

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-Molaeve 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

* 本文承李贻平教授仔细审阅, 敖世洲同志提供材料和帮助, 特此致谢。

品常有少量不溶性杂质,因此配成的溶液必须用超滤膜(0.45μ)过滤。最后浓度 1 mg/ml 的溶液,置于 0°C — 5°C 保存。容器若事先经过消毒处理,溶液可长期保持透明,不长霉可用几年之久。细胞色素 c 的浓度可用分光光度计校正, 1 mg/ml 溶液的吸光值 A_{410} 约为10。

染色液醋酸双氧铀($500\mu\text{M/ml}$)呈淡黄色溶液,必须用超滤膜处理,它具有一定的放射性,但对人体的危害并不大。

展开液^[2]中含有 $\text{DNA } 1\text{--}2\mu\text{g/ml}$,细胞色素 c 0.05 mg/ml , 0.1 M Tris-HCl ($\text{pH } 8.5$), $10\text{ m M Na}_3\text{EDTA}$ ($\text{pH } 8.5$)和 50% 甲酰胺。(配成后只能用 $1\text{--}2$ 小时。)

下相溶液中含 $10\text{--}20\%$ 甲酰胺、 10 m M Tris-HCl ($\text{pH } 8.5$) $1\text{ m M Na}_3\text{EDTA}$ 。(临用前配制)

我们用以下两种方法来展开单分子膜:

1. 斜面展开法:在直径9厘米的清洁培养皿中斜放一载玻片,注入下相溶液,用直径9厘米,深0.5厘米的聚四氟乙烯板来代替培养皿,因为聚四氟乙烯不能为水溶液所浸润,表面张力使下相溶液鼓起,而使蛋白单分子层展开得比较好,待溶液静止后,即可用50微升微量注射器在水面上方约0.5厘米处的载玻片上慢慢地滴加 $10\text{--}25$ 微升展开液。展开液在下相溶液上展开时把滑石粉推向盘的四周,中间露出一块没有任何颗粒的蛋白单分子层区,当最初的几微升展开液在下相液上展开后,若没有后继的展开液加入,有时可以观察到展开的单分子层又有往回缩的现象,因此应该慢慢地不断地滴加展开液。当展开液充分展开,细胞色素 c 在界面上变性后,膜就比较稳定了。30秒到1分钟后就可用覆盖有火棉胶并经真空喷碳强化的铜网与单分子膜接触。一般在载玻片和溶液界面 1 cm 左右的地方取样。取样后应有半球状小水珠附在铜网上,如无小水珠或只有很小的水珠沾在铜网上,这片铜网就应作废。

将沾有小水珠的铜网在 $\text{UO}_2\text{AC } 50\mu\text{M/ml}$ 95% 酒精中浸 $1\text{--}2$ 分钟染色,对增加单链核酸分子的反差有明显好处,然后在 $95\%\text{--}100\%$

酒精中漂洗15秒钟左右,放在滤纸上,注意吸有核酸分子样品的一面保持向上,为了保持样品的顺序不变,可以用双面胶纸,使铜网轻轻沾住,等酒精蒸发后放在真空喷涂仪的旋转台上,并调整旋转台速度30转/分。

钨丝可做成鸟巢状或直线状,每次喷涂用5厘米长($\varnothing 0.1$ 毫米)Pt-Ir铂铱合金丝已足够,喷涂粒子的粗细、投影角的大小以 $7^{\circ}\text{--}9^{\circ}$ 为宜、加热电流的大小、升温速度等条件需要在同一台仪器上经过多次实践才能充分掌握。电流先开到 10 A 、15秒钟、然后逐渐加大到 40 A ,至铂铱丝熔完即关电流。

我们用日本JEE-4x真空镀膜机投影,JEM-100cx电子显微镜观察、照相。

我们应用斜面展开法观察了 λ DNA和 $\text{Plac } 5\lambda$ DNA变性后复性得到的一个部分异源双链分子^[2],在它的中间 $2/3$ P位有一个单链环,这是由于这P位 λ DNA的碱基中插入lac基因的结果,见图1。

又观察了环状双链质粒pBR 322 DNA用乙二醛变性后的形态。在一个pBR 322 DNA分子里可以看到若干双链区松散后形成的单链小泡。见图2。

2. 玻棒展开法^[3] 在Iuman RB方法的基

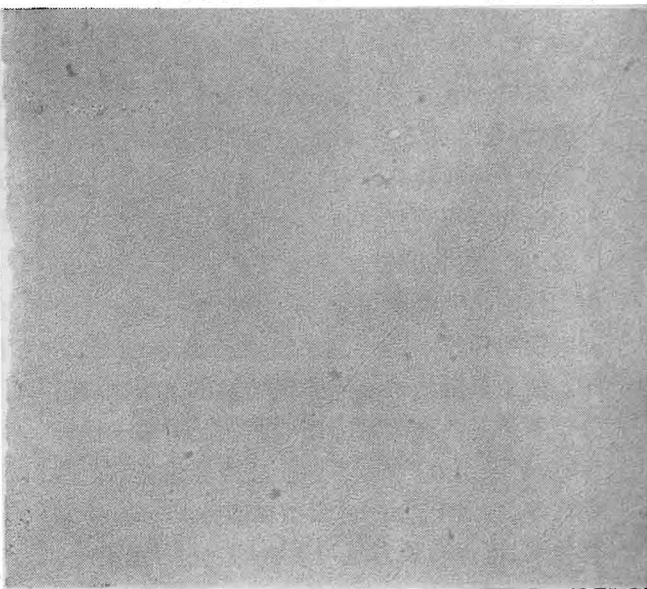


图1 λ DNA 和 $\text{Plac } 5\lambda$ DNA 变性后复性得到的
一个部分异源双链分子 $\times 15,000$ 倍(斜面展开法)

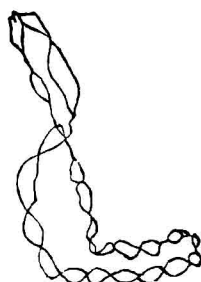
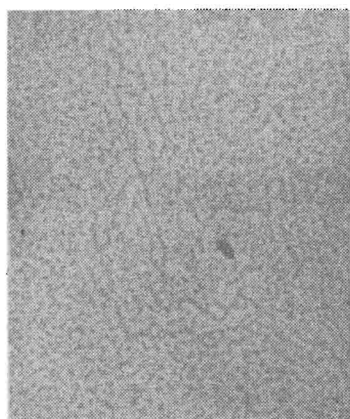


图 2 pBR 322 质粒用乙二醇变性后得到电镜图
×40,000 (斜面展开法)

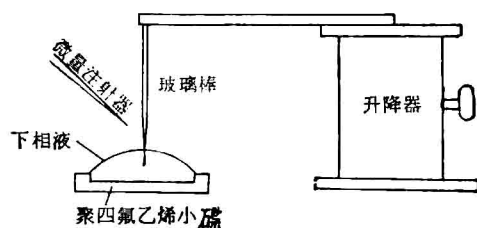


图 3 玻棒展开法示意图

础上作了一些改进,因而操作更为简便。

先把内径 13 mm, 高 1 mm 的聚四氟乙烯小碟, 和直径 3 mm 的玻棒和升降器按图 3 的方式装好。

将 1.3 毫升下相液沿玻棒加入小碟、聚四

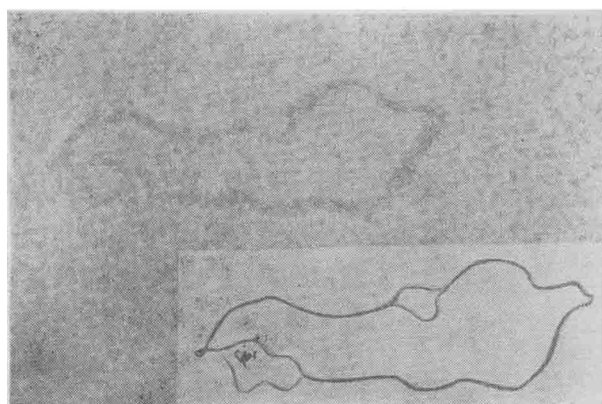


图 4 pBR 322 质粒经乙二醇变性后的形态
×10 万倍(玻棒展开法)

氟乙烯作成的小碟可使液面向上高高鼓起, 有利于样品的展开。待液面稳定后, 沿液面上 1—2 mm 的玻棒处用微量注射器慢慢加 5 微升展开液, 用升降器将玻棒慢慢提出液面, 1 分钟后即可用火棉胶-碳膜铜网取样。一般一次操作可在不同部位取二个样, 然后染色、投影同前述。

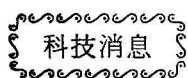
展开液和下相液与前述方法相同, 但此法消耗的溶液远小于斜面展开法, 因而可大大节省样品。

我们应用玻棒展开法观察了 pBR 322 DNA 变性后的状态, 可以看到环状双链 DNA 中有部分由单链 DNA 组成的小泡, 见图 4。

参 考 文 献

- [1] 徐有成等:《生物化学与生物物理进展》1975年, 2期, 9 页。
- [2] Ferguson, J. et al.: Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy II, 123—171 Koehler J. K. (ed), 1978.
- [3] Iuman R. B. et al. J. Mol. Biol. 49, 93—98, 1970.

[本文于 1981 年 5 月 13 日收到]



科技消息

光电转换的新模型

澳大利亚国立大学的 R. Payne 及 J. Howard 提出了关于眼睛接受光脉冲后转换成神经电脉冲的模

型。一个视紫红质分子吸收了一个光子后引起释放化学递体, 从而导致光照后膜电位变化有关的离子通道的启或闭(不同动物不同反应)。化学递体的浓度缓慢上升激发膜通道达到阈值水平。

摘自 Chem. Eng. News,
59(15): 25, 1981