

度为 0.6ng/ml.

总之,我们在国内首先合成了固相 TRFIA 螯合剂 BCPDA,探讨了 BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 的各种条件,所得 BCPDA 与国外同类产品一致,标记物具有较高标记比及生物活性,建立的双位点夹心法检测 AFP-R-LCA 的灵敏度为 0.6ng/ml,灵敏度高于 EIA 法,并可与 RIA 相比较.为新一代非放射免疫方法的建立及推广应用奠定了基础.

本实验得到陈雄、张丽民、陈克明、贺广彩等老师的大力支持,特此感谢.

参 考 文 献

- 1 Hurskainen P, Dahlen P, Siitari H *et al.* Time-resolved fluorometry: Principles and application to clinical microbiology and DNA technology. *Adv Exp Med Biol*, 1990; **263**: 123
- 2 Hemmila I. Lanthanides as probes for time-resolved fluorometric immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest.*, 1988; **48**: 389
- 3 韩玲,沈先荣,陈杞.一种新的非放射性免疫分析技术——时间分辨荧光免疫分析.国外医学,军事医学分册.1991; **4**: 159
- 4 Evangelista RA, Pollak A, Allore B *et al.* A new europium chelate for protein labling and time-resolved fluorometric applications, *Clin Biochem*, 1988; **21**: 173
- 5 Diamandis E P, Morton R C, Reichstein E *et al.* Multiple fluorescence labeling with europium chelaters application to time-resolved fluoro-immunoassays. *Anal Chem*, 1989; **61**: 48
- 6 胡天喜.时间分辨荧光免疫分析法.生物化学与生物物理进展,1987; **14** (5): 8
- 7 张天胜,李振甲.时间分辨荧光免疫分析技术的应用与进展.国外医学,临床生化分析与检验学分册,1990; **11** (5): 1
- 8 Dechaud H, Bador R, Claustrat F *et al.* Laser-excited immunofluorometric assay of prolactin, with use of antibodies coupled to lanthanide-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid. *Clin Chem*, 1986; **32**: 1323
- 9 Hemmila I, Dakubu S, Mikkala V M *et al.* Europium as a label in time-resolved immuno-fluorometric assays. *Anal Biochem*, 1984; **137**: 335
- 10 Helsingius P, Hemmila I, Lovgren T *et al.* Solid-phase immunoassay for digoxin using time-resolved fluorescence. *Clin Chem*, 1986; **32**: 1767
- 11 Charles S H L and Claude F M. Attachment of fluorescent metal chelates to macromolecules using "Bifunctional" chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977; **75** (1): 149
- 12 Dahlen P, Hurskainen P, Lovgren T *et al.* Time-resolved fluorometry for the identification of viral DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol.*, 1988; **26** (11): 2434
- 13 Tolonen E, Hemmila I, Marniemi J *et al.* Two-site time-resolved immuno-fluorometric assay of human insulin. *Clin Chem*, 1986; **32**: 637
- 14 Chan M A, Bellem A C, Diamandis E P. Time-resolved immuno-fluorometric assay of alpha-fetoprotein in serum and amniotic fluid, with a novel detection system. *Clin Chem*, 1987; **33**: 2000

高效薄层色谱法纯化合成寡核苷酸及其衍生物

王升启 马立人

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要

在分子生物学研究的许多领域均需要一定纯度的寡核苷酸.目前寡核苷酸的纯化方法主要有高效液相色谱法及电泳法两种.这两种方法不仅需要一定的仪器设备而且纯化周期长(2—3d)、回收率低(50%—80%).文中报道建立了一种高效薄层色谱纯化寡核苷酸及其衍生物的方法.该方法可在3—4h内获得寡核苷酸纯品,平

均回收率可达 97.7%。

关键词 高效薄层色谱, 寡核苷酸, 寡核苷酸衍生物

随着现代分子生物学技术的发展, 特别是 PCR 及反义核酸技术的发展, 寡核苷酸的用途越来越广泛. 它不仅可用作核酸测序引物、基因克隆接头、各种启动子、增强子、突变子等^[1], 而且还可用作 PCR 引物^[2]及反义核酸^[3]等. 由于人工合成的寡核苷酸含有许多长短不一的片段, 因此, 在用于上述研究目的时需要经过纯化方能得到理想的结果. 目前最常用的寡核苷酸纯化方法有两种——高效液相色谱法^[4]和电泳法^[5]. 遗憾的是, 这两种方法不仅需要特殊的仪器设备, 而且回收率低、纯化周期长及纯化产物需进一步脱盐. 为了克服现有方法的不足, 我们建立了一种用于寡核苷酸纯化的新方法——高效薄层色谱 (HPTLC) 法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 高效薄层色谱板, 西德 E. Merck 公司产品, 硅胶 GF254.

1.1.2 双底展开槽, 瑞士 CAMAG 公司产品, 规格 10cm×20cm.

1.1.3 自动薄层点样器, 瑞士 CAMAG 公司产品, Nanomat I 型.

1.1.4 紫外灯, 上海顾村光电仪器厂产品.

1.1.5 富集液 甲醇-浓氨水 (1:2).

1.1.6 展开剂 系统 1, 异丙醇: 双蒸水: 浓氨水 (57: 33: 10); 系统 2, 正丙醇: 双蒸水: 浓氨水 (60: 30: 10).

1.1.7 寡核苷酸: 采用 β -氰乙基亚磷酸酯法在 ABI 公司产 381A 型 DNA 合成仪上合成.

1.2 方法

1.2.1 样品准备 DNA 合成仪合成的寡核苷酸样品或其衍生物 (氨基、生物素或荧光素标记物等) 如为干燥状态可先用无菌去离子水配成浓度为 1—2 μ g/ μ l 的溶液即可用于点

样. 溶液状态的样品可直接上样.

1.2.2 点样 将准备好的寡核苷酸样品溶液吸入微量注射器于自动点样器上将样品点于带荧光的高效薄层硅胶板上, 样品点成条状. 也可用一内径约 1mm 的玻璃毛细管点样. 点样线 (起始区带) 距底边 1—1.5cm, 两垂边 0.5cm. 上样完毕, 用电吹风或氮气将点样区带吹干.

1.2.3 富集 如点样区带过宽, 可用富集液将其展开 0.5cm, 以使样品浓集成狭窄的条状, 这可增加分离效果. 富集后的样品区带同步骤 2 吹干即可. 如用带浓缩区的薄层预制板则可省去此步操作.

1.2.4 展开 将富集后的载样薄板放入内含展开剂的展开槽 (内壁贴滤纸) 内饱和室温上行展开 7.5—8cm (约需 1.5—2h). 展开完毕, 将板取出并吹干.

1.2.5 定位 将已展开并吹干的薄板置紫外灯 (λ 254nm) 下 (可见样品在绿色背景下显黑色阴影), 用铅笔迅速描出所要区带准确位置并尽快从紫外灯下取出.

1.2.6 刮取与洗脱 用一无菌刀片小心将定位的区带刮下放于一无菌 Eppendorf 管内, 用无菌去离子水洗脱 3 次 [(3×200—400 μ l)], 每次加水后放置 5min 并不时振荡, 离心取上清.

1.2.7 定量、分装、干燥与保存 合并 3 次洗液, 紫外或薄层扫描定量后分装成小份, 真空离心干燥, -20℃ 保存.

2 结果与讨论

2.1 合成寡核苷酸的典型色谱行为 图 1 是一 DNA 合成仪合成的寡核苷酸色谱图, 图中 R_f 值较小且颜色较暗的区带即为所需长度的寡核苷酸产品; 其它颜色较淡者均为杂质 (主要是短片段副产物). 从图 1 还可以看出, 正常寡核苷酸的高效薄层色谱片段分布特征与电

泳法类似, 片段越长 R_f (相当于电泳的迁移速率) 越小。

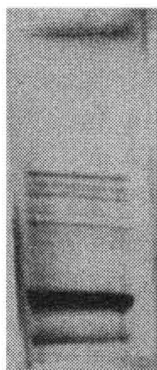


图 1 合成寡核苷酸典型的 HPTLC 色谱行为
寡核苷酸长度: 20nt; 展开剂: 系统 1

2. 2 纯度 HPTLC 法纯化的寡核苷酸经薄层扫描法 (图 2) 及 16% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 法 (同位素标记后电泳并放射自显影, 图 3) 分析均证明为单一成分。从图 2 还可以看出该法 (图 2c) 纯化寡核苷酸的纯度稍优于电泳法 (图 2b)。

2. 3 回收率 将一定浓度的纯品寡核苷酸用自动点样器点成一系列体积, 点样区带长度为 4cm, 展开后将样品洗脱并定量。根据回收量 (洗脱量) 与点样量的百分比计算回收率, 结果见表 1。从表 1 可以看出该方法平均回收率可达 97.7%, 比电泳法 (50%—70%) 及高效液相色谱法 (70%—80%) 高得多。另外低浓度时出现回收率高于 100% 现象, 这可能是由以下两因素引起: a. 低浓度时紫外定量误差; b. 硅胶洗下的紫外吸收物质 (不大于 0.02A)。

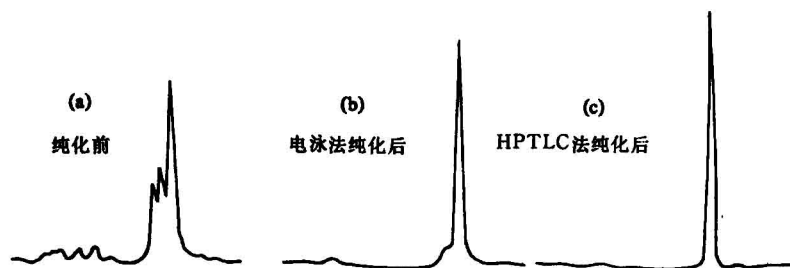


图 2 纯化寡核苷酸纯度的 HPTLC 分析
寡核苷酸长度: 16nt; 展开剂: 系统 2

表 1 HPTLC 纯化 Oligo 的回收率

样品	上样量 μg	回收量 μg	回收率 %
1	8.1	8.5	105.0
2	16.6	15.8	95.0
3	24.3	23.9	98.3
4	33.2	30.3	91.3
5	40.5	40.0	98.9
平均			97.7

2. 4 色谱容量 高效薄层色谱纯化寡核苷酸的色谱容量 (即有效载样量) 与待纯化寡核苷酸的纯度有关。对于合成质量较好且长度在 25nt 以下的寡核苷酸, 用一块大小为 10cm $\times$ 20cm, 厚度为 0.2mm 的 E. Merck 高效薄层

色谱板可纯化 20A 粗品。合成质量较差者, 可纯化 10A。若适当增加薄板硅胶涂层厚度, 色谱容量可望成倍增大。

2. 5 寡核苷酸衍生物的纯化 用高效薄层色谱法纯化生物素、荧光物及氨基修饰的寡核苷酸衍生物也获得理想的效果 (图略)。氨基修饰产物 R_f 值明显小于未修饰物, 生物素及荧光物修饰产物 R_f 值明显大于氨基修饰物, 薄层展开后可容易地将其分离。此外, 该方法还可用于跟踪寡核苷酸化学修饰反应的进程。

由上述实验结果可以看出, 与传统方法相比高效薄层色谱 (HPTLC) 纯化寡核苷酸的方法有以下优点: a. 操作简便、省时且无需特殊



图3 纯化寡核苷酸的纯度 PAGE 分析

寡核苷酸长度 1, 3: 18nt
2, 4: 16nt

仪器设备; b. 产品纯度好、回收率高且无需脱盐; c. 适用于少量样品及衍生物的纯化等。

致谢: 实验得到生物工程研究所石成华研究员和张京生实验师的协助。

参 考 文 献

- 1 黄培堂. PCR 技术的原理和应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1990: 143
- 2 McPherson M J *et al.* PCR. New York: Oxford University Press. 1991: 8
- 3 王升启, 马立人. 反义核酸技术及其应用-反义寡核苷酸. 军事医学科学院院刊, 1991; 15 (3): 191
- 4 Applied Biosystems. *User Bulletin*, 1987 (13-Revised): 28
- 5 Applied Biosystems. *User Bulletin*, 1987 (13-Revised): 9

发酵制取黄原胶的研究 (925231[#])

黄原胶是由野油菜黄单胞菌发酵产生的一种水溶性微生物多糖, 在适宜的培养条件下, 能以玉米淀粉为主要原料发酵产生黄原胶。200 升中型试验表明, 黄原胶对玉米淀粉的转化率为 55—64%, 发酵液粘度达 6 500—7 700 厘泊。经化学分析表明, 资料研制的黄原

胶制品其组分与美国的同类产品相同。本文介绍了研制工作的小试和中试两个阶段, 并作了总结。委托检索费: 单位 16 元, 个人 14 元。

[北京 867 信箱 20816 组李 群, 邮编: 100024 电话: 5762127, 5762194]

天然苋菜红色素的制取及其性质 (925232[#])

天然苋菜色素原料易得且价格低廉, 本色素与同类天然色素相比较, 色值较高, 其提取工艺、设备简单。提取过程未用任何有机溶剂, 操作安全, 降低了产品成本, 对大多数添加剂稳定, 故可在大多数食品中作为着色剂。本文详细介绍了苋菜红色素的提取工艺和理化

性质, 为苋菜红色素的提取和应用提供了科学依据。委托检索费: 单位 10 元, 个人 8 元。

[北京 867 信箱 20816 组李 群, 邮编: 100024 电话: 5762127, 5762194]