

研究快报

FOS/JUN 介导佛波酯对内皮素基因表达的诱导作用*

温进坤 胡 静 乔亚明

(河北医学院基础医学研究所, 石家庄 050017)

张晨晖 周爱儒 汤 健

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

摘要 利用凝胶电泳迁移率改变实验、RNA 印迹和蛋白质印迹分析分别检查 c-jun 抗体对内皮素-1 (ET-1) 基因 AP-1 位点与核蛋白结合的影响及肿瘤促进剂佛波酯 (TPA) 对 c-fos/c-jun 基因表达的作用。结果发现, c-jun 抗体可使 AP-1 位点-核蛋白复合物的电泳迁移率发生改变, TPA 显著促进 c-fos/c-jun 基因表达和血管内皮细胞的 AP-1 结合活性。实验表明, TPA 对 ET-1 基因表达的诱导作用是通过促进 AP-1 转录因子 c-fos/c-jun 合成来介导的。

关键词 ET-1 基因, 内皮细胞, c-fos/c-jun, TPA

内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 基因 5' 侧翼区存在的 AP-1 结合位点是该基因的主要顺式作用元件, 该位点不仅是 AP-1 转录因子 c-fos/c-jun 异源性二聚体的作用部位, 而且也是肿瘤促进剂佛波酯 (TPA) 反应序列^[1]。已有实验证明, TPA 和 c-fos/c-jun 均可诱导 ET-1 基因表达, 但两者在诱导 ET-1 基因表达之间的相互关系尚不清楚^[2]。我们前文报道, TPA 可促进 ET-1 基因在血管内皮细胞中的表达及 AP-1 结合活性^[3], 为进一步检查 TPA 诱导内皮细胞产生的 AP-1 结合活性是否与 c-fos/c-jun 有关, 本实验通过 RNA 和蛋白质印迹实验观察了 TPA 对 c-fos/c-jun 基因表达的影响, 用凝胶电泳迁移率改变分析检查了 c-jun 抗体对 ET-1 基因 AP-1 位点与核蛋白结合的影响。

牛主动脉血管内皮细胞 (BAEC) 按 Jaffe 等人^[4]的方法分离和培养。实验时, 向培养瓶中加入或不加 (对照) 含 0.5 μmol/L TPA 的 M₁₉₉ 培养基, 60min 后, 分别用异硫氰酸胍-酚-氯仿

方法和 Kwast-Welfeld 方法^[5]从对照和 TPA 处理的 BAEC 提取 RNA 和核蛋白。取核蛋白 10 μg, 与 3' 末端用 ³²P 标记的 ET-1 基因 5' 侧翼区 DNA 片段 (转录起始点上游 -40bp — -205bp, 长度为 162bp, AP-1 位点 GTGAC-TAA 位于 -109 至 -102bp 之间) 保温后, 经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析时, 在对照核蛋白, 出现一条极微弱的迁移率变慢的区带, 即 DNA-核蛋白复合物; 用 TPA 处理的核蛋白, 在与对照核蛋白相同的位置上出现迁移率变慢的区带, 其强度显著增加; 向上述反应体系中加入 c-jun 抗体, 用同样方法进行分析时, 出现一条迁移率进一步减慢的区带, 且这条区带随着 c-jun 抗体用量加大而增强, 原来的 DNA-核蛋白复合物区带逐渐变弱。单独用 c-jun 抗体与探针保温不引起探针电泳迁移率改变。上述结果表明, TPA 可诱导 BAEC 产生与 ET-1 基

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-04-20

因 5' 侧翼区结合的核蛋白因子, 由于探针分子上的顺式作用元件为 AP-1 结合位点, 因而可以断定, 与探针相互作用的蛋白因子是 AP-1 转录因子家族的成员. 根据 c-jun 抗体能与该蛋白因子相互结合, 使探针电泳迁移率进一步变慢这一现象, 不难得出 TPA 诱导 BAEC 产生的 AP-1 转录因子是 c-fos/c-jun 异源性二聚体.

为了鉴定 TPA 使 c-fos/c-jun 二聚体与 ET-1 基因 AP-1 位点作用增强是由于 c-fos/c-jun 基因表达增加还是其表达产物活性发生变化, 我们分别以 c-fos 和 c-jun DNA 片段为探针, 经 RNA 印迹分析检查 TPA 对 c-fos/c-jun 基因表达的影响. 实验结果表明, 未经 TPA 处理的 BAEC 只表达少量 c-jun mRNA, c-fos mRNA 不能被检出. 加入 TPA 60min 后, c-fos mRNA 含量增加数十倍, c-jun 基因表达亦显著增加. 将核蛋白提取物经 SDS-PAGE 后, 用 c-jun 抗体进行蛋白质印迹分析, 对照和 TPA 处理的 BAEC 提取液均在 37 000 位置上出现

一条阳性蛋白条带, 其分子量大小与 c-jun 相一致. 在 TPA 处理的细胞内, 还出现一条分子量略大于 37 000 的蛋白质, 据推测该蛋白是 c-jun 的前体. 依据 TPA 可诱导 c-fos/c-jun 基因在内皮细胞进行表达、增强内皮细胞的 AP-1 结合活性和与 ET-1 基因相互作用的蛋白因子可与 c-jun 抗体发生反应, 可以断定, TPA 对 ET-1 基因表达的诱导作用是通过促进 AP-1 转录因子 c-fos/c-jun 合成来介导的.

参 考 文 献

- 1 Lee M-E, Dhadly M S, Temizer D H *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 19034
- 2 Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y *et al.* J Biol Chem, 1989; **264**: 14954
- 3 温进坤, 魏素珍, 张静琴等. 生物化学与生物物理学报, 1994; **26** (3): 339
- 4 Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G *et al.* J Clin Invest, 1973; **52**: 2745
- 5 Kwast W J. J Biol Chem, 1989; **264**: 6941

快速可靠的双链 PCR 产物直接测序法*

王 亮 张金三 朱 丹 印 螺 王秀琴 吴 旻

(中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要 利用 T7 DNA 聚合酶在低温下仍具较高活性的特点, 在热变性后低温下进行测序反应, 使用该方法对多种 PCR 产物进行序列分析均取得较好的结果.

关键词 PCR, DNA 序列分析, T7 DNA 聚合酶

DNA 序列分析是分子生物学实验室基本技术之一. PCR 技术问世后, DNA 序列分析在多数情况下从过去繁杂的分子克隆测序进入扩增产物的直接测序. 目前 PCR 产物直接测序, 主要依赖 Sanger 创立的双脱氧终止法, 其首要条件是制备单链模板. 尽管已有多种方法将双链 PCR 产物转换成单链模板, 但均较复杂, 费时、费力. 另外, 对于某些 DNA 片断,

由于单链 DNA 在常温下易于形成较强的二级结构, 影响了聚合酶的延伸反应而无法成功地进行测序. 虽然近几年创立的循环测序技术利用耐热 DNA 聚合酶的耐热特性进行测序, 避免了二级结构的形成, 但引物需事先用同位素标记, 对不同引物和模板要事先优化退火、延

* 国家“八五”攻关课题资助.

收稿日期: 1994-06-29

yield. At the same time, AC, a by-product which was not contaminated by G_s , can be used for assay of G_s activity after reconstituting it into asolectin vesicles. This method of assaying G_s activity has been proved to be simple, reliable and sensitive.

Key words stimulatory GTP-binding protein, adenylate cyclase, bovine brain

FOS/JUN Mediates Endothelin-1 Gene Expression Induced by Phorbol Ester in Endothelial Cells. Wen Jinkun, Hu Jing, Qiao Ya-ming, Zhang Chenhui, Zhou Airu, Tang Jian. (*Institute of Basic Medicine, Hebei Medical College, Shijiazhuang 050017*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 457—458

Gel shift of electrophoresis and Northern and Western blotting analysis were used to detect the effect of c-jun antibody on the interaction between AP-1 site of ET-1 gene and nuclear proteins as well as the effect of TPA on c-fos/c-jun gene expression. The results showed that AP-1 binding activity in vascular endothelial cells was stimulated by c-fos/c-jun, whose expression was induced by TPA, and that the electrophoretic mobility of band of DNA-protein complexes was altered by the antibody against c-jun. These results suggest that ET-1 gene expression induced by TPA is mediated by c-fos/c-jun.

Key words ET-1 gene, endothelial cells, c-fos/c-jun, TPA

A Rapid and Reliable Method for Direct Sequencing of PCR Products. Wang Liang, Zhang Jinsan, Zhu Dan, Yin Luo, Wang Xiuqin, Wu Min. (*National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical*

College, Beijing 100021). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 458—459

A simple, rapid and reliable sequencing method for double stranded PCR products is described. This method presented utilizing the unique property of T7 DNA polymerase which remains active at low temperature to allow the sequencing reaction performed at low temperature. Excellent sequencing results have been obtained by this method for various PCR products.

Key words polymerase chain reaction (PCR), DNA sequencing, T7 DNA polymerase

Determination of the Content of AchE in the Plasma of Patients With PNH. Xu Caimin, Lu Hong, Pan Huazhen, Zhang Zhinan. (*National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 460

The contents of AchE in plasma and erythrocyte membrane of patients with PNH were determined by ELISA. The results show that the content of AchE is low in PNH erythrocyte membrane but high in plasma when it is compared with that in normal.

Key words paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), soluble acetylcholinesterase (soluble AchE), plasma, erythrocyte membrane

Computer Design of Murine Adenosine Deaminase mRNA Specific Ribozyme. Chen Hua, Chen Nongan, Lu Changde, Qi Guorong. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 461—463

With computer analysis of the adenosine