

## 介绍测定 DNA 序列的“末端终止”法及单链 DNA 模板的制备

近几年来测定 DNA 序列的新方法不断出现,对核苷酸的结构功能研究起了巨大推动作用。

Sanger 博士在“加、减”法的基础上,利用 DNA 聚合酶 I 的复制作用和特异性末端终止剂(即双脱氧核苷三磷酸),建立了“末端终止法”<sup>[1]</sup>。现介绍如下:

### 一、末端终止法

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I,在有单链 DNA 为模板、引物、四种脱氧核苷三磷酸存在下,可以复制出 DNA 产物。但如果在反应中加入一相应的双脱氧核苷三磷酸,如 ddTTP,在 DNA 聚合酶 I 复制反应过程中,一旦 ddTTP 参入到 dTTP 应该参入的地方,就会终止复制反应。因为 ddTTP 没有 3'-羟基基团,这条 DNA 链也就不再延长,结果反应特异性地终止在 dT 应参入的位置(图 1)。若将引物、模板、DNA 多聚酶 I、ddTTP 和 dTTP 混合物以及其它三种脱氧核苷三磷酸(其中一种用 <sup>32</sup>P 标记)共同保温,由于 ddTTP 是部分地随机参入,因此可得到一组长短不一的 DNA 片段混合物,它们都有相同的 5' 端,而 3' 端长短不一,但都为 ddTTP 残基。用变性凝胶电泳分离这组混合物,则带状图谱显示新合成的 DNA 链以 dT 为结尾的分布。同样道理,若将同一样品分成四组实验,各加入不

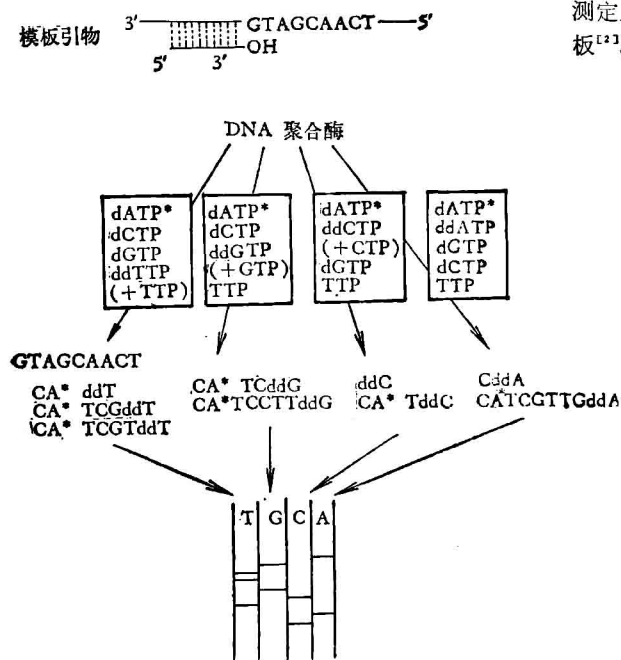


图 1 末端终止法原理图

同的双脱氧核苷三磷酸作为抑制剂,分别保温,并在凝胶上平行电泳,像其它序列分序快速方法一样,可从凝胶电泳后的放射自显影图谱直接读出要测定的核苷酸序列(图 1)。

为了得到一个理想的带状电泳图谱,从中读出 DNA 序列,则必须控制双脱氧核苷三磷酸与相应的正常脱氧核苷三磷酸的比例,以便使双脱氧核苷三磷酸部分地随机参入,这个比例大约为 100。

“末端终止”法是目前测定 DNA 序列所使用的方法中最优越的,它操作简便、快速、比较准确。该法的缺点是:需要单链 DNA 作为 DNA 聚合酶 I 的模板以及合适的引物,而天然 DNA 大部分是双链的,要得到单链 DNA 往往是困难的,这就限制了本方法的应用范围。最近, Sanger 用下面两种方法制备单链 DNA 模板,解决了这个问题。

### 二、单链 DNA 模板的制备

1) 用双链特异性外切酶(外切酶 III)处理双链 DNA,从两条链的 3' 端外切双链 DNA 中的一条链,将从双链 DNA 的两端暴露出二条单链来,而中间仍保留部分双链。如有适当的引物,这单链部分即可做为“末端终止”法测定 DNA 序列的模板(图 2)。此方法已在测定人的线粒体 DNA 序列中用来制备单链 DNA 模板<sup>[2]</sup>。

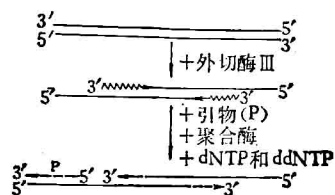


图 2 核酶外切酶 III 制备单链 DNA 模板示意图

2) 利用单链噬菌体 M13 制备单链 DNA 模板

噬菌体 M13 DNA 是单链环状 DNA,在 M13 DNA 某一位点插入外源 DNA 片段,并不使 M13 失去活性。有人把含有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的乳糖操纵子片段插入到噬菌体 M13 中<sup>[3]</sup>(M13 复制型)(图 III),这种含有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的重组体 M13mp2,生长情况与 M13 类似,而且在插入的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因中有一个 EcoRI 切点。

含有  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 M13mp2,在含

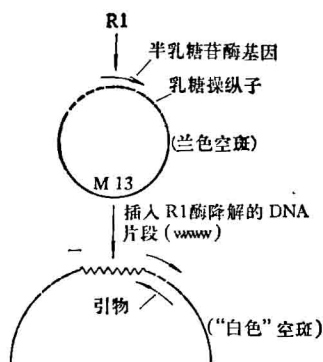


图3 利用噬菌体 M13 制备单链 DNA 模板过程示意图

有异丙醇- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷和 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷的琼脂板上形成蓝色噬菌斑。如果将外源 DNA 片段插入到  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的 EcoRI 位点上,则  $\beta$ -半乳糖苷酶基因就被破坏了,不能再产生  $\beta$ -半乳糖苷酶,而兰色噬菌斑就变成白色噬菌斑。从白色噬菌斑可知外源 DNA 片段已插入到 M13 mp2 DNA 中,从而可以挑选白斑进行繁殖,高效价的噬菌体 M13 mp2 可以从宿主细胞中分泌到培养液中(单链型)。通过离心等步骤可以得到 M13 重组体。在插入 DNA 片段的一侧,可利用一段引物(图 III),这

样就可以应用“末端终止”法对插入片段进行序列分析。

从图 3 可看出同一个 M13 mp2 可以插入任何外源 DNA 片断,外源 DNA 片段插入与否,又有灵敏的检验标记,这样重组 M13 mp2 DNA 就像一台 DNA 序列分析的机器,可以把各种不同的 DNA 片段插入 M13 mp2 中,利用同一引物(这种引物可由“克隆”技术大量制得)<sup>[4]</sup>,按“末端终止”法的程序,可以快而准确地测出大量 DNA 片段的序列来。Sanger 等应用上述技术在短时间内,即将完成  $\lambda$  DNA 的序列测定工作。

## 参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.* **74**, 5463—5467, 1977.
- [2] Barrell, B. G. et al.: *Nature (London)*, **282**, 189—194, 1979.
- [3] Messing, J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.* **74**, 3642—3646, 1977.
- [4] Anderson, S.: *Nucleic Acids Research*, **8**, 1731—1743, 1980.

(中国科学院生物物理所 程振起)  
(中国科学院武汉病毒研究所 赵林)

## 英国神经生理学家——布莱克谟尔教授来华短期工作和讲学

英国牛津大学生理系教授柯林·布莱克谟尔(Colin Blakemore)于1980年8月底起在中国科学院生物物理所作六周的研究及讲学访问。

布莱克谟尔教授在京作了视觉系统的一般结构和功能学术报告。他结合近年来在视觉生理、神经解剖及心理物理学方面的新进展,以脊椎动物的视觉系统为例较为全面地介绍了视觉信号由眼向中枢的传递通路,以及此通路上各级水平的信息处理特点。另外,他还结合自己近年的工作讨论了猴视敏度发育的神经基础,以及猫视觉、听觉空间在上丘脑的整合问题。

在“猴视敏度发育的神经基础”的报告中,他指出:在幼猫或幼猴的发育期内,只要暂短地剥夺某一只眼的视觉,就会对正在发育的视皮层造成严重的损害。利用这一点可以为研究婴儿早期单眼剥夺造成的弱视提供一个理想的模型。他用电生理学方法测量了不同年龄小猴外膝体单个细胞(X型)分辨空间细节的能力(即所谓单个细胞的视敏度),发现细胞视敏度的正常发展过程与用行为实验方法测得的视敏度与年龄的变化平行,而单眼剥夺对此没有影响。成年猴相当于中央凹的外膝体神经元的空间分辨率相当高,与

用行为方法测得的结果相当。在远离中央凹的位置上,神经元的分辨率则很低。新生猴与成年猴的唯一不同是:新生猴对应中央凹的外膝体神经元对空间细节的分辨能力相当低。可见,猴视敏度的发育主要表现在中央凹区域。在单眼剥夺后,猴外膝体单个神经元的视敏度随年龄而改善的过程不受影响,而且与分别通过两眼测得的视敏度随年龄而变化的曲线相似。在临床上,已知单眼视觉剥夺引起视力明显降低。上面的实验结果说明单眼剥夺造成弱视的病理起源不可能发生在外膝体及其以前的各阶段上,而很可能是由于它引起了外膝体与视皮层之间突触联系的改变所致。

关于“上丘对视觉与听觉空间的整合”问题,他指出,哺乳类动物的上丘对视觉定位功能特别重要,同时它也是视觉与听觉的整合中枢。上丘的深层有一些细胞,既对视觉刺激也对听觉刺激起反应,而且它们的视觉感受野和听觉感受野在空间上互相重叠。这些细胞的活动能给动物提供单纯的位置信息,负责视听整合。

现在普遍接受的一种假计认为,听觉细胞能根据声音在两耳的强度差或到达的时间差,对空间某一点上发出的声音起反应。其听觉感受野是以耳,也就是以