

多胺在体外转录中的作用

韩 玉 珉

(中国科学院生物物理研究所)

多胺(包括精胺、精脒及腐胺等),广泛存在于动物、植物、微生物及病毒中。许多研究表明,多胺在生命过程中起重要作用^[1,2]。从分子生物学角度看,多胺对于 DNA 复制,基因表达的转录和翻译有重要的调节作用^[3,4]。不少人研究过多胺对 DNA 体外转录的调节作用,并企图了解它们影响转录的机理^[5,6,7]。本文试比较多胺对不同来源的 RNA 聚合酶进行体外转录的影响,以及用不同的 RNA 聚合酶转录不同构象的 DNA 模板时多胺的调节作用,以便进一步了解多胺调节 DNA 体外转录的作用机理。

一、材料和方法

1. 小鼠肝 RNA 聚合酶的提取 基本按 Roeder^[8] 及郝检林^[9]的方法。细胞核的制备见文献[10]。提取过程简述如下:(1)酶的抽提:50克肝组织的细胞核悬浮在30毫升含0.3M硫酸铵的 TGMEMP 缓冲液 [50mM Tris-HCl (pH7.9)-30%甘油-5mM MgCl₂-0.5mM EDTA-1mM 巯基乙醇-0.1 mM PMSF]中,经超声(15秒×6)破核后,迅速用 TGMEMP 缓冲液稀释至0.1M 硫酸铵浓度,离心(17,000 r. p. m. 45分钟)后取上清液,加固体硫酸铵使成58%饱和度(用浓氨水调 pH7—8),搅拌30分钟,离心(35,000r.p.m.) 40分钟后,取沉淀部分,溶在15毫升的 TGMEMP 缓冲液中,并对此缓冲液透析3—5小时,使硫酸铵浓度达0.03M,以备下步柱层析用。(2)酶的柱层析分离:DEAE-Sephadex A-25 柱(2×8厘米)预先用含0.03M 硫酸铵的 TGMEMP 缓冲液平衡后,将上述透析过的酶溶液上柱,分别用含0.1M, 0.2M, 0.3M 硫酸铵的 TGMEMP 缓冲液分阶段洗脱,

流速为1毫升/分,收集0.3M硫酸铵洗脱部分,即为 RNA 聚合酶 II。经硫酸铵沉淀浓缩,保存于液氮中。以上实验均在2℃进行。酶的比活为25单位/毫克蛋白。对鹅膏蕈碱极为敏感,1微克/毫升的鹅膏蕈碱几乎全部抑制其酶活力。

2. 小鼠肝 RNA 聚合酶 II 的测活系统

50mM Tris-HCl (pH7.9), 50mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MnCl₂, 5mM 巯基乙醇,小牛胸腺 DNA 10微克,GTP,CTP, UTP 各0.33mM, ³H ATP 2微居里(29 居里/毫克分子),酶0.042单位,反应总体积0.1毫升。37℃保温30分钟,用纸片法作放射性计数测定。

3. 大肠杆菌 RNA 聚合酶测活系统

40mM Tris-HCl (pH7.9),10mM MgCl₂, 5mM 巯基乙醇 GTP、CTP、UTP 各0.33mM, 小牛胸腺 DNA10 微克, ³H-ATP 2 微居里,酶0.9单位,反应总体积0.1毫升,37℃保温15分钟,用纸片法作放射性计数测定。

4. DNA 热变性 将小牛胸腺 DNA 溶于10mM tris-HCl (pH8.0) 缓冲液中,浓度为1毫克/毫升,100℃水浴加热5分钟,迅速在冰水浴中冷却30分钟。

大肠杆菌 RNA 聚合酶, 小牛胸腺 DNA 均为本所生化试剂厂提供, M₁₃噬菌体 DNA 由本室蒋美岩提供,精胺及精脒均为瑞士产品。

二、结 果

1. 多胺对体外转录的影响 以双链 DNA 为模板,分别利用小鼠肝 RNA 聚合酶 II 和大肠杆菌 RNA 聚合酶作体外转录、在转录系统中加入不同浓度的多胺,它们对 RNA 体外合成的影响如表1所示。从表1看出,在 RNA 聚

表 1 多胺对体外转录的影响

多胺	浓度 (mM)	相 对 参 入 %	
		小鼠肝 RNA 聚合酶II	大肠杆菌 RNA 聚合酶
对照	0	100	100
	0.2	—	179
	0.5	161	192
	1.0	202	85
	2.0	328	37
	5.0	396	25
	10.0	377	—
精脒	0.2	—	121
	0.5	94	144
	1.0	119	225
	2.0	173	223
	5.0	251	189
	10.0	258	—

合酶 II 催化的转录反应中,浓度为 1—10mM 的精胺及 5—10mM 的精脒,对 RNA 的合成有较大的激活作用,可激活 2—4 倍。在大肠杆菌 RNA 聚合酶催化的转录反应中,浓度为 0.2—0.5mM 的精胺及 1—5mM 的精脒激活作用最大,可激活 1—3 倍。这一结果与文献报道的基本一致^[5,7]。另一方面在实验浓度范围内,精脒对这两种酶参与的转录反应有较强的激活作用,而精胺浓度在 1—5mM 时只对 RNA 聚合酶 II 参与的转录反应有强的激活作用,对大肠杆菌 RNA 聚合酶参与的转录反应却有强的抑制作用。

2. 多胺对 RNA 体外合成反应动力学过程的影响 图 1(A, B) 表明以小牛胸腺 DNA 为模板无论是小鼠肝 RNA 聚合酶 II 还是大肠杆菌 RNA 聚合酶参与的 RNA 体外合成反应,在有精胺与缺少精胺时,都表现出相似的动力学过程,随反应时间的加长,放射性掺入逐渐升高;不同的是,有精胺比缺少精胺时 RNA 合成的水平较高。这反映了多胺能使 RNA 合成的起始速率或起始位点的数目增加。

3. 多胺对不同构象 DNA 为模板的体外转录的影响 在大肠杆菌 RNA 聚合酶参与的转录反应中,精胺对三种不同构象 DNA 为模

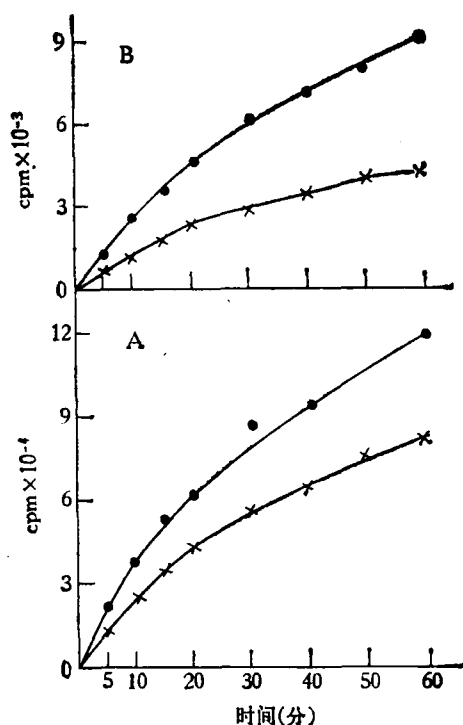


图 1 精胺对 RNA 体外合成动力学过程的影响

A: 小鼠肝 RNA 聚合酶 II (精胺 2mM)
B: 大肠杆菌 RNA 聚合酶(精胺 0.5mM)
●——· 加精胺 ×——× 不加精胺

板的体外转录的影响极为不同(图 2)。以双链 DNA 为模板时,浓度为 0.5mM 的精胺对转录有激活作用,在 1—5mM 时有明显的抑制作用。以变性的单链 DNA 为模板的转录,精胺对其无激活作用。以噬菌体 M₁₃ 单链环状 DNA 为模板的转录,精胺浓度达 5mM 时仍看不出抑制作用。在小鼠肝 RNA 聚合酶 II 参与的转录反应中(图 3),精胺对双链 DNA 为模板的体外转录激活效果显著,浓度达 10mM 时仍有一定的激活作用。精胺对以热变性单链 DNA 为模板的转录无明显影响,而对以单链环状 DNA 为模板的转录有较小的影响,在浓度为 0.5—2mM 时仅有 10% 左右的激活作用。10mM 的精胺对单链和单链环状 DNA 为模板的转录稍有抑制作用。

3. 无多胺时 DNA 模板对 RNA 聚合酶体外转录的影响 无精胺时,用小鼠肝 RNA 聚合酶 II 进行体外转录,变性 DNA 及 M₁₃ 噬菌

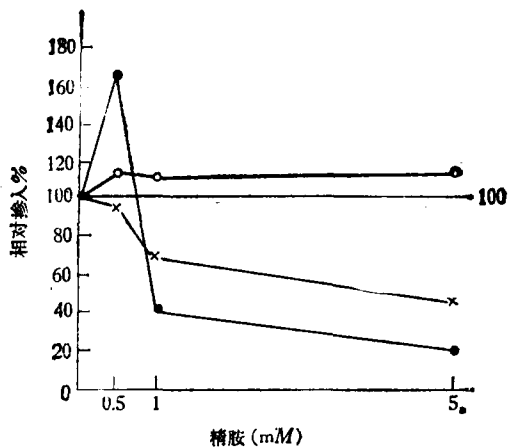


图2 精胺对不同构象 DNA 为模板大肠杆菌 RNA 聚合酶 II 体外转录的影响
 ·——· 双链DNA; ×—× 变性DNA; ○—○ M₁₃ DNA

体 DNA 的模板能力比天然 DNA 的模板能力高十倍以上。用大肠杆菌 RNA 聚合酶作体外转录时,变性 DNA 与天然 DNA 的模板能

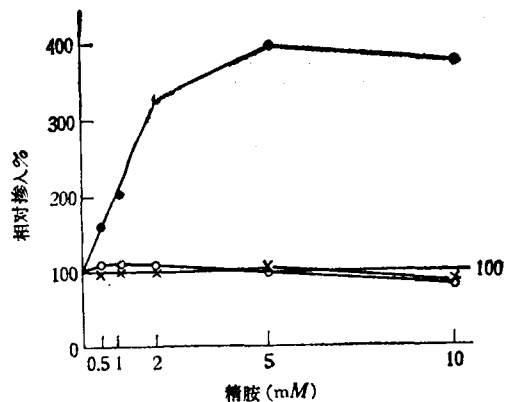


图3 精胺对不同构象 DNA 为模板小鼠肝 RNA 聚合酶 II 体外转录的影响
 ·——· 双链 DNA; ×—× 变性DNA; ○—○ M₁₃ DNA

力相近,而 M₁₃ DNA 的模板能力略低于天然 DNA (见表 2)。这表明两种 RNA 聚合酶对 DNA 模板的利用能力相差甚大,它们的转录活性有差异。

表2 无多胺时 DNA 模板对 RNA 聚合酶 II 体外转录的影响

DNA \ 聚合酶	大肠杆菌 RNA 聚合酶		小鼠肝 RNA 聚合酶 II	
	实验 1(cpm)	实验 2(cpm)	实验 1(cpm)	实验 2(cpm)
天然小牛胸腺 DNA	17319	15561	1394	1315
变性小牛胸腺 DNA	16868	16175	16540	17852
M ₁₃ 噬菌体 DNA	14433	13558	14679	15962

三、讨 论

许多研究表明^[4],多胺与核酸和含有核酸结构的核蛋白体、病毒等相互作用,其阳离子与核酸的磷酸基团上的负电荷相结合,可以稳定核酸的结构。不少人认为在转录过程中,多胺具有双重作用,即生理浓度或较低浓度的多胺刺激新合成的 RNA 链延长,并增加转录起始;而高浓度的多胺抑制 RNA 链的起始^[5,7]。转录过程中,多胺改变了 DNA 模板及新生 RNA 链的二级结构,延长了 DNA-聚合酶-RNA 复合物的存在时间,防止了 RNA 过早地从复合物中脱落下来,从而增加了新生 RNA 链的长度。另

外,由于 DNA 结构改变,暴露出更多的转录起始位点;RNA 结构的改变,阻止了聚合酶与 RNA 链的非特异性结合。这两种原因都导致更多的聚合酶分子结合到 DNA 模板上,从而增加了 RNA 的合成能力。最近有人报道^[11],外源性多胺不增加 RNA 合成,只是减缓降解,即多胺可保护 RNA 免受核糖核酸酶的作用。图 1 表明,有精胺时 RNA 合成水平比缺少精胺时高,这正是 RNA 起始速率或起始位点数目增加的一种反映。多胺的抑制作用,则可能是由于 DNA 链的结构变化,堵塞了 DNA 链上的起始位点。

Abraham 曾报道^[5],多胺能激活大肠杆菌

RNA 聚合酶参与的以双链 DNA 为模板的 RNA 体外合成,但却抑制热变性单链 DNA 为模板的 RNA 合成。我们的实验结果表明,模板构象的不同,精胺对其影响也很不相同。在一定精胺浓度范围内,无论用哪种聚合酶进行体外转录,精胺对以天然 DNA 为模板的转录有明显的激活作用,而对以变性 DNA 和 M_{13} DNA 为模板的转录影响较小。尽管两种聚合酶的模板专一性不同,但是,精胺影响转录的效应却是相似的。这说明精胺的作用主要与 DNA 模板的构象有关,而与聚合酶的关系不大。

从表 1 看出,以双链 DNA 为模板时,1—5mM 的精胺对这两种聚合酶所参与的转录反应的影响截然不同,除了反应条件不同外,这种差异似乎与聚合酶有一定关系。但是,有必要指出,在大肠杆菌 RNA 聚合酶体外转录系统中,当精胺浓度高于 1mM 时,透明的反应液变成微弱的乳白色,这说明,由于精胺的作用,出现了 DNA 或核苷酸类物质的团聚,这样便降低了反应系统的转录能力,致使放射性掺入减少。

值得注意的是,多胺与肿瘤的发生及其临

床诊断密切相关^[7,11,12],因此,多胺影响生命过程的作用机理有待深入研究。

本所生化试剂厂王淑娟、刘中昌帮助提取 RNA 聚合酶 II,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Sakai, et al.: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 17, 15, 1976.
- [2] Tabor, C. W. et al.: *Annual review of biochemistry*, 45, 285, 1976.
- [3] Wallace, H. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 652, 345, 1981.
- [4] Abraham, A. K. et al.: *Trends in biochemical Sciences*, 6, 106, 1981.
- [5] Abraham, A. K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 5, 143, 1968.
- [6] Samson, F. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 425, 125, 1976.
- [7] Olli, Janne, et al.: *Biochem.*, 14, 3589, 1975.
- [8] Roeder, R. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 65, 675, 1970.
- [9] 郝检林等:《实验生物学报》, 15(1), 71, 1983.
- [10] 韩玉珉等:《遗传》, 3(4), 11, 1931.
- [11] 虞性:《中华肿瘤杂志》, 3, 228, 1981.
- [12] 焦炳华:《生命的化学》, 3(4), 5, 1983.
- [13] Goyns, M. H.: *J. Theor. Biol.*, 97, 577, 1982.

[本文于 1983 年 2 月 8 日收到]

异种动物免疫 RNA 对小鼠脾淋巴细胞 cAMP 和 cGMP 的影响

赵 富 清

(海军军医学校生化教研室,南京)

从免疫宿主的淋巴样细胞中提取的免疫核糖核酸 (iRNA), 能在体内外传递特异的免疫反应,使正常淋巴细胞转变为对特异抗原起反应的效应细胞。但是 iRNA 的作用机制目前还不十分清楚。经 iRNA 致敏后淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的变化,目前也尚未见报道。为探讨 iRNA 的作用机制,本实验用异种动物 iRNA 使小鼠脾淋巴细胞致敏,然后测定致敏淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的变

化。还作了细胞介导细胞毒性实验,发现 iRNA 引起淋巴细胞内环型核苷酸水平的改变;这种改变与其传递细胞免疫功能有一定关系。

一、材料与方法

1. 实验动物 LACA 纯种小白鼠,雄性,18—22 克,2—3 月龄。山羊,雄性,3 岁。

2. 药品 DNase、DNA 钠盐(英国)Pronase (Merck)、聚乙酰硫酸钾盐 (PVS)(德国),DL-