

高温反向顺序测定

吕幼仪 叶盛钰 洪国藩

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

单链克隆DNA的反向测序是一个简单和快速的方法, 这个方法可利用原来的DNA再进行反向顺序测定, 从而达到校正和积累DNA数据的作用。由于反向测序的本质是双链测序, 所得到的DNA顺序的图谱背景较深, 伴有杂带, 或在X光显影上是不清晰的。本文报道利用我们实验室所开发的热稳定性的Bst聚合酶系统, 进行反向测序克服了这些缺点, 获得的图谱可以和单链DNA模板测序的图谱相媲美。我们以nod D 487-mp 8 ss-DNA为模板进行反向测序, 证明Bst聚合酶在65℃反应能得到满意的结果。

关键词 DNA反向顺序测定; Bst聚合酶

DNA顺序分析的两个方法已经确立^[1,2]。Sanger的末端终止法需要单链DNA作为模板, 已经证明是一个非常快速地积累DNA顺序信息的方法。从一个插入

末端测定大约有300核苷酸的DNA片段通常是很容易得到的, 但是被插入的DNA经常是比较长的, 而且一次测定准确性也不高。因此, 在1981年洪国藩提出了单链反

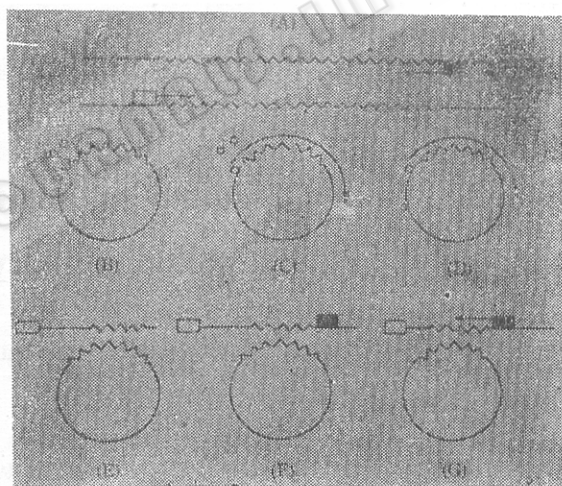


图1 两个方向的DNA测序

Fig.1 Diagram illustrating the strategy for DNA sequencing in both directions

□ 正向引物 The first primer; ■ 反向引物 The second primer; ~ 插入的DNA Inserted DNA

A. 两个方向的DNA测序。正向顺序测定按 Sanger 等. (1977) 方法; 反向测序方法如下:

B. 退火正向引物到M13载体; C. 用Bst聚合酶合成新的模板; D. 去除多余的正向引物; E. 变性拆开双链; F. 退火反向引物到新的模板上; G. 用末端终止法对新合成模板测序

A. Illustrating the principle of DNA sequencing in both directions. Sequencing with the first primer is according to Sanger et al. (1977) Sequencing with the second primer is shown below.

B. Annealing the first primer to the vector; C. Making a template with Bst polymerase; D. Removing the first primer; E. Denaturing the double-stranded DNA; F. Annealing the second primer to the template; G. Sequencing the synthesized template using the terminator method

本文于1990年11月16日收到。

向DNA顺序测定法^[3]。此方法主要是用反向引物作第二次顺序测定,使DNA顺序测定可以从两个相反方向进行。于是,如果插入的DNA片段大于300bp,通过反向测定可以多读至一倍的DNA顺序,同时,如果插入的片段少于300bp,那未通过反向测序可以核对原有的DNA顺序。

这个方法的要点概括在图1中。用Bst聚合酶和4种dNTPs加一个正向引物首先合成一个有插入顺序的单链DNA的拷贝,这个拷贝可作为第二次测序反应的模板。第二步就是变性上述反应产物,并加入反向引物进行测序。我们用速冷法和碱法都可以达到反应物变性的目的。模板的制备大约只要2.5h,这样我们就可以在一天时间里对一个单链克隆DNA完成双向DNA顺序测定。

两个方向的DNA测序原理见图1。

材 料 和 方 法

(一) 材料

Bst聚合酶为本实验室制备(5u/ μ l)^[4]; *E. coli* DNA聚合酶I Klenow片段为Boehringer Mannheim产品(5u/ μ l); (α -³²P)dATP(400Ci/mmol)为Amersham产品;正向引物(GTAAACGACGGCCAGT)和反向引物(CAGGAAACAGCTATGAC)均为New England Bio-Labs产品; nodD 487-mp8 ss-DNA^[6]制备及测顺序的方法均按Sanger方法;测顺序的Kit为Bio-Rad公司提供。

(二) 方法

1. 拷贝双链DNA

(1) 用于速冷法变性的双链DNA^[3]: nodD 487-mp8 ss-DNA 5 μ l (约0.2pmoles)加2 μ l正向引物(1.0pmole)和1 μ l反应缓冲液(100mmol/L Tris-

HCl pH8.3, 100mmol/L MgCl₂·6H₂O), 再加2 μ l重蒸水,反应体积为10 μ l。反应混合物经100℃, 3min加热后慢慢冷却至室温(约30min), 然后加2 μ l 0.5mmol/L dNTPs(每种0.125mmol/L), 再加1 μ l Bst聚合酶, 在65℃保温反应15min。Klenow酶在同样条件下室温反应。

(2) 用于碱变性的双链DNA^[6]: nodD 487-mp8 ss-DNA 15 μ l 约(0.6pmoles)和6 μ l正向引物(3pmoles)加3 μ l反应缓冲液(同上), 再加6 μ l重蒸水, 反应体积为30 μ l, 反应混合物经100℃ 3min加热后慢慢冷却至室温(约30min), 然后加6 μ l 0.5mmol/L dNTPs(每种0.125mmol/L), 再加1 μ l Bst聚合酶, 在65℃保温反应15min。Klenow酶在同样条件下室温反应。

2. 去除正向引物: 参照文献[3], 反应混合物加等体积1.6mol/L NaCl, 13%PEG-6000, 混匀, 在0℃放45min, 然后17000rpm离心10min, 用毛细管小心吸去上清液, 加50 μ l 0.8mol/L NaCl, 6.5% PEG-6000, 离心5min, 用同样的方法小心吸去上清液, 这样反复两次, 沉淀溶于50 μ l H₂O中加25 μ l TE饱和的酚抽提两次, 乙醚去酚, 再用通常的方法沉淀DNA。

3. 双链DNA变性和反向引物退火到模板上

(1) 速冷法^[3]: nodD 487-mp8 ds-DNA溶于8 μ l H₂O中加1 μ l反向引物(0.5pmoles)加1 μ l反应缓冲液(同上), 100℃加热3min, 立即放入干冰骤冷1min, 取出融化, 在室温放20min。

(2) 碱法^[6]: nodD 487-mp8 ds-DNA溶于10 μ l TE(pH8.0), 加10 μ l 0.4mmol/L NaOH, 0.4mol/L EDTA, 28℃保温5min, 然后加2 μ l 2mol/L

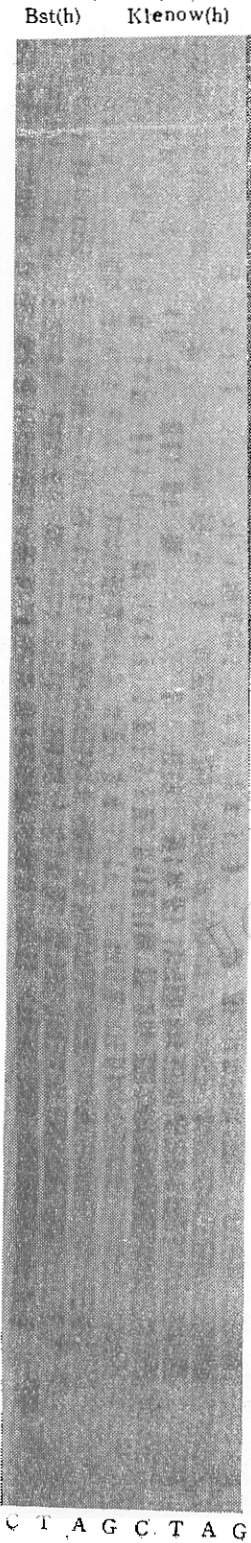


图 2 反向测序的放射自显影图
(模板DNA用速冷法变性)

Fig.2 Autoradiograph showing the result of reverse sequencing
(The template DNA was denatured by the quick quench method)
加样孔的次序为C.T.A 和 G. 测序的DNA是nodD487-mp8 ds-DNA. (看正文)
The lane order was C.T.A. and G. The DNA Sequenced was nodD 487-mp8 ss-DNA (see Text).

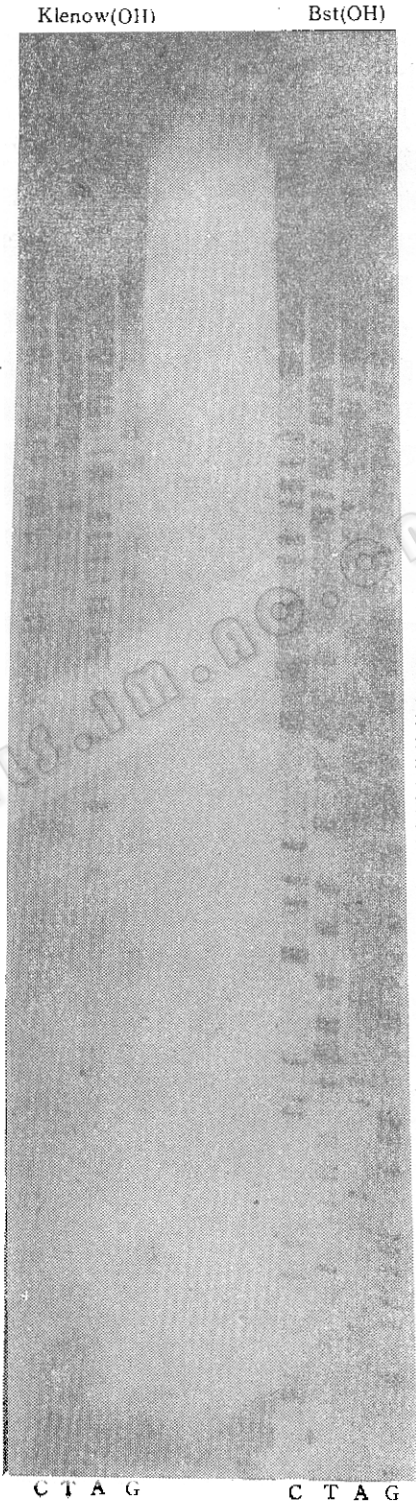


图 3 反向测序的放射自显影图
(模板DNA用常规的碱法变性)

Fig.3 Autoradiograph showing the result of reverse sequencing
(The template DNA was denatured by the conventional alkaline method)
加样孔的次序为C.T.A 和 G. 测序的DNA是nodD 487-mp8 ds-DNA
The right four lanes displayed the sequence pattern obtained by using Bst polymerase. The
left four lanes displayed the sequence pattern obtained by using Klenow enzyme.

NH_4Ac (pH 4.5) 中和, 再加 3 μl 反向引物 (1.5 pmol), 在室温放 15 min, 加无水乙醇 62.5 μl , 室温放 15 min, 17000 rpm 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇淋洗一次, 17000 rpm 离心 5 min, DNA 真空干燥, 溶于 9 μl TE 中, 加 1 μl 反应缓冲液 (同上)。

顺序测定方法按 Sanger^[2] 法, 反应的试剂用 Bio-Rad DNA Sequencing Kit。

结 果

我们利用 Bst 聚合酶, 以 nodD487-mp8 ss-DNA 为模板, 用上述方法拷贝成双链, 然后去除多余的正向引物, 再用速冷法或碱法变性双链 DNA, 测定其反向顺序, 无论是速冷法变性还是碱法变性都能得到满意的结果。用 *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片段反应, 同样的处理出现了较多杂带。

图 2 是速冷法变性 487-mp8 ds-DNA 反向测序的放射自显影图, 左边的顺序图谱是用 Bst 聚合酶在 65°C 反应; 右边的顺序图谱是用 *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片段在 25°C 反应。从图可看出 Klenow 酶反应产生了许多杂带, 而 Bst 酶反应得到了满意的结果。

图 3 是碱法变性 487-mp8 ds-DNA 反向测序的放射自显影图, 右边的顺序图

谱是用 Bst 聚合酶在 65°C 反应; 左边的顺序图谱是用 *E. coli* DNA 聚合酶 I Klenow 片段在 25°C 反应。从图中可明显地看出 Klenow 酶反应条带很淡, 还伴有杂带, 而 Bst 酶反应得到很清晰的图谱, 顺序能很顺利地读出来。

nodD 487-mp8 DNA 的正向测序与反向测序结果的比较, 得到完全符合的正反向互补的顺序。如图 4 所示。

图 4 是 nodD 487-mp8 ss-DNA 正反向测序图谱及顺序。

讨 论

由于反向测序的本质是双链测序, 所得到的 DNA 顺序图谱往往背景较深, 伴有杂带, 或在 X 光显影上是不清晰的。我们用高温 DNA 聚合酶进行反向测序可以克服这些缺点, 这是由于在 65°C 反应时 DNA 链中的二级结构解开, 使原来在凝胶上不能顺利读出来的顺序能够顺利地读出来。

我们的实验证明碱法变性反向测序需要较多的 DNA 量 (1 - 2 μg 之间), 而速冷法变性反向测序操作简单, 要求较少的起始单链 DNA (比单链测序略多二分之一)。

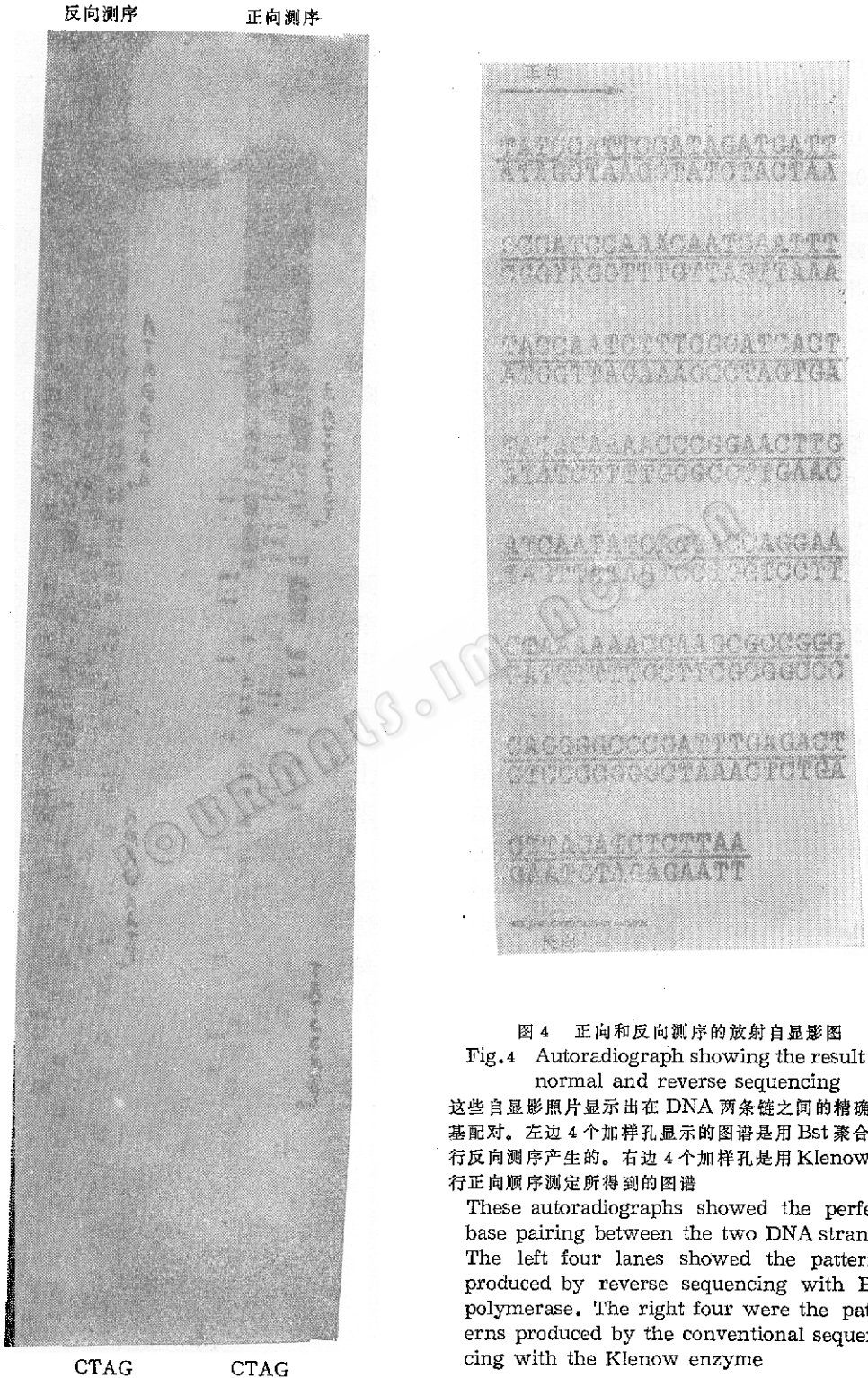


图 4 正向和反向测序的放射自显影图

Fig.4 Autoradiograph showing the result of normal and reverse sequencing

这些自显影照片显示出在 DNA 两条链之间的精确的碱基配对。左边 4 个加样孔显示的图谱是用 Bst 聚合酶进行反向测序产生的。右边 4 个加样孔是用 Klenow 酶进行正向顺序测定所得到的图谱

These autoradiographs showed the perfect base pairing between the two DNA strands. The left four lanes showed the patterns produced by reverse sequencing with Bst polymerase. The right four were the patterns produced by the conventional sequencing with the Klenow enzyme

参 考 文 献

- [1] Maxam, A.M. & Gilbert, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 74:560—564, 1977.
[2] Sanger, F. et. al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 74:5463—5467, 1977.
[3] Hong, G. F.: *Bioscience Reports*, 1:243—252, 1981.
[4] Ye, S. Y. & Hong, G. F.: *Scientia Sinica (series B)*, 30:503—506, 1987.
[5] Hong, G. F.: *Nucl. Acids. Res.*, 15:9677—9690, 1987.
[6] Bio-Rad Lab., Instruction Manual Bst DNA sequencing Kit.

Reverse DNA Sequencing by Using the Heat-stable Bst Polymerase System

Lu Youyi Ye Shengyu Hong Guofan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Shanghai)

Reverse DNA sequencing was a simple and rapid method to check the available DNA data by sequencing the original DNA in the opposite orientation. Because this method has the double stranded sequencing nature, high background, extra bands occurred not unfrequently on the autoradiographs. These short comings have now been overcome by using the heat stable Bst polymerase system developed in this lab. The reverse DNA sequence patterns obtained by using this system were now fully comparable with those patterns generated on the single-stranded DNA template.

Key words

Reverse DNA sequencing; Bst polymerase