

广东省生物工程学会 1990-1992年学术研讨会论文集

刘学高 朱伟杰 编

SYMPOSIUM OF GUANGDONG BIOENGINEERING
SOCIETY 1990—1992

暨南大学出版社

广东省生物工程学会 1990—1992年学术研讨会论文集

刘学高 朱伟杰 编

暨南大学出版社

1992·广州

粤新登字13号

广东省生物工程学会
1990—1992年学术研讨会论文集

刘学高 朱伟杰 编

※

暨南大学出版社出版

(广州·石牌)

广东省新华书店经销

广东省五华县印刷厂印刷

开本：787×1092 1/16 印张：12.5 字数：300千字

1992年11月第1版

1992年11月第1次印刷

印数1—1000册

ISBN 7-81029-183-1/Q·1

定价：8.00元

目 录

· 研究报告 ·

小麦培养细胞的农杆菌遗传转化研究.....	(1)
许 耀 李宝健 贾敬芬	
β -hCG基因表达载体的构建与鉴定.....	(8)
曹佐武 刘学高 刘冬梅 沈孝宙	
人生长激素基因在花叶芋中的整合与表达.....	(11)
李宝健 王金发 许友卿 徐增富 余慕贞 何 新 沈 玉	
克隆基因在酵母中的高水平表达 I · 新载体的构建.....	(15)
刘飞鹏 余焱林 周天鸿 温 晋	
分析大肠癌中myc基因扩增的临床意义.....	(20)
陈汉源 邹志华 杜世玲	
避免不理想引物带来PCR非专一性的方法探讨.....	(23)
余焱林 刘飞鹏 周天鸿 温 晋	
水稻DNA分子育种技术研究.....	(27)
赖来展 王志坚 刘毅敏 许秀珍	
人羊膜中NAG酶的分离提取及酶活性测定研究.....	(32)
陈淑英 范 放 关 华 孙 莉 陈海玲 夏盛强	
产 β -淀粉酶菌株的筛选及酶性质的研究.....	(37)
何 玲 王红革 罗进贤	
羧甲基甲壳素亲和层析分离纯化木瓜溶菌酶的研究.....	(41)
程明哲 刘 亮	
不育患者睾丸活检前、后的血清抗精子抗体检测.....	(45)
朱伟杰 梁蔚波 金庆骝 张春雪	

142例无精子症患者睾丸的生殖病理学观察..... (48)
梁蔚波 朱伟杰 曾子华 金庆骝 苏泽轩 符 思

107例小睾丸临床报告及其定义的探讨..... (52)
文任乾

人工精子贮囊治疗先天性输精管缺如的初步报告 (附3例报告) (57)
文任乾 李世勤 李庆琨 王春湘 王庆辉

人类精液一步冷冻法的研究..... (61)
朱伟杰 刘学高

上游与下游——两种精子优选方法的比较研究..... (66)
王学本

正常生育男子和精索静脉曲张不育男子精子形态学分析..... (70)
王春湘 文任乾 李世勤 王庆辉 李庆琨 姜彦嘉

不育夫妇的精子凝集试验..... (75)
郑仰泉 陈 栋 方黎明

慢性前列腺炎及其不育者血清与精浆抗精子抗体的研究..... (79)
姜彦嘉 邓春华 冯焕民 李世勤 梅骅 麦国健

B型超声显象监测卵泡发育的研究..... (84)
梁明锦 卞 嘉 吕雅赐 李 波

两种方法冷冻的精液与新鲜精液人工授精的效果观察..... (88)
李庆琨 文任乾 李世勤 朱伟杰 王春湘 王庆辉

63例新鲜精液治疗性人工授精的临床总结..... (92)
曾桂兰

猪卵母细胞体外成熟与精子体外获能..... (96)
王祖昆 雷 春 魏平华 王建忠 孔梅青 巫廷光

电激法的细胞学效应.....(100)
唐祝华 蔡尚达 邱逸光 蔡富筹 游仕湘

高温 (热疗法) 对肺腺癌PC 84045细胞株的生物效应研究..... (106)
孔令根

家蚕抗浓核病新品种选育的基因工程..... (110)

 方菲芳 卢蕴良 黄自然 唐维六 赵伯恩 吴佳乐 朱来俭 周演深

固定化盐藻产甘油和生物反应器..... (117)

 孔谷畴

泰山1号线虫共生菌在固体发酵中的变异..... (121)

 张爵玉 李素春

植宝素对草菇增产作用的报告..... (125)

 范镇基 张哲玲

复方壳多糖等保鲜剂对柑橙保鲜的试验..... (129)

 范镇基 黄转玉 钟治春 吴利侦 叶华文

· 技术交流 ·

水牛妊娠免疫学诊断初步研究..... (134)

 凌志忠 李大铁 杨素娇

在4℃作细胞短暂保存的方法探讨..... (137)

 何丽娟 孔令根

一种简便有效的精子优选方法..... (140)

 王学本

用高效液相色谱测定根瘤菌DNA中G+C的含量..... (143)

 许秀珍 杨 挺 陈素霞 程惠青 莫熙穆

一种高产廉价的线虫培养基..... (148)

 李素春 贺德菊 韩方胜

· 综 述 ·

受精的分子生物学研究..... (151)

 张孝慈 刘学高 周金鑫

卵表面精子受体糖蛋白(ZP)基因的研究	(158)
周金鑫 张孝慈 刘学高	
转基因小鼠的研究概况	(162)
陈汉源	
反义RNA和反义技术的应用	(167)
周天鸿	
广东计划生育科技的沿革 I。基础理论, 节育及人流的研究概况	(172)
欧汝强 田佩玲 姜彦嘉	
广东计划生育科技的沿革 II。绝育 不孕症及优生优育的研究概况	(179)
欧汝强 田佩玲 姜彦嘉	
兰花的共生培养	(184)
邓志红 沈德祖 王怀宇	

· 研究简报 ·

肺炎克氏杆菌苗霉多糖酶基因的克隆及其在大肠杆菌和枯草杆菌中的表达	(188)
罗进贤 何 玲 李文清	
分泌型表达载体pPSA18的构建及地衣芽胞杆菌 α ——淀粉酶基因在枯草杆菌中的表达和产物的分泌	(189)
张添元 罗进贤 李文清	
喷射自吸式环流反应器性能及其SCP连续培养的研究	(190)
周 晶 高孔荣	
胎儿残骨遗留宫腔三年不孕1例报告	(192)
曾桂兰	
转座子Tn ₆ 对银合欢根瘤菌MXU ₂ S _m ^R 的诱变	(193)
彭守来 莫熙穆 程双奇	

小麦培养细胞的农杆菌遗传转化研究

许 耀 李宝健

(中山大学生物工程研究中心)

贾 敬 芬

(兰州大学生物系)

单子叶植物(特别是重要禾谷类作物)的农杆菌转化是当今世界上植物基因工程研究中的一项重大难题。目前仅在百合科^[1-3]、石蒜科^[2]、鸢尾科^[4]、薯蓣科^[5]、禾本科^[6-11,21]及天南星科^[12]等的个别植物中报道了农杆菌的转化。即使在这些材料中,农杆菌的转化效率极低、实验的重复性较差。并且大部分这些报告多以冠瘿碱合成酶活性作为转化的依据,只有少数几例具有Southern blot分析^[1,5,10,11,21]。但至今在农杆菌转化单子叶植物方面尚无有性传递的报道。在当前所建立的几种高等植物基因转移方法中最为有效和可靠的是农杆菌介导的外源基因转化。因此,迅速发展的植物基因工程迫切要求建立适合禾谷类作物细胞特点的农杆菌转化体系。本文采用一些独特的研究手段获得了农杆菌对小麦培养细胞的成功转化。

材料与方法

一、小麦细胞系的建立

将普通小麦(*Triticum aestivum*)甘麦8号幼穗来源的松散状愈伤组织在附加2.0 mg/L 2,4-D、200mg/L YE、250mg/L CH和2%蔗糖的N₀培养基^[13](记作N₀D)中进行液体振荡培养。每7—10天换液一次,同时用20目的滤网滤去大的细胞团。连续换液培养6~8次后,当悬浮培养细胞系重新换液培养1—2天时用来与农杆菌共培养。

二、实验菌株

根癌农杆菌C58C1 Rif^r(pGV3850::neo1103)和大肠杆菌HB101(pLGV 2103)的质粒特性及其培养见前文^[10]所述。

三、化学信号物质

用于诱导农杆菌Ti质粒毒性区基因活化与表达的物质有以下8种:乙酰丁香酮(AS)、邻苯二酚、没食子酸、焦性没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸、香草醛及二羟基苯甲酸等。用50%二甲基亚砷将之配成5mg/ml的贮液,过滤除菌。AS单独配。使用浓度各为10mg/L。

四、天然复合敏感抽提液(FU)的制备

分别将生长着的4—7cm高的烟草无菌苗30株、绿豆幼苗100株、黄瓜幼苗200株、番茄幼苗200株（处理前所有材料苗体的叶茎部位均不同程度致伤,然后再培养过液）、熟透的西红柿3个、胡萝卜培养细胞5g等进行匀浆处理。经MS培养液抽提后,过滤并离心、弃残渣。用MS定容至500ml后,再加2%蔗糖和1/2 LB培养基成分。调pH至5.5。过滤除菌。

五、菌株的处理与共培养体系的改进

在供体与受体细胞相互作用前,首先将实验的农杆菌菌株用YEP (10g/L蛋白胨、5g/L NaCl和10g/L YE) 培养液培养16小时作为一级活性种子液。然后分别取2ml种子液于5倍体积的不同处理液中再培养12小时,即为二级活性菌液。这些处理液包括含或不含AS、上述8种复合化学信号物质(记作8PHE)、1/3 FU液或1/3 FU液+8PHE(记作F8P)的YEP培养液等,其中添加相应抗菌素。共培养时分别向不同培养瓶中的小麦细胞液加入经特殊培养后的二级活性菌液,平均接菌量为每30ml植物细胞液1ml菌液。共培养液分为N₆D液、FU液及高渗液(含10%PEG和50mmol CaCl₂·2H₂O的N₆D液)等。共培养条件有旋转磁场共培养条件及一般培养条件(28°C/、120r/min)。这样所构成的共培养处理组合如表1所示。小麦细胞与特定处理的菌株共培养24小时后,倾去上层菌液。另加新鲜的相

表1 小麦培养细胞与农杆菌共培养的处理组合

处理代号	一级活性菌液的处理	共培养液	共培养条件
YEP	YEP	N ₆ D	28°C、120r/min
AS	YEP+10mg/L AS	N ₆ D	同 上
8PHE	YEP+8PHE(各10mg/L)	N ₆ D	同 上
FU	1/3 YEP+1/3FU	FU	同 上
F8P-1	2/3YEP+1/3FU+8PHE	N ₆ D	同 上
F8P-2	同 上	N ₆ D	同上,再加旋转磁场
F8P-3	同 上	高渗液	28°C、120r/min
CK	无农杆菌处理的对照, 其他操作同YEP处理		

应共培养液,再共培养36小时。在共培养特定时间分别取样固定,用日立S520型扫描电镜观察细菌的附着状况。

六、转化细胞的分离与选择

共培养结束后,用60目的滤网过滤共培养物。交替用无菌水和含800mg/L先锋霉素V (Cef)和500mg/L氨基青霉素(Amp)的N₆D液充分洗涤细胞滤液。最后将之重新悬浮于含这两种抗菌素的(N₆D+Amp+Cef)中,并于26°C、100r/min条件下培养3天。倾上清,用同种新鲜液调至合适密度。取等体积的细胞液分别植板在含和不含120mg/L卡那霉素(Km)的N₆D+Amp+Cef琼脂平板培养基上。随后吸去多余的液体,进行进一步培养和选择培养。每处理3~5次重复。挑选在Km条件下生长的细胞克隆继续选择培养和扩大增殖及以后的再生实验。固定培养时另加0.5%的活性碳。

七、NPT II 和NOS酶活性的检测

利用点印迹分析法^[14]、ndPAGE分离分析法^[15]和高压纸电泳法^[16]分别检测转化克隆中NPT II 酶和NOS酶活性的有无。提取NPT II 酶的缓冲液同前^[17]。

八、转化频率的估算

小麦细胞转化频率的估算参照许耀等的方法^[18]修改如下：

$$\text{Km抗性形成频率}(\%) = \frac{\text{共培养过的细胞在含Km条件下形成的克隆数}}{\text{等量的同种细胞在无Km条件下形成的克隆数}} \times 100$$

$$\text{Km抗性保持频率}(\%) = \frac{\text{在Km选择条件下能够继续增殖的克隆数}}{\text{产生的Km抗性细胞克隆重新接于Km选择培养基上的克隆数}} \times 100$$

$$\text{转化频率} = \text{Km抗性形成频率}(\%) \times \text{Km抗性保持频率}(\%) \times \text{Km抗性保持克隆具NPTII酶活性的频率}(\%)$$

九.DNA提取与分子杂交

植物DNA的分离采用Bevan的方法^[19]。TE溶解的DNA溶液用20μg/ml RNase A在37°C下处理30min。再经酚/氯仿抽提、乙醇沉淀和TE溶解后，电泳估计DNA浓度。每样品约20μg DNA用EcoRI和Hind III 双酶完全消化（37°C过夜）。酶解的DNA片段经0.8%琼脂糖电泳分离后，按Maniatis等^[20]描述的方法进行Southern blot分子杂交。 α -³²P-dCTP标记的探针为pLGV2103 EcoRI+Hind III 酶切的小片段。

结果与讨论

一、不同处理条件在农杆菌转化小麦细胞中的作用

即使在双子叶植物的离体转化实验中，成功的转化不仅与受体细胞的生理和代谢状态有关，而且也与供体细胞的活性水平有关。小麦幼穗来源的愈伤组织在继代培养过程中生长繁殖迅速，其状态十分松散，易于进行液体悬浮培养。经过6—8轮换液培养和滤网过滤后，细胞系较为均一和稳定。当再重新换液培养1—2天时，细胞群体中大多处于代谢旺盛和分裂高峰阶段，此即为农杆菌转化的一个良好受体状态。在离体感染前，将一定量的一级活性菌液用一般培养液、或用能够诱导Ti质粒毒性区基因活性与表达的单一化学信号物质、8种复合化学信号物质、多种敏感受伤植物不同细胞、组织和器官的天然复合抽提物或化学复合信号物质+天然复合敏感抽提液等处理培养12小时，以期获得能够转化小麦细胞的有效活性状态的菌体。在共培养实验中，除了使用一般共培养条件外，还使用了高渗液和旋转磁场等特殊共培养条件，以促使细菌在受体细胞表面的附着、细胞的分裂和外源DNA的整合。共培养24小时，弃去上层菌液，另加相应新鲜共培养液、再继续共培养36小时，以保证供体与受体细胞有充分的相互作用和在此过程中大多受体细胞至少完成一个细胞周期，同时又不致过多的菌体影响受体细胞的分裂生长。共培养结束后，除去游离菌的小麦细胞先在无选择剂条件下培养3天，以降低选择压力对刚刚整合的外源DNA表达的影响。

同时，滤去细胞团以减少转化嵌合体的数目和非转化细胞的比例。

如表2所示，在YEP和CK处理中，植板在Km选择培养基上的小麦细胞虽然能够形成

表2 不同处理条件下鼠瘤农杆菌对小麦培养细胞的转化

处 理	细胞克隆形成数($\bar{X} \pm S$)		Km抗性频率(%)		Km抗性保持克隆的 NPTII酶活性(%)	转化频率
	在无Km条件下	在Km选择条件下	形成频率	保持频率		
	(Km = 0)	(Km = 120 mg/L)				
YEP	144 $\pm$ 32	3 $\pm$ 2	2.1	0	——	——
AS	207 $\pm$ 42	6 $\pm$ 4	2.9	8.9	1/3 (33.3)	8.6 $\times 10^{-4}$
8PHE	191 $\pm$ 18	7 $\pm$ 3 !	3.7	10.4	0/2 (0)	0
FU	317 $\pm$ 58	18 $\pm$ 5 Δ	5.7	7.9	3/11 (27.3)	1.2 $\times 10^{-3}$
F8P-1	191 $\pm$ 64	37 $\pm$ 7	12.7	11.2	6/12 (50.0)	7.1 $\times 10^{-3}$
F8P-2	234 $\pm$ 37	58 $\pm$ 13	24.8	18.6	7/12 (58.3)	2.7 $\times 10^{-2}$
F8P-3	86 $\pm$ 23	0	0	—	——	——
CK	287 $\pm$ 38	5 $\pm$ 3	1.7	0	——	——

个别的细胞克隆。但这些克隆重新转移后不能在Km选择条件下持续增殖生长(图1, C)。F8P-3处理的克隆形成数大为降低可能是所用的高渗液不太合适，即对受体细胞的生长有不良的影响。然而在其他处理中均获得了程度不同的Km抗性形成频率和保持频率(表2; 图1, A、B、D、E)，其中最佳处理为F8P-2。该组合的特点是，不仅使用了诱导菌株活性的复合化学信号物和复合天然敏感抽提物，而且应用了旋转磁场共培养条件。其作用可能是最大程度地诱导了适合小麦细胞转化所必须的农杆菌Ti质粒上毒性区基因或其他有关遗传位点的活化与表达^[22, 23]。旋转磁场可能还会刺激细胞的分裂、DNA的复制甚至外源DNA的转移与整合等。但这一假说尚无直接的证据。此外，在最佳处理条件下可观察到大量细菌附着到小麦细胞表面，并且附着的细菌有纤维丝的形成(图1, F、G)。

二、转化细胞克隆中NPT II 和NOS酶活性的检测

将经不同转化程序处理的小麦细胞在Km选择培养基上产生的细胞克隆分别在同样选择条件下连续分离、选择和培养。各Km抗性细胞克隆经扩大增殖后，随机取各处理中一定数量的样品，首先利用点印迹分析法确定表现NPT II 酶活性正反应的Km抗性细胞系和比例(表2)。然后再利用ndPAGE分析法进一步验证。图2A为三个典型Km抗性细胞系的NPT II 的ndPAGE分析。此外，利用高压纸电泳法分析了这三个细胞系中的NOS酶活性(图2, B)。其中未转化的正常小麦愈伤组织均不表现NPT II 和NOS酶活性。表明农杆菌转化的小麦细胞克隆中NOS基因和NPT II 基因获得了表达。

三、农杆菌对小麦培养细胞的转化频率

为了较为客观合理的计算培养细胞水平的转化频率，我们弃用通常以估计细胞起始植板密度为基数的粗旷方法，而是采用了这样的方法，即共培养处理后，将同一处理的细胞液

混合,每次吸取时均摇均匀。然后比较等量的同一细胞群体在无选择压力和具选择压力下形成的细胞克隆数,计算Km抗性形成频率,再综合考虑Km抗性的保持频率和具NPT II酶活性的频率来科学地估算各处理中小麦细胞被农杆菌转化的频率(表2)。

四、转化细胞系的再生实验

将在含Km条件下连续选择获得的小麦转化细胞克隆分别接于无Km的不同分化培养基上进行再生。正常小麦愈伤组织能够在附加3%蔗糖、1000mg/L CH、0.2%活性碳、0.6%琼脂、1.0mg/L KT、0.5mg/L BA和0.1mg/L 2、4-D的N₀培养基上分化出完整植株。在此培养基的基础上,我们又根据MS培养基、B₅培养基及其无机盐浓度、糖的种类(蔗糖、葡萄糖等)及浓度、各种激素(包括2、4-D、BA、KT、ZT、NAA、2ip)的配比、无激素条件、氨基酸(脯氨酸、谷氨酰胺)以及不同浓度AgNO₃等因子设置了近20种分化处理,然而,经过长期的分化培养,转化细胞系均无任何分化迹象。从而限制了对转化系的进一步分析。这种分化能力的丧失可能与细胞系的长期继代培养和Km的多次选择有关。

五、外源基因整合的DNA分析

分别提取小麦转化细胞来源的愈伤组织系和未转化的正常愈伤组织系的高分子量DNA。利用EcoRI+Hind III双酶完全消化。杂交探针为pLGV2103质粒中包含NPTII基因顺序的约3.3Kb的片段(图2, C)。正常小麦愈伤组织DNA无任何杂交迹象。在所分析的四个典型具NPTII活性和Km抗性的转化细胞系的愈伤组织DNA中除一个无明显的杂交带外,其他三个均具显而易见的杂交带,其中一个还具有三条分子大小不同的杂交带(图2, D)说明T-DNA在该细胞克隆的基因组中具有部分片段整合、分子重排或多位点插入整合等几种可能。因此,我们建立的这一相对新颖的转化程序对所用小麦材料的细胞转化是有效的。我们已在探讨和鉴定这一新途径是否也适合于其他重要作物细胞的农杆菌转化。

欧阳学智同志协助扫描电镜的观察,谨致谢意。

参 考 文 献

1. Bytebier B, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 5345
2. Hooykaas-Van Slogteren GMS, et al. Nature 1984; 311: 763
3. 许耀等,科学通报,1988, 33: 1745
4. Graves AC Goldman SL. J. Bacteriol. 1987; 169: 1745
5. Schafer W, et al. Nature 1987; 327: 529
6. Graves AC, Goldman, SL., Plant Mol. Biol. 1986; 7: 43
7. Woolston CJ, et al. Plant Mol. Biol. 1988; 11: 35
8. 邓万银等. 中国科学(B辑), 1989; 2: 171
9. Xu Y(许耀), et al. Chin. J. Bot. 1990; 2: 81
10. 李宝健等. 中国科学(B辑), 1990; 2: 144
11. Raineri DM, et al. Bio/technology 1990; 8: 33
12. 朱自清等. 中国科学(B辑), 1975; 6: 484
13. An G, et al. EMBO J. 1985; 2: 277
14. Reiss B, et al. Gene 1984; 30: 211
15. 许耀等. 遗传, 1987; 9: 211

16. 许耀等. 实验生物学报, 1991; 24: 109
17. 许耀等. 中国科学(B辑), 1989; 5: 488
18. Bevan MW. Nucl. Acid Res. 1984; 12: 8711
19. Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1982
20. Mooney, et al. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1991; 25: 209
21. Xu Y(许耀), et al. Plant Cell Rep. 1992; in Press
22. Xu Y(许耀), et al. Acta Genet. Sinica 1992; inPress

图1

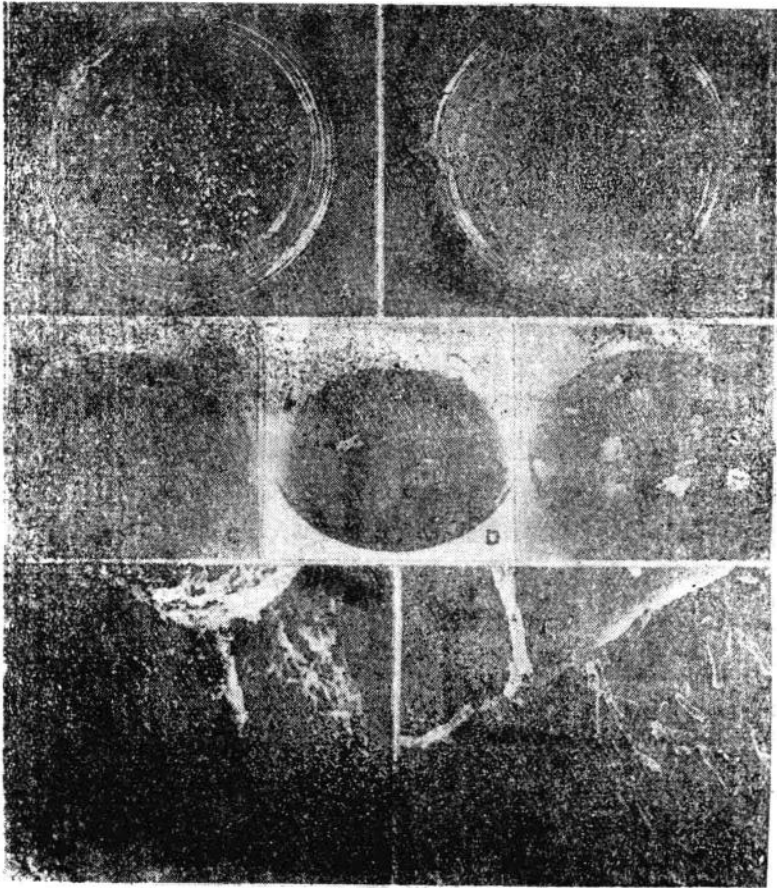


图1

- A、B: 经F8P-2转化程序处理的小麦细胞一月后在无Km (A) 和含 20 mg/l Km (B) 培养基上形成的细胞克隆。
- C、D: 将在含Km培养基上形成的细胞克隆重新接于Km选择培养基上培养6周时的生长情况, C为CK处理, D为E8P-1处理。
- E: 转化细胞来源且保持Km抗性的愈伤组织系。
- F、G: 在F8P-2处理的共培养过程中大量细菌在小麦细胞表面的附着(F) 及其纤维丝的形成(G)。

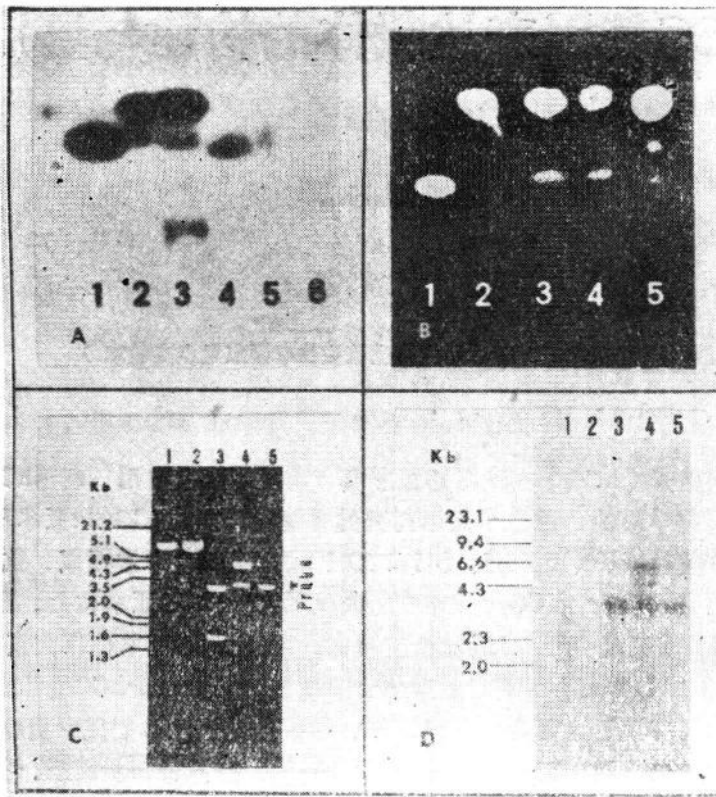


图2

- A:** 小麦转化细胞来源的培养组织中NPT II酶活性的ndPAGE分析。1, 含pGV2103的大肠杆菌提取样品; 2—4, Km抗性细胞克隆经点分析后具NPT II酶活性的三个典型转化系样品; 5、6, 正常小麦愈伤组织样品。
- B:** 磷脂碱合成酶活性的检测。1, 磷脂碱标准样品; 2, 正常的小麦愈伤组织; 3—5, 具NPT II酶活性的三个不同Km抗性转化细胞系。
- C:** 质粒pLGV2103的酶切分析及其探针片段的分离鉴定。1, EcoRI的消化; 2, HindIII的消化; 3, PstI的消化; 4, EcoRI+HindIII的双酶消化; 5, 低熔点琼脂糖法分离的探针片段的鉴定。
- D:** EcoRI+HindIII完全消化的转化与非转化小麦愈伤组织系DNA和Southern blot分析。1, 非转化的正常愈伤组织系; 2—5, 具NPT II酶活性和Km抗性的不同转化细胞系。

β -HCG基因表达载体的构建与鉴定

曹佐武 刘学高

(暨南大学生殖免疫研究中心)

刘冬梅 沈孝宙

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室)

人绒毛膜促性腺激素(hCG)在维持妊娠中具有重要的生理作用,利用hCG作抗原制备疫苗可有效地达到避孕目的。这已引起国内外的普遍重视。但hCG的 α 亚单位的化学结构与人体其它糖蛋白激素分子(如FSH、LH和TSH)的 α 亚单位非常相似,抗hCG抗体必然与这些激素发生交叉反应。hCG的特异性主要表现在 β -hCG亚单位上。虽然抗 β -hCG抗体与hLH有部分交叉反应^[1],但就目前而言,用 β -hCG亚单位作抗原,既保留 β -hCG的免疫特性,又大大减少与其它激素的交叉反应,仍是制备hCG避孕疫苗较为现实的设想。国内外都已开展了这方面的研究工作。然而传统上从孕妇尿中提取hCG有许多麻烦,国外已开始探索用基因工程的方法来生产hCG^[2],并取得初步结果。我国人口形势十分严峻,发展避孕疫苗也特别迫切。为此我们希望用基因重组的方法构建 β -hCG基因表达载体,争取在哺乳动物细胞中表达具有生物活性的 β -hCG亚单位,为制备避孕疫苗和临床检验提供抗原。

材料与方 法

一、材料

培养基: Ham's F₁₂培养基,胎牛血清为GIBCO产品

酶类: Hind III、Sal I、EcoRI、CIP、Klenow polI、T4DNA连接酶、RNA酶均为BRL产品。

DNA分子量标准物: λ /Hind III、 λ /Hind III + EcoRI 为医科院友谊公司产品。

低溶点琼脂糖凝胶为GIBCO BRL产品。

β -hCG试剂盒: 上海放射免疫技术研究所生产。

质粒pBR322 β 、E.coli、DH10B菌种, Hela细胞由沈孝宙教授实验室提供。PSMB质粒由沈孝宙教授实验室构建。

二、方法

用碱性裂解法和PEG沉淀法^[3]提纯pBR322 β 质粒,用Hind III酶解后,在低溶点凝胶

上回收0.6kb的 β -hCG cDNA片段,用Klenow pol I将 β -hCG cDNA的粘性末端补平。

用salI将PSMB质粒切开,按照冷泉港实验室介绍的方法^[4],用Klenow pol I将其粘性末端补平,用牛小肠碱性磷酸酶(CIP)去除末端的磷酸根。

用T₄DNA连接酶把平头 β -hCG cDNA连接到去磷酸根的线型pSMB质粒DNA上,用连接混合液转化E.coli DH10B,在含Amp的LB选择性培养基上筛选转化子。

用磷酸钙沉淀法^[4]将 β -hCG基因的表达式载体导入Hela细胞进行瞬时表达。用放射免疫法测定 β -hCG的分泌量。

结 果

把 β -hCG cDNA和PSMB连接后转化E.coli DH10B,涂布于含Amp的LB培养板上,挑出其中7个单菌落,做微量快速分析,发现样品2和样品4的质粒DNA分子量较大,推测可能是重组体。用AccI和SmaI共同酶解样品2和样品4的质粒DNA,样品4无SmaI位点,而样品2得到两个DNA片段,与标准DNA片段比较,这两个片段与1.7kb和3.7kb大小相符,由此判断样品2为顺向插入 β -hCG cDNA的重组体,命名为PSMB β 。

用磷酸钙沉淀法,将PSMB β 导入Hela细胞进行瞬时表达。每瓶细胞加2ml培养液,48小时后取出培养液,用hCG试剂盒测定培养液中的 β -hCG分泌量,结果每毫升培养液中含5ng的 β -hCG。通常用磷酸钙沉淀法导入外源基因后,能表达的细胞只占极少部分。如果按0.5%的机率计算,当挑出克隆株后,表达水平可望达到1 μ g/ml,而每瓶细胞约含 3×10^6 个细胞,这样表达量,也即0.33 μ g/ 10^6 细胞·24小时。由此可见, β -hCG基因的表载体PSMB β 在Hela细胞中能表达 β -hCG。

讨 论

本研究用于表达 β -hCG基因的载体PSMB由沈孝宙教授实验室构建,分子大小约为4.8kb,具有Amp抗性基因及其复制起点,也具有能表达真核基因的启动子(P)和增强子(E)。载体上的SalI位点可用来克隆外源基因。 β -hCG cDNA长0.6kb^[6],离3'端约0.1kb处有一SmaI位点。当 β -hCG cDNA插入SalI位点时,有两种情况,即顺向插入和反向插入(见图1)。顺向插入的重组体中, β -hCG cDNA上的SmaI位点离启动子侧的AccI位点1.7kb,因此,用AccI和SmaI双酶切PSMB β 时,得到约1.7kb和3.7kb的两个DNA片段。而反向插入的重组体中,SmaI与AccI两位点间的距离为1.3kb,用AccI和SmaI双酶切PSMB β 时,产生1.3kb和4.1kb的两片段。电泳结果显示,样品2为 β -hCG cDNA顺向插入PSMB所得到的重组体PSMB β 。

用磷酸钙沉淀法将PSMB β 导入HEla细胞后,得到5ng/ml的表达量,当挑出克隆后,表达量可能达到0.33/ 10^6 细胞24小时。比印度Chakrabarti等^[2]报道的结果低。他们用SV40

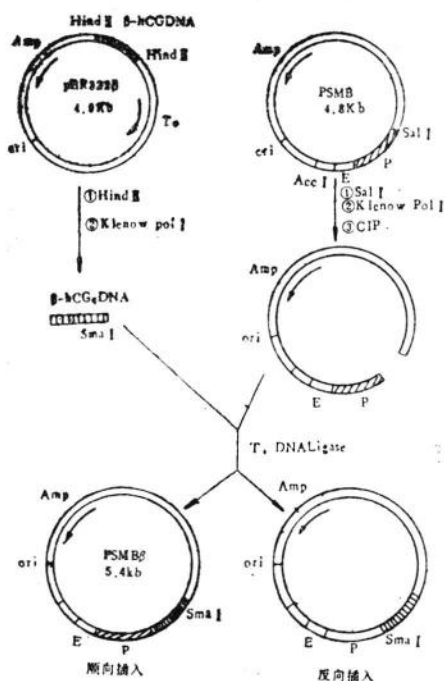


图1 质粒PSMB β 的构建

表达载体在CV-1细胞中表达 β -hCG, 得到 $0.6\mu\text{g}/10^6\text{细胞}\cdot 24\text{小时}$ 的分泌量。但我们目前得到的是瞬时表达量, 随后, 我们将把该 β -hCG表达载体导入CHO细胞中进行稳定表达, 并用MTX对其进行协同放大, 分泌量可望大大提高, 由此可见, 本研究所构建的表达载体是很有前途的, 具体的结果有待于我们下一步的工作。

参 考 文 献

1. Stevens VC. Actions of antisera to hCG- β : in vitro and in vivo assessment. In: James VHT, ed. Proceedings of the fifth international congress of endocrinology. Amsterdam: Excerpta Medica, 1976; p379
2. Chakrabarti S, et al. Expression of biologically active human chorionic gonadotropin and its subunits by recombinant vaccinia virus. Gene 1989; 77:87
3. 彭秀玲. 基因工程实验技术, 湖南教育出版社. 1987
4. Sambrook J, et al. Molecular Cloning. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
5. Fiddes JC, et al. The cDNA for the β -subunit of hCG suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. Nature 1980; 286: 684