

核酸物质蛋白单分子层电镜技术

乔 宝 义

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在研究核酸等遗传活性物质的电子显微镜技术过程中, 蛋白单分子层技术是最基本而且最重要的方法。它不只用来研究核酸物质的物理特性、核酸的复制, 而且能在体外观察转录的位置、方向和过程。

用这个方法还能使生物颗粒(如噬菌体、病毒)直接释放出核酸物质, 进而鉴别生物材料中所含的核酸是双股还是单股, 以及了解生物材料所含核酸的量。

特别是异源双股体方法应用以来, 可以通过核酸异源双股体的观察, 来精确地计算和绘制出两个噬菌体退火股(annealed strands)的突变、缺失、替换、倒位的位置, 也可以确定病毒基因组的易位和寄主的基因组区域。

什么是蛋白单分子层技术呢? 一些蛋白质可以在低盐溶液或蒸馏水表面上形成不溶解的薄膜, 这是由于聚蛋白键的伸展所形成的分子网, 一般认为这个蛋白分子网是单分子层。而 DNA 和 RNA 溶液中的分子可以与蛋白质分子上的氨基酸碱基以水合键结合。这样, 核酸就牢固地被吸附到蛋白分子上, 当蛋白分子扩展时, 可把核酸分子舒展开来。从而使得核酸分子由原来的三维结构变成二维的弯曲和一定走向的纤维状结构。人们一般把这个过程称作蛋白单分子层或蛋白膜技术。

一、蛋白单分子层展层技术

蛋白单分子层技术根据遗传活性物质(如核酸)吸附到蛋白单分子层上的过程不同可分成两个试验过程。一个为展层过程, 一个为扩散过程。

(一) 展层过程

核酸是在蛋白展层过程中吸附到单分子层上的, 这个过程需要配制两种溶液: 展层溶液和下相溶液。

展层溶液是由研究材料(包括病毒颗粒或核酸)、碱性蛋白组成的高浓度盐溶液; 下相溶液是由蒸馏水和低浓度盐溶液组成。

根据展层和下相溶液所含盐类的不同又可分成不同的方法。在这里主要介绍水溶液法、甲酰胺法和甲醛法。

1. 水溶液法: 展层溶液中所含有的盐类主要是醋酸铵, 浓度一般是 $0.5-7M$ 。下相溶液是水或 $0.05-0.25M$ 醋酸铵。

这种方法的特点是: 双股 DNA 一般形成圆滑弯

曲的丝状物。而单股 DNA 由于本身碱基之间随机结合, 使之凝聚成树丛状。这样, 不仅可以区别双股 DNA 分子上的单股 DNA 位置, 而且能精确地测量出双股 DNA 的长度。

2. 甲酰胺法: 展层溶液含有 40% 的甲酰胺, 下相溶液含有约 10% 的甲酰胺(比展层溶液低 30%)。

这种方法对双股 DNA 较稳定。而且又能使单股 DNA 自身碱基的结合打开来, 形成圆滑弯曲单股 DNA。因此可以精确地测量出单股 DNA 的长度。由于单股 DNA 比双股来得细, 并且有时多少形成结, 所以也能区分开双股 DNA 和单股 DNA。同时也可观察到双股 DNA 和单股 DNA 区域的连结形状, 可区别是“缺失”突变还是“替换”突变。

3. 甲醛法: 这种方法可以克服下相溶液对 DNA 分子长度的显著影响。由于同一种材料不同作者采用下相溶液不同, 其长度也报道不一。为了避免这些影响, 可在下相溶液中加入 0.5% 的甲醛。从而就大大降低了长度对下相溶液的依赖性。

展层过程的方法:

1. 皿碟法: 可参阅微生物学报 1976 年 1 期 7-11 页。

2. 水流法: 这个方法是 Inman, R. B. 等在研究 DNA 部分变性时对皿碟法进行简化建立的(见图 1)。在聚四氟乙烯板上放一滴重蒸馏水(1.2 毫升), 在水滴的一端插入一根直径 0.3 厘米带尖的清洁玻璃棒, 通过液面接触板面。用 0.1 厘米内径的毛细管吸取 0.005 毫升的展层液, 通过玻璃棒滑到水滴表面。把玻璃棒小心地从水滴边缘拿开, 再用细针尖注射器从水滴中吸出 0.1 毫升水, 以便压缩蛋白膜表层。

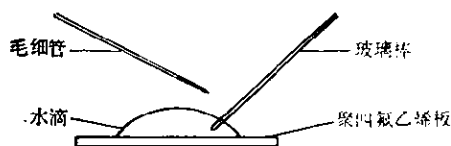


图 1

然后, 用制好的网膜在接近玻璃片蛋白膜上, 水平方向蘸取。每蘸取一次要相隔一个网膜。因为网膜与蛋白层的吸附力远远大于蛋白层与下相溶液表层的吸附力, 这种吸附叫做“化学吸附”。所以蘸取上就不易脱

落。用无水乙醇或异戊烷两次(10秒)脱水后,风干。进行电镜观察。

(二)扩散过程

核酸是在蛋白单分子层形成以后,才从核酸溶液中扩散并吸附到蛋白单分子层下表层。

扩散过程也同样需要展层溶液和下相溶液,所不同的是:在展层溶液中,有与扩展过程相同的含有碱性球蛋白的高浓度盐(或不含盐类)溶液,但是不加入试验材料(如核酸),而在下相溶液中加入试验材料。下面介绍两种方法。

1.“钢针法”:用一条钢针,使之浸入1%的水溶性蛋白溶液,随后很快抽干,这时,钢针包有一层干蛋白,在下相溶液表面上放上少许滑石粉,然后,在滑石粉颗粒层中心位置,把钢针轻轻插入,滑石粉颗粒向四周移动,通过滑石粉的移动可以看出蛋白层形成。最后,把针按进下相溶液。待核酸扩散后即可蘸取。也可用钢针直接浸粘亲水力强蛋白干粉,用同样方法,使得固体颗粒漂浮在下相表面,随后颗粒本身就会形成蛋白层。

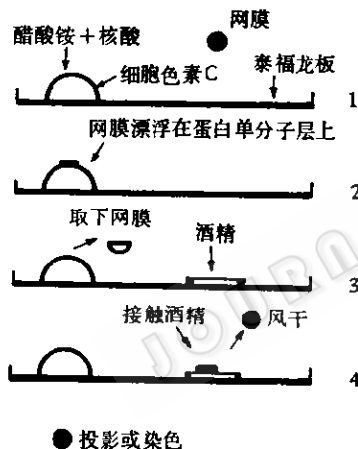


图 2

2.“小滴法”(见图2):在具有疏水性强的聚四氟乙烯板上,滴一滴含病毒颗粒或含核酸的溶液,随后用针蘸取细胞色素C的水溶液(50%),并触及液滴表面,使之在液滴表面形成蛋白膜。液滴中的核酸不断向液滴表面扩散并吸附到蛋白膜上。

二、蛋白层制作要求和蛋白的选择

无论是扩展过程,扩散过程或释放过程,核酸必须吸附在100 Å左右厚的蛋白单分子层上。它们的性能好坏直接关系到蛋白单分子层技术的成败。所以必须创造一定的制备条件。(1)要防止污染,如油污、空气中的尘土常常影响单分子层很好形成,所以要作好工具的清洁和房间的防尘,下相溶液准备好后马上就展层。下相用重蒸馏水。(2)如果使用蛋白变性剂来释

放核酸要采取适当的展层方法,使碱性蛋白与变性剂接触的时间尽量缩短以防碱性蛋白受到破坏。如果使用碱溶液,与碱性蛋白混合前,先用磷酸二氢钠等进行中和。蛋白展层有一个过程,需要停放一段时间。

待单分子层完全形成好后,再取样。否则,在尚未形成完整单分子层之前取样,核酸丝状物呈流动状态,不能很好地反映出核酸本来的性状。蛋白展层要适宜,一般是以1毫克蛋白展成1平方米的面积为好。因此,必须用玻璃棒或滑石粉调节蛋白膜的面积,使之蛋白膜呈现聚合状态,并且键结合稳定。

测量单分子层机械性能的方法,一般是采用平面天平,平面天平有两种,一种是水平型,一种是垂直型。这里介绍一种改进的简单的垂直平面天平。滤纸漂长度为4.9毫米,高30毫米左右,在漂的上端涂上石蜡,并且垂直勾在扭力天平上,下端通过蛋白膜浸到下相溶液中,当向上提滤纸漂时就可测出平面压力 π (达因/厘米)。通过压缩和减压膜的面积,可以绘制出平面压力与膜面积的坐标。图3是细胞色素C膜平面压力/面积曲线。

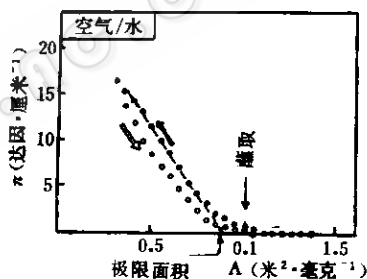


图 3

黑点线是压缩曲线,白点是减压曲线,通过这个坐标,测出 π 值就可计算出所需要的面积。如果沿着压缩线外推,直到零平面压力,就可以得到极限面积,这就是聚合的蛋白膜极限试验面积。蛋白层扩展时,总是接近1米²/毫克这个值,当我们没压缩蛋白膜之前就蘸取样品,其面积是极限面积,而这个极限面积小于1米²/毫克。

碱性蛋白物质的选择:所选择的蛋白质物质要附合几个要求,(1)具有充分扩展性能的球状蛋白;(2)扩展的膜层能在下相溶液液面上形成变性表层;(3)所形成的膜是由聚蛋白键的伸展而成的分子网,能较好地与核酸结合。具有橡皮性能。前面提到的细胞色素C是具备这些性能的。许多工作者都采用细胞色素C作为展层蛋白。使用量一般在100—200微克/毫升。除此之外,不少人还选择了诸如:胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、甲基蛋白、溶菌酶、核酸酶等。

三、增加反差的方法

为了清晰地观察到核酸物质,必须采取必要的方

法增加反差。方法不外乎下面两种。

(一) 染色法

用不同浓度的醋酸双氧铀等进行正染。

在核酸的电镜技术研究中,除少数人采用 1% 甲酸铀的 95% 乙醇溶液染色外,多数人采用 $1 \times 10^{-3}M$ 的醋酸双氧铀的 90% 乙醇溶液。

具体方法:先在 0.05N 盐酸水溶液中配成 0.05M 的盐酸双氧铀,或 0.05M 的醋酸铀。作为贮藏液在暗处保存。在使用前一小时内,用 90% 的乙醇稀释 1000 倍,得到新鲜的 $1 \times 10^{-5}M$ 的染色溶液。染 30 秒钟,然后用异戊烷或无水乙醇脱水 10 秒钟,风干。在观察附着在核酸上的酶物质,除用醋酸双氧铀正染外,还要用磷钨酸进行负染。但是,染色法经常使样品背景出现大量的氧化铀沉淀物,造成标本污染。特别对甲酰胺技术制备的样品,染色效果较差。非得用暗场电镜才能观察。

(二) 投影法

当网膜上以一定角度喷涂一层重金属,如果网膜比较平整,就可得到厚度均匀的金属层,当样品存在时,其样品周围就会大量堆积金属,一方面增加电子束的散射作用,提高反差强度。同时也会增加样品宽度,提高样品的能见度。这个方法比起染色法效果要好,见图 4(1)。



图 4(1)

它们可分成旋转投影和定位投影,定位投影又可分成多次和一次投影。

旋转投影:是核酸研究中常使用的方法,见图 4(2)。

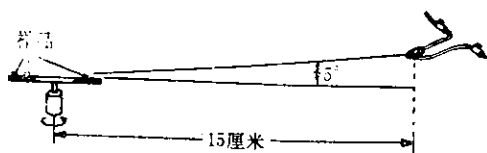


图 4(2)

旋转投影不仅能增加反差效果,投影均匀,不呈现反差很强的影子[见图 4(3)],而且能清晰地观察到核酸外状物的螺旋和核酸分子的走向。



图 4(3)

定位投影,在没有旋转投影设备的条件下,采用不同角度的二次或多次投影,也能得到满意的效果。特

别是对螺旋较少的核酸分子,反差比较好。但是有一定不足之处,由于两次或多次蒸发的金属量不一样,造成投影不均匀。特别是对材料颗粒释放核酸的观察,由于空壳和大颗粒的存在,投射影子很长,遮盖住核酸分子,所以容易失去所见核酸分子的完整性。一次定位投影,对于螺旋少的线状核酸分子或环状核酸分子,效果好,反差很强,但是材料密度不能太大。否则也会影响反差。

染色和投影好坏直接影响反差,但是影响反差的因素是多方面的。例如,展层溶液和下相溶液的离子强度不同,也会影响反差的,一般来讲醋酸铵浓度在一定范围内增加,反差随之增加,但是如果下相溶液醋酸铵浓度在 0.5M 以上时,核酸就不能或很少吸附到膜网上。另外一些蛋白变性剂存在降低反差。对于甲酰胺技术,增加甲酰胺浓度可以增加反差,85% 的甲酰胺对双股 DNA,95% 以上的甲酰胺对单股 DNA 反差效果都很好;当碱性蛋白较少的情况,利用这种性能可以用来区别单股和双股 DNA。

四、核酸分子观察和长度测量

为了达到不同的观察目的,可采用不同的放大倍数。观察核酸物质所附着的酶系或精确地绘制缺失突变的缺失区域的位置等就需要高倍放大。对核酸分子长度的观察,就得需要低倍放大。因为低放大视野面积大,可以观察到大量的核酸,一般在 5,000—10,000 倍放大范围就可以了。

核酸分子长度计算:电镜负片经过 8 倍以下的光学放大,制成正片,然后用地仪图描述核酸分子。也可把负片投影在纸屏上,直接在纸屏上描述核酸分子,测出长度后用精确的放大倍数除,就得到实际分子长度,这个方法比光学放大照片的方法优越。

按理讲,核酸分子长度应该均一的,但是许多因素的影响,最后测量的长度都有一定的偏差,例如 TMV 病毒 RNA 没有断裂的分子平均误差可达 15%,所以我们说明某种核酸的长度时必须采用统计值,也就是在适当的条件下得到一个较好的平均值来说明。在测量时,必须测量 50—200 条的核酸片断,有的测量 1,000 条以上。长度的测量经常是在坐标纸绘制出坐标图来表示。例如可绘制成长度分布图,即长度与每间隔的分子数量,或长度与总分子数的百分比比例绘制坐标图。

影响核酸分子绝对长度的主要因素和校正办法:

电光放大的误差,通常生物标本电镜照片的放大倍数是从电镜特有的中间电流与放大倍数的座标查出就可以了。虽然有误差影响不大。但是对于长度测量影响就严重了,所以须在观察核酸的同样条件下,用晶格复型或 Letax 乳胶粒重新测量放大倍数。也可以用晶格复型校正 Letax 乳胶粒,然后把乳胶粒放在标本网上,在观察核酸的同时就可测量出电光放大倍数。

(上接第 26 页)

异源双股体方法今后可以在噬菌体 DNA 方面广泛应用。戴维斯用这个方法通过电镜观察,能绘制出基因重组图,直接确定了缺失突变的真实的物理位置。这是因为野生型噬菌体和缺失突变型噬菌体的 DNA 分子混合后使双股遭到分离,经反复退火处理,最后可得到一些类型的双股再生分子和一些异源双股体分子。异源双股体分子,其中一股是野生型 DNA,另一股是缺失突变型 DNA。这样在缺失存在的位置上野生型 DNA 股就会出现一个单股环,在一定的电镜制备条件下,单股环呈现 T_2 噬菌体 DNA 那样的树丛状。它们的位置与双股区的关系可以精确地测量出来。

典型异源双股体制备方法是在小管 (6×50 毫米)中依次加入 10 微升 0.1M 的乙二胺四醋酸 (EDTA) ($\text{pH } 8.2$), 15 微升 5M 的氯化钠, 46.6 微升水, 5.1 微升 λC_{136} 噬菌体溶液 ($A_{260} = 10.0$), 3.4 微升的 $\lambda\text{b}_2\text{C}_1$ 噬菌体溶液 ($A_{260} = 14.2$) 和 10 微升 1N 氢氧化钠, 混合液 ($\text{pH } 13$) 在室温放置 10 分钟。随后在冰浴中冷却。在碱性溶液条件下,噬菌体溶解并且 DNA 分子

分离呈单股。溶液用 10 微升 2M 磷酸二氢钠调成中性 (最后溶解体积为 100 微升)。70°C 水浴中加热 30 分钟,随后立刻冷却,在这种条件下 DNA 50% 以上再生,同时有极少量的单股碎片和少量高聚合物。并只用其中一种类型噬菌体 DNA 作对照试验。

经过处理的溶液被制成含有 0.5 微克/毫升的 DNA 和 0.1 毫克/毫升的细胞色素 C 的 0.5M 的醋酸铵的展层液 ($\text{pH } 7.9$), 下相溶液为 0.15M 醋酸铵 ($\text{pH } 6.5$) 展层后用火棉胶膜网蘸取,以 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 的醋酸双氧铀乙醇溶液正染或铂钨合金投影,进行观察。

以上试验所得到的结果往往不是我们所理想的。这是因为经常在理想的制备中有 30% 以上的再生分子的树丛状单股出现在一端或两端 (端丛), 这些树丛状单股不是缺失突变引起的,而可能是退火不完善或单股叉的出现造成的。通过大量的异源双股体制备过程没有端丛的再生分子中,接近一半是内部树丛。在对照试验中,再生分子也能出现 5% 以下的内部树丛。

异源双股体方法不仅能研究异源核酸,而且利用这种方法研究同源核酸。