

双链DNA直接测序法在环境诱变剂致突变分子机制研究中的应用 II. 甲基丙烯酸环氧丙酯诱导质粒抗性基因突变的测定

高惠兰 左 瑾¹ 谢大英 方福德¹

中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 北京 100050

中国医学科学院基础医学研究所 北京 100005

摘要 运用我所建立的双链DNA直接测序法测定了GMA诱导的质粒抗性基因片段(Tc^R) EcoRI/SalI片段(~0.3Kb)的序列,并与相应正常基因片段序列作一比较,所得结果具有一定意义。本实验表明:双链DNA直接测序法可应用于环境诱变剂研究。

关键词 双链DNA直接测序,环境诱变,甲基丙烯酸环氧丙酯

APPLICATION OF DIRECTLY SEQUENCING OF DOUBLE STRANDED DNA IN RESEARCH OF EXPERIMENTAL MUTAGENS II. DETERMINATION OF MUTATED PLASMID PBR322 DRUG RESISTANT GENE INDUCED BY GLYCIDYL METHACRYLATE

Gao Huilan, Zuo Jin¹, Xie Daying, Fang Fude¹

Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050

¹Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100005

Abstract The EcoRI/SalI fragment (~0.3Kb) from mutant Ap^RTc^S of plasmid pBR322 induced by glycidyl methacrylate (GMA) has been sequenced after recombinated with vector using directly sequencing for double stranded DNA. In most case the mutation occurred in the form of deletion and insertion of cytidine and guanine to the sequenced fragment. The results showed that the method directly sequencing for double stranded DNA is useful to the study of environmental mutagens.

Key words Directly sequencing of double stranded DNA; Mutagenesis of environmental factor; GMA

我们已报道⁽¹⁾, 运用共价闭合环状双链质粒 DNA 直接测序法可简化目前常规测序法(如用 M13 载体制备单链 DNA 后再测序等)技术步骤。在适合的实验条件下可获得满意结果。故适合对环境诱变剂的研究。我们在用该法测定正常质粒 PBR322 自 EcoR I 位点向四环素抗性基因方向延伸的 1 个约 0.3Kb 片段达得完全正确的序列之后, 即对由我国现场筛得的新诱变剂甲基丙烯酸环氧丙酯(glycidyl methacrylate, 简称为 GMA)对基因的诱变性进行了序列测定, 得到了明确的结果。

材料和方法

1. 试剂: 限制性内切酶 EcoRI、SalI 等购自中国医科院基础医学研究所友谊开发公司。

2. 质粒与引物: 质粒 PBR322 按前述方法⁽¹⁾制得纯品, 经酶谱分析和序列测定证明与文献结果⁽²⁾完全一致, 故将其用于诱变实验, DNA 重组实验及对重组体的序列测定。

序列测定所用引物的设计同前⁽¹⁾, 为 -15mer 脱氧寡核苷酸 5'-GGCCCTTTCGTC-TTC-3', 由本室合成, 产物的纯化按方福德介绍的方法进行⁽³⁾。

3. 诱变实验

GMA 诱导 PBR322 突变的方法及所产生的突变体(Ap^RTc^S和 Ap^STc^R)的筛选按前述方法⁽⁴⁾。

4. DNA 重组实验及重组体的筛选

正常质粒 PBR22 (Ap^RTc^R) 和突变体 Ap^RTc^S 分别用 EcoRI/SalI 进行彻底双酶解, 得大、小 2 个片段, 用 DE-81 纸法或透析袋法回收正常质粒的大片段 (3.7Kb) 作为载体, 回收突变体的小片段 (0.3Kb) 作为被测序的目的基因(即突变基因)。两者在 T₄ 连接酶存在下按常规方法⁽⁵⁾进行重组反应。重组体的筛选与质粒突变体 Ap^RTc^S 的筛选方法

相同, 筛得重组体后, 用小量快速提取法制备其 DNA, 进行 EcoRI/SalI 双酶解并电泳鉴定, 电泳图谱显示 3.7Kb 和 0.3Kb 2 条带, 表明重组体是预期的重组体。

5. 双链重组体 DNA 直接测序

模板的碱变性、测序反应、电泳等步骤均同前述⁽¹⁾。为了进一步增加分辨率, 采用的标记物为 [α]-³⁵S-dATP, 而非 [α]-³²P-dATP

结果和讨论

1. 突变体 Ap^RTc^S 的直接测序

在正常质粒 pBR322 直接测序成功的基础上, 我们曾对筛选到的一些由 GMA 诱变的突变体 Ap^RTc^S 进行直接测序, 但均未获成功, 为了究其原因, 我们在严格的对照条件下对突变体和正常质粒同时进行测序, 结果表明: 突变体不能进行链延伸反应, 而正常质粒却能发生良好的链延伸反应, 这提示突变体在与引物相互补的序列中发生了突变, 致使在本实验条件下彼此不能发生退火和结合, 链延伸自然不可能发生。本实验引物设计在邻近 EcoRI 位点的反时针位置, 位于 Ap^R 基因和 Tc^R 基因之间。以前我们曾发现⁽⁴⁾, 在 Ap^RTc^S 突变体的 Ap^R 基因区域, 也存在某些限制性位点的突变, 导致这些位点消失和位移。但未观察到在该质粒的非基因区域发生突变的情形, 本实验测定结果则表明, 这一情形的存在, 说明 GMA 引起质粒 DNA 突变的范围是相当广泛的。就该突变体而言, Tc^S 基因之外的位点的突变对 Tc^S 表型并无影响, 那么它们有何生物学效应呢? 我们曾提出, 这些突变是否为无效突变? 如果是, 还可进一步提出 1 个问题: 为什么 1 种诱变剂(如 GMA) 对于某些表型的改变需伴随着这么多的无效突变? 无效突变是否为诱变过程中的普遍现象? 我们认为值得对此作进一步深究。

2. 重组体的直接测序

GMA 诱变的突变基因片段与正常质粒载体重组后,经双链 DNA 直接测序法迅速地测得它的序列。图 1 所列为测得的突变基因片段序列测定资料,并与正常对照的序列测定资料作一比较。由这些资料可知,GMA 对 PBR322 Tc^R 基因具有很强的诱变效

应,其突变类型以 C 和 G 的缺失和插入所致的点突变为主,它们极易导致移码突变,从而产生严重后果。根据序列测定资料,还可进一步分析诱变剂作用的序列专一性和热点区域。

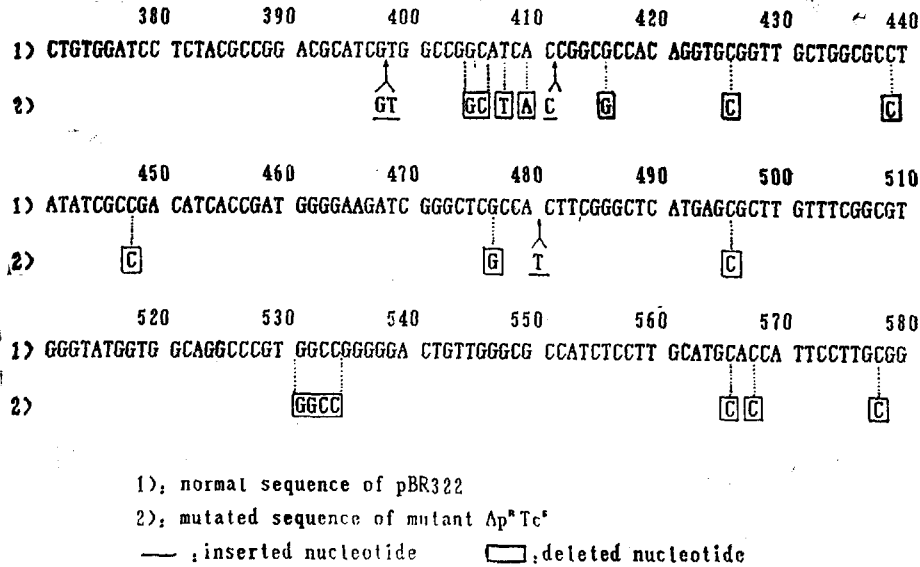


图 1 GMA 诱导质粒 PBR322 抗性基因突变的核苷酸序列测定

参考文献

1. 高惠兰,等.双链DNA直接测序法在环境诱变剂致突变分子机制研究中的应用.I.非突变质粒抗性基因片段的序列测定.癌变·畸变·突变 1991, 3:15.
2. Miniatis et al. Molecular Cloning. Cold spring harbor laboratory. New York,1982:

- 86-91.
3. 方福德.合成寡聚核苷酸的简易纯化方法.生物化学与生物物理进展 1990, 17: 205.
4. Xie DY, et al. Analysis of the phenotype and the restriction enzyme mapping level of mutations induced by the mutagen glycidyl methacrylate. Biomed Environ Sci 1991, 3: 146.