

用电镜直接观察核酸分子的制样技术

徐有成 戴培桦 龚祖垠

(中国科学院上海生物化学研究所)

脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)都是链状生物高分子。双链核酸1埃长度的平均质量为196—197道尔顿,如果DNA分子量为 2×10^6 ,则其长度应为 10^4 埃,即1.0微米左右,如此巨大的分子在电子显微镜下完全应能观察到,主要问题在于如何克服生物高分子反差弱的困难和保持核酸分子在溶液中的构型。若在制样时能克服上述困难,则通过电子显微镜的直接观察,可以区分各种核酸的单链和双链,环状或支链等不同的形态,计算核酸分子的长度和分子量,进而研究核酸的结构和功能。

Hall^[1]等首先应用观察蛋白质分子的云母覆型技术,来观察从鲑鱼精子中分离出来的DNA,虽然获得了较为清晰的图象,但由于DNA的分子量高达8,000,000,如此长链的分子在喷雾时就极易断裂和损伤。在用5或9千赫的声波使DNA分子降解为片断后,其形态已失去长链DNA分子的特性而近似于纤维状蛋白质分子。

Beer^[2]应用苯乙烯和乙烯吡啶的共聚物作为支持膜覆盖铜网,然后使膜面向下垂直接触于核酸溶液表面,并在极短时间内在溶液表面移动2厘米左右,使核酸分子被支持膜吸附。金属投影与移动方向垂直。由于这一共聚物支持膜具有弱的离子交换能力,因而核酸分子的吸附可由调节pH和溶液的离子强度而控制。这一方法虽然能避免核酸分子的断裂和保证金属投影的成功,但由于铜网移动时强烈的水动力学作用,使得核酸分子都被拉伸成直线,具有明显的方向性,因而最终只能观察到成一直线的局部核酸分子,失去了其柔软的长链性质。

也有报道使用强烈的变性剂,如尿素、二甲基亚砷^[3]等,来观察DNA或RNA分子,但此时的核酸分子均处于变性状态,并有一定的定向排列。

Kleinschmidt^[4]报道了观察核酸分子的蛋白质单分子膜技术。这一方法已获得广泛的应用,其优点在于应用了蛋白质单分子膜作为核酸分子的基膜,从而在一定程度上保证了核酸分子的完整性和相似于溶液的构型。很多球状蛋白均能在水溶液或盐溶液的表面形成不溶的变性薄膜,在适当条件下这一薄膜可以成为单分子层,由伸展的肽链构成为一个分子网。由于

蛋白质的氨基酸碱性侧链基团的作用,使得核酸从三度空间的溶液构型吸附至肽链网而转化为二度空间的构型,因而使核酸分子从形态到结构均能保持一定程度的完整性。在这一方法中还改进了一般的金属投影方法,应用了旋转投影法。在被投影的样品不是球状物体时,金属喷镀方向具有很大的意义,线状物体只有和金属喷镀方向垂直才能获得投影,从而增加反差;而在和喷镀方向一致时,则不能获得投影,样品无法分辨。核酸长分子常盘绕弯曲,在不同方向粗细不一,引起形象失真(图1)。应用旋转投影法,不论核酸的长分子如何盘绕弯曲,可使其在任何方向都能获得均一的投影而增加反差,分子直径粗细相同。我们工作中应用两次垂直投影法来代替旋转法,其效果也尚为满意。

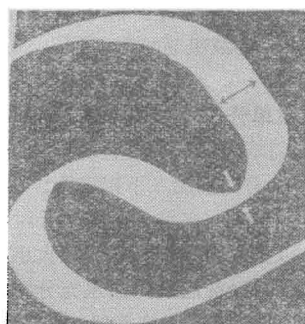


图1 核酸分子的投影示意

←→ 投影方向与核酸分子垂直;
→← 投影方向与核酸分子平行

在应用蛋白质单分子膜的基础上,制样方法可分为三种:1.展开法;2.扩散法;3.一步释放法。

一、展开法

展开法是把核酸加入到蛋白质溶液之中,在后者展开成单分子膜时,核酸分子也同时分布于蛋白质膜中间,并略受蛋白质分子肽链的包裹。蛋白质核酸的溶液,一般称为展开溶液。表面承受蛋白质单分子膜展开的溶液称为下相溶液。核酸分子的完整性和分散性以及它的反差,显然都和蛋白质单分子膜展开的好坏有关;而后者则又受展开溶液及下相溶液的多种因素的影响。整个方法可分下列几个步骤:

1. 展开溶液的准备 很多球状碱性蛋白均有展开成单分子膜的活性,如细胞色素c、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、核糖核酸酶、甲基化白蛋白和溶菌酶等,使用最普遍的是细胞色素c,其浓度为0.1毫克/毫升,核酸浓度在0.5—2微克/毫升之间。溶剂为挥发性的醋酸铵溶液,浓度为0.5—1克分子,并含有1毫克分子的乙二醇四乙酸二钠,整个溶液的pH为7.5。

2. 下相溶液的准备 经常使用的下相溶液为蒸馏水(两次重蒸或玻璃蒸馏水)或醋酸铵溶液,后者浓度为0.1—0.5克分子,下相溶液的醋酸铵浓度总比展开溶液为低。在用蒸馏水或醋酸铵溶液作为下相溶液时,双链DNA一般呈现为弯曲的长线状;单链DNA则由于碱基间散乱的无规则结合,常易形成丛枝状。Westmoreland等^[1]首先报道使用甲酰胺的盐溶液作为下相溶液,由于减少了碱基间的相互作用,因而单链DNA也呈弯曲的线状;同时,甲酰胺和大部分变性剂相反,能增加样品的反差。

Davis等(1971)建议在使用甲酰胺时,在40%的甲酰胺展开溶液内:核酸浓度0.5微克/毫升;细胞色素c 0.02—0.1毫克/毫升;缓冲液为0.1克分子三羟甲基氨基甲烷,内含10毫克分子的乙二醇四乙酸二钠(pH 8.5)。展开溶液配制后可在1—2小时内使用。下相溶液为10%的甲酰胺溶液,内含10毫克分子的三羟甲基氨基甲烷、1毫克分子的乙二醇四乙酸二钠(pH 8.5)。下相溶液极易酸化,所以必须在配制后5分钟内使用。

3. 蛋白质单分子膜展开 取直径为90毫米或100毫米的塑料培养皿或同样直径的玻璃培养皿,用洗液充分洗涤干净后,加入下相溶液;可喷上极少量的滑石粉于溶液表面,在单分子膜展开时,将推动滑石粉颗粒后退,以指示膜的形成好坏和大小、方向。取显微镜用的载玻片,经洗液及蒸馏水充分洗涤后(不能与裸露的手指接触),斜放于培养皿的一边,一端浸入下相溶液,另一端搁置在略高于培养皿的器具上,两者的高度决定了载玻片的倾斜度,因而也决定了展开溶液下滑至下相溶液表面时的速度,并对单分子膜的形成有所影响。根据我们的经验,其倾斜角以15°左右为宜。用聚四氟乙烯的微量注射器(或经充分洗涤干净的0.1毫升的玻璃移液管)吸取50微升的展开溶液,在离下相溶液表面约1厘米左右的载玻片上前后摆动,滴于载玻片表面。此时可看到滑石粉层后退,说明蛋白质单分子膜逐渐形成,整个过程约需2—3分钟;在此期间,整个装置最好用玻璃罩等物盖住,以防止操作人员呼吸和旁人走动等引起的气流的影响,以及灰尘等脏物的污染。理论计算及实验证明,当1毫克重的蛋白质展开成良好的单分子膜时,其面积约为1平方米。因而根据最后形成的单分子膜的面积大小,可以估计其好坏程度。如果面积过小,则说明形成的膜

并非单分子层,因而核酸就有局部或全部被膜包裹的危险,使整个核酸分子消失或反差变坏。

Bull, H. B. 在1947年曾介绍了蛋白质膜扩展的针尖法,此法除在扩散法中应用外^[6],并不普遍。

4. 膜的转移 单分子膜形成后,用载有火棉胶—碳膜的铜网,使支持膜向下,放置于离单分子膜展开前沿1厘米或距离载玻片0.5厘米的膜表面上,并用镊子即刻捞起,单分子膜即吸附于支持膜上;多余液体可用小片滤纸吸去,也可将铜网直接浸于95%的酒精或无水酒精中10—30秒钟。为增加样品的分辨率,我们在刚剥离开云母表面喷涂一层碳膜,然后如上述进行单分子膜的转移;将干燥后的云母—碳膜进行金属投影或染色,然后再在干净的蒸馏水表面剥离碳膜,用铜网捞起。

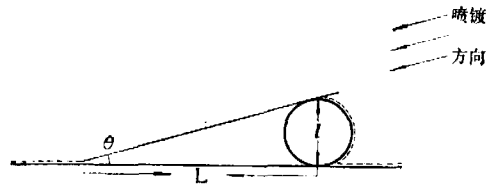


图2 核酸分子的金属喷镀

5. 金属投影和染色 核酸分子直径较小,约20埃,所以要求投影角 θ 小,一般在5—9°之间(图2)。投影宽度 L 决定于物体直径 l 及投影角 θ ,即 $\lg \theta = \frac{l}{L}$ 。投影后,核酸分子直径由20埃增大至 $\left(L + \frac{l}{2}\right)$,即可达70—150埃左右。

我们用手动的方式,在金属蒸发投影时,控制样品旋转速度为每分钟约6转。资料中报道的旋转投影,大都利用马达传动,每分钟为30—60转;也有高达每分钟1,500转的,但在此高速下,必须有样品固定装置。投影金属必须采用蒸发温度高、粒子细的金属,以提高分辨率,一般用铂。我们使用铂铱合金丝,直径为0.1毫米。投影层要控制适当,不宜过厚;样品和金属蒸发源距离需在6厘米以上,以避免金属蒸发时样品受热的影响,或较大的蒸发粒子投上样品。

在投影中间,将样品转动90°,成为两次垂直投影,效果也较好。

为增加样品的反差,也使用染色方法,一般可用醋酸铀的酒精溶液(浓度为 10^{-3} — 10^{-5} 克分子),在单分子膜转移后,进行脱水时同时染色,时间约30秒钟。在染色后再进行投影,其效果有时比单独使用一种方法似更好一些。

6. 电镜观察 由于单分子膜碳膜是转移到铜网上的,所以在电镜观察时,常会发生膜的移动或破裂等情况。因此在观察时,电子束电流不宜过大;也可在低放大倍数时,先用强电子束照射“老化”数秒钟。由于

核酸分子直径已增大至 70—150 埃左右, 所以放大倍数不需过大, 一般在 6,000—15,000 倍即可; 很多核酸分子具有很长的链, 所以只有缩小倍数或连续拍摄数张照片, 才能照到全景。

在操作中的注意事项如下:

(1) 在分离核酸时要注意是否使用了表面活性剂, 如硫酸十二酯钠等。表面活性剂将使单分子膜过度展开, 速度很快, 因而影响核酸分子的构型, 使其常沿展开方向伸展成一直线。因此, 在展开溶液中要尽量避免掺入表面活性剂; 实在不能排除时, 则可在下相溶液中也滴入极少量的表面活性剂, 此时单分子膜的展开即趋于正常。

(2) 为鉴定单分子膜的展开和转移的好坏, 在展开溶液中可适量加入一些与核酸分子量相差不大的指示样品, 如烟草花叶病病毒等。如果在电镜下能够观察到指示样品, 却不能观察到核酸分子, 则可以估计是核酸制剂的问题。

(3) 展开溶液及下相溶液中需加入挥发性盐, 以醋酸铵效果为最佳; 细胞色素 c 的溶液最好经超滤膜过滤。

(4) 展开溶液及下相溶液的缓冲试剂, 以三羟甲基氨基甲烷加乙二胺四乙酸二钠为最好, pH 不宜过酸和过碱; 实验证明, 当 $\text{pH} > 10$ 或 $\text{pH} < 6$ 时, 核酸分子常易聚合, 有时成丛枝状或网状结构, 同时使反差变坏。

我们应用展开法制样, 观察了大肠杆菌 DNA 分子, 见图版 I (封二)。

二、扩散法

所谓扩散法^[7]是将核酸配制在下相溶液中, 展开溶液与下相溶液的其它成分则与展开法相同。Lang, D. 等用针尖法来制备单分子膜, 以避免展开时下相溶液的波动。在单分子膜形成后, 核酸分子由于扩散而被吸附到膜的下表面。扩散法具有核酸浓度低 (一般为 0.01—0.05 微克/毫升) 和对核酸分子构型影响小的优点。扩散法适用于 RNA 或链较短的 DNA 分子, 长链的 DNA 分子不易扩散, 需要的时间较长。

Lang, D. 等及参考资料 [7] 中报道的微量法, 也是利用核酸分子在溶液中自动扩散的原理, 但简化了蛋白质单分子膜展开的步骤。将 40 微升的含有核酸 (浓度为 10^{-3} — 10^{-5} 微克)、细胞色素 c (浓度为 1.3 微克/毫升)、甲醛 (浓度为 0.2%) 的醋酸铵溶液, 直接滴于聚四氟乙烯板上, 待一定时间后, 细胞色素 c 在液滴的表面形成单分子膜, 再用带有支持膜的铜网直接覆盖于液滴上面以转移该膜。实验证明, 如果在 2 分钟内即进行转移, 则由于单分子膜尚未很好形成, 因而核酸分子未能吸附; 在 4 分钟至 5 小时内, 核酸分子在膜上的吸附浓度与 (时间) $^{\alpha}$ 成正比, $\alpha = 0.75$ 。我们应

用微量法观察了蚕多角体病毒的核酸, 见图版 II (封二) 和 III (封三)。

三、一步释放法

一步释放法是利用展开溶液和下相溶液间盐浓度的巨大差异, 从而产生渗透压的变化, 或使用蛋白质变性剂, 在蛋白质单分子膜的展开形成过程中, 同时使核酸直接从病毒、噬菌体、细菌、原生质体或含有核酸的细胞器中释放出来, 从而简化了核酸的分离提纯工作。我们用 6 克分子浓度的醋酸铵展开溶液, 以蒸馏水为下相溶液, 对烟草花叶病病毒的核酸进行释放, 见图版 IV (封三)。有些病毒在核酸释放后, 其蛋白外壳崩塌, 与内中尚含有核酸而未破碎的病毒颗粒形成明显对比。也有报道在展开溶液中使用表面活性剂——异丙醛或丙醛 (最终浓度为 0.05%), 或在下相溶液中使用尿素 (1—8 克分子)、高氯酸钠, 以达到释放核酸的目的。

四、分子长度统计及分子量计算

应用蛋白质单分子膜技术观察核酸分子时, 其绝对长度常受制样时各种条件的影响, 其中以溶液中离子强度的影响最为明显, 双链及单链核酸的分子长度随着离子强度增加而减短。Lang, D. 等改变离子强度从 0.00002 到 0.1 时, 发现 T₂ 噬菌体及牛乳头状瘤病毒的 DNA 分子长度, 随离子强度增加而减短; 当离子强度为 0.1—0.5 时, 分子长度不变。Inman, B. 报道, 当下相溶液的离子强度为 0.1 克分子时, 噬菌体 λ 的 DNA 分子长度将比用纯水时为短。单链 DNA 分子的长度对甲酰胺的浓度变化也极为敏感, 当展开溶液中甲酰胺浓度低于 30% 时, 随着甲酰胺的浓度增加, 其分子长度也稍有增加; 而当甲酰胺浓度超过 30% 时, DNA 分子长度随着甲酰胺浓度增加反而会略为减短。当然, 电子显微镜放大倍数的误差及成像的条件也会有所影响, 但作用较小, 估计一般不超过 4%。

对变性的直链核酸分子或轮廓并不复杂的长链核酸分子, 如噬菌体 ϕ X174 的环状 DNA 分子, 可用尺或尼龙线在照片上直接进行长度测量。对于形态复杂、盘扭弯曲的长链核酸分子, 则最好使用小型的量程器。一般统计的核酸分子数需在 100 以上, 再作出分子长度的分布图。

根据核酸的分子模型计算, 核苷酸的平均长度为 5.2 埃, 因此单链 DNA 的分子量可由下式计算^[8]:

$$\text{分子量} = \frac{\text{分子长度(埃)}}{5.2} \times \text{单体的平均分子量}$$

也可以在观察某一核酸分子时, 在制剂中同时加入一已知形态及长度的单链或双链核酸分子作为比较。例如, 已知噬菌体 ϕ X174 的 DNA 是单链的环状分子, 其分子量为 1.7×10^6 ; 噬菌体 ϕ X 的 Rf 型核酸

表1 各种不同对象的核酸分子的电子显微镜观察

样 品	方 法*	资 料
噬菌体 T ₁ , T ₁ DNA	2, 1	<i>Science</i> , 143 , 47, 1964.
噬菌体 T ₂ DNA	2, 3	<i>Biopolymers</i> , 9 , 373, 1970. <i>Biochem. Biophys. Acta</i> , 61 , 857, 1962.
噬菌体 T ₇ DNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 11 , 285, 1965. <i>J. Mol. Biol.</i> , 79 , 249, 1973.
噬菌体 λ DNA	1, 3	<i>Methods in Enzymology</i> , XXI , Part D, 413, 1971. <i>Virology</i> , 25 , 226, 1965. <i>J. Mol. Biol.</i> , 25 , 209, 1967.
噬菌体 λ b265C DNA	1	<i>Biopolymers</i> , 9 , 503, 1970.
噬菌体 φX 174 DNA	1	<i>Virology</i> , 53 , 384, 1973. <i>Science</i> , 142 , 961, 1963.
类菌质体 <i>Hominis</i> H39 DNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 23 , 191, 1967.
牛乳头状瘤病毒 DNA	2, 1, 3	<i>Biopolymers</i> , 9 , 373, 1970. <i>J. Mol. Biol.</i> , 13 , 749, 1965.
细菌 <i>Staphylococci</i> DNA	1	<i>Methods in Enzymology</i> , XII , Part B, 361, 1968.
细菌 <i>Homophilus influenzae</i> Spheroblast DNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 11 , 648, 1965.
大肠杆菌(<i>E. coli</i>) DNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 82 , 107, 1974.
鳕鱼精子 DNA	1	<i>Methods in Enzymology</i> XII , Part B, 361, 1968.
鳕鱼精子 DNA	2	<i>Biopolymers</i> , 9 , 373, 1970.
猪精子 DNA	1	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.</i> , 53 , 357, 1965.
呼肠孤病毒 (Reovirus) RNA	1, 3	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.</i> , 52 , 1449, 1964. <i>J. Mol. Biol.</i> , 10 , 282, 1964. <i>Z. Naturforsch.</i> , 22b , 159, 1967.
伤瘤病毒 RNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 10 , 282, 1964.
离红血细胞瘤病毒 RNA	1	<i>J. Mol. Biol.</i> , 16 , 571, 1966.
蚕细胞质多角体病毒 RNA	1	蛋白質 核酸 酵素, 12 , 521, 1967.
水稻矮缩病病毒 RNA	1	蛋白質 核酸 酵素, 12 , 521, 1967.
豇豆花叶病病毒 RNA	1	<i>J. Biophys. Biochem. Cytol.</i> , 11 , 273, 1961.
家鸭红血球 RNA	1	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.</i> , 56 , 1571, 1966.

* 1——展开法; 2——扩散法; 3——一步释法

则为双链的 DNA 分子, 已知其分子量为 3.4×10^6 ; 如把后者的核酸制剂加入到噬菌体 λ 的核酸样品中, 则噬菌体 λ 与 φX 的 Rf 型的双链 DNA 分子长度比为 9.1 ± 0.1 , 因此噬菌体 λ 的 DNA 分子量为 $(31.0 \pm 0.3) \times 10^6$ 。这一数据, 与用其他物化方法测得的分子量完全相符。

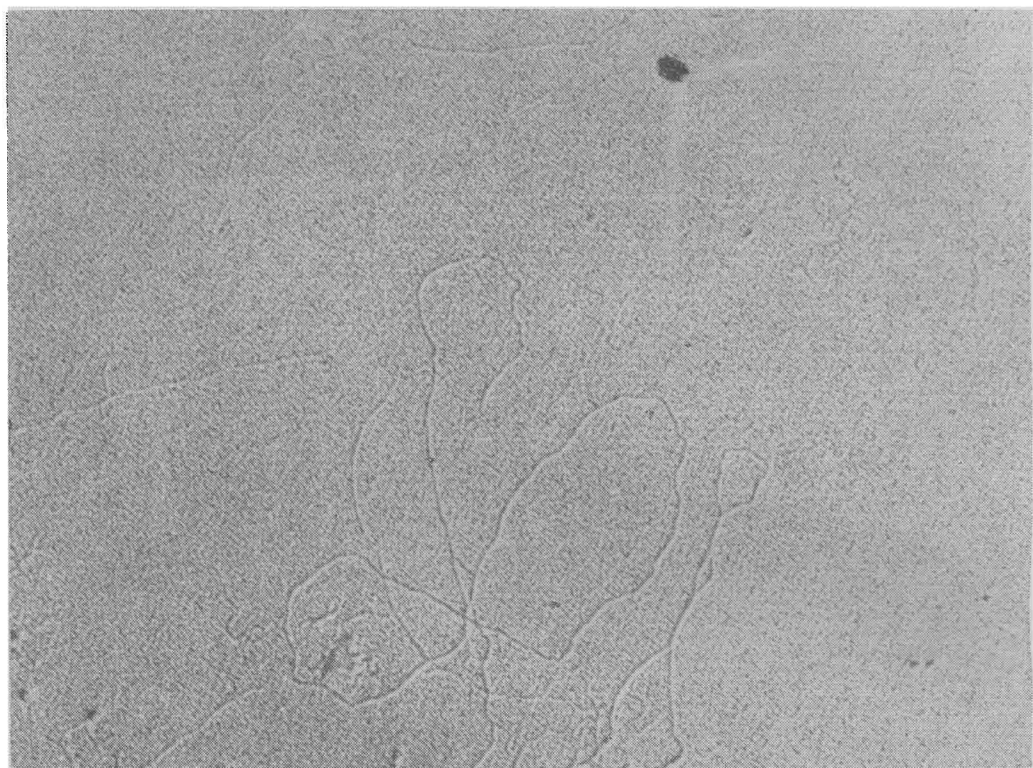
* * *

目前, 蛋白质单分子膜技术, 已成为在电子显微镜下直接观察核酸分子的基本方法。应用这一方法, 报道了不少关于细菌、病毒、噬菌体等 DNA 及 RNA 分子的观察结果, 表 1 中列出了一些主要的资料。人们通过直接观察核酸分子, 对其形态和结构有了更直接的了解。

参 考 资 料

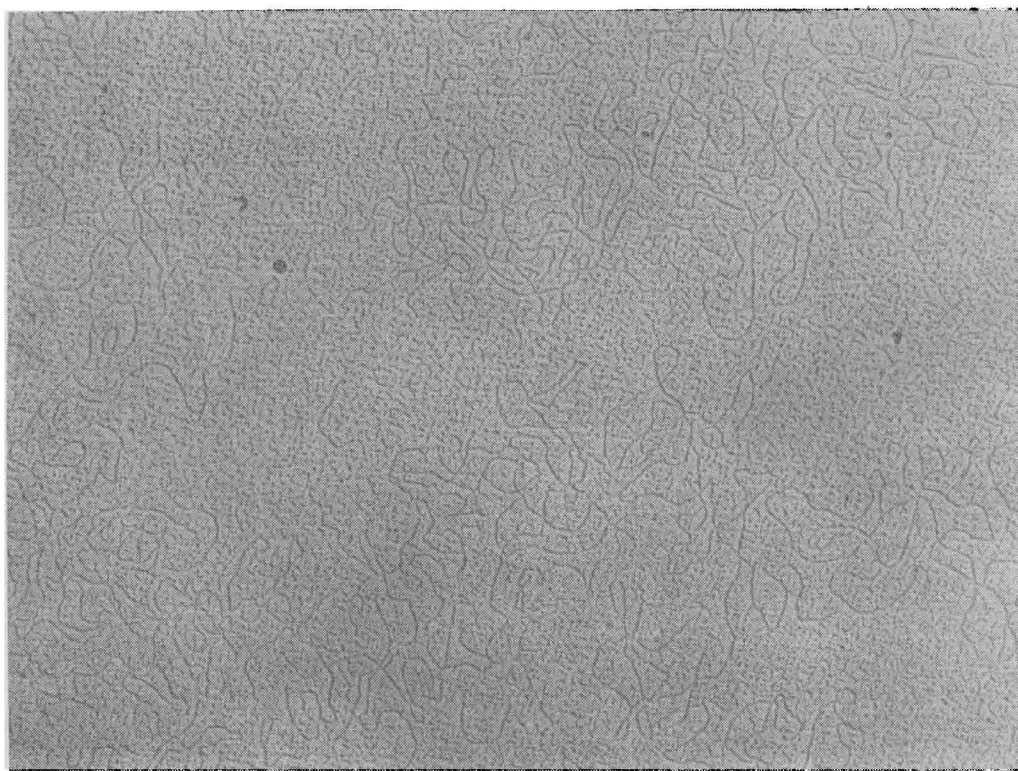
- [1] Hall, C. E. et al.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 1, 1958.
- [2] Beer, M.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 263, 1961.
- [3] Nanninga, N. et al.: *Proceedings of the Vth European Congress on EM*, 238, 1972.
- [4] Kleinschmidt, A. K. et al.: *Z. Naturforsch.*, **14b**, 770, 1959.
- [5] Westmoreland, B. C. et al.: *Science*, **163**, 1343, 1969.
- [6] Lang, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, **23**, 163, 1967.
- [7] エーグラー・ミタニ充子: 蛋白質 核酸 酵素, **19**, 388, 1974.
- [8] Beer, M.: *Methods in Enzymology*, **XII**, Part B, 377, 1968.

[本文于 1974 年 9 月 24 日收到]



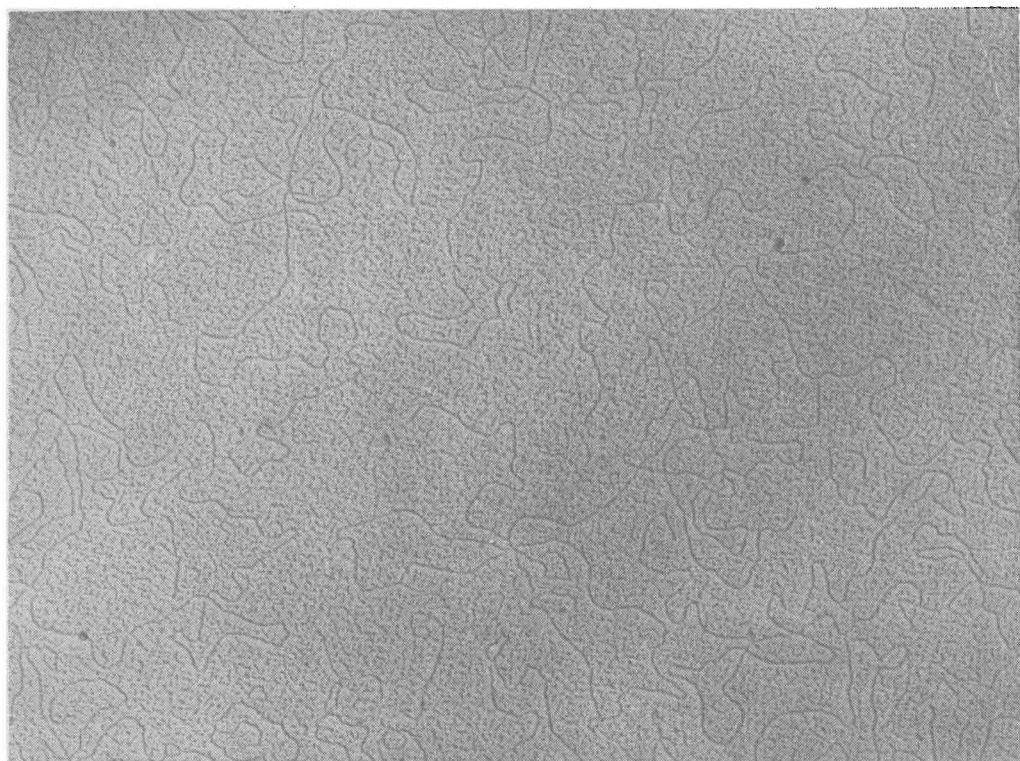
图版 I 大肠杆菌 DNA 分子片断, 50,000 倍, 展开法

展开液: $0.5M$ NH_4Ac , $0.001M$ EDTA, DNA 3-4 微克/毫升, 细胞色素 c 0.05 毫克/毫升; 下相液: $0.25M$ NH_4Ac



图版 II 多角体病毒 DNA 分子, 35,000 倍, 扩散法

35 微升 $0.15M$ NH_4Ac 含: DAN 0.035 微克, 4 微升细胞色素 c (16 微克/毫升), 1 微升 8% 甲醛; 在聚四氟乙烯膜上静置 15 分钟



图版 III 多角体病毒 DNA 分子, 35,000 倍, 扩散法
(条件同图版 II)



图版 IV 烟草花叶病毒 RNA 分子, 60,000 倍, 一步释放法
含病毒及 100 微克/毫升细胞色素 c 的 5M NH_4Ac 溶液, 向蒸馏水表面展开