

核酸电镜术简介*

龚启蕙

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

当前在核酸分子的生物化学方面已有比较深入的研究,而用电子显微镜来观察核酸分子及其变化的工作正在不断发展,这方面的研究以及技术上的改革层出不穷。限于篇幅,这里只能结合自己的工作将核酸电镜的一些主要方法和用途介绍一下。Ferguson和Davis(1978)的“核酸定量电镜术”^[1]描述了这些方法的改进和应用,Evanson(1978)在“病毒核酸电镜术”^[2]一文中详细介绍了实验方法、器皿、辅助药品以及有关参考资料。

一、蛋白质薄膜技术

硷性蛋白膜的方法是由Kleinschmidt等(1968)^[3]发展出来的。核酸分子带负电荷,在带有正电荷的硷性蛋白质单分子层上铺展的时候被吸附,并包裹在其中。铺展步骤可使核酸分子从三度空间构型变成二度平面构型,而且核酸细丝能伸展开来。包裹核酸的变性蛋白的厚度可达80—100 Å,这厚度在铀离子染色或重金属投影以后很容易观察到,并能跟踪它的长度。

在早期的技术中,将DNA溶解在细胞色素C的水溶液中进行电镜制样,可以观察到双链DNA呈现为平滑的、伸展的细丝,而单链DNA由于硷基的随机相互作用,呈现为聚集的灌木状。

Westmoreland(1969)^[4]和Davis等(1971)^[5]用甲酰胺代替水溶液,使硷基的随机作用不稳定,因而单链DNA也能伸展,所以单链DNA呈现比双链DNA更细更弯曲的细丝。

Ferguson和Davis(1978)^[1]比较了水溶

液方法和甲酰胺方法。用水溶液硷性蛋白膜方法制备 ϕ X174RF II型双链DNA,呈现为伸展的,而单链 λ DNA由于硷基的随机相互作用,呈现为聚集的灌木状。用40%的甲酰胺硷性蛋白膜方法,则单链 λ DNA线状分子能很好的铺展。我们用50%的甲酰胺制备同源双链分子,观察到单链比双链更细更弯曲^[6]。

这样一来单链分子能很好伸展,就扩大了使用范围,不只是停留在核酸分子的观察和长度测量上,而可以对以下的工作进行研究:突变种分子的缺失和取代,部分序列的同源,DNA复制形式,RNA转录复合物,DNA上互补RNA序列的制备等等。

1. 水溶液方法(铺展法)

铺展溶液含有:0.1—0.5微克/毫升DNA,0.05毫克/毫升细胞色素C,0.55M醋酸铵(pH7.5),将大约35毫升底相液,即0.2M醋酸铵(pH7.5),放在一只直径6厘米的塑料碟子中。用一根(12×1.5×0.5厘米)泰氟隆棒沿着塑料碟子两边向前推动液面,在圆面的三分之二处搁置不动,将一片载玻片一端插入塑料碟子底部,其中部靠在泰氟隆棒上形成一个斜坡,然后用针筒——毛细管吸取50微升铺展液,在液面上1厘米处将溶液在30秒内慢慢地滴完,蛋白质薄膜就会在1—5分钟后形成,用Parlodion膜或Formvar膜复盖的铜网在离载玻片1厘米的液面上捞取样

* 本文经匡达人教授审阅,特此致谢。

复旦大学遗传所汪训明,解放军某部郑荷花对本文编写提供宝贵意见,特此致谢。

品, 在 90% 酒精中洗涤 2—3 秒, 以除去底相液的盐, 浸入 $1 \times 10^{-4} M$ 醋酸铀/90% 酒精 (此染色液是用溶于 50mM 盐酸/ $5 \times 10^{-2} M$ 醋酸铀 90% 酒精的贮备液在 1 小时内稀释而制得), 染色 30 秒左右, 在 95% 酒精中洗 2—3 秒, 用滤纸轻轻吸干, 在空气中干燥后用铂—钨或钨——钨合金投影。

2. 甲酰胺方法(铺展法)

铺展溶液含有: 0.1—0.5 微克/毫升 DNA 50% 甲酰胺/0.1M Tris (由 Tris-OH 加 HCl 调至 pH8.5)/0.01M Na_3EDTA (由 Na_2EDTA 加 NaOH 调至 pH8.5)/0.05 毫克/毫升 细胞色素 C。甲酰胺很容易变酸, 故应该配置在较好缓冲作用的溶液中。底相溶液中甲酰胺浓度一般比铺展溶液中的要低 30—35%。底相溶液组成是: 15% 甲酰胺/0.01M Tris (pH8.5)/0.001M Na_3EDTA (pH8.5)。此底相液必须在使用前迅速配成 (五分钟内或更短时间)。铺展方法、染色、投影等均照水溶液铺展法进行。

二、无蛋白质的铺展技术

用细胞色素 C 硷性蛋白膜方法铺展 DNA, 能使 DNA 变粗至 100 Å 左右, 在电镜中容易观察到。但是要观察 DNA 的一些表面特征, 如研究酶或蛋白质与 DNA 形成的复合物, 就不能再包裹一层蛋白质, 因此就发展了如下几种无蛋白质的铺展技术。

1. BAC 方法:

BAC 是苄二甲基烷基氯化铵 (Benzyl dimethylalkylammonium chloride) 的缩写, Volenweider 等 (1975)^[7] 已经证明用它代替细胞色素 C, 对单链或双链 DNA 进行无蛋白质的铺展, 由于 BAC 的分子量 (340—368) 比细胞色素 C 的分子量 (13000 左右) 小, 它在 DNA 周围形成膜的厚度为 50—60 Å, 所以能对大肠杆菌 RNA 聚合酶—T₇ DNA 复合物进行观察。电镜制样既可以用铺展法也可以用扩散法。

BAC 微滴扩散法, 0.1 微克/毫升单链或双

链 DNA/2.5 × 10³% BAC/5.3M 尿素/1.3% 甲酰胺/3mM 三乙醇胺 (pH7.9)。50—100 微升溶液滴在清洁的泰佛隆棒上面, 用塑料碟子盖好, 10 分钟后用碳膜复盖的铜网与液滴面接触 2—5 分钟, 捞取样品, 水漂洗 5—10 分钟, 以减少 DNA 分子的纠结, 在 95% 酒精中浸 2—3 秒, 用滤纸将水迹吸干, 放在培养皿中空气干燥, 铂—钨投影。贮备液是 0.2% BAC 甲酰胺液, 能在室温中保存。

2. 添加染料法(溴化乙啶):

Koller 等^[8] 介绍一种添加染料方法, 使双链 DNA 可被吸附到碳膜上而且能观察到。染料有溴化乙啶, 二碘丙啶, actinomine 等, 其中溴化乙啶已被广泛应用: 配制溴化乙啶 200 微克/毫升左右/DNA 0.05—0.5 微克/毫升/0.01M 磷酸缓冲液, pH 7.8。用微滴扩散法, 用新鲜制备的碳膜捞取样品, 水洗、酒精脱水, 空气干燥, 然后铂—钨合金投影。

3. 直接观察法:

Griffith (1973)^[9] 介绍一种直接观察赤裸的 DNA 和 DNA-蛋白质复合物的方法, 这方法涉及到 DNA 吸附在辉光放电后的碳膜铜网上。具体操作如下: 碳膜铜网放在真空镀膜仪中, 真空度 0.06—0.3 毫米汞柱, 碳膜铜网放在电压为 10000 伏左右, 距离为 10—15 厘米的两电极之间, 一环状铜棒电极用锡铂纸包裹, 放电时间 2—3 分钟即可。处理过的碳膜在 1 小时内使用有效。然后按微滴扩散法捞取核酸样品, 无水酒精脱水、干燥、金属投影。

三、长度测量及分子量的确定

电镜底片经投射仪放大 13—15 倍, 描绘其图形, 用五一式指北针中的里程表测量长度。

DNA 分子的总长随着实验条件而有很大的变化, 例如底相溶液的离子强度、底相溶液变性剂的存在和产生膜的蛋白质类型。对这些条件单链长度比双链更敏感。因此在铺展分子时要加入标准分子量的已知分子, DNA 分子

的长度按标准的相对长度来测量,而未知分子的分子量,则按经验公式计算,双链分子每微米长度约为 2.07×10^6 道尔顿,单链分子为 1.2×10^6 道尔顿。

实验的误差与样品的均一性有关,一般测量 20—100 个分子的长度,其标准误差在 5% 以下,这样基本上反映该分子的平均长度。平均长度数据通常用分子量对间隔的长度作方块图来表示。

四、RNA 的制样方法

双链 RNA 能用双链 DNA 的同样方法进行电镜制样,操作要小心,避免受 RNase 的降解。单链 RNA 分子内的相互作用很强,经常出现许多二级结构,使 RNA 分子不能很好地伸展,造成长度测量困难,因而要用化学变性剂甲醛、尿素、以及专一与鸟嘌呤碱基起化学作用的乙二醛,分别同甲酰胺一起来消除氢键之间的相互作用。乙二醛-甲酰胺的方法是 RNA (10 微克/毫升)对 0.5M 乙二醛/0.01M 磷酸缓冲液 (pH7) 在 35°C 透析 1 小时, RNA 浓度稀释 20 倍,用硷性蛋白质甲酰胺术铺展,染色、投影、电镜观察。

五、异源双链术

将两根既有相同序列、又有一些不同序列的双链 DNA 分子放在一起,加硷使两者分别变性,随后在甲酰胺中复性,得到一种“杂交”分子,从而可以看出链上取代和缺失的位置。这种方法称为异源双链术,所得到的杂交分子称异源双链分子^[1]。

实验方法如下:各取 0.25 微克两种双链 DNA 分子(例如两种不同的 λ 噬菌体 DNA),用重蒸水稀释到 39 微升,待充分混和后加入 1 微升 1M Na_4EDTA (加 2 克分子的 NaOH 到 1 克分子 Na_2EDTA 溶液中配置而成),加 5 微升 1M NaOH,在室温 25°C 下放置 10 分钟使之变性,这时不宜震荡样品,以免单链断裂。加 5 微升 2M Tris-HCl (pH8.5) 以中和

DNA 溶液,在室温下加入 50 微升甲酰胺,在 1 小时左右进行复性。将样品置于冰浴中冷却,立即以硷性蛋白质甲酰胺铺展术进行电镜制样。图 1 显示两个噬菌体突变株 DNA 之间的异源双链分子。

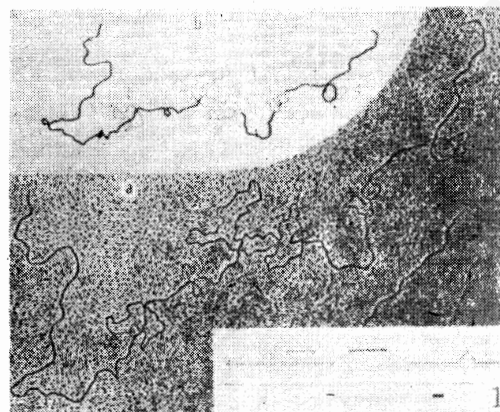


图 1 两噬菌体突变株 DNA 之间的异源双链分子

a. λ a 200b189 bio69 CI 857 nin5 DNA 和 λ imm434 DNA 间的一条异源双链分子 (在 40% 甲酰胺中制得)。

b. 是 a 的图解,区域 1 为 200 重复区;区域 2 是 b189bio69 与 λ 的非同源区;区域 3 是 imm434/ λ 非同源区;区域 4 是 nin5 缺失区。(引自 Thomas 和 Davis, 1974)^[11]。

如果用环状双链 DNA 进行异源双链术时,必须使其中一根单链断裂。这可用 DNase 将双链的一链断裂,也可以在溴化乙啶存在时用可见光打断单链,最好的方法是用限制性内切酶处理,从而得到线状双链 DNA,然后再进行异源双链术。图 2 是环状重组质粒 PCB2^[12]经 EcoR1 限制性内切酶处理后与 λ F₂ 的线状片段构成的异源双链分子的一例。

六、DNA 的部分变性

用硷或高温处理 DNA 样品,使双链 DNA 在 A + T 丰富的区域因变性而拆开 (呈单链环区域),而 G + C 丰富区域不易拆开,仍然呈双链形式,这称 DNA 的部分变性。这种部分变性的区域作为研究分子其它特征的参照点,例如表明限制性内切酶的专一切点,确定 DNA

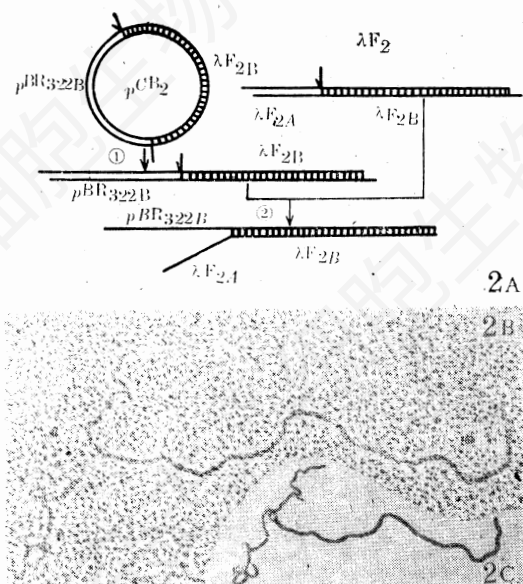


图2 重组质粒PCB₂与λF₂的异源双链分子

A是异源双链分子构建的示意图, 环状PCB₂重组质粒, 经EcoR 1限制性内切酶处理后(箭头①所示)得到线状片段, 与λF₂线状片段经变性和复性处理(箭头②所示)得到异源双链分子, 半箭头是BamH₁切点, 短线为EcoR₁切点。C是B的图解, B是异源双链分子电镜图。

复制的模型, 确定缺失、插入、突变的位置。双链DNA部分变性方法有好几种, 其中以硷变性和高浓度甲酰胺变性应用较广。现将高浓度甲酰胺变性方法介绍如下:

铺展溶液含有85%甲酰胺0.1M Tris-0.01M EDTA(pH8.5), 0.5微克/毫升DNA, 0.03—0.05毫克/毫升细胞色素C。在室温下放置2分钟, 按照硷性蛋白质薄膜甲酰胺铺展术立即制样, 将它在含有40%的甲酰胺, 液0.01M Tris-0.001M EDTA(pH8.5)的底相液上展开, 此底相液必须在使用前新鲜配置。

七、R-环方法

RNA和与其有互补序列的双链DNA杂交时, 会与双链DNA中的一链形成杂交链, 另一根单链DNA就无法形成双链, 从而产生一个环, 称R-环。实验方法是, 40毫微克DNA与40毫微克RNA处于20微升的下述溶液

中; 70%重结晶后的甲酰胺, 0.4M NaCl, 5mM EDTA, 80mM piperazine-diethane-sulfonic acid, pH7.4^[14]。在50—53℃下保温24小时。用硷性蛋白质甲酰胺术铺展, 染色、投影、电镜观察。

R-环方法常用于绘制DNA上能得到任意一条RNA编码序列。目前已广泛地应用于真核基因的插入顺序的研究。

Kleinschmidt等人在1959年创建的硷性蛋白膜技术为分子生物学家研究核酸问题开辟了一个新的领域。甲酰胺和其它变性试剂的引入能观察到单链核酸, 以致更加扩大了这一技术的应用范围。看来今后的趋向是, 用高分辨率的膜(例如BAC)来代替细胞色素C, 改进将裸露的核酸吸附到膜上的方法, 以及使用高分辨率的暗视野电子显微镜来观察不染色、不投影的核酸分子。

参考文献

- [1] Ferguson, J., R. W. Davis, 1978. in *Advanced Technique in Biological Electron Microscopy II*. Kochler, J. K. (ed). p. 123—171.
- [2] Evenson, D. P. 1978. *Methods in Virology VI*. Maramorosch, K., Koprowski, H. (eds). p. 219—264.
- [3] Kleinschmidt, A. K. 1968. *Methods in Enzymology. XIIB*. Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (eds). p. 361—377.
- [4] Westmoreland, B. C., W. Szybalski., H. Ris, 1969. *Science* 163: 1343—1348.
- [5] Davis, R. W., M. Simon., N. Davidson, 1971. *Methods in Enzymology. XXI* Grossman, L., Moldave, K. 413—428. (eds).
- [6] 龚启蕙、居其达、王妙珠、匡达人 实验生物学报 14: (在排印中)。
- [7] Vollenweider, H. J., J. M. Sogo., T. Koller, 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 83.
- [8] Koller, T.; J. M. Sogo, H. Bujard, 1974. *Biopolymers* 13: 995—1009.
- [9] Griffith, J. D. 1973. *Methods Cell Biol.* 7: 129.

(下转第40页)

胞团光滑的边缘开始不整齐了,部份的边缘细胞形成伪足伸展于玻璃表面,伪足以变形运动移动,有的伪足长而宽(图3),以后逐步分化成各种类型的细胞。胚胎细胞数目不同,分化情况也不一样。20个细胞的团块一般难以养活,不易在玻璃上紧贴,绝大多数团成球形,2—3天后就解体;有极少数即使在开始两天能粘住玻璃,但到第三天就立即缩回成圆球,不能继续向外生长,分化也就不能进行。50个细胞团有部分能很好地贴壁,而且能进一步向外扩展,分化成很好的成纤维细胞(图4)。这种细胞是棱形或星形的、有突起,许多细胞的突起可以相互连接,它具有透明的不含内含物的原生质,细胞核常为椭圆形,它们和哺乳类或鸟类培养的成纤维细胞很相似,一般能生存7—10天左右。100个与100个以上的细胞团,绝大部分都能粘在玻璃上,培养6整天就能见到分化很好的脊索细胞(图5、6)、大量的肌细胞与成纤维细胞。图6是一个放大600倍的脊索细胞,其特点是整个细胞边缘附着于玻片,细胞体扁平,核偏于细胞的一端,核的周围有大量的卵黄,核膜外围有囊泡。肌细胞细而长,细胞体形如一个纺锤体,核通常位于细胞的中央,两边的细胞质中有卵黄。在培养中分化得好而培养时间长的尚能见到部分细胞有横纹,但大部分细胞看不到横纹。大量的肌细胞常形成一片(图7)。在图8中可以清楚地看到核与核仁,另外,还能看到一类肌细胞沿着细胞表面有着丰富的精细的突起,像细胞质发附着于玻璃,这些细胞称为发状肌细胞。

三、讨 论

众所周知,细胞培养方法有多种多样,如

表玻璃法、玻璃瓶法、悬滴法、转管法等,但是都不适合于两栖类胚胎少量细胞的培养。吴政安(1978'a)^[2]报道过使用GLPY培养基及修改的Eagle培养基对两栖类13种成体组织的组织块进行了培养,取得良好的结果。但根据两栖类胚胎细胞本身含有大量卵黄的特点,以及短期离体培养的要求,我们摸索了玻璃板小室培养法,初步实验结果证明这种方法对于培养50个以上的胚胎细胞大部分是可以进行分化的。一般可培养两周左右,这点与Deucher E. M. (1970')^[3,4]报告指出要使两栖类晚期原肠胚外胚层产生神经分化,至少需要100个外胚层细胞的结果是一致的。根据我们目前的结果同样认为培养的细胞数量不能少于50个,需要有一定量的细胞数目才能进行生长与分化。此外,该方法具有设备简单、耗材少、实验过程中进行一般消毒即可的优点,所以在没有专门的组织培养室的条件下也能进行培养,观察与照相都很方便。这方法存在的问题是细胞团培养在封闭的小室中,因而培液的更换比较麻烦。同时,培养细胞的数目是否还能减少,甚至能否达到单个细胞,这些都是还待进一步摸索与改进的问题,以便使该技术更适合于我们胚胎诱导研究工作的需要。

参 考 文 献

- [1] Jones, K. W. and Elsdale, T. R. 1963 J. Embryol. Exp. Morph., Vol. 11, part 1, pp. 135—154.
- [2] 吴政安 1978a 动物学报 第24卷第2期.
- [3] Deuchar E. M. 1970 Exp. cell Res. Vol. 59 341—343.
- [4] Deuchar E. M. 1970 Develop. Biol. Vol. 22 185—199.

(上接第46页)

- [10] Hsu, M. T., H. J. Kung., N. Davidson, 1973. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 943.
- [11] Thomas, M., R. W. Davis. 1974. J. Mol. Biol. 91: 315—328.
- [12] 匡达人、何俊坤、居其达、龚启蕙、王妙

珠、朱心良 1980. 实验生物学报 13: 289—295.

- [13] Davidson, N. 1978. in Ninth International Congress on Electron Microscopy. III. 587—594.
- [14] White, R. L., D. Hogness, 1977. Cell. 10: 177—192.

中国细胞生物学学会会章

第一章 总 则

第一条 中国细胞生物学学会(以下简称学会)是在中国共产党领导下,细胞生物学工作者自愿结合的学术性群众团体。是党联系细胞生物学工作者的纽带,是中国科学技术协会(以下简称科协)的一个组成部分。

第二条 学会的基本任务是在马克思、列宁主义、毛泽东思想指引下,贯彻党的路线、方针、政策,根据新时期总任务,团结细胞生物学工作者。积极开展学术活动,普及细胞生物学科学技术知识,为出成果,出人材,赶超世界先进水平,为在本世纪内尽快把我国建设成为农业、工业、国防和科学技术现代化的伟大的社会主义强国作出贡献。

第三条 学会要认真贯彻“百花齐放、百家争鸣”的方针,为繁荣科学技术,充分发扬民主,提倡各种学术观点和各学派间自由讨论。

第四条 学会的主要任务:

1. 积极组织学术交流活动,定期召开以学术活动为主要内容的年会,大力普及科学技术知识,出版“实验生物学报”和“细胞生物学杂志”等刊物;
2. 积极开展国际学术交流活动,发展同国外细胞生物学学术团体和科学家的友好联系;
3. 举办各种有关的训练班、讨论会和教学经验交流等活动;
4. 发动会员对党和国家的生产建设和科学技术政策、措施及发展方向积极地提出建议和要求;并推荐优秀人才;
5. 结合学会的活动,提倡自觉学习和运用自然辩证法。

第二章 会 员

第五条 凡拥护中国共产党,遵守中华人民共和国宪法,承认学会会章,并具有下列条件之一者,可申请为本会会员。

1. 高等院校毕业,在研究、教学、生产单位从事细胞生物学工作具有助理研究员、讲师水平者;或已具有相当工作经验和学术水平者。
2. 对本学科有关的科学技术革新和群众科学实验活动有一定的成就和贡献者。
3. 具有相当水平的科学和教育组织管理工作人员。

第六条 会员入会须由本人申请,本会一位会员介绍或有关单位推荐,经学会批准,并发给会员证。对于著名科学家和对科学技术有贡献者,学会常务理事会可直接授予名誉会员。

第七条 会员的权利和义务
权利:

1. 享有选举权,被选举权;
2. 对学会工作有建议、批评权;
3. 优先参加本学会有关的学术活动。

义务:

1. 遵守学会会章;
2. 执行学会的决议和学会所委托的工作;
3. 积极为本学会出版的刊物撰写学术论文、专著、科普作品和报告等;
4. 对党和政府的有关社会主义建设问题提出建议;
5. 缴纳会费(会费的金额和缴纳使用管理办法另定)。

第八条 会员可以声明退会。二年无故不交会费者即认为自行退会。会员如违反会章,情节严重者,劝其退会或取消会籍,被剥夺公民权者,其会籍自然取消。

第三章 组 织 机 构

第九条 学会的组织原则是民主集中制,学会的最高权力机构是全国会员代表大会。每2—3年召开一次。代表由学会会员民主协商选举产生。

代表大会的职责:

1. 决定学会的工作方针和任务;
2. 审查理事会工作报告;
3. 选举新的理事会;
4. 制定、修改学会会章。

第十条 学会在代表大会或会员大会闭幕期间,理事会是执行机构。理事会的职责:

1. 执行代表大会或会员大会的决议;
2. 制定学会工作计划;
3. 领导所属工作机构开展活动;
4. 召开下届代表大会或会员大会;
5. 组织学术鉴定委员会或小组推荐高水平学术论文,新型仪器设备装备和新技术,建议国家给予奖励。

理事会推选理事长一人,副理事长及常务理事若干人和秘书长、副秘书长组成常务理事会,在理事会闭幕期间,主持日常会务工作,负责行使理事会的职责。

理事长任期不得超过二届,理事任期不超过三届,每届改选理事人数约三分之一。理事会可推举名誉理事和聘请顾问。

省市自治区如会员较多,可成立地区性学会,作为该省市自治区科协的组成部分。

第十一条 学会理事会根据工作需要,可设立各种工作机构:

1. 学报和其它刊物编辑委员会;
2. 普及工作委员会。

也可组织各种专业委员会或专业小组,人选由理事会或常务理事会聘任。在理事会领导下,负责完成学会的各项任务。

第十二条 学会根据工作需要,设若干专职人员。

第十三条 本学会的挂靠单位为中国科学院上海细胞生物学研究所。

第四章 经 费

第十四条 学会经费来源

1. 国家资助;
2. 学会举办的各种事业收入;
3. 会员会费;
4. 个人或单位捐赠。

第五章 附 则

第十五条 本会章程经一九八〇年七月十二日至十七日在兰州召开的《细胞生物学学会》成立大会通过。