

文章编号: 1673-3851 (2012) 04-0604-05

西兰花端粒酶分离与活性测定探究

刘红彦, 马国兴, 杨力媛, 郑 洁, 刘小川

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 植物端粒酶以自身的 RNA 亚基为模板, 维持着染色体末端端粒的长度, 从而使植物细胞可持续分裂。本研究以西兰花花蕾为材料, 采用不同分子量、不同浓度的 PEG 分别提取端粒酶, 根据 PEG 吸附蛋白质的原理, 从具有端粒酶活性的组织中分离并富集端粒酶。结果显示: 用 PEG 6000 提取西兰花端粒酶, 且用 100 μg 的酶量进行酶促反应时测得的端粒酶活性最高。以此为参数, 经改进的 TRAP 法成功检测到: 用 0.2 g PEG 6000/700 μL 洗脱液提取出的端粒酶活性很高。这些分离、检测技术为其它植物组织中端粒酶活性的检测和评价提供了新的途径, 尤其对低活性的植物端粒酶检测具有重要意义, 为深入研究端粒酶 RNA 的序列及结构奠定了基础。

关键词: 西兰花; 端粒酶分离; 端粒酶检测; 聚乙二醇(PEG)

中图分类号: Q814.1 **文献标识码:** A

0 引 言

真核生物 DNA 在半保留复制中存在“末端复制问题”, 为了能很好地解决这一问题, 染色体末端形成了一种特殊的结构——端粒(telomere), 它由一些简单的短寡核苷酸串联重复而成。在植物中, 端粒序列主要是拟南芥型, 由 7 个碱基(5'-TTTAGGG-3')组成^[1]。它不是结构基因, 不能编码蛋白质^[2-3]。端粒长度随细胞的分裂而逐渐缩短, 同时又在端粒酶的作用下得到延伸。因此, 端粒长度的维持主要靠端粒酶来完成。端粒酶类似于反转录酶, 以自身 RNA 为模板, 将 TTTAGGG 重复序列加到染色体末端^[4]。它包括两个必要的组分^[5]: 端粒酶 RNA(telomerase RNA, TER)和端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)。目前, 在一些动物和人体中, 已对端粒酶组分进行了深入的研究, 但在植物中这些方面研究得比较少。最早是 Fitzgerald 等^[6]从拟南芥中克隆到了端粒酶的催化亚基 TERT, 其开放阅读框为 3 372 bp, 编码蛋白为 131 kDa。对于植物 RNA 组分, 有最新报道

表明在拟南芥中找到 TER1 和 TER2 两个不同的 RNA 模板, 经体外检测这两个组分都存在于有活性的端粒酶中^[7]。动物端粒酶活性检测的方法主要是 Kim^[8]设计的端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)以及在此基础上改良的 TRAP 与荧光定量技术^[9]和 PCR-ELISA 法^[10]等。由于植物细胞端粒酶的活性远比动物细胞低, 一般方法较难检测。

本文报道了基于聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)吸附蛋白质的原理, 建立了分离和富集端粒酶的方法。以西兰花花蕾为材料, 选用不同分子量、不同浓度的 PEG 提取端粒酶, 通过 TRAP 法对酶活进行检测, 探究 PEG 对端粒酶提取吸附量的影响。这有助于对其它植物组织中低活性端粒酶的检测与研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

西兰花花蕾; 不同分子量的聚乙二醇(PEG 1000、PEG 2000、PEG 4000、PEG 6000、PEG 8000、

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 浙江省研究生创新基金(YK2010057)

作者简介: 刘红彦(1986-), 女, 山西霍州市人, 硕士研究生, 研究方向为端粒与端粒酶。

通讯作者: 刘小川, 电子信箱: xcliu@zstu.edu.cn

PEG 10000)、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(EGTA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、二巯苏糖醇(DTT)和 rTaq 酶; T₄ DNA ligase(大连 TaKaRa 有限公司), NANODROP 2000 spectrophotometer(Thermo SCIENTIFIC 公司)。

1.2 方法

1.2.1 西兰花花蕾粗提取液的制备

取 5g 西兰花花蕾(购自杭州市下沙农贸市场)放入研钵中加入液氮研磨成粉末,再加入 20 mL 提取液继续研磨。(提取液成分: 1 mL 1 M pH7.5 Tris-HCl, 4 mL 25 mM MgCl₂, 2 mL 1 M KCl, 4 mL 100 mM EGTA, 166 μL 12 mM PMSF, 4 mL 7.5% PVP, 4 mL 50% Glycerol, 200 μL 100 mM DTT, 634 μL ddH₂O)待研磨充分后转入 50 mL 离心管中, 4℃, 12 900 r/min, 离心 15 min, 将上清分装到 2 mL 的 EP 管中; 分别加入 0.2 g 的 PEG 1000、PEG 2000、PEG 4000、PEG 6000、PEG 8000、PEG 10000, 放入冰盒中, 手动搅拌混匀 1 h, 使 PEG 分子与样品充分接触, 便于吸附蛋白。离心, 并探索不同分子量的 PEG 吸附蛋白后的最佳离心速度, 弃上清; 再次加入一定量的提取液, 设置最佳 PEG 与提取液的洗脱比(0.2 g/300 μL, 0.2 g/500 μL, 0.2 g/700 μL, 0.2 g/900 μL, 0.2 g/1 100 μL, 0.2 g/1 300 μL, 0.2 g/1 500 μL)7 个处理, 探索最佳洗脱比。手动搅拌提取液 30 min, 4℃, 12 900 r/min, 离心 2 min, 取上清保存至 -80℃。

1.2.2 粗提取液中总蛋白含量的测定

通过 NANODROP2000 spectrophotometer 测定不同 PEG 处理的样品中蛋白质含量, 重复 3 次, 取平均值。

1.2.3 酶促反应产物回收

酶促反应采用以下方法^[11], 设正常酶促反应、酶灭活后进行酶促反应(65℃, 15 min)和正常酶促反应后加 RNaseA 消化三个处理。酶促反应体系为 300 μL: 15 μL 1.0 M Tris-HCl (pH 8.3), 60 μL 25 mM MgCl₂, 15 μL 1.0 M KCl, 30 μL 100 mM EGTA, 3.0 μL 10% Triton x-100, 3.0 μL 100 mM DTT, 6.0 μL 2.5 mM dNTP-C, 30 μL 0.1% BSA, 18 μL 20 mM 前导引物(5'-ATgATgTgCAACTCgACAACCTT-3'), 100 μg 蛋白, 加 ddH₂O 至 300 μL。反应条件: 19℃, 13 min; 94℃, 加热 1 min 进行酶灭活处理。加入等体积的氯仿, 通过常规短片段 DNA 回收方法回收反应物。

1.2.4 西兰花端粒酶反应物的检测

方法一: 制备接头与回收的酶促产物进行连接反应; PCR 扩增结果通过 GENE Genius Bio-imaging System 凝胶电泳成像进行分析。

方法二: 回收酶促反应产物, 通过 NANODROP2000 spectrophotometer 分别测定 3 个处理的 ssDNA 量, 比较正常酶促反应和酶灭活后酶促反应 ssDNA 的差值。

2 实验结果

2.1 不同分子量 PEG 吸附蛋白后最佳沉降速度

在西兰花花蕾初提取液制备中, 加入 6 种不同分子量的 PEG。一定转速进行离心, 使 PEG 包裹的蛋白沉降下来。其最佳离心速度的标准是沉淀斜面平实, 贴壁适中, 液面没有明显的悬浮杂质(见表 1)。

表 1 不同分子量 PEG 提取端粒酶的最佳离心速率 (r/min)

PEG	1000	2000	4000	6000	8000	10000
离心力/10 ³	8.5	10.2	12.1	12.9	13.5	13.7

2.2 不同分子量 PEG 提取西兰花花蕾总蛋白含量

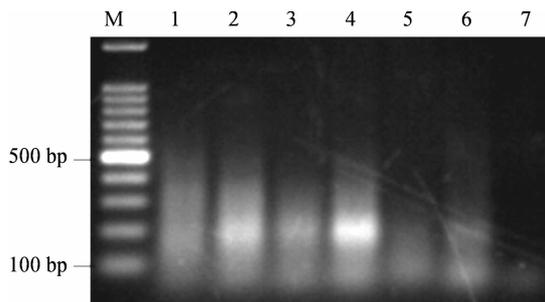
从 6 种不同分子量 PEG 提取到的西兰花花蕾蛋白液中各取 2 μL 加入 NANODROP 2000 spectrophotometer 的加样孔中, 测定每种粗提取液中蛋白含量。每个样品测定 3 次, 并取平均值(见表 2)。

表 2 西兰花不同分子量 PEG 提取物蛋白含量

PEG	西兰花花蕾总蛋白含量/(mg/mL)			
	I	II	III	平均值
1000	44.0	49.1	46.2	46.4
2000	23.3	24.5	24.8	23.9
4000	18.7	18.3	18.9	18.6
6000	19.5	19.6	19.7	19.6
8000	8.9	7.9	8.6	8.4
10000	23.6	25.8	24.2	24.5

2.3 不同分子量 PEG 分离的西兰花端粒酶活性

用 PEG 1000、PEG 2000、PEG 4000、PEG 6000、PEG 8000、PEG 10000 分别提取西兰花花蕾中端粒酶蛋白, 进行酶促反应并回收产物, 制备接头连接, 通过 PCR 扩增及凝胶电泳分析。结果成弥散状条带, 观察到 4 号样品的条带比其他样品中的条带亮且多, 可知在本实验中, 用 PEG 6000 提取的端粒酶活性最高(见图 1)。



M: 100 bp DNA Ladder Marker,

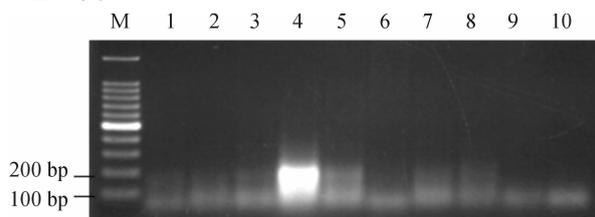
1. PEG 1000, 2. PEG 2000, 3. PEG 4000,

4. PEG 6000, 5. PEG 8000, 6. PEG 10000, 7. 阴性对照

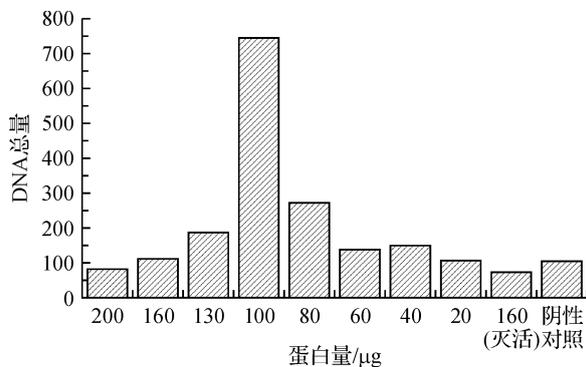
图1 不同分子量PEG提取西兰花端粒酶活性比较

2.4 不同酶量对酶促反应的影响

基于PEG 6000提取的端粒酶活性最好,选取该PEG分子量下提取的端粒酶,按不同的蛋白含量(200、160、130、100、80、60、40、20、160 μg 灭活、阴性对照)进行酶促反应,结果显示:4号泳道中的条带最亮(见图2(a)),并且DNA片段碱基总量达到了700 bp以上,与其它酶量下酶促反应得到的DNA量相比达到最高(见图2(b))。因此,在端粒酶含量为100 μg 时进行酶促反应,检测到酶的反应活性最高。

M: 100 bp DNA Ladder Marker, 1: 200 μg , 2: 160 μg ,3: 130 μg , 4: 100 μg , 5: 80 μg , 6: 60 μg , 7: 40 μg ,8: 20 μg , 9: 160 μg (灭活), 10: 阴性对照

(a) 不同酶量反应后PCR扩增结果



(b) 不同酶量反应后DNA总量的测定

图2 不同酶量反应下西兰花端粒酶的活性比较

2.5 不同PEG 6000与洗脱液的比值对端粒酶的洗脱作用

当洗脱液的量不同即PEG的浓度不同时,洗脱

下来的端粒酶蛋白浓度不同,导致提取的端粒酶活性存在较大差异。根据正常酶促反应ssDNA量与酶灭活后酶促反应ssDNA量的差值,可判断提取出的端粒酶活性的有无和高低。经过测定发现:在0.2 g PEG 6000中加入700 μL 洗脱液时,西兰花花蕾提取液中的端粒酶蛋白活性较高(见表3)。

表3 不同PEG 6000/洗脱液的比对提取的端粒酶酶活性的影响

0.2 g/ 洗脱液量 (μL)	正常酶促 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	酶灭活 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	酶作用 ^a ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	正常+ RNaseA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	总RNA ^b ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	端粒酶 合成 DNA量 ^c
300	161.60	98.50	63.10	114.33	47.27	1.33
500	182.80	136.43	46.37	143.57	39.23	1.18
700	178.27	139.20	39.07	169.68	8.59	4.55
900	185.27	114.17	71.10	146.77	38.50	1.85
1100	175.67	116.27	59.40	138.57	37.10	1.60
1300	185.90	123.97	61.93	146.23	39.67	1.56
1500	177.07	119.43	57.64	151.37	25.70	2.24

a: 酶作用=正常酶促-灭活酶促;

b: 系统中总RNA含量;

c: 合成的ssDNA量越高,端粒酶RNA所占比例越高

3 讨论

动物端粒酶提取液中曾用到PEG 2000。聚乙二醇是一种非降解性并且具有亲水性的聚合物,它可以吸附蛋白质作为其外壳沉积下来,具有很强的稳定性^[12]。它还是一种高分子渗压剂^[13],对蛋白质等进行修饰,降低免疫原性,延长循环半周期,从而保持蛋白质药物的活性^[14]。据报道,当H(OCH₂CH₂)_nOH这个重复单位数目不同时,PEG的分子量也不同,其粘度、水溶性、对热稳定性都不同,能够吸附不同分子量的蛋白质。与高分子量的PEG相比,低分子量的PEG对蛋白质的吸附性和细胞结合性较强^[10]。实验表明:用PEG 8000、PEG 10000提取的端粒酶蛋白反而没有PEG 1000~PEG 6000几个样品提取出的量多,端粒酶的活性也较低。除了总蛋白量减少外,可能提取的蛋白分子量也不同。

当用不同分子量PEG吸附粗提取液中蛋白后,对其沉降的最佳离心速率的选择非常重要。由于分子量不同,PEG吸附蛋白质的结构和数目亦不同。若离心转速较低,PEG吸附的蛋白就不能全部沉淀下来,造成样品的损失;若离心转速过高,吸附的蛋白沉淀下来,斜面会压在管中较难再次悬浮,这可能导致洗脱时不够完全。这两种情况都会影响到西兰花高活性端粒酶的提取,可能还会影响到对端粒酶

RNA 序列的提取及研究等。因此, 根据不同分子量的 PEG 进行了离心速率的优化, 使沉淀轻微的贴壁, 溶液中没有杂质时转速为最佳离心速度。

本研究对于端粒酶活性的检测采用了两种方法。其一是先从西兰花花蕾中提取端粒酶蛋白溶液并测定含量, 进行酶促反应后回收产物。可以通过制备接头与回收产物进行连接反应; PCR 扩增, 进行凝胶电泳, 用 GENE Genius Bio-imaging System 凝胶电泳成像进行分析; 其二在进行酶促反应时对端粒酶进行高温灭活处理作为对照, 正常酶促作为处理。通过 NANODROP 2000 spectrophotometer 测定 ssDNA 含量并比较。第一种方法可以从电泳图上看出现果, 非常直观、方便。但是实验过程中要进行接头制备、连接反应等, 步骤较繁琐, 检测时间较长, 准确率下降。第二种方法通过微量 DNA 测定仪检测得出的数据进行分析, 准确率较高, 节省了部分实验时间。

检测端粒酶活性的方法还有很多, 大都在 TRAP 法的基础上与 ELISA、荧光定量技术等结合。这些方法目前在动物、人体等临床医学中研究的比较多。本研究也是在 TRAP 法的基础上进行了改良和优化, 更适合于对植物端粒酶活性较低的组织进行检测。同时, 也为进一步研究植物端粒酶的特征、其 RNA 模板的结构等打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] Richards E J, Ausubel F M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Cell*, 1988, 53(1): 127-136.
- [2] Moyzis R K, Buckingham J M, Cram L S, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(18): 6622-6626.
- [3] Rhyu M S. Telomeres, telomerase, and immortality [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12): 884-894.
- [4] Davis A J, Siu L L. Telomerase: therapeutic potential in cancer [J]. *Cancer Invest*, 2000, 18(3): 269-277.
- [5] Blackburn E H, Greider C W, Szostak J W. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging [J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1133-1138.
- [6] Fitzgerald M S, Riha K, Gao F, et al. Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14813-14818.
- [7] Denchi E L, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1 [J]. *Nature*, 2007, 448(7157): 1068-1071.
- [8] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [9] Hou M, Xu D, Bjorkholm M, et al. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity [J]. *Clin Chem*, 2001, 47(3): 519-524.
- [10] 祝怀平, 凌 斌. 检测端粒酶活性的 PCR—ELISA 方法的建立 [J]. *安徽医科大学学报*, 1999, 34(5): 334-336.
- [11] 陈 波, 梁江丽, 田晓平, 等. 水稻愈伤组织端粒酶催化特征检测 [J]. *浙江理工大学学报*, 2009, 26(4): 597-601.
- [12] Harris C A, Resau J H, Hudson E A, et al. Reduction of protein adsorption and macrophage and astrocyte adhesion on ventricular catheters by polyethylene glycol and N-acetyl-L-cysteine [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 98(3): 425-433.
- [13] 张 燕, 方 力, 李天飞, 等. 聚乙二醇对烟草种子活力及幼苗保护酶活性的影响 [J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(1): 36-40.
- [14] 吴 稷. 蛋白质的 PEG 化 [J]. *生物工程进展*, 1995, 15(4): 48-51.

Isolation and Activity Evaluation of Broccoli Telomerase

LIU Hong-yan, MA Guo-xing, YANG Li-yuan, ZHENG Jie, LIU Xiao-chuan

(Bioengineering Institute, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Telomerase have its own RNA subunit as template for telomere extension, resulting in stabilizing the length of telomere at chromosomal end. Therefore, plant cells have the capacity to divide. This study uses the buds of the broccoli as materials, and adopts PEG of different molecular weight and different concentration to extract telomerase respectively. It realizes the purpose of separating and enriching telomerase from the tissue of telomerase activity according to the principle that PEG absorbs protein. The results show that the activity of the telomerase extracted by PEG 6000 is the highest when its content is 100 μg for enzymatic reaction. Based on this, it detects the telomerase activity is the highest in the improved TRAP method when the eluent quantity amount is 0.2 g PEG6000/700 μL . These isolation and determination techniques could provide a new approach to determination and assessment of telomerase activity in other plant tissue. In particular, it has very important significance to determine the low activity of plant telomerase and provides basis for deeply researching sequences and structure of telomerase RNA.

Key words: broccoli; telomerase isolation; telomerase determination; PEG

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 520 页)

Study on Mother's Behavior of Children's Garments

CHEN Wei-wei, ZHU Xiu-li, KONG Yuan, ZHANG Wei

(School of Fashion, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: With the improvement of living standards, the demand of children's products is continually increasing. Especially, the market of children's garments implies a tremendous business opportunity. This paper, based on the survey of the school-age children's mothers living in Beijing, Shenyang, Chengdu, Xi'an, Nanjing, Zhengzhou, Guangzhou and Changsha, studies the motivation of the mother's purchase of the children's clothes, the consumption decision-making, consumption patterns and related factors, in order to provide the basis for children's clothing enterprise to make market segmentation and marketing decisions.

Key words: school-age children's mother; children's clothing; consumer decision-making; purchase behavior

(责任编辑: 张祖尧)