

制剂酚噻嗪完全消除。这提示我们, KT 与 Ca^{2+} 和 CaM 有某种正相关的联系。Euiett^[17] 曾有实验表明, CaM 抑制剂对生长素、细胞激动素、赤霉素等多种激素的作用都有影响。Saunders 和 Hepler 发现, CaM 参与葫芦藓细胞分裂素诱导的芽形成的过程^[18]。这些发现使许多人相信, 通过 Ca^{2+} 、CaM 调节细胞内功能可能是植物激素的一种统一作用方式。我们的结果也表明, 在离体核这样一个内, Ca^{2+} 与 CaM 的细胞器内, 激动素对核内某种生化过程的调控作用可能通过 Ca^{2+} 及 CaM 进行。目前, 我们对 KT 及 Ca^{2+} 处理过的核转录产物的研究正在进行中, 试图在分子水平上对它们在核转录中的作用机理有进一步的了解。

摘 要

400 $\mu\text{mol/L}$ KT 加于离体核反应液中后, 核转录活性提高了 50% 左右; 在系统中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} , 使核转录活性提高了 90%, Ca^{2+} 浓度大于 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 产生负效应。La³⁺ 及 EGTA 明显地消除 Ca^{2+} 的促进作用。钙调蛋白抑制剂酚噻嗪部分地减弱 Ca^{2+} 的促进作用; 用酚噻嗪和 KT 同时处理离体核, 则 KT 的促进作用大大削弱。

参 考 文 献

[1] Guttman R. 1956; *Chromosoma*, 8: 341.

- [1] 1957, *J. Biophys. Biochem. Cytology*, 3: 129.
- [2] Fankhanser, M. & Erismann K. H. 1969, *Planta*, 88: 332.
- [3] Terry L. Shninger et al., 1977, *Plant physical*, 59: 4-9.
- [4] Roychoudhury, R. et al., 1965, *Biophys. Acta*, 107: 346.
- [5] Matthyse, A. G. et al 1970, *Biochim Biophys. Acta*. 199: 511.
- [6] Klambt. D. 1974, *Planta* 118: 7-16.
- [7] White, B. A., et al., 1981, *J. Biol. Chem*, 256: 5942-5975.
- [8] Kaplan, E et al., 1975, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 487-489.
- [9] Wu, F. S. et al., 1981, *J. Biol. Chem*, 256: 5309-5315.
- [10] J. P. Pardo et al., 1982, *Festsletters* 143, no. 1.
- [11] 赵微平等, 1985, 北京师院学报, 自然科学版第二期 73-80.
- [12] Peter, K. H. et al. 1985, *Ann Rev. Plant Physiol.* 36: 397-439.
- [13] Sikorska, M. et al. 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 1196-1203.
- [14] Chen, Y-R et al., 1981, *Plant Physiol* 2: 609-613.
- [15] Kanungo, M. S. et al., 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86: 14-19.
- [16] Kanungo, M. S. et al., 1979, *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 79, 1031-1036.
- [17] Elliot, D. C. 1980, *Biochem. International*, 1: 290-294.
- [18] Saunders, M. J., et al., 1983, *Development Biology*, 99: 41-49.

人血小板衍生生长因子 A 链(PDGF-A)反义 RNA 表达克隆的构建

林鑫华 李文裕

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

人 PDGF 是人血清中主要的生长因子, 由 A、B 两条多肽链以二硫链连接组成^[1]。A、B 链各由不同的基因编码。B 链基因与 SSV 病

毒的 V-SIS 癌基因同源, 被称之为细胞内原癌基因^[2]。A 链基因的功能尚不清楚。一些间叶组织来源的肿瘤细胞有 PDGF-A 链的高表

达,而且是不依赖于B链基因的表达,提示A链基因可能起着与B链相似或别的更重要的作用^[3]。

反义RNA (anti-sense RNA)是指与mRNA相互补的RNA分子,与mRNA互补结合,专一地抑制mRNA的加工和翻译,是原核细胞基因功能抑制的方式之一^[4]。在真核细胞中还没有发现这类调控方式。通过人工合成构建反义RNA表达克隆,将反义RNA导入细胞,可以抑制特定基因的表达,从而可以观察该基因对细胞生长、分化等方面的作用^[5]。如果能利用反义RNA选择性地抑制癌基因的表达,就有可能阻断肿瘤细胞恶性生长^[6]。本实验利用PSV₂neo表达载体,构建了两种PDGF-A反义RNA表达克隆,为我们进行PDGF-A功能的研究以及肿瘤生长阻断的探索打下了基础。

材料和方法

一、实验材料

1. 人PDGF-AcDNA克隆(D₁)由瑞典C. Betsholtz博士提供^[3]。PSV₂neo质粒由美国st. Louis华盛顿大学医学院T. F. Deuel教授提供。

2. 限制性内切酶购自New England Biolabs, T₄DNA连接酶购自BRL。

二、实验方法

1. DNA酶切片段的分离与纯化

DNA样品经完全酶解后,在50 mmol/L NaCl盐浓度下用95%乙醇沉淀,抽干,溶于适量重蒸水中,用1%或0.8%(含EB)的低熔点胶电泳(1×TAE或TBE, pH 8.0, 2 V/cm),待所需条带与其他条带分开后,紫外灯下切出所需条带,置离心管中65°C温育5分钟后,用等体积的饱和酚抽提2次,氯仿抽提1次,上清液用2倍体积的无水乙醇沉淀后置干冰30分钟或-30°C冻箱过夜。沉淀样品经高速离心后,用75%乙醇洗1次,抽干后用TE缓冲液溶解即可。

分离较大的DNA酶解片段采用电洗脱入透析袋法^[7]。

2. 感受态菌株制备

在JM 105 LB平板上挑取单菌落,接入20 ml LB培养基中活化,当OD₆₀₀达到0.2—0.8时,取10毫升加到1个装有100毫升LB的大瓶中培养。

当OD₆₀₀达0.5—0.9时,加入新鲜培养基使体积达500 ml,待细菌继续长到OD₆₀₀ 0.6时,置培养瓶于冰浴中,使其迅速冷却,4000 rpm离心15分钟,弃上清,沉淀悬浮于100毫升预冷的TfB I溶液(30 mmol/L KOAC, 50 mmol/L MnCl₂, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, 15% v/v 甘油),于冰中轻轻振荡后4000 rpm离心8分钟,沉淀悬浮于20 ml预冷的TfB II溶液(10 mmol/L HEPES, pH 7.0, 75 mmol/L CaCl₂, 100 mmol/L KCl, 15%甘油),分装到预冷的Eppendorf管中,每管0.2 ml,液氮速冻后置-70°C冰箱保存。

3. 连接与转化

粘端连接参照《分子克隆》手册^[7],即于粘端连接液中加入适当比例的质粒载体与片段,在连接酶作用下16°C过夜,第二天取样品(连接液)直接转化。

转化使用-70°C保存的JM 105感受态菌株,连接液与感受态细胞混和后置冰浴30分钟,37°C温育处理5分钟后加入1毫升LB培养基,继续置37°C温育1小时后涂板。实验中所用的质粒载体有的是PUC₁₉,因此选用X-gal板进行筛选。

三、结果与讨论

1. 用PDGF-A链第一个外显子(exon)片段构建PDGF-A反义RNA表达克隆

我们将PDGF-A第一个外显子的基因片段和cDNA克隆于PSV₂neo的Bgl II与Hind III位点构建成两种反义RNA表达克隆。PSV₂neo包含SV₄₀早期启动子,受此启动子的作用,反义RNA能与neo基因一道转录,起抑制mRNA活性的作用,而RNA 3'端包含完整的neo基因编码顺序,起基因转染的筛选标记作用。从图1A可以看到,用Hind III和Bgl II双酶解PSV₂neo质粒,可以除去neo基因5'端0.3 kb cDNA片段而不破坏基因编码顺序,外源DNA片段插入该位点,能得到有效转录。

根据原核细胞内反义RNA作用机理,认为5'端是构建反义RNA表达克隆的最佳片段,该片段所转录的反义RNA能与mRNA 5'互补,抑制翻译起始,从而达到抑制表达的目的。图1A所示,用BamHI和pstI酶切pUC₁₉-B₂质粒(B₂片段包含PDGF-A第一和第二外显子以及上游启动子的一部分),将此

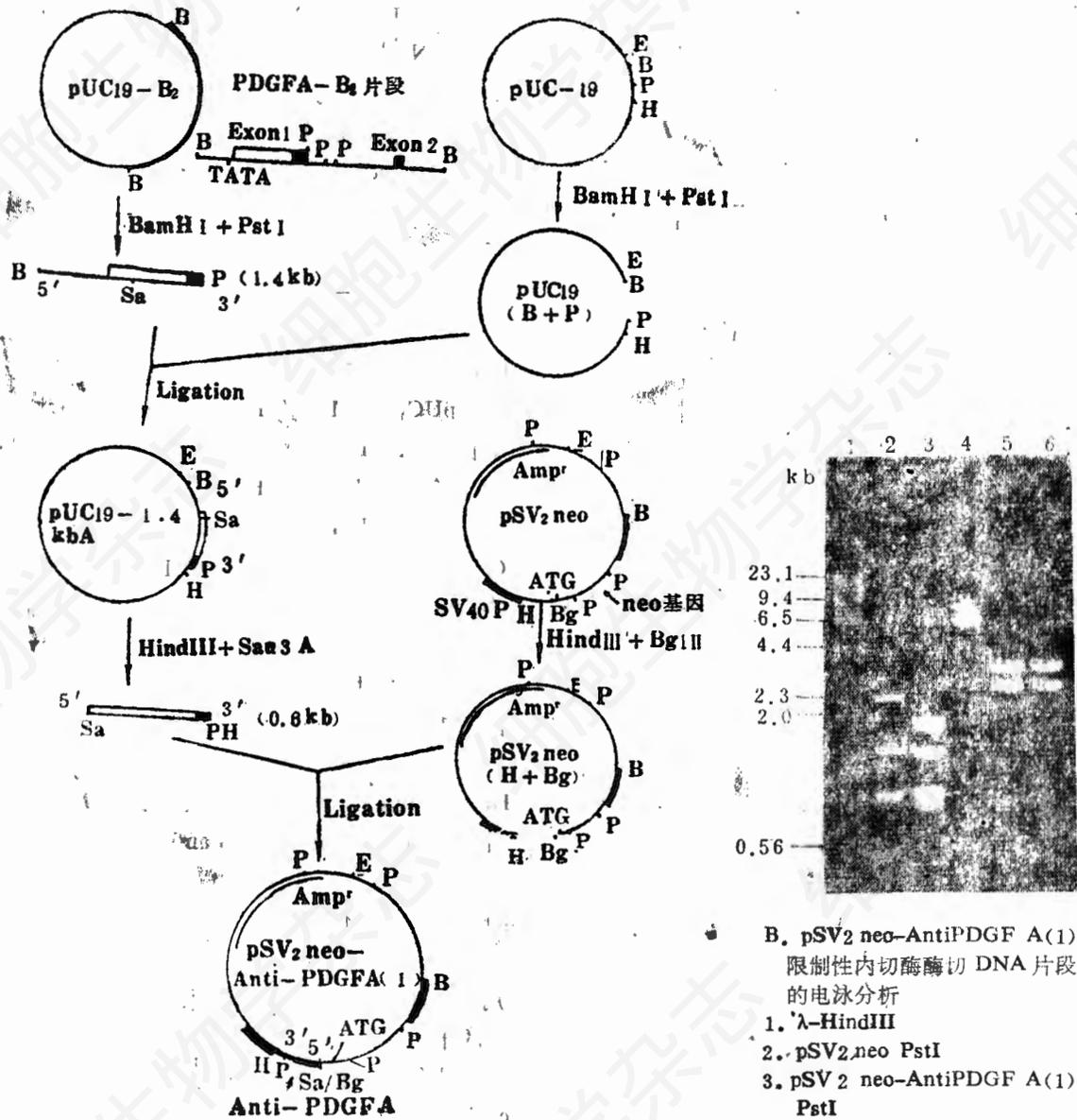
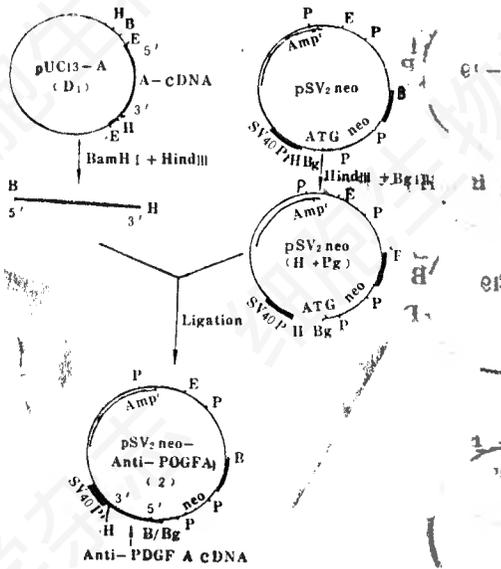


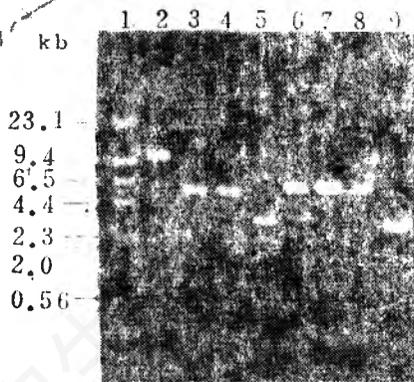
图 1 用 PDGF-A 第一个外显子 (exon) 片段构建 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆

酶切片段(1.4 kb)与 pUC₁₀ (BamHI 和 pstI 酶切)相连, 构建成 pUC₁₀-1.4 kb PDGF A。利用 pUC₁₀ 多克隆位点上的 HindIII 切点, 用 HindIII 和 Sau 3 A 酶解 pUC₁₀-1.4 kb-PDGF

A, 分离得到 0.6 kb PDGF-A 片段(该片段包含第一个外显子的大部分)。Sau 3 A 位于基因 5' 方向(相对于基因转录方向), 而 HindIII 位于基因 3' 方向。将该片段与 psv₂.neo(Hind



A. pSV₂neo-AntiPDGF A(2) 构建示意图酶切位点
 E: EcoRI B: BamHI
 H: Hind III P: pstI
 Bg: Bg^I II



1. λ-Hind III
 2. pSV₂neo
 3. pSV₂neo Hind III
 4. pSV₂neo BamHI
 5. pSV₂neo Hind III and BamHI
 6. pSV₂neo-Anti PDGF A
 7. pSV₂neo-Anti PDGF A Hind III
 8. pSV₂neo-Anti PDGF A BamHI
 9. pSV₂neo-Anti PDGF A Hind III and BamHI
 B. pSV₂ neo-Anti PDGF A(2)限制性内切酶酶切的DNA片段的电泳分析

图 2 用 PDGF-AcDNA 构建 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆

III 与 Bgl II 酶切) 片段相连, 构建成 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆, 见图 1 B。pSV₂neo 质粒共有 4 个 pst I 切点(最小的两个片段因分子量接近而未能在电泳胶上分开), 当 0.6 kb DNA 插入 pSV₂neo 后, 增加了 1 个 pst I 切点, 将包含 Ap 基和 SV₄₀ 启动子的 pst I 片段切成两段, 而别的片段位置不变, Hind III, EcoRI 及 BamHI 酶切结果也进一步证实了这一点。

2. 用 PDGF-A cDNA 构建 PDGFA 反义 RNA 表达克隆

pUC₁₈-A(D₁) 为 PDGF A cDNA 克隆^[3]。如图 2 A, cDNA 3' 端有 Hind III 位点, 而 puc₁₈ 多克隆位点上的 BamHI 位点位于 cDNA 的 5' 端。我们用 Hind III 与 BamHI 双酶切片段 (1.3 kb cDNA) 与经 Hind III 及 Bgl II 酶切的 pSV₂neo 连接, 构建成反插的 pSV₂neo-AcDNA。

在图 2 B 中, 用 Hind III 和 BamHI 酶切 psv₂neo 得到了 3.3 kb 和 3.1 kb 条带, 3.1 kb 条带包含了 1.3 kb neo 片段和 0.8 kb SV₄₀ DNA 片段。

在 pSV₂neo-AcDNA 中 neo 基因缺失了 0.3 kb Hind III-Bgl II 片段, 但插入了 1.3 kb cDNA, 因此该质粒用 Hind III 和 BamHI 酶解得到了 3.3 kb 和 3.1 kb 条带, 电泳结果与此是一致的。此外, 我们还可以利用 neo DNA 片段作为探针, 直接检测反义 RNA 表达量, 避免了用 PDGF-A cDNA 作探针时内源 PDGF A 产物的干扰。

我们已用微量注射和磷酸钙沉淀法将 c-sis 反义 RNA 表达克隆导入经 pSM-1 (c-sis 表达克隆) 转化的 CHO 细胞, 获得一定的实验结果 (见《实验生物学报》22 卷 3 期)。同时, 我们用构建的 PDGF A 表达克隆转染 CHO 已获得了不同转化程度的克隆。我们希望用上述构建的 PDGF A 反义 RNA 表达克隆来转染经 A 链基因转化的细胞和 PDGF A 表达的肿瘤细胞, 观察 A 链基因表达抑制对细胞生长的影响以及对肿瘤生长的阻断作用。

摘 要

(利用 DNA 重组技术, 我们将 PDGF-A 第

一个外显子 DNA 片段和 PDGF-A cDNA 反向克隆到 pSV₂neo 中, 构建成两种 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆。该两种 PDGF-A 反义 RNA 表达克隆可用于 PDGF-A 功能的研究以及肿瘤细胞生长阻断的探索。

参 考 文 献

- [1] Ross, R. et al., 1986, *Cell.*, 46: 155-169.
 [2] Favera, R. D. et al., 1982, *Science.*, 218: 686-687.
 [3] Betsholtz, C. et al., 1986, *Nature.*, 320: 695-699.
 [4] Green, P. J. et al., 1986, *Annu. Rev.*

- Biochem.*, 55: 569-597.
 [5] Anne E. Griep and Heiner Westphal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988 85: 6806-6810.
 [6] Kazuko Nishikura and John M. Murray. *Molecular and cellular Biology*, 1987, 7 (2): 639-649.
 [7] Maniatis, T. et al., In *Molecular cloning: A laboratory Manual* CSH Lab, p. 88, 164, 365, 390, 1982.
 [8] Guo Li-He. In *Methods in Enzymology: Recombinant DNA*. Vol. 100 Part B. P. 174.
 [9] Southern, P. J. and Berg, P.: *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1982, 1: 327-341.

芥菜原生质体培养和植株再生

赵军良* 陈柔和 张江涛

(山西大学生物系)

李文彬 陈正华

(中国科学院遗传研究所)

70年代以来, 芸苔属植物的原生质体培养进展尤为迅速, 现已从大部分芸苔属植物原生质体得到再生植株^[1-6], 使之成为植物体细胞杂交和进行遗传操作极好的实验材料。李文彬等^[7]和 Chatterjee 等^[4]曾分别从芥菜型油菜子叶和叶肉原生质体再生成植株, 在原来的基础上, 通过改变培养条件, 又成功地将芥菜下胚轴原生质体培养成完整植株。

材 料 和 方 法

一、无菌苗的获得 供试材料为 *Brassica juncea* 的栽培品种定兴芥。种子经表面灭菌后, 在含 MS 大量元素、1%蔗糖和 0.7%琼脂的培养基上生长获得无菌苗。酶解前将生长有无菌苗的玻璃瓶放在 13℃的冰箱里进行低温预处理, 直至所需时间为止。

二、原生质体的游离 用如下两种来源获得原生质体: I: 子叶和胚轴分别游离, 分别培养, 以比较

两者的培养效果。II: 子叶和胚轴一起酶解, 以保证原生质体培养初期具有一定的培养密度。酶液组成为 1% Cellulase "Onozuk" R-10, 0.5% Macerzyme R-10, 10%甘露醇, 由 CPW 液^[8]配成, 酶液抽滤灭菌, 酶解在 24~26℃条件下进行。

三、原生质体培养 原生质体培养基为含 1.5毫克/升 NAA、0.6毫克/升 BA 和 0.5毫克/升 2,4-D 的 *DPD*^[9]培养基, 渗透稳定剂组成为 2%蔗糖、2%葡萄糖和 8%甘露醇。以该培养基为对照, 设计了分别以甘露醇、葡萄糖、山梨醇和木糖为渗透稳定剂的原生质体培养基。原生质体的培养密度为 10^4 — 10^5 个/毫升。

四、愈伤组织的形成 来源于下胚轴的原生质体培养约 4 周, 发育成大量大细胞团, 再过 10 几天后, 长成大量肉眼可见的小愈伤组织, 此时转入含 1.0 毫克/升 2,4-D, 0.6 毫克/升 NAA, 和 1.0 毫克/升 BA 的 MS 固体培养基中, 进行愈伤组织的增殖。

* 现在山西省农科院蔬菜所。