

脂糖(上海东海制药厂制)进行凝胶电泳(图2)。

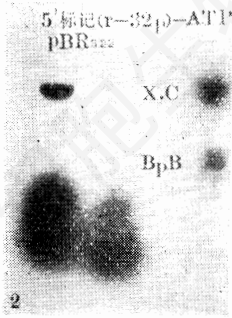


图 2 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定5'标记的pBR322

X.C: 二苯蓝
BpB: 溴酚蓝
电压: 100V
时间: 1小时
Buffer: 40mMTris-HClpH8.0-5mM, NaAc-1mMEDTA

再经 Hpa II^[2]酶解后, 用4%聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺及双丙烯酰胺均 E. Merck 产品)电泳分离(图3), 然后从胶上洗脱两个5'端

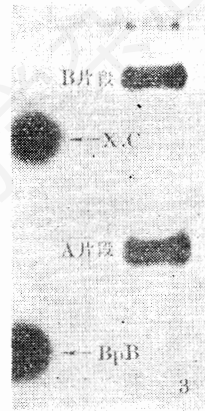


图 3 4%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离经ECOR I 酶解5'标记及 Hpa II 酶切的 pBR322 限制片段 A 和 B

电压: 100V
时间: 16小时
Buffer: 45mMTris-硼酸 pH8.3-1mMEDTA

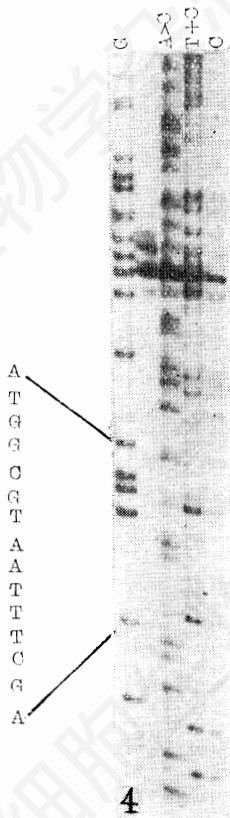


图 4 A 片段图 20%聚丙烯酰胺凝胶电泳

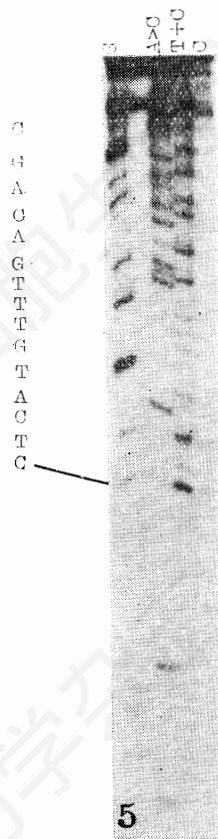


图 5 A 片段图 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 第二次加样

³²P标记的小片段A(161碱基对)和B(459碱基对)(洗脱用0.1M碳酸氢三乙胺, 回收约90%左右^[3])。片段A和B分别经过四组碱基专一性化学裂解(G, A>C, T+C, C), 然后分别进行8%和20%聚丙烯酰胺凝胶电泳(胶长40

厘米宽20厘米, 厚0.4毫米, 电压2200V)。由A片段在20%胶(图4), 8%胶第一次加样(图8)及8%胶第二次加样(图5)(在第一次加样电泳1.5小时后加样继续电泳)的自显图谱上可分别读出29个、53个及63个核苷酸序列, 其中图4和图5的序列中有8个核苷

酸重叠,图5和图8的序列中有25个核苷酸重叠,综合三个图,可读出A片段112个核苷酸序列(图9A)。B片段在20%胶(图6)和8%胶(图7)的自显影图谱上可分别读出34

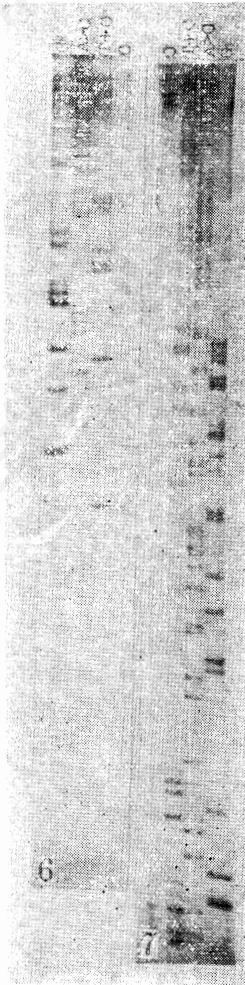


图6 20%聚丙烯酰胺凝胶电泳

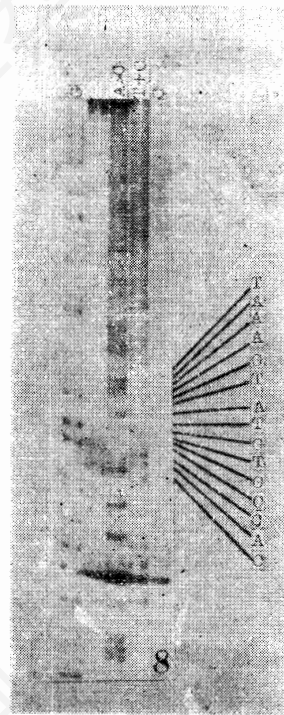


图8 A片段图
8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,第一次加样

图7 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳

个和89个核苷酸序列,其中有14个核苷酸重叠,综合起来可读出B片段109个核苷酸序列(图9B)。除了个别T核苷酸不清楚外,所得A片段序列和B片段序列与文献报道一致^[4,5]。

在本实验中,pBR322质粒DNA用量20—40微克,标记量达到 2×10^8 cpm,电泳时每条带子平均为100—250cpm左右,自显影3天。据我们经验用大片段标记的方法比小片段标记更经济,因为一端标记的DNA片段不论大小仍然都可以进行化学裂解,不过片段越长标记的比度就要求越高。

A (G)AATTCTCTAAGTTTCACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTAAATTCCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCCCTCATCG...3'
20% (胶) (G)AATTCTCTAAGTTTCACAGCTTATCATCGA
8% (胶)第二次上样 ATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTAAATTCCTAACGCAGTCAGGCACCG...3'
8% (胶)第一次上样 AAATTCCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCCCTCATCG...3'

B (G)AATTCCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTATACGCCATATTTTATAGTTAATGTCATGATAAATAATGCTTCTTAGACCTCAGCTGGCACTTTTCGGGGAATGTCGCCG...3'
20% (胶) (G)AATTCCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTATACGCC
8% (胶) (G) CCTCGTATACGCCATATTTTATAGTTAATGTCATGATAAATAATGCTTCTTAGACCTCAGCTGGCACTTTTCGGGGAATGTCGCCG...3'

图9 pBR322质粒DNA中ECOR I-Hpa II酶解片段A和B经化学裂解后在8%胶与20%胶上的重叠部分及读出序列

参 考 文 献

[1] A. M. Maxam and Gilbert. W. 1977. PROC. Natl. Acad. Sci. USA. 74/2:560—

564.

[2] 刘金富等, 1981, 细胞生物学杂志, 印刷中.

[3] Robert, C. A, Y, and R, Wu. 1978,