

MES23.5 细胞酪氨酸羟化酶的种属来源 及其重组酶的活性测定

于泓^{1,2)}, 李尧华¹⁾, 冯秀丽¹⁾, 吴燕川¹⁾, 周虹²⁾, 陈彪^{1,3)}*

(¹⁾首都医科大学宣武医院,北京老年医学研究所,北京 100053; ²⁾哈尔滨医科大学生物化学教研室,
哈尔滨 150086; ³⁾国家人类基因组北方研究中心,北京 100176)

摘要 MES 23.5 细胞作为研究神经变性疾病的工具,是一种杂交瘤性多巴胺能神经元细胞系,由大鼠胚胎中脑细胞与小鼠神经母细胞瘤-胶质瘤细胞系 N18TG2 杂交而成。其酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的动物种属来源不清楚。应用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法从 MES 23.5 细胞系中克隆了编码 TH 的 cDNA;结构分析表明,其 cDNA 编码区由 1497 碱基构成,共编码 498 个氨基酸,与大鼠和小鼠 TH 的同源程度分别为 93 % 和 100 %。该杂交瘤细胞系表达小鼠 TH。将该 cDNA 亚克隆至原核表达载体 pGEX-4T-1,经原核细胞表达、亲和层析得到了电泳纯的基因重组小鼠 TH (recombinant mouse tyrosine hydroxylase, rmTH)。改良和建立了一种体外分析 TH 活性的新方法。活性分析证明,纯化的 rmTH 能催化 L-酪氨酸发生加单氧反应生成 L-3,4-二羟苯基丙氨酸(L-多巴)。rmTH 的表观分子量为 56 kD;其酶促加单氧反应的最适 pH 值为 7.0。乙二胺四乙酸能显著抑制此酶的活性,而亚铁离子能明显增强其活性。

关键词 MES23.5 细胞系,酪氨酸羟化酶,克隆

中图分类号 R338

Identification and Activity Assay of the Tyrosine Hydroxylase in MES23.5 Cells

YU Hong^{1,2)}, LI Yao-hua¹⁾, FENG Xiu-li¹⁾, WU Yan-chuan¹⁾, ZHOU Hong²⁾, CHEN Biao^{1,3)}*

(¹⁾ Beijing Institute of Geriatrics, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China;

²⁾ Department of Biochemistry, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; ³⁾ Chinese National Human Genome Center, Beijing 100176, China)

Abstract MES23.5 cell line, which served as a useful tool for studying neurodegenerative disease, is a dopaminergic neuroblastoma derived from somatic cell fusion of rat embryonic mesencephalon cells and the murine neuroblastoma-glioma cells. But the origin of its tyrosine hydroxylase (TH) was unclear. A TH cDNA was cloned from MES23.5 cells by RT-PCR. The 1497 bp cDNA, encoding 498 amino acids, is completely identical to the mouse TH and shares 93 % homology with rat TH. These results reveal that MES cells express mouse TH. The coding region of the cDNA was subcloned into a bacteria expression vector pGEX-4T-1, and the resulting TH-GST fusion protein was expressed at a high level in *E. coli* and purified via affinity chromatography. An improved method is used to analyze the activity of TH *in vitro*. The specific enzyme activity was 0.2698 $\mu\text{mol}/\text{min}$ per mg of protein. The molecular mass of rTH—56 000 was measured by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the optimal pH of the enzymatic activity was 7.0. The activity was

收稿日期:2003-03-04,接受日期:2003-04-18

国家 973 项目(G2000057005),国家自然科学基金资助项目(30271437)和北京卫生重点学科项目资助

*联系人 Tel:(010) 83161294, Fax:(010) 83161294, E-mail:pbchan@bjasp.org

于泓,女,1972 年生,博士生,讲师

Received: March 4, 2003; Accepted: April 18, 2003

Supported by the "973" National Key Project of Basic Research (No. G2000057005), National Natural Science Foundation of China (No. 30271437) and Project of Key Subject on Health of Beijing

*Corresponding author, Tel:(010) 83161294, Fax:(010) 83161294, E-mail:pbchan@bjasp.org

significantly inhibited by EDTA, and was markedly activated by Fe().

Key words MES23.5 cell line, tyrosine hydroxylase, molecular cloning

MES23.5 细胞是由大鼠胚胎中脑细胞与小鼠神经母细胞瘤-胶质瘤细胞系 N18TG2 杂交而成,免疫组织化学方法证实其含有丰富的酪氨酸羟化酶,是研究多巴胺能神经元机能和代谢的工具^[1],但该细胞所表达的 TH 的种属来源于两种杂交细胞中的何者却不清楚.

酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH, EC1.14.16.2) 又称酪氨酸 3-单加氧酶 (tyrosine 3-monooxygenase),是哺乳动物体内儿茶酚胺类神经递质(包括 L-多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素等)生物合成途径的限速酶,其最主要的生理机能是在哺乳动物的脑、肾上腺髓质和周围交感神经末梢等组织细胞中催化 L-酪氨酸转变成 L-3,4-二羟基苯丙氨酸(L-多巴)^[2],后者是多巴胺、黑色素及肾上腺素等生物活性物质的前体物.在上述酶促反应中需四氢生物蝶呤为辅酶、需 Fe²⁺ 为必需激动剂^[3].在中枢神经系统,TH 主要分布在多巴胺能神经元和去甲肾上腺素能神经元,因此,TH 成为这些神经元的标记物.体外分析 TH 活性的方法是由 Nagatsu 等在 1964 年创立的^[2],虽然进行了若干改良^[4~7],但其原理仍是通过测定反应体系中³H₂O 的生成量来进行的,这些方法都使用 3,5-³H-L-酪氨酸作为底物.

在中枢神经系统,尤其是在黑质-纹状体系统 TH 质和量的变化直接影响到 L-多巴胺的合成,而后者合成的减少是帕金森氏病(Parkinson's disease)发生和发展的病理学基础^[8].虽然天然的 TH 已经从许多动物组织中得到部分纯化^[9~12],但是回收率极低,无法满足实验要求.本研究采用 cDNA 克隆技术鉴定了 MES23.5 杂交瘤细胞系酪氨酸羟化酶的属性,并通过原核细胞表达、纯化和酶活性分析等方法对重组小鼠酪氨酸羟化酶的部分理化性质进行了分析.

1 材料和方法

1.1 细胞系

MES23.5 黑质多巴胺能神经元细胞系由美国帕金森氏病研究所惠赠.

1.2 质粒

pUC119 质粒购自宝生物工程有限公司;pGEX-4T1 质粒购自 Amersham pharmacia 公司.

1.3 工具酶和试剂盒

TRIZOL Reagent 购自 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;PCR Fragment Recovery Kit,限制性核酸内切酶 *Bam*H 和 *Sal*,Blunting Kination Ligation Kit 购自宝生物工程有限公司;蛋白质定量试剂盒(BCA Kit)购自 Pierce 公司.

1.4 生化试剂

PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;BL21(DE3)、Gutathione-Sepharose 4B 和 Phenyl SepharoseTM 购自 Amersham Pharmacia 公司;凝血酶、过氧化氢酶、二氢生物蝶呤还原酶、L-酪氨酸、L-多巴和四氢生物蝶呤购自 Sigma 公司;其它均为分析纯试剂.

1.5 细胞培养

MES23.5 细胞从液氮复活后,用含有 5% 胎牛血清和 Sato 氏添加液的 DMEM/F12 培养基悬浮,然后接种于涂有多聚-L-赖氨酸的培养瓶中,在 5% CO₂ 培养箱培养.

1.6 MES23.5 细胞总 RNA 的提取

将细胞接种于 75 cm² 培养瓶中,待细胞生长到适当密度时(约 1.5 × 10⁷ 个细胞)弃净培养液,用冷 PBS 缓冲液(0.14 mol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10.1 mmol/L Na₂HPO₄,1.8 mmol/L KH₂PO₄,pH 7.3)洗细胞 2 次后,加 8 ml TRIZOL Reagent 并遵其使用说明书所记载方法提取总 RNA.

1.7 TH cDNA 的克隆及其鉴定

参照大鼠 TH cDNA 序列设计 N 端引物(导入 *Bam*H 酶切位点)为 5'-CGCGGATCCATGCCCAACCCCA GC GCG3 和 C 端引物(导入 *Sal* 酶切位点)为 5'-CGCGTCTGACTTAGCTAATGGCACTCA GT GCG3.取 2 μg 总 RNA 遵如下 RT-PCR 程序实施 TH cDNA 扩增:48 45 min,94 30 s,60 1 min,68 2 min,PCR 循环数为 40.扩增的 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收 1.5 kb 的片段并将该片段经 Blunting Kination Ligation Kit 处理后,重组至 pUC119 质粒.重组质粒 pUC119-TH 经上海生工生物工程技术服务有限公司测序.

1.8 TH 的原核细胞表达

用 *Bam*H 和 *Sal* 酶切处理重组质粒 pUC119-TH 得到含 TH cDNA 片段,再将该片段与同样酶处理过的 pGEX-4T1 质粒进行连接得到重组质粒 pGEX-TH,经测序确认读码框架无误后转化至

BL21 (DE3) 感受态细胞. 转化菌在含氨卞青霉素的 2 × YTA 培养液中 (每升含蛋白胨 16 g、酵母提取物 10 g 和 NaCl 5 g, pH 7.0) 培养至适当密度 ($A_{600} = 0.4 \sim 0.6$) 时, 加 IPTG (终浓度为 0.1 mmol/L), 28 °C 继续培养 3~4 h, 每隔 1 h 取菌液 1.0 ml, 通过 SDS-PAGE 确定融合蛋白质 GST-TH 表达的最佳条件.

1.9 重组 TH 的纯化

上述培养液经离心 (10 000 g, 5 min, 4 °C) 收获细菌, 用 8 倍体积的冷 PBS 缓冲液悬浮细菌后实施超声波破碎, 向破碎的菌液中添加 Triton X-100 (终浓度为 1%), 室温放置 30 min, 15 000 g 离心 1 h.

1.10 亲和层析

将上述离心所获上清以 1 ml/min 的流速添加至 Gutathione-Sephrose 4B 亲和层析柱 (柱床体积 1 ml, 用 PBS 缓冲液平衡), 然后用 20 ml PBS 缓冲液流洗层析柱, 再向柱内添加含有 20 U 凝血酶的 0.5 ml PBS 缓冲液, 封闭层析柱下口, 混合柱床内容物后室温放置 16 h, 用 PBS 缓冲液洗脱层析柱并回收洗脱液.

1.11 蛋白质定量及表达产物的 TH 活性鉴定

蛋白质定量采用紫外吸收法, 设定各组分蛋白质在 1 mg/ml 浓度时的吸光系数都是 1.0 ($E_{280}^{1\%} = 1.0$). TH 活性分析采用 HPLC 方法, 通过测定 L-多巴的生成量判断酶的活性. 标准的酶促反应系为 1 ml, 其组成如下: 10 U/ml 过氧化氢酶 20 μ l、10 mU/ml 二氢生物蝶呤还原酶 1 μ l、10 mmol/L NADH

10 μ l、10 mmol/L L-酪氨酸 20 μ l、0.5 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 400 μ l、超纯水 537 μ l、纯化的基因重组产物 2 μ l 和 10 mmol/L 四氢生物蝶呤 10 μ l. 上述反应在加入四氢生物蝶呤后立即混匀, 并置于 37 °C 水浴 10 min, 用 HClO_4 (终浓度 0.4 mol/L) 终止反应, 14 000 g 离心 20 min 后取上清 800 μ l 用于反相 HPLC 系统分析. 层析条件: Hypersil ODS C_{18} 反相柱 (125 mm × 4 mm, 5 mm); 室温; 流动相含有 90 mmol/L 乙酸钠、35 mmol/L 柠檬酸、130 mmol/L EDTA 和 115 mmol/L 辛烷磺酸钠 (SOS), pH 4.7; 流速为 1 ml/min; 检测系统为电化学检测器、电压 0.55 V.

2 结果

2.1 MES23.5 细胞 TH cDNA 的克隆与鉴定

用 2.0 μ g MES23.5 细胞总 RNA 实施 RT-PCR 扩增后, 经 1% 琼脂糖凝胶分离可见约 1.5 kb 的扩增产物, 符合分子量理论值大小. 回收该片段并将其以平端方式亚克隆至 pUC119/Hinc 后, 用 *Bam*H 和 *Sal*I 酶切处理进行初步鉴定. 对 pUC119-TH 测序的结果证明克隆的 cDNA 与小鼠 TH 核苷酸序列完全相同, 而与大鼠 TH 的同源性只有 93%; 该 cDNA 全长 1 497 bp, 编码 498 个氨基酸, 推定的分子量为 55.99 kD (Fig. 1).

2.2 小鼠 TH cDNA 在原核细胞内的表达

在克隆的 cDNA 的 5' 端起始密码子 ATG 之前和

```

1 ATGCCACCCACCGCCCTCTGCCACAGCCCAAGGGCTTACAAGAGCCGTCTCAGAGGACGCGGCGAGAGTCAGGATACCAAGCAGGCCAGGGCTGTACAG 105
1 M P T P S A S S P Q P K G F R R A V S E Q D T K Q A E A V T S P R F I 35
106 TCCTCAAGGTTCTATCTCAGGAGTCCCGCAAGGAGCGGAGGACAGCAGCTCAGCAGCGGCTCGGTAGCCTCCGCGGAACCTGGGAACCTATGGAG 210
36 G R R Q S L I E D A R K E R E A A A A A A A A V A S A E P G N P I E 70
211 GCTGTGGTATTCGAGGAGAGGATGGAATGCTGTTCTCAACCTGCTCTCTCTGAGGGGTACAAAACCTCCTCACTGTCTCGGGCTTGAAGTGTITGAG 315
71 A V V F E E R D G N A V L N I L F S I R G T K P S S L S R A I K V F E 105
316 ACATTTGAAGCCAAAATCCACCACTTAGAGACCCGGCTGCCAGAGGCCACTGGCAGGAAGCCCCACCTGGAGTACTTTGTGCGCTTCAGGTGCCAGTGGC 420
106 T F E A K I H H L E T R P A Q R P L A G S P H L E Y F V R F E V P S G 140
421 GACCTGGCTGCCCTCTCAGTTCTGTGCGTCGGGTGTCTGACGATGTGCCAGTGCCAGAGAGACAAGGTTCCCTGGTTCCCAAGGAAGTGTGAGATTGGAT 525
141 D L A A L S S V R R V S D D V R S A R E D K V P W F P R K V S E L D 175
526 AAGTGTACCACTGGTCACCAAGTTTGACCTGACCTGGACCTGGACCATCGGGCTTCTGACCAAGCGTATGCCAGCGCGGAAGCTGATTGACAGATT 630
176 K C H H L A V T K F D P D L D L D H P G F S D Q A Y R Q R R K L I A E I 210
531 GCCTTCCAATCAAGCAGGCTGACCAATTCCTCCACGTGGAATACACAAGGAGAAATGTCTACCTGGAAGGAGGTATACGCCACGCTGAAGGGCTCTATGCT 735
211 A F Q Y K Q G E P I P H V E Y T K E E I A T W K E V Y A T L K G L Y A 245
736 ACCCATGCTGCCGGGAACACCTGAGGCTTCCAGCTTCTGGAACGCTACTGTGCTACCGAGAGACAGCATTCACAGCTGGAGGATGTGTCTCACTTCTT 840
246 T H A C R E H L E A F T Q L L E R Y C G Y R E D S I P Q L E D V S H F L 280
841 AAGGAACGGACTGGCTTCCAGCTGCGACCCGTGGCCGGTCTACTGTCTGCGCGTATTCTTGGCCAGTCTGGCCTTCCGTGTGTTCAGTGCACAGATACATC 945
281 K E R T G F Q L R P V A G L L S A R D F L A S L A F R V F Q C T Q Y I 315
946 CGTCATGCTCTCACTATGCACTACCCGAGCCAGACTGTGCCAGGAGCTGTGGGACAGTACCCATGTTGGCTGACCGCACATTTGCCAGTTCTCCCG 1050
316 R H A S S P M H S P E P D C C H E L L G H V P M L A D R T F A Q F S Q 350
1051 GACATTGCACTTGCATCTCTGGGGCTTCAGATGAAGAAATGAAACCTCTCCACGCTACTGGTTCACTGTGAGTTTGAGTGTGTAAGACAGATGGGGAG 1155
351 D I G L A S I G A S D E E I E K L S T V Y W F T V E F G L C K Q N G E 385
1156 CTGAAGGCTTACGTTGCGGGCTGTGTCTCTTATGGAGAGTCTCTGCACTCCCTGTGAGAGGAGCCGAGGTCTGGGGCTTTGACCCAGACAGCAGCCGCT 1260
386 I K A Y G A G L L S S Y G E L L H S L S E E P E V R A F D P D T A A V 420
1261 CAGCCCTACCAAGATCAACCTACCAAGCGGTGTACTGTGTGAGAGAGTTCAGTGATGCCAAGGACAAGCTCAGGAATATGCCTCTGTATCCAGCCCA 1365
421 Q P Y Q D Q T Y Q P V Y F V S E S F S D A K D K L R N Y A S R I Q R P 455
1366 T T C T G T G A A G T T T G A C C T G A C C A T T G A T G A C T G G C A C T C A C A C C G C G C T T A G A G G G G T C A G G A T G C A C A C C T G 1470
456 F S V K F D P Y T L A I D V L D S P H T I R R S L E G V Q D F L H T L 490
1471 ACCAAGCACTGAGTGCCATTAGCTAA 1497
491 T Q A L S A I S * 498

```

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of isolated mouse TH cDNA fragment

* :TAA is one of the stop codons

3 端终止密码子 TAA 之后分别导入 *Bam*H 和 *Sal* 位点序列,再将该 cDNA 片段插入 pGEX-4T-1 质粒,重组质粒在 BL21 菌中的表达受 IPTG 诱导,前 3 个小时表现为随时间延长而表达量显著增多,以后则增加缓慢(Fig. 2).



Fig. 2 Expression of the mouse TH cDNA in *E. coli*
Bacteria lysate (5 ml) was separated with 12.5 % SDS-PAGE and stained by coomassie brilliant blue R250.
0—6: Induced-time (hour) with 0.10 mmol/L IPTG;
7: GST-rmTH after glutathione-Sepharose 4B chromatography;
M: Protein standard molecular weight marker

2.3 基因重组产物的纯化

使用 Glutathione-Sepharose 4B 亲和层析得到的基因重组蛋白质在 12.5 %的 SDS-PAGE 上可见为单一条带,无论 巯基乙醇存在与否其表观分子量均约为 56 kD(Fig. 3). 每升培养菌可收获目的重组 TH 约 4.0 mg. 酶的纯化回收率为 77.9 %,纯化倍数为 267 倍(Table 1).

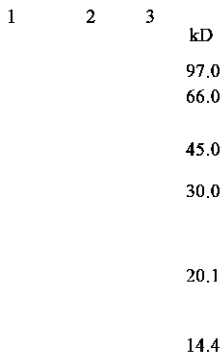


Fig. 3 SDS-PAGE of purified rmTH
1: Sample without γ -mercaptoethanol;
2: Sample with γ -mercaptoethanol;
3: Protein standard marker

Table 1 Purification of rmTH

Step	Total absorbance at 280 nm	Total activity /U	Specific activity /U mg^{-1}	Yield	Purification
Before chromatography	1385.5	1.4	1.01×10^{-3}	100	1
After chromatography	4.048	1.09	0.2698	77.9	267

One unit of activity was defined as the amount of enzyme that was capable of hydroxylating 1 μmol of *L*-tyrosine per minute (1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} = 1$ unit) under standard condition

2.4 基因重组产物的活性及部分性质鉴定

在本研究建立的分析条件下可见 *L*-多巴标准品在 1.9 min 保留时间出现了特征性反应峰(*L*-DOPA 峰, Fig. 4 A),添加了 rmTH 的反应液在相同保留时间也出现 *L*-DOPA 峰(Fig. 4 C),而未添加 rmTH 的反应液则在此保留时间没有出现反应峰(Fig. 4 B). 该重组酶在 pH 4.5 ~ 8.0 范围内有催化活性,但最大活性出现在 pH 7.0. 此外,该酶的催化活性因亚铁离子的存在显著增高,但受 EDTA 强烈抑制(Fig. 5).

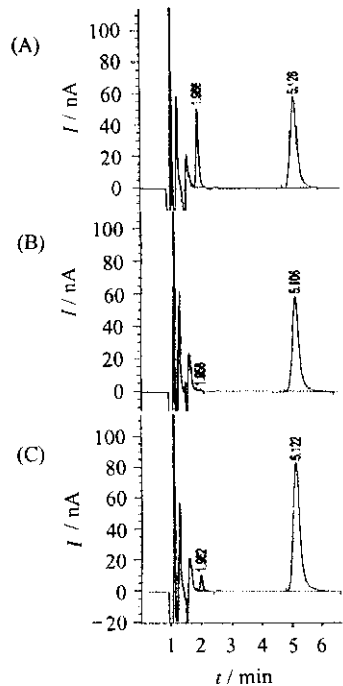


Fig. 4 Activity assay of the rmTH on HPLC system
(A) *L*-DOPA standard;
(B) Reaction without rmTH;
(C) Reaction with rmTH

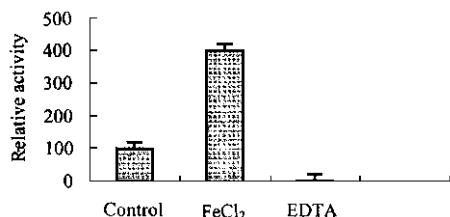


Fig. 5 Effect of enhancer and inhibitor

n = 6

3 讨论

采用 RT-PCR 方法克隆了 MES23.5 细胞的 TH cDNA 的编码区片段并在原核细胞中表达和纯化了重组蛋白质. MES23.5 细胞是由大鼠胚胎中脑细胞与小鼠神经母细胞瘤细胞系杂交而成,虽含有丰富的 TH^[7],但此酶来源于 2 种动物中的何者未见报道.由于 2 种动物来源的 TH cDNA 编码区有 93 % 同源,而且 N 端区之间与 C 端区之间具有高度保守性,所以在本研究中,我们参照 Grima 等^[13]报道的大鼠酪氨酸羟化酶序列设计了引物,克隆得到的 cDNA 与大鼠的 TH 仅有 93 % 的同源性,而与小鼠的 TH 同源性为 100 %.按照杂交瘤细胞制备的原理分析,该细胞系应该表达大鼠 TH,但结果却相反.中脑细胞是多巴胺能神经元集中的区域,为什么大鼠胚胎中脑细胞在与小鼠神经母细胞瘤细胞系杂交时其 TH 基因受到封闭?其机理还有待进一步探讨.

从 MES23.5 细胞克隆的 TH cDNA,其长度为 1 497 bp,编码 498 个氨基酸,与 Ichikawa 等报道的结果一致^[14].外源性蛋白质在原核细胞高水平表达时往往会形成包涵体^[15],对活性型目的蛋白质的回收产生影响.本研究利用 pGEX-4T1/BL21 原核表达体系,在较低的温度状态下(28 °C)培养细菌克服了包涵体形成的不利因素.无论有无 β -巯基乙醇存在,纯化的重组蛋白质在 SDS-PAGE 上的表观分子量均为 56 kD,基本上与天然 TH 相符合.

有文献报导,基因重组的大鼠 TH(rTH)具有生物学活性^[16].与天然 TH 一样,重组 rTH 被磷酸化后活性增高,其活性受多巴胺等反馈抑制^[16].如前言所述,目前体外分析 TH 活性的方法通常是以氚标记的 L-酪氨酸为底物,通过测定 $^3\text{H}_2\text{O}$ 的释放量来判断 TH 活性.这些方法虽然敏感,但共同的缺点是背景高且操作程序复杂.本研究中,我们改良了 Nagatsu 等^[1]的方法,采取测定酶促反应产物(L-多巴)的方法来判定酶的活性,方法敏感而无背景,既简化了操作程序又因为使用非同位素性底物,所以

易于推广使用.

帕金森病是一个典型的由化学性神经递质异常引起的神经退行性疾病,以黑质纹状体系统多巴胺能神经元减少为主要病理学特征^[17].虽然该病的病因和发病机制还不十分清楚,但多巴胺水平的低下是该病临床表现的直接原因^[8].酪氨酸羟化酶为多巴胺合成代谢的限速酶,研究影响此酶质和量的新因素,将有助于揭示帕金森氏病的病因和发病机制.本研究中,我们克隆了小鼠 TH cDNA 编码区片段,鉴定了 MES23.5 细胞 TH 的动物种属来源,对于今后更合理地使用该细胞系作为研究多巴胺能神经元的工具具有指导意义.通过原核细胞表达系统获得了大量高纯度基因重组的小鼠 TH,改良和建立了一种体外分析 TH 活性的新方法,为今后关于帕金森氏病等神经变性病的研究工作打下基础.

参考文献 (References)

- 1 Crawford G D Jr, Le W D, Smith R G, Xie W J, Stefani E, Appel S H. A novel N18TG2 X mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *J Neurosci*, 1992, **12**:3392 ~ 3398
- 2 Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Conversion of L-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine by cell-free preparations of brain and sympathetically innervated tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964, **14**:543 ~ 549
- 3 Kaufman S. Aromatic amino acid hydroxylases. Boyer P D, Krebs E G eds. In: *Enzymes*, 3rd ed. Orlando: Academic Press, FL, 1987, **18**: 217 ~ 282
- 4 Karobath M. Catecholamines and the hydroxylation of tyrosine in synaptosomes isolated from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68** (10):2370 ~ 2373
- 5 Cicero T J, Sharpe L G, Robins E, Grote S S. Regional distribution of tyrosine hydroxylase in rat brain. *J Neurochem*, 1972, **19** (9):2241 ~ 2243
- 6 Okuno S, Fujisawa H. Assay of tyrosine 3-monooxygenase using the coupled nonenzymatic decarboxylation of dopa. *Anal Biochem*, 1983, **129** (2):405 ~ 441
- 7 Reinhard J F Jr, Smith G K, Nichol C A. A rapid and sensitive assay for tyrosine-3-monooxygenase based upon the release of $^3\text{H}_2\text{O}$ and adsorption of [^3H]-tyrosine by charcoal. *Life Sci*, 1986, **39**:2185 ~ 2189
- 8 Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 1998, **16** (3):285 ~ 309
- 9 Shiman R, Akino M, Kaufman S. Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem*, 1971, **246** (5):1330 ~ 1334
- 10 Markey K A, Kondo H, Shenkman L, Goldstein M. Purification and characterization of tyrosine hydroxylase from a clonal pheochromocytoma cell line. *Mol Pharmacol*, 1980, **17** (1):79 ~ 85

- 11 Richtand N M, Inagami T, Misono K, Kuczenski R. Purification and characterization of rat striatal tyrosine hydroxylase. Comparison of the activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation and by other effectors. *J Biol Chem*, 1985, **260**(14):8465~8473
- 12 Haavik J, Andersson K K, Petersson L, Flatmark T. Soluble tyrosine hydroxylase (tyrosine 3-monooxygenase) from bovine adrenal medulla: large-scale purification and physicochemical properties. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **953**(2):142~156
- 13 Grima B, Lamouroux A, Blanot F, Biguet N F, Mallet J. Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985, **82**(2):617~621
- 14 Ichikawa S, Sasaoka T, Nagatsu T. Primary structure of mouse tyrosine hydroxylase deduced from its cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, **176**(3):1610~1616
- 15 Marston F A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240**(1):11~12
- 16 Wang Y H, Citron B A, Ribeiro P, Kaufman S. High-level expression of rat PC12 tyrosine hydroxylase cDNA in *Escherichia coli*: purification and characterization of the cloned enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(19):8779~8783
- 17 Stange P G. *Brain Biochemistry and Brain Disorders*. New York: Oxford University Press, 1992:161~185

2004 亚太地区国际肿瘤生物学暨第 21 届国际肿瘤标志物学术会议

2004 年 8 月 21~26 日, 中国西安

为了促进世界各国和地区肿瘤研究相关领域专家的交流与合作, 中国抗癌协会肿瘤标志物专业委员会、中华医学会微生物与免疫学分会、国家 863 计划西安细胞工程基地主办的 2004 亚太地区国际肿瘤生物学医学学术会议暨第 21 届国际肿瘤标志物学术会议将于 2004 年 8 月 21~26 日在西安召开。这是我国肿瘤生物学领域的一次重大盛会, 会议将邀请国内外著名专家报告当今肿瘤基础与临床研究的最新成果与发展趋势, 会议将授予与会者国家 类继续教育学分 10 分。

一、会议主题: 肿瘤后基因组学与肿瘤临床

二、征文内容

(一) 基础部分

1. 病毒与肿瘤, 2. 肿瘤相关抗原与蛋白组学, 3. 肿瘤功能基因(癌基因、抑癌基因、易感基因)与药物基因组学, 4. 细胞凋亡与细胞分化, 5. 细胞周期调控与信号转导, 6. 肿瘤细胞外基质与转移, 7. 肿瘤微环境与血管形成, 8. 炎症与肿瘤的进展, 9. 肿瘤耐药与逆转, 10. 肿瘤生物信息学, 11. 肿瘤新分子靶位与肿瘤预防治疗, 12. 肿瘤的 DNA 损伤与修复, 13. 肿瘤细胞代谢, 14. 肿瘤相关药物设计与靶位

(二) 临床医学

1. 肿瘤生物治疗与细胞因子, 2. 肿瘤免疫与基因治疗, 3. 细胞治疗(干细胞移植、树突状细胞、体细胞移植), 4. 肿瘤的传统医学治疗, 5. 肿瘤综合治疗(放疗、化疗、外科与生物治疗), 6. 肿瘤细胞外基质与抗复发治疗, 7. 肿瘤临床蛋白组学

(三) 肿瘤诊断、治疗新技术

1. 生物芯片, 2. 生物信息处理, 3. 癌症疫苗, 4. 肿瘤标志检测新技术、新方法, 5. 组织、血清、基因和细胞库的建立和应用, 6. 工程抗体、多肽、反义核酸、RNA 干涉, 7. 肿瘤血管靶位及其影像, 8. 肿瘤预后的基因预测, 9. 飞行质谱与肿瘤诊断

三、征稿要求 论文与摘要(附中文对照)一律以英文书写, 论文 2000~3000 字(摘要 500 字左右), 在标题下注明作者、单位、邮编。请用 A4 纸打印, 摘要占 A4 纸的 1/4 面积, 并附软盘, 也可以电子邮件投稿。稿件经专家评审后, 被录用的摘要并挑选其中优秀的全文刊登在由“国际肿瘤标志学会(IATMO)主办的 *JOURNAL OF TUMOR MARKER ONCOLOGY*(SCI) 杂志上, 将适当收取全文版面费, 稿件录用与否恕不退稿, 并请寄稿件处理费 30 元。(请来稿注明征文内容方向)

四、截稿日期: 2004 年 5 月 31 日(以邮戳为准)

五、投稿地址: 西安市长乐西路 17 号, 710032, 第四军医大学细胞工程研究中心 徐 静 刘 晶 收

电话: 029-3374547 传真: 029-3293906

E-mail: chcerc2 @fmmu. edu. cn website: http://chcerc. fmmu. edu. cn

中国抗癌学会肿瘤标志专业委员会
中华医学会微生物与免疫学分会
国家 863 计划西安细胞工程基地