

第 633 页。

[9] Kaji, S. et al.: *Vision Res.*, 14, 113, 1974.

[10] Groh, F. & Haendle, J.: *Electro. Medica*, No. 3, 71, 1968.

[11] 顾德门:《傅里叶光学导论》(詹达之等译), 1976, 科

学出版社, 北京。

[12] C. B. 古列维奇:《电视摄像管中的物理过程》(李洛童译), 1964, 科学出版社, 北京。

[本文于 1980 年 9 月 23 日收到]

用荧光探针菲啉溴红对不同来源 DNA 变性作用的初步研究

曹 恩 华

(中国科学院生物物理研究所)

1964 年 Le Pecq 等发现菲啉溴红 (Ethidium Bromide, 以下简称 Eth Br) 与 DNA 结合后, 其荧光强度显著升高。迄今对它与核酸的反应特性及其物理化学性质已作了较深入的研究^[1,2]。这些研究, 具有重要意义, 例如, 可用它作为荧光探针分离和测定微量核酸; 又由于它专一地插入双链核酸的碱基对之间, 对研究核酸的构象变化也有一定的帮助。

本文报道我们用荧光法测定 DNA-Eth Br 络合物的熔化曲线的条件和特点, 以及用荧光探针对不同碱基组成的 DNA 所做的初步研究。

材 料 和 方 法

1. 试剂

菲啉溴红, 本组合成^[3]。

DNA: 小牛胸腺 DNA, 鲤鱼精巢 DNA, 鸡红血球 DNA, 猪脾 DNA, 均为本组制备。大鼠肝脏 DNA、黄鱼精子 DNA 得自上海生物化学研究所。各种细菌 DNA 系中国科学院微生物研究所赠送。DNA 的样品必须保持天然构象; 蛋白含量需在 1% 以下。

DNA 的碱基组成数据(化学分析), 根据已发表的其它人的报告。

其余试剂分析纯; 均系北京化工厂产品。

2. 溶液配制

Eth Br 贮备液: 用 1.0 毫克 Eth Br/毫升

缓冲液配制; 4℃ 暗处保存。

DNA 贮备液: 用 1.0 毫克 DNA/毫升缓冲液配制。

柠檬酸缓冲液 (SSC) 0.15 M NaCl + 0.015 M 柠檬酸钠, pH7.0 ± 0.20, 测定时用重蒸馏水稀释 10 倍。

所有溶液均以重蒸馏水配制。

3. 仪器

WFD-9 型荧光分光光度计, 自带恒温附件。用恒温水槽循环加热 (当样品的熔化温度较高时, 改用乙二醇加热)。激发波长 520 毫微米, 荧光发射波长 600 毫微米。

4. 熔点温度 [$T_m(F)$] 的测定:

除特别说明外, 所有测定样品均用 0.1 × SSC 溶液稀释, 最终浓度 DNA 20 微克/毫升, Eth Br 10 微克/毫升。总体积为 3.0 毫升, 样品置于光径为 1.0 厘米的石英杯中。用连续加热法, 加热过程中自动记录 600 毫微米处的荧光强度; 温度上升速度为 0.5—2℃/分。荧光强度骤降为原来的 50% 处的温度定为熔点温度 [$T_m(F)$]。

结 果 与 讨 论

1. DNA-Eth Br 络合物的荧光强与温度的关系

小牛胸腺 DNA 溶液加入 Eth Br 后, 以 520 毫微米的单色光照射。随温度升高, 在 600

毫微米处的荧光强度逐渐减小, 高于 80℃ 时荧光强度骤然下降, 90℃ 以后趋于恒值 (图 1)。

同上条件, 在恒定的温度下, 600 毫微米的荧光强度不随光照时间而改变 (图 2)。

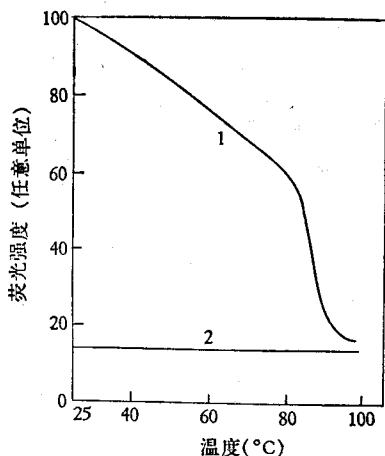


图 1 荧光强度与温度的关系
DNA 20 微克/毫升 Eth Br 10 微克/毫升
1. DNA-Eth Br 2. Eth Br

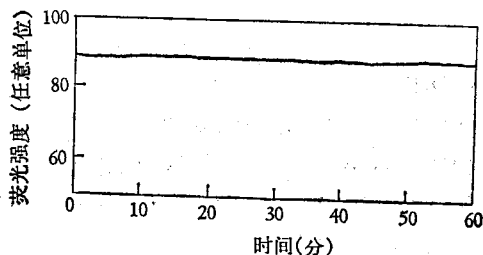


图 2 DNA-Eth Br 结合物的荧光强度与照射时间的关系

为证明荧光强度下降是由于 DNA 的结构变化, 以 520 毫微米单色光照射 Eth Br 的溶液。结果温度增高后, 荧光强度基本不变 (图 1)。

荧光强度骤然下降反映了 DNA 双链构象的变化。Lc Pecq 等人^[4]已研究, Eth Br 是插入双链 DNA 的碱基对之间, 当 DNA 与 Eth Br 结合后因为能量转移, 使 Eth Br 的荧光极大增强。加热过程中因 DNA 逐渐变性, 氢键和疏水相互作用遭到破坏, 影响与 Eth Br 结合, 结果表现为荧光强度下降。

为确定 $T_m(F)$ 值的特异性, 曾对小牛胸腺 DNA 进行重复测定, 15 次结果为 87.0 ± 0.3

($\bar{X} \pm t_{0.05} df \bar{X}$)。这进一步表明在一定条件下, DNA-Eth Br 络合物的 $T_m(F)$ 反映了 DNA 的结构特点。

2. DNA 的碱基组成与 $T_m(F)$ 的关系

为了观察不同碱基组成的 DNA 与 $T_m(F)$ 的关系, 测定了 18 种不同来源的 DNA 与 Eth Br 结合后的熔化曲线。它们的熔化曲线与小牛胸腺 DNA 相似, 但 $T_m(F)$ 值不同 (表 1)。碱基组成与 $T_m(F)$ 值相关性很好 (图 3), 可用以下方程式表示:

$$G + C\% = [T_m(F) - 71.5] 2.74$$

按此式算得的 $G + C$ 含量与文献值基本一致。

3. DNA 二级结构对熔化曲线和 $T_m(F)$ 值的影响

小牛胸腺 DNA 溶液分别经酸 (pH 2)、碱 (pH 12)、热 (沸水浴) 处理 15 分钟, 然后立即恢

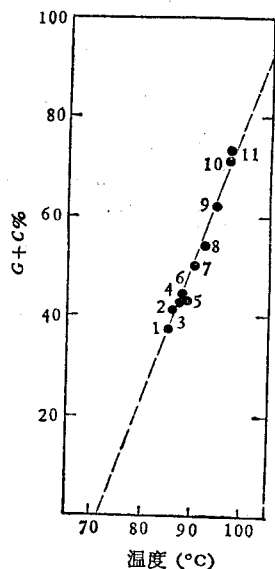


图 3 不同来源 DNA 的 $G + C$ 含量与 $T_m(F)$ 值的关系

1. 鲤鱼精子; 2. 猪脾; 3. 鼠肝; 4. 小牛胸腺; 5. 枯草杆菌; 6. 鸡红细胞; 7. 大肠杆菌; 8. 阴沟肠杆菌; 9. 氧化甲烷球菌; 10. 节杆菌; 11. 灰色链丝菌

复其中性或迅速冷却至室温。变性的 DNA 与 Eth Br 结合后的熔化曲线与未变性 DNA 相比, 不仅荧光强度下降而且熔化曲线形状发生变化, 相应的 $T_m(F)$ 值下降。说明 DNA 的

表 1 不同来源的 DNA 的 $T_m(F)$ 值及其碱基 (G + C) 含量

来 源	$T_m(F)$ °C	荧光法 测定值	文 献 值		
			光吸收法	化学分析	浮力密度
氧化甲烷球菌 (<i>Methylococcus</i>)					
M79-2	92.3	57.0			
T-60	94.1	61.0			62.5 ^[5]
T-52	93.5	60.3			
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	88.4	46.3	43.6—46.6 ^[7]	42.4 ^[4]	43.5 ^[6]
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) k ₁₂	90.1	51.0	50 ^[4] , 51.5 ^[7]	50.1 ^[4]	50 ^[6]
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	92.1	56.4	55.4—56.9 ^[7]	52—54 ^[7]	54.6 ^[7]
节杆菌 (<i>Arthrobacter sp.</i>)	97.0	69.9	71.4 ^[4]		
嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>) 17	92.5	57.5			
45	91.6	55.4			
灰色链丝菌 (<i>Streptomyces griseus</i>)	97.1	70.1		73.0 ^[7]	71 ^[6]
生丝菌 (<i>Hyphomicrobium</i>) T52C	95.3	65.2		59.2—66.8 ^[5]	
T59C	95.5	65.7			
大鼠肝	86.6	41.4	41 ^[4]	41.4 ^[4]	40 ^[6]
小牛胸腺	87.0	42.3	42 ^[4]	41.9 ^[4]	39 ^[6]
鸡红血球	87.4	43.6	43 ^[4]	43.7 ^[7]	41 ^[6]
猪脾	85.8	39.7		41.1 ^[7]	
鲤鱼精子	84.8	37.0		37.5 ^[7]	
黄鱼精子	86.2	40.3			

结构对热不稳定, 有序结构已有破坏. 可见荧光强度、熔化曲线和熔点温度可反应 DNA 二级结构的状况.

4. DNA 溶液浓度对 $T_m(F)$ 值的影响

不同浓度的小牛胸腺 DNA (2.0 微克—20

微克/毫升) 和相同浓度的 Eth Br 溶液结合后的荧光强度与 DNA 的浓度成正比, 其熔化曲线相似, $T_m(F)$ 值基本一致(表 2), 说明 DNA 的浓度不影响 $T_m(F)$ 的测定, 可为微量 DNA 的碱基组成测定提供新途径.

表 2 小牛胸腺 DNA 的荧光强度和 $T_m(F)$ 值

浓度 (微克/毫升)	2	4	8	12	20
荧光强度 %	7.0	12.0	27.0	43.0	69.0
$T_m(F)$ °C	86.8	87.3	86.9	87.1	86.8

5. DNA-Eth Br 络合物熔化曲线的可逆性

DNA-Eth Br 络合物的荧光强度随温度升高而下降. 停止加热后让其温度自然回升, 荧光强度逐渐升高, 但冷却过程中 DNA 有序结构的恢复是不完全的.

参 考 文 献

- [1] Le Pecq, J. B. et al.: *J. Mol. Biol.*, 27, 87, 1967.
- [2] Le Pecq, J. B. et al.: *Methods of Biochem. Anal.*

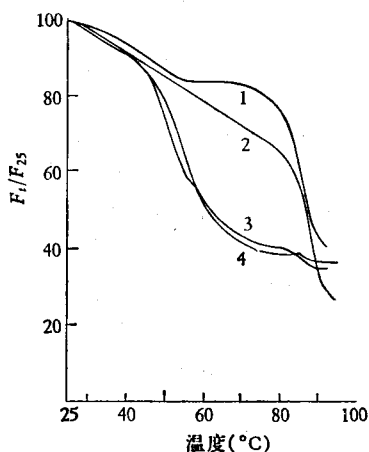


图 4 小牛胸腺 DNA 与 Eth Br 络合物的荧光强度与温度的关系

F_t/F_{25} : t °C 度时荧光强度与 25°C 时荧光强度的比值。

1: pH2; 15', 2: 未经任何处理, 3: pH12; 15', 4: 100°C 沸水; 15'.

ysis, 20, 41, 1971.

- [3] 中国科学院生物物理所一室二组:《生物化学与生物物理进展》, 1975年, 第1期, 第27页。
- [4] Marmur, J. and Doty, P.: *J. Mol. Biol.*, 5, 109, 1962.
- [5] Bergey' S.: *Manual of Determinative Bacteriology* (Ed. by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons), Baltimore, Williams & Wilkins 8th ed, 1974.

[6] Szybalski, W. et al.: *Nucleic Acid Res.*, Band 2, S 332, 1971.

[7] Fasman, G. D.: *Handbook of Biochem. and Mol. Biol.*, 3rd, *Nucleic Acids* Vol. II, Cleveland Ohio, 1976.

[本文于1980年8月30日收到]

从 T₄ 噬菌体突变体感染的大肠杆菌细胞中分离纯化 T₄ RNA 连接酶

中国科学院生物物理研究所二室核酸组生化试剂厂
中国科学院细胞生物研究所三室核酸组
中国科学院生物化学研究所二室核酸组
北 京 大 学 生 物 系

RNA 连接酶首先由 Silber 等^[1]从感染 T₄ 噬菌体的大肠杆菌中发现和分离纯化。这个酶需要 ATP 作为辅助因子, 不仅能催化连接 5' 端磷酸 3' 端羟基的寡核苷酸片段成环状分子, 而且还能把二个寡聚核苷酸片段在 5' 端磷酸, 3' 端羟基间连接起来。一些实验室利用此特性, 把它作为连接核苷酸片段的重要工具。如大塚荣子等在人工合成大肠杆菌甲酰甲硫氨酸 tRNA 中, 先后报道用 RNA 连接酶把化学法合成的核苷酸小片段, 连接成不带稀有碱基的 17 核苷酸, 20 核苷酸, 21 核苷酸等^[2]。我国人工合成核酸协作组, 也使用我们制备的 RNA 连接酶把核苷酸小片段连接成 10 核苷酸, 12 核苷酸, 19 核苷酸^[3]以及 41 核苷酸^[4]。这个酶也可用于较长核苷酸片段的连接, 例如 Kaufman 曾报道用 RNA 连接酶连接苯丙氨酸 tRNA 二个半分子成完整分子。生物物理所二室也用这个酶把拆开的二个酵母丙氨酸 tRNA 半分子连接成完整分子^[5]。另外 RNA 连接酶也能把 3' 5' 二磷酸的单核苷酸加接到另一核苷酸片段上, 因而可以利用以 ³²P 在 3' 端标记。值得注意

的是 RNA 连接酶还可用于无模板的脱氧核糖核酸的连接。

关于这个酶的分离纯化, 国外已有报道^[6,7], 而国内仅有的一篇报道^[8], 且缺少每步纯化的数据, 为此, 将我们几年来分离纯化此酶的工作, 总结成文, 报道如下。

材 料 和 方 法

1. 菌株和噬菌体 大肠杆菌 E. coli B (上海植生所噬菌体组提供), 大肠杆菌 CR₆₃, T₄Am N₈₂ × AmE₁₀rcgA (美国纽约州立大学金祖怡教授提供)。

2. DEAE-纤维素 52, 磷酸纤维素 P-11 (Whatman 产品) 葡聚糖 G-100 (Pharmacia 公司产品) 羟基磷灰石与 DNA-琼脂糖 (生物物理所生化试剂厂)。

3. 无载体 ³²P (北京 401 所提供), ³H poly (A) (上海细胞所二室提供)。

4. 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶 (上海细胞所提供), 3' 磷酸甘油酸激酶与磷酸甘油酸脱氢酶, 牛血清蛋白 (生物物理所生化试剂厂产品)。