

DNase 的 DNA-PAGE 快速分析法

陈石根 乐敏 王鹂形

(复旦大学生物系,上海)

毛嘉龄

(四川医学院,成都)

黄祥贤

(江苏启东肝癌研究所)

核酸酶,特别是 DNase,往往和机体的生理状况及病变有密切的关系^[1],如果能建立一种简便的核酸酶分析方法,将对临床诊断、探讨病变机制及筛选药物都有一定的价值。关于 DNase 的分析 Boyd 等先后建立了 DNA-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (DNA-PAGE) 法^[2-3]; Brown 等又将它加以简化,并将它直接用于细胞抽提液中 DNase 的鉴定与比较^[4]。本文又作了改进,降低了分离胶中的 DNA 含量,并以溴化乙锭 (Ethidium Bromid),代替焦宁 Y (Pyronia Y)。结果表明,改进后保温与染色时间可以大大缩短,检测灵敏度提高。应用这种方法检定人和小鼠白细胞和肝细胞中的 DNase,表明,不同类型的细胞中包含各自特征的 DNase 酶谱,而且它对反应条件有不同的要求,对抑制剂有不同的敏感性。

材料和方法

一、试剂和细胞材料

丙烯酰胺与 N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 Fluka 产品。TEMED 为 Koch-Light Lab. Ltd. 产品。溴化乙锭和焦宁 Y 分别为 BDH 与 Sigma 产品。DNase 为 K & K 或杭州师范学院产品。DNase II 为东风生化试剂厂产品;其余试剂均为 CP 或 AR 级。

人白细胞、鼠白细胞和人肝癌细胞分别为美 Roswell Park Memorial Institute、上海市医药工业研究院及启东肝癌研究所提供。细胞抽提液采用含 PMSF (氟化磺酰苯甲烷, Phenyl-

lmethyl Sulfonyl Fluoride)^[5] 之 Tris-HCl 缓冲液制备^[7]。

二、电泳、酶反应和染色

DNA-PAGE 法包括以下三个环节。

1. 电泳 DNA-PAGE 法的主要特点是由电泳分离胶中包含酶的底物 DNA。分离胶的组成为: 6.8% (W/V) 丙烯酰胺、0.18% (W/V) 双丙烯酰胺、0.03% (W/V) 小牛胸腺 DNA (CT-DNA)、0.05% (W/V) 过硫酸铵、0.035% (V/V) TEMED 和 320mM Tris-HCl pH 8.9; 浓缩胶组成为: 3.1% (W/V) 丙烯酰胺、0.08% (W/V) 双丙烯酰胺、0.06% (W/V) 过硫酸铵、0.08% (V/V) TEMED 和 370mM Tris-HCl pH 7.4。电极液为 0.05M Tris-0.38M Gly pH 8.6。

电泳在 0—4℃ 中进行,电流 5mA/管(管径 0.8cm、管长 15cm),电泳 3—5 小时。

2. 酶反应 样品经电泳分离后,剥出的电泳胶需先用酶反应缓冲介质浸泡平衡(室温) 2—3 次,每次 20 分钟,使电泳胶中的电泳缓冲介质为酶反应缓冲介质取代,然后再换上新鲜的反应缓冲介质。将胶和缓冲介质置于 37℃ 中保温反应一定时间。各种酶要求不同的反应缓冲介质。本文中 DNase 主要采用含 1mM CaCl₂-1mM MgSO₄ 之 0.2M 醋酸缓冲液, pH 5.0; DNase II 采用含 4mM EDTA 之 0.2M 醋酸缓冲液, pH 5.0。

3. 染色 电泳胶保温反应后再用核酸染色剂染色。由于酶所在位置的 DNA 被水解后不

能染色,于是 DNase 的谱带能够通过 DNA 染色背景上的透明水解带显示出来。本文采用的染色剂有两种:①0.2% (V/V) 焦宁 Y,染色需 6 小时,然后用 7% 醋酸脱色三次,每次 2—3 小时;② 4.0 μ g/ml 溴化乙锭,染色 15 分钟,然后用紫外层析灯进行荧光观察。

三、DNase 活力(动力学)测定

为了定量地检定样品中的 DNase,本文进行了 DNase 的活力测定。反应系统为 0.1ml 样品加 1.9ml 含有 0.1% (W/V) CT-DNA、60 μ g/ml PMSF 之酶反应缓冲介质(两者分别在 37 $^{\circ}$ C 预保温),然后于 37 $^{\circ}$ C 保温反应 0、3、5、10 和 15 分钟。取样 100 μ l 加入预冷的 1.2ml 7% 过氯酸溶液内停止反应。冰浴中放置 15 分钟。离心后取上清液稀释 1 倍,于 260nm 测定光吸收值 (A_{260}),在过程曲线呈线性关系范围内,根据 1ml 反应体系内 A_{260} 每分钟变化 0.001 为 1 单位 (u),再按下式计算活力:

$$u/mg\text{蛋白} = \frac{\Delta A_{260} \times 10 \times 1000 \times 26 \times 2}{\Delta t \times c \times l}$$

其中 c 为样品中蛋白质浓度 (mg/ml), l 为光径 (cm)。

结果与讨论

一、保温反应时间

与染色方法灵敏度有关。按 Brown 等的方法,样品在电泳后需保温过夜,然后用焦宁 Y 染色 6 小时,用 7% 醋酸脱色 6—9 小时。为了能尽快观察到分析结果,本文将分离胶内 CT-DNA 含量从 0.03% (W/V) 降低至 0.012% (W/V),并采用溴化乙锭为染色剂。结果表明,在这种条件下,杭州师范学院产品 DNase 5 μ g 在电泳后,置于含 1mM CaCl_2 -1mM MgSO_4 的缓冲介质 pH 7.0 中,平衡保温 3 小时(活力相当 250u),溴化乙锭染色 15 分钟,就能在荧光背景上观察到二条透明水解带;如保温 6 小时,这二条谱带(箭头所示)则更为清晰

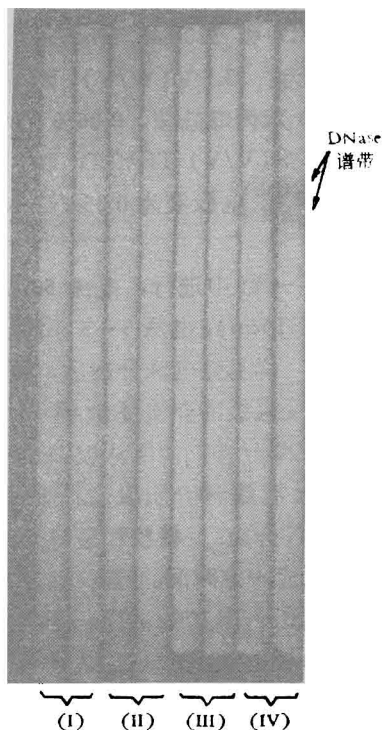


图1 保温反应时间与酶电泳图谱

DNase 5 μ g (在反应缓冲介质 pH 7.0 中相当于 250u)
保温时间: (I) 1 小时; (II) 2 小时; (III) 3 小时;
(IV) 6 小时。

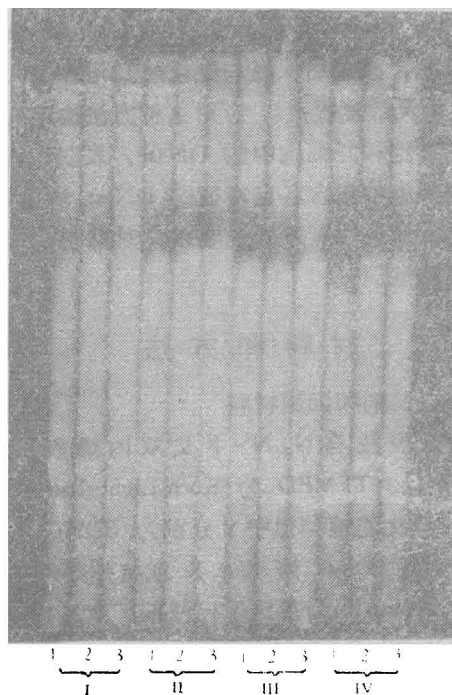


图2 分离胶中 CT-DNA 浓度与酶电泳图

CT-DNA 浓度 (W/V): (I) 0.020%; (II) 0.015%;
(III) 0.014%; (IV) 0.005%; DNase 酶量 1 0.15 μ g;
2 0.10 μ g; 3 0.05 μ g 反应缓冲介质: pH 5.0, 反应保
温时间: 3 小时。

(图 1)。

K & K 产品 DNase 0.05 μ g 在加有 0.005% 牛血清白蛋白 (BSA) 的系统中电泳后,置于反应缓冲介质 pH5.0 中平衡保温 3 小时,也可见透明的水解带(图略)。

二、分离胶中 CT-DNA 的含量

为缩短反应保温时间,检定了分离胶中 CT-DNA 浓度对酶电泳谱的影响。结果表明,0.005% (W/V)—0.020% (W/V)的 CT-DNA 范围内,都可获得良好的结果,但以 0.010—0.015% (W/V) 时谱带与背景间对比度最好(图 2)。

三、方法的灵敏度

采用 DNase 和 DNase II 为标准样品。结果表明: 1.“纯”的 DNase 或 DNase II 的水溶液直接用于电泳时,往往容易在电泳过程中失效,因而在样品量较低的情况下,常不易观察

到明显的谱带;但如果在上述酶溶液中加入 0.005—0.010% (W/V)BSA 作为保护剂时,可减少样品在电泳过程中的变性作用,提高检定的灵敏度(参见结果一); 2.在有 BSA 存在的条件下,应用相应的最适平衡保温介质,3 小时的保温反应, DNase (K & K)的电泳分析可检出的最低量可达 0.025 μ g (在 pH5.0 的反应缓冲介质中测定活力相当于 40u); DNase II 最低检出量为 3 μ g (在 pH5.0 的反应缓冲介质中测定活力相当于 2200u)(图 3)。3. DNase 的细胞抽提液在电泳时不需要加 BSA 可达到相同的检出灵敏度。

四、生物样品中 DNase 的初步分析

1. 人白细胞细胞质抽提液中 DNase 电泳

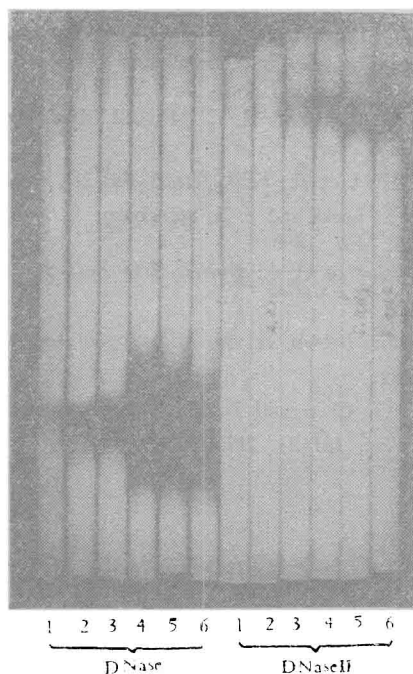


图 3 酶量与酶电泳图谱

DNase 酶量 1. 0.025, 2. 0.050, 3. 0.10, 4. 0.50, 5. 1.0, 6. 2.0 (单位 μ g), 平衡缓冲介质: 含 1mM CaCl_2 -1mM MgSO_4 之 0.2M 醋酸缓冲液, pH5.0
DNase II 酶量 1. 1.0, 2. 2.0, 3. 3.0, 4. 4.0, 5. 5.0, 6. 6.0. (单位 μ g), 平衡缓冲介质: 含 1mM EDTA 之 0.2M 醋酸缓冲液, pH5.0,

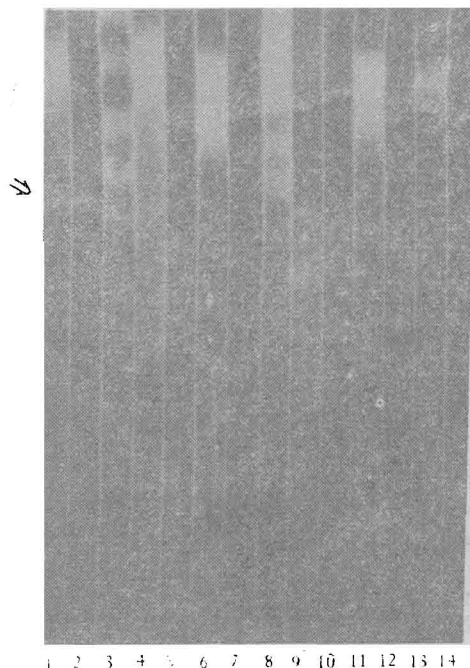


图 4 不同类型的人白细胞抽提中的 DNase 电泳图谱

酶量 250u, 反应平衡介质含 1mM CaCl_2 -1mM MgSO_4 之 0.2M 醋酸缓冲液 pH5.0

检查药物或抑制剂时分别用(1)反应平衡介质+药物“A”; (2) 反应平衡介质+碘乙酰胺 (IAA) 代替反应平衡介质进行平衡保温

ALL, Molt-4, CLL, AML 为不同类型白血病的白细胞
1. ALL; 2. ALL + “A”; 3. Molt-4; 4. Molt-4 + “A”; 5. Molt-4 + IAA; 6. CLL; 7. CLL + “A”; 8. AML; 9. AML + “A”; 10. AML + IAA; 11. PHA 激发的淋巴细胞; 12. PHA 激发淋巴细胞 + “A”; 13. 淋巴细胞; 14. 淋巴细胞 + “A”

空白处为酶谱带,如 $\rightarrow$ 所示。

分析

用焦宁 Y 染色剂检定, 结果表明, 1. 在电泳分析的酶量相同情况下, 不同类型(正常和病理)细胞具有各自特征的 DNase 电泳图谱(图 4); 2. 不同来源的 DNase 对抑制剂和药物, 或者完全抑制, 或者部分抑制, 或者表现不同的电泳行为(图 4)。

2. 小鼠白细胞细胞质抽提液中 DNase 电泳分析

用溴化乙锭染色剂检定, 结果表明: 1. 不

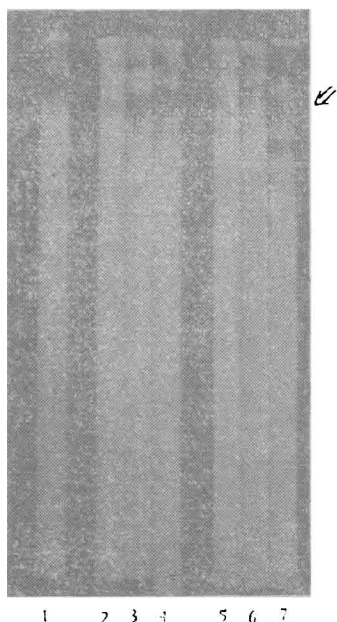


图 5 小鼠白细胞抽提液中的 DNase

酶量 80u; 反应平衡介质同图 4; “615”为正常小鼠; “7712”为白血病小鼠; 1. “615”胸腺; 2.—4. 分别为“7712”接瘤 5, 7, 9 天之胸腺; 5.—7. 分别为“7712”接瘤 5, 7, 9 天之腹水, 深色处为谱带,

如 → 所示。

同来源的白细胞具有不同的 DNase 电泳图谱; 2. 相同的细胞的 DNase 在癌变不同阶段电泳谱也不同(图 5); 3. 染色质抽提液中 DNase 活力很低(图略)。图 5 中的 615 为正常小鼠, 7712 为白血病小鼠。

3. 人肝细胞抽提液 DNase 的电泳分析

用溴化乙锭染色方法检定, 结果表明正常培养肝细胞和各种类型的肝癌细胞间存在着差异(图略)

DNase 电泳分析中应用含 DNA 的分离胶, 一方面可以提高酶在电泳过程中的稳定性与分辨效果, 一方面又可节省底物渗入电泳胶所需要的时间。本文减低了分离胶中 DNA 的含量, 并采用溴化乙锭为染色剂, 大大缩短了保温、染色和脱色所需要的时间, 而且也提高了方法的灵敏度。

参 考 文 献

- [1] C. C. Levy and T. P. Karpetsky, in *Enzymes as Drugs* (J. S. Holcenberg and J. Roberts eds.), John Wiley and Sons, New York p. 103, 1981.
- [2] J. B. Boyd and H. K. Mitchell, *Anal. Biochem.*, **13**, 28, 1965.
- [3] J. Hnet, et al.: *FEBS letters*, **94**: 28, 1978.
- [4] S. A. Lacks and S. S. Spingborn: *J. Biol. Chem.*, **225**, 7467, 1980.
- [5] Ad Spanos et al.: *Nucleic Acid Res.*, **9**(8), 1825, 1981.
- [6] G. E. Brown, et al.: *Electrophoresis*, **3**, 151, 1982.
- [7] S. G. Chen and B. I. Sahai Srivastava: *FEBS letters*, **161**(2), 217, 1983.

[本文于 1984 年 7 月 6 日收到]

简便、快速测定细胞裂解液中 DNA 含量的荧光分析

林卓坤 李建平 林 梹*

张洪涛** 刘以民**

(南开大学生物系, 天津)

生物组织中 DNA 的定量测定方法, 均需进行样品的处理, 步骤烦琐, 费时, 又影响灵敏

* 本校 79 级生化专业毕业生

** 本校 80 级生化专业毕业生