

四、蔗糖梯度电泳的几点注意事项

1. 病毒制剂须先部分提纯, 去掉大部分宿主细胞的细胞器碎片、杂蛋白, 如果没有去除, 则由于高浓度的蔗糖将使这些杂质沉淀, 从而影响病毒质粒的电泳行为。因为沉淀中的病毒需缓慢释放, 造成病毒质粒泳动不一致。

2. 蔗糖梯度电泳时间较长, 有一定的对流扩散的影响。如电泳时室温不超过 15°C , 并且电压与电流的乘积不超过 5,000 (伏·毫安), 一般就不会发热和产生对流。

3. 如果导入样品后, 立即加上电压, 由于样品层中缺乏梯度, 病毒立即在电场中迁移, 在一

定程度上还出现对流作用, 为此在加入样品后必需等 2—3 小时, 使样品层 (约 5mm 厚) 建立起稳定的梯度。

参 考 文 献

- [1] Ahmed, M. E. et al.: *Virology*, 41, 768, 1970.
- [2] Peters, B. D. et al.: *Virology*, 41, 135, 1970.
- [3] Polson, A. et al.: in *Methods in Virology* (Ed. by K. Maramorosch et al.), Vol. 2, 1967.
- [4] Van Regenmortel M. H. V. in *Principles and Techniques in Plant Virology* (Ed. by C. I. Kado et al.), 390, 1972.
- [5] Polson, A. et al.: *J. Hyg.*, 60, 2, 1962.

[本文于 1982 年 5 月 24 日收到]

荧光法检测 DNA 条件的探讨

郑秀龙 赵 芳 高建国

(上海第二军医大学)

3, 5-二氨基苯甲酸盐 (下简称 DABA) 荧光试剂, 是检测微量组织中 DNA 含量的一种灵敏的方法^[1]。近年来也被用来研究细胞 DNA, 特别是不能用同位素标记的、不分裂的细胞 DNA 的损伤与修复^[2-4]。但以往关于检测 DNA 的条件未见详细报道, 本文主要研究 DABA 与 DNA 反应后的荧光产物 (下简称 DNA 荧), 它在不同酸溶液中的光谱变化和稳定性, 我们还在反应时间、DABA 的用量、光线的影响以及灵敏度等方面进行了系统观察并从中选出了最适检测 DNA 的条件。

一、实验材料 小牛胸腺 DNA (西德 Serva 厂产品), 用去离子水配成 40 γ /ml。高纯度 DABA 由我室合成^[5], 用前配成 2M 盐溶液, 其它均属 AR 试剂。

二、实验方法与结果

1. 荧光发射光谱或荧光光谱 (λ_{Em}) 和激发光谱 (λ_{Ex})。

一般认为在不同溶剂中同一种荧光物质, 光谱峰的位置和强度有显著不同, 参照以前的工作, 我们分析了 DABA 及其与 DNA 反应后

在 0.6N HClO_4 、1N HCl 及 5% TCA 三种不同试剂中的光谱变化。用日制 MPF-4 型荧光分光光度计, 在同一灵敏度条件下分别测定三种酸溶液中 DABA 及其与 DNA 反应产物的 λ_{Em} 和 λ_{Ex} , 结果见表 1。

由表 1 可见 DNA 与 DABA 反应后的 DNA 荧 (其中还包括未反应的 DABA), 在不同酸中的荧光峰位均较相应的 DABA 略向长波偏移 2—5nm, 峰值在 498—502nm 之间, 两者区别不明显, 但 DNA 荧的荧光强度较 DABA 增高, 以在 HClO_4 中增高最大。DNA 荧和 DABA 的激发峰位在 HCl 中无差别, 在 TCA 中相差 4nm, 而在 HClO_4 中 DABA 的激发峰与 DNA 荧两者区别明显 (14nm, 见表 1), 且荧光强度增加倍数最高。比较上述结果, 故选用 HClO_4 较好。

2. 反应时间 图 1 是 DNA 与 DABA 在 60°C 水浴中反应不同时间后的荧光强度变化曲线。在最初的 10 分钟反应迅速, 荧光强度呈直线增加, 随后减缓, 30 分钟达最高值, 维持到 60 分钟变化不大。若延长保温时间至 75 分钟, 荧

表 1 DABA 及其与 DNA 反应后 λ_{Em} 、 λ_{Ex} 和荧光强度的变化

酸 溶 液		λ_{Em}				λ_{Ex}			
		DNA 荧	DABA	差数*	荧光强度** 增高倍数	DNA 荧	DABA	差数*	荧光强度** 增高倍数
峰 值 (nm)	HClO ₄	498	496	2	4.5	408	394	14	4.3
	HCl	502	497	5	3.3	408	408	0	3.2
	TCA	500	497	3	2.8	408	409	4	2.7

* 差数 = DNA 荧的光谱峰值 (nm) - DABA 光谱峰值 (nm)

** 荧光强度增高倍数 = $\frac{\text{DNA 荧的荧光强度}}{\text{DABA 的荧光强度}}$

光强度反而下降, 然后继续下降, 而 DABA 空白在 60℃ 保温 75 分钟以内变化不大, 其后空白荧光强度亦增高。结果表明 DNA 荧和 DABA 在高温中放置时间过长均不稳定。以选 30—60 分钟范围较好, 以下实验我们采用中间点为 45 分钟的反应时间。

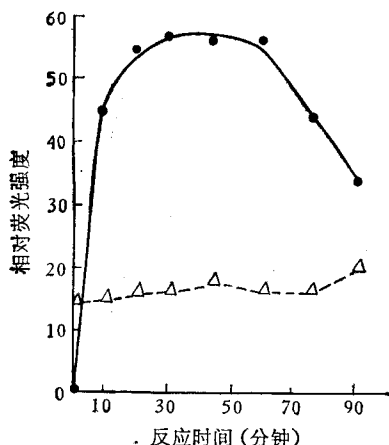


图 1 DNA 与 DABA 在 60℃ 水浴中反应不同时间后荧光强度的变化

—•— DNA + DABA 减去空白; $\triangle \cdots \triangle$ DABA

3. DABA 的用量 用 0.048—1.280 μg DNA 与不同体积的 2M DABA 反应后, 在 HClO₄ 中测其荧光强度, 发现用 25 μl 反应后的直线斜率较用 50 μl 陡峭 (图 2), 相对荧光增量也比后者大 10.0 荧光单位/ μg DNA, 50 μl 的 DABA 空白也较高, 影响检测 DNA 的灵敏度。故选用 25 μl 较好, 且易使样品完全湿润反应。

4. 光线对 DNA 荧的影响 将 DNA 与 DABA 的反应产物, 用 HClO₄ 稀释后分成二组, 同时测量, 一组避光 (用黑纸遮盖放置;) 另一组直接在日光灯下放置, 经不同时间后, 测荧

光强度。从图 3 可看到日光灯照射对反应产物

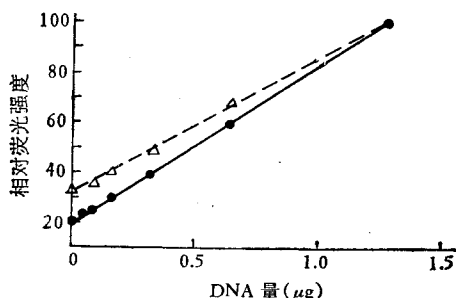


图 2 DABA 与 DNA 反应后荧光强度与 DNA 量间的关系

—•— DNA + 2M DABA 25 μl
 $\triangle \cdots \triangle$ DNA + 2M DABA 50 μl

无影响, 与 Thomas^[6] 等的结果不一致, Thomas 等^[6] 认为样品需避光才可稳定数小时, 我们认为短时间的光照对其稳定性影响不大, 无需避光, 但放置过久, 由于 DABA 渐被氧化使空白增高, 影响 DNA 荧的荧光强度测量准确性。

5. 比较 DNA 荧在不同酸溶液中的稳定性 由图 4 可看到 DABA 在 TCA 中荧光空白较高, 且不稳定, 在室温时, 随时间延长, 空白增高

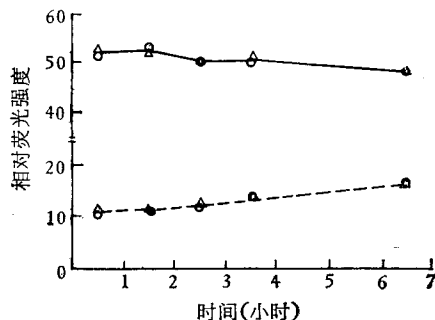


图 3 光线对 DABA 与 DNA 反应后荧光强度的影响

—•— DABA + DNA 减去空白; —•— DABA;
 $\triangle$ 避光; $\circ$ 不避光

很快(图 4b),但 DNA 荧光包括未反应的 DABA 的荧光强度亦很快升高。如扣除空白,在 $4\frac{1}{2}$ 小时内净荧光强度变化不大,其后下降(图 4a),这表明 DNA 荧光在 TCA 中是稳定的,但是 DABA 在 TCA 中很不稳定,故影响 DNA 检测的准确性和灵敏度。DABA 在 HClO_4 中最稳定,随放置时间的延长,空白虽也增高但很慢(图 4b)。DNA 荧光也很稳定,在 $3\frac{1}{2}$ 小时内无变化,其后略有下降(图 4a)。DABA 在 HCl 中的稳定性介于 HClO_4 与 TCA 之间(图 4b),但 DNA 荧光在 HCl 中不稳定, $2\frac{1}{2}$ 小时就明显下降(图 4a)。

比较上述结果,我们认为选用 HClO_4 作稀释剂最为合适,不同意文献上提出的这三种酸

可任意使用的观点^[1]。

6. 灵敏度 图 2 中 $25\mu\text{l}$ DABA 用量的直线是选择在最适条件下, DABA 与 DNA 反应后的荧光强度与 DNA 量间的关系, DNA 含量从 48ng 到 1280ng 范围内呈直线关系,无疑用微型石英池测量时,可准确到小于 48ng。

从以上结果可见,使用荧光法检测 DNA 时,如何选用反应、测试等条件,对提高检测 DNA 灵敏度和准确性很重要。通过上述一系列试验,我们选用了 DABA 与 DNA 反应后荧光增量较大、空白较低及比较稳定等最适检测条件,即用 2M DABA $25\mu\text{l}$ 与 DNA 在 60°C 水浴中反应 45 分钟,以 HClO_4 作稀释剂,以 408nm 作激发光,在 498nm 测 DNA 荧光的荧光强度,可检测到 48ng 以下,现正用于细胞 DNA 辐射损伤及其修复的研究中。

荧光测试由本校中心仪器室协助进行,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Kissane, J. M., et al.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 184, 1958.
- [2] Ono, T., et al.: *J. Radiat. Res.*, **14**, 204, 1973.
- [3] Karran, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 54, 1973.
- [4] Wang, T. S., et al.: *Radiat. Res.*, **73**, 464, 1978.
- [5] 孟祥顺等《第二军医大学学报》1982 年,第 3 期第 335 页。
- [6] Thomas, P. S. et al.: *Anal. Biochem.*, **89**, 35, 1978.

[本文于 1982 年 10 月 20 日收到]

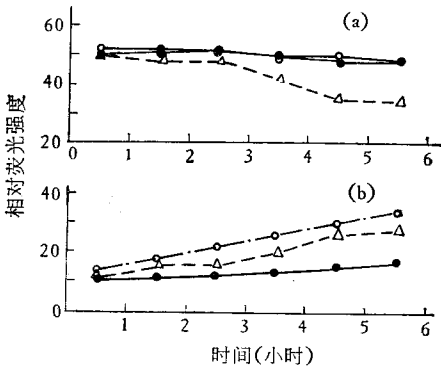


图 4 DABA 与 DNA 反应后产物在不同酸中的荧光强度与时间的关系

(a) 减去空白; (b) DABA ●—● HClO_4 ,
 Δ — Δ HCl; ○—○ TCA