

几种层析柱吸附多聚腺苷酸和与多聚腺苷酸相连的信使核糖核酸能力的比较

宋德秀 于建康

(中国科学院动物研究所)

我们选用上海试剂二厂生产的 oligo(dT)-纤维素,美国 P-L 厂生产的 oligo(dT)-纤维素,瑞典 Phamacia 厂生产的 Poly(U)-Sepharose-4B 和美国 Sigma 厂生产的 Sigma cell 38 微晶纤

维素制备层析柱,以比较它们对多聚腺苷酸 [Poly(A)] 和与 Poly(A) 相连的信使核糖核酸 (mRNA) 的吸附能力。

实验中所用的 Poly(A) 是匈牙利 Roaral 厂

产品。大鼠肝多聚核糖体 RNA (polysomal RNA) 按以下方法制备。

(一) 大鼠肝 Polysomal RNA 的制备

全部操作在 4°C 条件下进行。取新鲜的大鼠肝脏, 称重加二倍体积的 TMKS 缓冲液 (Tris-HCl 40mM, pH7.4, MgCl₂ 5mM, KCl 25 mM, 蔗糖 0.25M), 剪碎并用玻璃匀浆器匀浆 4—5 次。匀浆物用纱布过滤。将滤液用 30,000 ×g 离心 10 分钟, 弃去沉淀(细胞核、细胞碎屑及线粒体等), 取上清液再以 150,000 ×g 离心 2 小时, 弃去上清, 将沉淀(多聚核糖体部分)溶于 TSES 缓冲液 (Tris-HCl 10mM, pH7.5, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, SDS 0.5%), 加蛋白酶置室温下消化 30 分钟。然后加半量用 TSES 缓冲液饱和的酚(pH7.5)和半量氯仿-辛醇(24/1, W/V), 置室温下振荡 30 分钟, 用 2,700 ×g 离心 20 分钟。取上层水相液用同样方法重复处理一次。最后取上层水相液加乙酸钾至 0.2M, 再加 2 倍体积冷的 95% 乙醇, 置 -20°C 冰箱沉淀过夜。次日用 2,700 ×g 离心收集沉淀, 再用冷乙醇洗 2—3 次, 最后将沉淀物 (polysomal RNA) 溶于适当缓冲液, 供进一步分离纯化 mRNA 用。

(二) 四种层析柱吸附 Poly(A) 和与 Poly(A) 相连的 mRNA 能力的比较

1. Sigma cell 微晶纤维素层析: 主要参考 Schutz, Beato 和 Feigelson¹⁾ 的方法。1 克干重 Sigma cell (38 型) 微晶纤维素, 加 10 毫升缓冲液 (Tris-HCl 0.01M, pH7.6, KCl 0.5M, MgCl₂ 0.2mM) 浸泡过夜。次日调成糊状装柱 (1 × 5 厘米), 再用同样缓冲液充分平衡层析柱。然后把样品 (Poly(A) 或 polysomal RNA) 溶于同样缓冲液 (浓度为 30A₂₆₀/ml, 加样量见表 1、2) 上柱。再用上述缓冲液继续洗脱层析柱 (约需 300 毫升缓冲液), 至洗脱液的 260 毫微米吸收值小于 0.05 后, 改用中性无离子重蒸水洗脱 (约需 100 毫升), 流速为 1 毫升/3 分钟, 每 3 毫升收集一管。测量它们在 260 毫微米的吸收值, 计算 Poly(A) 和与 Poly(A) 相连的 mRNA 的回收量。

2. oligo(dT)-纤维素层析: 主要参考 Haim. Aviv 和 philp. leader²⁾ 方法进行。全部操作在室温条件下进行。1 克干重 oligo(dT)-纤维素加 10 毫升层析缓冲液 (Tris-HCl 0.01 M, pH 7.6, KCl 0.5 M, EDTA 0.001 M, SDS 0.5%) 调成糊状装柱 (1 × 5 厘米), 再用此缓冲液充分平衡层析柱。然后把样品 [Poly(A) 或 Polysomal RNA] 溶于层析缓冲液 (30A₂₆₀/毫升), 加入到已平衡好的层析柱内。接着用同样缓冲液继续洗脱层析柱, 至洗脱液在 260 毫微米的吸收值小于 0.05 为止。此时即表示柱不吸附物质已被洗脱干净。然后改用 0.01 M Tris-HCl, pH7.6, 0.001M EDTA, 0.5% SDS 缓冲液洗脱。流速为 1 毫升/3 分钟, 每 3 毫升收集一管, 并测量它们在 260 毫微米的吸收值, 计算 Poly(A) 和与 Poly(A) 相连的 mRNA 的回收量。

3. Poly(U)-sepharose-4B 层析: 主要参考 G. Vassart, H. Brocas, R. Lecocq and J. B. dumont³⁾ 的方法。全部操作在室温条件下进行。1 克 Poly(U)-Sephrose-4B 加 10 ml TKES 缓冲液 (Tris-HCl 0.01M, pH7.5, KCl 0.5M, EDTA 1mM, SDS 0.2%) 调成糊状装柱 (1 × 5 厘米)。再用同样缓冲液 (约 200 毫升) 充分平衡层析柱。然后把样品 [Poly(A) 或 polysomal RNA] 溶于 TKES 缓冲液 (30A₂₆₀/毫升) 上柱。继续用 TKES 缓冲液 (约 300 毫升) 洗脱层析柱, 至洗脱液在 260 毫微米的吸收值小于 0.05 后, 改用另外一种缓冲液 (Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5, KCl 0.3 M, EDTA 1 mM, SDS 0.2%) 洗脱 (大约需 100 毫升), 至洗脱液在 260 毫微米的吸收值小于 0.05 后, 再换第三种缓冲液 (Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5, 0.2% SDS) 洗脱, 约需 50 毫升。最后测量洗脱液在 260 毫微米的吸收值, 并计算 Poly(A) 和与 Poly(A) 相

- 1) G. Schutz, M. Beato and P. Feigelson Biochem. Biophys. Res. Commun. 49 No. 3 (1972).
- 2) H. Aviv and P. Leader Proc. Nat. Acad. Sci. US 69 1408 (1972).
- 3) G. Vassart, H. Brocas, R. Lecocq and J. E. dumont Eur. J. Biochem. 55 15--22 (1975).

表1 四种层析柱吸附 Poly(A) 能力的比较

层析柱	加入 Poly(A) 量 (A ₂₆₀)	吸附量 (A ₂₆₀)	吸附率
Sigma cell Type 38	11.6	7.8	67%
oligo(dT)-纤维素 (上海试剂二厂)	10.9	6.6	60%
oligo(dT)-纤维素 (P-L 厂)	10	8.0	80%
Poly(U)-sepharose-4B	10	8.0	80%

表2 四种层析柱吸附与 Poly(A) 相连的 mRNA 能力的比较

层析柱	加入 Polyosomal RNA 量 (A ₂₆₀)	吸附量 (A ₂₆₀)	吸附率
Sigma cell Type 38	500	7	1.4%
oligo(dT)-纤维素 (上海试剂二厂)	583	5.2	0.89%
oligo(dT)-纤维素 (P-L 厂)	583	5.4	0.91%
Poly(U)-sepharose-4B	500	4.6	0.92%

连的 mRNA 的回收量。

用上述四种不同层析柱, 吸附 Poly(A) 或与 Poly(A) 相连的 mRNA 所得结果如表 1 和表 2 所示。从表 1 可以看出, P-L 厂生产的 oligo(dT)-纤维素和 Pharmacia 厂的 Poly(U)-sepharose-4B 吸附 Poly(A) 的能力都比较强。上海试剂二厂生产的 oligo(dT)-纤维素吸附 Poly(A) 的能力, 略低于 P-L 厂的产品。Sigma cell 微晶纤维素也能吸附一定量的 Poly(A)。从表 2 可以看出, P-L 厂生产的 oligo(dT)-纤维素和 Pharmacia 厂生产的 Poly(U)-sepharose-4B, 吸附与 Poly(A) 相连 mRNA 的能力, 都略高于上海试剂二厂的产品。经聚丙烯酰胺凝胶电泳证明, 用这三种层析方法分离的 mRNA, 在纯度方面没有明显的差异。Sigma cell 38 吸附与 Poly(A) 相连的 mRNA 的能力较高。这是由于非特异性吸附的缘故¹⁾。Sigma cell 微

晶纤维素和其它两种层析柱不同, 它不是亲和层析柱。它吸附 Poly(A) 或与 Poly(A) 相连 mRNA 的能力, 是由于此种纤维素内含有的一种木质素的缘故。

根据以上结果分析, 这四种层析柱吸附与 Poly(A) 相连的 mRNA 的效率, 均大大低于单纯吸附 Poly(A) 的效率。这是因为 Polysomal RNA 中, 只含有很少量的与 Poly(A) 相连的 mRNA, 还没有达到层析柱的饱和和吸附能力的缘故。但以上这些实验结果比较稳定, 对于今后用它来分离提纯真核细胞中的与 Poly(A) 相连的 mRNA, 供进一步试验应用是非常有用的。

(三) 名词注释

1. Sigma cell Type 38: 是一种微晶纤维素。其颗粒大小为 50 微米。主要应用于制备和分析薄层层析技术。它含有一种木质素, 在一定条件下能吸附 Poly(A) 和与 Poly(A) 相连的 mRNA。所以也可用它来分离含 Poly(A) 的 mRNA。Sigma cell 是商品名。

2. Poly(U)-sepharose-4B: 这是一种亲和层析系统, 是通过把多聚尿苷酸 [Poly(U)] 交联在琼脂糖 (Sepharese) 上制成的。它含有 Poly(U), 能专一性地吸附 Poly(A) 和与 Poly(A) 相连的 mRNA。

3. oligo(dT)-纤维素: 它也是一种亲和层析系统。是通过把寡脱氧胸苷酸 (dT) 交联在纤维素上而制成的。它含有 dT, 能专一性地吸附 Poly(A) 和含 Poly(A) 的 mRNA。因为它的专一性强, 操作简便, 所以目前被广泛地应用于分离和提纯含 Poly(A) 的 mRNA。

4. Poly(A) 相连的 mRNA: 绝大多数真核细胞的 mRNA 分子的 3'-末端上, 连有一段多聚腺苷酸 [Poly(A)]。它的长度一般不超过 200 个核苷酸。此种 3'-末端上含有 Poly(A) 的 mRNA, 就叫做与 Poly(A) 相连的 mRNA。

1) Joseh. Delarco and Gordon. Guroff Biochem. Biophys. Res. Comm. 50 No. 2 (1973).