

参 考 文 献

- 1 Dano K, Andreasin P A, Grondah-Hansen J, *et al.* Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res*, 1985, **44**: 139~ 266
- 2 Vassalli I D, Sapping A P, Belin D. The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*, 1991, **88** (4): 1067~ 1072
- 3 Cajot J F, Bamat J, G E Bergaonzelli, *et al.* Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potent natural inhibitor of extracellular matrix degradation by fibrosarcoma and colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (18): 6939~ 6943
- 4 Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, 1989, **7** (9): 980~ 988
- 5 Laug W E, Cao X R, Yu Y B, *et al.* Inhibition of invasion of HT1080 sarcoma cells expressing recombinant plasminogen activator inhibitor 2. *Cancer Res*, 1993, **53** (24): 6051~ 6057
- 6 Eitzman D T, Krauss J C, Shen T, *et al.* Lack of plasminogen activator inhibitor 1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma. *Blood*, 1996, **87** (11): 4718~ 4722
- 7 Alizadeh H, Ma D, Berman M, *et al.* Tissue-type plasminogen activator induced invasion and metastasis of murine melanomas. *Curr Eye Res*, 1995, **14** (6): 449~ 458

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus for Expressing Human Plasminogen

Activator Inhibitor 1. SONG Hai-Yun, ZHANG Jing, XU Xiann-Xiu (*Department of Biochemistry, Nanjing University, National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing 210093, China*).

Abstract Human plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene was recombined into a replication-defective adenovirus vector AdCMVHSgD, co-transfected with plasmid pJM17 into human embryo kidney cell line 293 cells. Recombinant virus was produced without use of agarose overlay, identified by PCR analysis and used to infect B16 (F10) cells. The inhibition of plasminogen activator (PA) activity of PAI-1 was revealed in the elute and supernatant of infected B16 cells by regular and reverse agarose-fibrin autoradiography.

Key words human plasminogen activator inhibitor 1, recombinant virus, gene expression

蛋白质氯胺-T 双相碘标法的建立及其应用*

从玉文 陈家佩 邵 源

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 常规的蛋白质碘标方法易引起被标细胞因子的失活, 是受体配基竞争结合实验失败的原因之一. 试用氯胺-T 双相碘标法标记 rhG-CSF 和 rhEPO, 并应用受体配基竞争结合分析法测定 NFS-60 细胞 G-CSF 受体及 BET-2 细胞 EPO 受体的特性. 结果显示所获 ^{125}I -EPO 和 ^{125}I -G-CSF 放射比活度均较高; 发现 BET-2 细胞有高、低两种亲和力的 EPO 受体, NFS-60 细胞只有一种高亲和力的 G-CSF 受体, 所获结果与文献资料相一致. 说明氯胺-T 双相碘标法是细胞因子同位素碘标记的理想方法之一.

关键词 细胞因子, 同位素碘标记, 受体特性

学科分类号 Q5-3

放射配基结合分析法是研究受体特性的经典方法, 获得高放射比活度的标记蛋白质是实验成功的关键. 常规的同位素标记法如氯胺-T 法及 Iodogen 法, 因氧化剂和被标记物在同一个反应体系中, 反应较剧烈, 条件不易控制, 很容易引起标记多肽的失活. 为解决这一难题, Butt^[1]于 1972 年提出氯胺-T 双相碘标法的设想并进行了生长激素标记实验, 随后, Tejedor 等^[2]于 1982 年优化了该方法实验过程. 因当时对蛋白质标记后活性变化的要求不高, 且实验中需制备一些实验器材, 因此, 在一段

时间内并未引起人们的普遍重视. 最近国外少数实验室为解决小分子活性多肽标记后失活问题, 尝试应用氯胺-T 双相碘标法标记生物活性多肽, 获得了较满意的效果. 目前国内还没见到该方法的应用报道. 为在国内推广该方法的应用及积累细胞因子标记经验, 本文应用双相法成功地标记了 rhEPO 及 rhG-CSF, 并观察了造血细胞 EPO 及 G-CSF 的受体特性.

* 国家自然科学基金资助项目 (39800032).

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-01-21

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株: NFS-60 细胞为小鼠源性的 G-CSF 依赖的髓系白血病细胞株, BET-2 细胞为小鼠源性的 EPO 依赖的骨髓瘤细胞株 (军事医学科学院三所张明伟实验师惠赠), 常规条件培养, 取指数生长期细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂: rhEPO 活性为 1×10^5 U/mg, 纯度 > 95%, 由北京放射医学研究所汤仲明教授提供. rhG-CSF 活性为 1×10^7 /mg, 纯度 98%, 本所陈惠鹏副教授惠赠. Na^{125}I 购于美国 Amersham 公司。

1.2 氯胺-T 双相碘标法

1.2.1 基本原理: 把氯胺-T 氧化相与碘标记反应体系相分开, 利用氯胺-T 与氯化钠反应产生的氯气进入反应体系相, 置换 ^{125}I , 形成的碘原子标记蛋白质中的酪氨酸。

1.2.2 实验器材的准备: 切出 5 ml 塑料离心管底部, 保留其内部体积约 200 μl , 烫平管口, 固定在蜡块上, 制成标记反应管; 取一片 3 mm 型的滤纸, 用 1 mol/L 的氯化钠溶液浸泡 30 min, 室温干燥, 剪成约 2 cm^2 的圆片, 制成标记反应滤纸片。

1.2.3 标记过程: 首先在反应管边沿均匀涂抹少量硅油以便密封. 在反应管中依次加入 EPO (G-CSF 同) 2 μg , Na^{125}I 1.85×10^7 Bq, 用 100 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 补至 100 μl . 取制备好的滤纸片一张, 在其一面加 20 g/L 的氯胺-T 10~15 μl , 用其湿面紧贴在盖玻片上, 小心把盖玻片倒放在离心管上, 使滤纸片处在反应管中央, 每 10 分钟换滤纸片一次, 共换 4~5 次. 反应结束后加 15 g/L 的硫代硫酸钠 5 μl 终止反应。

1.2.4 标记蛋白质的纯化: 制备 Sephadex G25 分离柱 (1 cm \times 20 cm). 分离前用含 0.02% Tween20 的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液过夜平衡柱子. 贴壁加入标记反应液, 用上述平衡液洗脱, 流速控制在 5~7 滴/min, 每管收集 400 μl , 从中取出 2 μl 测放射活性, 计算标记率。

1.3 同位素结合实验

1.3.1 绘制结合动力学曲线: 用 RPMI 1640 洗涤 BET-2 细胞 3 次, 计数细胞, 调整细胞浓度为 1.25×10^7 /ml, 在 96 孔板中每孔加细胞悬液 80 μl , ^{125}I -EPO 125 000 dpm, 用培养基补至 100 μl , 对照孔加 50~100 倍未标记 EPO. 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡. 分

别于结合后 30 min、1、1.5、2、4、6、8、16 h 离心洗涤细胞, 测游离碘及结合碘的放射活性, 绘制结合动力学曲线。

1.3.2 细胞数量对同位素结合实验的影响: 用 RPMI 1640 洗涤 BET-2 细胞 3 次, 计数细胞, 适当调整细胞浓度, 在 96 孔板中每孔加入 ^{125}I -EPO 50 000 dpm, 细胞浓度分别为 0.5×10^7 /ml、 1×10^7 /ml、 2×10^7 、 5×10^7 /ml, 总体积 100 μl . 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡 12 h, 离心洗涤细胞, 分别测上清及沉淀的放射活性, 其中上清代表游离碘, 沉淀表示结合碘。

1.3.3 受体配基竞争结合实验: 洗涤细胞 3 次, 计数细胞, 调整细胞浓度为 2.5×10^7 (NFS-60) 或 1.25×10^7 /ml (BET-2). 在 96 孔板中每孔加细胞悬液 80 μl , 递增加入 ^{125}I -EPO (G-CSF) 6 250~250 000 dpm, 用培养基补至 100 μl , 对照孔加 50~100 倍未标记 EPO (G-CSF). 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡 12 h. 结合反应结束后离心洗涤细胞, 分别检测游离碘 (F) 及结合碘 (B) 放射活性, 并计算相应的 B/F 值. 以 B 值为横坐标, 以 B/F 值为纵坐标作 Scatchard 图, 直线回归后根据其斜率及 X 轴截距计算 B_{max} 值及 K_d 值。

2 结果

2.1 细胞因子同位素碘标记

应用氯胺-T 双相碘标法标记 EPO 和 G-CSF, 根据洗脱曲线计算出同位素标记率, 按图 1 计算 EPO 的标记率为 20.7%, 应用自身替代实验计算特异放射比活度 (每 ng 的 dpm 值) 为 1.55×10^4 ; 同理计算 G-CSF 的标记率为 21.8%, 放射比活度 (每 ng 的 dpm 值) 为 1.59×10^5 [3]。

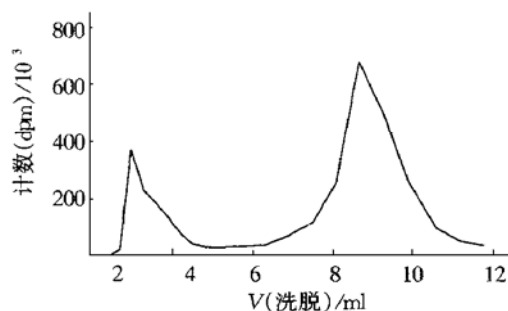


图 1 EPO 碘标记的洗脱曲线

2.2 EPO 与 BET-2 细胞的结合动力学

反应温度不同, 反应体系不一致, 细胞因子与细胞结合达到饱和时所需时间也不同. 为此本文

以¹²⁵I-EPO 与 BET-2 细胞结合为例观察了 4℃ 条件下细胞因子结合动力学的变化. 图 2 看出当反应时间为 8~ 18 h 时, EPO 与 BET-2 细胞的结合趋近饱和状态. 考虑到细胞内吞因结合时间延长而增加, 因此选用的最佳结合时间为 12 h.

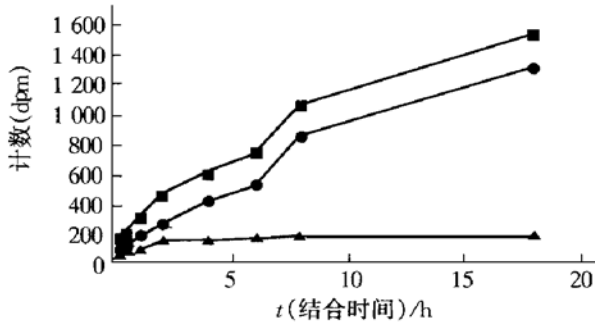


图 2 ¹²⁵I-EPO 与 BET-2 细胞结合动力学曲线

■ — ■: 总结合; ● — ●: 特异性结合;
▲ — ▲: 非特异性结合.

2.3 细胞数量对 EPO 特异性结合的影响

在¹²⁵I-EPO 数量不变的情况下, 增加反应体系中 BET-2 细胞数量, 观察特异性及非特异性结合放射活性的变化. 从图 3 看出当细胞数量为 1×10^7 /ml 时, 非特异性结合占总结合的比例最小, 并处于特异性结合曲线的上升区域, 据此作为研究 EPO 受体的最佳细胞浓度. 按上述方式观察到 NFS-60 细胞最佳结合浓度为 2×10^7 /ml.

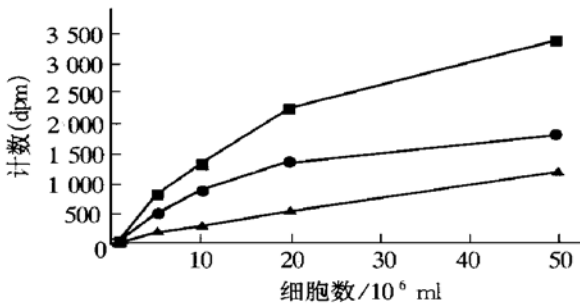


图 3 细胞数量对 EPO 结合实验的影响

■ — ■: 总结合; ● — ●: 特异性结合;
▲ — ▲: 非特异性结合.

2.4 BET-2 细胞 EPO 受体特性的研究

应用受体配基结合分析法观察了 BET-2 细胞 EPO 受体特性, 图 4 为¹²⁵I-EPO 与 BET-2 细胞结合的 Scatchard 图, 从中算出 BET-2 细胞有两种亲和力的 EPO 受体, 一种为高亲和力受体, K_d 值为 222.5 pmol/L, B_{max} 为 14.4 pmol/L, 另一种为低亲和力受体, 其 K_d 值为 3.5 nmol/L, B_{max} 为 88.1 pmol/L.

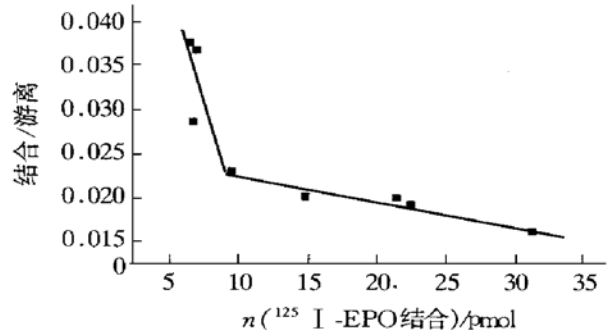


图 4 ¹²⁵I-EPO 与 BET-2 细胞结合的 Scatchard 图

2.5 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的研究

同法观察了 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性, 图 5 为¹²⁵I-G-CSF 与 NFS-60 结合的 Scatchard 图, 从中算出 G-CSF 受体的解离常数 K_d 为 94.3 pmol/L, B_{max} 为 12.3 pmol/L.

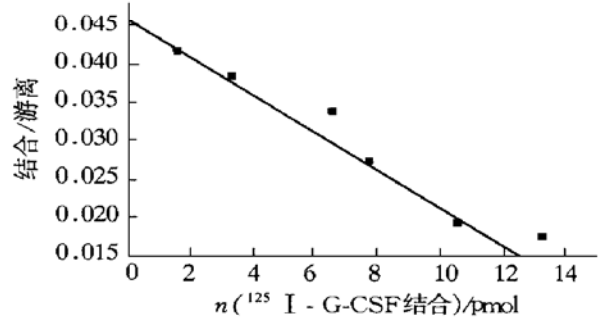


图 5 ¹²⁵I-G-CSF 与 NFS-60 细胞结合的 Scatchard 图

3 讨 论

我们按照文献资料建立了氯胺-T 双相碘标技术, 分别标记了 EPO 及 G-CSF, 根据标记率计算的放射比活度均在 185×10^7 Bq/g 以上, 明显高于国内应用其他方法标记所获得的放射比活度^[4,5], 应用自身替代实验检测发现上述标记的细胞因子特异性放射比活度也较高, 说明标记过程中细胞因子活性丧失较少, 另外, 观测的 BET-2 细胞上的 EPO 受体特性及 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性均与文献资料相近, 这些结果表明我们建立的细胞因子碘标法是可靠的^[6,7].

细胞因子受体特性研究国外已有较多的文献报道, 国内这方面的研究还不多, 原因是多方面的. 细胞因子标记后失活可能是研究受体特性的障碍之一. 氯胺-T 双相碘标法可能有助于解决这一难题. 通过实验, 我们认为双相碘标技术具有以下几个方面的特点: a. 反应温和, 标记时间长, 常温下进行, 条件易控制. b. 被标记的细胞因子可以较少的功能损失而获得较高的放射比活度. c. 重复性

好, 对于不同的细胞因子, 反应条件基本不变. d. 标记实验中所需同位素及细胞因子数量少, 较节省. 不足之处是需自制实验器材. 标记实验器材规范化可能有助于该方法的推广应用.

致谢 北京放射医学研究所汤仲明研究员、刘秀文副研究员在同位素标记及检测中给予了指导和帮助, 特此感谢.

参 考 文 献

- 1 Butt W R. The iodination of follicle stimulating and other hormones for radioimmunoassay. *J Endocr*, 1972, **55** (1): 453~ 454
- 2 Tejedor F, Ballesta J P G. Iodination of biological samples without loss of functional activity. *Analytical Biochemistry*, 1982, **127** (1): 143~ 149
- 3 Calvo J C, Radicella J P, Charreau F H. Measurement of specific radioactivities in labeled hormones by self-displacement analysis. *Biochem J*, 1983, **212** (2): 259~ 264
- 4 李前伟, 谭天秩 (Li Q W, Tan T Z). ^{125}I -VIP 的制备及其与 SGC7901 人胃腺癌细胞受体体外结合特性研究. *中华核医学杂志 (Chin J Nucl Med)*, 1998, **18** (2): 73~ 76
- 5 安明榜, 吕宝璋 (An M B, Lu B Z). rIL-2 的 ^{125}I 标记及淋巴细胞 IL-2 受体的鉴定. *中华核医学杂志 (Chin J Nucl Med)*, 1996, **16** (3): 157~ 158
- 6 Fraser J K, Lin F K, Berridge M V. Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562. *Blood*, 1988, **71** (1): 104~ 109
- 7 Nicola N, Metcalf D. Binding of the difference inducer, granulocyte colony-stimulating factor, to responsive but not

dependent leukemic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (12): 3765~ 3769

Establishment of Methods for Two-phase Iodination of Chromine-T and Applying in Cytokine Receptor Studies. CONG Yu-Wen, CHEN Jia-Pei, SHAO Yuan (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract The routine iodination methods are easy to lead to biological inactivation of cytokines, which is one of reasons for failure of ligand receptor binding assay. By using two-phase iodination of chromine-T, rhG-CSF and rhEPO were iodinated with Na^{125}I and the characteristic of EPO receptor in BET-2 cell and G-CSF receptor in NFS-60 cell were observed by receptor ligand binding assay. It was showed that the radioactivity of ^{125}I -G-CSF and ^{125}I -EPO were much higher than that obtained by other methods and it was found that there are high and low affinity EPO receptors in BET-2 cells and one high affinity G-CSF receptor in NFS-60 cells. These results are in accord with literature data. It suggests that the two-phase iodination of chromine-T is an ideal method to iodinate cytokines.

Key words cytokines, iodination method, receptor characteristic

牛眼透明质酸的分离及性质测定*

罗 曼 蒋立科

(安徽农业大学生物工程系, 合肥 230036)

奚 俊

(合肥神鹿药业有限公司, 合肥 230036)

摘要 研究了牛眼透明质酸 (HA) 的提纯方法, 采用 0.125 mol/L Na_2SO_4 取代 0.1 mol/L NaCl 溶解粗品, 发现前者溶液中有 2 个组分, 一个组分被十六烷基溴代吡啶 (CBP) 吸附回收, 产物呈纤维状, 另一组分保留在溶液中并能通过分级稀释而被沉淀回收. 产物呈粉末状; 而用 0.1 mol/ml NaCl 溶解粗品, 除了被 CBP 吸附回收外, 保留在溶液中的 HA 不能被回收; 与同类方法相比, 回收率提高 1.7 倍以上. 还分析了产物的性质, 与同类样品比较, 提高了纯度, 降低了提纯中有机溶剂的消耗.

关键词 牛眼, 透明质酸, 分级分离, 理化性质, 质量

学科分类号 Q538

* 安徽省重点科研项目资助. 收稿日期: 1998-11-09, 修回日期: 1999-03-22