

EB病毒 DNA酶基因特异性结合蛋白的检测

许道松^{1,①} 孔天青² 朱振宇¹ 马润泉

(中山医科大学 1 生化教研室 2 病理生理学教研室; 广州, 510089)

摘要 PCR法扩增出 EB病毒 DNA酶全基因之后,用 [γ -³²P]ATP进行 5'末端标记,然后利用凝胶迁移分析法 (gel mobility shift assay)来检测与该基因结合的蛋白质。结果表明在 Raji细胞核和细胞浆中均有 EB病毒 DNA酶基因非特异性和特异性结合蛋白,在人乳清中也有与该基因结合的蛋白质。

关键词 疱疹病毒 4型,人; DNA结合蛋白质类; 脱氧核糖核酸酶类

中图分类号 Q 523.3

在早期鼻咽癌患者血清中可出现抗 EB病毒的 DNA酶抗体。这种抗体滴度的高低与鼻咽癌的发生密切相关^[1]。这表明在鼻咽癌早期有 EB病毒 DNA酶基因的表达,表达出的 DNA酶可对宿主细胞染色体 DNA进行随机切割,造成细胞遗传物质的改变。本研究主要是寻找到能够特异性与 EB病毒 DNA酶基因结合的蛋白质,以便进一步研究它与 EB病毒 DNA酶基因表达之间的关系。用 South west blot方法检测 DNA结合蛋白^[2],方法稍繁琐,本实验使用一种较为简便的方法即凝胶迁移分析法 (gel mobility shift assay)来检测 DNA特异性结合蛋白^[3]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Raji细胞株来源于中山医科大学肿瘤研究所; [γ -³²P]ATP为北京亚辉生物工程公司产品; T₄多核苷酸激酶和小牛肠碱性磷酸酯酶 (CIP)购自 Promega公司;蛋白酶 K为华美公司产品;小牛胸腺 DNA为 Boehringer mannheim公司产品; PMSF (苯甲基磺酰氟化物)和 DTT(二巯苏糖醇)购自 Sigma公司;丙烯酰胺、双丙烯酰胺及 TEMED(N,N,N',N'-甲基乙二胺)均为 Merck公司产品;其它试剂为国产分析纯,用三蒸水配制。

1.2 EB病毒 DNA酶基因的提取

用 PCR的方法扩增出 EB病毒 DNA酶全基

因,扩增方法及鉴定均按以前描述的方法,片段长度为 1 460 bp^[4]。

1.3 Raji细胞核、浆抽提物的制备

Raji细胞核抽提物 (nuclear extract)的制备按 Dignam 等方法进行^[3]。胞浆抽提物的制备过程如下: 10⁶左右的细胞用 5 mL的 PBS(其中含有 0.5 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT)悬浮细胞,于 4℃,1 100×g,离心 5 min用 5 mL Buffer A(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mol/L蔗糖, 0.5 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT)洗 1次。将细胞完全悬浮在 5 mL的 Buffer A(其中加入 150 μL的 TritonX-100)中,混匀后,将上述混合物于 4℃缓慢旋转摇动约 10 min然后 8 000×g,4℃离心 10 min上清即为 Raji细胞浆抽提物,分装后于 -20℃存。

1.4 人乳清 (Whey)的制备和乳铁蛋白的提取

产妇的初乳收集后存于 4℃,在一二天之内进行乳清的制备。大致过程如下:初乳经过 15 000×g,4℃离心 30 min之后,去除上层的脂肪和下面的沉淀物,中间部分即为乳清,分装后于 -20℃保存。从上述乳清中提取乳铁蛋白按照其它描述方法进行^[5]。上述各样品中蛋白质含量的测定用考马斯亮蓝 G-250法进行^[6]。

1.5 EBV-DNA酶基因的 5'末端标记^[7]

首先用 CIP去除 EBV-DNA酶基因 5'末端的磷酸根。纯化后的 DNA用 T₄多核苷酸激酶作 5'末端标记,游离的 [γ -³²P]ATP经 Sephadex G-50柱层

① 第一作者,男,1964年出生,在职博士生,讲师。

析去除。收集标记峰,乙醇沉淀 DNA 之后,用 TE (pH 7.6)溶解 DNA

1.6 凝胶迁移分析法

反应的总体积为 $25 \mu\text{L}$,其中含有 $2 \times 10^6 \text{ min}^{-1}$ 同位素标记的 EB 病毒 DNA 酶基因 (约 0.2 ng) $5 \sim 10 \mu\text{g}$ 的蛋白质, $0 \sim 100 \text{ ng}$ 的经注射器不断吹打过的小牛胸腺 DNA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.3, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 5% 甘油。混匀上述混合物之后于室温 (约 30°C) 保持 30 min 将上述混合物直接上样于 4.5% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,其中一样品池加 $5 \mu\text{L}$ 的指示剂 (5% 甘油, 0.01% 溴酚蓝),于 4°C ,电泳约 3 h (10 V/cm)。电泳结束之后,将凝胶干燥,然后进行放射自显影。

2 结果

凝胶迁移分析法可用来检测 DNA 或 RNA 结合蛋白,检测出的蛋白质特异性比亲和层析法要强,其操作步骤比 Southwest blot 方法简便。这种方法的原理是根据游离状态的 DNA* 或 RNA* 迁移率与结合状态的 DNA* - 蛋白质或 RNA* - 蛋白质迁移率不同而设计的 (* 为同位素标记)

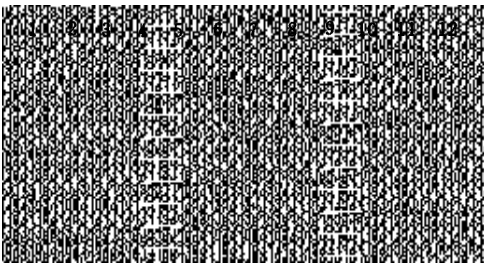


图 1 EBV-DNA 酶基因结合蛋白的检测

1, 12: $5 \mu\text{g}$ Raji 细胞核抽提物; 2~ 4: $10 \mu\text{g}$ 的 Raji 细胞核抽提物,分别加小牛胸腺 DNA, $0 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$; 5~ 7: $10 \mu\text{g}$ 的 Raji 细胞浆抽提物,分别加小牛胸腺 DNA, $0 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$; 8: 处于未结合状态的 EBV-DNA 酶基因; 9: $5 \mu\text{g}$ 的乳铁蛋白; 10~ 11: $10 \mu\text{g}$ 的人乳清,分别加小牛胸腺 DNA $0 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}$

图 1 上可以看出迁移率最快的条带为游离状态的 EB 病毒 DNA 酶基因 (第 8 号样品),而迁移较慢的条带都是结合条带。由此可见,在 Raji 细胞核和胞浆中均有可与 EB 病毒 DNA 酶基因结合的蛋白质。在加入小牛胸腺 DNA 之后,结合条带的深浅与未加小牛胸腺 DNA 的样品有所不同,表现为游离

条带变深,结合条带变浅,尤其是在加入 Raji 细胞浆抽提物的样品中 (图中第 6 7 号样品) 含有乳铁蛋白的样品 (第 9 号样品) 的自显影条带与游离条带一样 (第 8 号样品) 另外,在人乳清中,出现了 2 条结合带 (第 10 号样品),其中迁移率较快的条带在加入大量的小牛胸腺 DNA 之后,其迁移率则变得较慢 (第 11 号样品)。

3 讨论

从图中可以看出迁移率最慢的结合条带几乎处于同一位置,这是由于这些蛋白质本身分子较大,在与 1460 bp 的 EB 病毒 DNA 酶基因结合之后,组成的复合物分子则变得更大而比较难于进入 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶。本实验中所用的非特异 DNA 竞争物为小牛胸腺 DNA,结合条带在加入大量的小牛胸腺 DNA (约为 EB 病毒 DNA 酶基因量的 500 倍) 之后,若仍可与 DNA 结合则说明蛋白质结合位点处的 EBV-DNA 酶基因序列在小牛胸腺 DNA 中无同源性片段,该蛋白与 EBV-DNA 酶结合有一定的特异性。

实验结果提示在 Raji 细胞核和胞浆中都有 EB 病毒 DNA 酶基因结合蛋白。在加入小牛胸腺 DNA 之后,出现了游离条带,同时仍然有结合条带 (第 4 7 号样品),这说明在该细胞中有非特异性和一定特异性的 EB 病毒 DNA 酶基因结合蛋白。Raji 细胞是从 Burkitt 淋巴瘤细胞中建立的一种不产生 EB 病毒但通常有 EB 病毒全基因组的细胞株^[8],当用了酸纳或巴豆油刺激后,EB 病毒 DNA 酶则表达而出现了 EB 病毒 DNA 酶活性^[9]。本实验使用的为非激活状态培养的 Raji 细胞,细胞中无 EB 病毒 DNA 酶活性,该酶基因的表达是受抑制的。这种抑制可能与该细胞中的 EB 病毒 DNA 酶基因结合蛋白有关。

在人乳清中有 EB 病毒 DNA 酶基因结合蛋白,在加入大量的小牛胸腺 DNA 之后仍未见有游离条带 (图中第 11 号样品),说明结合较为特异。另外,分子较小 (迁移率较快) 的结合条带在加入小牛胸腺 DNA 之后,其迁移率变得较慢 (第 10 11 号样品),这可能是形成了 EB 病毒 DNA 酶基因-蛋白质-小牛胸腺 DNA 三者复合物所引起的。人乳中一般含有多种抑菌、抗病毒的物质,如乳铁蛋白,它可与多种不同来源的 DNA 结合^[10]。但本实验结果表明该蛋白不能与 EB 病毒 DNA 酶基因结合,那么,人乳清中存在的 EB 病毒 DNA 酶基因结合蛋白能否抑

制该基因的表达而起抗 EB病毒的作用还需实验证实。

利用凝胶迁移分析法检测出了几种 EB病毒 DNA酶基因结合蛋白。这种方法能够较快、较准确地检测出特异性 DNA结合蛋白,所用的样品量极少,尤其是所用的目的 DNA量。

参 考 文 献

- 1 黄 迪,陈丽珍,张锦明,等. Epstein-Barr 病毒特异性 DNA酶抗体水平检测在鼻咽癌早期发现中的提示性. 中华肿瘤杂志, 1993, 15: 289
- 2 许道松,马润泉. 蛋白印迹法血清 DNA结合蛋白的检测. 中山医科大学学报, 1991, 12(4): 261
- 3 Dignam J D, Lebowitz R M, Roder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 1983, 11: 1475
- 4 朱振宇,严世荣,黄 迪,等. EBV-DNA酶全基因扩增克隆和鉴定. 中山医科大学学报, 1995, 16(4): 5
- 5 Foley A A, Bates G W. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal Biochem.*

1987, 162: 296

- 6 Bradford M N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989. 10: 51
- 8 Hatfull G, Bankier A T, Barrell B G. Sequence analysis of Raji Epstein-Barr virus DNA. *Virology.* 1988, 164: 334
- 9 Ooka T, Turenne M D, Daillie J. Epstein-Barr virus-specific DNase activity in non-producer Raji cells after treatment with 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and sodium butyrate. *J Virol.* 1984, 49: 626
- 10 Hutchens T W, Magnuson J S, Yip T T. Rapid purification of porcine colostrum whey lactoferrin by affinity chromatograph on single-stranded DNA-agarose, characterization, amino acid composition and N-terminal sequence. *Biochem Biophys Acta.* 1989, 999: 323

(1996-03-14收稿 1997-01-21修回)

DETECTION OF PROTEINS SPECIFICALLY BINDING TO EPSTEIN-BARR VIRUS DNase GENE

Xu Daosong Kong Tianqing Zhu Zhenyu Ma Jianquan

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

The EBV-DNase gene was obtained by use of PCR. After the gene was labeled with [γ - 32 P]ATP at the 5' end, gel mobility shift assay was used to detect proteins binding to EBV-DNase gene. In the nuclear extract and cytoplasm of Raji cells, there were proteins binding to the gene with both specificity and non-specificity. In the human whey, there were also proteins binding to the gene, lactoferrin in which could not bind to it.

Subject headings herpesvirus 4, human; DNA-binding proteins; deoxyribonucleases