

## 利用 Dynabeads 固相单链分离法直接测定 PCR 产物序列

周天鸿 李月琴 梁志成  
(暨南大学生物工程学系 广州 510632)

段小贝  
(深圳市龙岗区第二人民医院 518000)

近年来, PCR 方法被应用于分子生物学各领域的研究, 对 PCR 产物进行序列分析可测定基因组结构, DNA 突变和基因多态性等。目前对 PCR 产物序列分析主要有三种方法: 1. 将 PCR 产物克隆进 M 13 和其他载体, 然后测序, 此法较为繁琐、费时。2. 以双链 PCR 扩增产物为模板, 直接测序, 但由于双链模板极易变性, 故结果不稳定。3. 非对称 PCR 扩增产生单链模板<sup>[1]</sup>, 此法结果较理想, 但 PCR 扩增条件较为严格, 通常要通过预实验才能得到单链 DNA。本文报道一种新方法——Dynabeads 固相分离单链法。利用该法, 我们测定了低密度脂蛋白(LDL)受体基因外显子 11 和内含子 11 的部分序列。证实此法在适当条件下可以将 PCR 和双脱氧测序法联系在一起, 直接快速地对 PCR 双链产物分离成单链进行测序。

## 材料和方法

## 1. 试剂

(1) DNA 引物 根据 Hobbs 报道序列<sup>[2]</sup>合成一对 PCR 引物。PCR 上游引物序列为 5'-CAGCTA-TTCTCTGTCCTCCCAC CAG 3', 下游引物序列为: 5'-CACCTAAGTGCTTCGATCTCGTACG 3'。下游引物合成时已掺入生物素。2 个引物均由 BioTeZ Berlin-Buch GmbH 公司(德国)合成。

(2) 其他试剂 Dynabeads M-280 (DynaI 公司); Taq DNA 聚合酶(Perkin Elmer), dNTP (Promega), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP(Amersham)和 Sequena<sup>TM</sup> Version 2.0 DNA 测序盒(USB 公司)。

## 2. 方法

(1) PCR 扩增 外周血白细胞基因组 DNA 制备按 Hofker<sup>[3]</sup>法进行。扩增反应采用 Gene Amp PCR System 9600 扩增仪(Perkin Elmer), 反应管为

薄壁 PCR 管; 反应液为: 100 ng 基因组 DNA, 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 上游引物, 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 下游引物, 10  $\mu$ l PCR 缓冲液(Perkin Elmer), 5.2  $\mu$ l 25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l 10 mmol/L 四种 dNTP 混合液, Taq DNA 聚合酶 1.5  $\mu$ l (1U/ $\mu$ l), 加双蒸水至 100  $\mu$ l。循环反应前在 94℃保温 2 分钟; 循环条件为: 94℃变性 15 秒, 65℃复性 30 秒; 70℃延伸 1 分 30 秒, 共循环 30 次; 最后在 70℃保温 10 分钟。

(2) PCR 产物 Dynabeads 固相单链 DNA 分离 40  $\mu$ l PCR 双链产物混合与 40  $\mu$ l Dynabeads M-280 悬浮液[2.0 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris HCl (pH 7.5)], 保持 Dynabeads 悬浮 30 分钟, 将反应管置于 Dynabeads 磁力架上(或置于离心机上 3500 rpm, 30 秒)。去上清, 用 40  $\mu$ l 洗涤缓冲液[10 mmol/L Tris, HCl(pH 7.5), 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl]洗涤后, 加入 8  $\mu$ l 0.1 mol/L NaOH 溶液。变性后重新用 Dynabeads 磁力架分开 Dynabeads 和上清液。此时沉淀的 Dynabeads 上结合了含有生物素的 PCR 的单链 DNA, 而上清液则是非含生物素的 PCR 的另一单链 DNA。Dynabeads 结合的单链 DNA 分别经 50  $\mu$ l 0.1 mol/L NaOH、40  $\mu$ l 洗涤缓冲液和 50  $\mu$ l TE 缓冲液各洗涤一次, 结合了 Dynabeads 的单链 DNA 悬浮于 7  $\mu$ l 的双蒸水中备用。

(3) 序列分析 将上述制备好的 7  $\mu$ l Dynabeads 单链 DNA 直接用 DNA 测序盒和 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP 依照厂家说明书进行测序。同位素测序产物在 6% 变性凝胶上电泳, 凝胶于 X 光胶片上放射自显影 3 个小时。

## 结 果

## 1. PCR 扩增产物

利用上述设计的引物, 扩增后得到 LDL 受体基因外显子 11—内含子 11—外显子 12 片段, 长约 0.8 kb(见图 1)。PCR 扩增产物的长度大小与资料<sup>[4]</sup>一致, 电泳显示, 扩增产物中无非特异性带出现。每管扩增产物量为 5  $\mu$ g 左

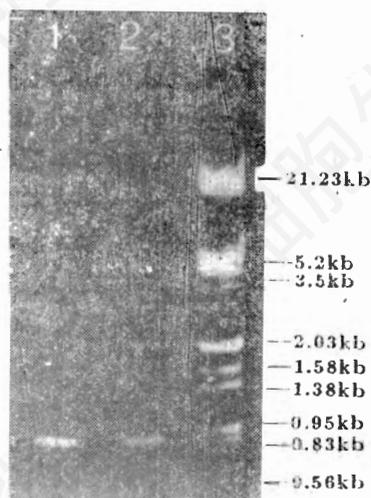


图1 LDL受体基因外显子11-内含子11-外显子12 PCR产物凝胶电泳图

1和2为PCR产物; 3为λDNA分子量标准(EcoRI + HindIII)

右。

## 2. 序列分析

以PCR上游引物作为测序引物,对扩增产物进行测序,模板链为生物素标记链,部分结果见图2。序列分析结果显示,共有98个碱基和已报道<sup>[5]</sup>的LDL受体基因外显子11序列完全一致,另外105个碱基为LDL受体基因内含子11的5'端部分序列,目前尚未见报道(见图3)

## 讨 论

本文测序所用的模板链是与Dynabeads结合的单链,由于Dynabeads上已有固定化的Streptavidin,它能牢固地结合生物素,从而结合了已掺入生物素的引物合成的DNA链。变性后,非生物素标记合成的DNA链留在上清液中,与Dynabeads结合的单链沉淀分开。需要时也可利用上清液中非生物素标记的DNA链作为模板链来测序,但上清液要经醋酸钠-乙醇沉淀后再使用,同时PCR双链产物用量应予加倍。另外,我们多次成功地利用同一引物进行PCR扩增和测序反应,效果良好,降

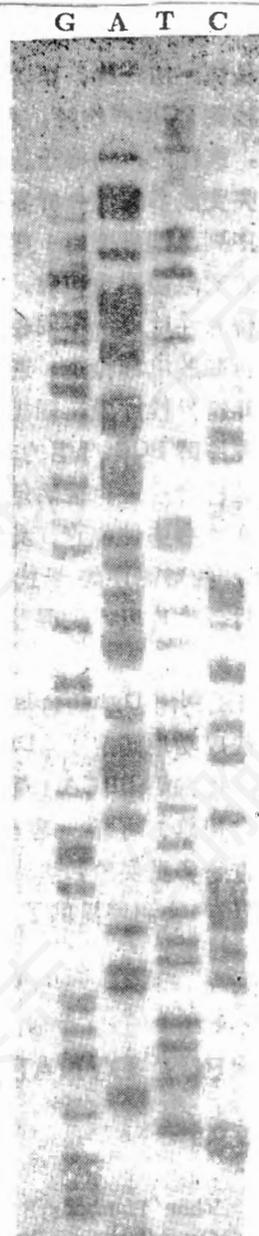


图2 LDL受体基因片段外显子11-内含子11部分序列分析放射性自显影图

```

30 GGGAACTCCCGCCAAGATCAAGAAAGGGGG
30 CCTGAATGGTGTGGACATCTACTCGCTGGT
30 GACTGAAAACATTTCAGTGGCCCAATGGCAT
29 CACCCTAG/GTATGTTCCGACAGGACAGCCGT
30 CCCAGCCAGGGCCGGGCACAGGCTGGAGGA
30 CAGACGGGGGTTGCCAGGTGGCTCTGGGAG
24 AAGCCCAAGCTGCTCCCTGAATTT

```

图3 LDL受体基因片段外显子11-内含子11部分序列图

(图中/线前为外显子11序列的98个碱基;/线后105个碱基为内含子11的5'末端部分序列)

低了测序成本。

此法与其他测序法一样,要求较纯的模板。凝胶电泳检测 PCR 产物时,若有非特异性扩散带出现,这样的产物将干扰测序反应。但在鉴定基因突变或多态性分析实验时,因已知扩增的原始序列,则可选用一些在待测序列中没有酶切位点的限制性内切酶,反应前先用这些酶切割非特异性片段,在固相分离前,取部分酶解液进行凝胶电泳检查,若特异性片段存在,切割的非特异性片段在固相分离时可去掉,从而降低测序时 PCR 产生的非特异性片段的干扰;若该特异片段也被酶解,则定性证明该片段有突变或多态性位点。此时,为消除非特异性 PCR 产物对测序的干扰,可采用其他方法来纯化特异性片段,如凝胶分离纯化片段法。

此外,我们还利用 Dynabeads M-280 固相分离单链测序法成功地测定了 LDL 受体基因其他片段以及抑癌基因 BRCA 1 等的序列。结果证明此法具有简单、可靠、容易掌握等特点,且可同时进行多批实验,大大降低了测序工作量,为 PCR 产物测序提供了一条新的途径。

## 摘要

用 PCR 方法扩增了低密度脂蛋白(LDL)受体基因外显子 11-内含子 11-外显子 12 片段,长约 0.8 kb。利用 Dynabeads 固相分离单链法测定了 PCR 产物序列,其中有 105 个碱基系第一次报道,结果证明: Dynabeads 固相分离单链法是一种简便、可靠、快速的 PCR 产物测序法。

关键词: LDL 受体基因 DNA 固相测序  
PCR

## 参考文献

- [1] Kreitman, M. et al., 1989, *Gene Anal Tech.*, 6: 84-88.
- [2] Hobbs, H. H. et al., 1992, *Human Mutation.*, 1: 445-446.
- [3] Hofker, M. H. et al., 1985, *Hum Genet.*, 70: 148.
- [4] Thomas, C. S. et al., 1985, *Science.*, 228: 815-822.
- [5] Yamamoto, J. et al., 1984, *Cell.*, 39: 27-38.

## DIRECT DYNABEADS SOLID-PHASE SEQUENCING OF PCR PRODUCTS

Zhou Tianhong, Li Yueqin, Liang Zhicheng, Duan Xiaobei  
(Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632)

### ABSTRACT

A DNA fragment (0.8 kb) from exon 11 to exon 12 of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene was obtained by PCR. The sequencing of the fragment was carried out using Dynabeads solid-phase sequencing technique with modification. 105 nucleotides never reported before were determined. This method is simple, rapid and reproducible.

Key words: LDL receptor gene DNA solid-phase sequencing PCR