

DNA 序列测定的化学断裂法

Maxam 和 Gilbert 化学断裂测定 DNA 序列法最近已发表 (PNAS, vol. 74:2, p. 560—564, 1977)。

此法利用四组不同化学反应, 在一个末端以 ^{32}P 标记的 DNA 分子上专一的破坏一种碱基, 使 DNA 链部分地断裂, 以形成一系列在该碱基重复出现的部位断开的、长短不一的带 ^{32}P 标记末端的 DNA 片段。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中, 这些片段根据大小依次被分离, 并显示出该碱基在链上断裂的位置。以分别对腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)这四种不同碱基专一反应的化学裂解产物, 同时在凝胶上电泳, 就可以从放射自显影后的电泳图谱直接读出各个碱基在 DNA 链上的排列顺序。

化学断裂法包括两个反应步骤: 首先用化学试剂处理 DNA, 破坏其中一个碱基, 使它从糖上脱落下来; 失去碱基的糖留在链上就成为糖磷酸骨架上的一个薄弱点, 在下一步由碱或胺催化的 β 消去反应中, 在 3' 和 5' 的位置上与磷酸完全断开。第一步破坏碱基的反应是有限度的反应, 只能破坏 DNA 链上每 50 至 100 个碱基中的一个。第二步断开 DNA 链的反应则必需完全, 使分析时分子中不致含有隐蔽的损伤。第一步反应中对嘌呤特异的试剂是硫酸二甲酯, 对嘧啶特异的试剂是胍。

化学断裂法要求单链 DNA 分子, 或双链 DNA 分子在其中的一条链上的 5' 或 3' 末端带有 ^{32}P 标记。一个由限制性内切酶作用产生的任何长度的双链片段, 可以先用碱性磷酸酶处理, 去掉链端原有的磷酸根, 再用多核苷酸激酶和 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 标记的 ATP 处理标记其两端, 然后通过两种可供选择的途径使适于用此法进行序列分析: (1) 用限制性内切酶再切一次, 以获得两

个在一端带标记的双链片段, 或(2) 令两端带标记的双链变性, 而分解成两条一端带标记的单链; 经过凝胶分离, 提取即可进一步作序列分析。

这种序列分析方法包含下列几种反应:

1. 强 G/弱 A 断裂

DNA 链上的嘌呤碱以硫酸二甲酯处理, 可以在 G 的 N7 和 A 的 N3 位置上甲基化。甲基化嘌呤的糖苷键不稳定, 在中性 pH 下加热即很容易脱去嘌呤留下游离的糖。再用 0.1 M 的碱处理, 此糖即可与相邻的磷酸根脱开。将所形成的末端标记的断片在聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 放射自显影分离谱中出现明暗不等的带, 由于 G 甲基化反应的速度 5 倍于 A, 分离谱中的暗带即相当于 DNA 上在 G 点的断裂。

虽然这种强 G/弱 A 反应的图谱已含有有序列分析所需的一半信息量, 但有时也会产生一些疑问, 因为有时很难评定分离带的暗度, 为准确测定这两种嘌呤的位置, 将分离谱与另一条 A 断裂加强的分离谱相互对比作出判断是可取的。

2. A 加强的断裂

利用甲基化腺苷的糖苷键不如甲基化鸟苷的糖苷键稳定的特点, 在较温和的反应条件下用稀酸处理甲基化的 DNA 键, 可优先从链上释出 A, 使链的断裂点发生在 A 的位置上。这样获得的分离谱, 暗带就相当于在 A 点的断裂。

3. C 和 T 的断裂

嘧啶的特异试剂是胍, 胍与嘧啶反应形成核糖酰尿素, 再进一步与胍反应成脒。标记 DNA 分子先在 20°C 用 15—18 M 胍的水溶液处理, 再用 0.5 M 氮杂环己胺处理置换掉糖与胍的反应产物, 同时催化 β 消去反应使 DNA 链断开。最后在分离谱中出现的 C 和 T 带暗度相似。

(下转封三)

(上接第 48 页)

4. C 断裂

胍化反应时加 2M NaCl, 优先抑制 T 与胍的反应, 经氮杂环己胺处理的断裂产物相当于断裂发生在 C 的位置。

这种序列分析法的优点是: 化学反应容易控制, 通过反应条件的合理选择, 每次只优先破坏一种碱基, 并产生全序列上标记物质的均匀分布。可以在凝胶上显示出所有碱基出现的位置, 通过强 G/弱 A、强 A、C 和 T, 以及 C 带分离谱的平行对比, 可直接读出 DNA 上的序列。

此法对双链和单链 DNA 同样适用, 仅在双链 DNA 的甲基化反应中因受空间关系的阻碍有序列特异性。表现为 GGA 序列的中间 G 受抑制, AAA 序列的中间 A 有加强效应, 但不干扰最终的分析结果。

目前此法的分辨能力受凝胶电泳分辨力的限制, 在 40 公分长的凝胶上可以无误的测出从标记端开始约 100 个碱基的序列, 如果能和其它资料相对照, 例如氨基酸序列, 则或许还可以测出更长一些的 DNA 序列。

一种检验金属致癌能力的方法

最近在一次国际生物无机化学协会上, 有人介绍了一种检验金属盐致癌能力的测试体系。利用离体复制 DNA 的合成体系, 在试管内把不同金属盐和合成 DNA 所需的酶、起始物、核苷酸亚基以及一段作为模板的合成 DNA 混合在一起, 使进行 DNA 复制。试验结果表明凡能引起突变或癌变的金属, 均可降低 DNA 复制的准确性。

如果在混合物中加上锰(Mn), 复制产生的错误 50 倍于只加镁(Mg)。并发现银、铍、镉、钴、铬、镍和铅都能降低 DNA 复制的准确性, 其它不被怀疑能引起突变或癌变的金属则没有这种作用。

此法的介绍者认为, 动物中 DNA 复制不准确时, 可产生有缺陷的酶, 使突变细胞转变为癌细胞。

核蛋白体的中子散射研究

制造蛋白质的细胞器——核蛋白体含有 58 个大分子。这些大分子的空间排列已经用中子束照射的方法搞清楚。

用电镜观察大肠杆菌中的核蛋白体, 只看到一些小的不规则的颗粒。如用 X-射线衍射法研究这些颗粒(亚单位), 颗粒又太大, 这样有人就用中子散射进行研究, 得到了很有用的资料。目前已知核蛋白体它的

大的亚单位含有 34 个蛋白分子(分子量从 9,000 到 23,500) 和二 RNA 分子(分子量分别为 1,100,000 及 36,000); 小的亚单位含有 21 个蛋白分子(分子量从 10,700 到 65,000), 和一个 RNA 分子(分子量为 560,000)。目前正在进行小亚单位的蛋白质空间排列的中子散射研究。

从人的成纤维细胞 WI₃₈ 研究细胞从 G₀—G₁ 的过渡

——用激光流动微荧光法

用快速激光流动微荧光计研究未经固定的人类二倍体成纤维细胞 WI₃₈ 的单个细胞荧光强度。细胞, 用无 Mg-Ca 离子的生理溶液悬浮、并用 EB 染色。用血清刺激细胞引起增殖时, 可以看到细胞的荧光强度增高(与休止细胞比较)。这种情况可以是在受刺激后 30

分钟内测出, 并且是在 DNA 开始合成的若干小时之前。也就是说 DNA 含量相同。但对 EB 的反应不一样, 说明从 G₀—G₁ 似乎有一个量子跃迁的过渡阶段。启示了在 WI₃₈ 细胞中从休止的 G₀ 到增殖的 G₁ 存在着明显的二种截然不同的物理化学状态。