

毛细管电泳 DNA 片段多态性分析*

韩富天 薛俊 林炳承*

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116012)

提 要 对毛细管筛分电泳在 DNA 片段多态性分析中的应用作了较为详细的论述, 还对 DNA 片段多态性研究的意义和作用进行了讨论。

关键词 毛细管电泳, DNA 片段, 多态性

分类号 O658/Q5

1 前言

生命科学是当今乃至 21 世纪最为重要的研究方向之一, 它将给人类的生活带来巨大的变革。生物工程研究给人类了解和战胜自然提供了强有力的武器, 其中基因工程研究是最为重要的一个环节, 它以 DNA 体外重组为主导实现了生物技术从传统技术向高技术的转变, 由此可能对困扰世界的重大问题诸如饥饿、疾病、能源和污染等提供解决方法, 从而对人类社会的生存和发展起到难以估量的推动作用。

DNA 片段多态性亦即基因的多态性是生命科学中的一个十分有趣而有重要意义的现象。基因的多态性包括长度多态性和序列多态性两个方面的内容。对基因的多态性进行分析有重要的现实意义。

目前普遍使用聚丙烯酰胺平板电泳配合其它一些生物技术来进行基因的多态性分析, 方法虽然成熟但是却耗时、耗力、非自动化。另外一种可以用来进行基因多态性分析的手段为高效液相色谱法, 但是由于它的分辨率较低和成本较高而缺乏应用远景。寻求一种方便、快捷、可靠而且自动化的基因多态性分析方法是许多基因分析工作者的共同心愿。

作为高效、快速分析方法的毛细管电泳, 近年来已经成为分析化学中最重要的手段之一。和传统的平板电泳方法相比, 它具有高效、高速、高灵敏度的特点, 更为重要的是, 它又是一种自动化的仪器分析方法。目前毛细管电泳已被广泛地应用于蛋白质、多肽和核酸等生物大分子的分离分析研究, 在基因领域的优势更加明显, 被用于基因突变研究、基因突变引起的遗传疾病、肿瘤以及病毒感染疾病等的临床诊断研究、法医检验等领域的分离分析, 并将在今后

的发展中不断地显示其潜在的能力^[1]。

DNA 是由戊糖、磷酸和碱基组合而成的一类线性大分子, 分子量大小不同的 DNA 片段有恒定的电荷/质量比, 因此使用毛细管自由溶液区带电泳这种依荷质比不同而分离的电泳方式不能进行 DNA 的分离。鉴于此, 必须在电泳中引入筛分机制。在毛细管内填充筛分剂后, 溶质在毛细管内不仅受到电场力的作用, 而且还受到筛分剂的体积排阻作用, 因此具有相同荷质比但是分子大小不同的物质也可以得到分离。依据筛分介质的状态不同, 毛细管筛分电泳有凝胶电泳和无胶筛分电泳之分, 这两种分离方式都可以用于基因的分离分析。

2 毛细管电泳 DNA 片段多态性分析

DNA 片段多态性包括长度多态性和序列多态性两个方面的内容。长度多态性是指某些基因对于不同个体或者在同一个个体的不同生理状态下有长度的差异, 这种长度的差异来源于基因本身的性质差异(如高度重复序列“卫星”DNA 片段)或由于碱基的插入或缺失引起的基因突变。基因的序列多态性则指基因在碱基序列上的不同, 这种基因序列上的不同往往来源于各种原因引起的基因碱基的替换, 碱基替换的结果为基因长度仍保持, 但是基因的碱基序列发生了变化, 亦即基因发生了点突变。

2.1 长度多态性分析

基因的长度多态性分析包括以下几个方面的内容: 其一, 把一个基因用特定的限制性内切酶进行酶切, 然后把内切片段做 DNA 图谱, 不同基因型的 DNA 分子酶切后所得的片段长度各异, 数目也不尽相同, 这种方法叫限制性片段长度多态性分析(restraint fragment length polymorphism, RFLP); 对

* 国家自然科学基金资助项目

** 通讯联系人

本文收稿日期: 1996-03-25, 修回日期: 1996-06-27

基因的酶切产物进行毛细管电泳分析, 然后对所得的电泳图谱进行比较, 就可以判别基因型的异同。其二, 对一个基因的 PCR 产物直接进行电泳分析, 也可以检测基因的长度变化, 从而检测基因的缺失或插入突变, 如 Gefli 等^[2]用此方法检测了致病的基因 F508 和 P450c21B 的缺失突变; Nesi 等^[3]也通过基因 PCR 产物的直接分析检测到 Kennedy 氏病人基因的插入突变。其三, 有的等位基因是由数目不等的重复单位串联起来组成的, 依重复单位的长度不同分别叫做 *minisatellite DNA* (十几到几十个副产物) 和 *microsatellite DNA* (几个副产物); 这种等位基因的重复单位的数目有种的或个体的特异性, 针对 *minisatellite DNA* 和 *microsatellite DNA* 进行分析分别叫做 VNTRs (variable number tandem repeats) 和 STR (short tandem repeat) 分析^[4]; 几个有意义的等位基因是 DIS80, SE33, MBP, HUMTH01, HUMVWA 以及 ApoB 等^[5]; 对这些等位基因做毛细管电泳分析, 然后把所得图谱与标准图谱相比较, 从而得出重复单元的数目; 对某些基因所得的 VNTRs 或 STR 电泳图谱有极强的特异性, 这种图谱叫做 DNA 指纹图谱, 在生物学、医学、法医学等领域有很大的应用价值。表 1 所列为毛细管电泳法基因长度多态性分析实例。

表 1 毛细管电泳基因的长度多态性分析实例

Table 1 Examples of gene length polymorphism analysis by capillary electrophoresis

分析对象	筛分体系	采取策略	文献
Target	Sieving system	Method	Ref.
ERBB2 oncogene	0.5% HPMC	RFLP	6
HUMTH01	0.8% HEC	STR	7
HUMTH01	1% HEC	STR	8
DIS80, SE33	0.5% HEC	STR	9
Apo E gene	3% T, 0.5% C PAA	RFLP	10
VWA, MBP	1% HEC	STR	11

Note (注): HPMC—hydroxypropyl methyl cellulose, HEC—hydroxyethyl cellulose, PAA—polyacrylamide.

2.2 基因的序列多态性分析

基因的序列多态性分析主要是对碱基替换引起的基因点突变进行检测, 可以采用如下策略与毛细管电泳配合进行基因序列多态性分析。表 2 列举了几个毛细管电泳检测基因点突变的实例。

(1) 运用毛细管电泳进行单链 DNA 构象多态性分析 (single strand conformation polymorphism,

SSCP), 可以检测到基因的点突变。所谓的 SSCP 的方法原理如下: 如果双链 DNA 中的某一个碱基发生了突变而变成了另一个碱基, 整个基因的构象只会发生微小的变化, 很难用电泳的方法把突变基因和正常基因分开。而对于单链 DNA 来讲, 一个碱基的变化就会引起整个链构型的较大变化, 从而使运用毛细管电泳方法分离突变基因成为可能。在分离 DNA 之前, 使用尿素等变性剂或热变性方法把双链 DNA 变成单链 DNA, 然后进行电泳分离, 可以检测到基因的点突变。在正常基因和突变基因的混合物变性后进行电泳分离, 除了得到少量复性双链 DNA (ds DNA) 峰 (正常和突变基因重合) 外还应有 4 条单链 (ss DNA) 峰, 如图 1 所示。Zheng 等^[12]使用平板电泳方法对 P53 基因进行 SSCP 分析检测点突变花费 7h, 而用毛细管电泳法做同样的分析只需几十分钟^[13,15]。

(2) 用毛细管电泳进行异源双链 DNA 构象多态性分析 (heteroduplex polymorphism analysis, HPA), 检测基因点突变。所谓的异源双链 DNA 分子, 实质就是突变型基因和野生型基因的杂合 DNA 分子。如果以 AB 代表野生型基因, A'B' 代表突变型基因的纯合型, 那么 AB' 和 A'B 就是异源双链基因型。由于异源双链 DNA 分子的同源性较差, 分子中总有一定的区域是不互补的, 因此构象与野生型 DNA 是不同的, 可以用毛细管电泳进行分离。在野生型和突变型基因混合物经过一个变性后再复性的过程中, 一般情况下其电泳图应显示出两条谱带 (AB 与 A'B' 重合, AB' 和 A'B 重合), 见图 2。

(3) 用毛细管电泳可对限制性内切酶的酶切产物进行 RFLP 分析, 也可对突变基因进行检测, 该方法的前提是基因突变位点正好位于某一个限制性内切酶的酶切位点上或者因为突变而产生了新的酶切位点, 从而造成酶切后片段数目或长度的变化。

除了上述的几种测定基因突变的方法外, Gefli 等人^[14]使用热梯度凝胶电泳技术直接对 PCR 产物进行分析, 也检测到了囊性纤维变性病人基因的点突变。有的研究者还使用变性剂凝胶电泳方法, 例如恒变性剂浓度的毛细管电泳 (constant denaturent capillary electrophoresis, CDCE)、变性剂浓度梯度的毛细管电泳 (denaturent gradient capillary electrophoresis, DGCE) 等, 进行基因突变研究。以上方法都有一定的适用范围。到目前为止, 人们尚未找到一种普遍适用的毛细管电泳测定基因点突变的方法。

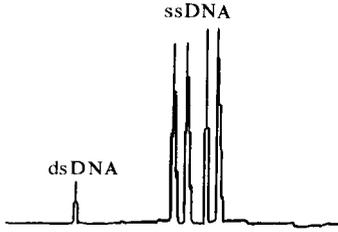


图 1 SSCP 方法检测点突变示意图

Fig. 1 SSCP to detect point mutation

4 个 ssDNA 峰显示有突变发生。

Four ssDNA peaks indicate the mutant gene.

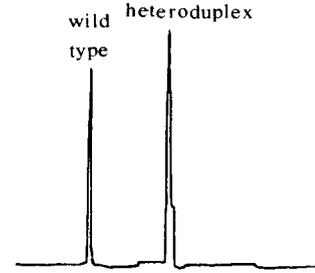


图 2 HPA 方法检测点突变示意图

Fig. 2 HPA to detect point mutation

显示有野生型和异源双链型两个峰。

Two peaks of wild type and heteroduplex gene.

表 2 毛细管电泳法对基因点突变的检测实例

Table 2 Examples of detection of gene point mutations by capillary electrophoresis

分析对象 Target	筛分体系 Sieving system	采取策略 Method	文献 Ref.
P53 gene	4% LPA	SSCP	15
H. annosum r-RNA gene	0.5% HPMC	HPA	16
div E42 gene	3% T, 0.5% PAA	RFLP	17
K-ras codon 12	unknown	RFLP	18

Note(注): LPA — linear polyacrylamide.

3 DNA 多态性分析的应用

应用毛细管电泳进行 DNA 片段的多态性分析具有重要的现实意义, 现阶段特别表现在下述几个方面。

3.1 法医检验领域

在 1985 年以前, 甄别罪犯的刑事分析工作只局限于对血型 and 指纹的分析, 但是这些物证远远不能满足现代社会判别法律争端的要求。Jeffreys 等于 1985 年首次将 DNA 指纹图谱技术应用于法医检验领域, 对某些基因进行分析(这些基因有极强的特异性)可以作为判别罪犯的依据。自 1988 年美国法庭首次接受 DNA 分析结果作为刑事案件的证据以来, 法医 DNA 分析不仅在理论上而且在实际中都被许多国家的法律采用。法医学上最感兴趣的是一些等位基因的 STR 位点, 如 ENDAp, HUMTH01 和 HUMVWA 等^[19-21], 原因不仅在于这些位点在生物体内存在和个体特异, 更为重要的是它们易于 PCR 扩增而且适于对法医上作为证据的极其微量或已降解的 DNA 样品进行分型。具体方法是从犯罪现场遗留的唾液、毛发以及其它体液或组织中提

取到 DNA 样品, 对某些基因进行 STR 或 RFLP 分析, 得到毛细管电泳图谱, 然后与嫌疑犯的 DNA 图谱进行比较, 就有可能找到罪犯^[5]。另外, 由于这些特异性很强的基因的 DNA 指纹图谱的区带是从亲代遗传而来的, 对不同个体的 DNA 指纹图谱进行分析比较就有可能进行亲缘关系判定, 这为法律上进行亲子鉴定, 解决家庭争端及遗产争端提供了一种可靠的方法。

3.2 生物领域

DNA 多态性分析也可用于物种鉴定和物种分类。生物的分类问题是一个至今尚未解决的问题, 对于某些生物的分类学地位, 不同的学者有不同的见解, 往往存在较大的争议。过去进行生物学分类主要是通过形态学鉴定, 这是一种通过研究生物的外观形态进行分类的宏观方法, 该方法有很大的局限性。现在运用基因多态性分析方法, 通过对某些基因进行分析, 比较某些高度重复序列, 可以从根本上解决物种的分类问题^[22]。这种方法还可以用于生物考古领域, 通过对远古时代生物化石中残留的遗传物质进行分析, 可以确定该物种的进化地位和分类地位。

3.3 医学领域

用毛细管电泳对某些特定基因的多态性分析, 可进行某些遗传疾病或其它因基因突变引起的疾病(心脏病、糖尿病、肿瘤等)的临床诊断研究。因为基因突变与许多疾病的发生有密切的关系, 因此对基因突变检测有利于对某些疾病的诊断。SSCP, RFLP, STR 和 VNTR 等方法都可以用于基因诊断研究。如 Kuypers 等^[23]运用毛细管电泳法, 通过对 14 号和 18 号染色体基因进行 RFLP 分析, 检测出基因的突变(二染色体 DNA 交换)并且用于诊断淋巴瘤。对基因突变的检测还可以促进对产生这些疾病的原因的深入了解。基因治疗是将正常基因通过

DNA 重组技术引入患者的体细胞中,使其恢复正常的功能,从而彻底治疗基因变异引起的疾病。对这些疾病实质的了解有助于对疾病的基因治疗。

4 展望

各种新技术(诸如毛细管的涂渍、进样技术、各种场强操作方式及各种联用技术等)的出现已经并将继续对毛细管电泳的发展起到极大的促进作用。使用一定的毛细管涂渍方法不仅可以延长管子的使用寿命,而且可以有效地抑制电渗流,提高分离效率;使用一定方式的脉冲电场可以实现更大分子量的 DNA 片段的毛细管电泳分离,通过改善进样技术既可提高分辨率和灵敏度,又可提高重复性;毛细管电泳和液相色谱或质谱等手段联用,取长补短,能大大扩展毛细管电泳的应用范围,并可得到更多的信息。毛细管电泳技术本身的发展对于这一技术在 DNA 多态性分析中的应用将起到极大的推动作用。当然也必将促进毛细管电泳方法在法医检验、医学检验以及生物、考古等各个领域的实际应用。

参 考 文 献

- 林炳承. 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996
- Gelfi C, Orsi A, Righetti P G *et al.* J Chrom atogr B, 1994; 657: 201-205
- Nesi M, Righetti P G, Patrosso M C *et al.* Electrophoresis, 1994; 15: 644-646
- 闫 威, 贾静涛, 姜先华等. 法医学杂志, 1995; 11(2): 61-63
- Northrop D M, McCord B R, Butler J M. J Capillary Electrophoresis, 1994; 1(2): 158-168
- Ulfelder K J, Schwartz H E, Hall J M *et al.* Anal Biochem, 1992; 200: 260-267
- Wang Y, Ju J, Carpenter B A *et al.* Anal Chem, 1995; 67: 1197-1203
- Butler J M, McCord B R, Jung J M *et al.* Biotechniques, 1994; 17(6): 1062-1070
- McCord B R, Jung J M, Holleran E A. J Liquid Chromatogr, 1993; 16(9&10): 1963-1981
- Baba Y, Tomisaki R, Sumita C *et al.* Biomedical Chromatogr, 1994; 8: 291-293
- McCord B R, McClure D L, Jung J M. J Chromatogr A, 1993; 652: 75-82
- Zheng W, Nakanura I. Biotechniques, 1995; 18(5): 742-744
- Oto M, Suehiro T, Yuasa Y. Clinical Chemistry, 1995; 41(12): 1788
- Gelfi C, Righetti P G, Cremonesi L *et al.* Electrophoresis, 1994; 15: 1506-1511
- Kuyper A W H M, Willems P M W, Schans M J *et al.* J Chromatogr B, 1993; 621: 149-156
- Cheng J, Kasuga T, Mitchelson K R *et al.* J Chromatogr A, 1994; 667: 169-177
- Arakawa H, Uetanaka K, Maeda M *et al.* J Chromatogr A, 1994; 664: 89-98
- Mitchell C E, Belinsky S A, Lechner J F. Anal Biochem, 1995; 224: 148-153
- Gill P, Kimpton C, D'Alloja E *et al.* Forensic Science International, 1994; 65: 51-59
- Lareu M V, Phillips C P, Carracedo A *et al.* Forensic Science International, 1994; 66: 41-52
- Lorente J A, Lorente M, Budowle B *et al.* Forensic Science International, 1994; 65: 169-175
- 蔡良琬主编. 基因分子生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1990: 40
- Kuypers A W H M, Meijerink J P P, Smetsers T F C M *et al.* J Chromatogr B, 1994; 660: 271-277

DNA Polymorphism Analysis by Capillary Electrophoresis

Han Futian, Xue Jun and Lin Bingcheng*

(Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116012)

Abstract A review is given here to describe the principle and methods of gene polymorphism analysis by capillary electrophoresis (CE). DNA length polymorphism and sequence polymorphism are very important phenomena in gene molecular biology. Some practical works of gene length polymorphism analysis and sequence polymorphism analysis are listed. SSCP and HPA methods detecting gene point mutations are demonstrated. Applications of gene polymorphism analysis by CE in clinical, forensic and biological research are also discussed in this paper.

Key words capillary electrophoresis, DNA fragments, polymorphism