

碱性)纤维素酶的等电点和分子量与一般CMC酶基本相同.碱性CMC酶究竟是由完全特殊的基因编码,还是由一般CMC酶基因编码,然后经过特殊翻译后修饰才具有了对碱性环境的抗性,还有待进一步的工作去阐明.

近年来,碱性纤维素酶正在被应用于洗涤剂工业中.它能使棉纤维的非结晶区结构膨松,使封闭在纤维间隙中的污物得以释放出来,同时又不破坏织物的牢固性,其作用机理虽然完全不同于传统表面活性剂型洗涤剂,但在洗涤剂中添加碱性纤维素酶可大大提高对织物的洗涤效果.本文对酶在洗涤剂主要成分(表面活性剂和助剂)存在条件下的酶活性进行了初步研究,结果表明酶在此条件下基本稳定,具备洗涤剂用酶的基本条件.有关碱性纤维素酶洗涤剂洗涤性能的工作,将在以后陆续报道.

参 考 文 献

- 1 Horikoshi K, Nakao M, Kurono Y. Can J Microb, 1984; 30: 774
- 2 Horikoshi K, Akiba T. Alkalophilic Microorganisms. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1982: 126
- 3 Fukumori F, Toshiaki K, Horikoshi K. J Gen Microb, 1985; 131: 3339
- 4 川合修次. 公開特許, 1985; 昭 64—37285: 18
- 5 Folin O, Rosebrough N J, Farr A L. J Biol Chem, 1951; 193: 265
- 6 张树政. 酶学研究技术. 北京: 科学出版社, 1987: 136
- 7 Wood T M, McCrae S I. Adv Chem Ser, 1979; 181 (10): 181
- 8 Kawai S, Okoshi H, Ozaki K *et al.* Agric Biol Chem, 1988; 52 (6): 1425
- 9 Fukumori F, Sashihara N, Toshiaki K. J Bacteriology, 1986; 168 (2): 479

石蜡包埋组织的 DNA 提取及其在免疫球蛋白基因重排分析中的应用*

张建中

(国防科工委五一四医院病理科, 北京 100101)

朱元晓 王建安 郑建强

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 基因重排分析在淋巴瘤诊断中具有重要意义. 文章应用改良 DNA 提取方法, 从 30 例淋巴增生性病变石蜡包埋组织获得的 DNA 虽有不同程度的降解, 但适于 PCR 扩增 Ig 重链基因重排分析; 约 1/3 病例提出高分子量 DNA, 可用于 DNA 印迹杂交. 因此, 石蜡包埋组织同样可为某些疾患, 如淋巴瘤疑难和罕见病例的回顾性分子病理学研究提供基因诊断的 DNA 来源.

关键词 石蜡包埋组织, DNA 提取, 基因重排分析, 淋巴瘤

近年来, 免疫球蛋白 (Ig) 和 T 细胞受体 (TCR) 基因重排分析给淋巴瘤的诊断提供了新手段. 由于 DNA 印迹 (Southern blot) 杂交分析基因重排技术要求从新鲜标本中提取完整的 DNA, 因而限制了其在临床上某些病例的应

用. 自从 Goelz 等^[1]报告了石蜡包埋组织 DNA 提取的改良方法以来, 特别是 PCR 技术的引进, 使得借助石蜡包埋标本分析基因重排成为

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-05-05, 修回日期: 1993-07-02

可能, 对于淋巴瘤罕见和疑难病例的基因诊断和研究具有重要价值. 本研究重点对常规石蜡包埋组织的 DNA 提取方法及其在基因重排分析中应用的可行性进行探讨.

1 材料与方法

1.1 材料来源 选取 1989—1990 年间病理科石蜡包埋组织 30 例: 非何杰金氏淋巴瘤 20 例, 其中 B 细胞表型 14 例, T 细胞表型 6 例; 反应性淋巴组织增生 10 例. 所有标本均经 10% 福尔马林固定 12—24h, 60—65℃ 浸蜡 2—3h. 其中 6 例淋巴瘤有新鲜标本. 另有 B 细胞株 (Nalm-6) 和胎盘组织作为对照.

1.2 DNA 提取 将每一石蜡包埋组织块切成 20 μ m 薄片, 收集于塑料离心管中. 以二甲苯脱蜡 (5min $\times$ 3), 无水乙醇和 TE (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH8.0) 各洗 2 次, 4℃ 离心沉淀. 将沉淀物悬浮于 2—3ml TE (pH8.0) 中, 加 SDS 终浓度至 1% 和蛋白酶 K 500 μ g/ml. 在 55℃ 水溶液中放置 48—72h, 不时摇动. 饱和酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提 1 次, 用 2.5 倍体积冷乙醇沉淀. 用玻璃棒搅起纤维絮状 DNA 或离心沉淀. 室温下让乙醇自然挥发, 用适量 TE 溶解. 取小样直接做 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以估计 DNA 分子量. 用紫外分光光度计测定核酸浓度和纯度.

1.3 DNA 印迹杂交 取 DNA 15 μ g, 经 BamH I, EcoR I 和 Hind III 消化, 电泳分离酶切片段并转移至硝酸纤维膜上, 与³²P 随机引物法标记的 Ig 重链基因 J 片段 (JH) 3.3kb 探针在含 50% 甲酰胺的杂交体系中于 42℃ 杂交 24h. 严谨洗膜, -40℃ 放射自显影分析.

1.4 PCR 扩增 Ig 重链基因引物 FR3A, LJH 和 VLJH, 根据文献[2]合成. 采用半重叠 PCR 扩增. 第一轮引物用 FR3A 和 LJH, 30 个周期循环后, 将扩增产物 1:1000 稀释, 改用 FR3A 和 VLJH 引物进行第二轮 20 个周期扩增. 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外下观察.

2 结 果

每一石蜡包埋组织块获得 DNA 90—832 μ g, 其大部分经乙醇沉淀后呈碎屑状沉于

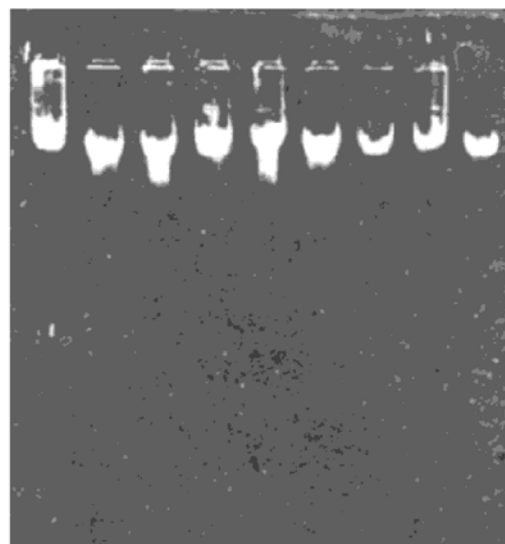


图 1 石蜡包埋组织提取 DNA 电泳图
最右侧一行为 λ DNA 分子量对照.

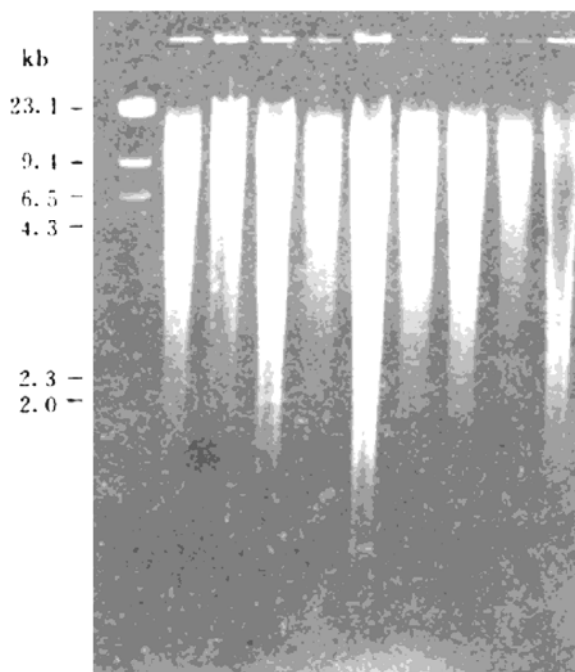


图 2 提取 DNA 经 EcoR I 酶切电泳
右侧第一行为 λ DNA/Hind III 分子量标志.

管底, 电泳结果显示明显降解, 其片段长度在 10kb 以下, 主要集中在 1000 bp 左右. 仅 11 例 (8 例淋巴瘤, 3 例反应性淋巴组织增生) 有纤维絮状 DNA 析出, 漂浮在乙醇表面. 电泳结果

表明,其分子量在 30kb 以上(图 1)。酶解产物电泳图象呈连续的涂片状(图 2)。紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值在 1.75—2.0 之间。

对 8 例有高分子量 DNA 提出的淋巴瘤进行了 DNA 印迹杂交分析。在 BamH I, EcoR I 和 Hind III 酶切下 JH 基因胚系条带分别为 17kb, 16kb 和 11kb。3 例淋巴瘤和 Nalm-6 细胞均表现为原胎系基因消失和/或胚系基因以外的新带出现(图 3),意味着 JH 基因发生了克

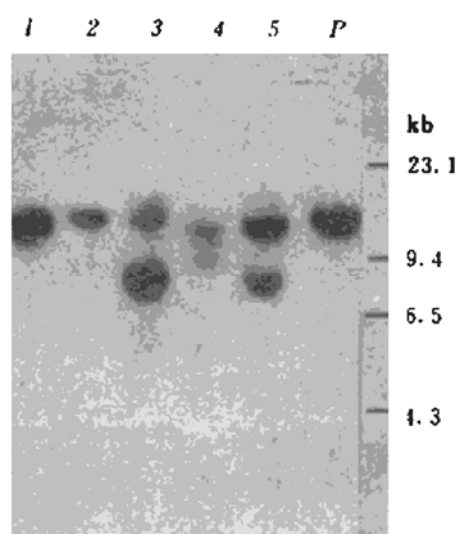


图 3 DNA 印迹杂交分析 Ig 重链基因重排
EcoR I 酶切显示 3, 4, 5 道出现 JH 基因重排条带。1, 2 道为 T 细胞性淋巴瘤。P 为胎盘组织 DNA 胚系基因对照。

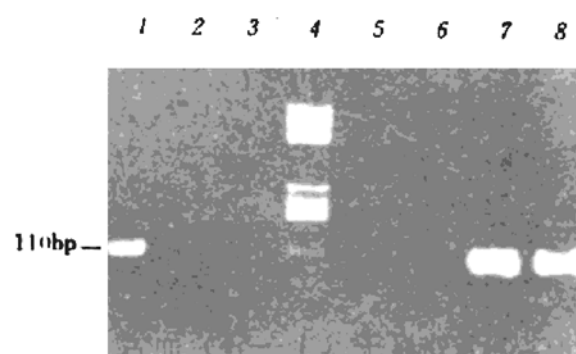


图 4 PCR 扩增 JH 基因重排电泳图

图示第 1 道为 Nalm-6 细胞, 2, 3 道为非淋巴细胞性肿瘤, 4 道为 pBR322/Hae III 分子量标志, 5, 6 道为 T 细胞性淋巴瘤, 7, 8 道为 B 细胞性淋巴瘤。

隆性重排 (clonal rearrangement); 与免疫表型分析及新鲜组织标本 DNA 杂交结果相一致。3

例反应性淋巴组织增生 DNA 均未检出 JH 基因重排。

30 例 DNA 标本均进行了 PCR 扩增, 其中 11 例出现单一条带, 分子量在 100—120bp 之间(图 4)。经查证实, 11 例阳性扩增者均为 B 细胞性淋巴瘤。T 细胞肿瘤和反应性淋巴组织增生均未扩增出单一重排条带。

3 讨 论

本研究发现, 从常规石蜡包埋组织中提取的 DNA, 大部分发生明显降解。这可能是组织处理过程所造成的影响。除组织坏死或固定不及时、不充分致使组织不同程度自溶外, 甲醛浓度过高、固定时间延长、包埋温度及浸蜡时间等因素均可导致 DNA 分子断裂^[3-5]。DNA 提取时, 我们主要依据 Dubeau 等^[5]提出的方法并略作改良。在实验中虽增加了蛋白酶 K 浓度和孵育时间, 以及两次消化处理等步骤, 但未能明显改善高分子量 DNA 提出率。可能主要是因为组织处理不当所致的 DNA 降解, 而非提取方法的问题。因此, 改善组织处理方法是获得高分子量 DNA 提取物的关键。

据报道, 高分子量 DNA 提取率各实验室因组织处理方法不同, 亦存有明显差异^[1,3-6]。一般认为, 10% 中性缓冲福尔马林或乙醇是保存组织 DNA 的最佳固定剂。组织固定使 DNA 分子交链而僵直, 更易受机械损伤, 故固定时间以 12—24h 为宜, 最长不能超过 5d。由于固定对 DNA 的化学修饰作用, 其与蛋白不易分离, 适当增加蛋白酶浓度和作用时间, 可改善 DNA 的解离度, 有利于 DNA 的纯化和分子杂交反应。

DNA 印迹杂交结果表明, 石蜡包埋组织提取的 DNA 与新鲜组织 DNA 杂交结果一致。唯前者因降解的 DNA 小片段存在, 故 DNA 量应适当增加, 以提高杂交信号强度。另外, 我们也注意到固定组织 DNA 的泳动速度稍有减缓, 可能与化学修饰作用所致的 DNA 分子构型改变有关^[5]。

本研究还表明, 石蜡包埋组织 DNA 虽有

降解,但仍适于用PCR进行基因重排分析.在用于PCR的模板DNA提取中,我们对常规提取方法,与简化NP40-蛋白酶K法,煮沸法进行了比较(未发表资料).结果发现,NP40-PK法(不经酚抽提)亦可得到满意的扩增;但煮沸法提取DNA虽较简便,但煮沸既可释放DNA,亦可破坏DNA,故不适于基因重排分析的模板制备^[7,8].在本组14例B细胞性淋巴瘤中,11例检测出Ig重链基因重排,其敏感性和特异性均不亚于采用新鲜组织DNA提取物所进行的DNA印迹杂交分析.而且,PCR简便快速,不需要同位素、模板DNA质量要求不高,在临床上有着更广泛的用途.

参 考 文 献

1 Goelz S E, Hamilton S R, Vogelstein B. *Biochem Biophys*

Res Commun, 1985; **130**: 118

2 Trainor K J, Brisco M J, Wan J H *et al.* *Blood*, 1991; **78**: 192

3 Wu A M, Winberg C D, Sheibani K *et al.* *Hum Pathol*, 1990; **21**: 1132

4 Miles C, Houldsworth L, Chaganti R S K. *Am J Surg Pathol*, 1991; **15**: 169

5 Dubeau L, Chandler L A, Glow J R *et al.* *Cancer Res*, 1986; **46**: 2964

6 Dubeau L, Weinberg H, Jones P A *et al.* *Am J Pathol*, 1988; **130**: 588

7 Greer C E, Peterson S L, Nancy H T *et al.* *Am J Pathol*, 1991; **95**: 117

8 Jackson D P, Lewis F A, Taylor G R *et al.* *J Clin Pathol*, 1990; **43**: 499

人脑髓鞘碱性蛋白 cDNA 体外 扩增、克隆和鉴定*

陈俊杰 王若菡 程汉华 陈 朴 李昌隆 杨鲁川

(华西医科大学生物化学教研室, 成都 610041)

摘要 采用聚合酶链反应(PCR)从人脑cDNA文库中扩增出600bp的髓鞘碱性蛋白(MBP)cDNA片段,与载体pGEM-3Zf(+)平端连接,重组质粒DNA转化宿主菌JM109,在含X-gal和IPTG的平板上直接筛选阳性克隆.限制性内切酶分析和成套引物扩增鉴定证明,该克隆含有7个外显子的21.5kD人脑MBP全长编码序列.

关键词 聚合酶链反应(PCR),人脑cDNA文库,髓鞘碱性蛋白编码序列,载体pGEM-3Zf(+)

髓鞘碱性蛋白(MBP)是脊椎动物中枢神经系统少突细胞和周围神经系统雪旺细胞合成的一种强碱性($pI > 12$)膜蛋白,它可能与细胞磷脂阴离子基团相互作用,促使胞浆面融合而成髓鞘多片层结构的主要致密线,对有鞘神经的绝缘和冲动快速传导起重要作用^[1].

人和鼠脑MBP基因编码区和部分非编码区序列基本上已确定,普遍认为两个种属这一

基因均含7个外显子(I—VII)而且其同源性高达90%以上,但两者原始转录物的剪接方式不同,已确定鼠脑有5种即21.5, 18.5, 17, 和17_b和14kD MBP,人脑有4种即21.5, 20, 18.5和17kD MBP^[2].但近年有人采用MBP不同外显子探针和聚合酶链反应(PCR)又从鼠

*国家自然科学基金项目,纽约中华医学基金部分资助.

收稿日期:1993-05-05,修回日期:1993-09-20

Preparation and Properties of Long Half-Life Recombinant Human Superoxide Dismutase.

Luo Xunyi, Wang Jingyi, Xie Bangtie, Li Zhanqing, Liu Xiaolin, Chen Xiaosui. (*Laboratory of Molecular Biology, Naval General Hospital, Beijing 100037*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 234

Recombinant human Cu/Zn SOD (rhCu/Zn SOD) obtained from *E. coli* was covalently linked with an amphipathic molecule poly-(styrene-co-maleic acid) butyl ester (SMA) via amide linkage. When 42% free amino groups of the enzyme were modified, 88% remained enzyme activity was obtained. The results of circular dichroism of rhCu/Zn SOD and SMA-rhCu/Zn SOD indicated that the structure of the modified rhCu/Zn SOD was scarcely changed. Its biological half-life in blood was prolonged 22 times, and its abilities to resist pepsin and trypsin were increased significantly.

Key words rhCu/Zn SOD, chemical modification of protein, SMA, genetic engineering

Purification and Properties of the Alkaline CMCase Derived from *Bacillus sp.* O74.

Wang Dong, Song Guijing, Gao Peiji. (*Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 237

An alkaline CMCase was partially purified from the culture medium of *Bacillus sp.* O74. The enzyme was purified 27.9 fold by sephadex G-100 gel filtration, ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography. The enzyme was characterized by demonstration of optimum activity at 50 °C and pH 7.0, and its molecular weight of 52 500 determined by gel filtration. The pH range of the enzyme showing the activity is

from pH 4 to 12, and at pH 9 and 10, it can keep 80% and 70% of the maximum activity respectively. The enzyme was stable in the presence of the most metal ions, surface active agents and auxiliaries.

Key words purification, cellulase, alkaline

Extraction of DNA From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues for the Analysis of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement.

Zhang Jianzhong, Zhu Yuanxiao, Wang Jianan, Zheng Jianqiang. (*Department of Pathology, Kegongwei Hospital, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 241

Gene rearrangement analysis plays an increasing important role in the diagnosis of lymphomas. The possibility of detecting immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues was examined. 30 cases of lymphoid lesions, only 11 have been extracted with high molecular DNA which could be used in southern blot, and others showed DNA degradation in some degree. The degraded DNA could also be used in antigen receptor gene analysis after amplified by polymerase chain reaction. DNA analysis using paraffin-embedded tissues has potential clinical and research applications in detecting gene abnormalities in rare and difficult cases of lymphomas in which fresh specimen was not available.

Key words paraffin-embedded tissues, extraction of DNA, gene rearrangement analysis, lymphoma

Amplification, Cloning and Identification of Full-Length Coding Sequence for Human Myelin Basic Protein. Chen Junjie, Wang Ruohan, Cheng Hanhua, Chen Pu, Li Changlong.