



图1 猪皮寡肽对 bFGF 影响 (×200)

A. 猪皮寡肽大剂量组 bFGF; B. 猪皮寡肽中剂量组 bFGF; C. 猪皮寡肽小剂量组 bFGF; D. 阳性对照 bFGF; E. 阴性对照 bFGF

参考文献

- 1 谢举临,卞徽宁,李厚东,等.碱性成纤维细胞生长因子与瘢痕成纤维细胞 I、III 型胶原蛋白的代谢[J].中国组织工程研究,2010,14(41):7657-7660
- 2 张焰,曾敬英,陈露,等.重建胶原纤维对细胞生长的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(41):8095
- 3 陈敏,黄德铨,杜勇军,等.熊珍膏干预大鼠皮肤创面新生肉芽组织成纤维细胞及新生毛细血管影响的实验研究[J].时珍国医国药,2012,23(6):1461-1463
- 4 陈静涛,徐政,顾其胜.胶原蛋白研发的最新进展[J].上海生物医学工程,2004,25(2):52-55
- 5 李成奇.创伤后应激障碍的认知行为治疗研究进展[J].医学与哲学,2011,32(1):35-36
- 6 沈道修,顾月芳,任晓英.一种研究中西药抗炎作用的塑料环肉芽肿定量法[J].中西医结合杂志,1983,1:31

- 7 Nissen NN. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds[J]. Surgery,119(4):457-465
- 8 付小兵,杨银辉,孙同柱,等.转化生长因子 $\beta 1$ 与白细胞介素 mR-NA 在糖尿病溃疡创面组织中的表达[J].中国修复重建外科杂志,1999,13(5):2591
- 9 Murata M, Hara K, Saku T. Dynamic distribution of basic fibroblast growth fact - or during epulis formation: an immuno - histochemical study in an enhanced healing process of the gingiva [J]. J Oral Pathol Med,1997,26(5):224-232
- 10 Han Y S, Lan L, Chu J, et al. Epigallocatechin gallate attenuated the activation of rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II via regulating β - arrestin[J]. Cell Physiol Biochem,2013,31(2):338-346

(收稿日期:2013-11-05)

(修回日期:2013-11-26)

ID-LC-MS/MS 方法对高糖血症 SD 大鼠肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 的检测

罗顺斌 夏梦明 邱相君 孙 未 王 哲 胡国新 蔡剑平

摘 要 **目的** 用同位素稀释高效液相-串联质谱法(Isotope-Diluted LC-MS/MS, ID-LC-MS/MS)和免疫组化法检测高糖血症 SD 大鼠肾组织 DNA 氧化产物 8-羧基脱氧鸟苷(8-oxo-dGsn)的含量,评价高糖血症对大鼠肾组织 DNA 氧化损伤的影响。**方法** 健康雄性 SD (Sprague-Dawley rats)大鼠 28 只,随机分为 4 组:3 月糖尿病模型组(3DR 组)及其对照组(3CR 组),6 月糖尿病模型组(6DR 组)及其对照组(6CR 组)。糖尿病模型组接受腹腔单次链脲佐菌素(streptozototin, STZ)每公斤 70mg 注射,对照组接受腹腔生理盐水注射。糖尿病模型组造模成功 3 个月及 6 个月,分别抽提大鼠肾组织 DNA,用 ID-LC-MS/MS 方法检测其 DNA 氧化产物 8-oxo-dGsn 的含量;用免疫组化法观察肾组织中 DNA 氧化损伤部位及程度。**结果** 糖尿病模型组造模成功 3 个月时肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 高于对照组高,造模成功 6 个月时肾组织 DNA 中 8-oxodGsn 含量比正常对照组增加显著($P < 0.01$);免疫组化结果显示 3 个月模型组 DNA 氧化损伤水平高于对照组,6 个月时模型组 DNA 氧化损伤更为严重。**结论** 高糖血症 3 个月可造成大鼠肾组织 DNA 的氧化损伤,高糖血症 6 个月时大鼠肾组织中 DNA 氧化损伤程度呈显著增加,高糖血症是肾组织中 DNA 氧化损伤的重要原因。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171028,81341023)

作者单位:325035 温州医科大学药学院(罗顺斌、夏梦明、胡国新、蔡剑平),药理教研室(罗顺斌、夏梦明、胡国新);471003 河南省河南科技大学医学院(邱相君);325027 温州医科大学附属第二医院(孙未、王哲)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

关键词 同位素稀释高效液相-串联质谱法(ID-LC-MS/MS) 高糖血症 DNA 氧化损伤 8-oxo-dGsn

[中图分类号] R318 [文献标识码] A

Determination of the Oxidative Damage Production of DNA (8-oxo-dGsn) in SD Rats Kidney of Hyperglycemia by ID-LC-MS/MS.

Luo Shunbin, Xia Mengming, Qiu Xiangjun, et al. Department of Pharmacology, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To evaluate the oxidative damage production of DNA (8-oxo-dGsn) in SD rats kidney induced by i. p. injection of STZ through ID-LC-MS/MS and Immunohistochemistry method. **Methods** Rats aged 2 months were randomly assigned to three months (start from injection) of control group, three months of diabetic group, six months of control group, six months of diabetic group (3CR, 3DR, 6CR, 6DR, respectively) receiving an intraperitoneal (i. p.) saline injection ($n=8$) or a single i. p. injection of STZ (70mg/kg body weight; $n=20$). The content and degree of the 8-oxo-dGsn are determined by ID-LC-MS/MS and Immunohistochemistry, respectively. **Results** The levels of 8-oxo-dGsn in the diabetes group were generally higher than those in the control group, and there was a significant difference between 6DR and 6CR ($P<0.01$). The results of the immunohistochemistry of 8-oxo-dGsn showed that a relative apparent oxidative damage of DNA had been observed in 3DR, while it was more serious in 6DR than the others (3CR, 3DR, 6CR). **Conclusion** The oxidative damage to DNA in the kidney occurred in hyperglycemia state for 3 month, while it became more serious for 6 month. So hyperglycemia may be a major factor which cause oxidative damage to DNA in kidney.

Key words ID-LC-MS/MS; Hyperglycemia; Oxidative Damage; 8-oxo-dGsn

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是以慢性高血糖为主要特征,以糖类、脂肪、蛋白质和水电解质的代谢紊乱为主要表现的临床综合征。糖尿病并发症是糖尿病致死或致残的主要原因,糖尿病的慢性并发症常累及多系统脏器,最终导致肾衰竭、心肌梗死、卒中、失明等严重并发症^[1]。

虽然糖尿病并发症的确切发病机制尚不完全清楚,但是目前的研究表明糖尿病并发症可能主要归因于糖尿病慢性持续性高糖血症而产生的氧化应激增加^[1-3]。氧化应激过程中产生的活性氧、自由基可引起核酸、蛋白质及脂质的氧化损伤。

2011~2012 年丹麦学者 Broedbaek 等^[4,5]通过对 1381 名 2 型糖尿病患者近 20 年的随访,发现尿中的核酸氧化标志物 8-羟基鸟嘌呤(8-oxoG)是 2 型糖尿病死亡的独立预测指标,在国际上首次提出了核酸氧化与糖尿病的并发症的发生及预后相关的观点。虽然该研究尚未能解释尿中的 8-oxoG 的来源以及可能的发生机制,但反映了糖尿病及其严重并发症可能与全身机体的核酸氧化增加相关。

为了研究高糖血症对促进氧化应激的作用,特别是对糖尿病并发症常累及的重要脏器肾脏核酸氧化的影响,本研究用腹腔注射链脲佐菌素法建立了可产生持续性高糖血症的 SD 大鼠糖尿病模型,用同位素稀释高效液相-串联质谱法(ID-LC-MS/MS)和免疫组化法观测了大鼠肾组织 DNA 氧化产物 8-羟基脱氧鸟苷(8-oxo-dGsn)水平的改变,评价了高糖血症对大鼠肾脏组织 DNA 氧化的影响。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:健康 SPF 级雄性 SD 大鼠购买于中国科学院上海实验动物中心。(2)试剂:8-羟基脱氧鸟苷(8-oxo-dGsn,纯度 > 98%)、脱氧鸟苷(dGsn,纯度 > 98%),甲磺酸去铁铵(DFOM)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;内标 [$^{15}\text{N}_5$]8-oxo-dGsn、[$^{15}\text{N}_5$]dGsn 均购自 Cambridge Isotope Laboratories 公司;色谱级甲醇、醋酸铵分别购自美国 Fisher Scientific 公司;核酸酶 P1(日本 Wako 公司);碱性磷酸酶(美国 NEB 公司);冰醋酸(分析纯,北京化学试剂有限公司)。免疫组化染色试剂盒(中杉金桥,货号:SP-9002);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,货号:23225);Anti-8 Hydroxyguanosine antibody [N 45.1] 购于 Abcam Co. UK。且实验用水均为高压灭菌双蒸水。(3)实验仪器:岛津 UFLCxr 高效液相系统联用 API 5000 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统中国公司);U-3900H 型全波长分光光度计(日本 HITACHI);核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司);Milli-Q Plus 超纯水装置(美国 Millipore 公司);520A 型 pH 计(美国 Orion 公司);120S 型精密电子分析天平(德国赛多利斯公司);KUBOTA 5922 型离心机(日本);KUBOTA 3740 型离心机(日本);Thermomixer compact 金属浴(德国 Eppendorf 公司)。

2. 实验方法:(1)动物分组、造模及样本收集:健康 SD 大鼠饲养 SPF 级动物房中。动物可自由饮水及进食。体重 249~281g 的 2 个月龄大鼠随机分配到 3 个月对照组(从注射开始算起),3 个月糖尿病模型组,6 个月对照组,6 个月糖尿病模型组(分别为 3CR、3DR、6CR、6DR)接受腹腔生理盐水($n=8$)或单次 STZ(70mg/kg, $n=20$)注射^[6]。注射前,称重以计算注射 STZ 和生理盐水的剂量。大鼠空腹血糖超过 16.7mmol/L 被认为造模成功,STZ 注射的大鼠若没有达到这标准则被排除,需要再次注射 STZ。处死前 24h,禁食不禁水。因此,所有

的血糖均为空腹血糖。大鼠按 0.3ml/0.1kg 的剂量注射水合氯醛。大鼠肾立即在冰上被摘除并快速用液氮冷冻并冻存。

(2)8-oxo-dGsn 的检测:用笔者实验室在“DNA 氧化损伤欧洲标准委员会”(ESCODD)推荐的 DNA 抗氧化提取方法^[7]基础上建立的新方法,提取并消化 DNA。为了降低 DNA 和 RNA 氧化背景水平,笔者增加了金属螯合剂 DFOM^[8~10]。岛津联用 AB API 5000 三重四级杆(Applied Biosystems-SCIEX, USA)进行检测。液相色谱条件:色谱用 Waters Atlantis dC18 (2.1×150mm, 5μm)柱,在 A 液 10mmol/L 醋酸铵(pH 值 3.75)和 B 液甲醇组成的流动相进行洗脱,梯度洗脱如下 0~8.5min, B 相由 5% 过渡到 38%;8.5~9.5min, B 相从 38%→40%;9.5~10.0min, B 相从 40%→5%;10min~14min, B 相一直以 5% 在冲洗系统。流速始终为 0.2ml/min;柱温:30℃,进样量 10μl,整个分析时间为 14min。样品箱温度设定为 4℃。质谱条件:电喷雾(ESI)离子源正离子模式,多反应检测扫描(MRM);辅助气压力 1(GS I):60.0kPa;辅助气压力 2(GS II):60.0kPa;气帘气压(CUR):25.0kPa;碰撞气(CAD):Medi-

um;电喷雾电压(IS):5500V;离子源温度(TEM):500℃;8-oxo-dGsn、dGsn 及其同位素内标检测离子对见表 1。为了降低离子源的污染,废弃早期和晚期的洗脱液。(3)8-oxo-dGsn 免疫组化:按照笔者实验室之前的方案做了修改来检测 8-oxo-dGsn^[11~13]。切片用 4% 的多聚甲醛固定 5min,用 0.01mol/L PBS(pH 值 7.4)洗 3 次,5 分钟/次;内源性过氧化氢酶用 3% 的过氧化氢室温孵育 15min 清除,用 0.01mol/L PBS(pH 值 7.4)洗 3 次,5 分钟/次;封闭液室温封闭 15min;然后一抗(N 45.1, 1:500 dilution)4℃ 过夜孵育;第 2 天,切片清洗,再用过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育 15min;接着用 DAB 显色;紧接着清洗,然后梯度乙醇脱水,再二甲苯脱水,明胶封片。对照 1 不加抗体进行全程操作;对照 2 用无 RNA 的 DNA 酶 I (1U/μl) 37℃ 孵育 60 min 消化 DNA 作为阴性对照。

3. 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一时间组的对照组和模型组比较,采用 SPSS 17.0 软件的独立样本 *t* 检验进行分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 正离子模式下各物质检测离子对

化合物	检测离子对	内标	驻留时间 (ms)	去簇电压 DP(V)	碰撞室入口电压 EP(V)	碰撞能 CE(V)	碰撞室出口电压 CXP(V)
[¹⁵ N ₅]8-oxo-dGsn	289.3/173.1	√	100	52	8	20	11
8-oxo-dGsn	284.2/168.1		100	52	8	21	11
[¹⁵ N ₅]dGsn	273.2/157.1	√	100	52	8	20	11
dGsn	268.4/152.1		100	30	8	27	6

结 果

1. 实验分组及相关数据(表 2):大鼠空腹血糖超过 16.7mmol/L 被认定为高糖血症大鼠,否则排除。

糖尿病组血糖明显高于对照组。糖尿病的主要特征多饮、多尿、多食,糖尿病大鼠中体重降低,差异有统计学意义。

表 2 实验分组及相关数据($\bar{x} \pm s$)

组别	对照 3 个月组(3CR)	糖尿病模型 3 个月组(3DR)	对照 6 个月组(6CR)	糖尿病模型 6 个月组(6DR)
数量	4	10	4	10
饲料	常规饲料	常规饲料	常规饲料	常规饲料
链脉佐菌素注射	否	是	否	是
空腹血糖 (mmol/L)	5.89±0.42	25.06±1.82 [*]	5.73±0.50	25.58±2.33 ^{**}
处死前重量(g)	599.25±26.00	222.13±16.70 [#]	752.5±53.15	247.80±11.73 ^{##}

与 3DR 相比,^{*}*P*<0.01;与 6DR 相比,^{**}*P*<0.01;与 3CR 相比,[#]*P*<0.01;与 6CR 相比,^{##}*P*<0.01

2. 肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 水平的比较:根据 ESCODD 推荐的方法进行了改良用于抽提 DR 和 CR 肾组织样本的 DNA。金属螯合剂 DFOM 被用于降低背景水平的氧化^[14]。DNA 加热变性后再进一步用核酸酶 P1 和碱性磷酸酶水解成核苷。随后加入内标[¹⁵N₅]8-oxo-dGsn,[¹⁵N₅]dGsn。脱氧鸟苷的两种类型由 ID-LC-MS/MS 方法检测,用于 DNA 水解后样品中 8-oxo-dGsn 的定量。结果以 10⁶ 个

dGsn 中 8-oxo-dGsn 的个数表示。如图 1 所示,笔者发现 8-oxo-dGsn 和 dGsn 能在不同位置被洗脱出来,并没有相互干扰。在模型组肾脏中可以发现 DNA 氧化损伤产物 8-oxo-dGsn 水平随着高糖血症持续而增加(图 2),3 个月模型与对照间不存在统计学差异,但 6 个月模型的 8-oxo-dGsn 水平与其对照相比差异有显著性。

3. 肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 检测的免疫组

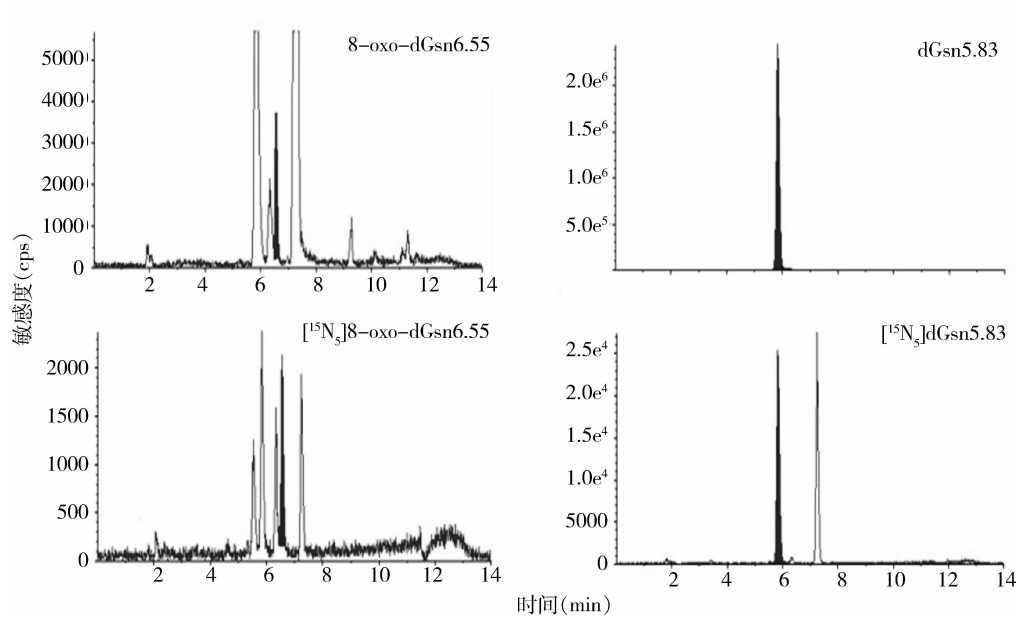


图 1 DNA 中 8-oxo-dGsn 和 dGsn 及其内标 LC-MS/MS 检测图

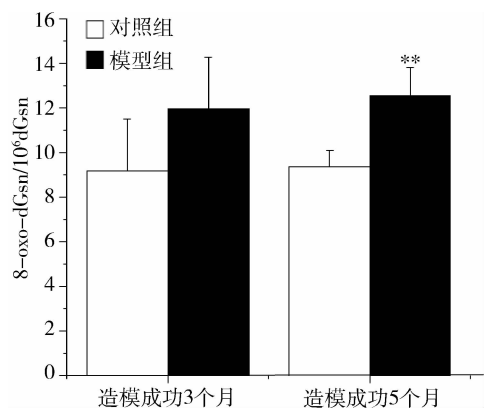


图 2 高糖血症大鼠肾组织 DNA 中 8-oxo-dGsn 的含量以 10⁶ 个 dGsn 中 8-oxo-dGsn 的个数表示, ** *P* < 0.01

化结果:STZ 诱导的高糖血症 SD 大鼠(3DR、6DR)及其对照鼠(3CR、6CR)肾组织 DNA 中的 8-oxo-dGsn 免疫组化的检测结果如图 3 所示。8-oxo-dGsn 是在氧化应激过程中 DNA 受到羟自由基等攻击而发生碱基修饰形成的产物。8-oxo-dGsn 免疫组化结果可看出,模型组肾小管细胞核相对于对照组出现较多的细胞核染色,在 3 个月高糖血症时可以观察到肾小管细胞核 DNA 的氧化损伤,而在 6 个月高糖血症时,可以观察到很明显的肾小管细胞核 DNA 氧化损伤。

讨 论

世界卫生组织将糖尿病分为 4 种类型:1 型糖尿病、2 型糖尿病、特发性糖尿病和妊娠糖尿病。虽然

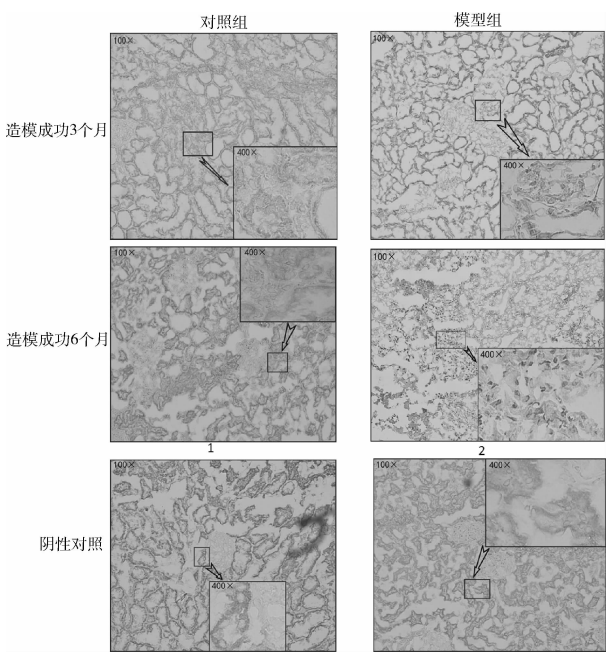


图 3 高糖血症大鼠肾 8-oxo-dGsn 免疫组化 (×100)

每种类型的糖尿病的病因和它们的人群分布不同,但是它们的症状相似甚至相同,均以临床慢性高血糖为主要特征。
糖尿病并发症是糖尿病致死或致残的主要原因。2010 年美国糖尿病协会(ADA)统计,3 年以上的糖尿病患者出现糖尿病并发症的概率是 46%,5 年以上的糖尿病患者出现并发症的概率是 61%,10 年以上的糖尿病患者,出现并发症的概率高达 98%。糖尿病并发症可分为急性并发症和慢性并发症两大类,在

胰岛素及抗生素应用之前糖尿病的急性并发症是糖尿病致死或致残的主要原因。胰岛素的应用大幅度延长了糖尿病患者的寿命,目前糖尿病的慢性并发症,已成为糖尿病致死或致残的主要原因。研究糖尿病并发症的产生机制和抑制机制将是减少糖尿病的致死率及致残率,提高糖尿病患者的生活质量的重要保证。

Broedbaek 等^[4,5]发现尿中的核酸氧化标志物 8-羟基鸟嘌呤(8-oxoG)是 2 型糖尿病死亡的独立预测指标,在国际上首次提出核酸氧化与糖尿病的并发症的发生及预后相关的观点,为糖尿病并发症的产生机制和抑制机制研究提供了新的思路。

针对核酸氧化标志物 8-羟基鸟苷的检测目前已开发出了免疫组化法,高效液相电化学检测法(HPLC-ECD),高效液相气相检测法(GC-MS)和高效液相串联质谱检测法(LC-MS/MS)等多种检测方法^[15-18]。由于免疫组化常存在较大的背景干扰及非特异性的抗原抗体反应,HPLC-ECD 对 ECD 的需求较高,而 GC-MS 在雾化过程中会有较为严重的自发氧化,而 LC-MS/MS 因其检测的灵敏度高,带入的氧化相对较少,受到了广泛的关注。笔者参照欧洲 DNA 氧化损伤标准化委员会(ESCODD)推荐的 DNA 抗氧化抽提及 LC-MS/MS 方法,建立了高敏感的 LC-MS/MS 检测体系(没检测反应 8-oxo-dGsn 最低检测限可达 1pg),笔者用此方法检测了 STZ 诱导的高糖血症大鼠肾组织 DNA 中氧化标志物 8-羟基鸟苷的含量,并用 8-oxo-dGsn 的免疫组化法评价了高糖血症对 SD 大鼠肾组织中 DNA 氧化损伤部位及程度的影响。笔者的研究结果显示 3 个月模型组大鼠肾组织中 8-oxo-dGsn 含量比 3 个月对照组增加 30%,表明高糖血症增加 3 个月时大鼠体内即可出现明显氧化与抗氧化失衡现象。高糖血症增加 6 个月大鼠肾组织中 8-oxo-dGsn 含量比 6 个月对照组增加 34% ($P < 0.01$),高糖血症 6 个月较 3 个月时 8-oxo-dGsn 含量的增加更加明显,机体细胞处于更高的 DNA 氧化与抗氧化失衡状态,表明高糖血症造成的肾组织 DNA 氧化损伤随时间延长有累积的趋势。免疫组化法的检查结果显示,高糖血症模型组肾小管细胞核相对于对照组出现较多的细胞核染色,在 6DR 中最为明显。

本研究结果显示,高糖血症 3 个月即可造成大鼠肾组织 DNA 的氧化损伤,高糖血症 6 个月时大鼠肾组织中 DNA 氧化损伤程度呈显著增加,表明高糖血

症是肾组织中 DNA 氧化损伤的重要原因。笔者的研究结果与 Broedbaek 等认为核酸氧化与糖尿病的并发症的发生及预后相关的观点是一致的,对糖尿病患者若能及时的检测机体氧化应激水平,并在早期做出干预,对预防糖尿病并发症的发生是重要的。

参考文献

- Haligur M, Topsakal S, Ozmen O. Early degenerative effects of diabetes mellitus on pancreas, liver, and kidney in rats: an immunohistochemical study[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012;120645-120654
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. *Circ Res*, 2010, 107(9):1058-1070
- Zheng Y, Li XK, Wang Y, Cai L. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators[J]. *Hemoglobin*, 2008, 32(1-2):135-145
- Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, *et al.* Urinary markers of nucleic acid oxidation and long-term mortality of newly diagnosed type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(12):2594-2596
- Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, *et al.* Association between urinary markers of nucleic acid oxidation and mortality in type 2 diabetes: a population-based cohort study[J]. *Diabetes Care*, 2012, 36(3):669-676
- Jiang H, Fang J, Wu B, *et al.* Overexpression of serine racemase in retina and overproduction of D-serine in eyes of streptozotocin-induced diabetic retinopathy[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8(2011):119-126
- Gedik CM, Collins A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study[J]. *FASEB J*, 2005, 19(1):82-84
- Gan W, Nie B, Shi F, *et al.* Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9):1700-1707
- Shi F, Nie B, Gan W, *et al.* Oxidative damage of DNA, RNA and their metabolites in leukocytes, plasma and urine of Macaca mulatta: 8-oxoguanosine in urine is a useful marker for aging[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46(9):1093-1098
- Nie B, Gan W, Shi F, *et al.* Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013;303181-303189
- Zheng JD, Hei AL, Zuo PP, *et al.* Age-related alterations in the expression of MTH2 in the hippocampus of the SAMP8 mouse with learning and memory deterioration[J]. *J Neurol Sci*, 2009, 287(1-2):188-196
- Song XN, Zhang LQ, Liu DG, *et al.* Oxidative damage to RNA and expression patterns of MTH1 in the hippocampi of senescence-accelerated SAMP8 mice and Alzheimer's disease patients[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8):1558-1565
- Shi F, Gan W, Nie B, *et al.* Greater nucleic acids oxidation in the temporal lobe than the frontal lobe in SAMP8[J]. *Neuroreport*, 2012,

- 23(8):508-512
- 14 Chao MR, Yen CC, Hu CW. Prevention of artifactual oxidation in determination of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(3):464-473
- 15 Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, *et al.* DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(1):288-293
- 16 Kasai H. A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography-electrochemical detector system[J]. *J Radiat Res*, 2003, 44(2):185-189
- 17 Lin HS, Jenner AM, Ong CN, *et al.* A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction[J]. *Biochem J*, 2004, 380(Pt 2):541-548
- 18 Henriksen T, Hillestrøm PR, Poulsen HE, *et al.* Automated method for the direct analysis of 8-oxo-guanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in human urine using ultraperformance liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(5):629-635 (收稿日期:2013-10-30)
(修回日期:2013-11-26)

应用酵母双杂交筛选与 FAM172A 相互作用蛋白的研究

张 蓉 李梅芳 李连喜 俞立波 赵催春 屠印芳 陆俊茜 包玉倩 贾伟平

摘 要 目的 应用酵母双杂交技术(蛋白与蛋白的相互作用),筛选人胎脑 cDNA 文库中与 FAM172A 蛋白相互作用的蛋白,为深入研究新发现的蛋白质 FAM172A 生物学功能及在疾病中的作用奠定基础。**方法** 构建 pGB-FAM172A 诱饵质粒,转化酵母菌株 Y190。人胎脑 cDNA 转化诱饵酵母菌,于营养缺陷型培养基(SD/-Leu/-Trp/-His)上生长,从中筛选到 35 个单克隆进行 β -半乳糖苷酶克隆转移滤纸实验,对蓝色克隆者进行质粒抽提,转入大肠杆菌 DH/OB,进行抗性筛选,从中提取质粒,一对一与诱饵质粒 pGB-FAM172A 共转酵母细胞 Y190,进行验证鉴定,提取质粒 DNA 进行测序并进行 BLAST 比对分析。**结果** 成功构建 pGB-FAM172A 质粒,经严格筛选,共有 10 个阳性克隆,分别进行测序、序列比对,成功筛选出 6 个与 FAM172A 存在相互作用的蛋白:RTCD1、MOCS2、A2M、KCNIP1、BTBD2 和 TOX2。**结论** 利用酵母双杂交系统筛选出 6 个可能与 FAM172A 相互作用的蛋白,为进一步研究 FAM172A 蛋白的生物学功能提供了线索。

关键词 FAM172A 基因 α_2 巨球蛋白 酵母双杂交系统 蛋白相互作用

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Screening Proteins Interacting with FAM172A Protein by the Yeast Two Hybridization. Zhang Rong, Li Meifang, Li Lianxi, *et al.* Soochow University, Medical College, Jiangsu 215123, China

Abstract Objective To screen the proteins in human fetal brain cDNA library interacting with FAM172A protein by yeast two-hybrid system (protein-protein interactions technique), and to lay the foundation for the further study about the biological function of the FAM172A protein and its roles in process of diseases. **Methods** The PGB-FAM172A bait plasmids were constructed and transformed into the yeast strain Y190. The bait yeast strains were incubated in the auxotrophic medium (SD/-Leu/-Trp/-His) after being transformed with Human fetal brain cDNA. Thirty-five monoclonal colonies were selected for the β -galactosidase colony-lift filter assay, from which blue clones were employed for plasmid extraction. The plasmids were then transformed into E. coli DH/OB. After antibiotic screening, both the extracted plasmid and the PGB-FAM172A bait plasmid were co-transformed into yeast cells Y190. At last we identified them, and extracted the DNA of the plasmid for sequencing and Blast comparative analysis. **Results** Ten positive clones selected strictly from the successful-constructed PGB-FAM172A plasmid were sequenced and compared. Six proteins interacted with FAM172A protein were left, including RTCD1, MOCS2, A2M, KCNIP1, BTBD2 and TOX2. **Conclusion** Six proteins involved in the interaction with FAM172A were selected by the yeast two-hybrid system. These findings brought some new clues for the further exploration of the FAM172A protein.

Key words FAM172A gene; Alpha2-macroglobulin; Yeast two-hybrid system; Protein-protein interaction

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81170759)

作者单位:215123 苏州大学医学部(张蓉);200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病重点实验室、上海市糖尿病临床医学中心、上海市代谢病临床医学中心(张蓉、李梅芳、李连喜、俞立波、赵催春、屠印芳、陆俊茜、包玉倩、贾伟平)

通讯作者:李连喜,电子信箱:lilx@sjtu.edu.cn