

微量 DNA 的聚丙烯酰胺凝胶薄板电泳分析

张志新

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

聚丙烯酰胺凝胶薄板电泳, 是进行微量 DNA 分析的一种有效方法。它能快速鉴定 DNA 的迁移位置, 并将分子量大小不同的 DNA 片段进行分离。

通常 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳均采用 2—3 毫米厚的平板胶, 由于板胶厚度大, 因此存在上样量大, 凝胶易受热而电泳带子扩散等缺点。本法经改用 0.5 毫米薄板胶和纸片吸样法后, 具有下述优点: 1. 上样量小, 最低分辨量可达 20 毫微克; 2. 耗材少, 凝胶等原料大为节省; 3. 优于迄今已有报道的微量毛细管电泳, 设备简单, 操作方便。

本文将着重介绍聚丙烯酰胺凝胶薄板电泳的操作技术以及在本实验室中的应用。

材料和方法

(一) 材料

1. 仪器

凝胶薄板电泳由稳压电源与电泳槽两部分组成。稳压电源为直流稳压装置, 采用国产 DY74 型电泳仪。电泳槽是由有机玻璃材料做成, 电极为铂金丝, 凝胶支持载体为普通光学显微镜的玻璃载片。

2. 试剂

- 30% 丙烯酰胺母液(交联度 3.3%)。
- 10 倍浓 TBE 缓冲液 (0.89M Tris-0.89M 硼酸-0.025M Na₂EDTA pH8.3)。
- 1.5% 过硫酸铵(临用时新鲜配制)。
- β -二甲基胺基丙腈, 即 TEMED。
- 含 40% 蔗糖的 0.2% 溴酚蓝溶液。
- 0.2% 甲苯胺蓝(Toluidine Blue)水溶液或 4×10^{-3} 毫克/毫升溴化乙锭(Ethidium Bromide)。

(二) 实验方法

1. 薄板凝胶的制备 将有机玻璃制成与薄板凝

胶同样大小的长方形方框模子, 模子形状似一无盖方盒子, 其大小为 $72 \times 24 \times 0.5$ 毫米。

然后分别取 0.6 毫升 A 液、0.5 毫升 B 液、0.2 毫升 C 液、3.7 毫升蒸馏水混匀; 真空泵抽除混合液中气泡后, 加 2 微升 D 液混匀。用吸管吸取配胶液注于有机玻璃方框模子中, 以载片作为盒盖复盖, 于 20℃ 左右室温下静置半小时, 待凝胶聚合后, 取下有机玻璃方框, 这样制得的粘附在载片上的板胶, 浓度为 3.5%, 交联度为 3.3%, pH8.3。

2. 预电泳 将 B 液稀释 10 倍, 分别置于正负电极槽内。水平搁置薄板胶, 然后分别在胶的两端搭上双层普通滤纸, 滤纸的一端搭于胶上, 另一端则浸于电极液使成闭合通路, 接通电源, 电流调至 2 毫安, 预电泳 20 分钟。

3. 纸片吸样 DNA 样品浓度通常为 1000 毫微克/微升。每块板胶可同时电泳五个样品, 上样量为 0.02—0.05 微升(相当于 DNA 含量 20—50 毫微克)。加样采用 0.5 微升规格的微量注射器, 吸取一定量样品, 注于 1.5×0.4 毫米大小的普通定性滤纸片上, 然后用钟表游丝镊子将纸片小心地嵌入靠近负极一端的凝胶中。

4. 电泳 接通电源, 样品由负极向正极移动, 电泳在与预电泳相同条件下进行半小时, 当标记的溴酚蓝泳动至距正极端 1 厘米时, 停止电泳。

5. 显色 将带有载片的凝胶置于 F 液中染色半小时, 蒸馏水脱色(如用溴化乙锭染料, 则在紫外灯下观察结果)。

应用结果与讨论

我们按上述方法对小牛胸腺核小体 DNA 进行了电泳分析。小牛胸腺染色质的小球菌核酸酶的酶解图谱如图 1 所示。图 1 a、c 为未经柱层析分离的小牛胸腺染色质 DNA 的酶解样品, 在电泳图谱中可清晰分辨核小体的单体



图1 小牛胸腺染色质 DNA 酶解的厚板与薄板电泳图谱的比较

小牛胸腺染色质在 37℃、小球菌核酸酶酶浓度 4 单位/1A₂₆₀·DNA 条件下消化 20 分钟。a, c 为酶解样品未经柱层析分离的 DNA 带谱；b, d 为酶解样品经柱层析分离得到的核小体核心颗粒 DNA 带谱。

a, b. DNA 的薄板电泳图谱
c, d. DNA 的厚板电泳图谱

DNA 及其多聚体 DNA 带子；b, d 为经柱层析分离的小牛胸腺染色质核小体核心颗粒 DNA 带谱，b, d 上样量分别为 20 毫微克和 20 微克。我们将规格为 72×24×0.5 毫米的薄板凝胶电泳图谱(图 1a, b)与规格为 200×170×3 毫米的厚板电泳图谱(图 1c, d)进行比较发现，除两者效果相同外，薄板电泳带子不易扩散，上样量少，走时短，耗电低，且无需低温条件；而厚板电泳则耗电大，走时长，且需低温(表 1)。

表 1 厚板与薄板凝胶电泳实验结果的比较

凝胶类别	上样量(毫微克)	耗材(百分比)	电流(毫安)	电泳时间(小时)
厚板 3.0 毫米	20,000	100%	20	5
薄板 0.5 毫米	20	1%	2	0.5

表 2 DNA 长度与凝胶浓度的选择

DNA 长度(碱基对)	20—100	80—400	400—1000
凝胶浓度	12%	3.5—5%	3.5%
交联度*	3.3%	3.3%	3.3%

* 交联度 = $\frac{W_{bis}}{W_{acry} + W_{bis}} \times 100\%$, W 为重量。

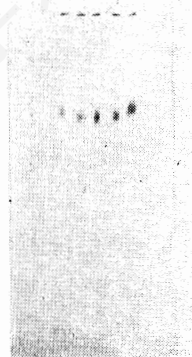


图 2 不同浓度核小体 DNA 样品的薄板电泳图谱

核小体 DNA 样品的上样浓度自左至右依次为 20、40、60、80、100 毫微克

另外，我们对不同浓度核小体 DNA 样品进行了电泳，图 2 所示 24 毫米宽薄板胶可同时电泳五个样品，它们的浓度(自左至右)依次为 20、40、60、80、100 毫微克。DNA 样品均采用滤纸片吸样法加样，由于滤纸吸样样品集中，故带子不易扩散。

本实验采用 3.3% 交联度以及 3.5% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶，适用于分析 100—1000 碱基对长度范围的小分子量 DNA。视 DNA 样品分子量大小的不同，可选用浓度不同的凝胶，表 2 所列之凝胶浓度是根据 Maniatis 的报道结果，可参考试用。一般低浓度凝胶孔径大而适于分离高分子量 DNA；相反低分子量 DNA 则需高浓度凝胶进行分离。所以，根据样品分子量来选择适当凝胶浓度和交联度是十分必要的。

人甲胎蛋白抗血清对纯 HBsAg 对流免疫电泳不产生沉淀线。(3) 以免抗 HBsAg 抗血清代替兔抗人甲胎蛋白抗血清作免疫酶定位时, 虽然在癌周肝细胞中也观察到阳性反应, 但两者的分布回异(图 3A、B) 根据上述结果, 可以认为本工作中所观察到的阳性定位结果是甲胎蛋白专一的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等: 1975, 生物化学与生物物理学报, 2 (2) 149—155.
[2] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等:

1976, 生物化学与生物物理学报, 8 (1) 49—59.

- [3] 上海市肿瘤医院病理科等: 1976, 生物化学与生物物理学报, 8 (3) 271—280.
[4] 张先扬等: 1974, 生物化学与生物物理进展 (2) 36—39.
[5] Stefanini, M., C. De Martino and L. Zamboni, 1967. *Nature* 216: 173—174.
[6] Accinni, L., K. C. Hsu, H. Spiele, and Cesare De Martino 1974 *Histochemie* 42: 257—264.
[7] 中国人民解放军第二军医大学病理教研室等: 中华医学检验杂志, 付印中。
[8] Cochrane, M. and R. Williams 1976. "Hepatocellular Carcinoma" (Okuda, K. and R. L. Petersed) pp. 333—349. John Wiley & sons.

(上接第 26 页)

用组蛋白吸附于去氧核糖核酸的子链上方法区别为正常和变形的两种结构。这种情况, 认为如果识别基因最先存在结合蛋白质的话, HMG 进一步结合形成变形的核小体, 如果不那样仅仅结合组蛋白就形成正常核小体。或许还有别的机理, 不管怎么说, 首先一定要弄清楚复制正常核小体的分子机制。

第三, 阐明细胞分化的分子机理。受精卵经反复细胞分裂的生长发育过程中(染色质复制)细胞分化了。也就是说, 由各种各样细胞所发现的特定基因, 没有发现别的分子机理就成立。如上述说明那样, 决定各基因的正常还是变形的核小体结构。这种决定因子能识别基因的蛋白质在染色质复制过程中是否结合到该基因上, 这样的因子在受精卵中作为蛋白质或信息核糖核酸 (mRNA) 来自亲本。随着生长发育的进程中必

须自己合成。因此, 它的调节必须先行。也许有别的结构。总而言之, 该细胞中一次转录的基因(红血球的珠蛋白基因), 虽然成为不转录基因也保持其变形的结构, 这种结构大概是不可逆的机理吧!

以上三点是 1980 年代染色质研究的重要课题。真核细胞的分子生物学姑且不论, 在其他方面也是重要课题。特别是真核细胞的去氧核糖核酸的一级结构及其转录产物的加工之间相互关系, 对真核细胞来说作为特有大概也是重要的。另外, 用分子水平来阐明染色质的高级结构及其细胞周期变化也是重要的。

[林斯骏摘译(日本)生物物理 Vol. 20, No 3, 1—2, 1980. 姚 鑫、开建伟校]

(上接第 42 页)

应用本文介绍的薄板电泳方法, 可以进行微量 DNA 样品的分子量链长测定。将已知链长的限制性内切酶酶切的标准 DNA 片段与被测样品在同一薄板上电泳, 根据各标准 DNA 片段与溴酚蓝标记染料相对电泳迁移的距离, 可求得相对迁移率与核苷酸碱基对对数的直线斜率关系, 由直线斜率而测知未知样品的碱基对数目。此法缺点在于板小、量程小、误差大。如在样品量微的条件下, 不得不使用此法时, 必须反复测定, 求得重复性一致的数据,

方可定量。

聚丙烯酰胺凝胶薄板电泳已初步应用于微量 DNA 的分析研究, 此法的应用或许有助于生物分子的微量分析。

参 考 文 献

- [1] Felgenhance, K.: 1967 *Biochem. Biophys. Acta*, 133: 165—167.
[2] Maniatis, T. et al.: 1975 *Biochem.*, 14: 3787—3794.
[3] 卫林祥等, 1979 细胞生物学杂志, 2: 24—26.