

# 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)

## 碱基专一性的化学切断反应

碱基专一性的部分切断反应包括以下三步: 1. 用具有碱基专一性的化学试剂对 DNA 分子中的某一种碱基进行部分修饰, 控制修饰反应的条件, 使 DNA 分子中每一个那样的碱基分别只在一部分 DNA 分子中被修饰; 2. 利用另一种化学试剂将被修饰的碱基从脱氧核糖上完全切除或置换掉; 3. 将 DNA 链在除去碱基的脱氧核糖两侧切断。常用硫酸二甲酯(DMS)作为鸟嘌呤(G)和腺嘌呤(A)的甲基化修饰剂, 利用G和A的甲基化反应速率的不同和甲基化G和甲基化A从脱氧核糖上被切除的速率的不同可以区分G和A。焦碳酸二乙酯也被用来修饰DNA中的G和A, 但它对G和A具有几乎相等的作用能力。用于修饰胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)的试剂是肼(HZ), 它可以打开嘧啶环, 并除去构成嘧啶环的部分结构, 生成核糖基尿素, 进而变成脲。高浓度盐的存在可抑制HZ与T的反应, 因而可以将C与T区分开来。在大多数碱基专一性反应中脲被用于置换那些经过修饰或改变的碱基, 并进而切断失去碱基的脱氧核糖两侧的磷酸酯键, 使DNA断链。表2列出了8个具有碱基专一性的化学切断反应。

DNA 片段的部分切断取决于某一种碱基的部分被修饰。为了控制 DNA 中某种碱基被修饰的数目, 可以改变修饰剂的浓度或修饰反应的温度和时间。修饰剂的浓度一般不宜变动。多通过延长或缩短反应的时间来增加或减少 DNA 中某种碱基被修饰的程度。

表 2 具有碱基专一性的化学切断反应

反应	碱基专一性	碱基修饰剂	修饰碱基的除去	链的切断
1	G>A (80%G, 20%A)	硫酸二甲酯	pH7 中加热	NaOH
2	A>G (55%A, 45%G)	硫酸二甲酯	酸	NaOH
3	G (100%G)	硫酸二甲酯	脲	脲
4	G+A (50%G, 50%A)	酸	酸	脲
5	G+A (50%G, 50%A)	焦碳酸二乙酯	脲	脲
6	A>C (85%A, 15%C)	NaOH	脲	脲
7	C (95%C)	肼+盐	脲	脲
8	C+T (60%C, 40%T)	肼	脲	脲

我们常采用表2中3、5、6、7、8五个反应导出 DNA 碱基序列。下面将逐个介绍这五个反应的实验要点。

从上节五(一)或五(二)得到的单个末端标记的 DNA 的洗脱液按下述比例分成5份转入 Eppendorf 管: 反应3(G)  $\frac{1}{7.5}$ , 反应5(G+A)  $\frac{2}{7.5}$ , 反应6(A>C)  $\frac{1.5}{7.5}$ , 反应7(C)  $\frac{1}{7.5}$ , 反应8(C+T)  $\frac{2}{7.5}$ , 在每份中加入  $2\mu\text{g}$  载体

DNA, 加入2—3倍体积乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置2小时或  $-70^{\circ}\text{C}$  放置30分钟。12,000×g 离心15分钟, 沉淀用70%乙醇洗一次后, 真空干燥15分钟。

载体 DNA 的制备: 小牛胸腺 DNA 经超声波处理后, 用60%甲酸水解, 用  $\text{NH}_4\text{OH}$  中

和后用乙醇沉淀。DNA 沉淀溶解后用酚萃取二次，水相用乙醇沉淀，然后溶于 0.01 N NaCl，根据  $A_{260nm}$  测定 DNA 溶液的浓度，稀释成 1mgDNA/ml。

## 一、对 G 专一的部分切断反应

原理：在 DMS 对 DNA 中的 G 和 A 进行部分修饰后，嘧啶可打开 7-甲基 G 环，除去修饰碱基，进行磷酸酯键的  $\beta$ -消去反应从而将 DNA 链切断。而在此条件下，3-甲基 A 不被开环，即使偶而开环也不能从糖基上被除去。

方法：在 DNA 沉淀（包括载体 DNA）中加入 200 $\mu$ l DMS 缓冲液（50mM 二甲胂酸钠，pH8.0，0.1mM EDTA），溶解后置于冰水中冷却。

加入 1 $\mu$ l DMS，于 20 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5—10 分钟。加入 50 $\mu$ l 冰冷的 DMS 反应终止液（1.5 M NaAc pH7.0，1.0M 2-巯基乙醇，100 $\mu$ g/ml tRNA），700  $\mu$ l 冰冷的无水乙醇。充分混合后在干冰中冷却 5 分钟。12,000 $\times$ g 离心 5—10 分钟，用滴管和毛细管小心吸去上清液。在沉淀中加入冰冷的 70% 乙醇，在干冰中放置 5 分钟，12,000 $\times$ g 离心 5 分钟，吸去上清液。

在沉淀中加入 250 $\mu$ l 0.3 M NaAc，加入 700  $\mu$ l 冰冷的无水乙醇，干冰中冷却 5 分钟，12,000 $\times$ g 离心 5—10 分钟，吸去上清液。在沉淀中加入冰冷的 70% 乙醇，在干冰中放置 5 分钟，12,000 $\times$ g 离心 5 分钟，吸去上清液。真空干燥 DNA 沉淀。

在沉淀中加入 20 $\mu$ l 新稀释的 1.0M 嘧啶水溶液，溶解沉淀后将溶液吸入毛细管，用小火将毛细管二端封死。放入 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 30 分钟。打开毛细管二端，将 DNA 溶液转入 Eppendorf 管，用 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 洗毛细管内部，合并洗涤液于 DNA 溶液中。在真空干燥器中将 DNA 溶液抽干。加入 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O，抽干；再加入 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O，抽干。

将沉淀溶于适量体积的凝胶电泳样品液（95% 甲酰胺，0.01 N NaOH，0.05% XC，0.05% BPB）。在 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 1 分钟，立即

于冰水中冷却，加样于序列分析凝胶上。

说明：1. DMS 是有毒的挥发性液体，所以操作时应戴乳胶手套，在通风橱中进行。所有使用过 DMS 的毛细管、滴管、Eppendorf 管及 DMS 反应后第一次乙醇沉淀的上清液应放入 1N NaOH 中钝化。

2. DMS 容易吸潮，分解成甲醇和硫酸。所以 DMS 应密封保存。可取出 10—20 $\mu$ l 盛于小管中作为工作液使用，待发现结果不好时及时更换。特别注意在吸取 DMS 时不要带入水溶液，否则将毁掉整瓶试剂。

3. 1.0 M 的嘧啶水溶液应每次重新从嘧啶原液（10M）稀释。由于嘧啶易滞留于管壁，故稀释时应将移液管反复在水溶液中冲洗几次。

4. 在嘧啶反应中采用二端封死的毛细管是为了不让在高温（90 $^{\circ}$ C）下易蒸发的嘧啶逸出而影响反应。但操作比较麻烦。为方便起见，也可采用密封良好的 Eppendorf 管作为反应容器，用 100 $\mu$ l 1.0M 嘧啶溶解 DNA 沉淀，90 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。

## 二、对 G 和 A 的部分切断反应

原理：G 或 A 的 N-7 能被焦碳酸二乙酯（DEPC）乙氧甲酰化，在反应过程中被修饰的 G 和 A 的咪唑环打开，嘧啶则完成除去修饰碱基及切断 DNA 链的反应。此反应从 RNA 序列分析的化学断裂法<sup>[9]</sup>移植过来，在 RNA 中是 A > G（约 7 倍之差），在 DNA 中 G 几乎与 A 相等，或 G 略大于 A（未发表资料）。类似的方法也可见报告<sup>[16]</sup>。

方法：在 DNA 沉淀（包括载体 DNA）中加入 200 $\mu$ l DEPC 缓冲液（50mM NaAc，pH4.5，1mM EDTA，用 HAc 调 pH）。溶解后置于冰浴中冷却。加入 1 $\mu$ l DEPC，在 90 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5—10 分钟。立即于冰中冷却，稍加离心使受热蒸发后凝聚在 Eppendorf 管盖的液滴回到管底。加入 50 $\mu$ l 冰冷的 1.5M NaAc 和 750 $\mu$ l 冰冷的无水乙醇充分混合后在干冰中冷却 5 分钟。12,000 $\times$ g 离心 5—10 分钟，小心吸去上清液。

按本节一、中的办法将 DNA 用  $250 \mu\text{l} 0.3\text{M}$  NaAc 溶解后用乙醇沉淀,用冰冷的 70% 乙醇洗涤。真空干燥沉淀。

按本节一、中的办法,进行嘧啶反应。干燥沉淀后溶于凝胶电泳样品液,使之热变性,并于冰中冷却。

说明: DEPC 是有毒的挥发性液体,应于通风橱中操作。使用过这种试剂的毛细管等物品应于  $1\text{N}$  NaOH 中钝化。

### 三、对 A 和 C 专一的部分切断反应

原理: 在强碱中腺嘌呤环在邻接糖苷键的地方被打开,胞嘧啶环也有一部分可被打开。嘧啶则完成修饰碱基的除去及磷酸酯键  $\beta$ -消去反应。此反应对 A 的专一性占 85%,对 C 约为 15%。

方法: DNA 沉淀(包括载体 DNA)溶于  $20 \mu\text{l} 1.5\text{N}$  NaOH,  $1\text{mM}$  EDTA, 吸入毛细管后将毛细管两端用小火封死。放入  $90^\circ\text{C}$  水浴加热 8—10 分钟。

打开毛细管,将 DNA 溶液转入含  $100 \mu\text{l} 1.0\text{M}$  NaAc (pH4.5) 的 Eppendorf 管中,加入  $5 \mu\text{g}$  tRNA 载体,加入  $400 \mu\text{l}$  冰冷的无水乙醇,充分振荡混合后,于干冰中冷却 5 分钟。 $12,000 \times g$  离心 5—10 分钟。吸去上清液,按本节一、中的办法用 70% 冷乙醇洗涤、真空干燥沉淀。

按本节一、中的办法进行嘧啶反应。干燥沉淀后溶于凝胶电泳样品液,使之热变性,并于冰中冷却。

### 四、对 C 和 T 专一的部分切断反应

原理: 胍可切开胸腺嘧啶环或胞嘧啶环,并除去嘧啶环上部分结构,嘧啶则在被修饰的地方取代嘧啶环的残余部分并切断 DNA 链。

方法: DNA 沉淀(包括载体 DNA)溶于  $20 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 置于冰中冷却。加入  $25 \mu\text{l}$  95% 胍,小心混合后于  $20^\circ\text{C}$  水浴中保温 15 分钟。加入  $200 \mu\text{l}$  冰冷的 HZ 反应终止液 ( $0.3\text{M}$  NaAc,  $0.1\text{mM}$  EDTA,  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA),  $700 \mu\text{l}$  冰冷的无水乙醇,充分振荡混合后置于干冰中冷却 5 分

钟。 $12,000 \times g$  离心 5—10 分钟,小心吸去上清液,按本节一、中的办法用冰冷的 70% 乙醇洗涤一次。将 DNA 用  $250 \mu\text{l} 0.3\text{M}$  NaAc 溶解后用乙醇沉淀,用冰冷的 70% 乙醇洗涤、真空干燥沉淀。按本节一、中的办法进行嘧啶反应。干燥沉淀后溶于凝胶电泳样品液,使之热变性后于冰中冷却。

说明: 1. HZ 是有毒的挥发性液体并且易燃,所以操作时应戴上手套,在通风橱中进行。所有使用过 HZ 的毛细管等物品及反应后第一次乙醇沉淀的上清液应放入  $1\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  溶液中钝化。

2. HZ 接触空气后易氧化成二亚胺。所以,同 DMS 一样,应从密封保存的 HZ 试剂瓶中取出  $200$ — $300 \mu\text{l}$  置于 Eppendorf 管中作为工作液使用,待发现结果不好时及时更换。

3. DNA 中的 C 有时会被 5 位甲基化, HZ 与 5-甲基 C 反应极慢,因而 DNA 在 5-甲基 C 处不被切断。

### 五、对 C 专一的部分切断反应

原理: 在胍与嘧啶的反应中,  $2\text{M}$  NaCl 的存在会抑制胍与胸腺嘧啶的反应,因此在嘧啶反应后 DNA 只在 C 处被切断。

方法: 将 DNA 沉淀溶于  $20 \mu\text{l} 4\text{M}$  NaCl, 其余步骤与本节四、相同。

表 3 是五个部分切断反应的操作步骤一览表。

## DNA 的部分切断产物的分开

DNA 片段在各个碱基专一性的化学切断反应后产生的部分切断产物可在序列分析凝胶上分开,经过放射自显影,可在 X 光底片上显示出所有从 DNA 5' 标记末端到每一个碱基的片段,根据碱基专一性和标记片段的泳动位置,可以导出 DNA 片段的碱基序列。

### 一、序列分析凝胶

凝胶电泳技术的改进对于核酸序列的快速

表 3. 五个化学切断反应的操作步骤

G	G+A	A>C	C	C+T
DNA 沉淀 200 $\mu$ l DMS 缓冲液 冷于 0 $^{\circ}$ C 1 $\mu$ l DMS 20 $^{\circ}$ C, 5-10 分钟	DNA 沉淀 200 $\mu$ l DEPC 缓冲液 冷于 0 $^{\circ}$ C 1 $\mu$ l DEPC 90 $^{\circ}$ C, 5-10 分钟	DNA 沉淀 20 $\mu$ l 1.5N NaOH 1mM EDTA 90 $^{\circ}$ C, 8-10 分钟	DNA 沉淀 20 $\mu$ l 4M NaCl 冷于 0 $^{\circ}$ C 25 $\mu$ l HZ 20 $^{\circ}$ C, 15 分钟	DNA 沉淀 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O 冷于 0 $^{\circ}$ C 25 $\mu$ l HZ 20 $^{\circ}$ C, 15 分钟
50 $\mu$ l DMS 终止液	50 $\mu$ l 1.5M NaAc	100 $\mu$ l 1.0M NaAc pH4.5 5 $\mu$ g tRNA	200 $\mu$ l HZ 终止液	
700 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	700 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	400 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	700 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	同左
70%乙醇洗沉淀	↓	70%乙醇洗沉淀	同左	同左
250 $\mu$ l 0.3M NaAc 700 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	同左	↓	250 $\mu$ l 0.3M NaAc 700 $\mu$ l 乙醇 干冰冷却 5 分钟 离心 5-10 分钟	同左
70%乙醇洗沉淀	同左	↓	70%乙醇洗沉淀	同左
真空干燥沉淀	同左	同左	同左	同左
20 $\mu$ l 1.0M 嘧啶 90 $^{\circ}$ C, 30 分钟 加 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 抽干 加 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 抽干 加 20 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 抽干	同左	同左	同左	同左
溶于样品液, 90 $^{\circ}$ C, 1 分钟 冰中冷却	同左	同左	同左	同左

直读分析方法的建立和发展起了重大的作用。序列分析凝胶是一种变性凝胶(含 7M 尿素),经过甲酰胺+NaOH 试剂变性和热变性迅速冷却的 DNA 样品在这种凝胶中电泳时, DNA 分子内部的二级结构被破坏,其泳动率严格地由 DNA 片段长度或核苷酸数决定,而且只相差一个核苷酸的二个 DNA 片段也能在凝胶中清楚地分开。这样从 5' 标记末端到 DNA 片段中每一个碱基的所有片段将依该碱基离 5' 标记末端的距离由近至远逐个在凝胶中由下往上排列,从而保证了 DNA 片段中每个碱基都被识别。

自然,序列分析凝胶的分辨率还是有限的。由于 DNA 片段的泳动率与其分子量的对

数成反比,则相邻的二个寡核苷酸之间分开的距离将随着 DNA 片段的增大而减小,所以由距 5' 标记末端太远的碱基断裂产生的较长的寡核苷酸将难以互相分开。从放射自显影图象上来看,电泳的分辨率由二个因素决定:代表寡核苷酸的黑带的厚度和二条相邻的带的中间部位之间的距离。凝胶的浓度、长度、厚度对分辨率都有影响。

凝胶的浓度:同一般的核酸凝胶电泳一样,浓度大的凝胶适合于分离较短的寡核苷酸,浓度小的凝胶适合于分离较长的寡核苷酸。对于 90cm 长的凝胶,10% 丙烯酰胺+0.33% 双丙烯酰胺的凝胶适于分离从 1 到 50 个核苷酸长

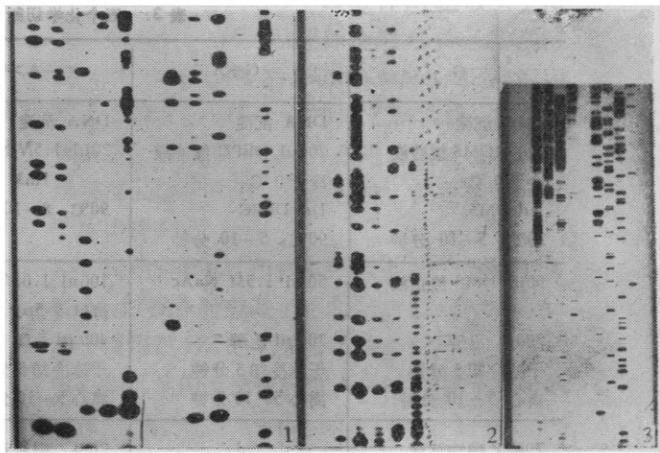
的片段,对于 40cm 长的凝胶,则可用 20% 的丙烯酰胺浓度的凝胶来分离这些较短的片段。8% 丙烯酰胺的凝胶应用最广泛,用它可以获得从第 1 到第 250 甚至更远的碱基序列。对于较长的寡核苷酸的分离,也可用 6% 丙烯酰胺凝胶。

**凝胶的长度:**一般来说用长 40cm 的薄胶,可以获得多达 300 个碱基的序列。目前不少实验室用长 80—100cm 的凝胶,这样可使二条相邻的带分得更好,从而提高分辨率,增加碱基的可读数。但这样大的凝胶操作起来较麻烦。

**凝胶的厚度:**凝胶厚度的减薄对于提高分辨率的效果最为显著。早先人们用厚 1.5—2.0 mm 的凝胶,目前普遍使用 0.3—0.5 mm 的胶<sup>[17]</sup>。使用薄胶的优点很多,①在电泳时可以在维持较小电流强度的情况下加上更高的电压,使得样品走得更快,而凝胶发热则可减少,不致使相同长度的寡核苷酸在相邻的样品槽中泳动位置不一样(即造成带谱的弯曲,这会给出序列带来困难),也不致因发热而造成玻璃板破裂。②在放射自显影时, $\beta$  粒子在薄胶中的散射和自吸收减少,这样在底片上的黑带就较窄。③节省做凝胶用的化学试剂。新近有人<sup>[18]</sup>介绍使用厚 0.2mm 的凝胶,电泳后在 1N HAc 中固定核酸和洗去尿素,然后在 85℃ 将凝胶烘干,其厚度减少至 0.02mm。用这种凝胶获得的分辨率更高(图 3),放射自显影所需的曝光时间也大大缩短,而且可在室温下曝光。缺点是这种凝胶的制作比较麻烦,对做凝胶的试剂纯度要求很高,而且由于凝胶太薄,加样时较困难。

下面介绍厚 0.4mm 宽 300mm 长 900mm 的 8% 聚丙烯酰胺序列分析凝胶的制备。取两块干净的 5×300×900mm 的玻璃板,其中一块在一端带有 3×24cm 的缺口。这块带缺口玻璃板的面向凝胶的一面,用二甲基二氯硅烷的 2% 四氯化碳溶液进行硅化处理,以便在电泳完毕后取下玻璃板时使凝胶方便地落在另一块玻璃板上。

用厚 0.4mm 宽 15mm 的聚四氟乙烯条及直径 0.5mm 的细橡皮条将二块玻璃板做成的凝胶



(1) 2.0mm (2) 0.4mm (3) 0.2—0.02mm

图 3. 三种不同厚度凝胶的分辨率

模子的三边封住,夹上铁夹子。

配制 150ml 凝胶溶液:

30ml 40% 丙烯酰胺 + 1.33% 双丙烯酰胺

7.5ml 20 × TB 缓冲液

63g 尿素

60ml H<sub>2</sub>O

在磁力搅拌器上稍微加热,搅拌溶解尿素。

加入 150 mg APS (1.5ml 10% APS 溶液,补足 H<sub>2</sub>O 至 150 ml)。

加入 100—150  $\mu$ l TEMED。

搅匀后即刻灌胶。灌胶时可将凝胶溶液装人大注射器,或者倒进塑料洗瓶里,沿着玻璃板的缺口往里倾注溶液。灌胶时要将玻璃板抬起约成 30° 角,并使一侧略高于另一侧,溶液从较低的一侧灌入,使溶液由底部往上慢慢铺满二块玻璃板之间的空间,这样不致在凝胶中生成气泡。注入溶液时不要中断,否则也将造成气泡。待溶液快灌满时,逐渐将玻璃板放平。在水平位置聚合是为了避免对底部橡皮条产生太大的压力而引起漏液,而且这样聚合成的凝胶厚薄均匀。

灌胶完毕后立即加入样品槽模子(样品槽宽 0.5cm, 深约 1cm)。凝胶约在 30 分钟内聚合。聚合完毕后在样品槽模子附近加一些 TB 缓冲液,小心拔出模子,立即用小滤纸条清洗样

品槽,除去残留于样品槽内的凝胶碎块。

## 二、加样和电泳

在移走封闭凝胶底部的细橡皮条和聚四氟乙烯条后将凝胶垂直地固定在上、下电泳槽间,上电泳槽也相应地带有一缺口使缓冲液与凝胶相通。注意除去凝胶底部可能带进的气泡。

为分析较短片段用的 10% 凝胶需经过预电泳。一般可在 1000 V 电泳 2 小时或更长些。对于分析较长片段的 8% 凝胶可以不必预电泳。

在预电泳后加样前,一定要用 TB 缓冲液冲洗样品槽以除去从凝胶中扩散出来的尿素,否则加样时样品不易沉下。

用拉细的毛细管小心地将热变性冷却后的 DNA 样品 3—5  $\mu$ l 加在样品槽内。特别要注意在样品几乎全被挤出毛细管时,不要带进气泡,否则会冲起样品,造成很坏的分辨率。碱基专一性部分切断的产物依 G、G + A、A > C、C、C + T 的次序加在相邻的样品槽内。加样要迅速,防止样品在样品槽内扩散。加样完毕立即接上电源电泳。

由于凝胶电泳分辨率的限制,由一次加样所获得的碱基序列数是有限的,所以常采用多次加样,在不同浓度的凝胶中电泳或在同一凝胶中电泳不同时间来获得更多的碱基序列。在二批序列之间要有相当数目的碱基序列重叠(5—10 个),保证这二批序列的连续性。

电泳时要保持较高的电压,一方面为了不使电泳时间过长,另一方面也为了在凝胶中产生一定的热量(维持凝胶在 40—50 $^{\circ}$ C 左右),使 DNA 保持变性状态。电泳的时间根据所要获得的碱基序列离 5' 标记末端的距离而定。BPB 和 XC 的移动速度是二个很好的参考标志。一般说来,要获得离 5' 末端最近的第一个碱基(实际上是从 5' 末端数起的第二个碱基)到第 50 个碱基,在 10% 凝胶中,1600V 电泳 7 个小时左右,此时 BPB 距胶底约 40 cm (BPB 在 10% 凝胶中与 14 个核苷酸长的片段泳动在一起)。在 8% 凝胶中,2400V 电泳 9 小时左右,此时 BPB 已

走出凝胶,XC 离胶底约 35cm,可读出从第 30 个碱基到第 150 个碱基以上的序列(XC 在 8% 凝胶中与 80 个核苷酸长的片段泳动在一起)。为获得更多的碱基序列,可以延长电泳时间。

在长时间电泳后,上、下电泳槽的缓冲液的 pH 会有改变。常采用上、下电泳槽缓冲液迴流的办法来改善这一状况。

## 三、放射自显影和读出序列

在电泳结束后移走一块玻璃板,用滤纸吸干凝胶四周的缓冲液后,在凝胶上敷上一层塑料薄膜,再放上 X 光底片,压上一块干净的玻璃板,用夹子夹紧,用黑布包严即可放入低温冰箱曝光。

除了上面提到的凝胶厚度的减薄可以缩短曝光时间外,另外一些技术上的改进也可以增加 X 光底片在放射自显影中的敏感度。若在 X 光底片上再覆上一片增感屏(intensifying screen),可以缩短曝光时间 5—10 倍(依不同种类的增感屏而异)。若将 X 光底片预先在闪光灯下以极短的时间(<1/1000 秒)曝一下光再用于放射自显影,则在增感屏的存在下于 -70 $^{\circ}$ C 曝光可缩短时间 10—20 倍<sup>[27]</sup>。采用增感屏和预曝光的缺点是会使带变宽,底片本底变得较深。

表 4 列举在 0.4mm 厚的凝胶上 G 样品的 Cerenkov 计数(即  $^{32}$ P 标记 DNA 不用闪烁液在液体闪烁计数器上得到的 cpm 数)与日本 Rx 底片经过预曝光、使用增感屏在 -70 $^{\circ}$ C 曝光所需的时间,供实验中参考。

表 4 曝光时间表

G 样品计数 (cpm)	曝光时间(天)
2,500	14
5,000	10
7,500	7
10,000	4
12,500	3
15,000	2
17,500	1.5
20,000	1

从放射自显影带谱读出碱基序列是较简单的。从带谱的底部往上读,依次为从 5' 标记末

端向 3' 末端方向的碱基序列。在 G 反应中出现的带为 G, 在 G + A 反应中出现的带为 G 或 A, 将二者比较一下就可读出 A; 在 A > C 反应中出现的颜色较深的带 (同时又在 G + A 反应中出现) 为 A, 颜色较浅的带为 C; C 同时应在 C 反应和 C + T 反应中出现, 只在 C + T 反应中出现而在 C 反应中不出现的带为 T。在 5' 末端那个碱基切断只产生  $^{32}\text{P}$ i, 在带谱上难以判定。

有时在带谱中也会出现一些异常现象。在有些区域, 相邻带之间的距离变得比正常的小, 即这些带堆积在一起。这是由于 DNA 分子中的二级结构造成的, 即使电泳时凝胶很热也不能打开这些二级结构。这些区域往往是靠近 5' 末端的一部分碱基; 若使这部分碱基在另一 DNA 片段中处于离 5' 末端较远的位置, 则可消除这些带的堆积现象。另一个办法是从互补链序列来确证这些区域的碱基序列。

如同前节四中说明 3 所述的, 5-甲基 C 抗 HZ 的修饰反应, 那样 DNA 序列中的 5-甲基 C 在 C 反应和 C + T 反应的带谱中将出现空白。从相邻带之间的距离变大可以判断出来。另外从互补链的碱基 G 也可判定空白位置是 C。

### 参 考 文 献

- [1] Sanger, F., A. R. Coulson: *J. Mol. Biol.*, **94**: 441—448, 1975.
- [2] Maxam, A. M., W. Gilbert: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 560—564, 1977.
- [3] Sanger, F., et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463—5467, 1977.
- [4] Messing, J., et al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**: 309—323, 1981.
- [5] Maxam, A. M., W. Gilbert: *Methods in Enzymology*, Vol. **65**, Part I (ed. by Grosman, L. and K. Moldave, Academic Press, New York, pp. 499—560. 1980.
- [6] Donis-Keller, H., A. M. Maxam, W. Gilbert: *Nucleic Acids Res.*, **4**: 2527—2538, 1977.
- [7] Simoncsits, A., et al.: *Nature*, **269**: 833—836, 1977.
- [8] Brownlee, G. G., E. M. Cartwright: *J. Mol. Biol.*, **114**: 93—117, 1977.
- [9] Kramer, F. R., D. R. Mills: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**: 5334—5338, 1978.
- [10] Peattie, D. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 1760—1764, 1979.
- [11] 赵惠智、仲如、程振起: 生物科学动态, (遗传工程专集), pp. 105—108, 1978.
- [12] Smith, H. O., M. L. Birnstiel: *Nucleic Acids Res.*, **3**: 2387—2398, 1976.
- [13] Kirby, K. S.: Isolation of Nucleic Acids with Phenolic Solvents, *Methods in Enzymology* 12B (ed. by Grossman, L. and K. Moldave), Academic Press, New York, pp. 87—99. 1968.
- [14] Boseley, P. G., et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**: 1121—1138, 1978.
- [15] Boseley, P. G., et al.: *Cell*, **17**: 19—31, 1979.
- [16] Krayev, A. S.: *FEBS Lett.*, **130**: 19—22, 1981.
- [17] Sanger, F., A. R. Coulson: *FEBS Lett.*, **87**: 107—110, 1978.
- [18] Garoff, H., W. Ansorge: *Analytical Biochemistry*, **115**: 450—457, 1981.
- [19] Laskey, R. A., A. D. Mills: *FEBS Lett.*, **82**: 314—316, 1977.