

特异性吸附。

(3) 层析柱及 Sephadex 每次实验前均进行消毒。

3. 玉米胚 S_{26} 匀浆的 pH 对其活性的影响较大^[2]。最佳 pH 为: 6.4—6.8; 如 pH 低于 6.3 则制剂的活力降低。pH 太高, 则内源性 mRNA 增加, 外源性 mRNA 掺入就降低。由于匀浆的 pH 受提取液控制, 因而配制提取液时应严格调整 pH 值。

4. 由于玉米种子来源方便, 胚粒较大, 剥离容易, 同时玉米胚体系内源掺入不高, 对外源模板敏感性又较高, 因而是一个值得进一步研究推广的无细胞体系。

动物所沈孝宙同志为本工作提供了小牛睾丸 mRNA, 并协助制备了兔肝 mRNA。小麦种子系中国农科院作物所提供。玉米种子由张家口坝下农科所、中国农科院作物所提供, 特此致谢。陈美英同志参加部分技术工作。

参 考 文 献

- [1] 微生物所病毒复制组: 《生物化学与生物物理学报》, 1976 年, 8 卷, 2 期, 179 页。
- [2] Marcus, A. et al.: *Methods in Enzymology*, **30**, 749, 1974.
- [3] 郭礼和等: 《第三次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》, 1979 年, 第 114 页。
- [4] Roberts, B. E. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2330, 1973.

[本文于 1980 年 9 月 29 日收到]

汉墓女尸肝脏核酸的分离与鉴定

王贵海 陆传宗

(中国科学院生物物理研究所)

研究表明, 埋藏达二千余年的长沙汉墓女尸, 从器官和组织水平来看, 保存得相当完好, 但从分子水平上其保存程度如何, 是一个令人感兴趣的问题。为此, 我们对此女尸的肝脏核酸进行了分离和鉴定研究。

材料、方法和结果

长沙汉墓女尸肝脏, 离体后福尔马林固定液保存, 呈深紫色, 湿重 4.7 克。另取明代尸体肝脏离体后固定保存十七年, 呈深黄色。现代人肝 (非患肝病死亡), 固定保存一年半左右进行比较。

本实验所用胃蛋白酶系英国产品; 胰凝乳蛋白酶由上海东风制药厂生产。

核酸的提取 首先将固定过的肝组织用水漂洗, 滤纸吸干; 剪碎后研磨。再用 10 倍体积的冷丙酮洗三次, 干燥后研磨成粉末。在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆。为提高其匀浆效果, 每克肝粉加入 3 克玻璃粉 (约 300 目)。匀浆液对水

透析, 除去甲醛, 然后转入到 0.2 M KCl-HCl pH 2.0 缓冲液透析。

经 0.2 M KCl-HCl pH 2.0 缓冲液透析的肝组织匀浆液中每克干粉加入 3.2 毫克胃蛋白酶, 反应总体积 100 毫升, 加入一滴氯仿, 在透析袋中 40℃ 搅拌保温 5 小时。反应后, 取出反应液, 5℃ 下离心 (9000 转/分) 30 分钟, 吸取上清液, 加入 0.2 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 7.5 缓冲液于组织残渣中, 再匀浆, 转入透析袋后, 加入 30 毫克胰凝乳蛋白酶, 一滴氯仿, 体积为 100 毫升, 37℃ 搅拌 5 小时。同上, 离心分离出上清液。其组织残渣再经匀浆和接着用蛋白酶水解处理。

4.7 克汉墓女尸肝脏经丙酮处理后得到 280 毫克干粉。表 1 给出三种肝组织蛋白酶处理的次序和效果。可以看出, 现代人肝的对照试验中, 由于增加了胰凝乳蛋白酶的处理次数, 除去蛋白和分离核酸的效果显著, 故对汉墓女尸肝样品也增加了胰凝乳蛋白酶的处理次数。

表 1 几种固定肝脏提取核酸的比较

肝 组 织	肝 粉 量 (克)	蛋白酶处理次序	水解蛋白量 (克)	得到核酸量 (毫克)
固定一年现代人肝	1	胃-胃-胃-胰-胰	0.243	14
固定一年现代人肝	1	胃-胰-胃-胰-胰	0.478	34.7
固定十七年明代尸肝	1	胃-胰-胰-胰	0.345	52(O.D ₂₆₀)
固定一年半汉墓女尸肝	0.28	胃-胰-胰-胰-胃-胰	0.085	13.9(O.D ₂₆₀)

Lowary^[1] 法测定酶水解上清液的水解蛋白量;得到核酸量系紫外分光光度法测定。

表 2 汉女尸肝脏蛋白酶各步处理的水解蛋白量和释放的 RNA 量

处 理	胃	胰 乳	胰 乳	胰 乳	胃	胰 乳
测 定						
水解蛋白量(毫克)	11.5	18.0	17.0	17.0	5.0	17.0
RNA 量(毫克)	1.9	5.0	3.3	2.8	0.4	2.2

RNA 量系用地衣酚^[2]法测定。

表 2 列出了汉女尸肝样品经各步蛋白酶处理后水解的蛋白量和释放的核糖核酸量。

核酸的分离与浓缩 5℃左右下操作,合并酶反应上清液,用水稀释 4 倍,调 pH 中性,然后上到 DEAE-纤维素柱(2×10 厘米)。流速 1.5 毫升/分钟。用 0.2M KCl 淋洗至 O.D₂₆₀ 毫微米读数为 0.05 以下。然后改用 1 M KCl 洗脱,每 5 毫升收集一管。合并较浓的管子。紫外测定核酸量结果表示于表 1 中。

核酸的进一步纯化 柱分离得到的核酸经光谱分析证明含有较大的蛋白,应进一步纯化。加入等体积的水饱和苯酚-甲酚试剂于核酸溶液中,振荡 1 小时,离心分离出水相,加两倍体积以上的乙醚,除去水相中的残余酚。一次酚处理可去除一半以上的蛋白。酚抽提后的样品对水透析后,冷冻干燥浓缩。

经上述方法处理,13.9 O.D₂₆₀ 毫微米汉女尸的柱 1 M KCl 洗脱液,回收得 5.4 O.D₂₆₀ 毫微米,蛋白质含量由 59%降到 25%以下。

图 1 和图 2 分别给出了现代人肝和汉女尸肝核酸样品经酚处理后光谱的改善情况。最小吸收移至 235 毫微米,最大吸收在 260 毫微米。O.D₂₆₀ 毫微米/O.D₂₈₀ 毫微米和 O.D₂₆₀ 毫微米/O.D₂₃₅ 毫微米之比值皆大大增加。

核酸分子量的比较鉴定 (1) 葡聚糖 G-

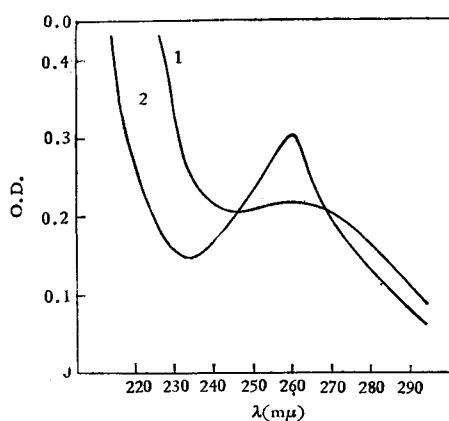


图 1 现代人肝核酸酚处理前后的光谱
1. 酚处理前 2. 酚处理后

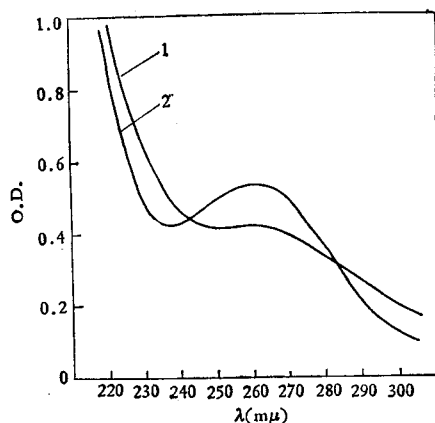


图 2 汉女尸肝核酸酚处理前后的光谱
1. 酚处理前 2. 酚处理后

100 柱 (0.5×110 厘米), 1 M NaCl 溶液平衡并洗脱。流速 0.11 毫升/分钟, 每份 2.2 毫升, 用 28 S TMV RNA , 23 S 大肠杆菌核糖体 RNA, 酵母 tRNA^{Ala} 和 CpU 为标准样品, 比较纯化的汉女尸肝和现代人肝核酸样品的柱层析行为。(2) 葡聚糖 G-25 柱 (0.5×113 厘米), 1 M NaCl 平衡并洗脱。流速为 0.15 毫升/分钟, 每份 2.9 毫升。用酵母 tRNA^{Ala} , $5'$ 半分子 tRNA^{Ala} 和 CpU 作标准样品, 柱层析皆在 LKB 紫外自动检测仪上进行。

图 3 和图 4 分别表示出 G-100 柱和 G-25 柱层析图谱。从图 3 可以看出, 除现代人肝核酸在 28 S 处有一个小峰外, 两者的核酸分子量分布相近, 皆小于 tRNA^{Ala} , 但是, 图 4 表明汉女尸肝核酸和现代人肝及明代尸肝核酸样品一样, 其分子量皆大于 $5'$ 半分子 tRNA^{Ala} 的分子量 (约 $13,000$)。

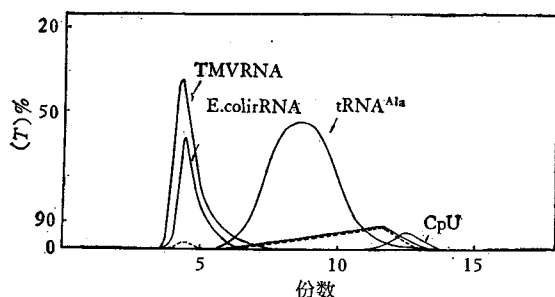


图 3 葡聚糖 (Sephadex) G-100 层析图谱

— 提取纯化的汉女尸肝脏核酸
- - 提取纯化的现代人肝核酸

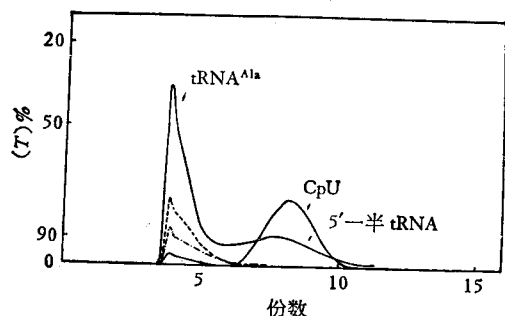


图 4 葡聚糖 (Sephadex) G-25 层析图谱

— 提取纯化的汉女尸肝脏核酸
- - 提取纯化的明代尸肝核酸
· · · 提取纯化的现代人肝核酸

讨 论

从固定组织提取核酸要比新鲜组织困难得多。有报道指出^[3]短时间的 6% 甲醛固定的蛋白颗粒不被 1% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 作用, 即使加苯酚处理也不能分离出核糖核酸。如果有 6% 甲醛存在时, 核糖体在 70°C 加热十分钟后, 它的蛋白质就难于被放线菌蛋白酶 (Pronase) 水解。令人高兴的是我们利用水解蛋白能力较强, 水解肽链专一性不同的胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶, 有效地破坏了变性蛋白, 并分离得到了二千多年前的汉墓女尸肝脏核酸分子。这一结果为这具古女尸的保存完好情况在分子水平上提供了科学依据。

考虑到汉墓女尸肝脏样品量少, 经蛋白酶处理后释放的核酸数量极微及其分子量较小等情况, 在分离和浓缩核酸时, 不用乙醇沉淀法, 而利用 DEAE-纤维素柱层析技术, 在一定条件下, 不仅回收核酸效率高, 而且也可除去上清液中的酶蛋白以及水解的蛋白产物 (如多肽和氨基酸), 起到了纯化的目的。

从图 3 和图 4 给出的分子量鉴定结果可以看出, 三种肝脏核酸的分子大小分布是相近的。这可能有两个原因, 其一是核酸分子在蛋白酶反复处理过程中的自身裂解; 其二是由于蛋白酶中可能含有核酸酶类。为此, 我们用酚抽提法^[6]分离得到的新鲜人肝核糖核酸作对照试验。结果表明, 不加蛋白酶保温, 核酸降解要比加蛋白酶处理的严重得多。这种情况可能是由于蛋白酶能消化样品中含有的核酸酶的结果。因此, 从方法上看, 加大蛋白酶量, 缩短保温时间对于减少核酸的降解是有益的。但是即使在这种情况下, 仍难于排除核酸在蛋白酶保温过程中可能引起的裂解。这一事实说明长沙汉墓女尸肝脏中保存下来的核酸分子要比实际得到的核酸分子还大些, 即分子量远不止一万左右。

采用 Schmidt 和 Thannhawer 法^[4]及测定磷酸法^[5]发现汉女尸肝脏经六次蛋白酶处理后组残渣还含有 0.364 毫克的 RNA 和 0.014 毫克的 DNA。另外, 在表 2 中所示的地衣酚法

测定的核酸量大于 1 M KCl 柱洗脱液中所得到的量,这是由于酶水解液中含有较多的小分子核酸,以及地衣酚法测定易受许多因素(如蛋白质、氨基酸和糖类)的干扰等原因所致。

试验蒙邹承鲁同志指导及室内同志帮助,微生物所二室蔡发兴同志提供核糖核酸样品,在此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Lowary, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265,

1951.

[2] Mejbbaum, W.: *J. Physical Chem.*, 258, 117, 1939.

[3] George, N. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 31 (1), 112—118, 1972.

[4] E. 查加夫, J. N. 达维生主编:《核酸》(中译本),第二卷,第 5 页。黄德民译,科学出版社,1955 年。

[5] Chen, P. S. et al.: *Analytical Chemistry*, 28, 17567, 1956.

[6] Kirby, K. S.: *Biochem. J.*, 64, 405, 1956.

[本文于 1980 年 5 月 19 日收到]

噬菌体 λ plac 5 DNA 的制备与鉴定

李金照 朱以桂 崔道珊

(中国科学院生物物理研究所)

噬菌体 λ plac5 DNA 的制备与鉴定是为了进一步分离乳糖操纵子。噬菌体 λ plac5 DNA 是 λ DNA 的变种,在它的分子上插入有一段乳糖操纵子。此操纵子位于 λ plac5 DNA 分子长度的 39.6% 与 48.1% 之间,包括 I 基因的一部分, P. O. Z 基因的全部和部分 γ 基因,约 3950 个碱基对^[1]。乳糖操纵子的发现及其调控机理的阐明是近代分子遗传学的重大成果。由于它的调控机制已经研究得很清楚,常被用来和外源 DNA 一起重组到质粒上,利用它的调控机制使外源 DNA 在大肠杆菌内得以起动。转录和表达。

材 料 与 方 法

大肠杆菌 CSH66, 它的染色体上整合有噬菌体 λ CI 857 S7plac 5 DNA 作为前噬菌体,在 32℃ 培养条件下,噬菌体 DNA 同寄主染色体一同复制并遗传给后代。因为噬菌体的抑止子是温度敏感型的,在 42℃ 作用下失活, λ plac5 DNA 便由染色体上激活下来,大量复制自己。 λ plac5 DNA 还带有 S7 变异,此变异使得 λ plac 5 噬菌体仅在大肠杆菌内大量复制自己,但不能裂解细胞壁。为了释放出噬菌体,必须加氯

仿,人工强迫裂解。

1. CSH 66 菌的单斑筛选 用限制性琼脂培养基制成固体平板(限制性琼脂培养基:每升含 K_2HPO_4 10.5 克, KH_2PO_4 4.5 克, $(NH_4)_2SO_4$ 1 克, 柠檬酸钠 0.5 克, 琼脂 15 克, 无菌后加 1 毫升 20% $MgSO_4$, 0.5 毫升 1% 维生素 B1, 10 毫升 20% 葡萄糖),培养基含有 Xgal 指示剂 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 0.05 毫克/毫升(参照 Miller 方法)^[2]。用接种针取 CSH 66 菌少许在上述平板上画线,画线要连续,并将接种针迅速通过火焰后再画,以达到稀释作用。34℃ 温箱培养 24 小时,挑出平板上的深蓝色单菌斑,作为制备 λ plac5 DNA 的菌株。

2. 噬菌体 λ plac5 DNA 的制备 取 CSH 66 菌蓝色单斑接入 100 毫升 2 YT 培养基里(每升含蛋白胨 16 克, 酵母膏 10 克, 氯化钠 5 克), 34℃ 摇床培养过夜;次日将过夜菌全部接入 1000 毫升 2 YT 培养基中, 34℃ 摇床培养 2 小时,生长到 O. D $\approx$ 0.8, 取下培养瓶,在 42℃ 诱导 15 分钟,再放回摇床,在 37℃ 培养 6 小时。以 8000 转/分离心 20 分钟 (MSE-18 高速离心机 6 $\times$ 100 毫升转头) 收集菌体, 菌体悬浮