

甘露醇添加剂对毛细管无胶筛分电泳分离 DNA 的影响*

韩富天 林炳承**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

提 要 在纤维素衍生物筛分体系中加入甘露醇添加剂大大提高了分离能力,在较低筛分剂浓度条件下可得到满意的分离。同时还对甘露醇影响分离的机理做出了解释。

关键词 毛细管电泳, DNA 片段, 甘露醇

分类号 O658/Q52

1 前言

毛细管电泳(CE)的出现为生物大分子的分离分析提供了新的手段,其中对核酸的分析更是引人注目。近几年,CE 在法医科学、临床诊断以及分子生物学研究等方面得到了广泛的应用^[1-6]。毛细管无胶筛分电泳是在毛细管中添加一定浓度和组成的线性高分子溶液,溶液中高分子之间相互交缠形成网孔,从而起到筛分作用^[7]。一般来讲,大片的核酸分子需要较小的筛分介质浓度,较小的核酸分子则要求较大的筛分介质浓度。较大浓度的筛分介质有较大的粘度,给操作带来不便。我们发现,在纤维素衍生物体系中加入一定量的添加剂时,使用较低的纤维素浓度可达到较高纤维素浓度所具有的筛分效果,从而在不影响分离的情况下,可以使用较小粘度的筛分试剂。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器 羟丙基甲基纤维素(HPMC, 20 g/L 水溶液在 25℃ 时的粘度为 4 000 cp, 购自 Sigma 公司), 三羟甲基氨基甲烷(国产分装), EDTA(长春化学试剂厂), 硼酸(开原化学试剂厂), 甘露醇(沈阳市和平化工厂), 以上试剂均为分析纯。Bio-Focus™ 3000 型毛细管电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), UV 检测器, 检测波长为 260 nm, 恒压操作模式, 电压为 4 kV(- → +)。自制熔融壁涂石英毛细管(30 cm × 50 μm i.d., 原料管购自河北永年光导纤维厂), 电动进样 10 kV × 15 s, 柱温为 25℃。

2.2 缓冲液 基体缓冲溶液为 TBE 缓冲液(100 mmol/L Tris-Borate, 2 mmol/L EDTA, pH 8.3)。将一定量 HPMC 溶于 TBE 缓冲液中, 再以一定量的甘露醇按重量-体积比加入上述 HPMC 溶液中形成分离缓冲液, 使用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.3 样品 DNA 标准样品为质粒 pGEM-3Zf(+)/Hae III 内切产物, 购自华美生物工程公司上海

分公司, 它所含有片段长度分别为 8, 11, 80, 102, 142, 174, 267, 289, 314, 323, 434, 458, 587 bp。标准样品用自配的储藏缓冲液(Tris-HCl-EDTA, pH 8.0)稀释, 质量浓度约为 20 mg/L。

3 结果

(1) 对含有不同量甘露醇的不同浓度 HPMC 筛分试剂的筛分性能进行考察发现, 甘露醇可以明显提高对 pGEM-3Zf(+)/Hae III 标准 DNA 片段的分离效果。在 HPMC 质量浓度低于 5 g/L 时, 即使使用甘露醇作为添加剂, 也不能得到满意的分离。这意味着, 5 g/L 是 HPMC 能够形成交缠溶液的阈值, 低于此值, HPMC 分子之间不能充分缠绕形成筛分网孔。在 HPMC 质量浓度大于 12 g/L 时, 即使在没有甘露醇存在的情况下也具有较好的分离能力, 但是高质量浓度的 HPMC 溶液具有较高的粘度, 难以将筛分剂灌入毛细管中。在相同条件下对筛分试剂灌入同一根毛细管的时间进行比较, 可了解不同筛分试剂的粘度。基于此法, 在 3.1 MPa 的压力下将 12 g/L HPMC 溶液灌入一根 30 cm × 50 μm 的毛细管柱需 10 s, 而在同样的条件下将含有 60 g/L 甘露醇的 5 g/L HPMC 溶液灌入同一毛细管中只需 4 s。可见, 后者的粘度比前者小。对于 5 g/L HPMC 筛分体系, 我们研究了不同甘露醇质量浓度对分离的影响。在没有甘露醇存在的情况下, 此筛分体系对标准片段的分离情况很差, 随甘露醇质量浓度的增大, 分离情况逐渐变好, 甘露醇为 60 g/L 时, 可得到满意的分离。除 8, 11 bp 两个片段由于检测限低而不能检测外, 其它片段都得以分离(如图 1 所示)。图 2 显示在不同甘露醇及 HPMC 质量浓度下 314/323 两个片段的分离度。分离度数值由 $R = \frac{1.18(t_2 - t_1)}{W_{0.5_1} + W_{0.5_2}}$ 计算而得。式中, R 为分离度, t_1 和 t_2 分别代表两个片段的迁移时间, $W_{0.5_1}$ 和 $W_{0.5_2}$ 代表两个峰的半宽度。由图 2 可以看出, 60 g/L 的甘露醇最佳。

* 国家自然科学基金资助项目(29635020)

** 通讯联系人

本文收稿日期: 1997-11-12, 修回日期: 1997-12-18

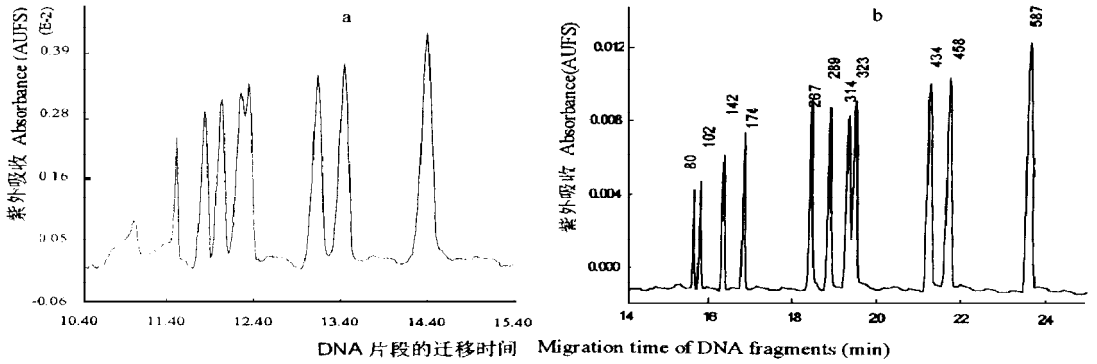


图 1 质粒 DNA PGEM-3Zf(+)/Hae III 的无胶筛分电泳谱图

Fig. 1 Electropherograms of plasmid DNA PGEM-3Zf(+)/HaeIII in non-gel sieving buffers

缓冲液: (a) 5 g/L HPMC 溶液, (b) 5 g/L HPMC + 60 g/L 甘露醇。电泳条件: 电进样 10 kV × 15 s, 运行电压为 4 kV (- → +), 紫外检测 260 nm, 柱温 25℃。其它条件见实验部分。 Buffers: (a) 5 g/L HPMC, (b) 5 g/L HPMC with 60 g/L mannitol. Conditions: injection at 10 kV for 15 s, running at 4 kV from negative to positive, UV detection at 260 nm, capillary temperature at 25℃. Other conditions as listed in the experimental section.

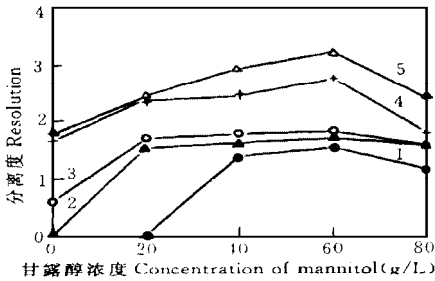


图 2 不同 HPMC 和甘露醇质量浓度下 314/323 bp 两片段分离度

Fig. 2 Resolution of 314/323 bp fragments in different HPMC and mannitol mass concentrations

HPMC mass conc: 1) 3g/L, 2) 4g/L, 3) 5g/L, 4) 8g/L, 5) 10g/L.

(2) 含有甘露醇筛分体系的迁移时间的重复性与不含甘露醇的筛分体系的重复性相当, 7 次连续运行的迁移时间的相对标准偏差为 1.2%。若每次运行使用新鲜的筛分试剂, 则重复性还会改善。

DNA 片段的淌度随甘露醇质量浓度的增大而线性的降低, 其迁移时间和分子的长度(碱基对, bp)成正比。图 3 显示在甘露醇不同质量浓度存在下的 5 g/L HPMC 溶液中 DNA 片段的迁移时间随长度的变化规律, 其线性相关系数大于 0.999 1。这意味着, 在此筛分体系中, 在所研究的 DNA 长度范围内(80~ 587 bp), 不同长度的 DNA 分子遵从相同的迁移规律。我们可以据此使用该体系分析确定 DNA 分子的长度, 该方法与传统的琼脂糖凝胶电泳相比

具有更大的准确度, 而且操作简单。

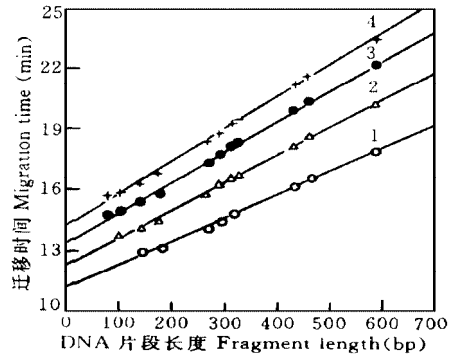


图 3 无胶筛分体系中 DNA 的迁移时间与长度的关系

Fig. 3 Plot of migration times vs DNA fragment length Mannitol conc: 1) 80g/L, 2) 60g/L, 3) 40g/L, 4) 20g/L.

4 讨论

甘露醇对分离的影响是由于它具有特殊的分子结构, 见图 4 式(1)。在电泳分离糖类分子时, 一般使用硼酸缓冲液体系, 原因在于硼酸根能与糖类分子上的多羟基形成四配位的络合物, 从而改变糖分子的带电状况, 改善分离, 见图 4 式(2)。纤维素为多糖类分子, HPMC 分子上的羟基虽然有些被取代, 但仍有 60% 以上的羟基未被取代。因此, HPMC 分子和甘露醇分子也同样可以和硼酸根络合, 这种络合物可在 HPMC 分子之间形成桥链(图 5)。Cheng 等^[8]曾报道甘油的存在可以提高纤维素筛分体系对 DNA 分子的筛分效果。甘露醇对分离的影响明显优

于甘油,原因在于甘油分子只有三个羟基,而甘露醇分子有四个羟基,而且两两处于反式,从而有利于甘露醇充当桥链上的一环。这种桥链的形成能减小或修饰交缠溶液中的网孔,从而大大改善 DNA 分子在 HPMC 筛分体系中的迁移行为,提高分离能力。

随着甘露醇质量浓度的增大,运行电流也在逐渐增大:从 0 g/L 时的 4.1 μA 到 60 g/L 时的 10.4 μA 。当甘露醇浓度从 60 g/L 增大到 80 g/L 时,电流基本不变,为 10.8 μA 。该现象间接证实了 HPMC、甘露醇以及硼酸根之间的络合。因在络合中游离 H^+ 被释放出来,使离子强度增大,从而电流也变大。甘露醇为 60 g/L 时的络合作用趋于饱和,再增大甘露醇质量浓度,分离能力受到负影响。

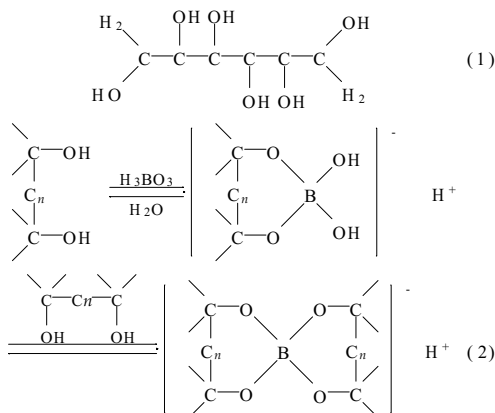


图 4 甘露醇的分子结构

Fig. 4 Structures of mannitol molecule

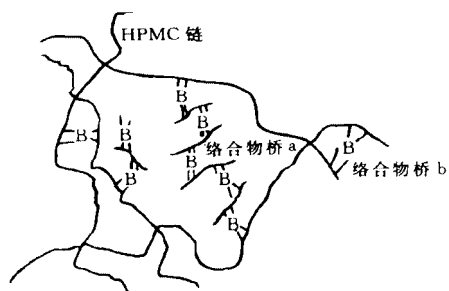


图 5 硼酸根、HPMC 及甘露醇分子间形成桥链示意图

Fig. 5 Illustration of the formation of tetraborate bridge

参考文献

- 1 Schwartz H E, Ulfelder K, Sunzeri F J et al. *J Chromatogr*, 1991, 559: 267-283
- 2 Gelfi C, Cossu G, Catra P et al. *J Chromatogr A*, 1995, 718: 405-412
- 3 McCord B R, Jung J M, Holleran E A et al. *J Liq Chromatogr*, 1993, 16: 1963-1981
- 4 Gelfi C, Righetti P G, Brancolini V et al. *Clin Chem*, 1994, 40: 1603-1605
- 5 Cheng J, Kasuga T, Mitchelson K R et al. *J Chromatogr A*, 1994, 677: 169-177
- 6 Felmler T A, Oda R P, Persing D A et al. *J Chromatogr A*, 1995, 717: 127-137
- 7 Weinberger R. *Practical capillary electrophoresis*. San Diego: Academic Press Inc., 1993. 99-128
- 8 Cheng J, Mitchelson K R. *Anal Chem*, 1994, 66: 4210-4214

Influence of Mannitol Additive on DNA Separation by Capillary Non-Gel Sieving Electrophoresis

Han Futian and Lin Bingcheng*

(Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116023)

Abstract Polymer solutions with high concentration were employed as sieving buffer in order to obtain satisfactory separation of smaller DNA fragments with length of less than 1 000 base pairs. The concentrated polymer solution had very high viscosity, which was difficult to be pumped into or out of the capillary. Mannitol additive can enhance the sieving ability of hydroxy-propylmethylcellulose (HPMC) solution in a Tris-Borate-EDTA background electrolyte. With the existence of mannitol, good separation of PGEM-3Zf(+)/Hae III was able to be obtained in a less concentrated HPMC solution with relatively low viscosity. The optimum mass concentration of mannitol was investigated and it was found that 60 g/L mannitol could give the best results. Mannitol chain could be formed through hydrogen bond among mannitol, HPMC and borate. This kind of mannitol chain shaped the network and decreased the pore size, so the separation was greatly enhanced.

Key words capillary electrophoresis, DNA fragment, mannitol