

载体的表达水平可用图 2 来表示:

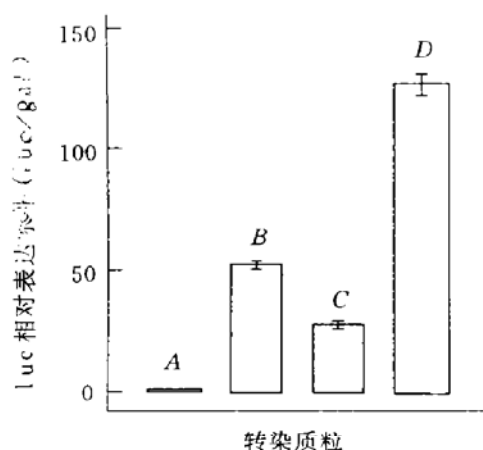


图 2 不同 luc 表达质粒的相对表达水平

A: pBR 322; B: pMAML 1-luc; C: pSV2-luc; D: pMAML2-luc.

不难看出,与出发载体 pSV2-luc 相比,我们构建的两个表达载体 pMAML1-dhfr 和 pMAML2-dhfr 都能有效地启动荧光素酶基因在 COS-7 细胞中的表达,而且构建的结果使得荧光素酶的表达增强了 2~5 倍.这是由它们各自不同的启动子/增强子调控元件决定的.另外与预期的一样, pMAML2-dhfr 的表达水平要比 pMAML1-dhfr 高 (约 3 倍).这是因为前者的两个转录单元方向相反, SV40 增强子可同时为两个启动子提供增强作用.

我们构建的 pMAML2-dhfr 表达载体具有较强的转录起始和终止作用,这已从表达调控的理论方面得到了较好的解释,在实践中又得到了进一步的证实.目前我们正试图对其作进一步的改进,期望能取得更好的结果,以满足高效表达外源基因的实践需要.

参 考 文 献

- 1 Subramani S P J. Anal Biochem, 1983; **135** (1): 1
- 2 Thomsen D R, Stenberg R M, Goins W F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81** (3): 659
- 3 Gluzman Y. Cell, 1981; **23** (1): 175
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989
- 5 程度胜, 张宏权. 军事医学科学院院刊, 1991; **5** (6): 320

Construction of Versatile Eukaryotic Plasmid Expression Vectors. Long Jianyin, Zhang Hongquan, Wang Huixin (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract According to the rules of eukaryotic gene expression and regulation, two versatile eukaryotic expression vectors (pMAML1-dhfr and pMAML2-dhfr) originated from pSV2-dhfr were constructed. They both have a CMV immediate early promoter/enhancer and consist of two expression units of parallel or opposite orientation. Using firefly luciferase gene as reporter gene and β -galactosidase gene as internal control, their effects on luciferase expression were studied in COS-7 transient expression system. The relative strength of their *cis*-elements were compared with those in pSV2-dhfr.

Key words eukaryotic expression vector, reporter gene, gene expression and regulation

多药抗药基因 Mdr1 探针的克隆及初步应用

胡美茹 汲言山 舒翠玲 陈立军 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 多药抗药基因 Mdr1 的表达水平与细胞的耐药性直接相关, 检测 Mdr1 的表达水平可预测化疗的

效果以及预后. 用分子原位杂交的方法可检测单个细胞中 Mdr1 的表达水平. 用 PCR 扩增方法获得了一段特异的 DNA 片段, 并将其克隆到 pUC18 载体中, 经 DNA 序列分析证明与文献报道一致, 此探针可用于临床标本的分子杂交检测.

关键词 Mdr1, 多药抗药 (MDR), 基因克隆

所谓多药抗药 (MDR) 是指细胞对多种结构不同、作用机理不同的药物产生耐药性或抗药性, 与 MDR 直接相关的就是多药抗药基因 Mdr1^[1]. Mdr1 的表达产物为 P-糖蛋白, 其分子量为 170 000^[2], 是一个能量依赖的跨膜药物外输泵, 它降低了细胞毒药物在细胞内的积累, 使细胞表现出抗药性. 检测抗药性水平可用分子杂交的方法, 从转录水平上检测 Mdr1 的表达水平. 本文克隆了一段 Mdr1 的基因片段可做为分子杂交的探针.

1 材料与方法

1.1 试剂

Taq DNA 购自 Promega 公司, T7 测序试剂盒购自 Pharmacia 公司, ³²P- α -dCTP 购自福瑞公司. AMV 反转录酶, T4 DNA 连接酶, BamH I, Hind III 均购自 Promega 公司.

1.2 标本

白血病人外周血 3~5 ml, 加入 $\frac{1}{3}$ 体积的 404 代血浆, 沉淀 15~20 min, 离心后用生理盐水洗两次, 取 5×10^6 细胞提取细胞总 RNA.

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取: 细胞总 RNA 提取方法参照异硫氰酸胍一步法^[3].

1.3.2 反转录: 取细胞总 RNA 的 10 μ g 进行反转录, 方法参照 Promega 公司的操作说明.

1.3.3 引物设计与 PCR 扩增: 引物用计算机辅助设计. 设计一对 Mdr1 特异的引物. Mdr1 的两条引物分别设在不同的外显子上, 上游引物为: 5' GTACCCATCATTGCAATAGC, 下游引物为: 5' CAAACTTCTGCTCCTGAGTC 在 100 μ l 反应体积中含逆转录混合物 2 μ l, 加入 $10 \times$ Taq 酶缓冲液 10 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 8 μ l, 2.5 mmol/L MgCl₂ 6 μ l, 20 μ mol/L 的上下游引物各 4 μ l, 无菌水

55.5 μ l, 95℃变性 8 min 后, 加入 Taq 聚合酶 2.5 U (5.0 U/ μ l), 94℃变性 50 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 40 s, 扩增 35 个循环. 取 10 μ l PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳观察. 结果显示扩增出一条 150 bp 的 DNA 片段.

1.3.4 PCR 扩增片段的克隆: 电泳回收 PCR 扩增的 Mdr1 片段, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 600 V/m 电泳 40 min, 溴化乙锭 (EB) 染色, 用透析袋法回收, 酚、氯仿抽提两次, 无水乙醇沉淀, 抽干后溶于 TE 缓冲液中. 在 1% 琼脂糖凝胶板上点上 DNA 点样标准, 由 80 mg/L 倍比稀释至 5 mg/L, 各取 1 μ l 及 PCR 扩增样品 1 μ l 点于胶面, EB 染色, 充分吸收后, 紫外光下观察结果, 定量. 将回收的 Mdr1 基因片段 50 ng 与 Hinc II 酶切的 pUC18 质粒 30 ng, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 22℃平端连接 16 h, 将连接物转化到大肠杆菌 JM109 中, 涂平皿后 37℃过夜, 挑出白色菌落进行小量扩增, 快抽质粒后, 酶切筛选出重组质粒, 基因克隆及重组子的筛选参照《分子克隆》^[5]. 用 BamH I、Hind III 双酶切鉴定筛选重组质粒, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果.

1.3.5 DNA 序列分析: DNA 序列分析参照 T7 测序盒的说明书进行操作, 模板用 3 μ g 重组质粒.

1.3.6 原位杂交: 取新鲜细胞甩片, 室温风干, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS-DEPC 液漂洗 2 遍, 蛋白酶 K (5 mg/L) 37℃温箱中孵育 15 min, PBS-DEPC 漂洗 2 遍, 用乙醇脱水, 每片加含经光敏生物素标记的 Mdr1 cDNA 探针的杂交液 50 μ l. (杂交液成分: 50% 去离子甲酰胺, 20% Denhart's 液, 2% 硫酸葡萄糖, 100 mg/L 鲑鱼精 DNA, Mdr1 cDNA 探针 (0.1 mg/L) 用前先煮沸变性 5 min, 并冰浴 5 min), 加盖片于 42℃水浴箱中杂交过夜. 取

出细胞玻片, 分别用 $2\times\text{SSC}-0.1\%$ SDS 和 $0.2\times\text{SSC}-0.1\%$ SDS 洗液充分漂洗各 3 遍, 加 3% BSA 室温封闭 30 min, 弃封闭液, 加 $1:40$ 稀释的链亲和素、胶体金液 $50\ \mu\text{l}$, 室温孵育 45 min, $1\times\text{PBS}$ 和双蒸水各漂洗 2 遍, 加入含硝酸银的显影液暗室中显影 $5\sim 15\ \text{min}$, 至镜检中待检标本上出现黑褐色阳性颗粒后, 立即用双蒸水冲洗 2 遍, 苏木精复染, 二甲苯透明, 树脂封片, 显微镜下观察到胞浆中 DNA-RNA 杂交信号为黑褐色颗粒, 定位于胞浆^[6].

2 结 果

2.1 Mdr1 基因片段的克隆

通过 PCR 扩增出一段 Mdr1 基因的特异片段, 其大小与设计的一致, 平端插入 pUC18 载体 HincII 位点, 获得了重组质粒. 经 BamHI 和 Hind III 双酶切鉴定, 证明插入正确, 结果见图 1.

2.2 DNA 序列测定

将重组质粒的双链模板直接做 DNA 序列

分析, 测序结果与文献一致, 结果见图 2.



图 1 琼脂糖电泳分析

1: 重组质粒 BamHI、Hind III 双酶切; 2: PBR 322/Hinf I marker; 3: PCR 产物.

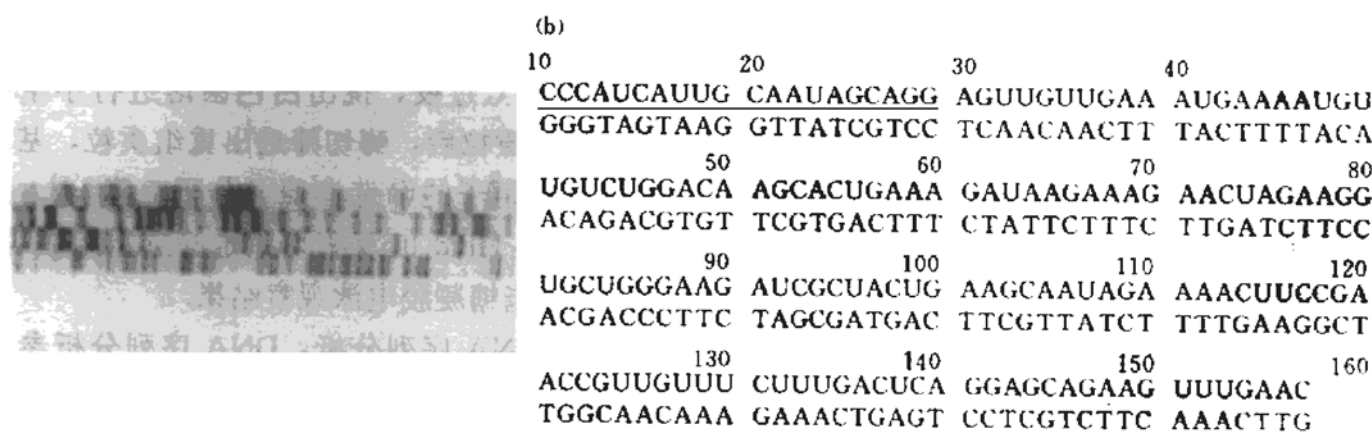


图 2 Mdr1 cDNA 序列分析

2.3 原位杂交的初步结果

图 3 为原位杂交结果, 阳性细胞表现为全细胞浆弥漫性分布着黑褐色颗粒, 甚至可覆盖胞核, 初步检测表明阳性细胞占全部细胞 60% 以上时, 病人表现为化疗不易缓解, 阴性细胞占 $20\%\sim 60\%$ 时, 化疗可缓解, 但很快会复发, 阳性率在 20% 以下的病人化疗易缓解, 并且缓

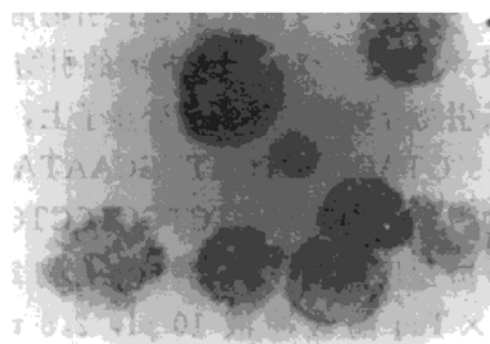


图 3 多药抗药基因探针原位杂交结果

解期维持时间长。

3 讨 论

总 RNA 的提取尽量保持完整不被降解的关键是尽可能防止 RNA 酶起作用, 所有器皿包括试剂均应用 DEPC 水处理, 高压灭菌。

本实验扩增和克隆的片段较短, RNA 有一些降解也是可以经 RT-PCR 扩增出来。扩增这样短片段时, 变性温度略低些, PCR 产物的得率会提高, 例如变性温度可保持 90~92℃。

平端连接效率低, 特别是 PCR 产物在平连时效率更低, 经过三次酚抽提并且在连接时加大外源片段的比例, 有利于重组。

用双链模板直接测序时, 最重要的是将蛋白质去除干净, 少量的 RNA 杂质不影响测序效果。模板量偏少时合成小片段比较少, 模板量偏大时, 合成的大片段偏少, 一般用 2~3 μg 为好。

检测 Mdr1 有多种方法, 只有用分子原位杂交的方法能够检测出单个细胞中 Mdr1 的表达水平, 特别是能检测癌细胞中 Mdr1 的表达水平, 而不是检测全部细胞的平均水平。本文克隆的 Mdr1 特异的探针可用于分子杂交包括原位杂交。

参 考 文 献

- 1 Chen C-J, Chin J-E, Ueda K *et al.* Cell, 1986; 47: 381
- 2 汲言山. 中华流行病学杂志, 1992; (特刊 2 号): 396
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Analytic Biochemistry, 1987; (162): 156

- 4 汲言山, 沈倍奋, 王文香等. 生物化学杂志, 1993; 9 (3): 327
- 5 Sambrook J, Fritsch E-F, Maniatis T 著, 金冬雁等译. 分子克隆, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 34~35
- 6 艾辉胜, 朱元晓, 赖春宁等. 山西白血病杂志, 1993; 2 (4): 325

Cloning of Mdr1 Gene Probe. Hu Meiru, Ji Yanshan, Shu Cuiling, Chen Lijun, Shen Beifen (*Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Mdr1 gene contributes to multidrug resistance. Because of the level of Mdr1 gene expression is correlated with the response of chemotherapy, it is a valuable method to measure the expression level of individual patients. The cDNA cloning of the human Mdr1 gene has made it possible to measure levels of Mdr1 RNA with hybridization in human cancer cells. A special part of Mdr1 cDNA was obtained by use of RT-PCR and inserting it into pUC18 vector. The DNA sequencing result is identical with the sequence of Mdr1 cDNA reported. This probe can be used to detect the level of Mdr1 gene expression in clinical specimen. The measurements can be useful in the design of chemotherapeutic protocols for certain tumors.

Key words Mdr1, MDR, gene cloning

大脑皮层神经元膜蛋白构象改变的 ESR 研究*

章 茜¹⁾ 吴本玠 于桂芬 卢景露²⁾

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 采用马来酰亚胺标记完整的大脑皮层细胞, 观察由低氧引起的 ESR 谱线的变化及脑细胞脂质过

*国家“八五”攻关课题一部分 (85-915-03-07). ¹⁾河南医科大学生理教研室。

²⁾北京医科大学天然药物和仿生药物国家重点实验室。 收稿日期: 1994-08-04, 修回日期: 1994-11-20