

用 RPC-5ANALOG 柱层析方法纯化 DNA

陈 丁 丁

(江苏农学院生化教研室,扬州)

提 要

本文详细介绍了运用 RPC-5ANALOG 柱层析技术纯化 DNA 的实验原理和方法。

一、引 言

在分子克隆工作中,制备一定纯度、产量较高、方法简单、具有高转化活性及适于限制酶切的质粒 DNA 是一项常规工作,占有非常重要的地位。许多实验室已在这方面建立了一系列方法。如 CsCl-EB 密度梯度超离心法,羟基磷灰石柱层析法,MAK 柱层析法,PEG 沉淀法,琼脂糖凝胶电泳法,高盐-Sepharose CL-4B 柱层析法,碱性抽提法及 Sepharacryl S-1000 凝胶过滤法等。最近又出现了几种纯化质粒 DNA 的新方法,本文拟讨论这方面的一些进展情况,并着重介绍 RPC-5ANALOG 柱层析方法^[1]。

二、RPC-5ANALOG 柱层析原理及其应用于纯化各种 DNA

RPC-5 柱层析是 1971 年由 R. L. Pearson 建立起来的一种纯化尤其是制备核酸的强有力技术^[2]。RPC 柱层析的早期不同变型(RPC-1 至 RPC-4)含有覆盖于硅藻土表面的水不溶有机季胺化合物,它们被广泛用于从不同来源分级分离 tRNA。之后,改用聚氯三氟乙烯树脂(即 RPC-5)改进了 tRNA 同功受体的分离,缩短了分析时间,而且更易于按比例扩大用于制备分离。研究表明,RPC-5 柱层析既是分析又是制备性分级分离 DNA 和 RNA 的有力工具。可用于限制酶切割产生的 DNA 片

段,特定的 DNA 限制性片段互补链,寡聚的单链 DNA 和 RNA 以及超螺旋质粒 DNA 的分析和制备。

虽然 RPC 柱层析原初称作“反相层析”(Reverse-Phase Chromatography,简称 RPC)。但分级实际上主要是根据阴离子交换机制进行的,结合于 RPC-5 柱的核酸主要根据核酸分子量的增加而被逐渐洗脱下来。然而也观察到具有相似大小的一些核酸(如 tRNAs 或限制性片段)可被很好地分离。例如,具有粘性末端的 DNA 限制性片段的洗脱比无粘性末端即平末端但长度相等的片段需要更高的盐浓度;单链 DNA 的洗脱比同样长度的双链 DNA 需要更高的盐浓度;同样大小但 A-T 丰富 DNA 的洗脱需要更高的盐浓度。说明还有除分子量外可影响洗脱分离的其他因素。但是使用原报道的层析基质却遇到几个困难,使这一技术的广泛应用受到限制。最大的困难是这种层析物质缺乏商业供应,购买不到。其他困难还有:(1)随着柱的连续使用,吸附在惰性颗粒支持物上的活性有机层(季胺)会逐渐流失即“泄漏”(bleed)出来,这样就降低了柱的使用寿命和实际活性;(2)由于层析基质的颗粒大小非常不均一,所以为了获得合理的流速,就必须给以高的操作压力(200—400psi);(3)每批制备的层析基质,其支持物与覆盖有机层都不同,限制了层析操作统一条件的建立,从而不能预期

每次实验的结果。

1981 年, 美国马里兰州贝萨斯达研究室 (Bethesda Research Laboratories, 简称 BRL) J. A. Thompson 等人发展了一种新的层析基质, 他们称作 RPC-5ANALOG, 即 RPC-5 类似物, 克服了上述困难^[4]。

RPC-5ANALOG 易于从 BRL 购得, 制备的每批基质都相同并极大地降低了活性有机层

的“泄漏”。所以, 一旦一个特定的层析条件建立起来后, 就能预期得到可重复的结果。RPC-5ANALOG 已直接取代 RPC-5 用于纯化各类核酸。如 RPC-5ANALOG 柱层析已用于改进 tRNA 同工受体的分离, 进一步地用于 DNA 限制性片段的制备分离。此外, 50 毫克的真核染色体 DNA 样品经 EcoRI 消化后同样可被 RPC-5ANALOG 柱层析常规分级分离。RPC-

表 1 用 RPC-5ANALOG 柱层析纯化各种核酸

应 用	样 品	层 析 条 件			
		核酸量	柱的大小 (cm)	载样缓冲液	梯度洗脱
DNA 限制性片段	ϕ x174RF DNA 的 Hae-III 消化产物	1.0 mg	0.9×25	0.2 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)	500 ml; 0.45 至 0.65 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)
插入的 DNA 片段	pSP14 载体产生的 30 bp 插入 DNA 片段	10.0 mg	0.9×88	同上	500 ml; 0.4 至 0.6 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)
消化的基因组 DNA	鼠肝 DNA 的 EcoRI 消化产物	30 mg	同上	0.5 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)	1000 ml; 0.5 至 0.8 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)
病毒超螺旋 DNA	ϕ x174RF DNA	1.0 mg	0.9×20	同上	300 ml; 0.4 至 0.9 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)
超螺旋质粒 DNA	pBR322 (用清亮裂解法制备粗提物)	2 升培养液所得粗提物	1.5×6	同上	300 ml; 0.5 至 0.8 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)
高分子量单链 DNA	从 M13RF DNA 中分离出 M13 ⁺ 链	200 μ g	0.9×25	同上	500 ml; 0.5 至 1.0 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH7.2)
寡聚 DNA 同聚物	poly(dA) _n 的混合物 (n = 4 至 40)	5 μ g	0.9×5	0.1 mol/L NaCl-12 mmol/L NaOH (pH 12)	1000 ml; 0.1 至 0.7 mol/L NaCl-12 mmol/L NaOH (pH12)
合成的 DNA 多聚物	EcoRI 接头 (8 聚体)	250 μ g	同上	同上	200 ml; 0.2 至 0.4 mol/L NaCl-12 mmol/L NaOH (pH12)
tRNA	[¹⁴ C] Leu-tRNA 的几个同工受体	6×10 ⁴ CPM	0.63×22	0.2 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)	300 ml; 0.4 至 0.9 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)
tRNA	兔网织红细胞的 rRNA (5S, 18S 和 28S)	2.0 mg	0.6×25	0.5 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)	300 ml; 0.5 至 1.3 mol/L NaCl-TE 缓冲液 (pH4.5)
DNA 限制性片段的链拆分	SV40 的 AluIII 限制性片段 (330bp)	10 μ g	0.2×45	0.5 mol/L NaCl-12 mmol/L NaOH (pH 12)	500 ml; 0.9 至 0.95 mol/L NaCl-12 mmol/L NaOH (pH12)

5ANALOG 也用于 DNA 限制性片段互补链的分离, 并用于超螺旋质粒 pBR322DNA 毫克级的纯化。表 1 列举了用 RPC-5ANALOG 柱层析纯化各种核酸的例子, 既有分析也有制备性的应用。

RPC-5 和 RPC-5ANALOG 柱层析广泛应用的另一个主要困难是为了获得合理的流速, 它们都需要较高的操作压力 (> 100 psi), 但是 J. A. Thompson 通过将层析基质进行仔细的颗粒大小分类, 改进了 RPC-5ANALOG 的层析操作条件, 可根据待纯化核酸的分辨率要求, 凭经验确定使用颗粒的大小, 然后只要依

靠重力流或蠕动泵进行层析操作。

在 RPC-5ANALOG 上的分离也似乎主要是根据阴离子交换机制进行的。RPC-5ANALOG 由覆盖于一种固体、无孔、不可压缩的惰性微珠状树脂表面的一层氯化三烷基甲基铵薄膜构成。紧密结合的表膜作为阴离子交换剂与核酸中的酸性磷酸残基发生作用。核酸一旦结合到 RPC-5ANALOG 上, 则必须使用比进行结合时盐溶液的离子强度更高的盐溶液, 才能将核酸洗脱下来。一般, 核酸复杂混合物结合到大小合适的层析柱上后, 可用离子强度线性增加的梯度盐溶液洗脱实现分级分离。

低分子量核酸具有较少的负电性磷酸基团,而在高分子量核酸前被洗脱下来。这样,分离通常是按核酸分子长度进行的。然而,由于碱基顺序或二级结构和三级结构的差异,不同核酸分子中实际参与阴离子交换作用的负电荷均不相同,这样,就会出现如前所述的干扰分离的现象和不常见的洗脱行为。但另一方面,这种独特的现象可被很好地利用,放大或抑制这种独特的电荷特性(如改变层析 pH 或温度),就能解决其他一些困难的分离问题。

一般, RPC-5ANALOG 柱的活性容量是每克层析基质结合 0.5 毫克核酸,而在批量制备方法中为每克基质结合 0.2 毫克核酸。柱的直径和高度取决于基质颗粒大小及其容量,待分离核酸的类型,分辨率要求,回收核酸的稀释度及影响液相层析的其他因素。

当进行 RPC-5ANALOG 柱层析时(RPC-5 亦然),核酸样品的制备对获得准确、可重复的分辨率是关键性因素。尤其在研究复杂的生物学系统时,初级纯化应包括去除蛋白、有机溶剂、堵塞性团块和多价或二阶阳离子(即精胺和 Mg^{2+})。经验表明, RPC-5ANALOG 柱层析的失败往往是由于上柱样品制备不当所致。在抽提质粒 DNA 的诸方法中以清亮裂解法^[3]、酸-碱抽提法^[1]和酚法^[4]较好。

RPC-5ANALOG 的核酸或质粒回收率一般大于 95%。没有观察到纯化后的核酸中有 RPC-5ANALOG 表膜物质的交叉污染现象或核酸的降解。过柱后高度纯化的核酸具有与其他方法纯化的核酸相同或更高的生物学活性。适合于限制酶切,用 T₄ 多核苷酸激酶、大肠杆菌 DNA 多聚酶或小牛胸腺末端转移酶标记,作液相或过滤杂交,化学法顺序测定反应,用 T₄ DNA 连接酶进行连接反应及具有高转化率等。经 RPC-5ANALOG 柱纯化的质粒 DNA 纯度大于 99%。从一升发酵液中可获得 1.2—1.4 毫克质粒 cccDNA,需时约 8 小时。与氯化铯-EB 超离心法相比具有产量高,纯度高,分辨率高(可分开相差一个核苷酸的多核苷酸链),成本低,操作设备简单,需时短,可按比例

扩大进行批量制备或微量分析等突出的优点(表 2)。RPC-5ANALOG (RPC-5 亦然)还可用于高效液相层析进行快速分析或制备。

表 2 质粒 DNA 纯化方法的比较*

	CsCl-EB 梯度	RPC- 5ANALOG 柱	RPC- 5ANALOG 批量制备法
超螺旋质粒 DNA 产量(毫克)	0.9	1.4	1.2
纯度(%)	90	>99	>99
A_{260nm}/A_{280nm}	1.9	1.9	1.9
纯化所需时间	4—5 天	8 小时	8 小时

* 使用的质粒是 pBR322,从一升扩增后的 *E. Coli* 培养液,用清亮裂解法制得粗提物,用于纯化。

一个高度纯化的质粒 DNA 制品应仅含有 I 型即双链 cccDNA,而没有 II 型即缺刻开环状的 ocDNA、III 型即线状 lcDNA、细胞 DNA 和 RNA 以及蛋白质。纵观迄今所有纯化方法, RPC-5ANALOG 柱层析是简便地获取高纯度质粒 DNA 的最好方法。

RPC-5ANALOG 柱的另一优点是它可用于大质粒(140kb)的纯化及许多病毒超螺旋 DNA 和线粒体超螺旋 DNA 的纯化并能保持被纯化核酸的生物学活性。由于条件限制,国内一般实验室大都不用氯化铯-EB 超离心法或 HPLC 方法纯化质粒或病毒 DNA。而且尚未见有应用 RPC-5ANALOG 柱层析纯化质粒的报道,鉴于上述优点,作者向国内同仁推荐这一在国际上已广泛应用的方法。

三、其他几种纯化质粒 DNA 的快速法

高分辨制备性电泳大量纯化质粒 DNA^[5]

加州大学医学院的 M. A. Hediger 用他自己设计的制备性电泳装置纯化质粒 DNA。结果表明,可纯化质粒 DNA 的量和分辨率比现在商业供应的其他装置都要高。需时仅约 4 小时,且 RNA、蛋白质和染色体 DNA 被有效地除去。

用 Ultrogel A2 柱层析纯化质粒^[6] D. Micard 描述了一种从细菌中简单、快速提纯无 RNA 质粒的方法,需时 8—10 小时。该法先用

(下转第 171 页)

染色体、7个X染色体的DNA标记,分析从一个黑色素瘤衍生的6个细胞系后发现,某些染色体位点从杂合子变为纯合子与肿瘤演进(tumour progression)和转移有关^[29]。40个脑膜瘤病人中,17个病人的瘤组织在22号染色体长臂的某些基因位点有缺失,而他们的正常组织未见缺失。并且,缺失与脑膜瘤的恶性程度有明显相关性^[30]。

诚然,不能夸大细胞遗传学方法所能发现的染色体缺失对指明基因位置所起的作用。但是,它们确实能帮助人们确定基因的位置,而且有助于富集特异的基因组片段,同时可用来在染色体某些区域中挑选探针。若结合分子生物学方法,必将能更深入、更广泛地研究染色体缺失与恶性肿瘤的关系。

参 考 文 献

- [1] Cairns, J.: *Nature*, 1981, 289, 353.
- [2] Klein, G.: *Nature*, 1981, 294, 313.
- [3] 徐宁志,邓国仁:《国外医学分子生物学分册》,1987,9, 261。
- [4] Groffen, J. et al.: *J. exp. Med.*, 1983, 158, 9.
- [5] Heisterkamp, N. et al.: *Nature*, 1985, 315, 758.

- [6] Groffen, J. et al.: *Cell*, 1984, 36, 93.
- [7] Shtivelman, E. et al.: *Nature*, 1985, 315, 550.
- [8] Konopka, J. B. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 1985, 5, 3116.
- [9] Maxwell, S. A. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 1731.
- [10] Daley, G. Q. et al.: *Science*, 1987, 237, 532.
- [11] McLaughlin, J. et al.: *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6558.
- [12] Shtivelman, E. et al.: *Blood*, 1987, 69, 971.
- [13] Kurzrock, R. et al.: *Blood*, 1987, 70, 233.
- [14] Morris, C. M. et al.: *Nature*, 1986, 320, 281.
- [15] Kurzrock, R. et al.: *Nature*, 1987, 325, 631.
- [16] Hermans, A. et al.: *Cell*, 1987, 51, 33.
- [17] Collins, S. et al.: *Mol. Cell Biol.* 1987, 7, 2870.
- [18] Knudson, A. G.: *Cancer Res.*, 1985, 45, 1437.
- [19] Cavenee, W. K. et al.: *Nature*, 1983 305, 779.
- [20] Cavenee, W. K. et al.: *New Engl. J. Med.*, 1986, 314, 1201.
- [21] Friend, S. H. et al.: *Nature*, 1986, 323, 643.
- Lee, W. H. et al.: *Science*, 1987, 235, 1394.
- [22] Lee, W. H. et al.: *Nature*, 1987, 329, 642.
- [23] Hunter, T.: *Nature*, 1986, 322, 14.
- [24] Weissman, B. E. et al.: *Science*, 1987, 236, 175.
- [25] Naylor, S. L. et al.: *Nature*, 1987, 329, 451.
- [26] Solomon, E. et al.: *Nature*, 1987, 328, 616.
- [27] Scrable, H. J. et al.: *Nature*, 1987, 329, 645.
- [28] Ohyashiki, K. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 3842.
- [29] Dracopoli, N. C. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 3995.
- [30] Seizinger, B. R. et al.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 5419.

[本文于1988年1月18日收到]

(上接第198页)

碱性抽提法^[10]提取质粒,用乙酸铵沉淀去除高分子量RNA,最后用Ultrogel A2柱层析去除小分子的RNA,获得纯一的无RNA污染的质粒DNA。廉价、快速、制备的质粒保持了较高的生物学活性。

通过反相高效液相层析(RP-HPLC)分析和制备纯化质粒^[7] S. Colote等应用反相HPLC技术分离大量不同的核酸分子,比通常的电泳技术更灵敏、简便、快速,且不需添加其他试剂(这些试剂可能会造成cccDNA的缺刻)。质粒DNA上柱量可达10毫克以上,是快速、有效地纯化大量质粒DNA的最佳方法之一。他们同时也指出,该方法也可作为质粒DNA的分析之用,比有关的电泳方法更灵敏,分辨率更高。得到的高度纯化质粒DNA具有很高的生物学活性。研究表明,质粒DNA或

其他核酸分子在反相HPLC柱上的滞留时间不依赖于核酸链长度而是取决于核酸的碱基组成及其二级结构,超螺旋DNA比松弛状或线状DNA具有更长的滞留时间。虽然HPLC技术具有上述优点,但需要较昂贵的仪器。

参 考 文 献

- [1] Thompson, J. A. et al.: *Methods in Enzymol.*, 1983, 100, 368.
- [2] Pearson, R. L. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 228, 770.
- [3] Hirt, B. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1967, 26, 365.
- [4] Zasloff, M. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1978, 5, 1139.
- [5] Hediger, M. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 159, 280.
- [6] Micard, D.: *Anal. Biochem.*, 1985, 148, 121.
- [7] Colote, S. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 154, 15.

[本文于1987年11月6日收到]