

吸收了 DNA 的滤膜,必须先于室温下干燥之后在真空下加热进一步干燥。以避免在干燥过程中滤膜上 DNA 自身复性。干燥过的滤膜与 DNA 结合得更紧,可减少在杂交保温反应过程中从滤膜上失去,杂交后滤膜必须彻底洗去未杂交的探针。

本文承蒙周光宇先生审阅,谨此志谢。

参 考 文 献

- [1] Nygaard, A. P. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **12**, 98, 1963.
- [2] Nygaard, A. P. et al.: *J. Mol. Biol.*, **9**, 125, 1964.
- [3] Gillespie, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, **12**, 829, 1965.

- [4] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 641, 1966.
- [5] Demare, J. L., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **28**, 550, 1967.
- [6] Dawid, L. B.: *Biochem. Biophys. Acta*, **477**, 191, 1977.
- [7] Kourilsky, P. et al.: *Biochimie* **53**, 1111, 1971.
- [8] Warnaar, S. O. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, 555, 1966.
- [9] Rioharel, O. C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **57**, 156, 1967.
- [10] Flavell, R. A., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 535, 1974.
- [11] Wetmur, J. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **31**, 349, 1968.
- [12] Flavell, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 545, 1974.

[本文于 1981 年 7 月 2 日收到]

*PEI-纤维素薄层层析法在分离单核苷酸上的应用

吴冠芸 方福德 杨善蓉

(中国医学科学院基础医学研究所生化及分子生物学研究室)

碱基、核苷和核苷酸的分离及定量分析在核酸代谢、核酸结构和药物作用原理的研究中以及核苷酸(包括标记物)的制备,纯化和鉴定等方面都十分重要。但是对于象 NDP, NTP, dNDP、dNTP 的复杂混合物的分离,用纸层、柱层、电泳等方法均有一定困难。应用高压液相层析虽能得到满意的分离效率,但所需的仪器价格昂贵,设备条件要求严格,一般实验室难以具备。因此到目前为止,PEI*-纤维素薄层层析法^[1,2],分离这样复杂核苷酸的混合物仍是公认的理想方法。关于该法的建立和应用,国内尚未见专文报道。我们在研究药物对细胞核苷酸代谢的影响的工作中,建立了本方法,并在原法基础上,摸索了一些更适宜的条件,还就国产微晶纤维素和进口纤维素对层析效果的影响做了对比,提出了使用国产纤维素的方法。

材 料 和 方 法

1. 材料和试剂

(1) 纤维素: Cellulosepuler MN 300, 西德

产品;薄层用微晶纤维素:上海试剂二厂产品和中国科学院生物物理所试剂厂产品,使用前需经预处理,方法是:100 ml 0.1 N HCl 浸泡 20 g 纤维素 1 小时,倾去上清,弃去残渣,用蒸馏水将纤维素洗至中性再使用。

(2) PEI: Polymin P 含量 100% BASF (西德)产品。

Polymin P 50% 水溶液 SERVA (西德)产品。

(3) PEI-Cellulose 分析纯 SERVA (西德)产品。

(4) 核苷酸(钠盐): ATP、ADP、AMP 为上海生化所东风试剂厂产品,其它均为西德 SERVA 产品。

(5) 溶剂系统所用试剂均为分析纯。

2. PEI-纤维素薄层板的制备

1 g 100% PEI 加水至 100 ml, 用浓 HCl 数

* PEI: 聚乙烯亚胺。

滴调 pH 至 6.0, 称取 15 g 纤维素悬浮于 100 ml 1% PEI-HCl 中, 电搅拌器匀浆 1 分钟, 11—13 ml 悬液可铺 10 × 20 cm 的玻璃板一块。悬液用玻棒轻轻滚动铺开, 自然凉干, 干板厚度约为 0.2 mm。薄板避光低温存放, 不要暴露于有紫外吸收物质(如吡啶等)的空气中, 一般不超过二周。

3. 点样、层析、洗脱

(1) 点样: 边点边用冷风吹干, 点直径 <2—3 mm。点样量 <20 μg/每点, 点与点的间隔至少为 2 cm。

(2) 层析: 薄板放入层析缸上行层析。溶剂高度为 0.7—1.2 cm, 缸内不需溶剂蒸气饱和, 薄层也不必预平衡。若为双向层析, 在第一向层析完毕后, 把不参加第二向层析的前沿刮去, 放入 500—800 ml 无水甲醇中漂洗 15 分钟。以除去板上的溶剂, 转 90°, 作第二向层析。若为连续分步层析, 可换 2—3 个浓度递增的电解质溶液连续进行层析, 不需中间干燥, 不改变层析方向。

(3) 定量分析: 采用直接洗脱法, 层析板先在 254 nm 紫外灯下显迹, 层析点用 20 μl 蒸馏水浸湿, 刮到试管内, 用 1 ml 或 3 ml 1.6 M LiCl 浸泡 2 小时, 离心, 吸取上清液, 用紫外分光光度计测 260 nm 波长下的光密度值, 以空白区域的纤维素作为空白对照样品。

4. 核苷酸的同形层析和放射自显影

按照本实验室的方法^[3]使 ³H-TdR 掺入艾氏腹水癌细胞, 然后用 0.5 N HClO₄ 抽提细胞的酸溶部分与非放射性标准品同时层析, 以非放射性样品指示定位, 放射性点刮取后用非均相法测量放射性脉冲数, 闪烁液组成为: 每升甲苯含 PPO 3 g、POPOP 0.3 g。层析板的放射自显影按文献^[4,5]加以改变: 在 7% PPO-丙酮溶液中, 样品(已分离好的)样品薄层板再上行扩展, 使薄层均匀充满 PPO。再将此薄层板与 X 光胶片紧贴在一起, 用双层黑纸及塑料膜包扎好, 置 -70℃—-80℃ 曝光一周, 常规冲洗后即得放射自显影图谱。

结 果

1. 具有相同碱基、不同磷酸基数目的核苷酸的单向分离

常用溶剂系统为 LiCl, 图 1 为 AMP、ADP、ATP 的单向层析结果, 1 小时以内即可完全分离。若用 1.6 M LiCl 与 2 N 甲酸等体积混匀 (pH2) 作为推进剂, ADP 与 ATP 之间的距离可加大, 分离更好。TdR、TMP、TDP、TTP 的分离可用 0.25 M—0.75 M LiCl 分步连续层析完成, 若用上海纤维素薄层板可以 0.25 M—0.75 M—1.0 M LiCl 进行层析, 获得同样的分离效果。

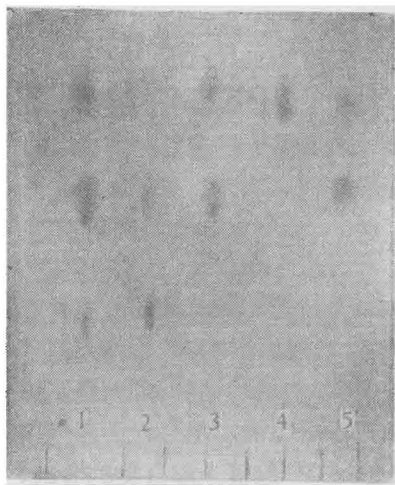


图 1 具有不同磷酸基数目、相同碱基的核苷酸的单向层析

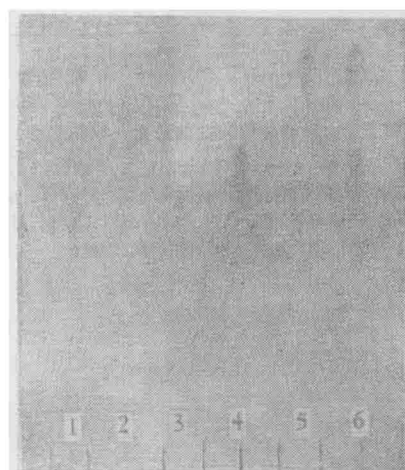
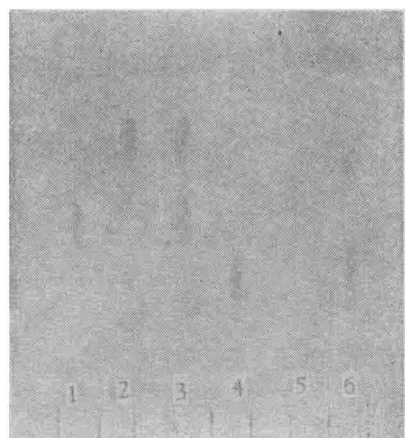
溶剂系统: 1.0 M LiCl (pH 6.0) 层析时间 1 小时。上样量: 4—6 μg/每个样品 样品: 1. ATP, ADP, AMP; 2. ATP, ADP; 3. ADP, AMP; 4. AMP; 5. ADP, AMP

2. 具有相同碱基的核糖核苷三磷酸和脱氧核糖核苷三磷酸的单向分离

核苷三磷酸具有 α-顺乙二醇结构, 可以与硼酸形成复合物, 添加一酸性基团, 增加负电性。而脱氧核苷三磷酸由于在核糖 2' 位上缺氧原子, 不能与硼酸形成复合物, 故 R_f 值较核糖核苷酸为高^[6]。这两类核苷酸用硼酸饱和的 LiCl (NH₄OH 调 pH 至 7.0) 溶剂系统单向层析来分离, 可获得满意结果 (图 2)。

3. 具有不同碱基的核糖核苷三磷酸的分离

当核苷酸具有相同的磷酸基数目时, 负电



b

图2 脱氧核糖核苷三磷酸与核糖核苷三磷酸的单向层析

A. 嘌呤类核苷酸的分离 1. ATP; 2. dATP; 3. ATP, dATP; 4. GTP; 5. dGTP, dGDP; 6. GTP, dGTP, dGDP。B. 嘧啶类核苷酸的分离 1. CTP; 2. dCTP; 3. CTP, dCTP; 4. UTP, UDP; 5. TTP; 6. UTP, TTP。溶剂系统: 1.0 M LiCl-饱和硼酸 (pH 7.0) 层析时间: 1小时

性的差异取决于碱基。图3为上海纤维素制的薄层板, 用 0.5 M-0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 连续分步层析, 分离四种核苷三磷酸, R_f 值的顺序是 $\text{UTP} > \text{CTP} > \text{ATP} > \text{GTP}$ 。

4. 嘌呤类核苷酸和嘧啶类核苷酸的双向层析

当样品含有多种单核苷酸时, 须用双向层析才能将其完全分离。例如分离嘌呤类或嘧啶类的四种核苷三磷酸, 可以采用如下的溶剂系统: 第一向以 1.0 M LiCl (饱和以硼酸 pH 7.0) 为推进剂, 第二向以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为推进剂, 嘌呤

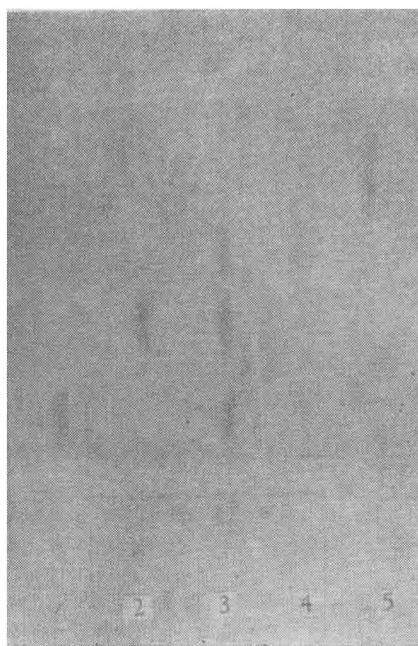


图3 具有不同碱基的核苷三磷酸的分离

溶剂系统: 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (7cm)-0.7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 cm) 层析时间: 30 分钟上样量 4-6/每个样品样品: 1. GTP; 2. ATP; 3. GTP, ATP, CTP, UTP; 4. CTP; 5. UTP

类可用 0.5 M-0.7 M, 分步层析, 嘧啶类则应降低为 0.3 M-0.5 M。分离结果见图4、图5。

5. 核苷酸的同形层析及放射自显影

实验表明, 艾氏腹水癌细胞酸溶部分含 ^3H 标记的 TdR、TMP、TDP、TTP 与这四种非标记的标准品混合物一起层析后, 其放射自显影图谱与紫外显迹图谱完全重合 (图6)。

放射自显影图谱上曝光点周围的虚线是紫外显迹时划出的定位标记, 由于掺入的 ^3H -TdR 有 80% 转化成 ^3H -TTP, 12% 转化成 ^3H -TDP, 所以 ^3H -TdR、 ^3H -TMP 位置显影很弱, 看不清。

6. 单核苷酸定量测定的回收率

对八种非标记的核苷三磷酸的测定表明, 本法的回收率为 90% 左右。

^3H 标记的核苷酸 ^3H -dATP 和 ^3H -TTP 的单向回收率分别为 $90.5 \pm 3.6\%$ 和 $88.6 \pm 2.1\%$ 。将标记的 ^3H -TTP 与非标记的艾氏腹水癌细胞抽提液混合后同时层析, 测得回收率为 89.3%, 若用标记的 ^3H -TTP 样品与 ^3H -TdR

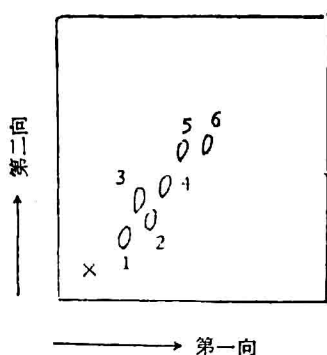
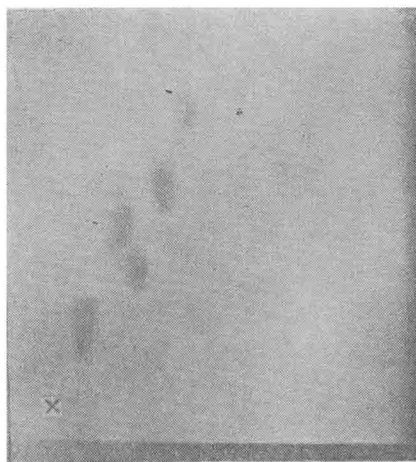


图 4 六种嘧啶核苷酸的分离 (双向层析)

溶剂系统: 第一向 1.0 M LiCl-饱和硼酸(pH 7.0);
第二向: 0.5 M (NH₄)₂SO₄(5cm)-0.7 M (NH₄)₂SO₄(15cm); 样品: 1. GTP; 2. dGTP; 3. ATP; 4. dATP; 5. ADP; 6. dADP

表 1 八种核苷三磷酸的 PEI-纤维素薄层层析的回收率(%)*

	样品	ATP	dATP	GTP	dGTP	CTP	dCTP	UTP	TTP
单 向	平均值	91.1	89.4	91.3	88.5	93.8	87.7	86.7	90.6
	标准差	0.8	0.7	2.3	1.1	4.1	5.2	3.0	1.9
双 向	平均值	88.8	87.9	93.1	92.7	95.1	87.9	90.8	86.8
	标准差	5.5	4.6	0.9	3.9	2.1	3.9	1.5	2.6

* 三次实验的平均值,使用西德产纤维素制板

掺入艾氏腹水癌细胞后的抽提液同时层析,测得³H-TTP 的回收率为 86.9%。

PEI-纤维素(国产)单向薄层层析的回收率也可达 90%,但双向层析的回收率不太稳定。

讨 论

为了得到较好的分离效果,首先必须制作理想的薄层板。须注意两个重要因素: 1. PEI

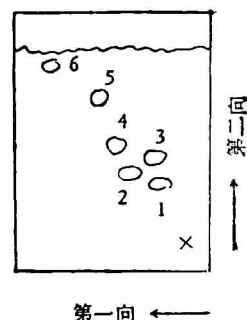


图 5 六种嘧啶核苷酸的分离 (双向层析)

溶剂系统: 第一向 1.0 M LiCl-饱和硼酸(pH 7.0);
第二向: 0.3 M (NH₄)₂SO₄(5cm)-0.5 M (NH₄)₂SO₄(15cm); 样品: 1. CTP, 2. dCTP, 3. UTP, 4. TTP, 5. UDP, 6. UMP

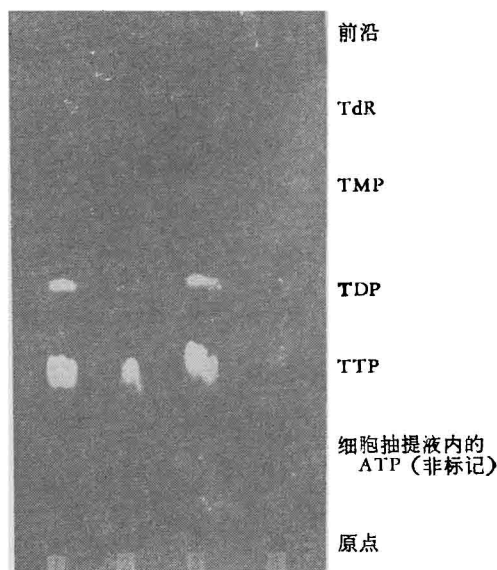


图 6 ³H-TdR 掺入艾氏腹水癌细胞抽液部分抽提液单向层析放射自显影图谱

样品 1, 3: 加标记的生物样品抽提液 50 μl, 样品 2: 加标记的生物样品抽提液 25 μl, 以上样品同时加入非标记的 TdR, TMP, TDP 和 TTP。4: 非标记的 TdR、TMP、TDP、TTP

的性能: 不同厂家生产的 PEI 由于交换能力不同, 各自的最适层析条件需要摸索。例如西德

SERVA 生产的 PEI-纤维素成品分离各胸腺嘧啶核苷酸的最适扩展条件为 0.1 M LiCl (5cm)–0.5 M LiCl (15cm), 而用 BASF 生产的 100% Polymix P 与 MN 300 纤维素新鲜制作的薄层来分离时, LiCl 的浓度在 0.25 M–0.75 M 范围内效果最好。2. 纤维素的性能: 纤维素的吸水性, 粘着性关系到薄层的机械强度, 它的纯净均匀性则直接可影响到层析的分离效果。我们所用的国产纤维素在上述性能方面比西德产品差, 因此必须经预处理后方能使用。由于国产纤维素铺的薄层机械强度较差, 一般用于单向分离比较满意, 用于双向层析效果不太稳定。

从不同核苷酸组合的单向或双向层析分离图谱来看, 该法重演性好, 所需时间短, 适用于复杂核苷酸混合物的微量分析, 回收率为 90% 左右, 虽比文献报道者^[1]略低, 但尚属满意。本法若与标记技术相结合, 对生物样品中游离核

苷酸进行分离测定, 灵敏度可大大提高。此外, 在同位素示踪实验中, 许多标记途径是已知的或可以控制的, 这样嘌呤类核苷酸衍生物和嘧啶类核苷酸衍生物可分别层析, 即可简化样品的复杂性, 又可保证得到更大的分离效果。

参 考 文 献

- [1] Randerath, K., in "Methods in Enzymology" Vol. 12 part A, 323 (Lawrence, G. & Kiwi Molaave eds. 1967).
- [2] Hans, J. Graw, in "Methods in Cancer Research" Vol. 3, 303, (Harris Busch eds. 1967).
- [3] 吴冠芸等, 《中国医学科学院学报》1980年, 2 卷, 2 期, 81 页。
- [4] Randerath, K., *Anal. Biochem.*, **34**, 188, 1970.
- [5] Ronald, A. L. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **56**: 351, 1975.
- [6] Joseph, X. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **15**: 139, 1954.

[本文于 1981 年 8 月 6 日收到]

单链核酸分子的电镜制样技术

戴培桦 钱 力 徐有成*

(中国科学院上海生物化学研究所)

单链核酸分子比双链核酸分子细得多, 也更柔软, 在电镜下呈现曲曲弯弯的细线状, 不象双链分子那样具有刚性, 两者很易区别。

电镜直接观察单链核酸分子有非常广泛的用途, 有关生物的进化, 核酸的结构和功能及遗传工程的研究都要用到它, 因此单链核酸分子的电镜制样技术是分子生物学的基本技术之一。由于单链核酸分子的电镜制样技术比双链分子更易受各种因素的影响, 因此对每一操作步骤, 必须十分严格, 不然往往会导致失败。我们在前文^[1]中已介绍过双链核酸分子的各种制样技术, 用水溶液方法可观察到双链核酸分子。Ferguson^[2] 等人用水溶液方法, 不能使单链 λ DNA 分子伸展而呈树丛状, 用甲酰胺溶液方法

虽能使它伸展, 但必须在展开液中保持一定浓度的甲酰胺和盐, 在 10% 甲酰胺中, 单链 DNA 还是呈树丛状, 在 40% 甲酰胺中才伸展呈弯曲的细丝。

从西德进口分装的或上海试剂总厂(第三分厂)生产的甲酰胺可不必经过任何预处理直接使用。

细胞色素 c 的质量很重要, 国外常用马血清及马心制备的细胞色素 c。我们使用江苏如皋肉联厂的产品, 效果也可以。

为了获得清晰的电镜照片, 室温最好在 20℃–25℃ 左右。细胞色素 c 由于是生物制

* 本文承李载平教授仔细审阅, 敖世洲同志提供材料和帮助, 特此致谢。