鼠12 h时存在内毒素血症，血BUN、Cr显著升高，肾组织NO显著升高，肾血流显著下降；即时给予小剂量L-Arg后明显降低血内毒素及肾组织NO，肾功能明显改善，明显降低死亡率，显著延长死亡时间；延时给予后对肾功能未见明显影响；大剂量L-Arg无论是延时或即时给予后均显著升高血内毒素及肾组织NO，肾血流量显著下降，肾功能明显受损，死亡率显著增加，死亡时间明显缩短。从而表明：一方面AHNP早期加入适量L-Arg后生存的NO，通过改善AHNP大鼠全身及肾脏局部血循环作用，减轻内毒素血症，相对减少了胰、肾组织NO生成，避免了AHNP时过量NO生成对胰、肾组织的损害作用，从而起着有益作用[5,7]；另一方面随过量NO生存：①NO与内毒素诱发产生的大量的细胞因子如TNFα协同作用对肾脏损害[7]；②随全身NO产生增加，降低血管对宿血管物质反应，致肾组织缺血性损害；③局部过量NO与O_2^-一相互作用后对肾组织细胞直接毒性作用[8]。

总之，AHNP大鼠在不同时机、不同剂量条件下生成的NO对胰、肾组织具有截然不同的生物学功能，了解这一变化对于临床应用NO供体治疗AHNP具有重要意义。

参考文献：

[1] Werner J, Revera J, Castillo C F, *et al*. Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis[J]. Surgery, 1997, 121(1): 23-30.
[2] Aho H J, Koskensal S M L, Nevalainen J J, *et al*. Experimantal pancreatitis in the rat, sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis J scand[J]. J Gastroentorol, 1980, 15(2): 411-416.
[3] Liu X H, Nakano I R, Yamaguchi Hy, *et al*. Protective effect of nitric oxide on development of acute pancreatitis in rats[J]. Dig Dis Sci, 1995, 40(10): 2 162-2 169.
[4] Abe T, Shimosegawa J, Satoh A, *et al*. Nitric oxide regulates pancreatitis edema formation in rat cearulein-induced pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1995, 30(3): 636-642.
[5] Jaworek J, Jachimcazk B, Bonior J, *et al*. Protective role of endogenous nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide induced pancretic damage[J]. J Physiol Pharmacol, 2000, 51(1): 85-102.
[6] Shimosegawa J, Toyota J. NO and pancreatic diseases[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1999, 96(8): 23-32.
[7] Tom L A, Castro I, *et al*. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia[J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(5): 1 139-1 145.
[8] Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic ranal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response[J]. 1998, 7(3): 289-295.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2001)09-1083-01

个案与短篇

人端粒酶催化亚单位诱饵融合蛋白表达载体的构建及初步鉴定

Construction and preliminary identification of human telomerase reverse transcriptase bait fusion protein vector

周 平[1]，陈 兵[2]，刘为纹[1]，房殿春[1]，张 雪[3]，黄庆[3]，杨仕明[1]（第三军医大学附属西南医院：[1]全军消化专科中心；[2]内分泌科；[3]检验科，重庆 400038）

端粒是真核细胞染色体末端的一个特殊结构，由一段具有特定重复序列的DNA和端粒结合蛋白组成，是维持染色体结构稳定的重要因素。正常细胞随着细胞分裂活动的进行，端粒DNA逐渐缩短，当缩短到一定程度时，染色体结构被破坏，细胞进入衰老期并以死亡而告终。但肿瘤细胞似乎丧失了这种能力，表现出永生化而无限制增殖的特性。尽管端粒研究为肿瘤、衰老难题提供了一个重要的研究方向，但有关端粒蛋白组分的结构及其调控机制仍不十分清楚。因此，寻找新的、关键性的端粒、端粒酶调控分子是非常重要的[1]。本课题拟以已发现的端粒相关蛋白中较为重要的人端粒酶催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)为诱饵，构建hTRT诱饵融合蛋白表达载体，为从cDNA文库中筛选与hTRT作用的端粒相关未知蛋白的编码基因奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ(Promega公司)，T4 DNA连接酶(Roche公司)，载体质粒pGBKT7(Clontech公司)，hTRT cDNA质粒pGRN145由美国Geron公司惠赠。宿主菌DH5α，蛋白胨及酵母提取物(Difco公司)，琼脂糖、λ/hindIII Marker(华美公司)，质粒提取试剂盒(roche公司)。紫外分光仪(Beckman Du-600)，电洗脱槽。

1.2 方法

1.2.1 质粒DNA的提取及纯化 质粒DNA制备按质粒提取试剂盒操作说明。

1.2.2 hTRT质粒pGRN145、载体质粒pGBKT7经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切，目的片段的回收纯化采用电洗脱法[2]。洗脱槽内灌满0.5× TBE溶液，从v型孔的垂直侧加入含溴酚蓝的5 mol/L NaCl溶液300 μl，左侧圆形样品孔内放入割取的含有待回收的

（下转1087页）

基金项目：国家自然科学基金高技术探索资助项目(39980010)
作者简介：周 平(1962-)，男，山东省淄博市人，博士研究生，主治医师，主要从事胃癌和肝癌发病机制及早期诊断方面的研究，发表论文12篇。电话：(023)68754000-73057
通讯作者：陈 兵，电话：(023)68754138
收稿日期：2001-05-20；修回日期：2001-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

regulated gene expression of Ito cells[J]. Hepatology, 1996, 24(2): 352—360.
[2] Border W A, Noble N A, Yamamoto T, *et al*. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease[J]. Nature, 1992, 360(6 402): 361—364.
[3] Reichel M B, Cordeiro M F, Alexander R A, *et al*. New model ! of conjunctival scarring in the mouse eye[J]. Br J Opthalmol, 1998, 82(9): 1 072—1 077.
[4] Narayanan A S, Page R C, Swanson J. Collagen synthesis by human fibroblasts. Regulation by transforming growth factor-beta in the presence of other inflammatory mediators[J]. Biochem J, 1989, 260(2): 463—469.
[5] Mietz H, Chez Barrios P, Lieberman M W, *et al*. A mouse model to study the wound healing response following filtration surgery[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(6): 467—475.
[6] Cordeiro M F, Bhattacharya S S, Schultz G S, *et al*. TGF-beta 1, -beta 2, and -beta 3 *in vitro*: biphasic effects on Tenon's fibroblast contraction, proliferation, and migration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(3): 756—763.
[7] Merle B, Durussel L, Delmas P D, *et al*. Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain[J]. J Cell Biochem, 1999, 75(3): 538—546.
[8] Melrose J, Ghosh P, Taylor T K, *et al*. Elevated synthesis of biglycan and decorin in an ovine annular lesion model of experimental disc degeneration [J]. Eur Spine J, 1997, 6(6): 376—384.
[9] Khaw P T, Doyle J W, Sherwood M B, *et al*. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1993, 111(2): 263—267.
[10] Schwartz A L, Weiss H S. Bleb leak with hypotony after laser suture lysis and trabeculectomy with mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1992, 110(8): 1 049.
[11] Derick R J, Pasquale L, Quigley H A, *et al*. Potential toxicity of mitomycin C[J]. Arch Ophthalmol, 1991, 109(12): 1 635.
[12] Nuyts R M, Greve E L, Geijssen H C, *et al*. Treatment of hypotonous maculopathy after trabeculectomy with mitomycin C[J]. Am J Ophthalmol, 1994, 118(3): 322—331.

(编辑　谢义霞)

(上接 1083 页)

DNA 凝胶片, 150 V, 30 min, 从 V 型孔内吸回含所需的 DNA 溶液。无水乙醇沉淀, 紫外分光仪定量。

1.2.3　hTRT 质粒 pGRN145 目的片段与载体质粒 pGBKT7 的定向连接[3], 按载体: 插入片段摩尔比 1∶3 的比例, 将二者加入到连接反应体系中, 5× T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μl, T4 DNA 连接酶 1 μl(总反应体积 10 μl), 12 ℃反应 16 h, 置 4 ℃备用。

1.2.4　大肠杆菌 DH5α 感受态细胞的制备(氯化钙法)。

1.2.5　转化: 将 pGBKT7-hTRT 连接产物转化入制备好的 DH5α 大肠杆菌感受态细胞。感受态细胞 100 μl, 加连接反应物 2 μl 置冰浴 30 min。42 ℃水浴 90 s。加 900 μl LB 培养液, 37 ℃振荡培养 45 min。转化菌涂于卡那霉素 LB 琼脂平板倒置培养 16 h。提取质粒, *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切鉴定重组体。

2　结果

hTRT cDNA 质粒经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分为目的片段 3.4 kb, 载体 10.6 kb 两段, 采用电洗脱法回收 3.4 kb 目的片段。

将载体质粒 pGBKT7 经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切, 采用电洗脱法回收 7.3 kb 载体片段。通过 T4 DNA 连接酶将 hTRT cDNA 质粒目的片段定向克隆入载体质粒 pGBKT7, 将其转化入大肠杆菌 DH5α。抽提质粒后经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切(7.3、3.4 kb)及 *Hind* Ⅲ单酶切(4.9、4.2、1.5kb)证实, hTRT cDNA 目的片段与载体质粒 pGBKT7 连接, 表明成功构建了 pGBKT7-hTRT 诱饵融合蛋白表达载体。

3　讨论

研究表明, 在已发现的端粒酶 3 个亚单位中, hTRT 可能是端粒酶催化活性亚单位。hTRT 在恶性肿瘤及肿瘤细胞株中呈高表达, 但在正常组织及端粒酶阴性的细胞株中不表达, 与端粒酶活性具有良好的一致性。hTRT cDNA 导入正常细胞使端粒酶活化, 细胞的生长周期增加, 而且细胞的核型无任何改变。研究显示 hTRT 上调是肿瘤发生的重要事件[4,5]。有关端粒及端粒相关蛋白的研究已取得较大进展, 但端粒、端粒酶相关蛋白组分的构成及其调控的分子机制并不十分清楚。因此, 利用亚克隆技术构建 hTRT 诱饵融合蛋白表达载体, 通过酵母双杂交技术筛选与 hTRT 相互作用的未知蛋白分子, 可望为上述问题的解决带来希望。

目前研究蛋白质间相互作用的主要技术方法之一是酵母双杂交技术, 其原理是基于许多真核转录活化因子是由两个物理上能分开的、功能上独立的结构域组成。如酵母 GAL4 转录活化因子包含一个 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DNA-BD)和转录活化结构域(Active domain, AD), 两种结构域是激活一个基因所必需的。两种不同的克隆载体用于制备这两种 GAL4 结构域分别与有相互作用可能性的两种蛋白的基因融合, 如果两种杂合蛋白的非 GAL4 部分相互作用, 则使 DNA-BD 和 AD 栓在一起, 使 GAL4 的转录活化功能再现, 激活具有上游 GAL4 结合位点的报告基因(lacZ 和 His3)。将编码靶蛋白基因克隆至 DNA— BD 载体以产生靶蛋白-DNA-BD 的融合蛋白(即"诱饵"), 即可筛选构建在 AD 载体上的 cDNA 文库, 获取 His^+ 的转化株, 利用灵敏的β-半乳糖苷酶活性的滤膜影印分析, 进一步检测 His^+ 转化株中二级报告基因(lacZ)的表达。因此, 诱饵融合蛋白表达载体的成功构建是实验首先要解决的关键问题。本研究以两种限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ分别消化 hTRT 质粒 pGRN145、载体质粒 pGBKT7, 将目的片段 hTRT cDNA 定向克隆入载体 pGBKT7, 经过大肠杆菌转化及质粒提取, 再经 *EcoR* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切证实成功构建了 hTRT 诱饵融合蛋白表达载体 pGBKT7-hTRT, 为从 cDNA 文库中筛选与 hTRT 相互作用的端粒相关未知蛋白的编码基因奠定了良好的实验基础。

关键词: 端粒; 诱饵载体
中图法分类号: R394-33　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Greider C W. Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future[J]. Curr Biol, 1998, 8(5): R178.
[2] 吉昌华, 陈南春, 杨安钢, 等. 生物化学及分子生物学实验与技术[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1994. 165.
[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 55—65.
[4] Steinert S, Shay J W, Wright W E. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(3): 1 095—1 098.
[5] Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, *et al*. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(2): 401—405

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net