

技术与方法

HeLa 细胞端粒酶的分离纯化及其蛋白质组分的研究*

周俊宜 罗超权

(中山医科大学生化教研室, 广州 510080)

摘要 根据端粒酶含有蛋白质组分和 RNA 组分的特点, 采用寡核苷酸亲和纯化法从 HeLa 细胞蛋白粗提物中分离纯化人类端粒酶, 纯化产物以 TRAP 法检测其延伸端粒活性, 并采用 RNA 印迹法进行鉴定, 然后从纯化产物中分离蛋白质组分, 以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其蛋白质亚基成分, 可见到 4 种蛋白质亚基成分, 与蛋白质分子质量标准比较, 有两条位置接近 212.2 ku, 一条接近 116.0 ku, 一条接近 42.7 ku. 结果表明, 蛋白质寡核苷酸亲和纯化法一步性分离纯化 HeLa 细胞端粒酶可得到端粒酶活性片段.

关键词 端粒酶, 亲和纯化, 蛋白质, TRAP, HeLa 细胞, 寡核苷酸

学科分类号 Q756

端粒酶是一种核糖核蛋白, 含有酶蛋白成分和 RNA 成分, 它的主要作用是合成与延伸端粒. 近年来的研究认为人类端粒酶与恶性肿瘤的发生和人的衰老之间具有非常密切的关系^[1~4]. 现在人们试图从端粒酶方面寻找抗肿瘤或抗衰老的新途径. 要达到这一目的, 阐明人类端粒酶的基本组成结构和生化特性是其前提和基础. 到目前为止, 对人类端粒酶 RNA 组分已研究得比较清楚^[5], 但人类端粒酶的分离纯化尤其是对其蛋白质亚基成分的分析却一直是该研究领域中的一大难题, 国内外还未有获得成功的报道. 本研究从人类端粒酶的组成特点和功能出发, 以其含有蛋白质成分和 RNA 成分这一重要特点和它在延伸端粒时的非常特别的作用过程为依据, 自行设计了一套高灵敏、高特异的寡核苷酸亲和纯化法对 HeLa 细胞端粒酶进行分离纯化和鉴定, 并对其蛋白质组分进行分析.

1 材料与方法

1.1 材料

HeLa 细胞株由本校寄生虫学教研室提供; 细胞培养试剂、RT-PCR 试剂购自北京天象人公司, TRAP 检测试剂、亲和纯化试剂购自美国宝灵曼公司; TS 引物、CX 引物由上海细胞生物研究所合成; 亲和纯化寡核苷酸序列和反转录引物由加拿大真达公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 HeLa 细胞端粒酶粗提液的制备: HeLa 细胞株, 培养液 PRMI1640 加 10% 小牛

血清, 常规培养. 收集细胞, 以 10^6 个细胞每 20 μ l 制备端粒酶粗提液, 具体方法按文献 [3] 进行.

1.2.2 粗提物端粒酶活性的测定: 参照文献 [3] 合成 TS 引物和 CX 引物, 采用 TRAP 法检测 HeLa 细胞端粒酶活性, 具体测定方法按文献 [3] 进行.

1.2.3 寡核苷酸亲和纯化分离 HeLa 细胞端粒酶的基本思路 and 过程: 根据人端粒酶 RNA 组分的模板序列、人的端粒序列以及端粒酶催化合成端粒时的“爬行模式”, 设计合成长短不一的两条互补寡核苷酸链, 通过 T4DNA 连接酶的作用把它们连接到一种带有双链寡核苷酸尾的层析磁珠上, 通过模拟端粒酶催化端粒的延伸过程使其 RNA 组分模板序列与寡核苷酸碱基互补, 从而达到对人端粒酶高特异、高灵敏的亲和纯化的目的.

亲和纯化过程包括连接反应、结合反应、洗脱过程, 首先以带有一段双链寡核苷酸的纯化微珠与亲和纯化寡核苷酸在 T4 连接酶的作用下进行连接反应, 待连接反应完成以后, 加入 HeLa 细胞粗提物进行蛋白质结合反应, 端粒酶通过其 RNA 组分中的模板序列与寡核苷酸中的人端粒重复序列互补而结合到纯化磁珠上从而与上清液相分离, 最后通过竞争性洗脱过程使结合在磁珠上的端粒酶活性片段洗脱下来. 采用 TRAP 法测定其端粒酶活性.

1.2.4 RNA 印迹法对纯化片段的鉴定: 采用改良的 RNA 印迹法, 将洗脱所得的纯化片段与地高辛

* 国家自然科学基金资助项目 (39670715).

Tel: (020) 87330621, E-mail: shying@gzsums.edu.cn

收稿日期: 1999-06-30, 修回日期: 1999-11-24

标记的端粒酶反义寡核苷酸片段在一小离心管中进行结合反应, 然后依次进行聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 电转移, 化学发光和放射自显影.

1.2.5 纯化产物蛋白质组分的分析: 纯化产物核苷酸链上端粒酶洗脱下来. 整个过程在 4℃ 进行. 洗脱液迅速置于 -80℃ 保存, 以 TRAP 法检测其端粒酶活性. 用 RNAase 消化后进行 SDS-聚丙烯酰

胺凝胶电泳分析, 5% 浓缩胶、8% 分离胶, 15 mA, 2 h, 考马斯亮蓝染色 6~8 h, 甲醇-冰乙酸洗涤至背景无色, 观察结果, 拍照.

2 结 果

2.1 HeLa 细胞端粒酶的纯化结果

纯化结果见表 1.

表 1 HeLa 细胞端粒酶的纯化

	总蛋白质/mg	总活性 (cpm × 10 ⁹)	比活性 (cpm × 10 ⁹) / mg	纯化倍数	产率/%
细胞粗提物	20	2.0	0.10	1	100
亲和上清液	18.75	0.22	0.012		11
洗脱液	0.010	1.8	180	1800	90

2.2 HeLa 细胞粗提物及纯化产物端粒酶活性的检测结果

以 TRAP 法检测 HeLa 细胞端粒酶活性, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色, 可见典型的梯形条带 (图 1).

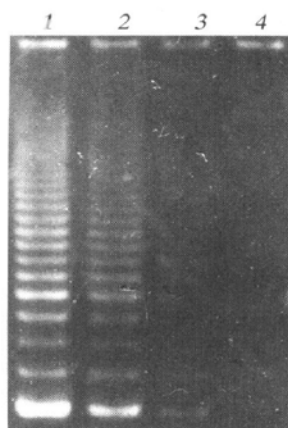


图 1 TRAP 法检测 HeLa 细胞端粒酶活性

1: HeLa 细胞粗提物; 2: 洗脱产物端粒酶活性; 3: 亲和上清液; 4: 阴性对照.

2.3 RNA 印迹分析对纯化片段的鉴定 (图 2)

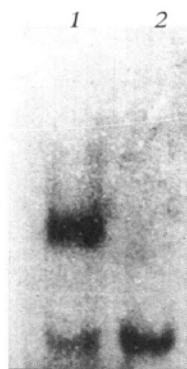


图 2 纯化产物 RNA 印迹分析

1: 纯化产物加反义探针; 2: 纯化产物加无关寡核苷酸探针.

2.4 纯化产物蛋白质组分 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果

HeLa 细胞粗提物经亲和纯化后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (图 3), 可见到 4 条很纯的蛋白质条带, 与蛋白质分子质量标准相比较, 最大的两条分子质量接近 212.2 ku, 中间的一条接近 97.4 ku, 最小的一条大于 40 ku.

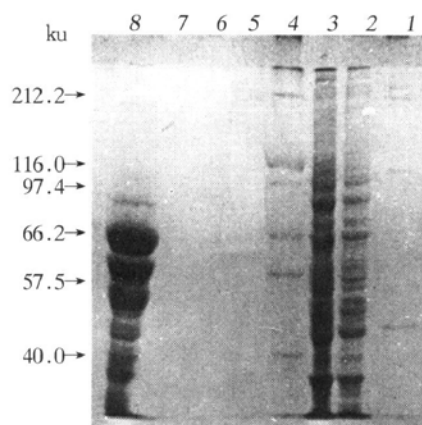


图 3 蛋白质成分的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

1: 纯化产物; 2: 亲和反应后的上清液; 3: HeLa 细胞粗提物; 4: 蛋白质分子质量标准; 5: 洗脱前最后一次的清洗液; 6: 无关片段的阴性对照; 7: 无端粒酶活性蛋白质提取液对照; 8: 无端粒酶活性蛋白质提取液.

3 讨 论

端粒酶作为一种核糖核酸逆转录酶在组成结构上有其特点. 而人端粒酶又由于在细胞内含量甚低 (其活性比四膜虫等低等生物低 100 倍) 而使其分离纯化工作尤其是对其蛋白质组分的分析一直难以取得突破性进展. 要从含有种类繁多的蛋白质成分的细胞粗提物中分离到含量极微的端粒酶成分, 关键所在是必需抓住该酶在组成、结构和功能上的特

点并针对这些特点来进行操作, 才能有效地提高其特异性和灵敏性. 查阅近年来国内外有关资料, 仅见国内外各有一则对人类端粒酶进行分离纯化的报道^[6, 7], 而且都只是报道初步分离到有端粒酶活性的组分, 并未对活性组分进行进一步的分离鉴定和蛋白质亚基组分的分析以及酶的活性重组.

本研究从人端粒酶的结构和功能出发, 经过两年多的摸索和探讨, 把实验设计的重点放在端粒酶包含了蛋白质组分和 RNA 组分, 而它的 RNA 组分又是作为染色体端粒合成时的模板这一重要特点上, 并参考端粒酶催化端粒合成时的所谓“爬行模式”和借鉴蛋白质纯化技术中的 DNA 结合蛋白质纯化过程的某些思路和技术特征, 设计了长短不一并能互补的两段寡核苷酸, 并把它们连接到一纯化磁珠上, 然后通过模拟端粒延伸的过程使细胞粗提物中的端粒酶结合到寡核苷酸上, 再通过竞争性洗脱特异地把端粒酶从层析磁珠洗脱下来. 再采用地高辛标记的端粒酶 RNA 反义寡核苷酸探针和 RNA 印迹对纯化所得片段进行了鉴定, 同时还进行了活性重组检测并获得了成功 (将另文发表). 在实验过程中, 我们还同时设立了两组阴性对照, 一组是无关的寡核苷酸片段对端粒酶粗提物的纯化; 一组是用端粒酶阴性的非肿瘤细胞蛋白粗提物进行亲和纯化. 实验结果表明, 两者都没有得到相应的纯化片段.

对纯化产物进行蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析可见大小不同的 4 个蛋白质亚基, 由于国内外人端粒酶蛋白质组分的研究至今尚处于探讨阶段, 无从比较. 与蛋白质分子质量标准比较, 有其中两条相距很近的条带分子质量与 212.2 ku 条带比较接近, 中间的一条与 116.0 ku 条带接近, 最小的一条与 42.7 ku 接近.

最近国外有人根据纤毛动物分离和克隆出来的端粒酶蛋白质组分的研究结果 (分子质量为 123 ku 和 43 ku 的两种成分), 用于对人类同源物的研究, 克隆出一个相关的片段, 被认为可能是人端粒酶催化亚单位的 p127 (127 ku); 还有一报道在人和大鼠中克隆四膜虫 p80 的同源物 p230 (230 ku) 和 p240 (240 ku)^[8]. 从这些研究结果来看, 本研究所得的 4 种蛋白质亚基成分在片段大小上似与之有相符之处, 但两者间是否确有相关或同一性, 尚有待于进一步的研究证实. 进一步的工作正在进行中.

参 考 文 献

- 1 Collins K, Kobayashi R, Greider C W. Purification of tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell*, 1995, **81** (6): 677~ 686
- 2 Autexier C, Pruzan R, Funk W D, *et al.* Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *The EMBO J*, 1996, **15** (21): 5928~ 5938
- 3 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K P, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, **266** (23): 2011~ 2021
- 4 Harrington L, Mcphail T, Mar V, *et al.* A mammalian telomerase associated protein. *Sciences*, 1996, **275** (11): 973 ~ 977
- 5 Walter D F, Sy-Shi W, Bryant V, *et al.* The RNA component human telomerase. *Science*, 1995, **269** (14): 1236~ 1244
- 6 Schnapp G, Rodi H P, Rettig W J, *et al.* One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Research*, 1998, **26** (13): 3311~ 3313
- 7 郑晓飞, 王升启, 邢瑞云, 等. 寡核苷酸亲和纯化人端粒酶的研究. *军事医学科学院院刊*, 1997, **21** (2): 157
Zheng X F, Wang S Q, Xing R Y, *et al.* *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 1997, **21** (2): 157
- 8 张 凯. 端粒酶蛋白质亚单位的研究进展. *国外医学分子生物学分册*, 1999, **21** (3): 167~ 170
Zhang K. *Molecular Biology Element of Foreign Medical Sciences*, 1999, **21** (3): 167~ 170

The Study of Purification of HeLa Cells Telomerase and Its Protein Components. ZHOU Jun-Yi, LUO Chao-Quan (*Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China*).

Abstract To purify the telomerase of HeLa cells and to study its protein components. The method of affinity purifying was used to extract the telomerase component from the crude extract of HeLa cells, basing on the specificity of telomerase containing protein and RNA. And then the activity of telomerase was tested, SDS-PAGE was used to test protein components. There four bands were observed in the SDS-PAGE gel, there are two near 212.2 ku, one near 97.4 ku, one near 42.7 ku compared with the protein mark. It was shown that the product with telomerase activity was obtained using the affinity purification method.

Key words telomerase, purification, protein, TRAP, HeLa cells, oligonucleotide