DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.033
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
84 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)01-0084-03

对琼脂糖凝胶电泳分离DNA片段的有效性的再认识

Evaluation of the efficiency of separating DNA fragments by agarose gel electrophoresis

黄建军,饶贤才,胡晓梅,金晓琳,朱军民,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨琼脂糖凝胶电泳对DNA酶切片段的分离效果。方法 将酶切后DNA片段进行琼脂糖凝胶电泳,回收单一目的片段并再行电泳,观察非目的片段的分离效果。结果 第一次回收的"单一"目的片段中,除目的DNA外,还含有多条较小的DNA分子;再次电泳回收的单一目的片段中,肉眼已看不见其它DNA分子,其纯度已大为提高;但是将几个批次的再次回收的目的片段浓缩后进行电泳发现其中仍然含有其它DNA片段。结论 琼脂糖凝胶电泳难以将大小不同的DNA片段彻底分开,电泳后回收的目的片段中含有大小不同的污染分子。

琼脂糖凝胶电泳是分离、鉴定和纯化DNA片段的常用方法[1],对DNA片段的分离范围与琼脂糖浓度有关[2]。在实际工作中将电泳后切胶回收的"单一"目的DNA进行连接和转化,在筛选阳性重组子的过程中常常挑到一些含较小片段的假阳性克隆。这些小DNA片段的来源令人费解。最近本室在做铜绿假单胞菌噬菌体PaP1基因组大片段克隆时,获得许多小于目的片段的假阳性克隆的问题尤为突出,致使多次挑选不到目的克隆。既然是用琼脂糖凝胶电泳分离纯化的目的片段与质粒载体连接重组后进行的分子克隆操作,为什么还会出现许多含小片段的克隆呢?于是怀疑到琼脂糖凝胶电泳分离DNA片段的有效性。本研究旨在通过实验来证实这种分离方法的有效性和条件性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铜绿假单胞菌噬菌体PaP1基因组DNA,按常规提取,置-20℃保存备用。琼脂糖Agarose Ⅰ、限制性内切酶*Eco*RⅤ为上海生工生物工程有限公司产品。从凝胶中小量回收DNA片段的试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品。1 kb DNA Ladder为MBI产品。

1.2 琼脂糖凝胶电泳

用1× TAE配制0.8%琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为1× TAE,电压为5 V/cm,电泳1 h。用溴化乙锭或LIGHTBLUE Dye显色。

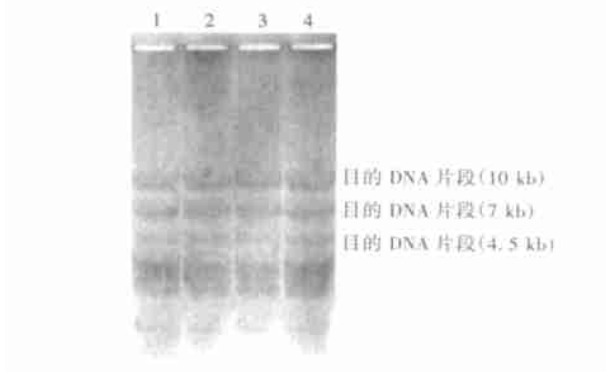
1.3 目的DNA片段的回收与再回收

电泳后在日光下(LIGHTBLUE Dye染色)或在紫外灯下(溴化乙锭染色)切取含"单一"目的DNA分子的胶条并称重,用小量胶回收试剂盒回收DNA。回收样品按上述方法再次电泳及回收。

2 结果

2.1 目的DNA片段的第一次分离与回收

图1显示,在3个大的目的DNA片段1、2和3(分别约为10、7、4.5 kb)之后有很多的较小片段(从大约3.5 kb到100 bp不等)。在日光下(用LIGHTBLUE Dye显色)分别切取含有单一目的片段1、2、3的胶条用试剂盒回收DNA分子。为了获得足够量的目的DNA而同时上样4条泳道。



1、2、3、4泳道均为*Eco*RⅤ酶切PaP1基因组DNA后的电泳结果

图1 ***Eco*RⅤ酶切PaP1基因组DNA的电泳图(LIGHTBLUE Dye染色)**

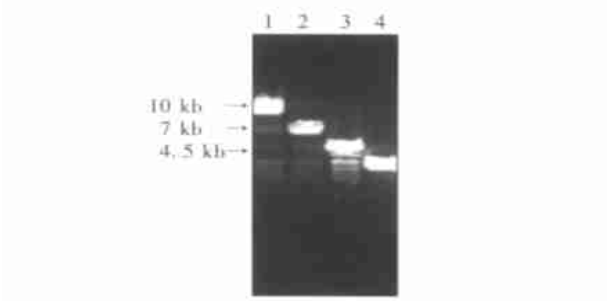
2.2 首次回收的目的DNA片段的再次电泳

将第一次电泳回收的3条目的片段进行第二次琼脂糖凝胶电泳,结果见图2。可见在回收的样品中,除目的片段外,还

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270065)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270065)
作者简介:黄建军(1969-),男,四川省岳池县人,博士研究生,助理研究员,主要从事噬菌体基因组学方面的研究 电话:(023)68752239
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hufuquan@yahoo.com
收稿日期:2002-09-05;修回日期:2003-01-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

含有 PaP1 基因组 DNA 被 *Eco*R Ⅴ酶切后产生的多条较小的 DNA 片段(其中一些条带非常清晰), 但未见比其大的 DNA 片段。

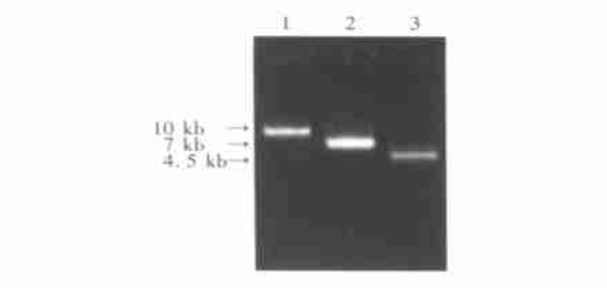


1、2、3 泳道分别为 *Eco*R Ⅴ酶切 PaP1 基因组 DNA 后回收的 3 个目的 DNA 片段, 5 泳道为 *Eco*R Ⅴ酶切后的 PaP1 全基因组 DNA 片段, 6 泳道为 1 kb DNA Ladder, 4 泳道为另一回收片段

图 **2**　***Eco*R Ⅴ酶切 PaP1 基因组 DNA 后回收的 3 条目的片段的电泳图(溴化乙锭染色)**

2.3　再次回收目的片段并进行第三次电泳、分离与回收

在紫外线下分别将第二次电泳分离的 3 条单一目的胶条切下, 用试剂盒回收后电泳。电泳结果显示, 见图 3。除目的片段外, 肉眼已经看不见其它 DNA 分子的存在了, 回收的 DNA 片段的纯度已经明显提高。



1、2、3 泳道分别为再次回收的 3 条目的 DNA 片段

图 **3**　再次回收的 **3** 条目的片段的电泳图(溴化乙锭染色)

2.4　将不同批次的再次回收的目的 DNA 片段浓缩后电泳

将在 3 个月内进行的几个批次的实验中先后得到的再次回收的 10、7 kb 片段分别收集在一起用小量胶回收试剂盒浓缩, 终体积均为 50 μl, DNA 含量分别为 59.1、93.6 μg/ml。从电泳结果(图 4)看出, 经高度浓缩后, 低浓度下认为"纯"的 7 kb 片段中含有 10 kb 片段(2 泳道), 10 kb 片段中含有 7 kb 片段(4 泳道); 此外, 这两个泳道中还依稀可见一些小片段。图 4 中的 1、5 泳道则显示将浓缩液 16 倍稀释后就基本上只能看见一条带了。



2、4 泳道分别为浓缩后的再次回收的 DNA 片段 2、1 的电泳情况, 1、5 泳道分别是 DNA 片段 2、1 稀释 16 倍后的电泳情况。3 泳道为 1 kb DNA Ladder

图 **4**　不同批次的再次回收的目的 **DNA** 片段浓缩后的电泳结果

3　讨论

目前, 将经琼脂糖凝胶电泳分离回收的 DNA 片段直接进行限制性酶切、PCR、分子克隆等操作已为大家接受和运用。然而, 该方法涉及到对样品 DNA 的回收效率和分离效率两个问题[3], 如果不能有效地分离、纯化目的 DNA 片段, 常会给后续操作带来麻烦, 如在分子克隆时常常挑到含非目的分子的假阳性克隆。一般而言, 出现假阳性克隆的原因有三: ①载体质粒 DNA 的自身环化; ②载体质粒 DNA 的反向串联; ③插入片段不纯, 存在有非目的 DNA 片段。由于实验中将线性载体质粒 DNA 作了去磷酸化处理, 这就使得在连接反应中质粒 DNA 不能自身环化或者反向串联, 即可以排除①、②两种原因的存在, 因此实验中假阳性克隆的出现很可能是因为插入片段中含有一些非目的 DNA 片段。也就是说, 经一次琼脂糖凝胶电泳并不能使不同大小的 DNA 片段得到彻底分离。

琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段的基本原理是基于 DNA 为多元酸, 在中性或弱碱性缓冲液中带负电荷而向阳极泳动, 由于不同 DNA 分子在同一凝胶中迁移速率不一样, 电泳一段时间后可将其分开。影响不同 DNA 分子有效分离的因素很多, 如 DNA 分子的大小和构象、凝胶中琼脂糖的浓度、电场强度的大小及电场方向是否恒定、碱基组成与环境温度、嵌入染料(如 EB[4])的存在以及电泳缓冲液的性质等等。在一个具体实验中, 对不同 DNA 分子电泳分离的有效性取决于对上述各种条件的掌握, 即条件是否达到最佳化。

本研究结果显示, 经 1 次琼脂糖凝胶电泳没有能将一些小于目的片段的 DNA 分子彻底分开; 而"纯化"产物在高度浓缩后电泳, 显示其中仍然含有大小皆有

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的污染分子。因此，可以认为，第一次回收的产物中不仅含有小于目的片段的DNA分子，而且也含有大于目的片段的DNA分子，只是后者远未达到肉眼可见的程度。归纳起来即是：琼脂糖凝胶电泳对不同大小DNA片段分离的有效性（即电泳分离得到的目的DNA分子的纯度）是一个相对概念，难以达到100%的纯度。

关键词：DNA；琼脂糖凝胶电泳；回收
中图法分类号：Q781 文献标识码：B

参考文献：

[1] 高凌云，陈一峰，李一伟. 琼脂糖凝胶电泳法的探讨[J]. 福建医科大学学报，2001，35(1)：93.
[2] J. 萨姆布鲁克，E. F. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯，著，金冬雁，黎孟枫，等 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京：科学出版社，1996. 304－306.
[3] Duro G，Izzo V，Barbieri R. Methods for recovering nucleic acid fragments from agarose gels[J]. J Chromatograph，1993，618(1-2)：95－104.
[4] Sigmon J，Larcom L L. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis[J]. Electrophoresis，1996，17(10)：1524－1527.
[5] Wang M，Lai E. Pulsed field separation of large supercoiled and open-circular DNAs and its application to bacterial artificial chromosome cloning[J]. Electrophoresis，1995，16(1)：1－7.

（编辑 陈聪连）

（上接83页）

怎样使胃管从鼻咽部顺利进入食道，怎样确定置入胃管的长度，如何判断胃管进入胃内，都需要临床经验。本组病人中有6例胃管在食道内，在手术中调整到位或在胃肠减压期间无胃液引流出而进行调整有效；1例胃管在气管内，在麻醉时进行气管插管发现；这都与置管经验不足有关。

2.2.3 置管技巧的掌握 目前临床使用的透明胃管绝大多数由高分子材料制成，具有一定的韧性，又是盘旋包装，因此取出来使用时一般都有一定的弧度，置胃管时如果掌握不好方向，盲目从鼻腔内插入，会使胃管不容易进入咽喉部而增加了病人的痛苦体验。置管过程中，快速、慢速、深吸气、吞咽动作运用时机不当，分寸掌握不够，也会导致置管失败。

3 对策

3.1 置胃管前认真对病人进行评估

置胃管前应认真查阅病人情况，如性别、年龄、文化程度、职业、诊断、病情，了解体验史、心理状态以及对置胃管的反应。从临床观察的情况看，男性病人对置胃管的耐受性好于女性病人，老年病人对置胃管的耐受性好于中青年病人。针对病人对置胃管所持的不同态度，问题而采取个体化措施。

3.2 耐心进行心理疏导，进行有效的健康交流

从一个健康人成为一个身体有疾患的人，必然导致心理的改变甚至出现一些心理问题，再看到又长又粗的胃管要从鼻腔插入胃内，容易产生紧张、恐惧心理而拒绝治疗，因此，在置胃管前，护士必须根据不同性别、年龄、心理问题耐心对病人进行个体化的心理疏导，也可让有过轻松体验的病人进行现身说法，以减轻紧张、恐惧心理。在对本组病人的问卷调查中，92.60%的病人认为护士在置胃管前很有必要给予鼓励和安慰，这会缓解他们的紧张情绪，增强他们战胜疾病的信心。强调置胃管的目的与意义，加强对置胃管重要性的认识，有助于病人的配合。

3.3 正确卧位

体位对胃管能否顺利置入有一定影响，护理操作常规对置胃管采取的体位并未作规定，因此，病人可以采取任何体位，但提倡半卧位，即床头摇高45°，头部自然靠枕，从临床观察的结果来看，半卧位一次置管成功率比其它体位高，主要是半卧位和平卧位相比，前者更有利于吞咽和深呼吸，半卧位和坐位相比，前者更能使病人处于自然、放松状态，且在经受痛苦体验时，头部位置不易变动。

3.4 掌握置管技巧

置管技巧掌握得好就能提高一次性插管成功率，应从以下几点着手。

若为手术前置胃管，最好在麻醉前给药5 min后达到中等镇静时（浅睡眠，呼之易醒）置管[1]，可明显减轻置胃管的痛苦反应而容易成功，因适量麻醉前用药可降低病人对置管的敏感性，从而消除恐惧心理，有利于病人配合。

置胃管前让病人从吸管吸入液体石蜡油20 ml，再从鼻腔滴入5滴，以润滑咽喉部及食道，减少胃管对组织的刺激。

当确定了胃管长度时，一般采用快速插胃管法或饮水法[2]，即嘱病人深吸气、吞咽，操作者迅速插入胃管15 cm，休息片刻后，再慢速下行到既定长度。

判断胃管是否进入胃内很重要。本组有1例病人采取胃管末端放入水内的检验方法，操作者因未见气泡逸出，病人也不咳嗽，因此判断胃管就在胃内，结果是在气管内；另外在胃较空虚、胃液较少的情况下，向胃管内注入空气，也不容易听见气过水声，所以最可靠的检验方法还是抽取胃液。但要注意鉴别抽出的是胃液还是唾液，在置胃管过程中，刺激可诱发唾液分泌，当胃管经过食道3个狭窄盘旋在食道时就可抽出唾液，误认为是胃液而判断胃管在胃内，其实在食道内，本组就有6例。有时胃管已经到达胃内，但不易抽出胃液，这就需要变换体位，右侧卧位较其它体位容易抽出胃液[3]，主要是右侧卧位时，胃底层面积小，胃液面高出胃管开口端，胃液才很快被抽出。

关键词：置胃管；失败原因；对策
中图法分类号：R473.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 周 平，曹瀚中，陈桂英，等. 给药镇静后插胃管的临床研究[J]. 实用护理杂志，1999，15(6)：37.
[2] 彭雪娟. 留置胃管的护理研究进展[J]. 中华护理杂志，2001，36(7)：532－533.
[3] 刘荣娟. 空腹侧卧位放置胃管抽取胃液的效果[J]. 实用护理杂志，2002，18(7)：32.

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net