

参 考 文 献

- 1 Oberhammer F, Wilson J W, Dive C *et al.* Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*, 1993, **12** (9): 3679~ 3684
- 2 Roy Walker P, Weaver V M, Lach B *et al.* Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*, 1994, **213** (1): 100~ 106
- 3 Zakeri Z F, Qniela D, Latham T *et al.* Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB*, 1993, **7** (5): 470~ 478
- 4 Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrenius S. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Cal*, 1994, **16** (4): 279~ 288
- 5 Eileen White. Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes Dev*, 1993, **7** (12A): 2277~ 2284

The Characteristics of DNA Cleavage of Apoptotic NIH3T3 Cells Induced by Ultraviolet Irradiation. HU Qing-liu, DING Zhen-hua, TAN Xiao-hua¹⁾, WANG Hong (*Department of*

Radiation Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;
¹⁾ *Department of Epidemiology, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China*).

Abstract When conventional gel electrophoresis was used, it was found that DNA of NIH3T3 cells cultured for different time after UVB irradiation had no DNA ladders, but thymocytes of Kunming mouse processed by the same method had DNA ladder. The results of field inversion electrophoresis showed that after UVB irradiation, the DNA of NIH3T3 cleaved into high molecular weight fragments at first, and then into low molecular weight fragments, still without the appearance of DNA ladders. It is suggested that DNA cleavage of apoptotic cell is not always initiate at internucleosome.

Key words apoptosis, DNA ladder, ultraviolet irradiation

MK 表达载体的构建及在大肠杆菌中的表达

薛泳涛 黄文晋 石 斌 陈镔复 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 MK 是属于肝素结合因子家族的一种多肽, 仅在胚胎中期和成年期肾脏表达, 在某些肿瘤细胞中也有异常表达. MK 能够促进细胞特别是神经细胞的生长和分化, 并抑制某些肿瘤细胞的生长. 通过 RT-PCR 从胚胎肾脏中获得了 MK 成熟肽 DNA 编码序列, 克隆入载体 pBV221 中, 并转入大肠杆菌, 建立了重组 MK 的高表达菌株.

关键词 Midkine (MK), 基因, 克隆, 表达

学科分类号 Q78

Midkine (MK) 是一种对细胞的生长和分化起重要作用的细胞因子, 1988 年由 Kadamatsu 等^[1]发现, 是属于肝素结合因子的一种多肽. 其基因表达见于胚胎中期多种组织及成年期肾脏. MK 含有 118 个氨基酸, 富含半胱

氨酸和碱性氨基酸. 具有高度的稳定性和严格的三维结构. 其前体含有 23 个氨基酸的信号肽序列. 人 MK 和小鼠 MK 基因同源性达 87%^[2].

收稿日期: 1996-12-25, 修回日期: 1997-03-17

MK 能够促进正常细胞的生长和分化^[3,4], 尤其促进神经细胞的发育, 成年期在肾脏可作为激素激发某些细胞的分化, 维持肾脏的正常功能^[4]. 它还可以抑制某些肿瘤细胞的生长^[5]. 本文从胎儿肾脏中获得 MK 成熟肽 DNA 编码序列, 成功构建 MK 的重组表达载体, 进一步得到 MK 的高表达菌株, MK 的研究在国内尚属首例.

1 材料和方法

1.1 组织

23 周龄人胎儿肾脏.

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α , 质粒 pBV221 由本室保存, pGEM-7Zf (+) 购自 Promega 公司.

1.3 寡聚核苷酸引物

由中国科学院北京微生物研究所基因工程中心王永立先生赠送. 依照文献 [3] 从成熟肽第一个氨基酸密码子开始设计如下. 5' 端引物为: 5' AAAAAGAAAGATAAGGTGAAGAAG 3', 3' 引物为 5' CCTTGGCGTCGACGCTTG-GCGT3', 其中 3' 引物终止码之后引入了一个 Sal I 酶切位点.

1.4 试剂及试剂盒

RNA 纯化试剂盒, 反转录 PCR (RT-PCR) 试剂, 各种限制内切酶、连接酶购自 Promega 公司. T7 测序试剂盒由 Pharmacia 公司赠送.

1.5 总 RNA 提取和 mRNA 的纯化

均按照试剂盒操作指南进行, 并测总 RNA 和 mRNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸收值. 琼脂糖凝胶 (缓冲液为 TAE) 电泳检测总 RNA 完整性.

1.6 RT-PCR 反应

依照试剂盒操作指南进行. 总反应体系 50 μ l, 反转录条件为 48 $^{\circ}$ C 反应 45 min. cDNA 产物 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min 后, 按下列顺序在 PCR 仪中扩增: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环后, 68 $^{\circ}$ C 维持

7 min. 取 5 μ l, 反应物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物.

1.7 感受态细胞的制备和转化

碱裂解法制备质粒 DNA, 从低熔点琼脂糖中回收 DNA 片段, 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化均参照文献 [6] 方法进行.

1.8 MK 基因的克隆与酶切鉴定

载体 pBV221 用 Nco I 消化, DNA 聚合酶大片段 (Klenow) 补平 5' 端, 再用 Sal 消化, 分离回收 3.6 kb 片段. MK 扩增产物经 Sal I 消化分离回收 400 bp 片段, 将两片段连接, 用 CaCl₂ 转化法^[6]导入 *E. coli* DH5 α 中, 重组子命名为 pBMK (图 1). 用 EcoR I 和 Sal I 双酶切消化, 鉴定是否有插入片段.

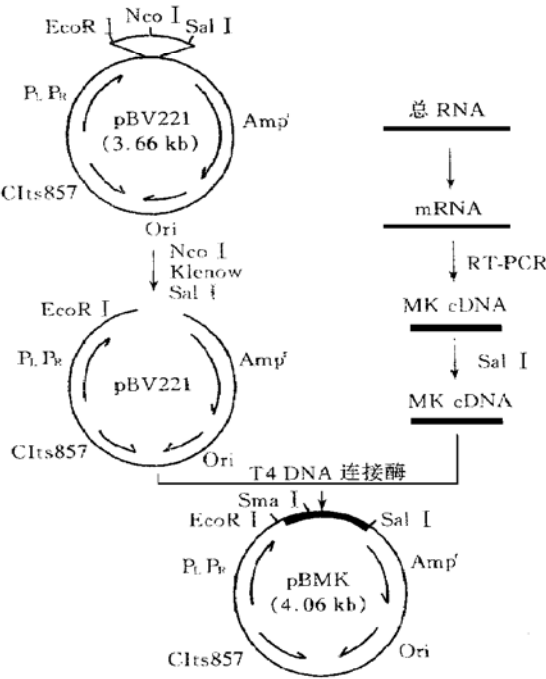


图 1 质粒 pBMK 的构建

1.9 MK 的诱导表达和鉴定

pBMK 32 $^{\circ}$ C 培养至对数期 ($A_{600} = 0.8$) 时, 立即置于 42 $^{\circ}$ C 水浴中振荡培养 4 h, 取样进行 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[6]. 采用凝胶成像分析系统进行表达量的分析.

1.10 重组 MK 核苷酸测序

测序质粒的构建见图 2. 将 pGEM-7Zf (+) 用 BamH I 消化, Klenow 补平 5' 端, 再用 EcoR I 消化, 分离回收 3 kb 片段. pBMK 用经 Sal I 消化, Klenow 补平 5' 端, 再用 EcoR I 消化, 分离回收 400 bp 片段, 将两片段连接, 用 CaCl₂ 转化法导入大肠杆菌 DH5 α . 蓝白筛选法^[6] 挑选白色克隆提质粒, 用 EcoR I 和 Sma I 酶切鉴定是否有插入片段. 重组子命名为 pGMK. 然后用双脱氧链终止法按照 T7 测序试剂盒操作指南进行测序分析.

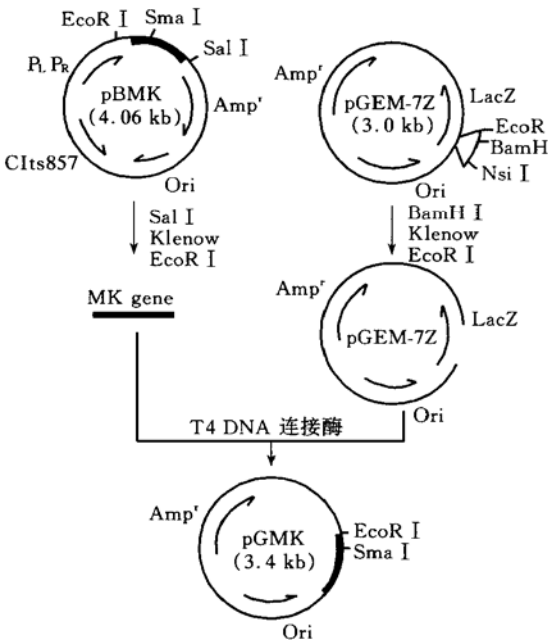


图 2 质粒 pGMK 的构建

2 结 果

2.1 模板 RNA 的制备

所提取的总 RNA 经紫外分光光度计所得 $A_{260}/A_{280} = 2.03$, 总 RNA 电泳检测, 观察 28 S 和 18 S 的比值约为 2: 1, 进一步纯化的 mRNA $A_{260}/A_{280} = 1.4$.

2.2 RT-PCR 产物鉴定

RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见一条清晰的 400 bp 条带 (图 3), 符合 MK 成熟肽基因的长度.

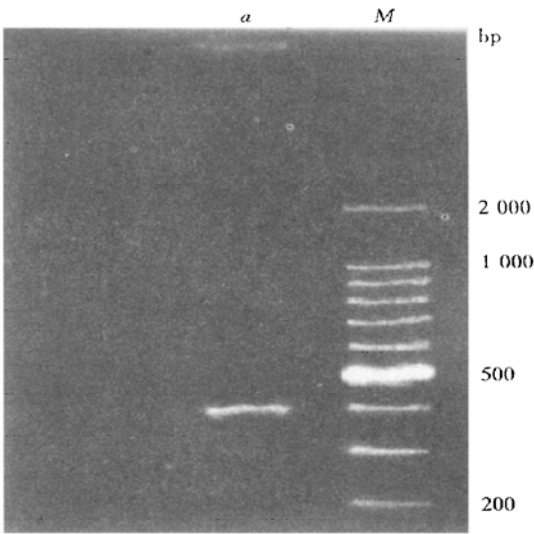


图 3 RT-PCR 产物的琼脂糖分析

M: 核酸分子质量标准; a: MK 基因扩增产物.

2.3 MK 基因的构建与酶切鉴定

本文采用一平一粘的定向克隆, 挑选 6 株单菌落提质粒分别用 EcoR I 和 Sal I 双酶切鉴定, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 6 株克隆子均切下 400 bp 的片段, 为阳性克隆.

2.4 MK 的基因表达

含 pBMK 重组子的大肠杆菌 DH5 α 温度诱导后, 进行 5% SDS- PAGE, 出现约 16 ku 表达蛋白. 初步研究表明表达产物为包涵体的形式, 表达量达 23% 以上 (图 4).

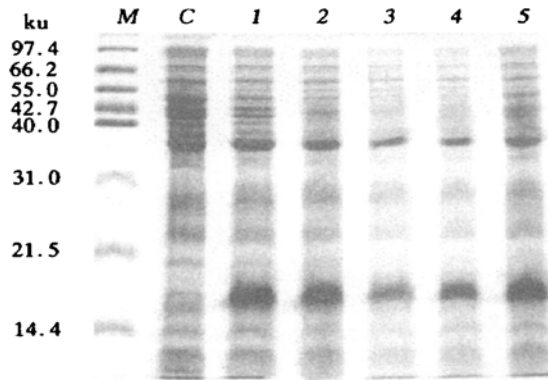


图 4 MK 表达产物的 SDS PAGE 分析

M: 蛋白相对分子质量标准; C: 未诱导; 1~ 5: 诱导表达菌株.

2.5 MK 基因序列分析

基因序列为:

阳性克隆进行测序, 结果见图 5, 成熟肽

```

AAAAAGAAAGATAAGGTGAAGAAGGGCGGCCCGGGGAGCGAGTGCGCTGAGTGG
GCCTGGGGGGCCCTGCACCCCCAGCAGCAAGGATTGCGGCGTGGGTTTCCGCGAG
GGCACCTGCGGGGCCAGACCCAGCGCATCCGGTGACAGGTGCCCTGCAACTGG
AAGAAGGAGTTTGGAGCCGACTGCAAGTACAAGTTTGAGAACTGGGGTGCGTGT
GATGGGGGCACAGGCACCAAAGTCCGCCAAGGCACCCTGAAGAAGGCGCGCTAC
AATGCTCAGTGCCAGGAGACCATCCGCGTCACCAAGCCCTGCACCCCCAAGACC
AAAGCAAAGGCCAAAGCCAAGAAAGGGAAGGGAAGGACTAG
  
```

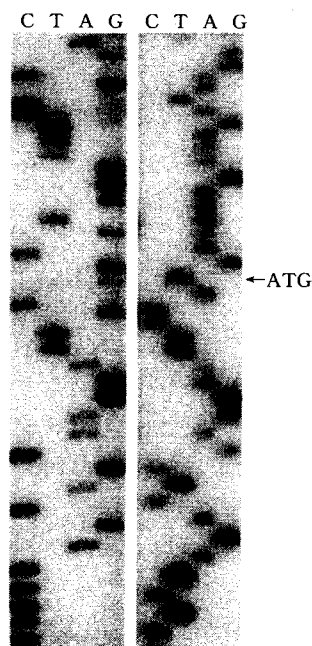


图 5 MK 基因测序结果

胚胎发育和器官分化. 在临床应用方面, MK 能促进神经细胞增生, 加快轴突分枝提示我们用 MK 治疗某些幼儿神经系统疾病的可能性. 另外, MK 在极低浓度下可以抑制多种肿瘤细胞生长而不诱导粒细胞分化, 可以探索利用 MK 治疗恶性肿瘤. 并可以考虑 MK 基因作为一种肿瘤标志用于多种毒性肿瘤的临床诊断.

在实验过程中, 总 RNA 模板 A_{260} 与 A_{280} 的比值表明总 RNA 基本无蛋白质污染, 总 RNA 电泳表明模板的完整性好, 为获得完整的 cDNA 奠定了基础, 有利于目的基因的获得. mRNA 中 A_{260} 与 A_{280} 的比值小于 2, 但实验结果表明并未影响目的基因的获得.

本文通过提取总 RNA, 进行纯化得到 mRNA, 运用 RT-PCR 的方法, 得到了特异性高重复性较好的 PCR 产物. 但是以 RNA 为模板直接进行 RT-PCR 也不乏成功的例子. 笔者也曾以总 RNA 为模板经 RT-PCR, 得到了约 900 bp 的片段, 推测为基因组 DNA 的污染, 即得到的产物含基因组内含子, 远大于目的基因的长度. 解决这一问题有两种方法: 一是用无 RNA 酶的 DNA 酶消化模板, 二是用 oligo (dT) -cellulose 纯化得到 mRNA, 两种方法比较, 后者更行之有效, 因为目前商品化的无 RNA 酶的 DNA 酶也难保证没有 RNA 酶的污染, 因此, 我们用 mRNA 作模板取得了较好效果.

基因测序表明, 本实验中获得的 MK 基因与 Tomomura^[3]所得的 MK 基因序列完全相同, 无突变发生.

3 讨 论

目前国外已对小鼠 MK 基因在发育不同时期的表达进行了较深入的研究, 在怀孕第 7 天至第 13 天的胚胎小鼠中有较广泛的基因表达, 在怀孕第 15 天的胚胎小鼠中, MK 仅在肾脏表达. MK 在肿瘤细胞中有不同程度的表达, 研究表明, 维甲酸 (retinoic acid) 在诱导胚胎癌 (embryonal carcinoma, EC) 细胞分化时, 可见在分化早期 mRNA 含量大大增加^[1], 本文从中孕期胚胎中获得了 MK 基因并克隆表达, 对它的研究有助于更深入地了解

本文所采用的载体 pBV221 是含有 P_{LPR} 启动子的一种温度诱导型表达载体, 所建立的 MK 工程菌, 与含有 lac、tac 启动子需昂贵且有毒性 IPTG 诱导的工程菌相比, 大量生产具有更大的优越性。MK 的蛋白纯化及活性检测工作将另文发表。

致谢 感谢王永立先生提供的引物与 Pharmacia 公司为本实验提供的 T7 测序试剂盒。

参 考 文 献

- 1 Kadomatsu K, Tomomura M, Muramatsu T. cDNA clone and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in midgestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **151** (3): 1312~1318
- 2 Jun-ichiro T, Uehara K, Kadomatsu K *et al.* A new family of heparin-binding factors; strong conservation of Midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **176** (5): 792~797
- 3 Tomomura M, Kadoatsu K, Nakamoto M *et al.* A retinoic acid responsive gene, MK, produces a secreted protein with heparin binding activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, **171** (2): 603~609
- 4 Kadomatsu K, Huang R P, Suganuma T *et al.* A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol*, 1990, **110** (3): 607~616
- 5 Maruta H, Bartlett P F, Nurcombe V *et al.* Midkine

(MK), a retinoic acid (RA) -inducible gene product; produced in *E. coli*, acts on neuronal and HL 60 leukemia cells. *Growth Factors*, 1993, **8** (2): 119~134

- 6 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社. 1993. 55~56

Construction of a High Level Expression Vector of Midkine and Its Expression in *E. coli*.

XUE Yong-tao, HUANG Wei-jin, SHI Bin, CHEN Bin-fu, JU Gong (*Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract A newly identified gene MK, specifies for a heparin binding factor, is transiently expressed in the midgestation period of embryogenesis and in the early stages of embryonal carcinoma cell differentiation. In late embryos and the adult, MK gene is expressed only in the kidney. MK plays decisive roles not only in growth regulation but also in regulation of cell differentiation. The encoding sequence of mature peptide of MK was obtained by RT-PCR from human fetal kidney and was cloned into pBV221, after transferring into *E. coli*. A highly expressed vector of MK was constructed.

Key words Midkine, gene, clone, expression

I-A^k 基因克隆转导及对肿瘤细胞成瘤的影响

丁广治 田 军 刘元林 章扬培 毛 宁

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用 RT-PCR 方法合成小鼠 MHC II 类分子 I-A^k 基因 α 和 β 链 cDNA, 插入逆转录病毒载体 pLSXN, 构建 I-A^k α 和 I-A^k β 表达载体, 采用脂质体介导的重组质粒转移方法将 I-A^k α 和 I-A^k β 基因导入 EL4 小鼠淋巴瘤细胞和 P815 小鼠肥大细胞瘤细胞, 经流式细胞仪检测在细胞表面有 I-A^k 表达。将以上两种细胞注射到同源小鼠 C57BL/6 (H-2^d) 皮下, 观察到肿瘤产生后又消退, 证明在肿瘤细胞中单独导入同种异型 MHC II 类分子基因也能激活肿瘤的细胞免疫, 为进一步开展肿瘤的基因治疗奠定了基础。

关键词 MHC II, 肿瘤, 基因转移

学科分类号 Q78