

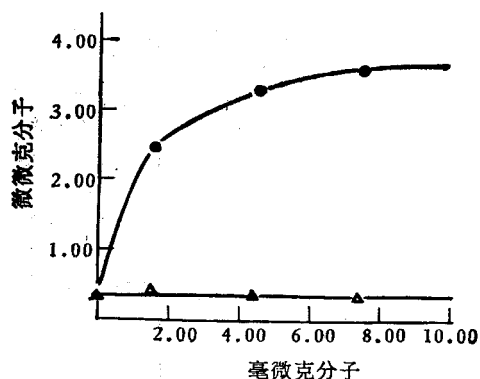


图9  $C^{14}$ -tRNA<sup>ala</sup> 对核糖体的结合曲线

横坐标: GpCpU 或 UpCpU 的毫微克分子数;  
纵坐标: 结合到核糖体 (2.75  $A_{260}$ ) 的  $C^{14}$ -tRNA<sup>ala</sup> 微微克分子数。

△——UpCpU; ●——GpCpU

GpCpU 代替 UpCpU 由图 8 可见, 尽管 UpCpU 与 GpCpU 很相似, 但二者表现了明显不同的结合活性: 在 UpCpU 存在时,  $C^{14}$ -tRNA<sup>ala</sup> 不结合核糖体, 而在 GpCpU 存在时, 随着 GpCpU 浓度增加,  $C^{14}$ -tRNA<sup>ala</sup> 对核糖体的结合率迅速上升、最高可达对照组的 10 倍。

## 小 结

用 RN<sub>ase</sub>A 和 RN<sub>ase</sub>N<sub>1</sub> 催化合成了近 10 毫克的酵母 tRNA<sup>ala</sup> 密码子 GpCpU, 经鉴定核酸酶已除净, 制剂具有生物活性。

本工作早期曾用上海有机化学所合成的 CpU 进行 GpCpU 合成反应条件与实验。工作中得到张其玖、程振起及本室其他同志的帮助、谨此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Lohrmann, R. et al.: *Am. Chem. Soc.*, **88**, 819, 1966.
- [2] Aoyagi, S. & Inoue, Y.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 514, 1968; *J. Biochem.*, **64**, 603, 1968.
- [3] Sekiya, T. et al.: *J. Biochem.*, **63**, 514, 1968.
- [4] 张其玖等: 《生物化学与生物物理学报》, 待发表。
- [5] Smith, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6024, 1958.
- [6] Michelson, A. M.: *J. Chem. Soc.*, 3655, 1959.
- [7] Nirenberg, M. and Lader, P.: *Science*, **145**, 1399, 1964.

[本文于 1978 年 12 月 12 日收到]

# 人体甲胎蛋白在麦胚无细胞系统中的生物合成

董 霖 张光扬 朱畴芳 李宝琰

杜端杰 朱梅青 黄道培

(中国科学院上海生物化学研究所四室)

人及动物体内有些蛋白质, 在胚胎中存在, 而在成年期含量极低, 当发生肿瘤时又大量产生。甲胎蛋白是这类蛋白之一。正常人体血清中甲胎蛋白的含量极低, 当体内产生原发性肝癌时, 甲胎蛋白的水平可升高近百倍, 甚至千倍以上<sup>[1, 2]</sup>。因此血清甲胎蛋白含量的测定, 对原发性肝癌的早期发现和早期诊断具有重要的意义<sup>[3]</sup>。我们<sup>[4]</sup>和 Ruoslahti<sup>[5]</sup>比较了胚胎及肝癌来源的甲胎蛋白的物化性质, 都证明二者相似。

Gitlin<sup>[6]</sup> 用放射自显影技术证明人体甲胎蛋白是由卵黄囊及肝细胞合成。原发性肝癌发生过程中肝癌细胞是重要的合成部位。但是甲胎蛋白的大量合成与肝癌发病机制的关系至今还不清楚。深入研究其合成过程的调节控制机制, 显然有其特殊的意义。而用体外无细胞系统深入研究蛋白质的合成过程比用整体或完整细胞更便于认识和分析。

真核细胞的无细胞翻译系统过去较多利用

兔网质红血球,腹水瘤细胞及大鼠肝等制备,近年来采用麦胚无细胞系统逐渐增多,因其具有制备方便、内源低、效率高等优点。Koga<sup>[7]</sup>, Kanai<sup>[8]</sup>, Tamaoki<sup>[9]</sup>等都曾在动物的无细胞系统中观察过大鼠及小鼠甲胎蛋白的合成。Innis<sup>[10]</sup>用分子杂交技术比较了大鼠肝及 Morris 7777 肝癌甲胎蛋白 (AFP) mRNA。研究人体甲胎蛋白的基因表达各水平的调节控制机制等问题,将为临床提供理论基础,因此我们考虑采用人胚肝为材料应有其明显的优点。本文报道人胚肝多聚核糖核蛋白体的制备,及用 <sup>14</sup>C-氨基酸掺入技术观察在麦胚无细胞系统中,多聚核糖核蛋白体翻译甲胎蛋白和白蛋白的能力。

## 材料与方 法

人胚肝取自 3—6 月水囊或前列腺素引产的胎儿。

ATP、GTP、磷酸肌酸,磷酸肌酸激酶,tRNA 均由本所东风厂提供。mRNA 的制备按前文所述<sup>[11]</sup>。TMV RNA 制备按<sup>[12]</sup>。珠蛋白 mRNA 由本所遗传工程组供给。

所用器皿皆为 120℃ 高温烘烤,缓冲液, Sephadex G-25 高压无菌。

### 一、人胚肝多聚核糖核蛋白体的制备

人胚肝在 4℃ 用预冷缓冲液浸洗后剪碎,加二倍体积预冷的缓冲液 (Tris-HCl 50mM, pH7.6, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 蔗糖 0.25 M, β-巯基乙醇 5 mM, 肝素 200 毫克/1,000 毫升), 在 Teflon 匀浆器中匀浆, 15,000 × g 离心 10 分钟, 取上清液经棉花过滤, 滤液加 10% Tritonx-100 至最终浓度为 1%, 冰浴中放置 30 分钟, 离心 105,000 × g 1 小时, 沉淀 (多聚核糖核蛋白体), 先用 50mM Tris-HCl, pH 7.6 缓冲液冲洗沉淀的表面, 用同样缓冲液将沉淀缓慢匀浆, 105,000 × g 离心 1 小时, 沉淀表面再用缓冲液冲洗一次, 然后将沉淀加少量无菌重蒸水缓慢地使匀浆至全部溶解。浓度以 260 毫微米吸收值 200—400 为宜, 分装后于 -20℃ 保存。

### 二、麦胚无细胞提取液的制备

参考中国科学院微生物研究所病毒复制组

方法<sup>[12]</sup>, 用“农大 139”冬小麦新鲜制备麦胚。

### 三、<sup>14</sup>C 亮氨酸掺入系统 (蛋白合成系统)

在 100 微升反应液中含 N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPEP) 20 mM, pH 8.0 (用 KOH 调节 pH), ATP 1mM、GTP 0.025 mM、MgAc<sub>2</sub> 2.5 mM、KCl 70 mM, 磷酸肌酸 4 mM, 磷酸肌酸激酶 4 微克, 19 种非标记氨基酸各为 0.03 mM, β-巯基乙醇 22 mM, tRNA 6 微克, <sup>14</sup>C 亮氨酸 0.5 微居里, 麦胚提取液 50 微升, O. D. 260 毫微米值为 3.0—4.5, O. D. 260/280 ≈ 1.5, 人胚肝多聚核糖核蛋白体 O. D. 260 毫微米为 4.0 左右或 mRNA O. D. 260 毫微米 0.01—0.2 之间, 25℃ 保温 2 小时, 将反应管放入冰浴终止反应, 并立即吸取 20 微升, 点在直径为 2 厘米的新华 1 号滤纸片上, 将滤纸片投入冷 10% 三氯醋酸固定, 再转入 5% 三氯醋酸 90℃ 处理 10 分钟, 将滤纸片转入冰冷的 5% 三氯醋酸换洗三次, 然后用 95% 乙醇, 乙醇: 乙醚 = 1:1, 及乙醚各洗一次, 待纸片干燥后, 放入 5 毫升闪烁液 (ppo 0.4%, popop 0.03% 溶于二甲苯), 用 NE 8312 液体闪烁仪测量。

### 四、羊抗兔 IgG 第二抗体的制备

羊抗兔 IgG 抗血清加一倍体积水稀释, 加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 达 50% 饱和度, 12,000 × g 离心 10 分钟, 沉淀溶于 H<sub>2</sub>O 中, 体积约相应原血清, 再加 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 达 30% 饱和度, 放置过夜, 12,000 × g 离心 10 分钟, 沉淀溶于少量 H<sub>2</sub>O 中, 在 4℃ 对 0.01 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 透析, 除尽 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 再用 DEAE-纤维素柱层析分离。

透析样品对上柱缓冲液 (0.0175 M 磷酸缓冲液) 平衡后, 上柱分离, 柱容量的选择以 0.5 毫升血清/厘米<sup>3</sup>为宜, 用同样缓冲液洗脱, 收集蛋白高峰, 在透析袋内吹干浓缩至小体积, 再对 H<sub>2</sub>O 透析去盐, 冻干保存。

### 五、兔抗人甲胎蛋白, 兔抗人白蛋白抗体的纯化

1. 亲和层析柱制备 用亲和层析法纯化的<sup>[13]</sup>人体甲胎蛋白及纯化的人血清白蛋白均采用溴化氢 (CNBr) 方法与 Sepharose 4B 交联,

凝胶的交联用量为 2—4 毫升/毫克蛋白,生成的甲胎蛋白 -Sepharose 4B 及白蛋白 -Sepharose 4B, 分别装柱(2.5 × 6 厘米)。

2. 抗体的纯化 兔抗人甲胎蛋白及兔抗人白蛋白血清各加水稀释 1 倍体积,加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  达 50% 饱和度。MSE 20 离心 12,000 rpm 10 分钟,取沉淀分别溶于重蒸水中,浓度为每毫升 O. D280 毫微米 150,上甲胎蛋白-Sepharose 4B 及白蛋白-Sepharose 4B 亲和层析柱,用生理盐水洗柱至 280 毫微米吸收值小于 0.03,再用 0.5N 醋酸洗脱,在 HD-73-3 型核酸蛋白检测仪监测下,收集高峰部分,并立即用 3 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  调节 pH 至中性,再通过 Sephadex G-25 柱(2.6 × 46 厘米)去盐,收集高峰部分,产率为 8% 左右。冻干或 -20℃ 保存。

## 六、正常兔 IgG 的提纯

用羊抗兔 IgG 第二抗体的制备(方法四)。

## 七、抗体、第二抗体免疫反应最适浓度的选择

在 2.0 毫升缓冲液中 (Tris-HCl 25 mM, pH8.0, KCl 70 mM,  $\text{MgAc}_2$  2.5 mM Trifox-100 1% DOC 1%) 用放射免疫第二抗体法<sup>[14]</sup>选择抗体及第二抗体的最适浓度,抗甲胎蛋白抗体为 370 微克/0.1 毫升,抗白蛋白抗体为 330 微克/0.1 毫升,第二抗体为 0.2 毫升(20 毫克/毫升)。

## 八、蛋白合成产物分析

免疫沉淀法: 1. 清扫非特异性吸附物,2 毫升反应液加 0.2 毫升 10% SDS, 37℃ 保温 30 分钟后, 4℃ 静置过夜, 离心 4,000 rpm 10 分钟除去 SDS 钾盐, 取 20 微升上清液做总蛋白放射性的测定(同前), 其余吸取 2 毫升去 SDS 钾盐的反应液, 加 2 毫升缓冲液(Tris-HCl 0.01M, pH 7.6, 亮氨酸 10 mM, NaCl 0.9%), 0.8 毫升 [Tritonx-100 (10%) + DOC (去氧胆酸盐), 10%],  $\text{H}_2\text{O}$  2.4 毫升, 正常兔 IgG 552 微克及羊抗兔 IgG 第二抗体 0.8 毫升(20 毫克/毫升), 4℃ 过夜, 离心去除沉淀, 上清液即为清扫后的反应液。

2. 每 2 毫升清扫后的反应液, 分别加正常兔 IgG 108 微克, 抗甲胎蛋白抗体 0.1 毫升(370

微克), 抗白蛋白抗体 0.1 毫升(330 微克), 4℃ 放置 4 小时, 各加羊抗兔 IgG 第二抗体 0.2 毫升(20 毫克/毫升), 4℃ 过夜, 离心 4,000 rpm 10 分钟, 沉淀用缓冲液(同 1) 洗二次, 分别溶解于 0.05 毫升 1 N NaOH, 点样于直径 2 厘米滤纸片上, 烘干后将纸片放入 5 毫升闪烁液, NE8312 液闪仪计数。分别测得对照组及甲胎蛋白, 白蛋白免疫沉淀的放射性。

凝胶电泳法 同上法经缓冲液洗过的免疫沉淀产物, 再经过 95% 乙醇, 乙醇: 乙醚 = 1:1 各洗一次, 干燥后将沉淀溶解于 40 微升缓冲液(磷酸缓冲液 0.01 M (pH 7.0), 4 M 尿素, 1% SDS, 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 沸水中加热 3 分钟。全部转入 SDS 聚丙烯酰胺凝胶管内(按 R. Weber 等<sup>[15]</sup>方法配制)。8 毫安/管, 50 伏, 电泳 4 小时。Coomassine 染色过夜, 用 50% 乙醇 + 7% 醋酸退色, 将凝胶切成每片 2 毫米厚, 分别放入闪烁杯内干燥, 加 0.3 毫升  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 在 55℃ 消化过夜, 全部溶解后每杯加 10 毫升闪烁液(1,000 毫升二氧六环中加乙二醇乙醚 167 毫升, 萘 50 克, ppo 10 克, popop 0.5 克), 闪烁仪计数, 测定每片凝胶的放射性。

# 结果与讨论

## 一、多聚核糖核蛋白体对 $^{14}\text{C}$ 亮氨酸掺入的作用

3—6 个月胎儿血中甲胎蛋白含量较高, 此后随胎龄的增长, 含量逐渐下降, 因此我们选择了 3—6 个月的胎儿制备多聚核糖核蛋白体。在麦胚无细胞系统中, 以  $^{14}\text{C}$  亮氨酸掺入总蛋白

表1 多聚核糖核蛋白体对  $^{14}\text{C}$ -亮氨酸掺入的影响

|                      | cpm/100<br>微升反应液 | 提高(倍) |
|----------------------|------------------|-------|
| 完整系统                 | 93               |       |
| 多聚核糖核蛋白体 O. D260=3.2 | 48               | 24.2  |

的放射性观察其翻译活力。反应系统中内源掺入活力极低, 加入多聚核糖核蛋白体后  $^{14}\text{C}$  亮氨酸掺入显著提高(表 1), 且随所加多聚核糖核蛋白体浓度的增高而上升(图 1)。在该系统中用人胚肝的 mRNA 为样板, 同样具有较好的掺

入活力(图 2)。

新鲜制备的多聚核糖核蛋白体活力较好,随着保存的时间增多,活力逐渐下降。在-20℃条件下保存二周活力降低 16%,一个月降低 29% 左右(表 2)。

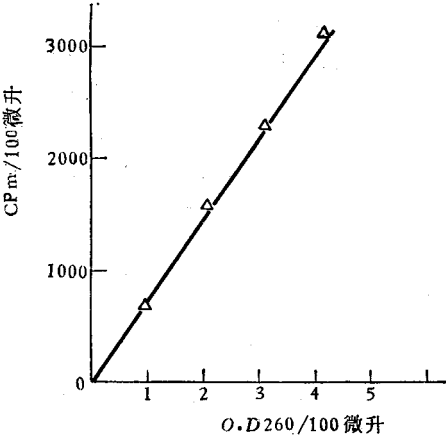


图 1 反应液中 Polysome 浓度对 <sup>14</sup>C-Leu 掺入的影响

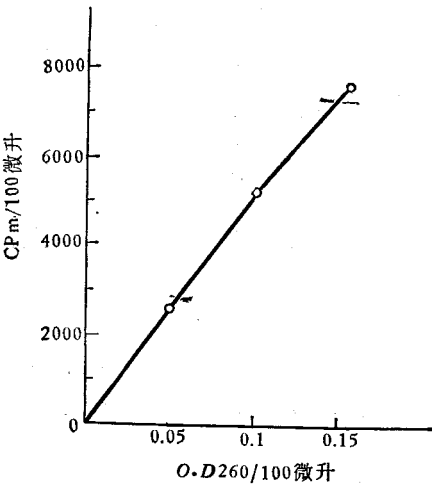


图 2 反应液中 mRNA 浓度对 <sup>14</sup>C-Leu 掺入的影响

表 2 -20℃保存多聚核糖核蛋白体对 <sup>14</sup>C-亮氨酸掺入活力的影响

| 多聚核糖核蛋白体 | cpm/100 微升<br>反应液 | 活力降低(%) |
|----------|-------------------|---------|
| 新鲜制备     | 10344             |         |
| -20℃保存二周 | 8672              | 16%     |
| -20℃保存一周 | 7122              | 29%     |

二、精胺(Spermine)对<sup>14</sup>C-亮氨酸掺入的影响

目前已知精胺一类物质对大分子的体外合成起重要作用。Igarashi<sup>[16]</sup> 观察亚精胺 (Spermidine)对以多聚尿嘧啶核苷 (poly U)为样板合成多聚苯丙氨酸 (poly Phe) 的反应中有促进起始的作用。Hunter<sup>[17]</sup> 等报告,亚精胺不仅能提高蛋白的合成速度,而且可以促进合成完整的长链分子。在我们的实验中观察到精胺(0.6mM)对以 RNA 为样板 <sup>14</sup>C-亮氨酸掺入的活力有显著刺激作用,而以多聚核糖核蛋白体为样板则不受影响(表 3)。可能精胺对翻译一步的起始有促进作用,而多聚核糖核蛋白体的作用只是使分子延伸,因此对其无影响。

表 3 精胺对 <sup>14</sup>C-亮氨酸掺入的影响

|                                   | 对照组<br>cpm/100<br>微升反应液 | 加精胺<br>(0.06mM)<br>cpm/100<br>微升反应液 | 提高(倍) |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------|
| 完整系统+TMV RNA<br>(6 微克)            | 2457                    | 19365                               | 7.9   |
| 完整系统+血红蛋白<br>mRNA                 | 1552                    | 3625                                | 2.3   |
| 完整系统+多聚核糖核<br>蛋白体<br>(O.D260=7.5) | 7102                    | 6377                                | —     |

三、甲胎蛋白与白蛋白的合成

3—6个月的胎儿乃是甲胎蛋白含量最高的阶段,甚至可达总蛋白的 17.6% 至 4.2%,平均约 10%左右,而此时白蛋白约为 50.8—70.4%,平均约 60% 左右。在离体的条件下,多聚核糖核蛋白体合成的多肽链中,我们用免疫沉淀方法进行反应产物的分析,两种蛋白大体上仍保持这样的比例关系。

表 4 甲胎蛋白及白蛋白的合成率

|       | cpm/0.5<br>毫升反应液 | 减去对照 | 合成率<br>(占总蛋白的<br>百分数) |
|-------|------------------|------|-----------------------|
| 合成总蛋白 | 72560            |      |                       |
| 对 照*  | 242              |      |                       |
| 甲胎蛋白  | 992              | 750  | 1%                    |
| 白 蛋 白 | 4529             | 4287 | 6.1%                  |

\* 对照系指正常兔 IgG 与第二抗体反应

反应液首先测得其中总蛋白的掺入,然后经过正常兔 IgG 与羊抗兔 IgG 第二抗体免疫沉淀清扫,除去大部分非特异性结合物,再用兔

抗人甲胎蛋白抗体及抗人白蛋白抗体进行特异性的免疫反应,用羊抗兔 IgG 第二抗体将免疫复合物沉淀,分别测定其中放射性,在此同时再用正常兔 IgG 与第二抗体反应作为对照,减去对照后甲胎蛋白占总蛋白中掺入量的 1%,白蛋白占 6.1% (表 4)。

免疫沉淀复合物再经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将凝胶切成厚度同为 2 毫米的小片,分别经  $H_2O_2$  消化后测定其放射性,结果表明多聚核糖核蛋白体合成的蛋白中大部分为分子量较小的产物,虽经特异性的免疫沉淀,但与标准的甲胎蛋白及白蛋白所泳动的位置不一致,测得其分子量为 40,000,均小于标准样品。这提示多聚核糖核蛋白体合成的蛋白很多都不是从头开始,而是在已有基础上延伸的结果,虽可能是不完整的分子,但已具有甲胎蛋白和白蛋白相同的抗原决定簇,Tse 等<sup>[18]</sup>也曾观察到在麦胚无细胞系统中,当盐浓度适合最大掺入活性时,所合成的蛋白质分子量小的现象,使多聚核糖核蛋白体在麦胚无细胞系统中新合成的蛋白质分子不完整的原因,还有待进一步实验加以说明。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理学报》,1977年,第9卷,第4期,第321页。
- [2] Ruoslahti, E. et al.: *Nature*, **235**, 161, 1972.
- [3] 中国肝癌研究协作组:《肿瘤防治研究》,1974年,第4期,第12页。
- [4] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组:《生物化学与生物物理学报》,1975年,第7卷,第41页。
- [5] Ruoslahti, E. et al.: *Int. J. Cancer.*, **8**, 283, 1971.
- [6] Gitlin, D. et al.: *Nature*, **228**, 995, 1970.
- [7] Koga, K. et al.: *Biochemistry*, **13**, 3024, 1974.
- [8] Kanai, K. et al.: *Cancer Res.*, **34**, 1813, 1974.
- [9] Tamaoki, T. et al.: *Nature*, **249**, 269, 1974.
- [10] Innis, H. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8469, 1977.
- [11] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组: (待发表)。
- [12] 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。
- [13] 张光扬等:《生物化学与生物物理进展》,1974年,第2期,第36页。
- [14] 中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组等:《上海科研单位成果展览会技术资料》,1974年。
- [15] Weber, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 1969.
- [16] Igarashi, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 163, 1977.
- [17] Hunter, A. R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **75**, 149, 1977.
- [18] Tse, T. P. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1272, 1977.

[本文于 1978 年 10 月 16 日收到]

# [8-<sup>3</sup>H]-鸟苷 3',5'-环磷酸钠盐的制备及鉴定

姜延林 续双城 廖家儒 顾振芳 曹德声

高月英 孙家秀 孙志伟 金德耀

(中国科学院原子能研究所)

## 一、引 言

自从 3',5'-环磷腺苷(cAMP)作为“第二信使”学说提出以来,通过实验不仅证实了它与某些病理过程密切相关,而且还注意到 cAMP 对肿瘤细胞也有某些影响。这是最近几年受人注意的一个研究课题<sup>[1,2]</sup>。它不仅涉及到肿瘤发

生,发展的理论,也涉及到肿瘤治疗的一个新的研究方向。

近几年来,人们在研究 cAMP 作用的同时,又对另一种核酸——鸟苷 3',5'-环磷酸(cGMP)的作用发生了浓厚兴趣。有人推测<sup>[3]</sup>,生物的细胞调节作用是受 cAMP 和 cGMP 相互影响的。这一理论有可能用实验方法加以证实,