

对其有不同的反应,造成不同的生理生化事件.另有资料表明^[7],NaBu 还可通过特异的 DNA 序列调节基因的表达,即 NaBu 本身作为特异的调节因子,修饰特异的转录调节蛋白,从而影响它们与启动子结合蛋白之间的作用.究竟什么转录调控因子参与了 NaBu 诱导 2BS 细胞凋亡过程中 p21^{WAF1} 的表达下调尚有待研究.

总之,细胞凋亡的诱发是一个多途径、多步骤的复杂过程,涉及许多基因和生化事件.目前正在用正、反义 p21^{WAF1} 转染的 2BS 细胞,进一步研究 p21^{WAF1} 在人胚肺二倍体成纤维细胞凋亡中的作用.

参 考 文 献

- 1 Freeman R S, Estus S, Johnson E M. Analysis of cell cycle related genes in post-mitotic neurons: Selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*, 1994, **12** (3): 343~ 355
- 2 Pandey S, Wang E. Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2 and RB phosphorylation, resembling events of early cell cycle traverse. *J Cell Biochem*, 1995, **58** (2): 135~ 150
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156~ 159
- 4 Park D S, Levine B, Ferrari G, *et al.* Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*, 1997, **17** (23): 8975~ 8983
- 5 Matsushita H, Morishita R, Kida I, *et al.* Inhibition of growth of human vascular smooth muscle cells by overexpression of p21 gene through induction of apoptosis. *Hypertension*, 1998, **31** (1-2): 493~ 498
- 6 Xiao H, Hasegawa T, Miyaishi O, *et al.* Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21^{WAF1}/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237** (4): 457~ 460

- 7 Fregeau C J, Helgason C D, Bleackley R C. Two cytotoxic cell proteinase genes are differentially sensitive to sodium butyrate. *Nucleic Acids Res.* 1992, **20** (12): 3113~ 3119

The Expression of p21^{WAF1} During Sodium Butyrate-induced Apoptosis in Human Fibroblast. HUANG Ying, ZHANG Zong-Yu, TONG Tarr-Jun (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract During the process of sodium butyrate (NaBu) -induced apoptosis in 2BS cells, p21^{WAF1} gene expression decreased obviously and gradually, bcl-2 gene expression did not decrease until apoptosis happened, c-myc and c-fos genes expression enhanced, while p53 and HER-2 genes expression had no obvious change. To analyze the change of p21^{WAF1} promoter activity, 2BS-WP cells were used, which were stably transfected with pDOR-WPs that containing different length of p21^{WAF1} promoter followed by green fluorescence protein (GFP) report gene. The results showed that the level of GFP expression decreased during NaBu induction, and the main regulating region was 0~ - 800 bp at upstream of TATA box of p21^{WAF1} promoter. It is suggested that down-regulation of p21^{WAF1} promoter activity was involved in the process of NaBu-induced apoptosis in 2BS cells, which was possibly p53-independent.

Key words apoptosis, gene expression, p21^{WAF1}, sodium butyrate

受精鸡蛋卵黄中 DNA 和 RNA 的分布*

雷海新 于 雷 孙立军 陈楚楚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 通过对受精未孵育鸡蛋卵黄的不同部位加以考查,发现 DNA 和 RNA 在卵黄中的分布是广泛存在的;采用荧光试剂 Hoechst33258 和 RiboGreen 对 DNA 和 RNA 进行定量分析,结果表明:DNA 在不同部位卵黄中的分布比较均匀,且主要存在于卵黄颗粒中,而 RNA 的含量在胚下表层卵黄、侧面和植物极中有较大差异.

关键词 受精鸡蛋, 卵黄, DNA 定位, RiboGreen

学科分类号 Q344

* 国家自然科学基金资助项目 (39670361). Tel: (010) 64888568, E-mail: beisz@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-07-13

人们早已知道鸡蛋卵黄中除了有蛋白质、脂类和多种无机盐等物质外还含有 DNA 和 RNA 成分^[1], 并在鸡早期胚细胞内的卵黄颗粒中发现了 DNA 的存在, 通过测定得知这一部分的 DNA 含量大大超出了核 DNA, 并且是不同于线粒体 DNA 的线性分子^[2,3]. 本实验室前期的工作^[4,5]主要是侧重于对受精未孵育鸡蛋胚下卵黄的考查, 并已证明胚下表层卵黄的卵黄颗粒中含有 DNA 成分, 在此工作基础上本文进一步对 DNA 在受精鸡蛋卵黄不同部位的存在情况作全面的分析. 此外, 本实验室对胚下表层卵黄颗粒中所含 DNA 的性质进行的初步研究^[6]表明该 DNA 是一种甲基化程度较低的 DNA 分子, 这预示着卵黄 DNA 可能具有较高的转录活性, 因而有必要对卵黄中是否存在 RNA 以及其在卵黄不同部位的分布情况加以考查.

1 材料与方法

1.1 材料

受精未孵育鸡蛋京白 939, 由北京西北旺种蛋场提供; 蛋白酶 K, Merck 公司生产; SDS, 反式-1, 2-二氨基环己烷四乙酸 (CDTA), Hoechst33258, 酵母 RNA, 均为 Sigma 公司产品; RiboGreen 购自 Molecular Probes 公司; Ficoll, Pharmacia 公司生产; 异硫氰酸胍, 氯化锂为国产.

1.2 方法

1.2.1 卵黄成分的分离: 用分蛋器将受精鸡蛋的卵黄和卵清分开, 调整卵黄位置, 使胚盘朝上, 剪去胚盘, 去除部分胚盘正下方的卵黄, 随后吸取卵黄 0.5 ml; 或使胚盘朝下, 或朝侧面, 分别吸取植物极或侧面的卵黄 0.5 ml, 悬浮于预冷的 4 倍体积 PB (0.1 mol/L NaHPO₄; pH 7.4) 中, 小心并充分混匀, 于 2 100 g 离心 10 min, 所得沉淀为组分 P₁; 上清中加入 0.4 体积的双蒸水 (ddH₂O), 混匀后于 2 100 g 离心 10 min, 沉淀为组分 P₂, 上清为组分 S. 将两次所得沉淀分别用 PB 悬浮, 与组分 S 一起做显微镜检.

1.2.2 卵黄中 DNA 的提取、电泳检测和回收量的测定: 将组分 P₁、P₂ 分别悬浮于缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 50 mmol/L EDTA-Na₂; 5 mmol/L CaCl₂) 中, 加蛋白酶 K 至终浓度 1 g/L, SDS 至 1%, 55℃温育 5 h, 随后用 Tris 饱和苯酚抽提两次, 氯仿抽提一次, 用等体积异丙醇于 -20℃沉淀 1 h 后于 5 000 g 离心 5 min, 70% 乙醇清洗一次, 真空抽干后溶于 TE 中; 将所得

DNA 在含有溴化乙锭的 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 0.5 × TBE, 电压为 2.5 V/cm, 电泳后紫外灯下观察; 利用 Hoechst33258 荧光分光光度法, 以 λDNA 为标准, 测定 DNA 的含量^[7].

1.2.3 卵黄中 RNA 的提取和检测: 用注射器吸取 3 ml 卵黄, 注入含 12 ml 缓冲液 R (50 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 5 mmol/L CDTA, pH 8.0; 1% SDS; 200 mg/L 蛋白酶 K) 的 50 ml 离心管中, 剧烈振荡后于 37℃水浴温育 1 h, 间或混匀之; 加入等体积的水饱和酚 (pH 4.0): 氯仿 (1:1) 抽提, 4℃, 12 000 g 离心 15 min, 上清转管后重复酚: 氯仿抽提一次; 上清转管, 加入 8 mol/L LiCl, 混匀后置于 -20℃至少 12 h; 4℃, 12 000 g 离心 30 min, 沉淀用 75% 乙醇清洗一次; 4℃, 12 000 g 离心 15 min, 沉淀真空抽干后溶于 100 μl TE 中 (以上所有用具和溶液均经预先处理以去除 RNase 活性, 操作均在 4℃进行). 所得样品在含 20 mmol/L 异硫氰酸胍和溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶中电泳^[8].

1.2.4 线粒体 RNA 的排除 (以下操作在 4℃下进行).

a. 鸡胚线粒体的提取: 取孵化 8 d 的鸡胚, 去头后用 0.9% NaCl 溶液清洗数次, 用剪刀将鸡胚剪碎, 再用 0.9% NaCl 溶液清洗, 去除血凝块和生理盐水后称重, 按 1:1 的比例添加匀浆缓冲液 (0.1 mol/L 蔗糖; 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 10 mmol/L EDTA), 用玻璃匀浆器充分匀浆, 合并匀浆液, 2 000 g 离心 10 min, 上清转管后于 15 000 g 离心 20 min, 所得沉淀即为鸡胚线粒体^[9].

b. 线粒体 RNA 的排除: 取 3 ml 卵黄, 注入匀浆器中, 加入适量匀浆缓冲液后进行匀浆, 将匀浆液转至离心管中; 另取 3 ml 卵黄, 注入匀浆器中, 加入适量匀浆缓冲液后再加入一定量上述鸡胚线粒体, 匀浆并将匀浆液转至离心管中; 4℃, 1 500 g 离心 10 min, 将中间液层转管后于 4℃, 12 000 g 离心 20 min, 小心去除上清; 加入 400 μl 缓冲液 R 重悬沉淀, 转至 Eppendorf 管中后剧烈振荡, 于 37℃温育 1 h; 用水饱和酚: 氯仿 (1:1) 抽提两次, 上清转管后加入等体积 8 mol/L LiCl, 混匀后置于 -20℃过夜; 4℃, 12 000 g 离心 30 min, 沉淀用 75% 的乙醇清洗一次, 干燥后溶于 50 μl TE 中; 用 1.2.3 中所述电泳检测结果.

1.2.5 卵黄不同部位 RNA 的提取和含量测定:

类似 1.2.1 中所述, 分别从 6 个受精鸡蛋的胚下, 侧面和植物极吸取对应部位卵黄 3 ml (每个鸡蛋取 0.5 ml) 用于卵黄 RNA 的提取. RNA 含量测定以酵母 RNA 为标准, 采用对 RNA 具有高度特异性的荧光试剂 RiboGreen 进行测定. 具体方法 (RiboGreenTM RNA quantitation reagent and kit. Molecular Probes-Product information sheet, MP 11490 08/18/97) 如下: 将 RNA 样品用 TE 作适当稀释后取 1 ml 与等体积 1:2 000 稀释的 RiboGreen 试剂混匀, 于黑暗中放置 3 min 后在激发和发射波长分别为 480 nm 和 520 nm 的条件下测定并记录数据.

2 结果与讨论

2.1 卵黄成分的分离

卵黄经过两次离心操作后, 分成 P₁、P₂ 及 S 三个组分, 经过显微镜检查表明 P₁ 为完整的卵黄球; P₂ 为卵黄球破裂后所释放出来的卵黄颗粒, 而组分 S 只含有少量的脂滴, 既不含有卵黄球, 也不存在卵黄颗粒 (图 1).

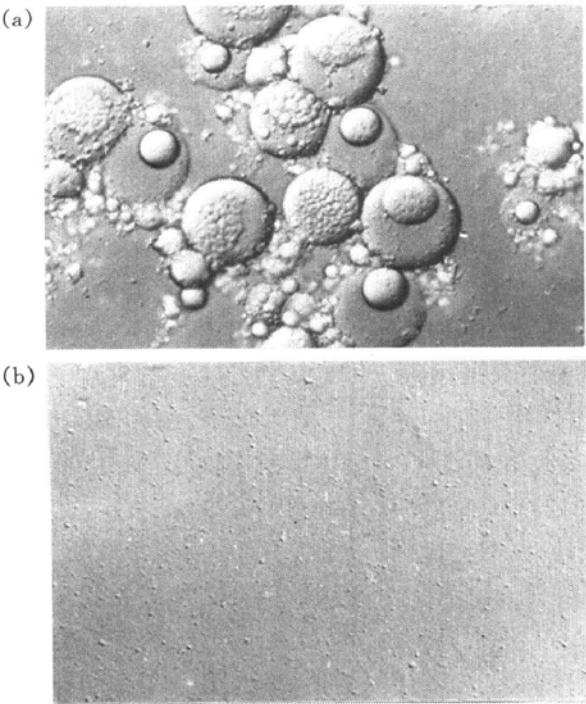


图 1 卵黄中的 P₁ 和 P₂ 组分
(a) 组分 P₁; (b) 组分 P₂.

2.2 卵黄 DNA 的电泳检测

将从组分 P₁、P₂ 提取所得产物进行电泳, 紫外灯下观察可见均相应于 λ DNA Hind III/EcoR I 分子质量标准 21 kb 处, 即都是大分子质量的

DNA 分子 (图 2).

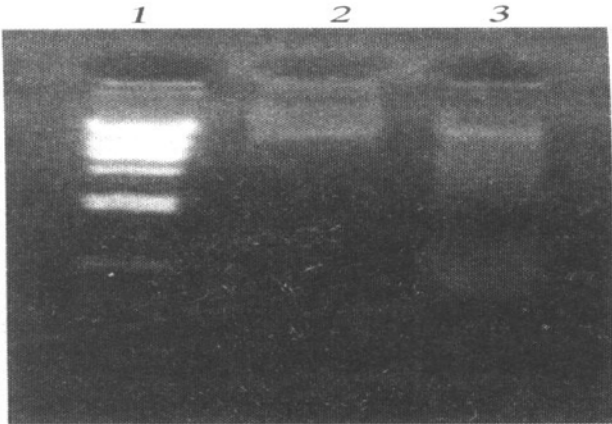


图 2 卵黄 DNA
1: λ DNA Hind III/EcoR I 分子质量标准; 2、3: 分别为从组分 P₁、P₂ 中提取所得 DNA.

2.3 受精未孵育鸡蛋卵黄不同部位的 DNA 含量
利用 Hoechst33258 荧光分光光度法测定受精鸡蛋不同部位的卵黄中所获得 P₁、P₂ 组分中 DNA 的含量, 结果如表 1 所示.

卵黄部位	DNA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			RNA 含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	组分 P ₁	组分 P ₂	P ₁ +P ₂	
胚下表层	8.7	53.8	62.5	0.43
侧面	11.3	52.5	63.8	2.87
植物极	15.8	55.0	70.8	3.63

另外, 考虑到 P₁ 部分的卵黄球可能杂有线粒体成分, 所以我们对从受精未孵育鸡蛋的卵黄中所获得的 P₁ 部分进行 Ficoll 不连续梯度离心^[10], 去除可能掺杂的线粒体, 之后从所获得的纯净卵黄球中提取 DNA, 结果还是没有明显的减少, 这表明组分 P₁ 中线粒体的影响是很小的. 另外我们还将组分 P₁ 用双蒸水充分裂解, 之后回收卵黄颗粒, 再从卵黄颗粒中提取 DNA, 也发现 DNA 的数量没有显著的减少. 结合表 1 中数据和以上实验的结果, 可以认为卵黄的不同部位都有 DNA 的存在, 其含量没有明显的差异, 并且该 DNA 成分主要是存在于卵黄颗粒之中的, 由此我们可以推断该 DNA 的来源与卵黄颗粒的生物发生过程可能是密切相关的.

2.4 卵黄 RNA 的特异性

将从卵黄中提取所得 RNA 与胚 RNA 进行电泳, 紫外下观察可见卵黄 RNA 的电泳图谱与胚 RNA 明显不同, 仅表现出一条较宽的 RNA 带 (图 3).

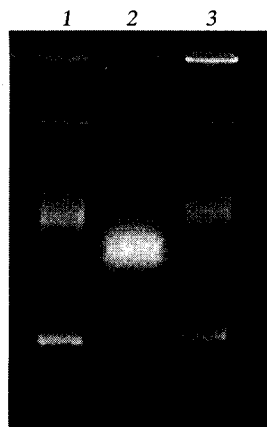


图3 卵黄 RNA 的特异性

1、3: 受精鸡蛋中的胚 RNA; 2: 卵黄 RNA.

2.5 卵黄 RNA 的可能来源

卵黄 RNA 的可能来源包括以下方面: a. 母体 RNA, 它们是在卵子形成过程中由母体产生的, 对卵子的发育、成熟以及受精卵的分裂分化有重要作用; b. 由于卵黄 DNA 在卵黄中的普遍存在, 而且是一种甲基化程度较低的 DNA 分子, 它可能具有较高的转录活性^[6], 因此我们推测卵黄 RNA 中除母体 RNA 成分外, 可能还有一部分来自于卵黄本身所含 DNA 成分的转录产物. 其中我们特别感兴趣的是是否存在由卵黄 DNA 直接转录而来的卵黄 mRNA 以及它们的功能, 但这还需要进一步探讨. 另外, 考虑到卵黄中可能掺杂有线粒体, 我们用内参法进行了线粒体 RNA 的排除实验, 即同时用鸡胚线粒体、卵黄与不同比例的鸡胚线粒体混合物以及卵黄进行线粒体 RNA 的提取, 结果如图 4 所示, 从鸡胚线粒体中可以提取到大量的线粒体 RNA, 而卵黄与不同比例鸡胚线粒体的混合物中

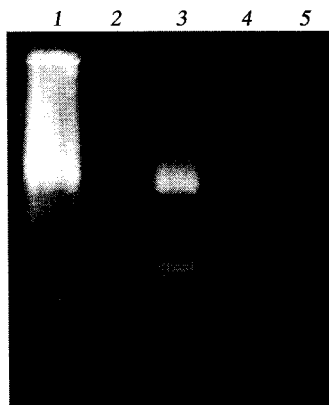


图4 内参法排除线粒体 RNA 的干扰

1: 鸡胚线粒体 RNA; 2、3: 卵黄与鸡胚线粒体混合物中提取所得 RNA, 2 中加入 1 份鸡胚线粒体, 3 中加入 5 份鸡胚线粒体; 4、5: 从卵黄中直接提取线粒体 RNA 的结果.

提取得到的线粒体 RNA 的量与所添加的鸡胚线粒体的量成正比, 这表明我们所采用的方法对卵黄中可能掺杂有的线粒体 RNA 有较好的分离效果. 使用同样的方法对卵黄进行线粒体 RNA 的提取没有得到阳性结果, 同时卵黄 RNA 的电泳图谱也与线粒体 RNA 有明显区别 (图 5), 这些都表明卵黄中可能含有的线粒体并非是卵黄 RNA 的来源.

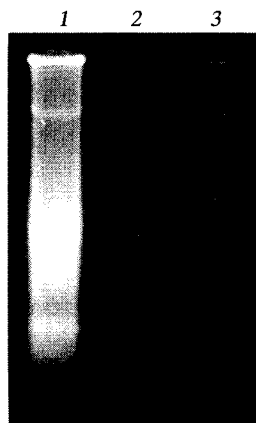


图5 卵黄 RNA 与鸡胚线粒体 RNA 的电泳图谱

1: 鸡胚线粒体 RNA; 2: 卵黄 RNA; 3: 受精鸡蛋胚 RNA.

2.6 受精鸡蛋卵黄不同部位的 RNA 含量

本实验中 RNA 的定量采用荧光试剂 Ribo-Green 进行, 与传统的 A_{260} 紫外吸收法相比, 该法具有灵敏度高, 相对不受核酸提取过程中常见混杂物的干扰 (RiboGreen™ RNA quantitation reagent and kit. Molecular Probes-Product information sheet, MP 11490 08/18/97). 利用此法对从受精鸡蛋胚下表层、侧面和植物极卵黄提取所得 RNA 进行定量的结果如表 1 所示. 与卵黄 DNA 在卵黄中呈现均匀分布不同的是卵黄 RNA 的分布表现为胚下表层卵黄中含量明显较低, 侧面和植物极卵黄中 RNA 含量高. 卵黄 RNA 的这一分布特征可能与 RNA 的功能定位有关.

DNA 作为遗传物质, 在卵黄中的广泛存在可以认为是 DNA 的一种独特存在方式, 我们对卵黄 DNA 的一些特性分析已经表明它具有不同于核 DNA 的特征, 对卵黄中 DNA 和 RNA 的分布以及含量测定为进一步探讨卵黄 DNA 与核 DNA、卵黄 RNA 之间的关系以及其存在的意义和功能, 卵黄 RNA 在卵黄中的特异分布等问题奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Solomom B. Nucleic acid of the egg of the domestic fowl. Biochim Biophys Acta, 1957, 23 (1): 211~213
- 2 Bruce L, Emanuelsson H. Isolation of intracellular yolk granules in

- early chick embryos and estimation of their content. *Experientia*, 1971, **27** (7): 817~ 819
- 3 Bruce L, Emanuelsson H. Analysis of DNA isolated from intracellular yolk granules in the early chick blastoderm. *Exp Cell Res*, 1975, **92** (2): 462~ 466
- 4 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒染色质的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, (11): 1007~ 1010
Li Y A, Li L, Pan Z Y, *et al.* *Science in China B*, 1982, (11): 1007~ 1010
- 5 李玉安, 李 莱, 潘宗耀等. 鸡胚细胞核和胚下卵黄颗粒 DNA 分子的电子显微镜观察. *中国科学 B 辑*, 1982, (12): 1089~ 1091
Li Y A, Li L, Pan Z Y, *et al.* *Science in China B*, 1982, (12): 1089~ 1091
- 6 Sun L J, Yu L, Chen C C. Presence, isolation and characterization of yolk DNA from chicken eggs. *Science in China (Series C)*, 1998, **41** (3): 251~ 257
- 7 Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*, 1980, **102** (1): 344~ 352
- 8 Goda S K, Minton N P. A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (16): 3357~ 3358
- 9 Takemori H, Halder S K, Nonaka Y, *et al.* Polyadenylation-mediated translational regulation of maternal P450 (11 β) mRNA in frog oocytes. *Eur J Biochem*, 1997, **250** (1): 197~ 204
- 10 孙立军, 许怀庆, 陈楚楚. 鸡蛋胚下表层卵黄 DNA 的提取方法. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24** (1): 82~ 85
Sun L J, Xu H Q, Chen C C. *Prog Biochem Biophys*, 1997, **24** (1): 82~ 85

Distribution of DNA and RNA in the Yolk of Fertilized Eggs. LEI Ha-Xin, YU Lei, SUN Li-Jun, CHEN Chur-Chu (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract By the investigation on different regions of the yolk of fertilized eggs, it was discovered that DNA and RNA were widely distributed in the yolk. DNA and RNA in the yolk were quantified by the method of fluorescence spectrophotometry with the reagents Hooechst33258 and RiboGreen respectively. The results indicated that DNA was uniformly distributed in the whole yolk (about 65.7 $\mu\text{g/L}$) and it was most probably that the DNA was contained in the yolk granules; while the distribution of RNA in the yolk showed another pattern: the amount of RNA in the superficial yolk beneath blastoderm was about 0.43 mg/L, which was much less than that of lateral yolk (2.87 mg/L) and vegetative pole (3.63 mg/L). The significance of the existence of yolk DNA and the unique distribution of yolk RNA remains to be elaborated.

Key words fertilized egg, yolk, DNA distribution, RiboGreen

腺相关病毒介导基因组来源的基因转移与整合*

李 斌 刘德培¹⁾ 王 晶 董文吉 郭志晨 夏 薇 梁植权

(中国医学科学院 基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 构建一个带 β -珠蛋白基因组序列的腺相关病毒载体 AV53HS2 $\Delta\beta$ 2Neo. 经包装成重组腺相关病毒后, 转导红系细胞. DNA 印迹证实包含红系增强子、 β -珠蛋白基因和筛选标志基因的前病毒基因组完整整合于红系细胞基因组中. 结果说明腺相关病毒载体能介导基因组序列来源的目的基因稳定整合于受体细胞基因组中.

关键词 腺相关病毒载体, 基因组, 目的基因, 基因转移, 整合

学科分类号 Q785

腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 载体是新近发展的基因转移载体, AAV 属细小 DNA 病毒, 基因组全长 4 700 bp. 构建 AAV 载体时, 以外源基因的表达序列盒代替 AAV 的编码序列 (rep/cap 基因), 只保留其基因组两端长 145 bp 负责病毒获救、复制、包装与整合的顺式元件——倒

转重复序列 (ITR). 当 AAV 载体与携带 AAV 编码序列 (rep/cap) 的辅助质粒共转染辅助病毒 (腺病毒) 感染的 293 细胞时, 即能获救、复制并

* 863 计划项目资助.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 65296415, E-mail: liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 1999-02-05, 修回日期: 1999-08-16