

DNA 指导的 RNA 聚合酶的研究

I. 615 小鼠肝 RNA 聚合酶 B (II) 的提取和鉴定

刘连瑞 张大达 王 斌 王金霞 黄崇喜 王恢鹏

(中国科学院遗传研究所一室一组)

本文叙述了从 615 小鼠肝中提取和纯化 RNA 聚合酶 B (II) 的程序。这种酶在性质和结构上与已报道的其他真核生物的同类酶基本一致。其 DEAE-纤维素 DE52 洗脱部分在 280 nm 光吸收测定和 ^3H -UTP 掺入活性测定都表明它是单一的峰,在不变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳上也是一条电泳带;在变性电泳条件下,它由 11 条电泳带组成,其中有两个大亚基,其分子量分别为 220,000 和 125,000 道尔顿。这种酶对 α -鹅膏蕈碱的抑制作用非常敏感, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ α -鹅膏蕈碱可以抑制 RNA 合成的 50%。

引 言

对真核生物基因转录的调节机制目前还不十分清楚,但转录过程是直接和 DNA 指导的 RNA 聚合酶有关的。已有的资料证明,真核生物有三种结构功能不同的 RNA 聚合酶: RNA 聚合酶 A (I),负责转录核糖体 RNA (rRNA) 的前体;RNA 聚合酶 B(II),负责转录信使 RNA (mRNA) 的前体或称核异质 RNA (HnRNA); RNA 聚合酶 C(III),负责转录 5S RNA、tRNA 和某些小分子量的 RNA^[1-5]。虽然染色质结构的变化可以调节一些特异性基因的表达,但是任何基因的表达都必须通过 RNA 聚合酶的作用。

RNA 聚合酶 B 是研究真核生物结构基因表达的重要探针,研究 B 酶的结构和它的功能,对研究真核生物基因表达的调节控制很有意义。

RNA 聚合酶 B 在转录结构基因时是起重要作用的,所以我们首先研究了 RNA 聚合酶 B 的提取及其性质。本文将叙述 615 小鼠肝细胞 RNA 聚合酶 B 的提取及鉴定。

材 料 和 方 法

1. 缓冲液

缓冲液 A: 0.25 M 蔗糖、10 mM Tris-HCl

(pH 7.9)、3 mM Mg Cl₂、0.1 mM 氟代甲烷苯磺酸。

缓冲液 B: 缓冲液 A 加 0.1% Triton-X-100。

缓冲液 MS(0): 50 mM Tris-HCl (pH 7.9)、10 mM 甘油、0.1 mM EDTA、0.1 mM DTT、0.1 mM 氟代甲烷苯磺酸。MS (5)、MS (30) 分别是在 MS (0) 的基础上加 5% 或 30% 的甘油。

2. DEAE-纤维素 DE52 的处理

称取 48 克 DEAE-纤维素 DE 52, 加 800 ml 0.5 N HCl, 混合后温和地搅拌 30 分钟,用 Whatman 3 MH 滤纸过滤,用无离子水洗脱到 pH 4 为止;然后加 800 ml 0.5 N NaOH, 温和地搅拌 30 分钟,用无离子水洗涤到 pH 8 为止。用含 1 M 硫酸铵的 MS (0) 洗涤,再用 MS (0) 洗到无游离的铵离子为止,处理好的 DE 52 纤维素用含 80 mM 硫酸铵的 MS (0) 平衡,冰箱保存备用。

3. DNA 制备

按 Marmur^[6] 和 Kirby^[7] 等人的方法稍加修改,从 615 小鼠肝组织中提取 DNA。具体做法是:取鼠肝,用 0.1 M EDTA-0.15 M NaCl 溶液洗涤三次,然后用玻璃匀浆器匀浆,匀浆液

加 7 倍体积予热到 70℃ 的上述缓冲液稀释,将稀释液置于 60℃ 水浴中,加 1/10 体积的 25% SDS,此步骤在不断搅拌下 10 分钟内完成。加 SDS 溶液之后混合物迅速置于 0℃,在 0℃ 条件下缓缓加入 1/5 体积 5M NaCl 溶液,搅拌 15 分钟。然后加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),摇动 30 分钟,在 3000 rpm 离心 30 分钟。离心后取出水相,加两倍体积的乙醇,搅拌提取 DNA。将 DNA 溶于 1 × SSC(0.15 M 氯化钠-0.015 M 柠檬酸钠)中,再加等体积的氯仿-异戊醇摇动,重复三次;提纯后的 DNA 按 50 μg/ml 加入无 DNase 的 RNase,在 37℃ 下热处理 30 分钟,处理后立即置于冰浴冷却;然后再用氯仿-异戊醇提取三次,提取的 DNA 溶液加两倍体积的冷乙醇,搅拌提取 DNA。将 DNA 溶于 0.1 M NaCl-0.01M Tris-HCl pH 7.9 中,贮藏备用。

4. 纯化细胞核

615 小鼠肝细胞核的制备采取 Liew、Tata 和 Goldberg 等人的方法^[8-11]。从刚杀死的小鼠中取肝组织,放入冰冷的 0.14 M NaCl-0.01 M 柠檬酸钠溶液中,剔除结缔组织,洗净血污,加入五倍体积的缓冲液 A 中。用玻璃匀浆器在冰浴中磨碎,使之成为单个细胞状态,用双层纱布过滤细胞悬液,滤液在 K-70 型离心机上,以 2000 rpm、4℃、离心 30 分钟,沉淀部分为肝细胞。沉淀的细胞加五倍体积冰冷的缓冲液 B,再一次在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆,匀浆液用双层纱布过滤,滤液用 K-70 型离心机 2500 rpm、4℃、离心 40 分钟,洗涤 2—3 次,得淡黄色细胞核沉淀,用显微镜检查细胞核,证明细胞核是完整的。

5. 从细胞核提取 RNA 聚合酶 B

用 60 克新鲜肝组织得到的细胞核,加 MS (5)缓冲液,最终体积为 300 ml。加 67.5 ml 饱和硫酸铵溶液,用玻璃棒搅拌成极粘稠状物,用 MSE 高速电动破碎器激烈搅拌去粘。去粘液用双层纱布过滤,滤液按每 100 ml 加 13.3 克固体硫酸铵,电磁搅拌 45 分钟,搅拌后产生大量蛋白质沉淀。然后在 MSE25 型离心机上、4℃、

12000 rpm 离心 30 分钟,收集沉淀。沉淀于 MS (30) 缓冲液中(按 60 克肝组织得的细胞核计算,溶于 100 ml 的 MS(30)中)。溶液缓缓滴加 5ml 1% 硫酸鱼精蛋白(pH5.5),搅拌 30 分钟,进一步除去核酸类物质。溶液在 MS-50 型离心机上、4℃、离心 35000 rpm 1 小时,收集上清液。上清液用 MS (30) 稀释 3.5 倍。使硫酸铵含量降至 70 mM。将稀释的溶液与经过充分处理的 DEAE-纤维素 DE52 混合搅拌 40 分钟,在这种条件下使 B 酶充分吸附到纤维素上,混合物用抽滤方法小心过滤,不使有空气流通过,A 酶和 C 酶进入流出液,然后用两倍体积的含 80 mM 硫酸铵 MS (30) 洗涤,使残存在纤维素上的 A、C 酶充分除去,用含 250 或 500mM 硫酸铵 MS (30) 洗脱,用部分收集器按每管 5ml 分部收集,用紫外分光光度计测定 A₂₈₀,并用 ³H-UTP 按下面方法(参看部分 7)测定酶活性部分。峰区即为 RNA 聚合酶 B。

6. 蛋白质测定

按照 Warburg 和 Christian^[14] 方法,测定峰区收集物的蛋白质含量,以结晶的牛血清白蛋白为标准,测定 RNA 聚合酶的蛋白质含量。

7. RNA 聚合酶 B 的活性分析

测定 RNA 聚合酶 B 的活性反应条件如下:测活反应液 250 μl 含 80mM Tris-HCl (pH7.9)、1mM DTT、3mM MnCl₂、3mM MgCl₂、8mM KCl、46mM (NH₄)₂SO₄、0.25mM EDTA、12mM 2-巯基乙醇、12% 甘油、200 μg/ml 牛血清白蛋白,ATP、GTP、CTP 分别为 0.3mM,10 μci ³H-UTP (1ci/mmol)。在冰浴中加入 50 μl (25 μg) 的 615 小鼠肝 DNA 和 60 μl RNA 聚合酶 B。在 37℃ 水浴中温育 30 分钟,反应后加入 1ml 反应停止液(5% 三氯乙酸-0.1mM EDTA-10mM Na₄P₂O₇),使反应停止,立即将反应物移回到冰浴中,用 0.45 μm HAWP 微孔滤膜过滤,用 2 ml 95% 乙醇洗一次,再用 30 ml 5% 的三氯乙酸洗三次,将滤膜干燥,在二甲苯闪烁液中计数。

8. α-鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶 B 活性的抑制作用

在上述酶活性测定的条件下, 加入一系列不同含量的 α -鹅膏蕈碱(如图 2), 测定对 RNA 聚合酶 B 转录活性的抑制作用。

9. RNA 聚合酶 B 的凝胶电泳

按照 Smith 和 Braun^[5] 的方法, 进行不变性的凝胶电泳, 用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶, 每条管胶用 8mA, 电泳到指示染料溴酚蓝到底为止。用 0.05% 考马斯亮蓝染色, 用 40% 甲醇—10% 乙酸脱色。

梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳用 7—12% 的凝胶梯度, 样品在沸水中煮沸 2 分钟, 按照 Laemmli^[12] 的方法电泳、染色和脱色方法与管胶相同。

结 果

1. 分部收集物的 280nm 吸收曲线和 ³H-UTP 标记测活曲线

RNA 聚合酶 B 结合在细胞核中的染色质上, 通过高速搅拌把染色质破坏, 用较高浓度的铵离子 (50% 的硫酸铵浓度) 把蛋白质沉淀出来, 通过 12000 rpm 离心, 就可收集大量蛋白质沉淀(参看材料和方法)。按 Keding^[1] 等人的方法, 加入硫酸鱼精蛋白, 沉淀核酸类物质, RNA 聚合酶保留在上清液中。RNA 聚合酶在 DEAE-纤维素上可以被选择性地吸附。我们选用 80 mM 硫酸铵为选择性的吸附条件, 在这种条件下 RNA 聚合酶 A、C 不被吸附, 保留于上柱后流出液中。根据以前的报道^[4-6], RNA 聚合酶 B 在 200—250 mM 硫酸铵浓度条件下

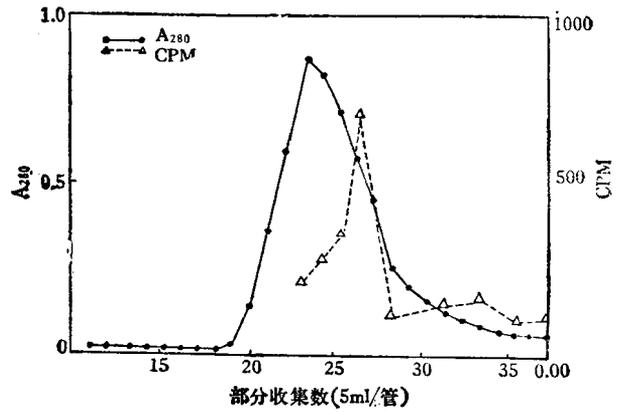


图 1 615 小鼠 RNA 聚合酶 B 洗脱图

可被洗脱出来。为了把 B 酶集中洗脱, 我们采用了 250 mM 和 500 mM 硫酸铵作为洗脱液的铵离子浓度。实验证明, 在两种铵离子浓度下, 洗脱曲线基本一致。从图 1 可以看出在 280nm 的吸收曲线和 ³H-UTP 标记测活曲线, 都只有一个峰。这两个峰区基本重合, ³H-UTP 标记测活峰比 280 nm 吸收峰区稍后。

将峰区收集起来, 存放于液氮中, 实验证明在这种条件下, 可以保存数目不失去活性。用前可将酶用冰水速溶。

2. 峰区收集物的转录活性测定

按前面介绍的方法对 RNA 聚合酶 B 的转录活性进行了测定。实验中用每分钟掺入数 (CPM) 表示 ³H-UTP 掺入数。酶活越高, ³H-UTP 掺入数就越高。我们把在这种反应条件下、37°C 反应 30 分钟、掺入 1 pmol 的 ³H-UTP 规定为一个酶活性单位。实验中除了本底之

表 1 615 小鼠肝细胞 RNA 聚合酶 B 活性测定

	反 应 条 件					计 数 (CPM)
	水 (0.25 ml)	反 应 液 (0.25 ml)	³ H-UTP (10 μ l)	DNA (25 μ g)	酶 (60 μ l)	
本 底	—	—	—	—	—	11
对 照 1	✓	—	✓	—	—	49
对 照 2	—	✓	✓	—	—	32
对 照 3	—	✓	✓	✓	—	59
对 照 4	—	✓	✓	—	✓	62
实 验	—	✓	✓	✓	✓	1744
酶 活 性						80 单位

外,还做了另外4组对照(表1),从表1中可以看出,在这种实验条件下, ^3H -UTP 掺入比对照提高十几倍,其酶活性单位为80。

3. α -鹅膏蕈碱的抑制实验

RNA 聚合酶 B 对 α -鹅膏蕈碱的抑制作用特别敏感,这已有很多报道^[4,13]。这种试剂是鉴定 B 酶的重要标准。我们研究了 α -鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶的抑制作用, RNA 聚合酶 A 不受 α -鹅膏蕈碱的抑制; RNA 聚合酶 C 只有在高浓度的 α -鹅膏蕈碱才受到抑制(关于这方面的详细资料将另作报道)。聚合酶 B 则在低浓度鹅膏蕈碱的情况下就受到强烈抑制,结果如图2所示。 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 α -鹅膏蕈碱就可以抑制合成 RNA 的 50%。

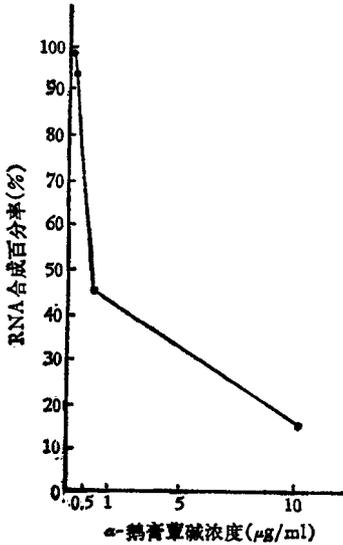


图2 α -鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶 B 的抑制作用

4. 电泳分析

对提取的 615 小鼠肝 RNA 聚合酶 B 作了电泳分析。从不变性的 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以看出 RNA 聚合酶 B 为一条电泳带(图3),这与 280nm 吸收曲线和 ^3H -UTP 标记活性曲线结果相吻合。在 5—12% 的梯度聚丙烯酰胺凝胶变性电泳时, RNA 聚合酶 B 有 11 条蛋白质多肽链(图4),与已知标准分子量的蛋白质做平行电泳,测定 RNA 聚合酶多肽链的分子量,其中最大的两条为 220,000 和 125,000 道尔顿。

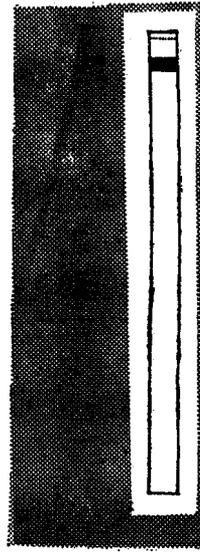


图3 RNA 聚合酶 B 不变性凝胶电泳

30% 丙酰胺单体-0.8% 丙酰胺双体贮存液用电泳缓冲液 (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4), pH 7.9, 加 7.5 mM β -巯基乙醇和 10% 的甘油 (V/V) 配成 5% 凝胶。样品中含 25% 甘油 (V/V) 电泳液中透析,予电泳以每管 5 mA 使溴酚蓝标记走出胶外,加样品后,电泳,使溴酚蓝指示染料到管胶底部,以 0.05% 考马斯亮蓝溶于 40% 甲醇-10% 乙酸中染色过夜,用 40—10% 的甲醇-乙酸脱色。

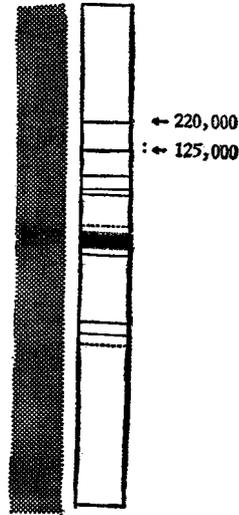


图4 RNA 聚合酶 B 变性凝胶电泳
615 小鼠肝 RNA 聚合酶 B 梯度聚丙烯酰胺 SDS 系统,于 Tris-甘氨酸缓冲液 20mA 电泳 10 小时,考马斯亮蓝染色,40% 甲醇-10% 乙酸脱色。电泳前样品煮沸 2 分钟

讨 论

615 小鼠是网质细胞型白血病的寄主。我们认为在白血病基因的表达过程中,当转录成 mRNA 时, DNA 指导的 RNA 聚合酶 B 可能起着很重要的作用。因此,我们以后将对 615 小鼠和 L 615 小鼠(白血病)的 RNA 聚合酶进行比较研究。

本文叙述了从 615 小鼠肝细胞核提取 RNA

聚合酶的程序。肝细胞核是提取 RNA 聚合酶 B 的较好材料之一。在选用 DEAE-纤维素 DE₅₂ 作为分离 RNA 聚合酶 B 时,采用低盐浓度(70 mM 硫酸铵),使 RNA 聚合酶 A 和 C 不被吸附在纤维素上,而 B 酶则被选择性地吸附。通过较高的盐浓度(250 mM 或 500 mM 硫酸铵)很快地而且集中地把 B 酶洗脱下来。通过这一步分离程序,实质上 RNA 聚合酶已经具有较高的纯度。通过 280 nm 吸收测定和 ³H-UTP 掺入实验,证明 RNA 聚合酶 B 洗脱峰为单一的峰(图 1)。不变性聚丙烯酰胺凝胶电泳证明这是一条蛋白质区带(图 3)。

615 小鼠肝 RNA 聚合酶 B 是由多条蛋白质多肽组成的。我们还不了解这种酶确切的有几条多肽链组成,从变性的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳中看到,从 615 小鼠肝细胞核提取的 RNA 聚合酶 B 由 11 条蛋白质多肽链组成,其中两条大的亚基分子量为 220,000 和 125,000 道尔顿。我们认为这两个亚基是这种 B 酶的固有组成成分。与原核生物比较, *E. Coli* 的 RNA 聚合酶也有 β' 和 β 两个大亚基,说明真核生物的 RNA 聚合酶 B 在某些方面与原核生物有相似之处。真核生物 RNA 聚合酶 B 的两个大亚基是否在转录过程中起着启动或 RNA 合成的延伸作用,值得进一步探讨。同样我们提取的 RNA 聚合酶 B 还存在着较多的小分子量的亚基,我们认为有些小亚基中可能在寻找特异结构基因、并引导 RNA 聚合酶结合在染色质的特异位置上有关。虽然一般认为染色质结构本身的改变是调节转录的重要因素,但并不排除酶分子的某些小亚基的作用。

α -鹅膏蕈碱对 RNA 聚合酶 B 有特异的抑制作用。615 小鼠肝细胞 RNA 聚合酶 B 与其他真核生物 B 酶一样,对 α -鹅膏蕈碱的抑制作用非常敏感。在我们的实验中当 α -鹅膏蕈碱为 1 μ g/ml 时, RNA 合成降低到 50% 以下。

参 考 文 献

[1] Kedinger, C., Gissinger, F., Gniazdowski, M., Mandel, J. L. and Chambon, P., 1972. *Eur. J.*

Biochem., 28: 269—276.
 [2] Gissinger, F., Chambon, P., 1972. *Eur. J. Biochem.*, 28: 277—282.
 [3] Kedinger, C., Chambon, P., 1972. *Eur. J. Biochem.*, 28: 283—290.
 [4] Greenleaf, I., Bautz, K. F., 1975. *Eur. J. Biochem.*, 60: 169—179.
 [5] Smith, S., Braun, R., 1978. *Eur. J. Biochem.*, 82: 309—329.
 [6] Marmur, J., 1961. *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218.
 [7] Kirby, K. S., 1962. *Biochem. Biophys. Acta*, 55: 382.
 [8] Tata, J. R., Baker, B. et al., 1978. *J. Mol. Biol.*, 118: 249—272.
 [9] Goldberg, R. B. et al., 1977. *Cell*, 10: 623—632.
 [10] Chambon, P., Ramur, M. et al., 1968. *Biochem. Biophys. Acta*, 157: 504.
 [11] Liew, C. C., 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 3476.
 [12] Laemmli, U. K., 1970. *Nature*, 227: 680.
 [13] Hager, G., Holl, M., 1976. *RNA Polymerase* (edited by Losick, R. and M. Chamberlin).
 [14] Warburg, O., Christian, W., 1939. *Biochem. Z.*, 303: 40.

会 议 消 息

1978 年 10 月中国遗传学会成立大会上曾决定于 1979 年 11 月在长沙召开中国遗传学会人类医学遗传学论文报告会,检阅 1979 年度人类医学遗传学研究成果,进行学术交流。报告会内容为宣读包括与人类和医学遗传有关的各个分支学科,即:人类群体遗传学、细胞遗传学、生化遗传学、免疫遗传学、微生物遗传学、肿瘤遗传学、基因工程、遗传咨询、遗传病的产前诊断及其有关技术的论文。此外,将正式成立中国遗传学会人类医学遗传学专业委员会或专业组,还将组成产前诊断等若干协作组。

中国遗传学会已委托湖南医学院教授、中国遗传学会副理事长卢惠霖先生负责,会议的筹办请湖南省科协 and 湖南医学院协助办理。

为开好这次会议,报告会筹备组已发出预备通知,希望有关单位抓紧科研工作,准备论文。

另外,1979 年 10 月还将召开“中国遗传学会植物育种学报告会。”

(安锡培)