

银染法在猪脾可提取性核抗原的小核 RNA 分析中的应用*

刘建荣 赵晓瑜 静天玉

(河北大学生物工程研究所,保定 071002)

关键词 银染法,小核 RNA (snRNAs),可提取性核抗原 (ENA),RNA-PAGE

可提取性核抗原 (extractable nuclear antigens, ENA) 是哺乳动物细胞核的生理盐水抽提物,它包括 Sm、RNP、La(SS-B) 和 Ro(SS-A) 等四种主要抗原成分。它们是由核内核糖核酸和蛋白质组成的复合物 (snRNPs),其核糖核酸组分属于核内小 RNA 类,称为 snRNAs。近几年来,小核 RNA 的研究愈来愈受到广泛重视。但是,由于含量极少,给分析带来困难。国外通常采用放射自显影技术进行小核 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (RNA-PAGE) 分析,但材料局限于人或小鼠的人工培养细胞系^[1-4]。有人报道^[5] 从组织中纯化抗原后,用 T₄ 连接酶将放射性标记的碱基连接到抗原的 RNA 3' 末端,再进行 RNA 分析。该法操作复杂,结果不甚理想。我们通过改进 RNA 的抽提方法,将高灵敏度的银染法应用于猪脾 ENA 的 RNA-PAGE 分析,取得了满意的结果。本法无需昂贵试剂,而且操作简便,不仅可以用纯化抗原,也可以用抗原抗体免疫复合物进行分析。本文同时首次报道猪脾 ENA 的小核 RNA 分析结果。

材料和方法

1. 试剂和仪器

聚丙烯酰胺为 MERCK 公司产品, pBR322 质粒和 HpaII 酶均购自华美生物工程公司。硝酸银为基准品,北京化工厂产品,其它试剂皆为国产分析纯。DYW-A 型电泳仪为武汉大学科教仪器厂产品,垂直夹心式电泳槽为北京六一仪器厂产品。

2. 小核 RNA 电泳样品的制备

小核 RNA 的制备基本参照 Roe^[6] 法和 Panasci^[7] 法,但稍有改动。RNA 抽提液为 0.14 mol/L NaAc-HAc, pH4.5, 内含 0.01 mol/L EDTA, 0.1% SDS, 0.5% 皂土(抽提前临时加入)。取 ENA 干粉或免疫亲和层析纯化的 Sm、RNP、Ro 和 La 抗原溶液(皆为本室制备)于 5ml 灭菌带盖离心管中,加 5-10 倍体积的灭菌 RNA 抽提液和等体积苯酚,于室温振荡抽提,4℃ 5 000r/min 离心 10min。上层水

相用 1/2 体积苯酚液反复抽提两次。离心后上层水相加入适量十六烷基溴化铵溶液^[7] (30mg/ml 水,按 4ml 加 150 μ l 计),于 0℃ 冰浴 10min, 4℃ 15 000r/min 离心 10min 得沉淀。用 70% 乙醇溶液 (含 0.1 mol/L 醋酸钠)洗 3 次,得 RNA 沉淀。真空烘干,溶于电泳样品缓冲液中,于 -20℃ 保存。用同样方法可以自免疫复合物制备 RNA 样品。

3. RNA-PAGE 分析

依据 Lerner 方法^[8] 配制凝胶。分离胶 12%, 浓缩胶 4%, 皆含 7mol/L 尿素。凝胶为 140 × 120 × 0.5mm, 电泳液为 0.05mol/L Tris-硼酸缓冲液 (pH8.3, 含 0.001mol/L EDTA)。将 RNA 样品和标准品(以 HpaII 酶消化的 pBR322 质粒 DNA 片段)分别加入样品槽内,先稳压 200V 电泳,待溴酚蓝进入分离胶后,再升至 250V,电泳 4~5h。

4. 凝胶银染色

根据 Herring 法^[9] 进行。

结果和讨论

图 1 为猪脾 Sm 和 RNP 的 RNA-PAGE 银染图谱。其中图 1-1 为纯化的 Sm 和 RNP 的 RNA,图 1-2、1-5 分别为纯化 Sm、RNP 的 RNA。显然,RNP 含有极丰富的 U1RNA (170 个核苷酸),而 Sm 的 RNA 含量相对较弱,主要在 190-210 核苷酸处 (U2RNA 的位置)有 3-5 条区带,另外在 U4 和 U6RNA 位置上也有较弱的区带,说明猪脾 Sm 以 U2RNA 为主。以上结果与人和小鼠细胞的 Sm、RNP^[2,3] 基本相同。

通常认为 Ro 抗原是细胞质中小核糖核酸蛋白 (scrNPs)^[4],因此抽提 Ro 的 RNA 是以整个组织匀浆液为原料。猪脾细胞质中含有极丰富的 Ro 抗原,然而细胞核 (ENA) 内也有 Ro,尽管它们的抗原性多肽相同,但 RNA 却明显不同。图 2-3 所示从猪脾

* 国家自然科学基金资助课题。

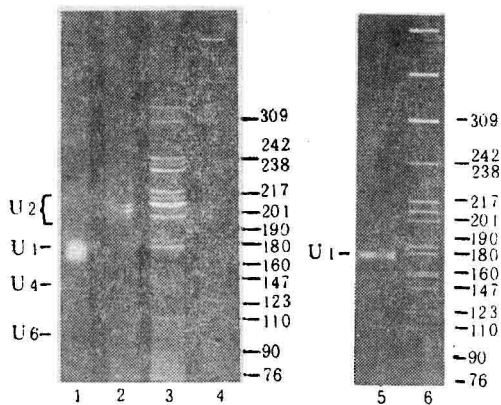


图1 猪脾 Sm 和 RNP 的 RNA-PAGE 银染图谱

- 1 免疫亲和层析纯化的 Sm 和 RNP
- 2 免疫亲和层析纯化的 Sm
- 3 ENA
- 4, 6 标准核苷酸长度 (0.1 μ g)
- 5 免疫亲和层析纯化的 RNP

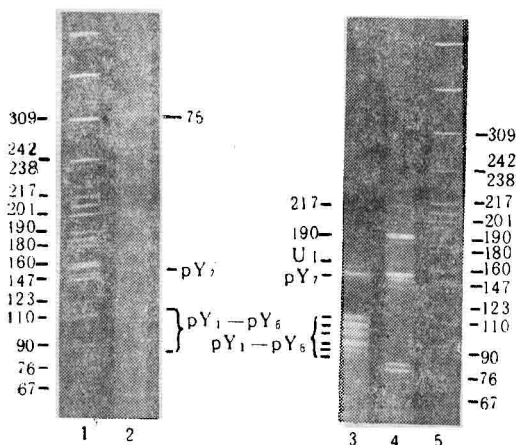


图2 猪脾 Ro 和 La 的 RNA-PAGE 银染图谱

- 1, 5 标准核苷酸长度 (0.1 μ g)
- 2 ENA 与抗 Ro 抗体免疫复合物
- 3 免疫亲和层析从细胞质纯化的 Ro
- 4 免疫亲和层析纯化的 La

细胞质利用Ro亲和层析柱纯化的样品所得的 scRNA, 其核苷酸长度为 85—120, 大小类似于小鼠 Ehrlich 腹水细胞和人的 Hela 细胞^[1,3] 的 Ro RNA, 但有 6 条区带。按照 Hendrick 方法命名, 我们标记为 pY₁-pY₆, 另有一条 150 核苷酸, 标记为 pY₇。图 2-2 所示 ENA 中 Ro 的 RNA, 其核苷酸长度在 150 (pY₇)-309 之间, 有多条区带, 另有极弱的 pY₁-pY₆。图 2-4 所示的 ENA 中 La 的 RNA, 除有 217/190/170 (U1)/150 (pY₇) 核苷酸外, 还有少量的 pY₁-pY₆, 因此, 从 RNA 的分析结果推测, ENA 的 Ro, La 与细胞质中的 Ro 是密切相关的 (另文讨论), Ro, La 的小核 RNA 随动物种系的不同而有差异^[1]。

银染法的缺点是 RNA 和蛋白质可同时被显带, 而放射自显影法同位素只标记在 RNA 上, 没有蛋白质的干扰。为此我们采用十六烷基溴化铵选择性沉淀 RNA, 使 RNA 样品中蛋白质污染小于 0.02%^[12]。银染法 RNA 点样量通常为 0.1—0.5 μ g, 此时 RNA 样品中杂蛋白 (0.02—0.1ng) 不会显色^[10], 不影响 RNA 分析结果。所以, 银染法可以代替放射自显影法进行 RNA 的微量 PAGE 分析, 特别是整个银染色过程只需要 1.5h 即可完成, 与放射自显影法相比, 操作简便迅速。

参 考 文 献

- 1 Hendrick J P *et al.* *Mol Cell Biol*, 1981; 1: 1138
- 2 Billings P B *et al.* *J Biol Chem*, 1984; 259: 12850
- 3 Wolin S L, Steitz J A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 1996
- 4 Pettersson I *et al.* *J Biol Chem*, 1984; 259: 5907
- 5 Yamagata H *et al.* *J Clin Invest*, 1984; 74: 625
- 6 Roe B A *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1975; 2: 21
- 7 Panasci L C *et al.* *Anal Biochem*, 1977; 83: 678
- 8 Lerner M R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 5495
- 9 Herring A J *et al.* *J Clin Microbiol*, 1982; 16: 473
- 10 蔡晓丹等. *生物化学与生物物理进展*, 1986; (3): 66

[本文于1990年7月3日收到, 10月15日修回]

书 讯

《中国医学、卫生学期刊概览》出版

投 稿、订 阅 指 南

为方便广大医护、科研人员投稿、订阅以及学术交流的需要,《中国医学、卫生学期刊概览》将向您展示全国近千家医学、卫生期刊、杂志的名称、主办单位、通讯地址、邮政编码、统一刊号、电话、主编、副主编姓名、主要栏目以及订购事宜等。全书 280 页(压膜封面)单价: 4.00 元,(邮费另加 15%)现已出版。《概览》特点是: 体积小, 内容新, 准确、简明、方便、实用。预购者可汇款: 大连海军政治学院图书馆陈志安, 邮政编码: 116001, 银行汇款: 大连海军政治学院教保处, 帐号: 02008510212 (注明《概览》书款)。开户行: 大连工商银行中山办事处。