



Maxam-Gilbert DNA序列分析实验方法

方 荣 祥

(中国科学院微生物研究所,北京)

核酸的一级结构的阐明,对于了解基因的结构、调控和表达有着重要的意义。Sanger 和 Coulson 建立的加减法^[1]和 Maxam 和 Gilbert 建立的化学断裂法^[2]使 DNA 序列分析技术有了革命性的突破。以后 Sanger 等人又发展了双脱氧核苷酸末端终止法^[3], M13 单链噬菌体克隆技术的建立使利用该法测定 DNA 序列变得更加方便、迅速^[4]; Maxam-Gilbert 法也有了新的改进^[5]。类似的技术已应用于 RNA 的序列分析^[6-10]。结合限制性内切酶和重组 DNA 分子克隆技术的应用,核酸的序列分析已成为当前分子生物学中发展最快的领域。核酸序列分析技术已成为许多实验室的常规技术,大量核酸一级结构的资料正在迅速积累,人们已着手建立核酸序列库、利用电子计算机来处理这些资料。

Maxam-Gilbert 的化学断裂法是 DNA 序列分析最常用的方法之一,它既适用于双链 DNA,也适用于单链 DNA。它的基本原理是利用几个具有碱基专一性的化学切断反应将单个末端被 ³²P 标记的 DNA 分子进行部分切断,产生几组从标记末端到与碱基专一性反应相应的那种碱基在 DNA 中每个位点的长短不同的片段,这几组片段在凝胶电泳中并排着按链长被分开,对凝胶进行放射自显影后就可以得到代表每个碱基位置的带谱,从这个带谱可以直接读出从标记末端向另一个末端方向的碱基序列(图 1 并参见文献[11])。

下面分步介绍具体的实验方法。

限制性内切酶图谱

由于凝胶电泳分辨率的限制,必须将 DNA

分子用限制性内切酶切割成数百个核苷酸长的片段,从这些片段的序列组建成整个 DNA 分子的序列。为此必须先建立 DNA 的限制性内切酶图谱。

在进行酶图分析时,通常先测定切点较少的酶的位点,然后再测定切点较多的酶的位点。内切酶切点出现的频率一般可根据内切酶识别序列的核苷酸长短来估计,即大约每 4^n 个碱基有一个内切酶切点, n 为该种内切酶识别序列的核苷酸数目,如识别 6 核苷酸序列的内切酶的切点出现频率大约是每 4,096 (4^6) 个碱基有一个。由于真核 DNA 中缺少 CpG 这样的相邻碱基,所以 Hpa II、Taq I、Ava I、Sal I、Xho I、Xma I 将会产生比 $1/4^n$ 更少的切点。考虑到序列分析时便于进行末端标记,一般应多选择产生 5'-凸出末端的内切酶。表 1 是 15 种产生 5'-凸出末端的内切酶。 N^6 -甲基化 A 和 5-甲基化 C 会抑制某些内切酶的作用,所以常用识别同样序列但能切断含甲基化 A 或 C 序列的同裂酶 (isoschizomer), 如用 BstN I 代替 EcoR II, Sau3 A 代替 Mbo I, Msp I 代替 Hpa II。

酶图分析的简便方法是将 DNA 分子用限制性内切酶切断,用琼脂糖凝胶 (0.7—1.5%, 适于分析 > 1,000 碱基对的片段) 或聚丙烯酰胺凝胶 (4—6%, 适于分析 < 1,000 碱基对的片段) 电泳,将产生的 DNA 片段分开,根据这些片段的数目和大小,可以推定该种内切酶的切点数目及位置。例如已知在 pBR 322 的 Pst I 切点处用 poly(dA) · poly(dT) 法插入了一段长 2,000 碱基对的 DNA。由于 pBR 322 的全部碱基序列 (4,362 碱基对) 已被测定,它本身所具有的各种内切酶切点的数目和位置就成为

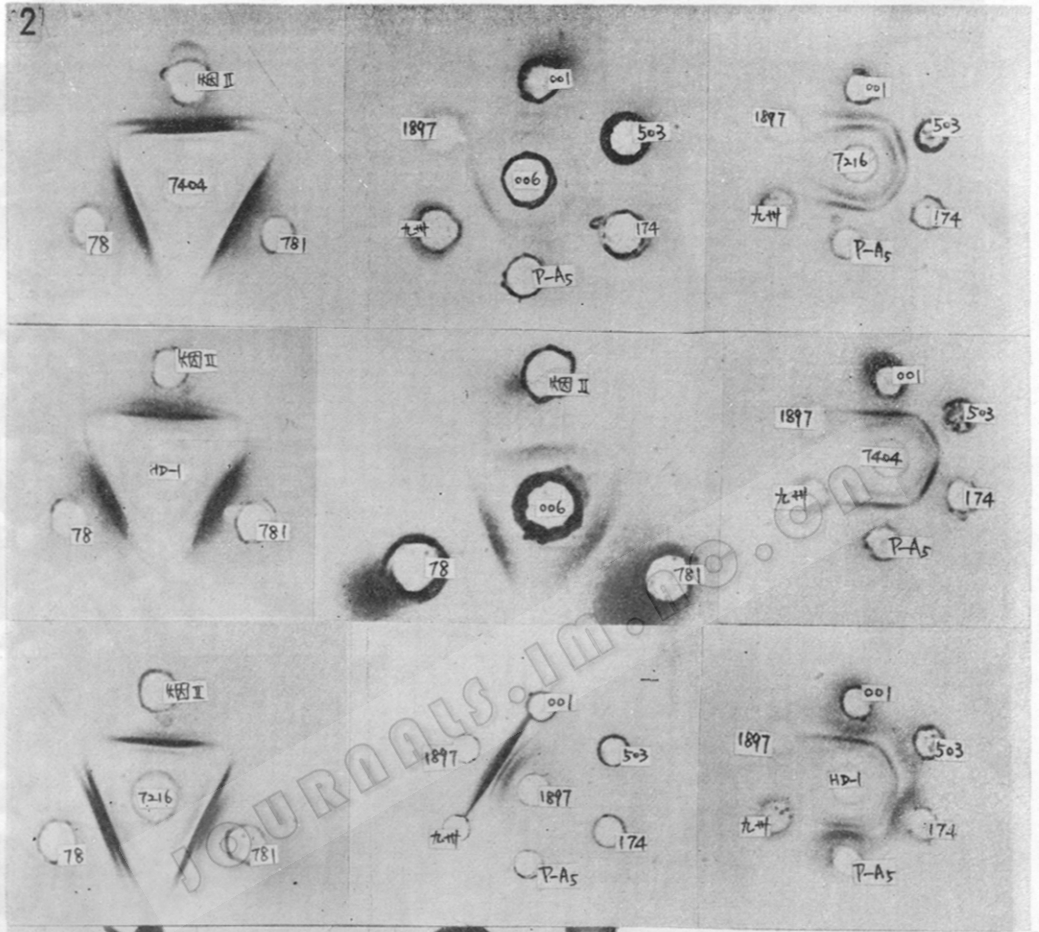
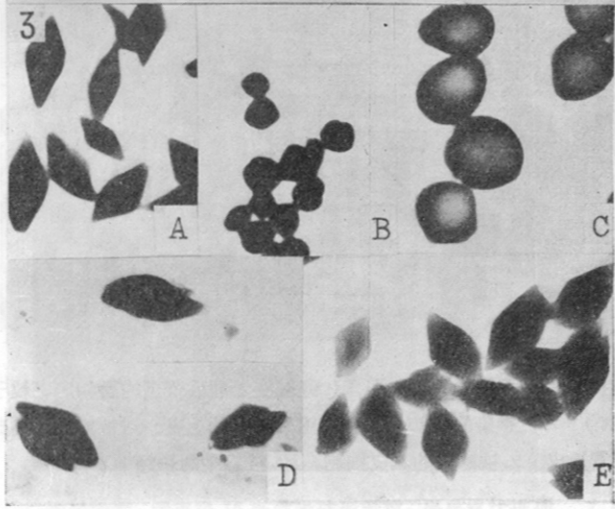


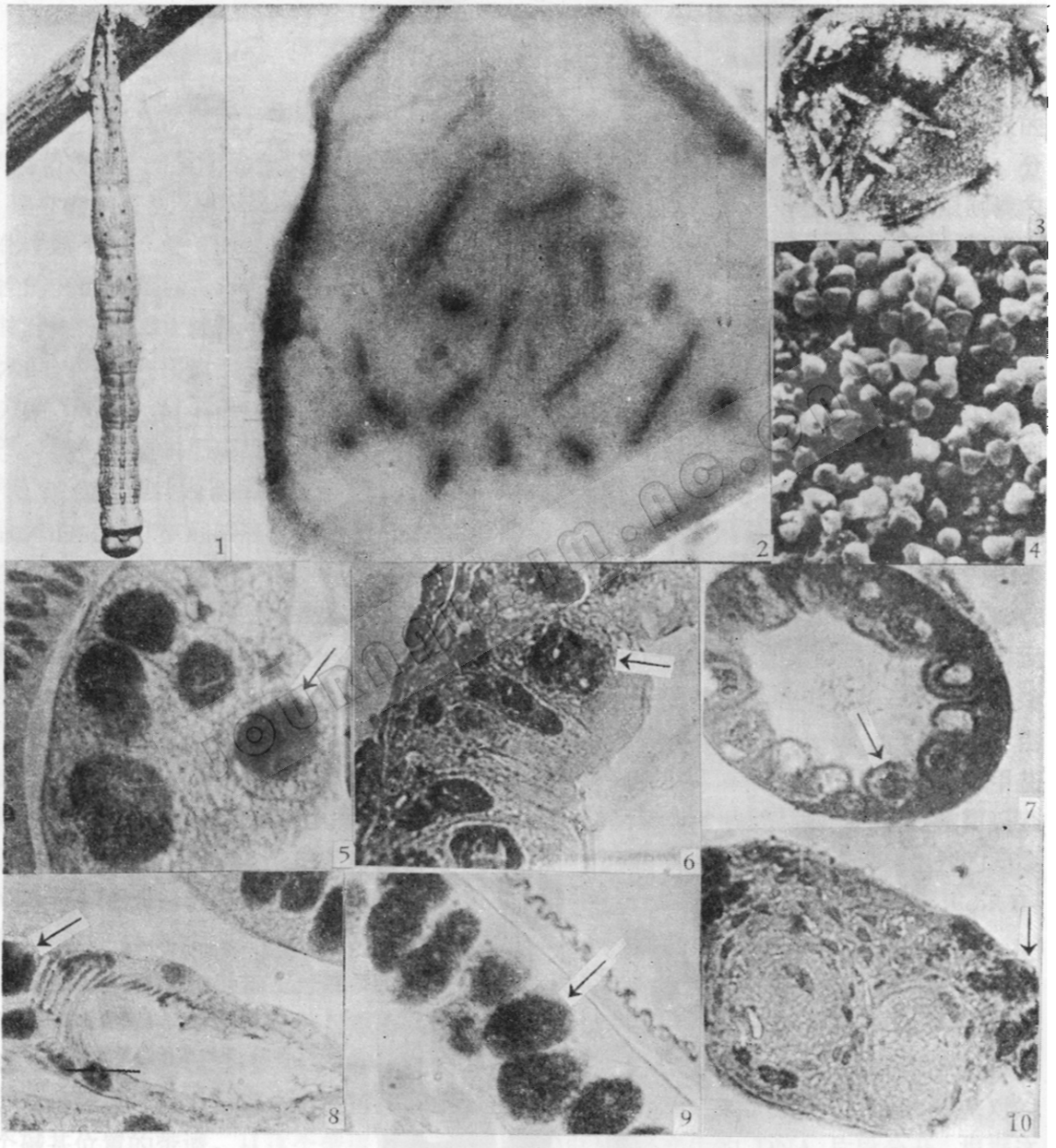
图2. 双向免疫扩散

中央孔为晶体蛋白抗血清
周围孔为晶体蛋白抗原

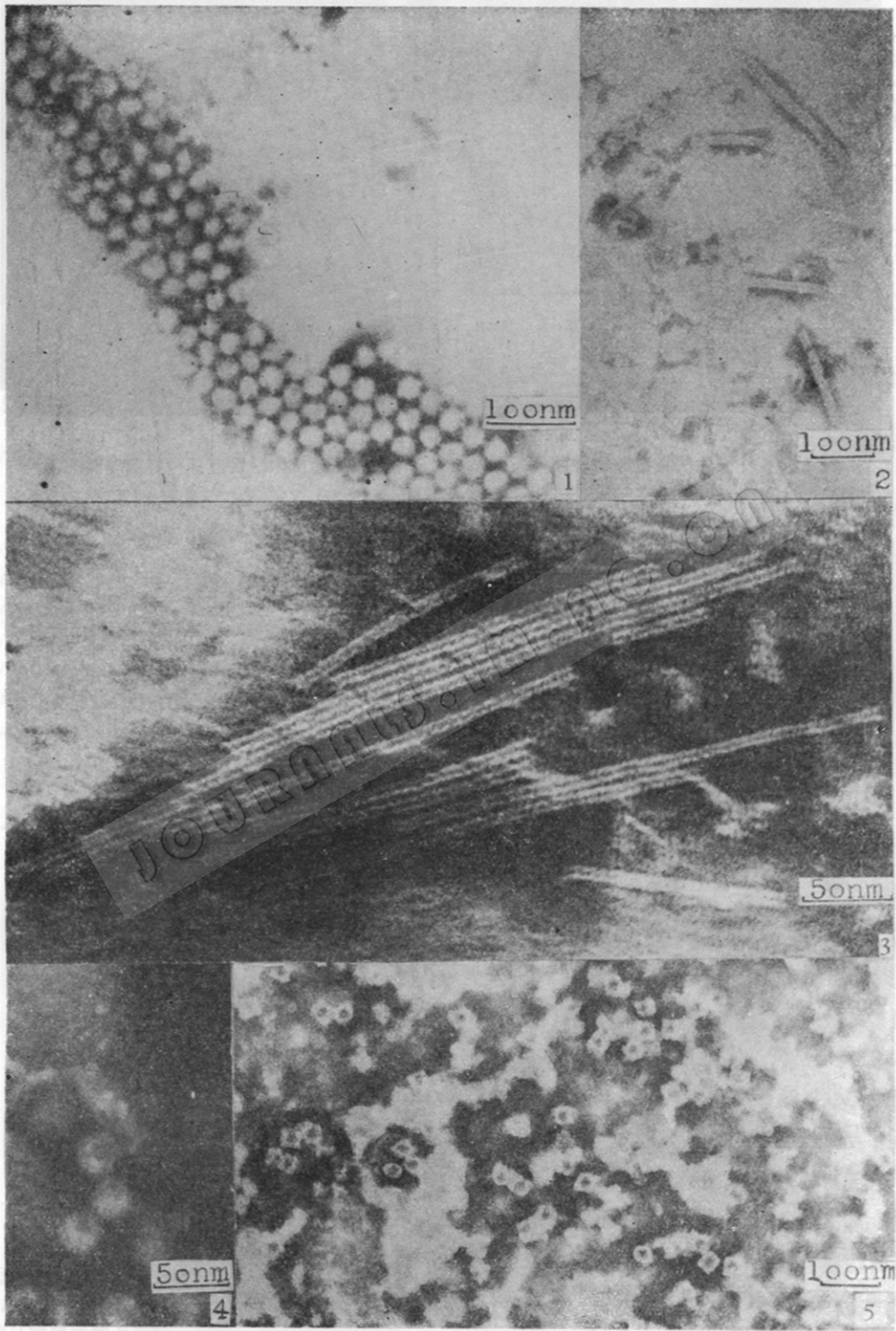
图3. 灭蚊菌株的晶体形态

- A. 烟 II (10, 400×)
- B. 1897 (5, 760×)
- C. 九州 (10, 400×)
- D. P-A₅ (10, 111×)
- E. 503 (7, 475×)





1. 感病幼虫死亡症状 2. 多角体超薄切片(67,500 \times) 3. 多角体经碱液处理后留下的膜和病毒粒子(18,000 \times) 4. 多角体扫描(2750 \times) 5. 被感染的脂肪体 6. 被感染的中肠上皮 7. 被感染的马氏管 8. 被感染的气管上皮 9. 被感染的真皮细胞 10. 被感染的神经



1.香菇病毒，示直径36毫微米球形颗粒，呈晶格状排列。2.茯苓粗棒状颗粒。3.茯苓细棒状颗粒，亚基隐约可见。4.茯苓球状颗粒。5.银耳球状颗粒，负染料透入核心。

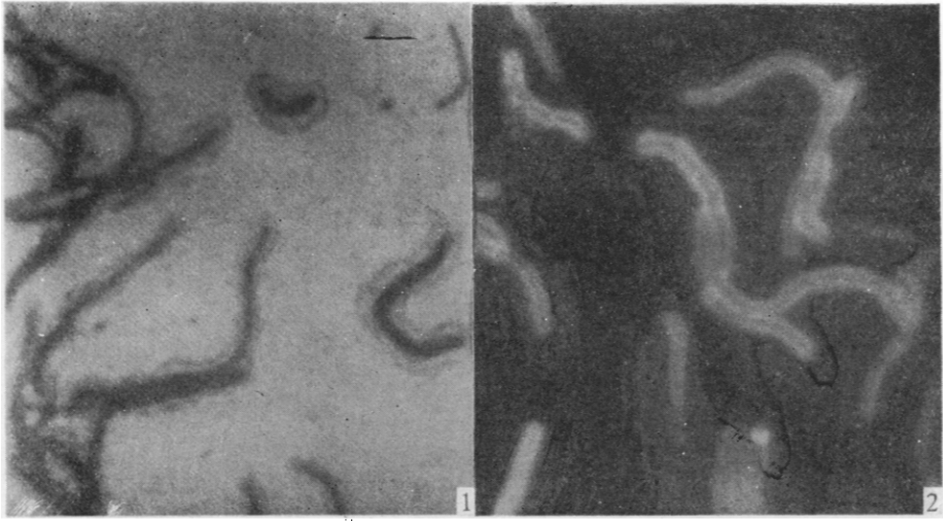


图1 免疫染色法炭疽芽孢杆菌荚膜形态

图2 荧光抗体法炭疽芽孢杆菌荚膜形态

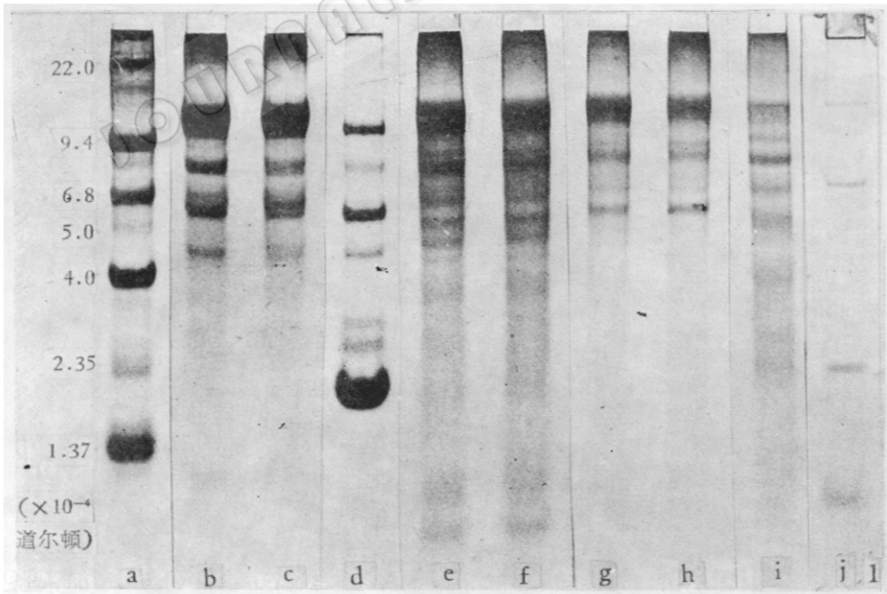


图1 苏芸金杆菌晶体蛋白 S. D. S 板状凝胶电泳图谱

a. 标准蛋白 b. 781 c. 78 d. 1897 e. 174 f. P-A5 g. 001 h. 503 i. 烟II j. 九州

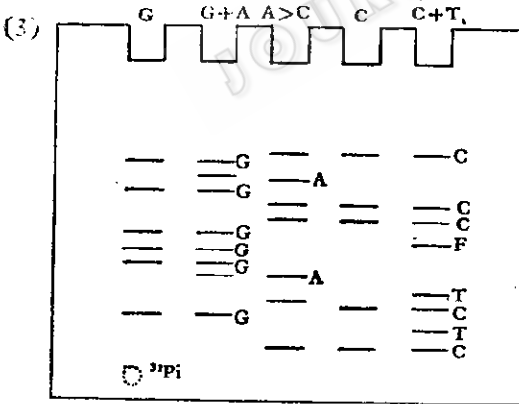
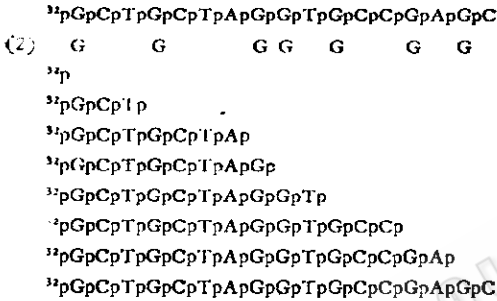
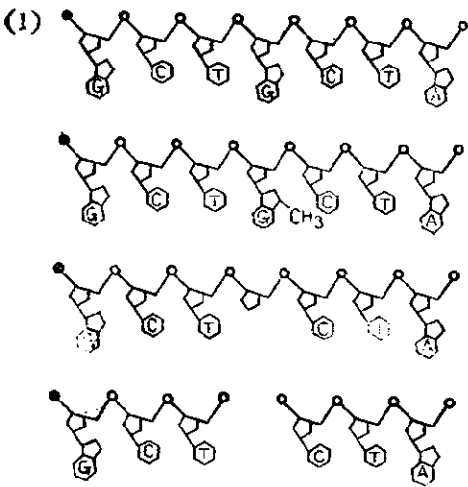


图1 Maxam-Gilbert 化学断裂法基本原理

- (1) 对 G 专一的部分切断反应: 5' 末端标记的每个 DNA 分子中只有一个 G 被甲基化; 甲基化的碱基被从脱氧核糖上切除, DNA 链在失去碱基的脱氧核糖两侧被切断。
- (2) 经过对 G 专一的部分切断反应后产生的一组包含 5' 标记末端的长短不同的片段。
- (3) 从 5 个碱基专一性反应得到的部分切断产物在凝胶电泳分离后的放射自显影带谱。

表 1 产生 5'-凸出末端的 15 种内切酶

内切酶	识别序列	产生片段的末端结构
Hinf I	GANTC	pANTC _{3'} NN GNN
Hpa II (Msp I)	CCGG	pCC _{3'} NN CNN
Sau 3A	GATC	pGATC _{3'} NN NN
Taq I	TCGA	pCGANN TNN
EcoR II (BstN I)	CC _{3'} GG	pCC _{3'} KGNN NN
Ava II	GC _{3'} CC	pGC _{3'} CNN GNN
Ava I	CYCGRG	pYCGR _{3'} NN CNN
BamH I	GGATCC	pGATCC _{3'} NN GNN
Bgl II	AGATCT	pGATCT _{3'} NN ANN
EcoR I	GAATTC	pAATTC _{3'} NN GNN
Hind III	AAGCTT	pAGCTT _{3'} NN ANN
Sal I	GTCGAC	pTCGAC _{3'} NN GNN
Xba I	TCTAGA	pCTAGAN _{3'} NN TNN
Xho I, Blu I	CTCGAG	pTCGAG _{3'} NN CNN
Xma I	CCCGGG	pCCGGG _{3'} NN CNN

精确的参考标志。当用 EcoRI 酶解这个杂交质粒后,得到了长 5,100 碱基对和 1,250 碱基对的二个片段。从 pBR 322 的单个 EcoRI 切点和单个 PstI 切点(已因插入 DNA 而被破坏)的位置可容易地推定插入 DNA 中有一个 EcoRI 切点,它离插入 DNA 的靠近 pBR 322 EcoRI 切点的末端约 500 个碱基对。若用 BamHI 酶解得到 3,900 碱基对和 2,430 碱基对二个片段,可推定插入 DNA 中有一个 BamHI 切点,它离插入 DNA 的远离 pBR 322 EcoRI 切点的末端约 700 个碱基对(图 2-1)。

对于切点较多的内切酶位点,可将这种内切酶酶解 DNA 后产生的片段,与该种内切酶

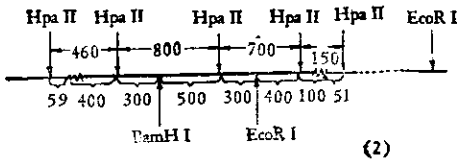
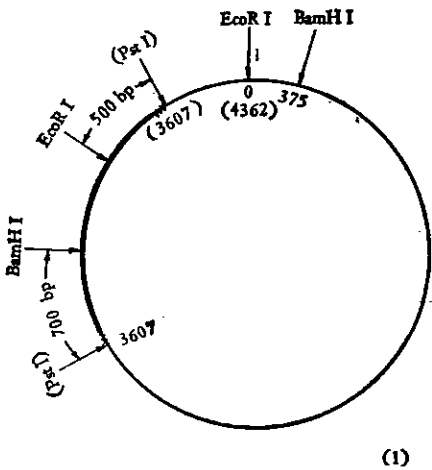


图2 在 pBR 322 的 Pst I 插入的长 2,000 碱基对 (bp) 的 DNA 中内切酶切点的定位。

- 粗线代表插入 DNA, 曲线代表 dA、dT 尾巴。
- (1) 插入 DNA 中单个 EcoR I 切点和单个 BamH I 切点的位置。圆圈内的数字为该切点在 pBR 322 中的位置。
 - (2) 插入 DNA 中 Hpa II 切点的位置。图中数字为碱基对长度。pBR 322 的其余部分未在图中示出。

和已知切点位置的切点较少的内切酶混合酶解后产生的片段比较, 从被已知切点位置的内切酶切断而消失了了的片段和新产生的片段的大小来推定该种内切酶的位点。例如图 2 的含 2,000 碱基对插入 DNA 的杂交质粒经 Hpa II 酶解后, 经与 pBR 322 的 Hpa II 酶解后产生的片段比较, 发现多 4 个片段 (pBR 322 中原来含 Pst I 切点的那个长 110 碱基对的 Hpa II 片段在杂交质粒-Hpa II 酶解物中理应消失), 它们

的长度分别为 800, 700, 460, 150 碱基对。杂交质粒经 Hpa II + EcoR I 的混合酶解, 700 碱基对片段消失, 新增加了 400 碱基对和 300 碱基对二个片段, 说明 700 碱基对片段含有 EcoR I 切点, 即插入 DNA 中有二个 Hpa II 切点位于 EcoR I 切点两侧; 将杂交质粒用 Hpa II + BamH I 混合酶解, 800 碱基对片段消失, 新增加了 500 碱基对和 300 碱基对二个片段, 这样就可确定插入 DNA 中另一个 Hpa II 切点的位置 (见图 2-2)。

在上述酶图分析中, 依靠溴化乙锭的染色来检出 DNA 片段。Smith 和 Birnstiel 发展了一种简单、快速的酶图分析方法⁽¹²⁾, 他们将只有一个末端被 ³²P 标记的 DNA 片段用要测定其切点位置的内切酶进行部分酶解, 凝胶电泳分离这些部分酶解的产物, 放射自显影后得到一组长短不同的 DNA 片段, 与 ³²P 标记的 DNA 分子量参照物比较后得知这些部分酶解产物的长度。标记 DNA 片段的数目 (未被酶解的完整片段不算在内) 就是该种内切酶切点的数目, 这些片段的长度就是这种内切酶的切点离标记末端的距离。这种方法特别适合于测定切点较多的内切酶的位点, 即使对于相距很近的切点和离 DNA 分子末端很近的切点也能清楚地显示出来, 而用完全酶解和溴化乙锭染色的方法往往由于泳动位置靠前甚至走出凝胶以及 DNA 量小荧光颜色浅而检查不出由这类切点产生的小片段。

在建立了初步的限制性内切酶图谱、开始序列分析后, 随着序列结果的积累, 还会发现更多的在进一步的序列分析中有用的内切酶切点。

(待续)