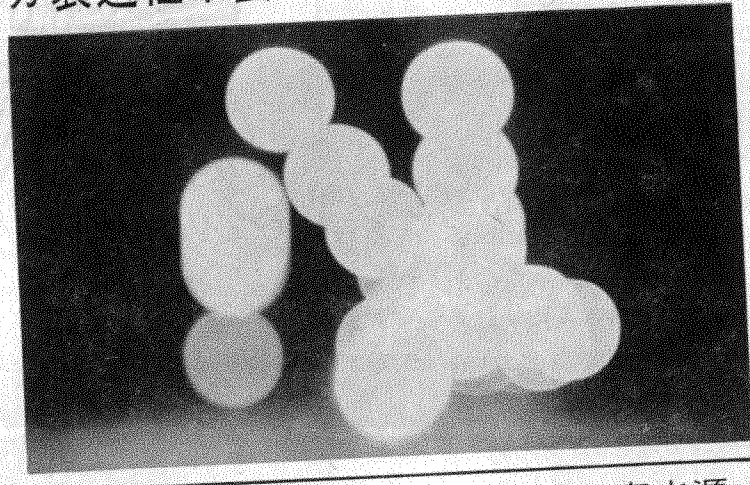


哺乳動物細胞蛋白合成之調節作用 (有絲分裂過程中蛋白合成在起始基準之抑制作用)



編譯：李水源

引文：有充分之實驗證據證明真核細胞在有絲分裂過程中蛋白合成速率降低，分裂細胞之研究已證明以 *Actinomycin D* 處理並不能防止在離開有絲分裂後分界面蛋白合成速率之恢復，因此在有絲分裂過程中之抑制作用並非由於缺乏在蛋白合成系統中主要之 *RNA* 成份，其理何在所知尚少。

對細菌而言，供應短生命期前驅 *RNA* 為控制蛋白合成之主要的因素，相對的，在哺乳系統中蛋白合成之控制在實質上與細菌有別，許多報告表示在前驅 *RNA* 之轉移之基層調節，尤其是 *polypeptide* 合成之起始為主要調節之點。

本報告之實驗表示在有絲分裂過程中之蛋白合成亦受轉移之早期之事件所限制。

物質及方法

(a) 細胞培養及同步

中國大鼠卵巢細胞於添充 7% fetal calf serum 及非必需氨基酸 (如 Eagle 所述) 之懸浮培養中生長，細胞維持於 $4 \times 10^5/ml$ 之濃度下，除非有其他之指示。

細胞以 *puck* 之重複 *thymidine* 中止技術使之同步生長，簡要敘述如下：細胞以 5mM *thymidine* (可抑制 *DNA* 合成) 處理 16 小時，然後將細胞離心，再懸浮於新鮮之培養基中以解除 *thymidine* 抑制，10 小時 *thymidine* 再加入 12 小時後再將細胞釋放出來，如在第一次之抑制然，在第二次 *thymidine* 抑制後 2 小時，每 1 ml 之培養液加入 0.6ug *colcemid*，則中期中止細胞聚積，有絲分裂指示以低張緩衝液 (0.1M *NaCl*, 0.01 *MgCl*₂, 0.01M *Tris*, *PH*7.4) 將細胞樣品脹大而測定之，帶有可觀察到之核之細胞 (以相對顯微鏡觀察) 為非有絲分裂，而沒有核之細胞為有絲分裂。

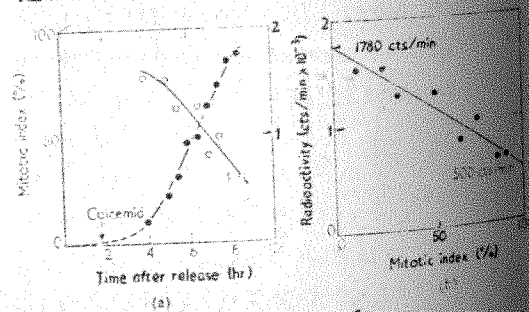


fig. 1

(b) 細胞標示及區分

(¹⁴C) 或 (³H) *Uridine* 加入培養基中，將 *RNA* 標示，放射性之量示於圖下，前驅 *RNA* 以下法標示：細胞濃縮至 $2 \times 10^6/ml$ 以 0.04ug/ml 之 *actinomycin D* 處理 30 分鐘後 (³H) *uridine* 加入其濃度為 5 uc/ml 然後細胞培養如圖所示之時間與 *polyribosome* 結合之 *RNA* 以下述方法測定之。合成中之 *polypeptide chain* 以下法標示，將生長於含 0.1 濃度 amino acid 之 *Eagles* 培養基中之細胞濃縮至 $2 \times 10^6/ml$ ，加入 5 ul/ml 濃縮之 (³H) *leucine* 將細胞倒入搗碎冰凍之 *Earle's saline* 溶液而停止培養。氨基酸介入之速率以下法測定之：1uc ¹⁴C 標示氨基酸水解液，加入 1 ml 之細胞懸浮液，10 分鐘後 5 ml 冰却 *Earle's* 溶液加入培養液中，試管保存於冰中，在 2000rev/min 離心 5 分鐘，將細胞沈降下來，上清液棄去，將試管拭乾，0.5ml 水加入細胞聚團，分解之細胞以 2 ml 10% *trichloroacetic acid* 沈澱下來，沈澱物收集於 *millipore* 濾器上，用 5% *trichloroacetic acid* 洗滌，然後以 *liquid scintillation counting* 或 *gas-flow counting* 測量其放射性。

細胞之分段如以前所述有關 *HcLa cells* 之細胞分段。簡要敘述如下：洗過之細胞浸於低張緩衝液約 10 分鐘使脹大，然後以 10 strokes 之緊密適合之不銹鋼 *Dounce* 勻和器勻和之，以 2000rev/min 之速率離心 2 分鐘以除去細胞核，*cytoplasm* 在高離子強度之蔗糖梯度分析之 (0.25 體積之 5 倍濃度鹽類緩衝液 (0.5M *NaCl*, 0.05M *MgCl*₂, 0.01M *Tris* - *PH*7.4) 加入 *cytoplasm* 中)。 *polyribosomes* 以低離子強度或高離子強度之蔗糖密度梯度離心法分析之。所得之 *polyribosome* 曲線以續流紫外線檢索器 (*cont*

inuou-flow ultraviolet monitor) 分析之。

(c) 在 *cesium chloride* 中 *polyribosome* 之固定及成帶

polyribosomes 按照 *Baltimore* 及 *Huang* 法以 *glutaraldehyde* 固定及在 *CsCl* 密度梯度中成帶，*cytoplasmic extracts* 先覆蓋在 15 至 30% *hypotonic-buffer-sucrose gradient* 上成一層，然後以 *spinco swco swinging bucket rotor* 在 40,000 rev/min 之轉速下離心 50 分鐘，收集各相當密度梯度之部份，相當於 *polyribosome* 區域之部份收集起來，樣品以 0.2ml 之 0.5% *glutaraldehyde* 固定以 1M *NaHCO*₃ 調節至 *PH*7.4，然後將樣品覆蓋於已形成之 *CsCl* 梯度 (1.35 至 1.68g/cm³) 上使成一層以 *spinco 50.1 rotor* 在 35,000 rev/min 之轉速下離心一夜，*tubes* 之底部第一孔每 4 滴收集於 *Wnatman* 濾紙盤 (*No. 3mm*) 上以熱燈泡乾燥之，將乾燥後之濾紙放於 10% *Trichloroacetic acid* 洗滌兩次，然後將其放入 *scintillation vials* 中加入 0.4ml *NH*₄*OH* 將沈澱之 *RNA* 水解，*ammonia* 蒸乾後加入 10ml *scintillation* 液 6 份 *toluene scintillator* 及 4 份 *methoxylthanol*，測定放射量。

(d) 轉移率計算 (*Translation rate measurements*)

細胞於減少氨基酸之介質中濃縮至 $2 \times 10^6/ml$ 然後加入 1 uc/ml 之 ¹⁴C 標示氨基酸之水解物在加入放射性後每隔 1 分鐘以吸管取 1 ml 樣品放入含有冰冷之 *Earle's medium* 中之試管中，用清潔劑 *Nonidet P40* 製備細胞抽出物，細胞在 2000rev/min 之速度下離心 2 分鐘，沈澱物再懸浮於 1 ml 低張緩衝液中，加入 *Nonidet P40* 至 0.5% 之濃度，樣品以 *vortex* 混合器攪拌之，細胞核藉

離心除去之。另一樣品之 *cytoplasmic extract* 定量其可溶性蛋白，將 3.5 ml 之 15% 低張緩衝液—蔗糖溶液盛於 *polyallomer* 離心管中，再將原生質抽出物覆蓋於其上以 *SW 50 1 swinging bucket rotor* 在 50,000 rev/min 之速率下離心 90 分鐘，此種操作使 *polyribosomes* 及 *monomeric ribosome* 沈積於沈澱物中，除去上清液部份，以 0.1 N-NaOH 短暫水解，測定在 *trichloroacetic acid* 中可沈澱物質之放射性含量。剩餘之樣品測定其原生質中酸性可沈澱放射性物質總量，再由測量中決定重量平均轉移時間（如結果中所示）。

(e) 蛋白之電泳分析

蛋白之電泳分析以 *Shapiro, Rinuela* 及 *Maizel* 法及 *McCormick* 及 *Penman* 之修飾法

操作，50ml *interphase* 之細胞—存於含 0.1 濃度氨基酸之介質中—濃縮至 $2 \times 10^6/ml$ ，然後加入 25 μc [3H] *leucine* 60 分鐘後將培養試管放入冰中，使放射性 *leucine* 之介入中止，50ml 有絲分裂細胞之培養液以 5 μc [^{14}C] *leucine* 以同法標示，*Nonidet P40* 之分界面及有絲分裂細胞各製備其原生質抽出液（1 ml）每一種抽出物取 50 μl 混合，然後加 5 μl 10% *sodium dodecyl sulfate*，10 μl 5 M-*urea*，10 μl 20 倍強度之電泳分析用緩衝液及 2 μl *mercaptoethanol* 上列混合物在 37°C 下共同混合 1 小時，加入 30 μl 之 *glycerol* 混合物直接加入 *polyacrylamide gel* 之上使成一層。7% *polyacrylamide gels* 按照 *Weinberg et al* 之法聚合之，加 0.5 M-*urea* 至聚合物溶液中，塑造圓柱形 *gel*（0.6 cm diameter \times 6 cm

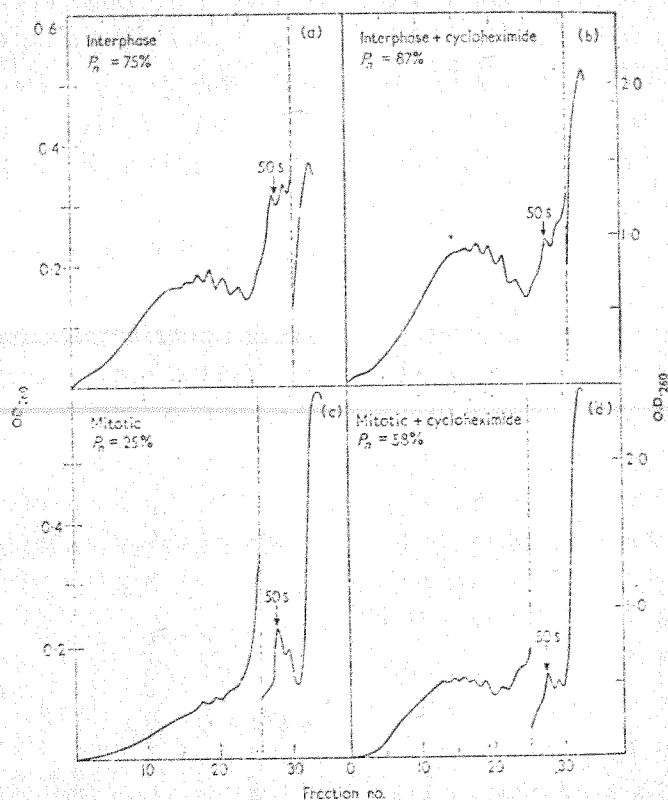


fig. 2

long) *gel* 依 *McCormick* 及 *Penman* 法在加有 0.1% *thioglycolic acid* 之電泳分析用緩衝液中電泳，在加入樣品前先通 10v/cm 之電流將 *sodium dodecyl sulfate* 跑進 *gel* 中然後將樣品溶液加入使成一層，電泳在同一電壓下進行 2.5 小時，*gel* 切成 1-mm 小段然後作 *scintillating counting*。

結果

如物質及方法項中所述之法，將生長於懸浮培養液之中大鼠卵細胞同步且聚積有絲分裂細胞，中期中止細胞之聚積顯示於圖 1 (a) 細胞進入有絲分裂約 4 小時，在 *thymidine* 之抑制釋放後約 6 小時半，有一半之細胞聚積於 *mitosis*，最後之有絲分裂指示為 85 至 95%（在聚積於中期中止時測量 *amino acid* 介入之速率，其結果顯示於圖 1 (a)）。*Fig 1 (a)* 表示在中期停止時氨基酸介入之速率，*Fig 1 (b)* 為氨基酸介入為有絲分裂指示之函數所繪得之圖，所得之直線關係包括兩種氨基酸介入之恒定速率其一為 *mitotic* 細胞，另一有為非有絲分裂細胞，將該圖內插至 0 及 100% 有絲分裂指示即得非有絲分裂及有絲分裂之氨基酸介入速率，內插值表示有絲分裂氨基酸介入之速率只為非有絲分裂速率之 28%，*colcemid* 加入不在有絲分裂之同步培養中對氨基酸介入之速率沒有效應至少 4 又 1/2 小時，此結果排除藥物對蛋白合成之直接效應。

此處對大鼠細胞所示之結果與 *Robbins* 及 *Scharff* (1966) *Prescott & Bender* (1962) 及 *Konrad* (1963) 之實驗結果相符合，他們發現 *Hela cell* 之有絲分裂蛋白合成之速率約為分界面層之 30%，*Robbins & Scharff* (1966) 亦發現在中期中止細胞之蛋白合成速率呈恒定至少 1 小時。

正在合成蛋白之 *ribosome* 不例外的均存於 *polyribosome* 中，這些迅速沈降之結構可

與活性 *Ribosomes* 區別之，此種活性之 *ribosome* 限制於單體結構或次單位，正在活潑生長之細胞之 *ribosome* 約有 60 至 80% 呈 *polyribosomes* 存在。

多體及單體 *ribosomes* 間量的關係之一方便的表示方法為 *pn*—為沈降速率大於 74 S 之結構中 *ribosomal RNA* 之部份。*ribosomal RNA* 在 *cytoplasmic extracts* 之蔗糖濃度分析中之分佈可以旋光濃度測量之，以細胞之放射活性分佈測之更佳，此處大部份之放射性在 *ribosomal* 及 *RNA* 其法乃將細胞以放射性 *uridine* 標示 16 小時或更長之時間，以放射活性測得之。*pn* 值並無在旋光濃度測量中之基底線不易確定之缺點，又單體 *ribosome* 被來自密度梯度頂端之非 *ribosomal* 物質所混淆亦較少。

圖 2 顯示大鼠細胞原生質之蔗糖密度梯度分析中 *polyribosome* 之分佈，該實驗中單體 *ribosome* 及 *polyribosomes* 間之分離可以高離子強度之緩衝液增加，在此種離子強度條件下，單體 *ribosome* 完全解離成更緩慢之沈降次單位而 *polyribosome* 居中，*ribosome* 則不改變。沈降速率較慢之次單位可與 *polyribosome* 分得更開，高離子強度之另一好處為減少蛋白之非專一性結合於 *ribosomes* 上，此種性質在較後之實驗裏有用。圖 2 (a) 之分界面細胞之 *pn* 值為 75%，有絲分裂細胞之 *pn* 值為 25%（圖 2 (c)）因此 *ribosome* 在 *polyribosome*—得自 90% 有絲分裂指示之培養—之數目為分界面細胞 *polyribosome* 中之 *ribosome* 數目之 33%（25%/75%=33%）此結果與圖 1 中在同一有絲分裂指示之氨基酸介入之減少程度相同，不論是分界面或有絲分裂之細胞，只有與 *polyribosome* 共同沈澱之 *ribosome* 俱有蛋白合成活性，因此減少 *polyribosome* 之數目表示減少在 *mi-*

totic細胞中俱蛋白合成活性之 *ribosome* 之數目。(註：插圖2)

減少活性 *ribosome* 之數目有下列可能之原因：(1)部份之 *ribosome* 被不活性化而不再參與蛋白合成。(2) *ribosome* 與前驅 *RNA* 結合之速率降低及 *polypeptide* 合成之起始速率較其轉移之速率為低。(3)可利用於轉移之先驅 *RNA* 之量顯著降低。(4) *ribosome* 在轉移之過程中過早由 *mRNA* 上解離出來(此說較不可能)。爲了區別上列可能性，研究低平準之 *cycloheximide* 對有絲分裂 *polyribosome* 之效應，*cycloheximide* 爲蛋白合成之抑制劑，在高濃度時可防止 *ribosome* 在 *mRNA* 上移動，在低平準時該藥可減少轉移之速率，*ribosome* 結合至 *m-RNA* 之速率之影響比對轉移之影響小，因 *Single ribosome*

之數目減少，圖2(b)顯示 $1 \mu\text{g cycloheximide/ml}$ 對分界面 *polyribosome* 之作用，細胞以 [^3H] *uridine* 標示一夜，然後在 $1 \mu\text{g cycloheximide/ml}$ 之存在下孵育45分鐘與未處理之細胞比較 P_n 值由75%增至87%。圖2(b)表示 *cycloheximide* 對有絲分裂細胞之效應， P_n 值由25%增至58%。圖3之實驗證明被 *cycloheximide* 移動之 *ribosome* 爲俱有蛋白合成活性者，圖3(a)細胞以 [^{14}C] *uridine* 標示一夜再以 [^3H] 標示6分鐘，因與 *polyribosome* 結合之放射活性物質之量在加入放射活性氨基酸三分鐘之內即達到飽和，故在這段時間中，*polyribosome* 上之新生 *polypeptide chain* (註：即合成未完成還附着在 *polyribosome* 上之 *polypeptide chain*) 達到恒定之特定活性

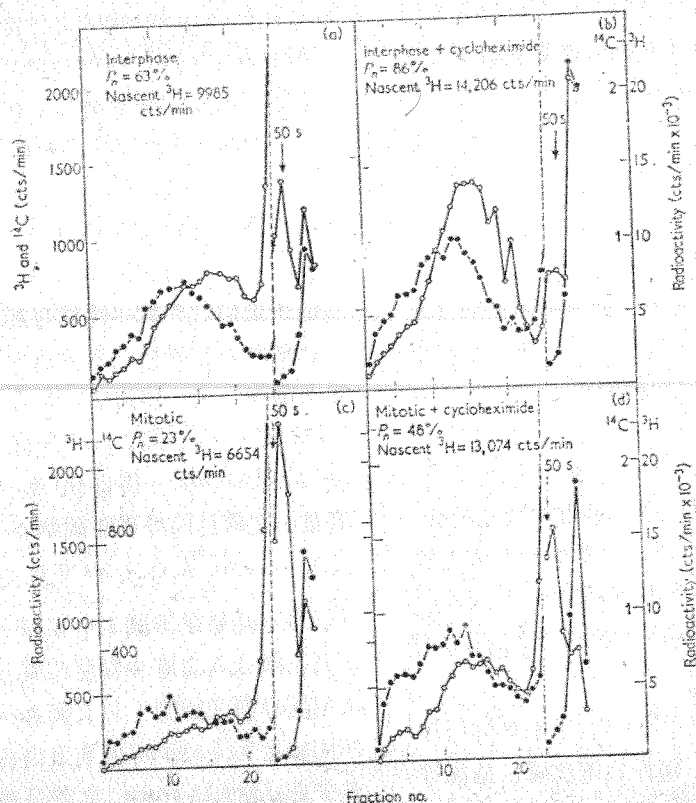


fig. 3

。圖3(b)細胞在以6分鐘之標示後隨後在 $1 \mu\text{g cycloheximide/ml}$ 存在下再標示45分鐘， P_n 值由63%增至86%(1.38倍)而在 *polyribosome* 區域之 ^3H 一標示蛋白之放射活性物質之量增加1.42倍，對有絲分裂細胞作同樣之實驗， P_n 值由23%增至48%(2.09倍)而與 *polyribosome* 結合之 [^3H] 蛋白增加1.97倍，如圖3(c)及(d)所示，在 *polyribosome* 區域沉降之 [^3H] *leucine* 與 *ribosome* 結合，因在離心以前，以 *pancreatic ribonuclease* 處理使 *ribosome* 及 [^3H] *leucine* 移至 *monoribosome* 之尖峯。Warner 及 Pene (1966) 證明高離子強度之條件可除去附着於 *ribosome* 上之非專一性聚積之蛋白，在此種條件下只有新生 *polypeptide chain* 與 *polyribosome* 結合。(註：插圖3)

以 *cycloheximide* 降低有絲分裂細胞蛋白轉移之速率結果使大部份之單體 *ribosome* 移至俱有蛋白合成活性之 *polyribosome* 上這些 *polyribosome* 所含 *ribosome* 之數目爲分界面細胞之 $\frac{3}{4}$ ，因此減少有絲分裂細胞之活性 *ribosome* 之數目並非只由於部份之 *ribosome* 被不活性化。

研究 *m-RNA* 在 *polyribosome* 存在之量被低平準之 *cycloheximide* 轉移之量，Martin, Tomkin 及 Granner 證明在有絲分裂時總蛋白合成降低，有一種特殊之蛋白，*tyrosine Aminotransferase* 之合成繼續以分界面之速率合成，此表示在有絲分裂時至少有兩類之 *mRNA* 即以正常迅速轉移之 *mRNA* 及減低轉移速率或甚至完全不轉移之 *m-RNA*。*cycloheximide* 可用來決定是否不與 *polyribosome* 結合之 *mRNA* 可用於轉移。圖4顯示 *cycloheximide* 對分界面細胞之

作用，細胞以 [^{14}C] *uridine* 標示一夜，然後在 $0.04 \mu\text{g actinomycin D/ml}$ 存在下，以 [^3H] *uridine* 標示3小時，此種 *actinomycin D* 之平準已證明對 *ribosomal RNA* 之合成可完全抑制，而 *mRNA* 之合成不受影響。一半之細胞在 $1 \mu\text{g cycloheximide/ml}$ 下孵育45分鐘，另一半作爲控制細胞，製備原生質抽出物覆蓋在蔗糖梯度上使呈一層，如圖4(a)及(b)所示，相當於 *polyribosome* 部份之樣品合併在一起，然後以 *glutaraldehyde* 固定，將固定之 *polyribosomes* 覆蓋至已形成之 CsCl_2 梯度上 (1.35 至 1.68g/cm^3) 使呈一層，以 *Swinging bucket rotor* 在 $170,000 \text{g}$ 下離心一夜，*polyribosome* 與 *ribosomes* 在約 1.54g/cm^3 之密度處成一帶，而 *nonribosomal ribonucleoprotein* 在較低之密度成帶。短期標示 *tritium* 之放射線計測在 CsCl_2 梯度中呈兩個尖峯如圖4(c)及(d)所示，主要之 ^3H 一尖峯與 ^{14}C 一標示 *ribosome* 尖峯在同一密度出現，因 *ribosomal RNA* 合成在以 [^3H] *uridine* 短期標示時被抑制，在 *ribosome* 之密度出現之 ^3H 一放射性尖峯乃來自 *nonribosomal RNA*，該尖峯以 *EDTA* 處理後之行爲可進一步支持該尖峯即爲 *mRNA* 之論據，收集之 *polysome* 在用 *glutaraldehyde* 固定之前先以 0.02M-EDTA 處理結果，短期標示之放射性計測移至較低之密度，而 *ribosomal* 之放射性計測呈兩個尖峯之帶。這些尖峯相當於重的及輕的 *ribosomal* 次單位，要得到預期之重的及輕的 *ribosome* 次單位中放射性之比例會遇到一些困難，但所有之場合，*pulse-label RNA* 與重的次單位分開。與 *cycloheximide* 處理之 *polyribosomes* 結合之總 *pulse-labeled*

放射活性物質與存於控制 *polyribosomes* 中者相同，同此不論有一些 *ribosome* 移入 *polyribosomes* 中但無外加之 *messenger RNA* 出現於該構造中。(插圖 4)

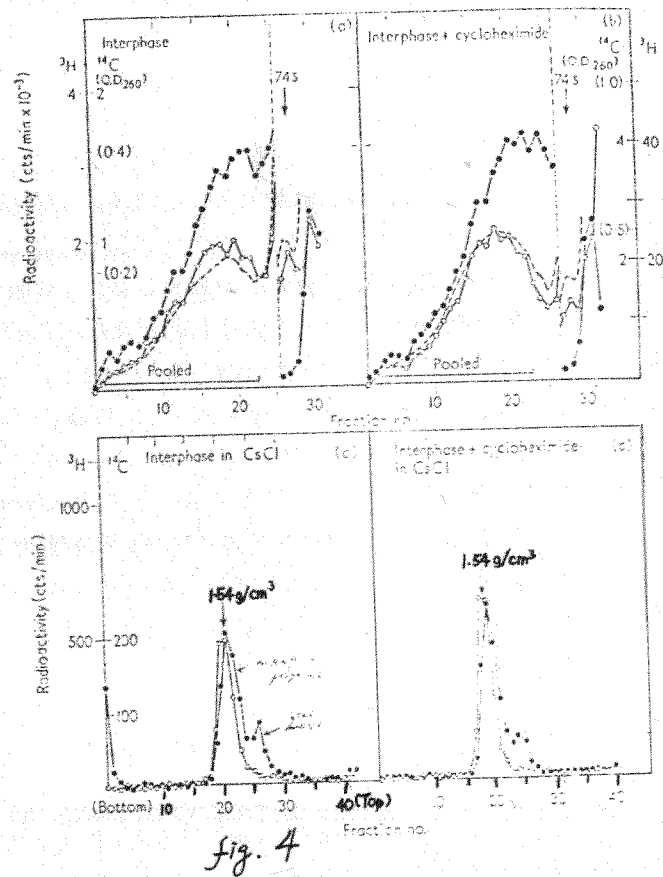


fig. 4

圖 5 顯示 *cycloheximide* 對有絲分裂細胞之作用，有絲分裂細胞之 *polyribosome* 之 *CsCl* 梯度顯示有一 *heavily labeled ribonucleo protein* 尖峯在分界面細胞中沒有發現，該物質類似來自細胞核之 *RNA* 在有絲分裂之過程中被釋放到細胞質中與 *ribosome* 結合之前驅 *RNA* 呈小的尖峯出現而與 *ribosome* 一起成一帶，估計在 *non polyribosomal ribonucleoprotein* 之基底以上之 *m-RNA* 之放射性如圖 5 (c) 及 (d) 所示 *mito-*

tic 細胞以 *cycloheximide* 處理後結合到 *polysomes* 之前驅 *RNA* 有兩倍之增加，此表示在任何特定之時間可利用於轉移之前驅 *RNA* 之量比真正存於 *polyribosomes* 上者為多，

此結果支持了前驅 *RNA* 在有絲分裂細胞並非速率限制之推論。(註：插圖 5)

Ribosome 在有絲分裂細胞之 *polyribosome* 內數目不能以 *ribosomes* 及前驅 *RNA* 之可用性決定之。本文較後會證明有絲分裂細胞之 *ribosome* 在轉移之過程中並不會過早由 *m-RNA* 分子上解離出來，因此所剩下來的可能性為：降低 *ribosome* 結合之速率(與轉移之速率比較)為主要降低 *polyribosome* 上之 *ribosome* 之數目之原因。

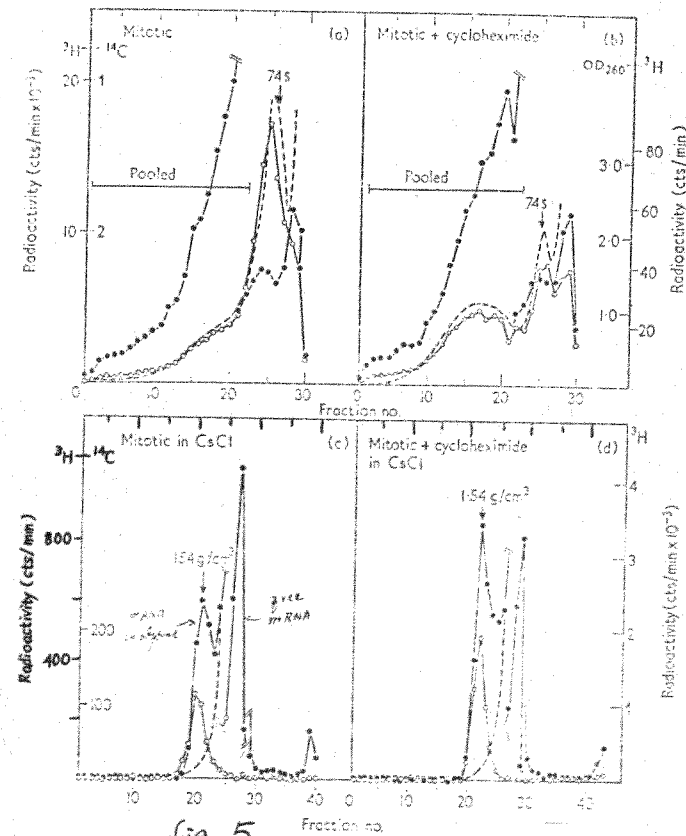


fig. 5

為了辨認在有絲分裂細胞內蛋白合成之步驟，必需將有絲分裂細胞之 *ribosome* 之速率與分界面細胞者作一比較，下列所述之實驗即測定放射活性物質由新生 *polypeptide chain* 流至完整之蛋白，此種測量與平均轉移時間相關一即 *ribosome* 結合到前驅 *RNA* 之後完成轉移而釋放完成之 *polypeptide* 所需之時間。必需強調的是，平均轉移時間並不決定於 *ribosome* 結合之速率，圖 6 顯示平均轉移時間與 *single polyribosome* 之標示可溶性蛋白之聚積間之關係，在以放射活性氨基酸短期處理之後新生鏈在一個轉移時間內完全被標示且合成完成而釋放出來之 *polypeptide chains* 中之放射活性物質與在新生鏈上者相同，在第二個轉移時間新生 *polypeptide*

chain 放射活性保持不變，而兩倍於該量之放射活性會釋放到完成之 *polypeptide* 分子，以後每一轉移時間將有與第二轉移時間相同之放射活性被釋放出來，在可溶性蛋白中之放射活性物質作為時間之函數所繪得之圖在 1 個轉移時間之後呈直線關係，可外插回到轉移時間之一半。總 *trichloroacetic acid* 沈澱放射活性計測(包括新生鏈及在可溶性蛋白中之放射活性計測)作為時間之函數所繪得之圖為一直線，可外插至氨基酸之介入開始呈直線之時間，在上列兩截距間之差異相當於轉移時間之一半之時間，事實上，有許多大小不等之 *polyribosome* 參與此種計測，且所測得之平均轉移時間為不同轉移時間之重量平均值。

圖 6 (b) 表示由分界面細胞所得之數據，樣

品在 ^{14}C -標示氨基酸放射活性處理之後，每隔一分鐘取出，另一樣品則測定原生質中所釋放之標示蛋白及總原生質放射活性，總酸中可沈澱物質及可溶性蛋白之放射活性計測作為時間之函數所繪得之圖產生許多平行之直線，可外插至 0.95 分鐘之分離時間，在此種情況下重量平均轉移時間 (*weight average transit time*) 約為 1.9 分鐘，在此段時間內原生質中所有蛋白合成均存於可溶性蛋白部份，因兩條直線幾乎平行。

圖 6 (c) 表示 *mitotic* 細胞之同樣之測量之結果，得到一截距為 0.90 分鐘或重量平均轉移時間約 1.8 分鐘。有絲分裂及分界面細胞以此法測得之轉移時間相同，因此一旦 *polypeptide* 合成開始後，在兩情況下，以相同之速率轉移。因測定平均轉移時間，故當有絲分裂及分界面細胞之蛋白合成有相同之大小分佈比較時方才有效。

圖 6 (d) 表示有絲分裂及分界面細胞蛋白合

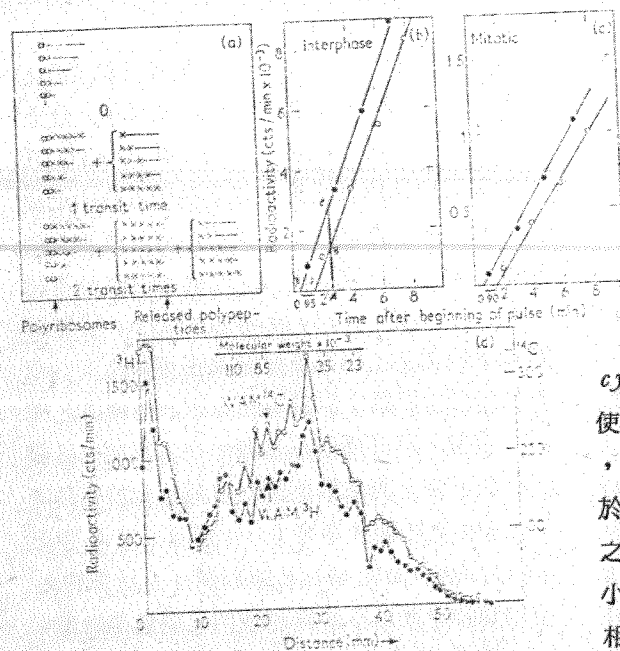


fig. 6

成之比較，有絲分裂細胞以 [^{14}C] *uridine* 標示 1 小時，分界面細胞以 [^3H] *leucine* 標示同樣之時間，然後將原生質抽出物合併以 *acrylamide gel electrophoresis* 分析，用 *sodium dodecyl sulfate-urea* 緩衝液一可依分子量之大小分離蛋白，雖然有絲分裂及分界面蛋白之放射活性之分佈圖樣稍有不同，但大小之分佈則無大的差異，測定兩大小分佈之相同性之結果為有絲分裂及分界面蛋白之重量平均移動性之差異小於六十分之一，因此轉移時間之測量可以比較，這些結果，證明 *ribosome* 過早中止而產生較小之蛋白在有絲分裂細胞內並不會發生。

有絲分裂 *HeLa* 細胞亦可得相同之結果，因此亦可得相同之結論。(註：插圖 6)

討 論

本實驗報告顯示有絲分裂細胞之特徵為蛋白質合成之活性 *ribosome* 較少，以低劑量之

cycloheximide 降低前驅 *RNA* 轉移之速率可使不活性 *ribosome* 轉移成俱有蛋白合成活性，故在有絲分裂細胞內蛋白合成之損害並非由於抑制 *ribosome* 之機能而起，轉移受到干擾之 *polyribosome* 含活性 *ribosome* 且其大小分佈與正常之分界面細胞之 *polyribosome* 相同，其所含之 *ribosome* 約為分界面之 75

%，此結果表示在有絲分裂細胞內之 *mRNA* 之量及功能 *ribosome* 之數目與分界面細胞相同，圖 5 所示之結果表示有絲分裂細胞以 *cycloheximide* 處理之後有相當量之 *m-RNA* 與 *ribosome* 結合，而未處理之有絲分裂細胞則無，此結果更進一步加強下列推論：可利用於 *translocation* 之 *RNA* 之數量在有絲分裂之過程中並不構成蛋白合成之速率限制成份，一旦與 *mRNA* 結合之後，*ribosome* 呈正常之機能作用，因轉移之速率在有絲分裂及分界面細胞相同，如圖 6 所示有絲分裂細胞之蛋白合成之大小分佈與分界面細胞所見者同，此顯示蛋白合成之大小並無顯著之改變，亦無 *ribosome* 由 *mRNA* 之早熟釋放。

因此在有絲分裂時細胞蛋白合成系統之主要改變為 *ribosome* 與 *mRNA* 結合，及 *polypeptide* 合成之起始之速率低劑量之 *cycloheximide* 降低轉移之速率，因此初發及轉移之平衡更接近在分界面細胞中之平衡，此種推論與 *Steward* 等人之建議一在有絲分裂時蛋白合成之降低乃由於 *ribosome* 結合至 *mRNA* 之速率降低使然一相付合。

大部份之實驗 *cycloheximide* 對 *mitotic polyribosome* 之組合並不完全達到如正常分界面 *polyribosome* 之 *pn* 值，以 *cycloheximide* 處理之分界面細胞亦然，不能完全再組合可能由於減小在有絲分裂細胞中可利用之前驅 *RV* 之量，或可能由於 *cycloheximide* 對起始反應過程之作用使然，若藥物抑制初發同時遲緩轉移則在藥物處理之細胞之初發相對於轉移速率之增加，將比預期者為低，此種 *cycloheximide* 對初發之可能之效應已有 *reticulocyte* 之生體外系統之報告，但藥物對轉移之作用必較初發為大，因為 *ribosome* 對 *mRNA* 之結合有淨增加。

圖 1 有絲分裂時同步細胞之聚積

(a) 細胞如“物質及方法”項下所述之法，使同步培養，在脫離第二次 *thymidine* 阻斷後，求得有絲分裂指示及氫氧基介入速率，有絲分裂指示及氨基酸介入速率作為時間之函數繪圖，氨基酸介入速率及有絲分裂指示如所述測量，*colcemide* 如箭頭所示之時間加入—•—•—•有絲分裂指示；—•—•—，以 ^{14}C 標示氨基酸處理 10 分鐘後之酸中可沈澱物之放射活性測量。

(b) 氨基酸介入速率對有絲分裂指示作圖。

圖 2 以 *cycloheximide* 處理或未處理之有絲分裂及分界面細胞之 *polyribosome* 之分佈圖(a)分界面細胞：100ml 分界面細胞以 10 μC [^3H] *uridine* 標示一夜，培養液之半製備原生質抽出液加入 0.25 Vol 5 倍濃度之高鹽緩衝液然後將其覆蓋於 36ml 的 15 至 30% 高鹽緩衝一蔗糖梯度使呈一層以 *Spinco SW 27 rotor* 在 27,000 *rev/min* 下離心 120 分鐘，以 *Gilford* 續流 *spectrophotometer* 記錄 $0 D_{260}$ 將其收集成各部份，然後測定各部份之放射活性，*Pn* 值由 ^3H 測值決定之（未顯示出來）。(b) 以 *cycloheximide* 處理之分界面細胞：*cycloheximide* 1 $\mu\text{g/ml}$ 加入(a)之細胞中 45 分鐘，然後抽取並如上處理。(c) 有絲分裂細胞：100ml 同步培養細胞如上標示一夜如圖 1，以 *colcemide* 收集於有絲分裂最後之有絲分裂指示為 88% 培養液之一半如上法製備原生質抽出液。(d) 由(c)所得之有絲分裂細胞以 1 $\mu\text{g cycloheximide/ml}$ 如(b)處理。

圖 3 有絲分裂及分界面 *polyribosomes* 之新生 *polypeptide* 之標示 100ml 任意生長中之中國大鼠卵細胞以 0.5 μC [^{14}C] *uridine* 標示一夜， [^3H] 如“物質及方法”所述加入

，6分鐘後一半之細胞倒入冰凍 Earle's saline 中，另一半加入 1 ug cycloheximide/ml 4 5 分鐘後如上法中止標示之介入，原生質抽出液如圖 2 所述製備之且在同一條件下離心，收集成各部份，測量各部份之放射活性。(a)分界面細胞(b)分界面細胞以 cycloheximide 處理。(c)及(d)對有絲分裂細胞所作之相同之實驗(最後之有絲分裂指示為 84%)
 —•—•—, ³H 放射活性; —•—•— ¹⁴C 之放射活性。

圖 4 分界面 polyribosome 之 CsCl equilibrium centrifugation analysis 100 ml 任意生長中之細胞以 1 uc [¹⁴C] uridine 標示一夜，mRNA 如“物質及方法”中所述之法標示 3 小時，一半之細胞以 1 ug cycloheximide/ml 處理 4 5 分鐘，另一半作為控制用，不與藥物混合，製備 0.5ml 之原生質抽出液覆蓋於 12ml 的 15 至 30% 低張蔗糖梯度中，使呈一層，以 Spinco Sw 40 rotor 在 40,000rev/min 下離心 50 分鐘，將梯度分段取出樣品，相當於 polyribosome 區域之樣品合併，固定後在 CsCl 梯度中分析。收集之部份以(a)(b)中之桿表示之，留下之部份測定放射活性如(a)及(b)所示。(a)分界面細胞原生質抽出液之製備性蔗糖密度梯度。(b)以 cycloheximide 處理之分界面細胞原生質抽出液之製備性蔗糖密度梯度。(c)如(a)所示之分界面細胞之 fixed polyribosomes 之 CsCl 密度梯度，1.0ml 之 polyribosome 以 glutaldehyde 固定後，覆蓋在 4.4ml pre-formed CsCl gradient (1.35 至 1.68g/cm³) 以 spinco SW 50 rotor 在 35,000rev/min (170,000g) 下離心，每 4 滴收集成一部份，如“物質及方法”項所述之法測定放射活性，由放射活性及密度在平行梯度下測量之實

驗可確定 1.54g/cm³ 為 ¹⁴C 之尖峯。(d)以 cycloheximide 處理之分界面細胞之 fixed polyribosome 之 CsCl gradient。
 —•—•—, ³H 放射活性; —•—•— ¹⁴C 放射活性; 0 D₂₀₀。

圖 5 有絲分裂 polyribosome 之 CsCl 密度梯度分析

100ml 同步培養細胞如 Fig 4 中之法標示其 ribosomal 及前驅 RNA。一半以 1 ug cycloheximide/ml 處理，另一半作為控制用(如圖 4)離心，固定及在 CsCl 中成帶均如圖 4 (a) 85% 有絲分裂細胞之原生質抽出液之製備性蔗糖密度梯度。(b)以 cycloheximide 處理之 mitotic 細胞原生質抽出液之製備性蔗糖密度梯度。(c)如(a)所示，由有絲分裂細胞中收集之 fixed polyribosome 之 CsCl 密度梯度分析。(d)如(b)所示，由以 cycloheximide 處理之有絲分裂細胞中所收集之 fixed polyribosome 之 CsCl 密度梯度分析。
 —•—•— ³H 放射活性; —•—•— ¹⁴C 放射活性; 0 D₂₀₀。

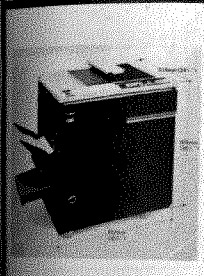
圖 6 分界面及有絲分裂細胞 ribosome 轉移時間之測定

(a)以放射活性氨基酸處理後在 0, 1 及 2 個轉移時間之與 polyribosome 結合之放射活性及在完成 polypeptide 中之放射活性之圖示。(b)分界面細胞原生質中總酸可沈澱放射活性物質及可溶性蛋白之放射活性對 ¹⁴C—標示氨基酸開始標示後之時間作圖，細胞以 ¹⁴C—標示氨基酸處理，總原生質及可溶性蛋白之放射活性如“物質及方法”項所述之法測定之。
 —•—•—, 總酸可沈澱放射活性; —•—•—

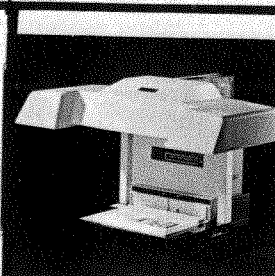
一，可溶性蛋白之放射活性。(c)總原生質中及可溶性原生質蛋白之放射活性對有絲分裂細胞之時間作圖(96%有絲分裂指示)細胞如(b)標示，分段及鑑定。(d)有絲分裂及分界面細胞蛋白之 acrylamide gel electrophoresis 分析。分界面細胞以 [³H] leucine 標示，而有絲分裂細胞以 [¹⁴C] leucine 標示(如“物質及方法”項所述之法行之)原生質抽出物合併如“物質及方法”項所述之法行 elect

-rophoresis, 電泳分析在 10v/cm 下操作, gel 為 7% acrylamide 以 sodium dodecyl sulfate-urea 為緩衝液, 如 Mcclormick & pemmen (1969) 所述。—•—•— ³H 放射活性; —•—•— ¹⁴C 放射活性, 重量平均移動性 (W.A.M) 以 ³H 及 ¹⁴C count 表示, 近似分子量由已知分子量之蛋白在同一 gel 中比較得知。●

Canon 事務機器



普通紙影印機總匯
Canon NP系列以新的過程 (New Process) 使用普通紙 (Normal Paper) 影印, 技術領先, 擁有多項專利。機型最多, 品質最高, 服務最佳。



資料縮影系統
Canon 以其優越的科學技術基礎, 創造出極精密的縮影系統。從縮影沖洗機, 到普通紙閱讀複印機, 系統最完整, 而且適合中國的文字作業。



小型電腦系統
Canon 新發展的小型電腦, 中央處理機容量大, 對話式操作的顯示窗及小型磁碟, 獨創的繪圖式印表機, 適合統計、商業、數值及科學工程計算等作業處理



電子計算機系列
Canon 電子計算機以高品質聞名。從內部的迴路到外部的鍵盤, 皆精心設計。使您完全相信它們演算的結果, 使您操作快速舒適。

Canon 影印機 三大特點

- 1 機型最多 NP50 . NP70 . NPL7 . NP80 . NP5100 . NP5500 . NP6000 (現貨供應) . NP60 . NP75AF . NP5000 . NP6300 . NP8500 . NPA2 (以上期貨)
- 2 服務最佳 全省服務人員一百多位, 均原廠技師受訓合格。
- 3 零件充足 零件耗材隨時維持五年庫存量, 確保售後服務。

嘉能企業有限公司
 台中市民權路233巷11號 (伯爵大廈) TEL:(042)296176~80
 總公司: 台北市南京東路二段178號6•7樓
 TEL:5213360— TEL:5213360-6 • 5213373