

从表 2 可以看出, 在所选的几种食物中, 核桃、黑芝麻的水提取物具有很强的清除 $\text{OH}\cdot$ 的功能.

2.6 注意事项

a. 在 1.2.2 部分的偶氮反应应在黑暗中进行, 反应结束后应及时加入吡啶, 使颜色稳定; b. 在萃取过程中, 混匀即可, 不用剧烈振荡, 以免发生乳化. 若出现轻微乳化现象, 可用离心法去除.

以上实验表明, 该法能用来研究羟自由基的产生与清除. 该法准确可靠, 易为一般实验室采用. 硫脲和抗坏血酸与羟自由基清除率具有明显的量效关系. 天然食物中的核桃与黑芝麻具有较强的清除羟自由基的功能. 该方法可用于羟自由基清除剂的筛选, 对于研究清除羟自由基的机理具有一定的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Stokes N J, Tabner B J, Hewitt C N. Determination of hydroxyl radical concentration in environmental chambers using electron spin resonance. *Chemosphere*, 1994, **28** (5): 999~ 1008
- 2 Kaur H, Halliwell B. Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 1994, **220** (1): 11 ~ 15
- 3 陈季武, 胡天喜 (Chen J W, Hu T X). 测定 $\text{OH}\cdot$ 产生与清除的化学发光体系. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1992, **19** (2): 136~ 140
- 4 Steiner M G, Babbs C F. Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **278** (2): 478~ 481
- 5 Gamoh K, Sakamoto M. Indirect liquid chromatographic determi-

nation of hydroxyl radicals based on formation of methane sulfinic acid. *Bunseki Kagaku*, 1994, **43** (9): 691~ 696

- 6 Fukui S, Hanasaki Y, Ogawa S. HPLC determination of methane sulphinic acid as a method for the determination of $\text{OH}\cdot$. *J Chromatogr*, 1993, **630** (1~ 2): 187~ 193

Determination of Hydroxyl Radicals in Fenton Reaction by Colorimetric Assay and Its Application.

XU Xiang-Rong, WANG Wen-Hua, LI Hua-Bin
(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China).

Abstract Hydroxyl radicals produced in Fenton reaction can react with dimethyl sulfoxide to produce methane sulfinic acid which can further react with Fast Blue BB salt to form light yellow diazosulfone. According to the principle, hydroxyl radicals can be indirectly assayed by colorimetry. The determination condition was studied to obtain a best experimental program. The results showed that the hydroxyl radical-scavenging effect were dose dependent upon thiourea and ascorbic acid. The walnut and black sesame were proved to be natural antioxidant foods. The method can be applied to sieve the hydroxyl radical scavenger.

Key words hydroxyl radical, Fenton reaction, colorimetry, methane sulfinic acid

人 SCF 非融合蛋白的纯化及生物活性*

赖春宁 朱元晓 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

洪海燕

(哈尔滨农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

摘要 将构建的可溶性 SCF 表达质粒 PBV-SCF 转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行非融合蛋白表达, 经克隆筛选出高效表达菌株表达量在 20% 左右, 大量扩增后经包涵体提取、液相层析技术纯化, 得到纯度为 90% 以上的 rh-SCF 制品, 对其等电点和 N 端氨基酸进行分析, 证实具有天然 SCF 特性, 生物活性检测表明该表达产物比活性为 6.6×10^5 U/mg, 同时可以协同 GM-CSF 促进人骨髓中 CFU-GM 增殖. 重组人可溶性 SCF 的获得对于实验室研究和临床应用具有一定价值.

关键词 rhSCF, 纯化, 生物活性

学科分类号 Q78

* 国家 863 青年基金资助项目 (7306127). 收稿日期: 1997-09-15, 修回日期: 1998-03-24

人干细胞生长因子 (stem cell factor-SCF) 是一种多功能细胞因子, 在机体内主要参与早期的造血祖细胞的增殖、分化和调控等。研究表明 SCF 作用的靶细胞比 IL-3 更为原始, 是造血细胞生长发育早期所必需的因子之一。在大肠杆菌中表达的人重组可溶性非糖基化的 SCF 已被证实同天然可溶性 SCF 具有相同的生物活性^[1,2]。本实验室将构建好的可溶性 SCF 基因转化到大肠杆菌中进行非融合蛋白表达, 经纯化得到 90% 以上的 rh-SCF 蛋白, 应用免疫学、生物化学方法和活性检测表明该表达产物具有天然的 SCF 的特性和生物活性。

1 材料方法

1.1 材料

实验中用 S-Sepharose Fast Flow 阳离子柱, Sephacryl S200 凝胶柱为瑞典 Pharmacia 产品; 人骨髓单个核细胞来源于临床非血液性肿瘤病人外科手术肋骨; Phastsystem 快速电泳为 Pharmacia 产品; 等电点标准品为 Bio-Rad 公司产品, 范围为 pI 3~9。

1.2 PBV-SCF 基因的转化

按分子克隆实验手册^[3], 将构建好的人可溶性 SCF 基因 PBV-SCF 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 经 30℃ 培养和 42℃ 诱导后, 选择出表达量高的菌株作为菌种。

1.3 人可溶性 SCF 蛋白的纯化

将 S-Sepharose Fast Flow 的胶粒装柱, 柱长 20 cm, 直径 1.6 cm, 用 1 mol/L NaCl 冲洗 3 个柱体积, 再用 25 mmol/L NaAc, pH 4.5 液平衡柱子, 将包涵体纯化的样品上样, 然后用 0~0.35 mol/L NaCl 梯度洗脱, 间隔 5 min 收集样品。再用 Sephacryl S-200HR 胶粒装柱, 柱长 100 cm (Φ 1.6), 用 10 mmol/L PBS pH 7.2 的液体平衡柱子, 将离子交换柱纯化的样品浓缩后上样, 用同样缓冲液洗脱, 使样品进一步纯化, 上述纯化蛋白用于生物活性检测、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点和 N 端氨基酸分析^[4]。

1.4 免疫印迹检测 SCF 蛋白

上述纯化的 SCF 蛋白经 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 在 pH 8.3 Tris-甘氨酸电泳转移液和 15 V 电压条件下, 用湿转移方法将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 应用人 SCF 标准单抗及辣根过氧化物酶显色来识别 SCF 蛋白和其表达的分子质量^[5]。

1.5 生物活性检测

将上述纯化的 SCF 蛋白在一定浓度范围与造血生长因子 GM-CSF 合用, 应用造血祖细胞集落培养法观察对人骨髓中 CFU-GM 集落生成影响, 间接检测纯化 SCF 生物活性^[6]。

2 结 果

2.1 高效表达重组菌的筛选

将构建好的 PBV-SCF 表达质粒转化到 DH5 α 大肠杆菌中, 在 AP 抗性的平板上, 随机挑四个菌株进行 30℃ 培养和 42℃ 诱导, 全菌体进行 SDS-聚丙烯酰胺电泳检测结果表明: 克隆的重组菌表达出 19 ku 左右蛋白, 表达蛋白占菌体总蛋白的 10%~20% 并以不溶性包涵体的形式存在于细菌包浆中, 挑选表达量在 20% 左右的表达菌株用 5L 发酵罐发酵收集细菌备用 (图 1)。

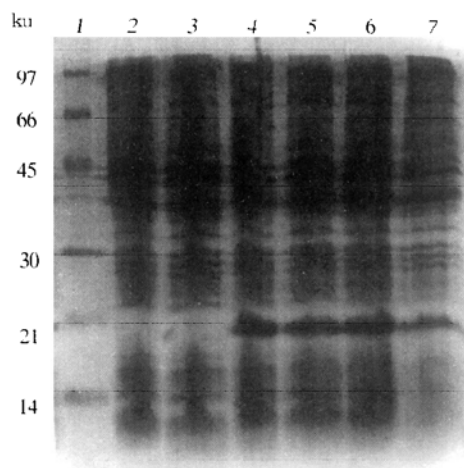


图 1 含有 SCF 基因的高效表达重组菌的筛选

1: 分子质量标准; 2, 3: 未诱导的对照; 4~7: 表达菌裂解物。

2.2 重组可溶性人 SCF 蛋白的纯化

将克隆筛选出含 PBV-SCF 基因的大肠杆菌 DH5 α , 经 30℃ 培养 42℃ 诱导收集表达菌, 超声破碎后收集到纯度在 50% 左右的包涵体, 用 1 mol/L 尿素反复地离心清洗后, 将沉淀溶解在 8 mol/L 尿素中室温 4 h, 离心除去沉淀收集上清, 将其溶解在含有 0.1 mol/L 还原谷胱甘肽, 0.1 mmol/L 氧化谷胱甘肽溶液中复性, 然后装入 10 000 分子质量的透析膜中, 在 10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4 缓冲液中透析 24 h, 离心收集上清, 将上清经 S-Sepharose Fast Flow 阳离子柱纯化, 收集 1 号样品

峰, 用 10 000 分子质量的超滤器超滤浓缩样品 (2 g/L), 样品经 Sephacryl-S200 凝胶柱进一步纯

化, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表达蛋白纯度在 90% 左右 (图 2, 3).

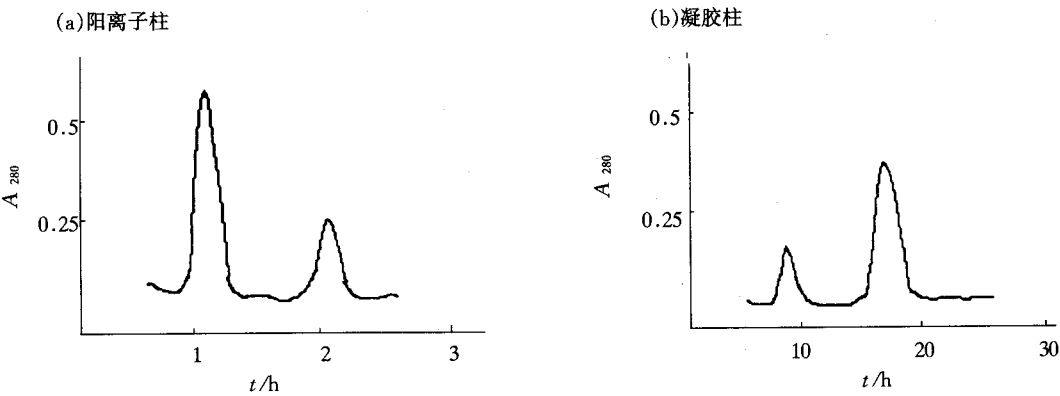


图 2 S-Sepharose Fast Flow 阳离子柱和 Sephacryl-S200 凝胶柱层析图谱

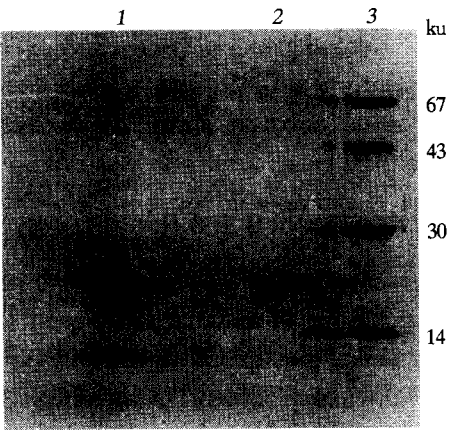


图 3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化样品纯度

1: 阳离子柱纯化样品; 2: 凝胶柱纯化样品; 3: 分子质量标准.

然的人 SCF 序列相同, 序列如下: Met-Glu-Gly-Ile-Cys-Arg-Asn-Arg-Val-Thr-Asn-Val-Lys.

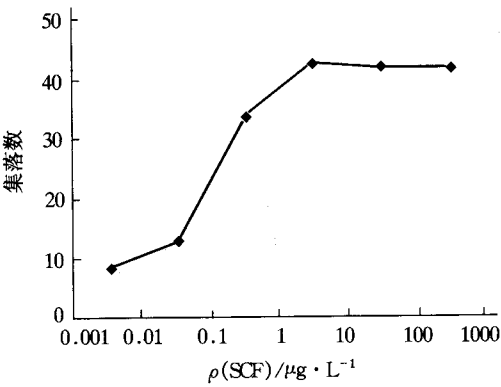


图 4 重组可融性人 SCF 蛋白生物活性检测

2.3 重组可融性人 SCF 蛋白生物活性检测

依据 SCF 可以协同 GM-CSF 促进 CFU-GM 增殖, 在培养体系中加入 10 $\mu\text{g/L}$ 的人 GM-CSF 和不同浓度纯化的 SCF, 根据集落数, 以最大增殖量一半为一个活性单位, 结果表明 SCF 蛋白比活性为 $6.6 \times 10^5 \text{ U/mg}$ (图 4).

2.4 SCF 蛋白免疫学鉴定

将表达产物经分离后, 用电转移法转到硝酸纤维素膜上, 做蛋白质印迹检测, 证明表达产物具有与天然 SCF 相同的分子质量 (图 5).

2.5 纯化的 SCF 等电点和 N 端氨基酸分析

在 Pharmacia 公司产的 Phastsystem 上做等电聚胶电泳, 与标准等电点蛋白相比, rhSCF 等电点约为 5.25. 氨基酸 N 端分析结果表明, 样品中除部分 N 端多出一个甲硫氨酸外, 前 13 个氨基酸与天

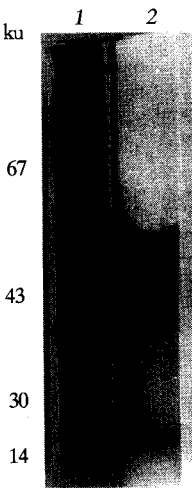


图 5 重组人 SCF 蛋白质印迹检测结果

1: 分子质量标准; 2: SCF.

3 讨 论

人天然 SCF 是一个高度糖基化糖蛋白, 分子

质量在 30 ku~ 40 ku 之间, 主要由基质细胞分泌. 基因根据编码区域可分为 4 个部分, 即: 信号肽、膜外区、穿膜区和膜内区. 机体内的 SCF 以膜型 SCF 和可溶性的 SCF 两种形式存在, 可溶性 SCF 由 λ 膜外区 1~ 165 氨基酸 (aa) 组成, 是其主要功能活性区域^[1]. 我们将可溶性 SCF cDNA 片段插入带有 λ 启动子的载体 pBV220 中, 构建成 pBV-SCF 重组质粒^[7], 转化到大肠杆菌 DH5 α 中进行非融合蛋白表达, 设计包涵体、液相层析技术纯化步骤, 得到纯度为 90% 以上的 rh-SCF 制品, 对其等电点和 N 端氨基酸分析证实具有天然 SCF 特性, 依据 SCF 可以协同 GM-CSF 促进 CFU-GM 增殖作用, 建立了 SCF 生物活性检测方法, 结果表明 SCF 蛋白比活性为 6.6×10^5 U/mg.

由于 SCF 在造血细胞发育过程中的重要调控作用, 人们对 SCF 基因工程产品在临床上的应用前景充满了兴趣. 研究表明 SCF 对于治疗贫血、提高放化疗后白细胞数量、抗急性辐射损伤、基因治疗等方面有应用前景^[9]. 高纯度重组人可溶性 SCF 的获得对于实验室研究和为临床应用打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Zsebo K M, Wypych J, McNeice I K, *et al.* Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from Buffalo rat liver conditioned medium. *Cell*, 1990, **63** (1): 195~ 120
- 2 Witte O N. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell*, 1990, **63** (1): 5~ 6
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 30~ 32
- 4 Strebel K, Beck E, Strohmaier K, *et al.* Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J Virol*, 1986, **57** (1):

983~ 991

- 5 Towbin H, Staehelin T, Gordon J, *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (9): 4350~ 4354
- 6 赖春宁, 朱元晓, 李彦, 等 (Lai C N, Zhu Y X, Li Y, *et al.*). 人干细胞因子与其它造血生长因子对造血细胞集落形成的协同作用. 中国实验血液学杂志 (Chinese J Exp Hematol), 1993, **1** (2): 117~ 121
- 7 朱元晓, 王建安, 赖春宁, 等 (Zhu Y X, Wang J A, Lai C N, *et al.*). 人 SCF 基因 cDNA 的克隆分析. 中华流行病学杂志 (Chinese Journal of Epidemiology), 1992, **13** (3): 407~ 409

Recombinant Human SCF Proteins Purification and Bioactivity. LAI Chun-Ning, ZHU Yuan-Xiao, SHEN Bei-Fen (*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China*); HONG Hai-Yan (*North-east Agricultural University, Harbin 150030, China*).

Abstract Recombinant plasmid PBV-SCF was transformed into the DH5 α and a high expressing germ that could produce about 20 percent SCF product of all the bacterial protein was selected. The SCF product is expressed in form of inclusion body. By liquid chromatography, recombinated human SCF (rhSCF) was obtained with the purity of 90 percent. The sequence of the N-terminal amino acid and the isoelectric point of the rhSCF were analyzed. They are same as the natural SCF. The specific activity of the rhSCF is 6.6×10^5 U/mg. Moreover, it can coordinate with the granule macrophage stimulating facet (GM-SCF) to stimulate proliferate of the CFU-GM from the human bone marrow. The acquisition of the rhSCF is important to both the laboratory research and the clinical therapy.

Key words rhSCF, purification, bioactivity

检测人结肠癌组织端粒酶活性的 TRAP 方法研究*

顾少华 江广平¹⁾ 曹根涛²⁾ 盛继群 刘建平 戴建凉³⁾
林 卿 林 渊 李实忠⁴⁾ 刘为平 谢 毅⁵⁾
(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 对检测人结肠癌组织端粒酶活性的端粒酶重复序列扩增法 (TRAP) 进行了研究. 当 Mg^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L、退火温度为 55℃ 时, 能得到可靠的检测结果. 影响检测结果可靠性的另两个因素是抽提物的反应用量和阳性片段的污染.

* 上海市自然科学基金资助项目 (952A14020). ¹⁾ 上海市克隆生物高技术有限公司, 上海 200433.

²⁾ 中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031. ³⁾ 海军医学研究所, 上海 200433.

⁴⁾ 第二军医大学附属长海医院普外科, 上海 200433. ⁵⁾ 通讯联系人. 收稿日期: 1997-09-22, 修回日期: 1998-01-16