

些结果提示, EC 细胞的诱导分化过程是复杂的, 同时看来 RA 和 DMSO 的作用方式也并不相同。

球状的肿瘤细胞的集合物已被广泛用于研究物理和化学因子对细胞的作用, 因为这种球状体中的细胞所处的条件更接近于活体内肿瘤中细胞的状况^[12]。球状系统的一个主要缺点是其内的所有活细胞都是恶性的。现已证实, 组成自然发生肿瘤的大多数细胞是干细胞的分化了的后代, 而干细胞本身所占的比例比较小^[18]。经 RA 或 DMSO 处理的 EC 细胞集合物可作为类似于人类自发性肿瘤的球状模型, 其中的干细胞的比例小、稳定而且可以控制。

参 考 文 献

[1] Edwards M. K. S. et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:2280—2286.

- [2] Rosenstraus M. J. and Levine A. J., 1979, *Cell*, 17: 337—346.
 [3] McBurney M. W. and Rogers B. J., 1982, *Dev. Biol.* 89: 503—508.
 [4] Jones- Villeneuve E. M. V. et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 94: 253—262.
 [5] Gusella J. and Housman D., 1976, *Cell* 8: 263—269.
 [6] Mager D. and Bernstein A., 1978, *J. Cell Physiol.* 94: 275—286.
 [7] Bennett D. C., 1983, *Cell* 34: 445—453.
 [8] Strickland S., 1981, *Cell* 24: 277—278.
 [9] Hogan B. L. M. et al., 1981, *Nature* 291: 235—237.
 [10] Speers W. C. et al., 1979, *Am. J. Pathol.* 97: 583—584.
 [11] Edwards M. K. S. and McBurney M. W., 1983, *Dev. Biol.* 98:187—191.
 [12] Sutherland R. M. et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2980—2984.
 [13] Pierce G. B. and Wallace C., 1971, *Cancer Res.* 31: 127—134.

选择性标记基因和 V-erb B 基因对哺乳动物细胞的转移及其转录产物的检测

徐卫明 朱德厚 姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

近十几年来, 应用 DNA 转移的方法将克隆基因或细胞总 DNA 导入离体培养的哺乳类细胞, 已成为研究真核细胞基因调控的一个重要方法。一般要获得克隆基因稳定表达的细胞系, 需要用选择性标记的基因^[1]。对于具有 TK⁻、aprt⁻ 或 hprt⁻ 缺陷的细胞, 通常可以用相应的互补基因作为选择基因^[2]。对于不具有特殊遗传缺陷的细胞, 可以用显性转移基因 Xgpt^[3], neo^[4] 或 dhfr^[5] 基因作为选择基因, 加上需要研究的本身不带选择标记的目标基因对细胞共转移, 二种基因都可以稳定地整合到宿主细胞染色体, 通常有 10—90% 的可能性, 但

因为要获得稳定的转移基因的克隆需要长时间和大量的工作, 并且共转移中需要 10⁹ 细胞才能检测到 RNA 的表达产物, 因此筛选和检测的工作量有时异乎寻常地大。为了提高检测的灵敏度, 我们应用了近二年新发展的 RNA 快速打点杂交法, 对转移后的细胞进行检测^[6,7]。结果发现, 只需 10⁵ 到 10⁶ 细胞就可以明显地观察到克隆基因的表达情况。

材 料 和 方 法

一、细胞

小鼠 L-TK⁻ 细胞株是一株 TK 基因缺陷的 L 细胞

株,由法国巴斯德研究所 Pierre Tiollais 博士赠送。NIH/3 T 3 细胞株由美国麻省理工学院 H. Land 博士赠送。二株细胞都培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中,用 0.025% 胰酶消化传代。

二、质粒的抽提

pAGO^[8] 是含单纯疱疹病毒(HSV) TK 基因的 pBR 322 质粒,由法国巴斯德研究所 Pierre Tiollais 博士赠送。pZipneo SV (B) erb B^[9] 质粒含耐 G418 和卡那霉素的 Tn 5 转座子和 1.9 kb 的 V-erb B 基因,由美国麻省理工学院 H. Land 博士赠送。应用 50 ng—100 ng 质粒 DNA, 转化大肠杆菌 HB 101 品系。然后用含 40 μg/ml 的氨苄青霉素和 LB 培养基筛选转化克隆。对 pZipneo SV(B)erb B 质粒转化的克隆用卡那霉素和氨苄青霉素的双重抗菌素 LB 培养基筛选。一般每只培皿可得到 200—400 个转化克隆。挑出十个集落,分别扩大培养,用小规模碱变性法抽提 DNA,再用酶介和电泳鉴定。大规模提取质粒也用碱变性的方法粗抽,再用氯化铯密度梯度离心,用 Hitachi 70 p-72 型超速离心机, Rp 80T-3 转头, 5×10^4 转/分钟离心 30 小时,用注射器抽取只含共价闭环的质粒 DNA 层^[10]。

三、转移试验

分别接种 6×10^5 个 L-TK⁻ 细胞或 NIH/3 T 3 细胞于 60 mm 塑料培养皿中,24 小时后,换新鲜培养液。再经 4 小时 5% CO₂ 培养箱培养,每只培皿加入 20 μg 质粒 DNA-磷酸钙复合沉淀物(不加载体 DNA)。DNA-磷酸钙复合沉淀物按下列方法制备:首先用吸管量取含 40 μg 的质粒 DNA 溶液(质粒 DNA 溶于 TE 缓冲液中, pH 8.0),加重蒸水至 0.5 ml,再加入 0.5 M 氯化钙 0.5 ml,用手摇匀。然后将这 1 ml 溶液,逐滴加入 1 ml 2 × HBS(Hepes 作缓冲剂的生理盐水, pH 7.10 ± 0.1),边和边用另一支吸管往里吹气,加完后室温放置半小时,使其形成极细颗粒的悬浊液,每只培皿加 1 ml。

转移时间 4—12 小时。细胞经生理盐水洗涤二次,换正常培养液继续培养。L-TK⁻ 细胞于 24 小时后,用胰酶消化,按 1:4 密度接种于选择性培养基中,该培养基含次黄嘌呤(H) 1×10^{-4} M, 氨基嘌呤(A) 4×10^{-7} M 和胸腺嘧啶核苷(T) 1.6×10^{-5} M。

NIH/3 T 3 细胞在换新鲜培养液 48 小时后,消化传代。按 1:10 比例扩大培养,再过 12 小时后,加入含 G 418(一种新霉素类似物抗生素, Gibco Laboratories, Life technologies, U. S. A) 的培养液,药物浓度为

100 μg/ml。

四、细胞 RNA 的快速打点杂交法*(Quick blot),

取待检转移基因的细胞和对照细胞各 50—150 万,经胰酶消化后计数。离心后用生理盐水洗涤,再经离心收集细胞,悬浮于含有 RNA 酶抑制剂(放射菌酮 20—30 μg/ml, 1/20 体积的硫酸氧钒核糖核苷复合物(vanadyl ribonucleoside complex)制作过程)^[11]的水溶液中,按 2.0×10^6 细胞加入 5 μl 的比例加入水溶液。-20℃ 反复冰融二次,再用 50 μg/ml 蛋白水解酶 K 37℃ 处理 30 分钟。然后,加 10% Brij-35 和 10% 脱氧胆酸钠各 1/20 体积。混合后冰浴中放置 3 分钟到 5 分钟。再加入过饱和的碘化钠(0.813 倍体积),混匀后点样于用 RNA 酶抑制剂处理过的硝酸纤维素膜 BA 85 上,用真空泵抽滤上样。

点样后用含 RNA 酶抑制剂的水洗 3 次,每次 5 分钟。70% 酒精洗 3 次,每次 5 分钟。用乙酰化试剂封闭膜上的残留蛋白,滤膜经 50℃ 烘干后,放入塑料袋中 -20℃ 保存。

在对照实验中,细胞先用 RNA 酶(上海东风试剂厂) 37℃ 处理 30 分钟(酶浓度 100 μg/ml),然后用蛋白水解酶 K 处理,后面的操作同实验组, RNA 酶解前水溶液中无 RNA 酶抑制剂。

五、探针的制备和缺口翻译

pAGO 质粒直接用 T. Manitis^[10] 等人的方法标记 DNA。

pZipneovs SV (B) 质粒用 XhoI(中科院生物物理所产品)酶解,电泳后用解剖刀切下 1.9 kb 的 erbB 基因片段,将这段琼脂糖置于透析袋中电泳分离回收。经电泳鉴定后常规缺口翻译法标记。pAGO 标记比度为 2.1×10^8 cpm/μg DNA, erbB 为 1.0×10^8 cpm/μg DNA)。

六、预杂交和杂交

预杂交液按下列比例配制:甲酰胺 50%, $6 \times$ SSC, 0.5% SDS, 100 μg/ml 小牛胸腺 DNA, $5 \times$ Dehardt 液。42℃ 温育 4 小时,小牛胸腺 DNA 先用 100℃ 水浴 10 分钟变性。

杂交液含甲酰胺 50%, $6 \times$ SSC, 1% SDS, $1 \times$ Dehardt 液, 100 μg/ml 小牛胸腺 DNA, 再加经 100℃ 水浴处理 15 分钟的 ³²P 标记的探针 DNA, 42℃ 温育 12—16 小时。

* 唐永明同志参加 RNA 快速打点杂交法的部分工作,特此感谢。

七、滤膜的洗涤和显示

滤膜先用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 洗三次, 每次 10 分钟。再用 $0.1 \times \text{SSC}$, 1% SDS 洗三次, 每次 10 分钟。37°C 烘干后, 固定在 Whatman 滤纸上, 最后把滤纸和滤膜一起装入含有增感屏的 X 光底片暗盒中, -70°C 曝光 3—7 天后显影。显影点的强度用岛津凝胶扫描仪扫描。

结果

一、质粒的转化和鉴定

pAGO 质粒转化大肠杆菌 HB 101 后, 挑出抗氨苄青霉素的菌落。细菌扩大培养后用碱变性方法提取质粒。然后, 用 Pvu II 内切酶(生物物理所出品) 37°C 1 小时, 电泳鉴定。图 1 是该质粒的物理图谱, 图 2 是酶解后的电泳图谱。

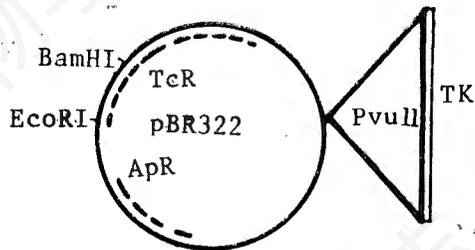


图 1 pAGO 质粒图谱

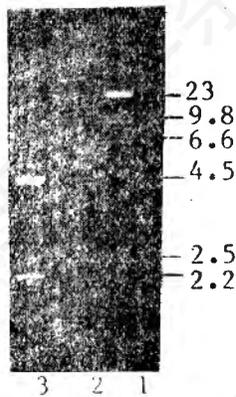


图 2 pAGO 质粒用 Pvu II 酶解图谱

图 2 中第一行是 DNA 用 Hind III 酶解后的分子量标记。第二行是标准样品质粒 DNA, 第三行是转化克隆 1 的 DNA, 用 Pvu II 酶解后

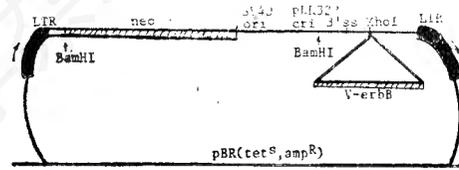


图 3 pZipneo SV(B)erbB 质粒图谱

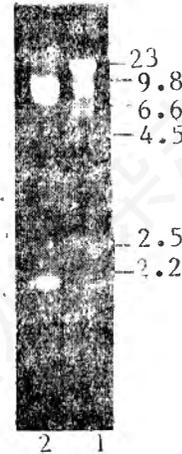


图 4 pZipneo SV(B)erbB XhoI 酶解图谱

可以看到, 二者在 4.5 kb 和 2 kb 各有一条带, 因此证实转化质粒是含有 2 kb HSV-TK 基因的 pBR 322 质粒。

pZipneo SV(B)erb B 质粒含有稳定的显性选择基因 neo, 可提供 G 418 抗性, 并有 V-erbB 插入片段 1.9 kb。该片段是在 pZipneo SV(B) 质粒的 XhoI 切点接入(图 3), 因此用 XhoI 内切酶可以切出 1.9 kb 片段。图 4 是用 pZipneo SV(B)erb B 质粒用 XhoI 酶解图谱。第一排是 λ DNA 用 Hind III 切后标准分子量。第二排是用 XhoI 酶解的图谱, 正好切出 1.9 kb 预定大小的片段, 因此证实转化的质粒的确是含 V-erb B 基因的。

二、细胞的转移

L-TK⁻ 成纤维细胞在基因转移后 15—21 天可以看到散在的转化克隆, 起始的克隆内细胞数 10—100 个不等。每只培养皿一般 10—20 个。大约需半个月左右单个克隆才能扩大到 24 孔板中培养, 再过半个月左右才能转入小北京瓶中扩大培养, 培养液中始终含有筛选药物

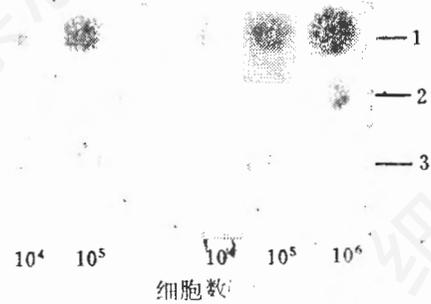
HAT。对照细胞(未经 pAGO 质粒 DNA 处理)全部在 10—20 天内死亡。而实验组细胞始终可以在 HAT 选择性培养基中扩大增殖,因此 TK 基因的转移是成功的。

NIH/3T3 细胞在基因转移后 15—20 天左右可以看到散在的转化克隆,转化后的克隆中纺锤形细胞增多,倒置显微镜下观察细胞折光率明显增高,细胞之间有交叉重叠生长的现象。一般每皿 30—40 个克隆,单个克隆可以用解剖刀或玻璃柱克隆法分离得到,用胰酶消化后传入 96 孔,待细胞在 96 孔板的孔中长大后再通过 24 孔板扩大后传到小北京瓶中,时间约需 1 个月左右。细胞在筛选初期始终在 1 mg/ml G 418 中生长。显然对照组(未经质粒转化)于 10—20 天内死亡,实验组细胞却可以增殖很快,在传到小北京瓶中后都换用 200 μ g/ml G 418 扩大培养(因为 G 418 药品很贵)。另外,在筛选初期,当克隆还比较小时,我们也试用 5—7 天不加 G 418,以后再加 G 418 继续筛选的方法,所得到的克隆以后仍是保持 G 418 抗性,因此说明这种抗性在撤除药物后仍是稳定的。

三、用快速打点杂交法对转化克隆基因表达产物的检测

使用不同细胞浓度点样后所得的结果如下:

对于转化后的 NIH/3 T3 细胞,分别以 1×10^6 细胞/点, 1×10^5 细胞/点, 1×10^4 细胞/点点样。从 X 光曝光的底片可以看出,经 neo 基因与 erbB 基因共转移后,erbB 基因的表达明显地增加了(图 5)。在 1×10^6 细胞/孔中,未经基因转移的空白对照组 3 T 3 细胞只有很弱的阳性点(可能为内源 C-erb B 基因的表达或质粒 DNA 杂交产生的本底,未作进一步分析),而实验组表达却很高。在 1×10^5 细胞/点的情况下,对照组检测不到阳性点而实验组仍能检测到很强的 erbB 基因的转录信号。在 1×10^4 细胞/点,实验组虽然有的点有很弱的阳性,但有的 1×10^4 细胞的点和空白对照组一样,却



- (1) 实验组
(2) 空白对照组
(3) 实验组(用 RNase 处理)

图 5 用 pZipneoSV (B)erbB 质粒转化 NIH 3T3 细胞后,用 crbB 作探针的 RNA 快速打点杂交

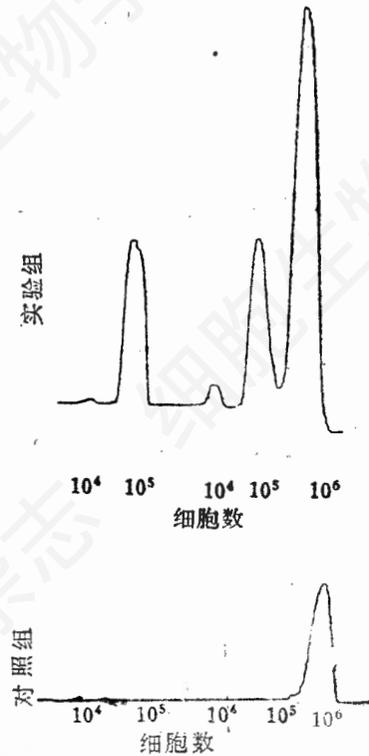


图 6 对图 5 各点的光密度扫描图谱

基本上没有。图 6 是用岛津式扫描仪对图 5 X 光片扫描的图谱。从各点的扫描图形可以看出,在 10^5 和 10^6 细胞的情况下, RNA 快速打点杂交法能够很明显地把实验组和对照组区分开来。为了确定用快速打点杂交法检测到的的确

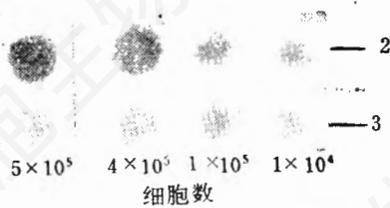


图7 用pAGO转化L-TK⁻细胞后RNA快速打点杂交

—(1) 实验组(用RNase处理)(空白, 未示)
—(2) 实验组(a)
—(3) 空白对照组(b)

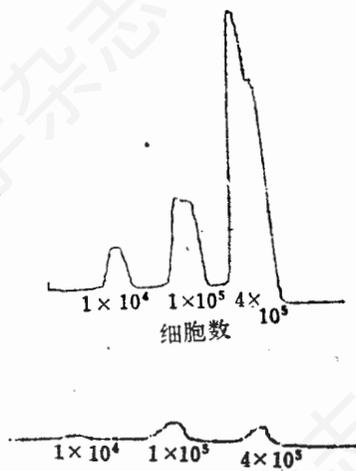


图8 为图7(1×10⁴—4×10⁵)细胞各点光密度扫描

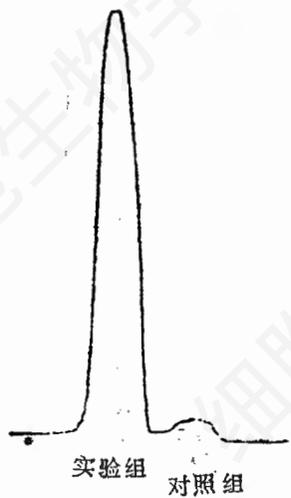


图9 为图7 5×10⁵细胞点的光密度的扫描

是RNA, 实验组细胞样品预先用RNase酶处理后作快速打点杂交, 结果是未发现阳性点(图5第三排)。

L-TK⁻细胞株是一株TK基因缺陷株。用含有单纯疱疹病毒的TK基因转移后, 可以获得抗HAT的转化细胞。这种经pAGO转化的细胞株与未经转化的L-TK⁻细胞相比(图7), TK基因转录信号要强得多, 在1×10⁵—5×10⁵细胞的情况下, 二者的差别很明显。在RNase酶处理后阳性点消失。图8,9是各点的扫描图, 从图中可见明显的差别。但值得注意的是, 无论是NIH/3T3转化细胞还是L-TK⁻转化细胞, RNA快速打点杂交法对其mRNA的检测都不是精确定量的。从各点的扫描数值看, 细胞量相差10倍时, 点的光密度值相差只有2—5倍(表1)。

表1 RNA快速打点杂交法扫描各点光密度值读数

质粒:pZipneo SV(B)erbB 转化 NIH/3T3 细胞		
细胞数	实验组	对照组
1×10 ⁶	4500	500
1×10 ⁵	2000	0
1×10 ⁴	50	0
质粒 pAGO 转化 L-TK ⁻ 细胞		
细胞数	实验组	对照组
5×10 ⁵	865	10
4×10 ⁵	860	26
1×10 ⁵	232	17
1×10 ⁴	72	17

讨 论

利用选择性标记基因与目标基因共转移的方式一般有二种: 一种是按一定比例混合二种基因一起转移到受体细胞; 另一种是利用DNA体外重组技术将二种基因接在同一质粒上进行转移, 后者共转移的效率接近90%^[4]。我们使用的是后一种方式。因为neo基因直接提供了G418抗性, 因此在我们的实验中与它

相联接的 V-erb B 基因也导入了受体细胞,问题是该基因能否得到表达,结果我们用 RNA 快速打点杂交法在刚转化出来的只有接近于二个小北京瓶的培养物(1.5×10^6 细胞)就检测到了目标基因的表达。如果用常规 Northern 印迹方法检查,需要 10^9 细胞,这就需要至少 10 个大的卡氏瓶细胞培养物。因此用 RNA 快速打点杂交法对转移的克隆基因表达的检测提供了一个简便快速的初筛方法。为了看一看是否这一情况也适用于其它克隆基因的转移实验,我们也用了最常用的基因转移模型: tK 基因(疱疹病毒)转化 L-TK⁻ 细胞,得到了相似的结果。有时对一个未知功能的 DNA 片段进行转移或对一个克隆基因虽然已知功能但其编码的蛋白或多肽尚未有适当的生化或免疫化学的方法检测时,利用 RNA 快速打点杂交法进行检测将是一个有效的途径。

当然,这种方法对 RNA 产物只能给以粗略的量的估计,并不能达到严格地准确地定量。同时对于转移后克隆基因转录的 mRNA 的种类和状态也还有待于进一步地用 Northern 印迹的方法进行分析。

小 结

利用 RNA 快速打点杂交法,在 10^5 — 10^6

细胞的情况下,检测到了 pAGO 质粒转化 L-TK⁻ 细胞后 TK 基因的表达和 pZineo SV(B) erbB 转化 NIH/3 T 3 细胞后 erbB 基因的表达。

参 考 文 献

- [1] Wigler, M. et al., 1977. *Cell* 11: 223.
- [2] Wigler, M. et al., 1979. *Cell*, 16: 777—785.
- [3] Mulligan, R. C. & Berg, P. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2072—2076.
- [4] Southern, J. & Berg, P. 1982. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327—341.
- [5] Wigler, M., et al. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 3567—3570.
- [6] Bressor, J. et al., 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 6523—6527.
- [7] Bressor, J. et al., 1983. *DNA* vol. 2 no. 3: 243—254.
- [8] Garapin, F. G. et al., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 3755—3759.
- [9] Cepk, C. L. et al., 1984. *Cell*, 37: 1053—1062.
- [10] Manitis, T, et al., 1982. *Molecular cloning*. P, 86—94.
- [11] 唐永明, 1985, 介绍一种快速、简便地测定 poly (A) RNA 的方法——快速打点杂交法,待发表。

新生大鼠肝细胞系 NRL-84 的建立及其特性的研究

陈尊器 葛曰萍

(汕头大学医学院)

朱德厚 叶秀珍 陈瑞铭

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从五十年代后期发现甲胎蛋白(AFP)以来,经过一系列研究,其与肝癌的关系已被肯定。虽然近年已有了一些人体和动物的肝癌细胞系、株^[1-3],但建立能够反映 AFP 变化动态

的正常肝细胞系,对于进一步开展实验研究和应用,将是非常重要的一环。我们已从纯品系 wistar 新生大鼠肝组织获得体外长期培养的正常肝细胞,定名为新生大鼠肝细胞系 NRL-84,