

小牛胸腺脱氧核糖核酸的提取和分析

上海实验生物研究所三室细胞研究组

在许多生化工作中,需要一定纯度和保持某些天然性质的脱氧核糖核酸(DNA)。鉴于这个目的,我们以小牛胸腺为材料,对DNA提取和纯化进行了多种方法的摸索,并对产品进行了初步鉴定。实验结果说明,按照确定的方法所获得的DNA符合一般生化工作的要求,这套方法也可供提取其它组织DNA时参考。

方 法

1. DNA的提取

(1) 小牛胸腺染色质的分离 详细过程见《小牛胸腺染色质组成分析》一文^[1]。

(2) 核组蛋白的制备 从100克小牛胸腺制备的染色质溶解在1,000毫升1M NaCl溶液中,经 $18,000 \times g$ 离心1小时后,上清液以6倍体积蒸馏水稀释,再以 $3,000 \times g$ 离心20分钟收集沉淀,即为核组蛋白,而上清液含非组蛋白染色体蛋白。

(3) 粗制DNA的制备 按Kay(1952)方法进行。将染色质或核组蛋白悬浮于1,000毫升4℃的0.9% NaCl溶液中,在不断搅拌之下,加入90毫升SDS溶液(5克重结晶的SDS溶解在100毫升45%乙醇中),于室温连续搅拌3小时后,加入55克NaCl,继续搅拌5—10分钟, $5,000 \times g$ 离心2小时,上清液以同体积95%乙醇沉淀DNA,以95%乙醇、丙酮洗数次即得粗制DNA。

(4) 精制DNA的制备 粗制的DNA溶解在300毫升0.15M NaCl-0.02M tris-1% SDS(pH 7.9)溶液中,以同体积用上述缓冲液饱和了的重蒸酚振荡20分钟, $7,000 \times g$ 离心30分

钟,水相重复酚处理过程一次。最后得到的上清液以同体积氯仿或乙醚振荡15分钟,重复3次以上,每次以 $7,000 \times g$ 离心30分钟,收集水相。水相对0.15M NaCl-0.015M 柠檬酸钠(pH 7.0)[称SSC溶液]透析30小时。

经过透析得到的DNA SSC溶液与RNase在37℃下温育两小时,DNA溶液中酶浓度为40微克/毫升,酶使用前应于95℃中加热10分钟。然后以蛋白酶(我们使用过胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶20 γ /毫升)于37℃温育40分钟。酶处理后的DNA溶液同样重复上述苯酚、氯仿或乙醚处理过程,以SSC溶液透析后,用乙醇沉淀和丙酮洗涤,得到纯制DNA。

(5) DNA制备的其它方法 除上述方法外也摸索了其它几种制备DNA的方法,全部过程归纳如图1所示。

2. DNA紫外吸收性质的鉴定

按Ohba和Hayashi方法(1972)进行,测定A260/A280和A240/A260吸收比值,以比较DNA样品的纯度。

以SP-700紫外分光光度计测DNA SSC溶液的熔点温度(T_m),温度上升为0.5℃/分。记录吸收曲线,并以温度为函数绘制dH 260/dT增色曲线。

3. DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

参考Gregson方法(1972)进行,丙烯酰胺单体浓度是2.4%,Bis浓度是单体的6.9%,TEMED和过硫酸铵分别是单体浓度的0.0875%和0.075%。电泳柱为0.5×5.5厘米。电极溶液是0.025M 巴比妥钠-0.005M 二乙基巴比妥酸(pH 8.75)。予电泳一小时后,加入30

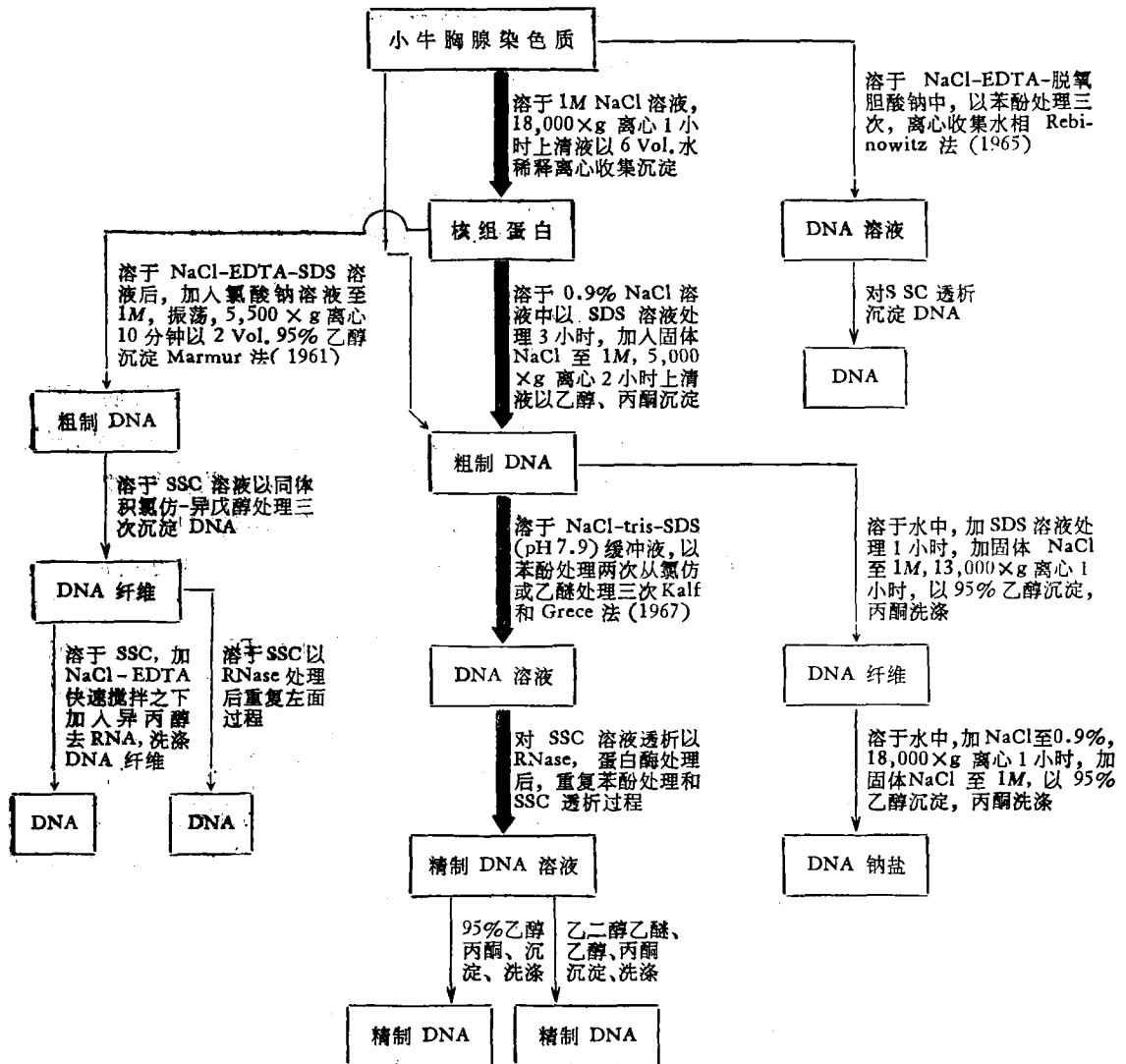


图1 小牛胸腺 DNA 提取过程

➔ 粗箭头为本实验室决定采用的过程

微升 5% 蔗糖的 0.1% DNA 溶液, 电压 55 伏, 电泳至溴酚蓝标记离前沿 0.5 厘米时停止。以 2% Pyronine y-1% 醋酸镉-15% 醋酸染色过液, 以 0.9N 醋酸电泳脱色。

4. 羟基磷灰石柱层析分离 DNA 的方法

按 Bernadi 方法(1969)进行。层析柱为 1.3 × 7.5 厘米, 柱以 0.001M 磷酸钾缓冲液平衡, 分别用 0.01, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50M 磷酸钾缓冲液洗脱, 流速 32 毫升/小时, 以 LKB uvicord II 自动扫描记录。

5. DNA 的电镜观察

取样过程参考 Kleinschmidt 方法^[2], 染色过程参考 Gordon 和 Kleinschmidt 方法^[3]。

6. 化学测定方法

蛋白测定以 Lowry 法^[4], RNA 测定以 Schjeide 法^[5], DNA 测定以 Burton 法^[6]进行。碱基比例测定以桔青酶水解 DNA 后经纸层析方法进行¹⁾。

1) 本测定由核酸组进行。

结 果

1. DNA 样品之纯度分析

按图 1 中粗箭头所示方法提取的 DNA, 其蛋白和 RNA 含量皆为 0.25%, 由于这样低的数值往往在仪器的误差范围之内, 因此, DNA 产品用于一般生化试验时, 其蛋白和 RNA 的污染可以忽略不计。

2. DNA 的紫外吸收特点和碱基比例分析

DNA 样品的 A260/A280 比值是 1.94, A244/A260 比值是 0.67, 按 Ohba 和 Hayashi (1972) 的报道, 此比值与组蛋白/DNA 比值呈函数关系, 本实验测得的数据表明, DNA 样品含有的极微量蛋白质对 DNA 紫外吸收特征没有影响。

DNA 的熔点温度测定结果如图 2 所示, 展示了典型的 DNA 熔点曲线, 单一的转化温度 Tm 是 86.4°C。DNA 增色性如图 3 所示, 如果有组蛋白污染将在熔点曲线中出现两个转化温度, 在增色曲线中出现两个峰, 因为组蛋白的存在对 DNA 有热变性的保护作用。本实验表现了 DNA 呈单一增色峰。

熔点温度 $T_m = 86.4^\circ\text{C}$ 可代入下式:

$$\text{GC}\% = 2.44 \times (T_m - 69.3)$$

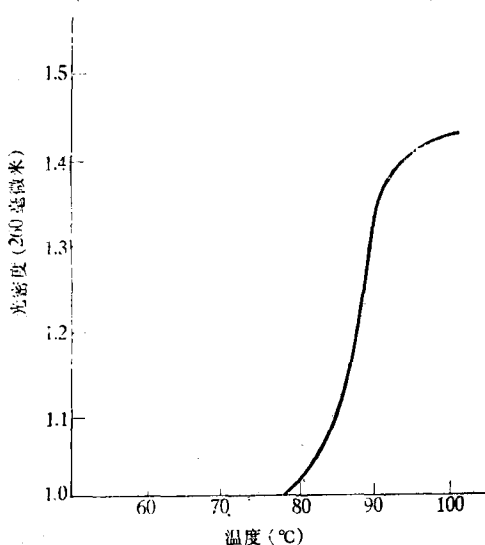


图 2 小牛胸腺 DNA 溶解曲线示意图

温度上升 0.5°C/分, DNA 溶解在 SSC 溶液中。

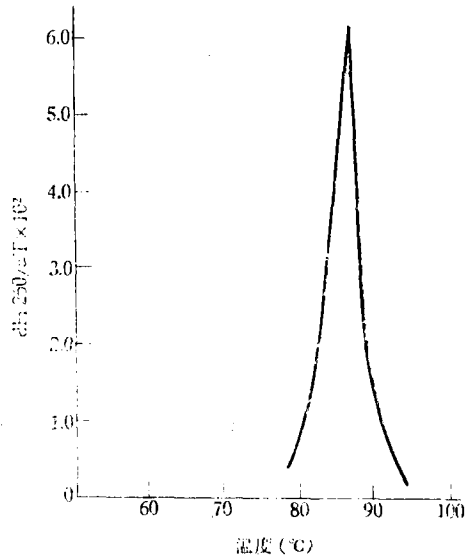


图 3 小牛胸腺 DNA 对温度变化的增色曲线

从而计算出 GC 碱基对所占百分比是 41.7%, 以生化方法测定获得的结果是 42.15%, 这两个结果相差不大, 基本与 Marmur (1961) 的结果一致。

3. DNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

按 Gregson 的报道, DNA 的分子量与 R_f 值之间的关系如表 1 所示。已知溴酚蓝的 R_f 值是 0.86, 我们测得的 DNA R_f 值在 0.06—0.08 之间, 因此其分子量在 $3-5 \times 10^6$ 之间。说明经过复杂的化学处理过程, DNA 分子的大小并不均一, 然而大部分有较高的分子量。

表 1 在 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳中 DNA 分子量与 R_f 值的关系

R_f 值	0.0	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
MW $\times 10^6$	>5.3	1.90	1.15	0.69	0.40	0.24	0.15	0.09	0.05	0.02

4. DNA 的羟基磷灰石柱层析和电镜观察

DNA 经羟基磷灰石柱层析分离的结果如图 4 所示。按 Bernardi 的分析, 0.20M 和 0.25M 洗脱的峰更接近于天然的 DNA 分子, 我们测定的结果指出 0.1 和 0.15M 磷酸钾洗脱部分量很少, 两者平均值的总和占上柱量的 2.4% 左右, 这部分可能属于小分子 DNA。溶解在 0.01M 磷酸钾缓冲液中的 DNA, 经过羟基磷灰石柱

子的最大吸附量是 85.1%，因此分子量较高的 DNA 部分大约可占 80% 左右。

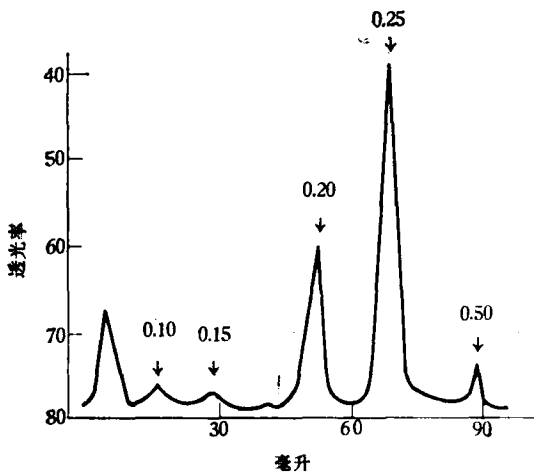


图 4 小牛胸腺 DNA 在羟基磷灰石柱上层析图谱

柱 1.3×7.5 厘米，流速 32 毫升/小时，第一峰为上柱流出峰，各峰上方数字代表洗脱的磷酸钾克分子浓度。纵座标以透光率表示，自动记录时基线是 80

而未被吸附的 DNA 样品再次以羟基磷灰石柱分离时，仍然可以获得正常 DNA 分离时所获得的图形。这种现象出现的原因有待于进一步研究，Bernardi 没有提到未吸附峰的存在。

经化学方法抽提的 DNA 造成分子间和分子内的聚合，一般难于解聚。经羟基磷灰石柱分离可以降低聚合现象。因此经过柱层析可以获得长链的 DNA 分子以及解聚的 DNA 分子。

DNA 按分子大小分级洗脱也从电镜观察获得了证明(见图版 I, 图 1—4), 图 1 是未经柱层析分离的 DNA 分子电镜照片, 其 DNA 分

子长短不一。图 2 和图 3 是经过羟基磷灰石柱层析分离后, 0.20 和 0.25M 磷酸钾缓冲液洗脱下来的 DNA 分子, 这些分子是解聚的长链 DNA 分子。图 4 是 0.5M 磷酸钾缓冲液洗脱峰的电镜照片, 看来象是未完全解聚的 DNA 分子。

总 结

经过初步摸索, 我们确定了一套提取小牛胸腺 DNA 的方法, 利用这套方法也提取了鼠肝 DNA。经过鉴定, 这样制备的 DNA, 蛋白和 RNA 的污染很低, 熔点温度和碱基比例测定结果与资料报道的小牛胸腺 DNA 的这些性质一致。聚丙烯酰胺凝胶电泳和羟基磷灰石柱层析分析的结果说明, 大部分属于大分子 DNA, 也不排除少量短链 DNA 分子的存在。这样的 DNA 是保持了天然 DNA 的某些性质的。

主要参考资料

- [1] 上海实验生物研究所三室细胞研究组: 《生物化学与生物物理进展》, 见本期。
- [2] Kleinschmidt, A. K.: *Methods in Enzymology*, Vol. 12, Part B, 361, 1968.
- [3] Gordon, C. N. & Kleinschmidt, A. K.: *Biochem. Biophys. Acta*, 155, 305, 1968.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [5] Schjeide, O. A.: *Anal. Biochem.*, 27, 473, 1969.
- [6] Burton, K.: *Biochem. J.*, 63, 315, 1956.

[本文于 1977 年 1 月 5 日收到]

小牛胸腺染色质的组成分析

上海实验生物研究所三室细胞研究组

高等真核细胞染色质是由 DNA、组蛋白、非组蛋白染色体蛋白(简称 NHC 蛋白)组成, 有人提出在染色质的结构中还含有少量的 RNA, 即所谓的 cRNA, 然而这还是一个争论中的问题。

各组成成份一起不仅维持着细胞周期中染

色质的结构, 而且通过各成分的有机联系和相互作用, 也控制着细胞功能的表现。作为研究染色质结构与功能的起始点之一, 我们以小牛胸腺为材料, 对染色质的各组成成分的比值进行了定量分析, 为通过染色质的重组研究染色质的结构与功能提供有关数据。

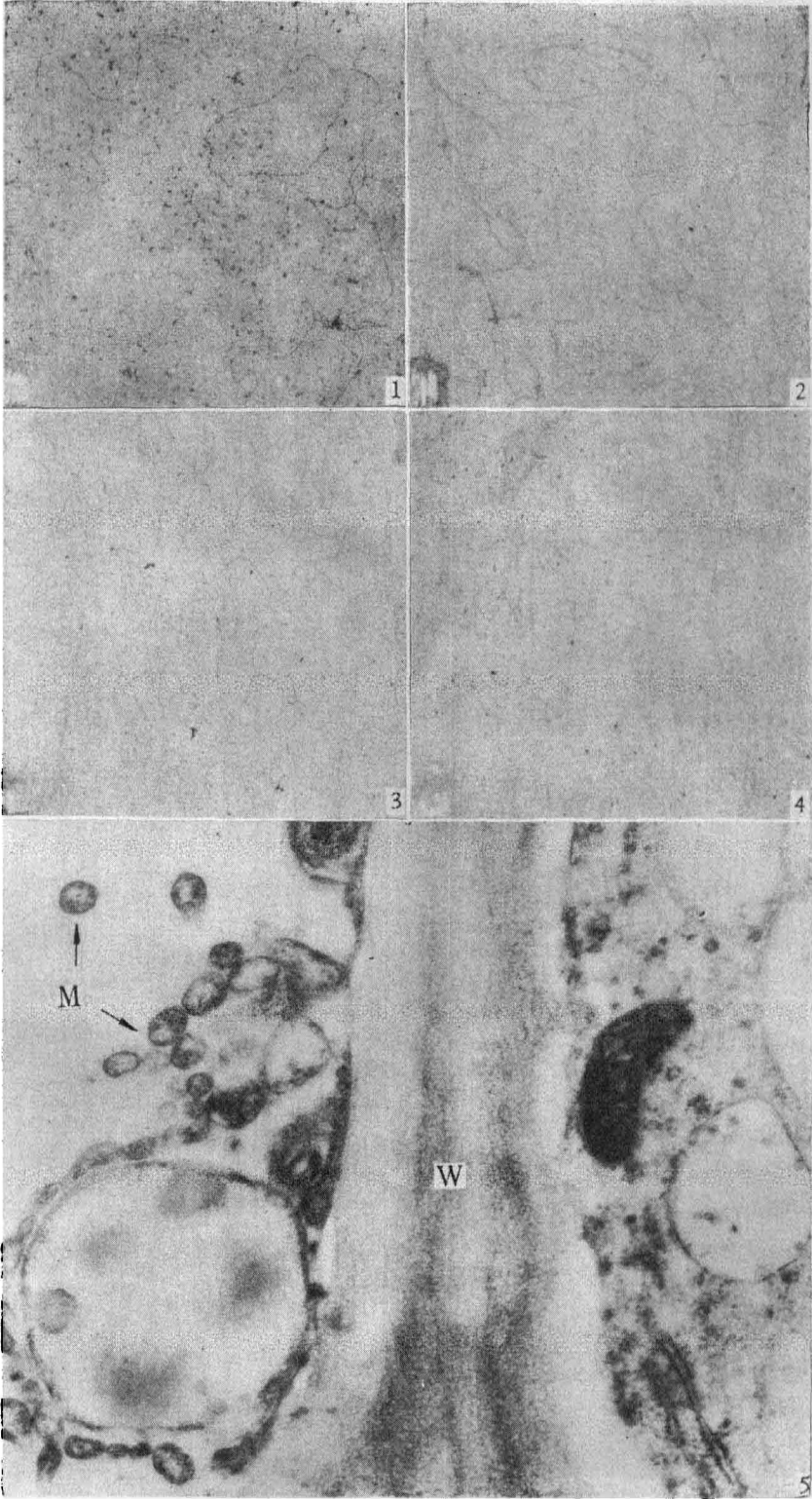


图1—4 小牛胸腺 DNA 的电镜照片 $\times 40,000$

1. 未经羟基磷灰石柱层析的 DNA; 2. 经过羟基磷灰石柱层析得到的 0.2M 磷酸钾缓冲液洗脱峰; 3. 经柱层析 0.25M 磷酸钾缓冲液洗脱峰; 4. 经柱层析 0.50M 磷酸钾缓冲液洗脱峰

图5 桑树萎蔫型萎蔫病初皮部切片

M——类菌质体; W——细胞壁