DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.005

大鼠肝细胞核游离型 RNA 聚合酶的体外转录活性测定

柳君泽* 易禄康 (第三军医大学学训练部生化教研室) 630038

提 要 本文利用大鼠肝细胞核体外转录体系,探讨放线菌素 D 对染色质(或 DNA)模板的抑制效应,并探讨人工合成的 Poly〔d(A-T)〕的转录模板效应;在此基础上测定细胞核游离型 RNA 聚合酶(RNA Pol)的活性,对以高渗(2.3mol/L)蔗糖一次提取的正常大鼠肝细胞核,比较了其中两类不同功能状态的 RNA Pol 的相对含量,并对游离型 RNA Pol 在真核细胞 RNA 转录过程中的作用进行了讨论。

关键词 核糖核酸聚合酶类;转录,遗传;大鼠;放线菌素 D

真核细胞 RNA 的转录生成是 1 个由多种成份参加的复杂过程,其确切机制不尽清楚。RNA Pol 是参与真核细胞内 RNA 转录生成过程的主要酶,国外不少学者报道,此酶是以两种形式存在于细胞核内,即①与染色质(或 DNA)模板紧密结合的(chromatin or template-engaged or bound)形式和②游离的(free)形式。真核细胞在受到激素或药物等刺激后,这两种类型的酶均发生活性变化。关于这两种类型的聚合酶在结构和功能上的相互关系及转录过程中的意义尚不十分清楚。本文作者在大鼠肝细胞核体外转录体系基础上,测定了游离型 RNA Pol 的活性,对研究真核转录器的组成和转录的机制,揭示真核基因表达在转录水平上的调节有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为健康雄性 Wastar 系大鼠,体重 250～300g。

主要试剂:多聚脱氧腺嘌呤-胸腺嘧啶核苷酸(Poly〔d (A-T)〕)和 α- 鹅膏蕈碱(α-amanitin , Boehringer -Mannheim 公司产品);二硫苏糖醇(DTT,Serva 公司产品);放线菌素 D(actinomycin D,中国科学院上海药物研究所产品);^{3}H-UTP(22 Ci/mmol)(中国科学院上海原子能研究所产品);ATP,CTP,GTP,UTP(上海东风试剂厂产品);肌酸激酶(30u/mg prot,中国科学院上海生物化学研究所产品)。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝细胞核悬液制备:按 Yu 报道的方法[1]进行。

1.2.2 模板结合的 RNA Pol 活性测定:按本文作者报道的方法[2]进行。

1.2.3 游离的 RNA Pol 活性测定:反应总体积 150μl,$(NH_4)_2SO_4$ 35mmol/L,^{3}H-UTP 1.2μCi,其他成份含量与结合酶活性测定相同。反应体系中加入 100μg/ml(或指定量)的放线菌素 D 和 40μg/ml(或指定量)的 Poly〔d(A-T)〕,通过加入 60μg DNA 的细胞核悬液起始反应,于 35℃振荡温育 30min。其后处理参照文献[2]报道的方法进行。

2 结果

2.1 放线菌素 D 的转录抑制效应

放线菌素 D 对转录的抑制随浓度的增加而增强,当介质中其浓度为 100μg/ml 时,抑制率达 90%(图 1)。

2.2 外源 Poly〔d(A-T)〕的转录模板效应

当 Poly〔d(A-T)〕浓度低于 40μg/ml 时,其转录的模板效应随浓度增加而明显升高(图 2)。

2.3 Poly〔d(A-T)〕、α-amanitin 和 Actinomycin D 对转录的协同影响(表 1)。

---

* 现在病生教研室

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　Poly[d(A-T)], Actinomycin D 和 α-amanitin 对转录的协同影响*

因素	H-UMP 掺入 dpm/μg DNA	%
+Poly[d(A-T)]	652.6±2.9	100
+Poly[d(A-T)]		
+actinomycin D	248.7±10.4	38.1
+Poly[d(A-T)]		
+α-amanitin	395.9±37.8	60.7
+α-amanitin		
+actinomycin D	0±2.3**	0
+Poly[d(A-T)]		
+α-amanitin	73.8±7.8	11.3
+actinomycin D		

* 表中数据为两次测定的 ($\bar{x}$ ± $s_{\bar{x}}$)；Poly[d(A-T)], Actinomycin D 和 α-amanitin 的浓度分别为 40, 100 和 1μg/ml；

** 测量管与本底差小于零

用高渗(2.3mol/L)蔗糖一次提取的正常大鼠肝细胞核，在无附加条件下测定其模板结合的 RNA Pol 活性，同时引入 Actinomycin D 和 Poly[d(A-T)]，观察其游离酶活性，比较二者的百分含量，结果见表 2。

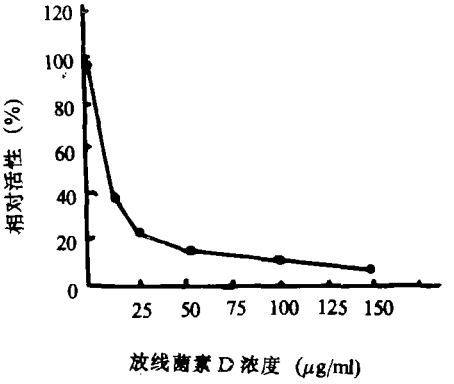


图 1　放线菌素 D 对转录的抑制效应
100%活性相当于 535dpm/μg DNA

2.4　正常大鼠肝细胞核两种类型 RNA Pol 的相对含量

表 2　大鼠肝细胞核模板结合的和游离的 RNA 聚合酶的百分含量*($\bar{x}$ ± $s_{\bar{x}}$)

	模板结合酶 (dpm/μg DNA)	%	游离酶 (dpm/μg DNA)	%
总 RNA Pol	102.1±1.5(6)	28.1	261.1±7.4(4)	71.8
RNA Pol I	70.7±2.7(6)	45.1	86.2±5.6(4)	54.9
RNA Pol II	31.1±1.5(6)	15.1	174.9±4.6(4)	84.9

* 100%代表结合酶与游离酶总活性；括号中数字代表测量次数；游离酶活性是在 Actinomycin D 和 Poly[d(A-T)]同时存在的条件下测量的。

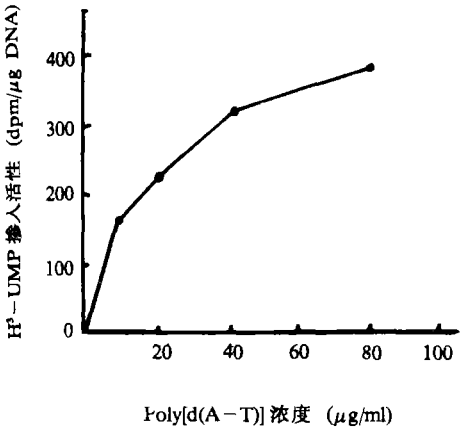


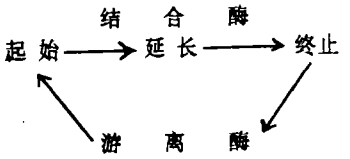
图 2　Poly[d(A-T)]浓度与转录活性的关系

3　讨论

真核细胞的转录过程是 RNA Pol 结合在编码基因的染色质 DNA 区域上，连同其它转录调节因子(TF)一起组成转录复合体[3]，此复合体在沿模板滑动过程中以三磷酸核苷为底物，按碱基配对原理合成一条 RNA 链(酶移动学说[4])。而游离于染色质(或 DNA)的 RNA Pol 则是通过应用放线菌素 D 和 Poly[d(A-T)]得到证实。放线菌素 D 可插入双链 DNA 的 GC 碱基对之间，破坏 DNA(或染色质)的模板活性[5]，从而影响转录复合体沿模板的移动，抑

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

制 RNA 的生成。在放线菌素 D 抑制内源性染色质(或 DNA)模板时,不含 G、C 碱基的 Poly〔d(A-T)〕发挥转录的模板效应。对于细胞核内这两种类型的 RNA Pol 在转录中的作用,Yu[6]曾提出"RNA Pol 循环假说",认为



游离酶如何辨认起始信号并与之结合,它怎样与转录因子结合形成复合体以及酶本身在此过程中发生了哪些结构上的变化,仍是值得探讨的问题。

游离酶在细胞核或 RNA Pol 的提取过程中极易丢失,尤其是在高离子强度介质中,以超声破碎细胞核或在低渗介质中反复洗涤细胞核,都可致其大量丢失[7]。因此,不同提取方法所得细胞核中游离酶的含量不尽一致。Yu[1]在用 2.3mol/L 的蔗糖提取的大鼠肝细胞核中,两种功能状态的 RNA Pol 各占 50%。本实验结果发现,总活性的 70%为"贮备"状态的游离酶,这种差别可能是测量条件不同所致,因游离酶对最佳离子强度需要较低[8]。同时发现,Pol I 的结合型(占 50%)较 Pol I 的为高(占 15%),说明多数 RNA Pol I 是处于非活性的游离状态,相对而言,结合在染色质模板上的活性 Pol I 分子较多。因细胞核体外转录是在体转录过程的延续[9],提示体内 rRNA 前体的转录调节主要发生在延长阶段,而 mRNA 前体(Hn-RNA)的合成调节主要是在转录的起始阶段。

参考文献

1. Yu Fuli. High concentration of RNA Polymerase I is responsible for the high rate of nucleolar transcription. Biochem J 1980; 188(2):381
2. 柳君泽 易禄康。几种因素对大鼠肝细胞核体外转录测定的影响。第三军医大学学报 1992;14(2):172
3. Fred HM, Osvaldo F, Danny R. Initiation of transcription by RNA Polymerase I. Biochim Biophy Acta 1989; 1009(1):1
4. Michel R, Michel ED, Bradury EM, et al. Chromosomal loop/nuclear matrix organization of transcriptionally active and inactive RNA Polymerase in Hela nuclei. J Mol Biol 1988; 201(3):545
5. Kellas B, Austoker LJL, Beebee TJC, et al. Forms AI and AII DNA-dependent RNA Polymerase as components of two defined pools of Polymerase activity in Mammalian cells. Eur J Biochem 1977; 72(3):583
6. Yu FL, Mary C, Laura R. Tissue, sex, and animal species specificity of aflatoxin B_1 inhibition of nuclear RNA Polymerase I activity. Carcinomgenesis 1982; 3(9):1005
7. Norman M, Stephen PG. Transcription in isolated nuclei. In: Busch H. The ceil nucleus: nuclear particles. Part A Vol. 8 New York: Academic Press, 1981:139～191
8. Chambon P. Eucaryotic RNA Polymerases. In: Boyer PD. The enzymes. Vol. 10, New York: Academic Press, 1974:261～331
9. Hosoya T, Nagai Y, Inagaki T, et al. In vivo effect of androgen and cycloheximide on the RNA sythesis in isolated nuclei of rat ventral prostates. J Biochem 1978; 84(6):1519

(收稿:1991-08-21;修回:1991-12-10)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Determination of transcription activity of rat liver nucleic free RNA Polymerase in vitro

Liu Junze, Yi Lukang (Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing. 630038)

Abstract The inhibitory effects of actinomycin D on chromatin (or DNA) template and the stimulating effects of synthetic template Poly [d(A-T)] on transcription were observed in the liver nucleic transcriptional system of the rat in vitor. By introducing proper concentrations of actinomycin D and Poly [d(A-T)] into each reactionary system, a method to assay free RNA polymerase activity in the nucleus was established. In addition, a comparison of the contents between chromatin-engaged and free polymerase in normal rat liver nuclei isolated with hypertonic sucrose (2. 3 mol/L) was made. Eventually, the possible role free RNA Polymerases play in the eukaryotic transcriptional process was discussed.

Key words RNA Polymerases; transcription, genetic; rat; actinomycin

(上接 212 页)

附表 治疗过程中病人血型鉴定观察表

日期	抗-A	抗-B	抗-A、B	Ac	Bc	Oc
1989.04.15	−	−	−			
1989.04.21	−	−	−	−	++	−
1989.05.29	+	−	+	−	+++	−
1989.06.15	++	−	++	−	+++	−
1989.07.02	+++	−	+++	−	+++	−
1989.07.19	+++	−	+++	−	+++	−

(2)本例病人血型变异其血型抗原随着疾病的缓解而逐渐增强(见附表),和以往报道的情况相似,但兰氏[1]报告一例白血病病人 A 抗原减弱病情未缓解 A 抗原即恢复,为何会出现此情况,尚需进一步探讨。

关键词 血型;抗原变化;白血病

参考文献

1. 兰炯采 杨世英 胡利娅。急性粒细胞白血病血型变异一例报告。中华血液学杂志 1985;9:559

(收稿:1991-10-25;修回:1992-02-10)

21994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net