参 考 文 献

- 1 Bennett M D, Smith J B. Nuclear DNA content in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*, 1991, 334: 309~ 345
- 2 Moor G, Gale M D, Kurata N, et al. Molecular analysis of small grain cereals: current status and prospects. *Bio/Technology*, 1993, 11: 584~ 589
- 3 Jung C, Clasussen U, Horshenke B, et al. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20: 503~ 511
- 4 Chen Q F, Armstrong K C. Characterization of a library from a single microdissected Oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1995, 38: 706~ 714
- 5 Schondelmaier J, Martin R, Jahoor A, et al. Microdissection and microcloning of the barley (*Hordum vulgare* L.) chromosome 1HS. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 629~ 636
- 6 Albani D, Cote M J, Armstrong K C, et al. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple single tube reaction. *Plant J*, 1993, 4: 899~ 903
- 7 Vega J M, Abbo S, Feldman M, et al. Chromosome painting in plants: *In situ* hybridization with a DNA probe from a specific microdissected chromosome arm of common wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12041~ 12045
- 8 Liu B, Segel G, Vega J M, et al. Isolation and characterization of chromosome specific DNA sequences from a chromosome arm genomic library of common wheat. *Plant J*, 1997, 11: 959~ 965
- 9 Segal G, Liu B, Vega J M, et al. Identification of a chromosome-specific probe that maps within the Ph1 deletions of common and durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 968~ 970
- 10 胡赞民, 崔丽华, 王兰岚, 等. 王百合单条染色体和染色体片段的分离. *遗传学报*, 1997, 24: 278~ 281
- 11 党本元, 胡赞民, 周弈华, 等. 王百合单条染色体 DNA 文库的构建. *科学通报*, 1998, 43(2): 194~ 199
- 12 程祝宽, 颜辉煌, 党本元, 等. 水稻第5染色体短臂端四体在染色体臂分离中的应用. *科学通报*, 1998, 43(3): 272~ 276
- 13 周弈华, 党本元, 胡赞民, 等. 大豆单染色体的显微分离及体外扩增. *植物学报*, 1998, 40: 144~ 150
- 14 崔丽华, 胡赞民, 王兰岚, 等. 黑麦 1R 染色体的显微分离与回收. *植物学报*, 1997, 39: 697~ 700
- 15 宋文芹, 李秀兰, 许文胜, 等. 黑麦染色体的显微分离与 PCR 扩增. *植物学报*, 1998, 40: 158~ 162
- 16 宋文芹, 李秀兰, 许文胜, 等. 蚕豆最大染色体长臂的显微切割与 PCR 扩增. *科学通报*, 1996, 41(4): 360~ 363
- 17 Telenius H, Carter N P, Berr C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992, 13: 718~ 725

(1998-05-07 收稿, 1998-09-07 收修改稿)

反义技术分离筛选抑制 Vero 细胞非定 标性突变的 cDNA 片段

胡文蔚 余应年 陈星若 宋 韬 谢海洋

(浙江医科大学病理生理教研室, 杭州 310031)

摘要 甲基硝基亚硝基胍(MNNG)可诱发猴肾 Vero 细胞的遗传不稳定, 在发生表达改变的表达序列标识(EST)中, 筛选到 1 个片段(片段 9), 它的相关基因表达被阻断后, MNNG 诱发的非定标突变率显著增高($P < 0.05$). 表明其相关基因的编码产物具有维持遗传稳定性, 抑制哺乳类细胞非定标突变发生的功能.

关键词 反义 RNA 突变 非定标性 遗传不稳定

本实验室曾应用一携带 *SupF* tRNA 基因的穿梭质粒 pZ189, 转染在 24h 前经受过烷化剂

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-4-393>

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)攻击的Vero细胞,从进行复制的质粒中筛选出了靶基因 $SupF$ tRNA的突变体,由此证明烷化剂MNNG攻击后可在非损伤碱基部位诱发突变(非定标性突变)^[1],并有序列特异性及基因表达依存性,即受MNNG攻击细胞的基因表达改变参与了非定标突变的发生^[2].为了解非定标突变的发生机制并分离相关基因,我们运用mRNA差异显示技术,分离到23个表达有差异的片段,其中15个片段在处理后的表达增加^[3,4].本研究采用反义核酸技术,证明其中1个片段(片段9)的相关基因具有抑制哺乳类细胞非定标突变发生的功能.通过构建含反向插入片段的真核细胞表达重组体并转染细胞,以获得反义RNA阻断相应基因表达.同时,在复制的质粒pZ189中含有检测突变的靶基因 $SupF$ tRNA,回收质粒DNA通过转化宿主菌*E. coli* MBM7070,在含X-gal和IPTG的氨苄指示板上培养,如果 $SupF$ tRNA基因发生突变,则菌落色泽为白色或淡蓝色.若真核细胞表达质粒也具有氨苄抗性,同样能转化入大肠杆菌*E. coli*并在氨苄板上长出白色菌落,就将干扰实验系统中对突变基因的筛选.由于目前商品化的真核细胞表达载体皆有对细菌氨苄抗性选择特性,因此,本研究还包括构建一个使之适用于本研究的真核细胞表达载体.

1 方法与材料

() 实验材料. 猴肾Vero细胞在DMEM培养基(Gibco)中(含10%小牛血清,2 000 U/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素及200 μ g/mL卡那霉素)常规贴壁培养;穿梭质粒pZ189由美国Dr. Michael M. Seidman赠送,重组在其中的 $SupF$ tRNA校正基因为检测突变的靶基因^[1],真核细胞表达载体pMAMneo自Clontech购得;质粒pBS-9为本实验室构建,由mRNA差异显示获得的片段9克隆于pBluescript SK+ / - T载体中获得,片段两侧相邻的酶切位点为EcoR iv和Hind ④.片段9在MNNG处理后表达增高,并不受蛋白合成抑制剂影响,序列分析显示片段长283bp,与Cricket瘫痪病毒聚合酶有一定的同源性(48.4%),其序列见图1;内切酶,修饰酶,接头及各种化学试剂分别购自Promega公司,Boehringer公司,Gibco公司及华美生物公司等.

碱基计数	85 A	63 C	52 G	83 T
1	CTGATCCA TG	CTGAAAATCC	TAGGCCCCCT	TAAGAATTAG GCCAAATCCA
51	CTCTGTTTGT	GCTCTAGAAA	TGGA ACTATA	ATGTCTGAAT AATAGCACAT
101	ATGTTACAGT	ATAGTTACTG	AATATTAGCC	AGCTGTGAGA GCCACTGCTC
151	AAACAGTTTT	CTTTC AAATA	TTACTGCTTG	TTGGAATGCA CCTGGTCACC
201	CAAGAGCTCT	GATGGAGACA	TACAAGGAGA	TTAATGTCTTTCATATCTGCT
251	AACACAATAT	CCATTCTGCT	GCCCATGGAT	CAG

图1 片段9的序列

() 真核细胞表达质粒的改建. 选用真核表达载体pMAMneo(同时具有氨苄抗性和卡那抗性)作为起始模板进行抗性改建,使其失去氨苄抗性而保留卡那抗性.根据pMAMneo序列,发现在编码氨苄抗性的基因内有1个唯一的Xmn iv酶切位点,为此先用内切酶Xmn iv将其切开,并插入BamH iv接头,然后用连接酶使之再环化,使编码氨苄抗性的基因被插入失活(pMAMneo^{-amp^r}),从而可以通过抗性选择使它与质粒pZ189区分开来;同时又保留了pMAMneo的卡那抗性,便于载体在细菌中的扩增及操作(图2左图).

() 反义表达质粒pMAMneo^{-amp^r}-9⁻的构建及转基因表达细胞系的筛选和建立. 利用

pBS-9 质粒中插入片段两端分别存在 *Sma* *iv* 和 *Sal* *iv* 单酶切位点, 先用 *Sma* *iv* 将 pBS-9 重组体切开, 在其平末端切口处装上 *Sal* *iv* 接头后再用 *Sal* *iv* 进行酶切, 以得到两端均为 *Sal* *iv* 粘性末端的 9 号片段, 可直接插入 pMAMneo⁻amp⁻ 载体多克隆位点中的 *Sal* *iv* 中(图 3). 根据 pMAMneo⁻amp⁻ 载体中的 2 个 *EcoR* *iv* 酶切位点及紧靠片段 9 一端的 *EcoR* *iv* 酶切位点, 通过 *EcoR* *iv* 的酶切图谱分析, 筛选出反向插入的重组体(图 4). 重组表达质粒用改良磷酸钙沉淀法^[5] 转染 Vero 细胞, 用 G418(400 μ g/mL) 筛选抗性细胞, 并扩大培养成系, 以无插入片段的 DNA 载体转染的 Vero 细胞作为对照.

图 2 质粒 pMAMneo_{amp⁻} 的具体构建过程

() 细胞处理及非定标突变率的检测. 按文献[1, 2]进行. 简言之, 细胞传代后 24 h, 贴壁面积达 70% 时用 10 μ mol/L 地塞米松作用 6 h 以诱导克隆于真核表达载体的目的片段转录^[6], 随后处理组用含 0.2 μ mol/L MNNG(Sigma) 的 DMEM 培养基处理 2.5 h, 用新鲜全培养基 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 再用 DEAE-葡聚糖法以穿梭质粒 pZ189 转染细胞, 复制 48 h 后用 Hirt 氏法回收质粒, 用 *Dpn* *iv* 内切酶处理质粒 DNA 以裂解未在细胞中复制过的质粒 DNA, 随后转化指示菌大肠杆菌 MBM7070. 在含有 X-gal 及 IPTG 的氨苄板上, *SupF* tRNA 基因突变的 pZ189 转化子不能代谢底物, 使菌落呈白色或浅蓝色, 而野生型 pZ189 转化子使菌落呈蓝色. 检出突变子并再次划种于指示平板以确证突变, 并计算突变率. 采用 χ^2 检验进行统计分析.

2 结果

2.1 真核细胞表达载体 pMAMneo⁻amp⁻ 的改建

在真核细胞表达质粒 pMAMneo 编码氨苄抗性的基因中插入了 *BamH* *iv* 接头, 使质粒失去对氨苄抗性, 但仍保留的卡那抗性使之能通过卡那霉素的选择在细菌中增殖. 细菌转化实验显

示,质粒 pMAMneo 转化入细菌能在含氨苄及卡那霉素的平板上生长,而 pMAMneo⁻amp⁻ 只能在含卡那霉素的平板上生长,不能在含氨苄青霉素的平板上生长. BamH^{iv}酶切图谱分析可见

图3 质粒 pMAMneo⁻amp⁻-9⁻ 的具体构建过程

图4 质粒 pMAMneo⁻amp⁻ (a) 及 pMAMneo⁻amp⁻-9⁻ (b) 的酶切鉴定电泳图

(a) 1—pMAMneo 的 BamH^{iv}酶切, 2~4—pMAMneo⁻amp⁻ 的 BamH^{iv}酶切, 5—DNA/Hind^{iv}标记; (b) 1—DNA/Hind^{iv}标记, 2—质粒 pBS-9 的 EcoR^{iv}及 Hind^{iv}双酶切, 3, 5—重组子 R₁ 及 R₂ 的 EcoR^{iv}和 Hind^{iv}的酶切, 4, 6—重组子 R₁ 及 R₂ 的 EcoR^{iv}酶切, 7—pMAMneo⁻amp⁻ 的 EcoR^{iv}酶切, 8—PCR 标记

改建后的载体较模板增加了1个 *Bam*H_{iv}识别位点(图4)。

2.2 重组质粒 pMAMneo^r-amp^r-9⁻ 和 pMAMneo^r-amp^r-9 的构建及建立转基因细胞系 Vero-pM^r-amp^r, Vero-pM^r-amp^r-9⁻ 及 Vero-pM^r-amp^r-9

将9号片段重组入载体 pMAMneo^r-amp^r 并用 *Eco*R_{iv}酶切鉴定插入取向. 酶切图谱分析见图4, R1与R2均重组有9号片段,但插入取向不同,其中R2含反向插入的9号片段. 将载体DNA, pMAMneo^r-amp^r-9⁻ 及 pMAMneo^r-amp^r-9 质粒DNA 20μg 分别导入 Vero 细胞,用含400 μg/mL G418的DMEM培养基筛选3~4周后,见到数个独立的细胞克隆形成,消化并扩大培养成系,分别命名为 Vero-pM^r-amp^r, Vero-pM^r-amp^r-9⁻ 及 Vero-pM^r-amp^r-9.

2.3 非定标突变率的检测

结果见表1,各组细胞在MNNG处理后,间隔12h转入穿梭质粒pZ189进行复制,随后回收并检测其突变率. 各细胞系在DMSO处理的对照组中pZ189自发突变频率均很接近,两两比较均 $P > 0.05$; MNNG处理后突变率均有显著增高,增加了5.3~16.8倍,与自发突变率相比 $P < 0.01$. 组间比较 Vero 细胞系及 Vero-pM^r-amp^r 的自发及诱发突变率均无统计学差异,但 Vero-pM^r-amp^r-9⁻ 细胞系在MNNG处理pZ189复制的突变率进一步增高,与其他各组的非定标突变率相比有显著差异 $P < 0.05$.

表1 表达片段9反义RNA的Vero的非定标突变率明显增高

处理	DMSO			MNNG		
	转化子的 数目	突变子的 数目	突变 频率($\times 10^{-4}$)	转化子的 数目	突变子的 数目	突变 频率($\times 10^{-4}$)
Vero	12 250	2	1.6	2 115	5	23.6*
Vero-pM ^r -amp ^r	6 085	3	4.9	8 594	31	36.1*
Vero-pM ^r -amp ^r -9	8 545	4	4.7	4 002	10	25.0*
Vero-pM ^r -amp ^r -9 ⁻	4 959	2	4.0	4 034	27	67.0*#

* 示每个细胞系中DMSO处理与MNNG处理比较均 $P < 0.01$; # 示MNNG处理后的突变率 Vero-9⁻ 较其他各细胞系 $P < 0.05$

3 讨论

遗传不稳定是存在于人类遗传性疾病及肿瘤中的一种重要现象. 细胞暴露于离子辐射或烷化剂后能诱导出遗传不稳定,可表现为延迟发生的点突变增加,延缓发生的染色体重排增加等. 但具体机制尚不清楚,可能有多种机制参与作用,包括一些早期事件及晚期事件. 一些基因外的改变引起某些基因的表达改变可能参与此现象的发生^[7]. 本实验室曾证实烷化剂可诱导 Vero 细胞的遗传不稳定,表现为延迟发生的非损伤部位DNA突变率增加(非定标突变),且基因表达改变参与此现象的发生. 因此,寻找并分离相关基因可为突变机制的研究提供有价值的线索. 用mRNA差异显示技术分离到烷化剂处理后表达发生变化的23个片段,长度约200~400 bp,这些不完整cDNA片段本身不含全部编码序列,不能编码产生有功能的蛋白质,但它与相关基因cDNA的部分序列完全相同,因此当反向克隆于真核表达载体时可转录反义RNA阻断相关基因编码蛋白的产生^[8]. 我们的实验表明,在 Vero-pM^r-amp^r-9⁻ 细胞系中, MNNG诱发的非定标突变率显著提高,引起此作用的可能途径就是通过反义RNA的表达阻断了相关基因的功能,提示被其阻断的相关基因的表达产物在细胞内参与维持遗传稳定性,起抗突变的作用,它在烷化剂处理后的表达增加可能参与抑制非定标性突变的发生. 片段9序列

分析显示与 Cricket 瘫痪病毒聚合酶基因有一定的同源性(48.4%),为进一步分离相关基因提供了线索. 筛选与非靶向性突变相关基因的工作及对片段相关基因的全貌和功能的研究正在进一步进行中.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39470779)及浙江省自然科学基金(批准号:394191)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Zhang X S, Yu Y N, Chen X R. Evidence for nontargeted mutagenesis in a monkey kidney cell line and analysis of its sequence specificity using a shuttle vector plasmid. *Mut Res*, 1994; 323(3): 105~ 112
- 2 孙雪敏, 余应年, 张小山, 等. 转录与翻译抑制剂对哺乳类细胞非靶向性突变形成的影响. *癌变·畸变·突变*, 1996, 8(5): 286~ 289
- 3 张小山, 余应年. MNNG 处理引起猴肾 Vero 细胞 mRNA 差异显示. *癌变·畸变·突变*, 1995, 7(1): 325~ 328
- 4 胡文蔚, 余应年, 张小山, 等. N-甲基 N'-硝基-N-亚硝基胍引起猴肾 Vero 细胞基因表达改变及有关 cDNA 片段的初步鉴定. *中国药理学与毒理学杂志*, 1998, 12(1): 62~ 66
- 5 萨姆布鲁克 J, 弗里齐 E, 曼尼阿提斯 T. 分子克隆实验指南, 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 792
- 6 Asano T, Zwelling L A, An T, et al. Effects of transfection of a *Drosophila* topoisomerase α gene into a human brain tumor cell line intrinsically resistant to etoposide. *Br J Cancer*, 1996, 73: 1 373~ 1 380
- 7 Murnane J P. Role of induced genetic instability in the mutagenic effects of chemicals and radiation. *Mut Res*, 1996, 367(1): 11~ 23
- 8 Weintraub H M. Antisense RNA and DNA. *Scientific American*, 1990, 262(1): 34

(1998-04-14 收稿, 1998-08-05 收修改稿)

3-酮硫裂解酶基因 *phbA* 的克隆、序列分析及功能检测

叶 梁 李 枏 宋艳茹*

(中国科学院植物研究所, 北京 100093. * 联系人)

摘要 用聚合酶链式反应扩增并克隆了真养产碱杆菌(*Alcaligenes eutrophus*)中合成聚- β -羟基丁酸酯(PHB)的一个关键酶——3-酮硫裂解酶基因 *phbA*. DNA 序列分析表明, 所克隆的基因与国外报道序列同源性很高, 只有1个碱基的区别. 为了检测该基因的功能及导肽的定位效率, 构建了带有导肽基因的组成型表达载体, 并转化烟草得到转基因植株. 蛋白质电泳结果表明, 导肽可以将外源蛋白定位于质体, *phbA* 基因能翻译成相应大小的蛋白. 酶活性分析证实, 转基因烟草中的3-酮硫裂解酶可以催化乙酰-CoA 合成乙酰乙酰-CoA.

关键词 *phbA* 基因 聚- β -羟基丁酸酯(PHB) 3-酮硫裂解酶

塑料废弃物对环境造成的污染日趋严重, 因此研究与开发生物降解塑料已势在必行, 利用转基因植物生产生物可降解的高分子聚酯成为生命科学、材料科学与环境科学共同关注的热点. 聚- β -羟基丁酸酯(PHB), 属聚- β -羟基链烷酸酯(PHA)类物质, 是一种新型的热塑性生物可降解塑料, 作为储藏物质存在于多种细菌中. 以 PHB 为原料制造塑料, 可减少石油消耗, 缓解