

· 简 报 ·

Rb 基因功能片段重组质粒的构建<sup>①</sup>郭奕斌<sup>②</sup>

(中山医科大学医学遗传学教研室; 广州, 510089)

**主题词** 基因, 抑制, 肿瘤; 视网膜神经母细胞瘤; 质粒; 基因表达; 克隆, 分子**中图分类号** Q33; 78

视网膜母细胞瘤基因(Rb)是首先被公认的肿瘤抑制基因。它与视网膜母细胞瘤、骨肉瘤、小细胞肺癌、乳腺导管癌等多种恶性肿瘤的发生有着密切关系,在细胞癌变机理研究中占有极其重要的地位。由于正常组织中Rb蛋白含量极微,又无法从肿瘤组织中分离,因此有必要着手Rb基因表达质粒特别是高效表达质粒的构建,这对于研究Rb基因产物的结构和生物学功能及研究癌变机理都将起着重要的作用。

## 1 材料和方法

## 1.1 菌种

*E. coli* HB101,为本室保存,作为受体菌。

## 1.2 试剂

内切酶、连接酶均为Promega公司提供,其它试剂如三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na<sub>2</sub>)、葡萄糖和醋酸钠等均为分析纯。

## 1.3 pR4.95B质粒的转化、筛选和鉴定

该质粒为目的基因供体。按常规的质粒转化方法进行转化<sup>[1]</sup>→氨苄青霉素(Ap)筛选抗Ap的菌落→快速微量检测<sup>[2]</sup>→扩增抽提→酶切分析、鉴定。

1.4 pSV<sub>2</sub>-gpt的转化、筛选和鉴定

该质粒作高表达的载体用,它含有细菌和哺乳动物细胞的筛选标记,转化、筛选和鉴定的方法同上。

## 1.5 目的基因的准备

根据供体的酶切图谱,选用*Bgl* I 酶切供体质粒,用透析袋电洗脱法或冻融法<sup>[3]</sup>回收目的基因片段。

## 1.6 重组质粒的构建、转化、筛选

方法和步骤参照文献<sup>[4]</sup>。构建的原理如图1所示。

## 1.7 重组质粒的鉴定

根据分析的结果,构建后的重组质粒应含有*Kpn* I 的单切点、*Bgl* I 的双切点和*Pst* I 的三切点,故用这三种酶进行酶切鉴定。

## 2 结 果

## 2.1 pR4.95B质粒的酶切图谱

pR4.95B质粒含有*EcoR* I 的双切点、*Kpn* I 的单切点和*Bgl* I 的三切点,与已知的图谱完全一致。其中*Bgl* I 可切出0.844 kb、1.88 kb和5.1 kb三个片段,如图2所示。其中0.844 kb片段为我们所需的目的基因。

2.2 pSV<sub>2</sub>-gpt质粒的物理图谱

pSV<sub>2</sub>-gpt质粒含有*Kpn* I、*Bgl* I、*EcoR* I 等的单切点的*Pst* I 的双切点,各酶切位点的相对位置见图1的右上图。

## 2.3 pRSV重组质粒的酶切图谱

构建后的重组质粒pRSV的分子量为6.144 kb,它含有*Kpn* I 的单切点、*Bgl* I 的双切点和*Pst* I 的三切点,如图3所示。这与预期的结果完全符合。

① 学科科研基金资助课题;

② 第一作者,1963年出生,男,硕士,讲师

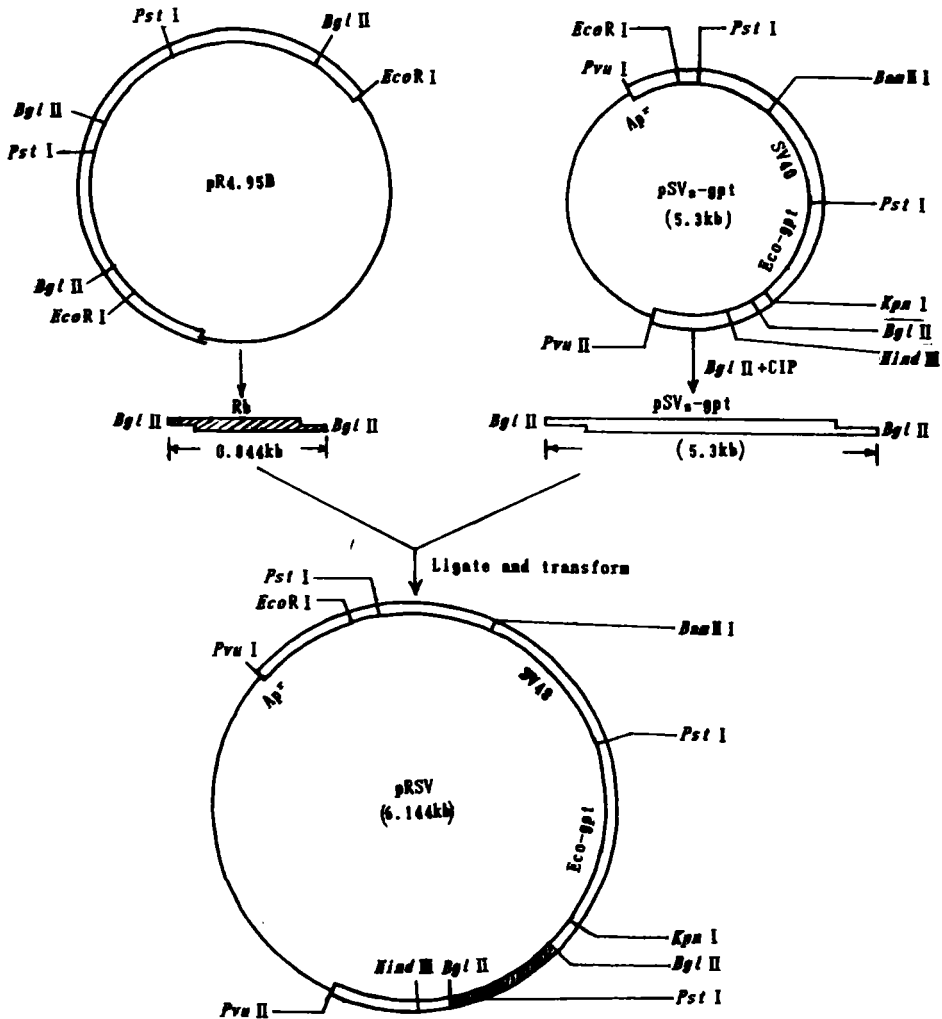


图1 Rb 基因功能片段重组质粒 pRSV 构建原理

入片段含有 *Bgl* I、*Eco*R I 及 *Pst* I 等酶切位点。844 bp 的 *Bgl* I 片段可编码第 330 至 610 位共 281 个氨基酸,这些氨基酸中有数处亲水性氨基酸密集区,并有与 SV40 大 T 抗原结合位点,故 844 bp 的 *Bgl* I 片段可作为目的基因。

由于 pSV<sub>2</sub>-gpt 也含有 *Bgl* I 位点,所以可将 844 bp 的 *Bgl* I 片段与其直接连接,进行重组质粒的构建,构建后的重组质粒可进一步用于体外表达的研究,这些工作将在以后介绍。

### 3 讨 论

pSV<sub>2</sub>-gpt 是一表达型载体质粒,它具有表达效率高、分子量小、单切点的内切酶种类多,含有细菌和哺乳动物细胞两种筛选标记等多种优点,故选用其作为载体进行表达质粒的构建。

从文献[5]可知:RbcDNA 克隆 pR4.95B 的插

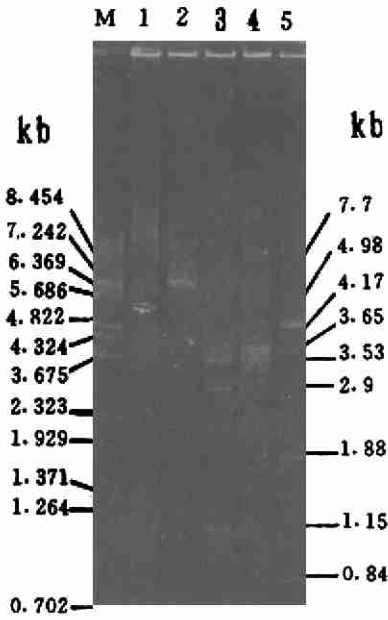


图2 供体质粒 pR4.95B 的酶切图谱

M:  $\lambda$ DNA/*Bst*E I 的 DNA 分子量标准; 1: pR4.95B (未切); 2: pR4.95B/*Kpn* I; 3: pR4.95B/*Kpn* I + *Eco*R I; 4: pR4.95B/*Eco*R I; 5: pR4.95B/*Bgl* I

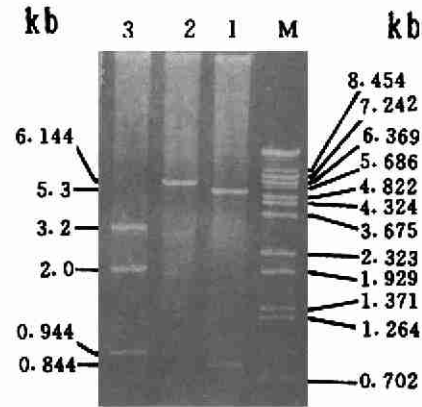


图3 重组质粒 pRSV 的酶切图谱

M:  $\lambda$ DNA/*Bst*E I 的 DNA 分子量标准; 1: pRSV/*Bgl* I; 2: pRSV/*Kpn* I; 3: pRSV/*Pst* I

### 参 考 文 献

- 1 赵晓祥. 重组质粒在大肠杆菌中的转化. 生物技术, 1991, 1(4): 46
- 2 刘伟民. 小量快速提取质粒 DNA 方法. 生物技术, 1991, 7(4): 193
- 3 Qian L, Wikinson M. DNA fragment purification: Removal of agarose 10 minutes after elec-

trophoresis. *Biotechniques*, 1991, 10: 736

- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T (金冬雁, 黎孟枫, 林枫, 等译). 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 34~69
- 5 黄倩, 顾健人, 徐来, 等. Rb 基因表达质粒的构建. *遗传与疾病*, 1990, 7(4): 193

(1994-07-08 收稿 1995-06-03 修回)

(上接第 80 页)

- 3 Trachtenberg J, Walsh CP. Correlation of prostatic nuclear androgen receptors content with duration of response and survival following hormonal therapy in advanced prostatic cancer. *J Urol*, 1982, 127(3): 466
- 4 吴乃允, 桂治宁, 卢汉平, 等. 人大肠癌组织不同组分中糖皮质激素受体含量与临床分期及组织学分型的相关性研究. *中华核医学杂志*, 1994, 14: 53

- 5 夏宗勤主编. 实验核医学与核药理学. 上海: 同济大学出版社, 1989, 227~231
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265
- 7 江希明, 郑树, 丁仁瑞主编. 肿瘤生物学. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1990, 168~170

(1995-01-16 收稿 1995-08-11 修回)