

of 8% (v/v) blood. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 1151

11 Nuovo G, Gallery F, Hom R *et al.* Importance of different variables for enhancing *in situ* detection of PCR-amplified DNA. PCR Methods Appl, 1993, 2: 305~ 312

12 Zhang X Y, Jiang H B, Li L J *et al.* *in situ* amplification of DNA fragments specific for human Y chromosome in cellular nuclei by PCR. Science in China (Series C), 1996, 39 (1): 45~ 52

13 Zhang X Y, Jiang H B, Ma Q *et al.* Studies on *in situ* PCR detected by the BrdU antibody technique. J Wuhan Univ (Natural Science, English Edition), 1996, 1 (1): 119~ 124

***in situ* Polymerase Chain Reaction of Human's Single copy and Repeated DNA Sequences.** MA Qi, ZHANG Xiuyan, LIU Ting, YANG Jianqi,

XU Yaoxian¹⁾ (School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; ¹⁾Department of Biology, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China) .

Abstract Single-copy and specific repeated DNA sequences of human Y chromosome were amplified and detected by *in situ* PCR in cultured human small intestine cancer metastatic ascites cell line cells. The results show that *in situ* PCR is much more sensitive than *in situ* hybridization.

Key words *in situ* polymerase chain reaction, PCR *in situ* hybridization, *in situ* hybridization, Y chromosome, cultured cell

mRNA 差别显示研究肝再生调控基因*

邱兆华 贺福初¹⁾

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 以正常肝和再生肝为对比材料, 利用 mRNA 差别显示技术, 研究肝再生过程中基因的差别表达, 旨在从基因选择性表达水平上探讨肝再生调控机理. 得到 4 种未知肝再生相关 cDNA, 完成其克隆与序列分析, 一例在再生肝中的表达低于正常肝, 余者则高于正常肝. 这些序列均已在 EMBL (Europe Molecular Biology Laboratory) 数据库中登录, 登录号分别为 X95721、X95722、X95723、X97973.

关键词 肝再生调控, mRNA 差别显示, 基因克隆, 核苷酸序列分析

mRNA 差别显示技术 (mRNA differential display, DD 法) 是 1992 年由美国哈佛大学医学院的 Liang Peng 等^[1]根据基因的选择性表达而建立的一种新的分子克隆策略. 本实验应用 DD 法, 研究肝再生过程中基因的选择性表达, 共得到 4 种肝再生相关 cDNA, 其一在再生肝中的表达低于正常肝, 余者则高于正常肝. 该结果为我们进一步从基因表达水平上探讨肝再生调控机理奠定了良好的基础.

1 材料与方 法

1.1 动物、质粒、宿主菌、工具酶及其他试剂
Wistar 大鼠 (一级、健康、雄性、体重 180~ 220 g) 由军事医学科学院动物中心提

供. PCR 产物克隆载体 pGEM-T vector、大肠杆菌 JM109 株、限制性内切酶、其他工具酶及 Wizard PCR Preps DNA Rapid Purification System 均购自 Promega 公司, DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司, α -³²P-dATP (比活性 1.11×10^{11} Bq/mmol) 购自福瑞公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, 其他主要试剂购自华美生物工程公司.

1.2 引物设计

按照 DD 法的引物设计原则^[2], 设计上、

* 国家 863 计划资助项目 (863-102-08-5).

¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1996-09-10, 修回日期: 1996-12-01

下游引物, 在本实验室 Applied Biosystems Inc. 319 DNA Synthesizer 上合成.

上游引物(Primer 1): 5'-GCTCTTTGTC-3'; 下游引物(Primer 2): 5'-TTTTT-TTTTTT (AGC) G-3'.

1.3 肝再生动物模型的建立

按 Higgins 和 Anderson 法^[3]将大鼠肝脏约切除 2/3, 手术于上午 8:30~11:30 进行, 术后大鼠饲以平衡饲料和自由饮水.

1.4 正常肝和再生肝总 RNA 的提取

按 RNeagents Total RNA Isolation System 操作指南, 从新鲜的正常肝组织中提取 RNA; 24 h 后杀鼠取肝, 从新鲜的再生肝组织中提取 RNA.

1.5 mRNA 差别显示

1.5.1 反转录 PCR: 分别以正常肝和再生肝总 RNA 为模板, 进行反转录 PCR. 反转录体系 20 μ l: 取 2 μ l 总 RNA (0.2 g/L)、2.5 μ l 下游引物 (20 μ mol/L)、6 μ l RNase-free H₂O, 混合后 70℃ 变性 10 min; 冷却后加 1 μ l RNasin (40 U/ μ l)、4 μ l 5 $\times$ 反转录缓冲液、4 μ l dNTPs (100 μ mol/L)、0.5 μ l MLV 反转录酶 (200 U/ μ l), 混合后 37℃ 反应 2 h; 反应结束后 95℃, 5 min 灭活酶.

以反转录产物为模板进行 PCR, 反应体系 20 μ l: 8 μ l 反转录产物、1 μ l 引物 1 (20 μ mol/L)、1 μ l 引物 2 (20 μ mol/L)、2 μ l dNTPs (100 μ mol/L)、2 μ l 水、2 μ l 10 $\times$ 缓冲液、3 μ l Taq 酶 (0.5 U/ μ l)、1 μ l α -³²P dATP (3.7 $\times$ 10⁸ Bq/L). 反应条件: 94℃, 30 s; 40℃, 2 min; 72℃, 30 s; 反应 40 个循环; 72℃, 7 min 延伸.

1.5.2 变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳与放射自显影: 每 4 μ l PCR 产物与 1.6 μ l 测序反应终止液混合, 80℃ 2 min 变性, 冰上冷却后, 在 6% 变性梯度聚丙烯酰胺凝胶上以 1800 V 高压、50 W 恒功率电泳 5.5 h, -20℃ 曝光过夜, 次日显影、定影各 5 min.

1.5.3 差示 cDNA 片段的回收与再次扩增: 从胶上回收在正常肝与再生肝之间有明显表达

差异的 cDNA 条带, 溶于 60 μ l TE 缓冲液中 (pH 8.0), 65℃ 2.5 h, 取 5 μ l 为模板, 按前述 PCR 条件再次扩增.

1.5.4 PCR 产物纯化与克隆: PCR 产物经 Wizard PCR Preps DNA Rapid Purification System 纯化后与 pGEM-T Vector 连接, 转化 JM109 菌株, 酶切鉴定重组子.

1.5.5 序列分析: 以末端终止法用通用引物对差示 cDNA 片段进行核苷酸序列分析.

1.5.6 RNA 印迹分析: 分别将正常肝和再生肝总 RNA 在 1% 变性琼脂糖凝胶中电泳并转移至硝酸纤维素膜上, 以放射性标记的差示 cDNA 为探针, 进行杂交和放射自显影, 检测其对应基因在正常肝和再生肝中的表达差异. 以 PCR 标记 cDNA 探针: 反应体系 100 μ l, 包括模板质粒 DNA 0.01~0.1 ng, 引物 1 (20 μ mol/L) 5 μ l, 引物 2 (20 μ mol/L) 5 μ l, dGTPs (250 μ mol/L) 2 μ l, dTTPs (250 μ mol/L) 2 μ l, dCTPs (250 μ mol/L) 2 μ l, dATPs (25 μ mol/L) 2 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ l, Taq 酶 (3 U/ μ l) 1 μ l, α -³²P dATP (3.7 $\times$ 10⁸ Bq/L) 2 μ l, 加水补足 100 μ l. PCR 按以下条件进行: 94℃, 30 s; 40℃, 2 min; 72℃, 30 s; 反应 40 个循环; 72℃, 7 min 延伸.

1.5.7 DNA 印迹分析: 分别以正常肝和再生肝总 RNA 为模板进行 RT-PCR, 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳并将 cDNA 转移至硝酸纤维素膜上, 以放射性标记的差示 cDNA 为探针, 进行杂交和放射自显影, 检测其对应基因在正常肝和再生肝中的表达差异. 探针标记反应同上.

1.5.8 同源性分析与数据库登录: 将差示 cDNA 的部分核苷酸序列与 Genbank 核酸数据库中的已知序列进行同源性比较, 并将未知的差示 cDNA 序列在 EMBL 数据库中登录.

2 结 果

2.1 肝再生模型的建立及 RNA 提取

肝部分切除后, 考察术后大鼠的成活状况和肝再生情况, 结果显示: 大鼠成活率达

95% 以上, 且生长状态良好. 分别提取正常肝和再生肝总 RNA, 其浓度根据 A_{260} 估算: 从 1 g 正常肝组织和再生肝组织中各得到 5 mg 左右总 RNA; 其纯度根据 A_{260}/A_{280} 估算: 其 A_{260}/A_{280} 均大于 1.8, 表明纯度良好.

2.2 mRNA 差别显示

用改良 DD 法^[4-7], 在正常肝和再生肝之间显示出差异表达条带. 从变性梯度聚丙烯酰胺凝胶上, 共回收了 7 条有明显表达差别的 cDNA, 再次 PCR, 均有特异扩增 (图 1).

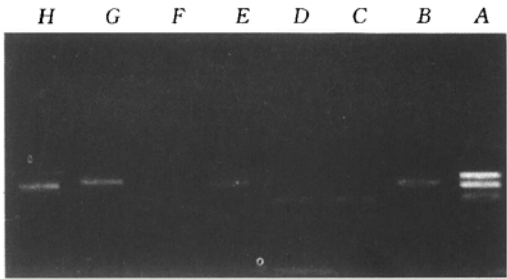


图 1 DD cDNA 的再次扩增

A: pGEM-3Zf (+) Hae III DNA markers; B~H: DD cDNA (N_3^1 、 N_3^2 、 N_3^3 、 P_3^2 、 P_3^3 、 P_4^1 、 P_4^2).

2.3 PCR 产物的克隆与序列分析

将其中 4 种差示 cDNA (其 1 在正常肝中高表达, 命名为 N_3^1 ; 余者在再生肝中高表达, 命名为 P_3^2 、 P_3^3 、 P_4^1) 克隆到 pGEM-T Vector 中, 以限制性内切酶分析 (图 2) 鉴定阳性重组子.

通过序列分析, 得到 4 种差示 cDNA 的部分核苷酸序列: N_3^1 : 5' GCAACCAGCTAT-CACCAAGCTCGATAGGCTTTTCACCTCTA-CCTAAAAATCTTCCCACTATTTTGCTACATAGACGGGTTGATTCATGAAATTGTTTT-TAGGTAGCT 3'; P_3^2 : 5' CACTAAAATTTG-GTTTGGATATTCTTAAAGTGTGGAAT-GATACTTAGTTCTGCATTTTGATTCTAA-AATAAAATTTACTCTGTAAGATACTGCA-TTAG 3'; P_3^3 : 5' TCTGGGTTTATTTT-GTTCAAAAGGAAGATTCAAGTTCAAGTT-CTGTAAGAGAAGGAACAGGTATTGAGTC-

CAATAGGAACAAAGTGGTTAAAAGAAAA-TTGAGGCTGGATC 3'; P_4^1 : 5' GGAAGGA-GAGGGTTTATTTTCAGCCTACAGTTCAAC-ATCACAGTTCATCACTGAGAGAAAACAG-GGCAGAAGCTAATGCTGGGGTCACAGAG-GAGTGCTATGTATTGATTTGCTCCCCAC-GGCTTG3'.

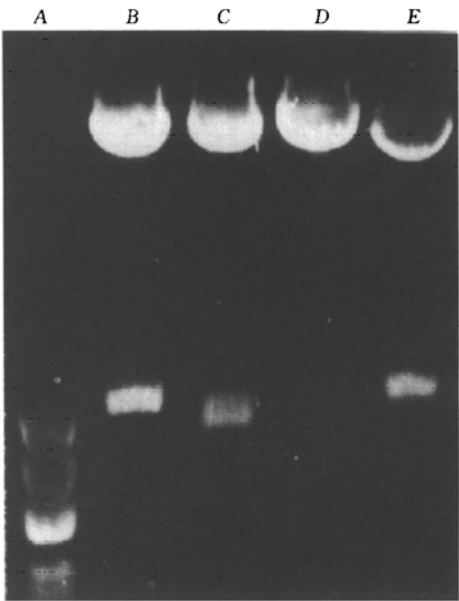


图 2 pGEM-DD cDNA 重组子的酶切鉴定

A: pGEM-3Zf (+) Hae III DNA markers; B~E: pGEM- N_3^1 、 P_3^2 、 P_3^3 、 P_4^1 转化子 DNA 经 Nco I 和 Sal I 双酶切.

2.4 RNA 印迹和 DNA 印迹分析

RNA 印迹结果表明 (图 3): N_3^1 在正常肝中的表达明显高于再生肝, 与差示结果一致. 但 P_3^2 、 P_3^3 、 P_4^1 在正常肝和再生肝中均未显示杂交条带, 这可能由于其对应 mRNA 的表达丰度太低所导致. 于是, 我们尝试分别以正常肝和再生肝 RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 以期放大引物 1 和引物 2 介导扩增的特异 mRNA, 然后进行 DNA 印迹分析, 结果表明 P_3^2 在再生肝中的表达明显高于正常肝, 与差示结果一致 (图 4).

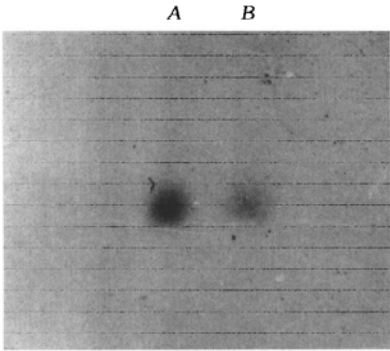


图3 N₃¹的RNA印迹分析

A: 正常肝组织 mRNA; B: 再生肝组织 mRNA.

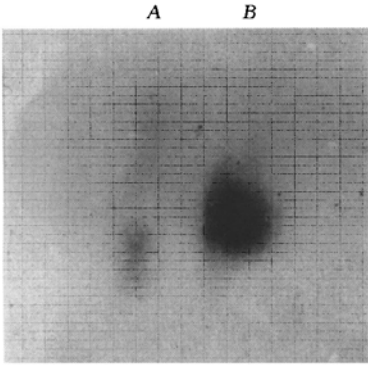


图4 P₃²的DNA印迹分析

A: 正常肝组织 cDNA; B: 再生肝组织 cDNA.

2.5 同源性分析与数据库登录

将以上核苷酸序列与 Genbank 核酸数据库中的已知序列进行同源性比较, 结果表明均为未知序列. 随后我们将 N₃¹、P₃²、P₃³、P₄¹ 分别在 EMBL 数据库中登录, 登录号分别为 X95721、X95722、X95723、X97973.

3 讨 论

肝脏是动物体内具有惊人再生潜能的重要器官: 肝部分 (2/3) 切除后, 剩余的肝细胞能迅速分裂增殖, 进而使肝组织代偿性增生, 其 DNA 合成从 12 h 开始, 24 h 达高峰, 48~72 h 再生肝重可增加一倍, 约 7~10 d 后, 再生肝达原来肝大小时停止生长. 由此可见: 肝再生不是一个自发过程, 其启动、进行及终止受体内精细的调节机制控制^[3,8~9], 但其调控

机制尚未完全明了.

基因选择性表达是许多生理和病理现象的基本调控方式, 肝部分切除后的再生过程亦不例外. 我们在已有工作的基础上 (另文待发表), 并结合对肝再生过程的分析, 进行如下推测: 肝部分 (2/3) 切除后 24 h 可能伴随着一些重要肝再生调控基因的表达. 据此, 我们选择正常肝和肝部分 (2/3) 切除后 24h 的再生肝为对比材料, 利用 mRNA 差别显示技术, 研究肝再生过程中基因的选择性表达, 结果得到 4 种未知肝再生相关 cDNA. 其中 X97973 的 18~82 位碱基与小鼠白介素 1 β (IL-1 β) 基因 5' 侧翼区 897~961 位碱基具有 70% 同源性 (46/65); 而 30~68 位碱基与小鼠胰岛素样生长因子 II (IGF-II) 的基因 1987~2025 位碱基具有 82% 同源性 (32/39). 已知 IL-1 对肝细胞增殖具有刺激和抑制的双向调节功能, 肝损伤时, Kupffer 细胞和巨噬细胞均能产生 IL-1, IL-1 既能诱导肝细胞合成急性反应蛋白 (acute phase proteins), 又能抑制原代培养肝细胞生长, 但其作用机制尚未完全明了. IGF 主要由肝脏产生, 其作用是促进细胞增殖和蛋白聚糖合成, 已知肝细胞表面存在 IGF 受体, 且 IGF 和受体间的结合活性与其细胞增殖促进活性之间存在极高相关性, 这说明肝脏产生的 IGF 可以自分泌或旁分泌的方式作用于肝细胞, 促进细胞增殖. X97973 与 IL-1、IGF 之间的同源性以及后二者在肝再生调控中的作用提示我们进行如下思考: a. X97973 与 IL-1、IGF 的确切关系如何? 是否属于同一家族? b. X97973 在肝再生调控中以何种方式起作用? 其作用与 IL-1、IGF 是否有相似或相关之处? 这些均有待于进一步研究.

其他三个序列与目前已知的肝再生相关基因没有明显同源性, 但考虑到肝再生的调控是一个由众多因子参与的复杂过程, 人们对该过程的了解还很有限, 更多新的调控分子和已知分子的新的功能还有待于被发现, 因此根据目前有限的知识, 还难以阐明它们在肝再生调控中的意义. 若要全面了解差示 cDNA 在肝再生

调控中的作用, 尚需对其基因的结构与功能等方面进行深入研究.

总之, 对肝再生过程中基因选择性表达的研究, 不仅有助于人们理解肝再生调控机理, 而且为进一步探讨真核细胞的增殖调控与癌变提供良好的体内模型, 同时也为各种肝病的治疗提供新的思路.

参 考 文 献

1 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~ 971

2 Bauer D, Muller H, Reich J *et al.* Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (18): 4272~ 4280

3 Higgins G M, Anderson R M. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931, **12**: 186

4 Guimaraes M J, Lee F, Zlotnik A *et al.* Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (10): 1832~ 1833

5 Shoham N G, Arad T, Rosin Abersfeld R *et al.* Differential display assay and analysis. *Bio/Techniques*, 1996, **20** (2): 182~ 183

6 Mou L, Miller H, Li J *et al.* Improvement to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **199** (2): 564~ 569

7 Callard D, Lescure B, Mazzolini L. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Bio/Techniques*, 1994, **16** (6): 1096~

1103

8 Gerhard H. In: Lesch R eds. *Liver regeneration after experimental injury*. New York: SIMBC, 1975. 340~ 346

9 Bucher N R. Liver regeneration: An overview. *J Gastroenterology and Hepatology*, 1991, **6**: 615~ 624

Studies on Regulation of Liver Regeneration by mRNA Differential Display. QIU Zhaohua, HE Fuchu (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing* 100850, China).

Abstract Regeneration of liver after hepatectomy is a complex process. It has been thought that there might be some growth factors and genes which play important roles in this process. In order to understand the regulatory mechanism of liver regeneration at molecular level, the changes in gene expression of regenerating liver have been demonstrated by mRNA differential display. As a result, four candidate cDNA fragments were obtained, including one down-regulated and three up-regulated. DNA sequencing demonstrated that all of them were novel. These sequences have been assigned the database accession numbers in EMBL as below: X95721, X95722, X95723, X97973.

Key words regulation of liver regeneration, mRNA differential display, gene cloning, sequencing of DNA

GM3 与 Ca²⁺-ATP 酶的重建及其 冷冻断裂电镜观察*

王丽华

杨小毅

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027) (中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 应用生物膜的分离与重建技术, 将 GM3、大豆磷脂与肌质网 Ca²⁺-ATP 酶共同重建在脂质体上, 酶活力明显增加. 经负染、冷冻断裂复型后电镜等形态学方法证实形成的脂酶体囊泡封闭性好, 脂酶体上 Ca²⁺-ATP 酶蛋白颗粒均匀、直径增大.

关键词 Ca²⁺-ATP 酶, 神经节苷脂 GM3, 重建, 冷冻断裂

* 生物大分子国家重点实验室课题资助. 收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-01-20