

质粒分子量的电子计算机电镜测定

张明 陈慎 史美德 陆惠民 王秀春

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

本文提出了用电子计算机测定电镜照片上环状质粒 DNA 长度的方法和计算机设计程序。并据此测定了从短杆菌中分离得到的未知质粒的分子量。

测定质粒分子量方法之一是利用核酸大分子的电镜图^[1,2]。尤其适合于未知质粒是多种质粒混合物, 它可直接测定不同种类质粒的分子量。该技术关键是如何较准确地测量一定放大倍数电镜照片上的环状质粒 DNA 线性长度。过去采用手工量取, 国内未见用电子计算机测定环状 DNA 长度的方法和设计程序报道。本文提供的这种方法, 使未知质粒分子量的电镜测定更简化且精确。

材 料 与 方 法

1. 质粒

质粒用碱裂解法^[3,4]从乙酰短杆菌 (*Brevibacterium aceticum*) E₆₅ 菌株中制备获得, 制备的质粒经过氯化铯密度梯度超离心纯化。

2. 支持膜制备^[5]

配制 2% 火棉胶溶液, 在滤纸上按合适间距放置一些铜网, 把滤纸放入布氏漏斗, 盛满蒸馏水, 待水面平静后, 滴一滴火棉胶溶液, 液滴迅速在水面上形成一层薄膜, 打开漏斗底部夹子, 缓缓放水, 铜网便覆盖上一层火棉胶支持膜。

3. 细胞色素 c 展层

采用甲酰胺法^[5,6], 临时配制展层用的上相液及下相液。上相液为: 40% 甲酰胺, 0.1mol/L Tris-cl, pH8.5, 0.01mol/L EDTA 0.01mg/ml 细胞色素 c 溶液, 0.005μg/ml DNA。一般上相液在半小时稳定下相液在 5 分钟内稳

定, 将配制的下相液注入洁净的有机玻璃培养皿中; 洗净的载玻片斜放在玻璃皿上, 倾斜角约 30°, 下相液表面撒上少量的滑石粉以便指示单分子膜的展开情况, 用微量吸管吸取 30μl 上相液, 滴在离液面 1cm 处载玻片斜面上, 使其缓缓下流, 触及下相液表面即迅速展开成单分子膜, 用镊子夹着铜网, 使带支持膜的一面轻沾一下单分子膜, 然后放 5×10^{-3} mol/L 乙酸双氧铀染色液中染色 30 秒钟, 再用 90% 乙醇脱水。

4. 样品膜的投影

展层后的样品膜置于 Balzers BAF-400D 高真空喷镀仪上旋转投影。具体投影条件数据如下: 旋转投影角度: 7°; 旋转速度: 25 转/分; 真空度: 优于 1×10^{-5} mmbar; 铂铱喷涂厚度: 60 Å。

5. 电镜观察

用电子显微镜 JEM100cx 先在低放大倍数下搜寻环状质粒, 然后在 5 万倍或 10 万倍下照相。根据外标光栅校正, 该电镜在 5 万倍和 10 万倍下放大倍数误差最小。

6. 双链 DNA 分子量和长度计算公式

通过电镜照片上闭环质粒图形长度测定和放大倍数, 可以知道闭环质粒 DNA 的实际长度便可用公式^[1,2]计算出质粒 DNA 的分子量。

双链 DNA 分子量和长度计算公式:

$$1 \mu m DNA = 2.07 \times 10^6 \text{ Dalton (3kb)}$$

7. 程序设计和图象处理

质粒的电镜图象呈现为各种不规则的几何

图形,目前采用数字化板将质粒图形输入计算机。所用的设备是 Cromemco CS-2H 型微型计算机。内存 64KB,有 48KTP 图象缓存器贮存显示图象的数据。二个 5 吋软盘驱动器用来读写数据文件, BIT, PAD-ONE 数字化图形输入板灵敏度为 0.127mm/点。

从图形输入板画入要测的线,得到线上各点的坐标数据(x, y 坐标),坐标精度为 12 bit,输入图形同时显示在监视器上。按“S”键结束图形输入。若不满意可清屏重新画入,待满意后键入存盘号,把坐标数据以数据文件形式存磁。

作图板灵敏度较高,手画线时抖动会使线条很不平滑,增大测量误差,因此在计算长度前要进行图形数据的预处理。预处理采用了二种方法:一种是五点加权平滑,中心点的权重最大,这样使图形去掉些小毛刺又不致丧失其细节。再一种是跟踪去点,即每点与前一点相比

较,如果 Δx 与 Δy 的绝对值都小于一指定值,则去掉此点。这意味着用一小段直线来代替此段折线,但是指定值必须取得合适,使之既能平滑图形又不致由于去掉了原线的小凹凸而造成误差,因此此值应由实验确定。预处理后按首尾点点距确定被测线为开口线还是闭合线,如果是闭合线还需要解决首尾衔接问题,进行首尾平滑处理^[7,8]。

对处理后的数据计算每二点间距离 $\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}$,再求所有点的距离和。此距离和乘上作图板二点间点距 0.127mm,即为以 mm 为单位的被测线长度。乘上一定的比例因子也可变换为 Kb 或 Mdal 等单位。在做完一批图形后,可将各长度值作为一个数据文件存盘,以备今后查看。

8. 数据处理

对经过计算机计算出的质粒 DNA 长度和分子量数据进行处理,可获知质粒的种类以及

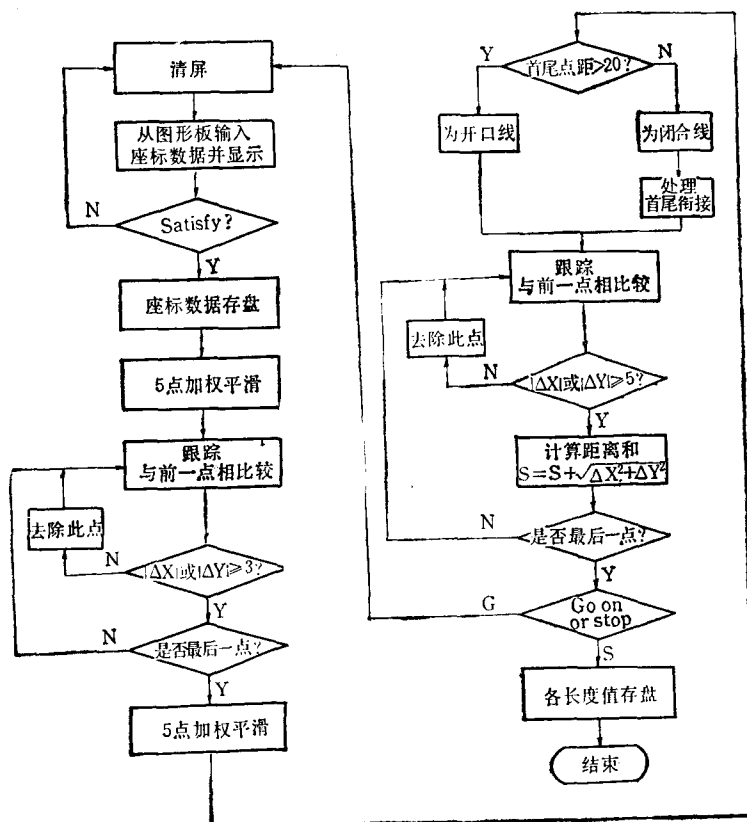


图2 测量线长度程序流程图

各种质粒的分子量。

结果和讨论

1. 从乙酰短杆菌 E_6 菌制备的质粒样品, 经超离心纯化后, 用于核酸大分子电泳样品膜的制备, 然后在电泳下观察。要想从电泳结果中获得质粒 DNA 分子量和质粒类别这两方面的准确数据, 就必须拍摄大量的电泳照片(如图 1, 见封二)。我们采取在电泳下随机选取各种形态质粒的方法, 量取每个质粒 DNA 长度, 再通过数据处理计算出各种质粒 DNA 实际长度及分子量。

2. 应用电子计算机测定电泳相片上环状图形的线长度, 其程序流程图如图 2。

3. 随机选取的 60 张不同形态的质粒 DNA 电泳照片图像通过图形输入板输入 Cromemco CS-2H 处理系统。一般来说, 误差主要来自图像输入时描画线对原线的偏离, 偏离 0.127 毫米就差一个点距。要想精确地描出照片上的原线是很不容易的, 但被测线越长, 相对来说误差越小, 所以为了减少输入时误差, 将电泳照片两次严格按倍数放大。测试误差计算如下: 取已知标准长度的不同类型之图形, 然后通过图形输入板输入这些图形, 计算机计算出各图形周长, 与相应的标准值相比较, 结果如表 1。

如表 1 所示, 各种类型图线其输入误差都小于 2%, 这个值对计算质粒 DNA 实际长度所造成的误差是比较小的, 如果对一个数据重复几次输入计算, 然后取平均值能进一步减少输入误差。

4. 输入环状质粒 DNA 之图象后, 由计算机按公式^[1,2] 计算各个质粒 DNA 的实际长度

表 1 各种类型图线输入误差

图 形	标准值 (mm)	实测值 (mm)	误差 (%)
30° 直线	100	101.54	1.54
45° 直线	100	100.78	0.78
60° 直线	100	100.84	0.84
45° 直线	143	142.49	-0.36
圆	314	313.81	-0.06
1/4 圆	157	157.4	0.25
二个相切圆	157	159.8	1.78

和分子量。结果如表 2。

表 2 DNA 长度测定数据(总数 60)

长度 (kb)	样品号	数目	频度 (%)
5.4	35	1	1.67
5.5	39, 53	2	3.33
5.6	14, 30, 55, 58	4	6.67
5.7	4, 20, 31, 51, 52, 54	6	10.00
5.8	18	1	1.67
5.9	1, 47	2	3.33
6.0	13, 21, 26, 41, 44	5	8.33
6.1	49	1	1.67
6.2	60	1	1.67
6.3	24, 57	2	3.33
6.4	10, 40	2	3.33
6.5	6, 7, 16, 29, 56	5	8.33
6.6	48	1	1.67
6.8	5, 15, 25	3	5.00
6.9	33, 59	2	3.33
7.1	8, 32, 36	3	5.00
7.2	2, 9	2	3.33
7.3	11, 17, 19	3	5.00
7.4	22, 23, 37	3	5.00
7.6	27	1	1.67
7.8	28, 45	2	3.33
7.9	3, 38, 42	3	5.00
8.0	43, 46	2	3.33
8.1	50	1	1.67
8.2	12, 34	2	3.33

根据对表 2 数据的统计处理, 以及其它生化实验, 可将从 E_6 菌中分离制备的质粒定为三个种类, pA, pB, pC。三种质粒分子量分别为: $pA = 5.98 \pm 0.36(\text{kb})$; $pB = 7.15 \pm 0.24(\text{kb})$; $pC = 7.98 \pm 0.12(\text{kb})$ 。

5. 样品膜制备的好坏直接影响电泳观察结果。支持膜厚度要适当, 如太薄, 容易被电子束击破, 太厚则降低分辨率。用随机选取大量质粒 DNA 电泳样品数据来确定所分离获得的质粒 DNA 样品中所包含的质粒个数及分子量, 这对于 DNA 样品的展膜效果要求很严。因为 DNA 是否完全展开及投影后变形程度都影响质粒 DNA 长度测定。展膜时所用的甲酰胺质量是影响展层效果最主要的因素。尤其对上相液使用的甲酰胺要求更高。我们使用的甲酰胺是经过重蒸的分析纯甲酰胺, 测定其 $OD_{270\text{nm}}$ 值小于 0.2, 用于质粒 DNA 展层效果很好。

6. 本文提供了一种用电子计算机量取电镜照片 DNA 长度, 从而计算质粒 DNA 分子量的方法。以前, 我们采用细铜丝手工量取电镜照片上 DNA 长度, 这种方法相对地说重复性差, 误差大, 而且还费时费力, 更不适宜做大规模数据处理, 使用计算机量取长度可以消除一些人为因素, 减小误差, 为利用核酸电泳法测定未知质粒种类及其分子量提供了一种好的方法。

参 考 文 献

[1] Puhler, A. et al.: *Advanced Molecular Genetics*,

Springer Verlag, 1984, 209.

[2] Stuber, D. et al.: *MGG*, 1977, 154, 299.

[3] Birnboim, H. C. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 1979, 7, 1513.

[4] Santamaria, R. and Martin, J. F.: *Journal of General Microbiology*, 1984, 130, 2237.

[5] 朱丽霞: «生物学中的电子显微镜技术», 北大出版社, 1982, 38 页.

[6] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, C. S. H., 1980, 188.

[7] 成瀨, 鸟脇, 福村: «濃淡画像の細線化手法の比较研究», 电子通信学会论文志, 1977, 60, 12.

[8] Rosenfeld, A. et al.: *J. A. C. M.*, 1971, 18, 255.

[本文于 1987 年 6 月 18 日收到]

(上接第 233 页)

分离的五个峰的峰 1、2 具有抗病毒活性, 两个活性峰分别与标准 α 、 γ 干扰素出峰时间一致。这可能是猪脾细胞干扰素抗病毒活性高于白细胞干扰素的原因之一, 因 α 、 γ 同时存在可以提高抗病毒活性。

3. 将猪脾细胞干扰素纯化物与标准分子量蛋白坐标图比较计算分子量, 根据标准分子量的峰形分析, 峰 4 可能是峰 1 的三聚体, 故推测经 DEAE-Sephrose FF 分离的峰 1 在 mono Q^{HR}5/5 柱分析, 表现的主峰和次峰的关系可能是猪脾细胞干扰素的二聚体物质。测得猪脾细胞干扰素 α 、 γ 分子量分别为 20,000 及 43,000 道尔顿左右。

我们采用沉淀与层析相结合的实验方案, 使干扰素的总活性回收率达 70.3%, 而经 DEAE-Sephrose FF 柱快速高效液相色谱自动程序分离系统一步活性回收率达 87.8%, 纯化 42.8 倍。以上结果说明, 快速高效液相色谱

对活性蛋白质具有快速、简便、高度纯化的效果, 此方法不致于因为纯化步骤中操作时间过长, 而使生物活性蛋白失去活性^[6]。另外, 快速高效液相色谱具有灵敏度高、分离效果好等优点, 对于生物、医学、农业以及其它涉及到蛋白、核酸等生物活性物质的领域有重要的实际意义。

本文承蒙方慈祺教授悉心指导, 特此致谢。

参 考 文 献

[1] 吴旭初: «福建师范大学学报»自然科学报, 1986, 2(1), 57.

[2] Carter, W.A. et al.: *Mol. pharmacol.*, 1979, 15, 685.

[3] Соловиев, В.Д.: *Вол. Вир.*, 1980, 5, 523.

[4] 罗经, 杨学楼等: «病毒学集刊», 1987, 5, 81.

[5] 黄文林等: «病毒学杂志», 1988, 3, 印刷中.

[6] 张仁斌等: «高效液相色谱在医学研究中的应用», 上海科学技术出版社, 上海, 1983, 135—140 页.

[本文于 1987 年 12 月 21 日收到]

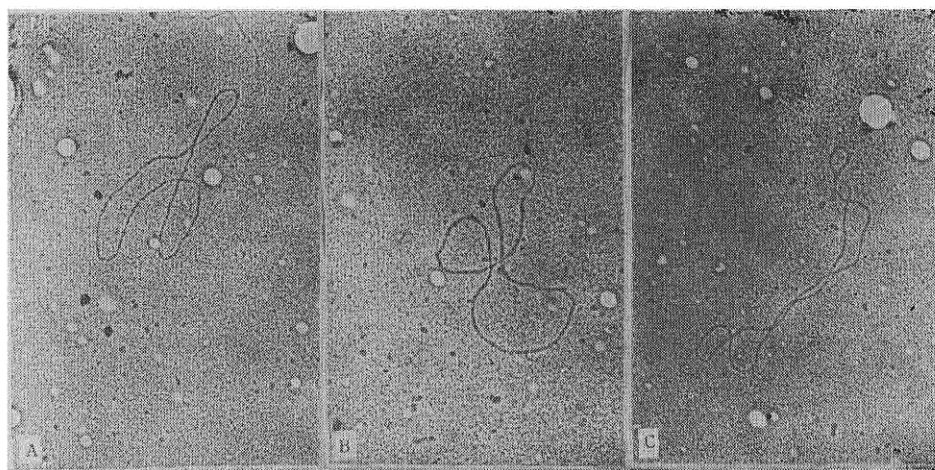


图 1 E_{68} 菌三种质粒 pA、pB、pC 在 5 万倍电镜下观察结果

- A、pA 质粒 (5.98kb)
- B、pB 质粒 (7.15kb)
- C、pC 质粒 (7.98kb)

欢迎使用序列数据库及序列分析处理

一套 DNA 和蛋白质序列数据库及其管理系统由军事医学科学院引进和开发应用，其中数据库由 GENBANK, EMBL, NBRFNUC 及 NBRF 等 1986 年 8 月份版本组成。数据检索程序使用方便。本系统具有多方面序列数据处理功能，从本数据库检索的分题数据可传送到 IBM-PC 的软盘，由建立在 IBM-PC 的序列数据处理程序处理。

本系统的序列数据分析处理的应用程序分别有：VAX-11/780, BCM-S68K 及 IBM-PC 三种版本。

联系人：中国人民解放军军事医学科学院
基础医学研究所 吴加金