

- 10 Righetti P G. Immobilized pH gradients: theory and methodology. Amsterdam: Elsevier, 1990: 119—139
- 11 Lucia P S. Electrophoresis, 1988; 9: 1602
- 12 李宝森, 胡宝庆. 遗传学. 天津: 南开大学出版社, 1991; 469—516
- 13 Righetti P G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Amsterdam: Elsevier, 1983: 1—6
- 14 郭尧君. 生物物理学报, 1988; 4 (4): 389
- 15 黄力力, 喻忠义, 许博博. 中国法医学杂志, 1993; 8 (4): 211
- 16 Smith T A. Journal of Forensic Sciences, 1990; 35 (6): 1436
- 17 Kamboh M I. Human Genetics, 1984; 67: 378

用 RNase 保护试验检测珠蛋白基因表达*

刘庆辉 刘德培 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 mRNA 的定量分析是基因表达调控研究中应用的重要方法. 与斑点杂交、RNA 印迹法相比, 用 RNase 保护试验测定 RNA 具有灵敏度高、操作简便等优点. 应用 RNase 保护试验成功地对转基因鼠中人 β E-珠蛋白基因及鼠 α -珠蛋白基因的表达水平进行了分析.

关键词 RNase 保护试验, 珠蛋白基因, 转基因小鼠

同位素标记的 RNA 探针可以象 DNA 探针一样用于分子杂交实验, 从而对特异性 RNA 含量进行测定并可对基因和 mRNA 的结构进行分析^[1-3]. RNase 保护试验(RNase protection assay)就是一种利用 RNA 探针对基因表达产物 RNA 进行定性定量分析的有效方法. 图1是该方法的操作原理示意图. 向待测 RNA 溶液中加入过量的反义 RNA 探针, 互补的部分形成 RNA*:RNA 杂交分子. 经 RNase 选择性水解去除未形成 RNA*:RNA 杂交双链的单链使成单核苷酸. 测定未被 RNase 水解的 RNA* 探针的长度及含量, 即可对待测 RNA 进行定量和定性分析.

RNase 保护试验灵敏度极高, 可以检测出 0.1pg 水平的 mRNA^[3]. 由于用 RNase 水解 RNA*:RNA 杂交反应中单链 RNA 产生的假带较用 S1 水解 RNA:DNA 反应中单链核酸产生的假带少, 所以该方法逐渐成为检测 RNA 的一种标准化方法. 本文结合转基因小鼠中珠蛋白基因表达水平检测对 RNase 保护试验作一介绍.

1 材料与方法

1.1 材料

异硫氰酸胍 (GIT), 氯化铯 (CsCl) 和丙烯酰胺为美国 BRL 公司产品, 限制性内切酶 EcoR I, BamH I 等为中国协和医科大学友谊公司产品, 体外转录试验试剂盒 (Riboprobe Gemini) 为美国 Promega 公司产品, RNaseA, RNaseT1, 酵母 RNA 均为华美公司产品.

溶液配制:

GIT 缓冲液: 称取 94.53g GIT, 加 1.67ml 3mol/L 醋酸钠 (pH6.0), 加水至 200ml, 0.2 μ m 滤器过滤后加入 1.67ml 巯基乙醇.

CsCl 缓冲液配制: 称取 95.97g CsCl, 加入 0.83ml 醋酸钠 (pH6.0), 加水至 100ml, 过滤.

洗脱缓冲液: 取 1.67ml 3mol/L 醋酸钠和 2.0 μ l 0.5mol/L EDTA, 加水至 10ml, 消毒后 -20℃ 冻存.

* 863 计划资助项目.

收稿日期: 1993-06-25, 修回日期: 1993-09-07

4×杂交缓冲液：取3.2ml 5mol/L NaCl, 0.4ml 2mol/L Tris-HCl (pH7.4), 80μl 0.5mol/L EDTA 及20% SDS 0.2ml, 补水至10ml, -20℃冻存. 1×杂交缓冲液临用前配制, 将1份4×杂交缓冲液与3份甲酰胺混合, 65℃水溶液使 SDS 充分溶解.

RNase 反应缓冲液: 600μl 5mol/L NaCl, 50μl 2mol/L Tris-HCl (pH7.4) 及 100μl 0.5mol/L EDTA, 加水至10ml, -20℃冻存.

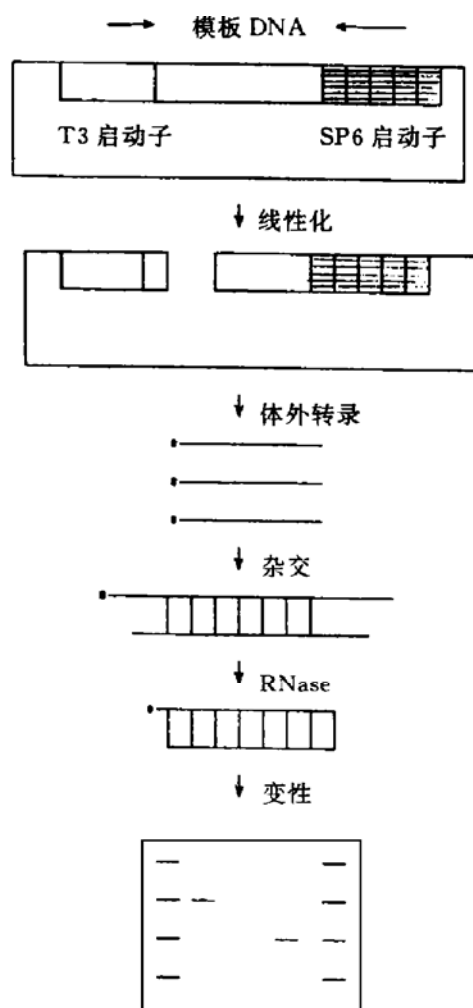


图1 RNase 保护试验示意图

1.2 方法

1.2.1 鼠肝脏组织及人网织红细胞 RNA 制备 取新鲜或冻存的肝脏或网织红细胞, 加入 GIT 缓冲液后在匀浆器 (tissuemizer) 上匀浆, 60%速度, 15s, 共3次. 向5ml 离心管中加入 1.7ml CsCl 缓冲液, 上覆2ml 组织匀浆, 再用

GIT 缓冲液充满离心管. 于20℃, 35 000r/min 离心20h; 离心毕, 小心倾出管内全部液体; 底部沉淀即为 RNA. 用0.3mol/L NaAC 100μl 溶解该沉淀并转移至 Eppendorf 管中, 重复洗管底两次, 合并 RNA 溶液, 加入 750μl 预冷无水乙醇, 于-70℃冻存20min, 于4℃, 15 000r/min 离心10min, 弃上清, 以300μl 80%乙醇沉淀1次, 冷冻抽干 RNA 沉淀, 将沉淀溶于50—100μl 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水中, 取部分于260nm 读取 A 值, 计算 RNA 含量; 其余部分分装冻存于-70℃.

1.2.2 同位素标记 RNA 探针制备

a. 体外转录模板的制备 用 BamH I 水解质粒 pSP6ma, 用 EcoR I 水解 pT3hβ, 分别得到线性化模板, 利用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收模板 DNA, 溶解至适量 TE 缓冲液中使终浓度达1μg/μl.

b. 体外转录标记 RNA 探针 探针标记应用 Promega 公司 Riboprobe Gemini 试剂盒; [α-³²P]UTP 为北京福瑞公司产品, 操作如表1.

表1 RNA 探针标记

依次加入试剂	(μl)	
	ma	mβ
5×缓冲液	4	4
DTT	2	2
RNasin	0.8	0.8
NTPs (2.5mmol/L) A. C. G. ¹⁾	4	4
UTP (240μmol/L)	1.5	1.5
pSP6ma/BamH I (1μg/μl)	1	
pT3hβ/EcoR I (1μg/μl)		1
[α- ³² P] UTP	5	5
SP6 RNA 聚合酶	1	
T3 RNA 聚合酶		1

37℃反应1h. ¹⁾A: ATP, C: CTP, G: GTP.

c. RNA 探针的纯化 在体外转录过程中, 有少量不均一产物合成, 会对 RNA*·RNA 杂交结果产生干扰, 需通过将上述转录产物在4%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离; 泳毕, 放射

自显影1—2min, 冲出 X 光片, 切下探针所在位置相应的凝胶块, 置于 Eppendorf 管中, 用 Tip 研磨至糊状, 加入 0.5ml 洗脱缓冲液, 37℃ 保温 30min; 4℃ 10 000r/min 离心 2min, 转移上清至 Eppendorf 管中, 并计数上清及沉淀中的放射活性, 上清应明显高于沉淀中的放射活性. 用酚/氯仿抽提上清一次; 取 2 μ l 上清, 用液闪仪测定其放射活性; 其余部分分装后 -20℃ 冻存.

1.2.3 RNase 保护试验^[4,5]:

a. RNA⁺:RNA 杂交反应 取肝组织 RNA 10 μ g (或网织红细胞 RNA 10ng) 与 10 μ g 酵母 tRNA 混合, 加入 h β RNA⁺ 探针 2×10^5 cpm, maRNA⁺ 探针 1×10^5 cpm, 20 μ l 1.3mol/L NaAC, 200 μ l H₂O, 混匀后加入 500 μ l 乙醇, 于 -70℃ 冻存 20min 后, 于 4℃, 15 000r/min 离心 10min, 比较上清及沉淀中的放射活性, 这时, 放射活性应主要集中在沉淀中. 70% 乙醇洗沉淀一次后冷冻干燥沉淀. 用 18 μ l 1 $\times$ 杂交缓冲液充分溶解沉淀, 于 55℃ 水浴中保温过夜.

b. RNase 酶解反应 向上述杂交反应管中加入 150 μ l RNase 反应缓冲液, 1 μ l RNase T1, 8 μ l RNase A, 室温反应 30min 后加入 5 μ l 蛋白酶 K (10mg/ml), 10 μ l 20% SDS, 37℃ 反应 15min, 酚/氯仿抽提一次, 取上清.

c. 电泳分离及放射自显影 向上清中加入 400 μ l 乙醇, 沉淀 RNA, 用 70% 乙醇洗沉淀两次, 检测上清及沉淀中放射活性, 这时上清中放射活性应比 RNase 作用前有明显增加, 但主要放射活性仍应集中在沉淀中. 抽干沉淀, 向沉淀中加入 15 μ l 含甲酰胺的测序上样缓冲液, 充分溶解沉淀, 取 4 μ l, 95℃ 变性 3min, 置冰浴上. 在 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离. 泳毕, 将凝胶转移至 3MM 滤纸上, 上覆保鲜膜, 80℃ 真空干燥 40min. 于 -70℃ 放射自显影 10—20h.

2 结果与讨论

2.1 RNA 电泳 利用 CsCl 超速离心方法提

取鼠肝细胞 RNA, 经电泳分析证实 RNA 无降解 (图2), 可以进一步用于 RNase 保护试验分析.

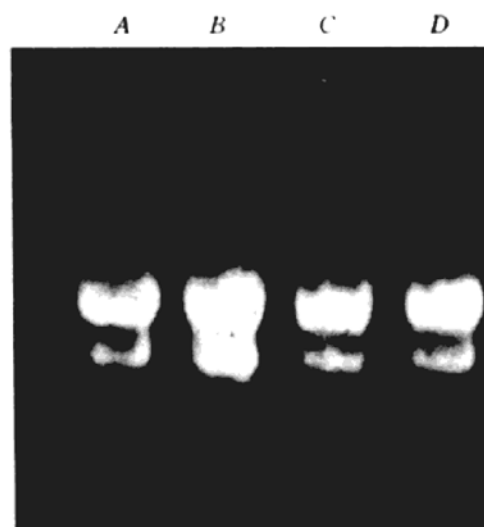


图2 RNA 电泳

A, B, C, D 均为提取的 RNA 样品.

2.2 RNA 探针纯化 合成 RNA 探针的 DNA 模板需在临用前纯化, 否则会影响 RNA 合成效率及均一性. 探针合成纯化如图3.

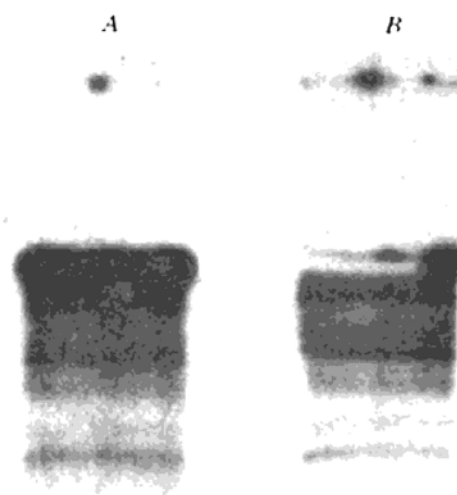


图3 RNA 探针纯化

A: 切取凝胶块前放射自显影; B: 切取凝胶块后放射自显影.

2.3 RNase 保护试验 对6只人 β E 珠蛋白基因转基因小鼠的 RNA 进行分析, 利用 h β RNA 探测人 β E 基因的表达; 利用 maRNA 探测鼠内源 α 基因的表达, 作为内对照. 结果发现在

三个带有红系增强子的人 βE 基因转基因鼠中 (5' HS2 βE), 均有人 βE 基因表达, 表达水平分别为内源鼠 α -基因的 79.7%, 88.3% 和 107%, 而在另一组只整合有单纯人 βE 基因的转基因 (βE) 鼠中未检测到人 βE 基因的表达。

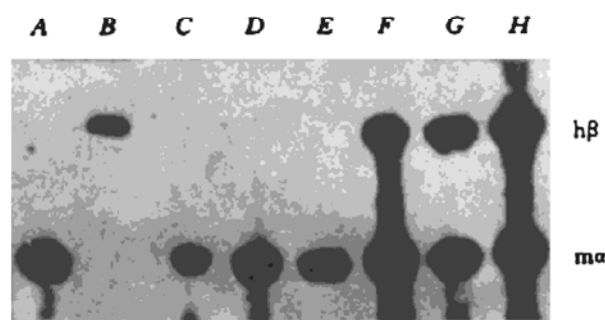


图4 RNase 保护试验

A: 鼠 α -珠蛋白 mRNA; B: 人 β -珠蛋白 mRNA;
C, D, E: βE 转基因小鼠; F, G, H: 5' HS2 βE
转基因小鼠。

2.4 讨论

2.4.1 核酸酶对 RNA 的降解作用是影响 RNA 质量从而影响 RNase 保护试验结果的重要因素, 因此需尽力排除核酸酶污染的可能性。

2.4.2 体外转录反应中, 各组分按表 1 所列逐次加入, 但反应管需在室温放置, 因冰上操作会导致反应物沉淀, 影响反应效率。

2.4.3 合成后的探针应分装后 -20°C 冻存, 并尽快用于杂交反应。

2.4.4 在 RNA:RNA 杂交反应中, 需设置针对所用各个探针的阳性及阴性对照, 排除交叉杂交的可能性。

2.4.5 ^{32}P -UTP 或 ^{32}P -GTP 的供应不便是 RNase 保护试验应用的主要限制, 如能及时解决这一问题, RNase 保护试验不失为一种有效的分析 RNA 的方法。

参 考 文 献

- 1 Lynn D A, Angerer L M, Bruskin A M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1983; 80: 2656
- 2 Zinn K DaMaio D, Maniatis T *et al.* Cell, 1983; 34: 865
- 3 Melton D A, Krieg P A, Rebagliati M R *et al.* Nucl Acid Res, 1984; 12: 7034
- 4 Curtin P T, Liu D, Liu W *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 7082
- 5 Liu D P, Chang J C, Moi P L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 3899

小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法

荣征星 刘慧中* 鲍景奇 陈红专 孙玉燕 孙 琛

(上海第二医科大学药理学教研室, 上海 200025)

摘要 报道了用分光光度计法直接测定小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX 活力的方法。取血样 10 μl , 423nm 为测定波长, 三氯醋酸为蛋白沉淀剂, 在 pH6.5, 3min 的酶反应条件下, 反应剩余的谷胱甘肽和其与 DTNB 试剂反应生成的颜色产物成线性相关。该法灵敏度高, 重复性好, 所需仪器简单, 可成为科研及临床研究工作中分析全血中 GSH-PX 的重要方法之一。

关键词 谷胱甘肽过氧化物酶, 分光光度法, 分析

1957年 Mills 等首先发现谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)^[1], 1973年 Rotruck 等证明 GSH-PX 为含硒酶^[2],

1978年 Frostrom 等证实 GSH-PX 的活性中心

* 上海市长宁区中心医院。

收稿日期: 1993-07-20, 修回日期: 1993-12-20

It has been reported that angiotensin I (A I) has antioioid effect. However, the mechanism of this action is still not understood. To evaluate a possible interaction on c-fos protooncogene expression between A I and DPDPE (δ receptor agonist) or NDAP (κ receptor agonist), the changing patterns of Fos protein in rat brain (less cortex and cerebellum) tissue induced by them were determined by immunoprecipitation. The results indicated that A I at $0.1 \mu\text{mol/L}$ markedly evoked the Fos protein expression in brain tissue. Meanwhile, both DPDPE ($0.1 \mu\text{mol/L}$) and NDAP ($0.1 \mu\text{mol/L}$) could induce Fos protein increase in brain although their effects were less than that induced by A I. The levels of Fos protein expression by A I plus DPDPE or NDAP are lower than that induced by A I individually. It is suggested that the action on c-fos expression between A I and opioids is antagonistic. And opioids may weaken the evoked action of A I on c-fos expression in the brain.

Key words Fos protein, brain, angiotensin I, opioids

Determination and Analysis of Pig Brain Gangliosides. Pan Ying, Huang Rubin, Wang Zesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 353—355
Gangliosides are one of the glycosylceramides, which are particularly abundant in the central nervous system of vertebrates. The content and components of pig brain Gls were detected. There were 0.0894% (W/W) Gls presented in the pig brain. It was about 0.39% (W/W) of total lipid. The main components were GM1, GD3, GD1a, GD1b and

GT1b. GM1 and GD1a of the pig brain were higher than that of human brain.

Key words gangliosides (Gls), pig brain, determination of content

Subtyping of the Gc System by Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang, Huang Lili, Yu Zhongyi. (Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 356—359

The distribution of Gc subtypes of 201 unrelated, healthy donors in the Han population in Beijing were investigated. Gc^{1F} is 0.3698, Gc^{1S} , 0.2812, Gc^2 , 0.3490. There was good agreement between the observed and the expected value. ($\Sigma x^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

Key words immobilized pH gradients, isoelectrofocusing, Gc subtypes of human serum, immunofixation

Determination of Globin Gene Expression by RNase Protection Assay. Liu Qinghui, Liu Depei, Liang Zhiquan. (Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 359—362

Quantitative analysis of mRNA is an important technique in the study of gene expression regulation. RNase protection assay shows higher sensitivity and easier operation than Dot blot and Northern blot. The expressions of human β E-globin gene and mouse α -globin gene in transgenic mice were successfully analyzed by RNase protection assay.

Key words RNase protection, globin gene, transgenic mice

Direct Micro Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Mice Blood. Rong