

仪器与设备

一种改进的羟基磷灰石层析法分离 DNA 的恒温加热装置*

刘建成 周幼宝

(苏州医学院化学教研室)

孙国器 王明锁 冯纪辛

(苏州医学院放损教研室)

提 要

本文设计了一种控温准确,操作简便的加热装置,提高了羟基磷灰石层析的分辨能力,并研究采用此装置在不同温度条件下的层析效果。实验证明,用羟基磷灰石层析法分离单、双链 DNA, 60℃ 时分离效果最佳, 65℃ 以上则严重影响层析结果,层析温度应控制在 $60^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

Bernardi^[1] 和 Miyazawa 及 Thomas^[2] 等人首先应用羟基磷灰石 (HA) 来分离单链和双链 DNA, 后来 Ahnström^[3], Rydberg^[4] 先后应用羟基磷灰石分离细胞中的单、双链 DNA。自此,羟基磷灰石层析技术在 DNA 的损伤^[5,6] 和修复^[7,8] 的研究工作中得到了广泛地应用。以后还被应用于 RNA 的分离^[9]。

应用羟基磷灰石层析技术分离 DNA 必需将层析柱的温度维持在 $60^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。实验证明,分离的效果与温度有密切的关系。但目前应用的套管加热法^[2] 和金属块加热法^[10] 均无法准确地维持温度的恒定。要满意地从双链 DNA 中分离单链 DNA, 必需研制一种控温准确、操作简便的加热装置。本文设计了一种控温装置,提高了羟基磷灰石层析的分辨能力,并研究了利用此装置在不同温度条件下的层析效果。

材 料 与 方 法

一、层析柱控温装置的设计及制作

用两块 $5.0 \times 9.0\text{cm}$ 暗丝电炉板, 每块内装 800W 电炉丝一根, 二根电炉丝串接。两块电炉板相距约 5.5cm, 周围用铝板固定。在中间腔内放置 0.5mm 厚的紫铜板“夹套”(容积为

$19 \times 13 \times 5.5\text{cm}$)。“夹套”顶部用紫铜板做盖,“夹套”上下打孔,用以放置层析管,“夹套”两侧垫以石棉隔热材料(图 1)。

加热装置内的电炉丝用调压变压器通过 WMZK-01 型温度控制仪 ($0^{\circ}-100^{\circ}\text{C}$) 控制“夹套”内的温度,具体装配见图 2。加热装置可用于 10 支层析管同时进行实验。

二、层析方法

按 Bernardi 方法制备变性 DNA^[11] (即单链 DNA)。将 2ml DNA ($300\mu\text{g}/\text{ml}$, Serva 公司产品) 和 2ml 0.13M NaCl-0.01 M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液(简称 KPB) 混合,在沸水浴中加热 15 分钟,然后迅速放入冰水浴中冷却, 4°C 保存。

在 $1.0 \times 17\text{cm}$ 层析柱底部垫一小块泡沫塑料小圆片,加入羟基磷灰石(高度约 1.5cm), 用 0.01M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液洗柱 2—3 次。

取天然 DNA 0.5ml 和热变性 DNA 0.5ml 加于事先用 0.01M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液平衡的柱中后,用 0.01M 磷酸钾盐缓冲液洗涤至流出液的光密度为零。如洗脱液为磷酸钠盐缓冲

* 本文系中国科学院基金会资助课题

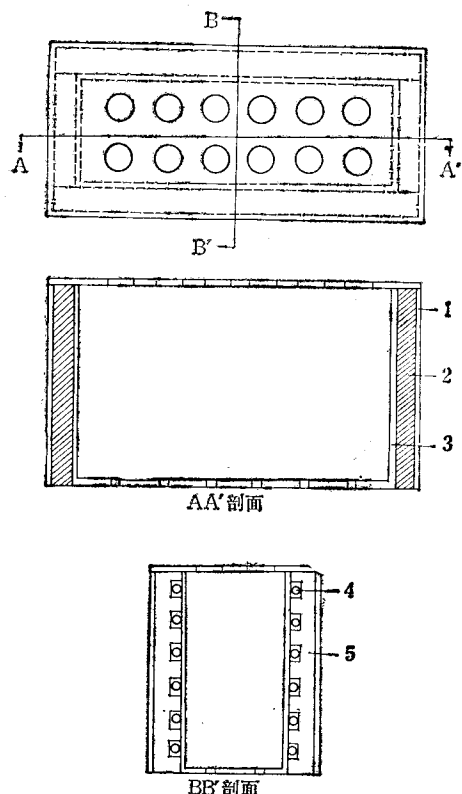


图 1 加热装置剖面图

1. 铝外壳 2. 石棉隔热材料 3. 紫铜“夹套”
4. 电炉丝 5. 暗丝电炉板

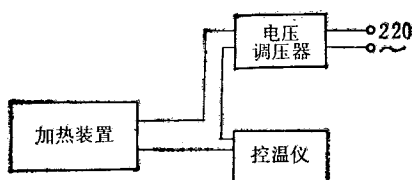


图 2 控温装置装配示意图

液时, DNA 上柱后用 0.01M 磷酸钠盐缓冲液洗涤。然后用 0.025—0.3M pH6.8 的不同浓度磷酸缓冲液分段洗脱, 每一浓度洗脱四次, 每次 4ml。洗脱液用 751-G 型分光光度计测定其光密度, 入射光波长为 260nm。

用 0.125M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液洗脱时为单链 DNA, 用 0.25M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液洗脱时为双链 DNA^[12]。单链 DNA 占单、双链 DNA 的百分率用下式计算:

单链 DNA% = {0.125M KPB 洗脱液的光密度读数} / {(0.125MKPB + 0.25M

KPB) 洗脱液的光密度读数} × 100%

结 果

在室温 (20℃) 下, 用不同浓度的磷酸钾盐缓冲液洗脱 50% 变性 DNA 和 50% 天然 DNA 混合样品时, 洗脱结果表明, 在这一温度下无法将单链和双链 DNA 分开。单、双链峰值分别出现在 0.15M 和 0.175M 处 (见图 3)。

在 50℃ 条件下, 用不同浓度的磷酸钾盐缓

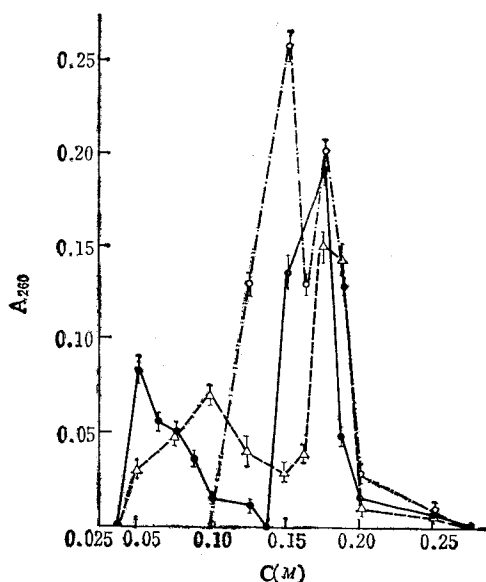


图 3 在不同温度下用不同浓度的磷酸钾盐缓冲液 (pH6.8) 洗脱混合试样的结果

●—● 为 60℃, △---△ 为 50℃, ○---○ 为 20℃

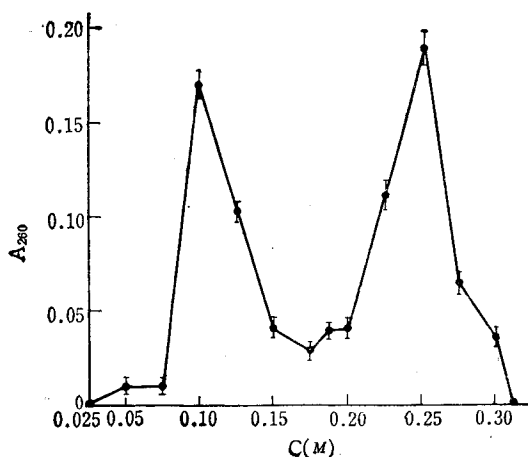


图 4 60℃, 用不同浓度的磷酸钾盐缓冲液 (pH6.8) 洗脱混合试样的结果

冲液洗脱时,单、双链 DNA 分离虽有改善,但仍无法完全分离。单、双链峰值分别移至 0.10M 和 0.175M 处(见图 3)。

在 60℃ 条件下,用不同浓度磷酸钾盐缓冲液洗脱时,能将单、双链 DNA 完全分离。单、双链的峰值分别出现在 0.05M 和 0.175M 处(见图 3)。

在 60℃ 条件下用不同浓度的磷酸钠盐缓冲液洗脱时,单、双链 DNA 的峰值分别出现在

0.10M 和 0.25M 处,分离效果不及磷酸钾盐缓冲液(见图 4)。

在 50°、55°、60°、65°、70℃ 条件下,分别选用 0.125M 和 0.25M pH6.8 磷酸钾盐缓冲液洗脱单、双链 DNA 混合试样,结果见表 1。从表 1 可知 55℃ 和 60℃、65℃ 与 60℃,单、双链 DNA 的分离效果无明显差别 ($P > 0.05$)。而 70℃ 与 60℃ 分离效果有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 1 温度对单链占单、双链总量百分率的影响

温度(℃)	50	55	60	65	70
单链% (均值±标准差)	47.0±1.80	48.3±1.30	49.7±3.17	47.7±3.87	61.4±1.63

讨 论

用羟基磷灰石分离单、双链 DNA,必需在 60℃ 条件下进行,以消除非特异性键合。Miyazawa 和 Thomas^[2] 曾提出用玻璃套管的装置,应用迴流热水的方法来进行 DNA 的热洗脱,这一方法至今仍被采用^[8]。但如果同时用几支层析管串接进行实验时,进水管与出水管的温差较大。尤其在室温较低的情况下,很难做到使几支层析管内的温度接近相同。Ahns-trön^[10] 等人提出用金属块中间打孔放置层析管,金属块外部绕包有绝缘材料的电炉丝,经继电器通电加热金属块来维持实验所需的温度。由于金属块的热容量大,因此温度波动的范围也较大,一般不易控制在所需温度的±5℃ 以内。根据本实验室经验,套管和金属块加热法温度波动常大于±10℃。层析时如果温度超过 65℃,“单链”DNA 在单、双链 DNA 中所占的百分率和 60℃ 时有显著的差异。(见表 1)根据 Peter^[12] 用超速离心法证明 60℃ 时用 0.125M 磷酸钾盐缓冲液洗脱得到的 DNA 为单链 DNA,以后用 0.5M 磷酸钾盐缓冲液洗脱得到的是双链 DNA。在偏离 60℃ 时进行分离单、双链 DNA 就意味着层析分离单、双链 DNA 能力的降低。因此,准确控制层析时的温度对于用羟基磷灰石分离 DNA 就显得十分

重要。

我们设计的加热装置材料易得,制作方便。该装置利用电炉丝加热紫铜“夹套”,由于紫铜的导热性能良好,能使“夹套”内的温度非常均匀。我们曾做过试验,如不用“夹套”,则腔内两侧与中间的温度有差别;而用“夹套”时,可基本消除温差。另外,如将 220V 市电直接与加热装置联接,仅通过控温仪来控制电源的断、接。当电路断路时,由于电炉丝的余热,“夹套”内的温度将高于所控温度,这也是金属块加热法的最大缺点。因此我们的设计,在加热装置与控温仪之间加接调压变压器,使加于加热装置的电压约在 120—140V。通过上述两项措施,可使“夹套”内的温度控制在所需温度的±1℃ 之内,仅为国外实验室所采用的控温装置温度波动的 1/5 左右。

图 3 提示层析温度应控制在 60℃ 左右,表 1 的数据表明,60°—70℃ 范围内温度变动比 60°—50℃ 范围内的温度变动对单、双链 DNA 的分离影响大。因此层析温度不应超过 65℃。图 3、表 1 还表明分离单、双链 DNA 的最佳缓冲液浓度为 0.125M 和 0.25M。因为缓冲液浓度越大越能将分子量较大的 DNA 片段洗下。

用羟基磷灰石层析法分离单、双链 DNA 是一种比较理想而简便的方法,但由于各厂生产的羟基磷灰石分辨能力并不完全一致,常会

影响实验结果。本实验采用上海东风生化试剂厂生产的羟基磷灰石,分辨能力良好,能满意地分离单、双链 DNA。

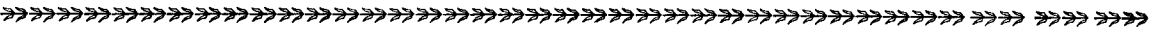
在热洗脱单、双链 DNA 的实验中,由于所用磷酸盐的不同,而影响洗脱峰值出现的位置。实验表明用磷酸钾盐缓冲液洗脱单、双链 DNA 的能力优于磷酸钠盐。

参 考 文 献

[1] Bernardi, G.: *Nature* (London), 206, 779, 1965.
[2] Miyazawa, Y. et al.: *J. Mol. Biol.*, 11, 223, 1965.

[3] Ahnström, G. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 23, 285, 1973.
[4] Rydberg, B.: *Radiat. Res.*, 61, 274, 1975.
[5] Sakai, K. et al.: *J. Radiat. Res.*, 22, 415, 1981.
[6] Sakai, K. et al.: *Radiat. Res.*, 98, 479, 1984.
[7] Lunec, J. et al.: *Radiat. Res.*, 85, 116, 1981.
[8] Catena, C. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 47, 489, 1985.
[9] Kalmakoff, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 55, 26, 1973.
[10] Ahnström, G. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 26, 493, 1974.
[11] Bernardi, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 423, 1969.
[12] Peter, M. K.: *Anal. Biochem.*, 97, 77, 1979.

[本文于 1986 年 3 月 30 日收到]



学术活动

全国第一届自由基生物学与自由基医学学术讨论会简况

第五届全国生物物理学学术会议卫星会之一——第一届自由基生物学与自由基医学学术讨论会于1986年10月27—29日在杭州召开。共42个单位104位代表参加,宣读论文75篇。论文有肿瘤、衰老、炎症、重灌注、流行性地方病、眼疾、环境因素、中医和中药作用机理、基础理论以及研究方法与技术等。其中少数工作已达到或接近国际水平。中国医学科学院药物研究所对五味子素抗自由基损伤机理的系统研究有相当深度。中国科学院生物物理所运用自旋捕集技术、电子自旋共振技术以及进行了光敏反应机理的研究取得了成绩。军事医学科学院放射医学研究所对超氧化物歧化酶(SOD)也进行了长期的较好的研究。许多工作是近年才开始,已取得较好结果。这次会议上自由基在植物生理及农业上的作用尚未得到反映。

会议期间还自发地进行了衰老问题、如何促进自由基生物学在我国的发展、氧化与抗氧化以及电子自

旋共振仪(ESR)研究技术等座谈会。学术空气浓厚。我国自由基生物学研究开始于五十年代后期,但当时参加人数及单位寥寥无几,研究内容也仅限于放射损伤及防护机理。七十年代以后,随着自由基生物学的迅速发展,以及它在许多疾病中所起的作用,引起我国生物物理学、生物化学、基础医学及临床工作者的注意。从事自由基生物学研究人员迅速增多的原因,主要是由于自由基涉及多种疑难疾病,也由于可以使用多方面的手段从不同角度来进行研究。预计必将有更多人参加此领域工作。大家提议:1988年召开第二届自由基生物学讨论会,并建议在生物物理学会之下成立自由基生物学专业委员会。

[兰州大学 生物系 郑荣梁
中国科学院生物物理研究所 忻文娟]