

生物化学的一个新领域——真核细胞mRNA

于富才

(中国科学院海洋研究所)

信使核糖核酸mRNA系由西文 Messenger RNA 而来。它是生命活动的重要物质之一，是遗传信息的传递者。从 mRNA 研究的现状看，它不仅是生物化学工作者感兴趣的研究对象，而且也是整个生物学，特别是遗传学工作者期望及早解决的主要问题之一。近几年来，有关mRNA的研究进展很快。本文主要就真核细胞mRNA在海洋生物中的研究现状，作一概要介绍。

一、mRNA 的特性

在细胞中，mRNA含量少，约占核糖核酸总量的1—5%。mRNA的沉降系数因来源不同而有很大差异，分子量至少有 $0.5-2 \times 10^6$ 道尔顿。它的分子很不均一，在通常情况下与核糖体连在一起。mRNA分子中的核苷酸组成比例与该细胞中的DNA相对称。如果以DNA中的胸腺嘧啶(T)与RNA中的尿嘧啶(U)相对称，则mRNA分子中腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)及U的克分子比例与DNA分子中的A、G、C、T的克分子比例一致。

在细胞核中，mRNA在依赖于DNA的RNA多聚酶(RNAPolymerase)作用下，以DNA为模板转录出mRNA的前体，又在酶促作用下，于mRNA前体的3'端加上多聚腺苷酸Poly(A)，经过选择性降解，最后形成成熟的mRNA而进入细胞质。

在细胞分裂时，遗传信息从DNA分子到蛋白质分子间的传递过程中，第一步由DNA分子一定的碱基排列顺序通过碱基互补原则传递给mRNA，也就是以DNA为模板合成

mRNA，此过程称为转录(Transcription)，第二步是mRNA将从DNA转抄来的遗传信息传递给蛋白质的过程，即核糖体根据mRNA分子上的核苷酸排列顺序(遗传信息)，选择相应的氨基酸合成多肽，此过程称为翻译(Translation)。在某种特定条件下，生物也能以mRNA为模板，按照RNA中的核苷酸顺序合成DNA，亦即遗传信息由RNA反向转给DNA，此称反转录(Reverse transcription)。

mRNA分子分为三部分，中间部分是蛋白质编码区，链的两端分别为3'端不编码区和5'端不编码区。合成蛋白质的起始密码子位于5'端不编码区内。很多mRNA在5'端还有一个特殊的“帽子”结构，它就是第七位上甲基化的鸟嘌呤核苷酸；终止密码子位于3'端不编码区内，绝大多数mRNA在3'端有Poly(A)结构。Poly(A)和帽子结构引起了很多学者的兴趣，但迄今其生物功能不十分清楚，尚有待进一步阐明。

由于mRNA具有上述特性，因而越来越引起国内外生物学工作者的重视，而在海洋生物学中，科学工作者们也在开展这方面的研究并且取得了较好的结果。

二、mRNA的纯化

1. 利用mRNA的结构特征进行纯化

mRNA分子的3'端的Poly(A)能与多聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸Oligo(dT)或多聚尿嘧啶核苷酸Oligo(U)形成碱基配对。利用这一结构特征，先将Oligo(dT)或Oligo(U)挂在纤维素树脂上，当含有mRNA的溶液流经

纤维素柱时, Oligo (dT) 或 Oligo (U) 则与 mRNA 分子 3' 端 Poly (A) 形成碱基配对, mRNA 就被吸附在柱上, 其他 RNA 分子不被吸附, 从而达到纯化的目的。作者曾利用此法分离出含 Poly (A) 的文昌鱼卵巢卵母细胞 mRNA。同样, 微孔滤纸和微晶纤维素也能选择性地吸附 mRNA, 因此也常被利用。但对 mRNA 亲和力强的核糖体核糖核酸 (rRNA), 采用此种简单的方法达不到有效的分离。作为必要措施, 提出了如在层析分离前在 60°C 加热数分钟, 或在缓冲液中加入十二烷基磺酸钠 (SDS), 或在较低的盐浓度下在 0°C 结合再于室温中溶出等等改进方法。

2. 应用免疫技术纯化特异性 mRNA

在细胞质中, mRNA 同核糖体结合形成聚核糖体, 开始进行蛋白质的合成。在一个生长旺盛的细胞 (如文昌鱼或海胆等的卵母细胞) 中, 同时进行着很多蛋白质的合成, 因此会有各种各样的聚核糖体。如何从中分离出合成特定蛋白质的聚核糖体呢? 又如何从特定蛋白质的聚核糖体中分离出特定蛋白质的 mRNA 呢? 免疫技术为我们提供了一个特异的方法。

聚核糖体免疫技术的原理在于: 特定蛋白质所产生的抗体, 能特异性地同聚核糖体上的新生肽链作用, 利用这一性质, 我们可以在体外使抗体蛋白与混合聚核糖体反应, 抗体与抗原产生特异性沉淀反应, 收集沉淀可获得单一抗原的聚核糖体, 最后从单一聚核糖体中分离单一 mRNA。

因此, 首先通过各种蛋白质分离纯化技术, 制备高纯度蛋白质作为抗原, 以免疫动物得到抗血清, 经亲和层析。也就是说, 将特定抗原结合到被 CNBr (溴化氰) 活化的 Sepharose (琼脂糖) 上, 使抗血清经此柱亲和分离后, 再经 CM-DEAE-纤维素柱纯化, 便可得到特异性的不含核糖核酸酶 (RNase) 的抗体。然后, 通过超离心法制备含有各种聚核糖体的混合制剂, 作为分离特异性聚核糖体之用。一般是将组织或细胞, 加抽提液使之成为匀浆, 由适当离心取上清液, 再经不连续的蔗

糖密度离心, 即得到聚核糖体混合制剂。

聚核糖体免疫技术不断完善, 已从直接免疫沉淀法过渡到免疫性更强的间接免疫吸附法。

(1) 直接免疫沉淀法 将特异性的抗体加进聚核糖体溶液中, 在 0—4°C 下温育, 抗体同聚核糖体的新生肽链进行特异性的免疫反应, 产生特异性的聚核糖体-抗体复合物, 此复合物为水溶性的。当顺序加入特定抗原和足够过量的抗体后, 特异性的聚核糖体即形成沉淀析出。本法由于存在着抗体需要量大、易感染 RNase 和共沉淀作用带下部分非特异性聚核糖体等缺点, 给 mRNA 提纯造成一定的困难, 故目前已很少有人应用。

(2) 直接免疫吸附法 本法是基于合成特定蛋白质的聚核糖体, 通过其新生肽链同特异性的抗体反应, 形成聚核糖体-抗体复合物, 这种复合物又同共价交联于固体支持介质上的特定蛋白质 (抗原) 相反应, 特异性吸附到支持介质上。非特异性的聚核糖体可从支持介质上洗去, 而特异性吸附在支持介质上的抗体-聚核糖体复合物, 用含乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 的缓冲液洗脱、解离, 得到含特异性 mRNA 及核糖体亚基的混合液。本法的优点是特异性高, 但需大量的纯蛋白, 致使其广泛应用受到限制。

(3) 双重抗体抗原反应法 (Double immunoprecipitation) 双重抗体抗原反应法又叫间接免疫沉淀法, 就是将特定的纯蛋白免疫动物得到的抗体 (第一抗体), 再在另一种动物内免疫, 得到此种蛋白抗体的抗体 (第二抗体)。聚核糖体制剂同第一抗体混合, 在 0°C 放置 30 分钟左右, 第一抗体同合成该蛋白质的聚核糖体上的新生肽链结合, 形成可溶性抗体-聚核糖体复合物。其次加以 40 倍于第一抗体的第二抗体, 在 0°C 温育 1 小时, 立即产生肉眼可见的混浊, 即不溶性一抗-聚核糖体-二抗复合物。免疫沉淀物通过不连续的蔗糖密度离心沉降, 得到所需要的特异性聚核糖体。用此法制备的特异性聚核糖体, 其纯度可达 99% 以

上,非特异性污染只有0.4%。作者等曾用此法分离出青岛文昌鱼卵母细胞原肌球蛋白聚核糖体核糖核酸。

双重抗体抗原反应法,较之直接免疫沉淀和免疫吸附法,其特异性和产率都有了很大的提高,是当前分离纯化特异性聚核糖体时广为采用的方法。美中不足是,作为一种沉淀反应,总会参杂少量非特异性聚核糖体。为了更好地改善分离效果,近年来又将间接免疫沉淀发展为间接免疫吸附,即间接免疫亲和层析法。

(4) 间接免疫吸附法 此法同直接免疫吸附类似,就是将抗-抗体共价连接到不溶性固体支持介质上,抗体-聚核糖体复合物通过结合反应(Binding reaction)特异性地结合到支持介质上,在原则上可以更有效地去除非特异性聚核糖体污染。此法分离纯化的mRNA,纯度达99%以上,而非特异性污染小于0.1%。

以上概要地介绍了聚核糖体免疫技术及其在特异性聚核糖体分离中的应用,这是分离特定mRNA进而得到特定蛋白质结构基因的关键性步骤。无论用何法所得之专一的聚核糖体,均需用SDS-苯酚抽提,再经Oligo(dT)或Oligo(U)-纤维素亲和层析得到单一的mRNA。

三、mRNA特异性检测

经分离纯化得到的mRNA,要对其纯度及生物活性进行检测。首先用聚丙烯酰胺凝胶电泳确定其均一性,如纯化后的白蛋白mRNA,在电泳柱上形成一条带,其扫描图谱为左右对称的单峰,就说明其纯化后的效果很好。经初步检测之后,还必须测定其生物活性,如利用动物网织红血球裂解物、麦胚无细胞蛋白合成系统使mRNA进行翻译,经同位素标记的翻译产物,通过特定抗体产生特异性免疫沉淀而鉴别,也可以进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过放射性自显影等方法同标准蛋白迁移率进行

比较。此法灵敏度和特异性高且简便易行,现已广泛使用。

特异性mRNA分离纯化的完成,大大促进了对于真核基因表达的研究,并可作为制备互补DNA杂交探针,对DNA分子进行定量分析和基因分离。

四、特定基因的分离

从mRNA得到特定蛋白质的基因大体有三种方法:

1. 利用反转录酶(Reverse transcriptase)将mRNA反转录成互补的DNA(cDNA),用碱将mRNA水解,得到单链DNA。这种DNA再用作模板,借助于另一种酶即DNA聚合酶来合成第二条DNA链。已合成的双螺旋DNA在5'端上是封闭的。可用专一的S₁酶在这个部位把多核苷酸链切开,即获得特定蛋白质的结构基因。作者等用此法得到了文昌鱼原肌球蛋白mRNA的互补DNA。

2. 将mRNA作为分子探针,同通过变性得到的单链DNA基因组杂交,并用专门的层析方法钓出特定蛋白质结构基因。J. Anderson等用含有成共价结合的卵清蛋白cDNA的纤维素柱分离纯化了卵清蛋白结构基因。

3. 将真核细胞DNA基因组事先用限制内切酶消化,得到的DNA片段经变性,再同特定的mRNA杂交,得到特定蛋白质的结构基因。S. Coher等从海胆的DNA中分离出含有组蛋白基因的无性繁殖系。

五、mRNA的核苷酸序列分析

测定mRNA的核苷酸排列顺序是研究结构功能关系的基础。研究mRNA序列最常用的方法是复本法,即将mRNA反转录成互补DNA,再用DNA序列分析新技术研究其一级结构。反转录能合成不同长度的cDNA。如果得到短片段(100—200个核苷酸),可直接分析序列;如果得到更长的片段,则必须用不同方法将其

降解成适宜长度，经分离后分别测其序列。最后将两种情况所得到的短片段各自首尾相接，排列成一行，从各种排列都可以推知mRNA的序列。

由于DNA序列分析技术有了重大突破，以及新技术的广泛应用，不仅加快了DNA的序列研究步伐，而且也推动了mRNA序列研究的发展。最近Surry独立完成了海胆胚mRNA 5'端部分序列分析。Dixon接近完成红鲱鱼精蛋白mRNA全序列测定。应该指出的是，我国学者程振起完成了卵白蛋白mRNA 3'端不编码区75个核苷酸的序列分析工作，第一个发表了关于卵白蛋白mRNA的序列研究结果。目前，生化工作者对mRNA全序列的认识还刚刚开始，需要研究多种mRNA的序列，才有可能充分了解mRNA的结构功能关系。

六、真核细胞mRNA的应用

关于“遗传工程”的研究，在我们面前开拓了一个全新的领域，不仅可以定向改变遗传特性，而且还可以跨越种属界限，人为地创造出自然界还不存在的具有独特优异性能的新生物个体来。

现有的事实证明，mRNA是生物遗传的物质基础之一，对生物的生长、发育、繁殖和变异等有密切的关系。我国著名生物学家童第周等，从鲫鱼卵巢提取mRNA，将其注入刚受精的金鱼卵，结果孵化而成的金鱼有一部分失去了金鱼的双尾鳍特征，变成鲫鱼样的单尾鳍。海胆的mRNA有两类：一类是聚(A)⁺，一类是聚(A)⁻。Costello和Henley等人从海胆的卵和胚中提取了组蛋白mRNA。海胆组蛋白mRNA属于(A)⁻类。组蛋白mRNA具有特殊

的物理化学性质，它引起了生化工作者的极大重视。他们以组蛋白mRNA为模板，合成了组蛋白互补DNA，并以其作为分子探针，有效地研究细胞分化过程中组蛋白基因表达的调控。文昌鱼原肌球蛋白聚核糖体RNA（内含mRNA），我们正在研究其在蛋白生物合成中的作用。珠蛋白是在网状红血球中合成的唯一蛋白质，其mRNA是最先从真核细胞中分离出来的，全世界已有若干个实验室用之作为基因无性繁殖的材料。

随着生物化学的迅速发展，对观察生命活动的现象日益深入到认识生命活动的本质。通过对核酸和蛋白质大分子结构、代谢变化及其相互作用规律的研究来揭示生命的奥秘，认识生命现象的本质，并改造生物。这些分子水平的研究，对海洋生物的细胞学、胚胎学、遗传学等的发展将起着重大的推动作用。

主要参考文献

1. 佐野浩, 1977. 蛋白质核酸酵素, 22 (12): 1303.
2. Maxam, A.M. et al, 1977. *Pro. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 74(2):560.
3. Sanger, F. et al, 1975. *J. Mol. Biol.*, 94: 441.
4. Paimiter, R. O. et al, 1972. *J. Biol. Chem.*, 274:3296.
5. Palacios, R. et al, 1973. *J. Biol. Chem.*, 248:540.
6. Shapiro, D. J. et al, 1974. *J. Biol. Chem.*, 249:3665.
7. Taylor, J. M. et al, 1976. *J. Biol. Chem.*, 251:7461.
8. Schutz, G. et al, 1977. *Nucleic Acid Research*, 4(1):71.