

核酸分子杂交技术的应用

——比较小鼠腹水肝癌和正常肝 RNA

张玉砚 徐永华 徐亚男 彭素芬

(上海实验生物研究所)

核酸分子杂交技术是近十几年来发展起来的一个灵敏度高、应用面广的研究工具。除了应用于细菌和病毒方面的研究外,已广泛应用于研究细胞分化以及演化发展规律等方面的生物学问题。近些年来,有些工作者应用核酸分子杂交技术,研究人体肿瘤病毒病因及探讨肿瘤发病机理等问题。在一些资料中应用核酸分子杂交技术来研究动物肿瘤或肿瘤发生过程,初步观察到了核糖核酸核苷酸顺序上的变化及核糖核酸由细胞核向细胞质传递上的改变。显然,从分子生物学角度探讨癌变机转,核酸分子杂交技术提供了一个有效的研究工具。

我们根据实验室现有条件建立了液相核酸分子杂交技术,并比较了小鼠腹水肝癌和正常肝 RNA 的同一性和差异性,为进一步探讨肝细胞的癌变机转打下初步基础。

一、材料与方法

实验用杂种小白鼠,雌性,体重 18—25 克。

肿瘤模型采用小白鼠腹水肝癌(H₂₂肝癌移植于杂种小白鼠腹腔)。

1. 细胞核和细胞质的分部

(1) 小鼠正常肝细胞核、细胞质的分部 小鼠饥饿过夜,放血取肝脏,浸于 0.15 M 氯化钠-0.015 M 柠檬酸钠溶液(以下简称 1×SSC)中;剪碎,洗去血水;加 4 倍体积 1×SSC 溶液,用玻璃匀浆器匀浆,细胞大部分破裂,用纱布过滤,滤液经 3000 转/分离心 10 分钟,吸取上悬液 2/3 部分,显微镜观察无完整细胞和细胞核,作为肝脏细胞质部分。弃去剩余的上悬液;沉淀部分加 5 倍体积 5% 柠檬酸,继续匀浆至显微镜检查无完整细胞为止;2000 转/分离心 10 分钟,沉淀部分用 5% 柠檬酸,0.25 M 蔗糖-0.003 M 氯化钙,1×SSC 各洗一次,离心得沉淀为细胞核。用 Schmidt 和 Thannhauser (1945) 及 Davidson 和 Smellie (1952) 方法测定分离细胞核的 RNA 和 DNA 含量,并计算得 RNA/DNA 值为 0.24±0.01。

(2) 小鼠腹水肝癌细胞核、细胞质的分部 将接

种腹水肝癌细胞后第 7 天的小鼠杀死,取腹水液,用 1×SSC 稀释洗涤两次,3000 转/分离心 5 分钟,弃去上悬液;细胞部分加 5 倍体积 0.0003 M 氯化钙浸泡 15 分钟,离心;压缩膨胀细胞部分加等体积 1×SSC,用玻璃匀浆器匀浆,其余步骤与上述正常肝细胞核、细胞质的分部相同。分离细胞核的 RNA/DNA 值为 0.26±0.01。

2. DNA 的抽提

根据 Marmur (1961)^[4] 方法略有改变。小鼠正常肝组织碎块或小鼠腹水肝癌细胞加 10 倍体积 1×SSC,用玻璃匀浆器匀浆,到大部分细胞破碎后离心,弃去上悬液,沉淀用 1×SSC 洗两次。将分离的细胞核悬于约 10 倍体积的 pH 8 的 0.15 M 氯化钠-0.1 M 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)溶液中;在搅拌的同时慢慢滴加 1/15 体积的 25% 十二烷基磺酸钠(SDS)(溶于 45% 酒精中),使其最后浓度为 1.6%;随后加入固体氯化钠,使氯化钠浓度达到 1 M,继续搅拌 30—60 分钟;加等体积氯仿-异戊醇(24:1 V/V)剧烈振荡 20 分钟,7000 转/分离心 20 分钟;取上层水相加 2 倍体积预冷的 95% 酒精沉淀 DNA,捞取 DNA 纤维,溶于 1×SSC 中;用氯仿-异戊醇重复去蛋白三—四次;最后所得 DNA 溶于 1×SSC 中,25000 转/分离心 40 分钟;将 DNA 样品贮存于-40℃ 冰箱待用。

同法抽提大肠杆菌 DNA,并经多次异丙醇沉淀纯化。

抽提所得的小鼠正常肝 DNA,小鼠腹水肝癌 DNA 和大肠杆菌 DNA,其 E₂₆₀/E₂₃₀ 值分别为 2.31±0.02, 2.35±0.03, 2.45;其 E₂₆₀/E₂₈₀ 值分别为 1.91±0.02, 1.86±0.01, 1.96。蛋白质和 RNA 污染<3%。

3. RNA 的抽提

根据 Scherrer 等^[4] (1962) 方法略加改变。将按上述方法分离得到的细胞核部分悬于 6—8 倍体积的 0.01 M 醋酸缓冲液-0.01 M EDTA (pH 5.1) 中,或将分离得到的细胞质悬液,分别振荡滴加 SDS 溶液,使其最终浓度为 0.3% (抽提肝脏核 RNA 时 SDS 最终浓度为 0.1%),室温摇匀,加等体积预热到 65℃ 的水饱和酚

表 1 DNA 理化性质比较

DNA 来 源	$\epsilon(P)$	O. I.	T_m °C	碱 基 比 例				G + C%	
				A	G	C	T	层析法	T_m 法
小鼠正常肝细胞	6797±120	32.6±3.00	87.2±0.55	29.6±0.22	20.9±0.70	20.8±0.56	28.7±0.10	41.7	43.6
小鼠腹水肝癌细胞	6763±290	31.7±1.90	86.2±1.60	30.7±1.36	20.8±2.90	20.8±0.22	27.9±0.45	41.6	41.2
大肠杆菌	5420	35.4	88.9						47.2

(90% W/V), 摇匀后置于 65°C 水浴中摇 5 分钟, 冰水中冷却, 3000 转/分离心 10—15 分钟; 吸取水相, 再加 1/2 体积水饱和酚摇 5 分钟, 离心, 水相加 2.5 倍体积冰冷的 95% 酒精-2% 醋酸钾沉淀 RNA; RNA 溶于 1×SSC 中, 再用酒精沉淀一次; 沉淀的 RNA 溶于 1×SSC, 通过 Sephadex G50 柱, OD_{260} 测定为一个峰, 将收集的 RNA 部分用 2.5 倍体积 95% 酒精沉淀, 离心, RNA 溶于 1×SSC 中, 贮于冰箱中备用。

^{32}P -RNA 的抽提: 给正常小鼠或腹水肝癌小鼠腹腔注射无载体 ^{32}P , 200 微居里/每只动物, 1.5 小时, 按上述方法分离细胞核和抽提 RNA。

抽提所得之 RNA 其 E_{260}/E_{280} 值和 E_{260}/E_{280} 值同为 2.08—2.17。DNA 和蛋白质污染 <1%, 但正常肝细胞核 RNA 中的 DNA 污染 <3%。

以上操作过程除去注明温度者外, 大都在冰水浴中进行。DNA 测定用二苯胺法, RNA 测定用苔黑酚法, 蛋白质测定用 Lowry 的 Folin 试剂法。

4. 核酸理化性质的分析

(1) DNA 碱基比例的测定 DNA 样品用过氯酸水解后进行纸层析, 用异丙醇-盐酸溶剂系统层析 20 小时左右。结果见表 1。

(2) RNA 核苷酸的测定 RNA 样品经碱水解后进行电泳, 电压 600 伏, 用 pH 3.5 的 0.02 M 柠檬酸缓冲液, 电泳分离 7 小时。结果见表 2。

(3) 光密度增加 (O. I.) 的测定 每毫升 20 微克 DNA 溶液经碱和加热变性, 计算变性前后 OD_{260} 增加的百分比。

(4) 熔点 (T_m) 值的测定 用 Sp 700 型分光光度计和加热附件装置进行测定。按照 J. Marmur 和 P. Doty (1962)^[1] 的 $T_m = 69.3 + 0.41 (G-C)$ 公式计算 G + C%。

(5) 克分子吸收系数 $\epsilon(P)$ 值测定 核酸样品用 1×SSC 稀释到每毫升 20—30 微克, 测定其 OD_{260} , 并定磷, 按 $\epsilon(P) = 30.98 E/(c \cdot l)$ 计算之。

5. DNA 和 RNA 杂交方法

采用 Nygard 和 Hall (1963)^[7] 液相杂交和微孔滤膜 (Millipore, HAWP, 0.45 微米, 25 毫米) 过滤杂交分子的方法。

DNA 用 1×SSC 稀释到浓度为 150—200 微克/毫升, 如氢氧化钠到最终浓度为 0.1 N, 室温水解 10 分

钟, 用酸调节 pH 到中性, 再在 100°C 水浴中加热 10 分钟之后速冷却, 将变性的 DNA 溶液保存于 -40°C 备用。

杂交反应在小试管中进行。将 ^{32}P -RNA 和变性 DNA 按一定量混合, 反应总体积为 1 毫升, 用高浓度的氯化钠-柠檬酸钠溶液调节反应液的盐浓度为 2×SSC。反应在最适温度, 最适时间进行后, 用 2×SSC 稀释到 10 毫升, 减压慢速滤过微孔滤膜 (滤膜预先在 2×SSC 中浸 1—2 分钟, 再用约 10 毫升 2×SSC 减压过滤冲洗之), 再用 50 毫升 2×SSC 过滤洗涤, 带杂交分子的滤膜用牛胰 RNase (20 微克/毫升, 配制在 2×SSC 中, 沸水浴中煮 5 分钟以破坏污染的 DNase 活力) 在 35°C 处理 1 小时, 再用 50 毫升 2×SSC 过滤洗涤滤膜, 室温干燥后, 浸入闪烁液即 PPO(2,5-二苯噁唑) 0.47%, POPOP [1,4-双(5-苯基噁唑基-2)-苯] 0.01%, 溶剂甲苯中, 然后在液体闪烁计数器上测放射性强度。

最适反应条件的测定: 改变温度条件测杂交温度曲线。改变反应时间测杂交时间曲线。在最适温度、反应时间和固定变性 DNA 量的条件下, 改变 ^{32}P -RNA 量测杂交饱和曲线。用不同组织来源的 DNA 检测杂交反应的专一性。以不同量的同源或异源非标记 RNA 与标记 RNA 混匀, 再加变性 DNA, 检测杂交反应中的竞争抑制效果。这部分工作是用盖革计数器测定放射性强度。

二、实验结果

1. 核酸理化性质的比较

从表 1 结果看来, 小鼠正常肝 DNA 与小鼠腹水肝癌 DNA 之间没有什么差异, 而大肠杆菌 DNA 的 G + C 含量比小鼠正常肝 DNA 和小鼠腹水肝癌 DNA 的含量高。

比较小鼠正常肝细胞核、细胞质 RNA 和小鼠腹水肝癌细胞核、细胞质 RNA, 在理化性质上没有明显差异。见表 2。

2. 杂交反应的动力学和专一性实验

(1) 温度 由表 3 和图 1 可见, 随着温育温度的增加, 标记 RNA 与 DNA 杂交的百分率也不断提高, 到温育温度为 60°C 时, 杂交百分率达到最大值。随后温度继续增高, 则杂交百分率逐步下降, 当温育温度为

表 2 RNA 理化性质比较

RNA 来 源	$\epsilon(P)$	核 苷 酸 比 例				GMP+CMP	AMP + UMP
		AMP	GMP	CMP	UMP	%	GMP + CMP
小鼠正常肝细胞核	7362±14	20.2±0.28	29.6±1.48	28.2±0.56	22.0±0.36	57.8	0.73
小鼠腹水肝癌细胞核	7481±255	20.9±0.64	29.3±0.78	27.1±0.92	22.7±0.56	56.4	0.75
小鼠正常肝细胞质	7593±185	19.6±0.64	28.2±1.63	32.4±1.98	19.9±0.36	60.6	0.65
小鼠腹水肝癌细胞质	7312±98	19.9±0.66	28.7±0.10	30.4±0.28	21.0±0.22	59.1	0.69

80℃ 即接近 T_m 值时, 杂交分子几乎全部解离。所以选择 60℃ 为最适温度, 与理论值(低于 T_m 值 25℃) 相近。

表 3 杂交反应最适温度

温育温度	37℃	50℃	60℃	70℃	80℃
杂交 %	2.14	3.00	5.36	3.74	0.70

反应条件: 变性小鼠腹水肝癌 DNA 50 微克; ^{32}P -小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 172 微克, 80 次脉冲/分钟/微克; 反应体积 0.5 毫升; 反应时间 16 小时; 杂交百分率: 与每 100 微克 DNA 杂交的标记 RNA 微克数

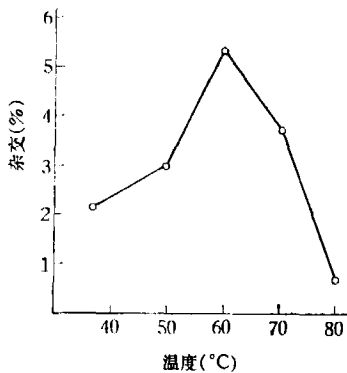


图 1 温育温度曲线

(2) 反应时间 标记 RNA 与变性 DNA 混合后立即出现杂交现象, 反应 1 小时则达最大值(表 4, 图 2)。之后杂交百分率有所下降, 到 2 小时后杂交百分率达

稳定值。说明起始反应中可能出现有不稳定的非配对的杂交分子, 而随着反应时间的延长, 非配对的杂交分子解裂。因此选用 16 小时为反应时间, 可得稳定的杂交值。

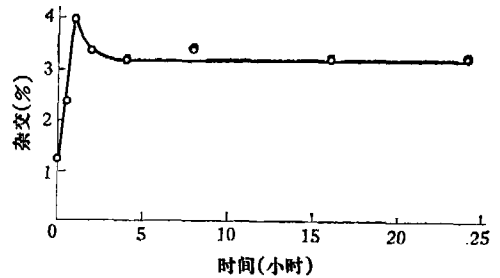


图 2 反应时间曲线

(3) 饱和实验 由表 5 和图 3 可见, 在相同反应条件下, 固定 DNA 量, 改变 RNA 量, 则杂交百分率随着 RNA 量与 DNA 量的比值的递增而增高, 一直到比值为 5—6 以上时, 杂交百分率才趋于水平; 即与 100 微克 DNA 配对杂交的 RNA 量为 4.2 微克时达到饱和度。七次杂交 RNA 饱和量实验结果的平均值为 4.02 ± 0.67 微克/100 微克 DNA。饱和实验结果表明, 在一定反应条件下, 增大液相杂交反应体系中的 RNA/DNA 比值, 也就是增加了体系中标记 RNA 与变性 DNA 分子间的碰撞机会, 并减少变性 DNA 发生“退火”的机会, 一直增大到出现杂交饱和度为止的比值, 此点即是最适的比值。

表 4 杂交反应最适反应时间

时 间 (小时)	0*	1/2	1	2	4	8	16	24
杂 交 %	1.26±0.15	2.35±0.64	3.95±0.91	3.37±0.45	3.20±0.35	3.40±0.72	3.20±0.91	3.23±0.42

反应条件: 变性小鼠腹水肝癌 DNA 50 微克 或 30 微克; ^{32}P -小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 150 微克, 74—78 次脉冲/分钟/微克; 反应体积 0.5 毫升; 反应温度 60℃

*: 是相对零时, 即 DNA 与 ^{32}P -RNA 混合后立即过滤之, 未经 60℃ 温育, 但已有瞬时间的反应

表 5 杂交反应饱和量

RNA/DNA 比值	1	2	3	4	6	8
杂 交 %	1.25±0.26	2.65±0.28	3.21±0.15	3.53±0.26	4.38±0.08	4.25±0.41

反应条件: 变性小鼠腹水肝癌 DNA 50 微克; ^{32}P -小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 不同量, 80, 135, 128 次脉冲/分钟/微克; 反应体积 0.5 毫升; 反应温度 60℃; 反应时间 16 小时; 三次实验空白标记污染: 0, 0.12%, 0.22%

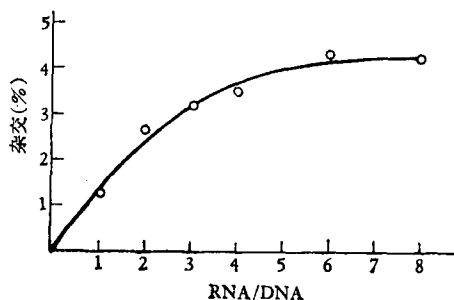


图3 杂交饱和曲线

(4) DNA的专一性 用小鼠腹水肝癌细胞核的³²P-RNA与各种不同来源的DNA进行杂交实验,结果表明杂交反应有一定的种属专一性(表6),但小鼠腹水肝癌细胞DNA与正常小鼠肝细胞DNA对杂交反应无明显差别。

表6 DNA专一性

DNA来源	杂交%	对比%
小鼠腹水肝癌细胞核	3.77	100
正常小鼠肝细胞核	3.79	100.5
小牛胸腺	0.32	8.5
甲鱼肝	0.12	3.2
大肠杆菌	0.21	5.6
空白	0.27	7.1

³²P-RNA来源: 小鼠腹水肝癌细胞核

(5) 杂交竞争的专一性 以未加竞争RNA所得的杂交百分率作为对照,并以100%表示之;则加竞争RNA后所得的杂交百分率与未加竞争RNA所得的杂交百分率相比所得的百分值即相对百分值表示竞争抑制后的杂交能力,以此进行比较。

由表7和图4实验结果显示,小鼠腹水肝癌细胞核RNA的竞争能力大于小鼠正常肝细胞核RNA,而大肠杆菌RNA则不起竞争作用。选择加入1200微克非

表7 杂交竞争抑制实验(一)

相对% 竞争RNA来源	竞争RNA量	0	150 微克	300 微克	600 微克	1200 微克
小鼠腹水肝癌细胞核RNA		100 (3)	83.0 (3)	65.0 (3)	56.0 (2)	30.9 (3)
小鼠正常肝细胞核RNA		100 (2)	90.0 (1)	77.0 (3)	67.0 (3)	41.2 (3)
大肠杆菌RNA		100 (2)		104.0 (1)	93.0 (1)	115.0 (1)

反应条件: 变性小鼠腹水肝癌DNA 30微克; ³²P-小鼠腹水肝癌细胞核RNA 150微克, 189, 198, 88次脉冲数/分/微克; 反应体积1毫升; 反应温度60℃; 反应时间16小时; 空白污染各为0.38%, 0.06%, 0.04%; 括弧内数字表示实验次数

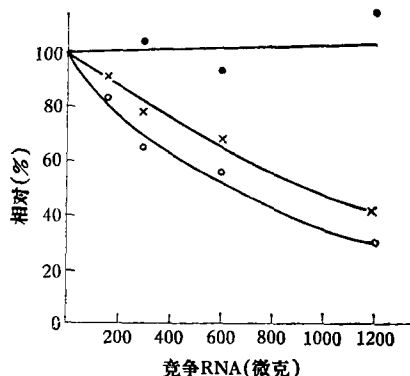


图4 杂交竞争抑制曲线(一)

○—○小鼠腹水肝癌细胞核RNA;
×—×小鼠正常肝细胞核RNA;
●—●大肠杆菌RNA

标记的小鼠腹水肝癌细胞核RNA和小鼠正常肝细胞核RNA,对标记小鼠腹水肝癌细胞核RNA的竞争抑制效果(分别为69.1%和58.8%),进行统计学处理,结果 $t = 5.5976$, $P = 0.005$,差异显著。实验结果证明,杂交竞争抑制实验能区别不同种属间和正常细胞与肿瘤细胞之间的RNA类别及碱基顺序上的差异,是一个比一般理化分析方法较灵敏的技术。

3. 比较小鼠腹水肝癌细胞和正常肝细胞RNA的同一性和差异性

将小鼠腹水肝癌细胞和正常肝组织按上述方法分部为细胞核与细胞质,并抽提得核RNA和质RNA,与³²P-小鼠腹水肝癌细胞核RNA进行杂交竞争抑制实验,结果见表8和图5。

结果指出,非标记的同源的小鼠腹水肝癌细胞核RNA的竞争抑制效力最强,抑制了72.3%的可杂交的标记核RNA的杂交反应。其次是小鼠正常肝细胞核RNA,抑制了50%。而细胞质RNA的竞争效力低于核RNA,非标记小鼠腹水肝癌细胞质RNA抑制了43.3%,小鼠正常肝细胞质RNA抑制了36.4%。

表8 杂交竞争抑制实验(二)

相对% 竞争RNA来源	竞争RNA量	0	300 微克	600 微克	1200 微克
小鼠腹水肝癌细胞核RNA		100	55.7	38.7	27.7
小鼠正常肝细胞核RNA		100	73.5	66.0	50.0
小鼠腹水肝癌细胞质RNA		100	77.7	64.5	56.7
小鼠正常肝细胞质RNA		100		74.5	63.6

反之,以标记小鼠正常肝细胞核RNA与变性DNA杂交,以非标记小鼠正常肝细胞核和细胞质RNA以及小鼠腹水肝癌细胞核和细胞质RNA为竞争核酸。结果是同源的小鼠正常肝细胞核RNA竞争抑制效力大

三、小结与讨论

为了比较小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 与小鼠正常肝细胞核 RNA 的同一性和差异性,用核酸杂交竞争抑制法作的实验结果显示,小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 一方面有比小鼠正常肝细胞核 RNA 为多的核苷酸顺序,另一方面又丢失了一些为小鼠正常肝细胞核 RNA 所具有的核苷酸顺序。在比较细胞核 RNA 和细胞质 RNA 的同一性和差异性的实验结果指出,细胞核 RNA 传递到细胞质内是有限制的,也就是说只有部分细胞核 RNA 传递到细胞质内;其中小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 传递到细胞质内略多于小鼠正常肝细胞核 RNA 的传递。而小鼠腹水肝癌 DNA 与小鼠正常肝 DNA 的杂交专一性没有明显差别。

Britten 和 Kohne (1968)证明,在较高等有机体的 DNA 中含有重复顺序和单一顺序。在小鼠基因组中,10% 是含有高度重复顺序,有 10^4 复本,这部分顺序似乎不转抄;20% 左右 DNA 含有中等重复顺序,有 10^3 — 10^4 复本;其它近 70% 的 DNA 含有单一顺序,只有 1 个复本。一般在低的 RNA 浓度和短的反应时间的条件下进行的杂交反应,仅能测得与重复顺序互补的 RNA。所以,在本文上述杂交反应条件下所测得的结果,是反映了与 DNA 重复顺序互补的 RNA 的差异性和同一性。根据本实验工作结果分析,在小鼠腹水肝癌细胞核 RNA 与小鼠正常肝细胞核 RNA 间呈现的,与部分 DNA 重复顺序可杂交的 RNA 分子间的差异性,有可能是量上的变化,即核苷酸碱基顺序频率的改变,是由于基因表现的抑制和去抑制的结果。

以小鼠腹水肝癌为材料所观察到的核 RNA 的变化,是与 Mendeck 等(1969)^[6]以大鼠 5123 D 肝癌为材料,以及 Chiarugi (1969)^[17]以大鼠的 Yoshida 腹水肝癌和 Morris 5123 肝癌为材料所得的结果是相一致的。Shearer 等(1972)^[18]在用化学致癌物诱发出来的肝癌中观察到细胞核 RNA 向细胞质内选择性传递机转的丧失,甚至致癌物处理 6 天时即见到变化的发生。Garrett 等^[19](1973)在用 DEN 诱发大鼠肝癌发生过程中,也观察到核 RNA 传递的改变或细胞质 mRNA 的不稳定性。Dreus 等^[21](1968)用大鼠 3924 A 肝癌、H₃TC₁ 肝癌和 9121 肝癌为材料也指出,在肿瘤组织中比正常肝组织有更多的核 RNA 出现在细胞质内。在本实验中,以小鼠腹水肝癌为材料,虽然也见到腹水肝癌细胞核 RNA 在细胞质内的出现比正常肝细胞核 RNA 为多,但差异不显著。

尚有一个问题应该提出的,就是现在用于接种腹水肝癌的小鼠种系与原来诱发腹水肝癌时所用的种系是不同的,那么本文结果会不会是反映遗传上的差异呢?在本文所使用的液相杂交技术条件下,核苷酸碱

(下转第 32 页)

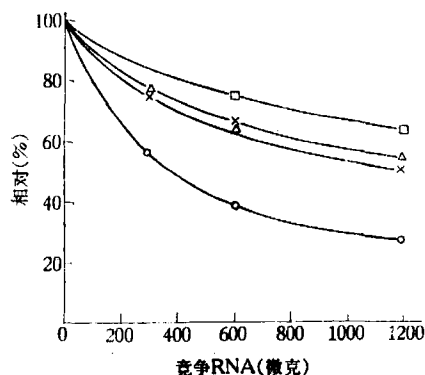


图 5 杂交竞争抑制曲线 (二)

变性 RNA: 30 微克; ^{32}P -小鼠腹水肝癌细胞核 RNA: 150 微克; 竞争 RNA:

- 小鼠腹水肝癌细胞核 RNA;
- ×—× 小鼠正常肝细胞核 RNA;
- △—△ 小鼠腹水肝癌细胞质 RNA;
- 小鼠正常肝细胞质 RNA

于异源的小鼠腹水肝癌细胞核 RNA (见图 6 和表 9),前者抑制了 84.7%,后者抑制了 60.4%。细胞质抑制效力低于核 RNA,小鼠腹水肝癌细胞质 RNA 抑制了 29.6%,肝细胞质 RNA 抑制了 23.4%。

表 9 杂交竞争抑制实验 (三)

相对 % 竞争 RNA 来源	竞争 RNA 量 0	300 微克	600 微克	1200 微克
小鼠正常肝细胞核 RNA	100	43.0	34.0	15.3
小鼠腹水肝癌细胞核 RNA	100	75.5	49.6	39.6
小鼠正常肝细胞质 RNA	100	89.9	80.8	76.6
小鼠腹水肝癌细胞质 RNA	100	76.8	77.1	70.4

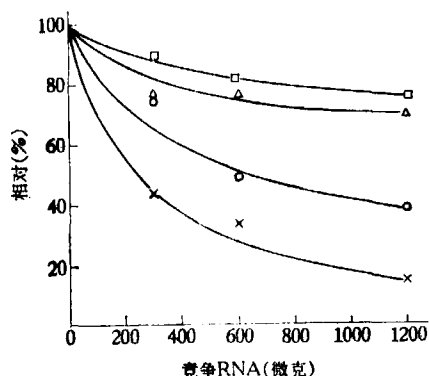


图 6 杂交竞争抑制曲线 (三)

变性 RNA: 30 微克; ^{32}P -小鼠正常肝细胞核 RNA: 150 微克; 竞争 RNA:

- ×—× 小鼠正常肝细胞核 RNA;
- 小鼠腹水肝癌细胞核 RNA;
- △—△ 小鼠腹水肝癌细胞质 RNA;
- 小鼠正常肝细胞质 RNA

定, 则均因其操作较烦且读数低而未能采用。鉴于 DiGiorgio^[10] 以 1:9 的二甲亚砷正丙醇液短时洗涤薄膜, 以使色带与非色带区色泽对比清晰; 我们用 INT 代替 NBT 染色, 再以 1:9 二甲亚砷正丙醇液洗脱色泽, 而后作定量测定, 结果比较满意。

我们在定量测定过程中, 系用自动紫外分光光度计, 因有放大系统, 所以只需将电泳条的各色带洗脱, 灵敏度已足够满意。如采用一般分光光度计或光电比色计, 则宜将电泳条与覆盖条的相应各色带一起洗脱, 再测定其光密度; 否则因读数过低而影响其正确性, 特别对 LDH-4, LDH-5 之影响更大。如果将薄膜条宽度适当增加, 如增至 5.0 厘米, 血清用量增加一倍, 则既能适用于一般分光光度计或光电比色计, 也可提高光密度读数, 唯薄膜及试剂之用量也将相应增多, 色泽洗脱时间也应适当延长。若薄膜条之宽度不变而仅增加血清用量, 则因其点样时间延长, 且未能增加酶促反应的面积, 所以效果不甚满意。

小 结

本文报告了在测定 LDH 同功酶时, 经电泳分离后, 用 1:9 的二甲亚砷正丙醇液来洗脱经 INT 染色的醋酸纤维薄膜各区带色泽, 再以分光光度计进行定量

测定的方法; 并对本测定方法的条件与可靠性作了一些探讨。

用本法测定了 111 例正常人血清 LDH 同功酶含量百分率的正常值(%), 其结果为: LDH-1, 27.1 ± 2.8 ; LDH-2, 34.7 ± 4.3 ; LDH-3, 20.9 ± 2.4 ; LDH-4, 11.7 ± 3.3 ; LDH-5, 5.7 ± 2.9 ; 与有关资料中报告用光密度法测定的正常值相近似。

主要参考资料

- [1] Auvinen, S.: *Acta Med. Scand.*, Supp. 539, 1972.
- [2] Criss, W. E.: *Cancer Res.*, **31**, 1523, 1971.
- [3] Schwatz, M. K.: *Clin. Chem.*, **19** 10, 1973.
- [4] Opher, A. W. et al.: *ibid.*, **12**, 308, 1966.
- [5] Lubrano, T. et al.: *ibid.*, **17**, 882, 1971.
- [6] Homer, G. M. et al.: *Am. J. Clin. Path.*, **51**, 287, 1969.
- [7] Preston, J. A. et al.: *ibid.*, **43**, 256, 1965.
- [8] Bergerman, J.: *Clin. Chem.*, **12**, 797, 1966.
- [9] 上海市闸北区中心医院检验科: 快速检验诊断资料汇编 (人民卫生出版社, 1972 年), 169 页。
- [10] DiGiorgio, J.: *Clin. Chem.*, **17**, 326, 1971.

[本文于 1975 年 1 月 3 日收到]

(上接第 24 页)

基顺序配对是相对的, 因此方法本身的灵敏度还是有一定的限度的。Chiarugi (1969)^[1] 的工作中也指出, 这种杂交技术对不同品种大鼠间的反应灵敏度是比较低的。所以认为本文所得的结果尚不能用遗传上的差异来解释的。

综合上述实验结果表明, 核酸分子杂交原理及其技术可用于比较肿瘤细胞和正常细胞间核酸核苷酸顺序的同一性和差异性; 并为进一步探讨这些差异性在肿瘤发生中的生物学意义提供一个较灵敏的研究技术。当然, 核酸杂交技术的灵敏度, 特别是应用于较高等有机体的研究中, 还有一定的限度。因此, 在肿瘤研究中, 除杂交技术本身外, 尚需要其它有效的、灵敏的分析技术的相互配合。

参 考 资 料

- [1] Chiarugi, V. P.: *Biochem. et. Biophys. Acta*, **179**, 129—135, 1969.
- [2] Drews, J. et al., *Europ. J. Biochem.*, **3**, 284—292, 1968.
- [3] Garrett, C. T. et al.: *Cancer Res.*, **33**, 1662—1669, 1973.
- [4] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208—218, 1961.
- [5] Marmur, J. et al.: *ibid.*, **5**, 109—118, 1962.
- [6] Mendecki, J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 494—501, 1969.
- [7] Nygaard, A. P. et al.: *ibid.*, **12**, 98—104, 1963.
- [8] Scherrer, K. et al.: *ibid.*, **7**, 486—490, 1962.
- [9] Shearer, R. W. et al.: *Cancer Res.*, **32**, 339—342, 1972.

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]