

# 倒转停顿电场电泳在大质粒检测中的应用

魏 辉 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

李 阜 棣

(华中农业大学土化系, 武汉)

**摘要** 利用带有电脑控制器的能周期性倒转并停顿电场的电泳检测了13株细菌的质粒。结果表明, 该方法分辨率高、分离范围广(30Md—600Md), 而且重现性好。应用该方法, 在根癌农杆菌 C58 和 A136 菌株中检测到一条未见报道的巨大质粒, 分子量 > 600Md; 在紫云英根瘤菌 S52 菌株中, 检测到常规电泳不能分离的、分子量非常接近的两条大质粒。

**关键词** 倒转停顿电场电泳, 质粒检测; 根瘤菌; 根癌农杆菌

1984年 Schwartz 等设计了一种脉冲电场梯度凝胶电泳装置, 交替采用两个垂直方向的不均匀电场来分离酵母菌染色体<sup>[1]</sup>。随后, Carle 等又进一步设计了一种倒转电场电泳装置, 也能有效分离大分子染色体<sup>[2]</sup>。目前, 这种电泳新技术已广泛应用于酵母、锥虫、疟原虫、利什曼虫和人体染色体的大分子 DNA 的分离研究<sup>[3,4]</sup>。我们曾将倒转电场电泳直接应用于大质粒的检测, 但没有获得比常规电泳明显改进的结果。

根据 Carle 等提出的倒转电场电泳机理, 染色体 DNA 分子随电场变化发生首尾颠倒式的构象变化并沿新的泳动方向伸直, 而这种构象变化的时间又显著地依赖于 DNA 分子大小<sup>[2]</sup>。我们设想在正、反向电场之间加入一个“无电场”的短暂停顿, 以增加 DNA 分子构象变化的缓冲及恢复时间, 减少 DNA 分子的简单来回泳动, 从而进一步提高分离效果和扩大分离范围。为此, 我们自行设计了能周期性倒转并间隔停顿电场的 DC-1 型电泳电脑控制器(由中国地质大学测试中心生产), 并将这种倒转停顿电场电泳技术引入根瘤菌(*Rhizobium* spp.) 及根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的质粒快速检测中, 对 13 株细菌的大质粒检测均获得满意的结果。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

表 1 菌株及已报道的质粒数目

菌株	菌株特征	已报道质粒数目	参考文献
根癌农杆菌			
<i>A. tumefaciens</i>			
A136	C58 质粒消除突变株	1	5
C58	野生型	2	5
紫云英根瘤菌			
<i>R. astragali</i>			
S52	野生型	2	6,7
S52-S2	S52 质粒消除突变株, Nod <sup>+</sup> Fix <sup>-</sup>	1	6
7653-5	7653 突变株, Nod <sup>-</sup>	1	6
7653	野生型	1	6
76531	野生型	2	7
7653R	野生型	2	6
7653R1	7653R 质粒消除突变株, Nod <sup>-</sup>	1	6
SR72	野生型	2	7
HR104	野生型	3	8
菜豆根瘤菌			
<i>R. phaseoli</i>			
3622-15	Tn5-Mob 插入 RCR3622	6	9
快生型大豆根瘤菌			
<i>R. japonicum</i>			
USDA205	野生型	4	10

各菌株及已报道的常规电泳检测的质粒数目见表 1。所有菌株均由华中农业大学生物固氮研究室提供。

本工作得到王常霖、张忠明同志的技术指导; 杨代华、甘明、孙佃、李波同志参加了电泳电脑控制器的设计安装工作, 特此致谢。

## (二) 培养基及培养条件

见文献[9]。

## (三) 质粒检测方法

样品及琼脂糖凝胶制备见文献[9],所用溶菌酶为美国 Sigma 公司产品, RNase 为西德 Merck 公司产品, SDS 为西德 Wasser 公司产品, 琼脂糖为日本 Serva 公司进口分装产品。所用琼脂糖凝胶浓度为 0.4%。DC-1 型电泳电泳控制器的输入端正负两极分别连接普通电泳仪正负两极, 它的输出端两极则连接普通电泳槽两极。该控制器能以一定频率周期性地供给四种输出: 正向电场-停顿-反向电场-停顿, 用时间比表示为: 正向电场时间(秒): 停顿时间(秒): 反向电场时间(秒): 停顿时间(秒)。这四种时间可分别任意调节。

## 结果与讨论

### (一) 常规电泳的质粒检测

用文献[9]描述的方法, 0.4% 琼脂糖凝胶电泳, 先低压电泳: 50V(1.6V/cm)40 分钟, 然后高压电泳: 140V(4.6V/cm)6 小时。对 13 株细菌的质粒检测结果与表 1 中已报道的一致。为便于下面的比较研究, 根癌农杆菌 C58 和 A136, 紫云英根瘤菌 S52 和 S52-S2 的质粒图谱照片见图 1。

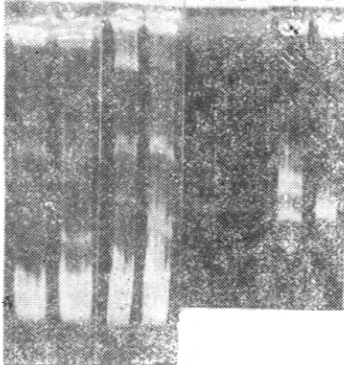


图 1 常规电泳和倒转停顿电场电泳对部分菌株大质粒检测结果的比较

大写字母 A、B、C、D 为常规电泳的结果, A 和 B 为根癌农杆菌: A. A136; B. C58。C 和 D 为紫云英根瘤菌: C. S52; D. S52-S2。小写字母 a、b、c、d 为倒转停顿电场电泳的结果, 所代表菌株对应于 A、B、C、D。

### (二) 倒转停顿电场电泳的质粒检测

因一定分子量范围内的大分子 DNA 分离效果与电场变化的频率密切相关<sup>[10]</sup>, 我们经过多次试验发现, 当倒转停顿频率(正向电场时间: 停顿时间: 反向电场时间: 停顿时间)为: 35 秒: 2 秒: 5 秒: 2 秒时, 分离效果最佳。所用凝胶浓度、电压及时间为: 50V(1.6V/cm) 1 小时和 140V(4.6V/cm) 9 小时。在此倒转停顿频率下, 净迁移比率为  $(35-5)/(35+2+5+2)$  即 15/22。因此, 扣除反向电泳后, 倒转停顿电场电泳中净正向电泳的电压与时间, 与前述常规电泳的可比条件完全一致, 它们之间的质粒检测差别是由于倒转停顿电场电泳代替常规电泳所造成的。由于电泳的边缘效应和电场的周期性变化的影响, 部分质粒带拖尾和弯曲了。

现将倒转停顿电场电泳中各菌株的质粒检测结果讨论如下:

1. 根癌农杆菌 A136、C58 中检测到一条常规电泳不能检测出的巨大质粒(图 1 孔 A-B 和 a-b)。该巨大质粒未见过报道, 其分子量与快生型大豆根瘤菌 USDA205 的最大质粒的分子量接近(图 2 孔 k), 估计亦  $>600\text{Md}$ 。我们将这条巨大质粒命名为 pAtC58c。

2. 紫云英根瘤菌 S52 中检测到三条质粒带, 分别为 pRaS52c、pRaS52b 和 pRaS52a。其中大质粒带 pRaS52c 和 pRaS52b 的分子量非常接近, 在常规电泳中不能分辨开而成一条带(图 1 孔 C-D 和 c-d)。而在 S52 的质粒消除突变株中只检测到一条小质粒带 pRaS52a。这种质粒的共迁移现象在苜蓿根瘤菌 41 中也有报道<sup>[11]</sup>, 它的二条巨大质粒 pRme41c 和 pRme41b 分子量非常接近, 在常规电泳迁移率相同, 只是通过转移和 Tn5 诱变等手段, 才证明了这两个质粒的存在。

3. 除 A136、C58 和 S52 以外的其它 10 株菌株, 所检测到的质粒都与表 1 中报道的一致(图 2), 其中孔 k 的快生型大豆根瘤菌 USDA205 有四条质粒(分子量为  $>600, 195, 112, 57\text{Md}$ ), 可作分子量标准对照<sup>[10]</sup>。这也从一个侧面说明, A136、C58 和 S52 中新检测出的质粒确实是

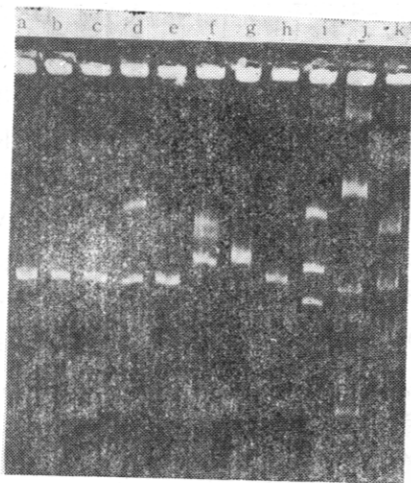


图 2 倒转停顿电场电泳对根瘤菌质粒检测的图谱。

a-i 为紫云英根瘤菌: a. 7653-5; b. 7653; c. 76531; d. 7653R; e. 7653R1; f. S52; g. S52-S2; h. SR72; i. HR104。 j. 菜豆根瘤菌 3622-15。 k. 快生型大豆根瘤菌 USDA205。

这些菌株的内源性质粒, 而不是它们的更小质粒的开环形式, 也不是一种电泳假象。

4. 本方法装置简单、所得结果易于同常规电泳结果相比较, 且重现性较好。在我们所进行的10次倒转停顿电场电泳重复实验中, 13株细菌中每次都有10株以上的质粒能得到清晰检测, 且检测结果一致。

此外, DC-1型电泳电脑控制器在性能和用途上超过国内同类仪器<sup>[12]</sup>, 它的电场变化频率连续可调, 且可按程序编排而随时间呈线性变化。它不仅可用于本工作的倒转停顿电场电泳, 还可用于单纯的倒转电场电泳和交变脉冲电场梯度凝胶电泳<sup>[1,2]</sup>, 有关它的应用研究还在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Schwartz, D. C. & Cantor, C. R.: *Cell*, **37**:67-75, 1984.
- [2] Carle, G. F. et al.: *Science*, **232**; 65-68, 1986.
- [3] Dawkins, H. J. S.: *Parasitology Today*, **3**: 60-62, 1987.
- [4] 毛先枝, 王子芳: *微生物学通报*, **16**(4): 228-231, 1989.
- [5] Plazinski, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1001-1003, 1985.
- [6] 周俊初等: *华中农业大学学报*, **6**(2): 156-164, 1987.
- [7] 宁林夫等: *微生物学报*, **26**(3): 271-276, 1986.
- [8] 王常霖, 陈金标: *华中农业大学学报*, **7**(1): 15-21, 1988.
- [9] 王常霖, 赫茨: *遗传学报*, **15**(1): 25-33, 1988.
- [10] Masterson, R. V. et al.: *J. Bacteriol.* **163**: 21-26, 1985.
- [11] Banfalvi, Z. et al.: *Plasmid*, **13**: 129-138, 1985.
- [12] 朱圣庚, 黄仪秀: *生物化学与生物物理进展*, **14**(5): 67-69, 1987.