

- 5 孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20** (2): 139~142  
Meng A M, Qi S Z, Gong G F. Prog Biochem Biophys, 1993, **20** (2): 139~142
- 6 Meng A. Simplified downward alkaline transfer of DNA. Biotechniques, 1994, **17**: 72~73
- 7 Wetton J H, Carter R E, Pakin D T, *et al.* Demographic study of wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature, 1987, **327**: 147~149
- 8 孟安明, 齐顺章. 用基因组总 DNA 做探针产生动物的 DNA 指纹图. 科学通报, 1993, **38**: 2092~2095  
Meng A M, Qi S Z. Chinese Science Bulletin, 1994, **39** (3): 240~244
- 9 Tautz D, Renz M. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res, 1984, **12** (10): 4127~4137
- 10 Sulaiman I M, Hasmain S E. DNA polymorphism analysis in five endangered species of Meconopsis (Himalayan poppy) using multi-copy sequence based probes. Electrophoresis, 1995, **16** (9): 1746~1749

**DNA Fingerprinting in Chicken with Probes Derived from Randomly Amplified Polymorphic DNAs PCR Products.** YANG Shao-Qing (*Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*); MENG An-Ming (*Department of*

*Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

**Abstract** Four chickens, each from a different strain, were analyzed using randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD) technique with 12 primers. 38 of 99 (38%) detected fragments showed polymorphic. Four individual-specific fragments were recovered and probed with labeled whole genome of chicken. Positive signal was detected in three of the fragments, suggesting that hypervariable fragments generated by RAPD contain repetitive sequences. Highly variable DNA fingerprints were generated when such repetitive sequence containing fragments were used as probe to hybridize to *Hae* III digests of random chickens' DNA. Therefore, RAPD products that are highly variable among individuals can be used as DNA fingerprinting probes.

**Key words** chicken, probe, DNA fingerprints, randomly amplified polymorphic DNAs

## 鞘氨醇-1-磷酸的定量测定 ——一种新的竞争性结合方法

屠振兴 龚燕芳

(第二军医大学长海医院消化实验室, 上海 200433)

J. R. van BROCKLYN S. SPIEGEL

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Georgetown University Medical Center, Washington DC 20007, USA)

**摘要** 鞘氨醇-1-磷酸 (SPP) 是重要的细胞第二信使, 影响细胞的生长和死亡. 通过培养和收集转染 SPP 受体 EDG-1 的 HEK293 细胞, 与标记及非标记 SPP 共孵育, 利用它们与 HEK293 细胞的竞争性结合, 测定细胞、血清和组织中 SPP 含量. 该法无需特殊仪器, 可以测到皮摩尔水平的低含量, 批间差异小于 15% (6 次).

**关键词** 鞘氨醇-1-磷酸, 受体, 测定

**学科分类号** Q2-33

鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate, SPP) 是在鞘氨醇激酶催化下由鞘氨醇磷酸化而生成, 经磷酸吡哆醛溶解酶分解为磷酸乙醇胺和十六烷, 或经鞘氨醇-1-磷酸磷酸酶脱磷酸再生成鞘氨醇<sup>[1,2]</sup>. SPP 具有重要的生理功能, 它激活多个信息传递途径, 如增加细胞内贮存钙和毒蕈碱 K 的释放, 激活磷脂酶 D, 激活 P125 FAK、paxillin 和 Crk 的酪氨酸磷酸化以及转译因子 AP-1 的 DNA

结合活性<sup>[3,4]</sup>. SPP 同样参与各种细胞功能, 包括刺激细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 诱导血小板形态改变和凝集, 抑制细胞的迁移及肿瘤细胞的侵袭<sup>[5]</sup>. 因此要阐明 SPP 在各种生理、病理环境中的作用, 定量分析 SPP 的含量是必要的.

Tel: (021) 25070556, E-mail: xiaohua@smmu.edu.cn

收稿日期: 1999-08-02, 修回日期: 1999-12-21

测定 SPP 含量的方法有快速原子轰击质谱法 (fast atom bombardment-mass spectrometry) 或同位素标记醋酸酐测定法<sup>[6,7]</sup>。最近, SPP 受体已被确定, 它能特异性地结合 SPP<sup>[8]</sup>。在此基础上, 我们建立了一种新的敏感的以竞争性抑制为原理的 SPP 定量测定方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 SPP 抽提

SPP 抽提参考 Y atomi 的方法<sup>[7]</sup>略有改变。收集在培养皿上生长的细胞或组织, 悬于缓冲液 A [20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L 脱氧吡哆醇 (deoxypyridoxine), 15 mmol/L NaF, 1 mg/L 抑蛋白酶肽 (aprotinin)、亮抑蛋白酶肽 (leupeptin)], 细胞计数后离心, 弃上清, 加 500  $\mu$ l 甲醇, 500  $\mu$ l 氯仿, 充分摇匀。超声处理后加 10  $\mu$ l 10 mol/L 氨水剧烈震荡, 加 0.5 ml 1 mol/L NaCl, 混匀后静置分层, 移取上层碱性水相到新的试管, 加 1.5 ml 氯仿, 100  $\mu$ l 浓盐酸。分层后弃上层水相, 将下层有机相用氮气吹干。干燥的样品悬于 500  $\mu$ l 含 0.4% BSA 的缓冲液 A 中备用。

### 1.2 SPP 标记

SPP 标记参照 Olivera 方法<sup>[9]</sup>略有改变。200  $\mu$ l 粗制鞘氨醇激酶溶液, 900  $\mu$ l 缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA, 20% 甘油, 1 mmol/L DTT), 65  $\mu$ l 1 mmol/L 鞘氨醇溶液, 5  $\mu$ l 2.5 mol/L MgCl<sub>2</sub> 和 30  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 混均后置 37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min。加 1.6 ml 氯仿: 甲醇: 浓盐酸混合液 (100: 200: 1), 1 ml 氯仿, 1 ml 2 mol/L KCl, 混匀离心。弃上层水相, 加 1 ml 氯仿, 2 ml 甲醇, 2 ml KCl 和 100  $\mu$ l 氨水混匀离心。转移上层碱性水相到新的试管, 加 3 ml 氯仿, 200  $\mu$ l 浓盐酸, 混均离心弃上层, 用氮气吹干下层有机相, 加含 0.4% BSA 的缓冲液 A, 并经超声处理溶解标记的 SPP。

### 1.3 SPP 含量测定

从培养皿收集表达 SPP 受体 (EDG-1) 的 HEK293 细胞, 经 PBS 和缓冲液洗涤后, 悬于含 0.4% BSA 的缓冲液 A 内, 调节终浓度为  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  /ml。50  $\mu$ l 细胞悬液, 50  $\mu$ l <sup>32</sup>P-SPP (cpm 值为  $10^5$ ), 100  $\mu$ l 待测样本或非标记的标准 SPP 溶液 (0、5、10、20 pmol) 置冰上 30 min。细胞经离心收集、洗涤后, 用液闪仪计数细胞结合的标

记 SPP。以非标记标准溶液的 SPP 含量的对数值为 X 轴, 以结合的标记 SPP cpm 值减少值为 Y 轴, 制作标准曲线, 计算出待测样本的 SPP 含量。

## 2 结果

### 2.1 标记 SPP 和 HEK293 细胞的结合

应用不同数量的细胞和同样量的标记 SPP (cpm 值为  $7.5 \times 10^4$ ) 共孵育, 当细胞数小于  $1.5 \times 10^5$  时, 标记 SPP 的结合量与细胞数近似于线性关系, 当细胞数超过  $2.0 \times 10^5$  时, SPP 的结合量接近饱和 (图 1)。我们选用  $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  细胞进行试验。

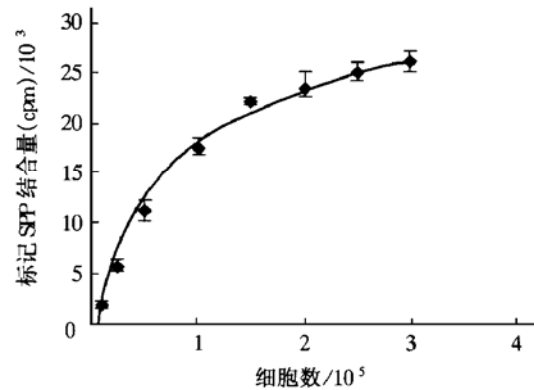


图 1 HEK293 细胞量结合 SPP 的能力

应用等量细胞 ( $1.5 \times 10^5$ ) 和不同量的标记 SPP (cpm 值为  $2.4 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ ) 共孵育, 结合的标记 SPP 的比率基本不变, 为 30% 左右 (图 2)。我们选择添加标记 SPP 的量 cpm 值为  $0.7 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 。

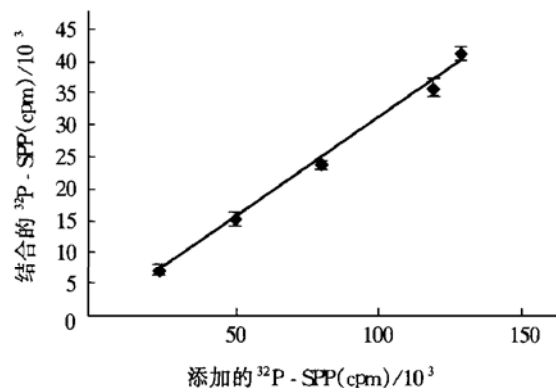


图 2 HEK293 细胞对 SPP 的结合率

### 2.2 SPP 测定标准曲线的制备

在 HEK293 细胞和 <sup>32</sup>P-SPP 混合液中加入不同浓度的非标记 SPP 溶液 (0、2.5、5、10、20、

40、80、100、200、250 pmol) 共同孵育, 结合的<sup>32</sup>P-SPP 量随着非标记 SPP 量的增加而减少. 减少的<sup>32</sup>P-SPP 量在加 2.5~40 pmol 非标记 SPP 时与其对数值成线性关系 (图 3). 我们以添加 2.5~20 pmol 非标记 SPP 制备标准曲线.

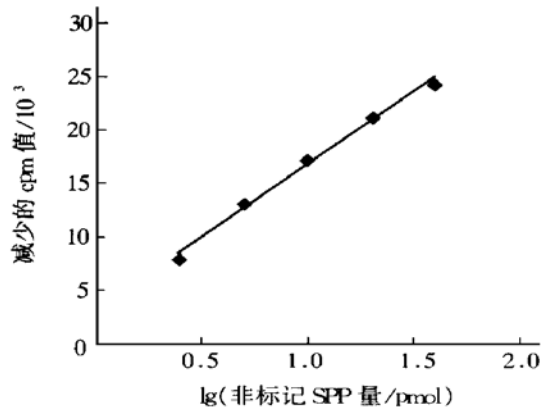


图 3 SPP 测定标准曲线

### 2.3 细胞内 SPP 含量的测定

我们测定了一部分细胞的 SPP 含量, Swiss、PC12、U937、Jurkat、MAD 的 SPP 含量分别为每 10<sup>6</sup> 细胞中 (15.7 ± 0.1)、(39.3 ± 4.9)、(5.8 ± 0.6)、(5.9 ± 0.4)、(1.8 ± 0.1) pmol. 马血清的 SPP 含量为 (584.7 ± 13.3) μmol/L. 批内差异 < 12%, 批间差异 < 15%.

## 3 讨 论

作为鞘脂类代谢物的 SPP, 最近已被认为是重要的细胞第二信使, 影响细胞的生长和死亡. SPP 在细胞内的含量很低, 在生长因子等刺激下可短暂地快速增高<sup>[7,9]</sup>. 但是在各种生理病理状态下细胞内确切的 SPP 含量及其变化尚不清楚. 曾有报道, 应用同位素标记醋酸酐测定 SPP, 但其敏感性不高<sup>[7]</sup>. 应用快速原子轰击质谱法测定 SPP, 需要特殊的仪器<sup>[6]</sup>. 我们曾明确 EDG-1 专一性结合 SPP, 不受其他物质的影响, 是特异性的 SPP 受体<sup>[8]</sup>. 在成功转染 EDG-1 (SPP 受体) 的基础上, 我们建立了用含 SPP 受体的 HEK293 细胞与标记及非标记 SPP 竞争性结合的原理, 测定细胞、血清和组织中 SPP 含量的方法. 本方法无需特殊仪器, 可以测到 pmol 水平的低含量, 敏感性高, 重复性好, 批间差异小于 15% (6 次). 本法的建立为 SPP 的进一步研究提供了一种可靠的手段.

### 参 考 文 献

1 Stoffel W, Heellenbroich B, Heimann G. Properties and specifici-

- ties of sphingosine kinase from blood platelets. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1973, **354** (10~11): 1311~1316
- 2 Blakesley V A, Beitner-Johnson D, van Brocklyn J R, *et al.* Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of Crk. *J Biol Chem*, 1997, **272** (26): 16211-16215
- 3 Ghosh T K, Bian J, Gill D L. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem*, 1994, **269** (36): 22628~22635
- 4 Su Y, Rosenthal D, Smulson M, *et al.* Sphingosine 1-phosphate: a novel signaling molecular stimulation DNA binding activity of AP-1 in quiescent Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 1994, **269** (23): 16512~16517
- 5 Spiegel S, Cuvillier O, Edsall L C, *et al.* Sphingosine 1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann New York Acad Sciences*, 1998, **845**: 11~18
- 6 Kim Y H, Yoo J S, Lee C H, *et al.* Application of fast atom bombardment combined with tandem mass spectrometry to the structural of O-demethylabierixin and related elucidatim polyether antibiotics. *J Mass Spectrom*, 1996, **31** (8): 855~860
- 7 Yatomi Y, Ruan F, Ohta J, *et al.* Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride. *Anal Biochem*, 1995, **230** (2): 315~320
- 8 Lee M J, van Brocklyn J R, Thangada S, *et al.* Sphingosine 1-phosphate, as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 1998, **279** (5356): 1552~1555
- 9 Olivera A, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 1993, **365** (6446): 557~560

### Quantitative Measurement of Sphingosine 1-phosphate: A Novel Competitive Binding Method.

TU Zhen-Xing, GONG Yan-Fang (*Laboratory of Gastroenterology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China*); J. R. van BROCKLYN, S. SPIEGEL (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Georgetown University Medical Center, Washington DC 20007, USA*).

**Abstract** Sphingosine 1-phosphate (SPP) is an important second messenger involved in cell growth and cell death. HEK293 cells transfected with EDG-1, a SPP receptor, were cultured and harvested, and incubated with <sup>32</sup>P labeled or non-labeled SPP. The SPP level was determined based on competitive binding of SPP or <sup>32</sup>P-SPP to HEK cells. This method does not require special apparatus, and able to measure the content of SPP as low as pmol with high sensitivity and good repetition. The between groups deviation was less than 15%.

**Key words** sphingosine 1-phosphate, receptor, quantitation