

蛋白印迹法人血清DNA结合蛋白的测定*

许道松 马润泉

(生物化学教研室)

提要 利用蛋白印迹法(Western blot)原理建立了检测人血清DNA结合蛋白的一种较特异性方法,发现在成人血清中有7种Lambda DNA结合蛋白,分子量为:90kDa、67kDa、43kDa、30kDa、24kDa、22kDa和17kDa。在婴儿血清中没有30kDa、24kDa和22kDa这3种Lambda DNA结合蛋白。在人的血清中有二种小牛胸腺DNA结合蛋白,分子量为:43kDa和17kDa。血清中有四种与正常成人血浆DNA结合的蛋白质,分子量分别为:67kDa、43kDa、30kDa和24kDa,其中30kDa的这种蛋白质与正常成人血浆DNA的结合力较弱,并在一些正常个体中未见到此带。

关键词 蛋白印迹法 人血清 DNA结合蛋白

在真核细胞核外,存在着多种DNA,其中有些在物理性质,细胞周期中的合成时间等方面与核内DNA不同^[1]。这类DNA,的来源目前仍不清楚,有人认为是来自退化、死亡的细胞。淋巴样组织细胞不仅可以分泌DNA,也可摄入外源性的DNA^[2]。在细胞核外也存在着DNA结合蛋白。Bennett等发现在人的白细胞上有一种可与Lambda DNA结合的蛋白质,被称为DNA受体的这种蛋白质与DNA形成的复合物可被细胞内在化(internalise)。在一些自身免疫性疾病患者及其部分亲属中这种受体出现功能性缺陷^[3,4]。在人的脑脊液和血清中有多种小牛胸腺DNA结合蛋白,在肿瘤和炎症等病理情况下会出现异常的DNA结合蛋白^[5-7]。

现有文献中,研究DNA结合蛋白多采用DNA纤维素柱亲和层析法。作者利用蛋白印迹法(Western blot)的原理,对人血清中的DNA结合蛋白作初步研究,建立了一种较新的,特异性较强的方法。

材料与方 法

材 料

1. 血清标本 正常成人血清标本取自献血员。正常婴儿血标本取自在医院体检的年龄在1岁左右的婴儿。肿瘤患者的血标本,取自经

临床表现和病理检查诊断为肿瘤,未经治疗或治疗效果不好者。

2. 试剂 DNA标记试剂盒, Lambda噬菌体DNA以及小牛胸腺DNA均为Boehringer Mannheim公司产品;硝酸纤维素膜(0.45 μ m)为Schleicher & Schuell公司产品;〔 α -³²P〕-dCTP为Amersham和福瑞公司产品;SDS-PAGE蛋白质分子量标准(94kDa-17.5kDa)为上海生物化学研究所产品。

方 法

1. 血清蛋白经SDS-PAGE分离和电转移用3%浓缩胶,9%分离胶电泳分离血清蛋白,然后采用电转移法把电泳分离的血清蛋白各组分转移至硝酸纤维素膜上。含有蛋白质分子量标准的硝酸纤维素膜用氨基黑10B染色。

2. DNA的标记以及标记DNA与蛋白质的杂交 采用缺口翻译法用〔 α -³²P〕-dCTP对DNA进行标记,标记反应混合物经sephadex G50柱分离得到标记DNA。硝酸纤维素膜室温下于标准结合缓冲液中浸泡30分钟后,放入杂交袋中,加适量标准结合缓冲液和标记的DNA至终浓度为10⁵ cpm/ml,室温下杂交1小时。用漂洗缓冲液(10mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 50mmol/NaCl)室温振荡洗膜2小时。洗膜完成后室温凉干,压片后于-70℃曝光24小时。

*国家自然科学基金资助课题,第一作者为硕士

结果与讨论

血清中与Lambda DNA 结合的蛋白

在正常人血清中与 Lambda DNA 结合的蛋白有 7 种, 分子量分别为: 90 kDa、67 kDa、43kDa、30kDa、24kDa、22 kDa 和 17 kDa。正常婴儿血清中缺少 30kDa、24kDa 和 22kDa 这三种蛋白质。在一些正常个体中未见到 22kDa 和 17kDa 条带, 原来有这两种蛋白的血清经反复冻融后这两条带消失(图1)。Bennett 等报道了在人白细胞膜上有一分子量为 30kDa 可与 Lambda DNA 结合的 DNA 受体^[4]。本文研究发现在人的血清中也有一种分子量为 30 kDa 的 Lambda DNA 结合蛋白, 婴儿血清中没有这种蛋白质。血清中的这种蛋白质与 DNA 受体是不是同一种蛋白质还需进一步实验证实。

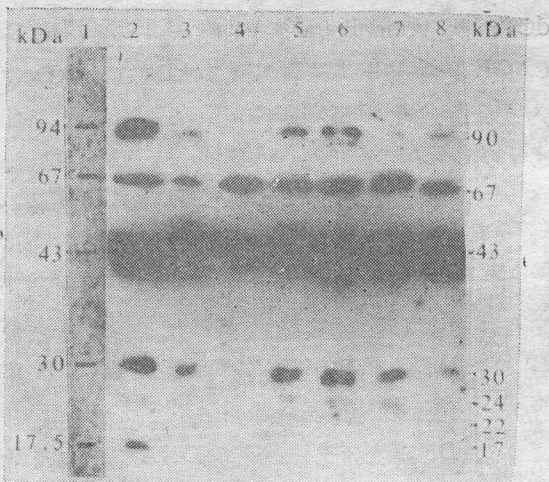


图1 与Lambda DNA 结合的蛋白

1. 蛋白质分子量标准。2 及 3. 正常成人血清。4. 婴儿血清。5 及 6. 胃癌病人血清。7 及 8. 淋巴瘤病人血清

在所检测的肿瘤(胃癌、淋巴瘤各 4 例)病人血清中未发现异常的 Lambda DNA 结合蛋白(图 2)。用标记 DNA 检测肿瘤病人血清中特异性的 DNA 结合蛋白是有可能的。根据本实验建立的方法, 用致癌病毒特异性的基因探针, 可作进一步的研究。肿瘤病毒与肿瘤的发生有一定的关系, 对于传染性核酸是怎

样进入细胞的目前也不清楚。利用本文的方法, 采用标记肿瘤病毒 DNA 来检测与这种 DNA 结合的蛋白, 将会对肿瘤的发生机制以及肿瘤诊断方面有意义。

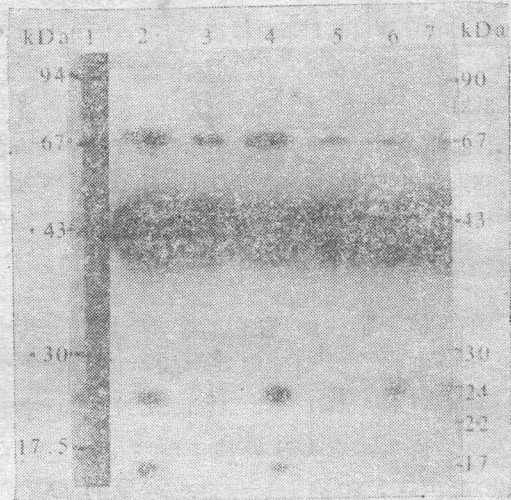


图2 与Lambda DNA 结合的血清蛋白

1. 蛋白质分子量标准。2 及 7. 正常人血清。3 及 4. 胃癌病人血清。5 及 6. 淋巴瘤病人血清

血清中与小牛胸腺DNA 结合的蛋白

人的血清中有两种小牛胸腺 DNA 结合蛋白, 即 43 kDa 和 17 kDa。肿瘤患者(胃癌 8 例、淋巴瘤 6 例, 血清中出现与正常人相同的带谱(图 3)。有人用 DNA-cellulose 柱亲和层析法发现血清中有多种小牛胸腺 DNA 结合蛋白^[6-7], 并发现在一些肿瘤患者中出现异常的 DNA 结合蛋白^[8]。用亲和层析法不能排除 DNA 与蛋白质之间的非特异性结合。

正常成人血浆DNA结合血清蛋白

血清中与正常成人血浆 DNA 结合的蛋白质有 4 种, 分子量分别为: 67 kDa、43 kDa、30 kDa 和 24kDa。其中 30 kDa 的这种蛋白与血浆 DNA 结合力较弱, 且在一些正常个体中未见到这一条带(图 4)。血浆 DNA 的研究文献报道很少, 关于这方面的研究主要是对血浆 DNA 的含量进行测定, 至于血浆 DNA 的来源及功能目前仍不清楚。

对于细胞核内DNA 结合蛋白的研究较多

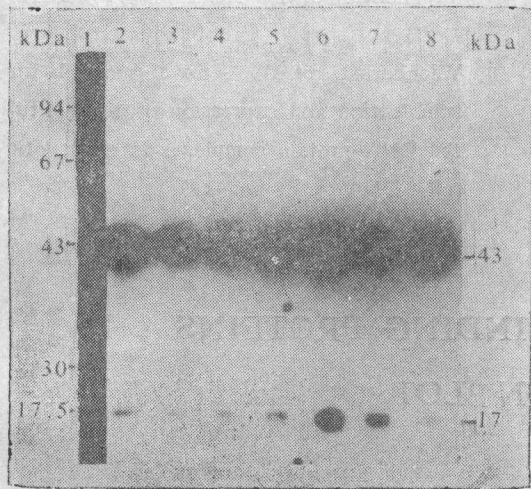


图3 与小牛胸腺 DNA 结合的血清蛋白

1. 蛋白质分子量标准。2~4. 正常人血清。5及6. 胃癌病人血清。7及8. 淋巴瘤病人血清

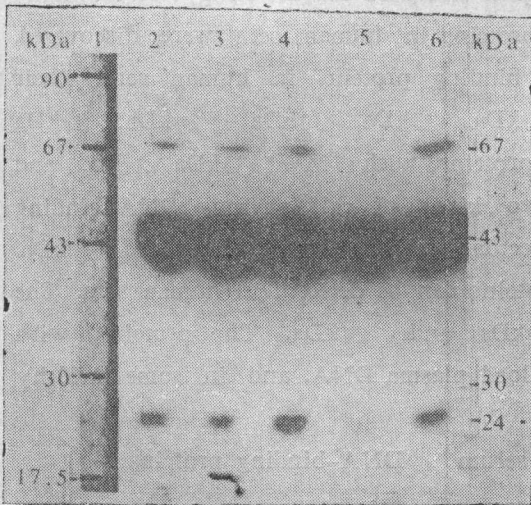


图4 成人血浆 DNA 结合的血清蛋白

1. 蛋白质分子量标准。2~5. 正常成人血清。6. 婴儿血清

为它们在 DNA 复制、重组、链裂解和转录过程中起关键作用，还与细胞周期间染色体的系变化有关。在真核细胞的细胞器（核、线粒体、叶绿体）之间，存在着 DNA 的迁移（mobility of DNA），这种基因转移（gene transfer）可能与生物共生有关。但是关于这种基因转移的机理并不清楚^[9]，有可能是靠某种 DNA 结合蛋白来完成的。脑脊液中的 DNA 结合蛋白可能有基因调节作用^[5]。在细胞核外有

DNA 及其结合蛋白，而细胞核内的 DNA 及其结合蛋白控制着细胞的遗传、生长。这二个系统之间有什么区别和联系呢？细胞核外 DNA 及其结合蛋白对细胞间遗传信息的传递等方面可能起作用，核外的 DNA 结合蛋白可能起着保护（免受核酸酶消化）和运载 DNA 的作用。

本文作者建立了一种检测血清 DNA 结合蛋白较新特异性较强的方法，并发现在人的血清中有几种 DNA 结合蛋白。在基因工程中，把外源性基因导入真核细胞中缺乏比较有效的载体。有人用腺病毒核心中的 DNA 结合蛋白把外源性基因导入真核细胞中，并在细胞内得到了较高的表达^[10]。对血清中 DNA 结合蛋白的研究很少，对于它们的功能也不清楚。作者认为，对血清 DNA 结合蛋白的深入研究，在基因调控，有效 DNA 载体的发现和利用等方面有较为重要的意义。

参 考 文 献

1. Meinke W, et al. Physical properties of cytoplasmic membrane associated DNA. *J Mol Biol* 1973;78(1):43
2. Jachertz D, et al. Information carried by DNA released by antigen stimulated lymphocytes. *Immunol* 1979;37:753
3. Gabor G, et al. Biotin-labeled DNA: A novel approach for the recognition of a DNA-binding site on cell membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122(3):1034
4. Bennett RM, et al. Defective DNA-refector function in systemic lupus erythematosus and related diseases: Evidence for an autoantibody influence cell physiology. *Lancet* 1986;1(8474):186
5. Kubinski H, et al. Proteins from unman cerebrospinal [fluid: Binding to nucleic acids. *Science* 1973;182:296
6. Brehm SP, et al. DNA-binding proteins in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;63:24
7. 于利敏,等, 人和小鼠血清DNA 结合蛋白质

- 的比较研究. 生物化学杂志 1986;2(2):27
8. Nakasaki H, et al. Clinical significance of a serum DNA binding protein (64-DP) in evaluating malignant diseases. Gann 1981;72:280
9. Gellisen G. Mobility of DNA between organelles. Chem Abstr 1987;106(21):171217n
10. Wienhues U, et al. A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells. DNA 1987;6(1):81

DETECT SERUM DNA BINDING PROTEINS BY WESTERN BLOT

Xu Daosong Ma Jianquan

(Department of Biochemistry)

A method based on Western blot was designed and used for detecting DNA-binding proteins in human sera. Several DNA-binding proteins in human sera were discovered. There are seven kinds of Lambda phage DNA binding proteins in human sera. Their molecular weights are as follows: 90kDa, 67kDa, 43kDa, 30kDa, 24kDa, 22kDa and 17kDa. Three kinds of DNA-binding proteins with MW 30kDa 24kDa and 22 kDa were not detected in baby sera. Two kinds of calf thymus DNA-binding proteins were detected in human sera. Their molecular weights are 43kDa and 17kDa. Four kinds of human plasma DNA binding proteins can be detected in human sera. The molecular weights are 67kDa, 43kDa, 30kDa and 24kDa. The proteins with MW 30kDa has a weak binding to human blood plasma DNA, and in some healthy individuals this protein is absent.

Key words Western blotn Human serum DNA-binding proteins