

途径。

参 考 文 献

- [1] Gibbons, I. R. et al.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 697, 1960.
- [2] Gibbons, I. R.: *Arch. Biol. (Liege)*, **76**, 317, 1965.
- [3] Gibbons, I. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **50**, 1002, 1963.
- [4] Tilney, L. G. et al.: *J. Cell Biol.*, **59**, 267, 1973.
- [5] Christopher, W. B. et al.: *Methods in Cell Biology*, **24**, 373, 1982. Academic press.
- [6] Gibbons, I. R.: *J. Cell Biol.*, **26**, 707, 1965.
- [7] Thompson, G. A. et al.: *J. Cell Biol.*, **61**, 253, 1974.
- [8] Mabuchi, I. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 991, 1974.
- [9] Takahashi, M. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1339, 1978.
- [10] David, R. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 12535, 1981.
- [11] Gibbons, I. R. et al.: *Science*, **149**, 424, 1965.
- [12] Nakamura, K. I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 54, 1979.
- [13] Blum, J. J.: *J. Submicrosc. Cytol.*, **15**, 237, 1983.
- [14] Gibbons, I. R. et al.: *J. Cell Biol.*, **47**, 71a, 1970. (Abstr.)
- [15] Raff, E. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 366, 1969.
- [16] Ogawa, K. et al.: *Biochim Biophys. Acta*, **256**, 142, 1972.
- [17] Warner, F. D. et al.: *International Review of Cytology*, **66**, 11, 1980. Academic Press.
- [18] Blum, J. J. et al.: *J. Supramol. Struct.*, **6**, 155, 1977.
- [19] Wen-Jing Y. Tang, et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 508, 1982.
- [20] Ogawa, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 5793, 1976.
- [21] Fasman, G. D.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* 3rd Edition Proteins II. p. 317 1976 by CRC Press, Inc.
- [22] Onishi, H. et al.: *J. Biochem.*, **74**, 435, 1973.
- [23] Takenaka, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4229, 1978.
- [24] Kanazawa, T. et al.: *J. Biochem.*, **57**, 604, 1965.
- [25] Cande, W. Z. et al.: *J. Cell Biol.*, **79**, 573, 1978.
- [26] Fujiwara, A. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **92**, 441, 1982.
- [27] Blum, J. J. et al.: *J. of Supramol. Structure*, **12**, 23, 1979.
- [28] Lowey, S.: *J. Mol. Biol.*, **42**, 1, 1969.
- [29] Johnson, K. A. et al.: *J. Cell Biol.*, **96**, 669, 1983.
- [30] Zieve, G. W. et al.: *J. Cell Sci.*, **48**, 241, 1981.
- [31] Satir, P.: *Protoplasmatologia*, III. E. 52pps, 1965.
- [32] Satir, P.: *J. Cell Biol.*, **39**, 77, 1968.
- [33] Satir, P. et al.: *Cell Motility*, **1**, 303, 1981.
- [34] Hisanaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 87, 1983.
- [35] Tominaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 1085, 1983.
- [36] Tominaga, S. I. et al.: *J. Biochem.*, **93**, 1093, 1983.
- [37] Blum, J. J. et al.: *J. Submicrosc. Cytol.*, **15**, 237, 1983.
- [38] Baccetti, B. et al.: *J. Cell Biology*, **88**, 102, 1981.
- [39] Bouchard, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **78**, 1033, 1981.

[本文于 1984 年 2 月 7 日收到]

胰岛素作用机制研究的新进展

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

胰岛素是脊椎动物胰脏 β 细胞分泌的一种重要的激素, 具有极其广泛的生理功能。在细胞水平, 它刺激葡萄糖和氨基酸的传递和利用, 激活许多重要的酶, 抑止脂肪分解, 改变蛋白质的磷酸化作用, 刺激蛋白质和核酸的合成, 促进细胞的生长和分化等。这些作用发生在细胞膜, 细胞质和各种亚细胞器的不同水平上, 并有不同的时间响应。譬如, 胰岛素作用后几秒钟内就可以发生刺激葡萄糖传递的现象, 但 DNA

的合成则要在 16—20 小时后才达到高潮。不同的生物功能对胰岛素数量的要求也很不同, 可以从 $10^{-11}M$ 到 $10^{-7}M$, 差别可达四个数量级。一般说来, 比较缓慢的过程要求的胰岛素浓度较高^[1]。随着研究的深入, 很可能还会发现胰岛素更多的今天还没有认识到的新的生物功能。然而, 它是通过什么途径发挥如此多种不同的生物功能的呢? 也就是说胰岛素的作用机制是怎样的呢? 这个问题已经成为近十几年

来胰岛素研究领域内最吸引人的、集中了最多人的课题。

至今为止,关于胰岛素的作用机制,只有第一步,即胰岛素发挥生物功能必须首先与靶细胞膜上的胰岛素受体发生专一的结合,得到了肯定的证明^[2],但是这种结合的细节还不清楚。靶细胞膜上的受体所处的环境中有无数的各种各样的蛋白质分子(浓度约为 $10^{-3}M$),但受体分子却能从一百万个或十亿个这样的蛋白质分子中把一个胰岛素分子(约 $10^{-11}M$)识别出来,与之专一结合。两个蛋白质分子这种高度特异的识别,其分子基础是什么呢?胰岛素分子与比它大约 50 倍的受体分子之间是通过什么性质的相互作用?又在各自的哪些部位,以极高的亲和力相结合的呢?在结合过程中,两个分子的构象是如何相互诱导,相互契合地发生变化,最后又如何把结合的信息传递下去,诱发一系列复杂的生物学事件而最终实现生物功能的呢?这些都还不清楚(图 1)。显然,要彻底阐明胰岛素发挥生物功能的全过程,首先要

对胰岛素分子和受体分子本身有足够的认识。胰岛素分子的结构最近已在 $1.2\text{Å}-1.0\text{Å}$ 这样少有的高分辨率水平上得到精细的分析^[3,4],但受体分子却还只能用方框框或圆圈圈对其亚基结构作粗略的描述,所以受体的研究在目前是首当其冲的。胰岛素和受体结合形成的复合物,当然也是胰岛素作用的研究者们,特别是结晶学家们最迫切希望加以研究的对象。

在前文介绍胰岛素受体的基础上^[5],本文对胰岛素作用机制研究的最新进展作如下概括介绍。

一、胰岛素受体研究

1. 胰岛素受体的分布——不同部位受体的来源,结构和功能,以及生物学意义。

现在发现胰岛素受体并不是仅仅存在于通常所认为的靶细胞上,如肝细胞,肌细胞,脂肪细胞等,而是广泛地存在于脊椎动物的几乎所有的组织细胞中^[6],包括高度分化而稳定的神经细胞。Underhill^[7] 报道每克大鼠中枢神经组织中约有 1 pmole 的胰岛素受体,其中嗅叶和大脑皮层的受体含量最高。但是这里的受体的生理功能还不清楚,它们确实表现有与靶细胞的受体不同的性质。如对胰岛素的特异性,表现为对 *Histricomorph* 的胰岛素(南美洲一类啮齿类动物的胰岛素,它对通常的靶细胞受体的亲和力很低)的亲和力特别高;没有负协同效应;与之结合的胰岛素不降解等。这些差异可能反映了中枢神经系统中的胰岛素有其特殊的生理功能^[8]。

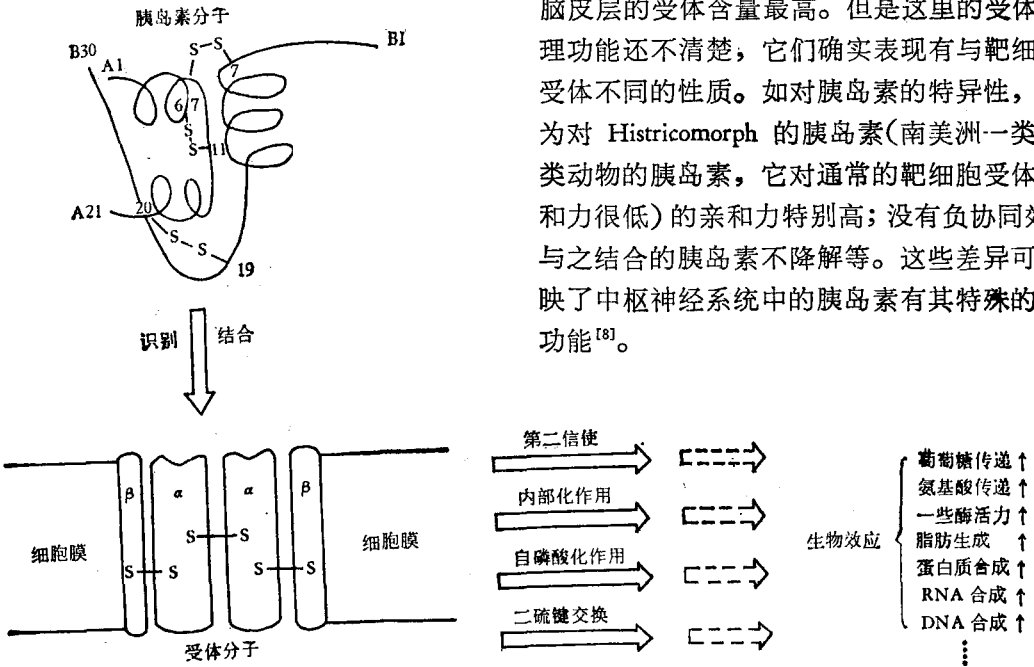


图 1 胰岛素作用机制示意图

胰岛素分子首先与靶细胞膜上的胰岛素受体分子相互识别,并特异结合;结合以后经过一系列极其复杂的生化过程,最终导致各种生物效应。

胰岛素受体不仅存在于细胞的质膜上,在细胞内部,诸如高尔基体,粗糙内质网,以及细胞核的膜结构上,用分部超离心技术和电子显微镜观察也都发现了胰岛素的特异结合位点^[9]。对这些细胞内部的胰岛素受体性质的研究表明,它们对胰岛素及其类似物的特异性与膜上受体是相同的,但不同部位受体对胰岛素的结合行为有所不同。如核上受体结合胰岛素的pH依赖性与膜上受体的不同,也不表现负协同效应,胰岛素受体的抗体不能抑止胰岛素对它的结合。细胞内的受体和定位到质膜上的受体的性质为什么有许多明显的差别?这是否体现了它们有不同的生理功能?最近 Goldfine^[10]证明胰岛素可以刺激分离核膜的 NTP 酶活力(nuclear envelope triphosphatase),并刺激 mRNA 释放,提出胰岛素对细胞内部可能有直接的作用。此外,不同部位的胰岛素受体的来源是否相同,它们是直接由生物合成的,还是质膜上的受体与胰岛素结合后经过内部化作用又进入细胞的,或者经过膜与细胞质之间的循环又重新回到质膜上去的等等,都需要进一步研究。

2. 受体的结构——多种聚合态的生理意义。

过去五、六年中,由于光亲和标记,双功能基因化学共价交联以及细胞经表面碘化或生物合成标记后再用受体的自抗体特异地免疫沉淀受体等方法的建立,使受体结构的研究有了突破^[1]。

胰岛素受体主要是由二种亚基, α 亚基(分子量约135,000,即结合亚基)和 β 亚基(分子量约90,000)组成。在生理状态,受体是以自由亚基状态和亚基间靠二硫键联接,形成不同分子量的寡聚体形式存在的。已发现的受体形式有 $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta\gamma$ (γ 亚基的分子量约为45,000,一般认为是 β 亚基的降解产物), $\alpha_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\alpha\beta_2$, α_2 , α , β ^[11]。受体以这样多种形态存在,其生物意义是什么?最近 Kahn 等^[12]利用受体的 down regulation 调节,在一种经过精细筛选得到的分化的肝癌细胞株 F₄。上(它具有大量的胰岛素受体,对胰岛素有极其敏感的反应),研

究了不同形态的受体的性质。他们发现,受体对胰岛素的亲和力是与它们的寡聚体的多少成反比例。寡聚体越多,亲和力越低。受体的寡聚体的丧失伴随着剩余受体的亲和力的升高,同时也伴随着胰岛素对酪氨酸转氨酶和糖元合成酶的激活作用的丧失,以及受体的自磷酸化作用的丧失。Reinauer^[13]用中性去污剂 Triton X-114 可以把猪肝膜受体分离成数量比例不同,结合胰岛素的亲和力不同,结合 pH 依赖性不同的二种受体。但这二种受体在细胞中的分布,结构以及功能都不清楚。在不同组织中,受体寡聚体的组成和分布也是不同的。所以说,受体的结构是非常复杂的,这一定是与其复杂的生理功能密切相关的。

3. 受体的纯化——高纯度受体的获得为最终阐明其结构提供了可能性

由于胰岛素受体在细胞膜上的浓度极低,其分离纯化多年来一直被认为是非常困难的。有几个实验室从鼠肝膜或人的胎盘,用各种亲和层析方法曾得到每毫克受体蛋白结合2—5微克的纯度尚低的胰岛素受体。1983年 Fujita-Yamaguchi^[14]采用麦胚凝集素(WGA)-Sepharose 和胰岛素-Sepharose 连续亲和层析,并改进了层析的洗脱条件,减少受体在纯化过程中的失活,从二个正常人的胎盘,已得到50微克比活达到每毫克受体蛋白结合27.8微克胰岛素的高度纯化的受体。按现在认为的胰岛素受体的分子量约为300,000计算,他们提纯的胰岛素受体,一个受体分子可以结合一个以上的胰岛素分子。这是至今为止胰岛素受体纯化的最高纪录,有人称它为“理论纯”。对这种纯化受体的鉴定表明,它们确是由 α 亚基, β 亚基以及 γ 亚基组成的,并且也是以 $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta\gamma$, $\alpha_2\gamma_2$, α_2 , $\alpha\beta$ 以及 $\alpha\gamma$ 这些不同聚合态的形式存在。纯化受体与胰岛素的结合呈标准的 Scatchard 曲线, β 亚基表现有自磷酸化作用,这些皆证明纯化受体确实保持了天然胰岛素受体的基本功能。

要对受体作进一步的系统分析,如氨基酸组成、氨基酸顺序、溶液构象、晶体结构分析,都需要一定数量的高度纯化的样品,特别是X射

线晶体结构分析,至少需要毫克数量级的受体蛋白。因此仅仅从组织中提取受体大概是不敷需要的。看来,将来也要用 DNA 重组技术,借助微生物来生产足够数量的受体。高度纯化的胰岛素受体的获得为最终阐明受体结构提供了可能性。

4. 受体的前体——受体的生物合成

近二、三年来,在研究受体结构的同时发现,除了分子量为 135,000 的 α 亚基和分子量为 90,000 的 β 亚基外,还有一个分子量约为 190,000 的糖蛋白成分,它表现了许多与 α 亚基和 β 亚基不同的特殊性质。譬如,不能被表面碘化,说明它不存在于细胞膜的外表面;它不像 α 亚基和 β 亚基那样含有多种糖成分,而主要含甘露己糖;进一步追踪标记的时间过程,表明它最早被标记,半寿命仅 2.5 小时。现在已有多家实验室提出这样的看法^[15],认为 190,000 成份是胰岛素受体生物合成过程中的前体,它在内质网上进行糖成分的初加工 (core glycosylation),再转到高尔基体上去完成糖基化作用,然后经过某种蛋白水解酶的作用,降解成 α 亚基和 β 亚基。但受体的不同寡聚体是在哪里,通过什么组装途径形成的?有生物活力的受体是怎样排列和植入细胞的质膜上去的?这些都还不清楚。看来,胰岛素受体与胰岛素相似,其生物合成似乎也是通过一条单链的前体,然后断裂成由二硫键相联接的亚基。这说明对胰岛素受体也只存在一个 mRNA 和一个基因密码。

二、目前关于胰岛素作用机制的四种假说

1. 第二信使假说

胰岛素与其受体结合后,是否也象胰高血糖素等激素那样,通过某种小分子的化学介质 (mediator),或者说第二信使的中介而发挥生物效应的呢?最近一些实验室采用各种分离分析方法,特别是高效液相层析技术 (HPLC),已经在靶细胞中分离到某些可能是胰岛素作用的中介信使物质。它们是分子量约为 1000—3000 的小分子的水溶性物质,是在胰岛素与受体结

合后刺激了膜上或膜附近的某种蛋白水解作用而形成的。把这种物质加入破碎的细胞体系或某些细胞器组成的体系中,可以观察到胰岛素的生物效应,如对胰岛素敏感的丙酮酸脱氢酶,糖元合成酶等酶的活力增高。这些小分子物质的化学本质还不清楚,可能含肽、糖或磷脂,但不像是核苷酸。它们形成的机制和在细胞中的真正的功能尚待研究。

2. “胰岛素—受体”复合物的内部化作用 (internalization)。

对低密度脂蛋白 (LDL) 调节胆固醇的过程已经建立了如下三步明确的联系: 1. LDL 与膜受体的识别和结合。2. 结合后形成的复合物发生内部化而进入细胞。3. 在溶酶体上融合,经酶的作用释放胆固醇。对胰岛素,也已经肯定了前二步,因此自然会设想胰岛素发挥生物功能是否也会像 LDL 那样通过内部化作用的途径。

早先用铁蛋白胰岛素,¹²⁵I 胰岛素以及荧光胰岛素标记作电镜观察。Orci^[17]最近用光亲和胰岛素标记作定量电镜放射自显影, Thun^[18]用密电子胶态金胰岛素作穿透电子显微镜和扫描电子显微镜观察,都证明胰岛素和受体结合的复合物经内部化作用到了细胞内部,并推测这种内部化过程是通过胞饮作用进行的。至于在细胞内的哪些部位继续发生作用,不同的实验室用不同的方法取得了不同的观察结果,如溶酶体,高尔基体,内质网以及核等都有所报道 (图 2)。但 Pfeiffer^[19]用胶态金标记后发现胰岛素与受体结合和内部化作用二者之间并没有必然的联系。无核的人红血球的胰岛素受体与胰岛素结合后并不发生内部化过程;而鸡等鸟类和两栖类动物的有核红血球的受体则发生内部化过程。所以胰岛素发挥生物功能的途径是多样的,在不同的细胞中也可能是不同的。

用光亲和胰岛素标记^[20]或胰蛋白酶酶解^[21]等生化方法也直接证明了这种内部化作用。它在 16℃ 时几乎不发生,而在 37℃ 则是一个半时间仅为 2 分钟的快速过程。Berhann^[21]最近研究这个过程的机制,认为“胰岛素—受体”复合

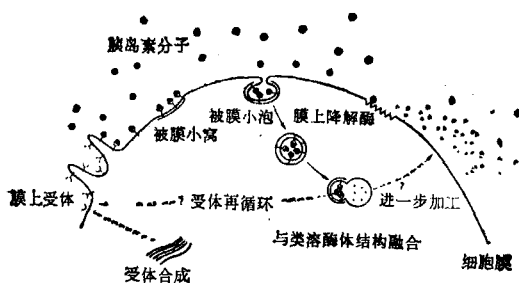


图2 胰岛素作用机制假说之二的示意图^[13]

图示胰岛素与受体结合形成的复合物通过胞饮作用进行内部化过程和以后的可能的命运。

物在内部化过程的早期阶段结构发生迅速的变化,而可以被胰蛋白酶水解,产生一个分子量为90,000的水解产物,这个水解产物可以用作内部化作用的标记物。但有的实验室认为内部化后的受体并没有发生明显的结构改变^[20]。

胰岛素和受体的复合物经过内部化作用后的命运又是怎样的呢?有人认为二者都可以被降解,降解碎片则可能起了第二信使的作用。有人认为受体可能不发生降解,而通过一个膜管系统在类溶酶体结构和质膜之间循环。胰岛素通过内部化作用发挥生物功能的假设需要在内部化作用和生物效应之间建立直接的联系后才能最后得到验证。

3. 受体的自磷酸化作用

上面谈到的经麦胚凝集素-Sepharose 和胰岛素-Sepharose 连续亲和层析获得的高度纯化的胰岛素受体,仍然保持蛋白质激酶的活力;而且其与胰岛素结合活力和胰岛素刺激蛋白质激酶的活力二者在纯化过程中总是以固定的比例一起提高。纯化的受体特异地催化 $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{ATP}$ 中的 P^{32} 参入它自身的 β 亚基。因此十分象是受体分子本身就有二种功能表达,即它还具有蛋白质激酶的活力。当然也不排斥这样的可能性,即存在着一个独立的蛋白质激酶,它是如此牢固地与受体结合着,或与受体有几乎相同的特异性,以致经过连续亲和层析仍然不能将它与受体分子分开。一般认为这种可能性似乎不大。以往的研究表明,激酶催化的蛋白质的磷酸化作用在生命活动中是十分重要的,因此对胰岛素的作用机制提出了一种新的假说^[21]。胰

岛素和受体结合,主要是与 α 亚基结合后,在极短的时间内($t_{1/2} \sim 30$ 秒)就刺激了受体本身固有的一种蛋白质激酶的活力,而使受体分子本身,主要是 β 亚基在多点发生磷酸化作用,所以这是一种自磷酸化作用 (autophosphorylation)。把磷酸化的 β 亚基水解物作氨基酸指纹图谱,发现磷酸化作用主要发生在酪氨酸残基上,可见这是一种对酪氨酸特异的蛋白质激酶。在正常细胞中的蛋白质激酶基本上都是对丝氨酸和苏氨酸特异的。胰岛素受体的这种对酪氨酸特异的蛋白质激酶是在正常细胞中少见的,需要有 Mg^{++} 的存在才表现活力;其磷酸成份供体是ATP,不是GTP;它对许多外源性底物表现有明确的磷酸化作用。 β 亚基的自磷酸化作用是胰岛素与其受体结合后一个非常早期的变化,它可以进一步刺激受体和其他蛋白质的另一些蛋白激酶的活力,从而引起一连串磷酸化作用,这些可能是导致胰岛素生物效应的必要事件之一(图3)。

4. 二硫键交换假说

胰岛素与其受体的结合是 高特异高亲和的,也是可逆的,故可达到动态平衡。但 Harrison^[24]报道,胰岛素与其受体的相互作用还可以形成一部份不能解离的共价结合的复合物,它是通过二者之间的二硫键的交换形成的。Harrison 用巯基封闭剂作探针,研究了胰岛素和受体之间的二硫键结合与生物功能之间的关系,发现这种结合可以被巯基的封闭作用抑止,此时胰岛素刺激葡萄糖传递的生物效应也被抑止。因此认为受体上的巯基对胰岛素发挥生物功能是必要的,它们与胰岛素分子之间的二硫键交换是胰岛素激活生物效应所不可缺少的。二硫键的结合提供了一个把胰岛素分子锁到受体上去的天然机制。这是除了受体的自磷酸化作用外唯一被阐明的受体在与胰岛素结合后早期发生的共价修饰作用。

胰岛素作用机制的研究目前大部份集中在受体的水平和胰岛素与受体结合后的早期阶段。自从七十年代初得以直接研究受体以来,1980年9月和1983年9月在罗马召开了一、二

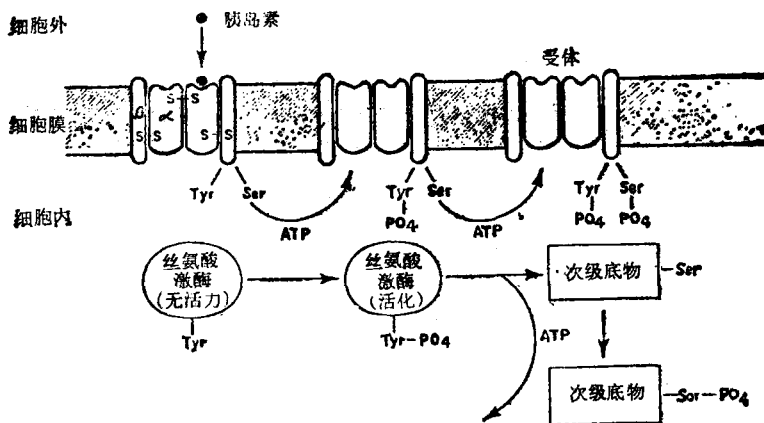


图3 胰岛素作用机制假说之三示意图^[23]

图示胰岛素与受体结合后,刺激受体固有的对酪氨酸特异的蛋白质激酶的活力,而催化 β 亚基的磷酸化作用。

胰岛受体讨论会,说明胰岛素受体研究进展十分迅速。胰岛素的研究的历史已有六十多年,至今不衰,正是因为发展了许多新的思想,新的方法和新的技术,开辟了新的领域,使它一直在生物科学的前沿上探索和发展。胰岛素受体蛋白结构和胰岛素作用机制的最终阐明必将是人类对生命运动的认识的又一次突破。

参 考 文 献

- [1] Kahn, C. R. et al.: *Rec. Prog. Horm. Res.*, **37**, 477, 1981.
- [2] Roth, J.: *Metabolism*, **22**, 1059, 1973.
- [3] Sakabe, N.: *Proceedings of the Symposium on Proinsulin, Insulin and C-Peptide* (Ed. Baba, S. et al.), Excerpta Medica Amsterdam-Oxford, 1978.
- [4] 常文瑞:(中国科学院·生物物理所、生物大分子结构与功能研究室)个人通信。
- [5] 王志珍:《生物化学与生物物理进展》,1983年,第3期,第6页。
- [6] Ginsberg, B. H.: In *Biochemical Actions of Hormones* (Ed. Litwack, G.), Vol. 4, pp. 313—349, Academic Press, New York, 1977.
- [7] Underhill, L. H. et al.: *Front. Horm. Res.*, **10**, 96, Karger, Basel, 1982.
- [8] Havrankova, J. et al.: *Nature*, **272**, 827, 1978.
- [9] Gorden, P. et al.: *Diabetologia*, **18**, 263, 1980.
- [10] Goldfine, I. D.: "2nd International Symposium On Insulin Receptors. Receptor Interaction and Insulin Action, Abstracts of Reports, Sep. 1984." p. 1. (以下简称 *Abstracts of Reports*)
- [11] Kasuga, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 10392, 1982.
- [12] Kahn, C. R. et al.: *Abstracts of Reports*, p. 11.
- [13] Reinauer, H. et al.: *ibid.*, p. 12.
- [14] Fujita-Yamaguchi, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, (In press.)
- [15] Kahn, C. R. et al.: *Abstracts of Reports*, p. 35.
- [16] Cheng, K. et al.: *Diabetes*, **29**, 659, 1980.
- [17] Gorden, P. et al.: *ibid.*, **31**, 659, 1982.
- [18] Pfeiffer, E. F. et al.: *Abstracts of Reports*, p. 40.
- [19] Thun, Ch. et al.: *ibid.*, p. 39.
- [20] Wang, C. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 5129, 1983.
- [21] Berhanu, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 4069, 1982.
- [22] Kasuga, M. et al.: *ibid.*, **80**, 2137, 1983.
- [23] Kahn, C. R.: *AFCR Clinical Investigator Award Lecture*, 1983.
- [24] Harrison, L. C. et al.: *Abstracts of Reports*, p. 16.

[本文于1983年11月21日收到]

84年5期“小资料”更正

第46页左16行“25%聚蔗糖(400号)”移到右第9行下

误

正

- | | | | |
|------|-------|--------------------|-------------|
| 第46页 | 左第13行 | “配制十倍贮存液” | “配制五倍贮存液” |
| | 右第2行 | “多种染料来揭示” | “多种染料来指示” |
| 第72页 | 右第4行 | “即10 D 260” | “即1 O.D260” |
| | 第8行 | “RNA制剂此比值” | “RNA制剂比值” |
| 封3 | 左第2行 | “于160℃重蒸” | “于180℃重蒸” |
| | 右 | “1mM $\Delta T1$ ” | “1mM DTT” |