

红螺肝细胞核核酸分离方法的比较研究

于 富 才

(中国科学院海洋研究所)

真核细胞核酸的研究近年来进展很快,生物化学家、生物学界对它都很感兴趣。真核细胞核酸的成就,不但丰富了核酸的化学知识,而且开辟了新的研究途径,在一些科学家切望解决的领域内获得了出色的成绩。如分子生物学中“中心法则”的确认;单一基因分离成功;蛋白质生物合成机理的阐明;遗传工程的迅速发展等。这些领域里活跃的研究工作,也促进了生物制备方法的研究,如亲和层析、生物免疫、DNA重组技术和基因分离方法等先后出现,并且日益完善。这些新方法、新技术的建立,又更有效地加速了上述各课题的解决。

随着生物化学各种新方法的相继问世,许多过去发表的方法由于专一性差、不够灵敏和过分复杂等而失去其本来的意义。

在细胞生物化学制备方法的研究中,以往多注重于细胞总DNA或总RNAs的分离,而对细胞核中DNA和RNA各组分的同时分离的方法尚未建立。作者试图用羟基磷灰石柱层析将红螺肝细胞核各核酸组分进一步分离,并与Lurquin⁽¹⁾和Laulhere⁽²⁾的凝胶过滤法加以比较。现将结果报道如下。

一、实验方法

1. 主要试剂和仪器

0.1M EDTA二钠盐, pH8.0 (内含NaCl, 浓度为0.15M); 20% SDS (十二烷基磺酸钠); 氯仿-异戊醇 (24:1, v/v); Sepharose 2B琼脂糖凝胶; 蔗糖钙或蔗糖柠檬酸溶液; 0.25M蔗糖溶液 (内含3.3mM CaCl₂或1.5%柠檬酸); HAP (羟基磷灰石, 上海东风试剂

厂产品); 不同浓度的 KPB (磷酸盐缓冲溶液, pH6.8); 标准DNA (英国BDH化学试剂公司产品); 标准rRNA (美国Sigma化学试剂公司产品); 标准tRNA (上海东风试剂厂产品); 1×20厘米和2×50厘米具砂芯滤板玻璃层析柱各一支; 带聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器。

2. 分离过程

(1) 红螺肝细胞核的制备: 基本按 Chauveau法⁽³⁾进行。红螺肝放入一盛有蔗糖钙或蔗糖柠檬酸溶液的研钵内, 在冰浴中研细, 然后用带聚四氟乙烯研杵的玻璃匀浆器匀浆。匀浆液于600×g/分离心6分钟, 弃去清液, 再加上上述溶液于沉淀中, 再行匀浆, 得到粗制细胞核混悬液, 铺在1M蔗糖液上, 900×g/分离心10分钟, 得肝细胞核沉积物。

(2) 红螺肝细胞核核酸的提取⁽⁴⁾: 取制得的肝细胞核于一个三角烧瓶中, 加10倍体积0.1M EDTA二钠盐溶液, 边搅拌边滴加20% SDS, 使其浓度为2%, 搅拌2小时后加5M NaCl溶液至其浓度为1M, 继续搅拌半小时, 加等体积氯仿-异戊醇, 振荡15分钟, 25000×g/分离心40分钟, 分出水相, 再加氯仿-异戊醇, 重复萃取, 直至两相界面无蛋白质为止。吸取上层液, 加0.5—1倍体积的95%冷乙醇(-20℃), 离心收集沉淀, 即为粗制DNA, 溶于2M NaCl溶液中, 0℃时保存。

(3) 粗制RNAs的提取: 在分离出DNA的乙醇水溶液中, 再加95%乙醇至原水相体积的2.5倍, 置-20℃冰箱内24小时以上, 离心并收集沉淀, 此产物便是RNAs, 也溶于2M NaCl中, 低温保存。

(4) 细胞核粗制DNA和RNAs的 Sepharose 2B凝胶过滤: DNA和 RNAs 贮存液在 $300000 \times g$ /分离50 分钟, 除去其析出的不溶物, 上清液各通过Sepharose 2B 柱过滤。先用含 1%乙醚的2M NaCl溶液将Sepharose 2B漂洗几次, 弃去微细颗粒, 然后转移至 2×50 厘米玻璃层析柱上, 使柱子连接在紫外检测仪上, 波长调至254nm, 以含 1%乙醚的 2M NaCl溶液洗至仪器基线, 即可加样。核酸样品用2M NaCl稀释至 $10A_{260}/ml$, 加样量 5—8ml, 用相同浓度的NaCl溶液洗脱, 流速30ml/小时, 分别收集各个吸收峰的洗脱物, 用751 G分光光度计于230nm、260nm和280nm 处测量光吸收度, 并计算获得率。

(5) HAP柱层析分级分离: 把(2)得到的粗制DNA和经(4)纯化的DNA与RNAs按作者¹⁾和Bernardi^[5]法进行HAP柱层析分级分离。

3. 分离产物的理化鉴定

用高纯度 DNA, rRNA和tRNA 样品作出标准 HAP 分离图谱, 并同待测样品的分离图谱进行比较。蛋白质测定按 Lowry 法, RNA测定按Schjeide法, DNA测定按 Burton法, 而核酸紫外吸收性质的鉴定按Ohba和 Hayashi法进行。

二、结果和讨论

将Lurquin和Laulhere的方法略加改动, 即在洗脱液中加入1%乙醚作防腐剂; 由 Sepharose 2B代替Sepharose 4B, 细胞核 DNA和RNAs粗制品的分离图谱两者相似。由图1可见, 粗制 DNA 在自动扫描记录纸上显示出两个吸收峰: 峰 I 高而宽、右侧有突出的肩部; 峰 II 宽而矮, 不完全对称。上样 $76A_{260}$, 收回 $54A_{260}$, 总洗脱回收率为 71%。峰 I 是 DNA, 占总回收量的83%, 峰 II 是RNAs, 约为总回收量的17%。这表明1M NaCl 溶液萃取DNA粗制品含有近20%的RNAs。

2.5倍乙醇沉淀出来的RNAs粗制品在 Sepharose 2B上也分离出两个洗脱峰, 但峰 I

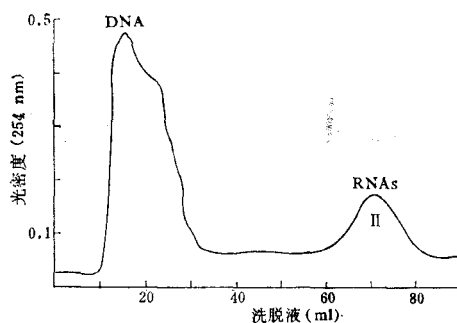


图1 红螺肝细胞核粗制DNA在 Sepharose 2B柱上纯化

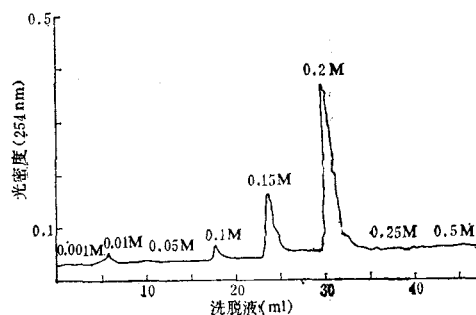


图2 经Sepharose 2B纯化的 DNA在HAP柱上的分离

呈一很小的单一对称峰, 其 DNA 含量少得在紫外分光光度计上测不出来。峰 II 为一较大的洗脱峰, 其内含物 RNAs 量占总回收物的 95%左右。

以上分离产物, 经Follin-酚显色检查, 均测不出蛋白质的存在。从Sepharose 2B分离图谱以及产物的生化分析结果(表1)看, 这种技术分离出来的DNA 仍含有 RNA 杂质, 而RNAs中含有少量DNA则可用此法除去。

为使核DNA和RNAs制品进一步纯化, 又把 Sepharose 2B纯化过的样品分别流经HAP柱进行分级分离, 并把粗制DNA直接上 HAP柱层析, 作为对照。

经Sepharose 2B纯化过的核 DNA样品上 HAP柱后, 通过递增浓度的KPB顺序洗脱, 除几个很小的杂质峰外, 可分离出两个较大的吸收峰(图2): 一是在 0.2M KPB 中溶出的

1) 羟基磷灰石柱层析分离海胆精核 DNA。海洋学报, 待刊。

表1 红螺肝细胞核核酸Sephrose 2B凝胶过滤结果

萃取阶段	凝胶过滤 洗脱物	DNA检出 量(微克)	RNAs检 出量(微克)	光谱性质		生化鉴定		上样量 (A_{260})
				A_{260}/A_{280}	A_{230}/A_{260}	苔黑酚反应	二苯胺反应	
0.5—1倍乙醇 沉淀物	峰	I	1955	1.93	0.41	+	+	76
		II	364	2.10	0.38	+	-	
2.5倍乙醇 沉淀物	峰	I	检不出					10.5
		II	350	2.10	0.38	+	-	

DNA占上样量88%以上; 另在0.15M KPB处洗下的rRNA吸收峰, 其量不到10%。这说明Lurquin和Laulhere的“一步分离”法不能获得纯的核DNA产品, 在用2M NaCl溶液洗脱时, 有部分rRNA与DNA发生“共洗脱”现象。

同核DNA不同, 由Sephrose 2B纯化过的RNAs再经HAP柱层析时, 在自动扫描记录纸上出现三个较大的单一对称吸收峰, 也就是说, 在0.05M、0.1M和0.15M KPB处各出现一个大的吸收峰。在0.1MKPB中溶出的tRNA占RNAs总量的50%左右, 由0.15MKPB洗脱出来的rRNA不到6%, 而存在于0.05MKPB流出液中的产物, 其量约占40%, 这部分物质是否更小的tRNA分子, 还是多聚核苷酸, 有待进一步研究确定。

红螺肝细胞核粗制DNA可直接进行HAP柱层析, 经递增浓度的KPB顺序洗脱, 共分离出四个单一对称吸收峰, 如图3所示。其主要产

物为DNA, 其次是tRNA, rRNA。多聚核苷酸含量很少。这清楚地指出, 粗制DNA或总核酸同经Sephrose 2B纯化的样品一样, 在HAP柱上能得到令人满意的分离结果。

分析结果证明, 由Sephrose 2B过滤得到的RNAs对二苯胺呈阴性反应, 说明可用此法大量分离纯化RNAs, 但必须加核糖核酸酶抑制剂, 否则部分RNAs会发生酶解, 因为同样的样品经HAP柱层析处理, 只出现少量的多核苷酸。

由HAP柱层析图谱和表2给出的数据可以看出, 在低浓度KPB条件下, 小分子量的核酸代谢物如核苷酸、低聚核苷酸和多聚核苷酸先分离出来, 以后相继出现的是tRNA, rRNA和DNA。它们在HAP柱上出现的位置同标准样品的分离图谱完全相同。不管是经Sephrose 2B纯化的DNA和RNAs, 还是粗制DNA(或全核酸)直接HAP柱层析, 其产物的总回收率都在90%左右。从分离产物的纯度考虑, HAP柱层分离的DNA, rRNA和tRNA, 几乎不含什么杂质, rRNA和tRNA的 $A_{260}/A_{280} > 2.0$, $A_{230}/A_{260} < 0.45$, 而DNA的 $A_{260}/A_{280} > 1.91$, $A_{230}/A_{260} < 0.47$ 。这样的纯度, 完全符合分子生物学研究工作的要求。

比较两种方法所得到的结果, 发现以下几点区别。

(1) 产物的纯度: Sephrose 2B分离的DNA含有一定量的rRNA, 这部分rRNA同DNA分子发生“共洗脱”现象; HAP柱层析法不仅能把DNA同RNAs完全分离, 而且还能将

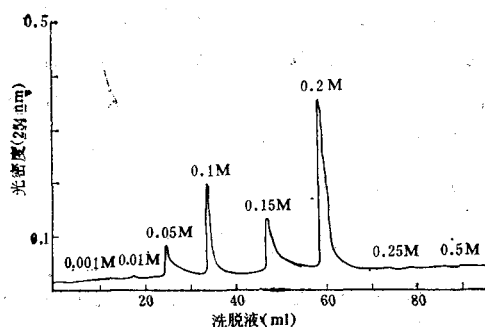


图3 红螺肝细胞核粗制DNA在HAP柱上的分离

表2 红螺肝细胞核核酸HAP柱层析吸附结果

纯化阶段	KPB (M)	DNA检出量 (微克)	RNAs检出量(微克)			光谱性质		上样量 (A ₂₆₀)
			rRNA	tRNA	多核苷酸	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₃₀ /A ₂₆₀	
Sephadex 2B纯化 后的核DNA	0.05							
	0.10							
	0.15		40			2.10	0.43	8.
	0.20	349				1.96	0.47	
Sephadex 2B纯化 后的核RNAs	0.05				154	2.21	0.42	
	0.10			294		2.14	0.43	
	0.15		39			2.03	0.45	10
	0.20							
细胞核总核酸	0.05							
	0.10			84		2.30	0.40	
	0.15		38			2.10	0.45	8
	0.20	262				1.91	0.48	

RNAs中的rRNA和tRNA(包括它们的前体分子在内)很好的分离。因此, Sephadex 2B过滤只能起到部分纯化的作用,要得到纯的DNA或RNA制剂可采用HAP柱层析分离法。

(2) 回收率:两种方法得到的回收率不一样。核酸样品在 Sephadex 2B 柱上的回收率为70%左右,可能有20%到30%的样品被酶降解,故要提高产物的回收率,需考虑加核酸酶抑制剂。而用HAP柱层析时,其回收率可达90%。

(3) 产物溶出的次序:由于核酸同两种分离支持物接触的方式不同,以及所用的洗脱液不一样,故被分离的产物的出现的先后次序完全相反。核酸在 Sephadex 2B 柱上用2M NaCl溶液洗脱时,大分子量的DNA先洗下来,然后是小分子的RNAs;在HAP柱上层析时,小分子量的化合物在先,大分子量的DNA在最后溶出,它们出现的顺序是:低聚核苷酸→多聚核苷酸→tRNA→rRNA→DNA。

(4) 产物的性质:经 Sephadex 2B 纯化的DNA是不同大小的DNA分子的聚合体,RNAs是各种RNA分子的混合物;HAP柱层析得到的是不同链长度的解聚的DNA分子和各种单一的RNA分子如tRNA, rRNA和多聚核

苷酸等。

(5) 分离峰的形状:由 Sephadex 2B 分离的产物的吸收峰平而宽,往往不对称,这是产物不纯的特征;从HAP柱上洗脱的各分离峰,高而细长,呈单一的对称形,这是产物纯净的表现。

(6) 层析柱的容量:HAP只适用于少量核酸样品的分离纯化,每次只能得到以毫克计的产品,故其柱的容量(体积)不宜大,否则流速极慢,分离效果很差;Sephadex 2B的柱体积可不受限制,根据纯化样品的量,可选择任意大小的柱,一次可制取大量的产品。

由上述看出,HAP在生化制备上可作为一种有效的分离方法,它不但能除去核酸中的任何杂质,而且还能将细胞核各核酸组份如DNA、rRNA和tRNA,以及多聚核苷酸等有效地分离,产物的纯度高,具有天然核酸的特性;而 Sephadex 2B 则分离不完全,只能得到部分纯化的产物。

参 考 文 献

- (1) Lurquin, P. F., 1975. Anal. Biochem 65:1-10.
- (2) Laulhere, J. P. et al., 1976. Plant Science Letters 6:231.

- (3) Chauveau, J. et al, 1956. Exptl. Cell Res, 11:317. Enzymology 12 (part B):112.
- (4) Robert, P. et al, 1968. Methods in (5) Bernardi, G., 1969. Biochem Biophys. Acta. 232:651.

COMPARATIVE STUDY ON THE SEPARATION OF NUCLEIC ACIDS FROM THE NUCLEI OF *RAPANA THOMASIANA* LIVER

Yu Fucai

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

Two different procedures for the separation of nucleic acids from cell nuclei of *Rapana thomasi* liver have been studied. Differences were found between the results chromatographed through Sepharose 2B and Hydroxylapatite. The nucleic acids extracted with Sodium dodecyl sulfate can only be separated into two peaks of DNA and RNAs by chromatography on Sepharose 2B. In case of using Hydroxyapatite columns, a good separation of polynucleotides, tRNA, rRNA and DNA can be obtained, the recovery rate of DNA and RNAs obtained on Hydroxyapatite column is higher than that on Sepharose 2B. Absorption spectrum analysis study showed that the quality of the products eluted from Hydroxyapatite column is better than that from Sepharose 2B. So Hydroxyapatite column chromatography is a useful method for the separation of DNA and various classes of RNA.