问题讨论

DNA 顺序测定中的人工带及其形成假说

齐 义 鹏
（武汉大学病毒学系）

DNA 核苷酸的顺序测定是现代分子生物学的基础工作。Gilbert 和 Sanger 创立的化学法[1]、加减法[2]、双脱氧核苷酸（ddXTP）链终止法[3]是目前进行 DNA 顺序分析的最先进技术。在 DNA 顺序测定中，人工带经常发生，这是影响核苷酸阅读的主要障碍。目前，关于人工带的资料，尚未见报道。本文叙述了人工带的产生和控制，并对某种特殊人工带的形成机制提出了初步解释。

一、人工带的类型及其识别

本文用 Sanger 的 ddXTP 链终止法[3,4]，以 α^{32}PdATP 进行标记测定 DNA 顺序时，在X光胶片上发现的人工带有三类。

1. 遗留人工带：这是常见的，有时大量出现（图 1，2，本文图均见封三）。产生遗留人工带的主要原因是由制胶玻板上残留的放射活性污染所致，或者由于放射自显影爆光时间过长。其特点是谱带微弱，均匀，分布不规则。然而，这类人工带容易识别，除影响X光胶片的清晰美观外，对测定结果无严重影响。

此外，在X光胶片上经常可看到放射性强度依次递减的一簇谱带（图 1，3），这是规则分布的连续核苷酸顺序，不在人工带之列。

2. 低强度人工带：在一个放射性谱带的空间位置，上下两条带紧密靠近，而且下带的放射强度较上带弱，则此下带即为人工带。

根据 Sanger ddXTP 链终止法原理[5]，在合成 DNA 时，每掺入一个核苷酸都面临着两种选择：ddXTP 抑或 dXTP。但 ddXTP 的克分子浓度远高于 dXTP，大部分 DNA 分子都以合成较短核苷酸片段而被 ddXTP 终止，只有极少数 DNA 分子有机会多次以 dXTP 掺入而在较远的位置再被终止。因此，处于凝胶下部的谱带的核苷酸数少于上部的谱带，但其总分子数却大于上部的谱带，这使得下带的放射性强度一般总是高于上带，即便是邻近的只相差一个核苷酸的两个带之间也是如此。所以，下面的弱带，必定是人工带。由于这类人工带的不正常位置和极弱的放射性强度，容易被识别，对正确的阅读影响不大。

3. 酶解人工带：根据 DNA 顺序测定的原理，在X光胶片上，每两个谱带之间仅相差一个核苷酸。因此，在 A，C，G，T 4 行的每个谱带之间的距离是均匀的，基本上是相等的。一个单位空间位置只可能出现一个谱带。图 2 显示在C和T之间的同一单位空间位置上出现了 A，C，T 三个谱带，其中必定有两个谱带是人工带。作者假定，这类人工带是由某种特殊的酶降解核苷酸片段所形成。

尽管这类人工带出现的机率不多，但不易识别，极大地影响测定结果的准确性。

二、人工带的控制

形成人工带的原因不同，控制其产生的方法也不同。控制遗留人工带比较简单。每次实验结束后，需要认真清洗电泳用的玻板，去除残留在玻板上的放射性污染，直到用盖革计数器检查无放射活性。不要立即使用洗净的玻板灌胶，如用 ^{32}P 标记，最好存放 20 天以上，超过其

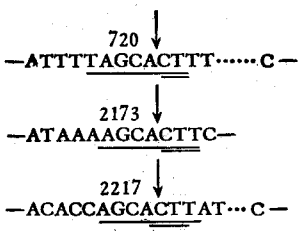
半衰期。再使用便能得到清晰的放射自显影图谱。放射自显影的爆光时间要严格控制，使用7天左右的 α^{32}Pd ATP，需爆光1—3天，用15天左右的，可爆光3—6天。

控制第二，三类人工带是个复杂的问题。经过多次实验，作者发现，在合成 DNA 时所加的4种核苷酸中，如果增高 ddXTP/dXTP 的用量比率，这两类人工带便可消除（图3）。

图3清楚的显示，在C与T的同一空间位置原有三个谱带 A，C，T，由于增加了 ddCTP 和 ddTTP 的用量，谱带C和T分别被消除了。因此，谱带C，T是人工带。在这个空间位置只能有一个谱带"A"。低强人工带可用同样办法被控制。

三、关于人工带形成机制的假说

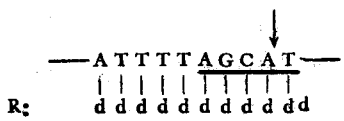
作者在测定酵母线粒体 DNA 顺序时，在3处发现了属于第三类的人工带，如：



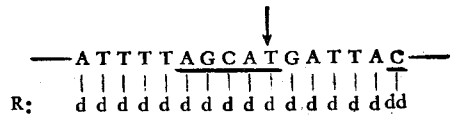
[注：AGCAT：识别顺序；CT：人工带；↓：切割位点]

这类人工带的共同特点是都有 AGCAT 顺序。实验证明，在C与T之间的单位空间位置，只有A是正确的谱带，C，T是人工带。

作者假设，在大肠杆菌 DNA 多聚酶制剂中存在一种杂质酶，它与现在的限制性内切酶一样，有特异的识别与切割顺序。其识别切割顺序是 AGCAT，但它也不同于现有的限制性酶，即：在识别顺序的末端必定是一个双脱氧核糖胸、腺嘧啶核苷酸（ddTMP）或在其远末端有一个双脱氧核糖胞嘧啶核苷酸（dd CMP），如：

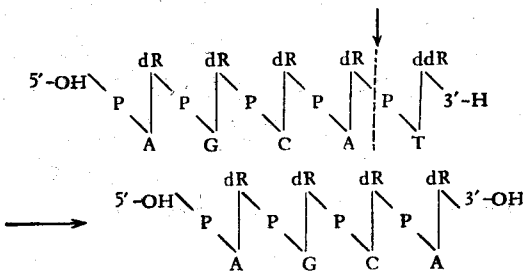


或



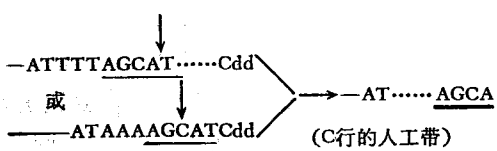
[注：R：核糖]

在顺序分析时，需用4个样品管进行 DNA 合成[4]。其中，T管内合成的 DNA 片段都以 ddTMP 为末端，C管内合成的 DNA 片段都被 ddCMP 终止。当某个片段中出现 AGCAT 顺序时，这种酶即从片段的3′末端在A与T间水解磷酸二酯键。因此，电泳凝胶上，在T行的 AGCAT 带之下，多了一个 AGCA 带。



（T行的人工带）

在 DNA 合成的C管内，当某个片段出现 AGCAT 顺序时，在其邻近或远末端必定会被一个 ddCMP 终止。该酶识别出此顺序并在A与T间水解，因而，在C行的 AGC 带之上，多了一个 AGCA 带。



（C行的人工带）

在 DNA 合成的A，G管内，由于每个片段仅分别被 ddAMP 或 ddGMP 终止，此酶不能识别，故A，G行无人工带。

ddTTP 或 ddCTP 是合成此酶底物的原料，当 ddXTP/dXTP 比值增高时，底物浓度相应增加，对此酶产生底物抑制，这可能是 ddXTP 浓度增高时，人工带被消除的原因。

总之，这类人工带的形成是由于迄今为止尚未发现的一种酶的催化作用，此酶特异的识别带双脱氧核糖胸腺嘧啶核苷酸或胞嘧啶核苷酸的顺序（AGCAT dd 或 AGCAT···Cdd），其

（下转第23页）

例如 Toh-E, A[22] 构建的 pSLe1 就是一个仅 3.2 kb 的去除 pMB 9 之载体。 pSLe 1 是由 pJDB 219 衍生而来，由 pJDB 219 经 HindIII 酶切后，产生的片段自连接而成环状载体。pSLe1 具有很高拷贝数，表型十分稳定(分离率 20%/32 代)，减数分裂呈现 $4^+:0^-$，只能转化入 [Cir^+] 菌株。类似的质粒还有 Dobson 构建的 pYX 质粒[23]，Scott 构建的 TRP-R_1 Circle 质粒[24]等。

影响外源基因在酵母中表达的因素很多，包括启动子加工，终止子加工，外源基因加工，表达产物的分泌等。但载体骨架构建好坏是影响基因表达最初一步，也是最重要的一个因素。以一个理想的载体骨架为基础加上一个高效启动子，再考虑对待表达之外源基因加工等细节问题，就能构建一个较为完善的表达型载体。目前在酵母中表达外源基因方面的工作日益增多，构建的表达型载体也日趋完善，本文仅对载体骨架构建基础及一些载体骨架的构建作一些介绍，以供参考。

参 考 文 献

[1] Struhl, K. et al.: *Nature*, **305**, (29), 391, 1983.
[2] Hitzeman, R. A.: *Science*, **219**, 620, 1983.
[3] Murray, A. W. et al.: *Nature*, 305, 189, 1983.
[4] Scherer & Davis,: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 4651, 1979.
[5] Stinchcomb, D. J. et al.: *Nature*, **282**, 39, 1979.
[6] Clarke, L. and Carbon, J. et al.: *Nature*, **287**, 504, 1980.
[7] Beggs, J. D.: *Nature*, **275**, 104, 1978.
[8] Gerbaud, D. et al.: *Gene*, **5**, 233, 1979.
[9] Botstein, D. and Ronald, W. D.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces*——Metabolism and Gene Expression, C. S. H., 607, 1982.
[10] Hartley & Doneson,: *Nature*, **285**, 5768, 1980.
[11] Broach, J. R.: *Cell*, **21**, 501, 1980.
[12] Broach, J. R.: *Symp. Quant. Biol.*, C. S. H., **47**(2), 1165, 1983.
[13] Broach, J. R.: *Cell*, 29, 227, 1982.
[14] Broach, J. R.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces*——*Life Circle and Inheritence*, C. S. H., 445, 1981.
[15] Jayaram, M. and Broach, J. R.: *Cell*, **34**, 95, 1983.
[16] Grant, A. et al.: *Gene*, **32**, 267, 1984.
[17] Blanc, H. et al.: *MGG*, **176**, 335, 1979.
[18] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, **145**, 1421, 1981.
[19] Beggs, J. D.: *The Molecular Genetics in Yeast, Alfred. Benzon. Symp.*, 16, 1981.
[20] Golf, C. G. et al.: *Gene*, **27**, 35, 1984.
[21] Lusky, M.: *Nature*, **293**, 79, 1981.
[22] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, **141**, 413, 1980.
[23] Dobson, M. J. et al.: *Current Genetics*, **2**, 201, 1980.
[24] Hollaender, A.: *Genetic Engineering of Miocroorganism for Chemicals*, 75, 1982.

[本文于 1985 年 10 月 30 日收到]

(上接第40页)

切割位点在A与T之间。

如果在生物体内存在 2′, 3′-双脱氧核糖或 2-取代 3′脱氧核糖，则 DNA 的复制就不能正常进行。这种酶的存在，可以识别特异的顺序，切去不正常的核苷酸，使 DNA 的合成得以正常的延续下去。 因而，此酶的生理功能是对 DNA 的不正常合成起修复作用。据此分析，它应该是能识别各种顺序的一类修复酶，本文叙述的只是其中的一种。

参 考 文 献

[1] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**(2), 560, 1977.
[2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **94**, 441, 1975.
[3] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** (12), 5463, 1977.
[4] Messing, J. et al.: *Nucl. A cid. Res.*, **9**, 309, 1981.
[5] Sherman, W. et al.: *Methods of DNA and RNA Sequencing*, SBS Educational and Professional Publishing, New York, p. 68, 1983.

[本文于 1985 年 6 月 25 日收到]

(上接第57页)

[7] Mahler, H. R.: *Methods in Enzymology*, **2**, 688, 1955.
[8] Kadlubowski, M. et al.: *British Journal of Haematology*, **37**, 111, 1977.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]

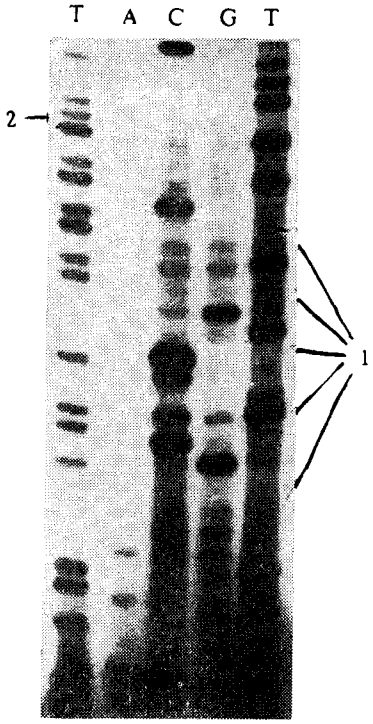


图 1

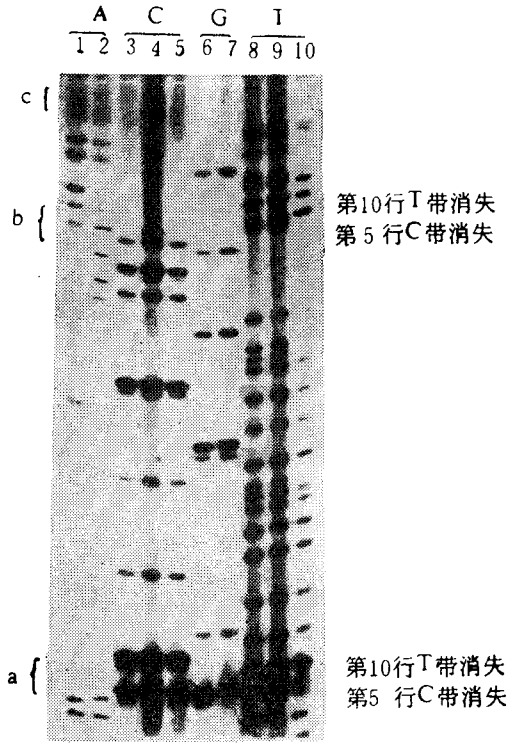


图 3

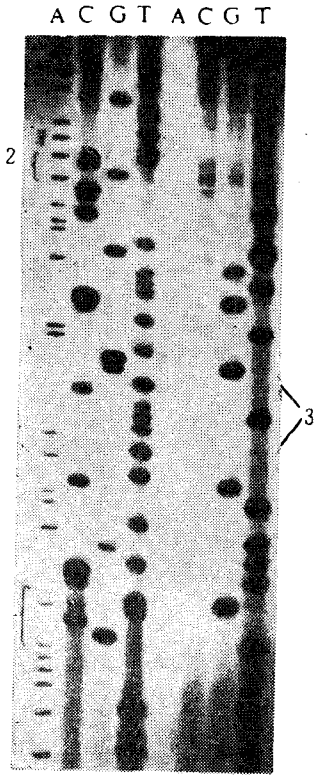


图 2

《DNA 顺序测定中的人工带及其形成假说》一文的图

图 1　DNA 顺序测定的部分放射自显影图谱显示遗留人工带

1.在 C. G. T 三行的主带之间有许多放射性强度较弱的不规则分布的人工带。

2.放射性强度依次减弱的连续核苷酸顺序。

图 2　显示酶解人工带的部分放射自显影图

1，2.酶解人工带，从 ACGT 4 行看出，在 C、T 之间的单位空间位置，本应只有一条带，图中出现三条带，即 A、C、T 在一条线上。

3.T 行的遗留人工带。

图 3　以不同的 ddXTP/dXTP 比率对酶解人工带的控制

1、2；ddA/dA 分别为 5/5 和 4/5；　3、4、5：ddC/dC 分别为 5/2，4/3，7/2；　6、7：ddG/dG 分别为 5/2，4/3；　8、9、10：ddT/dT 分别为 5/5，4/6，6/4。

a、b：图 2 中，在 C、T 间的三条带，由于 ddC/dC 和 ddT/dT 比率增加，C、T 被消除，仅剩下 A 带，说明 C、T 是人工带；　c：放射性强度依次减弱的连续核苷酸顺序。