

硒对培养的大鼠肝细胞核糖体相关蛋白质的影响*

阎小君** 李广元

(西安医科大学中西医结合研究所, 西安 710032)

关键词 硒, 核糖体相关蛋白质

硒作为人体必需微量元素之一, 一方面以有机硒的形式组成体内许多具有重要生物功能的结构; 另一方面, 又以无机硒的形式发挥重要的生理功能。近年来, 尽管硒与生物大分子合成的关系颇受重视, 但存在不少问题。其研究结果既有不一致现象, 又觉不够深入。本文采用在不同浓度硒的条件下体外培养大鼠肝细胞, 观察和探讨了硒对肝细胞核糖体相关蛋白质含量的影响。核糖体相关蛋白质是指蛋白质合成过程中, 结合在核糖体上的各种调节因子(如起始因子, 延长因子和终止因子), 这些因子可以用盐溶液洗脱下来, 再用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀便得到粗制品。由于上述因子对蛋白质的合成至关重要, 因而研究硒对核糖体相关蛋白质的影响有利于阐明硒在蛋白质合成中的作用。

实验主要步骤如下: 无菌条件下取出出生 3 天内的大鼠肝脏, 用机械挤碎法(另文报告)

获取肝细胞悬液。首次换液后按培养基中硒含量(依次为 0, 2.9, 5.7, 7.6, 12.7 $\mu\text{mol/L}$) 分组, 然后继续培养 2—15 天。按不同培养时间收获细胞。将收获的细胞($1-5 \times 10^9$ 细胞)用细胞破碎液作用 30min, 然后在 5000r/min 和 $15000 \times g$ 离心, 弃沉淀, 上清经 $165000 \times g$ 离心 1h, 沉淀即为核糖体。用缓冲液溶解核糖体沉淀, 并充分搅拌以使结合在核糖体上的调节因子脱落, 然后在 $260000 \times g$ 离心 30min, 弃沉淀, 并向上清中加入 40% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 收集蛋白质沉淀称之为核糖体相关蛋白质 A 部分; 使上清中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的饱和度达 70%, 所得沉淀部分称为核糖体相关蛋白质 B 部分。A, B 两部分分别经 Sephadex G-150 和 G-75 层析, 各得两个吸收峰。将各部分蛋白质浓缩后做 SDS-PAGE 电泳, 凝胶板用薄层层析扫描仪定量。

表 1 加硒第 8 天时各培养细胞组核糖体相关蛋白质的含量

吸收峰(单位为 A_{280})		培养基中硒含量 ($\mu\text{mol/L}$)				
		0	2.9	5.7	7.6	12.7
A 部分	吸收峰 I	1.41(9)	1.72(10)	2.49(13)	2.27(12)	1.09(8)
	吸收峰 II	0.22(6)	0.23(6)	0.31(6)	0.29(6)	0.24(6)
B 部分	吸收峰 I	0.56(5)	0.79(6)	1.21(7)	1.07(7)	0.48(5)
	吸收峰 II	0.13(3)	0.11(3)	0.16(3)	0.14(3)	0.17(3)

括号内数字表示各部分蛋白质在 SDS-PAGE 电泳时显现的条带数

实验结果表明(见表 1): 加硒后培养第 5 天便可观察到核糖体相关蛋白质 A 部分的吸收峰 I(主要为起始因子 3)和 B 部分的吸收峰 I

(下转第 253 页)

* 国家自然科学基金资助项目。

** 第四军医大学生化教研室。

患者,两例患者都是由于在 F VIII 基因的第 14 个外显子中插入了一段 L₁ 序列^[20](L₁ 序列是人基因组中特异的一类长而散置的重复顺序,总长 6.1 kb,它由富含 A 的 3' 端和两个开放阅读框组成)。

目前,对血友病患者分子水平诊断有两种方法。首先,我们可以用特异的基因探针直接检测突变的基因,根据限制性内切酶的切点数目和片断长短的变化来诊断分析。如上述基因点突变使 Arg-2209 的密码变为 TGA, TaqI 的识别位点消失,用 TaqI 酶切时,患者只产生一个 4.2kb 的 DNA 片段,而正常人会出现 1.4kb 和 2.8kb 两个片段。另外一个分析 F VIII 基因缺陷的方法是采用限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP),可利用与 F VIII 基因串联的其它 DNA 片段进行 RFLP 分析。最近 Kogan 等人采用 PCR 的放大技术成功地对血友病患者 F VIII 基因结构进行了研究,并进行了遗传诊断和产前诊断。随着对 F VIII 研究的深入发展,我们将会得到更多的关于血友病患者分子水平的信息,并为诊断和治疗血友病提供更有效的方法。

参 考 文 献

1 Kane W H, Davie E W. *Blood*, 1988; 71: 539

- 2 Fay P J. *Arch Biochem Biophys*, 1988; 262: 525
- 3 Truett M A, Blacher R, Burke R L *et al. DNA (NY)*, 1985; 4: 333
- 4 Toole J J, Knapf J L, Wozney J M *et al. Nature*, 1984; 312: 342
- 5 Gitschier J, Wood W I, Goralka T M *et al. Nature*, 1984; 312: 326
- 6 Wood W I, Capon D J, Simonsen C C *et al. Nature*, 1984; 312: 330
- 7 Eaton D, Rodriguez H, Vehar G A. *Biochemistry*, 1986; 25: 505
- 8 Eaton D L, Hass P E, Riddle L *et al. J Biol Chem*, 1987; 262: 3285
- 9 Kaufman R J, Wasley L C, Dorner A. *J Biol Chem*, 1988; 263: 6352
- 10 Vehar G A, Keyt B, Eaton D *et al. Nature*, 1984; 312: 337
- 11 Fars D N, Hewick R M, Knutson G J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 1688
- 12 Wion K L, Kelly D, Summerfield J A *et al. Nature*, 1985; 317: 726
- 13 Takahashi Y, Kelafatis M, Girma J P *et al. Blood*, 1987; 70: 1679
- 14 Fulcher C A, Gardiner J E, Griffin J H *et al. Blood*, 1984; 63: 486
- 15 Pavirani A, Meulien P, Harrer H *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 145: 234
- 16 Nordfang O, Ezban M. *J Biol Chem*, 1988; 263: 1115
- 17 White G C, Shoemaker C B. *Blood*, 1989; 73: 1
- 18 Yousoufian H, Antonarakis S E, Bell W *et al. Am J Hum Genet*, 1988; 42: 718
- 19 Bardoni B. *Hum Genet*, 1988; 79: 86
- 20 Kazazian H H, Wong C, Yousoufian H *et al. Nature*, 1987; 332: 165

【本文于1990年4月29日收到,7月6日修回】

(上接第 304 页)

(主要为起始因子 2 和 5) 随硒浓度变化而变化;而 A 部分的吸收峰 II(主要为起始因子 4B) 和 B 部分的吸收峰 II(主要为起始因子 1, 4A, 4C 和 4B) 在本研究的各时期及各组之间均变化不明显。当加硒量为 2.9—7.6 μmol/L 时,核糖体相关蛋白质 A, B 两部分的吸收峰 I 的含量及其蛋白带的数量均随硒量增加而增加,且都比不加硒组要高;但当加硒量大于 7.6 μmol/L 时则出现下降趋势。硒对核糖体相关蛋白质 A, B 两部分吸收峰 I 的上述影响在加硒后第 8 天的表现最明显,但在加硒第 12 天后,上述

变化有所缓和并保持平稳。说明硒对核糖体相关蛋白质的影响有一个显露,明显和平稳的过程。从而也提示,在一定程度内,机体对长期缺硒和过量硒有适应性。由于核糖体相关蛋白质中含有蛋白质合成所必需的各种调节因子,因而在缺硒或硒中毒的条件下,核糖体相关蛋白质的这一变化无疑会直接影响蛋白质的正常合成。本研究还证明,细胞微环境中硒浓度在 5.7—7.6 μmol/L 时,较适合于细胞的生长代谢。

【本文于 1991 年 2 月 21 日收到,4 月 13 日修回】