

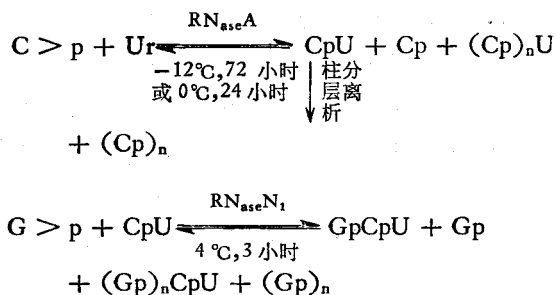
酵母 tRNA^{ala} 密码子 GpCpU 的酶促合成*

陈 德 高

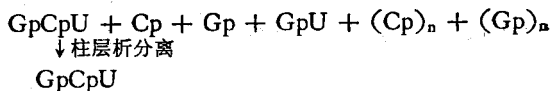
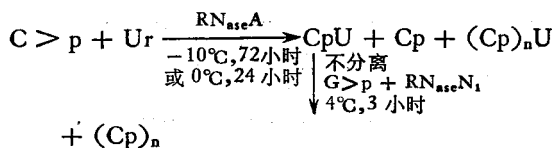
(中国科学院生物物理研究所)

tRNA 主要有两种生物学功能：一是接受相应的氨基酸，二是将此氨基酸转移到多肽链中。在后一功能中，tRNA 通过其反密码子同 mRNA 上相应的密码子形成互补碱基间的氢键配对，从而使氨基酸转移到由 mRNA 碱基顺序决定的多肽序列中。本工作合成酵母 tRNA^{ala} 密码子 GpCpU，将用于测验该 tRNA 的转移活性，即检查该 tRNA 能否通过其反密码子 3' CpGpI5' 同已结合在核糖体上的密码子 5'GpCpU3' 形成氢键配对而实现转移丙氨酸的功能。

迄今报道的关于制备寡核苷酸的方法,主要有三种:化学合成^[1]、酶解天然核酸^[2]和酶促合成^[3]。本工作用最后一种方法,用 $RN_{ase}N_1$ 和 $RN_{ase}A$ 催化合成了三核苷酸,所采用合成路线如下:



为了减少分离步骤,还摸索了“一步法”,即待 CpU 合成反应完成后,不经分离就直接在反应混合物中加入适量的 $G > p$ 和 $RN_{ase}N_1$:



材 料 和 方 法

酶和底物—— $\text{RN}_{\text{ase}}\text{A}$ 为英国 Light 产品, $\text{RN}_{\text{ase}}\text{N}_1$ 为本室从粗糙链孢霉提取^[4]。Gp、Cp 及 Ur 为上海试剂二厂产品。分别按 Smith 等^[5]用二环己基羰二亚胺和按 Michelson^[6]用氯甲酸乙酯从 Gp、Cp 制备 $\text{G} > \text{p}$ 、 $\text{C} > \text{p}$ 。用阳离子交换树脂 Amberlite IR-120 (NH_4^+ 型)将 $\text{G} > \text{p}$ 、 $\text{C} > \text{p}$ 转化为铵盐,再用 DEAE-纤维素 (HCO_3^-) 柱层析 ($0.01\text{--}0.2\text{M}\text{NH}_4\text{HCO}_3$) 除去未环化的核苷酸。

纸层析和纸电泳——分析时用 Whatman 一号滤纸,制备时用 Whatman 三号滤纸。分别用溶剂 1 (正丙醇:浓 $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 55:10:35$, 体积比) 和溶剂 2 (第三戊醇: $\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O} = 3:2:1$, 体积比) 进行单向下行纸层析,用溶剂 1 (第 1 向) 和溶剂 2 (第 2 向) 进行双向上行纸层析。在英制 Shandon 高压电泳仪上用缓冲液 1 (0.05 M 柠檬酸缓冲液, pH 3.5) 和缓冲液 2 (0.03 M 磷酸缓冲液, pH 7.1) 进行分析电泳。

* 黎高沃同志和常小迦同志曾参加部分工作。

本文所用缩写如下:

tRNA^{ala}, 丙氨酸转移核糖核酸;

tRNA, 转移核糖核酸;

RNaseA, 牛胰核糖核酸酶;

RNase N₁, 核糖核酸酶 N₁;

Gp, 3'-鸟嘌呤核苷酸;

Cp, 3'-胞嘧啶核苷酸:

Ur, 尿嘧啶核苷:

$G \succ p$ 和 $C \succ p$ 为 G_p 和 C_p 相应的 2',3'-环状核苷酸。

(6,000 伏, 1 小时) 和制备电泳 (3,000 伏, 2 小时)。

离子交换柱层析——将预先处理好的阴离子交换剂 DEAE-纤维素 (DE-11) (瑞典 pharmacia 产品) 或 DEAE-葡聚糖 A-25 (上海长征药厂产品) 装柱, 用 5 倍于柱体积的起始缓冲液平衡。经过除酶处理的反应混合物, 用 5 倍体积的起始缓冲液稀释, 调 pH 至 8.6, 上柱。用 3—5 倍于柱床体积的起始缓冲液洗柱, 最后进行直线浓度梯度洗脱。

CpU 的合成——标准反应混合物含有 0.15 M C > p、0.30 M Ur、0.125 M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8) 和 RN_{ase}A (30 微克/毫升)。此混合物于 -12℃ 左右反应 72 小时或于 0℃ 反应 24 小时。

GpCpU 的合成——标准反应混合物含有 0.08 M G > p、0.20 M CpU、0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 和 RN_{ase} N₁ (300 单位/毫升)。此混合物于 4℃ 反应 3 小时。

反应完成后酶的失活或去除——(1) 在合成 CpU 时采用酚法除酶: 加入 2 倍于反应液的重蒸酚, 剧烈摇动 5 分钟, 离心 (5,000 转/分, 5 分钟), 除去酚相, 重复 3 次。将各次酚相合并, 用等体积的水进行反抽提 (5 次)。合并全部水相, 用等体积乙醚萃取残留在水相中的酚 (重复 5 次)。减压抽除水相中的乙醚。(2) 在合成 GpCpU 时除采用上面的酚法外, 还采用如下两种方法: ① 0.04 M 二巯基丙醇 + 0.6 M NH₄OH, 37℃ 保温 15 分钟, 立即进行柱层析分离, 将分离到的产品反复用溶剂 1, 2 进行纸层析; ② “加酚电泳法”, 于反应液中加入等体积

重蒸酚, 剧烈摇动 5 分钟, 在冰箱中静置 20 分钟, 取水相进行制备电泳 (缓冲液 1, pH 3.5)。

分光光度计测定——用岛津紫外分光光度计测定底物、反应液及洗脱液的光密度。

产品的纯化——将产品溶液呈带状点在 Whatman 三号滤纸上, 于溶剂 2 中层析 20 小时, 剪下 R_f 值最小的紫外吸收带, 用水进行下行洗脱, 将洗脱液 (1—2 毫升) 进行酒精沉淀、乙醚脱水, 真空干燥, 即得纯产品。

产品鉴定——(1) 用上述纸电泳、纸层析法检查产品的纯度。(2) 取少量产品, 加入 5 微升 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.1), 密封后于 37℃ 保温 24 小时, 再用纸电泳, 纸层析法检查产品是否残留有 RN_{ase}A 或 RN_{ase} N₁。(3) 测定产品的碱基比例: 产品 (3 A₂₆₀)、RN_{ase} N₁ (30 单位)、RN_{ase}A (8 微克) 于 20 微升 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7) 中在 37℃ 保温 16 小时。用缓冲液 1 (pH 3.7) 进行电泳, 用 0.1 当量 HCl 洗脱 (37℃, 24 小时) 各紫外点, 测其紫外吸收, 根据克分子消光系数 ($\times 10^{-3}$) (Gp, $\epsilon_{260} = 11.6$; Cp $\epsilon_{260} = 12.95$; Ur $\epsilon_{260} = 10.1$) 算出各点的微克分子浓度, 推出它们相互间的比例。(4) 按 Nirenberg 法^[7]测定产品的生物活性。

结果和讨论

一、反应条件对合成反应的影响

1. CpU 的合成

首先确定了比较适宜的底物浓度 (0.15 M C > p, 0.30 M Ur) 和 RN_{ase}A 的浓度 (30 微克/毫升), 然后着重实验了 “0℃ 反应 24 小时” 和 “-12℃ 反应 72 小时” 两种条件对合成产率的

表 1 按 Cp 残基的分配比例计算 CpU 的产率*

成份 实验组	CpU	C > p	Cp	CpU 中的 C 残基	CpU 中的 C 残基占总 C 残基的比例
0℃, 24 小时	0.185	0.142	0.260	$0.185 \times \frac{7.6}{16.5} = 0.082$	$\frac{0.082}{0.082 + 0.142 + 0.260} = 16.6\%$
-12℃, 72 小时	0.080	0.043	0.047	$0.080 \times \frac{7.6}{16.5} = 0.037$	$\frac{0.037}{0.037 + 0.043 + 0.047} = 29.2\%$

* 表中数据来自反应液同一电泳图上各点洗脱液的 A₂₆₀, 其中 7.6 为 pH 7 时 Cp 的 ϵ_{260} ($\times 10^{-3}$), 16.5 为考虑了减色效应 (h = 4%) 后 CpU 的克分子消光系数 ($\times 10^{-3}$)。

影响。由表 1 可见,冰冻反应 (-12°C) 具有较大的优点,产率几乎提高了 1 倍。

2. GpCpU 的合成

发现磷酸给体 $G > p$ 的浓度以 $0.07-0.10\text{ M}$ 为宜,受体 CpU 的浓度越高时 GpCpU 产率越高,但在大量制备时考虑到 CpU 得来不易,不宜选择过高的浓度,故本实验采用 2—3 倍于 $G > p$ 的浓度。在 0.1 毫升反应混合物中,对酶量各为 $10、30、60、90$ 单位的 RNase N_1 进行实验,发现以 30 单位 (即 300 单位/毫升) 为

现不多,但 GpCpU 也不多; 4°C , 很少检查到 Gp, 而 GpCpU 较多。关于反应时间,文献报道需要 20 小时以上。本工作开始曾对反应时间 $6、12、24、72$ 小时进行实验,发现 6 小时以上

产率反而下降,而且副产物 Gp、GpGp 不断增多。后来对 30 分、 $1、1.5、3、6$ 小时进行实验,发现在本实验条件下 GpCpU 较高产率在 1 小时开始出现, 3 小时后开始下降 (图 1)。因此,本工作采用 $2-3$ 小时的反应时间,既节省时间,副产物 Gp、GpGp 较少,易分离到纯的产品。

二、反应产品的分离

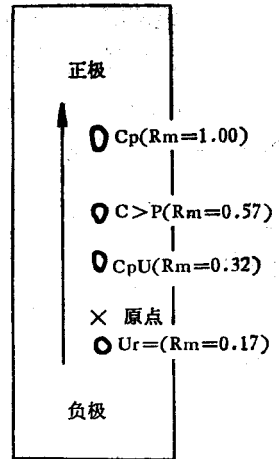


图2 CpU 合成液的电泳分离
 0.03 克分子磷酸缓冲液,
 $\text{pH}7.1$, 电压: 5000 伏, 电流:
 38 毫安, 时间: 1 小时

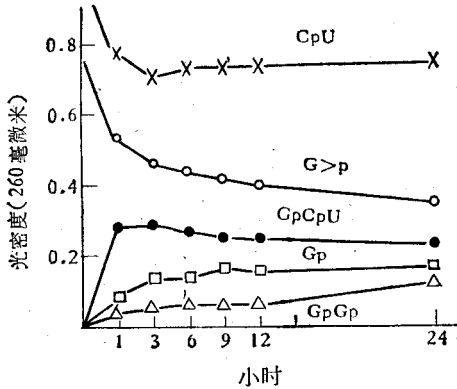


图 1 GpCpU 合成反应动力学

在不同时间取样电泳 ($\text{pH}3.5$), 用 0.1NHCl 洗脱各点, 测定各洗脱液的紫外吸收。实验了 $0^{\circ}\text{C}、4^{\circ}\text{C}、8^{\circ}\text{C}$ 等温度的影响: 8°C 、 $G > p$ 迅速被水解、出现较多 Gp; 0°C , Gp 出

1. CpU 的分离
 分析时,用缓冲液 2 进行纸电泳分离,得到了图 2 所示的结果,可以很方便地获得 CpU。在大量制备时,则采用柱层析分离,将反应物 ($1,000\text{A}_{260}$) 上到 DEAE-纤维素柱 (1×120 厘

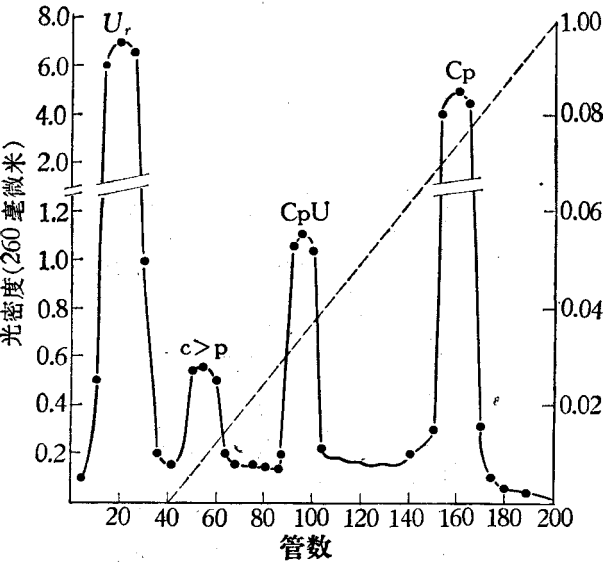


图 3a CpU 合成反应液的 DEAE-纤维素柱层析

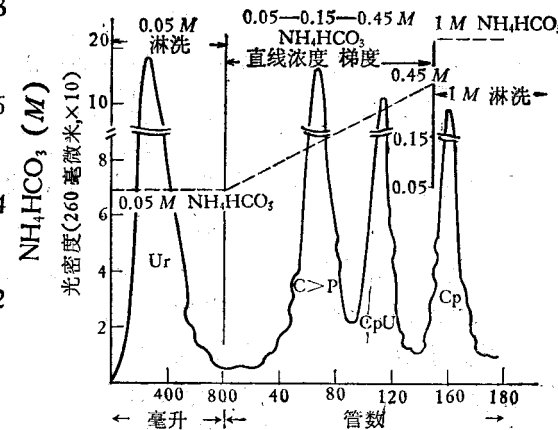


图 3b CpU 合成反应液的 DEAE-葡聚糖凝胶柱层析

米), 由于 U_r 不带负电荷, 不吸附, 故用大量 $0.01\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ 淋洗, 直到流出液检查不到 U_r 时为止。用 $0.01-0.05-0.10\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (各 500 毫升) 进行直线梯度洗脱, 先出现 $C>p$ 峰, 其次是 CpU , 最后是 Cp (图 3a)。又实验了交换量更大的交换剂 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 的分离效果, 其优点是上柱量大大增加 (对于 3×150 厘米的柱可达 $50,000\text{ A}_{260}$), 分离结果与上相似 (图 3b), 获得了 $5,000\text{ A}_{260}$ 的 CpU 。

2. $GpCpU$ 的分离

在溶剂 1 中纸层析具有使酶失活的优点^[3], 但 $GpCpU$ 不易同 Gp 完全分开 (图 4a); 在溶剂 2 的酸性条件下, $G>p$ 开环变成迁移最快的 Gp , 可同 $GpCpU$ 完全分开 (图 4b)。因此, 用此两溶剂系统连续层析, 或双向层析 (图 4c), 可以获得除去了酶的, 很纯的 $GpCpU$ 。

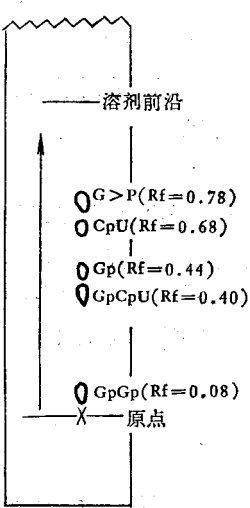


图 4a $GpCpU$ 的纸层析
(下行)
正丙醇:浓氨水:水
= 55:10:35

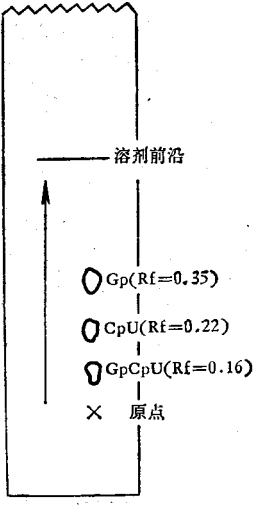


图 4b $GpCpU$ 的纸层析
(下行)
第三戊醇:甲酸:水
= 3:2:1

用“加酚电泳法”一次可以分离到 2 A_{260} 的 $GpCpU$, 在 $\text{pH}3.5$ 电泳时 $GpCpU$ 能同 $G>p$, CpU 完全分开 (图 5), 而酚留在原线不动。而且, 由于酸性时 RNase N_1 电负性较弱, 基本上不向正极泳动, 不会混入产品中。如从 CpU 开始, 加上 $G>p$ 和 RNase N_1 , 于 4°C 反应 2—3 小时, 立即用“加酚电泳法”分离, 在 6 小时之内就可获得 $GpCpU$ 。因此, 在制备少量的 $GpCpU$

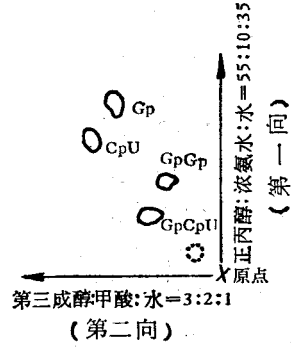


图 4c $GpCpU$ 合成液的双向纸层析(上行)
第三戊醇:甲酸:水=3:2:1 (第二向)

时, “加酚电泳法”是一种最简便、快速去酶的分离方法, 本工作用此法制备了 30 A_{260} 的 $GpCpU$ 。

在大量制备时采用柱层析分离, 用 $5,000$ 毫升 $0.1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ 平衡 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱 (1×50 厘米), 将反应物 (1100 A_{260}) 上柱, 用 150 毫升 $0.1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ 淋洗, 再进行 $0.1-0.2-0.3-0.4-0.5\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (各 150 毫升) 直线梯度洗脱, 各峰出现的顺序是: CpU , $G>p$, $GpCpU$, Gp , 最后用 $1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ 洗下剩余的 Gp (图 6)。其中 $GpCpU$ 峰混有 $G>p$, 可再用挥发性溶剂 2 进行制备层析, 纯化后得到 $160\text{ A}_{260}\text{ GpCpU}$ 。

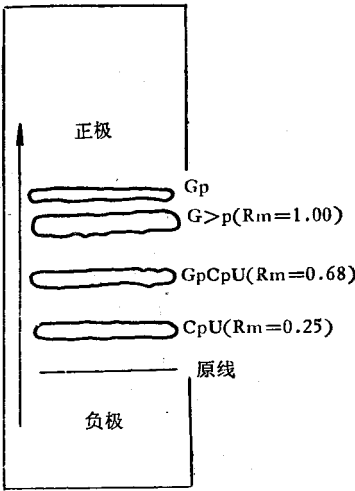


图 5 $GpCpU$ 合成液的电泳分离
0.05 当量柠檬酸缓冲液, $\text{pH}3.5$, 电压:
3000 伏, 电流: 60 毫安, 时间: 2 小时

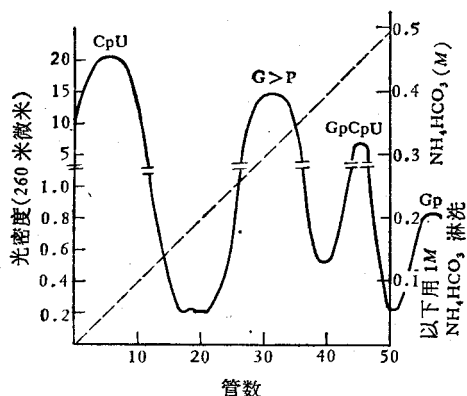


图 6 GpCpU 合成混合物的 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 柱层析

在分离 CpU 时相当麻烦,而且分离到的 CpU 含有大量的 NH_4HCO_3 , 尽管反复加水减压浓缩,但仍有残余的 NH_4HCO_3 影响 GpCpU 的合成产率。为简化工作步骤,我们试用“一步法”,结果是成功的,得到了符合要求的 $110 A_{260}$ GpCpU。这说明似乎 RN_{aseA} 并不干扰 $\text{RN}_{\text{aseN}_1}$ 的催化活性,而它们能在同一系统中分别对自己特异的底物发生催化作用。

三、产品鉴定

1. 纯度——CpU 和 GpCpU 皆为电泳纯和纸层析纯:层析后只出现一个紫外吸收点,而且经 37°C 密封保温 24 小时后仍然如此,于冰箱中贮存一年后依然未变,说明 RN_{aseA} 和 $\text{RN}_{\text{aseN}_1}$ 皆已从产品中除掉。

2. 紫外吸收性质——得到了与文献一致的吸收特征比值(表 2)和吸收光谱(图 7)。

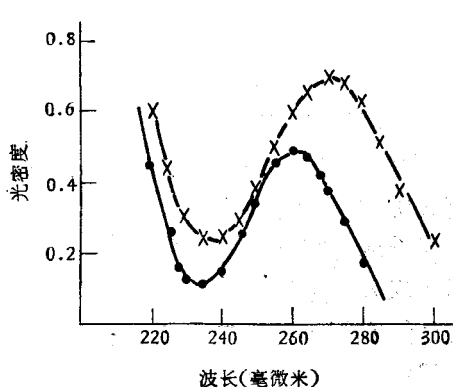


图 7 CpU 和 GpCpU 的紫外吸收光谱 (pH1)
×——CpU ●——GpCpU

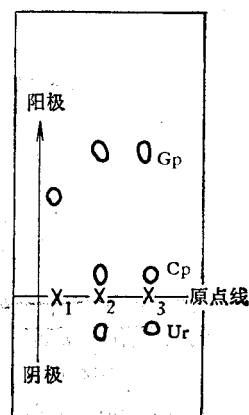


图 8 GpCpU 酶溶液的电泳图

0.03M 柠檬酸缓冲液(pH3.7), 5,000 伏80 分钟。1.——产品 GpCpU; 2.——GpCpU 酶解液; 3.——标准样品 Gp + Cp + Ur

表 2 CpU 和 GpCpU 的特殊吸收比值

产物	特征吸收比值	A_{250}	A_{270}	A_{280}	A_{290}
		A_{260}	A_{260}	A_{260}	A_{260}
CpU (pH2)	文献值	0.65		0.99	0.60
	实验值	0.65		1.01	0.63
GpCpU (pH7)	文献值	0.91	0.91	0.61	
	实验值	0.94	0.94	0.63	

表 3 GpCpU 酶解物的碱基比例

	A_{260}	A_{280}	微克分子/毫升
Gp	0.114		$A_{260}/\epsilon_{260} = 0.114/11.6 = 0.0097$
Cp		0.128	$A_{280}/\epsilon_{280} = 0.128/12.95 = 0.0099$
Ur	0.095		$A_{260}/\epsilon_{260} = 0.095/10.1 = 0.0095$

$$[\text{Gp}]:[\text{Cp}]:[\text{Ur}] = 0.0097:0.0099:0.0095 \\ = 1.02:1.04:1.00$$

3. 碱基比例——GpCpU 被 $\text{RN}_{\text{aseA}} + \text{RN}_{\text{aseN}_1}$ 混合酶解(见材料和方法),电泳分离到三个紫外吸收点,各与对照物 Gp、Cp、Ur 的位置相对应(图 8)。用 0.1 当量 HCl 洗脱各点,测其紫外吸收,根据它们的特征比值确定为 Gp、Cp、Ur,并算出它们相互间的克分子比例为 1.02:1.04:1.00(表 3)。

4. 生物活性——实验结果见图 9。对照组:“UpCpU(不同浓度) + ^{14}C -tRNA^{ala} (0.32 A_{260})”对核糖体 (2.75 A_{260}) 的结合率,实验组:产品

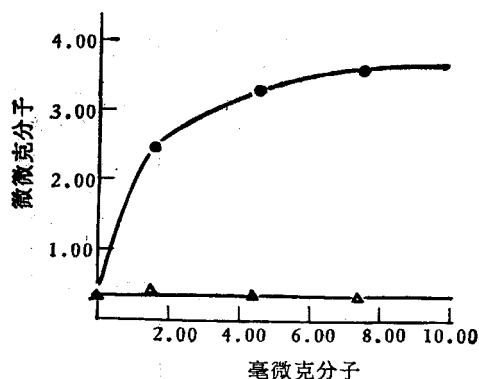


图9 C^{14} -tRNA^{ala} 对核糖体的结合曲线

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^{ala} 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^{ala} 不结合核糖体, 而在 GpCpU 存在时, 随着 GpCpU 浓度增加, C^{14} -tRNA^{ala} 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_{ase}A 和 RN_{ase}N₁ 催化合成了近 10 毫克的酵母 tRNA^{ala} 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^[1, 2]。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^[3]。我们^[4]和 Ruoslahti^[5]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^[6] 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