

热稳定性等,适于作洗涤剂的填充料。由于洗涤剂的发展趋势是增白洗涤剂,它有氧化性。纯酶对氧化剂 H_2O_2 的抗氧化能力研究发现,在 $1\text{mol/L } H_2O_2$ 中迅速失活,因此必需对蛋白酶进行改造使之具有抗氧化能力才能用于增白洗涤剂。有关酶的改造和改造后酶的抗氧化能力,另有论文报道。

参 考 文 献

1 Stahl D A *et al.* *J Bacteriol.* 1984; 158:411

- 2 Estell D A *et al.* *J Biol Chem.* 1985; 260: 6518
- 3 Delmar E Cr *et al.* *Anal Biochem.* 1979; 99: 316
- 4 中山大学生物系编. 生化技术导论. 北京: 高等教育出版社, 1978; 52
- 5 Bradford M M. *Anal Biochem.* 1976; 72: 243
- 6 Haglund H. *Methods of Biochemistry Analysis.* 1971; 19:1
- 7 Weber K *et al.* *J Biol Chem.* 1969; 244: 4406

PHA 诱导的 c-myc 基因表达与人淋巴细胞增殖

姚家慧 陈鸿书

(第三军医大学分子生物学实验室, 重庆 630038)

关键词 c-myc, 细胞增殖, 植物血球凝集素, 蛋白激酶 C, Ca^{2+}

细胞癌基因(c-onc)与细胞增殖的调节是当前分子生物学研究的中心课题之一,早在1985年 Macara 就提出癌基因调节细胞增殖的模型,认为 c-myc 是在细胞增殖早期参与作用的“获能基因”^[1]。该模型为进一步研究癌基因与细胞增殖的关系提供了有意义的线索,唯其细节尚待进一步阐明和证实,至今 c-myc 与细胞增殖的关系仍是研究的热点。本文以正常人外周血淋巴细胞(PBL)为材料,在离体培养的条件下,通过核酸分子杂交及同位素掺入等技术,研究 c-myc 表达与细胞增殖的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料

含 1.8kb c-myc cDNA 与 pBR322 重组质粒的大肠杆菌菌株(HB101),上海肿瘤研究所提供;碱性磷酸酶标记的抗生物素蛋白(AAP),Sigma; Bio-11-dUTP,北京医科大学药厂;植物血球凝集素(PHA),广州市医药工业研究所;乙酸肉豆蔻酸佛波酯(PMA),Sigma; 乙二醇-双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA),华美生物工程公司;环己酰亚胺(CHM),Fluka; [甲基- 3H] 胸腺嘧啶核苷(TdR),中科院上海原子核研究所; [5- 3H] 尿苷(UR),中科院原子能研究所。

1.2 细胞培养

新鲜人 PBL 的制备按文献[2]方法进行。分离的 PBL 以 1×10^6 个/ml 密度悬浮于 RPMI 1640 培养基中,置 37°C 培养;培养基含 10% 小牛血清及浓度均

为 100U/ml 的青霉素和链霉素,以及各种组合的调节细胞增殖的试剂,包括 PHA, PMA, EGTA 及 CHM。

1.3 [3H]-UR 及 [3H]-TdR 掺入实验

3×10^6 细胞培养 36h 后加入 [3H]-UR, 终强度为 $1\mu\text{Ci/ml}$, 继续培养 18h 后终止。而对 [3H]-TdR 掺入,则在培养 56h 后加入 [3H]-TdR, 终强度为 $1\mu\text{Ci/ml}$, 继续培养 6h 后终止。把细胞收集在 49 型玻璃纤维滤纸上,依次用蒸馏水、5% 三氯醋酸、无水乙醇洗涤,烘干,测其放射性。

1.4 RNA 斑点杂交分析

1.4.1 生物素标记的 c-myc cDNA 探针的制备用强碱法提取 c-myc cDNA 重组质粒,用 Bio-11-dUTP 标记重组质粒,标记方法采用二步缺口翻译法^[3]。

1.4.2 RNA 的提取

细胞培养 6h 后终止,立即提取总 RNA,因为 PHA 和 PMA 培养 6h 时 PBL 中 c-myc mRNA 表达达到高峰^[4]。RNA 的提取按照文献[5]方法进行。

1.4.3 RNA 的斑点杂交

制得的 RNA 用甲醛变性后稀释到所需浓度,点加到 $6 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}: 0.15\text{mol/L NaCl}, 0.015\text{mol/L}$ 柠檬酸钠, pH7.0) 浸泡的硝酸纤维素滤膜(NC膜)上, 80°C 真空烘膜 2h。制好的膜放入预杂交液 50°C

甲酰胺, $5 \times \text{SSPE}$, $5 \times \text{Denhardt's}$ 溶液 (不含 BSA), $0.1\% \text{SDS}$] ($1 \times \text{SSPE}$: 0.18 mol/L NaCl , $0.01 \text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH } 7.4$, 0.001 mol/L EDTA $\text{pH } 7.4$), 42°C 保温 4h, 然后转入杂交液 (预杂交液中加入探针, 探针终浓度为 150 ng/ml) 中, 保温 4—20h, 杂交液使用前在 70°C 保温 30min 使探针变性。杂交结束将膜立即漂洗, 并用 AAP 显色, 以上步骤综合了文献 [6], [7], 并略有修改。

各显色斑点用光密度计扫描, 得斑点显色相对强度, 即 *c-myc* mRNA 相对表达水平。

2 结果与讨论

2.1 PHA、PMA 刺激 PBL [^3H]-TdR 掺入最适剂量

丝裂原都有其最适作用剂量, 超过最适剂量反而抑制 DNA 合成^[8]。为测定 PHA 和 PMA 培养 PBL 时所需的最适作用剂量, 本文做了 PHA 和 PMA 促进 PBL [^3H]-TdR 掺入剂量反应曲线 (未给出)。从剂量反应曲线可看出, PHA 和 PMA 刺激 PBL 增殖的最适剂量分别为 $250 \mu\text{g/ml}$ 和 12.5 ng/ml 。PMA 是一种辅丝裂原, 单独不能刺激 PBL 合成 DNA^[9], 因此先用最适量 PHA 培养 24h 后再用系列浓度 PMA 培养, 以确定最适作用剂量。

因此, 本文其余的细胞培养实验中, 丝裂原作用浓度均采用这个最适剂量, 即 PHA $250 \mu\text{g/ml}$, PMA 12.5 ng/ml 。

2.2 *c-myc* 基因表达的调节

如图 1, 表 1 所示, 正常静止的 (G₀ 期) PBL 内只有极低水平的包括 *c-myc* mRNA 在内的 RNA 合成, PHA 刺激后 *c-myc* mRNA 的合成即迅速而明显地增加, 说明 *c-myc* 基因的表达是可诱导的, 并且在转录水平进行调节。蛋白质生物合成抑制剂 CHM (使用浓度参考文献 [4], 即 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 对 PHA 诱

表 1 各种试剂对 PBL *c-myc* mRNA 表达水平的影响

试 剂	对照	PHA	PMA	PHA + PMA	PHA + CHM	PHA + EGTA
<i>c-myc</i> mRNA	3	66	27	100	79	3

以新鲜分离的 PBL 作为对照; 将样品中 *c-myc* mRNA 的最大值 (PHA + PMA) 作为 100, 其余样品的数据为与之相比较得到的相对值。表中数据是样品总 RNA 含量不同的三个斑点各自相对应数值的平均值。

导的 *c-myc* mRNA 合成略有促进作用 (表 1), 即超诱导, 说明 *c-myc* mRNA 的诱导表达不依赖蛋白质合成, 是由某些生化反应直接调节的, 是细胞周期中的早期事件。这种超诱导的机制可能是因为细胞内存在某种不稳定的抑制 *c-myc* 基因表达的蛋白质。因此 CHM 作用后, 总 RNA 的合成虽受抑制, 但 *c-myc* mRNA 的合成反而增加 (图 1, 表 1)。

2.3 *c-myc* 基因表达与细胞增殖的关系

如图 1, 表 1 所示, 新鲜分离的 PBL 表达极少量的 *c-myc* mRNA, 在无丝裂原条件下培养后只有少量 RNA 合成, 无 DNA 合成; 然而 PHA 或联合 PMA 诱导 PBL DNA 合成时, 早期总先有大量 *c-myc* mRNA 及 RNA 合成, 提示 *c-myc* 表达是 DNA 合成的必要条件。但是, PMA 单独虽能诱导 *c-myc* mRNA 及 RNA 合成, 却无 DNA 合成, 提示 *c-myc* mRNA 表达不是细胞增殖的充分条件, 也可能 *c-myc* 产物触发细胞增殖有一定剂量要求, 因为 PMA 诱导的 *c-myc* mRNA 及 RNA 水平比 PHA 诱导的低得多。总之, *c-myc* 表达可能使细胞获得进入 S 期的潜能。

2.4 PHA 诱导淋巴细胞增殖的信息传导

PHA, PMA 可诱导 PBL *c-myc* mRNA 表达, 且 PMA 可加强 PHA 诱导 *c-myc* mRNA 表达的作用 (表 1), 而 PMA 是蛋白激酶 C (PKC) 的特异激活剂, 提示 PKC 激活对 *c-myc* 表达及 PBL 生长的调控起着重要作用。PHA 诱导的 *c-myc* mRNA 表达水平高于 PMA 诱导的, 而且 PMA 单独不能诱导 DNA 合成 (图 1, 表 1), 提示 PHA 诱导 *c-myc* 表达和 PBL 增殖过程中除了 PKC 激活外还有别的因素参与作用。另一方面, Ca^{2+} 螯合剂 EGTA (使用浓度参考文献 [9], 即 1.2 mmol/L) 除去培养基中 Ca^{2+} 后 PHA 则不能诱导 *c-myc* mRNA 表达、RNA 及 DNA 合成 (图 1, 表 1), 提示 PHA 诱导 *c-myc* 表达及 PBL 增殖还需要 Ca^{2+} 参与。可见 Ca^{2+} 与 PKC 协同作用诱导 *c-myc* mRNA 表达并促进 PBL 增殖。这个推论与许多作者的一致^[10]。据上述推论并结合他人的研究结果^[11], 初步认为, PHA 诱导淋巴细胞增殖的信息传导途径可能是: PHA 作用于膜上受体后, 受体再激活

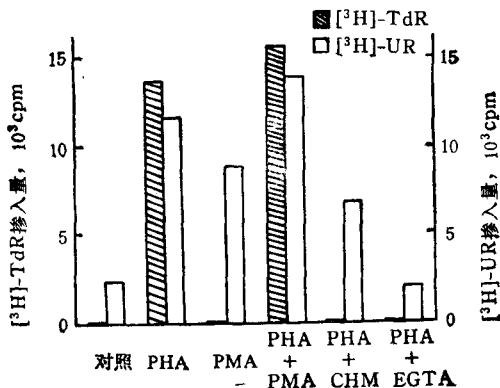


图 1 各种试剂对 PBL [^3H]-TdR 及 [^3H]-UR 掺入水平的影响

[^3H]-TdR 及 [^3H]-UR 掺入量 计数测定均系用 10^6 细胞

磷脂酶 C 而促进 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇分解产生甘油二酯 (DG) 和三磷酸肌醇 (IP₃)；由它们作为第二信使分别使 PKC 激活和胞内 Ca²⁺ 浓度升高；PKC 与 Ca²⁺ 协同作用激活 c-myc 等“获能基因”，使细胞获得进入 S 期的潜能；再通过诱导与细胞周期调节有关的蛋白质表达及一系列尚不清楚的机制使细胞进入 S 期。

参 考 文 献

- 1 Macara I G. *Am J Physiol*, 1985; 248:C3
- 2 赵桐茂主编. HLA 分型原理和应用. 上海: 科学技术出版社, 1984; 259
- 3 Koch J, Kølvrå S, Bolund L. *Nucl Acid Res*, 1986; 14: 7132

- 4 Krönke M, Leonard W J, Depper J M *et al.* *J Exp Med*, 1985; 161: 1593
- 5 Chromczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987; 162:156
- 6 Chan V T W, Fleming K A, McGee J O D. *Nucl Acid Res*, 1985; 13:8083
- 7 Gregersen N, Koch J, Kølvrå S *et al.* *Clin Chim Acta*, 1987; 169:267
- 8 Metcalfe J C, Hesketh T R, Smith G A *et al.* *J Cell Sci Suppl*, 1985; 3:199
- 9 Neckers L M, Bauer S, McGlennen R C *et al.* *Mol Cell Biol*, 1986; 6: 4244
- 10 Grausz J D, Fradelizi, D, Dautry F *et al.* *Eur J Immunol*, 1986; 16: 1217
- 11 Klaus G G B. *Immunol Today*, 1988; 9:157

单克隆抗体酶联免疫吸附测定数据的微机分析

邹岳奇

(河北省科学院生物研究所, 石家庄 050051)

邹翔

(河北工学院机械二系, 天津 300132)

关键词 单克隆抗体, 酶联免疫吸附测定法, 数据分析, 计算机软件

单克隆抗体酶联免疫吸附测定法 (McAb-ELISA) 是一种具有高特异性、准确性和敏感性的酶免疫测定技术。随着单克隆抗体技术的发展, 针对各种抗原, 尤其是酶和激素等蛋白抗原的微量 McAb-ELISA 相继建立并获得越来越广泛的应用。但是, 人工处理 McAb-ELISA 测定数据比较费时费力, 还可能掺杂主观因素。所以欧美发达国家在生物研究中已普遍引入计算机技术^[1-3]。近年来, 国内生物学工作者也陆续采用微机来分析实验数据^[4-6]。

本文报道用高级 BASIC 语言开发的微机程序, 该程序可快速准确地把 McAb-ELISA 测得的数据转换成抗原物质的实际浓度。它不仅适用于我们建立的检测促卵泡激素 (FSH) 的 McAb-ELISA, 对其它生物物质的 McAb-ELISA 检测也具有一定的通用性, 对大量样品的检测尤为适用。

1 McAb-ELISA 测定

测定参照文献 [7,8] 进行。图 1 显示 McAb-ELISA 检测 FSH 的主要步骤。

我们以中国科学院动物研究所激素组提供的牛 FSH 为标准品, 自制的两个抗牛 FSH 单克隆抗体分别作为包被抗体 (McAb A) 和辣根过氧化物酶标记

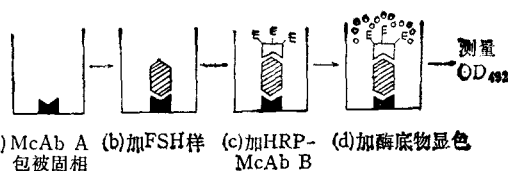


图 1 McAb-ELISA 检测 FSH 流程图

表 1 McAb-ELISA 对 FSH 的测定

FSH ng/ml	0	1	2	5	7.5	10	15	20
A_{492}	0.139	0.179	0.221	0.299	0.422	0.497	0.663	0.815
FSH ng/ml	30	40	50	60	70	80	90	100
A_{492}	1.063	1.280	1.435	1.550	1.647	1.718	1.763	1.800

抗体 (HRP-McAb B), 以邻苯二胺为显色底物, 在 492nm 波长上读出光密度 (A_{492}) 值。经预试验后, 在 FSH 0—100ng/ml 范围内设 16 种浓度。检测进行 3