

DNA顺序的ddXTP链终止法测定

齐义鹏

(武汉大学病毒学系, 武汉)

用Messing的M13克隆系统和Sanger的ddXTP链终止法, 测定了酵母线粒体DNA片段的核苷酸顺序。为了提高在一张X光胶片上的阅读水平, 作者对Sanger法的某些操作进行了适当修正。通过降低ddXTP/dXTP的用量比率、多次加样以及合理掌握两次加样的间隔时间和电泳结束时间、ss-DNA模板的筛选等措施, 在一张17×80cm的X光胶片上的阅读水平达到394bp, 从而测出了酵母线粒体DNA细胞色素b基因的一个大片段为709bp。

关键词 线粒体DNA; 细胞色素b基因; M13克隆系统; ddXTP; 链终止法

测定DNA核苷酸顺序是分子生物学的基础工作。1977年, F. Sanger等^[1]用抑制剂(双脱氧核苷三磷酸——ddXTP或3-阿拉伯糖脱氧核苷三磷酸)终止DNA链的合成反应, 提出了DNA顺序测定的ddXTP链终止法。此法和Messing的M13克隆系统相配合, 成了当前测定DNA顺序的理想方法。

要提高DNA顺序的阅读水平不是一件简单的事。在Sanger提出此法的时候^[1], 在一张X光胶片上的阅读水平很低, 现在一般能阅读200-300bp^[2,3]。为了阅读更多的核苷酸, 本文在测定酵母线粒体DNA片段时, 对ddXTP顺序法的一些常规操作进行了适当修正。

材料和方法

(一) 菌种

酵母细胞色素系统缺失突变种71号, 大肠杆菌(*E. coli*)噬菌体M13mp8和M13mp9 RF型(复制型), *E. coli* JM103均由美国俄亥俄州立大学遗传系线粒体和叶

绿体实验室保存并提供。

(二) 实验方法

按文献[4,5,6]分离线粒体和线粒体DNA(mt-DNA); 用Bcl I和Bgl II双酶消化。电泳后, 用冰冻-融化法^[7]回收需要的DNA片段。再一次用Hpa II消化此片段后, 即可作为DNA顺序分析的插入片段。

以M13mp8和M13mp9为载体, 用插入片段和载体的两种克分子比(I/V为1:1和3:1), 按Messing^[8]叙述的方法进行克隆、转染, 筛选无色噬菌斑, 制备M13 ss-DNA模板。

含有插入片段的M13 ss-DNA模板的制备是用聚乙二醇(PEG)6000沉淀噬菌体, 以酚-乙醚法抽提, 乙醇沉淀DNA。PEG沉淀后, 需吸干上清液并用微量TES缓冲液(10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH8.0)迅速洗涤一次, 除去残余的PEG。

本文于1985年1月3日收到。

本文得到美国俄亥俄州立大学遗传系Dr. P. Perlman和Dr. M. Haldy的热情指导和帮助, 特此致谢。

核苷酸混合物的配制:根据Sanger^[1]和Messing^[2]介绍的方法进行DNA顺序测定。但作者对一些操作进行了适当修正。核苷酸混合物的成分如下:

A^o: 0.5mM dCTP, dGTP, dTTP各20μl;

C^o: 0.5mM dGTP, dTTP, 各20μl, 0.5mM dCTP 1.0μl;

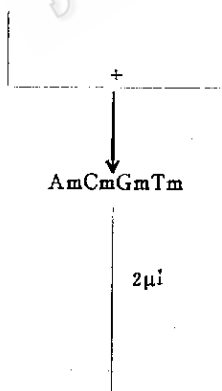
G^o: 0.5mM dCTP, dTTP, 各20μl, 0.5mM dGTP 1.0μl;

T^o: 0.5mM dCTP, dGTP 各20μl, 0.5mM dTTP 1.0μl.

向以上4管分别加10× Hin 缓冲液(70mM Tris-HCl, 70mM MgCl₂, 500mM NaCl, pH7.5) 20μl, 每管缺少的那个dXTP用α³²PdATP代替, 每管只加1.0μl的那个dXTP用ddXTP补充。

然后, 制备4种反应混合物。在浓度不变时, 作者采用了三种不同的ddXTP与dXTP的用量比(表1)。

dA^o C^o G^o T^o ddA C G T



α³²PdATP

M13ssDNA

Primer

templet

+

Carrying insert
fragment

Klenow
fragment

95°C, 5min
Cold to room
temperature

Templet-primer

Mixture
| 3μl

Ar Cr Gr Tr

↓ 30°C, 15min
↓ 0.5mM dATP 1μl
↓ 30°C, 15min
PAGE

表1 核苷酸反应混合物的制备

Table 1 Preparation of reaction mixture of nucleotides

编号 Number	X ^o 混合物 X ^o Mixture	ddXTP	ddXTP/ dXTP
Am	A ^o	0.33mM ddATP	5/5*, 4/5
Cm	C ^o	0.35mM ddCTP	7/2, 5/2*, 4/3
Gm	G ^o	0.70mM ddGTP	5/2*, 4/3
Tm	T ^o	0.66mM ddTTP	6/4, 5/5*, 4/6

*, dd/d 正常比率 (Normal ratio)

模板与引物融合: 取约100ng的已制备好的ss-DNA模板加1.25μg的26bp的引物^[10], 加热95°C, 5min缓慢冷却到室温。

DNA片段的体外合成: 取5μci α³²PdATP的乙醇溶液, 冷冻真空干燥, 加1单位*E. coli* DNA聚合酶Klenow片段, 以及上述已融合的模板-引物混合物12.5μl。最后, 在4个编号为Ar, Cr, Gr, Tr的小管

图1 Sanger ddXTP链终止法的简单流程

Fig.1 Flow diagram for Sanger's ddXTP chain-termination method

中分别加 Am, Cm, Gm, Tm 各 2.0 μ l, 上述 α^{32} PdATP-聚合酶-模板-引物混合物 3.0 μ l, 30 $^{\circ}$ C 反应 15min, 追加 0.5mM dATP 1.0 μ l, 继续反应 15min (图 1)。

合成反应结束后, 各管加甲酰胺染料混合物 (0.1% Xylene Cyanol, 0.1% 溴酚兰, 10mM EDTA, 95% 甲酰胺) 20—50 μ l, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 速冷, 使合成的 DNA 片段变性并从模板上脱落, 即可进行聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 电泳。

洗净玻板, 仔细去除上一次实验残留的放射性污染。短胶用 30 \times 40cm、长胶用 17 \times 80cm 玻板。丙烯酰胺浓度 8%, 尿素 48%, 以 TBE 缓冲液 (10 \times : Tris 碱 216g, 硼酸 110g, EDTA 18.6g, 加水到 2000ml, pH8.3) 制胶, 加过硫酸铵和 TEMED, 立即灌胶进行聚合。在玻板上为加样槽编号 A, C, G, T, 相应的分别加样品 Ar, Cr, Gr, Tr 各 1.5 μ l, 以 1 \times TBE 电泳缓冲液, 1000V 6—8 h 或 500V 过夜。

在正式测定之前, 用不同的无色噬菌斑制备的 ss-DNA 模板进行 DNA 片段的体外合成, 在短胶上点 7 个样品 (每个样品都加 A, C, G, T 4 个加样槽), 筛选最清晰的样品进行正式顺序测定。同一样品往往需要加样 2 次 (对长胶) 或 3 次 (对短胶)。电泳结束, 在凝胶上放一张 X 光胶片, -80 $^{\circ}$ C 放射自显影 3—6 天。

结 果

待测 DNA 片段经克隆转染后, 在含有 IPTG (异丙醇 β -D-硫代半乳糖苷) 和 Xgal (5-溴-4-氯-3-吡啶 β -D-半乳糖苷) 的培养基上, 出现蓝色和无色两种噬菌斑 (图版 I-1)。前者是由未消化的 M13 或 M13 自我重组分子转染的结果; 无色噬菌斑是由含有插入片段的重组分子或

M13 本身的缺失重组分子转染的结果。

重组率、阳性重组率与插入片段和载体的比率 (I/V) 有关 (图版 I-1a, 1b, 表 2)。当 I/V 为 1:1 时, 重组率和阳性重组率仅为 19.7% 和 8.1%, 当 I/V 升高到 3:1 时, 重组率和阳性重组率相应提高到 30.3% 和 45.3%。表 2 是 3 次实验的平均结果。

表 2 重组率和阳性重组率与 I/V 充分子比率的关系
Table 2 Relation between frequencies of recombination, positive recombination and molar ratio of I/V

插入片段/载体 (I/V) Insert/vector (I/V)	1:1	3:1
蓝色噬菌斑 (个) Blue plaques (pieces)	2576	2504
无色噬菌斑 (个) Colorless plaques (pieces)	578	1062
重 组 率 % Recombination frequency %	19.7	30.3
供筛选的无色噬菌斑 (个) Colorless plaques for screen (pieces)	26	74
阳性重组体 Positive recombinants	2	33
阳性重组率 % Positive recombination frequency %	8.1	45.3

ddXTP/dXTP 的用量比不同, 测定的核苷酸数目有很大差异 (图版 I-2, 表 3)。

从表 3 看出, dd/d 的用量比下降, 大大提高了在一张 X 光胶片上的核苷酸阅读水平。对于 ATP, 阅读水平提高 0.24 倍, 阅读距离延长 6cm; 对于 CTP, GTP, TTP 的效果更为明显, 阅读的核苷酸数提高近一倍, 阅读距离延长 10—20cm。几乎整个 X 光胶片上都是有效的阅读区。即使在胶片的顶部区域, 核苷酸带也清晰可见。从图版 I-3b 可以实际的观察到这种结果。

表 3 dd/d 用量比率与核苷酸的阅读水平**
Table 3 Relation between dd/d ratio and reading level of nucleotides

dd/d	阅读数 Read (bp)	比正常比例 提高(倍) Increase to normal ratio (fold)	阅读距离 (cm) Reading distance (cm)	比正常比例 延伸(cm) Extend to normal ratio (cm)
ddA/dA	1*	107	55	6
	0.8	133	61	
ddC/dC	3.5	20	54	11
	2.5*	25	56	
	1.3	47	67	
ddG/dG	2.5*	22	55	10
	1.3	42	65	
ddT/dT	1.5	60	40	20
	1.0*	67	42	
	0.67	122	62	

* dd/d 正常比率 (Normal Ratio)

** 5 次结果的平均值 (Mean result in 5 time tests)

提高阅读水平的另一个措施是在电泳时进行多次加样。加样时间和电泳结束时间以染料作标记。表 4 是阅读水平与多次加样的关系。

表 4 多次加样对核苷酸顺序测定的影响
Table 4 Effect of multi-loading on DNA sequencing analysis

实验次数 Trial time	第二次加样时溴 酚蓝泳动距离 Migration of BPB at 2nd loading (cm)	电泳结束时溴酚蓝 泳动距离 Migration of BPB at the end of electrophoresis (cm)	阅读水平 Reading level
1	50	70	285
2	50	70	292
3	55	75	316
4	55	75	324
5	55	85	394

表 4 说明, 多次加样以及合理掌握加样时间和电泳结束时间是提高阅读水平的有效措施。当第一次样品中的溴酚蓝泳动到 55cm 时, 进行第二次加样; 第二次样品中的溴酚蓝正好走出凝胶进入缓冲液中时, 结束电泳是比较合适的。图版 I-3b 是采用最适的 dd/d 比率和最适的加样和结束时间, 以及仔细地进行全部操作, 在一张 X 光胶片上测得的 394bp。

M13mp8 和 M13mp9 是一对限制位点相同、方向相反的载体^[8,9]。为了测定 DNA 大片的核苷酸顺序, 可以同时在这两个载体上克隆。以 M13mp8 为载体, 在 X 光胶片上, 核苷酸的阅读方向是从插入 DNA 的 3'→5'; 以 M13mp9 为载体, 核苷酸的阅读方向是从插入 DNA 的 5'→3'。作者用这两个载体, 从 DNA 的 3'、5' 两端测定, 从两端向中间阅读, 测出了酵母 mt-DNA 的一个大片的 709bp (图 2)。

讨 论

Messing 的 M13 克隆系统和 Sanger 的 ddXTP 链终止法结合起来是当前测定 DNA 顺序的较好方法。插入片段和载体的克分子比, 3:1 比 1:1 能得到较高的重组率和阳性重组率 (图版 1, 表 2)。这可能是由于低的载体克分子浓度, 减少了载体 DNA 分子自我重组和缺失自我重组的机率; 增加了插入片段与载体重组的机率。然而, 即使在这种情况下, 也不是所有的无色噬菌斑都是阳性重组体, 还可能有载体分子缺失重组, 杂质 DNA 片段插入重组, 非特异性片段插入重组以及双片段插入的重组等等。因此, 进行 ss-DNA 模板的筛选是必要的。本文测定的样品就是从 5 个无色噬菌斑的 ss-DNA 模板中, 在短胶上筛选出来的。

	2081				2101				2121
TGATC	ATTAA	ACATG	ATTGA	AGAAA	TAATA	ATAGT	TTATG	AAATA	AGATAG
Bcl I			Mbo I						
			2141				2161		
TGTAA	TATAA	ATTTT	TATGA	AGATA	TAGTC	CATTT	TATAT	TTATT	ATAAA
			Mbo I						
				T					A
			*						*
	2180			2201					2221
AGCAT	CCTGA	TAAC T	ATATT	CCTGG	TAATC	CTTTA	GTAAC	ACCAG	CATCT
				EcoR I					
			2241				2261		
ATTGA	TATTA	AAAAT	ATTAA	TAAAA	TTATT	ATTAT	TTAAT	CTTAT	TTATT
	2281				2301				2321
TTATA	TAAAA	AAAAT	AAATA	ATAAT	TATTA	ATAAA	AATAT	ATTAT	TTATT
			2341				2361		
TCTCC	TTTCG	GGGTT	ATTTA	TATAT	ATTCC	TTTAT	AATTT	ATATT	TAATA
	2381				2401				2421
TATTA	TATTA	AATAT	ATGAA	AAATT	ATAAT	AAATA	AATTA	ATTAA	TTAAT
			2441				2461		
AATAA	ATAAT	AATAA	AAAGT	ACAGT	AGCAT	TAAAT	ATTCT	TAAGT	TTCCG
	2481				2501				2521
CTTTG	TGGGA	ACTCC	CATAA	GGAGT	TTAAT	GATTA	AAATT	GGTTA	ATTGT
			2541				2561		
CAAGA	AAATC	TAAGG	TATTA	ATAAA	TAAAT	AATAC	TATGA	CAACT	TGCAG
	2581				2601				2621
CGAAG	TTTAT	ATCAT	CTCTA	TATTA	TATAT	TAATA	TATAT	ATATA	ATAAT
			2641				2661		
AATAA	TAATA	TTAAT	ATAAT	ATAAG	ATATA	AAAAC	GTTCA	ACGAC	TAGAA
	2681				2701				2721
AGTGA	ACTGA	GATAG	TAATA	CCTTT	CCACG	AAAAC	CAATT	AATTT	ATAAA
			2741				2761		
TTATT	TTTAA	ATAAA	GAATA	GATTA	TTAAT	TTTTT	TTTAT	ATAGT	ACCGG
									Hpa I
CCGG	2780								
Hpa I									

图2 酵母线粒体DNA细胞色素b基因Bcl I/Hpa I片段的核苷酸顺序

Fig. 2 Nucleotides sequence of the Bcl I/Hpa I fragment of cytochrome b gene in yeast mitochondrial DNA

* , 突变碱基 Mutational base

为了提高在一张 X 光胶片上的核苷酸阅读水平, 作者对 ddXTP 顺序法的一些操作作了适当改进。最重要的是改变 ddXTP/dXTP 的用量比率。当比率下降时, 核苷酸的阅读水平成倍提高。根据 Sanger 法原理, 在合成 DNA 片段时, 每掺入一个核苷酸, 都面临着选择 dXTP 和 ddXTP 的两种可能。当 ddXTP 浓度降低, dXTP 浓度增高时, dXTP 的掺入机率大于 ddXTP, 因而新 DNA 片段的合成可以一直延伸到较远的位置被终止, 故能测出更多的核苷酸。

多次加样和合理掌握第二次加样的时间以及电泳的结束时间是提高阅读水平的另一个重要措施。作者发现, 当第一次样品中的溴酚蓝泳动到 55cm 时进行第二次加样, 既可保证两次加样间少数核苷酸的

衔接, 便于识别和阅读, 又不致使其重叠过多。当第二次样品中的溴酚蓝泳出胶外, 引物的核苷酸正好到达胶底, 即可结束电泳。

洗净玻璃, 去除残存的放射性污染以及除尽沉淀噬菌体时的 PEG, 是保证得到清晰的放射自显影图谱的不可忽视的操作, 否则图谱上将出现许多杂带或人工带。

当 Sanger 在 1977 年^[1]提出 ddXTP 链终止法时, 在一张 X 光胶片上仅能阅读 15—200bp。现在的阅读水平一般可达到 200—300bp^[2,3]。有些作者甚至可达到 400bp^[11]。本文通过一些操作程序的改进, 在一张 17×80cm X 光胶片上, 阅读水平最高达到 394bp, 测出了酵母线粒体 DNA 细胞色素 b 基因的一个 709bp 的大片段。

参 考 文 献

- (1) Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74(12):5463—5467, 1977.
- (2) Maxam, A. M. and Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74(2):560—564, 1977.
- (3) Barnes, W. M. and Bevan, M., *Nucl. Acid. Res.*, 11(2):349—368, 1983.
- (4) Alexander, N. J., *Cell*, 20:199—206, 1980.
- (5) Hanson, D. K. et al., *J. Biol. Chem.*, 257:3218—3224, 1982.
- (6) Hudspeth, M. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 610:221—228, 1980.
- (7) Thuring, R. W., *Anal. Biochem.*, 66:213—220, 1975.
- (8) Messing, J. et al., *Nucl. Acid Res.*, 9:309—321, 1981.
- (9) Messig, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74:3642—3646, 1977.
- (10) Anderson, S. et al., *Nucl. Acid Res.*, 8(8):1731—1748, 1980.
- (11) Sherman, W. and Weisman, M. D., *Methods of DNA and RNA sequencing*, CBS Educational and Professional Publishing, New York, 1983, pp.69, 111, 260—303.

ddXTP CHAIN-TERMINATION METHOD FOR DNA SEQUENCING

Qi Yipeng

(Department of Virology, Wuhan University)

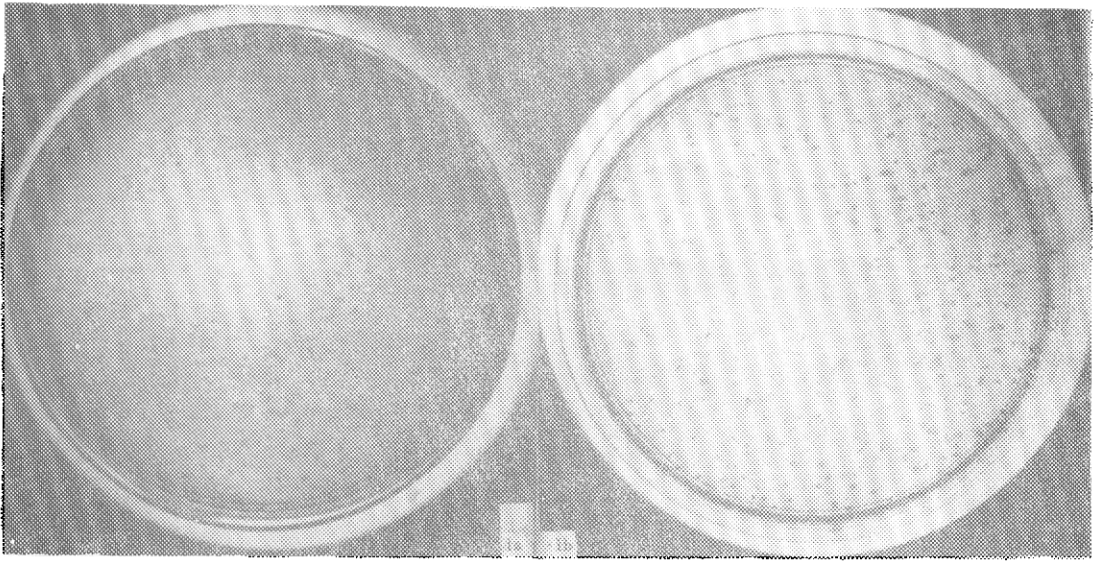
By using Messing's M13 cloning system and Sanger's ddXTP chain-termination method, a big fragment in yeast mitochondria DNA has been sequenced. In order to read more base pairs on one X-ray film, some procedures of Sanger's sequencing method, such as reducing of ratio for ddXTP/dXTP, screening for ss-DNA template, several times loading as well as control for loading time between first and second loading and for finishing time of electrophoresis etc, have been improved. On a 17×80cm X-ray film 394bps have been read because of those improvements and the big fragment of 709bp for cytochrome B gene in yeast mitochondria DNA has been also sequenced.

Key Words

Mitochondria DNA; cytochrome b gene; M13 cloning system; chain-termination sequence

图版说明

- 在Xgal平板上呈现无色噬菌斑的阳性重组体, 重组频率与插入片段和载体的比率 (I/V) 有关。1a, I/V为3:1, 1b, I/V为1:1
Positive recombinants were shown on the Xgal plate as colorless plaque. The frequency of recombination depends on ratio of insert/vector(I/V). The ratio of I/V is 3:1 (1a), 1:1(1b)
- 改变ddXTP/dXTP 的比率在80×17cm的放射自显影图谱上阅读更多的核苷酸
The ratio of ddXTP/dXTP was adjusted to read more nucleotides on an 80×17cm autoradiograph pattern
1,2, ddA/dA的比率为5/5和4/5, Lane 1 and 2: the ratio of 5/5 and 4/5 for ddA/dA
3,4,5, ddC/dC的比率为5/2, 4/3, 和7/2, Lane 3, 4 and 5: the ratio of 5/2, 4/3 and 7/2 for ddC/dC
6,7, ddG/dG的比率为5/2和4/3 Lane 6 and 7, the ratio of 5/2 and 4/3 for ddG/dG
8,9,10, ddT/dT 的比率为5/5, 4/6 和 6/4, Lane 8,9, and 10, the ratio of 5/5, 4/6 and 6/4 for ddT/dT
- 80×17cm的X光胶片上DNA顺序的放射自显影图谱
Autoradiograph pattern on 80×17cm X ray film for DNA sequencing
插入DNA: Bcl I/Hpa I 片段 Insert DNA: Bcl I/Hpa I fragment
载体: M13mp9 Vector: M13mp9
引物在图谱的下部 The primer is on bottom of the pattern 从右 (3a) 和左 (3b), A,C,G,T 为第一次加样; A,C,G,T 为第二次加样 From right (3a) 和left (3b). lane, A,C,G,T for first loading, A,C,G,T for second loading
图谱3a是图谱3b的部分放大 The pattern 3a is an enlarged one of part of the pattern 3b



2nd: 1st

