

关系分析结果发现, DNA 倍体与 P^{21} 表达量密切相关, 异倍体肿瘤 P^{21} 表达量 (2.54 ± 0.95) 明显高于二倍体肿瘤 P^{21} 表达量 ($FI = 1.56 \pm 0.67$), 说明 P^{21} 表达明显调控肿瘤 DNA 合成的改变. 从表 2 结果来看, P^{21} 表达阳性其细胞增殖活性 (PI) 值明显增强, 也说明 DNA 合成速率加快. 在各病变中, P^{21} 表达阳性者, 其 PI 值明显高于 P^{21} 表达阴性者, 而且各病变之间的 PI 值也逐渐增高.

本研究资料的结果说明, $ras P^{21}$ 表达量的变化, 从慢性萎缩性胃炎、癌前病变、胃癌细胞的表达是逐渐增加, 证明 $ras P^{21}$ 在癌变的过程中参与了重要的致癌作用. 但 ras 基因的激活不是唯一的导致肿瘤发生的因素, 可能还有其他癌基因的参与, P^{21} 表达量的改变, 能否作为癌变早期诊断的一分子生物学标志物, 有待进一步探讨.

参 考 文 献

- 1 左连富主编. 流式细胞术样品制备技术. 北京: 华夏出版社, 1991: 14
- 2 Morkve O, Laerum O D. Cytometry, 1991; 12: 438
- 3 Feramisco J R, Gross M, Rosenberg M *et al.* Cell, 1984; 38: 109
- 4 Hand P H, Thor A, Wunderlich D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 5227
- 5 Viola M V, Fronowitz F, Oravez S *et al.* J Exp Med,

1985; 161: 1213

6 Pandidos D A, Kerr I B. Br J Cancer, 1984; 49: 681

Quantitatively Study of Oncogene $ras P^{21}$ Expression in Carcinomas and Non-cancer Lesion of the Stomach. Zuo Lianfu, Hu Junlan, Liu Jianghui, Guo Jianwen, Gao Guodong (Hebei Provincial Tumor Hospital, Shijiazhuang 050011, China); Qi Fengying (Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017, China).

Abstract The $ras P^{21}$ expression in non-cancer lesion and carcinomas of the stomach was quantitatively studied by flow cytometry, and relation of $ras P^{21}$ expression to DNA ploid and cellular proliferation index were inquired. The results showed that $ras P^{21}$ expression was higher in carcinomas than in non-cancer lesion one's of the stomach. In non-cancer lesions, $ras P^{21}$ expression in precancer lesion was higher than in chronic atrophic gastritis, and the raiser of fluorescence index in $ras P^{21}$ expression was found with raiser of histological grade. DNA ploid was associated with $ras P^{21}$ expression.

Key words stomach, carcinoma and precancer lesion $ras P^{21}$, flow cytometry

携带 EB 病毒潜伏膜蛋白基因 转基因小鼠的制备*

肖志强 姚开泰

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

刘 薇 卢光琇

(湖南医科大学生殖工程研究室, 长沙 410078)

摘要 EB 病毒潜伏膜蛋白 (LMP) 具有致癌活性, 构建含金属硫蛋白基因-1 (MT-1) 调控区和 LMP 基因的 pBR322-MT-LMP 质粒, 用显微注射法将 MT-LMP 转基因接种于小鼠受精卵内制备转基因小

* 国家“八五”攻关和美国中华医学基金会 (CMB) 资助项目.

收稿日期: 1994-01-25, 修回日期: 1994-05-04

鼠的动物模型。结果: a. 注射后卵的存活率和仔鼠出生率分别为 73% 和 13%; b. 转基因鼠尾部组织 DNA 分析, PCR 法证明二只小鼠有 LMP 基因扩增带, Southern 杂交亦显示 PCR 阳性鼠有特异的 LMP 杂交信号, 这说明 LMP 基因已整合于鼠基因组, 整合率为 8%。结果说明, 构建携带 LMP 基因的转基因动物模型已成功。

关键词 转基因小鼠, 金属硫蛋白基因, 潜伏膜蛋白基因, EB 病毒, 鼻咽癌

许多学者认为 EB 病毒潜伏膜蛋白 (latent membrane protein, LMP) 与人鼻咽癌的发生有密切联系, 体外转化实验和分子杂交进一步提示, EB 病毒潜伏膜蛋白 (LMP) 基因是 EB 病毒的癌基因^[1-3]。但关于 LMP 在体内的作用探讨甚少^[4], 为此本文构建了含金属硫蛋白基因-1 (Metallothionein-1, MT-1) 调控区和潜伏膜蛋白基因的融合基因 (MT-LMP), 并以它作为转基因制备了转基因小鼠, 为今后探讨 EB 病毒致癌机理提供转基因的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物: 昆明种小白鼠, 本校实验动物中心提供。质粒: pCMV α -LMP 由本所彭怀政同志提供, pBR322-MT 由北大生物系提供。试剂: 内切酶, 碱性磷酸酶 CIP, T4DNA 连接酶, RNAaseA, 蛋白酶 K, Taq DNA 多聚酶, dNTP 及探针随机引物标记盒均购自 Promega 公司, PCR 引物由中科院上海细胞所合成, α -³²P-dCTP 购自北京福瑞生物工程公司。

1.2 pBR322-MT-LMP 质粒的构建

1.2.1 LMP 基因的分离 BamH I 酶切 pCMV α -LMP (9.14kb), 电泳分离, 低熔点琼脂糖回收 3.2kb 的含 LMP 基因片段, 该片段含 TATA Box, 戴帽和加尾信号及 LMP 基因序列。

1.2.2 pBR322-MT 大片段的分离 MT 基因的启动子和金属硫蛋白调控区位于 5' 端 300bp, 为保留其转录调控区, 又能切除其结构基因, 因此我们选择 Bgl II (位于 MT 基因 +64bp) 和 BamH I 酶切 8.16kb pBR322-MT 质粒, 电泳分离, 低熔点琼脂糖法回收 5.8kb 的 pBR322-MT 大片段, 该片段含 MT 基因转

录调控区和 3.986kb 的 pBR322。

1.2.3 CIP 处理和两片段连接 用 CIP 处理 pBR322-MT 大片段后, 再用 T4 DNA 连接酶将 LMP 基因与该大片段通过粘性末端连接 (15°C, 16h), 构成重组 pBR-MT-LMP 质粒。

1.2.4 重组质粒的转化和鉴定 应用 Cohen (1972 年) 的方法将重组质粒转化大肠杆菌 TG1 株, 得大量转化克隆, 随机挑取 10 个克隆扩增后快速抽提质粒 DNA, 用 BamH I 和 Sma I 酶切电泳分析, 再用 SaI I 酶切鉴定方向, 结果得到 2 个阳性重组质粒, 命名为 pBR322-MT-LMP。

1.3 MT-LMP 转基因的分离和纯化

用 BstE I 和 BamH I 双酶切 pBR322-MT-LMP, 琼脂糖电泳分离 3.5kb BstE I - BamH I 片段, 该片段包含 MT 基因调控区和 LMP 基因, 然后用电洗脱法回收纯化 MT-LMP 作为转基因。

1.4 前核显微注射法将转基因 (MT-LMP) 导入受精卵细胞

用 TE (0.2mmol/L EDTA, 8mmol/L Tris-HCl, pH7.4) 将 MT-LMP 转基因溶解, 调整浓度至 1.85ng/ μ l, 用显微注射法将其注入昆明种小鼠受精卵雄性前核中, 注入量为每个卵 1—2pL, 再移植到 6 周龄的假孕母鼠输卵管中, 每侧输卵管接种 5—24 个卵细胞, 待其发育后产仔。

1.5 仔鼠尾部组织 DNA 的制备和分析

1.5.1 制备 当仔鼠长至 2 周龄后, 剪下长约 0.5—1cm, 重约 0.1—0.2g 的鼠尾部, 剪碎, 在 2ml STE (1%SDS, 1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 中冰浴上匀浆, 用 600mg/L 蛋白酶 K 和 50mg/L RNAase A 37°C 消化匀浆液过夜, 酚提取一次, 酚/氯仿/

异戊醇(25:24:1)提取2—3次,氯仿再提取一次,无水乙醇(2.5:1)沉淀,75%乙醇洗二次,室温干燥1h,溶于TE(1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH7.6)中,其DNA浓度为0.5—1g/L.

1.6 鼠尾组织 DNA 中 LMP 基因的 PCR 扩增

1.6.1 PCR 引物的设计 引物设计参照 EB 病毒 B₉₅₋₈ 株 LMP 基因序列,两引物分别由 20 和 21bp 组成,(C+G)含量为 65%,二者之间无同源序列,不互补配对,引物 3' 端不形成“二聚体”,引物内部不形成二级结构,长度合适,特异性高,P1 和 P2 引物序列分别为:

P1 GTGACTGGACTGGAGGAGCC

p2 GAGGGAGTCATCGTGGTGGTG

P1 位于 LMP 基因的第二个外显子,P2 位于 LMP 基因第二和第三个外显子连接区,它们所对应的 EBV 基因组位置分别为 169341—169322 和 168721—168701,控制长度为 600bp.

1.6.2 LMP 基因的 PCR 在 0.5ml Eppendorf 管中加入 50 μ l 反应液,其中含 50mol/L KCl, 1.5mol/L MgCl₂, 10mol/L Tris-HCl, pH8.3, 4 种 dNTPs 各为 200mol/L,引物各为 30pmol,模板浓度为 0.5—1.0 μ g,混合后加 50 μ l 石蜡油,95 $^{\circ}$ C 变性 10min,加 2.5U Taq 酶,在 PCR 仪上,94 $^{\circ}$ C, 50s; 55 $^{\circ}$ C, 50s; 72 $^{\circ}$ C, 1min; 35 个循环周期.

1.7 Southern 杂交

1.7.1 DNA 探针的制备 用 Xho I 酶切 pCMV α -LMP 质粒,琼脂糖电泳分离 1.9kb LMP 基因片段,电洗脱法回收该片段作为探针.

1.7.2 探针标记 用 α -³²P-dCTP 为标记物,接随机引物标记盒说明标记探针.标记 DNA 量 50ng,探针比放射活性大于 1×10^{14} cpm/gDNA.

1.7.3 Southern 杂交 用 150U Xho I 消化 10 μ g 鼠尾部组织 DNA,以 λ DNA/Hind III 为分子量标志,在 0.9% 琼脂糖凝胶上电泳过夜

(1 $\times$ TAE, 30V),采用传统的纸巾法将凝胶中的 DNA 转移到尼龙膜上.杂交方法如下:尼龙膜在蒸馏水中浸湿,6 $\times$ SSC 中浸泡 10min,在 6 $\times$ SSC,5 $\times$ Denhart's,0.5%SDS,100mg/L SSDNA, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0 中 68 $^{\circ}$ C 预杂交 6h.弃预杂交液,换上同样的液体加同位素标记的探针 68 $^{\circ}$ C 杂交过夜.用 2 $\times$ SSC, 0.1%SDS, 37 $^{\circ}$ C, 洗膜两次,每次 10min;再用 0.1 $\times$ SSC, 0.1%SDS, 62 $^{\circ}$ C, 洗膜二次,每次 10min.放入暗匣内-70 $^{\circ}$ C 过夜.取出 X 光胶片显影,定影并观察结果.

2 结 果

2.1 转基因质粒 pBR322-MT-LMP 的构建

因基因表达的强弱和组织特异性受基因调控区的控制,为使 LMP 基因能表达,我们将

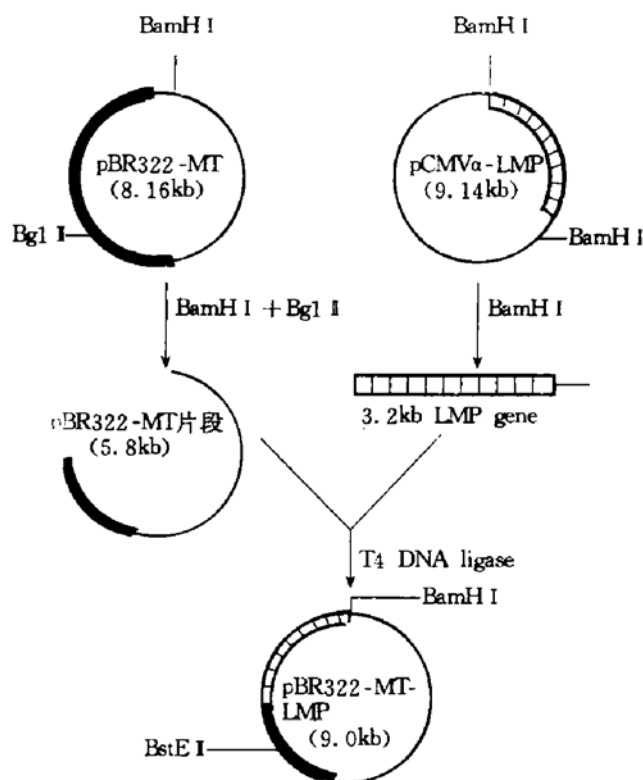


图 1 pBR322-MT-LMP 质粒的构建

LMP 基因与强启动子 MT 基因调控区相连,构建含 MT-LMP 融合基因的重组质粒.重组质粒鉴定结果为 9.0kb, SmaI (LMP 基因的唯一酶切位点) 能将 pBR322-MT-LMP DNA 线性化,再用 Sal I 酶切得 1.0kb 和 8.0kb 二个

片段, 这说明我们得到了 LMP 正方向与 MT 调控区相连的重组质粒, 命名为 pBR322-MT-LMP (图 1, 2, 3).

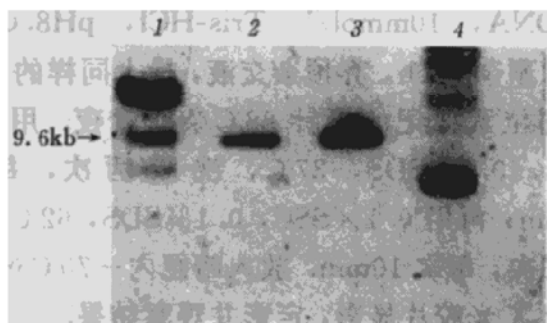


图 2 Sma I 酶切、电泳分析 pBR322-MT-LMP 重组质粒

1: λ DNA Hind III Marker; 2, 3: Sma I 酶切将二个 pBR322-MT-LMP 质粒线性化, 大小 9.0kb; 4: pBR322-MT-LMP 质粒 DNA.

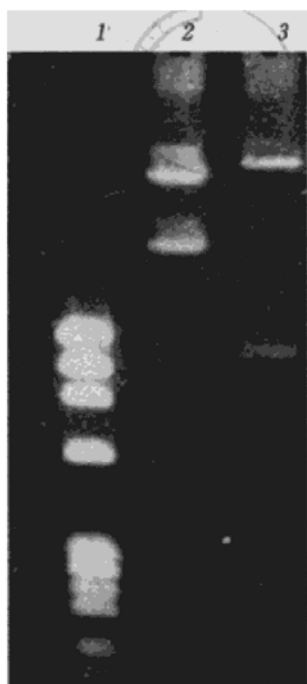


图 3 Sal I 酶切鉴定 pBR322-MT-LMP 重组质粒中 LMP 基因的正、反方向插入

1: $\Phi \times 174$ DNA Hae III Marker; 2: Sal I 将 pBR322-MT-LMP 切成二个片段, 大小分别为 2.7 和 6.3kb, 示 LMP 基因反方向插入; 3: Sal I 将 pBR322-MT-LMP 切成二个片段, 大小分别为 1.0 和 8.0kb, 示 LMP 基因正方向插入.

2.2 转基因鼠的制备

本文共注射 460 只受精卵, 335 只经注射培养后存活, 存活率 73% (335/460), 将其中的 261 只受精卵分别植入 10 只假孕母鼠输卵管中, 共有 34 只幼仔出生, 幼仔出生率 13%, 其中 9 只被母鼠咬死, 存活 25 只.

2.3 转基因的整合分析

25 只仔鼠基因组 DNA 经 LMP 的 PCR 扩增, 其中 6 号和 10 号鼠有特异的 0.6kb LMP

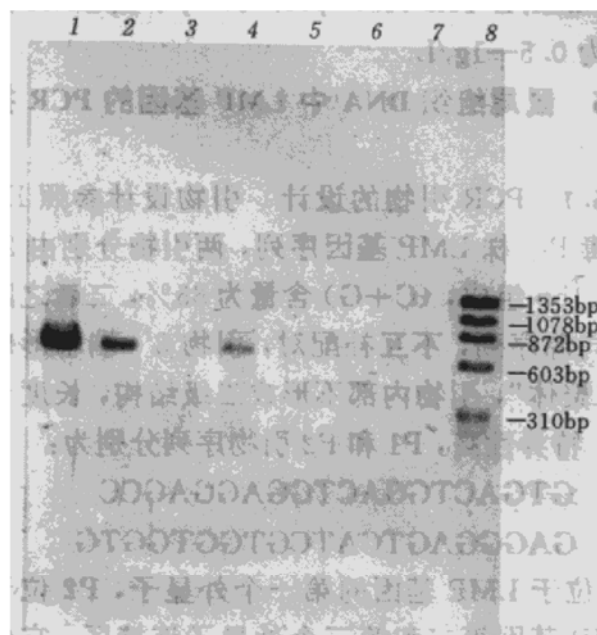


图 4 仔鼠基因组 DNA PCR 产物电泳分析

1: pCMV α -LMP 质粒, 有 0.6kb LMP 基因扩增带. 2, 4: 10 号和 6 号小鼠 DNA, 有 0.6kb LMP 基因扩增带. 3, 5, 6, 7: 依次为 7, 5, 4 及 3 号小鼠 DNA, 无扩增带. 8: Φ X174DNA Hae III Marker.

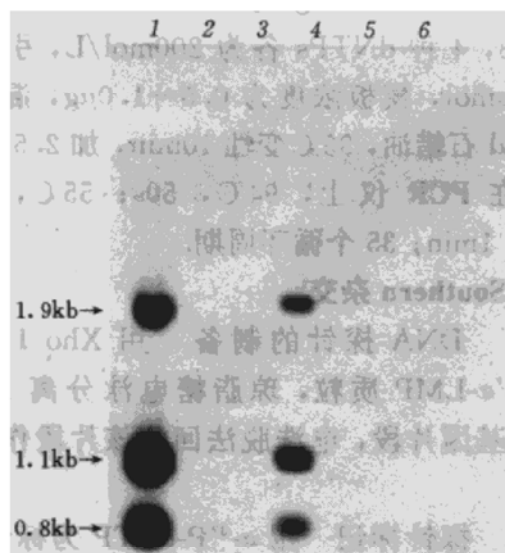


图 5 仔鼠基因组 DNA Southern 杂交分析

1, 4: 10 号和 6 号小鼠 DNA, 均见三条 LMP 基因杂交带. 2, 3, 5, 6: 依次为 7, 5, 4 及 3 号小鼠 DNA, 无杂交信号.

基因扩增带, 基因组 DNA Southern 杂交进一步显示: 6 号和 10 号鼠均出现三条 LMP 基因杂交带, 上述结果说明 6 号和 10 号鼠有 MT-LMP 基因整合, 整合率为 8% (2/25). (图 4, 5).

3 讨 论

将外源基因导入小鼠胚胎并建立转基因小鼠技术, 已成为探索生物发育、细胞分化、基因表达调控等重要生命现象奥秘的分子生物学技术, 它亦为复制人类遗传性疾病模型, 基因治疗, 癌变的分子机理研究, 及优生、衰老方面的研究提供了一个全新的基础^[5]. 生产转基因鼠的关键之一是转基因能表达, 尤其是能发生组织特异性表达, 而大量研究表明, 基因表达的强弱和组织特异性受基因调控区 (启动子和增强子) 控制, 这包括异源性调控区^[6,7]. 本文选用 MT 基因调控区构建了转基因, 这主要基于以下几方面的设想, 首先 MT 基因调控区含有强有力的启动子, 它在大多数上皮细胞, 尤其是内脏器官均能调控结构基因表达^[8], 其二是 MT 基因调控区受重金属镉及锌的调控, 在它们的作用下转录增强^[9]. 而金属镍在元素周期表上紧邻重金属, 且流行病学调查金属镍又是鼻咽癌病因之一, 因此我们建立的 LMP 基因转基因小鼠, 在 MT 调控下, LMP 可能表达, 至于金属镍能否发挥诱导作用, 有待后续实验证实.

近二十年来, 由于细胞工程、哺乳类动物发育工程及基因工程等新技术的建立和发展, 逐渐建立将外源性基因导入小鼠胚胎的多种技术, 比较成熟的有: 前核显微注射法, 逆转病毒载体介导的基因导入法, 胚胎干细胞 (ES Cells) 介导的基因导入法和电穿孔法^[10-13]. 本文用前核显微注射法将 MT-LMP 基因导入小鼠受精卵后, 卵的存活率、仔鼠出生率及转基因整合率依次为 73%, 13% 和 8%, 这说明前核显微注射法是可行的.

本文 Southern 杂交和 PCR 均证实 8% 仔鼠有 LMP 整合. 影响 DNA 整合的因素较多,

主要有 DNA 形状, DNA 纯度, DNA 稀释液的成分和 pH 值, 及注入 DNA 量. 本实验转基因因为线性化片段, DNA 经电洗脱法纯化, DNA 浓度为 1.85 ng/ μ l, 稀释液为 0.2 mmol/L EDTA, 8 mmol Tris-HCl, pH 7.4, 注入到受精卵的体积为每个卵 1—2 pL, 从整合情况来看, 上述条件是合适的, 这为今后制备转基因鼠提供了一些经验. 检测转基因整合一般用 Southern 杂交, 近年有人也用 PCR 法监测^[14,15]. PCR 方法简便、快速, 所需 DNA 量少, 对 DNA 纯度要求不高. Southern 杂交所需 DNA 量多、纯度高, 时间长, 操作者受放射线照射, 虽然 Southern 杂交有上述不足, 但是它的某些优点是 PCR 法不能取代的, Southern 杂交不仅能识别有无转基因整合, 而且能获得转基因是否完整整合、整合的拷贝数及整合形式等方面的信息. 结合本文结果, 我们建议, PCR 方法可作为监测转基因整合的初筛方法, 对于 PCR 阳性转基因鼠, 再作 Southern 杂交分析, 这样既能减少监测工作量, 又不会丢掉一些重要信息. 本文 Southern 杂交有三条带, 这可能是 MT-LMP 基因多位点、多拷贝整合所致.

研究表明, EB 病毒与人类鼻咽癌密切相关^[1-4], LMP 基因可能是 EB 病毒的癌基因, 本文成功地构建了 LMP 转基因小鼠, 为从整体水平探讨 EB 病毒潜伏膜蛋白的致癌作用及机理提供了很好的动物模型, 亦为最终揭开人类鼻咽癌病因研究提供了动物模型.

参 考 文 献

- 1 Young L S, Dawson C W, Clawk D *et al.* J Gen virol, 1988; **69**: 1051
- 2 Dawson C W, Rickinson A B, Young L S. Nature, 1990; **344**: 777
- 3 Wang D, Liebowitz D, Kieff E. Cell, 1985; **43**: 831
- 4 Willson J B, Weinberg W, Johsin R *et al.* Cell, 1990; **61**: 1315
- 5 Merlino G T. Methodology, 1991; **5**: 2996
- 6 Palmiter R D, Brinster R L. Genet, 1986; **20**: 465
- 7 Manlatis T, Goodbourn S, Fischar J A. Science, 1987;

36: 1237

- 8 Palmiter R D, Norstidt G. Science, 1983; 22: 809
- 9 Dyer K R, Messing A. Am J Pathol, 1989; 135: 401
- 10 Bailleul B, Surani M A, White S *et al.* Cell, 1990; 62: 697
- 11 Jahner D, Haase K, Mulligan R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 6927
- 12 Schwartzberg P L, Goff S P, Robertson E J. Science, 1989; 246: 799
- 13 Andreason G L, Evans G A. Biotechnology, 1988; 6: 650
- 14 Lin C S, Magnuson T, Samols D. DNA, 1989; 8: 297
- 15 David G K, Orkin S A. Biotechnology, 1990; 8: 32

Production of Transgenic Mice from Eggs Microinjected With MT - BNLF 1 Fusion Gene .

Xiao Zhiqiang, Yao Kaitai (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*); Liu Wei, Lu Guangxiu (*Reproductive Engineering Laboratory, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract In order to study the oncogenic ef-

fects of EB virus latent membrane protein, the putative oncogene product encoded by EB virus BNLF1 gene. The MT-BNLF1 gene containing the promoter of the mouse metallothionein-1 gene fused the structural gene of EBV BNLF1 gene was constructed. This gene was microinjected into the pronuclei of fertilized mouse eggs to build up a transgenic mouse line. The results were as follow (1). The zygote's survival rate and birth rate were 73% and 13%, respectively. (2) After analysing the mice that developed from the microinjected eggs by southern hybridization and PCR, 8% mice carry MT-BNLF1 fusion gene. This approach was a preliminary attempt to study the onset mechanism of the nasopharyngeal carcinoma.

Key words transgenic mice, metallothionein-1, BNLF1, epstein-barr virus, nasopharyngeal carcinoma

红细胞内翻外囊泡带 3 蛋白活性测试方法的研究*

冯 昶 关志英 屠亚平

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 从人血中提取红细胞膜, 用注射器加压推打的方法首次获得了包含 80mmol/L 吡啶二羧酸(DPA)的封闭完好的内翻外囊泡(IOVs)。离心除去囊泡外 DPA, 即可按 Newton 法测其阴离子转运活性。此法在红细胞膜内翻外囊泡体系上成功地建立了带 3 蛋白(Band 3)测活方法, 具有简便迅速, 重复性好等优点。

关键词 红细胞膜, 带 3 蛋白, 内翻外囊泡

带 3 蛋白(Band 3)是人红细胞膜上的主要蛋白, 占膜蛋白总量的 25%左右, 具有阴离子转运的功能。它在体内中介红细胞膜内外 HCO_3^- 与 Cl^- 的交换, 而使红细胞完成将毛细

血管处的高浓度二氧化碳运送至肺泡的功能。它也是目前被研究得最广泛的蛋白之一^[1,2]。

* 国家自然科学基金及中国科学院资助项目。

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-09-14