

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

伸的温度及时间以及循环次数. 为了能使 PCR 产物直接用于测序并避免模板二级结构对测序反应的影响, 最近我们发现 T7 DNA 聚合酶在低温下(约 0—4°C)仍具有较强的聚合能力, 利用此特性, 我们设计了一种快速可靠的双链 PCR 产物直接测序的方法——热变性后低温延伸和终止法, 介绍如下:

1 选用 T7 测序试剂盒 (Pharmacia).

2 双链模板的制备 PCR 反应结束后, 取少量产物走琼脂糖凝胶电泳, 与 DNA 标准进行比较, 确定产物的特异性并估计其产量. 如果产物特异性很高, 直接将反应产物用酚-氯仿-乙醇法纯化扩增片段, 然后按 20ng/μl 将待测 DNA 片段溶于 TE (pH8.0) 中, 如果有一些非特异性产物, 可用低熔点凝胶回收特异片段, 然后按上述方法纯化沉淀该片段并溶于 TE 中.

3 模板的变性及其与引物的退火 将 10μl 纯化后的模板, 2μl (20pmol) 上游或下游 PCR 引物及 2μl 退火缓冲液, 充分混合后于 98°C 变性 5min, 瞬间离心, 迅速置于冰上.

4 延伸及标记 取冰冷的预混液 6μl (4 单位 T7 DNA 聚合酶, 1μl α-³⁵SdATP, 3μl Labeling Mix A), 迅速加入已退火的引物模板混合液中, 充分混合, 然后分别取 4.5μl 加至标有 A, C, G, T 的 Eppendorff 管壁上 (A, C, G, T 各管中已分别事先加入 A Mix-short, C Mix-short, G Mix-short 和 T Mix-short 各 2.5μl), 瞬间离心, 迅速置于冰中 3—5min.

5 终止反应 将 5μl 终止反应液分别加入 A, C, G, T 各管的壁上, 短时离心, 终止反应.

6 聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影 按常规方法进行.

用上述方法我们对多种 PCR 产物 (如 APC, DCC, MCC, 人 DNA 聚合酶 β 及未知功能 DNA 片段等) 进行序列分析, 均取得满意效果 (见图 1). 与目前实验室常用技术相比,

上述方法有以下特点: a. 采用加热使双链 PCR 产物变为 2 个互补的单链, 简化了分离单

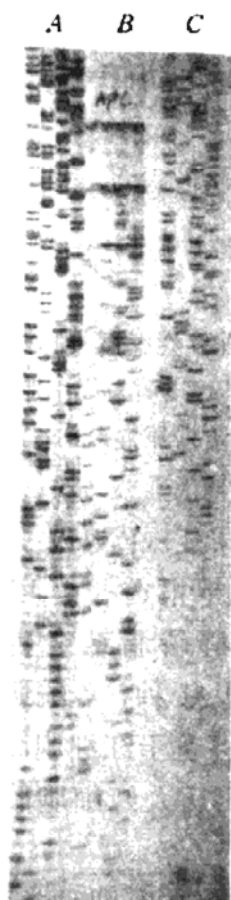


图 1 PCR 产物直接测序结果

A: 未知功能 DNA 片段 (280bp) B: APC 基因组 DNA 的 PCR 产物 (133bp) C: DCC 基因逆转录 PCR 产物 (233bp)

链的过程. b. 利用 T7 DNA 聚合酶低温仍具有较强活性的特点, 在低温下标记和延伸, 避免了双链的复性及单链二级结构的形成. c. 用过量的引物, 以确保模板与引物可瞬间退火以保持其严谨性. d. 具有良好的稳定性. 但要获得好的结果, 需注意以下几点: ① 所有操作均在冰上进行; ② 热变性要充分, 热变性后的模板与引物的复性应瞬间完成, 即瞬间离心后迅速置于冰上; ③ 引物与 DNA 模板的摩尔比约为 100:1, 模板量以 200ng 为宜, 模板量过高会导致较高的前景; ④ 该法特别适合小片段 (250bp 以内) 的序列分析.

利用 T7 DNA 聚合酶在低温下进行测序反应, 国内外尚未见报道, 我们认为上述方法确是一种简便易行的值得推广的 PCR 产物直接测序法.

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 Yaming, 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