

研究工作

哺乳动物核糖核酸酶天然抑制物对核糖核酸的保护作用

吴冠芸 王申五 黄松生* 徐晓石 齐上乐**

(中国医学科学院基础医学研究所)

哺乳动物某些组织的高速离心上清部分存在一种核糖核酸酶的天然抑制物(RI),它是一种糖蛋白^[1],与组织 RNA 和蛋白质合成的速度有密切关系^[2]。有人曾经应用 RI 防止聚核蛋白体和核 RNA 的降解^[3],最近还有人用 RI 在体外无细胞翻译体系中保护 mRNA 的模板活力,以增加氨基酸的掺入^[4],或者把它加入到逆转录体系以促进 cDNA 的合成^[5]。

我们曾在制备大鼠肝聚核蛋白体(简称 Rp)的同时,从超离心上清中部分纯化了 RI,并初步观察它在麦胚体系中对 RNA 有保护作用。本文报道我们对这一作用的进一步研究。

材料与 方法

1. Rp 按 Sala-Trepap 等人的方法修改后制备^[6]。主要改动是超离心为 $105,000 \times g$, 4°C 两小时;匀浆缓冲液中未加酵母 tRNA。

2. 大鼠肝聚核蛋白体 RNA 按照 J. M. Taylor 等人的方法^[7]制备。

3. 兔网组红细胞聚核蛋白体及其 poly(A) RNA 按照 Aviv 等人的方法^[8]制备。所用的 oligo-dT 纤维素为上海第二试剂厂产品。大鼠肝 poly(A) RNA 是将大鼠聚核蛋白体 RNA 经 oligo-dT 纤维素(西德 Boehringer $n = 1-18$)亲和层析制备的^[6]。所有 RNA 皆按 $1A_{260}$ 单位 = $50\mu\text{g}$ 计算。

4. 麦胚无细胞翻译体系 麦胚液按李文裕等人^[9]的方法制备。 $50\mu\text{l}$ 测定体系中含麦胚液 $15\mu\text{l}$, KCl 82mM , $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 2.65mM , DTT 2mM , Hepes 20mM , ATP 1mM , GTP 0.2mM , 磷酸肌酸 8mM , 精胺-盐酸盐 $65\mu\text{M}$, 酵母

tRNA $4\mu\text{g}$, 肌酸激酶 $42.8\mu\text{g}$ (上海东风厂)均为 ^{14}C 混全氨基酸 $0.2\mu\text{Ci}$ 及五种非放射性氨基酸^[4](精、甲硫、苯丙、色、组等)各 $20\mu\text{M}$, 使用 ^{14}C 或 ^3H 亮氨酸时改加 19 种非放射性氨基酸各 $20\mu\text{M}$ 。测定大鼠肝 Rp, RpRNA 及 mRNA 采用 pH7.2。其它具体方法见文献 [9]。

5. RI 的制备及其活力测定^[2] 大鼠肝匀浆去聚核蛋白体上清经硫酸铵盐析, DE52 柱层析制得 RI, 收集活力最高部分,分装在 -20°C 存放。RI 的活力单位:抑制 1ng RNaseA 活力至 50% 时所需 RI 量,蛋白浓度以 Lowry 法测定。

结 果

1. 麦胚测活体系中 RI 的最适量的测定在 $50\mu\text{l}$ 麦胚体系中加入等量的 Rp (图 1) 或大鼠肝聚核蛋白体 RNA (Rp RNA) (图 2), 再加入不同浓度的 RI。RI 在 100 单位/ml 以下时,对麦胚体系内源掺入基本无影响,对 Rp 而言,RI 浓度大于 60 单位/ml 时,其掺入量明显下降,而对 Rp RNA, RI 的浓度在 90 单位/ml 以下时与掺入量呈线性关系。大于此浓度出现明显的抑制作用。说明大鼠肝 RI 作为 RNA 的保护剂时,浓度不宜过大。在敏感的麦胚体系中尤需注意其浓度的限制。

2. RI 对聚核蛋白体体外翻译活力的影响 通过在麦胚翻译体系中加入或不加入 RI 或 Rp 的三组实验的动力学观察(图 1)表明,麦胚体系中只加入 RI 而不加入外源模板时,在 90 分

* 第三军医大学进修生

** 本室研究生

钟的保温过程中,放射性氨基酸的掺入无明显变化;而以 Rp 为模板时,麦胚体系中加入 RI 比不加 RI 掺入量明显增加,这说明 RI 只起保护外源性模板的作用。

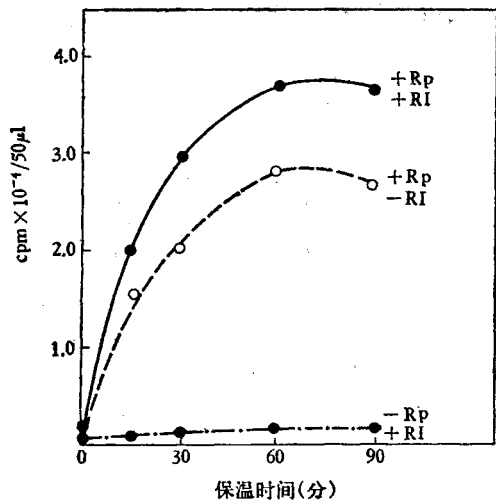


图1 大鼠肝 RI 对 Rp 翻译活力的促进作用
50μl 麦胚体系中加入 ³H 亮氨酸 0.5μCi, Rp145 μg RI 60 单位/ml, 其它见正文

3. RI 对 RNA 体外翻译活力的影响 以 Rp RNA 为模板时也可证实大鼠肝 RI 的这种保护作用(图 2)。在麦胚体系中加入 Rp RNA 后再加入 RI 掺入活力最高,而无 RI 时则 Rp RNA 掺入活力明显降低,而只加入 RI 的空白掺入活力最低。说明大鼠肝 RI 也能保护 Rp RNA 的模板活力。此外, Rp RNA 的掺入至

30 分钟即达饱和,而 Rp 的掺入则需延迟到 60 分钟;同时 Rp RNA 的模板活力的起始速度亦较 Rp 为慢(图 1、2)。

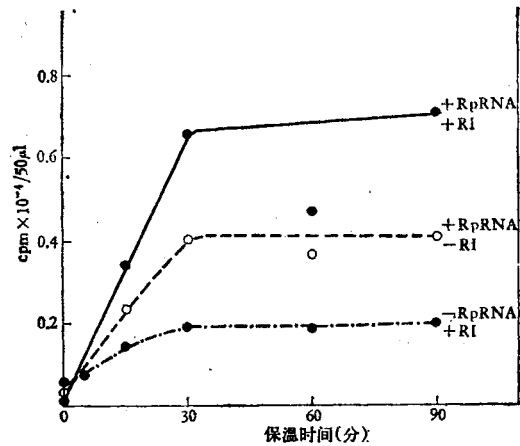


图2 大鼠肝 RI 对 Rp RNA 翻译活力的促进作用
50μl 麦胚体系中加入 Rp RNA 10μg, RI44 单位/ml,

4. RI 对 mRNA 体外翻译活力的影响 以大鼠肝 poly(A) RNA, 兔网织红细胞 poly(A) RNA 以及 TMV-RNA 为模板,在麦胚体系检测其翻译活力时,大鼠肝 RI 的这种对模板的保护作用都能表现出来。加入 RI 比不加入 RI 各模板的比活力可提高 3—4 倍(表 1)。

这些数据也反映出我们的麦胚体系中尚有微量破坏 RNA 模板活力的 RNase。但在 RI 的保护下在麦胚体系中 RNA 的翻译活力表达得较为充分。

表 1 RI 对不同 mRNA 模板活力的影响

	兔网织红 mRNA		大鼠肝 mRNA		TMVRNA	
	+/-RNA cpm/50μl	cpm/μg	+/-RNA cpm/50μl	cpm/μg	+/-RNA cpm/50μl	cpm/μg
-RI	8450/2310	1805	3785/1730	2055	3395/2055	153
+RI	21650/2310	5688	6470/1830	4640	8120/2205	676

50μl 麦胚体系中加入兔网织红 RNA 3.4μg, RI5 单位, ³H 亮氨酸 2.5μCi, 大鼠肝 mRNA 1.0μg, TMVRNA 8.75μg, 后两种都加入 RI3.3 单位, ³H 亮氨酸 1.0μCi。其它条件见方法正文。

5. 大鼠肝 RI 对 Rp 及兔网织红细胞聚核蛋白体在麦胚体系中的翻译活力都有促进作用(表 2)。用大鼠肝 RI 对人胚肝聚核蛋白体的实验也得到类似的结果(未列出)。以大鼠肝 poly(A) RNA, 兔网织红 poly(A) RNA 及 TMV-RNA 为模板时,大鼠肝 RI 对它们翻译

活力的促进作用并无明显差异(表 1),说明 RI 对不同 RNA 模板无明显的专一性。

讨 论

在 Rp 的制备过程中加入 RI 的粗制品,有利于保护它的完整性^[2]。由于肝素与 RI 对碱性

RNase 与酸性 RNase 的抑制作用各有侧重^[1], 我们曾在制备 Rp 时, 除加入肝素外, 又加入胎盘 RI 的粗提物, 从而改善了 Rp 的活力。因此若从细胞浆中 RI 含量较低的组织中分离聚核蛋白体时, 加入一定量 RI 粗制品有一定好处。

麦胚体系中含有微量 RNase^[10], 它对标记的 RNA 有明显的降解作用^[11]。其 RNase 活性主要不是来自麦胚本身, 而是来自加入混合体系中的其它生物制品^[4]。我们的实验结果也说明麦胚体系中含有的微量 RNase 活性不容忽视。就提高模板的掺入程度看, 似乎聚核蛋白体最小, 聚核蛋白体 RNA 次之, 而对 mRNA 最为明显。这可能是由于与核蛋白体结合的 RNA 比未结合的, 它受到 RNase 作用速度较慢^[11]。而聚核蛋白体 RNA 中又含有许多无模板活力的 RNA, 其中的 mRNA 被 RNase 降解的可能性要小些。所以用麦胚体系检测 mRNA 的活力和纯度时防止剩余的 RNase 的干扰甚为重要。

我们所使用的大鼠肝 RI 是部分纯化的制品, 它在麦胚体系中通过抑制 RNase 的活力对 RNA 起保护作用。但随 RI 制品浓度的增加表现了掺入活力降低 (图 1、2), 所以还不能排除有其它影响翻译作用的因素。

RI 不仅存在于哺乳动物的肝脏, 而且大鼠肾脏、人胎盘、垂体都有发现。但从鸡和蛙的肝脏测不出 RI 的活性。当将鼠肝 RI 粗制品加入到鸡肝匀浆制备其核蛋白体时, 只表现了部分

的保护作用。故 Diykstru 等人认为 RI 有某种程度的种属特异性。但是, 我们的结果表明 RI 对不同来源的 RNA 制品的专一性并无明显差异。以人胎盘 RI 保护狗胰 mRNA 也有类似的情况^[4]。这些资料仅供选择有效的 RI 时做参考, 还不能由此得出 RI 没有种属特异性的结论。

参 考 文 献

- [1] Shartman, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 88, 1962.
- [2] Blackburn, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 5904, 1977.
- [3] Grau, O. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 647, 1968.
- [4] Scheele, G. & Blackburn, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4898, 1979.
- [5] Gordon, J. I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 8629, 1978.
- [6] Sala-Trepat, J. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 173, 1978.
- [7] Taylor, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7661, 1974.
- [8] Aviv, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**, 1408, 1978.
- [9] 李文裕等: 《实验生物学报》, 1978 年, 第 11 期, 第 109 页。
- [10] Hickey, E. D., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 377, 1978.
- [11] Hunter, A. R. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **75**, 149, 1977.
- [12] Dijkstra, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 363, 1978.

[本文于 1981 年 4 月 3 日收到]

方位对 McCollough 颜色后效应的影响

赵冠美 齐翔林 汪云九

(中国科学院生物物理研究所)

1965 年 McCollough 首次提出了人的视觉颜色后效应是随附于用作刺激图形栅条的方位。即当受试者对交替出现的蓝/黑水平栅条与橙/黑垂直栅条适应后, 再观看无色的水平与垂直栅条的检验图时, 会感觉到水平栅条呈淡

橙色, 而垂直栅条呈淡蓝-绿色。不仅如此, 对其它颜色的栅条适应后也会在同朝向的无色栅条上出现它们的互补色^[1]。此后, 人们把这一效应称之为 McCollough 颜色后效应 (以下简称 ME)。同时 McCollough 指出这一后效应是和