

学术动态

人体抗血友病因子 IX 基因的分子克隆

1982 年 10 月中旬,英国牛津大学病理系教授 Brownlee 来中国科学院生物物理研究所作了一个学术报告,题目是“人体抗血友病因子 IX 基因的分子克隆”。因子 IX 是血液凝固中的凝血因子之一,如果人体内因子 IX 功能有缺陷,就会导致人流血失常,患一种叫血友病 B 的病症。为了了解血友病 B 的分子基础, Brownlee 等人对人体因子 IX 进行了克隆实验。

实验是从提取牛因子 IX 开始,首先用盐酸胍(guanidine hydrochloride)方法从牛肝中提取总 mRNA,然后用寡聚(dT)-纤维素柱层析法从总 mRNA 中富集带有多聚(A)的 mRNA,从而使因子 IX 的 mRNA 也得到了富集。接着对含多聚(A)的 mRNA 进行二次连续蔗糖梯度离心,并用免疫沉淀法在兔网织红细胞体系中对牛因子 IX mRNA 进行检测,发现在沉降系数为 20—22S 处富含牛因子 IX mRNA(富集程度达 10 倍)。

Brownlee 等人将 20—22S 的 mRNA 逆转录成 cDNA,所用“引物”是根据已知牛因子 IX 为 5 个氨基酸序列推出其可能的 DNA 序列,采用固相磷酸三酯法合成的。这样利用逆转录酶可以专一性地将牛因子 IX mRNA 逆转录成 cDNA,利用 DNA 重组技术将得到的双链 cDNA 连入 pBR322 质粒中进行克隆,得到 7,000 个克隆的菌落,再应用根据相应牛因子 IX 另外 6 个氨基酸序列而合成的 DNA 片段作为探针,从上述菌落中筛选出了一个带有正杂交信号的菌落,

从而得到了牛因子 IX cDNA 克隆。Brownlee 等利用此克隆的 cDNA 作为探针从人基因库 [(Hae III/Alu I λ (haron4a))]中找到了人体抗血友病因子 IX 的基因,并且测定了部分 DNA 序列,发现人与牛因子 IX 基因中的相应部分,96 个核苷酸中有 85% 的同源性。因此 Brownlee 认为利用牛因子 IX cDNA 序列对人体因子 IX 基因进行分子交叉杂交是可行的。令人特别感兴趣的是他们在做原位杂交筛选菌落时,采用 Whatman 541 普通滤纸,代替了价格昂贵的硝酸纤维素纸。

目前, Brownlee 等人不仅从人基因库中筛选出了人体因子 IX 的基因,而且还利用限制性内切酶获得了人体因子 IX 基因的部分片段(约 1000 个碱基对)。他们应用这个正常的人抗血友病因子 IX 的基因片段作为探针,对血友病 B 病人的总 DNA 进行了分子杂交检查,发现有如下三种情况:1) 有的血友病 B 病人的 DNA 中根本就无因子 IX 基因存在。2) 有的血友病 B 病人 DNA 与探针杂交给出异常图谱。3) 有的给出与正常人完全一样的图谱。

Brownlee 最后讲,他希望他们能应用 DNA 重组技术将已筛选到的人体因子 IX 的基因转化到细菌中进行表达,发酵生产人体因子 IX,并用于临床病人,还希望能将人体因子 IX 基因片段作为探针用于胎儿早期诊断。

[中国科学院生物物理研究所 程振起]

科技消息

两种荧光定量检测 DNA 的方法

DNA 经葡聚糖凝胶电泳分离后,用两种荧光物质作定量分析:EB(吡啶溴红)和 DAPI(4,6 diamidino-phenylindoles)进行比较。实验结果说明 DAPI 比 EB 敏感好几倍。DAPI 的最适浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mol}$ 。

[J. Biochem. and Biophys. method., 6(2), 95, 1982. 敏摘]

《肿瘤性质》

这是一篇较好的综述,作者是 1975 年诺贝尔医学奖金获得者 R. Dulbecco。

文章从简述正常细胞与肿瘤细胞的差异开始,叙述了启动子—控制基因活动,致癌基因病毒启动子的作用,原位致癌基因的激活作用,到化学致癌剂的作用,

启动与促进,肿瘤发展。最后提出一个肿瘤的分子模型。

[Eudeavour, 6(2), 59, 1982. 情摘]