

胡萝卜体细胞胚胎发生培养物 cDNA 的分子克隆和选择

刘 良 式

(中国科学院遗传研究所, 北京)

Borkird, C. Sung, Z.R.

(美国加州大学遗传学系)

从13日龄的胡萝卜Woolc 细胞株培养物分离 PolyA⁺ mRNA, 按 Leonard 程序合成双链cDNA, 将cDNA甲基化、末端变平, 并与EcoR I 接头连接之后再与λgt11 DNA连接构成重组DNA 分子, 经离体包装, 构建得到一个复杂度为 1.5×10^6 的 cDNA 文库。组织特异的cDNA克隆用与胚胎组织抗原特异反应的多克隆抗体进行筛选得到。

关键词 体细胞胚胎发生; cDNA克隆; 表达载体

胡萝卜的组织培养物逐渐成为一个优良的研究植物胚胎发生的模型系统^[1-3]。胡萝卜体细胞悬浮培养物在含植物激素(2,4-D 1 mg/L)的MS培养基中, 生长为非组织化的愈伤组织, 在不含激素的培养基中则转变为组织化的生长, 在最适条件下, 可以100%地分化为体细胞胚^[4, 5]。通过形态学的观察, 可以将体细胞胚胎分化过程划分为组织化的球形胚、心形胚、鱼雷胚和小植株几个阶段。用适当的程序可以使之同步化以得到一致发育阶段的纯化材料。在胚胎发生的可见形态学变化之前或当中, 可以检出一些生物化学的变化: 如愈伤组织特异的蛋白质C1、C2 的消失和胚胎特异的蛋白质 E1、E2 的出现^[6], 产生使亚胺环己酮和鹅膏蕈碱失活的能力^[7, 8]; PolyA⁺/rRNA比率上升; 精氨酸脱羧酶和S-腺苷酰蛋氨酸脱羧酶活性增加^[9, 10], 嘧啶代谢途径的一些酶活性增加^[11]等等。此外, 对影响

胚胎发育过程的因素也有过一些研究, 如新鲜培养基对胚胎发育过程起诱导作用; 低细胞密度对此过程起促进作用, 生长素和条件化培养基则起抑制作用^[3]。曾经分离到一些突变体^[12], 它们带有在胚胎发育不同阶段某些基因之一受到损伤的遗传标志, 对于进一步研究胚胎发生过程的遗传控制机理带来了更多的可能性。然而, 迄今还没有适当的工具对胚胎发育的早期阶段进行基因表达的研究。因此, 本研究的目的在于寻找胚胎发育过程特异的探针, 以便能通过它们进行胚胎发育特异表达的基因的结构和功能方面的了解。

材料和方法

(一) 实验材料

胡萝卜细胞株: 野生型胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 二倍体细胞株Woolc^[4]

本文于1986年3月18日收到。

细菌菌株^[13]

Y1088 (ATTCN 0.37195) = *E. Coli* Δ
lac U169 *sup E sup F hsdR*⁻
hsd M⁺*met B trp R ton* A21
Proc:: Tn5 (PMC 9)

Y1090 (ATTCN 0.37197) = *E. Coli* Δ
lac U169 *pro A*_Δ*lon ara* D139
strA sup F (trp c22:: Tn10)

Ns428; N205 (λ Aam 11 b 2 red 3
cIts 857 sam 7

Ns433; N205 (λ E am 4 b 2 red 3
cIts 857 sam 7

噬菌体^[13]

λ gt11 = *lac* 5 λ (shind III λ 2 — 3)
sr I λ 3 °C I 857 *sr I* λ 4 °nin
5 sr I λ 5 ° sam 100

(二) 培养基和溶液

MS (Murashige and Skoog) 培养基: 按文献[14]配制。

LB (Luria Bertani) 培养基: Bacto 蛋白胨 10g, Bacto 酵母浸出物 5 g, 氯化钠 10g。需添加氨苄青霉素时, 加入量为 50 μ g/ml。用于噬菌体工作时, 液体培养基加 0.2% 麦芽糖。固体培养基底层加 2% 琼脂糖, 上层软琼脂则加 0.7% 琼脂糖。

M9 培养基: 磷酸氢二钠 6g, 磷酸二氢钾 3g, 氯化钠 0.5g, 氯化氨 1g, 酪素氨基酸 20g, 按顺序溶于 800ml 蒸馏水中, 边搅拌边加入 2ml 1M 硫酸镁, 10ml 20% 葡萄糖, 0.1ml 1M 氯化钙, 加水至 1L。

SM 缓冲液 0.1M 氯化钠, 0.01% 明胶, 5 mM 硫酸镁, 50mM Tris-HCl (pH 7.5)

λ 稀释液: 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM 氯化镁, 0.1mM Na₂EDTA

CH (Collins and Hohn) 缓冲液: 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM 亚精氨, 10mM 丁二胺, 0.1% β -巯基乙醇,

7% 二甲基亚砷。

TBS 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 3% BSA, 150mM 氯化钠。

(三) 实验方法

1. 胡萝卜细胞胚胎发生培养物的生长^[8]: 愈伤培养物可在 MS 培养基中补加 1mg/L 2,4-D 进行培养。为了产生胚胎培养物, 细胞需转移到无 2,4-D 的 MS 培养基中。转移后的最初细胞密度为 2 — 3 $\times 10^4$ 细胞/ml。在 24°C 下的摇床上进行液体培养。

2. Poly A⁺ RNA 的制备: 收集 13 日龄的胚胎发生培养物, 置液氮中速冻, 粉碎并悬浮在变性溶液 (50% 硫氰酸胍, 0.1M β -巯基乙醇, 20mM 二乙基氨盐酸, 用 25mM Tris-HCl pH 7.0 配制) 中, 离心后的上清液用乙醇沉淀, 沉淀物经匀浆制成悬浮液, 再用酚-氯仿提取, 水相用异丙醇沉淀。沉淀物溶于 TESS 缓冲液 (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1M NaCl, 0.1% SDS) 中, 加 1/4 体积 8 M 氯化锂以析出 RNA。将此总 RNA 过 Oliga (dT) 纤维素柱, 收集低盐溶液洗脱部分, 加入 1/10 体积 4 M 醋酸钠和 100% 的冷乙醇使 Poly A⁺ RNA 沉淀, 离心收集 Poly A⁺ RNA。

3. cDNA 文库的构建: 首先需要制备 λ gt11 DNA。将溶源菌单菌落接种在 10ml LB 培养基中, 32°C 培养过夜。然后以 A₆₀₀ = 0.1 转移到 1 L LB 培养基中, 32°C 培养到 A₆₀₀ = 0.6, 进行 48°C 水浴诱导 30min。37°C 继续培养 3 h 后, 加入 10ml 氯仿, 混合 10min, 6000 rpm 离心 10min。上清液经 8000 rpm 离心 8h, 收集噬菌体沉淀。沉淀重悬于 4 ml λ 稀释液, 加入等体积的氯化铯饱和的 λ 稀释液, 35000 rpm 离心 48h (20°C)。从梯度中取出的噬菌体悬浮液进一步作氯化铯分部梯度离心

(32000rpm, 52min)纯化。从最后一次梯度中取出的噬菌体悬浮液对50%甲酰胺溶液透析, 接着用酚-氯仿提取, 纯化噬菌体DNA。

双链 cDNA 的合成采用改动过的 Leonard^[16] 和 Huynh 程序^[18] 进行。第一链 cDNA 的合成用 20 μ g Poly A⁺ RNA 作模板。反应混合物主要包括 1 μ l 0.1M 甲基氢氧化汞、30单位 RNasin, 5 μ ci ³H dCTP, 2.5 μ g Oliga (dT) 12—18, 40nM d (ATGC) TP 和 50单位的 AMV 逆转录酶。反应在 42℃ 下进行 3 h。双链 cDNA 的合成反应混合物主要包括 20 μ ci ³²P dCTP, 40nM d (ATGC) TP, 2 单位 RNaseH, 400单位 *E. coli* DNA 连接酶, 30 单位 *E. coli* DNA 聚合酶 I。反应在 15℃ 下进行 1 h, 25℃ 下 1 h。合成的 ds cDNA, 用甲基化酶甲基化之后, 用 T4 DNA 聚合酶使其末端变平。产物与 5' 端磷酸化的 EcoRI 接头 (linker) d (pGG AATTCC) 连接后, 用 EcoRI 酶消化, 将多余的接头除去。消化产物过一个 Biogel A 50m 柱, 以便将 ds cDNA 与多余的接头分开。收集分部过的带接头的 ds cDNA, 并与 EcoRI 消化完全的 λ gt11 DNA 进行连接 (14℃ 24h)。连接产物用 NS428、NS433 离体包装裂解物^[17] 进行离体包装。通常包装系统包括 5—10 μ l 连接产物、1.5 μ l 0.1M ATP, 30 μ l CH 缓冲液, 50 μ l 包装裂解物, 包装产物在 Y1088 上测滴度。

4. 滤纸片转移: 用硝酸纤维素滤纸片转移重组噬菌体产生的抗原蛋白时, 先将 λ gt11 cDNA 文库的噬菌体 (或经过放大的贮备液) 吸附细菌之后铺在 90mm 平皿中底层琼脂上, 42℃ 培养 3—4 h。用一张曾以 10mM IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside) 溶液饱和过的、

干燥好的硝酸纤维素滤纸片 (82mm) 小心铺在顶层 LB 琼脂糖 (0.7%) 上, 37℃ 保温 2 h, 揭下滤纸片, 再铺上第二张复制滤纸片, 再培养 2 h, 揭下第二张滤纸片。

5. 滤片与抗体反应: 本实验中所用的胚胎特异的抗体, 是用胡萝卜细胞胚之细胞表面蛋白免疫家兔得到的抗血清、经过用愈伤生长培养物细胞的抗原蛋白反复吸附纯化过的多价抗体, 这组抗体在 Western blot 中, 与胚胎发生细胞培养物的抗原至少有 6 条反应带^[18]。将上述转移有重组噬菌体抗原蛋白的滤纸片在 PBS 中洗涤 5—10min, 然后转移到预杂交缓冲液 (PBS+0.1% Trimerosal-0.1% Tween 20 3% BSA) 中, 反应 2 h, 加入 1:1000 的抗体稀释液, 保温 2 h 或过夜, 洗涤 2 h, 加入辣根过氧化物酶结合的羊抗兔第二抗体, 保温 2 h 或过夜, 然后用 0.06% 氯萘酚 (4-chloro-1-naphthol) 和 0.01% 过氧化氢进行显色反应。

结 果 和 讨 论

(一) cDNA 的合成和 λ gt11 cDNA 文库的复杂性

用上述程序纯化的 Poly A⁺ RNA 通过兔网织细胞裂解物和 ³⁵S 蛋氨酸, 进行蛋白质体外合成。在等电点聚焦-SDS 双向凝胶电泳上可以显示几百个产物的斑点 (资料未发表), 说明纯化的 Poly A⁺ RNA 是有活性的。平均产率为 5 g 鲜重的培养细胞, 可以得到 20 μ g 的 RNA。本程序重复性好, 但由于只在 Oliga (dT) 纤维素柱上过柱一次, 纯度较低。一般估计在这种样品中 Poly A⁺ RNA 约占总 RNA 的 30% 左右。

在 cDNA 合成过程中, 由于操作量极

其微小, 步骤冗长, 转移次数多, 因此每个步骤每次转移尽可能减少丢失反应产物是很重要的。我们在每个酚提取步骤中, 都采用水返提有机相两次, 然后合并水相, 最大限度地减少丢失。在整个程序中, 第一链 cDNA 的合成是一个关键步骤。我们采用甲基氢氧化汞代替热变性 RNA 的二级结构, 在反应系统中加 RNasin 抑制内源 RNA 酶, 第一链合成产率变动在 16—30% 之间。在第二链的合成中, 我们用 RNase H 消化杂种链 cDNA · RNA 中的 RNA, 由 *E. coli* DNA pol I 和 *E. coli* DNA 连接酶完成第二链的合成。合成产物在琼脂糖凝胶电泳谱上显示大部分产物在 0.5—2 kb 范围 (图版 I - 1)。ds cDNA 的甲基化是一个简单步骤, 但事先需用 pBR322 DNA 检查甲基化酶反应系统, 证明其有效性才进行 ds cDNA 的甲基化步骤。在 5' 磷酸 EcoR I 接头与修饰过的 ds cDNA 连接之后, 产物经一个 2 mm 直径的凝胶过滤柱分部。这是一个很不容易操作的步骤, 柱的分部效率事先用 pBR 322 Hinf II 消化产物检查过。经过 Biogel A 50m 柱分部后, 从每个分部 (50 μ l) 取 1 μ l 的琼脂糖凝胶电泳谱, ds cDNA 主要集中在 5—9 分部 (图版 I - 2), 分子量大部分在 0.5—2 kb 的范围。经过计算, 第二链的合成产率在 60% 左右。当以 20 μ g RNA 为起始材料, 最后得到大约 0.5 μ g 可供连接的 cDNA。连接好的 ds cDNA- λ gt11 DNA, 经离体包装之后得到一个复杂度为 1.5×10^6 pfu 的 cDNA 文库。用 IPTG 和 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 平板测定重组体的比率为 12%, 即 1.2×10^5 pfu。然而, 当考虑到插入方向和读格 (readings frame) 作为表达的限制因素时, 能表达的重组体将只 2 $\times 10^4$ 个克

隆。以 Poly A⁺ RNA 为基数考虑, 我们的克隆效率偏低, 主要原因是 Poly A⁺ RNA 是只通过一次 Oligo (dT) 纤维素柱的缘故。

(二) 用抗体探针筛选胚胎发生特异的克隆

多价抗体探针成功地用于筛选 λ gt11 cDNA 文库的特异克隆已有报道^[19]。由于多价抗体可以识别一个以上的抗原决定部位 (Epitope) 的性质, 因此作为筛选 λ gt11 cDNA 文库的探针比之单克隆抗体成功的机率要大些。本实验中的多价抗体是经过纯化过的几种多价抗体的混合物。在初步筛选时, 我们是用不经放大的包装产物直接筛选, 即将原包装产物以 5×10^4 pfu 与 3×10^7 细胞的 Y1088 吸附 30 min, 再与 3×10^7 Y1090 细胞混合, 用 0.7% 琼脂糖 (LB 培养基配制) 铺碟。由于 Y1088 是一个 R⁻ M⁺ 的宿主, 用它可以避免重组噬菌体在 Y1090 上增殖时被内源限制性内切酶消化。经过培养 3—4 h 之后, 转移噬菌体产生的抗原蛋白质到硝酸纤维素滤纸片上, 与抗体反应及显色之后, 我们初步得到 93 个强弱不等的信号正斑。以随机方式取其中 63 个信号正斑复筛, 得到 22 个正反应噬斑 (图版 I - 4)。

初筛和复筛的较大变化 (63:22) 有两个原因: 1. 多价抗体中常含有一些能结合到大肠杆菌正常产生的抗原成分。通常为避免由这种结合所产生的本底, 需将抗体通过用大肠杆菌细胞裂解物吸附的纯化程序。我们初筛用的抗体未经这种处理, 所以显示信号的正斑中有一些是假斑, 而且由于每平皿的噬菌斑密度极高, 初筛的信号斑很容易误辨; 2. 由于滤纸片上的正斑位置是以镜影的方式从平板挑取出来的, 这步操作难度大, 也会导致部分真正的正斑丢失。而且从初筛到复筛是

一个放大过程,由 λ gt 11 本身的结构上决定的重组噬菌体长势较弱,在此过程也会有丢失的倾向^[15]。

表 1 cDNA克隆的插入片段大小

Table 1 The size of inserts of cDNA clones

LAMDAgt11 clones	DNA插入片段分子量 Size of inserts of DNA
克 隆	(kb)
E 4	0.2
E 8	0.8
E14	0.8
E18	0.9
E22	2.2, 2.0, 0.1
E24	0.7, 0.2
E33	0.9
E35	1.1
E47	0.2
E50	0.8
E66	2.2, 2.1, 0.2
E76	0.2

(三) 插入片段的大小

经过复筛得到的正斑,仍需重复在 IPTG + X-Gal 平板上检查。因为我们发现,蓝斑和无色斑(重组体)的比例在不同的单斑贮备液之间不同,这是由于噬菌体在琼脂糖中扩散引起的,通常要经过 2—3 次 IPTG + X-Gal 平板上纯化才能得到纯的无色斑。取各单斑贮备液,用平板裂解物的方法在 Y1090 上制备噬菌体悬浮液,然后纯化其 DNA。经过 EcoR I 消化和琼脂糖凝胶电泳检查各重组体的插入片段大小。在检查过 12 个重组体中,它们的插入片段在 200bp 和 2.2kb 之间,大多数重组体均含有一个插入片段(表 1, 图版 I-3) 个别的重组体有多至三个片段,原因待进一步分析。

(四) 用 cDNA 克隆作探针研究基因表达

首先我们研究克隆的序列在细胞处于

愈伤生长和胚胎发育过程中表达的差别。分别提取两种培养物的 Poly A⁺ RNA, 取 20 μ g 的 RNA 样品作甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,然后转移到硝酸纤维素滤纸(Northern blot)上,用缺刻转译(Nick translation)方法将³²P dCTP 标记的探针 DNA(所有用作探针的 DNA 序列都事先再克隆到质粒 pUC18 上)与之杂交。一些克隆的 Northern blot,初步实验结果表明它们的表达有不同的特点:一些克隆在胚胎中强烈的表达而在愈伤中则完全不表达,如克隆 8、49、59。另一些克隆是非发育特异性的,如克隆 4、18、24,虽然它们都是用同一程序筛选出来的正信号斑。克隆 66 在 λ 噬菌体裂解液制备的 DNA 中存在三个片段,经再克隆到 pUC18 作为杂交探针,其中一个亚克隆显示与它相应的 m RNA 分子量为 2 kb。

另外将 13 日龄的愈伤培养物转移到无 2,4-D 的新鲜培养基(胚胎培养基)中,取 4、24、72、120h 的培养物和小植株分别提取其 Poly A⁺ RNA 作 Northern blot,然后用标记的探针 DNA pUE 8 杂交,结果表明这个序列在细胞接触胚胎培养基只有 4 h 就开始表达,在 24—72h 期间保持一种高水平的表达,然后逐渐降低。然而在 13 日龄的愈伤培养物中则显示极低水平的表达,说明这个序列的表达具有组织特异性和时间特异性。

本文首次报道从胡萝卜细胞中分离到一批发育特异的 cDNA 克隆,进一步研究这些克隆的表达和结构无疑具有重要意义。包括:1. 鉴定每个克隆的表达时空特异性,特别是它们在胚胎发育各个不同阶段的特异性;2. 从这些 cDNA 克隆进一步筛选基因组克隆,分析它们结构上的特点,探索是否存在协同表达的特异序列;3. 利用这些克隆作探针,查明这些序列

是否亦存在于其它种植物中以及它们表达的情况; 4. 利用这些探针研究合子胚的发育过程; 5. 由于 λ gt 11 克隆能产生融

合蛋白, 因此有可能得到大量的纯化蛋白质用来作免疫化学工作, 进行细胞学定位。

参 考 文 献

- [1] Steward, F.C. et al.: *Amer. J. Bot.*, 45:693—703, 1958.
- [2] Steward, F.C. et al.: *Science*, 143:20—27, 1964.
- [3] Sung, Z.R. et al.: *Plant Molecular Biology Reporter*, 2:3—14, 1984.
- [4] Halperin, W. and Wetherell, D.F.: *J. Bot.*, 51 (3):274—283, 1964.
- [5] Sung, Z.R.: *Plant physiol.*, 57:460—462, 1976.
- [6] Sung, Z.R. and Okimoto, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:3683—3687, 1981.
- [7] Pitto, L. et al.: *Italian Society Cell Biology*, 1983.
- [8] Sung, Z.R. et al.: *Plant physiol.*, 68:261—264, 1981.
- [9] Montague, M.J. et al.: *Plant physiol.*, 62:430—433, 1978.
- [10] Sengupta, C. and Raghavan, V.: *J. Exp. Bot.*, 31:259—268, 1980.
- [11] Ashihara, H.Z. et al.: *Pflanzenphysiol.*, 104:129—139, 1981.
- [12] Breton, A.M. and Sung, Z.R.: *Develop. Biol.*, 90:58—66, 1982.
- [13] Young, R.A. and Davis, R.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:1194, 1983.
- [14] Murashige, T. and Skooge, F.: *Physiol. Plant*, 15:473—479, 1962.
- [15] Leonard, D.: A protocol from Dept. of Biochemistry, New York University, School of Medicine, 1984.
- [16] Huynh, T.V. et al.: *DNA Cloning Techniques A Practical Approach*, edited by D. Glover, IRL press, Oxford, 1984.
- [17] Enquist, L. and Sternberg, N.: *Methods in Enzymology*, Vol 68, 281—298, 1979.
- [18] Jung, H.C. et al.: *Somatic Embryo Genetics* Edited by Terzi, M., Pitto, L., Sung, Z.R., 1985.
- [19] Young, R.A. and Davis, R.W.: *Science*, 222:778, 1983.

MOLECULAR CLONING AND SELECTION OF cDNAs COMPLEMENTARY TO POLYA⁺ mRNA DIFFERENTIALLY EXPRESSED DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CARROT

Liu Liangshi

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

Borkird, C. Sung, Z.R.

(Department of Genetics, University of California, Berkeley, U.S.A.)

Poly A⁺ mRNA was isolated from 13 day old embryonic cultures of a diploid carrot cell line of wild carrot Queen Anne lace, Woolc. Double strand DNAs were prepared according to the procedure by Leonard. The ds cDNA were methylated, flush ended and ligated with EcoRI linkers. The ds cDNA with linkers were then ligated with the λ gt11 DNA and the recombinant DNA was packaged. The unamplified library contain 1.5×10^8 pfu. The tissue specific cDNA clones were screened by an enriched population of polyclonal antibodies which react preferentially with antigens in the embryo tissues.

Key words

Somatic embryogenesis; cDNA cloning

图 版 说 明

1. 三个不同的PolyA⁺ RNA样品合成的 cDNA, (1) (3) 是来自胚胎发生培养物, (2) 为愈伤培养物, (4) 是 λ DNA 经 Hind III 完全消化的分子量标准, cDNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。2. 带有接头的 ds cDNA 在 Biogel A 50 柱上的分部, 从左到右为第 6—12 分部, 最右边那管为 λ DNA 用 Hind III 消化的分子量标准。3. 表示 6 个不同克隆的插入片段的分子量。4. 上边滤片表示一个初筛正斑噬菌体贮备液经过稀释铺碟进行复筛, 出现很高的与抗体反应的正斑率。下边滤片是初筛负斑, 在复筛中不表现与抗体反应。5. 表示胡萝卜胚胎发生培养物 (E) 和愈伤培养物 (C) PolyA⁺ RNA 的 Northern 杂交, 探针用克隆 66 DNA。

1. PolyA mRNA was isolated from callus and embryonic cultures of carrot cell line of Woolc. ³²P-labelled ds cDNA were electrophoresised through gel. Radioautography shows that the molecular weight of most ds cDNA range from 0.5—1.5 kb. λ DNA digest with Hind III as standard was at the right. 2. The ds cDNA with linkers were restricted with EcoRI, and the excess linker was removed by biogel A 50 column (2 mm \times 40 cm) chromatography. Radioautography shows those fraction from 6—10. 3. Different clones containing the cDNA inserts were electrophoresised through 1% agarose gel. 4. Rescreening plaques which gave positive reaction. The picture shows a typical filter from a positive isolate. Contaminating negative phage gave nearly undetectable background reactions (down) while the positive plaques turned a dark, purplishblue (top). 5. Clone 66 hybridized with mRNA in the embryo and callus. The extent of hybridization was stronger in the embryo than that in callus.