

研究简报

抗新霉素基因对草鱼肾细胞的磷酸钙共沉淀转移

李金花 魏彦章 朱作言

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

TRANSFORMATION OF PSV₂NEO GENE IN GRASS
CARP CULTURED CELLS VIA DNA-CALCIUM
PHOSPHATE COPRECIPITATION

Li Jinhua Wei Yanzhang and Zhu Zuoyan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

关键词 鱼类培养细胞, 抗新霉素基因, DNA-磷酸钙共沉淀转移**Key words** fish cultured cells, pSV₂neo, DNA-calcium phosphate coprecipitation

自1973年Graham和Van der Eb^[1]首次成功地应用DNA-磷酸钙共沉淀法转化哺乳动物培养细胞以来,又提出了电脉冲法^[2];显微注射法^[3];磷脂载体法^[4]及细菌原生质体融合法^[5]等多种培养细胞基因转移方法。然而,目前的研究多局限于哺乳动物细胞^[6],鱼类培养细胞方面的报道却很少^[7]。建立鱼类培养细胞基因转移的方法,对研究鱼类基因表达调控机制及鱼类基因工程育种有重要意义。

草鱼肾组织细胞系(GCK)(中国科学院水生生物研究所二室王铁辉提供),在含10%新生小牛血清的TC-199(Gibco, USA)培养液中28℃培养。用北京大学尚克刚教授赠送的抗新霉素基因质粒(pSV₂neo, 5.71kb)^[8]作转化DNA。按《MOLECULAR CLONING》^[9]一书的方法在传代的贴壁细胞培养瓶中加入“共沉淀液”(220μl转化DNA, 250μl 2×HEPES缓冲液及31μl 2mole/L CaCl₂),继续在28℃培养6h,然后用10%甘油处理1min,使细胞休克,再加入新鲜培养液在28℃培养48和60h。用胰蛋白酶将细胞从瓶壁上消化下来,用0.5ml 1×PBS悬浮并洗涤两次后加0.5ml 2×DNA提取液

(4% SDS, 0.4 mole/L NaCl, 0.2 mole/L Tris, Cl, 0.024 mole/L EDTA)和蛋白酶K(终浓度200μg/ml), 37℃保温5h,常规方法提取细胞总DNA,溶于40μl TE中。经EcoRI消化后,0.7%琼脂糖胶电泳,进行Southern转移,分子杂交和放射自显影^[11]。用BamHI和HindIII消化质粒pSV₂neo,回收含有neo基因的DNA片段(2.3kb)作为探针,以缺口转译法进行α-³²P-dCTP标记,其放射比活度为2×10⁷cpm/μg DNA。

实验结果见图1。在共沉淀转化的细胞总DNA中存在外源DNA。说明DNA-磷酸钙共沉淀法向鱼类培养细胞直接转移外源DNA是一种有效的方法。进入细胞中的外源DNA的物理构型发生了变化,其分子量明显增大(图1,B)。初步说明外源质粒DNA在鱼类培养细胞中进行了扩增,并形成了大分子量的多聚体,或者外源DNA已整合入受体细胞基因组中,而以大分子的形式存在。但酶切结果显示,“大分子”的外源DNA可以以原有限制性内切酶位点和线性片

1990年7月7日收到。

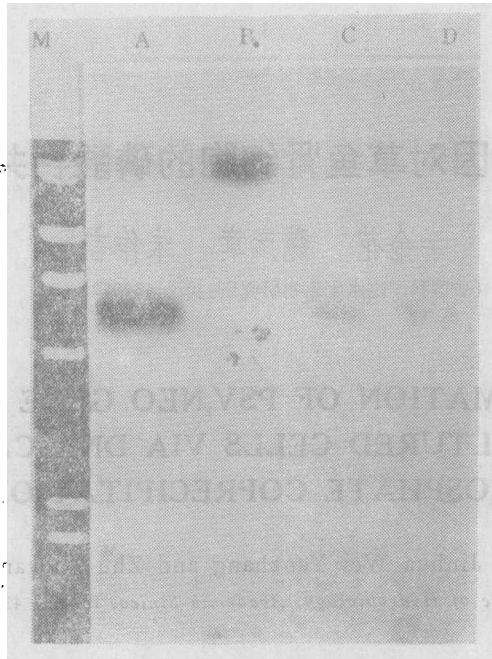


图1 转化 GCK 细胞中外源 DNA 的鉴定

M: λ DNA/HindIII 片段

A: pSV₂neo/EcoRI 线性质粒(阳性对照)

B: 转化细胞总 DNA (48 小时)

C: 经过量 EcoRI 消化的转化细胞总 DNA (48 小时)

D: 经过量 EcoRI 消化的转化细胞总 DNA (60 小时)

Fig. 1 Identification of novel DNA in total DNA from the transformed cells

M: λ DNA/HindIII fragments

A: Linear plasmid of pSV₂neo/EcoRI

B: Total DNA from transformed cells (48hr.)

C: Total DNA digested with excess EcoRI from transformed cells (48 hr.)

D: Total DNA digested with excess EcoRI from transformed cells (60 hr.)

段大小回收(图1,C,D)。说明这种“大分子”的外源 DNA 更可能是自身连接的多聚体。关于外源 DNA 是否与基因组 DNA 发生整合? 外源 DNA 能否在鱼类培养细胞中正常行使功能的实验正在进行中。已有实验表明^[2], SV₄₀ 早期启动子是可以鱼类培养细胞中行使其功能的。

将外源 DNA 导入鱼类培养细胞只是工作的第一步。基于我们的初步结果, 鱼类培养细胞很有可能被用作一个瞬时表达系统来研究一些鱼类基因的表达, 调控和表达产物的功能分析; 同时, 希望在此基础上建立稳定整合外源基因的鱼类细胞系。这无论对于鱼类发育工程中的基因表达, 还是对于鱼类细胞和基因工程育种都是有益的。

参 考 文 献

- [1] 齐义鹏, 黄永秀, 梁明山, 1988. 基因工程原理和方法. 四川大学出版社.
- [2] 沈孝宙等, 1990. 哺乳动物病毒启动子在鱼类细胞中具有调节功能. 科学通报, (5): 381.
- [3] Capecchi, M. R., 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22: 479.
- [4] Graham, F. L., and A. J. van der Eb, 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52: 456.
- [5] Maunino, R. J., and Gould-Fogerite, S., 1981. Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques*, 6: 682.
- [6] Mulligan, R. C., and Berg, P., 1981. Selection for animal cells that express the *E. coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(4): 2072.
- [7] Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofsehneider, P. H., 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric field. *EMBO J.*, 1: 841.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning-A laboratory manual. 2nd. ed. 16.3—16.8.
- [9] Schaffner, W., 1980. Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2160.