DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.041
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1113-02

技术方法

人hTRT正反义真核表达载体的构建及初步鉴定

Construction and preliminary identification of hTRT sense and antisense eukaryotic expression vector

杨仕明,房殿春,杨金亮,罗元辉,鲁 荣,刘为纹,梁光萍 (第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 构建人端粒酶蛋白催化亚单位(hTRT)正、反义真核表达载体。方法 采用分子克隆技术将hTRT cDNA正向及反向克隆到真核表达载体pcl-neo中。结果 *Not*Ⅰ酶切后,正义重组基因为8.8 kb一条带,反义重组基因为3.4 kb和5.4 kb二条带,与理论计算相符。结论 成功构建了hTRT正反义真核表达载体。

为探讨人端粒酶蛋白催化亚单位(Human telomerase reverse transcriptase, hTRT)在肿瘤基因治疗中的应用前景及正常细胞发育中的作用,我们构建了hTRT正反义真核表达载体,为进一步研究hTRT基因在延缓细胞衰老及肿瘤基因治疗中的作用创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 *E. coli* JM109由本室保存;pcl-neo真核表达载体购自Promega公司;pGRN-145质粒由美国Geron公司Okarma博士惠赠,全长14 kb,载有3.45 kb的hTRT cDNA。

1.1.2 工具酶及试剂 *EcoR*Ⅰ和*Not*Ⅰ限制性内切酶、无DNase的RNase、牛小肠碱性磷酸酶(CIP)和T4 DNA连接酶购自Promega公司。

1.2 hTRT真核表达载体的构建

1.2.1 质粒的提取和纯化 采用Boehringer Mannheim公司的试剂试剂盒,按说明书进行。

1.2.2 hTRT cDNA的制备 hTRT cDNA全长3.45 kb,位于pGRN-145质粒的*EcoR*Ⅰ酶切位点之间,用*EcoR*Ⅰ酶切该质粒,0.8%琼脂糖电泳,用琼脂糖DNA提取试剂盒(Boehringer Mannheim公司)回收DNA片段,去离子水溶解沉淀,-20 ℃冻存备用。

1.2.3 pcl-neo载体的酶切及5′端去磷酸化 用*EcoR*Ⅰ酶切pcl-neo使其线性化,试剂盒回收片段;牛小肠碱性磷酸酶(CIP)对线性载体5′端去磷酸化:线性pcl-neo 17 μl,10× CIP缓冲液2 μl,CIP 1 μl,于37 ℃反应30 min,75 ℃ 15 min,0.8%琼脂糖电泳鉴定,试剂盒回收片段,去离子水溶解,-20 ℃保存备用。

1.2.4 连接反应 取4 μl去磷酸化的pcl-neo/*EcoR*Ⅰ片段与4 μl hTRT cDNA片段混合均匀,45 ℃反应5 min,迅速转至冰上,加T4 DNA连接酶1 μl,缓冲液1 μl混匀,16 ℃水浴过夜。

1.2.5 质粒转化和克隆挑选 用氯化钙法制备JM109感受态,并按常规方法将连接产物转化感受态,将200 μl转化后的菌液涂于含氨苄青霉素的LB培养板上,37 ℃过夜。挑取单个菌落置于含氨苄青霉素的LB培养基中,37℃振摇过夜,质粒提取试剂盒提取质粒,根据重组质粒图谱,用*Not*Ⅰ限制性内切酶进行酶切鉴定。

2 结果

2.1 pGRN-145质粒的酶切及鉴定

hTRT cDNA全长3.45 kb,两端为*EcoR*Ⅰ酶切位点。用*EcoR*Ⅰ酶切质粒,经0.8%琼脂糖电泳后,所得到的酶切片段与预期长度相符。

2.2 pcl-neo线性载体的制备

pcl-neo载体以*EcoR*Ⅰ酶切后,成为5.4 kb的线性条带,酶切完全,大小正确。

2.3 pcl-hTRT正义及反义重组质粒的鉴定

在氨苄青霉素LB平板上挑选3个菌落,大量扩增后纯化质粒,经*Not*Ⅰ酶切后,正义重组质粒为8.8 kb的片段,反义重组质粒为3.4 kb、5.4 kb两个片段,与理论计算长度相符,说明成功构建了pcl-hTRT正反义重组质粒,见图1。

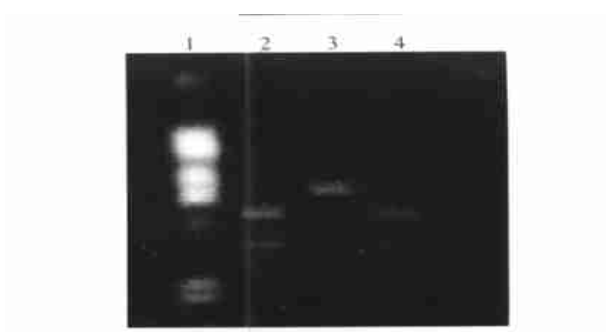


图1 重组正反义质粒*Not*Ⅰ酶切图谱

1:Marker(λDNA/*Hind* Ⅲ),2、4:hTRT正义重组质粒,3:hTRT反义重组质粒

基金项目:国家自然科学基金资助(39770302,30000072)

作者简介:杨仕明(1969-),男,湖南省双峰市人,主要从事肿瘤端粒酶方面的研究,发表论文22篇。电话:(023)68752898

收稿日期:1999-11-03;修回日期:2000-08-30

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

3 讨论

端粒酶具有双重作用。端粒酶的过量表达是肿瘤细胞无限增殖的必要条件，另一方面端粒酶的适量表达可以减缓染色体端粒丢失速度，从而延长细胞的寿命[1~3]。由于 hTRT 基因是端粒酶组份中真正具有调控端粒酶活性的亚单位，为此，我们成功构建了 hTRT 正、反义真核表达载体，一方面为肿瘤细胞的 hTRT 反义基因治疗创造条件，另一方面亦可以将 hTRT 正义真核表达载体导入正常体细胞中，从而为建立来源于正常体细胞的永生化细胞株奠定基础。

关键词：端粒酶；人端粒酶蛋白催化亚单位
中图法分类号：R394－33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al*. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90(4): 785－795.

[2] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al*. Elomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5 328): 955－959.

[3] Morales C P, Holt S E, Ouellette M, *et al*. Absence of cancer－associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 115－118.

（编辑 薛国文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2000)11-1114-02

双向电泳法分离 LDH 同工酶异常带

Separating abnormal bands of isoenzyme with two-dimensional electrophoresis

刘泽军，江海洪 （第三军医大学附属西南医院检验科，重庆 400038）

提 要：目的 采用双向电泳方法分离 LDH 同工酶的拖带现象。方法 经常规同工酶电泳后，改变方向 90°，再进行第 2 次电泳将异常带分开。结果 经过 2 次电泳后，拖带现象消失，5 种同工酶被清晰的分离。结论 普通电泳、免疫电泳、双向电泳的结合使用，能有效的分离异常同工酶，消除拖尾现象，确定异常电泳带的性质。

LDH 同工酶电泳分析以其组织特异性高而在临床上广泛应用。各种不同的疾病可出现不同的典型酶谱，借此可以准确地对病灶来源准确定位、判断疾病进程和预后状况。但在实际检查工作中，常常出现一些既不是任何疾病的典型酶谱，也不是正常酶谱形式的异常谱型[1]，拖尾现象是其中之一，它的出现影响到各同工酶带的分离，给正确提供检验报告造成困难。我们经过反复试验，当出现拖带现象时采用经过两次电泳、改变方向的双向电泳法，可有效的分离同工酶异常带，确定拖尾性质。

作者简介：刘泽军（1955－），男，河北省石家庄市人，硕士，副主任技师，主要从事临床生化方面的研究，发表论文 60 余篇。
电话：(023)68754691

收稿日期：2000-03-14；修回日期：2000-09-26

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Paragon 电泳系统（Beckman），光密度计（Appraise Densitometer System, Beckman），涤纶基醋纤膜（浙江台州路桥四青生化材料厂），抗人 IgG，抗人 IgA，抗人 IgM（Beckman）。

1.2 方法

1.2.1 LDH 同工酶测定 采用本室建立的涤纶膜测定法，在 Paragon 电泳仪上使用涤纶膜作载体，电泳缓冲液为 Tris-HCl-巴比妥-EDTA，pH 8.6，150 V，30 min 条件下电泳，然后使用夹心法活性染色，最后浓度为：乳酸锂 120 mmol/L，MTT 2 mmol/L，PMS 0.08 mmol/L，NAD 5 mmol/L 及 Tris-HCl 50 mmol/L，在 37 ℃下孵育 25 min，5%醋酸终止反应，600 nm 处光密度计扫描。

1.2.2 免疫对流电泳[2] 在浸泡好的薄膜的阴极侧 10 mm 处点上病人血清和对照血清约 5 μl，再在距阴极侧 13 mm 处分别点上抗 IgG、抗 IgA 和抗 IgM，然后置入 Paragon 电泳槽中，150

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