

转移酶活性而使扩增产物 3' 端带有腺苷酸残基 (A) 这一特点进行克隆^[4~6], 不但快速, 效率高, 而且由于在 T 载体的 EcoR V 位点下游具有 M₁₃ 序列, 因而也便于对插入片段进行序列分析. 图 3 是利用双脱氧链末端终止法和 M₁₃ 通用引物测定的重组 DNA 中 E 基因片段 5' 端碱基序列的部分凝胶电泳图谱. 可以看出 E 基因片段 5' 端的起始密码子 ATG. 图 4 为扩增的 E 基因片段 5' 端 120 个核苷酸序列, 与我们以前发表的 E 基因序列结果是一致的^[7].

101 ATG GCA AAA AAC AAA CCA ACA TTG GAT TTT
131 GAA CTG ATA AAA ACA GAAGCC AAA CAA CCT
161 GCC ACT CTA AGG AAG TAC TGT ATA GAG GCA
191 AAG CTG ACC AAC ACA ACA ACA GAA TCT CGT

图 4 D₂-43 病毒株 E 基因 PCR 扩增片段的 5' 端序列分析

上述结果证实, 我们扩增的片段确为 E 基因. 这为进一步对 E 基因进行表达研究和亚单位疫苗的研制奠定了基础. 目前我们正对该基因进行高效表达的研究.

参 考 文 献

- 1 Henchal E A, Putank J R. Clin Microbiol Rev, 1990; 3: 376
- 2 于 曼, 秦鄂德, 杨佩英等. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995; 9 (2): 5
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 34~35
- 4 Clark J M. Nucl Acids Res, 1988; 16: 9677
- 5 Moles S E, Iggo R D, Lane D P. Nucl Acids Res, 1989; 17: 3319
- 6 Marchuk D, Drumm M, Saulino A *et al.* Nucl Acids Res, 1990; 19 (5): 1154
- 7 司炳银, 杨佩英, 黄祥瑞等. 军事医学科学院院刊, 1992; 16 (4): 274

A Cloning and Partial Nucleotide Sequencing of the Amplified E gene Fragment of Dengue-2 Virus. Yu Man, Qin Ede, Yang Peiying, Sun Lei, Xu Pinfang, Si Bingyin, Yan Guozhen (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The E gene fragment was amplified from RNA isolated the Chinese dengue-2 virus by RT-PCR method. It was 1.29 kb in length. This unmodified E fragment was directly inserted into the EcoRV-cut T-tailed pBluescript II KS⁺ vector DNA. The positive recombinant colonies were identified by the PCR and the restriction endonuclease digesting method. Then nucleotide sequence analysis of the inserted E gene fragment was conducted directly by using the common M₁₃ primer. The result of the restriction endonuclease and sequence analysis confirmed that the 120 bp of 5'-terminal nucleotides sequence of the amplified E gene fragment was the same sequence as reported.

Key words dengue-2 virus, E gene cloning, T-vector, nucleotide sequence analysis

人心肌肌钙蛋白 T 的纯化和单克隆抗体的制备

李志梁 傅朝平 陆 青 黎梅兰 钱学贤 王素华

(第一军医大学附属珠江医院, 广州 510280)

摘要 从人左室心肌中成功纯化心肌肌钙蛋白 T (cTnT). 经匀浆, 70℃ 加热处理, 咪唑盐酸透析,

DEAE-纤维素层析, 100 g 心肌获取 cTnT 5 mg, 纯度为 97.6%。同时采用脾内免疫法, 免疫 Balb/C 小鼠, 经细胞融合, 筛选, 克隆化得 5 株稳定分泌抗人 cTnT 单克隆抗体 (McAb) 的杂交瘤细胞 (G_3 , G_8 , G_{10} , A_5 , A_7), 4 株为 IgM, 1 株为 IgG, 染色体数目 92~110 条。腹水效价为 3.2×10^{-6} ~ 1.6×10^{-7} 。

关键词 心肌钙蛋白 T, 纯化, 单克隆抗体

心肌钙蛋白 T (cTnT) 是心肌钙蛋白的三种亚单位之一, 参与心肌的兴奋-收缩耦联。近年来临床心血管研究表明测定人血清中 cTnT 水平能高度特异、敏感地反映心肌损伤和坏死的程度, 已应用于急性心肌梗塞, 不稳定型心绞痛, 心肌微小损伤的早期诊断^[1~3], 且作为评估心脏围手术期的心肌功能指标^[4]。本实验进行了人 cTnT 的提取, 纯化, 鉴定及其单克隆抗体 (McAb) 的制备, 为其在今后的临床应用奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 心脏来源

人意外死亡者新鲜心脏 (无心脏疾病, 死亡时间 < 3 h), 由第一军医大学解剖教研室提供。

1.2 主要仪器

ZK-401 高速低温离心机: 德国 BHG 公司; FH8802-2 紫外监测仪: 浙江温州孚华分析仪器厂; 753BI 微机型紫外可见分光光度计: 上海光学仪器厂; DG-3022A 酶标仪: 华东电子管厂; CO₂ 孵箱: 德国 Heraeus 公司。

1.3 主要试剂

DTT、PMSF、福氏完全佐剂、次黄嘌呤: 氨基嘌呤: 胸苷嘧啶核苷 (HAT)、次黄嘌呤: 胸腺嘧啶核苷 (HT)、IgG 亚类抗血清、HRP-兔抗鼠 IgG 均为 Sigma 产品; 丙烯酰胺: Marck 公司; DEAE-纤维素: 上海东风生化公司进口分装; SP2/O: 兰州生物制品研究所; 其余试剂均为国产分析纯。

cTnT McAb (NT-302): 日本 Chiba 大学 Takashi 教授惠赠。

1.4 cTnT 的提取和纯化

除特殊情况外, 试验均在 4℃ 下进行。参

照 Jin 和 Katus 法改进^[5,6]。取正常心脏, 去除脂肪和结缔组织, 称取左室心肌 100 g, 剪匀, 用 10 倍体积的匀浆液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DTT), 10 × 2 s 快速捣碎, 4000 g × 10 min 离心留取沉淀, 再以同样方法离心留取第二次沉淀, 加 10 倍体积萃取液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mol/L HCl, 1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF, 2 mmol/L DTT) 搅拌过夜, 4000 g × 15 min 离心取上清, 加热至 70℃ 15 min, 冰浴 2 h, 4000 g × 20 min 离心, 取上清, 经 30%~70% 硫酸铵盐析, 6000 g × 20 min 离心留取沉淀, 以 10 倍体积上柱液 (30 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑-HCl, pH 7.0, 5 mmol/L 2-巯基乙醇, 0.5 mmol/L EGTA, 6 mol/L 尿素) 透析去硫酸铵, 再用 10 倍体积咪唑-HCl (pH 7.0) 透析 24 h, 6000 g × 20 min 离心留取沉淀。用数毫升上柱液溶解沉淀, 上 DEAE-纤维素层析柱 (2.5 cm × 10 cm), 0~300 mmol/L NaCl 梯度洗脱 (0~300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑-HCl, pH 7.0, 5 mmol/L 2-巯基乙醇, 0.5 mmol/L EGTA, 6 mol/L 尿素)。洗脱速度 0.1 ml/min, 每管 2 ml 收集, 洗脱时间约 72 h。紫外吸收波长为 280 nm。蛋白质浓度测定采用 Lowry 法。

1.5 cTnT 的鉴定

以不连续垂直平板 SDS-PAGE 测定 cTnT 分子质量。cTnT 氨基酸组分测定由中国科学院广州分院测试中心完成。间接 ELISA 鉴定 cTnT: 100 μl cTnT (1 mg/L) 经稀释后加至微孔板, 4℃ 过夜, 洗涤, 拍干, 加入 cTnT McAb (NT-302), 每孔为 100 μl, 37℃ 水浴

1 h, 洗涤, 拍干, 加入辣根过氧化物酶标兔抗鼠抗体, 37℃ 水浴 1 h, 洗涤, 拍干. 底物液为四甲基联苯胺(TMB), 终止液为 2 mol/L H_2SO_4 . 酶标仪检测, 波长为 450 nm.

1.6 cTnT 的 McAb 制备

首次免疫用 cTnT 40 μg , 卡介苗 2.5 mg, 福氏佐剂注入 6 周龄 Balb/C 小鼠腹腔. 以后隔周脾内注射 cTnT 40 μg , 共 3 次. 融合前 3 天, 脾内注射量 60 μg . 以 50% PEG 4000 为融合剂, 将小鼠脾细胞与 SP2/O 细胞融合 (5:1), 而后 RPMI-1640 (含 HAT) 选择培养, 一周后 HT 培养液培养. 经 ELISA 法筛选阳性克隆后的杂交瘤细胞注入 Balb/C 小鼠腹腔, 诱生腹水. 收集腹水进行染色体分析, Ig 亚类测定, 特异性和效价测定.

2 结果和讨论

2.1 cTnT 的纯化

表 1 为 100 g 新鲜左室心肌中纯化 cTnT 的流程. 在这一过程中, 对样品的加热处理是重要一环. Jin^[5]报道牛心肌 cTnT 纯化加热处理的温度为 60℃, 我们亦在 60℃、65℃、70℃ 三种不同温度下处理样品, 比较发现唯有 70℃ 处理能获得满意结果. 主要原因可能是心肌来源种属不同所致.

表 1 人心肌肌钙蛋白 T 的纯化

步骤	总蛋白含量 /mg ¹⁾	cTnT 纯度 /% ²⁾	cTnT 回收率 /mg
心肌匀浆	106.65	7.88	4.00
1 mol/L KCl 抽提	30.48	8.02	2.74
70℃ 热处理	1.82	43.26	0.78
30%~70% 硫酸铵盐析	0.67	45.76	0.43
无盐咪唑缓冲液透析	0.28	62.14	0.17
DEAE-纤维素柱层析	0.05	97.62	0.05

¹⁾以每 g 新鲜心肌计算其总蛋白量, ²⁾以光密度扫描测定结果计算.

一般情况下, 样品经分级硫酸铵盐析及透析去硫酸铵后可以直接上柱层析. 我们亦曾将

此处理的样品直接上 DEAE-纤维素和/或 Sephadex A-50, 结果显示这些步骤并不能使那些分子质量相近而非 cTnT 的蛋白质分开. 利用 cTnT 只有在含 NaCl 或 KCl 的溶液中处于溶解状态的特性^[7], 本实验对上柱前的样品作无盐咪唑-HCl 处理, 有效地去除了一些非 cTnT 的蛋白质, 因而可以认为无盐咪唑-HCl 透析对提高 cTnT 的层析效果和纯度是大有裨益的.

图 1 为样品经 0~300 mmol/L NaCl 梯度洗脱的层析图. 共出现四个峰, IV 峰证实为 cTnT. 可以看出 cTnT 必须在较高浓度 NaCl 溶液中才能析出.

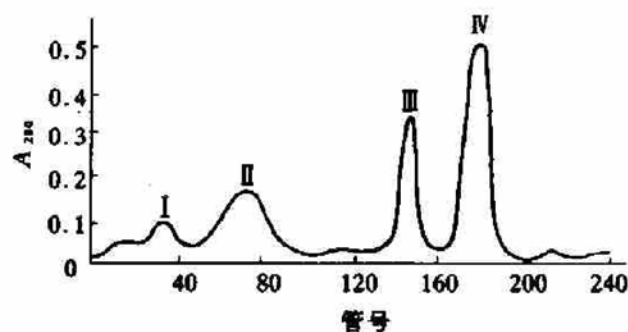


图 1 cTnT 的 DEAE-纤维素层析图谱

cTnT 溶于 5 ml 上柱液后, 上 DEAE-纤维素层析柱, 用含 0~300 mmol/L NaCl 的洗脱液梯度洗脱 (见材料与方法). IV 峰为 cTnT.

2.2 cTnT 的鉴定

图 2 为 cTnT 经 SDS-PAGE 确定的分子质量区带, 即人 cTnT 分子质量为 37 ku. 表 2 为

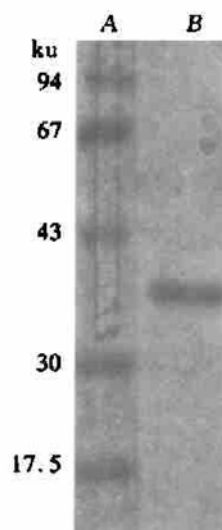


图 2 cTnT 的分子质量
A: 低分子质量标准蛋白; B: cTnT.

cTnT 的氨基酸组分分析, 结果与 Gusev^[7]报道的相似.

表 2 cTnT 的氨基酸组分

氨基酸	cTnT	氨基酸	cTnT
天冬酰胺	23.2	酪氨酸	4.0
谷氨酸	81.4	缬氨酸	11.2
丝氨酸	6.0	异亮氨酸	11.3
甘氨酸	12.5	亮氨酸	17.2
组氨酸	5.5	苯丙氨酸	6.9
精氨酸	35.7	赖氨酸	35.2
丙氨酸	23.5	苏氨酸	8.4
脯氨酸	9.1	蛋氨酸	4.6

应用 ELISA 技术, 本实验将纯化的 cTnT 与 NT-302 McAb 作鉴定检测, 显示加 cTnT 孔明确显色, 吸光度为阴性对照组 11 倍.

2.3 cTnT 的 McAb 制备

本实验在细胞融合后筛选杂交瘤细胞阳性集落, 融合率为 71.36%, 三次克隆化建立 5 株稳定分泌 cTnT McAb 的杂交瘤细胞株, 染色体数 92 ~ 110 条. Ig 亚类鉴定: G₃ 为 IgG_{2a}, 余为 IgM. G₈ 腹水效价 1.6×10^{-7} , 余为 3.2×10^{-6} ; 特异性鉴定显示除 A₇ 外, G₈, G₁₀, G₃, A₅ 均不与磷酸肌酸激酶 (CK), 磷酸肌酸激酶同工酶 (CK-MB), 乳酸脱氢酶 (LDH), 谷草转氨酶 (GOT) 等心肌酶产生交叉反应; 相加实验表明 A₅ 和 G₃ 二株 McAb 的相加指数 (AI) 值为 58%, 可识别 cTnT 肽链上的不同抗原表位, 具有相加效应, 其余各株 AI 值均小于 50%, 表明识别同一抗原位点.

70 年代以来国外在 cTnT 的纯化方法上做了许多工作^[8]. 由于动物种属不同, 方法亦不尽相同, 且重复性差. Jin 建立的方法适合于多种动物心肌 TnT 的纯化, 但本实验证明该方法不完全适用人 cTnT 的纯化. 本方法在后续的数次重复中证明可靠、稳定、易行. 应用 cTnT 制备 cTnT McAb, 对今后广泛深入探讨 cTnT 在人心肌发育及病理状态下质和量

的改变的研究是十分必要的.

参 考 文 献

- 1 Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P *et al.* Clin Chem, 1991; 37: 845
- 2 Neumann F J, Katus H A, Hoberg E *et al.* Br Heart J, 1991; 66: 425
- 3 Gerhardt W, Ljungdahl L, Herbert A K. Clin Biochem, 1993; 26: 231
- 4 Katus H A, Schoeppenthau M, Tanzeen A *et al.* Br Heart J, 1991; 65: 259
- 5 Jin J P, Lin J J. J Bio Chem, 1989; 263: 7309
- 6 Katus H A, Remppis A, Leiser S *et al.* J Mol Cell Cardiol, 1989; 21: 1349
- 7 Gusev N B, Barskaya N V, Verin A D *et al.* Biochem J, 1983; 213: 123
- 8 Katus H A, Loodrt S, Hallermary K *et al.* Clin Chem, 1992; 38: 386

Purification of Human Cardiac Troponin T and Production Monoclonal Antibody Against It. Li Zhiliang, Fu Chaoping, Lu Qing, Li Meilan, Qian Xuexian, Wang Suhua (Zhujiang Hospital, First Military Medical College, Guangzhou 510280, China).

Abstract The purification of cardiac troponin T (cTnT) from human left ventricular muscle has been developed. The 5 mg cTnT were obtained from 100 g cardiac muscle by homogenization, 70°C treatment, imidazol-HCl dialysis, and DEAE-cellulose chromatography. The purity of total cTnT was 97.6%. The cTnT was used to immunize Balb/C mice by intrasplenic injection and five hybridoma cell lines (G₃, G₈, G₁₀, A₅, A₇), which secreted stably monoclonal antibody against human cTnT, were obtained by cell fusion, identification, cloning, four lines were IgM, one line IgG by immunological analysis. The number of hybridomas chromosomes were 92 ~ 110, the McAb titers from ascitic fluid were about $3.2 \times 10^{-6} \sim 1.6 \times 10^{-7}$.

Key words cardiac troponin T, purification, monoclonal antibody