

- nt Nutrition, Vol. 25, No. 3, 323, 1979.
- [5] A. Ayanaba, P. J. Bart.: *Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics*, 335, 1977.
- [6] J. R. Postgate: *method in microbiology*, Chapter VIII, 345, 1972.
- [7] 中国科学院化学研究所色谱组:《化学通报》, No. 3, 31, 1975.
- [8] Hardy, R. W. F. et al.: *Plant Physiol.*, 43, 1185,

1968.

- [9] 顾俭本等《植物生理学通讯》, No. 2, 50, 1982.
- [10] A. Zlatkis, H. R. et al.: *J. of Chromatographic Science*, Vol. 8, No. 7, 416, 1970.
- [11] 中国科学院大连化学物理研究所:《气相色谱法》, 第193—194页, 1978年科学出版社。

【本文于1983年6月14日收到】

## RNA-DNA 杂交反应分析

陈建华

(上海同济大学医学系)

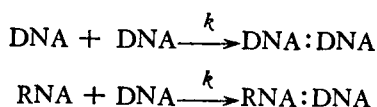
林元藻

(江西医学院宜春分院)

转录水平的调节是真核生物基因调控的主要方式,它对研究杂交反应有重要意义。RNA-DNA 杂交反应对于决定基因组中 DNA 序列和转录产物 RNA 的关系是很重要的手段。杂交体的形成有二种方式,即 DNA 驱动的反应和 RNA 驱动的反应,从中可以得到相互补充的信息。

### 一、DNA 驱动反应动力学

在 DNA 驱动反应中, DNA 是过剩的,而 RNA 是少量的,同时存在下列二种反应:



其中  $k$  是双分子反应常数,其大小由溶液的阴离子浓度、温度、核苷酸断片大小和 DNA 序列的复杂性决定。二种反应的  $k$  值实际上稍有差异,为简化计算可视为相同。单链 DNA 的减少速度如下:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2 \quad (1)$$

$C$  是以每升中核苷酸的克分子数为单位 (mole/l) 的单链 DNA 的浓度,  $t$  是杂交时间 (秒)。(1) 式积分,并代入初始值:  $t = 0$ ,  $C = C_0$  得:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + kC_0t} \quad (2)$$

或者

$$C = \frac{C_0}{1 + kC_0t} \quad (3)$$

$t = 0$  时, DNA 全为单链,此时  $C_0$  是 DNA 总浓度。同样,单链 RNA 的减少速度为:

$$-\frac{dR}{dt} = kRC \quad (4)$$

$R$  是单链 RNA 的克分子浓度,将(3)式代入(4)式得:

$$-\frac{dR}{dt} = kR \left( \frac{C_0}{1 + kC_0t} \right)$$

或者

$$\frac{dR}{R} = -KC_0 \left( \frac{1}{1 + kC_0t} \right) dt$$

在  $t = 0$ ,  $R = R_0$  时,将上式积分得:

$$\ln \frac{R}{R_0} = \ln \frac{1}{1 + kC_0t}$$

即

$$\frac{R}{R_0} = \frac{1}{1 + kC_0t} \quad (5)$$

从(2)式和(5)式比较可知,在 DNA 过量的反应中, RNA 序列和 DNA 序列是以相同的速度杂交的。杂交速度仅依赖于 DNA 的起始浓度  $C_0$ ,故又可称之为 DNA 驱动的反应。分析 DNA 驱动的反应可得下列信息:

1. RNA 序列的  $C_0t_{1/2}$  值表示 DNA 序列重复频率的类型

(2) 式中的  $C/C_0$  和(5)式中的  $R/R_0$  表

示残余单链(DNA 或 RNA)的浓度与起始浓度( $C_0$  或  $R_0$ )之比,以它们为纵坐标,以  $C_0t$  为横坐标可分别作出两者的  $C_0t$  曲线。当  $C/C_0 = 1/2$  时,  $C_0t_{1/2} = 1/K$ , 可见  $C_0t_{1/2}$  与  $K$  密切相关。标记 RNA 序列与相应的 DNA 序列是以同一的动力学形成氢键的,所以,某种 RNA 序列的  $C_0t_{1/2}$  可表示转录该 RNA 序列的 DNA 序列的重复频率类型。假设某真核生物基因组的 50% DNA 的复杂性 ( $X$ ) 是  $10^5$  核苷酸对,具有  $10^4$  次的重复序列 (A 成分)。其余 50% 是复杂性为  $10^2$  核苷酸对的非重复序列 (B 成分)。通过 DNA 复性动力学分析(图 1 中虚线表示 DNA 复性的  $C_0t$  曲线),混合物中 A 成分的  $C_0t_{1/2}$  (混) 和 B 成分的  $C_0t_{1/2}$  (混) 各为  $2 \times 10^{-1} \text{mole} \cdot \text{sec/l}$  和  $2 \times 10^3 \text{mole} \cdot \text{sec/l}$ 。从这种生物的胚胎细胞分离出放射性标记 RNA,与过剩的 DNA 杂交,可得图 1 的结果(实线)。

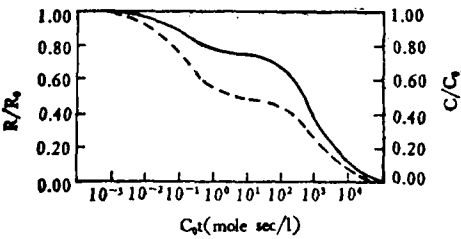


图 1 标记 RNA (实线)和过量 DNA 的假想杂交反应曲线  
---- 示 DNA 复性反应时的  $C_0t$  曲线

单链 DNA 比等量的双链 DNA 更多地吸收紫外线,用紫外分光光度计可测定 DNA 复性的量。RNA 的杂交量可通过对 RNase 耐受性的放射比活性测定。实验结果(图 1 中实线)证明, RNA 序列的 25% 由重复 DNA 序列转录, 75% 由非重复 DNA 序列转录。第一类 RNA 的一半形成杂种时,  $R/R_0 = 12.5\%$ , 而在 DNA 复性的  $C_0t$  曲线中,第一类 DNA 的半复性为  $C/C_0 = 25\%$ , 它们相应的  $C_0t$  值基本相同(从图 1 可看出都为  $2 \times 10^{-1} \text{mole} \cdot \text{sec/l}$ )。第二类 RNA 和第二类 DNA 也有这种关系。可见单从分析 RNA 杂交的  $C_0t$  曲线,即可判断转录该 RNA 的 DNA 序列的重复频

率类型。

## 2. RNA 序列是由何种 DNA 转录

通过羟磷灰石柱 (HAP) 和 RNase 耐受性的综合测定,可决定 RNA 分子是由一种重复频率的 DNA 转录的,还是由相邻的重复序列和非重复序列的两种 DNA 同时转录的。以上实验为例,用综合测定可得图 2 所示结果。

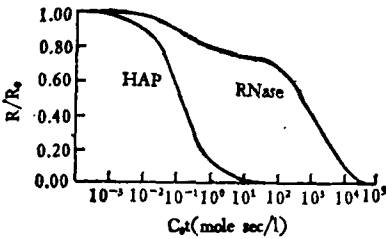


图 2 HAP 和 RNase 法测定 RNA 形成杂交链的  $C_0t$  曲线

羟磷灰石吸附 RNA-DNA 杂交体。RNase 法测定已与 DNA 碱基配对的 RNA 序列。从图 2 看出,重复序列转录的 RNA 序列只占总 RNA 的 25%。当  $C_0t = 10^2$  时,这类 RNA 基本杂交完毕。在 HAP 中表明,这种杂交与理想的二级反应曲线符合,说明这类 RNA 分子全是由重复 DNA 序列转录的。特定的 RNA 转录产物能用 RNA 依赖性 DNA 聚合酶合成强放射性标记的互补 DNA (cDNA) 序列,而分析 cDNA 的复性是很方便的。标记 cDNA 和标记 RNA 一样,其频率类型可用羟磷灰石色谱法测定  $C_0t_{1/2}$  后求出。

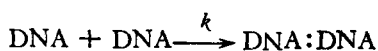
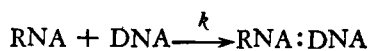
## 3. 测定重复 DNA 与非重复 DNA 的相互位置

如非洲爪蛙 (*Xenopus laevis*) 胚胎的 mRNA,一部分由非重复 DNA 转录,另一部分由重复 DNA 转录,那么后者是在前者的 5' 端还是在 3' 端呢? 这可以将  $^{32}\text{P}$  标记的 mRNA 进行正向杂交来测定。先从胚胎中分离出用  $^3\text{H}$ -尿嘧啶均匀标记的完整 mRNA,然后用  $^{32}\text{P}$  标记其 5' 端。经切断后与过量 DNA 杂交 (RNase 法)。由于有两种  $^3\text{H}$ -mRNA, 所以其  $C_0t$  曲线将分为两段,而  $^3\text{H}$  标记也出现在这两部分中。一小部分  $^3\text{H}$ -mRNA 在重复 DNA 的

$C_0 t_{1/2}$  下形成杂种,大部分在非重复 DNA 的  $C_0 t_{1/2}$  形成杂种。而  $^{32}\text{P}$  标记则与此不同,它只在其中一部分里出现,若  $^{32}\text{P}$  标记完全出现在与重复 DNA 形成杂种的部分,那么表明重复 DNA 转录的 mRNA 部分位于整个分子的 5' 端,若  $^{32}\text{P}$  标记全与非重复 DNA 形成杂种,则说明重复 DNA 转录的 mRNA 部分位于分子内部,或者在 3' 端。

## 二、RNA 驱动反应动力学

在 RNA 过剩或 RNA 驱动的杂交反应中存在下列两种反应:



DNA 用放射性标记物标记,浓度又低,故 DNA:DNA 反应可以忽略。单链 DNA 的减少速度为:

$$-\frac{dc}{dt} = kRc \quad (6)$$

由于 RNA 浓度大大超过 DNA, 所以单链 RNA 的浓度在反应中几乎不变,即  $R=R_0$ 。(6)式可写为:

$$-\frac{dc}{dt} = kR_0c$$

或者

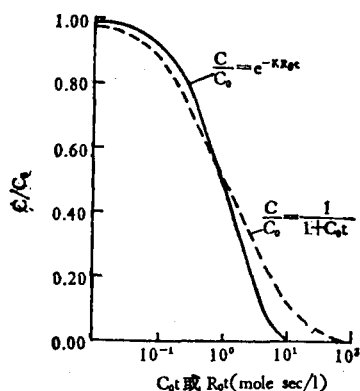


图3 假一级反应与二级反应的单链 DNA 减少曲线——一级反应,即 RNA 依赖性杂交反应中  $c/c_0$  和  $R_0t$  的函数关系。标记 DNA 由一种重复频率群组成,全都有对应的 RNA。-----在理想的 DNA 复性反应中  $c/c_0$  和  $C_0t$  的函数关系

$$\frac{dc}{c} = -kR_0dt \quad (7)$$

在反应起始时,  $t=0$ ,  $c=c_0$ , 积分得

$$\frac{c}{c_0} = e^{-kR_0t} \quad (8)$$

也就是说,对于前述双分子反应, RNA 驱动的杂交反应类似一级反应(图3)。当单链 DNA 减少 1/2 时,  $R_0t_{1/2}$  值 ( $R_0t_{1/2}$ ) 为:

$$R_0t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (9)$$

应用 RNA 驱动的反应,可直接测定 RNA 的复杂性。

### 1. 从 $R_0t_{1/2}$ 值中测定

复杂性  $X$  是指 DNA 中最长无重复顺序核苷酸对的长度,对于变性的单链 DNA 或 RNA 而言,是指核苷酸的个数。例如 (...ATAT...) 的复杂性为 2, (ATGC) $_n$  的复杂性为 4, 而由  $10^5$  不重复核苷酸对构成的均一 DNA 分子,其复杂性是  $10^5$  核苷酸对。

复杂性  $X$  与  $C_0t_{1/2}$  有什么关系呢? 让我们分析一下一种具  $10^5$  核苷酸对不重复顺序的噬菌体 DNA 和一种具  $5 \times 10^6$  核苷酸对不重复顺序的细菌 DNA。假如用 Virtis 匀浆器将它们切断成 500 核苷酸对的大小,则噬菌体中每特定断片占其 DNA 总量的 0.5%, 细菌中每特定断片占其 DNA 总量的 0.01%。如果两者的总 DNA 浓度相等(即每升中断片数相等),则噬菌体每特定断片的浓度是细菌每特定断片浓度的 50 倍,故噬菌体的  $t_{1/2}$  值是细菌的 1/50。要使两者每特定断片的浓度相等,则噬菌体的总 DNA 浓度应是细菌的 1/50, 于是噬菌体的  $C_0t_{1/2}$  值是细菌的 1/50。两者的复杂性也是这个比例。可见复杂性与  $C_0t_{1/2}$  是正比关系,即:

$$X = KC_0t_{1/2} \quad (10)$$

比例常数  $K$  由反应条件决定

如前所述有:

$$k = \frac{1}{C_0t_{1/2}} \quad (11)$$

而 RNA-DNA 杂交反应速度常数和  $R_0t_{1/2}$  值的关系如(9)式所示。因单链 RNA 浓度是双

链 DNA 浓度的 1/2, 故(9)式应写成:

$$R_0 t_{1/2} = \frac{1}{2} \left( \frac{\ln 2}{k} \right)$$

或

$$k = \frac{\ln 2}{2 R_0 t_{1/2}} \quad (12)$$

假定在相同条件下  $k$  值不变, 则有:

$$\frac{1}{C_0 t_{1/2}} = \frac{\ln 2}{2 R_0 t_{1/2}}$$

或

$$C_0 t_{1/2} = \frac{2 R_0 t_{1/2}}{\ln 2} \quad (13)$$

将(13)代入(10)式得

$$X = \frac{2 K R_0 t_{1/2}}{\ln 2} \quad (14)$$

在标准条件下(溶液阳离子浓度 0.18N, 核苷酸断片大小为 400 对),  $K$  值约为  $5 \times 10^5$  (升·核苷酸/核苷酸克分子数·秒)。由图 3 的一级反应曲线可知  $R_0 t_{1/2} = 1$ , 则:

$$X = \frac{2 \times (5 \times 10^5) \times 1}{\ln 2} \\ = 1.4 \times 10^6 \text{ (核苷酸)}$$

## 2. 从杂交反应的终点中测定

从 RNA 驱动的杂交反应的终点, 通过测定形成杂交链的标记 DNA 量, 可更直接求出 RNA 序列的复杂性。通常将分离出的特定频率组分 DNA (例如真核生物基因组的非重复 DNA) 作为标记 DNA 测定。在反应达终点时, 与 RNA 杂交的 DNA 的比例, 就表示对应 RNA 的 DNA 在整个 DNA 序列中的比例。只要知道标记 DNA 的复杂性, 根据反应程度, RNA 的复杂性就可算出。

譬如将从某真核生物分离的 mRNA (过量) 和基因组非重复成分 (设  $X = 10^9$  核苷酸对) 的放射性标记 DNA 进行杂交, 可得图 4 所示的结果。mRNA 的转录是非对称性的, 只有一条链的 DNA 可阅读其特定序列。因此, mRNA 的复杂性和该单链 DNA 完全相同时, 形成杂交链 DNA 的最大值是 50%。如图 4 所示, 在反应终点时 1% 的 DNA 参入杂交, 故 RNA 的

复杂性应为 DNA 的 2%, 即为  $2\% \times 10^9 = 2 \times 10^7$  核苷酸。

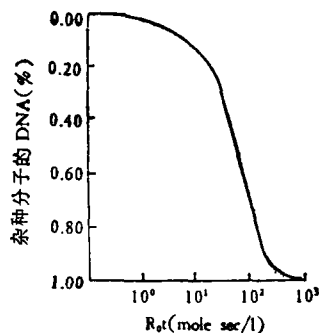


图 4 从杂交反应的终点中测定序列的复杂性

RNA 依赖性杂交反应中, 由标记 DNA 在终点时的结合量测定 RNA 序列的复杂性。杂交分子由羟磷灰石吸附的标记 DNA 的放射性测定

值得注意的是, 从杂交反应终点估计 DNA 的转录率常常偏小, 这一点通过 DNA 驱动的反应分析即可看出。如若海胆囊胚能产生  $7.2 \times 10^7$  mRNA 分子, 对于复杂性平均为 1200 核苷酸的 mRNA, 要使其一半量在  $R_0 t = 10^3$  时形成杂种, 那么这类 mRNA 至少应在囊胚中存在多少拷贝呢? 根据(14)式  $R_0 t_{1/2}(\text{纯}) = X \ln 2 / 2K$ , 取  $K = 5 \times 10^5$  (升·核苷酸/核苷酸克分子数·秒):

$$R_0 t_{1/2}(\text{纯}) = \frac{1200 \times \ln 2}{2 \times (5 \times 10^5)} \\ = 8.3 \times 10^{-4} \text{ (mole} \cdot \text{sec/l)}$$

而

$$R_0 t_{1/2}(\text{混}) = 10^3 \text{ (mole} \cdot \text{sec/l)}$$

所以这类 mRNA 在全群中的比例

$$f = \frac{R_0 t_{1/2}(\text{纯})}{R_0 t_{1/2}(\text{混})} = \frac{8.3 \times 10^{-4}}{10^3} \\ = 8.3 \times 10^{-7},$$

即这类 mRNA 在全群中的拷贝数为  $(8.3 \times 10^{-7}) \times (7.2 \times 10^7) = 60$  (拷贝/胚)。也就是说, 复杂性为 1200 核苷酸的 mRNA 在  $R_0 t = 10^3$  时, 只有拷贝数大于或等于 60 的才能检出, 而小于 60 的、包括那些只在很短的发育时期里产生的 mRNA 就不能检出了 (不能形成杂种)。可见由  $R_0 t = 10^3$  时得出的结论 (非重复 DNA

的2%用于囊胚 mRNA 的密码)与实际情况相比是偏低了。

## 参 考 文 献

[1] Britten, R. J. et al.: *Methods in Enzymology*,

Vol. 29, 363, Academic Press, New York, 1974.

[2] Britten, R. J. et al.: *Science*, 161, 529, 1968.

[3] Wetmur, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 31, 349, 1968.

[4] Davidson, E. H. et al.: *Cell*, 4, 217, 1975.

[5] Galau, G. A. et al.: *Cell*, 2, 9, 1974.

[本文于 1983 年 4 月 14 日收到]

# 高效凝胶色谱测定蛋白质分子量

姚志建 马立人

(军事医学科学院, 北京)

自从 1959 年凝胶过滤色谱出现以来<sup>[1]</sup>, 很快就提出这种方法可做为一种测定蛋白质分子量的手段<sup>[2]</sup>。但经典的凝胶过滤色谱流速慢、柱效低、检测灵敏度和操作的自动化程度也不高。因此, 长期以来凝胶过滤主要还是作为一种分离的手段, 并不经常用来测定分子量。

近年来高效凝胶过滤色谱法的出现, 使这项技术有了进一步的发展<sup>[3,4]</sup>。一些新型的高效液相色谱柱也表现出在一定的分子量范围内分配系数 ( $K_d$ ) 与分子量对数呈近似线性的关系<sup>[5]</sup>, 因此利用高效液相色谱的高效、高速、高灵敏度的特点, 就有可能建成一种快速、微量的测定蛋白质分子量的实用方法。

本文报告了我们在测定蛋白质分子量时所用基本色谱条件的选定及对几种蛋白质提取物的应用实例。

## 一、材料和设备

高效液相色谱仪由 Waters 6000 输液泵及 U6K 阀式进样器, 配用 Pharmacia 214 nm. 单波长紫外检测器组成。选用的高效凝胶色谱柱为瑞典 LKB 公司出售的 UltroPak TSK-SW 系列预装柱, 柱长 600 毫米, 内径 7.5 毫米。

右旋糖酐蓝、甲腺球蛋白、铁蛋白、过氧化氢酶、乳酸脱氢酶、牛血清白蛋白均为 Pharmacia 产品。卵清蛋白、细胞色素 C、糜蛋白酶原、二硝基苯丙氨酸 (DNP- 丙氨酸) 为 Serva

产品。其它试剂均为北京化工厂产之分析纯制品。

## 二、结 果

### 1. 色谱条件

(1) 移动相的离子强度 高效凝胶色谱填料是由硅胶表面键合亲水官能团制成的。实际使用的结果却发现填料表面仍有残留的极性基团存在。为了减少这些残留极性基团对蛋白质分子的吸附或排斥作用, 需对移动相中的离子强度做适当的调整。图 1 示出改变移动相离子强度对牛血清白蛋白在柱上保留行为的影响。根据图 1 所示的关系, 我们一般选用 0.1 M (离子强度  $\mu = 0.2$ ) 的磷酸缓冲液为移动相。

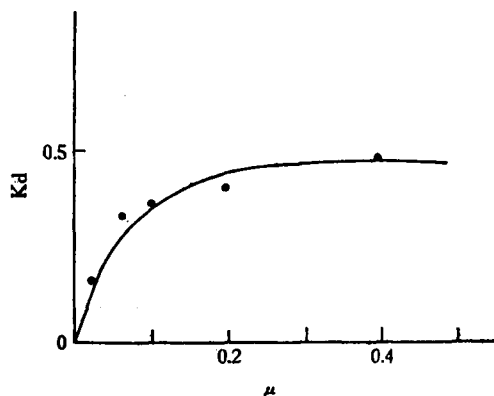


图 1 离子强度对分配系数的影响

分离条件: 柱: TSK 3000SW 移动相: 磷酸缓冲液 pH6.8 流速: 1.0 毫升/分 样品: 牛血清白蛋白 4.5 微克溶于 5 微升水中