

达, 扫描分析其表达量占大肠杆菌总蛋白的 39.4%, 经层析纯化每毫升培养液可得到 10~15 μg 纯化的 GST-RAP, 其诱导产生的抗体经蛋白质印迹分析能特异地识别 HN 肾炎致病病原 44 ku 受体相关蛋白天然抗原, RAP 蛋白在大肠杆菌中高效表达及纯化的成功为研究 HN 肾炎致病病原的病理性表型提供了有利条件. 为进一步探讨膜性肾病的形成机理打下了很好的基础.

参 考 文 献

- 1 张卫苏, 朱爱萍, 刘运义. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994; 14 (4): 267
- 2 Kerjaschki D, Ullrich R, Diem K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 11179
- 3 Orlando R, Kerjaschki D, Kurihara H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 6698
- 4 Sambrook J E, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor, 1992: 47~227

Expression and Purification of Recombinant Receptor-associated Protein (RAP) of the Heymann Nephritis Pathogenic Epitope. Hu

Yingqing, Zhang Weisu, Zhu Aiping, Xia Zhiyin (*Laboratory of Molecular Biology, Nantong Medical College, Nantong 226001, China*).

Abstract A recombinant expression plasmid was constructed by inserting the cDNA encoding mature receptor-associated protein (RAP) into pGEX vector. High level intracellular expression of the RAP gene was observed in the DH5 α bacteria transformed with the recombinant pGEX vector after IPTG induction. The abundant GST fusion protein constituted 39.4% the total cellular protein. The fusion proteins were purified from bacterial lysates by using GST-Sepharose 4B affinity chromatography. The Western blot analysis showed that the rabbit anti-RAP anti-serum recognized an apparent mass of 44 ku band from rat kidney microvillar protein. The high level expression and rapid purification of RAP-GST fusions was discussed.

Key words receptor-associated protein, expression, purification

栝楼核糖核酸酶在 RNA 序列分析中的应用*

赵 晁 华 陵

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 栝楼核糖核酸酶 (RNase TCS) 对 U 碱基具有高度的专一性, 在无脲、pH 3.5、50℃ 时, 它几乎都在 -Np↓U- 处裂解 RNA. 它与 RNase T1, U₂ 和有限的碱水解一起, 可用于直接的酶法 RNA 序列分析.

关键词 栝楼, 栝楼核糖核酸酶, RNA 序列分析

迄今, 在各种各样的生物体中, 已分离出许多具有不同特异性的核糖核酸酶, 由于它们具有某些特异性地切断底物的专一性, 一些核糖核酸酶在分子生物学研究中已成为很有用的工具酶. 对它们本身的结构和功能, 及其与核酸的相互作用已有不少研究. 从高等植物中分

离到的核糖核酸酶至今虽然尚为数不多, 但在这方面的研究也已开展.

酶法测定 RNA 序列方法, 是利用几种核

* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-07-03, 修回日期: 1995-09-26

糖核酸酶在裂解底物时的不同碱基特异性, 共同来确定 RNA 的序列. 其中常用的核糖核酸酶有 T1 酶 (专一于 G 碱基)、U₂ 酶 (专一于 A 碱基)、phy M 酶 (专一于 A、U 碱基) 和 *B. cereus* 酶 (专一于 C、U 碱基) 4 种. 但是 phy M 酶和 *B. cereus* 酶毕竟不像 T1 和 U₂ 酶那样专一性强, 并且其降解作用易受 RNA 分子二级结构的影响. 我们在研究栝楼核糖核酸酶性质的过程中^[1], 发现它对 Poly (U) 有很强的特异作用, 因此它有可能单独地确定 U 碱基的位置. 本文用 5'-³²P-标记的已知序列的芹菜 4.5 S RNA^[2]作为底物, 用酶解测序方法来分析研究栝楼核糖核酸酶降解 RNA 分子时的碱基特异性和在 RNA 序列分析中的应用.

1 材料和方法

RNA 酶法测序用的各种核糖核酸酶 (T1, U₂, phy M 和 *B. cereus*) 和多核苷酸激酶均购自 Pharmacia 公司, 丙烯酰胺为 SERVA 进口分装产品, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺为进口分装的 Fluka 产品. γ -³²P-ATP ($>1.85 \times 10^{14}$ Bq/mmol) 为北京市亚辉生物工程公司产品. 其他一些常用试剂为国产分析纯产品.

栝楼核糖核酸酶 (RNase TCS) 分离纯化的方法见文献 [3], 芹菜 4.5 S RNA 的提取方法见文献 [4]; RNA 分子的 5'末端³²P 标记方法见文献 [4]; 酶法测定 RNA 序列的方法基本按 Donis-keller 的方法^[5]进行.

2 结果和讨论

为了了解 RNase TCS 在不同 pH 和有脲或无脲条件下与 RNA 作用的情况, 我们设计了 4 种反应条件, 即 pH3.5, 无脲; pH3.5, 有脲; pH5.0, 无脲; pH5.0, 有脲等. 把在这些条件下的反应产物, 与其他酶的酶解物在同一块凝胶板上一起电泳分离和比较. 在 RNase TCS 对 5'-³²P-标记的芹菜 4.5 S RNA 的部分降解图谱中 (图 1), 它的一些带分别与 4 种序列分析酶的图谱中的一些带泳动在同一位置. 如核苷酸序列中第 23、40、42、47、53、

58、63 位的 RNase TCS 的酶解谱带与 T1 酶的酶解图谱中的一些带泳动在相同位置; RNase TCS 酶解图谱中的第 27、30、36、61、65 位的带与 U₂ 酶图谱中的带泳动处在同一位置. 在序列分析凝胶上只有两种长度是相等的核苷酸片段, 才能泳动到同一位置. 根据 T1 酶裂解 RNA 链的特点, 在-GpU-的情况下, T1 酶在-Gp↓U-处断开 RNA 分子, 而 RNase TCS 也只有在-Gp↓U-处断开 RNA 链才能形成两个长度相等的片段. 根据 phy M 酶和 *B. cereus* 酶的酶解谱带, 证明在 23 等位 G 之 3'相邻位置是一个 U 碱基, 在 27 等位的 A 碱基之 3'相邻碱基为 U. 也就是说, T1 酶等所特异的碱基是在切点的 5'边, 而 RNase TCS 所特异的碱基都是在切点的 3'边. RNase TCS 酶解产物图谱中显示的带的 3'位置才是 U 碱基的正确位置.

从图 1 我们还可以看出 RNase TCS 在不同反应条件下的活性变化, 酶的活力 pH5.0 时大于 pH3.5, 这是由于 pH5.0 更接近它的最适反应 pH; 无脲条件下酶的活力比有脲时高. 但总体上说, 对 U 碱基处的特异性降解无变化, 只是在其他碱基之间的裂解程度有所差异. 如在 28、29 位和 34、35 位, RNase TCS 于 pH5.0, 无脲条件下的反应产物, 在放射自显影图谱上有明显的带, 而在 pH3.5、无脲的情况下, 这几条带很浅. 不过, 这也说明它能在-Up↓C-, -Cp↓A-, -Cp↓G-, -Gp↓A-处断开 RNA 链. 同样, 41 位的带, 说明它在-Up↓G-处也可切断 RNA 链. 这些看来似乎并非特异的降解, 也许存在有相邻碱基的顺序特异性. 因为就对 U 碱基处的降解而言, 从图 1 显示的带的强弱来分析, 不难发现与其 5'相邻碱基的种类是有关的, 它们对 RNase TCS 的敏感程度为: -Up↓U->-Gp↓U->-Cp↓U->-Ap↓U- (-Cp↓U-参见图 2). 从 RNA 序列分析角度看, RNase TCS 在 pH3.5, 无脲的条件下, 50℃, 与 RNA 反应 15 min 是最适合的条件.

图 2 显示 RNase T1, U₂ 和 RNase TCS 部

分降解 $5'$ - ^{32}P -4.5 S RNA产物的放射自显影

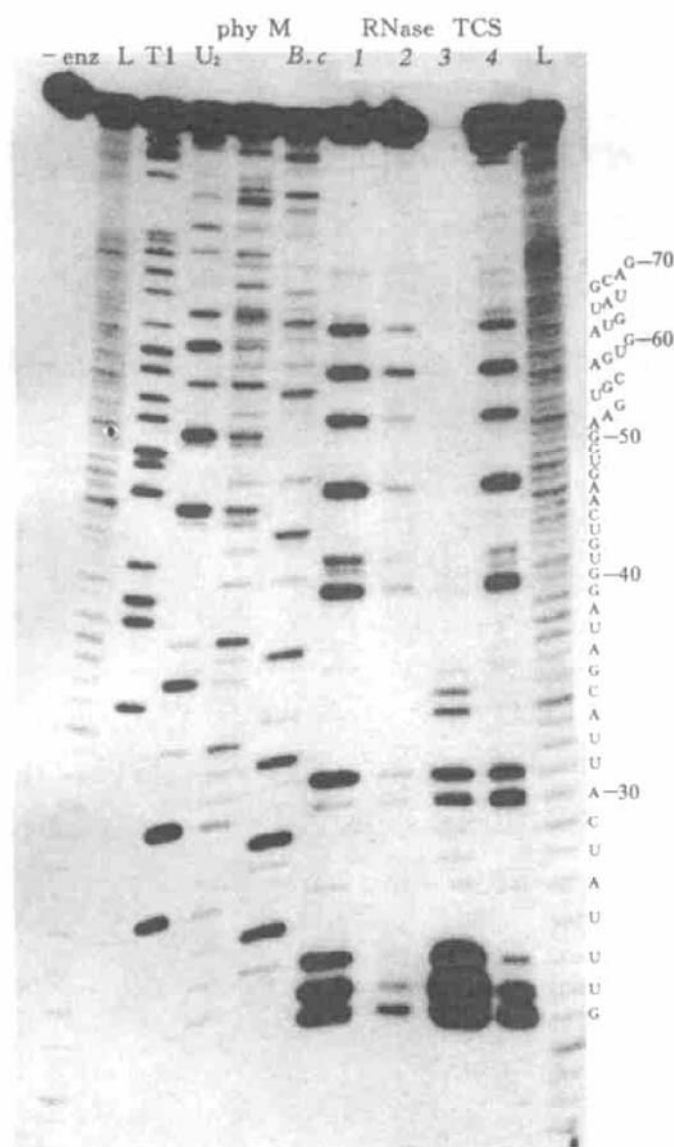


图1 $5'$ - ^{32}P 标记的芹菜 4.5 S RNA 经各种核糖核酸酶部分降解后, 其产物的放射自显影图

-enz: 在无任何核糖核酸酶情况下的 $5'$ 标记的 4.5 S RNA; L: $5'$ 标记的 4.5 S RNA 经有限碱水解的产物谱带 (阶梯); T1: 经 RNase T1 部分降解的产物谱带 (G 专一); U_2 : 经 RNase U_2 部分降解的产物谱带 (A 专一); phy M: 经 RNase phy M 部分降解的产物谱带 (A, U 专一); B.c: 经 RNase *B. cereus* 部分降解的产物谱带 (C, U 专一); RNase TCS: 经 RNase TCS 在: 1. pH 3.5, 无脲; 2. pH 3.5, 7 mol/L 脲; 3. pH 5.0, 无脲; 4. pH 5.0, 7 mol/L 脲等不同条件下的部分降解产物的谱带. 反应及电泳条件按文献[5]所述.

图. 从图 2 可以确定第 38~96 位共计 58 个核苷酸的序列, 说明用 RNase TCS 取代 phy M 酶和 *B. cereus* 酶, 并协同有限碱水解形成的

阶梯一起确定 U、C 的位置是完全可行的. 关键是正确识读 RNase TCS 酶解产物所形成的谱带. 根据 RNase TCS 降解 RNA 时的特点, 我们应注意以下几点: a. 如果 RNase TCS 水解产物的带与 T1、 U_2 酶的带在同一位置, 则

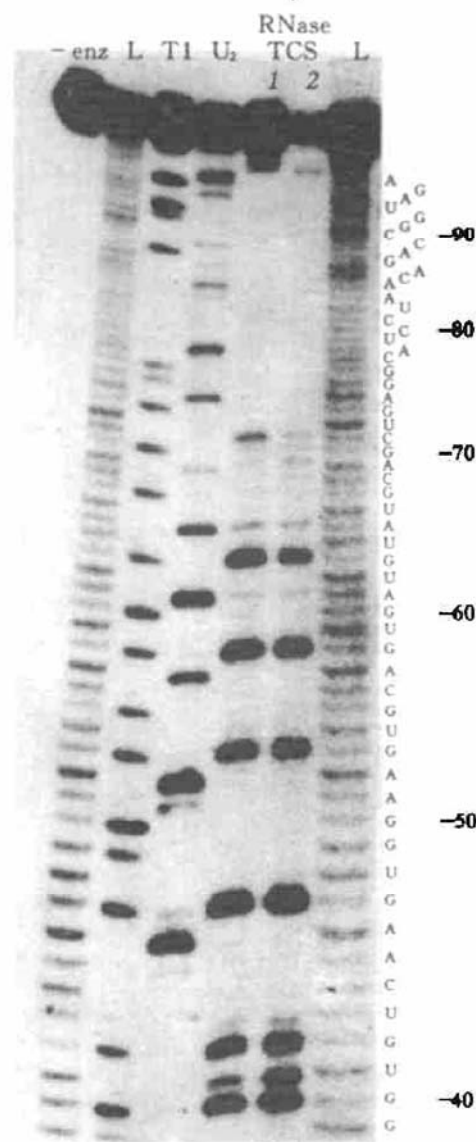


图2 $5'$ - ^{32}P 标记的芹菜 4.5 S RNA 经 RNase T1, U_2 和 RNase TCS 部分降解后, 其产物的放射自显影图

-enz: 在无任何核糖核酸酶情况下的 $5'$ 标记的 4.5 S RNA; L: $5'$ 标记的 4.5 S RNA 经有限碱水解的产物谱带 (阶梯); T1: 经 RNase T1 部分降解的产物谱带 (G 专一); U_2 : 经 RNase U_2 部分降解的产物谱带 (A 专一); RNase TCS: 经 RNase TCS 部分降解的谱带, 反应在: 1. pH 3.5, 无脲; 2. pH 3.5, 7 mol/L 脲; 反应及电泳条件按文献 [5] 所述.

U 碱基的实际位置是在所显示的带的 3' 位, 也就是在 G 或 A 碱基的 3' 位置. 在这个位置, 三种酶的水解物都不应有带显示. b. 但在 41、68、69 位显示的带的 3' 位, T1、U₂ 酶等的酶切图谱中分明有带, 是 G、A、G, 而不是 U 碱基, 因此在这种情况下, 应该以 T1、U₂ 酶的谱带为准. c. 除上述之外, RNase TCS 降解物中单独显示的带的位置 (如 71 位), 应该是 C 碱基, 其 3' 位是 U 碱基 (此处无带显示, 如 72 位). d. 从碱水解形成的阶梯中检出到的某些位置上, 没有 3 种酶的降解带显示时, 除 a. 中所述是 U 碱基的位置外, 则无疑应当是 C 碱基的位置, 如 56、77、80 位.

总之, 在了解了 RNase TCS 酶解 RNA 分子的特点和掌握了识读 RNase TCS 酶解谱带的方法之后, 用 RNase TCS 酶代替 phy M 和 *B. cereus* 酶来确定 U 碱基的位置是可能的, 配合 T1, U₂ 酶和碱解产生的阶梯能准确地定出 RNA 分子的核苷酸序列.

参 考 文 献

- 1 赵 昂, 华 陵, 黄青石. 生物物理学报, 1993; 9

(1): 32

- 2 Cheng Z Q, Zhang H, Li G Y *et al.* FEBS Lett, 1986; 200 (1): 193
- 3 华 陵, 赵 昂, 刘笑洋等. 生物物理学报, 1992; 8 (2): 351
- 4 蔡良琬主编. 核酸研究技术 (上册). 北京: 科学出版社, 1987: 193~198
- 5 Donis-Keller H, Maxam A M, Gilbert W. Nucl Acids Res, 1977; 4: 2527

Application of RNase TCS in RNA Sequence Analysis. Zhao Kun, Hua Ling (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract RNase TCS isolated from plant *Trichosanthes Kirilowii* Maxim has a high uracil-specific activity. In the absence of urea and under conditions of pH 3.5, 50°C, it cleaves almost exclusively and uniformly at -Np↓U-. In conjunction with RNase T1, U₂ and limited alkaline hydrolysis, the RNase TCS is useful in direct enzymatic RNA sequence analysis.

Key words *Trichosanthes Kirilowii*, RNase TCS, RNA sequence analysis

黄芪有效成分对氧自由基清除作用的 ESR 研究

汪德清 沈文梅 田亚平 孙仲怡¹⁾ 丛建波¹⁾ 吴 可¹⁾

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 用电子自旋共振技术研究了黄芪总黄酮 (TFA)、黄芪总皂甙 (TSA) 和黄芪总多糖 (TPA) 对次黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子自由基和 H₂O₂-Fe²⁺ 体系产生的羟自由基的清除作用. 结果表明, 这 3 种成分均有清除氧自由基的作用; 对超氧阴离子自由基的清除效能大于对羟自由基的清除作用; 其作用强度依次为 TFA>TSA>TPA. 结果提示清除氧自由基可能是黄芪抗衰老的主要机理之一, TFA 和 TSA 是黄芪抗氧化作用的主要药理活性成分.

关键词 黄芪, 电子自旋共振, 氧自由基

黄芪是中医抗衰老的常用药物之一, 具有补气、降压、利尿和保肝等多种功效^[1], 近年有研究表明, 黄芪具有抗氧化和清除自由基

作用^[2,3], 但用电子自旋共振 (ESR) 技术直

¹⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.

收稿日期: 1995-07-26, 修回日期: 1995-10-09