

# NIH/3T3, C-11细胞基因文库的构建以及成纤维蛋白质DNA片段克隆的分离

臧伟庆

(西北大学生物系分子生物学研究室, 西安)

野田亮 井川洋二

(日本理化学研究所分子肿瘤学研究室, 筑波)

本文以 $\lambda$ GT10为载体, 用两种不同的方法建立了 NIH/3T3, C-11细胞基因文库, 所得重组子值分别为:  $6 \times 10^5$  pfu,  $2.5 \times 10^6$  pfu,  $1.8 \times 10^6$  pfu,  $1.4 \times 10^6$  pfu均超过了建库要求的理论值。并且从C-11细胞基因文库中分离出成纤维蛋白质DNA片段克隆, 使得这一DNA片段克隆到pBR322质粒中。

**关键词** C-11细胞; 成纤维蛋白质; Kirsten鼠肉瘤病毒; 回复子;  $\lambda$ GT10载体

C-11细胞是Kirsten鼠肉瘤病毒(Ki-MuSV)特化的成纤维细胞(NIH/3T3)回复子<sup>[1]</sup>。C-11细胞虽然含有Ki-MuSV特异DNA, 但它对特异性致癌基因有抗性。体外实验表明, C-11细胞可以抑制由ras, fes和src转化的配偶细胞, 即某些反转录病毒致癌基因的转化作用能被一些抑制基因阻止<sup>[2]</sup>。最近日本理化学研究所分子肿瘤学研究室野田亮博士等发现C-11细胞中的成纤维蛋白质水平要比Kirsten鼠肉瘤病毒转化细胞中的高许多倍。为了从分子水平上研究C-11细胞对致癌基因的抑制作用, 揭示抗致癌基因的本质和它们的作用方式。我们利用 $\lambda$ GT10为载体, 以两种不同的方法组建了NIH/3T3, C-11细胞的基因文库, 并从基因文库中分离出成纤维蛋白质DNA片段克隆, 使得这一DNA片段克隆到pBR322质粒上。

## 材料与 方法

### (一) 材料

1. NIH/3T3、C-11两细胞株和重组质粒pFH134由日本理化学研究所分子肿瘤学研究室野田亮博士提供。

2. 菌种: *E. coli* HB101, VCS257, C600和C600Hfl<sup>-</sup>

3. 经EcoRI酶解后的 $\lambda$ GT10载体; 由Vector Cloning System公司提供。

4.  $\lambda$ DNA体外包装盒: Vector Cloning System公司产品。

5. 5'- $\alpha$ -(<sup>32</sup>P)-dCTP; Amersham公司产品。

6. “缺口翻译”反应盒: Amersham公司产品。

7. 硝酸纤维素膜: Schleicher & Schull公司产品。

8. 限制性内切酶等酶制剂: BRL公司产品。

### (二) 方法

1. 以 $\lambda$ GT10为载体构建NIH/3T3,

本文于1987年2月24日收到。

本文是作者在日本理化学研究所分子肿瘤学研究室进修时所作, 回国后在林培慈先生指导下撰写的。

C-11 细胞基因文库的步骤参照 DM Glover<sup>[3]</sup> 和 Maniatis<sup>[4]</sup> 的方法进行, 主要过程见图 1。图 1 所示的两个途径只是目的片段大小有差异, 建库过程相同。

2. NIH/3T3, C-11细胞DNA及整个基因组酶解片段的制备: 按 Maniatis<sup>[4]</sup> 的方法制备细胞DNA, 最后将DNA 溶于

TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH 8.0)缓冲液中。完全酶解条件按Maniatis的方法进行。

3. 4-6Kb DNA 片段的制备: 将完全酶解DNA 及分子量标记物进行琼脂糖凝胶电泳。从琼脂糖凝胶中回收所需的DNA片段 (4-6kb), 最后经Sephadex

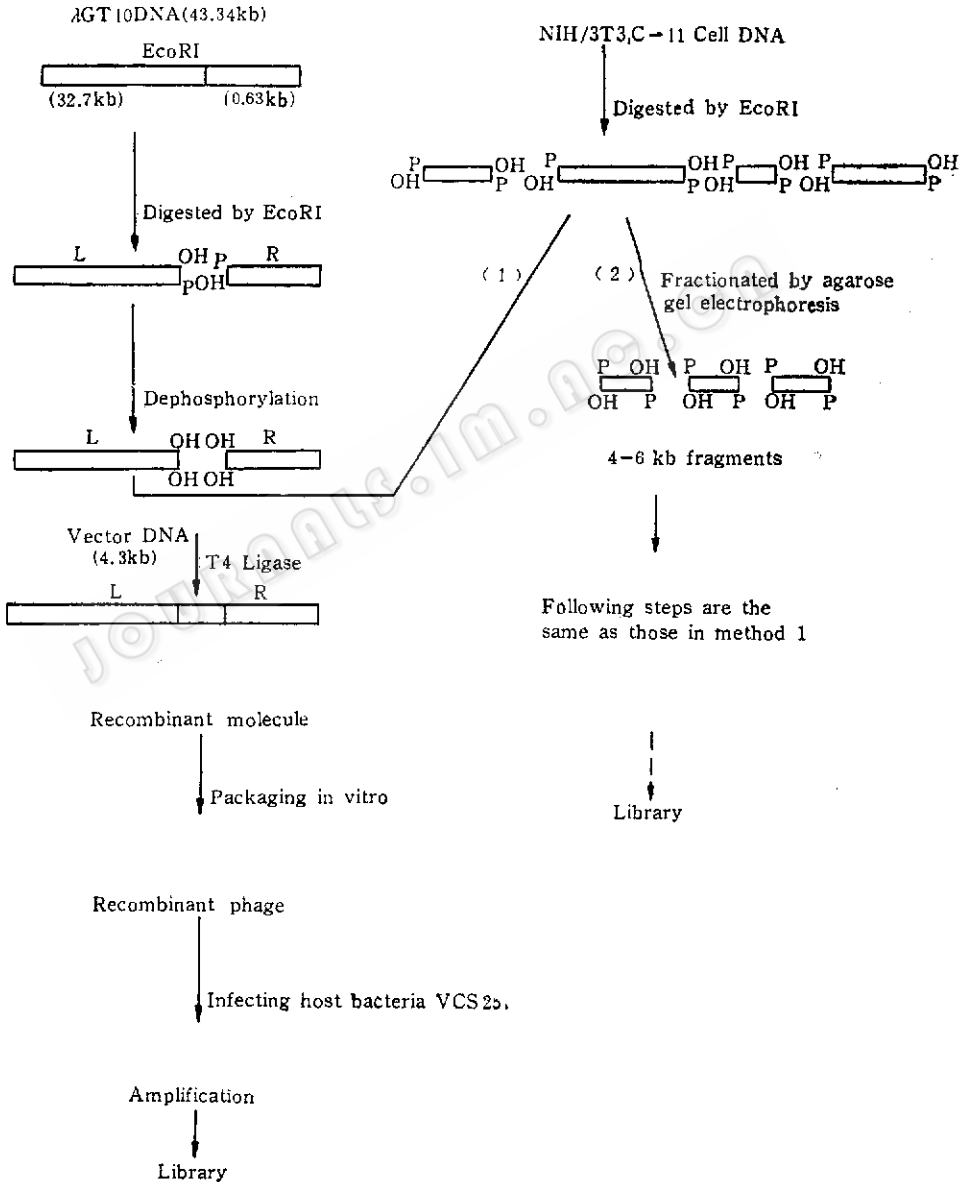


图 1 用 $\lambda$ GT10为载体构建NIH/3T3, C-11细胞基因文库的基本过程  
Fig.1 Schematic diagram illustrating the strategy for constructing NIH/3T3, C-11 cell genomic libraries using  $\lambda$ GT10 as a vector

G-50柱分离纯化。

4. DNA的连接和体外包装: 连接反应参照Barbara<sup>[8]</sup>的方法。将载体 $\lambda$ GT-10 1 $\mu$ g, 插入片段0.12 $\mu$ g混合于3 $\mu$ l 500mmol/L Tris-HCl pH7.5, 60mmol/L MgCl<sub>2</sub>的缓冲液中, 43 $^{\circ}$ C保温1h。冰中冷却, 加0.5 $\mu$ l 0.1mol/L DTT, 0.5 $\mu$ l 10mmol/L ATP, 1 $\mu$ l T4DNA连接酶, 14 $^{\circ}$ C保温一夜。电泳检测连接反应结果。按 $\lambda$ DNA体外包装盒的说明并参照Collins<sup>[9]</sup>的方法进行体外包装。

5. 重组噬菌体滴度的测定: 用倾注平板法进行测定。宿主菌为C600和C600 Hfl<sup>-</sup>。

6. 基因库的扩增: 按Karn<sup>[7]</sup>法。

7. 成纤维蛋白质cDNA探针的制备: 含有成纤维蛋白质5'末端cDNA的重组质粒pFH134按Davis<sup>[8]</sup>的方法转化大肠杆菌HB101并在其中扩增。参照Maniatis<sup>[4]</sup>方法抽提质粒DNA, 用BamH I和Hind III双酶切, 电泳分离, 切出插入片段的凝胶, 在室温下, 用电洗脱以及Sephadex G-50柱层析, 得到高纯度的成纤维蛋白质cDNA片段。

成纤维蛋白质cDNA探针的同位素标记用Davis<sup>[8]</sup>和Rigby<sup>[8]</sup>的方法稍加修改。反应液总体积为20 $\mu$ l, 反应完毕经Sephadex G-50柱分离, 用含有0.1% SDS的TE缓冲液洗脱。收集洗脱液, 液闪检测, 收集第一个峰(结合峰), 贮于4 $^{\circ}$ C冰箱待用。

8. 斑点杂交: 将成纤维蛋白质cDNA稀释成4种浓度(0.1 $\mu$ g/ml—100pg/ml), 用Bio-dot微量过滤装置进行点样。经处理后, 使DNA样品结合在硝酸纤维素膜上, 以便使用做分子杂交时的正对照。

9. 噬菌斑原位杂交: 用倾注平板法使重组噬菌体生长在NZY琼脂培养基上。

按Davis<sup>[8]</sup>和Grunstein<sup>[10]</sup>的方法将菌斑转移到硝酸纤维素膜上, 进行分子杂交和放射自显影。

10. 单个重组噬菌体的检出及噬菌体种子液的制备: 用灭菌后的竹签将所需噬菌斑挑出并溶于1ml Sm液中, 加入2滴氯仿。噬菌体种子液的制备按Maniatis<sup>[4]</sup>方法。

11.  $\lambda$ 重组噬菌体DNA的制备及酶解反应: 按Maniatis法<sup>[4]</sup>。

12. 成纤维蛋白质DNA片段的亚克隆建造: pBR322经EcoRI消化后, 取5 $\mu$ g于100 $\mu$ l 150mmol/L Tris-HCl (pH8.4)中, 经0.5个单位细菌碱性磷酸酶65 $^{\circ}$ C作用30min, 用苯酚抽提两次, 氯仿抽提一次, 乙醇沉淀后溶解于TE缓冲液中用作载体。 $\lambda$ 重组噬菌体DNA经EcoRI完全水解后的片段与处理后的pBR322载体在10 $\mu$ l反应液中进行连接反应。该液中包含66mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5mmol/L DTT, 1mmol/L ATP, 0.7 $\mu$ g上述重组噬菌体DNA EcoRI水解片段, 处理过的pBR322 0.2 $\mu$ g以及1 $\mu$ l T4 DNA连接酶(10个单位), 连接反应在16 $^{\circ}$ C进行一夜, 然后用50mmol/L CaCl<sub>2</sub>稀释到100 $\mu$ l。转化的受体菌为*E. coli* HB101。将0.4ml培养过夜的HB101接种于40mmol/L LB培养液中, 剧烈振荡, 使其生长达到A<sub>600</sub> = 0.6(不能超过0.7)。离心后用20ml冰冷的50mmol/L CaCl<sub>2</sub>液洗涤菌体, 再用2ml冰冷的50mmol/L CaCl<sub>2</sub>悬浮, 0 $^{\circ}$ C保持50min, 将以上所得到的连接反应物稀释液(30 $\mu$ g DNA)加至0.1ml 0.1mol/L Tris (pH7.2)和50 $\mu$ g/ml胸腺嘧啶混合液中, 然后加入0.2ml经CaCl<sub>2</sub>处理的受体细胞。以上反应液在0 $^{\circ}$ C冰浴60min。42 $^{\circ}$ C热刺激2min。将反应混合物涂匀在含有25 $\mu$ g/ml氨苄青霉素的LB

琼脂平板上, 37°C, 倒置培养 9—12h, 最后应用菌落原位杂交法筛选所需的重组子。

13. 菌落原位杂交: 按 Maniatis 和 Davis 法<sup>[4,8]</sup>。

14. 琼脂糖凝胶电泳: 采用 0.6% 的琼脂糖凝胶, 电泳按 Maniatis 法<sup>[4]</sup> 进行。

15. 吸印转移法 (Southern blotting): 吸印转移参照 Maniatis 法<sup>[4]</sup> 进行。

## 结 果

### (一) NIH/3T3,C-11细胞DNA完全酶解片段及4-6Kb片段的制备

NIH/3T3, C-11细胞DNA经EcoRI完全酶解后的电泳图见图版 I-1, 2。4—6kb DNA片段的分离见图版 I-3, 4。

### (二) 重组噬菌体滴度的测定

重组分子体外包装后所得的基因文库为: NIH/3T3(4—6kb):  $6 \times 10^6$  pfu; C-11(4—6kb):  $2.5 \times 10^6$  pfu; NIH/3T3:  $1.8 \times 10^6$  pfu; C-11:  $1.4 \times 10^6$  pfu。

本文所得的基因库重组子数均超过理论值 ( $3.6 \times 10^5$ ), 达到建库要求。

重组噬菌体(cI<sup>-</sup>)在宿主菌 C600HflA 150上形成透明菌斑率为98%。

### (三) 成纤维蛋白质cDNA探针的制备

重组质粒pFH 134DNA用BamHI和HindIII双酶解, 电泳图见图版 I-5所示。将图中电泳凝胶上两带中的下面一带进行分离纯化, 即可得到成纤维蛋白质cDNA小片段。

0.3μg成纤维蛋白质cDNA经缺口翻译后, 标记的总放射量为  $1.49 \times 10^8$  cpm, 比放射性强度为  $4.97 \times 10^8$  cpm/μg DNA。

### (四) 基因文库的筛选

用噬菌斑原位杂交的方法可筛选出阳性克隆, 经过进一步的纯化(3至4次分

子杂交), 可得到单一成纤维蛋白质DNA克隆。图版 I-6显示了一个经过3次噬菌斑原位杂交的杂交滤膜放射自显影结果。

### (五) 成纤维蛋白质DNA片段亚克隆的筛选及其分析

1. 以pBR322为载体, HB101为受体菌, 将成纤维蛋白质DNA片段进行克隆。通过菌落原位杂交来检测阳性克隆, 结果见图版 I-9。

2. 用 Maniatis<sup>[4]</sup> 的快速质粒提取法抽提阳性克隆的质粒DNA, 然后用EcoRI酶切后电泳, 结果如图版 I-7所示。

3. 用吸印转移法将电泳凝胶上的DNA转移到硝酸纤维素膜上, 结果见图版 I-8。从图版 I-7, 8中可以得出我们已经将1.9kb的成纤维蛋白质DNA片段克隆到了pBR322质粒上的结论, 并且证明了 we 已从C-11细胞基因文库中筛选出了一株成纤维蛋白质DNA片段克隆。

## 讨 论

λ噬菌体做为载体具有许多优点, 所以它已成为构建高等生物基因文库的常用载体。本文所用的是λGT10。λGT10只含有单一EcoRI酶切位点, 它是cI<sup>+</sup>表型, 不能侵染HflA 150溶源菌。当插入外源DNA片段后就从cI<sup>+</sup>变成cI<sup>-</sup>表型, 能侵染HflA 150溶源菌, 产生透明噬菌斑。这也可以做为鉴别重组子的标准之一。

在构建基因文库的过程中, 我们认为这个载体的优点是: (1) 载体DNA经过单酶(EcoRI)完全酶解并且去磷酸化后, 在连接时减少了载体两臂之间的自连接, 这样可以把本底降低许多, 提高了载体的利用率。(2) 可以用来做为插入较小DNA片段(0—7.6kb)的载体。(3) 不含质粒DNA顺序, 筛选重组子时本底

降低许多。(4)用 $\lambda$  GT10组建的基因库可以很方便地用核酸(DNA、RNA、寡核苷酸)探针来筛选重组子。

构建 NIH/3T3, C-11 细胞基因文库要求有足够量的重组子才能代表完整的基因组,因此,DNA 插入片的纯度、载体酶解后的去磷酸化作用、连接和包装效率对基因文库的质量都有很大的影响。

我们用两种不同的方法构建 NIH/3T3 和 C-11 细胞基因文库的目的是既要构建永久基因文库,又要富集 4—6kb DNA 片段在基因文库中浓度。因为我们对这两种细胞株 DNA 酶解后 5kb 左右片段感兴趣。

这是基于两细胞株基因组 DNA 用 EcoRI 酶解后吸印转移杂交的结果(结果待发表)。

我们已用成纤维蛋白质 cDNA 探针从 C-11 (4—6kb) 基因文库中分离纯化得到了一株成纤维蛋白质 DNA 片段克隆,并且已将这一 DNA 片段克隆至 pBR322 质粒中,以便进行精细分析。已组建的四个基因文库不但可用于研究致癌基因和抗致癌基因在复杂的调节循环中的相互作用<sup>[11]</sup>,而且还可以用来确定那些在结构特点上彼此无关的致癌基因之间的相互关系。

### 参 考 文 献

- [1] Makoto Noda et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80:5602—5606, 1983.
- [2] Ruth Sager, *Adv.Cancer Res.*, 44:43—68, 1985.
- [3] Glover D.M., *DNA Cloning*, 1:49—73, 1985.
- [4] Maniatis T., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982.
- [5] Barbara, H. et al., *Methods in Enzymology*, Vol.68, New York London, p, 299, 1979.
- [6] Collins, J. et al., *Methods in Enzymology*, Vol.68, New York London, p, 309, 1979.
- [7] Karn, J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 77 (9):5172, 1980.
- [8] Davis, R.W. et al., *Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1980.
- [9] Rigby, P.W.J., *J.Mol.Biol.*, 113:237—254, 1977.
- [10] Grunstein M. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A.* 75:3961, 1977.
- [11] Ruth Sager, *Cancer Res.*, 46:1573—1580, 1986.

## THE CONSTRUCTION OF NIH/3T3, C-11 CELL GENOMIC LIBRARIES AND THE ISOLATION OF FIBRONECTIN DNA FRAGMENT CLONE FROM ONE OF THESE LIBRARIES

Zang Weiqing

(Laboratory of molecular biology, Department of biology, Northwestern university, Xi an)

Makoto Noda Yoji Ikawa

(Laboratory of molecular oncology, Institute of physical and chemical research, Japan)

Four genomic libraries of NIH/3T3, C-11 cells were constructed by using bacteriophage lambda GT10 as a cloning vector. The number of phage recombinants obtained was  $6 \times 10^5$  pfu,  $2.5 \times 10^6$  pfu,  $1.8 \times 10^6$  pfu,  $1.4 \times 10^6$  pfu,

respectively. They all exceeded the necessary number of recombinants that represented an entire genome of NIH/3T3 and C-11 cell line. A fibronectin DNA fragment clone was isolated from genomic library of C-11 cell by several cycles of in situ hybridization. This fibronectin DNA fragment was cloned in pBR322 plasmid and the recombinant plasmid was verified by southern hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled probe.

### Key words

Genomic library; C-11 cell; fibronectin; Kirsten murine sarcoma virus; revertant;  $\lambda$ GT10 vector

### 图版说明

1. NIH/3T3 DNA酶解电泳图  
Agarose gel electrophoresis of NIH/3T3 DNA digested by EcoRI A,  $\lambda$ -DNA digested by Hind III, B, C, NIH/3T3 DNA digested by EcoRI
2. C-11 DNA酶解电泳图  
Agarose gel electrophoresis of C-11 DNA digested by EcoRI A,  $\lambda$ -DNA digested by Hind III, B, C, C-11 DNA digested by EcoRI
3. NIH/3T3 DNA 4—6kb片段分离  
Separation of 4—6 kb DNA fragment from NIH/3T3 DNA digested by EcoRI
4. C-11 DNA 4—6 kb片段分离  
Separation of 4—6 kb DNA fragment from C-11 DNA digested by EcoRI
5. 质粒pFH134酶切电泳图  
Agarose gel electrophoresis of plasmid pFH134 digested by BamHI and Hind III
6. 噬菌斑原位杂交的放射自显影结果  
Autoradiograph of hybridization of plaques
7. 重组质粒酶切电泳图  
Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid digested by EcoRI A,  $\lambda$ -DNA digested by Hind III; B, Undigested recombinant plasmid; C, Recombinant plasmid digested by EcoRI
8. 重组质粒的吸印转移杂交的放射自显影结果  
Southern blotting of recombinant plasmid digested by EcoRI A,  $\lambda$ -DNA digested by Hind III; B, Undigested recombinant plasmid; C, Recombinant plasmid digested by EcoRI
9. 菌落原位杂交的放射自显影结果  
Autoradiograph of hybridization of bacterial clones

Zang Weiqing et al.: The construction of NIH/3T3, C-11 cell genomic  
libraries and the isolation of fibronectin DNA  
fragment clone from one of these libraries

