

· 实验方法与技术 ·

## DNA序列分析中克隆片段在M13的缺失及质粒载体的应用\*

周世宁

(生物学系)

### 摘 要

应用新的亚克隆载体BLUESCRIPT M13 克服了外源DNA 缺失问题。采用外切核酸酶Ⅲ快速亚克隆法,在不知道任何内切酶位点的情况下,也能获得一系列适应于DNA顺序分析的重叠衔接克隆。用超螺旋双股DNA直接序列分析程序,简化了DNA序列分析工作。

**关键词** DNA序列分析,亚克隆

近年Dale等<sup>[1]</sup>发展了一个快速的亚克隆方法,大大简化了常规的亚克隆方法。但是,此法仍然以M13为载体。一些排列特殊的DNA顺序克隆到M13后发生严重的缺失,致使所得的亚克隆不能应用。本文应用了Bluescript M13新载体系统,克服了缺失问题,成功地获得了一系列亚克隆,并用超螺旋双股DNA序列分析法,完成了1.05Kb左右的DNA序列分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

寡核苷酸RD-22, T4 DNA聚合酶, T4 DNA连接酶,末端脱氧核糖核酸转移酶及d GTP均从IBI公司购入。Bluescript M13,外切核酸酶Ⅲ和Mung Bean核酸酶来自STRATAGENE公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 快速缺失亚克隆法。详细阐述参照文[1],简单过程是:①外源DNA大片段插入M13(如mp19)的多重克隆位点;②将寡核苷酸片段(RD-22)经退火杂交到单股M13的相应位置以形成含EcoR1切点的局部双股;③用EcoR1切断环状载体,使外源DNA一端暴露出3'自由端;④利用T4 DNA聚合酶的3'端外切活性切割外源DNA,控制不同时间以获长度不一的亚克隆;⑤用末端转移酶TdT接上(G)<sub>n</sub>尾巴;⑥再次用RD-22寡核苷酸片段退火,使载体环化;⑦用连接酶连接缺口,转化大肠杆菌;⑧克隆片段的大小检测。

本文1987年7月收到

\* 本文得到美国伊利诺大学生化系钟森文博士的指导

### 1.2.2 Bluescript 亚克隆法.

参照美国STRATAGENE公司介绍方法,但选用了不同的质粒寄主.步骤简述如下(见图1):①将外源大片段DNA插入载体质粒Bluescript M13的合适位置(即多重克隆位区的某一处);②选择适当的内切酶作双酶切,其中一个酶切口应具有突出的3'末端,而另一酶需有一个平头切口或突出的5'末端,并确保具有5'突出末端的酶切点位于3'突出末端酶切点和外源DNA片段之间;③用外切核酸酶Ⅲ处理,这时外源DNA端因含有凹进的或平头的3'末端而被切割.控制反应时间以取得大小不一的亚克隆;④用Mung Bean核酸酶处理,切去所有单链部份,使二末端均成为平头;⑤连接酶连接;⑥转化RecA<sup>-</sup>大肠杆菌,利用Amp<sup>r</sup>标记选择转化体;⑦克隆DNA大小检测.

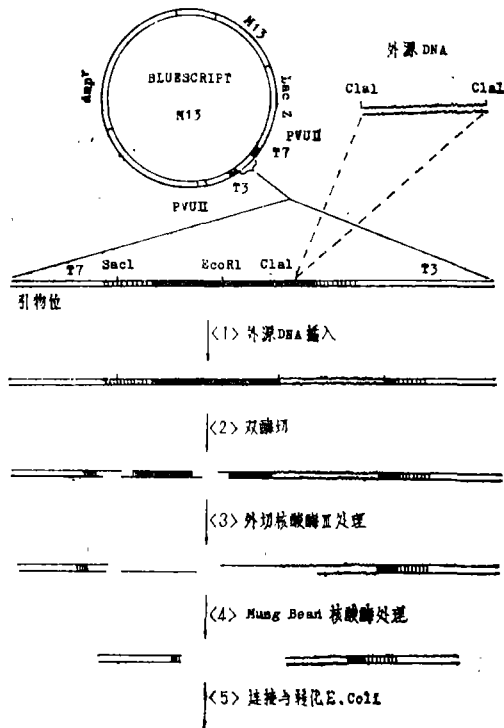


图1 载体BLUESCRIPT M13及亚克隆示意图

T3和T7分别代表T3启动子和T7启动子  
 ||||| 表示有3'突出末端的酶切点区  
 ■■■■■ 表示有5'突出末端或平头末端的酶切点区

Fig. 1 Vector BLUESCRIPT M13 and Subcloning

### 1.2.3 DNA核苷酸序列分析.

基本原理按照 Sanger 双脱氧链终止法<sup>[2]</sup>.我们的样板DNA不经制成纯化单股DNA,而是直接用以简易方法小规模制备的双股质粒DNA<sup>[3]</sup>,

反应由AMV反转录酶催化完成<sup>[4]</sup>.反应过程是:约1微克DNA加2微升NaOH(2N),停置于室温5分钟,然后加入引物50ng,3M NaOAc 3微升,冷乙醇800微升,于干冰浴20分钟,离心,收集沉淀,用70%乙醇洗,挥干,溶于6微升H<sub>2</sub>O中,加入反应缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.5,50mM MgCl<sub>2</sub>,200 mMNaCl)4微升, $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 4微升,反转录酶30单位,混匀后,从中取3微升分别加到A、C、G、T四支管中,每管再加入2微升含dNTP和ddNTP的反应混合液(见表1),在42℃至45℃保温20分钟,各管追加2微升dNTPS(0.5mM)混合液,再在上述温度保温20分钟,最后加入染料并进行高压电泳和放射自显影.

## 2 结果和讨论

### 2.1 外源大片段DNA在M13载体中的缺失

用内切酶从细胞粘菌的一个与发育调节有关的克隆基因中取出一个长约1.4Kb的片段,并克隆到M13<sub>mp19</sub>中.为了分析其DNA核苷酸序列,应用快速缺失亚克隆法,获得了大量含不同大小的外源DNA片段的重组体,经过对约50个重组体的单股DNA电泳

表1 各种dNTP和ddNTP在反应混液中的浓度( $\mu\text{M}$ )Tab. 1 Concentrations of dNTPS and ddNTPS in reaction mix ( $\mu\text{M}$ )

	管 号					管 号			
	A	C	G	T		A	C	G	T
ddATP	1.26				dATP	10	10	10	10
ddCTP	12.6				dCTP	250	60	250	250
ddGTP	12.6				dGTP	250	250	60	250
ddTTP	12.6				dTTP	250	250	250	60

分析及对双股克隆片段的酶切和电泳检查, 选择到一系列能重叠衔接的亚克隆, 他们所含的细胞粘菌DNA大小是1.4kb(无缺失)、0.95kb、0.79kb、0.65kb、0.54kb、0.34kb和0.27kb(照片无显示)。但当用0.95kb、0.79kb、0.65kb和0.54kb四个克隆的RF DNA再度转化E. coli JM101时, 除了0.54kb克隆外, 其余三个克隆DNA所转化的细菌产生的M13 DNA已不再含有原来长度的外源DNA, 经酶切检查, 所含的外源DNA的长度变成0.48kb左右, 显示了严重的缺失(图2)。大片段外源DNA插入M13后不够稳定早有报道。本文所用的外源DNA片段并不算很大, 但缺失现象是严重的。这可能与所用的外源DNA的结构特殊性有关。正如后来所知道的(见图6), 这一插入的DNA是由多个几乎一样的重复单位组成的, 这一结构特点可能增加了重组缺失的机会。因此选用别的载体和方法是必要的。

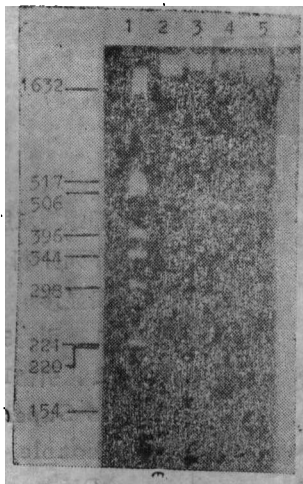


图2 克隆片段在M13中的缺失

各克隆片段由EcoRI和Hind III割出

1. 标准分子片段(PBR322/Hinf 1), bp.
2. 原克隆0.95kb
3. 原克隆0.79kb
4. 原克隆0.65kb
5. 原克隆0.54kb

Fig. 2 Deletion of Cloned DNA during subcloning in M13

## 2.2 Bluescript载体的应用

Bluescript M13由质粒PUC和部份M13 DNA等构成。它具有药物抗性标记和 $\alpha$ -gal选择功能。因为它含有M13的控制顺序, 可随意从正或负载体获得二条相应的单股DNA样板链。它也可以象普通质粒一样以小规模简易法制备, 所得的超螺旋双股DNA也可直接用于双向的序列分析。Bluescript载体还有很多其它用途。

与 M13 相比, Bluescript 可以容纳分子量很大的外源 DNA 而表现稳定,且它可以转化 RecA<sup>-</sup> 的大肠杆菌株,可大大降低重组缺失机率。因在多重克隆位区巧妙地排列了几组能分别产生 3' 突出末端及 5' 突出末端或平头端的内切酶位点,因此能利用外切核酸酶 III 进行快速亚克隆操作(图 1)。在进行这一操作时除了要选择适当二个酶作双酶消化外,关键在于掌握好外切核酸酶处理的时间。虽然在我们的实验中,每微克 DNA 用 50 单位上述外切核酸酶时,2 分钟处理时间便可以除去 100 至 1000 个碱基,但为了使产生的大小片段分布更均匀,最好每分钟都取样,然后合并样品,以保证更好的亚克隆结果。

对 14 个经外切酶处理后再转化得到的转化体进行检测,可知它们的质粒确实含有不同大小的外源 DNA 片段(见图 3)。从中选出 6 个克隆作 DNA 序列分析。这些克隆基本上可以重叠衔接(图 4)。经反复转化及制备,这些克隆所含的外源 DNA 无发生缺失现象。表明 Bluescript M13 载体用于大片段 DNA 的快速克隆是方便可行的。

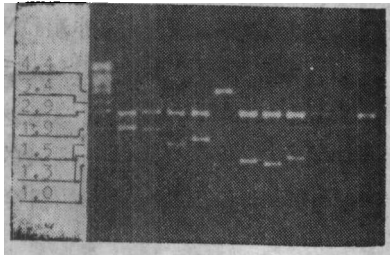


图 3 1.4kb 片段在 BLUESCRIPT 中的亚克隆插入片段由 PVU I 切出因而每个片段含有 450bp 的载体 DNA。左边样品为已知分子量的 DNA 片段,数字代表 kb

Fig. 3 Subclones of 1.4 kb fragment in BLUESCRIPT M13

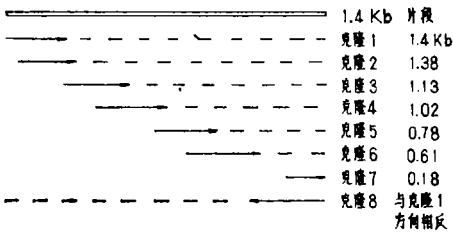


图 4 DNA 顺序分析方案  
Fig. 4 DNA sequencing strategy

### 2.3 DNA 核苷酸序列分析

为了方便,序列分析的样板直接使用上述亚克隆的双股重组 Bluescript M13 DNA。结果表明以质粒小规模制备法获得的超螺旋双股 DNA,在质和量上都能满足序列分析的需要。

比较了 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow)和反转录酶(AMV)在双股序列分析中的效果,结果显示了后者是值得推荐的(图 5)。当用 Klenow 大片段时,无论使用双股

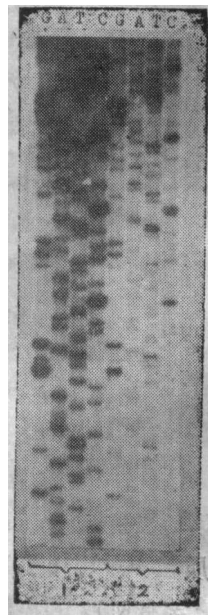


图 5 超螺旋双股 DNA 序列分析电泳胶自显影

1. 引物 50μg  
2. 引物 10μg  
Fig. 5 Supercoil double strand DNA sequencing gel

环状DNA或线状DNA都没有获得理想结果。

在用双股DNA作序列分析时,决定底片显影带可读性好坏的因素除了样板DNA纯度、酶活力等之外,所用的引物量比以单股时要增加几倍。从二次加样的高压电泳(凝胶长38cm,第一次样跑60cm;第二次样跑24cm)得到的最后自显影底片,可以读得近300个硷基的顺序,跟以单股M13作样板时所得的效果相似。通过选择的6个克隆的序列分析,成功地获得了约1000个硷基对的顺序(图6)。

```

ATC GAT GCC TGT ACT AAA TCA ACA GGT GTC ACC CAC ACT CCA ATC AAT GTC GAT GAT AAT AAC
AAA TGT ACA ACT GAT TCA TGT ACC AAA GAA GGT GGT GTA ACT CAT ACT CCA GTC AAT ACT GAT GAT AAC AAT
CCA TGT ACT GGT GAC TCC TGC TCA CCA TTT ACA GGT GTT TCT CAC ACT CCA ATC AAT GTT GAT GAT AAT AAC
AAA TGT ACA ATT GAT CCA TGT ACC AAA GAA GGT GGT GTA ACT CAT ACT CCA GTC AAC AAT GAT GAT AAC AAT
GCC TGT ACC GTT GAT TCT TGT TCA CCA TTA ACT GGT GTC ACT CAT GCC CCA ATA AAC TGT GAT CAT AAA AAG
GCC TGT ACT GTA GAT TCA TGT TCA AAT TCA ACT GGT TGC GTA AAT ACT CCA ATT TCC TGT GAT GAT AAT GGT
CCA TGT ACT GTT GAT ACC TGT GAT GAC TCA ACC GGT TGT TGC AAT ACT CCA ATC AAT GTT GAT GAT AAT AAT
CCA TGT ACC GTA GAT GCC TGT ACC AAA TCA ACA GGT GTC ACT AAT ACC CCA GTA AAT GTA GAT GAT AAT AAC
AAA TGT ACA ATT GAT CCA TGT ACC AAA GAA GGT GGT GTA ACT CAT ACT CCA GTC AAT ACT GAT GAT AAC AAT
GCC TGT ACT GTT GAT AAC TGT TCA CCA TTA ACC GGT GTC ACT CAT ACC CCA ATA AAT TGT GAT GAT AAA AAG
GCC TGT ACT GTC GAC TCA TGT TCA AAC TCA ACT GGT TGC GTA AAT ACT CCA ATT TCC TGT GAT GAT AAT AAT
CCA TGT ACT GGT GAT TGT TGT GAT GTC ATA ACT GGT TGT TGC AAT ACT CCA ATC AAT GTT GAT GAT AAT AAT
GCA TGT ACC GTC GAT GCC TGT ACC AAA TCA AAA GGT GTC ACT CAT ACC CCA GTA AAT GTA GAT GAT AAT AAC
AAA TGT ACA ATT GAT CCA TGT ACC AAA GAA GGT GGT GTA ACT CAT ACT CCA GTC AAT ACT GAT GAT AAC AAT
GCC TGT ACA ATT GAT TGT TGT TCA CCA TCA ACC GGT

```

图6 1.4kb片段的部分核苷酸顺序  
(来自克隆1—6)

Fig. 6 The partial nucleotide sequence of 1.4 kb fragment

这些结果表明,某些不宜用M13作亚克隆的DNA,以新载体Bluescript M13代之能有效地解决问题。Bluescript M13不但是一个用于快速亚克隆的载体,也可用于双股DNA序列分析。

### 参 考 文 献

- [1] Dale, R. M. K. et al., *Plasmid*, 13(1985), 31-40.
- [2] Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(1977), 5463-5467.
- [3] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning (A laboratory manual) by Cold Spring Harbor Laboratory (USA)*, 1982.
- [4] Zagursky, R. et al., *Gene Anal. Techn.*, 1985, 2, 89-94.

## Deletion of Cloned DNA Fragment in M13 and Application of Bluescript Vector for Subcloning and Sequencing

Zhou Shining

### Abstract

A *Dictyostelium* DNA fragment cloned into M13 for sequencing deleted during subcloning. The Bluescript M13 vector and exonuclease-III were employed to produce a sequential series of overlapping clones for sequencing. The sequencing procedure was simplified by using supercoiled double strand DNA as template.

**Keyword** Subcloning, DNA sequencing