

文昌鱼原肌球蛋白聚核糖体 核糖核酸的分离*

李明

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

于富才 吴贤汉 吴尚勳

(中国科学院海洋研究所)

邹永水

(中国科学院上海生物化学研究所)

文昌鱼 (*Amphioxus*) 胚胎发育的研究是从 Kowalevsky (1867—1871) 开始的。经 Hatschek (1881), Cerfontaine (1906) 和 Conklin (1905—1932) 等的研究, 使我们对文昌鱼正常发育的过程, 有了比较全面的认识^[1]。至于用实验方法来研究青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtaoense* Tchang et Koo) 的发育, 童第周、吴尚勳、叶毓芬等作了系统而全面的描述^[1-2, 6-12]。文昌鱼属于脊索动物门, 头索动物亚门, 文昌鱼科, 是无脊椎动物进化至脊椎动物的过渡类型, 在学术研究上有重要的意义。它不仅引起了胚胎发生学家的注意, 而且也引起了遗传学、细胞生物学和生物化学工作者的极大兴趣。几年前, 开始报道文昌鱼副肌球蛋白的研究^[3]。用 TM (原肌球蛋白) 免疫双扩散的方法, 已证实文昌鱼成熟的未受精卵子里, TM 只在植物极出现, 而动物极则没有^[2]。究竟文昌鱼卵子里的 TM 是怎样形成的, 如何集中到预定的区域? 这在研究发育过程中的核质关系中是个极为有趣的问题。这个蛋白的信息贮存在那里? 怎样调控? 在什么地方翻译? 又为什么集中到预定的部位? 为了解决上述一系列的问题, 首先要明确究竟在文昌鱼卵子里有没有 TM 的信息核糖核酸存在。因此, 我们需要设法在卵巢卵子里提取 Tropomyosin mRNA (原肌球蛋白信使核糖核酸)。这不仅为我们提供了一个研究 TM 在文昌鱼发育中出现的时空顺序与细胞分化和器官形成的关系, 而且也为我们研究细胞质的分化, 特别是核质关系方面, 提供了一个理想的系统。因此, 分离和提纯 TM-mRNA, 将有助于阐明细胞质对 TM 基因在发育过程中的控制机制及转录和翻译的分子机制。如果把 TM-mRNA 或 TM-cDNA (原肌球蛋白互补脱氧核糖核酸) 注入即将成熟的文昌鱼卵子内的动物极里, 它能否进行翻译? 在植物极以及整个卵子内又有什么变化呢? 这是我们的兴趣所在。

由于 TM 在文昌鱼卵巢中的含量不高, 所以采用双抗体方法分离 TM 聚核糖体的量极有限, 加之文昌鱼卵母细胞的形成目前还不能人为的控制, 受季节限制, 取材较难, 因而本文拟就 TM 和 TM 抗体的制备, 双抗体法分离 Polysomal RNA (聚核糖体核糖核酸) 及其翻译和反转录等实验的全过程, 予以描述。借以说明文昌鱼卵巢内可能有 TM-mRNA

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 706 号。本实验工作在中国科学院上海细胞生物学研究所进行, 得到一室基调二组同志们热情支持和帮助, 特此致谢。

本刊编辑部收到稿件日期: 1980年9月15日。

的存在。

实验方法

1. 原肌球蛋白的制备

文昌鱼置于滤过的海水中,不加饵料饲养 24—48 小时。然后转移到组织捣碎器内,加五倍洗涤液(0.05M Tris-HCl, 0.025M NaCl, 0.005M MgCl₂, pH7.7)匀浆,随后离心收集沉淀物,上述洗涤步骤重复 3—4 次。其余步骤基本上沿用 Bailey 方法抽提: pH4.5 沉淀和硫酸铵盐析^[43],随后用 CM-纤维素纯化^[45],得到电泳^[47]均一的 TM。然后按李明等人的方法制备成 TM-Sepharose^[4](原肌球蛋白-琼脂糖)。

2. TM 抗体的制备

纯 TM 1mg,加 0.5ml PBS(磷酸缓冲液)与 0.5ml 福氏全佐剂,制成乳剂用以致敏雄性家兔。每周皮下注射一次,共 4 次。第 4 次注射后,间隔 10 天,颈动脉取血,得到兔抗文昌鱼 TM 血清。然后对 PBS 透析,以 2—3 倍 PBS 稀释抗血清,上 TM-Sepharose 亲和层析柱,可以得到纯的兔抗 TM 抗体,上 DEAE-和 CM-纤维素柱后,就得到了无 RNase(核糖核酸酶)的 TM 抗体^[4]。

3. TM-聚核糖体的制备 (以下操作除注明外,一律在 4°C 左右进行)

取产卵季节^[6]之前即 3 月中旬到 6 月初的雌性青岛文昌鱼,在两分钟内分别用大量冷自来水、蒸馏水、生理盐水洗净,以 2:1(文昌鱼:缓冲液)的比例加入文昌鱼卵巢细胞匀浆液(0.25M 蔗糖, 50mM Tris-HCl, 25mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH7.7, 肝素钠 500μg/ml),于组织捣碎器内,控制电压调转速,仅使文昌鱼腹部破裂,释放出卵母细胞为宜,而文昌鱼身体的其他部分基本上维持完整。用市售尼龙网过滤,滤液用玻璃匀浆器匀浆,直至在显微镜下看不到完整的卵母细胞为止,匀浆在 10,000r. p. m. 离心 20 分钟,上清液以 9:1 的比例加入 10% TritonX-100-10% 脱氧胆酸钠,转入玻璃匀浆器内匀浆 15 次,半小时后,将 25ml 上清液铺在 15ml 1.0M 的蔗糖液(其他成分同匀浆液,下同)用 Sp-75 超速离心机于 105,000g 离心 2 小时,得到半透明凝胶状的聚核糖体沉淀物,溶于 TNMH(50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH7.6, 500μg/ml 的肝素钠)中,并用此液稀释成 20A₂₆₀/ml,以 70μg/ml 的比例加入 TM 抗体,冰浴半小时后,以 1:40(TM 抗体:第二抗体)的比例加入第二抗体,再冰浴 1 小时,并以 19:1 的比例加入 10% TritonX-100-10% 脱氧胆酸钠,将 15—20ml 溶液铺在 5ml 0.5M 蔗糖(其他成分与匀浆液同)和 10ml 的 1.0M 蔗糖液上,于 15,000r. p. m. 离心 30 分钟,收集免疫复合物,再重复一次,可得到纯净的 TM-聚核糖体的免疫复合物,悬浮在 TNMH 中,10—20A₂₆₀/ml,加 SDS(十二烷基硫酸钠)达 0.5% 后,置于干冰浴内保存。

4. TM-pRNA 的制备

加入等体积的酚仿醇(88% 水饱和酚:氯仿:异戊醇=50:48:2)到 TM-聚核糖体的免疫复合物溶液中,摇 15 分钟,8,000r. p. m. 离心 15 分钟,得到上清液,加 1/2 体积的酚仿醇,抽提两次,上清液加 NaCl 到 0.2M,加 2.5 倍体积的冷乙醇沉淀,干冰内存放 1—2 小时,于 8000r. p. m. 离心 15 分钟,得到白色沉淀,用 4M LiCl 洗涤 3 次,压积物成为半透明的凝胶状物溶于重蒸水中,作为翻译和反转录的模板。

5. TM-pRNA在麦胚无细胞蛋白合成系统中的翻译

麦胚抽提液按 Change 等^[4]的方法制备, 浓度调至 $100A_{260}/\text{ml}$, $A_{260}:A_{280} = 1.6-1.8$ 。按李明等人^[4]的方法进行翻译, 合成蛋白质反应液中含有 20mM HEPES-KOH, pH7.6, 2mM DTT, 1mM ATP, 20mM GTP, 8mM 磷酸肌酸, 磷酸肌酸激酶 $40\mu\text{g}/\text{ml}$, 100mM KCl, 3mM MgCl_2 , $20\mu\text{Ci}/\text{ml}$ DL-³H 亮氨酸, 19 种未标记氨基酸 (每种 $25\mu\text{M}$), 麦胚抽提液 $40A_{260}/\text{ml}$, TM-pRNA $15-120\mu\text{g}/\text{ml}$, 30°C 温育 30 分钟, 放在冰浴中停止反应, 取 $20\mu\text{l}$ 滴加在直径为 1.5cm 的 Whatman 3mm 层析滤纸上, 干燥, 按 Change 等人^[4]的方法处理, 纸片转入盛有 5ml 闪烁液 [4.0 克 PPO (2, 5-diphenyloxazol), 0.2 克 POPOP (1, 4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene), 甲苯 1000ml] 的计数瓶内, NE-8312 计数器内计数。

6. TM-pRNA 的反转录试验

反转录试验按 Nilson^[16] 改良的方法进行。 $100\mu\text{l}$ 反转录试验的溶液中, 含有 20 单位的反转录酶 (西德马普生物化学研究所 Hofschneider 教授所赠送); TM-pRNA $30\mu\text{g}$; Oligo(dT) (10-18 个胸腺嘧啶核苷酸低聚体) $1\mu\text{g}$; ³H-dGTP ($17\text{Ci}/\text{mM}$) $10\mu\text{Ci}$; dATP, dCTP, dTTP 各 0.33mM ; 10mM MgCl_2 ; 10mM DTE; 56mM Tris, pH8.3; 10mM ATP, pH7.5; $20\mu\text{g}$ BSA。 37°C 温育 8 分钟, 50 分钟, 100 分钟, 150 分钟, 放入冰浴停止反应, 分别取出 $20\mu\text{l}$ 滴加在直径为 1.5cm 的 Whatman 3mm 层析滤纸片上 (0.2M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 溶液处理过), 干燥, 用含有 1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 的 10% TCA 溶液处理两次 (5 分钟 1 次), 然后分别用 75% 乙醇, 95% 乙醇, 无水乙醇, 3:1 乙醇乙醚, 乙醚分别处理一次 (5 分钟 1 次) 后, 加 5ml 闪烁液 (PPO 4 克; POPOP 0.1 克, 甲苯 1000ml), 用 NE-8312 计数器计数。

结果与讨论

1. TM 及其抗体

采用 Bailey^[13] 方法抽提 TM, Porzio^[14] 方法电泳, 在凝胶上只出现一条带 (图 1)。

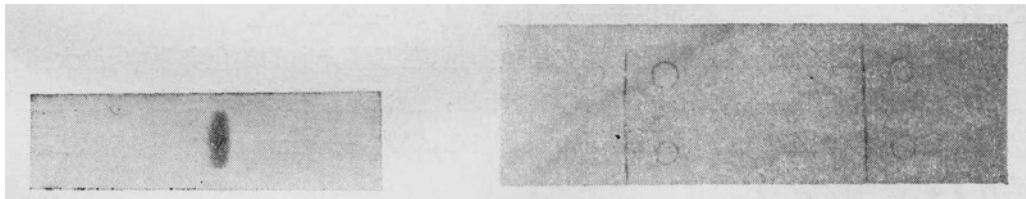


图 1 文昌鱼 TM 的 7.5% 聚丙烯酰胺电泳图

图 2 文昌鱼 TM 抗血清的 1% 琼脂糖与不纯的 TM 免疫扩散图

TM 抗血清, 上 TM-Sepharose 柱, 得到纯化的 TM 抗体, 上 DEAE 和 CM-纤维素柱后, 得到纯的无 RNase 的 TM 抗体; 免疫扩散 (图 2) 出现一条沉淀线。1% 琼脂糖免疫电泳 (在李明等人^[4]方法中, 使凝胶与电泳缓冲液的 NaCl 都增加到 0.1M), 也只出现一条沉淀线。

2. TM-聚核糖体和 TM-pRNA

大约 800 克文昌鱼的卵巢细胞匀浆液, 通过不连续的蔗糖梯度后, 可得到半透明凝胶状的聚核糖体压积物, 溶入 TNMH 后, 为乳白色半透明状的液体, A_{260}/A_{280} 为 1.7-1.9, 约 $2350A_{260}$ 。 经与 TM 抗体和第二抗体温育后, 可得到 A_{260}/A_{280} 接近 1.2 的免疫复合物 $530A_{260}$ 。 酚仿醇抽提后, 经 4M LiCl, 3:1 乙醇生理盐水洗涤后, 可得到纯净的 $9A_{260}$ TM-

pRNA, A_{260}/A_{280} 为 2.4, A_{230}/A_{260} 为 0.35。TM-pRNA 的得率是较低的,这可能是文昌鱼卵母细胞中含 TM 少的必然结果。也是我们难以得到 TM-mRNA 的原因所在。

3. TM-pRNA 在麦胚无细胞蛋白合成系统中的翻译

双抗体方法得到的 TM-pRNA, 在麦胚无细胞蛋白合成系统中, 其比活力为 13083 cpm/ μg TM-pRNA。它的动力学曲线表明, 在 $50\mu\text{l}$ 麦胚无细胞蛋白合成反应液中, TM-pRNA 的最适浓度是 $3\mu\text{g}$ 左右(图 4)。有翻译活力的 TM-pRNA 的得到, 给进一步得到

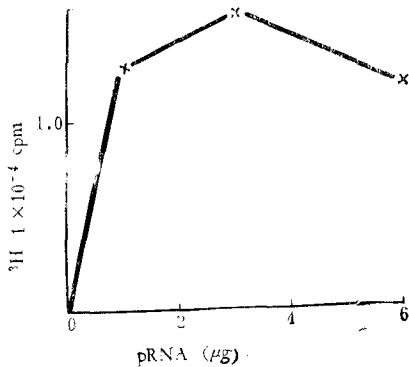


图 3 TM-pRNA 在麦胚无细胞蛋白合成系统中的翻译

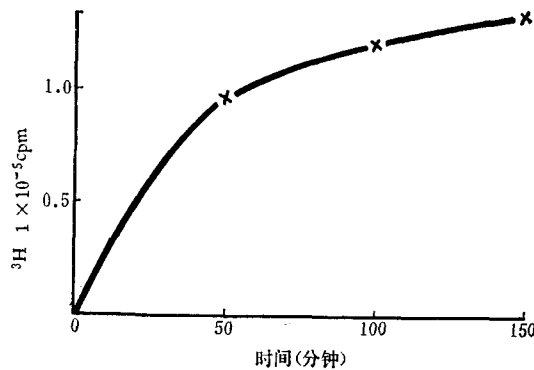


图 4 TM-pRNA 反转录试验的动力学曲线

纯的 TM-mRNA 和对翻译产物即初生 TM 多肽的鉴定和分析, 提供了可靠的证据。

4. TM-pRNA 的反转录试验

$30\mu\text{g}$ 的 TM-pRNA, 可反转录得到 $2.2 \times 10^5 \text{cpm}/A_{260}$ 的 TM-cDNA, 它的动力学曲线是一个典型的酶促反应曲线(图 4), 可反转录成为 TM-cDNA 的结果证明, 文昌鱼的 TM-mRNA 的 3' 一端是含有 Poly(A) 的, 这说明 TM-pRNA 上 Poly(U)-Sepharose 或 Oligo(dT)-纤维素亲和层析柱后, 是可以进一步得到纯的 TM-mRNA 的。

我们提取时最初采用的原料是雌性文昌鱼卵巢, 在即将产卵的雌鱼卵巢中, 绝大部分是接近成熟的卵母细胞, 其他结缔组织和肌肉纤维, 虽然不能排除, 但所占比例极小, 且在捣碎过程中, 卵母细胞极易破碎, 而结缔组织则较难, 因此, 在取上清液时, 基本把这些碎渣去除了。

由于材料较为难得, TM 在卵子内的含量又极小, 因而所得 TM-pRNA 已经很少了, 很难再从这个样品中进一步分离 TM-mRNA, 除非有大量的样品。但是从翻译和反转录的结果以及 TM 抗体的纯度和专一性来看, TM-mRNA 的存在是十分可能的。

这个 mRNA 分布在卵子的什么地方? 在什么地方翻译成 TM? 还需要进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 叶毓芬、陆德裕、童凤明, 1960。文昌鱼内胚层调整能力的研究。实验生物学报 10(4): 332—345。
- [2] 吴尚勳、吴厚余、施奠族, 1982。文昌鱼原肌球蛋白在胚胎发育过程中出现的时间和位置。海洋与湖沼 13(3): 254—258。
- [3] 吴尚勳、蔡难儿, 1964。文昌鱼卵子各部分之间相互影响的进一步研究。实验生物学报 9(2): 119—129。
- [4] 李明等, 1979。采用双抗体免疫沉淀技术分离和提纯大鼠肝细胞白蛋白 mRNA。实验生物学报 12(3): 247—255。

- [5] 邹永水、龚祖坝, 1978。文昌鱼副肌球蛋白纤维及其细微结构。生物化学与生物物理学报 **10**(4): 375—380。
- [6] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1959。文昌鱼卵子分裂球的发育能力的研究。实验生物学报 **6**(1): 57—90。
- [7] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1959。文昌鱼卵子 32 细胞时期分裂球层发育能力的研究。实验生物学报 **6**(3): 191—210。
- [8] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1960。文昌鱼卵子的预定器官形成物质分布区域的研究。实验生物学报 **7**(12): 81—92。
- [9] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1961。文昌鱼卵子外胚层细胞与内胚层细胞调整能力的研究。实验生物学报 **7**(3): 253—262。
- [10] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1961。文昌鱼胚胎神经诱导现象的研究。实验生物学报 **7**(3): 263—270。
- [11] 童第周、吴尚勳、叶毓芬, 1963。文昌鱼卵子中胚层和外胚层细胞转化的研究。实验生物学报 **8**(3-4): 408—414。
- [12] 童第周、吴尚勳、叶毓芬、严绍颐、杜淼, 1965。文昌鱼卵子 8 细胞和 16 细胞时期动物性半球和植物性半球细胞配合的研究。实验生物学报 **10**(4): 318—331。
- [13] Bailey, K., 1948. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.* **43**(2): 271—279.
- [14] Chang, S. E. and J. W. Littlefield, 1976. Elevated dihydrofolate reductase messenger RNA levels in methotrexate-resistant BHK cells. *Cell* **7**: 391—396.
- [15] Cummins, P. and S. V. Perry, 1973. The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.* **133**(4): 765—777.
- [16] Nilson, J. H., et al., 1980. Construction and characterization of a cDNA clone containing a portion of the bovine prolactin sequence. *Nucleic Acids Reseach.* **8**(7): 1561—1573.
- [17] Porzio, M. A. and A. M. Pearson, 1977. Improved resolution and myofibrillar protein with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta.* **490**(1): 27—34.

ISOLATION OF TROPOMYOSIN POLYSOMAL RNA FROM AMPHIOXUS*

Li Ming

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica)

Yu Fucui Wu Xianhan and Wu Shangqin (S. C. Wu)

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Zou Yongshui

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

ABSTRACT

Amphioxus is a transitory form from invertebrate to vertebrate evolution and scientifically very important. Great attention has been paid not only by embryogists but also by cytologists, geneticists and biochemists. It has been confirmed by immunological technique that TM only exists in the vegetative poles of amphioxus eggs before fertilization. How does TM in the egg of amphioxus form and accumulate at the destined region? This is a very interesting problem in studying the relationship between the nucleus and the cytoplasm in the developmental process. Where is TM messenger stored? How does it exert regulation and control? Where is it translated? Why is it accumulated in the destined region? To answer these questions, we think it necessary to determine whether there is TM mRNA in the Ovarian egg of amphioxus or not. We must try to extract TM mRNA from the Ovarian egg. This will provide us with means

* Contribution No. 706 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

for studying to investigate time and space in the appearance of TM in amphioxus developmental process. It will also provide us with an optimal system for studying cytoplasmic differentiation. The isolation and purification of TM mRNA will help to demonstrate the controlling mechanism of cytoplasm over TM gene in the developing process and the molecular theory of transcription and translation. If TM mRNA is injected into the animal pole of a nearly mature amphioxus egg, could it be translated? What changes will take place in the vegetative pole and whole egg? This is just what we are interested in.

Tropomyosin polysomal RNA (TM pRNA) was isolated from *Amphioxus (Branchiostoma belcheri tsingtaoense)* Tchang et Koo oocytes polysome by a combination of immunoprecipitation of specific polysomes. The isolation of TM-synthesized polysome involved the incubation of the oocytes polysome with an antibody against native TM which was obtained from rabbit antiserum by affinity chromatography on columns of TM-Sepharose. The binding is highly specific and occurs through an immunological recognition of nascent TM peptide chains on the polyribosomes. This TM antibody reaction is followed by the incubation of the polysome-antibody complex with a second antibody (sheep anti-rabbit γ globulin). The polysome-double antibody complex is then sedimented through a discontinuous sucrose gradient to remove unreacted polysomes and unreacted antibody. The TM pRNA was extracted from the polysome immunoprecipitate by phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50:48:2). Then TM pRNA was precipitated by 2.5 volumes of ethanol (-50°C , 2h.) and was washed by 4 M LiCl and 3:1 ethanol saline respectively to obtain TM pRNA of translational and transcriptional activities. Upon addition of the TM pRNA to a cell-free proteinsynthesizing system derived from wheat germ, the total translation product was identified to obtain 6.5×10^5 cpm/ A_{260} TM pRNA specific activity.

The reaction of synthesis of DNA complementary to TM mRNA was carried out under micromodified conditions described by Nilson, J. H. et al. In the presence of TM pRNA at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and reverse transcriptase (the generous gift of Prof. Dr. P. H. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, West Germany) at 20 units/ml, the reverse transcription product was identified to obtain 2.2×10^5 cpm/ A_{260} TM cDNA specific activity.

These results, in combination with the result of Wu et al about the presence and localization of TM in the mature, unfertilized egg of *amphioxus* indicate that TM mRNA may exist in the Ovarian egg, but its distribution and location of its translation remained to be worked out further.