

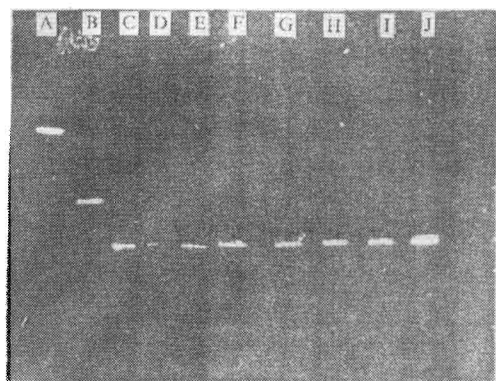


图2 溴化乙锭荧光染色

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 sequencingTMkit)。 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

保温 3min 后, 立即置于冰浴, 加入 20 μ l 预冷的 3mol/L NaAc (pH5.2), 混匀后加入 2.5 倍体积的无水乙醇. 于液氮 (或 -70℃ 冰箱) 中放置 5min 后离心 (12000r/min, 10min) 沉淀 DNA, 并以 70% 乙醇及无水乙醇乙醇各洗一次, 真空干燥. 按照测序盒所介绍的方法, 加入一定量的双蒸水溶解 DNA 样品, 并加入退火缓冲液及引物 (正向引物或反向引物) 混匀, 于 42℃ 保温 5min 并缓慢冷却至室温.

1.2.3 测序反应 按照测序盒所介绍的程序进行测序反应.

2 结果与讨论

2.1 质粒 DNA 的提取

使用这一程序有如下优点: a. 整个提取步骤均在一只 Eppendorf 管内进行, 只需 30min 即可得到用于序列分析的模板 DNA; b. 节约实验用品, 所用 TE 也是实验室常用的缓冲液, 极为方便; c. 获得的模板 DNA 质量高.

2.2 质粒 DNA 的碱变性及模板 DNA 与引物的退火

我们以前曾采用文献或测序盒介绍的方法碱变性 dsDNA, 如变性溶液为 0.2mol/L NaOH, 在室温放置 15min 或 37℃ 保温 5min. 但往往出现假带, 背景很差, 且可读性不高. 推测可能是模板中污染了 RNA 的缘故. 我们认为, 加剧碱变性的条件, 不仅可使 dsDNA 变性完全, 又可借助高温碱水解掉 RNA 分子, 消除 RNA 的影响. 因此扩大碱变性体积为 150 μ l, 提高变性温度 (100℃, 3min). 测序结果表明, 经过上述介绍的碱变性的条件, 背景清晰, 无假带, 采用 T7 测序盒中的 “short-mix” 所测定的序列, 可读序列达 500 多个碱基 (见图 1). 这一水平接近于以单链模板的序列分析, 而且操作简易, 节省时间. 同时, 我们采用的退火温度也与一般介绍的方法不同, 为 42—50℃.

参 考 文 献

- 1 Birnboim H C, Doly J. A rapid alkline extraction proce-



图 1 质粒 DNA 序列测定的放射自显影结果
序列测定反应采用 T7 测序盒所介绍的程序 (Mix-short). 三次加样后可读出序列 500 多个碱基

dure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1979;7(5-6):1513

- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Manitis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition, New York: Cold Spring Harbor, 1989;P1. 34-1. 35
- 3 Serghini M A, Ritzenthler C, Pinck L. A rapid and efficient “Miniprep” for isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 1989;17(9):3604