

证结果的稳定性。

张双喜、彭善云参加技术工作，谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Lofstrom, A. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 415, 1976.
- [2] Bittiger, H. et al.: *Toxicology*, **8**, 63, 1977.
- [3] Krinke, G. et al.: *Experientia*, **34**, 1077, 1978.

- [4] Partanen, M. et al.: *Histochem. J.*, **12**, 49, 1980.
- [5] 董新文等:《生理学报》, **33**(1), 24, 1981.
- [6] de la Torre J. C. et al.: *Histochemistry*, **49**, 81, 1976.
- [7] 张世宾:《测量误差及数据处理》, p.128—143, 科学出版社, 1979.
- [8] Schipper, J. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **28**, 124, 1980.
- [9] 华仲慰:《军事医学科学院院刊》, **2**, 175, 1981.

[本文于1983年9月19日收到]

末端终止法测定非特异性降解的 DNA 片段的顺序

琦 祖 和

(中国医学科学院基础研究所生化室)

用末端终止法测定 DNA 顺序的方法之一是用限制性内切酶将被测 DNA 降解^[1,2],再与噬菌体 M₁₃DNA 重组、克隆。提取单链 DNA 做为模板,进行顺序测定。寻找一些非特异性的降解工具取代内切酶,有一定的经济价值,而且还可以扩大方法的应用范围。尤其在多酶切点的载体 M₁₃mp 系列出现后,更为 DNA 重组提供了方便。本文用酶法及超声波法切剪,得到了适合在 M₁₃mp₈ 载体中以平齐末端重组的片段。

一、材料与方 法

1. 材料 小牛胸腺 DNA 及质粒 PJDB Clone 71 DNA 均按常规方法纯化。ddNTP(双脱氧核苷三磷酸)为 P-L Bio-Chemicals 公司产品,酶制剂及其它试剂为 BRL 公司产品,细菌用培养基为 Difco 出品,α³²P-dATP 比活度 400 Ci/m mole 为 Amersham 出品。所有酶的反应条件均按厂家说明书。

2. 非特异性降解方法

(1) 酶法 DNase I 与 S₁ 核酸酶联合降解,每 μg DNA 用 0.5 ng DNase I(总体积 10 μl)在 37°C 保温 10 分钟短暂降解后,经酚提取,乙醇沉淀后,再用 40—100U 的 S₁ 核酸酶断链。停止反应后,取一部份进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电

泳,鉴定酶切情况,另一部份用 DNA 聚合酶 I 修整并标记末端,通过 Sepharose 4 B 柱层析分段收集用于克隆。

(2) 超声波剪切法 用 5mm 小头,功率 100 W 超声发生器对 200 μl 反应液(含 5—10 μg DNA)切剪 3—6 秒钟,乙醇沉淀。电泳鉴定并用 DNA 聚合酶 I 修整并标记末端,通过 Sepharose 4 B 柱层析分段收集用于克隆。

3. 载体 M₁₃mp₈DNA 的制备 用 CsCl-EB 超离心法纯化复制形双链 DNA。经 Sma I 消化制取线形载体并稀释到 10 ng/ml 备用。

4. 重组 将 50 μl 反应液(含 5 μg DNA),线形 M₁₃mp₈ 50 ng, ATP 1 mM, 10 倍连接缓冲液 5 μl, T₄ DNA 连接酶(1:10) 5 μl, 在 16°C 保温 24 小时。对照管分别不加 DNA 及连接酶。

5. 转染 宿主 *E. coli* K-12 JM103 经 200 mM CaCl₂ 处理。每 50 ml (OD₆₆₀ = 0.6—0.7) 的菌体悬浮于 3 ml 80 mM CaCl₂ 溶液中,取 0.3 ml 用于转染。转染后的菌液中加入 IpTG (24 mg/ml) 20 μl, x-Gal (20 mg/ml 二甲基甲酰胺溶液) 30 μl, 0.6% 琼脂 3 ml, 自发生长的宿主菌液 0.2 ml, 平皿培养 37°C 过夜。

6. 制备模板 取无色透明菌落于 5 ml 2YT 培养基中扩增,每 0.8 ml 上清液加 0.2 ml 20% PEG

($M_w = 6000$) 1.5 M NaCl 沉淀噬菌体, 经酚提取, 乙醇沉淀后, 溶于 50 μ l 水即为待测 DNA。

7. 测序方法 按 Sanger^[3] 1977 年法。

8. 校正非特异降解法的有效性 按 Sanger 1980^[4] 法, 在末端修整的片段上, 加上 EcoRI 接头, 再与 M_{13} mp₂ 载体 DNA 重组, 转染与测序方法同上。

二、结 果

1. S_1 核酸酶可以把 DNase I 造成缺口的 DNA 链, 切成长短不一的片段, 此小片段的数量随 S_1 酶量而增加 (图 1 见封 3)。以每微克 DNA 用 80—100 U 的 S_1 核酸酶所得到的片段较适用于克隆。

2. 用超声波切剪, 则以 5 秒钟超声 3 次所得到的片段较适宜于克隆 (图 2, 见封 3)。

3. 经过克隆得到的无色菌落最多时有 30—50 个, 约占蓝色菌落的 20%。对照平皿中, 由于无 DNA 存在, 只出现 1—2 个白色菌落, 但在个别平皿中, 出现率达 3—5%。

4. PJOB Clone 71 DNA 经降解克隆测序表明: 在 M_{13} mp₈ Sma I 位点插入了外源 DNA (图 3, 见封 3)。I、II、III 分别为插入片的顺序, 箭头为插入位点 -CCCC.....-GGG-, 中间为插入片段。I 因片段较长 -GGG- 切点未测到, 他们的顺序分别为: (IV、V、顺序的图未列入):

1-CCCCATGTTCTTCAGCACCAATCGCCAGCTGCA
CGGGAACCGGGTTCGCGCCAGACGGGTTTGTATCT
GGTTAACAACCTTTCAGGAAGTTCGCACCTAGCGGTC
ATTTTGTTAACGACGGATTGCGGTTTCATTAATTGTCT
GGGCTATTAAGTC-

2-CCCCTTATTGTCCTGGTTATTCCCCGGTTGTAA
AAATCTCTCCTAAACTTAACGGTACGGCTACACACT
TTCGGGGATGAAATGTTCCGCGCTGGTACTTTTTGTT
TGCTACIGGATTGGCGGTTGTGAGATTATTGTTGTG
GGAATT-

3-CCCCTTCAATTACCGGTGTGTCGTCTGTATTCA
GATCATGTCCAACAAATGCAAATGCTAACGTTTGT
ATTTCTTATAATTGTCAGGAACCTGGAAAAGGGAAT
T-

4-CCCCATGAGATTTCTCATATTTAGCATACGTAA
GGCTGTTGTTAAGATTCAATCATCGGCCGGTCTGA
ATTTCTTTGCTGTAGAAAAATAACGCAACTTGGAA
AACAGAGGAAATTAACAATTGGAAAAGAGAAAAA
TTATGGGGAATT-

5-CCCCTATTACAAAACCTATGGTAACTCTTTA
GGCATTCCTTCGAACAAGATGCAAGAAAAGACAAA
TGACAGCCCTTCTACGAGTGATTTAGCCTGGTCTG
ATGGGAATT-

5. 非特异性降解片段加入 EcoRI 接头后, 克隆入 M_{13} mp₂ EcoRI 位点, 从测得的几个片段顺序 (图 4, 见封 3) 说明非特异降解可代替内切酶降解进行顺序测定。

三、讨 论

非特异法可将 DNA 随机切断, 选择一定条件就可获得适合于克隆的片段, 一般以 300 bp 左右为最合适, 这样即可节约内切酶, 又有利于寻找接头, 适宜于在一般的实验室条件下进行, 是值得推荐的一个方法, 也是继 M_{13} mp₂ 以后, 多切点 M_{13} 载体的应用和发展。但平齐接头所用的 T₄ DNA 连接酶的量要比粘性末端连接时大 10 倍左右, 为此必须确保酶的质量。

DNase I 和 S_1 核酸酶联合降解是一个比较理想的方法, 若单用 DNase I 降解, 稍有过量, 则切下的片段太小, 若单用 S_1 核酸酶降解, 经缺口翻译法标记 DNA 进行鉴定, 说明降解结果不够理想。

参 考 文 献

- [1] F. Sanger et al.: *J. Mol. Biol.*, **143**, 161, 1980.
- [2] 张继仁、程振起: 《遗传工程》2. 7. 1982.
- [3] F. Sanger et al.: *PNAS*, **74**, 5463, 1982.

[本文于 1983 年 8 月 19 日收到]

(上接第 33 页)

[21] Wilson, H. R.: *Vision Res.*, **18**, 493, 1978.

[22] Marr, D. Poggio, T. et al.: *J. Opt. Soc. Am.*, **70**,

868, 1980.

[23] Watson, A. B.: *Vision Res.*, **22**, 17, 1982.

[本文于 1983 年 6 月 13 日收到]