

人淋巴毒素基因的分子克隆及其物理图谱

李凌衡 庄文漪 柴建华

李昌本 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

本文报道用一种简便、快速并省时的方法——体内同源重组法^[1], 以小鼠淋巴毒素(MuLT) cDNA为探针, 从以粘粒 pcos2EMBL 为载体构建的人基因组文库中分离出人淋巴毒素(HuLT)基因。然后, 以同位素³²P标记重组粘粒的cos单链末端^[2], 再将经限制酶部份酶切的这种重组粘粒DNA片段电泳分部后, 制作出HuLT基因的EcoR I、BamH I、Pst I和Pvu I四种限制性内切酶的物理图谱。

关键词 人淋巴毒素(HuLT)基因; 体内同源重组; cos单链末端标记; HuLT基因物理图

1967年 Ruddle和 Waksman 首次报道在小鼠中发现了淋巴毒素(LT, lymphotoxin)^[3]。随后在许多种不同的人体肿瘤和其他疾病患者的血浆中也检测到LT^[4]。许多研究结果表明, 经促细胞分裂素(mitogen)诱导24—48h后, T-淋巴细胞可分泌出LT^[5]; 一些B-淋巴胚芽细胞系也产生LT。现已证明LT是一种糖蛋白, 单体的分子量为25000^[6, 7]。对于不同的靶细胞LT具有裂解细胞和抑制细胞生长的作用, 因此是一种直接作用的细胞毒素^[8-11]。尽管正常成纤维细胞对LT也敏感, 但许多种恶性转化细胞对LT更为敏感^[12]。因此, LT既可以阻止癌的生长, 又具有治疗癌的功能^[14-16]。人淋巴毒素由单个基因编码, 基因定位于第6染色体上^[16]。为进一步研究HuLT基因的结构和功能, 设法构建工程菌, 以基因工程方法生产HuLT。我们首先分子克隆HuLT基因, 并制作其物理图谱。

毒素(MuLT) cDNA (1.3kb) 由李昌本等从小鼠cDNA文库中分离得到^[17], 并亚克隆在质粒pBR 322上。本实验用的由我们收集的菌株、质粒和噬菌体有pUC 9 (LacZ⁺, Amp^r, 2.7kb)(图1a), pcos 2 EMBL (Kan^r, Tet^r)(图1b), *E. coli* BHB 3175[W₃₁₁₀r_k⁻, m_k⁺, recA⁻(imm⁴³⁴, cI¹⁸, red⁻, b₂, Sam7)], *E. coli* BHB 3169[W₃₁₁₀r_k⁻, m_k⁺, (imm⁴³⁴, cI¹⁸, red⁻, b₂, Sam7)], *E. coli* BHB3171(W₃₁₁₀r_k⁻, m_k⁺(imm⁴³⁴, cI¹⁸, red⁺, Sam7)], *E. coli* DH1(r_k⁻, m_k⁺, recA⁻, gyrA96, supE), *E. coli* AZ760 (Amp^r)。

2. 人基因组文库: 人基因组文库由欧洲分子生物学实验室(EMBL)的Lehrach博士惠赠。该文库以粘粒pcos2EMBL为载体, 长度为40kb左右的人基因组DNA片段插入pcos2EMBL的BamH I位点。重组粘粒的宿主菌为*E. coli* DH1, 也可临时转入*E. coli* BHB 3175。

(二) 方法

1. 通过体内同源重组筛选重组粘粒

材料和方法

(一) 材料

1. 质粒、菌株和噬菌体: 小鼠淋巴

本文于1989年1月26日收到。

(1) DNA 的制备: 质粒 DNA 和粘粒 DNA 均采用二氯乙酸快速制备法^[18], 这种方法具有操作简便、得率和纯度都很高等优点。

(2) MuLT cDNA 探针的重新亚克隆: MuLT cDNA 从质粒 pBR322 的 BamH I 位点上切下, 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化与回收。然后再亚克隆在质粒 pUC9 上。方法是先用 BamH I 将载体 pUC9 DNA 切成线状, 碱性磷酸酯酶处理阻止其自身环化, 然后用 T4 DNA 连接酶把载体同 MuLT cDNA 片段连接, 由此构成的重组质粒转化感受态的 *E. coli* BHB3169, 在 Amp 平板上筛选转化子。在制备 BHB3169 感受态细胞之前, 先要检查其温度敏感性。

(3) 受体菌的制备: 带有 MuLT cDNA 的受体菌 BHB3169 和重组粘粒的受体菌 BHB3175 和 DHI 均需预先作如下处理: 分离单菌落后, 挑取单菌落接种在 3ml LB 培养液中, 30°C (DHI 为 37°C, 下同) 振荡培养过夜。翌日转接于 200ml LB 培养液中, 30°C 培养到 $OD_{600} = 0.3$, 离心收集细胞, 用 10ml 10mmol/L $MgSO_4$ 悬浮, 4°C 贮存 (可贮存 1—2 周)。为提高 λ 噬菌体的感染率, 可在受体菌的培养液中加入麦芽糖至终浓度为 0.2%。

(4) 重组粘粒扩增并在体内被包装成假病毒: 含有建成基因文库的重组粘粒的 *E. coli* BHB3175 在 500ml 培养液中 30°C 振荡培养至 $OD_{600} = 0.3$ 。转入 42°C 水浴振荡培养 20min, 再转入 37°C 培养 3h, 离心收集细胞, 用 1/20 倍体积的 λ dil (10mmol/L $MgCl_2$, 10mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 1mmol/L Na_2EDTA) 悬浮, 加入 1/20 倍体积的氯仿混匀, 室温下静置 30min, 释放出 λ 假病毒颗粒, 即由病毒蛋白外壳与重组粘粒 DNA 构成的具有感染能力的颗粒。离心取上清, 测定其效价,

4°C 保存。

(5) 体内同源重组和重组克隆的筛选: 将 10^9 cfu (菌落形成单位) 含重组粘粒的 λ 假病毒颗粒和 10^{10} 含 MuLT cDNA 的 *E. coli* BHB3169 混合, 30°C 水浴保温 20min, 转入 200ml LB 培养液, 30°C 振荡培养 1h, 分别加入 Kan (15 μ g/ml) 和 Amp (15 μ g/ml), 转入 42°C 水浴。然后, 按方法 (4) 操作, 由此得到的细菌裂解液中存在 λ 假病毒颗粒, 其中一些颗粒包装的是在 MuLT cDNA 与重组粘粒所含外源 DNA 之间发生了同源重组后的 DNA 片段。

用 10^8 cfu 上述裂解液转导 10^7 *E. coli* BHB3175, 涂布在含 Kan (30 μ g/ml) 和 Amp (30 μ g/ml) 铺有硝酸纤维素滤膜的 LB 平板上, 30°C 培养过夜。次日在平板上长出的菌落即是阳性克隆。

挑取双抗平板上的阳性克隆, 接种在 200 μ l LB 培养液 (含 Kan (30 μ g/ml), Amp (30 μ g/ml) 和 10mmol/L $MgSO_4$), 30°C 培养 2h 后, 按方法 (4) 制备裂解液。取 1—5 μ l 裂解液感染宿主菌 DH1, 涂布在含 Kan 和 Amp 的 LB 平板上, 37°C 培养过夜, 第二天长出的是已纯化的阳性克隆。

2. 重组粘粒 DNA 顺序的复原: (1) 从同源重组后的粘粒中切除作为探针的 MuLT cDNA (图 2): 取已纯化的阳性克隆接种于 200 μ l LB 培养液, 37°C 培养 2h。用噬菌体 λ 3171 感染, 使在体内将重组粘粒包装成假病毒。收集裂解液。取 1—5 μ l 裂解液感染宿主菌 DH1, 涂布在含 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal, 80 μ g/ml) 异丙巯基半乳糖 (IPTG, 5mmol/L) 和 Kan (30 μ g/ml) 的 LB 平板上。37°C 培养过夜。由于 pUC9 质粒带有 Lac Z 基因, 因而在与 X-gal 作用后会使得宿主菌呈蓝色菌落。如果从同源重组后的粘粒中除去了探针 DNA, 即除去了含 MuLT

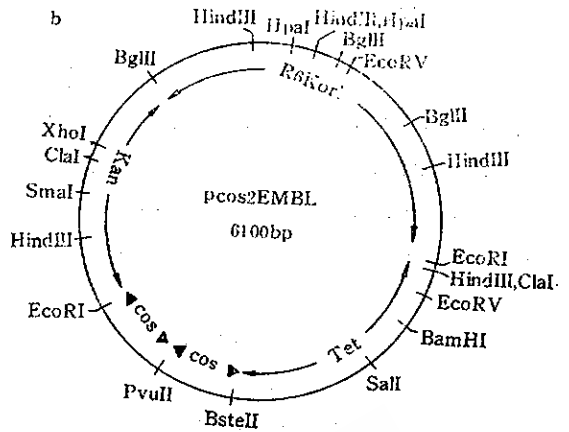
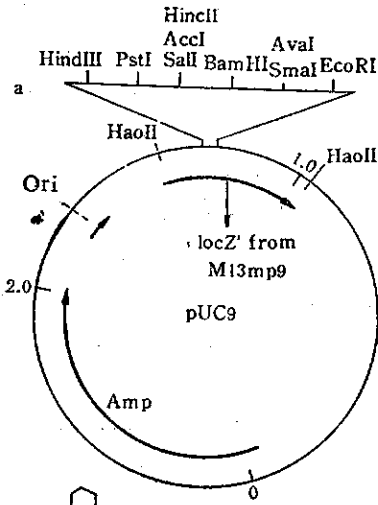


图 1 质粒pUC9和粘粒pcos2EMBL的物理图谱
Fig 1 The physical map of plasmid pUC9 (a) and cosmid pcos2EMBL (b)

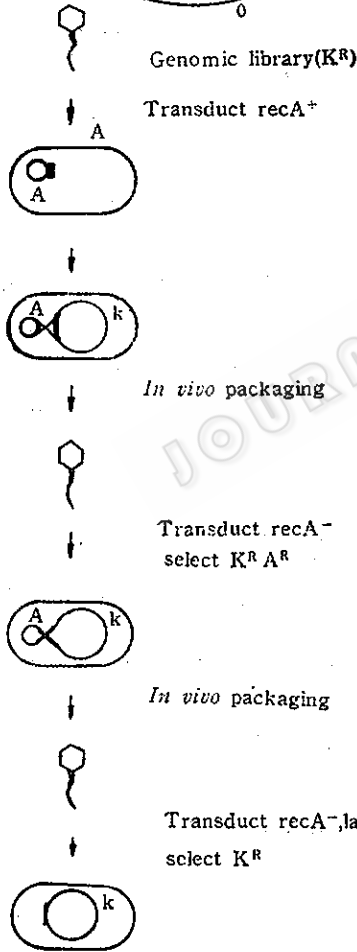


图 2 体内同源重组及其从同源重组后的粘粒中切除探针DNA模式图
Fig 2 Diagram of *in vivo* homologous recombination and excision of the probe DNA from homologous recombinant cosmid

cDNA 的 pUC9, 则宿主菌将成为白色菌落。取白色菌落分别点种在含 Kan 和 Amp 的 LB 平板上, 选出抗 Kan 而对 Amp 敏感的菌落, 这种宿主菌不含带探针的质粒而只含与探针有同源顺序的重组粘粒, 也即回复为原先建成基因组文库的重组粘粒。这称为复原子 (revertant)。复原率一般在 1% 到 50% 之间。

(2) 重组子与复原子的鉴定: 以切口平移法标记 MuLT cDNA 为探针, 与经过限制酶酶切的重组子 DNA 和复原子 DNA 作 Southern 印迹杂交^[1,9], 从而可以确定 HuLT 基因的边界。

3. DNA 顺序的物理图谱分析(图 3)

(1) λ 末端水解酶 (terminase)^[20] 粗提物的制备: 按照 Rackwitz 的方法^[2], 将菌株 AZ760 接种于 400ml LB 培养基, 30°C 培养至 OD₆₀₀ = 0.3 (约 10⁸ 细胞/ml)。44°C 水浴振荡培养 15min, 37°C 继续培养 45 min。置水浴中。离心收集细胞, 用 4ml DPA [(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 3mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EDTA)/DTT(100:1)]

悬浮。超声波破碎细胞 (10×20秒)。离心除去细胞碎片, 收集上清, 加入 0.1mmol/L PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) 和 50μg/ml Aprotinin, 分装后液氮速冻, -70℃ 贮存。

(2) 制作 HuLT 基因的物理图谱: 复原子 DNA 在 cos 位点上被 λ 末端水解酶粗提物切开成为线状, 两端为 cos 单链顺序, 用限制酶作部份酶切。探针是分别与左右两端 cos 单链顺序互补的两种寡聚核苷酸 (12 聚体), 用 γ - ^{32}P -dATP 作标记后, 与经部份酶切的 DNA 进行杂交。0.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶真空干燥器抽干, 直接与 X 光片曝光, 冲洗。测量 X 光片上每条杂交带的迁移距离 (cm), 用计算机算出各个杂交片段的大小, 直接打印出 DNA 的物理图谱^[21]。

结果和讨论

(一) 体内同源重组筛选出阳性克隆

粘粒 pcos2EMBL 构建的人基因组文库以噬菌体 λ3169 作感染后, 进行体内包装而释放出假病毒颗粒, 每一个假病毒颗

粒内含有一个重组粘粒 DNA, 即一个 cfu。以 10^9 cfu 感染 10^{10} 含重组质粒 (pUC9 + MuLT cDNA) 的 *E. coli* BHB3169 可再次获得假病毒颗粒。此时的假病毒颗粒有二类: 一类所含的是原先构成基因组文库的重组粘粒 DNA; 另一类所含的则是与探针有同源顺序的重组粘粒 DNA, 并经同源重组后整合了探针的重组 DNA, 即包含了重组粘粒和重组质粒的 DNA。由于探针载体 pUC9 有 Amp^r 基因, 粘粒有 Kan^r 基因, 所以同源重组后的重组 DNA 分子应同时有 Amp^r 基因和 Kan^r 基因; 这样就能使宿主菌具有对 Amp 和 Kan 的双重抗性。包装了这种重组 DNA 分子的假病毒颗粒 (5×10^5 cfu) 感染受体菌 (3×10^8) 后, 在含 Kan (30μg/ml) 和 Amp (30μg/ml) 的 LB 平板上, 我们得到了 24 个阳性克隆。同源重组率为 5×10^{-5} 。

为进一步鉴定重组子, 随机选取了一个阳性克隆, 抽取 DNA 后用 Kpn I, Msp I, Pst I, EcoR I, BamH I 和 Sal I 酶切, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 (图版 I-A)。凝胶中的 DNA 转移到硝酸纤维素膜

表 1 重组粘粒 DNA 的复原

Table 1 The reversion of recombinant cosmid DNA

重组粘粒 Recombinant cosmid	总菌落数 Total number of colony	白色菌落数 Number of white colony	Kan ^r	Amp ^r	复原子 Revertant
HuLT18	310	5	5	3	HuLT181 HuLT182
HuLT20	502	4	4	2	HuLT207 HuLT208
HuLT38	730	7	7	4	HuLT384 HuLT385 HuLT387
HuLT41	463	3	3	1	HuLT4115 HuLT4117
合计 Total	2,005	19	19	10	9

上, 与经同位素标记的含MuLT cDNA 探针的pUC9作Southern印迹杂交。所得结果见图版 I - A。该项杂交结果表明, 重组子DNA中确实含有插入了MuLT cDNA探针的pUC9, 而且由此可表明存在与MuLT cDNA 同源的顺序, 这就是我们所要的HuLT 基因或该基因的一部分顺序。

(二) 重组粘粒DNA顺序的复原

上述步骤得到的重组子 DNA 中除了含有我们所要的 HuLT 基因或其部分顺序外, 还带有 MuLT cDNA 顺序和 pUC9。必须除去 MuLT cDNA 和 pUC9 才能获得 HuLT 基因或其部分顺序, 进而对其作物理图谱分析。在重组子 DNA 中切除重组质粒 DNA 的操作原理是: 在重组子克隆中引入噬菌体 λ 3171 (red^+), 在 red^+ 的作用下, 可以发生新的重组。在此重组过程中, λ 3171 产生的切割酶会有一定几率切除 MuLT cDNA 顺序和 pUC9, 从而得到原先建成基因组文库的重组粘粒, 这称为复原子, 此时 pUC9 的 LacZ 基因可作为选择标记, 在含 Xgal、IPTG 和 Kan 的平板上选出抗 Kan 的白色菌落。我们在 2 005 个菌落中选到 19 个白色克隆 (表 1), 再分别点种在 Kan 和 Amp 平板上, 得到 9 个阳性克隆, 即对 Kan 有抗性而对 Amp 敏感的克隆。复原率为 0.5%。

(三) 重组粘粒(复原子)中外源DNA的物理图谱

选取一个复原子抽取 DNA 后, 用 λ 末端水解酶切成线状, cos 单链顺序各居左右两端, 称之为 cos 左臂和 cos 右臂。分别用 BamH I, EcoR I, Pst I 和 Pvu II 部分酶切后, 分成两份样品, 各与同 cos 左、右臂顺序互补的, 经同位素标记的寡聚核苷酸杂交。0.5% 琼脂糖凝胶电泳 40 h

(1—1.5V/cm) 凝胶经真空干燥器抽干, X 光片 (Kodak XAR-5) 曝光, 冲印后的结果见图版 I - C。

经限制酶部分酶切的 DNA 分子成为长度不等的片段, 带有 cos 端的片段因 cos 单链末端与寡聚核苷酸探针杂交而显示出杂交带。按照杂交带的分子量大小排序, 即可确定这种酶的切点位置。cos 左臂标记而显示的 DNA 长片段, 一定有右臂标记的 DNA 短片段与其互补, 这样就可相互印证, 大大提高限制酶切点位置的准确性。现在我们以点样孔为起点, 测量出每条杂交带的迁移距离 (cm), 将测得数据输入计算机, 算出各片段的大小, 直接打印出相应的物理图谱。图 4 是复原子 HuLT 208 插入外源 DNA 片段的物理图谱。重组粘粒全长 44.92kb, 插入的外源 DNA 片段为 38.82kb。

(四) HuLT 基因的物理图谱

HuLT208 经 BamH I, EcoR I 和 Pvu II 三种限制性内切酶酶切 (图版 I -B) 与 ^{32}P 标记的 MuLT cDNA 作 Southern 印迹杂交, 所得杂交带的大小如下: BamH I 为 6kb, 0.9kb 和 0.8kb; EcoR I 为 2.3kb; Pvu II 为 7kb 和 0.9kb。从重迭部分可以推算出 HuLT 基因的 EcoR I /EcoR I 片段长约 2.3kb。这个片段内的酶切图谱与 Nedwin 等已发表的 HuLT 基因的资料基本吻合^[22]。参照他们的资料, 我们确定 HuLT 基因的外显子区域落在以 EcoR I /Pst I 为边界的长约 3 kb 的片段内。为进一步验证这个推论, 我们已用克隆的 HuLT 基因转染哺乳类细胞, 观察到其表达产物及生物学活性, 这方面的结果我们将另文报道。

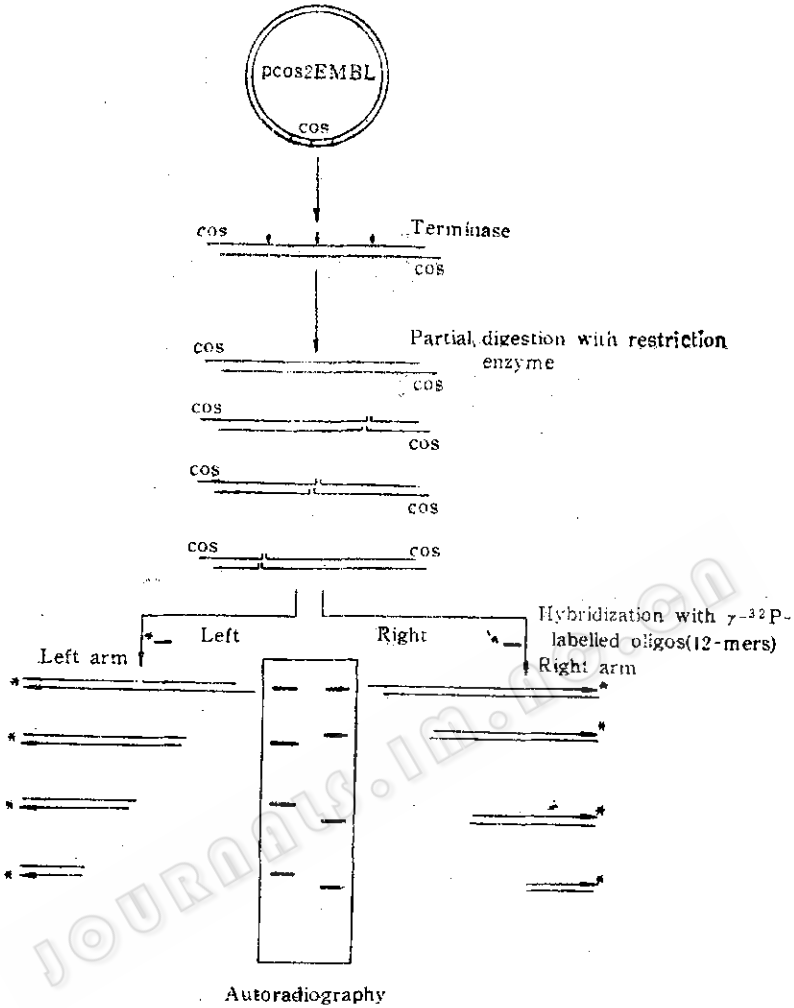


图 3 DNA顺序的物理图谱分析模式图

Fig. 3 Scheme represents the physical map analysis of DNA sequence

*: 表示 γ -³²P标记 γ -³²P labelled

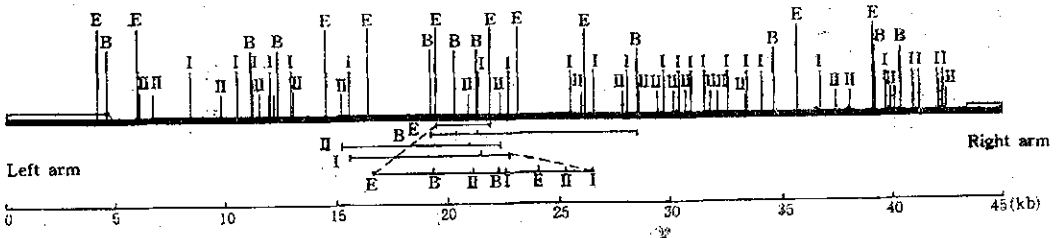


图 4 HuLT基因及其相邻DNA顺序的物理图

Fig. 4 Physical map of HuLT gene and its flanking sequence

虚线区域内表示以EcoR I—Pst I为界线的HuLT基因

Dot line indicates the boundary (EcoR I—Pst I) of HuLT gene

E: EcoR I, B: BamH I, I: Pvu I, I: Pst I

全长 Total length: 44.02kb 插入片段 Insert: 38.92kb

参 考 文 献

- [1] Poustika, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4129—4133, 1984.
 [2] Rachwitz, H. R. et al.: *Gene*, 40:259—266, 1985.
 [3] Ruddle, N. H. and Waskman, B. H.: *Science*, 157:1060, 1967.
 [4] Granger, G. A. et al.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 10:104, 1978.
 [5] Svedersky, L. B.: *J. Immunology*, 134:1604—1608, 1985.
 [6] Aggarwal, B. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 259:689—691, 1984.
 [7] Aggarwal, B. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 260:2334—2344, 1985.
 [8] Evans, C. H. et al.: *Lymphotoxin Cytotoxicity Immunopharmacology*, 3:347, 1981.
 [9] Nawba, Y. et al.: *J. Immunol.*, 135:1018, 1985.
 [10] Rosenau, W.: *Int. J. Immunopharmacol.*, 3: 1, 1981.
 [11] Weitzel, M. et al.: *J. Immunol.*, 125:719, 1980.
 [12] Ruddle, N. H.: *Lymphokine Res.*, 2 (1) :22—31, 1983.
 [13] Ranson, J. H. et al.: *JNCI*, 69 (3) :741—744, 1982.
 [14] Peng, I. et al.: *Cancer Res.*, 128:383, 1987.
 [15] Boyer, J. J. et al.: *Cancer Res.*, 128:367, 1987.
 [16] Owerbach, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3132—3127, 1981.
 [17] Li, C. B. et al.: *J. Immunol.*, 138 (12) :4496—4501, 1987.
 [18] Summerton, J. et al.: *Analytic Biochem.*, 133:79—84, 1983.
 [19] 赵寿元等: *遗传*, 9 (3) :46, 1987.
 [20] Scrull, M.: *Trends in Genetics*, April, 1986.
 [21] Lehrach, H. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 14:335—349, 1986.
 [22] Nedwin, G. E. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 13:6361—6373, 1985.

MOLECULAR CLONING AND RESTRICTION MAPPING OF HUMAN LYMPHOTOXIN GENE

Li Linheng Zhuang Wenyi Chai Jianhua Li Changben Zhao Shouyuan
(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai)

In order to clone the human lymphotoxin(HuLT)gene, we practised a kind of concise, and time-saving method-homologous recombination *in vivo*. By using the mouse lymphotoxin(MuLT) cDNA(1.3kb) as the probe, we isolated the HuLT gene from a human genomic library which was constructed with cosmid pcos 2-EMBL as vector. After linearization, the recombinant cosmid was partially digested with BamHI, EcoRI, PstI and PvuII respectively, and either cos end was labelled by hybridization with radioactive oligos complementary to the cohesive end sequence. The physical map of HuLT gene was made by this method.

Key words

Human lymphotoxin (HuLT) gene; homologous recombination *in vivo*; cohesive end sequence labelling; physical map of HuLT gene

图版说明

Explanation of plate

A. 重组子DNA酶切后的凝胶电泳图 (a) 及其与探针MuLT cDNA的Southern印迹杂交图 (b)
Electrophoregram of a recombinant cosmid DNA digested with restriction enzyme (a). Hybridization with ^{32}P -labelled MuLT cDNA (b).

Lane M, Molecular weight marker, λ DNA cut with Hind III 1. Kpa I 2. Msp I 3. EcoR I
4. BamH I 5. Sal I 6. Hind III

B. 复原子DNA酶切电泳 (a) 和Southern印迹杂交图 (b)

Electrophoregram of a revertant DNA digested with restriction enzyme (a). Autoradiography of the DNA blot hybridization with MuLT cDNA as a probe (b) Lane 1; λ DNA cut with Hind III, molecular weight marker; lane 2; Spp I DNA cut with EcoR I, molecular weight marker; lane 3; BamH I cut; lane 4; EcoR I cut; lane 5; Pvu I cut

C. 复原子DNA经部分酶切后电泳杂交的放射自显影图

Autoradiography of a revertant DNA partial digested with restriction enzyme, hybridized with γ - ^{32}P -labelled oligos and then electrophoresis

1, 10; DNA digested with Sal I, Hind III, EcoR I, and Hpa I, as molecular weight marker. 2, 3: Pst, I, 4, 5: BamH I, 6, 7: EcoR I, 8, 9: Pvu I; left arm: 2, 4, 6, 8; right arm: 3, 5, 7, 9

关于编辑《中国微生物学会全国会员名录》的通知

由中国微生物学会组织工作委员会提议, 在京常务理事扩大会议批准, 决定编辑全国会员名录。

本册名录主要刊登自开展组织整顿工作以来, 全国数千名办理了申请登记、交纳会费并领取新会员证和会徽的中国微生物学会会员的详尽资料。

凡1989年内未重新办理登记换证、交纳会费的原中国微生物学会会员, 不收入该名录。现考虑一些特殊情况, 再请未重新登记及欲申请入会的同志, 于1990年6月15日前与所在地的省(直辖市或自治区)微生物学会联系办理, 过时不再收入此名录。

中国微生物学会接纳永久会员, 除一次交会费100元外, 权利和义务与普通会员相同; 本会还发展团体会员(译文另发)。这两类会员也收入名录(收入本名录的时限同上)具体入会事宜均与我会办公室联系。

中国微生物学会

Li Linheng et al.: Molecular cloning and restriction mapping of human Plate I lymphotoxin gene

