

## 参 考 文 献

- [1] Lehnherdt, W. F.: *J. Chromatog.*, **34**, 471, 1968.
- [2] Albersheim, P. et al.: *Carbohydr. Res.*, **5**, 340, 1967.
- [3] Yasui, Takeshi et al.:  
«日本食品工业学会志», **27**, 358, 1980.
- [4] Linder, J. C. et al.: *J. Chromatog.*, **105**, 125, 1975.
- [5] Lee, K. Y. et al.: *ibid.*, **174**, 187, 1979.
- [6] Quach, R.: et al.: *ibid.*, **174**, 195, 1979.
- [7] Echigo, Takashi et al.: *Tamagawa Daigaku Noga-kubu Kenkyu Hokoku*, No. 9, 115, 1970.
- [8] Siddiqui, I. R. et al.: *J. Apicult. Res.*, **6**, 139, 1967.
- [9] idem, **7**, 51, 1968.
- [10] Mohamed, M. A. et al.: *J. Food Qual.*, **4**, 185, 1982.
- [11] 范正友等: «蜜蜂茶花蜜中毒原因及其防治措施的初步报告», 全国蜜蜂茶花蜜中毒学术讨论会论文, 1982年6月, 杭州。
- [12] 中国农业科学院养蜂研究所: 未发表材料。
- [13] Hakomori, S.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205, 1964.
- [14] Janssen, P. E.: *J. Chem. Commun (Arrhenius Laboratory, Stockholm)*, **8**, 21, 1976.
- [15] Siddiqui, I. R.: *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **25**, 285, 1970.
- [16] Borukh, I. F. et al.: *C. A.* **85**: 76514W, 1976.
- [17] Marletto, F. et al.: *Apic. Mod.*, **70**, **35**, 1979, *C. A.* **91**: 106746S, 1979.
- [18] Lombard, A.: *C. A.* **91**, 87721, 1979.

[本文于1983年9月2日收到]

# 羊垂体促黄体素 (LH) mRNA 在兔网织红红细胞溶胞物系统中翻译的研究

曹泳清 王 宾 叶良素·陈幼珍

(中国科学院动物研究所内分泌室, 北京)

高等哺乳动物垂体前叶合成并分泌两种与生殖有密切关系的激素, 它们是促黄体素(LH)和促滤泡素(FSH)。其合成一方面受丘脑下部促黄体素释放激素(LH-RH)的控制, 同时也受性甾体激素的控制。例如雌二醇主要是控制促性腺激素的 $\beta$ -亚单位的合成<sup>[1]</sup>。近年来有人报道<sup>[2]</sup>, 用 Sephadex G-100 纯化 LH, 发现有分子量超过 100,000 的具有 LH 免疫结合活性的大分子, 并且在血液中也有分子量大于 32,000 的 LH 分子。本研究采用正交试验法, 建立了羊垂体 LH mRNA 体外蛋白质翻译系统, 并对其翻译产物作了鉴定, 实验结果表明, 在翻译产物中除了分子量为 32,000 的 LH 分子外, 也有分子量超过 100,000 的 LH 分子。

## 一、材料和方法

### 1. 材料 羊垂体(冬季屠宰时摘取), 用液

氮冷冻, 在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。<sup>35</sup>S-甲硫氨酸和 <sup>14</sup>C-标准蛋白是 Amersham 产品; 小球菌核酸酶 15,000 单位/ml; 蛋白 A (Staphylo-coccus aureus) BRL 产品; Oligo d(T) 纤维素 Sigma 产品; X 光感光胶片(天津市感光胶片厂产品)。

**2. 羊垂体多聚(A) RNA 的分离** 羊垂体总 RNA 的制备用 SDS-酚法<sup>[3]</sup>稍加改进, 即以冷冻的 10 克组织, 加适当比例的溶液 I (0.5% SDS, 0.025M Na<sub>2</sub> EDTA, 0.075M NaCl 调 pH 至 8.0) 和溶液 II (用溶液 I 饱和酚并调 pH 至 8), 室温打碎并匀浆 2 分钟。将提取所得总 RNA 经 Oligo d(T) 柱 2 次层析<sup>[4]</sup>, 收集第 2 峰即为多聚(A) RNA。

**3. 兔网织红细胞溶胞物的制备**<sup>[5]</sup> 选用 2.5—2.7 公斤年青公兔, 每天注射盐酸苯胍 25mg/只, 共 4 天, 使兔贫血, 分离出血球并使其破裂; 将放出的溶胞物分装收集, 保存于

-80℃ 冰箱内。

**4. 兔网织红细胞溶胞物无细胞蛋白质合成系统** 按照前人<sup>[6]</sup>方法并作改进。网织红细胞溶胞物中首先加入 Hemin, Cpk, EDTA, 小球菌酶等, 破坏其内源的 mRNA。用 EGTA 抑制酶活性后, 再加入 L-<sup>35</sup>S-蛋氨酸、19 种氨基酸及羊垂体 mRNA, 最后再加入 Mg<sup>++</sup>。保温后, 取出 2.5μl 反应液测定掺入放射性<sup>[7]</sup>。

**5. 翻译产物的免疫沉淀分析<sup>[8]</sup>** 由于 LH mRNA 在总 RNA 中所占百分比极少 (少于 1%), 需采用双抗体技术进行鉴定。LH 抗体由本研究室制备 (双扩散法鉴定在一定浓度范

围内与抗原有沉淀反应)。蛋白 A 使用前按操作规程先做处理<sup>[9]</sup>。将沉淀物作 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 胶经二甲亚砜 (DMSO) 脱水后<sup>[10]</sup>, 于 X 光胶片上感光, 存放在 -80℃ 冰箱, 10 天左右取出胶片显影。

## 二、结果与讨论

**1. 外源 mRNA 转译系统的建立** 为建立一个高效率的翻译垂体 LH 的无细胞蛋白质合成系统, 采用正交试验方法, 对一些重要的反应组分浓度与翻译效率的关系进行探讨 (表 1), 结果是按级差大小排列。各因素均在所测浓度

表 1 正交试验选择各因素水平所得极差值

因素	A MgCl <sub>2</sub>		B DTT		C EDTA		D NaCl		E CaCl <sub>2</sub>		F KOAc		G Cp	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
水平 mM	1.0	1.8	2×10 <sup>-3</sup>	0.5	26×10 <sup>-3</sup>	13×10 <sup>-3</sup>	36	30	0.4	1.0	80	40	8.0	4.0
K	19.6	20.2	19.0	20.9	18	21.6	20.7	19.2	20.6	19.3	19.7	20	24.8	15
k	4.9	5.0	4.7	5.2	4.5	5.5	5.2	4.8	5.2	4.8	4.9	5.0	6.2	3.8
R	0.10		0.46		0.95		0.40		0.38		0.10		2.40	

注: K: 为各水平试验结果之和 k: 结果和的平均值 R: 为 k 的最大值减最小值所得到的极差。

表 2 正交试验选择各因素水平所得极差值 L<sub>g</sub>(3<sup>4</sup>)

因素	A MgCl			B CP			C EDTA			D DTT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
水平 mM	1.8	2	2.5	8.0	10	15	13×10 <sup>-3</sup>	5×10 <sup>-3</sup>	0	0.5	1	1.5
K	27.7	34.3	31.7	29.1	29.5	35.1	32.2	31.1	30.4	30.2	30.8	32.6
k	9.2	11.4	10.6	9.7	9.8	11.7	10.7	10.4	10.1	10.1	10.3	10.9
R	2.2			2.0			0.6			0.8		

注: K、k、R 注释同表 1。

范围内, 对翻译影响的大小次序是: CP EDTA DTT→NaCl→CaCl<sub>2</sub>→MgCl<sub>2</sub>→KoAc, 由于 CP、EDTA 等因素对整个合成系统影响较大, 所以进一步又选用了 L<sub>g</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表, 即对四个因素进行三种不同浓度水平的试验。四种因素浓度水平变化时对合成系统影响的主次关系是: MgCl<sub>2</sub>→CP→DTT→EDTA (见表 2)。

从以上结果可知 Mg<sup>++</sup> 浓度在 2.5mM 左

右翻译效率最高。文献报道无细胞转译系统中 Mg<sup>++</sup> 的最适浓度不仅随不同的蛋白合成系统而不同, 而且与合成的蛋白种类不同有关<sup>[11,12]</sup>。Mg<sup>++</sup> 浓度的变化对核糖核蛋白体的解聚、聚合和与 mRNA 的结合和释放都有很大影响, 所以 Mg<sup>++</sup> 浓度的变化会直接影响蛋白质的合成 (见图 1)。

实验中磷酸肌酸 (CP) 浓度在 15mM 时翻译效率最高, 它是合成蛋白质过程中能量的间

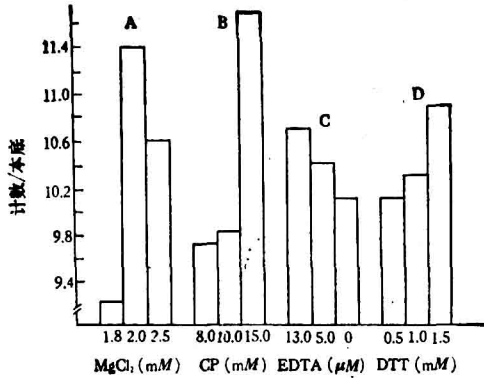


图1 不同因素浓度水平变化时翻译效率的比较

接提供者,而且需要量较高,但在网织红细胞溶胞物中的能量化合物是有限的,所以大部分能量由磷酸肌酸转化得到。从极差值看,CP对合成蛋白质的影响比较大,即它对能量合成系统是至关重要的。

**2. 羊垂体 mRNA 滴度曲线** 将正交试验结果综合后的无细胞蛋白质合成系统作了羊垂体 mRNA 滴度曲线(图2),由图2可见随着

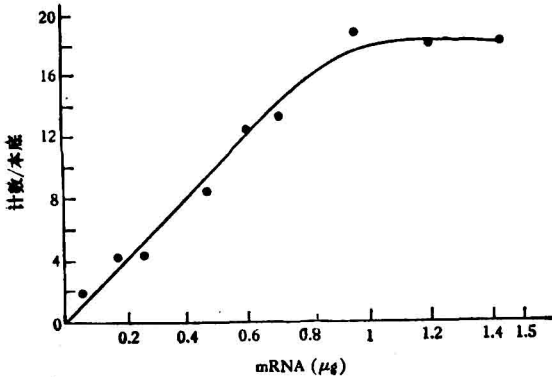


图2 羊垂体 mRNA 滴定曲线

mRNA 浓度增加,氨基酸掺入量也增加。这是典型的 mRNA 滴度曲线,但当 mRNA 量增加至一定量时,掺入不再增加反而稍有下降。出现这种现象有可能是当 mRNA 剂量增大后,带人的杂物也增多,因而引起抑制作用。此外,从计数/本底所得的值看,此系统对 mRNA 的翻译效率较正交试验前的系统提高十多倍(正交试验前的系统计数/本底值为 1.10—1.36 之间)。

### 3. 翻译产物的荧光自显影(Fluorography)

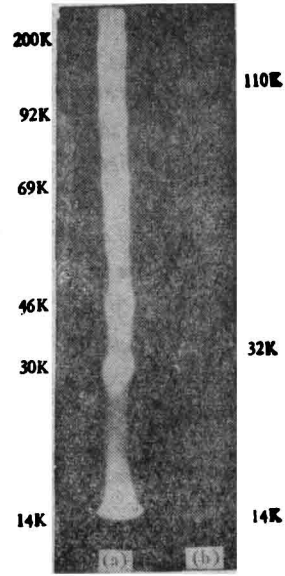


图3 羊垂体 LH mRNA 在兔网织红细胞溶胞物中翻译产物的荧光自显影图谱

(a) <sup>14</sup>C 标准蛋白  
(b) LH mRNA 翻译产物

**分析** 从免疫沉淀翻译产物的荧光自显影胶片上可见到如图3的条带,即分子量为 32,000 的 LH 分子;在分子量为 14,000 处有一较亮的带,它是 LH α 亚单位前体<sup>[13]</sup>以及垂体 FSH α-亚单位和 TSH α-亚单位前体的共同沉淀产物。由于本实验采用的 LH 抗体是抗 LH 整个分子,也包括抗 α、β 亚单位,而上述三种激素 α 亚单位的抗原性是完全一样的,所以这条带是它们的共沉淀产物;还有分子量超过 100,000 的大分子,这与 Jackson<sup>[14]</sup> 和 Ryan<sup>[15]</sup> 发现在 Sephadex G-100 纯化 LH 过程中有 LH 免疫活性的大分子相符合(它的分子量也是超过 100,000)。作者认为大分子 LH 可能是一种聚合体,它是在翻译后形成的。值得进一步探讨的是这种具有免疫活性的大分子 LH,它在体内的功能究竟是什么,它是否确实是分子量为 32,000 的聚合体,弄清这个问题将有助于阐明 LH 的新功能和特性。

### 参 考 文 献

[1] Alexander, D. C. et al.: J. B. C., 267, 2282,

- 1982.
- [ 2 ] Zaneveld, L. J. D. et al.: *Biochemistry of Mammalian Reproduction*, p. 320, 1982.
- [ 3 ] Rosen, J. M. et al.: *Biochemistry*, 14, 69, 1975.
- [ 4 ] Aviv, H.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 1408, 1972.
- [ 5 ] Crystal, R. G. et al.: *Method in Enzymol.*, 30F, 101, 1974.
- [ 6 ] Schrader, W. T. et al.: *Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology*, (Forth edition) p. 8, 1982.
- [ 7 ] Beato, Miguel: *FEBS Letters*, 59, 305, 1975.
- [ 8 ] Martial, J. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 1816, 1977.
- [ 9 ] BRL公司产品说明书。
- [ 10 ] Bonner, W. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 46, 83, 1974.
- [ 11 ] Palmiter, R. D.: *J. Biol. Chem.*, 248, 2095, 1973.
- [ 12 ] Thang, M. N. et al.: *FEBS Letters*, 61, 85.
- [ 13 ] Godine, J. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 255, 8780, 1980.
- [ 14 ] Liu, T-C et al.: *Endocrinology*, 105, 10, 1979.
- [ 15 ] Prentice, L. G.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40, 303, 1975.

[本文于1983年9月19日收到]

## 磁水处理的番茄中过氧化物酶同工酶的分析

薛毓华 蔡素雯 晋坤贞

校现周 李 杰 黄占斌

(西北大学生物系,西安)

同工酶在植物中普遍存在<sup>[1]</sup>,其中研究较多的是过氧化物酶同工酶。从同工酶谱的分析,可以识别基因的存在和表达,反映代谢调控的改变及生理功能的差异,因此它是研究生理生化变化的灵敏指标<sup>[2]</sup>。我们曾观察到番茄经磁水(磁处理水)处理后,氮代谢加强、核酸含量增加、硝酸还原酶活性提高等<sup>[3]</sup>。文献报道,植物经磁场处理后,其过氧化物酶、多酚氧化酶、酯酶等多种酶的活性均有提高<sup>[4]</sup>。

经磁水处理后,番茄中同工酶谱的变化及其机理的研究,未见报道。本文着重分析磁水处理后,番茄在不同发育期过氧化物酶同工酶的变化及其与抗病力的关系。

### 一、材料和方法

#### 1. 材料处理:

(1) 水培试验组 选用的番茄是带有抗烟草花叶病毒(TMV)基因的一代杂种——“早魁”。共分对照和1000、1200、1400Gs三个不

同磁强处理组,每组10缸,试验条件同文献[3]。

(2) 大田小面积(0.27亩)试验组 选用不具抗TMV基因的“杂交九号”番茄,观察磁水对植物抗病力的影响。自浸种(元月三日)开始,以磁处理的井水灌溉。磁水处理选用MPT-1.4×4磁处理器,磁场强度1.3—1.5KGS,磁程27×2mm,磁隙44cm<sup>2</sup>,流量18.8T/h。对照组以同源的普通井水灌溉。其它均系一般农业管理条件(西安市红星农业生产大队)。

#### 2. 取样

水培组分真叶期(苗龄15天),苗期(45天),第一花序现蕾期(59天)和盛花期(84天)四次采样。大田组分第一花序现蕾期(108天植株),盛花期(122天),座果期(135天)和果实成熟期(153天)四次采样。除水培真叶期采用全株外,其他均为功能叶,随机取样。

#### 3. 同工酶分离

采用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳方法<sup>[5]</sup>。样