

技术与方法

一种有效的 DNA 序列测定方法

洪 益 国

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 比较了单链和双链 DNA(ss 和 dsDNA) 模板和两种不同的聚丙烯酰胺凝胶电泳对 DNA 序列测定的影响。结果表明: 在相同的条件下, ssDNA 模板明显优于 dsDNA 模板; 缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 DNA 序列的长度在 40cm 长的胶上可达 350nt, 而一般的线性聚丙烯酰胺凝胶电泳才可测 150nt。对于基因组序列分析, 采用单链 DNA 模板和缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种有效的测定方法。

关键词 DNA 序列测定; 单链和双链 DNA 模板; 线性和缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳

DNA 序列分析包括酶法^[1]和化学裂解法^[2]是分子生物学研究中最重要技术之一, 而常用的是 Sanger 的双脱氧末端终止法(酶法)^[3], 其测定的准确性和效率受多种因素的影响, 这些因素包括 DNA 模板的种类和质量, 不同的 DNA 聚合酶, 同位素标记的 dNTPs ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dNTPs}$ 和 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$) 的用量, dNTPs 与 ddNTPs 的浓度以及聚丙烯酰胺凝胶电泳的选择等。本文利用 Pharmacia ^{32}P 序列试剂盒, 比较了 ss 和 dsDNA 模板及线性和缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳对 DNA 序列测定的影响, 寻求一种有效的 DNA 序列分析方法。

材 料 和 方 法

(一) 试剂和材料

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, Amersham 公司产品, 3000 Ci/m mol, $10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; ^{32}P 序列试剂盒, Pharmacia 公司产品, TEMED 和尿素, Sigma 公司产品。

10 × TBE: 0.9 mol/L Tris, 0.9mol/L 硼酸, 20mmol/L EDTA, pH8.3。

胶母液: 38% 丙烯酰胺, 2% 甲叉双丙烯酰胺溶于水中。

25% 过硫酸胺水溶液。

2.5 × 缓冲液梯度胶母液(100ml): 15ml 胶

母液, 25ml 10 × TBE, 5% 蔗糖, 8mol/L 尿素, 0.005% 溴酚蓝。

0.5 × 缓冲液梯度胶母液 (250ml): 12.5ml 10 × TBE, 37.5ml 胶母液, 8mol/L 尿素。

(二) DNA 模板的制备

1. dsDNA 模板: 将木薯花叶病毒的 ds cDNA 片段与载体 pUC19 连接, 转化 DH5 α , 接种重组菌落于含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素的 3ml LB (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl) 中, 37°C 培养过夜, 15000 r/min 离心 5min 收集菌体, 加 100 μl 溶菌酶溶液 (50 mmol/L 葡萄糖, 10mmol/L EDTA, 25mmol/L Tris-HCl pH8.0, 4.0mg/ml 溶菌酶), 置室温 5min 后, 加 200 μl 0.2 mol/L NaOH, 1.0% SDS 溶液, 置冰上 5min, 再加 150 μl 3 mol/L KAc (pH4.8), 离心后, 等体积酚-氯仿抽提上清液, 乙醇沉淀质粒 dsDNA, 75% 乙醇洗涤, 干燥后溶于含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAase 的 50 μl 无菌水中, -20°C 保存备用。

2. ssDNA 模板: 重组质粒经合适的限制内切酶作用, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳脱分离酶切片段, 与 M13mp 18 或 M13mp 19 连接, 转染 DH5 α F', 挑单个重组噬菌斑于 1.5ml 含 JM101 的 2 × TY (1.6% tryptone, 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl) 中, 37°C 培养 5h, 15,000

r/min 离心 5min, 在上清液中加入 200 μ l 20% PEG6000, 2.5mol/L NaCl, 室温置 5min, 离心收集沉淀, 溶于 100 μ l TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 中, 用 50 μ l 苯酚及 150 μ l 氯仿分别抽提一次, 乙醇沉淀, 空气干燥并溶于 30 μ l TE 中, -20°C 保存备用。

(三) DNA 序列反应

1. 引物与 ssDNA 模板的退火: 反应体积 10 μ l: 1.0—2.0 μ g ssDNA, 0.04 μ mol/L 引物, 15mmol/L Tris-HCl pH7.5, 15mmol/L MgCl_2 , 15 mmol/L DTT, 60°C 10 min, 冷至室温。

2. 引物与 dsDNA 模板的退火: 质粒 dsDNA 在与引物退火之前, 先用 NaOH 变性, 变性反应体积 10 μ l: 1.0—2.0 μ g dsDNA, 0.4 mol/L NaOH, 室温 10min, 加 2 μ l 3 mol/L NaAc (pH 5.2) 中和, 乙醇沉淀得变性的 dsDNA, 退火反应同上。

3. 序列反应: 分别加 3 μ l T-mix, C-mix, G-mix, A-mix 于相应的标记有 T、C、G、A Eppendorf 离心管中, 再各个加入 3 μ l FLPT 混合液 (10 μ l 引物与 DNA 模板的退火反应液中补加 10 μ Ci [α - ^{32}P]-dATP, 5 U Klenow 大片段酶), 室温下反应 15min, 加 1 μ l chase 液, 又 15min, 加 3 μ l 终止反应液, 100°C 变性 3min, 加样 1—2 μ l, 1500—1700V, 60W, 1 \times TBE 缓冲液系统电泳 2.5h 或更长时间。

(四) 序列胶的配制

1. 线性聚丙烯酰胺凝胶(线性胶): 胶浓度 8%, 胶体积 70ml: 7ml 10 \times TBE, 14ml 胶母液, 8mol/L 尿素, 加水至 70ml, 抽气后加入适量的 25% 过硫酸铵和 TEMED, 灌注 40 \times 40 \times 0.04cm 胶板, 1h 后胶凝。

2. 缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶(梯度胶): 胶浓度 6%, 胶体积 70ml: 取 50ml 0.5 \times 缓冲液梯度胶母液和 20 ml 2.5 \times 缓冲液梯度胶母液, 抽气后, 分别加入适量 25% 过硫酸铵和 TEMED, 形成梯度后灌注, 1h 后胶凝。

结果与讨论

(一) DNA 模板的种类和质量

ssDNA 和 dsDNA 都可以作为序列测定的模板^[9], 但在同样的序列反应和凝胶电泳条件下, 所得到的序列信息量不同, 同一 DNA 片段的单链模板明显优于双链模板。ssDNA 模

D E
T C G A T C G A

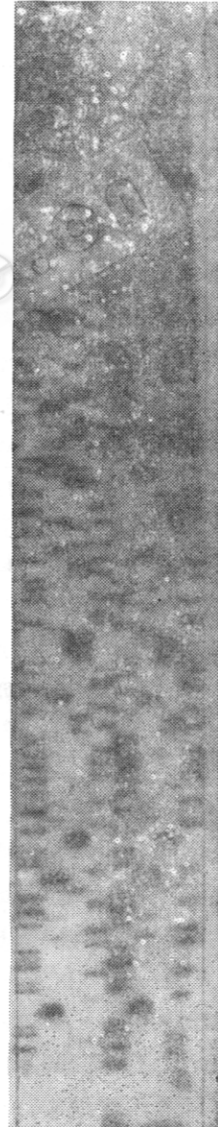


图1 ss 和 dsDNA 模板序列电泳图谱 T,C,G,A: 每个样品的加样顺序; D:ssDNA 模板; E: dsDNA 模板; 两相邻的“—”: 100nt

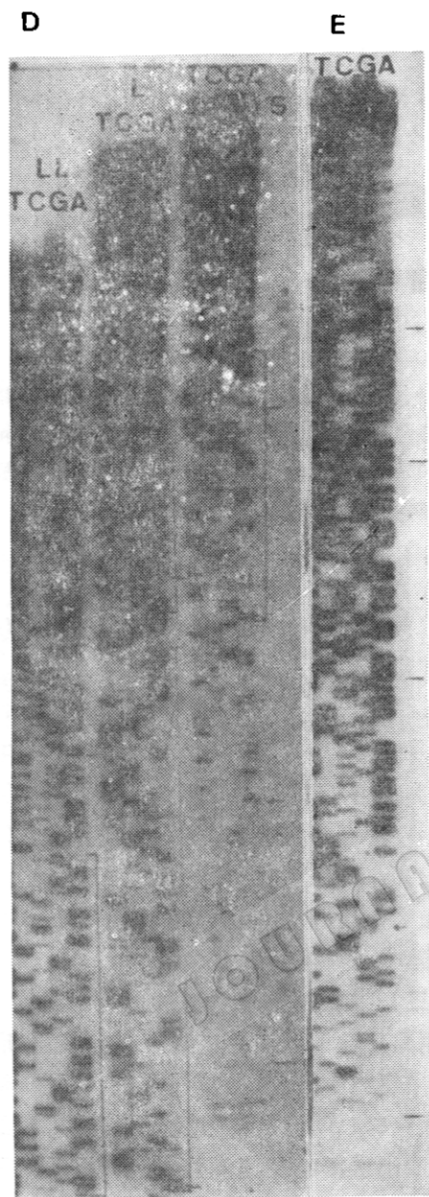


图2 线性和梯度胶电泳序列图谱 T,C,G,A: 每个样品的加样顺序; D:线性胶; E:梯度胶; S,L, LL: 分别表示电泳 2.5h, 5.0h, 7.5h; “J”: 重叠序列; 两相邻的“-”: 100nt

板一次加样可读序列在 40 cm 长梯度胶中可达 350nt(图 1D),而 dsDNA 模板仅大约为 150nt(图 1E)。dsDNA 作为测序模板的主要问题在于小量制备的质粒 DNA 中常混有寡聚核苷酸片段,后者可以作为 DNA 合成的随机引物,影响正常的序列反应。另一方面,许多质粒制备中含有影响 DNA 聚合酶活性的物质,导致

DNA 延伸的非特异性终止。ssDNA 模板的质量同样影响序列测定,制备 ssDNA 模板时,要尽量除去 PEG6000 和苯酚,在进行序列反应之前,最好用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查 ssDNA 的质量。

dsDNA 的制备比较简便,一般用于短序列的测定和已知序列的检测,ssDNA 常用于基因组全长序列的测定。

(二) 线性和缓冲液梯度聚丙烯酰胺凝胶

用于序列测定的聚丙烯酰胺凝胶一般胶长 40cm,60—100cm 长的胶亦有使用;胶宽 20cm 或 40cm;标准的胶厚度 0.04cm,薄胶(0.02mm)可提高分辨率,但胶易碎,厚胶(0.06cm)可加大上样量,但胶不易固定和干燥,胶的厚度均一^[4]。亦有报道用 Wedge 胶测定 DNA 序列^[5]。本文使用 40×40×0.04 cm 线性和梯度胶,两者相比,线性胶制备过程简单,但一次加样可读序列较短,大约为 150nt(图 2D, S)。因为 DNA 片段在线性胶中的泳动速度与其长度成对数关系,一个碱基差别的两个片段的电泳行为如果片段长度短,则它们相距的距离长;反之则短。梯度胶亦称离子强度梯度胶,在胶的底部离子强度高,而上部低,使得一个碱基差别的两个 DNA 片段不论其长短,它们的距离基本一致,提高了胶的纵向使用率,可读的序列大大增长^[6]。在我们的实验中,利用 40cm 长梯度胶可测 300—350nt(图 2E)。一个样品,先后两次或三次加样,在线性胶中亦可得到 250—300 nt 或更长的序列(图 2D, L, LL)。但对整块胶来说,可测的样品数目较梯度胶大为减少,而不能得到较多的序列。

采用本文所介绍的 ssDNA 模板和梯度胶,在较短的时间内测定了多于 20kb 的 DNA 序列,完成了木薯花叶病毒基因组 DNA 1 和 DNA2 的全长序列。

参 考 文 献

1. Sanger F et al.: *J Mol Biol*, 94: 441, 1975.
2. Maxam A M et al.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 560, 1977.
3. Sanger F et al.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463,

- 1977.
4. Sambrook J et al.: eds, *Molecular Cloning*, CSH, New York, 13, 1989.
5. Reed A P et al.: *BioTechniques*, 4: 306, 1986.
6. Hong G F: *Methods Enzymol*, 155: 93, 1987.