

Maxam-Gilbert DNA 序列分析实验方法(续)

方 荣 祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

[³²P]-5' 末端标记 DNA 片段的制备

在建立了限制性内切酶图谱后, 即可拟订序列分析的计划, 即选择好要进行 5' 末端标记的内切酶切点, 以及用于分离 DNA 片段的两个标记 5' 末端的内切酶切点 (或进行拆链以达到此目的), 以图通过尽可能少的 DNA 片段的序列分析来获得 DNA 分子的全序列。

一、DNA 内切酶解

要获得 ³²P-5' 末端标记的 DNA 片段, 首先应用某一选定的内切酶 (见表 1 或其他适于 5' 末端标记的酶) 完全分解 DNA 分子。下面以 PBR 322 为例作具体说明。

20 μ l 质粒 DNA (20 μ g),

10 μ l 100mM Tris-HCl pH7.6, 70mM MgCl₂, 70mM 2-巯基乙醇,

20 单位内切酶,

并根据各种内切酶的需要适量加 NaCl,

加水补足至 100 μ l,

将上述各组分混合于 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1.5—4 小时。

取出 5 μ l 于 1% 琼脂糖凝胶或 4—6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 经溴化乙锭染色后检查 DNA 分子是否被完全酶解成酶图上所指示的那几个片断。若酶解不完全, 应补加几个单位的内切酶, 37 $^{\circ}$ C 继续保温 1 小时。

若酶解已经完全, 加入等体积酚-间甲酚-8-羟基喹啉溶液 (100ml 酚 + 14ml 间甲酚 + 0.1g 8-羟基喹啉 + 11ml H₂O)^[13], 在多用振荡器 (GZ-1 型, 北京冰箱电机厂出品, 又名 Vortexer) 上充分混合, 在台式小离心机上 12000g 离心 3 分钟, 用毛细管吸出水相, 水相用 TSE 缓冲液 (50mM Tris, pH7.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA) 饱和酚, 如上萃取一次; 在

水相中加入 1ml 乙醚, 充分混合后, 稍加离心, 若此时水相已澄清, 表明水相中残留的酚已被除尽。吸走上层乙醚。在水相中加入 1/10 体积的 3M NaAC (pH7.0), 2—3 倍体积的冷 95% 乙醇沉淀 DNA, 在 -20 $^{\circ}$ C 放置 2 小时或在 -70 $^{\circ}$ C (干冰-乙醇浴) 中放置 30 分钟。

说明: 1) 有些内切酶反应时需要一定浓度的 NaCl, 一般在 50—100mM。可参考提供酶的厂商的说明书。2) 1% 琼脂糖凝胶电泳: 0.4g 琼脂糖经加热溶于 40ml EB 缓冲液 (40mM Tris, 20mM NaAc, 2mM EDTA, pH7.8), 在 10 \times 20cm 玻璃板上铺成约 3mm 厚的凝胶, 样品槽在离 10cm 长的一边约 3cm 处以直立的样品槽模子 (样品槽面积 5 \times 2mm) 做成。凝胶两侧用滤纸与电泳槽缓冲液 (EB 缓冲液) 相连。在 DNA 样品中加入 1/10 体积的 50% 蔗糖/0.2% 溴酚兰 (BPB)。加样后 100V 电泳 4—5 小时 (视 DNA 片段大小而定)。电泳时在凝胶上覆一层薄塑料布, 以防水分蒸发。电泳后将凝胶在 1mg/l 的溴化乙锭溶液中染色 10 分钟, 在紫外灯下观察或照相。

二、DNA 片段末端磷酸的除去

经内切酶切断后产生的 DNA 片段, 其 5' 末端为磷酸根, 3' 末端为羟基, 为了用 T₄ 多核苷酸激酶和 [³²P] ATP 以加成法将 ³²P 标记到 DNA 的 5' 末端, 先要将 DNA 片段的 5'-P 除去。通常使用 E. Coli 碱性磷酸酶。

将一、得到的 DNA 乙醇沉淀于 12000g 离心 15 分钟 (4 $^{\circ}$ C), 吸走上清液, DNA 沉淀于干燥器中真空干燥 15 分钟。

加入 40 μ l 10mM Tris-HCl pH8.0 溶解沉淀 (可于 37 $^{\circ}$ C 水浴中温热几分钟帮助溶解)。加入 10 μ l 碱性磷酸酶溶液 (1mg/l, 于 0.5M

Tris-HCl pH 8.3 溶液中)。37℃保温 30 分钟。

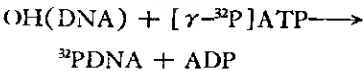
如上依次用等体积酚-间甲酚-8-羟基喹啉、等体积 TSE 饱和的酚、乙醚萃取, NaAc + 乙醇沉淀 DNA。

说明: 1)碱性磷酸酶溶液的制备: 通常市售的碱性磷酸酶是高浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的悬浮液。取出 0.1mg 碱性磷酸酶的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 悬浮液, 12000g 离心 15 分钟, 小心地尽可能彻底地吸走上清液。将沉淀溶解于 100 μl 0.5M Tris-HCl pH8.3 溶液置于 4℃ 保存。也可对 0.5M Tris-HCl pH8.3 溶液透析过夜, 以除去残留的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。2) 有些内切酶产生的 5' 末端较难进行 ^{32}P 标记。此时可考虑采取在较激烈的条件下 (0.1% SDS 60℃) 进行除磷酸反应。将 DNA 沉淀溶于 35 μl 10mM Tris-HCl pH8.0 缓冲液中, 加入 5 μl 1% SDS, 加入 10 μl 碱性磷酸酶溶液 (1mg/l 0.5 M Tris-HCl pH8.3), 60℃ 保温 30 分钟。

三、DNA 片段的 5' 末端的 ^{32}P 标记

由 T_4 多核苷酸激酶催化的 DNA 的 5'-OH 末端加成磷酸化是一个很有效也是最常用的标记方法, 高比度的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ($>1000\text{Ci}/\text{mmole}$) 对获得足够放射性强度的 DNA 片段是至关重要的。

加成磷酸化的反应如下:



从二、中得到的去磷酸 DNA 片段经离心、干燥后溶于 44 μl H_2O (可在 37℃ 水浴中保温数分钟以帮助溶解 DNA)。加入 5 μl 激酶缓冲液 (200mM Tris-HCl pH7.6, 150mM 2-巯基乙醇, 100mM MgCl_2)。

在另一 Eppendorf 离心管中加入一定量 (见说明 3) 的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 乙醇溶液, 真空干燥后, 将上述 DNA 溶液加入到此管中, 再加入 1 μl (2—3 单位) T_4 -多核苷酸激酶, 总体积为 50 μl 。小心混合后, 于 37℃ 水浴中保温 1 小时。

保温结束后加入 50% 蔗糖/0.2% BPB 溶液,

可直接上聚丙烯酰胺凝胶电泳分离所需的 DNA 片段。若准备直接进行第二次酶解以分离 DNA 片段的二个标记末端, 则可进行如上所述的酚萃取、乙醚萃取和 NaAc + 乙醇沉淀标记 DNA 片段。

说明 1) DNA 片段的 5' 末端结构与标记的效率有很大的关系。5'-凸出末端结构的标记效率最高 (见表 1), 平头末端结构或 3'-凸出末端结构较难被标记。上述方法适用于标记 5'-凸出末端结构。对于平头末端结构和 3'-凸出末端结构, 可采用 DNA 变性条件下的磷酸化反应, 如 DMSO (二甲基亚砜) 变性^[14]、碱变性^[15]、热变性^[12]等。下面介绍一种 DMSO 变性条件下 5'-末端标记的方法。

从二、中得到的去磷酸后的 DNA 沉淀溶于 8 μl H_2O , 加入 7 μl 0.1M NaCl, 3 μl 激酶缓冲液, 将此 DNA 溶液加到含有干燥了的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的管中, 加入 7 μl DMSO, 3 μl T_4 -多核苷酸激酶, 37℃ 保温 1 小时。

2) T_4 -多核苷酸激酶还可催化 DNA 的 5' 末端磷酸与 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ 的交换反应 (在 ADP 存在下), 此交换反应也被用于标记 DNA 的 5' 末端。其优点是无须进行 DNA 片段的去磷酸反应, 缺点是标记效率较低 (60—70%)。

3) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 用量的计算: 若 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的比度为 1250Ci/mmmole, 浓度为 10pmole (12.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)。又设 DNA 20 μg , 其分子量为 3×10^6 , 被内切酶酶解后产生二个片段, 即有 4 个 5' 末端。所以 20 μg DNA 产生的 5' 末端为:

$$\frac{20 \times 10^6}{3 \times 10^6} \times 4 = 26.8 \text{ pmoles}$$

一般加入的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 的量为 DNA 5' 末端分子数的 3 倍, 即需 $3 \times 26.8 = 80.4 \text{ pmoles}$ 或约 8 μl 的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 溶液。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离标记的 DNA 片段

在 T_4 -多核苷酸激酶反应后获得的标记 DNA 片段的混合物 (包括大量未反应的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) 可直接用聚丙烯酰胺凝胶电泳来分

离,根据限制性内切酶图谱和一、中检查酶解完全程度时电泳的带谱,可以判定那几条 DNA 带是需要进行序列分析的 DNA 片段。

4—6% 的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺 = 30:1)可满意地用于分离 100—1,000 碱基对的 DNA 片段。6% 的凝胶在洗脱 DNA 时较易被破碎,而且 DNA 洗脱液中含有少量的聚丙烯酰胺。

制做 $2 \times 200 \times 400\text{mm}$ 的 6% 的平板凝胶的配方如下:

22.5ml 40% 丙烯酰胺 + 1.33% 甲叉双丙烯酰胺溶液

7.5ml $20 \times \text{TB}$ 缓冲液(TB 缓冲液: 50mM Tris-硼酸, 1mM EDTA, pH8.3)

120ml H_2O

混合后加入 150mg 过硫酸铵(APS), 100 μl 四甲基乙二胺(TEMED), 在室温下放 20 分钟左右凝胶聚合。

在 50 μl 激酶反应混合物中加入 5 μl 50% 蔗糖/0.2% BPB 溶液。用毛细管小心地加入样品槽(面积 $2 \times 20\text{mm}$)内,用电桥或以电泳缓冲液(TB)接通上电泳槽和凝胶。电泳的电压和时间根据 DNA 片段的长短和分离效果而定。可能的话应控制 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 仍留在 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 凝胶内,避免大量高放射性强度的电泳槽缓冲液难以处理。

电泳结束后,移走一块玻璃板,凝胶仍放在另一块玻璃板上,在凝胶上覆上一层塑料膜,在凝胶的四角各贴上一块发光粉或放射性墨水的定位标志,再放上 X 光底片,在暗处曝光。曝光时间取决于 DNA 片段的放射性强度。将洗出的 X 光底片与凝胶四角的定位标志对准后,切下含有所需 DNA 片段的凝胶块。

将凝胶块研碎后,放入 Eppendorf 管中,加入 500 μl TEN 缓冲液 10mM Tris, 10mM EDTA, 1.0M NaCl, pH7.2, 在多用振荡器上打匀后,于室温缓慢振荡过夜,将 DNA 从凝胶中扩散出来。将凝胶的 TEN 悬浮液倒入垫有一片 Whatman 3mm 圆纸片的 2ml 注射器套筒内,依靠重力过滤下 DNA 溶液,用 100 μl TEN

洗涤几次圆纸片上的凝胶残渣,最后插入注射器芯子,将凝胶残渣中的溶液挤出来。

在 DNA 洗脱液中加入 2 倍体积冷乙醇或等体积的冷异丙醇, -20°C 放置 2 小时或 -70°C 放置 30 分钟。

说明: 1.40% 丙烯酰胺/1.33% 甲叉双丙烯酰胺溶液应用粗滤纸、活性炭纸、Millipore 微孔滤纸三层过滤,以除去各种杂质。

2. DNA 从凝胶碎块中扩散出来所需的时间和效率跟 DNA 片段的长度有关。100—300 碱基对的片段只需 4—5 小时, DNA 洗脱效率可达 80% 以上;较长的片段需较长的时间,洗脱效率在 60—70% 左右。

五、DNA 片段的两个标记末端的分开

从“四”回收到的 DNA 片段只有将其二个标记的 5' 末端分开后才能用于序列分析,因为在单向的序列分析凝胶上不可能同时分析二个 DNA 序列。将二个标记末端分开通常所用的方法是用一种内切酶将 DNA 片段切开,产生二个长度不同的各带一个标记末端的片段(若该酶在 DNA 片段上有多个切点,则只有二个含有标记末端的片段可以在电泳分离后的放射自显影图上被显示出来)。选择这一种内切酶时要注意产生的二个含标记末端的片段在随后的聚丙烯酰胺凝胶电泳上要能够分开,而且为了获得尽可能多的序列,这二个含标记末端的片段不要太短,也不要太长,最好在 200—400 碱基对左右。但有时在 DNA 片段内部没有可被利用的切点,这时可采用将 DNA 变性后的两条链在凝胶电泳上拆开的办法来分开二个标记末端。二条链长相同但碱基序列不同的单链 DNA 能在聚丙烯酰胺凝胶电泳中分开的原理不太清楚,但不大可能是二条链的嘌呤、嘧啶碱基含量不同而引起的重量上的差别,比较可能的是由于不同的碱基序列使每条链折迭成不同形状的亚稳定结构使得它们在电泳时能被分开。拆链后序列分析的优点是若 DNA 片段不太长的话,可以从二条单链 DNA 获得更多的序列(在内切酶切断的情况下靠近非标记末端的一些碱基不能被清楚地读出),而且二条互补链

的序列可以互相验证。缺点是并不是每个 DNA 片段的二条链都能被满意地拆开,有时会在未拆开的双链中损失相当多的放射性计数,待拆链的 DNA 片段量越大,在电泳时拆链效率就越低。拆链后获得的单链 DNA 非常容易吸附在玻璃、塑料管壁及过滤用的滤纸片上,即使硅化后也不能完全避免,所以在操作中会带来较大的损失。

(一) 内切酶切断

从“四”中得到的 DNA 片段的乙醇或异丙醇沉淀经离心、干燥后,溶于适当的缓冲液或水,参照“一、”的方法进行第二次酶解。参照“四、”中介绍的制备电泳、放射自显影和从凝胶块中洗脱 DNA 的方法回收 DNA。

(二) 拆链

制备拆链用的聚丙烯酰胺凝胶: $2 \times 200 \times 400\text{mm}$, 5% 丙烯酰胺, 0.1% 甲叉双丙烯酰胺, 50mM Tris-硼酸, 1mM EDTA, pH8.3。样品槽面积为 $2 \times 20\text{mm}$ 。加样前 200—300V 预电泳 30 分钟。

从“四、”中得到的 DNA 片段的乙醇或异丙醇沉淀经离心,用 70% 乙醇洗涤(洗去在 DNA 沉淀时同时被沉淀下的一些 NaCl,盐的存在对拆链不利)。干燥后溶于 $25\mu\text{l}$ 1.5mM EDTA,加入 $12\mu\text{l}$ DMSO, $3\mu\text{l}$ 染料 (10M 尿素/0.05% XC*/0.05% BPB)。90℃ 水浴中加热 2 分钟,立即用干冰-乙醇浴或冰冷却。加在预电泳

后的凝胶上,200—300V 电泳,电泳时间依所分离的片段长度而定,一般可让 BPB 泳动到胶底。

按“四、”中的方法放射自显影,从凝胶块中回收二条单链 DNA。

说明: 1. 双链 DNA 在 30% DMSO 中热变性的拆链效果较在 0.3N NaOH 中变性的好。

2. 电泳时电压要控制在不使胶发热的程度。有条件的话最好在冷室中电泳,以减少电泳时二条链重新结合(复性)的可能性。注意在冷室中电泳可适当加高电压,否则电泳速度太慢。

3. 由于被拆开的二条单链和复性的双链都是同位素标记的,所以在放射自显影图上会出现三条带。一般来说,在这个凝胶体系中,移动得快的那条带是双链 DNA。而且二条单链带的深度应差不多,而可能与双链带的深度差别较大,这也有助于判断哪二条是单链。

4. 拆链用的聚丙烯酰胺凝胶其 Acr:Bis = 50:1。凝胶的浓度可根据 DNA 片段的长度而改变。若片段短,可增加凝胶浓度至 10%。5% 的凝胶即使对于 1000 碱基对的 DNA 片段也能使其二条链分开。

(未完待续)

* “XC”为二甲苯兰 FF (Xylene cyanol FF)。