是利用核酸不被磷酸纤维素(P11)柱吸附的特性[3]。根据 Wilson, G. G. 等人[4]报道，在磷酸纤维素柱上 DNA 酶先于 T4 DNA 连接酶被洗脱下来，长期实践证明，DNA 酶比大多数限制性内切酶先被洗下来。故可免去上柱前沉淀去除核酸，硫铵分级沉淀等步骤。

2. 使用肝素琼脂糖分离纯化限制性内切酶具有许多优点[2]，最突出一点是能得到纯度较高的限制性内切酶，但因其对所有的核酸酶都有亲和力，故样品在上柱前需先上一个能除去其他核酸酶的柱（如 P11 柱）。在此柱上 Sau 3AI 酶活性检测结果见图 3（见封 2）和 4。其酶活峰在 0.2—0.32*M* NaCl 梯度处。

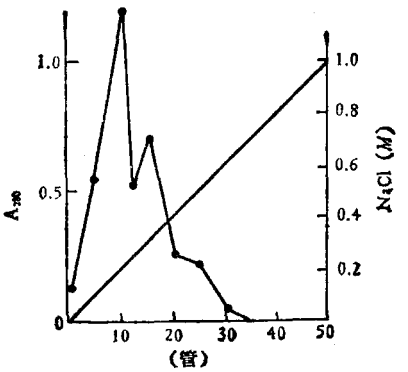

图 4　肝素琼脂糖的 NaCl 线性梯度洗脱曲线

3. 用上述方法制备的 Sau 3AI 限制性内切酶与国外同类产品相符（图 5，见封 2）。

为了进一步确定以上方法的可靠性，做了以下三项检验：

1）1 微克 λDNA 加入 1—10 单位 Sau 3AI，在 37℃ 保温 10 小时，相当于 10—100 单位 Sau 3AI 在 37℃ 保温 1 小时，从图 6（见封 2）可以看出琼脂糖凝胶电泳分析图谱清晰，无杂酶出现。

2）λDNA 被酶解后经 T4DNA 连接酶连接，其效率在 95% 以上，连接后的样品经 Sau 3AI 再酶解仍能表现其特性（图 7，见封 3）。

3）100 倍 Sau 3AI 酶解 [^{32}P] E.coli DNA 的结果说明，每单位酶酸溶性放射强度小于总放射强度的 0.01%。

以上结果说明用磷酸纤维素（P11）和肝素琼脂糖两步分离纯化方法制备 Sau 3AI 是切实可行的。

参　考　文　献

[1] Sussenbach, J. S. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 3, No. 11, 3193, 1976.

[2] Thomas, A. B. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 4, No. 8, 2561, 1977.

[3] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, vol. 5, No. 7, 2373, 1978.

[4] Wilson, G. G. et al.. *J. Mol. Biol.*, vol. 132, 471, 1979.

[本文于 1984 年 10 月 20 日收到]

介绍几种 DNA 的限制性内切酶图谱分析方法

余　曙　华

（中国医学科学院基础医学究研所，北京）

限制性内切酶图谱（restriction map），又称物理图谱（physical map），是将各种限制性内切酶的切点在 DNA 上定位，绘制成的图谱（以下简称酶谱）。1968 年 Meselsen 等人首先发现了限制性内切酶[1]，至今已从四百多种菌株中分离了限制酶。1973 年，Danna 等绘制了 SV40 的简单图谱[2]。此后各种 DNA 的酶谱不断被绘制。酶谱的出现，对 DNA 分子的克隆，基因定位，核酸序列的测定以及进化比较等方面的研究都有重要意义。DNA 酶谱的分析方法很多，本文只简单叙述几种。

一、双酶解分析方法

此法是将酶两两组合进行彻底酶解，并与

每个酶的单酶彻底降解片断对照，分析片断之间的关系，确定酶切点的相对位置。下面以质粒 AJP1 酶谱[3]为例，说明双酶解分析方法的基本原理。AJP1 分子量为 9.0Md，限制酶 XhoI，PstI 和 EcoRI 在 AJP1 上分别有 1，1 和 2 个切口。它们单独降解及双酶降解 AJP1 产生的片段分子量百分数如表 1。

表 1　三种限制酶单解和双解 AJP1 产生的片段分子量占 AJP1 总分子量的百分数

百分数 / 酶	单解	XhoI	PstI
XhoI	100.0		
PstI	100.0	55.5 44.5	
EcoRI	51.8	51.4	38.0 13.3
	48.2	41.8 6.9	48.8

纵横行相交处，是双酶解产生的片段分子量百分数

为叙述方便，我们将 EcoRI 的两个切点分别称为 EcoRI(1) 和 EcoRI(2)，将双酶解产生的片段由大到小称为 a，b，c···。一般选择有单一切点的酶切点作零点，此处规定 XhoI 切点为零点，并规定 XhoI 和 PstI 双解片段的 b → a 方向为顺时针方向，因此 PstI 切点在零点顺时针 44.5 的位置上。从表 1 可见，XhoI 将 EcoRI 的小片段降解成 41.8 和 6.9 二段。分析这一结果，EcoRI 酶切点的位置可能有两种，见表 2。

表 2　EcoRI 酶切位点的两种假设

假设	若 EcoRI① 在零点	则 EcoR② 应在零点	EcoRI 和 PstI 双解应产生三个片段大小为		
1	逆时针 6.9 处	顺时针 41.8 处	48.2	44.5 − 41.8 = 2.7	51.8 − 2.7 = 49.1
2	顺时针 6.9 处	逆时针 41.8 处	48.2	44.5 − 6.9 = 37.6	51.8 − 37.6 = 14.7

从表 1 可见 EcoRI 与 PstI 双解实验结果为 48.8，38.0 和 13.3，这与假设 2 的数值接近，与假设 1 的数值不符合，因此判断假设 2 的 EcoRI① 和②的位置是正确的。以上是通过推算片段与切点之间的距离以及计算切点间距对照片段大小等帮助定位。

双酶降解可采用双酶同时降解[3]，先后分别降解[3]，从电泳凝胶中回收酶 A 的各片段再用酶 B 降解[4]，以及用酶 B 直接降解电泳凝胶中酶 A 的各片段等方法[5]。

二、DNA 一端标记加部分降解的分析方法

以 ϕ80 argF 基因酶谱[6]为例说明基本原理。首先制备一个 BamHI 一端标记有 ^{32}P 同位素的 DNA，然后用 HaeIII 对 argF 基因进行不完全降解，电泳展开各区带，放射自显影，得 9 条区带，分子量分别是 1611，1186，1088，862，848，717，417，244 和 98bp。可见 HaeIII 彻底降解 ϕ80argF 可产生 9 段，它在线状 argF 基因上有 8 个切点(见图 1)。

从图 1 可见，放射自显影显出的部分降解片段必定连接带有放射标记的一端，因此计算各片段之差，从实验得到的最小片段 98 读起，顺序读出各片段之差(箭头所示)，便是各片段的正确排列顺序。

与此方法相似的还有末端片段杂交法[7]和 D 环定位法[4]，都是 DNA 一侧带有标记并结合部分降解的定位方法。此外还有回收部分降解片段后再彻底降解的方法[2]。

三、片段杂交法[8]

其基本原理如下：设有 A、B、C 三种酶的切点要在线状 DNA 上定位，它们降解 DNA 分别产生 4，3，3 段，其片段按分子量由大到小称为 a，b，c···0。将酶 B 的 a，b，c 三段从电泳凝胶中回收，并用缺口翻译方法进行标记。将酶 A 和 C 的酶解片段电泳展开，并转移到硝酸纤维膜上，然后用标记的各酶 B 片段分别与酶 A 和 C 的酶解片段进行分子杂交，结果见表

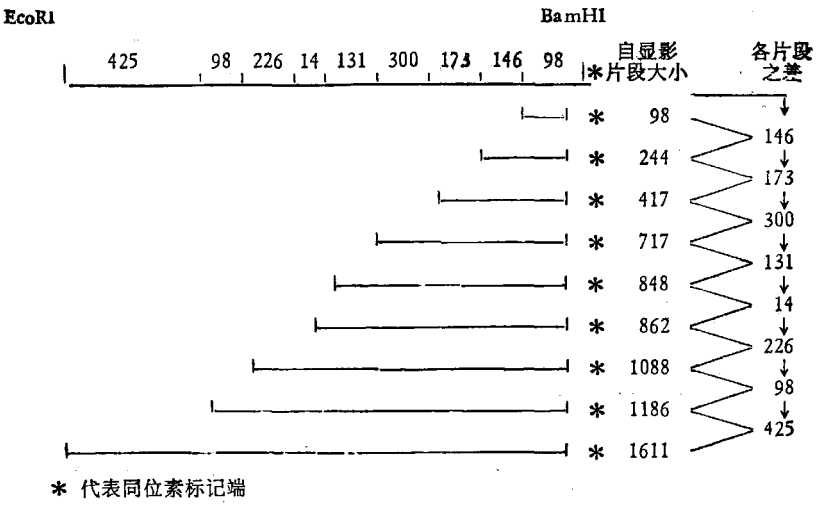

图 1　HaeIII 部分降解 BamHI 一端标记的线状 ϕ80argF 的图解

表 3　酶 B 各标记片段与酶 A 和 C 各片段的杂交结果

杂交结果 / 片段		酶 B		
片	段	a	b	c
酶 A	a		+	+
	b	+	+	
	c	+		
	d		+	
酶 C	a		+	+
	b	+		
	c	+	+	

注：A、B、C 代表三种酶，a、b、c、d 代表由大到小的酶解片段

3。

从 Aa 横行看，Aa 与 Bb 和 Bc 可杂交上，说明酶 B 的 b 与 c 相连。从 Ab 横行看，Ab 与 Ba 和 Bb 可杂交上，说明酶 B 的 a 与 b 相连，因此酶 B 的 a、b、c 三段一定是 a-b-c 的顺序相连。根据它们的分子量大小可画出图 2B 行。

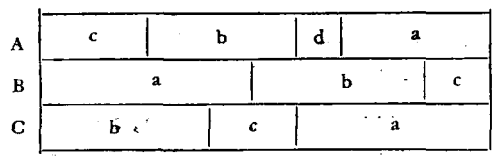

图 2　酶 A、B、C 各片段在线状 DNA 中的排列顺序

同理可推出图 2 的 A 和 C 行。这是一个简单的例子，实验中可能遇到一些复杂情况，例如酶 A 降解 DNA 时产生分子量相同的二个片段，使杂交结果变得复杂。或者酶 B 的大片段与酶 A 较多的小片段可杂交，此时不易定出这些小片段的相互位置，详见文献[8]。

四、DNA 复制法[9]

其基本原理参见图 3。酶 A 降解某环状

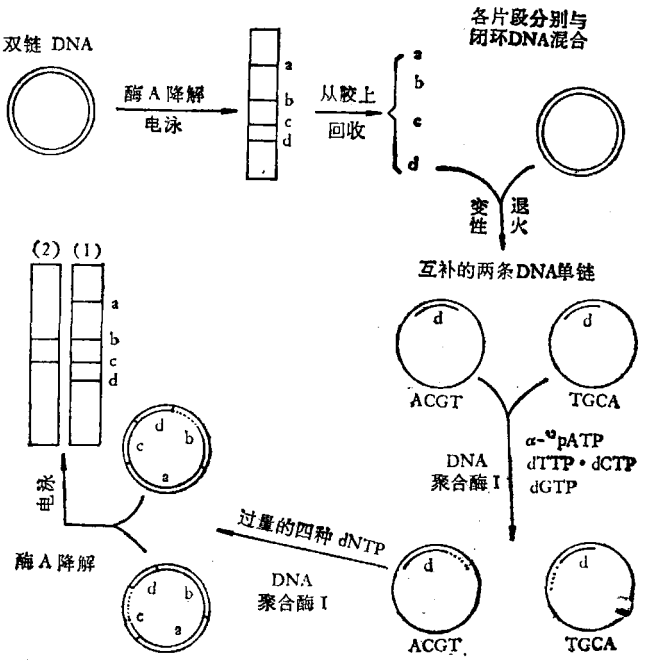

图 3　DNA 复制法绘制 DNA 物理图谱的基本原理

(1) 为 EB 染色，可见 a、b、c、d 四条带　(2) 为放射自显影，可见 b 和 c 带显影

DNA 后进行电泳，再从琼脂糖凝胶中回收每个酶解片段，分别与等克分子的该闭环 DNA 凝合保温，使 30—50% 闭环分子不可逆的变性，然后退火，加入 DNA 聚合酶 I。α-^{32}P dATP 和非同位素标记的其他三种 dNTP，进行 DNA 复制反应，以其中变性的 DNA 为模板，胶上回收的片段为引物合成一小段带标记的 DNA 之后，加入不带同位素的四种 dNTP 完成整个 DNA 复制，再用酶 A 降解 DNA，并进行电泳分析。因变性后的酶解片段的两条链都被作为引物，所以和这个片段两端邻接的两个片段都带有放射性标记，如图 3(2) 中的 b 和 c 带。因此可以知道环 DNA 中酶 A 的各片段顺序为 (c — a — b — d)。

五、根据全序列推测法[10]

一般是先用其他方法制作一个简单的酶谱，然后测定 DNA 的全序列，再根据全序列推出更详细的酶谱，例如 pBR 322 DNA 的酶谱。图 4 是计算机推出的 pBR322 酶谱。

这种方法的原理是将 DNA 的全序列和酶

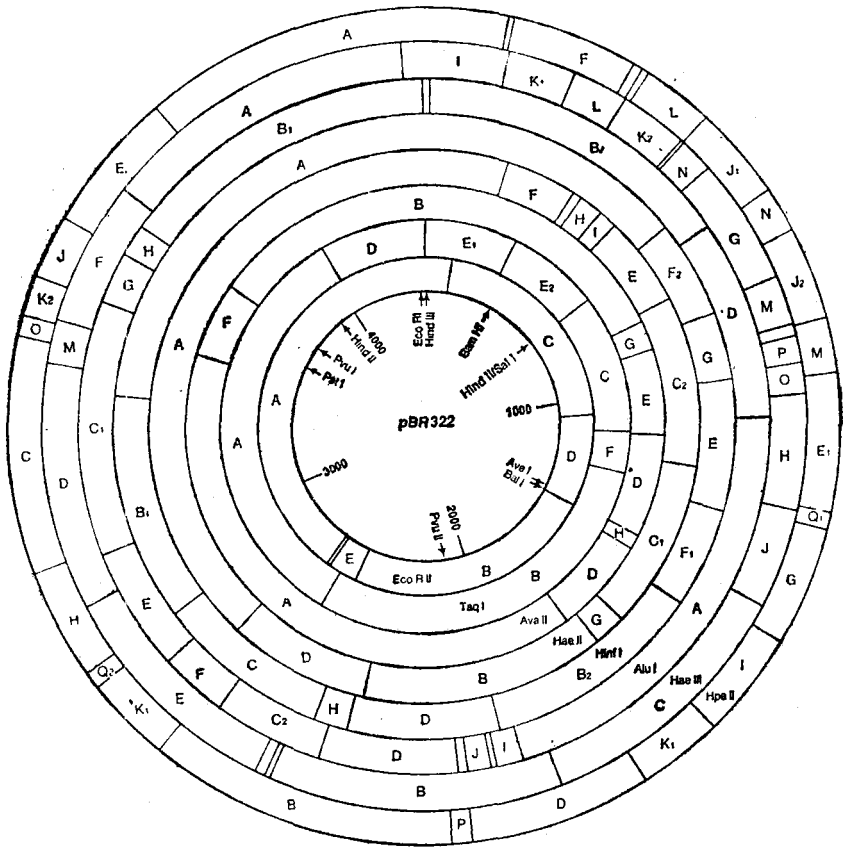

图 4　pBR322 的物理图谱

的识别序列均输入计算机，让计算机识别各切点的位置。用这种方法得到的酶谱显然要更精确和更详细。

上述的几种方法中，最常用的是双酶降解方法和部分降解方法，或几种方法联合使用。目前，人们已对大量的生物材料进行了酶谱分析，但还有更多的 DNA 需要分析。在今后的核酸分子生物学研究中，DNA 的酶谱分析将继续发挥它的重要作用。

本工作承梁植权教授和强伯勤同志提出宝贵意见，特此致谢。