

多核苷酸磷酸化酶及其应用(下)

——关于应用的研究

刘新垣 谌章群 陈常庆

(中国科学院上海生物化学研究所二室)

人们对于多核苷酸磷酸化酶(PNPase)的巨大兴趣,并非由于它在体内的生理意义(这方面还不清楚),而在于它的广泛应用及其所作出贡献。例如 Nirenberg 和 Ochoa 等应用 PNPase 研究遗传密码及其阅读方向,因此获得诺贝尔奖金。仅此即足以说明 PNPase 在应用方面的卓越贡献。这些细节过去已有报道^[13,14],不拟赘述。近十年来 PNPase 又对核酸人工合成、RNA 结构分析、以及合成具有生物功能的 poly N 等方面作出了重大的贡献,现就这几方面作些介绍。

一、PNPase 用于核酸的人工合成

PNPase 是人工合成六核苷酸的重要工具酶之一,下面谈四点。

1. 利用引物与盐浓度进行控制加成

这方面的工作,一般用 *M. luteus* PNPase 来进行,因为这个 PNPase 往往有引物依赖性,只有在有引物时才有聚合作用,故可排除自身聚合,当有引物时,底物只加到引物上面,但合成产物的链长则随引物及盐浓度而异。

引物对聚合反应的影响,前已叙述。当引物浓度很高时,合成方式大部分为非连续性(即随机方式),反应很慢;当引物大于底物浓度时,只加一个或几个底物分子到引物上面去,利用这个特点,便可进行控制性加成。P. Leder 等用此法加一个或几个核苷酸到引物 NpN 上面去,分离出只加一个底物分子者,因而获得了 ApApC 等十四个三联体密码子,对解决一部分三联体密码子的顺序编排作出了贡献。P. Leder 等所用底物与引物之比为 1 (或 0.5),反应液中

不含 NaCl。H. Schettters 等使用底物与引物之比为 0.5,并加 NaCl 至 0.15 M 在合成三联体反密码子的类似物时,产率似乎比 P. Leder 等略有提高。

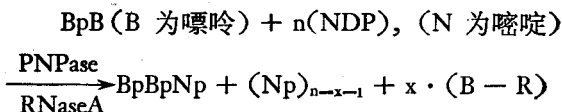
盐(如 NaCl)对聚合产物分子量的影响是 R. E. Thach 和 P. Doty 发现的。盐的浓度增大,使 poly N 与 PNPase 的亲合力降低,因而 poly N 从酶分子上掉下来,终止了链的继续增长,使链的重平衡进行得更快,故合成产物的链短。选择一定的盐浓度以及底物和引物的比例关系,可使有控制地加几个底物到引物分子上去,从中分离获得所需链长的产品。O. C. Uhlenbeck 等选择 NaCl 浓度为 0.6 M、底物(UDP)与引物(A₆Cm)之比为 30,获得了 A₆CmU₆,这是一种发夹型结构,如

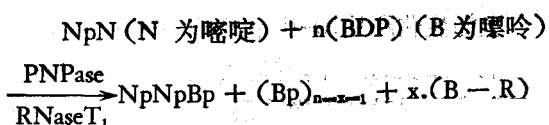


其 T_m 值随 C 的数目而不同,当 m 为 6 时, T_m 最高(20℃)。J. Gralla 等还对其自由能的变化作了研究。当需要同时加几个相同核苷酸到引物上时,此方法有其方便之处。

2. 利用 RNase 与 PNPase 协同作用在引物上接长一个核苷酸

很多工作,如上述三联体密码的合成及下面要谈到的 CpUpCpG > p 的合成,只需在引物上加一个核苷酸即可。此时利用 RNase 与 PNPase 协同作用,可获得较高产率,其原理如下:





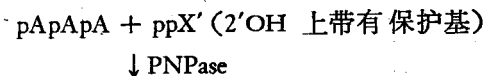
现以 UpU 为引物,以 GDP 为底物稍作说明。当 UpU 被 PNPase 加上一个 G 生成 UpUG 时, RNaseT₁ 不能作用;当加了一个以上的 G 生成 UpUpGp, Gp_n 时,则 RNaseT₁ 可在箭头处将 G 切下来,最后只留下 UpUpGp 作为唯一产物,引物利用得很充分,没有浪费,故一般产率很高,可达 75—95%。这方面工作最早是 R. E. Thach 开始的,1967 年安藤俊夫^[15] 对此作了详细的研究报道,合成了很多三、四核苷酸,其中 ApGpUp 及 CpApGp 的产率达 95%。R. E. Thach 还用此法合成了起始密码子 ApUpGp,以及用 MPase、RNase 与 PNPase 协同或交替作用的办法,合成了 AUG(U) 15, AUGG(U) 13, ACGG(U) 15, AUGG(U) 23, UAGG(U) 16, AAGG(U) 15, AAUG(U) 15, AACG(U) 15 等产物,再用它们作为 mRNA 去进行翻译,对密码的阅读方法作了说明。

1973—1974 年上海生化所用类似方法合成了 CpUpGpCpG > p^[16], 这是在两个酶共同作用下合成的第一个末端为环状磷酸的产物。过去用 RNaseT₁ 与 PNPase 协同作用不易得到末端为环状磷酸的产物,因为 RNaseT₁ 易使 G > p 开环变为 Gp, 上海生化所采用 RNase N₁ 与 PNPase 协同作用获得了成功。国外作者用 RNaseT₁ 与 PNPase 合成 oligoN 时,常在 pH 8.2—9.0 的条件下进行,但将此条件用于 RNase N₁ 与 PNPase 协同作用中没有成功,这是因为 RNase N₁ 与 RNaseT₁ 不同,在 pH 8.2 以上,其活力已降到最低,故不能把接到引物上的 G 切下来,因而得不到 CpUpCpG > p (或者极少)。但采用 PNPase 降解 oligoN 的最适条件 (pH 7.5—7.6) 却获得成功,而且产率很高,这是因为上海生化所采用了过量的 GDP 去与 pi 竞争 PNPase 的活力中心,并适当地调节了 RNase N₁ 与 PNPase 的比例关系。经不断改进, CpUpCpGp 与 CpUpCpG > p 的总产率达到了 83%。

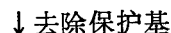
3. 利用 2'OH 保护的 NDP 进行单一加成

前面两个方法,均有其特点,如需同时加一个或几个相同核苷酸到任何引物上面去,宜采用引物与盐的浓度控制链长法;如只需把一个核苷酸接到仅含嘌呤(或嘧啶)的引物上面去,则宜采用 RNase 与 PNPase 协同用法。但如果要把不同几个核苷酸加到任何一种 oligoN 引物上面去,则需 PNPase 用 2'OH 保护的 NDP 进行单一加成法。这个方法是由 J. K. Mackey, P. T. Gilham 及 G. Kaufman 等两个实验室分别创造的。

产生这个想法的原因是他们发现 PNPase 对底物的要求并不严格,糖的部分略加修改仍可作为底物^[17,18],而在 dADP 与核糖六核苷酸共聚时,只能加上 1—2 个 dADP,他们从中得到启示,将 2'或 3'OH 进行保护,可能只加一个底物分子到引物上面去,第一次产物在除掉所用的保护基后,又可作为引物再用。如此反复,则可逐步将几个不同核苷酸加到引物上面去,其原理如下:



pApApAX' (由于 X' 的 2'OH 带有保护基,故不能再作引物,不能接受新的核苷酸)



pApApAXOH (保护基已去除,又可作为引物接受新的核苷酸)

这里最重要的一个问题是选择适当的保护基,它需要满足如下三个条件:(1)保护基不太大或太小,太大则空间障碍可能影响 PNPase 的作用,如太小 PNPase 还可继续合成;(2)被修饰的 NDP 在酶反应条件下稳定,不致脱落下来;(3)保护基需要易于除去,在一轮反应结束后需除去保护基时,只用温和条件处理即可,不致引起产物降解。根据以上要求,目前已选择下面几种保护基(表 5)。这些保护基,原来不知加在何处有效,后来证明,需加在 2'OH 才有效,而加在 3'OH 处时,PNPase 完全不能作用。

用此方法, G. Kaufman 等(1973)合成了

CCCUCU, UUUGAA, UUUGAGA, 达到七核苷酸水平,但此法目前还不完善,其中主要的问题是要选择好的保护基(注:异戊酰基并不算最好的保护基)和适当的反应条件。

表 5 单一加成法所用 NDP 的保护基

作 者	保 护 基	去保护基的条件
J. K. Mackey 和 P. T. Gilham	$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ (\alpha\text{-甲氧基乙基}) \end{array}$	pH2, 15
G. Kaufman 等	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CHCH}_2\text{CO}- \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$ (异戊酰基)	50%, 甲醇饱和 NH ₃ 37℃, 2-3 小时
Y. Kikuchi 等	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH} \text{ (反式肉桂} \\ \parallel \text{酰基)} \text{ (要求反} \\ \text{式或顺式} \\ \text{HC}-\text{CO}- \text{作者} \\ \text{未指出)} \end{array}$	浓氨水:甲醇=1:1 37℃, 1 小时
M. Ikehara 等	$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2- \text{(硝基} \\ \text{苄基)} \end{array}$	300 瓦高压汞灯光 照 2 小时

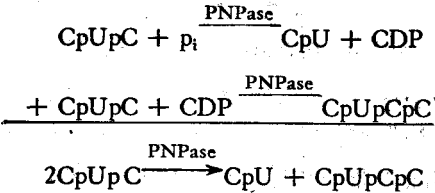
上海生化所用 α -甲氧基乙基保护 NDP 进行了单一加成的工作,并对反应条件作了研究,发现合成条件对产率影响很大(见表 6)。在合成 CUCU 等物质时,一般用 37℃, pH8—9, 底物与引物之比为 3, 酶的浓度为 26 单位/毫升, 但用此条件合成 CUCG 则产率极低。由表 6 可见,合成 CUCG 需要高温(59℃)、高 pH(pH 10)、高酶浓度(69 单位/毫升), 底物与引物之比也高(为 10),还需要用 Mn²⁺ 代替 Mg²⁺, 满足了这些条件, 则合成 CUCG 的副反应小(转核苷酸作用小),产率高(75%), 这些与 GDP 聚合的最适条件很相似^[19]。

所谓转核苷酸作用是 M. F. Singer 等首先报道的, 1973 年上海生化所也证实这种现象, 当用 CpUpCpG 加 ppU^{Me} 时, 如果条件掌握不好, 结果出现大量 CpUpC 及 CpUpCpGpG,

表 6 反应条件对 CUCG 产率的影响

实验次数	反 应 条 件							得 率 %	副反应消耗 的引物%
	引物 CUC (μmole 毫升)	ppG ^{Me} (2', 3' 混合物) (μmole /毫升)	Mn ²⁺ (μmole 毫升)	PNPase 用量(单位/ 毫升)	pH	温度 (t℃)	时间 (小时)		
1	2	6	10	24	8—9	37	7	6.7	13.3
2	2	6	10	24	8—9	37	7	3.3	15.0
3	2	6	10	26	9	58	4	33.0	<5
4	2	6	10	26	9	57	4	34.5	5
5	3	20	20	69	10	59	4	75.0	
6	4	22	20	71	10	59	4	63.0	7.8

甚至还有 CpUpCpGpGpG, 当时曾提出一个设想, 即转核苷酸是由于 p_i 的存在产生磷酸解所引起, 可用下式说明:



个系统可使反应系统中所有的 p_i 变成有机磷 (IR + p_i $\xrightarrow{\text{磷酸化酶}}$ HX + 1-p-ribose, HX $\xrightarrow{\text{氧化酶}}$ 尿酸), 但实验效果表明, 这样的酶系虽可减轻转核苷酸作用, 但还不能根除, 这可能是反应体系还不完善, 也可能是转核苷酸作用并不完全是由磷酸解反应所引起的。

4. 用 PNPase 合成脱氧六核苷酸

PNPase 能将 dADP 加到核糖 oligo N 引物上面去, 早有报道, 经 S. Gillam 等(1974)及 J. Y. Chou (1971) 两个实验室的研究, 发现 PNPase 既可将 4 种 dNDP 加到核糖 oligo N 引物上, 也可将 4 种 dNDP 加到脱氧核糖 oligo N 上面去, 而且如果条件适当, 可以人工地控制

主要只加一个或主要只加两个核苷酸到引物上面去。此外,核糖 NDP 也可加到脱氧核糖 oligo N 引物上面去, dADP 也可与 ADP 共聚。上海生化所也做了一点这方面的工作,用 $GC^mI\psi$ 作为引物,加底物 GDP 并加适量 dCDP 控制 GDP 的加成。结果发现,除有高聚物外,还分离得到约 10% 产率的七聚物,其中 $GC^mI\psi GGG$ 与 $GC^mI\psi GGGC$ 之比约为 8:2,若以 CUC 为引物,产率还略高一些。

关于这方面工作,最近 S. Gillam 等(1977)实验室取得了重大进展他们从 d(pTTAG) 开始,逐步加 1 个或 2 个脱氧核苷酸,合成了 iso-1-cytochrom C 基因的一段顺序——13 脱氧核苷酸 d(pTTAGCAGAACCGG)。这项工作有两方面重要性:(1)有可能利用 PNPase 与 DNA 连接酶相结合,完全用酶促法合成各种基因;(2)有可能重新促进 PNPase 用单一加成法合成核糖 oligo N。此法近来进展不大,主要是选择保护基反应条件不当,如果选择适当,取得进展,也可能利用 PNPase 与 RNA 连接酶相结合,完全用酶促法合成各种六及多聚核苷酸。

二、PNPase 用于结构分析

PNPase 用于结构分析是 1967 年 Holley 等开始的^[20],七十年代有新的进展。

1. 利用 PNPase 的磷酸解作用分析六或多核苷酸的结构

PNPase 在磷酸的存在下,可以降解六或多核苷酸,其降解属于外切酶性质,从 3' OH 端开始,逐个将核苷酸依次降解下来,生成 NDP,它的磷酸解作用分连续与非连续两种方式,两者都能用于结构分析,但分析的目的各有不同。

利用 PNPase 磷酸解的非连续性(即随机性),可以分析 oligo N 的排列顺序。G. Kaufman 等(1973)用以分析了六个 oligo N 的 3' 端排列顺序(其中最长一个为 12 核苷酸)。例如,用 PNPase 降解一个 oligo N 不同时间分离测定出现的 NDP,根据所得结果(如图 4),即可知道此 oligo N 为 CCCUCA, (CCC 由碱水解测定,因此 PNPase 不能再水解了)。如果

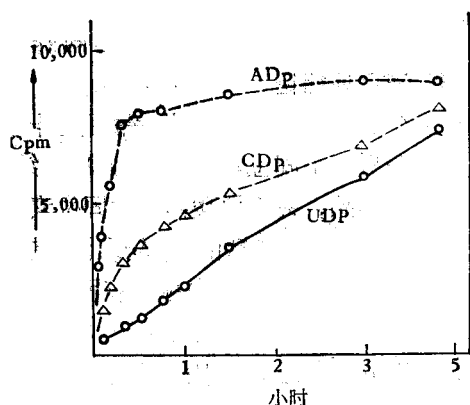


图 4 PNPase 降解 CCCUCA 的速度

存在同位素 $^{32}P_i$,则可生成带 ^{32}P 的 NDP,可大大提高灵敏度,一个不带同位素的六核苷酸,分析其 3' 端三个核苷酸的排列顺序,只需 0.005A₂₆₀ 的样品量就够了。这是很灵敏的方法,但分析某些能自我形成氢键配对的六核苷酸较为困难。虽然分析 3' 末端几个核苷酸较为灵敏方便,但分析六核苷酸的全部排列顺序则较为繁难。

PNPase 降解的连续性虽然不能用以准确地测定排列顺序,但加大酶量,使酶分子数目大于底物分子数目,则每个底物分子都可与酶分子接触,都可被 PNPase 分子同时(或同步)地、随机地进行降解,这也可以叫做同步连续降解。U. Z. Littauer 等利用这种作用方式分析了兔血红蛋白 mRNA 的结构,发现 poly A 在其 3' 端平均链长为 149 个 A。这个方法由于酶的用量极大,故 PNPase 中不能污染 RNase,否则得不到正确结果。此外,不加大酶量,利用 PNPase 的连续降解性质,也可用于 RNA 的结构分析。M. N. Thang 等(1971)用 PNPase 分析了 tRNA,发现 tRNA 的结构有两类,一类为 PNPase 敏感型(S-型),一类为 PNPase 阻抗型(R-型),S-型 tRNA 几乎可被 PNPase 100% 地降解,而 R-型 tRNA 则完全不被水解,连末端—CCA 也切不下来,每一种特异性 tRNA 都表现这两类构型。抗 PNPase 降解的原因还不清楚,很可能是由于 tRNA 的三级结构所引起,而非二级结构之故,因为二级结构不能完全抗

PNPase 而只影响 PNPase 的降解速度。

2. 利用 RNase 与 PNPase 协同作用对 oligo N 进行外标记

常量分析一个 tRNA 结构,需用数十毫克样品,而分析一个同位素标记的 tRNA 结构,只需微克量样品,关于核酸样品的同位素标记可分为:外标记法,内标记法,转录法(其实属于外标记法),但有些样品内标记有困难,有些样品缺乏模板不能转录,故外标记就成为很重要的同位素分析方法。5' 端外标记用多核苷酸激酶, RNA 3' 端的外标记,化学方法一般是用过碘酸氧化后,再用各种同位素物质加以标记,现介绍用 RNase 与 PNPase 协同作用,对 oligoN 的 3' 端进行外标记法,其原理如下:

RNase T₁ 产物如 CpUpCpGp $\xrightarrow{\text{MPase}}$ CpUpCpG
($\alpha - ^{32}\text{p}$)-NDP
PNPase + RNaseT₁ $\rightarrow$ CpUpCpG³²p, 其机制是先生成
CpUpCpG³²p, N³²p, N³²p, ..., 然后用 RNase T₁ 在
箭头处切断,生成 CpUpCpG³²p, 对 RNaseA 酶
解产物进行 3' 端的外标记原理与此相同。

RNaseA 产物如 ApApApCp $\xrightarrow{\text{MPase}}$ ApApApC
($\alpha - ^{32}\text{p}$)-NDP
PNPase + RNaseA $\rightarrow$ ApApApC³²p。Szeto 和 Söll 用此

法将 RNase 水解产物进行 3' 端³²p 标记,然后用牛脾二酯酶进行部分酶解,则可解决其排列顺序。M. E. Kimbal, K. S. Szeto 和 D. Söll^[21] 在解决 Mycoplasma Sp (Kid) tRNA^{phe} 的全部结构时,此法曾作出了有益的贡献。

3. 用 PNPase 与化学法结合在 3' 端进行磷酸化

5' 端磷酸化用多核苷酸激酶, 3' 端磷酸化可用 RNase 与 PNPase 协同作用来进行,此法虽也方便,但由于 RNase 对核酸有水解作用,其普遍性受到一定限制, W. Wintermeyer 和 H. G. Zachou (1970) 发现 tRNA 的 7-甲基鸟核苷酸处很易断裂并生成 3'-磷酸末端, DNA 结构快速分析法利用了这个特点。根据上述经验,王等及 A. M. Maxam 用 PNPase 将 m⁷GDP

聚合到引物 CpUpCpOH 上面,经消除 7-甲鸟核苷酸后,得到 CpUpCp, 这样 3'OH 被磷酸化了,如用 $\alpha - ^{32}\text{p}$ 的 m⁷GDP 作为底物,则可得 3'-³²p 标记的产物 CpUpC³²p, 是否可以利用这个反应发展成为 3'端³²p 标记的新方法,在分析与合成上得到普遍应用呢? 这点在研究之中,估计引物的专一性不太大,如 CpCpA 也可磷酸化,对一般小片段的,问题也不会太大,能否用于较大的片段呢? 决定的因素是需要采取温和的条件进行消除反应,以便所需 3' 磷酸化对象 oligo N 3'OH, 不致发生键的移位或断裂。

三、用 PNPase 合成具有生物

功能的 poly N

poly N 作为 mRNA 也是一种生物功能,其贡献前面已经提到了。除生物功能性 poly N 外, PNPase 所合成的 poly N 对 RNA 的空间构型及溶液构型,对很多有关核酸酶的研究,如 RNase, Aminoacyl-tRNA 合成酶, RNA 复制酶, 反向转录酶等等,都起了很重要的作用,不再赘述。

1967 年 A. K. Field (1968) 发现, 双链 poly I:poly C 是非常好的干扰素诱导物,能干扰多种病毒的生长,由于病毒性疾病缺乏良好的治疗药物,而当时干扰素的生产和应用又很困难,故这个发现引起了很大的震动,希望从这里能找到一个治疗病毒性疾病的良好方法,因此对 poly I:poly C 的作用原理、药理、毒性,对病毒性疾病的治疗等,进行了大量的细胞及动物试验。除对 poly I:poly C 本身的链长与疗效及毒性的关系作了很多工作外,还合成了各式各样的 poly N, 如磷酸基团的硫代、糖的取代、碱基的改变,文献之多,远远超过 PNPase 本身的酶学研究。poly N 除能用于诱导产生干扰素外,有些 poly N 还能抑制反向转录酶,此酶在肿瘤的发生上有很大的作用,因此最近几年又合成了大量能抑制反向转录酶的 poly N,以期对克服肿瘤有所裨益。上述这些方面的文献很多,非短短的篇幅所能概括的,需要时拟另文

综述。

自1967年Field等发现poly I:poly C能诱导干扰素以来,其最大的贡献之一是用于超诱导产生了大量的人纤维母细胞干扰素^[22],这使干扰素在临床上大量应用有了可能,并已取得很大进展^[23]。poly I:poly C本身在临床上也作了不少尝试,但至今尚未在临床正式应用上获得良好的效果。主要问题是药物制备,剂量以及用药方式方法等等不够妥当之故。1969年,我们着手从事干扰素治疗肿瘤的研究,因当时得不到可供使用的干扰素,便先从干扰素诱导物入手,合成了poly I:poly C,1970年用于动物试验,发现poly I:poly C对小鼠实体肿瘤L₁₂₁₀有抑制作用,在病毒性疾病治疗上也与其他同志作了一些工作,但以后因客观缘故而中断,1976年我们又重新兼顾这项工作,在合成方法上作了一些改进,获得了较好的产品,并在临床进行了试用,患者每隔2天左右肌肉注射0.5—1.0毫克,未发现任何毒性反应,用于慢性迁延性肝炎近100例,获得较好效果。详情另文发表。鉴于干扰素已成功地用于治疗骨髓肉瘤^[22],

我们也想用poly I:poly C治疗肿瘤患者作一些探索。

撰写此文时承王德宝教授的指导与修改,承王启松、姜艳春等同志的各种帮助与指正,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [13] Nirenberg, M. W. et al.: Informational Macromolecules, p. 451, Academic Press New York, 1963.
- [14] Ochoa, S.: Ibid, p. 437.
- [15] 安藤俊夫:《蛋白质,核酸,酵素》,12, 954, 1967.
- [16] 中国科学院上海生物化学研究所二室:《生物化学与生物物理学报》,1978年,第10卷,第二期.
- [17] Rottman, F.: Biochemistry, 7, 2634, 1968.
- [18] Zmudzka, B. et al.: Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 895, 1969.
- [19] Thang, M. N.: Biochem. Biophys. Acta, 108, 125, 1965.
- [20] Madison, J. T. et al.: Biochem. Biophys. Acta, 145, 825, 1967.
- [21] Kimbal, M. E. et al.: Ibid, 1, 1721, 1974.
- [22] Billiau, A. et al.: Viral, 19, 1, 1973.
- [23] J. Infect. dis. 1976, June, Suppl., 干扰素专题讨论会.

[本文于1978年6月30日收到]

休克尔分子轨道法与药物作用*

翁 元 凯

(南京药学院物理化学教研组)

随着数学、物理学的迅速发展以及它们对药学学科的渗透,药物研究逐渐由过去的宏观状态步入微观结构(原子、分子)的新层次。近十余年来,分子轨道理论结合高速电子计算机的使用,使设计制造指定疗效的药物、逐渐成为现实。通过这种分子水平的研究,有可能定量地阐明药物的化学结构与药物疗效间的关系,因而在实践上将有助于解决多种重大疾病的防治。

寻找新药、以往多采用“尝试法”,即将一个具有一定生物活性的化合物作为母体,进行各

种化学反应,合成一系列衍生物,经过生物试验,从中找出有医疗用途的药物,这种方法的命中率较低,一般约在 10^{-4} ^[1],从微观结构水平阐明药物的作用原理,就有可能很大地提高寻找有效药物的几率。

药物研究进入微观领域,近年来尽管进展迅速,但对于阐明药物作用的基本规律、药物的定量构效关系等重大理论问题来说,还只是一个开端。要提高这种研究的水平,必须继续付

* 本文曾于南京药学院1977年科学报告会上宣读,并经修改。