

## 噬菌体 T<sub>4</sub> 诱导的脱氧核糖核酸(DNA)连接酶的分离和纯化

中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组(上海)

中国科学院生物物理研究所二室核酸研究组(北京)

本文介绍一个从噬菌体 T<sub>4</sub> 诱导的大肠杆菌中纯化 DNA 连接酶的简法。这是从同一起始原料(噬菌体 T<sub>4</sub> 感染的大肠杆菌菌体)同时提纯三种酶(多核苷酸激酶, DNA 连接酶及 RNA 连接酶)的步骤的一部分。这个方法包括以下几步: 超声破碎菌体, 抽提粗酶, 用硫酸链霉素沉淀去除多核苷酸激酶和 DNA, 用 DEAE 纤维素(DE-52)柱层析将 DNA 连接酶与 RNA 连接酶分离开来, 用磷酸纤维素(P-11)分步洗脱 DNA 连接酶, 对在 Tris-HCl, pH7.6 中含 50% 甘油的缓冲液透析加以浓缩。最终得到高浓度(5500 单位/毫升)和高纯度酶制品。

DNA 连接酶广泛存在于原核和真核生物中, 它可将 DNA 两条互补链的单链缺口上的及双链 DNA 上的 3'-OH 与 5'-P 配齐钝端进行共价连接而形成新的二酯键。

我们选择噬菌体 T<sub>4</sub> 感染的大肠杆菌来提纯 DNA 连接酶(T<sub>4</sub>-DNA 连接酶), 首先是由于在各种 DNA 连接酶中, 以 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶最为多能: 在脱氧核糖核酸模板上, 它既可连接脱氧核糖核酸片段, 亦可连接核糖核酸片段。同时还可提取多核苷酸激酶和 RNA 连接酶。材料来源较易, 得率很高。由于它在遗传工程中的广泛应用, 它的性质也最为人们所熟悉。

我们在 Weiss 等<sup>[1]</sup>的方法基础上, 进行了某些改进与简化。所提取的酶的浓度和纯度, 达到了既可连接 DNA 片段, 又可连接 RNA 片段的要求。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 材料

大肠杆菌 B 株野生型及噬菌体 T<sub>4</sub> 野生型由中国科学院上海植物生理研究所微生物室提供。所用树脂为中国科学院有机化学研究所实验工厂出产的强碱性阴离子树脂。微晶纤维素与 DEAE

微晶纤维素由中国科学院有机化学研究所供给。DEAE 纤维素(DE-52)及磷酸纤维素 P-11 均系 Whatman 产品。无载体 <sup>32</sup>Pi 由北京 401 所供给, <sup>3</sup>H 由中国科学院上海 8204 所供给。多核苷酸激酶由本实验室酶组按 Richardson 方法<sup>[2]</sup>制备。多核苷酸磷酸化酶和 3-磷酸甘油酸激酶由中国科学院生物化学研究所二室供给, 磷酸甘油醛脱氢酶由中国科学院生物物理研究所二室提供 C-U-C-G-U-C-C-A 由中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组提供, dG-A-C-G-A-G-T-C-C-G-G-A-A 及 d(Tp)<sub>8</sub>T 由本实验室合成组合成。r(Ap)<sub>8</sub>A 由中国科学院生物物理研究所提供。2,5-二苯基噁唑(2,5-Diphenyl oxazole, 以下简称 PPO), 和 1,4-双(5-苯基噁唑基-2)-苯[1,4-Bis(5-Phenyl oxazolyl-2) benzene, 以下简称 POPOP] 是上海试剂一厂产品。Poly dT 和 Poly dA 是 Calbiochem 产品, 二巯基赤藓醇(Dithiothreitol 以下简称 DTT)是 BDH 产品, 牛血清白蛋白(以下简称 BSA)是 Cambrian Chem Ltd 产品。超声破碎器是 MSE 型。液体闪烁计数器是 NE 4312 型。其他试剂均为国产。

#### (二) 方法

1. 菌体的制备: 采用 Weiss 等的方法<sup>[1]</sup>
2. <sup>32</sup>Pp<sub>i</sub> 焦磷酸的制备:

本文于 1978 年 1 月 9 日收到。

参照 Bergmann 等的方法<sup>[3]</sup>, 本实验室酶组制备。用阴离子交换柱层析加以纯化。层析分离见图1。放射性转化率一般为 60%, 比强为  $10^7 - 10^8$  cpm/ $\mu$ mole。

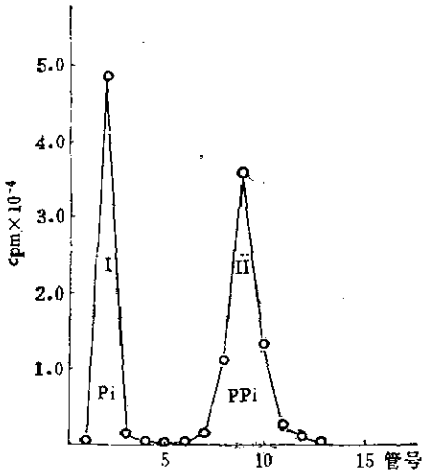


图1 阴离子交换柱层析纯化  $^{32}\text{P}$  图谱

树脂 Dowex 1 × 8,  $\text{Cl}^-$ ,  $0.7 \times 50$  厘米, 上样后用少量水淋洗。洗脱用  $0.05\text{M}$   $\text{NaCl} - 0.01\text{N}$   $\text{HCl}$ , 流速为 15 毫升/15 分钟。鉴定用纸层析。溶剂为: 叔丁醇: 异丙醇: 20% 三氯醋酸: 浓氨水 (13:10:10:0.1 V/V)。鉴定结果: 峰 I 为正磷酸盐, 峰 II 为焦磷酸盐。合并峰 II 各管留用。

### 3. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的制备:

按 Glynn 和 Chappell<sup>[4]</sup>方法标记。产品的比强可达到  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ mole。

### 4. $^3\text{H}$ -聚腺苷酸 ( $^3\text{H}$ -Poly A) 的制备:

按照 Ikehara 和 Uesugi<sup>[5]</sup>及 Kimhi 和 Li-tauer<sup>[6]</sup>方法略加改进后合成。产品比强为 21.5 mci/ $\mu$ mole AMP<sup>[7]</sup>。

### 5. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-寡聚 DNA}$ , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-d(Tp)}_n\text{T}$ 及 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-r(Ap)}_n\text{A}$ 的制备:

利用  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  和噬菌体 T<sub>4</sub> 诱导的多核苷酸激酶, 将寡聚 DNA,  $\text{d(Tp)}_n\text{T}$  及  $\text{r(Ap)}_n\text{A}$  的 5'-端磷酸化而得到标记产物 (Richardson)<sup>[42]</sup>。

### 6. 焦磷酸交换法测定 DNA 连接酶:

测定方法与酶单位定义均按 Weiss 等<sup>[11]</sup>。测活时酶量在 0.05—0.5 单位时, 定量线性关系较好(见图2)。

### 7. RNase 测定:

以  $^3\text{H}$ -Poly A 为底物, 在连接条件下与酶作

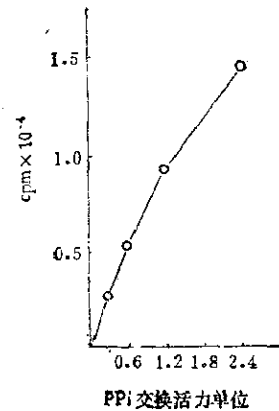


图2 PPi 交换测 DNA 连接酶活力线性定量关系图

用一定时间后, 利用纸片法<sup>[8]</sup>测定剩余的酸(10% 三氯醋酸)可沉淀  $^3\text{H}$ -Poly A 量。从与无酶对照间的放射性差数中显示出  $^3\text{H}$ -Poly A 被降解为酸溶性寡核苷酸的量来测定 RNase 的污染情况。温育系统: 50 微升中含 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\beta$ -巯基乙醇, 1 mM ATP, 25 微克 BSA, 0.5 微升  $^3\text{H}$ -Poly A (50000 cpm) 以及适量的酶。在 37°C 下温育 1 小时, 冷却, 取 40 微升反应液点在直径 2.1 厘米的厚滤纸片上 (Whatman 3MM), 立即投入 10% 三氯醋酸中, 振荡使之处于漂浮状态 7 分钟, 用 5% 三氯醋酸洗两次, 最后用乙醇和乙醚洗涤, 使之干燥。用液体闪烁计数器测滤纸上的放射性。计算法:

$$\frac{\text{对照 cpm} - \text{样品 cpm}}{\text{对照 cpm}} \times 100$$

= 底物被降解的百分数

如果没有  $^3\text{H}$ -Poly A 底物时, 也可用  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-RNA}$  代替。

### 8. DNase 测定:

方法与测 RNase 的相同, 只是将底物改为  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-DNA}$  (比强约为  $10^7$  cpm/ $\mu$ mole)。测活时, 底物用量为 1 n mole。

### 9. 蛋白测定: 以 $A_{280}$ 毫摩尔来定量。

### 10. 标准法连接反应条件:

(1) 在 Poly dA 模板上连接  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{d(Tp)}_n\text{T}$  的反应条件:

100 微升内含 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ATP, 50 微克 BSA, 0.24 n mole

Poly dA, 0.74 n mole  $[5'-^{32}\text{P}]\text{-d(Tp)}$ , T, 0.72 单位 DNA 连接酶。25℃ 保温 30 分钟。

(2) 在 Poly dT 模板上连接  $[5'-^{32}\text{P}]\text{-r(Ap)}$ , A 的反应条件:

200 微升内含 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM DTT, 1 mM ATP, 50 微克 BSA, 4 n mole Poly dT, 7.5 n mole  $[5'-^{32}\text{P}]\text{-r(Ap)}$ , A, 12 单位 DNA 连接酶。0℃ 保温 48 小时。

#### 11. 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶的制备:

由本实验室酶组参照 Torriani<sup>[9]</sup> 和 Csopak<sup>[10]</sup> 等方法加以改进而制备的<sup>[11]</sup>。

#### 12. 片段连接后抗单酯酶特性分析:

用标准连接反应条件 (内含 0.2—2.0 单位 DNA 连接酶) 进行连接反应后, 加 5—20 微升大肠杆菌碱性磷酸单酯酶 (120 单位/毫升), 在 65℃ 下温育 30 分钟, 用 50 微升点样, 按纸片法常规洗涤计数。实验组与无单酯酶对照组数据之比即抗单酯酶能力。

#### 13. DEAE 微晶纤维素薄板的制备及同系层析:

将微晶纤维素与 DEAE 微晶纤维素按 7.5:1 的比例混合, 按  $T_e$  等方法<sup>[12]</sup> 制成  $0.04 \times 5 \times 20$  厘米的薄板。用一般商品 RNA (酸型) 按 Jay 等<sup>[13]</sup> 改进的方法制备同系混合物, 以此进行同系层析。

#### (三) 纯化步骤

各步皆在 4℃ 左右进行。TM 缓冲液为 0.01 M Tris-HCl (pH 7.6), 内含 0.01 M  $\beta$ -巯基乙醇。PM 缓冲液为 0.01 M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.6), 内含 0.01 M  $\beta$ -巯基乙醇。

#### 1. 菌体破碎及粗酶液抽提:

将 43 克冰冻的 T<sub>4</sub> 感染的大肠杆菌菌体解冻, 悬浮于 250 毫升 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6 (内含 0.001 M 谷胱甘肽) 用玻璃匀浆器制成匀浆, 超声破碎 3.5—4 分钟。离心 (20,000 转/分钟) 30 分钟, 取上清再加 150 毫升上述溶液, 搅匀。得 420 毫升上清液, 测 260 毫微米处光吸收为 60。

#### 2. 链霉素沉淀:

边搅拌边滴加 84 毫升 5% 硫酸链霉素至上述 420 毫升抽提液中, 在 45 分钟内加完, 再搅拌 15 分钟, 离心 (20,000 转/分钟) 20 分钟, 得上清液 460 毫升, 内含多核苷酸连接酶。保留沉淀作为继续提取多核苷酸激酶之用。

#### 3. 硫酸铵沉淀:

边搅拌边向上述 460 毫升上清液内加 152 克固体硫酸铵, 使最终饱和度为 55%, 在 30 分钟内加完, 继续搅拌 30 分钟, 放置冰箱。这时酶活力较为稳定, 放置半年后, 酶活力仍未丧失。离心 (20,000 转/分钟) 30 分钟, 将沉淀溶解于 25 毫升 0.1 M NaCl-TM 缓冲液, 再对 TM 缓冲液透析, 直至无硫酸根离子为止。得粗酶液 31 毫升。

#### 4. DEAE 纤维素柱层析

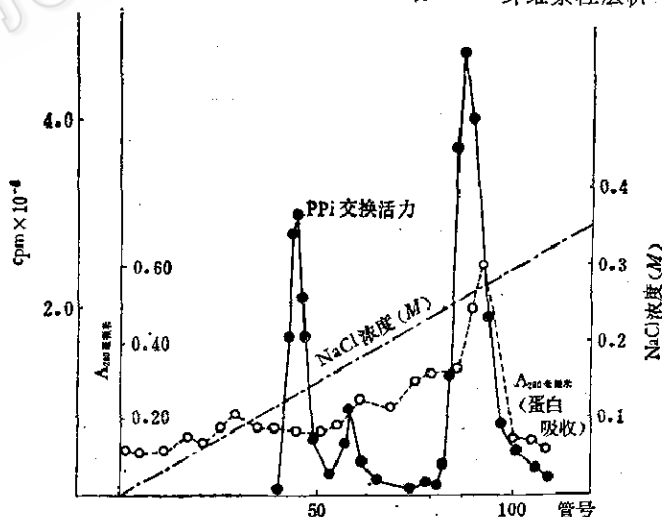


图 3 DEAE 纤维素柱层析分离多核苷酸连接酶图

树脂用 DE-52, Cl<sup>-</sup>,  $3.5 \times 31.5$  厘米, 用 TM 缓冲液平衡至 pH 7.6。上样完毕后用 500 毫升 TM 缓冲液淋洗。梯度洗脱用 6000 毫升 0—0.35 M NaCl-TM 缓冲液, 流速为 40 毫升/20 分钟。峰 I 是 DNA 连接酶 (43—47 管, 共 220 毫升)。峰 II 未作进一步研究。峰 III 可作为提纯 RNA 连接酶之用。

将上述透析过的31毫升粗酶液,上样至DEAE纤维素(DE-52)柱(3.5×31.5 厘米)层析纯化(见图 3)。层析纯化可分离出三个焦磷酸交换活力峰。合并峰 I 的 43—47 管,共 220 毫升,进行下一步纯化。峰 III 可作为进一步提取纯化 RNA 连接酶之用。

5. 磷酸纤维素柱层析:

磷酸纤维素(P-11) Na<sup>+</sup> 型柱(1.7×17.5 厘米)先经 0.1 M NaCl-PM 缓冲液平衡至 pH7.6。将等体积的 PM 缓冲液加到上述 DE-52 柱层析活力峰 I (220 毫升)中,使之稀释,再上样至磷酸纤维素柱进行层析(见图 4)。

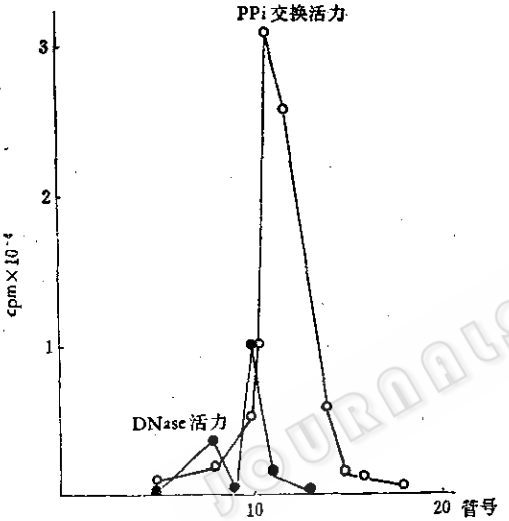


图 4 磷酸纤维素柱层析纯化 DNA 连接酶图  
树脂是磷酸纤维素 P-11, Na<sup>+</sup> 型, 1.2×18 厘米, 先经 0.1M NaCl-PM 缓冲液淋洗, 分步洗脱, 用 0.5M NaCl-PM 缓冲液洗脱。流速为 1.5 毫升/4 分钟。合并 11—13 管, 共 5 毫升左右。

6. 浓缩:

将磷酸纤维素柱层析活力高峰部分 5 毫升(除摒弃活力峰前沿污染 DNase 的部分外), 对 50%甘油-IM 缓冲液透析, 浓缩至 3 毫升, 保存于-5℃低温冰箱。

结果和讨论

(一) T<sub>4</sub> 诱导的 DNA 连接酶纯化各步活力

结果见表 1。

(二) 从 DE-52 柱层析分离出三个焦磷酸交换活力峰

峰 I 为 DNA 连接酶, 峰 III 为 RNA 连接酶, 峰 II 活力较少, 且容易失活, 未作进一步研究。

由此可见, 我们用噬菌体 T<sub>4</sub> 感染的大肠杆菌同一菌体, 可以同时提取三种酶: 从链霉素沉淀部分提取多核苷酸激酶用 DE-52 柱层析获得的峰 I 可提取 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶, 峰 III 可提取 T<sub>4</sub>-RNA 连接酶<sup>[4]</sup>。

(三) 缓冲液

磷酸纤维素柱层析时如采用磷酸缓冲液, 则 DNA 连接酶在层析后极不稳定, 18 小时后酶活力丧失 90% 以上。因而我们不用梯度, 而采用 0.5M NaCl-PM 缓冲液洗脱, 如此则酶比较集中, 操作比较方便, 历时比较短, 避免了稀酶在磷酸缓冲液中为时过长可能造成的失活, 所以纯化效果较好。经活力测定, 确定酶活力高峰部位

表 1 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶纯化各步酶活力回收总表

	体 积 (毫升)	蛋 白 量		<sup>32</sup> PPI 交换活力单位		比 活 <sup>32</sup> PPI 交换活 力单位/A <sub>280</sub> 毫微米	回收率 (%)
		A <sub>280</sub> 毫微米/ 毫升	总 A <sub>280</sub> 毫微米	每毫升	总		
硫酸铵 沉淀	31	16.4	508	5650	175,000	344	100
DE-52 柱层析	峰 I	0.169	37.2	40	8,800	237	5
	峰 II	0.194	23.3	8	930	40	0.53
	峰 III	0.338	287.3	80	68,000	237	39
P-11 柱层 析浓缩后	3	0.453	1.36	2830	8,490	6243	4.8

后,如果立即并管,且立即对50%甘油-TM缓冲液透析浓缩,则活力基本上能全部回收。

(四) 活力

经过上述方法纯化浓缩后,酶浓度很高,一般约为 2830 单位/毫升,高的可达 5500 单位/毫升。

(五) 纯度

我们提取的  $T_4$ -DNA 连接酶,要求既能连接 DNA,又能连接 RNA,对酶制品的纯度要求较高。Sano 和 Feix 提取的 DNA 连接酶中始终存在着一种所谓的缺口酶。我们以 5'-端用  $^{32}P$  标记的八核苷酸,  $[^{32}P]$  CUCGUCCA 为底物,用同系层析为鉴定手段,在纯化过程中发现一种类似 3'-外切酶的 RNase,用他们的方法不能去除。不知道这里的 3'-外切酶是否就是他们所谓的缺口酶?但用本文方法提取的酶,其 3'-外切酶含量极微,不影响 RNA 片段连接。

为了在柱层析中观察掌握 RNase 和 DNase 的分布情况,作为并管时取舍标准,以便较好地去除杂酶,我们在层析测活时对 RNase和DNase 的活力进行跟踪。DE-52 柱层析中杂酶分布情况见图 5。

经 DE-52 柱层析纯化后,峰 I (即 DNA-连接酶活力部分),已能较好地去除 RNase,因为 RNase 的活力主要在盐浓度 0.15 M (50 管) 以后出现。但峰 I 部分仍有 DNase 的污染。磷酸纤维素柱层析进一步去除大部分杂蛋白,较多地提高了酶的比活。而且 DNase 分布在上柱流出液和  $^{32}PPi$  交换活力峰的前沿,因此只要摒弃峰的前沿部分,就能大大减少 DNase 的污染。

在 DNA 连接酶的最终纯化制品中,污染的 RNase 和 DNase 的检查,结果见表 2。

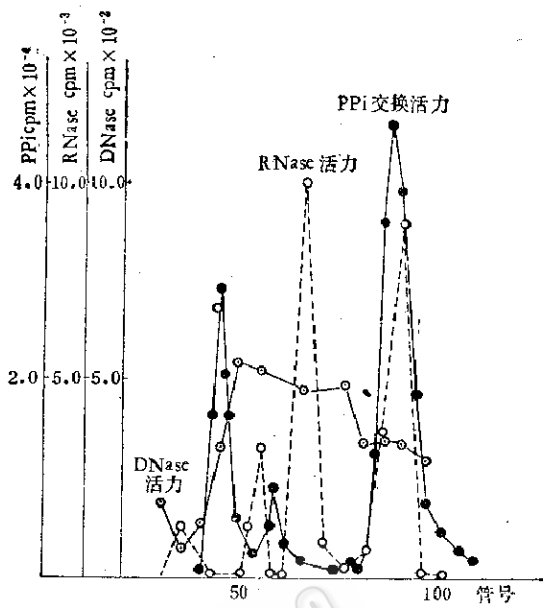


图 5 DE-52 柱层析中 RNase 和 DNase 的分布图 (说明详见图 3)

表 2  $T_4$ -DNA 连接酶最终纯化产品中的杂酶

	RNase 检查 cpm	DNase 检查 cpm
对照	49920	3470
实验*	53620	3427

\* 在 100 微升温育系统中加 42.5 单位 DNA 连接酶。

结果表明在 100 微升温育系统中加酶量即使高达 42.5 单位,仍测不出 RNase 和 DNase 的污染。

又用最终纯化的 DNA 连接酶 35 单位在 100 微升的连接反应系统中,与  $[5'-^{32}P]$ -d-GACGAGTCCGGAA 一起保温 1 小时后再用同系层析检查降解程度(见图 6)。由图 6 可见,从 DNA 片段没有出现降解的斑点,说明我们的酶制品中并无 DNase。

从图 7b 中可见我们的酶制品中污染的 RNase 并不影响连接反应。

由以上杂酶检测实验中说明,我们的酶制品的纯度完全可用于连接 DNA 又适用于连接 RNA。

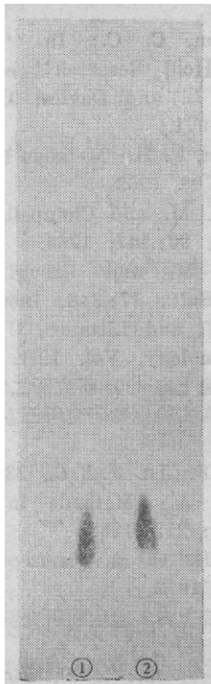


图 6 用短片段 DNA 检查 DNase 的同系层析图  
用 [5'-<sup>32</sup>P]-脱氧十三核苷酸为底物检查 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶中 DNase 污染情况。左为无 DNA 连接酶对照，右为有 DNA 连接酶实验区。用酶量为 3.69 单位。

(六) 标准连接反应

使用 DNA 连接酶最终纯化产品进行以下两种标准连接反应:

- 1. 以 Poly dA 为模板，连接 [5'-<sup>32</sup>P]d(Tp)<sub>8</sub>T;
- 2. 以 Poly dT 为模板，连接 [5'-<sup>32</sup>P]r(Ap)<sub>7</sub>A。

通过抗单酯酶特性分析和同系层析检测，均显现明显的连接效果:

(1) 抗单酯酶特性分析

在连接反应后，再加 10 微升大肠杆菌碱性磷酸单酯酶 (120 单位/毫升) 在 65℃ 中温育 30 分钟，进行点样计数，如材料和方法中所述。结果见表 3。

可见加 DNA 连接酶后，不论是连接 DNA 或 RNA 片段，其产物都具有明显的抗单酯酶特性。

(2) 同系层析

经 DNA 连接酶作用后，点样进行薄

表 3 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶反应后，底物抗单酯酶特性分析

模板	底 物	对碱性磷酸单酯酶的抗性	
		不加 DNA 连接酶 cpm	加 DNA 连接酶 cpm
Poly dA	[5'- <sup>32</sup> P]d(Tp) <sub>8</sub> T	1600	3400
Poly dT	[5'- <sup>32</sup> P]r(Ap) <sub>7</sub> A	1000	3400



图 7 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶标准连接反应同系层析图  
a. 以 Poly dA 为模板，[<sup>32</sup>P]-(Tp)<sub>8</sub>T 为底物定性检查 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶的作用。连接反应后，未去除 [r-<sup>32</sup>P]-ATP，故图顶端出现二个很浓的斑点 (ATP 及其降解产物 Pi)，自左至右各点: ①、②为无酶对照，其中②的点样量加倍; ③、④为加酶实验，其中④的点样量加倍。  
b. 用 Poly dT 为模板，[<sup>32</sup>P]-r(Ap)<sub>7</sub>A 为底物定性检查 T<sub>4</sub>-DNA 连接酶的作用。连接反应后，去除 [r-<sup>32</sup>P]-ATP。⑦为无酶对照，可见 r(Ap)<sub>7</sub>A 不纯，二个斑点中，只有下面一点物质能作为底物参加连接反应。⑤与⑥为加酶实验。二者唯一区别是所用连接反应液中 ATP 含量不同，⑥为 20μM; ⑤为 1mM。

板同系层析(见图 7)。从图 7a 中可见，加 DNA 连接酶后，原料有所消耗，并出现新斑点。其链长比原料更大。从图 7b 的无酶对照中可见 r(Ap)<sub>7</sub>A 不纯，出现两个斑

点。两个斑点中,只有分子量较大的一点的物质能作为底物参加连接反应。中间与左边为加酶实验区,均出现明显的新斑点,其分子量比原料大。图示 ATP 用量对连接效果影响不大,看来  $20\mu\text{M}$  已经足够。从图 7b 中还可以看到我们的酶制品中 RNase 污染不影响连接。

由上可见,我们纯化的 DNA 连接酶对均聚 RNA 和 DNA 片段都具有明显的连接效果。

### (七) 酶的稳定性

在我们制备的  $T_4$ -DNA 连接酶的纯度和浓度下,在 50% 甘油-TM 缓冲液中,保存于  $-5^\circ\text{C}$  下,活力比较稳定,保存四个月未见失活。但在酶浓度较低,纯度不高时,有失活现象。

### 参 考 文 献

- [1] Weiss, B. et al.: *J. B. C.*, **243**: 4543, 1968.
- [2] Richardson, C. C.: In "Procedures in Nucleic Acid Research" edited by Cantoni, G. L. and Davies, D. R., Vol. 2, p. 815, 1971.
- [3] Bergmann, F. H.: *Methods in Enzymology*, Vol. 5: 708, 1962.
- [4] Glynn, I. M. and Chappell, J. B.: *Biochem. J.*, **90**: 147, 1964.
- [5] Ikehara, M. and Uesugi, O.: *Chem. Pharm. Bull.*, **17**: 348, 1969.
- [6] Kimhi, Y. and Littauer, U. Z.: *Methods in Enzymology*, Vol. 12B: 513, 1968.
- [7] 中国科学院上海 8204 研究所二室标记组和中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组: (待发表)
- [8] Bollum, F. J.: *J. B. C.*, **234**: 2733, 1959.
- [9] Torriani, A.: *Methods in Enzymology*, Vol. 12B: 212, 1968.
- [10] Csopak, H. et al.: *Acta Chem. Scand.*, **26**: 2401, 1972.
- [11] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组: (待发表)
- [12] Tu, C-p. et al.: *Anal. Biochem.*, **74**: 73, 1976.
- [13] Jay, E. R. et al.: *Nucleic Acids Research*, **1**: 331, 1974.
- [14] 中国科学院上海实验生物研究所三室核酸研究组: *微生物学报*, **18** (3): 1978.

## ISOLATION AND PURIFICATION OF BACTERIOPHAGE T<sub>4</sub>-INDUCED DNA-LIGASE

Section for Nucleic Acid Research, Third Laboratory, Shanghai  
Institute of Experimental Biology, Academia Sinica  
(Shanghai)

Section for Nucleic Acid Research, Second Laboratory,  
Institute of Biophysics, Academia Sinica  
(Beijing)

A simple method for purification of bacteriophage T<sub>4</sub>-induced DNA-ligase is introduced in this paper. It is a part of the procedure for purifying three enzymes (polynucleotide kinase, DNA-ligase and RNA-ligase) simultaneously from the same starting material, bacteriophage T<sub>4</sub> infected *Escherichia coli* cells, and consists of the following steps: ultrasonic disintegration and extraction of the crude enzyme, removal of DNA and polynucleotide kinase by streptomycin sulfate precipitation, precipitation of the polynu-

cleotide ligases by ammonium sulfate fractionation, separation of DNA-ligase and RNA-ligase by means of DEAE-cellulose (DE-52) column chromatography, stepwise elution of DNA-ligase from the phosphocellulose (P-11) column and concentration by dialysis against 50% glycerol in tris-HCl pH 7.6 buffer. A final enzyme preparation of the purified T<sub>4</sub>-induced DNA-ligase with high concentration (up to 5500 units/ml) and high purity was obtained.