

- [28] Brewster, A. I. R.: *Biochemistry*, 12, 1643, 1973.
- [29] Huestis, *Biochemistry*, 11, 1648, 1972.
- [30] Bradbury, E. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 77, 45, 1977.
- [31] Jardetzky, O. and Wade-Jardetzky, *Ann. Rev. Biochem.*, 40 605, 1971.
- [32] Damadian, R.: *Science*, 171, 1151, 1971.
- [33] Mathur-devré, R.: *Progress in Biophys. and Mol. Biology*, 35, 103, 1979.
- [34] 许健生, 高联佩:《生物化学与生物物理进展》, 1980年, 第5, 6期。
- [35] 林克椿:《生理科学进展》, 1978年, 第9卷, 第2期。
- [36] 上海肿瘤波谱学研究组:《自然》, 1980年, 第3卷, 第3期。
- [37] 生物物理研究所六室溶液构象组:《生物化学与生物物理学报》, 1976年, 第8卷, 第1期。

[本文于 1980 年 5 月 30 日收到]

杂交阻断翻译与选择性杂交

王 申 五 吴 冠 芸

(中国医学科学院基础医学研究所)

近年来分子杂交技术在分子生物学的研究中进展很快。信使核糖核酸(mRNA)是由DNA转录后再经加工形成,因此某种特异的mRNA与含有其特异基因的DNA片断之间的碱基顺序有一定的互补关系,两者在一定条件下可以进行分子杂交,形成DNA-mRNA杂交体。若将某种纯化的mRNA,经放射性同位素标记,或者此种纯化的mRNA经逆转录合成同位素标记的*cDNA,即可做为分子探针,在DNA链上探测与此mRNA有关的基因的存在和位置。然而,得到一定量纯化的匀一的探针,并不是一件容易的事情。如果用不匀一的探针与DNA进行分子杂交,就必须进一步鉴定和分离被杂交的放射性核酸(*mRNA或*cDNA),发展以分子杂交法纯化专一性mRNA的技术^[6]。

mRNA可在体外无细胞翻译体系中合成相应的多肽链,所以分析这种专一性多肽是鉴定mRNA纯度的有效方法。最近,发展了一种以DNA片断与RNA杂交,将特异的mRNA从胞浆总RNA中选择出来,形成DNA-RNA杂交体,然后通过无细胞翻译和产物的分析,了解被选择的mRNA的专一性。这就是所谓杂交阻断翻译(Hybrid-arrested Translation)和选择性杂交(Selection Hybridization)。它们都是将分子杂交技术与无细胞翻译技术结合起来,具

有某些新的特点。本文拟就这种分子杂交检测技术及其在基因表达研究上的应用做一简要的介绍。有关技术方面的细节,请参考有关文献[1,2]。

杂交阻断翻译法的基本原理是将DNA用限制性内切酶切成不同大小的DNA片断,分离纯化后,各个电泳区带上的DNA片断,应具有大致相等的碱基对数和相同的末端^[3],这就为它能选择性的与某种mRNA杂交提供了结构基础。这样的DNA片断与mRNA混合后,在DNA变性的条件下(80%去离子甲酰胺),DNA双链解开,单链DNA与RNA发生杂交反应,形成DNA-RNA杂交分子,而在此条件下变性DNA基本上不再复性形成双链DNA^[4]。这样形成的DNA-mRNA杂交分子,不能在无细胞翻译体系中进行翻译,但当杂交体经加热解开后,mRNA游离,其翻译活力即可完全恢复^[5]。因此,能与mRNA形成杂交体的DNA片断有可逆地阻断此mRNA的翻译作用。例如兔 β -珠蛋白-cDNA与pMB₁质粒的重组体(称为pBG₁DNA),经限制性内切酶Hha I消化后,经琼脂糖电泳将DNA片断分离纯化,此种pBG₁DNA片断就能与9S兔网织珠蛋白mRNA进行杂交,此mRNA的翻译作用可被pBG₁DNA片断可逆地阻断^[4]。当将此种杂交体溶液分为两部分,其中一部分经热变性处理,然后分别将

这两部分的核酸沉淀回收，加入到无细胞翻译体系中进行翻译，再经聚丙烯酰胺凝胶电泳及荧光自显影技术，分离并比较两部分的翻译产物，就会发现，变性处理的那部分，与总 mRNA 的翻译产物是一致的，而未经变性处理的那部分的翻译产物则缺少某种多肽的区带，它就相当于被选择的 mRNA 所编码的蛋白质(图 1)。所以，经杂交阻断翻译，就可能得到特异编码某

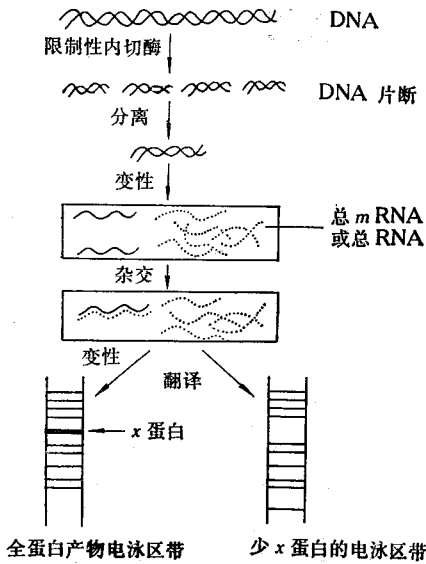


图 1 杂交阻断翻译法示意图

种蛋白的 DNA 片断。若将此片断再经无性繁殖扩增后，研究它的顺序，就可以得到部分或全部的基因顺序的资料，同时还可以进一步以它做为分离提纯特异 mRNA 的工具^[4]。最近，Gorden^[10] 等人利用此技术检查了以无性繁殖法制备的 A₂₆ 质粒 DNA (pBR₃₂₂ 质粒与鸡白蛋白 cDNA 的重组体)。鸡肝 RNA 与 A₂₆ DNA E. coli 的酶解产物杂交后，其翻译产物中的前白蛋白带消失，而同样条件下，变性处理后的翻译产物，又出现了前白蛋白区带，从而证明了 A₂₆ 质粒中含有插入的鸡白蛋白 cDNA。所以，利用杂交阻断翻译法，只用总 RNA 就能鉴定出重组质粒中是否含有所研究的基因或 cDNA。

杂交阻断翻译法的优点是简单易行，杂交反应在液相进行，杂交后，不必分离杂交体。它对于研究含量丰富的特异 mRNA 与 DNA 片断

的互补性，以及研究它们的基因表达等方面是很有用的。Hastie 等人^[11] 以这种方法研究了小鼠肝中含量较多的一组 mRNA。由于经杂交捕获后分析其多肽产物，故所用的 DNA 和 mRNA 可以是不纯的。他们发现，这组 mRNA 的杂交阻断翻译的动力学是不同的，并提出小鼠肝中存在量最多的是主要尿性多肽 mRNA，其次是白蛋白 mRNA。所以用这种方法还可以研究两种以上 mRNA 同时存在下的一种 mRNA 的相对存在量。然而，它对于含量较低的 mRNA 则不能给出满意的结果。因为在翻译产物分析时，由于 mRNA 产生的特异蛋白很少，在大量的蛋白区带中，缺少某一种微量蛋白，蛋白区带不会有明显的差别，从而也就难以测出 DNA 片断选择的那一种 mRNA^[6]。此外，DNA-mRNA 杂交体的熔解温度 (tms) 与此种 mRNA 被阻断的翻译活力恢复有关。所以利用杂交阻断翻译法还可以测定 mRNA-DNA 杂交体的 tms 值，以确定这种 mRNA 与其有关基因形成所谓 R 环时的温度，来研究该基因的插入顺序^[7]。

当我们所研究的 mRNA，不是含量丰富的组份，如上所述，就难以用杂交阻断翻译法直接进行分析；或者，研究者打算利用分子杂交法，得到被选择的特异的 mRNA 时，就必须将 DNA-mRNA 杂交体分离出来。被分离的杂交体，经变性处理后，使被选择的 mRNA 游离，然后再进行体外翻译，这就是所谓选择性杂交法^[2]。

选择性杂交法的基本原理是以限制性内切酶将 DNA 裂解为较小的片断，经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步分离^[2]。然后，将凝胶上分离的 DNA 片断，经加热变性后，按照 Southern 法^[8] 直接将单链 DNA 定量地转移到硝酸纤维素膜上。把结合不同片断的膜剪开，分别在 65% 的去离子甲酰胺中与 RNA 杂交。杂交后，经彻底洗脱，洗去未被选择的 RNA，而被选择的 mRNA_x 仍留在膜上(这一过程是十分关键和重要的)。再将膜上的 DNA-mRNA 杂交体经变性处理，使 mRNA_x 游离，沉淀回收。从而经过选择性杂交就能得到某种 mRNA。将此种

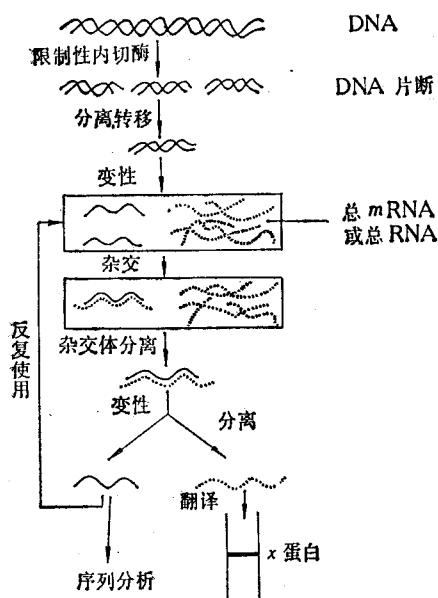


图 2 选择性杂交法示意图

mRNA 在无细胞翻译体系中进行表达,并鉴定其翻译产物,以期了解 DNA 片断, mRNA 及其有关蛋白质三者的关系(图 2)。

选择性杂交法的特点是:(1) DNA 酶解片断不需分离纯化,只需经一次琼脂糖电泳分离后就可以得到许多条结合不同长度 DNA 片断的硝酸纤维素膜,供选择性杂交使用;(2) 结合 DNA 片断的膜,可以反复使用(至少用四次其活力不减);(3) 经一次酶解的 DNA 片断选择杂交的 mRNA 种类仍然很多时,还可以再选用另一种限制性内切酶,把 DNA 片断再切割成更小的片断。固定在膜上的 DNA 片断可以小到 350 个核苷酸,而 DNA-RNA 杂交体的杂交部分则可以小到 50 个核苷酸,就能重复进行选择^[2]。所以被选择的 mRNA,并不一定与 DNA 片断整个顺序都杂交起来,或者说,两者不一定是完全互补的,只要有一部分互补区就可以进行选择。

选择性杂交法已经用于从 Ad₂ 病毒感染的细胞及其转化的细胞中分离某种特异的 mRNA。将病毒 DNA 连续酶解分离后,得到一个约 350 个碱基对的片断,它相当于其基因图上的 41—42 位点,它只能选择编码多肽 III 的 mRNA。因此该法不但可以通过翻译产物分析,

鉴定被选择的 mRNA,还能制备某种特异的 mRNA。

有必要指出,硝酸纤维素膜只能结合 DNA 片断,而不能结合 RNA。而且它对小于 100 个碱基对的变性 DNA 片断,结合能力也是很差的。为了克服硝酸纤维素膜的这一限制,Alwine 等人建立了 DBM (Diaz benzyloxy methyl) 纸膜转移法。例如人们若打算测定细胞提取物中的小量特异 mRNA (或转录产物 RNA),可以将分离的 RNA 区带,转移到 DBM 纸膜上,然后以已知的 cDNA 分子探针杂交加以确定^[9]。当然也可以将已知的 mRNA 转移到 DBM 纸膜上用以探测和分离未知的 DNA^[11]。可是,最近 Thomas 等人^[12]以去离子甲酰胺和乙二醛,将 RNA 或 DNA 变性后,经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳,可以圆满地将变性的 RNA 和 DNA 的小片断转移到硝酸纤维素膜上,这就为选择性杂交提供了方便条件。

利用杂交阻断翻译和选择性杂交分离鉴定 mRNA 时,可以分析该 mRNA 在无细胞体系中的翻译产物,与天然蛋白进行对比加以确定;也可以分析选择该 mRNA 的 DNA 片断的碱基顺序^[3],根据其编码氨基酸的顺序,确定它是否含有所研究的蛋白质的基因。

总之杂交阻断翻译与选择性杂交都是把基因表达的三个重要环节——基因片断,转录物和翻译产物联系起来,经过反复分析,找出其相互的关系。而鉴定与分离某种蛋白产物及有关的基因工作必然导致对基因表达机制的深入了解^[3],所以这些分子杂交技术在基因表达的研究中有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Paterson, B. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 4370, 1977.
- [2] Ricciardi, R. P. et al.: *ibid.*, 76, 4927, 1979.
- [3] Taylor, J. M.: *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 681, 1979.
- [4] Casey, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 4, 1539, 1977.
- [5] Paterson, B. M. et al.: *Cell*, 10, 177, 1977.
- [6] Woolford, J. L.: *Nucleic Acids Res.*, 6, 2483, 1979.

- [7] Thomao, M., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2294, 1976.
 [8] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 73, 125, 1975.
 [9] Alwine, J. C., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5350, 1977.
 [10] Gorden, J. I., et al.: *J. Biol. Chem.*, 253, 8629,

1978.

- [11] Hastie, N. D., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1217, 1978.
 [12] Patricia S. Thomas: *ibid.*, 77, 5201, 1980.

[本文于 1980 年 9 月 12 日收到]

cAMP 在细胞代谢中的调节作用

易 健 华

(武汉大学生物系基础课教研室细胞生化小组)

3', 5'-环状腺苷酸(简称 cAMP)是 1957 年发现,分布极广,从低等的细菌到高等的哺乳动物的细胞中均含有。其含量极微^[1,2,3]。一般仅为 ATP 的千分之一,以每克湿组织计算,多在毫微克分子甚至微微克分子水平。它对代谢的影响极大,是细胞中存在的极为重要的生理活性物质。由于它以小分子化合物的形式调节控制细胞代谢诸过程,在细胞生化和生理过程中起着重要作用,因而引起国内外许多学者的重视和多方面的研究。从 50 年代发现时进行描述开始,逐渐对它引起的各种生理效应的表现加以分析^[1,5],直至 80 年代的今日从分子水平上探索和阐明这些表现的机理方面,已发表了许多文献和专著,并取得了不少成就。二十多年来的研究表明,它的生物学意义是相当广泛的,大大超出 Sutherland 最初提出的“第二信使”学说的含义。本文从六个方面说明 cAMP 在调节细胞代谢过程中的重要性。

一、cAMP 的生成与分解 近年来,人们对 cAMP 在机体内的生成与分解机理已有较清楚的了解。它在含氮激素(多肽、蛋白质激素以及儿茶酚胺激素)的参与下由细胞膜中的腺苷酸环化酶(简称 AC)催化生成。含氮激素作为“第一信使”由内分泌腺分泌后,经血液循环将多种调节信息(化学信号)带到靶细胞后,激素本身并不进入靶细胞,而是通过与细胞膜上特异受体(简称 R)结合,引起受体构形变化,从而激活膜上的 AC,激活的 AC,再催化胞浆

中的 ATP 生成 cAMP。所生成的 cAMP 充当激素的媒介物,即作为“第二信使”,把各种调节信息带到细胞内某些特定的部位,以调节酶的活性、基因表达、膜通性、细胞的分裂与分化等而表现其生理效应(图 1)。

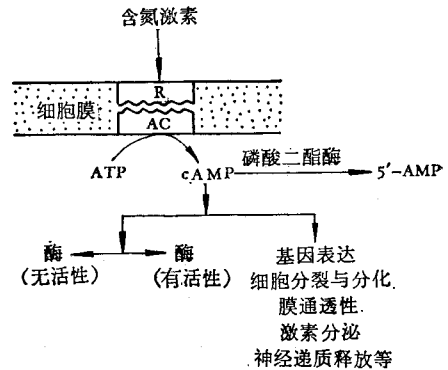
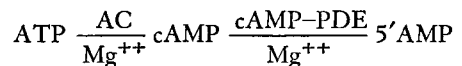


图 1 cAMP 的生成分解及生理效应的体现

R: 受体 AC: 腺苷酸环化酶

从图 1 看出, cAMP 代谢非常简单, cAMP 生成时需要 AC 的催化。cAMP 完成一定的生理功能后,需要 cAMP-磷酸二酯酶(简称 PDE)分解而灭活。cAMP 生成与分解过程依赖 Mg^{++} 的存在。 Mg^{++} 是 AC 和 PDE 的激活剂。



实验证明^[4], cAMP 含量高的细胞, PDE 的活性相应较低,由此说明,不仅 AC 的活性和 cAMP 的含量直接有关,而且 cAMP 的含量与 PDE 活性亦有一定的相关性。