

胶用脱色液脱色。用棉花轻轻地擦凝胶的表面,并更换脱色液,直到胶的背景完全脱去蓝色为止。用热风吹干,就可永久保存。光密度扫描,同前述。

参 考 文 献

[1] Allen, R. C. et al.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **62**, 732, 1974.

[2] *Instruction Sheet 1818-P for 0.5 mm Thin-Layer Polyacrylamide Gels for Electrofocusing*, LKB-Produkter, Bromma, 1981.

[3] Radola, R. J. *Electrophoresis*, Vol. 1, April 43—57, 1980.

[4] *Instruction Sheet 1818-A for 0.5 mm Thin-Layer Agarose Gels for Electrofocusing*, LKB-Produkter, Bromma, 1981.

[本文于1982年8月23日收到]

蔗糖密度梯度区带电泳技术在病毒分离中的应用与改进

龚祖坝 龚兴昌* 郑巧兮

(中国科学院上海生物化学研究所)

病毒质粒的外壳由蛋白质亚基组成,它和一般的蛋白质一样,在合适的 pH 条件下,能在电场中移动。但又有它的特殊性,所以 Tiselies 的自由电泳和淀粉胶电泳、琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术对病毒的分离提纯均有一定的局限性。

从 50 年代中期开始,有的实验室开始设计利用蔗糖密度梯度作为介质进行电泳,分离和提纯病毒,但由于仪器设计不够完善或因操作繁琐,未能获得较为广泛的应用。至 60 年代中期,蔗糖密度梯度区带电泳仪才比较定型,并在分离提纯动物病毒、植物病毒等方面取得较大进展。近年来,蔗糖密度梯度电泳(简称蔗糖密度电泳)已扩大到应用于蛋白质、细胞器、细菌等的分离。而对于一些质粒不稳定病毒,如动物和植物的弹状病毒,带有脂膜的动物病毒,如用超离心、聚乙二醇沉淀、有机溶剂处理等方法分离提纯,极易使病毒质粒破碎、变形,而蔗糖密度电泳却能排除这些弊病,成为分离提纯此类病毒的非常有益的手段^[1,2]。

我们在植物病毒的分离和纯化的研究中,建立了蔗糖梯度电泳技术,并在应用过程中简化了仪器装置及操作过程,取得较好的结果。

一、蔗糖密度梯度电泳仪的装置及操作

1. 电泳仪装置 图 1 是一个玻璃装置的仪

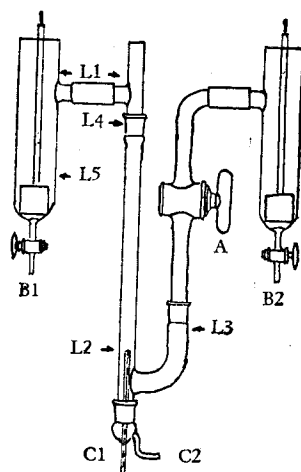


图 1 常规蔗糖密度梯度电泳仪示意图

器。中心部分是一个 U 形管,直径约 23 毫米,右臂在 2/3 高度的地方装置一个宽孔开关(A)。U 形管二端各连接一个直径为 50 毫米的电极槽。B₁, B₂ (二管粗细相等,位于同一水平), C₁, C₂ 分别为内径 1 及 2 毫米的毛细管。从 L₂ 至 L₄ 的高度约 32—35 厘米。

2. 电极 以白银电极最为理想,一般可用银丝编成大小为 20 毫米×5 的银网。我们则用大小相同的银片,每隔一定距离在银片上钻一小孔使电极液流通,也能获得较好的效果。使用时,首先需要在 1N 盐酸或用氯化钠饱和

* 中国医学科学院病毒研究所。北京。

的 0.1N 盐酸的溶液中进行电解。电泳 24 小时后,正负电极要进行调换,宽孔开关 A 暂时关上即可。

3. 缓冲液及蔗糖溶液 病毒质粒所带的电荷随溶液 pH 而变,在强酸性的 pH 介质中,整个质粒带有正电荷,相反在强碱性溶液中酸性基团解离,碱性基团不带电,从而使质粒带有负电荷。因此在电泳实验中必须使用缓冲液来保持系统的 pH 稳定不变。pH 的选择一般从下列二个因素考虑:

① 在所选择的 pH 内,病毒质粒稳定,并且不在该病毒的等电点范围内。植物病毒质粒或其衣壳蛋白的等电点,在 pH3.5—6.0 范围,因此不能在这一 pH 范围进行电泳。个别病毒如豇豆褪绿斑驳病毒等,虽在酸性 pH 时质粒较稳定,但也要尽可能远离等电点区域。

② 实验证明,病毒的分离提纯在碱性 pH 比较合适,因为在此条件下,各种成分的电泳移动率的差异较大,容易达到分离的目的。

目前用于病毒分离的蔗糖梯度电泳缓冲液以 0.1M, pH 8.6 的硼酸缓冲液为最合适。其组成为: H_3BO_3 0.035N, NaOH 0.0175N, HCl 0.0075N 和 NaCl 0.037N。

在实际使用时,硼酸缓冲液的离子强度,根据电泳时间、电流强度、电压大小等,可选在 0.02M—0.1M 范围内。一般讲,离子强度高时,电压低,电流大,而离子强度降低时,电压升高,电流减小。在后一种情况下,病毒质粒的电泳速度能加快。

当需要在接近中性或酸性缓冲液中进行电泳时,可使用 0.03M, pH 7.5 的磷酸缓冲液或 0.05M pH 4.0 醋酸缓冲液。

4. 50% 蔗糖溶液 在电泳时作为整个蔗糖梯度的衬垫及调节样品使之处于合适的起始位置。为了确保这一浓度的正确性配制时可将 300 克分析纯的蔗糖溶解于 300 毫升的离子强度增加一倍的缓冲液中,将其溶解后,加入蒸馏水到约 590 毫升。

5. 样品的准备 待要分离提纯的病毒样品 2 毫升,加入蔗糖使之含蔗糖浓度为 45%。这

一浓度必须精确,不然样品在 50% 蔗糖溶液和蔗糖梯度之间不能形成稳定的梯度,如要测迁移率,可在样品中加入极少量的酚红作为标记。

6. 操作

(1) 通过毛细管 C_2 使整个电泳仪充满缓冲液至 L_1 , 检查各玻璃接口有无渗漏,排除玻璃管道内气泡。

(2) 从 C_2 压入 50% 浓度的蔗糖溶液到 L_2 及 L_3 水平。从 B_2 放掉少量缓冲液,使 L_3 的水平约高于 L_2 2—3 厘米。

(3) 将宽孔开关 A 关掉。

(4) 往 C_1 加入 0%—50% 蔗糖梯度,流速约 4 毫升/分。待梯度装置中 150 毫升 50% 浓度的蔗糖溶液全部流完,关闭梯度装置,从 B_1 放掉多余缓冲液约 150 毫升。

(5) 电极槽中先放入电极,并从 B_1 , B_2 压入饱和 NaCl 溶液至 L_5 水平。左右两槽中溶液保持适当水平,使在开关 A 打开时,由于 U 形管两臂中的溶液对底部的压力相等使 L_2 水平稳定。

(6) 从 C_1 放出约 5 毫升蔗糖梯度溶液,使 50% 蔗糖溶液和已形成的蔗糖梯度之间造成一个梯度空隙,以便加入蔗糖浓度为 45% 的样品。

(7) 用长针头注射器将样品液注射到 50% 浓度的蔗糖液的液面上,由于样品液的蔗糖浓度小于 50%,又大于蔗糖梯度,所以在梯度及 50% 浓度的蔗糖溶液之间形成一稳定的、界限分明的样品层。通过对 50% 浓度的蔗糖溶液量的调节,可使样品层升降至适当位置作为样品电泳的起始点。接上电源进行电泳。

(8) 电泳完毕后,关闭电源及开关 A。此时如病毒浓度较高,则在暗室中利用氩汞灯光源可清晰地看到病毒存在的乳白带。记录病毒带上限和酚红层中线离开原点的距离,二者之比即为病毒的电泳迁移率 R_{fe} 。取出分离样品时,可以小心地从 C_1 中逐步将各分离成分放出收集。如果病毒液软稀,用肉眼观察不到病毒区带,则需采用分部收集后透析,再用紫外吸

收,血清反应或电镜观察等方法检查。

二、蔗糖梯度电泳在病毒分离中的应用和病毒的迁移率

迄今为止,蔗糖梯度电泳已成功地从寄主细胞的抗原蛋白中分离了数十种植物病毒^[4]。我们对芜菁花叶病病叶的汁液进行有机溶剂处理,差速离心等步骤得到了部分纯化的病毒(TpMV),再经蔗糖梯度电泳分离,分部收集后进行透析和电镜及紫外检查。从电镜检查中可见乳浊度最浓的区带有密集 的病毒。电泳前TpMV的紫外光谱,在260—270nm处突起不明显,而电泳后呈现一个病毒的特征峰形。

由于病毒质粒的带电电荷的不同,因此它们在电场中迁移率也不相同。每一种病毒的 R_f 都是特征性的。更有意义的是同一种病毒的不同株系在形态上经常相同,抗血清有时也难以作出判断,但它们都有不同的 R_f ,因而在电泳上可以把它它们分开。例如烟草花叶病毒的普通株,其 R_f 为0.76,而其 U_2 株系仅为0.38。我们用TMV的地黄株系(DDV)进行电泳,其 R_f 为0.40。可见 R_f 可以作为分离和鉴别植物病毒不同株系的一种手段。至于同一植株中如果复合感染有二种病毒,则更易分开。这在形态相似的具有较多成员 的同一病毒组特别有用,例如马铃薯Y族病毒。

动物病毒的研究中曾报道人的肠道病毒根据它的迁移率的不同,基本上可分为三个大组^[5],三种脊髓灰质炎病毒具有最低的迁移率,疱疹病毒则属于迁移率高的一种。

但蔗糖梯度电泳也有一些不足之处,主要是仪器结构复杂,操作繁琐,电泳时间很长,容易引起酚红及病毒带的扩散,特别在电流电压及室温较高的情况下。为此,我们改进了电泳仪,大大简化了操作。

三、电泳仪的简化和改进

要简化和改进目前国外通用的常规电泳仪,首先要做到既能承载在垂直方向上获得线性的蔗糖梯度,又能直接导电,这样才能把电泳

仪的中心部分U形管及二个大的电极槽革掉。为此我们设计了如图二所示的简化的电泳仪。

电泳仪底部用常用的小孔的玻璃封闭,上面覆盖双层滤纸,然后从直径为3毫米的 C_1 中加入聚丙烯酰胺凝胶,由于需承担整个蔗糖梯度的重量,所以凝胶浓度要稍高(用琼脂糖凝胶也可以)。我们使用7.5%的凝胶获得很好的效果。待凝胶聚合后,去掉上层蒸馏水,即可从 C_1 中加入缓冲液,再加入50%的蔗糖溶液至毛细管 C_2 (直径3毫米)水平。从 C_2 中导入蔗糖梯度,待梯度平衡后,再放出5毫升左右蔗糖溶液,以造成梯度空隙,最后从 C_2 中导入样品,上面的电极槽放入电极后,从 C_3 导入饱和的NaCl溶液,至电极以上高度。下面则另用一个烧杯底部承载饱和NaCl溶液,上面加入缓冲液。操作大大简化,而且电泳分离时间也大为缩短,最多需十几小时。表1是二种仪器所获得的一些植物病毒的 R_f 值比较。

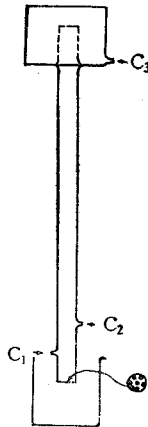


图2 简化电泳仪示意图

表1 几种植物病毒的 R_f 值

	常规电泳仪	改进电泳仪
TMV 普通株	0.64(290V12mA)	0.75(150V20mA)
	0.59(270V20mA)	
TMV 地黄株	0.42(290V24mA)	0.37(150V20mA)
		0.4 (200V20mA)
		0.42(250V19mA)
TpMV	0.53(260V20mA)	

四、蔗糖梯度电泳的几点注意事项

1. 病毒制剂须先部分提纯, 去掉大部分宿主细胞的细胞器碎片、杂蛋白, 如果没有去除, 则由于高浓度的蔗糖将使这些杂质沉淀, 从而影响病毒质粒的电泳行为。因为沉淀中的病毒需缓慢释放, 造成病毒质粒泳动不一致。

2. 蔗糖梯度电泳时间较长, 有一定的对流扩散的影响。如电泳时室温不超过 15°C , 并且电压与电流的乘积不超过 5,000 (伏·毫安), 一般就不会发热和产生对流。

3. 如果导入样品后, 立即加上电压, 由于样品层中缺乏梯度, 病毒立即在电场中迁移, 在一

定程度上还出现对流作用, 为此在加入样品后必需等 2—3 小时, 使样品层 (约 5mm 厚) 建立起稳定的梯度。

参 考 文 献

- [1] Ahmed, M. E. et al.: *Virology*, 41, 768, 1970.
- [2] Peters, B. D. et al.: *Virology*, 41, 135, 1970.
- [3] Polson, A. et al.: in *Methods in Virology* (Ed. by K. Maramorosch et al.), Vol. 2, 1967.
- [4] Van Regenmortel M. H. V. in *Principles and Techniques in Plant Virology* (Ed. by C. I. Kado et al.), 390, 1972.
- [5] Polson, A. et al.: *J. Hyg.*, 60, 2, 1962.

[本文于 1982 年 5 月 24 日收到]

荧光法检测 DNA 条件的探讨

郑秀龙 赵 芳 高建国

(上海第二军医大学)

3, 5-二氨基苯甲酸盐 (下简称 DABA) 荧光试剂, 是检测微量组织中 DNA 含量的一种灵敏的方法^[1]。近年来也被用来研究细胞 DNA, 特别是不能用同位素标记的、不分裂的细胞 DNA 的损伤与修复^[2-4]。但以往关于检测 DNA 的条件未见详细报道, 本文主要研究 DABA 与 DNA 反应后的荧光产物 (下简称 DNA 荧), 它在不同酸溶液中的光谱变化和稳定性, 我们还在反应时间、DABA 的用量、光线的影响以及灵敏度等方面进行了系统观察并从中选出了最适检测 DNA 的条件。

一、实验材料 小牛胸腺 DNA (西德 Serva 厂产品), 用去离子水配成 40 γ /ml。高纯度 DABA 由我室合成^[5], 用前配成 2M 盐溶液, 其它均属 AR 试剂。

二、实验方法与结果

1. 荧光发射光谱或荧光光谱 (λ_{Em}) 和激发光谱 (λ_{Ex})。

一般认为在不同溶剂中同一种荧光物质, 光谱峰的位置和强度有显著不同, 参照以前的工作, 我们分析了 DABA 及其与 DNA 反应后

在 0.6N HClO_4 、1N HCl 及 5% TCA 三种不同试剂中的光谱变化。用日制 MPF-4 型荧光分光光度计, 在同一灵敏度条件下分别测定三种酸溶液中 DABA 及其与 DNA 反应产物的 λ_{Em} 和 λ_{Ex} , 结果见表 1。

由表 1 可见 DNA 与 DABA 反应后的 DNA 荧 (其中还包括未反应的 DABA), 在不同酸中的荧光峰位均较相应的 DABA 略向长波偏移 2—5nm, 峰值在 498—502nm 之间, 两者区别不明显, 但 DNA 荧的荧光强度较 DABA 增高, 以在 HClO_4 中增高最大。DNA 荧和 DABA 的激发峰位在 HCl 中无差别, 在 TCA 中相差 4nm, 而在 HClO_4 中 DABA 的激发峰与 DNA 荧两者区别明显 (14nm, 见表 1), 且荧光强度增加倍数最高。比较上述结果, 故选用 HClO_4 较好。

2. 反应时间 图 1 是 DNA 与 DABA 在 60°C 水浴中反应不同时间后的荧光强度变化曲线。在最初的 10 分钟反应迅速, 荧光强度呈直线增加, 随后减缓, 30 分钟达最高值, 维持到 60 分钟变化不大。若延长保温时间至 75 分钟, 荧