

样品稀释对毛细管电泳分离检测 DNA 片段的影响*

宋立国 陈 洪 张 乐 程介克 **

(武汉大学化学系 武汉 430072)

提 要 通过理论推导和实验验证表明:适当稀释 DNA 样品溶液,采用流体力学进样或电动进样都不会较大地减低峰高,而 DNA 片段毛细管电泳的分离效率和分离度还能有所提高。采用稀释样品的方法可提高 DNA 样品的使用效率。采用羟乙纤维素无胶筛分介质分离了 DNA 片段。用激光诱导荧光(氩离子激光器,488 nm)电荷耦合器件检测。用低浓度的筛分介质(0.4%)分离了分子质量较大的 λ DNA-Hind III 全部 8 个片段(125 bp~23 130 bp)。用高浓度的筛分介质(1.6%)分离分子质量较小的 pBR322-Hae III 22 个片段(18 bp~587 bp)。将 pBR322-Hae III DNA 样品溶液稀释 10 倍时,123 bp 和 124 bp 两个片段得到了分离。

关键词 毛细管电泳,激光诱导荧光,电荷耦合器件,样品稀释,DNA 片段

分类号 O658

1 前言

用毛细管电泳分离 DNA 片段具有高效、高速、进样量少和耗用试剂低等优点,正成为分子生物学中重要的研究手段,在生物医学、法医学等领域发挥着越来越重要的作用^[1]。在分子生物学实际的研究工作中,DNA 样品溶液体积小,一般只有 μ L 级,而毛细管电泳仪,无论是商品仪器还是实验室组装的仪器,都要求样品溶液最少要有数微升到数十微升,这样才能使毛细管的进样端和电极插入到样品溶液中,完成进样操作。由于 DNA 样品较容易被污染降解,与毛细管或电极接触后,一般仅在一天左右 DNA 片段就会基本完全降解。在需要使用 DNA 分子质量标准物(DNA Marker)作毛细管电泳条件实验时,往往需要大量的 DNA 样品试剂,而这些 DNA 试剂一般价格都较昂贵。在实验中有时由 PCR 扩增的 DNA 样品溶液的离子强度较高,会导致毛细管电泳分离效率降低,分离度不能满足要求^[2]。样品堆积(sample stacking)作为一种提高毛细管电泳检测灵敏度的柱上浓缩方法,由于其简便易行,近来得到了越来越广泛的应用^[3,4]。样品堆积是通过将分析样品溶于离子强度低于电泳载体缓冲溶液后再进行流体力学进样(电堆积富集)^[5]或电动进样(场增强进样)^[6]来实现的。本文依据这一原理通过理论推导和实验验证表明:适当稀释样品并将其分装成若干份后分别使用,峰高没有降低或者降低得较少,分离效率和分辨率还有所提高。在分子生物学研究中,采用毛细管电泳分离检测 DNA 片段,能节约样品,提高

样品的使用效率,具有重要的实际意义。

2 实验部分

2.1 实验装置

自行组装的激光诱导荧光电荷耦合器件毛细管电泳装置,由高压电源(华中理工大学研制)、毛细管(DB-1, J&W Scientific Folsom, CA, USA, 总长度 60 cm,有效分离长度 55 cm)、氩离子激光器(上海埃恩激光技术有限公司)、单色仪(HR320, Instrument SA, Inc., USA)、电荷耦合器件(CCD, 512 \times 512 EG&G PAR, USA)、计算机(Gateway 2000 4DX 2-50V)等部分组成^[7]。

2.2 试剂

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)均为国产分析纯试剂;羟乙纤维素为 Serva 公司产品(2%的水溶液 25 $^{\circ}$ C 时的粘度为 4 Pa \cdot s);噻唑橙(TO)为 Aldrich 产品; λ DNA-Hind III 及 pBR322-Hae III 购自华美生物工程公司,二者都保存于 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA(pH 7.8)的缓冲溶液中。

载体电解质溶液采用 1 \times TBE 缓冲溶液,由 89 mmol/L Tris、89 mmol/L 硼酸和 2 mmol/L EDTA 组成。筛分介质溶液的配制和 DNA 片段毛细管电泳分离步骤见文献^[8]。将荧光插入试剂加入筛分介质缓冲溶液中,用无菌的双蒸水稀释 DNA 样品。

3 结果与讨论

3.1 样品稀释对毛细管电泳分离检测的影响的理论推导

* 国家自然科学基金资助项目

** 通讯联系人

本文收稿日期:1998-05-19,修回日期:1998-07-12

当样品溶液与载体电解质溶液的离子强度不同时,样品溶液与载体电解质溶液的电阻率不同,由此可导致进样前后在外加电压作用下分配在样品区带内的电场强度与充满电解质溶液的毛细管柱的其它部分不同,样品离子的迁移速度也不相同。如果以 C, E, V 分别代表样品溶液和载体电解质溶液中离子的浓度、电场强度、样品溶液中被分离离子的迁移速度,以 s 和 b 分别代表样品溶液和载体电解质溶液,以 i 代表被分离的样品离子,则在理想条件下,以上关系可近似表达为

$$V_{is} : V_{ib} = E_s : E_b = C_b : C_s \quad (1)$$

式(1)中假定样品溶液与载体电解质溶液的离子强度由相同的某一电解质控制,而其浓度分别为 C_s 与 C_b 。

由于被分离离子在样品溶液与载体电解质溶液的边沿前后流量须保持平衡,因此有 $C_{is}V_{is} = C_{ib}V_{ib}$, 与式(1) 结合可得

$$C_{ib} = C_{is}V_{is}/V_{ib} = C_{is}C_b/C_s \quad (2)$$

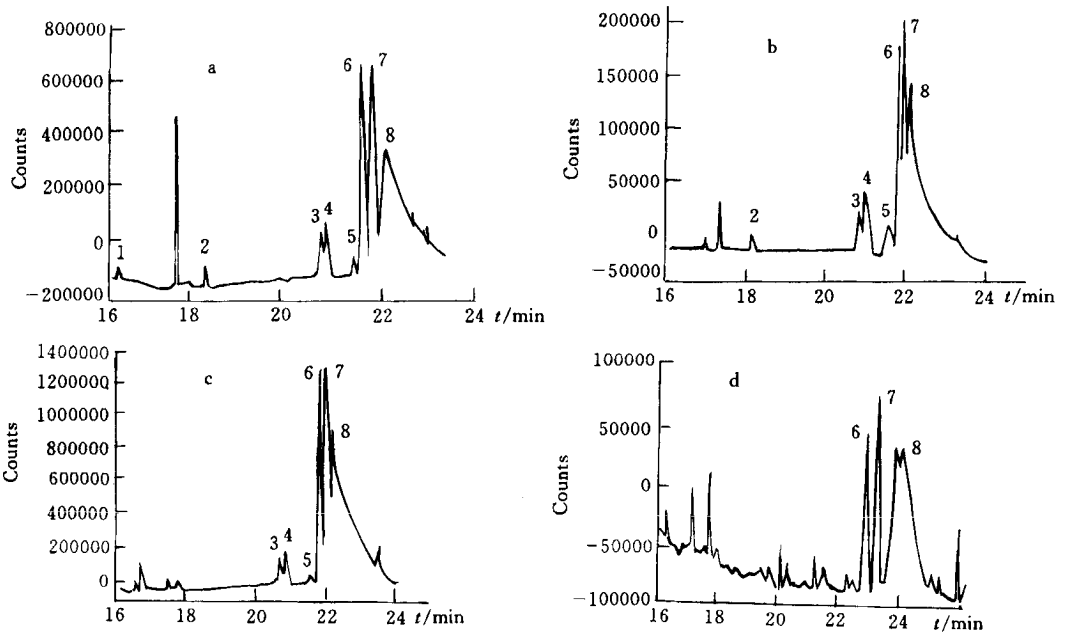


图 1 样品稀释对流体动力学进样后 DNA 片段分离的影响
Fig. 1 Influence of sample dilution on separation of DNA fragments by hydrodynamic injection

实验条件:毛细管 DB-1 柱,内径 $100 \mu\text{m}$,外径 $365 \mu\text{m}$,涂层厚度 $0.1 \mu\text{m}$,总长度 60 cm ,分离长度 55 cm ;载体电解质溶液: $1 \times \text{TBE}$ 缓冲溶液; 0.4% 羟乙基纤维素, $1 \mu\text{mol/L}$ 噻唑橙; DNA 片段: $\lambda \text{ DNA-Hind III}$ (1 g/L); 流体动力学进样, $40\text{s}/8\text{cm}$; 分离电压: -12 kV , 电流 $20 \mu\text{A}$; 氩离子激光器(激发波长为 488 nm); CCD 检测器(发射波长为 520 nm); 样品稀释倍数: (a)1, (b)2, (c)4, (d)8。

Condition: Capillary DB-1 column, $100 \mu\text{m}$ (i. d.), $365 \mu\text{m}$ (o. d.), coating thickness $0.1 \mu\text{m}$, total length 60 cm , effective length 55 cm ; carrier electrolyte: $1 \times \text{TBE}$; 0.4% hydroxyethyl cellulose, $1 \mu\text{mol/L}$ thiazol orange; DNA fragment: $\lambda \text{ DNA-Hind III}$ (1 g/L); hydrodynamic injection $40\text{s}/8\text{cm}$; separation voltage -12kV , current $20 \mu\text{A}$; Ar ion laser (wavelength of excitation light, 488 nm); CCD detector (wavelength of emission light, 520 nm); ratios of sample dilution, (a)1, (b)2, (c)4, (d)8. 1. 125, 2. 564, 3. 2027, 4. 2322, 5. 4361, 6. 6557, 7. 9416, 8. 23130.

如果将样品稀释 γ 倍后进样,则其中各离子的浓度降低 γ 倍,即 $C'_{is} = C_{is}/\gamma, C'_s = C_s/\gamma$,代入式(2) 得

$$C'_{ib} = C_{ib} \quad (3)$$

式(3)表明将样品稀释后进样,进样完成后在分

离中可保证被分离离子的浓度保持不变,即在电泳谱图中相对应的峰高保持不变,而样品稀释可以较大地节约样品。

3.2 流体力学进样时样品稀释对 DNA 片段分离的影响

λ DNA-Hind III 的分离采用 0.4% 羟乙基纤维素作为筛分介质。由于筛分介质粘度较低,适于考察样品稀释对于流体动力学进样后 DNA 片段分离的影响,结果如图 1 所示。从图 1-a~c 中可以看出 λ DNA-Hind III 样品在稀释倍数小于 4 时,尽管峰高和分离度都发生一定的变化,但总体来说变化不大。而当稀释倍数为 8 时,峰高的降低及分离度的提高已相当明显。

3.3 电动进样时样品稀释对 DNA 片段分离的影响

pBR322-Hae III DNA 的分离采用 1.6% 羟乙基纤维素作为筛分介质。由于介质的粘度极高,不便于考察样品稀释对流体动力学进样后 DNA 片段分离

的影响,我们用它考察了样品稀释对电动进样后 DNA 片段分离的影响,结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,pBR322-Hae III DNA 样品稀释 10 倍后,峰高变化不明显,虽基线噪声明显增大,但分离度有所改善,表现在 8/9(即 123/124)峰发生了明显的分裂。

以上分离结果表明,样品稀释进样应用于 DNA 片段的分离中效果显著,分离时取少量 DNA 样品稀释后进样,可保证检测灵敏度不降低或降低较小,分离度还可以得到改善,更可贵的是极大地节约了样品。

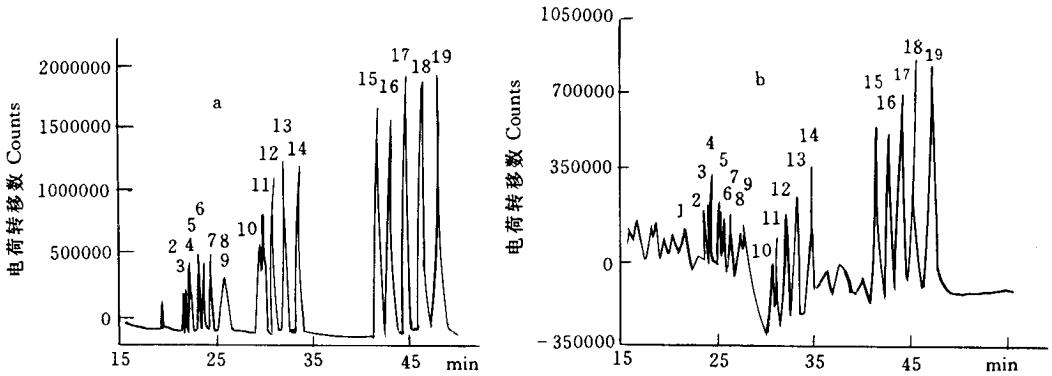


图 2 样品稀释对电动进样后 DNA 片段的影响
Fig. 2 Influence of sample dilution on separation
of DNA fragments by electrokinetic injection

实验条件:1.6%羟乙基纤维素;电动进样,-8 kV/24s;DNA 片段:pBR322-Hae III DAN(0.5 g/L);样品稀释倍数:(a) 1,(b)10。其它实验条件参见图 1。

Conditions:1.6% hydroxyethyl cellulose; electrokinetic injection -8 kV/24s; DNA fragments:pBR322-Hae III (0.5 g/L); ratio of DNA sample dilution:(a)1,(b)10; others as Fig. 1.

1. 18/21, 2. 51, 3. 57,4. 64, 5. 80,6. 89,7. 104,8. 123, 9. 124, 10. 184, 11. 192, 12. 213, 13. 234, 14. 267, 15. 434, 16. 458, 17. 504, 18. 540, 19. 587.

参 考 文 献

- 程介克. 分析科学学报,1994,10(3):61
- Song L G, Qu Q Y, Yu W L et al. J Chromatogr, 1995, 696, :307-319
- 宋立国,陈洪,程介克. 分析化学,1997,25(6):722~727
- 胡深,胡涌刚,李培标,程介克. 分析化学,1995, 24 (9):1028~1032
- Albin M, Grossman P D, Moring S E. Anal Chem, 1993,65(10):489A-496A
- Chien R L, Burgi D S. Anal Chem, 1992,64(8):489A-496A
- Zhang Le, Chen Hong, Hu Shen, Cheng Jieke. J Chromatogr B, 1998,707(1-2):59-67
- 陈洪,宋立国,熊少祥,程介克. 高等学校化学学报, 1997,18(11):1773~1776

Influence of Sample Dilution on Separation and Detection of DNA Fragments by Capillary Electrophoresis

Song Liguo, Chen Hong, Zhang Le and Cheng Jieke*

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan, 430072)

Abstract Capillary electrophoresis has become an important and useful method to separate and determine DNA fragments. In molecular biochemistry, the volume of DNA sample is very small (μL level) and DNA sample is liable to be contaminated and degraded. According to theoretical inference and experiments, we propose that dilution of DNA sample solution can increase separation efficiency and resolution without evidently reducing height of peaks. By this method, the usage efficiency of DNA sample can be improved. It is also demonstrated the separation and detection of DNA fragments by capillary electrophoresis with hydroxethyl cellulose non-gel sieving matrix and with laser-induced fluorescence charge-coupled device as detector. By using lower concentration non-gel matrix (0.4%), all 8 larger size fragments of λ DNA/Hind III (125 bp-23130 bp) can be completely separated. Twenty smaller size fragments of pBR322-Hae III DNA (18 bp-587 bp) can be separated by higher concentration (1.6%) non-gel matrix. As ratio of sample dilution is 10, two adjacent fragment (123 bp and 124 bp) of pBR322-Hae III DNA can be separated.

Key words capillary electrophoresis, DNA fragments, sample dilution, laser-induced fluorescence, charge-coupled device

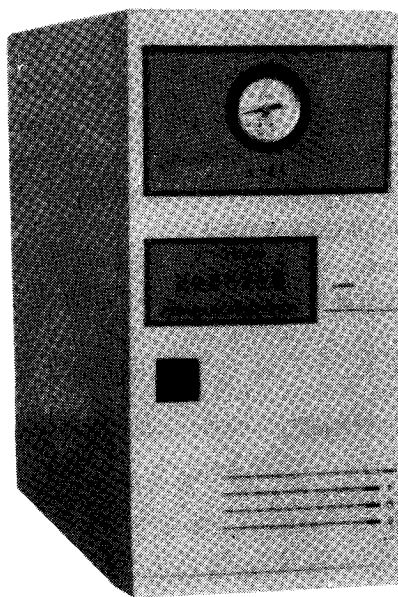
SPH 型全自动超纯氢发生器

【性能指标】(1)产氢速率:0~200,0~1000,0~2000,0~3000mL/min;(2)氢输出压力0~0.4MPa;(3)产氢纯度99.9995%~99.9999%;整机功率<200W。

SPN 型超纯氮发生器

【性能指标】(1)产氮速率:0~210mL/min(常压);(2)氮气输出压力:0.05~0.4MPa,(3)产氮纯度:99.9995%(若加脱氧器可达99.9999%)。

我厂还生产适用于气相色谱的无油润滑空气压缩机,以及空分设备不可缺少的总烃分析仪。我厂还备有高压截止阀、六通进样阀、气瓶微调阀以及各种备件。



中国科学院大连化学物理研究所仪器厂

厂址:辽宁省大连市中山路459号(大连113信箱)

邮编:116023 网址:www.dicp.ac.cn 传真:(0411)4671015

联系人:郑录明,李健 电话:(0411)4671015,4691484 电报:4114