

核酸碱基薄层层析双波色谱扫描分析

贾成禹 窦永泽

(中国科学院成都生物研究所)

核酸组成成分及衍生物的分析除常用的电泳、纸层析和薄层层析洗脱比色法外,近年来又出现了双波长色谱扫描法和高压液相层析法^[2,3]。但已报道的双波长色谱扫描法测定的碱基种类不多,在测定 DNA (G + C) 克分子%方面,尚未见报道。我们在实验中摸索出分离核酸碱基效果好的硅胶薄层析,并考查了双波长色谱扫描分析法的准确度。

材料和方法

(一) 主要试剂及仪器

1. 试剂 碱基 A、G、C、T 和 U, 均为层析纯, 含量 >98%; A、U 德国产, C 为 BDH 产, G、T 分别为上海东海制药厂和恒信化工厂产。小牛胸腺 DNA 为上海牛奶公司产。薄层层析用硅胶 H, 为青岛海洋化工厂产。薄层层析用纤维素 (cellulosepulver MN300UV254), 德国产。羧甲基纤维素钠为上海化学试剂厂产。其他试剂为 AR, 水为重蒸水。

2. 仪器 日本岛津 CS-910 双波长色谱扫描仪。

(二) 分析方法

1. 薄层层析分离

(1) 制板: 取 16.2g 硅胶 H, 1.8g MN 300UV 254 纤维素, 0.5% 羧甲基纤维素钠 (离心去除悬浮物) 90ml, 于匀浆器中匀浆 5 分钟, 速度以浆液不溅出为度, 抽气, 均匀涂布在 6 块 20×10cm 或 4 块 20×15cm 的平整清洁的玻璃上。

(2) 薄层分离: 称取 $25 \times 10^3 \text{ nM}$ ($1 \text{ nM} =$

10^{-9} M) A、G、C、T、U, 盛于不同容器中, 再分别称取同样量的上述各碱基混合于一个容器, 各加 1ml 水, 1 滴 12N NaOH 液助溶, 后加 1 滴浓 HCl, 用 0.1N HCl 稀释到 5ml。将上述硅胶薄层板于 105°C 活化半小时, 按常法把单个及混合的碱基溶液分别点在不同的点上, 用饱和正丁醇上行展开至前沿 12cm 处取出, 时间 1.5 小时。层析后风干或吹干, 于 254nm 紫外灯上定位, 画出各碱基斑点的位置, 计算 Rf 值。

2. DNA 碱基定量分析

(1) 标准曲线绘制: 准确称取并按上法配成各种碱基浓度为 $5 \text{ nM}/\mu\text{l}$ 的 A、G、C、T 标准碱基混合液, 取活化的 3 块 20×10cm 硅胶板, 每板点 5 点, 分别为 1、2、3、4、5 μl , 按前层析, 用 CS-910 双波长色谱扫描仪测定。测定条件: $\lambda_S = 265 \text{ nm}$, $\lambda_R = 370 \text{ nm}$, 反射法, 线性扫描。用量高法计积分值, 将各板中种类和含量均相同的碱基之积分值加和平均, 求各碱基积分值和 nM 之间关系的回归方程, 作出以积分值 (任意单位) 为 Y, nM 为 X 的回归直线, 即为标准曲线。

(2) 样品测定: 加 2 mg DNA 样品和 2ml 88% 甲酸于 GG 17 玻璃制的 2ml 安瓶中, 按 Aaron Bendich^[4] 法水解, 依标准碱基溶液配法溶成 0.2ml 样品液。取不同量的样品液与 3 μl 标准碱基混合液点于同板的不同点上, 层析和

扫描测定后, 选取积分值与标品积分值相差不大的样品量作为测定点样量。取 3 块薄层板, 每板点标品 $3\mu\text{l}$, 共 3 点, 样品按预测量点样, 亦为 3 点, 照前层析和扫描, 分别求出各板中标品和样品相应碱基积分值的平均值, 在相应碱基标准曲线上找出标品积分值和 15nM 所在的点, 从该点推出标准曲线的平行线, 即校正曲线, 其上由样品积分值对应的 X 值就是样品的 nM 数。如果样品和标品积分值接近, 也可由样品 $\text{nM} = \text{样品积分值} \times 15 / \text{标品积分值}$, 直接算出来。

将测得的 A、G、C、T 之 nM 数, 即 A_{nM} 、 G_{nM} 、 C_{nM} 、 T_{nM} 代入下式:

$$(G + C) \text{ 克分子 \%} = \frac{G_{\text{nM}} + C_{\text{nM}}}{A_{\text{nM}} + G_{\text{nM}} + C_{\text{nM}} + T_{\text{nM}}} \times 100$$

就得到分析结果。把 3 块薄层板测得的上述数值平均, 便是该 DNA 的碱基组成。

结果和讨论

(一) 碱基薄层层析结果 如表 1 和图

表 1 碱基薄层层析 R_f 值

碱基	A	G	C	T	U
R_f	0.54	0.40	0.30	0.74	0.64

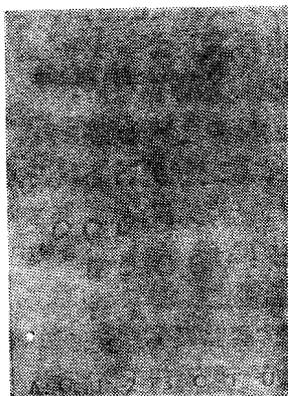


图 1 薄层析谱

1. 小牛胸腺 DNA 水解物; 2. (A + G + C + T);
3. (A + G + C + T + U)。

在 254nm 紫外灯下显影时, 由于该仪器形状限制, 无法用一般照相机拍摄, 此照片系在 254nm 紫外分析灯显影时用铅笔勾画出各斑点后, 在自然光照下拍摄结果。

1 示。对于核酸碱基薄层层析分离, 大多数文献是使用纤维素板, 据我们多方实验不如硅胶板层析好。聚酰胺薄层析^[1]可以把 RNA 碱基 A、G、C、U 分开 (G 在原点), 但未报道 DNA 碱基中的 T 层析数据。桧山千都子等^[2]的硅胶薄层层析分离的碱基种类也很少。本实验根据前人的经验, 摸索出的硅胶薄层层析法, 只经单向展层就彻底分开了 A、G、C、T、U 5 种碱基混合物, 各斑点很明晰, 效果稳定, 重现性很好, 既可用于 DNA 及 RNA 碱基分离, 又可用于此两种核酸混合物的各碱基测定。在薄层板的两端可各作一次分析, 省时省原料。

(二) 定量分析

1. 标准曲线如图 2 示。回归方程的 t 检验: 查 t 表, $df = n - 2 = 3$, $t_{0.01} = 5.841$, 而现在 A 的 $t = 33.43$, G 为 17.90 , C 为 17.39 , T 为 9.26 , 均 $> t_{0.01}$, 故 $P < 0.01$, 差异极为显著。这表明 $5-25\text{nM}$ 范围内线性关系好, 宜作定量分析, 灵敏度也高, 可测小于 $1\mu\text{g}$ 的碱基。由于有明显的线性关系, 所以在此范围内如果样品和标品积分值接近, 可由样品 $\text{nM} = \text{样品}$

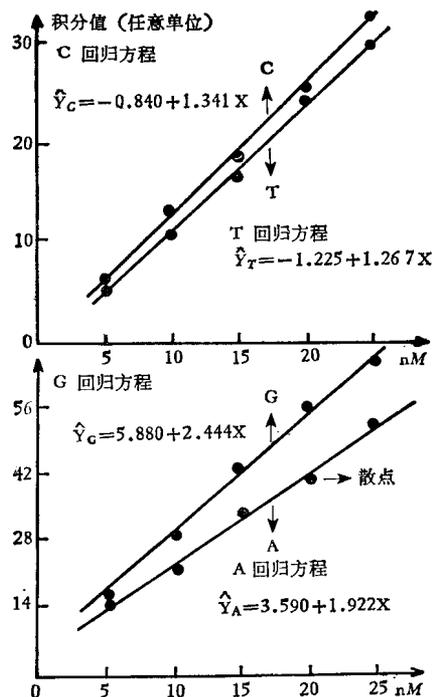


图 2 各碱基标准曲线

积分值 $\times 15$ /标品积分值,直接算出样品碱基含量,省去作标准曲线,使工作更为简便。

2. 分析结果 如表 2 示。由表 2 数据可看出,(G+C) 克分子%最大标准误差在 ± 0.66 以下,相对误差 $\pm 1.28\%$ 以下,各碱基的最大标准误差在 ± 0.50 以下,相对误差 4.42% 以下,符合一般光学分析法的误差范围。另外,将本实验测得的小牛胸腺DNA(G+C)克分子% = 44.02% ,与文献^[3]报道的不同作者的常法分析结果为 $41.60-44.80\%$ 相比,也说明本法结果可靠。

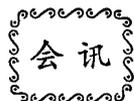
表 2 小牛胸腺 DNA 碱基分析数据

	碱基 nM				(G+C) 克分子%	测定 次数
	A	G	C	T		
平均值	9.75	7.76	7.67	9.87	44.02	10
标准误差	± 0.45	± 0.35	± 0.29	± 0.49	± 0.65	
相对误差(%)	± 4.00	± 3.47	± 3.28	± 4.41	± 1.27	

本报告摸索出的核酸碱基硅胶薄层层析双波长色谱扫描分析,只需 1.5 小时的单向层析就可把 A、G、C、T、U 彻底分开,扫描测定半小时即可完成,可测低至 5nM (即 $1\mu\text{g}$ 以下)的碱基,经统计处理完全符合一般光学分析法的准确度(相对误差 $\pm 5\%$);溶剂系统简单,主要用国产硅胶,故价廉。所以,在核酸碱基分析方面,与现在常用的纸层析和薄层层析洗脱比色法比较,本法简便、快速、灵敏、可靠。

参 考 文 献

- [1] 蔡菊娥等: 1980. 生物化学与生物物理进展, (3): 65.
- [2] 松山千都子 *らど*: 1978. 药学杂志, 98(8): 1132.
- [3] D. O. 佐登(施嘉钟等译): 1965. 核酸的化学, 第 1 版, 上海科学技术出版社, 86 页.
- [4] Aaron Bendich: 1957. *Methods in Enzymology*, Vol. III, 715.
- [5] Kenneth, C. Kuc et al.: 1980. *Nucleic Acids Res.*, 8(20): 4763.



遗传工程在工业上的应用讨论会简讯

中国遗传学会最近在杭州召开了遗传工程在工业上的应用讨论会。会议主持人李载平教授在发言中指出,基因工程与核子物理等学科相比是小学科,花钱不多,但收效极大。他说,当前世界上开展的遗传工程研究仅仅是个开始,我们需要做的而又能够做的工作很多,一定要开阔视野。例如用基因工程制造探针技术,必将形成一个新的产业。它可以用特异性 DNA 片段的分子杂交法进行各种目的基因的检测,其灵敏度将比现在常用的免疫沉淀法高出 1,000 倍。这种探针可用于检测遗传病、食品检验检查沙门氏菌污染,甚至制造探针柱预防血液受乙型肝炎病毒或其它化学有害物质的污染。其它诸如建立分泌型载体系统,建立合适的发酵和产物提取工艺、降低成本、增加收益等等,将有大量工作可做。

在会议上的学术交流表明,近几年来我国遗传工程的研究工作在某些项目上已取得可喜成果。例如乙型肝炎病毒、干扰素等不仅得到克隆,而且已经在细菌

或酵母中表达。人前胰岛素的研究在细菌中得到高效表达,前胰岛素蛋白的产量已占菌株总蛋白的 40%,达到了可以投入生产的水平。此外口蹄疫病毒、人绒毛膜促性腺激素抗生育疫苗、抗菌素、氨基酸、传染性腹泻病疫苗、尿激酶等的基因工程也已获得阶段成果。对于纤维素酶、血浆蛋白、胸腺素、家畜和鱼类育种也提出了许多引人注目的课题。

会上,就如何在我国迅速发展基因工程问题组织了专题座谈并提出了建议:(1)进一步加强遗传工程的学术交流活动,组织人员迅速的报道国外情报信息。(2)扎扎实实抓好全国 3 个生物工程中心的建设,提出建议,看准研究方向。(3)抓好遗传工程研究人材的培养。(4)抓好科研、教育、生产三结合。(5)希望改善国内工具酶、同位素的供应,从长远来看应建立自己的工业体系。

(安锡培)