

# DNA 顺序有序测定中特定亚克隆的 简便检出

吕幼仪 倪福弟 洪国藩

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

在按非随机法测定策略由 DNase I 处理获得大量亚克隆后, 随机从中选出一些亚克隆测定其 DNA 顺序, 就可以迅速获得几组彼此不相联的亚克隆组, 以这些亚克隆组首尾的克隆作电泳对照, 与混合克隆同时电泳, 就能方便地检出填平克隆组间空缺的特定亚克隆。用此方法, 我们迅速完成了对含有 psr 基因的 4064bp DNA 片段的 DNA 顺序测定。

**关键词** DNA 顺序测定; psr 基因; SDS-琼脂糖电泳

共生生物固氮是一个极为复杂的体系, 最近人们发现固氮菌的胞外粘多糖 (Exopolysaccharide, EPS) 的合成可被粘多糖合成抑制基因 (Polysaccharide synthesis inhibition, psi) 所关闭, 而 psi 的关闭作用又可被粘多糖恢复基因 (Polysaccharide restoration, psr) 打开。在某些固氮菌中, EPS 合成受抑后该菌株不能结瘤。psr 能将含有 psi 基因的固氮菌由 EPS<sup>-</sup>转为 EPS<sup>+</sup>, 从而参与对生物固氮的调节<sup>[1,2]</sup>。本文通过对含有 psr 基因的 DNA 片段的全顺序 (4064bp) 的测定, 发现了原核细胞 *R. leguminosarum* 染色体中含有与真核细胞相似的基因, 同时提出了能简便地填平 DNA 顺序测定中必然造成的空缺的方法。

自 1982 以来, 很多人利用双脱氧核苷酸链端终止法和噬菌体 M13 系统作非随机 DNA 顺序测定<sup>[3-10]</sup>, 但如何快速筛选出彼此仅相差 200—300bp 的有效亚克隆, 仍是一个重要而没有很好解决的问题。我们试图把混合克隆的培养和分离结合起来, 结果证明可以简便地选出特定的亚克隆, 从而使提高了对含有 psr 基

因的 DNA 片段 (4064bp) 的双向非随机顺序测定速度。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材 料

限制性内切酶 EcoR I, Sal I 为 Bio-labs 产品, T4-DNA 连接酶, DNase I, DNA 聚合酶 I (Klenow fragment) 为 Boehringer 产品,  $\alpha$ -<sup>35</sup>S dATP 为中国科学院上海原子核所及本所东风生化试剂厂联合生产,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP 为 Amersham 产品。

### (二) 方法和原理

1. 有序亚克隆的制备: 使用非随机法<sup>[3]</sup>获得以 M13mp18 及 M13mp19 为克隆载体的含 psr 基因的 DNA 片段的双向亚克隆。

2. 不连续的 DNA 片段组的获得: 根据统计学原理可知, 在顺序测定初期, 随机选择一些亚克隆测定其顺序, 这些克隆顺序间彼此重复的概率是极低的。将所得的数据用计算机处理, 把彼此有重叠序列的亚克隆顺序连接起来, 便可迅速获得

本文于 1988 年 8 月 5 日收到。

几组彼此不相连的亚克隆组。在本实验过程中,我们随机选择了 58 个亚克隆即获得 8 个亚克隆组(图 1),其总长 3791bp,而这个测定过程只需要三个星期。

3. 亚克隆组间空缺的填补——特定亚克隆的挑选:获得了 8 个亚克隆组后,怎样把它们连起来以完成整个基因的顺序,这是关键的一步,也是非随机顺序测定的限制因素。我们发现,利用混合克隆培养和分离的想法是成功的。因为它使我们能简便地找到我们所需要的特定亚克隆。从而迅速地将原来不连续的各个亚克隆组连接起来而完成对整个 DNA 片段的顺序测定。这个方法的原理基于下面的这样模拟实验:选择 7 个已知序列的克隆,其大小从 7kb

—11kb,每个克隆的大小相距大约 500bp,它们在单独时可在 Agarose 凝胶上按分子量大小排列(如图版 I-A)。把这 7 个克隆放在同一个 1.5ml 的 2TY 培养基中,加 1%JM101 过夜菌混合培养,然后离心得到噬菌体上清液。以每个 DNA 的浓度大约 100ng 上样量,经 1%Agarose-SDS 电泳分离,得到有 7 个中心点的一条线。每个中心点的 DNA 经回收后<sup>[11]</sup>,用 1/10 的量进行 Hanahan 方法<sup>[12]</sup>转化,可得到噬菌斑 30—50 个。随机挑若干个噬菌斑做成 ss-DNA,鉴定其大小,结果至少有 50% 的 ss-DNA 与混合以前相应位置的 ss-DNA 大小相同。它们的 DNA 顺序也和混合前的克隆完全相同。

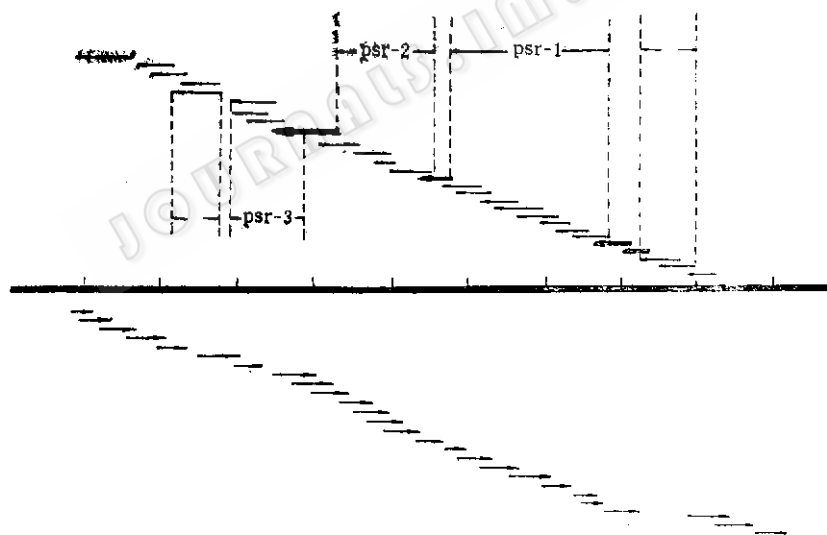


图 1 含有 *psr* 基因的 DNA 片段中,各亚克隆组和单独亚克隆的排列

Fig.1 The arrangement of the sequenced subclones of the DNA fragment containing the *psr* gene

图中:粗线示含 *psr* 基因的 DNA 片段,线上为 M13mp18 为载体的各亚克隆, *psr*-1, *psr*-2, *psr*-3 为顺序初期所得的三组不相连的大亚克隆组,位于组间空缺的亚克隆(用粗线箭头示)用文中所述的方法筛选所得。线下为 M13mp19 为载体的各亚克隆

In the Fig.1 DNA fragment containing *psr* gene indicated by the solid line, the upper lines indicated the sequenced subclones with M13mp18 as vector, *psr*-1, *psr*-2, *psr*-3 were individual contiguous DNA sequences obtained after sequencing some random picked subclones. The subclones (solid arrow) required to fill in the gaps were easily found according to the text. The under lines indicated the sequenced subclones with M13mp19 as vector



SDS 的颜料, 分别上样在加样孔里。在一块  $23 \times 18$  ( $\text{cm}^2$ ) 的平板琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 经 E.B 染色后, 在紫外灯下找出位于每组亚克隆首尾克隆间的 DNA, 分别回收这些点的 DNA<sup>[11]</sup>, 经转化感染大肠杆菌 JM101, 再从中挑选出若干单克隆与亚克隆组首尾的克隆再次进行比较。我们发现在这样随机挑出的克隆中找到我们所需要的特定克隆的几率为 50% 左右。即每挑二个克隆就可以找到一个我们所需要的克隆去填平克隆组之间的空缺, 从而完成 DNA 全顺序的测定。

4. 混合克隆分离的电泳条件: 电泳分离混合克隆, 并不需要花时间制备 ss-DNA, 只要将噬菌体上清液与含有 SDS 的颜料混合后直接上样电泳就可以了。我们使用的 SDS 颜料的成分如下: 1% SDS, 0.05% 溴酚蓝, 0.2mol/L EDTA 和 50% 甘油, 在 0.8% - 1% 琼脂糖电泳 (2—3 V/cm) 过夜, 缓冲液系统用 TBE (0.089mol/L Tris-base, 0.089mol/L boric acid, 0.002mol/L EDTA) 经 E.B 染色后, 即可见亚克隆按分子量大小排列〔请参阅图版 (I-B)〕。

5. DNA 回收, 制备等实验按 Hong<sup>[3,11]</sup> 方法。

## 结 果

根据上述原理, 我们首先从 M13mp18

为载体的亚克隆随机选择了 58 个亚克隆, 即获得 3 个克隆组和 5 个单独小片段, 总共积累数据 3791bp, 接着我们用上述方法从混合克隆中选出填平空缺所需要的特定的亚克隆, 对这些特定亚克隆的 DNA 顺序测定, 即完成整个 DNA 分子的分析。图 1 表明了全部亚克隆组和特定亚克隆的分布情况。

利用同样的方法完成了对 DNA 片段另外一向 (M13mp19 为载体) 的测定 (图 1), 获得的 DNA 全顺序请见 (图 2)。

## 讨 论

我们发现把混合克隆的培养、分离的想法用于选择特定的亚克隆是成功的。它简便、省时。我们的实验证明: 混合克隆的上样量不能超过  $0.10\mu\text{g}/\text{mm}^2$  (单位面积电泳样品的负荷量)。

我们也发现, 如果数十个以上克隆混合培养将发生亚克隆的严重缺失。我们尚不清楚这是什么原因。但十个以内的克隆混合培养, 未观察到缺失现象。这是我们为什么把每组混合克隆控制在 7—10 个单克隆的原因之一。另外, 我们也发现如果多于十个克隆的混合培养, 实际电泳分辨率也会降低, 并会造成电泳总上样量的超负荷。

## 参 考 文 献

- [1] Finan, T. M. et al.: *Cell*, 40:867, 1985.
- [2] Borthakur, D. et al.: *Mol. Gen. Gent.*, 200:278, 1985.
- [3] Hong, G. F.: *J. Mol. Biol.*, 158:539, 1982.
- [4] Poncz, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79:4298, 1982.
- [5] Guo, L. H. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 11:5521, 1983.
- [6] Henikoff, S.: *Gene*, 28:351, 1984.
- [7] Li, Q. L. & Wu, G. D.: *Gene*, 56:245, 1987.
- [8] Misra, T. K.: In *Methods in Enzym.*, Academic Press, U. S. A., Vol. 155, 119—138, 1987.
- [9] Henikoff, S.: In *Methods in Enzym.*, Academic Press, U. S. A., Vol. 155, 156—165, 1987.
- [10] Dale, R. M. K. & Arrow, A.: In *Methods in Enzym.*, Academic Press, U. S. A., Vol. 155,

204—213, 1987.

[11] Hong, G. F.: In *Methods in Enzym.*, Academic Press, U. S. A., Vol. 155, 93—110, 1987.

[12] Hanahan, J. *Mol. Biol.*, 100:557, 1983.

## A SIMPLE AND RAPID METHOD TO SELECT THE PARTICULAR SUBCLONES REQUIRED TO FILL UP THE GAPS BETWEEN THE CONTIGUOUS DNA SEQUENCES

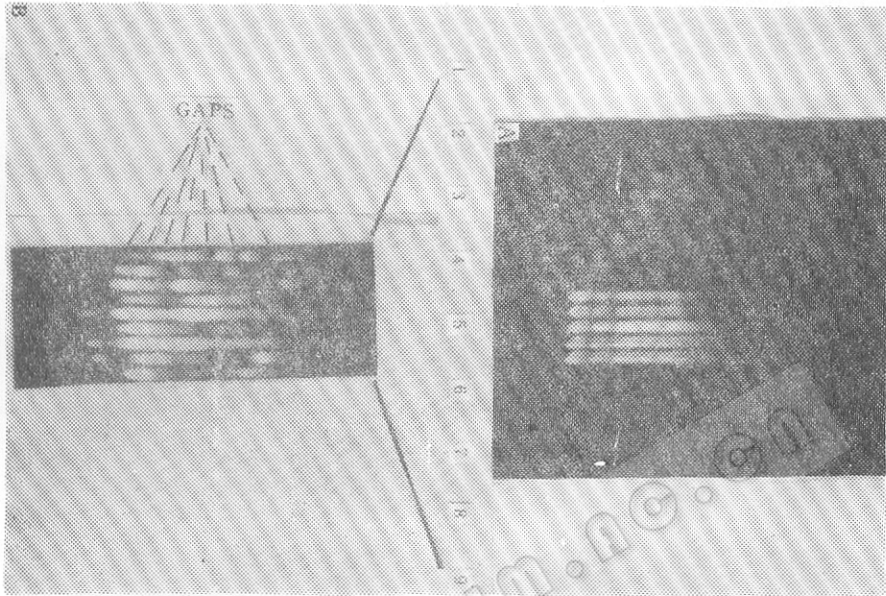
Lu Youyi Ni Fudi Hong Guofan

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Shanghai*)

In this paper, We described a simple and rapid method to fish out the subclones required to fill up the gaps created between individual contiguous sequences. The subclones were generated by the non-random DNase I strategy. The contiguous DNA sequences were rapidly formed after sequencing of some amount of random-picked subclones. The subclones required to fill in the gaps were easily found by gel electrophoresis of mixed subclones, which were co-electrophoresed with the subclones as markers that were located at all the ends of the individual contiguous sequences.

### Key words

DNA sequencing; psr-gene; SDS-agarose gel electrophoresis



部分混合克隆的SDS-琼脂糖电泳分离图谱

SDS-agarose gel electrophoresis of mixed subclones

A: 已知顺序样品的分离 (从左到右为 1—13)

孔 1—7: 单个已知顺序克隆的分离, 它们间的DNA长度相差约 500bp

孔 9—13: 将 1—7 的克隆混合培养后分离

Electrophoresis of subclones with known sequence (left to right: 1—13)

Lanes 1—7, individual subclones, the difference in length between which is about 500bp

Lanes 9—13, mixture of subclones loaded on lanes 1 to 7.

Lanes 9—13 showed that all the individual subclones were very well separated

B: 混合样品的分离

孔 1: 各亚克隆组的首尾克隆样品

2—9: 各混合亚克隆样品

孔图示表明如在孔 3、孔 8 等的混合样品中可以找到填补空缺的克隆

Electrophoresis of subclones picked up at random.

Lane 1, the subclones located at the ends of individual contiguous sequences

Lane 2—9, subclones picked up at random. It was showed that the Bridging subclones could be found in, for instance, Lane 3 and Lane 8