

果未显示)。

**3.3 hTNFD3 与原型人 TNF 相比, 比活性升高达  $10^3$  数量级, 这比单独缺失 N 端的氨基酸或单独将 157 位 Leu 改为 Phe 引起的活性升高都要大<sup>[11,12]</sup>, 其原因可能是 hTNFD3 形成的三聚体更稳定, 更有利于与 TNF 受体的结合. 上述结果也提示, 多种增强 TNF 活性的突变有叠加效果. hTNFD3 是否达到了 TNF 作用的极限, 是否还有活性更强的 TNF 衍生物, 尚需进一步的研究. Soma 等曾报道, TNF 氨基端碱性增强可使 TNF 抗肿瘤谱扩大<sup>[13]</sup>, 因此我们将原型人 TNF8, 9, 10 位的 Pro Ser Asp 改为 hTNFD3 中 1, 2, 3 位的 Arg Lys Arg, 但目前尚未发现 hTNFD3 有更大的抗肿瘤谱 (结果未显示)。**

### 参 考 文 献

1 Thomas H, Balkwill F R. *Pharmac Ther*, 1991; **52**: 307

- 2 Porter A G. *Trends in Biotechnology*, 1991; **9**: 158
- 3 李昌本, 柴常星, 谢毅等. *中国科学 B 辑*, 1991; (5): 497
- 4 Aggawal B B, Kohr W J, Hass P E *et al.* *J Biol Chem*, 1985; **260**: 2345
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 302
- 7 Laemmli U K. *Nature*, 1970; **227**: 680
- 8 Kramer W, Fritz H J. *Methods Enzymol*, 1987; **154**: 367
- 9 Jones D H, Howard B H. *Biotechniques*, 1991; **10**: 62
- 10 Gheysen D, Iserentant D, Derom C *et al.* *Gene*, 1982; **17**: 55
- 11 Creasey A A, Doyle L V, Reynolds M T *et al.* *Cancer Res*, 1987; **47**: 145
- 12 Kamijo R, Takeda R, Nagumo M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **160**: 820
- 13 Soma G I, Kitahara N, Tsuji Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; **148**: 629

## γ 射线诱发大鼠胚胎细胞转化与 N-ras 的激活

陈昌虎 姚开泰\*

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

C. C. LING

(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, N. Y. USA)

**摘要** 以 γ 射线诱发转化的大鼠胚胎细胞 (REC: myc: Y33) 的 DNA 构建粘粒基因库, 用总基因库 DNA 转染 NIH/3T3 细胞, 产生转化灶的 DNA 作二轮转染, 二轮转化的 NIH/3T3 细胞内有大鼠 REC: myc: Y33 DNA 中具转化活性的 N-ras 基因, 用不对称 PCR 和 DNA 序列分析法证明, REC: myc: Y33 细胞中鼠 N-ras 的活化是由于第 61 位密码子的 A→G 点突变. NIH/3T3 转化灶中鼠 N-ras 也有同样点突变, 但 NIH/3T3 细胞的内源性 N-ras 基因则无此突变.

**关键词** γ 射线, 鼠胚胎细胞转化, N-ras 基因活化

流行病学调查及动物实验证实, 放射线能够引发人及动物肿瘤. 但其引发肿瘤的分子机理至今未明. 自从发现了瘤基因和抑瘤基因, 人们推测放射线致瘤可能涉及某些瘤基因的激活及抑瘤基因的失活<sup>[1]</sup>, 且有人在放射线引发

的动物肿瘤中发现了活化的瘤基因<sup>[2]</sup>.

在体外实验中放射线能诱发某些细胞的恶性转化, 但仍无证据说明细胞转化与特定的瘤

\*通讯联系人.

收稿日期: 1993-05-11, 修回日期: 1993-08-02

基因激活有关. 本文报道  $\gamma$  射线诱发大鼠胚胎细胞转化是由于激活了细胞的 N-ras 基因, 并进一步揭示了 N-ras 基因的激活是由于该基因的第 61 位密码子突变而使其编码的蛋白质的第 61 位氨基酸由正常的谷氨酰胺变成精氨酸所致.

## 1 材料与方法

**1.1 细胞与细胞培养** REC 即大鼠胚胎细胞; REC : myc 细胞为经 PMV-7/c-myc 重组病毒感染而永生化的含有人 c-myc cDNA 的 REC 细胞. REC : myc 细胞能在体外无限制传代生长, 但在软琼脂中不生成细胞集落, 在裸鼠体内亦无致瘤性. REC : myc :  $\gamma$  细胞则为经  $\gamma$  射线转化的 REC : myc 细胞株, 本实验中所用的 REC : myc :  $\gamma$ 33, REC : myc :  $\gamma$ 14, REC : myc :  $\gamma$ 41, REC : myc :  $\gamma$ 66, REC : myc :  $\gamma$ 93, 及 REC : myc :  $\gamma$ 95 均能在软琼脂中生长且在裸鼠体内具致瘤性<sup>[3]</sup>; NIH/3T3 细胞为小鼠成纤维细胞, 在本实验中用作转染试验的受体细胞. 本实验所用的全部细胞除另加说明外均在含有 10% 的胎牛血清, 适量抗生素的 DMEM 培养基中于 37 C, 5% 的 CO<sub>2</sub> 环境中生长.

**1.2 粘粒 (cosmid) 基因库的组建及总基因库 DNA 的提取** 按 Dilella 等<sup>[4]</sup>介绍的方法进行. 用作组建基因库的载体为 pWE15 (图 1). REC : myc :  $\gamma$ 33 细胞 DNA 经 Mbo I 部分消化后进行蔗糖密度梯度离心, 收集介于 31—50kb 的 DNA 片段与经 BamH I 消化, 5' 端去磷酸化的 pWE15 载体连接后进行体外包装, 包装物用于感染 NM554 宿主菌即得粘粒基因库. 应用碱变性法抽提总基因库 DNA.

**1.3 DNA 介导的基因转移** 采用改良的 Graham 磷酸钙沉淀法<sup>[5]</sup>. 用总基因库 DNA 制备 DNA-磷酸钙沉淀, 加入到 NIH/3T3 受体细胞培养过夜. 次日弃去含磷酸钙沉淀的培养基, 加入新鲜培养基继续培养 24h. 转染细胞经胰酶消化后以 1 : 10 传入含有 400  $\mu$ g/ml G418 的 DMEM 选择培养基中筛选. 每周换液二次,

直至肉眼可见的转化灶出现.

**1.4 高分子量 DNA 的提取及 Southern 印迹杂交** 按文献<sup>[6]</sup>方法进行.

**1.5 PCR, 不对称 PCR 及 DNA 序列分析** 每一个 PCR 反应的总体积为 100  $\mu$ l, 含有 1  $\mu$ g 细胞高分子量 DNA, 400  $\mu$ mol/L 引物, 200  $\mu$ mol/L dNTP, 50  $\mu$ mol/L KCl, 1.5  $\mu$ mol/L MgCl<sub>2</sub> 及 10  $\mu$ mol/L Tris · HCl (pH8.3) 和 2.5U Taq DNA 多聚酶. PCR 于 PCR 仪中进行 30 个温度循环, 每个循环为 95 C 1min, 59 C 1min, 72 C 1min. PCR 结束后取 10  $\mu$ l 产物作为引物进行不对称 PCR (asymmetric PCR) 以产生用于 DNA 序列分析的单链 DNA. 不对称 PCR 与 PCR 基本相同, 只是在每一个不对称 PCR 反应中仅有一个引物. 不对称 PCR 产生的单链 DNA 经氯仿抽提, 重沉淀纯化后溶于 30  $\mu$ l 蒸馏水中. 取 7  $\mu$ l 单链 DNA 作为模板, 采用 Sequenase<sup>™</sup> version 2.0 DNA 序列分析试剂盒, 以 <sup>35</sup>S-dATP 参入标记. 按厂家 (United States Biochemical, Cleveland, OH, USA) 提供的操作程序进行 DNA 序列分析.

## 2 结 果

### 2.1 REC : myc : $\gamma$ 23 基因库 DNA 有转化基因活性

REC : myc :  $\gamma$ 33 粘粒基因库组建后提取总基因库 DNA 作转染试验. 用于组建基因库的载体 pWE15 为一穿梭载体, 含有两个抗药基因 (图 1), 一个为氨苄青霉素抗性基因, 另一个是新霉素抗性基因. 用作转染受体细胞的

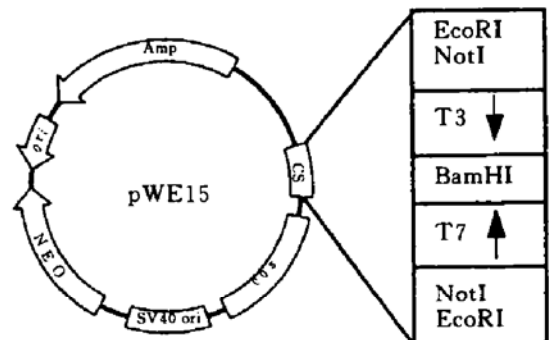


图 1 用于组建粘粒基因库的载体 pWE15

NIH/3T3 细胞转染后于 G418 选择培养基中生长。在第一轮转染试验中 880 $\mu$ g 总基因组 DNA 转染后在 G418 选择培养基中得到约  $6 \times 10^4$  细胞集落，最后有 7 个肉眼可见的转化灶出现 (表 1)。将 7 个转化灶扩大培养后抽提高分子量 DNA 进行 Southern 印迹杂交，发现所有转化灶细胞均摄入了外源性的重组粘粒，少则 5 个拷贝，多则 20—30 拷贝。图 2 为第一轮转化灶细胞 DNA 与  $^{32}$ P-标记的 pWE15 载体杂交后所得的放射自显影图。以上所述说明总基因组 DNA 中含有转化基因，当转染进入 NIH/3T3 受体细胞后能使其转化而形成转化灶，而每一转化灶细胞都摄入了外源性 DNA。

表 1 NIH/3T3 细胞转染试验

转染试验	DNA 用量 / $\mu$ g	G418 抗性集落	转化灶	转化率 / (转化灶/ $\mu$ g DNA)
一轮转染	880	60 000	7	0.008
二轮转染	500	300	5	0.01

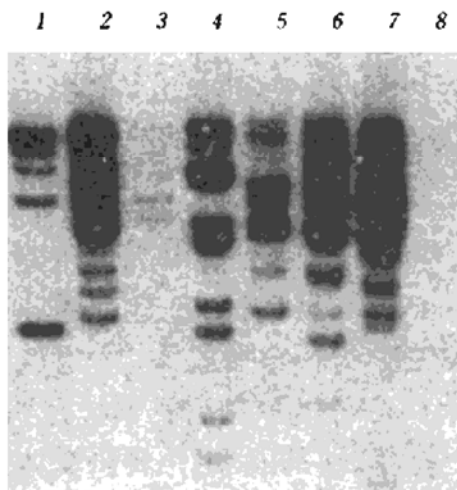


图 2 NIH/3T3 第一轮转化灶 DNA 与载体 pWE15 杂交放射自显影图  
1-7 分别为 7 个第一轮转化灶细胞 DNA，8 为 NIH/3T3 细胞 DNA。

### 2.2 N-ras 是存在于 REC : myc : Y33 细胞中的转化基因

为了进一步确定存在于 REC : myc : Y33

细胞中能转化 NIH/3T3 受体细胞的转化基因，转化灶 4 的细胞大分子量 DNA 被直接用于 NIH/3T3 细胞的第二轮转染试验。第二轮转染细胞亦接种于 G418 选择培养基中进行筛选。值得提出的是在第二轮转染过程中转染细胞对 G418 的抗性来自第一轮转化细胞摄取并整合入基因组的 G418 抗性基因，该基因存在于 pWE15 载体。如表 1 所示第二轮转染试验 DNA 用量为 500 $\mu$ g，最后得到 5 个转化灶。5 个第二轮转化灶经扩大培养，提取高分子量 DNA 后进行 Southern 印迹杂交。图 3a 为与载体 pWE15 杂交所得的放射自显影图象。1-5 为 5 种第二轮转化灶细胞 DNA。可见两轮转染后只有一个拷贝的 pWE15 存在于各转化灶细胞内。6 为 NIH/3T3 细胞 DNA，原本就不含有 pWE15 序列。图 3b 为与小鼠 N-ras 基因杂交的放射自显影结果，其中 6 为 NIH/3T3 细胞 DNA，只在 2.5kb 分子量处见一杂交带，而在 1-5 五个第二轮转化灶细胞中除见到一条与 NIH/3T3 细胞一样的分子量为 2.5kb 的杂交信号外尚有一条分子量较大 (30—32kb) 的额外杂交带出现。2.5kb 处的杂交信号为 3T3 受体细胞内源性 N-ras 基因，而 30—32kb 处出现的杂交信号则显示转化灶细胞中含有一个外来的 N-ras 基因，是第一轮转染过程中被 3T3 受体细胞所摄取，且因维持转化表型的需要而在第二轮转染过程中被保存下来。值得注意的是 5 种第二轮转化灶细胞 DNA 与小鼠 N-ras 探针杂交的额外的杂交信号与用 pWE15 载体序列杂交时所得的杂交信号完全重叠。说明外来的 N-ras 基因与 pWE15 载体连锁。这些资料显示在用 REC : myc : Y33DNA 组建的粘粒基因库中，一个含有活化 N-ras 基因的重组粘粒在第一和第二轮转染过程中起着转化作用。图 3c 用人 Ha-ras 基因作探针进行 Southern 印迹杂交，在 5 种转化灶细胞 DNA 中没有发现额外的 Ha-ras 基因存在。同时用 K-ras, myb, fos, fms 以及其他数种已克隆的瘤基因进行杂交都未见额外的杂交信号。

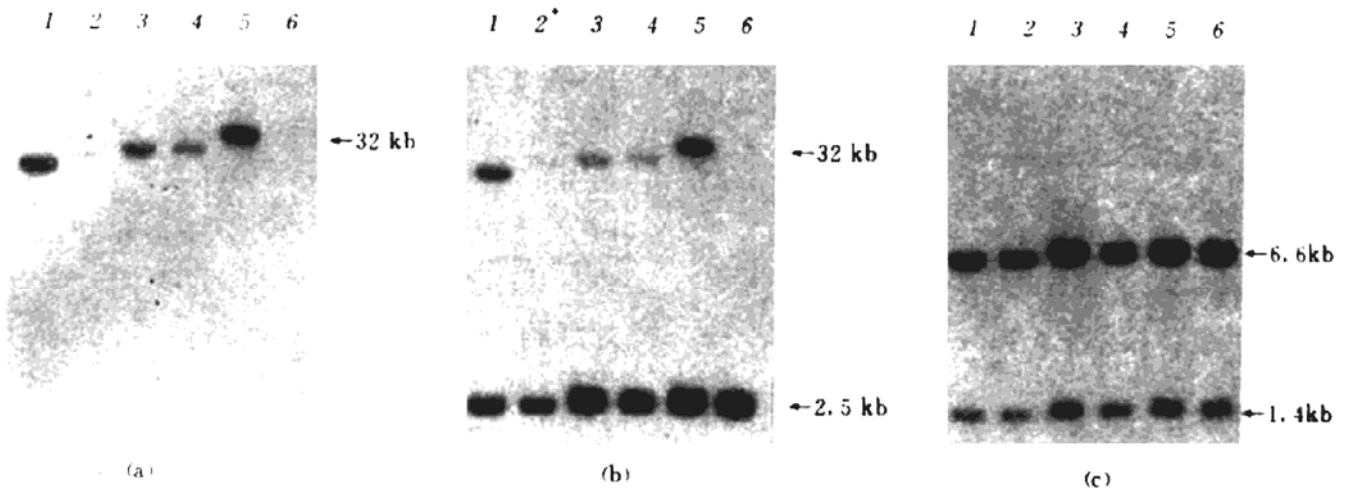


图3 NIH/3T3 第二轮转化灶细胞 DNA 分别与 pWE15 (a); 小鼠 N-ras 基因 (b); 及人 Ha-ras 基因 (c) 杂交放射自显影图

1—5 分别为 5 种二轮转化灶细胞 DNA, 6 为 NIH/3T3 细胞 DNA.

### 2.3 N-ras 基因在 REC : myc : Y33 细胞中由于点突变被激活

N-ras 被发现为存在于 REC : myc : Y33 细胞中的转化基因, 而 REC : myc : Y33 是 REC : myc 细胞经  $\gamma$  射线转化得到的恶性细胞株. 以前的资料显示<sup>[3]</sup>, REC : myc : Y33 细胞 N-ras 基因并无重排和扩增, 它的表达亦无太大改变, N-ras 在 REC : myc : Y33 细胞中被激活的最可能机制是通过点突变. 为了弄清楚这一问题, 采用 PCR 技术将 N-ras 基因扩增出来再进行 DNA 序列分析. 我们知道, ras 基因家族的点突变多发生在第 1 外显子内的第 12, 13 及第 2 外显子内的第 59 到 61 位密码子部位, 故首先进行第 1 第 2 外显子的 DNA 序列分析. 因为大鼠 N-ras 基因的核苷酸序列尚无报导, 用作 PCR 的引物则根据小鼠 N-ras 的序列进行设计<sup>[7]</sup>. 引物序列如表 2 所示. 如

表 2 PCR, 不对称 PCR 及序列分析的引物

a	5' ATGACTGAGTACAAACTGGT	3'
b	5' CTCTATGGTGGGATCATATT	3'
d	5' CTGTAGAGGTTAATATCTGC	3'

图 4 所示, PCR 时首先用引物 a 和 d 将 N-ras 的第 1 外显子、第 1 内含子及第 2 外显子扩增

在同一 DNA 片段中, 所得的 PCR 产物作为模板再用引物 a 进行不对称 PCR, 产生供序列分

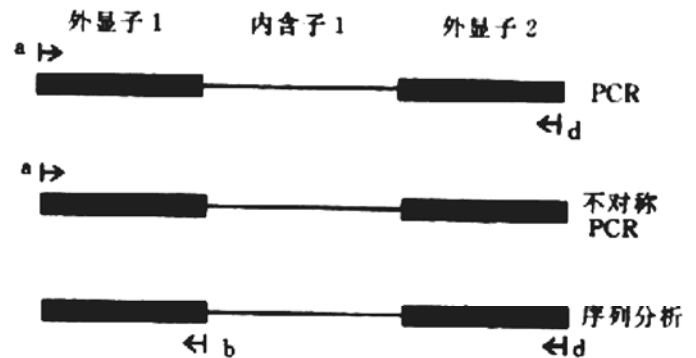


图 4 PCR, 不对称 PCR 及 DNA 序列分析时引物与模板的结合部位

图示 N-ras 第 1 外显子, 第 1 内含子及第 2 外显子.

析用的单链 DNA. 之后分别用引物 b 和 d 对 N-ras 的第 1 和第 2 外显子进行 DNA 序列分析. 图 5a 为 REC : myc 细胞 N-ras 第 2 外显子的部分 DNA 序列, 箭头所指部位为第 61 位密码子 CAA, 编码谷氨酰胺; 图 5b 显示 REC : myc : Y33 N-ras 第 2 外显子的部分序列, 箭头所指的 61 位密码子, 除一个正常的等位基因第 61 位密码子为 CAA 外, 另一个等位基因的第 61 位密码子发生了突变成为 CGA, 该密码子编码的氨基酸则由正常的谷氨酰胺变

成精氨酸. N-ras 第 1 外显子的序列 REC : myc : Y33 细胞中并未发现有突变的存在.

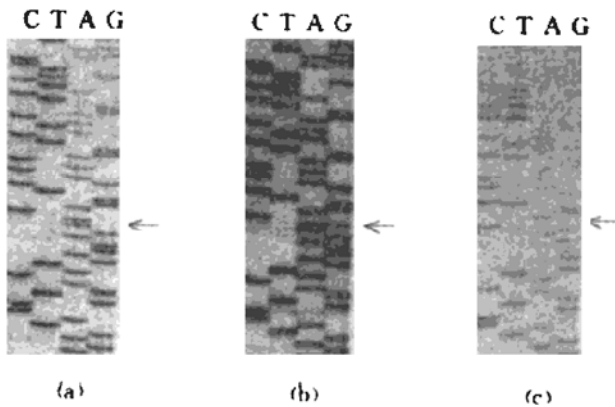


图 5 大鼠 N-ras 基因第 2 外显子部分 DNA 序列

箭头所指部位为第 61 位密码子, (a) REC : myc 细胞 N-ras 第 2 外显子部分序列, (b) REC : myc : Y33 N-ras 第 2 外显子部分序列, (c) NIH/3T3 第二轮转染细胞中 (转化灶细胞中) 来自 REC : myc : Y33 N-ras 的第 2 外显子部分 DNA 序列.

在用 PCR 技术扩增 REC : myc : Y33 粘粒基因库转染所得的 NIH/3T3 第二轮转化灶细胞中的 N-ras 基因时一个意外收获使我们能够分别进行 NIH/3T3 受体细胞内源性 N-ras 和转染过程中摄入的外源性 N-ras 即来自于 REC : myc : Y33 粘粒基因库的 N-ras 第 1 和第 2 外显子的 DNA 序列分析. 如图 4 所示, 用引物 a 和 d 进行 PCR 时所得到的扩增片段除包含 N-ras 基因第 1 和第 2 外显子尚包括介于其间的第 1 内含子. 由于大鼠和小鼠细胞 N-ras 基因第 1 内含子长度上的差异, 用第二轮转化灶细胞 DNA 进行 PCR 时所得到的含有第 1 和第 2 外显子以及第 1 内含子的 N-ras 基因片段来自小鼠 3T3 细胞内源性 N-ras 的较来自转染过程中摄入的大鼠 N-ras 基因的片段为小, 故 PCR 后能得到分子量不同的二个 DNA 片段. 图 6 为 5 个第二轮转化灶细胞 DNA 与 NIH/3T3 受体细胞 DNA 以及 REC : myc : Y33 细胞 DNA 经引物 a 和 d 进行 PCR 后, PCR 产物的琼脂糖电泳照相. 从图 6 中可

见到 5 种第二轮转化灶 DNA 经 PCR 后得到的两个 DNA 片段, 其中一个与用 3T3 受体细胞 DNA 进行 PCR 时所得的片段分子量相同, 说明是来自受体细胞内源性 N-ras 基因; 另一片段分子量则与用 REC : myc : Y33 DNA 进行 PCR 时产生的 DNA 片段分子量相同, 源自转染过程中摄入的外源性 N-ras 基因. 将用转化灶细胞 DNA 进行 PCR 时所得到的两个 DNA 片段分别从琼脂糖凝胶中切下, 纯化后分别作为模板进行不对称 PCR 产生单链 DNA 后直接进行 N-ras 第 2 外显子的 DNA 序列分析. 图 5c 为第二轮转化灶细胞中 大鼠 N-ras 第 2 外显子的部分 DNA 序列. 箭头所指的 61 位密码子为突变了 CGA, 且无正常的等位基因. 说明在第二轮转化灶细胞中外源性的 N-ras 基因是突变了 N-ras, 正是它使 NIH/3T3 受体细胞发生转化而形成转化灶. 另一片段的序列分析证明该片段来自于 3T3 受体细胞的内源性 N-ras, 第 1, 第 2 外显子的序列与小鼠正常的 N-ras 基因序列完全相同.

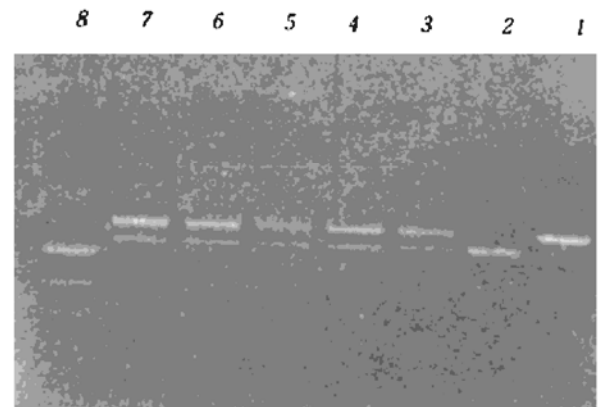


图 6 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

用引物 a, d 进行 PCR 扩增 NIH/3T3 第二轮转化灶细胞内 N-ras 基因的第 1 外显子 + 第 1 内含子 + 第 2 外显子的 DNA 片段. 1 为 REC : myc : Y33 DNA; 2 为 NIH/3T3 DNA; 3-7 为 5 种第二轮转化灶细胞 DNA; 8 为  $\phi$ X174 Hae III 分子量标志.

### 2.4 N-ras 第 61 位密码子点突变在 REC : myc : Y 细胞中是一个比较普遍的现象

除 REC : myc : Y33 细胞 DNA 经上述实

验证实含有一个突变激活的 N-ras 基因外, 我们用 PCR 技术和 DNA 直接测序法对另外 5 株 REC : myc :  $\gamma$  细胞, REC : myc :  $\gamma$ 14, REC : myc :  $\gamma$ 41, REC : myc :  $\gamma$ 66, REC : myc :  $\gamma$ 93 及 REC : myc :  $\gamma$ 95 细胞中的 N-ras 第 2 外显子进行 DNA 序列分析. 发现所有这些经  $\gamma$  射线转化的恶性细胞株, 除 REC :

myc :  $\gamma$ 95 以外其 N-ras 第 61 位密码子都发生了突变, 且都是由 CAA 变为 CGA, 致使其编码的氨基酸由谷氨酰胺变成精氨酸. 图 7 显示这些恶性细胞株中 N-ras 基因第 2 外显子的部分 DNA 序列. 箭头所指部位为第 61 位密码子中间的一个核苷酸.

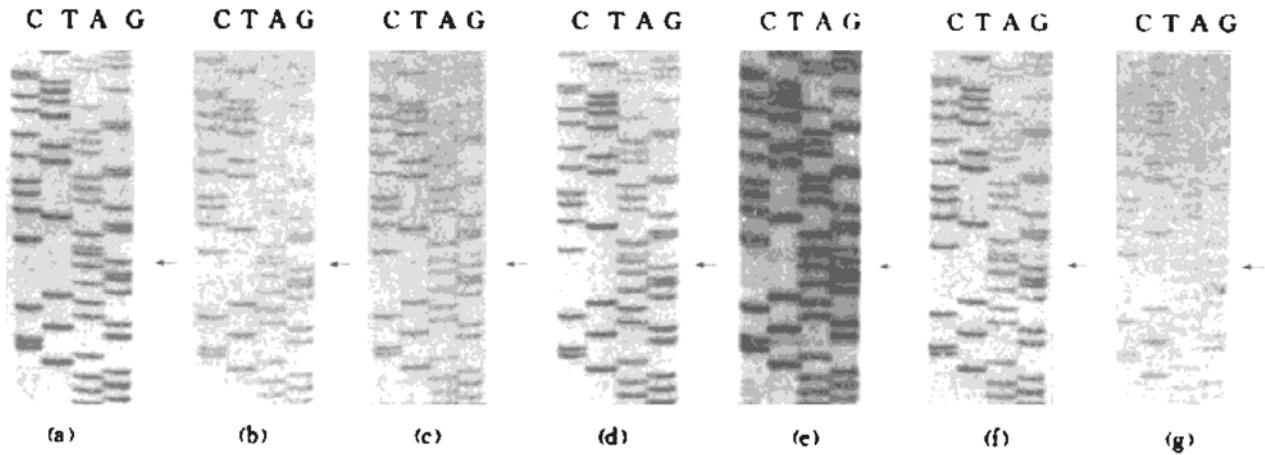


图 7 各种不同细胞株内 N-ras 基因第 2 外显子的部分 DNA 序列

箭头所指为第 61 位密码子. (a) REC : myc 细胞 N-ras, 及 (b) REC : myc :  $\gamma$ 95, (c) REC : myc :  $\gamma$ 14, (d) REC : myc :  $\gamma$ 41, (e) REC : myc :  $\gamma$ 33, (f) REC : myc :  $\gamma$ 66, (g) REC : myc :  $\gamma$ 93 细胞内 N-ras 基因第 2 外显子部分 DNA 序列.

### 3 讨 论

shuin 等<sup>[9,9]</sup>报导 X 射线转化的 C3H/10T1/2 细胞中 c-myc 的表达有所增高而 c-fos 表达下降. 用同一种细胞进行的研究并未发现放射线的转化作用与 ras 家族成员的激活有关<sup>[10,11]</sup>. 可是这些实验都提示放射线对细胞的转化作用是通过激活尚未鉴定的转化基因, 但至今未见到后续文章发表.

大鼠胚胎细胞以前被成功地用于研究 ras 与 myc 基因在细胞转化过程中的协同作用<sup>[12]</sup>. Land 等发现仅 ras 或 myc 基因不能完全转化大鼠胚胎细胞, 只有它们共同作用才能使正常细胞完全转化. Endlich 等<sup>[3]</sup>发现  $\gamma$  射线并不能使 REC 细胞转化但能转化含有人 c-myc 基因的 REC : myc 细胞, 认为  $\gamma$  射线通过激活细胞中的另外一个基因, 该基因与人为导入的 c-myc 基因协同作用才使 REC 细胞完全转化.

本文所述的研究揭示了  $\gamma$  射线转化 REC : myc 细胞是由于激活了细胞内的 N-ras 基因, 并证明了 N-ras 的激活是其第 61 位密码子的 CAA $\rightarrow$ CGA 点突变致使其编码的蛋白质第 61 位氨基酸由正常的谷氨酰胺变成精氨酸所致. 有趣的是在 6 株用于本研究 REC : myc :  $\gamma$  细胞中有 5 株有 N-ras 第 61 位密码子的突变且都是 CAA $\rightarrow$ CGA.

以前人们发现化学致癌物在体外引发细胞转化是通过点突变激活特定的瘤基因. 本实验结果则强烈提示  $\gamma$  射线是通过激活 N-ras 基因, 并通过 N-ras 与 myc 的协同作用才能使 REC 细胞转化.

实验中有一株  $\gamma$  射线转化的细胞 REC : myc :  $\gamma$ 95, 不含有点突变的 N-ras 基因, 说明  $\gamma$  射线通过激活 N-ras 并不是其转化 REC : myc 细胞的唯一途径. REC : myc :  $\gamma$ 95 细胞 DNA 在 NIH/3T3 细胞转染试验中被证明有

转化基因活性(资料未显示)说明 $\gamma$ 射线还可能激活其它基因而与 myc 合作而使正常 REC 细胞发生转化. REC : myc :  $\gamma$ 95 细胞中存在的转化基因的进一步鉴定对我们进一步弄清 $\gamma$ 射线转化细胞的分子机理是十分有用的.

### 参 考 文 献

- 1 Bishop J M. Cell, 1991; 64: 235
- 2 Guerrero I, Calzada P, Mayer A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 202
- 3 Endlich B, Salavati R, Sullivan T *et al.* Radiat Res, 1992
- 4 Dilella A G, Woo S L C. Methods in Enzymology, 1987; 152: 199
- 5 Graham F L, Van der Eb A J. Virology, 1973; 52: 456

- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Guerrero I, Villasante A, Corces V *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 7810
- 8 Shuin T, Billings P C, Lillehaug J R *et al.* Cancer Res, 1986; 46: 5302
- 9 Billings P C, Shuin T, Lillehaug J *et al.* Cancer Res, 1987; 47: 3643
- 10 Borek C, Ong A, Mason H. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 794
- 11 Krolewski B, Little J B. Mol Carcinogen, 1989; 2: 27
- 12 Land H, Parada L F, Weinberg R A. Nature, 1983; 304: 596

# 长半衰期重组人超氧化物歧化酶的研制及性质

骆训懿 王晶翼 谢邦铁 李战青 刘晓琳 陈晓穗

(海军总医院分子生物学研究室, 北京 100037)

**摘要** 一种双亲有机化合物聚苯乙烯马来酸丁酯(SMA)经酰胺键与重组人铜锌超氧化物歧化酶(rhCu/Zn SOD)共价交联,制得修饰酶.当42%游离氨基被修饰时,保留酶活力为88%.酶蛋白主链结构在修饰前后变化不大.与天然酶相比,修饰酶的生物半衰期延长了22倍,抗蛋白水解酶能力亦有所增强.

**关键词** 超氧化物歧化酶,蛋白质化学修饰,聚苯乙烯马来酸丁酯,基因工程

超氧化物歧化酶(SOD)作为新型酶制剂具有重要的医用价值.但是由于生物半衰期短及异体免疫原性等问题,使其临床应用受到局限.我们于1990年得到在大肠杆菌中高效表达,并经亲和层析纯化比活达4000U/mg以上的重组人铜锌SOD(rh Cu/Zn SOD)<sup>[1]</sup>.但是该基因工程SOD制品仍存在半衰期短的问题.解决的途径之一是对酶分子进行适当的化学修饰.聚苯乙烯马来酸丁酯(SMA)是一种双亲中分子有机化合物,曾作为修饰剂与抗肿瘤药物neocarzinostatin(NCS)交联,通过延长生物半衰期使NCS的药理作用显著增强<sup>[2]</sup>.本文将SMA与rh Cu/Zn SOD交联,并

对所得修饰酶的理化及生物学性质进行了探讨.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌种,本室构建的含pCZS2载体的大肠杆菌.聚苯乙烯马来酸丁酯, Aldrich 产品. Sephadex G75, Pharmacia 产品.

### 1.2 方 法

**1.2.1 rh Cu/Zn SOD 在大肠杆菌中的表达<sup>[1]</sup>** 含pCZS2载体的大肠杆菌接种于LB液体培养基中,32℃振荡培养,当细胞密度达

8-hydroxyguanine. fluorescence products.  
lipid. DNA

**Apoptosis and Oncogenes.** Yan Shuizhong, Zhao Xiaohang, Wu Min. (*National Lab of Molecular Oncology, Cancer Institute Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 222

Apoptosis, programmed cell death, is a natural form of cell death characterized by active participated of a cell in the process leading to its own decrepit and death. Recently, studies suggested that apoptosis is a result from a set of discrete cellular events that are regulated by a cascade gene expression. Oncogenes and tumor suppressor genes are involved in this regulation. Apoptosis is closely related to cancer. Failure and bolckage of apoptosis in tumor cells could therefore be the fundamental importance in contributing not only to the evasion of physiological countrols on cell numbers, but also to the resistance both to natural defenses and to clinical therapy.

**Key words** apoptosis, bcl-2 gene, c-myc gene, p53 gene

**Construction of a Novel Human TNF Expression Plasmid and its High Expression in *E. Coli*.** He Xiaolong, Chang Jinli, Cai Wucheng, Yu Hong, Lu Qun, Zhao Shouyuan, Wang Chenghai, Lin Baocheng, Zhu Henian. (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 225

On the basis of analysis of TNF structure and the relationship between structure and function, a novel TNF coding sequence was synthesized by PCR technique and inserted into an

expression plasmid. By temperature induction the transformed *E. Coli* with the novel TNF expression plasmid produced high yield of novel TNF, whose cytotoxic activity to L929 cell was  $10^3$  higher than recombinant human TNF.  
**Key words** tumor necrosis factor, polymerase chain reaction, gene mutagenesis

**Activation of N-ras Gene is Associated With  $\gamma$ -Radiation-Induced Transformation of Rat Embryo Cells.** Chen Changhu, Yao Kaitai, C. C. LING. (*Cancer Research Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 228

A cosmid library, constructed from DNA of the  $\gamma$ -radiation-transformed REC: myc cell line, designated REC: myc: Y33, was transfected into NIH/3T3 cells, yielding foci. Another round transfection of DNA from the first round focus into fresh NIH/3T3 cells produced second round foci. An active N-ras gene which originated from rat REC: myc: Y33 cells was detected in the NIH/3T3 secondary transformants. With PCR and direct DNA sequencing techniques, rat N-ras gene was found activated in the REC: myc: Y33 cells by CAA  $\rightarrow$  CGA point mutation at codon 61, but not in the REC: myc cells. Also rat N-ras gene was identified as a point mutated gene in the NIH/3T3 transformants, and the endogenous N-ras gene in the NIH/3T3 recipient cells remains normal. What was found to be more interesting is that five out of six  $\gamma$ -radiation transformed REC: myc cell lines bear the same point mutation (CAA  $\rightarrow$  CGA) indicating association of  $\gamma$ -radiation-induced transformation with point mutation in the N-ras gene.

**Key words**  $\gamma$ -radiation, transformation of rat embryo cells, activation of N-ras gene