

研究工作

pSV-2 neo 和 HPV-II DNA 共同转染 NIH 3T3 细胞的结果

陈保平 陈晓 陈敏海

(武汉, 湖北医学院细胞生物室 430071)

根据 Southern 及 Berg^[1] 的报道, 哺乳动物细胞转染 pSV-2 neo (neo) 基因后可转变为抗 G 418(氨基葡萄糖甙抗生素)的细胞。该抗生素可杀死不含此基因的细胞。因此该作者提出 neo 基因可作为一种选择标志基因与其它非选择基因共同转染细胞, 然后用含 G 418 的培养基进行筛选, 将不含 neo 基因的细胞杀死。这一技术曾被运用于许多领域的研究。在病毒转化细胞试验中 Yasumato^[2] 及 Chesters^[3] 先后报道了人乳头瘤病毒 16 型(HPV-16)对 3 T 3 细胞的转化, 二者均是使用的以 neo 为载体的重组 HPV-16 DNA, 但前者观察到细胞转化, 而后者则否。其原因可能是由于重组经酶切损伤了病毒 DNA 的功能部分。为此本实验将两种重组质粒共同转染, 以避免再次酶切的损伤, 就人乳头瘤病毒 11 型(HPV-11)及 neo 对 NIH 3T3 细胞的转化潜能进行了观察。同时还就 G 418 对该细胞的毒性进行了观察。

材料和方 法

NIH 3 T 3 细胞 来自瑞士小鼠胚胎成纤维母细胞, 由美国宾州大学医学院 Rapp 教授提供。培养液为 90% Dulbecco 改良的 Eagle 培养液及 10% 小牛血清, 加适量的青、链霉素, 常规培养。

重组 pSV-2 neo 选择基因 按报道方法^[1] 组成, 亦由 Rapp 教授提供。

重组 HPV-11 DNA 由西德 Zur Hausen 教授赠送。载体质粒为 pBR 322, 切割点为 Bam HI。

生长曲线 在 60 mm 培养皿内加入 10 ml 培养液, 接种 1×10^5 个细胞。培养液内分别加入不等量的

G 418: 500 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 箱内培养, 连续 5 天, 每天计数细胞一次, 每次计数 5 皿, 取平均值。

DNA 转染及分组 将 1×10^5 细胞接种于盛有 12 ml 培养液, 直径为 90 mm 的平皿内, 培养 24 小时, 用磷酸钙共同沉淀法^[5] 转染 DNA, 载体为裸鼠胚胎成纤维母细胞 DNA。转染 DNA 之量及分组列表于下。

表 1 转染 DNA 之量及组别

组别	培皿数	每皿加入 DNA 之量 (μg)		
		载体	pHPV-11	pSV-2 neo
1	2	10	-	-
2	2	10	2	-
3	5	10	-	1
4	5	10	2	1

抗生素 G 418 (geneticin neomycin) 从 GIBCO 公司购得, 采用了四个不同的浓度用于其对细胞的毒性试验(见图 1)。择其毒性最强浓度 500 $\mu\text{g/ml}$ 作为选择浓度, 运用于细胞转化试验。于 DNA 转染后的 48 小时开始使用, 在转化灶克隆时继续使用, 直至实验终止。

转化灶计数 在 DNA 转染后第四周末将所有培养皿用 10% 中性福尔马林固定, 0.05% 结晶紫染色, 肉眼计数。

转化灶克隆 于固定前用弯管将部分转化灶分别移取, 种植于 20 mm 的平皿内, 待生长成单层时转至 T 75 培养瓶内继续培养, 收集所有培养细胞抽提 DNA, 供点杂交用。

DNA 抽提及点杂交 按 Blin 和 Stafford^[4] 法进行 DNA 抽提。简而言之, 用 Phenol-Chloroformisoamyl-alcohol (25, 24, 1) 抽提 2 次, 酒精沉淀。用 TE

(pH 7.6)混悬,透析,测DNA含量,杂交时取50 μ l分5次滴在硝酸纤维滤纸上,碱性溶液使DNA变性,在严格条件下与 32 P标记的HPV-11探针(4×10^8 cpm/ μ g)或 32 P标记的pSV-2 neo探针(3×10^8 cpm/ μ g)进行杂交^[5],随后将其暴露于富士RX胶片片下,于-70℃冰箱内1周,显影后确定斑点的有、无及相对强度。

结果与讨论

一、抗生素G 418对NIH 3 T 3细胞的致死作用

本实验证明G 418对不含neo基因的NIH 3 T 3细胞有致死作用(图1)。

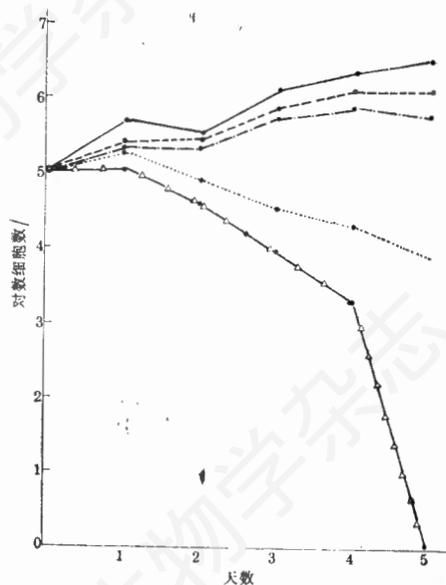


图1 G 418不同时间对NIH 3 T 3细胞的毒性反应曲线图

—○— 0 μ g/ml - - - - - 50 μ g/ml
 - · - · - 100 μ g/ml · · · · · 300 μ g/ml
 —△— 500 μ g/ml

G 418的浓度越大致死的时间越快。在500 μ g/ml的浓度作用下,5天内所有的细胞完全死亡。此一结果与Southern^[1]的结果一致,不过该报道没有剂量效应数据。本实验结果所显示的500 μ g/ml杀死所有细胞的具体时限及剂量效应对细胞转化实验非常重要,因为转化灶出现的时间一般在实验开始后的1—2周内,所以在第一周内将不含neo基因的细胞

杀死可以除去自发转化。

二、细胞死亡及转化灶的出现

于DNA转染后一周内,表2中第1、2组的细胞全部死亡,无转化灶出现。3、4组虽见很多细胞死亡,但仍有一定数量的散在的存活细胞。于第2至3周内,由存活的细胞原位增殖,形成大小不等的细胞集落。在集落内细胞生长失去接触抑制,相互重叠,方向紊乱形成转化灶(见图版图1)。两组转化灶之大小及细胞形态无明显不同。于DNA转染后第4周末对转化灶的计数结果见表2。

表2 pHPV-11 DNA及pSV-2 neo诱导的转化灶

组别	转化灶数/皿	转化灶平均直径(mm)
1 载体 DNA	0	
2 载体 + pHPV-11	0	
3 载体 + pSV-2 neo	44.00	2.00
4 载体 + pSV-2 neo + pHPV-11	162.66	1.80

从表2可看出HPV-11和neo共染NIH 3 T 3细胞可诱导该细胞的转化,转化率为 $162.66/1 \times 10^5$ /皿。本实验的分子杂交结果还证明转化细胞中含HPV-11的DNA(图版图2)。此两项数据说明了HPV-11有转化细胞的能力,从而支持了这一病毒株的感染与肿瘤发生可能有关的报道^[6]。

neo在本实验中原是作为选择基因而被采用,但是从表2中看出单独用neo组中(3组)NIH 3 T 3细胞也有转化,其转化率为 $44.00/1 \times 10^5$ /皿。在此组转化的细胞中经分子杂交(图版图2)证明含有neo基因DNA。由于不含neo基因的细胞均被G 418杀死(见对照1组及2组),所以本组(3组)的转化灶中会不会还存在自发转化灶,尚需进一步研究。Southern^[1]开始提出neo可作为选择基因时,也提出它对3 T 6细胞有 $1/7 \times 10^5$ 的转化率,可是其他研究者^[2-3]在进行HPV-16转化3 T 3细胞并用neo作选择基因时未观察到neo的转化

作用。这些报道的不同可能与实验条件不同有关。本实验的条件与上述报道也不尽相同。这是在使用 neo 作为选择基因时需要考虑的问题。

HPV-11 和 neo 共染诱导的转化灶数是 neo 单独诱导的 3.7 倍,并在转化的细胞中含有该两种 DNA(图版图 2)。由此虽可证明 HPV-11 的转化作用,但该两种 DNA 对细胞的转化作用是彼此单独的,抑是协同的?尚需进一步研究。

摘 要

本实验将 neo 及 HPV-11 两种 DNA 共同转染 NIH 3 T 3 细胞,以 G 418 抗生素作为选择剂,对诱导的转化灶进行筛选。同时还就 G 418 对 NIH 3 T 3 细胞的毒性进行了观察。neo 单独使用诱导的转化灶数为 $44.00/1 \times 10^5$; neo 与 HPV-11 合用诱导的转化灶数为 $162.66/1 \times 10^5$ 。由 neo 转化的细胞含有 neo 基因,由 neo 和 HPV-11 转化的细胞内含有该两种基因。

图 版 说 明

1. 示转化灶的形成。A 由 pSV-2 neo + pHPV-11

转染,可见大量转化灶。B 由 pSV-2 neo 转染,可见较少转化灶。C 对照,无转化灶出现。DNA 转染后 4 周,福尔马林固定,结晶紫染色,缩小 0.55 倍。

2. 克隆转化灶细胞 DNA 与有关探针点杂交显影。A: 与 pSV-2 neo 杂交结果,上排为标准 neo,从左至右以 0.125 μg 作倍比稀释。下排从左至右分别为 pSV-2 neo + pHPV-11 转化细胞之克隆 a, b, c, d 及 pSV-2 neo 转化细胞之克隆 a, b。所有克隆细胞均含有 neo DNA。B: 与 pHPV-11 杂交之结果,上排为标准 HPV-11 DNA,从左至右的 0.125 μg DNA 作倍比稀释。下排材料从左至右与 A 的下排同,但 pSV-2 neo + pHPV-11 转化细胞克隆含 HPV-11 DNA, neo 转化细胞克隆 a 及 b 不含 HPV-11 DNA。

参 考 文 献

- [1] Southern, P. J. and Berg, P., 1982, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1: 327-341.
- [2] Yasumoto, S. et al., 1986, *J. Virol.*, 57: 572-577.
- [3] Chesters, P. M. and McCance, D. J., 1985, 66: 615-620.
- [4] Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. PP. 280-281, CSH.
- [5] Graham, F. L. and Van der Eb, A. J., 1975, *Virology*, 52: 456-467.
- [6] Gissman, L. et al., 1984, *J. Invest. Dermatol.*, 83: 26-28.

人体骨髓长期培养中粘壁层的基质细胞

陈志哲 李觉民 洪华山 林艳娟

(福州,福建省血液病研究所 350001)

人体骨髓长期培养 (HLTBMC) 能维持粒-单核细胞的造血达数月之久。这种粒-单核细胞的长期造血依赖于造血细胞和粘壁层的基质细胞之间的密切互相作用。所谓基质细胞包括成纤维细胞、脂肪细胞、巨噬细胞和内皮细胞等^[1]。有证据表明 HLTBMC 基质细胞中的成纤维细胞有别于通常骨髓中的成纤维细胞。后者在不同的培养条件下可以传代生长。利用表面标记可以将骨髓基质细胞中各种不同的细胞群体辨别开来,从而进一步研究它们各自的功

能特性。本研究报告 HLTBMC 粘壁层中基质细胞的抗原表型,并与两次传代的存在于骨髓的成纤维细胞、皮肤成纤维细胞和脾脏的成纤维细胞作一比较。此外,本研究还报告 HLTBMC 中各种不同的基质细胞的分布。

材 料 与 方 法

一、骨髓细胞长期培养

1、自髂后上棘穿刺采取骨髓液。抽吸髓液的 10 ml 针筒内预先装有 1 ml RPMI-1640, 5% 小牛血