DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.013

文章编号:1000-5404(1999)10-0726-03

人端粒酶亲和纯化方法的建立及其初步鉴定*

陈 兵** 刘为纹 房殿春 府伟灵*** 杨金亮 杨仕明 周子成 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,400038

提 要 **目的**:建立一种亲和纯化人端粒酶的手段。**方法**:酶切鉴定人端粒酶RNA(hTR)质粒,所切下的hTRcDNA片段用生物素标记后与链霉亲和素琼脂糖珠耦连,用高端粒酶活性的胃肿瘤细胞提取液与之反应,利用端粒酶核糖核蛋白的特性,形成链霉亲和素琼脂糖珠-生物素标记hTRcDNA-hTR-端粒酶蛋白组份复合物,核酸解离液洗脱后获得亲和纯人端粒酶。其活性用宝灵曼公司端粒酶试剂盒检测,定量利用Beckman DU-640检测仪进行。**结果**:酶切鉴定的结果与hTR质粒图谱吻合。生物素hTRcDNA与链霉亲和素琼脂糖珠耦连量为31.71 μg,耦连率为98.38%。纯化后的端粒酶活性保持良好,相对纯化程度为108.46。**结论**:本研究中建立的方法是一种可行的端粒酶纯化手段,可用于人端粒酶的深入研究。

关键词 端粒酶;核糖核蛋白;亲和纯化;胃肿瘤

中图法分类号 Q782;Q55 **文献标识码**:A

端粒酶可能是目前已知的特异性最好的广泛肿瘤标志,但其临床应用迄今未能得以普及推广,原因之一是人端粒酶(Human telomerase,hTR)的蛋白组份仍不十分清楚[1]。为此,我们利用端粒酶的RNA结合蛋白特性,尝试建立一种亲和纯化人端粒酶的手段,以期获得具有完整活性的亲和纯人端粒酶并推动人端粒酶结构及应用性研究的深入。

1 材料与方法

1.1 hTRcDNA片段的获取及标记

含hTRcDNA的pGRN83质粒由美国Villeponteau博士惠赠。采用*Mlu* I和*Sal* I酶切鉴定,电泳洗脱法回收hTRcDNA片段,光敏生物素标记盒(军事医学科学院)进行标记,核酸蛋白含量用美国Beckman DU-640核酸蛋白检测仪测定。

1.2 细胞提取液和端粒酶活性的检测

SGC7901人胃癌细胞系由军事医学科学院引进,端粒酶活性采用宝灵曼公司端粒酶PCR-ELISA试剂盒检测[2],细胞提取液参照该试剂盒说明进行。

1.3 端粒酶亲和琼脂糖珠的制备[3,4]

将生物素标记的hTRcDNA和链霉亲和素琼脂糖珠(SIGMA)置于结合缓冲液(10%甘油,12 mmol/L HEPES pH 7.9,4 mmol/L Tris·Cl pH 7.9,60 mmol/L KCl,0.5 mmol/L PMSF,1 mmol/L EDTA和DTT)中,室温摇床上孵育2 h,4℃、1 000 r/min离心5 min制得。按以下公式计算耦连量和耦连率:

$$\text{耦连量}(\mu g)=\frac{\text{加入核酸量}(\mu g)-\text{收集液核酸量}(\mu g)}{\text{耦连琼脂糖珠体积}(ml)}$$

$$\text{耦连率}(\%)=\frac{\text{加入核酸量}(\mu g)-\text{收集液核酸量}(\mu g)}{\text{加入核酸量}(\mu g)}\times 100\%$$

1.4 纯化和鉴定程序[2~5]

人端粒酶亲和琼脂糖珠用含0.5 g/L BSA的结合缓冲液流洗2次和结合缓冲液流洗1次,加入对结合缓冲液透析后的细胞提取液,室温摇床上孵育2 h,用结合缓冲液流洗2次,4℃、1 000 r/min离心5 min,加入核酸解离液(宝灵曼)室温30 min,4 ℃、1 000 r/min离心5 min,重复此解离过程共3次,收集合并解离液后对结合缓冲液透析,测定蛋白含量和端粒酶活性。按以下公式计算相对纯化程度:

$$\text{相对纯化程度}=\frac{\text{纯化后端粒酶活性}}{\text{纯化前端粒酶活性}}\times\frac{\text{纯化前蛋白含量}}{\text{纯化后蛋白含量}}$$

2 结果

2.1 端粒酶亲和琼脂糖珠制备结果

pGRN83质粒酶切鉴定结果与其物理图谱吻合,见图1。将获得的32.23 μg生物素hTR cDNA片段与1 ml链霉亲和素琼脂糖珠耦连,收集液核酸量为0.52 μg,耦连量为31.71 μg,耦连率为98.38%。这些结果说明端粒酶亲和琼脂糖珠上耦连的核酸片段正确且耦连方案可行。

2.2 细胞提取液制备和端粒酶纯化鉴定结果

细胞提取液与端粒酶亲和琼脂糖珠孵育后流洗液的端粒酶活性显著低于细胞提取液和解离液($P<0.01$),而其蛋白含量与细胞提取液接近且与解离液差别悬殊,提示细胞提取液中的多数端粒酶已结合到端粒酶亲和琼脂糖珠上。细胞提取液和解离液(含纯化的端粒酶)在蛋白浓度上同样差别悬殊,但端粒酶活性无显著差异($P>0.05$),据此计算得相对纯化度为108.46。这些数据说明端粒酶得到纯化且活性保持良好,见表1。

* 中国博士后科学基金和总后勤部博士后科学基金资助项目

** 陈 兵,男,38岁,副主任医师,副教授

*** 基因诊断与治疗中心

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

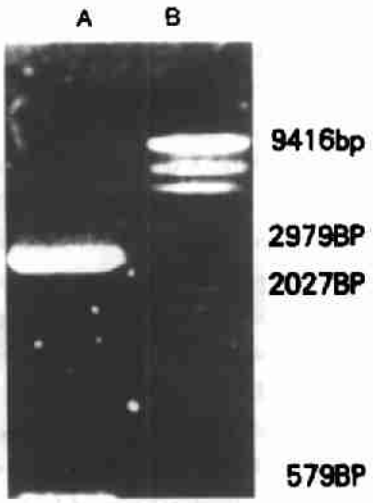


图 1　pGRN83 限制性酶切分析

A：pGRN83/*Mul* I -*Sal* I；　B：λDNA/*Hind* Ⅲ

Fig 1　Restriction fragment analysis of pGRN83

A：pGRN83/*Mul* I -*Sal* I；　B：λDNA/*Hind* Ⅲ

表 1　人端粒酶纯化鉴定数据

Tab 1　Identification data of purification protocol for human telomerase

Fraction	Protein concentration(g/L)	Telomerase activity (OD_{450}, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Cell extract	5.163	2.217±0.017
Washing supernatant	5.111	0.929±0.002*
Affinity eluate	0.047	2.189±0.011

*：$P<0.01$ vs cell extract and affinity eluate

3　讨论

无限制增殖的永生化能力是癌细胞的显著特征之一，其原因目前仍不十分清楚。近年来端粒酶的发现和"端粒假说"的提出，使有关癌细胞此种特性的解释有了长足的进展。目前已知端粒酶是一种催化端区 DNA 合成的核糖核蛋白酶，由 RNA 模板和蛋白组份 2 部分构成。人端粒酶 RNA 模板部分的构成已经清楚，但蛋白组份的结构迄今仍未明了[1,5,6]。近年来国外学者根据四膜虫端粒酶分析的结果，预测人端粒酶蛋白组份中存在有 2 种亚单位，即 TLP1(Telomerase protein 1) 和 hTRT (Human telomerase reverse transcriptase)。TLP1 预测由 2629 个氨基酸构成，可能是端粒酶的一个调节亚单位。hTRT 预计分子量约 130×10^3u，是具有催化活性的亚单位。但这些看来还远远不够，因为种种迹象提示人端粒酶的分子量可能会接近 1×10^6u，比目前已知端粒酶结构的分子量远大得多[5,6]。此外，端粒酶的调控机制仍不清楚。而且由于 RNA 保存的特殊性，使目前基于端粒酶 RNA 结构设计的检测方法在临床的应用受到限制。所有这些问题可能有赖于端粒酶蛋白组份的搞清而获解决[1,5,6]。为此，我们利用端粒酶 RNA 结合蛋白的特性和核酸杂交的原理设计本研究方案，并于 1998 年 6 月获得基金资助，实验结果表明纯化后的端粒酶纯度高且活性保持完整。截至 1999 年 4 月 MEDLINE 检索表明，1998 年 7 月国外有 1 篇类似研究的报道，纯化后的端粒酶活性也保持良好[6]。这些结果提示建立在上述原理之上的端粒酶纯化方法是可行的。进一步研究是利用该方法大量制备亲和纯化的端粒酶，进行蛋白组份的结构性分析，制备单克隆抗体并建立相应的检测方法，推动端粒酶的基础和应用性研究。

参考文献

1　McKenzie K E, Umbricht C B, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. Mol Med Today, 1999, 5(3): 114

2　Hiis A, Herr H H, Kaul S, *et al*. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. Int J Cancer, 1998, 79(1): 8

3　Chodosh I. A. Purification of DNA-binding proteins using biotin/streptavidin affinity systems. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, *et al*. Short Protocols in Molecular Biology. Canada: John Wiley & Sons, 1995. 23～26

4　陈　兵，周绍娟，樊代明，等. 新型结肠癌相关抗原 MC3-Ag 的分离、纯化与鉴定. 细胞与分子免疫学杂志，1994，10(1)：1

5　Ishikawa F. Regulation mechanisms of mammalian telomerase. Biochemistry (Moscow), 1997, 62(11): 1332

6　Schnapp G, Rodi H P, Rettig W J, *et al*. One-step affinity purification protocol for human telomerase. Nucleic Acids Res, 1998, 26(13): 3311

(收稿：1998-09-15；修回：1999-07-15)

(编辑　刘　鹏)

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

Establishment and pilot identification of affinity purification for human telomerase

Chen Bing, Liu Weiwen, Fang Dianchun, Fu Weiling, Yang Jingliang, Yang shiming, Zhou Zicheng (Department of Gastroenterology, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To establish a method for affinity purification of human telomerase. **Methods**: A fragment of human telomwrase RNA (hTRcDNA) was purified and collected with electroelution after the fragment was identified with restriction enzyme digestion. The affinity chromatography beads were prepared with binding of biotinylated hTRcDNA fragment with streptavidin agarose beads. The purification was based on the ribonucleoprotein property of telomerase with hTRcDNA complementary to hTR template component. After binding reaction between the cancer cell extract with high telomerase activity and the affinity chromatography beads was set up, a complex of the affinity chromatography bead-telomerase was formed. Bound telomerase was eluted with nucleic acid denaturation reagent. Telomerase activity was detected with telomerase PCR-ELISA. The quantity of protein and nucleic acid was assayed with Beckman DU-640 spectrophotometer. **Results**: The result of restriction fragment analysis tallied with the structural map of hTR plasmid vector. The binding quantity and the rate of biotinylated hTRcDNA with streptavidin agarose beads were 31.71 μg and 98.38% respectively. The affinity-purified telomerase kept active and its relative purity was 108.46. **Conclusion**: Our purification method provides a feasible tool for further studies of human telomerase.

Key words telomerase; ribonucleoprotein; affinity purification; gastric neoplasm

文章编号:1000-5404(1999)10-0728-02

方丝弓矫治技术结合上颌前牙平面导板矫治重度深覆𬌗

Treatment of deep overbite by using edgewise appliances in conjunction with a guiding-plate

黄新理* 许 鹏 (第三军医大学附属大坪医院口腔科) 重庆,400042

在正畸的临床工作中,对前牙深覆𬌗矫治成功的关键取决于咬合的打开及颌间关系的调整,作者采用上颌前牙的平面导板结合 Edgewise 技术联合矫治,收到满意的临床效果。

1 临床资料与方法

前牙深覆𬌗Ⅱ度35例,男15例,女20例,平均年龄14.5岁,其中15岁以下20例,伴后牙锁𬌗者6例;Angle Ⅰ类7例,Angle Ⅱ类28例。

35例错𬌗根据牙齿拥挤度及𬌗关系调整的需求,除5例不拔牙者,其余均拔除$\frac{4}{4}\left|\frac{4}{4}\right.$。35例均进行X线头影测量分析,测量治疗前后覆𬌗情况。

小平导的制作:$\frac{2\ 1}{}\left|\frac{1\ 2}{}\right.$间或$\frac{6\ 5}{}\left|\frac{5\ 6}{}\right.$间作邻间沟,$\frac{3}{}\left|\frac{3}{}\right.$的腭侧形成平面导板,其高度使后牙𬌗间距打开1～2mm,嘱患者全天戴用,直到打开咬合。

矫治步骤:对35例患者,先用Ni-Ti丝排齐牙列,并用摇椅弓打开咬合。待牙列基本排齐后,即戴小平导,戴小平导期间可拉尖牙向远中。对Angle Ⅱ类错𬌗,也可行Ⅱ类牵引,待咬合打开后,即停戴小平导,随后按Edgewise矫治方法进行治疗。

X线头影测量:矫治前后分别拍摄X线头颅侧位片,选择有关测量指标,测量结果采用配对 t 检验。

2 结果

用Edgewise矫治器结合小平导完成矫治的时间为(13.8±4.8)个月,打开咬合的时间为2～4个月。X线头影测量结果,见表1。

固定矫治器结合小平导矫治方法在少年与成年人之间,其打开咬合的量值,所需时间及速度差异均无显著差异。

(下转733页)

* 黄新理,女,36岁,主治医师,学士

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