

改良聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA

李宏业 范树国

(中国科学院华南植物研究所 广州 510650)

刘玉乐 陈刚 王寰宇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种常用的 DNA 检测方法^[1-3],此法分离小于 500bp 的 DNA 片段效果很好,分辨率极高,只相差 1bp 的片段也能分开,且可容纳相对大量的 DNA。但其不足之处在于制备和操作较为繁琐,对于使用此方法频率高的试验如 DNA 限制酶切电泳检测等就带来了许多不便。我们经过长期的实践,对该方法进行了改良,使之更加快捷、方便。

材料和方法

一、制备凝胶储液

根据试验的需要,选择一个合适的凝胶浓度配制较大量的储液。一般地,若经常需检测的 DNA 片段大小在 150bp 以上,可选择 3.5% 左右的浓度;若经常需检测的 DNA 片段小于 150bp,则可选择 8% 或更高的浓度。以配制 100ml 3.5% 及 8% 的凝胶为例,配方见表 1。

表 1 100ml 3.5% 及 8% 的凝胶储液配方

试剂(ml)	3.5%	8%
30% 丙烯酰胺	11.6	26.6
H ₂ O	76.8	66.8
10×TBE	10	10
TEMED	0.06	0.06
10% 过硫酸铵	1	1

将前四种成分混溶后贮于 4℃,10% 过硫酸铵贮于 -20℃。用时取所需量的凝胶储液,再加入 10% 过硫酸铵,即可灌胶。

二、灌胶

对于 18×16cm 以下的小型制胶玻璃板不必经常硅化处理,甚至可不硅化,规格再大者可适当进行硅化。凝胶厚度在 0.5—2mm 之间,一般用 1mm,将两块玻璃板洗净晾干后间以隔片后用夹子夹紧,不必封口,

放平,底部略低,或以水平仪调整,即可用滴管或注射器缓缓灌胶。灌满后再插入梳子,等待聚合。如有气泡,可用 X 光片做成的钩子勾出。

三、电泳

通常采用 1-8V/cm 的电压梯度电泳。如果是大概地检测较大的 DNA 片段,可将电压梯度提高到 10—16V/cm 进行快速电泳,对结果影响甚微。

四、染色观察

常采用下述两种方法:

a. 银染法:电泳毕,卸下玻璃板,用薄钢勺撬去上面一块玻璃板,将附有凝胶的玻璃板以凝胶面朝下浸入 0.2% AgNO₃ 溶液(可盛于较大平皿中),凝胶即落入液中,浸染 3—5 分钟后去除 AgNO₃ 溶液,以蒸馏水快速冲洗凝胶 2—3 次,再倒入适量显色液没住凝胶,几分钟后即可见结果。如需拍照,可将处于最佳显色状态的凝胶转入 0.75% 的 Na₂CO₃ 溶液中终止显色。显色液为 16g NaOH 和 4ml 甲醛溶于 1000ml H₂O 中配成。AgNO₃ 溶液可回收利用。

b. 溴化乙锭染色法:将凝胶浸入染液中(1×TBE 缓冲液中含 0.5μg/ml 的溴化乙锭),染色 30—45 分钟后,用塑料板或废 X 光片小心取出凝胶,用无纤维纸揩去剩液或水洗,然后将凝胶移置紫外灯下观察。

五、应用实例

采用本方法,对以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组 DNA 为模板的 PCR 产物及其克隆于 pGEM7Z (Promega) 上的重组质粒限制酶切产物进行检测,凝胶浓度为 3.5%,电泳电压梯度为 15V/cm,银染法检测。

结果与讨论

一、应用实例结果

图 1 结果显示 DNA 片段得到很好的分离,条带显示清晰。

二、凝胶储液的配制

一般对于每个项目或试验的某些阶段,需

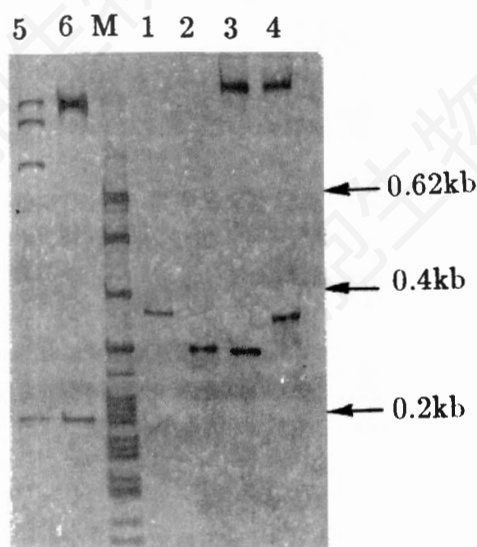


图1 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测 DNA
M: ϕ BR322/Msp I 分子量标准。
1, 2: PCR 产物。
3, 4, 5, 6: 质粒限制酶切产物。

要检测的 DNA 片段的大小范围常常比较固定。配制 3.5% 和 8% 的两种浓度的凝胶储液基本可满足需要, 不必每次电泳都要量取各种成份现配凝胶, 且电泳效果同样很好。这样可省却很多人工, 也大大减少了丙烯酰胺对人的毒害频度。

三、灌胶

采用本方法灌胶, 无需再封口, 胶液一般不会出现漏流, 减省了操作。

四、DNA 的检测

对于溴化乙锭染色法, DNA 片段观察后可以直接切下纯化。但因聚丙烯酰胺会熄灭溴化乙锭的荧光, 故不能检出少于 10ng 的 DNA 条带。所用的溴化乙锭具强烈的神经毒性并污染环境, 检测用的紫外线亦对人眼具伤害作用。银染法相对而言其操作简便、快速、毒性污染很小。以往银染前都进行凝胶固定, 我们省却了此步骤而对实验结果无影响, 凝胶也能长期保存,

简化了实验操作。显色液也不必现配现用, 可以配制大量储液, 即取即用。但是, 银染的 DNA 片段不能直接回收纯化, 对此我们采用的方法是将需回收纯化的 DNA 样品取出一小份与该样品点样于相邻泳道, 电泳毕沿泳道切去含需纯化的 DNA 样品凝胶, 染色观察其小份样品电泳结果, 再将切去的凝胶与其对齐吻合, 根据相对应 DNA 条带位置切下纯化。

五、银染色度控制

样品中 DNA 含量较高、 AgNO_3 浓度较高、银染时间长、银染后水冲时间缩短, 显色时间延长, 银染的色度则较深。反之则较浅。可根据需要调整。如果凝胶已达最佳显色状态而观察到其色度仍在加深, 可去掉显色液, 加入 0.75% 的 Na_2CO_3 溶液以终止显色。若达到较佳显色状态而其色度不再加深则无需处理。

摘 要

本文介绍了应用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA 的改进方法。与以往方法相比, 本方法从配制凝胶储备液, 无需封口的水平灌胶, 适当地提高电泳的电压梯度, 采用改良银染法检测, 省却凝胶固定, 银染法 DNA 的纯化方法, 及溴化乙锭染色法的操作等一系列改进措施, 使聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 DNA 的操作得到简化, 更便捷, 并减小了对人与环境的毒害作用。

关键词: 聚丙烯酰胺凝胶电泳 DNA 检测

参 考 文 献

- [1] 彭秀玲等, 1997, 基因工程实验技术 (第二版), 湖南科学技术出版社, p48-54.
- [2] Maniatis, T. A. et al., 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72:1184.
- [3] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

IMPROVEMENTS TO PAGE METHOD FOR DETECTING DNA

LI Hong Ye FAN Shu Guo

(South China Institute of Botany, CAS, Guangzhou, 510650)

LIU Yu Le CHEN Gang WANG Huan Yu

(Institute of Microbiology, CAS, Beijing, 100080)

ABSTRACT

Some improvements to the routine PAGE method for detecting DNA, was introduced, including preparation of stored gel solution, pouring gel horizontally without sealing the edges, running the gel under higher voltage gradient, rapid staining and detection, and tactics of recovering silver stained DNA. This method is proved to be more simple and faster than previous ones and also reproducible.

Key words: PAGE Detecting DNA

经验交流

国产和进口 DMEM 培养基培养 CHO-C₂₈ 工程细胞的质量评价

艾智武 吕东升

陈文庆

(卫生部武汉生物制品研究所 武汉 430060) (江苏省宜兴市塞尔生物化工厂 宜兴 214217)

孙燮钧

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

血源性乙型肝炎疫苗用于预防乙型肝炎病毒感染已有 20 多年的历史,但是这种血源性乙型肝炎疫苗存在一些问题,如血源供应有限,具有潜在的危险性;且该疫苗总使 5%—10% 的人不能产生免疫应答^[1]。为了克服这些缺点,国内的研究人员利用带有 HBsAg 基因片段的重组质粒转化二氢叶酸还原酶缺失的 CHO 细胞,从而获得能分泌 HBsAg 的重组细胞^[2],该细胞可进行大规模生产。目前已有较为成熟的生产工艺^[3],但为了今后的大规模生产作好准备,本着降低成本,提高收获率的原则,我们对国产 DMEM 培养基和进口 DMEM 培养基的质量进行了比较研究。

材料和方法

(一) 材料

1. CHO-C₂₈ 工程细胞 由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

2. 细胞培养基 (1) 进口 DMEM 培养基, GIBCO/BRL U. S. A., 葡萄糖含量为 4500mg/L (批号为 70K3465)。(2) 国产 DMEM 培养基, 宜兴市塞尔生物化工厂, 葡萄糖含量为 4500mg/L (批号为 960819、960820、970320)。

3. RPHA 试剂盒 用于检测细胞培养液中 HBsAg 的滴度(卫生部上海生物制品研究所生产)。

(二) 方法

1. 细胞培养 利用两种 DMEM 培养基, 10L 转瓶培养 CHO-C₂₈ 细胞。

2. HBsAg 滴度测定 采用反向血凝(RPHA)法测定细胞培养液的 HBsAg 滴度, 不小于 1:128 的收液为合格。

3. HBsAg 的纯化 收集到的细胞培养液分别经连续流高速离心去细胞碎片、硫酸铵沉淀、盐溶、两次 KBr 密度梯度离心、柱层析、除菌过滤。