

plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene*, 1988;68:119

6 Wolk C P, Vonshalk A, Kehoe P *et al.* Construction of

shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1561

简单、快速、敏感的化学合成寡核苷酸银染色

陈惠崔泓

(中国康复研究中心康复医学基础研究所, 北京 100077)

关键词 银染, 单链寡核苷酸, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭荧光染色

随着分子生物学的研究进展, PCR 技术的广泛应用以及 DNA 合成仪的问世, 人们对 DNA 合成、改造、检定有着迫切的要求. 本室自 DNA 合成仪开机以来试用多种方法, 如放射自显影、溴化乙锭荧光染色及银染检定化学合成寡核苷酸的纯度、产量及寡核苷酸链长、短和相对移动位置. 放射自显影虽能检出 10^{-14} — 10^{-16} g 物质^[1], 但因其本身存在诸多缺点不宜常规应用, 而溴化乙锭荧光染色简单、快速、敏感 (200ng), 因其致诱变^[2]作用不利于化学合成寡核苷酸常规检测. 也有人用快速电泳仪检定, 但因仪器价格昂贵不宜推广. 因此, 我们采用普通电泳仪 PAGE 银染色, PAGE 是实验室常规技术, 改以银染能提高检出寡核苷酸的灵敏度^[3], 检出量 <4ng, 主带占 90% 以上, 且整个过程 1 d 内完成. 文献^[4]报导银染 da-DNA 而国内应用较少, 尤其是银染检定化学合成寡核苷酸单链片段尚未见报导.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 丙烯酰胺日本进口分装. 双丙烯酰胺德国进口.

1.1.2 银氨溶液: A, 20% AgNO_3 12ml. B, 0.36% (W/W) NaOH 66ml 与 14.8mol/L NH_4OH 4.36ml 混匀. C, 将 A 滴入 B, 搅拌 40—60r/min 补加双蒸水至 300ml, 用前现配.

1.1.3 甲醛-柠檬酸显影液: 1% 柠檬酸 1.5ml 与 38% 甲醛 0.15ml 补加双蒸水至 300ml.

1.1.4 化学合成寡核苷酸片段为本室合成.

1.2 方法

1.2.1 化学合成寡核苷酸经 NAP-10 柱初提后将

样品稀释为不同浓度, 走含 7mol/L 尿素, 20% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 胶板 15cm×15cm×2mm, 电压 200V, 电泳 2h, 电泳毕将凝胶板取下用双蒸水充分摇动冲洗.

1.2.2 固定 50% 乙醇固定凝胶 1h, 双蒸水充分洗涤轻摇 40—60r/min, 使尿素尽量自凝胶中洗涤去除.

1.2.3 染色 将胶板放入新鲜配制的银氨溶液内染色 15min, 搅拌 40—60r/min, 双蒸水充分洗涤.

1.2.4 显影 将染色好的凝胶板放入甲醛-柠檬酸显影液^[5]内至寡核苷酸带不再出现为止. 双蒸水充分洗涤.

1.2.5 定影 若背景太深用含 10% 甲醛快速定影剂脱色至背景清晰而核苷酸带不致丢失为止.

2 结果

结果见图 1 和图 2.

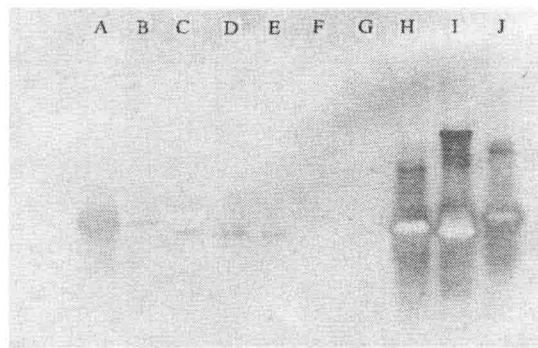


图 1 20%PAGE 银染

从 A—J 为 17 个碱基的寡核苷酸, 但其碱基组成不同, 从 A—J 上样量为 0.4928 μg , 19.7ng, 10.32ng, 14.6ng, 7.3ng, 3.9ng, 3.6ng, 1.032 μg , 1.17 μg , 1.23 μg

收稿日期: 1992-12-24

修回日期: 1993-04-29

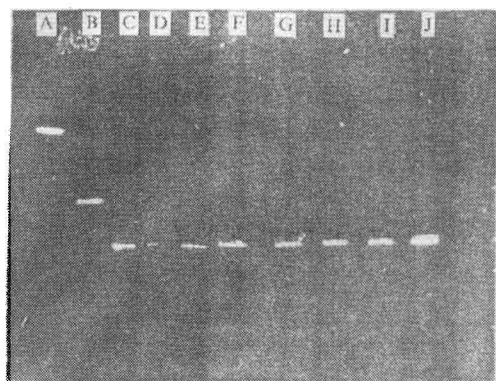


图 2 溴化乙锭荧光染色

A 为 51 个碱基, B 为 25 个碱基, 从 C—J 为 20 个碱基, 从 A—J 上样量为 2.28 μ g, 0.8 μ g, 0.3 μ g, 10ng, 0.2 μ g, 0.4 μ g, 0.5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g

从图 1 和图 2 可见, 在条件相同情况下银染比溴化乙锭荧光染色敏感 100 倍以上, 比文献^[4]报导的还敏

感。化学合成 DNA 一般是微克级产量, 银染既解决高灵敏度的放射自显影的不安全因素, 又达到微量敏感的目的。是值得推广的一种简单快速又安全的常规应用技术。

参 考 文 献

- 1 齐义鹏, 黄永秀, 梁明山. 基因工程原理与方法. 四川: 四川大学出版社, 1988: 90
- 2 Maniatis T 著, 沈桂芳等译. 分子克隆操作指南. 北京: 科学出版社, 1987: 111
- 3 Sommerville L L, Wang K. High sensitive staining with silver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; **102**: 53—58
- 4 Beidler J L, Hilliard P R, Rill R L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem*, 1982; **126**: 374—380
- 5 张树政, 孟广震, 何忠效. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987: 99—105

一种快速可靠的质粒 DNA 序列测定程序

魏征宇 叶寅田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

关键词 质粒 DNA, DNA 序列测定, DNA 测序程序

质粒的提取与 dsDNA 的碱变性是质粒 DNA 序列测定的关键步骤。一般采用碱-SDS 法^[1]以及煮沸法^[2]提取质粒; 而 dsDNA 碱变性的条件为 37℃ 处理 10min。我们参照 Serghini^[3]等介绍的快速有效的质粒提取方法, 加以改进, 省掉乙醇沉淀步骤, 使模板 DNA 的提取时间大为缩短; 同时提高变性温度并缩短处理时间等, 形成了一套快速、简便的质粒 DNA 测序程序。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒与受菌体: 质粒为大肠杆菌质粒 pUC18 或 pUC19, 受体菌为 DH5 α 。

1.1.2 测序盒为 Boehringer Mannheim 公司的 pUC 测序盒 (DNA 多聚酶为 Klenow 酶) 或 Pharmacia 公司的 T7 测序盒 (T7 sequencingTM kit)。 α -³²P-dCTP

或 ³⁵S-dATP 均购自美国 Dupont 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取 根据 Serghini^[3]等的方法略加改进。挑一单菌落接种于 5ml LB 培养基 (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素), 过夜培养, 转移 1.5ml 菌液于 Eppendorf 管中, 极限离心 10s 收获菌体, 倒掉上清并控干。加入 50 μ l TE 缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mmol/L EDTA) 悬浮菌液, 再加入等体积的酚-氯仿, 混匀后, 立即离心 (12 000r/min, 5min)。取上清液直接用于碱变性。

1.2.2 质粒的碱变性及与引物的退火 碱变性反应总体积为 150 μ l。取 25 μ l 上述上清液 (3—5 μ g 质粒), 加入 2mol/L NaOH 至终浓度为 0.2mol/L 于沸水