

用垂直凝胶脉冲电泳分离染色体 DNA

刘毅 沈岩 徐燕英 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所,北京)

提 要

脉冲电场凝胶电泳 (PFGE) 是近几年发展起来的一种分离高分子 DNA 片段 (50—10000kb) 的有效方法。包括正交场, 六边形场, 反向场和垂直胶脉冲电泳。本文改进了垂直胶脉冲电场 (TAFE) 的条件, 使酵母 DCo4 染色体电泳核型从 11 条带提高到 14 条。利用 TAFE 鉴定了蛋白酶消化法和 TLS 法制备的人基因组 DNA, 其分子长度主要分布在 200—450kb。

关键词 脉冲电场凝胶电泳, 染色体, 分离

传统的凝胶电泳是使 DNA 分子在连续的均一电场作用下通过凝胶, 利用凝胶对不同长度 DNA 分子阻滞作用的差异使 DNA 分子按片段长度分开。但分子量大于 50kb 的 DNA 片段只能在凝胶中泳动却无法得到有效的分离。近几年新发展起来的脉冲电场凝胶电泳使 DNA 分子在定期改变电场方向的凝胶系统中泳动。由于 DNA 分子在电场方向改变后重新定向所需的时间与其分子长度成正比, 故高分子 DNA 片段净迁移率降低。利用这一原理可以分离 50—10000kb 的 DNA 分子^[1]。PFGE 的电场设置方式有正交场 (OFAGE) 六边形场 (CHEF), 反向场 (FIGE) 和 TAFG。其中 OFAGE 开发应用最早^[2], 但近两年来 CHEF 和 TAFE 大有取而代之的趋势^[3,4]。这两种方法既有良好的分离效果, 又能克服 OFAGE 造成的 DNA 区带弯曲变形。可以同时分离多份样品。酵母 (*S. cerevisiae*) 的单倍体基因组约含 14000kb 染色体 DNA, 分布在 17 条染色体中, 长度在 200—2200kb 之间。酵母染色体存在长度多态性 (CLPs)^[5]。不同菌株的染色体 DNA 电泳区带数目和位置不同。本文讨论 TAFE 分离酵母 DCo4 染色体

的条件, 并利用 TAFE 鉴定了蛋白酶消化法和 TLS 法制备的人基因组 DNA 分子量。

材 料 与 方 法

1. 酵母菌完整染色体 DNA 的制备

本文所用酵母菌株 DCo4 为强伯勤教授惠赠。经丰富培养基 (YPD) 培养, 按 Carle 等的方法^[6]制备酵母完整染色体 DNA。用 1% 蜗牛酶 (中科院生物物理所生化厂) 代替 Zymolase。

2. 人基因组 DNA 的制备

实验所用的血液标本取自临床血液学检查剩余的抗凝全血。分别经蛋白酶消化法^[6]和 TLS 法^[7]制备白细胞的基因组 DNA。

3. TAFE 电泳

本工作使用 Beckman 公司的 Geneline™ 垂直凝胶脉冲电泳系统。脉冲电场的夹角平分线垂直于水平面, 凝胶直立于该角平分线上。在脉冲电场作用下, DNA 分子沿 115° 的脉冲角在凝胶厚度的方向上作折线式前进。凝胶体积为 10cm × 7.6cm × 0.64cm (高 × 宽 × 厚), 浓度 1% 琼脂糖 (BRL, 超纯)。缓冲体系为 10mmol/L Tris·Ac, 0.5mmol/L EDTA (pH

8.2)。电泳条件 I:恒流 170mA, 脉冲时间 4 秒钟, 电泳 30 分钟; 恒流 150mA, 脉冲时间 60 秒钟, 电泳 18 小时(此为厂家推荐的条件)。电泳条件 II:恒流 170mA, 脉冲时间 4 秒钟, 电泳 30 分钟; 150mA, 脉冲时间 60 秒钟, 电泳 12 小时; 脉冲时间 120 秒钟, 电泳 10 小时。

结果与讨论

由于酵母染色体 DNA 存在长度多态性, 所以不同菌株的酵母染色体核型不尽相同。表现为电泳区带数目和位置不同。但同一菌株的染色体电泳核型是稳定的, 可重复的。根据电泳和分子杂交结果可以把电泳核型划分为 9 个带区, 每个带区内含 1—3 条长度相近的染色体(图1)^[5,8]。在一些菌株中这些染色体可以被分成不同的电泳带, 而在另一些菌株中两或三条染色体 DNA 合在一起构成电泳带。

我们按照 TAFE 条件 I 分离酵母 DCo4 染色体 DNA 得到 11 条电泳带(图 1), 与文献[4]报道的结果一致。在 6 带区内有一条三联体带(triplet), 7, 8, 9 带区内各有一条二联体带(doublet)。为了使长度接近的高分子 DNA

更好地分离, 我们对电泳条件做了适当调整(条件 II)。增加了一步 2 分钟脉冲时间, 10 小时电泳。使电泳区带增加到 14 条(图 1)。

不同长度的 DNA 分子在脉冲场中分离的效果主要取决于电场强度和脉冲时间。在恒定场强的情况下, 若脉冲时间过长则 DNA 的迁移与常规电泳无本质差别。只不过是交替在两个电场方向下进行而已。不同长度的 DNA 无法得到有效的分离。若脉冲时间过短, DNA 分子同样得不到有效分离。只有脉冲时间恰当时才可利用不同长度的 DNA 分子重新定向所需时间的差别将其分开。使用 150mA 电流, 60 秒钟脉冲时间, 18 小时电泳可使 DCo4 染色体 1—5 带区内的 7 条染色体得到有效分离。但对 6 带区以上的 4 组长度接近的染色体分离效果不好。调整电泳条件, 增加 10 小时 2 分钟脉冲后, 6, 8 和 9 带区又各分离出 1 条带。其中

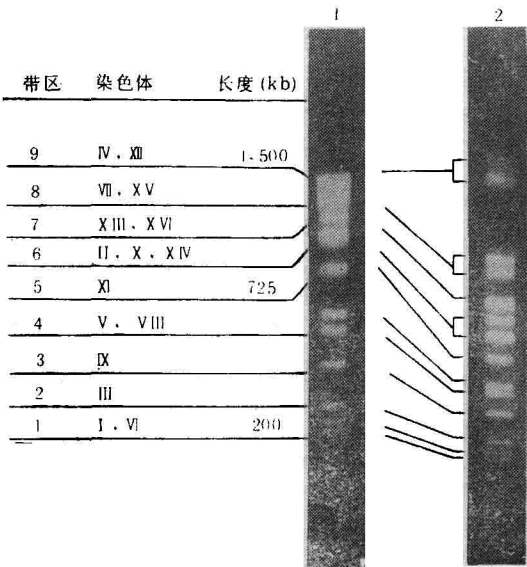


图1 酵母 DCo4 染色体电泳核型

1. 150mA, 60s 交变时间, 电泳 18h
2. 150mA, 60s 交变时间, 电泳 12h; 120s 交变时间, 电泳 10h

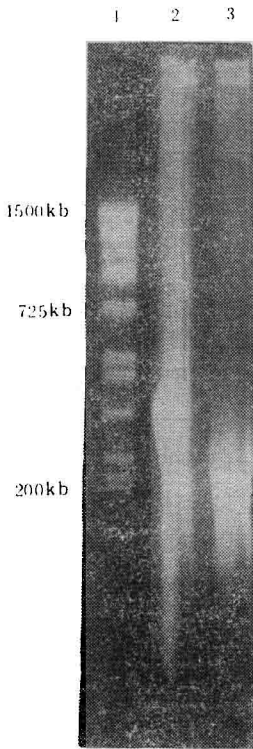


图2 蛋白酶消化法与 TLS 法制备人基因组 DNA 片段长度的鉴定

1. 酵母 DCo4 染色体电泳核型
2. 蛋白酶消化法制备的人基因组 DNA
3. TLS 法制备的人基因组 DNA

一种简便有效的菌落原位杂交法

肖蕾 田园 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京)

提 要

本方法采用国产定量滤纸代替硝酸纤维素膜进行菌落杂交筛选。省去了真空烤膜和预杂交操作。末端标记的寡核苷酸探针杂交所得结果具有较好的特异性和较强的放射活性。

关键词 菌落原位杂交, 定量滤纸, 寡聚核苷酸探针, 肿瘤坏死因子

菌落原位杂交法是重组 DNA 技术中最常用的方法之一。通过一定的方法将菌落转到硝酸纤维素滤膜, 将滤膜上的菌落在原位裂解, 使释放出来的 DNA 固定在滤膜上。最后借助同位素标记的探针筛选出带有目的基因的菌落^[1]。由于硝酸纤维素膜的质量会直接影响杂交结果的好坏, 目前国内所用的滤膜大都要依赖进口。

为克服这一不足, 我们摸索了滤纸杂交法, 得到较满意的结果。

材 料 与 方 法

一、材料和试剂

杂交所用滤纸为杭州新华造纸厂生产的双圈牌定量滤纸 (直径 9cm); [γ -³²P] ATP

IV 和 XII, VII 和 XV 号染色体均被分离。II 号染色体从三联体带中分开。XIII 与 XVI, X 和 XIV 号染色体由于长度接近依然未被分开。目前只有 CHEF 分离酵母 YNN 295 得到 16 条带。其它一些菌株在不同条件下一般只能得到 11—13 条带。本工作使酵母 DCo4 的电泳核型从 11 条提高到 14 条。

进行基因组 DNA 文库构建, 染色体 DNA 限制酶物理图谱分析等许多工作都要求制备高分子 DNA。但以往的凝胶电泳方法无法区分 50kb 以上 DNA 片段的分子量。我们利用 TAFE 分别鉴定了蛋白酶消化法和 TLS 法制备的人基因组 DNA 的长度 (图 2)。这两种方法制备的 DNA 分子主要分布在 200—400kb, 最高可达 1500kb 以上, 但也有部分 DNA 降解, 小于 200kb。

cystic fibrosis^[11]、MHC^[12] 等许多真核基因组结构的分析研究。对推动分子生物学和分子遗传学研究的发展将产生深远的影响。

参 考 文 献

- 1 Schwartz DC *et al.* *Cell*, 1984; 37: 67
- 2 Carle GF *et al.* *Nucl Acids Res*, 1984; 12: 5647
- 3 Chu G *et al.* *Science*, 1987; 234: 1582
- 4 Gardiner K *et al.* *Somat Cell Molec Genet*, 1985; 12: 185
- 5 Carle GF *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3756
- 6 方福德等, 中华血液学杂志, 1985; 6: 432
- 7 沈岩等, 生物化学与生物物理学进展, (待发表)
- 8 朱怡文, 实验生物学报, 1988; 21: 23
- 9 Burmeister M *et al.* *Nature*, 1986; 324: 582
- 10 Kenricks S *et al.* *Cell*, 1987; 48: 351
- 11 Collins FS *et al.* *Science*, 1987; 235: 1046
- 12 Dunham I *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7237

[本文于1989年4月11日收到]

目前 PFGE 技术已应用于 DMD^[9,10],