

# 淺談脈衝式凝膠電泳技術

曾福生、余俊欣、林金榮

水產試驗所水產養殖組

## 發展背景

DNA 主要由五碳糖、含氮鹼基及帶負電的磷酸根組成，DNA 電泳的原理即利用磷酸根帶負電的特性，於電場受力穿過膠體，向正極移動。因為不同分子量的 DNA 在膠體孔徑中的泳動速率有所差異，藉此可將不同大小的 DNA 分離。若欲分離分子量較小或是樣本間分子量差距較小的 DNA，可使用非變性聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)，以 3.5—20.0% 膠體濃度，在垂直式電泳槽進行電泳，可分析 6 bp—3 Kb 大小的 DNA。而通常在一般生物學的研究上最常使用的膠體為瓊膠 (agarose gel)，膠體濃度為 0.3—2.0%，以水平式電泳槽進行電泳，可分析 100 bp—60 Kb 大小的 DNA。然而，如果 DNA 分子量大於 15 Kb，在一般瓊膠電泳操作時，DNA 往往會一起移動，無法有效分離。為了克服這個難題，1984 年哥倫比亞大學 Schwartz 和 Cantor 在一般瓊膠電泳操作上，引進一個交替變化的電壓梯度，使得大分子 DNA 能較有效的分離，顯著提高了大分子 DNA 的解析度，並成功應用在釀酒酵母染色體 DNA 分離，這個技術就稱為脈衝式凝膠電泳 (Pulsed Field Gel

Electrophoresis, PFGE)。PFGE 的發展擴大了 DNA 片段的解析範圍，使分子生物學的研究邁向新的領域。

## 操作方式

PFGE 的操作過程與瓊膠電泳相當類似，其不同處在於一般瓊膠膠片電泳電壓流動的方向為固定的單一方向，而 PFGE 是在電泳過程中時常改變電壓流動的方向，電壓流動的方向週期性在 3 個方向轉換，1 個方向穿過膠片的中央軸，另 2 個方向為兩邊各移動 60 度的角度，呈 120 度的夾角，並可視欲分離的 DNA 分子大小來調整適當的夾角，通常隨著夾角的減小，可使較大的 DNA 分子分離的效果更好。而每個方向電壓流動的脈衝時間，會造成 DNA 向前移動速度的改變，而電壓流動方向的改變，使得 DNA 在膠片上並非以直線移動，進而造成不同大分子 DNA 片段大小的有效分離。在分離較小片段的 DNA，通常會減少脈衝時間，而在分離較大片段的 DNA，通常會增加脈衝時間。由於電壓流動方向轉換間距的電壓梯度，並在分離較大片段的 DNA 增加每一個方向的脈衝時間，所以在進行較大 DNA 片

段分離時，完成電泳所需時間遠超過一般瓊膠電泳。此外，在電泳過程中需降低緩衝液的溫度，緩衝液的溫度越低，電泳速度越慢，通常得到的條帶越細直，結果越理想，目前在操作上多控溫在 14°C (圖 1—5)。

## 理論基礎

PFGE 為什麼適合應用於大分子 DNA 的移動與分離？一般而言小片段 DNA 比大片段 DNA 更容易通過膠片母體。當 DNA 分子超過一特定大小 (如分子量在 15 Kb 以上)，往往無法有效的移動與分離，因為超過如此大小的 DNA 在一般瓊膠電泳時具有相同的電泳速率，故電泳結果在膠片中看起來是大小相同的擴散條帶。但是經由 PFGE 過程中，週期性的改變電流方向及脈衝時間，會造成不同分子量的 DNA 泳動速率的改變。即大片段的 DNA 將比較慢改變它的相對方向，而比較小的 DNA 片段改變方向比較快。透過如此一連串改變方向的過程及時間，每一個不同大小的 DNA 條帶將可更有效的分離，甚至是非常大的 DNA 片段也可以被分離。

## 應用現況

PFGE 用於大分子 DNA 的分離，分辨率可達 10 Mb，因而具有獨特的使用價值，是一種非常有效的 DNA 分子分型研究方法。它的應用範圍廣泛，可直接測定生物體細胞染色體 (或基因組) 大小及研究基因的重組

和缺失等。應用 PFGE 分析，使用的 DNA 樣本不需建立在 PCR 技術的基礎上，且多用於全染色體 DNA 的分析，因此對 DNA 樣本的完整性要求較高。目前使用 PFGE 分析，在 DNA 萃取上普遍採用的方法為瓊脂糖基質保護下的原位 (*in situ*) 萃取法。這種方法反應條件溫和，可避免如酚—氯仿法等其他萃取方法，因為機械力的作用而造成部分 DNA 斷裂的缺失。使用此種原位萃取法，會使研究結果更能準確的呈現生物原本染色體 DNA 經限制酶作用後的分子型態，如此更能揭示完整的染色體基因組 DNA 遺傳特性及其基因多樣性。

一般應用 PFGE 的研究中常使用的限制酶為寡切點酶 (low frequency cleavage restriction endonuclease)，樣本經這種限制酶作用後，DNA 片段少，非常適合用於 PFGE 分析。隨著限制酶不斷的開發和利用，PFGE 近年來廣泛應用在分子遺傳學上基因型及 DNA 指紋分析，特別是應用於細菌分型及追溯傳染源方面，被公認為最有分辨力的一種流行病學研究方法。目前在許多病原體方面的流行病學研究中，PFGE 被認為鑑定菌株是否一致的標準操作方法，對於細菌性傳染病監測、傳染源追蹤、傳播途徑和識別等調查很有幫助。自 PFGE 方法問世以來，發展快速，應用廣泛。水產養殖研究者可將其應用於細菌性疾病如弧菌、鏈球菌、巴斯德桿菌及立克次體等 DNA 分子分型研究或生物本身基因組染色體 DNA 遺傳特性及基因型分析等方面，使水產養殖在分子生物學研究方面進展更加快速。

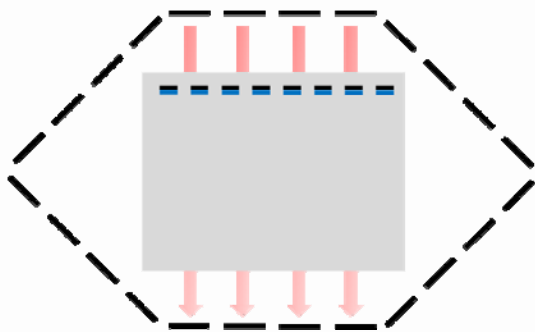


圖 1 排成 6 角型每邊的四條黑線代表三組電極。灰色方形為膠片，膠片上的黑色虛線代表樣本槽，藍色虛線代表與染劑混後的 DNA 樣本。紅色箭號代表電壓流動方向。最初，電壓流動方向由上至下穿過膠片的中央軸，DNA 樣本由上往下移動。

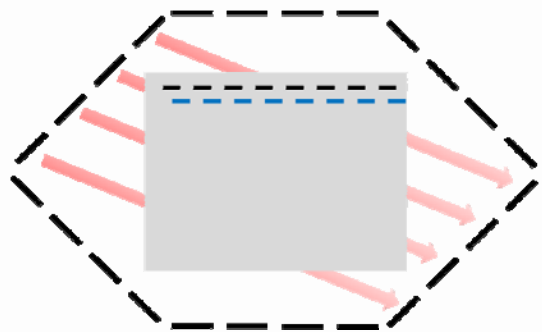


圖 2 電極向左移動 60 度的角度，電壓流動方向由左上至右下穿過膠片，這個方向電壓流動的脈衝時間，會造成 DNA 樣本往右下移動。

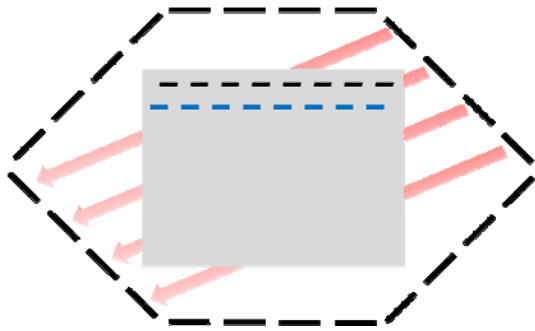


圖 3 電極向右移動 120 度的角度，電壓流動方向由右上至左下穿過膠片，這個方向電壓流動的脈衝時間，會造成 DNA 樣本往左下移動。

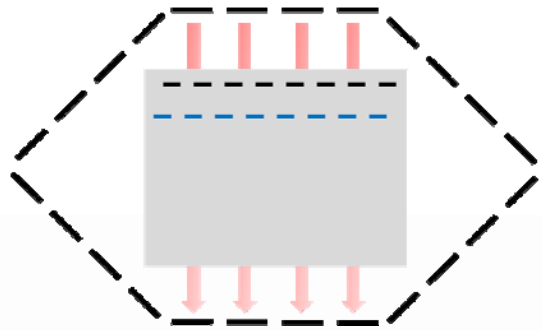


圖 4 電極向左移動 60 度的角度，電壓流動方向回到由上至下穿過膠片的中央軸，這個方向電壓流動的脈衝時間，造成 DNA 樣本由上往下移動。

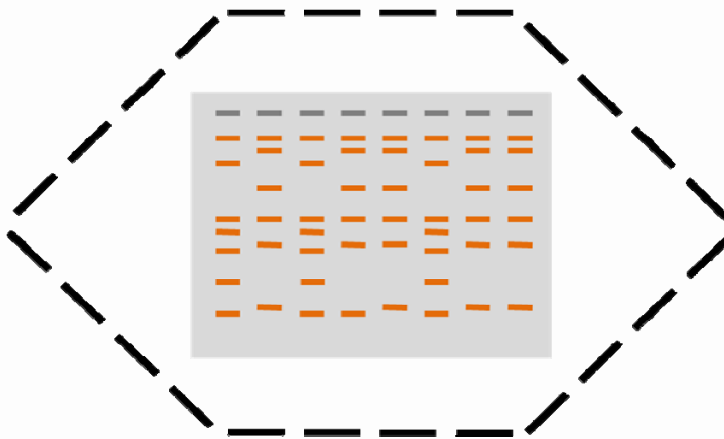


圖 5 重複圖 2-4 三組電極轉換方向及其電壓流動的脈衝時間，直到染劑條帶接近膠片末端。圖中灰色方形膠片示意圖，為電泳後的膠片經溴化乙菲錠(ethidium bromide, EtBr)染色，橘紅螢光條帶為與 EtBr 緊密結合的 DNA。