

一种改进的体外蛋白合成体系

程龙生 胡勿秋 王锦兰

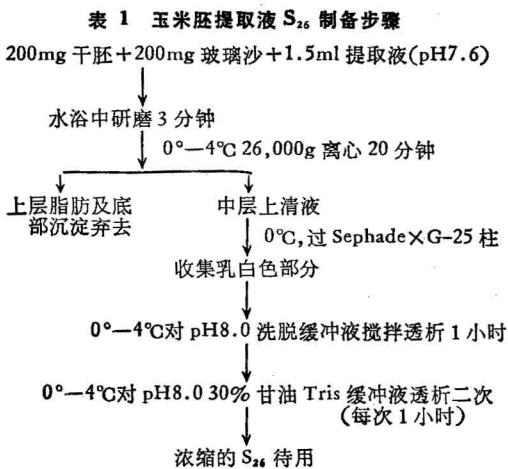
(中国科学院生物物理研究所)

近年来在分子生物学和分子遗传学的研究中,在体外蛋白质合成体系中,采用麦胚无细胞体系^[1]最为广泛。国内对小麦“农大 139”无细胞体系做了大量工作,但方法本身存在不少问题,如:稳定性、重复性较差;小麦胚小,剥离完整麦胚很困难。本文试图寻找一个比麦胚体系更敏感、更稳定的高等植物体外蛋白合成体系。通过多次实验筛出了几种较好的麦种,并在建立玉米胚无细胞体系方面,初步取得一些结果。

材料和方法

1. 材料 PC (磷酸肌酸), ATP, GTP, YtRNA (酵母转移 RNA), PCK (磷酸肌酸激酶), Poly U (多聚尿嘧啶核苷酸)。Tris, β -巯基乙醇、³H-Phe (比度 29Ci/m mole)³H-Leu (比度 54Ci/m mole); ³H-Ala (比度 20Ci/m mole)。

2. 玉米胚提取液 S_{26} 的制备^[1,3]:



3. ³H-氨基酸掺入 在 50 微升反应总体积中反应混合物的组成,基本上参考文献报道^[1,3];略有不同的是对 Mg^{++} 的要求,在麦胚体

系中人工模板要求 5mM 的醋酸镁,而玉米胚体系则要求 8mM 的醋酸镁。

反应温度 30°C, 时间 60 分钟, 点样 30 微升于 Whatman No.3 滤纸上, 吹干后, 置于含有少量未标记的氨基酸的 10% 三氯醋酸中固定, 再用 5% 三氯醋酸 (含有少量未标记的氨基酸) 洗涤。纸片干燥后投入 6 毫升 0.6% 2, 5-二苯基噁唑 (PPO) 的二甲苯溶液中, 用 LKB-81000 液闪谱仪测量放射性计数。

结果与讨论

1. 新麦种的筛选: 对 20 多种不同的麦种进行了筛选: 看出同一种麦胚体系对人工模板及天然模板的敏感性是不同的。在我们的实验条件下“杨麦 3 号”对人工模板 Poly U 指导下 ³H-Phe 的掺入率最高 (绝对掺入 60829cpm, 促进掺入 293 倍), 小黑麦 (“新麦 8 号”) 次之 (绝对掺入 42057, 促进掺入 87 倍)。但对天然模板而言则以小黑麦 (“新麦 8 号”) 为最佳 (绝对掺入 2528Cpm, 促进掺入 21 倍)。

2. 玉米胚无细胞体系: 先后对种子粒大、胚大、蛋白质含量丰富的大豆和玉米胚进行试验。初步建立了玉米胚无细胞体系。以 Poly U 指导下 ³H-苯丙氨酸的掺入为指标, 摸索了玉米胚体系反应的最佳条件, 其结果如下:

(1) Mg^{++} , K^+ 浓度的影响 从图 1、2 可看出, 玉米胚对 $[Mg^{++}][K^+]$ 浓度是很敏感的。以人工模板 Poly U 而言, 麦胚系统要求的最适浓度 $[Mg^{++}]$ 为 5mM, $[K^+]$ 为 70mM。但玉米胚系统 $[Mg^{++}]$ 为 8mM, $[K^+]$ 为 110mM。

(2) 保温时间的影响: 从图 3 可见, 保温 60 分钟掺入已达最高值。随着保温时间的增

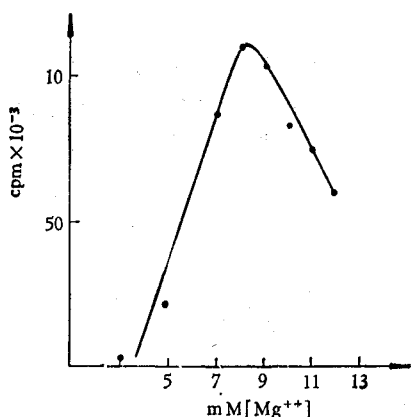


图1 Mg⁺⁺ 浓度曲线

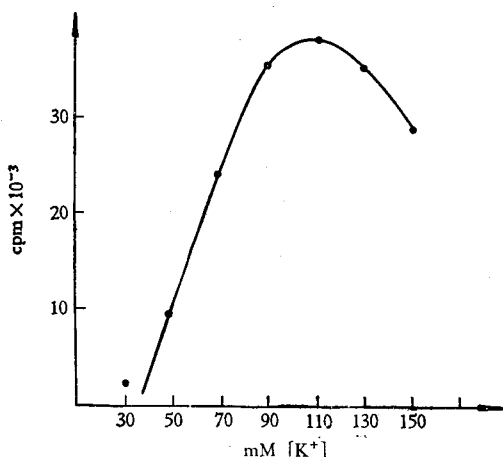


图2 K⁺ 浓度曲线

加,掺入不再增加。其结果与小麦胚体系相同。

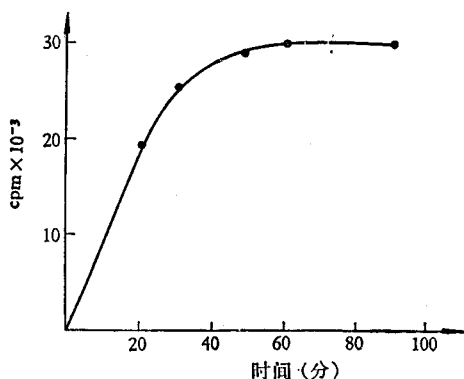


图3 保温时间对掺入的影响

(3) 在玉米胚系统中氨基酸掺入: 以人工模板 Poly U 及几种天然模板作为信使,在不同品系玉米胚的体系中氨基酸的掺入情况列于下表:

表2 在不同的玉米胚体系中人工模板 poly U 指导下氨基酸的掺入

玉米品种	³ H-苯丙氨酸掺入的 cpm			促进掺入倍数
	对照计数 cpm	加入外源 poly U 计数 cpm	绝对掺入 cpm	
京早7号	138	2232	2094	16 倍
张单9号 (金02×张系5)	462	52212	51750	113 倍
金02	604	46963	46359	78 倍
张系5	540	50787	50247	94 倍

表3 在不同的玉米胚体系中天然模板指导下氨基酸的掺入

玉米品种	天然 mRNA 模板	对照计数 cpm	绝对掺入 cpm	促进掺入倍数
京早7号	小牛睾丸 mRNA	1084	3190	2.9 倍
张单9号 (金02×张系5)	小牛睾丸 mRNA	1175	2798	2.4 倍
金02	小牛睾丸 mRNA	959	2532	2.6 倍
张单9号 (金02×张系5)	兔肝 mRNA	1465	16550	11.3 倍

实验结果表明各种玉米胚对模板敏感性是不同的。其中以“张单9号”对外源性信使 RNA 敏感性最高,促进掺入倍数也最高。

讨 论

1. 在玉米胚 S₂₆ 的制备中,我们认为对30%甘油缓冲液透析很重要,因为它可以将 S₂₆ 制剂中盐及其他小分子物质进一步除去,提高了 S₂₆ 对外源性添加物的敏感性。其次,甘油有保护大分子的作用,使 S₂₆ 活性更加稳定,同时还能使过柱后被稀释的 S₂₆ 进一步浓缩。

2. 我们发现对照(即不加入外源性模板)的计数高低是实验成功的关键。如对照计数太高,则实验必定失败。我们认为,对照计数是由内源性掺入及非特异吸附所造成的,因而采取了以下措施降低对照计数:

(1) 种子及剥离的胚在 0°—4°C 的干燥器中保存,降低种子的新陈代谢,减少内源性 mRNA 合成,以降低内源性掺入。

(2) 在点样后的滤纸片的固定、洗涤的溶液中都加入相应的未标记氨基酸^[4],以减少非

特异性吸附。

(3) 层析柱及 Sephadex 每次实验前均进行消毒。

3. 玉米胚 S_{26} 匀浆的 pH 对其活性的影响较大^[2]。最佳 pH 为: 6.4—6.8; 如 pH 低于 6.3 则制剂的活力降低。pH 太高, 则内源性 mRNA 增加, 外源性 mRNA 掺入就降低。由于匀浆的 pH 受提取液控制, 因而配制提取液时应严格调整 pH 值。

4. 由于玉米种子来源方便, 胚粒较大, 剥离容易, 同时玉米胚体系内源掺入不高, 对外源模板敏感性又较高, 因而是一个值得进一步研究推广的无细胞体系。

动物所沈孝宙同志为本工作提供了小牛睾丸 mRNA, 并协助制备了兔肝 mRNA。小麦种子系中国农科院作物所提供。玉米种子由张家口坝下农科所、中国农科院作物所提供, 特此致谢。陈美英同志参加部分技术工作。

参 考 文 献

- [1] 微生物所病毒复制组: 《生物化学与生物物理学报》, 1976 年, 8 卷, 2 期, 179 页。
- [2] Marcus, A. et al.: *Methods in Enzymology*, **30**, 749, 1974.
- [3] 郭礼和等: 《第三次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》, 1979 年, 第 114 页。
- [4] Roberts, B. E. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 2330, 1973.

[本文于 1980 年 9 月 29 日收到]

汉墓女尸肝脏核酸的分离与鉴定

王贵海 陆传宗

(中国科学院生物物理研究所)

研究表明, 埋藏达二千余年的长沙汉墓女尸, 从器官和组织水平来看, 保存得相当完好, 但从分子水平上其保存程度如何, 是一个令人感兴趣的问题。为此, 我们对此女尸的肝脏核酸进行了分离和鉴定研究。

材料、方法和结果

长沙汉墓女尸肝脏, 离体后福尔马林固定液保存, 呈深紫色, 湿重 4.7 克。另取明代尸体肝脏离体后固定保存十七年, 呈深黄色。现代人肝(非患肝病死亡), 固定保存一年半左右进行比较。

本实验所用胃蛋白酶系英国产品; 胰凝乳蛋白酶由上海东风制药厂生产。

核酸的提取 首先将固定过的肝组织用水漂洗, 滤纸吸干; 剪碎后研磨。再用 10 倍体积的冷丙酮洗三次, 干燥后研磨成粉末。在冰浴中用玻璃匀浆器匀浆。为提高其匀浆效果, 每克肝粉加入 3 克玻璃粉(约 300 目)。匀浆液对水

透析, 除去甲醛, 然后转入到 0.2 M KCl-HCl pH 2.0 缓冲液透析。

经 0.2 M KCl-HCl pH 2.0 缓冲液透析的肝组织匀浆液中每克干粉加入 3.2 毫克胃蛋白酶, 反应总体积 100 毫升, 加入一滴氯仿, 在透析袋中 40°C 搅拌保温 5 小时。反应后, 取出反应液, 5°C 下离心(9000 转/分) 30 分钟, 吸取上清液, 加入 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5 缓冲液于组织残渣中, 再匀浆, 转入透析袋后, 加入 30 毫克胰凝乳蛋白酶, 一滴氯仿, 体积为 100 毫升, 37°C 搅拌 5 小时。同上, 离心分离出上清液。其组织残渣再经匀浆和接着用蛋白酶水解处理。

4.7 克汉墓女尸肝脏经丙酮处理后得到 280 毫克干粉。表 1 给出三种肝组织蛋白酶处理的次序和效果。可以看出, 现代人肝的对照试验中, 由于增加了胰凝乳蛋白酶的处理次数, 除去蛋白和分离核酸的效果显著, 故对汉墓女尸肝样品也增加了胰凝乳蛋白酶的处理次数。