

微克/毫升,分装入无菌安瓿瓶中, -20℃ 下保存备用。

参 考 资 料

- [1] 上海市科学技术交流站:《上海科研单位成果展览会技术资料》, 1974 年。
- [2] 上海实验生物研究所, 上海第二医学院附属瑞金医院:《中华医学杂志》, 1975 年, 第 8 期, 第 463 页。
- [3] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组, 上海市第六人民医院检验组, 上海第一医学院中山医院同位素室:《生物化学与生物物理学报》, 1975 年, 第 1 期, 第 53 页。

- [4] 中国医科院肿瘤研究所免疫室:《肿瘤防治研究》, 1975 年, 第 1 期, 第 12 页。
- [5] 张先扬等:《生物化学与生物物理进展》, 1974 年, 第 2 期, 第 26 页。
- [6] Greeneuood, F. C., Hunter, W. M.: *Biochemical J.*, **89**, 114, 1963.
- [7] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理进展》, 1975 年, 第 3 期, 第 7 页。
- [8] 上海市肿瘤研究所, 上海市生物制品研究所:《1975 年上海市肿瘤防治研究资料选编》, 1976 年, 第 22 页。

[本文于 1976 年 8 月 27 日收到]

Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素的合成及其应用

上海实验生物研究所三室
上海试剂二厂核酸研究组

Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素具有分离信使 RNA(mRNA) 的功能。这是由于大多数的 mRNA 分子的 3'-末端含有多聚腺嘌呤核苷酸的片段(亦有例外, 如一类组蛋白的 mRNA), 在低温与高离子强度的条件下, 此片段能与多聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸或多聚尿嘧啶核苷酸形成互补的碱基配对, 而核糖核蛋白体 RNA(rRNA) 与转移 RNA(tRNA) 缺少多聚腺嘌呤核苷酸的片段, 不能被该树脂吸附, 利用这一特性可将 mRNA 与其它 RNA 分离开来。所以 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素已成为分离 mRNA 的有效工具。近年来随着国内分子生物学研究的进展, 如遗传工程、基因表达的调节控制、体外蛋白质合成等一系列工作都需要分离纯化 mRNA, 对 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素的需求更为迫切。为了填补我国这一空白, 我们与上海试剂二厂的工人同志一起试制了这两种树脂。产品经初步鉴定证明: 所合成的两种树脂都具有分离 mRNA 的功能, 分离所得的 mRNA 经麦胚无细胞体外合成蛋白质系统测定, 确实具有信使作用。

一、材料与方法

(一) 材料

5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸与 3'-尿嘧啶核苷酸由上海试剂二厂制备。

纤维素(Whatman 标准级), 预先于 100℃ 真空干燥过夜。

无水吡啶, 将市场上购买的吡啶用 3—5% 对甲基苯磺酸回流 2 小时, 然后蒸馏; 蒸馏液再加固体氢氧化钾(为吡啶量的 5—10%) 回流 2 小时, 再经蒸馏后用分子筛与氯化钙干燥备用。

(二) 合成方法

5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸吡啶盐或 3'-尿嘧啶核苷酸吡啶盐(2 毫克分子), 溶于吡啶中, 在真空泵下 30℃ 减压浓缩, 用无水吡啶脱水四

* 本文缩写:

Oligo(dT) 寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸

Oligo(U) 寡聚尿嘧啶核苷酸

Poly(A) 多聚腺嘌呤核苷酸

TMV-RNA 烟草花叶病毒的 RNA

PK 丙酮酸激酶

PEP 磷酸烯醇丙酮酸

S₂₀ 麦胚匀浆经 26,000g 离心的上清液

RNase 核糖核酸酶

次,加入预先在 P_2O_5 上真空干燥的双环己基羰二亚胺(4 毫克分子),然后再加无水吡啶调成稠浆状,密封避光,振荡 5 天,于第三天再添加双环己基羰二亚胺(2 毫克分子),以上无水操作须在干燥箱中进行。

振荡至第五天,在干燥箱内将 5 克纤维素粉与 2 克双环己基羰二亚胺加入反应样品中,并加无水吡啶直至可摇动为准(吡啶过多,易引起环化),密封避光,继续振荡 5 天,第三天时再加入 2 毫克分子双环己基羰二亚胺。振荡毕,加等体积蒸馏水终止反应,静置过夜;再用抽滤瓶过滤,纤维素用温酒精充分洗涤,去除双环己基脲,然后用水洗(未缩合的核苷酸的回收:合并洗涤液与过滤液,用石油醚抽提,去除过量的羰二亚胺,水相浓缩后去除吡啶,测 O. D. 267 毫微米,回收率约 40%)。

将纤维素装入柱中,用 2MKCl, 0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 洗涤,直至 O. D. 260 毫微米 <0.03 ,再用 4—5 倍柱体积的蒸馏水洗,然后抽滤收集纤维素,再用酒精洗涤(酒精浓度从 50% 递增至 100%),最后用乙醚洗涤,抽干,纤维素放入瓷盘中自然干燥。合成最大量为 100 克。

(三) 信使 RNA 的柱层分离方法

(1) 升温及降低离子强度 20 毫克总 RNA 在冰浴中溶解于 2 毫升重蒸馏水后,加入 0.5 毫升 2.5MKCl、0.05MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5)。Oligo(dT)-纤维素或 Oligo(U)-纤维素经 0.5MKCl、0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 浸泡后,装入夹套柱(45 厘米 $\times$ 1 厘米);在 4℃ 条件下用上述缓冲液充分平衡,直至 O. D. 260 毫微米没有读数之后滴加样品,仍用此缓冲液洗脱得峰 I,直至 O. D. 260 毫微米 <0.03 。然后升温至 54℃[Oligo(dT)-纤维素]或 45℃[Oligo(U)-纤维素],此时峰 II 亦就洗脱下来;直至 O. D. 260 毫微米 <0.03 ,再改用 0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 洗脱,所得峰 III 即为 mRNA,经 Sephadex G-25 脱盐,和冷冻干燥后备用。

(2) 直接吸附及降低离子强度 20 毫克总

RNA 在冰浴中溶解于 2 毫升重蒸馏水后,加入 0.5 毫升 25MKCl、0.05MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5)。5 克 Oligo(dT)-纤维素或 Oligo(U)-纤维素置于小烧杯中用 0.5MKCl、0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 反复浸泡多次之后,将缓冲液尽量吸去,再把样品液加入,与树脂充分混和后放置冰箱 3—4 小时。过后在室温中装柱,用 0.5MKCl、0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 充分洗脱;直至流出液 O. D. 260 毫微米 <0.03 ,再改用 0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 洗脱,此峰为 mRNA,经 Sephadex G-25 脱盐和冷冻干燥后备用。

(3) 树脂再生方法 一般用过的树脂经 5 倍柱体积的 2MKCl、0.01MTris-HCl 缓冲液 (pH7.0) 洗涤后,再用 5—10 倍柱体积的蒸馏水洗,然后再用酒精、乙醚干燥备用。如使用过的树脂沾污蛋白类物质较多,可用 0.05MKOH 处理后,再照上述步骤洗涤。Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素再生后可反复使用。但必须在低温、干燥的条件下保藏。我们曾反复使用过 3—4 次后仍未发现此树脂吸附能力有明显降低。

二、结果与讨论

(一) Oligo (dT)-纤维素与 Oligo (U)-纤维素吸附多聚腺嘌呤核苷酸 [Poly(A)] 的能力

由于大多数的 mRNA 分子的 3'-末端含有多聚腺嘌呤核苷酸的片段,在低温与高离子强度的条件下,此片段能与这两种树脂结合。为了测定所合成的树脂这一能力,我们以 Poly(A) 作为标准样品,采用直接吸附法进行柱层分离的试验(图 1、2)。

以上实验表明:每克(干重)Oligo(dT)-纤维素能吸附 299 微克 Poly(A) (国外同类型产品曾有人测定为 160—200 微克/每克干重),每克(干重)Oligo(U)-纤维素能吸附 107 微克 Poly(A)。我们制备的 Oligo(dT)-纤维素吸附 Poly(A) 的能力比 Oligo(U)-纤维素为强。

我们采用升温及降低离子强度的方法测定

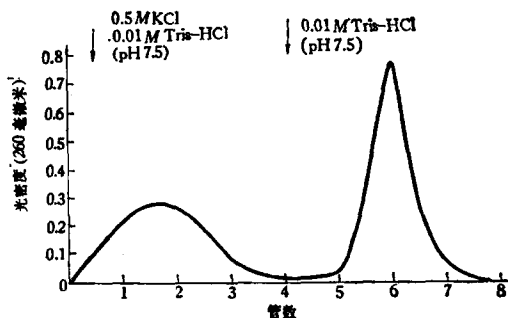


图1 Oligo(dT)-纤维素吸附 Poly(A) 的能力

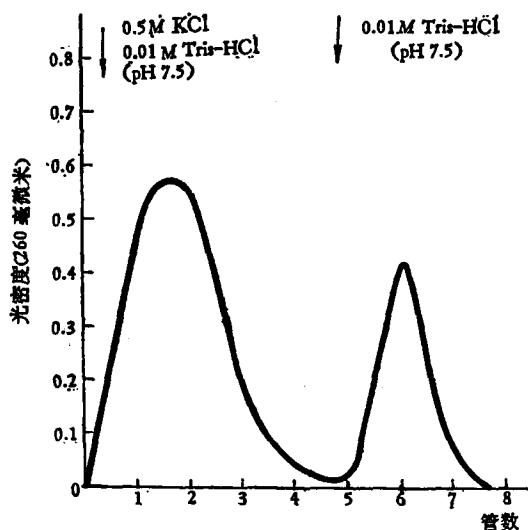


图2 Oligo(U)-纤维素吸附 Poly(A) 的能力

了新近合成的 Oligo(dT)-纤维素吸附 Poly(A) 的能力,结果表明: 每克(干重) Oligo(dT)-纤维素能吸附 706 微克 Poly(A)。该树脂经使用一次后再再生处理,再测定其吸附 Poly(A) 的能力,仍相当于原有水平。

(二) mRNA 的柱层析分离

我们从小牛肝、鼠肝的多聚核糖核蛋白体及兔网织红血球抽提的 RNA, 用 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素进行柱层分离,采用以下两种方法:

(1) 将 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素装入夹套柱, 用升温与降低离子强度的办法进行分离(图 3、4)。

结果表明,从几种不同组织提取的总 RNA, 无论用 Oligo(dT)-纤维素或用 Oligo(U)-纤维素进行柱层分离都可以获得三个峰, 第三个峰

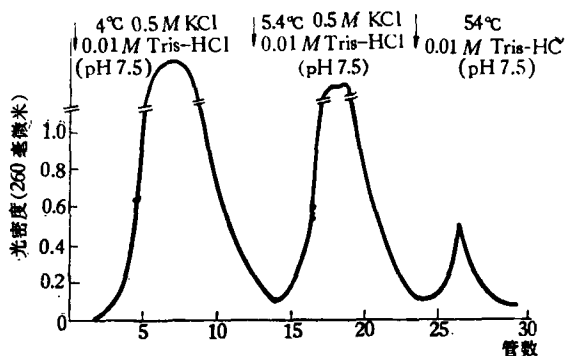


图3 网织红血球 RNA 的 Oligo(dT)-纤维素柱层分离图谱

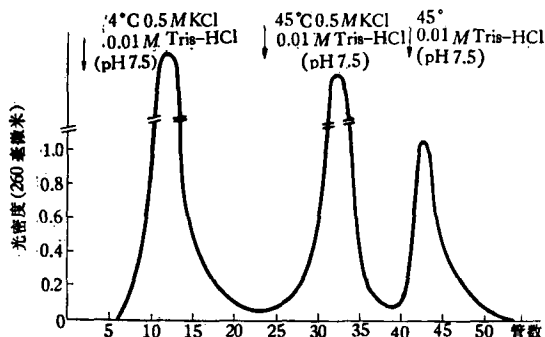


图4 小牛肝多聚核糖核蛋白体 RNA 的 Oligo(U)-纤维素柱层分离图谱

即是 mRNA。而从同一组织提取的 RNA, 用这两种树脂分离的差别是, 洗脱峰 II 时 Oligo(U)-纤维素只需升温至 45°C, 而 Oligo(dT)-纤维素要升至 54°C, 从中可看出这两种树脂在结合 RNA 的能力上有所差异, 这与它们吸附 Poly(A) 的实验结果是相吻合的。

(2) 直接吸附与降低离子强度的方法, 此方法操作简便省时间, 同样可将 mRNA 从总 RNA 中分离出来。用 Oligo(dT)-纤维素或 Oligo(U)-纤维素柱进行分离都可获得二个峰, 第二个峰即为 mRNA (图 5)。

从上述两种方法分离鼠肝 RNA 所得的 mRNA 含量约占总 RNA 的 2%, 而兔网织红血球的 mRNA 约占总 RNA 的 2.4%。

(三) 应用麦胚无细胞系统检测所分离 mRNA 体外合成蛋白质的活力

我们从几种组织的多聚核糖核蛋白体抽提的 RNA, 再经 Oligo(dT)-纤维素或 Oligo(U)-纤维素分离、纯化的 mRNA, 在麦胚无细胞系

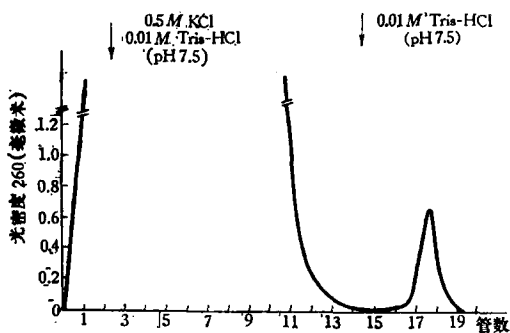


图5 网织红血球 RNA 的 Oligo(dT)-纤维素的柱层分离图谱

统的蛋白质体外合成中都能促进氨基酸的参入,证明其确实具有指导蛋白质合成的信使功能。

经 Oligo(dT)-纤维素分离、纯化的兔网织红血球的 mRNA,能促使氨基酸参入高达 112 倍,说明此种 mRNA 已达到一定的纯度,该树脂的分离效率较佳(见表 1)。

一般认为 Oligo(dT)-纤维素能牢固地与纤维素相结合,另外它也不受核糖核酸酶的分解,较之 Oligo(U)-纤维素为好。我们的结果也表明,用 Oligo(dT)-纤维素分离、纯化的 mRNA 促进氨基酸参入的效率比用 Oligo(U)-纤维素高,说明了 Oligo(dT)-纤维素分离 mRNA 优于 Oligo(U)-纤维素。

其次,用夹套柱升温与降低离子强度的方法分离获得的 mRNA,其促进氨基酸参入的效率高于一直接吸附的方法。这可能由于用升温的方法更有利于 mRNA 与其它 RNA 分离。

综上所述,可初步归结为:

(1) 我们制备的 Oligo(dT)-纤维素与 Oligo(U)-纤维素都具有分离 mRNA 的功能,前者效果优于后者;

(2) 用 Poly(A) 作标准样品测定这两种树脂的吸附能力表明,每克(干重) Oligo(dT)-纤

表 1 经树脂分离的 RNA 对体外蛋白质合成系统氨基酸参入的促进

树脂	RNA 来源	洗脱方法	洗脱峰	体外麦胚无细胞蛋白合成系统*	
				¹⁴ C-亮氨酸参入 (cpm/0.15O.D.260)	促进倍数
Oligo(dT)-纤维素	兔网织血球	直接吸附及降低离子强度	2	对照	124
				对照	—
				TMV-RNA**	2326
				未上柱 RNA	298
				峰 I	273
Oligo(U)-纤维素	兔网织血球	同上	2	峰 II	3348
				对照	248
				峰 I	—
				峰 II	2221
				对照	44
Oligo(dT)-纤维素	兔网织血球	升温及降低离子强度	3	未上柱 RNA	387
				峰 I	128
				峰 II	330
				峰 III	4960
				对照	92
Oligo(U)-纤维素	兔网织血球	同上	3	未上柱 RNA	515
				峰 I	570
				峰 II	589
				峰 III	3606
				对照	—

* 麦胚无细胞蛋白合成系统(100 微升)含: Tris-醋酸—25mM(pH8.0); KCl—70mM; MgAc₂—2.5mM; 巯基乙醇—2.2mM; ATP—1mM; GTP—0.025mM; YtRNA—6 微克; PEP—50 微克; PK—2.5 微克; ¹⁴C-L 亮氨酸—1.25 微居; 非标记氨基酸—各 0.03mM; RNA—0.15 (O. D.₂₆₀); S₂₅—50 微升 (O.D.₂₆₀ = 1.42, $\frac{260}{280}$ = 1.5); 23℃ 温育 60 分钟

** 以 TMV-RNA 测定无细胞蛋白合成系统活力的参照。

维素能吸附 299 微克的 Poly(A),而每克(干重) Oligo(U)-纤维素能吸附 107 微克的 Poly(A);

(3) 应用这两种树脂分离纯化的 mRNA,

经麦胚无细胞系统鉴定表明,都能促进氨基酸参入,确实具有信使的功用。

[本文于 1977 年 4 月 11 日收到]