

胃癌 823 细胞 cDNA 文库的建立

祖志飞 韩复生

杨卫民 沈孝宙

(北京市肿瘤防治研究所生化室) (中国科学院动物研究所)

随着 DNA 重组技术的发展,某些与细胞癌变有关的基因的分离与克隆越来越受到人们的重视。要达到分离和纯化癌基因及其产物的目的,一个较为有效的方法就是构建 cDNA 文库。最近我们建立了胃癌 823 细胞(BGC-823)的 cDNA 文库,希望能从文库中分离到与胃癌变有关的基因,并令其表达产物,从而更深入研究胃癌发病机制和寻找治疗途径。

从接种 823 细胞到裸鼠身上 4 周后取肿瘤组织,经异硫氰酸胍/氯化铯超离心,oligo-dT 纤维素亲和层析柱纯化得到 mRNA^[1]。以 mRNA 为模板,利用 oligo-dT₁₂₋₁₈ 作为引物,在逆转录酶作用下合成第一条 cDNA 链^[2,3],效率为 25%,长度在 0.1—5kb 之间。第二条 cDNA 链是在 RNaseH, DNA 聚合酶 I 和大肠杆菌 DNA 连接酶作用下完成的^[4,5],合成效率近 100%。合成的双链 cDNA 用 EcoRI 甲基化酶将其内部的 EcoRI 位点保护之后,利用 T₄-DNA 聚合酶使其成为平端。该产物与 5'末端磷酸化的 EcoRI 人工接头连接后,再用 EcoRI 限制性内切酶消化。经 Sepharose 4B 柱除去小片段的 cDNA(<500bp) 和多余的接头,收集

500bp 以上带有接头的双链 cDNA,与 EcoRI 完全消化,并经碱性磷酸脂酶(CIP)处理的 λ gt11 DNA 连接,然后用大肠杆菌 BHB2688 和 BHB2690 制备的包装蛋白进行包装(包装效率为 3×10^8 pfu/ μ g DNA)。用其感染大肠杆菌 Y1090,得到 7.1×10^5 个重组体。即此 cDNA 文库的构建效率为 7.1×10^5 重组体/ μ g DNA。

典型哺乳动物细胞含有 10000—30000 种不同的 mRNA,低丰度 mRNA 所需的克隆数一般在 $1-2 \times 10^5$,我们所获得的 cDNA 是完整的,这是首次构建该细胞系的 cDNA 文库。目前,此文库的筛选工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1982, 128—131.
- [2] Gubler, U. et al.: *Gene*, 1983, **25**, 263.
- [3] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1982, **2**, 161.
- [4] 沈翔非等:《生物化学与生物物理进展》,1986, **6**, 62.
- [5] 刘良式等:《生物工程学报》,1987, **3**(2), 108.

[本文于 1989 年 2 月 28 日收到]

(上接第 214 页)

查唾液酸含量的最少的红细胞膜蛋白量为 0.2 毫克。为了深入探讨生物膜损伤与克山病病因之间的关系,为克山病的综合防治提供更多的理论和实验依据,今后尚需对亚急性克山病及病区正常人进行测定,还应结合病情在病区的易感人群中进行动态观察和综合分析。

参 考 文 献

- [1] Pearson, T. W.: *Life Sciences*, 1978, **22**, 127.
- [2] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》1983, **3**, 31.
- [3] Mary, A. K. M.: *Anal. Biochem.*, 1978, **87**, 206.
- [4] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》1985, **2**, 66.
- [5] Aminoff, D. et al: *Biochem. J.*, 1961, **81**, 384.

[本文于 1888 年 12 月 20 日收到]