

# 人类端粒酶分离纯化的研究<sup>①</sup>

周俊宜 罗超权

(中山医科大学生化教研室; 广州, 510080)

主题词 端粒酶; 寡核苷酸

中图分类号 Q 756

近年来, 端粒酶与恶性肿瘤的发生以及衰老的密切关系是人们所关注的一个热点<sup>[1~3]</sup>。现在人们试图从端粒酶方面寻找抗肿瘤或抗衰老的新途径, 要达到这一目的, 阐明人类端粒酶的基本组成结构和生化特性是其前提和基础<sup>[4~5]</sup>。到目前为止, 为人类端粒酶 RNA 组分已研究得比较清楚, 但人类端粒酶的分离纯化和对其蛋白质成分的分析一直是该研究领域中的一大难题, 国内外还未有成功分离的报道。本研究从人类端粒酶的组成特点和功能出发, 以其含有蛋白质成分和 RNA 成分这一重要特点和它在延伸端粒时的作用过程为依据, 自行设计了一套高灵敏、高特异的寡核苷酸亲和纯化法对 HeLa 细胞端粒酶进行分离纯化, 并对其蛋白质组分进行分析。

## 1 材料和方法

寡核苷酸亲和纯化分离 HeLa 细胞端粒酶的基本思路 and 过程如下: 根据人端粒酶 RNA 组分的模板序列及人的端粒序列以及端粒酶催化合成端粒时“爬行模式”, 设计合成长短不一的两条互补寡核苷酸链, 通过 T<sub>4</sub>DNA 连接酶的作用把它们连接到一种带有双链寡核苷酸尾的层析磁珠上, 通过模拟端粒的延伸过程使其 RNA 组分模板序列与寡核苷酸长链碱基互补, 从而达到对人端粒酶高特异、高灵敏的亲和纯化的目的。具体方法是首先把寡核苷酸链连接到带有一段双链寡核苷酸的纯化磁珠上, 然后加入 HeLa 细胞粗提物进行蛋白质结合反应, 端粒酶通过其 RNA 组分中的模板序列与寡核苷酸中的人端粒重复序列互补而结合到纯化磁珠上从而与上清液相分离, 最后通过洗脱过程使结合在微珠寡核苷酸链上端粒酶洗脱下来。纯化产物以

TRAP 法检测其端粒酶活性, 用 RNase 处理后进行 PAGE 分析。

## 2 结 果

洗脱产物用 TRAP 法检测具有端粒酶活性, 对其进行 SDS-PAGE 分析可见到 4 条蛋白质条带; 与标准蛋白质分子质量比较: 有两条位置接近 212.0 ku, 一条接近 97.4 ku, 一条接近 42.7 ku。同时, 设立了两组阴性对照: 一组是无关的寡核苷酸片段对端粒酶粗提物的纯化, 一组是用端粒酶阴性的非肿瘤细胞蛋白提取物进行亲和纯化。实验结果表明, 两者都没有得到相应的纯化片段(图 1)。

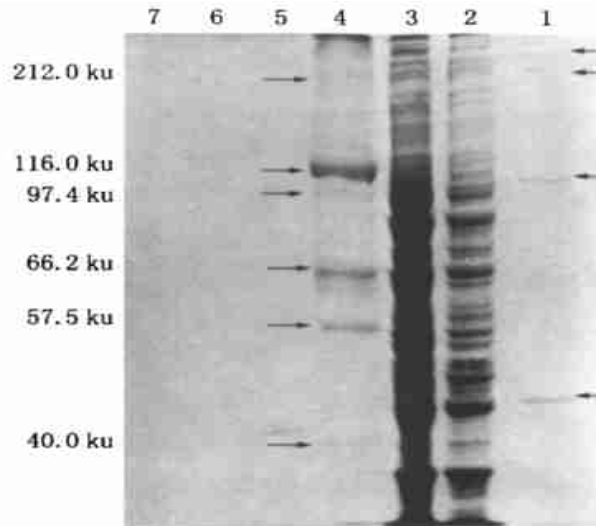


图 1 蛋白质成分的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS PAGE of protein components

1. Elute. 2. Supernatant of purification procedure. 3. Crude from HeLa cells. 4. Molecular Weight Mark of protein. 5. Fraction of last washing step. 6. Negative control using non-target sequence. 7. Control from normal cells

(下转封 3)

### 3 讨论

端粒酶作为一种核糖核酸逆转录酶在组成结构上有其特点。而人端粒酶又由于在细胞内含量甚低(其活性比四膜虫等低等生物低很多)而使其分离纯化工作一直难以取得突破性进展。要从含有种类繁多的蛋白质成分的细胞粗提物中分离到含量极微的端粒酶成分,关键所在是必须抓住该酶在组成、结构和功能上的特点并针对这些特点来进行操作,才能有效地提高其特异性和灵敏性。本研究经过两年多的摸索,在历经了多次失败的经验教训以后,把实验设计的重点放在了端粒酶包含了蛋白质组分和 RNA 组分,而它的 RNA 组分又是作为染色体端粒合成时的模板这一重要特点上,参照生物体内端粒酶催化端粒合成时的所谓“爬行模式”,根据人端粒酶 RNA 组分的模板序列以及人染色体端粒重复序列,设计长短不一的两段寡核苷酸,并把它们连接到一纯化磁珠上,然后通过模拟端粒延伸的过程使细胞粗提物中的端粒酶结合到寡核苷酸上,这样就特异性地把端粒酶从粗提物中分离出来,再通过洗脱过程得到了具有端粒酶活性的纯化产物。

在实验过程中,我们还同时设立了两组阴性对照,一组是无关的寡核苷酸片段对端粒酶粗提物的纯化,一组是用端粒酶阴性的非肿瘤细胞蛋白提取物进行亲和纯化。实验结果表明,两者都没有得到相应的纯化片段。对纯化产物进行蛋白质的 SDS-

PAGE 分析可见大小不同的 4 条蛋白条带。由于国内外人端粒酶蛋白组分的研究至今尚处于探讨阶段,没有成功分离的资料<sup>[9]</sup>,无从比较,与标准蛋白质分子相比较,有两条相距很近的条带其分子质量与 212.0 ku 条带接近,中间的一条与 97.4 ku 条带接近,最小的一条在 40.0 ku 和 57.5 ku 之间。进一步的工作正在进行中。

#### 参 考 文 献

- 1 Collins K, Ryuji Kobayashi, Greider W. Purification of tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell*, 1995, 81(8): 677
- 2 Autexier C, Pruzan R, Funk W D, *et al.* Reconstitution of the human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J*, 1996, 15(6): 5928 ~ 5938
- 3 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K P, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266(9): 2011
- 4 Junli F, Walter D F, Sy-Shi W, Bryant V, *et al.* The RNA component of Human telomerase. *Science*, 1995, 269(4): 1236
- 5 Harrington L, McPhail T, Mar V, *et al.* A Mammalian Telomerase-associated protein. *Science*. Vol, 275(4): 973
- 6 Kanaya T, Kyo S, Takakura M, *et al.* HTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 1998, 78(5): 529

(1999-07-02 收稿 1999-10-07 修回)

#### 参 考 文 献

- 1 Moses J J, Paker I D. TMJ arthroscopic surgery; an analysis of 237 patient. *J Oral Maxillofac Surg*, 1989, 47(8): 790
- 2 White R D. Retrospective analysis of 100 consecutive surgical arthroscopies of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 1989, 47(10): 1014
- 3 Mosby E L. Efficacy of temporomandibular joint arthroscopy; a retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg*, 1993, 51(1): 17
- 4 王大章, 彭贵平, 林野. 颞下颌关节内窥镜检查的实验研究及其临床应用评价. *中华口腔医学杂志*, 1990, 25(6): 334
- 5 曾融生, 任材年, 沈强. 内窥镜手术治疗颞下颌关节紊

- 乱综合征的初步体会. *中华口腔医学杂志*, 1995, 30(6): 367
- 6 McCain J P, Podrasky A E, Zabiegalski N A, *et al.* Arthroscopic disc repositioning and suturing; a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*, 1992, 50(6): 568
- 7 丘蔚六, 杨驰, 哈琪. 治疗性颞下颌关节镜外科的临床应用. *中华口腔医学杂志*, 1998, 33(4): 241
- 8 Sugisaki M, Ikai A, Tanabe H. Dangerous angles and depths for middle ear and middle cranial fossa injury during arthroscopy of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 1995, 53(7): 803

(1999-01-22 收稿 1999-07-12 修回)