

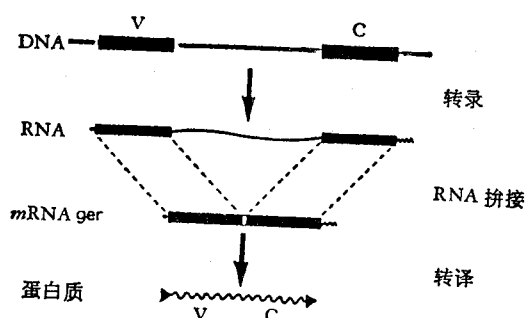


图6 免疫球蛋白轻链的产生过程示意图

V_L 和 C_L 两个结构域的微基因在 DNA 分子分离的区域^[19]

种,以防异物为害机体。事实上,每个细胞只产生一种免疫分子,其差别就是可变区基因片有突变,特定的异物结合到相应细胞表面的受体上,会刺激该种细胞大量分裂并且产生有效的免疫分子。当然,并非所有的基因段都正好相应于一个蛋白质的结构域。但基因分片与蛋白质结构域之间的联系使我们对于分子进化的认识大大深化。由此可以理解发散型和收敛型无非是在进化过程中不同的分子利用了一个相同

的微基因或甚至更小的基因片段,再加上别的基因片段,拼接而成。每个基因段的遗传和变异也因而有一定的独立性,并且一个新的分子的进化成型并不要求先破坏一个老的分子。这使整个生物界对自然环境有了更大的适应能力。

总结上述,作者倾向于认为:蛋白质分子在进化过程中,大量涉及的是一个氨基酸残基替换的量变,它们起因于 DNA 分子中一个核苷酸碱基的替换。自然选择则只保留那些稍加改善或至少不损害分子基本功能的替换。这就是同一蛋白质分子的种属差异现象。而这种量变积累到一定程度后,会发生质变,有可能出现新的基因片段组合方式(包括成段的插入和缺失)。如果这种组合更有助于机体对环境的适应,那么一个新的分子品种就会诞生。随着越来越多的三维结构的测定以及蛋白质分子折叠过程研究的深入,联系分子生物学其它分支的进展,比较分子生物学一定会提供越来越多的信息(未完待续)。

核磁共振及其在分子生物学中的应用(二)

华庆新

(中国科学院生物物理研究所)

三、NMR 在分子生物学中的应用

最早从事生物样品 NMR 研究的是 Jardetzky^[10]。1957 年他用 2—3M 的 Gly、Ala 等氨基酸作 ^1H 谱,观察共振峰随 pH 的变化。第一个蛋白质的 NMR,也是在 1957 年由 M. Saunders^[11] 等人测定了 RNase 的 ^1H 谱。以后, NMR 在分子生物学中得到了广泛应用。

1. 作分析研究 (1) 鉴定生物分子成分。最简单的方法是将图谱与已知化合物分子的谱线进行比较。一般由 δ 、J 强度,即可大体确定分子成分。研究完整组织时,由于 NMR 的非破坏性,已受到广泛重视。如在人、蛙、蟾蜍的

腓肠肌,新发现了一种磷的代谢成分——甘油-3-磷酸胆碱^[4]。其含量有种属差异,与生理状况亦有关。这为进一步研究提供了线索。目前要推测未知化合物的分子结构,必须仔细分析图谱。这在有机化学中用得较多,而在生物学中还不常用。1965 年有人^[12]曾预言 NMR 可用作短链多肽(如三肽)的序列测定。实际上,它比常规定序,并没有太多优点。但最近又有人用 Gd^{3+} 谱线加宽探针,作了小肽序列测定,也有人作了多糖糖链的序列测定^[13]。

(2) 确定生物分子的物理、化学状态 只要在所测 pH 范围内,样品有可解离的基团, NMR 即可测定分子的解离态,测定样品的 pH。

有人以 ^{31}P 谱测定海洋中一种无脊椎素虫组织的细胞内 pH 为 7.2, 远低于海水的 pH 8.1。特别有趣的是可以测定完整组织细胞内外的 pH 值。如新鲜完整的艾氏腹水癌细胞的 ^{31}P 谱, 显示膜内 pH 为 6.82, 膜外 pH 为 6.36^[14]。这是其它方法所无法测定的。氧化磷酸化的 Mitchell 化学渗透学说的主要依据是认为线粒体膜内外 pH 不同, 有“质子泵”的作用。而 1978 年, S. M. Cohen^[15] 以 ^{31}P NMR 方法在鼠肝细胞的线粒体与胞液之间确实测出 ΔpH 。从而得出了对 Mitchell 学说的有力的实验支持。此外, NMR 方法还可测定组织中金属离子是游离态, 还是结合到其他小分子上(如 Mg^{+2} 连到 ATP 上)或结合到膜上、蛋白质上。6-磷酸葡萄糖的异头体比例, 也可由 ^1H NMR 测知^[16]。磷酸二羟丙酮是丙糖磷酸异构酶的底物, 其羟式与酮式的比例, 可由 NMR 测知。只有酮式可连到酶上。

(3) 定浓度 主要方法是比较谱线积分强度, 但此时特别要求仪器稳定。在完整组织中, NMR 可测知化合物浓度, 这是其它方法难以办到的。在临床上, 器官移植失败的一个主要原因, 是器官组织不够新鲜。今后似可用 NMR, 先测组织的新鲜程度(如可以 ATP 含量为准), 以确定其选用与否。在生化中, 某些成份(如酶)的区域化分布很重要。NMR 对测定复杂体系不同部分的代谢物浓度, 提供了新途径。

2. 热力学研究 任何波谱方法都可以研究结合常数、pK 值及相变情况, 而 NMR 的优点在于能逐一研究分子的每一基团。

(1) 测结合常数 由监测结合型和非结合型的相对浓度, 就可知其结合常数。在分子结合时, 任何可被微扰的 NMR 参数, 都可用来监测。但常用的是 δ 和 T_0 。在与溶剂只有慢交换时, 由两峰面积之比, 可得相对浓度; 在快速交换时, 作化学位移对浓度的滴定曲线, 按一定公式也可推算出来^[9]。如测定了 D-3-磷酸甘油与丙糖磷酸异构酶的结合常数。

(2) 测 pK 值可分为两种方式: 第一是监测解离基团的共振参数(一般测 δ)。由于基团

解离, 直接通过键传递质子, 因而影响化学位移。血红蛋白的 Bohr 效应, 是在脱氧时接受一个质子, 这伴随着基团的解离。Perutz 在其经典的 X 衍射研究中推测, $\text{Hb} \rightleftharpoons \text{HbO}_2$ 互变时, His- β -146 基团局部环境有变化。而 His- β -146 的 pK_a , 可由 NMR 监测 Hb 与 HbO_2 的 His- β -146 的 C-(2) 质子峰来确定。如图 9 所示, Hb 的 His- β -146 pK_a 为 7.9; HbO_2 的 pK_a 为 6.8, pK_a 值的变化, 是由于脱氧 Hb 中, Asp-94 与 His- β -146 之间有盐键。这是 X 衍射与 NMR 结果互为补充的范例。用 NMR 测蛋白质的解离态, 虽没有很好结果, 但亦报道测定了丝氨酸蛋白酶、猪胃蛋白酶、碳酸酐酶的一些活性基团

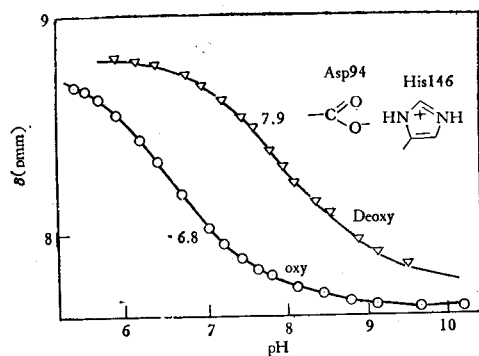


图 9 Hb 与 HbO_2 的 His- β -146 的滴定曲线

观察 C-(2) 质子峰位移。Asp-94 的接近, 导致脱氧 Hb 的 pK_a 值

的 pK_a 值。第二由于基团解离而伴随的空间效应, 也可用来测 pK_0 主要是用蛋白质局部构象变化。如溶菌酶的 Glu-35 基团的 pK 值, 反映了邻近的 Trp-108 的影响。蛋白质构象随 pH 变化, 使 Glu-35 与 Trp-108 间距改变, 间接影响了基团的解离度。

(3) 测定其它热力学参数 如二级相变、 ΔG 、氧化还原电位等。以温度对弛豫时间作图, 可测膜的二级相变。由化学位移的变化, 也可知蛋白质、核酸是否折迭型, 观察生物相变。

3. 动力学研究 监测底物或产物的浓度随时间的变化, 可作动力学研究。NMR 虽不能作快速测定, 只能测十秒量级的速度较慢的动力学过程, 但其优点是能监测单个分子。

(1) 非平衡态测定 由测定单个分子的峰

强随时间的变化可知其浓度的变化。由谱峰的此消彼长,亦可知其转化过程。较快的酶动力学研究,可结合停流法测定,如胰凝乳蛋白酶和伴刀豆球蛋白(ConA)的研究。

(2) 平衡态测定 主要是靠测定弛豫时间。测 T_2 分子中不同部位的核的交换有快有慢。在慢交换时可看到不同部位的分立的峰;而在快交换时,只有一个单峰。若交换作用对 $1/T_2$ 有较大贡献,则根据线宽和线形,可确定交换作用的大小。如由测线宽,可追踪碳酸酐酶的动力学过程,从 His 的 C(2) H 的 ^1H 谱线加宽对 pH 的依赖关系,可知质子交换使谱线在 pK_a 处加宽^[17]。在缓冲液中,质子交换率增加。人的高活性异构酶(C 酶),在同样条件下比低活性的异构酶(B 酶)的质子交换快得多。小分子抑制剂结合到溶菌酶上,也观察到谱线加宽,这是结合到酶上的配体多少的函数。抑制剂 $(\text{Glc NAc})_3$ 结合到酶上,诱导了酶蛋白构象变化。这可以直接由 ^1H 谱看到。如图 10,线形分析相对较容易,对应着一半游离的,一半结合的蛋白质。在低温时, trp 峰一分为二,部分抑制剂结合到酶上,另一部分未结合。升温时构象变化加速,慢交换变成快交换,通过线形

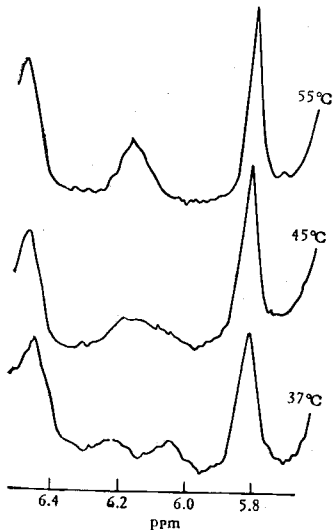


图 10 含有 4mM $(\text{GlcNAc})_3$ 抑制剂的 8mM 溶菌酶 270MHz ^1H NMR 谱的一部分

37°C 时 trp 呈两峰,对应于 I 结合到 Enw 上及未结合到 En 上,化学位移差是构象不同所致。

分析可知构象变化。在 Cyt-C 中 ^1H 谱的线形分析,已能确定 trp 残基的旋转或翻转速率。测 T_1 。如在 tRNA 中测 NH 的质子与溶剂的质子交换,在激酶中测核苷酸之间的 ^{31}P 的交换。一般认为,在较慢的动力学过程中,常用 T_1 的测定;而在较快的过程中,可以测线宽;对很快的过程,交换效应对弛豫时间没有显著贡献,此时作偶极弛豫的分析,可提供信息。

4. 分子运动 NMR 可对分子运动作广泛研究,其中包括扩散或穿透运动、总体旋转(overall rotation)。至于微扰所产生的运动(如配体结合诱导的蛋白质构象变化),前已述及。磷脂的扩散常以自旋回波法测定,其它类型的运动,常用弛豫效应研究。

(1) 蛋白质中 ^{13}C 弛豫研究表明, α -碳原子和芳香基团的翻滚是各向同性的,因此可以用简单的相关时间 τ_c 来描述这种运动。蛋白质表面基团的 T_2 ,一般比内部基团的 T_2 大得多,可以预期其内部是刚性的^[9,18]。蛋白质 ^1H 谱的弛豫解释比较困难。

(2) 磷脂与生物膜的研究 发现磷脂的极性头的碳原子 T_1 较小。越向疏水尾, ^{13}C T_1 值越大。这是 ^{13}C NMR 在卵磷脂上测定 T_1 的结果,提示双脂层的中间疏水部分,比极性头表面有更大的流动性,见图 11。另外,观察到磷脂分子在双脂层平面上的横向扩散决定了质子的 T_2 。由生物膜与人工磷脂膜 ^{13}C 谱相对强度的比较,发现有四分之三的磷脂参与了生物膜谱线的形成,这是与流动的膜成比例的。此膜流动部分的质子 T_1 研究表明,横向扩散系数约为 10^{-8} 厘米²/秒^[19]。有趣的是在生物膜的 ^1H 谱中未出现 $-\text{NM}_3^+$ 共振峰,可能这些基团参与

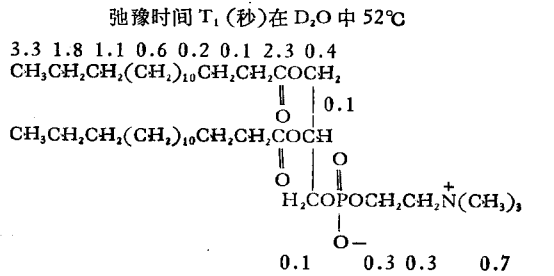


图 11 卵磷脂在双脂层中各核 ^{13}C 的 T_1 值

与蛋白质的反应。若用同位素作磷脂选择性标记,将会对生物膜的流动和非流动区提供更多的信息^[8]。

5. 分子结构的研究 在确定生物分子的结构方面,X衍射与核磁共振是目前相辅相成的两个最有效方法。X衍射作晶体分子结构分析,确定键长键角。核磁共振则是目前能在溶液状态广泛提供分子三维结构信息的唯一技术。NMR用于结构研究,定量地可用偶合常数测定构象角,用化学位移、弛豫时间确定核间距离及角度;定性地可用测溶剂交换率等方法了解结构信息。

(1) 定量方法 ①分析偶合常数:在多肽中,由测定 $^1\text{H}-\text{C}_\alpha-\text{N}-^1\text{H}$ 的偶合常数,可知酰胺键的转角。在核苷酸中测核糖的 $^1\text{H}-\text{C}-\text{C}-^1\text{H}$ 的偶合常数,可知核糖的构象。如由公式 $^2J_{\text{H}^1\text{H}^2} = 10J_{1/2}$,可知核糖 C_2' -endo 的比例。由公式 $\text{gg}\% = \frac{13.7 - (J_{4'5'} + J_{4'5''})}{9.7} \times 100$,可知 NAD 中腺嘌呤组份的 ϕ 角($\text{C}_3'-\text{C}_4'-\text{C}_5'-\text{O}'_5$)为 $+60^\circ$ 的比例。由公式

$$\text{gg}\% = \frac{25.9 - (J_{5'p} + J_{5''p})}{20.9} \times 100,$$

可知 NAD 中腺嘌呤环的 ϕ 角($\text{C}_4'-\text{C}_5'-\text{O}'_5-\text{P}$)为 180° 的比例等等^[20,21]。此外,还可利用偶合常数测定小分子结合到大分子上的构象。而 J 值常可用同位素取代法或用顺磁探针测定。②抗磁系统的位移和弛豫,都是分子三维结构的函数。在位移信息中,芳香环的环流位移最重要。构象的微小变化即可反映到环流位移上。无结构体系(如无规卷曲的蛋白质)中的基团,其化学位移可称为一级位移或基本位移。它与有特定构象的体系(如天然蛋白质)所观察到的化学位移之差,称为二级位移。二级位移对环境很敏感。如 Cyt-C 蛋白中含一个 trp ,其苯环质子的二级位移很大,因为血红素环较近。任何 Trp 环境的变化都改变其二级位移。但在表 2^[22]列出的还原型(抗磁的)Cyt-C 的 Trp 残基信号中,不同种属的 Cyt-C 虽有不同序列,其 Trp 的二级位移都相似。说明这些种属不同的蛋白质

表 2 Cyt 中 Trp 的特性

	一级序列 ^a			二级位移 ^b (ppm)	
	His	Met	Trp	双峰	三峰
马 Cyt-C	18	80	59	+0.05	+1.4
酵母 CytC	18	80	59	+0.05	+1.4
鲐鱼 CytC	18	80	59	+0.25	+1.4
R. Viridis CytC ₂	17	79	58	+0.1	+1.5
P. Mendocina CytC ₃₃₁	16	61	56	+0.0	+1.4

- a. 根据 His 和 Met 连到铁上,确定 trp 在氨基酸序列中的相对位置
b. 观察到的化学位移与游离的 trp 化学位移之差

必定有同源结构,至少相对于 Trp 的环境,其结构相同。在种属不同的溶菌酶、tRNA、碳酸酐酶中也都作过这种 NMR 的比较研究。③顺磁体系的位移和弛豫: 顺磁中心对 NMR 的弛豫的影响,比抗磁体系大得多。因为顺磁中心的未偶电子的磁矩,比核磁矩大得多。在某些含金属的蛋白质(如血红蛋白、铁蛋白),在含有以自由基形式存在的辅基的蛋白质(如黄素蛋白),在小分子金属复合物中,都有内在固有的顺磁探针。在不同条件下,这种顺磁中心都会对谱线产生微扰,可供研究。另一类顺磁离子是外加进研究体系的,可共价结合,也可非共价结合。如自旋标记的生物分子,带有金属离子的复合物。许多镧系元素,过渡族金属元素,都会产生偶极位移。常用作位移探针的离子,还有 Co^{++} 、 Fe^{+++} 和除 Gd^{3+} 、 Pm^{3+} 外的所有镧系元素。从核磁的观点,镧系元素是最有用的。它除可作构象研究的探针,还可使谱线(特别是核糖区)简化。如图 12 所示。镧系离子的位移与 $(3\cos^2\theta - 1)/r^3$ 有关。用镧系探针研究得最详细的是溶菌酶^[18],其溶液构象与 X 衍射的结晶极相似。含 Mg^{++} 蛋白质,常以 Mn^{+2} 代替天然的 Mg^{++} 作配体的结合研究,如激酶配体的结合研究。含 Mn^{+2} 的 ConA 结合糖分子的研究结果,也证实了 X 衍射的研究。

有趣的是 Dobson 及 McDonald 在 Cyt-C₃ 方面的工作。Cyt-C₃ 是一个低分子量(MW 14000)、含四个血红素的蛋白质。由对铁原子的结合,以及环流位移的研究,Dobson^[23] 只用

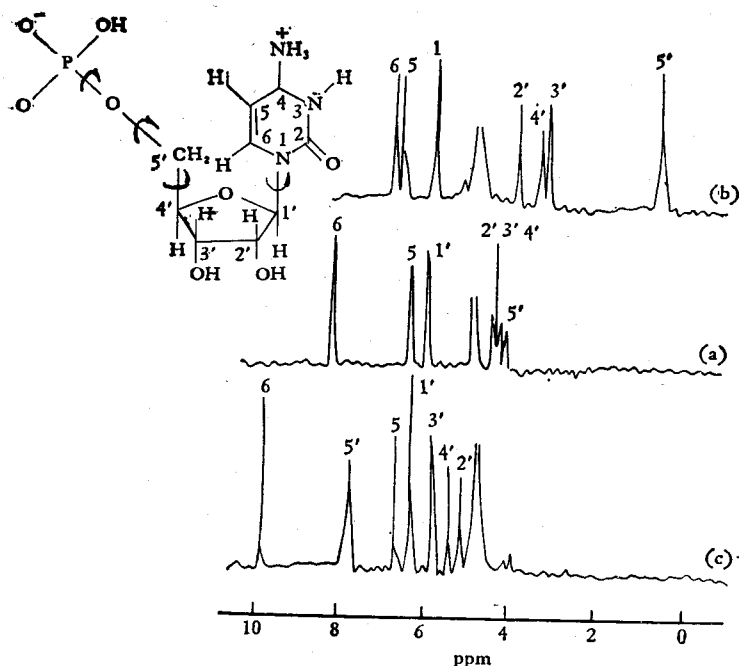


图 12 镧系位移探针的效应

(a) pH2.0, 25°C 时 30mM CMP + 0.5M LaCl₃, 谱线与 CMP 极相似。LaCl₃, (b) 30mM CMP + 0.5M EnCl₃, (c) 30mM CMP + 0.5M PrCl₃

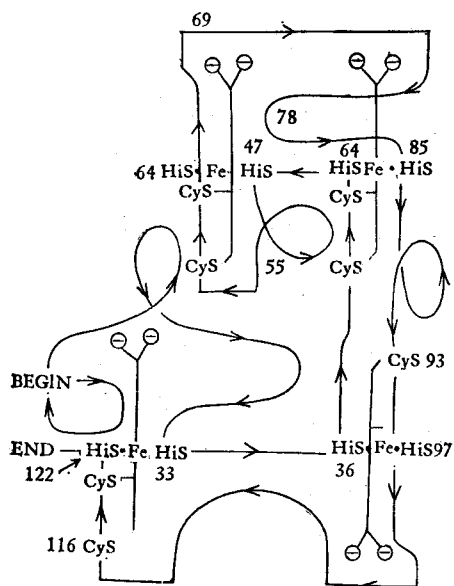


图 13 Cyt-C₁

NMR 技术就提出了这个蛋白质的大体结构(图 13)。当然,在 NMR 中用顺磁探针作结构研究,必须先了解所测样品的天然构象。对金属离子结合到蛋白质基团上的性质,对结合配体的构象,亦应了解。

(2) 定性研究方法 ①基团的接近: 可用

化学修饰配体结合或基团解离来微扰大分子的局部结构,使这些空间上接近的核产生二级位移。虽不知定量的详细信息,但可定性了解这一区域受影响基团的变化。②交换速率: 基团的环境对氢的交换有影响。常用以研究—NH 及某些—CH 上的氢的交换。(如 His 的 C(2)H 或 A, G 碱基的 C(2)H)。一般—OH、—SH 的氢交换太快, NMR 无法测定。用照射溶剂使之过饱和的方法,可测—NH 质子与 H₂O 的交换,一般可在 1—100 秒⁻¹区间。若以 D₂O 交换,记录谱线随时间的变化,只可测到 0.1 秒⁻¹。溶菌酶的六个 trp 的—NH 基的氢交换都已作了研究。tRNA 在水中的氢谱,在 δ_{H} —15ppm 处,有 25 个—NH 质子^[24],这都是参与碱基配对的芳香环—NH 基团。不参与碱基配对的芳香环—NH 质子,由于快速交换而不能测出。因此,可以定性地比较不同 tRNA 的溶液构象,比较 tRNA 的结晶结构与溶液构象的区别。D. R. Kearns 对酵母 tRNA^{Phe} 的 NMR 研究,有力地支持了由 X-衍射分析得出的“三叶草”结构模型。1977 年 G. T. Robillard 对此 tRNA^{Phe} 结构作

了更全面的研究^[18]。

(3) 构象研究 是目前 NMR 在分子生物学中的研究重点。在溶菌酶中,以碘化物使 Trp-108 氧化,与 Glu-35 成内脂。用 X 衍射只看到 Glu-35 的构象变化,而用 NMR 可看到更多的构象变化,包括与 Trp-108、Glu-35 都有一定距离的 Trp-23 这一表面残基,也出现构象变化。这表明此蛋白质中可能有过渡的构象变化^[18]。在构象研究中,除了用化学位移外,还可用弛豫时间(如测组蛋白),用偶合常数(如测小分子),用溶剂交换速率(如测 tRNA)。NMR 方法特别适于研究生物大分子有无局部构象变化。对较小分子, NMR 也作了许多构象研究。在辅酶的构象研究中, R. H. Sarma^[25] 等人,以 ¹H、³¹P 谱观察 NAD、NADH 在不同情况下的溶液构象,在酸性时 NAD 成伸展型,在碱性时成折迭型。M. Blumenstein^[26] 作了 NAD 与相应核苷酸的 ¹³C NMR 研究。D. B. Davies^[27] 对核苷酸的溶液构象作了比较详尽的综述。C. H. Lee 研究了核苷二磷酸在水溶液中的构象(七个构象角及二个核糖构象)。用 NMR 还研究了催产素九肽的构象^[28],提出了结构模型,其基本方法是将其九肽与其七个前体(各少一个氨基酸残基)的 NMR 谱线进行比较。Bradbury 首先完成了多聚-r-苯基-L 谷氨酸的 α -螺旋与无规卷曲的两种多肽构象的互变研究^[8]。在一定比例的氘氯仿和三氟乙酸混合溶剂中观察 ¹H 谱,升温可使无规卷曲态变为 α -螺旋,其酰胺键骨架上的质子峰的 δ ,随构象而变。聚合度高的较大分子螺旋构型比例高。

6. NMR 在生物分子结构功能研究中的若干例子:

(1) 酶与辅酶的结合以及酶活性中心的研究 G. C. K. Roberts, J. Feeney^[18] 作了二氢叶酸还原酶与 NADPH 相互作用以及氟标记和选择性氘化的酶与底物、抑制剂结合的 NMR 研究,认为辅酶与酶结合时, NMNH 组份和 2'-磷酸基团起重要作用,其焦磷酸骨架有一特定构象变化,即 P—O—C—H 角转了 50°。J. Bode 在兔肌 GAPDH 的 ¹⁹F NMR 研究中^[5],以

三氟溴丙酮与酶活性中心的 Cys-149 共价结合,探知酶四面体活性中心区域的对称关系。在酶活性最大区域的 NMR pH 滴定研究,显示有 ($\alpha\alpha'$)₂ 结构形式。J. W. Long 作了鲟鱼 GAPDH 与 NAD 结合的 ¹⁹F 研究,认为此酶负协同性是四个活性部位—SH 基作媒介,由亚基诱导出的。C. Y. Lee 比较了几种脱氢酶与 NAD 结合时的构象,认为 NAD 以折迭型与 GAPDH 结合。胰凝乳蛋白酶与其底物的反应,也以 ¹⁹F、³¹P、¹³C 谱作了较全面的研究。鸡卵清蛋白溶菌酶以顺磁探针研究了酶-底物的结合过程。

(2) 血红蛋白与氧结合的协同性,是生化工作者感兴趣的问题之一。Huestis^[29] 以 ¹⁹F 研究了血红蛋白与血红素配体的相互作用和变构效应。发现 TFA-Hb 与 TFA-HbO₂ 二者的化学位移略有差异,提示其 ¹⁹F 探针的环境不同。脱氧 TFA-Hb 的化学位移显示有 1pK_a 7.4 的基团。进一步研究可知,这是 β 链 His-146。可见 β 链对构象变化是敏感的。Ogawa 等人由 ¹H 谱研究提出了与 Monod 变构模型相同的协同性解释,他们用各种“价键杂化”(Valency hybrid)的四聚体与天然四聚体作比较研究,认为整个四聚体是“全配位”的或“氧化”的四聚体。存在着两种四级结构,其变化是协同性的。

(3) 组蛋白与核酸的相互作用 E. M. Bradbury^[30] 等研究了真核细胞核组蛋白 H₁ 的 NMR 谱,认为 H₁ 的 C 端与 DNA 结合, N 端在水溶液中有某种盐诱导的结构。其 47—106 残基参与染色质结构的形成。H₁ 在生理条件下呈球形,它的 1—34 残基片段对形成 H₁ 的球形结构并不是必须的。由 NMR 及超离心研究,认为 H₁ 由三部分组成: N 端 1—35 或 1—40 的“鼻端”; 35—112 或 40—120 的球形“头部”; 112 或 120—C 端的无规卷曲的“尾部”。其 N 端或 C 端片段与 DNA 的重结合研究表明, C 端片段与 DNA 结合引起的构象变化与盐诱导的染色质包扎收缩,与 H₁ DNA 复合物的包扎收缩有一定内在联系。J. E. Coleman 对 Gene-5 蛋白与 DNA、与核苷酸,脱氧核苷酸的相互作用,作了 ¹H、¹⁹F、³¹P 谱的详细研究。

(4) 蛋白质变性过程的研究 Jerdetsky 以 ^1H 谱观察葡萄糖菌核酸酶的热变性过程, 将完全氘化的酶放在质子化的(普通) His、Trp、Tyr 中培养, 谱线为天然折迭型的九个分立的峰, 对应于 12 个质子, 即 4 个 His, 7 个 Tyr, 1 个 Trp。随着溶液由 pH8 变到 pH11, 蛋白质去折迭, 变为三个可见峰。从 pH 的渐变过程引起的化学位移, 他们提出了此酶的折迭、去折迭的渐变模型。早在六十年代, McDonald 就对 RNase 的热变性过程进行研究, 在由 22℃ 加温到 72.5℃ 的失活变性区间, 观察谱线消长和 δ 变化。看到热变性的 RNase 的大部分三级结构以及部分二级结构消失, 认为热变性谱主要是构象改变引起环境变化所致, 主要并不是蛋白质的流动性不同, 在折迭构象中, 侧链芳香氨基酸有两个或更多的屏蔽环境, 均随温度而变。他同时还做了溶菌酶的热变性谱, 在 77.5℃ 时 1.0ppm 处甲基尖峰没有次峰, 而 76℃ 时甲基峰变弱, 次峰出现, 提示这是甲基峰变来的。此次峰在 55℃ 时很强, 成为八个独立谱峰。因此认为对 Leu、Ile、Val 的甲基, 都存在折迭构象, 有多种屏蔽环境, 随温度变化。

(5) 结构水的研究 生物分子的天然溶剂是水, 水在生物体内是有序的。对生物分子结构水的研究引起了广泛注意。Damadian^[32] 对人、鼠的多种肿瘤组织测定了 T_1 值, 发现弛豫时间都大于正常组织, 认为 T_1 与癌分化程度有关。可能结构水的有序性遭到破坏, 结构水与自由水比例变小, 引起 T_1 加长。近期还有结构水 NMR 研究的综合报道^[33], 结构水的 ^1H 、 ^2H 、 ^{17}O 的弛豫时间和扩散常数, 比自由水都低得多。认为在分子水平上研究生物反应和生物物理过程中结构水所起作用, NMR 是很有力的工具。Berendsen 以及后来的 Chapman, 以 NMR 研究了胶原与水的结合, 认为与胶原结合的水, 相对于胶原链是不对称分布的, 两个 O—H 键长不同, 因只有一个氢原子参与成氢键。含 24% 水份的胶原为一级水合层, 水合层外还有有序的结构水。这些水合结构对胶原等大分子结构的稳定性起重要作用^[8]。

此外, 还有人作抗体结合部位的 NMR 研究^[18]。1977 年有人开始作毒素多肽结构功能方面的 NMR 研究。近年来生物活组织、活器官的 NMR 研究越来越多, 已有综述, 不再赘述^[34, 18]。

我国近年来也开始了核磁共振在生物、医学方面的研究。北京医学院林克椿教授等以 ^1H NMR 作人血清的谱线分析, 发现 1.0ppm 和 0.6ppm 处两峰面积之比, 可作为鉴别癌症的有用指标^[35]。上海一些单位对白血病人血清作 ^1H 谱^[36], 发现 1.3ppm 处的超精细谱峰的变化, 可作为白血病早期筛选诊断的指标。生物物理所六室对去 B 链羧端五肽胰岛素 (DPI) 的溶液构象作了 ^1H 谱^[37], 认为胰岛素去五肽后溶液构象有局部变化, 但不影响生物活性。DPI 在无 Zn^{++} 溶液中、以单体形式存在。1979 年夏, 在武汉召开的核磁共振讨论会上, 生物物理所、遗传所。上海有机所等单位, 也都有关于生物分子的 NMR 研究的报告。核磁共振在分子生物学、生物物理、生物化学中的应用正日益广泛, 也日趋深入, 必将更快地促进这些学科的发展。

参 考 文 献

- [10] Jardetzky, O.: *J. Chem. Phys.*, **26**, 1346, 1957.
- [11] Saunders, M. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 3280, 1957.
- [12] Mandel, M.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 4, 1965.
- [13] Fournet, B. et al.: *Biochemistry*, **17**, 5206, 1978.
- [14] Navon, G. et al.: *PNAS USA*, **74**, 87, 1977.
- [15] Cohen, S. M.: *Nature*, **273**, 554, 1978.
- [16] Dwek, R. A.: *NMR in Biochemistry*, 1973.
- [17] Campbell, C. D. et al.: *J. Mol. Biol.*, **90**, 469, 1974.
- [18] Dwek, R. A.: *NMR in Biology*, 1977.
- [19] Lee, A. G. et al.: *Biochemistry*, **12**, 1650, 1973.
- [20] Lee, C. H. et al.: *Biochemistry*, **15**, 697, 1976.
- [21] Lee, C. H. et al.: *Biochemistry*, **16**, 5403, 1977.
- [22] Cookson, D. J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **83**, 261, 1978.
- [23] Dobson, C. M. et al.: *Nature*, **249**, 425, 1974.
- [24] Bolton, P. H. et al.: *Biochemistry*, **15**, 4370, 1975.
- [25] Sarma, R. H. et al.: *The Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry*, **12** (19), 3585, 1973.
- [26] Blumenstein, M.: *Biochemistry*, **12** (19), 3585, 1973.
- [27] Davies, D. B.: *Progress in NMR Spectroscopy*, Vol 12, part 3, 1978.

- [28] Brewster, A. I. R.: *Biochemistry*, 12, 1643, 1973.
- [29] Huestis, *Biochemistry*, 11, 1648, 1972.
- [30] Bradbury, E. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 77, 45, 1977.
- [31] Jardetzky, O. and Wade-Jardetzky, *Ann. Rev. Biochem.*, 40 605, 1971.
- [32] Damadian, R.: *Science*, 171, 1151, 1971.
- [33] Mathur-devré, R.: *Progress in Biophys. and Mol. Biology*, 35, 103, 1979.
- [34] 许健生, 高联佩:《生物化学与生物物理进展》, 1980年, 第5, 6期。
- [35] 林克椿:《生理科学进展》, 1978年, 第9卷, 第2期。
- [36] 上海肿瘤波谱学研究组:《自然》, 1980年, 第3卷, 第3期。
- [37] 生物物理研究所六室溶液构象组:《生物化学与生物物理学报》, 1976年, 第8卷, 第1期。

[本文于 1980 年 5 月 30 日收到]

杂交阻断翻译与选择性杂交

王 申 五 吴 冠 芸

(中国医学科学院基础医学研究所)

近年来分子杂交技术在分子生物学的研究中进展很快。信使核糖核酸(mRNA)是由DNA转录后再经加工形成,因此某种特异的mRNA与含有其特异基因的DNA片断之间的碱基顺序有一定的互补关系,两者在一定条件下可以进行分子杂交,形成DNA-mRNA杂交体。若将某种纯化的mRNA,经放射性同位素标记,或者此种纯化的mRNA经逆转录合成同位素标记的*cDNA,即可做为分子探针,在DNA链上探测与此mRNA有关的基因的存在和位置。然而,得到一定量纯化的匀一的探针,并不是一件容易的事情。如果用不匀一的探针与DNA进行分子杂交,就必须进一步鉴定和分离被杂交的放射性核酸(*mRNA或*cDNA),发展以分子杂交法纯化专一性mRNA的技术^[6]。

mRNA可在体外无细胞翻译体系中合成相应的多肽链,所以分析这种专一性多肽是鉴定mRNA纯度的有效方法。最近,发展了一种以DNA片断与RNA杂交,将特异的mRNA从胞浆总RNA中选择出来,形成DNA-RNA杂交体,然后,再通过无细胞翻译和产物的分析,了解被选择的mRNA的专一性。这就是所谓杂交阻断翻译(Hybrid-arrested Translation)和选择性杂交(Selection Hybridization)。它们都是将分子杂交技术与无细胞翻译技术结合起来,具

有某些新的特点。本文拟就这种分子杂交检测技术及其在基因表达研究上的应用做一简要的介绍。有关技术方面的细节,请参考有关文献[1,2]。

杂交阻断翻译法的基本原理是将DNA用限制性内切酶切成不同大小的DNA片断,分离纯化后,各个电泳区带上的DNA片断,应具有大致相等的碱基对数和相同的末端^[3],这就为它能选择性的与某种mRNA杂交提供了结构基础。这样的DNA片断与mRNA混合后,在DNA变性的条件下(80%去离子甲酰胺),DNA双链解开,单链DNA与RNA发生杂交反应,形成DNA-RNA杂交分子,而在此条件下变性DNA基本上不再复性形成双链DNA^[4]。这样形成的DNA-mRNA杂交分子,不能在无细胞翻译体系中进行翻译,但当杂交体经加热解开后,mRNA游离,其翻译活力即可完全恢复^[5]。因此,能与mRNA形成杂交体的DNA片断有可逆地阻断此mRNA的翻译作用。例如兔 β -珠蛋白-cDNA与pMB₁质粒的重组体(称为pBG₁DNA),经限制性内切酶Hha I消化后,经琼脂糖电泳将DNA片断分离纯化,此种pBG₁DNA片断就能与9S兔网织珠蛋白mRNA进行杂交,此mRNA的翻译作用可被pBG₁DNA片断可逆地阻断^[4]。当将此种杂交体溶液分为两部分,其中一部分经热变性处理,然后分别将