

别经上述非离子去污剂处理,则电泳结果完全相同。这是与去污剂的化学结构相近有关^[4]。如胶中含 Tween 20,由于其特殊化学结构,致使样品不能溶解,电泳分离效果极差,因此我们认为 Tween 类的非离子去污剂不适用于红细胞膜电泳分析。

此外,我们还测定了红细胞膜等电点聚焦的 pH 梯度,发现虽然胶中所含的非离子去污剂不同,但 pH 梯度不改变。仅以 Triton X-100 为例作图(图 5)。

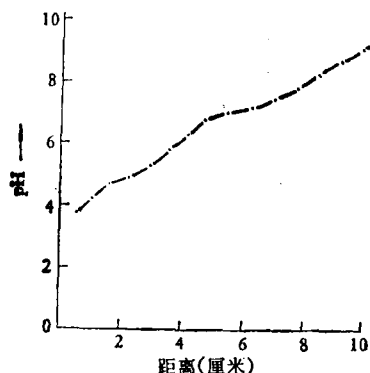


图 5 胶中含 0.2% Triton X-100 等电点聚焦 pH 梯度图

三、几个问题应该注意的

1. 选用非离子去污剂时,首先注意它对膜的溶解情况。电泳前必须使膜完全溶解。

2. 胶中含适量的非离子去污剂是很重要的。如果只将处理样品的去污剂选得合适,而胶中不含相应的去污剂,样品仍不能分离。

3. 有些蛋白不溶于非离子去污剂而溶于 SDS。据 Ames^[2] 报道,Nonidet P40 可与 SDS 结合形成微团而移到酸性端。因此,在进行等电点聚焦电泳前,必须先去除 SDS。

4. 在电聚焦结束后,加样部位有微量的沉积物,我们推测是红细胞膜的骨架蛋白^[5]。

5. 为了使电聚焦蛋白区带分得整齐,阳极加样比阴极加样好,可避免区带弯曲。

6. 电泳采用逐渐升压或恒功率,可避免产热,影响分离效果。

7. 聚胶板最好用 1—1.5 毫米厚的玻璃板,太厚导热性差,不适于高压。

参 考 文 献

- [1] Merz, O. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 84, 1972.
- [2] Ames, G. F.: *Biochemistry*, 15, 616, 1976.
- [3] Dodge, J. T.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [4] Ari Helenius et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 29, 1975.
- [5] Liu, S. C. et al.: *Erythrocyte Mechanics and Blood Flow*, 15, 1980.

[本文于1983年9月19日收到]

蛋白质更新速率的同位素示踪测定

贺 新 军

(中国医学科学院首都医院,北京)

哺乳动物细胞内蛋白质各以其特征速率不断更新。蛋白质更新包括合成与降解两个方面,测定蛋白质更新速率就是测定蛋白质的合成和降解速率,同位素示踪技术是主要测定方法。

一、蛋白质合成速率的测定

蛋白质合成速率示踪测定法大致上可分为

两类:一类方法基于整个翻译过程,即从氨基酸进入肽链直至肽链完成而释放的测定,称掺入法。又因给予标记前身的方式和数量不同而分为单次注射、恒速输注和大量前身掺入法。另一类方法根据肽链延伸速率的测定,叫做肽链延伸速率法。

1. 单次注射掺入法 从理论上讲最严密的掺入法应该是,一次注射标记前身(通常是氨基

酸)后,在不同时间间隔测定组织游离库和蛋白质结合库示踪氨基酸比放射性,从结合库比放射性为游离库比放射性的函数变化,计算蛋白质合成速率。但实际上人们关心的往往不是每小时合成多少蛋白质,而是合成速率有无改变,因此,文献中多采用蛋白质合成速率相对测定,典型例子是 Doyle 和 Schimke^[1] 的方法。他们经腹腔给小鼠注射 ³H-亮氨酸,2 小时后杀死动物,取肝、匀浆,把蛋白质直接沉淀在含有三氯醋酸的滤纸上计数,从放射性强度估算蛋白质合成速率。

相对测定虽能反映合成速率,但掺入放射性将受下列因素影响:(1)组织摄取标记前身的时程;(2)细胞内前身比放射性随代谢进行出现的变化;(3)掺入时间较长时,标记蛋白质分解和同位素重利用;(4)蛋白质分泌(如肝脏分泌血浆蛋白)。因此测得的掺入数据至多是蛋白质合成速率的相对值。

为了使单次注射掺入法得到理想的合成速率,必须严格控制实验条件,即选择适当注射途径以改善组织摄取同位素的重复性,尽量缩短掺入时间使测量在线性掺入范围内完成;仔细测量掺入期间前身比放射性的变化,按 Peters 等^[2]的公式图解积分并计算合成速率。

2. 恒速输注掺入法 用掺入法测蛋白质合成速率,前身库比放射性的分析很难处理。恒速输注法则可消除这方面的问题。

当恒速输注标记氨基酸时,血中氨基酸比放射性升高达坪值,可以下式近似表示^[3]:

$$S_p = S_{p\max}(1 - e^{-\lambda_p t}) \quad (1)$$

式中, S_p 是血浆氨基酸比放射性; $S_{p\max}$ 是 S_p 的坪值; λ_p 是血浆氨基酸比放射性升高速率常数; t 是输注时间。组织游离氨基酸比放射性亦升高达坪值,也能用单指数方程描述:

$$S_i = S_{i\max}(1 - e^{-\lambda_i t}) \quad (2)$$

式中符号意义与式(1)同,下标 i 表示组织游离氨基酸。由于细胞内非标记蛋白质降解的稀释,组织坪值比血浆坪值低。 λ_i 随组织和输注氨基酸的不同而有变异。在蛋白质更新迅速的组织、如肾、肝,输注酪氨酸时, $\lambda_i = \lambda_p$, 因此

$$S_i = S_{i\max}(1 - e^{-\lambda_p t}) \quad (3)$$

在蛋白质更新较慢的组织,如肌肉,心脏和脑, $\lambda_i = RK_i$, 则

$$S_i = S_{i\max}(1 - e^{-RK_i t}) \quad (4)$$

K_i 是蛋白质合成速率常数(时间分之一); R 是组织蛋白质结合库与游离库中氨基酸含量的比值。在恒速输注期间,蛋白质结合库示踪氨基酸比放射性(S_B)的增加由下式给出:

$$\frac{dS_B}{dt} = K_i(S_i - S_B) \quad (5)$$

把(3)、(4)代入方程(5),积分,得

$$\frac{S_B}{S_i} = \frac{\lambda_p}{(\lambda_p - K_i)} \cdot \frac{(1 - e^{-K_i t})}{(1 - e^{-\lambda_p t})} - \frac{K_i}{(\lambda_p - K_i)} \quad (6)$$

和

$$\frac{S_B}{S_i} = \frac{R}{(R - 1)} \cdot \frac{(1 - e^{-K_i t})}{(1 - e^{-RK_i t})} - \frac{1}{(R - 1)} \quad (7)$$

在恒速输注结束时,测定组织蛋白质结合库和游离库氨基酸比放射性(S_B 和 S_i)。 λ_p 和 R 亦为实验测量值,其大小对计算 K_i 影响甚小。给定 t (通常为0.25天)和 R 或 λ_p ,利用方程(6)和(7),作 S_B/S_i 对 K_i 曲线,相应于实验测量 S_B/S_i 值的 K_i ,很易从这曲线读出。

从方程(6)可以看到,如果 $\lambda_p \gg K_i$,则式(6)可简化为:

$$S_B/S_i = 1 - e^{-K_i t} \quad (8)$$

使用方程(8),由于无需测 λ_p ,实验简便得多。

3. 大量前身掺入法 蛋白质合成速率的准确测定,决定于前身库比放射性的可靠分析。细胞内氨基酸库被外源氨基酸标记的能力很不均一,从组织提取物测氨基酸比放射性,得到的是个平均数,不能代表真正前身库比放射性。前身库比放射性的测定是个难题。

1974年,Scornik^[4]建立了无需分析前身库的大量前身掺入法。其基本原理是,注射不同大剂量恒定比放射性的标记氨基酸,短期掺入(如5分钟)后,测定剂量-掺入依赖关系,作掺入对剂量的双倒数图,把掺入数据外推到无穷剂量,产生的外推掺入速率按注射氨基酸比放射性换算成蛋白质合成速率。

同位素示踪实验的一个基本原则是,引入示踪剂的量应小于内源物质质量的1%。因此,大量前身法的可行性取决于下述假定:注射大量标记氨基酸不会干扰蛋白质合成系统。实验证明,这假定成立^[4]。

4. 肽链延伸速率法 蛋白质生物合成,即翻译包括三阶段:起始、肽链延伸和终止。翻译过程可用动力学参数描述,机体往往通过改变这些动力学参数实现对翻译的调控。主要参数有肽链起译、延伸和终止时间。肽链起译时间的测定还没有很好的方法,肽链延伸和终止则可定量测定。

标记氨基酸给予后,掺入到已合成蛋白质(S)或掺入到与核糖体结合的延伸肽链(R)上。掺入到S与整个系统($T = S + R$)中氨基酸的比值,同平均多肽链装配时间或核糖体转移时间 t_c 有如下关系:

$$S/T = t/2t_c \quad 0 \leq t \leq t_c \quad (9)$$

$$S/T = 1 - (t_c/2t) \quad t \geq t_c \quad (10)$$

多肽链装配时间 t_c 是肽链延伸和终止时间的总和。测量一组时相点的S和T,以S/T对掺入时间 t 作图,斜率为 t_c ^[5]。

在测定S/T同时,用SDS凝胶电泳分析新合成肽链的分子量分布,可以把 t_c 转换成肽链延伸速率(每个核糖体每秒钟掺入的氨基酸残基数)^[6]。如果 t_c 从S/T对时间曲线的初始线性部分得到,则 t_c 相当于合成一条算术均数分子量(M_n)大小的肽链所需的时间。按下式计算肽链延伸速率(R_p):

$$R_p = [(M_n/115)/60t_c] \quad (11)$$

式中,115是蛋白质的平均残基质量。肽链延伸速率与功能核糖体浓度的乘积就是总蛋白质合成速率。

用肽链延伸速率法估测蛋白质合成速率,与大量前身法一样,不必分析前身库;另外,肽链延伸速率的测定使人们有可能独立于翻译的其他环节,特异地探讨肽链延伸的变化。

二、蛋白质降解速率的测定

蛋白质降解指细胞内蛋白质水解为氨基

酸。蛋白质降解遵从一级反应动力学,一个蛋白质分子一旦合成,它与细胞内任何其他同类分子有相同的降解机率。降解反应可以下式表示:



A是P的降解产物, K_d 是这反应的速率常数,其速度方程为:

$$dP(t)/dt = -K_d P(t) \quad (13)$$

积分,得

$$P(t) = P(0)e^{-K_d t} \quad (14)$$

或

$$\ln P(0)/P(t) = K_d t \quad (15)$$

式中, $p(0)$ 是初始蛋白质分子数, $p(t)$ 是时间 t 后存留的蛋白质分子数。蛋白质降解速率常数与半减期($T_{1/2}$)有如下关系:

$$T_{1/2} = \ln 2 / K_d \quad (16)$$

半减期是代谢库中蛋白质分子降解到初始数量一半所需要的时间,它在比较蛋白质降解速率时是个很有用的参数。

1. 衰减曲线法 衰减曲线法是测定蛋白质降解速率常采用的方法。如果标记随机从蛋白质丧失,则放射性衰减呈指数性质,把衰减曲线描绘在半对数坐标上,可得一条直线,斜率为蛋白质降解速率常数。依标记前身给予方式的不同,衰减曲线法又可分为脉冲和连续标记两种方法。

(1) 脉冲标记法 短时间内一次给标记前身,然后测定标记从蛋白质消失的速度,以蛋白质放射性的对数对时间作图,产生斜率为 $-K_d$ 的直线。在稳态,通常测定蛋白质比放射性衰减;在非稳态则测定蛋白质总放射性衰减。

脉冲标记法测定 K_d 的基本假定是,放射性标记前身以极短的脉冲形式给予,之后从游离库迅速消失。这种状态很难达到,蛋白质降解释放的标记氨基酸可重被用于蛋白质合成。这样,测得的 $T_{1/2}$ 比实际半减期大,其偏离正比于重利用的程度。选择非重利用标记前身,^[7]可克服这个问题。

然而,脉冲标记法不适于组织总蛋白质降

解速率测定。用 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 标记肝蛋白质的典型衰减曲线如图 1^[7]。把它描在半对数坐标上,不能变成直线,两时相点间画直线求 K_d 的方法就不适宜。Garlick 等^[8]用曲线分解法(或称多指数分析法)把图 1 曲线分解为三个指数项,其物理意义是把混合蛋白质看成降解快、中、慢的三组蛋白质。从三指数的系数和速率常数计算各自的质量和降解速率,再求总蛋白质平均降解速率。

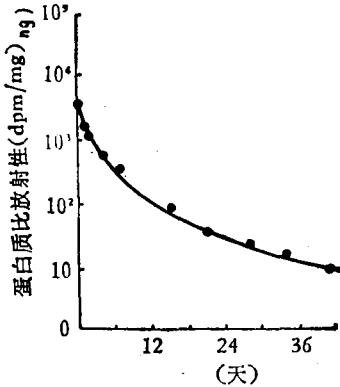


图 1 大鼠肝标记蛋白质衰减曲线
雌大鼠 (240g) 腹腔注射 $1\text{mCi NaH}^{14}\text{CO}_3$,
之后从 1 小时到 41 天分批处死

(2) 连续标记法 连续给动物以标记氨基酸,细胞蛋白质比放射性升高达到这氨基酸比放射性所需的时间,是蛋白质降解速率常数的函数^[9]。实际上,蛋白质比放射性决不能达到前身比放射性,只能把蛋白质比放射性坪值用作蛋白质中非标记氨基酸被标记前身完全取代的近似值。以 $\ln(P_{\max} - P_t)$ 对时间作图,斜率为 K_d 。 $P_{\max}$ 是蛋白质能达到的最大比放射性, P_t 是标记期间任一时刻 t 的蛋白质比放射性。

连续标记法的前身重利用问题比脉冲标记法小得多。可是,要得到准确结果,前身比放射性须迅速(相对于蛋白质 $T_{1/2}$)达到最大值且维持恒定。对于更新迅速或氨基酸转移慢的组织,连续标记法的使用受到严重限制,对选用适当前身或许有所帮助。对半减期较长的蛋白质,用连续标记法测 K_d 则较合适。

2. 双同位素法 1969 年, Arias^[10]采用双同位素法测定蛋白质相对降解速率。先给一种标记氨基酸 (^{14}C), 几天后再给 ^3H 标记的同种氨

基酸,短时间后处死动物,测定蛋白质 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值,更新越迅速(即合成快(高 ^3H)降解也快(低 ^{14}C)), $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值越大。

从方程(15)可以看到, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值的对数是 K_d 的函数。对任一实验, t 是常数,代表两次注射前身的时间间隔,以 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ (相当于 $P(0)/P(t)$) 的对数对 K_d 作图,将产生一条直线,可把 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值转变成 K_d ^[11]。

起初,双同位素法只适于稳态研究。Dice 和 Walker^[12]改良实验设计,使之能用于非稳态研究。

双同位素法的主要特点是在一次实验中能比较多种蛋白质的降解速率。

3. 代谢区法 Khairallah^[13]利用氨基酸代谢区原理,提出了大鼠肝缬氨酸(Val)代谢库模型(图 2)。按这模型,从蛋白质合成速率 (R_s)、细胞外氨基酸、细胞内氨基酸和 tRNA 结合氨基酸的比放射性(分别用 A_o , A_c 和 A_t 表示)四个参数,能计算蛋白质降解和氨基酸转移速

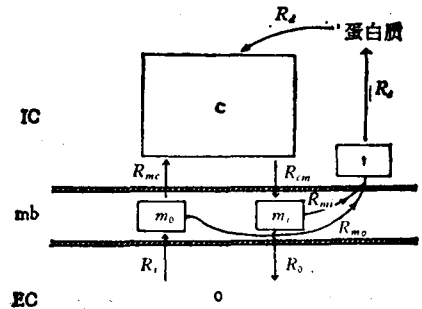


图 2 大鼠肝缬氨酸代谢库模型

代谢库(Pool)是指在给定空间或代谢区域内缬氨酸(Val)分子总量。C:肝细胞内游离 Val 库; m_o :与膜载体结合从细胞外向内运转的 Val 库; m_i :与膜载体结合从细胞内向外出运转的 Val 库; m :与膜载体结合的总 Val 库,等于 $m_o + m_i$; t :酯化在 tRNA 上的 Val 库; O :肝细胞外游离 Val 库; R : Val 分子从一个库转移到另一个库的流速,单位是 $\text{n moles/分/100 (肝重/100g/体重)}$ 。

率。例如,

$$R_s = 125 \text{ nmol Val/min/L100,}$$

$$A_o = 2700 \text{ dpm/nmol, } A_c = 900 \text{ dpm/nmol,}$$

$$A_t = 1620 \text{ dpm/nmol.}$$

先计算细胞内库相对比放射性, $A_c/A_o = 900/2700$, 表示从细胞外进入一个比放射性为 2700

的分子,就有两个来自蛋白质降解的非标记分子同时进入细胞内库。由于 A_c/A_o 表示转膜浓度梯度, $A_i = 1620\text{dpm/nmol}$ 就意味着从细胞外库进入两个比放射性为 2700 的分子,将有三个来自细胞内库比放射性为 900 的分子一道装在 tRNA 上。然后,按下列方程

$$R_d = R_{cm} - R_{mc} \quad (17)$$

$$R_i = R_{mo} + R_{mi} \quad (18)$$

$$R_i = R_{mc} + R_{mo} \quad (19)$$

$$R_o = R_{cm} - R_{mi} \quad (20)$$

计算蛋白质降解及氨基酸转移速率,分别为:

$$R_d = 100, R_{cm} = 150,$$

$$R_{mc} = 50, R_{mo} = 50,$$

$$R_{mi} = 75, R_i = 100,$$

$$R_o = 75\text{nmol Val/min/L100}.$$

4. 间接法 前已述及,用衰减曲线法测定总蛋白质降解速率会受到更新速率不均一的影响;实验证明,只要掺入时间限制在数小时内,那么,从掺入速率测定总蛋白质合成速率就不受此影响^[8]。因此,可以从蛋白质合成与净增长之差间接估计降解速率常数:

$$K_d = K_i - K_g \quad (21)$$

式中, K_g 是蛋白质增长速率常数(增长速率被蛋白质质量除)。增长速率以蛋白质含量对时间作图求得。

第一次肯定动物体内蛋白质更新就是以同位素示踪实验为根据的。目前,同位素示踪法仍然是研究组织蛋白质更新的主要方法。随着蛋白质更新速率测定技术的发展,人们对蛋白质更新的机理、意义和调控的理解,定会出现新的飞跃。

本文承王世真教授审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Doyle, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5449, 1969.
- [2] Peters, T. Jr. et al.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3858, 1972.
- [3] Garlick, P. J. et al.: *Biochem. J.*, **136**, 935, 1973.
- [4] Scornik, O. A.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3876, 1974.
- [5] Mathews, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 1329, 1973.
- [6] Mathews, R. W. et al.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **61B**, 479, 1978.
- [7] Swick, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 6836, 1974.
- [8] Garlick, P. J. et al.: *Biochem. J.*, **156**, 657, 1976.
- [9] Doyle, D. et al.: *Methods Cell Biol.*, **10**, 235, 1975.
- [10] Arias, I. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 3303, 1969.
- [11] Glass, R. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 5234, 1972.
- [12] Dice, J. F. et al.: In *Protein Turnover and Lysosome Function*, (ed by Segal, H. L. and Doyle, D. J.) p 105, Academic Press, New York, 1978.
- [13] Khairallah, E. A.: *ibid.*, p 89, 1978.

[本文于1983年9月19日收到]

小资料

透 析 袋 处 理

1. 把透析袋裁成适当长度(10~20cm);
2. 于大量 2% NaHCO₃, 1mM EDTA 溶液中煮沸十分钟;
3. 用蒸馏水把透析袋洗净;
4. 于蒸馏水中煮沸 10 分钟(或将透析袋放于充满水的容器中,高压灭菌 10 分钟);
5. 冷却, 5℃ 存放于水中。切记一定要浸于水中;
6. 使用之前,用蒸馏水洗净透析袋内外壁,拿透析袋应戴手套。

分光光度法测定 DNA 或 RNA 含量

若样品纯度较高(即蛋白质、酚、琼脂糖或其他核酸的污染量不大),用紫外分光光度法即简便又准确。测定时,于 260 nm 与 280nm 两个波长下读数。通过 260nm 的读数可计算出样品中核酸的浓度,即 10. D. 260 相当于 50 μg/ml 双链 DNA, 40μg/ml 单链 RNA 或单链 DNA 及 20μg/ml 寡核苷酸。通过 260、280nm 读数的比值(OD₂₆₀/OD₂₈₀)可确定核酸溶液的纯度,纯 DNA 和 RNA 制剂此比值分别为 1.8 和 2.0。如果核酸样品中蛋白质或酚污染,此比值会显著下降,用分光光度法无法定量。

[*Molecular Cloning*, 1982. 吕俊宣, 吴雷摘译]