

非珠蛋白基因的电镜特性

马积庆

Lesley W. Coggins

(上海市肿瘤研究所) (Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, U. K.)

成熟红血球除有血红蛋白外, 还有各种代谢酶, 膜蛋白等。BALB-C 小鼠基因组的 15kb DNA 片段是为 12S mRNA 编码的顺序。该 mRNA 在红母细胞中表达外, 在网织细胞和肝、肾细胞中均有表达。上述 BALB-C 小鼠 15kb DNA 的三个 Eco RI 片段 (0.7, 2.2 和 12kb) 均分别克隆于质粒 pAT153、称为 p2D6, p2B9 和 p2B4 (图 1)。p2D6-22, p2M9 则是 DNA 片段插入质粒的方向分别与 p2D6, p2B9 相反。

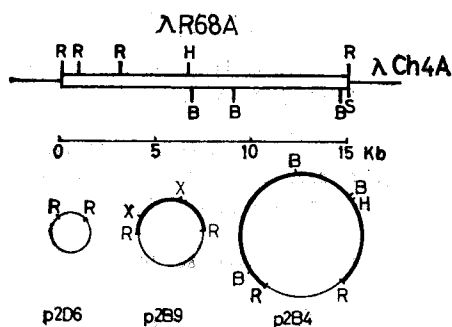


图 1

BALB-C 小鼠 15kb 基因组三个 EcoRI 片段 (0.7kb, 2.2kb 和 12kb) 分别克隆于质粒 pAT 153 称为 p2D6, p2B9 和 p2B4。

来自红细胞系翻译为 16000—19000d 蛋白简称为 ep19, 它的 12 SmRNA 有二个 cDNA, 它们的重组体 (克隆于 pAT153) 为 pFC5 和 pFA6。pFC5 及 pFA6 和 α 珠蛋白、 β 珠蛋白的 cDNA 克隆均不杂交。因此, 它们是非珠蛋白的 cDNA^[1,2]。

上述 cDNA 重组体与基因组 DNA 片段之间的关系, 虽已由 Goldfarb 等用生化方法加以阐明^[1], 本文在他们的合作下进行了电镜分析。

方 法

我们用 40% 甲酰胺铺展液进行电镜异源双链分析^[3]。反应的混合液为 50% 甲酰胺, 0.1M Tris-HCl pH8.5, 10mM EDTA, 0.3 μ g 总量 DNA。经 80℃ 变性 2 分钟, 然后在 37℃ 水浴中进行复性 1.5 小时。在铺展前加入甲酰胺和细胞色素 c, 使最后浓度为 40% 甲酰胺, 20mM Tris-HCl pH 8.5, 2 mM EDTA, 100 μ g/ml 细胞色素 c。铺展于浓度为 10% 甲酰胺, 10mM Tris-HCl pH8.5, 1mM EDTA 的下相液上。带膜铜网捞取后, 在乙醇醋酸铀中染色 30 秒, 经 95% 乙醇中漂洗, 铂/钼=80/20 下投影后, 在电镜下观察。

自我退火的样品制备, 除退火时间小于 1.5 小时外, 其他过程与上相同。

结果与讨论

一、转录顺序图分析:

为了测定 cDNA 和基因组片段间的关系, 我们进行了 p2D6-22/pFA6, p2D6/pFC5 和 p2B9/pFC5 的异源双链分析。

1. pFA6 的 cDNA 顺序图 p2D6-22 和 pFA6 经内切酶 ScaI 或 BamHI 作用后, 在载体的不同位点上有一切点。在上述 40% 甲酰胺的条件下, p2D6-22 和 pFA6 的异源双链图除了显示在载体部分杂交外, 插入的 cDNA 和基因组片段间存在同源双链区和它二侧发夹样的单链环 (图 2a, c)。p2D6/pFA6 的样品放在同一制备中, 作为单链和双链的标准长度 (图 2b, d)。

由于 ScaI 或 BamHI 内切酶在载体上的

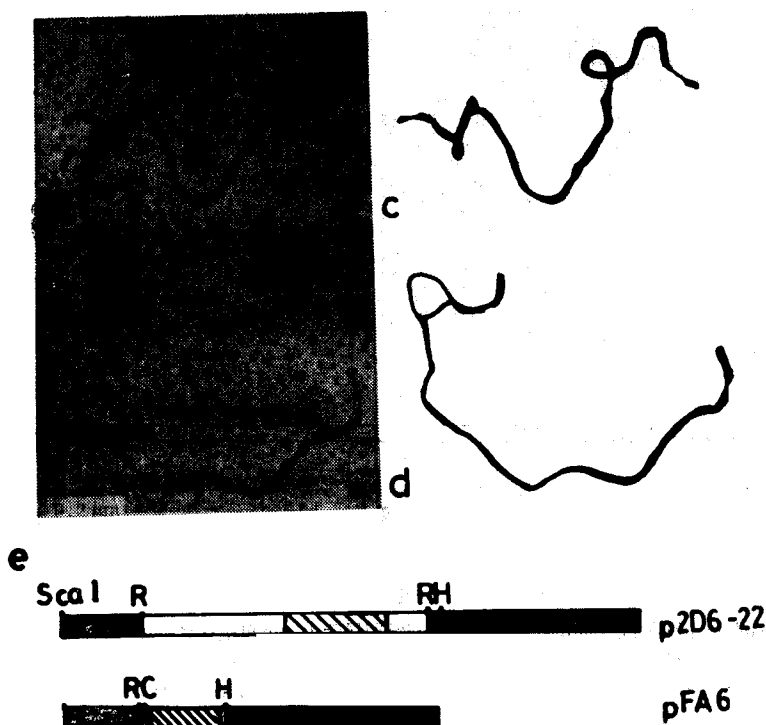


图 2

a) p2D6-22/pFA6 经 Sca I 作用, 异源双链图显示二个发夹样的单链环(箭头)。近短臂侧单链环 $306 \pm 84\text{bp}$, 长臂侧环为 $85 \pm 48\text{bp}$, 中间同源双链区为 $191 \pm 46\text{bp}$, $n = 24$ 。b) p2D6/pFA6 异源双链图显示载体部分杂交, 插入的 DNA 部分未杂交, 呈单链环。二者分别作为双链和单链的标准长度。c, d) 为 a, b 照片的图解。e) p2D6-22/pFA6 异源双链图的示意图。同源区以斜线表示, 空白区为非杂交的单链区, 黑区为载体的双链杂交区。

b 中“——” $0.2\mu\text{m}$

切点不同, 使我们能确定二个发夹样单链环的位置。ScaI 切点短臂的理论长度为 515bp , 后者为 375bp 。二者的理论长度和实际测定的 $532 \pm 64\text{bp}$ 和 $387 \pm 64\text{bp}$ 很近似。这表明二单链环是属于基因组片段内的两端顺序。

上述 p2D6-22/pFA6 的电镜异源双链资料与生化顺序分析资料 (Goldfarb 待发表材料) 是基本一致的。顺序资料指出 pFA6 重组体中插入的 cDNA 和 0.7kb 片段有两个同源区, 它们被一 220bp 的内涵子所分开 (图 4d)。电镜异源双链图中较大的单链环 (306bp) 相当于顺序分析资料中 300bp $5'$ 端内涵子和外显子部分。它的杂交区是相当于 cDNA 和基因组编码区的 150bp 顺序的一部分。但另一 85bp 的小单链环较顺序分析相应的 220bp 内涵子区短。

这可能因该区富于 GC 碱基 (Goldfarb 待发表材料), 使环呈不完全变性。此外, 与顺序分析资料比较, 电镜下未见 $3'$ 端 70bp 杂交区, 这可能与核酸电泳方法的分辨本领有关。

2. pFC5 的 cDNA 顺序图 p2M9 和 pFC5 经 BamHI 或 ScaI 内切酶作用后, 异源双链图显示单链小环和大环, 二环之间有同源双链区 (图 3a, b)。载体短臂的杂交长度与理论长度近似。因此, 二单链环亦是属于基因组片段内的两端顺序。

pFC5 中插入的 cDNA 片段不仅和 2.2kb DNA 片段, 而且与 0.7kb 的部分编码区存在同源。经 SalI 内切酶作用后 p2D6 和 pFC5 的异源双链分析显示有一杂交双链区, 它的二侧有大、小单链环各一个。短臂的实际长度为

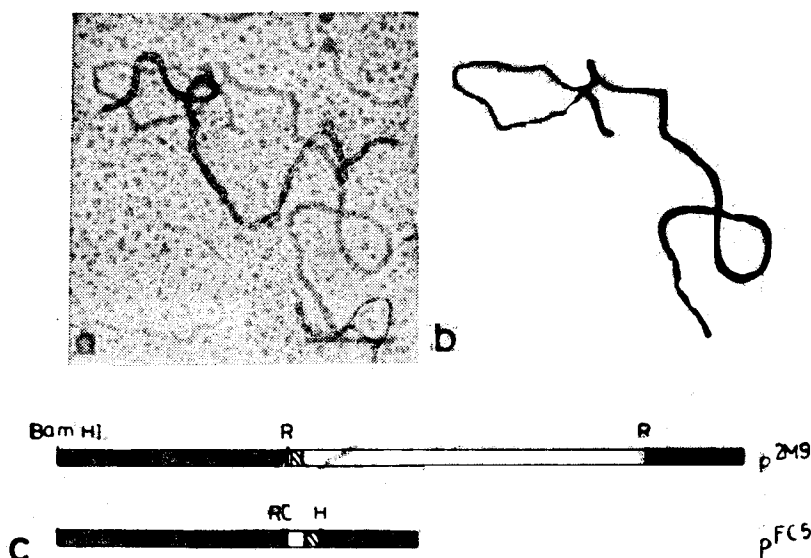


图 3

a) p2M9/pFC5 经 BamHI 作用, 异源双链图显示大, 小单链环各一个 ($162 \pm 81\text{bp}$ 和 $2.23 \pm 0.24\text{kb}$), 其间为双链杂交区 (箭头) ($67 \pm 55\text{bp}$, $n = 31$)。 b) 照片 a 的图解。 c) p2M9/pFC5 的异源双链图的示意图。 同源区以斜线表示, 空白区为非杂交的单链区, 黑区为载体的杂交双链区。

a 中“——”代表 $0.2\mu\text{m}$

$589 \pm 61\text{bp}$ 与它的理论长度 651bp 近似(图 4a, b)。

上述结果与顺序资料的结果是一致的 (Goldfarb 等待发表材料)。该资料表明 2.2kb 是在基因的 $5'$ 端, 0.7kb 则在 $3'$ 端。pFC5 中 cDNA 片段的 $3'$ 端与 0.7kb 和 2.2kb 交界处, 也就是 EcoRI 切点的两侧各有 50bp 的同源顺序。它与 2.2kb 异源双链的小环是相当于基因组 200bp 的内涵子。 2kb 左右的大环则为基因组中 pFC5 以外的编码区和其上流的非编码区(图 4d)。至于 pFC5 中 $3'$ 端与 2.2kb DNA 的同源区也因方法的分辨力的局限无法显示出来。

二、重复顺序图分析:

1. 12kb 片段的重复顺序图 p2B4 经 EcoRI, Hind III 或 SalI 处理后自我退火(Self-annealing), 电镜下显示 12kb 基因组至少有九个逆向重复顺序区。有的是相邻的逆向重复顺序呈发夹样。有的逆向重复顺序间存在非重复顺序。可见非重复区的单链环和重复顺序区的

颈部(图 5a, b)。有时可呈现各种复杂的图型。

为了确定逆向重复顺序的位置, 将 p2B4 经 Bam HI 处理后再自我退火。这样切成 5.5kb , 3.9kb 和 2.2kb 三个片段。它们各自的重复顺序图, 特别是 5.5kb 在一端经常显示发夹样相邻逆向重复顺序。据此, 我们可以确定各个重复顺序在整个 12kb DNA 上的方向和位置。

2. 2.2kb 的重复顺序图 p2M9 或 p2B9 与 p2B4 进行异源双链图分析, 以便了解插入顺序中是否具有共同的重复顺序。结果表明, 大多 p2B4/p2M9 显示一个杂交区, 它在 p2B4 SalI 短臂侧(以下均以短臂侧计算)的 $10.8\% - 12.4\%$ 处, 在 p2M9 的 $25.2\% - 31.3\%$ (图 6)。如果是 p2B4/p2B9 的异源双链图, 那末常见杂交区在 p2B4 的 $34.9\% - 37.3\%$ 处与 p2B9 的 $67.2\% - 74.0\%$ (图 6)。由此可见, p2B9 或 p2M9 和 p2B4 含有共同的重复顺序。

为了确定这个重复顺序的类型, p2B9 或 p2M9 与 7.2kb BALB-C 小鼠 M β G-2 重组体进行异源双链分析。M β G-2 不仅含有 β -珠蛋

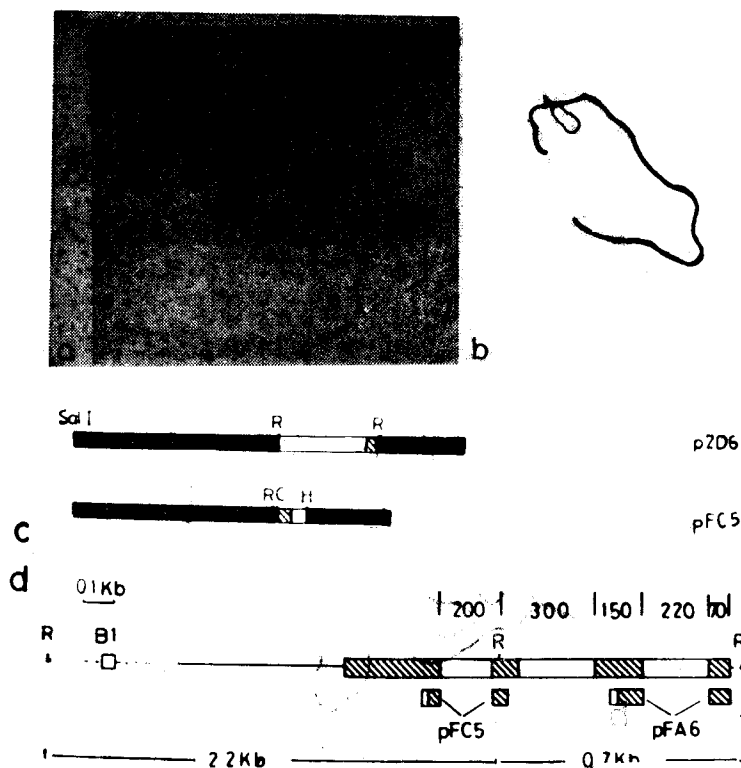


图 4

a) p2D6/p⁺FC5 经 SalI 作用, 异源双链图显示大, 小单链环各一个 ($135 \pm 46\text{bp}$, $580 \pm 59\text{bp}$), 其间为杂交双链区 ($89 \pm 48\text{bp}$, $n = 24$)。b) 照片 a 的图解。c) p2D6/pFC5 的异源双链图的示意图, 同源区以斜线表示, 空白区为非杂交单链区, 黑区为载体的杂交双链区。d) 0.7 和 2.2 kb DNA 生化顺序分析资料示意图, 斜线为编码区, 空白区为非编码区。B₁ 是 B₁ 族的重复顺序区。

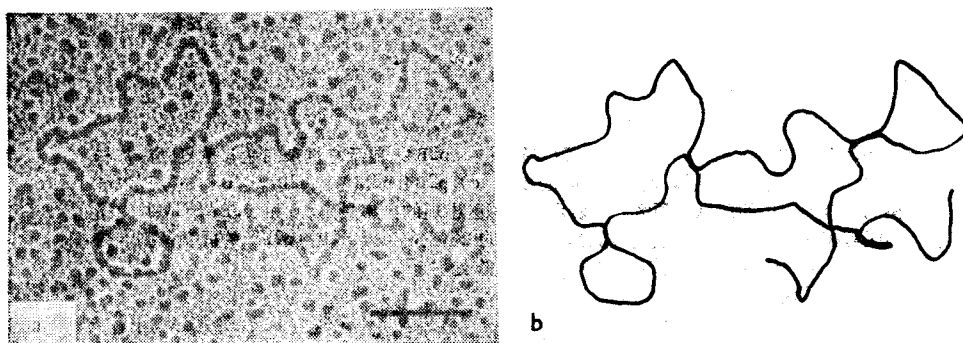


图 5

a) p2B4 经 EcoRI 作用后的自我退火。右侧可见一个相邻的逆向重复顺序 (Snapback)。其它三对为逆向重复顺序, 其间均有单链非重复顺序环。b) 照片 a 的图解。a 中“——”代表 $0.2\mu\text{m}$ 。

白基因, 而且已确认含有 B₁ 重复顺序^[4]。我们仅在 p2M9/MβG-2 见有一短的杂交区。该

区正与 MβG-2 的 B₁ 顺序区和 p2M9 的重复顺序区相一致。至于它的方向, 如由 pol III

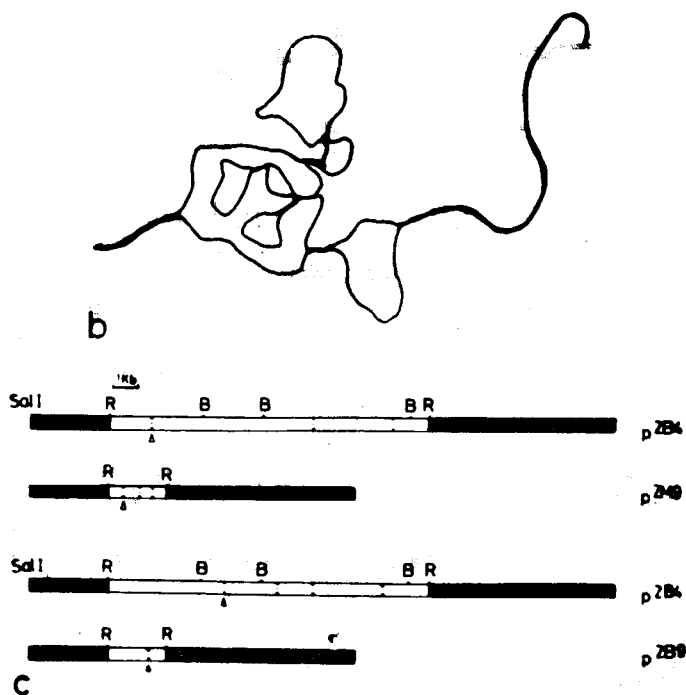
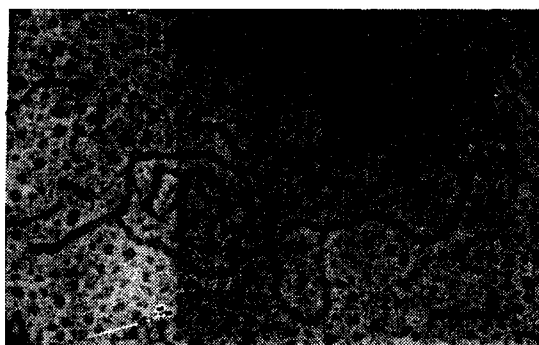


图 6

a) p2B4/p2B9 经 SalI 作用后的异源双源图。p2B4 显示有复杂的逆向重复顺序外和 p2B9 也有杂交区(箭头)。b) 照片 a 的图解。c) p2B4/p2M9 及 p2B4/p2B9 的异源双链图的示意图。虚线表示同源区, △表示该同源区出现的频率最高。如 p2B4/p2M9 的同源区常在 p2B4 11.6% 处(短臂侧), p2M9 的 28.3%。而 p2B4/p2B9 的同源区则常在 p2B4 的 36.1% 处(短臂侧), p2B9 的 68.1% 处。

“——”代表 0.2 μm,

转录,则与邻近的 ep19 基因的编码区为同一方向。

参 考 文 献

[1] Affara, N., et al.: *Nucleic Acids Research*, 11(4): 931, 1983.

[2] Goldfarb, P. S., et al.: *Nucleic Acids Research*, 11 (11): 3517, 1983.

[3] Davis, R. W. et al.: in *Methods in Enzymology*, 71: 413, 1973.

[4] Coggins, L. W. et al.: *Gene*, 17: 113, 1982.

[本文于 1986 年 4 月 28 日收到]