

测定脱氧核糖核酸酶的简单方法

——荧光法

邱长春 吴冠芸

吴志奎

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京) (中医研究院广安门医院, 北京)

脱氧核糖核酸酶 (DNase) 是真核与原核细胞中广泛存在的 DNA 水解酶。1962 年 Kurnick^[1] 曾对某些根据底物特性变化来测定 DNase 活性的方法作了评述。近年来建立了更灵敏的用同位素测定 DNase 活性的方法。但由于同位素价格高昂, 危险, 又受本身半衰期和比强度的限制, 有时又需自己标记合成底物, 所以在应用上有一定的局限性。本文介绍一种简单、灵敏的测定 DNase 活性的荧光法。其基本原理是根据 DNA 和溴化乙锭 (EB) 结合发生荧光, 其强度与 DNA 量成正比。当 EB-DNA 复合物经 DNase 处理后, 由于 DNA 被降解、荧光强度减弱, 下降程度与 DNase 量有关, 因此从相对荧光强度可计算出 DNase 的活性。

一、材料与 方法

1. 仪器 双光束 DP-40A 型 UV-200 分光光度计、Hitach MPF-4 荧光光度计。

2. 酶与其他试剂 牛胰 DNase-I, 比活性 1200 单位/每毫克蛋白; 牛胰核糖核酸酶, 比活性 81 单位/每毫克蛋白; 蛋白水解酶 K, 比活性 20 mAnson E/每毫克蛋白; 溶菌酶, 比活性 9000 单位/每毫克蛋白; 小牛胸腺 DNA, 纯度 85% 以上; 以上各酶分别购自 BDH, Sigma, Merck 公司和中国科学院生物化学研究所。³H-DNA, 自制, 10 μ l 计数为 1×10^6 cpm。

3. DNase-I 的活性测定方法 反应混合物总体积 2 ml, 其中含浓度为 5.5 μ g/ml 的 DNA 溶液* 1.8 ml, 10 μ M 的 EB 溶液 100 μ l 和一定量 DNase-I, 余以 0.02 M pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液补足。37℃ 保温 30 分钟, 反应停止

后测荧光强度。

二、结果与 讨论

1. 吸收光谱与荧光光谱 从图 1 可见, EB 的最大吸收峰在 480 nm, EB-DNA 复合物的

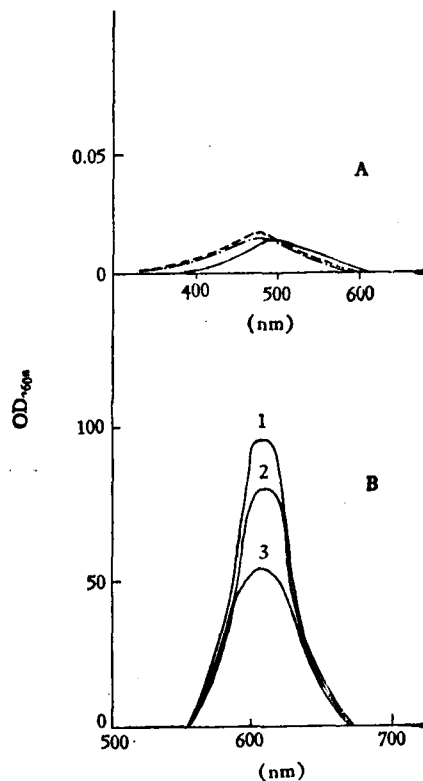


图 1 EB-DNA 复合物的吸收与荧光光谱

A. 吸收光谱: ——EB-DNA 复合物; ---EB; -.-.-经 DNase 处理的 EB-DNA 复合物 (DNA 10 μ g, DNase-I 20ng EB 10 μ M 100 μ l) B 荧光光谱: 1. EB-DNA 复合物; 2. 用 20 ng/ml DNase-I 处理; 3. 用 100 ng/ml DNase-I 处理。荧光测定条件: $E_m = 550-650$ nm $E_x = 520$ nm 温度 23℃

* DNA 溶于 0.02 M Tris-HCl 缓冲液, pH 7.6。

最大吸收峰移至 500 nm。经 DNase 处理之后,最大吸收峰又回到 480 nm。EB-DNA 复合物发出的荧光最强,经 DNase 处理后,荧光强度明显下降。

2. 荧光强度改变与 DNase-I 量的关系

通过以下两个实验阐明: (1) 固定 EB-DNA 复合物量,加不同量 DNase,观察荧光强度的改变,结果见表 1。(2) EB-DNA 复合物与 DNase-I 量固定,加不同量的 EDTA (DNase-I 的抑制剂),观察荧光强度的变化。从图 2 可见, DNase-I 固定时荧光强度随 EDTA 量的增加而增加,但总不能恢复到 EB-DNA 复合物的荧光强度,说明 EDTA 抑制了 DNase-I,但并没有完全抑制。由此证实 EB-DNA 复合物荧光强度的降低是由于 DNA 被 DNase-I 降解所致,其降低程度与 DNase-I 量成正比。

表 1 不同浓度 DNase-I 对 EB-DNA 复合物荧光强度的影响

组 别	EB + DNA	DNase - I	相对荧光强度*(%)
1	100 μ l + 10 μ g		100
2	100 μ l + 10 μ g	50pg	95.0
3	100 μ l + 10 μ g	250pg	90.7
4	100 μ l + 10 μ g	5ng	87.0
5	100 μ l + 10 μ g	25ng	75.9
6	100 μ l + 10 μ g	50ng	67.6

* %为平均值(下同)

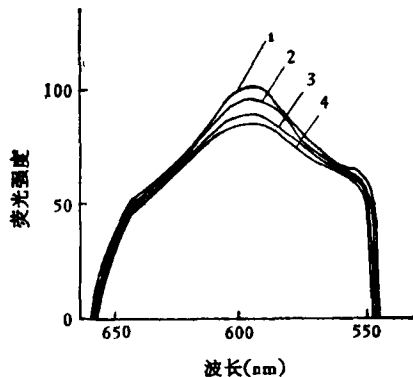


图 2 EDTA 对 EB-DNA 复合物荧光强度的影响

1. EB-DNA 复合物; 2. 10 mM EDTA, 5ngDNase-I;
3. 5 mM EDTA, 5 ng DNase-I; 4. 无 EDTA, 5ng.
DNase-I

3. 不同水解酶对 EB-DNA 复合物荧光强度的影响 为进一步证明 DNase-I 降低 EB-DNA 荧光强度的特异性,我们同时观察了 RNase, 蛋白水解酶 K 和溶菌酶对 EB-DNA 复合物荧光强度的影响,结果均无明显变化。

4. 三种测定 DNase-I 活性方法的比较

(1) 紫外吸收法 主要根据 DNA 被 DNase-I 水解后产生的增色效应来判断 DNase-I 的活性。实验按 Zimmerman 等^[2]方法稍加改进,反应混合物总体积为 2ml (其中含 50mM Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 2 μ mol MgCl₂, 5 μ mol DTT, 10 μ g 小牛胸腺 DNA 和一定量的 DNase-I), 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟,立刻放入冰浴停止反应,测其吸收光谱,并记录 O. D₂₆₀ 的数值,结果见表 2。DNase-I 量少于 50ng, O. D 值不增加, 100 ng 时其增色效应只有 7.4%; 而用荧光法测定,用 50 pgDNase-I 即可使 EB-DNA 复合物的荧光强度降低 5%,说明灵敏度很高,因此紫外吸收法不适于测定微量 DNase。

表 2 DNase-I 量与增色效应的关系

组 别	DNA	DNase-I (ng)	O.D ₂₆₀	增色(%)
1	10 μ g		0.107	
2	10 μ g	10 ng	0.106	
3	10 μ g	30 ng	0.107	
4	10 μ g	50 ng	0.108	0.01%
5	10 μ g	100 ng	0.116	7.4%

(2) 同位素法 实验按 Greth 方法^[3]进行。反应混合物总体积 200 μ l,其他同方法(1),用 10 μ l³ H-DNA 代替 10 μ g 小牛胸腺 DNA, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟后,加入 1ml 10% TCA (含 0.1% 焦磷酸)和 10 μ g 非标记 DNA, 停止反应。将酸不溶物收集在 49* 玻璃纤维滤纸上,依次用 10% TCA、5% TCA 和 95% 乙醇各洗二次。干燥后液闪测量计数,结果如表 3。20 pg DNase-I 可使酸不溶物的计数减少 10%,可见此方法较荧光法更灵敏,但实验要求条件较高,设备和操作都很复杂,在应用上有很大局限性。综上所述,三种方法中,以荧光法最为简单易行,又相对灵敏。(下转第 35 页)

90° 脉冲结束时的 FID 信号幅度。

根据式(9)和 At 作对数图,可得一条直线,该直线的斜率就是自然横向弛豫时间 T_2' 。用这种方法求 T_2' ,可把非均匀磁场引起的 T_2'' 用 180° 脉冲平均掉,因此避免了非均匀磁场的影响。

用上述方法求 T_2' 有测量时间长和测量结果受样品中分子扩散运动的影响的缺点。因而发展了其他方法,即方法②,③,④。由于篇幅有限在本文中不再详述。

(3) $T_{1\rho}$ 的测量

目前对 $T_{1\rho}$ 的研究还很少,但对慢运动来讲,它是非常重要的。

$T_{1\rho}$ 是旋转坐标 (x' , y' , z') 的纵向弛豫时间。沿 x' 轴的 90° 脉冲使 M 翻转到 y' 轴上,若将射频场 H_1 的相位改变 90°, 使其沿 y' 轴的方向,这时 M 平行于 H_1 ,也就是无力矩作用。这意味着 M 被 H_1 锁在 y' 轴的方向上,故称自旋锁定 (Spinlock), 此时 H_1 的作用和 H_0 相同。 M 沿 H_1 方向上的弛豫和 T_1 类似, 所以叫 $T_{1\rho}$ 。 $T_{1\rho}$ 反应了分子重新取向的信息,因而有助于了解分子运动情况。

$T_{1\rho}$ 测量的脉冲序列为:

$[90^\circ\tau(\text{加 } \Delta\phi = 90^\circ \text{ 的 } H_1), \text{ 取样}]_n$

由图可见,自旋绕 H_1 进动,而 rH_1 非常小,所以它

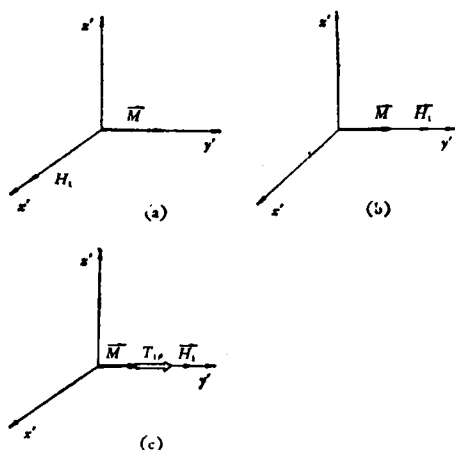


图 5 $T_{1\rho}$ 测量中脉冲序列对 M 的作用

(上接第 80 页)

表 3 酸不溶物同位素计数降低与 DNase-I 量的关系

组别	$^3\text{H-DNA}$	DNase-I	DNase-I (相应酶单位)	酸不溶物计 数(%)
1	10 μl			100
2	10 μl	20 μg	0.02	95.4
3	10 μl	200 μg	0.2	86.6
4	10 μl	1 ng	1.0	80.1

对应于非常慢的运动。实验中 $T_{1\rho}$ 可根据

$$Mt = M_0 e^{-\frac{t}{T_{1\rho}}},$$

以及 FID 信号幅度与 H_1 的持续时间的关系曲线计算而得到。

有人曾测量了含蛋白质的双层脂的 $T_{1\rho}$, 在有蛋白质的双层脂中的 T_1 的变化并不大, 而 $T_{1\rho}$ 的变化却很大, 所以 $T_{1\rho}$ 反应的是低频运动的变化。

美国加州理工学院陈长谦教授通过测定弛豫时间取得了许多重要成果, 揭示了膜中分子运动的某些规律。如多层膜 T_1 和频率的关系的研究。对小分子来讲, T_1 与磁场无关, 而在膜中 T_1 和频率有关。十年前陈教授就提出了膜中有二种运动的独特见解: 一种是异构化, 这是一种快运动, 另一种是慢运动。对小分子来讲, T_1 与频率无关, 但高频时, 中等大小(分子量 = 1000)的分子, T_1 与频率有关, 这些分子的 τ_c 大约为 10^{-10} — 10^{-11} 秒。

陈教授曾作双层脂中 ^1H 的研究, 也作 ^2D 和 ^{13}C 的研究, 研究 T_1 和频率的关系, 发现双层脂中有快运动、慢运动, 甚至还有很慢的运动。

陈教授 15 年前从测量脂体小泡的波谱中得到各个基团的 T_1 值, T_1 约为 1 秒, T_2 约为 10 毫秒。这个结果表明运动是各向异性的。 T_1 和 T_2 的研究揭示了膜中有不止一种运动。

陈教授今后打算对光谱密度函数和频率的关系进行深入研究, 进一步揭示双层脂的动力学规律。

参 考 文 献

- [1] Chan, S. I.: Lecture on "NMR and ESR", in Institute of Biophysics, Academia Sinica, 1981.
- [2] Chan, S. I. et al.: Membrane Spectroscopy, 1981.
- [3] Kroon, P. A. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 433, 282—293, 1976.
- [4] Lee, A. G.: Methods Membr. Biol., 2, 1, 1974.
- [5] Carr, H. T.: Phys. Rev., 94, 630—638, 1954.
- [6] Martin, M. L. et al.: Practical NMR Spectroscopy, 1980.

[丰玉璧编写]

参 考 文 献

- [1] Kurnick, N. B.: Methods in Biochem. Anal., 9, 1962.
- [2] Zimmerman, S. B. et al.: J. Biochem. Biophys., 246, 309, 1971.
- [3] Greth, M. L. et al.: Biochem. Biophys. Acta, 390, 168, 1975.

[本文于 1983 年 5 月 20 日收到]