

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

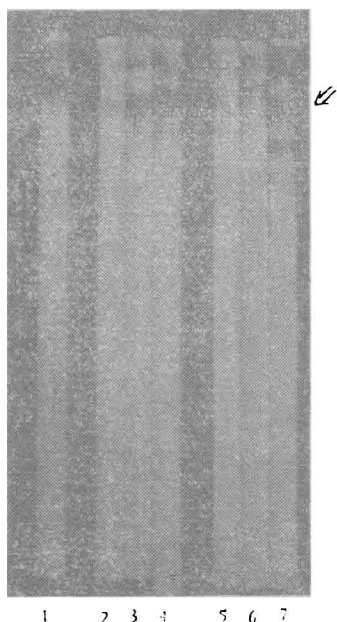


图 5 小鼠白细胞抽提液中的 DNase

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

度和重现性。Ananda 等^[1]利用荧光探针——菲啶溴红检测生物样品中核酸的含量,虽然简化了样品的处理过程但仍不能直接测定细胞匀浆中 DNA 的含量。Russel 和 Williamson 等^[2,3]报道了 4,6-二脒基-2 苯吡啶 (DAPI) 荧光试剂能与 DNA 特异性结合成荧光复合物。La-barca 等^[4]利用反苯并咪唑荧光试剂直接检测生物组织粗匀浆液中 DNA 含量,我们实验室在此基础上建立了直接测定细胞粗裂解液中 DNA 含量的方法、可检测 10ng DNA。

材料与 方法

1. 试剂 双苯并咪唑化合物(2-[2(4-羟基苯)-6-苯并咪唑基]-6-(1-甲基-4-哌嗪)-6-苯并咪唑·3HCl),(Sigma, Hoechst H33258);小牛胸腺 DNA (Sigma);N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(Hepes, 上海东风试剂厂);其他试剂均为国产分析纯。

2. 仪器 MPF-4 型荧光分光光度计。

3. 试剂配制:

双苯并咪唑贮液 20 μ g/ml 于 NaCl-Hepes 缓冲液中, pH 7.0。

DNA 标准溶液 小牛胸腺 DNA (Sigma), 160 μ g/ml 于 Tris-NaCl 缓冲液中, pH 7.4。

RNA 标准溶液 酵母 RNA (Sigma), 100 μ g/ml 于 Tris-NaCl 缓冲液中, pH 7.4。

Tris-NaCl 缓冲液 0.2M Tris, 0.1M NaCl, pH 7.4。

Na₃PO₄-NaCl 缓冲液: 0.05M Na₃PO₄, 2.0M NaCl, pH 7.4。

NaCl-Hepes 溶液: 0.012M NaCl, 0.005M Hepes pH 7.0。

4. 生物样品制备:

(1) 小鼠白血病白细胞裂解液 抽取白血病(7811)615 纯系小鼠的腹水,用 0.85% NH₄Cl 除去红细胞后,调整白细胞为 0.5—1 $\times 10^7$ 细胞/ml,加入等体积 0.1N NaOH,于 21—22℃ 裂解 30 分钟,中和后,加入一定体积的含 0.02M NaEDTA 的 NaCl-Hepes 缓冲液,3000rpm,离心 15 分钟,取上清液(细胞裂解液),低温保存备用,

(2) 人肝癌(7402)细胞株裂解液 取人肝癌细胞株培养悬浮液,用生理盐水洗两次,细胞计数后进行裂解,步骤同上。

(3) 脾细胞裂解液 615 小鼠脾脏迅速挤压通过 60 目铜网,制得细胞悬液,细胞计数后进行裂解,步骤同上。

(4) DNA 标准曲线 精确吸取 DNA 标准溶液,使其反应体系中最终浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 及 5.0 (μ g/ml),各含双苯并咪唑 2 μ g/ml;另配一组溶液, DNA 浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 (μ g/ml),各含双苯并咪唑 2 μ g/ml。缓冲液均为 Na₃PO₄-NaCl, pH 7.4, 纵坐标以任意荧光单位表示,横坐标为 $\frac{1}{2}$ DNA 浓度,绘制标准曲线。

(5) 盐浓度影响 在 0.05M Na₃PO₄, pH 7.4 含双苯并咪唑 2 μ g/ml, DNA 2 μ g/ml 溶液中,加入不同浓度的 NaCl (0.16M, 0.25M, 0.4M, 0.6M, 1.0M, 1.5M, 2.0M 及 3.0M)测其荧光强度。

(6) RNA 及蛋白质的影响 比较 DNA (3 μ g/ml)、DNA (3 μ g/ml) 与 RNA (30 μ g/ml) 混合液的荧光强度。

(7) 测定小牛血清蛋白 (300 μ g/ml) 与双苯并咪唑 (2 μ g/ml) 的荧光强度。

结果与 讨论

1. 荧光光谱 双苯并咪唑及双苯并咪唑-小牛胸腺 DNA 的荧光光谱见图 1,前者在 356nm 处有最大激发光,470nm 处为最大发射光。后者的最大激发光波长保持不变时,最大发射光波长移至 450nm 处。

2. 盐浓度对双苯并咪唑-DNA 荧光强度的影响 随着 NaCl 浓度的增高,荧光强度相应改变,当 NaCl 浓度增加到 2.0M 时,荧光增强到最大值。之后,再增加 NaCl 浓度,荧光强度有降低趋势(图 2)。

3. DNA 标准曲线 当 DNA 浓度在 0.05—1.0 (μ g/ml) 范围内,荧光强度与浓度呈线性关系。

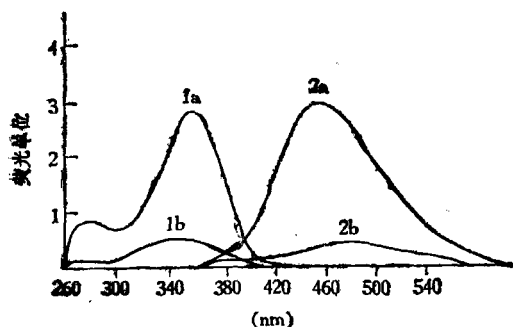


图1 双苯并咪唑及双苯并咪唑-DNA 的激发光谱与发射光谱

激发光谱: (1a) 双苯并咪唑-DNA (1b) 双苯并咪唑
发射光谱: (2a) 双苯并咪唑-DNA (2b) 双苯并咪唑
DNA 浓度: $2\mu\text{g/ml}$ 双苯并咪唑浓度: $2\mu\text{g/ml}$ 缓冲液: $0.05\text{M Na}_3\text{PO}_4$, 2.0M NaCl , $\text{pH } 7.4$

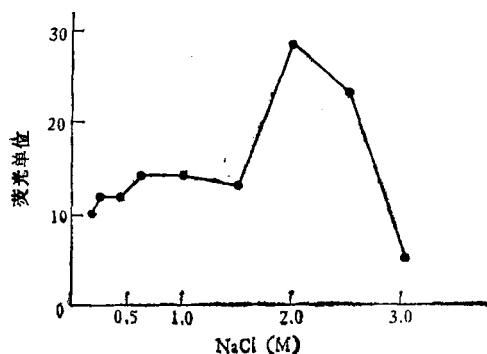


图2 盐浓度对双苯并咪唑-DNA 荧光强度的影响

双苯并咪唑: $2\mu\text{g/ml}$ DNA 浓度: $2\mu\text{g/ml}$ 缓冲液: $0.05\text{M Na}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 7.4$

4. 双苯并咪唑的荧光强度 不同浓度的 $0.37 \times 10^{-6}\text{M/ml}$ 和 $0.37 \times 10^{-5}\text{M/ml}$ 的双苯并咪唑的荧光强度十分接近, 此结果与文献^[5]报道一致。

5. 细胞裂解液中 DNA 含量测定 图3表示不同体积的细胞裂解液与双苯并咪唑结合成荧光复合物的实测扫描图。每毫升细胞裂解液含 2.5×10^6 白细胞。图3右上角表示细胞裂解液检测曲线。检测结果对照 DNA 标准曲线即可求得 DNA 含量。

测定4个重复样品, 误差小于1%。重现性较好。表1为几种不同细胞的 DNA 含量。

双苯并咪唑与细胞裂解液结合荧光增强, 其荧光的激发光谱和发射光谱与 DNA 标准样

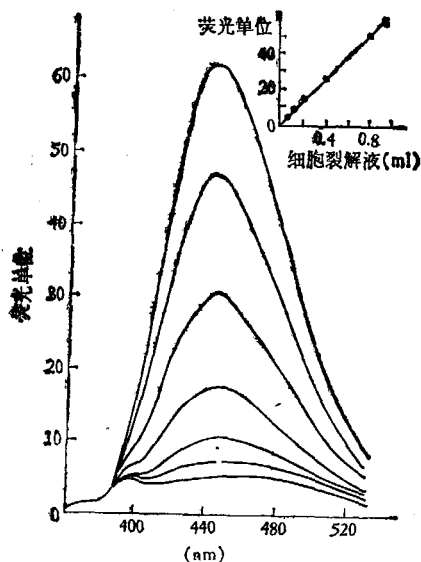


图3 细胞裂解液曲线

双苯并咪唑: $0.2\mu\text{g/ml}$; 细胞裂解液: $0.05-1.0\text{ml}$;
缓冲液: $0.05\text{M Na}_3\text{PO}_4$, 2.0M NaCl

表 1

细 胞	DNA $\mu\text{g}/\text{细胞}$
小鼠脾细胞	3.5×10^{-7}
人肝癌细胞	1.4×10^{-6}
小鼠白血病白细胞	3.8×10^{-7}

品荧光光谱相同。因此可以认为此增强的荧光几乎全部是由双苯并咪唑与细胞裂解液中 DNA 结合所致。

Weisblum 等^[6]分析了双苯并咪唑与 DNA 同聚物, 及含有 27—68% 的 A-T 成份的细菌 DNA 结合发现其荧光增强与天然 DNA 中 A-T 量成正比。与 A-T 多聚体反应, 荧光增强值最大; 染色体富含 A-T 区域其荧光更为明显。本实验用小牛胸腺 DNA 作为检测哺乳动物细胞 DNA 标准品。DNA 碱基组成大致相同。如需检测碱基组分异常不同的 DNA 样品, 则采用来自同一种或相似碱基组成的 DNA 标准品为宜。Labarca 分析了离子强度的影响, 认为离子强度并不影响 DNA 的结构, 但用碱或加热使 DNA 解链, 将导致荧光强度减少 50%。本实验采用接近中性的缓冲体系, 较高的盐浓度实验数据重现性较好。要达到这个要求, 必须在制备裂解液时使 DNA 自染色质核蛋白中

全部解离出来。本文测定三种细胞匀浆液中的 DNA 含量,比文献报道的用其他方法测定的结果低,可能是由于裂解不完全所致。最好的办法是用超声波处理样品。此外每次操作条件必需一致才有可能得到较好的重现性。总之用本法直接检测细胞裂解液或组织粗匀浆液中 DNA 含量,确实是一个非常简便而可靠的微量方法值得推广。

南开大学化学系倪凤淑同志,中国医学科学院血液学研究所甘午君,蔡辉国,许静等同志及天津医学院神经病理研究所许理衍,单书宝等同志在实验仪器及材料上给予支持,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Anamda S. P., *J. Lab. and Clinical Medicine*, 80,

4, 1972.

- [2] Russel W. C., Newman C. and Williamson, D. H.: *Nature* (London) 253, 461—462, 1975.
- [3] Williamson D. H., and Fennel D. J.: in *Methods in cell Biology* (Prescott. D. M. ed), Vol. 120, 335—351. Academic Press, New York. 1975.
- [4] Cesar Labarca and Kenneth Paigen: *Anal. Biochemistry*, 102, 344—352, 1980.
- [5] Cesarone C. F. Bolognesi C. et al.: *Anal. Biochemistry*, 100, 188—197, 1979.
- [6] Weisblum B. and Haenssler, E.: *Chromosoma* (Berlin) 46, 255—260, 1974.

[本文于 1984 年 8 月 18 日收到]

膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 连续自动分析方法*

徐友涵 倪基德

(南开大学分子生物学研究所)

目前,膜 ATPase 的活性测定主要是利用 ATP 再生系统^[1,2],以及测定 ATP 水解所释放 Pi 的方法。比色测 Pi 的方法为 Fiske 所开创。Lacy 改用抗坏血酸作还原剂,还原磷钼酸,提高了灵敏度^[3]。通常在中止酶反应,进行 Pi 比色测定之前,使用离心或过滤去除变性的酶蛋白。Kline 将酶水解产生的 Pi 透析到还原性试剂中,以进行 Na^+ - K^+ -ATPase 的自动分析^[4]。Arnold 用表面活性剂溶解膜蛋白,省去过滤、离心或透析等步骤,进行膜 ATPase 的自动分析,具有简便、快速、灵敏度高、结果可靠等特点^[5],本文基于 Arnold 的工作,全部使用国产仪器,用于红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的分析。

材 料 与 方 法

1. 试剂

ATP (江门化工厂), Ouabain 为 Serva 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

2. 溶液配制

A 液: 29mM SDS, 40mM TCA

B 液: 6.9mM 钼酸铵, 0.56mM 酒石酸锶钾, 0.9M H_2SO_4

C 液: 0.114M 抗坏血酸, 20 μM KH_2PO_4 , (C 液中添加无机磷,用以减少自动分析体系中管壁对样品 Pi 的吸附与解附的影响)

3. 标准无机磷: 分析纯 KH_2PO_4 于 110℃ 烘 4 小时。

4. 钙调蛋白 (CaM) 以及膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的制备

CaM 制备按 Kakiuchi 法^[6],在 SDS-凝胶电泳上显示单一蛋白带。缺少 CaM 的红细胞膜制备按 Gietzen 方法^[7]。膜蛋白测定按 Lowry 法^[8],以牛血清白蛋白为标准。

5. 酶反应体系:

* 本工作是科学技术委员研究基金资助