

脉冲凝胶电泳系统及其应用

李 齐 朱 静 和

(天津医学院寄生虫学教研室)

提 要

脉冲凝胶电泳系统是近年来发展起来的一种分离大分子染色体 DNA 的新型电泳技术。本文介绍了该技术的基本原理以及各种脉冲凝胶电泳系统,并比较了各个系统的优缺点。简要介绍了该技术在酵母、寄生虫以及高等动物染色体 DNA 的核型分析与基因定位中的应用。

关键词 脉冲凝胶电泳,染色体,核型,基因定位,真核生物

单细胞真核生物以及高等动植物染色体 DNA 的结构、功能、易位、重排、基因定位及核型分析的研究需要我们对其进行直接的细胞遗传学分析。但是染色体并非出现于细胞周期的每一阶段,这使直接的显微镜观察受到阻碍。在 DNA 研究中常用的琼脂糖凝胶电泳,由于它有限的分辨能力(分子量在 15—20kb 以下的 DNA 片段。即使降低凝胶浓度、延长电泳时间其分辨能力也不超过 750kb)^[1],也不能将其逐条分开,因为一般动植物染色体 DNA 的分子量高达 1×10^3 — 10^6 kb^[2],远远超过此限。所以不能对染色体 DNA 的分子生物学和生物工程学进行更加深入的研究。从 1983 年起,一项崭新的电泳技术使染色体的分离成为可能。Schwartz 等采用垂直方向的不均一交变脉冲电场首先将酵母 *Saccharomyces cerevisia* 的染色体 DNA 分离,并通过分子杂交技术证实了电泳带型与染色体的一致性。这一技术称之为脉冲式梯度凝胶电泳(Pulse field gradient gel electrophoresis)简称 PFGE。目前,这一技术进展很快,已广泛应用于单细胞真核生物以及人类遗传病的基因分析中。

一、染色体 DNA 凝胶电泳的基本原理及其进展^[1-6]

(一) 基本原理

卷曲的染色体 DNA 分子在电场作用下通过小于 DNA 分子的凝胶孔径时,必须沿电场方向拉伸,使之与电场平行才能通过。当电场方向变化后,电场内的 DNA 分子重新定向,使之与新的电场方向相适应,这样, DNA 分子在两个不同的均一或不均一电场中,不断改变方向挤过凝胶,得到较好的分离效果。电场方向的改变称为脉冲式。只有当交变脉冲时间与 DNA 分子的粘弹性弛豫时间(DNA 由卷曲状态变为伸张状态所需时间)相适应时, DNA 分子沿一个方向运动,漂移较小。所以交变脉冲电场的频率应是取决于 DNA 分子的共振频率。分子量越大,粘弹性弛豫时间越长,脉冲时间越长,反之亦然。因此,欲取得理想的分离效果,应选用不同的交变脉冲时间,使大小不等的 DNA 分子均得以分离。在大分子 DNA 的凝胶电泳中,脉冲时间、电场梯度及变化的电场角度三者均很重要,其中尤以电场角度最为重要。90°—120°被认为是取得较好分离效果的角度。

(二) 电泳技术进展

染色体 DNA 的凝胶电泳首先由 Schwartz 等于 1983 年发展起来,称为 PFGE,通过位于电泳槽四周的电极产生相互垂直的两个均一或不均一(即有梯度)的电场,这主要取决于电场两侧电极的选用。Schwartz 认为至少需要

一个方向上的电场梯度,其产生的切变压力(Shear stress)有利于 DNA 分子的伸展与转弯,同时使电泳带型更加清晰,分辨能力可达 2000kb。染色体 DNA 的 PFGE 分析称为电泳核型分析(electrophoretic karyotype)。继 Schwartz 之后,Carle 等(1984)又发明了一种类似 PFGE 的电泳方法,称为 OFAGE,即相互垂直交替电场凝胶电泳(Orthogonal field alternation gel electrophoresis)。其原理类似

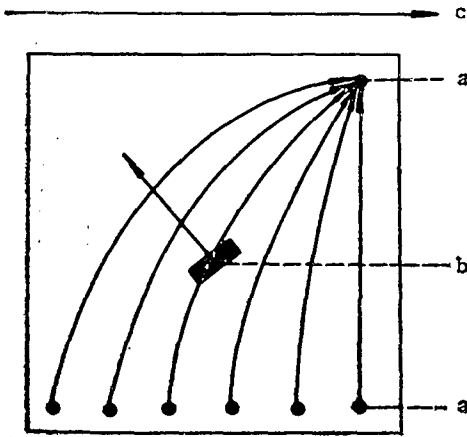


图 1 电场电极的选择与电场内染色体移动的方向

a. 电极位置 b. 染色体移动方向 c. 电场强度增强方向

PFGE,但其电极的设置不同,OFAGE 的电极是两对,相互垂直,每对电极由一较长的负极(16.5 cm)与较短的正极(2.5 cm)组成。电极的位置与凝胶成 45° ,在两个方向上均形成梯度。产生的结果与 PFGE 类似,但电极趋于简单。然而,上述两种方法由于电场的不均一性,使 DNA 的移动产生漂移,从而使多个样品的比较产生困难。Carle 等(1986)又进行了一种新的试验,即周期性倒向电场电泳(Field inversion gel electrophoresis,简称 FIGE)。其优点在于结构简单,几乎可以和所有现有的电泳装置兼容,在互为相反的两个方向上交替进行电泳,在脉冲时间上,正方向是反方向的三倍。使不同分子量的 DNA 均得到较好的分离。以水平 FIGE 为基础,Dawkins 发明了垂直 FIGE,优点在于可以较好地控制电流的变化,由于凝胶垂直悬浮于缓冲液中,使温度交换

便于控制。另外,垂直 FIGE,可以同时操作 4—6 块凝胶,使结果的可靠性增加。Chu 等(1986)设计了一个新型的电泳装置,称为等边匀强电场电泳(Contour-clamped homogeneous electric field,简称 CHEF),其分辨能力可达 5 Mbp。电极沿多边(四边或六边)电泳槽对称分布,电极数目较 PFGE 少。其交变电场的角度为 90° 或 120° 。在实验中发现,若角度变小,分离效果变差,漂移增加,认为角度的选择是至关重要的,采用合适的角度,单一脉冲时间也能取得良好的分离效果。能克服 FIGE 在某些脉冲时间所出现的分子量不同之 DNA 共同移动的问题。同时,CHEF 也可产生电场梯度,改善分离效果。Clark 等(1988)发明了一种程控电泳装置,称为程控电极凝胶电泳(Programmable autonomously controlled electrode gel electrophoresis,简称 PAGE)。该装置由三部分组成:1. 电子计算机;2. 电极控制系统;3. 电泳槽。电泳槽四周 24 个电极呈圆形分布,电极控制系统分别控制每一电极,电子计算机贮存电场梯度、电泳方向和脉冲时间等参数信息,通过调整这些参数,可获得 DNA 片段近乎线性的分离效果。其分辨能力可达 5 Mbp。最近 Biometra 公司推出一种电泳仪,称为旋转电场电泳(Rotating field electrophoresis,简称 RFE)。其电极为可旋转的弧形电极,在整个凝胶区域产生匀强电场。其优点在于染色体在凝胶中的电泳带型不发生漂移,便于多个样品之间的比较。无需变换电场方向,可任意调整脉冲时间或电场角度。分辨能力为 10 Mbp,可在 24 小时内获得结果,目前这一技术进展很快。

(三) 样品的处理

与常规 DNA 提取方法不同。为使完整的染色体 DNA 得到分离,必须防止抽提过程中对 DNA 的机械损伤。为此,Swartz 与 Cantor 设计了染色体 DNA 纯化的温和方法。将细胞包埋在 0.5% 的低熔点琼脂糖凝胶内,然后将凝胶块($20 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)置于蛋白酶 K, SDS 和 EDTA (0.5 mol/L) 中,去除核蛋白,从而使 DNA 不受剪切,得到完整、裸露的染色

体 DNA。将含有染色体 DNA 的凝胶按需要切成适当大小,置于标准的琼脂糖凝胶样品孔(slot)内。电泳条件:电压为 100V,温度保持在 18℃,采用不同的脉冲时间。其它同一般的 DNA 琼脂糖凝胶电泳。

二、脉冲凝胶电泳技术在单细胞真核生物与人类遗传学研究中的应用

(一) 单细胞真核生物

国际上第一个应用脉冲凝胶电泳系统分离染色体 DNA 的生物是酵母^[1],它是最简单的真核生物。采用不同的脉冲时间及变化的电场方向可将其染色体分成 11 条或更多条带。对不同株酵母的核型分析显示出株间核型的差异,可应用于不同酵母株的鉴别。

Giannini 等^[7]采用不同的脉冲时间对利什曼原虫的鞭毛体和无鞭毛体进行 PFG 电泳核型分析,发现鞭毛体和无鞭毛体的染色体核型不随脉冲时间而发生变化,至少出现 20 条带。说明对利什曼原虫不同阶段的 PFG 分析足可以进行种间鉴别。但不同种利什曼核型不同,其相似的染色体带型不到 1/10,甚至亚种间也存在核型差异,如 *L. b. braziliensis* 与 *L. b. guyanensis* 之间。对美洲大陆同一亚种不同虫株的利什曼原虫进行 PFG 分析,其株间染色体核型的相似程度为 (4/5—9/10),可用于临床利什曼病的株间鉴定。应用分子杂交技术还可将特异的基因定位在不同的染色体上,如 α 和 β 微管蛋白基因随虫种的变化而定位在不同的染色体上, α 微管蛋白基因位于各种利什曼原虫的 9 号染色体上, β 微管蛋白基因则位于 *L. major* 和 *L. donovani* 的 7, 13, 21 号染色体和 *L. m. amazonensis* 的 8, 11, 16 号染色体上^[8-12]。

在对动基体目的 5 属 9 种染色体进行 PFG 分析中显示所有种内存在至少 20 条染色体,种间差异较大。*T. brucei*, *T. vivax* 和 *T. equiperdum* 的主要差异位于分子量较小的染色体之间^[13]。这种染色体的重排频率与抗原变异频率相一致,为每代锥虫的 10^{-4} — 10^{-5} ^[14]。在对肯

尼亚沿海地区 Kilifi 的 54 株 117 个克隆的 *T. congolense* 应用 OFAGE 分析显示同一血清同类群 (serodeme) 的克隆染色体数目及分子量相同,依核型可将 117 个克隆分成 18 组,抗原性不同的克隆分子核型明显不一^[15]。应用核型分析也可研究锥虫亲代与子代之间的染色体变化。非洲锥虫通过其表面的抗原 (VSG) 变异逃避宿主的免疫攻击。这种抗原基因大约有 1000 个。通过分子杂交, Van der Ploeg 等^[14,16] 将 VSG 221 和 VSG 118 定位在 2Mbp 和较小的染色体上。

Van der Ploeg 等^[18]比较了不同阶段和不同地理株的 *P. falciparum* 核型,显示染色体可分成 7 条带,不同发育阶段核型相似,但不同地理株或同一株不同克隆的核型不同。应用染色体特异探针针对 11 株及克隆的 *P. falciparum* 染色体 DNA 进行分子杂交,也显示出不同株及克隆在同一染色体上的多态性^[17]。在对疟原虫抗原基因定位分析中发现编码环状体表面抗原基因 RESA, 编码株特异分泌蛋白抗原基因 S, 编码裂殖子入侵红细胞相关抗原基因 Ag 7 和编码恶性疟原虫主要免疫原的基因 FIRA 分别定位在不同的染色体上^[19]。

(二) 人类遗传学

随着 PFGE 的发展,现已应用于人类遗传病的研究,如分析巨片段的人基因组:组织相容性基因、杜兴氏肌肉营养不良症基因,囊性纤维化基因、地中海贫血和贝克氏肌营养不良基因等^[20-23]。人类染色体分子巨大,不能直接应用 PFGE,要借助于核酸内切酶,使酶切后的染色体分子正好落在 PFGE 的分离范围内。目前常用的内切酶为 Not I 和 Sfi I,这两种酶的识别序列是 8 核苷酸序列,特异性最高,切口较少,从而产生的酶解片段较大以保证染色体的完整性。den Dunnen 等^[24]对 39 例杜兴氏肌肉营养不良症进行 FIGE 分析和分子杂交,发现其中 21 例染色体重排,然而一般常规方法只发现 7 例存在染色体异常,说明该技术在遗传病研究中的敏感性较强。目前,由于适用的内切酶较少,制约了 PFGE 在大分子染色体的分离

与基因定位中的应用。随着科学进步,会发现更多适用的内切酶,结合分子杂交技术,使更多的遗传病机理变得更加清楚。

三、结 语

很明显,大分子染色体的凝胶电泳技术在比较生物分子核型方面是一个非常有用的工具。已应用在相近的生物种、亚种及株的鉴定和某些人类遗传病的临床诊断上。结合分子杂交技术,可将寄生虫的某些抗原基因定位在染色体上,这对研究寄生虫特有的免疫现象“免疫逃避”和疫苗效果的鉴定具有重要作用。同时通过基因定位可研究染色体的重排、易位、缺失等遗传变异,从而使人类遗传病的机理变得更加清楚。

参 考 文 献

- 1 Schwartz D C *et al. Cell*, 1984; 37: 67
- 2 Carle G F *et al. Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 5647
- 3 Carle G F *et al. Science*, 1986, 232: 65
- 4 Dawkins H J S *et al. Nucleic Acids Res*, 1987; 15: (8) 3634
- 5 Chu G *et al. Science*, 1986, 234: 1582

(上接第37页)

突变要用斜线隔开。例如, 'T4 溶菌酶 (I3C/C 54 T/A 146 T)'。括号内 I3C 表示野生型 T4 溶菌酶第 3 位 Ile 被 Cys 置换, C 54 T 表示野生型第 54 位 Cys 被 Thr 置换, A 146 T 表示野生型第 146 位 Ala 被 Thr 置换。这样可以用较少的字数命名一个特定蛋白质的多重突变体。

关于肽链中氨基酸顺序的插入与缺失, R. Wetzel 用乙酰胆碱受体的 α 亚基突变体中的一种^[9]为例。该突变体可以表示为 'AchR- α (Δ 224-237/+224 PSS)'。其中 AchR- α 表示乙酰胆碱受体的 α 亚基, 括号内的标志表示突变的内容, Δ 224-237 表示缺少该种野生型亚基第 224-237 位的十四个氨基酸残基, +224 PSS 表示从第 224 位开始引入三个新的氨基酸残基, 即第 224 位 Pro 第 225、226 位 Ser。作

- 6 Clark S M *et al. Science*, 1988; 241: 1203
- 7 Giannini S H *et al. Science*, 1986, 232: 762
- 8 Scholler J K *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1986; 20: 279
- 9 Comeau A M *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1986; 21: 161
- 10 Bishop R P *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1987, 24(3): 263
- 11 Samaras N *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1987; 25: 279
- 12 Spithill T W *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1987; 24: 23
- 13 Van der Ploeg L H T *et al. The EMBO Journal*, 1984; 3(13), 3109
- 14 Van der Ploeg L H T *et al. Cell*, 1984; 39: 213
- 15 Masaka R A *et al. Mol Biochem Parasitol*, 1988; 30(2): 105
- 16 Van der Ploeg L H T *et al. Cell*, 1984; 37: 77
- 17 Langsley G *et al. Exp Parasitol*, 1988; 65(2): 168
- 18 Van der Ploeg L H T *et al. Science*, 1985; 225: 658
- 19 Kemp D G *et al. Nature*, 1985; 315: 347
- 20 Shaw D J *et al. Journal of Medical Genetics*, 1986; 23: 421
- 21 Kenwrich S *et al. Cell*, 1987; 48: 351
- 22 Michiels F *et al. Science*, 1987; 236: 1305.
- 23 Burmeister M *et al. Nature*, 1986; 324: 582
- 24 den Dunnen J T *et al. Nature*, 1987; 329: 640

[本文于1988年10月4日收到]

者认为用 'AchR- α (\ominus 224-237/ \oplus 224 PSS) 表示可能更清楚些并且可以避免对 '—' 产生不同的理解('到'或'减少')。

此外, R. Wetzel 还提出了不同情况下所形成蛋白质变异体 (variant) 的残基编号以及翻译后经过修饰而形成的蛋白质肽链内二硫键位置与肽链相连的糖基位置及组成的命名问题。

总之, 蛋白质突变体与变异体的命名问题是应该及早解决的。

参 考 文 献

- 1 Leatherbarrow R J Fersht A R. *Protein Eng*, 1986; 1: 7
- 2 Shaw W V. *Biochem J*, 1987; 246: 1
- 3 Gerlt J A. *Chem Rev*, 1987; 87: 1079
- 4 Wetzel R. *Protein Eng*, 1988; 2: 1
- 5 Mishina M *et al. Nature*, 1985; 313: 364

[本文于1988年9月16日收到]