

逆转录酶活性降低或丧失了,应改换酶制剂。此时再以 mRNA 为模板测定,如掺入仍较低,则可稍增加 mRNA 量,同时更改非标记和标记脱氧核苷三磷酸的比例,提高比活性以获较高掺入计数。

此外,为保证模板和产物不被破坏,所有使用器皿需高温灭菌处理。为保证合成产物不被吸附,所有使用玻璃器皿应以硅油处理,层析柱也应以 100. D. 的 tRNA 预饱和处理方能使用。由于 cDNA 合成是 DNA 克隆等一系列过程的最初和较困难的一步,因此各个因素都

应仔细检查以确保合成的完成和获得高的 cDNA 产量和合成效率。

参 考 文 献

- [1] Buell, G. N. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 2471. 1978.
- [2] Efstratiadis, A. et al.: *Cell*, **7**, 279. 1976.
- [3] Retzel, E. F. et al.: *Biochemistry*, **19**, 513. 1980.
- [4] Seeburg, P. H. et al.: *Nature*, **220**, 486. 1977.
- [5] Wickens, M. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 2483. 1978.

【本文于 1983 年 4 月 12 日收到】

小鼠甲胎蛋白基因的扩增及其 mRNA 相对含量的测定

李宝珪 仲金良 彭宝珍 戴培桦 黄道培

(中国科学院上海生物化学研究所)

卢惠卿 周国林

(上海生物制品研究所)

甲胎蛋白 (AFP) 是一个癌胚性蛋白,已被广泛用于肝癌早期诊断。近几年的研究发现,血清中 AFP 水平的升高,主要是由于肝细胞中 AFP 的信使核糖核酸 (mRNA_{AFP}) 的量增加,即是由于 AFP 基因转录水平升高,而不是 mRNA_{AFP} 翻译活性升高所致^[1,2,3]。在肝癌发病机理和肝癌治疗研究中,人们逐渐将注意力集中在 AFP 基因调控的研究上,试图从整体或离体试验中,找出影响 AFP 基因表达的有关因子或药物,并已取得了一定进展^[3]。在转录水平上研究 AFP 基因调控,首先要解决 mRNA_{AFP} 的定量测定技术,应用互补于 mRNA_{AFP} 的单链 DNA (cDNA) 作探针,通过液相杂交进行测定是目前应用最普遍,也是最准确的方法。但这首先要分离纯化相当数量纯的 mRNA_{AFP}。本文介绍一种改良的纯化质粒的方法和一种简便的定量固相杂交方法,即将扩增所得的嵌合了小鼠 AFP 基因片段的质粒 DNA,固相于硝酸纤维素膜片上,与含小鼠 mRNA_{AFP} 的样

品进行杂交,以达到定量测定的目的。

一、材料和方法

琼脂糖 (上海东海制药厂), 硝酸纤维素滤膜 (孔径 0.45 μ , 上海医工院), λ DNA, 酵母 tRNA 和牛胰核糖核酸酶 A (RNase A 东风化学试剂厂), Ficoll400 (pharmacix), 限制性内切酶 HindIII、HincII 和 EcoRI 由本所李载平教授赠给, 聚乙烯吡咯烷酮由本所植物遗传组赠给, 小鼠甲胎蛋白基因 (5'端) clone pBR322-AFP₁ (转化在 E.coli LE392 中、以下简称 pAFP₁) 由美国 S. M. Tilghman 博士赠给, 寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷纤维素 (Oligo (dT)-cellulose) 是自己合成的^[4]。

1. 羟基磷灰石 (HAP) 的制备 基本上按 Bernardi 介绍的方法^[5]进行,但在制备过程中增加一次 40% NaOH 煮沸过程,所用试剂均由重蒸水配制。

2. 正常成年小鼠肝和小鼠卵黄囊 poly(A)

RNA 的制备 正常成年小鼠肝和取自怀孕后 16—18 天的小鼠卵黄囊,按前法^[4]制成总的 poly(A) RNA。为了提高纯度,重复一次 oligo (dT)-cellulose 柱层析过程。

3. RNA 的碘-125 标记 RNA 的碘-125 标记按 Getz 等人介绍的方法进行^[6],但反应体积由 2 毫升改为 200 微升,反应温度由 60℃ 升高至 70℃。

4. 质粒 DNA 的纯化 含 pAFP₁ 质粒 DNA 的 E·coli LE392 菌,在含 25μg/ml 氨苄青霉素的 L. B 培养基中,37℃ 培养至 590nm 光密度为 0.5 左右。加固体氯霉素达 100μg/ml 后 37℃ 继续培养 20 小时。冷却菌液,离心收集的菌按 Chewell^[7] 和 Colman^[8] 等介绍的方法制成溶菌液,然后经 HAP 柱层析纯化质粒 DNA。

5. DNA 的电泳和分子量的测定 质粒 DNA 或经限制性内切酶降解后的 DNA 片段,在制备于电泳缓冲液(40mM Tris·HCl pH7.7-20mM NaAc-2mM EDTA) 中的 0.7% agarose 凝胶板上进行潜水电泳分析,电压降为 4—5 伏/cm,电泳结束后,凝胶在 2μg/ml 溴化乙锭中浸 30 分钟,在 254nm 波长紫外灯下观察或拍照。我们以 HincII 酶解 pBR322 (得 1.10 和 3.26K·b 二个 DNA 片段)和 E·coRI 酶解 λ DNA (得 21.8、7.55、5.93、5.54、4.80 和 3.38 Kb 6 个片段)作为标准。

6. 质粒 DNA 的电镜观察及其分子长度的测量 质粒 DNA 按蛋白质单分子膜展开法^[9]进行制片,在 JEM-100CX 电子显微镜上观察和照相。用里程计测量不同电镜照片的 DNA 分子长度,按 Lang 方法计算分子量^[10]。

7. 核酸分子的定性、定量杂交 对于鉴定核酸顺序的定性杂交,我们主要按 Southern 介绍的方法^[11],将电泳后的 DNA 转移到硝酸纤维素滤膜上,同¹²⁵I 标记的不同来源的 mRNA 在 68℃ 进行杂交。杂交缓冲液为 6XSSC-10mM Tris·HCl pH 7.4-0.5% SDS-500μg/ml 酵母 tRNA-1×Benhardt's*。预杂交和杂交通常为 24—48 小时。杂交结束后滤膜用 6XSSC-0.5% SDS

室温下洗 2 次,然后在 2XSSC-25μg/ml RNaseA 中 37℃ 保温 15 分钟,以降低非特异吸附,最后用 6XSSC 洗一次,室温干后的膜片对 X 光片曝光。

为了定量地观察 mRNA_{APP} 的含量变化,我们根据 Thomas^[12] 和 Chiu^[3] 所介绍的“点点杂交”(dot blot hybridization) 原理,建立了一种定量的固相杂交测定方法,并对¹²⁵I 标记的不同含量的小鼠卵黄囊 mRNA 样品(即 mRNA_{APP} 含量不同的样品),进行了测定。为了更接近于实际情况,样品都以¹²⁵I 标记的小鼠肝 mRNA 补充至同一水平(同位素记数)。现将方法简述如下: (1) 将纯化的质粒 DNA (pAFP₁)溶于 10 mM Tris·HCl pH8.0 缓冲液中,100℃ 水浴上变性 5 分钟,冰浴上速冷后制成 2μg/ml-4SSC 溶液备用。(2) 硝酸纤维素滤膜浮于消毒重蒸水面上浸润,然后在 20XSSC 中平衡,膜在低温干燥后制成直径为 6mm 的圆片。每张膜中心点上已变性之质粒 DNA 5μl(10μg),室温下自然干燥后,80℃ 真空烘烤二小时。(3) 真空烘烤后的膜片同不同含量的¹²⁵I 标记的 mRNA_{APP} 样品杂交。杂交缓冲液可以同上,也可以用 50% 甲酰胺-5XSSC-50mM 磷酸钠 pH 6.8-1×Denhardt's 缓冲液 42℃ 下进行杂交。杂交后的滤膜片洗涤烘干后,对 X 光片曝光,得杂交程度不同的圆点,而滤膜可以用圆的打孔器将中心的点样部分取下(直径 3mm),在 γ 计数器上计数测定,每片样品膜都用自身对照(即取同一滤膜上非点样部分等面积滤膜进行计数)进行校正。测得的数据对 mRNA_{APP} 含量作图。

二、结果与讨论

1. 质粒 pAFP₁ 的扩增和鉴定

(1) 质粒 pAFP₁ 的扩增 按 Colman 等人介绍的纯化方法,用我们改良的 Bernardi 法制备的 HAP,从 E·coli LE392 溶菌物中,一次柱层析即纯化了质粒 DNA。电泳结果(图 2)

* Benhardt's = 0.02% Ficoll-0.02% 牛血清白蛋白-0.02% 聚乙烯吡咯烷酮。

表1 质粒 pAFP₁ 的扩增

实验批号	E.coli LE392 菌			HAP 纯化后质粒 DNA	
	培养体积 (ml)	生长浓度* (A _{590nm})	湿重 (克)	DNA 量** (A _{260nm})	收率 mg(DNA)/克菌(湿重)
1	6000	0.47	8.9	123.1	0.69
2	4000	0.47	5.9	101.4	0.86
3	7000	0.40	8.8	123.6	0.70

* 加入氯霉素前的浓度

** 1mgDNA $\approx$ 20A_{260nm}.

表明,质粒 DNA 基本上不含宿主菌染色质 DNA 和 RNA。每克菌(湿重)可得 0.7mg 左右的质粒 DNA (表 1)。

经改良后的 Bernadi 法制备的 HAP,吸附性能没变,而柱层析的性能大为改善。样品的吸附、洗涤和洗脱过程中流速极快,不发生堵塞现象,而且还可以再生后重复使用。分离的 DNA 也较纯。从而使大量、快速地分离纯化不为宿主菌染色质 DNA 和 RNA 污染的质粒 DNA 成为可能。

(2) 质粒 pAFP₁ 的鉴定 大量扩增后由 HAP 层析纯化的质粒,通过电子显微镜观测、限制性内切酶图谱和核酸分子杂交等多种方法进行了鉴定,结果如下:

a. 电镜观测结果 由封 2 的图 1 可以看出,扩增后由 HAP 柱层析纯化的质粒 DNA,同 pBR322 一样,是环状双链 DNA。将两者放大至同样倍数(3 万倍),按前法测得 pBR322 DNA 长为 1.3 μ ,由 HAP 层析纯化的质粒 DNA 长 1.7 μ (各为 5 个展开的环状分子的平均值)。由此推算我们扩增纯化的质粒 DNA 应为 5296 b.p.,即在 pBR322 载体中插入一长为 935b.p 的 DNA 片段。

b. 限制性内切酶图谱及基因片段的大小 我们扩增后的质粒 DNA 经限制性内切酶 Hind III 酶切后,与作为标准的 DNA 片段在同一块凝胶板上电泳。由封 2 图 2 可以看出,其是由质粒 pBR322 和另一分子量较小的 DNA 片段所组成。根据这片段 DNA 的迁移距离,参照已知分子量 DNA 的迁移距离,由作图(图 3)可以求得其大小为 950b.p,这与由电镜观测所

得的结果一致。

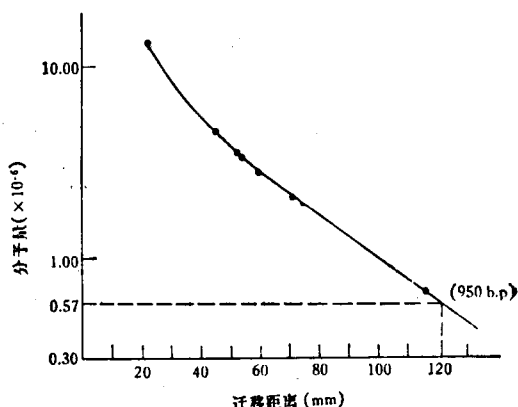


图3 DNA 分子量的测定

c. 核酸分子杂交结果 小鼠卵黄囊是小鼠胚胎早期合成 AFP 的地方,因此是富含 mRNA_{AFP} 的。其含量可高达总 mRNA 的 20—50%。而成年小鼠肝中 mRNA_{AFP} 含量极低,仅为胚胎时期的 0.01% 以下^[13,14,15]。可以作为富含 mRNA_{AFP} 的卵黄囊的一个对照组织。我们按上述介绍的方法纯化了此二种来源的总 mRNA,并分别碘标成 1.5×10^7 cpm/ μ gmRNA (卵黄囊)和 3.8×10^7 cpm/ μ gmRNA (成年鼠肝)。质粒 DNA 经 Hind III 酶切或不酶切直接在琼脂糖凝胶上电泳后,转移至硝酸纤维素滤膜上。相同的二张转移了 DNA 的滤膜,分别与碘标的卵黄囊总 mRNA 和成年小鼠肝总 mRNA 在同一条件下杂交、洗涤,最后对 X 光片曝光。结果(封 2 图 4)表明,不论是酶切的质粒还是不经酶切的质粒 DNA,只和卵黄囊 mRNA 杂交,说明扩增纯化的质粒是包含小鼠甲胎蛋白基因顺序的。

以上电镜观测, 酶切图谱和分子杂交的结果表明: 我们扩增的质粒是在质粒 pBR322 的 Hind III 切点上插入了约 950b.p 大小的 AFP 基因片段, 与报道的结果一致^[15], 证明其确为 pAFP₁。

2. mRNA_{AFP} 含量的测定

为了模拟测定不同含量 mRNA_{AFP} 的样品, 我们将 ¹²⁵I 标记的小鼠卵黄囊 mRNA 与 ¹²⁵I 标记的成年小鼠肝 mRNA 按不同比例混合, 使成一系列含不同量 mRNA_{AFP} 的样品, 按上述介绍的方法进行杂交测定。经过自身本底校正后, 各个样品的杂交量 (以 cpm 表示) 与其 mRNA_{AFP} 的含量成正比。作图后发现二者呈很好的线性关系 (图 5)。测定后的滤膜片对 X 光片显影, 可以发现自显影的深浅与计数的结果一致 (图 6), 表明这种固相的“点点杂交”方法也可以用于 mRNA_{AFP} 的相对含量测定。它不仅可以由计数来定量, 而且可以由自显影来直观地验证。避免不必要的失误。

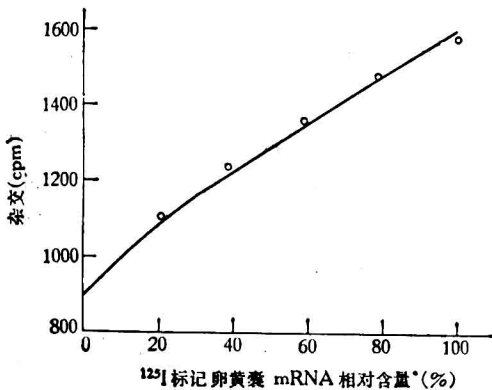


图 5 mRNA_{AFP} 相对含量的杂交测定

* 20%、40%……表示样品中小鼠卵黄囊 mRNA 的百分含量。全部为小鼠卵黄囊 mRNA 的以 100% 表示, 全部为成年小鼠肝 mRNA 的以 0 表示。

以小鼠卵黄囊中 mRNA_{AFP} 的含量为总 mRNA 的 20% 计算, 含 20% 小鼠卵黄囊总 mRNA 的样品中, mRNA_{AFP} 的含量即为 4%。而仅由 Oligo(dT)-Cellulose 层析法分离纯化的 mRNA, 往往含有相当数量的核糖核蛋白体 RNA (rRNA), 因此样品中的 mRNA_{AFP} 的实际含量比这要少。然而由图 5、图 6 看, 其计数

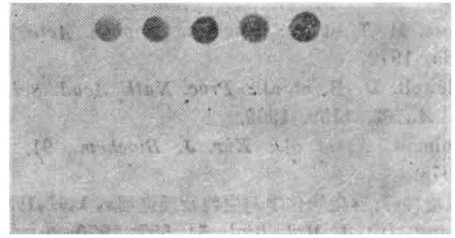


图 6 “点点杂交”滤膜的自显影

上: 3mm 直径样品膜点 下: 去样品点后的 6mm 膜片的外圈。由左至右分别为 0, 20%, 40%...100%

和自显影都与本底对照有较明显的差别。如能进一步提高 mRNA 碘标效率, 改进实验条件, 例如减少杂交体积、适当延长杂交时间和同位素测定时间 (本实验取 5 分钟计数的平均值作为 cpm, 仪器测定误差降至 1% 以下) 等, 定能将检测灵敏度进一步提高。

在解决了较大量扩增质粒的困难后, 只要制备一定数量固定了某种特异基因探针 DNA 的硝酸纤维素膜片, 就可以同时进行大量与此基因相应的 mRNA 样品的定量测定。这特别适用于像细胞和细胞核等离体转录系统。在这些系统中, 研究者往往是希望了解通过某些特定的条件或某些调控因子的改变而引起的基因表达的改变。利用上述方法, 只要将转录后的系统上清液与固相了某种基因探针的膜片进行固相杂交, 由计数测定或自显影的变化即可了解此种基因在变化了的条件或不同的调控因子作用下的表达情况。作者实验室准备利用此法在离体的细胞核转录系统中, 对 AFP 基因表达的调控作进一步的研究。

本工作得到周光宇教授的关心和指导, 还得到郑仲承和敖世洲等同志的不少帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Innis, M. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 252, 8469, 1977.
- [2] Sell, S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 564, 173, 1979.
- [3] Chiu, Jen-Fu, et al.: *Nucleic Acids Res.*, 9(24) 6917, 1981.
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所四室肿瘤组: 《生物化学与生物物理进展》, 2, 40, 1979.
- [5] Bernardi, G.: *Methods in Enzymol.*, 21, part D

- 95.
- [6] Getz, M. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 287, 485, 1972.
- [7] Clewell, D. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 62, 1159, 1969.
- [8] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 91, 303, 1978.
- [9] 戴培桦等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 97, 1982.
- [10] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, 54, 557, 1970.
- [11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98, 503, 1975.
- [12] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 5201, 1980.
- [13] Law, S. et al.: *Gene*, 10, 53, 1980.
- [14] Gorin, M. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 1954, 1981.
- [15] Tilghman, S. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 7393, 1979.

【本文于1983年3月25日收到】

49 型玻璃纤维滤纸在测定胆碱能受体中的应用

陈世铭

(军事医学科学院药理毒理研究所, 北京)

一些蛇毒的 α -毒素能与烟碱样乙酰胆碱受体形成特异的、近于不可逆的复合物。因此可用这些 α -毒素的放射性标记物定量测定此受体。但是, 首先必须把毒素与受体的结合物和游离的标记毒素分开。Miledi 等曾采用 Sephadex G-50 凝胶过滤法^[1], Meunier 等用硫酸铵沉淀法^[2], 其他还有超速离心法, 透析法等。这些方法工作量都很大, 有的敏感性差。Schmidt 等^[3]用 DEAE-Cellulose 纸片法测定分离提取的受体, 提供了一种简便快速的方法。但有的步骤仍较繁杂, 并受离子强度和 pH 的影响, 特别是纸片来源不易, 需要进口。本文报道采用国产 49 型玻璃纤维滤纸代替 DEAE-Cellulose 纸片测定膜结合烟碱样乙酰胆碱受体。

一、材料与方 法

DEAE-Cellulose 纸片 (DE81) (Whatman 公司)、49 型玻璃纤维滤纸 (49 型滤纸, 上海红光造纸厂研制), 加工成直径 2.5cm 的纸片。电鳗 (*Torpediniforms Nacline timilei*) 从我国南海捕捞。湖南眼镜蛇 (*Naja naja atra*) α -毒素按徐等^[4]的方法提取分离, 再经 Sephadex G150 凝胶柱过滤, 小白鼠腹腔注射致死量为 150 μ g/kg, 碘化钠- I^{125} 由原子能研究所供应。其他药品均为试剂规格。

按改良的 Vogel 法标记 α -毒素^[5], 分离出单 I^{125} 标记物。 I^{125} - α -毒素与过量的电鳗受体 25 $^{\circ}$ C 保温 1 小时后, 经 Sephadex G7.5 凝胶过滤柱, 证明所有的放射性都结合在受体上, 即分离得到的单 I^{125} 标记物都有与受体结合的活性。用已知浓度和比活的 [3 H]- α -毒素测定其比放射性比活为 201ci/mmol。计数采用 γ 免疫计数器 FJ-2003 型。

1. 膜结合受体的制备 取电鳗电器官 20 克, 加入 200ml 50mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4, 内含 0.1mM 苯基甲磺酰氟 (PMSF) 作为蛋白分解酶抑制剂, 及 0.02% $NaNO_3$ 。在冰浴中用组织粉碎机, 2 万转/分, 15 秒 $\times$ 3 次, 间歇 15 秒, 制成匀浆。5000 $\times$ g 离心 12 分钟, 取上清部分加在 25ml 0.7M 蔗糖溶液上, 39000 $\times$ g 离心 70 分钟, 分成 4 个部分, 取最下面的沉淀, 重新均匀混悬于磷酸缓冲液中备用。4 $^{\circ}$ C 冰箱保存不超过一周。

2. 受体的定量测定 受体 (终浓度 1—2nM) 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5 分钟后加入 2—3 倍量的 I^{125} - α -毒素 (终浓度 2—5nM), 继续保温 1 小时。结合反应可在 10 分钟左右完成, 而且近乎不可逆, 测得 K_D 为 $6.1 \times 10^{-12}M$ 。这为受体的定量测定提供十分有利的前提条件。由于标记物是单碘标记物, 所以可以根据结合的 I^{125} - α -

小鼠甲胎蛋白基因的扩增及其 mRNA 相对含量的测定

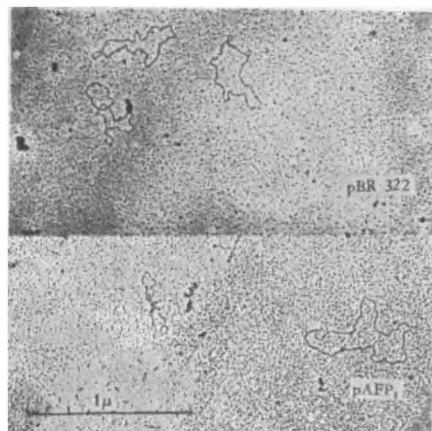


图 1 质粒的电镜照片



图 2 质粒的酶切图谱

1. pBR322 2. HAP 纯化的质粒 3. pBR322 + HindIII 4. pBR322 + HincII 5. HAP 纯化的质粒 + HindIII 6. λDNA + EcoRI 样品
各为 1μg 0.7% agarose 凝胶板(11x17cm)

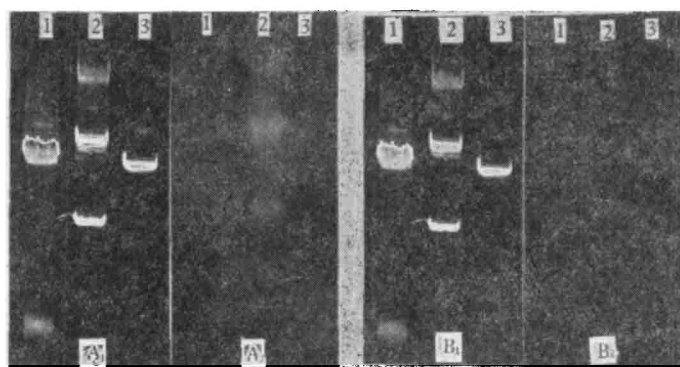


图 4 质粒 DNA-mRNA 杂交图谱

A₁、B₁: 质粒 DNA 电泳图, 其中 1. HAP 纯化的质粒 + HindIII, 2. HAP 纯化的质粒, 3. pBR322

A₂: 转移后的硝酸纤维素滤膜与 ¹²⁵I 标记的小鼠卵黄囊总 mRNA 的杂交自显影图
B₂: 转移后的硝酸纤维素滤膜与 ¹²⁵I 标记的成年小鼠肝总 mRNA 的杂交的自显影图