

精胺 (Light 厂产品) $65\mu M$; 肌酸磷酸激酶 (上海东风生化试剂厂产品) $42\mu g$ ($840\mu g/ml$); 19 种非放射性氨基酸, 各 $20\mu M$; 大鼠肝 tRNA $4mg/ml$; [3H] 亮氨酸 ($57ci/m\ mole$, 上海原子核研究所), $1.0\mu ci$; 麦胚液 $15\mu l$ ($1-1.5A_{260}$ 单位); 反应总体积 $50\mu l$ 。

改进后的麦胚体系: $KCl\ 70mM$; $Mg(OAc)_2\ 2.5mM$; 肌酸磷酸激酶 $2\mu g$; 其它组分同原体系。肌酸磷酸激酶溶于 50% 甘油使成 $1\mu g/\mu l$, 存于 $0^\circ C$ 备用。

结果与讨论

1. 麦胚体系中肌酸磷酸激酶 (CPK) 浓度对其翻译活力的影响

在原麦胚体系中, 以大鼠肝聚核蛋白体为模板时, 体系中不加入 CPK, 其掺入明显降低; 而加入 CPK 浓度在 $80\mu g/ml$ 至 $1.2mg/ml$ 之间时, 其掺入活力无明显的差异, 而且 CPK 浓度增加并不使掺入活力下降 (见表 1)。

表 1 CPK 浓度对大鼠肝聚核蛋白体在麦胚体系中掺入活动的影响

		cpm/50 μl +/- RP	cpm/100 μg RP
不加 CPK		4000/2340	830
加 CPK	$80\mu g/ml$	10670/2085	4293
	$400\mu g/ml$	10650/2100	4275
	$1.2mg/ml$	12310/1900	5205

$50\mu l$ 体系中, 加入 [^{14}C] 混合氨基酸 $0.25\mu ci$, 大鼠肝聚核蛋白体 (RP) $200\mu g$, 其它条件见前文^[1]表 1。

但是, 以大鼠肝 pRNA 为模板时, 则出现另一种情况 (图 1)。首先, 不加入 CPK 时, 掺入活力很低, 加入 RI 后有明显升高 (提高近 6 倍)。可能 RI 制品中有 CPK 的活力, 而麦胚体系中缺乏 CPK 的活力。当加入不同量的 CPK 时, 加入 RI 与不加入 RI 的 CPK 浓度曲线基本一致, 只是加入 RI 的掺入活力较高 (提高约 50%)。第二, 最适 CPK 浓度为 $80\mu g/ml$, 大于此浓度则掺入明显下降; 加入 RI 与不加入 RI 有同样的趋势。第三, CPK 浓度达到原体系所加浓度 ($840\mu g/ml$) 时, 掺入活力接近空

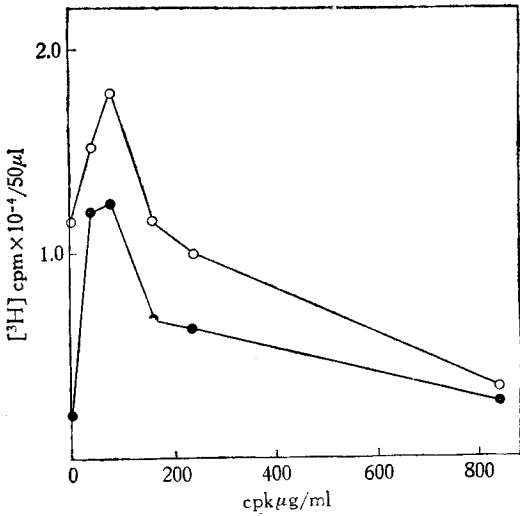


图 1 CPK 浓度对大鼠肝 pRNA 在麦胚体系中翻译活力的影响

$50\mu l$ 原麦胚体系, 加入不同浓度的 CPK 及大鼠肝 pRNA $20\mu g$ 。以 Beckman LS 8000 测量 [3H] 亮氨酸掺入酸不溶部分的 cpm。●—●: 未加大鼠肝 RI; O—O: 加入大鼠肝 RI 3.3 单位。

白水平。这说明原麦胚体系对大鼠肝 pRNA 并非是最适体系。

为了弄清 CPK 制品对大鼠肝 pRNA 掺入活力的抑制现象, 是否与 CPK 制品的来源有关, 我们比较了三种 CPK 制品 (西德 Boehringer, 上海东风生化试剂厂, 本所试剂站)。结果表明, 它们对翻译活力的影响是一致的, 即以 CPK 浓度为 $40\mu g/ml$ 时掺入最高, 随着 CPK 浓度的再增加而掺入活力降低。

因为加入无细胞体系中 poly(A) RNA 的浓度很低 ($0.5\mu g-2\mu g/50\mu l$ 体系), 更易受到 CPK 制品中 RNase 的攻击, 有必要说明 CPK 浓度对大鼠肝 poly(A) RNA 的模板活力的影响 (图 2)。当 CPK 浓度在 $2-20\mu g/ml$ 范围内, 掺入活力最高。而当 CPK 浓度大于 $20\mu g/ml$ 时, 掺入活力随其浓度增加而下降。

以上实验结果说明 CPK 制剂中有少量 RNase 的污染, 降低它 (CPK) 在麦胚体系中的浓度, 从而减少外源 RNase 的污染, 是建立稳定的麦胚体外翻译体系的重要环节。在制备动物组织 mRNA 时, 不仅要在提取过程中防止 RNase 对 mRNA 的降解, 还要注意检测 mRNA

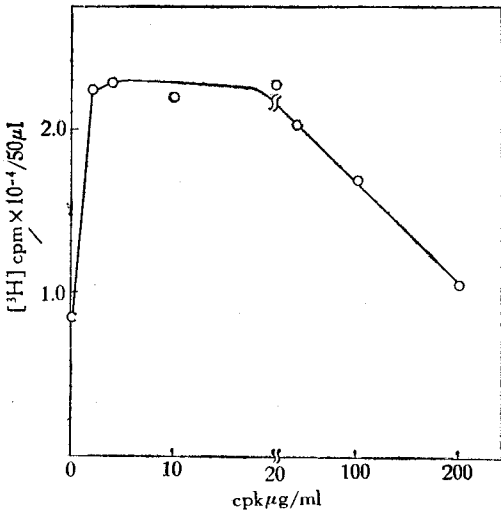


图2 CPK 浓度对大鼠肝 poly(A) RNA 体外翻译活力的影响

改进的麦胚体系 50μl, 大鼠肝 poly(A) RNA 1.0μg, 其它条件见正文。

表 2 改进的麦胚体系与原麦胚体系的比较

		原 体 系	改进的体系
[K ⁺]*		82mM	70mM*
[Mg ⁺⁺]		2.65mM	2.5mM
[CPK]**		840μg/ml	40μg/ml**
[精胺]		65μM	70μM
大 鼠 肝 pRNA	+/- RNA (10μg)	4,075/2,045	12,550/728
	cpm/μg	203	1,182
大 鼠 肝 poly(A) RNA	+/- RNA (1μg)	3,785/1,730	25,360/4,100
	cpm/μg	2,055	21,260

两体系中都含有 Hepes 20mM, DTT2mM, ATP 1mM, GTP 0.2mM, cp 8mM, 麦胚液 15μl, 19 种非放射性氨基酸各 20μM, 大鼠肝 tRNA 2μg, [³H] 亮氨酸 1μci, 总体积 50μl、终 pH 7.16。

* 测量大鼠肝 poly(A) RNA 掺入活力时可增加至 80—90mM。

** 测量大鼠肝 poly(A) RNA 掺入活力时可降至 4μg/ml。

活力的体外翻译体系中 RNase 的污染,这样才能保证 mRNA 在体外无细胞体系中得到充分的表达。

2. 依赖于大鼠肝 RNA 浓度的麦胚体系

理论上, RNA 的掺入活力是由 mRNA 作模板引起的。但是不同的 RNA 制品以及编码不同蛋白质的 mRNA, 要求麦胚体系的条件并不相同。其中体系中的钾离子、镁离子浓度, pH 及多胺都起重要作用。Tse 等人发现, 大鼠肝白蛋白 mRNA 比总 mRNA 要求更高的钾离子和镁离子浓度^[8]。我们也发现大鼠肝总 mRNA 比 pRNA 要求更高的钾离子浓度。为了达到较高的翻译活力, 除了把麦胚体系中的 CPK 浓度降至 40μg/ml 以下外, 还对上面这些主要组份的最适条件进行了研究, 得到了与文献报道一致的结果^[8,9]。综合这些反应条件的研究, 对原麦胚体系作了改进, 两者的比较详见表 2。以大鼠肝 pRNA 为模板时, 改进后的体系比原体系的掺入活力增加了 5 倍, 而以大鼠肝 poly(A) RNA 为模板时, 则比原体系的掺入活力提高了 10 倍。

以改进后的麦胚体系研究大鼠肝 RNA 的浓度与掺入活力的关系时, 两种 RNA 都得到

了依赖于其浓度的掺入活力曲线(图 3)。pRNA 的浓度在 100μg/ml—300μg/ml 之间, poly(A) RNA 的浓度在 0—80μg/ml 之间与其掺入活力呈线性关系。浓度大于这个限度时, 掺入活力不再增加。

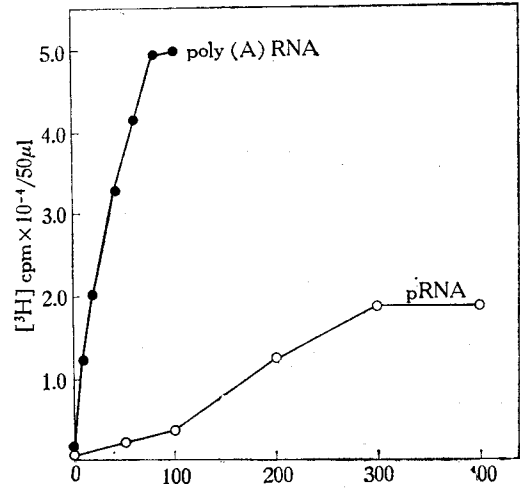


图 3 改进的麦胚体系中掺入活力——大鼠肝 RNA 浓度曲线

实验条件见表 2。○——○: pRNA; ●——●: poly(A) RNA, 测定后者时体系中含精胺 70μM

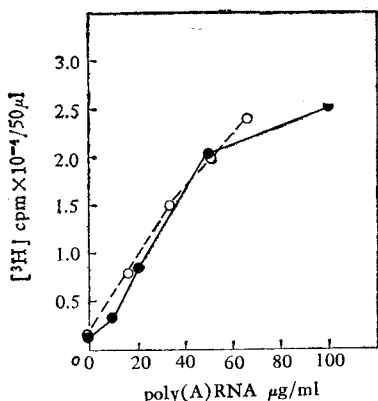


图 4 两种不同方法制备的大鼠肝 poly(A) RNA 体外掺入活力的比较
实验条件见表 2。○——○：直接法制备的大鼠肝 poly(A) RNA；●——●：间接法制备的大鼠肝 poly(A) RNA。

从国内已报道的麦胚体系对动物组织 RNA 的翻译活力的结果可以看出：

1. mRNA 的纯度越高,其比活力越高;2. 随着体系中 CPK 浓度的降低,其比活力明显增加;3. 除了钾离子,镁离子浓度外,对于不同动物组织的 RNA,体系的 pH 也是影响 mRNA 掺入活力的重要因素,4. 本体系的掺入活力较高。

3. 两种方法制备的大鼠肝 poly(A) RNA 的掺入活力

以改进的麦胚体系,比较了两种方法制备的大鼠肝 poly(A) RNA,得到了相似的翻译活力曲线(图 4)。上海生化所四室肿瘤组曾证明人胚肝 mRNA 制备中直接法比间接法有较高的掺入活力^[5]。这可能是由于我们在间接法中采用了 SDS 解聚和蛋白酶 K 处理的步骤,而后再经酚-氯仿提取的。可见以间接法制备 mRNA 时,这种处理对保护 mRNA 的翻译活力是很必要的。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所病毒复制组:《生物化学与生物物理学报》,1976 年第 8 卷,第 179 页。
- [2] 李文裕等:《实验生物学报》,1978 年第 11 卷,第 109 页。
- [3] 吴冠芸等:《中国医学科学院学报》(待发表)。
- [4] 吴冠芸等:《生物化学与生物物理进展》,1982 年,第 3 期。
- [5] 中国科学院上海生物化学研究所四室肿瘤组:《生物化学与生物物理进展》,1979 年,第 2 期,第 40 页。
- [6] Peterson, J. A. et al: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1427, 1976.
- [7] Krystosek, A. et al: *J. Biol. Chem.*, **250**, 6077, 1975.
- [8] Tse, T. P. H. et al: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1272, 1977.
- [9] 静国忠等:《生物化学与生物物理进展》,1981 年,第 1 期,第 72 页。

[本文于 1981 年 7 月 2 日收到]

鱼精蛋白 mRNA 被 *E. coli* DNA 聚合酶 I 逆转录的研究

林万禄 程振起 赵惠智

(中国科学院生物物理研究所)

鱼精蛋白 mRNA 是一种小分子真核细胞 mRNA, 其长度为 300 个核苷酸左右, 沉降系数为 6S。在结构和功能上, 它具有一般真核细胞 mRNA 的共同特征。它是研究真核细胞 mRNA 结构和功能关系的较好的材料之一。将 mRNA 逆转录成 cDNA 是研究其基因结构及核苷酸序列的有效方法。

我们利用 *E. coli* DNA 多聚酶 I 的逆转录

活性对鱼精蛋白 mRNA^[1] 进行逆转录研究,并测定其 3'-端邻接 poly(A) 序列的一个核苷酸。

材 料 和 方 法

材料

[³H] 脱氧腺嘌呤核苷三磷酸 (26.5ci/mmol), [³H] 脱氧胞嘧啶核苷三磷酸 (18.4ci/mmol) 和 [³H] 脱氧鸟嘌呤核苷三磷酸