

A New Method of Preparation of High purity Aprotinin by Chemical Modified Trypsin of Chitosan. SONG Yang, HOU Si, ZHAO Hui, WANG Rong-Hai, WU Zhong-Hua (*Biology Institute of Anhui Province, Hefei 230031, China*).

Abstract The trypsin was covalently linked with chemical modified granulechitosan and was used to isolate and purify aprotinin from the extract of cattle lungs by affinity chromatography. Then high-purity aprotinin was prepared after ultrafiltrating and freeze drying. The result showed: the specific

activity of immobilized trypsin on chitosan was 25 950 kU/g, 60.5% protein was coupled, and the activity recovery of trypsin was 55%. The purity of aprotinin was high, and the activity recovery of trypsin on immobilized trypsin had low non specific adsorption and ideal anti-contamination, and it could be used more than 72 times. It was accepted as a simple and stable method and suitable for purifying aprotinin with high activity in industrial manufacturing.

Key words immobilized trypsin, affinity chromatography, aprotinin, chitosan

用 cDNA 表达阵谱分析小鼠鼻咽部相对特异表达基因*

张玲 凌建华 何志巍 姚开泰¹⁾

(湖南医科大学肿瘤研究所, 卫生部癌变重点实验室, 长沙 410078)

摘要 利用 Mouse AtlasTM cDNA expression array 检测鼻咽、气管、食管、膀胱四种组织中 588 个已知基因的表达谱, 得到 11 个在鼻咽上皮中表达相对较高的基因, 作为鼻咽部组织相对特异基因的候选者, 并用 RT-PCR 进一步验证。

关键词 基因表达谱, 鼻咽, 相对组织特异性基因

学科分类号 Q756

构建鼻咽癌转基因小鼠模型是从整体上研究这一疾病发病分子机理的理想方法, 但成功的关键在于获得鼻咽部特异表达基因的调控区, 使导入的致癌相关基因能在鼻咽部特异性表达。目前工作重点仍在寻找鼻咽部特异表达的基因及其调控区。我室用 cDNA-RDA 方法得到数个在鼻咽部特异表达的片段, 多为未知序列, 有待克隆 cDNA 全长, 特别是基因的启动区^[1]。Clontech 公司最近推出 AtlasTM cDNA expression arrays, 在 80 mm × 120 mm 大小的膜上点有 588 个已知基因的特异代表性片段, 并将基因按功能分类排列在六个区域: a. 瘤基因、抑瘤基因、细胞周期调节因子; b. 应激反应相关基因、信号传导通路调节因子及效应因子; c. DNA 合成、修复、重组基因及凋亡相关基因; d. 转录因子; e. 受体及细胞表面抗原、细胞粘附因子; f. 细胞间信息传递因子 (生长因子、趋化因子、

干扰素等)。可同时检测组织中 588 个基因的表达情况^[2], 或比较组织、细胞在不同发育阶段 588 个基因的表达差异^[3]。我们利用 Mouse AtlasTM cDNA Expression Arrays 检测了鼻咽、气管、食管和膀胱四种上皮组织中 588 个基因的表达情况, 获得其基因表达谱, 通过分析比较基因表达差异, 筛选出在鼻咽部相对表达较高的基因, 作为其相对特异基因的候选者, 用 RT-PCR 进一步验证基因表达差异。

1 材料和方法

1.1 标本来源

五周龄昆明小白鼠 20 只, 颈椎脱臼法处死后,

* 国家自然科学基金重点项目 (39730200) 和美国中华医学会基金 (96-655) 资助项目。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (0731) 4360094; E-mail: klcrcmh@public.cs.hn.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-04-26

分离鼻咽、气管、食管、膀胱上皮，立即液氮冻存。

1.2 总 RNA 提取

按照 Trizol™ Reagent (GIBCO. com) 说明书进行。用 DNase I 消化 gDNA 后，紫外分光光度计进行 RNA 定量， A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0，取 4 μg RNA 于 1.0%~1.2% 琼脂糖凝胶电泳，检测 RNA 质量。

1.3 Poly A⁺ RNA 纯化

按照 MESSAGEMAKER mRNA Isolation System (Life & Technologies Co.) 说明书进行。100 μg RNA 约得到 1 μg Poly A⁺ RNA。

1.4 放射性标记 cDNA 探针合成及纯化

根据 Atlas™ cDNA Expression Array (Clontech

Co.) 用户手册进行， α -³²P-dATP 标记 1 μg Poly A⁺ RNA，G-50 过柱纯化探针。

1.5 杂交、洗膜及放射自显影

照用户手册进行。68℃ 预杂交 30 min，68℃ 杂交过夜，68℃ 洗膜三次，采用 AGFA 胶片，YEZ-ELB400 型增感屏，-75℃ 曝光。显影后 X 胶片于 VDS (Image Master^R VDS, Pharmacia) 成像系统摄影成像。

1.6 RT-PCR 反应

结合应用 Access RT-PCR System。一步法 RT-PCR (Promega Co.) 及 Reverse Transcription System 两步法 RT-PCR (Promega Co.)。扩增片段引物序列及片段长度如表 1 所示。

表 1 扩增片段引物序列

基因名称	基因库注册号	引物序列	片段长度/bp
1 三磷酸甘油醛脱氢酶 (G3PDH)	M32599	aatcccatcaccatctcca/ cctgctcaccacctcttg	580
2 钙结合蛋白 HR21SpA (HR21SpA)	D49429	tgtgtgactgatcttgg/ tctctcattggtctgcctt	226
3 转录因子 S-II (transcription factor S-II)	D00926	cactgaccttgcggtgta/ ctctcctgctgggtcttctt	199
4 RNA 活化蛋白激酶抑制子 (inhibitor of the RNA activated protein kinase)	U28423	cgcagccttatcacagt/ ctgctcactgggtttacat	270
5 丁酸盐反应因子 I (butyrate response factor I)	M58566	tttagcttgctgggttcc/ aaaaggegaaggggtattg	163

D49429、D00926、U28423 用两步法 RT-PCR: RNA 逆转录 (20 μl 反应体系): 总 RNA 1~2 μg, Mg²⁺ 5 mmol/L, AMV Reverse Transcriptase 15 U, RNasin 20 U, Oligo (dT)₁₅ 引物 0.5 μg, dNTP 1 mmol/L; 42℃ 60 min, 99℃ 5 min. PCR 反应 (25 μl 反应体积): 1/10 逆转录产物 (15~20 ng cDNA), 1× 反应缓冲液, dNTP 200 pmol, taq 酶 1.5 U, 引物 10 pmol; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 26 个循环 (D00926) 或 28 个循环 (D49429, U28423)。

M58566 (一步法) 反应条件: 50 μl 反应体系: RNA 0.5~1 μg; 1× 反应缓冲液; dNTP 200 pmol; 引物 15 pmol; Mg²⁺ 1.5 mmol/L; AMV 逆转录酶 (reverse transcriptase) 5 U; Tfl DNA 聚合酶 (Polymerase) 5 U, 反应条件: 48℃ 45 min; 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min 延伸。

1.7 灰度扫描

采用 TIPAS-98 真彩色医学图像分析处理系统。以看家基因 G3PDH 的密度值进行校正。

2 结果

a. RNA 的抽提及 mRNA 的纯化: RNA 三条主带 28S、18S、5S 清晰, 无降解。mRNA 片段大小约 12~0.5 kb (结果未显示)。

b. 两次膜杂交, 每次两张 cDNA Array 膜。以鼻咽、气管上皮为一组, 食管、膀胱上皮为一组, 两次杂交信号清楚。图 1 为放射自显影胶片进行扫描后打印的结果。该组照片显示表达明显, 肉眼能清楚识别的信号。膜分六个功能区 (A、B、C、D、E、F), 对应不同功能的基因。经过肉眼观察及灰度扫描, 选出在鼻咽中表达相对较高的基因 (表 2)。

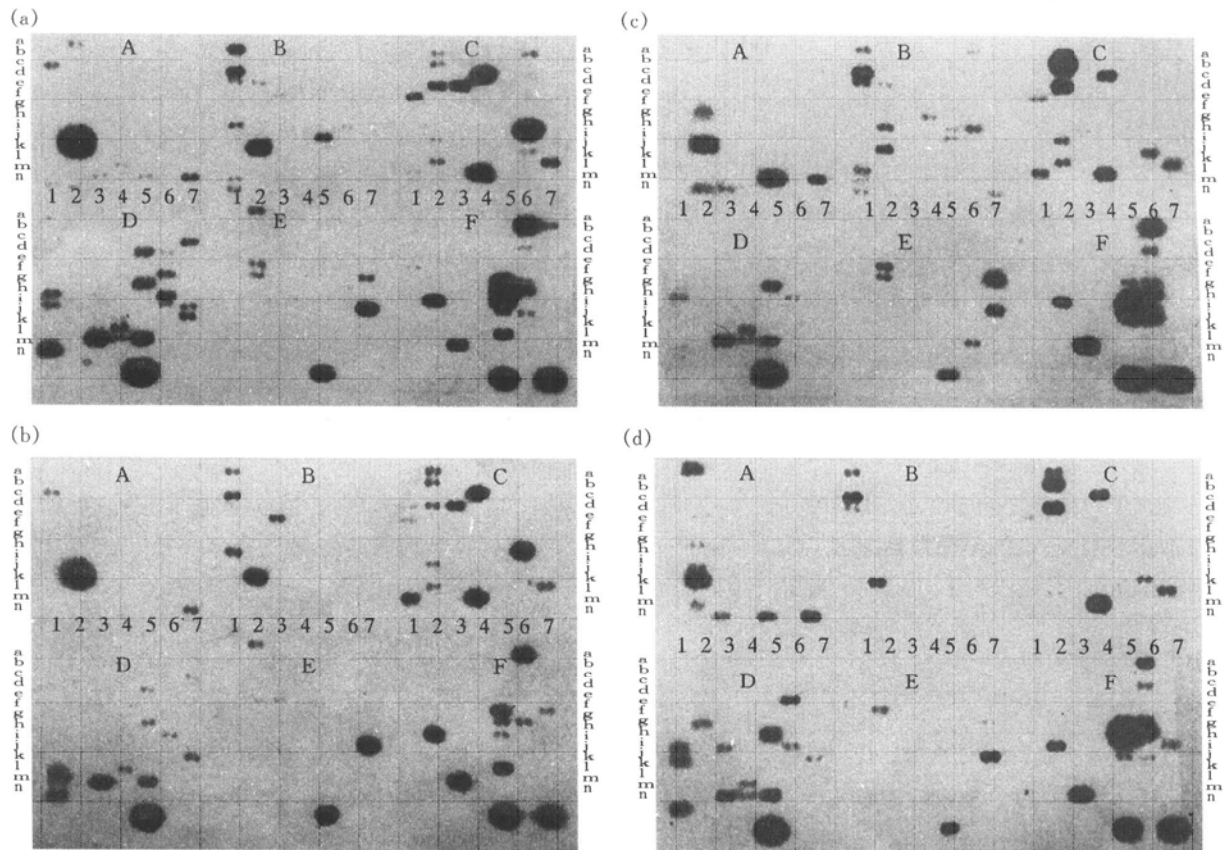


图 1 Mouse Atlas™ cDNA expression arrays 杂交结果
(a) 鼻咽; (b) 气管; (c) 食道; (d) 膀胱.

表 2 鼻咽部高表达基因及灰度扫描结果

膜中的位置	基因库中的序号	基因名称	灰度扫描			
			鼻咽	气管	食管	膀胱
D1i	M58566	丁酸盐反应因子 I (butyrate response factor I)	3.293	0.00	1.013	1.019
D1n	U42554	转录因子 Sim (Sim transcription factor)	5.440	2.979	1.687	4.010
D5e	U29086	神经螺旋-环-螺旋样蛋白 (neuronal helix-loop-helix protein NEX-1)	3.205	0.153	0.000	0.000
D6i	X61753	热休克基因转录因子 I (transcription factor I for heat shock gene)	3.084	0.876	1.118	1.225
D6g	U09419	视黄酸 x 受体作用蛋白 (retinoid x receptor/interacting protein)	1.915	0.370	0.000	0.000
D7d	D00926	转录因子 S- II (transcription factor S- II)	2.272	0.586	0.000	0.000
B1a	U03560	热休克蛋白 27 (HSP27)	5.628	2.236	4.206	4.024
B5i	U28423	RNA 活化蛋白激酶抑制子 (inhibitor of the RNA activated protein kinase)	3.180	0.000	0.183	0.000
C1e	U17162	BAG-1, 抗细胞死亡的 Bcl2 结合蛋白 (bcl-2 binding protein with anti-cell death activity)	3.335	0.000	0.000	0.000
C4c	U68193	Nm23-M2, c-myc 相关转录因子 (c-myc-related transcription factor)	10.477	7.989	9.558	9.835
C6h	D49429	HR21SpA. 钙结合蛋白 (calcium-binding protein), pw29.	13.975	8.724	0.000	0.000

注: 取看家基因 G3PDH 的信号定为 10, 其他信号与之相比较读数.

c. RT-PCR: 随机选取 C6h、D7d、B5i、D1i 四个基因, 利用 Internet 网中 Primer3 software (网址: <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/>

primer) 设计引物, 进行 RT-PCR 反应检验膜杂交结果 (图 2).

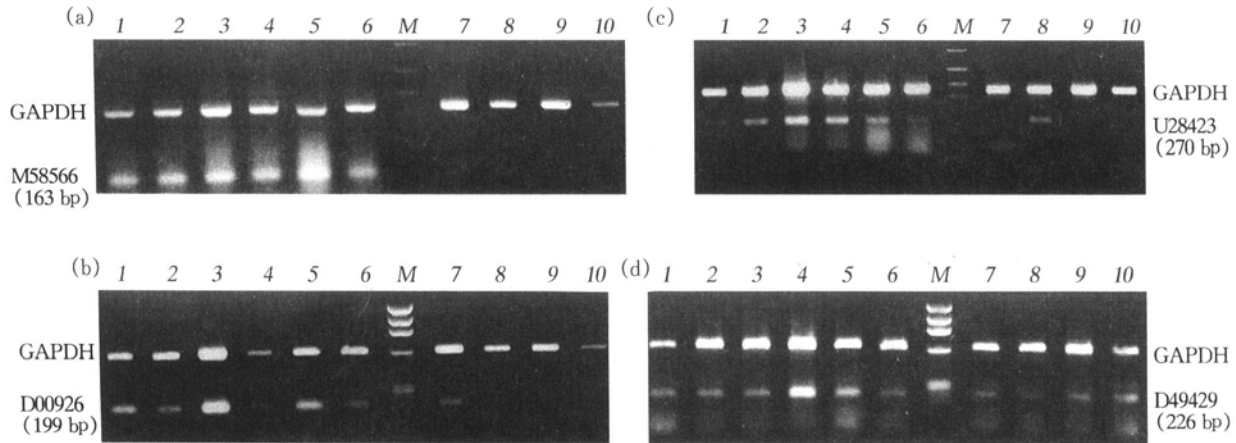


图 2 RT-PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果

(a) M58566; (b) D00926; (c) U28423; (d) D49429. 1: 鼻咽; 2: 气管; 3: 食管; 4: 膀胱; 5: 胃; 6: 肠; M: PCR 分子质量标准 (a、c), 分子质量标准 ϕ X174 DNA/*Hinf*I (b、d); 7: 心; 8: 肝; 9: 脑; 10: 肾.

3 讨 论

鼠鼻咽为位于颅底之下, 软腭之上的管状结构, 在组织结构和功能上并无特殊性, 很难从功能克隆、定位克隆等策略入手获得特异性表达基因, 而传统的检测基因表达方法如 RT-PCR、RNA 印迹等一次仅能检测一个或几个基因的表达, 工作量大而且效率低. Mouse AtlasTM cDNA Expression Array 可以同时检测 588 个基因在组织中的表达, 构成基因表达谱, 能快速直观地分析特定组织中的基因表达情况, 由于杂交膜可以反复利用, 亦可以比较不同组织中的基因表达差异.

我们将膜与四种上皮组织杂交后将结果进行灰度扫描比较鼻咽、气管、食管、膀胱组织中 588 个基因的表达差异, 筛选出 11 个在鼻咽部表达相对较高的基因作为鼻咽部相对特异基因的候选者; 随机挑选四个位点 (D1i、D7d、B5i、C6h) 的基因设计引物进行 RT-PCR 反应, 实验证实这些基因在鼻咽等上皮性组织中的表达明显高于心、脑、肝、肾等实质性组织, 杂交结果显示基因在气管、食管、膀胱等组织中不表达或低表达而 RT-PCR 均有产物, 有些产量还较高, 但都低于其在鼻咽部的表达. 分析原因可能是在杂交时不同反应探针的标记强度不同或因基因表达丰度过低用杂交方法不易检测, 这也说明 PCR 方法敏感度强于杂交. 由于所获得的基因均为已知基因, 对其功能有一定研

究, 基因的结构已清楚, 对分析其调控序列, 构建转基因动物等后继工作带来便利. 其不足之处在于一张膜中仅有 588 个基因, 相对于基因组中约 10 万个基因信息量较少, 难以得到完整的组织基因表达谱; 但选择了细胞各个功能区的基因, 信息面广, 能比较全面地反应细胞内主要功能基因的表达情况. 目前, GENE 等公司又相继推出点有 1 000 个、5 000 个, 18 000 个基因的高密度膜^[4], 以及新近推出的 DNA 芯片技术不仅可检测已知基因, 而且同时测定未知基因在组织中的表达^[5]. 相信随着这些技术的发展应用, 我们一定能找到更多的特异基因候选者.

本实验应用高密度膜杂交方法寻找鼻咽部组织表达相对特异的基因, 对这些基因调控区的分析将是我们下一步工作的重点.

致谢 感谢本室杨玉文、王磊同志在图像扫描及处理中所做的工作.

参 考 文 献

- 1 凌建华, 姚开泰. cDNA-RDA 法克隆小鼠鼻咽部组织特异性表达基因. 生物化学与生物物理学报 (Ling J H, Yao K T. Acta Biochem Biophys Sin), 1998, 30 (5): 501~504
- 2 Chenchik A, Chen S, Makhanov M, et al. Profiling of gene expression in a human glioblastoma cell line using the Atlas Human cDNA expression array I. CLON TECH-niques, VIII (1): 16~17
- 3 Sehgal A, Boynton A L, Young R F, et al. Application of the

differential hybridization of Atlas Human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J Surg Oncol*, 1998, **67** (4): 234~241

- 4 Jeremy J W, Wu C R, Yang P H, *et al.* Profiling expression patterns and isolation differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*, 1998, **51** (3): 313~324

Analysis of the Gene Expression in Murine Nasopharynx by Mouse Atlas™ cDNA Expression Array. ZHANG Ling, LING Jian-Hua, HE Zhi-Wei, YAO Kai-Tai (*Key Laboratory of Carcinogenesis of Ministry of Health, Cancer*

Research Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract 588 genes expressed in nasopharynx, trachea, esophagus and bladder tissues were examined by Mouse Atlas™ cDNA expression array and there are 11 genes expressed much higher in nasopharynx than in other tissues. These genes might be candidates for relative tissue specific genes of nasopharynx. The expression result was further confirmed by RT-PCR examination.

Key words gene expression profile, nasopharynx, relative tissue specific gene

科技部委托中国科学器材进出口总公司颁发化学试剂特供卡

中国科学器材进出口总公司受科技部委托, 承担改善化学试剂市场供应的工作, 现正举行为国内著名科学家建立化学试剂特供档案, 颁发化学试剂特供卡的活动。到目前为止, 按照科技部的要求, 已经为中国科学院化学部 106 位院士和生物学部 101 位院士, 以及中国工程院化工、冶金与材料工程学部 60 位院士和医药卫生工程学部 65 位院士建立了化学试剂特供档案, 并且用 EMS 寄送了化学试剂特供卡和通知信。此工作在科技界引起较大反响, 因此, 按照科技部的要求, 以及许多科学家的希望, 我们将进一步扩大化学试剂特供档案的建立范围, 第一步将再为 500 名科学家建立化学试剂特供档案并颁发化学试剂特供卡, 凡具有正教授或正研究员资格的科研人员, 我们将优先安排建立档案和颁发特供卡的工作。凡持有特供卡的科学家在我公司购买化学试剂将享受到如下的服务:

- 1、北京市内免费送货上门;
- 2、外地用户可享受邮政特快专递服务, 并免收国内快递费;
- 3、公司免收任何手续费;
- 4、及时订货, 按时交货, 不因我司责任拖延交货期;
- 5、无需预付货款或订金, 交货时付清。

此次活动无需您花费任何费用, 所有费用已由科技部承担。另外, 我公司将根据具体情况和您的要求, 派遣有关人员上门了解您的困难, 提出解决方案, 设法帮您解决。

凡希望得到化学试剂特供卡的科研人员, 可以把申请寄到我公司。地址如下:

中国科学器材进出口总公司
北京市东城区灯市口大街 75 号
邮编: 100006

申请中请写明: 姓名、单位、地址、电话、职称、您所取得的工作业绩以及从何期刊得到的信息。另外, 随信请附您职称证书的复印件, 以及所取得工作业绩的有关证明文件的复印件。

我公司为了改善化学试剂市场供应状况, 特组织成立化学试剂部专门负责代理国外主要化学试剂公司的产品, 现已有多家公司与我公司合作, 如 SIGMA、ALDRICH、FLUKA、ACROS 等等。若您需要我们的帮助, 请与我们联系, 我们将用热情的服务使您满意。联系方法:

电话: (010) 65272049; 传真: (010) 65272048

E-mail: xiangyu@csimc.com.cn

Yjxiong@csimc.com.cn