

较强,并含较多的硫酸基团。由此初步证明,盐藻多糖复合物是一种酸性蛋白质聚糖。

盐藻多糖复合物经酸水解后,与醋酸酐盐酸羟胺作用生成糖腈乙酸酯衍生物置 OV-

1710 毛细管气相色谱柱中层析,可得到葡萄糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖和阿拉伯糖色谱峰。其中葡萄糖最多,半乳糖和甘露糖次之。

人 SCF 基因 cDNA 克隆及其在 COS7 细胞中的表达*

朱元晓 赖春宁 王建安 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

关键词 SCF, 基因, 克隆, 表达

造血干细胞因子(SCF)是新近发现的一种影响造血干祖细胞生长和发育的细胞生长因子。它在造血系统原发性疾患和继发性损伤治疗方面具有潜在应用价值^[1]。本研究属首次在国内报道人 SCF 基因 cDNA 的克隆和表达。首先参照 F. H. Martin 等人发表的人 SCF 基因 cDNA 序列^[2],设计并合成用于扩增人 SCF 信号肽和膜外活性区域基因 cDNA 的一对引物,即:5' CGGAGATCTCCTTATGAAG-AAGACACAA 3' 和 5' GCATCGATTACTA-GGCTGCAACAGGGGGTAACAT 3' 从培养的人肝细胞株中提取总 RNA,取 1 μ g 总 RNA,以 oligo dT 为引物,在逆转录酶作用下合成 cDNA 第一条链^[3]。将反应产物用 Cetus 公司生产的 PCR 试剂盒进行扩增,引物为上述合成的特异性引物,反应条件和反应步骤按试剂盒说明书进行。反应体积为 100 μ l,引物浓度为 0.5 μ mol/L,反应温度和时间是:94 $^{\circ}$ C 80s, 55 $^{\circ}$ C 80s, 72 $^{\circ}$ C 100s, 共 40 个循环。循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 保温 8min,取 5 μ l 扩增物于 2% 琼脂糖胶上检查扩增结果。用 Promega 公司生产的 PCR 产物回收试剂盒回收扩增片段。将扩增片段以平端方式插入 pUC18 质粒的 Sma I 位点,在正向和反向引物的引导下,用 Pharmacia 公司生产的 T₇DNA 测序试剂盒进行插入片段的核酸序列分析。将扩增片段插入穿梭载体 pCSV 的 Bgl II 和 Cla I 位

点,构建成 pCSV-SCF。用 DEAE-Dextran 方法将 pCSV-SCF 转入 COS7 细胞。收集转染后 48h 的培养上清,观察其对体外人骨髓粒-

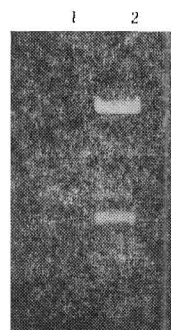


图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖胶电泳图

1. PCR 2. PBR322/Hinf I

表 1 PCSV-SCF 转染 COS7 细胞培养上清对骨髓细胞形成克隆的影响¹⁾ $n = 3$

因子	CFU-GM	BFU-E
1640	0	0
HMCM ²⁾	78.5 $\pm$ 5.5	
HMCM + PCSV	74.6 $\pm$ 4.7	
HMCM + PCSV-SCF	185.5 $\pm$ 4.5	
EPO		23.1 $\pm$ 2.1
EPO + PCSV		20.3 $\pm$ 3.2
EPO + PCSV-SCF		44.0 $\pm$ 2.8

1) 转染细胞上清经 10⁻⁴ 稀释后加 100 μ l 至 1ml 体系中,表中数据为 2 $\times$ 10⁵ 细胞中所含克隆数(克隆数/个)。

2) HMCM: 人肌浸液。

* 本课题为国家 863 青年基金资助项目。

收稿日期: 1992-11-02 修回日期: 1992-12-29

单集落形成单位 (CFU-GM) 和红系爆增集落形成单位 (BFU-E) 的影响。CFU-GM 的培养采用肌浸液培养体系^[4], 肌浸液浓度为 50 μ l/ml。BFU-E 培养中的红细胞生成素 (EPO) 为 Amgen 公司产品, 反应浓度为 2U/ml。

研究结果显示, 经反转录和 PCR 扩增出来 cDNA 片段长度为 600bp 左右 (见图 1), 与原设计中欲扩增 cDNA 片段大小相符。对扩增片段两端共 500 多 bp 的核酸序列分析, 显示与欲扩增片段两端序列完全一致。表明本研究成功地克隆了人 SCF 信号肽和膜外活性区域的 cDNA。转染 pCSV-SCF 的 COS7 细胞培养上清, 可明显增加 CFU-GM 和 BFU-E 的

数量和大小 (表 1), 与国外报道的 SCF 活性一致, 表明克隆的 SCF 基因 cDNA 片段在 COS7 细胞中获得表达, 也说明 SCF 可影响髓系早期造血细胞的生长发育。

参 考 文 献

- 1 Witte O W. Steel locus defines new multiple growth factor. *Cell*, 1990; 63:5
- 2 Martin F H, Sidney V S, Keith E L *et al*. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, 1990; 63:203
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: CSH lab press, 1989; 14. 20
- 4 葛中良, 刘秀珍. 肌浸液对骨髓培养的成团作用. *中华血液学杂志*, 1981; 2:8

科技信息

³³P: 一种新的分子生物学放射性示踪物

邓 锡 云

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

关键词 ³³P, 放射性示踪物, 分子生物学

在选择放射性示踪物时, 人们主要考虑敏感性、分辨率和安全性。作为分子生物学实验常用的放射性示踪物, ³²P 和 ³⁵S 各有其不足之处。³²P 因为能量高、放射比活性大因而其操作极不安全, 且有分辨率不够高之缺陷, 用于序列测定极不理想, 而且由于其半衰期太短, 操作很不方便。³⁵S 虽补充了 ³²P 的不足, 但由于其放射比活性低, 检测敏感性不够高, 对于单拷贝基因的检测往往是爱莫能助。

最近, 在国外出现了一种新的放射性示踪物——³³P。与其他两种常用的同位素 ³²P 和 ³⁵S 相比, ³³P 以其独特的物理学特征 (见表 1) 而受到人们的关注和

重视。

显然, ³³P 的物理学特性介于 ³²P 和 ³⁵S 之间。³³P 所发出的射线最高能量比 ³²P 低得多, 因而其使用的安全性极强, 3 mm 厚的塑料管壁即可阻挡大部分的射线, 而且 ³³P 的分辨率大大超过 ³²P。同时, 由于 ³³P 的放射比活性比 ³⁵S 高出一倍, ³³P 的敏感性亦很强, 可用于单拷贝基因的检测。

现在, 美国 Du Pont 公司已开始生产 ³³P 标记的单核苷酸, 这些单核苷酸有数种形式, 包括 [γ -³³P]-ATP (NEG-302H)、[α -³³P]-dATP (NEG-312H) 和 [γ -³³P]-UTP (NEG-307H) 等。

³³P 在分子生物学领域崭露头角, 已开始显示出广阔的应用前景。用于 DNA 序列测定、单链构象多态性 (SSCP) 分析以及原位分子杂交等, 均已取得较为满意的结果。³³P 的出现是生物学中放射性示踪技术的一个重要进展。可以说, ³³P 是一种颇为理想的分子生物学示踪物。

表 1 ³²P, ³³P 和 ³⁵S 的物理学特征比较

同位素	半衰期 /d	最高能量 /MeV	最大比活性 /(Ci/mol)
³² P	14.3	1.71	6,000
³³ P	25.4	0.249	3,000
³⁵ S	87.4	0.167	1,500