维普资讯 http://www.cqvip.com

328-331
基因工程，电泳
Q78

基因工程中的电泳技术进展

实验室管理科　陈思秀

中国分类号　R392－33

基因工程包括 DNA 重组技术以及其它可使生物基因组结构得到改造的技术，基因工程的产生使整个生物技术跨入了一个崭新的发展时代。现在，基因工程技术正以令人目不暇接的速度迅速发展，包括 PCR 基因扩增技术、DNA 序列测定技术、基因突变技术等正在日渐走向成熟[1]，这些发展对 DNA 电泳技术有极大的促进作用。本文旨在介绍分离核酸的电泳技术中某些最重要的进展情况。

1 DNA 序列测定技术

DNA 体外重组工作需要有关 DNA 序列的信息，以便于设计载体及重组体。DNA 序列测定技术，是在高分辨率变性聚丙烯酰胺凝胶平板电泳技术的基础上建立起来的，这种电泳技术可将相差仅为一个单核苷酸的单链 DNA 区分开。目前应用的两种快速序列测定技术是由 Maxam 和 Gilbert 提出的化学降解法以及由 Sanger 提出的双脱氧核苷酸末端终止法[2]。

1.1　Maxam－Gilbert 化学降解法

在这一方法中，首先对待测 DNA 片段进行单侧末端的放射性核素标记，然后使该片段在 4～5 组互相独立的化学反应中分别得到部分降解，其中每一组反应特异地针对某一种或某一类碱基，因此生成 4～5 组放射性标记的分子，从共同起点（放射性标记末端）延续到发生化学降解的位点。每组混合物中均含有长短不一的 DNA 分子，其长度取决于该组反应所针对的碱基在原 DNA 全片段上的位置。此后，各组均通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，再通过放射自显影来检测末端标记的分子并读出 DNA 序列。化学降解法通常用 ^{32}P 标记 DNA，它显出的条带比较宽且有扩散，这就限制了化学降解法对较大片段条带的分辨能力，一般在一块电泳胶上最多能读出 200－250 个核苷酸序列。

1.2　Sanger 的双脱氧核苷酸末端终止法

该方法又称酶法。其原理是利用 DNA 的半保留复制，将待测的单链 DNA 作为模板，以大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 或 Klenow 片段催化多核苷酸链的延伸（5′→3′），以 2′，3′—双脱氧三磷酸核苷酸（ddNTP）来终止 DNA 的复制反应。不同的复制链经电泳分离检测，即可知待测 DNA 的序列。具体的操作步骤包括：(1)将待测 DNA 制备成单链分子，并将其克隆到噬菌体 M13 或质粒 DNA 中；(2) 将人工合成的寡聚核苷酸与模板中待测区域的 3′部位退火，做为聚合酶反应的引物；(3) 退火后的模板－引物分置 4 个反应管中，向每管加入 4 种脱氧核糖核苷酸（其中一种为 ^{35}S′或 ^{32}P 放射性核素标记），一种 2′，3′—双脱氧三磷酸核苷酸以及 DNA 聚合酶 I 或 Klenow 片段。这样，在加入不同的 ddNTP 的链延伸反应中，凡碰到需要相应的 dNTP 时，链延伸即告终止。用凝胶电泳分析这四组反应的产

维普资讯 http://www.cqvip.com

物，即可读出待测 DNA 的序列。

由于噬菌体及其他载体的发展以及引物的极易获得，加之 Sanger 法简便快速，目前，双脱氧核苷酸末端终止法的应用远比化学降解法更为广泛。事实上，目前大多数测序策略都是以 Sanger 法为基础设计的。

商品化的仪器中，Pharmacia 生物技术公司推出的"Macro Gene 核酸定序工作站"具有优良的性能，能够灌制 0.1mm 的超薄胶，一次可获得 400 碱基对以上的测序结果。

2 全自动核酸测序系统

在商品化的仪器中，目前具有代表性的全自动核酸测序系统有两种，即：Pharmacia 公司生产的 A.L.F 全自动激光荧光 DNA 测序系统（ALF DNA Sequencer）和 Applied Biosystem 公司生产的 373DNA 测序仪（373DNA Sequencer）。以下分别加以介绍。

2.1 A.L.F 全自动激光荧光 DNA 测序系统[3]

该系统由欧洲分子生物学实验室（EMBL）与 Pharmacia 生物技术公司共同开发，所依据的是双脱氧核苷酸末端终止法，采用单一的荧光素（Fluorescein）标记，A.C.G.T 四通道分别检测。标记的方法有两种：以 5′端带荧光素标记的引物进行反应或使用荧光素标记核苷酸。前者适用于以引物渐进法测序以及 PCR 产物直接测序；后者的优点是使任何引物可被用于 ALF 系统上，而且可使一个 DNA 片断上有多个标记点，提高了检测灵敏度。该系统的电泳单元采用厚度为 0.35mm 的超薄凝胶，电泳时间可缩短至 3.5h；检测单元由固定的激光光源及一排（40 个）光二极管阵列组成。一次电泳中，可进行 10 个样品的测序。ALF 系统一天内可完成 18000 碱基测序，420 左右的碱基测序误差低于 1%。据该公司报道，EMBL 的研究人员曾利用该系统在 60cm 长板上一次电泳获取了超过 1000 碱基的序列信息，但是，在 800 个碱基以后的序列误差较大。

2.2 373DNA 测序仪[4,5]

该系统所依据的也是双脱氧核苷酸末端终止法，但与 A.L.F 全自动激光荧光 DNA 测序系统不同，采用的是四种荧光染料标记引物或核苷酸，用单一通道分离、检测。用作标记物的荧光染料有荧光素异硫氰酸酯、7－硝基七呋喃氨基乙酸、四甲基罗丹明（Tetramethylrhodamine）和德克萨斯红（Texas Red）。根据不同的测序目的，该系统可提供 20 种标记试剂盒，从而使其适用范围相当宽广。分离单元的凝胶板有 6、12、24、34、48cm 几种规格，可适用于不同目的。检测单元由激光光源及光电倍增管组成。该系统最多可测定 DNA 片断的 700 碱基序列。单通道分离、检测使样品容量提高，可进行多至 36 个样品的同时测定，一天可完成 25000 碱基的测序工作。

应当指出，DNA 序列的全自动测定并不仅仅是电泳技术的问题，其系统化只有在 DNA 重组技术成熟的基础上才得以实现。再有，商品化的系统中，各公司都十分重视解析电泳结果的软件开发，这对降低测序误差，提高测序能力具有重要的意义。

3 脉冲电场凝胶电泳（*Pulsed Field Gel Electrophoresis*，*PFGE*）[6]

由于超过一定大小的线状双链 DNA 分子在琼脂糖凝胶中的迁移速率相同，因此，对于整条染色体和大基因组的分离，难于用普通的琼脂糖凝胶恒电场电泳完成。1984 年，Schwartz 和 Canfor 提出了 PFGE 的设计，其基本思路是在凝胶上外加正交的交变脉冲电场，进行电泳时，改变电场方向，DNA 将随之沿新的电场轴向重排后再继续向前移动。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DNA 分子越大，重排所需的时间越长。若 DNA 分子变换方向的时间小于电脉冲周期时间，DNA 分子就可按其大小分开，在这一构思下，曾经出现过几种类型的 PFGE 装置，目前使用较为普遍的是钳位均匀电场（Contour - Clamped Homogeneous Electric Fields，CHEF）电泳装置。CHEF 系由多个在水平凝胶的周围沿正方形或六边形排列的电极产生电场，这些电极都被钳制在预定的电位上。结合运用低电场强度（例如 1.3v/cm）、低浓度琼脂糖（例如 0.6%）、延长转换间隔（例如 1h）和延长电泳时间（例如 130h）等条件，有可能分离数千甚至上万 Kb 的 DNA 分子。例如，Pharmacia 公司近来推出的 Gene Nevigator PFGE 系统能有效分离 20 - 12000 千碱基对的 DNA 片段，该系统中的六角形电极单元配有 20 个电极，经优选配合后，可获得均一电场并保持良好的分辨率。又如 Bio - Rad 公司推出了三种型式的 PFGE 系统，其六角形电极单元均配有 24 个电极，其中 CHEF - DR Ⅱ型电极角度为 120°，CHEF - DR Ⅲ型的电极在 90° - 120° 范围内可变，CHEF MaperXA 型的电极在 0° - 360° 范围内可变。该公司的产品可分离 20 - 10000 千碱基对的 DNA 片段。

4 毛细管电泳（Capillary Electrophoresis CE）[7]

CE 是在八十年代发展起来的一种新型电泳分离技术。毛细管电泳仪的基本组成为：熔融石英毛细管的两端分别浸在含有电解质的贮液槽中，毛细管内也充满了同样的电解质溶液。在毛细管的一端安装了在线的检测器。被分析样品可以用多种进样方式通过毛细管的另一端加入。样品被引入后，便开始施加电压，典型的操作电压从 5kV 到 30kv，一般操作时间为 1 - 45min。目前，Millipore 公司、P - E 公司、HP 公司、Dionex 公司、Bio - Rad 公司等均已推出商品化的毛细管电泳仪。在理想条件下，CE 的理论塔板数可超过 1 百万，甚至有人计算可达 10^6，在通常的操作条件下，柱效可达到 10 - 20 万。

CE 克服了平板凝胶电泳技术费时、费工难于自动化等固有缺点，具有进样量小、分辨率高、分析快速、定量准确、使用方便等明显优势，在生物大分子、小分子及离子的快速分离分析方面均显示出优异性能，近几年发展很快，文献量呈指数上升。因此，CE 也受到 DNA 研究工作者的十分重视，目前，不少研究室仍致力于 CE 分析 DNA 技术的进一步开发。例如，用化学方法将荧光团标记于 DNA 后，在 200v/cm 电场强度和分辨率 > 300 碱基的情况下，在聚丙烯酰胺凝胶填充毛细管上进行分离时，灵敏度比平板凝胶电泳提高 10 倍，能达到 atto - mole（10^{-18} 摩尔）的检出水平；有关报导表明，400v/cm 电场强度下的分离速度率比普通平板凝胶电泳要快 25 倍[8]。

目前，商品化的 CE 均是单通道的，与多通道的平板凝胶电泳相比，总分析效率并未提高。因此，人们更注重于阵列毛细管电泳进行 DNA 测序技术的开发。1992 年美国 Berkeley School of California University 的 Mathies 等[9]首次提出阵列毛细管电泳进行 DNA 测序，采用 25 支毛细管并列同时电泳，用扫描法同时检测。日立公司 Kambara 等[10]采用 20 支毛细管并列电泳，采用 CCD 多道检测（即电荷耦合转移器件多道检测），不需要扫描，分离及检测均为阵列分析。美国 Iowa University 的 Yeung 等[11]将 10 支毛细管阵列，用光导纤维插入电泳毛细管末端，导入激光，用 CCD 多道检测。还有的研究人员提出建立 50 - 100 个阵列毛细管电泳测序技术的设想。以上研究结果是令人鼓舞的，但离实用化还有一段距离。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5 展望

人类大约有5万至10万个基因，人基因组DNA大约由30亿个核苷酸组成。在过去的20年中，只测定了人体基因六百万个核苷酸序列。搞清楚人类全部基因的核苷酸序列，掌握人类遗传信息，是科学家们不懈追求的目标。前不久，美国发起了人体基因组研究计划（HGP），预计到2005年完成人的DNA分子中全部苷酸序列的测定工作，有人把HGP称之为"人体阿波罗计划"，这对DNA分离测定技术提出了挑战。按现有的电泳测序方法，每年只能测定一百万个核苷酸，远远不能满足要求。按HGP的目标，现有的DNA序列分析方法必须改善100倍[12]。可以预见，今后，DNA分离测定技术将会有更快、更新的发展。在分离技术方面，主要集中在高效率分离和选择性分离两个方面；在鉴别测定技术方面，除放射性标记及非放射性标记将继续发展外，分析化学及生物分析化学中的新技术将从不同的角度进人DNA分离分析领域，如质谱法（MS），共振电离谱（RIS），电喷雾电离质谱（ESI－MS）多段测序，单分子测定技术等[13]。

参 考 文 献

1. 宋平，惠永正主编现代科学技术基础知识科学出版社、中共中央党校出版社 1994；199
2. 沈同，王镜岩主编生物化学（第二版，下册）高等教育出版社，1991；486
3. Pharmacia Biotech，Biotechnology products Catalogue，1994；268
4. George L T. Anal. chem，1990；62：418
5. Applied Biosystems，Catologue：373 DNA Sequencer，1994
6. Ketheleer Gardiner. Anal，chem，1991；63：658
7. Karger B L. Anal，Chem，1991；63：385A
8. Newman A R. Anal. Chem，1991；63：25A
9. Mathies R A. Huang X H，Nature，1992；359：167
10. Kambara H. Takahashi. s，Nature 1993；361：565
11. Taylor J A. Yeung E A. Anal，Chem. 1993；65：956
12. Collins F，Science，1993；262：43
13. 龙耀庭，分析化学，1993；21（10）：1212

（收稿日期 1994－10－13）

（上接第342页）

Anat 1990；416：185
13. Barsky S.H，et al. Lab Invest 1983；49：140
14. Charpin C，et al. Histopathology 1989；14：47
15. Dahet N，et al. Br. J. Cancet 1987；55：665
16. Tsubura. A，et al，Virchows，Arch A. Pathol Anat 1988；；413：133
17. 杨景山。医学细胞化学与细胞生物学技术。第一版，北京；北医协和联合出版社。1990；72；213
18. Herrera G. A，et al. Ultrastructural Pathol 1992；16：37
19. Wetzels. R. H. W，et al. Am J Pathol 1989；134：571
20. Bocker W，et al. Virchows. Arch A. Pathol Anat 1992；421：315
21. Harris. M，et al. J Pathol 1977，123：79
22. Sternberg. S.S. Diagnostic surgical pathology. NEW YORK：Raven Prnss 1989；253
23. Diaz N.M，et al. Arch Pathol Lab Med 1991；15：578
24. Herbst. W.H，et al. J Clin Pathol 1989；42：470
25. Mroczka－B，et al. Patol－Pol 1989；40：179
26. Willebrand. D，et al. Histopathology 1986；10：1231
27. Tobon. H，et al. Arch Pathol Lab Med 1977；101：310
28. Virginia G，et al. Ultrastruct pathol 1992；16：47
29. Birembaut. P，et al. J. Pathol 1985；145：283

（收稿日期 1994－10－13）