

哺乳动物 mRNA 在兔网织红细胞溶解 物体外翻译体系中的翻译作用

吴冠芸 王申五 齐上乐

(中国医学科学院基础医学研究所)

体外蛋白合成体系对测定 mRNA 的生物活性及研究蛋白合成的调控机制有重要意义。

目前研究真核细胞 mRNA 体外翻译体系应用最多的有三种: 麦胚、Krebs II 腹水癌细胞提取物、以及 RRL* 体系。其中 RRL 体系几经改革、逐渐完善, 与前两者比较, 更显得优越。其特点是结果比较稳定, 本底较低, 外源 mRNA 的翻译活性高, 合成的蛋白质肽链比较完整。

国内目前多采用麦胚体系, 尚未见到 RRL 体外翻译体系的有关报道。为此, 我们在 Pelham 等^[1] 体系的基础上, 研究了影响该体系翻译的一些主要因素, 提高了该体系的翻译活性, 并以不同的外源模板检查了该体系对 mRNA 翻译作用的有效性。

材料与 方法

一、RRL 的制备 用盐酸苯胍 10mg/kg 注射 2.5kg 左右家兔, 6 天后, 网织红细胞达 90% 以上。颈动脉放血后, 按 Schimke 等人的方法^[2] 制备 RRL。

二、RRL 的 MNA 酶处理 参照 Pelham 等人的方法^[1], 取上述 RRL 7.8ml, 加入 4mg/ml 肌酸磷酸激酶 0.1ml, 1mM 氯化血红素 (溶于 90% 乙二醇, 20mM Tris-HCl, pH 8.2, 50mM KCl 中) 0.2ml, 0.2M 磷酸肌酸 0.2ml, 2M KCl/10mM MgAc₂ 混合液 0.5ml, 1mM 19 种氨基酸 (缺 L-亮氨酸) 0.5ml, 0.1M CaCl₂ 0.1ml, 1mg/ml, MNA 酶 0.1ml, 混匀后, 于 20℃ 保温 10 分钟, 立即加入 0.1M EGTA (预先用 0.1M KOH 调成中性) 0.2ml。

混匀后分装贮存于液氮中备用。

三、RRL 体外翻译体系 反应混合物总体积 50μl: 含 MNA 酶处理的 RRL 36μl, 肌酸磷酸激酶 28.8μg/ml, 磷酸肌酸 7.2mM, 氯化血红素 14.4μM, 19 种氨基酸 36μM, ATP 1mM, GTP 0.05mM, K⁺ 112mM, Mg⁺⁺ 1.56mM, Cl⁻ 74.5mM, 不同浓度的外源 mRNA, ³H-亮氨酸 2μci, 体系最终 pH7.3。测活于 30℃, 保温 60 分钟, 取样 5μl, 加无离子水 1ml, 脱色液 (1M NaOH, 0.5M H₂O₂, 1mg/ml 亮氨酸) 0.5ml, 混匀后 37℃ 保温 15 分钟, 再加 25% 三氯醋酸 1ml。沉淀液经玻璃纤维滤纸抽滤, 用 8% 三氯醋酸及 95% 乙醇各洗二次, 干燥后加闪烁液 (每升甲苯含 ppo 3g, popop 0.3g) 5ml, 于 Beckman-Ls 8000 型液体闪烁计数器计数。

四、RR-TRNA、RR-mRNA、HR-mRNA 等制备 均参照 Cann 等人的方法^[3]。RL-mRNA、HL-mRNA 参照上海生化所方法^[4] 制备。RR-TRNA 样品测活前以 3M NaAc (pH6.0) 洗三次, 70% 乙醇洗二次, mRNA 只经 70% 乙醇洗二次, 真空干燥后溶于无菌水, 贮于液氮中备用。RNA 按 TA₂₆₀ 单位 = 50μg 计算。

五、麦胚体外翻译体系 RR-TRNA、RR-mRNA、HR-mRNA 采用 pH7.6 体系^[5] 测活, RL-mRNA、HL-mRNA 采用 pH7.2 体系^[6],

* 本文采用下列简写: RRL: 兔网织红细胞溶解物; EGTA: 乙二醇二乙醚二氨四乙酸, MNA 酶: 微球菌核酸酶, RR-TRNA: 兔网织红细胞总 RNA, RR-mRNA: 兔珠蛋白信使 RNA, HR-mRNA: 人珠蛋白信使 RNA, RL-mRNA: 大鼠肝信使 RNA, HL-mRNA: 人胚肝信使 RNA。

加入 65 μ M 精胺盐酸盐,测活。50 μ l 反应体积中含 3 H-亮氨酸 2 μ Ci。

六、SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续板电泳与荧光显影 参照 Sala-Trepat 等人的方法^[7],处理翻译产物,采用 Laemmli 等人的体系^[8]进行 15% 聚丙烯酰胺凝胶不连续板电泳^[9]。板为 2.5 $\times$ 90 $\times$ 120mm; 条件: 恒压 130 伏特,室温,5 小时。电泳后将胶切成 4mm 等宽胶片,以 30% H₂O₂ 0.5ml 溶解 (37 $^{\circ}$ C 过夜)加 5ml 均相闪烁液 (4g ppo, 0.3g popop, 100g 萘加二氧六环至 1000ml) 计数。荧光显影时,胶用 ppo-二甲基亚砷处理^[9]后,用 X 线感光胶片于液氮中显影 14 天。

主要材料: 人网织红细胞系新生儿 ABO 血型不配溶血后换血所得,网织占 7% 左右。MNA 酶: Millpore 产品,比活性 9875 单位/mg。EGTA: 三级纯,北京化工厂产品。氯化血红素: 本实验室制备。 3 H-亮氨酸: 比度 57Ci/m mole,上海原子核研究所产品。玻璃纤维滤纸: 49 号,上海红光造纸厂产品。X 线感光胶片: 广东汕头感光化学厂产品。

结果与讨论

一、影响 RRL 体系的一些因素

1. EGTA 浓度对翻译活力的影响 在制备 RRL 过程中加入 MNA 酶消化内源 mRNA,可以降低本底。此酶需 Ca⁺⁺ 激活,1mM CaCl₂ 足以激活 10 μ g/ml 的 MNA 酶。加 EGTA 的目的是络合 Ca⁺⁺,从而终止酶的

作用。从表 1 可见: (1) 如不加 EGTA 或加 EGTA 不足时,酶将在测活保温过程中继续水解外源 RNA,同时过量的 Ca⁺⁺ 也影响蛋白的合成,因而降低了外源模板的翻译活性; (2) 2mM EGTA 足以络合 1mM Ca⁺⁺,且使翻译活性显著提高; (3) EGTA 过量至 4mM 时,不影响其翻译活性。

2. MNA 酶的浓度及其作用时间 当酶浓度从 0 增至 10 μ g/ml 时,内源掺入逐渐降低,至 10 μ g/ml 时仅为未经 MNA 酶处理的 1.6%,外源 mRNA 掺入虽也有小幅度减低,但此时外源模板对内源掺入的倍数最高。

处理 RRL 时,加酶 10 μ g/ml,对不同的保温时间的掺入活性作了比较,结果以 10—14 分钟较合适,时间过少或过长都使掺入倍数降低。

3. 氯化血红素的最适浓度 适当浓度可以明显增加 RRL 体系的翻译活性。本实验结果,氯化血红素浓度在 10—40 μ M 范围内掺入活性较高,超过 40 μ M 反而起抑制作用。加入 15 μ M 氯化血红素时的掺入活性,比不加入增加了 2 倍多。

4. K⁺、Mg⁺⁺ 浓度的影响 图 1 是以 RR-TRNA 为外源模板得到的 K⁺、Mg⁺⁺ 最适浓度曲线。两者的最适浓度范围均较宽,当 K⁺ 浓度在 72—142 mM, Mg⁺⁺ 浓度在 1.16—1.76mM 区间,得到稳定的高掺入活性。

文献报道,在 RRL 体系中,不同的外源模板所要求的 K⁺、Mg⁺⁺ 最适浓度可能是不一

表 1 EGTA 浓度对 RRL 体系翻译活性的影响

CaCl ₂ 浓度 (mM)			1	1	1	1
EGTA 浓度 (mM)			0	1	2	4
3 H 亮氨酸 掺入	空 白	cpm $\times 10^{-3}/50\mu$ l	1.64	1.84	2.19	2.21
	RR-TRNA 4 μ g	cpm $\times 10^{-3}/50\mu$ l	9.05	17.77	33.87	33.45
		倍 数	5.5	9.7	15.5	15.1
	RR-mRNA 0.15 μ g	cpm $\times 10^{-3}/50\mu$ l	12.1	17.08	41.4	41.47
		倍 数	7.4	9.3	18.8	18.8

制备 RRL 过程中,加入 1mM CaCl₂, 10 μ g/ml MNA 酶,20 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟后,加不同浓度的 EGTA,对 RRL 本底及外源模板活力的影响。

样的。本实验将 RR-mRNA 于肌球蛋白 mRNA 翻译最适的 K^+ 、 Mg^{++} 浓度^[40] 中进行翻译,只得到极低的掺入活性。

5. ATP、GTP 的影响 本实验比较了四种不同浓度的 ATP、GTP 对翻译活性的影响(表 2)。结果表明加入 1mM ATP, 0.05mM GTP 时,外源模板的翻译活性最高,约为不加 ATP、GTP 的 2.5 倍。但对内源掺入无影响。

6. 测定活性的保温时间 本体系于 30℃ 保温,外源模板的翻译活性在 0—10 分钟内上

升很快,10 分钟时的掺入已达到 60 分钟时的一半。60 分钟以后达到坪高线,说明合成的蛋白不再水解,可能体系中含的蛋白水解酶极少。

7. 本 RRL 体系与 Pelham 等人 RRL 体系^[3] 反应条件及翻译活力比较 由表 3 可以看出本体系在反应条件上有如下主要改动: K^+ 、 Mg^{++} 浓度较高,是珠蛋白 mRNA 翻译的最适浓度;加入了适宜浓度的 ATP、GTP,保证了体系的能量供给(比不加的提高了珠蛋白 mRNA 翻译活性约 2.5 倍);降低了 RRL 在反

表 2 不同浓度 ATP、GTP 对翻译活性的影响

ATP、GTP 浓度 (mM)		ATP 0 GTP 0	ATP 0.5 GTP 0.025	ATP 1 GTP 0.05	ATP 1.5 GTP 0.075
³ H 亮氨酸掺入 cpm × 10 ⁻³ /50μl	空 白	2	2.1	2	2.2
	RR-tRNA 5μg	14.8	26.8	40.4	33.2
	RR-mRNA 0.15μg	21.5	35.1	50.8	46

表 3 本实验 RRL 体外翻译体系与 Pelham 体系反应条件及翻译活力比较

反 应 体 系		Pelham 体系	本实验体系
反 应 条 件	K^+ 浓度	84mM	112mM
	Mg^{++} 浓度	0.42mM	1.56mM
	Cl^- 浓度	84mM	74.5mM
	氯化血红素	16.8μM	14.4μM
	肌酸磷酸激酶	33.6μg/ml	28.8μg/ml
	磷酸肌酸	8.4mM	7.2mM
	ATP 浓度	0	1mM
	TPG 浓度	0	0.05mM
	³ H- 亮氨酸含量	0.83μCi/50μl	2μCi/50μl
	RRL 含量	42.5μl/50μl	36μl/50μl
翻 译 活 力	内源掺入 cpm × 10 ⁻³ /50μl	未经 MNA 酶处理	10.7**(100%)
		经 MNA 酶处理	0.5**(4.1%)
	外源掺入 cpm × 10 ⁻³ /50μl	未经 MNA 酶处理	10.65**(100%)
		经 MNA 酶处理	7.9**(74%)
	比活性(兔珠蛋白 mRNA) cpm × 10 ⁻³ /μg		4.5
	翻译倍数(兔珠蛋白 mRNA 1.65μg)		15.8

* 为 RR-TRNA 20μg/50μl 测定的结果。
** Pelham 体系为 RR-mRNA 1.65μg/50μl, 保温 40 分钟所测定结果。

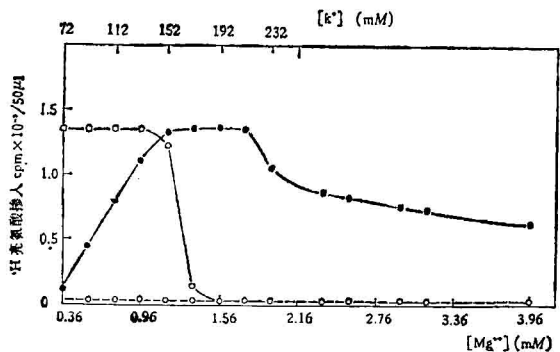


图1 K⁺、Mg⁺⁺ 浓度对翻译活性的影响
 ○—○: K⁺ 浓度曲线。RR-tRNA 20μg, Mg⁺⁺ 浓度为 1.56mM。
 ●—●: Mg⁺⁺ 浓度曲线。RR-tRNA 20μg, K⁺ 浓度为 112mM。
 ●—●: RRL 内源掺入。

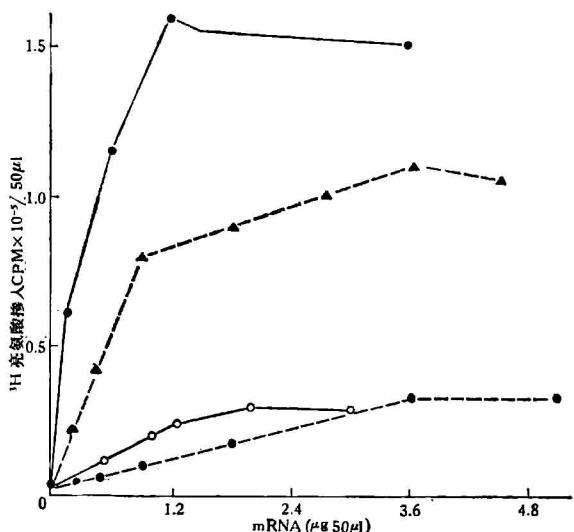


图2 四种 mRNA 在 RRL 体系中的翻译活性与其浓度的依赖关系
 ●—●: RR-mRNA 翻译活性曲线;
 ▲—▲: HR-mRNA 翻译活性曲线;
 ○—○: RL-mRNA 翻译活性曲线;
 ●—●: RL-mRNA 翻译活性曲线。

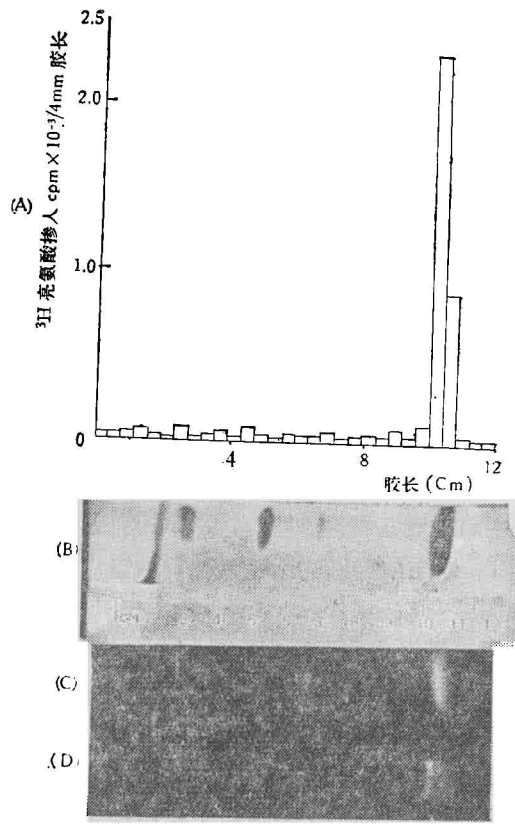


图3 RR-mRNA 翻译产物的鉴定
 A 为 RR-mRNA 在 RRL 体系中的翻译产物,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶不连续板电泳后,切胶计数放射峰
 B 为标准蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续板电泳。10—10.8cm 处区带为人珠蛋白。
 C 为 RR-mRNA 在 RRL 体系中翻译产物电泳后放射自显影。
 D 为 RR-mRNA 在麦胚体系中翻译产物电泳后放射自显影。

应混合物中的含量(由 85% 减至 72%)。由翻译活力的比较来看: 本体系经 MNA 酶处理后,内源去掉 98.4%;对外源掺入的影响, Pelham 体系降低 26%,本体系为 33%。以同样浓度的兔珠蛋白 mRNA 掺入量比较,本体系掺入的比放射活性及掺入倍数均较 Pelham 体

表4 四种 mRNA 在 RRL 与麦胚体系中掺入倍数及比放射活性的比较

mRNA 种类		RR-mRNA	HR-mRNA	RL-mRNA	HL-mRNA
最高翻译倍数	RRL 体系	53.3	30.6	11.7	10.8
	麦胚体系	25	21.3	6.2	12.4
比放射活性 cpm × 10 ⁻³ /50μl	RRL 体系	185.7	81	29.8	10
	麦胚体系	60	25.1	21.3	8.4

系有显著的提高。

二、几种 mRNA 在 RRL 体系中的翻译作用

1. 几种 mRNA 的翻译活性 RR-mRNA、HR-mRNA、RL-mRNA、HL-mRNA 在 RRL 体系中的掺入活性如图 2 所示，它们均在一定的浓度范围内与其浓度呈直线关系，而后达到饱和状态。本实验还比较了上述四种 mRNA 在 RRL 与麦胚两种体外翻译体系中翻译的比放射活性以及最高掺入倍数(表 4)。可以看到 RRL 体系对珠蛋白 mRNA (人或兔)的翻译活力比麦胚体系高 3 倍以上。而肝 mRNA (人或大鼠)则与麦胚相近，这可能是由于肝 mRNA 在 RRL 体系中翻译的最适条件与珠蛋白 mRNA 不同。

2. 翻译产物的鉴定 RR-mRNA 在 RRL 体系中翻译产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶不连续板电泳分离，切胶计数的结果见图 3A。RR-mRNA 的翻译产物在 10.0—10.8cm 处放射性最高，此区域相当于电泳板上标准珠蛋白区带。

RR-mRNA 在 RRL 体系中的翻译产物经电泳分离后，又经荧光显影(RRL 内源掺入在这部分的计数为 153cpm，未能显影)，结果见图 3C，表明表达出完整的珠蛋白。而 RR-mRNA 在麦胚体系中的翻译产物，虽然也能显出珠蛋白区带(图 3D)，但其前方还有二条较淡区带，可能是珠蛋白 mRNA 在麦胚体系中翻译不完整的肽片段。这说明 RRL 体系较麦胚体系翻译的蛋白质肽链完整。

本文所用微球菌核酸酶系美国康奈尔大学吴瑞教授赠给，本组沈岩同志协助部分技术工作，一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Pelham, H. R. B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247, 1976.
- [2] Schimke, R. T. et al.: *Methods in Enzymol.*, **30F**, 694, 1974.
- [3] Cann, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7536, 1974.
- [4] 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 卷，第 40 页。
- [5] Chu, M. L. et al.: *Biochem.*, **17**, 5128, 1978.
- [6] Tse, T. P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1272, 1977.
- [7] Sala-Trepat, J. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 173, 1978.
- [8] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [9] Bonner, W. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **46**, 83, 1974.
- [10] Benoff, S. et al.: *Biochem.*, **18**, 494, 1979.

[本文于 1981 年 9 月 25 日收到]

科技消息

我国正常人血浆环核苷酸的含量

叶淑金 李忆梅 杨宝华

(北京友谊医院 北京市临床医学研究所)

cAMP、cGMP 是调节细胞功能的重要环核苷酸，与神经、内分泌及免疫系统的功能密切相关。一些重要疾病，如肿瘤、急性心肌梗塞、爆发性流脑、慢性肾炎等常伴有体液或组织液中 cAMP、cGMP 含量的变化。这项指标，已开始广泛地应用于临床。

我们应用放射免疫测定法测定人血浆中 cAMP 和 cGMP 的含量。其特点是：1) 用氘标记作示踪剂，以乙酰化步骤处理标记与非标记的 cAMP、cGMP。2) 血浆以酸化酒精去蛋白。3) 用微孔滤膜分离结合与游离部分。以液体闪烁法作固相放射性测量。

cAMP 样品回收率为 $89.33 \pm 3.7\%$ ；cGMP 样品回收率为 $96.22 \pm 2.5\%$ 。结果见表。

表 人血浆中 cAMP、cGMP 正常值 Pmol/ml

cAMP	23.22 ± 0.51 n = 95	儿 童	23.21 ± 1.02	n = 36
		献 血 员 (工人、农民)	23.20 ± 0.72	n = 36
		医务人员	23.26 ± 0.87	n = 23
cGMP	5.90 ± 0.19	农民、工人、干部、医务人员		n = 120

[本文于 1982 年 2 月 8 日收到]