DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.02.025

几种因素对大鼠肝细胞核体外转录测定的影响

柳君泽* 易禄康（第三军医大学训练部 生化教研室）630038

包含真核细胞全部遗传信息的DNA以及催化RNA生成的RNA聚合酶(RNA Pol)位于细胞核内，其中Pol Ⅰ位于核仁，转录生成rRNA前体，Pol Ⅱ和Ⅲ位于核浆，分别转录生成mRNA前体(HnRNA)和5sRNA、tRNA及SnRNA前体[1]。细胞核体外转录反应体系是研究真核细胞RNA转录发生机制以及真核基因表达转录水平调节的有效手段。本文就转录体系中细胞核的剂量、反应时间以及核的贮存方式等对RNA转录生成的影响进行了观察。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为健康雄性Wistar系大鼠，体重250～300g。

主要试剂：α-鹅膏蕈碱(α-amanitin)系西德Boehringer-Mannheim公司产品，DTT系Serva公司产品，H^3-UTP(814GBq/mmol)为中科院上海原子能研究所产品；ATP、CTP、GTP、UTP为上海东风试剂厂产品；小牛胸腺DNA为上海牛奶公司产品；肌酸激酶（30u/mg Prot.）为中科院上海生化所产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝细胞核悬液的制备 参照Yu[2]的方法改进，全过程在0～4℃下操作。最终核沉淀悬浮于0.34mol/L蔗糖溶液中，分装后于指定条件下保存备用。核悬液DNA含量按Burton[3]法测定，以小牛胸腺DNA为标准。所分离的细胞核经光镜检查形态完整，无胞浆污染。核产率达40%～45%。

1.2.2 细胞核转录活性测定 所用器皿及溶液均经灭菌处理。除反应总体250μl，含70mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，0.5u肌酸激酶，0.03mmol/LUTP，0.074GBq H^3-UTP外，其他成份同文献[4]。低浓度（1ug/ml）或高浓度（200μg/ml）α-amanitin的加入以区别不同类型RNA聚合酶。加入一定量的核悬液起动反应，于35℃振荡温育一定时间，终止反应后，酸不溶物质收集于玻璃纤维膜上，抽洗后烘干，加闪烁液于液闪计数仪中计数。

酶活性以在此反应条件下H^3-UMP掺入的dpm/μgDNA表示。RNA Pol Ⅰ的活性为加入高浓度的α-amanitin时所测的活性；RNA Pol Ⅱ的活性为总活性－加入低浓度α-amanitin时所测的活性；RNA Pol Ⅲ的活性为总活性－酶Ⅰ活性－酶Ⅱ活性。

2 结果

2.1 细胞核3种RNA Pol的活性分布

高渗蔗糖分离的大鼠肝细胞核以存在于核仁的Pol Ⅰ含量最高（如表1）。因Pol Ⅲ在核内含量很微，故以下讨论可不考虑[5]。

表1 细胞核RNA聚合酶活性分布*

RNA Pol	H^3-UMP掺入 dpm/μg DNA	%
Ⅰ	327.1±19.2	57.69
Ⅱ	225.6±11.4	39.79
Ⅲ	14.3±13.0	2.52

* 反应介质不含未标记UTP；表中数值为8次平行测量的$\bar{x}\pm s\bar{x}$

2.2 细胞核DNA量对RNA Pol活性测定的影响

细胞核转录的总活性随核DNA量增加而升高，但单位DNA量的H^3-UMP掺入则有一极限（如图1）。

2.3 反应温育时间对转录活性的影响

在观察的1h反应时间内，以H^3-UMP掺入dpm/μg DNA对温育时间作图呈一矩形双曲线，表现出RNA Pol活性的饱和现象（如图2）。

2.4 细胞核不同贮存温度对RNA Pol活性的影响

* 现在病理生理教研室

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

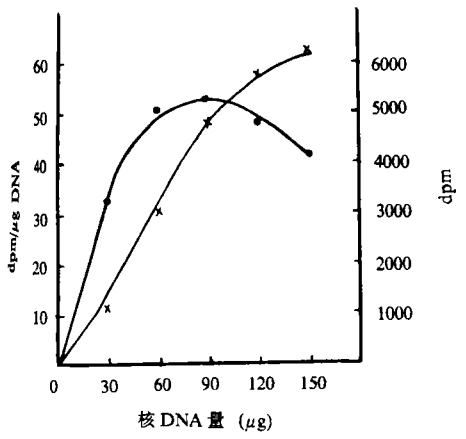


图 1　细胞核转录系统中核DNA量对H^3-UMP掺入活性的影响

× —— × H^3-UMP掺入的dpm；·—— · H^3-UMP掺入的dpm/μg DNA

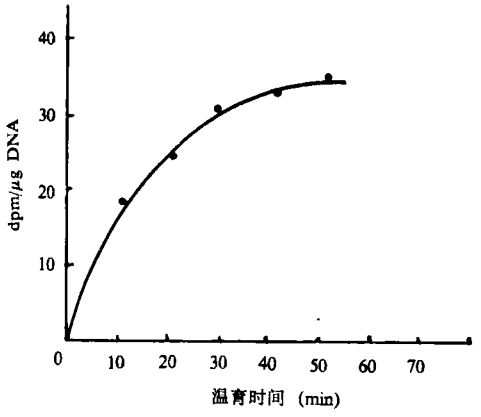


图 2　核转录活性与反应时间的关系

所分离肝细胞核按DNA浓度约1mg/ml悬浮于0.34mol/L 蔗糖溶液中，分别于液氮，－18℃和0℃贮存24h，检测其体外转录活性改变情况。以液氮中保存的细胞核转录活性为100%，相当于94.6 dpm/μg DNA（如图3）。

2.5 不同贮存时间对细胞核体外转录活性的影响

以贮存24h细胞核的RNA Pol总活性为100%，分别观察于液氮中贮存72h、16 d和液氮中贮存48 h后解冻于0℃继续保持24h（共72h）的肝细胞核RNA Pol总活性的变化（如图4）。

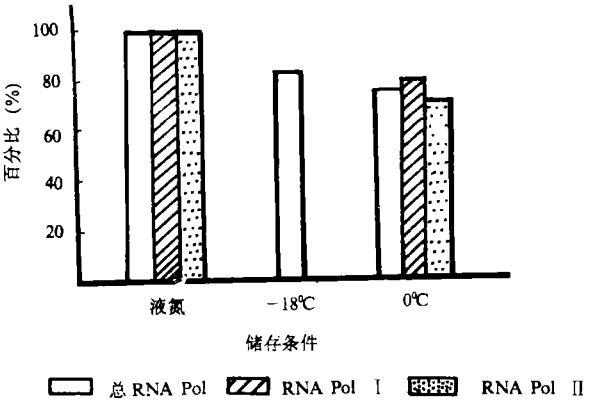


图3　细胞核不同贮存温度对其体外转录活性的影响

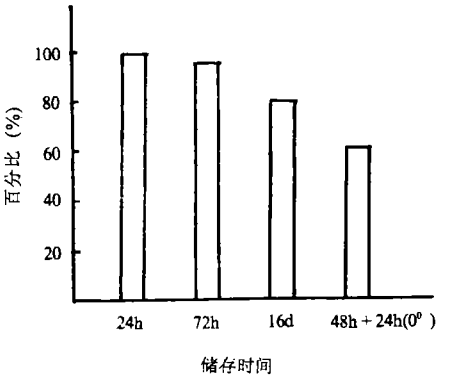


图 4　液氮中不同贮存时间对细胞核转录活性的影响

3　讨　论

细胞核体外转录反应是研究真核基因表达转录水平调控的重要手段。本实验发现在底物过量的反应体系中，H^3-UMP的掺入与细胞核剂量和反应时间有关，存在剂量和时间依赖性，其核DNA用量在100μg时，反应时间30min，酶活性最高，与 George 等[4]所用剂量一致。

有报道，大鼠及小鼠肝细胞核中RNA Pol Ⅰ + Ⅲ的活性为总活性的60%左右[6][7]，与本实验结果相近。不同的细胞核分离方法对转录活性的影响主要表现在Pol Ⅲ，匀浆组织或核洗涤过程中均可使其丢失[8]。核仁

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

含有高浓度的RNA Pol I，若以单位DNA量（核仁DNA量为总核量的4%～5%）来表示，核仁Pol I的含量或/和活性是细胞核总RNA Pol含量或/和活性的10倍[2]。因此，Pol I的活性对RNA的转录生成影响明显。

对用于体外转录分析所分离的细胞核，在24h内，最好分装后于液氮或－18℃保存，避免反复冻融。长期保存于液氮中的细胞核以不超过两周为佳。0℃保存的细胞核不适用于RNA的体外转录生成研究。

关键词 遗传转录；RNA聚合酶类；细胞核

参 考 文 献

1. Blair DGR. Eukaryotic RNA polymerase. Comp Biochem Physiol 1988;89(B):647
2. Yu Fuli. High Concentration of RNA polymerase I is responsible for the high rate of nucleolar transcription. Biochem J 1980;188(2):381
3. Burton K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods Enzymol 1968;12(B):163
4. George AJ, Catherine MC. Response of skeletal muscle RNA polymerase I and II to tumour growth. Biochim Biophys Acta 1988;950(2):296
5. Åström Stefan, von der Decken A. Release of transcriptionally active chromatin from liver nuclei by micrococcus nuclease. Life Sci 1980;26(1):797
6. Yu Fuli. Increased level of rat hepatic nuclear free and engaged RNA polymerase activities during liver regeneration. Biochim Biophys Res Commun 1975;64(3):1107
7. Inga Ljungquist, Åström Stefan. Effects of partial hepatectomy on RNA polymerase activities in mouse liver. Int J Biochem 1984;16(1):69
8. Dauphinais C. The control of ribosomal RNA transcription in lymphocytes; Evidence that the rate of chain elongation is the limiting factor. Eur J Biochem 1981;114(3):487

（收稿：1991-08-21；修回：1992-02-14）

合成肽抗原ELISA检测丙型肝炎病毒核心抗体实验条件的初步探讨*

郝 飞 吴纯清 陈国致 郑 红 李梦东 （第三军医大学西南医院 传染科） 630038

自1989年获得丙型肝炎病毒（HCV）克隆并测出HCV RNA的大部分核苷酸序列以来，相继建立了HCV抗体测定和聚合酶链反应（PCR）检测HCV RNA的方法，使丙型肝炎的病原诊断取得突破性进展[1][2]。目前所采用的重组抗原建立的酶联免疫吸附试验（ELISA）和重组免疫印迹法（RIBA）检测抗HCV存在着感染早期检出率低、试剂昂贵和检出的临床意义不太明确等缺点，且特异性较差[2]。最近研究表明，用人工合成多肽作抗原检测特异性抗体显示良好的应用前景[3]。我们用按HCV RNA编码的部分氨基酸序列合成的多肽抗原，建立了检测抗HCV的ELISA方法，并与用重组抗原检测的阳性血清作对比，结果较满意，现报告如下。

* 国家自然科学基金资助项目

1 材 料 和 方 法

1.1 合成肽（CP_8）

按HCV RNA序列[4]合成第39～74氨基酸的寡

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net