

生物学研究概说

# 蛋白质生物合成

〔英〕A. E. 史密斯 著



科学出版社

Q51  
5.11

统一书号：13031·1252

定 价： 0.50 元

本社书号：1743·13-10

科技新书目：157-17

· 生物学研究概说 ·

# 蛋白质生物合成

(英) A. E. 史密斯 著

董垣君、张宗玉 译

科学出版社

1980

## 内 容 简 介

本书是 J. M. 阿什沃恩主编的《生物学研究概说》丛书之一。内容包括蛋白质生物合成的全过程,参与蛋白质生物合成的各种分子(信使 RNA、核蛋白体、转移 RNA、氨基酰-tRNA 合成酶、肽酰转移酶、起始因子、延伸因子、终止因子等等)的结构与功能。蛋白质生物合成的机理及其调控。

本书可供生物化学及有关的科技工作者及大专院校师生参考。

A. E. Smith

Outline Studies in Biology

PROTEIN BIOSYNTHESIS

Chapman and Hall 1976

· 生物学研究概说 ·

### 蛋 白 质 生 物 合 成

[英] A. E. 史密斯 著

童坦君 张宗玉 译

\*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 137 号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

\*

1980年6月第一版 开本: 787×1092 1/32

1980年6月第一次印刷 印张: 3 3/4

印数: 0001—6,900 字数: 83,000

统一书号: 13031·1252

本社书号: 1743·13—13

定价: 0.50 元

# 目 录

第一章 绪论 .....	1
1.1 蛋白质生物合成问题 .....	1
1.2 蛋白质生物合成的全过程 .....	2
第二章 参与蛋白质生物合成的分子 .....	5
2.1 信使 RNA .....	5
2.1.1 发现与分离 .....	5
2.1.2 mRNA 的分析 .....	8
2.1.3 结构 .....	13
2.2 核蛋白体 .....	21
2.2.1 引言 .....	21
2.2.2 在核蛋白体上发生的分步反应 .....	23
2.2.3 结构与功能 .....	29
2.2.4 生物合成 .....	42
2.3 转移 RNA .....	43
2.3.1 发现与性质 .....	43
2.3.2 tRNA 的反应 .....	45
2.3.3 tRNA 的提纯及其一级顺序 .....	47
2.3.4 tRNA 的三级结构 .....	53
2.3.5 tRNA 的结构与功能 .....	56
2.3.6 突变型 tRNA .....	59
2.4 起动 tRNA .....	60
2.5 氨基酰 tRNA 合成酶 .....	65
2.6 肽链延伸因子 .....	68
2.6.1 肽链延伸因子 T 和肽链延伸因子 I .....	68

2.6.2 肽链延伸因子G与肽链延伸因子U	71
2.7 肽酰转移酶	72
2.8 肽链合成起始因子	72
2.9 肽链合成终止因子	74
参考文献	75
<b>第三章 蛋白质生物合成的机理及其调控</b>	<b>78</b>
3.1 引言	78
3.2 mRNA的代谢	79
3.3 起始复合物的形成	81
3.3.1 起动tRNA与核蛋白体的结合	82
3.3.2 mRNA的结合反应	85
3.4 肽链延伸	97
3.5 蛋白质合成的终止与翻译后的修饰	102
3.6 RNA噬菌体的蛋白质合成	106
参考文献	110
略语表	112

# 第一章 绪 论

## 1.1 蛋白质生物合成问题

发现脱氧核糖核酸 (DNA) 是生物体的遗传物质, 稍后又证明 DNA 分子的双股螺旋结构, 这是二十世纪科学史上的两大里程碑, 由此奠定了分子生物学这门新兴学科的基础。然而即便有了这么重大的发现, 遗传物质如何得以表达为对于所有活细胞的功能都极为重要的结构蛋白质与催化蛋白质, 其详细机理仍未了然。只有在严格证明一种特定蛋白质是由氨基酸的独特线型顺序构成之后, 才有可能认识到 DNA 的碱基顺序与蛋白质的氨基酸顺序之间存在着相关性。一旦完成了这一概念性的突破, 阐明蛋白质生物合成多个步骤的这一复杂任务即可在实验室开始。过去二十年, 这一任务一直在高速进行着, 以至今日我们对这一过程的全貌才有了相当清晰的了解。现知阐明蛋白质生物合成的许多步骤及其错综复杂的有关成分, 甚至涉及百种以上分子之多, 这必将列为目前分子生物学最重大、最激动人心的成就。

本书的目的是较为详细地概括我们关于蛋白质生物合成的现有知识, 介绍与蛋白质合成有关的分子及蛋白质合成的有关基本机理, 并介绍为适应细胞与生物体的需要而可能进行的调控过程。也许可以假定读者业已具有一般分子生物学特别是蛋白质生物合成的某些知识, 但我们通过绪言仍然将每种主要分子与这一过程的主要阶段给以简单的介绍, 在随后章节再逐个予以较为详尽的讨论。

## 1.2 蛋白质生物合成的全过程

被编码在 DNA 两股互补链的任一结构基因中的信息,由酶催化转录,这种酶称为依赖 DNA 的 RNA 聚合酶,它催化生成一种互补于某一股 DNA 的单股 RNA 抄本,这一抄本称为信使 RNA(mRNA)。mRNA 系附于一种称为“核蛋白体”的亚细胞器,核蛋白体由两个亚单位组成,其功能如同一件复杂而精巧的电子构件 (black box), mRNA 就在其上被翻译。翻译一词包括以下步骤,即 mRNA 中以核糖核苷酸线型顺序体现的遗传信息转换成可体现酶的性质或其它生物学性质的氨基酸线型顺序。以一特定核苷酸顺序指令一种特定氨基酸的插入,这种翻译语言称为遗传密码,这一特定核苷酸顺序则称为一个密码子。一类特别的适应体 (adaptor) 分子,既能认识 mRNA 遗传密码的密码子,又能携带适当的氨基酸到核蛋白体进行聚合,这类适应体分子由 RNA 构成,被称为转移 RNA(tRNA)。

mRNA 通过蛋白质生物合成的起始过程,附着于核蛋白体,以备用于翻译。起始过程包括一系列关键性反应,这些反应需要一种独特的作为起动者的 tRNA (initiator tRNA),并由几种称为起始因子 (initiation factors) 的蛋白质所催化,这些蛋白质保证 mRNA 在核蛋白体上正确排列,进入翻译阶段。包括上述所有成分的“起始复合物 (initiation complex)”的形成,可能是蛋白质生物合成中的限速步骤之一,并是很多调控因素的操纵点。

“起始复合物”成功地形成后,肽链中的下一个氨基酸由一种 tRNA 携带着到达核蛋白体。相应的这种氨基酰 tRNA 与核蛋白体的结合是密码子指导的,需有一种肽链延伸因子

进行催化。然后由核蛋白体的蛋白质——肽酰转移酶催化肽键形成,结果在新来的氨基酰 tRNA 的氨基,与增长中的肽链上的前一个氨基酸的羧基,形成一共价键。这样, mRNA 由 5' 端向 3' 端被“阅读”,多肽链则由氨基端向羧基端方向延伸。通过第二种肽链延伸因子的作用,核蛋白体沿着 mRNA 移位,以便露出一个新的密码子,使循环性肽链延伸过程得以延续。

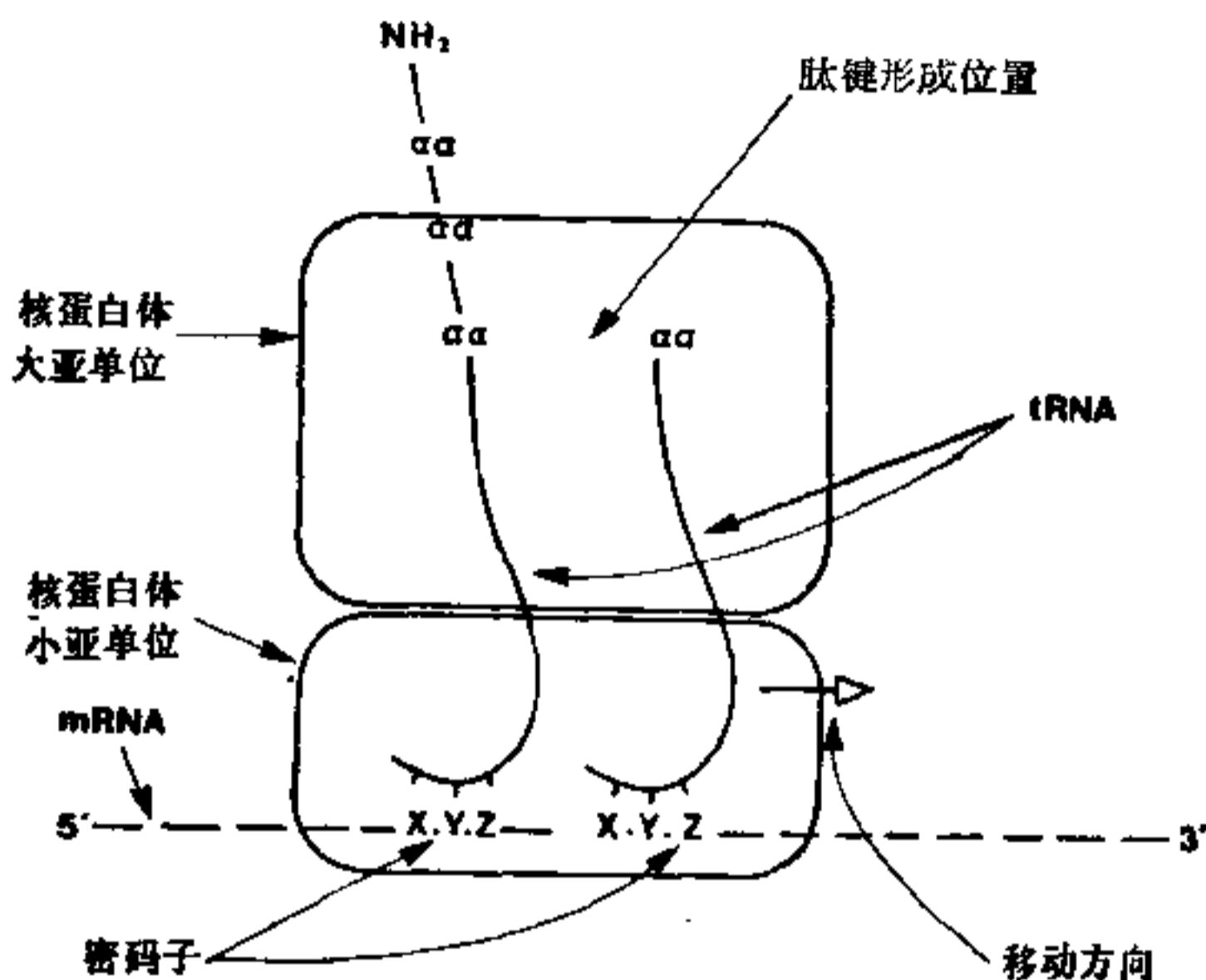


图 1.1 核蛋白体的模式图

一旦肽链延伸充分展开,核蛋白体沿着 mRNA 前进了一定距离,mRNA 与核蛋白体的结合位点\*又空了出来,于是第二个核蛋白体又可附着其上。这样,几个核蛋白体可同时附在一个 mRNA 分子上,形成称之为多核蛋白体 (polysome)的

\* 指形成起始复合物时,mRNA 上的核蛋白体结合点。——译者注

结构。当核蛋白体行进到 mRNA 分子的编码区的终点时,即遇到作为蛋白质合成终止信号的密码子,于是合成好的多肽在几种终止因子参与的反应中,即被释下。可能尚在合成过程中,亦即多肽链还连在核蛋白体上时,这一新生的多肽链可能就开始折叠形成其天然的二级和三级结构。但是,释放出来的多肽未必就是其最终形式。新生肽链除进一步折叠外,还可形成二硫键以及进行另外几种翻译后的修饰(post-translational modifications)。

各种生物体的蛋白质生物合成的机理十分相似。较大的差别出现在原核生物移行于真核生物的过程,这主要因为高等生物的细胞出现了核膜,而且此类细胞半寿期较长。在其它结构方面,如核蛋白体的大小,起动 tRNA 与 mRNA 结构等,两类生物只有细微的差异。遗传密码本身或许是完全可通用的。

## 第二章 参与蛋白质生物合成的分子

本章将述及参与蛋白质生物合成的每一种分子、分子的类别或分子的组成。并讨论其在蛋白质生物合成中的作用，分离方法以及生物化学和生物物理的分析结果。

### 2.1 信使 RNA

#### 2.1.1 发现与分离

初期实验将标记氨基酸注入大鼠，并在不同的掺入中止期（或追踪期），测定掺入到多肽中的放射性，实验表明氨基酸首先汇集到细胞微粒体部分的蛋白质，也就是说氨基酸可能首先汇集在附着于膜的核蛋白体上。这一时期还根据遗传分析方法推得了遗传密码的三联体性质，但是遗传信息从 DNA 向核蛋白体转移的途径，直到雅各布（Jacob）与莫诺德（Monod）二氏在乳糖操纵子的理论<sup>[1]</sup>中把 mRNA 的概念具体化后，才有了眉目。

按照这一理论，很快确定大肠杆菌感染噬菌体 T<sub>2</sub> 后不久<sup>[2]</sup>，即有一种新的 RNA 与大肠杆菌的核蛋白体相联，这种 RNA 并非核蛋白体 RNA，从而增加了对 mRNA 这一概念的实验支持。然而，要分离任何量的 mRNA，并研究其生物化学性质仍显得极为困难。不过与此同时（1961），体外实验发现，人工合成的核糖多核苷酸可作为信使以指导氨基酸聚合为多肽，从而进一步支持了 RNA 在蛋白质合成中起作用的说法，后来这一发现很快就被用来精确地阐明遗传密码的本质（参

见 2.2 节)。而且在电子显微镜中看到的多核蛋白体,有一根把相邻的核蛋白体连结起来的细丝,亦为存在 mRNA 分子的说法提供了又一论据(图 2.1)。

图 2.1 兔网织红细胞多核蛋白体的电子显微镜照片

但是要在细胞中分离出 mRNA,在实验技术上仍然存在着严重问题,首先因为 mRNA 只是细胞 RNA 组成中的一小部分,其次是 mRNA 对核糖核酸酶十分敏感。长期以来,通常把 mRNA 认之为迅速被标记,且与多核蛋白体相联的一群不均一的 RNA。此种 RNA 可用乙二胺四醋酸(EDTA)处理而使其与核蛋白体分离,其碱基组成与大部分 DNA 相似,而与鸟苷(G)和胞苷(C)核糖核苷酸含量较高的核蛋白体 RNA 有所不同。

大量具有信使性质的 RNA 首先是从噬菌体和病毒中分离成功的。有几种大肠杆菌的噬菌体(例如  $f_2, R_{17}, M_{s_2}, Q_{\beta}$ )不含 DNA,由单股 RNA(ssRNA)代替 DNA 作为基因组,此单股 RNA 的外面,包有一层单纯的蛋白质外壳。与之相似,同样亦存在十分简单的动物病毒,其中了解最多的是微小 RNA 病毒(picornaviruses),包括脊髓灰白质炎(polio)病毒、口蹄疫病毒。接着很快认识到这种噬菌体和病毒可能代表着能自我复制的许多生物中最简单的一类,它们的 RNA 既能储存遗传信息,又能起 mRNA 的作用。单股 RNA 按质量计算占病毒颗粒的 30%,所以从病毒颗粒大量分离这类 RNA

并不困难，这样也就有可能在无细胞体系中试验它们指导合成相应多肽的能力。

因为 mRNA 在体内本来就不稳定，因而即使在今日分离细菌 mRNA 仍极为困难，不过目前在体外应用酶促法以合成 mRNA 者，已日益增多。有关合成 mRNA 的方法问题已超越本书的范围，但值得提出的是如有一种适当的 DNA 模板，再使用适当的酶和辅因子就能准确而大量地在体外生产 mRNA。初期实验只使用 DNA 噬菌体，如噬菌体 T<sub>4</sub> 的 DNA 来生产 mRNA，但在有了扩增和纯化特异细菌基因的方法后，已可进而使用像纯化的乳糖操纵子 DNA 那样的，进一步经过人工处理的 DNA 模板。

过去，曾用螯合剂 EDTA<sup>[4]</sup> 以瓦解多核蛋白体，并用蔗糖密度梯度离心法分离其生成的核蛋白体亚单位与信使核糖核酸蛋白质复合物 (mRNP)。mRNP 中的蛋白质可用去污剂处理而除去。许多较为复杂的动物病毒，其病毒粒子含有合成 mRNA 的酶。例如，以一条双股 RNA(dsRNA) 片段为基因组的呼肠孤病毒 (reovirus)，含一种能在体外利用双股 RNA 为模板以合成单股 RNA 的酶。现已利用呼肠孤病毒及一些类似的病毒在体外大量制备真核生物的 mRNA。然而分离真核细胞 mRNA 最容易和最新的方法莫过于利用几乎所有真核细胞 mRNA 都存在聚腺嘌呤核苷酸(聚 A)顺序，这一晚近的发现。这样的聚 A 顺序能与含于玻璃纤维滤器的聚尿嘧啶核苷酸(聚 U) 以及系于琼脂糖 (sepharose) 的聚 U 杂交结合，亦可与附着在纤维素上的寡胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (oligo dT) 杂交结合，而其它类别的 RNA 则不与上述物质进行这种结合<sup>[5]</sup>。附着于上述物质后，这一含聚 A 的 RNA 可用降低盐浓度的方法进行洗脱，亦可用甲酰胺进行洗脱，然后检定其 mRNA 的性质。近二、三年来，利用真核细胞 mRNA 的尾部

带有聚A这一特点已分离出许多此类 mRNA；包括珠蛋白 mRNA，免疫球蛋白 mRNA，肌球蛋白 mRNA，卵清蛋白 mRNA 及几种病毒蛋白质的 mRNA(参见综述文献[6])。

### 2.1.2 mRNA 的分析

对任一 mRNA 制品，最终应分析其指导合成它所编码的那种蛋白质的能力。很多场合，在含有放射性标记氨基酸的适当的无细胞体系中加入待测 mRNA，经过适宜的保温时间，分析已合成的标记多肽，即可完成上述测定。

细菌的无细胞体系通常是用指数生长期收获而得的细菌来制备的。洗涤这些细菌然后用矾土 ( $Al_2O_3$ ) 在冰冷的乳钵中研磨。研捣时应加以含有一价和二价阳离子 (通常用  $NH_4^+$ ，也常常用  $Mg^{++}$ )，巯基保护剂及脱氧核糖核酸酶的缓冲液。细胞一旦破碎，即将混合物在 30,000 g 离心 10 分钟以沉降除去矾土，细胞壁与细胞碎片，分出的上清液称为  $S_{30}$ 。 $S_{30}$  再在 37℃，适宜的离子条件和非标记的氨基酸、ATP、GTP 及能量生发体系存在的情况下先进行保温。在这种事先处理下，存在于  $S_{30}$  中的内源性 mRNA 即被翻译和破坏。透析除去氨基酸以及其它低分子物质后，将  $S_{30}$  分装，低温 (液氮) 贮存<sup>[3]</sup>。

类似经过预先保温的  $S_{30}$  制剂亦可由许多真核细胞制备而得。已广泛使用的一种制剂系用克雷布斯 (Krebs) II 小鼠腹水瘤的细胞制备而得<sup>[7]</sup>。还有一种内源性 mRNA 活性较低的十分有用的无细胞体系，这种体系由市售的小麦胚芽制备而得<sup>[8]</sup>。用家兔网状红细胞制备的无细胞体系与上稍有不同。制备时，先造成家兔贫血，然后制备并洗涤网状红细胞。将收集到的这种细胞膜很易破碎的网状红细胞，利用渗透压的冲击使其胀破，再用离心法除去细胞基质。所得的上清液

称为溶胞产物 (lysate), 可在无细胞的条件下极其有效地合成珠蛋白, 合成的开始速率几与完整细胞相似。而且, 如将外源性 mRNA 加入其中亦可被有效地翻译。

上述每一种无细胞提取物均含有体外合成多肽时所需的核蛋白体、酶与 tRNA 分子等。除提取物中含有高分子成分外, 还需要氨基酸、ATP、GTP 及一种生发能量体系 (图 2.2)。对阳离子浓度的要求亦很严格: 蛋白质合成对  $Mg^{++}$  浓度的变化极为敏感, 对  $K^+$  或  $NH_4^+$  浓度的变化敏感性稍低。假定以上条件均能满足, 加入少量 mRNA (1 微克) 即可导致大量标记氨基酸掺入多肽之中 (图 2.4)<sup>[9]</sup>。

格登 (Gurdon) 及其同工曾记述过一种多少有点不同的 mRNA 活性的测定方法。此法在成长中的、南非爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的卵母细胞中或活化的卵中注入微量 mRNA, 然后

细胞提取物(由细菌, 动物细胞, 麦胚等)	5mg/ml
三羟甲基氨基甲烷缓冲液	20mM
MgCl <sub>2</sub>	1—5mM
KCl	60—120mM
ATP	1mM
GTP	0.1mM
磷酸肌酸	5mM
磷酸肌酸激酶	5μg/ml
β 巯基乙醇	5mM
氨基酸 (不包括放射性同位素标记的那种氨基酸)	50μM
放射性同位素标记的氨基酸	10—200μCi/ml
mRNA	20—200μg/ml
总体积	25μl—1ml
温育温度	20—37°C
温育持续时间	10—180 分钟

图 2.2 体外蛋白质合成所需的条件

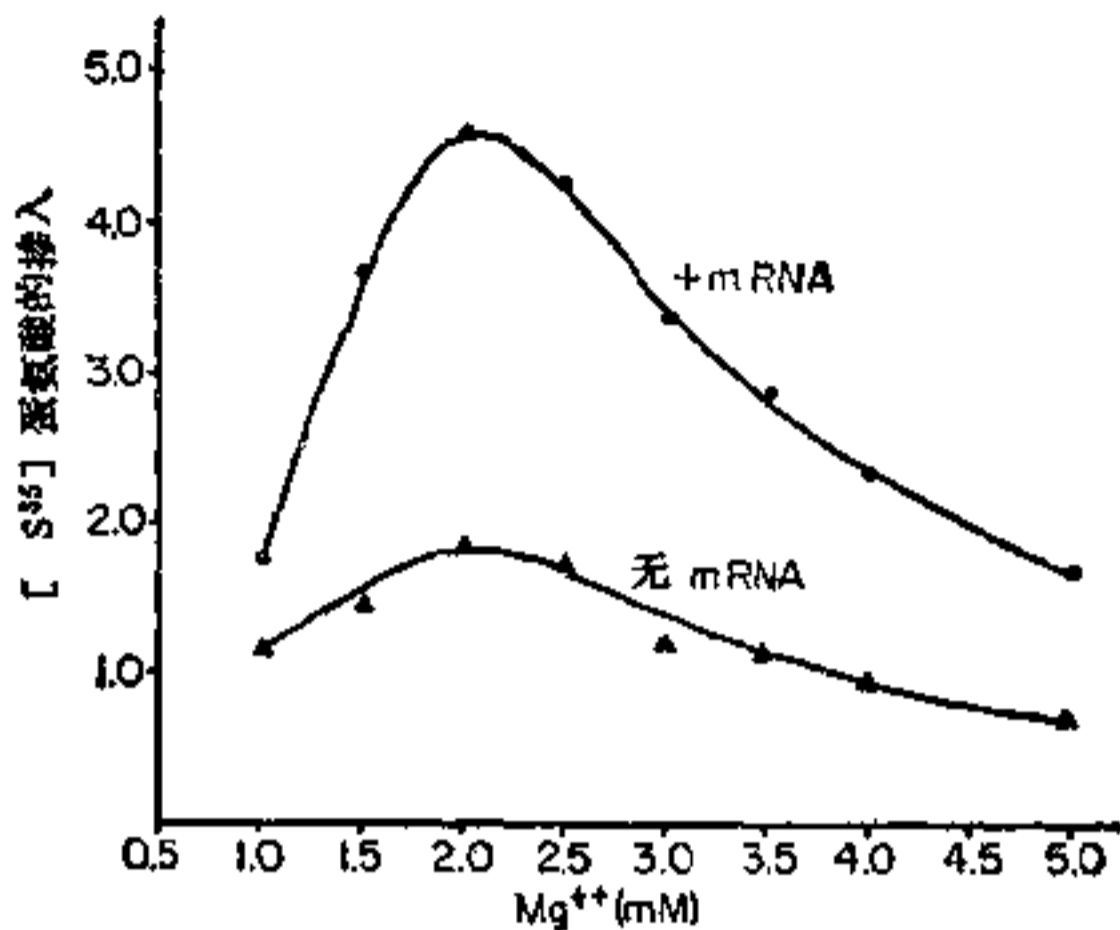


图 2.3 因  $Mg^{++}$  浓度而异的体外蛋白质合成(由[9]重画)

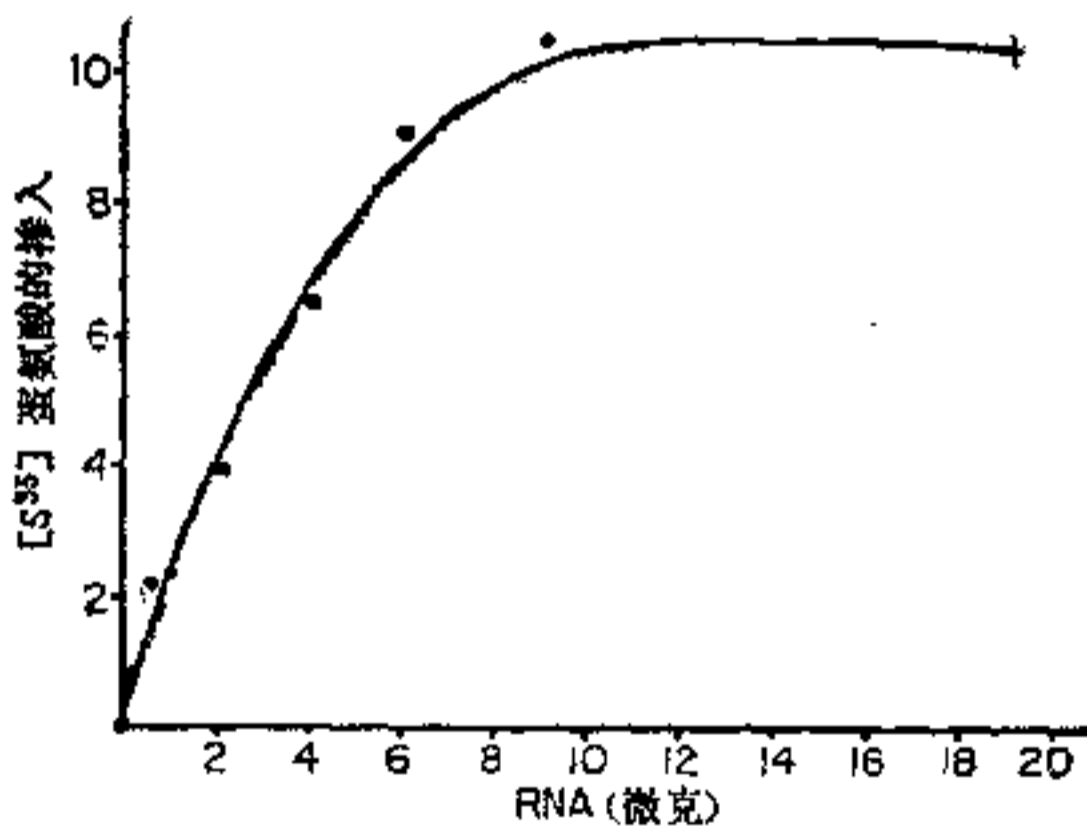


图 2.4 加入病毒 RNA 对体外蛋白质合成的影响(由[9]重画)

将其与无机盐以及带放射性的氨基酸共同温育。分析其合成的蛋白质表明,在卵内合成由注入的 mRNA 所编码的蛋白质达数天之久。因为卵母细胞测定体系所需 mRNA 量甚少,翻译效率又很高,翻译持续时间亦很长,所以这一体系颇受欢迎<sup>[10]</sup>。

翻译一种特定的 mRNA 未必就一定要选择一特殊体系。例如以小鼠的提取物翻译来自小鼠的 mRNA, 这样的同源体系可能会减少无细胞体系翻译的人为性, 这固然是可取的, 但是并不意味着同源体系是必不可少的; 因为用麦胚提取物翻译兔的珠蛋白 mRNA 也全然有效! 然而, 虽然以这种分析方法来鉴定 mRNA 可能极其有用, 但它未必就能表示活体中翻译的任何有关原理和需要。一般说来, 与完整细胞相比, 无细胞体系的蛋白质合成功率极差, 所以在估价体外实验所得资料的生理意义时, 此点务必牢记。

标记氨基酸掺入多肽(不溶于热的三氯醋酸)中, 这并未表明 mRNA 在体外是被准确地翻译着, 所以还需要作进一步

图 2.5 由塞姆利基森林病毒 RNA 导致的体外合成的蛋白质, 其聚丙烯酰胺凝胶电泳图(由[9])。(1) 不加 mRNA, (2) 加 RNA, (3) 病毒蛋白质, E 被膜, C 衣壳