物,它位于高血糖素原羧基末端,与其信号肽之间尚有胰高血糖素、胰高血糖素样肽 1(GLP-1)等多肽序列[11],故用于体内基因治疗时尚需切除这部分多肽编码序列,使其信号肽与成熟肽编码序列直接相连,避免基因治疗时产生其它多肽而带来副作用。

我们采用了 PCR 重叠延伸技术,成功拼接了 GLP2 的信号肽和成熟肽。该技术又称重叠延伸剪接术(splicing by overlap extension,SOE),它是基于 PCR 技术,不需要引入酶切位点,而通过 PCR 重叠延伸将不同的 DNA 片段进行连接的一种操作简便、快速、准确的基因重组技术[12]。我们针对 SOE 引物设计的要求,在引物中引入 overlap,不需要在每条引物中都引入 overlap,我们只在引物 4 和引物 5 的 5′端引入了 overlap。首先分别扩增 2 个目的 DNA 片段,然后,第一个片段的上游引物 3 和第 2 个片段的下游引物 6,将 2 段 cDNA 通过 PCR 进行融合为嵌合分子 cDNA,获得了特异性较高、扩增效率亦高的 PCR 产物。本实验采用 pVITRO3 载体,因为嵌合分子的两端引入了 *Sta*Ⅰ和 *Cla*Ⅰ限制性酶切位点,所以可以将载体和嵌合 cDNA 双酶切回收后进行定向连接,根据载体的潮霉素 B 基因筛选标记,较快地筛选阳性重组子,酶切位点的引入方便了 PCR 产物克隆的酶切鉴定,测序结果与已知序列相比较显示:无论是从引物合成还是扩增产物均正确无误。

3.3　[2]Gly-GLP2 促肠上皮增殖活性检测

目前国内外检测肠上皮组织或循环血液中 GLP2 含量的方法主要是先采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)分离纯化 GLP2,再结合放射免疫分析方法进行测定[13]。直接采用 HPLC 方法检测 GLP2 含量有很大困难,因为循环血液中的 GLP2 含量极低(pg/ml),达不到 HPLC 能检测到的最低极限(ng/ml)。我们以 Caco-2 细胞为靶细胞,应用体外实验方法直接证明了转染 [2]Gly-GLP2 基因的 Caco 细胞增殖活性明显增加,提示培养的上清中有 [2]Gly-GLP2 蛋白分泌。

参考文献:

[1] Chance W T, Sheriff S, Dayal R, *et al*. The role of polyamines in glucagon-like peptide-2 prevention of TPN-induced gut hypoplasia[J]. Peptides, 2006, 27(4): 883-892.

[2] Burrin D G, Stoll B, Guan X, *et al*. Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets[J]. Endocrinology, 2005, 146(1): 22-32.

[3] Brubaker P L, Drucker D J. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system[J]. Endocrinology, 2004, 145(6): 2653-2659.

[4] Cottrell J J, Stoll B, Buddington R K, *et al*. Glucagon-like peptide-2 protects against TPN-induced intestinal hexose malabsorption in enterally fed piglets[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(2): G293-G300.

[5] Guan X, Karpen H E, Stephens J, *et al*. GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow[J]. Gastroenterology, 2006, 130(1): 150-164.

[6] Perez A, Duxbury M, Rocha F G, *et al*. Glucagon-like peptide 2 is an endogenous mediator of postresection intestinal adaptation[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2005, 29(2): 97-101.

[7] Cameron H L, Perdue M H. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(1): 214-220.

[8] Washizawa N, Gu L H, Gu L, *et al*. Comparative effects of glucagon-like peptide-2 (GLP-2), growth hormone (GH), and keratinocyte growth factor (KGF) on markers of gut adaptation after massive small bowel resection in rats[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004, 28(6): 399-409.

[9] Jeppesen P B, Sanguinetti E L, Buchman A, *et al*. Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients[J]. Gut, 2005, 54(9): 1224-1231.

[10] Booth C, Booth D, Williamson S, *et al*. Teduglutide (_Gly2[GLP-2]) protects small intestinal stem cells from radiation damage[J]. Cell Prolif, 2004, 37(6): 385-400.

[11] Drucker D J. Glucagon-like peptides[J]. Diabetes, 1998, 47(2): 159-169.

[12] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, *et al*. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.

[13] DaCambra M P, Yusta B, Sumner-Smith M, *et al*. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2[J]. Biochemistry, 2000, 39(30): 8888-8894.

(编辑　王　红)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部