

THE EXTRACTION OF SINGLE KIND NONHISTONE PROTEIN FROM NUCLEUS

LIU Qing Ying

(Department of Biochemistry Dalian Medical University, 116027)

ABSTRACT

This paper describes a simple method for extracting single kind chromatin nonhistone protein. After obtaining the phenol-soluble nonhistone proteins, the proteins were subjected to two-dimensional gel electrophoresis. The gel containing spot protein was cut off soaked and extracted in the buffer solution. Through centrifuge the supernatant was obtained and then precipitated with acetone at low temperature.

Key words: Chromatin nonhistone protein Two-dimensional gel electrophoresis

经验交流

RT-PCR 法检测大鼠脑组织及 C 6 细胞中 β -APP 的表达

马 磊 舒 宁 谢昌平 陈小爱 陈素珍 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 200433)

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, 简称 AD)是一种常见的老年性痴呆, 它的特征性病理改变主要是: 脑组织中出现老年斑(senile plaque)和神经纤维缠结(neurofibrillary tangles)及造成神经元细胞死亡(neuronal cell loss)。老年斑的主要组分是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protien, 简称 β -AP)。AD 的发病与 β -AP 的代谢存在着直接的联系。 β -AP 是 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, 简称 β -APP)剪切后的产物, 长度在 40 个氨基酸左右。 β -APP 在哺乳动物细胞中广泛表达, 它是一个膜结合蛋白, 由一段很长的胞外 N 端片段, 一个跨膜区及一段很短的胞内 C 端组成, 分子量约 100—140 KDa。 β -AP 是 β -APP

近膜的一小段, 它 2/3 是胞外部分, 1/3 是跨膜部分^[1]。

β -APP 在体内的表达方式很特别, 它的转录物要经过多种方式的剪接, 形成至少五种不同长度的 mRNA, 其中最主要的 3 种为 β -APP₇₇₀, β -APP₇₅₁, β -APP₆₉₅(数字表明相应蛋白质所含的氨基酸数目)。它们 3 者的区别是 Kunitz 丝氨酸蛋白酶抑制区(Kunitz Protease inhibitor domain, 简称 KPI)编码序列的存在和缺失。 β -APP₇₇₀ 保留了 225 个核苷酸的 KPI 编码区; β -APP₇₅₁ 经部分剪接保留了 168 个核苷酸的 KPI 编码区; β -APP₆₉₅ 则完全不含此编码区^[2-4]。大量文献表明: β -APP₆₉₅ 主要表达在正常哺乳动物中枢神经系统中, 而

在其它组织中以表达 β -APP₇₆₁, β -APP₇₇₀ 为主^[6]。在 AD 病人脑组织中, 病变较重的皮质、海马区 β -APP₆₉₅ 含量减少, β -APP₇₆₁ 含量增加。转基因实验证实, 带有 β -APP₇₆₁ cDNA 的转基因小鼠表现出一些明显的 AD 样病症, 而带有 β -APP₆₉₅ cDNA 的转基因小鼠则几乎未有表现^[6]。这些结果都说明老年斑中 β -AP 的沉积与 β -APP 基因转录物之间平衡的改变可能存在直接的相关性。因此, 深入研究 β -APP 基因转录水平特别是其剪切机制在生理过程中的变化, 将为探讨 AD 的发病机理提供重要的依据。

我们设计了针对 KPI 编码区两侧序列的一对特异性引物, 运用反转录-多聚酶链式反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 简称 RT-PCR) 方法, 可分别扩增出反映 β -APP₆₉₅, β -APP₇₆₁ 及 β -APP₇₇₀ 的 DNA 片段, 它们的大小依次为 230 bp, 398 bp, 455 bp。由此建立了检测 β -APP 基因转录物的方法。通过该方法我们检测了胎鼠脑组织, 6 月龄大鼠大脑皮层、海马组织, 大鼠神经胶质瘤细胞系 C6 中 β -APP 的表达。

材料和方法

1. 动物材料处理和细胞培养

6 月龄 SD 大鼠购自二军大实验动物中心, 断头处死, 取全脑组织, 分离大脑皮层和海马组织。

孕 16—18 天 SD 大鼠购自二军大实验动物中心, 取胎鼠的全脑组织。

大鼠神经胶质瘤细胞系 C6 由本实验室提供, 采用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 5% CO₂, 37°C, 饱和水蒸气培养, 在 100 ml 玻璃培养瓶中长达 70% 满收获。

2. 总 RNA 抽提

按文献[7]的方法进行。

3. 反转录反应

采用 Promega 公司的 AMV 反转录酶, 取约 1 μ g 的总 RNA 样品, 操作按说明书。

4. PCR 反应

β -APP 引物 1: 5'-TCTCTCATGACCTGGGAC 3'

引物 2: 5'-CCCTACGAAGAAGCCACA-GAGAGAA 3'

由中科院细胞所合成。

β -actin 引物 1: 5'-TCATGAAGTGTGACGTT-GACATCCGTAAAG 3'

引物 2: 5'-CCTAGAAGCATTTGCGG-TGCACGATGGAGG 3'

由本实验室合成。

采用购自金球国际有限公司的 Jian's Taq DNA Polymerase, 每个反应体系含酶 2U, 引物各 20pmol, 总体积 50 μ l。反应按 94°C 120 秒, (94°C 45 秒, 58°C 45 秒, 72°C 60 秒) \times 35 循环, 72°C 420 秒进行。产物由 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离。

结果与讨论

在五只 SD 胎鼠的实验中, 我们没有扩增出脑组织中反映 β -APP mRNA 的条带, 可能是 β -APP 没有表达或表达量极微; 6 月龄大鼠属于成年期大鼠, 实验共用 6 只 SD 大鼠, 在它们的大脑皮层、海马组织样品中均扩增出了 230 bp 的条带, 而无其它明显可见条带, 说明在这些组织中 β -APP₆₉₅ 的表达占绝对优势; 大鼠神经胶质瘤细胞系 C6 样品中扩增出了 230 bp, 398 bp, 455 bp 的条带, 其中 455 bp 的条带较其它两条条带明亮, 说明 β -APP₇₇₀ 的表达占优势, 重复结果相同, 见图版。所有样品中作为阳性对照的 β -actin 检测结果均正常。关于 12 月龄以上的老年大鼠的检测结果还在进行之中。

在正常大鼠脑组织中 β -APP₆₉₅ 占优势, 这一结果与文献报道相符^[5]。C6 细胞样品的检测结果表明: 高分子量的 β -APP 在体外培养细胞中占有优势, 这也与文献报道相符^[6]。这些结果说明我们的检测系统的可行性与有效性。体外培养的神经细胞系在长期传代过程中 β -APP mRNA 的表达与正常脑组织已经有了差别, 因此不适合作为研究 β -APP 转录水平变化的模型。

AD 发生在中、老年人中, 它的发病与年龄明显相关。国外有报道, 带有人 β -APP₇₅₁

cDNA的转基因小鼠发育早期与正常小鼠比无明显变化,而随着年龄增加,AD样病症越来越明显^[9]。这表明 β -APP的代谢受到发育阶段的调节。我们的实验结果也说明了随着年龄的增高, β -APP在大鼠脑组织中转录水平有明显的变化。 β -APP的表达量随年龄的增高而提高这一现象为AD的发病提供了可能的合理解释。

RT-PCR方法具有灵敏度高,快速,简便的特点。在严格控制实验条件一致性的情况下,它是探讨转录水平变化的有效手段。我们建立的RT-PCR法检测大鼠脑 β -APP基因转录情况的系统为探讨各种药物刺激及创伤状态下 β -APP转录变化提供了重要手段。这些将为研究AD发病机理提供重要线索。

摘 要

β -淀粉样蛋白(β -AP)是阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)病人老年斑的主要成分,它是 β -淀粉样前体蛋白(β -APP)剪切后的产物。 β -APP基因在体内存在 β -APP₆₉₅, β -APP₇₅₁, β -APP₇₇₀等几种主要的转录物,它们的区别在

于Kunize丝氨酸蛋白酶抑制区(KDI)编码序列的存在和缺失。通过RT-PCR技术,用针对KPI编码区两侧序列的一种特异性引物可由总RNA样品中扩增出反映以上三种转录物的cDNA片段。实验表明,胎鼠脑组织中未检测到 β -APPmRNA;6月龄大鼠海马组织,大脑皮层中只检测到 β -APP₆₉₅;在神经胶质瘤细胞系C6中存在 β -APP₆₉₅, β -APP₇₅₁, β -APP₇₇₀,其中 β -APP₇₇₀占优势。

关键词: β -淀粉样前体蛋白 反转录-多聚酶链式反应

参 考 文 献

- [1] Dennis J et al, 1993, *Trends in Neuroscience*, 16: 403-408.
- [2] Jie K. et al, 1987, *Nature*, 325: 733-736.
- [3] P. Ponte et al., 1988, *Nature*, 331: 525-527.
- [4] Nobuya K. et al., 1988, *Nature*, 331: 530-532.
- [5] P. J. Gebicke-Haerter et al., 1994, *Journal of Neuroscience Research*, 38: 32-40.
- [6] L. S. Higgin et al., 1994, *Annals of Neurology*, 35: 598-607.
- [7] Piotr C. et al., 1987, *Biochemistry*, 162: 156-159

DETECTION OF β -APP EXPRESSION IN THE BRAIN TISSUES OF RAT AND C6 CELL USING RT-PCR

MA Biao SHU Ning XIE Chang Pin CHEN Xiao Ai CHEN Su Zhen
ZHAO Shou Yaun

(Institute of Genetics, Fu dan University)

ABSTRACT

The deposition of β -amyloid protein (β -AP) in the brain is the causative agent of Alzheimer's pathology. β -AP is a peptide product of the β -amyloid precursor protein(β -APP). Due to alternative splicing, there are several mRNA variants of β -APP. β -APP₆₉₅, β -APP₇₅₁ and β -APP₇₇₀ are the main three which are different in the absence or presence of the Kunitz protease inhibitor domain(KPI). RT-PCR with a pair of primers for the flank sequences of KPI can give rise to three cDNA variants corresponding to β -APP₆₉₅, β -APP₇₅₁ and β -APP₇₇₀. In embryo rat's brain there is no detectable β -APPmRNA, whereas in the cerebral cortex and hippocampus of six-month-old rat the β -APP₆₉₅ mRNA existed predominantly. In the neuroblastoma cell line C6 cells, β -APP₆₉₅, β -APP₇₅₁ and β -APP₇₇₀ all appeared and the β -APP₇₇₀ mRNA was the main one.

Key words: Alzheimer's Disease β -amyloid protein RT-PCR method