

蚕类核酸的研究 II 用羟基磷灰石 柱层析法分离纯化蚕蛹DNA

吕慧梅 李桂兰 丁 益

(南京大学生物系生化教研室)

陈元霖 郑子修 叶文娟

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

本文叙述一种制备蚕蛹DNA的简便有效方法。用本法制得的DNA是纯净的双链高分子，适合于分子遗传学研究转化之用。

随着分子生物学和分子遗传学的迅速发展，近年来研究DNA分子的复制、重组与表达的工作进展很快。要做这方面的工作首先须获得一定纯度和天然态的DNA分子，而且纯化DNA的方法要求简易有效。60年代Marmur等人介绍了一个制备具有转化活性的DNA方法，但步骤多，操作烦，1969年Bernardi报导了用羟基磷灰石柱层析法分离纯化小牛胸腺DNA，获得了天然态的DNA分子。

我们在Bernardi方法的基础上进行了一些改进，用高氯酸钠法从蓖麻蚕和家蚕蛹分别制得了DNA粗制品，再通过羟基磷灰石柱层析分离、纯化，获得了纯净的双链高分子DNA。本方法的特点是：①不需用高速离心机；②不用有机溶剂和酶去杂质，所以是一种简而有效的纯化DNA的方法。

材 料 和 方 法

1. 本实验所用的蓖麻蚕 (*Attacus cynthia ricini*) 及家蚕 (*Bombyx mori*, L) 云南省蚕科所提供。

本文所用名词代号如下：羟基磷灰石—HA；磷酸钾缓冲液—KPB；A—DNA—蓖麻蚕蛹DNA制品；B—DNA—家蚕蛹DNA制品；SSC—0.15MNaCl—0.015M柠檬酸三钠pH7.0±0.2。

本文于1979年10月13日收到。

2. 羟基磷灰石, 是照上海生物化学研究所代谢调节控制组, 1976所述方法自行合成的。

3. 化学测定方法:

DNA测定用Barton法, RNA测定用Schjeide法(1969), 蛋白测定用Lowry(1951)法。

4. DNA的分离与纯化:

粗制DNA的制备: 详细过程见陈元霖等(1980)

HA柱层析分离: 是参考Bernardi(1969); 上海生物化学研究所代谢调节控制组, (1976); 上海实验生物研究所, 三室细胞研究组(1977)所述方法略加以改进。先用小柱作试探性分离, 然后用大柱进行制备。

(1) 层析柱为 1.4×5 厘米(小柱), 在 $8-10^{\circ}\text{C}$ 进行层析, 取粗制DNA水溶液上柱, 先后用 0.07M 、 0.1M 、 0.2M 、 0.25M KPb($\text{pH}6.8$)洗脱, 分部收集, 分别测定260nm光密度、DNA、RNA及蛋白质含量。

(2) 层析柱为 2.4×5 厘米(大柱), 层析温度, 上柱条件同上, 先后用 0.1M 、 0.2M KPb($\text{pH}6.8$)洗脱, 分部收集, 测定内容如前(1)。取 0.2M KPb洗脱的高峰管对SSC溶液充分透析后, 封管, 在 4°C 保存(简称透析液), 或者加95%冷乙醇(两倍体积), 得纤维状DNA沉淀, 先后以70%、80%、90%、95%及100%乙醇、丙酮洗涤, 真空干燥, 低温保存(简称干品)。干品的纯度比透析液的更高, DNA纯化简单步骤见图1。

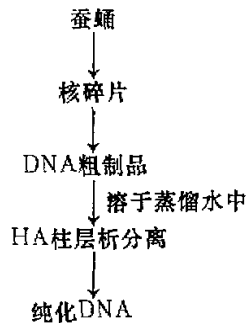


图1 DNA纯化简单步骤

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照文献上海实验生物研究所三室细胞研究组(1977); Gregson(1972)所述方法进行。

6. DNA熔点温度(T_m)值的测定: 照文献Marmur & Doty(1962); 周慧玲(1978); 周慧玲(1978)所述方法进行。样品为A—DNA、B—DNA透析液, 用Unicam sp 1800型双光束分光光度计自动记录测定。

结 果

1. DNA的HA柱层析

粗制B—DNA经HA柱层析分离的结果如图2、3所示,从图2可以看出变性DNA、RNA及蛋白质等杂质在0.1M KPB以前已被洗脱下来,用0.2M KPB洗脱得到双链DNA,但洗脱液中还含有极微量的蛋白质和RNA*。制备时改用二步洗脱(图3),0.1M KPB洗去杂质,0.2M KPB洗脱双链DNA。加大0.1M KPB洗脱体积还可能提高DNA制品的纯度。

2. 紫外吸收光谱的测定

用A—DNA、B—DNA的透析液进行扫描,得到一条典型的核酸紫外吸收曲线,见图4。A—DNA、B—DNA的最大吸收均在259nm,最低吸收均在232nm。A—DNA和B—DNA的A259/A232比值分别为2.34和2.43; A259/A280比值分别为2.1和2.01。说明二种DNA制品均符合纯度要求。

3. 聚丙烯酰胺凝胶分析

用A—DNA、B—DNA的干品进行电泳均得到一条清晰的区带,见图5。扫描图谱见图6。

按Gregson报导的方法进行分子量测定, DNA分子量与 R_f 值之间的关系如表1所示。测得A—DNA、B—DNA的 R_f 值均为0.27,因此其分子量在 $1.15-1.90 \times 10^6$ 之间。

表1 在2.4%聚丙烯酰胺凝胶电泳中DNA分子量与 R_f 值的关系

R_f 值	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
MW $\times 10^6$	75.3	3.1	1.00	1.15	0.69	0.40	0.24	0.15	0.09	0.05	0.02

4. T_m 值及G—C对克分子百分数的测定

测定数据,经校正计算后得到显示 T_m 值的特性曲线(图7)。根据图7测得 T_m 值,按经验公式 $GC\% = 2.44 \times (T_m - 69.3)$ 求得G—C对克分子的百分数见表2。

表2 蚕蛹DNAT_m值及G—C对克分子百分数

样 品	T_m (°C)	GC(%)
A—DNA	84.3	36.6
B—DNA	83.5	34.6

根据以上几项鉴定的结果,我们认为通过HA柱层析分离获得的DNA样品是纯净的双链高分子,适合于分子遗传学研究转化之用。

*这是我们几次实验中杂质含量最高的一次结果。

参 考 文 献

陈元霖等：《动物学研究》，第2期，第151—156页。

上海实验生物研究所三室细胞组：《生物化学与生物物理进展》，第5期，第3页，1977年。

上海生物化学研究所代谢调节控制组：《生物化学与生物物理进展》，19第1期第24页，1976年。

周慧玲：《微生物学报》18(2)，134—139，1978。

周慧玲：《微生物通报》5(2)，39—41，1978。

Bernardi, G., *Biochim. Biophys. Acta*, 174, 423(1969)

Burton, K., *Methods in Enzymology*, Vol. 12, part B, 163

Gregson, S., *Anal. Biochem.*, 48, 613(1972)

Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)

Marmur J., *J. Mol. Biol.* 3, 208(1961)

Marmur, J. & Doty, P., *J. Mol. Biol.*, 5, 109(1962)

Schjeide, O. A., *Anal. Biochem.*, 27, 473 (1969)

STUDIES OF SILKWORM NUCLEIC ACIDS

II Isolation and purification of DNA from pupae of silkworm with column chromatography by hydroxyapatite

Lu Hui-mei, Li Guei-lan and Ding Yi

(Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Nanking University)

Chen Yuan-lin, Zheng Zi-xiu and Ye Wen-juan

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

A simple, effective and reliable procedure for the preparation of DNA from pupae of silkworm is described. A pure double stranded macro-molecular DNA isolated by this modified procedure was obtained. Analysis of this DNA indicates that it fulfills the desired requirement for molecular genetics study.

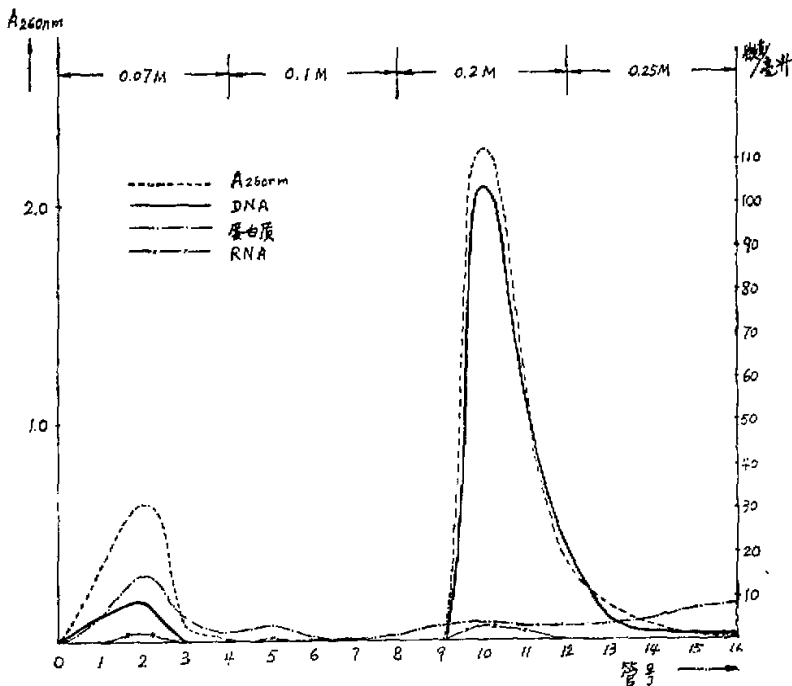


图2 B—DNA在HA柱上层析图谱 每管收集6 ml

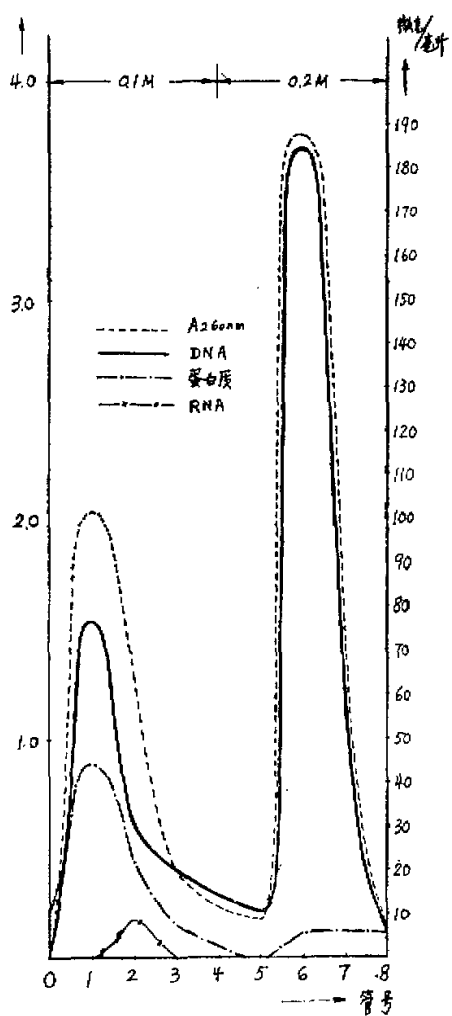


图3 B—DNA在HA柱上层析图谱 每管收集17ml

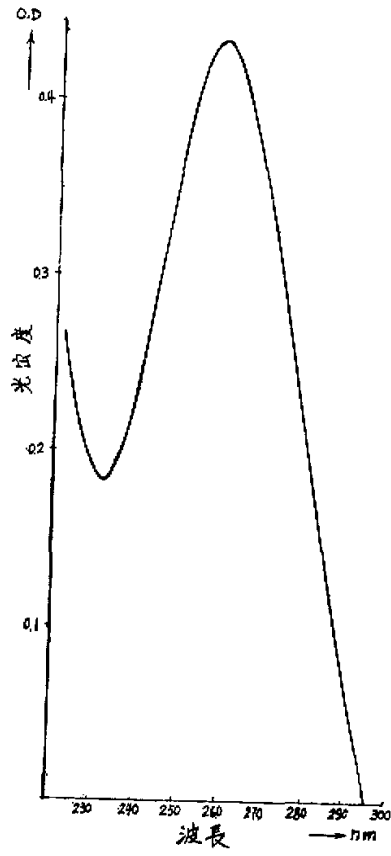


图4 B-DNA的紫外吸收曲线

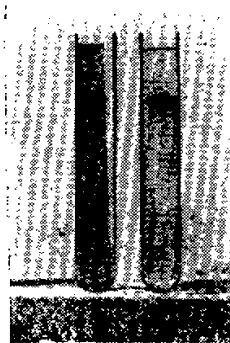


图5 聚丙烯酰胺凝胶电泳显色图谱
1.A-DNA 2.B-DNA
① 2.B-DNA

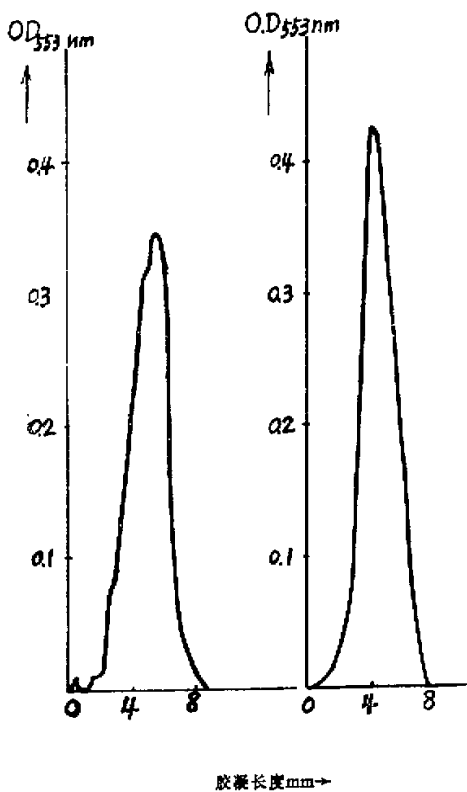
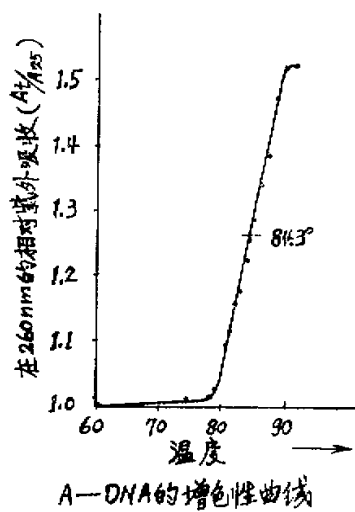


图6 聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱
左A-DNA 右B-DNA



A-DNA的增色性曲线

图7