

经验交流

快速检查寡聚 DNA 片段序列的方法

朱榴琴 吴宇杰

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 以质粒为模板, 用待测寡聚 DNA 片段和通用测序引物进行 PCR (聚合酶链式反应), PCR 片段经纯化后插入到 pUC-18 或 pUC-19 的多克隆位点中, 然后用通用测序引物测定重组质粒上待测寡聚 DNA 片段, 即可清晰、正确地知道它的序列。

关键词 PCR, 寡核苷酸, DNA 序列

化学合成寡核苷酸常出现序列上的差错。我们实验室几年前就曾被合成引物的序列是否正确所困扰, 曾经用末端核苷酸转移酶在合成引物的 3' 末端加一段均聚的寡核苷酸, 然后直接用与均聚核苷酸互补的寡核苷酸引物测序。此法虽然有时能得到清楚的序列照片, 但经常出现假带。而且, 为了测未知的寡核苷酸还得合成或购买另一个测序的引物, 此外还需准备末端核苷酸转移酶及高比强的 γ - ^{32}P -ATP 等等。方法不够简捷。

合成的寡核苷酸一般是根据已知的序列设计的, 具有这一序列的 DNA 已经克隆在质粒中。将待测寡核苷酸和与之反向的通用测序引物做 PCR, 纯化得到的 PCR 片段经限制性酶解后定向插入到测序载体 (如 pUC-18 或 pUC-19) 上。如果此载体的多克隆位点与做 PCR 时的载体的顺序相反, 则可以用同样的测序引物直接测得待测寡核苷酸的序列, 整个过程只需 4~5 d。

1 材料和方法

1.1 材料

pUT-18 质粒为本实验室构建^[1]。pUC-18 和 pUC-19 为本实验室保存的商品质粒。M13 反向和正向测序引物为本所生物大分子国家重

点实验室合成。B2 突变引物为上海生物化学研究所合成, 序列为: 5'-TCC GGC GTA GAG AAT CCA CAG GAC GGG-3'。E. coli JM109 为本实验室保存。化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

质粒重组和质粒纯化按《分子克隆》^[2]上的方法进行。序列测定用 T7 DNA 聚合酶 (sequenase) 按双脱氧末端终止法测定。测序的模板为经碱变性的双链质粒。PCR 按 Perkin Elmer 公司提供的条件在该公司的 PCR 仪上进行。二引物浓度均为 1 $\mu\text{mol/L}$, 模板 DNA 5 ng, 反应总体积为 100 μl 。反应前在 97°C 预变性 7 min, 然后反应 25 个循环。每个循环为: 93°C, 1 min; 52°C, 1 min; 70°C, 1 min。最后在 70°C 保温 10 min。

2 结果和讨论

化学合成的寡核苷酸, 其序列除了是根据氨基酸序列而推测出核苷酸顺序具有因密码简并性而造成的一定的随机性外, 都是根据确切知道的 DNA 序列而设计的。它们可以是 PCR 的引物, 或定点突变的引物。如果引物的序列

有错误, 那么往往会因此而影响实验的成败, 对定点突变尤其如此, 因此有时很有必要对引物的序列进行检查。

欲研究的基因可以较容易地插入到 M13、phagemid 或 pUC 系列的载体。在这些载体中都有 M13 通用正向测序引物和反向测序引物的退火位点, 所以欲将待测寡核苷酸与正向测序引物或反向测序引物做 PCR, 条件是具备的。在我们的实验中, pUT-18 来自 pUC-18, 其上具有反向测序引物的退火位点。B2 引物的退火位点在插入的基因内与反向测序引物方向相反, 可构成一 PCR 引物对, 它们相距 0.5 kb。于是以 pUT-18 为模板进行 PCR, 得到单一长度 0.5 kb 的片段。此片段经琼脂糖凝胶电泳与模板和剩余的引物分离, 纯化的片段经 EcoR I 酶解后插入到 pUC-19 的 EcoR I 和 Sma I 切点之间。转化 *E. coli* JM109, 在 X-Gal 平板上挑选白色单菌 6 个, 提取它们的质粒。选取 4 个有插入的重组质粒进行测序分析, 测序结果见图 1。

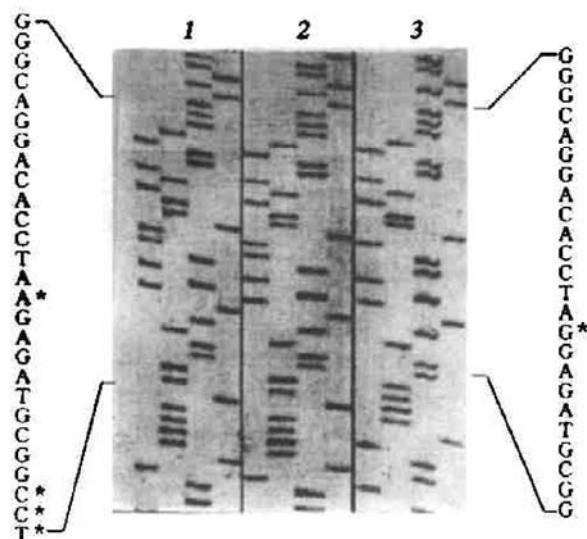


图 1 寡聚 DNA 的序列

1, 2 为正确的寡聚 DNA 的序列; 3 为错误的寡聚 DNA 的序列; * 表示差错的位置。

结果表明, 其中 3 个的序列与预定的 B2 引物完全一致, 但有 1 个不仅在 5' 端缺失 3 个核苷酸 TCC, 而且中间有一个核苷酸发生错误 (A 变 G)。好在这一错误的引物在长度上比预定的短 3 个核苷酸, 故可用聚丙烯酰胺凝胶电泳将它除去。总的结果表明 B2 引物是可以用的。

这一方法整个过程都是基因操作中常规的实验, 只需 4 个工作日即可得到肯定的结果, 具有快速简便和可靠的特点。

参 考 文 献

- 1 Shen T J, Zhu L Q, Sun X. *Gene*, 1991; 103: 73
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1.21-1.87

A Method to Confirm the Sequence of a Defined DNA Primer. Zhu Liuqin, Wu Yujie (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract The sequence of a defined DNA primer can be detected easily by a method described as below. A PCR (polymerase chain reaction) was carried out with the primer to be detected and one of the M13 universal sequencing primers. The resulting PCR fragment was purified and inserted into a pUC-18 or pUC-19 at the multicloning sites. Then the sequence of the primer to be detected can be exactly known by sequencing the recombined plasmid with a M13 universal sequencing primer.

Key words PCR, oligonucleotide, DNA sequence