

mini-质粒筛选大鼠基因组库

徐 幼 海

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

提 要

两个雄激素相关的 pBR322 克隆的 cDNA 插入片段, 克隆到 mini-质粒 π AN7, 再由词源顺序互补重组的方式, 整合到 Charon 4A 大鼠肝基因组库的噬菌体 DNA 中。由此筛选的 λ DNA 克隆经遗传学试验和点杂交确证。此外, 限制性酶解和 Southern 杂交分析推演出该两基因组片段的大致物理图谱。对于应用 π AN7 质粒筛选基因组库的原理及优缺点, 本文作了简要的讨论。

关键词 大鼠基因组库, mini-质粒 (π AN7), DNA 分子克隆

一、前 言

真核 DNA 基因库对于研究真核染色体, 包括基因结构和功能的分析, 是一种非常有用的途径。分离和鉴定一个专一性基因组片段的通常方法是, 噬菌体噬斑与 ^{32}P 标记的 cDNA 探针作原位杂交。该方法迅速有效。由于基因组的复杂性相当高 (3×10^9 bp), 因此大批量筛选时, 仍然耗时费力。为此, Brain Seed^[1] 利用大肠杆菌噬菌体 DNA 的重组现象, 发展了一种快而敏感的方法。将 cDNA 探针插入到一种 mini-质粒 (supF), 杂交质粒转化大肠杆菌 (su^-), 再由基因库的噬菌体感染, 得到一种新的噬菌体。mini-质粒因 cDNA 与噬菌体携带的真核 DNA 顺序同源而整合到噬菌体。

我们用 π VX 系列的 π AN7 质粒, 克隆了两个编码大鼠前列腺细胞雄激素调节多肽的 cDNA 片段^[2,3]并用于筛选 Charon 4A 大鼠肝基因组库。该两种雄激素调节多肽的基因组片段, 经部分酶解, 推导出一个大致的物理图谱。

二、材料和方法

雄性 SD 大鼠, 体重 300g 左右, 经腹腔取

出前列腺。限制性内切酶和其它核酸酶购自 BRL 和 Boehringer Mannheim。其它试剂均为分析纯, 购自 Sigma。

噬菌体 Charon 4A 大鼠基因组库由 Dr. Takashi Sugimura 提供。mini-质粒 π AN7 和 *E. coli* MC1061 $\text{r}^- \text{m}^+ \text{su}^-$ 菌株由 Dr. Michael Garrick 赠送。 *E. coli* NK 5486 (LacZam) 和 KH 802 由 Dr. Edward Morgan 赠给。

质粒 DNA 制备 质粒 DNA 用碱提取法分离, 并经氯化铯超离心纯化^[4]。

Northern 杂交 大鼠前列腺细胞总 RNA 用盐酸胍-氯化铯方法制备^[5]。poly (A) RNA 经 oligo (dT) cellulose 柱层析纯化^[6], 并于 1% 琼脂糖凝胶电泳分部^[7], 转移至硝酸纤维素滤膜后与 ^{32}P -cDNA-92 和-119 作 Northern 杂交^[8]。

π AN7 cDNA 克隆 cDNA-92 和-119 片段取自相应的 pBR322 克隆, 经 PstI 酶解和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分部洗脱^[9]得到, 以 2:1 与 5' 端脱磷的 π AN7 DNA 的 PstI 切点连接^[10], 转化 MC1061 $\text{r}^- \text{m}^+ \text{su}^-$ 菌株^[11]。转化株用 ^{32}P -cDNA-92 和-119 作原位杂交选择^[9], 阳性克隆经小量 DNA 制备^[12], 用 Pst I 酶解和 1.5% 琼脂

糖凝胶电泳鉴定。

大鼠基因组库的筛选 详见文献[1]。

(1) 重组：取大约 10^6 的大鼠基因组库噬菌体，感染携带 π AN7-92 和-119 的转化株，用平板法温培过夜，次日从裂解细菌制得噬菌体悬液。

(2) 筛选：噬菌体悬液按 1:100 稀释，以 0.1ml 感染 MC1061 $r^-m^+su^-$ 菌^[11]，获得单个

噬斑。

(3) 遗传学试验：选取 10 个分隔良好的噬斑，制备成悬液，按系列稀释点样于 NK5486 (LacZam) 菌面 (Xgal/IPTG)。选取蓝色噬斑，重复实验，以得到纯化的克隆。实验过程如图示，野生型噬菌体 λ Charon 4A 用作对照，与实验组平行操作。

λ DNA 的制备和点杂交 参照文献 [13]，

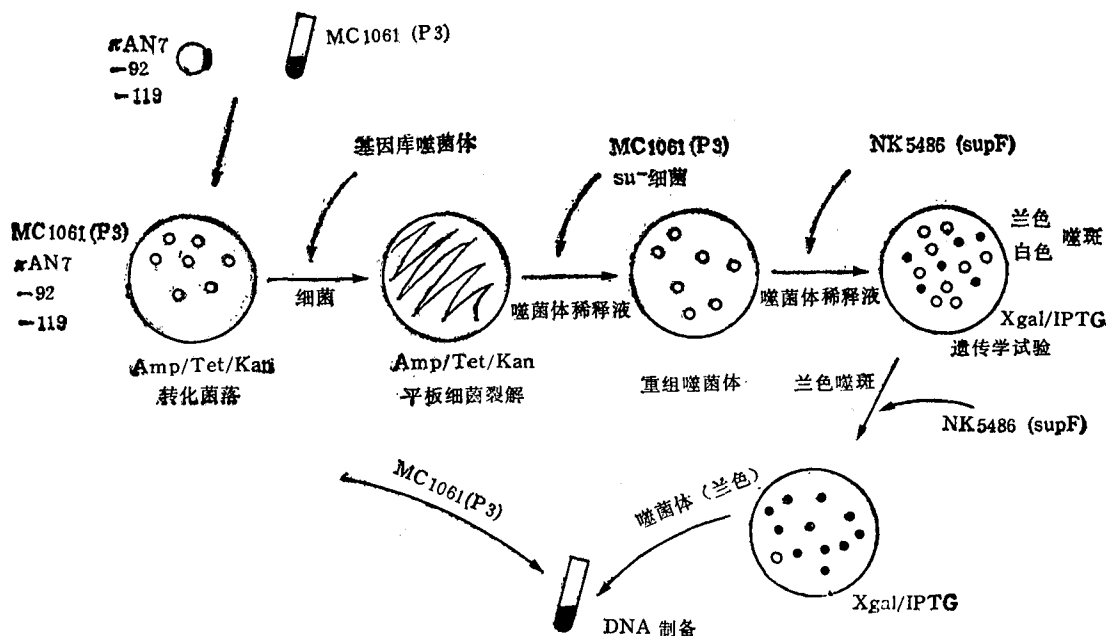


图1 π AN7-质粒筛选大鼠基因组库

Fig. 1 The protocol for screening rat genomic library with π AN7 mini-plasmid

基因组噬菌体感染携带 π AN7-92 和-119 的 MC1061 $r^-m^+su^-$ 菌，得到的重组噬菌体经 NK5486 (LacZam) 菌的遗传学试验，分离出蓝色噬斑，用于小量 DNA 制备。详见正文方法学一节

The library phages infected *E. coli* MC1061 $r^-m^+su^-$ (P3) carrying π AN7 clones (-92, or-119) and the resulted phage suspension was incubated on su^- cell plates. The isolated plaque suspension was put onto the lawn of *E. coli* NK5486 (LacZam) for genetic test. Blue plaques were tested once more and used for DNA-prep

14] 的方法，从上述纯化的蓝噬斑制备小量 DNA 样品。取 $1\mu\text{g}$ λ DNA 点样于硝酸纤维素滤膜^[15]，与 ^{32}P 标记的探针 cDNA-92 和-119 作杂交鉴定。

λ DNA 物理图谱

(1) 部分酶解：上述鉴定的重组 λ DNA，经 ^{32}P -dGTP 和 Klenow 片段标记于右臂的 3' 端^[16]。约 $5 \times 10^4\text{cpm}$ 的 ^{32}P - λ DNA 用于部分酶解反应：EcoRI、SalI、HindIII、BamHI、

SphI、HaeIII 和 XbaI^[17]。酶解样品由 0.3% 琼脂糖凝胶电泳 ($15 \times 20\text{cm}$) 分析，电压 2V/cm ，24h。凝胶于 7% TCA 固定 20min，吸除多余水分，曝光于 X 射线胶片 (-70°C)。

(2) Southern 杂交： $1\mu\text{g}$ 非标记 λ DNA 经同样的部分酶解反应和琼脂糖凝胶电泳分部，与 ^{32}P -cDNA-92 和-119 作 Southern 杂交。综合该两部分的资料，推演出基因组 DNA 的大致物理图谱。

三、结果和讨论

π AN7cDNA 克隆 π AN7 是一种 885bp 的 mini-质粒,携带有酪氨酸-tRNA 琥珀突变抑制子基因 (supF), 以及用于插入 cDNA 片段的多个限制性酶位点^[12]。两个经鉴定的 cDNA 片段插入到 π AN7 的 PstI 位点, 如图 (2) 所示, 其与依赖于雄激素的前列腺专一性 mRNA 相互补。

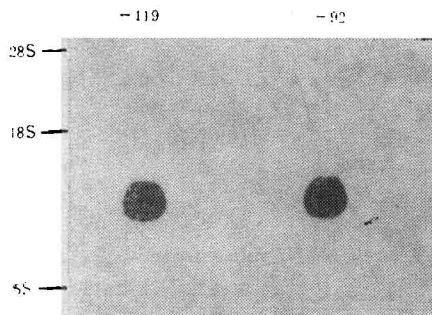
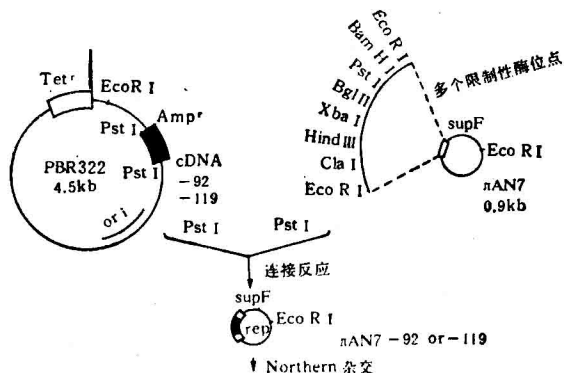


图2 π AN7cDNA-92 和-119 的克隆和鉴定

Fig. 2 The cloning and the identification of cDNA fragments

cDNA-92 和-119 (*PstI* 位点)连接在 π AN7 质粒的 *PstI* 位点上。该克隆的 cDNA 作探针,与前列腺 poly(A) RNA 作 Northern 杂交

Two cDNA fragments (*PstI* site) were ligated to π AN 7 plasmid at *PstI* site of polylinker. The cloned cDNAs were hybridized to prostatic poly (A) RNA, which was Northern-blotted onto N.C. filter from 1% agarose gel, under the condition described in METHODS

克隆的 π AN7-92 和-119 经菌落杂交选出 (图 3), 然后, 从对应的母板上选取阳性菌落, 用于克隆 DNA 的制备和鉴定。图 4 结果

π AN7-92

π AN7-119

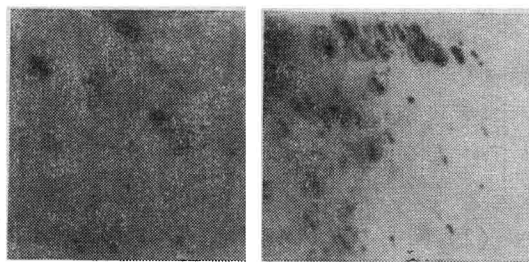


图3 克隆的 π AN7 质粒与 cDNA 探针的原位杂交

Fig. 3 *In situ* hybridization of cloned π AN7 plasmids with cDNA probes

π AN 7-92 和-119 的 MC1061 转化株生长于 LB 平板表面的硝酸纤维素滤膜上,经处理 (见方法学一节)后,与 32 P-cDNA-92 和-119 (5×10^6 cpm) 杂交。X-线胶片曝光 10h

MC1061 transformants by ligated plasmid DNA π AN7-92, or-119 grew on N. C. filters which had been blotted on the top of LB plates (Kan/Amp/Tet). After incubation, the N. C. filters were treated as described in METHODS and hybridized with 32 P-pBRcDNA (5×10^6 cpm). X-ray film exposure was for 10h

表明,克隆的 π AN7 杂合质粒携带的插入片段与 pBR 杂合质粒中的相一致。

雄激素相关的基因组克隆 当携带有 π AN7-92 和-119 的菌株 MC1061 $r^-m^+su^-$ 由基因库噬菌体感染时,与 π AN7 克隆中 cDNA 顺序同源的噬菌体,可与前者发生重组。噬菌体因此携带有来自 π AN7 质粒的 *supF* 基因,而能生长于 su^- 细菌内^[1]。

按照噬菌体对宿主菌的比例 ($10^6:10^8$),感染的细菌全部裂解。收获的裂解细菌悬液再感染 su^- 菌,分离到几十个重组噬菌斑。基因库噬菌体不能直接在 su^- 菌内生长,可作为负对照。野生型 Charon 4A 噬菌体,则“吃掉”全部 su^- 菌,平板呈半透明状。

遗传学试验中,噬菌体悬液于 NK 5486 (LacZam) 菌面产生 7—7.5% 的蓝色噬斑。取 10—20 个蓝噬斑重复试验,最后得到 100% 的蓝噬斑。Charon 4A 野生型噬菌体全部为蓝噬斑。

少量制备的 DNA 用于点杂交,约 1/3—2/3 蓝噬斑含有的大鼠 DNA 顺序与雄激素调节的 cDNA 顺序同源。

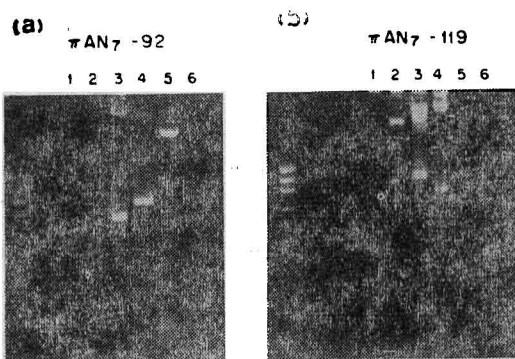


图4 π AN7 杂合质粒的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of hybrid π AN7 plasmid

自杂交阳性菌落分离到的质粒DNA,经用 PstI 消化后于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。pBR 322 克隆及其 PstI 酶解产物作为对照。(a),第 1 行至第 6 行: π AN7 质粒, π AN7 质粒 + PstI, π AN7-92, π AN7-92 + PstI, pBR 克隆-92 + PstI 和 pBR 克隆-92。(b),第 1—6 行: pBR 克隆-119, pBR 克隆-119 + PstI, π AN7-119 + PstI, π AN7-119, π AN7 质粒 + PstI 和 π AN7 质粒。分子量标准为 λ DNA HindIII 和 ϕ X174DNA HaeIII 片段

DNA samples were isolated from positive colonies (from filter hybridization in Fig. 3), digested with PstI and applied to 1.5% agarose gel. pBR322 clones and its PstI products were run as controls. (a), lanes 1 to 6: π AN7 plasmid, π AN 7 plasmid + PstI, π AN 7-92, π AN 7-92 + PstI, pBR clone-92 + PstI, and pBR clone-92. (b), lanes 1 to 6: pBR clone-119, pBR clone-119 + PstI, π AN7-119 + PstI, π AN 7-119, π AN7 plasmid + PstI, and π AN7 plasmid. Molecular markers were λ DNA HindIII and ϕ X174 DNA HaeIII fragments

基因组 DNA 物理图谱 阳性噬斑制备的 DNA, 末端标记后用于限制性酶谱分析。 λ DNA-92 有 4 个 EcoRI, 5 个 KpnI, 6 个 SmaI, 12 个 HaeIII, 8 个 BamHI, 6 个 SalI, 7 个 PstI 和 5 个 HindIII 片段; λ DNA-119 则有 4 个 EcoRI, 5 个 KpnI, 5 个 SmaI, 7 个 HaeIII, 9 个 BamHI, 3 个 SalI, 6 个 PstI 和 6 个 HindIII 片段(图未列)。

单个或两个限制性酶解的 λ DNA 样品, 分别与 32 P-cDNA-92 和 -119 (~300bp, 作 3' 端探针)或与 32 P λ gt10cDNA-92 和 -119 (~1kb, 作 5' 端探针, 资料未发表), 进行 Southern 杂交, 分析基因组片段的 3' 和 5' 区域, 如图(5)所示。

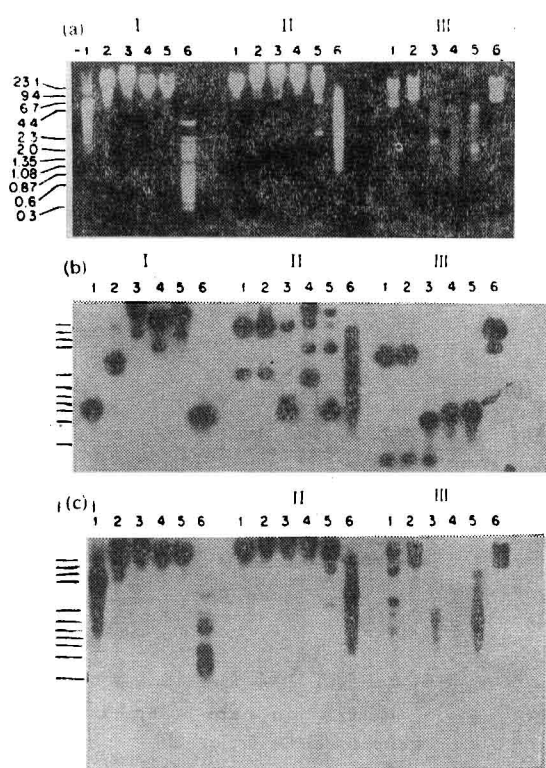


图5 λ DNA-92 限制性片段与 cDNA 探针的 Southern 杂交

Fig. 5 Southern blot hybridization of restriction fragments of lambda genomic DNA-92 with 3' and 5' cDNA probes.

(a) 酶解 DNA 于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳(b) 32 P-cDNA-92 探针和 (c) 32 P- λ gt10cDNA-92 探针的 Southern 杂交。分子量标准是 λ DNA HindIII 和 ϕ X174 DNA HaeIII 片段。 32 P-c DNA 5×10^6 cpm, X-线胶片曝光 12h

λ DNA-92 was digested with combinations of various restriction endonucleases. The digests were subjected to 0.7% agarose gel electrophoresis (a) and Southern hybridized with 32 P-cDNA-92 probe (b) and 32 P- λ gt 10 cDNA-92 probe (c). The various restriction digestions are shown in three frames reading from left to right. I: (1) EcoRI; (2) EcoRI + SalI; (3) EcoRI + XbaI; (4) EcoRI + BamHI; (5) EcoRI + SphI; (6) EcoRI + Sma I. II: (1) EcoRI + TaqI; (2) HindIII; (3) TaqI + HindIII; (4) TaqI; (5) TaqI + PstI; (6) PstI. III: (1) XbaI + SmaI; (2) XbaI + KpnI; (3) XbaI + SphI; (4) XbaI + BamHI; (5) XbaI + SalI; (6) XbaI + TaqI. Input of both 32 P-cDNA probes was 5×10^6 cpm; film was exposed for 12h. DNA size markers shown at left were HindIII digest of lambda DNA and HaeIII digest of ϕ X 174 DNA

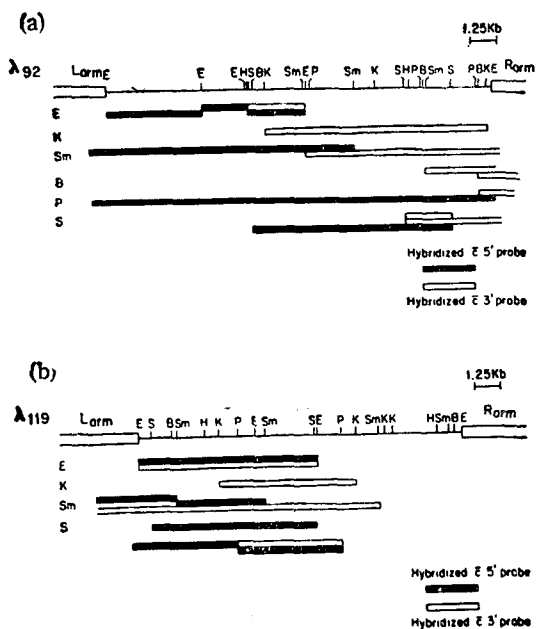


图6 λ 基因组 DNA 的限制性酶谱

Fig. 6 Restriction maps of λ genomic DNA-92, or-119

λ DNA-92(a), 或-119 (b)的限制性酶谱由部分酶解和 Southern 杂交推演。图中P:PstI, B:BamHI, Sm:SmaI, K:KpnI, E:EcoRI, H:HindIII

The restriction maps are deduced by the combination of the partial digestions and Southern hybridizations of DNA-92(a), or-119(b), respectively. The letter P is PstI B is BamHI, Sm is SmaI, K is KpnI, E is EcoRI and H is HindIII, respectively.

结合上述部分资料, 推演出一个大致物理图谱(图6)。其中与5'端探针有较强杂交的限制性DNA片段, 将被再克隆, 用于上游区结构和功能的分析。

本文应用 π AN7 杂合质粒筛选了 λ Charon 4A 大鼠肝 DNA 基因库, 原理是 π AN7 杂合质粒的插入顺序识别噬菌体携带的同源顺序,

与之重组整合。因此, 来自 π AN7 的功能性 supF 基因, 使重组噬菌体能在 su^- 细菌生长。而其余的噬菌体, 因为在 A 和 B 基因上的 amber 突变, 不能在 su^- 细菌生长。须注意到, 整合的 π AN7cDNA 会阻断基因组的 DNA 顺序; 并且, 这些附加的顺序 (π AN7 质粒 DNA 和 cDNA) 在今后精细的酶谱和顺序分析中, 应被仔细检查出来。

本工作得到王通裕教授的资助和指导, 特此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- 1 Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 353—361
- 2 Chamberlin L L *et al.* *Biochemistry*, 1983; 22(13): 3072
- 3 Xu Y H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 111 (2): 624
- 4 Ullrich A *et al.* *Science*, 1977; 196 (4296): 1313
- 5 Cox R A. *Meth Enzymol*, 1968; 12 (Part B): 120
- 6 Aviv H, Leder P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972; 69 (6): 1408
- 7 Goldberg D A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77 (10): 5794
- 8 Alwine J C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74 (12): 5350
- 9 Grunstein M, Hogness D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72(10): 3961
- 10 Chaconas G, van de Sande J H. *Meth Enzymol*, 1980; 65(Part I): 75
- 11 Dagert M, Ehrlich S D. *Gene*, 1979; 6(1): 23
- 12 Ish-Horowicz D, Burke J F. *Nucleic Acids Res*, 1981; 9(13): 2989
- 13 Blattner F R *et al.* *Science*, 1977; 196 (4286): 161
- 14 Maniatis T *et al.* *Cell*, 1978; 15(4): 687
- 15 Parnes J R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78 (4): 2253
- 16 Drouin J. *J Mol Biol*, 1980; 140(1): 15
- 17 Smith H O, Birnstein M L. *Nucleic Acids Res*, 1976; 3 (9): 2387

[本文于1989年9月25日到收]

(Continued on page 447)

EFFECT OF SCAVENGERS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND Ca^{2+} -CHANNEL BLOCKER ON THE HUMAN LYMPHOCYTE CHEMILUMINESCENCE

Zhang Xuejun, Liu Lian, Si Chanping

(Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hufei 230032)

ABSTRACT

It was reported that Con A-induced, Luminol-dependent chemiluminescence response of human peripheral lymphocytes might be inhibited by scavengers of reactive oxygen species (ROS), ie, vitamin C, sodium benzoate, mannitol, L-histidine, superoxide dismutase (SOD) and catalase. It was suggested that human lymphocyte chemiluminescence (Ly-CL) is related to the generation of ROS after lymphocytes were stimulated with Con A. ROS participating in human Ly-CL contained $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , O_2^- and so on. The higher the concentration of Ca^{2+} -channel blocker—Verapamil presented, the lower the intensity of human Ly-CL observed. Probably, human Ly-CL depended on increased intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ of lymphocyte stimulated with antigens or mitogens. These findings propose that human Ly-CL may be an early events of lymphocyte activation.

Key word lymphocyte chemiluminescence, reactive oxygen species scavenger, Ca^{2+} -channel blocker

(Continued from page 452)

SCREENING OF RAT GENOMIC LIBRARY WITH MINI-PLASMID

Xu Youhai

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

ABSTRACT

Two androgen related cDNA fragments were re-cloned into mini-plasmid AN7 (885bp) and then integrated into phage chromosome of lambda Charon 4A-rat liver genomic library by reciprocal recombination. The selected lambda DNA clones with the homologous sequence to the cDNAs were identified by genetic test and dot hybridization.

Key words rat genomic library, mini-plasmid π AN7, DNA molecular cloning