

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³⁵SdATP标记及梯度胶分离^[8],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^[1]在 Maxam 和 Gilbert^[2]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³²P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

[γ -³²P]ATP,比强>5000居里/毫克分子(英国 Amersham;中国科学院原子能研究所);T₄多核苷酸激酶, T₄ 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);Hepes(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'-³²pCp 的制备 在经硅烷处理过的 Eppendorf 离心管中,加入 200 μ Ci [γ -³²P]ATP, 冷冻真空干燥。然后加入 10 μ l 3'-CMP (100n mole/ml), 20 μ l 激酶缓冲液 (100m M Tris-

* 武汉大学生物系。

HCl pH7.5, 20mM MgCl₂, 20mM PTT) 和 10μl T₄ 多核苷酸激酶 (0.5U/μl)。37℃ 保温 30 分钟, 100℃ 加热 30 秒终止反应, 冷冻真空干燥。

3) 5S rRNA 的 3' 末端标记及纯化 直接向上述制备的 5'-³²P Cp 混合物中加入纯化的 5SrRNA 30μl (10μg), 1μl ATP (10μmole/ml), 5μl 连接酶缓冲液 (0.5M Hepes pH 7.5, 0.1M MgCl₂, 33mM DTT), 5μl 二甲亚砜, 8μl T₄ RNA 连接酶 (0.5U/μl)。4℃ 反应 24 小时。反应液加入 20μl 上样缓冲液 (50mM Tris-硼酸 pH8.3, 1mM EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯蓝, 10M 尿素), 90℃ 加热 30 秒, 冰浴冷却。点样于 8% 聚丙烯酰胺凝胶板 (40 × 20 × 0.1cm, 600 伏预电泳 2 小时) 上, 600 伏电泳过夜。二甲苯蓝泳至板下缘时取下胶板, 揭去上层玻板。用塑料膜包紧凝胶, 点上含 ³²P 的红墨水, 对 X 光胶片曝光。显影定位后, 切下放射性凝胶区带。胶条以洗脱液 (0.5M 乙酸胺, 1mM EDTA 0.1% SDS) 浸泡 2 小时。吸出洗脱液, 重复操作一次; 合并洗脱液, 加入载体 tRNA 至终浓度为 0.2mg/ml, 加三倍体积无水乙醇, 干冰中放置 30 分钟。1,5000g 离心 10 分钟, 弃上清。沉淀分别以 75% 和无水乙醇各洗一次。真空干燥后溶于适当灭菌双蒸水中, 分装于灭菌的硅烷处理过的 Eppendorf 离心管内。每管放射计数 10—20 万次/分。冷冻真空干燥, 置干燥器中低温保存备用。

2. RNA 的化学修饰及裂解

1) G 反应 取上述装有干燥 ³²P 标记样品的 Eppendorf 管一支, 加入 300μl 50mM 二甲砷酸钠 (pH5.5), 1mM EDTA 溶液混匀, 置冰浴中。加入 0.5μl 硫酸二甲酯, 混匀, 迅速离心, 90℃ 水浴保温 60 秒, 冰浴冷却。立即加入 75μl 1M Tris-醋酸 (pH7.5), 1M 2-巯基乙醇, 1.5M 乙酸钠溶液终止反应。加入 900μl 冷无水乙醇, 混匀, 干冰冷却 10 分钟, 台式离心机离心 4 分钟, 沉淀以 200μl 0.3M 乙酸钠 (pH5.5) 溶解。加入 600μl 冷乙醇, 混匀。干冰冷却 10 分钟, 离心 4 分钟。沉淀以 600μl 冷乙醇洗一次, 真空干燥,

干燥样品溶于 10μl 1M Tris-HCl (pH8.2), 置冰浴上, 加入 10μl 用灭菌双蒸水临时配制的 0.2M 硼氢化钠, 混匀, 迅速离心。0℃ 避光反应 30 分钟, 加入 200μl 0.5M 乙酸钠 (pH4.5, 每毫升含 0.025mg tRNA) 终止反应。加入 600μl 冷乙醇, 混匀。干冰冷却 10 分钟。离心 4 分钟, 沉淀用 600μl 冷乙醇洗一次, 真空干燥。

2) A > G 反应 取装有干燥 ³²P 标记样品的 Eppendorf 离心管一支, 加入 200μl 50mM 乙酸钠 (pH4.5), 1mM EDTA 溶液混匀。迅速离心, 90℃ 保温 7 分钟。冰浴冷却。加入 50μl 1.5M 乙酸钠 (pH5.5) 和 750μl 冷乙醇, 混匀。干冰冷却 10 分钟, 离心 4 分钟, 沉淀溶于 200μl 0.3M 乙酸钠中, 加入 600μl 冷乙醇, 混匀。干冰冷却 10 分钟, 离心 4 分钟, 沉淀用 600μl 冷乙醇洗一次, 真空干燥。

3) C > U 反应 取装有干燥 ³²P 标记样品 Eppendorf 离心管一支, 置冰浴上。加入 10μl 已冷至 0℃ 的 3M NaCl/无水胍, 混匀, 迅速离心; -8—-6℃ 冰盐浴反应 15 分钟; 加入干冰中预冷的 80% 乙醇 1ml, 混匀。干冰中冷却 10 分钟, 离心 4 分钟, 沉淀溶于 200μl 0.3M 乙酸钠中, 加入 600μl 冷乙醇, 混匀。干冰冷却 10 分钟, 离心 4 分钟, 沉淀以 600μl 冷乙醇洗一次, 真空干燥。

4) 苯胺裂解反应及序列胶的凝胶电泳 在上述装有经不同化学反应修饰过的 RNA 样品的四支离心管中, 各加入 20μl 1M 苯胺水溶液 (冰乙酸调至 pH 4.5), 使样品溶解。置 60℃ 水浴避光反应 20 分钟。干冰冻结终止反应, 冷冻真空干燥。加入 20μl 灭菌双蒸水, 冷冻真空干燥。重复后操作一次。抽干的样品溶于 3—6μl 上样缓冲液 (50mM Tris-硼酸 pH8.3, 1mM EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯蓝, 7M 尿素)。90℃ 加热 30 秒, 冰浴迅速冷却。点样在经 2000 伏预电泳 4 小时以上, 含 7M 尿素的 12% 聚丙烯酰胺凝胶板 (60 × 20 × 0.05cm) 上, 3000 伏电泳 3 小时。电泳后揭去经二甲基二氯硅烷处理的玻板, 包上聚乙烯薄

膜,对 X 光胶片曝光 1—2 天。

二、结果与讨论

用化学法测定的芹菜叶 5S rRNA 的部分序列如图 1 (见封 3) 所示。从图上可看到 G、A、U 三种碱基反应的特异性较好。其中又以 G 的特异性最好。而 C 的特异性稍差。C 出现的区带实际上是 C+U。但是,在 G、A、U 三种碱基都能确定的情况下,C 也是不难读出的。C 的特异性不好,可能与胂的纯度有关。在整个反应过程中,严格控制反应时间和温度是实验的关键。反应时间过长,会使反应的特异性下降,副反应增加。时间太短,则大部分样品仍是完整分子。

我们通过比较 C 反应的不同反应温度和时间,发现在一定程度上降低反应温度 (—8——6℃),并缩短反应时间(15 分钟)可提高 C 反应的特异性。

因为化学法是由小分子试剂进行的有机反应,空间位阻较小,且反应是在高温或强碱性条件下进行,因此 RNA 二级结构对反应几乎没有干扰,这是化学法的一个显著优点。从图 1 看出,没有出现区带缺失或深度大的区带,这也说明二级结构对反应没有影响。在序列胶电泳时,我们采用 3000 伏高压,使凝胶发热,这样有利于 RNA 分子变性,能防止进行电泳时因二级结构而引起的区带压缩现象。

化学法的另一优点是不需特殊酶试剂。化学试剂比酶试剂更易得到和保存,用量少,价格又便宜,在目前国内的条件下,化学法似乎更可

取。化学法实验周期较短,在我们的实验室条件下,一个熟练工作人员在一天内就可以完成所有的化学反应和电泳。X 光胶片曝光过夜,次日便可得到放射自显影图谱。因此它无疑是一种快速的序列测定方法。

化学法的缺点是操作较繁杂。尤其是 G 反应,有十多个步骤,其中包括反复的乙醇沉淀、离心和洗涤。稍不留心就会使微量的放射性样品丢失。在反应完成后的反复乙醇沉淀和洗涤过程中,必须把每次的上清液除尽,否则会因残余的化学试剂而影响以后的反应。此法所用部分试剂有毒,必须在通风橱中小心操作,这也是它的不足之处。

此外,化学法对于 3' 末端标记的 RNA 分子测定效果较好,而对 5' 末端标记的 RNA 分子只能测定其 G 与 A 两种碱基, C 与 U 则效果很差,因而使该法的应用受到一定局限。化学法一般多用于较小的 RNA 分子,如 5.8S、5S、4.5S rRNA 等的序列分析,有时一块胶板便可读出除 5' 末端核苷酸以外的整个分子的序列。对于大分子 RNA 则需先切割成较小片段后再用此法测定。

总之,化学法测定 RNA 序列简单易行,且较准确,一般实验室均可采用。

参 考 文 献

- [1] Peattie, D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 1760, 1979.
- [2] Maxam, A. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 560, 1977.
- [3] 赵果等:《植物学报》, 24(1), 54, 1982 年。

[本文于 1984 年 8 月 18 日收到]

· 科技消息 ·

将外来基因转移到小鼠多功能造血干细胞

最近美国哈佛医学院和麻省理工学院的研究人员,以反向病毒 (retrovirus) 为载体,将外来基因成功地移入到小鼠的多功能造血干细胞。他们的实验步骤大致如下:(1) 将细菌新生霉素的抗性基因插入有传染性的反向病毒;(2) 再用上述病毒感染从小鼠身上抽取出来的骨髓细胞;(3) 采用 X 射线照射,破坏小鼠的骨髓细胞,然后再给这种致死性照射过的小鼠静

脉注射上述骨髓细胞。实验结果表明,移植细胞在存活下来的小鼠的骨髓和脾脏中进行了增殖,即造血细胞中已含有移入的细菌基因。

这一实验提供了一个高效、快速地将外来基因移入造血干细胞的方法。可以预期,这将会推动基因治

(下转第 62 页)

邹明发等：“6株抗人IgE重链McAbs杂交瘤细胞株的建立和鉴定”一文的图2

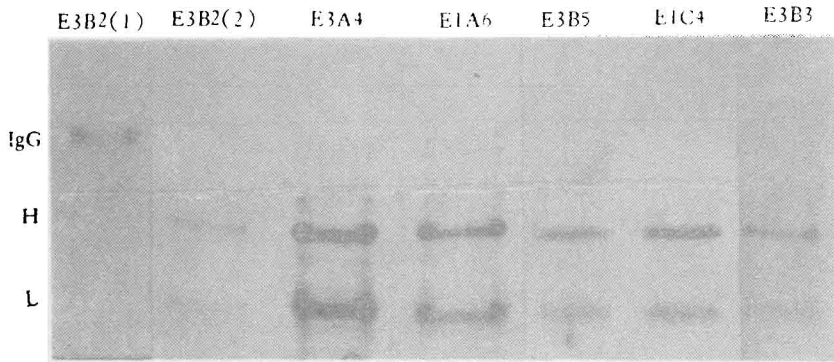


图2 6个抗人IgE McAbs的SDS-PAGE图谱

无血清液浓缩15倍，加入50μl，E3B2(1)：未经2-巯基乙醇还原的SDS-PAGE图谱；E3B2(2)，E3A4，E1A6，E3B5，E1C4和E3B3：经2-巯基乙醇还原后的SDS-PAGE图谱

肖啸等：“测定RNA序列的化学裂解直读法”一文的图1

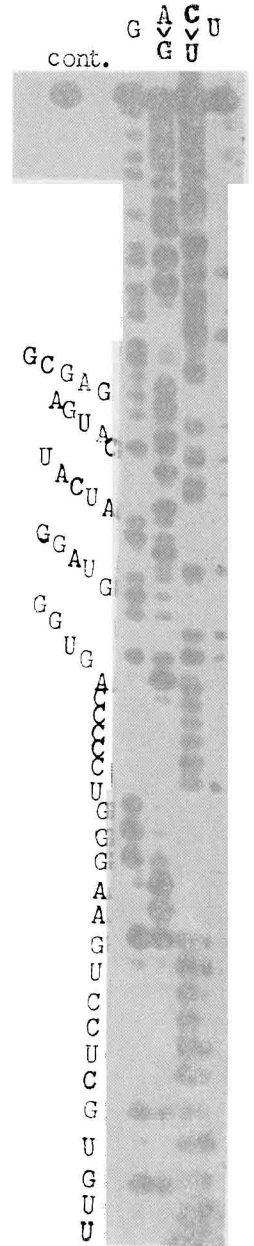


图1 化学裂解直读法测定的芹菜叶5S rRNA部分序列

任惠民等：“超薄板状聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳”一文的图2

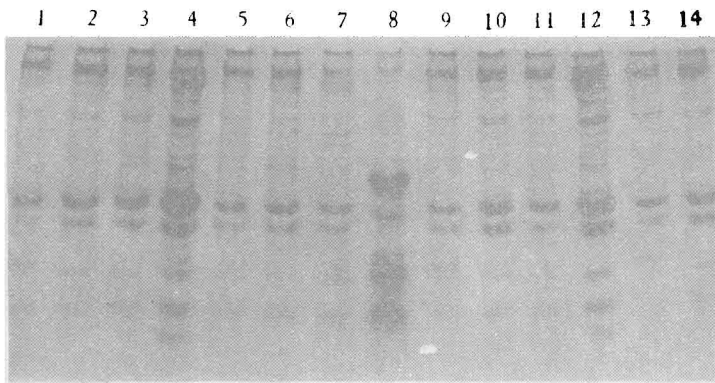


图2 大鼠不同类型单肌纤维肌球蛋白轻链图谱

(1)(9)比目鱼肌；(2)(10)睫肌；(3)(11)腓肠肌(小头)；(4)(5)(12)(13)腓肠肌(大头)；(6)(14)伸趾长肌；(7)颞肌；(8)标准蛋白