

技术与方法

³⁵S-标记与 DNA 酶解片段核苷酸的顺序测定

琦祖和 宋松* 熊伟军

(中国医学科学院基础医学研究所生化室,北京)

末端终止法^[1]测定 DNA 分子内核苷酸排列顺序,常用 ³²P 标记, Tris-H₃BO₃-EDTA (TBE)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。在实际工作中都希望从有限的胶板上得到尽可能多的数据。Biggin 及 Hung 等^[2]应用 ³⁵S- α -ATP 标记和缓冲液梯度胶分离,大大改善了凝胶的分离状况,扩大了区带的可读范围。在乙型肝炎病毒(HBV) DNA 顺序测定中,我们将 ³⁵S-dATP 标记法用于 0.5 与 2.5 $\times$ TBE 缓冲液梯度-8% 聚丙烯酰胺凝胶分离,得到了良好的分离效果,顺序可读长度增加一倍以上,因而使较大片段的顺序测定能在一次克隆的样品中完成。

材料与方 法

dATP, dGTP, dCTP, dTTP (dNTP) 为 Sigma 产品。ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP (ddNTP) 为 P. L. Biochemicals 出品。 α -³⁵S-dATP, 比活度大于 400 Ci/mmol 及 α -³²P-dATP, 比活度大于 3000 Ci/mmol 为 Amersham 出品。15 核苷酸引物, M₁₃mp₈ 双链(RF) DNA 及工具酶为 New England Biolabs 出品。IPTG 及 XGal 为 BRL 出品,酶解条件按说明书。

被测 HBV (adr 亚型) DNA 来自 pH BVNC-1 质粒^[3],用 CsCl 密度梯度法离心纯化,经 Bgl II 降解,滤纸片法回收 4.3kb 片段,再克隆入载体, M₁₃mp₈ DNA (RF) 的 BamHI 位点。重组,转染,克隆及单链模板的制备见参考文献[4]和[5]。

试剂配制及末端终止反应见表 1, 2, 3。

表 1 dNTP 溶液的配制

贮备液	μ l	工作液			
		A	G	C	T
dGTP	0.5mM	60	3	45	45
dCTP	0.5mM	60	45	3	45
dTTP	0.5mM	60	45	45	3
10xH		60	45	45	45

10xH: 500mM NaCl, 66mM Tris-HCl pH7.4, 66mM MgCl₂, 10mM DTT

表 2 ddNTP 溶液的配制

配制比例		贮备液 μ l	水 μ l
贮备液及浓度			
ddATP	4mM	4	100
ddGTP	4mM	8	70
ddCTP	4mM	8	70
ddTTP	8mM	13	70

电泳分离用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAG), 丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺浓度比为 19:1, 胶板宽 20cm, 长 40cm, 间隔 0.4mm。TBE 缓冲液含 10.8gr. Tris, 5.5gr. H₃BO₃, 0.93gr. EDTA = 钠盐。

缓冲液梯度胶的配制按 Biggin 等^[2]法。

甲液: 0.5 $\times$ TBE-8% 聚丙烯酰胺胶 35ml 含 40% PAG 贮备液 7ml, 10 $\times$ TBE 1.75ml,

* 中国协和医科大学

表 3 末端终止反应

反应液	反应管	A	G	C	T
模板-引物(6 μ l 模板 3 μ l 引物 1 μ l 10 $\times$ H 退火)		2	2	2	2
A ⁰ + ddATP		2			
G ⁰ + ddGTP			2		
C ⁰ + ddCTP				2	
T ⁰ + ddTTP					2
³⁵ S-dATP 7 μ Ci/ μ l		1	1	1	1
DNA 聚合酶大片段 1.5U/ μ l		1	1	1	1

20—24℃ 放 15 分钟

0.5mM dNTP 追加液 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	2	2	2	2
DNA 聚合酶大片段	0.25	0.25	0.25	0.25

20—24℃ 放 15 分钟

停止液(去离子甲酰胺含溴酚蓝,二甲苯蓝各 0.05% EDTA Na ₂ 20mM)	10	10	10	10
电泳取出	6—7	6—7	6—7	6—7

尿素 14.7gr, 10% 过硫酸铵 210 μ l, 灌入胶板前加入 TEMED 18 μ l.

乙液: 2.5 $\times$ TBE-8% 聚丙烯酰胺胶 6ml, 含蔗糖 0.6gr., 40% PAG 贮备液 1.2ml, 10 $\times$ TBE 1.5ml, 10% 过硫酸铵 36 μ l, 尿素 2.52gr., 0.05% 溴酚蓝 0.6ml. 灌入胶板前加入 TEMED 4 μ l.

用 10ml 移液管, 先吸甲液 4ml, 再吸乙液 6ml, 放入 2—3 个气泡, 立即倒入 20 $\times$ 40cm 间隔 0.4mm 的玻板中, 再用甲液灌满, 用溴酚蓝指示梯度形成情况。电泳恒定电流 28mA, 待样品中溴酚蓝走出后 15 分钟左右停止电泳, 电泳后用 1000ml 10% 甲醇, 10% 乙酸固定 10 分钟, 切去顶端 6cm, 将凝胶转移到 Whatman 3 mm 滤纸上, 于 80℃ 减压干燥 15 分钟, 直接放上 X-光胶片进行放射自显影。国产三环牌胶片显影需 5—10 天。

结果与讨论

1. 梯度胶板比普通胶板分离效果明显优越。用普通胶板分离时(图 1) 在正极方向的区带越接近底部, 带间距离越大, 而上部的区带越接近加样点, 带间间隔越小, 甚至挤在一起, 很难正确解读。梯度胶由于缓冲液浓度自负极向正极方向递增, 使电势梯度递减, 使下部区带间距减小, 上部区带间距增加(图 2), 从而改善了分离状况, 增加了顺序的可读长度。

AGCTAGCT

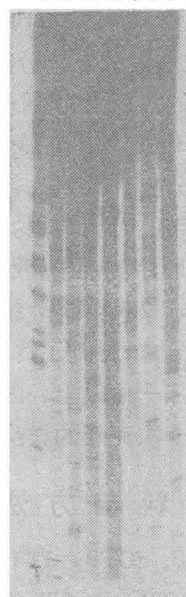


图 1 ³²P 标记-8% PAG 分离
(非梯度缓冲液)自显影图

A 腺嘌呤脱氧核苷酸
G 鸟嘌呤脱氧核苷酸
C 胞嘧啶脱氧核苷酸
T 胸腺嘧啶脱氧核苷酸

2. ³⁵S 标记得到的自显影图谱区带集中, 间隔清楚、背景浅, 再加以缓冲液梯度的作用, 使凝胶的分辨能力大大增加(图 3)。与 ³²P 标记的结果比较, 相同的一段顺序在图 3 中比图 2 集中, 说明自同样长度的凝胶板上得到的数据 ³⁵S 标记的明显增多, 实际测定说明, 顺序可读长度增加一倍以上。

3. 采用定点克隆法, 一个 DNA 片段可得

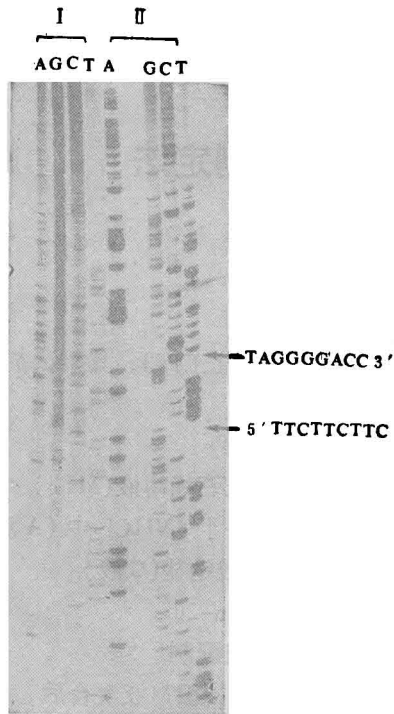


图2 ^{32}P 标记-8% PAG 分离
0.5 与 $2.5\times\text{TBE}$ 梯度自显影图

箭头示右侧序列在图中
的部位, I II 为同一片
段不同方向克隆测得的顺序

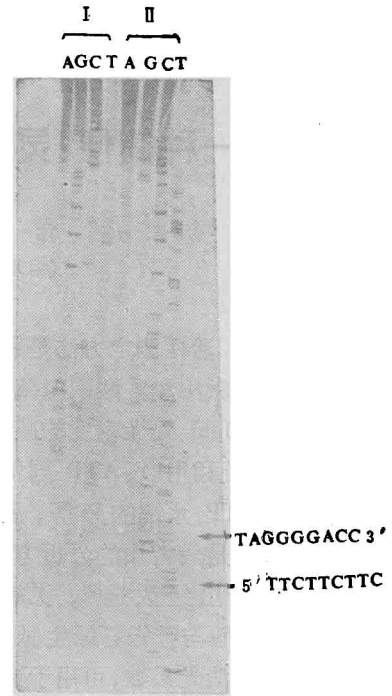


图3 ^{33}S 标记-8% PAG 分离
0.5 与 $2.5\times\text{TBE}$ 梯度自显影图

箭头示右侧序列在图中
的部位 I、II 同图 2

5' GATCTC	CTCGACACCG	CCTCTGCTCT	GTATCGGGAG	GCCTTAGAGT
3' <u>CTAGAG</u>	GAGCTGTGGC	GGAGACGAGA	CATAGCCCTC	CGGAATCTCA
CTCCGGAACA	TTGTTCACCT	CACCATACAG	CACTCAGGCA	AGCTATTCTG
GAGGCCTTGT	AACAAGTGGA	CTGGTATGTC	GTGAGTCCGT	TCGATAAGAC
TGTTGGGGTG	AGTTGATGAA	TCTGGCCACC	TGGGTGGGAA	GTAATTTGGA
ACAACCCAC	TCAACTACTT	AGACCGGTGG	ACCCACCCTT	CATTAAACCT
AGACCCAGCA	TCCAGGGAAT	TAGTAGTCAG	CTATGTCAAT	GTTAATATGG
TCTGGGTCGT	AGGTCCCTTA	ATCATCAGTC	GATACAGTTA	CAATTATACC
GCCTAAAAAT	CAGACAACCTA	TTGTGGTTTC	ACATTTCCTG	CCTTACTTTT
CGGATTTTTA	GTCTGTTGAT	AACACCAAAG	TGTAAAGGAC	GGAATGAAAA
GGAAGAGAAA	CTGTCTTGGA	GTATTTGGTG	TCTTTTGGAG	TGTGGATTCTG
CCTTCTCTTT	GACAGAACCT	CATAAACCCAC	AGAAAACCTC	ACACCTAAGC
CACTCCTCCC	GCTTACAGAC	CACCAAATGC	CCCTATCTTA	TCAACACTTC
GTGAGGAGGG	CGAATGTCTG	GTGGTTTACG	GGGATAGAAT	AGTTGTGAAG
CGGAAACTAC	TGTTGTTAGA	CGACGAGGCA	GGTCCCTAG	AAGAAGAACT
GCCTTTGATG	ACAACAATCT	GCTGCTCCGT	CCAGGGGATC	TTCTTCTTGA
CCCTCGCCTC	GCAGACGAAG	GTCTCAATCG	CCGCGTCGCA	GAAGATC 3'
GGGAGCGGAG	CGTCTGCTTC	CAGAGTTAGC	GGCGCAGCGT	CTT <u>CTAG</u> 5'

图4 439bp 片段的全顺序
——示酶切位点

一种简便、灵敏的 ATPase 活性测定法

徐友涵 宋铨华*

(南开大学分子生物物理研究所,天津)

现有的 ATPase 活性测定方法是利用分光光度法,偶联丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的反应,测定 NADH 在 340nm 处光密度的减少,求出 ATP 的水解量,以及利用³²P-ATP 同位素测定或用比色法测定 ATP 水解的 Pi 等,后一方法因实验条件简单,仍是最常用的分析方法。Fiske 建立的钼蓝比色法^[1]虽经改进^[2],灵敏度仍较低。Itaya 发现磷钼酸与孔雀石绿生成的复合物,有很高的克分子消光系数,可用于灵敏测定 Pi^[3]。但用于 ATPase 分析时,酸性钼酸催化的底物 ATP 非酶促水解,将严重干扰对酶活性的测定^[4]。Lanzetta 利用柠檬酸淬灭新生 Pi(如中止酶反应后,ATP 非酶促水解产生的 Pi)的颜色反应,使该法有可能用于 ATPase 的活性测定^[5]。本文基于上述工作,全部使用国产试剂,并用 Tween-20 取代不易获得的 sterox,顺利完成对红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 的测试。现将此法介绍如后。

材料与方 法

孔雀石绿酒石酸盐(MG)(天津化学试剂

一厂),ATP(江门化工厂),其余试剂均为国产分析纯。

1. 原始溶液配制

- (1) 0.05% 孔雀石绿溶液(M液)
- (2) 4.2% 钼酸铵于 4NHCl 中(A液)
- (3) 24% 柠檬酸钠盐(C液)
- (4) 1.5% Tween-20

2. 呈色反应溶液配制

1 体积 A 液与 3 体积 M 液混合后,搅拌 30 分钟,滤纸过滤,滤液存于聚乙烯瓶中(AM 液)。100ml AM 液与 4ml 1.5% Tween-20 混合液存于 4℃ 冰箱 (AMT 液),此溶液可贮存一个月。

3. 红细胞膜 Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase 测定

酶反应溶液含 50—60μg 膜蛋白/ml, 25mM Tris-Maleate (pH7.0), 100mM NaCl, 2mM MgCl, 0.1mM 鸟本苷, 1mM ATP 和 36μM Ca²⁺^[6]。不同时刻取 0.4ml 酶反应液(制作标准曲线时,则取 0.4ml 标准 Pi 溶液)于 2ml AMT

* 河北大学 85 届生化专业毕业生

到不同方向的两个克隆株,用普通胶板测序时,片段在 300 核苷酸以上的,就需要用另外的酶切片段重新克隆,以测定片段中间的部分,用³⁵S 标记梯度胶分离后,可以自一次克隆得到两个方向的重组子,经过测定便可以得到完整片段的顺序,简化了操作,便于大片段的测定。一次测得 430 核苷的片段的结果见图 4。

³⁵S 标记的不足之处是显影时间长,所以通常与 ³²P 标记联合应用,收效更好。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463, 1977.
- [2] Biggin, M. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 3963, 1983.
- [3] 蔡良琬等:《中国医学科学院院报》, **6**(4), 251, 1984.
- [4] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **143**, 161, 1980.
- [5] 琦祖和等:《生物化学与生物物理进展》, **6**, 55, 1985.

[本文于 1985 年 8 月 17 日收到]