

照相法的适用范围和检测灵敏度见表2和表3。

上述三种放射照相技术,最后都是获得一张分布着浓淡不一斑点的胶片。这胶片的定量分析可在扫描显微密度计上完成^[5]。

高灵敏度放射性同位素检测技术与高分辨力蛋白质电泳分离技术的结合,为蛋白质的研究及其生物学应用提供了犀利武器,使人们有可能彻底弄清组成人体的全部蛋白质,对分子解剖学、分子病理学和分子诊断与治疗学研究会有极大的促进作用。

参 考 文 献

- [1] O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007, 1975.
- [2] Markwell, M. A. K.: *Anal. Biochem.*, **125**, 427, 1982.
- [3] Parsons, R. G. and Kowal, R.: *Anal. Biochem.*, **95**, 568, 1979.
- [4] Bolton, A. E. and Hunter, W. M.: *Biochem. J.*, **133**, 529, 1973.
- [5] Chafouleas, J. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 10262, 1979.
- [6] Finger, J. M. and Choo, K. H.: *Biochem. J.*, **193**, 371, 1981.
- [7] Christopher, A. R. et al.: *Anal. Biochem.*, **85**, 404, 1978.
- [8] Zapolski, E. J. et al.: *Anal. Biochem.*, **123**, 325, 1982.
- [9] Brinster, R. L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 1927, 1979.
- [10] Kruppa, J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**, 703, 1983.
- [11] Laskey, R. A.: *Methods Enzymol.*, **65**, 363, 1980.
- [12] Bonner, W. M. and Laskey, R. A.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83, 1974.
- [13] Pulleyblank, D. E. and Booth, G. M.: *J. Biochem. Biophys. Methods*, **4**, 339, 1981.
- [14] Chamberlain, J. P.: *Anal. Biochem.*, **98**, 132, 1979.
- [15] Bossinger, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 7986, 1979.

[本文于1985年2月18日收到]

Q β 复制酶与 RNA 重组技术

陈 建 华

(同济大学医学系,上海)

以往的遗传工程主要是设计生物的基因蓝图,转移 DNA 的过程,其关键是 DNA 的重组操作。自1983年哥伦比亚大学的 Kramer, Mills 和 Miele^[1] 建立 RNA 重组技术以后,人们认为遗传工程的内容必将极大地丰富起来。

一、Q β 复制酶和 MPV-1 RNA

RNA 重组技术是在需求大量 RNA 的刺激下发展起来的。细胞内的 RNA 是 DNA 的转录产物,而转录要求一定的条件,进行的规模也很有限。即使在转录活跃的情况下,一个 DNA 分子一次产生一个 RNA 分子, RNA 分子的量只能按算术级数增长。因此要想得到足

够用于 RNA 研究的量是较困难的。在类病毒 RNA 的研究中,这一问题更为突出。这些类病毒的 RNA 一般为270—380个核苷酸,无论在经济上还是在科学研究方面都有很重要的意义,然而却很难得到足够的量。因此,类病毒的研究进展缓慢。

人们早就发现噬菌体 Q β 的 RNA 能以较快的速度复制,能在较短的时间内积累大量的 RNA 产物。这一点并不难理解。因为 Q β 的 RNA 复制是从 RNA 到 RNA,第一次复制以后,就出现了二个 RNA 模板,第二次复制则产生四个 RNA 模板,如此复制下去, RNA 分子的量即按几何级数增长。1965年 Haruna 和

Spiegelman^[2] 提纯了 Q β 复制酶以后,分子生物学家对 Q β 复制酶产生了极大的兴趣。然而,20 年来的进展却令人失望,他们对 Q β 复制酶的高度专一性都束手无策。将 Q β 复制酶用于其他 RNA 的复制时,虽然偶而也能得到一些拷贝,但却从未得到具有实际意义的量。直到 Kramer 等的 RNA 重组技术诞生,才使 Q β 复制酶的应用崭露头角。应用这一技术,重组 RNA 的量能在 10 分钟时间内增加 10⁵ 倍。R. Lewin^[3] 认为, Q β 复制酶将会在今后的工业中成为“能者多劳的分子”(a molecular work horse)。

Q β 复制酶是在 Q β 噬菌体感染大肠杆菌后合成的,由四个亚基构成。其中亚基 I, III, IV 来自宿主,分别是 30S 核糖体蛋白 S1(I)、蛋白质合成延长因子 EF-T μ (III) 和蛋白质合成延长因子 EF-Ts(IV)。Q β RNA 编码的是亚基 II。Q β 复制酶比较容易提纯,且相当稳定。

Mills 等^[4]发现,将提纯的 Q β 复制酶用于无模板 RNA 的复制系统时,系统中能产生一种短链 RNA,称 midvariant RNA (MDV-1RNA)。后来发现,在不同的反应条件下复制,产生的 RNA 链长和顺序也不同。迄今得到的,多少带有 Q β 特征的变异体有: minivariant, microvariant^[5], nanovariant^[6] 以及一种尚未命名的变异体^[7]。其长度从 77 核苷酸到 221 核苷酸,与 Q β 的 RNA (4220 核苷酸)相比是相当短的。关于这些变异体是如何产生的问题,目前有两种解释。一种解释认为:是在完全没有模板的情况下自发产生的^[8]。另一种解释是:在提纯 Q β 复制酶时,由于微量短链 RNA 的混入,从而以它们为模板复制产生的。而这些短链 RNA (即变异体)则很可能起源于宿主细胞,其功能可能是防御 Q β 噬菌体感染^[9]。大多数人支持后一种解释。

近 20 年来,虽然对 Q β 复制酶和模板 RNA

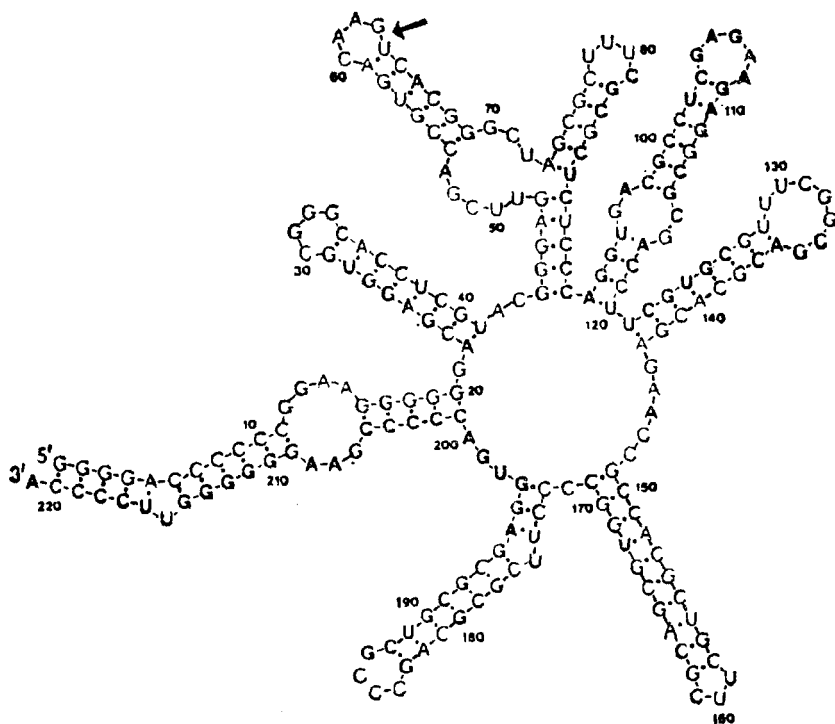


图 1 MDV-1 正链 RNA 的二级结构

箭头所示为切口,在 63 和 64 之间。其中 81—126 与 Q β RNA 的 84—129 对应,46 个碱基中有 40 个相同。其中 187—221 与 Q β RNA 的 4186—4220 对应,35 个碱基中有 30 个相同。相同碱基用黑体字母标出。

进行了大量研究,但关于它的专一性还有许多问题没有解决^[10]。为什么 Q β 复制酶只能复制 Q β RNA 和一些变异体呢? 通过对 Q β RNA 及其类似物的研究、比较,目前至少有一点是比较明确的: 即无论是哪种变异体,都具有与 Q β RNA 相似的特异识别部位(即与复制酶结合的部位)和复制起始部位。如 MDV-1 RNA (图 1), 从 81 到 126, 46 个碱基中有 40 个碱基与 Q β RNA 的相应部位 (84—129) 相同。它的 3' 端 (187—221) 与 Q β RNA 的 3' 端 (4186—4220), 35 个碱基中有 30 个相同。这两个部位分别是它们的识别部位和起始部位。其他 RNA 由于不具备这些特征,所以不能被 Q β 复制酶复制。此外,由于分子内碱基配对, RNA 模板的二级结构比较丰富,形成发夹结构、杆状结构和环。进一步还折叠成类球形结构。Mills 等认为,这种折叠、再折叠是按一定顺序进行的,在 Q β RNA 及其类似物的复制过程中起相当重要的作用,可能也是一种特异性。从生物学角度看, Q β 进入细胞后,当然只需要复制自己的 RNA; 若 Q β 复制酶没有专一性,那么它就会耗费大量时间去复制异己分子,这于它自身显然是不利的。

二、RNA 重组技术

既然 Q β 复制酶把变异体和 Q β RNA 一样看待,那么将外源 RNA 与变异体重组以后,重组体有可能仍然保留 Q β 特征,并被 Q β 复制酶复制。这就是开发 RNA 重组技术的动因。

DNA 重组面临的困难是显而易见的。它没有 RNA 那样的限制性内切酶,所以很难按实验者的需要在指定部位切开它。切开后 RNA 没有粘性末端,连接过程也就相应复杂些。这些问题, Miele 等都巧妙地解决了。他们选用 MDV-1 RNA 做载体,其步骤如下:

(1) 首先选择切点。他们把切点选在 63 和 64 核苷酸之间,这样可以避免切断载体的识别部位或起始部位,同时使它的二级结构受到破坏最小。

(2) 将 RNA 反录成 cDNA, 并对 cDNA

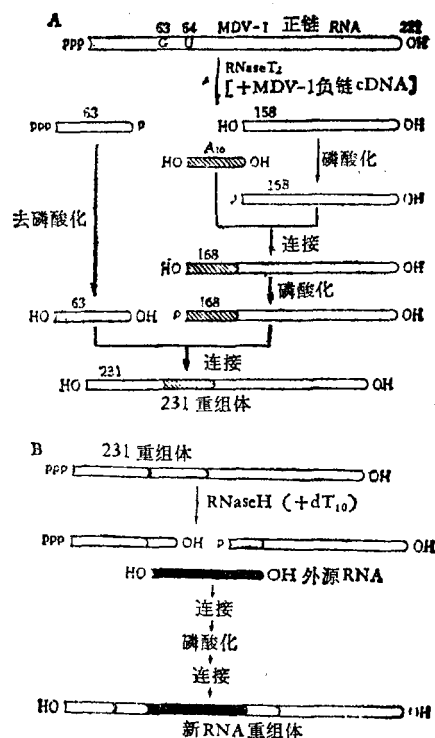


图 2 RNA 重组操作

A. 231 重组体的制备

B. 以 231 重组体作载体制备新的 RNA 重组体

加以处理,使 cDNA 除 61—64 核苷酸外,其他部分与 RNA 互补。

(3) 上述两种分子混合后,可形成杂种分子,除 61—64 核苷酸外,其他部分形成碱基配对。这相当于屏蔽了 RNA 分子的绝大部分,仅暴露出它的 61—64 核苷酸,在核糖核酸酶 T₁ 的作用下,在 63 和 64 之间切开,形成长度为 63 和 158 的两个片段。

(4) 一般情况下,磷酸基在 63 片段的 3' 端,而 158 片段的 5' 端是一个羟基。为了连接,158 片段的 5' 端要磷酸化,而 63 片段的 3' 端要去磷酸化,在噬菌体 T₄ RNA 连接酶作用下完成重组。首先加入过量的 10 腺苷酸片段 A₁₀,使 A₁₀ 与 158 片段连接成 168 片段,然后将 168 片段 5' 端磷酸化,加入过量的 63 片段,使之连接成 231 片段。

得到的 231 核苷酸 RNA 即是一个重组体,它被 Q β 复制酶迅速复制。同时它又是

一个比 MDV-1RNA 更易操作的载体。因为一方面,以后可以很容易地将切点选择在 A_{10} 部位,此时只需在 10 胸腺嘧啶核苷酸 T_{10} 的存在下,用核糖核酸酶 H 作用,即可在 $A_{10}:T_{10}$ 部位产生切口。另一方面,用核糖核酸酶 H 切得的两片段,切口处基团都处于正确位置,可直接与外源 RNA 连接(全过程见图 2)。目前,已成功地将来自腺病毒的 210 核苷酸顺序和来自 *E. coli* 的 5S 核糖体 RNA (120 核苷酸) 导入了这种载体,而且两种重组体都能被 $Q\beta$ 复制酶复制。

三、展 望

重组 RNA 技术虽尚处于萌芽状态,但其应用前景是可喜的。人们可以希望任一种 RNA,都有可能大量生产。于是,生产高比活性标记的杂交探针,构造用于 RNA 加工机理研究的模板,对某些病毒和类病毒基因组 RNA 的操作和研究等,这些过去的技术难点,现在就可能很容易办到了。当然, mRNA 也可能大规模合成,这将会使有价值的蛋白质在实验室控制下生产变为现实。

Mills 则准备另辟蹊径,把 DNA 重组技术用于 RNA 分子的重组。其原理相当简单,而在实践上却可能产生一个大飞跃。例如,可把 MDV-1 的 RNA 先拷贝成 DNA,再把 DNA 拷贝连接在质粒上,于是就可利用限制性内切酶对它进行精确、有效的处理了。然后,导入特定 DNA,

并将这种重组 DNA 转录,从而得到我们所需要的重组 RNA。任何一种 RNA,只要能分离出它的基因,就可采用此法。有些 RNA 的制备是相当难的,而处理 DNA 总是比处理 RNA 容易,用这一方法则可避开制备 RNA 难关。

当然,尚待解决的问题也不少。如来自硫细菌 *Sulfolobus solfataricus* 的 tRNA 就不能在此系统中很好地工作。这可能是因为: $Q\beta$ 复制酶有一个宿主产生的核糖体亚基 (S1),它是一个能与 tRNA 结合的蛋白,由于两者之间的特异相互作用,从而阻碍了正常的复制。此外,复制与 RNA 二级结构的关系, $Q\beta$ 复制酶复制 RNA 重组体的可靠性及有效性问题等都还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Miele, E. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, **171**, 281, 1983.
- [2] Haruna, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 579, 1965.
- [3] Lewin, R.: *Science*, **222**, 1313, 1983.
- [4] Mills, D. R. et al.: *Science*, **180**, 916, 1973.
- [5] Mills, D. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 4252, 1975.
- [6] Schaffner, W. et al.: *J. Mol. Biol.*, **117**, 877, 1977.
- [7] Fukami, Y. et al.: *Mole. Gen. Genet.*, **169**, 173, 1979.
- [8] Sumpter, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 162, 1975.
- [9] Hill, D. et al.: *Nature*, **301**, 350, 1983.
- [10] Blumenthal, T. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 525, 1975.

[本文于 1984 年 11 月 12 日收到]

防止 SDS-聚丙烯酰胺凝胶平板电泳中出现的异常现象

陈 日 新

(中国医科大学,生化教研组,沈阳)

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳灵敏度高,分辨率高,广泛应用于医学,生物化学,分子生物学,免疫,遗传工程等方面。它要求有严谨的操作技术,在电泳过程中如某个环节掌握得不好,就很难得到理想的结果。下面介绍几年来我们在进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时常出现的一些异常现象以及预防的措施。

1. 样品处理时,通常是用 Tris-HCl pH6.8 的缓冲液,要使样品均一的进入分离胶,必须确保缓冲液有精

确的 pH。为此必须用 pH 计测量溶液的 pH 而切忌用 pH 试纸。

2. 配制缓冲液时加入甘油的目的是提高缓冲液的粘度,使样品直接进入梳子齿的底部,不致漂浮在表面,造成样品外溢出现图 1(见封 3)的结果。

3. 结缔组织较多的样品(肌肉、肺脏等),必须彻底匀浆后,再溶于缓冲液中,否则会出现大量沉淀,电泳带浅,模糊(图 3(见封 3))。(下转第 19 页)