

- [2] 施渭康等, 1982, 实验生物学报, 15: 41-55.
- [3] Thomas, S. et al., 1986, *J. Cell Physiol.*, 127: 274-280.
- [4] 丛笑倩、姚鑫, 1984, 实验生物学报, 17: 309-321.
- [5] 陈汉源、钟启平, 1987, 实验生物学报, 20: 187-195.
- [6] Nishimune, Y. et al., 1983, *Exp. Cell Res.*, 146: 439-444.
- [7] Cronmiller, C. et al., 1978, *Develop. Biol.*, 67: 465-477.
- [8] Iles, S. A. et al., 1977, *J. Exp. Embryol.*, 38: 77-92.
- [9] Lehman, J. M. et al., 1974, *J. Cell Physiol.*, 84: 13-20.
- [10] Swartzendruber, D. E. et al., 1976, *Cancer Res.*, 36: 1894-1899.

## 大鼠肝和 BERH-2 肝癌 5 kb BamHI DNA 片段的克隆及其转录研究\*

叶 锋\*\*

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

已有文献报告指出, 转录产物在细胞核、质间的选择性运转机制的失控, 与细胞癌变有关。如与大鼠肝细胞相比, 大鼠肝癌细胞有更多的与重复顺序 DNA 互补的细胞核 RNA 出现在细胞质中<sup>[1-7]</sup>。本实验室曾用饱和杂交实验证明与中度重复顺序 DNA 互补的细胞核 RNA 的顺序复杂性比肝细胞减少 60.0%, RNA 由细胞核向细胞质内的运转, 肝癌细胞高于正常肝细胞<sup>[8]</sup>。本文对在大鼠肝和肝癌 BERH-2DNA 中与细胞核 RNA 杂交有差异<sup>[9]</sup>的 5 kb BamHI 重复顺序 DNA 片段进行了克隆, 进一步以来自正常肝 DNA 的克隆质粒、pL5 B-4, 和来自肝癌 DNA 的克隆质粒、pH 5 B-1 的插入片段为探针, 比较它们的转录产物在大鼠正常肝和肝癌细胞核和质中分布的变化。结果提示其转录产物在正常肝细胞核、质间的选择性运转特征, 在肝癌细胞中发生变异。

### 材 料 和 方 法

#### 一、实验材料

正常大鼠肝取自 3 个月左右的 Wistar 大鼠, 饥饿过夜。

移植性大鼠肝癌 BERH-2, 是本所用二乙基亚硝胺诱发的 Wistar 大鼠原发性肝癌移植到刚断奶的 Wistar 大鼠腹腔建株而成<sup>[10]</sup>。移植后 10-13 天取肿瘤块, 去除坏死组织。

#### 二、核酸抽提

1. 大分子 DNA 抽提: 根据 Gross-Bellard 等方法<sup>[11]</sup>, 略有改变。DNA 样品经 0.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 分子量大于 T<sub>4</sub> DNA (160 kbp)。

#### 2. RNA 的分离:

细胞核 RNA 和细胞质 RNA 抽提同前<sup>[12]</sup>。

多聚核蛋白体 RNA 抽提则采用蔗糖密度梯度离心法分离多聚核蛋白体<sup>[13]</sup>, 再从多聚核蛋白体抽提多聚核蛋白体 RNA。

rRNA 的抽提同前<sup>[14]</sup>。

poly A<sup>+</sup>核 RNA 和 poly A<sup>-</sup>核 RNA 用 oligo(dT) 纤维素(本所产品)吸附柱分离, 方法同前<sup>[15]</sup>。

所有采用的 RNA 样品均经过 1% 或 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 无明显降解。poly A<sup>+</sup>核 RNA, 没有

\* 硕士学位论文, 指导教师张玉砚。本课题得到中科院科学基金资助、中科院上海分院青年科技工作鼓励基金的部分资助。徐亚男、麻孙恺协助工作, 孙兰英提供 BERH-2 肝癌材料, 特此致谢。

\*\* 现工作单位: 中国科学院上海生物工程实验基地。

与 28 s, 18 s, 4 s 相应的荧光条带。polyA<sup>-</sup>核 RNA 则呈现有明显的与 28 s, 18 s, 4 s 相应的荧光条带。

### 三、5 kb BamHI 片段的克隆与筛选

1. 5 kb BamHI 片段的分离、纯化: 100 μg 大鼠肝或肝癌 BERH-2 大分子 DNA, 用 300 单位 BamHI 酶(Bio-Lab 产品)37℃酶切 6—8 小时, 0.7% 琼脂糖凝胶, 4 V/cm 电泳 6 小时。切下 5 kb 区条带, 电泳洗脱结合正丁醇-QN<sup>+</sup>法<sup>[16]</sup>去除琼脂糖。

2. DNA 片段连接<sup>[17]</sup>: 0.5 μg 脱磷 BamHI 酶切 PBR 322 DNA(Bio-Lab 产品)加 1 μg 分离的分子量约为 5 kb 的 BamHI DNA 片段, 加 20 单位 T<sub>4</sub>DNA 连接酶(生物物理所产品), 16—20℃连接 8 小时, 反应体积为 30 μl。

3. Hb 101 菌的 CaCl<sub>2</sub>/RbCl 处理、转化及抗菌素筛选: 方法见文献<sup>[17]</sup>。挑取抗青霉素、对四环素敏感的菌落, 扩增后加 15% 甘油, -80℃保存菌株。

### 四、DNA 探针的制备

碱法制备重组质粒 DNA<sup>[17]</sup>, 经 BamHI 酶切后电泳分离插入片段。用切口翻译标记法标记探针<sup>[17]</sup>。

### 五、核酸分子杂交

1. 菌落原位杂交。方法见文献<sup>[17]</sup>。杂交膜依次在 2×SSC—0.5%SDS 室温洗涤 4 次, 每次 5 分钟; 0.1×SSC—0.5%SDS 68℃洗涤 30—45 分钟。烘干, 压 X 光片, 曝光。

2. DNA Southern 印迹杂交: 基本参照 Southern 法<sup>[18]</sup>。

3. RNA 点杂交: 参照 Thomas 法<sup>[19]</sup>。硝酸纤维素膜(医工院产品, 孔径 0.22 μ)在重蒸水浸润后, 浸于 20×SSC 中, 然后铺到点样器上。样品配制在 6×SSC 中。在水泵抽气下, 各取 10 μl 样品点到膜上。待样品完全抽完, 将膜揭下, 室温使干, 再 80℃烘 2—3 小时。加入预杂交液, 42℃预杂交 6—10 小时。加入探针, 杂交 24—28 小时。杂交膜用 2×SSC—0.5%SDS 室温下漂洗 4 次, 每次 5 分钟; 0.1×SSC—0.5%SDS, 50℃漂洗 2 次, 每次 20 分钟; 0.1×SSC 室温漂洗 5 分钟, 使干后压 X 光片, 曝光。

## 结 果

### 一、5 kb Bam HI DNA 片段的克隆、筛选和鉴定

用电泳洗脱结合正丁醇-QN<sup>+</sup>法制备的大鼠肝和肝癌 DNA 的分子量约为 5 Kb 的 Bam

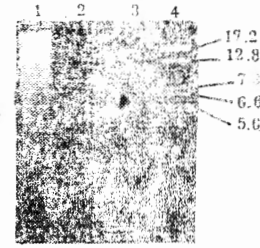


图 1 5 kb-BamHI 片段的电泳鉴定

- (1) 大鼠肝 DNA Bam HI 酶切
- (2) BERH-2 DNA 5 kb 片段
- (3) 大鼠肝 DNA 5 kb 片段
- (4) λ DNA BamHI 酶切

HI 片段, 电泳鉴定结果见图 1。

将制备的 DNA 片段插入到 PBR 322 DNA 的 BamHI 位点, 转化 Hb101 菌, 经抗菌素筛选。用大鼠肝 DNA 片段连接构建的重组质粒转化 HB 101 菌后, 筛选得抗青霉素, 对四环素敏感菌落 200 只, 编号为 pL 5 B-1—200。用大鼠肝癌片段连接构建的重组质粒转化 HB 101 菌, 筛选得抗青霉素、对四环素敏感菌落 145 只, 编号为 pH 5 B-1—pH 5 B-145。

挑选 pL 5 B-4, pL 5 B-5, pH 5 B-1, pH 5 B-2 4 个克隆菌扩增, 抽提质粒 DNA。pL 5 B-4 DNA 和 pH 5 B-1 DNA 用 BamHI 酶切后电泳, 以 λ DNA 的 Hind III 酶切片段为片段大小标准, 检测插入片段的大小, 如图 2 a 所示。将重组质粒 DNA 用 BamHI 酶切后, 按 Southern 法印迹到硝酸纤维素膜上, 与 <sup>32</sup>P 标记的 5 Kb Bam HI 片段杂交, 杂交放射自显影图谱见图 2 b。酶切结果和 Southern 杂交结果证实此 4 个重组质粒 DNA 中插入有大鼠肝或肝癌 DNA 片段, 插入片段分别称为 L 5 B-4, L 5 B-5, H 5 B-1 和 H 5 B-2。

另外, 将大鼠肝和肝癌大分子 DNA 用 BamHI 全酶切后, 印迹到硝酸纤维素膜上, 以 <sup>32</sup>P 标记的 L 5 B-4 和 H 5 B-1 DNA 片段为探针进行杂交。在克隆片段来源的 5 Kb 处显示出强的杂交带。

### 二、L 5 B-4 和 H 5 B-1 DNA 片段的转录产物在大鼠肝和肝癌细胞中的分布

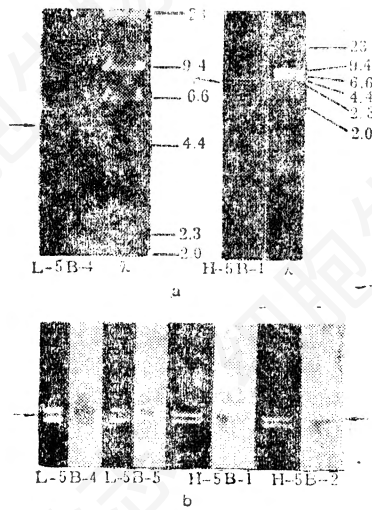


图 2 克隆片段的鉴定

a. 重组质粒DNA BamHI酶切电泳图。 $\lambda$  DNA Hind III酶切片作片段大小标准  
 b.  $^{32}$ P-5kb Bam HI片段与 BamHI酶切重组质粒DNA的杂交图。

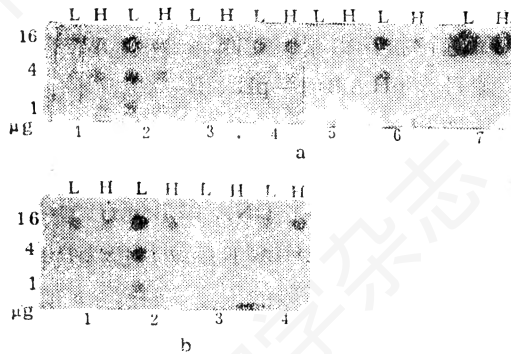


图 3 克隆片段转录产物在肝和肝癌细胞中分布的比较(点杂交)

a. L 5 B-4 DNA 转录产物的分布  
 b. H 5 B-1 DNA 转录产物的分布  
 L: 肝 H: 肝癌  
 1. 总 RNA 2. 核 RNA 3. 胞质 RNA  
 4. 多聚核蛋白体 RNA 5. rRNA 6. polyA<sup>-</sup>核 RNA 7. poly A<sup>+</sup>核 RNA (3  $\mu$ g)

用 RNA 点杂交法, 以 L 5 B-4 和 H 5 B-1 克隆 DNA 片段为探针, 比较它们的转录产物在大鼠肝和肝癌细胞中的分布。如图 3 结果提示。

L 5 B-4 和 H 5 B-1 DNA 片段探针与细胞总 RNA、细胞核 RNA 以及细胞质 RNA 点

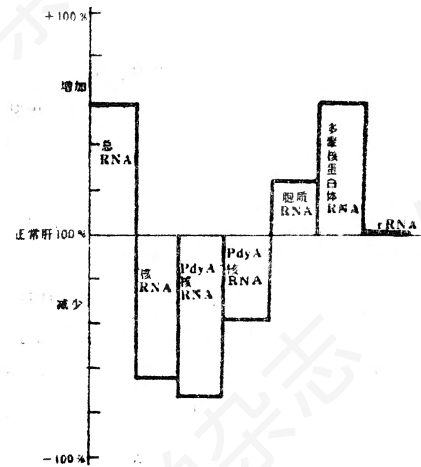


图 4 L 5 B-4 DNA 转录产物在肝和肝癌各 RNA 组分中相对量的比较

杂交的杂交行为相近似。其在细胞核中的转录产物相对含量, 正常肝高于肝癌细胞, 其在细胞质 RNA 中的转录产物相对含量, 则是肝癌高于肝细胞。

将细胞核 RNA 分为 poly A<sup>+</sup>核 RNA 和 poly A<sup>-</sup>核 RNA 两部分; 从总胞质 RNA 中分出多聚核蛋白体 RNA, 核蛋白体 RNA。以 L 5 B-4 DNA 片段为探针, 分析其转录产物在细胞不同 RNA 组分中的相对分布量。其结果是: L 5 B-4 DNA 片段转录产物在 poly A<sup>+</sup>核 RNA 中的相对量高于 poly A<sup>-</sup>核 RNA。其转录产物在正常肝 poly A<sup>-</sup>核 RNA 中的相对量高于肝癌细胞的 poly A<sup>-</sup>核 RNA。L 5 B-4 DNA 片段的转录产物在肝癌细胞多聚核蛋白体 RNA 中的相对量, 比在正常肝细胞相应组分中高。但无论是在肝癌细胞 rRNA, 还是在正常肝细胞 rRNA 中, 均几乎测不到 L 5 B-4 DNA 片段的转录产物的存在。

将 L 5 B-4 DNA 片段转录产物在大鼠肝和肝癌细胞各 RNA 组分中分布的放射自显影图, 用 CS-900 薄层色谱仪扫描, 比较正常肝和肝癌细胞间的相对量, 以在正常肝中的相对量为 100%, 其结果是: 在总细胞 RNA、胞质 RNA 和多聚核蛋白体 RNA 中 L 5 B-4 DNA 转录产物相对量, 肝癌细胞比正常肝细胞分别

高59%，25%和60%；而在总细胞核RNA、polyA<sup>+</sup>核RNA和polyA<sup>-</sup>核RNA中，肝癌细胞比正常肝细胞分别减少65%，37%和73%。

### 讨 论

我们克隆的大鼠肝与大鼠移植性肝癌BERH-2 DNA的分子量大小约为5 kb的BamHI片段，是大鼠肝及肝癌DNA经BamHI酶切后电泳，EB染色显示最明显的一条荧光带，我们称之为Bam 5族重复顺序。根据其在基因组中所占的百分数推算，此约5 kb Bam HI荧光带在基因组中约有 $2-4 \times 10^4$ 拷贝。

从克隆之一的pL5B-4 DNA分离插入片段L5B-4，以此作为探针与RNA点杂交结果指出，L5B-4 DNA片段的转录产物分布于细胞核内多于在细胞质内。在细胞核内其转录产物由polyA<sup>+</sup>RNA和polyA<sup>-</sup>RNA组成，前者多于后者。在细胞质内，L5B-4 DNA片段转录产物主要分布于多聚核蛋白体RNA中，而在rRNA中几无其转录产物的存在。Northern印迹杂交的初步结果(待发表资料)也表明L5B-4 DNA探针与多聚核蛋白体RNA中的18S和28S两条最明显的RNA带无杂交反应。比较大鼠肝和肝癌细胞中L5B-4 DNA片段的转录产物的相对分布量结果为，在细胞核RNA中，肝多于肝癌；在细胞质中，则肝癌多于肝。Northern印迹杂交结果的进一步分析指出，在肝癌细胞质内L5B-4 DNA片段的转录产物主要分布于多聚核蛋白体RNA中介于18S和4S RNA间的小分子量RNA部分(待发表资料)。实验结果提示，在肝癌细胞中，L5B-4 DNA片段的转录产物由细胞核向细胞质内的运转发生了改变。至于L5B-4 DNA片段的转录产物在肝癌细胞中显示的核质间选择性运转机制改变的可能意义还有待进一步探讨。

本实验室曾用固相膜核酸分子杂交实验<sup>[12]</sup>、饱和杂交实验<sup>[8]</sup>观察到与重复顺序

DNA互补的RNA，肝癌细胞核比正常肝细胞核低；在肝癌细胞质中则比正常肝细胞质高。本文则用克隆技术，从大鼠肝和肝癌基因组DNA中筛选到的克隆片段L5B-4和H5B-1，其转录产物在肝癌细胞中具有核质间选择性转运失调特征，为深入研究癌变分子机制和重复顺序的功能提供了一个实验系统。

### 摘 要

本文克隆了大鼠肝和肝癌BERH-2 DNA的分子大小约为5 kb的BamHI片段(Bam 5族重复顺序)。从筛选出的克隆中取一个来自肝癌细胞基因组DNA的克隆片段H5B-1和来自肝细胞基因组DNA克隆片段L5B-4做进一步分析研究。采用RNA点杂交法对L5B-4 DNA片段的转录产物在细胞核、质间分布的研究结果表明：L5B-4 DNA片段转录产物在肝癌细胞的总核RNA、polyA<sup>+</sup>核RNA和polyA<sup>-</sup>核RNA中的相对量，比正常肝细胞的相应RNA组分低；在肝癌细胞的总胞质RNA和多聚核蛋白体RNA中的相对量，则比正常肝细胞的相应RNA组分高；其转录产物在polyA<sup>+</sup>核RNA中的相对含量高于其他细胞RNA组分，几乎不存在于rRNA中。当用大鼠肝和肝癌总RNA进行RNA点杂交比较时其转录产物在肝癌细胞中的相对含量则高于正常肝。结果提示，L5B-4 DNA片段的转录产物从细胞核向细胞质内转运，肝癌细胞明显高于正常肝细胞。以H5B-1 DNA片段代替L5B-4 DNA片段进行RNA点杂交，得近似的杂交放射自显影图谱。

### 参 考 文 献

- [1] Chiarugi, V. P., 1969. *Biochim. Biophys. Acta.* 179: 129-135.
- [2] Mendecki, J., Minc, B., Chorazy, M., 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 494-501.
- [3] Drews, J., G. Brawerman and H. P. Morris., 1968. *Europ. J. Biochem.*, 3: 284-292.

- [4] Sherrer, R. W. et al., 1972. *Cancer Res.*, 32: 339-342.
- [5] Garrett, C. T. et al., 1973, *Cancer Res.*, 33: 1662-1669.
- [6] Patel, N. T., D. S. Folse and V. Holoubek, 1979, *Cancer Res.* 39: 4460-4465.
- [7] Sherrer, R. W., 1974. *Biochemistry*, 13: 1764-1767.
- [8] 张玉砚等, 1982, 实验生物学报, 15: 137-143.
- [9] 张玉砚等, 1987, 实验生物学报, 20: 47-52.
- [10] 强家模等, 1978, 实验生物学报, 11: 87-93.
- [11] Belhard, M. G., Ovdet, P., Chambon, P., 1973. Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells. *Europ. J. Biochem.* 36: 32-38.
- [12] 张玉砚等, 1978, 实验生物学报, 11: 97-104.
- [13] Bloemehdal, H., 1974, *Methods in Enzymology*, 30 (F): 313-327.
- [14] 徐亚男等, 1980, 实验生物学报, 13: 371-376.
- [15] 孙 蕊, 张玉砚, 1984, 实验生物学报, 17: 47-53.
- [16] Langridge, J., 1980, *Anal. Biochem.* 103: 264-271.
- [17] Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [18] Southern, E. M., 1975, *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- [19] Thomas, P. S., 1980, *PNAS USA* 77: 5201-5205.

## 硒对培养的心肌细胞的影响\*

王治荣 李金凤 佟利家 徐世东 王孝铭

(哈尔滨医科大学病理生理教研室)

微量元素硒在机体内是一种非特异性抗氧化剂,是谷胱甘肽过氧化酶的组分之一,此酶能防止毒性过氧化物在细胞内蓄积,保护细胞免受损伤<sup>[1-3]</sup>。近年来在细菌和哺乳动物细胞中陆续发现了多种含硒转移核糖核酸(se-tRNA),并证明这种se-tRNA对某些信使核糖核酸(mRNA)翻译蛋白质的过程具有特异的促进作用<sup>[8]</sup>。se-tRNA在蛋白质合成中的作用越来越引起人们的重视。

本文利用小剖腹取得的4个月人胚、新生大鼠和胚胎小鼠心脏,进行了心肌细胞、组织和器官培养,观察:(1)硒对培养的人胚心肌细胞的影响;(2)硒对儿茶酚胺(异丙基肾上腺素和去甲基肾上腺素)性心肌损伤的保护作用;(3)硒对胍引起的心肌细胞脂质过氧化损伤的保护作用。

### 材 料 和 方 法

心肌细胞培养:从我校附属二院产科得到因妇产

科难产而小剖腹娩出的4个月左右胎儿5例,取材时胎心仍在跳动。取150只出生1—2日的Wistar新生大鼠心脏,对人胚和新生大鼠心脏均按Burt法<sup>[6]</sup>,用0.25%胰蛋白酶(Difco1:250)消化,按 $10^5$ /ml的细胞浓度分装于培养瓶,37℃下密闭培养。每2日更换1次培养液。实验结束后,刮取和离心收集心肌细胞。

心肌组织培养:取每个胎儿的部分心肌和50只新生大鼠心脏,剪碎为 $1\text{mm}^3$ 左右,置于培养瓶壁,室温下放置20分钟后加培养液,37℃密闭培养。有时用转速12次/分的转鼓进行旋转培养,效果更好。

胚胎小鼠心脏器官培养:取妊娠16—17日的昆明雌鼠20只,开腹切开子宫取出胚胎小鼠,取出心脏以Hanks液洗净血液,除去心包,将完整心脏置于不锈钢网上进行心脏器官培养<sup>[9]</sup>。每窝8—10只胚胎小鼠的心脏共放于1个培养瓶中。

培养液:用Eagle MEM(日本),加20%胎牛血清(哈尔滨兽医研究所)。如培养的是人胚心肌细胞或组织,则加用15%人血清白蛋白(西班牙)。常规地便

\* 国家自然科学基金资助课题,1986年第36号。