

大鼠大脑皮层细胞核体外转录模型

邱平 易禄康

(第三军医大学生化教研室,重庆)

提 要

本文用改良的 Giuffrida 法分离纯化大鼠大脑皮层细胞核,产率为 41—52%,具有很高的体外转录活性。参照 Blatti 硫酸铵浓度法建立了大鼠大脑皮层细胞核体外转录模型,能分别测定真核基因三类 RNA 聚合酶转录活性,并对有关问题进行了讨论,指出本系统具有操作简便、省时、省实验材料等优点,适用于大脑皮层细胞核体外转录调控的研究。

关键词 RNA 聚合酶,转录,大脑皮层,细胞核

真核细胞离体转录实验是研究真核基因表达调控的重要方法之一。以往研究结果证明^[1,2]: 真核基因分别由三类 RNA 聚合酶转录,它们不仅存在于细胞核不同部位和合成特定的 RNA,而且具有对抑制剂 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin) 敏感性及对 NH_4^+ 离子依赖性的显著差异。根据这些特性质,我们建立了大鼠大脑皮层细胞核体外转录模型。在不增加 α -amanitin 用量的情况下,能够从完整细胞核中分别测定三类 RNA 聚合酶转录活性。因而能更真实地反映生理状态下真核细胞三类 RNA 合成代谢,为进一步研究大脑神经元发育及衰老过程基因表达调控等提供了一条有效的途径。

材料与 方法

1. 材料

动物: 健康 Wistar 系雄性大鼠,体重 160—200 克。

试剂: ^3H -UTP (20Ci/mmol) 系中科院上海原子能研究所产品。ATP、CTP、GTP 为上海东风生化试剂厂产品。 α -amanitin 系西德 Boehringer 公司产品,二硫苏糖醇 (DTT) 为

Serva 公司产品。全部实验用玻璃器皿和缓冲液均经灭菌处理。

2. 方法

(1) 大脑皮层细胞核的制备: 断头处死大鼠,迅速取脑置于玻璃皿中。分离小脑、脑干和脑膜; 大脑半球去白质,灰质经冰冷缓冲液 A (0.32mol/L 蔗糖, 3mmol/L MgCl_2 , 1mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液, pH6.4) 冲洗后称量,按每克组织加入 15ml 缓冲液 A 制备匀浆。参照并改进 Giuffrida 等^[3]修改的 Løvtrup-Rein & McEwen^[4]方法: ①用 Teflon 杵玻璃匀浆器(间隙为 $150\mu\text{m}$) 手动匀浆约 12—15 次; ② 120 目尼龙筛未过滤组织经手动匀浆 3—6 次后再过滤; ③粗制核沉淀用缓冲液 B (缓冲液 A + 0.25% Triton X-100) 和缓冲液 A 各洗一次, $850 \times g$ 离心 10 分钟; ④粗制核悬液超速离心 ($75000 \times g$, 离心 60 分钟) 前用 $400\mu\text{m}$ 间隙玻璃匀浆器手动匀浆 2—4 次。全部操作需在 4°C 或冰浴中进行,耗时约 3 小时。

纯化核涂片,相差显微镜下检查核纯度。按 Schneider 法分别抽提纯化核和匀浆 DNA, 用 Burton 二苯胺法测 DNA 含量计算核产率。纯化核以含 1mg DNA/ml 悬浮于细胞核贮存液

[10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L $MgCl_2$, 25% (V/V)甘油]中, $-20^{\circ}C$ 保存备用。

(2) 细胞核转录活性测定: 参照 Das 等^[4]方法并加以改进。反应总体积 200 μl 中含 40 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9, 0.2 mmol/L DTT, 1mmol/L β -巯基乙醇, 8mmol/L KCl, 1.6mmol/L $MnCl_2$, 2.0mmol/L $MgCl_2$, ATP、CTP、GTP 各 0.32mmol/L, 3H -UTP $2\mu Ci$ 。转录模型依硫酸铵浓度分为高盐(含 240mmol/L $(NH_4)_2SO_4$) 和低盐(含 50mmol/L $(NH_4)_2 \cdot SO_4$)系统, 低浓度 α -amanitin ($1\mu g/ml$)的加入用于区别不同 RNA 聚合酶活性。加入含 0—70 μg DNA 的细胞核悬液启动反应, $37^{\circ}C$ 水浴恒温振荡至指定时间。各反应管加入 2ml 预冷的 10% TCA-20mmol/L $Na_4P_2O_7$ 中止反应, 冰浴中静置 15 分钟后, 酸不溶物质经玻璃纤维滤膜过滤, 相继用 10% TCA、5% TCA、95% 乙醇各 5ml 抽洗 3 次, 滤膜经 $80^{\circ}C$ 干燥 30 分钟, 浸于 5ml 0.4% PPO-0.01% POPOP-甲苯闪烁液内, 在 LKB-Rack-Bata 1217 液体闪烁计数仪中测 cpm。细胞核体外转录活性以 3H -UMP 掺入 RNA cpm/mg 细胞核 DNA 表示。

① RNA 聚合酶 I 转录活性指低盐系统中加入 α -amanitin 时所测得的活性; ② RNA 聚合酶 III 转录活性指高盐系统中加入 α -amanitin 时所测得的活性; ③ RNA 聚合酶 II 转录活性以高盐系统中不加入 α -amanitin 时测得的活性减去酶 III 活性表示。

结果与讨论

一、大鼠大脑皮层细胞核的分离纯化

细胞核纯度和分离产率是评定核分离效果的主要指标, 在保证纯度的前提下提高核制备产率对于来源较少的大脑皮层组织尤为重要。本实验改进 Giuffrida 法分离的大脑皮层细胞核形态正常, 核膜结构完整, 核仁清晰, 极少胞浆或完整细胞污染(图 1)。制备核涂片进行分类计数, 神经元核数量 $>85\%$ 。

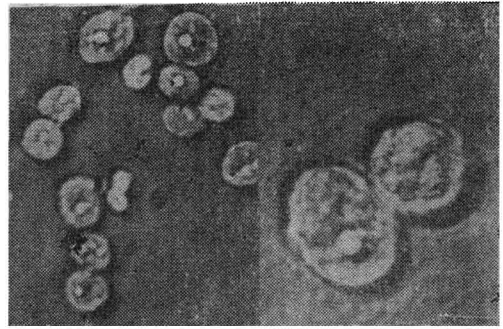


图 1 分离纯化大鼠皮层细胞核的相差显微镜
Fig. 1 Phase-contrast micrographs of a suspension of purified nuclei from rat cerebral cortex $\times 400$ (left); $\times 1000$ (right)

在细胞核分离纯化过程中, 加入去垢剂 Triton X-100 能去除红细胞及线粒体等其它胞浆成分的污染, 提高核产率^[4]。但 Triton X-100 也能破坏核膜外膜和抽提膜脂质成分^[6]。本实验用含 Triton X-100 缓冲液洗粗核沉淀一次, 保证去垢剂与细胞核接触时间不超过 10 分钟, 可减轻对核膜的损伤。经减少手动匀浆次数, 增加对未过滤组织匀浆及超速离心前分散粗核沉淀均有助于提高核产率。所得核产率

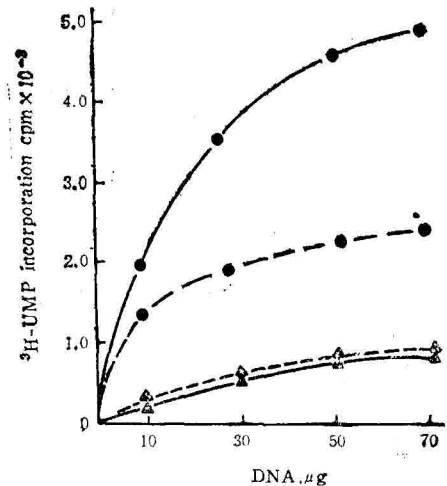


图 2 酶促反应温度对细胞核转录活性的影响
Fig. 2 Effect of incubation temperature on the transcriptional activities of nuclei in high (solid line) and low (broken line) ionic strength condition

The values of abscissa represent nuclei DNA contents adding incubation mixture. The incubation temperature are $25^{\circ}C$ (▲) and $37^{\circ}C$ (●) separately

由原方法的 28—35% 提高到 45—52%，具有较好的分离效果。

二、大鼠大脑皮层细胞核体外转录活性研究

(1) 体外转录反应的最适条件

参照并改良 Das 法建立的脑细胞核体外转录系统具有较高的转录活性。在反应系统中加入 β -巯基乙醇能明显提高转录基质液的稳定性。将酶促反应温度由原方法 25°C 增至 37°C 时，高盐系统中细胞核 ^3H -UMP 的 RNA 掺入值增高 1 倍以上，低盐系统变化不明显(图 2)。

酶促反应时间在 30 分钟以内时，细胞核转录活性增长迅速，至 60 分钟时趋于平缓(图 3)。

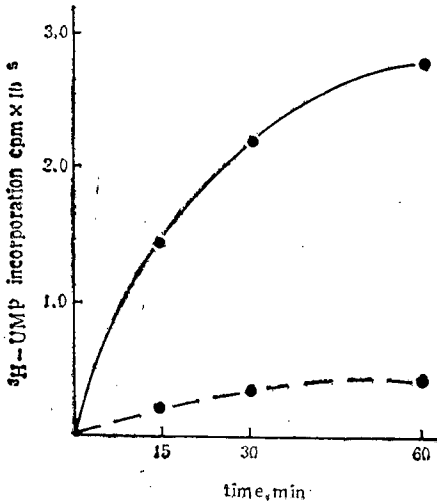


图 3 酶促反应时间与细胞核转录活性的关系
Fig. 3 The relation between incubation time and transcriptional activities of nuclei in high (solid line) and low (broken line) ionic strength condition

高盐系统细胞核 DNA 在 30 μg 以下和低盐系统细胞核 DNA 在 50 μg 以下时，均与酶促反应速度成正比。但单位量细胞核的转录活性在高盐系统中随浓度增加而稍有降低，低盐系统则保持恒定(图 4)。

(2) 高盐、低盐转录系统中 α -amanitin 的抑制作用和三类 RNA 聚合酶转录活性的变化。

脑细胞核转录系统包含三类 RNA 聚合酶

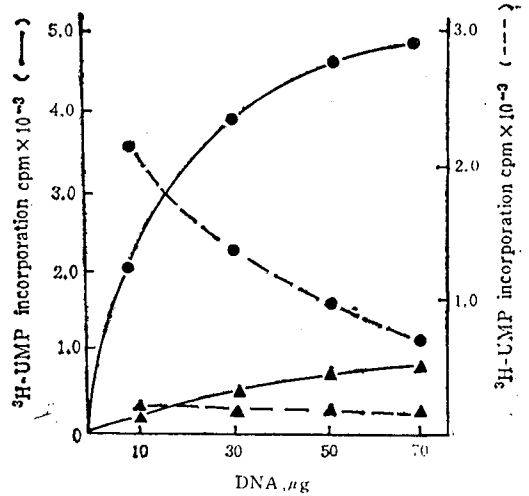


图 4 细胞核浓度对体外转录活性的影响
Fig. 4 Effect of varying the concentration of nuclei DNA in the incubation mixture on the transcriptional activities of nuclei in high (\bullet) and low (\blacktriangle) ionic strength condition

活性。大脑细胞核中至少可分离出 RNA 聚合酶 I、IIa-b、IIIa-c 等六种亚型的 RNA 聚合酶^[7]。其中酶 I 转录富含 G-C 序列的 r-RNA，酶 III 合成 tRNA、5sRNA 及脑组织特异的核内小分子 RNA (SnRNA)^[8]，而染色质结合的 RNA 聚合酶 II 则转录合成 mRNA 前体——hnRNA^[2]。多年来人们从细胞核中测定三类 RNA 聚合酶时，常用低浓度 α -amanitin (0.25—1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 抑制酶 II 活性，仅能测出酶 II 与酶 (I + III) 活性比，而且由于选择了或高或低离子强度的转录反应体系，难以真实地分别测出三类 RNA 聚合酶活性。尽管加入高浓度 α -amanitin (20—200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 可以抑制酶 III 活性而不影响酶 I 活性，但用此方法区别酶 I 和酶 III 活性因药品价格昂贵且用量大，一般实验室很难承受。本实验采用 Das 根据 Blatti 等^[9-11]硫酸铵浓度法建立的大脑皮层细胞核体外转录模型，在不增加 α -amanitin 用量的前提下，同样可以达到测定三类 RNA 聚合酶活性的目的。如图 5 所示，随着转录反应时间的增加，RNA 聚合酶 II 转录活性迅速增高，而酶 I 和酶 III 活性增长缓慢。反应进行

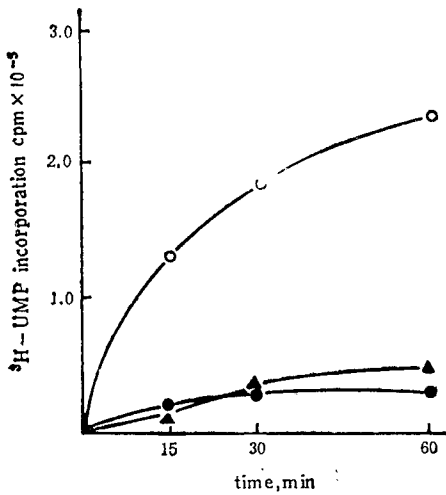


图5 大脑皮层细胞核 RNA 聚合酶 I(●)、II(○)、III(▲) 转录活性的变化

Fig. 5 The changes of transcriptional activities of RNA polymerase I(●), II(○), III(▲) in the nuclei from cerebral cortex at different incubation time

至 30 分钟后酶 III 转录水平高于酶 I。

硫酸铵浓度法测定三类 RNA 聚合酶活性的根据是：①从多种组织分离纯化三类 RNA 聚合酶体外转录测定显示^[7,9,12]：在 40—60 mmol/L(NH₄)₂SO₄ 离子强度下酶 I 转录活性较高，至 200mmol/L (NH₄)₂SO₄ 浓度时酶 I 活性几乎丧失。而酶 II 和酶 III 在高硫酸铵浓度下转录活性很高。因此，低盐条件主要反映出酶 I 转录活性。而高盐条件使酶 I 活性受到抑制，加入低浓度 α-amanitin 后酶 II 活性也被抑制，从而可以区分酶 II 和酶 III 活性；②细胞核体外转录实验表明。高盐条件下 ³H-UMP 掺入值明显高于 ³H-GMP，低盐条件则相反，反映出低盐转录系统中合成富含 GC 序列的 rRNA 代谢较为活跃^[13]；③低盐条件下细胞核转录对 α-amanitin 抑制作用不敏感，高盐条件则反之。这与本实验结果完全吻合（图 6），低盐转录系统 α-amanitin 的抑制率为 30% 左右，远低于高盐转录系统抑制率（85—90%）。

总之，本实验建立的大鼠大脑皮层细胞核体外转录模型，具有操作方法简便、节省药品，并能准确地反映真核基因由三类 RNA 聚合酶

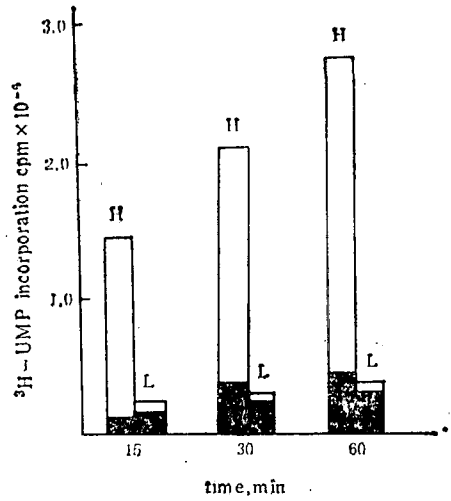


图6 高盐 (H) 和低盐 (L) 转录系统中 α-amanitin 抑制作用

Fig. 6 The inhibition of α-amanitin on the transcriptional activities of nuclei in high (H) and low (L) ionic strength condition at different incubation time

The dark regions represent the incorporated values after adding α-amanitin

转录、合成 RNA 等优点，是研究在发育、衰老过程及在遗传和某些放射病等因素作用下大脑皮层细胞核转录调控的理想模型。

参 考 文 献

- 1 Chambon P. *Ann Rev Biochem*, 1975; 44: 613
- 2 Sentenat A. *CRC Crit Rev Biochem*, 1985; 18: 31
- 3 Giuffrida A M, Cox D, Mathias A P. *J Neurochem*, 1975; 24: 749
- 4 Løvtrup-Rein H, McEwen B S. *J Cell Biol*, 1966; 39: 405
- 5 Das B R, Kanungo M S. *Molec Biol Rep*, 1987; 12: 43
- 6 Newport J W, Forbes D J. *Ann Rev Biochem*, 1987; 56: 535
- 7 Yamamoto H, Takahashi Y. *J Neurochem*, 1978; 31: 449
- 8 Sutcliffe J G, Milner R J, Gotesfeld J M *et al. Science*, 1984; 225: 1308
- 9 Blatti S P, Ingles C J, Lindell T J *et al. Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1970; 35:649
- 10 Weil P A, Blatti S P. *Biochemistry*, 1975; 14: 1636
- 11 Weil P A, Blatti S P. *Biochemistry*, 1976; 15: 1500
- 12 Schwartz L B, Sklar V E F, Jaehning J A *et al. J Biol Chem*, 1974; 249: 5889
- 13 McEwen B S, Plapinger L, Wallach G *et al. J Neurochem*, 1972; 19: 1159

[本文于1988年11月22日收到]

THE TRANSCRIPTIONAL MODEL OF NUCLEI ISOLATED FROM CEREBRAL CORTEX OF RATS IN VITRO

Qiu Ping Yi Lukang

(Dept. of Biochem., The Third Military Medical College, Chong Qing)

ABSTRACT

This paper deals with establishing a transcriptional model in which the transcriptional activities of RNA Pol I, II, III in intact nucleus could be determined separately in vitro. With modified Giuffrida method, the nuclei isolated from rat cerebral cortex were purified in good yields ranging from 41 to 52% and high purity judging with phase-contrast microscopy. According to the method described by Blatti, RNA synthesis were studied under high or low (240 or 50 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ionic strength condition. The inhibited and residual transcription in high-salt system and presence of α -amanitin represented the activities engaged by RNA Pol II and Pol III independently, the transcription in low-salt system containing α -amanitin was mainly responsible for RNA Pol I activities. In addition, some factors effecting on the nuclei transcription in vitro were also evaluated. It was concluded that the reported model had advantages being easy to operated, saving materials, and approaching cell physiological conditions, it was suitable for studying transcriptional mechanism of cerebral cortex neurons.

Key words RNA polymerase (RNA Pol), transcription, cerebral cortex, nuclei

(Continued from page 53)

Isolation of total RNA from control and heat-shocked rat liver by phenol/chloroform/isomylalcohol method and fractionation of Poly(A)⁺mRNA by Oligo (dT)-cellulose chromatography were performed. The difference of Poly(A)⁺mRNA between control and heat-shocked rat liver was shown by urea agarose gel electrophoresis. In vitro translation of Poly(A)⁺mRNA in wheat germ system, the synthesis of four major heat shock polypeptides with approximate molecular weights of 71000, 90000, 98000 and 110000 Dalton was observed. The relative amount of major heat shock proteins increased as the rectal temperature of the heat-exposed rats rose. These results indicated that HSP was also induced when rats, as a whole, were exposed to a simulated hot environment.

Key words heat shock protein, acute heat exposure rat liver