

鲤鱼血红蛋白信息核糖核酸 (HbmRNA)的分离

徐权汉 徐永立 蔡难儿

(中国科学院海洋研究所)

信息核糖核酸(mRNA)是十分重要的生物活性物质。基因通过转录作用合成mRNA,再由mRNA翻译,编码特定的蛋白质顺序。因此,mRNA是基因和蛋白质之间的桥梁。不仅如此,某些病毒还可以用mRNA反转录编码DNA的程序。一些学者还发现某些高等动物也具有反转录酶,这样对mRNA的研究愈来愈受到各国学者的重视。

血红蛋白信息核糖核酸(HbmRNA)是研究得较多而较为深入的一种信息核糖核酸,但在研究中,一般是用哺乳动物或鸡等动物为材料,这已有许多报道^(2,3),而对水产动物血红蛋白的mRNA分离报道甚少。我们用鲤鱼作材料,从鲤鱼腹主动脉中抽血得网织红细胞,分离HbmRNA获得成功。具体方法如下。

一、材料及试剂

鲤鱼每尾重约500g。

pH8.3缓冲液(内含0.01mol/L Tris, 0.075mol/L NaCl, 0.005mol/L EDTA, 0.001mol/L MgCl₂, 0.5% SDS);

饱和酚:市售酚经重蒸后,用pH8.3缓冲液饱和,然后调其pH至8.3;

高盐洗脱液:0.5mol/L KCl, 0.001mol/L Tris,用HCl调至pH7.5;

低盐洗脱液:0.1mol/L KCl, 0.001mol/L Tris,用HCl调至pH7.5;

氯仿-异戊醇液, V/V = 24/1;

Oligo(dT)纤维素;系上海市试剂二厂产

品。

主要仪器设备:751-G紫外分光光度计,高速冷冻离心机,核酸蛋白紫外检测仪,玻璃层析柱(1.5×20cm)。

二、网织红细胞的制备

网织红细胞是新生的红血细胞,在网织红细胞大量产生的时期,血红蛋白信息核糖核酸(HbmRNA)处于高度活动的状态,而且含量丰富,所以,HbmRNA必须从网织红细胞中分离提取。在哺乳动物中,注射苯胍盐酸盐使其产生贫血,从而促使红血球再生,形成大量网织红细胞⁽¹⁾。本实验采用抽血法使鱼贫血,而得到网织红细胞。具体方法是,取500—1000g的鲤鱼10尾,在腹主动脉抽血,间隔3—4天抽一次,每次5ml,连抽3次,这时从显微镜检查血液中的红细胞数大大减少,但新生的网织红细胞比率大大增加,血液呈淡红色。这时用20ml注射器,在腹主动脉处采血,每尾约抽10ml血液,同时用肝素钠防凝,每100ml血液加入10ml柠檬酸钠等渗溶液稀释,4层纱布过滤,滤过液2000rpm离心,10分钟,弃上清液,取沉淀再加200ml柠檬酸钠等渗溶液,2000rpm离心10分钟,反复多次,至上清液无红色为止。沉淀物即为网织红细胞。置冰箱中保存备用。

三、鲤鱼红血球总RNA 的分离制备

网织红细胞加2倍体积蒸馏水,剧烈振荡

10分钟,使其溶血,3000rpm离心10分钟,取红色上清液,加6VpH8.3缓冲液,混匀后再加6V饱和酚,放入磨口三角烧瓶中,剧烈振荡20分钟,然后于4℃,10000rpm离心10分钟,取上清液,弃去中间层及酚层;上清液加3/4V饱和酚,1/4V氯仿-异戊醇,振荡20分钟,10000rpm离心10分钟,取上清液,加1/2V饱和酚,1/2V氯仿-异戊醇,振荡20分钟,10000rpm离心10分钟,取上清液,加1/4V饱和酚,1/4V氯仿-异戊醇,振荡20分钟,10000rpm离心10分钟,取上清液,加1V氯仿-异戊醇,振荡20分钟,10000rpm离心10分钟,取上清液,此步可重复多次,直至分界层看不到变性蛋白沉淀。将最后一次离心所得上清液加入固体醋酸钾至2%,然后加2.5V冷的95%乙醇,-20℃冰箱放置过夜。第二天将乙醇沉淀物用7000rpm离心10分钟收集,然后将离心收集到的沉淀物用70%乙醇洗三次,每次均用7000rpm离心收集。最后将沉淀溶解在2.5mol/L氯化钾-HCl、pH7.5的缓冲液中。

测紫外吸收: $260/280 > 2$, $260/230 > 2$ 。而且样品具有典型的核酸吸收峰,此样品即为鲤鱼红血球总RNA。

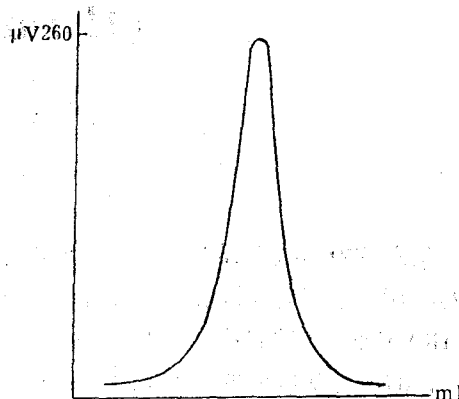
四、mRNA的纯化

Oligo(dT)纤维素预先用大量的重蒸水浸泡漂洗多次,除去浮在上面的颗粒,然后加到玻璃层析柱内,高5cm,用0.5mol/L KCl-HCl pH7.5缓冲液洗至260nm无吸收,后改用0.1mol/L KCl-HCl pH7.5缓冲液洗至260nm无吸收,最后再用0.5mol/L KCl-HCl pH7.5缓冲液平衡备用。

将所得的总RNA用0.5mol/L KCl-HCl pH7.5稀释到40 OD/ml,然后轻轻地加到Oligo(dT)纤维素柱上,让其慢慢地流出。待全部RNA液加完,再用大量的0.5mol/L KCl-HCl pH7.5缓冲液洗,紫外监测仪监测至260nm无吸收时,改用0.1mol/L KCl-HCl pH7.5缓冲液洗,在紫外监测仪监测下,收集有吸峰的部分(见图)。溶液中加入LiCl至2%,然后加2V

冷的无水乙醇使其中的mRNA沉淀,-20℃冰箱放置过夜。第二天用7000rpm离心收集沉淀物,并将其溶解在生理盐水中。

测紫外吸收 $260/280 = 2.01$, $260/230 = 1.98$,此溶液即为HbmRNA。



mRNA紫外吸收图谱

Fig. mRNA uV absorption spectrum

五、生物活性的测定

上述所提纯的HbmRNA用蛋白质麦胚无细胞翻译系统进行生物活性的测定,因为mRNA分子具有特定的蛋白质编码顺序,如果它能在麦胚无细胞翻译系统中,准确无误地指导翻译蛋白质,就表明分离到的mRNA是完整的,有活性功能。这种翻译信息的鉴定,我们采用加入 H^3 标记的亮氨酸,随同其它未标记的氨基酸共同参入合成蛋白质,实验结果表明有放射性同位素记数,说明所提纯的HbmRNA具有生物活性。

六、结果讨论

信息核糖核酸的分离、提纯,对于研究动物细胞基因结构和基因表现的调控及有关遗传工程方面,都有非常重要的意义。针对不同的生物,选择正确的分离、提纯方法,对研究则能起到积极的作用。我们改用抽血法代替用注射苯胍盐酸的方法使鱼贫血,同样可产生大量的网织红细胞,是一种简便安全的手段,可以减少因注射药物而引起的死亡。而冷酚法提取网

织红细胞 mRNA, 使纯化的 HbmRNA 保持其生物活性, 这对进一步的研究是有意义的。

参 考 文 献

- [1] 潘铁城等, 1983。珠蛋白 mRNA 的分离和 CDNA 的合成。生物化学和生物物理学报 2:125。
- [2] Nienhuis, A. W. , Favley, A. K.

- and W. F. Anderson, 1974. preparation of Globin Messenger RNA, *Method in Enzymology*. 30:621.
- [3] Crystal, R.G. et al., 1974. Initiation of Globin Synthesis Assays. *Methods in Enzymology* 30:101.
- [4] Boedtker, H., Frischman, A.M. and Leheach 1976. *J. Biochem.* 15:4765-4770

THE ISOLATION OF RETICULOCYTE MESSENGER RNA FROM CARP

Xu Quanhan Xu Yongli Cai Naner

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Abstract

This article introduces a method of isolation and purification of reticulocyte messenger RNA. For preparing reticulocyte, a new method had been used. The Carp was made anemic by abstracting blood instead of classical method of injecting Phenylhydrazine. Then the total reticulocyte mRNA was prepared using cold phenol. The purified mRNA was used for chromatography of cellulose Oligo (dT). Purified mRNA had a typical peak of nucleic acids and biological activity.