

的工作, WHO 至今未提出一项可行的通用方法, 以致各实验室所得结果相差甚远. 本文表明 DNA 标准品的制备对结果的判定影响较大, 在残余 DNA 测定方面作了一定探索, 欲得准确可靠的结果, 还有待进一步的研究工作或技术的进步.

致谢 承蒙李育阳教授, 刘祖洞教授, 向建之教授, 丁锡申教授审阅, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 WHO Technical Report Series. Geneva: WHO, 1987; 771: 158
- 2 张智清, 侯云德, 李玉英等. 病毒学报, 1988; 4: 97
- 3 蔡良琬. 核酸研究技术(上册). 北京: 科学出版社, 1987; 6
- 4 郭礼和. Methods in Enzymology, 1986; 100: 76
- 5 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982; 109
- 6 向建之. 生物制品快讯, 1992; 19: 14
- 7 WHO Technical Report Series. Geneva: WHO, 1991; 814: 5

Detecting of Residual Cell DNA From Products of Recombinant Human Interferon γ .
Chen Yuguang (Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052, China).

Abstract Residual cell DNA (RC DNA) in the products of recombinant human interferon γ (IFN- γ) was detected by hybridization with digoxigenin-labeled total DNA of *E. coli* DH5 α -pBV220/IFN- γ as probes. The result showed a great disparity between two DNA standards in colour; thus indicating that high protein amount interfere seriously in the detection of trace RC DNA and that the DNA standard supplied with IFN- γ is more reasonable than the homogeneous one. The sensitivity of the method is 4 pg and RC DNA amount existed in each dose of all samples is less than 100 pg, which satisfied WHO requirements.

Key words residual cell DNA, recombinant human IFN- γ , digoxigenin-labeled DNA probe

从水稻细胞核中制备分子量达到 Mb 级的 DNA *

王春新 谢亦武 刘良式

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 用水稻黄化苗作实验材料, 经蔗糖不连续梯度纯化细胞核、琼脂糖包埋、蛋白酶消化释放 DNA, 脉冲交变电泳显示所得 DNA 样品分子量在 200 kb 至 3 Mb 之间, 其中大量集中在 2.2 Mb 处. 所得 DNA 容易被多种内切酶消化和连接, 可用于构建水稻 YAC 文库和大尺度物理图的研究.

关键词 水稻, Mb 级 DNA, 脉冲交变电泳

从植物细胞中分离几 Mb 的高分子量 DNA 存在一些困难: 破碎细胞壁的条件容易引起 DNA 的剪切, 植物细胞核内核酸酶活性高, 提取过程中难以完全抑制它的活性, 因而 DNA 往往断裂和降解^[1]. 许多研究者常利用原生质体来制备高分子量 DNA. 此法有几个缺点: 一

是不能避免其它细胞器 DNA 的污染; 二是使用的纤维素酶、果胶酶不仅价格昂贵, 而且大多数制品不纯, 须先作纯化处理才能使用^[2], 操

* 国家“863”计划 (863-101-01-03) 及美国洛克菲勒基金会 (1994-0001-0137) 资助.

收稿日期: 1994-07-26, 修回日期: 1994-12-19

作步骤冗长,产率甚低,需要大约 10^7 个原生质体才能获得 25 μ g 的 DNA,因而使用起来受到限制,实际上这条途径最初来自动物细胞作实验材料的研究工作。

一些研究者曾经发展了从干胚、黄化幼苗、叶片、培养细胞等不同材料的细胞核^[3,4]获得高分子量 DNA 的方法,但 DNA 的质和量均不尽人意。我们经过多次比较实验,对如何使释放的 DNA 不仅分子量高,而且一次性产量也高,及制备 DNA 过程中使用的一系列介质系统如何避免核酸酶的降解,进行了多方面的探索,最终摸索出一个用来制备分子量高达 2~3 Mb DNA 的程序。水稻的细胞壁比较厚、又脆又硬,本程序尚能够成功,相信对于其它植物种稍加修改,也会达到预期目的。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 水稻 (*Oryza sativa* L. 品种 Cpslo17) 黄化苗制备:将经消毒的水稻种子用自来水浸泡,放置在 37℃ 温箱内 1 d 发芽,然后铺在湿润的纱布上,30℃ 暗培养 3~4 d,每天换水两次,待黄化苗长至 4~8 cm 收集,洗净用滤纸吸干,用纱布包裹,经液氮速冻后置 -70℃ 冰箱保存。

1.1.2 试剂:蛋白酶 K 和蛋白酶 E、 β -巯基乙醇、十二烷基肌氨酸 (N-lauroyl sarcosine)、多胺、小牛血清白蛋白以及苯甲基磺酰氟 (PMSF) 均购自美国 Sigma 公司。Triton X-100 为 Aldrich chemical 公司产品,琼脂糖购自瑞典 LKB-Pharmacia 公司,其它均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的制备(所有过程除特别指出外,均在冰上进行):定量称取水稻黄化苗,加液氮研磨 10 min,转入灭菌三角瓶中,每克材料加入 10 ml 预冷 IM-I 抽提缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH7.6, 50 mmol/L EDTA pH8.0, 40% 甘油, 20 mmol/L β -巯基乙醇, 0.5% Triton X-100, 0.1% 小牛血清白蛋白),混匀,冰

上放置 30 min,每 5 min 轻轻旋转三角瓶一下,用四层纱布或一层尼龙布(网眼较细一种)过滤至灭过菌的离心管中。残渣加少量抽提液继续研磨 5 min,再加入抽提液 (5 ml/g),此步骤重复两次,合并滤液,再经过 400 r/min 离心 10 min (所有离心步骤均在 4℃ 进行),去沉淀。上清液转入新离心管中,5000 r/min 离心 10 min。沉淀用抽提缓冲液洗一次,最后用 0.25 mmol/L 蔗糖悬浮,铺在 25%、45%、60% 蔗糖不连续梯度上,4000 r/min 水平转子离心 20 min。经过离心之后细胞核集中在 45% 和 60% 间的界面上,用宽口滴管吸取细胞核层到一离心管中,用抽提液洗涤(悬浮-离心)数次,最后用等体积抽提液悬浮,45℃ 保温 1 h。加入 3/4 体积预先在 45℃ 保温的 2% 低熔点琼脂糖 (用 0.125 mmol/L EDTA 配制),迅速倒置数次混匀,加到可预制成胶块的模具中,4℃ 放置 30 min。取出胶块,加入 3 倍体积 ESP 溶液 (0.5 mmol/L EDTA pH8.0, 0.1% Sarcosine, 1 g/L 蛋白酶 K 或 4 g/L 蛋白酶 E) 50℃ 处理 48 h (若用蛋白酶 E,则在 37℃ 保温),最后用 TE₅₀ (10 mmol/L Tris-HCl pH7.6, 50 mmol/L EDTA pH8.0) 洗 2 次,每次 50℃, 24 h,置于新鲜的 TE₅₀ 或 0.5 mmol/L EDTA 溶液中,4℃ 保存。

1.2.2 DNA 的消化:将胶块用 20~40 倍体积的 TE₁₀ P (10 mmol/L Tris-HCl pH7.6, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF) 洗涤两次,每次 50℃, 1 h,再用 20~40 倍体积 TE 洗两次,每次也是 50℃ 1 h。继续用无菌双蒸水洗,4℃ 1 h。再用 20 倍体积预消化液 (1×限制酶缓冲液补加 8 mmol/L 亚精胺, 5 mmol/L 二巯基苏糖醇, 100 mg/L 小牛血清白蛋白) 洗两次,一次 50℃ 1 h,一次 4℃ 1 h,最后用无菌刀片将胶块切成几等份,每 1/4~1/6 胶块加 100 μ l 消化液 (预消化液中 BSA 浓度加大到 1 g/L) 再加入适量限制性内切酶,冰上放置 2 h,然后在所需温度下消化过夜。

1.2.3 电泳:脉冲交变电泳使用美国 Bio-Rad 公司 CHEF II 型脉冲电泳仪。电泳前,

胶块用 $0.5 \times \text{TBE}$ (0.5 mol/L Tris-硼酸, 1 mmol/L EDTA, $\text{pH} 8.0$) 洗 3 次, 每次室温 30 min, 然后填入预制琼脂糖胶块的加样孔中, 脉冲时间采用 70~90 s, 琼脂糖浓度为 1%, 电压 200 V, 电泳 22~24 h. 电泳时, 缓冲液温度为 14°C .

2 结果与讨论

制备植物高分子量 DNA 的优化程序, 需要材料容易获取, 操作简便易行, 重复性好. 我们对各种材料和条件进行了大量比较, 最终使本文发表的程序规范化. 使用这个程序制备的 DNA 分子量在 200 kb~3 Mb 之间, 大量集中在 2.2 Mb 附近 (见图 1). 如以 50 g 黄化幼苗为起始材料, 一次性可以得到毫克计量的 DNA 制品. DNA 易于被内切酶消化, 因此本程序对于构建核基因组 YAC 文库, 大尺度物理图谱的研究为目的的 DNA 制备具有明显的优点.

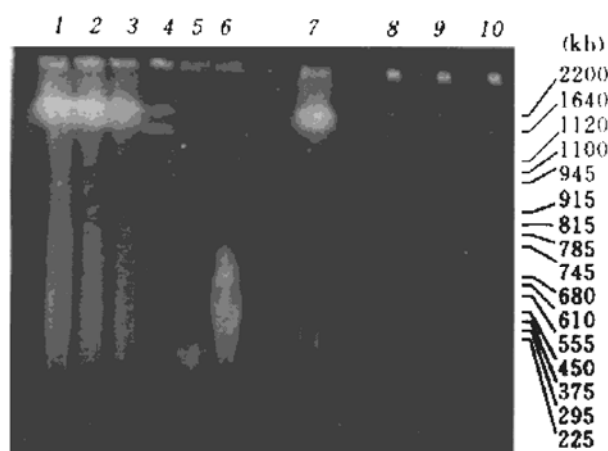


图 1 从水稻黄化苗中提取的高分子量 DNA

1~3, 7: 从不同批次分离的 DNA 样本; 4, 8~10: 作为分子量标记的酵母染色体 DNA.

配制提取缓冲液及一系列后续步骤缓冲液是一个关键. 用 0.5% Triton X-100 选择性破坏叶绿体膜^[4], 可以减少细胞器 DNA 的污染. 有许多程序使用二价阳离子 (Ca^{2+} $0.1 \sim 10 \text{ mmol/L}$) 及甘油、山梨醇、亲水聚合物 Ficoll (2.5%), Dextran (15%) 稳定核膜^[6], Kuethl 还认为必须用有机溶剂二乙基醚预处理材

料, 破坏细胞外膜, 才有利于细胞核的释放. 二价阳离子虽能保护核膜, 但我们的结果显示必须有高浓度的 EDTA 存在, 以抑制核酸酶活性. 提取缓冲液中如不加 EDTA (IM-I) 而用 8 mmol/L MgCl_2 (IM-II) 代替, 结果只得到 200 kb 的 DNA (图 2). 在制备胶块的过程中亦须注意保持一定浓度的 EDTA.

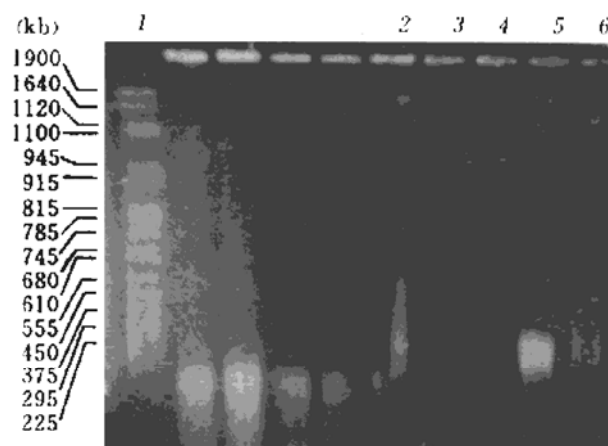


图 2 提取缓冲液中二价阳离子对高分子量 DNA 质量的影响

1: 酵母染色体分子量标记; 2: 未经蔗糖梯度纯化的核 DNA; 3, 4: 用 IM-II 程序制备的核 DNA; 5, 6: 用 IM-I 程序制备的核 DNA.

细胞核在用琼脂糖包埋前, 必须用抽提液洗涤几次, 不能在上蔗糖梯度后直接包埋, 任何微量蔗糖的存在, 均导致制品中 DNA 的严重断裂, 结果只能得到 200 kb 的产物.

蔗糖梯度纯化细胞核这一步主要是除去细胞碎片和释放的内含物. 许多研究者对此进行了仔细的比较, 在所用的离心条件下, 如小麦细胞核不能穿过 2 mol/L 蔗糖垫 (55%)^[8]; 烟草细胞核不能穿过 1.93 mol/L 蔗糖垫^[9]. 叶绿体不能穿过 1.5 mol/L 蔗糖垫 (45%)^[8]; 大豆细胞核可穿过 60% 的蔗糖垫^[3]. 水稻的细胞核 ($\Phi 3 \sim 5 \mu\text{m}$) 比这些植物的核要小^[10], 经过离心后, 虽然大部分在 40%~60% 界面上, 但相当部分可以穿过 60% 蔗糖而沉淀到离心管底, 收集起来仍能制备高分子量的 DNA. 这些结果说明, 通过蔗糖梯度纯化细胞核, 需根据材料的不同, 离心的条件要作适当摸索.

蛋白酶消化时间如用蛋白酶 K (1 g/L) 一般以 50℃ 48 h 为宜, 本程序的一个突出优点是可以用较便宜的蛋白酶 E (2~4 g/L) 37℃ 作用 48 h 来代替, 同样可将高分子量 DNA 从核中释放出来. 为了缩短整个制备过程, 曾尝试 4、8、16、32 h 消化情况, 发现 8 h 处理的效果与 48 h 一样 (图 3).

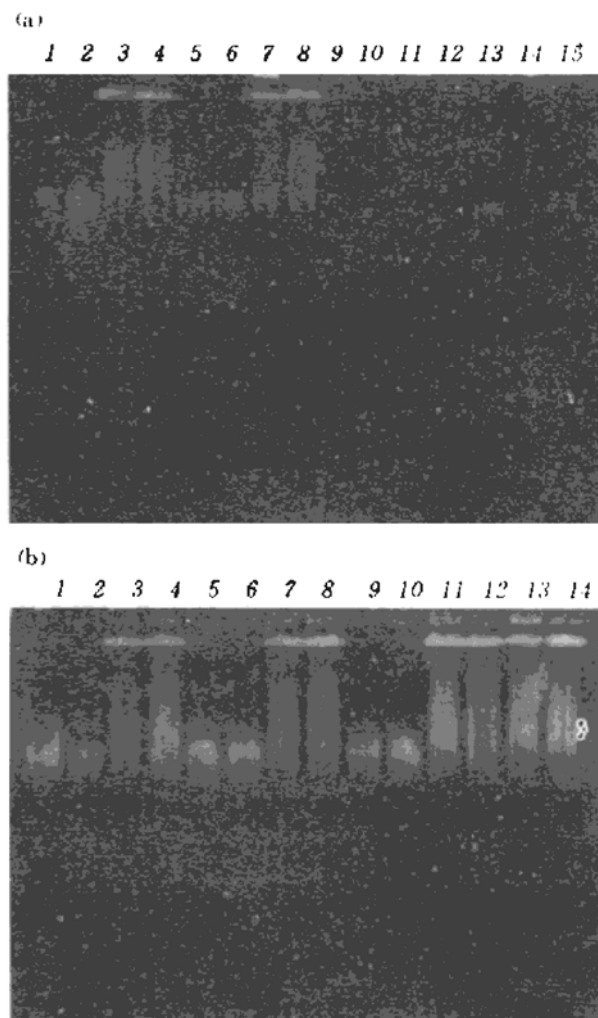


图 3 不同蛋白酶 K 处理时间及 ESP 溶液的不同 pH 值对高分子量 DNA 释放的影响

(a) 1, 2, 5, 6, 13~15: 绿叶作为实验材料; 3, 4, 7, 8, 9~12: 黄化苗作为实验材料; 1, 3, 5, 7: ESP 溶液 pH8.0; 2, 4, 6, 8: ESP 溶液 pH9.5; 1~4: 蛋白酶处理 8 h; 5~8: 蛋白酶处理 16 h; 9~15: 没有 ES 或 ESP 处理. (b) 1~4: 蛋白酶处理 24 h; 5~8: 蛋白酶处理 32 h; 9~12: 蛋白酶处理 48 h; 13, 14: 无蛋白酶 K 的 ES 处理 24 h.

过用绿色叶片作材料, 结果不太理想, 虽然亦曾得到过分子量达到 Mb 级的 DNA 样品, 但大部分都是降解分子 (200 kb), 可能与绿色叶片核膜易破和核酸酶活性高有关. 根据我们经验, 黄化苗不宜生长过长. Hamilton 等^[1]曾用烟草叶片作过测定, DNA 含量与苗长并不成比例, 叶片长 4~5 cm, DNA 含量为 1.64 mg/g; 叶片长 6~7 cm, DNA 含量为 1.52 mg/g; 叶片长 14~16 cm, DNA 含量 0.58 mg/g; 叶片长 20~23 cm, DNA 含量仅为 0.25 mg/g. 因此, 我们的经验是采用 4~8 cm 的水稻黄化苗效果最好.

用本程序获得的 DNA 制品容易被内切酶消化, 5 μ g DNA 经 2 U EcoR I 消化 12 h 便达到完全消化. 0.01~2 U EcoR I 的系列酶浓度消化实验表明, 5 h 可以见到明显的部分消化 (图 4), 10 种内切酶消化的实验结果亦是理想的 (图 5). 说明制备的 DNA 样品质量达到要求. 我们后来用同样的程序, 以苏铁、勾树、李氏禾绿色叶片为材料, 也成功地获得了分子量高达 2 Mb 以上的核 DNA.

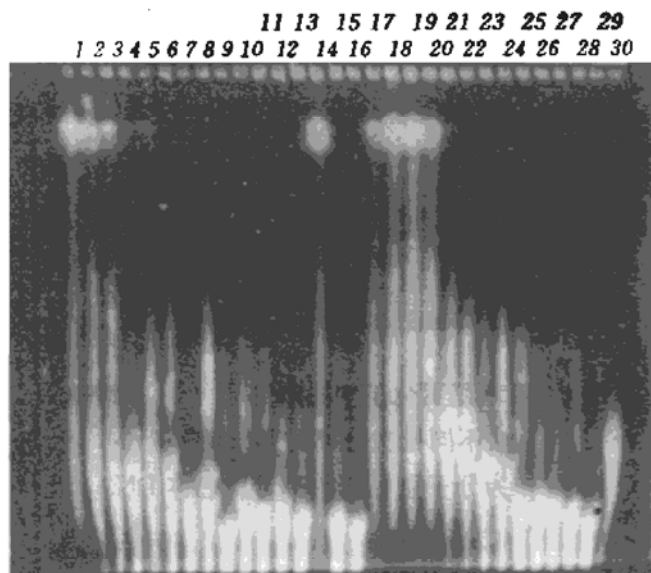


图 4 高分子量 DNA 经 EcoR I 部分消化的情况 1~16: 每 1/8 胶块加 5 U EcoR I, 消化不同时间; 14: 未经预处理的胶块 DNA; 17~30: 每 1/8 胶块用不同的 EcoR I 酶量消化 14 h; 17: 贮存在消化缓冲液中的胶块 DNA.

最后, 关于植物材料的选择, 我们曾比较

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

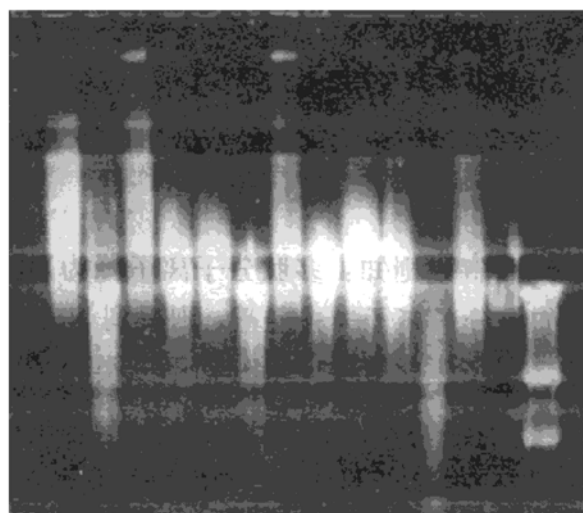


图5 高分子量DNA用不同限制酶消化的情况
1: 酵母染色体; 2: 未消化处理的胶块DNA; 3
~ 13: 用11种不同的内切酶消化的DNA; 14:
λDNA; 15: λDNA/Hind III 分子量标记。每1/6
胶块, 37°C消化3h。

参 考 文 献

- 1 Hamilton R H, Kunsch U, Temperli A. *Anal Biochem*, 1972; **49**: 48
- 2 Willmitzer L. In: Vasil I K ed. *Cell culture and somatic genetics of plants*. Orlando: Academic Press, 1984; **1**: 454
- 3 钟 翎, 李文哲, 刘良式. *生物化学与生物物理进展*, 1992; **19** (5): 352
- 4 Rizzo P J, Pederson K, Cheng J H. *Plant Sci Lett*, 1978; **12**: 133
- 5 Slater R J, Venis M A, Grierson D. *Planta*, 1978; **144**: 89

- 6 孙敬三, 钱迎倩. *植物细胞学研究方法*. 北京: 科学出版社, 1987: 369~371
- 7 Kuethl L Z. *Naturforsch*, 1964; **196**: 525
- 8 Luthe D S, Quatrano R S. *Plant Physiol*, 1980; **65**: 305
- 9 张自立, 俞新大. *植物细胞和体细胞遗传学技术与原理*. 北京: 高等教育出版社, 1990: 320
- 10 Yamaguchi J, Lim P Y, Aratani K *et al.* *Cell Structure and Function (Japan)*, 1992; **17**: 87

Isolation of Megabase DNA from Rice Nuclei.

Wang Chunxin, Xie Yiwu, Liu Liangshi
(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China).

Abstract A convenient and efficient procedure for isolation of rice HMW DNA had been developed. Etiolated seedlings were ground into the fine powder with a pestle and mortar under liquid nitrogen, then extracted with a protective medium. Filtrate was layered on discontinuous sucrose gradient, then the purified nuclei were embeded in agarose gel. After proteinase digestion, the HMW DNA was released. Pulsed-field gel electrophoresis showed that the sample size ranges from 200 kb to 3 Mb and in the majority of 2.2 Mb. Rice YAC library was constructed successfully, using these easily digestable DNA preparation.

Key words rice, Mb DNA, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

序列搜索算法在多肽质谱解析中的应用*

方慧生 相秉仁 安登魁

(中国药科大学分析计算中心, 南京 210009)

摘要 序列搜索算法由三部分组成: 搜索过程、搜索得到多肽的各氨基酸残基的评分及两端(N端、C端)搜索得到的多肽的合并过程。通过若干实际多肽质谱的解析, 结果表明, 该算法对多种序列专一性

*江苏省自然科学基金资助课题。 收稿日期: 1994-08-30, 修回日期: 1995-02-15