

高速离心-同位素示踪法分析核糖体-mRNA 复合物

程林丽 李重九

(中国农业大学 理学院,北京 100094)

摘要 本实验全面改进了用于蛋白质起始翻译阶段研究的传统介质梯度离心法。以 ^{32}P -(TMV-RNA)为供试 mRNA 在麦胚离体翻译系统中形成核糖体-mRNA 复合物,在 100 μL 蔗糖垫上(含蔗糖、Hepes、KAC、 $\text{Mg}(\text{AC})_2$ 和肝素钠, pH7.5), $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 150 min 即可分离该复合物与游离 mRNA。测定沉淀物的 cpm 值可对其定性定量分析。该方法简便快速、准确安全、成本低。

关键词 核糖体-mRNA 复合物; 蔗糖垫; 离心-液闪计数分析法

中图分类号 O 657.34

文章编号 1007-4333(2003)03-0029-02

文献标识码 A

Analysis method of ribosome-mRNA complex

Cheng Linli, Li Chongjiu

(College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The traditional sucrose gradient centrifugation for protein initiation translation analysis was improved greatly. $1 \mu\text{g } ^{32}\text{P}$ -(TMV-RNA) was reacted with 25 μL wheat germ extraction, then the mixture was centrifuged for 150 min at $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ through 100 μL sucrose cushions (sucrose 0.5 mol L^{-1} , Hepes 25 mmol L^{-1} , KAC 80 mmol L^{-1} , $\text{Mg}(\text{AC})_2$ 1 mmol L^{-1} , heparin sodium 0.1 mmol L^{-1} , pH7.5). The sediment included ribosome-(TMV-RNA) complex and analyzed by liquid scintillator. The method was proved to be sample, quick, sensitive, cheap and safe.

Key words ribosome-mRNA complex; sucrose cushions; centrifugation-liquid scintillation counting method

生物化学、病毒学、药学研究经常涉及到蛋白质翻译起始阶段的核糖体-mRNA 复合物的形成和分析,这在核糖体构成因子、蛋白质结构分析以及一些以核酸为靶标的药物研究中有重要意义^[1]。多年来的研究致力于发现快捷灵敏的分析方法,主要有:电泳法^[2]、凝胶色谱法^[1]、超速介质梯度离心法^[1,3]、间接免疫沉淀法^[2]和引物延伸分析法^[1,2]。但以上各方法都比较复杂,操作难度较大。本研究利用生物体 mRNA 的沉降系数、化学组成的共性,以 TMV-RNA 作为 mRNA 材料,对最常用的介质梯度超速离心法进行改进,以期能找到一种快速简便分析该复合物的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

麦胚提取物参照 Kairt M. 方法提取^[4]、TMV-RNA 参照 Sean N. C. 方法提取^[4]、去酶水参照 Robb K. 方法处理^[4]。ATP、GTP、磷酸肌酸、肌酸激酶、 1 mmol L^{-1} 氨基酸标准液购于北京原平皓生物公司。KAC、 $\text{Mg}(\text{AC})_2$ 、DTT、Hepes、放线菌酮、超纯级蔗

糖、电泳琼脂糖、溴化乙锭、核酸点样缓冲液购于北京毕龙-毕特博公司。T4 激酶体系购于大连宝生物公司。 $[\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 购于北京福瑞公司。

1.2 仪器

Mikro 22R 台式高速冷冻离心机 and Max18 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转子 (HITACHI 公司)、DYY-III-6 型电泳仪 (北京六一仪器厂)、LKB 液闪计数器 (BECKMAN 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 核糖体-mRNA 复合物的形成 用麦胚提取物和 TMV-RNA 建立麦胚离体翻译系统 (参照 Louise O. 方法略作改进^[4],其中 TMV-RNA 加入量为 $8 \mu\text{g}$),加入放线菌酮将翻译控制在起始阶段。用 1% 琼脂糖凝胶电泳 (简称电泳法) 检验确定核糖体-(TMV-RNA) 复合物 (简称复合物) 的形成^[4]。实验设核糖体对照 (反应液中不加 TMV-RNA) 和 mRNA 对照 (反应液中不加核糖体)。

1.3.2 核糖体-mRNA 复合物的分离 将上述复合物样品分别与 200 μL 待试 A 液 (蔗糖 0.5 mol L^{-1})、B 液 (蔗糖 0.5 mol L^{-1} 、Hepes 25 mmol L^{-1} 、KAC 80 mmol L^{-1} 、 $\text{Mg}(\text{AC})_2$ 1 mmol L^{-1} 、pH7.5)、C 液 (蔗糖 0.5 mol L^{-1} 、

收稿日期: 2003-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970501)

作者简介: 程林丽, 硕士研究生; 李重九, 教授, 博士生导师, 联系作者, 主要从事农药分析及药理研究

Hepes 25 mmol L⁻¹、KAC 80 mmol L⁻¹、Mg(AC)₂ 1 mmol L⁻¹、肝素钠 0.1 mmol L⁻¹、pH7.5)混合,置于4 ℃过夜。用电泳法分析复合物样品在A、B、C液中的稳定性,选择合适的蔗糖垫溶液。然后用不同体积(50、100、200和500 μL)所选蔗糖垫分别对样品在4 ℃下离心1.5 × 10⁴ r · min⁻¹不同时间(15、30、60、120和150 min),用电泳法检验样品。根据分离情况选择合适的蔗糖垫体积和离心时间。实验设完整反应和核糖体 + mRNA 对照(反应液中不加能量物质和激酶)、mRNA 对照、核糖体对照。

1.3.3 核糖体-mRNA 复合物的检测 用³²P标记TMV-RNA,再用非标记TMV-RNA稀释后,取1 μg按照上法使其与核糖体形成复合物。采用以上优化条件对游离TMV-RNA与复合物进行分离,离心后沉淀用液闪计数器检测。实验设完整反应及核糖体 + mRNA 对照、mRNA 对照、核糖体对照、试剂空白对照。

2 结果与讨论

在麦胚离体翻译系统中TMV-RNA与核糖体形成的复合物用蔗糖垫高速离心法与游离mRNA分离后,用同位素标记法检测复合物含量提高了检测灵敏度。为了优化分离条件,探讨了蔗糖垫高速离心法中各种影响因素。

TMV-RNA在麦胚离体翻译系统中反应后的混合样品电泳图谱在游离核糖体2个亚基条带位置出现了高亮度连续拖尾条带,而2个对照图谱未出现任何拖尾条带,说明样品中已经形成复合物。

将上述样品分别与A、B、C3种溶液混合过夜后经电泳分析可见:只有在C液中反应物和产物均未降解,可用作离心介质。用不同体积的C液作为蔗糖垫对样品离心,100和200 μL蔗糖垫都能分离复合物和TMV-RNA,且前者所用时间短。离心时间对样品的分离也有重要影响,在100 μL C液蔗糖垫上,离心150 min时核糖体沉降完全而TMV-RNA仍未沉降。因此确定复合物的分离方法为:以100 μL C液为蔗糖垫,1.5 × 10⁴ r · min⁻¹离心150 min。

由于电泳法灵敏度低,因此改用同位素标记法监测复合物。将1 μg ³²P-(TMV-RNA)加入麦胚反应体系进行反应,离心分离复合物与游离的TMV-RNA,沉淀用液闪计数器检测(表1)。完整反应的cpm值与各对照差异显著,据此可检测与核糖体结合的³²P-(TMV-RNA)。虽然对照的游离核糖体亦产生了沉淀,但它不含³²P-(TMV-RNA)不会产生干扰。该方法检出RNA下限可达0.2 μg。10次重复试验

中9次的相对标准差为1%~3%,1次为5%,实验准确度高于其他方法。

表1 离心沉淀物cpm数据

处 理	cpm 平均值	1%差异显著水平
完整反应	4 868	a
核糖体 + TMV-RNA 对照	287	b
TMV-RNA 对照	261	b
核糖体对照	70	c
空白对照	68	c

复合物分析难度在于mRNA容易分解,以及一条mRNA与数目不等的多个核糖体结合而成的产物分子量范围很宽,这使它与游离核糖体不易分离。为解决这2个问题,目前报道的分析方法均需复杂的程序和特殊试剂及设备。改进后本方法优于目前常用的介质梯度超速离心法:无需制备介质梯度柱、介质(蔗糖液)体积为超速离心法的1/50、上样量减少到1/10、采用普通的高速离心代替了昂贵的高速离心、离心后无需检测梯度柱中各个部位的紫外吸收值和放射性强度而只需测定沉淀的放射性强度即可区分复合物与游离的RNA及核糖体,而且放射性强度仅为前者的1/20,离心时间亦缩短了1/2。

综上所述,本研究确立了蔗糖垫离心-同位素示踪检测法。在麦胚离体翻译系统中形成核糖体-mRNA复合物,反应物在100 μL蔗糖垫上(含蔗糖0.5 mol · L⁻¹、Hepes 25 mmol · L⁻¹、KAC 80 mmol · L⁻¹、Mg(AC)₂ 1 mmol · L⁻¹、肝素钠 0.1 mmol · L⁻¹、pH7.5),4 ℃,1.5 × 10⁴ r · min⁻¹离心150 min即可将复合物与游离mRNA分离。测定其沉淀物的cpm值可确认该复合物的形成并分析其数量。该方法具有简便、快速、准确、安全、成本低的特点,使得蛋白质起始翻译阶段的研究更加方便准确。

参 考 文 献

- [1] Varilly Z. Primer extension analysis of eukaryotic ribosome - mRNA complexes [J]. Nuc Aci R, 1998, 21 (26): 4853 ~ 4859
- [2] Christine D M, Hung D, Arthu E J, et al. The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCPI) ring complex (TRiC) with ribosome - bound nascent chains examined using photo-cross-linking [J]. Cell Bio, 2000, 3(149): 591 ~ 601
- [3] Marilyn K. Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first [J]. Bio Pro Nat Acad Sci USA, 1995, 92: 2662 ~ 2666
- [4] 哈伍德 A J 主编. DNA 及 RNA 基本实验技术 [M]. 盛小禹, 等译. 北京: 科学出版社, 2002. 350 ~ 353