

消耗有机溶剂 20~ 30 L^[2]. 本法分离速度快、消耗少、回收率高是它的明显优点, 以标准 Gls 15 μg 在同样条件下分离纯化最后得到 (14.46 \pm 0.39) μg , $n = 7$, 结果显示 $CV < 3\%$. 表明本方法有良好的重复性. 采用本法分离纯化的大鼠脑组织中 Gls 主要组分含量 (如表 1 所示) 结果与文献报道^[8]的结果基本一致, 与以前的方法相比, 操作简单, 回收率好, 省去了过柱后所需的紫外检测及洗脱液的冷冻干燥等繁琐步骤, 使整个过程简便快速.

本方法较适用于微量组织细胞的 Gls 纯化, 为微量样品 Gls 组分的比较学研究及 Gls 的代谢研究提供了一个有效的手段.

参 考 文 献

- 1 Cham B E, Knowles B R. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J Lipid Res*, 1976, **17** (2): 176~ 181
- 2 Ladisch S, Gillard B. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Anal Biochem*, 1985, **146**: 220~ 231
- 3 张新波. 一种微量神经节苷脂纯化法. *生物化学与生物物理学报*, 1993, **25** (2): 189~ 190
- 4 潘 颖. 离心液相色谱法快速分离纯化神经节苷脂. *生物化学杂志*, 1994, **10** (4): 387~ 391
- 5 Penesky H S. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 1977, **252**: 2891~ 2899
- 6 Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta*, 1957, **24**: 604~ 611
- 7 蒋谷人. 血清脂质结合唾液酸改良间苯二酚测定法用于恶性肿瘤临床诊断初探. *中华医学检验杂志*, 1987, **10** (5): 257~ 261
- 8 Irwin L N, Michael D B, Irwin C C. Ganglioside patterns of fetal rat and mouse brain. *J Neurochem*, 1980, **34**: 1527~ 1530
- 9 范广胜. 成人正常大肠神经节苷脂. *生物化学与生物物理学报*, 1991, **23** (5): 443~ 447
- 10 崔肇春, 顾天爵. 水牛脑神经节苷脂的分离纯化. *生物化学与生物物理进展*, 1985, (5): 27~ 31

Isolation and Purification of Gangliosides by Rapid Centrifugal Mini-column Chromatography. WANG Jiangyan, ZHANG Weining, WANG Renjie, XU Yuru, WANG Mengyin (Department of Biochemistry, Shijiazhuang Medical Higher Training School, Shijiazhuang 050081, China).

Abstract A simple and rapid method for isolation and purification of gangliosides (Gls) from the rat brain is described. The gangliosides were isolated and purified by centrifugal mini-column chromatography. The rate of recovery of standard Gls was up to 97.64%, $n = 7$, $CV < 3\%$. No detective loss of Gls was demonstrated. The novel method offers a few advantages: 1. It is simple, rapid and efficient. 2. The thin layer chromatographic patterns of total Gls of samples obtained are clear and distinct. 3. Less solvent was consumed. Thus, the method is especially applicable to comparative and qualitative studies of gangliosides of micro samples, and to ganglioside metabolism research of tissues and cells *in vitro*.

Key words centrifugal mini-column chromatography, isolation, purification, gangliosides

用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成大鼠肝 tRNA^{Ile}

张 璐 钟雄霖 彭朝晖 徐 铃

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

摘要 采用 PCR 技术从 rec-M13mp18 中扩增出 120 bp 的大鼠肝 tRNA^{Ile} 合成基因片段, 经限制性内切

酶 BstN I 酶切后作为模板, 利用 T7 RNA 聚合酶在体外无细胞体系转录由 T7 启动子带动的大鼠肝 tRNA^{Ile}基因, 生成不含修饰碱基的 tRNA^{Ile}, 并对体外转录反应条件进行了优化, 回收的 tRNA 产量可达 DNA 模板量的 40 倍.

关键词 T7 RNA 聚合酶, 体外转录, 大鼠肝 tRNA^{Ile}

tRNA 是蛋白质生物合成的关键元件之一. 研究 tRNA 的结构与功能需要足量的 tRNA 分子作为研究材料. 传统的 tRNA 提取方法繁琐而且产量甚微, 如从 8 kg 牛肝中仅获得 6.5 mg 的 tRNA^{Ile}[1]. Ogilvie 等[2]用固相亚磷酸三酯法合成了酵母 tRNA^{Phe}, 但该方法未引起人们重视, 原因是有机合成要求的反应条件苛刻, 而且合成片段不能太长. 应用体外转录的方法合成 RNA, 不仅简便、快捷而且对 RNA 的长度没有限制[3,4], 因而在 RNA 结构与功能等研究领域受到越来越广泛的重视.

本文报道用 T7 RNA 聚合酶在体外无细胞体系转录大鼠肝 tRNA^{Ile}基因, 制备不含修饰碱基的 tRNA^{Ile}, 以满足下一步对其结构与功能研究的需要.

1 材料与方法

1.1 大鼠肝 tRNA^{Ile}基因的化学合成

设计合成的基因全长 120 bp, 整个基因分成 6 个寡核苷酸片段 (34~46 bp), 采用固相磷酸酰胺法在 ABI 381 A 型 DNA 合成仪 (美国 Applied Biosystem 公司) 上合成. 合成基因被克隆到 M13mp18 的 BamH I 与 Hind III 位点之间, 构建为重组子 rec-M13mp18, 采用 Sangers 末端终止法对其进行序列测定, 结果证明与设计合成的基因完全一致.

1.2 体外转录模板的制备

1.2.1 PCR 扩增 tRNA^{Ile}基因: PCR 5' 端引物为基因合成所用的 P1 片段 44 bp: GATC-CGGCCAAGTCGGCCTCTAATACGACTCAG-TATAGGCCGGT; 3' 端为基因合成所用的 P6 片段 46 bp: AGCTTCCTGGTGGCCCGTACG-GGGATCGAACCCGCGACCTTGGCGT, 该引物对可特异性地扩增出 120 bp 的合成基因

片段.

1.2.2 BstN I 酶切 PCR 扩增产物: 以限制性内切酶 BstN I 酶切上述 PCR 扩增产物, 60 °C, 1 h. 分别以酚: 氯仿, 氯仿: 异戊醇各抽提一次, 乙醇沉淀.

1.3 体外转录反应

转录反应体积为 20 μ l, 其中含有 40 nmol/L Tris · HCl, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L 精胺, 5 mmol/L NaCl, 1 U/ μ l RNasin, 5 mmol/L DTT, 100 mg/L BSA, 80 g/L PEG 8000. 为建立最佳反应条件, 分别加入不同浓度的 T7 RNA 聚合酶、核糖核苷三磷酸 (NTP), DNA 模板, 于 37 °C 保温 4 h. 反应结束后, 加入 3 μ l 无 RNase 污染的胰 DNase I (1 U/ μ l), 37 °C 20 min. 分别以酚: 氯仿, 氯仿: 异戊醇各抽提一次, 加入乙酸铵至终浓度 1 mol/L 及 3 倍的无水乙醇, -20 °C 沉淀过夜, 12 000 r/min, 30 min, 离心收集沉淀. 转录产物进行 7 mol/L 尿素-12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳.

1.4 转录产物的定量测定

按文献 [5] 方法进行.

2 结果与讨论

2.1 体外转录模板的制备

本研究采用 PCR 技术从 rec-M13mp18 中扩增出 120 bp 的合成基因片段, 其中 tRNA^{Ile} 基因上游紧邻着一个 T7 启动子, 3' 末端为一个 BstN I 酶切位点. PCR 产物经 BstN I 酶切后, 产生末端为 3' GGT 5', 长度为 114 bp 的片段, 将此片段作为体外转录的模板, 在 T7 启动子及 T7 RNA 聚合酶的作用下可生成 3' 末端为 CCA 的 tRNA. 图 1 为合成基因的体外转录示意图.

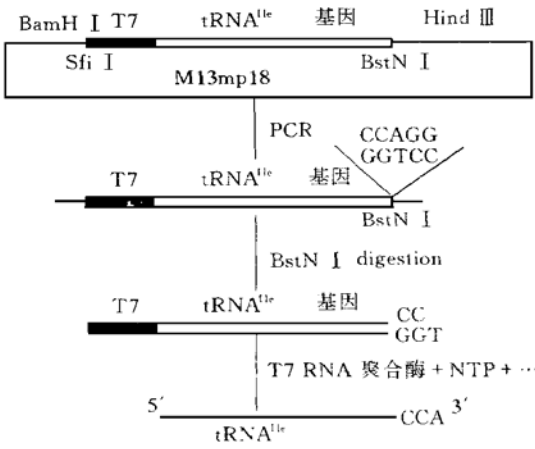


图1 tRNA^{Ile}合成基因体外转录示意图

2.2 体外转录最佳反应条件的建立

体外转录体系中的DNA模板浓度、T7

RNA聚合酶浓度、核糖核苷三磷酸浓度对转录反应的效率有明显影响。因此，为了获取较高产量的转录产物，首先应摸索出最佳反应条件，再扩大反应体积。

2.2.1 DNA模板浓度对转录反应的影响: 20 μl反应体积中含有40 nmol/L Tris·HCl, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L精胺, 5 mmol/L NaCl, 1 U/μl RNasin, 5 mmol/L DTT, 100 mg/L BSA, 80 g/L PEG 8000, NTP浓度为4 mmol/L, T7 RNA聚合酶3 U/μl, 加入不同浓度的DNA模板, 37℃保温4 h, 测定转录生成的tRNA量。结果如图2所示, 当DNA模板浓度为50 nmol/L时, RNA产量最高, 可生成40 pmol的RNA, 因此转录反应的模板浓度以50 nmol/L为宜。

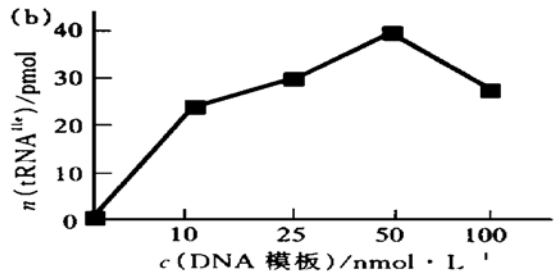
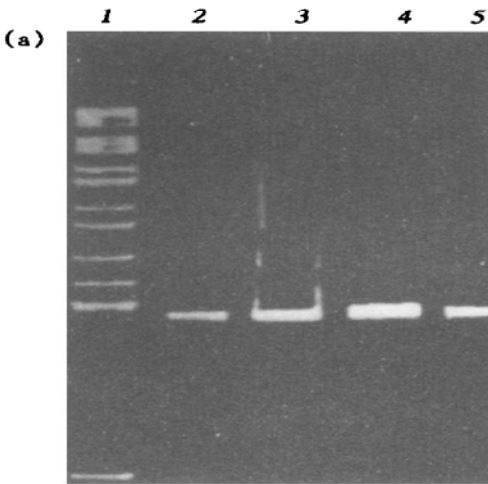


图2 DNA模板浓度对体外转录反应的影响

(a) 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳。1: 分子量标准PBR 322/Msp I; 2: 10 nmol/L DNA模板; 3: 25 nmol/L DNA模板; 4: 50 nmol/L DNA模板; 5: 100 nmol/L

DNA模板。(b) DNA模板浓度与tRNA^{Ile}产量关系示意图。

2.2.2 T7 RNA聚合酶对转录反应的影响:

20 μl反应体积中含有40 nmol/L Tris·HCl, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L精胺, 5 mmol/L NaCl, 1 U/μl RNasin, 5 mmol/L DTT, 100 mg/L BSA, 80 g/L PEG 8000, 50 nmol/L的DNA模板, NTP浓度为

4 mmol/L, 并加入不同浓度的T7 RNA聚合酶。37℃保温4 h。测定转录生成的tRNA量。结果如图3所示, 随着T7 RNA聚合酶浓度的增高, RNA产量增加。考虑到T7 RNA聚合酶的价格与来源, 我们取其浓度为3 U/μl。

2.2.3 核糖核苷三磷酸浓度对转录反应的影响

响: 20 μ l 反应体积中含有 40 nmol/L Tris·HCl, 6 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L 精胺, 5 mmol/L NaCl, 1 U/ μ l RNasin, 5 mmol/L DTT, 100 mg/L BSA, 80 g/L PEG 8000, 50 nmol/L 的 DNA 模板, 3 U/ μ l T7 RNA 聚合酶, 并加入不同浓度的 NTP, 37 °C 保温

4 h. 测定转录生成的 tRNA 量. 结果如图 4 所示, 当 NTP 浓度为 4 mmol/L 时, tRNA 可达 40 pmol, 当 NTP 浓度达 5 mmol/L 时, 出现明显的非特异性转录产物, 因此, NTP 的最佳浓度为 4 mmol/L.

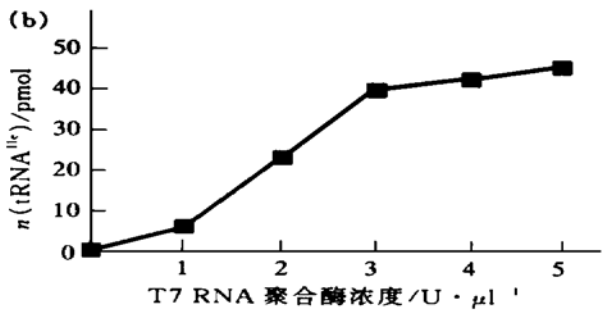
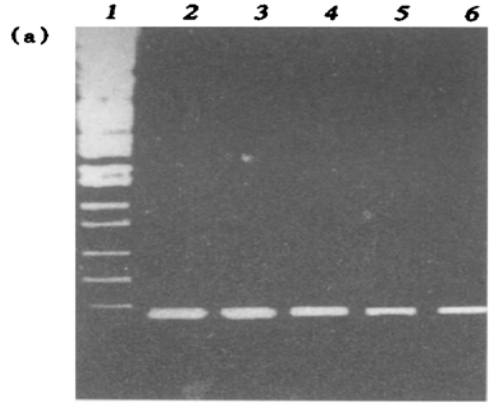


图 3 T7 RNA 聚合酶浓度对体外转录反应的影响

(a) 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 1: 分子质量标准 PBR 322/Msp I; 2: 5 U/ μ l T7 RNA 聚合酶; 3: 4 U/ μ l T7 RNA 聚合酶; 4: 3 U/ μ l T7 RNA 聚合酶; 5: 2 U/ μ l T7 RNA 聚合酶; 6: 1 U/ μ l T7 RNA 聚合酶. (b) T7 RNA 聚合酶浓度与 tRNA^{Ile} 产量关系示意图.

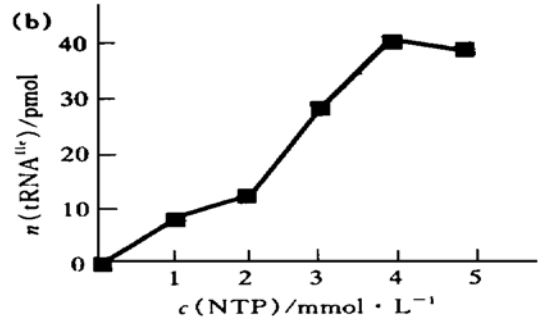
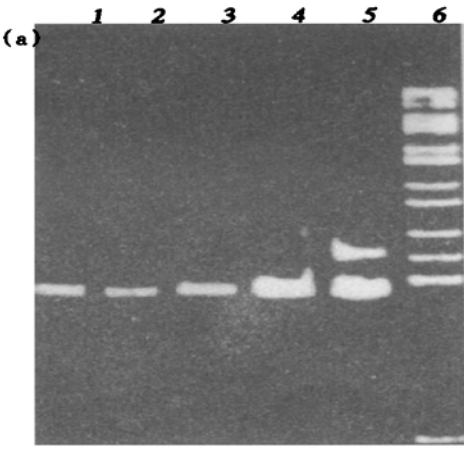


图 4 核糖核苷三磷酸浓度对体外转录反应的影响

(a) 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 1: 1 mmol/L NTP; 2: 2 mmol/L NTP; 3: 3 mmol/L NTP; 4: 4 mmol/L NTP; 5: 5 mmol/L NTP; 6: 分子质量标准 PBR 322/Msp I; (b) 核糖核苷三磷酸浓度与 tRNA^{Ile} 产量关系示意图.

由以上结果我们得出转录反应的最适条件为: 模板 DNA 浓度为 50 nmol/L, 核糖核苷

三磷酸 (NTP) 浓度为 4 mmol/L, T7 RNA 聚合酶浓度为 3 U/ μ l.

2.3 转录效率

按最佳反应条件进行转录反应, 每 1 pmol DNA 模板可生成 40 pmol 的 tRNA^{Ile}, 回收到的 tRNA 是 DNA 模板量的 40 倍. 以上结果说明我们建立了较为理想的体外转录反应条件, 从而可以进一步扩大反应体积, 制备出足量的不含修饰碱基的 tRNA^{Ile} 制品, 应用于结构与功能的研究.

参 考 文 献

- 1 Peng ZH, Kusama Eguchi K, Watanabe S *et al.* Responsibility of tRNA^{Ile} for spermine stimulation of rat liver Ile tRNA formation. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **279**: 138~ 145
- 2 Ogilvie K K *et al.* Total chemical synthesis of a 77-nucleotide-long RNA sequence having methionine-acceptance activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5764~ 5768
- 3 Sampon JR, Uhlenbeck O C. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 1033~ 1037
- 4 Milligan J F, Grobe D R, Witherell G W *et al.* Oligonucleotide synthesis using T7-RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl Ac Res*, 1987, **15**: 8783~ 8798
- 5 刘建华, 王德宝. 用 T7-RNA 聚合酶体外转录合成 RNA 片段. *生物化学与生物物理学报*, 1991, **23** (6): 500 ~ 505

Transcription of Rat Liver tRNA^{Ile} Gene with T7 RNA Polymerase. ZHANG Lu, ZHONG Xionglin, PENG Zhaohui, XU Qian (*The Molecular Biology institute of the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The rat liver tRNA^{Ile} gene has been synthesized before. Now the synthetic tRNA^{Ile} gene was transcribed *in vitro* with T7 RNA polymerase and the optimum reaction condition was investigated.

Key words T7 RNA polymerase, rat liver tRNA^{Ile} gene, *in vitro* transcription

鸡蛋胚下表层卵黄 DNA 的提取方法

孙立军 许怀庆 陈楚楚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 利用 Ficoll-400 不连续密度梯度离心将受精和未受精鸡蛋的胚下表层卵黄进行纯化, 显微镜观察表明卵黄球形态良好, 没有胚细胞的存在. 然后利用较高浓度的蛋白酶 K 消化, 较长时间的酚抽提, 最后提取了 DNA. 电泳显示 DNA 条带清晰. 该方法简便快速, 从每个鸡蛋的胚下表层卵黄可回收 10 ng DNA.

关键词 DNA 提取, 卵黄球, 密度梯度离心

许多动物的卵母细胞和成熟卵中 DNA 含量大大超出体细胞 DNA 的含量^[1,2], 关于这些 DNA 的归属问题曾有人认为它们主要是线粒体 DNA^[3], 但随着研究的深入, 更多的学者认为这些 DNA 是卵黄内在的 DNA^[4~6]. 后来, Bruce 等^[7,8] 从早期鸡胚的细胞内卵黄颗粒中发现并提取了 DNA. 本研究室^[9,10] 发现

鸡蛋胚下表层卵黄中也存在 DNA, 并利用免疫组化和原位杂交技术进一步证实了这种 DNA 的存在. 为了进一步研究卵黄中 DNA 的性质和功能, 必须建立一种简便快速的提取方法. 以前的提取方法^[9,10] 操作复杂, 回收率

收稿日期: 1996-03-20, 修回日期: 1996-08-19