

无胶筛分毛细管电泳分离盐生盐杆菌 DNA 片段

王园朝², 熊 音³, 曾昭睿¹, 程介克¹, 沈 萍³

(1. 武汉大学化学系, 湖北 武汉 430072; 2. 咸宁师范高等专科学校化学系, 湖北 咸宁 437005; 3. 武汉大学生命科学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 由羟乙基纤维素和聚吡咯烷酮混合组成筛分介质, 在涂敷聚硅氧烷的毛细管柱上, 研究了 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段分离的最佳条件。实验表明, 混合筛分介质与单一的羟乙基纤维素筛分介质相比, 改变了筛分介质的孔径大小, 抑制了毛细管壁对 DNA 的吸附, 从而改善了分离, 并首次在同一条件下将所含的 13 个片段完全分离。方法简便、快速, 曾应用于两组盐生盐杆菌 DNA 片段的分离及其碱基对数目的推测。

关键词: 无胶筛分毛细管电泳, 混合筛分介质, DNA 片段, 盐生盐杆菌

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2001)05-0439-04

1 前言

近年来, 毛细管电泳在分子生物学、分子医学和生命科学方面应用日益广泛^[1], 在脱氧核糖核酸(DNA)片段的分离和测序方面的应用尤其频繁。用于分离 DNA 片段的毛细管电泳方法主要有毛细管凝胶电泳^[2]和无胶毛细管电泳^[3~8]。前者以凝胶作筛分介质, 分离效率高, 但制柱技术要求高, 易产生气泡, 重现性差, 且柱寿命短^[9]。后者一般以非交联的高分子化合物溶液作筛分介质, 由于其具有便于注入和冲出毛细管, 易实现高效自动化分离等优点, 实际应用中采用较多。文献[10]报道采用不同类型和分子质量的线形高分子组成混配的筛分介质能提高毛细管电泳分离 DNA 片段的分辨率。

本文由羟乙基纤维素(HEC)和聚吡咯烷酮(PVP)混合组成筛分介质, 在涂敷聚硅氧烷的毛细管柱上, 探讨了完全分离 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 13 个片段的最佳条件, 并在此条件下进行了两组盐生盐杆菌 DNA 片段的分离, 根据迁移时间与 DNA 碱基对数目关系图推测得到其碱基对数目的大概范围。方法简便、快速, 结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器及试剂

Spectra-Phoresi 1000 型毛细管电泳仪(Thermal 分离产品公司, 美国), 联想 486 计算机(PS/100PC, 中国), DB-1 气相色谱毛细管柱(52.5 cm(有效长度 45 cm) × 100 μm i.d., J & W 科学公司, 美国)。

Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段购自华美生物工程公司(样品浓度为 0.55 g/L), 含 13 个片段, 其编号及长度分别为: 1 号, 125 bp; 2 号, 564

bp; 3 号, 831 bp; 4 号, 941 bp; 5 号, 1 375 bp; 6 号, 1 584 bp; 7 号, 1 904 bp; 8 号, 2 027 bp; 9 号, 2 530 bp; 10 号, 4 269 bp; 11 号, 4 973 bp; 12 号, 5 148 bp; 13 号, 21 227 bp。HEC 购自 Serva 公司(25 °C 时, 质量分数为 2% 的水溶液, 粘度为 4 Pa·s); PVP 购自上海佰奥生物科技公司(进口分装, K30); 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硼酸和乙二胺四乙酸(EDTA)均为国产分析纯; 古生菌 DNA 片段由武汉大学生命科学院提供。

2.2 筛分介质的制备

筛分介质溶液每天使用前配制, 取一定体积的缓冲溶液的储备液(含 445 mmol/L Tris, 445 mmol/L 硼酸和 10 mmol/L EDTA, pH 8.9)与一定量的蒸馏水混合加热至近沸, 然后趁热搅拌, 缓慢加入一定量的羟乙基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮, 于磁力搅拌机上搅拌 1 h 后, 再于离心机上(12 000 r/min)离心 10 min, 超声脱气后备用。

2.3 毛细管电泳方法

进样前, 用水和筛分介质分别冲洗 DB-1 柱 10 min, 并施加一定电压预平衡至基线稳定, 进样浓度为 0.55 g/L, 采用电动进样方式, 在负电压下运行, 于 260 nm 波长处检测。

3 结果与讨论

3.1 筛分介质溶液中各组分及浓度的影响

DB-1 气相色谱柱内壁涂层为非极性的聚甲基硅氧烷, 其涂层稳定, 重现性好, 柱寿命长, 因此选作 DNA 片段分离的毛细管电泳柱。

用缓冲溶液的储备液稀释成含 89 mmol/L Tris, 89 mmol/L 硼酸和 2 mmol/L EDTA 作流动相。

Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段常作为标

示物 marker) 来考察毛细管电泳对 DNA 片段的分离效果。在以 0.7% 琼脂糖作凝胶介质的平板电泳分离中, 1 号和 2 号片段未出峰, 11 号和 12 号片段未分离。

首先, 我们以 1% 的 HEC 与上述缓冲溶液组成筛分介质进行 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段的分离, 结果长度较短的 DNA 片段 1 号, 2 号, 3 号和 4 号以及较长的 DNA 片段 7 号, 8 号和 9 号得到较好分离, 但 5 号和 6 号, 11 号和 12 号片段未能分离, 13 号是一峰包, 未见明显谱峰, 可能吸附严重。

由于 PVP 是一种易溶于水的线形高分子物质, 溶于水后能与 HEC 一起形成一种胶态溶液, 改变了筛分介质的孔径大小, 利于某些 DNA 片段的分离。另一方面, PVP 的加入还可抑制毛细管内壁对 DNA 的吸附, 降低电渗流, 利于改善筛分介质选择性。在上述筛分介质中, 我们加入 10 mL 质量分数为 10% 的 PVP 水溶液, 使其在整个介质中的质量分数为 2%, 在相同条件下, 对 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段进行了分离, 结果见图 1。可见在此条件下, 5 号和 6 号, 11 号和 12 号 DNA 片段分别得到了较好的分离, 13 号片段也出现明显的峰。这说明 PVP 在改善分离和抑制管壁吸附方面具有一定的作用。在此条件下分离 DNA 片段, 最高柱效可达 $4.2 \times 10^5/m$ 。

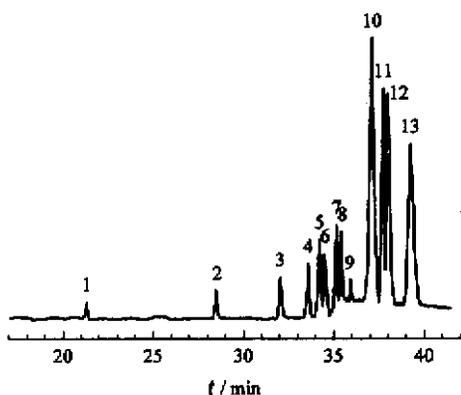


图 1 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段的电泳图

Fig.1 Electropherogram of Lambda DNA/EcoR I + Hind III fragments

Conditions: DB-1 capillary column (52.5 cm (effective length), 45 cm) \times 100 μ m i. d.); 1.0% hydroxyethylcellulose (mass percentage); 2.0% polyvinylpyrrolidone (mass percentage) (relative molecular weight is about 30,000); buffer, 89 mmol/L Tris-89 mmol/L boric acid-2 mmol/L EDTA, pH 8.9; separation voltage, -5 kV; temperature, 25 $^{\circ}$ C; injection, -10 kV \times 0.5 s; detection at 260 nm; sample concentration 0.55 g/L.

Peaks: 1. 125 bp; 2. 564 bp; 3. 831 bp; 4. 941 bp; 5. 1375 bp; 6. 1584 bp; 7. 1904 bp; 8. 2027 bp; 9. 2530 bp; 10. 4269 bp; 11. 4973 bp; 12. 5148 bp; 13. 21227 bp.

HEC 和 PVP 的浓度对 DNA 片段迁移行为的影响较大。在筛分介质中, HEC 自身以及与 PVP 之间相互缠绕, 形成类似凝胶中的“筛孔”, 随着它们浓度的增加筛分介质中“筛孔”孔径减小, 对 DNA 片段迁移阻力增大, 同时介质的粘度也随浓度的增加而增大, 导致 DNA 片段电泳淌度减小, 迁移时间增长。当 PVP 的质量分数为 2.0% 而 HEC 的质量分数低于 1.0% 时, 9 号、10 号、11 号、12 号片段不能分离, 另外 7 号、8 号片段和 5 号、6 号片段也不能分离。当 HEC 的质量分数大于 1.4% 时, 介质粘度过大, 筛分溶液进入和洗出毛细管比较困难。因此 HEC 的质量分数选取 1.0%。PVP 的质量分数在 1.8% ~ 2.4% 范围内对分离影响不大。浓度过小, 对分离的改善不明显; 浓度过大, 反而不利于一些大片段分离, 且增加了介质的粘度。实验中选取的 PVP 质量分数为 2.0%。

3.2 温度的影响

温度主要影响筛分介质的粘度和“筛孔”的大小。一方面, 随温度升高, 介质粘度减小, DNA 片段迁移速率增大, 使某些碱基对数目接近的片段分离变差。另一方面, 随温度升高, HEC 分子在筛分溶液中运动活跃, 造成“筛孔”孔径减小, 使碱基对数目较大的片段分离变差, 而有助于碱基对数目小的片段的分离。实验表明, 当电泳温度为 45 $^{\circ}$ C 时, 5 号和 6 号片段可以分离, 但 11 号和 12 号片段不能分离。当电泳温度过低时, 凝胶介质粘度太高, 柱前过滤困难, 而且电泳速度太低。实验中选择电泳温度为 25 $^{\circ}$ C。

3.3 电压对分离的影响

电压对分离的影响表现在两方面, 一是对 DNA 片段电泳淌度的影响, 电压高 DNA 迁移速度加快, 使各片段迁移速率的差别减小, 分离选择性变差。另一方面, DNA 片段, 特别是大片段在电泳中会沿电场方向定向伸展^[11], 这种伸展在低电场时对分离影响不大, 但随电场强度增加, 伸展程度增大, 造成谱带拓宽, 分离变差。我们在 -3.0 kV ~ -20 kV 范围内, 研究了电压对 Lambda DNA/EcoR I + Hind III 片段分离的影响, 发现随电压降低, 分离度变好, 但电压过低, 分离时间增加。实验中选择 -5.0 kV 的电压。

图 2 是 DNA 片段迁移时间与其碱基对数目的关系曲线。对长度小于 1000 bp 的短链 DNA 片段, 其迁移时间与碱基对数目呈良好线性关系, 相关系数为 0.9887。而长度大于 1000 bp 的长链 DNA 片段, 其迁移时间与碱基对数目的对数呈良好的线性关系, 相关系数为 0.9882。

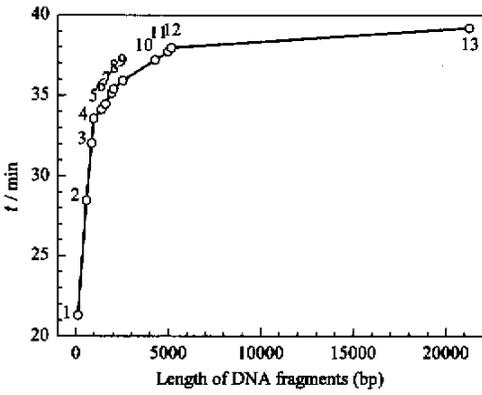


图 2 迁移时间与 DNA 片段长度的关系
Fig.2 Relationship of migration time and length of DNA fragments
All conditions are the same as in Fig.1.

4 盐生盐杆菌 DNA 片段的分离鉴定

盐生盐杆菌(*halobacterium halobium*)是一种只能在高浓度盐溶液(4 mol/L NaCl)下生长良好的极端嗜盐古生菌。它不仅具有特殊的分类地位,而且其细胞膜上还含有具特殊功能的膜蛋白——细菌视紫红质^[12],因而受到国内外学者广泛重视,相关的分析研究十分活跃。将处理好的盐生盐杆菌 DNA 的两组片段(片段 I 和片段 II)用少量无菌水稀释后,在最佳条件下分别进行实验,结果见图 3。由图 3 可知,这两组 DNA 片段电泳后分别得到两个峰,依据 DNA 片段迁移时间与所含碱基对数目的关系,计算其碱基对数目分别在 350 bp, 370 bp 和 900 bp, 5 200 bp 左右。

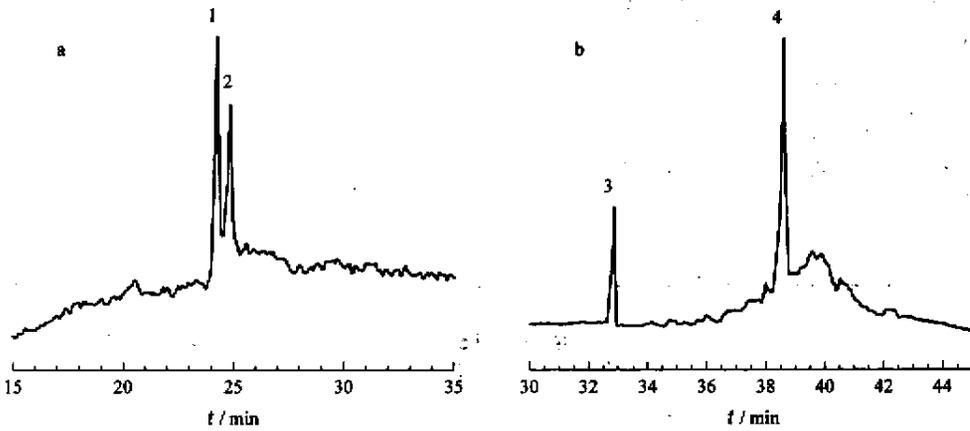


图 3 盐生盐杆菌 DNA 片段 I (a) 和片段 II (b) 的电泳分离图
Fig.3 Electropherograms of DNA fragment group I (a) and DNA fragment group II (b) of *halobacterium halobium*
All conditions are the same as in Fig.1.
1. 350 bp ; 2. 370 bp ; 3. 900 bp ; 4. 5 200 bp.

参考文献：

[1] Baba Y. J Chromatogr B, 1996, 687 :271-302
 [2] Baba Y, Matsuura T, Wakamoto K, et al. Anal Chem, 1992, 64 :1 221-1 225
 [3] Manabe T, Chen N, Terabe S, et al. Anal Chem, 1994, 66 :4 243-4 252
 [4] Barron A E, Soane D S, Blanch H W. J Chromatogr, 1993, 652 :3-16
 [5] Bocek P, Chrambach A. Electrophoresis, 1992, 13(1-2) :31-34
 [6] CHEN Hong, SONG Li-guo, XIONG Shao-xiang, et al. Chemical Journal of Chinese Universities, 1997, 18(11): 1 769-1 773
 陈 洪, 宋立国, 熊少祥, 等. 高等学校化学学报, 1997, 18(11):1 769-1 773
 [7] CHEN Hong, ZHANG Le, LIU Bi-feng, et al. Journal of Analytical Science, 1999, 15(6) :441-445
 陈 洪, 张 乐, 刘笔锋, 等. 分析科学学报, 1999, 15(6) :441-445
 [8] Gao Q, Yeung E S. Anal Chem, 1998, 70 :1 382-1 388
 [9] CHENG Jie-ke. Journal of Analytical Science, 1994, 10(2) :65-70
 程介克. 分析科学学报, 1994, 10(2) :65-70
 [10] Skeidsvoll J, Ueland P M. Anal Biochem, 1995, 231 : 359-365
 [11] Williams P E, Marino M A, Del Rio S A, et al. J Chromatogr A, 1994, 680 :525-540
 [12] Mohan S, Dow C, Coles J A. Prokaryotic structure and function: a new perspective. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 1-16

Separation of DNA Fragments from Halobacterium Halobium by Capillary Electrophoresis with Non-Gel Sieving Media

WANG Yuan-chao², XIONG Yin³, ZENG Zhao-rui¹, CHENG Jie-ke¹, SHEN Ping³

(1. Chemistry Department, Wuhan University, Wuhan 430072, China ;

2. Chemistry Department, Xianning Teachers College, Xianning 437005, China ;

3. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract : The optimum electrophoresis separation conditions of Lambda DNA/EcoR I + Hind III fragments were investigated using the capillary column DB-1 coated with polysiloxane. When hydroxyethylcellulose (HEC , 1.0% , mass percentage) was used as the only non-gel sieving medium solution , some Lambda DNA fragments could not be separated. After polyvinylpyrrolidone (PVP , 2% , mass percentage) being added into the medium solution , PVP and HEC formed a network colloidal solution in buffer , and changed the network hole size of sieving media. In addition , the results showed that PVP could restrain the adsorption of capillary to DNA , reduced electroosmotic flow , and improved the selectivity of separation. For the first time , all fragments of Lambda DNA marker was separated completely under the same condition of mixed sieving medium solution . The method was applied to separate two groups of DNA fragments of halobacterium halobium , and the base pair number was conjectured.

Key words : non-gel sieving capillary electrophoresis ; mixed sieving medium ; DNA fragment ; halobacterium halobium

膜科学与技术 (双月刊)

- 全国中文核心期刊
- 中国科技论文统计源期刊
- 中国学术期刊综合评价数据库来源期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 1286 种科技论文统计源期刊中影响因子排序第 96 名期刊
- 同类 47 种化工期刊中 , 影响因子排序第 4 名期刊
- 被引频次最高的前 500 名期刊
- 美国《化学文摘》(CA)、《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)、美国 DIALOG 系统检索和收录期刊
- 中国化学文摘数据库、中国化学化工文摘、中国化学化工期刊文献总录、中国石油化工文摘等收录期刊
- 获 1998 年度化工系统优秀信息成果二等奖期刊
- 国内唯一报道膜技术、膜材料、膜装置、膜过程和水处理技术等内容的专业性学术刊物

主要内容 : 介绍有关膜和膜技术及水处理技术的基础理论研究 ; 报道国内外膜科学和技术及水处理技术等的最新研究成果及在石油、化工、冶金、医药、食品、环保、生物制品提纯等领域的应用成果和产业化情况 ; 反映该学科的发展动态和趋势及最新信息等。

读者对象 : 从事膜分离技术研究、教学及应用等的科研人员、大专院校师生和工程技术人员等。

国内统一刊号 : CN 62-1049/TB 国际出版物连续刊号 : ISSN 1007-8924 邮发代号 : 54-40 全国各地邮局均可订阅。定价 8.00 元/期 , 全年 48.00 元。漏订者可到编辑部补订 (另加 15% 邮费)。

地址 : 北京市朝阳区北土城西路 9 号 邮编 : 100029

电话 (010) 62376642 传真 (010) 62376625

E-mail : CBSC@china-bluestar.com

感谢广大读者及客户多年来给予的大力支持和良好合作
欢迎订阅投稿及刊登广告