

研究工作

人成纤维细胞成纤维蛋白质 cDNA 片段的分离及亚克隆

臧 伟 庆

(西北大学生物系分子生物学研究室,西安)

提 要

我们用噬菌斑原位杂交的方法从人成纤维细胞 cDNA 基因库 (λ NMT-pCD-cDNA 重组体)中分离到一株成纤维蛋白质 cDNA 克隆。经限制性内切酶酶切电泳及吸印转移法分析证明这是一个成纤维蛋白质 cDNA 片段克隆,并进一步将此 cDNA 片段克隆到 pBR322 质粒上。

成纤维蛋白质或纤维粘连蛋白 (Fibronectin, FN) 是一种位于血浆和细胞表面的高分子糖蛋白^[1]。它是由两条多肽链构成的二聚体,每条链分子量约为 220,000 道尔顿^[2]。FN 有许多生物学功能,例如:正常细胞形态的维持,培养中的细胞对底物的吸附作用,创伤愈合,细胞的迁移,分化,癌变转化作用,细胞吞噬作用和止血作用等^[3]。有些细胞株在受病毒转化后可以通过降低 FN mRNA 的量来停止合成 FN^[4]。FN 是细胞间质的主要成份,它在肿瘤的形成中大幅度地减小^[5]。在过去几年中,许多实验室对 FN 的表达、功能和结构进行的研究揭示 FN 具有复杂的分子结构,由多个特异性的结合位点组成。现在认为 FN 参与细胞的复杂生物学功能是由其结构决定的。确实在 FN 分子的不同功能区域里发现了可与胶原蛋白、肝素、纤维、细胞表面、细菌和 DNA 结合的位点。FN 可能是至今所知的在结构和功能上最易变的蛋白质^[6]。最近日本理化学研究所分子肿瘤学研究室野田亮博士等发现由 Kirsten 鼠肉瘤病毒 (Ki-MuSV) 转化的一株成纤维细胞 (NIH/3T3) 回复突变子中 FN 水平比转化细胞要高许多倍。为了弄清楚 FN 基因在癌

变转化方面的作用,我们筛选出了人成纤维细胞 FN cDNA 片段克隆,并将 FN cDNA 片段进一步克隆到 pBR322 质粒上。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. λ -NMT-pCD-cDNA 重组体和宿主菌 *E. coli* J. 8679 由日本理化学研究所分子肿瘤学研究室野田亮博士提供。
2. 质粒 pFH₁ 由野田亮博士赠给。
3. 限制性内切酶等酶制剂: Boehringer-Mannheim, New England Biolabs 以及 Bethesda Research Lab. Inc.。
4. 硝酸纤维素膜: Schleicher 和 Schull 公司。
5. 5'- α [³²P]-dCTP: Amersham 公司。
6. 缺口翻译反应盒: Amersham 公司。

(二) 方法

1. 质粒 DNA 的制备: 用 Davis^[7]的方法将重组质粒转化宿主菌并在其中扩增。用 Maniatis^[8]的方法抽提质粒 DNA。
2. FN cDNA 探针的制备: 重组质粒 (pFH₁) DNA 经 *Hind* III 酶水解,电泳分离,

切出含插 λ 片段的凝胶,用电洗脱以及 Sephadex G-50 柱层析,得到高纯度的 FN cDNA。

FN cDNA 探针的同位素标记按 Rigby^[9]和 Davis^[7]的方法稍加修改进行。反应液的总体积为 20 μ l,反应终止后用 Sephadex G-50 柱层析分离,洗脱液为含有 0.1% SDS 的 TE 缓冲液。收集洗脱液,做液闪检测,收集第一个峰(结合峰),贮于冰箱待用。

3. 宿主菌的培养和重组噬菌斑的获得:将单克隆菌 *E. coli* J. 8679 接种于 5ml L-培养液(另加 0.2% 麦芽糖)中。37 $^{\circ}$ C,振荡过夜。

将上述 5ml 培养过夜的菌液离心(4000 转/分),5 分钟,倾去上清液后加入 5ml SM 液,摇匀。取此菌悬液 1ml 与 10^3 pfu 的 λ -NMT-pCD-cDNA 重组噬菌体混和,37 $^{\circ}$ C,温育 20 分钟,将混和液与 15ml 47 $^{\circ}$ C 左右上层琼脂培养基混匀,倒在 243 $\times$ 243mm 的四方琼脂底层平板上面,室温放置 10 分钟,37 $^{\circ}$ C,倒置培养 9—12 小时,即可见到透明的噬菌斑。

4. 斑点杂交和噬菌斑原位杂交:将 FN cDNA 液稀释成四种浓度(0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 0.1 μ g/ml)。用 Bio-dot 微量过滤装置进行点样,经处理后使 DNA 样品结合在硝酸纤维素膜上,然后进行分子杂交以作为阳性对照。

将 λ -NMT-pCD-cDNA 重组体和其宿主菌 J. 8679 用倾注平板法培养在方形平板中(243 $\times$ 243mm)。按 Davis^[7]和 Grunstein^[10]的方法转移到硝酸纤维素膜上,经固定处理后进行分子杂交和放射自显影。

5. 单个重组噬菌体的检出及其原液的制备:用灭过菌的竹签将所需单个噬菌斑挑出溶于 1ml SM 液中,加入 2 滴氯仿。噬菌体原液的制备按 Maniatis^[8]的方法。

6. 大量制备 λ 重组噬菌体 DNA:按 Maniatis^[8]的方法。

7. 重组噬菌体 DNA 的多酶水解及吸印转移法(Southern blotting):多酶水解用 Maniatis^[8]的条件。吸印转移按 Southern^[11]的方

法进行。

8. FN cDNA 片段的亚克隆建造:pBR322 经 *Bam* HI 消化后,取 5 μ g 于 100 μ l 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中,经 0.5 个单位细菌碱性磷酸酶 65 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟后,用苯酚抽提两次,氯仿抽提一次,乙醇沉淀后溶解于 TE 缓冲液中用作载体。

重组噬菌体 λ -FN8B₂ DNA 经 *Bam* HI 完全水解后的片段与处理后的 pBR322 载体在 10 μ l 的反应液中进行连接反应。该液中包含 66mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、5mmol/L MgCl₂、5mmol/L 二巯基苏糖醇、1mmol/L ATP、0.8 μ g 上述 λ -FN8B₂ DNA 水解片段、处理过的 pBR 322 (0.2 μ g) 以及 1 μ l T4 DNA 连接酶(10 个单位)。连接反应在 16 $^{\circ}$ C 进行一夜。然后用 50mmol/L CaCl₂ 稀释到 100 μ l。

转化的受体菌为 *E. coli* HB101。将 0.4ml 培养过夜的 HB101 接种于 40ml L-培养液中,剧烈振荡,使其生长达到 $A_{600} = 0.6$ (不能超过 0.7)。离心后用 20ml 冰冷的 50mmol/L CaCl₂ 悬浮,0 $^{\circ}$ C 保持 50 分钟。将以上所得到的连接反应物稀释液(30ng DNA)加至 0.1ml 0.1mol/L Tris (pH 7.2) 和 50 μ g 1ml 胸腺嘧啶混合液中,然后加入 0.2ml 经 CaCl₂ 处理的受体菌细胞。以上反应液在 0 $^{\circ}$ C 冰浴 60 分钟。42 $^{\circ}$ C 热刺激 2 分钟。将反应混合物涂匀在含有 25 μ g/ml 氨苄青霉素的 L-琼脂培养基上,37 $^{\circ}$ C,倒置培养使其长出菌落。最后应用菌落杂交法筛选所需的重组子。

9. 菌落原位杂交:按 Maniatis^[8]的方法稍加修改。用硝酸纤维素滤膜将菌落转移下来,晾干,经碱变性和中和处理滤膜后,80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2 小时。最后与探针进行分子杂交和放射自显影。

10. 琼脂糖凝胶电泳:采用 0.6% 的琼脂糖凝胶,电泳缓冲液为:0.089mol/L Tris, 0.089mol/L 硼酸, 0.002mol/L EDTA (TBE),电泳后,将凝胶在含 EtBr (菲啉溴红) (0.5 μ g/ml) 的 TBE 缓冲液中浸泡 20 分钟,紫外灯下观察结果并照相。

结果与讨论

(一) FN cDNA 探针的制备

0.3 μ g FN cDNA 片段经缺口翻译后所得探针的比放射性强度为 8.6×10^7 cpm/ μ g。

(二) 用噬菌斑原位杂交筛选阳性克隆

经过三至四个循环的菌斑原位杂交,我们从 λ -NMT-pCD-cDNA 基因库中共获得了十五株单一纯化 λ -FN 重组噬菌体。pCD 重组质粒的组成图见图 1。

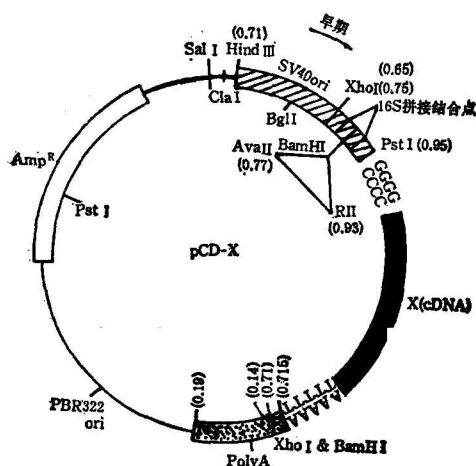


图 1 pCD-cDNA 组成结构图 (Hiroto Okayama, 1983)

在噬菌斑原位杂交中,我们采用斑点杂交结果做为阳性对照,这样可以验证实验结果是

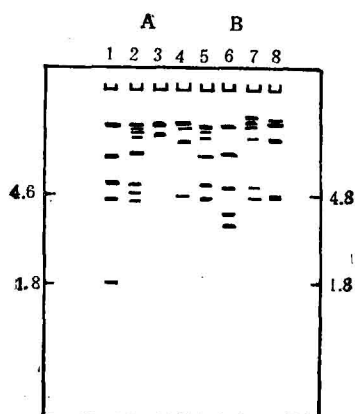


图 2 限制性内切酶切片段电泳图

A: λ -FN8B₂ DNA B: λ -FN15B₂ DNA

1, 5: BamHI 2, 6: EcoRI 3, 7: HindIII 4, 8: SalI

否正确。

(三) λ -FN 重组噬菌体 DNA 的分析

我们从纯化了的十五株重组噬菌体中挑选了两株 (λ -FN8B₂ 和 λ -FN15B₂) 进行分析。

1. 限制性内切酶酶切图谱分析: 分别用 BamHI、EcoRI、Hind III 和 Sal I 四种限制性内切酶对 λ -FN8B₂ 和 λ -FN15B₂ DNA 进行完全酶解,其电泳图如图 2 所示。

2. 吸印转移法分析 (Southern blotting): 以上电泳凝胶经吸印转移法转移到硝酸纤维素滤膜上,通过与探针 pFH₁ 进行分子杂交、放射自显影后所得的结果如图 3。

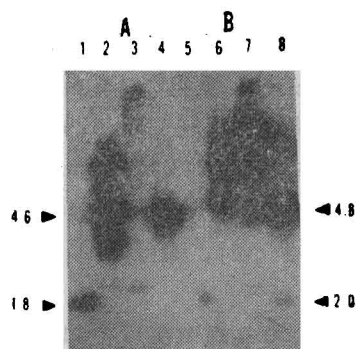


图 3 吸印转移法分析结果

A: λ -FN8B₂ B: λ -FN15B₂

1, 5: BamHI 2, 6: EcoRI 3, 7: HindIII 4, 8: SalI

将酶切电泳照片和吸印转移分析的放射自显影底片进行对照,并参照文献 [12—16],我们绘出了重组噬菌体 λ -FN8B₂ 的限制性酶切图谱,见图 4。

从图 4 中可知,要分离 FN cDNA 片段,应选用 λ -FN8B₂ DNA 的 BamHI 完全水解产物来进行分子克隆。

(四) λ -FN8B₂ 中 FN cDNA 片段的亚克隆

1. 以 pBR322 为载体, HB101 为受体菌,将 FN cDNA 片段进行克隆。通过菌落原位杂交来检测阳性克隆。

2. 用 Maniatis^[13] 的快速质粒提取法抽提阳性克隆质粒,用 BamHI 酶水解后电泳,并用吸印转移法将电泳凝胶上的 DNA 转移到硝酸纤

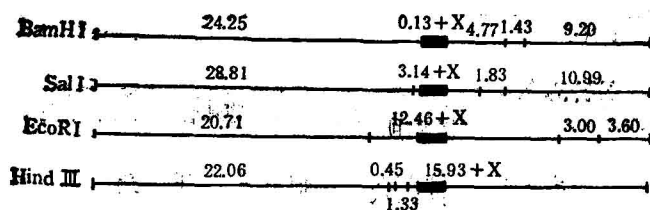


图4 λ -FN8B₂ 的限制性酶切图谱

图中细线表示载体 DNA, 粗线表示 FN cDNA 片段(插入片段)

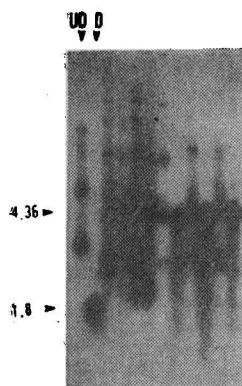


图5 吸印转移法分析结果

D: 酶解的重组质粒

UD: 未经酶解的重组质粒

纤维素滤膜上, 结果如图5所示。从图5中我们可以看出 1.8 kb 的 FN cDNA 片段已经被克隆到 pBR322 质粒上。

由此, 我们可以进一步对此 FN cDNA 片段进行精细分析, 并且还可利用其转化癌细胞以了解 FN 基因对癌细胞的影响, 研究癌细胞回复突变后细胞内 FN 增多的机制。

(上接第 27 页)

- [4] Poo, M. and Cone, R. A.: *Nature*, 1974, 247, 438.
- [5] Peters, R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 367, 282.
- [6] Thomas, D. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1975, 72, 1729.
- [7] Cherry, R. J. et al.: *Nature*, 1976, 263, 349.
- [8] Poo, M. et al.: *J. Cell Biol.*, 1978, 76, 483.
- [9] 胡坤生: 《生物化学与生物物理进展》1986, (5), 14.
- [10] Liebman, P. A. and Entine, G.: *Science*, 1974, 185, 457.
- [11] Tan Man-qi, Hu Kun-sheng, Zhao Dong-po: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 1981, 68, 277.
- [12] Fowler, V. and Branton, D.: *Nature*, 1977, 268, 23.
- [13] Koppel, D. E. and Sheetz, M. P.: *Nature*, 1981, 293, 159.
- [14] Poo, M.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, 10, 245.

此工作是作者在日本理化学研究所分子肿瘤学研究室进修时完成的。本文是在林培懋先生指导下列写的, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Kornblihtt, A. R. et al.: *EMBO J.*, 1984, 3 (1), 221.
- [2] Umezawa, K. et al.: *FEBS Lett.*, 1985, 186(1), 31.
- [3] Hynes, Richard O. et al.: *J. Cell Biol.*, 1982, 95, 369.
- [4] Kornblihtt, Albert R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3218.
- [5] Matsuura, H.: *Biochemistry*, 1985, 82, 6517.
- [6] Yamada, K. M.: *Annu. Rev. Biochem.*, 1983, 52, 761.
- [7] Davis, R. W. et al.: *Advanced Bacterial Genetics*, C. S. H. 1980.
- [8] Maniatis, T.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, C. H. S. 1982.
- [9] Rigby, P. W. J.: *J. Mol. Biol.*, 1977, 113, 237.
- [10] Grunstein, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 75, 3961.
- [11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503.
- [12] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1985, 5, 1136.
- [13] Fiers, W. et al.: *Nature*, 1978, 273, 113.
- [14] Reddy, V. B. et al.: *Science*, 1978, 20, 494.
- [15] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1983, 3, 230.
- [16] Beck, E. et al.: *Gene*, 1982, 19, 327.

[本文于 1987 年 3 月 18 日收到]

- [15] Sowers, A. and Hackenbrock, C. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 78, 6246.
- [16] Axelrod, D. et al.: *Biophys. J.*, 1976, 16, 1055.
- [17] Wey, L-L. et al.: *Biophys. J.*, 1981, 33, 225.
- [18] Edidin, M. et al.: *Science*, 1976, 191, 466.
- [19] Schlessinger, J. et al.: *Science*, 1977, 195, 307.
- [20] Axelrod, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1976, 73, 4594.
- [21] Schlessinger, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1977, 74, 2909.
- [22] Schlessinger, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1978, 75, 5353.
- [23] Poo, M. et al.: *Biophys. J.*, 1979, 26, 1.

[本文于 1987 年 4 月 3 日收到]