



## 小片段 DNA 电泳分离、转移和分子杂交的一个简单有效的方法

许远钟

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

Southern DNA 转移技术<sup>[1]</sup>已广泛地应用于分子生物学研究。主要实验步骤如下：藉琼脂糖电泳将不同分子量的 DNA 片断分开，再将这些 DNA 片断从琼脂糖胶上原位转移到硝基纤维素滤膜上。在 DNA 混合物中，特定的 DNA 片断可以用同位素标记的相应的 DNA 片断作为探针，通过分子杂交反应而专一性地显示出来。

但是，此法的局限性是琼脂糖胶的分辨率太低。如欲提高对较小分子量的 DNA 片断(例如小于 400 个碱基对)的分辨率，就必须增加琼脂糖胶的浓度。而制备高浓度的琼脂糖胶相当困难。

聚丙烯酰胺凝胶电泳能较有效地分开含不同核苷酸数目的小分子量 DNA 片断。但遗憾的是，将 DNA 片断从聚丙烯酰胺凝胶上转移到二偶氮苄氧基甲基滤膜(DBM 滤膜)或硝基纤维素滤膜上非常困难。

为解决这一问题，许多人提出了改良方法。如 Rerser<sup>[2]</sup>等采用含可裂解交联剂的聚丙烯酰胺-琼脂糖电泳。其 DNA 转移效率，对于 490 碱基对的 DNA 片断仅为 20%，对于 235 碱基对的 DNA 片断也只有 42%。Levy 等<sup>[3]</sup>制备聚丙烯酰胺梯度胶，上层浓度为 8%，下层浓度为 4%。电泳后，将 DNA 片断从 4% 聚丙烯酰胺胶上转移到 DBM 滤膜的过程长达 36 小时，转移效率低于 30%。又有人提出用电泳方法完成 DNA 转移<sup>[4]</sup>。此法不仅需要特殊的装置而且小于 300 个碱基对的 DNA 片断的转移效率亦仅为 60%。此外，常常不能定

量转移。因此，这些改良方法都未能被广泛采用。

本文介绍一种新的电泳技术，即含甲酰胺的琼脂糖电泳，或称甲酰胺-琼脂糖胶电泳。它对小于 500 碱基对的 DNA 片断具有较高的分辨能力，并能定量、有效地转移 DNA 片断至 DBM 滤膜或硝基纤维素滤膜，从而有效地发展了 Southern 技术。例如，图 1 中的 c-f 片断转移效率达 90%，而 g-p 片断可以 100% 的转移。

胶的制备及 DNA 转移过程简单易行，无需特殊装置。梯度电泳、垂直或水平电泳均可。根据所分析 DNA 的量及分子量范围，可以制成不同厚度(0.4 毫米至 5 毫米)以及不同浓度(琼脂糖浓度可达 7%)的含甲酰胺琼脂糖胶。

胶的分辨能力与其中甲酰胺的浓度有关。甲酰胺浓度为 40—50% 时，分辨率最高。电泳缓冲液中不一定含甲酰胺，但在琼脂糖浓度较高或较厚的胶(琼脂糖浓度超过 4% 或胶厚度超过 2 毫米)电泳时，电泳缓冲液与电泳胶中的甲酰胺浓度应相同。

以制备 50% 甲酰胺-2% 琼脂糖的垂直平板电泳(170×138×2 毫米)为例，简单介绍制胶方法及电泳过程。将 8 毫升 10 倍浓度的电泳缓冲液(电泳缓冲液为：40mM Tris-HCl, pH7.8; 12mM CH<sub>3</sub>COONa; 1mM EDTA)，40 毫升 100% 甲酰胺，32 毫升水和 1.6 克琼脂糖粉加入 200 毫升三角烧瓶中，置磁搅拌加热器上加热至沸腾并保持沸腾 1—2 分钟。然后将三角烧瓶置另一磁搅拌器上温和搅拌，待胶

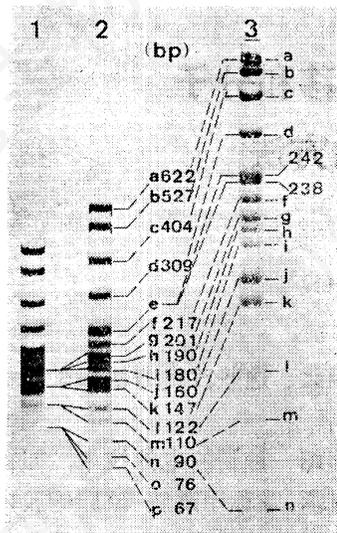


图 1 含有甲醛胺与不含有甲醛胺的琼脂糖胶电泳的分辨能力比较

DNA 片段是限制性内切酶 *Hpa* I 水解质粒 pBR322 的产物。胶的厚度是 2 毫米，电泳条 1, 2, 3 分别加样量为 0.8 微克。电泳条 1 是 2% 琼脂糖胶，电泳条 2 是 2% 琼脂糖—5% 甲醛胺胶，电泳条 3 是 7% 琼脂糖—50% 甲醛胺胶

溶液冷至 60℃ 后注入底部密封、两侧夹紧的两块塑料板中，插入电泳梳，于 4℃ 放置 1 小时后即可用于电泳。

DNA 样品溶解在蔗糖浓度为 25%，不含

甲醛胺的电泳缓冲液中。电泳缓冲液的甲醛胺浓度为 50%。此缓冲液可反复使用数次。电泳电压为 100 伏。电泳可在 4℃ 或室温进行。用溴酚蓝作指示染料。电泳后，胶用蒸馏水漂洗，用 ethidium bromide 染色，紫外线下拍照，图 1 指出了甲醛胺-琼脂糖胶电泳的高度分辨能力。胶在 0.5M NaOH—1M NaCl 溶液中浸 10 分钟，用蒸馏水漂洗几次，以去除碱处理所产生的氨气，再用转移缓冲液 (1M NaAC, pH6.1) 浸洗二次，每次 20 分钟。随后进行 Southern DNA 转移和分子杂交反应。

关于甲醛胺-琼脂糖胶电泳的制备、特性、应用等详细内容见参考文献<sup>[5]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- [2] Reiser, J., Renart, J. and Stark, G. R., 1978, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 1104-1112.
- [3] Levy, A., Frei, E. and Noll, M., 1980, *Gene* 11, 283-290.
- [4] Stellwag E. J. and Dahlberg, A. D., 1980, *Nucleic Acids Res.* 8, 299-317.
- [5] Y. L. Sun, Y. Z. Xu and P. Chambon, 1982, *Nucleic Acids Res.* 10, 5753-5763.

## 经验交流

### “钨酸—丹宁酸—钨酸”法在扫描电镜术中植物样品制备的应用

徐 敏 源

(浙江人民卫生实验院电镜组)

用扫描电镜 (SEM) 观察生物样品，首先要使样品表面导电。现在的常规法是用金属喷镀法来达到这一目的。该方法的主要缺点是金属膜的厚度和膜层的不均匀性，而对一些多孔粗糙的样品要在整个表面喷镀一层连续的金膜更为困难。随着细胞生物学的不断发展，所观察样品结构的要求也越来越细微，使这一

问题显得更为突出。使用金属喷镀法所喷金属膜厚度越大，被覆盖的细微结构就越多；厚度太薄，在样品表面不能形成一层连续的金膜，会导致样品的滞电现象 (charging artifact) 而

\* 实验材料部分由浙江林学院植物教研室、杭州大学生物系遗传教研室、浙江人民卫生实验院药物研究所提供，特此谢意。