

# 大豆不同组织mRNA体外翻译产物2D PAGE的比较

陈德高\* 孙午良 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心, 分子生物学研究室, 北京)

从大豆的叶片、种子、茎和根制备了未降解的、具有生物活性的 Poly(A)<sup>+</sup>mRNA。建立了高效翻译的麦胚无细胞系统。通过对不同组织mRNA翻译产物双向聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱(2D图谱)的比较, 找出了每种组织的专一性或高丰度的蛋白质斑点。这些结果有助于克隆组织专一性的DNA调控序列和转基因植物的研究。

**关键词** Poly(A)<sup>+</sup>mRNA; 体外翻译; 2D图谱; 组织专一性蛋白

选择性转录是基因调控最重要的机理, 它使同种生物的不同组织出现了不同类型的 mRNA 群体。无细胞翻译系统使 mRNA 翻译成(<sup>35</sup>S)-标记的蛋白质, 后者借双向电泳分开, 可在放射自显影图谱中检测到微量的蛋白质。采用这些技术, 我们想比较大豆不同组织mRNA翻译产物的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱, 企图找到叶片或种子的专一性蛋白质。如果得到正的结果, 我们将进一步克隆它们的cDNA和基因组DNA, 有可能找到叶片或种子专一性的DNA调控序列, 再将它们引入表达型运载体, 希望获得组织专一性表达的转基因植物。

## 材料和方法

### (一) 材料

大豆: 夏大豆新品系, 生长期95天, 本院作物研究所杜文卿同志培植, 编号中作D28; 小麦: 农大139; 寡聚(dT)-纤维素, 美国BRL产品; (<sup>35</sup>S)-甲硫氨酸, 中国医学科学院放射所产品; 两性电解质, 瑞典LKB产品; RNasin, 美国 Promega产品。

所有玻璃器皿皆经 1mol/L NaOH 浸泡、洗净, 高压灭菌, 所有溶液皆经高压高温处理或过滤灭菌。

### (二) 方法

1. 总体RNA的分离: 按 Auffray 的方法<sup>[1]</sup>稍有改进。分别将大豆的叶片、种子、茎和根在 6mol/L 脲素-3mol/L LiCl 中匀浆 2-4min, 于 4°C 静置过夜。离心(16000g, 0°C, 20min)。将沉淀物溶于 20mmol/L Tris, pH8.0-0.5mg/ml 肝素-0.5% SDS 中。用氯仿反复抽提三次, 最后用乙醇沉淀核酸。

2. Poly(A)<sup>+</sup>mRNA 的分离: 按 Aviv 和 Leder 方法<sup>[2]</sup>, 用 LiCl 代替 KCl。

3. 麦胚无细胞翻译系统的建立: 按照 Anderson 等的方法<sup>[3]</sup>。1g 麦胚经研磨后, 用 2ml “抽提缓冲液”抽提。离心(30000g, 2°C, 10min)。上清液通过 Sephadex G-25 柱, 收集 A<sub>260</sub> 大于 100 的组分, 分装保存于液氮中。

4. 无细胞翻译: 10μl 标准反应混合物含 4.9μl 麦胚工作液, 5.1μl 包括(<sup>35</sup>S)-

本文于1989年1月19日收到。

\* 现在工作单位: 北京师范大学生物系细胞生物研究室。

甲硫氨酸、mRNA、RNasin 的混合液。在27℃保温 90min, 分别在0和90min 取样 1.5μl, 测定酸不溶性物质的放射性。

5. 电泳和荧光显影: 按 Laemmli 法<sup>[4]</sup>进行 10—15% SDS-PAGE。板状胶经染色、脱色和抽干后, 进行放射自显影。按 Hirsch 等改进的方法进行微型双向聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[5]</sup>。无细胞翻译产物(约  $1 \times 10^5$  cpm) 经乙醇沉淀和抽干后, 溶于 10μl 9 mol/L 脲素-1.5% Ampholine (pH 5—7) -0.5% Ampholine (pH 3.5—10)-2mmol/L DTT, 加到已作好凝胶的毛细管(6.3×0.2cm) 上端。插入圆盘电泳槽, 上槽盛0.01mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(阳极), 下槽盛0.02mol/L NaOH(阴极)。50V30min, 100V30min, 200V直到结晶紫跑出胶条, 400V20min。从毛细管取出胶条, 浸泡于 0.05mol/L Tris, pH7.5-1%SDS, 再浸泡于含有 5% β-巯基乙醇的Laemmli 电泳缓冲液, 进行第二向板状(100×120×1.5mm) SDS-15%PAGE。板状胶经染色和脱色后, 于二甲亚砜中浸泡1h, 再浸泡于含有12%闪烁剂PPO的二甲亚砜中, 最后浸泡于流动的水中。抽干的板胶同 X- 感光片置于两层增感屏之间, 于-70℃进行荧光显影。

## 结果和讨论

### (一) 植物RNA的分离

与动物相比, 植物组织(尤其是茎和根) 含有较多的纤维素, 有细胞壁, RNase含量更高。为从植物组织分离到未降解的 RNA, 关键的一步是在快速匀浆破碎组织的瞬间即使蛋白质(包括 RNase) 变性。我们试验了数种分离方法, 最后选用 6mol/L 尿素-3mol/L LiCl 的方法, 6mol/L 尿素可使蛋白质迅速变性, 3mol/L LiCl

可以选择性地沉淀核酸, 除掉 DNA 碎片、多糖和蛋白质。我们发现这种方法比较适用于植物RNA的分离, 它简便、快速、经济, 而且进一步分离到的 mRNA 具有较高的翻译活性(图1)。

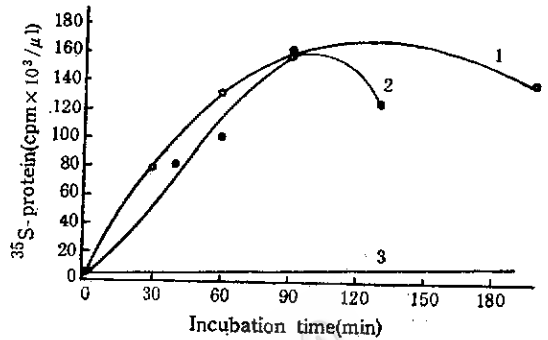


图1 (<sup>35</sup>S)甲硫氨酸掺入的时间曲线  
Fig. 1 Time course of <sup>35</sup>S-methionine incorporation

1, 2 为不同实验的数据 Different experiment data with soyben mRNA

3. 为“无RNA”空白 “Without-RNA” blank

### (二) mRNA的无细胞翻译

兔网织红细胞裂解物和麦胚抽提物是最常用的无细胞翻译系统。前者翻译效率高, 合成产物的分子量可达 200kd, 但最大的缺点是内源翻译活性高, 制备耗时。后者虽然合成的产物分子量不高 (<70 kd), 但内源活性低, 制备方便。我们建立了一个具有高效翻译活性的麦胚系统, 其最适反应条件为: 每 10μl 反应液含 0.6μg mRNA, 27℃, 反应 90min。以大豆种子 mRNA 为例, 每微升反应物测得  $1.6 \times 10^5$  cpm 的掺入活性(图1), 算出其比强为  $2.6 \times 10^9$  cpm/μg mRNA。我们使用的(<sup>35</sup>S)-甲硫氨酸比强很低, 如果使用 Amersham 的(<sup>35</sup>S)-甲硫氨酸, 还可得到更高的掺入率。RNase 的抑制剂 RNasin 可以延长翻译系统的工作时间, 保温 210min 的掺入率仍然高于保温 60min 的掺入率(图1)。经 SDS-PAGE 证明, 我们的麦胚

系统没有任何内源活性(图版 I-1 中 C), 而且合成了高于 90kd 的蛋白质(图版 I-1 中 a 和 b)。

### (三) 双向凝胶电泳图谱的比较

第一向电泳采用 Busch 实验室改进的微型等电聚焦电泳<sup>[6]</sup>, 该法灵敏度高、重复性好、加样少和时间短, 而且可在简单的圆盘电泳槽中进行。与常规方法不同, 样品加到酸端(阳极), 60% 以上的样品可按其等电点分布在整个胶条上。第二向为 SDS-15% PAGE。我们对四种组织 mRNA 翻译产物的 2D 图谱进行了详细的比较, 用实心箭号表示某一种组织的专一性(不见于其他三种组织)的蛋白质斑点, 用空心箭号表示某一种组织的高丰度(爆光强度比其他组织相应斑点更强)的蛋白质斑点, 用“分子量/PI”表示某种或某群蛋白质斑点。图版 I-2—5 依次为大豆种子、叶片、茎和根的 mRNA 翻译产物的 2D 图谱。通过比较, 首先发现种子的 2D 图谱与其他三种组织的 2D 图谱截然不同, 而其他三种组织的 2D 图谱则彼此相似。

种子: 最显著的是在“58—66/6.0—

7.0”处分布了 7 个种子专一性的蛋白质斑点, 其次 35/6.5、35/6.8、22/6.0、和 18/8.4 皆为种子专一性的蛋白质。叶片: 26/8.4 是叶片专一性的而且是各图中爆光最强的斑点; 76/4.8 虽然不是叶片专一性的, 但其丰度远比其他组织相应斑点的丰度更高(估计高 5—10 倍); 在区域“52/6—6.8”还存在 4 个叶片专一性的斑点。茎: 在区域“50—60/7.0—7.5”有一群低丰度茎专一性的斑点。根: 在低分子量(<20kd)区有一个根专一性斑点 12/6.4 和三个高丰度斑点。

直接从凝胶回收某一斑点的蛋白质, 测定它的氨基酸序列<sup>[6]</sup>。一旦定出了蛋白质的序列, 则有两条途径进行它的分子克隆。一是合成寡核苷酸探针, 筛选 cDNA 文库或基因组文库; 另一是合成多肽, 制备抗体探针, 筛选 λgt11 cDNA 文库。通过这条技术路线, 有可能克隆到某些组织专一性的基因, 进一步鉴定负责组织专一性表达的调控序列和相应的调控蛋白, 从而揭露组织专一性表达的分子机理, 建立组织专一性表达的转基因植物。

### 参 考 文 献

- [1] Auffray, C. and Rougeon, F.; *Eur. J. Biochem.*, 107: 303, 1980.
- [2] Aviv, H. and Leder, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1408, 1972.
- [3] Anderson, C.W. et al.; *Methods in Enzym.*, Vol. 101, Academic Press, p. 635, 1983.
- [4] Laemmli, U.K.; *Nature (London)*, 227: 680, 1970.
- [5] Hirsch, F.W. et al.; *Cancer Res.*, 37: 3694, 1977.
- [6] Aebersold, R.H. et al.; *J. Biol. Chem.*, 261: 4229, 1986.

## 2D PAGE COMPARISON OF *IN VITRO* TRANSLATION PRODUCTS OF mRNAs FROM DIFFERENT TISSUES OF SOYBEAN

Chen Degao      Sun Wuliang      Fan Yunliu

(Department of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese  
Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Undegraded Poly(A)<sup>+</sup>mRNA with biological activity were isolated from the leaves, seeds, stems and roots of soybean. A high efficient translation system was constructed from wheat germ. The differences between four mRNA populations were revealed by analysis of their wheat germ translation products on two-dimensional isofocusing/SDS gel electrophoresis, and some of tissue-specific and abundant protein spots for each of tissue were found out by comparison of their 2D patterns.

The 2D pattern of seed mRNA translation products was markedly different from that of other three tissues. Seven seed-specific protein spots were found in the 58—66/6.0—7.0 region. Many similarities were present in the different translation products of leaf, stem, and root mRNAs. In leaf, spot 26/8.4 was the leaf-specific and most abundant protein, a group of four leaf-specific proteins were in 52/6.0—6.8 region, and the spot 76/4.8 was much denser and larger than corresponding spots in other tissue 2D patterns. These results have a implication in searching tissue-specific regulatory DNA sequences and engineering tissue-specifically expressed transgenic plants.

### Key words

Pol. (A)<sup>+</sup>mRNA; *in vitro* translation; 2D pattern; tissue-specific proteins

### 图版说明 Explanation of plate I

1. Wheat germ cell-free translation of soybean leaf mRNA (lane a), seed mRNA (lane b), and blank without mRNA (lane c)
  - 2—5. 2D PAGE autoradiograms of <sup>35</sup>S-proteins *in vitro* translated by mRNAs from seed (2), leaf (3), stem (4) and root (5)
- Sincere arrow indicated protein spots only in one tissue  
Hollow arrow indicated protein spots that are markedly denser than that of other three tissues

