

入法,通过肠腺开口使核酸进入肠腺腔内作用于肠腺细胞,此实验模型可在活体内较为直接地研究核酸(或其它药物)对受照射肠腺的存活率的影响,且用量甚微。而肠腺的存活实质上反映了小肠干细胞的存活。

图1和表1表明,小鼠小肠DNA,小牛胸腺DNA,λ噬菌体DNA/EcoRI及pGEM-3zf(+)质粒DNA/HaeIII都能提高受照射小鼠的肠腺存活率,说明不同来源的DNA都有疗效,这同文献上在其它实验对象所得到的结果一致。

由图1可知,随着小肠DNA和胸腺DNA注入剂量的增加,肠腺存活率也随之增高,达到峰值后,则随注入剂量的进一步增加而降低,呈钟形曲线。此结果表明,DNA对照射后肠腺细胞的有益作用有一最佳的剂量值。

一般认为,DNA的分子量越大,对急性放射损伤的疗效越好,但也有不同的意见<sup>[4,9]</sup>。从图3可知,小肠DNA经热变性双链解链后,其活性并未降低。另一方面,表1和图1说明:小肠DNA,其分子大小在23000—4900bp之间,注入剂量为5μg;λDNA经EcoRI酶切成6个片段(21226,7421,5804,5643,4878及3530bp),注入剂量为5μg;pGEM-3zf(+)DNA经HaeIII酶切成13个片段(587,458,434,323,314,289,267,174,142,102,80,18及11bp),注入剂量为2.5μg,而后的肠腺存活率较前两者为高(P<0.01)。由于此实验并不是在等分子数目水平上所做的比较,因此还不能得出DNA的分子大小与其生物活性之间

具有依赖性的判断。但从中可以看出,小至数百个碱基对的DNA片段仍保持着提高肠腺存活率的活性。因此,我们在肠腺细胞所得到的实验结果,似并不支持DNA分子量越大效果越好的观点。至于最适的分子大小究竟是多少,当降解至单核苷酸或甚至更小组分时是否仍保持其活性,这是一个有兴趣的涉及核酸作用机制的问题,我们正在肠腺细胞上对此问题继续加以研究。

承智刚博士对原稿提出宝贵意见,陈萍同志在技术上予以协助,特此致谢

### 参 考 文 献

- 1 周元恺,韩士臣,曾桂英. 军事医学科学院院刊, 1987; (2):88
- 2 曾桂英,韩士臣,刘健. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990;8(4):228
- 3 王娇,周元恺. 军事医学科学院院刊,1990;14(3):174
- 4 周元恺,沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979;(2):70
- 5 Petrovic D.In: Ebert M *et al.* eds, *Current topics in radiation research*, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1968: 251
- 6 陈家佩. 国外军事医学资料第2分册 1973;(2):26
- 7 Кудрячев В Д. Гумвнюк Л И, Цыганков А П. *Радиобиология*, 1978; 18(1):92
- 8 Petrovic D, Ferle-Vidovic A, Habazin V *et al.* *Int J Radiat Biol*, 1970; 18(3):243

## 真核RNA聚合酶II无细胞体外转录体系的构建及其应用

王永俊\* 琦祖和 沈翊珩

(中国医学科学院基础医学研究所,北京 100005)

**关键词** 全细胞提取物(WCE),无细胞转录体系,IL-2Rα基因

近年来,研究真核基因的转录调控已成为分子生物学的热点之一。为了研究DNA元件或蛋白质因子在转录过程中的作用,建立无细胞体外转录体系是十分必要的。到目前为止,发现至少有六种必需的蛋白质因子参与RNA聚合酶II的起始转录<sup>[1]</sup>。绝大部分RNA聚合酶II的无细胞转录体系来自哺乳动物<sup>[2]</sup>或果蝇<sup>[3]</sup>的组织培养细胞的提取物。本文研究了人的白介素-2受体α链基因(IL-2Rα)在HeLa细胞提取物中的转录,所建立的体系也是研究其它真核基因的

表达调控之重要手段。

### 1 材料与方 法

质粒pJSG5,pD16均为本组构建。HeLa细胞系由本所生物物理室惠赠。限制性内切酶为本所内切

\* 现工作单位: 中国人民解放军空军总医院分子生物学研究室,北京100036。

收稿日期: 1991-10-09 修回日期: 1992-03-02

酶组产品。T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 Klenow 片段、RNase 抑制剂购自华美生物工程公司。[ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP (>3000 Ci/mmol) 为美国 NEN 公司产品。丙烯酰胺、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、羟乙基哌嗪乙烷磺酸 (HEPES)、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 为 Sigma 公司产品。ATP, CTP, GTP, UTP,  $\alpha$ -鹅膏蕈碱 ( $\alpha$ -amanitin), 磷酸肌酸 (CP) 为 Boehringer Mannheim 公司产品。放线菌素 D, 溴乙锭为 Fluka 公司产品。RPMI 1640 为 GIBCO/BRL 公司产品。其它试剂均为国产分析纯试剂, 所有溶液均用灭菌双蒸水配制。

1.1 转录模板的构建

质粒 pJSG5 中的 IL-2R $\alpha$  cDNA 插入质粒 pD16 中的上游调控区下游构成质粒 pYJ12, 如图 1 所示。

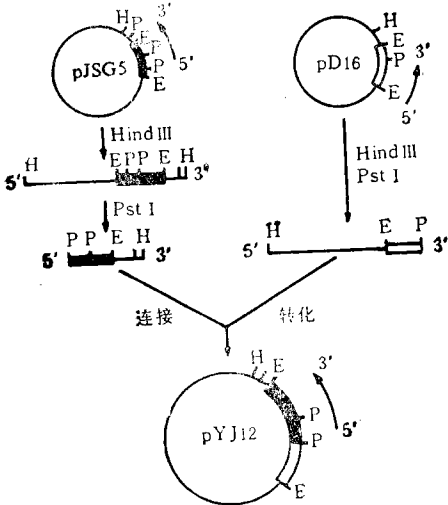


图 1 质粒 pYJ12 构建图

图中黑框是 IL-2R $\alpha$  基因的 cDNA, 白框是 IL-2R $\alpha$  的调控区。

1.2 细胞培养及全细胞提取物的制备

HeLa 细胞贴满瓶壁后用胰酶 EDTA 消化, 在 4°C, 2000 × g 离心收集细胞, 用 PBS (每升水中含 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 1.56g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g) 洗两次后, 记录细胞压积 (PCV)。全细胞提取物的制备按照 Manley<sup>[4]</sup> 的方法进行, 但是在透析液中加入终浓度为 1m mol/L 的 PMSF。

1.3 体外转录实验及转录产物的电泳分析

参照 Manley<sup>[4]</sup> 的方法, 作如下的修改: 为抑制蛋白酶和 RNase 的活性, 在 20 $\mu$ l 转录体系中加入蛋白酶抑制剂 PMSF (0.5 mmol/L) 和 RNase 抑制剂 RNasin (20—40U)。ATP, CTP 及 UTP 各为 0.5 mmol/L。[ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP 的比活性大于 3000Ci/mmol。 $\alpha$ -鹅膏蕈碱和放线菌素 D 的终浓度分别为 1 $\mu$ g/ml 和

200 $\mu$ g/ml。30°C 保温 60min 后, 加入 180 $\mu$ l 反应终止液 (10mmol/L Tris-HCl pH7.6, 1% SDS, 10mmol/L EDTA, 250 $\mu$ g/ml 酵母 tRNA)。先后经酚-氯仿、氯仿-异戊醇抽提及 NaAc/乙醇沉淀后将转录产物溶解在 20 $\mu$ l 载样缓冲液 (50% 甲酰胺, 50% H<sub>2</sub>O, 0.01% 二甲苯胺, 0.01% 溴酚蓝) 中, 再加入 5 $\mu$ l 5 × TBE (1 × TBE: 89mmol/L Tris, 89mmol/L 硼酸, 2mmol/L EDTA, pH8.3), 100°C 变性 5min, 上样于含 8mol/L 尿素的 4.5% 聚丙烯酰胺变性胶进行电泳, 待溴酚蓝带到达胶下端, 停止电泳, 干燥器加热抽干, 用增感屏 -80°C 自显影 48—96h, 观察结果。

2 结果与讨论

2.1 IL-2R $\alpha$  基因转录模板的构建

质粒 pYJ12 中含有 IL-2R $\alpha$  基因序列从 -350 至 +937, 为避免质粒载体上原核启动子 SP6 和 T7 对转录的干扰, 用限制性内切酶 EcoRI 将 IL-2R $\alpha$  基因从 pYJ12 质粒上切下分离去除载体后作为转录的模板。IL-2R $\alpha$  基因调控区示意图参见文献[5]。

2.2 HeLa 细胞全细胞提取物的制备及 IL-2R $\alpha$  基因的体外转录

本实验从约 6 × 10<sup>8</sup> 个对数生长期的 HeLa 细胞得到的 WCE 蛋白含量一般在 5—10mg/ml 范围内。转录结果见图 2。通过采取: a. 改变模板的长度, 可转录出不同长度的产物; b. 用放线菌素 D 抑制模板的转录活性; c. 用  $\alpha$ -鹅膏蕈碱抑制 RNA 聚合酶的

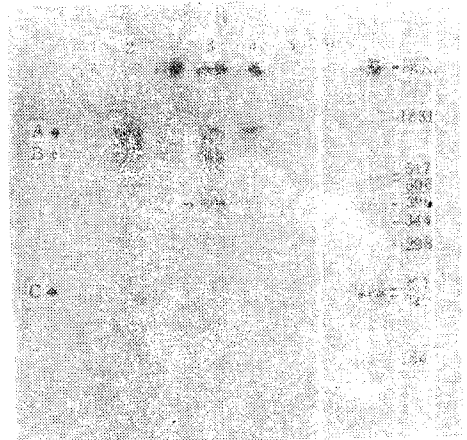


图 2 IL-2R $\alpha$  基因体外转录产物的电泳分析

在标准反应体系中分别含有: 1. 无模板 DNA; 2—6 各管均含 0.75 $\mu$ g 模板 DNA; 3. Sst I 酶切模板; 4. 1 $\mu$ g/ml  $\alpha$ -鹅膏蕈碱; 5. 200 $\mu$ g/ml 放线菌素 D; 6. 反应 1h 后用 20 $\mu$ g RNase A 水解 30min; 7. pBR322/Hinf I 分子质量标准 (右侧数字为 bp 数)

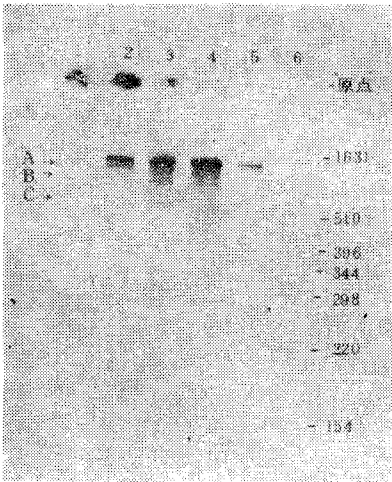
活性等处理, 以证实片段确系 RNA 聚合酶 II 作用下以外源 DNA 为模板的转录产物。

从图 2 可以看出, B 带能够被  $\alpha$ -鹅膏蕈碱完全抑

制,而且对 RNase A 敏感.再从放线菌素 D 的对照看, B 带(908±20 bp) 确系以 IL-2RαDNA 为模板的转录产物. A 带可能是模板的标记产物,因为它不仅不能被 α-鹅膏蕈碱抑制,而且不被 RNase A 水解.由于在 WCE 中 RNA 聚合酶 II 可能从模板的 5' 末端和缺口处进行转录<sup>[4]</sup>,因此 C 带可能是从模板的缺口处的转录产物.

**2.3 体外转录的模板浓度效应**

如图 3 所示,当模板量为 1μg (50 μg/ml) 时,转录产物最多. 如果低于 0.25μg 或高于 1.25μg,几乎没有特异转录产物. 我们还观察到模板浓度与蛋白量之间呈正相关(结果未列出).如果蛋白量过高,可能导致非特异蛋白结合于模板的启动子部位,从而影响转录起始复合物的形成;相反,如果模板浓度过高,则过量的 DNA 分子可能非特异地结合某些转录因子,从而影响形成有效的起始复合物.此外,尽管聚合酶 II 及其相应的转录辅助因子普遍存在于各种细胞中,但不同细胞的 WCE 可能含有完全不同的特异性调控因子或衔接子<sup>[6]</sup>,同时,各类基因启动子结构也有差异,它们与各种主要蛋白质因子的亲和力不一样,所以二者之间的比例并不是固定的. Manley<sup>[4]</sup> 报道,当模板长度小于 300bp 时,应严格控制 DNA 与蛋白的最适浓度.

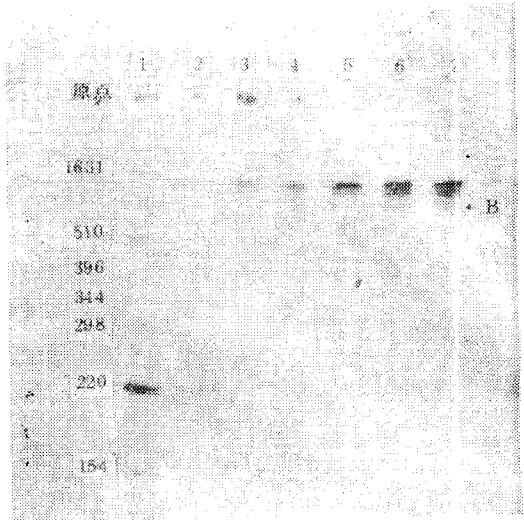


**图 3 体外转录的 DNA 模板浓度效应**  
在标准反应体系中,从 1 至 5 各含 DNA 模板为 0.25μg, 0.50μg, 0.75μg, 1.00μg, 1.25μg. 分子量标准是 pBR322/Hinf I (右侧数字为 bp 数)

**2.4 体外转录反应的时间和温度效应**

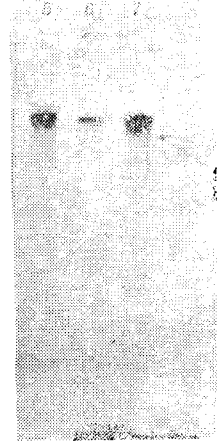
如图 4 所示,转录产物在 2h 内表现出线性动力学效应,而且特异转录产物在反应进行 15min 时即开始出现. 如图 5 所示,当反应升高到 37℃ 时,则不能获得特异转录产物. 此结果与 Manley<sup>[4]</sup> 的报道一致. 另外,由于体外转录的温度比体内低 7℃,所以催化效

率也较低,这可能是体外转录反应可以持续 2h 的部分原因.



**图 4 体外转录的时间效应**

图中 2—7 的反应时间分别为 15,30,45,60,90 和 120 min, 分子量标准是 pBR322/HinfI (左侧数字为 bp 数)



**图 5 体外转录的温度效应**

反应温度分别为 30℃ (5,6) 及 37℃ (7). 6 中含 α-鹅膏蕈碱. 箭头所指为特异转录产物

综上所述,我们所建立的无细胞体系能够正确起始人 IL-2Rα 链基因的转录,而且在 30℃ 转录反应可以持续至少 2h,反应体系中模板 DNA 的最适浓度为 37.5μg/ml.

**参 考 文 献**

- 1 Alan G S, Roberto W. Promoter specificity and production of RNA polymerase II transcription. *FASEB J*, 1989; 3: 1723
- 2 Heintz N, Roeder R G. Transcription of eukaryotic genes in soluble cell-free system. In: Setlow J K *et al.*

- eds, *Genetic engineering* 4, New York: Plenum press, 1982: 57
- 3 Parker C S, Topol J. A *drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell*, 1984; **36**: 357
  - 4 Manley J L, Fire A, Samuels M *et al.* *In vitro* transcription whole-cell extract. *Methods in Enzymology*, 1983; **101**: 568
  - 5 Ernst B, John W L, Miriam S *et al.* The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor alpha gene and type I HIV. *Cell*, 1988; **53**: 827
  - 6 Lewin B. Commitment and activation at pol II promoters: a tail of protein-protein interactions. *Cell*, 1990; **61**(7): 1161

## 重组蛋白 G Fc 结合区单结构域的纯化及理化性质\*

王园园 蔡仕英 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850)

**关键词** 蛋白 G, 重组蛋白 G Fc 结合区, PGFB-2 肽

蛋白 G 是存在于链球菌 C 群和 G 群胞膜上的一种分子量为 65kD 的膜蛋白,完整的蛋白 G 分子主要由四部分组成,其中第三部分能与许多动物的 IgG Fc 段特异结合<sup>[1]</sup>。近年来,蛋白 G 的应用研究已展示出广阔前景<sup>[2-4]</sup>,它一方面可与多种标记物(如酶、放射性同位素、胶体金等)连接,用于免疫分析;另一方面,可用作纯化单克隆抗体及多克隆抗体的亲和配基。但是有关蛋白 G 的空间结构及其与 IgG Fc 的结合机制均了解得很少,我们首次利用 PCR 技术扩增出蛋白 G 中 IgG Fc 结合区单结构域基因片段<sup>[5]</sup>,并在大肠杆菌中高效表达该多肽(简称 PGFB-2 肽),由于该多肽分子量较小,又具有与 IgG 结合的活性,因此有利于用二维核磁、圆二色散等方法对其结构进行分析,从而揭示出蛋白 G 与 IgG Fc 段结合的分子机制。本文就大肠杆菌表达的 PGFB-2 肽的纯化及理化性质进行了研究,为蛋白 G 的应用和进行结构与功能关系的分析提供了材料。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料、试剂

大肠杆菌 RR1 (pBG<sub>2</sub>) 工程菌由本室构建<sup>[5,11]</sup>其表达的 PGFB-2 肽含天然蛋白 G 的 C3 结构域,并在其 C 端融合了载体质粒的 17 个氨基酸。Sephadex G50 为 Pharmacia 公司产品,辣根过氧化物酶的人 IgG 由本室卢秀桂老师提供。氨基酸序列分析试剂为进口产品,其它常规试剂均为国产。

#### 1.2 分析技术

1.2.1 以牛血清白蛋白为标准,用染料结合法<sup>[6]</sup>

测定蛋白质含量。

1.2.2 酶联免疫法测 PGFB-2 肽与 IgG 结合活性。将 PGFB-2 肽包被到酶联板上,然后用 1% 牛血清白蛋白封闭,再加酶标 IgG,最后用邻苯二胺作底物显色,测 A<sub>490</sub>, P/N 值大于 2.1 为阳性。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(简称 PAGE)<sup>[7]</sup> 鉴定蛋白质纯度。电极缓冲液含 0.25mol/L Tris, 1.92 mol/L 甘氨酸 pH8.3。

1.2.4 用十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE<sup>[7]</sup> 及蛋白质印迹(Western blot)测定蛋白质分子量<sup>[8]</sup>,用电聚焦电泳(IEF)<sup>[9]</sup> 测定蛋白质的等电点。

1.2.5 用 Edmann 降解法<sup>[10]</sup>测定氨基酸顺序。

#### 1.3 纯化过程

##### 1.3.1 细胞裂解液上清的制备

RR1 (pBG<sub>2</sub>) 工程菌 30℃ 培养过夜,次日 5% 扩增培养至 A<sub>600</sub> = 0.5 左右,提高温度至 42℃,继续培养 4h,诱导 PGFB-2 肽的表达,然后收集菌体,超声破碎,12000g 离心 30min 取上清液。

##### 1.3.2 Sephadex G50 柱层析

制备 Sephadex G50 层析柱(2cm × 74cm),用 0.01mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4 平衡,上样后以平衡缓冲液洗脱,紫外检测,部分收集器收集样品。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 纯化结果

将大肠杆菌诱导表达的 PGFB-2 肽裂解液上清

\* 属国家自然科学基金资助课题的一部分。

收稿日期: 1991-10-09 修回日期: 1992-03-23