

## 影响麦胚无细胞合成体系的氨基酸参入及其翻译产物分子量的因子

吴世宣 赵淑珍 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

不同来源的麦种所制成的麦胚无细胞蛋白质合成体系,在以 TMV-RNA 为模板时,不仅影响氨基酸参入效率,而且影响其合成大分子的能力。参入效率和合成大分子能力并不平行,冬小麦<sup>33</sup>制成的体系能合成分子量较大的蛋白质。

在常规的麦胚反应体系中,补加少量 tRNA 或其它非模板性的核糖核酸进行竞争性保护,能明显提高其合成大分子的能力。

麦胚体系经保温后氨基酸参入值的降低主要是由于 S-26 提取液的失活所致。

麦胚无细胞体系已被证明是个有效的体外蛋白质合成体系,它广泛地用于翻译各种来源的 mRNA<sup>[1]</sup>。虽然麦胚体系效率高、内源 mRNA 含量低、制作简便,但是不易翻译出分子量大的蛋白质产物,所以忠实性较差,这可能是由于无细胞体系中含核糖核酸酶之故<sup>[2,3]</sup>。关于提高麦胚无细胞体系合成大分子的能力的方法已有不少报道<sup>[4-10]</sup>,本文报道不同麦种的胚对翻译产物分子量大小的影响,以及加 RNA 可以明显地提高大分子蛋白质合成的比率。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 麦胚体系的制备

基本按参考文献[1]进行,稍加改进。每 100 mg 麦胚加等量玻璃砂,0.8ml 匀浆液(20mM pH 7.5 Tris-醋酸,1mM 醋酸镁,2mM 氯化钙)研磨后离心(26000 × g)。上清液通过用 20mM pH 8.0 Tris-醋酸,100mM 醋酸钾,2.5mM 醋酸镁,2 mM DTT 充分平衡过的 Sephadex G-25 柱。用平衡液洗脱,并收集空床体积内流出的乳白色溶液。一部分立即用于保温反应,其余的分成 0.5ml 一份放在液氮中贮存备用。

反应总体积一般为 50μl 含有 25μl 麦胚提取液,10 mM HEPES-KOH,12.5mM pH 8.0 Tris-

醋酸,2.5mM 醋酸镁,100mM 醋酸钾,1mM ATP,0.025mM GTP,每毫升反应液中含 30μg 酵母 tRNA,25μg 丙酮酸激酶 500μg 磷酸烯醇式丙酮酸钠盐,120—160μg TMV-RNA,100 μCi <sup>14</sup>C-小球藻蛋白水解液(中国医学科学院简阳分院,比度 50mCi/mg 碳原子)在 30℃ 反应 60 分钟或 23℃ 2 小时,反应后吸 5μl 点样计数。

#### (二) 平板凝胶电泳分析麦胚无细胞体系的翻译产物

基本参考文献[11]进行,但在 TCA 沉淀后,用 80% 丙酮洗三次,然后溶解,进行平板凝胶电泳分析。凝胶干燥后进行放射自显影和荧光放射自显影。

#### (三) 核酸的制备

TMV-RNA 的提取按 A. marcus 等人的方法提取<sup>[12]</sup>,250mg TMV 加 0.6ml 0.5M EDTA,0.6 ml 10% SDS,加水至 12ml,然后加 14ml 经 EDTA 洗过的酚,震荡 10 分钟,离心分相后,取水相再用酚重抽提二次,最后所得的水相加 0.05ml 2M 醋酸钾 pH 5.5,和 2.5 倍体积的冷乙醇在 -15℃ 沉淀过夜,离心,沉淀溶于蒸馏水中。

商品酵母 tRNA (购于上海生物化学所东风试剂厂),在蒸馏水中透析 24 小时,或用 Sephadex G-25 柱过滤,收集空床体积下来的紫外吸收峰。

本文于 1981 年 1 月 6 日收到。

周家炽教授审阅全文

白菜总核酸按前法提取<sup>[13]</sup>。

#### (四) <sup>14</sup>C-小球藻蛋白水解液中氨基酸含量的分析

基本按参考文献[13]进行,把2 $\mu$ l的<sup>14</sup>C-小球藻蛋白水解液和10 $\mu$ l 20种氨基酸混合物(各为0.24mM),混合后进行双向层析,层析纸为新华1号滤纸 23 $\times$ 23cm,第一相为正丁醇:冰醋酸:水=4:1:5的正丁醇饱和溶液,展层两次,每次8小时。第二相为80%苯酚,缸内用5ml 0.5%氨水饱和,展层10小时。每次上行层析约20cm左右,然后用热风吹干去酚。再用0.5%水合茚三酮(或吡啶酮)显色,分别剪下相应的氨基酸色斑,放在装有5ml 闪烁液的测量瓶中测定放射性计数。

数。

#### (五) 小麦种子由中国农业科学院作物研究所提供

## 结果和讨论

### (一) 不同品种的小麦胚或黑麦胚对翻译产物分子大小的影响

我们制备不同小麦、冬小麦麦胚提取液时,除农大139用500mg胚外,其余每种均为200mg。表1为不同种麦胚提取液的浓度( $A_{260}/\text{ml}$ )对促进<sup>14</sup>C-氨基酸参入数的影响。

表1 不同品种的小麦麦胚提取液对总cpm及cpm/ $A_{260}$ 值的影响

Table 1. Total cpm and cpm/ $A_{260}$  stimulated by the S-26 extract from embryo of various varieties of wheat

| 品 种                 | 冬小麦鉴 <sub>31</sub>                    | 武功黑麦          | 农大 139                | 春小麦<br>77K-3144             | 杨 麦           | 小黑麦<br>(6倍体)  | 小黑麦新麦<br>10号                       |
|---------------------|---------------------------------------|---------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|---|------------------------------------|
| race                | Winter<br>wheat<br>jian <sub>31</sub> | Wugong<br>rye | Nongda <sub>139</sub> | Spring<br>wheat<br>77K-3144 | Yang<br>wheat | FH <sub>12</sub> -1<br>Tritical<br>(hexaploid)<br>FH <sub>12</sub> -1 | Tritical<br>xin wheat<br>10 number |
| $A_{260}/\text{ml}$ | 33.5                                  | 52.5          | 89.8                  | 42                          | 44            | 53  | 39                                 |
| 总 cpm               | 8830                                  | 9412          | 14853                 | 13387                       | 8857          | 8190  | 6034                               |
| cpm/ $A_{260}$      | 52715                                 | 35655         | 41305                 | 63750                       | 40255         | 30905   | 30945                              |

注: 总体积 50 $\mu$ l, <sup>14</sup>C-小球藻蛋白水解液 1 $\mu$ Ci/50 $\mu$ l, TMV-RNA 6 $\mu$ g/50 $\mu$ l, 点样 5 $\mu$ l 在 NE8312 液体闪烁仪上测定。

Note: Total volume 50 $\mu$ l, <sup>14</sup>C-algae protein hydrolysate 1Ci/50 $\mu$ l, TMV-RNA 6 $\mu$ g/50 $\mu$ l counts were obtained by measuring 5 $\mu$ l sample in NE8312.

由表中可见除了春小麦 77K-3144 和冬小麦鉴<sub>31</sub>的 cpm/ $A_{260}$  比值高以外,其余的都相差不大。取其中4种进一步做其翻译产物分析(见图1)。

由图1可以看出不同麦胚提取物同在TMV-RNA指导下翻译产物的分子大小不一样,且合成大分子的能力不与参入数呈正比。鉴<sub>31</sub>的参入数比春小麦 77K-3144低,但合成产物的分子量大,而且大分子的比例也显著地高于其他几种麦种。尽管产物的大小及其比例随着麦种而改变,但翻

译出来产物的图谱却能彼此相对应,这可能是由于在不同麦胚中存在同一类的核糖核酸酶,该酶降解了TMV-RNA从而形成分子量较小的mRNA,同时也说明TMV-RNA的降解不是随意的而是有一定的规律。

### (二) RNA的保护作用

分别把健白菜的总核酸和透析过的商品酵母tRNA加入反应体系。白菜总核酸的 $A_{260}/\text{ml}$ / $A_{260}/\text{ml}$  72, 2.4%聚丙烯酰胺凝胶电泳,加样25 $\mu$ g,电泳2.5小时,紫外扫

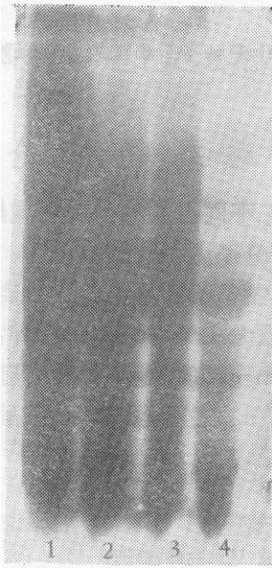


图 1 不同麦胚提取液同在 TMV-RNA 指导下翻译产物的比较

Fig. 1. Effect of wheat embryo extracts from different sources on the TMV-RNA directed translation products

50 $\mu$ l 的反应样品(产物处理, 分析方法见材料与与方法部分)在 13% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 7 小时, 在液氮中荧光放射自显影 14 天

1: 冬小麦鉴<sub>31</sub> 2: 杨麦 3: 春小麦 77K-3144 4: 农大<sub>139</sub>

50 $\mu$ l of samples (for the treatment and analysis of products, see materials and methods) was electrophoresed in 13% polyacrylamide gel for 7h, the photograph was exposed for fluorography in liquid nitrogen for 14 days.

1: Winter wheat jian<sub>31</sub> 2: Yang wheat  
3: Spring wheat 77K-3144 4: Nongda<sub>139</sub>

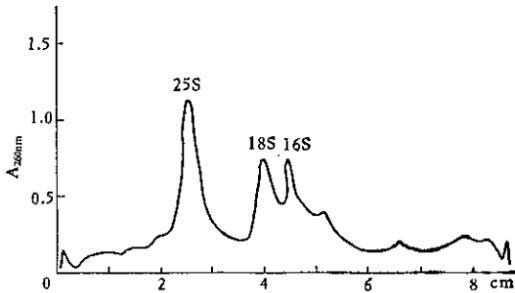


图 2 白菜总核酸的凝胶电泳紫外扫描图

Fig.2 Scanning profile of the polyacrylamide gel electrophoresis of the total RNA from Chinese cabbage leaves

描图谱如图 2 (扫描仪为 Joyce Lobel U. V. Sanner)。

由图 2 可见白菜总核酸主要为 rRNA, 外加 RNA 非但不能促进参入, 还稍有抑制作用(见表 2), 外加 400 $\mu$ g/ml rRNA 或 tRNA, 对参入的抑制为 10—15% 左右, 再加抑制就更加明显, 外加 rRNA 或 tRNA (400 $\mu$ g/ml) 对翻译产物的影响见图 3 和图 4。

表 2 外源非模板性 RNA 对 TMV-RNA 指导的氨基酸参入的影响

Table 2. The effect of exogenous non-template RNA on the incorporation of amino acid directed by TMV-RNA

| RNA<br>麦胚<br>Wheat<br>embryo                             | 对照<br>Control<br>(cpm) | tRNA<br>400 $\mu$ g/<br>ml<br>(cpm) | 白菜总 RNA<br>Chinese<br>cabbage<br>390 $\mu$ g/ml<br>(cpm) |
|--|------------------------|-------------------------------------|--|
| 农大 <sub>139</sub><br>Nongda <sub>139</sub>               | 34521                  | 29206                               | 28071  |
| 冬小麦鉴 <sub>31</sub><br>Winter wheat<br>jian <sub>31</sub> | 22836                  | 19028                               | 20591  |

注: 都为 10 $\mu$ l 的计数

Note: 10 $\mu$ l of samples were counted for cpm cited here

图 3 中, 1、2、3、4 为不加 rRNA 或 tRNA 的翻译产物其结果与图 1 相同。5 和 6、7 和 8 两组说明同种麦胚的无细胞体系在加了外源核酸保护后能生成更大分子量的翻译产物。这种保护功能与所加核酸的种类无关。无论是白菜中的以 rRNA 为主的总核酸还是酵母中的 tRNA 都有同样的作用。

商品酵母 tRNA 必须经蒸馏水彻底透析或经 G-25 柱纯化才能使用, 否则严重抑制体系的参入, 可能由于 tRNA 制品中含有 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 等对蛋白质合成的抑制因子。

已知多胺等物质如精胺 (Spermine) 可以促进参入, 更可以促进大分子的生成<sup>[9]</sup>,

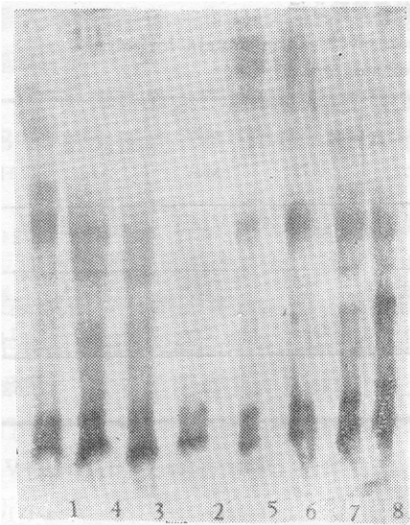


图 3 外加 rRNA 或 tRNA 对翻译产物的影响  
Fig. 3 Effect of additional rRNA and tRNA on the translational products

50μl 样品, 13% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在冰箱中放射自显影 37 天

50μl samples were applied to 13% polyacrylamide gel, the photograph was autoradiographed for 37 days in refrigerator.

1—4. 图例同图 1

- 5, 6. 冬小麦茎 31; 5. 加 tRNA 400μg/ml  
6. 加白菜总 RNA 390μg/ml  
7, 8. 农大 139; 7. 加 tRNA 400μg/ml  
8. 加白菜总 RNA 390μg/ml

1—4. Legend as in figure 1

- 5, 6: Winter wheat Jing 31; 5. +tRNA 400μg/ml;  
6. +Chinese cabbage 390μg/ml 7, 8: Nongda 139;  
7. +tRNA 400μg/ml; 8. +Chinese cabbage 390μg/ml

但在我们试验条件下加不同量的精胺既不能促进参入, 也不利于大分子的合成。却有抑制参入的作用, 即使在降低  $Mg^{2+}$  条件

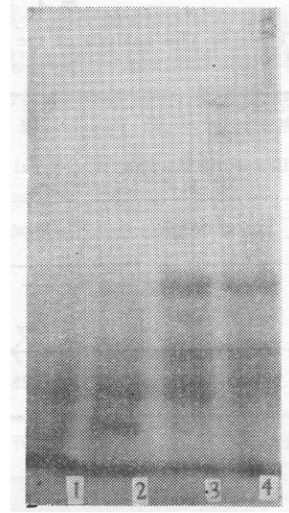


图 4 精胺和 tRNA 对反应产物的影响  
Fig. 4 Effect of spermine and tRNA on the products

加样 50μl, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在液氮中荧光放射自显影 20 天

1, 2:  $Mg^{2+}$  2mM, 精胺分别为 20 和 40μM

3, 4:  $Mg^{2+}$  2mM, 酵母 tRNA 分别为 100 和 400 μg/ml

Electrophoresis was carried out with 50μl of sample on 10% polyacrylamide gel. Fluorography was performed in liquid nitrogen for 20 days

1, 2: 2mM  $Mg^{2+}$ , 20 and 40μM spermine respectively

3, 4: 2mM  $Mg^{2+}$ , 100 and 400μg/ml yeast tRNA respectively

下也如此, 见表 3。

由表 3 可见即使在最适条件下 (20 20mM 精胺, 2.0mM  $Mg^{2+}$ ) 精胺也不能促进参入, 同样对大分子的合成也没有促进作用。

表 3 精胺对 TMV-RNA 指导的氨基酸参入的影响

Table 3 The effect of spermine on the incorporation of amino acid directed by TMV-RNA

| Spermine (μM)              | 0     | 10    | 20    | 40    | 60   | 20  |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-----|
| $Mg^{2+}$ (mM)             | 2.5   | 2.0   | 2.0   | 2.0   | 2.0  | 2.5 |
| 10μl 样品 cpm (10μl samples) | 32629 | 24605 | 28511 | 12193 | 1849 | 915 |

表 4  $^{14}\text{C}$ -小球藻蛋白水解液的氨基酸分析Table 4. The analysis of the amino acid composition of  $^{14}\text{C}$ -algae protein hydrolysate by two dimension paper chromatography

| 氨基酸<br>Amino acid | 亮+异亮 <sup>△</sup><br>Leu + Ile | 苯丙<br>Phe   | 缬<br>Val | 脯<br>Pro | 酪<br>Tyr     | 丙<br>Ala | 蛋*<br>Met | 精<br>Arg   | 组<br>His |
|-------------------|--------------------------------|-------------|----------|----------|--------------|----------|-----------|------------|----------|
| cpm/C<br>原子       | 3963                           | 1197        | 9090     | 6292     | 541          | 15516    | 0         | 4128       | 2416     |
| 氨基酸<br>Amino acid | 苏<br>Thr                       | 谷氨酰胺<br>Gln | 甘<br>Gly | 丝<br>Ser | 天冬酰胺*<br>Asn | 谷<br>Glu | 色*<br>Try | 半胱*<br>Cys | 赖<br>Lys |
| cpm/C<br>原子       | 5575                           | 1610        | 12228    | 7832     | 0            | 14168    | 0         | 0          | 5312     |

注:  $\Delta$ : 亮+异亮在此层析系统中未分开;

\*: 0 表示其计数低于平均本底;

 $^{14}\text{C}$ -小球藻蛋白水解液取  $1\mu\text{Ci}$ 。Note:  $\Delta$ : Leucine and isoleucine were not separated in the developing systems used.

\*: The cpm was lower than background

One Ci of  $^{14}\text{C}$ -algae protein hydrolysate was used in this experiment.

表 5 补加非标记氨基酸对氨基酸参入的影响

Table 5. The effect of supplementing nonlabeled amino acids

| 非标记氨基酸<br>Nontabeled amino acid | 不补加<br>Control | 补加 7 种<br>Supplement 7 | 补加 20 种<br>Supplement 20 |
|---------------------------------|----------------|------------------------|--------------------------|
| cpm                             |                |                        |                          |
| cpm/10 $\mu\text{l}$            | 20823          | 19959                  | 7272                     |
| (%)                             | 100            | 96                     | 35                       |

由图 4 中可以很明显地看到加 tRNA 比加 Spermine 对大分子的合成更有促进作用。

### (三) 过 Sephadex G-25 柱后的 S-26 仍有游离的氨基酸存在

我们采用双向纸层析对  $^{14}\text{C}$ -小球藻蛋白水解液进行了氨基酸分析, 结果见表 4。

由表 4 可见,  $^{14}\text{C}$ -蛋白水解液中基本上没有蛋氨酸、天冬酰胺、色氨酸和半胱氨酸, 只含微量的酪氨酸、谷氨酰胺和苯丙氨酸。在我们用  $^{14}\text{C}$ -蛋白水解液标记时, 补加了 7 种缺少的氨基酸及补加 20 种氨基酸, 并与不补加的进行比较, 结果见表 5。

结果表明, 补加 7 种  $^{14}\text{C}$ -蛋白水解液

中稀少的非标记氨基酸并没有提高参入水平, 但也没有明显的竞争性抑制作用。而加 20 种非标记的氨基酸则有很明显的竞争性抑制作用。此 7 种氨基酸既没有竞争性抑制也没有促进作用, 表明在 S-26 中已存在着少量的游离氨基酸, 这样即使同位素中缺少一些氨基酸也无需补加。为什么 S-26 中还存在游离氨基酸? 我们所用 Sephadex G-25 的柱床体积已是一般上柱液的 15—20 倍, 而且还是细颗粒。似乎不可能是由于大分子和小分子没有分开之故, 可能是由于少量氨基酸附着在大分子上或是过柱后的匀浆液里蛋白酶分解而重新产生的。因此, 若要提高  $^{14}\text{C}$ -蛋白水解

液参入率, 还需进一步减少 S-26 中的游离氨基酸。

#### (四) 体系参入迅速降低的主要原因是 S-26 的失活而不是 TMV-RNA 的降解

麦胚体系加 TMV-RNA 保温后典型的反应时间曲线见图 5 中 A。在保温 40 分钟后, 就很少有新的参入。参入迅速降低的主要原因是 S-26 的失活还是 TMV-RNA 降解呢? 或者是两者共同造成的? 为此我们考察了 S-26 在保温不同时间后再加 TMV-RNA 的反应动力学, 结果如图 5 中 B 所示。

尽管在 S-26 保温后加进的 TMV-RNA 是新鲜的, 完整的, 但随 S-26 保温时间的加长, 体系参入效率降低的速度仍然很快。而且当把两条曲线同样时间的各点计数分别相加后, 所得到的曲线 C, 几乎是一条水平直线, 不随时间的改变而改变。这究竟说明了什么问题呢? 由于曲线 C 反映的是完全的理想反应体系, 即在反应进行到某一时间后再换上新的完整的 TMV-RNA 继续反应的情况, 因此不随反应时间改变的曲线 C 表明不管反应到什么时候, 再换上新的 TMV-RNA 并不能增加参入。所以 RNA 的降解与否并不影响参入水平, 可能只影响合成产物分子大小。据此参入值随反应时间的延长而迅速降低的主要原因可能就在于 S-26 失活了。究竟 S-26 中的什么成份最易失活, 有待深入的研究。

蛋白质合成是个十分复杂的过程, 影响其翻译效率和忠实性的因子很多, 根据本文结果, 不仅麦胚的来源不同, 而且 S-26 提取液中游离氨基酸, S-26 在保温后的失活都能影响氨基酸的参入。氨基酸参入值的多少并不与翻译产物的分子量大小成正相关。影响产物分子量的主要原因除

麦胚来源外还有麦胚中原有的核糖核酸酶对模板 RNA 的降解, 因此用非模板 RNA 进行竞争性保护是增加其翻译忠实性的有效方法。

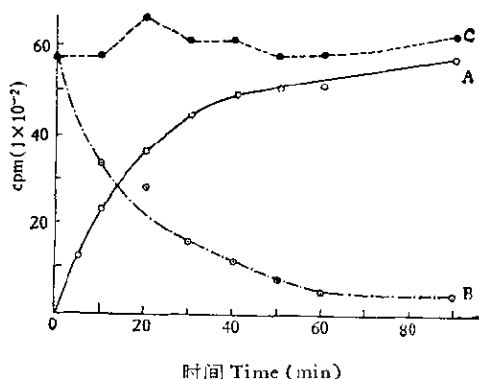


图 5 时间对 cpm 的影响

Fig. 5 Effect of time on cpm

- A: 麦胚体系加 TMV-RNA 保温后不同时间的参入值  
B: S-26 保温不同时间后再加 TMV-RNA 的参入值  
C: A、B 曲线同时间的各点计数分别相加后的参入值  
A: A typical curve of amino acids incorporation in wheat embryo cell-free system programmed by TMV-RNA  
B: Amino acid incorporation directed by TMV-RNA which was added after the incubation of S-26 extract at different intervals  
C: The curve was made by summing the cpm of each correspondent spot in curve A and B

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所病毒复制组: 生物化学与生物物理学, 8 (2): 179, 1976。
- [2] Tsuruchi, Y. et al.: *Nature*, 266: 235, 1977.
- [3] Miura, K. I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2734, 1977.
- [4] Weber, L. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3254, 1977.
- [5] Weber, L. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 252: 4007, 1977.
- [6] Nivleau, A. and A. G. Quash: *FEBS Letter*, 99: 20, 1978.
- [7] Abraham, A. K. et al.: *FEBS Letter*, 101: 93, 1979.
- [8] Hunter, A. R. et al.: *J. Biochem.*, 75: 149, 1977.
- [9] Atkins, J. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, 250: 5688, 1975.
- [10] Scheele, G. and P. Blackburn: *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA*, **76**: 4898, 1978.

[11] 彭学贤等: 微生物学报, **19** (1): 34, 1979.

[12] Marcus, A. et al.: The wheat embryo cell-

free system. *Methods in Enzymology* Vol. XXX Part F: 749, 1974.

[13] 莽克强等: 植物病理学报, **7**(2):117, 1964.

## FACTORS AFFECTING THE INCORPORATION OF AMINO ACIDS AND THE TRANSLATION PRODUCTS IN WHEAT EMBRYO CELL-FREE SYSTEM

Wu Shixuan Zhao Shuzhen Mang Keqiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Both the incorporation efficiency of amino acids and the ability of synthesizing high M. W. proteins in the wheat embryo cell-free system varied with the sources of the embryo used. This efficiency and ability of the synthesis are not necessarily to be paralleled each other.

Cell-free system from winter wheat jian<sub>31</sub> presented a higher ability to synthesize high M. W. protein than others when template TMV-RNA was added. Addition to

the cell-free system of 200—400  $\mu\text{g/ml}$  of yeast tRNA or nontemplate RNA extracted from healthy Chinese Cabbage Leaves can significantly improve the ability of synthesize high M. W. proteins by competitive protection while the presence of spermine gave no effect

It is the loss of the S-26 activity after incubation that causes the decrease of the amino acid incorporation.