

大鼠前列腺前叶细胞两种受雄激素调节的 mRNA 核前体

徐幼海

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

在大鼠前列腺前叶细胞,雄激素在转录水平调节六种已知多肽的合成:前列腺结合蛋白(PBP)的三个亚肽^[1]、一种 22 KDa 糖蛋白^[2,3]、亚精胺结合蛋白(SBP)^[4]和 29 KDa 蛋白质^[5]。此外,尚有 9.3 KDa 和 13.5 KDa 的多肽,其相应的 mRNA 已由克隆的 cDNA (*119 和 *92)杂交以及体外翻译系统证实^[6]。虽然这后两种多肽尚未被分离和定性,其 mRNA 水平已显示对前列腺内雄激素水平有反应。因此,雄激素可能既影响转录的起始过程,又影响原始转录产物的转录后加工。为理解该过程中雄激素的可能作用,我们分析了其前体 nRNA 的资料。同时,用 cDNA 探针探查有或无雄激素状态下的 nRNA 水平,以确定雄激素的调节作用。

材料和方法

动物 雄性 SD 大鼠,300 克左右。去雄激素动物于麻醉下经阴囊切除睾丸。正常或去雄激素动物断头处死后取前列腺组织。

试剂 所用试剂均为分析纯。

方法 前列腺组织用等渗蔗糖缓冲液匀浆方法,分离出细胞核^[7]。nRNA 的分离用盐酸胍(Schwarz-mann)方法^[8],最后溶于 40 mmol/L KCl—10 mmol/L Tris—HCl pH 7.5—1 mmol/L EDTA—0.1% SDS(结合缓冲液)。RNA 溶液加热至 70℃,3 分钟后即上样至 Oligo (dT)12—18 Cellulose(7 型,PL—Biochemicals)柱^[9]。经结合缓冲液洗涤后,结合的 Poly(A) nRNA 用 10 mmol/L Tris—HCl pH 7.5—1 mmol/L EDTA 洗脱。加入 1/10 体积的 2 mol/L NaAC pH 5.5 和 2 倍体积的乙醇,贮放于 0—20℃ 沉淀。离心后的 RNA 沉淀用 70% 冷乙醇洗涤,干燥后溶于灭菌水中。RNA 样品 25 μg 用 1.0% agarose 凝胶电泳分部(含甲基氢氧化汞^[10]),经 Northern 印迹转移,与两种缺口转译的

cDNA 探针 *92 和 *119 杂交^[11]。cDNA *92 和 *119 筛选自前列腺 PBR 322 cDNA 库,经鉴定其编码的多肽为 13.5 KDa 和 9.3 KDa。

专一性 RNA 的半定量检测,采用点杂交方法^[12]。0.25—16 μg 的 RNA 样品溶于 50 μl 水中,与 30 μl 的 20×SSC 和 20 μl 的 37% 甲醛混合,在 60℃ 水浴中温育 15 分钟。经处理后的 RNA 样品与 100 μl 的 15×SSC 混合后,在负压下点样至 Nitrocellulose (N. C.)滤膜上(BA 85—0.45 μm, Schleicher & Schuell)。点样后的 N. C. 滤膜在 42℃ 预杂交 6 小时,加 ³²P—cDNA 探针后杂交 12 小时^[11]。预杂交液成份为 50% formamide—5×SSC—0.5 mol/L Na phosphate pH 6.5—5×Derhardt's—0.1% SDS—100 μg/m-Sperm DNA(变性)。杂交后的 N.C. 滤膜用 2×SSC—0.1% SDS 室温下洗涤两次,然后用 0.2×SSC—0.1% SDS 68℃ 洗涤三次。空气中干燥滤膜,X-线胶片曝光。得到满意的印象后,剪下点样的小圆片,于含甲苯的内标液中计数。剪下相应大小的圆纸片,作为背景计数。

结果和讨论

图(1)是前列腺 nRNA 与克隆的 cDNA *92 (编码 13.5 KDa 多肽)和 *119 (编码 9.3 KDa 多肽)杂交的 Northern 分析。曝光的 X-线胶片显示,与 cDNA *92 杂交的 nRNA 有三条带,大小依次为 4.7、3.8 和 1.2 kb。最大的是 4.7 kb,可能是初始转录产物。3.8 kb 的条带较模糊,假定为转录后加工的中间产物。但其放射性的相对含量很低,仅 0.47%、不能排除污染造成的假象。1.26 kb 为成熟的 nRNA,相当于 mRNA 大小^[6]。最大的和成熟的 nRNA 长度差是 3.5 kb,约占初起转录物的 74%,代表 intron 顺序。cDNA *119 与 nRNA 的杂交

本人得到王通裕教授的资助及指导,在此铭谢。

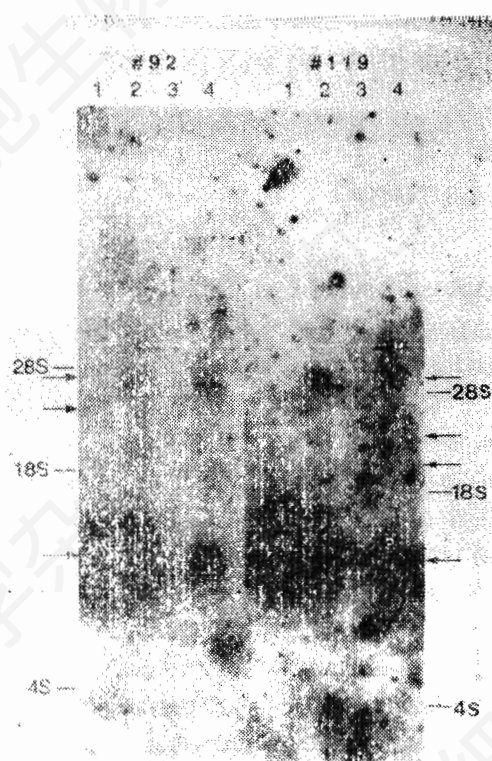


图1 大鼠前列腺 nRNA 与 cDNA 的 Northern 杂交

正常大鼠前列腺 Poly(A) nRNA(样品2)25 μ g, 经1% Agarose 凝胶电泳分部, 与 cDNA-92 和-119 作 Northern 杂交。分子量最大的 RNA 假定是初始转录产物, 曝光最强的是成熟 nRNA。样品1是正常大鼠 mRNA, 10 μ g。样品3是去雄激素大鼠前列腺的 Poly(A) RNA。样品4是正常大鼠前列腺总 nRNA。初始和成熟 nRNA 间的箭头所示, 为可能的中间加工转录物。

有类似情况, X-线胶片显示 1.18、2.5、3.1 和 5.4 kb 四条带。其中 1.18 kb nRNA 与 mRNA 大小相符, 最大的 nRNA 是 5.4 kb, 占初始转录物的 78%。因此可以估计, 编码多肽 13.5 kDa 和 9.3 kDa 的初始转录物, 可能是相应 mRNA 长度的 4 倍和 5 倍。分子量标准 28 S、18 S 和 4 S。

Northern 杂交的 X-线胶片用密度扫描仪分析结果见图(2)和表(1)。图(2)的密度分析显示, 正常大鼠 Poly(A) -nRNA 与 cDNA-92 或-119 杂交分别有三个或四个峰, 其位置与

照片上的条带对应。其中初始转录物分别占 5.3% 或 9.3%, 成熟 nRNA 分别为 94.4% 或 88%, 而中间转录物呈痕迹量, 分别为 0.47% 或 2.7%。由于分析精度的限制, 3.8 kb 和 3.1 kb 条带转模糊, 密度分析其含量分别占 0.47% 和 0.3%, 只能假定为可能的中间转录物, 尚不能排除污染造成的假象。上述 Poly(A) nRNA 的三种形式均与 cDNA 探针杂交, 表明 Poly(A) 化是转录后加工的最早步骤之一, 可能与 nRNA 的切接同时进行。我们尚能看到, 成熟 nRNA 占 90% 左右, 提示新生的 nRNA 分子切接过程相当快, 似是“瞬间”发生的。因此, 用常规生化制备方法得到的 Poly(A) nRNA, 其中间转录物的检测有一定的困难。当然, 这些可能的中间产物的证实, 需要辅以相应基因顺序的分析、比较。

图(1)第4行是正常大鼠前列腺细胞总 nRNA 与 cDNA 探针杂交的结果, 其带型与 Poly(A) nRNA 的相似, 尤以初始转录物显示相同的影象密度。由于 Poly(A) nRNA 的得率为 2% 左右, 因此总 nRNA 中的 50 倍, 才能在 Northern 杂交中呈现出相近的影象密度。同样道理, 根据密度分析(资料未列于本文)总 nRNA 中成熟转录物(第4行)为 Poly(A) -nRNA(第2行)中的 26%。由于总 nRNA 中相应的 RNA 分子被稀释了 50 倍, 所以其成熟 nRNA 理应为 Poly(A) nRNA 中的 13 倍。上述推算表明, 大部分的 nRNA 均未被 Poly(A) 化, 仅在核中周转, 其中少部分被转运到胞质用于蛋白质合成。

图中 mRNA 与成熟 nRNA 分子的位置一致, 表明后者为最终的加工产物。由于成熟 nRNA 占整个 Poly(A) nRNA 的 90% 左右, 因此杂交后过度曝光, 影象密度较宽, 难以精确计算其分子的大小。此外, 本实验中 RNA 电泳使用 1% 的 agarose 凝胶, 因而分子量较小的成熟 nRNA 分子在电泳中的分部与已发表资料(使用 1.4% agarose 凝胶)^[6] 有所差异。本文着重讨论前体 nRNA 的表达与激素的关

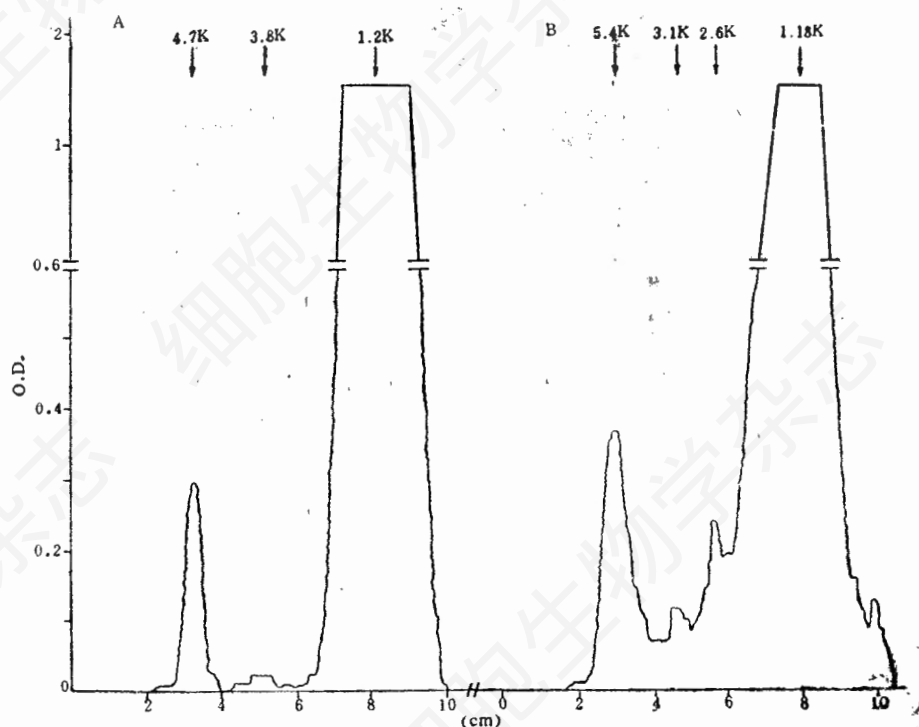


图2 大鼠前列腺 Poly(A) mRNA 各组分分析

正常大鼠前列腺 poly(A) mRNA 与探针 ^{32}P -cDNA-92 (A)和-119 (B) Northern 杂交(见图1 Lane 2)的密度扫描分析。

表1 大鼠前列腺 Poly(A) mRNA 各组分分析

	* 92		* 119	
	MW	%	MW	%
初始转录物	4.7 kb	5.3	5.4 kb	9.3
中间转录物 I	3.8 kb	0.47	3.1 kb	0.3
II			2.5 kb	2.4
成熟转录物	1.2 kb	94.4	1.18 kb	88

正常大鼠前列腺 Poly(A) mRNA 经与 cDNA-92 或-119 Northern 杂交后的 X-线胶片(见图1, lane 2), 密度扫描仪扫描的峰波(见图2)。按面积推算的百分比值。

系, 因此 mRNA 分子的大小是一个近似值。

已有报告, 去雄激素大鼠前列腺细胞中雄激素专一性基因的转录低下^[1-3], 本文 Northern 杂交显示相似结果。去雄激素的大鼠前列腺 Poly(A) mRNA 与 cDNA-92 或-119 的杂交未能探测到初始转录顺序, 况且成熟的 mRNA 也仅为微量(图1第3行)。然而, mRNA 点杂交的半定量检测结果发现, 去雄激素两天后可

杂交的顺序减少到正常数 20% 左右(图3)。这一差异除去操作因素之外, 可能反映了该两种方法用于探查基因表达状况精确度的差异。因此, 对于基因表达程度的探测, 宜加用内标准, 如 House Keeping 基因的探针。另一方面, mRNA 样品中已降解的顺序, 经 Northern 分部后被稀释或走出凝胶, 而不能被探测到。但是, 这些顺序仍然可以被固定在 NC 滤膜上而用点

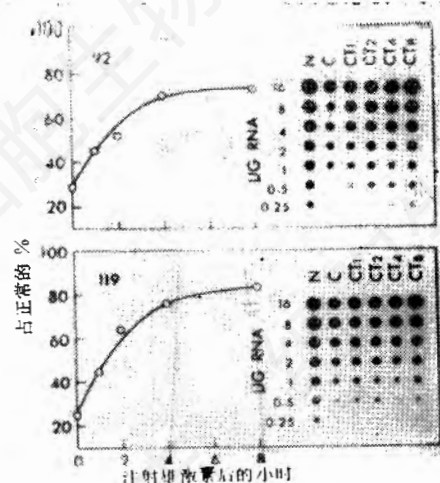


图3 大鼠前列腺 nRNA 和 cDNA 探针的 Dot 杂交

0.25—16 μg 不同激素条件下的大鼠前列腺细胞 Poly(A) nRNA 经系列稀释后点样于 N、C 滤膜, 与 cDNA 探针 *92 和 *119 杂交。N 为正常 nRNA, C 为去激素两天的 nRNA, CT₁—CT₈ 分别为去激素两天后注入雄激素后 1—8 小时所提取的 nRNA。杂交点纸片经闪烁液中计数, 以 10^3cpm 对 nRNA 量(μg)作图。

杂交的方法检测到。

图(3)的点杂交是用 cDNA-92 和 -119 来探测雄激素对前列腺细胞基因转录的影响。去雄激素大鼠于雄激素投用后 8 小时, 前列腺 nRNA 的合成达到最大, 分别为正常的 74% 和 80%, 这一结果与先前的工作相一致^[3,6]。投用雄激素后 4 小时, 大鼠前列腺 nRNA 的合成率减慢, 曲线趋于饱和。结果表明, 雄激素对于编码 13.5 kDa 和 9.3 kDa 两种多肽的基因转录活性, 有显著的调节作用。从 nRNA 合成的动力学分析, 转录活性于 2 小时左右最大。已有报告, 大鼠前列腺细胞核内 Poly(A) 聚合酶活性于雄激素处理后的 2—4 小时被刺激^[14]。这提示雄激素的作用至少也涉及到转录后的加工步骤。由于实验资料的限制, 本文尚不能就雄激素对于转录后调节的全过程的影响进行探讨。

摘 要

编码两种雄激素调节的多肽(13.5 kDa 和 9.3 kDa)的 mRNA 前体已由 Northern 杂交分析大鼠前列腺前叶细胞的 nRNA 得到证实。可被杂交的最大 nRNA 经测定是 4.7 kb 和 5.4 kb, 分别编码 13.5 kDa 和 9.3 kDa 两种多肽, 并被假定为初始转录物。基于已经测定的成熟 nRNA 分子大小分别是 1.2 kb 和 1.18 kb, 因此可以估计大约 80% 的初始转录物为 intron 顺序。该两种前体 RNA 的合成取决于雄激素的存在与否。在去激素两天的大鼠, 前体 RNA 的水平即降至正常的 20% 左右。注入雄激素后 8 小时, 前体 RNA 可以恢复到正常值的 80% 左右。文章尚不能对雄激素影响 nRNA 转录后加工过程的可能性, 作出进一步的探讨。

参 考 文 献

- [1] Heyns, W. et al., 1978, *Endocrinology*, 103:1090-1095.
- [2] Parker, M. G. et al., 1978, *Biochem. J.*, 170:115-121.
- [3] Chamberlin, L. L. et al., 1983, *Biochemistry*, 22:3072-3077.
- [4] Liang, T. et al., 1978, *Biochim. Biophys. Acta*, 542:430-441.
- [5] Satzman, A. G. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:432-437.
- [6] Xu, Y. H. et al., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:624-629.
- [7] Blobel, G. and V. R. Potter, 1966, *Science*, 154:1662-1665.
- [8] Cox, R. A., 1968, *Meth. Enzymol. Part B*, 12:120-129.
- [9] Aviv, H. and P. Leder, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69:1408-1417.
- [10] Bailey, J. M. and N. Davidson, 1976, *Anal. Biochem.*, 70:75-81.
- [11] Alwine, J. C. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5350-5354.
- [12] White, B. A. and F. C. Bancroft, 1982, *J. Biol. Chem.*, 257:8569-8572.
- [13] Xu, Y. H. et al., 1982, *Biochim. Biophys. Acta*, 760:278-283.