

- of Radiation Induced Base Damage of DNA: Implication DNA Repair Processes. *Anal Biochem*, 1985, **144** (2): 593~ 603
- 10 Halliwall B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*, 1987, **1**: 358~ 364
- 11 Gajewski E, Rao G, Nackerdien Z, *et al.* Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 1990, **29**: 7876~ 7882
- 12 Guyton K Z, Kensler T W. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull*, 1993, **49** (3): 523~ 544
- 13 Floy R A. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1990, **11** (9): 1447~ 1550

Detection of 8-hydroxyguanine in Hydrogen Peroxide-damaged HL-60 Cells DNA. ZHANG Hai-Tao, ZHU Qi-Feng (*Institute of Medical Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); MO Li-Er, ZHUANG Hai-Qi (*Department of Chemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*); Cai Chun (*The Central Laboratory, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

Abstract Although hydrogen peroxide is generated in cells by normal metabolism, the reaction of the stress or by treatment of the cells with 0.4 mmol/L of hydrogen peroxide for 8~ 24 hours can result in DNA damage. 8-hydroxyguanine is a typical hydroxyl radical-induced products in DNA. The yields of the 8-hydroxyguanine in DNA isolated from H₂O₂-treated HL-60 cells in different ways were reported. The 8-hydroxyguanine in the cells treated in more than 0.4 mmol/L H₂O₂ for eight hours. In order to identify the 8-hydroxyguanine, the result was confirmed by CGC/MS-SIM. The results suggested that the nuclear DNA damage in cells caused by H₂O₂ may be involved in formation of hydroxyl radicals.

Key words human promyelocytic leukemia, 8-hydroxyguanine, H₂O₂, gas chromatography/flame ion detector

内皮型氧化氮合酶 FAD 间区在大肠杆菌中的表达^{*}

赵建华

沈月 朱敏生¹⁾ 许祥裕 潘英

(江苏省肿瘤防治研究所, 江苏省临床检验中心, 南京 210009)

(南京军事医学研究所防护室, 南京 210002)

摘要 为了研究内皮型氧化氮合酶 (eNOS) 的功能、功能调节以及结构与功能的关系, 通过 PCR 技术克隆出 eNOSFAD 间区 801~ 902AA 肽段的编码基因, 插入 pET-28a (+) 表达质粒中构建成 pET-28a/eNOS₂ 重组表达质粒, 经转染在大肠杆菌中成功表达。表达蛋白经金属离子螯合亲和层析和 SDS-PAGE 回收纯化, 得蛋白质纯品。为 eNOS 特异性抑制肽的筛选和 eNOS 特异性抗体的制备提供了必要的准备。

关键词 eNOS, 重组表达, 大肠杆菌

学科分类号 Q55, Q78

一氧化氮 (NO) 具有第二信使物质、神经递质和细胞毒性等多重功能, 广泛参与机体生理、病理生理功能的调节。其化学性质极不稳定、半衰期短, 功能的发挥主要依赖于氧化氮合酶 (NOS) 的生物合成。目前, 已被纯化或克隆的 NOS 大致分为三种类型: 脑型 (nNOS)、内皮型 (eNOS) 和诱导型 (iNOS)。它们均以 L-Arg 为底物, 在 FAD、FMN、NADPH 和 BH₄ 等辅助因子协同下, 催化合成 NO; 同时, 它们的活性也可受 L-Arg 衍生物的抑制^[1]。

eNOS 属原生酶, 主要分布在内皮细胞^[2]; 与其他 NOS 同源性比较发现: eNOS 存在两个同源

性较低的区域即 N 端 1~ 134AA 区 (简称 e₁) 和 801~ 902AA 区 (简称 e₂)。e₂ 正好处于 FAD-P 与 FAD-I 之间, 很可能与 FAD 电子传递功能密切相关; 同时 e₂ 又是 eNOS 第二种读框结构中唯一低同源性区域, 非常独特。为此, 我们选择性对 e₂ 进行了表达。表达蛋白一方面可作为目标蛋白, 通过噬菌体展示随机肽库筛选该区的结合肽, 若该肽的结合可阻断 FAD 电子传递, 即得到 eNOS 特异

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39670856) 和 95 全军医药卫生科研基金。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1999-01-18, 修回日期: 1999-03-06

性抑制剂, 这对 eNOS 功能和功能调节的研究以及心血管药物的开发非常重要. 另一方面表达蛋白也可用作抗原, 制备与 eNOS 两种表达形式均可特异性结合的抗体, 以开展 eNOS 免疫学研究.

1 材料和方法

1.1 质粒与菌种

pCMV5/eNOS 质粒 (内含 eNOS 全长 cDNA), pCRTM II 质粒及 pET-28a (+) 质粒均由美国德克萨斯西南医学中心 James T Stull 教授提供. BL₂₁ 宿主菌、JM109 菌由南京军事医学研究所防护室提供.

1.2 酶与试剂

各种限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RNase 等购自 Promega 和 Boehringer 公司. 1 kb DNA 分子质量标准、异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 均为 Promega 公司产品, 蛋白质分子质量标准购自上海东风试剂厂, His-BindTM Sepharose 柱为 Novegen 公司产品.

1.3 PCR 引物

为了便于克隆, 在设计引物时, 我们分别在上下游引物的 5' 端引进了 *Nde* I、*Xho* I 酶切位点. 上游引物 (P₁):

5'-AACTGCAGCATATGGACCACATAGGCAT-3';
Pst I Nde I

下游引物 (P₂):

5'-AATTCTCGAGCTAGCGCCGGGGTCTCTG-3'.
Xho I

上述引物由中国科学院上海植物生理研究所合成.

1.4 PCR 扩增

以 pCMV5/eNOS 质粒为模板、P₁ 和 P₂ 为引物, 扩增 eNOS801~902AA 肽段的编码基因. 为避免非特异性产物产生, PCR 体系中加入 1.5% 二甲亚砜 (DMSO). 采用“热启动” (hot start) 进行 PCR 扩增, 条件为: 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 50 s, 30 个循环后, 72℃ 延伸 7 min.

1.5 重组表达质粒的构建

1.5.1 PCR 产物纯化后, 经 TA 克隆直接装入 pCRTM II 载体中, 通过蓝白斑筛选和酶切鉴定, 得到阳性克隆.

1.5.2 该阳性克隆用 *Nde* I / *Xho* I 酶切, 电泳回收片段; 同时, 用相同酶切 pET-28a (+) 载体, 将两者按 2:1 比例进行连接、电穿孔转化 BL₂₁ 宿主菌. 经碱裂法提取质粒 DNA 和酶切筛选, 得到

重组质粒 pET-28a/eNOS₂. 其构建工程见图 1.

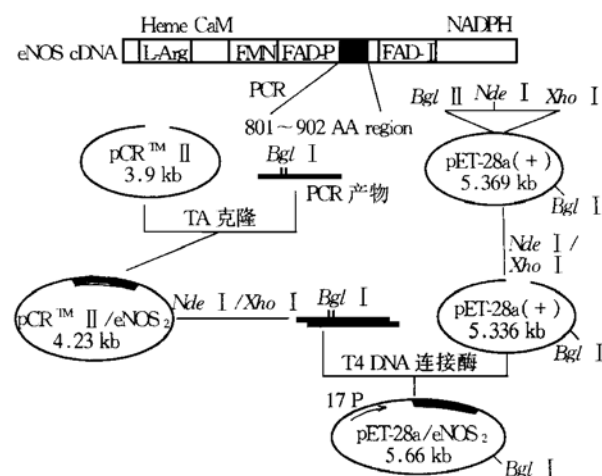


图 1 重组表达质粒 pET-28a/eNOS₂ 的构建

1.6 重组蛋白的表达和纯化

1.6.1 挑取单克隆重组菌, 扩增培养至对数生长期; 加 0.25 mol/L IPTG 诱导 4 h, 收集细菌沉淀, 8 mol/L 脲重悬后, 超声破膜, 离心得到含表达产物的上清液.

1.6.2 上述表达产物经 His-BindTM 亲和柱层析纯化, 方法按 Novegen 公司的产品说明书进行.

用 His-BindTM 亲和柱纯化的目的蛋白仍有少量杂蛋白残留, 为了获得更纯的表达蛋白, 采用 SDS-PAGE 目的条带回收纯化, 得到蛋白质纯品, 方法见文献 [3].

2 结果和讨论

2.1 eNOS801~902AA 区编码基因的扩增

eNOS801~902AA 肽段位于 FAD 间区 (图 1), 该区除位置独特、同源性低等特点外, 碱基组成也比较特殊, 富含 G+C (占 71%), 这给该序列的特异性扩增带来了困难, 用常规 PCR 和“hot start”PCR 方法进行扩增, 几乎无扩增产物. 这主要是由于 GC 含量高, 链间氢键多, DNA 二级结构稳定而不易变性, 干扰了引物的结合. 变性剂或共溶剂如甲酰胺、DMSO、甘油、吐温 20 及 NP40 等具有降低 DNA 模板融解和解链温度, 减少二级结构形成, 使模板易于完全变性的作用^[4]. 为此, 我们分别把上述各种变性剂, 以各种不同浓度加入 PCR 体系, 进行扩增. 并适当提高变性温度 (达 95℃). 结果证实: 变性剂或共溶剂可促进高 G+C 含量 DNA 序列的特异性扩增, 但不同的模板对变性剂的种类及其浓度的要求不同 (另文发表).

层析被纯化, 纯度达 90% 以上. 再经 SDS-PAGE 目的条带回收纯化, 可获得蛋白质纯品, 分子质量 14.4 ku 与氨基酸序列理论计算值一致 (图 5).

从以上结果可见, 我们已建立 eNOS₂ 表达工程菌, 并获得目的蛋白纯品, 以此蛋白质为抗原, 我们已制备了 eNOS 的特异性抗体 (另文发表). 同时, 亦可利用该蛋白作为筛选 eNOS 特异性抑制肽的靶蛋白.

参 考 文 献

- 1 储国洋, 郭兆贵 (Chu G X, Guo Z G). 一氧化氮及其药理学前景. 国外医学分子生物学分册 (Foreign Medical Sciences: Molecular Biology), 1992, 14 (6): 281~ 285
- 2 Lamas S, Marsden P A, Li G K, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89 (7): 6348~ 6352
- 3 Hager D A, Burgess R R. Elution of proteins from SDS-PAGE. Anal Biochem, 1980, 109 (1): 76~ 86
- 4 Varadaraj K, Skinner D M. Denaturants or Cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene, 1994, 140 (1): 1~ 5

Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) 801~ 902AA Residues in *E. coli*. ZHAO Jiar-Hua¹⁾, SHEN Yue, ZHU Min-Sheng, XU Xiang-Yu, PAN Ying (*Nanjing Military Medical Institute, Nanjing 210002; ¹⁾ Jiangsu Center of Clinical Laboratory, Nanjing 210009, China*).

Abstract To investigate the function, function regulation and structure-function relationship of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), a gene fragment encoding eNOS 801~ 902 AA residues was cloned by PCR, and inserted into pET-28a (+) expressive vector. The resulted pET-28a/eNOS₂ was transformed into BL₂₁ host *E. coli* and expressed by IPTG induction for 4 hour. The expressed protein (14.4 ku) was purified by His-BindTM Sepharose colum and SDS-PAGE, thus providing the basis for the selection of the eNOS-specific inhibiting peptides and the preparation of the specific antibody against eNOS.

Key words eNOS, recombinant expression, *E. coli*

用干血纸片扩增人雄激素受体基因*

王 进 陈光椿 卢 建

(第二军医大学病理生理教研室, 上海 200433)

摘要 雄激素不敏感综合征 (AIS) 为一类主要与雄激素受体 (AR) 基因缺陷密切相关的 X-连锁隐性遗传病. 为进一步阐明 AIS 的发病机制, 建立了用干血纸片直接 PCR 扩增或将干血纸片中的血细胞洗脱裂解后进行 PCR 扩增雄激素受体 (AR) 基因的方法, 结合已建立的 SSCP 分析及 DNA 直接测序等方法, 可对 AR 基因进行突变分析. 干血纸片取样及保存容易, 便于邮寄, 适用于外地, 特别是边远地区患者的取样. 该法不仅为 AIS 患者的 AR 基因突变分析和家系调查提供简便易行的方法, 也适用于 PCR 基础上的其他各种基因的突变分析.

关键词 雄激素受体, 干血纸片, 多聚酶链式反应 (PCR), 基因突变

学科分类号 Q789

自 1987 年英国学者 Guthrie 建立用干血纸片诊断遗传病的方法以来, 由于干血纸片血样本易于保存和邮寄, 血斑中 DNA 也比较稳定, 已经广泛应用于一些遗传病的检测和筛选^[1]. 雄激素不敏感综合征 (androgen insensitivity syndrome, AIS), 为一类主要与雄激素受体 (AR) 基因缺陷密切相关的 X-连锁隐性遗传病, 主要表现为不同程度的男性性分化发育异常及某些特发性男性不育症^[2]. 为研究 AIS 的发病机制, 本实验室已在国内率先

建立了用外周血白细胞或培养的外阴部皮肤成纤维细胞检测 AIS 患者 AR 基因突变的 PCR-SSCP 分析及 DNA 直接测序法, 并用该法确定了国人四种 AR 基因的突变型^[3]. 为解决外地特别是边远地区患者取样难的问题, 我们又建立用干血纸片扩增人 AR 基因的方法.

* 国家自然科学基金资助课题 (39270310).

收稿日期: 1999-01-07, 修回日期: 1999-03-15