

新技术讲座

温度梯度凝胶电泳技术及应用

陈汉奎 冯 忻

(广州市肿瘤医院, 广州 510095)

摘要 温度梯度凝胶电泳 (TGGE) 是一种用于检测核酸序列变异和点突变的电泳方法。该法利用不同构象的核酸分子具有不同的变性温度 (T_m) 来进行分离。TGGE 方法具有分辨能力高、重复性好和节省时间的特点, 可广泛应用于分子生物学研究领域。

关键词 温度梯度凝胶电泳, 变性温度, 序列变异, 点突变

学科分类号 R394

在检测点突变的电泳技术中, 温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) 是最近出现的一种方法。Riesner 等^[1]最先将这种技术应用到 DNA/RNA 的分子构象分析、序列变异分析和核酸蛋白质的相互作用研究中, 并将其发展为成熟的商业性分子生物学技术。本文就其分析原理、操作方法和应用作一简单综述。

1 TGGE 分析原理

传统的电泳分离方法基于分子的大小和带电荷数的多少, TGGE 则增加了一个新的分离参数, 即分子构象。稳定的构象由氢键和范德华力共同维系, 并受环境温度、盐离子浓度、pH 值等因素影响。如果环境温度升高到某一限定值就可以破坏氢键和范德华力, 这时分子即处于变性状态, 此过程就称为热变性。TGGE 就是利用不同构象的分子具有不同的变性温度 (T_m) 来进行分离的。

在正常情况下, DNA 分子呈双链结构状态; 当温度升高到一定值时, DNA 双链开始解开, 由完整的双链变为分叉双链; 如果温度继续升高, DNA 双链完全解开, 变为单链 DNA。这种分子构象的改变会影响分子在电泳时的迁移行为, 因为 DNA 双链的打开直接导致迁移率下降。这种影响在两条链即将完全解开时最大, 此时分子的电泳速度最慢; 而当全部形成单链时, 泳动速度又会变快。

以一个杂合位点 Aa 来说, 突变型 aa 与野生型 AA 相比只存在单碱基改变。在对杂合子个体 Aa

进行 PCR 扩增后, 其 PCR 产物混合液中有四种组分: AA、aa、A (Waston 链) a (Crick 链) 和 a (Waston 链) A (Crick 链) 四种不同构象的 DNA 双链, 它们的分子质量相同但 T_m 值各不相同。在进行 TGGE 时, 异源双链 Aa 和 aA 因存在不配对碱基而最先变性, 同源双链 AA 和 aa 则因为碱基组成不同表现为不同的变性行为 (GC 碱基对有三个氢键, AT 碱基对只有两个氢键)。这样, 四种 T_m 不同的双链 DNA 的迁移率各不相同, 最后形成四条位置不同的泳带。

2 TGGE 实验装置和操作方法

TGGE 分析是一种新的水平式聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 电泳方法。根据 TGGE 温度梯度方向与电泳方向是否一致可以进行两种模式的 TGGE: 垂直 TGGE 和平行 TGGE。垂直 TGGE 的温度梯度方向与电泳方向垂直, 可用于优化样本的分离条件, 也可用于分析 PCR 产物的组成。平行 TGGE 的温度梯度方向与电泳方向一致, 一般采用优化后的电泳条件, 可用于同时分析多个样本。

目前市场上已有商品化的实验装置, 如德国 Biometra 公司的专利产品 TGGE-System。该系统包括三部分, 电泳单元 (温度梯度板和电泳槽), 微处理控制器 (整合有电源功能) 和常用附件 (玻板、电极纸和胶联膜)。温度梯度板用 Peltier 元件作成, 两端的温度设定值决定温度梯度的线性范

围. 控制器则可通过编程控制温梯板的升温时间、升温速率及电泳温度条件, 并可将其运行参数不间断显示出来. 两个可移动的缓冲液槽可以随意放置, 进行两种电泳模式的安装转换.

TGGE 的操作过程和常见的 SSCP 有些相似, 但更易于控制实验条件, 操作也更方便. 基本操作步骤为: 电泳系统安装, 温度梯度编程, 样本制备, PAG 凝胶灌制及上样, TGGE 电泳及电泳后染色. 与其他电泳方法一样, PAG 凝胶的制备、剥取及上样是 TGGE 分析中最具技巧性的操作, 也是实验成功的关键. 该系统中关于灌胶的新颖设计使这一工作变得轻松易行. 首先是玻板设计. 可根据需要选择不同齿突数的玻板, 带齿玻板在凝胶形成的同时也形成加样孔, 这样避免了插拔加样梳的烦琐操作. 其次是胶联膜的使用. 一面疏水另一面亲水的胶联膜可使胶液只在胶联膜与带齿突玻板间进行聚合, 胶联膜的支持作用还可保证凝胶在剥取时不会破烂. 使用电极纸作为电桥连接凝胶与电泳缓冲液, 简化了凝胶安装过程.

TGGE 系统具有以下特点: a. 分辨率高. 温度梯度由微处理器控制, 线性极为严格. 2 mm 的距离最大可对应 0.6 °C 的温度差, 即使分子间的 T_m 差异极细微也可以检测出来. b. 加样量小. 1 ~ 5 mg 的 DNA 或 RNA 上样量即可达到清晰的电泳分离效果. c. 重现性好. 电泳条件 (如温度、时间等) 易于控制, 可以保证电泳的重现性和结果的重复性. d. 节约时间. 小面积温度梯度板和小尺寸凝胶 (7.4 cm × 8.2 cm), 只需要 2.5 ml 凝胶溶液. 电泳可在 30 min 至 1 h 内完成.

3 TGGE 技术的应用

TGGE 技术的最大特点就是具有高分辨能力, 能够 100% 检出只存在单碱基差异的突变个体. 该方法还有电泳条件易于控制、重现性好、操作简便快速等优点, 所以这种方法出现以后很快就得到广泛的应用, 包括用分子生物学技术进行研究的肿瘤学、病毒学、免疫学、群体分析和 RNA 研究等领域.

对人类疾病基因的突变或者转基因动物的突变个体的检测, 或者对某些未知基因突变的筛选, 都需要这种检测或筛选方法能够检出所有可能发生的突变情况. 为此, Riesner 等^[2] 设计了一种特别的 PCR/TGGE 方法. 与野生型相比, 突变型因碱基序列发生改变, 导致 TGGE 电泳条带的位置改变,

并且条带位置因突变位置的不同而不同. 这种条带位置的改变可根据热动力学统计方程计算出来, 从而确定突变发生的位置.

如果要确定标本中某特异 DNA 或 RNA 序列的数量, 则可采用定量 PCR/TGGE 方法^[3,4]. 针对靶序列设计的内参照序列与靶基因之间只存在特定位点的单碱基改变. 将已知拷贝数的内参照与标本中的靶基因共同扩增, TGGE 分离两者的扩增产物, 根据两者的扩增比率就可以确定标本中靶基因的拷贝数. 定量 PCR/TGGE 方法的准确性非常高, 数值波动小于 15%.

在人类遗传病和肿瘤基因研究中, PCR/TGGE 也得到广泛应用. 用于抑癌基因 P₅₃ 的研究较多^[5,6], 因为 P₅₃ 基因的失活在大多数的恶性肿瘤的形成或发展中都起作用. Kneba 等^[7] 采用 PCR/TGGE 结合 DNA 测序成功扩增鉴定淋巴瘤患者和白血病患者 T 细胞抗原受体 γ 链 V-N-J 序列的结构特征. Horn^[8] 采用 TGGE 方法对 I 型神经纤维瘤 (NF1) 患者进行普查, 发现了 NF1 基因的 3 个新突变. 随着对各种遗传病和肿瘤分子病理研究的深入, 人们发现的遗传病和肿瘤相关基因也会日益增多, TGGE 技术也会得到更多的应用.

另外, TGGE 方法也可用于蛋白质的分子结构和热稳定性研究, 以及温度敏感蛋白质 (如酶类) 的分离与鉴定分析.

4 小 结

TGGE 技术的出现给分子生物学家提供了一种新的电泳分析方法, 与其他检测点突变的电泳方法如 DNA 测序、SSCP 分析、DGGE/DCGE 分析等相比, 这种方法具有一定的特点. 随着人类基因组计划的实施和基因诊断技术的日益普及, TGGE 技术必将得到更为广泛的应用. 然而, 在国内尚未见到相关的应用报道.

参 考 文 献

- 1 Riesner D, Steger G, Zimmat R, *et al.* Temperature gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, 1989, **10** (5): 377~389
- 2 Riesner D, Steger G, Wiese U, *et al.* Temperature gradient gel electrophoresis for the detection of polymorphic DNA and for quantitative polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 1992, **13** (9): 63~66
- 3 Henco K, Heibey M. Quantitative PCR: the determination of template copy numbers by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (22): 6733~6734

- 4 Schafer P, Braun R W, Mohring K, *et al.* Quantitative determination of human cytomegalovirus target sequences in peripheral blood leukocytes by nested polymerase chain reaction and temperature gradient gel electrophoresis. *J Gen Virol*, 1993, **74** (12): 2699~ 2707
- 5 Kappes S, Milde Langosch K, Kressin P, *et al.* p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. *Int J Cancer*, 1995, **64** (1): 52~ 59
- 6 Schlechte H H, Schnorr D, Loning T, *et al.* Mutation of the tumor suppressor gene p53 in human prostate and bladder cancers——investigation by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *J Urol*, 1997, **157** (3): 1049~ 1053
- 7 Kneba M, Bolz I, Linke B, *et al.* Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood*, 1994, **84** (2): 574~ 581
- 8 Horn D, Robinson P N, Boddich A, *et al.* Three novel mutations of the NF1 gene detected by temperature gradient gel electrophoresis of exons 5 and 8. *Electrophoresis*, 1996, **17** (10): 1559~ 1563

The Technique of Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Its Applications. CHEN Har

Kui, FENG Xin (*Guangzhou Cancer Hospital, Guangzhou 510095, China*).

Abstract Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) is a new and powerful electrophoresis method for separation of nucleic acids (DNA and RNA) and analysis of sequence variations. The TGGE method uses the melting temperature (T_m) as an important parameter to identify DNA, which differs in sequence among a mixture of molecules of the same size but different conformation. With the advantages of high-resolution capability, high reproducibility and timesaving process, the TGGE technique has been applied broadly in the field of molecular biology.

Key words temperature gradient gel electrophoresis, melting temperature, sequence variation, point mutation

一种改良的从银染的聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA 的方法

Clin Chem, 1998, **44** (9) 报道了 Steven 等介绍的从聚丙烯酰胺凝胶上将 DNA 转移到 DEAE 膜上的技术。此技术能同时进行多个样品的处理和纯化, 被纯化的差异显示法 (DDA) 产物电泳条带单一, 分离的范围为 100~ 700 bp 的 DNA, 回收的 DNA 足够作数次重扩增反应, 且重新扩增的条件不变, 重复性高。此技术不需要特殊仪器和试剂, 操作简便在 DDA 中应用十分广泛。

细胞遗传学正常的羊水细胞在二倍的常氏 (CISM) 细胞培养液中生长。信使 RNA 用寡聚 dT/链霉抗生物素蛋白磁珠吸附系统分离, 以 MMLV 逆转录酶、寡聚 dT 为引物 (5'-TTTTTTTTTTTTC), 将其转变成 cDNA。DDA 分析, 用 20 μ l 反应液。1 $\times$ PCR 缓冲液, 含 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 20 μ mol/L dNTP, 0.5 μ mol/L 寡聚 dT 引物, 0.25 μ mol/L 上游引物 (5'-CTGCTTGATG, 5'-GATCCAGTC, 5'-GATCGCATTG, 和 5'-AAACTCCGTC), 30 ng cDNA 和 0.625 U Taq 酶, 40 个热循环, 95 $^{\circ}C$ 30 s, 40 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 1 min。DNA 产物用乙醇沉淀, 再水溶解, 用 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显色。

含 DDA 扩增产物的聚丙烯酰胺干胶用小刀切下, 放入 2% 琼脂糖凝胶中近阴极端的孔内, 压平, 小心地用溶化的较凉的 2% 琼脂糖胶填满。将 DEAE 膜裁成 0.5 cm $\times$ 0.75 cm 的条, 插入离孔 0.5 cm 处, 每孔后插一条, 可用小刀帮助插入干 DEAE 条。DNA 以 10 V/cm 电泳 90 min 后, 将 DEAE 膜取出, 放入小离心管内, 用 500 μ l 低盐 NET (0.15 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris, pH 8.0) 缓冲液浸泡, 然后用 50 μ l 高盐 NET 缓冲液 (1 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris, pH 8.0), 在 65 $^{\circ}C$ 温育 30 min 以洗脱 DNA。DNA 用 2.5 倍的乙醇沉淀, 然后用 15 μ l 水溶解。用 5 μ l 洗脱 DNA, 以上述条件进行扩增, 产物连接上 T-载体 (Promega) 并测序。

(童大跃, 伍新尧摘译. 中山医科大学生化教研室, 广州 510089)