



真核细胞 mRNA 3' 端 Poly(A) 序列长度测定

程振起 吕俊宣*

(中国科学院生物物理研究所)

盖晓霞 徐长法 沈同

(北京大学生物系)

在生物体中, 信使核糖核酸(mRNA)的生物学功能是从 DNA 接受遗传信息, 再以密码形式翻译出特异性蛋白质。mRNA 对于基因表达和遗传信息传递起着重要作用。真核细胞 mRNA 分子的结构较为复杂, 其特征之一是它的 3' 端几乎都有多聚腺嘌呤核苷酸序列 (poly(A))。poly(A) 的功能可能是对 mRNA 在核内加工或由核内向胞质转移起作用^[1,2]。也有人发现在 mRNA 行使生物功能过程中, poly(A) 逐渐变短^[3]。但是, 生物体中也存在着有活性而 3' 端无 poly(A) 的 mRNA。目前, poly(A) 在 mRNA 分子中的作用尚无定论。

在深入研究 mRNA 结构及功能的同时, 较准确地、直观地测定其 3' 端 poly(A) 的长度也是有必要的。过去人们曾用凝胶电泳或 ³H 标记的 poly(U) 与 poly(A) 杂交的方法间接测定

poly(A) 长度, 其准确度较差^[4]。本文应用 RNA 3' 端标记及酶解方法和聚丙烯酰胺电泳与放射自显影技术直接测定了鸡和兔的血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 的长度及分布。

材料与 方法

材料

[γ -³²P]ATP, 比强大于 2000 居里/毫克分子 (英国, Amersham); 3'-CMP, H⁺ 型, 纯度为 98% (上海, 东风生化试剂厂); T₄ 多核苷酸激酶和 T₄RNA 连接酶 (中国科学院生物物理所生化厂分别为 6.5 单位/微升和 0.5 单位/微升); 牛胰核糖核酸酶 (RNase A), 核糖核酸酶 T₁ 和 T₂ (RNase T₁ 和 RNase T₂) (西德, Boehringer mannheim GmbH); 丙烯酰胺 (天津市化学试剂一厂); 甲叉双丙烯酰胺 (匈牙利, Reanal); DTT (西德, Serva); Hepes (瑞士, Fulka); Tris (四

*中国农业科学院畜牧研究所。

参 考 文 献

- [1] Imamura, J., H. Harada, 1980, *Z. Pflanzphysiol.*, 100:285-289.
- [2] Johanson, L., B. Andersson, T. Eriksson, 1982, *Physiol. Plant.*, 54:24-30.
- [3] Pannbacker, R. G., L. S. Bravard, 1972, *Science*, 175:1014-1015.
- [4] Hamada, T., M. Furuya, K. Hodata, 1982: *Experientia*, 38:462-464.
- [5] Moore, T. C., 1979, *Biochemistry and physiology of plant hormones*. Springer-Verlag, 193-202.
- [6] Noodén, L. D., A. C. Leopold, 1978: *phytohormones and the endogenous regulation of senescence and abscission*. In "Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise, Vol. II", Letham, Goodwin & Higgins, ed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 347-349.
- [7] 关颖谦, 方建雄, 张映璜, 王丽蓉, 陈梓卿. 1981: *植物生理学报*, 7: 257-263.
- [8] 山口俊彦, 中岛哲夫. 1972: *日作纪*, 41: 531-532.
- [9] Shephard, J. F., 1980, *Plant Sci. Lett.*, 18: 327-333.
- [10] Inoue, M., E. Maeda, 1981: *Japan. J. Crop Sci.*, 50: 318-322.
- [11] Brown, E. G., R. P. Newton, 1981: *Phytochemistry*, 20: 2453-2463.
- [12] 张述祖, 陈皓兮, 周静茹. 1980: *北京师范大学学报*, 1980:131-136.
- [13] Mizuno, K., A. Komamine, 1978: *Bot. Mag. (Tokyo)*, 91: 213-219.

川自贡化工研究院试剂厂); 聚乙烯亚胺(PEI) 50%水溶液(英国, BDH); 纤维素MN300(西德, Macherey Negel + CO 516 Düren)。其它常规试剂均为北京化工厂产品。

方法

1. 鸡和兔血红蛋白 mRNA 分离纯化方法已有介绍^[5]。

2. ³²pCp 制备和 mRNA 3' 端标记参照有关方法^[6]。两步反应均在同一系统中进行。反应系统为: 50 mM Hepes-Tris pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 3.3 mM DTT, 10 微克/毫升牛血清白蛋白, 10% (V/V) 二甲基亚砷。

3. 混和酶解: mRNA 3' 端标记后, 在原反应液中加入 10 微升混和酶(RNase A 0.5 毫克/毫升, RNase T₁ 2500 单位/毫升, 在 0.1 M 醋酸铵溶液中, pH 4.5), 于 37°C 保温 3—4 小时, 切去 mRNA 分子中除 poly(A) 外的其他三种核苷酸 (RNase A 切 CpN 和 UpN, RNase T₁ 切 GpN)。保温后加入电泳指示染料直接点样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳。

4. 凝胶电泳: 电泳缓冲体系为 90 mM Tris-硼酸 pH 8.3, 1mM EDTA, 12% 聚丙烯酰胺凝胶 (90 × 20 × 0.1 厘米, 丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 = 19:1 (w/w)) 预电泳 (1.5—2.0 千伏, 20—24 毫安) 4—6 小时, 将 3) 处理好的样品点样 (上样孔 1 × 1 × 0.1 厘米) 电泳 (1.5—2.0 千伏, 20—24 毫安) 约 10 小时, 10% 醋酸固定 15 分钟, 用 0.015 毫米厚的塑料薄膜包好, 对 X-光乳胶片于 4 °C 曝光 (约 8 小时)。

5. PEI-纤维素薄层制备: 100 毫升 1% PEI-HCl pH 6.0 水溶液与 15 克纤维素 MN 300 混匀, 铺于废的除去胶膜的 X-光片基 (38 × 25 厘米) 上^[7]。

6. 凝胶上的放射性样品带向 PEI 纤维素薄层转移, 原位酶解和 1.0M LiCl 上行展层之操作已有介绍^[8]。

结果和讨论

我们应用聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影直读序列法测定了鸡和兔血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 的长度及其分布 (图 1)。

(1) ³²pCp 制备 50 mM Hepes-Tris pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 3.3 mM DTT, 10 微克/毫升牛血清白蛋白, 10% (v/v) 二甲基亚砷, 50 μCi [r-³²p] ATP, 1mM 3'-CMP, 10 单位 T₄ 多核苷酸激酶, 总体积 50 微升, 37°C 保温 10—30 分钟, 沸水中煮 1.5 分钟。

(2) mRNA 3' 端标记 在 (1) 反应液中加入 5 微升 mRNA 样品 (25—50 微克), 2 微升 ATP (5 mM), 5 单位 RNA 连接酶, 于 4 °C 保

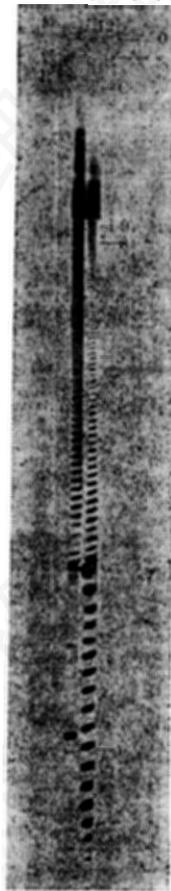
温过夜。

(3) 在上述 (2) 反应中, 直接加入 10 微升混和酶于 37°C 保温 3—4 小时。

反应液加 1/4 体积电泳指示染料 (0.05% 溴酚兰, 0.05% 二甲苯蓝, 10 M 尿素, 2 倍电泳缓冲液) 点样于经过预电泳的 12% 聚丙烯酰胺凝胶加样孔中, 电泳 (1.5—2.0 千伏, 20—24 毫安) 约 10 小时。取下上层玻板, 凝胶连同下板在 10% 醋酸中固定 15 分钟, 点上放射标志, 包上一层 0.015 毫米厚的塑料薄膜, 4 °C 曝光约 8 小时。

从 ³²pCp 的制备, mRNA 3' 端标记到混和酶解都是在一个反应管中进行。方法简便, 操作容易, 而且得到了较高的标记效果。

从图 1 可见, mRNA 3' 端 poly(A) 的长度是随机分布的, 这可能是在 mRNA 行使翻



- 1 —— 兔血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 图谱
- 2 —— 鸡血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 图谱
- R, C —— 分别为兔、鸡血红蛋白 mRNA 3' 端最长 poly(A) 谱带
- A —— 前沿第一个核苷酸位置
- O —— 点样基线

图 1 3' 端标记的 poly(A) 电泳放射自显影图谱

译功能过程中, poly(A) 长度逐渐变短形成的。从图 1 的放射自显影谱带, 直接可读出 poly(A) 长度到约 90 个碱基, 再长的 poly(A) 由于凝胶分辨率的限制, 不能用肉眼读出。实验发现, 可辨范围内 poly(A) 长度之对数与其迁移率有线性关系。我们根据这种关系推算出鸡和兔血红蛋白 mRNA 3' 端 poly(A) 最长者分别为 150—160 个和 170—180 个碱基。

从使用的混和酶专一性降解 3' 端标记的

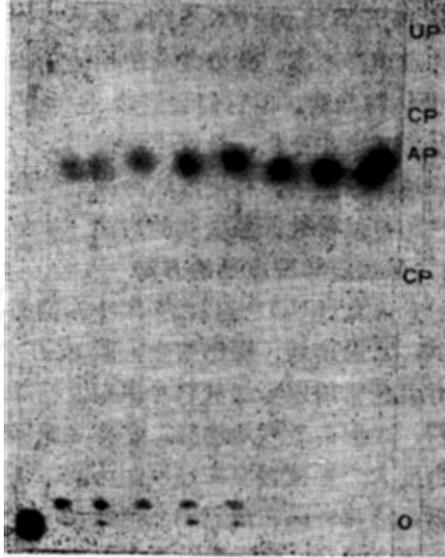


图 2 RNase T₂ 降解 3' 端标记 poly(A) 的层析放射自显影图谱

O——基线 Ap、Gp、Cp、Up 分别为四种单核苷酸层析位置

3' 端标记的 poly(A) 谱带转移到 PEI-纤维素薄层上后, 原位用 RNase T₂ (200 单位/毫升, 0.1 M 醋酸铵 pH 4.5) 降解成 3'-单核苷酸, 在 1.0 M LiCl 中上行层析 6 小时, 于室温放射自显影。

mRNA 和放射自显影谱之间间隔的均匀程度, 可以肯定各带均为 poly(A) 片段。为了进一步证实, 我们又将放射谱带转移到 PEI-纤维素薄层上, 用 RNase T₂ (0.1 M 醋酸铵, pH 4.5) 进行原位酶解, 得到 3' 标记的 Np³², 在 1.0 M LiCl 中上行层析(图 2) 所得到的放射自显影图谱上各点均为 Ap³², 这就毫无疑问地证明图 1 的各条谱带均为 poly(A)。

从实验结果可见(图 1), poly(A) 片段越大, 放射自显影谱带越弱, 这可能由两种原因造成: 1. 由于 mRNA 代谢过程使含有较长 poly(A) 的 mRNA 越来越少; 2. RNA 连接酶标记小片段比大片段效率高。

本方法可适用于所有 mRNA 3' 端 poly(A) 序列长度及分布的测定。

参 考 文 献

- [1] Adesnik, M., et al., 1972. *J. Mol. Biol.*, 71: 21-30.
- [2] Darnell, J. E., et al, 1971. *Science*, 174: 507-510.
- [3] Gorski, J., et al, 1975. *Nature*, 253: 749-751.
- [4] Hunt, J. A., 1973. *Biochem. J.* 131: 327-333.
- [5] Jacobs-Lorena, M., et al, 1972. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69: 1425-1428.
- [6] 魏西平等. 1982. 《生物化学与生物物理进展》1 期, 60 页。
- [7] Randerath, E., et al, 1967 *J. Chromatog.*, 31: 485-499.
- [8] Randerath, K., et al, 1964. *J. Chromatog.*, 16: 111-125.

生物样品制备的冷冻技术

锤慈声 陈桂荣

(上海第一医学院)

在分子水平上探讨生物组成, 用电子显微镜(EM) 与生物化学和 X 线衍射等方法有着根本的差异。采用电子显微镜可以探讨活细胞及活组织是以怎样的形式存在并起作用的。

如何使样品保存得近于活体状态, 并能放

在电镜下进行观察, 是样品制备方法的关键。用醛类和 OsO₄ 固定剂进行处理, 是为了使活细胞体的生命现象在瞬间停止并固定住, 并使在以后的各种处理中尽可能少发生变化。脱水、包埋、薄切、染色则是为了使固定后的样