

高强度分析光长时间的照射将引起光电倍增管的疲劳和样品被分析光光解而影响观测结果。如果在样品池前安装一个与显示记录系统联动的快门,在激发闪光前很短时刻(毫秒量级)打开快门,当瞬态过程完成后立即闭合,可避免它在非观测时间内仍继续照射光电倍增管和样品,防止了光电倍增管的疲劳和样品被分析光光解。

参 考 文 献

[1] Hart, E. J. et al.: *The Hydrated Electron*, 1970.

- [2] Porter, G. et al.: *Techniques of Chemistry*, Vol. 6, pt. 2, Ed. by Hammes, G. G., New York, 1974.
- [3] Keene, J. P.: *Pulse Radiolysis*, (Ed. Ebert, M. et al.) Academic Press, London, New York, 1965.
- [4] James, J. F. et al.: *Design of Optical Spectrometers*, Chapman and Hall, London, 1969.
- [5] Hunt, J. W. et al.: *Int. J. Radiat Phys. Chem.*, 4, 1, 1972.
- [6] Schurek, K. et al.: *J. Sci. Instrum.*, 44, 952—953, 1967.
- [7] Boag, J. W.: *Trans. Faraday Soc.*, 64, 677—685, 1968.
- [8] Hunt, J. W. et al.: *Radiat. Res.*, 32, 149, 1967.

[本文于1980年8月21日收到]

用较简便的双向纸电泳装置分离蓖麻 蚕后部丝腺小分子 RNA 酶解片段

李文琴 曹功杰 吴仁龙 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所二室)

Sanger 等人^[1]最先采用双向纸电泳方法(通常称作指纹图谱法)测定全标记 RNA 的顺序,其后同实验室 Brownlee 等人^[2]又发展了该方法,采用电泳一同系层析技术。近几年来,核酸顺序研究的技术发展很快,特别是凝胶直读法能快速测定核酸顺序。但对于确定 RNA 中的修饰成分,指纹图谱法仍是最准确的,因此目前很多实验室仍旧利用这一方法,并结合凝胶直读法测定 tRNA 的顺序^[3,4,5]。我们在研究蓖麻蚕后部丝腺小分子 RNA 的结构中也采用了指纹图谱法,并在电泳装置方面做了一些改变,它比 Sanger 等人设计的装置较为简便。本文介绍这一装置及其在分离小分子 RNA 酶解片段中的应用。

材 料 和 方 法

1. 材料 (1)³²P-全标记蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 和 5S RNA 的制备方法见(6)。RNA 用 RNase T₁ 全酶解条件:反应体积为 40 微升,含有 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA-

Na₂, 100 单位 RNase T₁/1A₂₅₀ ³²P-RNA。37℃ 保温十五小时。RNA 用 RNaseA 全酶解条件:反应体积为 40 微升,含有 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA-Na₂, 20 微克 RNaseA/1A₂₅₀ ³²P-RNA。37℃ 保温十五小时。RNase T₁ 系 Merck 公司产品, RNaseA 系上海生化所东风厂产品。

(2) 醋酸纤维素纸使用上海市湖南街道加工厂产品或英国 OXOID 产品。规格 25×3 厘米。

(3) DEAE 纤维素纸是 Whatman 产品,规格为 55×20 厘米。

2. 电泳装置 我们用于第二向的电泳装置如图 1 右所示。装置长 50 厘米,宽 20 厘米,高 30 厘米的平放有机玻璃槽。槽内两端各有一只放电极缓冲液的小槽,横接两小槽为一块有机玻璃板,平板上放一个“波浪式”的玻璃支架(图 2),电泳纸放在上面。槽内盛放 200 号溶剂汽油,盖没电泳纸。槽内四周有可以通自来水冷却的管道。和 Sanger 等人的装置相比,本

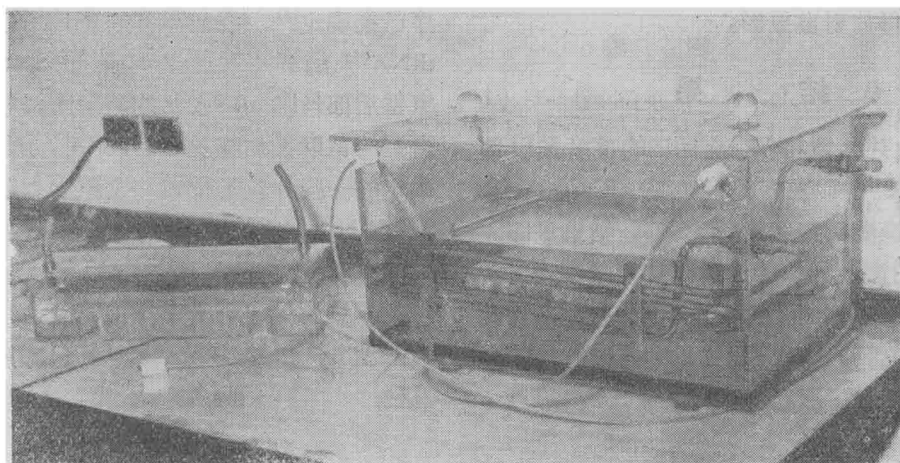


图 1 双向纸电泳的电泳槽装置

右图用于第一向电泳;左图用于第二向电泳。

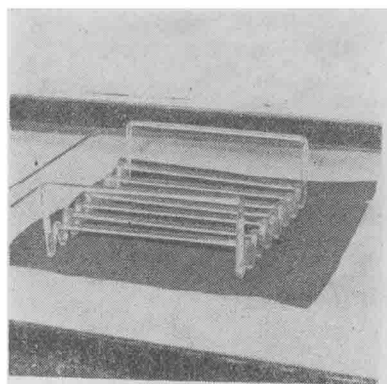


图 2 玻璃支架

装置具有体积小和冷却汽油用量少等优点。第一向电泳装置和以上装置类似,不过比较狭长,不用玻璃支架,体积也小得多(图 1 左)。

3. 操作 将 RNA 的 RNaseT₁ 或 RNaseA 全酶解产物点在醋酸纤维素纸上,并点上二甲苯蓝、酸性品红和甲基橙混合染料作指示剂,在第一向电泳槽中电泳。缓冲液是 5% 醋酸,0.5% 吡啶, pH3.5。电压 3500 伏,电流 10—20 毫安。样品和指示剂向正极移动,当甲基橙移动

18 厘米时(约电泳 15 分钟),停止电泳,取出醋酸纤维素纸条,用冷风吹去纸条表面的汽油,然后通过转移装置用重蒸水将样品转移到 55×20 厘米的 DEAE 纤维素纸上(图 3)。当重蒸水前沿在 DEAE 纤维素纸上行至 10 厘米时停止转移。DEAE 纤维素纸室温干燥后放在“波浪式”玻璃支架上,并用数根玻璃棒压好(我们现用的支架能使 55 厘米长的 DEAE 纤维素纸缩短至 30 厘米,如需用更长的 DEAE 纤维素纸进行第二向电泳,可使用较高波峰的支架),置于适当大小的器皿中,用第二向电泳缓冲液(7% 甲酸)润湿 DEAE 纤维素纸,然后将带有 DEAE 纤维素纸的玻璃支架,放在电泳槽的平板上进行第二向电泳(润湿的 DEAE 纤维素纸易碎,操作要十分小心),电压 1000—1200 伏,电流 70—90 毫安,用自来水冷却槽内汽油。分离 RNaseT₁ 酶解产物时,二甲苯蓝指示剂向正极移动 17 厘米时停止电泳;对于 RNaseA 酶解产物只需 15 厘米即可结束。取出玻璃支架,小心地把 DEAE 纤维素纸平铺在玻璃板上,自然

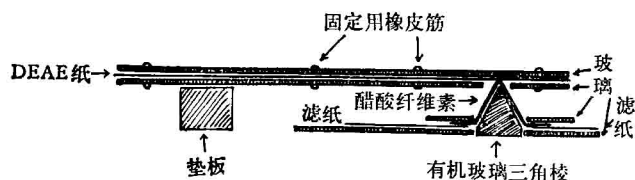


图 3 转移装置示意图

干燥后,进行放射自显影。

结 果

采用上述装置将 ^{32}P -全标记的蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 以及 5SRNA 的 RNaseT₁ 和 RNaseA 的全酶解产物进行了分离,结果见图 4 和图 5。图谱中各点的组成和排列顺序通过洗脱后进一步分析,得到确定。蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 中含修饰成分的片段和末端片段的顺

序已经确定^[6]。我们得到的蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 酶解图谱与 Zuniga 和 Steitz^[7] 报道的家蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 的酶解图谱相似。我们得到的蓖麻蚕后部丝腺 5SRNA 的酶解图谱中确定的一些片段的位置与文献中报道的其他来源 5SRNA 的酶解图谱中相同片段的位置是相似的^[8],表明这一装置分离效果较好。

本装置也可用于后标记的酶解片段的分离。图 6 为酵母 tRNA^{Ala} 后标记酶解图谱。

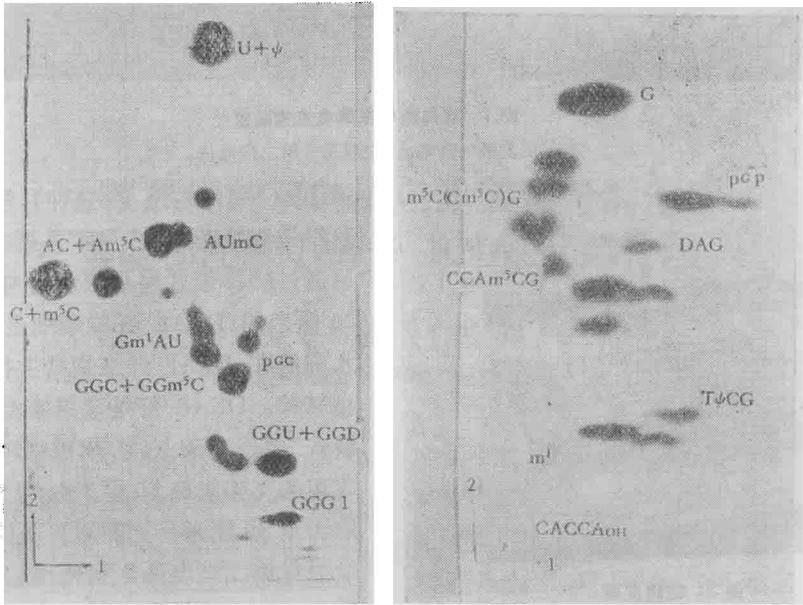


图 4 蓖麻蚕后部丝腺 tRNA^{Gly} 的 RNaseA (左)和 RNaseT₁ (右)的全酶解图谱

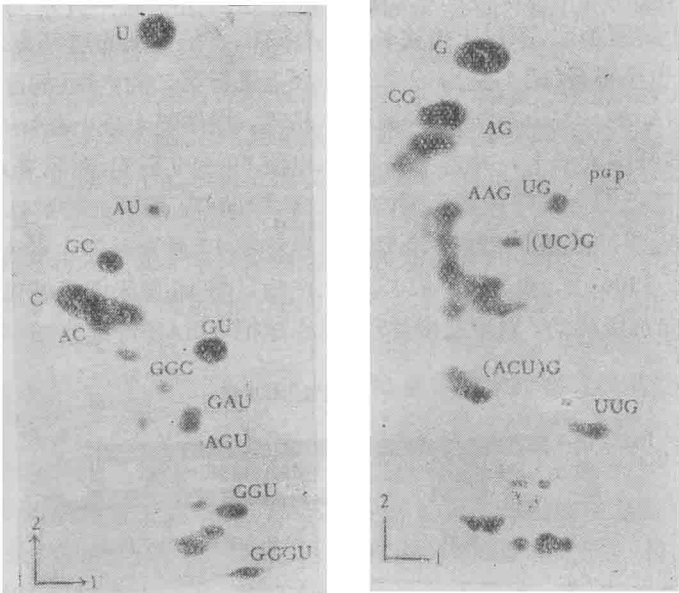


图 5 蓖麻蚕后部丝腺 5SRNA 的 RNaseA (左)和 RNaseT₁ (右)的全酶解图谱



图6 酵母 tRNA^{Ala} 的 RNaseA
全酶解后标记图谱

(图中深点为未标完的 r-³²P-ATP)

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **13**, 373, 1965.
- [2] Brownlee, G. G., et al.: *J. Mol. Biol.*, **34**, 379, 1968.
- [3] Vögeli, G.: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1059, 1979.
- [4] Martin, R. P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4579, 1978.
- [5] Brown, R. S.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 23, 1978.
- [6] 李文琴等: 待发表。(生化通讯 1980 第 5 期有简短摘要)
- [7] Zúñiga, M. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4175, 1977.
- [8] Brownlee, G. G.: *Determination of Sequences in RNA*, **100**, 1972.

[本文于 1981 年 2 月 12 日收到]

脑内游离氨基酸的微量测定

朱剑琴 李春宝 王新昌

(南京大学生物系)

近年来,由于神经系统内氨基酸递质的发现,使测定脑内游离氨基酸含量变化,不仅和脑蛋白代谢研究有关,而且是脑神经元兴奋或抑制的一种指标。因此对脑内游离氨基酸的测定,已是研究脑代谢和脑功能活动的一个重要指标。

本文介绍在一般实验室条件下如何提取脑内游离氨基酸的方法。干燥样品,可以保存相当时间,最后集中上氨基酸自动分析仪测定,它为一般实验室开展脑生理生化的研究提供方便,并可供测定其它组织中的游离氨基酸含量参考。

一、测定方法

1. 脑内游离氨基酸的提取 取脑组织

500 毫克左右(根据需要可增减)放入冰冷的 10 毫升 75% 酒精中匀浆,然后将匀浆液倒入 50 毫升 14 英寸磨口圆底小烧瓶中,再将匀浆管用 5 毫升酒精洗涤一次,一并倒入小烧瓶内。在小烧瓶口按上 14 英寸磨口 25 厘米长回流冷凝管,在 100℃ 水浴中回流提取 20 分钟。从水浴中取出小烧瓶,把液体倒入 15 毫升离心管中,4000 转/分离心 20 分钟。把上清液倒入 50 毫升小三角烧瓶内,放入 100℃ 水浴中蒸发酒精,至起泡沫后立即拿出。将小三角烧瓶放入冰箱内冷却半小时左右,然后将液体倒入 15 毫升离心管,4000 转/分离心 2 小时。把上清液倒入一干净的 50 毫升圆底烧瓶内,放在 90℃ 水浴中继续蒸发酒精,如起泡沫,用干净的洗耳球轻轻吹散,不使泡沫满至瓶颈,至不发生泡沫,酒精