

## · 论 著 ·

# 人白细胞干扰素 mRNA 在大肠杆菌细胞中的翻译研究

微生物学教研室 杜 平 吴清璇 杨蓉芬

现已公认,人白细胞系统是制备人干扰素的一个最为稳定的系统。因此,目前国内外大多数研究单位都采用这一系统来制备人干扰素<sup>(1-2)</sup>。近年来,虽然对动物干扰素 mRNA 在异源细胞或无细胞系统中的翻译研究已有一些报道<sup>(3-12)</sup>,但是,对人白细胞干扰素 mRNA 在大肠杆菌细胞中的翻译研究尚未见有人报道。

从干扰素基因工程角度考虑,为寻求重组模板材料和较理想的接受表达系统,以及转化与表达条件等,首先弄清人白细胞干扰素 mRNA 向大肠杆菌细胞中的转化以及在其中的翻译等情况,很有必要。为此,我们在这方面作了一些初步探索,现将部分结果报道如下。

## 材料与方 法

### (一) 材 料

1. 供制备干扰素 mRNA 的人白细胞。以“白细胞分离液”或“EDTA-NH<sub>4</sub>Cl”法从新鲜人(脐带)抗凝全血(以下简称“人(脐)血”)中分离制备<sup>(13)</sup>。

2. 激活干扰素基因的诱导物。采用鸡胚尿囊液形式的新城鸡疫病毒F-系无毒株(Newcastle disease Virus, 以下简称 NDV-F), 取自中国医学科学院病毒研究所。

3. 人白细胞干扰素 mRNA(IF-mRNA)。参照 De Maeyer-Guignard 法<sup>(4)</sup>略加修改从经诱导之人(脐)白细胞中提取。

4. 翻译 IF-mRNA 的大肠杆菌。采用本室保贮之大肠杆菌 X79 株。

5. 检测翻译干扰素的细胞与病毒。采用 1

日龄培养的人胚皮肤或人胚肺纤维母细胞传代系。攻击病毒是采用鸡胚细胞培养液形式的水疱性口炎病毒(Vesicular Stomatitis Virus, 简称: VSV)取自中国医学科学院病毒研究所。

(二) 方法: IF-mRNA 的提取、转化、翻译及鉴定主要参照文献<sup>(4,8,12)</sup>略加修改进行,其要点如下:

1. 激活人白细胞中的干扰素基因。先将人(脐)白细胞在 Eagle 生长培养基中制成每毫升含 $1 \times 10^7$ 个细胞悬液,再按每毫升细胞量加入100血凝单位(HAU)的NDV,置37C诱导6~18小时,以充分转录 IF-mRNA。

2. 提制人白细胞IF-mRNA。主要步骤是:(1)将上述诱导细胞沉淀物悬浮在50倍体积的专门提取液(对RNA酶有良好的抗性)<sup>(4)</sup>中;(2)立即向上述悬液中加入等体积的经过重结晶的水化酶(9:1),并激烈振荡15分钟;(3)置-20C 20分钟后取出摇匀,以3,000~4,000 rpm 沉淀20分钟,并分离出“水相”(A相)和“中间相”(I相);(4)将A相和I相继续按文献<sup>(4)</sup>提取与纯化;(5)最后,分别将A相与I相以乙醇沉淀,并测定其总RNA的含量(在O、D、260nm处测定,以微克/毫升表示,浓度=吸光率 $\times 100/25$ )。

3. 转化人白细胞 IF-mRNA——其主要程序为:

(1)将培养在 Hottinger 培养基上的1日龄的大肠杆菌在含5%小牛血清的199培养基中制成 $1 \sim 2 \times 10^8$ /毫升的菌细胞浓度;(2)一部分用放线菌素 D(Actinomycin D, 以下简称

“ACD”)处理(37C 2小时),一部分不处理;并分别以4,000rpm离心沉淀20分钟,弃上清,留沉淀,用PBS(磷酸缓冲液)将用ACD处理的样品洗涤1次;(3)分别向上述样品中加入含75微克/毫升DEAE-dextran的PBS适量(如0.5毫升)和PBS-RNA(A相RNA 50微克/毫升;I相RNA 25微克/毫升)适量(如0.25毫升);置37C作用45分钟后,将未转入细胞内的RNA-Dextran混合物洗去;(4)向上述混合物中加入5%小牛血清的199培养基,并置37C孵育6~18小时后,离心沉淀,收集上清液测定翻译干扰素。

4. 鉴定翻译干扰素—干扰素的测定按“国际标准法”进行<sup>(13)</sup>;干扰素效价以能保护50%的细胞免受攻击病毒损害的最高稀释倍数的倒数来表示,鉴定指标包括pH、酶和种属特异性。

### 实验结果

(一)人白细胞IF-mRNA的A相和I相在大肠杆菌中的翻译能力:

为了解人白细胞IF-mRNA在大肠杆菌中是否能翻译,首先,将上述翻译产物酸化(pH 2.0, 4C 48小时)和中性化(pH 7.2);接着再以其各个稀释度处理1日龄的良好单层人胚肺纤维母细胞,经37C 20小时孵育;最后以500 TCID<sub>50</sub>的VSV攻击,再经37C孵育,待病毒对照管中的细胞出现100%的病变、对照管细胞完全良好时,即开始观察结果(见表1)。

表1 人白细胞IF-mRNA在大肠杆菌中的翻译能力

组 分	效价(Cpu*/毫升)	
	6小时	18小时
A相翻译产物	120~240	120~240
I相翻译产物	120~240	120~240

\*Cellular protective unit 细胞保护单位 Cpu

表1表明:人白细胞IF-mRNA的两个组分(A相和I相)在大肠杆菌中都能进行翻译,并且其翻译能力相对地说,亦比较高。同时,

这种翻译能力从6~18小时内仍无明显的变动(其它动态曲线时相未进一步做)。

(二)放线菌素D处理对翻译能力的影响:鉴于有人报道,某些接受mRNA转化的真核细胞若不预先用放线菌素D处理,则就不能进行翻译<sup>(12)</sup>。因此,我们亦将接受人白细胞IF-mRNA的大肠杆菌,在未转入IF-mRNA前,预先用放线菌素D进行了处理,其结果见表2所示。

表2 放线菌素D对人白细胞IF-mRNA的A相和I相翻译能力的影响

类 别	效价(Cpu/毫升)	
	A相RNA	I相RNA
加放线菌素D	240	120
不加放线菌素D	240	120

从表2中可看出:人白细胞IF-mRNA在预先受放线菌素D处理的大肠杆菌中的翻译能力和在未受处理的该菌中的翻译能力,并未显示出明显的差别。

(三)人白细胞IF-mRNA的A相和I相翻译产物的种属特异性:为进一步查明这种翻译产物是否为人白细胞干扰素,我们又对其敏感(人胚肺纤维母细胞)和不敏感(鸡胚纤维母细胞)的细胞对其进行了“种属特异性”试验,其结果见表3。

表3 人白细胞IF-mRNA翻译产物的种属特异性试验

组 分	效价(Cpu/毫升)			
	人胚肺纤维母细胞		鸡胚纤维母细胞	
	HEP-L38-3 <sup>△</sup>	HEP-L39-3	CEF-5-2*	CEF-42
A相翻译产物	240	120	<4	未做
I相翻译产物	120	120	<4	<4

注: <sup>△</sup>人胚肺成纤维细胞38系第3代,其余类推

\*鸡胚成纤维细胞5系第2代,其余类推

表3指出:人白细胞IF-mRNA的A相和I相样品在大肠杆菌中的翻译产物在人胚肺纤维母细胞上的效价为120~240,而在鸡胚纤维母细胞上的效价都<4,这说明该抑制物有

属特异性。

(四) RNA 酶和胰蛋白酶对人体白细胞 IF-mRNA 翻译产物的影响: 为进一步了解这种翻译产物的性质, 测定了 RNA 酶和胰蛋白酶对他们 (A 相和 I 相 RNA 翻译产物) 的影响, 其结果如表 4 所示。

表 4 RNA 酶和胰蛋白酶对人白细胞 IF-mRNA 翻译产物的影响

组 分	效价(Cpu/毫升)		
	未 处 理	RNA酶处 理(10微克/ 毫升/37℃- 45')	胰蛋白酶处 理(10微克/ 毫升/37℃- 45')
A相翻译产物	120	120	<4
I相翻译产物	240	120	<4

由表 4 可见, A 相和 I 相 RNA 翻译产物对 RNA 酶甚为稳定 (其效价与未处理的完全一样), 而对胰蛋白酶则不稳定 (其效价 < 4), 这表明该翻译产物是属于蛋白质物质。

### 讨论与小结

(一) 讨论: 根据上述结果, 现提出以下几点来讨论:

1. 首先要弄清的是, 上述 A 相和 I 相 RNA 在大肠杆菌 X79 株中所翻译的物质是不是“人干扰素” (Human Interferon)。我们知道, 典型的干扰素 (I 型干扰素) 主要有这样几个特性<sup>(1)</sup>: (1) 对 pH 2 稳定 (能耐受 pH 2 长时间处理); (2) 除猪、牛、兔细胞外, 对极大多数异种细胞都有“种属特异性” (即缺乏人干扰素的效应受体); (3) 可被蛋白酶降解而不被 RNA 酶降解。从上述结果看, 两个组分 (A 相和 I 相) 的翻译产物都是符合这三项条件的, 因此, 我们认为这种翻译产物是人干扰素, 而不是其它的抑制物。

2. 关于人白细胞 IF-mRNA 的分布与含量问题。现已查明<sup>(4,14)</sup>: A 相制剂大部分为胞浆 RNA, 少量为某些核糖体 RNA 的前体; 而 I 相制剂, 则主要为与膜呈结合形式的 RNA, 以及一些与异质核结合形式的 RNA。上述结果表

明: 以 A 相样品 50 微克/毫升和 I 相 25 微克/毫升都获得了较好的转化与翻译效果。因此, 看来在这两种制剂 (A 相和 I 相) 中的 IF-mRNA 的含量都很高。所以, 这就可能为今后进一步纯化人白细胞 IF-mRNA 提供了有利的条件。这里, 应顺便提一下的是, 人白细胞系统虽是一个最为稳定的干扰素制备系统, 但人白细胞系统是比较复杂的, 其中含有中性白细胞、大单核细胞及淋巴细胞等, 在产生干扰素方面以哪些细胞为主, 以及它们之间的关系是什么, 目前, 虽有一些研究, 但还未完全弄清。但是, 看来这可能并不妨碍高度纯化的人白细胞 IF-mRNA 的获得, 因为现已有许多事实表明, 用纯化干扰素抗血清“免疫亲和层析法”来解决这一问题 (专门纯化出 IF-mRNA), 是大有希望的。

3. 关于用大肠杆菌翻译的意义。上述结果至少有两点是值得提出的: 其一, 相对地说来, 大肠杆菌翻译人白细胞 IF-mRNA 的水平是不低的; 其二, 这种翻译无需用放线菌素 D 作专门处理。因此, 若该菌能够顺利表达干扰素体外重组基因的话, 则就有可能应用它 (大肠杆菌) 来大规模生产干扰素。

(二) 小结:

1. 用适量 DEAE-dextran 分别将人白细胞 IF-mRNA 的 A 相和 I 相样品转化到大肠杆菌 X79 株细胞中去以后, 两者都有较好的翻译能力, 并且都不受放线菌素 D 的影响。

2. 将这种翻译产物在 pH 2 条件下处理 48 小时, 经中性化后, 再分别用其处理人胚肺纤维母细胞和鸡胚纤维母细胞, 其结果表明: 这种翻译产物只对人细胞有保护能力, 而对鸡胚细胞则无保护能力。

3. 进一步用适量的胰蛋白酶和 RNA 酶分别处理这种翻译产物, 其结果显示: RNA 酶对这种翻译产物的活性 (抗病毒活性) 完全没有影响; 而胰蛋白酶则完全破坏了这种翻译产物的活性。

以上结果表明: 这种翻译抑制物是属于“人干扰素”, 而不是其它抑制物。

### 参考文献

1. 杜平: 干扰素引论, 第二军医大学《学术资料》1:76~105 1979.
2. Hirsch MS: Interferon—Its hour come at last? New Engl J Med 298:1022, 1978.
3. Metz D: Interferon translated. Nature. 259: 362, 1976.
4. DeMaeyer-Guignard, et al: Interferon messenger RNA, translation in heterologus cells. Proc Nat Acad Sci USA. 69:1203, 1972.
5. Reynolds FH, et al: The induction of interferon and its mRNA in human fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 59:1023, 1974.
6. Kronenberg LH, et al: Relative quantitative assay of the biological activity of interferon messenger ribonucleic acid. J Gen Virol 27: 225, 1975.
7. Raj NBK, et al: Biosynthesis of human interferon by translation of its messenger RNA in a wheat germ cell-free system. Abst Annu Meet Am Soc Microbiol, 76:253, 1976.
8. Orlova TG, et al: Interferon-inducing and interferon-translating functions of RNA isolated from newcastle disease virus-infected cells. Acta Virol 18:210, 1974.
9. Thang MN, et al: Biosynthesis of mouse interferon by translation of its messenger RNA in cell-free system Proc Nat Acad Sci USA 72:3975, 1975.
10. Reynolds FH, et al: Interferon activity produced by translation of human interferon messenger RNA in cell-free ribosomal system and xenopus Oocytes, Proc Nat Acad Sci USA 72:4881, 1975.
11. Pestka S, et al: Cell-free synthesis of human interferon. Proc Nat Acad Sci USA 72(10):3898, 1975.
12. Orlova TG, et al: Translation by bacterial cells of messenger RNA for interferon of animal origin. Acta Virol 21:353, 1977.
13. Cantell K: Preparation of human leukocyte interferon, "International symposium on standardization of interferon and interferon inducers", London 1969, symp series immunobiol stand Vol 14, pp6~8 Karger Basel, New York, 1970.

## 开展电化教育 拍摄教学电影

我校电化教学室为了提高教学质量, 去冬今春拍摄了《休克》、《白内障针拨吸出术》、《急性放射病》等三部十六毫米彩色教学影片。《休克》用实验犬观察休克的发生发展与急救治疗, 并通过微循环、血压、尿量等指标观察其病理生理变化; 《白内障针拨吸出术》着重通过对先天性绕核型白内障、外伤性白内障、老年性白内障等病例的治疗, 结合动画介绍了从后路进入针拨、吸出手术的操作方法; 《急性放射病》分为什么是急性放射病, 造血

型、肠型、脑型急性放射病以及急性放射病的治疗等五个部分, 同时介绍了我国在一次意外事故中患急性放射病病人十六年后恢复的情形。

这些影片分别在教学、交流和全国学术会议的放映中受到许多兄弟单位好评, 并提出需要订购拷贝。电教室的同志为了保证影片的质量, 降低生产成本, 认真地进行编辑修剪并已与电影制片厂联系洗印。

(学报编辑室)