

- Theoretical and Applied 3rd. ed. London.
- [6] Gledhill, B. L. 1970. In "The Testis vol. II" p. 307-353 eds. Johnson, A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [7] Calvin, H. and Bedford, J. M. 1971. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 13,65.
- [8] Free, M. J. 1970. In "The Testis vol. II" p. 125-183 eds. Johnson, A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [9] de Domenech, E. M. et al. 1972. *Biol. Reprod.* 6,136-147.
- [10] Coniglio, J. G. 1977. In "The Testis vol. IV" p. 425-445 eds. Johnson A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L. Academic Press, New York, London.
- [11] Steinberger, A. and Steinberger, E. 1977. The Sertoli cell *Ibid.* p. 371-394.
- [12] Reddy, K. L. and Svoboda, D. J. 1967. *Am. J. Path.* 51,1-18.
- [13] Christensen, A. K. 1975, In "Handbook of Physiology section 7 Endocrinology vol. V. Male Reproductive System" p. 57-94. *Am. Physiol. Soc.*
- [14] Hamilton, D. W. 1972, In "Reproductive Biology" eds. Balin, H. and Glasser, S. p. 268-337 *Excerpta Medica Amsterdam.*
- [15] Sharon, N. et al. 1974. *Scientific American* 5,78-86.

大鼠肝癌 BERH-2 聚核糖体 mRNA 的变化

刘海湖、胡凤祖、贾爱琪、李文裕

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

真核细胞聚核糖体 RNA 包含正在翻译蛋白的 mRNA, 比较肝癌与正常肝聚核糖体 RNA (pRNA) 的异同, 对于了解癌细胞基因转录、翻译的分子过程和调控机理有着重要的意义。对真核细胞 RNA 复杂性的研究很多, 但大多数是对正常细胞 RNA 复杂性的研究, 或对不同类型细胞 RNA 复杂性加以比较。也有人比较了癌与正常细胞 RNA 的复杂性(1-3), 他们多采用分离的单一顺序 DNA 为探针, 进行分子杂交比较, 但胞质的 mRNA 与单一顺序 DNA 杂交只达 2-3% 的杂交率。因此本文报道了按 Grady 等的方法, 从正常大鼠肝的单一顺序 DNA 中进一步用胞质的 RNA 与之杂交, 选出所谓的可表达 DNA (pDNA) 部分, 以此为探针, 进行与 pRNA 过量的分子杂交, 希望提高杂交率, 从而比较了肝癌与正常肝聚核糖体中与正常肝 pDNA 对应的 RNA 的差异, 并测定了用羟基磷灰石分离的杂交分子对 S_1 酶抗性的不同, 进一步证实了这种差异的存在。

材料与 方法

(一) 材料

正常大鼠肝取自成年 Wistar 大鼠。

大鼠肝癌组织取自移植性肝癌 BERH-2 株^[4]。

S_1 酶为 Sigma 产品。其余化学药品为分析纯。

(二) 羟基磷灰石 (HAP) 的制备

参考 Giorgio Bernardi 的作法^[5]。2 升 0.5M $CaCl_2$ 和 2 升 0.5 M Na_2HPO_4 同时匀速 (5 毫升/分) 滴加到盛有 200 毫升 1.0 M $NaCl$ 或 400 毫升水的大烧杯中, 同时搅拌。滴加完后, 静置, 收集沉淀, 用 2000 毫升蒸馏水洗两次, 再用 2000 毫升重蒸水洗两次。沉淀悬浮在 4000 毫升重蒸水中, 边搅拌边加入 100 毫升 40% 的 $NaOH$, 加热至沸 1 小时, 冷却静置, 吸去上清液及沉淀较慢的沉淀物, 沉淀再用水洗, 同样煮沸, 同样吸去上清及沉淀较慢的沉淀物。然后, 将沉淀悬浮在 4000 毫升 0.01 M 磷酸钾盐缓冲液 (KP) 中, pH 6.8, 煮沸, 沉淀再悬浮在 0.01 M KP 中, 煮沸 5 分钟, 每次倾去上清时, 同时倾去沉淀较慢的沉淀物。最后沉淀悬于 0.001 M KP 中, 置 4 °C 冰箱, 保存备用。

(三)DNA 的提取与修剪

参考 Marmur 的方法[6]。杀死饥饿过的大鼠,取出肝组织,加 SSC(0.15 M NaCl, 0.015 M 柠檬酸三钠),匀浆,离心 7000 rpm(12000×g),20 分钟。弃上清液,留下沉淀。再以 SSC 液洗 2 次。加 10 倍体积的 SEDTA 液(0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0),加 SDS 溶液,使最终浓度为 1.6%,再加固体 NaCl,使最终浓度为 1.0 M,室温搅拌 1 小时,用等体积的氯仿-异戊醇(24:1)液抽提,水相以 2 倍体积乙醇沉淀。捞取 DNA 纤维,溶于 SSC 中,依次以等体积水饱和酚-氯仿(1:1, V/V)液、氯仿-异戊醇液抽提,水相再以 2 倍体积乙醇沉淀。

参考 Britten 等人的作法[7],捞取 DNA 纤维,溶于 SSC 中,加三分之二体积甘油,在冰冷的条件下,用匀浆器捣碎(8000 rpm, 36 分钟)。0.2 M NaAc、2 倍体积乙醇沉淀。低温冰箱贮存。

(四)单一顺序 DNA 的分离

参照 Grady 等人的作法[8],将修剪过的 DNA 溶解在含 1.35 M NaCl 的 0.1 M KP_i 中,浓度为 1.1 毫克/毫升,煮沸变性,60°C 温浴,使 Cot(核苷酸克分子浓度·秒)值达到 220。稀释至 0.01 M KP_i ,在 60°C 与以 0.01 M KP_i 平衡过的 HAP 混合,使之吸附,然后以 0.01 M KP_i 洗,再以 0.06 M KP_i 洗出单链部分。单链 DNA 调到 0.4 M KP_i ,再使 Cot 达到 220,同法洗出单链部分,对水透析,风吹浓缩,置低温冰箱备用。

(五)大鼠肝 EDNA 的制备

取单一顺序 DNA,溶于 1.35 M NaCl-0.1 M KP_i 中,煮沸变性,与 275 倍过量的大鼠肝细胞质 RNA 混合,60°C 温浴,使 Rot 值达到 11800。按前述方法,分出双链部分,再调到 0.3 N NaOH,降解 RNA,对水透析,风吹浓缩,贮存备用。

(六) ^{125}I 标记 EDNA

参考 Getz 等的作法[9],0.5 毫升标记混合物中含有 120 微克 EDNA, 6.25×10^{-5} M KI, 0.1 M NaAc-0.04 M HAc 缓冲液, pH 5.0, 0.8 毫居里 ^{125}I 同位素, 2.3×10^{-3} M $TiCl_3$, 60°C 温浴 20 分钟,然后在冰浴中加入 0.1 M Na_2SO_3 30 微升,消耗多余的 $TiCl_3$,同时,用 37 微升 1.0 M NH_4Ac -0.5 M NH_4OH 液调 pH 至 8, 60°C 温浴 30 分钟,加 NaAc 至 0.2 M, 2 倍体积乙醇沉淀。

离心收集沉淀,并以酒精:生理盐水(3:1)液洗一次,沉淀溶于水中,上 Sephadex G-50 柱层析分离,

用重蒸水洗脱,收集 EDNA,再以 HAP 纯化备用。

(七)RNA 的提取

(1) pRNA 的提取:

参考 Taylor 等的作法[10]。从饥饿了一天的大鼠取出肝组织,用生理盐水冲洗干净,加 5 倍体积的匀浆液(50 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7.7; 0.25 M 蔗糖; 500 微克/毫升肝素)匀浆,离心 12000 rpm(16000×g),20 分钟,吸取上清液,加入九分之一体积的 10% Triton-10% 脱氧胆酸钠液,20 分钟后,加入管底垫 1 M 和 0.5 M 两层蔗糖的离心管中,离心,105000×g,90 分钟,离心好后,弃上清液,沉淀溶于醋酸缓冲液(0.1 M NaAc, 5 mM EDTA pH 5.6),离心,12000×g,20 分钟,去掉沉渣,上清液则为聚核糖体溶液。聚核糖体溶液中加入 0.5% 的 SDS,用等体积水饱和酚:氯仿:异戊醇(58:48:2)液抽提 2 次,等体积氯仿抽提 1 次,0.2 M NaAc、2 倍体积乙醇沉淀。沉淀用 3 M NaAc, 10 mM EDTA, pH 5.6 液洗 2 次,再以酒精:生理盐水(3:1)洗 1 次,则为 pRNA。

(2) polyA-mRNA 的分离:

参考 Deeley 等人的作法[11]。200 O.D₂₆₀(波长为 260 毫微米时的光密度)的 pRNA 溶于 10 毫升 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5 的缓冲液中,室温上 Oligo(dT)纤维素柱(3×1 厘米),先以同一缓冲液洗到 O.D₂₆₀ 小于 0.04,然后升高温度至 45°C,用不含 NaCl 的上述缓冲液洗脱,收集,则为 mRNA。0.2 M NaAc, 2 倍体积乙醇, -20°C 冰箱沉淀。

(3) 大鼠肝细胞质 RNA 的提取:

按上述方法,大鼠肝匀浆,离心,去掉细胞核及其他杂物,得到细胞质液,直接提取 RNA。

(八)EDNA 与过量 pRNA 和 polyA-mRNA 杂交

参考 Tse 等的作法[2]。适量 pRNA 或 mRNA (5—18 毫克/毫升)同 ^{125}I -EDNA 按 5000—20000:1 混合,混合物还含 0.5—1.5 毫克/毫升酵母 tRNA, 0.1% SDS, 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM HEPES 缓冲液, pH 7.4, 以石蜡油覆盖,60°C 温浴,不同温浴时间取出 20 微升左右(3000—20000 cpm),加至 400 微升解离液(0.1 M 醋酸钠, 0.1 M 氯化钠, 1 mM 醋酸锌, 200 单位 S_1 酶, 5% 甘油, pH 4.5)中,37°C 温浴 2 小时,在冰浴中加入牛血清白蛋白 400 微克和 12% 的三氯醋酸,离心收集沉淀,再以 12% 的三氯醋酸洗,则为杂交部分,测放射性,计算杂交率:

$$\text{杂交百分率} = \frac{\text{沉淀 cpm}}{\text{总 cpm}} \times 100\% - \text{本底百分率}$$

结 果

(一) 单链 E_{DNA} 探针的纯度测试

(1) 真核基因组中的重复顺序 DNA 复性较快, 而单一顺序较慢。利用这一特性, 将大鼠肝 DNA, 两次温浴到 220 Cot 值, 分离单链部分, 第 1 次得率约 70%, 第 2 次约 80%, 这样就去掉了重复顺序 DNA, 得到一般认为的单一顺序 DNA。

从单一顺序 DNA 中分离的 E_{DNA} , 经 ^{125}I 标记后, 用专一降解单链核酸的 S_1 酶作用, 结果有 98% 的 ^{125}I - E_{DNA} 被降解 (见表 1)。又用专一降解 RNA 的 RNase 作用于 ^{125}I - E_{DNA} , 从表 1 可见, 完全不能降解, 可见 E_{DNA} 是不含 RNA 的单链 DNA, DNA 纯度在 98% 左右。

表 1 两种专一的核酸酶对 E_{DNA} 的降解情况

样 品	酶	降 解 (%)
^{125}I - E_{DNA}	S_1	98.2
^{125}I - E_{DNA}	RNase	0.0

(2) E_{DNA} 作为探针分别与大鼠肝 pRNA 经过一次 Oligo (dT) 纤维素柱层析分离的 polyA-mRNA 和 pRNA 杂交, 杂交动力学和杂交率详见图 1, 图示 E_{DNA} 与 polyA-mRNA 的饱和杂交率近 10%, 而与 pRNA 的杂交动

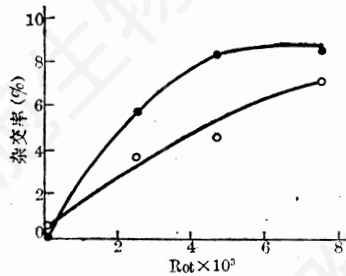


图 1 E_{DNA} 与过量的 pRNA 和 polyA-mRNA 杂交

DNA 的浓度为 2.6 微克/毫升, 而 pRNA 和 polyA-mRNA 的浓度都为 6.64 毫克/毫升。
○-○ 代表 E_{DNA} 同 pRNA 的杂交;
●-● 代表 E_{DNA} 同 polyA-mRNA 的杂交。

力曲线比与 polyA-mRNA 向右偏移, 而尚未达到饱和, 这结果表明: 1, E_{DNA} 与 polyA-mRNA 的饱和杂交率比单一顺序 DNA 与 polyA-mRNA 的饱和杂交率, 一般为 2%, 提高到 10% 左右, 因此, E_{DNA} 比单一顺序 DNA 较为敏感。两种样品, polyA-mRNA 与 pRNA 的 mRNA 的含量不同, 因此, E_{DNA} 与 mRNA 含量较低的 pRNA 的杂交动力学曲线向右偏移。2, E_{DNA} 与 pRNA 杂交的动力学曲线未达饱和, 但从一般的动力学曲线模式来看, 似已接近饱和, 因此 E_{DNA} 与 pRNA 的饱和杂交率会稍高于 polyA-mRNA, 这种差别可能是 pRNA 中的核糖体 RNA 的干扰或错交所致。

(3) 为了表明经过制备的 E_{DNA} 是否仍具有原先单一顺序 DNA 的特性, 将 E_{DNA} 用碘标记后, 与制备它的同批单一顺序 DNA 进行复性试验, 从曲线 (图 2) 表明, 复性主要在较

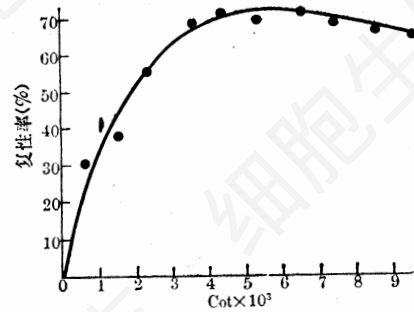


图 2 E_{DNA} 与单一顺序 DNA 复性曲线

高 Cot 进行, 符合单一顺序 DNA 的特征。但最大复性率只达 72%, 虽然基本上已达到要求, 但我们怀疑是 ^{125}I 标记的 E_{DNA} 在高 Cot 长期温浴的情况下发生碘的游离而降低复性率, 曾经将标记样品 60°C 温浴 91 小时, 有 4% 的 ^{125}I 游离出来, 温浴达数百小时, ^{125}I 的游离率近 10%。因此, 标记 E_{DNA} 中碘的游离, 只能是部分原因, 其余可能是 E_{DNA} 中含有某些不纯顺序所引起。根据以上几方面的实验分析, 认为从大鼠肝单一顺序 DNA, 经与胞质总 RNA 进行杂交而分离得到的单链 E_{DNA} , 仍具有原先单一顺序 DNA 的特征, 与 mRNA

杂交比用单一顺序 DNA 有较高的敏感性。我们用此作为探针进行了对正常肝及肝癌 pRNA 杂交的比较研究。

(二) 大鼠肝癌与正常肝 pRNA 的比较

(1) eDNA 同过量的大鼠肝癌和正常肝 pRNA 的饱和杂交:

杂交反应含有 eDNA 1 微克/毫升, pRNA 15 毫克/毫升。各种杂交都在同一条件下进行。由图 3 可见, eDNA 与肝癌和正常肝 pRNA 的饱和杂交率都在 10% 左右, 表明 eDNA 比单一顺序 DNA 更富有 pRNA 中 mRNA 的顺序。此外, eDNA 与大鼠肝癌的杂交率和饱和度比与正常肝 pRNA 略高约 1%。三次实验结果均显示如此情况, 由此表明, 正常肝 pRNA 与肝癌 pRNA 中同类顺序的浓度在肝癌 pRNA 较大。由于与 eDNA 的杂交饱和度亦有差别, 因此在 mRNA 的复杂性上亦存在着少些的不同。

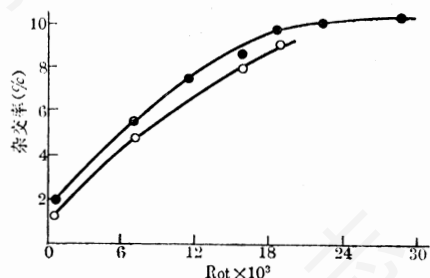


图 3 EDNA 同过量的大鼠肝癌和正常肝 pRNA 的杂交

○—○ 同正常肝 pRNA 的杂交;
●—● 同肝癌 pRNA 的杂交。

(2) eDNA-pRNA 杂交分子中单链部分的测定:

用 HAP 分离杂交分子, 再以 S₁ 酶处理, 求得杂交分子中单链的比例。从表 2 可见, eDNA

表 2 杂交分子中单链部分的测定

R ₀ t	种 类	S ₁ 酶降解 (%)
5968.5	EDNA-肝癌 pRNA 杂交分子	50.0
5968.5	EDNA-正常肝 pRNA 杂交分子	36.9
18088	EDNA-肝癌 pRNA 杂交分子	40.0
18088	EDNA-正常肝 pRNA 杂交分子	36.5

与肝癌 pRNA 不同 R₀t 的杂交分子分别有 40% 和 50% 的单链存在, 而与正常肝均仅 37% 的单链存在。同一探针, 同时与肝癌 pRNA 和正常肝 pRNA 杂交, 杂交分子中以单链形式存在的量不同, 亦可以辅证说明这两种 pRNA 中所含的 mRNA 不尽完全相同。

讨 论

本文分离制备的大鼠肝 eDNA, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 大小约 600 个碱基左右。根据上述的对其性质的实验分析, eDNA 可作为比单一顺序 DNA 较灵敏而专一的探针, 应用于对胞质 mRNA 的分子杂交研究中^[8]。又因其是单链的, 很少含有互补链, 所以自身复性少^[8], 特别在 DNA 必须过量的杂交实验中。虽然 eDNA 有以上优点, 但从实验中可以看到, 亦有不足之处, 主要是 eDNA 是从单一顺序 DNA 与胞质 mRNA 杂交后分离出来的, 按理论来说, 它应包括胞质的 mRNA 全部复杂性, 当它与胞质 pRNA 杂交时, 应该是得到较高的杂交率, 因为胞质大部分 mRNA 都在 pRNA 中, 但我们实验中的杂交率只达 10% 左右, 这反映所分离 eDNA 仍然相当的不纯, 产生的原因, 一是分离 eDNA 的方法尚有缺陷, 有待改进。二是, 也是主要的, 核酸间的群体相互杂交是很不精确的方法, 干扰因素较多, 错交的机会也是很大的, 特别在高 Cot 条件下。因此, 应用杂交方法提取分离至少一方最好是已知确定的核苷酸顺序, 这样可以杂交分离到较纯的相对应的顺序。

从肝癌与正常肝 pRNA 对 eDNA 的比较杂交曲线(图 3)可见, 不论不同 R₀t 时的杂交率, 还是饱和杂交率, 肝癌的都高于正常肝百分之一左右, 说明肝癌 pRNA 的 mRNA 含量高, 而且种类也多一些。这种现象与我们另外的工作是一致的^[13]。也表明正常肝与肝癌 pRNA 的 mRNA 大部分是相似的, 仅一小部分是不同的。从杂交的实验数据看到肝癌的 mRNA 比正常肝种类有些增加, 但并不意味着

某些种类的 mRNA 不会减少, 只是, 增加是净结果。事实上, 正常肝的某些 mRNA 在肝癌 pRNA 中不存在。表明癌不是无规律的增加, 而是有增有减, 是有规律的, 符合癌细胞表型变化的规律。这种现象不仅在肝癌中存在, 而且在胚肝(1)、再生肝(12)中程度不同的存在。为什么肝癌正在翻译蛋白的 mRNA 与正常肝有不同呢? 可归之于它们的基因的表达在转录或翻译的调节上发生了变化所引起。

参 考 文 献

- [1] 徐永华, 彭素芬, 张玉砚. 1979. 实验生物学报, 12:237-245.
- [2] Tse T. P. H., H. P. Morris, and J. M. Taylor, 1978, *Biochemistry*, 17(15):3121-3128.
- [3] Atryzek V., Tamaoki, and N. Tausto, 1980, *Cancer Research*, 40:3713-3718.
- [4] 强家模, 季闻行, 孙兰英, 徐永华. 1978. 实验生物学报, 11:87-93.
- [5] Bernardi G., 1971, *Chromatography of Nucleic Acids on Hydroxyapatite Columns*, in "Methods in Enzymology", 21(Part D): 95-139.
- [6] Marmur J., 1961, *J. Mol. Biol.*, 3:208-218.
- [7] Britten R. J. D. E. Graham, and B. R. Neufeld, 1974, *Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation*, in "Methods in Enzymology", 29(Part E):363-418.
- [8] Grady L. J., A. B. North, and W. P. Campbell, 1978, *Nucl. Acids Res.*, 5(3): 697-712.
- [9] Gets M. J. L. C. Altenburg and G. F. Saunders, 1972, *Biochim. Biophys. Acta*, 287:485-494.
- [10] Taylor J. M. and R. T. Schimke, 1973, *J. Biol. Chem.*, 248(22):7661-7668.
- [11] Deeley R. G., J. I. Gordon, A. T. H. Burns, K. P. Mullinix, M. Binastein, and R. F. Goldberger, 1977, *J. Biol. Chem.*, 252(22):8310-8319.
- [12] Colbert D. A., M. V. T. V. Atryzek, and N. Fausto, 1977, *Develp. Biol.*, 59:111-123.
- [13] 徐幼海. 1982. 实验生物学报, 15:331-340.

用未标记免疫酶技术在甘蔗大豆叶片内定位 RuBP 羧化酶*

王 美 琪

(中国科学院上海植物生理研究所)

RuBP 羧化酶是绿色植物同化 CO₂ 的关键酶。研究 RuBP 羧化酶在 C₄ 植物叶片内的分布, 有助于阐明 C₄ 植物的光合作用结构和功能的特点, 以及 RuBP 羧化酶对光合作用的调控功能。这种工作具有明显的理论意义和实用价值。

近年来对利用免疫荧光法在 C₄ 和 C₃ 植物叶切片内定位 RuBP 羧化酶已有所研究^[1,2], 但尚未见到用未标记免疫酶染色技术在植物叶片内定位 RuBP 羧化酶的报道。

本文应用未标记免疫酶技术在叶片内定位 RuBP 羧化酶, 它比免疫荧光技术、免疫酶标技术更加灵敏和专一。

以特异性兔抗 RuBP 羧化酶抗血清为第一抗体, 用未标记免疫过氧化物酶技术在大豆 (*Glycine max.*), 甘蔗 (*Saccharum sinensis*) 叶冰冻切片内定位 RuBP 羧化酶, 借助光学显微镜观察实验结果。

材 料 与 方 法

一、抗血清的制备

1. 特异性抗 RuBP 羧化酶抗血清 从菠菜叶片中提取和纯化的 RuBP 羧化酶, 酶纯度较高, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现一条带。用纯化的 RuBP 羧化酶作为抗原, 制备兔抗 RuBP 羧化酶抗血清, 方法同前

*双磷酸核酮糖羧化酶简称 RuBP 羧化酶。