

护九肽干粉。

5. 氢化 将保护九肽干粉置于瓶中使溶解于甲醇中,加入新鲜制备的钯黑,边搅拌边通入干燥氢气,根据板层析的结果决定氢化的时间。滤去钯黑,将滤液减压浓缩至干,得白色粉末。

6. 纯化 取 50 毫克上述白色粉末,经 Sephadex LH-20 柱 (1.5 × 60cm) 分离纯化,上柱液为 1 毫升,用甲醇洗脱,每 15 分钟收集 3ml/管,测 280nm 紫外吸收,合并所要的管数,抽去甲醇即得纯化的九肽。

二、结果与讨论

OBzl

取 1.5 克 BOC—Glu— $\textcircled{\text{P}}$ 树脂(含 Glu 0.73 毫克分子/克)按顺序接成 BOC-Trp · Ala · Gly
OBzl OBzl OBzl

· Gly · Ala · Asp · Ser · Gly · Glu— $\textcircled{\text{P}}$ 最后得 2.7 克,增重 1.2 克。取 300 毫克保护九肽树脂,水解后得 65 毫克保护九肽,产率 70%。取 60 毫克保护九肽氢化去除全部保护基得 30 毫克九肽。再经 Sephadex LH-20 分离纯化后即得纯品。它的分析数据和物理常数列入表 2。

在多肽合成过程中曾将改进后的树脂与原树脂进行比较(树脂含溴量均为 0.9 毫克分子/克)。从表 3 的树脂上总氨基测定值可见,在原树脂(2)上第二、三肽氨基的测定值都低于计算值,接肽率比较低,仅为 80—85%,这主要是由

于树脂上第一个氨基酸的环化使得游离的氨基减少,第二个氨基酸接上去的数量也相应的减少,因此,二、三肽氨基的测定值就大大的低于计算值。同时由于树脂上第一个氨基酸的环化所引起的副反应在表中也表现出来,当接肽进行到四肽和八肽时,氨基的测定值均大于计算值,接肽率超过了百分之百,这就是由化合物(3)所引起的副反应造成树脂上游离氨基增加后出现的异常现象。经改进后的树脂上各肽氨基的测定值都接近于计算值,可见它虽不能完全克服树脂上第一个氨基酸的环化,但已大大的减少了环化的比例,而且将环化引起的副反应降到了最小程度。因此,用改进后树脂(5)合成的肽,只须经 Sephadex LH-20 柱一次层析即可得到满意的结果。

参 考 文 献

- [1] Merrifield, R. B. et al.: *J. A. C. S.*, 85, 2149, 1963.
- [2] Wang, S. S.: *J. Org. Chem.*, 41, 3258, 1976.
- [3] Tjoeng, F. S. et al.: *Int. J. Pept. Protein. res.*, 14, 262, 1979.
- [4] Birr, C. et al.: *American Peptide Symposium*, (Goodman, M.) 1977. 510, John Wiley and Sons New York.
- [5] Tam, J. P. et al.: *Tetrahedro lett.*, 46, 4001, 1977.
- [6] 邹永水、钱肖贞:《生物化学与生物物理进展》4, 12, 1978.
- [7] 中国科学院生物化学研究所多肽应用组:《生物化学与生物物理学报》7, 23, 1975.

【本文于1982年10月29日收到】

氚标记脱氧胞苷 5'-三磷酸盐的制备

林 奋 智 沈 德 福

(中国科学院,上海原子核研究所)

氚标记脱氧胞苷 5'-三磷酸盐 (^3H -dCTP) 作为一种常用的生化试剂见于许多文献报道。

^3H -dCTP 是以我们自制的溴化脱氧胞苷 5'-三磷酸钠盐为原料,经过卤氚交换而制得。

方法是:在一个玻璃反应瓶中置入 38.6mg Br-dCTPNa₃, 35mgpd/CaCO₃, 0.8ml 水和 0.2ml 2N NaOH 溶液,在真空系统上常压室温 (25℃) 通氚反应 1.5 小时。反应完毕,滤去催化剂,将粗

品浓缩,进行制备层析,溶剂系统为异丁酸:1M NH_4OH :0.1M EDTA(66:33:1)。根据放射自显影径迹及紫外斑点,在制备纸上确定 ^3H -dCTP 位置,然后用水淋洗 ^3H -dCTP 色带,得到 ^3H -dCTP 产品。

经放射性测量, ^3H -dCTP 的放射性总强度为 333mci, 在 751 型分光光度计上测得化学量为 21.89 μM , 计算得比度为 15ci/mM。

^3H -dCTP 的紫外特征 在中性介质中, $\lambda_{\max} 271-271\text{m}\mu$, $\lambda_{\min} 248-251\text{m}\mu$, $\frac{\text{O} \cdot \text{D}_{270}}{\text{O} \cdot \text{D}_{260}} =$

$$0.845, \frac{\text{O} \cdot \text{D}_{280}}{\text{O} \cdot \text{D}_{260}} = 0.962, \frac{\text{O} \cdot \text{D}_{290}}{\text{O} \cdot \text{D}_{260}} = 0.327$$

在[1]正丁醇:丙酸:水:氨(40:27:28:1)和[2]异丁酸:1M NH_4OH :0.1M EDTA(66:33:1)溶剂系统中进行放化纯度测定,经 ^3H 层析扫描仪鉴定其放化纯度 >95%。

^3H -dCTP 用 50% 乙醇水溶液稀释,以 1mci/1ml 的浓度分装,贮存于 -20°C 冰箱中。

(中国科学院上海原子核研究所林奋智、沈德福)

[本文于 1982 年 11 月 3 日收到]

科技消息

甾体激素受体与 DNA 识别问题的研究进展

真核生物在甾体激素的作用下,可诱发靶组织内某些特异蛋白质的合成。这是因为甾体激素进入靶细胞以后,可以与胞质内的受体分子相互作用,引起受体的构象变化,形成激素-受体复合物迅速移入核内,并在核内与 DNA 或其它组分相互作用而诱发少数特异基因的转录。最近有关三种甾体激素,孕酮、糖皮质激素、和蜕皮素的研究报道说,已在离体实验中获得有力的证据,表明激素-受体复合物与 DNA 的相互作用有序列专一性。

在孕酮受体与 DNA 相互作用的研究方面, Mulvihill 的研究小组利用重组 DNA 克隆技术和 DNA 竞争结合法,从鸡输卵管细胞 DNA 获得的五种可被孕酮诱导合成的蛋白质基因的克隆片段中,鉴定出可被孕酮-受体复合物特异识别的区域位于 mRNA 转录起点的 5' 端上游。卵清蛋白基因序列中,这一识别区位于 mRNA 起点前,5' 上游 250—300bp 处。他们还发现这五种蛋白基因中共有的孕酮-受体复合物结合序列是一段长 19bp 的段落,其序列如下:

ATCCTGATTCTGTGTTGTA

这段序列在鸡珠蛋白基因内相应的区域内没有发现。Schrader 的研究小组用硝酸纤维素 DNA 直接结合法进行研究,报道了 mRNA 起点前 5' 上游 135—250bp 区,有一段 A + T 丰富的段落,可被孕酮-受体复合物识别。他们利用光亲合法,用合成的孕酮类似物标记受体,再次证实孕酮受体含 A、B 两个亚基,其中 A 亚基识别 DNA, B 亚基则可与染色质上某种蛋白组分相结合。虽然这两个小组都证实孕酮受体与 DNA 的相互作用有序列专一性,然而对于这种相互作用的机理却还有不同看法。Mulvihill 的小组认为,孕酮受体可识别并结合于双链 DNA 上的特定序列区, Schr-

ader 小组则认为孕酮受体是作为一种解盘绕蛋白或螺旋去稳化蛋白而优先作用于单链 DNA, 在这里, Mulvihill 小组采用了粗制胞质抽提液作为受体分子来源,测定处于溶液状态的特异 DNA 与固定在纤维素上的非特异小牛胸腺 DNA 竞争结合激素-受体复合物的能力;而 Schrader 小组则使用提纯的受体分子直接与 DNA 在滤纸上结合。受体分子的过份提纯,有可能造成受体识别双链 DNA 上特异序列时所必需的某种重要组分的丢失,并且直接结合法也只能测出受体与 DNA 之间的结合速率。因此 Mulvihill 认为这种分歧可能起因于研究方法不同。

在糖皮质激素受体的研究中, Payvar 等报道了提纯 10,000 倍所得均一性接近 50% 的糖皮质激素受体,在离体条件下可识别小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV) 的 DNA 上的特定序列。把克隆所得的含转录起点的 MMTV DNA 片段引进培养中的大鼠细胞 DNA 内,被转化的大鼠细胞可在糖皮质激素的作用下转录 MMTV DNA。离体实验证实,当 MMTV DNA 处于与糖皮质激素受体结合状态时,可被硝酸纤维素滤纸滞留。三种不同类型的竞争结合实验表明: MMTV 前病毒 DNA 上至少有四个相隔甚远的区域是受体的选择性结合位置,其中之一位于 MMTV DNA 转录启动区 5' 上游 110—449 bp 处,初步观察还发现至少有一个受体结合点位于转录起点下游几千 bp 处。

蜕皮素受体研究中, Pong 等发现 β 蜕皮素可共价的结合在果蝇三龄幼虫唾腺多丝染色体上特定的由激素诱发产生的膨突上。另一组实验证实紫外线辐照下,蜕皮素可与一种分子量为 130,000 的蛋白质交联,这种可与蜕皮素交联的蛋白质具有甾体激素受体

(下转第74页)