

研究快报

反义及正义表达癌基因 c-Ha-ras 重组质粒的构建

胥薇 邓国仁 刘景梅

(北京市肿瘤防治研究所生化室)

c-Ha-ras 癌基因通过其产物 p 21 蛋白的点突变或过量表达使细胞恶变。国外一些实验室的初步研究表明, 导入一段与 c-Ha-ras 基因转录出的 mRNA (sense RNA, 正义 RNA) 顺序互补的 RNA (anti-sense RNA, 反义 RNA), 有可能通过阻断 DNA 复制, RNA 转录或蛋白质翻译等过程, 减少 p 21 蛋白的合成, 从而使转化细胞逆转。为了进一步系统研究反义 c-Ha-ras RNA 在转化细胞逆转中的作用, 必须采用有效的筛选手段, 得到足够量的逆转细胞, 从而对其基因型及表型进行鉴定。此外, 我们还希望反义 RNA 的产生可受某些诱导剂的诱导。为此, 我们将 c-Ha-ras 基因第一外显子及其上游区 2.0 kb 片段反向插入质粒 pMAM neo 中。此质粒因含有来自小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列 (MMTV LTR) 启动子, 可使插入在其后的基因在真核生物细胞中表达, 并且还受地塞米松的诱导。由于 pMAM neo 上含有 neo 基因, 转入了此质粒的宿主细胞在抗菌素 G 418 的抗性筛选中能形成细胞集落。同时还构建了正向插入 2.0 kb 片段的重组质粒, 作为实验对照。

在本室构建的含有 c-Ha-ras 基因第一外显子及其上游区 2.0 kb 片段的质粒 pER 2.0 AS 基础上, 用 EcoRI、Sal I 将 2.0 kb 片段切下, 电泳后洗脱回收, 并修平两端的粘性末端。然后与用 Xho I 完全消化并修平粘末端的质粒 pMAM neo 连接, 连接产物转化大肠杆菌 HB 101 感受态细胞。以 [α - 32 P] dCTP 用缺口翻译法标记 2.0 kb 片段作为探针, 利用原位杂交

技术, 对 970 个转化体进行筛选, 共获得 11 个

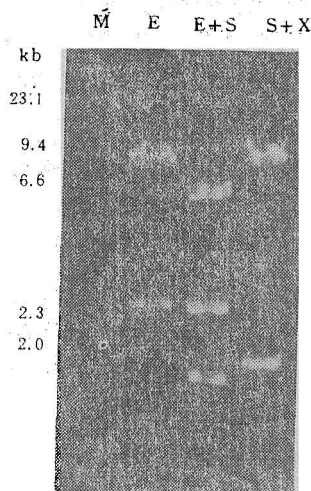


图 1 酶切鉴定 pMAM neo-2.0 AS

M: Hind III- λ ; S: Sal I; E: EcoRI; X: Xho I

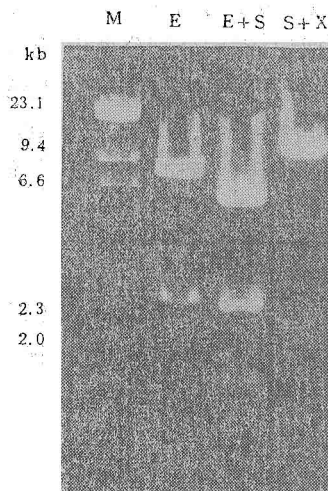


图 2 酶切鉴定 pMAM neo-2.0 S

各字母表示意义同图 1

选择标记法对钙调神经磷酸酶和钙调素结合位点的研究

魏 群

(北京师范大学分子生物学及生物化学研究室)

Devid Cheng, Ernest Y. C. Lee, Keith Brew

(Department of Biochemistry, University of Miami, USA)

钙调素是一种多功能的钙调节蛋白。在细胞调节中,它往往需要与细胞里一些活性物质。蛋白质、酶等相结合而进行作用。钙调神经磷酸酶 (Calcineurin) 是新近发现的一种活性直接受 Ca^{2+} 、钙调素调节的磷蛋白磷酸酶^[1]。因此,钙调素如何和钙调神经磷酸酶结合,它们的结合位点等问题就成为这两个领域的研究者共同关心且迫切需要解决的课题。最近,我们用差异标记法研究,发现了钙调神经磷酸酶和钙调素的结合位点是在钙调素一级结构顺序赖氨酸 75 区域,赖氨酸 21 和 148 区域也因为和钙调神经磷酸酶结合而使微环境受到严重干扰^[2]。本文拟用另一种方法:选择痕量标记法来进一步证实和补充这一实验结果。

选择痕量标记法的实验步骤大致为:先用高比活的痕量 ^3H 乙酸酐和 ^{14}C 乙酸酐分别对钙调素进行标记,然后分别分离出 ^3H 钙调素和 ^{14}C 钙调素;将 ^3H 钙调素和钙调神经磷酸酶在 pH 7.5 含 Mn^{2+} , Ca^{2+} , DTT 和 NaCl 的 Tris 缓冲液下进行结合,反应后分离出它们的复合物,再从复合物中分离出 ^3H 钙调素,此为试验

组,取未与钙调神经磷酸酶结合过的 ^3H 钙调素为对照组,二组分别加入均一的 ^{14}C 钙调素作为内标记,对试验组和对照组样品进行一系列的分析比较。包括用胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶,嗜热菌蛋白酶等专一性水解酶进行特异位点水解;用 HPLC 逐个分离出所有含赖氨酸的多肽,进行各多肽的同位素标记强弱比较等,最后通过钙调素中各赖氨酸的 ^3H 和 ^{14}C 比率,找出和钙调神经磷酸酶结合时的赖氨酸内环境改变,再用氨基酸序列分析确定其结合位点。实验证实了钙调神经磷酸酶和钙调素的结合位点确实在钙调素的一级结构顺序赖氨酸 75 区域,处在钙调素立体结构的中心螺旋区,并延伸到羧基端附近的疏水区。和另一个钙调素结合酶,肌球蛋白轻链与钙调素的结合位点非常相似。

参 考 文 献

- [1] Klee, C. B. et al.: *Calcium-Binding Proteins*, 1988, p. 149
- [2] Wei Qun et al.: *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 19541.

[本文于 1989 年 4 月 14 日收到]

阳性克隆。通过酶切鉴定(见图 1、图 2)、Southern 杂交鉴定(图略),得到 2.0 kb 片段正向、反向插入质粒 pMAM neo 的两个重组质粒,分别命名为 pMAM neo-2.0 S 和 pMAM neo-2.0 AS。

有了以上两种质粒,我们便可把它们分别

转入转化细胞,经抗菌素 G 418 筛选,得到逆转细胞系统以观察 pMAM neo-2.0 AS 导入后在不同量地塞米松诱导下对转化细胞的逆转作用,从而阐明反义 c-Ha-ras RNA 导致恶性细胞逆转的作用原理。

[本文于 1989 年 2 月 30 日收到]