

品浓缩,进行制备层析,溶剂系统为异丁酸:1M NH₄OH: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 μ M,计算得比度为 15ci/mM。

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

$$0.845, \frac{O \cdot D_{280}}{O \cdot D_{260}} = 0.962, \frac{O \cdot D_{290}}{O \cdot D_{260}} = 0.327$$

在[1]正丁醇:丙酸:水:氨(40:27:28:1)和[2]异丁酸:1M NH₄OH: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℃ 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)

设置的数。由于打印出来的数是十进制的,而内存单元里都是二进制数,因此打印前须将二进制变为二—十进制,且一个数的个、十、百……

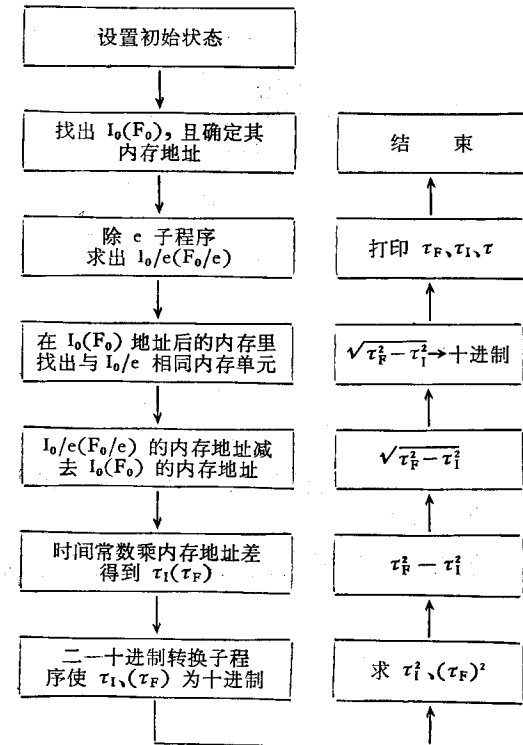


图6 数据处理程序框图

等位的值应独立送进各个内存单元,一个单元的内容只能打一个字符。

三、数据处理程序

采用“矩方法”将求荧光寿命 τ 简化成式(2)的形式,数据处理的程序设计就比较简单了。(图6)其中 I_0 指测激励光脉冲时得到最大值, F_0 指测样品荧光衰减时最大值,时间常数用已知荧光寿命的样品校正获得,测激励光脉冲和荧光样品时采集的数据各自放在二组内存中。最后,数据处理结果打印输出,第一行为激励光脉冲的 τ_1 值,第二行是 τ_F , 第三行是荧光寿命 τ 。

参考文献

- [1] 阮康成,江寿平等,《生物化学与生物物理学报》1982年,第5期,71页。
- [2] 阮康成,江寿平等,《生物化学与生物物理进展》1982年,第1期,73页。
- [3] H. Riipple, et al.: *Methods in Enzymology*, 1969, 16, 317.
- [4] Yguerabide, J.: *Methods in Enzymology*, 26, parte, 498, 1972.
- [5] Birks, J. B.: *Progress in Reaction Kinetics*, 1967, 4, 75.

[本文于1982年7月7日收到]

(上接第80页)

的全部特征,包括可从胞质移入核内。

近年来由于研究技术的更新,基因表达中甾体激素调节作用的研究已取得重大进展。现在首先需要澄清不同实验技术引起的分歧,其次是如何把以下矛盾事实统一起来:基因组内可被甾体激素受体识别的DNA段落为数不多,而保持激素全面反应需要核内有数量很多的受体分子。Mulvihill的实验中,在14kbp的已知可被孕酮激活的基因序列中,只测出42个段落含孕酮-受体复合物特异识别的19bp同源序列。这个数字很难说明通常在每个细胞核内发现的成千上万个受体结合位置的事实。这里值得指出的是,Mulvihill的观察中,注意到孕酮-受体复合物与靶基因5'上游DNA序列相互作用的相对强度只不过10—40倍于非特异的小牛胸腺DNA或珠蛋白基因DNA。这或许

意味着大量其它结合位置并不在DNA上,而是位于核内其它组份,如染色体蛋白质,RNP颗粒或核基质上,甚至还可能有非核部位的结合位置也发生了结构或构象变化。以保证实现激素诱发的全部转录活力。

甾体激素对基因活动的调节机理要形成一个统一的概念,还有许多工作要做,从展望的角度考虑,像前文中提及的向含糖皮质激素受体的活细胞引进外来的MMTV病毒序列,及用光亲和标记法使蜕皮素在果蝇细胞内与受体结合,并在染色体上定位这样的体内功能实验是有待进一步开拓的重要研究手段。另外,开展向不含受体的细胞引进受体分子以及进行受体基因的遗传工程研究,以进一步探讨甾体激素受体复合物与DNA及其它细胞组分的相互作用必将能为理解真核基因表达的调控机理提供重要的情报。

[*Nature*, 298, 707, 1982. 情]