

狗胰中含 polyA 的 RNA 的分离和体外翻译

钱 标 沈绿萍 崔桂芳 盛沛根 潘铁城 杨冠珍

(中国科学院上海生物化学研究所)

胰岛素久以作为治疗糖尿病的有效药物而称著,但直到六十年代后期才有人致力于探讨它的生物合成的机制。由实验得知:哺乳动物及鱼类的胰腺内,胰岛素的生物合成是通过一种单链多肽的前体形式进行的,这种前体已予以鉴定并命名为胰岛素原(proinsulin)。从七十年代中期开始,又有许多人从各种来源:狗及胎牛的胰腺,兔、大鼠、鲑鱼及鲤鱼的胰岛,人的胰岛细胞瘤(insulinoma)分离出相应的 mRNA,并知道这些 mRNA 的体外翻译产物,绝大部分是比胰岛素原更大的多肽物质。S. J. Chan 等人^[1]从大鼠胰岛所得总核酸的无细胞翻译产物,测知其分子量为 11,500,命名为前胰岛素原(Preproinsulin)。这些 mRNA 的分离及提纯是进而研究胰岛素基因的必要前提。本文报道我们从狗胰中分离出含 polyA 的 RNA 并使其在麦胚元细胞系统中进行体外翻译所得的结果。

材 料 和 方 法

1. 寡聚胸苷酸纤维素(简作 oligo(dT)-C) 的制备 按 Gilham^[2]的方法制备。所用的胸苷酸(dTMP)二铵盐为上海市牛奶公司综合厂产品,经纸层析鉴定,只呈现一个紫外吸收斑点;双环己基碳酰二亚胺(DCCI)为本所东风生化试剂厂产品;纤维素为德国 Carl Schleicher & Schüll 出品的 Zellulosepuloer Nr. 123,用蒸馏水浮选除去其中约占半量的微细颗粒。最后合成的 Oligo(dT)-C 经重蒸水洗净,保存于含 P₂O₅ 的真空干燥器中。

2. 狗胰总核酸的提取及其中含 polyA 的 RNA 的分离 实验用成年狗进行。狗胰总核酸按 Lomedico 及 Saunders^[3]的方法提取,总核酸的 Oligo(dT)-C 柱层析也按 [3] 所述在室温(11—23℃)进行。上柱的总核酸浓度一般为每毫升 40—60A₂₆₀ 单位。从柱上洗脱的含 polyA 的 RNA 曾按原法用 Lice 及 95% 乙醇沉出,但发现得率损失较大(可达 40%),故第三次制备时作了如下改进:将洗脱液装入预先用 10mM EDTA 煮沸处理的透析袋中,在冰库对重蒸水透析去盐后,用电扇吹浓至较小体积,再分装于经高温灭菌的小安瓿中,封口保存于 -20℃。

3. 体外蛋白合成的检测 采用麦胚无细胞蛋白合成系统^[4]对含 polyA 的 RNA 指导的体外翻译活性进行检测。实验用冬小麦“农大 139”品种。每 100 毫克干麦胚加玻璃砂 100 毫克,0.8 毫升抽提缓冲液(20 mM Hepes*, 50 mM KCl, 1 mM MgAc₂, 2 mM CaCl₂, 用 1 N KOH 调至 pH = 7.6)在玻璃研钵中研磨 3—5 分钟(在冰浴中进行),麦胚匀浆液以 25,000rpm(≈ 32000 × g)离心 10 分钟(4℃)。然后在离心管中小心地避开漂浮的白色脂肪层,吸取黄绿色的上清液使通过 Sephadex G-25 柱。上样前柱用缓冲液(20mM Hepes, 70mM KCl, 2.5mM MgAc₂, 2.2mM β-巯基乙醇, pH8.0)平衡,上样后仍用此缓冲液洗脱,收集洗脱液乳浊度最浓的部分,以 S₅₂ 表示。我们

* Hepes: 为 N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 的简写。

在实验中所用的 S_{32} , 其 $A_{260}/\text{毫升} = 60-80$, $A_{280}/\text{毫升} = 40-60$, $A_{260}/A_{280} = 1.3-1.5$ 。体外翻译反应混合液的总体积一般为 100 微升, 其中含有 20mM Hepes (pH7.6), 70mM KCl, 2.5mM $MgAc_2$, 2.2mM β -巯基乙醇, 1mM ATP, 0.025mM GTP, 3 微克酵母 tRNA, 8mM 肌酸磷酸钠盐, 4 微克肌酸磷酸激酶, 19 种未标记的氨基酸各 0.03mM, ^{14}C -亮氨酸 0.3 微居里, 麦胚提取液 S_{32} 50 微升, 含 polyA 的 RNA 10—12 微克。混合液在 25℃ 水浴保温 90 分钟后, 将反应管移入冰浴使反应终止。体外合成蛋白的放射性是取 20 微升反应液纸片法用液体闪烁计数器测定之。仪器的计数效率为 70% 左右。

结 果

1. oligo(dT)-C 对 polyA 的结合能力

我们制备的 oligo(dT)-C 每克含 0.45 毫克磷, 相当于 14.5 微克分子 dTMP。又按方法^[5]测定每克 oligo(dT)-C 对 polyA 的最大结合能力为 20.5 A_{257} 单位, 按 23.5 A_{257} 单位与 1 毫克 polyA 相当^[5], 此值相当于 0.87 毫克 polyA 或 2.5 微克分子 AMP。一般的 mRNA 分子其 3' 末端所含的 polyA 尾链约占其分子长度的 10—20%^[6], 我们制备的 oligo(dT)-C 每克既能与 0.87 毫克 polyA 结合, 因此可推算出它每克至少可吸附 4.35 毫克 mRNA。

2. 狗胰总核酸和含 polyA 的 RNA 的得率及有关结果 三次制备所得的结果如表 1。由表可见, 除第一次制备以外, 总核酸得率为狗胰湿重的 2% 左右, 含 polyA 的 RNA 约占总核酸

的 0.8—1.7%。总核酸的绝大部分 (93% 以上) 是不能被 oligo(dT)-C 吸附的。由图 1 可见, 在含 polyA 的 RNA 从柱上洗脱时, 峰型很集

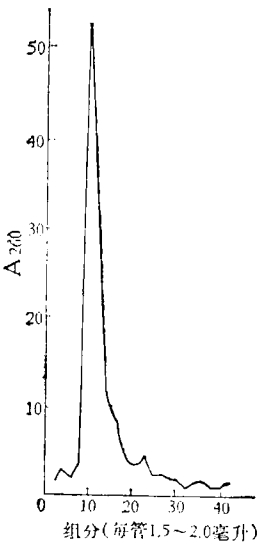


图 1 狗胰中含 polyA 的 RNA 从 oligo(dT)-C 柱上洗脱之一例 (第三次制备, 洗脱液中共含 478 A_{260} 单位)

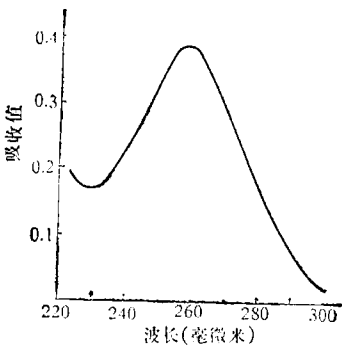


图 2 狗胰中含 polyA 的 RNA 的紫外吸收光谱 样品来自第二次制备中从柱上洗脱的最浓一管溶液的 40 倍稀释液

表 1 狗胰总核酸的得率及其在 oligo(dT)-C 柱上的层析结果

制备序号	动物只数	狗胰湿重(克)	总核酸干重(克)	A_{260} 单 位 数			
				上柱总数	未被吸附者	未被吸附者中由无盐的 Tris 缓冲液洗脱者	前一步经乙醇沉出后
一	1	20	0.22	3,870	3,590(92.7%)	32.5(0.8%)	未检测
二	3	75*	1.65	24,600	23,700(96.3%)	336 (1.4%)	200
三	2	74	1.5	28,700	27,040(94.2%)	478 (1.7%)	—

* 原为 90 克, 因在操作过程中容器破碎, 所损失的抽提液约占总量的 1/6, 故按 75 克计。表中括号内的数字为占上柱总数的百分率。

中，便于以后对产物浓缩，这是 oligo(dT)-C 柱最明显的优点之一。图 2 表示含 polyA 的 RNA 的紫外吸收光谱之一例。谱型正常，吸收高峰一般位于 258 毫微米，低峰位于 230—232 毫微米，低峰与高峰吸收值之比为 0.44—0.50。

3. 狗胰含 polyA 的 RNA 对于 ^{14}C -亮氨酸掺入的促进作用 在麦胚无细胞蛋白合成系统中，加入我们各次制备的狗胰含 polyA 的 RNA 后，与对照相比，对于 ^{14}C -亮氨酸的掺入，一般有 5—13 倍的促进作用。促进掺入之量则随核酸加入量及保温时间而异(图 3, 4)。核酸浓度过高则亮氨酸掺入量略有降低的趋势。保温时间达 90—120 分钟时，掺入量已接近或达到最高值。

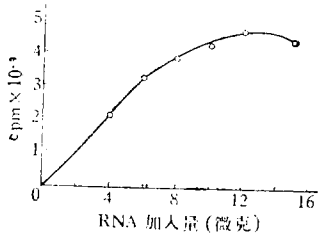


图 3 狗胰含 polyA 的 RNA 加入量对促进 ^{14}C -亮氨酸掺入的影响

反应总体积为 100 微升。其他条件和“材料和方法”一节所述的常规条件相同。分别加入不同量的 RNA 样品

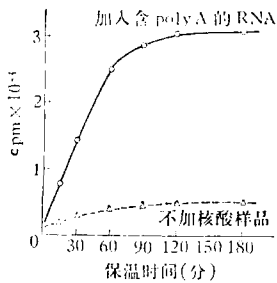


图 4 保温时间对 ^{14}C -亮氨酸掺入的影响

反应总体积为 300 微升，其他条件和常规方法相同，在保温不同时间后，分别取样进行测定，并以不加核酸样品作对比

我们还观察到 Mg^{++} 和 K^+ 的浓度对亮氨酸掺入都有一定影响(图 5, 6)，特别是对 Mg^{++} 浓度的差异更为敏感。 Mg^{++} 和 K^+ 的最适浓度分别为 2.5mM 和 65mM，这与其他研究者^[4]报道的结果相近。

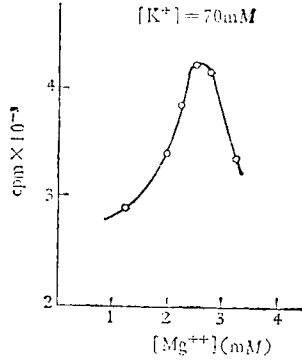


图 5 Mg^{++} 浓度对 ^{14}C -亮氨酸掺入的影响

反应条件同常规， K^+ 浓度固定在 70mM，加入不同浓度的 Mg^{++}

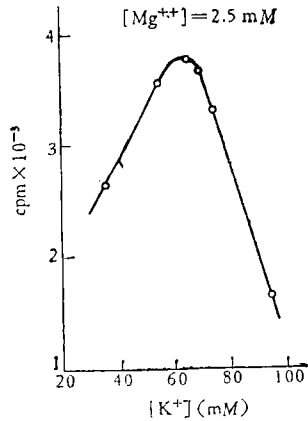


图 6 K^+ 浓度对 ^{14}C -亮氨酸掺入的影响

反应条件同常规， Mg^{++} 浓度固定在 2.5mM，加入不同浓度的 K^+

此外还发现，在麦胚无细胞蛋白合成系统中，狗胰含 polyA 的 RNA 对于促进 ^{14}C -亮氨酸掺入新生蛋白质的这种活性相当稳定。将 RNA 样品放置小安瓿管中，封口于 -20°C 保存，在半年至一年内尚可保持 1/2—2/3 的活性。

讨 论

从成年哺乳动物的胰腺分离有生物活性的 mRNA 时，最感困难的一个问题是胰腺内含有很多 RNA 酶。因此不得不在分离过程中使用 RNA 酶的各种抑制剂，如肝素、焦碳酸二乙酯等。我们采用 Lomedico 等人的 SDS-苯酚-氯仿去蛋白法^[3]无需另加抑制剂而能有效地控制住 RNA 酶活性。此法的另一个优点就是操作

简易,便于进行活性 mRNA 的分离。

自 Aviv 等人^[7]于 1972 年分离珠蛋白 mRNA 以来, oligo(dT)-C 已被广泛用于分离各种含 polyA 的 RNA。Mercer 等人^[3]对各种能与 polyA 结合的物质层析性质进行比较,结果认为 oligo(dT)-C 是用于分离 mRNA 的最合适的载体。我们所得的结果也说明 oligo(dT)-C 对 polyA 的选择本领很强,即它能把在总 RNA 中含量不到 2% 的 mRNA 挑选出来。Kates^[6]及 Nakazato 等人^[8]还指出 oligo(dT)-C 的其余优点: (1) oligo(dT) 与纤维素两者以共价键紧密结合,使用过程中 oligo(dT) 不致从层析柱上漏失而污染 mRNA 样品,在这方面 oligo(dT)-C 比含 polyU 的载体优越得多; (2) 对 RNA 酶及碱水解有抗性,因此可长期保存而不致丧失其对 polyA 的结合能力。

我们从狗胰所得含 polyA 的 RNA 未用超离心法进一步提纯,实为胰腺内多种 mRNA 的混合物,从聚丙烯酰胺凝胶电泳可知,它含有不止一种组分。这些 mRNA 在麦胚无细胞蛋白合成系统中有促进 ¹⁴C-亮氨酸掺入的作用,但不能确定其中是否有与胰岛素或胰岛素原相应的 mRNA 存在。我们按 Chan 等人^[1]的方法对狗胰含 polyA 的 RNA 的翻译产物进行了双抗体免疫沉淀分析,实验初步结果表明,总的三氯醋酸不溶物(即翻译产物)的放射性计数中约 0.1—0.2% 与具有胰岛素免疫活性的物质(IRD)相当。这说明所得的 RNA,其中胰岛素 mRNA 的含量很低。为此,我们打算从动物胰腺分离

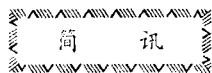
出胰岛后再抽提 mRNA,以作进一步的研究。

开展本工作三年多以来,许多报道说明国外这方面的进展非常迅速,特别是最近一、二年,由于遗传工程技术的应用,这方面更是独辟蹊径。例如 Permutt 等人^[9]从鱼的胰岛、Ullrich 等人^[10,11]从大鼠胰岛、Efstratiadis 等人^[12]从 X 射线引起的大鼠胰岛细胞瘤分离出胰岛素原或前胰岛素原的 mRNA,并用反转录酶合成与它相应的 cDNA。Pictet 等的工作^[11,12]中把这种 cDNA 引入到细菌质粒中,用无性繁殖(Cloning)的方法使其扩增,有力地促进了胰岛素基因的分离与鉴定工作,也将进一步对利用细菌发酵大量生产胰岛素作出重要的贡献。

参 考 文 献

- [1] Chan, S. J. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 1964, 1976.
- [2] Gilham, P. T.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 4982, 1964.
- [3] Lomedico, P. T. & Saunders, G. F.: *Nucleic Acid Res.*, **3**, 381, 1976.
- [4] 中国科学院微生物研究所病毒复制研究组:《生物化学与生物物理学报》, **8**, 179, 1976。
- [5] Mercer, J. F. B. & Naora, H.: *J. Chromatogr.*, **114**, 115, 1975.
- [6] Kates, J.: *Methods in Cell Biology*, **7**, 53, 1973.
- [7] Aviv, H. & Leder, P.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1408, 1972.
- [8] Nakazato, H. & Edmonds, M.: *Methods in Enzymol.*, **29**, Part E, 431, 1974.
- [9] Permutt, M. A. et al.: *Diabetes*, **27**, Suppl., 2, 456, 1978.
- [10] Ullrich, A. et al.: *Science*, **196**, 1313, 1977.
- [11] Pictet, R. Ullrich, A., et al.: *Diabetes* **26**, Suppl. 1, 378, 1977.
- [12] Villa-Komaroff, L., Efstratiadis, A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 3727, 1978.

[本文于 1979 年 5 月 29 日收到]



简 讯

发现治疗痤疮新穴位

近两年,我们通过临床实践,发现一个治疗痤疮的取名为“瘰穴”的新穴位,深刻此穴治疗痤疮,疗效十分显著。

痤疮中医称之为“肺风粉刺”,俗称“寻常痤疮”,又叫“壮疙瘩”、“青春痘”等。患者多为青春期男女。好发部位在前额、面颊、上胸、后背。轻者有疼痛刺痒感,重者可留下瘢痕和色素沉着,损害患者面容,给患者带来精神负担。中、西医疗方法不少,但疗效不理想。我们采用针刺“瘰穴”(位于胸锁

乳突肌的前缘颈两侧之动脉应手搏动处是穴)、用 2.5 寸 26 号不锈钢毫针 2 支,深刻 1.5—2 寸,捻转 1 分钟,不留针。用此法已治疗八十余例,均有疗效:痊愈者占百分之九十以上。

此法疗效显著,可能是刺激“瘰穴”后能调整气血,通达卫营,绕利经络,改善机体内分泌调节,达到了除邪治病的目的。

(生物物理研究所医务室阎振海)