

层析被纯化, 纯度达 90% 以上. 再经 SDS-PAGE 目的条带回收纯化, 可获得蛋白质纯品, 分子质量 14.4 ku 与氨基酸序列理论计算值一致 (图 5).

从以上结果可见, 我们已建立 eNOS₂ 表达工程菌, 并获得目的蛋白纯品, 以此蛋白质为抗原, 我们已制备了 eNOS 的特异性抗体 (另文发表). 同时, 亦可利用该蛋白作为筛选 eNOS 特异性抑制肽的靶蛋白.

参 考 文 献

- 1 储国洋, 郭兆贵 (Chu G X, Guo Z G). 一氧化氮及其药理学前景. 国外医学分子生物学分册 (Foreign Medical Sciences: Molecular Biology), 1992, 14 (6): 281~ 285
- 2 Lamas S, Marsden P A, Li G K, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89 (7): 6348~ 6352
- 3 Hager D A, Burgess R R. Elution of proteins from SDS-PAGE. Anal Biochem, 1980, 109 (1): 76~ 86
- 4 Varadaraj K, Skinner D M. Denaturants or Cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene, 1994, 140 (1): 1~ 5

Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) 801~ 902AA Residues in *E. coli*. ZHAO Jiar-Hua¹⁾, SHEN Yue, ZHU Mir-Sheng, XU Xiang-Yu, PAN Ying (*Nanjing Military Medical Institute, Nanjing 210002; ¹⁾ Jiangsu Center of Clinical Laboratory, Nanjing 210009, China*).

Abstract To investigate the function, function regulation and structure-function relationship of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), a gene fragment encoding eNOS 801~ 902 AA residues was cloned by PCR, and inserted into pET-28a (+) expressive vector. The resulted pET-28a/eNOS₂ was transformed into BL₂₁ host *E. coli* and expressed by IPTG induction for 4 hour. The expressed protein (14.4 ku) was purified by His-BindTM Sepharose colum and SDS-PAGE, thus providing the basis for the selection of the eNOS-specific inhibiting peptides and the preparation of the specific antibody against eNOS.

Key words eNOS, recombinant expression, *E. coli*

用干血纸片扩增人雄激素受体基因*

王 进 陈光椿 卢 建

(第二军医大学病理生理教研室, 上海 200433)

摘要 雄激素不敏感综合征 (AIS) 为一类主要与雄激素受体 (AR) 基因缺陷密切相关的 X-连锁隐性遗传病. 为进一步阐明 AIS 的发病机制, 建立了用干血纸片直接 PCR 扩增或将干血纸片中的血细胞洗脱裂解后进行 PCR 扩增雄激素受体 (AR) 基因的方法, 结合已建立的 SSCP 分析及 DNA 直接测序等方法, 可对 AR 基因进行突变分析. 干血纸片取样及保存容易, 便于邮寄, 适用于外地, 特别是边远地区患者的取样. 该法不仅为 AIS 患者的 AR 基因突变分析和家系调查提供简便易行的方法, 也适用于 PCR 基础上的其他各种基因的突变分析.

关键词 雄激素受体, 干血纸片, 多聚酶链式反应 (PCR), 基因突变

学科分类号 Q789

自 1987 年英国学者 Guthrie 建立用干血纸片诊断遗传病的方法以来, 由于干血纸片血样本易于保存和邮寄, 血斑中 DNA 也比较稳定, 已经广泛应用于一些遗传病的检测和筛选^[1]. 雄激素不敏感综合征 (androgen insensitivity syndrome, AIS), 为一类主要与雄激素受体 (AR) 基因缺陷密切相关的 X-连锁隐性遗传病, 主要表现为不同程度的男性性分化发育异常及某些特发性男性不育症^[2]. 为研究 AIS 的发病机制, 本实验室已在国内率先

建立了用外周血白细胞或培养的外阴部皮肤成纤维细胞检测 AIS 患者 AR 基因突变的 PCR-SSCP 分析及 DNA 直接测序法, 并用该法确定了国人四种 AR 基因的突变型^[3]. 为解决外地特别是边远地区患者取样难的问题, 我们又建立用干血纸片扩增人 AR 基因的方法.

* 国家自然科学基金资助课题 (39270310).

收稿日期: 1999-01-07, 修回日期: 1999-03-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 干血纸片的制备: 耳垂或手指取血, 点在进口 3M 滤纸或国产新华滤纸上, 室温干燥后备用。

1.1.2 主要试剂: Tris、TritonX-100、NP-40、Tweeer-20、蛋白酶 K、TaqDNA 聚合酶等分别购自瑞士 Fluka 公司、上海西巴斯、华美及加拿大 ACGT 公司等生物工程公司。DNA 小分子质量标准购自复旦复华公司。

1.1.3 引物: 用 7 对引物分别扩增人 AR 基因外显子 B~ H^[3], 其中引物 B、C 由中国科学院细胞所合成, 引物 D~ H 由加拿大 ACGT 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 模板处理

a. 干血纸片洗脱裂解法: 将干血纸片放入一 50 ml 离心管中, 加入 4.5 ml 0.9% 生理盐水, 室温下放置 1 h, 然后分别将洗脱液移至 3 个 1.5 ml Eppendorf 管中, 4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min, 去上清, 将沉淀汇集后加入 50 μ l 裂解液 [10 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 蛋白酶 K 200 mg/L], 55℃水浴过夜, 然后依次煮沸、冰浴 5 min, 4℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清进行 PCR 扩增。

b. 干血纸片直接 PCR 扩增法: 参照国外文献, 采用进口 3M 滤纸制成干血纸片, 将干血纸片置入 Eppendorf 管, 适量甲醇固定 20 min, 真空抽干, 剪成约 2 mm × 2 mm 大小, 按下列方法进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 扩增: 采用 50 μ l 反应体系, 内含 13 μ l 洗脱上清或干血纸块一块, Taq DNA 聚合酶 1U (后加), 1 × 缓冲液 [50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 2 mmol/L MgCl₂, 0.1% Triton X-100, NP-40、Tweeer-20 各 0.45%], 引物各 0.25 μ mol/L, 四种 dNTP 各 50 μ mol/L。先进行预反应, 即于 96℃, 55℃各 5 min, 重复 3 次, 降至 80℃时加入 Taq DNA 聚合酶, 然后进行常规 PCR 循环, 即于 93℃, 58℃ (其中外显子 E、H 为 60℃), 72℃各 1 min, 35 个循环, 最后在 72℃保温 7 min, 置 4℃保存。

2 结 果

用干血纸片对 AR 基因 B~ H 的 7 个外显子分

别进行了 PCR 扩增, 为取得最好的扩增效果, 我们参照文献, 对几种常用的干血纸片 PCR 扩增方法进行了摸索。实验证实将干血纸片洗脱裂解后进行 PCR 扩增或用进口 3M 滤纸制备的干血纸片直接 PCR 扩增, 在我们选定的实验条件下, 取得了与用外周血白细胞抽提的 DNA 为模板进行 PCR 扩增同样的结果。图 1 显示了用干血纸片直接 PCR 扩增出的单一和特异的 B~ H 7 个外显子条带。在此基础上, 我们用 SSCP 分析和 DNA 直接测序法对三个 AIS 家系的患者和部分家系成员进行了 AR 基因 B~ H 的突变分析, 证实这三个家系患者分别在外显子 G 和 E 有突变, 其中一个为单碱基缺失, 另外两个为错义突变。

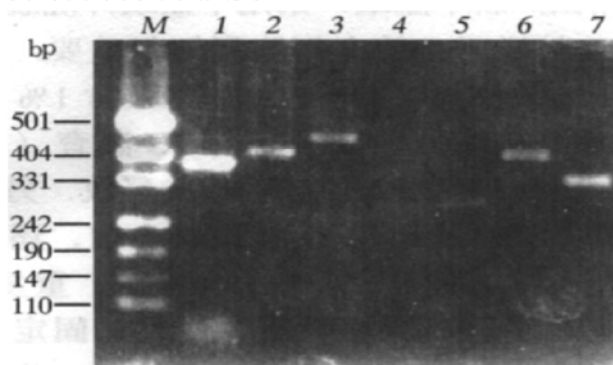


图 1 干血纸片直接扩增人 AR 基因外显子 B~ H 结果
M: DNA 小分子质量标准; 1~ 7: 分别代表 AR 基因的外显子 B~ H。

3 讨 论

AR 基因长约 90 kb, 由 8 个外显子组成。AIS 患者的 AR 基因突变具有明显的异质性, 已证实的突变分布于所有的外显子, 无明显的突变热点, 但以编码雄激素结合区的外显子 D~ H 发生率最高^[4]。故进行 AR 基因突变分析时, 需对所有外显子逐个进行检测, 以防漏检。在制备干血纸片时, 如果需扩增 AR 基因的全部外显子, 一般需要采 3 ~ 4 滴血。

我们用 PCR-SSCP 和 DNA 测序的方法首先对 AR 基因的 7 个外显子进行了突变分析。由于干血纸片含血量少, 能获得的 DNA 模板量低, 要完成上述实验, 这就要求能通过 PCR 扩增出一定质量和数量的 AR 基因片段。我们首先参照文献, 对几种常用 PCR 扩增干血纸片的方法进行了摸索。实验表明采取干血纸片微量 DNA 抽提法虽可获得较高纯度的模板, 但因抽提步骤多, 模板因丢失而获量少, 不能满足实验需要^[5]。将干血纸片置入

Eppendorf管, 加适量双蒸水煮沸 10 min, 离心后取上清为模板进行常规 PCR 扩增, 效果也比较好, 但用该法干血纸片必须新鲜, 放置二周后的干血纸片则扩增不出条带, 由于取自外地患者的干血纸片邮寄时需要时间, 因此该法也不够实用^[6].

用干血纸片直接 PCR 扩增是一种简便快速, 效果好的方法^[7]. 由于该法要求 PCR 体系中的血纸片体积尽可能的小, 同时又要求血纸片提供的模板 DNA 尽可能的多, 因此必须采用吸血量较多的进口 3M 滤纸. 实验前还应用甲醇变性、固定干血纸片中的血红蛋白, 以去除其对 TaqDNA 聚合酶的抑制. 如无进口滤纸, 也可选用干血纸片洗脱裂解法 PCR 扩增 AR 基因^[8], 该法对滤纸的要求不高, 可用国产新华滤纸. 采用干血纸片洗脱裂解法进行 PCR 扩增时, 使血细胞裂解很重要. 本实验表明将干血纸片洗脱出的血细胞采用含 1% SDS 或含 1% TritonX-100 的裂解液 55℃ 温育 (过夜), 能保证血细胞的充分裂解和模板的释放. 另外, 用上述两种方法进行常规 PCR 循环之前, 还必须进行预反应, 即: 96℃, 55℃ 各 5 min, 重复 3 次, 充分裂解血细胞, 获得模板, 变性、固定血红蛋白, 去除其对 Taq DNA 聚合酶的抑制, 此外 PCR 缓冲液中必须有 NP-40、Tween 20, 前者能裂解血细胞, 后者能稳定 Taq DNA 聚合酶, 增加产量. 总之, 在用干血纸片洗脱法对基因进行扩增过程中, 注意到如何最大程度地获得模板 DNA 及怎样去除 Taq DNA 聚合酶抑制因子以及调整 PCR 体系各成分的比例, 才能够达到预期的目的. 此外还要注意干血纸片放置时间不宜过长. 我们的实验证实干血纸片放置 3 个月后经直接 PCR 扩增, 虽然能扩增出单一、特异的条带, 但条带亮度减弱. 而且放置时间过长, 致模板降解多, 测序效果也差.

干血纸片易于保存, 可直接邮递, 并且血斑中的 DNA 较稳定, 这就解决了外地, 特别是边远地区 AIS 患者取样难的问题^[9]. 利用干血纸片扩增出的人 AR 基因外显子片段的特异性好, 在此基础上用 SSCP 分析, DNA 直接测序法及限制性内切酶酶切等方法既可检出 AR 基因的片段性改变, 又可测出点突变, 能够运用于 AIS 患者的 AR 基因突变分析、家系调查和产前诊断, 也适用于 PCR 基础上的其他各种基因的突变分析.

参 考 文 献

- 1 Edward R B. Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. PCR methods and applications, 1991, 1 (1): 99~106
- 2 Griffin J E, Wilson J D. The Androgen Resistance Syndromes: 5-Redutase Deficiency, Testicular Fiminzation and Related Disorders. The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th. New York: McGraw-Hill, 1989. 1919~1944
- 3 陈光椿, 卢建, 徐晓春, 等 (Chen G C, Lu J, Xu X C, et al). 七例睾丸女性化综合征患者雄激素受体基因突变的研究. 第二军医大学学报 (Acad J Sec Mil Med Univ), 1996, 17 (3): 300~304
- 4 Gottlieb B, Trifiro M, Lumbroso R, et al. The androgen receptor gene mutations database. Nucleic Acids Res, 1997, 26 (1): 234~238
- 5 Edward R B, Shu Z H, William K S, et al. DNA microextraction from dried bloods pots on filter paper blotters: potential application to newborn screening. Hum Genet, 1987, 75 (2): 213~216
- 6 陈林, 孙光云, 吴梅筠 (Chen L, Sun G Y, Wu M J). 用全血直接进行 DNA 扩增. 中华医学遗传学杂志 (Chin J Med Genet), 1992, 9 (1): 6
- 7 Raskin S, Phillipslll J A, Kaplan G, et al. Cystic fibrosis genotyping by direct PCR analysis of guthrie blood spots. PCR Methods and Applications, 1992, 2 (2): 154~156
- 8 Zeng Y T, Huang S Z, Ren Z R. Identification of Hb D-punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. Am J Hum Genet, 1989, 44 (6): 886~889
- 9 Schwartz E I, Khalchitsky S E, Eisensmith R C, et al. Polymerase chain reaction from dried blood spots on guthrie cards. Lancet, 1990, 336 (9): 639~640

PCR Amplification of Androgen Receptor Gene from Dried Blood Spot. WANG Jin, CHEN Guang-Chun, LU Jian (Department of Pathophysiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China).

Abstract Androgen Insensitivity syndrome (AIS) is a X-linked recessive disease mainly associated with the defect of androgen receptor (AR). A method was established by which the AR gene can be amplified by PCR directly from the dried blood spot or from the wash-fluid of dried blood spot. The PCR products from dried blood spot have good specificity. Combining this method with SSCP and direct DNA cycle sequencing, the point mutations and the fragment changes of AR gene can be identified. This method is simple, economical and it offers the possibility of mutation analysis of AR gene or other genes from patients who live in remote countryside.

Key words androgen receptor, dried blood spot, polymerase chain reaction (PCR), gene mutation