



小牛胸腺 mRNA 的提纯与翻译活性

宋建国 蔡红 刘培楠

(北京市肿瘤研究所)

胸腺的多种功能是通过自身分泌的一类胸腺素组分完成的。这些胸腺素组分是由不同种类和数量的氨基酸分子所组成的小分子多肽。目前国内^[1,2]外^[3,7]已报道了从小牛或猪的胸腺提出不同的胸腺素组分,进行了氨基酸组成与结构、理化性质、生物活性和临床应用等研究^[8]。本研究室也从小牛胸腺提出一种多肽,其氨基酸组成与文献报道的有所不同^[9]。

最近, Freire 等^[10,11]证明从小牛胸腺提出的 mRNA 翻译产物(分子量 16,000)是胸腺素 α_1 的前身物。本工作研究胸腺中 mRNA 存在的情况及其翻译活性。

材料和方法

材料

小牛胸腺(北京红星公社),蔗糖(分析纯), Sepharose 4 B(Pharmacia), 寡(dT)纤维素(上海生化试剂二厂), DNase(电泳纯, 无 RNase 活性), 农大 139 麦种(北京东北旺公社), 20 种氨基酸(AR), [³H]-DL-亮氨酸(57 Ci/mmol, 1m Ci/ml)(上海原子核所), ATP-Na, GTP-Na (Sigma), 磷酸肌酸钠(电泳纯, 上海东海厂), 磷酸肌酸激酶(本室制备), 其他 Hepes, Tris, 无机盐均为分析纯。

方法

1. 小牛胸腺聚核糖体核糖核酸(pRNA)的制备

(1) 镁离子沉淀法按 Freire 等的方法进行。

(2) 超速离心法^[12]按(1)法制备胸腺匀浆上清液, 铺在缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 M 蔗糖)液面上(1.0-1.5:1), 在 105,000 × g, 4 °C 离心 90 分钟, 得聚核糖体。

从上述两法所得聚核糖体, 用水溶解, 分装, 保存在 -40 °C 冰箱内, 待用。

(3) pRNA 的提取 将聚核糖体溶于 Tris-HCl 缓冲液中^[11], 加酚与氯仿混合液提取 RNA, 用无水乙醇沉淀, 经真空干燥后, 用重蒸水配成 20-40 A₂₆₀ 单位/ml, 存于 -40 °C 冰箱中。

2. 小牛胸腺 mRNA 的制备^[13]

按 Aviv 及 Leder 的方法^[13]及上海实验生物所三室方法^[14]进行。

3. Sepharose 4 B 柱层析按 Goldstein 等方法^[15]进行。

4. mRNA 模板活性的测定

(1) 麦胚提取物的制备 参照 Roberts 等方法^[16]制备。

(2) mRNA 模板活性的测定^[17]麦胚翻译体系的总体积为 50 ml, 含有 28 mM Hepes, pH 7.5, 0.1 M 乙酸钾, 3 mM 乙酸镁, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 0.02 mM GTP, 8 mM 磷酸肌酸, 3 μg 磷酸肌酸激酶, 19 种氨基酸(无亮氨酸)各 24 μM, 3 μCi(1 μCi/μl) [³H]亮氨酸, 0.5-2.0 μg mRNA, 1.2-1.6 A₂₆₀ 单位麦胚液。

测定管含上述翻译体系的所有组分, 对照管含上述翻译体系, 唯缺外源性 mRNA, 本底管含上述翻译体系, 唯缺放射性亮氨酸。于 25 °C 水浴中保温 90 分钟, 在冰浴中终止反应, 分别吸出 10 μl, 点在新华三号滤纸片上, 吸干, 加闪烁液在 FJ-353 液闪计数器读脉冲数。

5. 翻译产物的分析

SDS 聚丙烯酰胺凝胶连续电泳^[18]: 将翻译反应终止后的测定管和对照管中的液体, 分别取其 1 体积与 1-2 体积样品缓冲液混合, 在 90 °C 水浴加热 5 分钟, 然后分别加在 0.2% SDS 聚丙烯酰胺凝胶管(0.6 × 8.5 cm)的上端, 每管电流 8 mA, 电泳 6-9 小时, 常规固定, 考马斯蓝染色。

将样品电泳凝胶与对照电泳凝胶分别切成小片(3 mm/片)70 °C 烘干, 冷却后加 H₂O₂ 约 0.3 ml, 置 65 °C 水浴中 3 小时, 待凝胶完全溶解, 加入闪烁液, 测其脉冲数。以样品胶片的每分钟脉冲数减对照胶片每分钟脉冲数绘图。

结 果

1. 小牛胸腺聚核糖体及其 RNA

每 100 g 组织可得聚核糖体 1400—1786 A_{260} 单位, 平均为 1560 A_{260} 单位。其 A_{260}/A_{280} 值为 1.71—1.84 (以 SDS 液为介质), 或 1.22—1.48 (以水为介质)。镁离子沉淀法超离心法所得聚核糖体得率无明显差别。

从聚核糖体提取 pRNA, 每 100g 组织可得 160—820 A_{260} 单位 pRNA, 其 A_{260}/A_{280} 为 2.02—2.16。其中最大紫外吸收值位于 260 nm, 最小吸收值位于 230 nm。

pRNA 经寡(dT)纤维素亲和层析分成两部分(图 1)。第二部分为 mRNA, 占 pRNA 的 0.7—0.4%, 其中 A_{260}/A_{280} 为 1.97—2.06, A_{260}/A_{230} 为 1.64—1.80。

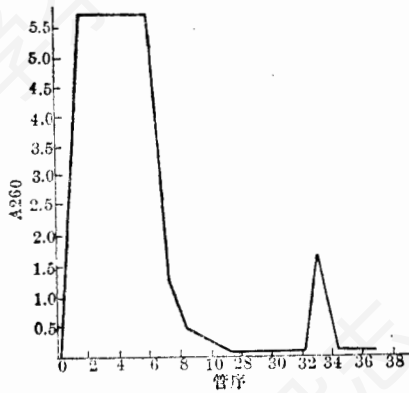


图 1 pRNA 的寡(dT)纤维素亲和层析

由上所得 mRNA 进行 Sepharose 4 B 层析, 又可分为两个峰(图 2)。两峰均用乙醇沉淀, 经在麦胚翻译体系显示有 mRNA 的翻译活性, 第一部分的活性较高于第二部分。(数据从略)

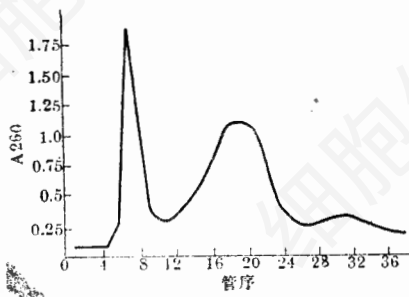


图 2 胸腺 mRNA 的 Sepharose 4 B 层析

2. 胸腺 mRNA 的翻译活性

按“方法”4 制备的麦胚液, 每 ml 的 A_{280} 值为 80—126, 平均 102。 A_{230}/A_{260} 平均为 1.44。下列表显示加有胸腺 mRNA 的测定管与不加胸腺 mRNA 的对照管相比较所表现的翻译活性。前者比较后者提高平均为四倍。

表 1 小牛胸腺 mRNA 的翻译活性

批次	测定管 (A)cpm	对照管 (B)cpm	A B
1	3890	1015	3.8
2	2335	1445	1.6
3	1770	480	3.7
4	7680	1775	4.3
5	2635	430	6.1
6	2540	700	3.6

3. 胸腺 mRNA 的浓度对其翻译活性的影响

从图 3 可以看出不同浓度的 mRNA 在麦胚翻译体系中翻译活性随 mRNA 的浓度增加而上升, 以 1 μ g 左右为最适当, 超过此范围的 mRNA 浓度, 翻译活性反而下降。这可能由于 mRNA 制品中所含的盐离子的影响。

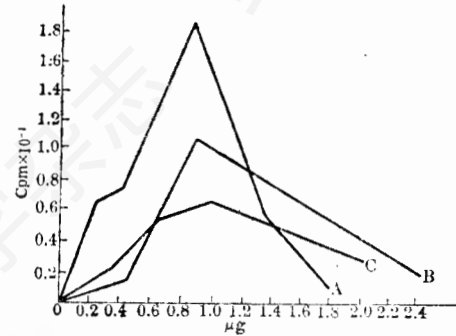


图 3 胸腺 mRNA 浓度对体外翻译活性的影响(A、B、C表示三次实验结果)

4. 翻译产物的放射活性及相应分子量

胸腺 mRNA 的翻译产物经在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 可将所测的放射活性绘制如图 4, 主要为分子量 14,000 和 18,000 两个部分。

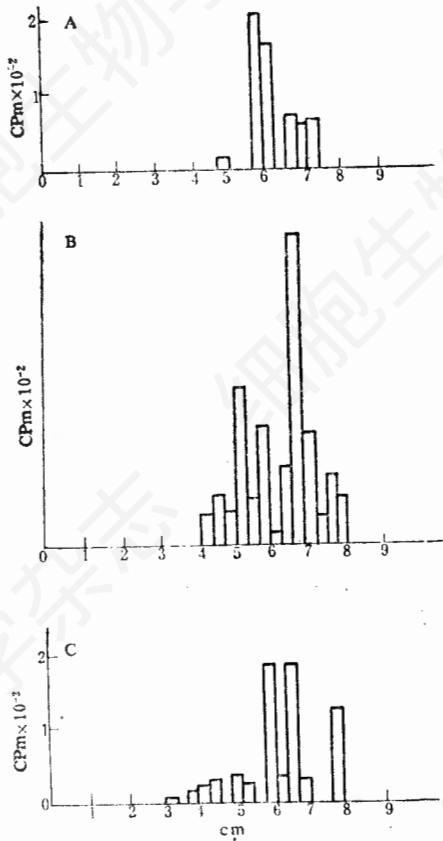


图4 翻译产物的放射活性(三次实验结果)

讨 论

小牛胸腺含有大量的DNA,而RNA含量相对地少,mRNA则更少。因此采用从胸腺总RNA中纯化mRNA的方法则提取损失很大。本实验用制备核糖体RNA,再进一步提取mRNA,可大大减少mRNA的损失。本实验用寡(dT)纤维素柱和Sephrose 4B柱层析纯化mRNA,可达到较满意的效果。参考Rosen等方法^[19]mRNA量在4—5mg以上可得较纯的mRNA,10mg以上则达不到纯化目的。经纯化的mRNA进行尿素-琼脂糖凝胶电泳^[19],

可见10条带。由于含量及技术上的困难,尚未对每条带进行翻译活性测定。

本实验翻译产物电泳结果与Freire等报道相符^[10,11]。其性质尚有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] 刘士廉等,1978,生物化学与生物物理学报,10: 413.
- [2] 金以丰等,1980,生物化学与生物物理学报,12(2): 133.
- [3] Goldstein, A. L. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 725.
- [4] Low, T. L. K., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254: 981.
- [5] Kook, A. I., 1975, *Cell Immunol.* 19: 151.
- [6] Schesinger, D. H., 1975, *Cell* 5: 361.
- [7] Bach, J. F. et al., 1975, *The Biological Activity of Thymic Hormones*, 145.
- [8] Goldstein, A. L. et al., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1800.
- [9] 刘培楠等,1983,中华微生物免疫学杂志,3(3) 137.
- [10] Freire, M. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(12): 6007.
- [11] Freire, M. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(1): 192.
- [12] Michael, E. et al., 1974, *Eur. J. Biochem.* 43: 549.
- [13] Aviv, H. and Leder, P., 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69(6): 1408.
- [14] 上海实验生物所三室,1977,生物化学与生物物理进展,第四期。
- [15] Jeffrey, M. et al., 1975, *Biochemistry* 14(1): 69.
- [16] Roberts, B. E. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2330.
- [17] Marcus, A. et al., 1974, *Nucleic Acids. Res.* 1: 1385.
- [18] Weber, K. and Osborn, M., 1969 *J. Biol. Chem.* 244: 4406.
- [19] Rosen, I. M. et al., 1980, *Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology*, 4th ed. Chap 4: P.13.

(上接第34页)

参 考 文 献

- [1] Schlarbaum, S. E. and Tsuchiya, F., 1981

The Journal of Heredity. 72(1): 62--63.

- [2] Pathak, S., 1979 *J. Reprod. Med.* 17(1): 25--26.