

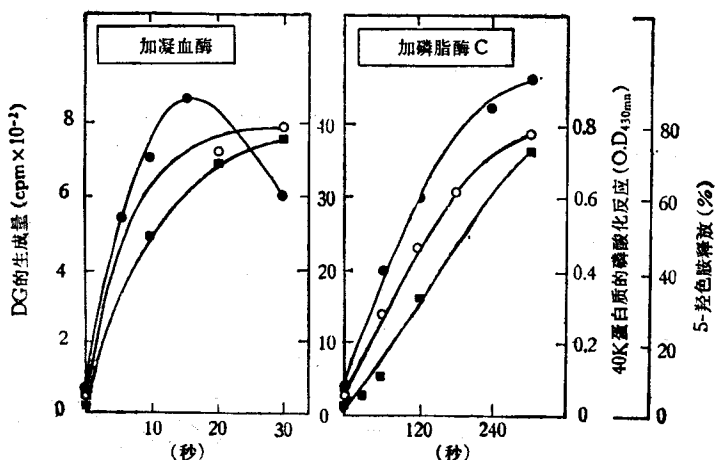


图9 40K 蛋白质的磷酸化反应, DG 的生成反应, 5-羟色胺释放反应的关系
●—● DG 生成 ○—○ 40K 蛋白质磷酸化 ■—■ 5-羟色胺释放

磷酸化反应去解释许多激素的作用机理实际上是很困难的,也就是说,40K 蛋白质的性质、机能等问题的解决对这一机制的确立是不可缺少的。也许在 40K 蛋白质磷酸化之后又可引起一些连锁反应,最终使激素的作用才得以发挥。值得注意的是,实验已证明,这一 C-激酶系统所活化的细胞机能通常可受 cAMP 抑制。cAMP 的这种作用是通过阻断肌醇磷脂代谢来实现的。同时前列腺素 E_1 也可以抑制肌醇磷脂代谢中的甘油二酯的生成。因此在整个调节过程中 cAMP 系统,与 C-激酶系统很可能是两个正、负信息,从而使机体保持在平衡状态,但是机体的上述过程中在膜上的最初引起的现象是什么?肌醇磷脂的水解又是如何引起的? cAMP 能抑制 C-激酶系统的机制是什么? 还并不十分清楚,只有上述问题在分子水平上——得到解决,才能真正理解激素及生理活性物质的作

用机制。

对任永忠、吴治成老师的审阅表示感谢。

参考文献

- [1] Inoue, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 7619, 1977
- [2] Binzu, Yu., Kobe. *J. Med. Sci.*, **27**, 225, 1981.
- [3] Kishimoto, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 2274, 1980.
- [4] Mori, T. et al. *J. Biol.*, **91**, 427, 1982.
- [5] Kaibuchi, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 7146, 1981.
- [6] Opden Kamp, J. A. F. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47, 1979.
- [7] Mori, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 8378, 1980.
- [8] Seeman, P. *Pharmacol.* **24**, 583, 1972.
- [9] Wallace, W. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1932, 1980.
- [10] Rittenhouse-Simmons, S. *J. Clin. Invest.*, **63**, 580, 1979.
- [11] Kawahara, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 309, 1980.
- [12] Kawahara, Y. et al.: *J. Biochem.*, **88**, 913—916, 1980.

[本文于 1982 年 9 月 24 日收到]

mRNA 的 5' 末端帽子结构及其功能

曾庆平

(湖南医学院生化教研组,长沙)

真核生物的 mRNA 成为指导蛋白质合成的直接模板,经历了从前体 hnRNA 到成熟

mRNA 的所谓转录后加工过程。这一过程包括形成 5' 末端 m⁷G 冠区和 3' 末端 poly (A) 尾

链,以及内含子的剪接和链内的甲基化等。感染真核细胞的病毒,其病毒基因组(单链 RNA,双链 RNA 及 DNA),通过在宿主体内或体外的复制过程,大多可见 m^7G 样结构。通常将

mRNA 5' 末端冠有的这种特殊修饰结构称为“帽子结构 (cap structure)”。现将帽子结构及其通式示如图 1。

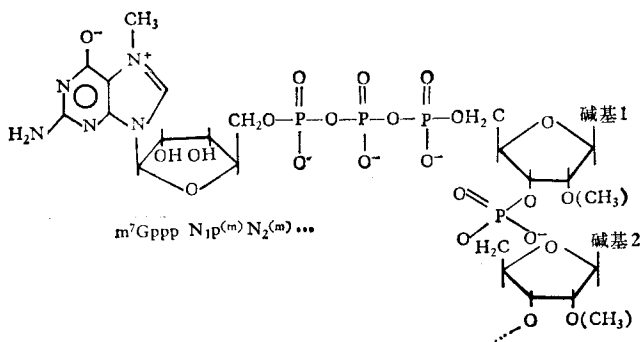


图 1 mRNA 5' 末端帽子结构与通式

一、帽子结构的特殊性与形式

帽子结构通过前导序列与 mRNA 直接相连,但它并不作为编码氨基酸而合成蛋白质的模板,而且也不象 mRNA 的编码序列一样依赖于 DNA 碱基序列的特异性,而是独立于 DNA 转录的碱基互补关系,在帽子结构合成酶等参与下自主加工而成。这便是帽子结构的特殊性赋予它以极大的重要性之所在。

真核生物及其病毒的 mRNA 5' 末端在结构上都具有四个共同特点:

1. 第一个核苷酸残基无种属特异性,它们无一例外地都是鸟嘌呤核苷酸。多数在碱基第 7 位 N 原子上甲基化,成为 N^7 -甲基鸟嘌呤核苷酸 (m^7G)。

2. m^7G 与 mRNA 下一个核苷酸残基 (N_1) 之间以 5', 5'-三磷酸酯键反式连接,而包括 N_1 与 N_2 在内的其余核苷酸残基则均以 3', 5'-磷酸二酯键相连。

3. 除 poly (A) 3' 末端外, m^7G 上的 3'-羟基也是游离的,使得 mRNA 分子出现两个 3' 末端,而封闭了游离的 5' 末端。

4. N_1 及 N_2 中核糖的 2'-位均可甲基化,但甲基化与否以及甲基化程度如何因种属而异。 m^7G 中核糖的 2'-位并不甲基化。

此外, mRNA 的链内甲基化也是转录后修饰的一个基本内容,常见的形式为 m^6A 和 m^5C 。

在某些植物病毒,如烟草花叶病毒 (TMV)、菠萝花叶病毒 (BMV) 的 mRNA 中,核糖未甲基化, 5' 末端为 m^7GpppN , 称为“帽子 0”, 呼肠孤病毒、疱疹性口炎病毒 (VSV) 和牛痘病毒在体外合成的 mRNA, 仅有一个核糖甲基化,其 5' 末端呈 m^7GpppN^m , 称为“帽子 I”; 从感染细胞中获得的 mRNA, 进一步受宿主细胞内甲基转移酶的作用,使 N_1 和 N_2 中的两个核糖均甲基化,成为 $m^7GpppN_1^mN_2^m$, 称为“帽子 II”, 如腺病毒与猿猴病毒 40 (SV40) 就是这样,它们在宿主细胞中 RNA 聚合酶 II 和帽子合成酶系作用下生成的 mRNA, 同时含有帽子 I 和帽子 II。其次,某些低等真核生物,如酵母、粘菌的帽子结构中 N_1 全部是嘌呤核苷酸,而哺乳动物细胞中 N_1 则嘌呤和嘧啶两种核苷酸都有,其中由嘧啶核苷酸构成的帽子结构占总数的 30—40% 左右。如果 N_1 为 A, 则通过碱基的甲基化,多呈 m^6A^m 的形式。

从真核生物帽子结构形式的复杂程度,可以看出,进化程度越高,其帽子结构亦越复杂。例如,酵母主要是帽子 0; 粘菌有 75% 是帽子 0, 还有 20% 是帽子 I; 海胆胚胎中几乎全是帽

子 I; 大多数哺乳动物则兼有帽子 I 和帽子 II; 蚕丝心蛋白 mRNA 具有帽子 II。作为一个特殊的例子是, 果蝇细胞质 poly (A)⁺ RNA 有 80% 具有帽子结构, 包括 0、I 和 II 三种形式, 即介于单细胞真核生物与哺乳类之间。正常情况下, N₁ 象其它高等动物的一样为嘧啶核苷酸, 由它构成的帽子结构也约占 40%。但细胞经热振荡后, 嘧啶核苷酸参与构成的帽子结构便锐减至 5% 以下, 大部分转变成 m⁷GpppA^m。

曾经从腺病毒和 SV40 中鉴定出很多种不同形式的帽子结构。例如 SV40 的晚期 mRNA 中至少可以找到八种形式; 从 Sindbis 病毒感染细胞获得的 26SmRNA, 除含有通常的 m⁷G 帽子结构外, 尚有约 30—40% 的 m₃^{2,7}G 和 m₂⁷G。另外, Tobacco hornworm (*Manduca sexta*) 卵母细胞的 mRNA 含有未甲基化帽子结构 GpppN⁻。

二、帽子结构的普遍性与分布

Reddy 等 (1974) 在分析 Novikoff 肝癌细胞的核内小分子 RNA (snRNA)—U1、U2 和 U3 的一级结构时, 最先发现 m₃^{2,7}GpppA^m 的 5' 末端结构。古市泰宏等 (1975) 在 CPV 的 mRNA 中发现了 mRNA 5' 末端磷酸基被 7-甲基鸟苷酸封闭的现象, 当时称之为“5'-封闭结构 (blocked structure)”。嗣后, 又在呼肠孤病毒、牛痘病毒和 VSV 等病毒 mRNA 中相继发现类似的结构。同年这种特殊结构也在 HeLa 细胞、L 细胞及小鼠骨髓瘤细胞的 mRNA 中发现。

从目前已经研究过的真核生物 mRNA 来看, 5' 末端几乎全部具有帽子结构, 连 3' 末端无 poly (A) 尾链的组蛋白 mRNA 也不例外, 已知仅两至三种真核生物无帽子结构。在感染真核细胞的病毒中, 除小 RNA 病毒属 (*picorna virus*) 及少数植物病毒外, 其余的 RNA 及 DNA 病毒的 mRNA, 无论在体内或体外都具有帽子结构。

流感病毒本身虽然不具有合成帽子结构的酶, 但它却能从宿主 mRNA 链上切取一段含

帽子结构的寡核苷酸作为引子, 来合成自己的 mRNA。

应该指出, 包括脊髓灰质炎病毒在内的 *picorna* 属病毒基因组 ssRNA(+) 虽无帽子结构, 但其 RNA 5' 末端并不呈游离状态, 而是与病毒基因组编码出来的低分子量蛋白质共价结合。如脊髓灰质炎病毒即是以其 RNA 5' 末端 pUp-与分子量为 12,000 的蛋白质 VPg 中酪氨酸残基以磷酸二酯键相连。但是, 由该病毒感染细胞中多聚核糖体得到的病毒 mRNA 5' 末端却不与蛋白质等结合, 而呈游离的 pUp-形式。

迄今尚未在原核生物及感染原核细胞的病毒 mRNA 中发现帽子结构。至于线粒体 mRNA, 曾以 HeLa 细胞和仓鼠肾细胞的线粒体为材料, 研究了 poly (A)⁺ RNA 的结构, 结果没有发现帽子结构及与之类似的其它结构。

三、帽子结构的自主性与合成

1. 与帽子结构合成有关的酶

大凡具有帽子结构的真核生物及其病毒, 都拥有产生这种修饰结构的一整套合成酶。自牛痘病毒粒中分离出帽子合成酶以来, 已相继在多种真核生物中提纯出六种与帽子结构合成有关的酶。包括 RNA 三磷酸酶、鸟苷酸转移酶和四种甲基转移酶, 即 (G-7-) 甲基转移酶、(A^m-N⁶-) 甲基转移酶、帽子 I-和帽子 II-(核糖 2'-O-) 甲基转移酶。

Martin 等 (1975) 曾用 Sephadex G-200 凝胶过滤和蔗糖密度梯度离心, 从牛痘病毒粒中提纯出合成帽子结构的多酶复合体, 其斯笃克半径为 5.0nm, S_{20,w} 为 6.0, 分子量约 127,000。又用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 获得分子量分别为 95,000 和 31,400 的两个亚基, 分别含有鸟苷酸转移酶和 G-7-甲基转移酶活性。

Monroy 等 (1978) 通过甘油密度梯度离心, 也从牛痘病毒粒中提纯出另一个合成帽子结构的多酶复合体, 分子量为 12,000, 同样具有上述两种酶活性。pH 等于 4.5 时采用聚丙烯酰胺凝胶电泳提纯出的鸟苷酸转移酶中无

G-7-甲基转移酶活性。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离测定鸟苷酸转移酶的分子量约为 59,000。

Barbosa 等 (1978) 从牛痘病毒粒中提纯出分子量为 38,000 的核糖-2'-0-甲基转移酶, 它并不存在于上述多酶复合体中。

Lipmann 等 (1979) 在大鼠肝细胞核抽提液中加入 RNA 后, 发现其 5' 末端有帽子 I 的生成。进而将超声波破碎细胞核获得的抽提液与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$, (p) ppG-RNA 一起保温, 在 S-腺苷蛋氨酸的存在下, 至少检出四种帽子结构, 即 $\text{m}^7\text{G}^*\text{pppG}^{\text{m}}$ 、 $\text{m}^7\text{G}^*\text{pppG}$ 、 $\text{G}^*\text{pppG}^{\text{m}}$ 和 G^*pppG 。显然, 这四种帽子结构的生成至少需要鸟苷酸转移酶、G-7-甲基转移酶和核糖-2'-0-甲基转移酶。他们已经分离出 G-7-甲基转移酶和鸟苷酸转移酶, Sephadex G-150 凝胶过滤测得分子量分别为 130,000 和 65,000。

Venkatesan 等 (1980) 从 HeLa 细胞核中提纯并鉴定了鸟苷酸转移酶, 蔗糖密度梯度离心测定分子量为 48,500。

现已从 HeLa 细胞分离提纯了四种甲基转移酶, 并分别在牛痘病毒粒、HeLa 细胞、大鼠肝、小牛胸腺、麦胚及酵母细胞中提纯了鸟苷酸转移酶。新近在大鼠肝中又分离出 RNA 三磷酸酶。该酶的活性在牛痘病毒粒中也已检出, 已知它与鸟苷酸转移酶及 G-7-甲基转移酶一起构成牛痘病毒粒中合成帽子结构的多酶复合体。

2. 病毒 mRNA 帽子结构的生成

牛痘病毒 (DNA 病毒) 和呼肠孤病毒、CPV、VSV (RNA 病毒) 的病毒粒中都具有帽子合成酶系, 并且它们在合成帽子结构的机制上也基本相似, 只在鸟苷酸转移酶催化的这一步反应中不尽相同。

呼肠孤病毒帽子结构的合成是在 mRNA 开始转录后进行的, 这一过程始于 RNA 聚合酶作用下由 GTP 与 CTP 形成的第一个磷酸二酯键: 而 CPV 在形成磷酸二酯键之前, 即先生成 GpppA, 这步反应由鸟苷酸转移酶所催化。呼肠孤病毒在生成 GpppGpC 之前, 尚

需经过核苷酸磷酸水解酶催化由 pppGpC 转变为 ppGpC 这两种病毒合成帽子结构时的 GTP 受体都是 ppN-。已有实验证明, 甲基化帽子结构的形成对于 CPV mRNA 的合成并非必需, 加入 S-腺苷同型半胱氨酸及 S-腺苷蛋氨酸的其它同系物, 同样能促进体外 mRNA 的合成, 这是基于变构产生的影响。

VSV 和牛痘病毒帽子结构合成中由鸟苷酸转移酶催化的反应与呼肠孤病毒及 CPV 不同, 特别是牛痘病毒更加复杂, 其 GTP 受体因不同纯化酶而异。Martin 纯化酶中的鸟苷酸转移酶要求 RNA 的 5' 末端至少要含有两个磷酸基, 已知只含单磷酸的 RNA (pN-RNA) 是不能参与这一反应的。Monroy 纯化酶中鸟苷酸转移酶催化的反应, 只有 5' 末端具有三个磷酸基的 RNA, 才能成为合成帽子结构的受体, 而二磷酸 RNA 则不能。VSV 是以只具备一个末端磷酸基的 RNA 作为帽子合成受体的。现将鸟苷酸转移酶催化反应的三种不同机制示如图 2。

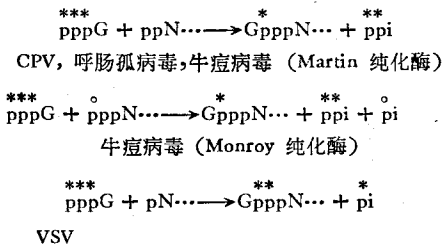


图 2 RNA 鸟苷酸转移酶反应机制

以上四种病毒粒在生成 GpppN 这一中间物后, 即以 S-腺苷蛋氨酸为甲基供体, 分别在 G-7-甲基转移酶及核糖-2'-0-甲基转移酶作用下, 遂完成帽子结构的合成。详细过程见图 3。

3. 真核生物 mRNA 帽子结构的生成

在病毒粒的体外 mRNA 合成系统中, 帽子结构的合成与 RNA 的转录几乎同步进行, 难怪有人称之为“甲基化偶联转录 (methylation-couple transcription)”。相反, 真核生物则无论体内和体外转录, mRNA 的合成至少要在转录早期有了数十至数百个核苷酸时才开始。

Perrey 等 (1976) 用 $[\text{H}^3\text{-甲基}]\text{-蛋氨酸}$ 活体

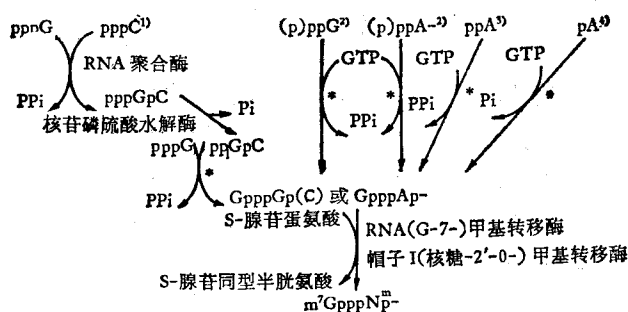


图3 病毒 mRNA 帽子结构合成途径

1) 呼肠孤病毒; 2) 牛痘病毒; 3) CPV; 4) VSV

* 由 RNA 鸟苷酸转移酶催化

标记小鼠 L 细胞 RNA, 通过分析 hnRNA 与 mRNA 的帽子结构发现, hnRNA 全部是帽子 I。继而他们以脉冲示踪证明, 位于 hnRNA 5' 末端的帽子结构在 mRNA 的帽子 I 和 II 中均得以保存。mRNA 帽子 I 中的 N^m 的碱基组成与 hnRNA 的完全一致, 但帽子 II 中的 N_2 被进一步甲基化, 与 hnRNA 中的不一样。显然, 在细胞质中, mRNA 的特定亚类经修饰而生成帽子 II。

此外, 先后在 HeLa 细胞和果蝇的细胞质中, 发现有相当一部分 hnRNA 具有帽子结构, 而且 N_1 的碱基组成与 mRNA 的极为一致。由此可以推测, 帽子 I 的合成是在细胞核内进行的, 而由此经进一步修饰而成帽子 II 的反应则发生于细胞质中。

水本等 (1979) 在大鼠肝细胞鸟苷酸转移酶催化的反应中发现, 用 $[^{32}P]$ 分别标记 GTP 中的各个磷酸, 结果仅 $[\alpha-^{32}P]$ -GTP 进入帽子结构, 生成 G^*pppNp 。作为帽子结构合成受体的 mRNA, 其 5' 末端不拘 ppN -和 $pppN$ -两种形式, 但 pN -或 $HO-N$ -RNA 则不能合成帽子结构。 *ppG -RNA 生成帽子结构时, ^{32}P 即进入帽子结构的中间磷酸基。此外, 帽子结构的形成受低浓度焦磷酸的强烈抑制, $[\alpha-^{32}P]$ -GTP 生成帽子结构的反应不受 m^7GTP 过剩的影响。

Venkatesan 等 (1980) 研究了 HeLa 细胞 mRNA 鸟苷酸转移酶反应中供体与受体的特异性, 发现以二磷酸为末端的多聚核苷酸是最佳

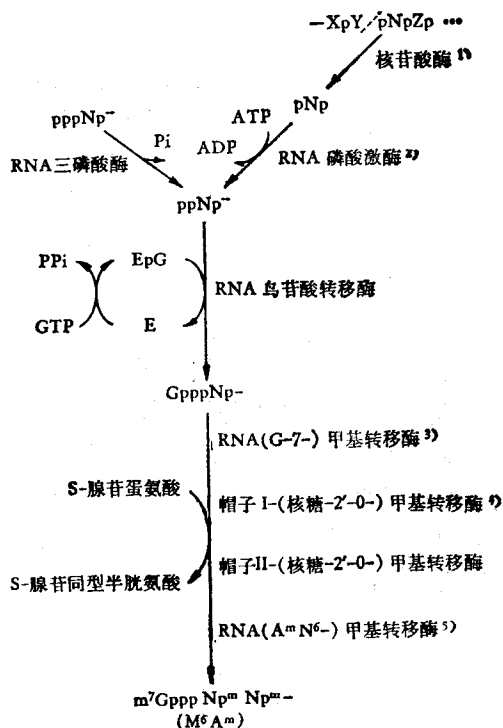


图4 真核生物 mRNA 帽子结构合成途径

1) 和 2) 反应尚未证明; 3) 和 4) 反应先后不明
5) 催化 $m^7GpppNp^- \rightarrow m^7Gpppm^6A^m$

受体, 以三磷酸为末端的 poly (A) 不能成为有效受体, 而单磷酸的形式完全不能生成帽子结构。

业已从大鼠肝细胞、HeLa 细胞、麦胚和酵母中分离出分子量分别为 69,000、69,000、77,000 和 45,000 的鸟苷酸转移酶-GMP 中间复合物, 故由鸟苷酸转移酶催化的反应实际上分

两步进行。真核细胞帽子结构合成的过程如图 4 所示。

此外,作为一个特殊的例子,brine shrimp 的胚胎中帽子结构合成的机制为: GTP 在 GpppG 合成酶作用下,加到 pppG-上形成 GppppG,然后由帽子结构合成酶系催化,经与 ppG-生成 GpppG 的反应,进一步完成帽子结构的合成。

四、帽子结构的重要性与功能

Muthukrishnan 等(1975)发现真核生物 5' 末端的 7-甲基化鸟苷酸对 mRNA 的翻译是必需的。将非甲基化的呼肠孤病毒和 VSV 的 mRNA 分别用麦胚和小鼠 L 细胞抽提液特异地甲基化,形成 m⁷GpppN。他发现,包括网织红细胞 mRNA 在内的具有 m⁷G5' 末端帽子结构的 mRNA 均可促进体外蛋白质的合成,而经 β 删除法(β -elimination)移去 m⁷G,则阻断 mRNA 的翻译。

1. 提供核糖体识别位点

Kozak 等(1977)比较了两个呼肠孤病毒及另外四种病毒 mRNA 与核糖体结合部位的核苷酸顺序,发现在离帽子结构 15—33 个核苷酸处有一共同的 AUGG 序列,并且帽子结构与 AUG 起始密码均包含在 40S 核糖体亚基所保护的区段内,而 80S 亚基结合的序列中则不含帽子结构。显然,帽子结构可能在蛋白质合成起始的早期为核糖体提供一个识别位点。

Kozak 等(1978)在呼肠孤病毒 mRNA、TMV-RNA 和珠蛋白 mRNA 中发现,一种阻止核糖体 60S 亚基结合的抗菌素—伊短菌素能使多个 40S 亚基结合到各自的 mRNA 链上而形成复合物。将呼肠孤病毒 mRNA 用核糖核酸酶水解,检出了由 40S 亚基保护的抗核酸酶的 mRNA 片段。这些片段中的核苷酸顺序很不相同,亦即 40S 亚基是分布在 mRNA 内部的多个部位上。同时还发现,多个 40S 亚基似乎总是从 mRNA 中的一个固定部位进入而与之结合的,该部位包括了 mRNA 的 5' 末端在内。实验表明,在伊短菌素存在下,40S 核糖体

能够在 mRNA 链上移动。首先连接到 5' 末端,然后向前移动而空出一个位置,让下一个核糖体亚基结合上来。

据此他们提出了 80S 起始复合物形成的所谓“滑动模型(scanning model)”。模型的要点是,40S 亚基首先与 mRNA 的 5' 末端结合,然后沿 mRNA 链向前滑行至第一个 AUG 起始密码处即停止,这时 60S 亚基便结合上来形成 80S 起始复合物。伊短菌素的作用可能是干扰 AUG 的识别过程,从而使 40S 亚基继续沿 mRNA 链向前移动。

真核生物 mRNA 作为单顺反子(monocistron),都以 5' 末端第一个 AUG 作为起始密码子,滑动模型能真实地反映其 mRNA 上核糖体结合的情形。此外,还有许多证据支持这一模型。例如,大肠杆菌核糖体能与环状 RNA 中的 AUG 结合,而麦胚及网织红细胞的核糖体则不能与之结合。又如多顺反子(polycistron)的 λ 噬菌体及乳糖操纵子的 mRNA,若利用帽子合成酶使之形成帽子结构,则 mRNA 在麦胚无细胞蛋白质合成系统中的翻译效率高,但此时并不一定只从 5' 末端的顺反子开始翻译。

2. 促进起始复合物的形成

帽子结构之所以被认为是有效翻译的必需结构,就在于它促进起始复合物的形成。在麦胚 S30、兔网织红细胞和小鼠腹水癌细胞等的无细胞蛋白质合成系统中,已经证明好几种病毒及鱼精蛋白、卵清蛋白甲状旁腺激素 mRNA 5' 末端的 m⁷G 对于形成 40S 起始复合物是必需的。

当多肽链合成终止时, mRNA 上的 80S 核糖体即游离出来,并解离成 60S 和 40S 两个亚基。40S 亚基首先与起始因子 eIF-3 和 eIF-4C 结合,形成所谓“原 40S (native 40S)”。在它 Met-tRNA_f 结合之前,后者首先与 eIF-2、GTP 一起构成 eIF-2 · GTP · Met-tRNA_f 复合体。然后,该复合体再与原 40S 结合形成起始前复合物(preinitiated complex)。该复合物在与 mRNA 结合的过程中,有一种“帽子结合蛋白(CBP)”起着重要的识别作用。CBP 首先

与 mRNA 的帽子结构相结合,然后,在 CBP 与 eIF-3 的相互作用下, mRNA 才与 40S 起始前复合物结合。最后,60S 亚基在 eIF-5 参与下,亦结合上来并游离出 eIF-2 和 eIF-3,于是形成 80S 起始复合物的过程即告完成。

Shafritz 等(1976)在网织红细胞纯化的 eIF 和珠蛋白 mRNA 组成的无细胞蛋白质合成系统中发现, m^7GMP 特异地抑制 eIF-4B 与 mRNA 的相互作用,而 eIF-2 及 eIF-5 等与 mRNA 的结合则不受 m^7G 的影响。因此,他们认为 eIF-4B 就是设想中的 CBP。

后来查明,CBP 仅微量存在于 eIF-3 及 eIF-4B 中。

从兔网织红细胞、HeLa 细胞、小鼠腹水瘤细胞中,应用凝胶电泳检出了分子量为 24,000 的 CBP。该纯化 CBP 可促进 Sindbis 病毒、呼肠孤病毒及珠蛋白等具帽子结构 mRNA 的翻译,但脑心肌炎病毒(EMC)及烟草卫星坏死病毒(STNV)的无帽子结构 mRNA 的翻译则不受 CBP 的影响。此外,CBP 不仅可识别帽子结构,而且还能识别 mRNA 的其它部分。

Shafritz 等(1976)发现,要抑制 mRNA 与 CBP 的结合,则帽子结构类似物的浓度需高于 mRNA 浓度 1000 倍以上。Padilla (1978)发现,CBP 可与无帽子结构的 STNV 及化学去帽的珠蛋白 mRNA 结合,但这种结合不受帽子结构类似物的抑制。

3. 提高 mRNA 的翻译效率

Both 等(1975)将呼肠孤病毒有甲基化帽子 (m^7GpppG^m) 和只有未甲基化帽子 (75% ppG, 25% GpppG) 的两种 RNA,置于麦胚 S-30 的无细胞蛋白质合成系统中,发现前者翻译效率很高,而后者极低。

实验还表明, m^7Gp 、 m^7Gpp 、 m^7Gppp 及 $m^7GpppN^{(m)}$ 等帽子结构类似物,均可抑制 m^7G -RNA 的翻译。上述两种情形在 mRNA 与核糖体结合时也体现出来。实际上,帽子结构对于 mRNA 的正确翻译并非绝对必需,只是提高 mRNA 与核糖体结合的速度以及增加它

们结合的量。

在上述无细胞蛋白质合成系统中, m^7G 的重要性受控于当时的 K^+ 离子、mRNA 及起始因子等的浓度。一般在约 150mM 的 K^+ 及低浓度的 mRNA、起始因子存在时,对帽子结构的依赖性强。

Smith 等(1978)用纯化的牛痘病毒帽子结构合成酶在 STNV-RNA 上接上一个帽子结构,对翻译效率并不产生什么影响。因此,5'末端帽子结构在 STNV-RNA 的翻译中是不起作用的。不过 m^7GMP 尚可轻微抑制有帽子结构和无帽子结构 STNV-RNA 的翻译起始过程。这可能意味着真核生物的核糖体上具有一个 m^7GMP 敏感部位,而 STNV-RNA 则具有一个不利于帽子结构发挥作用的三级结构,即核糖体的结合还有赖于 RNA 的高级结构。

4. 稳定 mRNA 一级结构

下远野邦忠等(1976)将 CPV mRNA 用特异的焦磷酸酶切除 5'末端帽子结构,并将其置于麦胚抽提液中保温。3 分钟后几乎完全降解成小分子核苷酸,但未经去帽处理的 mRNA 并不发生类似的小分子化现象。在后一种情况下,考虑到 mRNA 与核糖体形成复合物可能产生的稳定作用,故通过离心剔除核糖体,结果仍获得与上述相同的结果。显然在该系统中,存在着 5'-核酸外切酶对无帽子结构 mRNA 的积极降解作用。

古市泰宏等(1977)将呼肠孤病毒 5'末端具有 m^7GpppG^m 、GpppG、ppG、pppG^m 和 pppG 的五种 mRNA 注入非洲爪蟾卵母细胞及在麦胚和小鼠 L 细胞抽提液中保温,均发现前两种的 mRNA 要比其余三种稳定得多。从保温一定时间的卵母细胞回收 mRNA,结果发现前两种的 mRNA 的结构依然如故,而其余三种均已降解。还发现,在麦胚无细胞蛋白质合成系统中, m^7GpppG^m 的 mRNA 可指导蛋白质的合成, mRNA 几乎全部与核糖体结合; GpppG 虽然也与核糖体结合的 m^7GpppG^m mRNA 同样稳定,但它不能用于合成蛋白质。

参 考 文 献

- [1] 古市泰宏等: 蛋白质核酸酵素, **22**, 931, 1977.
[2] 水本清久等: *ibid.*, **27**; 773, 1982.
[3] Checkley, J. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1582, 1981.
[4] Sonenberg, N.: *Nucleic Acids Res.*, **9** 1643, 1981.
[5] Sonenberg, N. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4138, 1981.
[6] Langberg, S. R. et al.: *ibid.*, **256**, 10054, 1981.
[7] Furuichi, Y.: *ibid.*, **256**, 483, 1981.
[8] Matsui, T. et al.: *ibid.*, **255**, 11992, 1980.
[9] Shuman, S. et al.: *ibid.*, **255**, 11588, 1980.
[10] Venkatesan, S. et al.: *ibid.*, **255**, 2835, 1980.
[11] Venkatesan, S. et al.: *ibid.*, **255**, 2829, 1980.
[12] Venkatesan, S. et al., *ibid.*, **255**, 903, 1980.
[13] Ziff, E. B.: *Nature*, **287**, 491, 1980.
[14] Merrick, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 3708, 1979.
[15] Peterson, D. T. et al.: *ibid.*, **254**, 7730, 1979.
[16] Peterson, D. T. et al.: *ibid.*, **254**, 2509, 1979.
[17] Kozak, M., *Nature*, **280**, 82, 1979.
[18] Mizumoto, K., et al.: *Fed. Proc.*, **38**, 225, 1979.
[19] Hashimoto, S. et al.: *Virology*, **94**, 254, 1979.
[20] Benne, R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 3078, 1978.
[21] Shafritz, D. A. et al.: *ibid.*, **253**, 5939, 1978.
[22] Kozak, M. et al., *ibid.*, **253**, 6568, 1978.
[23] Smith, R. E. et al.: *Fed. Proc.*, **37**, 1503, 1978.
[24] Muthukrishnan, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 1710, 1978.
[25] Keith, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 5033, 1978.
[26] Mizumoto, K. et al.: *Fed. Proc.*, **37**, 1734, 1978.
[27] Monroy, G. et al., *J. Biol. Chem.*, **253** 4490 1978.
[28] Monroy, G. et al.: *ibid.*, **253**, 4481, 1978.
[29] Barbosa, E. et al.: *ibid.*, **253**, 7698, 1978.
[30] Levis, R. et al.: *J. Mol. Biol.*, **120**, 487, 1978.
[31] Ambros, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 5263, 1978.

[本文于1982年10月20日收到]

多 糖 的 结 构 测 定

张 翼 伸

(东北师范大学生物系)

多糖也是重要的生物高分子化合物,虽然多糖类的研究开始不比蛋白质核酸晚,但在较长时间内却没有受到重视。近十多年来情况有了变化,由于膜的化学功能、免疫物质的化学研究与发展以及新药物资源的寻找与研究等,发现糖类具有多种多样的功能,在生命现象中参与了细胞的各种活动,因此多糖的研究开始活跃起来。同时由于分离分析方法的改善,使国内外对糖类的研究有了空前迅速发展的趋势。

多糖的结构也有一、二、三、四级的概念,在一级结构的测定方面也不是轻而易举的,要解决一种多糖的一级结构,必须依次解决糖基的组成、糖基排列顺序,相邻糖基的连接方式、异头物构型,以及糖链有无分支、分支的位置与长短等。要解决多糖的空间结构当然就更复杂了。

结合我们近年实验室的工作,仅就有关多糖的分离提纯与一级结构的测定,扼要作点介

绍。

一、分 离 提 纯

尽管当前已有许多先进技术与仪器可以使用在多糖的结构测定上,但化学方法的处理仍是非常重要的。首先是多糖的提纯与精制。般先将原料物质脱脂,然后按多糖的特性用水(冷、或热水)或稀盐、稀酸、稀碱进行提取,提取液经浓缩后,即以等量或数倍的甲醇、乙醇或丙酮等沉淀析出。同一原料,分别用水,酸,碱提取所得多糖的成分常是不相同的^[1]。在提取中要防止降解,用稀酸提取时间宜短,温度最好不高于5℃,用稀碱提取时,为防止降解,常通以氮气或加入硼氢化钾或钠^[2]。稀酸稀碱提取液应迅速中和、浓缩、透析与醇析而获得多糖沉淀。用稀碱提取,经透析取其水溶部分醇析,比直接先用水提取产率较高。含有糖醛酸,硫酸基团