

甲胎蛋白(AFP)信息核糖核酸的纯化

II. 人胚肝和正常大鼠肝信息核糖核酸(mRNA)的制备

中国科学院上海生物化学研究所四室肿瘤组*

应用寡聚胸腺嘧啶纤维素(简称 OdC)柱层析从哺乳动物 RNA 样品中提取 mRNA 已被人们普遍采纳。这一方法首先需要用改良的酚-氯仿法提取总 RNA,然后再经 OdC 柱层析分离得到 mRNA(下称此法为间接法)。

近年来,有人用 0.5% 十二烷基磺酸钠(SDS)解聚多聚核糖核蛋白体(简称多聚核糖体)后,直接经 OdC 柱层析分离某些 mRNA 获得成功^[1,2]。据报道这一方法(下称直接法)具有条件温和、产率较高及不影响翻译活力等特点。

我们在纯化 AFP mRNA 的过程中,考虑到 AFP 在胚肝细胞总蛋白中的含量很低,因此拟先用免疫沉淀双抗体法分离合成 AFP 的多聚核糖体,以后再用直接法制备 AFP mRNA。

本工作采用 Arnemann 改良的直接法^[3],用 OdC 柱层析从正常大鼠肝和人胚肝多聚核糖体的 SDS 解聚液中直接制备 mRNA。结果使 mRNA 产率提高,并在麦胚无细胞系统中显示出较好的活力。

一、材料和方法

人胚肝取自 3—6 月水囊或前列腺素引产的胎儿。

5' 胸腺嘧啶一磷酸二铵盐(5'-TMP 二铵盐)由上海试剂二分厂生产。

纤维素采用 Whatman 标准级。

SDS 用乙醇重结晶一次。

蛋白水解酶(Sigma Type V 2 单位/毫克)。

葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)。

正常大鼠肝和人胚肝多聚核糖体的制备另文发表。

正常大鼠肝和人胚肝多聚核糖体的 RNA 按 Temple 法制备。

麦胚无细胞系统测定大鼠肝及人胚肝 mRNA 的生物活力按中国科学院微生物研究所病毒室的方法进行^[4]。

实验用玻璃器皿均在 120°C 烘烤 2—3 小时。

缓冲液、OdC、Sephadex G-25 等均经高压灭菌。

紫外全波扫描在 Unicam SP-1800 紫外分光光度计上进行。

1. OdC 的制备 按 Gilham 法^[5]稍加修改。简要过程如下: 3.65 克 5'-TMP 吡啶盐加无水吡啶 13 毫升、干燥的二环己基羰二亚胺(DCCI) 3.45 克和玻璃珠若干,于 37°C, 240 次/分振荡器上避光摇七天后,反应物从干燥箱内转移到 500 毫升圆底烧瓶中,再加无水吡啶 200 毫升、DCCI 8.6 克、纤维素 11 克、玻璃珠若干,于 120 次/分的摇床上连续避光震荡 6 天。最后的反应物依次用无水吡啶、50% 吡啶水溶液、95% 乙醇、50% 乙醇、1M 氯化钠、10mM 磷酸缓冲液(pH7.0)洗净。经浮选后再真空干燥,共得 8.45 克 OdC。

2. OdC 对多聚腺嘌呤核苷酸(polyA)结合能力的测定 OdC 0.3 克在重蒸水中溶胀 24

* 江西医学院温博贵同志参加本工作

小时 (1 克 OdC 溶胀体积约 4 毫升) 装入夹套层析柱内 (1.1 × 5 厘米), 依次用重蒸水、无水乙醇、0.1N NaOH、0.05N HCl、2.5M NaCl/50 mM tris-HCl pH 7.4、0.5 M NaCl/10 mM tris-HCl pH 7.4 (缓冲液 A) 洗净平衡。其中 0.05N HCl 在低温下短时间洗涤。

poly A 溶于缓冲液 A (15.5 A₂₆₀/毫升) 于 25 ± 1℃ 上 OdC 柱, 流速为 (0.4 毫升/分)。再用缓冲液 A 充分洗涤, 使洗出液的 A₂₆₀ < 0.03, 然后用重蒸水在 25℃ 下洗脱, 分部收集, 洗脱峰作适当稀释后, 在岛津 QV40 紫外分光光度计上读出 A₂₆₀。

3. 人胚肝多聚核糖体解聚条件的测定 将不同量的多聚核糖体溶于缓冲液 A 中, 并加入不同浓度的 SDS 后温育, 在指定的时间内抽样, 离心后上清液在 Unicam SP 1800 紫外分光光度计上作全波扫描。根据紫外光吸收光谱, 计算出每个样品的 A₂₆₀/A₂₈₀ 及 A₂₆₀/A₂₈₀。

4. 人胚肝多聚核糖体的解聚 多聚核糖体水溶液 (30 A₂₆₀/毫升) 与等体积 20 mM tris-HCl 缓冲液 pH 7.4/1.0% SDS 混合, 再加蛋白水解酶 (100 微克/毫升), 于 37℃ 水浴中温育 30 分钟, 再加冰冷的 2.5 M NaCl/50 mM tris-HCl, pH 7.4 缓冲液, 使最后浓度为 0.5 M NaCl/10 mM tris-HCl, pH 7.4/0.5% SDS (缓冲液 B), 然后 60℃ 温育 10 分钟, 并使反应混合物迅速冷至 25℃, 过滤后的清液即为多聚核糖体解聚液。

5. OdC 柱层析分离人胚肝 mRNA 按上述处理过的 1 克 OdC, 装入夹套层析柱内 (1.2 × 4 厘米), 分别以缓冲液 A 和 B 洗涤平衡。人胚肝多聚核糖体解聚液 50 毫升 (15 A₂₆₀/毫升) 在 25℃ 上 OdC 柱, 流速 0.25 毫升/分。依次分别用缓冲液 B 20 毫升、含蛋白水解酶 (100 微克/毫升) 的缓冲液 A 20 毫升及缓冲液 A 洗柱至流出液 A₂₆₀ < 0.03。OdC 柱吸附的 mRNA 在 HD-73-3 型单光路核酸蛋白检测仪监视下, 以重蒸水洗脱, 收集 A₂₆₀ 高峰部分。

6. Sephadex G-25 凝胶过滤脱盐 Sephadex G-25 溶于双蒸水内高压灭菌后装柱 (0.8 × 4

厘米), 流速 0.2 毫升/分, 在核酸蛋白检测仪监视下用重蒸水过柱, 收集高峰部分, 于 -20℃ 冰箱保存备用。

二、结果与讨论

1. OdC 的合成及其与 polyA 的结合能力

我们在合成 OdC 时, 震荡的反应时间比 Gilham 法长, 所用纤维素的量亦减少了一半, 这样就使单位重量的纤维素与 oligo dT 的交联率增加, 所得 OdC 与 polyA 的结合能力有所提高, 从而更适用于分离小量的 mRNA。

表 1 合成 OdC 时纤维素用量及其与 polyA 结合能力的比较

纤维素的用量 (克纤维素/克 5'-TMP)	polyA 结合能力 A ₂₆₀ /克 OdC	相 对 百 分 率
6	24.4	100%
3	95.3	391%

由表 1 可见, 当纤维素用量减少一半时, 它与 polyA 的结合能力可提高 3.9 倍。

此外, 我们发现经上述方法合成的 OdC, 无论是高压灭菌处理或是长期反复使用, 其与 polyA 结合能力均未受到明显影响, 表明上法所合成的 OdC 是十分稳定的。

2. 人胚肝多聚核糖体的解聚 由浓度高的人胚肝多聚核糖体解聚液, 经 OdC 柱层析分离得到的 mRNA, 在麦胚无细胞系统中检定其活力很低。我们以 A₂₆₀ 作为指标, 对解聚过程中多聚核糖体的浓度、SDS 浓度, 解聚反应的温度及温育时间进行了较系统的比较。结果发现在这些因素中, 多聚核糖体的浓度是关键性的因素。低浓度人胚肝多聚核糖体的解聚液 A₂₆₀ 的吸收峰较明显 (见表 2), 而且经 OdC 柱层析所制备的人胚肝 mRNA, 在麦胚无细胞系统中的活力也较高, 说明在多聚核糖体的解聚过程中, 选择适当的多聚核糖体浓度进行解聚甚为重要。

表 2 列出了不同浓度的多聚核糖体进行解聚的结果, 从紫外吸收比值看来, 差距甚小。但依然能看出一个趋势, 即高浓度的多聚核糖体解聚比低浓度时更不完全。如果改用 RNA/蛋

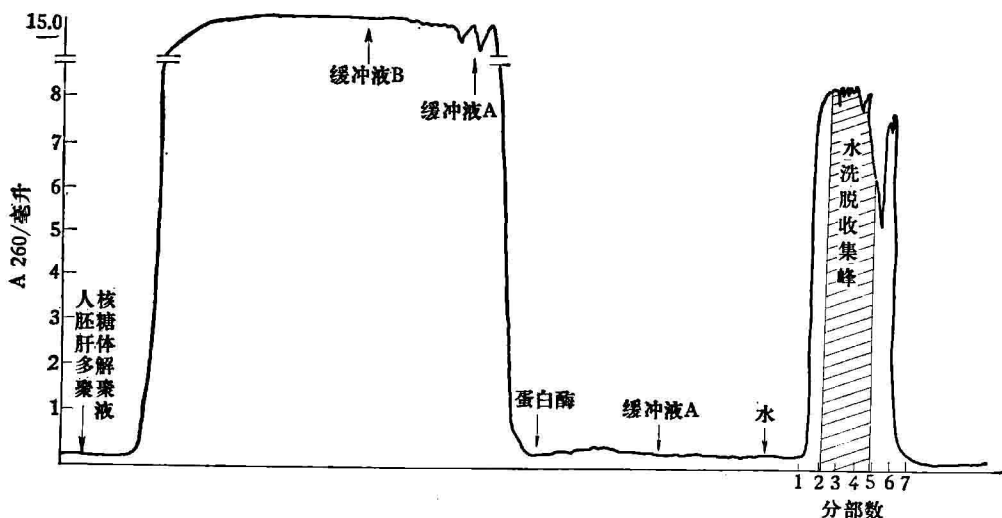


图1 核酸蛋白检测仪记录人胚肝多聚核糖体解聚液的 OdC 层析过程

白质定量比值作为观察解聚情况的指标,有可能使这一趋势表现得更为清楚。

表2 不同浓度的人胚肝多聚核糖体解聚后紫外光吸收的变化

多聚核糖体		$A_{260}/A_{\text{最小}}$	A_{260}/A_{280}
解聚前		1.10	1.34
解聚后	200*	1.17	1.45
	100	1.17	1.45
	50	1.19	1.48
	25	1.19	1.50
	12.5	1.21	1.52

* 解聚时多聚核糖体浓度 (A_{260} /毫升)

3. 正常大鼠肝和人胚肝 mRNA 的制备和

活力测定 按 Arnemann 改良直接法,多聚核糖体解聚液中含有蛋白水解酶、蛋白质在遭到酶的降解以后,将有利于 mRNA 的分离。为了尽可能地排除蛋白质对 mRNA 分离的干扰及污染,我们在洗柱过程中,加用了蛋白水解酶溶液进行中间水洗(图1),由图1可见,加入蛋白水解酶后,在蛋白核酸检测仪监视下,在260毫微米处的吸收变化不大,且可使流速不再减慢。说明加入的蛋白水解酶至少不会干扰核酸的分离。

为了使 mRNA 样品能直接在体外无细胞系统中进行活力测定,上述 OdC 柱的水洗脱液需要经 Sephadex G-25 过滤脱盐,因为 Na^+ 的

存在会影响该系统的活力测定。如图2所示,人胚肝 mRNA 经脱盐后,吸收峰所含 mRNA 的浓度仍可达 $6 A_{260}$ /毫升左右,因此最后所收得的 mRNA 制备物可不经浓缩即可直接在麦胚无细胞系统中测定其活力。

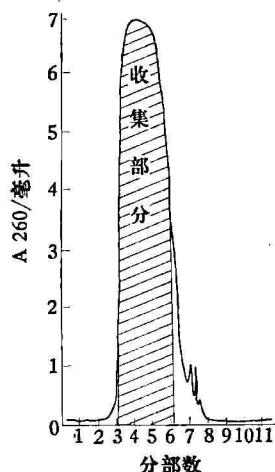


图2 OdC 柱水洗脱的高峰部分 Sephadex G-25 凝胶过滤柱层析

我们用酚-氯仿法从大鼠肝及人胚肝制备多聚核糖体 RNA,再经 OdC 柱间接分离 mRNA,其产率比直接法为低。采用直接法从人胚肝制备的 mRNA,在麦胚无细胞系统中的翻译活力可达 $50,000 \text{ cpm}/A_{260} \text{ mRNA}$ 左右,而且产率也比间接法提高 3 至 4 倍(见表3)。这就为我们

(下转第 32 页)

促进了脑的呼吸过程(氧化磷酸化),从而增强脑的代谢。另外,有人给已麻醉的狗静脉注射10毫克/公斤 CDP-胆碱,发现狗脑部血流量增加约25%。因此,摄氧量和血流量的增加都能促进损伤组织的代谢和修复过程。

在猫的脑室内注射1毫克/公斤 CDP-胆碱,立即引起瞳孔放大,呼吸加速,心搏过快;若继续增加剂量,还会引起痉挛、脑电图中快波增多等现象。这说明 CDP-胆碱具有中枢胆碱能作用,故应用适宜剂量的 CDP-胆碱可以提高病人中枢神经的兴奋度和意识状态。

帕金森氏症候群是中枢神经系统锥体外系病变引起的疾患。锥体外系起着调节人体随意运动的作用,它和锥体系相互配合以实现机体的随意运动。锥体外系遭到损伤后,便会增加不随意运动(震颤)。进一步从神经生物化学的角度查其原因,发现在正常的锥体外系(尤其是纹状体和黑质)中含有丰富的神经介质多巴胺和乙酰胆碱,二者构成对立统一的多巴能系统和胆碱能系统。一般认为,锥体外系中多巴胺能活性偏低或胆碱能系统活性偏高皆会引起震颤麻痹。实验证明,人为地破坏猫脑的黑质,结果脑中多巴胺含量剧烈下降,导致锥体外系结

构和功能的异常。这时给猫注射200毫克 CDP-胆碱/日,2—5周,结果多巴胺和左旋多巴的浓度回升了。另外对兔子的实验表明,注射 CDP-胆碱时脑电图的改变同注射左旋多巴时相同。因此,CDP-胆碱可以活化锥体外系中多巴胺的合成,从而活化锥体外系中的多巴胺能神经。多巴胺能神经的活性提高后,相应地便降低了胆碱能神经的活性,即抑制了锥体外系的活动性,以减少或消除震颤麻痹。

与上相似,抑郁症的产生也归因于多巴胺代谢紊乱,即多巴胺代谢活性降低将会引起血液生长激素分泌系统的活性降低,导致抑郁症的各种神经症状。已证明凡属增加多巴胺能的药物均可促进血液生长激素的分泌。因此,CDP-胆碱通过活化多巴胺能系统而促进血浆生长激素分泌系统的活性,故亦可治疗抑郁症。

* * *

CDP-胆碱是磷脂代谢的重要前体,使用本药能够增加神经组织中磷脂的含量,大大提高患者的意识水平,治疗某些神经疾患有较高的疗效,而且未发现任何副作用,可以说是目前神经内、外科有效的药物之一。

[本文于1978年7月19日收到]

(上接第42页)

表3 两种制备肝 mRNA 方法的产率和活力比较

方法	材料	多聚核糖体用量(A ₂₆₀)	mRNA总收率%	在麦胚无细胞系统中的活力 cpm/A ₂₆₀
间接法	大鼠肝	1,900	0.33	27,625
	人胚肝	2,700	0.26	21,643
直接法	大鼠肝	1,200	0.9	24,300
		1,400	0.7	24,250
	人胚肝	400	0.74	45,454
		800	1.2	52,800

下一步使用双抗体法沉淀合成 AFP 的多聚核糖体,然后再直接从免疫沉淀的多聚核糖体解

聚液中纯化 AFP mRNA 打下了基础。

主要参考文献

- [1] Pemberton, R. E. et al.: *Anal. Biochem.*, **66**, 18, 1975.
- [2] Krystosek, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 6077, 1975.
- [3] Temple, G. F., Housman, D. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **69**, 1574, 1972.
- [4] 中国科学院微生物研究所病毒复制研究组:《生物化学和生物物理学报》1976年,第8卷,第179页。
- [5] Gilham, P. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4982, 1964.

[本文于1978年4月6日收到]