

- 8(5), 2662, 1973.
- [6] Uzgiris, E. E. et al.: *Nature Phys. Sci.*, **242**, 77, 1973.
- [7] Uzgiris, E. E. et al.: *Anal. Biochem.* **60**, 455, 1974.
- [8] Kaplan, J. H. et al.: *J. Immuno. Method*, **7**, 337, 1975.
- [9] Petty, H. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2278, 1979.
- [10] Petty, H. R. et al.: *Cell Biophys.*, **3**, 19, 1981.
- [11] Malher, E. et al.: *Biorheology*, **19**, 647, 1982.
- [12] Batels, P. H. et al.: *Cell Biophys.*, **3**, 371, 1981.
- [13] Uzgiris, E. E. et al.: *Rev. Sci Instrum.*, **45**(1), 120, 1974.
- [14] Lochner, J. E. et al.: *Cell Biophys.*, **4**, 15, 1982.
- [15] Smith, B. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2388, 1976.

〔本文于1983年2月8日收到〕

cDNA 合成和产量计算

吴 石 君

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

以信使核糖核酸(mRNA)为模板合成互补的 DNA 链(cDNA), 并以此单链 DNA 合成双链 cDNA 的技术是基因工程中最初的和重要的环节之一。本文根据研究工作的体会介绍 cDNA 合成方法, 产量计算, 影响 cDNA 合成的因素和解决的方法。

一、cDNA 合成方法

自从1970年 Temin 和 Baltimore 发现鸡骨髓瘤病毒逆转录酶以后, 以 mRNA 为模板合成 cDNA 的技术很快应用到基因工程研究中。由于大多数合成反应都以 polyA-mRNA 为模板, 因此需要加入寡聚脱氧胸腺核苷酸作为引物。底物是四种脱氧核苷三磷酸, 其中一种按一定比例加入标记化合物。加入放线菌素 D 的目的在于抑制以混杂的 DNA 分子为模板的 DNA 合成, 由于它同样也会抑制随后的双链 cDNA 合成, 因此如确证无混杂 DNA 存在, 可不加放线菌素 D。下面列出单链 cDNA 合成混合物组成, 以供参考。

polyA-mRNA	1 μ g
dATP, dTTP, dGTP	各 1mM
dCTP	0.1~0.5 mM
Tris-HCl pH8.3	100mM
MgCl ₂	10mM

KCl	50mM
DTT	10mM
放线菌素 D	50 μ g/ml
Oligo d(T) ₁₂₋₁₈	20 μ g/ml
³ H-dCTP	10~50 μ ci
逆转录酶	20—50 单位

总反应体积为 25 μ l。

实验程序是: 取 mRNA 1 μ g, 加入四种脱氧核苷三磷酸及标记脱氧核苷三磷酸, 冰冻抽干。然后加入其他各溶液, 最后加入逆转录酶。并在酶加入前取样做为对照。37 $^{\circ}$ C 保温, 每间隔 10—15 分钟取样。

样品中 cDNA 合成产物的计数测定方法是: 首先取 100 μ l 0.4% 的牛血清白蛋白(BSA)置于测定管中作为沉淀 cDNA 的载体, 加样 1 μ l, 再加入 2ml 三氯乙酸(TCA)溶液(其中三氯乙酸 10%, 焦磷酸钠 0.2%)。滴加铺于硝酸纤维素微孔滤膜上, 抽滤, 并以 10% TCA 洗涤。加入水溶性(或烘干后加入脂溶性)闪烁液 5ml 计数。图 1 是兔血红蛋白 mRNA 为模板的 cDNA 合成保温时间曲线。

实验证明 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟, ³H-dCTP 掺入最高, 故一般采用 45—60 分钟的保温时间。保温后加入 0.2M EDTA 溶液至终浓度达 0.01M 终止反应。加入等体积水饱和酚及氯仿辛醇

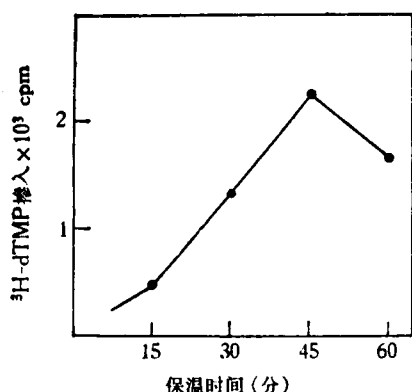


图1 兔血红蛋白 mRNA 为模板的 cDNA 合成保温时间曲线

混合溶液 (25:24:1), 离心去除溶液中蛋白质。为去除反应溶液中残余的脱氧核苷三磷酸及小片段的 cDNA, 可通过葡聚糖凝胶 G-50 或 G-75 (1 $\times$ 10cm) 柱层析。柱以 0.02 M EDTA, 0.1M Tris-HCl (pH7.1) 溶液平衡并洗脱, 每个收集组分为 0.2ml 左右, 取 5 μ l 加入 5ml 水溶性闪烁液计数。图 2 中, 前一个峰是新合成的 cDNA, 后一滞留洗脱峰是未掺入的核苷酸。

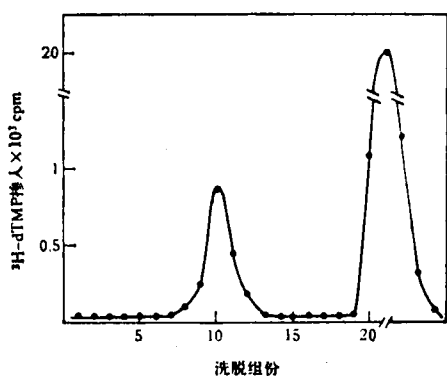


图2 合成后 cDNA-mRNA 链产物的 Sephadex X G-75 柱层析洗脱曲线

将第一峰的各组分合并, 得 cDNA-mRNA 杂交链。为去除 mRNA 链, 在溶液中加入 3N NaOH 至最终浓度为 0.3N, 60 $^{\circ}$ C 保温 1 小时, 加入冰乙酸使溶液 pH 至 7.0。(由于溶液体积很小, 为避免损失和同位素污染, 一般不用 pH 计测定反应溶液, 而是通过一个同 cDNA-mRNA 溶液一致的空白对照管, 加入 NaOH 使终浓度为 0.3M, 然后以冰乙酸调至 pH7.0, 记下加

入冰乙酸的量, 也就是应加入反应溶液中冰乙酸的量。)

随后加入 E. Coli tRNA 至 1 OD/ml, 作为载体, 加入乙酸钠至 2%, 加入 2 倍体积冷乙醇沉淀过夜, 16,000 rpm 离心 30 分钟后, 真空泵抽干, 用于双链 cDNA 合成。

双链 cDNA 合成可采用两种不同的反应系统: 一为 DNA 多聚酶 I 系统, 另一为逆转录酶系统。根据我们体会, 使用逆转录酶无论对合成效率还是 DNA 的长度都优于 DNA 聚合酶 I 的方法。文献报道它对模板的忠实性也较高。使用逆转录酶合成系统, 方法同于单链 cDNA 合成, 只是在反应混合物中不须加入 Oligo d(T) 及放线菌素 D。保温时间可延长到 2 小时。反应结束后, 双链化的程度是通过被 S1 酶消化来测定的。经 S1 酶消化而保留的同位素计数表明双链 cDNA 的量。一般应保留原单链 cDNA 计数的 70—80%。在双链 cDNA 合成过程中, 每间隔 15—30 分钟取样, 以 S1 酶消化, S1 酶反应系统为:

每 100 μ l 混合物中:

NaAc-HAc pH4.5	30mM
NaCl	300mM
ZnCl ₂	7.5mM
载体 tRNA	1 μ g

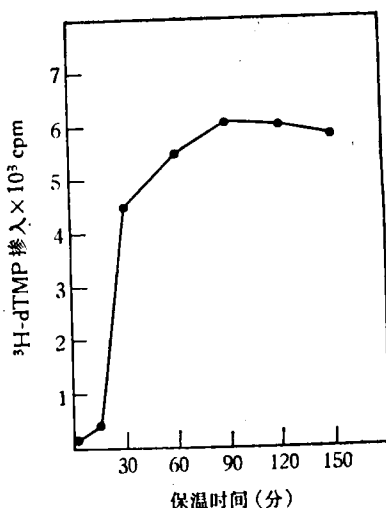


图3 双链 cDNA 合成保温时间曲线
以 S1 酶消化后, 残余的 $^3\text{H-dCMP}$ 掺入计数, 表明双链 cDNA 合成量

S1 酶

10—50 单位

室温下放置 30 分钟。保温后加入 100 μ l BSA 溶液, 2ml 10% TCA, 微孔滤膜过滤, 液闪计数。图 3 是双链 cDNA 合成的保温时间曲线。合成反应终止后, 去除蛋白质, 柱层析去除未掺入核苷酸, 冷乙醇沉淀, 程序同于单链 cDNA 合成。

二、cDNA 合成产量计算

计算 cDNA 合成的产量及效率是检定 cDNA 合成过程及为单链 cDNA 合成后进行双链合成, 3'-端接尾和 DNA 重组提供计算依据的重要步骤。在产量计算中已知的参数有: 1 ci ^3H 标记化合物的 dpm (2.22×10^{12}); 液闪计数器效率 (通过标准源测定得知); 标记化合物的比活性; 未标记脱氧核苷三磷酸加入量; 脱氧核苷三磷酸平均分子量 (按 350 计算); 合成中四种核苷酸掺入按各四分之一计算。

计算程序:

首先推知在 25 μ l 反应混合物中 ^3H -dCTP 的实际比活性, 假定未标记 dCTP 浓度为 0.5mM, 在反应混合物中的毫克分子数为

$$\frac{0.5\text{m mol.} \times 25\mu\text{l}}{10^6\mu\text{l}} = 1.25 \times 10^{-5}\text{m mol.}$$

假定 ^3H -dCTP 标记化合物的比活性为 18ci/mmol., 溶液为 1 μ ci/ μ l, 反应中加入 20 μ l。标记化合物在总 dCTP 中所占毫克分子数忽略不计, 反应混合物的 dCTP 实际放射比活性为

$$\frac{20\mu\text{ci}}{1.25 \times 10^{-5}\text{m mol.}} = 1.6\text{ci/m mol.}, \text{因此新合成的}$$

$$\text{cDNA 中, 每 } 1\mu\text{g cDNA 应显示的 cpm 数为 } \frac{1.6\text{ci/mm ol.} \times 2.22 \times 10^{12}\text{dpm/ci}}{4 \times 350000\mu\text{g/m mol.}} \times 40\% \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

$$= 2.54 \times 10^5\text{cpm}/\mu\text{g}$$

(40% 为液闪计数器 ^3H 的计数效率)

根据新合成 cDNA 的计数即可推知所合成 cDNA 的微克数。而 $\frac{\text{cDNA 的 } \mu\text{g 数}}{\text{mRNA 的 } \mu\text{g 数}} \times 100\%$ 即为 cDNA 合成效率。

三、影响 cDNA 合成的主要因素

1. 作为合成模板的 mRNA, 一般使用 polyA-mRNA。为得到具有单一编码功能的 mRNA, 多选用富含血红蛋白 mRNA 的网织红细胞, 富含卵清蛋白 mRNA 的卵巢, 富含晶体蛋白 mRNA 的晶体等试验材料。如一时不能获得这类材料, 则可先分离、纯化某种蛋白质, 然后用双抗体亲和分离法得到正在合成这种蛋白的多聚核糖体, 进而得到 mRNA。分离纯化 mRNA 中, 可采用 Oligod(T) 纤维素或 poly U 琼脂糖柱亲和层析配合蔗糖密度梯度离心纯化的方法。mRNA 的纯度与生物活性在 cDNA 合成中至关重要。因此必须对 mRNA 进行纯度及体外翻译活性, 产物的鉴定, 一般说来 mRNA 纯度达 60—80% 即可用于 cDNA 合成。

2. 逆转录酶 (依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶) 的质量是决定 cDNA 合成效率的最关键因素。为避免酶活性的降低和丧失, 在保存和运输中必须保持在 -20°C 环境中, 时间不得超过三个月。否则在使用前, 要以标准 mRNA 制剂或以人工合成模板鉴定其活性。

3. 四种脱氧核苷三磷酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 为合成底物。为了解 cDNA 合成的过程和计算产量, 其中一种带有同位素标记。可根据要求选用适当比活性 (即以非标记化合物进行稀释), 原则是既能够通过液闪计数精确计算产量又不使标记量过大而掩盖下步实验过程中的标记化合物掺入。如果需要将合成产物 cDNA 直接用作探针, 就不必用非标记化合物稀释, 甚至可以选用二种, 三种或全部四种标记的合成底物提高 cDNA 的放射比活性。

4. 在取样测定 TCA 不溶性成分的液闪计数时, 如未发现 ^3H 脱氧核苷酸掺入或掺入不随保温时间的延长而提高。则首先考虑的是逆转录酶的活性和 mRNA 的模板活性。应立即检查 cDNA 合成系统。

检查的方法: 以人工模板 poly r(A)-Oligod(T) 代替 mRNA 作模板, 测定 ^3H -dTTP 掺入。如有较高掺入说明反应系统可靠, 否则可能是

逆转录酶活性降低或丧失了,应改换酶制剂。此时再以 mRNA 为模板测定,如掺入仍较低,则可稍增加 mRNA 量,同时更改非标记和标记脱氧核苷三磷酸的比例,提高比活性以获较高掺入计数。

此外,为保证模板和产物不被破坏,所有使用器皿需高温灭菌处理。为保证合成产物不被吸附,所有使用玻璃器皿应以硅油处理,层析柱也应以 100. D. 的 tRNA 预饱和处理方能使用。由于 cDNA 合成是 DNA 克隆等一系列过程的最初和较困难的一步,因此各个因素都

应仔细检查以确保合成的完成和获得高的 cDNA 产量和合成效率。

参 考 文 献

- [1] Buell, G. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 2471. 1978.
- [2] Efstratiadis, A. et al.: *Cell*, **7**, 279. 1976.
- [3] Retzel, E. F. et al.: *Biochemistry*, **19**, 513. 1980.
- [4] Seeburg, P. H. et al.: *Nature*, **220**, 486. 1977.
- [5] Wickens, M. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 2483. 1978.

【本文于 1983 年 4 月 12 日收到】

小鼠甲胎蛋白基因的扩增及其 mRNA 相对含量的测定

李宝珪 仲金良 彭宝珍 戴培桦 黄道培

(中国科学院上海生物化学研究所)

卢惠卿 周国林

(上海生物制品研究所)

甲胎蛋白 (AFP) 是一个癌胚性蛋白,已被广泛用于肝癌早期诊断。近几年的研究发现,血清中 AFP 水平的升高,主要是由于肝细胞中 AFP 的信使核糖核酸 (mRNA_{AFP}) 的量增加,即是由于 AFP 基因转录水平升高,而不是 mRNA_{AFP} 翻译活性升高所致^[1,2,3]。在肝癌发病机理和肝癌治疗研究中,人们逐渐将注意力集中在 AFP 基因调控的研究上,试图从整体或离体试验中,找出影响 AFP 基因表达的有关因子或药物,并已取得了一定进展^[3]。在转录水平上研究 AFP 基因调控,首先要解决 mRNA_{AFP} 的定量测定技术,应用互补于 mRNA_{AFP} 的单链 DNA (cDNA) 作探针,通过液相杂交进行测定是目前应用最普遍,也是最准确的方法。但这首先要分离纯化相当数量纯的 mRNA_{AFP}。本文介绍一种改良的纯化质粒的方法和一种简便的定量固相杂交方法,即将扩增所得的嵌合了小鼠 AFP 基因片段的质粒 DNA,固相于硝酸纤维素膜片上,与含小鼠 mRNA_{AFP} 的样

品进行杂交,以达到定量测定的目的。

一、材料和方法

琼脂糖 (上海东海制药厂), 硝酸纤维素滤膜 (孔径 0.45 μ , 上海医工院), λ DNA, 酵母 tRNA 和牛胰核糖核酸酶 A (RNase A 东风化学试剂厂), Ficoll400 (pharmacix), 限制性内切酶 HindIII、HincII 和 EcoRI 由本所李载平教授赠给, 聚乙烯吡咯烷酮由本所植物遗传组赠给, 小鼠甲胎蛋白基因 (5'端) clone pBR322-AFP₁ (转化在 E.coli LE392 中、以下简称 pAFP₁) 由美国 S. M. Tilghman 博士赠给, 寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷纤维素 (Oligo (dT)-cellulose) 是自己合成的^[4]。

1. 羟基磷灰石 (HAP) 的制备 基本上按 Bernardi 介绍的方法^[5]进行,但在制备过程中增加一次 40% NaOH 煮沸过程,所用试剂均由重蒸水配制。

2. 正常成年小鼠肝和小鼠卵黄囊 poly(A)