

研究简报

噬菌体显示法克隆 RNA 结合蛋白 cDNA

——表达文库的构建*

何元政 倪晓东 刘定干¹⁾ 卿国良 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 试图用噬菌体显示法 (phage display) 克隆编码与人白细胞介素 6 核转录因子的 3' 非翻译区 (NF-IL6 3' UTR) 特异结合的蛋白的 cDNA. 构建了回复系 RR 细胞的 cDNA 的噬粒 (phagemid) 表达文库, 并设法除去了 cDNA 的大部分终止密码子. 鉴定表明, 该文库中含有各种大小的 cDNA 插入片段, 并能够表达外源 cDNA, 为用噬菌体显示法克隆 RNA 结合蛋白基因或 cDNA 做好了准备.

关键词 噬菌体显示, RNA 结合蛋白, NF-IL6 3' UTR

关于抗癌基因 (肿瘤抑制基因) 或具有肿瘤抑制功能的核酸元件的研究, 是当代分子生物学的一个重大课题. 我们在 1990~ 1995 年间, 曾经发现了一个对活性 ras 基因转化细胞具有抗癌基因样效应的核酸调控元件——人白细胞介素 6 核转录因子 3' 非翻译区 (NF-IL6 3' UTR)^[1~3]. 在受 NF-IL6 3' UTR 转染而回复突变的细胞 RR 中, 发现一与 NF-IL6 3' UTR 的转录物特异结合的蛋白质 (BNF) 高表达, 且其表达与细胞表型的回复呈正相关^[3]. 显然, 寻找该 BNF 并对其功能的研究是阐明 NF-IL6 3' UTR 的抗癌基因功能之机制的关键.

在本文中, 我们尝试利用能将蛋白质的生物结合活性和其 DNA 序列直接联系起来的噬菌体显示 (phage display) 法, 来克隆 BNF 蛋白的 cDNA.

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

回复突变系 RR 细胞^[1]和 pSP64/0.28 质粒^[3]为本组保存. 噬粒 pHEN1^[4]和大肠杆菌

TG-1 为英国 MRC Centre for Protein Engineering 的 Harrison 博士惠赠. 辅助病毒 M13KO7 为本所潘华惠赠. 生化试剂和化学试剂均为国产分析纯以上级或进口试剂级.

1.2 方法

1.2.1 RR cDNA 的 pHEN1 表达文库的构建: RR 细胞在标准条件下^[1]培养至约 70%~90% 汇合, 抽提总 RNA^[5], 用 oligo-dT 纤维素柱 (华美公司) 纯化 poly-A⁺ RNA^[6], 并用 SuperscriptTM Plasmid cDNA Synthesis and Cloning Kit (GibcoBRL) 制成 5' 端带 Sal I 接头、3' 端带 Not I 接头的 cDNA. 噬粒 pHEN1 用 Sal I 和 Not I 双酶切开, 并与上述 cDNA 连接 (是为正向), 转化大肠杆菌 TG-1, 得到粗制库 (图 1). 将提纯的粗制库的噬粒用 Not I 切开成线型, 再用外切酶 III (exonuclease III, Boehringer-Mannheim) 短时间酶解 (分为三组, 酶切时间分别为 10 s, 20 s, 30 s), 立即用 S1 核酸酶削平两端, 用

* 国家 863 计划人抗癌基因研究 (上海生物化学研究所) 课题经费资助 (863-102-11-3-4).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-08-26, 修回日期: 1997-01-27

T4 DNA 聚合酶进一步补平 cDNA 两端, T4 DNA 连接酶重新环化, 电转化 TG-1, 即得

RR cDNA 的 pHEN1 噬菌体显示用表达文库. 这些操作系根据^[6].

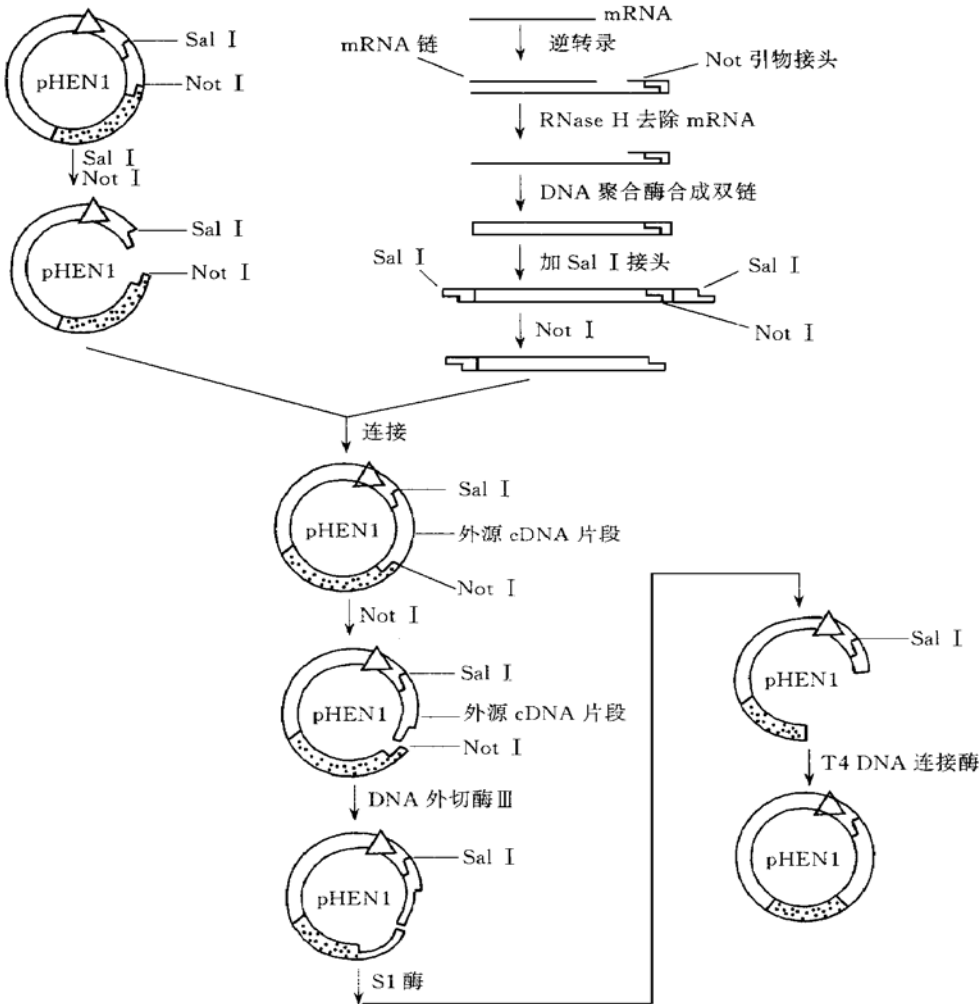


图 1 RR cDNA 的 PHEN1 表达文库的构建和 cDNA 的终止密码子的去除

1.2.2 表达文库的检验: a. 酶切鉴定 cDNA 插入片段: 从表达文库中抽提重组 pHEN1 质粒, 用 BamH I 和 Hind III 切开, 以空 pHEN1 为对照, 1.5% 琼脂糖电泳. 空 pHEN-1 经 BamH I 和 Hind III 切开后出现 0.7 kb 的小带; 含插入片段的 pHEN1 同样酶切后出现的小区带应大于 0.7 kb. b. 蛋白质电泳和染色: 提纯表达文库的混合的重组噬菌体, 用蛋白质电泳上样液在 100 °C 裂解后, 行还原条件下的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以空载 (无插入片段)

的 pHEN1 噬菌体为对照. 电泳后用银染色^[7].

2 结果和讨论

2.1 建库过程

噬菌体显示法的原理是在线型噬菌体 M13 的外壳蛋白 III 中融合表达外源蛋白. pHEN1 是一种噬粒, 含有 M13 噬菌体的部分基因. 该 cDNA 文库是将外源的 cDNA 克隆在 pHEN1 中 M13 基因 III 的 N 端. 去除 cDNA 的终止密码子后, 重组的 pHEN1 能被辅助噬菌

体 M13KO7 包装为重组噬菌体. 这些重组噬菌体的基因 III 蛋白的 N 端上游融合有外源 cDNA 所表达的肽段, 其基因组 DNA 则包含该外源肽段的编码序列. 因此, 只要设法 (如与 RNA 体外结合或亲和层析) 分离纯化带有 RNA 专一结合蛋白肽段的重组噬菌体, 就能克隆 RNA 结合蛋白的基因.

我们较顺利地建成了 RR cDNA 的 pHEN1 表达文库. 从转化实验得知, 粗制库中含有大于 10^7 个独立克隆, 可以满足筛选要求.

为了保证库中的 cDNA 能够和噬粒的 M13 基因 III 转录为融合蛋白, 须除去 cDNA 的终止密码子. 我们用的是外切酶 III 部分酶解的方法^[6] (图 1), 同时考虑不损伤 cDNA 的编码区, 酶解时间分别为 10 s、20 s、30 s. 随机抽取单菌落的噬粒 DNA 作酶解鉴定 (图 2). 可见经该处理的库中的重组噬粒有 1/2~ 1/3 左右仍含有大小约 2 kb 的 cDNA 插入片段.

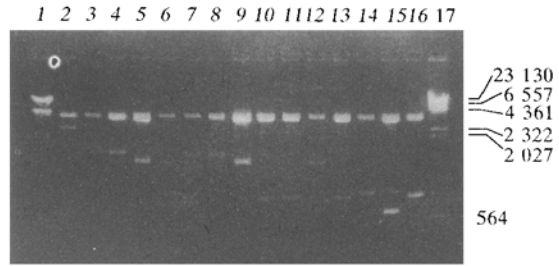


图 2 BamHI 和 Hind III 酶切重组 pHEN1 的琼脂糖 (1.5%) 电泳
1、17: DNA 分子质量标准; 2~ 6: 去尾 10 s 的重组 pHEN1; 7~ 11: 去尾 20 s 的重组 pHEN1; 12~ 15: 去尾 30 s 的重组 pHEN1; 16: 空 pHEN1 质粒.

2.2 表达文库的检验

对 RR cDNA 的 pHEN1 噬菌体显示用表达文库的检验分两方面: a. 检查该库的 cDNA 插入片段; b. 看该库能否表达外源 cDNA.

第一项已如上叙. 我们用简单的凝胶电泳法检查了该文库表达外源 cDNA 的能力. 电泳结果示于图 3. 可见各批重组噬菌体的结构蛋白与空载 pHEN1 的结构蛋白比较, 均呈现更

多的区带; 这些区带的合乎逻辑的来源应是插入的外源 cDNA 表达的结果. 因而该库是能够表达外源 cDNA 的.

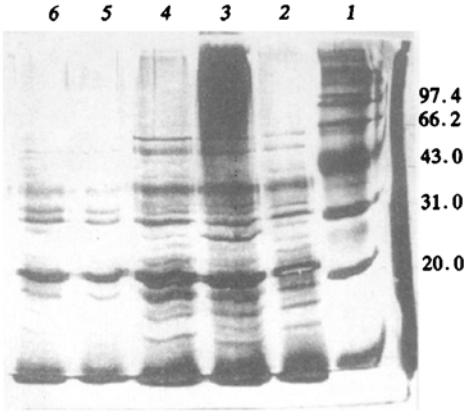


图 3 重组 pHEN1 噬菌体结构蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (10%) 电泳
1: 蛋白质分子质量标准; 2: 空载 pHEN1 噬菌体; 3、4: 重组 pHEN1 库噬菌体, 5、6: 单克隆重组 pHEN1 噬菌体.

所以, 这些初步鉴定提示, 这一用于噬菌体显示的 cDNA 文库的构建基本上是成功的; 用噬菌体显示法筛选 RNA 专一结合蛋白 cDNA 是可行的. 我们现正着手分离 NF-IL6 3' UTR RNA 专一结合蛋白的 cDNA 和基因.

致谢 英国 MRC Centre for Protein Engineering 的 J. H. Harrison 博士赠给噬粒 pHEN1 和大肠杆菌 TG-1, 本所潘华赠给辅助噬菌体 M13KO7, 特此一并致谢.

参 考 文 献

1 刘定干, 野田亮, 王 达等. 具有抗癌基因活性的一个 cDNA 克隆. 中国科学 B 辑, 1991, 7: 730~ 737
2 刘定干, 朱丽华, 陈珍珍等. 具有抗癌基因活性的一个 cDNA 克隆的核苷酸序列. 生物化学与生物物理学报, 1991, 23 (3): 246~ 254
3 刘定干, 审良静男, 岸本忠三等. 回复系 RR 中一种与回复相关的蛋白表达增强. 中国科学 B 辑, 1995, 25 (4): 372~ 378
4 Hoogenbaum H R, Griffiths A D, Johnson K S *et al.* Multisubunit protein on the surface of filamentous phage: method ologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chain. Nucl Acids Res, 1991, 19 (15): 4133~ 4137

5 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~ 159

6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7. 26~ 7. 30

7 入江伸吉. グル内タンパク質の高感度銀染色法. *生化学 (东京)*, 1980, **52**: 411~ 412

8 Georgellis D, Sohlberg B, Hartl F *et al.* Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1995, **16**: 1259 ~ 1264

Cloning cDNA of RNA-binding Proteins by Using Phage Display Method: Construction of the Phage Expression Library. HE Yuanzheng, NI Xiaodong, LIU Dinggan, QING Guoliang, LI Zaiping (*Shanghai Institute of Biochem-*

istry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract In order to clone cDNAs coding for proteins specially binding to NF-IL6's 3' UTR, a phagemid expression library was constructed from cDNAs of revertant RR cells. The termination codons of those cloned cDNAs were largely removed by restricted exo III enzyme digestion, in order to facilitate the expression of cDNA as fusion proteins with the phage gene III. Examinations of this library showed that the library includes various lengths of cDNA inserts and it can express exogenous cDNA.

Key words phage display, RNA-binding protein, NF-IL6 3' UTR

超微粒 TiO₂ 对 U937 细胞光杀伤效应及机理研究

黄宁平 黄 丹¹⁾ 徐敏华 袁春伟
(东南大学分子与生物分子电子学实验室, 南京 210096)

摘要 超微粒 TiO₂ 经光催化氧化后对 U937 白血病细胞有明显的杀伤作用, DNA 琼脂糖凝胶电泳图证明了光激发 TiO₂ 能够损伤细胞内的 DNA, 从而导致细胞死亡, 提出了一种杀伤癌细胞的新思路.

关键词 超微粒 TiO₂, 光催化氧化, U937 细胞, 活性氧类

当 TiO₂ 半导体吸收了能量大于禁带宽度的光后, 价带电子被激发至导带, 产生电子-空穴对. 光生空穴具有强氧化性, 它能促使许多化学反应发生, 如光还原、光催化、光有机合成等^[1~ 5]. 目前将 TiO₂ 的光催化性质用于降解有机污染物的研究已比较多, 而将其应用于生物领域特别是研究它对人体内癌细胞作用的还很少. 通常人们治疗癌症采用的大多是放射疗法和使用抗癌药物的化学疗法, 放疗和化疗都会产生较大范围的副作用. 本文提出的思路中所需光为 300~ 400nm 的长波紫外光, 不仅容易获得, 而且射线的伤害较小. 本文以人体 U937 单核白血球的白血病细胞为实验对

象, 研究了超微粒 TiO₂ 对恶性细胞的光催化杀伤效应, 观察了细胞 DNA 的变化, 阐明了 TiO₂ 对细胞的作用机理.

1 材料和方法

1.1 超微粒 TiO₂ 胶体溶液的制备

采用水解钛酸丁酯 [Ti (OC₄H₉)₄] 的方法^[6, 7]来制备 TiO₂ 超微粒胶体溶液. 为了防止钛酸丁酯发生强烈水解, 先将 25 ml 钛酸丁酯加入装有异丙醇的滴液漏斗中, 然后将混合液缓慢滴入含有少量 70% 硝酸的 150 ml 去离

¹⁾南通师范专科学校, 南通 226000.
收稿日期: 1996-09-05, 修回日期: 1996-12-07