第七章 DAN序列分析

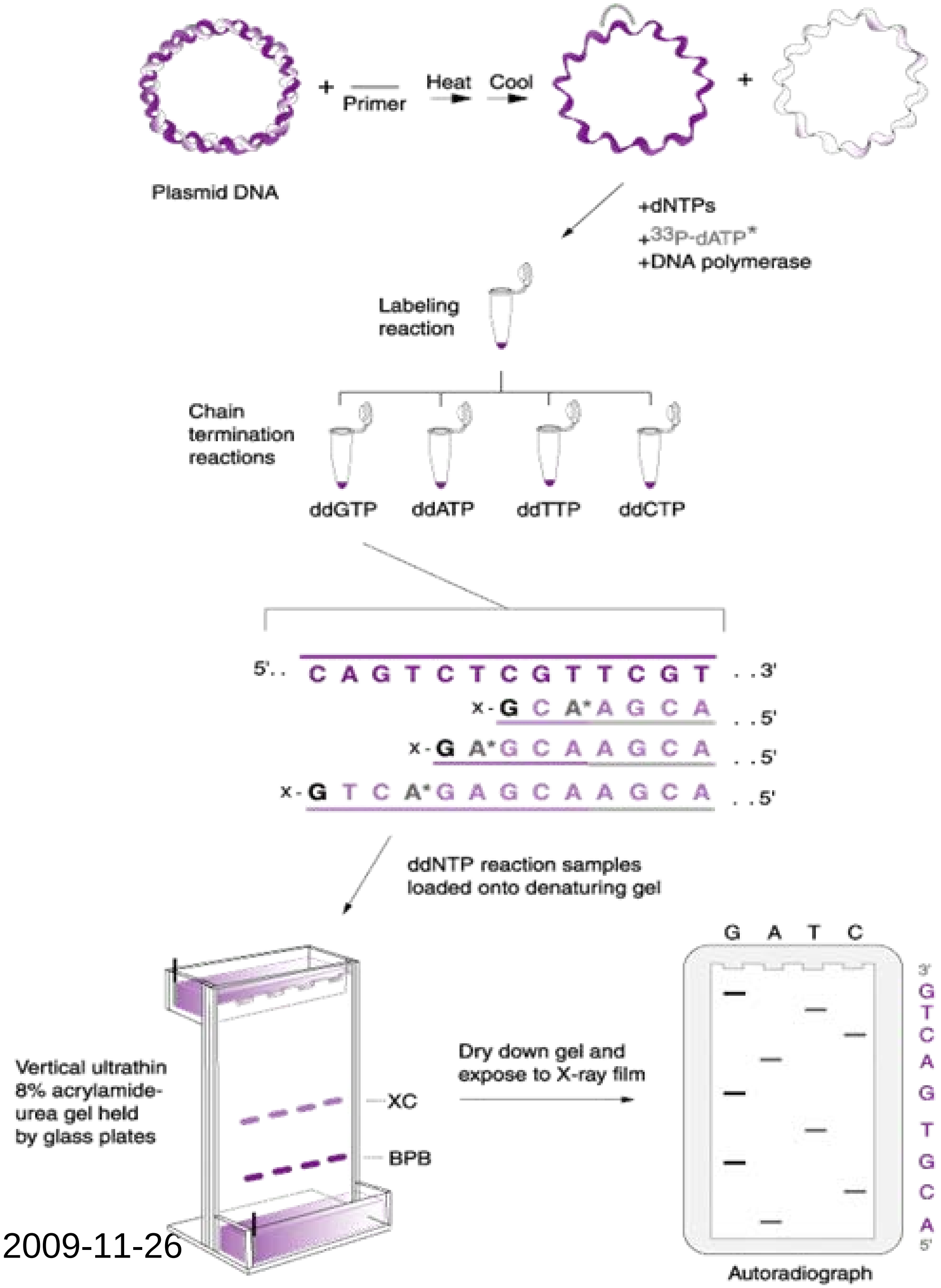
- **Sanger等(1977)提出的酶法及Maxam和Gilbert (1977)提出的化学降解法。其原理大相径庭，但这两种方法都是同样生成互相独立的若干组带放射性标记的寡核苷酸，每组寡核苷酸都有固定的起点，但却随机终止于特定的一种或者多种残基上。由于DNA上的每一个碱基出现在可变终止端的机会均等，因些上述每一组产物都是一些寡核苷酸混合物，这些寡核苷酸的长度由某一种特定碱基在原DNA全片段上的位置所决定。然后在可以区分长度仅差一个核苷酸的不同DNA分子的条件下，对各组寡核苷酸进行电泳分析，只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶中若干个相邻的泳道这上，即可从凝胶的放射自影片上直接读出DNA上的核苷酸顺序。**

一、Sanger双脱氧链终止法原理

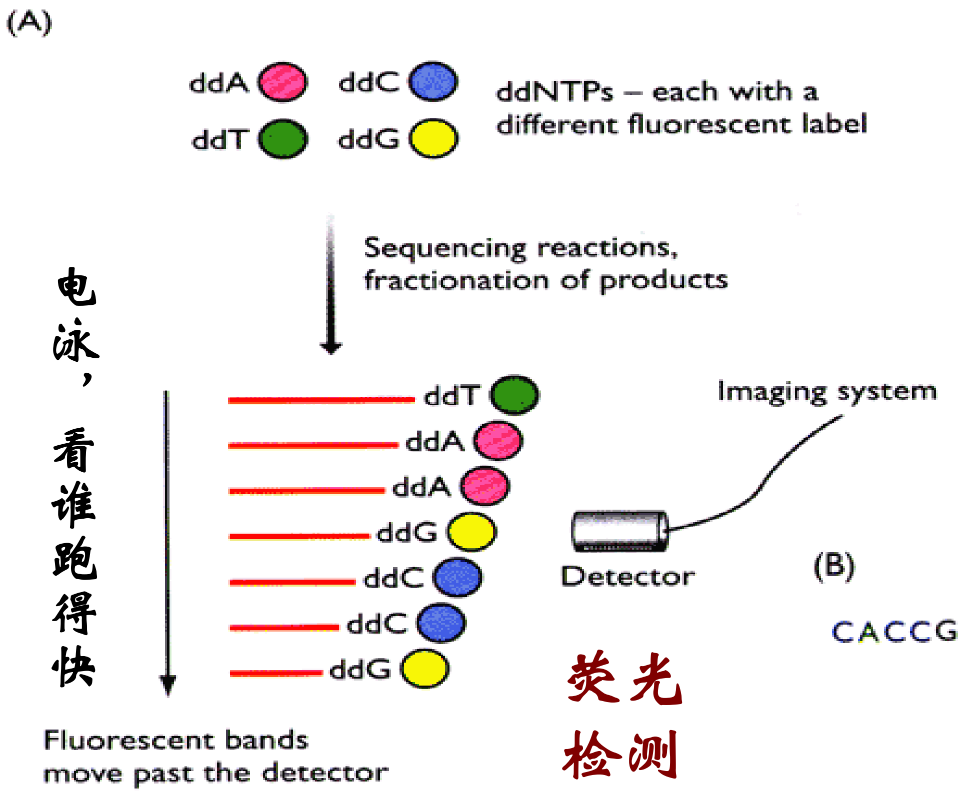
- 现行的链终止法由加减法序列测定技术发展而来的。加减法首次引入了使用特异引物在DNA聚合酶作用下进行延伸反应、碱基特异性的链终止，以及采用聚丙烯酰胺凝胶区分长度差一个核苷酸的单链DAN等3种方法。尽管有了这些进展，但加减法仍然太不精确，也太不得法，因此难以广为接受。直至引入双氧核苷三磷酸(ddNTP)作为链终止剂，酶法DNA序列测定技术才得到广泛应用。

- 2‘,3'ddNTP与普通dNTP不同之处在同它们在脱氧核糖的3' 位置缺少一个羟基。它们可以在DNA聚合酶作用下通过其5' 三磷酸基团掺入到正在增长的DNA链中，但由于没有3'羟基，它们不能同后续的dNTP形成磷酸二酯链，因此，正在增长的DNA链不可能继续延伸。这样，在DNA合成反应混合物的4种普通dNTP中加入少量的一种ddNTP后， 链延伸将与偶然发生但却十分特异的链终止展开竞争，反应产物是一系列的核苷酸链，其长度取决于从用以起始DNA合成的引物末端到出现过早链终止的位置之间的距离。

—谁终止，碱基就是谁!

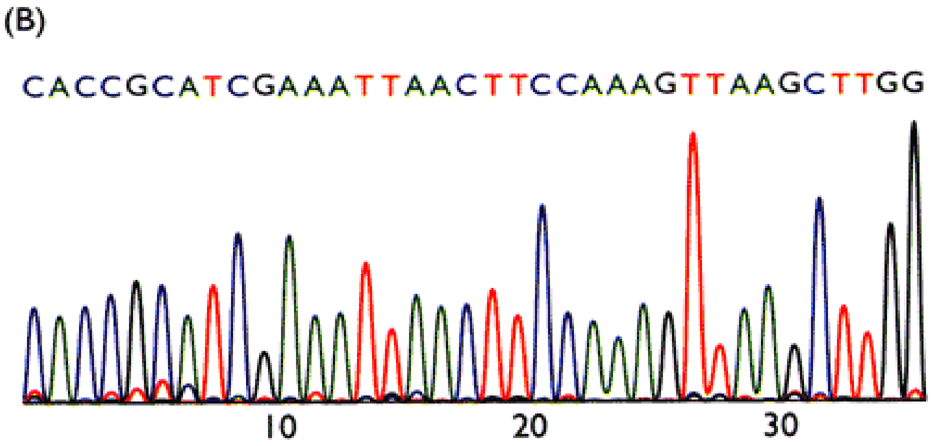


在4组独立的酶反应中分别采用4种不同的ddNTP，结果将产生4组寡核苷酸，它们将分别终止于模板链的每一个A、每一个G或每一个T的位置上。



电泳，看谁跑得快

荧光检测探头



跑得快的先监测到

跑得慢的后检测到

跑得快慢表示长短不同

同一个起点开始复制，短的表示在前头，长的表示在后头

根据荧光定序列。

引物

- 酶促测序反应中利用一个与模板链特定序列互补的合成寡核苷酸作为DNA合成的引物。可以采用能与位于靶DNA两侧的载体序列相退火的通用引物，而不必取得与未知DNA序列互补的引物。

模板

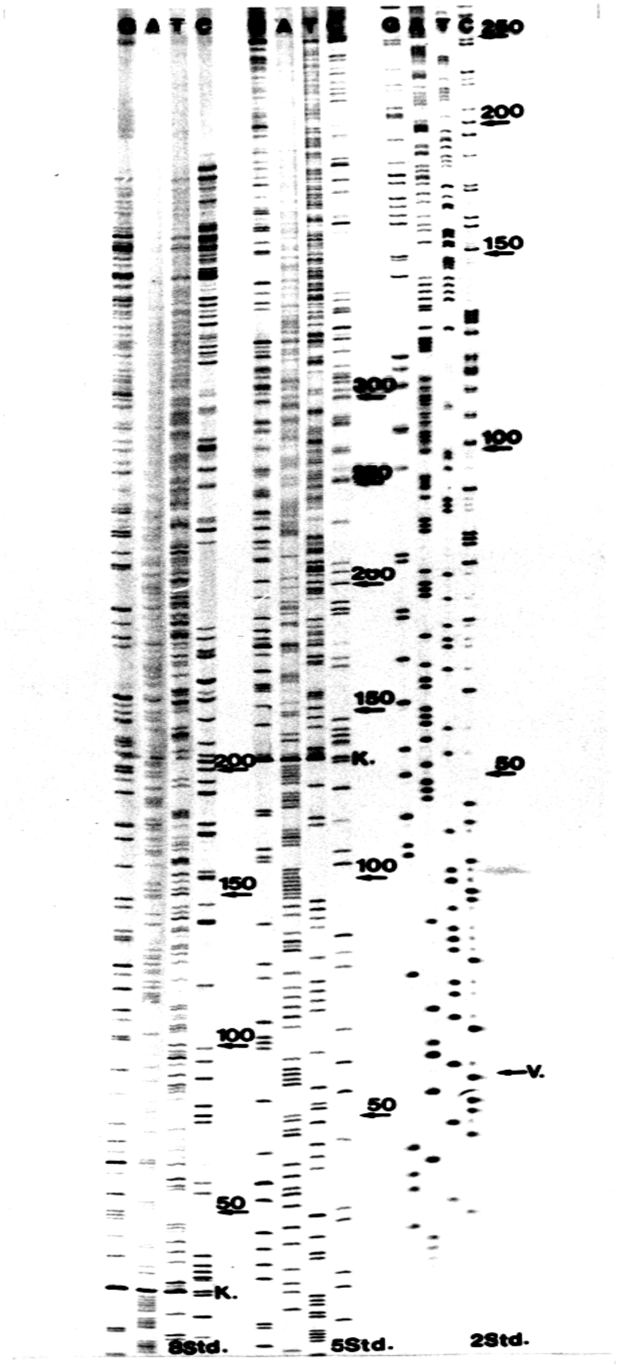
- 两类DNA可以用作Sanger 法测序的模板：纯单链DNA和经过热变性或碱变性的双链DNA。
- 通常利用M13噬菌体分离得到的单链DNA
- 加热或碱变性双链DNA作为模板。

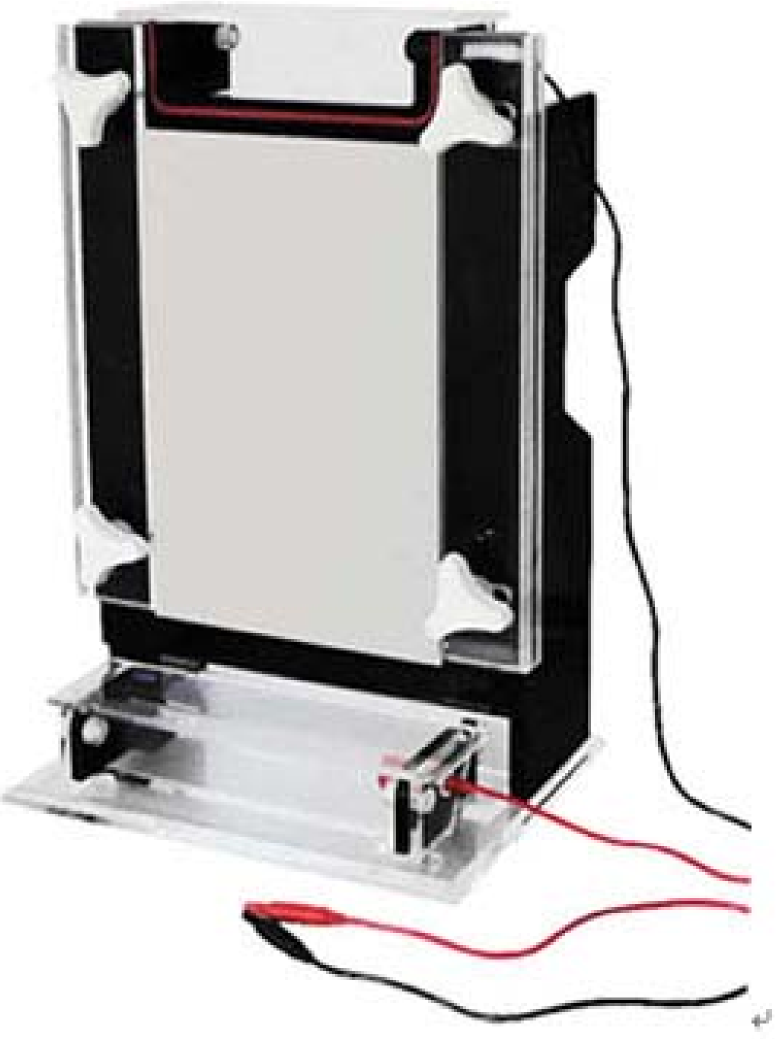
DNA聚合酶

- 大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段
- 反转录酶
- 经过修饰的、去除了3‘→5’外节酶活性的T7噬菌体DNA聚合酶
- 测序酶2.0 (Sequenase)
- 耐热DNA聚合物(Taq DNA聚合酶)

标记的dNTP

- [α-^{35}S]dATP产生β射线，
- [α-^{32}P]dNTP
- 荧光染料
- 其它


G A T C
G A T C
G A T C
250
200
150
100
50
K.
V.
8Std.
5Std.
2Std.



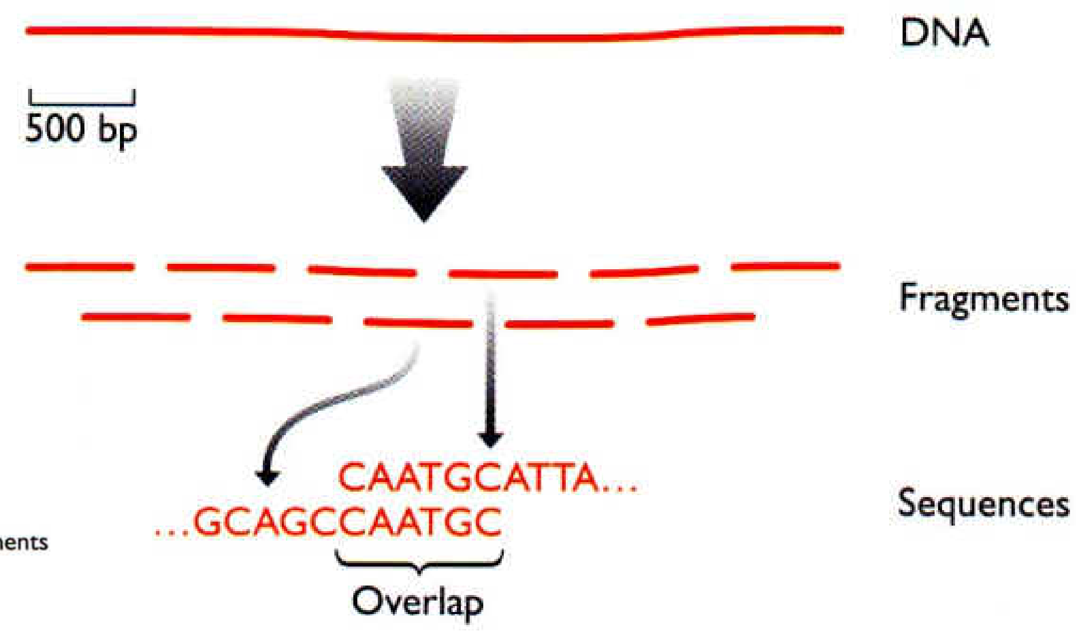
确证性测序

- 确证性测序：确定突变位点、确定克隆的正确性
- 从头测序：鸟枪法、定向法

美国应用生物系统公司 3130xl 基因分析仪

测序策略

1. 鸟枪法
2. 定向测序
3. 引物合成



'e 2.1 The shotgun approach to sequence assembly.

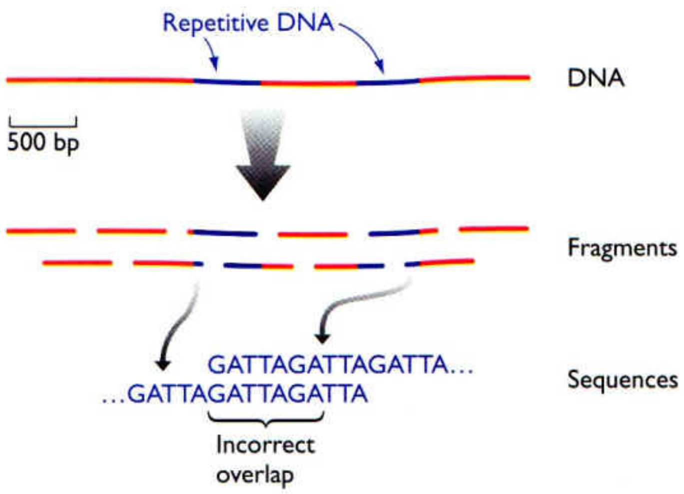
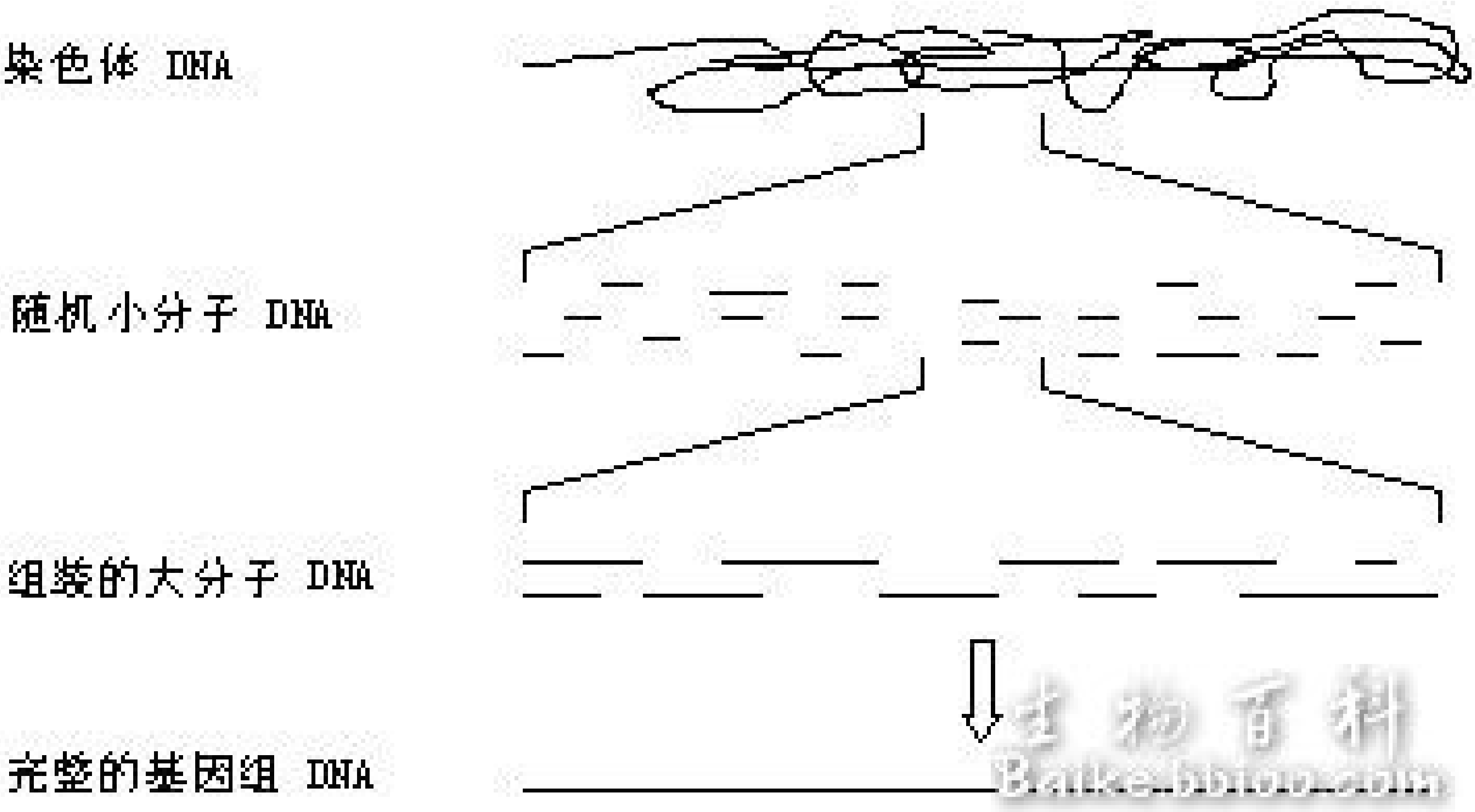
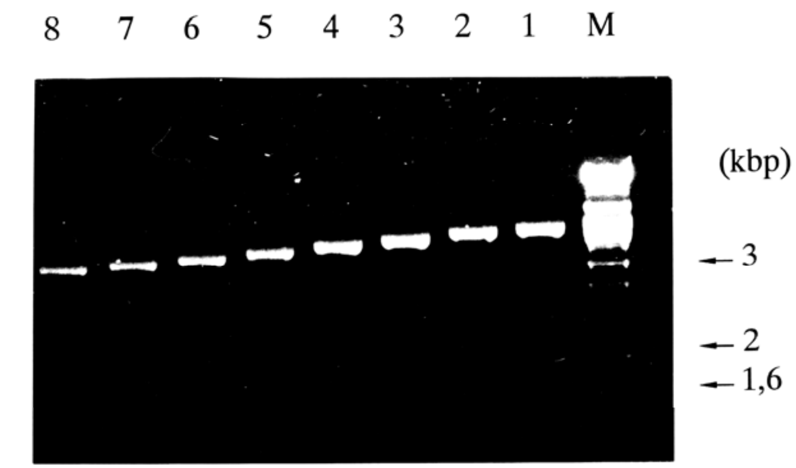
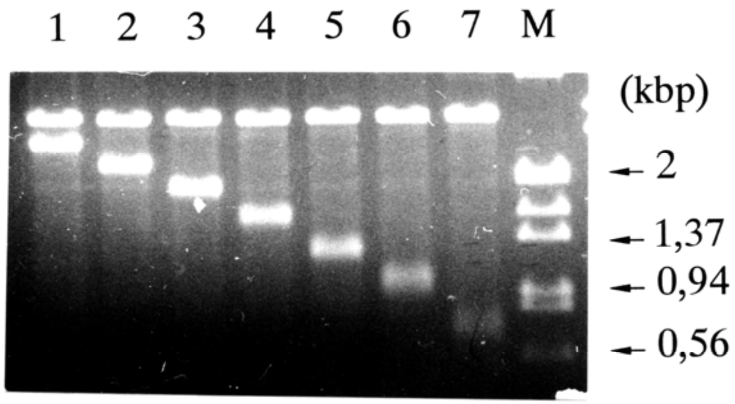


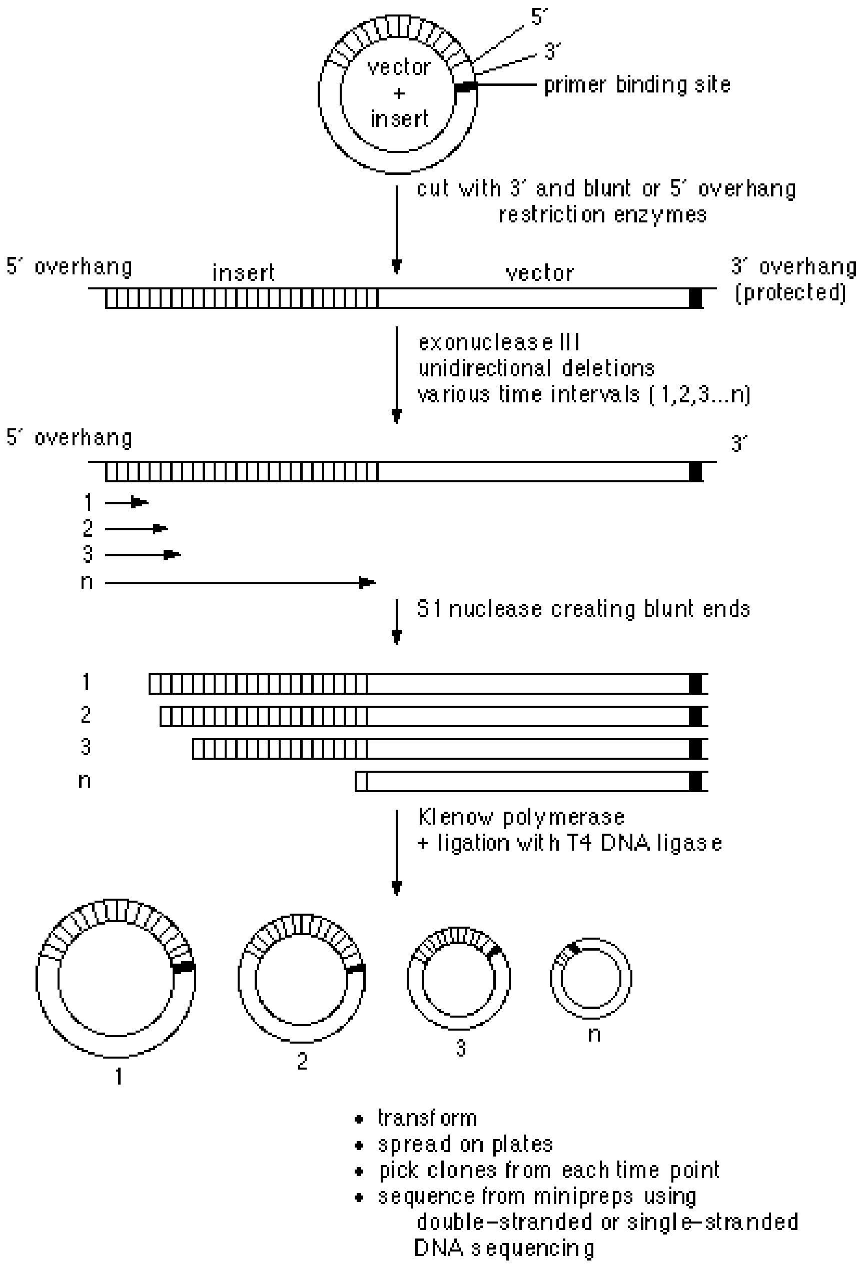
Figure 2.2 Problems with the shotgun approach.

鸟枪法测序



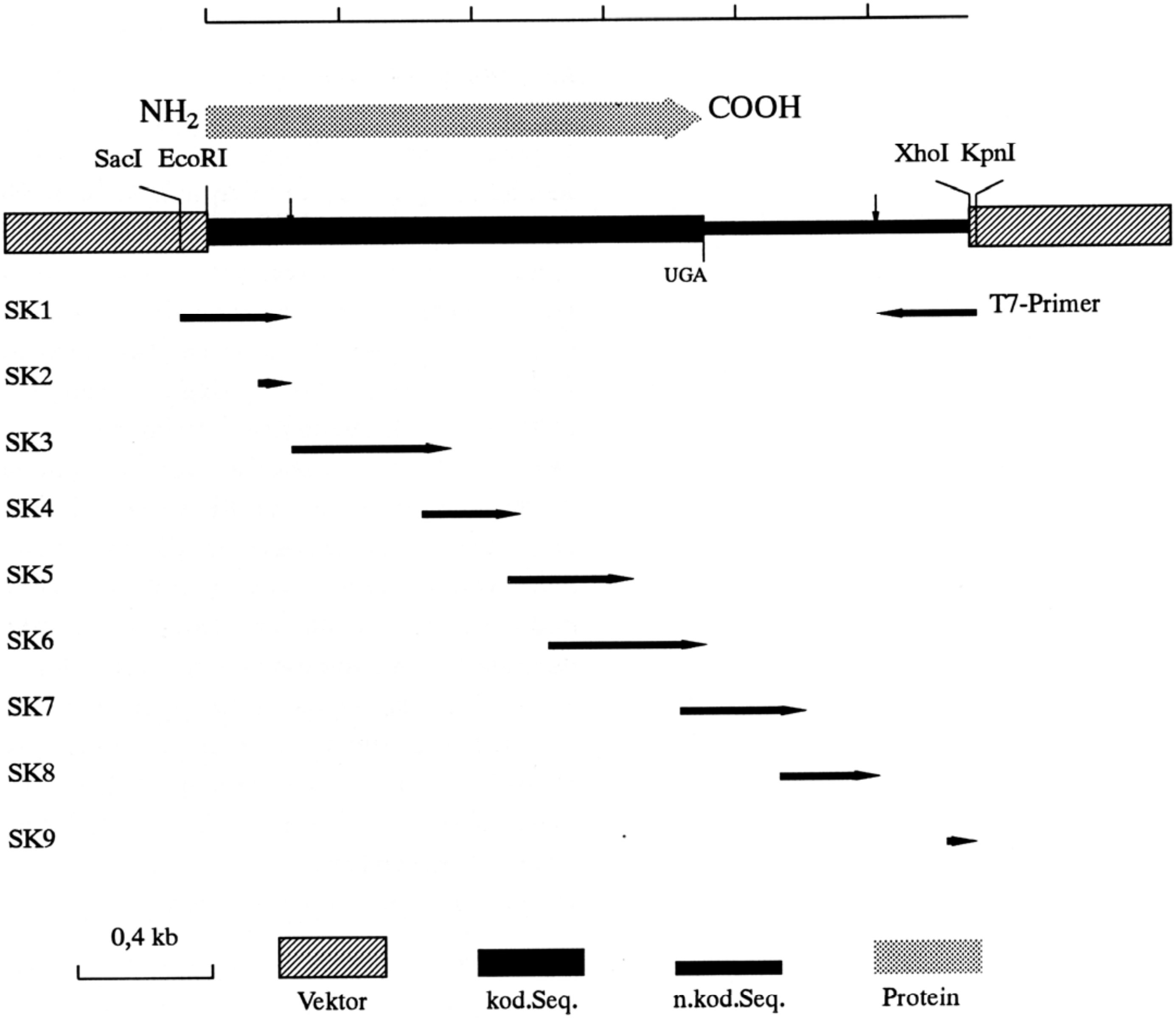






Exonuclease III和S1 nuclease 消化构建亚克隆的方法

2009-11-26


NH2
COOH
SacI EcoRI
XhoI KpnI
UGA
SK1
T7-Primer
SK2
SK3
SK4
SK5
SK6
SK7
SK8
SK9
0,4 kb
Vektor
kod.Seq.
n.kod.Seq.
Protein