

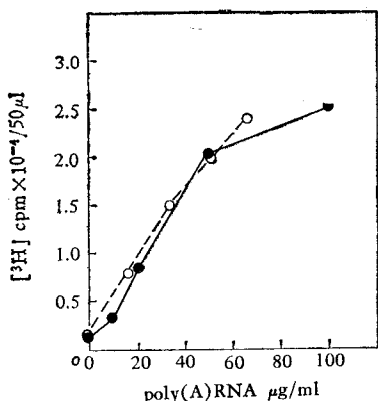


图4 两种不同方法制备的大鼠肝 poly(A) RNA 体外掺入活力的比较
实验条件见表2。○——○：直接法制备的大鼠肝 poly(A) RNA；●——●：间接法制备的大鼠肝 poly(A) RNA。

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

(25mci/mmol) 为英国 Amershan 公司产品; 引物 Oligo (dT)₆, 由上海细胞生物研究所三室提供, 实验中使用的 E. coli DNA 多聚酶 I 由本室与微生物所同志共同纯化^[2] 和 Boehringer Mannheim GmbH 产品(西德)。

方法

1. 鱼精蛋白 mRNA 的制备

鱼精蛋白 mRNA 的制备见前文^[2]。所得 mRNA 在聚丙烯酰胺/7M 脲凝胶电泳上, 主要呈现一条带, 并在麦胚无细胞翻译体系中显示出高的翻译活性。

2. 逆转录反应体系和 [³H] 脱氧核苷-磷酸掺入 cDNA 的测定方法

以鱼精蛋白 mRNA 为模板合成 cDNA, 需要有酶, Mn²⁺、Oligo(dT) 引物和四种脱氧核苷三磷酸存在。表 1 所示为 cDNA 合成反应的全体系。总体积一般是 30μl, 反应温度为 37℃, 时间为 60 分钟。反应过程中振荡反应杯 1—2 次, 反应后将反应杯立即放入冰水浴中终止反应。吸取反应液 20μl 点在 whatman 3mm 型圆形滤纸片上 (直径 1.8cm), 待干后, 投入 10% 三氯醋酸 (TCA) 中固定数小时, 再将滤纸转入冰冷的 5% TCA 中洗三次, 每次 10—15 分钟, 用无水乙醇, 无水乙醇: 无水乙醚 (1:1 体积比) 以及乙醚依次脱水干燥。干纸片放在盛有 5ml 含 0.4% BBOT 的甲苯闪烁液的测量瓶中。在液体闪烁谱仪上测量放射性计数。

3. 逆转录反应产物。cDNA 长度的测定

按表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应全体系制备 cDNA 样品, 然后加入甲醛至样品液,

使浓度达 2%, 在 45℃ 保温 5 分钟使其解链。解链后的 [³H] cDNA 样品, 用 8% 聚丙烯酰胺/7M 脲板状凝胶 (8 × 17cm) 电泳, 测定长度, 以 5S RNA、tRNA 和溴酚兰作为参照物。凝胶电泳槽中的缓冲液为 50mM Tris-4.5mM 硼酸-1.0mMEDTA pH8.0, 加样前预电泳 1.5 小时, 加样后电泳 2 小时 (V=600; mA=15)。电泳结束后, 在 15% 醋酸-0.05% 溴酚兰中染色 15 分钟, 接着用水脱色, 找出参照物 5S RNA 和 tRNA 带的位置, 然后将凝胶横向切片 (3mm/片)。将凝胶片放入液体闪烁瓶中, 加入 0.3ml 过氧化氢和 0.15ml 过氯酸, 盖紧瓶盖后, 于 60℃ 水浴中保温过夜, 冷至室温后, 加入 6ml TritonX-100 甲苯闪烁液 (3/7)(含 ppo 5 克-popop 5 毫克/升), 在液体闪烁谱仪上测定放射性计数。

4. 邻接 poly(A) 序列一个核苷酸的测定

利用 DNA 多聚酶 I 的逆转录活性, 作三组不同的鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应, 即一组加 [³H] dATP, 另一组加 [³H] dGTP, 第三组加 [³H] dCTP, 三组实验反应体积均为 30μl, 在 37℃ 保温 1 小时。反应杯立即转入冰浴, 各取 20μl 点样, 照前面介绍的方法处理后测定放射性计数。

结果

1. 鱼精蛋白 mRNA 指导 cDNA 的合成

利用 DNA 多聚酶 I 的逆转录活性, 在有 Mn²⁺, Oligo (dT) 引物和四种脱氧核苷三磷酸存在下, 把 mRNA 逆转录成 cDNA, 其基本原理如图 1 所示。mRNA 3'-端的 poly(A) 同引物 Oligo (dT) 杂交, cDNA 的合成从 poly(A) 序列开始, 即在酶的作用下, 以 poly(A) 杂交上的 Oligo (dT) 为引物, 按照 mRNA 模板合成一条与 mRNA 互补的新生链, 即 cDNA。

如表 2 所示, cDNA 的合成依赖于 mRNA、

表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应全体系

成 分	数 量
mRNA	10μg/ml
引物 Oligo (dT)	9μg/ml
DNA 多聚酶 I	1.0—4.0u
[³ H] 脱氧核苷三磷酸	1μci (26ci/mmol)
脱氧核苷三磷酸	0.3mM
MnCl ₂	3mM
β-巯基乙醇	10mM
Tris-Cl	10mM
放线菌素 D	100μg/ml

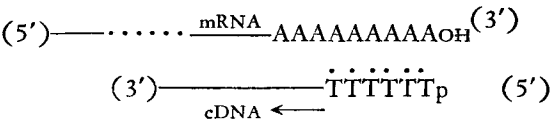


图 1 以 mRNA 为模板合成 cDNA 的基本原理示意图

酶和引物的存在。在有 mRNA 存在的全逆转录反应体系中， $[^3\text{H}]$ dAMP 的掺入计数比无 mRNA 的对照高 13 倍，但反应体系中无外加引物 Oligo (dT)₆ 时， $[^3\text{H}]$ dAMP 的掺入计数也较高。这可能是在制备过程中，有来自 Oligo (dT)-纤维素上的 Oligo (dT) 在反应中起引物作用的结果。

表 2 在不同实验条件下 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入比较

No	*实 验 条 件	$[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 (cpm)
1	全反应系统	28590
2	无 mRNA	2125
3	无引物 Oligo (dT) ₆	7039
4	无引物 Oligo (dT)和 mRNA	1698
5	无 DNA 多聚酶 I	999

* 实验 1 全反应系统，指按表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应全组分；实验 2—5 指按照表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应组分中分别缺少 mRNA，引物，DNA 多聚酶 I。五组实验反应体积均为 30 μl ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 小时，取出 20 μl 点样，放射性计数测定。

2. 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应的最适条件

(1) 不同温度对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响

如图 2 所示，在 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下，cDNA 合成反应基本不进行。在 10—20 $^{\circ}\text{C}$ 之间，其合成效率也很低。只是在 23—30 $^{\circ}\text{C}$ 这一温度范围内，随着温度的增高，合成效率才显著增高。在 37 $^{\circ}\text{C}$

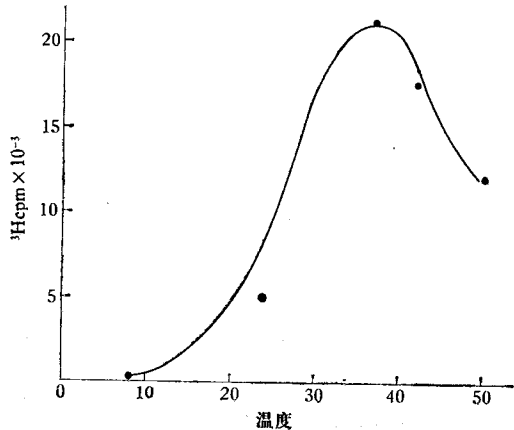


图 2 不同温度对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响
cDNA 合成反应除按所示的不同温度进行外，其余条件同表 1。

时合成效率达到最高值。而超过 37 $^{\circ}\text{C}$ 时，合成效率又开始下降。可见在我们的实验条件下，鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应的最适温度是 37 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 不同保温时间对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响

如图 3 所示，在反应初期（前 15 分钟），cDNA 合成反应进行缓慢。而从 15 分钟以后，合成反应就几乎成线性增加。反应进行至 40 分钟时，已达 65 分钟时合成最高值的 81%。

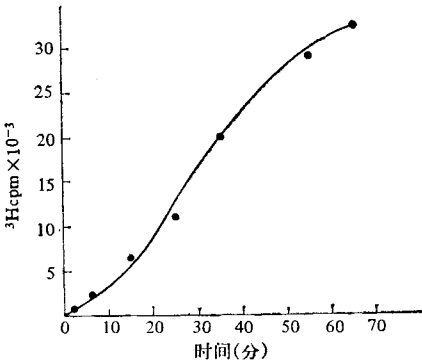


图 3 反应不同时间对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响
cDNA 合成反应除反应体积 200 μl ，在所出的不同时间取出 20 μl 点样外，其余条件同表 1。

(3) 不同酶量对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响

鱼精蛋白 mRNA 的逆转录对酶量特别敏感。如图 4 所示，使用酶量在 3 μl 以下时 cDNA

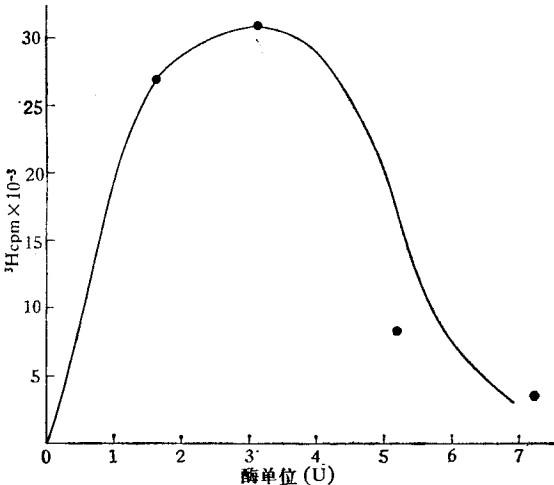


图 4 不同酶量对 $[^3\text{H}]$ dAMP 掺入 cDNA 的影响
反应体积 30 μl ，除所加的酶量不同而外，其余条件同表 1

的合成随酶量的增加而增加。但超过 3 μ l, 其合成就急骤下降。

3. 鱼精蛋白 mRNA 的逆转录产物— $[^3\text{H}]$ cDNA 长度的分析

为了测定鱼精蛋白 mRNA 的逆转录产物—— $[^3\text{H}]$ cDNA 的长度, 我们使用 8% 聚丙烯酰胺/7M 脲的板状凝胶电泳, 比较 $[^3\text{H}]$ cDNA 与参照物 5S RNA, tRNA 和溴酚兰染料的相对位置^[3]。在我们的实验条件下, 逆转录出来的

cDNA, 大部分长度在 120 个核苷酸以上。如图 5 所示, 除接近染料溴酚兰位置有一主峰而外, 5S RNA 位置以上有两个主峰。另外, 4S 和 5S RNA 位置之间还有一个主峰。具有这种长度的 cDNA 适于分析 mRNA 3'-端非编码区的核苷酸序列。

4. 邻接 poly(A) 序列的第一个核苷酸分析

我们利用逆转录法, 作了三组不同的鱼精蛋白 mRNA 的逆转录反应实验。即在每一组实验中, 只分别加一种不同的 $[^3\text{H}]$ 脱氧核苷三磷酸, 反应后看哪一组有放射性掺入, 以此确定紧邻 poly(A) 序列的一个核苷酸, 即放射性掺入高的核苷酸应互补于紧邻 poly(A) 的一个核苷酸。如表 3 所示, $[^3\text{H}]$ dAMP 的掺入计数比对照 (无 mRNA) 高 24 倍; $[^3\text{H}]$ dGMP 的掺入计数比对照高 0.7 倍。 $[^3\text{H}]$ dCMP 的掺入计数比对照高 2 倍。比较上述各组的放射性掺入计数, 可以确定邻接 poly(A) 序列的一个核苷酸是腺嘌呤核苷酸。

讨 论

1. 我们利用 DNA 多聚酶 I 的逆转录活性合成鱼精蛋白 mRNA 的 cDNA 时, 发现使用过多的酶量后, cDNA 和合成速度就急骤下降。

我们认为这主要是由于 DNA 多聚酶 I 中外切酶作用的结果 (3'-和 5'-外切酶的降解作用), 因 DNA 聚合酶 I 中无核糖核酸酶污染^[1]。

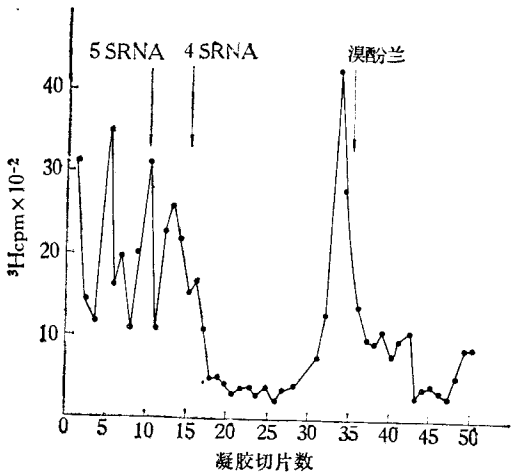


图 5 鱼精蛋白 mRNA 的逆转录产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳上的分析

按表 1 逆转录反应全系统制备的 cDNA 样品加入甲酰胺至 2% 浓度, 在 45℃ 保温 5 分钟, 使其解链。解链后的 $[^3\text{H}]$ cDNA 用 8% 的聚丙烯酰胺/7M 脲凝胶电泳分析。电泳后, 在 15% 醋酸-0.05 溴酚蓝中染色 15 分钟, 用水脱色, 找出参照物 5S RNA 和 tRNA 带的位置。然后将凝胶横切切片 (3mm/片)。放射性计数测定见材料和方法。

表 3 三种 $[^3\text{H}]$ 脱氧核苷-磷酸掺入 cDNA 的放射性计数比较

No	实 验 条 件		$[^3\text{H}]$ 掺入计数 (cpm)	比对照高 (倍)
1	加 $[^3\text{H}]$ dATP	*全反应系统	49854	24
		**无 mRNA	1810	
2	加 $[^3\text{H}]$ dGTP	全反应系统	989	0.7
		无 mRNA	578	
3	加 $[^3\text{H}]$ dCTP	全反应系统	1969	2
		无 mRNA	676	

*全反应系统: 指按表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应全组分; **无 mRNA: 指按表 1 鱼精蛋白 mRNA 逆转录反应组分, 其中不加 mRNA。三组实验反应体积均为 30 μ l, 在 37℃ 保温 1 小时, 各取出 20 μ l 点样, 放射性计数测定, 见材料与方

在正常情况下,聚合作用大大超过降解作用。但一旦当反应体系中 mRNA 耗尽(或出现不利于 cDNA 合成的其他因素),又无新的 cDNA 合成累积时,则外切酶的降解作用就突出了。随着酶量的增加,cDNA 的降解也随之增加。

2. cDNA 合成在反应初期(前 15 分钟)进行缓慢。这可能是由于我们未预先将 mRNA 和 Oligo(dT) 引物保温的缘故。因为 cDNA 是在 Oligo(dT) 引物先同 mRNA 的 poly(A) 杂交后,再按照 mRNA 模板进行延长而产生的。而 Oligo(dT) 引物同 poly(A) 杂交是需要一段过程的。因此,在开始一段时间,合成反应进行缓慢。

3. 在我们通过逆转录的方法测定邻接 poly(A) 序列一个核苷酸时,发现除 [^3H]dAMP 掺入 cDNA 的放射性计数特别高而外, [^3H]dCMP 也有少量掺入。产生这种情况,有两种可能:一是由于模板 mRNA 不纯。即在模板中,除主要以腺嘌呤核苷酸残基为末端的一种 mRNA 外,还存在一种以鸟嘌呤核苷酸残基为末端的微量 mRNA;二可能是由于 DNA 多聚酶 I 识别的错误。尽管此酶具有高度的识别能力,但也有偶尔的错误出现^[4]。

4. 我们打算用 DNA 的末端终止法来测定 mRNA 的核苷酸序列。这就要求由鱼精蛋白 mRNA 逆转录出来的 cDNA 有齐的 5'-末端(即相同的 5'-末端)。为此需要制备一专一性引物,即在 Oligo(dT) 的 3'-端,加上 1—2 个正好同 mRNA 3'-末端 1—2 个核苷酸互补的核苷酸。从这种专一性引物延伸出来的 cDNA,其 5'-末端就相同了。我们在此利用逆转录法首先测出鱼精蛋白 mRNA 3'-端邻接 poly(A) 序列的一个核苷酸,目的是为了制备这一专一性引物(即 PT_6UOH),而最终要得到具有相同 5'-末端的 cDNA,以利于序列分析。

作者十分感谢魏西平和赵鼎同志对此工作的帮助。

参 考 文 献

- [1] 蔡发兴等:《生物化学与生物物理进展》,1982 年,第 2 期,第 37 页。
- [2] Zhao Hui-zhi et al.: *The Second International Symposium on RNA in Development and Reproduction* in 1980, Peking.
- [3] Proudfoot, N. J.: *J. Mol. Biol.* **107**, 491, 1976.
- [4] Setlow, P.: *Methods in Enzymology*, **29**, 3, 1974.

[本文于 1981 年 7 月 30 日收到]

绵羊红细胞电泳用于恶性肿瘤临床诊断的研究

李殿君 夏燕冶 洪鼎铭 甘大清 王敖金 张文林

(中国科学院生物物理研究所)

田竞生 武纯净

寇丽筠

(北京市肿瘤研究所) (北京医学院第三附属医院化验室)

寻找简便、灵敏可靠的恶性肿瘤诊断方法,对于提高治愈率有着十分重要的意义。这类方法研究很多,其中 Field 和 Caspary 1970 年首先应用细胞电泳方法于恶性肿瘤的临床诊断^[1],取得了良好的结果。

Field 分离受试者的淋巴细胞,与致脑炎因子(简称 E. F.)和豚鼠巨噬细胞共同温培,以

豚鼠巨噬细胞为指示细胞,测定其电泳迁移率是否减慢,作为恶性肿瘤的诊断指标。Field 认为,恶性肿瘤病人的淋巴细胞在体内被肿瘤抗原所致敏,当它在体外与 E. F. 接触时,便释放出一种活性物质,此物质可作用于豚鼠巨噬细胞表面,降低其表面电荷,使豚鼠巨噬细胞电泳迁移率减慢,故称其为“巨噬细胞电泳致缓因