

等高度重复使用,核糖体结合位点周围易形成“发卡”和回文结构,SD的3'端与ATG之间的距离较长有利于核糖体结合位点的暴露。

链霉菌中蛋白质表达无明显的诱导过程,不同阶段菌体培养物表达的各种蛋白成分不同,外源基因的表达也无例外,是一个动态的连续过程。本实验表明:GM-CSF基因在链霉菌中表达时,目的基因表达的峰值时间在48~72 h之间,即对数生长晚期和生长静止相早期,此现象可能具有一定的普遍性,说明链霉菌中基因表达在时间上的调控虽然复杂,但仍是有规律可循的。

链霉菌信号肽 MEL398 是一段典型的疏水序列信号肽,其长度为30 aa。我们构建的分泌型菌株其表达产物的1/3直接分泌到培养基中,胞内表达产物占菌体总蛋白的15%,活性测定达到5 MU/L。本工作为利用链霉菌表达体系分泌表达外源基因提供了一些理论依据,并为在链霉菌中大规模生产hGM-CSF创造了一定的前期条件。

参 考 文 献

- 1 Perman, D. J Mol Biol, 1983; 167: 391
- 2 Kieser T. Mol Gen Genet, 1982; 18: 223
- 3 Laemmli U K. Nature, 1970; 227: 680
- 4 Burgess A W. Blood, 1987; 69 (1): 43
- 5 吴祖泽. 造血干细胞移植基础. 北京: 人民卫生出版社, 1988; 53

- 6 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990; 301

Study on Secretive Expression of hGM-CSF in Streptomyces. Liu Dailan, Qiang Boqin, Yuan Jiangang, Li Yuan¹⁾, Liang Zhiqian (Liang Chih-chuan) (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; ¹⁾Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China*).

Abstract The high level secretive expression of hGM-CSF in streptomyces was obtained. The factors, which can influence the exogenous expression in prokaryotes, such as the distance between SD and ATG, and the features of expression induction in streptomyces, etc. were studied. Then the secreted hGM-CSF protein in streptomyces using the signal peptide MEL were obtained. One third of the expression products were secreted. By the experiment of colony stimulating factor formation and cell culture of TF-1 (hGM-CSF dependent cell line), its biological activity determined is 5 MU/L.

Key words GM-CSF, gene expression, streptomyces, signal peptide

H₂O₂-Fe³⁺所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤

隋建丽 吕 星 周平坤 方允中

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用脉冲电场凝胶电泳法检测 H₂O₂-Fe³⁺体系产生的 OH· 对人淋巴细胞 DNA 的双链断裂损伤。H₂O₂-Fe³⁺浓度与 DNA 双链断裂呈明显量效关系; 随 OH· 作用时间延长, 细胞 DNA 双链断裂加重; 过氧化氢酶对 OH· 损伤有明显抑制作用。脉冲电场凝胶电泳法可检测到的 H₂O₂ 和 FeCl₃ 引起细胞 DNA 双链断裂的最低浓度为 0.3 mmol/L 和 6 μmol/L。

关键词 脉冲电场凝胶电泳, 羟自由基, DNA 双链断裂, 人淋巴细胞

脉冲电场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 是近年发展起来的对大分子 DNA 进行分离与分析的一项新技术. PFGE 用于细胞内染色体 DNA 双链断裂检测, 与速度沉降、粘弹性测量、中性膜过滤等常用方法比较, 具有灵敏度高和操作简便的显著优点, 故日益受到重视和采用^[1].

PFGE 电场的设计可有多种形式. 我们采用的是六角形电极电场, 其中 A、B 两个电场方向的交角为 120°. 在此电场的作用下, DNA 分子呈“Z”形向前泳动, 增大了迁移阻力, 结果是只有发生了双链断裂的小分子 DNA 片段可从原点处进入凝胶, 而未断裂的和仅发生单链断裂的大分子 DNA 仍留在原点. 这样即可通过电泳照片的图象分析测算两部分 DNA 的比例, 从而判断双链断裂的损伤程度. 实验中, 我们以过氧化氢-铁离子($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{3+}$)反应体系生成羟自由基($\text{OH}^\cdot$), 观察了 $\text{OH}^\cdot$ 对人淋巴细胞 DNA 的双链断裂损伤, 取得了检测灵敏度、时间影响, 以及过氧化氢酶的防护作用等项结果.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

新鲜健康人全血, 取自解放军 307 医院血库; 琼脂糖、低熔点琼脂糖, 美国 Sigma 公司产品; 过氧化氢酶, 德国 Merck 公司产品; 30% H_2O_2 , 北京化工厂产品; 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂产品; 其余试剂均为分析纯. DMDY-II 型多功能脉冲电泳仪, 北京五洲电子仪器厂产品; Quanimet-970 型图象分析仪, 英国 Cambridge 公司产品.

1.2 淋巴细胞分离

取 3 ml 淋巴细胞分离液加入离心管中, 将肝素抗凝的健康人全血用 PBS 按 1:1 稀释, 取 6 ml 缓慢加至淋巴细胞分离液上层, 1500×g 离心 20 min, 吸取悬浮于血浆层与分离液层之间的淋巴细胞. 用 PBS 将淋巴细胞洗两遍后, 细胞计数.

1.3 $\text{OH}^\cdot$ 损伤实验

用 PBS 将淋巴细胞浓度调至 $3 \times 10^6/\text{L}$, 取 0.5 ml, 加入 1.5 ml 离心管中, 再加入含一定浓度的 H_2O_2 和 FeCl_3 水溶液 1 ml, 37°C 培养 30 min, 4000×g 离心 5 min, 弃上清. 加 1.5 ml PBS 悬浮细胞, 1500×g 离心 5 min, 反复两次, 终止反应.

观察时间对损伤影响时, 取 5 支离心管, 各管加淋巴细胞悬液 0.5 ml, 再加 1.25 mmol/L H_2O_2 、25 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 水溶液 1 ml, 于 37°C 分别进行不同时间的培养, 其余操作同上.

观察过氧化氢酶防护作用时, 取 8 支离心管, 加淋巴细胞悬液 0.5 ml, 再加 5 mmol/L H_2O_2 、50 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 水溶液 0.5 ml, 而后各加含不同浓度过氧化氢酶的 PBS 0.5 ml, 37°C 培养 30 min, 其余操作同上.

1.4 细胞 DNA 制备

将经 PBS 清洗两遍的淋巴细胞用 40 μl PBS 悬浮细胞, 加入 1% 低熔点琼脂糖 60 μl , 充分混匀后, 加至制胶模孔中, 待胶凝固后, 小心取出, 置于青霉素小瓶中, 加入 DNA 提取液 (10 mmol/L Tris-HCl, 2 mg/L 蛋白酶 E, 1% SDS, 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0) 1 ml, 50°C 保温 48 h, 进行细胞溶解和蛋白消化反应, 而后用 TE 液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 清洗胶块, 加入少量 0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 置 4°C 保存, 待电泳.

1.5 电泳、照相与图象分析

电泳凝胶为 1% 琼脂糖, 胶块大小 9.9 cm×9.5 cm×0.55 cm. 取上述制备的 DNA 样品胶块小心放入电泳胶的加样孔内, 用 1% 琼脂糖封固, 放置电泳槽中, 加电泳缓冲液 (45 mmol/L Tris、45 mmol/L 硼酸、1.25 mmol/L EDTA, pH 8.0), 电泳槽放置 4°C 冷柜中, A、B 电场的电流与脉冲时间分别设定为 34 mA、25 min 和 29 mA、27.5 min, 电压 30 V, 电泳 72 h. 电泳完毕, 将电泳胶置于

0.5 mg/L 溴化乙锭液中染色 1.5 h 后, 在紫外灯下观察并照相, 负片用 Quanimet-970 型图象仪进行分析, 测算入胶 DNA 占细胞总 DNA 的百分含量。

2 结 果

2.1 OH[•] 所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂

图 1 为人淋巴细胞经不同浓度 H₂O₂ 和 FeCl₃ 反应后 DNA 的 PFGE 电泳图和负片经图象分析测算出的入胶 DNA 占细胞总 DNA 的百分含量。图 1 表明, 随 H₂O₂ 和 FeCl₃ 浓度的提高, 进入凝胶的 DNA 量增加, 提示细胞 DNA 发生双链断裂所形成的小分子 DNA 片段增多, 呈明显量效关系。未经 H₂O₂-Fe³⁺ 反应的细胞 (空白管), 无 DNA 断裂片段进入凝胶。可检测到损伤的 H₂O₂ 和 FeCl₃ 的最低浓度为 0.313 mmol/L 和 6 μmol/L。

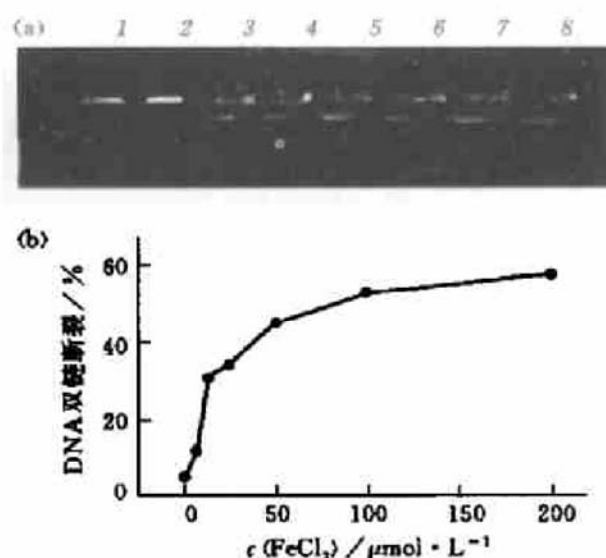


图 1 OH[•] 所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂及量效关系

(a) 1: 阴性对照; 2~7: H₂O₂ 浓度依次为 0.3、0.6、1.25、2.5、5.0 和 10.0 mmol/L, FeCl₃ 浓度依次为 6、13、25、50、100 和 200 μmol/L. (b) DNA 双链断裂与 H₂O₂ 和 FeCl₃ 浓度的关系。

2.2 时间对 OH[•] 损伤的影响

图 2 为一定 H₂O₂-Fe³⁺ 浓度、不同时间内细胞 DNA 的 PFGE 图及图象分析结果。由图 2

可见, 随反应时间的延长, 细胞 DNA 双链断裂的损伤程度加重。

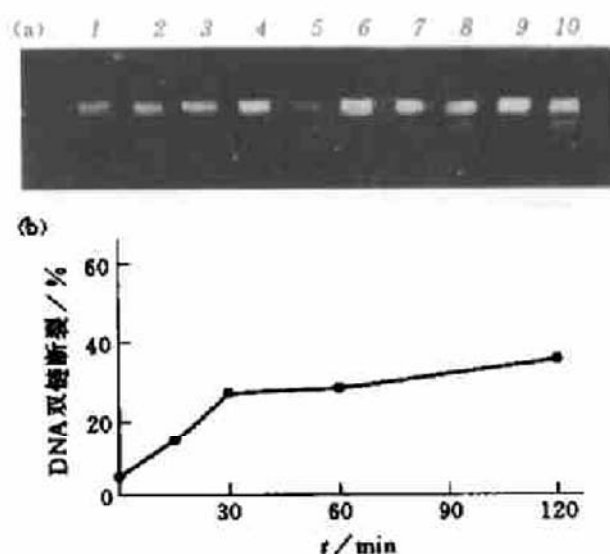


图 2 时间对 OH[•] 所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂的影响

(a) 1、3、5、7 和 9: 阴性对照; 2、4、6、8 和 10: H₂O₂ 和 FeCl₃ 浓度为 1.25 mmol/L 和 25 μmol/L; 1 和 2、3 和 4、5 和 6、7 和 8、9 和 10 分别于 37℃ 培养 0、15、30、60、120 min。

(b) DNA 双链断裂与反应时间的关系。

2.3 过氧化氢酶对 OH[•] 损伤的防护

图 3 表示不同浓度的过氧化氢酶对 OH[•]

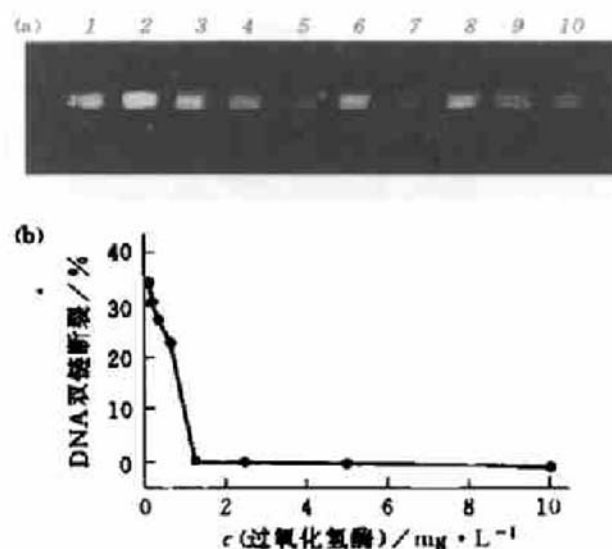


图 3 过氧化氢酶的防护作用

(a) 1: 阴性对照; 2~9: 过氧化氢酶浓度依次为 10、5、2.5、1.25、0.6、0.3、0.15、0.08 mg/L; 10: 阳性对照. (b) DNA 双链断裂与过氧化氢酶浓度的关系。

所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤的抑制作用。由图 3 可见, 随过氧化氢酶浓度的增加, DNA 双链断裂减轻, 其显示抑制作用的最低浓度为 0.08 mg/L。

3 讨 论

细胞有氧代谢过程中产生的活性氧主要为超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和 H_2O_2 。在生理条件下, $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 不直接引起 DNA 链断裂^[2], 但经铁离子介导的 Haber-Weiss 反应生成 $OH^{\cdot}$ 后, 可造成 DNA 的链断裂损伤^[3,4]。

近年发展的质谱、限制性长度多态性等方法检测 $OH^{\cdot}$ 所致 DNA 损伤, H_2O_2 和 $FeCl_3$ 的浓度分别在 0.07 ~ 2.8 mmol/L 和 10 ~ 25 μ mol/L 范围^[5,6]。本实验用 PFGE 法可检测 H_2O_2 和 $FeCl_3$ 浓度为 0.3 mmol/L 和 6 μ mol/L 时细胞 DNA 的双链断裂损伤, 说明灵敏度较高。此外, DNA 制备采用完整细胞在琼脂糖中包埋提取的方法, 具有 DNA 收率高和操作简便的优点。

过氧化氢酶催化 H_2O_2 的水解, 是体内抗氧化损伤的保护酶。其对 H_2O_2 - Fe^{3+} 体系的抑制作用显然与水解 H_2O_2 有关。但我们曾观察到过氧化氢酶对抗坏血酸- Fe^{3+} 体系产生的 $OH^{\cdot}$ 引起的 DNA 损伤也有抑制作用^[7], 提示过氧化氢酶的作用不单纯是水解 H_2O_2 , 而可能是直接参与了对 $OH^{\cdot}$ 的抑制。这一现象在一些辐射防护实验中也得到证实^[8], 其机理尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 van Ommen G J B, den Dunnen J T, Lehrach H *et al.* In: Lai E eds. Electrophoresis of large DNA molecules: theory and application. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 133
- 2 Dizdaroglu M. Free Radical Biol Med, 1991; 10 (3/4): 225

- 3 Deng R Y, Fridovich I. Free Radical Biol Med, 1989; 6 (2): 123
- 4 McBride T J, Preston B D, Loeb L A. Biochemistry, 1991; 30 (1): 207
- 5 Aruoma O I, Halliwell B, Gajewski E *et al.* J Biol Chem, 1989; 264 (34): 20509
- 6 Hussain S P, Aguilar F, Cerutti P. Oncogene, 1994; 9 (1): 13
- 7 吕 星, 陈吉中, 方允中. 军事医学科学院院刊, 1992; 16 (4): 268
- 8 Jones J B, Cramer H M, Inch F W R *et al.* J Otolaryngol, 1990; 19 (5): 299

Double-strand Breaks of DNA Damage in Human Lymphocytes Induced by H_2O_2 - Fe^{3+} System. Sui Jianli, Lu Xing, Zhou Pingkun, Fang Yunzhong (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used to quantitatively measure the double-strand breaks (dsbs) of DNA damage in human lymphocytes induced by hydroxyl radicals generated from H_2O_2 - Fe^{3+} system. It was shown that there was a significant dose-dependent relationship between concentration of H_2O_2 - Fe^{3+} and the content of DNA dsbs occurring in cells. Moreover, the DNA damage in terms of dsbs became heavier as the time of incubating cells with H_2O_2 - Fe^{3+} was extended but could be inhibited by catalase considerably. The sensitivity of PFGE was estimated by the concentration of H_2O_2 - Fe^{3+} which were 0.3 mmol/L and 6 μ mol/L, respectively.

Key words pulsed field gel electrophoresis, hydroxyl radicals, DNA double-strand breaks, human lymphocytes