

开始都是先合成较大的前体,通过膜以后才能转变成‘成熟’的形式。这种形式一旦形成以后就不再能穿越膜。多肽或蛋白质前体穿越线粒体膜是一个需能过程,但这一过程与(1)中所述蛋白质穿越细胞内其它一些膜系不同。新生多

肽穿越线粒体膜时,合成过程已经停止。换言之,蛋白质穿越膜的过程并不伴随合成过程。这些差异的生物学意义是什么?这是一个很有趣并值得进一步探索的问题。

应用免疫技术纯化特异性 mRNA

静国忠 陈建文

(中国科学院生物物理所三室)

真核基因表达的调控的研究,是分子生物学最活跃的领域之一。为了深入地对这一问题进行研究,分离特定蛋白质的信使 RNA(mRNA)及其基因(DNA)是非常之必需。由于 mRNA 分子的长度随其所编码的多肽链的长度不同而有很大的差别,因此按其分子量的大小和密度,通过密度梯度超离心的方法,从理论上来说可以得到不同的 mRNA。然而到目前为止,用此法只从特定组织或细胞中分离纯化几种蛋白质的 mRNA,如分别从网织红血球、蚕丝腺以及早期海胆胚及同步的 Hela 细胞中分离纯化了血红蛋白、丝蛋白及组蛋白等 mRNA,由于这些 mRNA 多半是这些组织和细胞中 mRNA 的主要组份,所以便于直接分离。如果从一个特定的蛋白质出发,我们是否可以得到此蛋白的基因呢?回答是肯定的!多核糖体(Polyribosome 或 Polysome 以下简称多体)免疫技术为我们分离特定蛋白质的基因,提供了一个特异的方法。其最主要的特点是,只要我们得到一个高纯度的蛋白质,通过免疫技术就可以得到此蛋白的 mRNA,再通过反转录便可得到其特定基因。多体免疫技术正不断完善,已从直接免疫沉淀法过渡到特异性更强的间接免疫吸附法(即间接免疫亲合层析法)。利用这些技术,已成功地分离纯化了鸡卵白蛋白 mRNA,小鼠骨髓瘤轻链 mRNA、鸡组蛋白 VmRNA,绵羊酪蛋白 mRNA 以及大鼠肝白蛋白 mRNA 等,

并通过遗传工程的手段将其中某些蛋白的基因(如卵白蛋白基因)进行 DNA 分子的体外重组,在大肠杆菌中得以扩增。

本文就多体免疫技术及其在 mRNA 及基因分离中的应用作一简要的评述。

一、多体免疫技术的一般原理

mRNA 的前体即核不均一 RNA(heterogeneous nuclear RNA)从 DNA 模板转录之后,在 PolyA 合成酶的作用下,于 3'-末端加上多聚腺苷酸,再经过选择性的降解才最后形成成熟的 mRNA,进入细胞质中。在细胞质中, mRNA 同核糖体结合形成多体,开始进行蛋白质的合成。在一个生长旺盛的细胞中,同时进行着很多蛋白质的合成,因此会有各种各样的多体。如何从中分离出合成特定蛋白质的多体呢?这就是多体免疫技术所要解决的问题。

多体免疫技术的原理就在于:特定蛋白质所产生的抗体,能特异性地同正在合成此蛋白质的多体上的新生肽链相反应,利用这一性质我们就可以分离获得此种蛋白质的多体,最后从中分离得到这种蛋白质的 mRNA。因此,我们首先应该(1)通过各种蛋白质的分离纯化技术,得到特定高纯蛋白质作为抗原物质。(2)制备无 RNase 活性的特定蛋白质的抗体。最初将家兔用特定抗原进行免疫后,用硫酸铵分部沉淀的方法得到 γ -球蛋白组份,然后通过

DEAE-纤维素-CM-纤维素柱层析, 得到合格的特异性抗体。近来广泛采用了亲和层析的方法, 即将特定抗原结合到被 CNBr-活化的 Sepharose 上, 将所得的特异性抗体 (γ -球蛋白) 组份在此柱上进行亲和层析, 便可得无 RNase 活性的特异性抗体。为保险起见, 亲和层析后的样品, 可再通过 DEAE-纤维素—CM-纤维素柱纯化。(3) 多体的分离: 要分离纯化特异性多体, 首先要得到含有各种多体的混合制剂。一般是将组织在缓冲液中匀浆, 通过适当的离心取上清液, 然后通过不连续的蔗糖梯度离心, 即可得到多体的混合制剂。必须注意的是, 所用的缓冲液必须含足够量的肝素(100—500微克/毫升), 以便有效地抑制 RNase 活性, 所用的器皿必须严格处理, 以防 mRNA 在分离过程中被污染的 RNase 降解。多体制剂可在 -70°C 保存备用。上述三个条件具备之后, 我们便可着手分离特异性的多体。

二、特异性多体的分离方法

1. 直接免疫沉淀法

将混合多体同特异性的抗体在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 保温, 抗体同多体上的新生肽链进行特异性的免疫反应, 产生特异性多体-抗体复合物, 此种复

合物并不沉淀下来, 当顺序加入特定抗原和足够过量的抗体后, 特异性的多体即形成沉淀析出。有人用此法首先分离纯化了合成鸡卵白蛋白的多体, 并进一步得到鸡卵白蛋白的 mRNA, 在离体的蛋白合成体系中, 此 mRNA 能指导完全的卵白蛋白链的合成^[1]。它的缺点是: (1) 当大量分离特异性多体时, 需要大量的抗体蛋白。(2) 由于大量抗体蛋白的存在, 增加了 RNase 的污染机会, 在多体分离过程中容易造成 mRNA 降解。(3) 沉淀反应产生时, 容易将一定量的非特异性多体一同带下来, 给 mRNA 进一步纯化带来困难。为了克服直接免疫沉淀法的不足, 人们提出了直接免疫吸附法(直接免疫亲和层析)。

2. 直接免疫吸附法

此法是基于合成特定蛋白质的多体, 通过其新生的肽链同特异性的抗体反应, 形成多体-抗体复合物, 此复合物进一步同共价交联于固体支持介质上的特定蛋白质(抗原)相反应, 特异性地吸附到支持介质上。非特异性的多体可以从支持介质上洗下除去, 而特异吸附在支持介质上的抗体-多体复合物, 用含 EDTA 的缓冲液洗脱、解离, 得到含特异性 mRNA 及核糖体亚基的混合清液。此原理如图 1 所示。

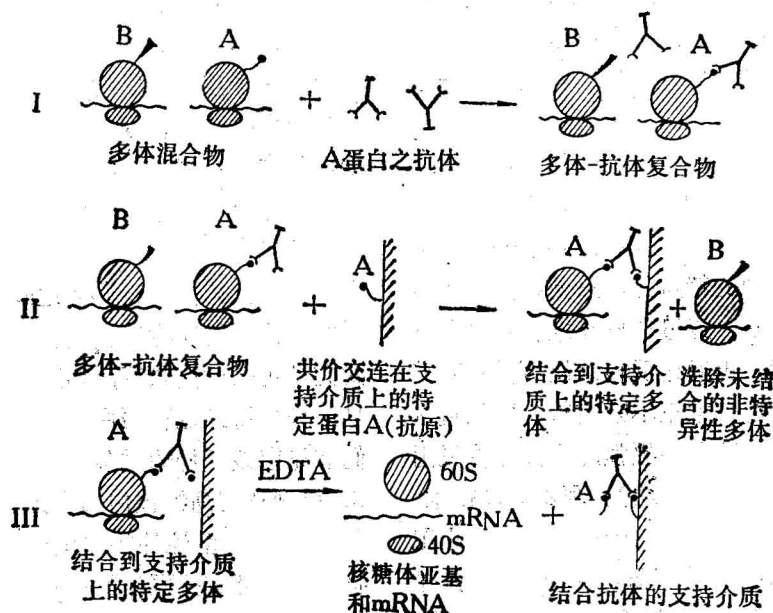


图1 直接免疫吸附图式

此方法的优点是：直接免疫吸附较之直接免疫沉淀法有较高的特异性，因为它可以通过充分地洗脱，除去固体支持介质上的非特异性多体。Palacios 等人曾用戊二醛同卵白蛋白(抗原)共价交连形成的固体支持介质，通过直接免疫吸附法制备了合成卵白蛋白的多体，其纯度可达 95% 以上^[2]。但是直接免疫吸附法需要大量的纯蛋白(抗原)，去制备挂上特定抗原(蛋白质)的固体支持介质。众所周知，卵白蛋白占输卵管蛋白合成总量的 60% 左右，因此用直接免疫吸附的方法有其方便之处，但对于不能得到大量纯蛋白的体系而言，用此法就会产生困难。为克服此困难，人们试图将特定蛋白的抗体直接共价交连在支持介质上进行亲合层析，但当用此法制备卵白蛋白多体时，产率非常之低。为弥补直接免疫吸附之不足并提高其分离的特异性，提出了间接免疫沉淀法。

3. 间接免疫沉淀法(双抗体技术)

所谓间接免疫沉淀即是从特定的纯蛋白质(抗原)得到的抗体，再在另一种动物体内免疫，得到此蛋白抗体的抗体，称为抗-抗体(anti-antibody)，为分离得到特定的多体：(1)将多体制剂同特定蛋白质的抗体进行保温，此抗体同合成该蛋白多体上的新生肽链相结合，形成可溶性的抗体-多体复合物。(2)将复合物同抗-抗体一起保温，形成不溶性的抗-抗体-抗体-多体复合物。(3)免疫沉淀物通过不连续蔗糖梯度离心沉降，即得到所要的特异性多体。

间接免疫沉淀的特点是：(1)在制备合成特定蛋白质的多体时，免疫沉淀物是通过此蛋白的抗体同抗-抗体的特异性反应形成的，因此特异性更高，用此法制备的合成卵白蛋白的多体，其纯度可达 99% 以上，非特异性多体的污染只占 0.4%^[3]。(2)在间接免疫沉淀反应中不需要高纯抗原(特定蛋白质)，因此可适用于不能被大量纯化的蛋白质的多体之分离。用此法分离纯化了合成鼠肝白蛋白的多体及其 mRNA，其纯度可达 95% 以上^[3]。近来报道，用此法得到的鼠肝白蛋白 mRNA 纯度更高^[4]。鼠肝白蛋白同鸡卵白蛋白不同，其只占肝细胞蛋白合

成总量的 10—11% 左右。由此可见，间接免疫沉淀可作为一般蛋白质多体分离的手段。(3)用此法分离纯化得到的多体，其 mRNA 的产率较直接免疫吸附法高。从卵白蛋白多体及鼠肝白蛋白多体中得到的 mRNA，其产率分别为 60—70% 及 70—80%，而用直接免疫吸附法所得到的卵白蛋白多体，其 mRNA 之产率只有 30% 左右。(4)间接免疫沉淀即双抗体法，为得到特定多体的沉淀物，必须首先用抗原-Sepharose 亲合层析法来纯化抗体，有了纯化的抗体，就可以减少非特异性的吸附的程度，减小免疫沉淀物的体积，提高了分离的特异性。

综上所述，间接免疫沉淀法较之直接免疫沉淀和免疫吸附法，其特异性和产率都有了很大的提高，是当前分离纯化特定多体时广为采用的方法。其美中不足之处是，作为一种沉淀反应，总避免不了会掺杂少量的非特异性多体，这个缺点在分离像合成卵白蛋白、大鼠肝白蛋白(占细胞内蛋白合成总量的 10—60%)的多体时尚不明显，而如果通过此法分离一般的合成酶蛋白的多体时(这种酶蛋白一般只占细胞内蛋白合成总量的很小比例)。由于在沉淀反应中的非特异性吸附，多体的非特异性沉淀就变得明显起来，为更好地改善分离效果，近来又将间接免疫沉淀法发展为间接免疫吸附，即间接免疫亲合层析法。

4. 间接免疫吸附

此法同直接免疫吸附的原理类似，就是将抗-抗体共价连接到不溶性固体支持介质上，抗体-多体复合物通过所谓结合反应(Binding reaction)特异性地结合到支持介质上，在原则上可以更有效地去除非特异性多体的污染。其原理如图 2。

Schutz 等人的实验指出，PAB 纤维素(Mergerig para aminobenzyl-Cellulose)适于作为结合抗-抗体的支持物，因为其结合效率高(抗-抗体可通过偶氮化反应同其偶联)，而且非特异性吸附很小。他们用此方法从鸡输卵管多体中，分离纯化了卵白蛋白的 mRNA，纯度达 99% 以上，而非特异性污染小于 0.1%。在无细胞体系

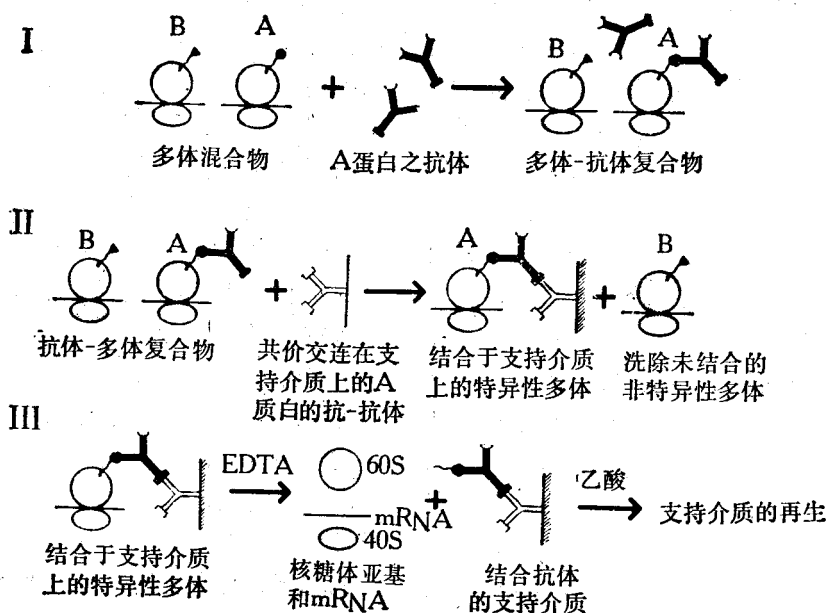


图2 间接免疫吸附(亲和层析)法图式

中所合成的蛋白质与天然卵白蛋白相同,并能 为卵白蛋白抗体 (anti-ovalbumin antibody) 所沉 淀^[5]。

以上,我们概要地介绍了多体免疫技术及其在特异性多体分离中的应用,这是分离特定 mRNA 进而得到特定蛋白的结构基因的第一步,也是关键性的一步。

三、mRNA 的分离、纯化及检测

1. mRNA 的分离纯化

多体免疫沉淀法得到的多体,一般溶于含 2% SDS 缓冲液中,通过线性蔗糖梯度离心,除去蛋白质, tRNA 和缓冲液中的肝素,所得 RNA 组份制成 0.2 M NaCl 浓度,用 2—2.5 倍体积的乙醇将 RNA 沉淀。用免疫吸附法所得到的含核糖体亚基和特异性 mRNA 的清液,首先用乙醇沉淀 RNA,再通过上述过程去蛋白,最后再用乙醇沉淀收集 RNA。这样得到的 RNA 是 mRNA 和 rRNA 的混合物。由于真核 mRNA 在其 3'-末端具有 Poly(A) 序列,利用 mRNA 和 rRNA 这一不同的物化特性,可将二者分离。mRNA 纯化一般可采用二种方法:一是通过纤维素过滤法,将 RNA 样品通过硝酸纤维

素滤纸、由于 rRNA 不用滤纸结合而除去,吸 附在滤纸上的具 Poly(A) 序列的 mRNA 可 用特定缓冲液洗脱,乙醇沉淀收集。二是通过 (oligocdT)-纤维素或 Poly(U)-Sephadex 亲和层 析, mRNA 上的 Poly(A) 特异性地同纤维素 或 Sephadex 上的 oligo(dT) 或 Poly(U) 结合, 达到纯化的目的。为提高 mRNA 纯度,可将 所得的 mRNA 样品,重复上述纯化过程,最大 限度地去除 rRNA 的污染。分离纯化 mRNA 有多种方法,可根据实际条件选择性的应用。

2. mRNA 特异性的检测

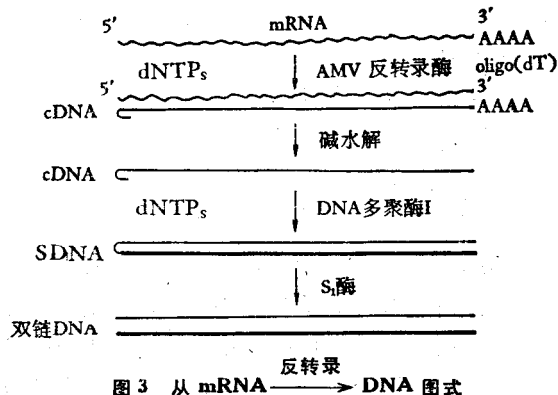
经分离纯化所得到的 mRNA,要对其纯度 及其生物活性进行检测。首先是用聚丙烯酰胺 凝胶电泳,确定其均一性,如通过纯化后的大鼠 肝的白蛋白,在电泳胶柱上形成一条带,其扫描 图谱为一左右对称的单峰,就说明其纯化效果 很好^[4]。经初步检测之后,还必须对其纯度及 其生物活性进一步检测,行之有效的办法是利 用体外蛋白合成体系,如利用兔网织红血球裂 解物,麦胚等无细胞蛋白合成体系使 mRNA 进 行翻译,经同位素标记的翻译产物,通过同特定 抗体产生特异性免疫沉淀来鉴别。也可进一步 走聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过放射自显影等方

法同标准蛋白的迁移率进行比较。此法灵敏度和特异性高,且简便易行,现已广泛采用。

特异性 mRNA 的分离纯化的完成,大大促进了对于真核基因表达的调控研究,并可作为制备互补 DNA 杂交探针,对 DNA 分子进行定量分析和基因分离。

四、从 mRNA 到 DNA——特定基因的分离

从 mRNA 得到特定蛋白质的基因,大体有三种方法,(1)广泛应用的方法是利用反转录酶将 mRNA 反转录成互补的 DNA 链(cDNA),用碱将 mRNA 水解,得到单链 DNA,然后用 DNA 多聚酶 I 合成双链(dsDNA),再用 S_1 酶将单链部分切去,即得特定蛋白的结构基因(图3)。用此法已经从卵白蛋白 mRNA 和骨髓瘤免疫球蛋白轻链 mRNA,分别合成鸡卵白蛋白、兔的 β -球蛋白以及骨髓瘤免疫球蛋白轻链等结构基因,并通过遗传工程的手段,将这些真核基因转入大肠杆菌进行无性繁殖。(2)将 mRNA 作为分子探针,同通过变性得到的单链 DNA 基因组杂交,钓出特定的结构基因。或者(3)将真核细胞 DNA 基因组,事先用限制内切酶消化,得到的 DNA 片段经变性,再同特定的 mRNA 杂交,得到特定蛋白质的结构基因。



总之,通过多体免疫技术,我们可以成功地从一特定的蛋白质开始,得到此蛋白的 mRNA,再从 mRNA 可以得到此蛋白的基因(DNA)。如果我们通过遗传工程的手段,将特定的真核基因同载体 DNA 进行体外重组,在大肠杆菌内进行扩增,我们就可以得到足够量的真核基因,有了大量的材料,便可以更方便地开展 DNA 分子一级结构的研究和真核基因表达的调控研究。目前通过多体免疫技术所得到的 mRNA,在体外无细胞体系中,可完全地翻译出特定的蛋白质,可是当从 mRNA 反转录得到 DNA 后,再用遗传工程的手段转入细菌细胞后,虽然体外重组的 DNA 分子可复制、扩增,然而要正确的表达还有不少问题需要解决:如是否在反转录时发生错误,还是重组分子在细菌体内发生交换重组呢?是原核细胞内的转录、翻译系统有时不能识别外来的真核基因,还是翻译产物被细菌的内原水解酶所降解而未能检测出呢?这一切正是当前研究的中心课题之一。不久前 Itakura 等人报道,用化学方法合成了一个哺乳动物多肽激素(Somatostatin 由十四个氨基酸所组成)的结构基因,利用人工粘末端同在质体 PBR 322 上的半乳糖苷酶基因相连,在大肠杆菌中得以表达,为我们进行这方面的研究提供了借鉴,也必将进一步促进有关真核基因在原核中表达的研究。

参 考 文 献

- [1] Paimiter, R. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, 247, 3296, 1972.
- [2] Palacios, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248, 540, 1973.
- [3] Shapiro, D. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 249, 3665, 1974.
- [4] Taylor, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 251, 7461, 1976.
- [5] Schutz, G. et al.: *Nucleic Acid Research*, 4(1), 71, 1977.

[本文于 1978 年 12 月 5 日收到]