

基础研究

人类端粒酶活性重组及其重组特异性

周俊宜, 罗超权

(中山医科大学生化教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】对Hela细胞端粒酶进行活性重组并探讨其重组特异性。【方法】以RT-PCR法从纯化的人端粒酶复合体中扩增人类端粒酶RNA(hTR)基因片段,将其克隆至含有SP6启动子的pGEM3f⁺质粒中,构建hTR的体外转录体系以获得体外合成的hTR。与端粒酶蛋白组分进行活性重组。四膜虫端粒酶RNA及16S rRNA作为重组反应对照组,以探测其重组特异性。【结果】经RT-PCR扩增出450 bp片段;体外转录重组载体经酶切图谱和PCR扩增鉴定构建成功;体外转录的RNAs经聚丙烯酰胺凝胶电泳进行了鉴定;活性重组实验中,对照组的MNase处理但未作重组管为阴性;3组重组管中,经MNase处理后的端粒酶蛋白特异性地与经体外转录所得的人端粒酶RNA组分重组而重获端粒酶活性,与四膜虫端粒酶RNA及16S RNA重组均不能获得酶活性,说明端粒酶复合体有自身不可替代的组成成分,而且不同生物体的端粒酶有各自特异的酶蛋白组分和RNA组分。【结论】Hela细胞端粒酶蛋白组分能特异地与体外合成的hTR重组端粒酶活性。

关键词: 端粒酶; 活性重组; hTR

中图分类号: R730.231; Q756

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)06-0409-04

Reconstitution of Human Telomerase Activity and Its Specificity

ZHOU Jun-yi, LUO Chao-quan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To observe reconstitution of human telomerase activity and its specificity to hTR.【Method】RT-PCR was used to amplify hTR from the enzyme complex, the hTR fragment was cloned into pGEM3f⁺ and constructed phTR450, which involved SP6 promoter and transcribed *in vitro* RNA. RNA transcribed was used in reconstitution of telomerase. The hTR and *Tetraehymena* RNAs were respectively transcribed *in vitro*. The purified enzyme complex was treated with MNase to obtain protein components of the enzyme. The hTR and control RNA were used to reconstitute active telomerase in combination with MNase-treated purified prorein. The TRAP was used to detect telomerase activity.【Result】The specific hTR fragment (450 bp) was amplified by RT-PCR. The PCR product was cloned. Telomerase RNAs were transcribed *in vitro*. The active telomerase was reconstituted specific to hTR transcribed.【Conclusion】Human telomerase activity can be reconstituted using protein componats of Hela cell telomerase and synthetic RNA and the reconstitution is specific to hTR.

Key words: telomerase; activity reconstitution; hTR

人类端粒酶与恶性肿瘤的密切关系已为大量研究所证实^[1-3]。分析明了该酶的分子组成和功能特点是开展以端粒酶为靶点的抗肿瘤研究的前

提和基础。端粒酶的蛋白质组分及其RNA组分(hTR)是它的两种基本成分。为了探测和分析人端粒酶及其组分的基本构造和功能特征,本实验通

收稿日期: 2000-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670715)

作者简介: 周俊宜(1963-),女,湖南郴州人,博士,讲师。

过构建 hTR 体外转录体系以获得体外合成的端粒酶 RNA, 与经本室亲和纯化所分离的人端粒酶蛋白质进行体外端粒酶活性重组, 并通过设立不同的对照组, 以确定其重组特异性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

Hela 细胞株由本校实验动物中心提供。细胞培养试剂购自北京天象人公司, TRAP 检测试剂购自罗氏公司; TS 引物、CX 引物^[2]由上海细胞所合成。RT-PCR 引物^[4]由加拿大真达公司合成; 质粒、细菌培养、质粒 DNA 提取、酶切鉴定等基因克隆试剂购自华美公司; RNA 多聚酶、RNA 酶抑制剂等体外转录试剂、MNase 等活性重组试剂及 RT-PCR 等试剂购自上海生工及罗氏公司; Tetrahymena RNA 的体外转录重组体由美国 Geron Corporation 提供。主要仪器设备: CO₂ 培养箱, 倒置显微镜, 超净工作台, 冷冻式高速离心机, 电热恒温水浴箱, PCR 扩增仪, 1000/500 型电泳仪, 垂直电泳槽等。

以下所有试剂、器材及操作均需严格按照无 RNA 酶污染程序处理(电泳项可除外)。

1.2 细胞培养

Hela 细胞株体外常规培养, 培养液 PR-MI1640, 体积分数为 15% 小牛血清, 含体积分数 5% CO₂, 饱和湿度, 37 °C 培养箱中培养。

1.3 细胞端粒酶粗提物的制备和酶复合体的纯化

粗提物制备具体操作按文献[3]。端粒酶复合体纯化方法按文献[5]。

1.4 hTR 目的基因的获得

取纯化的端粒酶 8 μL 加蛋白酶 K (10 g/L) 2 μL 混匀, 于 37 °C 消化 1 h, 加 RNase-free DNase 2 μL, 37 °C 消化 1 h, 72 °C 10 min 灭活所加酶后作为 RT-PCR 第一链合成的模板, 加入反转录缓冲液 AMV 反转录酶, 建立反转录体系, 反转录反应条件为 45 °C 作用 45 min。PCR 反应参数为 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共循环 35 次, 最后 72 °C, 10 min。以未经反转录作用的粗提物处理液作为阴性对照。以 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 2 h, 溴乙锭染色, 紫外灯下观察电泳结果。

1.5 重组质粒的构建

选择含 SP6 启动子的载体 pGEM3-zf⁽⁺⁾。用

EcoRI 和 *HindIII* 分别双酶切目的基因 hTR 和质粒 pGEM3-zf⁽⁺⁾。用 T4-DNA 连接酶连接目的基因 hTR 片段和质粒 pGEM3-zf⁽⁺⁾。重组体转化感受态大肠杆菌 JM109。挑取阳性菌落。碱裂解法小量提取质粒 DNA。PCR 扩增法及限制性内切酶酶切图谱分析对重组质粒进行鉴定, 获得阳性重组质粒 pGEM3-hTR。以上各步骤的具体操作参见文献[6]。

1.6 体外转录 hTR 及 Tetrahymena RNA

以限制性内切酶 *EcoRI* 将重组体 pGEM3-hTR 线性化。酶切反应物用酚、氯仿抽提醋酸铵、乙醇沉淀, TE 溶解备用。体外转录 RNAs; 反应管中加入线性化模板、4 种 NTP, 转录缓冲液, RNA 酶抑制剂, SP6 RNA 聚合酶及双蒸水, 37 °C 保温 20 min。加 RNase-free DNase 处理 10 min。转录产物用 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis 为 49:1)电泳检测, 银染色。

1.7 人端粒酶活性重组

MNase 处理纯化的酶复合体: 用 MNase 按 1.0×10^{-6} U/L 酶复合物在 30 °C 保温 15 min; 加 EGTA 至 1.5 mmol/L 以终止反应。TRAP 检测经 MNase 处理的酶复合体的端粒酶活性。端粒酶活性重组^[7]: 调节反应管的 EDTA 浓度至 5 mmol/L, 分别与各组 RNA 混和于 37 °C 共孵育 5 min。RNA 成分分 3 种, 分别是体外转录的 hTR, Tetrahymena RNA, 以及 16S RNA。TRAP 法检测各重组反应管的端粒酶活性。

2 结 果

2.1 RT-PCR 的扩增

端粒酶 RNA 组分的 RT-PCR 产物经 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并以 DNA Marker 作标准, 可见到一条清晰的 450 bp 的条带(图 1), 与预计的相符合。

2.2 重组质粒的酶切鉴定及 PCR 鉴定

将 hTR 片段克隆至体外表达载体 pGEM3-zf⁽⁺⁾ 构件重组质粒 pGEM3-hTR, 通过限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII* 酶切和 PCR 扩增均可见到 450 bp 片段(图 2)。

2.3 体外转录的 RNAs

图 3 为利用体外表达重组体和 SP6 RNA 多聚酶建立的体外转录体系转录的 RNAs 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的电泳图谱。 <http://www.cnki.net>

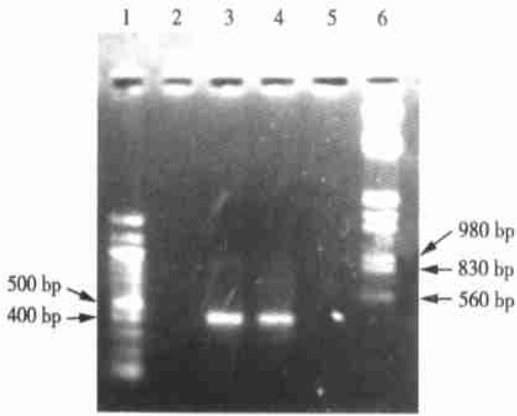


图1 hTR 的 RT-PCR 扩增产物

Fig.1 RT-PCR product of hTR

Lane 1, 6: Molecular marker; Lane 2, 5: Negative control; Lane 3, 4: RT-PCR products

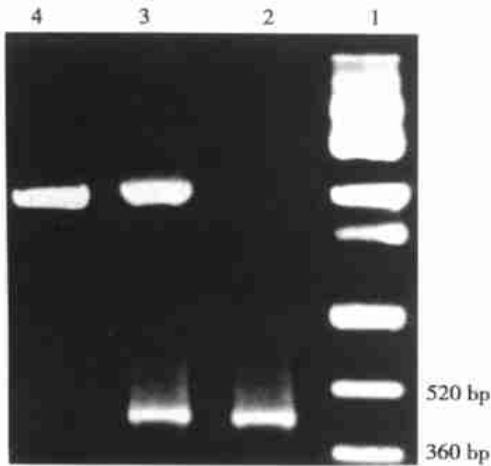


图2 hTR 重组质粒的鉴定

Fig.2 Identification for cloned hTR fragment

Lane 1: Molecular marker; Lane 2: identification by PCR; Lane 3: digested with *EcoRI* and *HindIII*; Lane 4: pGEM3-zf⁽⁺⁾

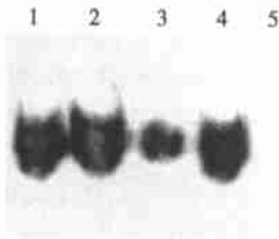


图3 体外转录的 hTR

Fig.3 RNAs *in vitro* transcribed

Lane 1, 2, 3, 4: hTR *in vitro* transcribed; Lane 5: Negative control

2.4 人端粒酶的活性重组

把纯化的酶复合体用核酸酶处理以除去原始的 RNA 组分, 与体外转录的 RNA 重新共孵育, 进

行人端粒酶活性的重组。同时设立对照组, 人端粒酶 hTR、四膜虫端粒酶 RNA 及 16S rRNA, 分别与 MNase 处理的纯化产物重组以确定其重组特异性。重组反应后对各组进行 TRAP 检测, 从电泳图谱可以看到, 只有 hTR 组出现典型的梯形条带, *Tetrahymena* 端粒酶 RNA 组和 16S RNA 组均无梯形条带, 说明纯化产物中的酶蛋白能特异性地与体外转录的 hTR 重组端粒酶活性(图 4)。

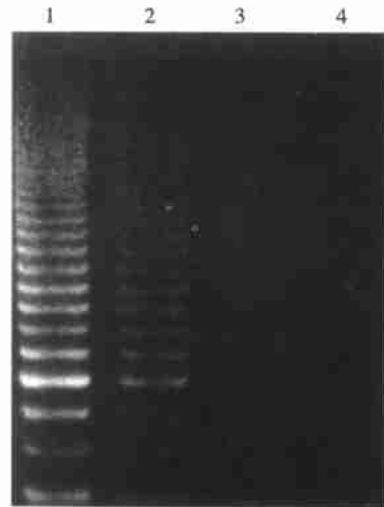


图4 人类端粒酶活性重组的 TRAP 检测

Fig.4 Reconstitution of human telomerase activity

Lane 1: Purified telomerase; Lane 2: hTR+MNase-treated purified fragment; Lane 3: *Tetrahymena* RNAs+MNase-treated purified fragment; Lane 4: 16S RNA+M Nase treated purified fragment

3 讨论

在重组实验中先将酶复合物经 MNase 处理, 目的是消除端粒酶复合体中原始的 hTR, 经 TRAP 检测已无可探测的端粒酶活性; 重组实验共设立了 3 组, 分别是 hTR、*Tetrahymena* 端粒酶 RNA、16S RNA, 所用的酶蛋白质部分均为经 MNase 处理的纯化蛋白。

人类端粒酶 RNA (hTR) 与纯化的人类端粒酶蛋白组分重组后, 经 TRAP 检测有典型的梯形条带, 说明两者经重组已重获端粒酶活性。对照组的 16S RNA 组既不能与 *Tetrahymena* 端粒酶蛋白重组端粒酶活性^[7], 也不能与人端粒酶蛋白重组活性, 说明端粒酶 RNA 组分相对于端粒酶是特异的, 不能用其他 RNA 成分取而代之; *Tetrahymena* 端粒酶 RNA 只能与 *Tetrahymena* 的蛋白质组分重组

出端粒酶活性^[7],而不能与人端粒酶蛋白重组活性,说明端粒酶的种族特异性,不同的生物种类有不同的染色体端粒重复序列,同时也有各自特异的端粒酶,包括它们的蛋白质组分和 RNA 组分。

从本研究也可看出人类端粒酶各组分对于酶活性的表达的重要性。特异性表达于恶性细胞中的端粒酶在化学本质上是一种核糖核蛋白,含有蛋白质组分和 RNA 组分(hTR),其 RNA 组分中含有构建端粒亚单位的模板序列,在端粒酶延伸端粒的过程中起模板作用。虽然有研究报道 hTR 在组织细胞中的表达与端粒酶活性不呈平行关系,本实验中纯化的活性端粒酶经 MNase 处理后因 RNA 组分的消失而失去酶的活性,体外合成的 hTR 的加入又能使其恢复活性,说明 hTR 是维持其酶活性必不可少的因素。

重组所需的端粒酶 RNA 组分由体外转录获得。采用 RT-PCR 的方法从纯化酶复合物中扩增 hTR 片段,既从 RNA 组分方面对纯化的端粒酶进行了鉴定,同时又能获得构建体外转录载体所需的目的基因。质粒 pGEM 3-zf⁽⁺⁾ 是体外表达载体,含 SP6 启动子,在 RNA 多聚酶作用下,可在体外进行转录从而获得活性重组所需的端粒酶 RNA 组分。

参考文献:

- [1] Piatyszek M A, Jyothi G, Shay J W, *et al.* Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues[J]. *Cancer Research*, 1996, 56 (3): 645.
- [2] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K P, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(23): 2011.
- [3] Brien T P, Kallakury B V, Lowry C V, *et al.* Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 2760.
- [4] Junli F, Walter D F, Sy-Shi W, *et al.* The RNA component of human telomerase[J]. *Science*, 1995, 269 (1): 1236.
- [5] 周俊宜, 罗超权. 人类端粒酶分离纯化的研究[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(4): 封 2.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟译. 北京: 科学出版社, 1996. 401~405, 672~688.
- [7] Autexier C, Greider C W. Functional reconstitution of wild type and mutant *Tetrahymena* telomerase. *Genes Dev*, 1994, 8(4): 563.

(编辑 张敏瑞)

·新成果·

肿瘤临床信息系统的设计、建设和效益

课题负责人 吴一龙, 等

(中山医科大学附属第三医院, 广东 广州 510630)

临床信息系统是医学、信息学和计算机科学相结合的边缘学科,国内极少数的单位刚起步进行研究。本项目受广东省科委重点攻关项目基金资助,在对肿瘤临床信息进行深入细致反复比较的研究基础上,进行了下述几个方面的研究:①首次应用以病人信息为中心作为系统设计思想,以此构建了肿瘤临床信息系统的框架并在实践中实现了这一思想;②首次在信息处理上实现了对“恶性肿瘤病人的全程监控”;③首次设计、开发和使用“计算机自动挂号系统(包括电话挂号、磁卡挂号、网上挂号)”和“门诊医生计算机诊病系统”;④首次实现了肺癌单病种的电子病案系统;⑤在国内首次对医院信息系统进行效益分析。本项目共发表论文 9 篇,其中的部分计算机软件及相关的管理经验,为浙江省肿瘤医院、汕头肿瘤医院、广西肿瘤医院等应用。本课题研究还参加了在日本神户举行的第二届中日医学信息大会,相关论文进入了 Internet。在良好的社会效益的基础上,也获得可观的经济效益,1996、1997 两年增加了 30 万元的挂号收入、杜绝的漏收费每年在 60 万元左右。已先后接待了 95 批 430 人次的参观。包括《人民日报》在内的多家传媒进行了多次报道。成果于 1999 年获广东省科学技术进步三等奖。

(陈丽芳)

吴一龙教授获国际肺癌研究奖

我校肺癌研究中心主任、附属第三医院院长、中国抗癌协会肺癌专业委员会主任委员吴一龙教授在日本东京获国际肺癌研究的“Developing Nations Investigator Awards”(发展中国家研究者奖)。

(下转第 453 页)