

## 末端终止法测定 DNA 酶解片段的核苷酸排列顺序

琦祖和 袁建刚 熊伟军 蔡良璇

(中国医学科学院基础医学研究所生化室,北京)

1977年 Sanger 等<sup>[1]</sup> 建立末端终止法测定 DNA 分子中核苷酸的排列顺序,后来又吸取了 DNA 重组技术,利用  $M_{13}$  载体<sup>[2,3]</sup> 制取被测 DNA 片段的单链模板,以测定双链 DNA,使方法的应用范围更加开阔。至今这个方法已广泛用于 DNA 一级结构的研究,并公认为是快速简便、准确的测序方法。所谓的“鸟枪战术”,即将被测 DNA 用适当的限制性内切酶降解,与  $M_{13}$  载体重组,经过克隆,自无色的菌落中筛选出被测 DNA 的单链模板,再测定顺序。与化学法<sup>[4]</sup> 比较,它具有同位素用量小,接触时间短的优点。国内也已开始将此法用于研究 DNA 的结构。我们建立并应用末端终止法测定了乙型肝炎病毒 DNA adr 亚型 (HBV-DNA adr) 酶解片的顺序。

### 一、材料与方 法

被测 DNA 自 PHBVNC<sub>1</sub>\* 质粒<sup>[5]</sup> 提取,工具酶均为 New England Biolabs 产品。dATP dGTP dCTP dTTP 为 Sigma 产品,相应的双脱氧核苷三磷酸 ddATP ddGTP ddCTP ddTTP 为 P-L-Biochemicals 产品。 $\alpha^{32}P$  dATP 比活度 >3000 ci/mmol 为 Amersham 产品。IPTG (Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside, 异丙基硫代  $\beta$ -D-半乳糖苷) 及 x-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷) 为 BRL 产品。胰蛋白胨、酵母提取物及琼脂为 Difco 产品。所有酶反应条件均按厂家说明。

**1. 被测 DNA 的提取** PHBVNC<sub>1</sub> 质粒\* 用缓和溶菌法自 *E. coli* 中提出,经 CsCl-EB

超离心法纯化,50000 rpm, 15°C, 24 小时。如分离不好,可将下带取出,加入计算量的 CsCl,使终浓度为 60% (w/w),加入 1/10 体积的 EB (10mg/ml)。放在离心管的底部 (约 0.25—3 ml),上层复以 9ml 42% (w/w) 的 CsCl 溶液,于 65000 rpm 离心 5 小时 15 (Beckman L8 Ti80 转头),得两条分离清晰的区带。按常规处理,可得相当纯净的 DNA。

**2. 被测 DNA 酶解片段的制备** 质粒 PHBVNC<sub>1</sub>-DNA 经 Bam HI 降解,1% agarose 电泳分离,DE81 滤纸片法回收 3.2kb 的 HBV-DNA 片段,再用 Sau3A1 降解。产物用于随机克隆。

**3. 酶解片段与载体的重组** 载体  $M_{13}$ mp8 DNA 经 Bam HI 切开与上述酶解片段重组,反应体系含载体 DNA 20ng,被测 DNA 酶解片段约 0.1  $\mu$ g, T<sub>4</sub> DNA 连接酶 400—800 单位, ATP 1mM, Tris-HCl 50mM pH7.5, MgCl<sub>2</sub> 10mM, DTT (二硫苏糖醇) 1mM, 总体积 30  $\mu$ l, 于 16°C 保温 16—20 小时。

**4. 重组 DNA 转染** 宿主 *E. coli* K<sub>12</sub> JM 101 经 CaCl<sub>2</sub> 处理,每 50ml 培养液的菌体悬浮于 3ml 80mM CaCl<sub>2</sub> 中,取 0.3ml 的菌液与 2—10  $\mu$ l 的连结液于 0°C,共同保温 40 分钟;再 42°C 保温 2 分钟,然后依次加入 IPTG (24mg/ml) 20  $\mu$ l, x-Gal (20mg/ml) 50  $\mu$ l (溶于二甲基甲酰胺中), 0.6% YT 琼脂 3ml (YT: 0.8% 胰蛋白胨 0.5% 酵母提取物, 0.5% NaCl, 用于配制琼脂凝胶)。倒入 1.5% YT 琼脂平板

\* PHBV NC<sub>1</sub> 质粒为 HBV DNA 与质粒 PAT 153 的重组体。

上, 37℃ 保温过夜。

**5. 制备 DNA 单链模板** 自转染后的培养皿上取下无色透明的菌落, 于 5ml 二倍浓度的 YT 溶液中扩增。每 0.8ml 上清液, 加 0.2ml 20% 聚乙二醇分子量 6000、1.5M NaCl, 沉淀 DNA。经酚提取, 乙醇沉淀, 溶于 50ml 水, 做成待测模板。

**6. DNA 顺序测定** 按 Sanger<sup>[1]</sup> 法。用国产 x-光胶片自显影 20 小时左右, 加增感屏, 其余按常规。

**7. DNA 鉴定及分离** 用 2% 或 1% 琼脂糖凝胶电泳, 40mM Tris, 10mM NaAc, 1mM EDTA, pH8.3 缓冲液, 板长 20cm, 电压 80V, 2--3 小时。

## 二、结 果

1. 被测 DNA 酶解片段与载体重组后转染宿主得到无色菌落 (为重组后 DNA 转染后的菌落) 和蓝色菌落 (为载体 M<sub>13</sub>mp<sub>8</sub> 转染后的菌落), 这两种菌落数目的比例代表转染的效率。

2. 自无色菌落中提取的单链 DNA, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 结果如图 1 (见封 2)。泳动度的差别, 说明插入片段的大小不同; 10, 11 为 M<sub>13</sub>mp<sub>8</sub> 单链 DNA 对照。

3. 图 2 (见封 2) 为提取的模板经测序反应后自显影图。每个插入片段都找到正反二方向的克隆, 测得顺序为互补链两端的顺序; 如片

```
5' GATCCATACTGCGAACTCCTAGCAGCTTGTTTTGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCGAAACTTATCGG
CTAGGTATGACGCCTTGAGGATCGTCGAACAAAACGAGCGTCGG CCAGACCT CGC TTTGAATAGCC
AACCG ACAA C TCTGTGTCTCTCTCTCGGAAAGA CACCTCCTTTCCATGGCTGCTAGGGATGTGC
TTGGCTGTTGAGACAACAGGAGAGAGAGCCCTTCTGTGGATTAAAGGTACCGACGATCCCTACACG
TGCCAACTGGATCCTGCGCCGGA CGTCCTTTGTCTACGTCCCCTCGGCGCTGAA' CCCGCGGA C GA C
ACGGTTGATTTAGGACCGCGCCTGCAGGAAACAGATGCAGGGCAGCCCGACTTAGGGCGCCTGCTG
CCGT CTCGGGGC CGTTTGGGGCTCT'ADCGTCCCCTTCTTCTTCTGCCGT'TCCGGCCGA CC ACGGGG
GGCAGAGCCCCGGCAAACCCCGAGATGGCAGGGGAAGAAGAAGACGGCAAGGCCGGCTGGTGCCCC
CGCACCTCTCTTTACG C GGTCTCCCCGTCTGTG3'
```

```
5' GATCAACAGTTGGA CCCTGCGTTCGGAGCCAACCTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCCCAACA
GGAGTGGTCAACCTGGGACGCAAGCCTCGGTTGAGTTTGT'AGGACTAACCTGAAGT'TGGGGTTGT
AGGATCAATGGCCAGAGGCAAATCAGGTAGGAGTGGGAGCATTCCGGCCAGGGTTCACCCACCACA
TCC TAGTTA CCGGTCT'CCGTTTAGTCCATCCTCA CCCTCGT'AAGCCCCGTCCCAACTGGGGTGGTGT
CGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATATTGACAACAGTGCCAGCAGCACCT CCT
GCCGCCAGAAAACCCACCTCGGGAGTCCGAGTCCCCTATAACTGTTGTACGGTTCGTGTTGGAGGA
CCTG CCTGGA CC AATCGGCAGTCAGGAAGACAGCCT'ACTCCCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGTC
GGACGGACCTGGTTAGCCGTCAGTCCCTCGGTCCGATGAGGGTAGAGAGGTGGAGATTCTCTGTGAG
ATCCTCAGGCCATGCAGT'GGAAGTCCACAACATTCCACCAAGCTCTGCTAGATC3'
```

图 3 测得的片断的核苷酸排列顺序  
片段连接处参考 HBV-DNA (Adr) 酶切图谱<sup>[6,7]</sup>

段不长可以找到中间重复区域; 如片段较长, 中间部分由另一酶切片段的测定补充, 测得的顺序见图 3

## 三、讨 论

以上面测得的顺序为代表, 说明随机克隆

法可以得到正反二方向的克隆,测得数据可以互相补充。一般在110—150个顺序以下可以自图谱上准确读出,当分离效果好时,也可以读到200个顺序左右,所以300—400bp长的片段可以顺利的解决;再长的片段则需要另一酶切片测定结果补充。我们曾试用连续加样法,未能得到预期的效果。也曾试用<sup>35</sup>SdATP标记及梯度胶分离<sup>[8]</sup>,大大提高了测序效率,结果在另文介绍。

### 参 考 文 献

[1] Sanger, F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74,

5463, 1977.

[2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 143, 161 1980.

[3] Messing, J. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 9, 309 1980.

[4] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 560, 1977.

[5] 蔡良琬等:《中国医学科学院学报》,6(4),251,1984.

[6] 蔡良琬等:待发表。

[7] Ono, Y. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11, 1747, 1983.

[8] Biggin, M. D., Gihson, T. J. and Hong, G. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 3963, 1983.

[本文于1984年10月2日收到]

## 测定 RNA 序列的化学裂解直读法

肖 甯\* 程振起 赵 翥 韩恒湘 王鄂生

(中国科学院生物物理所,北京)

1979年 Peattie<sup>[1]</sup>在 Maxam 和 Gilbert<sup>[2]</sup>的 DNA 化学裂解序列测定直读法的基础上,建立了 RNA 的化学裂解直读法。该法利用几种不同化学试剂,在<sup>32</sup>P 末端标记的 RNA 链上进行碱基特异性的、限制性的修饰。经苯胺作用后, RNA 分子在修饰部位断裂。凝胶电泳分离和放射自显影后,可以从 G. A>G、C>U 和 U 四组区带上直接读出 RNA 的序列。该法快速、微量、不需特殊酶试剂。不受被测 RNA 二级结构影响,因而比较准确,现已逐渐成为测定 RNA 序列的一种重要方法。我们采用 RNA 序列的化学直读法测定了芹菜叶 5S rRNA 的部分序列,所得结果与双向直读法一致。现将我们的测定结果与使用此法时摸索所得到的条件和经验介绍如下。

### 一、材料和方法

#### (一) 材料

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 比强 >5000 居里/毫克分子(英国 Amersham; 中国科学院原子能研究所); T<sub>4</sub> 多核苷酸激酶, T<sub>4</sub> RNA 连接酶(中国科学

院生物物理研究所生化厂); 3'-CMP(上海东风试剂厂); ATP 钠盐、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟基胺基甲烷(Tris)(美国 Sigma); Heps(瑞士, Fluka); 二巯基苏糖醇(DTT), 无水胍(西德, Serva); 硫酸二甲脂(英国, Aldrich); 焦碳酸二乙脂(西德, Merck); 硼氢化钠(英国, Aldrich); 二甲砷酸钠(法国进口分装); 苯胺(北京化工厂, 用前重蒸); 二甲基二氯硅烷(上海试剂一厂); X光乳胶片(上海感光材料厂); 其他常用试剂均为北京化工厂分析纯产品。

#### (二) 方法

##### 1. RNA 的分离纯化及末端标记

1) 芹菜叶 5SrRNA 提取及纯化按文献[3]的方法。

2) 5'-<sup>32</sup>pCp 的制备 在经硅烷处理过的 Eppendorf 离心管中, 加入 200  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 冷冻真空干燥。然后加入 10  $\mu$ l 3'-CMP (100n mole/ml), 20  $\mu$ l 激酶缓冲液 (100m M Tris-

\* 武汉大学生物系。

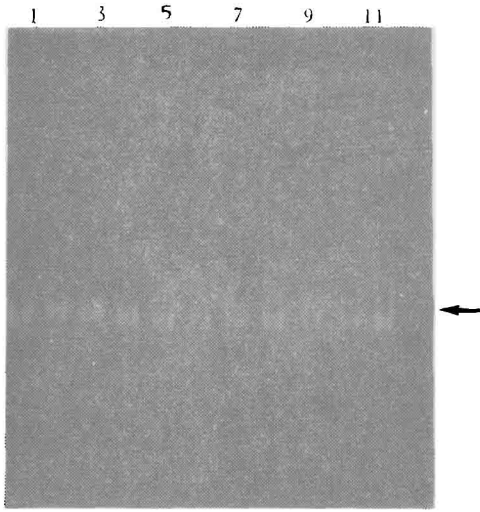


图 1 自无色菌落中提取的单链 DNA 电泳图  
 2% 琼脂糖凝胶电泳；→ 示二甲苯蓝 (MG) 染料位置；  
 10, 11 为对照。

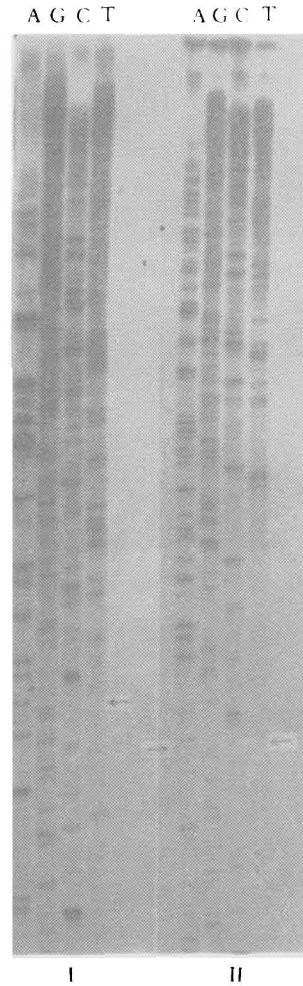


图 2 测序自显影图谱  
 → 示插入位点，—GATC 上方为插入片段顺序，I, II 为同一片段不同方向克隆的结果

许凯黎等：“不同源性甲胎蛋白分子变异体的研究”一文的图 3



图 3 大鼠不同源性血清 AFP 变异体之 ConA 亲和双相免疫电泳图谱  
 a. 孕鼠 b. 四氯化碳中毒 c. 移植性肝癌