

- [3] Rauser, W. E. et al.: *Nature*, 204, 563, 1980.
- [4] Rudd, C. J. et al.: *Toxico. Appl. Pharmacol.*, 47, 273, 1979.
- [5] Karin, M. et al.: *Science*, 204, 176, 1979.
- [6] Hager, L. J. et al.: *Nature*, 291, 340, 1981.
- [7] Hidebrand, C. E. et al.: *Biochemistry*, 19, 5850, 1980.
- [8] Squibb, K. S. et al.: *Biochem. J.*, 164, 223, 1977.
- [9] Bell, J. U.: *Toxico. Appl. Pharmacol.*, 50, 101, 1979.
- [10] Otvos, J. D. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 7734, 1979.
- [11] Otvos, J. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 7094, 1980.
- [12] Boulanger, Y. et al.: *J. Inorg. Biochem.*, 17, 147, 1982.
- [13] Briggs, R. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 1259, 1982.
- [14] Otvos, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 2427, 1982.
- [15] Winge, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 3742, 1982.
- [16] Boulanger, Y. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 1501, 1983.
- [17] Tsunoo, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 253, 4172, 1978.
- [18] Boulanger, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13717, 1982.
- [19] Durnam, D. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 6511, 1980.
- [20] Glanville, N. et al.: *Nature (London)*, 292, 267, 1981.
- [21] Karin, M. et al.: *Nature (London)*, 299, 797, 1981.
- [22] Nielson, K. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 258, 13063, 1983.

[本文于 1984 年 8 月 13 日收到]

核 酸 抗 体

方福德 沈 岩

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

核酸抗体的研究始于五十年代中期。最初一些研究者试图用纯 DNA 免疫动物制备抗体, 均告失败。稍后, 人们才用 DNA 与载体蛋白组成复合物免疫动物, 获得了核酸抗体, 同时还发现既使用碱基、核苷、单核苷酸或寡核苷酸与牛血清清蛋白的复合物也能产生特异性抗体。至此人们开始认识到核酸物质具有抗原性。由于抗体-抗原反应的高度特异性, 核酸抗体的研究在核酸的检测、分离和提纯, 核酸结构与功能的研究及临床应用等方面都发挥着重要的作用。本文拟就核酸抗体的某些研究情况作一简要介绍。

一、核酸的抗原性

核酸由碱基、戊糖和磷酸组成。核酸的抗原性由碱基或戊糖-磷酸所决定, 因此核酸的抗

原性可分为碱基中心型和糖-磷酸中心型两类。前者即以碱基为抗原决定基的中心, 包括碱基、核苷、核苷酸、单链 DNA、单链 RNA 和大多数修饰化核酸的抗原性; 后者即以糖-磷酸为抗原决定基的中心, 包括双链 DNA、双链 RNA、RNA-DNA 杂交体和三链核酸的抗原性。碱基中心型抗原的特点是在结构上具有单链结构或修饰组分, 另外碱基、核苷也具有半抗原性质, 这些都说明碱基是作为抗原决定基的中心。糖-磷酸中心型抗原的特点是核酸必须具备严格的二级或高级结构, 特定的空间螺旋结构产生特定的抗体。证明这一点是比较容易的, 最简单的证据是热变性可使这类抗原的抗原性消失。此外, 具有相同的螺旋结构而其所含碱基种类不同的核酸具有共同的抗原性也是有力的证明。这类核酸的抗原性与碱基无关。除以上

特点外,大分子核酸与抗体反应时对其长度有一定的要求,如单链核酸与抗体的抗原结合分段(Fab)结合,至少需6个核苷酸,双链DNA抗原决定基的长度是4—6碱基对(bp),一个抗体的两个Fab之间的距离为35bp(122 Å)。下面分别介绍各种核酸的抗原性。

1. 碱基、核苷、单核苷酸和寡核苷酸的抗原性

目前已经知道有抗原性的这类核酸成分有AR*、UR、CR、GR、TR、IR、m⁷GR、m⁶AR、br⁵UR、iA、AMP、UMP、CMP、GMP、dAMP、pm⁷G、ApA、GpA。它们的抗体特异性高,但其中抗UR抗体、抗CR抗体和抗AR抗体有时与别的类型核酸有交叉反应。

2. 单链RNA的抗原性

一般来说,这类核酸的抗原性比较弱。已得到抗体者列于表1。核糖体含有rRNA和蛋白质,可直接免疫动物得到抗蛋白质和抗rRNA的抗体,后者能与各种RNA反应,但不与DNA反应,可见反应的进行与碱基有关,而与糖-磷酸骨架无关。tRNA通常几乎不产生抗

体,但酵母tRNA^{Phe}例外。

3. 单链DNA的抗原性

这类核酸的抗体容易制备。这种抗体识别抗原决定基的碱基排列(4—6个碱基),而不是其中某个碱基。从自身免疫病小鼠已制备出对单链DNA特异性高的单克隆抗体。有意思的是,如果单链DNA经过某种修饰作用,则产生的抗体高度特异于该种修饰作用,不与别的单链或双链DNA反应。如T偶数噬菌体DNA含有不同的羟甲基胞苷(HMC),所得抗体亦不同^[1]: T₂DNA得到抗α-糖基HMC抗体, T₄DNA得到抗α-和抗β-糖基HMC抗体, T₆DNA得到抗龙胆二糖HMC抗体。由硫酸甲酯甲基化了的DNA可得抗m⁷C抗体,紫外线照射处理的DNA得到抗胸腺嘧啶二聚体的抗体,等等。以上抗体识别碱基时,DNA必须是单链。

4. 双链DNA的抗原性

迄今为止,合成的或天然双链DNA不论用何种方法处理,均未能获得抗体,唯有合成的

表1 一些RNA抗体

抗RNA抗体	与之反应的抗原	不反应的抗原
polyA	polyA, polyI, 变性DNA	天然DNA, rRNA, tRNA
polyC	polyC, 变性DNA	天然DNA, T4DNA, rRNA, tRNA
polyI	polyI, 变性DNA, polydI	rRNA, tRNA, polyA, polyU, polyC polyA·2polyU
兔rRNA	rRNA, tRNA, polyA, polyU polyI, polyG, polyA·2polyU	天然DNA, 变性DNA
杂交瘤rRNA	23SrRNA, 16SrRNA	DNA, tRNA, polyA, polyU, polyC polyA·polyU, polyI·polyC, polydA·polydT
tRNA	tRNA, 变性DNA, AMP, UMP, CMP, GMP, GR	dAMP, dCMP, dGMP, dTMP, A, G, U, C, AR, GR, CR, UR
酵母tRNA ^{Phe}	酵母tRNA ^{Phe} (Y碱基) 小麦胚tRNA(Yw碱基)	大肠杆菌tRNA, 大肠杆菌rRNA

poly dG·poly dC例外^[2]。后者产生抗体的主要原因是它具有左手螺旋构型(Z型)。Z型DNA的抗体特异性很高,不与其它双链DNA反应。

5. 双链RNA的抗原性

用合成的双链RNA或某些病毒双链RNA与甲基化牛清蛋白的复合物免疫动物,很易得到抗体,有的甚至不用载体蛋白也能在一定种

属的动物中产生抗体^[3]。用双链RNA制备的抗血清通常含有几个抗体群,它们有不同的反应特异性。

6. RNA-DNA的抗原性

RNA-DNA杂交体与其它核酸不同,它在

* 本文简写如下:

A, 腺嘌呤; AR, 腺苷; AMP, 腺一磷。余类推。
iA, 异戊烯腺嘌呤。m⁷G, 7-甲基鸟嘌呤, 余类推。br, 溴化。

山羊中产生抗体的效率比兔子高。

7. 三链核酸的抗原性

自然界是否存在三链核酸目前尚未确定,但可人工合成三链核酸并由其产生抗体,如 polyA·polyU·polyU、polyA·polyU·polyI、polydA·polyU·polyU 和 polydA·polydT·polyU 等^[4]。这类三链结构是经二链结构,然后第三条链结合上去两步形成的,如果第三条链的糖-2'-OH 位经乙酰化,则抗体与其反应性下降,说明二者反应与第三条链的整体结构相关。

二、核酸抗体的应用

1. 分离、提纯和浓集具有一定结构特点的核酸

各种特异性核酸抗体的存在为分离纯化及浓集具有一定结构特点的核酸提供了有用的工具。为此目的,所用的方法基本上都是将抗体固定在 Sepharose 上制成亲和层析柱,以吸附相对应的核酸。如用抗次黄嘌呤核苷抗体制成的亲和柱,可提纯具有次黄嘌呤的大肠杆菌精氨酸-tRNA;用 m⁷GR 和 m⁶AR 抗体的亲和柱,可由大肠杆菌 tRNA 的 T₁ 酶降解物中分离含 m⁷GR 和 m⁶AR 的寡核苷酸。mRNA 5' 帽结构中含有 m⁷GR,也可用此法来分离帽结构^[5]。酵母 tRNA^{Phe} (Y 碱基) 抗体有一特点:除了与酵母 tRNA^{Phe} 反应外,还能与大鼠肝 tRNA^{Phe} (过氧化 Y 碱基) 反应,有人利用此性质把大鼠肝 tRNA^{Phe} 浓缩了 20 倍。

过去分离单链 DNA 和双链 DNA 多采用羟基磷灰石柱层析法。由于单链 DNA 的抗体容易制备且特异性高,故用抗体亲和层析柱法分离单链 DNA 和双链 DNA 的效果比上法更佳。用类似方法也可分离 RNA-DNA 杂交体。

在基因工程中,运用核酸抗体的特异反应来筛选带有一定基因片段的重组质粒是很方便,可靠的。Thomac 等^[6]介绍了用这样的方法从大肠杆菌基因文库中筛选含有 Z-DNA 的片段,整个操作步骤比较简便。这里特以图解方式画出(图 1)。

2. 研究核酸结构和功能

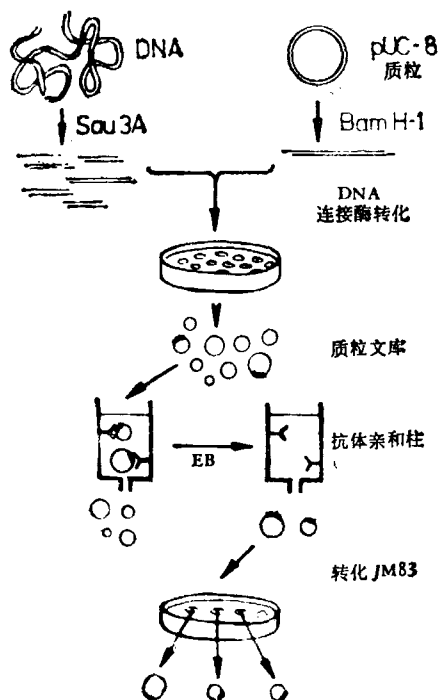


图 1 含 Z-DNA 质粒由亲和层析选择的格式

Sau 3A 和 Bam HI 为限制酶

EB: 非烷溴红

JM83: 受体菌

(1) 确定 RNA 中的稀有组分 有些稀有组分具有重要的生物学意义,如 tRNA 中的 iA, mRNA 中的 m⁷GR 和 m⁶AR 等等。因此确定特定 RNA 分子中是否存在某种稀有组分及含量的比例很有必要。有的作者用 iA 抗体定量测定了各种种属 tRNA 中的 iA^[7],用 m⁷GR 抗体测知 mRNA 的帽结构 5' 端含有 m⁷G,若用 m⁷GR 抗体分离出帽结构后再用 m⁶AR 抗体去测定,可知大约 20% 的病毒 mRNA 的帽结构中含有 m⁶AR^[5],这些工作对于研究帽结构及其功能都是很有益的。

(2) 确定核酸的构象 Z-DNA 的生物功能已引起人们的极大关注。生物体内是否存在 Z-DNA? 由于 Z-DNA 是强抗原,利用其抗体来检查细胞染色体 DNA 中的 Z-DNA 比其它方法更为理想。实际测定表明^[8],细胞内确实存在 Z-DNA。

DNA 复制和转录过程与细胞增殖、分裂密切相关。复制和转录过程中双链 DNA 是否

需全部或局部解开成为单链 DNA 呢? 证明这一点并不难。由于单链 DNA 抗体和嘌呤及嘧啶的抗体仅与单链 DNA 反应而不与双链 DNA 反应, 因此只要将抗体进行荧光标记, 再与细胞一起保温, 在显微镜下就可观察有无单链 DNA 存在及存在的位置。用该法曾观察到海胆卵在受精后 10 分钟出现局部的荧光区, 从而证明受精卵在分裂和增殖时 DNA 需要拆成单链^[9]。同时还看到, 抗体与单链 DNA 结合后受精卵的发育就受到抑制, 这是复制和转录过程受抑制之故。

有的作者还利用核酸抗体来研究溶液中 polyG 和 polyI 的构象^[10]。在体系中固定抗体量(过量), 逐渐加入 polyI 或 polyG, 然后测定被沉淀的抗体量和 polyI 或 polyG 的量, 观察到在低盐溶液态和高盐溶液态, polyI 或 polyG 被沉淀的量发生明显改变, 后者条件下增加 4 倍, 而被沉淀的抗体量基本不变。相反, polyU 被沉淀的量不变。这表明 polyU 在溶液中总是以单链形式存在, 而 polyI 和 polyG 在低盐溶液中以单链形式存在, 在高盐溶液中却以 4 链形式存在。

(3) 测定 T_m 值 有的作者报告^[1], 抗光氧化 T₄ DNA 的抗血清含有与缺少葡糖基 HMC

反应的抗体, 这种抗体可与单链 DNA 反应, 这样, 可由该种抗血清测定 DNA 由双螺旋结构变为无规线状 DNA 的量, 根据不同温度下补体结合百分比所作出的反应曲线可确定 DNA 融解温度 (T_m)。如枯草杆菌和 *P. vulgaris* DNA 由此法测得的 T_m 值分别为 93° 和 89° (图 2), 与用常规的分光光度法测得值完全一致。其他核酸抗体也同样可用于 T_m 测定。

(4) 研究细胞周期中核内大分子的变化

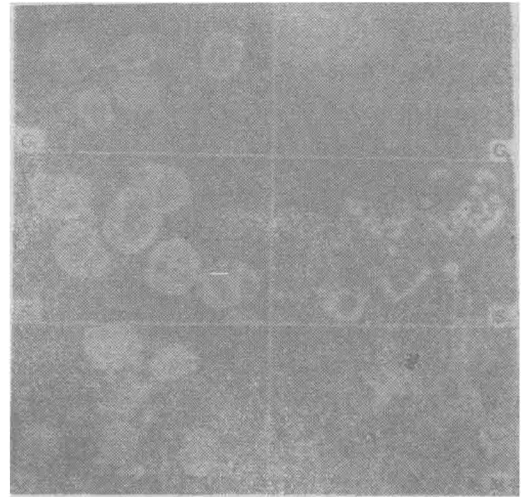


图 3 WIL₁ 细胞周期中天然和单链 DNA 的荧光显微镜图谱
左面纵行: 双链 DNA 右面纵行: 单链 DNA

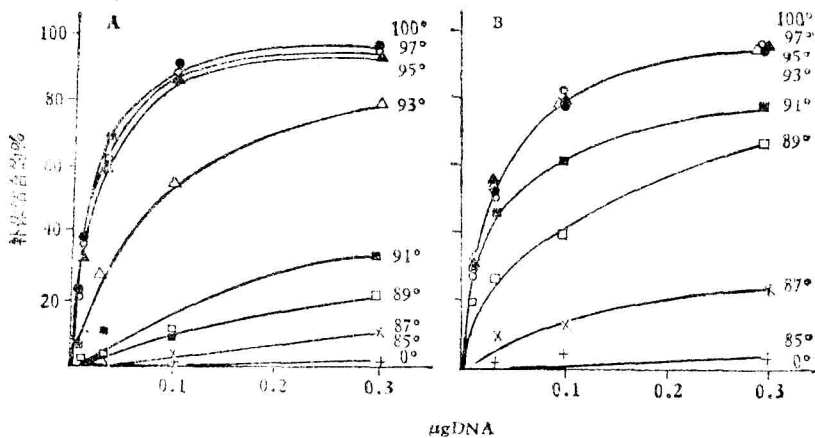


图 2 补体结合实验测定 T_m 值
DNA (3_μg/ml) 在指定温度下保温 10 分钟, 骤然冷却, 最后测定补体结合的百分比。
A. 枯草杆菌 DNA B. *P. vulgaris* DNA

用核酸抗体免疫荧光法能追踪和显示细胞核内大分子的移动及变化过程,这对于细胞生物学研究是很合适的方法。例如有的作者应用同步化的人二倍体淋巴细胞系(WIL₂)为观察对象,用双链DNA抗体和单链DNA抗体探讨这些DNA在细胞周期各时相的动态变化过程(图3)^[41]。由图3可见:在G₁期,天然双链DNA聚集在核膜周围呈环状,未出现单链DNA;在S期,双链DNA分布于核膜周围和核中心,并明显地出现单链DNA;在M期,核内物质出现于胞质,双链DNA扩散到细胞膜,单链DNA呈蛛网状分布。显然,上述方法比用其他生化方法更为直观、清楚和说明问题。

(5) 研究核酸功能 核酸功能涉及细胞的各种重要活动,如复制、基因表达及调控以及分化等等。核酸抗体同样可以在这些领域的研究中发挥重要的作用。例如,双链RNA抗体可检出的双链RNA量为2ng/ml,若用荧光抗体法则可检出一个细胞中的11pg的双链RNA。如此高的检测灵敏度足以定量测定细胞中的双链RNA。已用这些方法证明病毒感染细胞中有病毒双链RNA的存在以及某些单链RNA病毒复制过程中需经过形成双链RNA这一步骤^[12,13]。此外,近年来还用双链RNA抗体检查的方法发现细胞内存在一些功能未知的小分子双链RNA。以上工作对于病毒分子生物学研究都是极为重要的。

RNA-DNA杂交体是DNA复制的引物结构及转录过程中出现的过渡性结构。RNase H虽然降解该种结构,但其检测灵敏度仍偏低,如测定大鼠肝染色质中的RNA-DNA,用RNase H降解法测得这种杂交体核酸占总核酸的0.1%,而用RNA-DNA抗体测定为<0.001%,灵敏度大大地提高,这对于探讨RNA-DNA的生理意义是有帮助的。另外,现在普遍认为RNA在基因表达的调控起重要作用,用RNA-DNA抗体测定,观察到在活性基因的非转录区(调节基因部分)存在RNA-DNA结构,此种RNA叫调节RNA或活性RNA(activator RNA),据此有人还提出了基因表达的调控模

型^[44]。有关这方面的研究报道还有不少。

在体外已制得三链核酸及其抗体,但细胞内是否存在三链核酸?有的作者已用polyA·polyU·polyU的抗体证明了呼肠病毒感染初期L细胞中确实存在三链RNA,因而提出了三链RNA与病毒的复制及基因调控等过程的关系问题。

3. 临床中的应用

如上所述,天然DNA一般是不能产生抗体的。但前几年有人报道系统性红斑狼疮(SLE)患者血清中存在抗双链DNA抗体,并可用检查此种抗体存在与否作为SLE的特异诊断指标。国内首都医院也报告^[15]活动性SLE患者血清抗双链DNA抗体为阳性;正常人,缓解的SLE及非SLE患者均为阴性。他们认为此指标对于活动性SLE是特异性很高的临床诊断指标。该病的预后多凶险,若能制得双链DNA抗体基因型的单克隆抗体以抑制产生抗体的细胞,则可能为治疗该病开辟新的有效的途径。目前已有有人在这方面进行工作。但是对于SLE血清中是否存在抗双链DNA抗体的问题目前尚有争论,有的作者得到证据表明所谓抗双链DNA抗体可能只是一种多肽的抗体,对于这个争论尚需作进一步的研究。

双链RNA是干扰素诱导剂,由于它也产生抗体,且细胞膜上干扰素受体和抗体受体相同或相似,因此当动物经过双链RNA免疫后再给予该种RNA时将不再产生干扰素^[16]。为此有的人摸索将双链RNA低分子化,使其丧失产生抗体的能力,但又不降低产生干扰素的能力^[17],以作为理想的干扰素诱导物用于临床。

参 考 文 献

- [1] Seaman, E. et al.: *Biochemistry*, 4, 2091, 1965.
- [2] Stollar, B. D.: *Science*, 169, 609, 1970.
- [3] Parker ML and Steinberg, A. D.: *J. Immunol.*, 110, 743, 1973.
- [4] Rainen, LC and Stollar, B. D.: *Biochemistry*, 16: 2003, 1977.
- [5] Munns, T. W. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 4327, 1979.
- [6] Thomae, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80, 5550, 1983.

- [7] Illicker, B. et al.: *J. Immunol.*, **108**, 1726, 1972.
 [8] Lafer, E. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 3546, 1981.
 [9] Rosenkranz, H. S. et al.: *Science*, **145**, 282, 1964.
 [10] Souleil, C. and Panijel, J.: *Biochemistry*, **7**, 7, 1968.
 [11] Tan, E. M. and Lerner, R. A.: *J. Mol. Biol.*, **68**, 107, 1972.
 [12] Stollar, V. and Stollar, B. D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 993, 1970.
 [13] Derrick, K. S.: *Science*, **199**, 538, 1978.
 [14] Britten, R. T. and Davidson, E. H.: *Science*, **165**, 349, 1969.
 [15] 徐世正等:《中国医学科学院学报》, **3**, 6, 1981.
 [16] Field, A. K. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 1113, 1972.
 [17] Butlin, F. M. and Cunningham, P. G.: *Eur. J. Immunol.* **6**, 607, 1976.

[本文于 1984 年 9 月 8 日收到]

视 网 膜 的 神 经 递 质

杨 雄 里

(中国科学院上海生理研究所)

引 言

近二十年来,随着细胞内记录和染色技术的发展,对视网膜神经元及其回路的研究已经取得了显著的进展,视网膜中信息传递的概貌已渐有端倪(参见文献[1,2])。视觉信息在各类神经元之间的传递和处理主要是通过化学突触进行的*。视网膜各种神经元的递质是什么?它们各具什么生理特性和作用?这是视觉科学家面临的重要问题。从 70 年代后期起,视网膜神经递质的研究开始形成视觉研究的生长点,并逐渐成为这一研究领域的前沿。本文将概述这方面近年的新进展。

研究技术的发展

在视网膜递质研究中一个重要的进步是单个分离神经元技术的发展^[3,4]。十多年来,在递质对突触后神经元的生理和生化效应的研究方面多采用分离的整片视网膜。这些工作有严重的缺陷。首先,难以确定所观察的效应是属于那些特定的细胞或细胞类型的;即使某一效应得以定位,但所观察到的反应可以为周围神经元或神经胶质细胞的活动所变化或掩蔽。其次,在这样的实验中,当施加递质时所提供的浓度可能并不反映药物到达靶细胞的量。为了克服这些困难,人们用酶学方法把视网膜神经元解

离,然后按细胞类型集群,加以培养。这种分离的单个细胞既可用于生化研究,也可用于电生理和药理的研究,对于递质的研究起了重要的推动作用。

另一个重要的技术进步是发展了一些新方法使细胞的功能和形态的研究更紧密地相关起来^[5]。例如用 Falck-Hillarp 组织荧光法、放射自显术和免疫组织化学方法已经能在光镜下鉴别视网膜中的多巴胺能神经元(见后)。进而,用 5,6-双羟色胺标记多巴胺神经元和 5-羟色胺神经元使不同型细胞间突触的超微结构的观察成为可能,这些结构既可用以区别神经元的类型,又能揭示突触传递的方向。这样,与关于视网膜神经元的丰富的形态学资料相结合,就使递质的研究与视网膜神经元回路的研究融为一体。

视网膜神经元的递质

1. 光感受细胞

关于光感受细胞的递质意见比较一致,可能是天冬氨酸(Asp)或谷氨酸(Glu)^[6]。其证据可列举如下: 1. 许多种动物的光感受细胞对这两种氨基酸有较高的亲合摄取能力,并保持较高的浓度。2. 它们将使水平细胞强烈地去极化。3. 若在 (³H)-D-Asp 中培养兔或豚鼠的

* 视网膜中也存在着间隙接头(gap junction),它们在信息处理中的作用还不十分清楚,本文不作讨论。