

凝胶中 ^3H , ^{14}C 和 ^{35}S 同位素测定的快速荧光自显影方法

王苏生 舒群芳 周 芬

(中国科学院遗传研究所, 北京)

近年来,对聚丙烯酰胺凝胶中的 ^3H , ^{14}C 和 ^{35}S 等放射性测定的荧光自显影(fluorography)方法已经得到广泛应用^[1,2]。上述这些同位素均发射软 β -射线。而 ^3H 所发射的 β -粒子能量最低 ($E_{\max} = 18.6\text{KcV}$), 它的射程很短。由于凝胶与 X-光底片之间的间隙以及凝胶对射线的吸收作用等原因,一般不能达到感光底片产生放射自显影作用。

荧光自显影技术的发展,使得凝胶中 ^3H 同位素的测定成为可能,同时也大大提高了 ^{35}S , ^{14}C 放射自显影的灵敏度。荧光自显影方法的基本原理是在凝胶中渗入某种荧光体,当放射性同位素 ^3H , ^{14}C 等发射的 β -粒子作用于荧光体时,便产生多个光子,光子作用于 X-光底片上的感光乳胶,使其感光。

通常选用的荧光体是 2, 5-二苯基噁唑(PPO)^[3,4]。将 PPO 溶于二甲基亚砜(DMSO)中,用此溶液浸泡凝胶,然后再用水洗除 DMSO,干胶后对 X-光底片曝光。由于 PPO 毒性较大,价格昂贵,操作也不方便。后来有人发现以水溶性的水杨酸钠作为荧光体代替 PPO,仍能取得较好效果^[5]。此外还发现对 X-

光底片作预曝光处理,能提高自显影的灵敏度^[6]。而在 -70°C 低温条件下对底片曝光也是必要条件^[7]。

本文综合以上方法,全部采用国产试剂和 X-光底片,试验了水杨酸钠的浓度以及底片预曝光的不同强度对 ^3H 标记蛋白质荧光自显影的影响。确定了一个经济而快速的荧光自显影

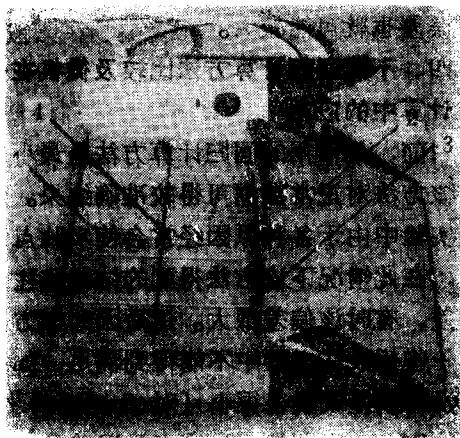


图 1 平板凝胶干燥器

1. 恒温加热板, 2. 多孔滤板, 3. 密封硅橡胶片, 4. 抽气管道。需要干燥的凝胶, 放置在滤纸上, 然后移到多孔滤板上复以密封硅橡胶片, 接通真空管道, 抽真空约 1 小时。胶便干燥成固体薄片。

参 考 文 献

量。

7. 各种作图法和回归计算方法均有其各自的适用范围, 故必须视实验情况而选用合适的方法。若数据中有偏离点时, 最好采用加权回归法计算, 绝不能随意丢弃实验数据(除非从统计学角度认为是可以丢弃的)。若将微机用于受体参数计算, 则结果将更可靠。

- [1] Braunsberg, H. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 11, 1561, 1979.
- [2] Braunsberg, H. et al.: *ibid.*, 13, 1147, 1980.
- [3] Keightley, D. D. et al.: *ibid.*, 13, 1317, 1980.
- [4] Braunsberg, H.: *Recent Results in Cancer Res.*, 91, 18, 1984.
- [5] Chamness, G. C. et al.: *Steroids*, 26, 1975.

[本文于 1986 年 5 月 12 日收到]

的标准方法,该方法也适用于 ^{14}C 和 ^{35}S 等标记的生物高分子的类似实验,现介绍如下:

材料与 方法

1. 材料

水杨酸钠(北京化工厂出品,化学纯)。X-光底片的显影及定影粉(北京照相器材厂出品)。X-光底片(天津感光材料厂出品)。预曝光用滤光片为普通半透明 0.5 mm 左右的红色聚乙烯塑料片。普通 6 伏照相用闪光灯和凝胶干燥器(李树桐、王苏生设计,本所技术室生产的 ST-1 型凝胶干燥器,见图 1)。

2. 方法

凝胶的荧光体处理:电泳完毕后将凝胶直接浸泡于 10 倍体积 0.5—1.0M 的水杨酸钠水溶液中(pH5—7)在室温下摇动 30 分钟。用考马斯蓝染色后的凝胶,脱色后先在无离子水中浸泡 2 小时,其中换水一次以除去甲醇和醋酸,然后用水杨酸钠溶液处理。

凝胶的干燥:将水杨酸钠处理过的凝胶垫以用水浸湿的滤纸(新华 3 号),移放到平板凝胶干燥器的多孔滤板上,以聚乙烯薄膜(保鲜纸)覆盖凝胶,盖上密封硅橡胶片,抽真空并打开加热和定时开关,待凝胶干燥后(约 1 小时)揭去塑料薄膜。与经预曝光处理的 X-光底片夹紧,在 -70°C 冰箱中曝光。

X-光底片的预曝光 在暗室中(可有暗红光)将 X-光底片置于淡黄色的厚纸片上,用红色滤光片覆盖。闪光灯置于底片中央上部约 60cm 处,闪光灯的光窗也用红色塑料片覆盖。按闪光灯开关进行一次闪光。

结 果

1. X-光底片预曝光强度对自显影的影响

为了提高感光胶片的敏感度,小心地控制光量对 X-光底片预曝光,致使感光乳胶中产生由 2—3 个银原子形成的银核微粒,这种微粒能更有效地捕获光子,因而能提高荧光自显影的灵敏度。我们按上节所述方法,改变闪光灯与底片之间的距离对底片预曝光。对显影及定影

后的底片在 600 nm 波长比色,以未预曝光的底片作为空白对照,观察不同光量对底片感光的影响。比色结果如下:闪光灯离底片的距离分别为 60cm, 55cm, 45 cm 时,其光密度(O. D)分别为 0.263; 0.392 和 0.598。

在取得不同光量预曝光底片的定量数据以后用相同 ^3H 放射性强度的样品作凝胶电泳,干胶后对不同预曝光强度底片作荧光自显影。结果发现未经预曝光处理的底片没有出现自显影条带,而经预曝光处理的底片均出现明显的条带。为得到定量的数据,用 CS-910 薄层扫描

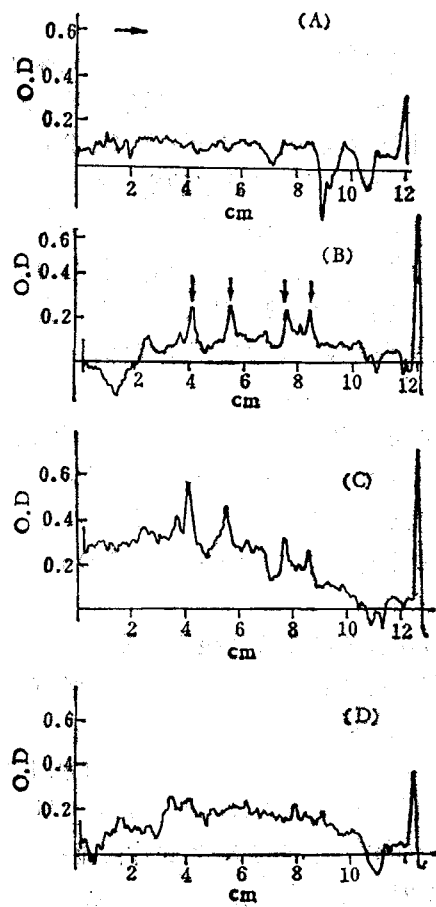


图 2 不同强度预曝光处理 X-光底片后的荧光自显影扫描图谱

(A) 未经预曝光处理,
(B) 底片发黑度 $O. D_{600} = 0.263$,
(C) 底片发黑度 $O. D_{600} = 0.329$,
(D) 底片发黑度 $O. D_{600} = 0.598$,
图中纵座标为光密度。横座标为扫描距离。(A) 中箭头示扫描方向。(B) 中箭头示部分吸收峰。

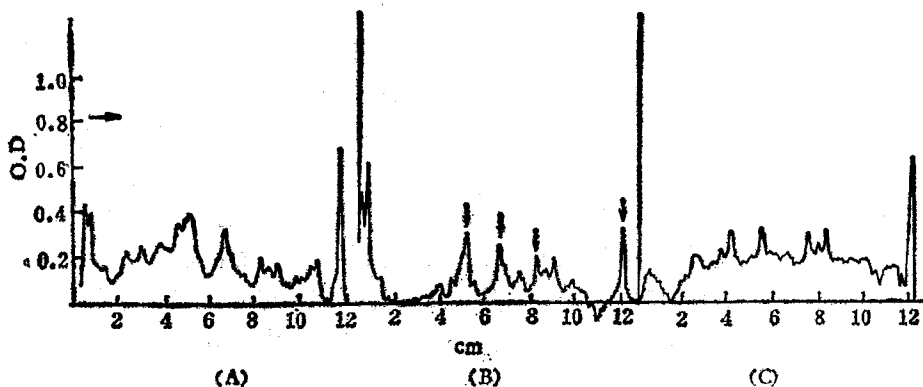


图3 不同浓度水杨酸钠处理凝胶后的荧光自显影扫描曲线图谱

(A) 0.5M; (B) 0.75M; (C) 1.0M; 纵座标为光密度。横座标为扫描距离(cm)。

(A) 中箭头示扫描方向。(B) 中箭头示吸收峰。

仪进行自显影图谱的光密度扫描,结果示于图2(A—D)。其中(A)为未经预曝光的X-光底片,未出现吸收峰。图2(B)及(C)分别为距离60cm和55cm预曝光处理的底片在相同实验条件下,可以清晰地看到 ^3H 标记蛋白质电泳图谱所产生的光密度扫描吸收峰。图2(D)是距离45cm预曝光处理的底片,由于预曝光强度过大,致使底片发黑,因而反差降低,不能测出吸收峰。

比较图2(B)和2(C)发现,尽管(C)的峰值较高,但基线不够平直,而(B)可得到相对平直基线和较好的分辨率。由此可以确定,当控制光量预曝光,使底片产生约0.25O.D时,将能获得满意结果。

2. 水杨酸钠浓度对荧光自显影的影响

以水杨酸钠作为荧光体,具有经济和操作简便等优点。本实验的目的在于确定一个合适的浓度。为此分别用0.5M, 0.75M和1.0M三种不同浓度浸泡凝胶,时间均为30分钟。干胶后对经预曝光处理的X-光底片自显影。最后以CS-910光密度扫描仪对底片上自显影条带扫描。结果示于图3(A—C)。由图可见,当用0.75M水杨酸钠水溶液处理凝胶能得到基线平直,分辨率最佳的结果。当浓度增加到1.0M时,基线增高(底片背景发黑度增加)因而分辨率略有下降。因此认为选用0.75M水杨酸钠处理效果较为理想。

3. 荧光自显影的标准方法

^3H , ^{14}C 或 ^{35}S 标记的蛋白质样品在聚丙烯酰胺凝胶电泳以后,将凝胶浸泡于10倍凝胶体积的0.75M水杨酸钠水溶液中(含0.5%甘油, V/V)在室温下摇动30—60分钟。然后用平板凝胶干燥器抽干。在暗室中将干胶与经预曝光处理的X-光底片重叠,放正在自显影暗盒中,置于 -70° 冰箱中作荧光自显影。

预曝光的强度经预备实验确定,用改变滤光片的厚度(层数)和闪光灯与底片之间的距离,使X-光底片的发黑度达到 $\text{O.D}_{600} = 0.25$ 左右,固定此实验条件,以便得到较好的重复性。

图4(见封三)给出一个用此标准方法进行荧光自显影的实例。枯草杆菌用 ^3H -Ser标记30分钟提取蛋白质作SDS-PAGE,然后作荧光自显影。每个样品的点样量约为300,000cpm。自显影3天后便能得到非常清晰的电泳自显影图谱。足以适用于一般的研究工作。

讨 论

本文所述的 ^3H 放射性测定的荧光自显影方法的特点是对感光底片作预曝光处理和用水杨酸钠作荧光体处理凝胶。尽管其灵敏度较用美国New England公司出品的专用试剂“Enhance”(专利配方)略差,但其价格不到“Enhance”的1%,故而值得推广。为了克服灵

直接凝胶杂交法的生物素显色与增色

黄承汉 胡惠廉 袁恬莹

(湖南医学院生化研究室, 长沙)

对于任一核酸样品中靶 DNA (或 RNA) 序列的检测, 均需借助两项基本分析技术: (1) 基因特异探针的掺入标记; (2) 带标探针与待测样品的分子杂交。杂交的结果可借放射自显影^[1]或呈色反应^[2]所产生的信号而加以分辨。

用缺口平移 (nick translation, NT) 法标记的双链 DNA 探针, 依掺入脱氧核苷酸 (dNTP) 性质不同而分为放射性与非放射性两类, 前者多用 [α -³²P]-dNTP、后者常以生物素衍生物 (如 biotin-11-dUTP) 作掺入体。DNA 分子的互补杂交, 按样品在电泳分离后是否进行转移也分为两类, 即 Southern 印迹 (滤膜) 杂交^[1]和直接凝胶杂交^[3]。本文作者曾建立放射性直接凝胶杂交法, 用于正常人、大鼠珠蛋白基因组和克隆 DNA^[3], 以及地中海贫血患者 DNA^[4,5]

灵敏度较差的问题, 可通过延长自显影曝光的时间而得到克服。从本文所给出的实例 (图 4) 来看, 我们认为本文所提供的方法具有广泛的适用性。如果样品中的放射性强度 (cpm) 较低, 可以增加在 -70℃ 中的曝光时间, 自显影图谱的清晰度随着曝光时间的增加而增加, 而条带无明显的扩散现象。

本实验所用的凝胶厚度为 1 mm, 如果胶厚度增加, 则浸泡时间应适当延长, 一般不应超过 60 分钟。为防止高浓度凝胶 (超过 10%) 在干胶时可能发生断裂, 在水杨酸钠溶液中加入 0.5—1% 的甘油较为有利。

为了确定预曝光的光强度, 本文给出一个简单易行的比色经验方法。国产医用 X-光底片的片基略呈蓝色。吸收光谱波长扫描表明片基在 600nm 处有小的吸收峰。因此在比较预曝

的限制性图谱分析, 获得非常理想的效果。本文报道一种非放射性直接凝胶杂交法, 并对如何增强其信号作了初步探索。此法与使用生物素探针的滤膜杂交法^[1]一样, 切实可行, 效果好, 而更经济、简便。

材 料 和 方 法

1. 药品和试剂 限制性内切核酸酶: Bio-Lab 产品; 琼脂糖: BRL 及上海东海制药厂产品; 硝酸纤维素滤膜: S&S 出品; DNA 检测药盒与生物素-11-dUTP: 由 BRL 公司馈赠; 荧光体 EN³HANCE™: New England Nuclear 产品。其余试剂为国产分析纯。

2. λDNA 的分离提取与消化 用 λ噬菌体 cI857ts 感染宿主细胞 (菌株 W3110), 按文献

光引起底片的发黑度时, 在 600nm 处比色是合理的。对预曝光光源的性质及滤光片的种类和质量无严格要求。

参 考 文 献

- [1] Fruscoloni, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3359, 1983.
- [2] Inasi, B. S. and Brown, I. R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 881, 1982.
- [3] Bonner, W. M. and Laskey, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83, 1974.
- [4] Bravo, R.: in "Two-Dimensional Gel Electrophoresis of proteins, Methods and Applications" ed by Celis, J. E. and Bravo, R. pp. 3—36, 1984.
- [5] Chamberlain, J. P.: *Anal. Biochem.*, **98**, 132, 1979.
- [6] Laskey, R. A. and Mills, A. D.: *Eur. J. Biochem.*, **56**, 335, 1975.
- [7] Prydz, S. et al.: *Anal. Biochem.*, **42**, 156, 1970.

[本文于 1986 年 2 月 25 日收到]

《甲型流感病毒的固相碘化标记及放射免疫沉淀》的图

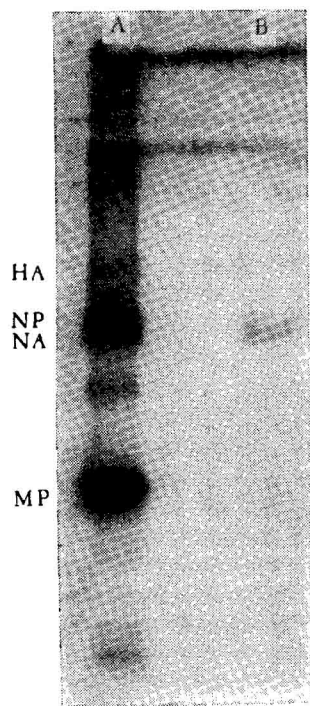


图 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影
A 示¹²⁵I标记的流感病毒多肽, B 示相应抗体的免疫沉淀

《凝胶中³H,¹⁴C和³⁵S同位素测定的快速荧光自显影方法》的图

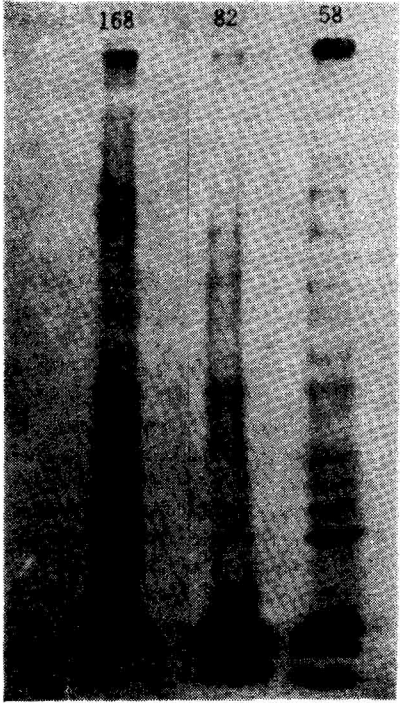


图 4 运用本文标准方法的荧光自显影实例
对数生长期的枯草杆菌,加入³H-丝氨酸(5μCi/ml细胞)标记30分钟,提取蛋白质作 SDS-PAGE. 自显影三天结果. 168 为野生型 82 及 58 为核糖体蛋白基因突变株。

《介绍一种高效,简便的 cDNA 合成方法》的图

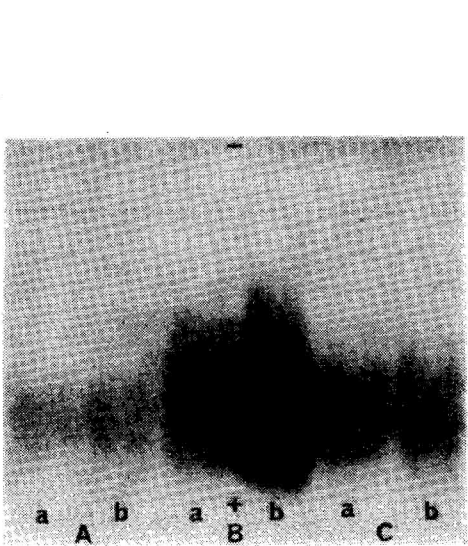


图 3 碱性琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示不同浓度 RNaseH 对 cDNA 第二链链长的影响。A、B、C 的 RNaseH 浓度分别为 0.42u, 0.58u 和 0.75u(参看图2)。a 和 b 分别表示在不同 RNaseH 浓度下反应 2 小时和反应 16 小时。

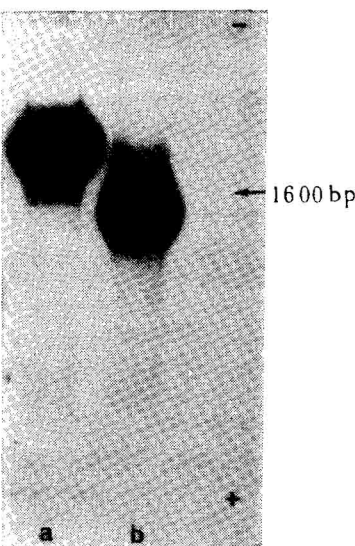


图 4 琼脂糖电泳、放射自显影图谱
示大肠杆菌 DNA 连接酶对 cDNA 链长的影响。
a. 加 *E.coli* DNA 连接酶(反应过夜); b. 未加 DNA 连接酶。