

电泳后凝胶中 DNA 的回收方法

梁业楷 赵 林 吴体云

(中国科学院武汉病毒所, 武汉)

本文根据文献和笔者近年来的研究工作, 分述电泳后凝胶中核酸的洗脱、回收方法及其优缺点, 以供从事这方面工作的同行参考。

一、电泳回收法

(一) 柱状电泳洗脱法

1. 从聚丙烯酰胺凝胶中洗脱: Aller 等^[1]于 1973 年报告以内切酶 RI 切割 λ DNA, 用梯度聚丙烯酰胺凝胶 (2.5—7.5%) 将各限制性片段展开, 然后分别将各片段切下, 置于两端开口的小塑料管中, 管内一端系以预先放有少量电泳缓冲液 (40mM Tris-乙酸盐, pH 8.3, 20mM 乙酸钠, 2mM EDTA) 的透析袋, 将此安放于柱状电泳装置上, 透析袋浸入下端之电泳槽内, 然后进行电泳, 室温 12 小时, 50—500V, DNA 即从凝胶中被洗脱至透析袋内, 取出后用乙醇沉淀, 再用 10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA 溶解制成悬液备用。

2. 从琼脂糖-聚丙烯酰胺凝胶中洗脱: Pet-

tersson 等^[2]报告以 2.2% 丙烯酰胺, 0.11% 甲撑双丙烯酰胺及 0.7% 琼脂糖制成凝胶, 加入 32 P 标记的腺病毒核酸, 进行电泳分析, 电泳完毕后, 将凝胶从玻管中取出, 以刀片切成小段, 每段 1 mm, 用液体闪烁计数器分别测定其放射性, 然后将带有放射性的凝胶 1—2 段置于一端有一窄口的小玻管中 (内径 0.5×5 cm), 窄口端捆以透析袋 (1—2 cm), 玻管灌满电泳缓冲液, 在凝胶电泳仪上电泳, 100V, 2 小时, 电泳完毕, 测量透析袋中缓冲液的放射性, 据称回收率可达 70—100%。

3. 从琼脂糖凝胶中洗脱: Wheeler 等^[3]于 0.5—1.5% 琼脂糖凝胶中加入 H^3 标记的 G,RF-DNA, 进行电泳, 然后应用稍加改良的上述 Pettersson 方法电泳洗脱, 回收率仅为 6—12%。作者证明, 电泳洗脱核酸, 应用于聚丙烯酰胺凝胶时, 相当成功^[2]。但用琼脂糖凝胶则收获率较低。这一方法的最大缺点是洗脱液中严重污染

琼脂糖,这可能是由于琼脂糖带有电荷,可与DNA一起泳动到透析袋中。

Sugden 等^[4]曾以 0.5—1.4% 琼脂糖凝胶对DNA进行电泳分析,然后回收核酸。取一支 10 ml 滴管,尖端先塞以小块棉花,并系以 3/8 吋透析袋,袋内置有 0.5ml 缓冲液(0.04M Tris-乙酸盐, pH 7.9, 0.005M 乙酸钠, 0.001M Na₂EDTA),待回收的凝胶移置于滴管内,最后以另一小块棉花压紧,滴管置柱状凝胶电泳仪上,电泳洗脱,120V,36 小时[如为低分子量之核酸时($<2 \times 10^6$ 道尔顿),可在 18 小时完成],洗脱出来的 DNA 为免受污染,可置于调节为 0.05M Tris-HCl, pH9.0, 0.2M NaCl 的洗脱液中。用饱和酚提取,并经氯仿处理,再用 2.5 倍于原体积的乙醇在 -20℃ 沉淀一小时,回收率可达 50—80%。

此外, Wu 等^[5]将含 DNA 的 1.5% 琼脂糖凝胶切成小块(0.25cm²),进行电泳回收,其法与上述相仿, DNA 片段的回收率为 70—90%。作者观察到本法回收的 DNA 片段中,含有一些残存的琼脂糖。在此情况下,就不能用来进行限制性内切酶的切割。因琼脂糖本身可能含有一些酶抑制物,痕量的琼脂糖即能抑制微生物核酸酶与脾磷酸二酯酶对 DNA 的消化作用,如此则需另用碘化钾溶解,平衡离心法去除污染物。

(二) 平板电泳洗脱法

Wienand 等^[6]分别以 3% 聚丙烯酰胺制备分析 RNA 的变性平板凝胶(7M 尿素)及以 1% 琼脂糖制备分析 DNA 的平板凝胶,电泳后切下含核酸部分,用下法洗脱: 先制备洗脱用的平

板凝胶,在水平玻板上倾注 1% 琼脂糖,待凝固后,以滤纸作桥,两端分别与电泳槽两极相连,此平板凝胶应比上述电泳分析所用的平板厚 2mm,然后在此洗脱凝胶上挖长方形槽,其深度约为待洗脱样品凝胶的 2 倍,透析袋纵切一长缝,两端结紧,将其置于长方形槽内。注意必须使透析袋与槽的四壁紧密相贴,如需同时洗脱数个凝胶条时,应制备可供挖 10—20 个长方形槽的洗脱平板凝胶(图 1)。同一洗脱凝胶板可重复使用数次,将含有核酸的凝胶条置于垫有透析袋的洗脱凝胶槽中,放在靠阴极端,长方形槽内注入缓冲液。于冷室中电泳,6—12 mA, 200V,5 小时或过夜。为了避免液体蒸发,在其上 1 cm 高处盖玻璃板。电泳完毕,以毛细管沿透析袋内壁,将其中缓冲液来回吸入挤出,待混匀后吸出,转至塑料管中,用乙醇沉淀。如为 RNA 时,以 0.24M 乙酸铵沉淀,若此 RNA 是以聚丙烯酰胺凝胶洗脱,可与乙醇共沉淀,但并不影响以后的生物试验;如为 DNA 时,则以 0.3M 乙酸钠和 10mM Mg²⁺ 使之沉淀。

本洗脱法简便快速,最大优点为可同时洗脱 20 个凝胶条,适用于聚丙烯酰胺或琼脂糖的柱状或平板凝胶,适于高分子量核酸的分离与洗脱。在每个槽中垫以透析袋,可使被洗脱的核酸保留于槽内,又不会被琼脂糖碎片或其大分子物质污染。核酸的回收率: rRNA 与 tRNA 为 50—70%。DNA 片段为 70—90%。洗脱的核酸再进行电泳,结果表明洗脱过程并不引起核酸的降解,回收的核酸不需再经纯化便可直接用于生物试验。

此外, Chouikh 等^[7]还报告过一种平板电泳洗脱法,从电泳后的聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶中切下含核酸的片段,置含有缓冲液(40mM Tris, 20mM 乙酸钠及 2mM Na₂EDTA, pH7.8) 的透析袋中,两端结紧,放在琼脂糖凝胶电泳仪平台上,将缓冲液加入电泳槽中覆盖透析袋。于冷室内洗脱,3V/

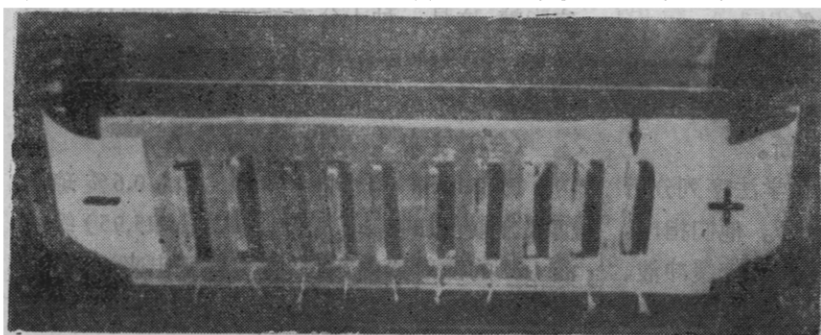


图 1 有 10 个洗脱孔的洗脱凝胶(盖子已移去)(箭头表示放入凝胶的位置)

cm, 6—14 小时 (视洗脱物大小而定), 泳毕, 反转电流 5 分钟, 以回收粘附于透析袋壁的部分物质。打开透析袋, 以毛细管吸出袋内凝胶周围的液体, 用半体积的蒸馏水洗涤透析袋 2 次, 洗脱液与洗涤液的混合液用等体积异丁醇处理 3 次以除去溴化乙锭。如需要时, 将溶液浓缩, 最后以 0.2M 乙酸钠, 并加入 2 体积的乙醇将核酸沉淀, 用 Eppendorf 离心机离心, 收集于 1.5—2.2ml 小管中。

本法只需常用的电泳装置, 不需特殊设备。核酸 (DNA 或 RNA) 的回收率甚高, 并可直接用于各种酶反应。如 *E. coli* DNA 聚合酶的缺口翻译, T₄ 聚核苷酸激酶的磷酸化作用或限制性内切酶的消化及其它化学反应。DNA 回收率为 75—90%。作者指出, 此法回收的 DNA 片段, 不含有抑制酶反应的物质, 可用作序列分析。

二、捣碎回收法

(一) 匀浆提取法

Wu 等^[9]曾分别将琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶打碎使成匀浆, 然后将 DNA 洗脱下来, 匀浆器内放置待回收 DNA 的琼脂糖凝胶, 加入 2—3 倍体积的提取缓冲液 (300mM NaCl, 10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA), 捣碎 30 秒, 混匀液置室温 12 小时, 10,000 rpm 离心 15 分钟, 保留上清液, 沉淀再加入 2 倍体积的提取液, 3—4 小时后, 离心, 将 2 次上清液混合, 用酚提取 2 次, 可除去大量的琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶。水溶液部分即含有 DNA。用等积的乙醚提取 3 次, 最后以 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀, -20℃, 4—6 小时。6000rpm 离心 2 小时, 沉淀物即为 DNA。双链的 DNA 片段回收率达 80% 以上。

用匀浆法回收的 DNA, 纯度相当高, 但仅适用于小分子的 DNA (如限制性片段), 因为大分子 DNA 在匀浆时可能被折断。

Maxiam 和 Gilbert 在建立化学法序列分析时, 应用捣碎法回收 DNA 片段^[8,9]。他们指出, 用此法回收的 DNA 不降解, 不含凝胶缓冲液、酶抑制物及半可溶性聚丙烯酰胺, 而且可同时进行较多量的凝胶回收, 其方法是: 将切

下的凝胶段放于 1000 μl 的 Eppendorf 滴管尖端, 用硅化玻璃棉紧压后, 加热封口, 以硅化玻璃棒研磨凝胶使成糊状, 然后加入 0.6ml (0.5M 乙酸铵、0.01M 乙酸镁、0.1% SDS、0.1mM EDTA) 溶液。如为标记的 DNA 时, 再加入 50 μl tRNA 载体。封口, 37℃ 10 小时后, 切开封口, 将此尖端部分放到 10 × 75 μm 的硅化小管内, 离心 5 分钟, 先以 0.2ml 新鲜洗脱液冲洗, 再以乙醇沉淀 2 次, 作者不主张以组织研磨器于酚中匀浆化, 以避免低分子量聚丙烯酰胺的释出, 后者能与 DNA 共同纯化。洗脱液中的乙酸铵有增强 DNA 从凝胶中扩散出来的作用。SDS 的作用是使 DNase 变性 (如存在的话), 镁离子及载体 tRNA 可使较稀释的 DNA 从乙醇中沉淀下来, 扩散时间至多 10 小时, 视分子量大小而适当缩减。

(二) 注射器挤压法

Kaplan 等^[10]以注射器捣碎琼脂糖凝胶 (0.3—1.2%) 回收 DNA 限制性片段。将含 DNA 部分的凝胶切下, 置于一带有 14 号针头的注射器内, 加入约 2ml 缓冲液 (0.25M NaCl, 2mM EDTA, 0.01M Tris-HCl, pH 7.9), 用力挤压凝胶, 通过针头收集悬液, 4℃, 20 小时后, 再通过 200 目的细眼筛绢布, 30,000g 离心 15 分钟, 以除去残存的琼脂糖, 加入 2 体积乙醇, 置 -20℃ 18 小时后, 15,000g 离心 15 分钟, 弃去上清液, 将沉淀悬于 pH 7.9 的 0.01M Tris-HCl 中, 用液氮迅速冷冻, 储存于 -20℃。据称 6 × 10⁶ 道尔顿的 DNA 回收率约为 75% (1.0—1.2% 琼脂糖)。此法回收的 DNA 可用作第二次内切酶的切割。用此法回收的 DNA 片段仅含微量的琼脂糖, 这是一种十分有效的快速回收 DNA 的方法, 但本法仅适用于通过针头且不会折断的 DNA。

(三) 注射器-琼脂糖酶联合法

Finkelstein 等^[11]将含有 DNA 的 0.6% 琼脂糖部分置于加有 0.1M Tris-HCl (pH 5.95) 缓冲液 1ml 的注射器内, 用力将其挤压出来, 共挤 3 次。匀浆液置离心管中, 加入琼脂糖酶^[12], 每一凝胶片段为 50 μg, 浓度为 1mg/ml 0.1M Tris-HCl

(pH 5.95), 在 37℃ 温育 2 小时, 亦可再置 4℃ 温育 2—4 小时, 于 4℃, 48,000g 离心 30 分钟。如需浓缩, 可用 2 倍体积的乙醇沉淀。作克隆化试验时, 在浓缩前先将上清通过 0.45 μ m 微孔滤膜进一步纯化。作者用 PML2-DNA 及 NR1-DNA 试验, 结果凝胶片段以 50 μ g 琼脂糖酶处理后, 回收率可达 71—79%。此法缺点是回收的 DNA 需再度纯化, 而且无 DNase 的琼脂糖不易买到。

(四) 冰冻-挤压法

Thuring 等^[13]报告用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 长链 DNA 的回收可用冰冻-挤压法。将含 DNA 的凝胶切成了 3 mm, 直径 6 mm 的小段, 夹于塑料纸中, 置低温冰箱 -20℃ 后以大拇指与食指挤压 10 秒钟, 如凝胶量较多时, 可用压榨机挤压。约 70% 的凝胶可挤成清液流出。为了获得最大的回收率, 挤过的凝胶, 可加入 50 μ l 缓冲液 (40mM Tris-乙酸盐、20mM 乙酸钠, 1mM EDTA, pH7.7), 再重复一次全过程, 挤出液中的残存琼脂糖碎片, 可用 Eppendorf 离心机 8,000g 离心 5 分钟除去, 此上清液不需再次纯化即可使用。

此法亦可加入干冰加速其冰冻, 约 15 分钟即达 -20℃, 但温度勿低于 -20℃, 否则凝胶难于挤压。挤出之 DNA, 如用于内切酶降解时, 需先除去溴化乙锭, 以防止其抑制酶活性。为此, 可加入 1mg Dowex 50W-X8 (每 mg DNA 以 30 μ l 10mM Tris-HCl 悬浮), 室温放置 5 分钟后, 离心除去 Dowex 树脂及残存琼脂糖碎片 (用 Eppendorf 离心机于 8,000g 离心 5 分钟)。作者指出, 电泳后以冰冻-挤压法回收长 DNA, 如噬菌体 T₇ DNA (25 × 10⁶ 道尔顿) 及环状噬菌体 PM₂ DNA (6 × 10⁶ 道尔顿) 的回收率约为 70%。沉淀分析证明挤出的 DNA 无双股或单股的缺口。由此得到的 DNA 不需进一步纯化即可用做限制性内切酶消化和 DNA-DNA 杂交。作者认为本法在制备少量纯化的 DNA 时是一种简便、不会引起 DNA 降解、不需特殊仪器的较满意的方法。但在大规模制备时则有技术上的困难。有人报告其回收率仅为 50—60%。

三、碘化钾回收法

(一) 碘化钾梯度离心法

Blin 等^[14]将含有 DNA 的 0.5% 琼脂糖凝胶部分切下, 溶解于饱和碘化钾溶液中, 使碘化钾最后浓度为 1.5g/ml, 琼脂糖浓度为 0.1—0.2%。然后进行平衡离心 (20℃, 200,000g, 20—24 小时), 假如碘化钾梯度含有溴化乙锭 150 μ g/ml 时, DNA 即可直接以紫外线观察, 如无溴化乙锭, 则可测定其放射性, 或取不同部分点样 (每样品 10 μ l) 于滤纸上以判断 DNA 的部位。滤纸干后浸泡于溴化乙锭溶液中 (0.5 μ g/ml), 含 0.02 μ g 或以上的 DNA 者即能清楚地显示出来。将含 DNA 的各部分合并, 若含有溴化乙锭时, 需以正丁醇提取 3 次, 然后用 0.01M 磷酸钠, 0.001M EDTA, pH7.9 缓冲液透析, 贮存于 4℃。由此制得的 DNA 含量为 5—60 μ g/ml, 可直接用于限制性内切酶消化及 *E. coli* RNA 聚合酶转录等研究。

作者指出虽然一般常用核酸回收法能成功地从聚丙烯酰胺回收核酸, 但从琼脂糖回收者常常不能直接用作限制性内切酶的降解。这种对特异核酸酶的抑制作用无论是以电泳法回收或将琼脂糖溶解于高浓度离子如碘化物后, 再于低离子强度沉淀的方法均可遇到。DNA 用酚提取或氯化铯平衡离心都不能除去此酶抑制物。若是用本节所描述的方法, 即将琼脂糖 DNA 混合物于碘化钾梯度中平衡离心, 可得到高纯度的对限制性内切酶有正常敏感性的 DNA。回收率可达 90—95%。

(二) 碘化钾-羟磷灰石层析法

由于上述方法难于处理大量 DNA 样品, Wu 等^[15]对其进行了简化, 先把含 DNA 片段琼脂糖溶于饱和碘化钾-1mM Na₂S₂O₃ 中, 使琼脂糖浓度为 0.1—0.2%, 然后将其通过羟磷灰石柱 (0.6 × 2cm) 的滴管 (先以饱和碘化钾冲洗), 柱子用 4 倍床体积饱和碘化钾及 8 倍床体积的 0.02M Tris-磷酸盐 (pH 7.0)-1mM EDTA 冲洗, 最后以 4 倍床体积的 0.4M Tris-磷酸盐 (pH7.0)-1mM EDTA 缓冲液冲洗。

而 Wheeler 等^[13]则以 8—10cm 的磷灰石柱

子先以 0.08M 磷酸钾缓冲液平衡,然后将已溶解于饱和碘化钾中的含 DNA 的琼脂糖部分通过柱子,琼脂糖用饱和碘化钾洗脱,又用 0.08M 磷酸钾缓冲液冲洗后,再以 1M 磷酸钾缓冲液将 DNA 洗脱。作者认为虽然本法所获得的 DNA 不含琼脂糖,但其回收率只有 50—75%。

四、过氯酸钠密度梯度离心回收法

Fuke 等^[12]用 ³²P 标记的环状及线状 DNA 与等量 (150 μ l) 的 1% 琼脂糖混合制成 0.5% 凝胶,然后挤压成直径约 1mm 的小块,与 40ml SSC 缓冲液 (0.5M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠) 混合,于室温中搅拌 4 小时,离心,收集琼脂碎片,测定其放射性,发现约有 25% 开环 DNA 仍滞留于琼脂内,而线状 DNA 及线状 T₄ DNA 仅分别为 1.6% 与 0.8%。滞留在琼脂内的 DNA 可用下法回收: 琼脂沉淀物与等体积的 8M 过氯酸钠 (于 0.01M Tris 缓冲液中, pH7.4) 混匀,待琼脂溶解后,经 4—8M 过氯酸钠密度梯度离心,50,000 rpm 分离 14 小时,λDNA 即可在中间梯度内获得,而琼脂则在液柱的弯月面附近。

五、甲酰胺回收法

Hayward 等^[16]使用 0.6% 琼脂糖凝胶对单链 DNA 片段电泳后,将含 DNA 的凝胶溶于在 70℃ 加热 10 分钟的 6 倍体积的 50%(V/V) 甲酰胺, 0.01M Tris, 1mM EDTA (pH8.0) 中。在此浓度时,琼脂糖即形成一种松散的凝胶,可于 5,000g 离心 5 分钟,将其去除。上清液中 DNA 的回收率可达 80—90%。作者认为此法快速,回收率高,但仅适用于单链 DNA,因为处理过程中能使双链 DNA 变性。

六、结语

电泳后从凝胶中回收核酸采用哪种方法合

适,需视具体实验情况而定。应根据支持物是琼脂糖还是聚丙烯酰胺凝胶,核酸是环状还是线状,单股还是双股,分子量大小及实验室设备条件等考虑采用相应的回收方法。也可联合使用两种方法。一般说来,在我国以采用电泳及捣碎两种回收方法较普遍。选用的方法应尽可能以操作快速简便,要求设备条件不高,回收率高,不含凝胶成分,无需再处理或纯化即可直接用于下一阶段的生化试验者为原则。

参 考 文 献

- [1] Allet, B. et al.: *Nature.*, **241**: 120, 1973.
- [2] Pettersson, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**(1): 200, 1973.
- [3] Wheeler, F. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **78**: 260, 1977.
- [4] Sugden, B. et al.: *Anal. Biochem.*, **88**: 36, 1975.
- [5] Wu, R. et al.: In “*Methods in Cancer Res*, Vol XII, p. 130, Academic Press, N. Y., 1976.
- [6] Wienand, M. et al., *FEBS Let.*, **98**(2): 319, 1979.
- [7] Chouikh, Y. et al.: *Mol. Biol. Rep.*, **5**(4): 237, 1979.
- [8] Maxiam, A. M. and W. Gilbert: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**(2): 567, 1977.
- [9] Maxiam, A. M.: *Sequencing DNA by Labeling the End and Breaking at Bases: DNA Segments End Labels, Cleavage Reactions, Polyacrylamide Gels and Strategies*, 1980 (Monograph).
- [10] Kaplan, D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**: 2395, 1975.
- [11] Finkelstein, M. et al.: *Plasmid*, **1**: 557, 1978.
- [12] Sampietro, A. R. et al.: *Biochimica et Biophysica acta.*, **224**(1): 65, 1971.
- [13] Thuring, R. W. J. et al.: *Anal. Biochem.*, **66**: 213, 1975.
- [14] Blin, N. et al.: *FEBS Let.*, **53**(1): 84, 1975.
- [15] Fuke, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **52**: 395, 1970.
- [16] Hayward, G. S. et al.: *J. Mol. Biol.*, **63**: 397, 1972.