

多核苷酸磷酸化酶及其应用(上)

关于酶蛋白的研究

谌章群 刘新垣 陈常庆

(中国科学院上海生物化学研究所二室)

多核苷酸磷酸化酶 (Polynucleotide phosphorylase——Polyribonucleotide: Orthophosphate nucleotidyltransferase——E. C. 2. 7. 7. 8, 以下简称 PNPase)^[1] 是一个很重要的酶, 自 1955 年被 Ochoa 等^[1]发现以来, 它在核酸研究的许多方面起了重要的作用。早期利用它合成的多或寡聚核苷酸的物理化学和生物学性质, 证实了 Watson-Crick 关于 DNA 的双螺旋结构理论, 阐明了遗传密码及其阅读方向。最近以来, 它对特定顺序寡核苷酸的人工合成和 RNA 的结构分析等起着多方面的重要作用。PNPase 所合成的具有生物功能的多核苷酸对干扰素和抗病毒制剂的研究也起了有力的推动作用。PNPase 的提纯及其酶蛋白的研究近来也有很大的成绩。本文就 PNPase 的酶蛋白的研究和应用作一介绍。

一、纯化问题

PNPase 可催化三个反应, 即聚合反应、磷酸解反应和 P_i 交换反应(至于转核苷酸作用, 一般认为是磷酸解反应所引起)。这些反应都可用作酶活性的测定方法。在不具备同位素的条件下, Fuwa 和 Okuda^[2] 建立的用紫外分光光度计测定 poly A 的形成量来表示酶的活力单位的方法是切实可行的。

PNPase 不仅在细菌中是普遍存在的, 而且在真核细胞, 如酵母乃至高等动植物中也不断有它存在的报道。近年来为了大规模合成多核苷酸的需要, Rokugawa^[3] 等筛选有工业价值的富于 PNPase 的菌株, 其中 *Pseudomonas*, *Serra-*

tia, *Xanthomonas*, *Proteus*, *Aerobacter*, *Bacillus* 和 *Brevibacterium* 等含 PNPase 较高, 且核酸酶活性较低。

从研究得比较深入的几种来源 (*E. coli*, *M. luteus* 和 *Azoto, Vinellalii*) 的 PNPase 中, 多年来在纯化上一直存在着的一个问题是, PNPase 对细菌细胞内蛋白酶极其敏感, 常被水解成多个活性组份, 因而在提纯过程中, 很难获得一个均一的酶制剂。1973 年 Portier^[4] 等报道了一个方法, 可从 *E. coli* B 中分离到一个在平衡沉降和不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳中均一的制剂。这一方法包括在粗提取液中加入蛋白酶抑制剂 (Phenylmethylsulfonylfluoride) 和在一定盐浓度下加热的措施, 并吸取了 Fitt^[8] 等人总结的在 0.25 M NaCl 浓度下通过 DEAE-Sephadex 可除去大部分蛋白质的经验, 使 *E. coli* PNPase 的比活性达到或超过 1,000 单位/毫克蛋白, 这是目前从 *E. coli* 来源的 PNPase 的最好指标(表 1)。但是, Singer^[5] 报道, 在 *E.*

1) 本文所用缩写如下:

2'-O-Me ADP	2'-O-甲基 ADP
2-methyl ADP	2-甲基 ADP
PP ^x	5'-核苷二磷酸
pppMe	2'(3')-甲氧乙基尿嘧啶核苷二磷酸
dADP	5'-脱氧腺苷二磷酸
2- ³² P NDP	³² Pp ^N
poly N	多核苷酸
oligo N	寡核苷酸
NPN	二核苷一磷酸
m ³ I	1-甲基次黄嘌呤
IR	次黄嘌呤核苷
HX	次黄嘌呤
MPase	磷酸单酯酶
pi	正磷酸

表 1 *E. coli* B PNPase 的提纯 (300 克细菌)

步 骤	总蛋白 (毫克)	总活性	A_{280}/A_{260}	比活性
粗提液	10,605			
加 热	5,432	19,500		3.6
DEAE-Cellulose	4,698	19,314	1.18	4.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%	3,417	24,300	1.27	7.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 26-38%	1,513	19,440	1.24	12.8
DEAE-Sephadex A-50	68.44	16,077	1.63	235
	70.00	7,860	1.68	112
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%	59.6	13,000	1.54	218
	75.6	10,692	1.52	141
Sephadex G-200	15.29	11,951	1.21	761
	12.44	6,978	1.25	553

coli 酶中使用的蛋白酶抑制剂以及其他的蛋白酶抑制剂应用到提纯 *M. luteus* 酶时,没有获得成功。*M. luteus* 酶制剂尽管电泳表现出不均一性,但分析超离心是均一的。Singer 最近使用磷酸纤维素柱改进了 *M. luteus* 酶的纯化方法,它可简化提纯步骤,缩短时间和提高产率。经过磷酸纤维素提纯的酶,表现出稳定的构形,而过去使用羟基磷灰石柱常使酶不稳定,且贮存后显著改变性质。然而有趣的是,Wood^[6] 等从 *B. stearothermophilus* 中提取了一个热稳定的 PNPase,它不象其他来源的酶那样存在着容易被细菌蛋白酶水解成多种组份的现象,而这个酶的氨基酸组成与 *E. coli* 酶的氨基酸组成是没有什么显著不同的,疏水和亲水的氨基酸的比例是相似的。Hishinuma^[7] 等也从 *Thermus Thermophilus* 中提取了一个嗜热性的 PNPase,提纯的酶是凝胶电泳均一的,这个酶可能是其天然酶被蛋白酶水解后的产物,其最终提纯物,对 poly A 缺乏磷酸解活性,仅对四或五核苷酸有微弱的磷酸解活性。上述两个热稳定酶的最适温度在 70℃ 左右。

酶制剂中核酸含量的问题,是纯化过程中存在的另一个问题。PNPase 动力学研究的初期工作中,一些矛盾的资料部分是由于酶制剂

中存在着不同程度核酸含量的问题所引起的。通过在提纯过程中加入 RNase-DNase,硫酸链霉素或鱼精蛋白,以及各种柱层析方法,可除去绝大部分的核酸,但微量核酸附在酶分子上仍然是可能的,天然的 PNPase 对核酸有强烈的亲和力。Fitt^[8] 将 *Azotobacter Vinelandii* PNPase 提纯了 2,900 倍,但 A_{280}/A_{260} 的比值只有 0.75,说明了酶制剂中存在着较高的核酸含量。*E. coli* 酶 A_{280}/A_{260} 的比值可达 1.25—1.68,但仍难肯定酶制剂中不含任何核酸。

此外,也有人寻求用亲和层析的方法提纯 PNPase。J. C. Smith 利用 P-amino-phenyloligo (dT) Sepharose 作为载体,对 *B. stearothermophilus* 和 *E. coli* PNPase 进行了提纯研究(表 2)。pH、温度对酶与载体的结合均有影响,*E. coli* 酶的最大附着着力在 pH 8.2, *B. stearothermophilus* 酶在 pH 7.8,两者对载体的最大附着着力都在 10℃ 以下。另外,单链 DNA-agarose, Blue-

表 2 *B. stearothermo Philus* 提纯步骤

步 骤	比活性	提纯倍数	回收(%)
细胞溶破	1.5	1	100
Polyethyleneimine	5.5	3.6	95
Sepharose 4B	10	6.7	80
Oligo (dT)-Sepharose	(峰部分) 1350	900	72

dextra-Sepharose 和 poly I-Sepharose 等也发现都是 PNPase 的亲载体,均可考虑用于某种条件下酶的亲和层析分离。U. Z. Littauer 利用 RNA-Sepharose (RNA 部分水解后,偶联到 Sepharose 上, RNA 片段 3'-端带有磷酸基团,它是 PNPase 的抑制剂)由 *E. coli* B 提纯了一个高纯度的 PNPase。K. R. Keguaro 发展了一个梯度筛层析方法,用于蛋白质和酶的快速提纯,图 1 是 *E. coli* 中一些酶用梯度筛分离的情况。

PNPase 在正常条件下不易被氧化,但在较低的比活状况时则有氧化的可能。因而在提纯和贮藏中加入还原剂(如乙-巯基乙醇 β -mercaptoethanol)是有帮助的。*A. agilis* 酶似比 *E. coli* 酶更易被氧化。

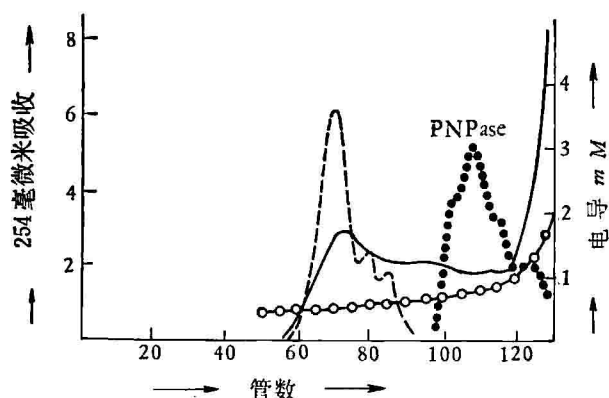


图1 *E. coli* 中一些酶用梯度筛层析提纯
t-RNA 核苷酸转移酶(-----)
PNPase (.....)
254 毫微米紫外吸收(——)
梯度以电导率表示(○-○-○)

二、酶的结构以及结构与功能的关系

现在可以分离到两种形式的 *E. coli* PNPase, A 和 B 型, B 型由 $(\alpha)_m(\beta)_n$ 组成, B 型经凝胶电泳后可以得到 A 型, 它由 $(\alpha)_m$ 组成, 两者可以互变: $(\alpha)_m(\beta)_n \rightleftharpoons (\alpha)_m + (\beta)_n$, A 型与 B 型都有催化活性, 但二者物理化学性质不同, A 型凝胶电泳行为是均一的, Stokes radius 6.4 毫微米, 沉降常数 8.9S, 分子量 252,000; B 型 Stokes radius 是 8.7—9.0 毫微米, 沉降常数 9.95, 分子量 365,000, 形状是不对称的。在酶的亚基和酶的质量上曾出现过矛盾的资料, Portier^[9] 利用一个新的技术: Dimethylsuberimide 与酶蛋白交联, 进行 SDS-凝胶电泳, 证明了 A 形式的酶是三聚体, 即 *E. coli* 的 A 形式 PNPase 是由三条肽链组成, 每一条的分子量为 85,000 (α 亚基)。电子显微镜的研究有利于支持三聚体的理论, 负染时, 酶呈一个中空三角形状。 β 亚基的分子量为 $4,800 \pm 200$, 功能是什么, 尚不清楚。由免疫扩散, 抗原抗体沉淀等免疫学方法^[10], 证明了 B 形式不是一个人为的因素。B 形式的存在似乎解释了过去观察到的, 而又说明不了的若干事实。首先, 可以解释 *E. coli* 酶的沉降常数值在 8.8—9.15S 之间和 *M.*

luteus 酶在 10.2—10.5 及 9.6—9.0S 之间的问题; 第二, 解释了在 Sephadex G-200 过滤中活性峰常有一个大的肩膀的问题; 第三, 在凝胶电泳中很多带状的组成其中可能部分是 B 形式酶解离的结果。当然酶在凝胶电泳中多组份行为是较复杂的; 蛋白酶作用后也出现复杂的组份。 *M. luteus* PNPase I (不依赖引物形式) 分子量 2.6×10^5 , PNPase II (依赖引物形式) 为 2.2×10^5 。鉴于酶呈现多组份的活性带, Singer^[5] 认为, 对于亚基数的确定将是为时过早。 Wood^[6] 提取的 *B. stearothermophilus* PNPase, 分子量为 2.1×10^5 , 他们认为酶是由四个亚基组

成, 而不是象 *E. coli* 酶是由三个亚基组成的。 Hishinuma^[7] 提取的嗜热性 PNPase 分子量是 19×10^4 , 由三个不同的亚基组成: 92,000, 73,000, 35,000。某些变种的 PNPase 的分子量则是相当不同的, 如 *E. coli* O₁₃, 1113 来源的一种形式的分子量是 200,000, 另一种形式只有 100,000, 可能它们已被降解了。现将几种来源的 PNPase 的分子量和亚基结构列于表 3。

天然的酶分子和被蛋白酶水解的酶分子在聚合和磷酸解反应中的行为是显著不同的。蛋白酶水解的 PNPase 在聚合反应中, 对引物的

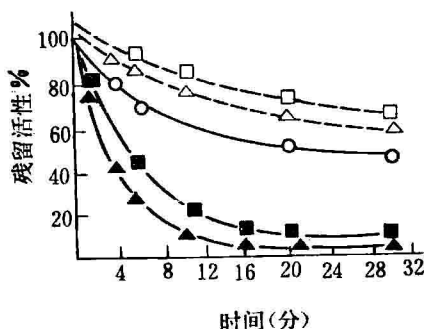


图2 *A. Vinelandii* PNPase 被 trypsin 水解的时间曲线

降解条件由 Fitt 提供

- □ ADP 掺入 } 有引物存在
- △ △ CDP 掺入 }
- ■ ADP 掺入 } 无引物存在
- ▲ ▲ CDP 掺入 }
- ○ 磷酸解

表3 几种不同来源的 PNPase 的分子量和亚基结构特点

来 源	分 子 量	沉降常数 (S)	Stokes radius (毫微米)	亚 基 数	亚基分子量
<i>E. coli</i> PNPase A	252×10^5	8.9	6.4	α_3	85,000
<i>E. coli</i> PNPase B	3.65×10^5	9.9	8.7—90	$\alpha_3\beta_n$	$\alpha 85,000$ $\beta 4,800 \pm 200$
<i>M. luteus</i> PNPase From I	2.6×10^5				
From II	2.2×10^5				
<i>B. stearothermophilus</i>	2.1×10^5			4	51,000
<i>Thermus thermophilus</i> HB-8	1.9×10^5	7.8	5.4	3	$\begin{cases} 92,000 \\ 73,000 \\ 35,000 \end{cases}$
<i>E. coli</i> 4°C PNPase	62000×3	8.5	4.7	3	62,000

依赖性大大提高。例如,提纯的 *A. Vinelandii* 还原型 PNPase 用胰蛋白酶处理后,在无引物的情况下,迅速失去 ADP, CDP 的掺入活性(图2)。提纯的天然 *E. coli* PNPase 在 4°C 放置几周后,在 *E. coli* 蛋白酶的作用下,得到一个“PNPase 4°C”酶,其 Stokes radius 为 4.7 毫微米。沉降常数 8.5S,分子量约 175,000, f/f_0 (摩擦比)=1.27,在 SDS-电泳中,一条主要带的分子量约 62,000。所有这些常数说明天然的酶被降解了一部分,这个被降解的酶,在多核苷酸的磷酸解中,其 K_m 为 $10^{-4} M$,而天然酶为 $10^{-6} M$,大大降低了对多核苷酸的亲和性。上述的 Hishinuma^[7] 提取的嗜热性 PNPase,也因被蛋白酶作用过,而失去了对 poly A 的磷酸解活性,同时底物聚合时需要引物的存在。利用亲和层析提取的天然形式的这种嗜热 PNPase 则保留着磷酸解和聚合二种活性。*E. coli* “PNPase 4°C”酶在聚合反应中,对寡核苷酸引物几乎是绝对需要,无引物存在时,聚合反应有一个长的潜伏期,在有引物,例如 (pA)_n 存在时(以多核苷酸作引物时,并不能克服潜伏期),被降解的酶的聚合活性可能升高至相当于天然酶活性的 80%,而在缺乏引物的情况下,克服潜伏期后,聚合活性只相当于天然酶的 25%。降解的酶较易与多核苷酸聚合物解离,

而天然酶在聚合或磷酸解反应终止前并不离开多核苷酸聚合物,因而,降解酶的作用方式是部分“连续”的。而天然酶则完全是“连续”(Progressive)方式。酶被降解后丢失部分肽段,失去了对多核苷酸结合的一些点,更近于球形蛋白,因而表现出上述特性。*M. luteus* PNPase 被胰蛋白酶降解后的性质也十分类似降解过的 *E. coli* PNPase。

三、酶的作用原理

PNPase 的动力学研究,常受底物(或抑制物)链长的影响,链长不同所得结果不一致,故其结果不典型。在磷酸解反应中,使用链长为 2—10 的 3'-OH (或 3'-p) 寡核苷酸作为底物(或抑制物),其结果是符合 Michaelis-Menten 理论的。长链的多核苷酸的磷酸解则是以一种“连续”的方式进行,即每条链一直要降解到其链长低于 20 核苷酸残基时,酶才有可能从该寡核苷酸上解离出来,再引发另一条链的降解。Chou 和 Singer 对于寡核苷酸的磷酸解提出了一个迅速平衡的随机机制来解释。对于这个机制的有力证据是在寡核苷酸的磷酸解中确实有中间物的寡核苷酸释放出来,如 (Ap)_n, A 用 *M. luteus* PNPase 磷酸解,有 (pA)_n + ADP 释放出来。3'-OH 端磷酸化的寡核苷酸是寡核苷酸底物磷

酸解的竞争性抑制剂。但 $(pA)_{20}(dA)$ 这样 3'-端是脱氧核苷的寡核苷酸则可被磷酸解。

长链多核苷酸(链长在 20 以上)磷酸解的连续方式指出,在两个连接着的磷酸解步骤之间,酶与多核苷酸复合物是不解离的,为了将下一个 3'-末端核苷酸带到右边位置上切除,聚合物必须对酶作相对移动。怎样解释这种作用机制呢?对于 Ehrlich ascites tumor 细胞的外切酶和 *E. coli* RNase II 的“连续”作用方式已提出了一个理论模型,但是,PNPase 的作用却是更为复杂的。为了解释 *E. coli* PNPase 的非经典行为,提出了一个模式图解,这个模型的要点是在磷酸解反应中,聚合物对酶的结合由两部分组成:(1)酶活性基团的一定数量(底物点 I)结合聚合物或寡核苷酸的 3'-OH 端,磷酸结合在邻近 3'-末端核苷酸的区域,整个底物点 I 和磷酸固定点将组成催化活性中心。(2)当聚合物足够长时,它们能够达到离活性中心某些距离的第 II 组结合点(底物点 II)。第二结合点对于反应并不是必需的,其主要贡献是稳定酶-底物这个复合物。聚合物在底物点 II 结合的时间,对于其“连续”方式的磷酸解是足够的。底物点 II 并不参与寡核苷酸的磷酸解,因此,如果假定结合在底物点 II 的聚合物不一定结合在底物点 I 上,寡核苷酸(底物点 I)和聚合物(底物点 II)的同时结合是可能的。由这些假定导出的速率方程式,解释了观察到的动力学,包括所有的抑制实验。解释了长链聚合物的“连续”方式磷酸解,解释了聚合物转向寡核苷酸时,由“连续”移向随机的过程,也可以帮助理解,为什么在 poly A 的磷酸解中没有定量观察到 5 至 10 个链长这样中间大小的寡核苷酸,而仅 $(pA)_2$ 是最终产物(即使在短的磷酸解期间)。但是这个磷酸解模式图解(图 3)可能仍有不妥或错误之处,对于两类底物结合点的见解也还需要更直接的实验来证明。

聚合反应时,在无引物的情况下,反应速度有一个缓慢增加的时期,称潜伏期,它可以被加入的引物(具游离 3'-OH 的寡或多核苷酸)所克服,当加入的引物与底物有碱基配对的可能

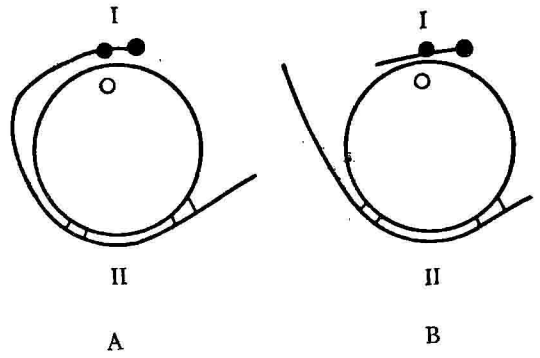


图 3 在磷酸解中聚合物结合到 PNPase 上的可能图式 (A) 一个长聚合物的磷酸解或被 3'-磷酸长聚合物的抑制; (B) 一个聚合物和寡核苷酸的同时磷酸解或聚合物磷酸解被一个 3'-磷酸寡核苷酸抑制。黑点代表聚合物的 3' 端。(I) 和 (II) 代表底物点 I 和 II。圆圈代表无机磷,它是反应的另一底物

时,仍有反应潜伏期。

通常的底物在无引物的合成中,象长链多核苷酸的磷酸解一样,是以“连续”方式进行的,反应产物仅是高分子量的 RNA,即使在很短的反应时间内,用多种方法测定(凝胶电泳、凝胶过滤、纸层析等)也没有寡核苷酸中间物出现。合成的聚合物的分子量是相当均一的,聚合物的大小随时间无明显改变。分子量的恒定,很可能是由于聚合物对酶的亲和性很大,以致阻止了自由的解离和重组。在有引物的合成中,当引物在一个适当的浓度时,会迅速被天然的 PNPase 并合到高分子量的聚合物中去。但加入的寡核苷酸引物是极大地过量于底物时,则小量的引物以“连续”的方式生成高聚物,而大部分的引物则以随机的方式加上几个核苷酸残基。某些其他的因素,例如高盐浓度也将限制链的伸长,故制备某些引物上加 1—2 个核苷酸残基的寡核苷酸时,常常使引物大于底物的比例和高盐浓度两个条件相结合。

无引物的合成中,第一步是如何开始的呢?有一种意见认为是两个核苷二磷酸分子之间的反应,其中之一起部分引物作用,按这种解释,每一个聚合物的 5'-端将是一个焦磷酸基团,但所有合成的多核苷酸,其 5'-端仅含一个磷酸基团。这可能是 PNPase 中杂有一个或作为 PNPase 一部分的核酸内切酶作用的结果,而释

放出 5'-磷酸基团和 3'-OH 基团,但在高纯度的 E. coli PNPase 中没有可以测出的 RNase 活性,不过,最近 Craine^[21] 等在研究 dADP 聚合的引发步聚时,在高纯度的 M. luteus PNPase 中发现联结着一个脱氧腺苷酸激酶和核酸酶活性,他们讨论了这些酶的意义,认为可能与 5'-端为磷酸基团有关。酶合成时的引发步骤看来并未搞清楚,仍有待进一步研究。

四、关于底物特异性的问题

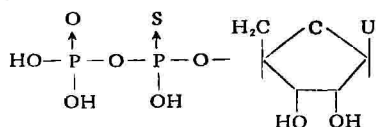
PNPase 对底物——5'-核苷二磷酸的要求似没有严格的专一性,很多天然的或在某些位置上被取代的核苷二磷酸都可以被酶聚合。有些底物可能聚合速率低于正常的天然底物,或

者要在特殊的条件下才能反应。非常少数的几种底物,如 8-溴 GDP 和 6-甲基 CDP 不能单独作为 PNPase 的底物。Michelson^[22] 根据这一情况提出,PNPase 对核苷二磷酸底物的构型要求很严格。他认为,在核苷酸分子中,含氮碱基可围绕着糖苷键以两个最低限的能量旋转,分别代表着反式和顺式构型,天然的核苷酸和大多数被某些基团取代过的核苷酸,反式构型最稳定。对酶来说空间障碍最小,如果在嘌呤的 C⁸ 位置和嘧啶 C⁶ 位置上被一个较大的基团取代后,则顺式构型最稳定,对酶来说,这类底物是抑制剂。但 M. Ikehara 等发现 C⁸ 位取代的嘌呤核苷二磷酸在引物存在时可被聚合,也可与天然碱基的底物共聚。过去认为 PNPase

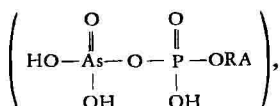
表 4 各种修饰的 PNPase 底物

正常底物	碱基修饰底物	糖环修饰底物
ADP	1-methylADP, 1-oxideADP, 1-deazaADP 1. N ⁶ -ethenoADP, 1. N ⁶ -etheno-2azaADP, N ⁶ -methylADP, N ⁶ . N ⁶ -dimethylADP, N ⁶ -hydroxyethylADP, 3-isoADP, 2-aminoADP, 2-methyl-N ⁶ -methylADP, 3-deazaADP, 2-dimethylamiooADP, 8-bromoADP, N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl) ADP	dADP, 2'-azido-2'ADP 2'-amino-2'dADP, 2'-o-ethylADP, 2'-o-methylADP
GDP	1-methylGDP, 8-azaGDP, N ² -methylGDP, N ² -dimethylGDP	dGDP
IDP	6-thioIDP, 2-methylthiolIDP, 7-deazaIDP	2'-azido-2'dIDP, 2'-o-methylIDP, 2'-o-azidoIDP
XDP	6-methylthiopurineDP, 6-methylpurineDP, 6-methyloxypurineDP	
CDP	5-bromoCDP, 5-iodineCDP, 5-chloroCDP, 5-fluoroCDP, 5-methylCDP, 6-azaCDP, N ⁴ -methylCDP, 2-thioCDP, N ⁴ . N ⁴ -dimethylCDP, 5-ethylCDP, 5-dimethylaminoCDP, 3-N ⁴ -ethenoCDP, 5-hydroxyCDP	2'-azido-2'dCDP, 2'-amino-2'dCDP, 2'-methyl-CDP, 2'-o-ethylCDP, 2'-chloro-2'dCDP, 2'-fluoro-2'dCDP
UDP	5-fluoroUDP, 5-chloroUDP, 5-bromoUDP, 5-hydroxymethylUDP, 3-methyl-5-bromoUDP, 3-methylUDP 5-idoineUDP, 5-methylUDP, 5-hydroxylUDP 3,5-dimethylUDP, 3-methyl-5-bromoUDP, 2-thioUDP, ϕ DP, 4-thioUDP, 2,4-dithioUDP, S-methyl-4-dithioUDP, 5-ethylUDP, 5,6methylUDP, dihydro-UDP	dUDP 2'-azido-2'-dUDP, 2'methylUDP, 2'amino-2'dUDP, 2'-o-ethylUDP, 2'-chloro-2'dUDP, 2'-fluoro-2'dUDP,
(抑制物)	6-azaUDP, 3-methyl-6-aza-UDP, 6SH-purine-DP arabino-UDP, 2,6,-quinazoinedione-1'-ribosyl-5'-DP	

虽对碱基没有严格的专一性,但对糖环却有高度专一性。近来的实验表明,2'-OH 并非绝对必需,2'-O-Me ADP, 2'-O-Me CDP, 2'-O-chloro UDP 和各种 2'-脱氧的核苷二磷酸都可作为酶的底物。酶对引物末端是否 3'-5' 联结也并无绝对专一性,如 UpA (2', 5') 可以作为 *M. luteus* 酶的引物。PNPase 还可以聚合这样的底物:



由此合成的多核苷酸类似物是由糖-磷酸-硫脂作骨架的。在磷酸解反应中,无机磷可被砷酸代替,多核苷酸可被砷酸解,形成 5'-磷酸砷酸核苷



它很容易被水解成单核苷酸。表 4 列出可作为 PNPase 底物的各种修饰过的 5'-核苷二磷酸。其中有一些只有在与其它底物共聚的条件下,

才能为酶所利用,如 dihydro UDP 等。

参 考 文 献

- [1] Grunberg-Manango, M., Ochoa, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3165, 1955.
- [2] Fuwa, I., Okuda, J.: *J. Biochem.*, **59**, 95, 1966.
- [3] Rokugawa, K., Katon, Y., Kuninaka, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1455, 1975.
- [4] Portier, C., Rapenbush, R. V., Thang, M. N., Grunberg Manago, M.: *Eur. J. Biochem.*, **40**, 77, 1973.
- [5] Letendre, C. H., Singer, M. F.: *Nucleic Acids Res.*, **2**, 149, 1975.
- [6] Wood, J. N., Hutchinson, D. W.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 219, 1976.
- [7] Hishinuma, F., Hirai, K., Sakaguchi, K.: *Eur. J. Biochem.*, **77**, 575, 1977.
- [8] Fitt, P. S., See, Y. P.: *Biochem. J.*, **116**, 309, 119, 517, 1970.
- [9] Portier, C., *FEBS Letter*, **50**, 79, 1975.
- [10] Portier, C.: *Eur. J. Biochem.*, **55**, 573, 1975.
- [11] Craine, J. E., Klee, C. B.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2923, 1976.
- [12] Michelson A. M. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **217**, 7—28, 1970.

(待续)

[本文于 1978 年 6 月 30 日收到]

钠钾 ATP 酶与阳离子主动运输*

王 理 开

(广州中山医学院生物化学教研组)

高等生物能维持体内环境的相对恒定。一般讲,细胞内液钠浓度低,钾浓度高;细胞外液钠浓度高,钾浓度低。如人心肌细胞内钾离子浓度为细胞外液的 38 倍,而钠离子浓度,外液为内液的 36 倍。这种离子分布的差异,是由于细胞膜不断将钠输出细胞外,将钾输入细胞内所致。这种逆电化学梯度地运输离子的过程是一耗能过程,通常称为一价阳离子主动运输,或称“钠钾泵”。

1957 年,Skoul 从蟹神经的微粒体组份中

发现了钠钾 ATP 酶,提出此酶可能与细胞膜的阳离子运输有关。此后对钠钾 ATP 酶的研究取得了不少的进展^[1-5],本文就钠钾 ATP 酶的研究作一简介。

一、钠钾 ATP 酶是阳离子主动运输机构的证据

1. 凡具有钠钾离子运输系统的生物组织都

* 中国科学院上海生物化学研究所林其谁同志给予热情指导,谨致衷心感谢。