



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89107031.1

[51] Int.Cl⁵

C12P 19/30

[43] 公开日 1990年3月7日

[22] 申请日 89.7.28

[30] 优先权

[32] 88.7.28 [33] GB [31] 8818020.3

[71] 申请人 帝国化学工业公司

地址 英国英格兰

[72] 发明人 阿历山大·弗雷德·马卡姆

约翰·克雷格·史密夫

拉希达·安瓦

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 罗宏

C12Q 1/68 C12N 15/10

说明书页数: 133 附图页数: 30

[54] 发明名称 一种扩增核苷酸顺序的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于扩增含有未知顺序的核苷酸片段的方法及其药盒,可以快速有效地测定长核苷酸顺序。该方法包括通过切割靶核酸和连接以形成靶核酸片段/小载体单位。其中一个靶核酸片段含有和起始引物杂交的已知顺序的起始引发区,而靶核酸片段/小载体单位含有一个和小载体引物杂交的已知顺序的小载体引发区。本扩增方法通过与靶核酸片段/小载体单位的起始引发区杂交的起始引物的延伸来完成。

△
△
△

权 利 要 求 书

1. 一种通过引物延伸使含有未知顺序的核酸片段进行扩增的方法，其特征在于该方法包括，切割一种靶核酸以得到靶核酸片段，其中一个所述片段含有能和起始引物杂交的已知核苷酸顺序的起始引发区，通过连接从靶核酸片段中制备靶核酸片段/小载体单位，每个单位带有一个和载体引物杂交的已知顺序的载体引发区，并且用合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂在杂交条件下，一起或依次处理靶核酸片段/小载体单位，以合成一个互补于一个单链靶核酸/小载体单位的起始引物延伸产物，该单链靶核酸/小载体单位带有一个杂交有起始引物的起始引发区，对该起始引物要进行选择，使它基本上互补于起始引发区，不然，如果没有这种起始引发区，则不能合成互补于单链靶核酸片段/小载体单位的延伸产物。

2. 权利要求1的方法，其中，在一个小载体引物存在下对该延伸产物扩增，该引物是经过选择的，以使它基本上互补于小载体引发区。

3. 权利要求2所述的方法，其中小载体引物扩增产物的合成依赖于起始引物延伸产物的最初合成。

4. 权利要求3所述的方法，其中靶核酸片段/小载体单位的小载体部分含有一个带有第一和第二链的双链部分，小载体部分的第二链被连接到含有起始引发区的靶核酸片段链上，要对第一链、第二链和小载体引物的核苷酸顺序进行选择，以使小载体引物能够与第二链的互补体进行杂交，但在相同杂交条件下不能与第一链杂交。

5. 权利要求3所述的方法，其中靶核酸片段/小载体单位的小

载体部分含有一个带有第一和第二链的双链部分，第一链带有一个末端聚合阻断基团，而被连接到含有起始引发区的靶核酸片段链上的第二链，则携有一个单链部分，在合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂的存在下和杂交条件下，该末端聚合阻断基团能防止第一链的延伸，从而不能形成第二链的所述单链部分的互补体。

6. 上述任一项权利要求中所述的方法，其中，制备许多不同的小载体文库以用于相同的单一起始引物，每个小载体文库都含有通过连接核酸片段得到的靶核酸片段/小载体单位，在不同的切割位点切割靶核酸即能制备这些核酸片段，用合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂在杂交条件下分别或一起处理每个小载体文库，从而，通过使用相同的单一起始引物而得到许多起始引物延伸产物。

7. 权利要求1或2所述的方法，其中，使带有能互相连接的末端的核酸进行环化，该核酸的一部分能够作为可与起始引物杂交的起始引发区；在已知核苷酸顺序以外切割该环化的核酸，以形成一个含有该已知核苷酸顺序的线性分子，该分子至少在一端具有一个用于连接形成靶核酸片段/小载体单位的已知的切割位点模式；通过连接形成所说的靶核酸片段/小载体单位，并且用起始引物，在合适的三磷酸核苷、三磷酸核苷的聚合剂和杂交条件下，一起或依次处理靶核酸片段/小载体单位。

8. 权利要求7所说的方法，其中用起始引物、小载体引物、合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂，一起或依次处理靶核酸片段/小载体单位。

9. 上述任一项权利要求中所述的方法，其中，以这样的方式通过连接从靶核酸片段中制备靶核酸片段/小载体单位，以致不能用切

割靶核酸以产生靶核酸片段时所用的相同试剂，从靶核酸片段/小载体单位上将小载体切割下来。

10. 权利要求9所述的方法，其中，用一种限制性核酸内切酶切割靶核酸，以产生一个用于与小载体连接的靶核酸片段，对小载体的顺序要进行选择，以使在靶核酸片段/小载体单位中不存在所说的限制性核酸内切酶的限制性核酸内切酶识别顺序。

11. 上述任一项权利要求所述的方法，其中，至少在所说起始引物的远端，对任意或所有得到的起始引物延伸产物进行顺序测定，以确定下一个起始引物的顺序，从而通过下一个起始引物的引物延伸获得下一个起始引物延伸产物。

12. 上述任一项权利要求所述的方法，其中，测定起始引物延伸产物或其一部分的顺序，以确定所述延伸产物或其一部分的特征。

13. 权利要求11或12所述的鉴定导致某种表型的基因型的方法，其中，将含有该基因型的核酸顺序与不含有这种基因型的核酸顺序进行比较，借此鉴别出导致所述表型的基因型。

14. 权利要求13所述的方法，其中，使用来自某给定表型的专性杂合子核酸的单一样品即可进行比较。

15. 权利要求11或12所述的方法，即鉴别导致所述表型或有助于所述表型倾向性（如果存在这种倾向性）的基因型的方法，其中，将来自受所研究表型影响的许多个体的核酸顺序，与来自那些没有该表型表现的个体的核酸顺序进行比较，从而鉴别导致所研究表型或有助于该表型倾向性（如果存在这种倾向性）的基因型。

16. 权利要求15所述的方法，其中，比较下列两种核酸顺序的差别：1）来自那些受所研究表型影响的个体的核酸集合体；和

2) 来自那些没有所研究表型表现的个体的核酸集合体。

17. 一种通过引物延伸而扩增未知顺序核酸片段的药盒，该药盒包括：

1) 在某特异位点切割靶核酸以获得靶核酸片段的试剂；

2) 一种适于连接到用(1)所述的靶核酸切割试剂得到的靶核酸片段上的小载体，利用该小载体形成靶核酸片段/小载体单位，所述小载体带有一个和小载体引物杂交的已知顺序的小载体引发区；

3) 四种不同的核苷三磷酸；以及

4) 一种使(3)中的三磷酸核苷聚合的试剂。

18. 权利要求17所述的药盒，该药盒另外还包括一个小载体引物，而且如果需要至少包括一种巢式引物，所述引物带有一个基本上互补于靶核酸片段/小载体单位中的小载体引发区的核苷酸顺序。

19. 权利要求17或18所述的药盒，其中适于连接到靶核酸片段上的小载体含有一个带有第一和第二链的双链部分，小载体的第二链适合于连接到含有起始引发区的核酸片段链上，而且对第一和第二链的核苷酸顺序进行选择，以使小载体引物能够和第二链的互补体杂交，但在相同的杂交条件下不能与第一链杂交。

20. 一种用于通过引物延伸而扩增未知顺序核酸片段的小载体文库药盒，该药盒包括：

1) 至少一个小载体文库，每个文库含有一套从动物、植物或微生物个体核苷酸顺序中得到的靶核酸片段/小载体单位；和

2) 一个或多个与靶核酸片段/小载体单位的起始引发区杂交的引物。

21. 权利要求20所述的药盒，该药盒可用来分析导致所给表

型或有助于该表型倾向性的基因型，其中的一套靶核酸片段／小载体单位包括：

1) 来自那些受所研究表型影响的个体的靶核酸片段／小载体单位集合体；和

2) 来自那些没有所研究表型表现的个体的靶核酸片段／小载体单位集合体。

一种扩增核苷酸顺序的方法

本发明涉及一种扩增核苷酸顺序的方法及其药盒。本方法尤其涉及扩增只有一小部分顺序是已知的核苷酸顺序，并且能够快速、高效率地测定长核苷酸顺序。本方法无需使用迄今为止对于测定未知核苷酸顺序仍属必需的重组DNA克隆方法。通过本方法，也可以测定位于某一遗传位点上各种等位基因核苷酸顺序间的多态现象，以及同时对不同个体的某一特定位点的等位基因进行分析。

核苷酸可以单个核苷酸的形式存在，或者以碱基对（以后简称bp）或核苷酸链的形式存在，每个核苷酸链可含有 10^6 个碱基对甚至更多。例如，人的基因组被认为含有约 3×10^9 个碱基对，一个单染色体含有约 $10^7 - 10^8$ 个碱基对。用于测定相对较短的核苷酸顺序的方法已使用多年，这些方法中包括Maxam和Gilbert的方法 [Maxam A. M. Gilbert W (1977) “一种测定DNA顺序的新方法”。Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74: 560—564和“用碱基特异性化学切割测定末端标记的DNA顺序”Methods in Enzymology 65: 499—560 (1980)]，在此方法中，对在一端具有放射性标记的单链DNA，比如说用放射性 ^{32}P 标记，进行多次化学切割（例如用硫酸二甲酯或肼），有选择性地在一核苷酸的一端切断。用丙烯酰胺凝胶电泳根据大小将所得到的核苷酸片段分开，并运用放射自显影进行鉴别。对于相对短的核苷酸顺序的测定，可以采用Sanger等人的酶促双脱氧方法 (Proc. Natl. Acad. Sci, USA 74:

5463—7, 1977), 在该方法中, 运用DNA聚合酶I的Klenow片段或T7 DNA聚合酶或Taq DNA聚合酶, 在四种三磷酸脱氧核苷酸存在的情况下, 合成一种单链靶顺序的互补链。这四种三磷酸脱氧核苷酸中有一种或几种进行了放射性标记, 比如说用 ^{32}P 标记, 反应在四种独立的保温混合物中进行, 其中含四种低浓度三磷酸双脱氧核苷酸之一。每个反应可得到很多截断的有放射性的DNA分子, 每个分子都有一个相同的5'端, 但距某一特定碱基3'一端的长度不同。适当地保温之后, 使每种混合物中的DNA变性, 并将它们靠在一起进行电泳, 用放射自显影测定单链DNA的放射活性带。从放射自显影照片上可以直接读出靶DNA的顺序。而且E. I. Du Pont de Nemours & 公司 (Du Pont) 最近在市场上投放了一种用于测定DNA链顺序的自动化仪器, 它是对上述“双脱氧”方法的改进。该修改后的方法使用四种用荧光染料标记的三磷酸双脱氧核苷酸终止因子, 用氩激光激发时每个双脱氧链终止因子发出波长略不相同的光 (Science, 238: 336, 1987)。由于可以通过发射光谱对四种三磷酸双脱氧核苷酸终止因子进行区别, 因而这四种终止因子可以在同一容器内使用。可以在丙烯酰胺凝胶单泳道中对最后的DNA片段混合物进行电泳。由于可以通过特征性的荧光发射光鉴别出凝胶中每条谱带上的核苷酸, 因此可以自动地读出靶DNA的顺序。

据估计, Du Pont DNA顺序仪在最佳条件下一天之内能够识别出约10,000个核苷酸, 相对而言, 一个技术熟练的研究人员运用未改进的人工“双脱氧”方法, 一年内估计约识别出50,000个核苷酸。尽管在测定相对短的核苷酸顺序时, 此仪器从根本上提高

了速度和效率，但测定相对长的顺序时，如测定基因组顺序时，测定步骤的速度要取决于俗称的“染色体巡查”步骤。“染色体巡查”方法包括连续分离携有重迭片段的克隆，以覆盖一个片段如染色体，该片段比噬菌体、粘性质粒或酵母人工染色体载体上所能携带的片段都要大。因此本方法可以分离一种感兴趣的位点，对于此位点没有专用于它的探针，而且当此感兴趣的位点连接于如基因或DNA标记这种已经鉴别和克隆的位点上时，此技术则特别有用。这种已鉴别位点可以作为筛选基因组文库的探针，并能与任何含有互补核苷酸顺序并因此代表重迭克隆的片段杂交。这种重迭顺序可以是在5'端上的重迭，也可是在3'端的重迭。一个已经鉴别代表一个重迭克隆的片段本身则可以作为再次筛选基因组文库的探针，并且能与任何含有互补核苷酸而因此代表又一个重迭克隆的片段杂交。通过这种反复过程，可以测定越来越远离于最初识别位点的区域的核苷酸顺序，直至最终找到所需位点。

“染色体巡查”方法存在很多潜在的困难，例如从发现遗传疾病的标记到发现引起该疾病的特异遗传损害所需要的时间。因此，例如在1983年发现了导致亨廷顿舞蹈病〔Huntington's Chorea (D4S1)〕的连接遗传标记，但直至今日，仍未找到引起此疾病的特定遗传损害。对于很多其他遗传疾病都存在类似问题。

“染色体巡查”方法尤为突出的不足之处是，必须先进行基因组DNA的克隆。在很多情况下，克隆是无法进行的，或至少是非常困难的，而且在这种条件下“染色体巡查”会过早结束（参见A R Wyman和K F Wertman在《酶学方法》152卷中的“分子克隆技术指南”，S L Berger和A R. Kummel编，Academic

Press, San Diego, 1987 p 173—180)。而且，对被识别为代表重迭克隆的片段进行分析是复杂的，考虑到片段数目可能位于基因组文库的任一筛选中，以及重迭顺序可以是5'端也可以是3'端的重迭这种事实时，这种分析则更为复杂。

关于“染色体巡查”另一个十分实际的问题是在人和其他基因组内广泛出现的重复顺序。因此，如果这种被识别的位点含有这种重复成分，人基因组内的所有这些成分会被错误地识别为重迭克隆。因而分析会变得极为复杂。

此外，通过“染色体巡查”得到的任何重迭克隆按上述方法测定顺序时，将产生一种从已识别位点上单克隆等位基因衍生的顺序信息。而在研究同一种个体成员间的重要差异及它们与个体表型的关系时，最好是对一个以上的等位基因进行分析并确定其特征。

本发明的基础就是发现了一种至少部分排除了上述困难的方法，该方法通过切割已知顺序之外某特定位置的靶DNA而得到片段，对这些片段进行扩增，因而不必再进行克隆。

因此，根据本发明的一个方面，提供了一种通过引物延伸而扩增含有未知顺序核酸片段的方法。该方法包括切割一种靶核酸而得到靶核酸片段，所述片段之一含有一个与起始引物杂交的已知核苷酸顺序的起始引发区，包括通过连接从靶核酸片段制备靶核酸片段/小载体单位，每个单位有一个和小载体引物杂交的已知顺序的小载体引发区，用合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂，在杂交条件下同时或连续地对靶核酸片段/小载体单位进行处理，以合成一种互补于单链靶核酸/小载体单位的起始引物的扩展产物，该产物具有一个和选择的起始引物杂交的起始引发区，选择起始引物是为了使其基本上与起始引发区互补。

反之，如果不合成这种互补于单链靶核酸片段/小载体单位的扩展产物，就没有这种起始引发区。

如果需要，可以在小载体引物存在的情况下对所说的扩展产物进行扩增，对上述小载体引物要进行选择以使其基本上和小载体引发区互补。

如果要对起始引物扩展产物进行扩增，如 R. K. Saiki 等人所描述的 (Science 239: 487—491, 1987)，则要对靶核酸片段/小载体单位用起始引物进行处理，另外再用小载体引物处理。如果不使用小载体引物，则可通过起始引物和起始引发区的杂交，然后用合适的三磷酸核苷和一种三磷酸核苷聚合剂，在杂交和变性条件下，达到算术或线性扩增 (以后称为线性扩增)。这种引发、引物扩展和变性的过程可以重复多次，以达到所要求的扩增水平。不过，最好是在起始引物和小载体引物都存在的情况下，用上面提到过并将在后面说明的 PCR 技术进行扩增。

根据本发明的另一个特征，还提供了一种通过引物扩展来扩增未知顺序的核酸片段的药盒。该药盒包括：

- 1) 用于在某特异位置切割靶核酸而得到靶核酸片段的试剂；
- 2) 一种适于与靶核酸片段连接的小载体，这些靶核酸片段是运用 (1) 中切割靶核酸的试剂得到的，用此小载体形成一种靶核酸片段/小载体单位，所述小载体具有和小载体引物杂交的已知顺序的小载体引发区；
- 3) 四种不同的三磷酸核苷，和
- 4) 一种用于 (3) 中的三磷酸核苷的聚合剂。

如下面所定义，靶核酸片段/小载体单位的小载体部分可以有小

载体 引发区，也可以没有。因此，只要在使用过程中所形成的靶核酸片段/小载体单位的小载体部分含有一个小载体引发区，本发明药盒中的小载体（2）本身可以不含载体引发区。所以这些单位比如说既可以在通过连接而形成的靶核酸片段/小载体单位的载体部分中含有小载体引发区，也可以如下面所说的那样仅含有一个由于起始引物的扩展而产生的小载体引发区。对后面所有叙述中所说的“靶核酸片段/小载体单位”（也叫做“小载体单位”）应当这样理解。

优选的是药盒另外再包括一种具有与靶核酸片段/小载体单位的小载体引发区基本上互补的核苷酸顺序的小载体引物。如果本发明的药盒中带有这种小载体引物，则可根据需要用PCR方法（后面将作解释）对靶核酸片段/小载体单位进行扩增。

更优选的是，这种药盒还包括一系列“巢式”小载体引物（如后面所定义的），这些小载体引物例如可用来进行必需的或要求的第二次扩增反应，和/或直接用于如U B Gyllenstein和H Ehrlich所描述的扩增产物的测序（Proc. Natl. Acad Sci. USA 85: 7652—7656, 1988）。应当理解的是，所有这些小载体引物都可很好地用作直接测序引物，以测定只用起始引物通过线性扩增所得片段的远端顺序。

鉴于所要测定的靶核酸对于药盒的使用者来说一般是特殊的，药盒内一般不包括起始引物，但是药盒的使用者可以制备。

不过，如果需要，本发明的药盒还可以包括起始引物，而且需要的话也可以包括巢式起始引物。

本发明的药盒最好还包括用于本发明方法的缓冲液，本药盒一个特殊的性质是，含有用于调节反应混合物中钾、镁和三磷酸核苷浓度

的缓冲液。后面这些缓冲液对于确定本发明方法后续循环的最佳条件是必需的。

最为理想的是，该药盒包括一种以上（许多）用于在某些特定位置切割靶核酸的试剂。如果提供许多这种试剂，那么该药盒一般将含有用于每个这种试剂的不同的小载体，以使所得到的每套靶核酸片段都能够形成相对应的靶核酸片段/小载体单位。虽然本发明并不局限于这种使用，但是许多不同的小载体最好能具有互补于同一小载体引物的顺序。在这种情况下，一个单一的小载体引物可以提供许多靶核酸切割位点的扩增。

因此，在一个优选的具体方案中，本发明药盒还应包括下述一种或多种成份：起始引物，巢式小载体引物，巢式起始引物，测序引物，用于完成本发明方法的缓冲液，以及用于调节镁、钾和三磷酸核苷浓度的缓冲液。

根据本发明的另一个特征，还提供了一种小载体文库药盒，以用于通过引物扩展来扩增未知顺序的核酸片段，该药盒包括：1）至少一种小载体文库，每个小载体文库含有一组从动物、植物或微生物个体的核苷酸顺序中得到的靶核酸片段/小载体单位；和 2）一种或多种用于和靶核酸片段/小载体单位的起始引发区杂交的起始引物。

小载体文库药盒最好包括多种小载体文库。

靶核酸片段/小载体单位既可以直接从所需要的种中制备，也可以从所需种在质粒、噬菌体、粘性质粒或酵母人工染色体（YAC）载体的初始克隆中间接制备。所使用的动物、植物或微生物种最好是人，但也可以是任何其他动物种、植物或微生物，如细菌、病毒、

酵母或寄生虫。核苷酸顺序最好是从基因组 DNA 中得到，但也可从选择的染色体或克隆中得到。

所用的小载体单位可以通过单一切割法得到的，和/或多种小载体单位通过多切割法得到，这些小载体单位可一起或各自组成小载体文库或多小载体文库（如后面所述）。

所使用的靶核酸片段可以来自许多不同的来源。例如，靶核酸片段可来自动物、植物或微生物的单个个体，例如来自这些种的典型个体。靶核酸片段也可来自对于所给遗传位点（例如一个可导致膀胱纤维变性或其他遗传疾病的位点）来说已知是杂合的单个个体。靶核酸片段也可来自对于所给遗传位点（例如可导致膀胱纤维变性或其他遗传疾病的位点）来说已知是纯合的单个个体。靶核酸片段也可来自对于所给遗传位点（例如可导致膀胱纤维变性或其他遗传疾病的位点）来说已知是一般纯合子的单个个体。靶核酸片段也可来自具有共同表型的一组个体（相对于单个个体而言）。如果需要，从具有共同表型的一组个体的每个成员得到的核酸或组织可以合并。每组个体至少包括 2 个而且最好不超过 1000 个成员，例如 50—500。小载体单位可以从靶核酸片段中制备，这些小载体单位可以共同或分开使用以形成小载体文库。如果需要，该共同表型可以是一种疾病或疾病倾向性，一种遗传疾病的专性传递，或者是没有疾病或疾病倾向性表现的一般状态。

通过比较用本发明方法得到的核苷酸顺序，可以识别出群体中与某种疾病或疾病倾向性有关的任一种共同遗传变种。应当理解，本发明能大大扩大细致分析的范围，而且超过了以往使用 RFLP 方法企图达到的范围。

本发明小载体文库药盒最好还含有小载体引物，以及最好含有由下列选出的一种或多种：巢式起始引物，巢式小载体引物和测序引物。小载体文库药盒还可方便地包括四种不同的三磷酸核苷中的每一种和一种三磷酸核苷的聚合剂。如果需要，小载体文库药盒还可含有完成本发明的缓冲液和/或用可调节镁、钾和三磷酸核苷浓度的缓冲液。在确定本发明方法后续循环的最佳条件时，后面这些缓冲液是必需的。

本发明用途广泛。例如，本发明可用来鉴别某些特殊微生物（如导致植物或动物，尤其是人发生疾病的）的核苷酸顺序，这些微生物可以是例如真菌、酵母菌、细菌、病毒或寄生虫（如疟原虫（疟疾）或锥虫（睡眠方面的疾患））。本发明的方法也可用于鉴别某生物体内引起抗药（如抗生素）性的核苷酸顺序。因而，本发明能够生产动物或植物疾病的诊断探针，还可以生产抗药（如抗生素）性的诊断探针。

本发明还可用于：例如 1）测定引起植物，但特别是动物，尤其是人的遗传性疾病的核苷酸顺序变异，如点突变；2）测定引起动物，尤其是人的肿瘤性疾病的核苷酸顺序变异，如缺失；3）测定引起植物，但特别是动物，尤其是人体内疾病或疾病倾向性的核苷酸顺序变异；以及 4）测定负责某些特殊性质的核苷酸顺序变异，例如所需要的特性，如植物中花的颜色、农作物产量或除莠剂抗性等。

本发明也可用于动物研究，例如对基因转化动物的监视。

此外，本发明尤其涉及动物基因组，尤其是人基因组的顺序测定，例如可对一些迄今尚不清楚的，能在体内尤其是人体内生成且具有治疗意义的多肽进行鉴别。本发明还涉及一些药物蛋白的生产，例如测定基因或表达系统调节区的顺序。

在大基因组如人基因组的测序过程中，目前所公认的主要障碍是制备包括分离的粘性质粒克隆的重迭“邻接”的物理图谱。目前对这种图谱测定方法的评论见下文：“测定我们的基因图：基因组方案：多大，多快？”美国国会技术评定办公室，约翰·霍普金斯大学出版，巴尔的摩和伦敦（1988）。更为详细的描述见“测定人基因组图谱：用于克隆和编排DNA片段的实验方法，”（R M Myer, Department of Physiology, University of California, San Francisco, USA, 《设计我们基因图的条约报告》Vol. 2, order No PB 88-162 805/AS, 由美国国家经济技术信息中心的OTA主办（NTIS），5285 Port Royal Road, Springfield, VA 22161, USA）。一种用于测定小得多的大肠杆菌基因组图谱的方法见C L Smith等人（Science 236: 1448—1453, 1987）和Y Kohara等人（Cell 50: 495—508, 1987）。

本发明也可用来例如测定那些在粘性质粒和YAC（酵母人工染色体）中克隆而纯化的大核苷酸片段的顺序。粘性质粒可用于克隆高达约45 kb的核苷酸片段，而YAC可用于克隆平均大小超过300 kb的片段（Nucleic Acids Research 17: 3425—3433, 1989, R Anand等人）。应用本发明的方法测定这种大核苷酸片段顺序，能够加速测定很大的核苷酸片段的顺序。

本发明的一个突出优点是，使用本发明方法进行顺序分析不涉及靶核酸的克隆。实际上，这就是说可以对存在于靶核酸样品中的全部等位基因同时进行分析。这种用于鉴别杂合子及正常纯合子和纯合子

突变体的方法，其优点在前面已有描述，即采用 P C R 产物的直接测序法来分析导致遗传病的突变（例如点突变）。（*Nucleic Acids Research* 16; 8233—8243, 1988, C R Newton 等人）。在杂合子中很容易看到点突变，因为在两个“双脱氧”测序凝胶泳道中出现对应于两种不同碱基的共迁移带。在此碱基对的纯合子（正常的或突变体）表现为对应于测序凝胶上此位置的一个碱基或其他碱基的单一谱带。

在以往，以这种 P C R 为基础的顺序分析法的前提是，用已知方法事先测出感兴趣区域的顺序。这样可设计出用于感兴趣区域的扩增和后续的重复测序的 P C R 引物。本发明用尚未完全建立顺序的靶核酸片段就能进行这种分析。用本发明方法测定来自某个体的人基因组 D N A 的顺序，揭示出二倍染色体之间全区域内的多态差异。如果该个体对于在所给遗传位点的未知突变来说是专性杂合子，那么，运用本发明方法测定两种等位基因的顺序（最好同时测序），将不可避免地揭示出所存在的导致可见表型的所有多态碱基。通过对已知的正常纯合子和纯合子突变体（和其他专性杂合子）内相同靶核酸顺序的后续研究，可以确定或否定个体多态碱基变化的重要性。本发明又一个优点是，在研究染色体之间的变异方面，本发明方法大大超过了目前以 R F L P（限制片段长度多态现象）为基础的方法。在该方法中，只能测出那些很少产生或破坏限制性核酸内切酶识别位点的碱基变化。现有技术中有用于对不产生 R F L P 的点突变进行简易分析的技术（*Nucleic Acids Res.* 17（7）：2503—2516, 1989, C R Newton 等人）。

本发明的另一个特征是在多基因或多因子疾病分析中的应用。例

如，确定位于某些特定遗传位点的特殊多态变种，是否表示是引起这些多因子多基因疾病如动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、精神分裂症等的一种倾向性是有利的。以往试图运用 RFLP 技术来解决这个问题，一般都未能成功。这并不奇怪，因为这种研究要依赖于用个体候选基因探针通过大量费时费工的 Southern 印迹法以检查多态现象。因此，对于与疾病倾向性连锁的人基因组内所有多态现象已进行实际分析的范围实际上已经非常之小了（见“Molecular Approaches to Human Polygenic Disease,” Ciba Foundation Symposium 130, John Wiley, Chichester, 1987）。运用本发明的方法能够将来自一些带有某种疾病、疾病倾向性或其他表型个体的靶核酸混合。如后面所定义的小载体文库可以从这样合并的靶核酸构建，如合并的人基因组 DNA。本发明可以对合并的基因组 DNA 以队列方式进行测序。共同多态现象和单一杂合子在观察方式上的相似性将变得很明显。而且，无需进行任何重组 DNA 的克隆，意味着能同时分析存在于合并的基因组物质中的全部等位基因。存在于合并物中的个体样品的数量不受限制。运用本发明的方法简单地揭示出一致基因型加多态现象。使这样得到的结果和分析来自未表现疾病、疾病倾向性或其他表型个体的合并的基因组 DNA 而得到的类似结果加以比较，可以鉴别出与该疾病或表型有关（或相反不具有该疾病或表型）的多态现象。这种分析不局限于与候选基因较密切的小区域人基因组。通过使应用所给的起始引物而得到的扩增产物及特殊小载体文库的结合，可以使本发明的这种分析方法更为容易，所述小载体文库是由“正常的”或“受感染的”个体的靶核酸合并物制备的。如果群体之间的确存在大的多态差异，那么混合扩增产

物，并使之变性和再退火将产生带有错配碱基对的双链扩增产物。这种错配可以运用试剂如 OsO_4 或羟胺而揭示出来，方法见 (R G H Cotton, N R Rodrigues 和 R D Campbell PNAS, 4397—4401 1988)。

下面列举了一系列本文所使用的术语，以便有助于读者阅读本说明书。

术语“靶核酸”是指一种核苷酸顺序，一般基因组 DNA，例如植物或动物基因组 DNA，象人 DNA 或细菌 DNA。本发明方法中所使用的这种“靶核酸”一般包括一部分（一般是一小部分）已知顺序和很大部分的未知序列。

本文所用的术语“靶核酸片段”是指通过切割（如后面所述）靶核酸而得到的靶核酸的一个片段。因此，术语“靶核酸片段”不局限于运用限制性核酸内切酶得到的这种片段。而且，这种片段还包括一部分已知顺序和一般是很大部分的未知顺序，或者该片段是未知顺序。如果该片段是未知顺序，靶核酸片段/小载体单位的切割和产生将按后面所述进行。在这种情况下，可以用“随机”起始引物通过线性扩增、或用随机起始引物加小载体引物的扩增由很大的基因组片段中产生随机 DNA 探针。特异性扩增将随机产生能够纯化及运用于遗传图谱测定的片段。见 Cell 51: 319—337, 1987. H Donis-Keller 等人。

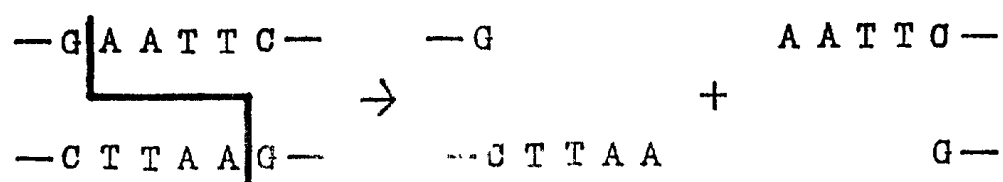
本文所用术语“扩增”是指，通过非生物学方法进行的某种核苷酸顺序和/或它的互补顺序的复制，因此包括单独使用起始引物的扩增，这种引物和某种靶核酸片段/小载体单位的起始引发区杂交，引物的扩展是在合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂作用下在杂交

条件下进行的，这种引物扩展之后使之变性，这种引发、引物扩展和变性的过程可以重复多次，以达到所需要的扩增水平。术语“扩增”也包括运用聚合酶链反应（PCR）技术进行的复制，如R. K. Saiki等人对此方法作过描述（Science 239: 487-491, 1987）。而且美国专利4,683,195和4,683,202号使用了如下所述的起始引物和小载体引物，本文所说的聚合酶链反应或PCR技术就是指这些文献中的方法。

这里所用术语“非生物学的”仅仅排除由细菌集落的直接克隆和增殖而进行的扩增。因此，本文所用术语扩增最好包括如PCT专利公报WO 87/06270（或Biotechnology Vol 6, 1988年10月），PCT专利公报WO 88/10315或PCT专利公报WO 89/01050中所述的那些扩增方法。

本文所用术语“切割”是指核酸在特定位点上的切割。这种切割运用限制性核酸内切酶很容易进行，最好是一种切割6bp的核酸内切酶，并具有已知的识别顺序和切割方式，以及在某一特定位点上切割DNA的特性。

关于这一点，一般不知道所说靶核酸中这些“特定位点”的位置与该核酸中另外已知成分位置的关系，但是，正如知道它们的切割方式一样，这些特定位点的顺序是知道的。因此，所得到的限制片段的终止顺序是知道的。因此，比如说限制性核酸内切酶EcoRI识别下面的顺序：



并切开如上所述的顺序，以产生带有所说粘性末端的限制片段。由于该粘性末端的顺序是已知的，因此，根据后面关于“靶核酸片段/小载体单位”所说的知识，能够生产靶核酸片段/小载体单位。可以使用并不是限制性核酸内切酶而在某特定位置切割靶核酸的方法，但是最好使用限制性核酸内切酶。任何合适的核酸内切酶都可使用。限制性核酸内切酶的例子详见“核酸研究”，顺序目录，16：r 271—r 313，1988。以及见“分子生物学现代方法 1987—1988”，由 Ausubel F. M.，Brent R.，Kingston R. E.，Moor D. D.，Smith J. A.，Seidman J. G. 和 Struhl K. 编，Wiley Interscience，第三部分，表 3.1—1。不管该粘性末端带有 5' 伸出还是 3' 伸出，只要能够生成粘性末端片段的限制性核酸内切酶就可使用，例如 EcoRI、Hind III 和 XbaI。下面的情况也是可以的，就是不仅可使用能够产生带有 3' 或 5' 粘性末端片段的限制性核酸内切酶，也能够使用产生平头的限制性核酸内切酶和如下定义的平头小载体来产生靶核酸片段/小载体单位。不使用标准的限制性核酸内切酶消化而对靶核酸在某个（些）特异位点进行切割的方法，在现有技术中是已知的，而且还包括（例如）使用连接物—引物和 Class—II S 限制酶（S C Kim 等人，Science 240：504—506，1988；W Szybalski，Gene 40：169，1985；A J Podhajaska 和 W Szybalski，Gene 40：175，1985）以及各种化学方法（B L Iverson 和 P B Dervan，J. Amer. Chem. Soc. 109：1241—1243，1987；G B Dreyer 和 P B Dervan，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82：968，

1985; V V Vlassov等人, *Nucleic Acids Res.* 14: 4065, 1986; H E Moser和P B Dervan, *Science* 238: 645, 1987; D R Corey和P G Schultz, *Science* 238: 1401, 1987; J P Sluka等人, *Science* 238: 1129, 1987)。

此外, 不管靶核酸片段是通过限制酶消化还是通过其他(如化学的)方法产生的, 都能使该靶核酸片段变为平头, 可以用DNA聚合酶对任何5'伸出的粘性末端进行填充/修补, 也可以运用S1核酸酶进行单链消化而切除3'和/或5'伸出。所有这些平头片段可以通过附着于合适的平头小载体而再次转化为靶核酸片段/小载体单位。

本文所说的“起始引发区”是指切割的(如限制酶消化)靶核酸片段中已知核苷酸顺序的那部分, 而且在使用中, 该部分可与起始引物杂交, 如果需要, 起始引物可以是巢式起始引物(如后面所述), 例如重迭的巢式起始引物。一般情况下, 进行本发明的方法时只有一种靶核酸片段带有起始引发区。一种例外是, 使用大量的不同小载体文库的混合物(定义如下)。

本文所述的“小载体引发区”是指(正如小载体本身所定义的)靶核酸片段/小载体单位中的已知核苷酸顺序的部分, 而且在使用中, 它可与小载体引物杂交, 而且如果需要, 可与巢式小载体引物(如后面所定义)杂交, 例如重迭的巢式小载体引物。小载体引发区存在于与含有起始引发区的链互补的链中。关于这一点, 在使用中, 杂交有小载体引物(如果需要的话是巢式小载体引物)的“小载体引发区”既可存在于通过连接制备的靶核酸片段/小载体单位中, 也可存在于通过起始引物的引物扩展而制备的靶核酸片段/小载体单位中, 或者

存在于两者中。因此应当理解，本发明方法中所用的小载体引物（必要时是巢式小载体引物）可根据与小载体引物区的杂交进行选择，而后者要直到起始引物（必要时是巢式起始引物）的引物扩展后才产生。其结果是，小载体本身不必是一个完全自我互补的双链DNA片段。

本文所用术语“引物”是指一种寡核苷酸，不管是在纯化的限制消化液中自然产生的还是合成的，当置于下述条件时它可作为合成起始点起作用：该条件是合成互补于核酸链的引物扩展产物的诱导条件，也就是说，在合适的三磷酸核苷和某种聚合剂如DNA聚合酶的存在下，处于合适的缓冲液中（“缓冲液”包括pH值、离子强度、辅助因子等），并在适宜的温度下。

为了达到最大效率的扩展，引物最好是单链的，但也可以是双链的。如果是双链的，首先对引物进行处理，在用来制备扩展产物之前分开其双链。该引物最好是一种寡聚脱氧核苷酸。引物必须有足够的长度，以在聚合剂的存在下引发扩展产物的合成。引物的确切长度取决于很多因素，包括温度、引物的来源和方法的使用。例如，根据靶顺序的复杂性，典型的起始引物和小载体引物可含有15—35个核苷酸，当然也可含有更多或更少的核苷酸。短的引物分子一般需要在较低温度下才可与模板形成足够稳定的杂交复合物。

本文所用术语“起始引物”是指能和前面所说的起始引发区杂交的引物。和从全部人基因组DNA中制备的小载体单位一起使用时，“起始引物”的长度最好超过15—17个核苷酸，以避免和存在于人基因组中的顺序发生随机杂交和引发，那些顺序刚好能与起始引发区中的顺序配对。

本文所用术语“小载体引物”是指一种能够和靶核酸片段/小载

体单位的小载体引发区进行杂交的引物。“小载体引物”具有这样一个核苷酸顺序，它在从其互补体上分离下来后能与起始引物扩展产物进行杂交，借此该起始引物扩展产物作为合成小载体引物的扩展产物的模板，从而促进扩增。鉴于在一般情况下，使用本发明方法时只有一种靶核酸片段/小载体单位带有一个起始引发区，所以只有那个单位被扩增。那些没有起始引发区的靶核酸片段/小载体单位则不能进行PCR扩增，其原因是，虽然能够形成小载体引物扩展产物，但没有能和小载体引物扩展产物杂交的起始引物，既然不存在起始引发区，因此就不可能进行PCR扩增。

在使用中，小载体引物扩增产物的合成最好依赖于起始引物扩展产物的初始合成进行。这样可以避免形成大量不能扩增的小载体引物扩增产物，这些产物会以有害的方式耗尽反应物中存在的三磷酸核苷或其他辅助因子。

本文所用术语“巢式引物”是指，被远离起始引物5'端的3'方向上，或远离小载体引物5'端的3'方向上，或远离二者5'端的3'方向上的一个或更多碱基对所取代的引物。这个(些)巢式引物的顺序，最好从互补于已知的起始引发区或小载体引发区，或互补于二者的顺序中选择。

本文所用术语“靶核酸片段/小载体单位”(本文也称为“小载体单位”)是指一个核苷酸顺序，例如一个DNA顺序。该顺序含有一个靶核酸片段和一部分已知核苷酸顺序，如一个DNA顺序，如前所述，其中以单链形式存在的该部分顺序能和小载体引物杂交。关于这一点，应当理解，“靶核酸片段/小载体单位”能够和小载体引物杂交，是依靠所述单位中基本上互补于小载体引物的已知核苷酸顺序

的存在，或者依靠起始引物扩展产物的能力而完成。以所述单位的一条链作为模板为基础，它含有一个基本上互补于小载体引物顺序的核苷酸顺序。关于这一点，应当理解，“靶核酸片段/小载体单位”的单链中至少有一部分和小载体引物顺序基本相同的顺序。这个链也将含有起始引发区。

已知核苷酸顺序的部分（如DNA顺序）可从任何方面的来源产生，只要它能满足上述要求，即在单链形式下能和小载体引物杂交。因此，可用DNA合成仪分别制备小载体，并将得到的小载体与靶核酸片段连接，以得到靶核酸片段/小载体单位。关于这一点，小载体要方便地适于与核酸片段连接，例如，靶核酸片段上的粘性末端和小载体上的粘性末端进行杂交，形成如前所述的小载体单位。或者使平头靶核酸片段与平头小载体连接，以形成前述的小载体单位。不过，没有必要在和靶核酸片段连接之前就先形成小载体，当然这样做更好。因此，在合适的情况下，可通过将一个单链DNA与靶核酸片段连接而制备上述单位，例如，运用粘性末端的伸出而获得第一个朝向它的单链DNA，然后连接第二个单链DNA，以形成所需要的单位。

在本发明的一个具体方案中，靶核酸片段/小载体单位含有一个阻断小载体部分。这里所用术语“阻断小载体”是指在小载体或靶核酸片段/小载体单位的小载体部分中，对一个或两个自由的末端碱基进行了修饰，以防止它与核苷酸连接，或者防止比如在合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂的存在下及在杂交条件下发生的引物延伸。这种修饰作用本身是已知的，而且可以包括一种双脱氧核苷的存在。因此，双链阻断小载体可以带有一个3'端的双脱氧核苷，例如双脱氧腺苷（ddA）。这种修饰也可以包括核酸核苷，在此修饰中，用

高磷酸盐切下核糖的二醇。还有一种可能是，可以用3' -脱氧腺苷三磷酸和末端转移酶将3' -脱氧核苷如3' -脱氧腺苷残基加在3'末端上。此外，还可以用本身已知的化学方法在3'端加上一个3' -氨基或3' -硫基官能团。

本发明的另一个具体方案是，小载体或小载体部分含有两个部分杂交的单链顺序，该顺序具有一定程度的非互补性，以致不能运用这种小载体进行小载体引物的延伸。

本文所用术语“三磷酸核苷”是指存在于DNA或RNA中的核苷的三磷酸盐，因而包括以腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶为碱基，糖部分是脱氧核糖或核糖的核苷。一般情况下，脱氧核苷要和DNA聚合酶结合使用。不过，应当理解，也可以使用能和常规碱基腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶之一进行碱基配对的其他修饰碱基。这种修饰碱基包括例如7-去氮杂鸟嘌呤和次黄嘌呤。

本文所用术语“核苷酸”可以是指存在于DNA或RNA中的核苷酸，因而包括以腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶为碱基，糖部分是脱氧核糖或核糖的核苷酸。不过，应当理解，也可将与常规碱基腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶之一进行碱基配对的其他修饰碱基用于本发明所使用的起始引物和小载体引物中。这些修饰碱基包括如7-去氮杂鸟嘌呤和次黄嘌呤。

三磷酸核苷聚合剂可以是能够合成引物延伸产物的任何化合物或系统，包括酶。适用于这种合成的酶包括如大肠杆菌DNA聚合酶I (Richardson C. C. 等人, J. Biol. Chem. 239:222, 1964), 大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段 (Jacobsen

H. 等人, *Eur. J. Biochem.* 45: 623-627, 1974), T4 DNA聚合酶 (Panet A 等人, *Biochemistry* 12: 5045-5050, 1973), T7 DNA聚合酶 (Tabor S. 和 Richardson C. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4767-4771, 1987), 其他可得到的DNA聚合酶, 逆转录酶和其他酶, 包括热稳定酶。这里所用术语“热稳定酶”是指对热具有相对稳定性并且抗热的酶, 并且该酶能够以适宜的方式催化核苷酸的结合, 以形成互补于每条核酸链的引物延伸产物。一般情况下, 合成是在每个引物的3'端开始, 沿着模板链向着5'端的方向进行合成, 直到合成终止, 一般生成长度各不相同的分子。在本发明中, 合成一般终止于由靶核酸切割位点所决定的位置, 产生长度相同的分子。不过, 有一些酶, 包括热稳定酶, 是在5'端开始沿着另一方向合成, 合成过程近似于上述过程。可用于本发明方法的优选的热稳定酶是从水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) 中提取和纯化的, 其分子量约为86,000-90,000道尔顿, 有关描述见欧洲专利公报 No. 237,362 (也可见欧洲专利公报 No. 258,017)。水生栖热菌YT1株可从美国典型培养物保藏中心 (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA) 无限制地得到, 登记号为ATCC 25,104。

显然, 可通过表达这些蛋白质的克隆的随机突变, 得到具有更好或有利特性的DNA聚合酶。例如, 显然最好是得到一种编码Taq DNA聚合酶的双链DNA的突变体, 它表达一种具有优越特性的蛋白质, 例如缺乏5'-核酸外切酶活性。得到这种突变体的方法是已知的, 而且是在分子生物学普通技术人员的技术范围之内。

本文所用有关核苷酸的术语“互补于”是指一种核苷酸被掺入DNA或RNA以后，会和另一个特定核苷酸进行碱基配对。因此，脱氧腺苷三磷酸互补于胸苷三磷酸，脱氧鸟苷三磷酸互补于脱氧胞苷三磷酸，而脱氧鸟苷三磷酸与胸苷三磷酸则是不互补的。关于这一点，应当理解，虽然胸苷三磷酸与脱氧鸟苷三磷酸在特定条件下可以进行碱基配对，但本说明书不认为它们是互补的。

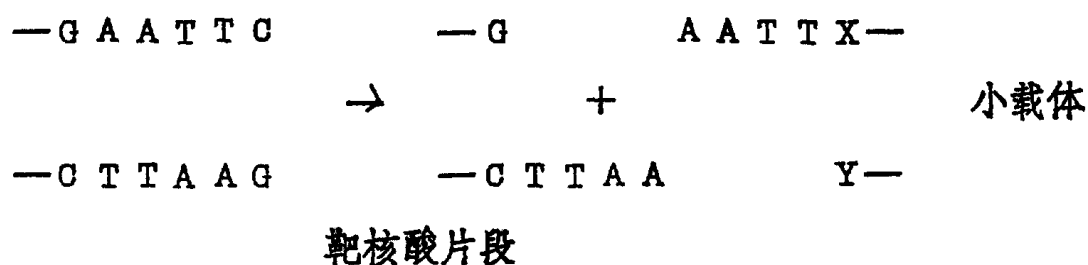
本文中所选用的引物“基本上”互补于所要延伸或扩增的每个特定顺序的不同链。这就是说，这些引物必须具有足够的互补性以和它们各自的链进行杂交。因此，这些引物顺序不一定严格反映其模板的顺序，当然一般情况下这样更好。

本文所用术语“小载体文库”是指大量的靶核酸片段/小载体单位，这些小载体单位的获得方法是，就所给限制性核酸内切酶而言，在靶核酸具有的所有可能的切割位点上对靶核酸进行切割，之后，通过与适当改变的小载体部分反复连接，从靶核酸片段的总混合物中制备靶核酸片段/小载体单位（需要的话可反复切割）。一般情况下，在所给的小载体文库中只有一个小载体单位含有感兴趣的起始引发区。用能识别特异的6 bp顺序（即6 bp切割酶）的限制性核酸内切酶切割人基因组DNA时，所得到的靶核酸片的平均大小是4096 bp，该靶核酸生成约 10^6 这种片段。因而，由一个切割6 bp的限制性核酸内切酶切割的人基因组DNA中，可得到约含有 10^6 靶核酸片段/小载体单位的小载体文库。而且在整个人小载体文库中，只有一个这种小载体单位含有给定的起始引发区，该起始引发区能够在起始引物（必要时用小载体引物）及合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂的存在下，在杂交条件下启动扩增作用。

通过用不同的限制性核酸内切酶切割，以及与适当改变的小载体部分的连接以产生靶核酸片段/小载体单位，可以从同一靶核酸中制备各种不同的小载体文库。如果需要，本方法可以使用所有能够得到的限制性核酸内切酶，在此范围内，一个小载体部分能在靶核酸中的每个限制性酶识别位点处与靶核酸片段连接。这种特性并不总是所期望的，因为在理想情况下，任何所给小载体文库中感兴趣的起始引发区会以100 bp 的长度从小载体部分的结合点分开。这是因为，比它还要小的起始引物延伸产物或起始引物/小载体引物扩增产物在本发明的实际应用中，产生的顺序信息太少，以致对于有效地测定长核苷酸顺序来说没有多少价值。而且，这些小产物的核苷酸顺序被包含在用小载体文库得到的产物中，其中，起始引物离小载体部分的附着点更远。运用大量不同的小载体文库和一个特殊的起始引物，可以鉴别出这样一些文库，其中，延伸或扩增产物的大小可方便地用于顺序测定。例如，最好是选择那些从具有给定的起始引物的特殊小载体文库中得到的大小约为200 bp、400 bp、600 bp、800 bp、1000 bp 等的起始引物延伸或扩增产物。这些刚好由于给定的起始引物而产生的来自小载体文库的产物，用小载体或巢式小载体测序引物和已知方法来测定顺序，结果可能产生该起始引物3' 一侧大部分区域的重迭顺序数据。在对大量具有给定起始引物的小载体文库进行的一轮分析中产生的顺序数据量，只受到起始引物延伸或扩增产物大小的限制，这些产物可以在实践中和/或根据（从该起始引物区）至小载体文库中的最远限制性核酸内切酶位点的距离而获得。

在本发明方法的优选方案中，靶核酸片段/小载体单位是通过连接从靶核酸片段中制备的，因此，这个小载体不能够用与切割靶核酸

产生靶核酸片段时相同的试剂而从形成的靶核酸片段/小载体单位上切下。最好用一种能够产生与小载体连接的靶核酸片段的限制性核酸内切酶切割靶核酸，并对小载体顺序进行这样的选择，使得在靶核酸片段/小载体单位中不存在所述限制性核酸内切酶的识别顺序，例如，在上述的EcoRI例子中：



其中，X是除C以外的任何核酸，而Y是它的互补核苷。

本发明还可以这样进行，即使得引物延伸产物或者最好是小载体引物扩增产物的合成依靠于起始引物延伸产物的初始合成。

例如，这可以通过线性扩增，或者最好是通过运用只能和起始引物延伸产物杂交的小载体引物而完成。因此，靶核酸片段/小载体单位的小载体部分最好含有一个具有第一和第二链的双链部分，第一链具有一个终端聚合阻断基团，而第二链被连接到含有起始引发区的靶核酸片段链上，并具有一个单链部分，所述终端聚合阻断基团能够防止第一链的延伸，以在合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂的存在下和在杂交条件下，不能形成对于第二链的所述单链部分的互补体。这样，小载体引物不能与靶核酸片段/小载体单位杂交，但能与起始引物的延伸产物杂交。因此，只有在产生一种起始引物的延伸产物后才能得到小载体引物的延伸产物，随后，所获得的延伸产物一般包括一个和第二链的单链部分的已知核苷酸顺序互补的部分。这一优选方案在后面的图6中予以解释。

聚合阻断基团能够防止来自引物的核苷酸顺序的聚合，从而在三磷酸核苷聚合剂的存在下，例如DNA聚合酶，如大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段、T7 DNA聚合酶或Taq DNA聚合酶，不能形成模板核苷酸顺序的互补体。该聚合阻断基团可以是能起这种作用的任何合适的已知基团，如某种适当修饰的核苷如双脱氧核苷或3'-脱氧核苷（如3'-脱氧腺苷），或者一个3'氨基或3'硫基官能团。

在本发明的另一个特别优选的方案中，靶核酸片段/小载体单位的小载体部分含有一个具有第一和第二链的双链部分，小载体部分的第二链被连接到含有起始引发区的靶核酸片段链上，对第一链、第二链和小载体引物的核苷酸顺序进行选择，以使小载体引物能够和第二链的互补体杂交，但在同样的杂交条件下不能和第一链杂交。应当理解，在本方案中可以不需要聚合阻断基团的存在。进一步应当理解，在这种情况下，小载体引物的顺序可以和小载体第二链的至少一部分顺序基本相同。本发明的这个特别优选的方案将在后面涉及到图6时作进一步讨论。

本发明的另一个优选方案包括制备用于同一起始引物的大量不同的小载体文库，每个小载体文库可通过在不同切割位点上切割靶核酸来制备，并通过连接从靶核酸片段中制备靶核酸片段/小载体单位，从而形成所说的小载体文库；用合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂在杂交条件下分别或一起处理每个小载体文库，在使用同一起始引物的基础上，从而得到大量起始引物延伸产物。这种延伸产物的大小，取决于从起始引物到特殊切割试剂的最近3'位点的距离，例如构建特异文库所用的限制性酶。

如果需要，可以对一种或更多所说的起始引物延伸产物进行分离和/或测序，或者至少测定一部分延伸产物的顺序。因此，应用本方案可方便地鉴别出所需要的，一般是最长的，含有起始引发区的靶核酸片段，从而用一个如下所述的巢式小载体引物可方便地测定该3'末端顺序，以便为使用本发明的方法（例如本方案）提供一个新的起点。对于另一轮小载体文库的多起始引物延伸产物的形成以及最长靶核酸片段的鉴别和顺序测定来说，上述的最长靶核酸片段3'末端顺序则因此变成新的靶核酸片段的起始引发区。

在根据用本发明方法在靶核酸片段3'端产生的新顺序数据选择新的起始引发区时，使这些数据和公众可得到的已知核酸顺序的数据库（如Genbank，EMBL）作常规比较，以保证所选择的新的起始引发区不会偶然与感兴趣的基因组DNA中已知的其他核酸顺序密切匹配。显然，如果某特别靶核酸片段的3'端偶然会有象ALU顺序这样的重复成分，则很有可能会出现这种情况。在这种情况下，在进行本发明的方法时，最好将大量小载体文库和一个给定的起始引物一起使用，以保证至少有一个所得到的延伸产物具有非重复的/独特的3'端，以选择另一个起始引发区。

用与制备靶核酸片段/小载体单位（如前所述的“小载体文库”）所用相同的限制性核酸内切酶，对所说的靶核酸分别进行完全消化，并进行琼脂糖凝胶电泳和Southern印迹分析。用这样得到的样品可以方便地监测从一个未知的起始引发区沿靶核酸到另一个起始引发区的逐步前进。用第一起始引物对这样得到的滤膜进行探测，揭示出一个与该靶核酸片段中第一起始引发区周围的各种限制性酶识别位点相一致的图谱。将本发明的方法用于大量小载体文库和此第一起

始引物，会产生一系列延伸产物，所有这些产物的3'端根据与产生所述小载体文库所用限制性酶的最近识别位点的起始引发区的相对位置而定。因此，有效地得到第一起始引物3'侧的限制位点图谱。继而选择一个未知顺序的第二新起始引发区之后，通过用第二个新起始引物对上述Southern印迹滤膜进行探测，可建立一个与第一起始引发区的连锁。在第一与第二起始引发区之间没有所用限制酶的识别位点的情况下，所得到的图谱与用第一起始引物得到的图谱相同。如果在相应的小载体文库中出现较小的延伸产物，则在起始引发区之间确实存在所用限制酶的识别位点，在此情况下，通过用第二起始引物对Southern印迹滤膜进行探测，则一般可观察到一个不同大小的片段。通过反复进行这种方法，这种从一个起始引发区沿靶核酸向另一个起始引发区逐步前进的稳定性、准确性和可靠性可得到保障。

应当理解，通过已知方法使用相同的小载体引物或巢式小载体引物测定顺序，也可以容易地得到所有起始引物延伸产物的3'端顺序。通过这种途径，可以简易和系统的方式确定靶DNA核酸未知片段的全部顺序，而且比使用M13(“鸟枪法”)克隆方便得多。这是因为可以按大小对起始引物延伸产物进行排列，这样它们在原靶核酸中的顺序次序就很明显了。每个起始引物延伸产物都有一个由该起始引物决定的5'端，和一个3'端，该3'端取决于用于合成特定小载体文库的特异切割试剂(如限制性酶)的最近的3'位点。

根据本发明的一个优选方案，对于所获得的任何或所有起始引物延伸产物，至少在远离于所述起始引物的一端进行测序(如后面所述)，以便确定下一个起始引物的顺序，借此通过下一个起始引物的引物延伸可得到下一个起始引物延伸产物。

在本发明的另一个优选方案中，测定起始引物延伸产物或它的一部分的顺序（如后所述），以确定所述延伸产物或其一部分的特征。

如上所述，本发明的一个重要实施可能性就是，识别某种以往尚未鉴别的基因型，例如某种遗传缺陷。这种遗传缺陷可导致某种表型如遗传疾病或紊乱，或识别一种以往未知的基因型，例如一种遗传缺陷，它负责或者有助于一种表型倾向性，例如一种疾病。

因此，涉及某种基因型如遗传疾病或紊乱时，可将本发明方法用于那些不含有该基因型（如遗传缺陷）的核酸和那些要研究的含有该基因型（如遗传缺陷）的核酸，通过比较这两种核酸样品的顺序测定产生的信息可鉴别该基因型，如遗传缺陷。这种比较可使测序凝胶通过方便的自动扫描即可完成。关于这一点，应当理解，只要能产生足够的信息以测定和鉴别出靶核酸样品之间的差别，就不必确定特定的顺序。因此，本文所用术语“顺序测定”不仅包括特异核苷酸顺序的测定，还包括在没有确定特异核苷酸顺序的情况下对顺序差别的测定和鉴别。可以方便地将本发明的方法用于所研究遗传疾病或紊乱的专性杂合子靶核酸。在这种个体中必然含有所说位点的正常和突变两种等位基因，这些用本发明方法鉴别出的位点（其中不止一个的核苷酸被测定了顺序）有可能导致该表型，例如引起疾病或紊乱的突变。

除上面所述之外，特定的基因型如遗传缺陷还会使一些个体表现出表型倾向性，该表型可以是某种疾病，如早熟动脉粥样硬化、高血压、糖尿病和肿瘤。例如，如果能鉴别出这种遗传缺陷，那么即可对这些“高危”病人进行监视，并且可在任何疾病发作的早期给予治疗。本发明的方法可用来鉴别这些倾向性基因型。因此，一方面，本发明方法可用于那些受所研究表型影响的个体的核酸，另一方面，也可用

于那些没有所说表型表现的个体的核酸，通过核酸样品的顺序比较可鉴别基因型。为方便起见，可将来自那些受所研究表型影响的个体的核酸合并在一起，再使用本发明的方法。同样，也可将来自那些没有所说表型表现的个体的核酸合并在一起，再使用本发明的方法。通过比较两组合并物之间核酸顺序的差别，如果存在任何倾向性基因型，即可将它们鉴别出。这种方法的优点是，不管这些倾向性基因型出现的频率怎样，以及不管总表型的各种遗传促进因子的复杂性和数目怎样，都能识别出个体倾向性基因型。因此，如果存在一个显然不相关的遗传缺陷的结合，并且它导致所研究的疾病，或代表该疾病倾向性的促进因子，本发明的方法则可将它鉴别出来。

本发明的一个具体方案包括，环化一个带有能互相连接的末端的靶核酸片段，该靶核酸片段含有一部分已知的核苷酸顺序，这种已知核苷酸顺序或其一部分能够作为和起始引物杂交的起始引发区，使起始引物和所述起始引发区杂交，并在合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂的存在下和杂交条件下，使所形成的杂种进行引物延伸。例如，使用两个方向相对的起始引物，而不是象PCR的那种正常的引物，即可以进行扩增。

关于这一点，对靶核酸片段的环化，可以看作是用连接法制备靶核酸片段/小载体单位，而且，以环化的靶核酸片段作为模板，可以进行引物延伸。不过，如果需要，可以对环化的靶核酸片段进行切割，并以切割产物作为模板进行引物延伸，对此的描述见 *Nucleic Acids Res.* 16:8186, 1988, 该文献是在我们在英国的专利申请NO. 8818020.3之后公开的，我们从该申请要求了优先权。此外，如果需要，可以用切割产物通过连接制备靶核酸片段

／小载体单位，并以如此得到的靶核酸片段／小载体单位为模板进行起始引物的延伸。所有这些实施方案都在本发明的范围之内。

因此，可以对所形成的环化靶核酸片段进行切割，以产生一个含有至少一部分是已知核苷酸顺序的切割产物，此部分已知顺序能够作为和起始引物杂交的起始引发区，在这种情况下，可以在这个已知核苷酸顺序之内对靶核酸片段进行切割，以形成一个在其邻接未知顺序的末端带有已知顺序的线性分子；也可在已知核苷酸顺序的末端进行切割，以形成一个线性分子，该分子在一个末端具有已知核苷酸顺序，在另一端带有一个已知的切割位点模式，它能使该末端与一个小载体连接。或者更为优选的是，在已知核苷酸以外进行切割，以形成一个线性分子，该分子含有已知的核苷酸顺序，而且至少在一端，一般是在两端具有已知的切割位点模式，它能使这一个或两个末端通过连接形成靶核酸片段／小载体单位。因此，本发明的一个优选方案包括，环化一个带有能互相连接的末端的靶核酸片段，该靶核酸片段的一部分能够作为和起始引物杂交的起始引发区；在已知核苷酸以外切割环化的靶核酸片段，形成一个含有已知核苷酸顺序的线性分子，该分子至少在一个末端具有用于连接形成靶核酸片段／小载体单位的已知的切割位点模式；通过连接形成所述靶核酸片段／小载体单位，并用合适的三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂，在杂交条件下处理该靶核酸片段／小载体单位。

在本发明的这个优选方案中，主要涉及大小至少从1 Kb到约20 Kb的环化靶核苷酸片段，但特别涉及大小从20 Kb到约120 Kb的较大的环化靶核苷酸片段，如约100 Kb的环化靶核酸片段。大小的上限要根据实际情况而定，即根据所能环化的最大靶核酸片段而

定。这种环化可用已知技术完成 (F. S. Collins , 1988 ,
Genome Analysis — A Practical Approach , Editor
K. Davies , P. 73-94. IRL Publishers , Oxford) 。
例如通过在低浓度下的连接来完成。实施此优选方案时, 可以通过用
限制性酶消化基因组 DNA 来进行。该限制性酶最好是一种切割频率
相对较低的酶 (如平均片段大小 10-20 kb) , 例如 XbaI 、
KpnI 或 BamH I 。这些片段可以自我连接以形成环状。然后可用限
制性酶, 最好是一种高频率切割的酶 (如 HinfI) 切割该环状片段,
并将该片段连接到相应的 (如 HinfI) 小载体上。因此, 如果邻近
于一个已知 XbaI 位点的顺序是可得到的, 那么, 通过分析小载体产
物可得到邻近于下一个 (尽可能远的) XbaI 位点的顺序。通过这种
方法, 可以进行一系列跳跃, 以提供用于该方法的额外的起始点。应
当理解, 进行这种跳跃的能力比迄今为止所述的 PCR 技术优越得多,
因为它能够在距起始引物位点相当远处得到扩增的小载体产物。因此,
在常规使用 PCR 技术时, 为得到大于大约 5 kb 的标准 PCR 产物
时所遇到的困难并不限制本发明的方法。

为了更充分地了解本发明, 现以举例方式, 参照附图描述如下,
在附图中:

图 1 (a) 图解说明了一个双链靶核酸, 图 1 (b) 图解说明了
限制性切断的靶核酸, 图 1 (c) 图解显示使靶核酸限制性片段与小
载体连接所得到的靶核酸片段/小载体单位, 图 1 (d) 则图解显示
(i) 起始引物和 (i i) 小载体引物与靶核酸片段/小载体单位的
杂交。

图 2 图解显示了本发明的一个实施方案, 图 2 (a) 显示由部分

消化基因组DNA并进行凝胶电泳后所得限制性片段的电泳图形。图2(b)显示选择用作进一步处理的不同大小高分子量片段的混合物。图2(c)显示通过连接形成靶核酸片段/小载体单位后所得产物的混合物。

图3图解说明了本发明的一个实施方案，其旨在提高能与起始引物杂交的限制性片段的相对浓度。

图4图解说明本发明的另一实施方案，其避免了使用S1核酸酶，并试图增加能与起始引物及小载体引物杂交的限制性片段的相对浓度，图4(a)显示在DNA连接酶存在下，用阻断小载体处理通过完全消化感兴趣的靶DNA顺序所产生的限制性片段后可得到的产物混合物。图4(b)显示用限制性内切酶EcoRI消化后用于本发明的阻断小载体；图4(c)则显示完全消化图4(a)中所示产物混合物后而得到的产物。

图5显示用于本发明方法中的两个不同的小载体部分，小载体部分(1)为一阻断的双链小载体，它具有一个短的上方(5')链(该链具有能阻断聚合的3'端基团)和一个形成尾端的下方(3')链，上方(5')链能够在杂交条件下，及存在三磷酸核苷和三磷酸核苷聚合剂时阻断聚合；小载体部分(11)为一双链DNA，链间有一定程度的非互补性。

图6图解显示图5所示小载体部分在本发明中的应用。

图7图解显示小载体文库的使用。

图8图解显示用本发明方法扩增环化的靶核酸片段。

图9显示使用寡核苷酸58和61(见方法I步骤6)和XbaI小载体单位/文库扩增部分α-1抗胰蛋白酶基因。

图 1 0 显示质粒 B 3 (在 *EcoRI* 酶切点有 4 4 0 bp 插段的 pUC8) 的限制性酶切图。

图 1 1 (i) 和 (1 i) 为下文实例 1、5 和 7 中所得已扩增片段的琼脂糖凝胶电泳图。

图 1 2 显示得自邻接外显子 9 的苯丙氨酸羟化酶基因的顺序及与寡核苷酸 5 8、6 3、6 6 和 5 9 结合的相对位置。

图 1 3 显示按实例 8 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 4 显示按实例 9 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 5 显示按实例 1 0 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 6 显示按实例 1 1 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 7 显示按实例 1 2 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 8 显示按实例 1 3 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 1 9 显示按实例 1 4 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 2 0 显示按实例 1 5 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 2 1 显示实例 1 6 中所得产物之测序凝胶的放射自显影图谱。

图 2 2 显示由实例 1 6 中所述产物获得的核苷酸顺序资料。

图 2 3 显示侧接外显子 1 的苯丙氨酸羟化酶基因的一部分, 并指出用于小载体单位构建的寡核苷酸 5 8、6 2 和 6 7, 以及 *EcoRI* 限制性切点的相对位置。

图 2 4 (a) 是实例 1 7 所得第一次扩增产物之琼脂糖凝胶的电泳图谱; 2 4 (b) 是实例 1 7 中所得第二次扩增产物之琼脂糖凝胶的电泳图谱。

图 2 5 显示由实例 1 7 中所述产物获得的核苷酸顺序资料。其中 2 5 (a) 显示用寡核苷酸 6 2 (定义见下文) 读出的顺序, 2 5 (b)

显示用寡核苷酸 6 7 (定义见下文) 读出的顺序, 2 5 (c) 显示用寡核苷酸 6 2 和 6 7 读出的整个顺序。

图 2 6 显示侧接外显子 V 的 α -1 抗胰蛋白酶基因的一部分, 并显示出用于与小载体退火和连接的寡核苷酸 5 8、6 0、6 8、6 9 和 7 0, 以及 *EcoRI* 限制性酶切点的相对位置。

图 2 7 (a) 是实例 1 8 中所得第一次扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱; 2 7 (b) 是实例 1 8 中所得的第二次扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱, 2 7 (c) 是其中滤膜上吸印了图 2 7 (b) 中所示并用 α -1 抗胰蛋白酶基团探针探测过的凝胶的放射性自显影图谱。

图 2 8 显示人基因组染色体 7 上一无名片段—D 5 的核苷酸顺序, 并指出了寡核苷酸 7 1 和 7 2 的相对位置。

图 2 9 显示了含 D 5 区域的限制性酶切图。指出了寡核苷酸 7 1 和 7 2 的相对位置。还显示了按实例 1 9 方法合成之产物的位置。

图 3 0 是显示实例 1 9 中所得扩增产物的琼脂糖凝胶的电泳图谱。

图 3 1 显示由按实例 1 9 所述方法制得的 *BclI* 产物获得的核苷酸顺序。其中显示了根据限制酶消化预测的 *Hind III* 和 *Hae III* 酶切点的位置。也指出了可在小载体单位扩增的后续循环中用作起始引物的寡核苷酸 7 3 的位置。

图 3 2 显示了依实例 2 0 方法所得扩增产物之琼脂糖凝胶的电泳图谱。

图 3 3 显示了按实例 2 0 所述方法制得的 *EcoRI* 产物的核苷酸顺序。

图 3 4 显示了用限制酶消化实例 2 0 中所得 *EcoRI* 产物后所得片段的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 3 5 显示了按实例 2 1 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶的电泳图谱。

图 3 6 (a) 显示 Hind III / 粘性质粒小载体文库之一部分的限制性酶切图, 其中标示了寡核苷酸 5 8、7 6 和 7 7 的位置。图 3 6 (b) 显示了按实例 2 2 方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

图 3 7

(a) 显示了一个与 EcoRI 小载体连接的靶基因组 DNA 片段的限制性酶切图, 并标出了寡核苷酸 2 7、7 6、7 8 和 7 9 的位置。

(b) 显示了一个与 EcoRI 小载体连接之靶基因组 DNA 片段的限制性酶切图, 并标出了寡核苷酸 7 8、7 9 和 8 4 的位置。

(c) 显示了一个与 EcoRI 小载体连接之苯丙氨酸羟化酶基因外显子 9 的片段。并指出了寡核苷酸 6 3 和 7 9 的位置。

(d) 显示了与修饰的 EcoRI 小载体连接的靶基因组 DNA (如上面 3 7 (c) 中所示) 片段的限制性酶切图, 并指出了寡核苷酸 7 6、7 9、8 0 和 8 1 的位置。

(e) 显示了与修饰的 EcoRI 小载体连接之靶基因组 DNA (如上面 3 7 (b) 中所示) 片段的限制性酶切图, 并指出了寡核苷酸 7 9、8 0、8 1 和 8 4 的位置。

(f) 显示了与修饰的 EcoRI 小载体连接之苯丙氨酸羟化酶基因外显子 9 的一个片段, 并指出了寡核苷酸 6 3、7 9、8 0 和 8 1 的位置。

(g) 显示了一个与修饰的 Hind III 小载体连接之靶基因组 DNA 片段的限制性酶切图, 并指出了寡核苷酸 7 6、7 8 和 7 9 的位置。

(h) 显示了一个与修饰的 Hind III 小载体连接之靶基因组 DNA

片段的限制性酶切图，并指出了寡核苷酸76、79、81和82的位置。

(1)显示了一个与修饰的Hind III小载体连接之靶基因组DNA片段的限制性酶切图，并标出了寡核苷酸76、79、81和83的位置。

图38显示了按实例23(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)方法所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

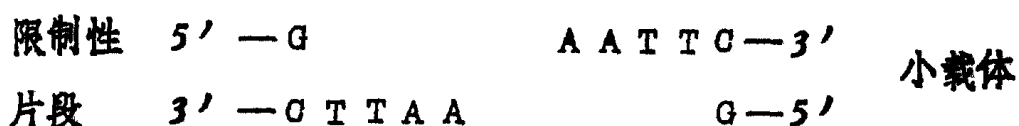
图39(a)显示了含有由探针KM19检测的含多态性Pst I位点的靶基因组DNA顺序的限制性酶切图，其中多态性Pst I位点用星号标出。39(b)显示了通过连接Pst I裂解的靶基因组DNA片段而形成环形产物。39(c)则显示了通过使寡核苷酸与Hind III切断的Pst I环连接而构建Hind III小载体单位文库。

图40显示按实例24所得扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱。

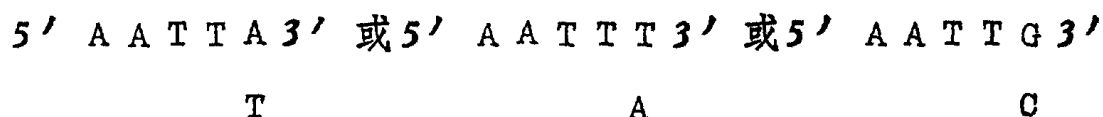
图1(a)图解显示了一个双链靶核酸，其长度约为100Kb或更长，除如影线所示的5'起始端约20个核苷酸外，其它的顺序尚不明确。在距5'端的一个未知距离上显示了一个未知顺序的感兴趣的位点X。使用识别6bp的限制酶如EcoRI，限制性切断靶核酸(见图1(b))，该酶可望平均每隔4096bp切断核酸。

EcoRI的识别顺序是G↓AATTC，由箭头指出酶切点。因而用EcoRI裂解靶核酸可产生粘性末端。然后使靶核酸限制性片段的粘性末端与加影线的合适小载体相连接(如图1(c)所示)。小载体可以是如上所述的任何常见核苷酸顺序，但其5'端将具有相同的核苷酸顺序模式，以确保与上述限制性片段的粘性末端相连接。因此，如果使EcoRI作为限制性核酸内切酶，限制性片段的3'端和小载

体的5'端将具有下列顺序:



最好改变小载体中不参与连接的限制性核酸内切酶识别模式部分,以破坏该识别模式。这样,任何适用于裂解靶核酸的限制性核酸内切酶便不能裂解已形成的限制性片段/小载体单位。因此,当使用的限制性核酸内切酶是EcoRI时,小载体的5'端最好是



即识别模式的CG部分改变为AT,或CG颠换成EcoRI识别模式中的顺序。然后在杂交条件下用起始引物和小载体引物一起或最好相继(先加起始引物)处理限制性片段/小载体单位(见图1(d))。起始引物只能与含已知顺序之靶限制性片段的那个部分杂交(见图1(d)(i))。将小载体引物设计成可与经起始引物延伸而形成的核酸链杂交(而且如图1(d)中所示,该核苷酸链互补于起始引物能与之杂交的核苷酸链)。小载体引物将与各限制片段/小载体单位的小载体引发区杂交(见图1(d)(ii)),但在适当三磷酸核苷及三磷酸核苷聚合剂存在下,扩增作用只能发生在与起始引物杂交然后延伸的限制性片段/小载体单位上。应明确的是,杂交(ii)最好只能在杂交(i)之后、在三磷酸核苷及三磷酸核苷聚合剂存在下延伸及变性之后进行。这可以避免图1(d)中出现的一种明显的情况,即小载体引物(ii)与复杂混合物中的每个靶核酸片段/小载体单位杂交,并因此形成延伸产物。因此,最好先用起始引物处理小载体单位,在上面详述的各步骤之后加入小载体引物。

因此，有可能鉴定扩增的靶片段，并可根据需要用上述技术鉴定整个片段的顺序。但在必要时，只须测定已扩增的靶限制性片段3'端的核苷酸顺序，从而可设计一新的起始引物。然后可使用该新的起始引物扩增用不同的限制性核酸内切酶（最好也是6 b p切割酶）消化靶核酸所得到的新靶限制性片段，并重复本发明的方法。以这种方式，无须克隆便可由5'端测定靶核酸顺序，并使顺序测定在5'至3'方向上持续进行下去。因此，重复本发明的方法便有可能迅速延伸顺序，达到上述感兴趣的位点X。

图2图解说明了本发明的一个实施方案。可用EcoRI部分消化感兴趣的DNA顺序，并如图2(a)所示对限制片段作凝胶电泳分析。电泳在箭头指示的方向上进行，因此高分子量限制性片段显现于凝胶顶部，而低分子量限制性片段则显现于凝胶的底部。X轴代表增加的限制酶浓度或延长的保温时间。弃去小于预定长度（如10 kb）的限制性片段，较高分子量限制性片段则进入下一阶段。这些较高分子量限制性片段将构成如图2(b)中所示重迭的部分消化片段的混合物，位于限制性片段末端的限制性切点标记为(┆)，位于片段之内的限制性位点标记为(∇)。所有限制性片段均使用同一种限制性核酸内切酶（如EcoRI）切断，因此每个片段都具有用于消化作用的限制性核酸内切酶的特征性粘性末端。只有顶端的5'和3'片段有单个粘性末端，其余的片段均有两个这样的粘性末端。然后可在连接酶存在下，使已破坏了限制性核酸内切酶识别顺序的上文定义的小载体与上述靶限制性片段混合，以产生如图2(c)中举例说明的产物的混合物，图中的小载体以末端的方框表示。应认识到的是，连接酶的存在不仅能使靶限制性片段与小载体连接，而且能使靶限制

性片段自身相互连接。因此，应当认识到，在图2的连接条件下，起始靶核酸片段/小载体单位中的片段A和B很可能不与原来的靶基因组核酸相邻，而是在连接时不寻常地聚在一起。然后用进行部分消化的限制性核酸内切酶（如EcoRI）完全消化连接产物。一般说来，完全消化的产物均为在片段的两端连有小载体的双链靶限制性片段，或在片段的一端连有小载体的靶限制性片段。将会出现一个靶限制性片段的本底群落，如图2（c）中所示的片段A和B，它们的末端均没有小载体。前者产物将构成产物总混合物中的一小部分。变性后，只有微量的产物小载体单位能与起始引物杂交，但产物混合物中的绝大部分可与小载体引物杂交，除非按下述方法对小载体进行实质性修饰。因此，有可能扩增所需的限制性片段，但小载体单位文库中能与小载体引物杂交的绝大部分将导致必须使用大量的小载体引物、三磷酸核苷的聚合剂（如Taq DNA聚合酶）以及三磷酸核苷本身。如果使用小量的起始材料，便可在一定程度上避免这一困难，但这样将有利于选择性地增加能与产物混合物中起始引物杂交的靶限制性片段/小载体单位的相对比例。

构建图2所示小载体单位文库的原理如下：用6bp切割酶进行完全消化将产生一个平均长度为4096bp的片段群落。使小载体单位与该群落（约 10^8 个得自总人基因组DNA的片段）连接，可望产生许多在各端连有小载体单位的片段。其中许多限制性切点呈现Gaussian分布的片段将小于4096bp。在这些情况下使用小载体引物时，它可在标准PCR中作为两种引物起作用。可产生大量假扩增产物以及任何源自起始引物的产物。上文讨论的一些方法中，小载体引物扩增产物的合成取决于起始引物延伸产物的最初合成。图

2 所示的实施方案中，小载体单位本身可与小载体引物杂交，并启动其复制过程。上述由各端带有小载体部分之靶核酸片段形成 PCR 产物的缺点，可通过一个按大小进行分离的步骤来克服，这样，任何这样的小载体单位构建物便具有两个由一定距离（如大小 10 kb）分隔的相同的小载体，致使标准的 PCR 效率太低，以致于没有大量的产物生成。

图 3 图解说明了本发明的一个实施方案，其旨在提高能与按上述方法（见涉及图 2 的描述）制得的小载体单位产物混合物中起始引物杂交的限制性片段的相对浓度。图 3 (a) (i) 显示含有起始引发区 (1) 并具有小载体部分（用影线表示）(2) 的限制性片段，(i i) 是在两端连有小载体部分（用影线标出）(2)，但没有起始引发区的限制性片段，(i i i) 是没有起始引发区，但具有一个小载体部分（用影线标出）(2) 的限制性片段。在此方案中，在变性（见图 3 b）后，在三磷酸核苷聚合因子（如 Taq DNA 聚合酶）及三磷酸核苷存在下，仅只用起始引物 (3) 处理产物混合物。在此步骤中没有使用小载体引物。从而可选择性地复制能够与起始引物杂交的靶限制片段/小载体单位（见图 3 c）；没有必要的起始引发区便不可能使片段复制。然后用单链特异性核酸内切酶如 S1 核酸酶处理这样得到的产物混合物（见图 3 d）。该核酸内切酶可切断单链 DNA 的内部磷酸二酯键，从而产生平头双链 DNA。与其余的本底片段相比，此方法可增加能与起始引物杂交的靶限制片段/小载体单位的相对浓度。此外，为了使能与起始引物杂交的靶限制片段/小载体单位增加到所需的相对浓度，必要时可重复进行方法中变性、在三磷酸核苷聚合剂和三磷酸核苷存在下只用起始引物处理，及后继的用单链特

异性核酸内切酶(如S1核酸酶)处理所得产物混合物等步骤。当认为这种小载体单位的浓度相对于其余本底片段足够高时,即可按美国专利4,683,195和4,683,202中所述的方法,再用小载体引物处理以进行扩增。

上述技术的缺点在于S1核酸酶可能没有如所期望的单链特异性,而可能使某些双链DNA被降解。

另外,就图3所示的技术来说,线性扩增可能不是很适当的,因为只有一次起始引物的延伸会产生S1核酸酶抗性的双链。

图4图解说明了本发明的另一个实施方案。它避免了使用S1核酸酶,并旨在增加能与用限制性核酸内切酶完全消化所需靶DNA顺序而得到的产物混合物中起始引物杂交的限制性片段的相对浓度。该实施方案的优点在于不必对所得片段进行分离,也不必将凝胶电泳作为起始步骤。在用限制性核酸内切酶如EcoRI完全消化感兴趣的DNA顺序之后,在DNA连接酶存在下用阻断小载体(如上文中定义的)处理所得片段即产生如图4(a)所示产物的全部混合物。应当认识到,片段A和B不一定与原始DNA顺序相邻接,而可能在DNA连接酶反应中发生了不寻常连接。阻断小载体包含一个如图4(b)中所示的双链寡核苷酸顺序,该顺序在其一端具有适于用限制片段之相应粘性末端连接的第一粘性末端,但其中(小载体中)并未参与连接的限制性核酸内切酶识别位点的那个部分被改变,从而破坏了该识别位点,从而使一旦形成了的限制性片段/小载体单位不能被产生限制性片段的限制性核酸内切酶切断。阻断小载体的另一端包括具有阻断残基的末端,它最好是3'-双脱氧核苷(如双脱氧腺苷ddA)或其他3'残基,如3'-脱氧核苷或已知的其他化学修饰,

以致不能由此进行引物延伸。如图4 (b)所示, 下面的链与上面链相交迭。该链最好终止在一个非磷酸化的残基处, 以避免自身连接问题。区域 (4) 具有如小载体引物一样的顺序, 从而使小载体引物能够与起始引物的延伸产物杂交, 而不与修饰的阻断小载体的不可延伸的上方链杂交。通常作为两条分别的链来制备阻断小载体, 然后再行杂交。可使用手工方法, 或使用 D N A 合成仪分别制备第一和第二条链, 还可例如使用多核苷激酶, 以常规酶促化学方法使第一条链的 5' 端磷酸化, 并用末端转移酶引入 3' 端双脱氧核苷酸或其他修饰的核苷酸。另外, 也可用已知方法在 3' 端用化学法引入其他阻断基因 (如氨基)。然后, 使这样制备的第一和第二条链杂交, 以形成双链阻断小载体。

在 D N A 连接酶存在下用阻断小载体处理限制性片段得到图 4 (a) 所示的产物混合物, 用用以产生限制性片段的同种限制性核酸内切酶完全消化该产物混合物以形成限制性片段/小载体单位, 从而得到如图 4 (c) 所示的 (i)、(i i)、(i i i) 三种产物。为了降低存在于限制性片段/小载体单位 (i) 和 (i i) 的混合物中的限制性片段 (i i i) 的相对浓度, 可根据需要多次重复上述处理过程, 以形成例如基于使用限制性核酸内切酶 E c o R I 制成的限制性片段/小载体单位库。

图 5 (1) 显示了含有上方 1 4 碱基寡核苷酸和下方 4 2 碱基寡核苷酸的阻断小载体, 二者退火在一起时留下了四个碱基的伸出 (5' 伸出), 该伸出部与由裂解的靶 D N A 产生的末端互补。N¹、N²、N³、N⁴、N⁵ 和 N⁶ 的定义见下文表 1。1 4 碱基寡核苷酸的 3' 是被修饰的 (X), 因而使用任何已知的 D N A 聚合酶如 Klenow

片段、T7 DNA聚合酶(Sequenase)或Taq DNA聚合酶均不能进行由该末端开始的5'—3'链延伸。该修饰的碱基可以是双脱氧核苷或3'脱氧核苷(如3'—脱氧腺苷)。必要时可用已知的化学方法修饰3'糖残基。

以这样的方式选择下方42碱基链的3'端碱基及上方14碱基寡核苷酸中第5位(从5'端起)的互补碱基,以使阻断小载体与裂解的靶DNA连接后,所得到的六核苷酸(在连接接合处)不能被用于切断原基因组DNA的限制性核酸内切酶识别。这对于确保每个被裂解的基因组DNA片段均具有与其末端连接的阻断小载体是很重要的。很显然,连接产物中将含有彼此再连接的被切断的基因组DNA片段,再次消化这些连接产物,以产生在第二次连接反应中可接受阻断小载体的末端。为确保每个被切断的基因组DNA片段在各端都有一阻断小载体,可多次重复(如三至四次)这一限制性切断及连接循环。最好在各切断的基因组DNA片段的两端都有阻断小载体,以便防止在变性及用起始引物处理后,反应混合物中基因组DNA片段的任何未阻3'端的随机引发。

图5(1)中所示的阻断小载体适用于用产生5'伸出的限制性核酸内切酶切断的靶基因组DNA。对于产生3'伸出的限制性核酸内切酶来说,阻断小载体必须稍加修饰。例如可用10碱基上方链取代14碱基上方寡核苷酸(在5'端缺失4碱基突出部分),以及可用46碱基下方链取代42碱基下方寡核苷酸链,即在3'端多出4个碱基,且互补于由用来切割基因组靶DNA的限制性核酸内切酶切出的末端部分。

图5(11)显示了由两个退火的单链顺序(57碱基和53碱

基寡核苷酸)组成的非互补的小载体部分,由于所说的顺序具有一定程度的非互补性,故不能直接发生小载体引物的延伸。上面关于图5(1)所示阻断小载体的讨论非常适用于非互补的小载体部分,不同之处在于,非互补的小载体部分不必具有任何修饰的核苷酸。

图6图解说明了图5(1)所示小载体部分在本发明中的应用。用单一限制性核酸内切酶完全消化靶基因组DNA以产生如图5(i)中所示的片段。在DNA连接酶存在下使阻断小载体部分(图5(i)中的5)连接到各个切断的基因组靶DNA片段(11)的末端上。变性后,在聚合酶如Taq聚合酶存在下使用已知核苷酸顺序X和Y的引物进行扩增。

因此,在图6(111)中,X代表起始引物,并具有与链1中标出IP(起始引物)区域同样或至少基本上同样的顺序。X能够与链2中的起始引发区(IPR)杂交。含有起始引发区(IPR)的链2还含有与小载体引物(VP)的核苷酸顺序相同或至少基本上相同的部分。在使用中,X引物的延伸作用产生一条含有小载体引发区(VPR)的链,它适于与引物Y代表的小载体引物(VP)杂交。因为链1并不包含小载体引发区本身,又因为存在聚合阻断基团而不能进行引物延伸,而且链2也没有小载体引发区,所以在由起始引物的引物延伸作用产生小载体引发区之前,便不会发生小载体引物的引物延伸作用。

因此可知,在第一次扩增循环中,只有引物X能够产生延伸至阻断小载体之42碱基寡核苷酸末端的延伸产物(111)。因为没有与之杂交并产生延伸产物的互补顺序,所以引物Y在第一次循环中是多余的。引物Y的顺序与图5(i)所示下方42碱基寡核苷酸5'

端的碱基 2 到 3 1 及图 5 (1 1) 中所示下方 5 3 碱基寡核苷酸的碱基 1 3 至 4 2 完全相同。在第二次及 此后的循环中 (v 和 v1), 引物 Y 可与引物 X 的延伸产物杂交并可进行这一延伸产物 (i v) 的互补合成。因此, 引物 Y 不能与 (i 1 1) 中所示的任何一个连接产物杂交。它只能与引物 X (其在感兴趣的位点上具有已知的核苷酸顺序) 的基本上完全延伸的产物杂交。因此, 只产生一种包含引物 X、未知核苷酸顺序 Z 和引物 Y 的扩增产物。可使用引物 X 和 Y 作为测序引物由两端测定 Z 的核苷酸顺序。另外, 可以制备“巢式”测序引物 X' 和 Y'。这些引物将包含引物 X 的 3' 或引物 Y 的 3' 顺序, 如图 5 (1) 中 4 2 碱基寡核苷酸 5' 端的碱基 2 5 至 4 2。

图 6 图解说明了本发明关于靶核酸片段/小载体单位的方法, 其中的小载体部分含有聚合阻断基团。当小载体部分至少含有一个如上文描述及图 5 (1 1) 中举例说明的非互补性区域时, 情况也是这样。因此链 1 将具有与标记为 I P 的区域相同或至少基本上相同的顺序。起始引物 (I P) 将能够与链 2 中的起始引发区 (I P R) 杂交。包含 I P R 的链 2 也含有与小载体引物 (V P) 的核苷酸顺序相同或至少基本上相同的核苷酸顺序部分, 但因为链 1 中审慎地引入了一定程度的非互补性, 所以链 2 的这个部分并不与链 1 的相应部分杂交。因为链 1 不含小载体引发区 (V P R), 所以小载体引物 (V P) 不能与链 1 杂交, 又因为链 2 含有一个与 V P 相同的顺序部分, 而没有互补顺序或 V P R, 所以它也不能与链 2 杂交。因此, 在经过起始引物 (I P) 的引物延伸作用产生小载体引发区 (V P R) 之前, 便不会形成小载体引物的延伸产物。

然后, 最好使用不同的限制性核酸内切酶和不同的相应设计的阻

断小载体重复上述方法，以形成构成不同小载体文库的限制性片段／小载体单位的不同贮备库。

可以用任何所需数目的不同限制性核酸内切酶（如10至30种，通常15到25种，最好大约20种）及相应设计的阻断小载体重复这一方法，以得到许多限制片段／小载体单位文库。然后可混合不同的限制性片段／小载体单位文库，以形成包含大量这类杂交体的文库。然后可在杂交条件下，及加有三磷酸核苷和三磷酸核苷的聚合剂如Taq DNA聚合酶时，用起始引物处理这些限制性片段／小载体单位文库。按美国专利4,683,195和4,683,202号中所述的方法，在适于进行聚合酶链反应（PCR）的条件下加入小载体引物，则只导致感兴趣位点的扩增，测定如此扩增的片段的顺序，便能够设计出新的起始引物，并可使用新的起始引物作为扩增起始点重复上述方法，必要时，可以测定进一步感兴趣区域的顺序，以根据需要重复此方法。

图7图解显示了小载体文库的应用。用限制性核酸内切酶EcoRI完全消化基因组DNA，使具有4碱基突出（它互补于EcoRI切割产生之4碱基突出）的小载体部分与各个切割的基因组DNA片段的两端连接。此即所谓的EcoRI小载体文库。可使用识别六核苷酸顺序的大约15至20种限制性核酸内切酶构建相似的文库。合并这些文库并扩增之，即可得到一定范围的PCR产物，更为优选的是，单独或分别使用这些文库，从而由各文库产生单一的PCR产物。

图7(a)显示了已知核苷酸顺序的感兴趣位点(w)3'侧的假定的限制性酶切图。使用引物x和y扩增合并的小载体文库后，产生了(b)中所示的PCR产物Z、Z1、Z2、Z3和Z4。这些

P C R产物在琼脂糖凝胶上电泳产生如(c)所示带型, 这些P C R反应是分别用各个小载体文库, 而不是用合并的许多文库进行的。使用凝胶纯化凝胶上可见的最大的P C R产物(本例中是Z 4), 并使用寡聚体y或“巢式”寡聚体y'作为测序引物以测定其3'端核苷酸顺序。然后, 该核苷酸顺序, 即Z 4的3'端, 可在本方法的进一步巡查步骤中用作或用于合成新的起始引物x。

图8图解说明了本发明在进行反向P C R (Triglia T. 等, *Nucleic Acids Research* 16; 8186, 1988; Ochman H. 等, *Genetics* 120: 621—623, 1988年11月在最近描述了反向P C R)中的应用。

用倾向于以相对较低的频率切断D N A (如平均片段长度10—20 kb)的限制性酶如Xba I, Kpn I或Bam HI消化基因组D N A。以低浓度存在的片段自身连接形成环。然后用倾向于频繁切断D N A的限制酶(如Hinf I)切断这些环, 并使所得片段连接到相应的小载体如Hinf I小载体上。因此, 如果已得到与已知Xba位点相邻的顺序, 便可以通过对小载体单位产物的分析得到与下一个Xba位点相邻的顺序。用这种方法, 可以进行一系列跳跃, 以为本发明方法提供额外的起始点。虽然上面作为例子提到平均长度为10—20 kb的片段, 但如果以更优选的方式切割靶核酸, 亦可产生更长如大约100 kb的片段。例如, 可使用以很低频率切断基因组D N A的限制酶(如Not I、BssH II和Sal I)制得这样的片段。

图11显示了一系列琼脂糖凝胶电泳的结果。(i)中泳道1和11显示用Hae III切割的标记物 $\phi \times 174$, 泳道12显示标记物 λ /Hind III, 泳道2显示P C R对照, 泳道9则显示实例1中使用

所述的寡核苷酸 5 8 和 6 1 制得的扩增片段 (如图 9 所示)。

图 1 1 (ii) 为电泳图谱的上部分, 其中泳道 1 和 1 3 显示标记物 λ / Hind III, 泳道 2 和 1 2 显示标记物 $\phi \times 174$, 泳道 3 显示 PCR 对照, 泳道 1 0 中显示实例 1 中使用寡核苷酸 5 8 和 6 1 制得的扩增片段 (见图 9)。

图 1 1 (iii) 为电泳图谱的下部分, 其中泳道 1 和 1 1 显示标记物 λ / Hind III, 泳道 6 显示用 Hae III 切割的标记物 $\phi \times 174$, 泳道 2、3、4 和 5 显示按实例 5 所述方法制得的扩增片段, 泳道 7、8、9 和 1 0 中显示按实例 7 所述方法制得的扩增片段。

有关其他附图所显示的内容将在下文实例中详细讨论。

下面有关本发明方法的描述及实例旨在进一步阐明而不是限定本发明, 其中使用的寡聚脱氧核苷酸列出如下, 本文提到的核苷酸顺序都是以常规 5' \rightarrow 3' 有意义方而阅读的。

A 型寡核苷酸

这是一组 1 4 碱基的寡核苷酸, 在顺序的 5' 端中有 4 或 5 个碱基变化, 故适于与 5' 突出使用。4 个末端碱基代表 5' 突出, 而第五个末端碱基在于破坏限制性酶识别位点。

使用的特定寡核苷酸是:

寡核苷酸 1

CTAGGAAGGAGAGG

与用限制性核酸内切酶 XbaI 或 NheI 或 SpeI 消化的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 2

AATTGAAGGAGAGG

与用限制性核酸内切酶 EcoRI 消化的 DNA 使用。

寡核苷酸 3

GATCGAAGGAGAGG

与用限制性核酸内切酶 BamHI 或 BglII 或 XhoII 或 BclI 消化的 DNA 使用。

寡核苷酸 4

AGCTGAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 HindIII 切割的 DNA。

寡核苷酸 5

TCGAGAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 SalI 切割的 DNA。

寡核苷酸 6

CGCGGAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 MluI 或 BssHI 切割的 DNA。

寡核苷酸 7

GTACGAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Asp718 切割的 DNA。

寡核苷酸 8

TCGACAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Xho I 切割的 DNA。

寡核苷酸 9

CATGCAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Nco I 切割的 DNA。

寡核苷酸 10

GGCCCAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Not I 或 Eag I 切断的 DNA。

寡核苷酸 11

CCGGTAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Bspm II 或 Xma I 或 Acc III 切断的 DNA。

寡核苷酸 12

CATGTAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 BspHI 或 Nco I 切断的 DNA。

寡核苷酸 13

CTAGTAAGGAGAGG

适用于用限制性核酸内切酶 Avr II、Nhe I 或 Xba I 切断的 DNA。

B型寡核苷酸

这是一组在顺序中有 3' 末端碱基变化的 4 2 碱基寡核苷酸，这组寡核苷酸适于与 5' 突出使用。

具体使用的是，

寡核苷酸 1 4

CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCTTC

此寡核苷酸是与寡核苷酸 1, 2, 3, 4, 5, 6 和 7 一起使用的。

寡核苷酸 1 5

CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCTTG

此寡核苷酸顺序同于 1 4, 不同的是 3' 端残基 C 被 G 取代。它与寡核苷酸 8、9 和 10 一起使用。

寡核苷酸 1 6

CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCTTT

核苷酸顺序同于 1 4, 不同的是 3' 末端残基 C 被 T 取代。

寡核苷酸 1 7

CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCTTA

核苷酸顺序同于 1 4, 不同的是 3' 末端残基 C 被 A 取代。此寡核苷酸与寡核苷酸 1 1、1 2、1 3 和 1 8 (定义见下) 一起使用。

寡核苷酸 1 8 (10 聚体)

TAAGGAGAGG

寡核苷酸 1 8 与寡核苷酸 1 7 退火。它们被设计成作为小载体单位用于通过能产生平头的限制性核酸内切酶消化的 DNA。

寡核苷酸 1 9 和 C 型寡核苷酸系列适于与 3' 突出使用;

寡核苷酸 1 9 (10 聚体)

5'-AAA GGA GAG G-3'

此寡核苷酸是为与下文定义的寡核苷酸 20 至 25 一起使用而设计的。

C型寡核苷酸

一组46碱基长的寡核苷酸。

寡核苷酸20

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT TGC A-3'

与用限制性核酸内切酶Nsi I或Pst I消化的DNA一起使用。

寡核苷酸21

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT AGC T-3'

与用限制性核酸内切酶Sst I或Sac I消化的DNA一起使用。

寡核苷酸22

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT CAT G-3'

与用限制性核酸内切酶Sph I消化的DNA一起使用。

寡核苷酸23

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT GTA C-3'

与用限制性核酸内切酶Kpn I消化的DNA一起使用。

寡核苷酸24

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT ACG T-3'

与用限制性核酸内切酶Aat II消化的DNA一起使用。

寡核苷酸25

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTT GGC C-3'

与用限制性核酸内切酶A_{pa}I消化的DNA一起使用。

D型寡核苷酸

这是一组在顺序的5'端有4至5个核苷酸变化的长57个碱基的寡核苷酸。

寡核苷酸26

CTAGGAAGGAGAGGACGCTGTCTGTCGAAGGTAAGGAACGGAGGAGAGAAGGGAGAG

与寡核苷酸40(如下文所定义)和用X_{ba}I、N_{he}I或S_{pe}I消化的DNA一起使用。

寡核苷酸27

5'-AAT TGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸40和用E_{co}RI切断的DNA一起使用。

寡核苷酸28

5'-TCGAGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸40和用S_{al}I切断的DNA一起使用。

寡核苷酸29

5'-CGC GGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸40和用B_{ss}HI或M_{lu}I切断的DNA一起使用。

寡核苷酸30

5'-AGC TGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸40和用H_{ind}III切断的DNA一起使用。

寡核苷酸 3 1

5'-GAT CGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 0 和用 BamH I、Eco I 或 Bgl I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 2

5'-CCG GGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG

与寡核苷酸 4 0 和用 Acc I 或 Bsp M I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 3

5'-TGC AGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 0 和用 Apa I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 4

5'-TCG ATA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用 Xho I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 5

5'-GGC CTA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用 Eag I 或 Not I 或 Xma I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 6

5'CCG GTA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用 Bspm I 或 Xma I 或 Acc II 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 7

5'-CAT GTA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用 BspH I 或 Nco I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 8

5'-CTA GTA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用 Avr II、Nhe I 或 Xba I 切断的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 3 9

5'-TA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC GGA
GGA GAG AAG GGA GAG-3'

与寡核苷酸 4 1 和用能产生平头的限制性核酸内切酶切割的 DNA 一起使用。

Ⅴ型寡核苷酸

这是一组具有一个变化的 3' 末端残基的长 5 3 碱基的寡核苷酸。

寡核苷酸 4 0

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TC-3'

与寡核苷酸 2 6 到 3 3 一起使用。

寡核苷酸 4 1

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TA-3'

与寡核苷酸 3 4 到 3 9 一起使用。

F 型寡核苷酸

这是一个与下述 G 型寡核苷酸 (4 3 至 4 8) 一起使用并用于 3' 突出的 5 3 碱基长的寡核苷酸。

寡核苷酸 4 2

5'-AAAGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC GGA
GGA GAG AAG GGA GAG-3'

G 型寡核苷酸

这是一组 3' 端的 4 个碱基在顺序中有所变化的 5 7 碱基长的寡核苷酸。

寡核苷酸 4 3

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTT GCA-3'

与寡核苷酸 4 2 和用 Pst I 或 Nsi I 切割的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 4 4

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTA GCT-3'

与寡核苷酸 4 2 和用 Sst I 或 Sac I 切割的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 4 5

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTC ATG-3'

与寡核苷酸 4 2 和用 Sph I 切割的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 4 6

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTG TAC-3'

与寡核苷酸 4 2 和用 *Kpn* I 切割的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 4 7

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTA CGT-3'

与寡核苷酸 4 2 利用 *Aat* II 切割的 DNA 一起使用。

寡核苷酸 4 8

5'-CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG TTC GTA CGA GAA TCG
CTG TCC TCT CCT TTG GCC-3'

与寡核苷酸 4 2 和用 *Apa* I 切断的 DNA 一起使用。

所指出的限制性核酸内切酶是用于切割与特定寡核苷酸或寡核苷酸对一起使用的 DNA 的。例如寡核苷酸 1 是与用 *Nhe* I 或 *Spe* I 或 *Xba* I 切断的基因组 DNA 一起使用的。

所有用于 5' 突出的寡核苷酸 (即 A、D 和 F (4 2) 型寡核苷酸及寡核苷酸 1 8、1 9 和 3 9) 最好都是磷酸化的。

寡核苷酸 4 9 - 5 7 均用于构建可代用的载体单位。

寡核苷酸 4 9

5'-AAT TGA AGG AGA GGA CGC TGT CTG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA G-3'

寡核苷酸 5 0

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT GTC CTC TCC
TTC-3'

寡核苷酸 5 1

5'-AAT TGA AGG AGA GGA CGC TGT CAG AGG ACG GTT ACG AAC
GTA GGA CAG AAG GGA GAG-3'

寡核苷酸 5 2

AAT TGA AGG AGA GGA CGC TGA CTG TCG AAC GTA CGG ATA GGA
GTC GAG AAG GGA GTC GAG AAG GGA GAG-3'

寡核苷酸 5 3

5'-AAT TGA AGG AGA GGA GAG AAG GGA CGC TGT CTG TCG AAG
GTA AGG AAC GGA GGA-3'

寡核苷酸 5 4

5'-CGA ATC GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATC GCT TCC CTT CTC
TCC TCT CCI TC-3'

寡核苷酸 5 5

5'-AAT TGA AGG AGA GGA CGC TGT CIG TCG AAG GTA AGG AAC
GGA GGA GAG AAG GGA GAG AAA GAG GAA GGG AAG-3'

寡核苷酸 5 6

5'-CTT CCC TTC CTC TTT CTC TCC CTT CTC GAA TCG TAA CCG
TTC GTA CGA GAA TCG CTG TCC TCT CCT TC-3'

寡核苷酸 5 7

5'-AAT TGA AGG AGA GGC AGA AGG GAG AG-3'

可替代的小载体单位

寡核苷酸 4 9 应与寡核苷酸 5 0 退火。

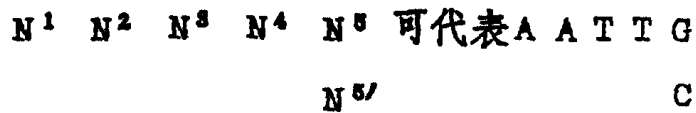
寡核苷酸 5 1、5 2 和 5 7 应与寡核苷酸 4 0 退火。

寡核苷酸 5 3 应与寡核苷酸 5 4 退火。

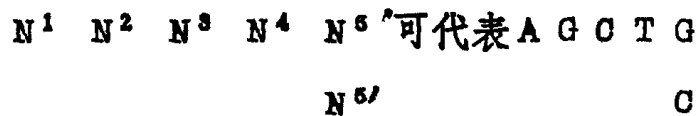
寡核苷酸 5 5 应与寡核苷酸 5 6 退火。

这些寡核苷酸均可与 EcoRI 切割的基因组 DNA 一起使用。

在表1中, N¹、N²、N³和N⁴代表四个提供粘性末端的核苷核, 此末端能够与靶核酸片段上的相应限制性位点连接。核苷酸N⁵和N^{5'}是被审慎选择的, 以便破坏限制性切点识别模式。例如, 就EcoRI限制性切点来说,



就Hind III限制性切点来说,



在下列表2所示的特异性小载体单位1-10中, N¹、N²、N³、N⁴、N⁵和N^{5'}代表上述的EcoRI限制性切点识别模式, 其中各寡核苷酸均用适当的鉴别号码标记。在表2的小载体单位11和12中, N¹、N²、N³、N⁴、N⁵和N^{5'}代表上述的Hind III限制性酶切点识别模式, 且各个寡核苷酸均标有适当的鉴别号码。

表 2. 特异性小载体单位

1.	49	5'	AATTGAAGGAGAGGACGGCTGTCTGTCTCGAAGGTAAGGAACGGAGGAG
	50	3'	CTTCC TC TCCTGTGCTAAGAGCATGCTTGCCCAATGCTAAGC
2.	51	5'	AATTGAAGGAGAGGACGGCTGTCTCAGAGGACGGTTACGAACTAGGACAGAGGGAGAG
	40		CTTCC TC TCCTGTGCTAAGAGCATGCTTGCCCAATGCTAAGCTCTTCCCTCTC
3.	52	5'	AATTGAAGGAGAGGACGGCTGACTGTCTGGAACGTACGGATAGGAGTCGAGAGGGAGAG
	40		CTTCC TC TCCTGTGCTAAGAGCATGCTTGCCCAATGCTAAGCTCTTCCCTCTC
4.	53	5'	AATTGAAGGAGAGGAGAGAGGGACGGCTGTCTGTCTCGAAGGTAAGGAACGGAGGA
	54		CTTCC TC TCCTCTCTCTTCCCTTCCCTAAGAGCATGCTTGCCCAATGCTAAGC
5.	55	5'	AATTGAAGGAGAGGACGGCTGTCTGTCTGGAAGGTAAGGAACGGAGGAGAGAGGGAGAGGAAGG
	56		CTTCC TC TCCTGTGCTAAGAGCATGCTTGCCCAATGCTAAGCTCTTCCCTCTCTTCTCCTCC

表 2 (续)

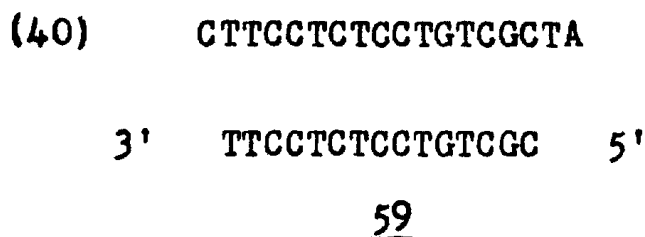
		<u>Not 1</u>	
10.	80	5'	AATTGGCGCGCGCCATCCCTAATTCTGTGGAAGTAAGGAACGGAGGAGAACT
	81		CCGCCGGCGGTAGCGCGCCTGCCGTAGCACCGGCCGTAGTGGCCCTCTTGA 5'
		Fok I 切点	GCGGCCCTGCCGTAGCACCGGCCGTACTGGCC 5' 79
			<u>Fok I 识别位点</u>
			<u>Not 1</u>
11.	82	5'	AATTGGCGCGCGCCATCCCTAATTCTGTGGAAGTAAGGAACGGAGGAGAACT
	81		CCGCCGGCGGTAGCGCGCCTGCCGTAGCACCGGCCGTAGTGGCCCTCTTGA 5'
		Fok I 切点	GCGGCCCTGCCGTAGCACCGGCCGTACTGGCC 5' 79
			<u>Fok I 识别位点</u>
			<u>Not 1</u>
12.	83	5'	AGCTGGCGCGCGCCATCC-NH
	81		CCGCCGGCGGTAGCGCGCCTGCCGTAGCACCGGCCGTAGTGGCCCTCTTGA
		Fok I 切点	GCGGCCCTGCCGTAGCACCGGCCGTACTGGCC 79
			<u>Fok I 识别位点</u>

寡核苷酸 58、59 和 60 可用于所有构建物。

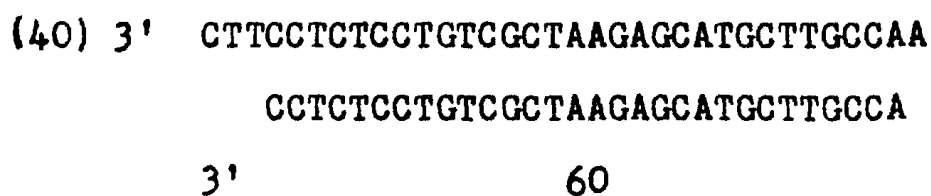
寡核苷酸 58 是一个普遍型的小载体引物，如：



寡核苷酸 59 是一个普遍型的测序引物和“巢式”小载体引物，如：



寡核苷酸 60 是一个普遍型的“巢式”小载体引物，如：



短寡核苷酸是由 14 聚体 + 42 聚体退火而成的。长寡核苷酸是 57 聚体 + 53 聚体退火而成的。A 型和 D 型分别相当于短和长寡核苷酸。因此 1 和 26 具有同样的突出，且两者均可与 *Nhe* I、*Spe* I 或 *Xba* I 切割的 DNA 一起使用。与此相似，2 和 27 两者可与用 *Eco* R I 切割的 DNA 一起使用。

对于 B 型和 E 型，19 和 F 型 (42)，以及 C 型和 G 型也完全是这样。

各寡核苷酸均用于与用在该寡核苷酸后面指出的限制性核酸内切酶

切割的DNA连接。A型和B型(及D型和E型)用于5'突出。寡核苷酸19 + C型(及F型和G型)用于3'突出。

寡核苷酸1至8与寡核苷酸14配对。

9至13和18与寡核苷酸17配对。

19与寡核苷酸20-25配对。

26-33与寡核苷酸40配对。

34-39与寡核苷酸41配对。

F型(42)与G型寡核苷酸43-48配对。

可用与Bspm II限制性切断的DNA一起使用的寡核苷酸11(和36)代替寡核苷酸7(和32)。

应当认识到,寡核苷酸1-7是与寡核苷酸14退火的,寡核苷酸8-10是与寡核苷酸15退火的。寡核苷酸11-13是与寡核苷酸17退火的。可以不必使用寡核苷酸16。

寡核苷酸58

CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCT

可在下文方法I步骤6所述的聚合酶反应(POR)中用作“普遍型小载体引物”的30碱基寡核苷酸。

用于下文实例中的其他寡核苷酸

除寡核苷酸65以外,下述各寡核苷酸均可用于以各种限制性核酸内切酶制得的任何小载体文库:

寡核苷酸61

GAGACTTGGTATTTTGTTCAATCATTAAAG

α -1抗胰蛋白酶基因外显子V的3'寡核苷酸。

寡核苷酸62

AAAAGCCAGAGACCTCACTCCCGGGGAGCC

人苯丙氨酸羟化酶基因外显子1的5'寡核苷酸，其突变可引起苯丙酮酸尿症(PKU)。

寡核苷酸63

AGGGACTTACTGTGGCGAGCTTTTCAATGT

苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因外显子9的3'寡核苷酸。

寡核苷酸64

GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGGTG

α -1抗胰蛋白酶基因外显子III的3'寡核苷酸。

寡核苷酸65

AATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATG

延伸的M13反向引物。此寡核苷酸被用作扩增M13DNA或pUC质粒DNA中插段的PCR引物之一。

寡核苷酸66

5'-ATC AGG TGC ACC CAG AGA GGC AAG GCC-3'

苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因外显子9的3'寡核苷酸。

方法I

方法I包括下列六个步骤：

步骤1：A型寡核苷酸的磷酸化，然后用凝胶电泳法纯化磷酸化的寡核苷酸。

步骤2：在步骤1中磷酸化的A型寡核苷酸的3'端加上ddA残基，然后进行凝胶纯化。

步骤3：使修饰的A型寡核苷酸与相应的B型寡核苷酸退火。

步骤4：制备DNA并进行限制性消化。

步骤5：将退火的A型和B型寡核苷酸连接到步骤4切割的去磷酸化DNA上。

步骤6：扩增步骤5的连接产物并检测和分析PCR产物。

可按下述完成这些步骤：

步骤1

使用下述缓冲液及其他标准溶液：

I. 1 10×激酶缓冲液

0.5 M Tris-HCl (pH 7.6)

0.1 M MgCl₂

50 mM 二硫苏糖醇

1 mM 亚精胺

1 mM EDTA

储存于-20℃下。

I. 2 5' -三磷酸腺苷

以其钠盐制成10 mM溶液 (Pharmacia)

用水稀释到20 微微摩尔/μl

贮存于-20℃下。

I. 3 放射性同位素

a) 5' - [γ³²P] 三磷酸腺苷 (Amersham)

比活性约6000 Ci/mmol。

b) 5' - [α³²P] 三磷酸双脱氧腺苷 (Amersham)

比活性约3000 Ci/mmol。

I. 4 甲酰胺样品缓冲液

80% (v/v) 去离子甲酰胺

50 mM Tris-硼酸盐 (pH 8.3)

1 mM EDTA

0.1% (W/V) 溴酸盐

0.1% (W/V) 二甲苯胺 (xylene cyanol)

甲酰胺去离子的方法是, 加2 g Amberlite MB-1 树脂 (Bio-Rad) 搅拌30分钟, 再用 Whatman 1号滤纸过滤。该缓冲液保存于暗处。

I. 5 40% 丙烯酰胺母液

每500 ml加:

丙烯酰胺 (电泳纯190 g)

双丙烯酰胺 (电泳纯10 g)

丙烯酰胺加5 g Amberlite MB-1树脂 (Bio-Rad) 搅拌30分钟, 并使用双层 Whatman 1号滤纸过滤。

贮液保存于4℃暗处。

I. 6 10% 过硫酸铵

溶解1 g 过硫酸铵 (Sigma, 电泳纯), 并加无菌去离子水至10 ml。贮存于暗处。

I. 7 0.5× 凝胶混合物

(20% 丙烯酰胺, 7 M 尿素)

每50 ml内含:

21 g 尿素

25 ml 40% 丙烯酰胺贮液 (1.5)

2.5 ml 10× TBE (1.8)

使用前加入聚合剂。

300 μ l 10%过硫酸铵 (1.6)

40 μ l TEMED

I. 8 10 \times TBE, 每升含:

Tris 109 g

EDTA 9.5 g

硼酸 55 g

根据需要将10 \times TBE缓冲液在水中稀释至1 \times 或0.5 \times 的强度。

I. 9 缓冲液A

0.1 M Tris-HCl (pH7.7)

10 mM 三乙胺

1 mM EDTA

缓冲液贮存于4 $^{\circ}$ C, 一个月重新配制一次。

I. 10 试剂B, 每100 ml 含:

50 ml 乙醇

50 ml 无菌去离子水

1.4 聚体A型寡核苷酸的磷酸化

在1.5 ml Sarstedt 试管中混合下列:

A型寡核苷酸 100 微微摩尔

10 \times 激酶缓冲液 (1.1) 5 μ l

5' - 三磷酸腺苷 (1.2) 9.5 μ l (190 微微摩尔)

5' - [γ^{32} P] 三磷酸腺苷 (1.3) 5 μ l (10 微微摩尔)

T4 多核苷酸激酶 (大肠杆菌

B. Amersham) 40 单位

水 加至 50 μ l

其中寡核苷酸对 ATP 分子的比例保持在 1 : 2。

于 37 °C 保温 60 分钟完成寡核苷酸的磷酸化。

加入 20 μ l 甲酰胺样品缓冲液 (1.4)，并在 90 °C 水浴中使酶样品变性 (10 分钟)，然后加于 20 % 丙烯酰胺、7 M 尿素的变性凝胶上。

按 Wu R. 等人 (见 M. J. Gait 编, *Oligonucleotide Synthesis—A Practical Approach*, “合成寡核苷酸的纯化和顺序分析”, IRL Press) 所述的方法, 用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化磷酸化的 (即激酶处理的) 寡核苷酸。

c) 通过柱进行最终纯化

在最终纯化步骤中, 使用 NeNsorb™ (DuPont) 核酸纯化柱体。

1) 柱的预平衡

将柱夹在夹持架上。用 2 ml HPLC 纯甲醇冲洗柱体内部。此冲洗过程使任何疏松的装填物与柱床相接。

将接管牢固地压入柱体的顶部, 形成气密密封。在一次性使用的塑料注射器内充入空气并接在接管上。通过柱体恒定而轻轻地推入所有甲醇 (流速约为每 2 秒钟 1 滴)。以同样方法, 使 2 ml 缓冲液 A (1.9) 通过柱以使其“引发”。

2) 样品装填

将 2.8 μ l 三乙胺加到 2 ml 含寡核苷酸的水中。然后用注射器

和针头将其直接加至柱顶部。使用如C(1)所述充有空气的注射器将样品推进柱。

3) 样品洗涤

使用注射器和针头向柱内加入3 ml缓冲液A(1.9)。方法同C(1)。

4) 在柱顶部加入1 ml试剂B(1.10)。按C(1)所述,使用充有空气的注射器轻轻推入,从柱床中洗脱DNA。在1.5 ml Sarstedt 试管中收集洗脱液,在施加真空的离心管(UNIVAP, Uniscience)中蒸发至干。

按要求重新悬浮干燥、纯化的寡核苷酸。

步骤2

使用下列缓冲液及其他标准溶液:

2.1 1.4 M 卡可酸钠

用HCl调至pH 7.5,贮存于-20°C下。

2.2 5 mM 氯化钴

贮存于-20°C下。

2.3 1 mM 二硫苏糖醇

贮存于-20°C下。

2.4 5'-三磷酸双脱氧腺苷,为冻干的钠盐。

(Boehringer Mannheim)

用水稀释成10 mM 贮液和1 mM 工作溶液。

2.5 0.5 M EDTA (pH 8.0)

在A型寡核苷酸的3'端加双脱氧腺苷残基

按步骤1所述方法，使A型寡核苷酸磷酸化并纯化。按80%的回收率，可得到80微微摩尔激酶处理的寡核苷酸用于末端转移酶反应。

将80微微摩尔激酶活化并纯化的寡核苷酸I重新悬浮于48 μ l无菌去离子水中。

向激活的寡核苷酸中加入：

48 μ l 寡核苷酸（80微微摩尔）

1 μ l 1mM ddATP（1纳摩尔）（2.4）

10 μ l 1.4M 卡可基酸（2.1）

10 μ l 1mM DTT（2.3）

20 μ l 5mM 氯化钴（2.2）

5 μ l ddATP（ α^{32} P）（15微微摩尔）（1.3b）

6 μ l 末端转移酶（150单位，Boehringer TdT）

反应混合物于31 $^{\circ}$ C下保温1小时，然后加入4 μ l 0.5M EDTA终止反应。

加入40 μ l 甲酰胺样品缓冲液（1.4），并将样品置于90 $^{\circ}$ C水浴中保温10分钟使之变性，然后加于20%丙烯酰胺，7M尿素的变性凝胶上。

按步骤1中所述方法进行凝胶电泳。

切下15聚体A型寡核苷酸带并完全按步骤1所述方法纯化。估计最终回收率为50微微摩尔。将其重新悬浮于250 μ l无菌去离子水中，浓度达0.2微微摩尔/ μ l。

步骤3 使修饰的A型寡核苷酸与相应的B型寡核苷酸退火

须使用下列溶液：

3.1 10X退火缓冲液

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

100 mM MgCl₂

在 1.5 ml 加有螺帽的 Sarstedt 试管中混合下列：

2.5 微微摩尔修饰的 A 型寡核苷酸 (通过步骤 1 和 2 得到)

2.5 微微摩尔 B 型寡核苷酸

5 μ l 10 X 退火缓冲液 (3.1)

加水至 50 μ l。

如果从寡核苷酸 1、2、3 或 4 中选择 A 型寡核苷酸，则与之 (1-4) 连接的 B 型寡核苷酸通常是寡核苷酸 1-4。

将 Eppendorf 试管置于沸水浴 (通常是烧杯) 中。5 分钟后使烧杯内的水缓慢冷却到室温 (在约 2 小时内)。最后离心 10 秒钟以在底部收集试管内容物。将该浓度调至 0.5 微微摩尔/ μ l 退火的寡核苷酸用于连接反应。

步骤 4 DNA 制备及限制性消化

使用下列 DNA 样品：

1. 人基因组 DNA I

2. 人基因组 DNA II (由淋巴样干细胞中制备的基因组 DNA)，

对于它，向培养基中加入 0.1 mg/ml 的 5-氮胞苷，以防止 DNA 复制和细胞生长期间胞苷残基的甲基化。

使用下列缓冲液：

4.1 10 X 低盐缓冲液

100 mM Tris-HCl (pH 7.5)

100 mM MgCl₂

10 mM 二硫赤藓糖醇

4.2 10 X 中盐缓冲液

- 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 100 mM MgCl₂
- 500 mM NaCl
- 10 mM 二硫赤藓糖醇
- 4.3 10 X 高盐缓冲液
- 500 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 100 mM MgCl₂
- 1000 mM NaCl
- 10 mM 二硫赤藓糖醇
- 4.4 10 X BamHI 缓冲液
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 50 mM MgCl₂
- 1000 mM NaCl
- 10 mM 2-巯基乙醇
- 4.5 10 X EcoRI 缓冲液
- 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 100 mM MgCl₂
- 500 mM NaCl
- 4.6 TE 缓冲液
- 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 1 mM EDTA
- 4.7 琼脂糖样品缓冲液
- 15% (W/V) Ficoll 400
- 0.05% (W/V) 溴酚蓝

0.05% (W/V) 二甲苯胺

在 $1 \times \text{TBE}$ 缓冲液 (1.8) 中配制样品缓冲液。

4.8 $10 \times \text{CIP}$ 缓冲液

500 mM Tris·HCl (pH8.0)

1 mM EDTA

(1) 在下述条件下用特异的限制性核酸内切酶切割基因组 DNA:

50 μg DNA

20 μl 适当的 $10 \times$ 限制酶缓冲液

50 单位所需的限制性核酸内切酶

将反应混合物终体积调到 200 μl 。

于 37°C 下消化 2 小时。加入 4 μl 0.5 M EDTA (2.5) 和使样品于 70°C 加热 10 分钟以终止反应。

(11) 经琼脂糖凝胶电泳检查 1 μg 样品, 以确保完全消化;

琼脂糖凝胶电泳

在 $1 \times \text{TBE}$ (1.8) 缓冲液中制成 0.7% (W/V) 琼脂糖 (Pharmacia) 凝胶, 并浸在同一强度的 TBE 缓冲液中电泳。在将样品加入凝胶的小孔内之前, 向样品内加入五分之一体积的琼脂糖样品缓冲液 (4.7)。电泳后, 将凝胶浸没在含 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭的去离子水中染色 10 分钟。使用透照仪 (Macrovue-LKB) 于 302 nm 处观察 DNA。

(111) (a) 用苯酚萃取法纯化消化的 DNA

向限制性切断的 DNA 中加入等体积的缓冲并重蒸的苯酚 (BRL, 用 TE (4.6) 缓冲的核酸纯苯酚), 并将混合物搅动 30 秒。离心 5 分钟使形成的白色乳液分成两相。将水相移入新的试管内。用等

体积苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）第一次萃取含水层后，再用等体积氯仿：异戊醇（24：1）萃取，以除去所有残留的苯酚。

（b）经乙醇沉淀最后纯化DNA

在DNA溶液内加入十分之一体积的3M乙酸钠，使乙酸钠终浓度为300mM。加入2.5倍体积的95%乙醇并于-80℃下放置30分钟，然后离心（微型离心机，12,000rpm离心5分钟）以沉淀DNA。用80%（V/V）冷乙醇洗涤沉淀的DNA并于真空下干燥。根据需要可将DNA溶于缓冲液中。

（iv）已切割DNA的去磷酸化

使已切割的DNA去磷酸化，以防止其自身连接。

将限制性消化并纯化的DNA溶于175μl无菌去离子水中。

向其中加入：

5μl牛小肠磷酸酯（CIP）

（Boehringer Mannheim，1单位/μl）

20μl 10X CIP缓冲液（4.8）

样品于37℃保温60分钟。加入4μl 0.5MEDTA，并按上面（iii）（a）和（iii）（b）所述方法，用苯酚萃取及乙醇沉淀纯化去磷酸化的DNA。将最后的DNA沉淀溶于50μl TE缓冲液（4.6）中，产生的浓度为1μg/μl。

步骤5 使退火的寡核苷酸I和II连接到经过酶切并去磷酸化的DNA上

使用下列缓冲液

5.1 10X连接缓冲液

200mM Tris-HCl（pH7.4）

1 0 0 m M MgCl₂

1 0 0 m M DTT

1 0 m M ATP

在 1. 5 m l Sarstedt 试管中混合下列：

经过酶切的基因组 DNA (7. 4 微微摩尔) 1 0 μ g

退火的寡核苷酸 (得自步骤 3) 1 1 微微摩尔

1 0 X 连接缓冲液 1 0 μ l

T 4 DNA 连接酶

(Boehringer Mannheim) 2 单位

无菌去离子水加至 1 0 0 μ l

此连接混合物于 4 °C 放置过夜。用 5 % 连接产物以凝胶电泳法估计连接效率 (具体方法见步骤 4 (i i))。

然后按步骤 4 (i i i) 中所述方法用苯酚萃取和乙醇沉淀纯化连接产物。将最后的 DNA 沉淀溶于 9. 5 μ l TE 缓冲液 (4. 6) 中，产生的浓度为 1 μ g / μ l。

步骤 6 步骤 5 连接产物的扩增

使用下列缓冲液及其他标准溶液：

6. 1 1 0 X 扩增缓冲液

5 0 0 m M KCl

1 0 0 m M Tris-HCl (pH 8. 3)

1 5 m M MgCl₂

0. 1 % 明胶

贮存于 - 2 0 °C 下。

6. 2 核苷酸 1 0 X 贮液：

2 m M dATP

2 m M dTTP

2 m M dGTP

2 m M dCTP

贮存于-20℃下。

6.3 片段大小标记物

用Hae III切割的噬菌体 $\phi \times 174$ ，以碱基对数目表示的谱带大小为：

1350、1078、872、603、310、281、271、234、194、118和72。

在1.5 ml带螺帽的Sarstedt试管中混合下列：

1 μ g 连接产物（得自步骤5）

100 微微摩尔寡核苷酸58

100 微微摩尔寡核苷酸61或62或63

10 μ l 10 X 扩增缓冲液（6.1）

10 μ l 10 X 贮备核苷酸

加去离子蒸馏水至100 μ l

将试管在沸水中放置5分钟。用1 X 扩增缓冲液（6.1）将Taq 聚合酶（Anglian）稀释至1单位/ μ l。

向上述煮沸的反应混合物内加入2 μ l 稀释的酶并混合之。在微型离心管中离心5秒钟以使内容物沉淀在管底。然后在反应混合物上加50 μ l 轻质矿物油（Sigma）（防止在后面的反应期间内蒸发）。

将试管置于水浴中：1）60℃2分钟；2）72℃3分钟；3）91℃2分钟。步骤1）、2）和3）重复进行39次。然后将试管

于60℃水浴中放置2分钟，再于72℃下保温8分钟。扩增反应终止时使内容物离心至底部并吸掉矿物油。

按步骤4(11)所述用琼脂糖凝胶电泳分析15μl扩增产物。用经过Hae III(6.3)切割的∅×174作为大小标记物，通过电泳分析估计扩增产物的大小。

方法Ⅱ

方法Ⅱ包括以下步骤：

1. 在A型寡核苷酸的3'端加上ddA残基，然后凝胶纯化3'末端标记的寡核苷酸。

2. 使3'末端标记的A型寡核苷酸磷酸化，然后从未掺入的核苷酸中分离之。

3. 使修饰的A型寡核苷酸与相应的B型寡核苷酸退火。

4. 切割基因组DNA。

5. 使退火的寡核苷酸A+B连接到酶切的DNA上。

6. 扩增连接产物。检测并分析PCR产物。

可按下述完成各步骤：

步骤1

实验的具体程序完全同于方法Ⅰ的步骤2。

步骤2

按方法Ⅰ步骤1中所述方法使寡核苷酸磷酸化。按方法Ⅰ步骤1(11)中所述方法通过柱直接纯化磷酸化的寡核苷酸。

在向柱中加入样品之前，先向反应混合物内加入200μl缓冲液A(1.9)以代替三乙胺。

步骤3-6同方法Ⅰ中所述。

方法Ⅲ

方法Ⅲ包括下列步骤：

1. 使14聚体A型寡核苷酸磷酸化，然后凝胶纯化磷酸化的寡核苷酸。

2. 在激活的寡核苷酸3'端加上ddA残基，然后经凝胶电泳纯化之。

3. 将A型寡核苷酸与相应的B型寡核苷酸退火。

4. 限制性切断DNA。

5. 使退火的寡核苷酸A+B连接到限制性酶切的DNA上。

6. 在游离3'端加上双脱氧核苷酸。

7. 扩增连接产物。检测并分析扩增产物。

这些步骤可如下述进行：

其中步骤1—5如方法I中所述。

步骤6

将从步骤5得到的纯化的连接产物溶于30 μ l去离子蒸馏水中。

向该DNA内加入：

5 μ l 10X扩增缓冲液(6.1)

15微微摩尔适当的双脱氧核苷酸

1单位Taq聚合酶(Anglian)

加水至50 μ l。

将反应混合物于37 $^{\circ}$ C保温30分钟。按方法I步骤4(111)中所述用苯酚萃取和乙醇沉淀纯化DNA。将DNA沉淀溶于50 μ l TE缓冲液(4.6)中，产生的浓度为1 μ g/ μ l。

步骤7同方法I步骤6。

方法Ⅳ

同方法Ⅱ，有一点不同是在方法Ⅱ的步骤5和6之间加上方法Ⅲ的步骤6。

方法Ⅴ

方法Ⅴ包括下列步骤：

1. 使5'聚体D型寡核苷酸磷酸化，然后由未掺入的核苷酸中分离之。

2. 使磷酸化的寡核苷酸，如激活的D型寡核苷酸与适当的E型寡核苷酸退火。

然后进行方法Ⅰ—Ⅳ步骤4及以后的各步骤。

可按下述完成这些步骤：

1. 按方法Ⅰ步骤Ⅰ所述完成寡核苷酸的磷酸化，并按方法Ⅰ步骤(11)C所述通过NeNsoRb™柱纯化之。

2. 退火同方法Ⅰ中所述。步骤4及以下各步骤同前所述(方法Ⅰ和Ⅲ)。

方法Ⅵ

方法Ⅵ包括下述步骤：

1. 使A型1-4聚体寡核苷酸，或寡核苷酸18、19或39，或F型(42)或D型寡核苷酸磷酸化，然后凝胶纯化磷酸化的寡核苷酸。

2. 使磷酸化的寡核苷酸如18、19、或D型与相应的B型(或C型)、或E型或G型寡核苷酸退火。

3. 用限制酶消化基因组DNA。

4. 将退火的寡核苷酸连接到限制性切割的DNA上。

5. 限制性切断由上述步骤制得的连接产物。

6. 将更多退火的寡核苷酸连接到由步骤(5)得到的产物上。
7. 重复步骤(5)和(6)。
8. 最后限制性消化步骤(7)的产物。
9. 在步骤(8)所得产物的3'端加上一个三磷酸双脱氧核苷酸。

10. 扩增步骤(9)的产物。检测并分析扩增产物。

可按下述完成这些步骤:

步骤1

同方法I的步骤1。

步骤2

同方法I的步骤3。例如:

寡核苷酸1-7与寡核苷酸14退火,寡核苷酸11-13及18与寡核苷酸17退火,寡核苷酸20-25与寡核苷酸19退火,寡核苷酸26-32与寡核苷酸40退火,寡核苷酸24-39与寡核苷酸41退火,寡核苷酸43-48与寡核苷酸42退火。

步骤3

此步骤同方法I的步骤4(i)、4(ii)和4(iii),但限制性切割的DNA未经去磷酸化处理。

步骤4

将退火的寡核苷酸连接到限制性酶切的DNA上。使用的缓冲液及其他标准溶液是:

4.1 10X连接缓冲液

200 mM Tris-HCl (pH7.4)

100 mM MgCl₂

步骤8

同上述步骤5。

步骤9

使用下列缓冲液及其他标准溶液。

9. 1 T7 DNA聚合酶缓冲液 (5X)

200 mM Tris-HCl (pH 7.5)

100 mM MgCl₂

250 mM NaCl

9. 2 dNTP-dATP

1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP

加无菌去离子水配制。

9. 3 ddATP

1 mM ddATP, 加无菌去离子水配制。

(1) 在步骤8所得产物的3'端加上dda残基。

在1.5 ml Sarstedt 试管内混合下列:

4 μg 上述步骤8的DNA

20 μl 5X T7 DNA聚合酶缓冲液 (9.1)

20 μl dNTP-dATP (9.2)

20 μl ddATP (9.3)

5单位 T7 DNA聚合酶 (Sequenase)

加无菌去离子水至100 μl。

将反应混合物于37°C下保温30分钟。然后于70°C下保温10分钟使酶变性。然后按前述方法经苯酚萃取和乙醇沉淀DNA。

步骤10

此步骤同方法 I 的步骤 6，或者可在温度循环机（如 Techne Programmable Dri-Block PHC-1）上完成扩增。

该明确的是，在方法 VI 中，在 T 7 DNA 聚合酶 (Sequenase) 存在下，5' - 三磷酸双脱氧腺苷与连接好的寡核苷酸的 3' 端反应，从而可补偿由于特异于双脱氧核苷酸的 T 4 DNA 连接酶的意外的核酸外切酶活性造成的 3' 端 d d A 残基的丢失。

方法 VII

方法 VII 同方法 VI，只是删掉了方法 VI 的步骤 1。本方法中没有进行凝胶纯化，但可用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色法检验连接效率。

方法 VIII

方法 VIII 同于方法 VI，只是删去了步骤 9。用于本方法的寡核苷酸是：

与寡核苷酸 4 0 退火的寡核苷酸 2 6 - 3 2，与寡核苷酸 4 1 退火的寡核苷酸 3 6 - 3 9，与寡核苷酸 4 2 退火的寡核苷酸 4 3 - 4 8。

方法 IX

方法 IX 包括下列步骤：

1. 磷酸化；
2. 退火；
3. 限制性切断 DNA；
4. 将退火的寡核苷酸连接（如在 25 °C 下）到经过酶切的 DNA 上；
5. 限制性酶切/连接；
6. 扩增步骤 5 的产物，检测并分析扩增产物。

可按方法Ⅶ中所述各相应步骤完成以上各步骤。

方法 X

方法 X 的步骤 1, 2 和 3 与方法Ⅷ的步骤 1, 2 和 3 相同。方法 X 的步骤 4 (1) 也同于方法Ⅷ的步骤 4 (1), 但步骤 4 (11) 如下所述:

4 (11) 连接

在一个 0.5 ml Sarstedt 试管内混合:

限制性酶切割的 7387 DNA	0.74 微微摩尔 (1 μ g)
退火的寡核苷酸	1.65 微微摩尔
10 X 连接缓冲液 (4.1)	1 μ g
1.0 X ATP (4.2)	1 μ l
T4 DNA 连接酶 (Boehringer Mannheim)	1 单位
水加至	10 μ l

连接混合物于 25 $^{\circ}$ C (在 Techne Dri-Block 中) 放置 120 分钟。然后用水稀释至 DNA 浓度为 10 ng/ μ l, 并按上面方法Ⅷ的步骤 10 中所述进行扩增。

方法 XI

方法 XI 大致与方法 X 相同, 所不同的是于 25 $^{\circ}$ C 连接反应 120 分钟后, 加入 2 μ l 适当的限制性核酸内切酶缓冲液 (见 3.1)、2 单位限制性核酸内切酶并加水至 20 μ l, 并于 37 $^{\circ}$ C 下保温 60 分钟, 以用限制性核酸内切酶消化连接产物。然后用水将样品稀释至 DNA 浓度为 10 ng/ μ l。

方法 XII

方法Ⅺ基本上与方法Ⅹ相同，所不同的是在步骤4(表1)中，将连接反应混合物于4℃放置过夜，而不是于25℃放置2小时。

最后用水将连接混合物稀释至DNA浓度为10ng/μl。

方法Ⅻ

方法Ⅻ基本与方法Ⅺ相同，所不同的是，使连接反应于4℃下过夜后，向10μl连接反应混合物内加入2μl适当的限制性核酸内切酶的缓冲液和2单位限制性核酸内切酶(Boehringer-Mannheim)并加水至20μl，于37℃下保温60分钟，以用适当的限制性核酸内切酶消化连接产物。

然后用水将样品稀释至DNA浓度为10ng/μl。

实例1

按上述方法Ⅰ步骤1和2制备寡核苷酸1和14。这些用于方法Ⅰ中的寡核苷酸按上述步骤3退火。人基因组DNAⅡ的制备和切割按方法Ⅰ的步骤4进行。人基因组DNAⅡ用限制性核酸内切酶XbaⅠ切割，脱去磷酸(按上述步骤4所述)，然后与退火的寡核苷酸1和14连接，这些完全按上述步骤(5)所述进行。

然后使此连接产物扩增。

上文所述的图11(1)表明泳道1和11中的用HaeⅢ切割的标记物ØX174，泳道12中的标记物λ HindⅢ，泳道2中的扩增对照和用寡核苷酸58和61得到的扩增片段。该扩增片段如所期望的那样长度为800bp。

图11(11)还表明泳道1和13中的标记物λ HindⅢ，泳道2和12中的用HaeⅢ切割的标记物ØX174，泳道3中为扩增对照，泳道10中用寡核苷酸58和61得到的扩增片段。

实例 2

使用寡核苷酸 1 和 1 4 以及用限制性核酸内切酶 Xba I 切割的 DNA。

a) 按方法 I 的步骤 1 所述, 使寡核苷酸 1 (100 微微摩尔) 磷酸化, 然后纯化激活分子。

b) 激活的寡核苷酸 1 用末端转移酶在其 3' 端加上一个双脱氧腺苷残基。按方法 I 步骤 2 所述纯化所得到的 1 5 聚体寡核苷酸 1 (+3' 端的 ddA)。

c) 使寡核苷酸 1 与寡核苷酸 1 4 杂交。

d) 按方法 I 所述, 用限制性核酸内切酶 XbaI 切割人基因组 DNA II 并去磷酸。

e) 退火的寡聚体 1 和 1 4 与用 XbaI 限制的人基因组 DNA II 连接——详见方法 I。

f) 用寡核苷酸 5 8 和 6 1 使连接产物扩增。在该情况下, 预期的扩增产物为大约 800 bp。

实例 3

使用寡核苷酸 2 和 1 4 以及用限制性核酸内切酶 EcoRI 切割的 DNA。

a) 按实例 2 所述使寡核苷酸磷酸化, 并将 ddA 残基加到 3' 端。使此修饰过的寡核苷酸与寡核苷酸 1 4 退火。

b) 按方法 I 所述, 用限制性核酸内切酶 EcoRI 切割基因组 DNA I, 并脱去磷酸。

c) 退火的寡核苷酸 2 + 1 4 与 EcoRI 切割的基因组 DNA I 连接。

d) 使用下述对连接产物进行扩增:

(1) 寡核苷酸 58 和 62。预期产物约为 220 bp。

(11) 寡核苷酸 58 和 63。预期产物为 560 bp。

实例 4

使用寡核苷酸 3 和 14 以及用限制性核酸内切酶 BamHI 切割的 DNA。

a) 按实例 1 所述, 使寡核苷酸 3 磷酸化, 并将 ddA 核苷酸加到其 3' 端。

b) 使所制备的寡聚体与寡核苷酸 14 退火。

c) 按方法 I 所述, 用限制性核酸内切酶 BamHI 切割基因组 DNA 并去磷酸。

d) 使退火的寡核苷酸 3 和 14 与 BamHI 切割的基因组 DNA 连接 (详见方法 I)。

e) 利用方法 3 步骤 6 所述的方法, 用 ddG 残基阻断连接产物中所有的游离 3' 端。

f) 最后, 用寡核苷酸 58 和 63 使这些连接产物进行扩增。
预期的产物约为 200 bp。

实例 5

使用寡核苷酸 3 和 14 以及用限制性核酸内切酶 BamHI 切割的 DNA。

a) 按实例 4 所述制备寡核苷酸 3, 并与寡核苷酸 14 退火。

b) 按方法 I 所述, 用限制性核酸内切酶 BamHI 使含有 440 bp 插段 (见 B3, 图 10) 的 pUC8 质粒 DNA 完全消化, 并脱去磷酸。

c) 使寡核苷酸 3 和 14 与用 BamHI 切割的 B3 质粒 DNA 退火。
d) 按实例 4 所述将 ddG 残基加到游离的 3' 端。用寡核苷酸 58 和 65 使连接产物扩增。上文所述的图 11 (111) 表明泳道 1 和 11 中的标记物 λ Hind III, 泳道 6 中的 Hae III 切割的标记物 ϕ X 174 和泳道 2、3、4 和 5 中的按实例 5 得到的扩增片段。正如所期望的, 产物长度约为 440 bp。

实例 6

使用寡核苷酸 26 和 40 以及用限制性核酸内切酶 Xba I 切割的 DNA。

- a) 按方法 V 所述, 使寡核苷酸 26 磷酸化并纯化激活分子。
- b) 在方法 I 步骤 3 所述条件下, 使激活的寡聚体 26 与寡核苷酸 40 退火。
- c) 按方法 I 步骤 4 所述, 用 XbaI 切割人基因组 DNA II 并去磷酸。
- d) 使退火的寡聚体 26 和 40 与用限制性核酸内切酶 Xba I 切割的基因组 DNA II 连接 (详见方法 I 步骤 5)。
- e) 使用方法 III 步骤 6 所述的程序, 用 ddA 残基阻断连接产物中的所有游离 3' 端。

f) 用下述使连接产物进行扩增:

(1) 寡核苷酸 58 和 61, 预期产物约为 800 bp。

(11) 寡核苷酸 58 和 64, 预期产物约为 760 bp。

实例 7

使用寡核苷酸 27 和 40 以及用限制性核酸内切酶 EcoRI 切割的 DNA。

a) 按实例 5 所述, 使寡核苷酸 27 磷酸化, 纯化后与寡聚体 40 退火。

b) 按方法 I 步骤 4 所述, 用限制性核酸内切酶 *EcoRI* 切割基因组 DNA I 并去磷酸。

c) 使退火的寡聚体 27 和 40 与经 *EcoRI* 切割的基因组 DNA I 连接 (详见方法 I 步骤 5)。

d) 按方法 III 步骤 6 所述, 用 ddA 残基阻断连接产物中所有的游离 3' 端。

e) 使用下述使连接产物扩增:

(i) 寡核苷酸 58 和 62, 预期产物约为 220 bp。

(ii) 寡核苷酸 58 和 63, 预期产物为 560 bp。

上文所述的图 11 (iii) 表明泳道 1 和 11 中的标记物 λ Hind III, 泳道 6 中的 Hae III 切割的标记物 ϕ X174 和按照实例 7 得到的泳道 7、8、9 和 10 中的扩增片断。

实例 8

按方法 VI 构建 *EcoRI* 小载体文库, 并且一起使用小载体单位 6 (寡核苷酸 27、40) 和 7387 细胞系 DNA。

用 10 ng 构建的文库进行扩增反应, 以扩增图 12 所述的顺序。
扩增作用的条件

在 0.5 ml Sarstedt 管中混合下列物质:

10 ng 构建的 *EcoRI* 小载体文库

100 微微摩尔 58

100 微微摩尔 63

100 μ m (终浓度) dNTP (见下面定义的 M1.7)

用无菌的重蒸馏水调节体积至 $100\mu\text{l}$ 。为了防止蒸发，将 $50\mu\text{l}$ 的轻质矿物油（Sigma）轻轻加在反应混合物表面。然后将管置于 96°C 下的Techne Dri-Block装置中。使DNA于 96°C 下变性10分钟。然后使装置冷却至 90°C 。向反应混合物中加入2单位Taq聚合酶（Cetus）。使寡核苷酸58和63之间的顺序扩增时使用下列温度和时间：

91 $^\circ\text{C}$ 2分钟

62 $^\circ\text{C}$ 2分钟

72 $^\circ\text{C}$ 2分钟

进行40次循环。最后一次循环时使装置温度维持在 72°C 9.9分钟，然后使其在1小时内冷却至室温。

取 $15\mu\text{l}$ 的扩增反应混合物用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

所得结果列于图13中，图中表明泳道1中的本实例得到的扩增产物和泳道2中的Hae III切割的标记物 $\phi\times 174$ 。该扩增产物为预期的大小（约600bp）。

实例9

本实例根据方法 IX按下述进行。

步骤1 “上部”寡核苷酸的磷酸化作用

寡核苷酸49、51、52、53、55、27、57和2。

缓冲液和其他标准溶液

1. 10X激酶缓冲液

0.5M Tris-HCl (pH7.6)

0.1M MgCl₂

50mM二硫苏糖醇

1 m M 亚精胺

1 m M E D T A

于-20℃下贮存。

1. 2 腺苷5' -三磷酸

购自Pharmacia 的钠盐为10 m M溶液。用水稀释至20微微摩尔/ μ l, 贮存于-20℃下。

程序

使下述物质在1.5 ml Sarstedt 管中混合:

寡核苷酸	10 微微摩尔
10 X 激酶缓冲液 (1. 1)	1 μ l
A T P (1. 2)	1 μ l (20 微微摩尔)
T 4 多核苷酸激酶 (Amersham)	5 单位
H ₂ O	加至10 μ l

寡核苷酸对A T P的摩尔比维持在1 : 2。

在37℃下保温60分钟进行寡核苷酸的磷酸化。

在此阶段结束时, 通过在90℃下保温10分钟使T 4多核苷酸激酶失活。然后使试管在微型离心机中旋转10秒钟以收集所有的浓缩物。

在该方法中, 磷酸化的分子不经凝胶纯化。

步骤2 磷酸化的“上部”寡核苷酸与相应的“底部”寡核苷酸退火所需溶液:

2. 1 10 X退火缓冲液

100 m M Tris-HCl (pH8. 0)

100 m M MgCl₂

在 1.5 ml 带螺口帽的 Sarstedt 管中混合下述物质:

来自步骤 1 的 10 微微摩尔 (10 μ l) 磷酸化的“上部”寡核苷酸, 10 微微摩尔相应的“底部”寡核苷酸, 2 μ l 10 X 退火缓冲液 (2.1), 水加至 20 μ l。

将管置于沸水浴内。5 分钟后停止加热, 使水浴在约 2 小时内缓慢冷却至室温。最后在微型离心机中离心 10 秒钟, 从底部收集管内内容物。浓度为 0.5 微微摩尔/ μ l 的退火的寡核苷酸则可备用于连接反应了。

小载体 1-8 如上文表 1 所定义。

步骤 3 DNA 的制备

使用细胞系 7387 DNA。

所需缓冲液:

3.1 10 X EcoRI 缓冲液

100 mM Tris-HCl pH7.5

100 mM MgCl₂

500 mM NaCl

3.2 TE 缓冲液

10 mM Tris-HCl pH7.5

1 mM EDTA

3.3 琼脂糖样品缓冲液

15% (W/V) Ficoll 400

0.05% (W/V) 溴苯酚盐

0.05% (W/V) 二甲苯胺

用 1 X TBE 缓冲液 (下文 3.4) 制备样品缓冲液。

3. 4 10X TBE 缓冲液, 每升:

Tris	109g
EDTA	9.5g
硼酸	5.5g

10X TBE 缓冲液按需要用水稀释至1X或0.5X的浓度。

(1) 用限制性核酸内切酶EcoRI切割7387细胞系DNA时使用下列条件:

40 μ g的7387基因组DNA, 40 μ l的10X EcoRI缓冲液(3.1), 80单位的限制性核酸内切酶EcoRI(来自Boehringer Mannheim), 用水加至400 μ l。

在37 $^{\circ}$ C下消化2小时。使样品在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟终止反应。

(11) 为保证完全消化, 通过琼脂糖凝胶电泳检验5 μ l的样品。

琼脂糖凝胶电泳

由0.7% (W/V) 的琼脂糖 (Pharmacia) 在1X TBE (3.4) 缓冲液中制成凝胶, 电泳时浸于同样浓度的TBE缓冲液中。在将样品装入凝胶孔之前, 先将五分之一体积的琼脂糖样品缓冲液(3.3) 加入样品(5 μ l) 中。在电泳以后, 使凝胶浸于含1 μ g/ml 的溴化乙锭的去离子水中染色10分钟。使用透照器 (Chromato-Vue C-63 透照器) 在302nm处目测观察DNA。

(111) (a) 通过苯酚萃取纯化消化过的DNA;

等体积缓冲的重蒸苯酚(用TE-3.2缓冲的BRL DNA级苯酚) 加入限制的DNA中, 混合物搅动30秒。用微型离心机将生

成的白色乳浊液离心5分钟，使之分成两相。水相转移至另一只新管中。首先用等体积的苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1），然后用等体积的氯仿：异戊醇（24：1）萃取水相以去除残留的苯酚。

(b) 最后用乙醇沉淀法纯化DNA：

在DNA溶液中加入3 M乙酸钠，使其终浓度达到300 mM。加入2.5倍体积的95%乙醇使DNA沉淀，然后于-80℃冷却30分钟，随之离心（微型离心机5分钟，12000 rpm）。DNA沉淀用80%（V/V）冷乙醇洗涤后，真空干燥。将DNA溶于TE缓冲液（3.2）中，产生0.5 μg/l的浓度。

步骤4 使退火的寡核苷酸与切割的DNA连接

缓冲液和其他标准液：

4.1 10 X连接缓冲液

200 mM Tris-HCl pH7.4

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

4.2 10 X ATP

100 mM ATP

4.3 0.5 M NaCl

对于1 μg切割的DNA中的粘性末端的微微摩尔数如方法I

4.1(1)所述计算。

连接

使下列物质混合于0.5 ml的Sarstedt管中：

切割的7387 DNA 1.48 微微摩尔 (2 μg)

退火的寡核苷酸 3 微微摩尔

(来自步骤2)

10 X 连接缓冲液 (4.1) 2 μ l

10 X ATP (4.2) 2 μ l

T4 DNA 连接酶 2 单位

(Boehringer Mannheim)

H₂O 加至最终体积 20 μ l

连接混合物置于25°C下120分钟。之后向该连接混合物加入NaCl (4.3) 至终浓度为50 mM。所有与其他基因组DNA片段连接的基因组DNA片段都通过加入2单位EcoRI (Boehringer Mannheim) 进行再切割, 即于37°C下保温样品30分钟。通过加入下述物质使小载体单位再与这些再切割的基因组DNA片段连接:

ATP至1 mM浓度(4.2), 1.5微微摩尔退火的寡核苷酸, 1单位T4 DNA连接酶(Boehringer Mannheim)

于25°C下保温1小时。在37°C用EcoRI切割DNA30分钟后, 限制性核酸内切酶不失活。

因此, 在25°C下60分钟的第二次和最终连接过程中, 任何一种与其他基因组DNA片段连接的基因组DNA片段都可能在同一反应中再次裂解, 以至于在限制/连接反应结束时, 差不多有100%的基因组DNA片段在其两个末端都有小载体单位。小载体单位与切割的基因组DNA的连接会使特异的限制位点失活。

再使DNA(反应混合物)稀释至10 μ g/ μ l。使用本方法和小载体单位1-8以及7387细胞系DNA构建EcoRI小载体文库。

还构建了一个对照的EcoRI文库, 其中的小载体单位被从上述的连接中略去。

步骤5 小载体文库的扩增作用

每份10 ng的构建文库（小载体单位1-8和没有小载体的DNA对照文库）进行扩增处理。使用寡核苷酸58和63作为扩增体（amplicon）以扩增示于图12中的顺序，所用扩增条件如实例8所述。

15 μl扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

结果如图14所示。所有反应中都产生了预期大小（约600 bp）的产物，除了底物DNA是来自在没有小载体的连接混合物中构建的文库。由于寡核苷酸（上述一种扩增体）顺序在小载体单位范围内，所以这是预期中的。

这些结果表明，小载体单位的设计对于扩增小载体单位和任何要求的基因组顺序之间的核苷酸顺序（即上述寡核苷酸63）没有很大影响。

结果列于图14中。该图是一张表明所获产物的溴化乙锭染色的凝胶照片，这些产物如下：

1. 用7387 DNA + 小载体单位1构建的文库
2. 用7387 DNA + 小载体单位2构建的文库
3. 用7387 DNA + 小载体单位3构建的文库
4. 用7387 DNA + 小载体单位4构建的文库
5. 用7387 DNA + 小载体单位5构建的文库
6. 用7387 DNA + 小载体单位6构建的文库
7. 用7387 DNA + 小载体单位7构建的文库
8. 用没有小载体的7387 DNA构建的文库
9. $\phi \times 174$ Hae III标记物
10. $\phi \times 174$ Hae III标记物
11. 用7387 DNA + 小载体单位8构建的文库

在每种情况下都得到了预期大小的产物。

实例 10

本实例按上文所述的方法 X 进行。

使用本方法和如本文限定的小载体单位 1-7 以及 7387 细胞系 DNA 构建 EcoRI 小载体文库。

还构建了 EcoRI 的对照文库，其中的小载体单位被从上述连接反应中略去。

小载体文库的扩增作用

使每份 10 ng 的构建文库（小载体单位 1-7，和没有小载体的 DNA 对照文库）进行扩增。用寡核苷酸 58 和 63 作为扩增体以扩增示于实例 8 的顺序，使用实例 8 所述的扩增条件。

15 μ l 的产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

结果如图 15 所示。在所有反应中都产生了预期大小（约 600 bp）的产物，除了底物 DNA 是来自于没有小载体的连接混合物中构建的文库。由于寡核苷酸 58（上述一种扩增体）的顺序是在小载体单位范围内，所以这是预期中的。

示于图 15 的泳道照片如下：

1. ϕ X174 Hae III 标记物
2. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 1 产生的扩增产物
3. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 2 产生的扩增产物
4. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 3 产生的扩增产物
5. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 4 产生的扩增产物
6. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 5 产生的扩增产物
7. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 6 产生的扩增产物

8. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 7 产生的扩增产物

9. 由没有小载体的文库 7387 DNA 产生的扩增产物

10. ϕ X174 Hae III 标记物

由每一文库都得到了预期的结果。

这些结果表明，小载体单位的设计对于扩增小载体单位和任何要求的基因组顺序之间的核苷酸顺序（即上述寡核苷酸 63）没有显著影响。

实例 11

本实例按上文所述的方法 VI 进行。

使用本方法，小载体单位 1-7 和 7387 细胞系 DNA 来构建 EcoRI 小载体文库。

还构建了 EcoRI 的对照文库，其中小载体单位被从上述连接反应中略去。

小载体文库的扩增作用

使每份 10 ng 的构建文库（小载体单位 1-7，和没有小载体的 DNA 对照文库）经受聚合酶链反应。用寡核苷酸 58 和 63 作为扩增示于实例 1 中的顺序。使用实例 8 所述的扩增条件。

15 μ l 的产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

结果如图 16 所示，在所有反应中都产生了预期大小（约 600 bp）的产物，除了底物 DNA 是来自在没有小载体的连接混合物中构建的文库。由于寡核苷酸 58 的顺序是在小载体单位范围内，所以这是预期中的。

示于图 16 的泳道照片如下：

1. ϕ X174 Hae III 标记物

2. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 1 产生的扩增产物
3. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 2 产生的扩增产物
4. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 3 产生的扩增产物
5. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 4 产生的扩增产物
6. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 5 产生的扩增产物
7. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 6 产生的扩增产物
8. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 7 产生的扩增产物
9. 由没有小载体的文库 7387 DNA 产生的扩增产物
10. ϕ × 174 Hae III 标记物

这些结果表明，小载体单位的设计对于扩增小载体单位和任何要求的基因组顺序之间的核苷酸顺序（即上述寡核苷酸 63）没有显著的影响。

实例 1 2

按上文所述的方法进行本实例。

使用本方法，小载体单位 1—7 和 7387 细胞系 DNA 来构建 EcoRI 小载体文库。

还构建了 EcoRI 的对照文库，其中小载体单位被从上述连接反应中略去。

小载体文库的扩增作用

使每份 10 ng 的构建文库（小载体单位 1—7，和没有小载体的 DNA 对照文库）进行扩增处理。用寡核苷酸 58 和 63 作为扩增体以扩增示于实例 1 中的顺序。使用实例 8 所述的扩增条件。

15 μ l 的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

结果如图 1 7 所示。在所有的反应中都产生了预期大小（约 600 bp）

的产物，除了底物 DNA 是来自在没有小载体的连接混合物中构建的文库。由于寡核苷酸 5'8（上述一种扩增体）在小载体单位范围内，因此这是预期中的。

示于图 17 中的泳道照片如下：

1. $\phi \times 174$ Hae III 标记物
2. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 1 产生的扩增产物
3. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 2 产生的扩增产物
4. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 3 产生的扩增产物
5. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 4 产生的扩增产物
6. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 5 产生的扩增产物
7. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 6 产生的扩增产物
8. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 7 产生的扩增产物
9. 由没有小载体的文库 7387 DNA 产生的扩增产物
10. $\phi \times 174$ Hae III 标记物

这些结果表明，小载体单位的设计对于扩增小载体单位和任何要索的基因组顺序之间的核苷酸顺序（即上述寡核苷酸 6'3）没有显著的影响。

实例 13

按上文所述方法进行本实例。

使用本方法，小载体单位 1-7 和 7387 细胞系 DNA 来构建 EcoRI 小载体文库。

还构建了 EcoRI 的对照文库，其中小载体单位被从连接反应中除去。

小载体文库的扩增作用

使每份 10 ng 的构建文库（小载体单位 1—7，和没有小载体的 DNA 对照文库）进行扩增处理。用寡核苷酸 58 和 63 作为扩增体以扩增示于实例 1 中的顺序。使用实例 8 所述的 PCR 条件。

15 μ l 的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

结果如图 18 所示。在所有的反应中都产生了预期大小的产物（600 bp），除了底物 DNA 是来自在没有小载体的连接混合物中构建的文库。由于寡核苷酸 58（上述的一种扩增体）在小载体单位范围内，因此这是预期中的。

示于图 18 的泳道照片如下：

1. ϕ × 174 Hae III 标记物
2. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 1 产生的扩增产物
3. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 2 产生的扩增产物
4. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 3 产生的扩增产物
5. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 4 产生的扩增产物
6. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 5 产生的扩增产物
7. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 6 产生的扩增产物
8. 由文库 7387 DNA + 小载体单位 7 产生的扩增产物
9. 由没有小载体的文库 7387 DNA 产生的扩增产物
10. ϕ × 174 Hae III 标记物

这些结果表明，小载体单位的设计对于扩增小载体单位和任何要求的基因组顺序之间的核苷酸顺序（见上述寡核苷酸 63）没有显著的影响。

实例 14

以下述方式，用 7387 细胞系 DNA 和小载体单位 8 构建 5 种

不同的EcoRI I 小载体文库。

(1) (a) 用方法Ⅰ 构建一种文库

(b) 用方法Ⅱ 构建一种文库

(c) 用方法Ⅲ 构建一种文库

(d) 用方法Ⅳ 构建一种文库

(e) 用方法Ⅴ 构建一种文库

(2) 在扩增之前, 使上述(1)构建的文库进行3'端的阻断反应。

缓冲液和其他标准溶液

7. 2. 1 T7 DNA聚合酶缓冲液 5 X

200 m M Tris-HCl₂ pH7.5

100 m M MgCl₂

250 m M NaCl

7. 2. 2 dNTP—dATP

1 m M dTTP

1 m M dGTP

1 m M dCTP

配制于无菌的去离子水中。

7. 2. 3 ddATP

1 m M ddATP, 配制于无菌的去离子水中。

向上述(1)产物的3'端加入ddA残基。

使下列物质在0.5 ml Sarstedt管中混合:

0.5 μ l 由上述步骤(1)产生的DNA, 4 μ l 的5 X T7
DNA聚合酶缓冲液(7. 2. 1), 2 μ l dNTP—dATP 溶液

(7. 2. 2), $2 \mu\text{l}$ ddATP 溶液 (7. 2. 3), 1 单位的 T7 DNA 聚合酶 (Sequenase), H_2O 加至 $20 \mu\text{l}$ 。

该管于 37°C 下保持 30 分钟。然后使酶于 70°C 下保温 10 分钟进行变性。

然后, 所有样品中的 DNA 浓度用水稀释至 $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

小载体文库的扩增作用

使每份 10 ng 的 5 种构建文库进行聚合酶链反应。用寡核苷酸 58 和 63 作为扩增体以扩增实例 8 所示的顺序。使用实例 8 的扩增条件。

$15 \mu\text{l}$ 的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

结果如图 19 所示。

图 19 所示的放射自显影泳道如下:

1. $\emptyset \times 174$ Hae III 标记物
2. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 I X + 3' 端阻断产生的扩增产物
3. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 X + 3' 端阻断产生的扩增产物
4. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XI + 3' 端阻断产生的扩增产物
5. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XII + 3' 端阻断产生的扩增产物
6. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XIII + 3' 端阻断产生的扩增产物

所有产物的大小都与预期的一致。

实例 1 5

使用 7 3 8 7 细胞系 DNA 和小载体单位 8 构建 5 种不同的 EcoRI 小载体文库。

(a) 用方法 IX 构建一种文库

(b) 用方法 X 构建一种文库

(c) 用方法 XI 构建一种文库

(d) 用方法 XII 构建一种文库

(e) 用方法 XIII 构建一种文库

不同之处在于寡核苷酸 2 是非磷酸化的。按方法 IX—XIII 所述制备文库 (b)—(e)，用 ddATP 和 T7 DNA 聚合酶 (Sequenase) 处理文库 (b)、(c)、(d)、(e) 和文库 (a) 的等分试样，以阻断游离 3' 端。条件按实例 1 4 所述。对所有这些文库进行扩增。用寡核苷酸 6 3 和 5 8 扩增示于图 1 2 中的顺序。使用实例 8 所述的 条件。

1.5 μ l 的扩增产物用琼脂糖凝胶电泳 (1.4% w/v 凝胶) 分析。

所获得的结果如图 2 0 所示。

示于图 2 0 中的泳道照片如下：

1. 由 7 3 8 7 DNA + 小载体单位 8 方法 IX 产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

2. 由 7 3 8 7 DNA + 小载体单位 8 方法 IX + 3' 端阻断产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

3. 由 7 3 8 7 DNA + 小载体单位 8 方法 X + 3' 端阻断产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

4. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XI + 3' 端阻断产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

5. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XII + 3' 端阻断产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

6. 由 7387 DNA + 小载体单位 8 方法 XIII + 3' 端阻断产生的扩增产物 (寡核苷酸 2 是非磷酸化的)

7. ϕ X174 Hae III 标记物

所有产物都是预期大小的。

实例 16

进行本实例以证实图 13-20 中的约 600 bp 产物是寡核苷酸 58 和 63 (见实例 8) 的产物, 而不是一种扩增体的产物。

使每份 10 ng 的下列小载体文库用于各个扩增作用:

使用方法 VII 中 7387 DNA 和小载体单位 1-8 制备的文库。

使用方法 VII + 3' 端阻断以及 7387 DNA 和小载体单位 8 (详见实例 14) 制备的文库。

使用方法 VII + 3' 端阻断以及 7387 DNA 和小载体单位 8 (1b 寡核苷酸是非磷酸化的, 详见实例 15) 制备的文库。

使用方法 VII 和没有小载体的 7387 DNA 制备的文库。

为了证实实例 8 中由用小载体单位 1-8 构建的文库产生的全部产物是相同的, 用寡核苷酸 59 和 66 测定图 16 (产物 2-8) 所示的正确顺序的扩增产物和图 14 泳道 11 所示产物的顺序。

图 21 是一张放射自显影照片复制品, 它产生自寡核苷酸 66 对图 16 的产物 2-8 进行的顺序测定。

放射自显影中, 还给出了苯丙氨酸羟化酶基因 (苯丙酮酸尿——

P K U) 的内含子 8 和外显子 9 的部分顺序测定以作为对照。扩增产物 2—8 自左至右排列 (如图 1 6 所示), 并且全部一样。泳道顺序是 C G T A。

图 2 2 表明来自实例 1 6 所述产物的核苷酸顺序数据。

碱基 1—1 6 位于已公开的 P K U 内含子 8 顺序的 3' 端。碱基 1 7—4 5 2 构成通过本发明方法确定的新 P K U 内含子 8 的顺序数据。

实例 1 7

用寡核苷酸 6 2 和 6 7 测定实例 7 (1) 中轨道 (C) 泳道 7、8、9、1 0、1 1 中约 2 2 0 b p 产物的顺序。

因此, 使实例 7 (1) 的 2 2 0 b p 产物进行下述处理: 1) 以 3 步骤循环进行扩增, (a) 6 0 ° C 2 分钟, (b) 7 2 ° C 3 分钟, (c) 9 1 ° C 2 分钟, 进行 4 0 次循环 (用 0. 5 μ g D N A) / 装入 1 0 0 μ l / 轨道 (见图 2 4 a), 2) 然后使上述 (1) 的产物经凝胶纯化, 并在 a) 6 0 ° C 4 分钟和 b) 9 1 ° C 2 分钟的 2 步骤循环中再次扩增, 进行 4 0 次循环 (见图 2 4 b)。

寡核苷酸 5 8、6 2 和 6 7 的位置示于图 2 3 中。在图 2 5 中, (a) 中所给顺序是用寡核苷酸 6 2 解读的顺序, (b) 中所给顺序是用寡核苷酸 6 7 解读的顺序。在 (a) 和 (b) 中, 下加横线的顺序是互补的 / 用寡核苷酸 6 2 和 6 7 解读的反向顺序。整个 5'—3' 顺序都给在图 2 5 (c) 中, 图中:

位置 2—3 1 读出寡核苷酸 6 2 的 5'—3' 顺序。

位置 7 5—1 0 4 读出寡核苷酸 6 7 的反向互补顺序。

位置 9 5—1 0 4 (顺序上方用连续线标出) 是已公开的内含子

顺序的头10个碱基(见Biochemistry, 1985, 24:556-561, Kwok等人)。

位置2-104与已公开的PKU外显子I的顺序和部分内含子顺序配对。

位置105以上是PKU内含子I的新的顺序数据。

实例18

使 α 抗胰蛋白酶基因的外显子V用于本发明的方法中(见图26),使用下列寡核苷酸:

58(全能小载体引物)、60(全能小载体巢式寡核苷酸)、68(外显子V 5')、69(外显子V 5'巢式)和70(外显子V 3')。

用EcoRI切割的基因组DNA制备小载体文库,使用退火的小载体寡核苷酸(如本文定义的87/40)并进行连接。

按下述进行扩增作用:

在第一轮扩增中,如下述使用100ng的小载体文库:

100ng小载体文库DNA

寡核苷酸58+68(100微微摩尔)

10 μ l缓冲液: 500mM KCl

100 μ M dNTP

100mM MgCl₂

2单位Taq聚合酶

14mM MgCl₂

使用重蒸馏水

0.1%明胶

补充体积至100 μ l

反应条件: 开始的变性步骤—93 $^{\circ}$ C 10分钟

93 $^{\circ}$ C 2分钟

65 °C 2 分钟

72 °C 8 分钟循环 39 次

最后一次循环: 72 °C 10 分钟

结果列于图 27 (a) 泳道 4 中。泳道 3 代表使用寡核苷酸 68 和 70 的对照扩增反应, 以产生约 200 bp 的产物。

第一轮扩增得到大小近似预期的拖影。第一次反应混合物再按下述稀释:

图 27 (a) 泳道 4 的 1 μ l 产物用重蒸水补充到 1 ml (即稀释 10^3 倍)。

1 μ l 此溶液用于下一步 PCR (总体积为 100 μ l) (即总稀释度为 10^5), 并按下述使用一个范围的引物对扩增:

第二次 PCR (使用巢式寡核苷酸)

1 μ l 图 27 (a) 泳道 4 的产物 (10^3) DNA

100 微微摩尔寡核苷酸 60 + 69

10 μ l 10 X 缓冲液 10 X 缓冲液: 500 mM KCl

100 μ m dNTP 100 mM Tris pH 8.3

2 单位 Taq 聚合酶 10 mM MgCl₂

0.1 % 明胶

用重蒸馏水补充体积至 100 μ l

反应条件: 开始的变性步骤—95 °C 10 分钟

第二次扩增产物呈现为图 27 (b) 泳道 1、2 和 3 中的 3.0 kb 产物。

图 27 (b) 是一张显示寡核苷酸 60 和 69 之间的第二次扩增产物的琼脂糖凝胶照片。

泳道1：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

泳道2：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

泳道3：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

泳道4：用Hae III切割的标记物 ϕ X174和用Hind III切割的标记物 λ 。

将凝胶吸印至尼龙膜上并用 α -1抗胰蛋白酶探针检测。可观察到正确大小(3.0 Kb)的单谱带，并示于图27(c)中。

图27(c)是一张用 α -1抗胰蛋白酶探针检测过的尼龙滤膜(吸印有图27(b)的凝胶)的放射自显影图片。并显示了DNA标记物的位置。

泳道1：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

泳道2：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

泳道3：寡核苷酸60和69之间的第二次扩增的3.0 Kb产物

实例19

D5是一个作为474 bp XbaI-EcoRI片段克隆的无名基因组顺序。D5的顺序已为标准方法所测定(Newton等人, Nucleic Acids Research 16:8233-8243, 1988), 并示于图29中。

合成两种寡核苷酸引物71, 72。

71 5' AAGTTTGAGCATAGGAAAAGTTCTGTGCC

72 5' AGTTCTGTGCCCAAATTCATCCAAG

图 2.9 已指出寡核苷酸 7 1、7 2 的位置。

由类成淋巴细胞系 GM 7 3 8 7 (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository) 分离基因组 DNA, 其等分试样 20 μ g 用下列限制性酶消化: Dra I、Bcl I、Hind III 和 Hae III。再接方法 X 制备小载体文库。

第一次扩增如下述用各文库的等分试样进行。

使下述物质在 0.5 ml Sarstedt 管中混合:

1 0 n g 构建的小载体文库

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 5 8

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 7 1

1 0 0 μ M dNTP

1 0 μ l 1 0 X 缓冲液 1 0 X 缓冲液是: 5 0 0 mM KCl

1 0 0 mM Tris-HCl

pH 8. 3

1 0 mM MgCl₂

0. 1 % 明胶

用无菌的重蒸水将体积调至 1 0 0 μ l。为了防止蒸发, 在反应混合物表面轻轻吸入 5 0 μ l 的轻质矿物油 (Sigma)。

然后使管加热至 9 6 $^{\circ}$ C (在平衡于 9 6 $^{\circ}$ C 的 Techne Programmable Dri-Block PHC-1 中)。DNA 于 9 6 $^{\circ}$ C 下变性 1 0 分钟。冷却装置至 9 0 $^{\circ}$ C。再将 2 单位 Taq 聚合酶 (Cetus) 加到反应混合物中。使用下述的温度和时间扩增寡核苷酸 5 8 和 7 1 之间的顺序。

92 °C 2 分钟

65 °C 2 分钟

72 °C 5 分钟

进行40次循环。在最后一次循环中，使反应混合物保持在72 °C 10分钟。

由反应混合物取出等分试样(15 μl)。加入着色装样混合物(5 μl)，样品用1.4%琼脂糖凝胶分析。

着色装样混合物 1.5% (W/V) Ficoll 400

0.05% (W/V) 溴苯酚蓝

0.05% (W/V) 二甲苯胺

溶于1X TBE中

使第一次反应混合物的试样进行第二次扩增。第一次反应混合物的试样(2 μl)用水稀释至400 μl。将稀释过的试样置于0.5 ml Sarstedt 管中。

下列物质也加到管中：

100 微微摩尔寡核苷酸60

100 微微摩尔寡核苷酸72

100 μM dNTP

10 μl 1.0 X 缓冲液

1.0 X 缓冲液是：500 mM KCl

100 mM Tris-HCl pH8.3

10 mM MgCl₂

0.1% 明胶

用无菌的重蒸水补充体积至100 μl。

为了防止蒸发，在反应混合物表面轻轻吸入 $50 \mu\text{l}$ 的轻质矿物油 (Sigma)。

将管加热至 90°C (于平衡于 96°C 下的 Techne Programmable Dri-Block PHC-1 中)。使 DNA 于 96°C 下变性 10 分钟。冷却装置至 90°C 。在反应混合物中加入 2 单位 Taq 聚合酶 (Cetus)。扩增寡核苷酸 60 和 72 之间的顺序时使用下列温度和时间。

92°C 2 分钟

65°C 2 分钟

72°C 5 分钟

进行 37 次循环。在最后一次循环中，反应混合物于 72°C 下保持 10 分钟。

由反应混合物中取出等分试样 ($15 \mu\text{l}$)。加入着色装样混合物 ($5 \mu\text{l}$)，用 1.4% 琼脂糖凝胶分析样品。

着色装样混合物 1.5% Ficol1 400

0.05% 溴苯酚蓝

0.05% 二甲苯胺

溶于 1X TBE 中

文库 (Hae III、Hind III、Bcl I、Dra I) 给出大小范围在 0.4 - 1.5 Kb 的独特产物 (图 30)。根据所观察到的产物大小，能绘出假定的限制图谱 (图 31)。产物经限制性消化进一步分析。真实的产物应被切断以产生预期大小的片段。因此，0.82 Kb Bcl I 产物能被 Hind III 切断而产生 0.78 Kb 产物，它还能被 Hae III 切断而产生 0.75 Kb 的产物。Hind III 和 Hae III 对

0.82 Kb Bcl I 产物的消化分析示于图 30 中。观察到了预期产物，然后使 Bcl I 产物洗脱进行顺序分析。

因此在图 30 中，由 Hae III 小载体文库扩增所得到的产物示于泳道 2 中，由 Hind III 小载体文库扩增所得到的产物示于泳道 3 中，由 Bcl I 小载体文库扩增所得到的产物示于泳道 4 中，由 Dra I 小载体文库扩增所得到的产物示于泳道 5 中。泳道 7 是用限制性酶 Hae III 消化 Bcl I 产物所得到的片段。泳道 8 是用限制性酶 Hind III 消化 Bcl I 产物后得到的片段。泳道 9 是 Bcl I 产物，泳道 1 和 6 含有 1 Kb 的 DNA 标记物 (BRL)。

小载体产物的限制性消化分析

16 μ l 扩增反应混合物

2 μ l 10X 限制缓冲液

2 μ l 限制性酶

样品于 37 °C 保温 1 小时，向其中加入 5 μ l 着色装料混合物，产物用 1.4% 琼脂糖凝胶分析。

顺序测定

由琼脂糖凝胶洗脱 Bcl I 产物，然后用寡核苷酸 59 和标准方法测定顺序 (Newton 等人, Nucleic Acids Research 16: 8233-8243, 1988)。该顺序示于图 31 中。根据此顺序设计进一步的引物 (73)，并用于下面的步骤中。

73 5' GGCCTTTGANNAAGAGAAGAGTCAAGGATG

对该顺序进行的检查证实了根据本发明方法预测的 Hae III 和 Hind III 位点的存在。

实例 20 使用本发明方法检查衣原体属的基因组

使沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*) 血清型 L2 在

环己酰亚胺处理的McCoy细胞中生长。用甘油-酒石酸盐梯度纯化原生小体,产生 10^8 原生小体。DNA通过用蛋白酶K/SDS、苯酚/氯仿处理萃取,并通过乙醇沉淀回收。回收得到90mg DNA,其中有900ng估计是衣原体DNA,剩余的是由McCoy细胞产生的小鼠DNA。

用EcoRI或BamHI消化DNA(与50ng的衣原体DNA等价的 $5\mu\text{g}$)。按方法X使用合适的寡核苷酸(27、40、EcoRI, 31、40、BamHI)制备小载体文库。将文库调整至最终体积为 $100\mu\text{l}$ 。

根据衣原体L2的MOMP(主要外膜蛋白)的共感顺序合成两种寡核苷酸引物。(Stephens等人, J. Bacteriology, 169: 3879-3885, 1987)。

74 5' CTGCTCACGTAAATGCACAATTCCG

75 5' AACCGAGAGCAAAAGCCATATTGGC

扩增

使下述物质在0.5ml Sarstedt管中混合:

10 μl EcoRI小载体文库

20 μl 5X缓冲液

5X缓冲液= 335mM Tris-HCl pH8.5

83mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

10mM MgCl_2

50mM 2-巯基乙醇

0.8mg/ml 牛血清清蛋白

100微微摩尔寡核苷酸58

100 微微摩尔寡核苷酸 74

200 μ M dNTP

用无菌的重蒸水将体积调至 100 μ l。为防止蒸发，在反应混合物表面轻轻吸入 50 μ l 的轻质矿物油 (Sigma)。然后使管加热至 96 $^{\circ}$ C (在平衡于 96 $^{\circ}$ C 的 Techne Programmable Dri-Block PHO-1 中)。使 DNA 于 96 $^{\circ}$ C 下变性 10 分钟。然后使装置冷却至 90 $^{\circ}$ C。在反应混合物中加入 2 单位 Taq 聚合酶 (Cetus) 在扩增寡核苷酸 60 和 72 之间的顺序时使用下列温度和时间。

92 $^{\circ}$ C 0.7 分钟

65 $^{\circ}$ C 0.7 分钟

72 $^{\circ}$ C 1 分钟

进行 40 次循环。取出 10% 的反应混合物进行琼脂糖凝胶分析。结果列于图 3 2 中，其中：泳道 1 是用 Hae III 切割的标记 ϕ X 174。泳道 2 是用 10 μ l EcoRI 文库扩增寡核苷酸 58 和 74 之间的产物。泳道 3 是用 1 μ l EcoRI 文库扩增寡核苷酸 58 和 74 之间的产物。

纯化用寡核苷酸 58 和 74 扩增 EcoRI 文库所得到的产物。如上所述，使用 50 微微摩尔寡核苷酸 74 和寡核苷酸 58 使产物通过 35 次循环进行不对称扩增 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656, 1988 年 10 月, U. B. Gyllenstein 和 H. Ehrlich)。扩增产物在 G50 旋转柱上纯化 (如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 所述, Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., 冷泉港实验室, 1982), 并按实例 17 所述用寡核苷酸 59 测定顺序。该顺序示于图 3 A 中。

用HinfI或Cla I消化PCR产物的等分试样证实了这些限制位点(图34)的存在。

图34泳道照片如下:

泳道1: ϕ X174 Hae III DNA标记物

泳道2: 用Cla I消化的EcoRI产物

泳道3: EcoRI产物

泳道4: 用HinfI消化的EcoRI产物

泳道5: ϕ X174 Hae' III DNA标记物

实例21 衣原体属基因组的线性扩增作用

使下述置于0.5 ml Sarstedt管中:

10 μ l BamHI小载体文库

20 μ l 5X缓冲液(实例20所定义)

100微微摩尔寡核苷酸75

200 μ M dNTP。

用无菌的重蒸水调体积至100 μ l, 为了防止蒸发, 在反应混合物表面轻轻吸入50 μ l的轻质矿物油。

然后将管加热至96 $^{\circ}$ C(在平衡于96 $^{\circ}$ C下的Techneprogrammable Dri-Block PHC-1中)。使DNA于96 $^{\circ}$ C下变性10分钟。再使装置冷却至90 $^{\circ}$ C。向反应混合物中加入2单位Taq聚合酶(Cetus)。在扩增寡核苷酸75和BamHI位点之间的顺序时使用下列温度和时间:

93 $^{\circ}$ C 0.7分钟

65 $^{\circ}$ C 0.7分钟

72 $^{\circ}$ C 1.5分钟

进行40次循环。向反应混合物中加入100微微摩尔的寡核苷酸58和2单位的Taq聚合酶，并如上所述使扩增连续进行20次循环。反应混合物的试样用琼脂糖凝胶电泳分析(图35)。

在完成的另一次反应中，在上述反应条件下用寡核苷酸75和58扩增BamHI文库。反应混合物的试样用琼脂糖凝胶电泳分析(图35)

在图35中：

泳道1表明用HaeIII切割的标记物 ϕ X174。

泳道2表明用寡核苷酸75线性扩增BamHI小载体文库的产物。

泳道3表明用寡核苷酸58和75由第二次扩增的20次循环所得到的产物。

泳道4表明用寡核苷酸58和75由第二次扩增的35次循环所得到的产物。

泳道5表明用寡核苷酸58和75由第二次扩增的40次循环所得到的产物。

实例22

按已经公开的程序(PFR Little (1987)in DNA Cloning ; A practical approach , Vol III, p 19-42, DM Glover 编)，用粘性载体pCos EMBL2构建人基因组文库。通过与探针KM19的杂交作用筛选文库(X Estivill 等人, 1987, Nature 326:840-845)。鉴定到好几个阳性克隆，选择一个在40Kb插段中含有KM19顺序的克隆4.17。

粘性质粒4.17用Hind III进行消化，并按方法X制备小载体文库。

合成两种寡核苷酸76、77：

76 5' GGAAGGCC TTCAA AATTAACAGTGTAGCC

77 5' GCTGCATCATATAAGTTGCC

这些引物的位置示于图 3 6 (a) 中。

按下述对文库试样进行 P O R 扩增。

使下列混合于 0. 5 ml Sarstedt 管中，

0. 1 pg 粘性质粒小载体文库

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 5 8

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 7 6

1 0 0 μ M dNTP

1 0 μ l 1 0 X 缓冲液

1 0 X 缓冲液是： 5 0 0 mM KCl

1 0 0 mM Tris-HCl pH8. 3

1 0 mM MgCl₂

0. 1% 明胶

在 0. 5 ml Sarstedt 管中建立含有下列物质的第二次反应：

0. 1 pg 粘性质粒小载体文库

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 5 8

1 0 0 微微摩尔寡核苷酸 7 7

1 0 0 μ M dNTP

1 0 μ l 1 0 X 缓冲液

用无菌的重蒸水将反应混合物体积调至 1 0 0 μ l。为防止蒸发，在反应混合物表面轻轻吸入 5 0 μ l 的轻质矿物油 (Sigma)。然后将管置于已在 9 6 °C 达到平衡的热循环控制装置中 (Techne Programmable Dri-Block PHC-1)。使装置冷却至 9 0 °C。在反

应混合物中加入2单位Taq聚合酶(Cetus)。在扩增寡核苷酸58和76之间和58和77之间的顺序时使用下列温度和时间,

92°C 2分钟

65°C 2分钟

72°C 5分钟

进行40次循环。在最终一次循环中,使反应混合物保持在72°C下10分钟。

由反应混合物中吸取等分试样(15μl)。加入着色装料混合物5μl,样品用1.4%琼脂糖凝胶分析。

着色装料混合物 1.5%(W/V)Ficoll 400

0.05%(W/V)溴苯酚蓝

0.05%(W/V)二甲苯胺

溶于1X TBE中。

所得结果示于图36(b)中。

泳道1: ∅×174 Hae III DNA标记物

泳道2: 230bp产物(寡核苷酸58和78)

泳道3: 1200bp产物(寡核苷酸58和77)

泳道4: ∅×174 Hae III DNA标记物

实例23

合成下列寡核苷酸

78 5' CTCTCCCTTCTCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGGTCTCTCCTTC

一种修饰型E寡核苷酸,它含有质粒PBR322四环素抗性基因的核苷酸残基385-414顺序(T. Maniatis, EF Fritsch和J. Sambrook(1982), Molecular Cloning; A

Laboratory Manual, p479-503)。被用于与D型寡核苷酸
的连接。

79 5' CCGGTGATGCCGGCCACGATCGGTCCGGCG

一种修饰型全能小载体引物，代表质粒pBR322(四环素抗性基因
核苷酸残基385-414 (Maniatis等人, Molecular
Cloning, A Laboratory Manual, p479-503)。用于
下文所述寡核苷酸78和寡核苷酸80/81, 82/81和83/
81的连接。

80 5' AATTGGCGGCCGATCCTAATTCTGTCTGAAGGTAAGGAACGGAGGAGAGAACT

一种修饰型D寡核苷酸，含有一个EcoRI粘性末端、一个Not
I识别位点和一个FokI识别位点。用于与寡核苷酸81的连接。

81 5' AGTTCTCCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCCGGATGCCGGCCCGCC

一种修饰型E寡核苷酸。

82. 5' AGCTGGCGGCCGATCCTAATTCTGTCTGAAGGTAAGGAACGGAGGAGAGAAC

一种修饰型D寡核苷酸，含有一个Hind III粘性末端、一个Not
I识别位点和一个FokI识别位点。用于与寡核苷酸81的连接。

83. 5' AGCTGGCGGCCGATCC-NH₂

一种修饰型A寡核苷酸，含有一个Hind III粘性末端，并有一个
氨基己基修饰阻断了3'末端。用于与寡核苷酸81的连接。

84. 5' GGCTCAACAGTCAGTTGAACTAGC

一个与KM19区域EcoRI位点邻接的引物。

适于下列每一扩增作用的限制性图谱示于图37中，其中

(a)表明与EcoRI小载体连接的基因组DNA片段的限制性
图。并指出了寡核苷酸27、76、78和79的位置

(b) 表明与 *EcoRI* 小载体连接的基因组 DNA 片段的限制性图。并指出了寡核苷酸 78、79 和 84 的位置。

(c) 表明与 *EcoRI* 小载体连接的苯丙氨酸羟化酶基因外显子 9 的片段。并指出了寡核苷酸 63 和 79 的位置。

(d) 表明与修饰型 *EcoRI* 小载体连接的基因组 DNA 片段的限制性图 (描述于上述图 37 (a) 中)。并指出了寡核苷酸 76、79、80 和 81 的位置。

(e) 表明与修饰型 *EcoRI* 小载体连接的基因组 DNA 片段的限制性图 (描述于上述图 37 (b))。并指出了寡核苷酸 79、80、81 和 84 的位置。

(f) 表明与修饰型 *EcoRI* 小载体连接的苯丙氨酸羟化酶基因外显子 9 的片段。并指出了寡核苷酸 63、79、80 和 81 的位置。

(g) 表明与修饰型 *Hind III* 小载体文库连接的基因组 DNA 片段的限制性图。并指出了核苷酸 76、78 和 79 的位置。

(h) 表明与修饰型 *Hind III* 小载体文库连接的基因组 DNA 片段的限制性图。并指出了寡核苷酸 78、79、81 和 82 的位置。

(i) 表明与修饰型 *Hind III* 小载体文库连接的基因组 DNA 片段的限制性图。并指出了寡核苷酸 76、79、81 和 83 的位置。

(a) 按照方法 X, 由 *EcoRI* 消化的基因组 DNA (细胞系 7387) 和寡核苷酸 27 和 79 制备 *EcoRI* 小载体文库。文库的等分试样 (1 ng) 用寡核苷酸 76 和 79 扩增。按实例 8 所述进行扩增。反应混合物的等分试样 (15 μ l) 用 1.4% 琼脂糖凝胶分析。结果列于表 38 中。

泳道 1: ϕ × 174 *Hae III* DNA 标记物

泳道2：由寡核苷酸7 6和7 9之间的扩增所得到的8 7 0 bp产物。

(b)用寡核苷酸7 9和8 4扩增前面实例中的EcoR I小载体文库的等分试样(1 ng)。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图3 8中。

泳道3：由寡核苷酸7 9和8 4之间的扩增得到的5 2 0 bp产物。

(c)用寡核苷酸6 3和7 9扩增前面实例中的EcoR I小载体文库的等分试样(1 ng)。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图3 8中。

泳道4：由寡核苷酸6 3和7 9之间的扩增产生的6 0 0 bp产物。

(d)EcoR I小载体文库按方法X由EcoR I消化的基因组DNA(细胞系7 3 8 7)和寡核苷酸8 0和8 1制备。文库的等分试样(1 ng)用寡核苷酸7 6和7 9扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图3 8中。

泳道5：由寡核苷酸7 6和7 9之间的扩增产生的8 7 0 bp产物。

(e)上述(4)中的文库等分试样用寡核苷酸7 9、8 4进行扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图3 8中。

泳道6：由寡核苷酸7 9和8 4之间的扩增产生的5 2 0 bp产物。

(f) 上述(4)中的文库等分试样用寡核苷酸63和79进行扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图38中。

泳道7: 由寡核苷酸63和79之间的扩增产生的600 bp产物。

(g) Hind III小载体文库按方法X由Hind III消化的基因组DNA(细胞系7387)和寡核苷酸30和81制备。文库的等分试样(1 ng)用寡核苷酸76和79扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图38中。

泳道8: 由寡核苷酸76和79之间的扩增产生的230 bp产物。

(h) Hind III小载体文库按方法X由Hind III消化的基因组DNA(细胞系7387)和寡核苷酸82和81制备。文库的等分试样(1 ng)用寡核苷酸76和79扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析, 结果列于图38中。

泳道9: 由寡核苷酸76和79之间的扩增产生的230 bp产物。

(i) Hind III小载体文库按方法X由Hind III消化的基因组DNA(细胞系7387)和寡核苷酸83和81制备。文库的等分试样(1 ng)用寡核苷酸76和79扩增。扩增按实例8所述进行。反应混合物的等分试样(15 μ l)用1.4%琼脂糖凝胶分析。结果列于图38中。

泳道9: 由寡核苷酸76和79之间的扩增产生的230 bp产物。

泳道10, $\phi \times 174$ Hae III DNA 标记物

实例 24

合成下列寡核苷酸:

85 5' ATTCTGTCCAGGAAACTTTGTGTTTTGTCA

86 5' AGCCGAAGACAAAGGGCATAATCTC

87 5' TCACTACCAGCTTTCCTCCACTTCCCTGGC

88 5' CCCTAAATTAGTCTCAGCTCCAGGTAAGGT

DNA 由细胞系 7382 (以前曾证明具有 KM19 Pst I 多态的 + + 单模式) 提取并用 Pst I 消化。用苯酚/氯仿萃取之后, 通过乙醇沉淀回收 DNA (见图 39 (a))。

成环

在 0.5 ml Sarstedt 管中加入下述物质:

100 ng Pst I 消化的 7382 DNA

10 μ l 10 X 连接缓冲液

10 μ l 10 mM ATP

0.5 μ l T4 DNA 连接酶

(Boehringer Mannheim 8 单位/ μ l)

用无菌的重蒸水将体积调至 100 μ l, 并于 25 °C 下保温 2 小时。进行 5 个相同的反应, 并在 25 °C 下 2 小时后合并。合并的混合物用苯酚/氯仿萃取, DNA 通过乙醇沉淀法回收。将 DNA 沉淀溶于 100 μ l 水中, 再通过预包装柱 (G-50 Sephadex Nick 柱, Pharmacia) 上的凝胶过滤纯化。DNA 用 400 μ l 水洗脱。溶液冻干后重新溶于水 (9 μ l) 中, 使最终浓度为 50 ng/ μ l。用水将 1 μ l 该溶液稀释至 50 μ l (见图 39 (b))。

小载体文库的构建

Hind III 消化

2 μ l Pst I 环 (100 ng)

0.5 μ l 10 \times 缓冲液

1.5 μ l H₂O

1 μ l Hind III (2 单位)

反应混合物于37 $^{\circ}$ C下保温30分钟。

连接

向限制性消化液中加入下列：

1 μ l 10 \times 缓冲液

1 μ l 10 mM ATP

1 μ l 退火的寡核苷酸 81 和 82 (0.25 微微摩尔)

或 81 和 83 (0.25 微微摩尔)

1 μ l 连接酶 (2 单位)

0.5 μ l 10 \times Hind III 缓冲液

混合物于37 $^{\circ}$ C下保温30分钟。

加入退火的寡核苷酸 (81/82 或 81/83, 0.25 微微摩尔), 使反应再于37 $^{\circ}$ C下保温1小时。用水将反应混合物的体积调至100 μ l (见图39(c))。

1. 向0.5 ml Sarstedt 管中加入下列：

Pst I 环 (5 ng)

寡核苷酸 85 (100 微微摩尔)

寡核苷酸 86 (100 微微摩尔)

10 μ l 10 \times PCR 缓冲液

100 μ M dNTP

2单位Taq聚合酶(Cetus)。

用水将体积调至100 μ l, 扩增作用按实例8所述进行。得到的预期的710 bp产物证实环状物已经形成。结果列于图40中。

泳道1: ϕ X174 Hae III DNA标记物

泳道2: 寡核苷酸85和86之间扩增的710 bp产物。

2. 在0.5 ml Sarstedt管中加入下列:

10 ng Pst I环-Hind III小载体-寡核苷酸81/82

寡核苷酸85 (100微微摩尔)

寡核苷酸79 (100微微摩尔)

10 μ l 10X PCR缓冲液

100 μ M dNTP

2单位Taq聚合酶(Cetus)

用水将体积调至100 μ l, 按实例8所述进行扩增。得到预期的720 bp产物。结果列于图40中。

泳道3: 寡核苷酸85和79之间扩增的720 bp产物。

3. 将上述(2)的扩增反应混合物稀释 10^7 倍。取1 μ l的稀释混合物放于0.5 ml的Sarstedt管中。

在Sarstedt管中再加入下列:

寡核苷酸79 (100微微摩尔)

寡核苷酸88 (100微微摩尔)

10 μ l 10X PCR缓冲液

100 μ M dNTP

2单位Taq聚合酶(Cetus)

体积调至 $100\mu\text{l}$ ，按实例8所述进行扩增作用。得到预期的 500bp 产物。结果列于图40中。

泳道4：寡核苷酸79、88之间扩增的 500bp 产物。

4. 上述(3)的扩增产物用Pst I消化。得到预期的产物(340bp 、 160bp)。结果列于图40中。

泳道5：由Pst I消化PCR产物(泳道4)产生的产物。得到 340bp 和 160bp 的产物。

5. 在 0.5ml Sarstedt管中放入下列：

10ng Pst I 环-Hind III小载体-寡核苷酸83/82

寡核苷酸85 (100 微微摩尔)

寡核苷酸79 (100 微微摩尔)

$10\mu\text{l}$ 10X PCR缓冲液

$100\mu\text{M}$ dNTP

2单位Taq聚合酶(Cetus)

用无菌的重蒸水调体积至 $100\mu\text{l}$ ，按实例8所述进行扩增。得到预期的 720bp 产物。结果列于图40中。

泳道6：寡核苷酸79和85之间扩增的 720bp 产物。

6. 将上述(5)的扩增反应混合物稀释 10^6 倍。取 $1\mu\text{l}$ 稀释混合物放入一个 0.5ml Sarstedt管中。再向该Sarstedt管中加入下列：

寡核苷酸79 (100 微微摩尔)

寡核苷酸88 (100 微微摩尔)

$10\mu\text{l}$ 10X PCR缓冲液

$100\mu\text{M}$ dNTP

2 单位 Taq 聚合酶 (Cetus)

用无菌的重蒸水调体积至 $100\ \mu\text{l}$ ，按实例 8 所述进行扩增。得到预期的 $500\ \text{bp}$ 产物。结果列于图 40 中。

泳道 7：寡核苷酸 79、88 之间扩增的 $500\ \text{bp}$ 产物。

7. 由上述 (6) 产生的扩增产物用 Pst I 消化。得到预期的产物 ($340\ \text{bp}$, $160\ \text{bp}$)。结果列于图 40 中。

泳道 8：用 Pst I 消化 PCR 产物 (泳道 6) 所得到的产物。得到 $340\ \text{bp}$ 和 $160\ \text{bp}$ 的产物。

8. 将上述 (3) 的扩增反应混合物稀释 10^7 倍。取 $1\ \mu\text{l}$ 的稀释混合物放入一个 $0.5\ \text{ml}$ Sarstedt 管中。向该管加入下列：

寡核苷酸 79

寡核苷酸 85

$10\ \mu\text{l}$ 10X PCR 缓冲液

$100\ \mu\text{M}$ dNTP

2 单位 Taq 聚合酶 (Cetus)

用无菌的重蒸水调体积至 $100\ \mu\text{l}$ ，再按实例 1 所述进行扩增。得到预期的 $720\ \text{bp}$ 产物。结果列于图 40 中。

泳道 9：寡核苷酸 79、85 之间扩增的 $720\ \text{bp}$ 产物。

9. 上述 (8) 的扩增产物用 Pst I 消化。预期的产物 ($370\ \text{bp}$, $350\ \text{bp}$)。

泳道 10：用 Pst I 消化 PCR 产物 (泳道 9) 得到的产物。得到 $370\ \text{bp}$ 和 $350\ \text{bp}$ 的产物。

泳道 11： $\phi\times 174$ Hae III DNA 标记物。

图 1

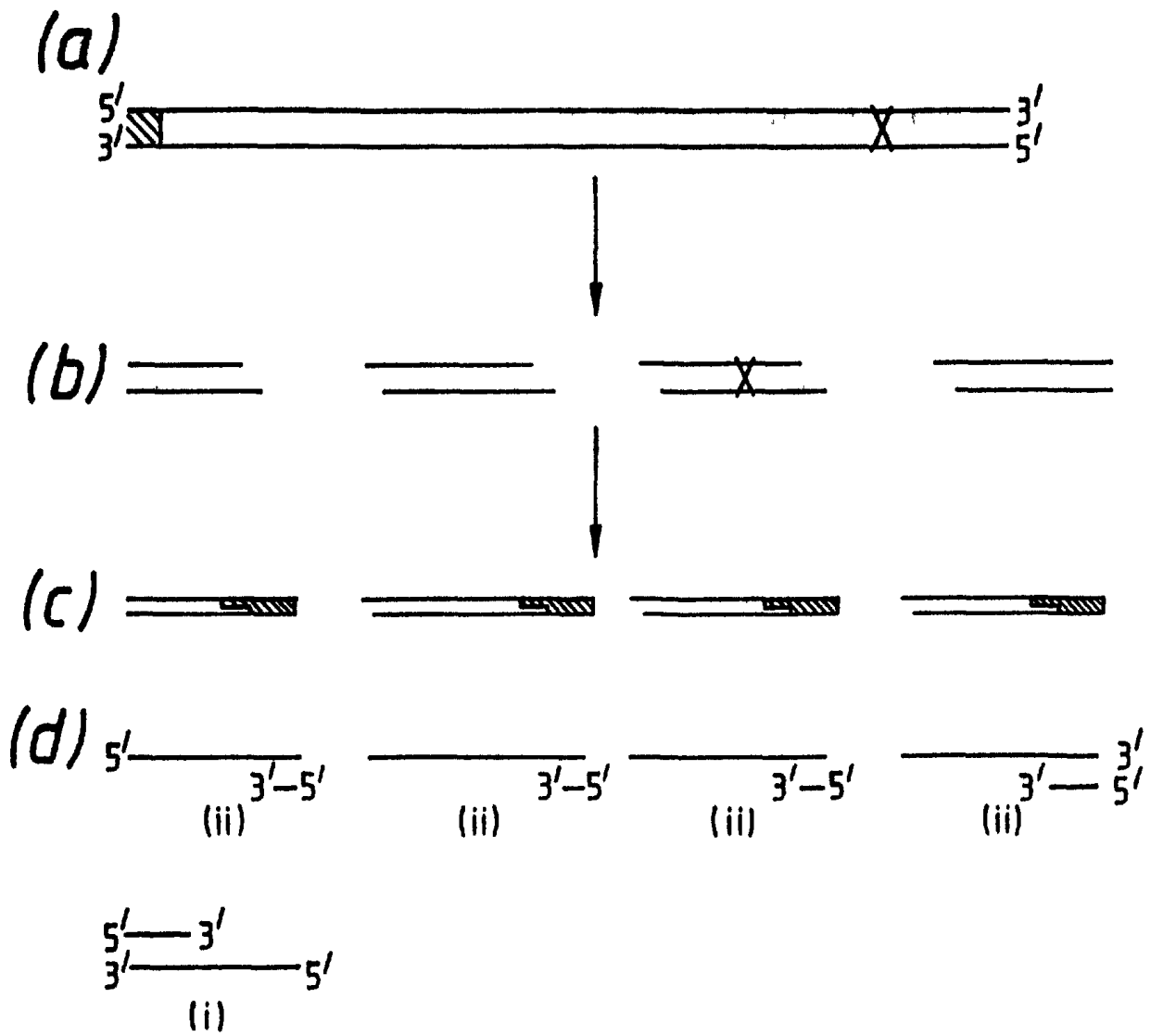
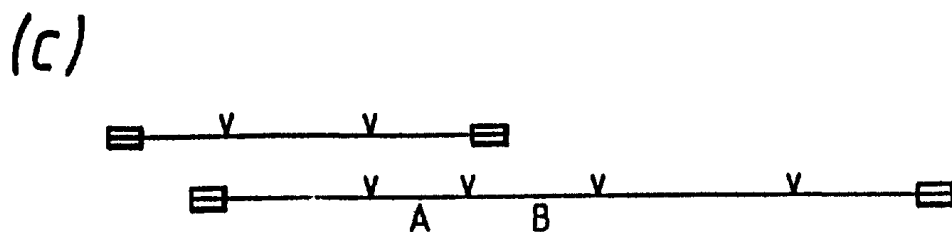
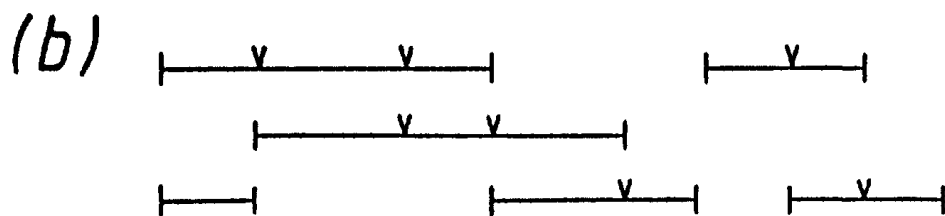
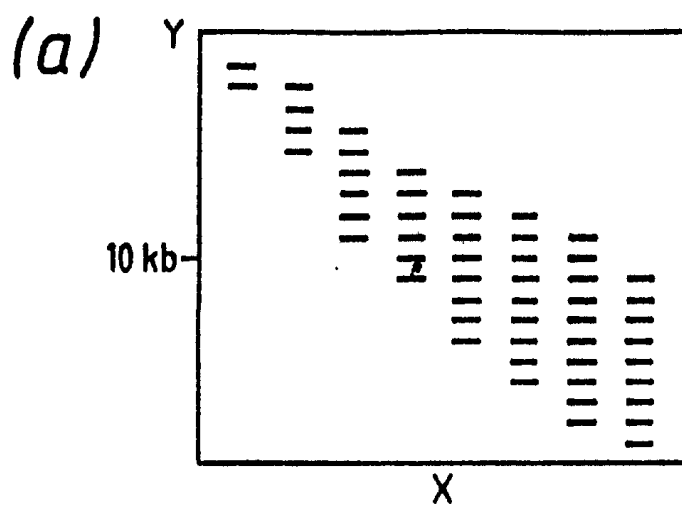
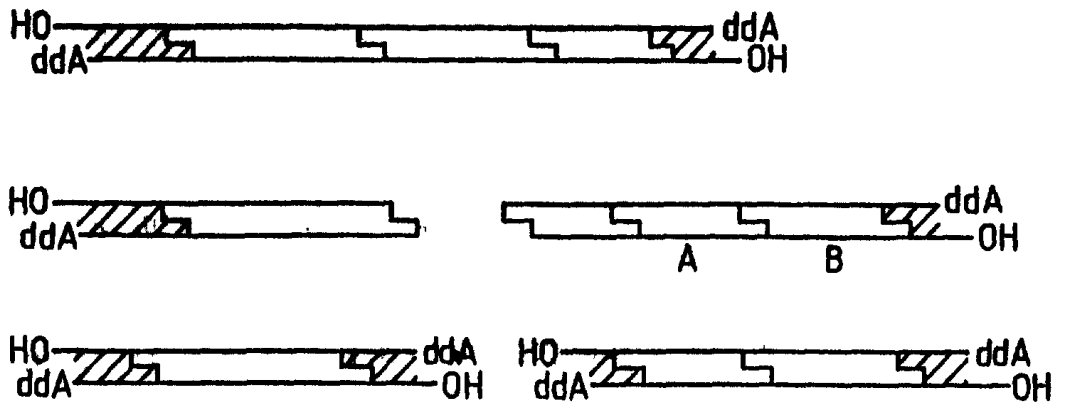


图 2

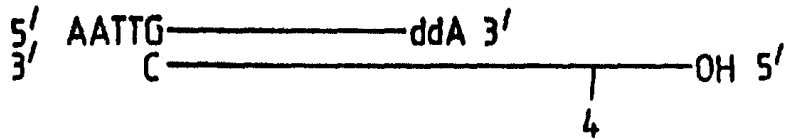


(a)

图 4



(b)



(c)

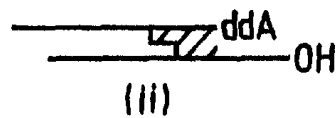
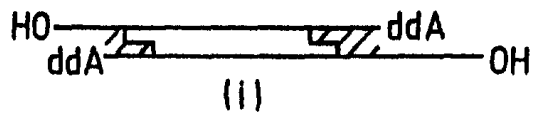
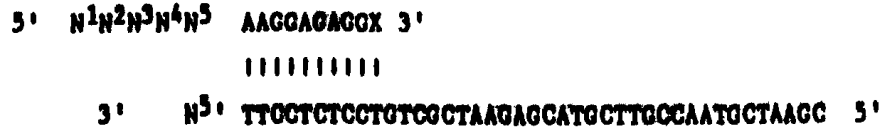


图 5

1)



11)

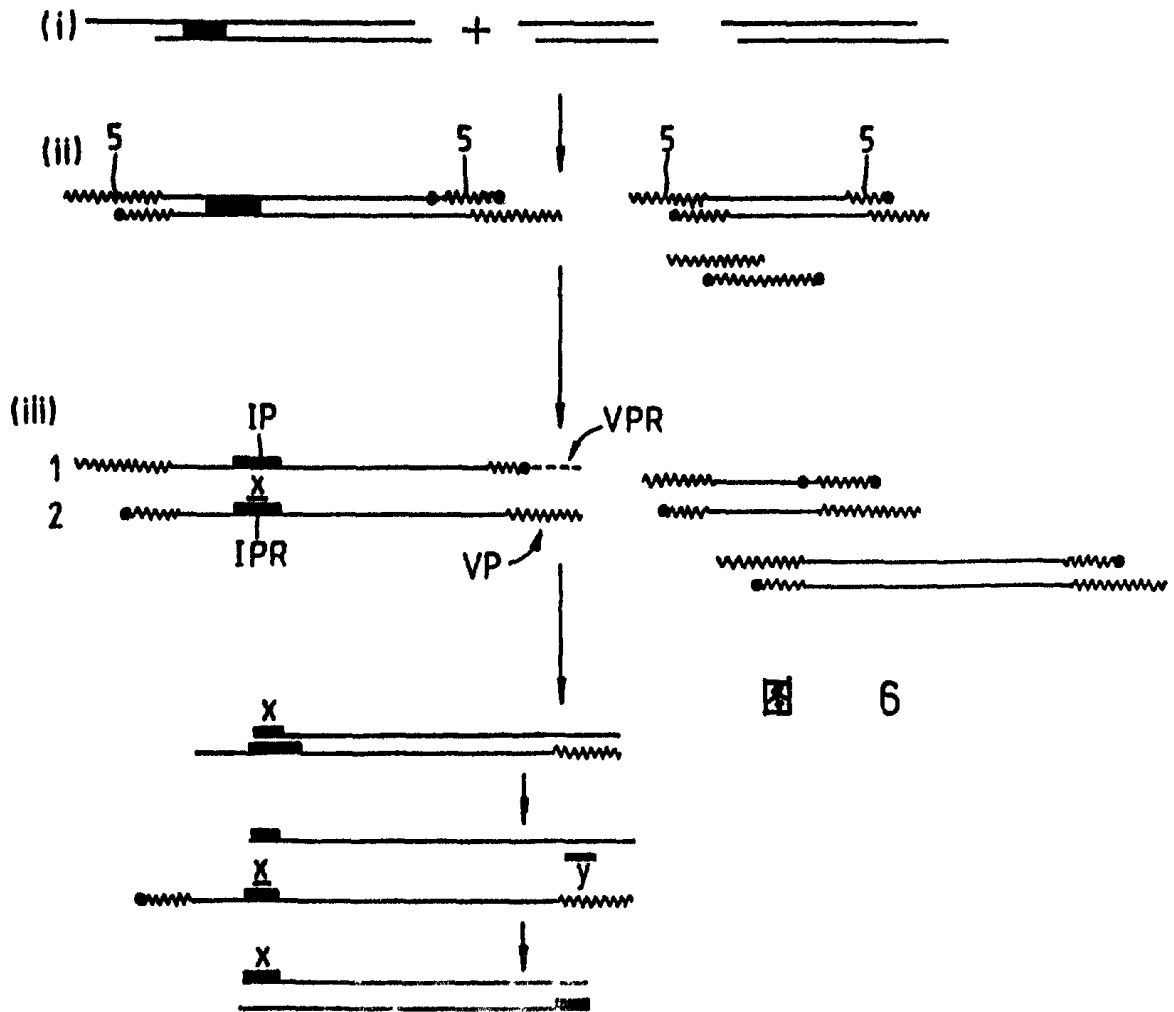
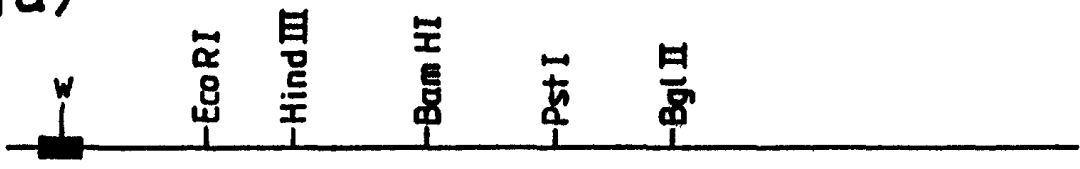
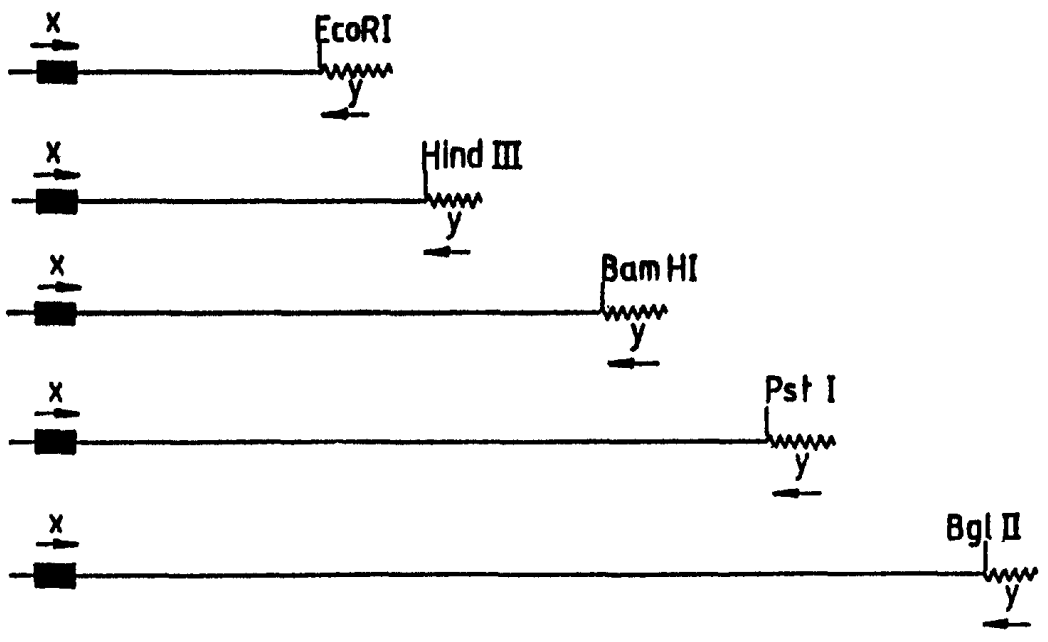


图 6

(a)



(b)



(c)

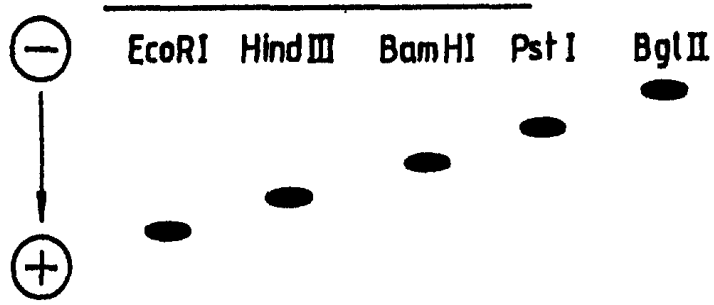


图 8

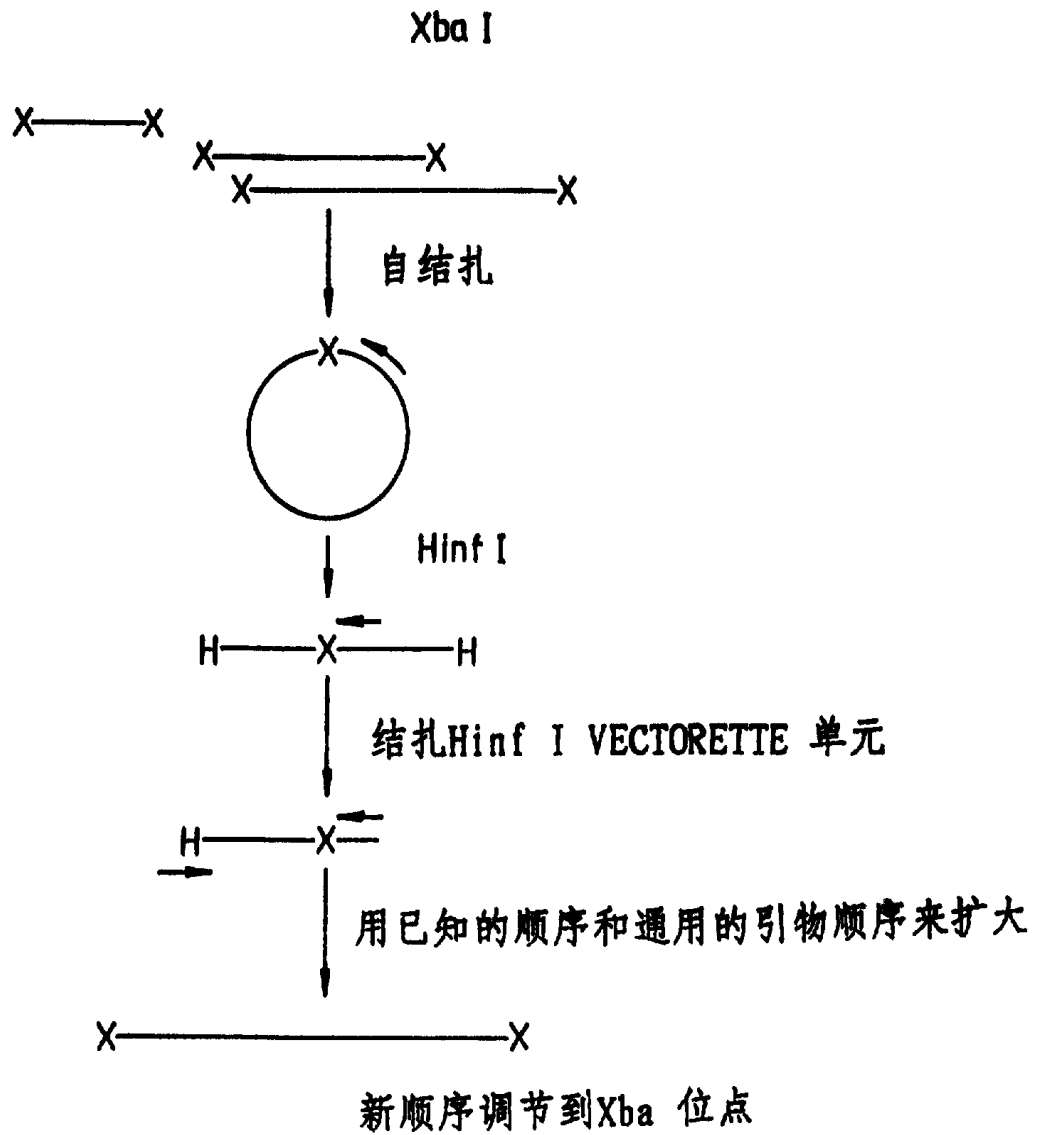
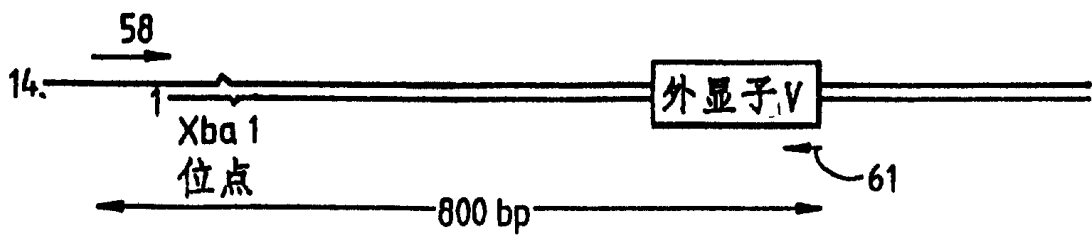


图 9



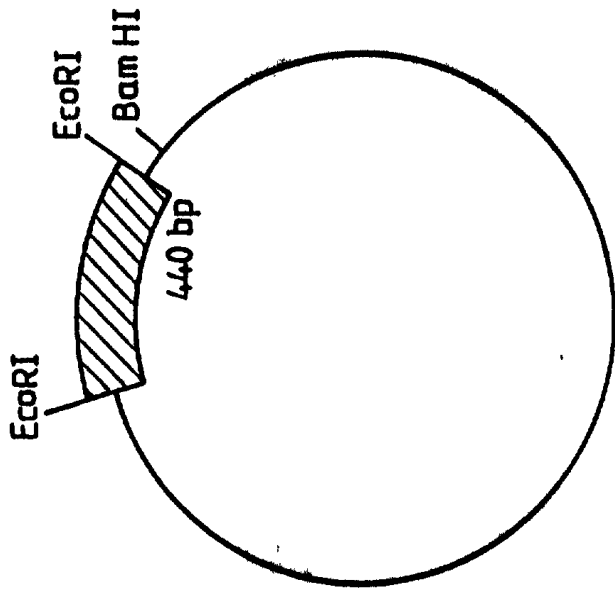
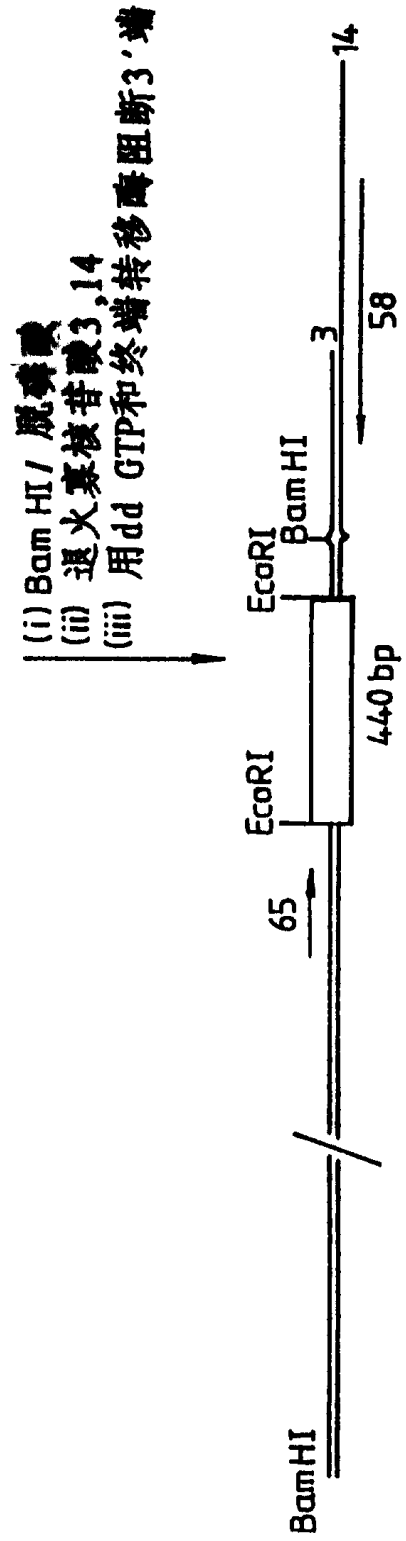
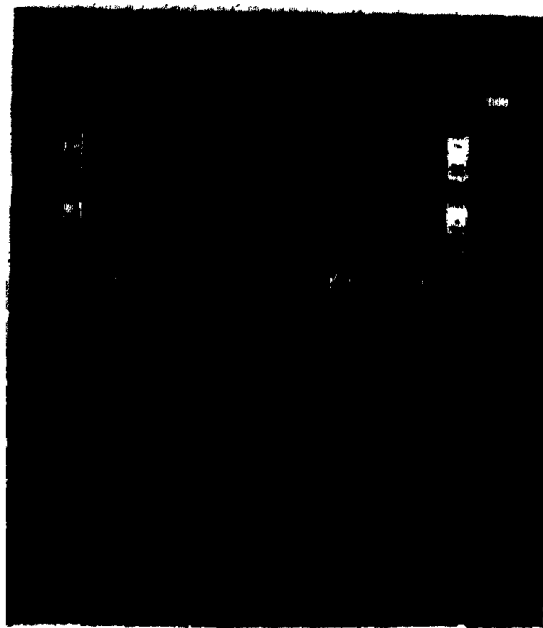


图 10

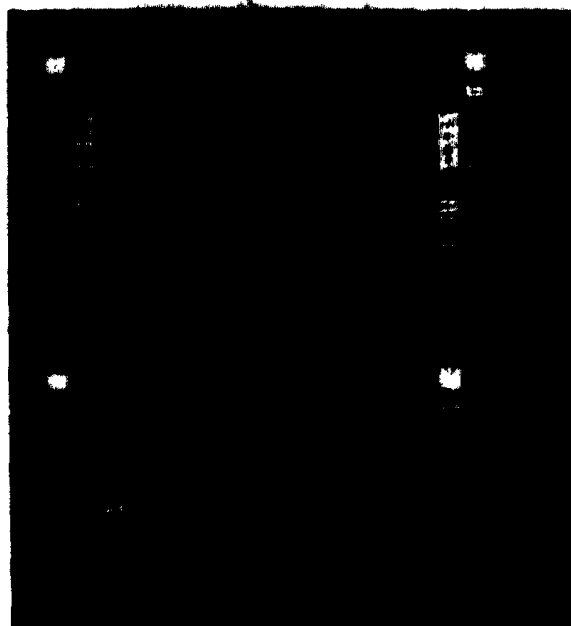


(i) 1 9 图 1 1



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

(ii) 1 2 3 10 12 13



(iii)

1 2 3 4 5 6 6 7 8 9 11
10

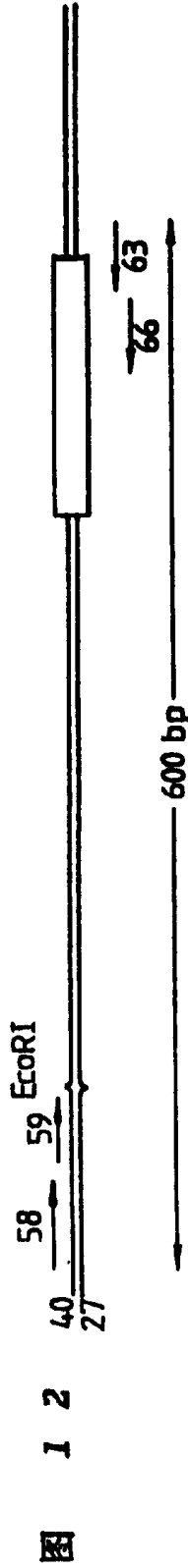
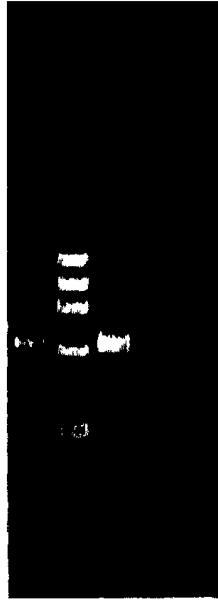


图 2 2

10 20 30 40 50
5' TGTAAATTCGG CCGAAATATAGA ACGGATTCCTG FTTTATATATG TCGAACCACA 100
60 GAACCAACCT AGTACTTCGC CATAAAAGG TCAATCGG TCGATGCGCT
110 TCAGAAAGC CCGATTCAGC CCTCAGTCTG TTATCAATG TTTCTGCGC
160 ATATCTTATA CAGGATGCGA TCTCAGCGCT AGGGAATTA TTCCACCCTC 200
210 ACTTGCCTT TGTCTTTCAC TTTATAAGTC AGGAATTCG GGCACAGACA 250
260 AGGGAATGCA CTTCGTCATG ATCACAGGGT CCGTTAGTAT CTAAAGCTTC 300
310 TTCTCTTGAC TCCAGTTCAG TCAATTATCA TCAGCAGAAC ATTCTTGGAA 350
360 TGTAAATGA GTCTTAATCA TGTACCCTGG AAACATCACA GGAGAATCTGC 400
410 AGATAAGTGC TCACATCGGT CCAGGCATAT ATATAGCTGG AGAGTCTAAC AC 3' 450

图 1 3



1 2

图 1 4

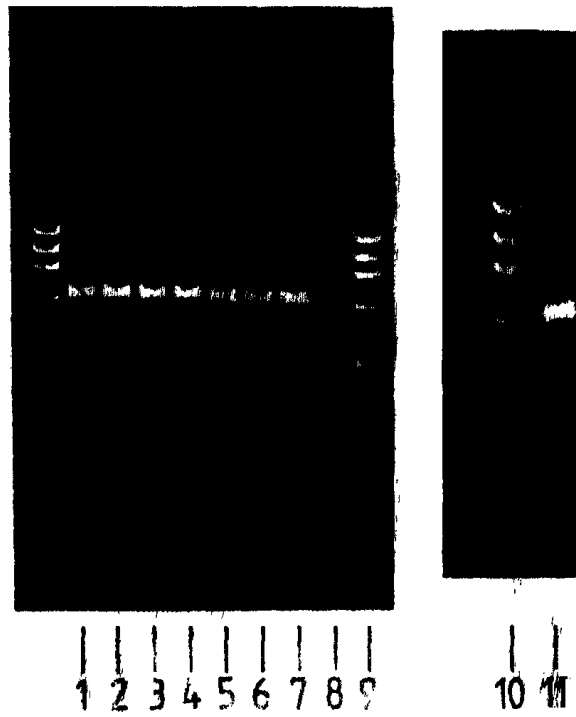
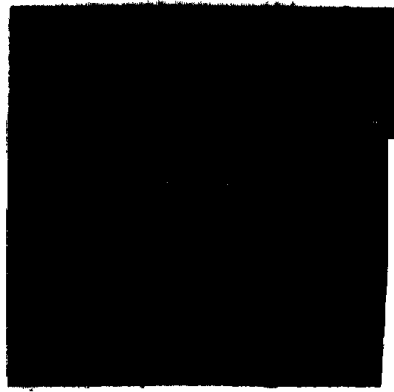


图 15



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 16



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

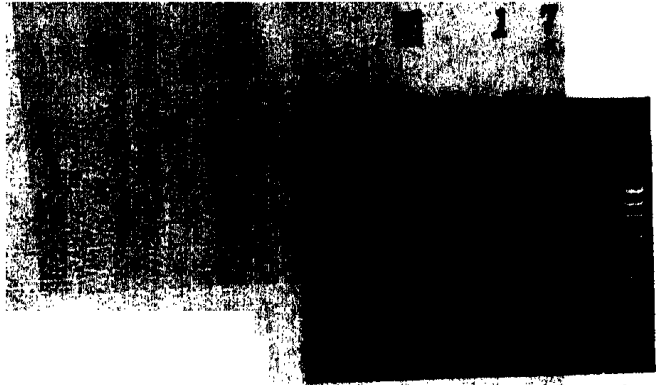


图 18

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

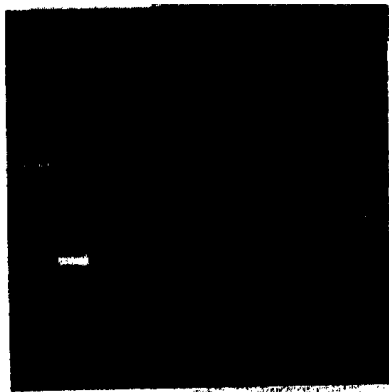
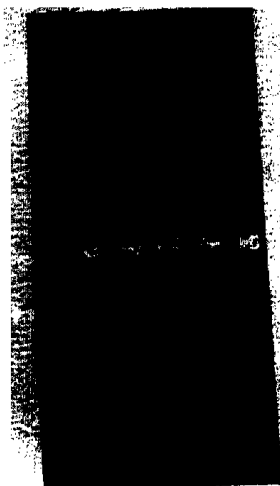


图 19

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1 2 3 4 5 6

图 20

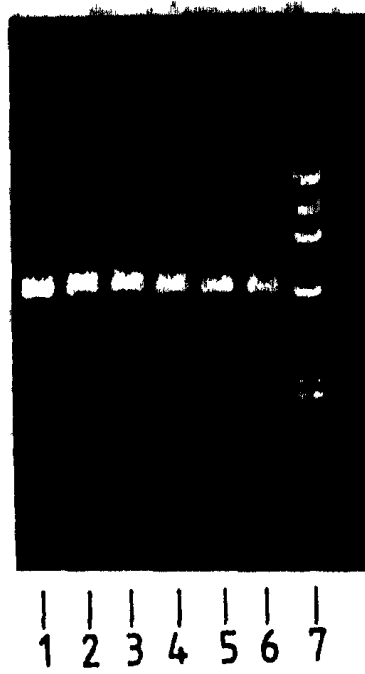
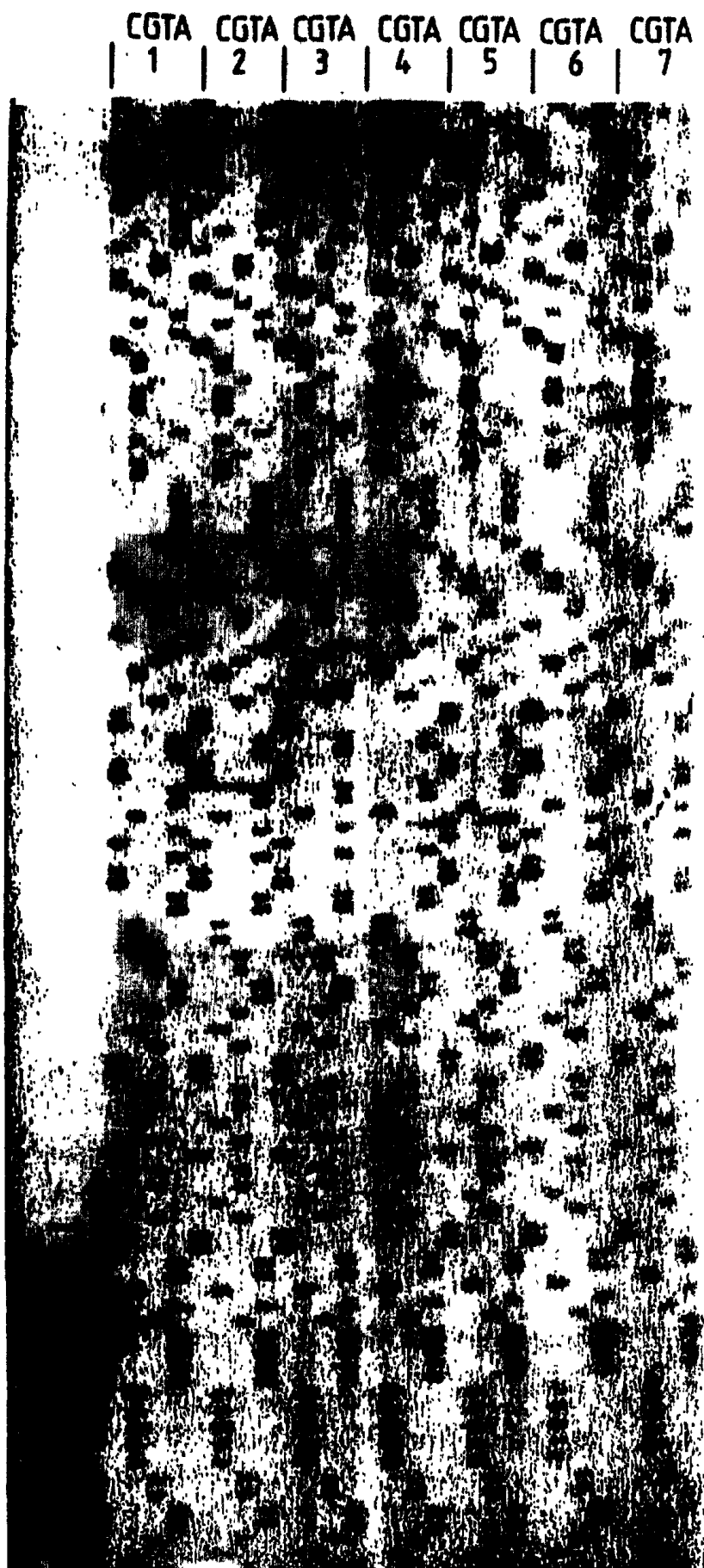


图 2 1



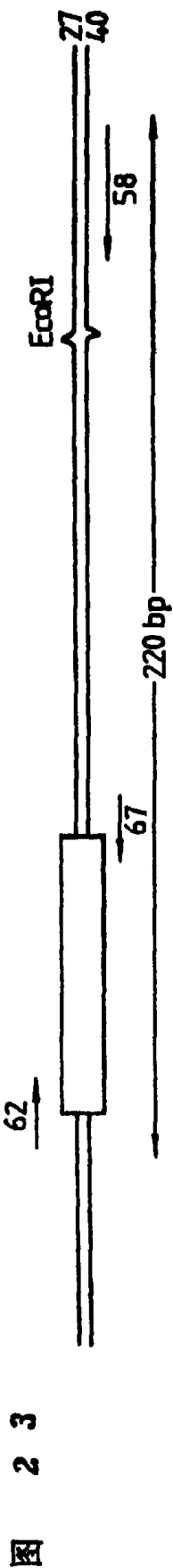


图 2 5

- a) CTC GAA AAC CCA GGC TTC GGC AGC AAA CTG TGT GAC TTT GCA CAG GTC AGC
CAC GGC AGC CTC AGC TGT CAG TTA GGG GAA TTT GGC CCT CCA CAG AAA CAG ATC
CGA AGA CTC CTC GTC CTT CTC GTT TAA TAA
- b) GGG TTT TCC AGC ACC GCA GTC GAC ATG CTC GCT GCG CCG GAG TGA GGG CTC
TGG CTT T
- c) ---AAA GCCAG AGACC TCACT²⁰ CCGGG GGAGC CAGCA TGTC⁴⁰ ACTGC

GGTCC TGGAA AACCC⁶⁰ AGGCT TGGCC AGGAA ACTCT⁸⁰ CTCAC TTTCG

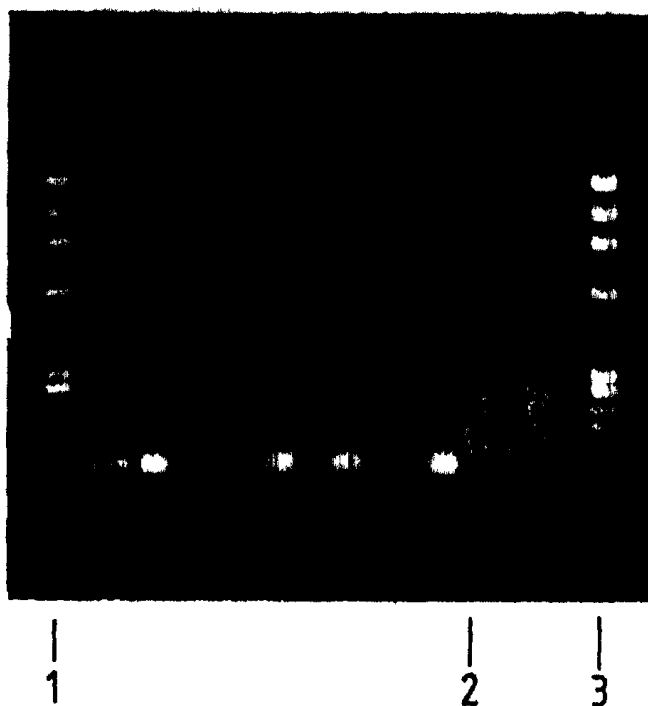
ACAGG TGAGC¹⁰⁰ CACGG CAGCC TGAGC TGTC¹²⁰ GTTAG GGGAA TTITG

GCCTC¹⁴⁰ CAGAG AAAGA GATCC GAAGA¹⁶⁰ CTGCT GGTCG TTCTG

GTTTA¹⁸⁰ ATAA ----- etc.

图 2 4

(a)



(b)

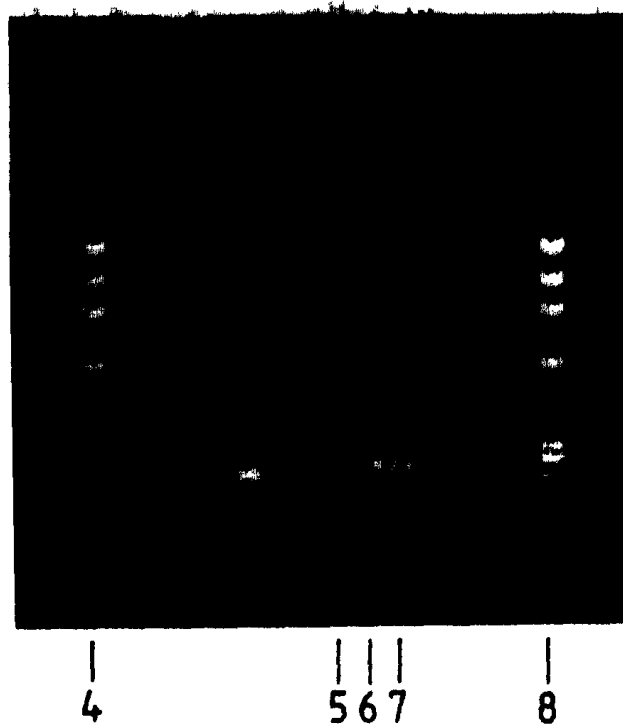
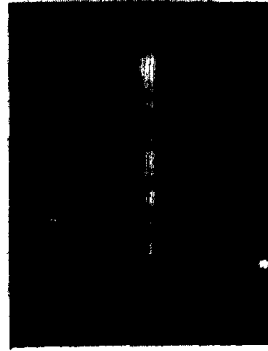


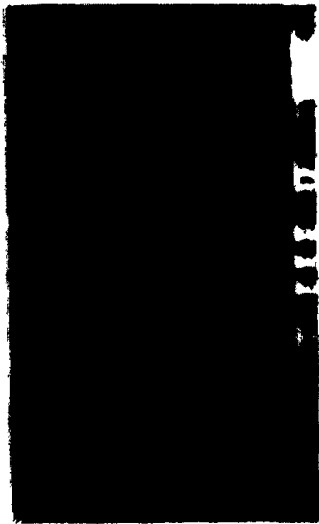
图 27

(a)



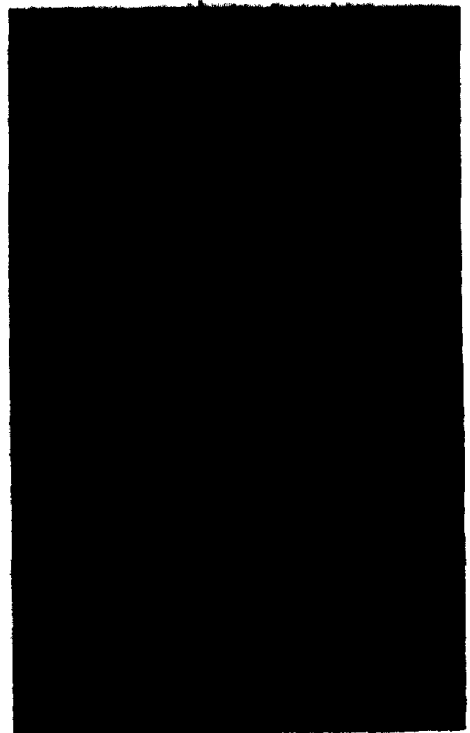
3
4

(b)



1 2 3 4

(c)



1 2 3

28

1 ATGCCTGCAG GTCGACTCTA GAGGATTCCC CTAGAGCATA TAAAATTATT
51 TTCAAGGGAA GATGTAAAAA TAGGTATGAA GAAGTTCTGG TACTTTTTTC
101 CCGACCCAGC AGATCACTGT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
151 TATCACTTGA GTGTTATGCA CTGCTCTTTA AAGATTCCCTG CTCTCAGGAG
201 CACCTAAGGG TAGAATAGGA ACTGGCACTT CCATGGCCAG GACATGCCTT
251 CTGGAAGTGC TTATGGAGAT GGACTGGAGT CTGGGTCTTG GAAAGTAGGC
301 ATGTTTGATG GGCCAGTTTT ACATTAAGTT CTGTAGTCTC ATTGCATCTG
351 GCACCCTCAA ATTTCTTATT AAATACTACA GCCTGGTTTT TAGCTTTGTT
401 CCATAGTAGG AAAAGTTTGA GCATAGGAAA AGTTCTGTGC CCAAAATTGC
71
451 ATCCAAGAAT TGGGTACCGA GCTC 72

33

1 AGATGCTGTA CACATAAAAG GACAAGCTGA ACTCCTGCAA CTCACTTAAC
51 GAGAACTATT ^{HinfI}AGAATCGGCA ^{HinfI}CATTTGAACA GACAAGTCCG TGAATCCAAG
101 ATGAAGCCTT TTATTTTAA GAAAAAATG GCCTTTACAT CACCGACAAA
151 TTAGGTTTCAG ATGAAAAAGG CTGTTTC

图 2 9

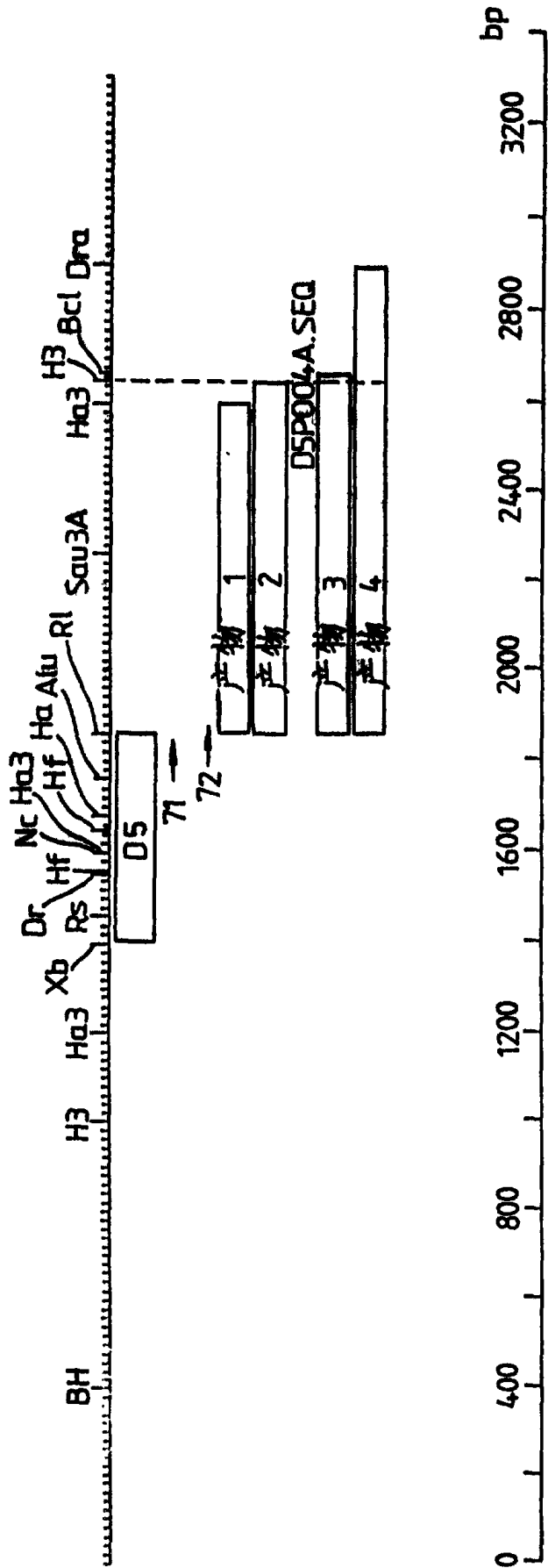


图 3 0



||| | ||| | |
9 8 7 6 5 4 3 2 1

图 3 2



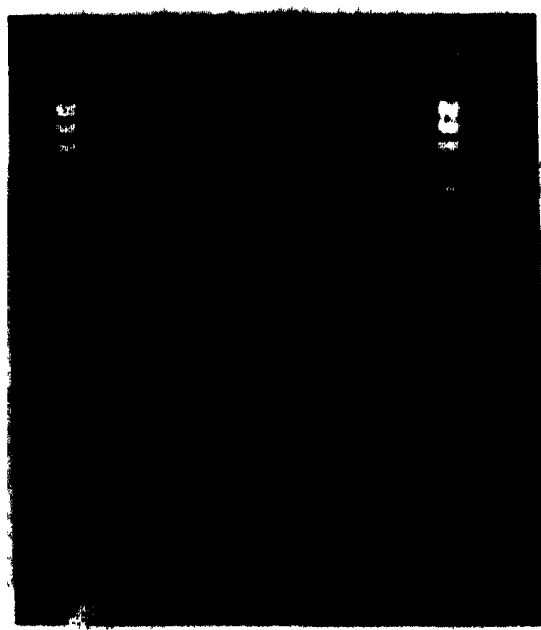
|||
1 2 3

图 34



| | | | |
1 2 3 4 5

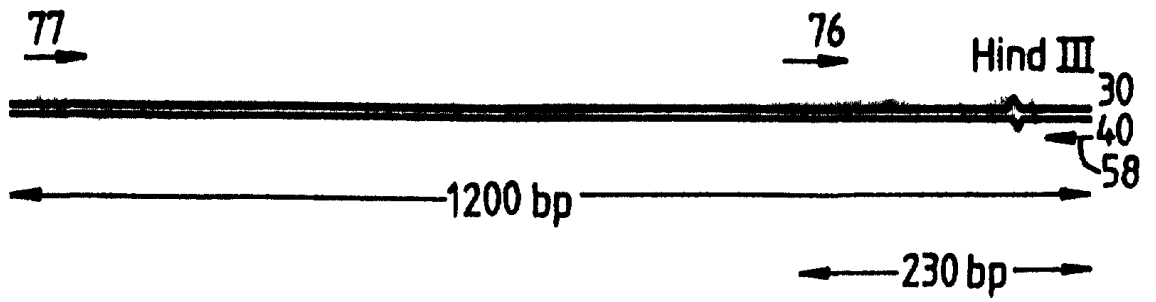
图 35



| | | | |
1 2 3 4 5

图 36

(a)



(b)



1 2 3 4

图 37

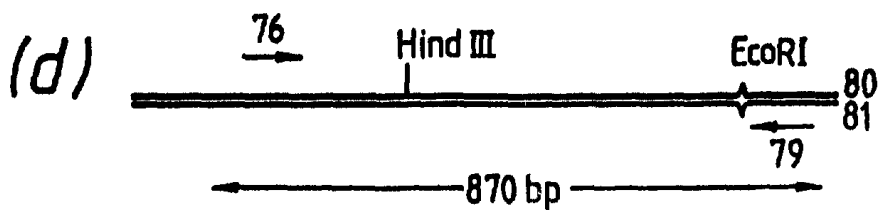
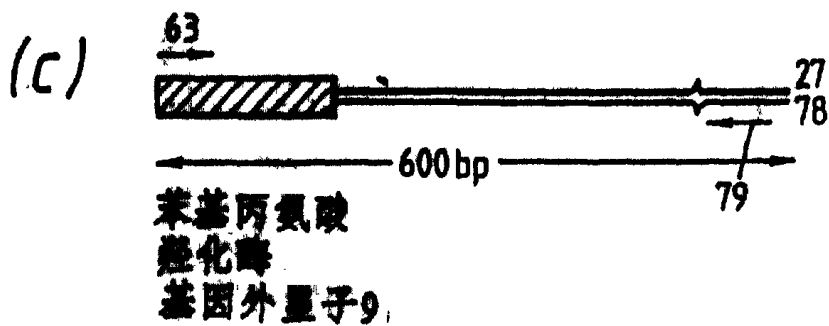
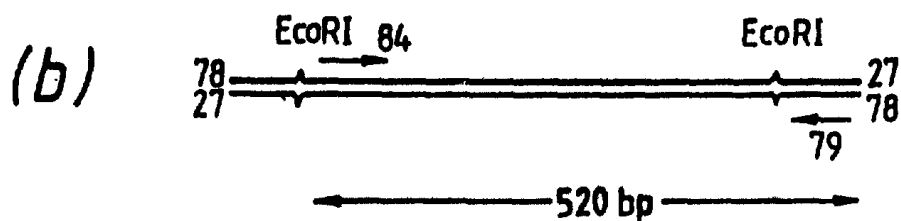
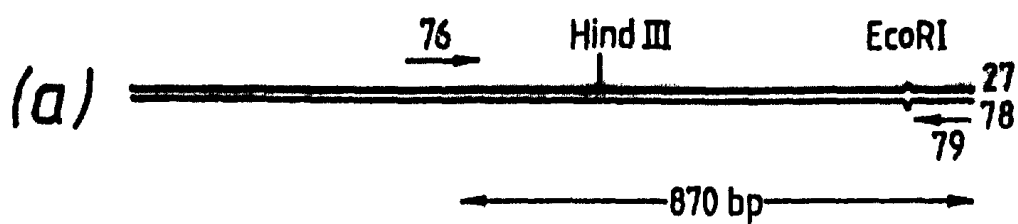


图 37

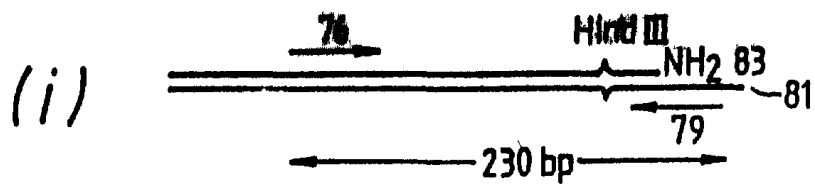
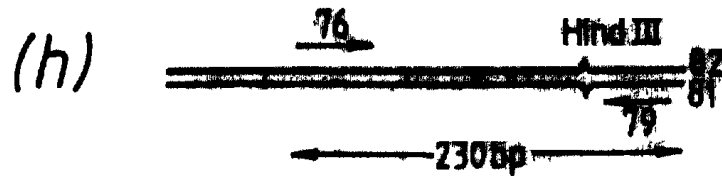
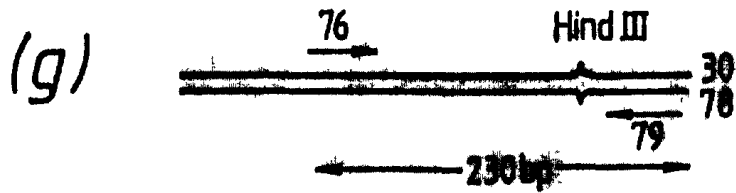
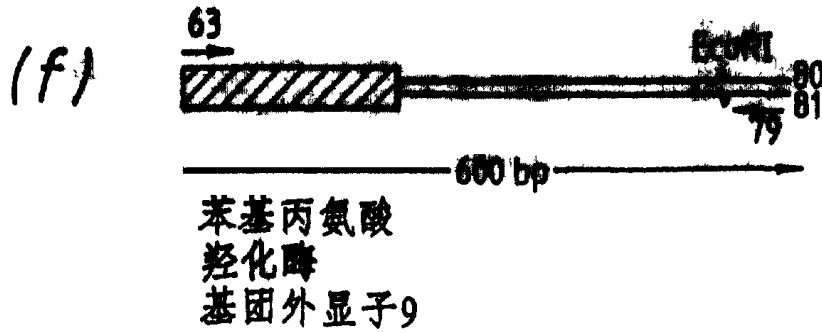
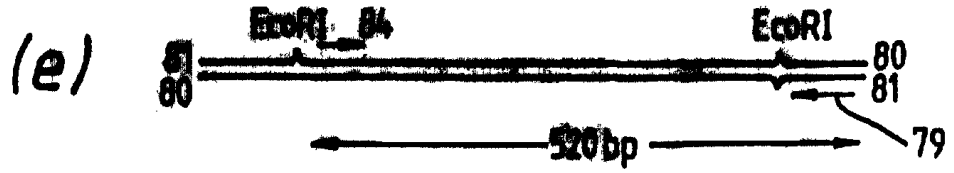


图 38

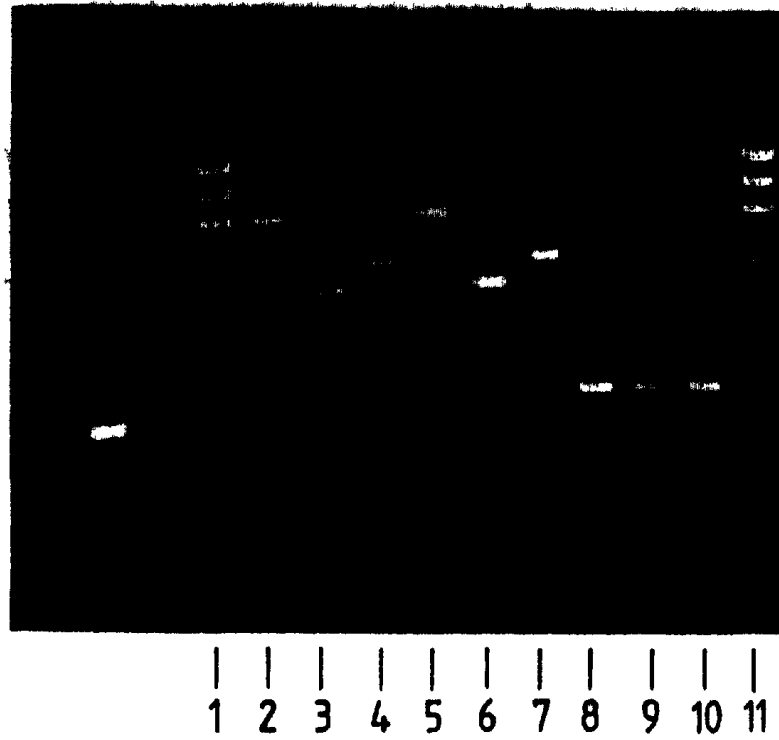


图 40

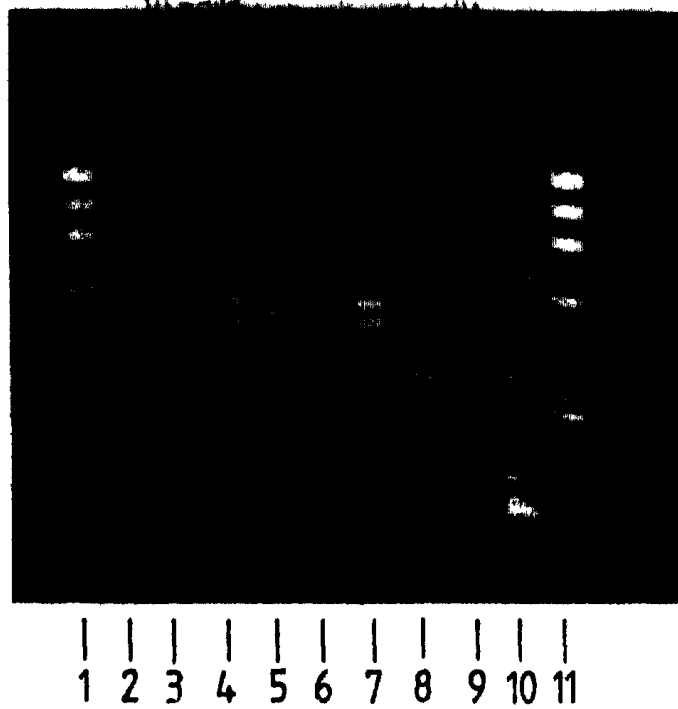
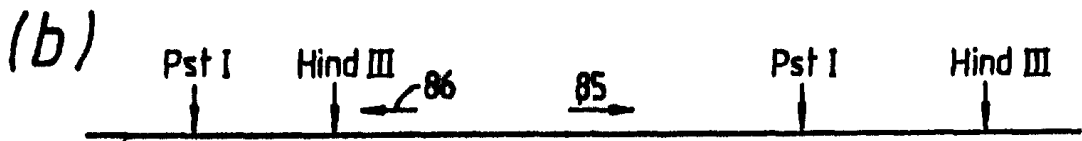
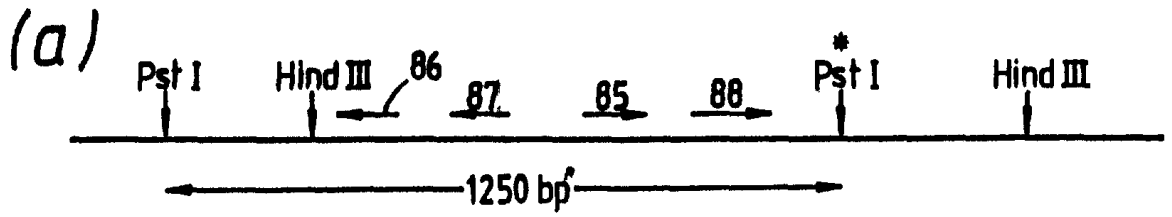


图 39



(i) Pst I 消化
(ii) 结扎

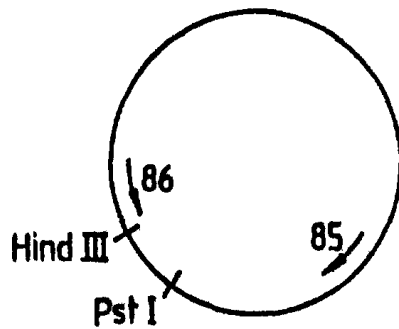
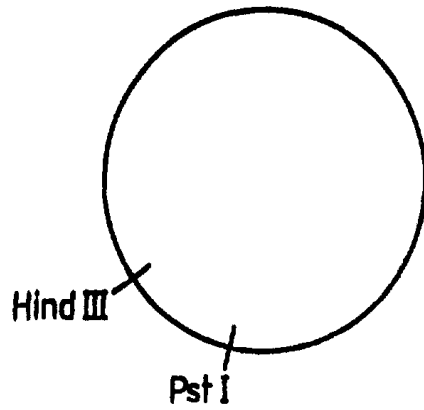


图 39

(c)



(i) Hind III 消化
(ii) 结扎Hind III VECTORETTE 单元



OR

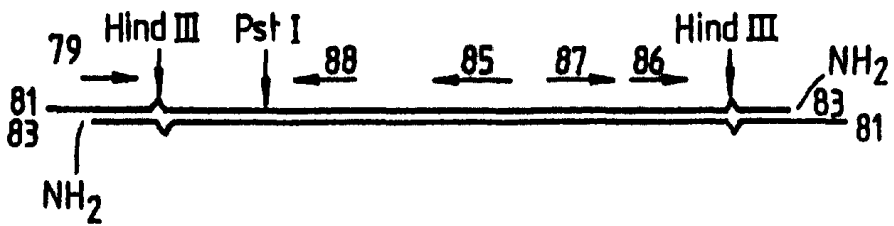


图 41

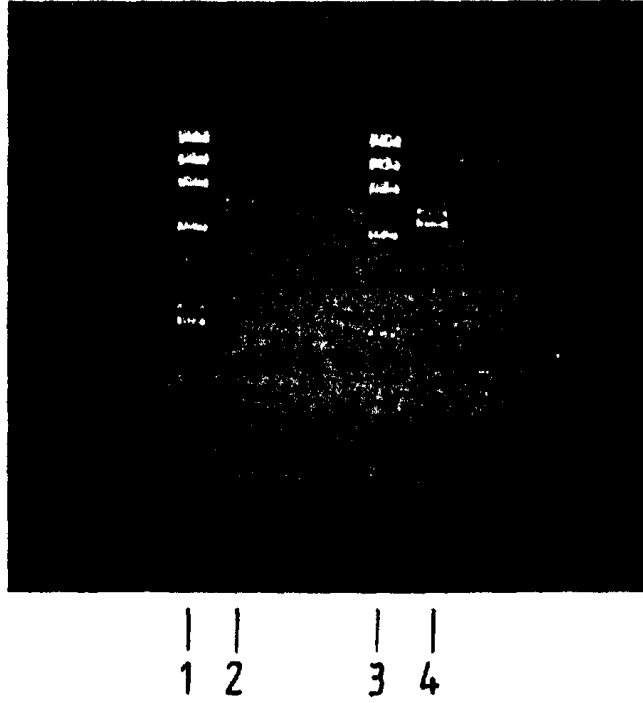


图 42

