

非洲绿猴肾细胞株 AGMr (Hind III)-1 高度重复顺序的克隆及初步应用

陈宇光

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

R373.9
R392-33

A 摘要 从非洲绿猴肾细胞株分离高度重复顺序 AGMr (Hind III)-1 基因, 以 pUC18 质粒为载体构建重组质粒 pUC18/AGMr (Hind III)-1, 转化 *E. coli* JM83。酶切分析、Southern Blot 分析和序列分析均证明克隆成功, 但所用的第 165 代 Vero 细胞株与另一非洲绿猴肾 BSC-1 细胞株的序列相比较, 172 个碱基中有 6 个位点突变。用该重组质粒作探针, 对 Vero 细胞培养的狂犬疫苗作 Southern Blot 分析表明, 未经纯化的半成品中残余细胞 DNA 长度约 400~5000 bp。斑点杂交分析表明, 杂交特异性良好, 残余细胞 DNA 最小检出量约 4 pg。提示 AGMr (Hind III)-1 高度重复顺序可特异地应用于 Vero 细胞残余 DNA 检测。

关键词 Vero 细胞, 狂犬病毒, 重复 DNA, DNA 序列, 残余 DNA

非洲绿猴肾细胞株 (Vero) 已用于多种疫苗的生产。用传代细胞株生产生物制品的主要考虑之一是其安全性, 表现为具潜在致瘤性的残余细胞 DNA (RC DNA)^[1]。无论从制品中检测 DNA 的残存量还是检查 RC DNA 的结构, 都需采用较敏感的核酸杂交技术。作为探针的 DNA 片段, 应在细胞基因组中有足够多的拷贝数, 以提高检测灵敏度^[2]。Vero 细胞基因组中有一类高度重复顺序 AGMr (Hind III)-1, 重复 6.8×10^6 次。占基因组 19.3%^[3]。这样多的拷贝数适于制作探针, 增加检测灵敏度, 为此我们分离 AGMr (Hind III)-1 基因, 以 pUC18 为载体构建重组质粒 pUC18/AGMr (Hind III)-1, 以该重组质粒作探针, 用 Southern Blot 和斑点杂交方法分析 Vero 细胞制备的狂犬病毒疫苗的 RC DNA。

材料与amp;方法

1 材料

Vero 细胞 (第 165 代) 及其经微载体培养试制狂犬疫苗样品由本所 Vero 疫苗组提供。Hind III 内切酶、Cloning Kit、Sequencing Kit 和 DNA Labeling and Detection Kit 为 Boehringer 公司产品, α -³²P dATP、 α -³⁵S dATP 为 Amersham 公司产品, DNA 低分子量标准品购自华美公司。

2 方法

2.1 经转瓶传代培养的 Vero 细胞用胰酶消化制备细胞悬液。基因组大分子 DNA 提取基本按文献^[4,5]。

2.2 基因组 DNA 经 Hind III 酶消化, 5% PAGE 分离后, 切下相应条带并用 Bio-Rad 公司电洗脱装置分离重复顺序。

2.3 AGMr (Hind III)-1 的分子克隆按说明书; 质粒提取及纯化按文献^[4,6]。

2.4 质粒分析用5% PAGE电泳, RC DNA结构分析用0.8%琼脂糖电泳。Southern Blot转移按文献^[7]。

2.5 探针标记基本按说明书,但AGMr(HindⅢ)-1探针用6 mer随机引物;经内切酶 Sca I消化后的重组质粒探针用17 mer正通用引物。同位素标记物为 α -³²P dATP和 α -³⁵S dATP,非同位素标记物是 Dig-11-dUTP。杂交及检测基本照说明书。

2.6 序列测定按说明书采用双链测序法。

2.7 样品中RC DNA含量的斑点杂交

2.7.1 标准品与样品的制备及处理 Vero基因组总DNA经超声剪切和紫外定量后制作标准品。一组标准品(Std I)用TE缓冲液系列稀释,使每150 μ L溶液中各含500、100、20、4、0 ng的总DNA及1 ng鱼精DNA;另一组标准品(Std II)按上法制备,但各浓度管每150 μ L溶液中另添加一支剂量(2.5 IU)T6D8批狂犬疫苗半成品(该半成品经2 ng/mL DNase I 37 $^{\circ}$ C消化2 h)。标准品与样品管各加1/2体积20 \times SSC(3.0 mol/L氯化钠-0.3 mol/L柠檬酸钠),100 $^{\circ}$ C 10 min,冰浴后缓慢抽滤点样于硝酸纤维滤膜。80 $^{\circ}$ C固定2 h。点样量:标准品225 μ L/dot,地高辛标记探针及杂交和检测基本照说明书。

2.7.2 结果判定 肉眼比较样品与标准品色斑颜色深浅,限量法表示结果。

结 果

1 AGMr (HindⅢ)-1 基因分离

Vero细胞大分子总DNA经核酸内切酶HindⅢ消化后电泳表现为高分子量的异质群体以及一系列呈梯形状的电泳条带(图1A, 2),具典型的高度重复DNA电泳特征。可见的四条区带[AGMr (HindⅢ)-1, -2, -3, 和-4]分别位于172、344、516、688 bp处,呈整倍数关系。切下

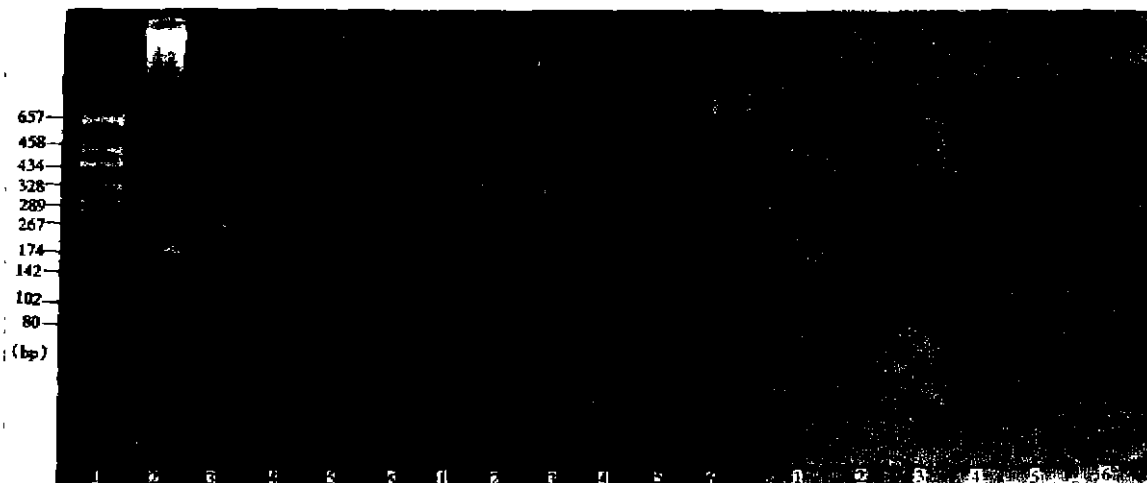


图1 AGMr (HindⅢ)-1的分离和纯化

Fig. 1 Separation and purification of AGMr (HindⅢ)-1

A. EB stain of 5% PAGE. B. Southern Blot analysis of A, with ³⁵S-labeled AGMr (HindⅢ)-1 as probe.

C. Southern Blot analysis of A, with Digoxigenin-labeled AGMr (HindⅢ)-1 as probe.

1. SMW DNA marker. 2. HindⅢ-generated fragment of Vero genome DNA 3. AGMr (HindⅢ)-1;

4. AGMr (HindⅢ)-2. 5. AGMr (HindⅢ)-3 6. AGMr (HindⅢ)-4.

各区带并经电洗脱装置纯化,分别获得纯化的 AGMr (Hind III)-1, -2, -3, 和-4 片段(图 1A, 3~6)。以 AGMr (Hind III)-1 片段作探针,经 Southern Blot 分析(图 1, B 和 C)表明,AGMr (Hind III)-2, -3, -4 都是单体 AGMr (Hind III)-1 的同源系列,分别是单体的二倍体、三倍体和四倍体,与非洲绿猴肾另一细胞株 BSC-1 获得的结果一致^[3]。高分子量异质群体区域(图 1, 2)和分子量标准(图 1, 1)则为杂交阴性,证明杂交特异性良好。

2 AGMr (Hind III)-1 的分子克隆

pUC18 质粒经 Hind III 酶切作载体,与 AGMr (Hind III)-1 连接并转化 *E. coli* JM83 细胞,转化效率 3×10^5 。从转化细胞中提取质粒后进行质粒分析。图 2, A 显示,重组质粒经 Hind III 酶切产生 172 bp 区带,EcoRI 酶切和未经酶切的重组质粒未见该区带,证明 pUC18 中已插入 172 bp 的 DNA 序列。经 Southern 转移后与 AGMr (Hind III)-1 探针杂交(图 2, B 和 C),进一步证明,插入 pUC18 质粒的 DNA 序列与 AGMr (Hind III)-1 同源。重组质粒暂名为 pUC18/AGMr (Hind III)-1。

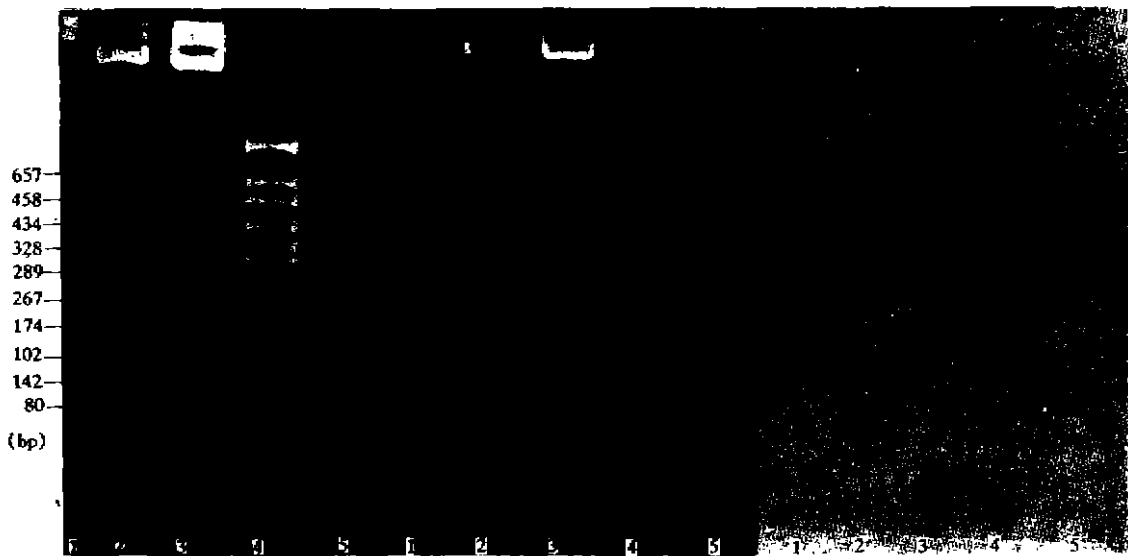


图2 重组质粒 pUC18/AGMr (Hind III)-1 的分析

Fig.2 Analysis of recombinant plasmid pUC18/AGMr (Hind III)-1

A. EB stain of 5% PAGE. B. Southern Blot analysis of A, with ³⁵S-labeled AGMr (Hind III)-1 as probe.

C. Southern Blot analysis of A, with Digoxigenin-labeled AGMr (Hind III)-1 as probe.

1. undigested. 2. digested with EcoRI. 3. digested with Hind III. 4. SMW DNA marker. 5. AGMr (Hind III)-1.

以正、反两种通用引物对重组质粒作双链序列分析,进行相互印证。插入顺序的全序列测定结果(图 3)证明,克隆的 DNA 片段确为非洲绿猴肾细胞的 AGMr (Hind III)-1,但 Vero 细胞株与另一非洲绿猴肾 BSC-1 细胞株的 AGMr (Hind III)-1 序列^[5]相比较,有 6 个位点碱基不同。前者第 34、39、65、120、121、126 位分别是 C、G、G、T、T、T,后者相应为 T、C、A、C、A、G,可能是 Vero 细胞经多次传代(165 代)后这 6 个位点发生突变,有何意义尚待进一步研究。

```

                    50
-AGCTTTCTGA GAAACTGCTC TGTGTTCTGT TAACTCATGT CACAGAGTTA
  -AAGACT CTTGACGAG ACACAAGACA ATTGAGTACA GTGTCTCAAT

                    100
CATCTTTCCC TTCAGGAAGC CTTTCGCTAA GGCTGTTCTT GTGGAATTGG
GTAGAAAGGG AAGTCCTTCG GAAAGCGATT CCGACAAGAA CACCTTAACC

                    150
CAAAGGGATA TTTGGAAGCT CTTAGATGGC TATGGTGAAA AAGGAAATAT
GTTTCCCTAT AAACCTTCGA GAATCTACCG ATACCACTTT TTCCTTTATA

                    172
CTTCCGTTCA AAACTGGAAA GA
GAAGGCAAGT TTTGACCTTT CTTCGA-
    
```

图3 AGMr (HindIII)-1的核苷酸全序列

Fig.3 The complete nucleotide sequence of AGMr (HindIII)-1 in the 165 generation of Vero cell

3 RC DNA 的结构和含量测定

以重组质粒为探针 DNA, 对 Vero 细胞培养的狂犬疫苗半成品(未经去除 DNA 处理)进行 Southern 分析。结果(图 4)表明, 制品中 RC DNA 长度为 400 bp~5000 bp, 优势区带在 2 kb

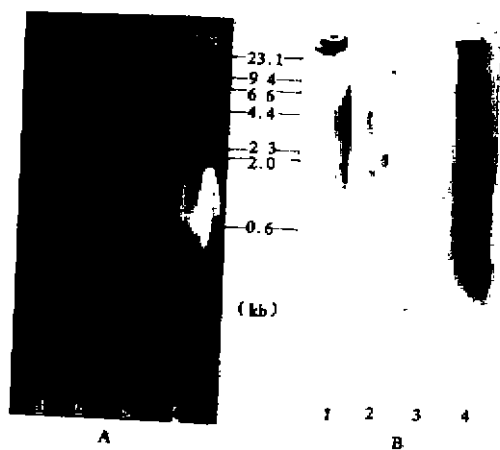


图4 残余 DNA 的 Southern Blot 分析

Fig.4 Southern Blot analysis of residual cell DNA

After 0.8% agarose electrophoresis, DNA was transferred to nitrocellulose filters. Hybridization was done with ³⁵S - labelled pUC18/AGMr (Hind III)-1 (A) and with Digoxigenin - labelled pUC18/AGMr (Hind III)-1 (B) probes, respectively.

1. 4 doses (10 IU) of Rabies vaccine. 2. 1 dose (2.5 IU) of Rabies vaccine. 3. λ DNA - Hind III marker. 4. Vero genome DNA cleaved by Hind III

以上,这意味着可能存在完整基因。由此提示,有必要建立适当的纯化方法以清除 RC DNA。

图 5 显示狂犬疫苗半成品中 RC DNA 含量的检测。std I 为单纯的 DNA 含量标准,仅含 Vero DNA。考虑到样品中大量的蛋白质对 DNA 含量检测可能的干扰^[4],设置了 std II。该含量标准品中除含定量 DNA 外,另添加一支剂量(2.5 IU)的疫苗半成品,以使标准品与待测样品除 DNA 外其余组分背景基本一致。图中可见 std II 标准品中空白和阴性均未显色,各阳性标准品色斑比 std I 略浅,可能是点样时蛋白质与 DNA 竞争膜上结合位点的缘故。由此提示以 std II 作为 DNA 含量标准品,利用 AGMr(Hind III)-1 作探针杂交检测的结果可能更能反映样品中残余 DNA 的真实含量,也可达到较高的灵敏度(4 pg)。以此检测经两种方法纯化的两批半成品,表明经纯化的半成品其 RC DNA 均 < 20 pg/mL,两种纯化方法对去除样品中 RC DNA 都是有效的。除菌滤膜也有助于去除 DNA。

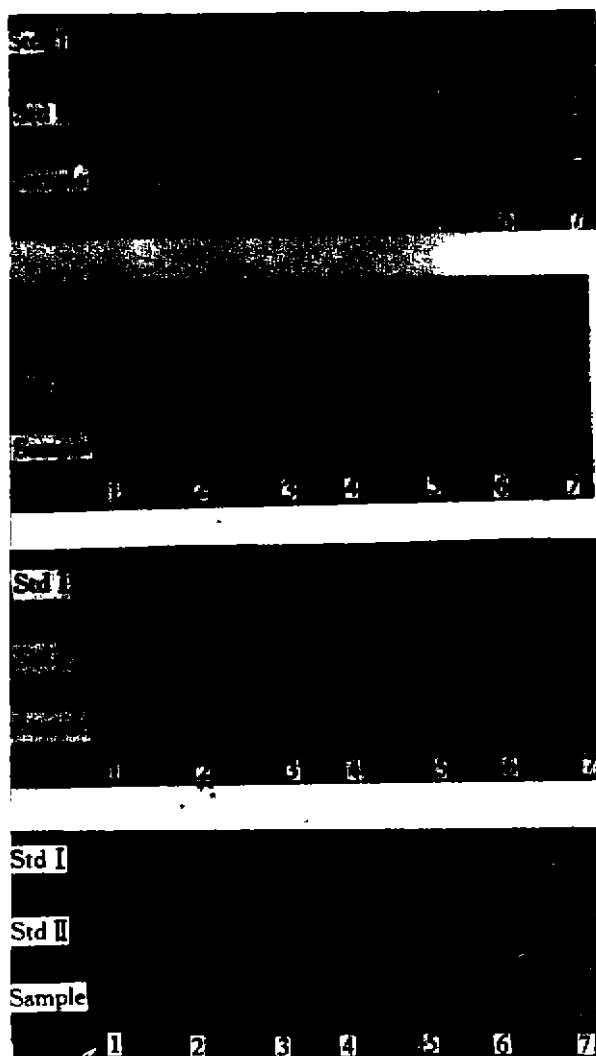


图 5 残余 DNA 的含量测定

Fig. 5 Determination of RC DNA amount

Hybridization and detection were done according to Kit instructions. The concentration of Digoxigenin-labeled probe was about 50 ng/mL.

Std I: standard of RC DNA amount. Dot 1~6 corresponded to 500, 100, 20, 4 and 0 pg Vero genome DNA, and dot 7 corresponded 1000 pg herring sperm DNA.

Std II: standard of RC DNA amount. Dot 1~7 were the same as that of Std I, but each dot was spiked with one dose of rabies vaccine semifinal product (T6D8, 2.5 IU), which had been digested by 2 ng/mL DNase I for 2 h at 37 °C.

Sample: 1. lot T7-6, both purified (by DEAE) and sterilized.

2. lot T7-6, purified (by DEAE) but unsterilized.

3. lot T7-6, neither purified nor sterilized.

4. lot T7-18, purified (by DEAE) but unsterilized

5. lot T7-18, neither purified nor sterilized.

6. lot T7-18, both purified (by DEAE) and sterilized.

7. lot T7-18, purified (by Hydroxylapatite) but unsterilized.

讨 论

Vero 细胞已越来越多地用于多种生物制品的生产,从制品中检测残余细胞 DNA 将是一项重要的常规工作。鉴于 AGMr (Hind III)-1 基因占 Vero 基因组 19.3%,重复 6.8×10^6 次^[3]。重组克隆 pUC18/AGMr (Hind III)-1 将是较理想的探针 DNA,可望获得较高的检测灵敏度。有报道 AGMr (Hind III)-1 是非洲绿猴该属特异的高度重复顺序^[5],因此,用该片段作探针,不仅具有高度杂交特异性,而且有可能在多种传代细胞存在交叉污染的场合进行 Vero 细胞的鉴别试验。本工作用同位素和地高辛两种方法标记探针,结果表明,二者在杂交特异性方面都无显著差异,为今后常规检测工作所需采用的非同位素方法建立了工作基础。

致谢 本文承蒙李育阳教授、刘祖洞教授、向建之教授和丁锡申教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Report of a WHO Study Group, WHO Technical Report Series, 1987, 747:7-25
- 2 Doehmer J. Residual cellular DNA as a potential transforming factor. *Develop Biol Standard*, 1987, 68:33-41
- 3 Singer D S. Arrangement of a highly repeated DNA sequence in the genome and chromatin of the African green monkey. *J Biol Chem*, 1979, 254(12):5506-5514
- 4 陈宇光. 人 γ 型基因工程干扰素中残余 DNA 的检测. *生物化学与生物物理进展*, 1995, 22(4):355-357
- 5 Rosenberg H, Singer M, Rosenberg M. Highly reiterated sequences of simian. *Science*, 1978, 200:394
- 6 Li-He Guo, Ray Wu. Exonuclease III: Use for DNA sequence analysis and in specific deletions of nucleotides. *Methods in Enzymology*, 1983, 100:76-77
- 7 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J *et al*. *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 382-389

Molecular Cloning of Highly Reiterated Sequence AGMr (Hind III)-1 in Vero Cell Line of African Green Monkey and Its Preliminary Application

Chen Yuguang

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052)

Highly reiterated sequence AGMr (Hind III)-1 was isolated from genome of Vero cell line derived from African green monkey and cloned into plasmid pUC18. Sequence analysis confirmed that the insert sequence is right but 6 out of 172 bp had mutated in the 165th generation of Vero cell. Southern Blot and Dot Blot analysis of rabies vaccine prepared by Vero cell showed that residual cell DNA (RC DNA) displayed heterogeneous size from 400 ~ 5000 bp, and that the amount of RC DNA can be determined specifically and sensitively (minimum 4 μ g). The fact that AGMr (Hind III)-1 sequence represents about 20% of the genome DNA and repeats 6.8×10^6 times and is rare in Primates except in members of the same genus also suggested that the recombinant plasmid could be applied as probe for detecting RC DNA existed in vaccine prepared by Vero cell and maybe used for identifying test of Vero cell.

Key words Vero cell, Rabies vaccine, Highly reiterated sequence, DNA sequencing, Residual cell DNA