



## 珠蛋白 mRNA 的分离及其在麦胚无细胞系统中指导珠蛋白的合成\*

张基增 钱若兰

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

哺乳动物红细胞成熟过程中, 在无核的网织红细胞阶段储存着大量的珠蛋白mRNA, 它指导的珠蛋白合成进行得很旺盛, 加之成熟的红细胞的功能蛋白绝大部分是血红蛋白, 故网织红细胞为提取珠蛋白mRNA的极好材料。

体外麦胚无细胞蛋白合成系统能够忠实地翻译各种mRNA的信息, 方法简便、制备快速, 而且具有内源信息含量低、对外源RNA的反应明显等优点, 所以被广泛用于蛋白质的翻译和调节的研究。

本工作采用本实验室制备的 Oligo (dT)-纤维素树脂分离纯化兔珠蛋白mRNA, 结合升温 and 降低离子强度的方法, 提高了珠蛋白mRNA的分离纯度, 它在麦胚无细胞系统中具有明显的促进标记氨基酸参入蛋白质的功能, 并观察了钾离子、温度、时间、mRNA浓度及麦胚提取液浓度与参入的相互关系, 对体外合成的蛋白质电泳分析表明: mRNA编码的珠蛋白被忠实地翻译出来了。

### 材料和方法

#### 一、兔网织红细胞mRNA的制备<sup>(1)</sup>

选取健康的大白兔(体重约2—5公斤), 按下述方法使之贫血: 第一天肌肉注射B<sub>12</sub>-叶酸溶液(0.01%B<sub>12</sub>和0.1%叶酸的生理溶液)1毫升, 皮下注射2.5%苯胍溶液(按每公斤体重0.25毫升计); 第二天至第六天注射相同量的苯胍溶液。贫血情况经甲酚亮蓝染色后用显微镜检查, 当网织红细胞数目超过50%, 即可取血用于RNA的制备。

分离总RNA程序图解如图示。

#### 二、mRNA的分离

使用本实验室制备的 Oligo (dT)-纤维素树脂[吸附Poly(A)的能力为706毫克/克树脂]进行柱层析分离。树脂装入夹套柱(0℃), 用0.5 M KCl, 0.01M Tris-HCl (pH 7.5)液充分平衡, 上样后分部洗脱条件如下: (1) 0℃ 0.5M KCl, 0.01M Tris-HCl (pH 7.5); (2) 54℃ 0.5M KCl, 0.01M Tris-HCl (pH7.5); (3) 54℃ 0.01M Tris-HCl (pH7.5)。洗脱的第三峰为mRNA, 经 Sephadex G-25脱盐和冰冻干燥后保存。

#### 三、麦胚无细胞蛋白合成系统<sup>(3)</sup>

麦种为“农大139”, 反应体积100μl, 内含: Tris-醋酸(2.5mM pH8.0); KCl(70 mM); MgAc<sub>2</sub>(2.5mM); 巯基乙醇(2.2 mM); ATP(1 mM); GTP(0.025mM); YtRNA(6μg); PEP(50μg)或PC(200μg); PK(2.5μg)或PCK(4μg); 19种非标记氨基酸(各0.03mM); <sup>14</sup>C-L-亮氨酸(1.25

\* 本文缩写:

mRNA-信使 RNA SDS-十二烷基硫酸钠 Oligo(dT)-寡聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸

PC-磷酸肌酸 PEP-磷酸烯醇丙酮酸

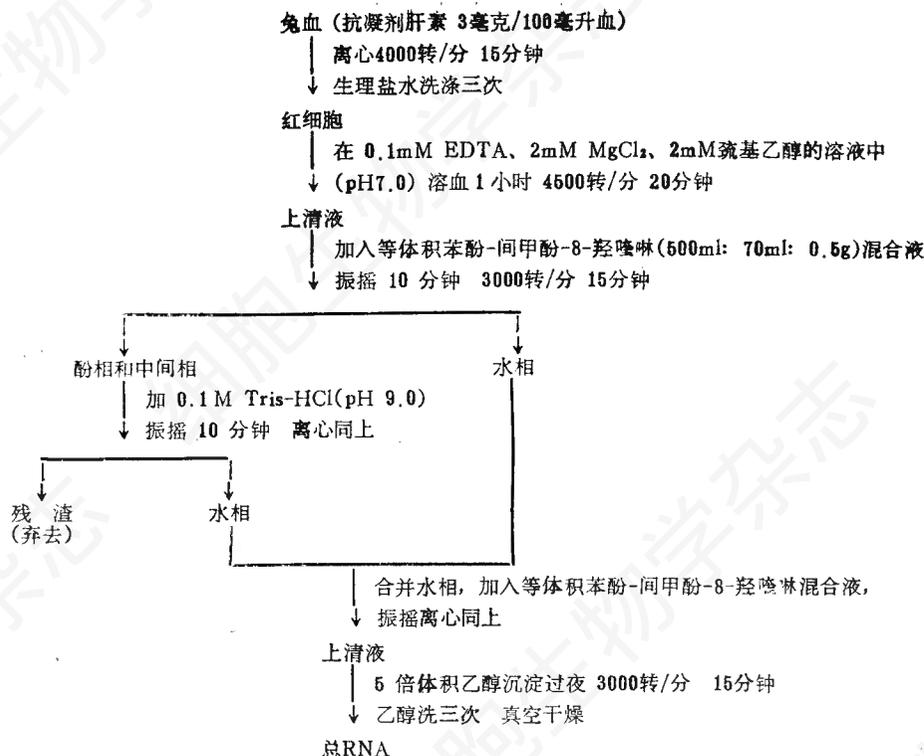
PCK-磷酸肌酸激酶 PK-丙酮酸激酶

YtRNA-酵母转移核糖核酸

Poly(A)-多聚腺嘌呤核苷酸

S26-麦胚匀浆经26000g离心的上清液

麦胚无细胞蛋白合成系统的建立得到中国科学院微生物研究所病毒复制组的指导和帮助, 特此致谢!



操作均在 4 °C 条件下进行, 总 RNA 的得率约为 1 毫克/毫升血

μci 312 mci/mM) 或 <sup>3</sup>H-L-亮氨酸 (5.0 μci, 22ci/mM); RNA (0.150, D<sub>260</sub>); S<sub>26</sub> (50 μl)。23°C 温育 60 分钟。

#### 四、聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) RNA 电泳: 胶浓度为 3%, 电极缓冲液 (0.04M Tris、0.02M NaAc、0.001M EDTA 二钠, pH7.4), 电泳 5 mA/管, 电泳时间 2 小时 10 分钟, 电泳毕胶柱用次甲基蓝染色, 染色带经扫描记录。

(2) 蛋白电泳: 胶含 7.5% 丙烯酰胺、1% SDS, 电极溶液 (0.01M 磷酸缓冲液 pH 7.0、0.1% SDS), 电泳时间二小时, 电泳后用氨基黑染色, 胶柱经扫描记录, 切片溶胶 (每片 2.5mm 厚, 加 0.5ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶解) 后测定放射性同位素。

### 结果和讨论

#### 一、mRNA 的分离鉴定

真核细胞绝大部分的 mRNA 3' 末端均带

有 Poly A 结构 (除组蛋白 mRNA 外), 因此可利用碱基配对原理进行亲和层析, 把 mRNA 专一地总 RNA 中分离出来。

我们采用了化学合成方法制备的 oligo (dT)-纤维素树脂, 经鉴定表明, 它吸附 Poly A 的能力良好, 从小牛肝、大鼠肝和兔网织血球等不同材料均能分离出显著促进氨基酸参入的 mRNA, 说明此树脂性能良好, 为分离纯化 mRNA 的极好工具。

在洗脱条件方面, 结合降低离子强度和升温的方法在第二步中仅升温而保持离子强度不变, 而第三步一举除去 KCl, 使绝大部分 mRNA 集中地洗脱下来, 峰形集中, 回收率高 (图 1)。鼠肝总 RNA 中 mRNA 约占 2%, 兔网织血球 mRNA 约占 2.4%<sup>(2)</sup>。

丙烯酰胺凝胶电泳分析说明, 分离的 mRNA 为单一谱带, 纯度较高 (图 2)。

#### 二、mRNA 对氨基酸参入的促进作用

mRNA 的信息作用主要是作为蛋白质合成

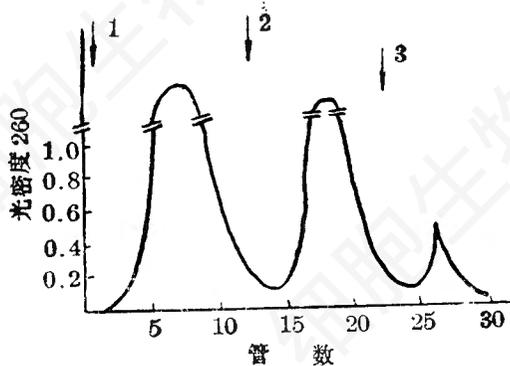


图1 网织红细胞RNA的柱层分离图谱

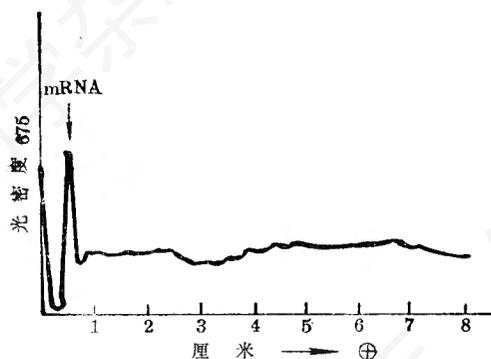


图2 mRNA 凝胶电泳扫描图形

的模板，指令一定的氨基酸相互连接形成多肽链，因此在合适的条件下，mRNA能极大地促进氨基酸参与。我们分离纯化的mRNA促进氨基酸参与高达几十倍到一百多倍（表1）。

表1 Oligo(dT)-纤维素柱层分离的 RNA 对氨基酸参与的促进

<sup>14</sup> C-亮氨酸参与* (CPM/0.15 O.D <sub>260</sub> )	促进倍数	<sup>3</sup> H-亮氨酸参与** (CPM/0.15 O.D <sub>260</sub> )	促进倍数
对照	44	对照	2.210
未上柱总RNA	387	未上柱总RNA	44.466
峰 I	128	峰 I	17.029
峰 II	330	峰 II	7.083
峰 III	4960	峰 III	123.868

\* PEP和PK系统

\*\* PCK和PC系统

### 三、氨基酸参与的反应动力学

(1) mRNA 浓度 在最适条件下100微升反应体积中 mRNA 最适浓度为 0.15 O.D<sub>260</sub>，反应最初呈直线上升，而后达到最大值，若再增加浓度参与也不再增加，反而有下降的趋势（图3）。

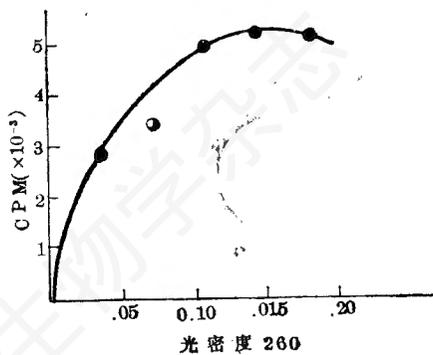


图3 mRNA的浓度对参与的影响

(2) 反应时间 温育 30 分钟参与达最大值，延长温育至 150 分钟仍保持原来水平（图4）。

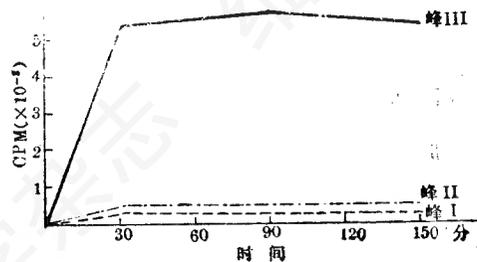


图4 Oligo(dT)-纤维素柱层析分离三个峰的时间参与曲线

K<sup>+</sup>70 mM, 温度23℃

(3) 温度 麦胚无细胞系统对温度敏感，在23℃比在37℃有更大的参与（图5），可能是由于蛋白质起始因子容易受热失活的缘故。

(4) 钾离子浓度 麦胚无细胞系统对钾离子很敏感，浓度过高时则极大地降低参与活力，最适浓度为70mM（图6）。我们发现柱

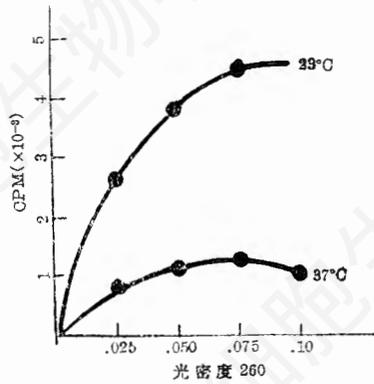


图5 温度对参入的影响  
K<sup>+</sup>70mM, 时间60'

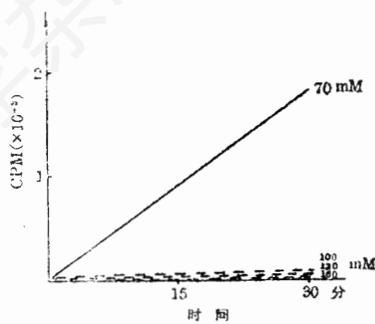


图6 钾离子强度对参入的影响

层洗脱峰未经 Sephadex G-25 脱盐几乎无活力表现, 推测其原因即在于含有多量的钾离子。

(5) 麦胚提取液浓度 麦胚用提取液 (0.05M KCl、1 mM MgAc<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>

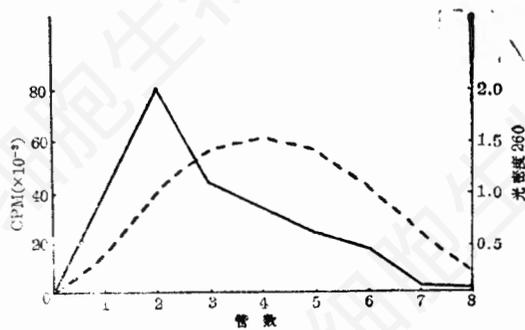


图7 麦胚提取液的浓度和参入活力的关系  
——CPM      .....光密度

pH7.5—8.0) 在研钵里磨碎后经过 26000g 离心20分钟, 吸出上清液通过Sephadex G-25柱, 分部收集乳白部分, 测定各部分的活力, 见表2和图7。从图表中可看出麦胚提取液的浓度和活力曲线不相一致, 活力最高部分偏向前面。

表2 麦胚提取液的浓度和参入活力的关系

收集部分	O. D <sub>260</sub> *	O. D <sub>280</sub> *	参入活力(CPM)
1	0.35	0.24	36.472
2	0.06	0.69	78.627
3	1.36	1.03	42.672
4	1.46	1.13	32.437
5	1.37	1.06	22.523
6	1.00	0.74	17.026
7	0.55	0.40	1.056
8	0.19	0.15	1.167

\* 稀释 100 倍

#### 四、mRNA 指导的珠蛋白的合成

我们采用 SDS-丙烯酰胺凝胶电泳对体外合成的产物进行了定性鉴定(图8和图9)。加入 mRNA, 同位素标记的蛋白质与标准珠蛋白电泳位置相同, 染色带扫描峰与同位素测定峰重迭, 证明标记的蛋白质为珠蛋白, 而不加 mRNA 则无峰出现。

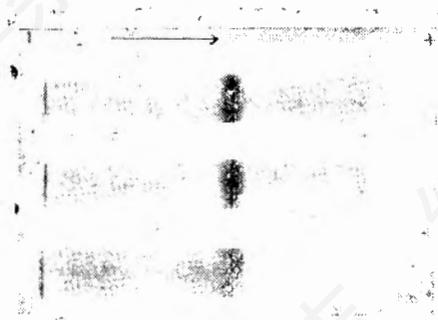


图8 丙烯酰胺凝胶电泳  
(空白和样品均加入载体珠蛋白)

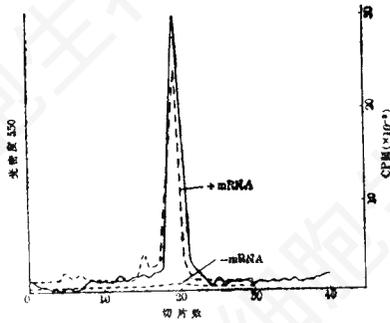


图9 胶柱扫描(550mm)和同位素测定图

### 小结

1. 本实验采用自己化学合成的Oligo(dT)-纤维素树脂, 结合升温 and 降低离子强度的方法, 分离得到呈单一电泳带的珠蛋白mRNA。
2. 在体外麦胚无细胞蛋白合成系统中, 此珠蛋白的mRNA高效率地促进标记氨基酸参



(上接第43页)

定量估价自身免疫的机能障碍等。

综上所述, 定量多参数流式细胞分析和分类技术作为一种崭新的技术进入生物学、生物医学和临床医学的领域。它以高速率对单个细胞进行分析, 获得多参数的信息, 并且进行高纯度的分类为特点, 引起人们对它的极大注意。这种技术的进一步改进和应用需要生物学家、临床工作者、工程技术人员和生物物理学家的进一步协作, 这就要求进一步改进样品制备的技术, 扩大应用的范畴和仪器的改进。有人预言, 在本世纪末流式细胞光度术, 在研究和临床医学中将象液体闪烁仪和自动分析

入, 最适温度23°C而非37°C, 并发现参入活力曲线与麦胚提取液浓度不一致的现象。

3. 对体外合成的蛋白质进行分析鉴定表明, 珠蛋白被忠实地翻译出来了。

### 参考文献

- (1) B. E. Roberts et al. 1974. The cell-free synthesis and assembly of viral specific polypeptides into TMV particles *Virology* 59, 307-313
- (2) A. W. Nienhuis et al. 1974 Preparation of Globin messenger RNA *Methods in Enzymology* XXX(F), 621-630
- (3) 实生所三室等, 1977 Oligo dT-纤维素与 OligoU-纤维素的合成及其应用 *生物化学与生物物理进展* 4, 8-11
- (4) 微生物所病毒复制组 1976 小麦胚无细胞体系中 TMV-RNA 指导的氨基酸参入 *生物化学与生物物理学报* 8(2), 179-186

仪一样重要, 看来这种估计并不夸大。

### 参考文献

- (1) Crissman, H. A., Mullaney, P. F. and Steinkamp, J. A., 1975 In "Methods in Cell Biology" Vol IX ed. by prescott, D. M., Academic press, New York, p. 179-246.
- (2) Horan, P. K. and Wheelless, L. L., Quantitative Single Cell Analysis and Sorting, *Science*, 1977, 198, P. 149-157.
- (3) Herzenberg, L. A., Sweet, R. G. and Herzenberg L. A., Fluorescence-activated Cell Sorting, *Scientific American*, 1976, 234, P. 108-116.