

图2 不同密度粒子等速梯度的沉降行为
 $\rho_p = 1.2$ 时

此条件为 $\rho_p = 1.2$ 粒子在日立 RPS 40T 转头的等速梯度。结果画成 $S_{20,w} \sim r$ 曲线如图 2。若给定 $S_{20,w}$ 值, 也可画出 $t \sim r$ 曲线。

TI-59 可编程序计算器程序及用法, 本文从略。需用者可与作者联系索取。

参 考 文 献

- [1] Martin, R. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1372, 1961.
- [2] McEwen, C. R.: *Anal. Biochem.*, **20**(1), 114, 1967.
- [3] Barber, E. L.: *Natn. Cancer Inst. Monogr.*, No 21, 219, 1966.

[本文于 1984 年 6 月 14 日收到]

DNA 的荧光染料 DAPI 的特性及其应用

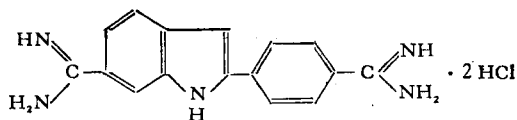
殷蔚蕙 邵莉楣 赵 军 白克智

(中国科学院植物研究所, 北京)

在检测 DNA 的各种染料中, DAPI 具有专一性强、灵敏度高、使用简便等特点。本文简要地就有关 DAPI 的文献作一综述, 并介绍我们在使用 DAPI 时的一些经验。

一、DAPI 的物理化学性质

DAPI 是一种二价阳离子的荧光染料, 由 Dann 等于 1971 年合成^[1]。化学名为 4'6-二脒基-2-苯基吲哚 (4'6-Diamidino-2-phenylindole · 2HCl)。结构式为



分子量 350.3。黄色晶体, 易溶于水, 最大溶解度为 2.5%。可被高浓度的两价或高价阴离子 (硫酸盐离子和磷酸盐离子) 所沉淀。

DAPI 具有与各种来源的、富含 A-T 碱基对的 DNA 专一结合的特点。DAPI 与 DNA 形成的复合物发出高强度的浅蓝色荧光。其最

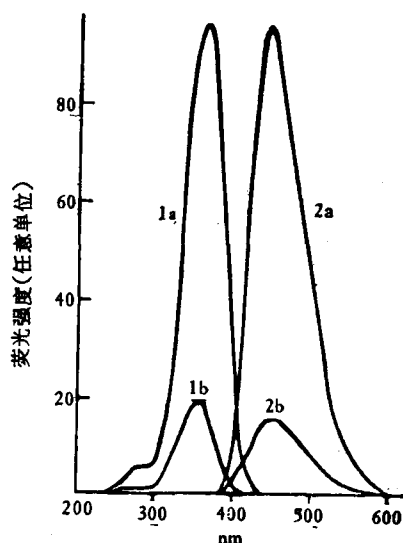


图1 DNA-DAPI 复合物及 DAPI 溶液的激发光谱 (1a, 1b) 和荧光光谱 (2a, 2b)

(摘自 *Anal. Biochem.*, **83**(1), 252, 1977.)

大的激发波长为 372nm, 最大的发射波长为 454nm (图 1)。其荧光可被适当浓度的 SO_4^{2-} 加强。

Brunk 等^[2]首先探讨了细胞匀浆中 DAPI-DNA 复合物的荧光与 DNA 含量之间的定量关系。他们在 DAPI 溶液中加入不同量的细胞匀浆,通过对 DAPI 与细胞匀浆中的 DNA 形成的复合物荧光强度的测量,证明了 DNA 含量与 DAPI-DNA 复合物的荧光之间有定量关系。Coleman 等^[3]采用显微荧光分光光度测量法,对完整细胞内的 DNA 含量进行了测量,证明了荧光强度与细胞内的 DNA 含量间的正比关系,并且指出,在 pH4—8 的范围内,复合物的荧光强度不受 pH 变化的影响。用 DAPI 染色方法可以检出 2×10^{-16} g DNA。

采用这种染料时,不需要对样品进行特殊制备,只要把 DAPI 溶液直接加在样品上即可。一般一小时以后,即可在激发荧光的光源下观察。

文献曾报道 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DAPI 所发出的荧光已达到饱和。一般是用蒸馏水把 DAPI 配成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的母液,使用时再稀释^[3]。这种水溶液在 4°C 下,避光可长时间保存。

DAPI 最初是作为一种杀锥虫剂合成的,以后才用于 DNA 的检测上。迄今尚未见到 DAPI 致癌、致畸等毒性作用的报告。

二、细胞生物学中的应用

Williamson 和 Fennell^[4]对于 DAPI 在细胞化学研究中的可能用途作了较为全面的阐述。Coleman 等^[3]用 DAPI 检测细胞内 DNA 含量作了大量的工作。随着应用范围的扩大,已有不少报道。综合起来,有以下几方面的应用。

1. Poter 等^[3]利用 DAPI 检查浮游物中的微生物(如细菌、蓝绿藻),并进行了计数。他们证明,用 DAPI 染色时,无需象标准的吖啶橙法那样,必须采用两周内采集的新鲜标本。也无需在计数期间一直保持湿润等。用 DAPI 染色后,可以观察到 $<1 \mu\text{m}$ 的细胞。染有 DAPI 的细菌,在 4°C 下,24 周后计数时,细胞数目不变。它的另一优点是即便样品放干之后,荧光强度也不受影响^[3]。

白克智等^[5]应用 DAPI 标记分化的满江红

鱼腥藻细胞(营养胞、孢子、原异形胞、异形胞),在显微荧光分光光度计下比较了上述各类细胞中 DNA 相对含量。结果显示出在专行固氮功能的异形胞中未见 DNA 的存在。

小鸡红(血)细胞、小鸡成肌细胞、小鼠肝脏细胞、大鼠细胞系 E-63,酵母细胞、噬菌体 T₄ 等动物细胞及微生物细胞内的 DNA 测定也有报道^[3]。

我们在大蒜、小麦等植物中,观察到 DAPI 染色的核物质正在穿越细胞壁的景象,充实了我们用 Feulgen 等染料观察的结果(未发表)。

2. 在组织培养中,DAPI 也曾被用来检查原核生物支原体及病毒对培养物的污染。加入的 DAPI 很快地被结合到细胞核上,发出强荧光。细胞质是不被 DAPI 染色的,因此没有荧光。这样就很容易地检测出附在培养物细胞壁上的微生物以及侵入细胞质中的支原体或病毒的“工厂”^[6]。

3. 在细胞器 DNA 检测中,James 等^[3]对高等植物(烟草、菠菜、甜菜)离体叶绿体中 DNA 进行了检测。经过比较,DAPI 染色较吖啶橙染色更深、更为专一。DAPI 染色的叶绿体在低温下放置许多天,仍可保持结构完整。检测藻类细胞的叶绿体,也得到了同样的效果。DAPI 还被用来检查酵母中低浓度的线粒体 DNA,并用来区分小菌落突变体^[4]。

4. 在染色体分带的研究中,DAPI,使植物(蚕豆,虎眼万年青、锦枣儿)根尖细胞及人体细胞中,分裂中期的染色体着色,显示出明亮的荧光带。结合抗生素的应用,可使人体染色体分带更为清晰^[7]。

我们也曾用 DAPI 对马铃薯根尖细胞的染色体进行了观察(未发表)。

5. Yezierski 等^[8]用辣根过氧化物酶(HRP)及 DAPI 对大鼠神经元进行双标记定位。由于颗粒状的 HRP 反应产物的存在及 DAPI 的蓝色荧光,使神经元很容易被辨认出来。

三、DAPI 在生物化学中的应用

Williamson 和 Fennell^[4]曾将 DAPI 试用于

生化研究中。DAPI-DNA 在氯化铯梯度离心中显色效果良好,但分离手续则较溴化乙锭-DNA 繁复。

其后 Matsumoto 等^[9]发展了在光学显微镜下用 DAPI 示踪显示 DNA 分子结构形态的技术,用此法所得的 DNA 分子的图象依其来源不同而各异。

Nairn 等^[10]倡导 DAPI 用于 DNA 的琼脂糖凝胶电泳。DNA 含量在 0.1—0.6 μg 范围内, DAPI 染色的灵敏度比溴化乙锭染色高一倍。但用扫描方法进行检测,因此手续较繁,而且电泳后的凝胶染色,又需 12—40 小时。因此,我们对 Nairn 等人的方法加以改进,以 0.5ppm DAPI 溶液制备琼脂糖凝胶柱,可快速、准确、灵敏地检测出 DNA。电泳后,也不需作任何处理,即可用紫外检测仪(254nm)检测,实验结果表明,sppl DNA 含量低至 40ng(10^{-9}g)/管时,用 DAPI 染色尚可见清晰的条带(待发表)。

四、DAPI 在活体染色中的应用

现在的活体染料不多,对 DNA 专一的就更少。Williamson 和 Fennell^[4]首先注意到 DAPI 在低浓度下可能成为活体染料,并指出在酵母培养中没有引起突变体的产生。

我们用 DAPI 进行了高等植物的活体染色的试验:

1. 用 0.5mg/l 溶液培养小麦种子及大蒜蒜

瓣,二者均能在 DAPI 中正常生根发芽。或将发芽的小麦的根及胚乳剪去,在加有 DAPI 的培养液中培养,麦苗生长未见异常。四天后的培养液高度约为处理前的三倍,并长出新的根系。取根尖作显微观察,根中细胞核已着色,在紫外光激发下发出浅蓝色的荧光。这一结果表明,细胞核经 DAPI 染色后,仍能正常生长(待发表)。

2. 大蒜表皮细胞及水生植物水王孙的叶片中,细胞核染上 DAPI 后,仍能观察到活跃地原生质流动的现象(待发表)。

这些试验结果说明 DAPI 作为活性染料的用途大有扩展的余地。

参 考 文 献

- [1] Dann, O et al.: *Justus. Liebigs. Ann. Chem.*, **749**, 68, 1971.
- [2] Brunk, C. F. et al.: *Anal. Biochem.*, **92**, 497, 1979.
- [3] Coleman, A. M.: *J. Histochem. and Cytochem.*, **29** (8), 959, 1981.
- [4] Williamson, D. H. et al.: in "*Methods in Cell Biology*", **12**, 335, 1975.
- [5] 白克智等:《科学通报》, **13**, 821, 1983.
- [6] Russell, W. C. et al.: *Nature*, **253** (5491), 461, 1975.
- [7] 董兆文等:《科学通报》, **12**, 750, 1983.
- [8] Yezierski, R. P. et al.: *J. Neurosci. Methods*, **4**, 53, 1981.
- [9] Matsumoto, S. et al.: *J. Mol. Biol.*, **152**, 501, 1981.
- [10] Nairn, R. S. et al.: *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **6**, 95, 1982.

[本文于 1984 年 5 月 29 日收到]

显微分光光度计测量细胞内物质含量的两种方法——双区法和双波法的比较

池旭生 庞大本

(中医研究院中心实验室,北京)

一、前 言

根据显微分光光度计测得被测物质的透射

光、反射光、荧光等的光强可确定物质的含量。其中透射法的原理是基于朗伯—比尔定律。此定律在被测物质均匀分布的情况下才能成立。