



应用动物温度敏感变种细胞分离鉴定真核基因

曾桂超

(北京医科大学生化教研室, 北京)

目前已鉴定克隆了上千种基因, 获得这些基因克隆的方法一般是应用核苷酸探针进行分子杂交或应用抗体进行原位抗原抗体反应, 从基因文库或cDNA文库中筛选。采用此法的前提是基因产物是已知的, 已被提纯或测得全部或部份氨基酸序列。事实上, 在许多情况下我们很难了解参与复杂生理过程的蛋白质。如果我们能够得到参与某种生理过程的基因, 就能反过来找到相应的蛋白质。这就是近年提出的逆向研究途径。换言之, 我们要克隆执行某种生理功能而其产物又是未知的基因。一种用于筛选这类未知基因的方法称之为基因转移法。Bishop已成功克隆了一类人类癌基因^[1], 该法利用人癌基因能转化鼠细胞的特性以及利用Alu序列能够从鼠基因组中鉴别人DNA片段的能力来进行的。能否应用这种方法来鉴别具有其他生理功能的, 产物不明的基因呢? 关键是找到某种生理功能缺陷的变种细胞作为DNA转染的受体细胞。温度敏感(TS)变种细胞就是合适的一类受体细胞。

TS变种产生于点突变造成的氨基酸代换, 后者造成某种生理功能必须的蛋白质在限制温度(一般为较高温度)下失活而导致细胞丧失该生理功能^[2]。可用TS变种建立一种体外补偿体系来分离鉴定缺失蛋白。例如用DNA复制缺失的TS变种构成体外DNA合成体系, 在限制温度下

该体系由于某种DNA复制蛋白失活而不能合成DNA, 当加入野生型细胞提取液, 其中相应的正常蛋白就能补偿这种突变蛋白而使DNA得到合成。测定补偿活性, 就能从野生型细胞提取液中逐步分离纯化该种DNA复制蛋白^[3, 4]。应用这种方法成功地分离鉴定了十多种原核生物DNA复制蛋白。然而这种方法不适用于动物细胞。虽然曾有过用TS动物细胞建立体外补偿体系的例子^[4], 但由于其他非突变蛋白的热不稳定性干扰等原因, 未能最终鉴定分离该突变蛋白^[5]。近年来应用逆向研究途径对TS变种的缺失基因的分离鉴定相继取得成功^[6-8]。

70年代以来, 建立了百余种动物TS变种细胞系。鉴定的结果, 大部分为细胞周期变种, 一部份为DNA复制缺失变种^[2]。去年Kai^[6]等人首次克隆了一段人类DNA片段, 它能补偿BHK细胞变种tsBN₂的缺失。今年Greco等人^[7]和Sauve等人^[8]又分别克隆了补偿另外两种细胞周期TS变种ts11和ts13缺失的人类DNA序列。他们使用的BHK变种细胞都是细胞周期缺失的, 即在限制温度(39.5°C)下, 这些细胞不能进入G₁或S期, 继续在39.5°C保温, 就会导致细胞死亡。他们分别用人基因组DNA经磷酸钙

本文于1987年12月18日收到。

共沉淀法在允许温度(33°C)下转染TS细胞,然后升至39.5°C继续培养2—3周,分离存活细胞。只有那些获得能够补偿其缺失基因的同源人DNA序列的TS细胞才能存活。这种转染细胞就不再是温度敏感的细胞。用Alu序列就可以从BHK转染细胞中鉴别与缺失基因同源的或功能相同的人DNA片段。Greco^[7]等人获得了一条编码540个氨基酸的cDNA克隆,而Sauve^[8]等人则获得了一条12.5kb的片段。虽然他们用的ts11和ts13都是G₁周期变种,但克隆的两段DNA并无同源部分,也不同于所有已知基因。Greco等人的研究还提示影响细胞周期的蛋白可能具有细胞类型特异性^[7]。细胞周期是重要的细胞生理过程,其机制还很不清楚。由于建立了许多细胞周期变种,因此,鉴定它们的缺失基因和基因产物的生理功能,就能逐步搞清细胞周期的调控机制。另外,发现变种细胞ts A1S9^[9]和ts 20^[10]缺失的

DNA复制功能可能由于拓扑异构酶活性改变,对其缺失基因的鉴定也在进行之中,并将有助于研究真核细胞DNA拓扑异构的生物学功能^[11]。

应用基因转移法以TS细胞为受体细胞来研究参与复杂生理过程的基因及其产物,具有普遍的意义,因为筛选转染细胞的标准是TS特性的丧失,而与哪种生理功能无关;而且到目前为止,所有TS变种的突变都是隐性的,因此,只要筛选出某种生理功能缺失的TS细胞,原则上都可以鉴定参与该生理功能的基因。较为困难的是DNA转染频率较低(小于 10^{-7}),而又有较高的自发回复突变(丧失TS特性)频率(约 10^{-7})。因此,转染后在限制温度下存活的细胞并非都获得外源基因,要进一步用Alu序列鉴定或与其它基因(如TK等)进行共转染。无疑TS细胞的基因转移法对鉴定参与复杂生理过程的未知基因,是一条大有前途的途径。

参 考 文 献

- [1] Bishop, J.M.: *Science*, 235:305—311, 1987.
- [2] Basilio, C.: *Adv. Cancer Res.*, 24:223—266, 1977.
- [3] Wickner, R.B. (ed): *DNA Replication*, Marcel Dekker Inc., New York, 1974.
- [4] Zeng, G.C. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 4:1815—1822, 1985.
- [5] Zeng, G.C. et al.: *Somat. Cell Mol. Genet.*, 11:557—569, 1985.
- [6] Kai, R. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 6:2027—2032, 1986.
- [7] Greco, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:1565—1569, 1987.
- [8] Sauve, G.J. et al.: *Oncogene Res.*, 1:137—147, 1987.
- [9] Colwill, R.W. and Sheinin, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4644—4648, 1983.
- [10] Zeng, G. C. et al.: *Exp. Cell Res.*, 160:184—196, 1985.
- [11] 曾桂超:生物化学杂志, 2:1—8, 1986.