

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 factor (GM-CSF) to stimulate proliferation 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

关键词 人结肠癌组织, 端粒酶活性, 端粒酶重复序列扩增法

学科分类号 Q7

端粒位于真核生物染色体的末端, 由一连串富含 G 的 DNA 重复序列和相关蛋白组成, 其功能主要是维持染色体的稳定^[1]. 人的端粒重复序列是 TTAGGG^[2]. 由于染色体中线状 DNA 末端复制缺口问题^[3], 真核细胞每分裂一次, 端粒的重复序列就要丢失一些, 从而导致细胞衰老、死亡. 如果没有一个端粒的补偿机制, 很难想象古老的单细胞真核生物能繁衍至今. 1985 年, Greider 和 Black 在单细胞真核生物四膜虫 (*Tetrahymena*) 中发现了端粒酶, 从而解开了这个迷团. 不同于 DNA 聚合酶, 端粒酶是一种核酸蛋白酶, 它以自身的 RNA 为模板, 不断地合成端粒重复序列加到端粒末端, 以弥补细胞分裂丢失的端粒片段^[4]. 1989 年, Morin 发现人 HeLa 细胞株具有端粒酶活性^[5]. 1994 年, Kim 等建立了端粒酶重复序列扩增方法 (TRAP, telomeric repeat amplification protocol), 对大量的人肿瘤样品和正常组织进行端粒酶活性检测, 证明端粒酶活性与肿瘤密切相关^[6]. 越来越多的研究证据表明, 绝大多数的人类肿瘤细胞具有端粒酶活性, 而正常体细胞 (体外培养永生细胞株^[7]、生殖腺细胞^[8]、造血干细胞^[9]和表皮基底细胞^[10]除外) 与良性肿瘤则无端粒酶活性^[11]. 肿瘤细胞的无限止增殖能力, 与之具有端粒酶活性有关. 端粒酶活性可作为检测组织癌变的一种方法; 抑制端粒酶活性, 可作为肿瘤治疗的一种手段. 据最近报道, 人端粒酶基因已克隆, 但端粒酶在肿瘤形成过成中的调控机理尚不清楚.

端粒酶研究正成为分子生物学的一个热点, 在国内尚属新领域. 本研究以人结肠癌组织为材料, 用 TRAP 方法对端粒酶活性进行研究, 以建立可靠的端粒酶测活体系, 一则可为肿瘤临床检测服务, 二则为对端粒酶的进一步研究打下基础.

1 材料和方法

1.1 细胞质抽提物的制备

人结肠癌组织和正常结肠组织由第二军医大学附属长海医院提供. 组织切下来后, 立即置于液氮中.

抽提方法按 Nam 等^[6], 略有不同. 取 0.5 g 组织, 放入预冷的研钵中, 不断加入液氮研至粉末, 转至冰浴的 5 ml 玻璃匀浆器 (江苏省海门市

麒麟医用仪器厂) 中, 加入 0.5 ml 裂解缓冲液 { 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L 乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸 (EGTA), 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 5 mmol/L β-巯基乙醇, 0.5% 3-[(3-乙醇胺丙基)二甲基氨]-1-丙磺酸酯 (CHAPS), 10% 甘油}, 匀浆至细胞破碎 (镜检), 约 30 min, 然后转至离心管中, 4℃ 100 000 g 离心 45 min (KONTRON 超速离心机, TFT80.8 转头), 上清即为细胞质抽提物. 取 5 μl 上清加双蒸水定容至 1 ml, 以 5 μl 裂解缓冲液加双蒸水定容至 1 ml 作空白对照, 测 A₂₁₅ 和 A₂₂₅ 值 (UV240, 岛津公司), 以估算抽提物中蛋白质浓度. 其余上清分装储存于 -70℃.

1.2 细胞质抽提物端粒酶活性的 TRAP 分析

TRAP 反应底物和正向引物 (TS): 5'-AATCGTCGAGCAGAGTT-3', TRAP 反向引物 (CX): 5'-(CCCTTA)₃CCCTAA-3' 由复旦大学遗传所合成.

TRAP 反应液终体积为 50 μl, 含有: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1.8 mmol/L MgCl₂, 63 mmol/L KCl, 1 mmol/L EGTA, 0.1 g/L 牛血清白蛋白 (BSA), 50 μmol/L dNTPs, 0.1 μg TS 寡核苷酸, 0.5 μl 细胞质抽提物, 0.1 μg CX 寡核苷酸, 0.5 μl α-³²P-dCTP (3.7 × 10¹¹ Bq/L, 11.1 × 10¹⁶ Bq/mol, 北京亚辉生物医学工程有限公司), 2 U Taq 酶 (复旦大学遗传所), 后三者待 TS 寡核苷酸 25℃ 延伸 30 min 后再加. 为提高 PCR 的特异性, 采用高温起动: 94℃ 变性 5 min, 降至 70℃ 保温 5 min, 加 2U Taq 酶 70℃ 继续 5 min, 连接 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 45 s, 30 个循环 (9600PCR 仪, PE 公司). PCR 产物在 7 mol/L 尿素、6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳 [1 × Tris 硼酸缓冲液 (TBE), 75 W 恒功率约 1 h, BioRad 公司]. 抽干凝胶, -70℃ 压片过夜.

2 结果与讨论

根据紫外吸收法: 蛋白质浓度 (g/L) = 0.144 × (A₂₁₅ - A₂₂₅) × 稀释倍数^[12], 人结肠癌组织细胞质抽提物中蛋白质的浓度约为 14~17 g/L (六次抽提结果).

端粒酶以寡核苷酸 TS 为底物, 把 TTAGGG 一个个地加到其 3' 端, 形成具有不同 TTAGGG 串

联数的延伸产物. 用 TS 为正向引物, 另一寡核苷酸 CX 为反向引物, 加入同位素标记前体, 在合适的条件下对端粒酶延伸产物进行 PCR 扩增, 扩增产物走 PAGE, 放射自显影, 得到的是一连串相差 6nt 梯度 DNA 片段. 这就是 TRAP 检测端粒酶活性的原理. 合适的扩增 6nt 梯度 DNA 片段的 PCR 条件, 对检测的成败至关重要.

影响 PCR 的因素很多, 在 TRAP 分析中主要是反应体系中的 Mg^{2+} 浓度和退火条件. 如果 Mg^{2+} 浓度过高或退火温度过低, 就会引物之间配对、引物与靶序列非特异配对、引物与抽提物中的 DNA 配对, 产生非特异条带, 形不成 6nt 梯度, 得不出正确的判断; 如果 Mg^{2+} 浓度过低或退火温度过高, 引物与靶序列不能配对, 就扩增不出产物. 本研究表明, 当反应体系中 Mg^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L、PCR 退火温度为 55℃ 时, 结肠癌组织抽提物 TRAP 分析结果呈现 6nt 梯度, 而不加抽提物和加正常组织抽提物的对照则不会呈现 6nt 梯度. 20 μ l 结肠癌组织抽提物加 1 μ g RNase A (Promega 公司) 25℃ 处理 10 min, 再进行 TRAP 分析, 6nt 梯度消失 (图 1). 呈现 6nt 梯度和需要 RNA 为模板, 此二特征表明结肠癌组织抽提物具有端粒酶活性.

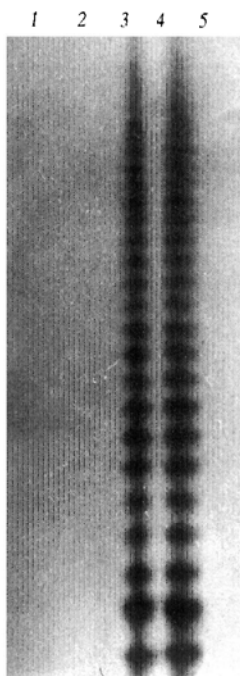


图 1 TRAP 分析结果

1: 阴性对照 (抽提物无); 2: 正常组织; 3: 肿瘤组织;
4: 肿瘤组织 (抽提物 25℃ 预处理 10 min); 5: 肿瘤组织
(RNase A 处理).

在进行 TRAP 分析时, 加入的抽提物不宜过量. 如果抽提物过量, 其中的杂质会抑制 Taq 酶活性, 使 PCR 扩增失败, 测不出端粒酶活性. 因此, 对抽提物的蛋白质量要进行测算, 以确定加多少量为宜. 在本研究中, 当抽提物量在 0.5~ 2 μ l 时, 能得到可辨的 6nt 梯度. 当抽提物量在 4 μ l 以上时, 则得不到 6nt 梯度. 为提高检测灵敏度可采取延长延伸反应时间至 1 h、加入 Tween-20 至 0.5%、降低 dNTPs 浓度以提高同位素标记效率和增加 PCR 循环数至 34 等措施^[13].

TRAP 是一种基于 PCR 的检测方法, 高度灵敏, 极易被阳性片段污染, 产生假阳性结果. 在本研究中, 出现过此问题. 因此, 必须采取严密的防污染措施. 加样区和反应、分析结果区必须严格隔离, 两区所用的加样枪、枪尖、管子等不能混用. 为确保检测结果的可靠性, 每次检测都应设一个不加抽提物的空白对照.

由于端粒酶是一种核酸蛋白酶, 它以自身的 RNA 为模板, 合成端粒重复序列. 因此在匀浆和延伸反应时, 所用器皿和试剂必须进行严格的无 RNA 酶处理, 同时严防外源 RNA 酶污染.

本研究建立了一个可靠的人结肠癌组织端粒酶测活体系, 可作为结肠癌组织临床诊断的一种可靠手段, 同时也为其他肿瘤组织的 TRAP 检测提供了一种模式.

参 考 文 献

- 1 Blackburn E H, Szostak J W. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu Rev Biochem*, 1984, **53**: 163~ 194
- 2 Moyzis R K, Buckingham J M, Cram L S, *et al*. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (18): 6622~ 6626
- 3 Waston J D. Origin of concatameric T7 DNA. *Nature New Biol*, 1972, **239** (94): 197~ 201
- 4 Greider C W, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 1985, **43** (2): 405~ 413
- 5 Morin G B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*, 1989, **59** (3): 521~ 529
- 6 Nam W K, Mieczyslaw A K, Karen R P, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immol/Lortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266** (5193): 2011~ 2015
- 7 Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immol/Lortal cells which express telomerase activity. *J EMBO*, 1992, **11** (5): 1921~ 1929
- 8 Mantell L L, Greider C W. Telomerase activity in germline and embryonic cells of Xenopus. *J EMBO*, 1994, **13** (13): 3211~

- 3217
- 9 Broccoli D, Young J W, de Lange T. Telomerase activity in normal malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (20): 9082~ 9086
- 10 Harle B C, Boukamp P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (13): 6476~ 6481
- 11 Greider C W, Blackburn E H. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*, 1996, **274** (2): 92~ 97
- 12 陶慰孙 (Tao W S) 编著. 蛋白质分子基础. 北京: 人民教育出版社, 1981. 93
- 13 Woodring E W, Jerry W S, Mieczyslaw A P. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucl Acids Res*, 1995, **23** (18): 3794~ 3795

A TRAP Assay on Human Colonic Tumor Telomerase

Activity. GU Shao-Hua, JIANG Guang-Ping¹⁾, CAO Ger-Tao²⁾, SHENG Ji-Qun, LIU Jian-Ping, DAI Jian-Liang³⁾, LIN Qing, LIN Yuan, LI Shi-Zhong⁴⁾, LIU Wei-Ping, XIE Yi (*Institute of*

Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China; ¹⁾ *Shanghai Clon Biotechnology Corporation Limited, Shanghai 200433, China;* ²⁾ *Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;* ³⁾ *Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China;* ⁴⁾ *Hospital of Changhai, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China).*

Abstract A TRAP assay on human colonic tumor telomerase activity is reported. The reliable result is obtained when 1.8 mmol/L Mg^{2+} and 55 °C annealing temperature are adopted. The other two factors affecting reliability are quantity of the extract and contamination of the positive DNA fragments in the reaction.

Key words human colonic tumor tissue, telomerase activity, telomeric repeat amplification protocol

反相高效液相层析在糖化白蛋白肽段 分离纯化中的应用*

梁 逊 李顺子

(南开大学化学系, 天津 300071)

李文兰

(南开大学吸附分离功能高分子材料国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 采用一种简单的“甲醇-水-三氟醋酸”作为洗脱体系的反相高效液相层析 (简称 RP-HPLC) 对通过固相合成方法合成的糖化白蛋白肽段进行了分析鉴定和分离纯化。使用酸敏性 PEG 载体, Fmoc 保护化学法合成了白蛋白八肽 NH_2 -Lys-Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH。对其 N 端 Lys 进行糖化反应后, 经 Sephadex G-10 柱色谱纯化后, 通过 RP-HPLC 分析, 证明得到了糖化八肽的单一峰。使用 Merrifield 树脂, Boc 保护化学法合成了白蛋白七肽 NH_2 -Gln-Thr-Ala-Leu-Tyr-Tyr-Cys-COOH。通过 RP-HPLC 半制备分离提纯后, 得到了所需的肽段。对 N^{α} -Boc-Lys 的 ϵ 氨基进行糖化反应后, 经 RP-HPLC 分析, 证明得到了比较纯的糖化赖氨酸, 与纯化后的白蛋白七肽偶联后, 通过 RP-HPLC 分析, 得到了偶联产物——糖化八肽的单一峰。

关键词 反相高效液相层析, 糖化白蛋白, 糖化赖氨酸

学科分类号 Q5

反相高效液相层析 (RP-HPLC) 特别适用于分子质量不大的蛋白质和多肽物质的分离、纯化和鉴定。与通常的柱层析相比, 具有速度快、灵敏度高、分辨率强的优点, 在生物化学领域起着重要的作用。

糖尿病是当前世界上最常见的代谢内分泌病^[1]。通过对血清糖化蛋白质的研究和临床应

用^[2], 发现随着糖尿病人血糖水平增高, 糖化白蛋白 (glycoalbumin, GA) 的含量也随之增高, 因此 GA 含量的百分数的变化就反映了糖尿病的病情程度^[3,4]。近年来, 国外有人制备了抗 GA 的单克隆抗体, 并用于 GA 的免疫测定^[5,6], 该方法的建

* 国家自然科学基金资助项目 (29474161)。

收稿日期: 1997-10-10, 修回日期: 1998-04-24