

m-RNA 的体外翻译技术及其在分子病毒学中的应用

龚 祖 坝

(中国科学院上海生物化学研究所)

真核细胞 m-RNA 体外翻译体系的建立至今已近二十年的历史。建立这样的体系最初是为了鉴定 m-RNA 分子之用,以后又用来作为分离各种不同的 m-RNA 的工具。随着各种无细胞体外翻译体系的建立,目前该技术已成为分子生物学研究中的一个重要手段,对于了解基因结构,基因表达与调节,基因产物的鉴定能提供很多重要的信息。以病毒学研究来说,可以认为病毒基因表达的分子机理的大部分信息是通过这一技术获得的。

一、体外翻译的无细胞体系

噬菌体 ϕ_2 的 RNA 在细菌的无细胞体系中进行体外翻译是第一个成功的例子^[1],但后来发现,利用从细菌或叶绿体中分离出来的核蛋白体来翻译真核细胞的 m-RNA 效率不高,而哺乳动物,特别是兔的网织红血球细胞的溶胞产物所制备的无细胞体系则效率高得多^[2]。可是这一无细胞体系却含有较高的内源 RNA,从而影响外源 RNA 的翻译及其产物的分析。曾经试图以各种方法来减少内源 RNA 的作用,如进行分部分离以除去内源 RNA,但分离后的体系活力大大降低。也曾试以胰核糖核酸酶来降解内源 RNA,但为了除去残留的酶又必须进行分离。1976 年 Pelham^[3] 等考虑利用小球菌核糖核酸酶来代替胰核糖核酸酶,因为前者的活性需要 Ca^{++} 的存在,而 Ca^{++} 可用螯合剂 EDTA 除去,也即使降解内源 RNA 的酶活性消失,处理后的体系尚保留其蛋白质合成能力的 70%。近年来,网状细胞的溶胞产物在国外已成为商品,是最为广泛使用的一种无细胞体外核酸翻译的体系。

从植物病毒的 RNA 翻译考虑,当然设想能从植物来源制备一种无细胞体系最为理想,但试图从植物的叶肉细胞来制备却一直未获成功。七十年代以来,一些人分别从小麦胚^[4],黑麦胚^[5]及水稻胚^[6]中成功地制备成无细胞体系,特别是小麦胚获得较为广泛的应用。小麦胚的无细胞抽提物具有较低的内源 RNA 活力,同时又可通过葡聚糖凝胶来脱盐,这一步骤也能大大减少内源氨基酸前体的量,从而使翻译产物具有较高的专一性,但麦胚无细胞体系的翻译活性较差,特别对于大的 m-RNA,要产生完全的翻译产物相对来讲效率较低。

近年来,还报道了一些其它来源的体系,如小鼠腹水瘤细胞的溶胞产物^[7]等。但鉴于目前以兔网状细胞溶胞产物和小麦胚的无细胞体系应用最为广泛,本文对这两种体系作较为详细的介绍。

二、兔网状细胞溶胞产物及麦胚的无细胞体系的制备

I 兔网状细胞溶胞产物体系

1. 溶胞产物的制备 (1) 选择适当重量的兔子(4至6磅),注射 1.2% 乙酰苯肼,以造成兔子贫血,增加网状细胞的比例。(乙酰苯肼为致癌物质的衍生物,使用时要注意)。(2) 一周后取血,取出血液后立即转入用冰冷却的离心管中,内含和血液等体积的冷生理盐水(0.14M NaCl 1.5mM MgCl_2 , 5mM KCl)。4℃ 时离心,3500rpm 5 分钟,弃上清,用冷生理盐水重复洗涤三次,最后一次离心转速为 7000rpm。然后尽可能地把上清分离掉,测量细胞体积,加入等量的冷却重蒸水以使细胞溶解。将此溶胞产物在

冰中放置 1 分钟, 然后在 4℃ 时离心 15,000 rpm 20 分钟。(3) 小心地将上清取出, 不要混杂有大量细胞膜以及脂肪层的表面物质, 立刻分装并保存于液氮之中。

2. 决定于外源 RNA 的溶胞产物的制备

(1) 往每毫升上述溶胞产物加入 10 微升的肌酸磷酸激酶 (5 毫克/毫升, 溶剂为 50% 甘油和 50% 水) 及 25 微升的氯高铁血红素。(2) 往上述产物 800 微升中加入 150 微升主宰混合物, 内含 50 微升的 0.2M 磷酸肌酸, 50 微升的氨基酸混合液 (除标记氨基酸外, 浓度各为 5mM), 50 微升 2M KCl 和 10mM MgCl₂ 混合物。(3) 加入 10 微升 0.1M CaCl₂ 和小球菌核糖核酸酶 (1 毫克/毫升) 20℃ 保温 15 分钟, 立即加入 20 微升 0.1M 中和的 EGTA, 放入冰浴, 快速分装, 放入液氮中保存。

3. 体外蛋白质合成试验 把准备翻译的 m-RNA 加入反应试管, 25 微升的溶胞产物以 1 微克 RNA 为宜。再加入 ³⁵S 甲硫氨酸或氘标记的亮氨酸于溶胞产物。把此溶胞产物和 RNA 混合, 在 30℃ 时反应 1 小时。

II. 麦胚无细胞体系

1. 麦胚无细胞体系的制备: 6—10 克麦胚在预冷的捣碎机中和等量的砂子, 28—46 毫升的缓冲液, 内含 20mM Hepes, 100 mM KCl 1mM 醋酸镁, 2mM CaCl₂ 及 6mM 巯基乙醇磨散, 然后在 0℃ 时 30,000g 离心 10 分钟, 小心除去上层脂肪及沉淀, 上清称谓 S-30, 调节 S-30 中醋酸镁浓度为 3.5mM, 然后对每毫升 S-30 用 1 毫升中性 ATP, 20μM GTP, 2mM DDT, 8mM 磷酸肌酸, 40μl 肌酸激酶, 30℃ 保温 12—15 分钟, 保温后的 10 至 12 毫升的 S-30 通过葡聚糖凝胶 G-25, 并用 20mM Hepes (pH 7.6), 120mM KCl, 5mM, 醋酸镁, 6mM 巯基乙醇洗脱, 有峰的部位加在一起, 然后放在液氮中保存, 活性可以保持 6 个月。

2. 体外蛋白质合成试验 反应总体积可以随实验条件而变化, 如反应总体积为 50 微升, 则可加入上述 S-30 制剂 10—20 微升, 另加 20 mM Hepes (pH 7.6) 2mM DDT, 1mM ATP,

20μM GTP, 8mM 磷酸肌酸, 40 微克/毫升肌酸激酶, 20—30μM 未用同位素标记的氨基酸, 3mM MgCl₂, 100mM KCl 以及标记氨基酸及适量的 m-RNA, 在 25℃ 时反应 90 分钟。

三、体外翻译产物的分析

目的在于鉴定 m-RNA 或其体外指令合成蛋白质的能力, 最终反应产物可以用三氯醋酸沉淀产物于滤纸片上, 然后测定同位素标记的氨基酸渗入产物的放射性, 但在大量的分子生物学研究中, 单纯的鉴定有无产物常是不够的, 例如常需鉴定病毒核酸的体外产物和它在宿主细胞内的产物是否一致, 如果不一致, 是否存在翻译后的修饰等。所以常可对体外翻译产物以下列三种方式进行鉴定: 1. 用 SDS 聚丙烯酰胺电泳分离产物并测定其分子量。2. 用电泳或微量柱层析方法分离所需的蛋白质, 再进行单相或双相的指纹图谱分析。3. 用免疫沉淀的方法获得所需的蛋白质, 再进行生化分析或生物活性的测定。

四、技术上要注意的几点

1. 被翻译的 m-RNA 必须是完整的, 体系中没有抑止蛋白质合成的因子。2. 对于每一种 m-RNA 或每一批新制备的无细胞体系, 其最适的体外合成条件是不同的, 其中最主要的是 K⁺ 及 Mg⁺⁺ 的离子强度, 因此必须在实验中确定 K⁺ 及 Mg⁺⁺ 的离子强度。3. 对于一定体积的体外翻译体系 m-RNA 的量也是一定的, 到达一定浓度后, 其合成能力即达到饱和, 如果过多地加入核酸, 相反会引起抑止作用, 这也需要在实验中进行确定。

五、有关植物病毒核酸体外翻译研究进展

应用体外翻译体系来研究植物病毒的基因及基因产物的文献报道为数很多, 在此仅举棒状病毒-烟草花叶病毒 TMV 及球状病毒-雀麦花叶病毒 BMV 为例介绍如下:

1. TMV 是一个长为 300 毫微米, 宽为 18

毫微米的棒状病毒,其 RNA 既具有信使又有模板作用,分子量为 2.1×10^6 ,有 6400 个核苷酸。病毒仅有一种外壳蛋白,分子量为 17,500。关于 TMV-RNA 的信使性质的研究至今已有 15 年的历史,其中有两个问题一直使研究者迷惑不解: (1)根据病毒核酸的大小,其密码蛋白质的分子量应达 230×10^3 ,大大超过其外壳蛋白。(2)从 1967 年开始,不少实验室利用各种不同的体外翻译体系,如大肠杆菌,麦胚和网状细胞溶胞产物等都不能获得外壳蛋白,所翻译的蛋白质为分子量从 10×10^3 到 140×10^3 一系列大小不同的肽链。有人认为,这是由于 TMV-RNA 不是一个强有力的有效的模板,但实验证明,外壳蛋白的基因的确存在于这一核酸的基因组内,因此设想,在体内一定存在某些机制来促进外壳蛋白基因的表达,而这样的机制在体外翻译的条件下并不存在。体外翻译实验证明,这种机制之一就是存在一种亚基因形式的 m-RNA (Subgenomic RNA),而 TMV 外壳蛋白的基因就是这样一种 RNA。在被感染的烟草组织及原生质体中的确存在有一种低分子量的 RNA (LMC-RNA),而在病毒中并不存在,分离出来的 LMC-RNA 在几种不同的无细胞体系中,能够有效地进行翻译,其产物和外壳蛋白无区别。除上述 LMC-RNA 外,在从提纯的 TMV 制剂中还分离到一种中等大小的 RNA,其分子量为 $0.6-1.6 \times 10^6$ 。统称为 I-RNA。I-RNA 及 LMC-RNA 均存在 TMV-RNA 的基因组内。I-RNA 的体外翻译产物的分子量为 30,000。I-RNA 和 LMC-RNA 虽共有 3' 末端,但从酶解图谱来看,两种蛋白质都没有共同肽段。除了外壳蛋白以外,在烟草病叶和原生质体中还发现有两种与病毒有关的蛋白质。 L_1 分子量为 $120-140 \times 10^3$, L_2 为 $150-165 \times 10^3$ 。这两种蛋白质的合成高峰出现于外壳蛋白合成之前。在体外翻译实验中,也发现有两种大分子量的蛋白质,分别为 130×10^3 及 160×10^3 。指纹图谱鉴定,体外合成的 130×10^3 和体内合成的 L_1 是一样的。

虽然到目前为止, TMV 基因组的结构和

功能还有很多方面没有了解,但由于无细胞翻译体系的应用结合其它的一些实验结果,对于上述的两个问题已经有所阐明:

(1) L 蛋白质的分子量为 160×10^3 (L_2 含有 L_1 的整个片断),加上 30×10^3 和外壳蛋白 17.5×10^3 ,被翻译的蛋白质总分子量为 207×10^3 , TMV-RNA 的编码能力为 230×10^3 ,所以为其 90%,这一数字和其它一些原核生物的 m-RNA 和噬菌体 RNA 的数据基本一致。

(2) 根据上述, TMV-RNA 的全部遗传图谱可用下图表示(见图 1)

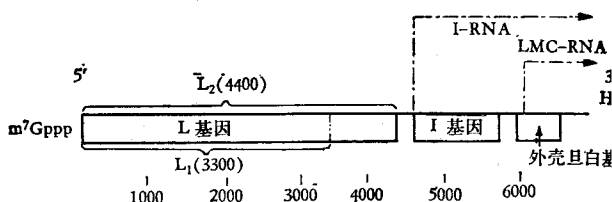


图 1

2. 雀麦花叶病毒 BMV 是一种直径为 25—30 毫微米的球状病毒。三种大小相同的病毒质粒含有四种分子量不同的 RNA,即两种病毒质粒分别含有 RNA₁ 及 RNA₂,而第三种病毒质粒含有另二种 RNA,即 RNA₃ 及 RNA₄。RNA₁₋₃ 为感染所必需。外壳蛋白的分子量为 20×10^3 。从麦胚的体外翻译证明, RNA₁ 及 RNA₂ 分别指令合成分子量为 110 及 105×10^3 的两种蛋白质,这两种蛋白质的分子量可达其核酸编码能力的 90%。RNA₃ 具有 2300 个碱基,能编码分子量为 85×10^3 的蛋白质。结构及遗传的研究证明 RNA₃ 是一个双基因组,其中一个基因可以翻译成分子量为 35×10^6 的蛋白质,可能是 RNA 聚合酶的一部分,另一基因是编码外壳蛋白的,但在 RNA₃ 内这一基因组被关闭而不工作。RNA₄ 具有 850 个碱基,除两端的非基因组区外,中间约 550 个碱基编码外壳蛋白,在无细胞体系中,可以体外合成。

在很多的无细胞体外翻译体系中,四种混合物的主要翻译产物为外壳蛋白。

应该指出,无细胞体外翻译体系虽给我们提供了一个十分有用的手段,但病毒蛋白质合

成的很多机理问题,到现在仍然不很清楚,摆在我们面前的仍是一个引人入胜的未知世界。

参 考 文 献

- [1] Nathans, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 1421, 1962.
- [2] Lockord, R. E., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 204, 1969.
- [3] Pelham, H. R. B., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **67**,

- 247, 1976.
- [4] Efron, D.: et al.: *Virology*, **53**, 343, 1973.
- [5] Carlier, A. R., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **447**, 436, 1976.
- [6] Srivatsan, E. S., J. D. Indian: *J. Biochem. Biophys.*, **13**, 284, 1976.
- [7] Mathews, M. B., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **17**, 328, 1970.

[本文于1982年10月7日收到]

蛇 毒 蛋 白 的 双 向 电 泳

(一种快速简便不含变性剂的双向电泳技术)

蒙义文 莫卫平 徐维政 陈素文

(中国科学院成都生物研究所)

自 Kaltschmidt 和 Wittmann (1970) 用碱一酸系统的双向凝胶电泳法成功地分析了大肠杆菌核糖体蛋白的组分以来,双向电泳技术得到不断的发展与改进,成为分析复杂蛋白质混合物的有效工具。

为了建立一种程序简单、操作方便、保持天然蛋白质活性的高分辨力的双向电泳技术,我们在前人^[5-10]工作基础上作了部分修改,设计了在整个过程中不用蛋白解离试剂,并用普通的丙烯酰胺盘状电泳作第一向,把分辨力高的薄层电聚焦作第二向,对蛇毒蛋白进行了双向电泳分析,效果较好。

一、材料和方法

材料 蛇毒蛋白,采用辽宁蛇岛的蛇岛蝮 (*Agkistrodon Shedoensis zhao*) 的蛇毒蛋白。

贮液配法 (1) 30% 的丙烯酰胺溶液;(2) 分离胶缓冲液:1N KOH-醋酸缓冲液(pH4.3);(3) 20% 丙烯酰胺溶液;(4) 浓缩胶缓冲液:1N KOH-醋酸缓冲液(pH6.7);(5) 0.04% 核黄素溶液;(6) 电极缓冲液:β-丙氨酸-醋酸缓冲液(pH4.5)。以上配法参照 Gabriel (1971) 推荐的酸性和碱性盘状电泳的方法。(7) 0.01%

次甲基蓝水溶液;(8) 20% 蔗糖溶液;(9) 40% (W/V) Ampholine 溶液;(10) 87% 甘油溶液;(11) 固定液、染色液、退色液及保存液等均参照 LKB 公司推荐的程序 (Djupsund 1976)。

实验方法

1. 第一向电泳(酸性盘状电泳) (1) 灌胶、聚合 采用内径2.8mm 外径8mm 长105mm 的匀质玻管,涂上0.1% 吐温,干燥后灌胶;7.5% 的分离胶混合液为30% 丙烯酰胺溶液:分离胶缓冲液:核黄素溶液:蒸馏水,(2:1:1:4),混合后抽气10分钟,立即灌胶,8ml 混合液可灌12管,室温下,2×20瓦荧光灯照射聚合约40分钟后灌浓缩胶;3.3% 浓缩胶混合液为20% 丙烯酰胺溶液:浓缩胶缓冲液:核黄素:蒸馏水,(1:1:1:3);灌柱高10mm,同前光聚合约30分钟后即可使用。(2) 加样 取蛇毒蛋白样品2mg 溶于60μl 的20% 蔗糖溶液中,加少许次甲基蓝溶液,每管加入样品约1mg/30μl。(3) 电泳 采用通常盘状电泳用的圆筒形电泳槽,其中上下槽各盛约1升电极缓冲液,上槽接电源正极,下槽接负极,样品走向从正到负,电泳时采用恒定电流1.5mA/管,指示剂(次甲基蓝)走到胶柱末端后,再电泳半小时,共约4小时。(4)