

高效液相色谱非多孔型阴离子交换柱分析 DNA 片段

廖 杰 周建忠 钱小红 董芳霆 刘志红*

(军事医学科学院国家生物医学分析中心 北京 100850)

提要 建立了高效液相色谱非多孔型阴离子交换柱分离 DNA 片段的方法,用 TSK gel DEAE-NPR 柱、Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)、1.0 mol/L NaCl 多阶式线性梯度洗脱,分析了核酸分子量参照物 pBR322 DNA-Hae III, Lambda DNA-Hind III 及乙肝病毒基因 PCR 产物,探讨了梯度、流速对分离的影响,方法简便、快速、分辨率高。

关键词 高效液相色谱法,非多孔型离子交换柱,DNA 片段

1 前言

核酸的分析在分子生物学研究领域中有十分重要的意义。高效液相色谱法和目前广泛使用的聚丙烯酰胺凝胶电泳相比,具有操作简便、快速和定量准确等优点。在 DNA 片段的分析中,常用的高效液相色谱方法有凝胶色谱法、多孔型离子交换色谱法等^[1,2],但是,凝胶色谱法的分辨率较低,多孔型离子交换色谱法由于孔径的限制,对大片段的 DNA 分离效果不够理想。我们建立了用非多孔型阴离子交换柱分离 DNA 片段的方法,此方法可以快速、高分辨地对 pBR322 DNA-Hae III 和 Lambda DNA-Hind III 水解产物进行分离,并将这一方法用于对乙肝病毒基因聚合酶链反应(PCR)产物的分析。

2 实验部分

2.1 仪器、样品和主要试剂 PE 高效液相色谱仪:200 型二元梯度泵、235 型二极管阵列检测器、TC4 数据处理系统。pBR322 DNA-Hae III 和 DNA-Hind III 分子量参照物(华美生物工程公司);乙肝病毒基因 PCR 产物(由本中心基因分析实验室扩增、纯化);三羟甲基胺基甲烷(Tris)、氯化钠为分析纯。

2.2 分析条件 色谱柱:TSK gel DEAE-NPR 柱(35 mm × 4.6 mm i. d.),流动相 A:20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,含 1 mmol/L NaCl(pH 9.0),流动相 B:20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 9.0)。

多阶式线性梯度洗脱(1.0 mL/min)

检测波长 260 nm

A (%)	40	50	56	58	75	100
B (%)	60	50	44	42	25	0
时间(min)	1.0	0.1	3.5	3.5	1.0	0.8

3 结果与讨论

3.1 对核酸分子量参照物的分离 TSK gel DEAE-NPR 是以 2.5 μm 粒度的无孔亲水树脂为基质,表面键合二乙胺基乙基,由于不存在孔径对大片段 DNA 分离的限制,因此,分辨率较高,速度较快^[3]。对 pBR322 DNA-Hae III 的分离色谱图见图 1。pBR 322 DNA-Hae III 是 pBR 322 被 Hae III 彻底水解并经加热灭活的产物,在核酸分析中常用来作为分子量参照物,共含有 22 个片段:7, 11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 104, 123, 124, 184, 192, 213, 234, 267, 434, 458, 504, 540, 587 bp。从分离结果可以看出,在选定的条件下,链长差异在 5% ~ 10% 以上的 DNA 片段基本上能够完全分离。各片段峰的确定参照有关文献^[4,5],DNA 片段的出峰顺序与链的长度相一致,个别 A-T 含量较高的片段出峰略有提前。我们还对更大片段的 DNA 进行了分离。对 Lambda DNA-Hind III(2 027 ~ 23 130 bp)的分离结果表明:在所用系统上分离 1 000 bp 以上的片段也是可行的。使用非多孔型离子交换柱比用多孔柱分离分析速度更快,在同一系统上分离的核酸 bp 范围更宽。

3.2 梯度及流速对分离的影响 以 1.0 mL/min 流速和 0.5 ~ 1.0 mol/L NaCl 梯度洗脱,对两种核酸分子量参照物进行分离,考察梯度变化幅度对分离的影响,结果显示:对 2 000 bp 以上的 DNA 片段,NaCl 以 50 mmol/(L · min) 增加时,各峰的分辨率最佳,时间过长则峰形变宽,且分离度反而下降。而对分离 1 000 bp 以下的 DNA 片段,梯度变化幅度在 NaCl 为 10 ~ 20 mmol/(L · min) 时,分离效果最好。此外,我们还研究了在相同梯度变化幅度时,不同流速对 pBR322 DNA-Hae III 分离的影响。结果显示:流速在

* 放射医学研究所
本文收稿日期:1995 年 7 月 24 日,修回日期:1995 年 9 月 25 日

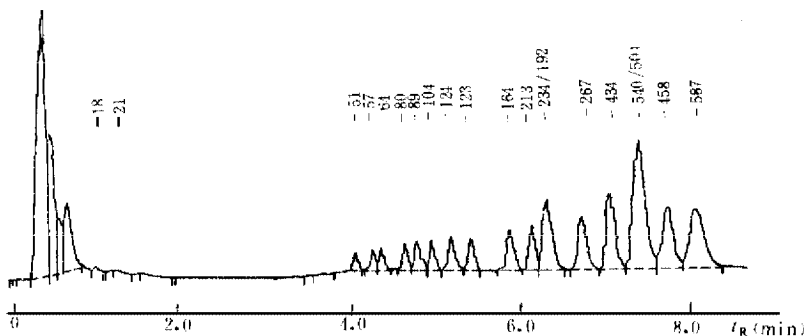


图 1 pBR322 DNA-Hae III 色谱图(分析条件见正文)

Fig. 1 Chromatogram of pBR322 DNA-Hae III digest

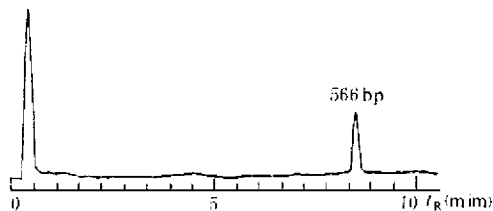
The separation was performed on a TSK DEAE-NPR column with gradient elution of sodium chloride in 20mmol/L Tris-HCl buffer(pH 9.0) at a flow rate of 1.0mL/min. The numbers on the peak are the estimated chain lengths of the DNA fragments in base pairs.

0.5~ 1.0mL/min 之间, 分辨率、分析速度均较好。

3.3 对乙肝病毒基因 PCR 产物的分析结果 用本法对乙肝病毒基因 PCR 产物的分析结果见图 2。

4 结论

用本法对 18~ 2 000bp 的 DNA 片段进行分离, 简便、快速、分辨率高, 可用于 PCR 产物等核酸片段的分析和纯化。



2 乙肝病毒基因 PCR 产物色谱图(分析条件见正文)

Fig. 2 Chromatogram of the PCR product of hepatitis B virus gene(conditions as in Fig. 1)

参 考 文 献

- 1 Westman E, Briksson S, Murotsu T *et al.* Anal Biochem, 1987; **166**: 158
- 2 Hecker R, Coipan M, Riesner D. J Chromatogr, 1985; **326**: 251
- 3 Yoshio K, Takashi K, Akane M *et al.* J Chromatogr, 1988; **447**: 212
- 4 Yoshio K, Yosuke Y, Akane O *et al.* J Chromatogr, 1989; **478**: 264
- 5 John M. LC Views, 1992; Perkin Elmer Fall: 1

Analysis of DNA Restriction Fragments by High Performance Liquid Chromatography(HPLC) on a Nonporous Ion Exchange Column

Liao Jie, Zhou Jianzhong, Qian Xiaohong, Dong Fangting and Liu Zhihong

(National Center of Biomedical Analysis, Academy of Military Medical Science, Beijing, 100850)

Abstract A rapid and high resolution method for the analysis of DNA restriction fragments by HPLC on a non-porous ion exchange column was developed. The analytical column was 35mm x 4.6mm i.d. TSK del DEAE-NPR, 2.5µm of which the surface was chemically bonded with diethylaminoethyl groups. pBR322 DNA-Hae III digest, Lambda DNA-Hind III digest and a kind of PCR product have been separated by gradient elution of sodium chloride in 20mmol/L Tris-HCl buffer(pH 9.0). The small DNA fragments(less than 600 base pairs) can be separated almost completely when their difference in chain length is 5%-10%. DNA fragments are mainly eluted in the order of increasing chain length. The recovery and linear relationship were examined. The influences of gradient steepness and flow-rate on the resolution are discussed.

Key words high performance liquid chromatography, non-porous ion exchange column, DNA restriction fragments