

pathol., 16, 57, 1978.

[2] Smith, K. M.: *Plant Viruses*. Chapman and Hall, 1977.

[3] Bawden, F. C. et al.: *Brit. J. exp Path.*, 17, 204, 1936.

[4] Stanley, W. M.: *Science*, 83, 626, 1936.

[5] 陈作义、朱本明:《生物化学与生物物理进展》, 1977年, 第5期, 第24页。

[6] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等:《生物化学与生物物理学报》, 1978年, 第10期, 第355页。

[7] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等:《生物化学与生物物理学报》, 1979年, 第11期, 第89页。

[8] Rose, N. R. etc: *Principles of Immunology*, 44, 1973.

[9] Engvall, E. etc: *Biochim. Biophys. Acta*, 251, 427, 1971.

[10] Van Weemen etc: *FEBS Letters*, 15, 232, 1971.

[11] Clark, M. F. etc: *J. Gen. Virol.*, 34, 475, 1977.

[12] 熊立民、徐伟军:《生物化学与生物物理学报》, 1980年, 第12期, 第101页。

[13] 朱本明、陈作义:《自然杂志》, 1981年, 第4期, 第3页。

[14] 熊立民、徐伟军:《生物化学与生物物理学报》, 1981年, 第13期, 第5页。

[本文于 1981 年 2 月 20 日收到]

pBR 322 DNA 的 *Hae*III, *Bam*HI 的酶切片段的核苷酸顺序

王 珩 甘人宝 刘定千 李载平
(中国科学院上海生物化学研究所)

DNA 是生物体的遗传物质。蛋白质和 RNA 分子结构信息以及调节基因的信息都编码在 DNA 的特定核苷酸顺序中。搞清楚蛋白质结构密码的编排十分重要, 而且在基因调控和基因组织的研究中同样重要。可以说 DNA 的顺序分析是分子生物学研究中最基本的问题

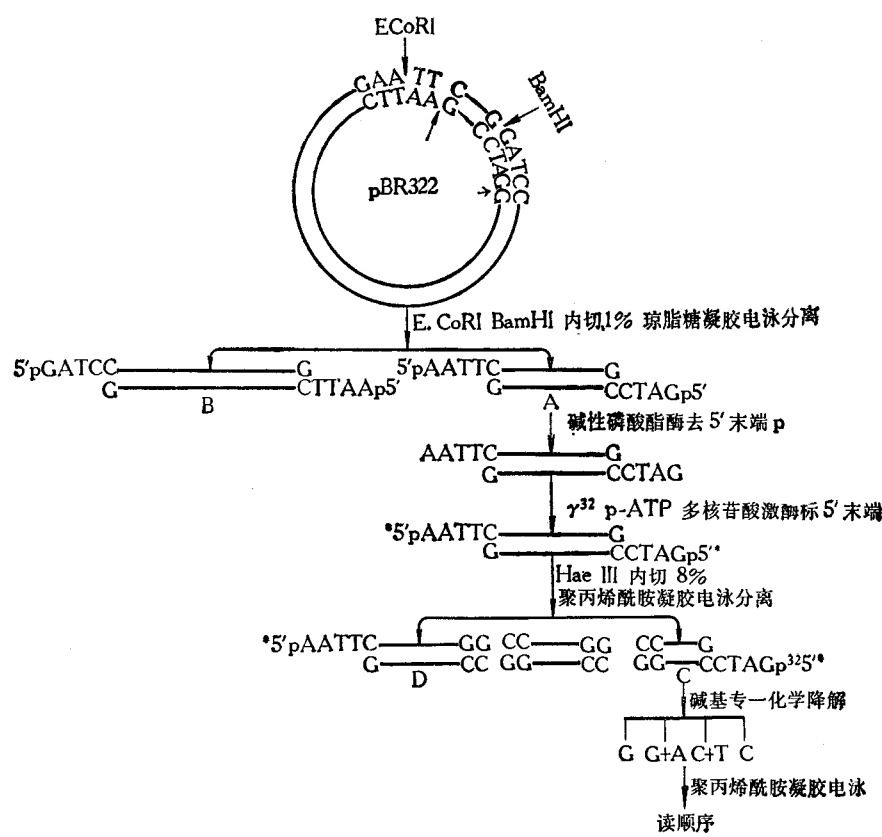


图 1 pBR322DNA 酶切片段的分离标记顺序分析流程

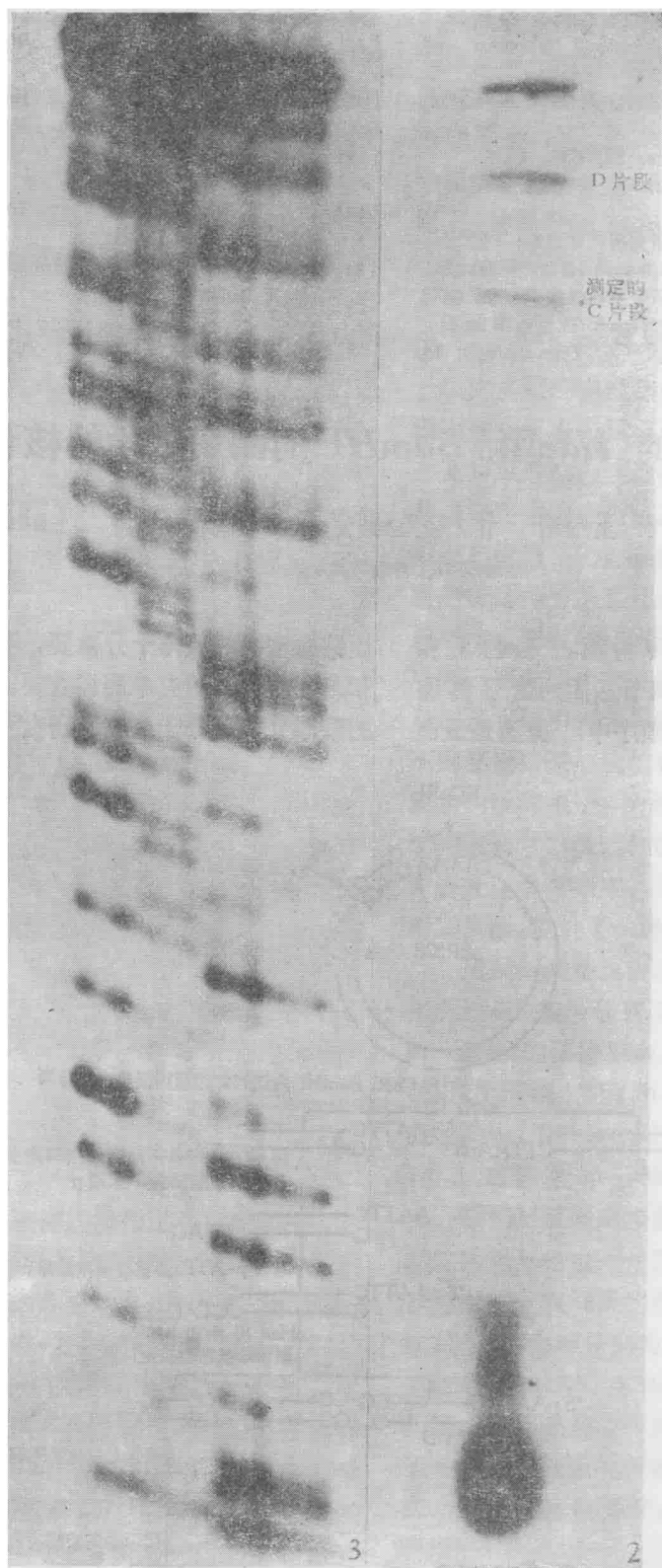


图3 C片段在8%聚丙烯酰胺上的顺序分析

图2 C和D片段在8%聚丙烯酰胺上的电泳分离

1.5' (GA)TCCACAGGACGGGTGTGTCGCCATGATCGCG3'

2. 5' TGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGGCGG3'

3. 5' CGCCATGATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGGCGGCGG3'

图6 三种不同浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳结果: 1.20% 胶 2.10% 胶 3.8% 胶

除20%胶中最小的GA末端片段不够清楚外,以上顺序包括了pBR322DNA的HaeIII, BamHI酶切片段的全顺序

题。

近年来,由于 Sanger^[1] 和 Maxam、Gilbert^[2] 等人建立了简便而快速测定 DNA 顺序的方法,使 DNA 顺序分析的工作有了飞跃发展。在我国则尚未看到有关报道。本文介绍用化学降解法测定 *pBR322* DNA 经 *Hae*III、*Bam*HI 酶切的片段顺序分析的初步结果。

材料与方法 质粒 *pBR322* DNA 及限制性内切酶 *Eco*RI、*Bam*HI 由本实验室提供*。*Hae*III 酶为美国 mils 公司产品。碱性磷酸单酯酶为上海试剂二厂产品。多核苷酸激酶为北京生物物理所制备。胍、上海向阳化工厂产品。硫酸二甲酯、天津市化学试剂一厂产品。呱啶,国产。[γ -³²P]ATP,2000ci/mM,英国 Amersham 公司出品。DNA 的化学降解法按 Maxam、Gilbert 方法^[2]。

实验操作步骤: 见图 1。

结果与讨论 质粒 *pBR322* DNA 的抗四环素 T_r^R 基因的一个片段——*Hae*III、*Bam*HI 酶切片段的顺序分析见流程图 1。*Eco*RI、*Bam*HI 酶解 *pBR 322* 得双链小片段 A,经 ³²p 标记 5' 末端,再经 *Hae*III 酶解后,在 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后得到两个一头标记的片段 C 和 D,见自显影图 2。将 C 片段进行化学部分裂解,分别以 8%、10%、20% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析后可以分别读出 61、64 和 32 个核苷酸顺序,见自显影图 3、图 4(见封三)、图 5(见封三)。三种浓度凝胶电泳后读出的相互重复的核苷酸见图 6。在 20% 与 8% 胶上、20% 与 10% 胶上和 10% 与 8% 胶上读出的相互重复区分别有 13、17 和 60 个核苷酸。从而肯定了

该片段中的 80 个核苷酸顺序: 5'(GA) TCCAC AGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAG TCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGC AGGACTGGGCGGCGG3'。其中 65 个核苷酸顺序有二次以上的重复,结果一致,相互验证。片段降解的最后二个核苷酸,即 *Bam*HI 切口处的二个,虽能推测出来,但在 20% 凝胶电泳分离中还不够清楚。

关于 *pBR 322* DNA 的顺序分析,只看到 Sutcliffe^[3] 报告的结果。我们分析的 *Hae*III、*Bam*HI 酶切片段的顺序,他曾不同的酶切片段作了分析。虽然所用的酶切片段不同,但结果相一致,从而重复肯定了这一段的顺序。

要清楚地分离,准确地读出核苷酸顺序,首先要得到相当纯的 DNA 片段,标记 DNA 的比度要高。我们实验中在最后顺序分析薄板电泳时,每一行上样放射量约 1×10^4 cpm,自显影约 3—4 天即可读得清晰的显影条带。这说明目前除 [γ -³²P] ATP 之外,利用国内条件可以进行 DNA 顺序分析,得到较好结果。本文的图 4,图 5 放在封三。

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. Coulson, A. R. J. *Mol. Biol.* Vol. **94**, 441, 1975.
- [2] Maxam, A. H. Gilbert, W. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. **74**, 560, 1977.
- [3] Sutcliffe, J. G. *Coldspring Harbor Symposia on quantitative biology*, Vol. **XLIII**, 77, 1978.

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]

* 丁广治参加了部分实验工作, *pBR322* DNA 由徐敏制备,内切酶由朱绳祖、吴雪、孔玉英制备,特此致谢。

