

DNA 限制性片段的两向电泳分离

用 EcoRI 限制性内切酶水解 *E. coli* DNA 时,估计可以获得 500—600 个大小不同、碱基组成和序列也不相同的片段。如果用琼脂糖电泳法来观察这样的水解混合物,限于此法是根据分子的大小来进行分离,因此结果很不理想,得到的电泳谱往往没有十分显著的特征,不足以分辨那些长度相同的不同组分。

今年一月 Fischer 和 Lerman (Cell 16, 191, 1979) 报道了一种新的两向电泳法,在用琼脂糖电泳根据片段的大小分离以后,利用含变性剂的浓度梯度与电场方向平行的聚丙烯酰胺凝胶作第二向电泳,成功的进一步分离了稳定性不同的 DNA 片段,从而大大地提高了 DNA 限制性片段的分离效果。

他们首先观察到非离子型变性剂尿素和甲酰胺的混合物能使双链 DNA 变性,如果增加这两种变性剂的浓度达到某种临界浓度,就会使双链 DNA 完全解链。这种临界的变性剂浓度依赖于温度,即温度越高,临界浓度越低;同时也依赖于 DNA 片段的碱基组成和序列。

在初步实验中,他们把一个 λ 噬菌体 DNA 的 EcoRI 酶水解液作为样品,这个样品含 6 个 DNA 片段,在含变性剂浓度梯度从 0 至 7 M 尿素, 40% (v/v) 甲酰胺的聚丙烯酰胺凝胶板上进行电泳。当变性剂浓度梯度垂直于电场时,在下行电泳中观察到这 6 个片段的电泳行为直接受到凝胶中变性剂浓度的影响。在变性剂浓度低的区域,片段仍按大小分离,泳动速度几乎与变性剂浓度无关。在凝胶中变性剂浓度高的区域,各组分的泳动速度均有 20 至 30 倍的降低,几乎停留在凝胶块的顶部。在凝胶中变性剂浓度处于中间值的区域,这 6 个组分就以中间速度泳动,而使得到的电泳谱上, DNA 的区带扭曲成 S 形曲线,形状和双链 DNA 的解链曲线十分相似。每个片段所得谱带的转折点对应于该片段的临界变性剂浓度。在这一点上,由于双链 DNA 发生部分变性或完全变性而大大降低其电泳迁移率。这种临界浓度随不同片段而异,无疑地决定于片段的碱基组成和序列结构。假如这时,把凝胶所保持的温度从 60℃ 降至 45℃,临界变性剂浓度

就会增加,但图谱形状保持不变,并可注意到有的片段中因 DNA 含有对变性剂临界浓度要求不同的区域而出现解链曲线分阶的复杂现象。

若把这个样品放在变性剂浓度递增方向平行于电场方向的聚丙烯酰胺凝胶板上进行下行电泳,就可观察到各个片段在开始时都以相当于天然状态的速度泳动,达到各自变性的临界浓度时,泳动速度急剧下降,几乎停止前进而集中形成清晰的带。并且观察到各个片段的停点与片段的大小无关,但与其稳定性有关,其结果是片段按照稳定性而不是大小的顺序被分离。

在观察到上述现象以后, Fischer 和 Lerman 仍以 λ 噬菌体 DNA 的 6 片段水解混合物作为模型样品,先用琼脂糖在第一向电泳中根据片段大小分离,然后把含分离组分的琼脂糖条放在含变性剂竖向浓度梯度的聚丙烯酰胺凝胶板上作第二向下行电泳,成功的得到 6 个分离得很好的斑点分布于凝胶板上。这 6 个片段在两向电泳谱上的特色是:一个方向根据分子大小进行分离,另一个方向则根据分子在变性剂梯度中的稳定性进行分离。

在 DNA 限制性片段的两向电泳分离中,变性剂浓度梯度的应用,无疑地大大提高了片段分离的分辨力,同时也扩大了人们对 DNA 限制性片段研究的眼界。Fischer 和 Lerman 把这种方法用于 *E. coli* DNA 的 EcoRI 限制性片段研究,已经分离得到约 350 个斑点。另外,还曾用此法比较研究了正常 *E. coli* DNA 和从 λ 噬菌体感染后的 *E. coli* 分离所得的 *E. coli* (λ) DNA 的 EcoRI 水解液的两向电泳谱,在 *E. coli* (λ) DNA 的水解液中测出了四个独特的斑点是未经感染的 *E. coli* DNA 中所没有的,其中有两个斑点相当于只有从 λ 噬菌体 DNA 中才能得到的斑点。说明这种两向电泳法的重要意义,不仅在于它能提高限制性片段分离的分辨力,而且可用于鉴别嵌入被感染细胞 DNA 中的病毒 DNA,因此有着广阔的应用前景,从而促进分子生物学的研究进展。

[中国科学院生物物理研究所刘蓉供稿]