

人恶性疟原虫 DNA 的制备及研究

王昌才 陈仕荣 吴承声 金福军 钟雄林

(第一军医大学, 广州)

提 要

本文报道应用 SDS-酚方法从人工培养的海南人恶性疟原虫中提取 DNA, 用 $1 \times \text{SSC}$ 缓冲系统测得熔点 (T_m) 值为 63°C , 推算出 G+C 含量为 22.2%。用 S1 及绿豆核酸酶处理凝胶电泳分析表示在 DNA 内部存在对 S1 酶敏感的结构。

疟疾流行范围很广, 其病原体为疟原虫。近年来国外都在用基因工程技术研制疟疾疫苗和对原虫进行分子生物学的深入研究, 以便进行有效的防治。本文报道从人工培养的海南人恶性疟原虫中分离纯化出基因组 DNA, 进行凝胶电泳以及 S1 和绿豆核酸酶分析, DNA 熔点 (T_m) 测定推算碱基组成的结果, 并对 DNA 内部结构进行了初步探讨。

材 料 和 方 法

一、海南人恶性疟原虫 为本校疟免室人工培养, 纯化。

二、恶性疟原虫基因组 DNA 的制备

Tris 缓冲液) 相近似。而 PVC 固定化脲酶膜的表观 K_m 亦未见报道, 本研究测得为 25 mmol/L (37°C , $\text{pH} 7.5$, 20 mmol/L 磷酸盐- 10 mmol/L EDTA)。有人^[6-7]认为固定化酶由于基质和产物的扩散限制, 其表观 K_m 大都有增大的趋势。尽管酶膜的扩散限制小, 亦都增大。本研究测得的 PVC 固定化脲酶膜表观 K_m 比天然脲酶的 K_m 约大 4 倍, 与之相符。

参 考 文 献

- [1] Kaplan, A. et al.: *Selected Methods of clinical chemistry* Vol. 9(ed. Faulkner, W. R. et al.), American

取已分离纯化的人工培养疟原虫, 用 TE 缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl $\text{pH} 9.0$; 10 mmol/L EDTA) 洗 2 次, 用 3—5 体积 TE 缓冲液匀浆, 加入 SDS 至最终浓度为 1%, 60°C 保温 30 分钟, 加 RNase (用前 100°C 15 分钟处理) 至 $50 \mu\text{g/ml}$, 37°C 保温 1 小时, 加 $50 \mu\text{g/ml}$ 蛋白水解酶 E, 50°C 保温 1 小时, 然后用等体积的酚-氯仿-异戊醇提取 2—3 次, 收集水相 (含 DNA), 加入 2 体积的冷乙醇, 用玻棒将白色纤维状 DNA 挑出, 溶于 TE 缓冲液中备用。

三、琼脂糖凝胶电泳分析 按文献[1]进行。

- Association for clinical chemistry, New York, 1982, 357.
[2] Thomas, D. et al.: *Biochimie*, 1972, 54, 229.
[3] Konecny, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 403, 573.
[4] Carr, P. W. et al.: *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical chemistry*, John Wiley & sons, New York, 1980. 183.
[5] 上海化学试剂采购供应站: 《试剂手册》, 上海科学技术出版社, 1985, 1274.
[6] Wingard, L. B. et al.: *Immobilized Enzyme Principles*, Academic Press, New York, 1976, 128.
[7] Goldstein, L.: *Methods in Enzymology* (ed. Mosbach, K.), Vol. 44. Academic Press, New York, 1976, 397.

[本文于 1987 年 7 月 21 日收到]

四、DNA 熔点 (T_m) 的测定和碱基组成

计算 T_m 测定碱基组成计算,基本上按文献[2]进行。纯化的 DNA 溶解在 $1 \times \text{SSC}$ (0.15 mol/L NaCl ; 0.015 mol/L 柠檬酸钠), DNA 浓度约为 OD 260nm 读数 0.5 单位,在岛津 UV-240 分光光度计上进行测定紫外吸收光谱和连续升温测 T_m ,升温速度为每分钟 0.5°C ,从 50°C 开始,连续测 OD260nm 的变化,然后将 OD260nm 对温度作图,从图中定出溶解温度 T_m 值,应用 T_m 值按公式 $G + C\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ 计算碱基组成。

五、DNA 的 S1 和绿豆核酸酶切图谱分析

S1 酶反应条件基本上按文献[3]进行,反应缓冲系统为 40 mmol/L NaAc pH 4.6; 50 mmol/L NaCl ; 1 mmol/L ZnCl_2 ,反应条件为 37°C 30 分钟,然后加入 10 mmol/L EDTA 终止反应, S1 酶量为 $5 \text{ u}/\mu\text{g}$ DNA,反应终了用酚-氯仿-异戊醇处理一次, 0.7% 琼脂糖电泳,绿豆核酸酶反应条件基本上按文献[6]进行。

结果及讨论

一、海南株人恶性疟原虫 DNA 的制备

从人工培养的海南人恶性疟原虫中用 SDS-酚-氯仿-异戊醇方法可得到白色纤维状 DNA,每压积毫升原虫可得约 1 毫克 DNA,用 0.7% 琼脂糖电泳分析,出现一条比较均一的 DNA 带(图 3,4) 没有看到有 RNA 污染,紫外光谱为典型核酸图谱(图 1) OD260nm/280 nm 为 1.84; OD260nm/230nm 为 1.92,表明得到的 DNA 纯度较好较均一。

二、DNA 熔点 (T_m) 的测定和碱基组成的计算 DNA 熔点 (T_m) 是反映 DNA 内部结构和 G + C 或 A + T 含量的一个物理参数。G + C 含量高熔点就高。我们用 $1 \times \text{SSC}$ 缓冲系统配成 OD260nm 约 0.5 单位 DNA 浓度,用连续升温 ($0.5^\circ\text{C}/\text{分钟}$) 测定 OD260nm 的吸收变化,然后用 OD260nm 对温度作图得结果如图(图 2),从图中定出 T_m 值为 63°C ,应用公式 $G + C\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$ 计算得 G + C 为 22.2%,按双链 DNA 结构推算 A +

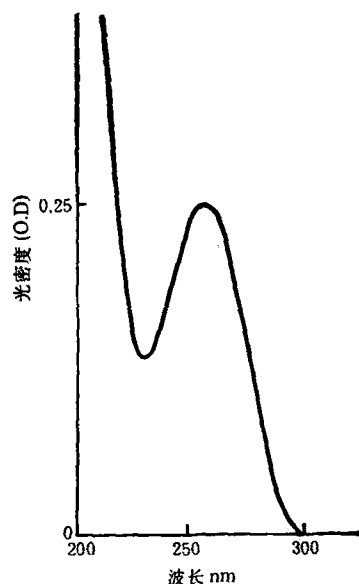


图 1 海南株人恶性疟原虫 DNA 紫外吸收光谱

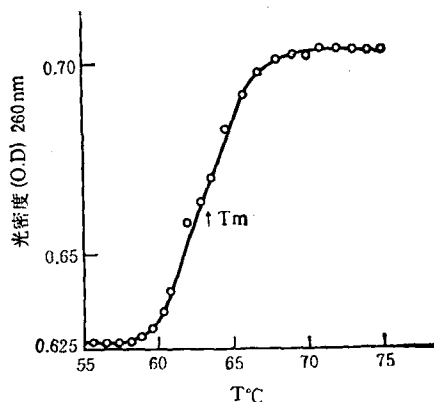


图 2 海南株人恶性疟原虫 DNA 热变性曲线

T 含量为 77.8%。即恶性疟原虫 DNA 的碱基组成为 G22.2%; C22.2%; A77.8%; T77.8%,比一般真核生物基因组 DNA 的 G + C 含量低得多,与国外文献报道基本相同^[4]。

三、S1 和绿豆核酸酶切分析结果 S1 酶可作用于单链 DNA 和 RNA,文献已报道用于分析染色质和 DNA 结构^[3,5],发现真核细胞基因组 DNA 内部有 S1 酶敏感点,认为是迴文排列的碱基顺序形成的“十”字结构,在 DNA 复制转录中起重要的调节作用。我们用 S1 酶处理恶性疟原虫 DNA,然后电泳分析,结果有明显的降解(图 3),表明 DNA 内部有 S1 酶敏感

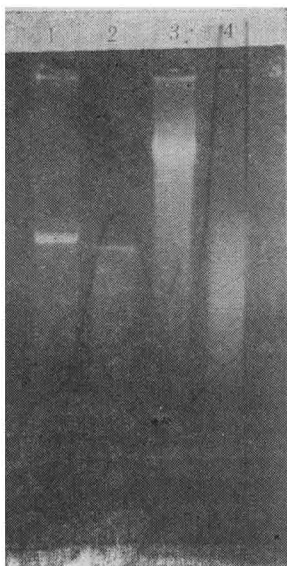


图3 S1酶切电泳图

1. pBR322 DNA 2. pBR322 DNA + S1 酶
3. 原虫 DNA 4. 原虫 DNA + S1 酶

点,具有“十”字结构。绿豆核酸酶(Mung bean Nuclease)与S1酶相似,作用于单链DNA和RNA,在与S1酶相同的反应条件下对原虫DNA没有作用,但有变性剂甲酰胺时出现明显的降解,降解程度与甲酰胺浓度有关(图4),说明DNA要经变性形成局部单链才能被绿豆核酸酶降解。文献已有报道用绿豆核酸酶切片基因组建疟原虫DNA文库^[6],这二个核酸酶切图谱结果,暗示恶性疟原虫DNA内部似乎没有较大的单链环状结构,只有“十”字发夹式结构存在,因此,在不变性条件下绿豆核酸酶不能降解,只有S1酶才有作用。

以上结果表明,我们应用简单的SDS-酚-氯仿-异戊醇方法得到比较纯的DNA碱基G+C含量比一般真核生物低得多,S1和绿豆

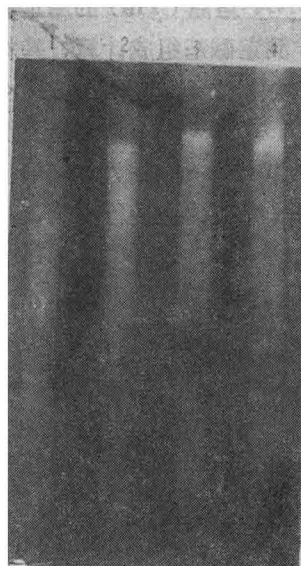


图4 绿豆核酸酶切电泳图

1. 原虫 DNA + 40% 甲酰胺 + 酶
2. 原虫 DNA + 30% 甲酰胺 + 酶
3. 原虫 DNA + 20% 甲酰胺 + 酶
4. 原虫 DNA 对照

核酸酶切分析暗示DNA内部有较多的S1敏感点,存在“十”字发夹结构,这些结果将为进一步研究原虫DNA结构功能和设计分离基因研制疫苗提供参考。

参 考 文 献

- [1] 王昌才等:《第一军医大学学报》,1985,5(2),114.
- [2] Eudoh, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 63(2), 251.
- [3] 靳嘉瑞等:《生物化学与生物物理学报》1984,16(6), 615.
- [4] Pollack, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10(2), 539.
- [5] Joanne, M. et al.: *Cell*, 1983, 35, 467.
- [6] McCutchan, T. F. et al.: *Science*, 1984, 225, 625.

[本文于1987年7月10日收到]

第三次全国离心机学术会议征文通知

定于明年下半年召开(时间、地点待定)第三次全国离心机学术会议。广泛征集离心机的工程研究、设计、制造与离心技术在医学、生物学等学科中应用方面未发表过的论文。请把论文名称及作者姓名、工作单

位和通讯地址在9月30日前寄到北京349信箱离心机专业委员会。

中国仪器仪表学会 离心机专业委员会
实验室仪器学会