

一种灵敏实用的 DNase I 定量测活方法

邹国林 曹新文 史平* 朱汝璠

(武汉大学生物系)

DNase I 的测活方法有紫外吸收法^[1]、同位素法^[2]和荧光法^[3,4]等。紫外吸收法简便,但灵敏度较低。同位素法灵敏度高,但实验条件要求高,且操作复杂。荧光法灵敏度较高,也简便,但影响因素较多。我们建立了一种以固定化 DNA 为底物的微量紫外吸收法,它较简便,灵敏度也较高。

材料与 方法

材料: DNase I (Seravac Laboratories 出品),小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司出品),微晶纤维素(上海试剂四厂出品),TMD 缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM MgCl₂, 1mM DTT),其它试剂均为分析纯。

仪器: M750UVIS-A 型微量紫外可见分光光度计。

方法:

1. 小牛胸腺 DNA-纤维素的制备 参照文献^[5]。

2. DNA 结合量的测定 用紫外吸收法^[6]和二苯胺法^[7]分别测得每克纤维素上 DNA 的结合量为 13.12 毫克和 13.39 毫克,结果一致;

确定一相对较短的加热灭活时间,使空白值较低而稳定。此外,当 ³H-cAMP 放化纯度降低时易使空白增高,此时可用纸层析等方法纯化后使用。若用缓冲液(匀浆介质)代替加热灭活后的粗酶提取液作空白对照,二者无差别。

参 考 文 献

[1] Thompson, W. J. and Appleman, M. M.: *Bioche-*

结合率在 93% 左右。

3. 酶单位数的测定 将 DNase I 配制成一定浓度的酶溶液,按文献^[8]测定每毫升酶溶液所含的酶单位数。

4. 固定化底物的微量紫外吸收法 称取一定量的 DNA-纤维素,用 TMD 缓冲液配成 DNA 浓度为 115 微克/毫升的 DNA-纤维素悬浮液。每管取 0.5 毫升上述底物,加 0.5 毫升含 0.08% Triton X-100 的 TMD 缓冲液,振荡混匀后,4000rpm 离心 5 分钟。将上清液倾出,用滤纸条吸净残留液,加 50 微升含 0.04% Triton X-100 的 TMD 缓冲液,置于 37℃ 水浴预保温,再加一定量的 DNase I,连续振荡进行酶反应。反应完毕,加 50 微升 40mM EDTA 液终止反应,4500 rpm 离心 3 分钟,取 20 微升上清液测 A₂₆₀ 值。

(a) 酶反应进程曲线绘制 除空白对照管外,每管加酶液 1.6 个酶单位(按文献^[8]测定),按不同的时间间隔终止反应。

(b) 反应速度与酶量关系由线绘制 根据

* 本校生化专业 81 级学生。

mistry, 10, 311, 1971.

[2] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976.

[3] Londesborough, J.: *ibid.*, 71, 623, 1976.

[4] Boudreau, R. J. and Drummon, G. I.: *ibid.*, 63, 388, 1975.

[5] Rutten, W. J. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 315, 378, 1973.

[6] Greengard, P. and Robison, G. A. (ed): *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, Vol. 8, 119, Raven Press, New York, 1977.

[本文于 1985 年 5 月 13 日收到]

酶反应进程曲线,选定保温时间为 20 分钟。除对照管外,每管加不同的酶量进行反应。

5. 溶液态底物的紫外吸收法 仿照 Zimmerman 法^[1]。为了便于对比,将 Zimmerman 法改为微量法,并且使每管的反应总体积、缓冲液、DNA 的浓度,保温温度与时间以及各管的酶量均与方法 4(b) 相同。

6. Triton X-100 对酶反应的影响 方法与方法 4 相似。只是各管分别加入含不同浓度的 Triton X-100 的 TMD 缓冲液,加 0.8 个酶单位,37℃ 下保温 10 分钟。另取一组不加酶液的对照管。测定两组对应管的 A_{260} 差值。

结果与讨论

酶反应进程曲线见图 1。从图 1 可知反应时间 20 分钟处于直线范围内,故此曲线的绘制时,保温时间定为 20 分钟。

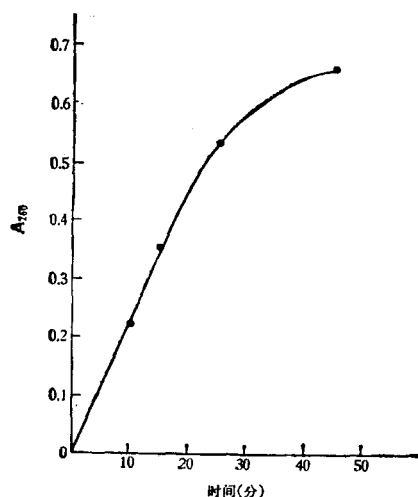


图 1 酶反应进程曲线

反应速度与酶量关系曲线见图 2。从图 2 可知,采用固定化底物的紫外吸收法,在 1.6 个酶单位(按文献[8]测定)酶量范围内, A_{260} 值与酶量成很好的线性关系。A 直线的斜率远大于 B 直线斜率,说明固定化底物的紫外吸收法的灵敏度远高于溶液态底物的紫外吸收法。采用溶液态底物,在 1.6 个酶单位酶量范围内, A_{260} 增值很低,难于测准。

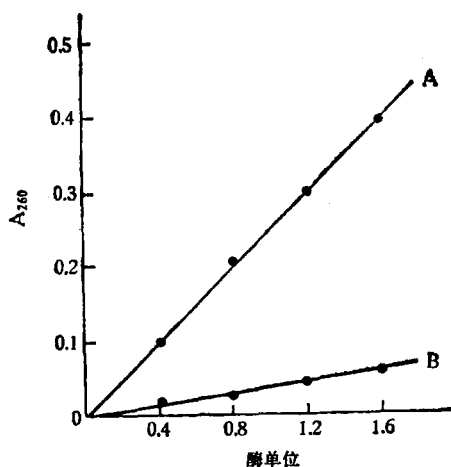


图 2 反应速度与酶量关系曲线

A. 固定化底物的紫外吸收法
B. 溶液态底物的紫外吸收法

Triton X-100 对酶反应影响的结果见表 1。Triton X-100 是一种非离子型去垢剂,反应体系中含一定量的 Triton X-100,可减小纤维素对酶的吸附,保证酶可充分自由地发挥催化作用。从表 1 可知最适 Triton X-100 的浓度范围在 0.08% 左右。

表 1 Triton X-100 对酶反应的影响

Triton X-100 浓度(%)	0.02	0.05	0.08	0.15	0.50
A_{260} 差值	0.128	0.133	0.159	0.093	0.030

直到目前为止,在 DNase I 的测活工作中,紫外吸收法的使用远比荧光法、同位素法普遍。溶液态底物紫外吸收法是建立在增色效应基础上,而 A_{260} 增值一般只能达到底物 DNA 本身 A_{260} 值的 30~40%,所以此类方法的灵敏度受到极大限制。而我们建立的方法是直接测定从固相载体上被酶切下来的产物的 A_{260} 值,灵敏度要高得多。制备 DNA-纤维素采用紫外光照射可大大提高 DNA 结合率(90%左右)^[5],而不用紫外光照射 DNA 结合率一般在 10% 左右。DNA-纤维素制备手续简便,可一次大量制备,同时它的性能稳定,存放数年,仍可使用^[5]。固定化底物的紫外吸收法与同位素法相比,不需要严格的底物和比较高级的仪器;

苯乙烯树脂割断法在生物样品制备中的应用

蔡 继 炯

(浙江省测试技术研究所, 杭州)

近年来样品割断法已成为扫描电镜样品制备的新技术之一。早在 1968 年 Kachler 已利用冰冻蚀刻复型技术, 在透射电镜下观察了细胞内部结构。1970 年 Arenberg 等对样品制备方法作了进一步改良, 使扫描电镜也能观察细胞内部结构。1972 年日本田中敬一设计了一种冷冻割断装置, 观察组织块割断面上暴露出的各种管腔内面, 以及割断面上细胞内的微细结构^[1,2]。目前冷冻割断技术已发展成树脂割断法、有机溶剂割断法、水溶性包埋剂割断法等多

种, 各有特点的方法。

本文介绍应用苯乙烯树脂作为包埋剂, 进行生物样品包埋割断试验。该方法具有操作简便, 成功率高, 割断容易, 样品并能长期保存等特点, 是一种较理想的割断方法。现将实验方法和结果报道如下。

一、材料和方法

取人体大肠癌组织块、大白鼠肾上腺、月季花叶柄、水稻种子为试验材料。按图 1 所示顺

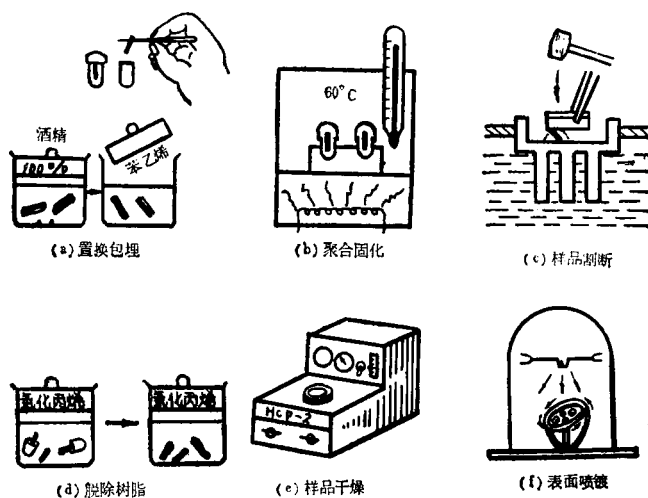


图 1 苯乙烯树脂割断法示意图

与荧光法相比, 测定所受的干扰因素较少。此法一般实验室均可使用, 所以有一定的实用价值。同时, 我们认为此法对其它一些 DNA 水解酶的定量测活也会是适用的。

参 考 文 献

- [1] Zimmerman, S. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 309, 1971.
- [2] Greth, M. L. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **390**, 168, 1975.
- [3] 邱长春等: 《生物化学与生物物理进展》, (3), 79, 1984.
- [4] Rule, G. S.: *Anal. Biochem.*, **138**, 99, 1984.
- [5] Litman, R. M.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222, 1968.
- [6] 张龙翔等: 《生化实验方法和技术》, 人民教育出版社, p. 218, 1981.
- [7] Ashwell, G.: *Methods in Enzymol.*, **3**, 99, 1957.
- [8] Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **33**, 349, 1950.

[本文于 1985 年 7 月 15 日收到]