

交变脉冲电场凝胶电泳分离染色体 DNA 分子*

朱 圣 庚 黄 仪 秀

(北京大学 生物学系)

提 要

交变脉冲电场凝胶电泳是一种可用来分离染色体大分子 DNA 的新的凝胶电泳方法。通过交替采用两个不同方向的不均匀电场,使 DNA 分子在挤过凝胶筛孔时不断改变方向,从而获得大分子 DNA 的高分辨率电泳。本文报道用自行设计的交变电场电泳仪进行脉冲电场凝胶电泳分离酵母染色体 DNA,可分成 11 个条带。用自身连接的 λ DNA 作为分子量标准物,可分出 14 个条带。

基于分子筛效应的传统琼脂糖凝胶电泳只能分离分子量在 15—20 kb (约 10^7 道尔顿) 以下的 DNA 限制片段以及病毒和质粒 DNA 分子,更大的 DNA 分子彼此很难分开。这是由于 DNA 分子在凝胶介质中呈无规卷曲的构象,当 DNA 分子的有效直径超过凝胶孔径时,在电场作用下可变形挤过筛孔,此时其电泳迁移率不再依赖于分子大小。然而,细菌染色体 DNA 分子可达数千 kb,高等动、植物细胞染色体 DNA 的平均分子量在十万 kb 以上,采用常规的琼脂糖凝胶电泳是完全无法分离的。这对染色体 DNA 的分子生物学和生物工程研究无疑是一个极大的限制。

1983 年 Schwartz 等人根据 DNA 分子粘弹性弛豫时间(外推浓度为零时的迟滞时间)对分子量敏感的特性,设计了脉冲电场梯度凝胶电泳 (pulsed field gradient gel electrophoresis),交替采用两个垂直方向的不均匀电场,使 DNA 分子在凝胶介质中不断改变泳动方向,从而使不同大小的分子分开。其后 Carle 等人改进了这一电泳技术,并发现周期性倒转电场 (Periodic inversion of the electric field) 亦能使大分子 DNA 通过电泳有效地分开。目前国外

已有多种交变脉冲电场凝胶电泳装置问世。其基本原理为: 大分子 DNA 在电场作用下挤过较小孔径的凝胶介质时,将会改变无规卷曲的构象而沿泳动方向伸直,当电场方向改变时, DNA 分子必须改变其构象沿新的泳动方向伸直,而此转向时间与其粘弹性迟滞时间有关,并显著依赖于分子大小。

我们采用自行设计的交变电场电泳仪 (由江苏兴化分析仪器厂生产),对 Lambda DNA (48.5 kb) 聚合物和酵母染色体 DNA 进行了正交(沿凝胶对角线)交变电场和倒转电场凝胶电泳,均获得较好分离效果。

实 验 方 法

1. Lambda DNA 的聚合 10 μ g Lambda DNA (Promega Biotec 产品), 10 单位 T₄ DNA 连接酶 (New England Biolabs 产品), 置于 50 μ l 反应液 (66 m M Tris-HCl, pH7.6, 5 m M MgCl₂, 5 m M DTT 和 1 m M ATP), 14℃ 聚合 24 小时,加 1/4 体积染料混合液 (25% Ficoll 或甘油, 0.1% 溴酚蓝, 200 m M EDTA, pH8.0)

* 国家自然科学基金资助课题。

终止反应。此自身聚合物可用作分子量标准。

2. 琼脂糖包埋酵母染色体 DNA 的制备

按 Schwartz 等人的方法作适当修改。1g 湿啤酒酵母加 4ml 含 1M 巯基乙酸钠的 0.1M Tris-HCl, pH9.3, 30℃ 保温预处理 30 分钟。离心收集酵母细胞, 用 1.2M 山梨醇, 0.01M 柠檬酸-磷酸氢二钠, pH 5.8, 0.1 M EDTA 溶液洗两次。将酵母细胞悬浮于 4ml 含 60 mg 蜗牛酶(生物物理所产品)的 1M 山梨醇, 0.02M 柠檬酸-磷酸氢二钠, pH5.8, 30℃ 保温, 随时取样镜检, 及至 95% 左右酵母细胞转变成原生质球时(约 40 分钟)放置冰箱中以停止反应。将原生质球悬液倒入 6ml 0.125 M EDTA 的 1% 低熔点琼脂糖溶胶(维持 38℃), 混合后倒入模子内, 并置冰箱中使其凝固, 然后切成小块, 浸泡在 NDS 溶液(0.01M Tris, 0.5 M EDTA, 1% SDS, pH 9.5 和 2mg/ml 蛋白酶 K)中, 50℃ 保温过夜。此包埋的 DNA 样品在 4℃ 可长期存放。

3. 交变电场凝胶电泳 将 10 × 10 cm 玻璃板放在模子内, 倒入 40 ml 0.5 × TBE 的 1.5% 琼脂糖溶胶, 插入梳子, 待胶充分凝固后, 取出凝胶(连同玻璃板), 放在正交交变电场凝胶电泳槽中(如图 1 所示)。加 1500—2000 ml 0.5 ×

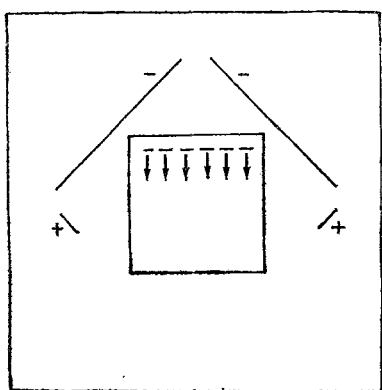


图 1 正交交变电场凝胶电泳槽示意图

TBE 缓冲液(1 × TBE = 90 mM Tris, 90mM 硼酸, 2.5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$, pH 8.2)液面高 1.5—1.7 cm。将 DNA 样品加入凝胶井孔内, 包埋样品切成合适大小的胶条插入井孔中, 每

一井孔约加 DNA 0.5—1 μg 。将电泳槽两对正负电极分别与交变电场电泳仪的左右正负电源输出接通。选择适当的电压强度和交变时间。电泳槽置于冷室或通冰水冷却, 电泳过程中缓冲液温度维持在 14℃。电泳完毕, 取出凝胶, 在 0.5 × TBE 含 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 菲啉溴红溶液中浸泡 20 分钟, 用 0.5 × TBE 洗, 然后在紫外灯照射下显示核酸条带, 用橙红色滤片照相, 曝光 15—20 秒。

倒转电场凝胶电泳可采用普通的琼脂糖凝胶电泳槽, 将交变电场电泳仪的左右两对电源输出正向和反向接在电泳槽的正负极, 使正向电泳时间大于反向电泳时间。其余操作与一般电泳相同。

结果与讨论

在上述实验条件下, Lambda DNA 聚合物经正交交变电场凝胶电泳可分出 14 个条带(图 2, 见封二)。各条带之间距离除中间部分略宽, 最后两条较窄外, 其余大体相等, 即在一定分子量范围内, 电泳迁移率与分子量成反比, 而不是象基于分子筛效应的传统凝胶电泳那样, 与分子量的对数成反比。

酵母细胞共有 17 条染色体, 其 DNA 在正交交变脉冲电场凝胶电泳中可被分成若干条带。样品 DNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶, 260—300 V (电位梯度约 10V/cm), 交变时间为 40Sec 的条件下经脉冲电场凝胶电泳分出六个条带, 更大的 DNA 分子(> 700kb) 不能分开, 成为一坨(图 3a, 见封二)。将交变时间增至 60Sec, 样品 DNA 分成十一个条带, 不再有成坨现象(图 3b, 见封二)。交变时间增大到 85Sec, 条带数大致相同, 分布较为均匀一些(图 3c, 见封二)。琼脂糖浓度下降至 1%, 对于分子量较大的 DNA 分离效果比较好(图 4 a—c, 见封二)。

与传统的凝胶电泳不同, 在交变脉冲电场凝胶电泳中, 电泳电压对大分子 DNA 的分离有明显的影 响。在 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 电泳电压降至 120V, 交变时间为 60Sec, 分子量较大的染色体 DNA 不能彼此分开(图 5。见封二),

用银染色显示的 rHuIFN- α D 垂直板聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定法*

张 向 明

(中国药品生物制品检定所,北京)

提 要

本文报道了用聚丙烯酰胺垂直凝胶板进行蛋白质等电聚焦的方法,用改进的银染法使测定灵敏度达到 ng 水平。通过分析蛋白质等电聚焦的影响因素,建立了稳定的电泳条件,并用该方法发现了重组人 α D 型干扰素 (rHu IFN- α D) 基因表达产物的带电荷不均一性。

等电点聚焦 (IEF) 具有非常高的分辨率,是测定蛋白质等电点 (pI) 的重要手段,是分析蛋白质纯度和组成不可缺少的参数,尤其对蛋白质中某些氨基酸变化非常敏感。用银染法显示蛋白 IEF 的结果,可使检测灵敏度比考马斯

亮蓝染色提高几十至上百倍。本文用普通凝胶电泳的垂直板电泳槽进行等电聚焦,并用改进的银染色法显示结果。测定了基因工程技术生

* 本文为国家七·五科技攻关项目“人基因工程干扰素”协作组的工作。

而当电压在 260V 时,这些 DNA 是可以分开的。推测这是由于一定分子量的 DNA 在不同电压下挤压过筛孔所需的时间是不同的,受到的阻力也不同。

酵母染色体 DNA 经交变脉冲电场凝胶电泳分开并用非啉溴红染色,除明显的荧光条带外,还有一些较弱的条带。不难设想,这是由于酵母染色体的多形态性引起的,即在一酵母群体中存在若干不同大小的同源染色体。由此可见,交变脉冲电场凝胶电泳可以方便地进行细胞核型分析,这称为电泳核型分析 (electrophoretic karyotype)。

交变脉冲电场凝胶电泳问世还不久,尚不十分成熟,在原理上也未完全搞清楚。它的潜力很大,原则上凡线性的大分子电解质均可采用此技术进行分析分离。对这一技术我们正在作进一步的研究。

交变电场电泳仪由张正本同志设计安装,孙相超同志参与电泳槽的安装,于永彬和郝福英同志帮助冲洗相片,我们在此向他们表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Schwartz, D. C. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1983, 47, 189.
- [2] Carle, G. F. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 5647.
- [3] Schwartz, D. C. et al.: *Cell*, 1984, 37, 67.
- [4] Van der Ploeg, L. H. T. et al.: *Cell*, 1984, 37, 77.
- [5] Carle, G. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 3756.
- [6] Van der Ploeg, L. H. T. et al.: *Science*, 1985, 229, 658.
- [7] Kemp, D. J. et al.: *Nature (London)*, 1985, 315, 347.
- [8] Carle, G. F. et al.: *Science*, 1986, 232, 65.
- [9] Bernards, A. et al.: *Gene*, 1986, 42, 313.

[本文于 1987 年 5 月 26 日收到]

《交变脉冲电场凝胶电泳分离染色体 DNA 分子》一文的附图

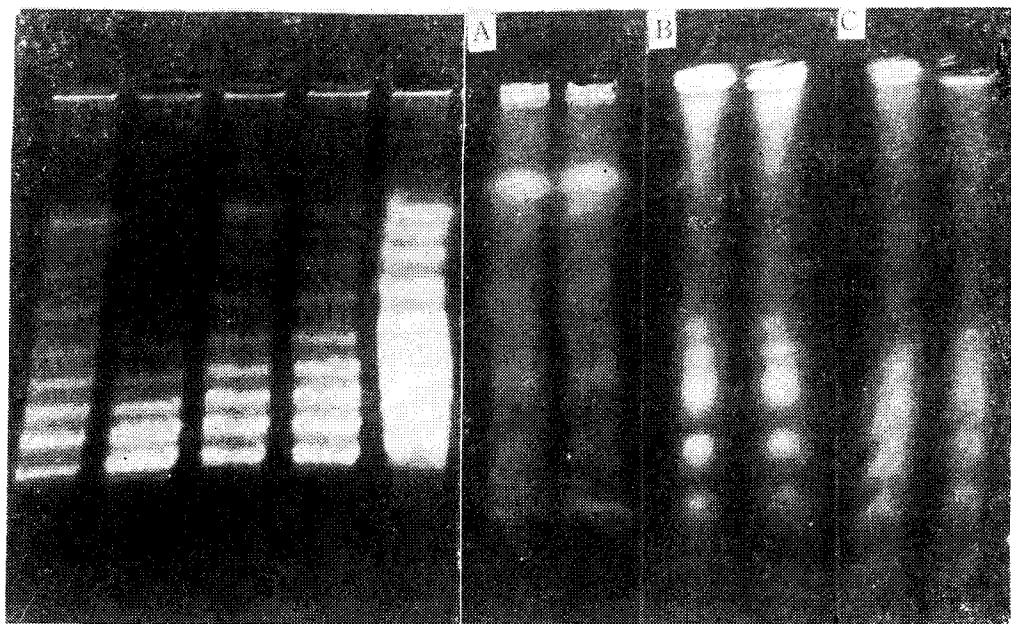


图2 Lambda DNA 聚合物的交变脉冲电场凝胶电泳

1.5% 琼脂糖, 0.5×TBE, 电泳电压 120V, 交变时间 40Sec, 14°C, 电泳 48h。照像条件见实验方法。

图3 交变时间对酵母染色体 DNA 凝胶电泳的影响

1.5% 琼脂糖, 0.5TBE, 电泳电压 260—300V, 交变时间分别为 40Sec(a), 60Sec(b) 和 85Sec(c)。14°C 电泳 9h。

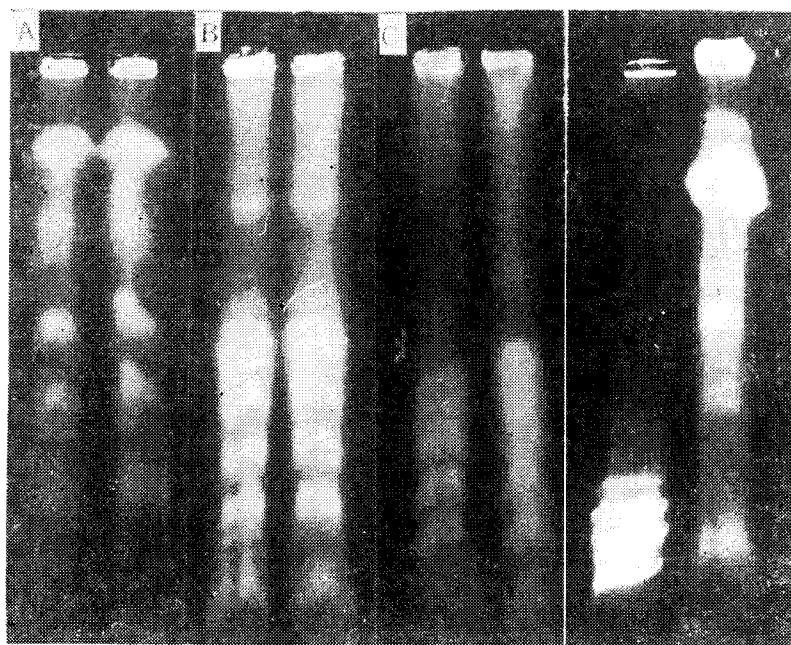


图4 改变凝胶浓度对酵母染色体 DNA 凝胶电泳的影响
1% 琼脂糖, 电泳条件与图 3 相同, 电泳 8h。

图5 电泳电压对交变脉冲电场凝胶电泳的影响

1.5% 琼脂糖, 电泳电压 120V, 交变时间 60Sec, 其余电泳条件与图 3 相同。电泳 46h。左边样品为 Lambda DNA 聚合物, 各条带可彼此分开; 右边为酵母染色体 DNA, 较小的染色体 DNA 分子能分开, 较大的分子则分不开。