

网织红细胞破碎液中蛋白质生物合成抑制的测定

应文斌* 张振范 王庆诚

(中科院上海生物化学研究所, 上海)

提 要

本文介绍了一种定量测定蛋白质合成抑制剂活性的方法。该法是通过同位素氨基酸掺入的测定, 观察抑制剂对兔网织红细胞破碎液的蛋白质生物合成的影响而评价抑制剂的作用强度。

引 言

许多细菌和植物毒素, 例如白喉毒素, 绿脓杆菌外毒素, 蓖麻毒蛋白、相思子毒蛋白和天花粉蛋白等都具有抑制蛋白质合成的能力。它们的作用机制和强度并不一样, 为了定量地测定这些毒蛋白的活性, ^3H 或 ^{14}C 标记的氨基酸在无细胞系统合成的蛋白质的掺入已被广泛地作为检测手段。

在无细胞蛋白质生物合成系统中, 最常用的是兔网织红细胞破碎液。Herbert 等^[1,2]最早应用这个系统来测定蛋白质生物合成; Jackson 等人^[3-5]又作了改进。正常家兔用苯胂造成溶血性贫血后, 代偿性地由骨髓中的干细胞分化出较多的网织红细胞; 这种红细胞有很强的球蛋白合成能力, 因为这种红细胞中的每一个核糖体大约能启动 10—15 个肽链的合成; 尤其在加入氯化血红素 (Hemin) 后, 这种合成能持续较长的时间。因此, 带有同位素标记的氨基酸, 在这种系统中就可被合成为带标记氨基酸的蛋白质。

我们在研究毒蛋白的过程中, 建立了无细胞蛋白质生物合成抑制的测定技术, 发现该方法不容易达到定量程度。本文介绍的是我们在这一工作方法上的一些改进。

材 料 和 方 法

1. 材料

磷酸肌酸激酶、Hemin、ATP、GTP、放线菌酮为 Sigama 产品, 明胶为 E. Merk 产品; ^{14}C -亮氨酸为 Amersham 产品; ^3H -亮氨酸为中科院上海原子核研究所产品。新西兰家兔购自中科院上海动物中心; 蓖麻毒蛋白由本实验室自行制备。其它试剂均为分析纯或市售生化试剂。

2. 试剂

溶液 A 0.64mg Hemin 溶解在 0.1ml 2mol/L, Tris-HCl, pH7.7 缓冲液中, 然后加 0.9ml 丙三醇, 4℃, 15 000g × 30' 离心, 上清作为溶液 A。

溶液 B 4mg 磷酸肌酸激酶溶解在 2ml 50% 甘油中。

溶液 C 145.2 mg 磷酸肌酸在 2ml 蒸馏水中溶解。

溶液 D 151.2mg ATP、31mg GTP 用蒸馏水溶解后以氢氧化钾调 pH 7.2, 补充蒸馏水至 10ml。

溶液 E 氨基酸混合液 (每 100 毫升中毫

* 上海中医学院中药系。

克)

精氨酸 10.5; 门冬酰胺 6.6; 胱氨酸 12; 谷氨酰胺 7.3; 异亮氨酸 6.6; 蛋氨酸 7.5; 色氨酸 10.2; 酪氨酸 0.9; 组氨酸 41.9; 甘氨酸 15; 谷氨酸 29.4; 门冬氨酸 26.6; 脯氨酸 11.5; 苏氨酸 17.8; 丝氨酸 21; 苯丙氨酸 24.8; 丙氨酸 26.7; 缬氨酸 35.1; 赖氨酸 36.5。

以上溶液以 0.1—0.3ml 分装贮于 -20℃ 备用。

溶液 F 2mol/L KCl; 10mmol/L MgCl₂; 4℃ 保存。

溶液 G 10mmol/L, Tris-HCl; pH 7.7 缓冲液。

溶液 H 含 0.02% 明胶的溶液 G。

3. 兔网织红细胞破碎液 (lysate) 的制备、贮存

新西兰家兔 (2.5—3kg) 每天用新配的经中和 (pH 7.0) 的 2.5% 盐酸苯胍 (W/V); 经皮下多点注射 0.8—1ml; 通过家兔眼睛观察贫血程度, 或依文献^[6]方法来检测兔血中网织红细胞的比例; 约 5—6 天家兔贫血后; 停止注射一天, 于第二天通过颈动脉或心脏穿刺取血。将抗凝血球用 1.5 倍量的生理盐水洗涤后; 冷冻离心 (2500g × 20') 共三次, 得到的兔血细胞用等体积的 4℃, 2mmol/L 氯化镁与细胞混合, 剧烈搅拌十分钟, 冷冻离心 (18000g × 30min); 得上清溶胞产物 (lysate) 以每份 300μl 或 800μl 分装贮于液氮中。以上实验应在低温下尽快操作。本实验使用通过三次制备并取于十只家兔的不同 lysate。

4. 抑制剂的配制

放线菌酮用溶液 G 配制。蓖麻毒蛋白或免疫毒素用 3% 巯基乙醇、37℃ 还原半小时然后以溶液 H 稀释。天花粉蛋白不需还原仅用 H 稀释。

5. 网织红细胞破碎液蛋白质合成抑制测定

每一测定管总体积 60μl, 其中抑制剂以 H 稀释到 20μl; lysate 用溶液 G 稀释到 20μl; 溶液 A、B 各 2.4μl, C、D、F 各 2.04μl, E 4.08μl, ³H-亮氨酸 1—1.5μCi, 并以 G 稀释到 20μl。在

预冷的试管中依次加入上述三液, 混匀; 37℃ 温育 1 小时; 取出 50μl 于 1ml 含 0.3% 双氧水的 0.1mol/L KOH 终止反应并脱色 30—60 分钟; 加入 50% 三氯乙酸使其终浓度为 10%; 用玻璃纤维滤纸收集蛋白质沉淀; 以 5% 三氯乙酸和 95% 乙醇依次洗涤滤纸; 烘干后的滤纸在 5ml 含 0.3% PPO (2, 5-二苯基噁唑) 和 0.04% POPOP [1, 4-双-2-(5-苯基噁唑基) 苯] 的二甲苯中由液闪仪测定同位素掺入量 (CPM 或 DPM); 并以下式计算合成率:

$$\% \text{合成率} = (\text{CPM}_{\text{样品管}} - \text{CPM}_{\text{空白管}}) / (\text{CPM}_{\text{对照管}} - \text{CPM}_{\text{空白管}})$$

结果和讨论

1. 同位素种类对结果的影响

³H 或 ¹⁴C 标记的氨基酸均可用于该实验。但为获得相同的对照管脉冲数, 使用 ³H-氨基酸的实验其空白管脉冲数就较高; 结果见表 1。

表 1 两种同位素对蛋白质合成的 cpm_{空白管}/cpm_{对照管} 值的影响

同位素	cpm* _{对照管}	cpm* _{空白管}	cpm _{空白管} /cpm _{对照管}
³ H-亮氨酸	13558.48	1753.00	12.9%
¹⁴ C-亮氨酸	11439.0	304.99	2.6%

* n = 2。

2. 同位素剂量的确定

同位素用量在无细胞蛋白质生物合成中是一个重要的限制因素, 当使用固定量的 lysate 时, 在一定范围内同位素的用量与掺入量成正比; 而该范围又取决于 lysate。图 1 示出当使用 5μl lysate 时, 用 1μCi 的 ³H-亮氨酸已获最大的掺入。由此提示, 选用合理的同位素剂量, 可降低相对误差而使实验获得较好的结果。

3. lysate 用量的确定

由于实验家兔的个体差异, 所以同样剂量的苯胍所致贫血程度不一致, 故其网织红细胞比例不尽相同, 由此产生的不同溶胞产物合成球蛋白的能力相差很大。为使实验获得相对稳定的掺入量, 就必须选用不同量的 lysate。根

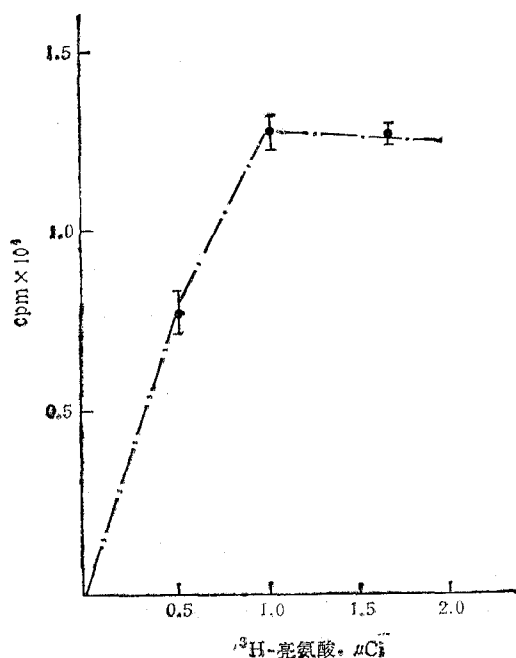


图1 同位素用量与掺入量的关系

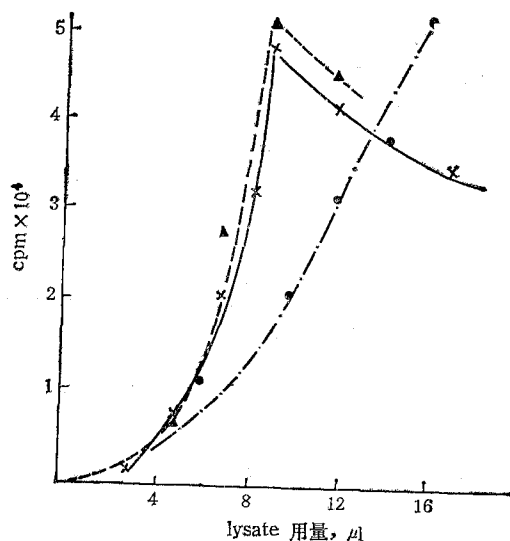


图2 不同 lysate 的剂量与掺入的关系

—▲— lysate I; —×— lysate II;
---●--- lysate III

据本方法,在 $1.5\mu\text{Ci}$ ^3H -亮氨酸条件下,用不同体积的 lysate 进行测定(图2)。lysate I、II 均在 $8.5\mu\text{l}$ 时获得最高掺入,而 lysate III 直到 $10\mu\text{l}$ 时掺入还趋于升高,这进一步证明了合理选择 lysate 量是必要的。

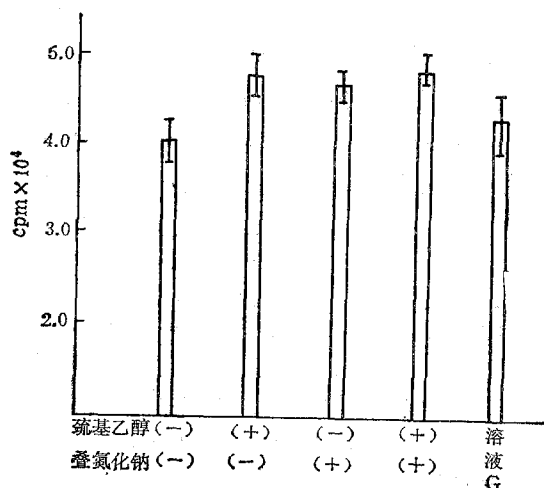


图3 巯基乙醇、叠氮钠对测定的影响

(+) 示体系中加入此项; (-) 示体系中加入此项

4. 巯基乙醇及叠氮钠对蛋白质合成的影响

为了评价毒蛋白等的活力,常需将毒蛋白或免疫毒素还原后测其活性簇的活力,所以在无细胞系统中加入巯基乙醇防止二硫键形成而影响活性簇的功能,图3证明体系中加入0.03%的巯基乙醇对同位素掺入无影响;另外两组数据表明0.02%叠氮钠及0.02%明胶也不影响测定结果;这提示了测定前的蛋白质溶液中加入叠氮钠有利于样品的保存而明胶的加入则有助于在高度稀释时的抑制剂不被容器吸附,使测定灵敏度得以提高。

5. 本底(空白)的测定

由于本测定方法中所含蛋白质的量较多,

表2 本底测定方法及结果

试剂	溶液G	3mol/L KOH	1mg/ml 亮氨酸	10mmol/L 放线菌酮	无 lysate	滤纸
cpm	8394*	273*	491*	544*	256**	105**

* $n = 3$; ** $n = 2$ 。

随标记氨基酸的增加,其非专一性吸附也就增加,可用表 2 中的方法扣除本底。

6. lysate 的保存对结果的影响

表 3 表示 lysate 经冻化后对掺入的影响,第一次从液氮中取出 lysate 分作二份,一份测活另一部分于 -20°C 放置 24 小时;第二次实验分别使用液氮中新取的 lysate 以及在 -20°C 放置 24 小时的样品。结果表明,冻化一次活性损失近 50%。有经验证明,经反复冻化后可使其生物合成能力完全丧失。所以低温、快速制备及小剂量分装 lysate 是必要的。

表 3 冻化后的 lysate 对掺入的影响

	第一次实验	第二次实验	
lysate	新 lysate	新 lysate	冻化后 lysate
cpm	8118; $n=2$	8000; $n=4$	4041; $n=4$

7. 抑制剂对不同 lysate 的作用

家兔的个体差异不仅表现为合成蛋白质能力的差异,而且也对不同抑制剂表现出不同的敏感性,如图 4 所示。进一步的研究我们发现

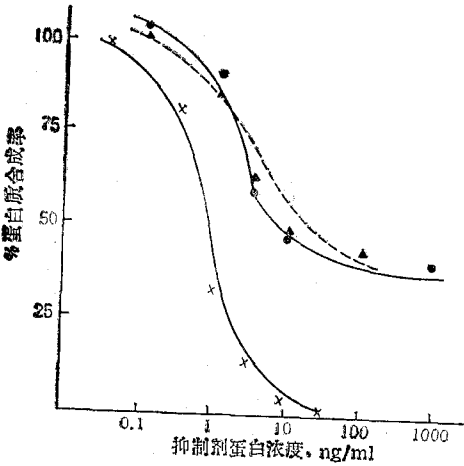


图 4 不同 lysate 对抑制剂的敏感性

——●——: 天花粉蛋白对 lysate I; ---▲---: 蓖麻毒蛋白对 lysate I
——×——: 天花粉蛋白对 lysate II; ---○---: 蓖麻毒蛋白对 lysate II

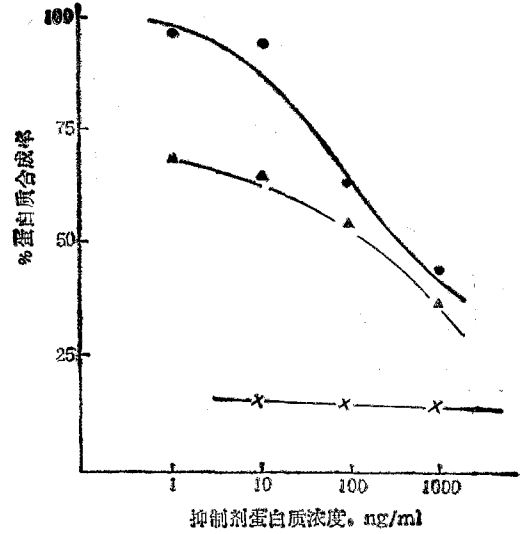


图 5 与 lysate 预保温后天花粉蛋白作用强度的比较

——●——: 预保温 20 分钟; ———▲——: 预保温 40 分钟
——×——: 预保温 60 分钟

对天花粉蛋白不敏感的 lysate 经与天花粉蛋白预保温后又可显示抑制强度的提高(图 5)。

综合以上结果,我们可以看到,影响网织红细胞蛋白质生物合成抑制测定的原因虽然较多,但只要较好地了解其原因,要达到定量测定的标准也是可能的。

参 考 文 献

- [1] Wooddard, W. R. et al.: *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. eds), Academic press, New York, 1974, 30, 724—731.
- [2] Godchaux, W. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1967, 27, 57.
- [3] Hunt, T. and Jackson, R. J.: *Modern Trends in Human Leukaemia* (Neth, R. et al. eds) J. F. Lemmanns Verlag, Munich, 1974, 300.
- [4] Hunt, T. et al.: *J. Mol. Biol.* 1972, 66, 471.
- [5] Pelham, H. R. B. et al.: *Eur. J. Biochem.* 1976, 67, 247.
- [6] 徐叔云等主编:《药理实验方法学》,人民卫生出版社, 1982, 827.

[本文于 1988 年 9 月 7 日收到]