

一种研究核酸的电镜方法——BAB 的应用

朱以桂 崔道珊 李金照

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

我们曾简要地介绍了用新洁尔灭(溴代十二烷基二甲基苄基胺, 简称 BAB) 代替细胞色素 C 制备脱氧核糖核酸电镜样品的方法^[1]。本文对该法的应用作了进一步阐明, 并报道了对分子量较小的质粒 DNA 分子、核型多角体病毒 DNA 分子和它变性后的单链 DNA 分子, 以及 DNA 与蛋白质的复合物的观察结果。

材料与方 法

(一) 脱氧核糖核酸制备

1. 质粒 DNA (pBR322) 的制备: 含有 pBR322 质粒的大肠杆菌菌株 (Bolivar et al.^[2]), 用 M₁ 培养基在 37℃ 摇床培养至对数期晚期, 加氯霉素 (170mg/ml) 后继续培养 12 小时, 按照 Clewell, D. B.^[3] 方法抽提质粒 DNA, 并按 zasloff 方法^[4]进一步纯化质粒。

2. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA 的制备: 先从染病致死的大尺蠖 (*Buzura Suppressaria*) 中纯化核型多角体, 用 Na₂CO₃ (pH10.8, 30℃) 将多角体裂解, 然后经蔗糖梯度离心 (20—50% 蔗糖, 22000rpm) 分离出病毒带, 将纯化的病毒颗粒悬浮于 SSC 溶液中加入 SDS 使其浓度达裂解病毒的 2%。同时加入 NaCl 使浓度达到一克分子, 离心除去外壳碎片用氯仿-正丁醇或酚抽提除去蛋白, 加入乙醇使 DNA 沉淀, 然后再溶于 SSC 溶液中。

(二) 大肠杆菌 RNA 聚合酶的提取和纯化

大肠杆菌 B 株用改良后的 Berg 的方法^[5]进行纯化。

(三) 质粒 DNA 的凝胶电泳

1% 琼脂糖凝胶 TEA 电泳缓冲液 (50mM Tris-醋酸, 20mM 醋酸钠, 2mMEDTA, 20mMNaCl, pH8.0), 50V、电泳 5 小时。

(四) 电镜样品的制备

按照我们已发表过的方法进行^[1]。

结果与讨论

(一) 大尺蠖核型多角体病毒 DNA 分子的观察

大尺蠖核型多角体病毒 DNA 是周长约 27μm 的双链闭环分子, 分子量为 46.5×10^6 道尔顿, 比一般细菌病毒 DNA 分子要大, 对这类较大的双链闭环 DNA 分子进行电镜观察时, 应防止 DNA 分子的凝聚, 需要将 DNA 分子充分的展开。为此我们采用了三种制样方法对同一样品进行观察。

1. 用碱性蛋白展层技术: 上相溶液含有 DNA 2μg/ml、细胞色素 C 80μg/ml, 醋酸铵 0.5M、EDTA 1mM、pH7.5; 下相溶液为 0.25M 醋酸铵 (图版 I-2)。

2. BAB-碱性蛋白结合展层技术: 上相溶液含有 DNA 2μg/ml、BAB $5 \times 10^{-3}\%$, 细胞色素 C 16μg/ml, 醋酸铵 0.5M、EDTA 1mM、pH7.5, 下相溶液为 0.25M 醋酸铵 (图版 I-6)。

3. BAB 展层技术: 上相溶液含有 DNA 2μg/ml、BAB $5 \times 10^{-3}\%$, 1M 醋酸铵。pH7.9 下相溶液为 0.25M 醋酸铵 (图版 I-1)。

比较上述三张照片, 可以看出用细胞色素 C 制样得到的 DNA 展层分子中有部分被凝聚缠绕不能充分展开, 若减少细胞色素 C 的用量、代之加入适量的 BAB、可得到展开和卷曲都较好的 DNA 分子, 单独使用 BAB 则可使 DNA 分子得到更充分的展开。

(二) 质粒 DNA 的观察

质粒 pBR322 是一种小的双链闭环分子, 周长约 1.3μm 左右、分子量为 2.6×10^6 道尔顿, 一般情况下得到的这种 DNA 制剂, 通过凝胶电泳分析, 证明有三种不同构型分子同时存在, 即二聚体、开环型和超盘绕型 (图版 I-3)。使用碱

本文于 1981 年 3 月 17 日收到。

性蛋白展层技术制备这种核酸样品,只能看到线型和开环型两种构型分子(图版 1-4),很难看到超盘绕型分子。同样使用 BAB 展层技术制备样品,可以看到超盘绕型分子(图版 1-5)。通过比较可以推论用细胞色素 C 展层时,由于细胞色素 C 的加厚作用掩盖了细小的结构特征,结果使超盘绕型结构的精细结构不能显现出来,往往误认为较短的线型分子。BAB 的分子量比细胞色素 C 小得多、对分子的加厚作用很小,从而使超盘绕分子的细微结构展现出来。

(三) 变性后的大尺蠖核型多角体病毒 DNA 分子的观察

为使大尺蠖核型多角体病毒 DNA 变性,将 DNA 样品稀释到含有 70% 甲酰胺, 0.4M NaCl, 0.03M EDTA (pH7.3) 混和溶液中, 60℃ 加热 10 分钟,迅速冷却至室温,用 0.01M NaHCO₃ 稀释使甲酰胺的浓度降为 50%, DNA 最终浓度为 1μg/ml。用 BAB 法制样进行电镜观察,看到了变性后双链被打开后的单链 DNA 分子(图版 1-7)。

(四) 核酸与蛋白质复合物的观察

DNA-RNA 聚合酶复合物的形成: 0.6μl 大肠杆菌 RNA 聚合酶 (1.64mg/ml) 与 20μl 大尺蠖核型多角体病毒 DNA (0.1mg/ml) 加入到 20μl 连接缓冲溶液 [0.03M Tris-HCl pH7.9, 0.05M KCl, 0.008M 醋酸镁] 中, 25℃ 保温 10 分钟后加入 10μl 固定缓冲溶液 (0.03M Tris-HCl pH7.9, 0.05M KCl, 0.008M 醋酸镁, 0.5% 戊二醛), 继续保温 10 分钟, 这样得到的反应混合物, 不经纯化, 直接用 BAB 展层技术制样, 上相溶液

含有 13mM NH₄Ac, 2.5×10⁻³% BAB, 下相溶液为 0.25M NH₄Ac, 初步表明 E. coli RNA 聚合酶的确结合到大尺蠖核型多角体病毒 DNA 分子上, 但由于所用的 RNA 聚合酶是过量的, 没有经过 Portmann^[6] 所描述的方法处理, 非结合的 RNA 聚合酶没有除去, 因此得到的复合物既包括特异结合位点, 也包含有非特异结合位点(图版 1-8)。RNA 聚合酶-大尺蠖核型多角体病毒 DNA 的特异结合的电镜观察正在进行中。

以上结果表明, BAB 展层技术对于分子量较大的超盘绕 DNA 分子, 能防止凝聚、有利于观察和分子量的测定, 对于小分子的超盘绕型 DNA 分子, 能使超盘绕的细微结构展现出来; 由于 BAB 为非蛋白试剂、分子量小, 它的加厚作用很小, 双链和单链分子易于区别。同时适用于核酸与蛋白质复合物的电镜观察。这些方面似乎比细胞色素 C 展层技术优越, 表明这是一种简便有效的方法。

参 考 文 献

- [1] 朱以桂等:《病毒学集刊》第一期, 科学出版社, 1982 年, p. 187—190。
- [2] Bolivar, F. et al.: *Gene*, 2: 75—93, 1977.
- [3] Clewell, D. B., *J. Bacteriol.*, 110: 667—676, 1972.
- [4] Zaslloff, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5: 1137—1142, 1978.
- [5] Berg, B. and Chamberlin, M., *Methods in Enzymology*, Vol XXI part D 501, Academic press.
- [6] Protmann, R. et al.: *FEBS Lett.*, 45: 64—67, 1974.

图 版 说 明

1. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA, 用 BAB 展层制样 ×26,400
2. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA 用细胞色素 C 展层制样 ×25,000
3. 质粒 pBR322 DNA 的 Agarose 凝胶电泳, 第一条带为二聚体型, 第二条带为开环型, 第三条带为超盘绕型。
4. 质粒 pBR322 DNA, 用细胞色素 C 展层制样。×42,000
5. 质粒 pBR322 DNA, 用 BAB 展层制样 ×25,000
6. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA; 用 BAB-细胞色素 C 结合展层制样, ×25,000
7. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA 变性后用 BAB 展层
8. 大肠杆菌 RNA 聚合酶-大尺蠖核型多角体病毒 DNA 片段复合物用 BAB 展层 ×87,000