

研究工作

人与猪的 uPA cDNA 序列同源性的鉴定*

王嘉玺 孙苏华 邳玉宝**

(军事医学科学院基础医学研究所,北京)

核酸分子杂交是从 cDNA 或基因组 DNA 文库中筛选目的基因的最为敏感而特异的方法。为了从人胚肾细胞 cDNA 文库^[1]和人胚食道粘膜细胞基因组文库^[2], 筛选含有人尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活剂(简称 uPA)基因序列的克隆,我们分别从 F. Blasi 和 Y. Nagamine 获得了含有人 uPA cDNA 1500bp 片段的重组质粒 pHUK-8 转化的 E. coli HB101 菌株^[3],以及含有猪 uPA 全长 cDNA 2375 bp 片段的重组质粒 pYN-15 菌株^[4]。如果二者的 uPA cDNA 片段具有同源性,则皆可作为探针从上述文库中钓取人 uPA 基因克隆。本文采用菌落原位杂交及 Southern 吸印杂交,对二者的同源性进行鉴定。

材料和方法

菌株与试剂 pHUK-8 与 pYN-15 菌株如前述。限制酶 P_{st} I、XbaI 为 BRL 产品; dNTP_s 为 Sigma 产品; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, 比强 > 7,000Ci/mmol, Amersham 产品。

pHUK-8 质粒 DNA 及其 P_{st} I 片段的分离与纯化 采用氯化铯—溴化乙锭密度梯度超离心法纯化质粒 DNA, 制备电泳回收 P_{st} I 片段, 即含人 uPA cDNA 1500bp 的 HUK 片段^[5]。

缺口转译标记 HUK 片段作为杂交探针^[6]

PYN-15 质粒 DNA 的快抽、酶切电泳分析及 Southern 吸印转移 以碱裂解法快抽质粒 DNA^[7], 取 1 μg 酶解, 尔后在含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭的 0.7% 琼脂糖凝胶上, 加 TBE(0.089

M Tris-硼酸盐, 0.089M 硼酸, 0.01M EDTA, pH 8.0), 100 伏令样品进胶, 30 伏电泳过夜。紫外灯下观察、照相, 随后 Southern 吸印转移至硝酸纤维素膜(NCF)上^[8]。

菌落原位杂交与 Southern 吸印杂交 按 Maniatis 等的方法^[9]。

结果和讨论

HUK 片段的标记 结果见表 1。从表 1 看出底物 1 μg , 加 50—80 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, 比强与掺入率似乎随放射性同位素量的增加而增加。如继续提高同位素量, 比强增大一个数量级是可能的。

表 1 缺口转译标记 HUK 片段的结果

HUK (μg)	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ (μCi)	dATP (μmol)	比 强 ($\text{cpm}\cdot\mu\text{g}^{-1}\times 10^{-7}$)	掺入率 (%)
1	50	7.0	1.5	14
1	50	8.4	2.7	19
1	50	11.2	7.8	41

菌落原位杂交 在含 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素的 LB 琼脂平皿上分离 pYN-15 菌株单菌落, 再转种至覆盖在 LB 琼脂上的灭菌 NCF 膜上。接种顺序见图 1。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 可见 NCF 膜上长出直径约 1mm 的灰白色菌落, 不经氯霉素扩增, 取下 NCF 膜碱变性处理, 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥固定, 然后 42 $^{\circ}\text{C}$ 预洗 1 小时, 预杂交 4 小时, 杂交过夜。然后漂洗、干燥、压 X 光片加增感屏, -70 $^{\circ}\text{C}$

* 中国科学院科学基金资助的课题

** 河南农科院进修生

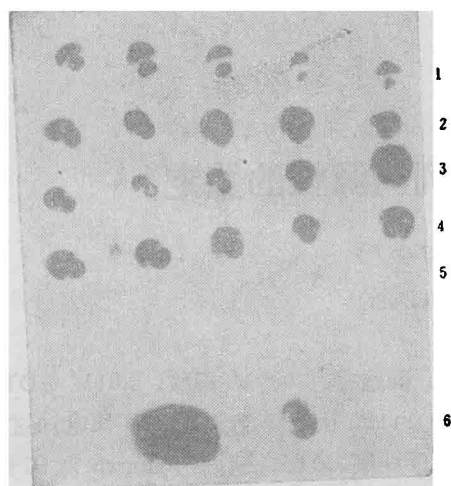


图1 菌落原位杂交结果

1—4——pYN-15 菌落； 5——pBR322 菌落与 *E. coli* HB101 菌落； 6——pHUK-8 菌落

自显影过夜^[9]。图1为自显影胶片的翻拍照片。pYN-15质粒是将猪uPA全长cDNA片段插入pBR322的P_{st}I位点构成。从图1看出pYN-15菌落全部呈杂交阳性，pBR322与*E. coli* HB 101均呈阴性，pHUK-8阳性。因此，可以断定pYN-15菌落杂交阳性，不是非特异性的，而是由于猪uPA cDNA片段与人uPA cDNA (HUK) 片段具有同源性所致。

pYN-15质粒DNA的快抽与Southern转移 5ml LB培养物可得质粒DNA约8.3μg，取1μg酶解，电泳分析。酶解条件见表2，电泳结果见图2。从图2可看出未经酶切的

表2 XbaI 酶解条件^[10]

底物 pYN-15 质粒 DNA	16μl (1μg)
双蒸水	2μl
5×浓缩的 XbaI 反应缓冲液	5μl
XbaI (2000u/ml)	2μl

37℃ 水浴反应 1 小时

pYN-15质粒DNA走出四条带，由上至下：Ch，OC，L及SC带；XbaI酶解后走出三条带：Ch，质粒载体带及XbaI片段(约2000bp)。pHUK-8经P_{st}I酶解产生两条带：载体带与HUK带。将电泳分开的DNA区带经Sout-

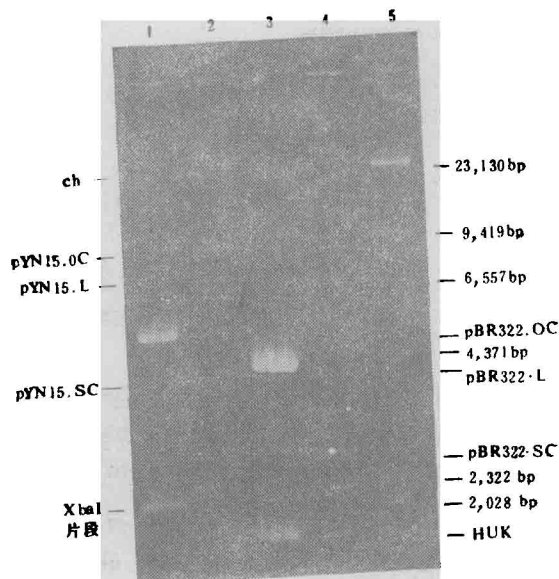


图2 酶解电泳图型

1. pYN15 + XbaI 2. pYN15 3. pHUK8 + P_{st}I 4. pBR 322 5. λ DNA Hind III 片段 OC. 开环； L. 线状； SC. 超旋环状； Ch. 染色体

hern 吸印转移至 NCF 膜上。

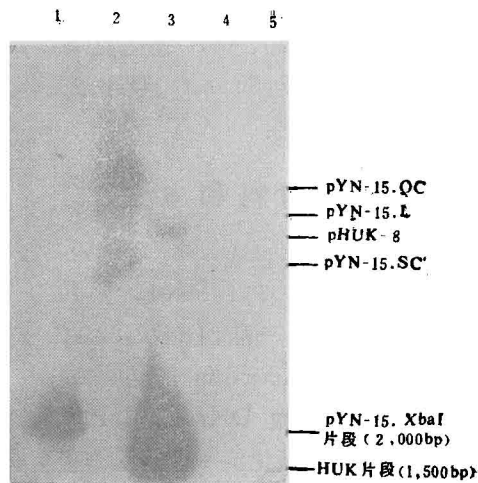


图3 Southern 杂交自显影照片

1. pYN-15 + XbaI 2. pYN-15 3. pHUK-8 + P_{st}I 4. pBR 322 5. λDNA-Hind III 片段

Southern 吸印杂交结果见图3。从图3可以看出：(1) XbaI酶切的pYN-15 DNA的载体带微弱杂交，这是因为猪uPA cDNA片段是在P_{st}I位点插入的，而XbaI在cDNA内

老化红细胞膜的脂质及蛋白质变化

曹锡清 毕 蕾 潘华珍

(中国协和医科大学,北京)

近年来许多学者从两个方面对机体衰老的机制进行了研究:机体的衰老过程与细胞老化过程,后者是机体衰老的基础。^[1]红细胞由于直接暴露在高氧分压下,又有铁离子催化,特别易受脂质过氧化的损伤,所以成为研究细胞老化的最好材料之一。本文仅以老化红细胞为对象,研究其膜脂、膜蛋白及脂质过氧化与老化的关系。

材 料 与 方 法

一. 老化红细胞的分离^[2]

用生理盐水将 40% 的葡聚糖配成五种稀释度 (27%、26%、25%、24%、23%), 其比重分别为 1.093、1.090、1.086、1.080 及 1.074, 各取 1ml 加到离心管中。取正常人全血, 弃血浆用生理盐水洗去白细胞及血小板, 离心得压紧

部切割, 因而有部分 cDNA 片段仍留在载体上, 如与 HUK 同源仍可杂交。XbaI 片段在胶片上显现浓黑区带, 与 HUK 杂交强阳性, 表明二者同源性很高; (2) 未经酶解的三种构型的 pYN-15 均为杂交阳性, 因为它们同样含有猪 uPA cDNA 序列, 与 HUK 同源即能杂交; (3) pHUK-8 质粒的 P_uI 片段 (HUK) 杂交最强, 此系阳性对照。但在 HUK 片段上方可见两个微弱杂交带, 可能是酶解不全残留微量完整的 pHUK-8 所致; (4) pBR322 质粒及 λ DNA Hind III 片段均杂交阴性。因此, pYN-15 质粒 DNA 的 XbaI 片段与 HUK 片段杂交阳性不是由于非特异性显影, 而是由于二者具有同源序列。即人 uPA cDNA 与猪 uPA cDNA 具有显著的同源性。由于 HUK 是一个靠近人 uPA cDNA 3' 端且含有内含子的片段, 因此作为探针有一定局限性; 而猪 uPA cDNA 是全长序列, 5' 端与 3' 端序列均完整又无内含子, 同时又显著地与 HUK 同源, 二者结合使用可能有助于从 cDNA 或基因组文库中钓取人 uPA 克隆。

小 结

菌落原位杂交及 Southern 吸印杂交均证明, pYN-15 重组质粒中的猪 uPA cDNA 片段与 pHUK-8 质粒中的人 uPA cDNA (HUK) 片段, 具有明显的同源性; 二者均可作为探针从人的基因组或 cDNA 文库中钓取人 uPA 克隆。

参 考 文 献

- [1] 逮好英等: dG-dC 同聚物接尾法构建人胚肾 cDNA 文库 (内部资料) 1983。
- [2] 丁少宏: 胎儿食管粘膜基因文库的构建 (医科院研究生论文), 1985。
- [3] Blasi, F. et al., *PNAS*, **81**: 4727, 1984。
- [4] Nagamine, Y. et al., *Nucl. Acids Res.*, **12**(24): 9525, 1984。
- [5] 王嘉玺, 孙苏华: 《军事医学科学院院刊》6: 1985。
- [6] 王嘉玺: 《中国遗传学第二次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编》, 28—29, 1983。
- [7] Davis, R. W. et al., in *Methods in Enzymology*, Vol. **65**, 407—408, Academic Press, New York, 1982。
- [8] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning a laboratory manual*, 383, CSH, 1982。
- [9] *ibid.*, 326
- [10] *BRL Catalog and Reference Guide*, 15, 1983。

【本文于 1985 年 12 月 30 日收到】