

(图 5) 拟合较好。可见在加 Ca^{2+} 后实际上形成了 Ca^{2+} 与 CL 的复合物, 因而在实验中除 CL 为 0mol% 与 100mol% 处以外, 是一个由 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 与 DMPC/ $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 所组成的两相体系。

整个实验都在 CL 与 DMPC 的相变温度以上进行, 因此实验本身说明在液态体系存在着液-液不可混合性, 即有相分离现象。

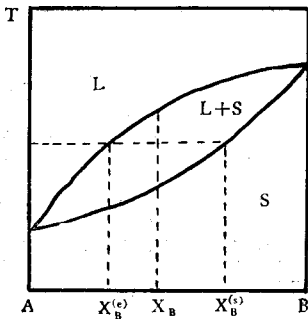


图 6 两相体系的固-液相图

附 录

设 A 与 B 组成两相体系, 以纵轴为绝对温度 T , 横轴为 A 与 B 所占克分子比 X_A 与 X_B , X_A 由左向右递增, X_B 由左向右递减。常见的相变为固相 (s) 与液相 (l) 之间的转变, 则相图如图(6)所示。设

N = 样品中 A、B 分子之总数

则

$$\begin{aligned} X_B &= \frac{B \text{ 分子数}}{N} \\ &= \frac{\text{处于液相的 } B \text{ 分子数} + \text{处于固相的 } B \text{ 分子数}}{N} \\ &= \frac{f^{(l)}NX_B^{(l)} + f^{(s)}NX_B^{(s)}}{N} \end{aligned}$$

由于

$$f^{(l)} + f^{(s)} = 1,$$

故

$$\begin{aligned} X_B &= f^{(l)}X_B^{(l)} + (1 - f^{(l)})X_B^{(s)} \\ \therefore f^{(l)} &= \frac{X_B^{(s)} - X_B}{X_B^{(s)} - X_B^{(l)}} \end{aligned}$$

将上式写成更为普遍的形式, 即以 i, j 代替上式中的 l 与 s 即得(1)式:

$$f^{(i)} = \frac{X_B^{(j)} - X_B}{X_B^{(j)} - X_B^{(i)}}$$

参 考 文 献

- [1] Shimshick, E. J. et al.: *Biochemistry*, 12, 2531, 1973.
- [2] Luna, E. J. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 470, 306, 1977.
- [3] Mabrey, S. et al.: *Biochemistry*, 17, 2464, 1978.
- [4] Melchior, D. L. et al.: *Progress in Surface and Membrane Science*, Vol. 13, 211, (Academic press, New York) 1979.
- [5] De Kruijff, B. et al.: *International Cell Biology*, 559, 1980.
- [6] Cullis, P. R. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 559, 399, 1979.

[本文于1982年11月29日收到]

Northern 转移与人珠蛋白 mRNA 的探测

吴冠芸 沈 岩 王申五

(中国医学科学院基础医学研究所)

组织中某种特异 mRNA 的探测, 对于该基因的转录活性, 以及它的表达与调控等方面的研究具有重要意义。如果我们已经制得了某种特异的基因探针, 欲使它探测组织中特异的 mRNA, 目前, 多采用液相分子杂交法, 也有用固相膜分子杂交法的报道^[1]。后者, 即将 mRNA 分离后用化学法把它结合到重氮化纤维素纸膜上, 然后与探针进行 DNA-RNA 分子杂交。由

于 Southern 转移法^[2]是将 DNA 片断分离变性后直接吸附在硝酸纤维素膜上, 而这种纸膜吸附 RNA 的能力很低, 它只适于 DNA-DNA 的分子杂交, 因此, 人们将上述 RNA-DNA 的膜上杂交法称为 Northern 转移法。

McMaster 等人^[3]建立了使 DNA 和 RNA 变性后, 经电泳分离测定其分子量的方法。此法不但可以在同一胶板上同时分析天然的和变

性的 DNA 和 RNA 的分子量,而且用吡啶橙染色后还可以将单链(显红色)与双链(显绿色)核酸区别开来。进而,Thomas 等人^[4]使用了这一方法,将 RNA 以乙二醛-二甲亚砷变性并以琼脂糖凝胶电泳分离后,将变性的 RNA 直接转移到硝酸纤维素膜上获得成功,从而 Northern 转移法又从化学结合转移发展为直接转移,这就进一步简化了 RNA 的直接探测技术。

血红蛋白 H 病的病因,据目前的了解,其 α 珠蛋白肽链合成的降低主要是由于 α 基因的缺失所致。其结果会导致 α -珠蛋白 mRNA 的合成减少^[5],从而使 α -珠蛋白肽链合成降低。为了直接了解血红蛋白 H 病的珠蛋白 mRNA 水平,我们应用 McMaster 的电泳法,对人肝 mRNA 及人血总 RNA 进行了分析,同时分析了血红蛋白 H 病人血总 RNA。从而从 Thomas 的 Northern 转移法探测了人珠蛋白 mRNA。

材料与方法

一、人血总 RNA 的制备 以新生儿 ABO 血型不配的换血标本制备人血总 RNA,其血中网织红细胞在 5% 以上。血红蛋白 H 病病人血细胞 30ml,其中网织红细胞含量为 9%,HbH 18%。按本室方法^[6]制备总 RNA。30ml 病人血细胞得总 RNA 约 1.3mg。制备后皆溶于无菌去离子水中,分装,于液氮中保存。

二、核酸电泳分析 RNA 及 DNA 的乙二醛-二甲亚砷(DMSO)变性处理按 McMaster^[3]法进行。变性后以 1.5% 琼脂糖行竖板电泳^[6]。乙二醛的浓度,按 Canizaro 法测定^[7]。电泳条件: 80V, 14mA, 室温, 2 小时。分子量标准物: pUB 110DNA/Hpa II 片断,各片断碱基对数为 2950, 750, 625, 175^[8]。

三、珠蛋白基因探针的制备 α 珠蛋白基因组克隆菌株(含 pRB α_1 质粒)由 Maniatis 赠送^[9]。质粒 DNA 的提取: 以碱变性法^[10]溶菌后除去染色体 DNA,然后再经 HA 柱法^[11]去除 RNA。含 α 基因的 DNA 片断的制备: 由 pRB α_1 质粒 DNA 中制备含完整 α -珠蛋白基因的 1.52Kb DNA 片断,按本室方法^[12]进行。

缺口翻译^[13]: 由 ^{32}P 标记上述 1.52Kb DNA 片断,做为 α -珠蛋白基因的探针。其反应条件是: 在 30 μl 反应体系中含 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP 40 μCi , $\alpha^{32}\text{P}$ -TTP 40 μCi , dATP 20 μM , dGTP 20 μM , Tris-HCl, pH7.5, 50mM, MgCl_2 5mM, 2-EtSH 10mM, 牛血清白蛋白(Serva) 3 μg , DNaseI 5 μg , 待标记 DNA 片断 0.5 μg , 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 2-5 单位。标记后以蛋白酶 K 处理^[9]过 Sephadex G50 回收标记大分子峰,低温保存。

四、Northern 转移与分子杂交 人血总 RNA 经乙二醛-DMSO 变性电泳分离后按 Southern^[2] 方法直接转移到硝酸纤维素膜(西德 S&S)上。转移前不必经碱变性处理^[4]。转移后于负压下(60mmHg) 80 $^{\circ}\text{C}$, 2 小时烘干。预杂交: 将吸附了 RNA 的硝酸纤维素膜放入分子杂交池(内径 $\phi 33\text{mm}$, 外径 $\phi 40\text{mm}$, 高 70mm 的环形玻璃槽),加预杂交液[50% 甲酰胺(去离子), 5 $\times$ SSC, 50mM Na-PO $_4$ pH6.5, 鲑精 DNA 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 Denhardt 液*]浸没纸膜于 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。杂交: 倒去预杂交液,加入 4/5 体积的预杂交液及 1/5 体积的 50% 葡聚糖硫酸酯,加 ^{32}P 标记的探针(10 8 dpm/ μg) 42 $^{\circ}\text{C}$, 20 小时。杂交后以 2 $\times$ SSC/0.1% SDS 室温 5 分钟洗 4 次。0.1 $\times$ SSC/0.1% SDS, 50 $^{\circ}\text{C}$, 15 分钟洗两次。在红外灯下烤干。包以医用 X-光片于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3-7 天后显影。

实验结果与讨论

一、RNA 的变性及电泳分析

使用 RNA 变性-琼脂糖凝胶电泳分析有两个目的: 1. 通过电泳测定 RNA 分子量,证明在人血总 RNA 中含有珠蛋白 mRNA。核酸的电泳行为与其分子量及其构型有关。若以变性剂消除其二,三级结构的影响,即可得到核酸泳动度与其分子量的函数关系^[3]。不同种类的 RNA 的构型也有很大差异,不同于线性双链 DNA 那样基本一致的构型,必须在完全变性的条件下才能得出比较准确的结果。2. 将分离的

* Denhardt 液-牛血清白蛋白,聚蔗糖,聚乙烯吡咯烷酮各 0.02%。

RNA 转移到硝酸纤维素膜上,以便与探针进行分子杂交,对人珠蛋白 mRNA 做进一步分析。实现这一转移, RNA 的完全变性是必要的条件。为此,我们首先以人血总 RNA 为材料,对变性条件做了一些研究。

人血总 RNA,以不同条件变性后的电泳分析结果见图 1(见封 3),表明(1)天然的 RNA 泳动最快,吡啶橙染色呈桔红色(红与黄绿相间);(2)以二甲亚砜变性的 RNA 泳动相对变慢,染色基本同天然 RNA,说明它对 RNA 的变性作用不完全;(3)以乙二醇变性的 RNA 泳动最慢,吡啶橙染色呈暗红色;(4)以乙二醇加二甲亚砜变性的结果与单纯乙二醇变性同。说明 0.5M 乙二醇变性可达完全,再加二甲亚砜,其泳动度不再变化。但后者分离的区带较为清晰,可以保证变性完全。一般我们采用 0.5M—1M 乙二醇,二甲亚砜最多至 50%。

用酚抽提法制备的 RNA,常常出现聚合现象,加入 DMSO 可以消除这一影响^[4]。从图

1 可以看出,不加 DMSO 处理的电泳区带都有一条泳动度最慢的 RNA 聚合物(图 1①③ 见封 3),而加入 DMSO 处理后,该区带消失(图 1②④见封 3)。

按上述 RNA 变性条件,人血总 RNA 经 1.5% 琼脂糖电泳分离及其主要区带的 RNA 的分子量测定见图 2。这些 RNA 的分子量测定最初采用大肠杆菌 16S、23S、4S 为标准,但它的稳定性较差尤其是 16S、23S 容易降解成小片断^[6]。现在改用 λ DNA 或 pUB 110DNA。经一定的限制性内切酶降解后,在同类变性条件下电泳,作为单链核酸分子量的标准物,得到了满意的结果。以 DNA 片断作为分子量标准时,由于 DNA 已变性为单链它所具有的分子量应为双链 DNA 片断的一半。这样测得 RNA 的分子量分别是:28S RNA 1.73×10^6 18S RNA 0.66×10^6 , 9S RNA 0.22×10^6 及一条区带较宽的小分子 RNA,相当于 5.8S~4S。由于它的分子量小,故不适于在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

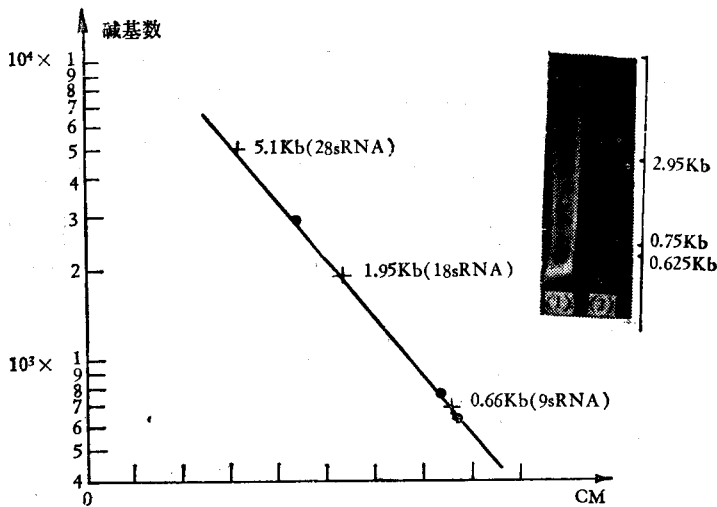


图 2 人血 RNA 分子量测定

(1) 被测人血 RNA (×) (2) pUB 110 DNA/Hpa II 水解片断(●)

上分离测定^[3]。

二、人血 RNA 的 Northern 转移

人血 RNA 经上述变性电泳分离后,不再经任何处理,可直接将 RNA 区带转移到硝酸纤维素膜上去。转移后的硝酸纤维素膜,以甲烯蓝染色,出现与电泳区带相对应的四条主要

区带。而转移后的琼脂糖凝胶电泳板,即使以比较敏感的吡啶橙染色,也未见到任何区带残留。说明这种变性 RNA 的直接转移是完全的(图 3 见封 3)。因而转移至硝酸纤维素膜上的 RNA 区带,可以进一步做分子杂交的探测。

三、人珠蛋白 mRNA 的探测

上述转移到硝酸纤维素膜上的人血总 RNA 与缺口翻译标记的人 α 珠蛋白基因组克隆 DNA 1.52Kb *pst*I 片断进行分子杂交。放射自显影后, RNA 的四条主要区带中只有第三条,相当于 9S RNA 的电泳区带显影,即它是杂交区带(图 4 见封 3),说明该区带中有 α 珠蛋白 mRNA。当探针浓度恒定时(5×10^6 dpm/ml),随着 RNA 量的增加,该显影区带逐渐加深。说明在 mRNA 未饱和的条件下,可以通过放射自显影的区带强度初步测定 mRNA 的相对量。这对于我们进一步直接分析血红蛋白 H 病人的 mRNA 及其前体的相对量也是有意义的。

四、一例血红蛋白 H 病人血中 α mRNA 的探测

病例黄××,男,16岁。经广西医学院附属医院儿科临床检查和电泳分析(HbH 13.7%, HbBarts 8%, HbA₂ 2.8%, HbA₁ 75%)诊断为 HbH 病。该病例的 DNA 经限制性内切酶图谱分析为非缺失型 HbH^[12]。从该例的血液中抽提总 RNA,然后经变性电泳分析及 Northern 转移,以 α -珠蛋白探针进行探测(图 5 见封 3)。从 HbH 血总 RNA 的电泳图谱(图 5(1)见封 3)亦看出含四条主要区带,其中 9S 部分亦相当明显。转移杂交后的显影区带,其 α mRNA 则比正常 α mRNA 有明显的降低(图 5(2)与(3))。说明该例 HbH 病的 α mRNA 比正常人合成大为减少。其放射自显影的 X-光底片,经岛津 CS-900 光密度计扫描测量,该 HbH 病 α 珠蛋白 mRNA 的表达仅为正常表达的 3.5%(图 6)。

通过以 α -珠蛋白探针直接探测正常人和病人血中 mRNA 的水平,初步研究,我们认为这一方法有可能利用作为对转录产物分析及基因表达研究的工具。只要我们有有效的探

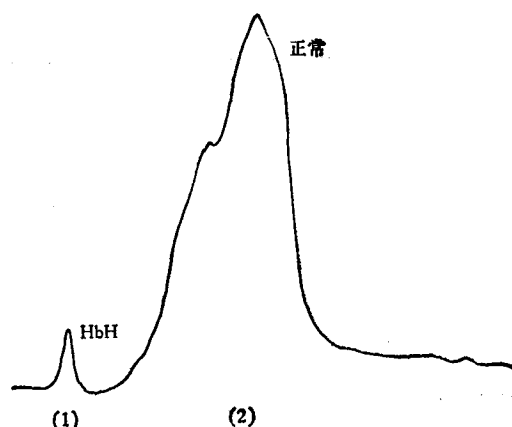


图 6 HbH 病血 α -珠蛋白 mRNA 的探测光密度扫描曲线,经求积仪测量

- (1) HbH 病人 α -珠蛋白 mRNA
(2) 正常表达的 α -珠蛋白 mRNA

针,也可以分析组织中特异 mRNA 的水平。

参 考 文 献

- [1] Alwine, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 5350, 1977.
- [2] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98, 503, 1975.
- [3] McMaster, G. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 4835, 1977.
- [4] Thomas P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 5201, 1980.
- [5] Kan, Y. W. et al.: *Nature*, 255, 255, 1975.
- [6] 王申五等《中国医学科学院学报》4. b. 1982.
- [7] Pentti Salomaa *Acta Chem. Scand.*, 10, 306, 1956.
- [8] A. Talanko, et al.: *Gene*, 14, 325, 1981.
- [9] Laurer, et al.: *Cell*, 20, 119, 1980.
- [10] Biruboin et al.: *Nucleic Acid Res.*, 7, 1513, 1979.
- [11] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 91, 303, 1978.
- [12] 吴冠芸等《中国医学科学院学报》待发表。
- [13] Rigby, P. W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 113, 237, 1977.
- [14] Bantle, J. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 72, 413, 1976.

[本文于1982年11月26日收到]

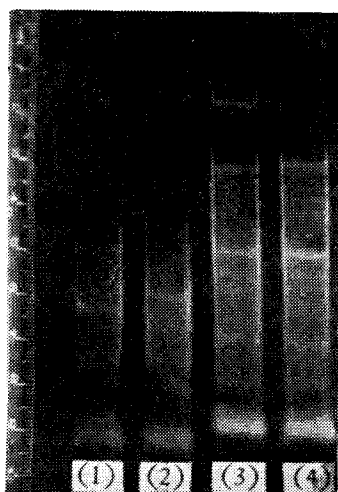


图 1 不同变性条件下人血总 RNA 电泳图谱

(1) 未变性 (2) 二甲亚砜变性 (3) 乙二醛变性 (4) 二甲亚砜+乙二醛变性

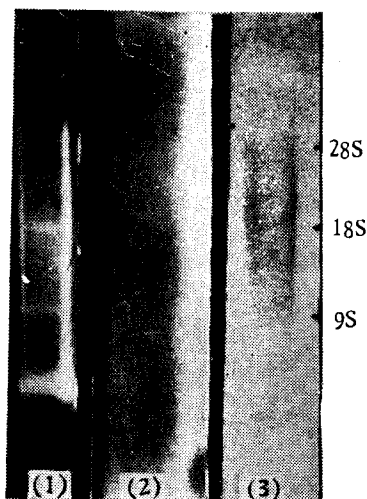


图 3 人血总 RNA 电泳区带的 Northern 转移

(1) 人血总 RNA 的变性电泳图谱(吡啶橙染色)
(2) 经 Northern 转移后的琼脂糖凝胶条(吡啶橙染色)
(3) 转移后的硝酸纤维素膜(甲烯蓝染色)

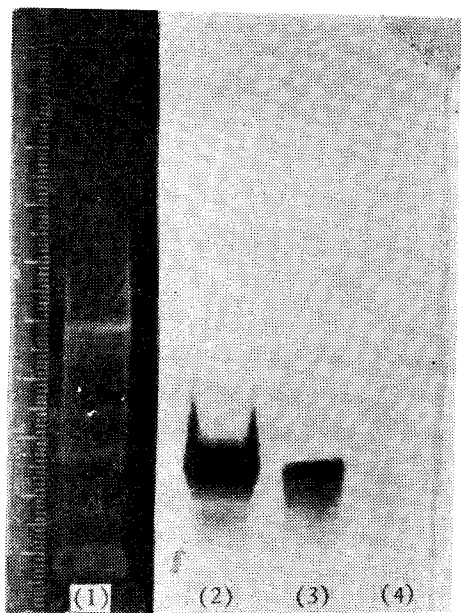


图 4 人 α -珠蛋白 mRNA 的探测

基因组 α -珠蛋白探针: $5 \times 10^7 \text{dpm}/\mu\text{g}$
杂交条件:

(1) $13\mu\text{g}$ 总 RNA 的电泳图谱
(2) $10\mu\text{g}$ 总 RNA 的杂交显影区带
(3) $5\mu\text{g}$ 总 RNA 的杂交显影区带
(4) $1\mu\text{g}$ 总 RNA 的杂交显影区带

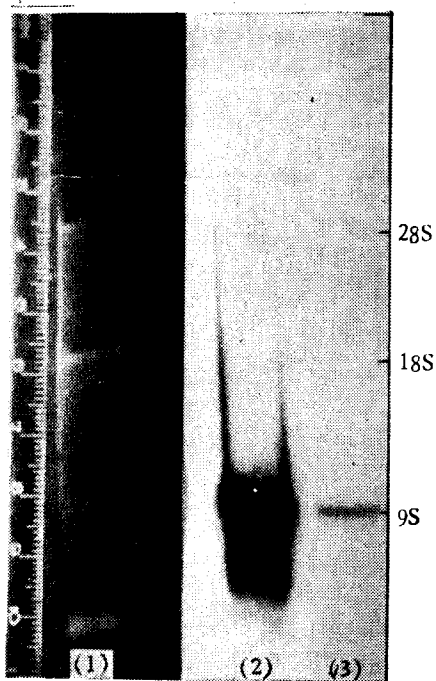


图 5 HbH 病血 αmRNA 的探测

(1) HbH 病血 总 RNA 变性电泳图谱
(2) 正常人血总 RNA $3.9\mu\text{g}$ 探测后的显影区带
(3) HbH 病人血总 RNA $3.7\mu\text{g}$ 探测后的显影区带