

“缺刻翻译”后 [^{32}P] DNA 回收的简便方法

郑珉 杨胜利 邹冈

(中国科学院上海药物研究所)

在分子生物学研究中,常常遇到从“缺刻翻译”(Nick Translation)后的缓冲液中回收 ^{32}P 标记的 DNA 问题。多年来不少人均采用柱层析法。该方法操作步骤多,须多人协作进行,且 [^{32}P] DNA 洗脱液体积较大(约 1.5ml),给后继的分子杂交实验带来了诸多不便。在研究神经肽基因表达调控的工作中,我们受 Davis^[1] 等方法的启发,摸索出一套快速、简便、单人便可操作的有效方法介绍如下:

材料与 方法

1. Sephadex G50 (medium) 为 Pharmacia 产品。预先平衡于 TE (10 mM Tris HCl, 1mM Na₂ EDTA, pH 7.5) 中。

2. 1.5 和 0.5ml 塑料离心管(浙江慈溪塑料离管厂)。在 0.5ml 离心管底部和盖上用 $4\frac{1}{2}$ 注射针分别穿 1 和 4 个小孔。塞少许细玻璃纤维于穿洞后的 0.5ml 离心管底部。然后加入 500 μl Sephadex G50-TE 平衡液。静置 2 分钟后待离心管内装柱体积调整至约 400 μl 成一 mini-column。将装填好 Sephadex G50 后的小离心管套入 1.5ml 离心管中(图 1)成一试管组。

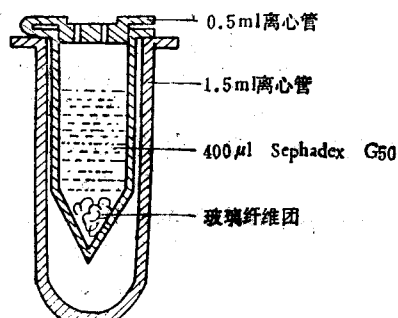


图 1 试管组示意图

3. 将试管组置于 TGL-16 (上海医疗器械六厂)或类似的台式离心机, 3000rpm 离心 0.5 分钟后, 加 TE 100 μl 于 0.5ml 离心管中。3000rpm 离心 0.5 分钟洗柱。重复两次。洗柱后的小离心管移入另一清洁的 1.5ml 离心管中, 将终止反应后的“缺刻翻译”缓冲液

稀释至 50 μl 。上样到小离心管中的 mini-column 中。3000rpm 离心 0.5 分钟后, 加 50 μl TE 洗。离心速度, 时间均同前。此时 1.5ml 离心管中所收集到的 ^{32}P 标记 DNA 约 100 μl 。

结果与 讨论

我们比较了两种回收 [^{32}P] DNA 的方法, 即目前国内各实验室常用的 $0.7 \times 20\text{cm}$ Sephadex G50 柱层析法和我们采用的试管组法(表 1)。柱层析法工作时, 须测每个洗脱液组分的放射性 (cpm) 以追踪 [^{32}P] DNA。通常以 0.5ml/组来收集洗脱液。一般情况下 [^{32}P] DNA 洗脱峰出现在二至三个组分中。共约 1.5ml。且工作时须有二人合作。在“缺刻翻译”后 [^{32}P] DNA 比度不高的情况下, 则常常须将柱层析后的洗脱液用二倍乙醇沉淀浓缩一次方再进行后继的分子杂交实验。

表 1 两种回收 [^{32}P] DNA 方法的比较

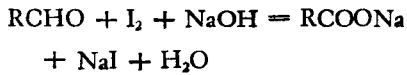
	层析法	试管组法
洗脱液体积	~1.5ml	~100 μl
操作时间	~3h	~30min
操作人员	2	1
DNA 回收率	82%	76%

DNA 回收率按下式计算: $\frac{\text{cpm}(2)}{\text{cpm}(1)} \times 100\%$

式中 cpm(1) 为标记反应停止后, 缓冲液中三氯醋酸沉淀物的放射性计数。cpm(2) 为反应终止, 回收的 [^{32}P] DNA 洗脱液中三氯醋酸沉淀物的放射性计数。

本文所介绍的方法采用了非梯度 Sephadex G50 装柱来取代 Davis^[1] 介绍的梯度 Bio-gel 装柱, 因而在操作上更为简便, 且材料而较易得到。试管组法也可用于末端标记 [^{32}P] 后 [^{32}P] DNA 的回收。在试管组外面再套一根 5—10ml 离心管后, 则离心也可在一般医用台式离心机上进行。在 [^{32}P] DNA 回收率相差不多情况下, 试管组具有明显的优点: 简便, 省时且实用。

(下转第 71 页)



因此,使用这个方法可以测定果糖含量,并在已知还原糖含量的情况下,推算出葡萄糖的含量。

二、测定方法

1. **样品液的制备** 用移液管吸取 1ml (视样品含单糖量高低而定) 分析液放入 50ml 容量瓶中,加入 1 滴酚酞 (0.1%), 用 0.4N 的 NaOH 中和。在加入 NaOH 时,应逐滴加入,直至溶液颜色出现玫瑰色。然后加入 5ml 0.05N 的碘液、1ml NaOH 混匀,静置 10 分钟。这时葡萄糖被碘氧化。经过 10 分钟加入 1ml 0.4N 盐酸,并用新配置的 0.05N 亚硫酸钠滴定,使未反应的碘退色。亚硫酸钠可用滴定管加至溶液呈麦杆黄色为止。最后加入 4 滴 0.5% 淀粉液,并滴定到蓝色消失。其反应按下述方程式进行: $\text{I}_2 + \text{Na}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{O} = \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{HI}$

反应中形成的碘氢酸,必须立即用碱中和,以避免二糖水解。在黄色消退后用 0.4N Na_2OH 中和,以 1 滴酚酞作指示剂。溶液用蒸馏水稀释至 50ml,并仔细混匀,留待比色测定。

2. **标准曲线的制作** 在一组 10ml 容量瓶中 (1—11 号),分别加入标准果糖 (mg/ml) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0ml, 加水至 5ml, 再加 1% 3, 5-二硝基水杨酸 1.5 ml, 放在沸水浴上保温 5 分钟,立即取出,用流动冷水冷却,用蒸馏水稀释至刻度。混匀后在 721 型分光光度计上 (在波长 520nm 处比色) 测定,用空白管溶液调零点,记录光密度值,以果糖浓度为横坐标,光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

3. **样品中果糖含量的测定** 取样品液 1ml (视含果糖量高低而定) 放入 10ml 容量瓶中加

蒸馏水 4ml 和 1.5ml 3, 5-二硝基水杨酸溶液,放入沸水浴中保温 5 分钟,立即用流动冷水冷却,加蒸馏水至刻度,并混匀进行比色测定。然后在标准曲线上查出相应的还原糖含量,按下述公式计算出样品内果糖的百分含量。

$$\text{果糖}\% = \frac{\text{果糖毫克数} \times \text{样品稀释倍数}}{\text{样品重(g)}} \times 100$$

三、结果与讨论

用比色法测定野生水果木通科 (*Lardizabalaceae*) 的八月炸 [*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz] 和五叶瓜藤 [*Holboellia fargesii* Reaub] 成熟新鲜果实中果糖含量,与用波钦诺克碘量法测定结果相比较,两者基本相符合。

表 1 两种测定方法所获结果的比较

方法 样品	碘量法(%)	比色法(%)	误差
八月炸	3.123	3.060	-0.063
五叶瓜藤	1.053	1.081	+0.026

1. 制备样品液需用盐基性碱式盐去除蛋白。由于本测定是比色法,因此用硫酸锌而不用硫酸铜。

2. 测定果糖时,样品是用碘氧化葡萄糖,而本测定又是用亚硫酸钠氧化多余碘。为了避免生成的碘氢酸水解二糖,导致测定误差,应尽快用碱中和,以保证测试的准确性。

3. 葡萄糖氧化最完全是在碱的滴定度 1.6 倍时。因此,在测定样品中果糖时,需注意反应的酸碱度,严格按照规定数量加入有关试剂。

参 考 文 献

- [1] Sumner, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **47**, 391, 1921.
- [2] X. H., 波钦诺克著:《植物生物化学分析方法》(中译本),第 140—141 页,科学出版社,1976.

[本文于 1986 年 2 月 4 日收到]

York, 171, 1980.

- [2] Maxam, A. M. et al.: *Methods Enzymol.*, **65**, 499, 1980.

[本文于 1986 年 4 月 21 日收到]

(上接第 77 页)

参 考 文 献

- [1] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics* (1st ed.), Cold Spring Harbour Laboratory, New