

- [5] Howry, D. H.: *Ultrasonnd in Biology and Medicine* (E. Kelly, ed.), Waverly Press, Baltimore, p. 49, 1957.
- [6] 长沙工学院情报资料室:《计算机图形显示综述》, 1975,10。
- [7] Levitt, D. G.: *Biophys. J.* **13**, 186, 1973.
- [8] Macey, R. I. and Wadzinski, L. T. *Computers in Life Science Research*. p. 29, (Edited by. William Siler), Plenum Press, 1975.
- [9] P. 亨德森主编, 上海生物化学所等译《生物学与人类未来》, 第 321 页, 科学出版社, 1977 年。
- [10] Ledley, R. S. *Comput. Biol. Med.*, **6**, 239, 1976.
- [11] Preston, K. Jr: *Computer*, **9**, 54, 1976.
- [12] Janksch, W. and Kazner, E (ed): *Cranial. Computerized Tomography*, Springer-Verlag, 1976.
- [13] 谷口庆治、川端信賢、尾崎弘: 电子通讯学会论文志, Vol. J. 59—C. No. 1, p15 1976.
- [14] Prewitt, J. M. S: *Adv. Computers*, **12**, 285, 1972.

【本文于 1978 年 6 月 10 日收到】

信使核糖核酸的核苷酸序列分析

魏 西 平

(中国科学院生物物理研究所)

核酸是重要的遗传物质。信使核糖核酸 (mRNA)* 从 DNA 转录生物遗传信息, 并将此信息翻译成蛋白质。测定 mRNA 的核苷酸排列顺序是研究结构功能关系的基础。近年, 越来越多的学者致力于测定 mRNA 的一级结构, 目前已有了一定进展。现仅就 mRNA 的一般特性、纯化方法和核苷酸序列分析技术作一简单介绍。

一、mRNA 的一般特性

细胞中信使核糖核酸占核糖核酸总量的百分之三到五, 分子量一般为 $0.5-2 \times 10^6$ 道尔顿。其寿命较短, 可能是多核苷酸磷酸化酶“终止”它的寿命。在细胞核中, 依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶以 DNA 为模板转录出 mRNA 的前体, 又在酶促作用下, 于 mRNA 前体的 3' 端加上多聚腺苷酸 (poly A), 经过选择性降解, 最后形成成熟 mRNA, 进入细胞质。

mRNA 的主要生物功能是与核糖体结合合成蛋白质。任何蛋白质的氨基酸排列顺序都是

由其基因——DNA 碱基排列顺序决定的, 这信息是通过 mRNA 从 DNA 传递到蛋白质,

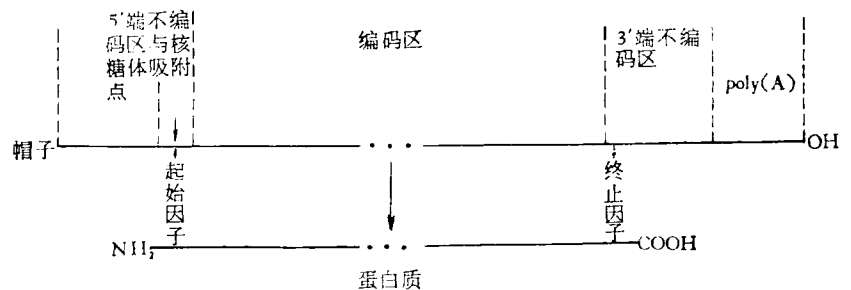


图 1 mRNA 分子的结构示意图

mRNA 分子上密码区的碱基排列决定了蛋白质的氨基酸排列。

可将 mRNA 分子分为三个部分, 中间部分是蛋白质编码区, 链的两端分别为 3' 端不编

* 缩写注释

mRNA	信使核糖核酸
DNA	脱氧核糖核酸
dNTP	某一种脱氧核糖核苷三磷酸
rNTP	某一种核糖核苷三磷酸
A	腺苷
G	鸟苷
C	胞苷
T	胸腺嘧啶核苷
poly(A)	多聚腺苷酸
oligo(dT)	寡聚胸腺嘧啶核苷酸
oligo(U)	寡聚尿苷酸

表 1 mRNA 分子的 5'末端结构

结 构	mRNA 来源	文 献
m ⁷ G(5')ppp(5')A _p	疱疹性口炎病毒 VSU	Abraham (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')A _{mp}	HeLa 细胞	Wei and Moss (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')A _{mp} A _p	鼠骨髓瘤	Adams (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')A _{mp} C _{mp} U _p	Novikoff	Rottman (1974)
m ⁷ G(5')ppp(5')A _{mp} C _p	鼠骨髓瘤	Adams (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')A _{mp} G _p	细胞质多角体病毒	Furuichi (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')C _{mp}	HeLa 细胞	Furuichi (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')C _{mp} C _p	鼠骨髓瘤	Adams (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _p	烟草斑纹病毒	Zimmern (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp}	牛痘病毒	Urushibara (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp}	HeLa 细胞	Wei (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp} A _p	鼠骨髓瘤	Adams and Cory (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp} C _p	鼠骨髓瘤	Adams and Cory (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp} G _p	鼠骨髓瘤	Adams and Cory (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp} U _{mp} C _p	鼠骨髓瘤	Adams and Cory (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')G _{mp} U _p	鼠骨髓瘤	Adams and Cory (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')U _{mp}	HeLa 细胞	Furuichi (1975)
m ⁷ G(5')ppp(5')GUAUUAUAUAG	Brome 镶嵌式病毒 RNA ₄	Dasgupta (1975)

引自 Harris. B «methods in cancer research»Vol. XIII p. 102)

码区和 5' 端不编码区, 见图 1。合成蛋白质的起始密码子位于 5' 端不编码区内, 很多 mRNA 在 5' 末端还有一特殊的“帽子”结构, 它就是第七位上甲基化的鸟嘌呤核苷酸, 见表 1; 终止密码子位于 3' 端不编码区, 绝大多数 mRNA 在 3' 末端有 poly (A) 结构。poly (A) 和“帽子”结构引起了很多学者的兴趣, 但至今其生物功能仍不十分清楚, 尚待进一步阐明。

二、mRNA 的纯化

因细胞中 mRNA 含量少, 寿命短, 制备适于序列分析纯的材料有一定困难。

七十年代中期逐渐改进了纯化方法, 提纯了一些 mRNA 制剂, 如表 2 所示。

下面介绍纯化技术的几个要点:

1. 选材适当

有些特化的组织或器官, 主要合成某种专一蛋白, 因此单一 mRNA 含量丰富, 便于提纯。例如, 生蛋期母鸡输卵管腺细胞合成的卵清蛋白占其蛋白合成总量的百分之六十, 药物造成贫血的家兔网织红细胞所合成的蛋白, 百分之九十都是珠蛋白, 五龄后期蚕后丝腺几乎只合成丝心蛋白…, 这些材料是提取单一

mRNA 的好材料。

2. 利用 mRNA 结构特征进行纯化

mRNA 分子的 3' 末端有多聚腺苷酸, 能够与多聚脱氧胸腺嘧啶核苷酸 [oligo(dT)] 或多聚尿苷酸 [oligo (U)] 形成碱基配对。利用这一特性, 先将 oligo (dT) 或 oligo (U) 挂在纤维素树脂上, 含有 mRNA 的溶液流经纤维素柱时, oligo (dT) 或 oligo (U) 则与 mRNA 分子的 3' 端 poly (A) 形成碱基配对, 使 mRNA 吸附在柱上, 而其它核酸不会被柱吸附, 从而达到纯化的目的。

同样, 微孔滤纸和微晶纤维素也能选择性吸附 mRNA, 因此也常被使用。

3. 免疫技术

这一技术用于从混合 mRNA 中提取单一 mRNA。原理是 ①制备高纯度蛋白, 可分别获得抗原和抗体。②制备混合聚核糖体 (其中包括合成抗原的聚核糖体)。③在体外使抗体蛋白与混合聚核糖体反应, 因抗体与抗原可以有特异性沉淀反应, 收集沉淀则可获得单一抗原的聚核糖体。④从单一聚核糖体分离单一 mRNA。目前已有直接免疫沉淀技术, 双抗体技术, 以及间接免疫亲和层析。

表 2 部分真核 mRNA 的纯化

mRNA 对应的蛋白质	分子量 $\times 10^{-4}$	材 料	mRNA S 值	分子量 $\times 10^{-5}$	碱基数	纯度%	文 献
白蛋白	6.37	鼠 肝	18	7—9		>90	Taylor (1976)
酪蛋白 α_1	2	绵羊母乳腺		3.7		>5—80	Houdebine (1976)
酪蛋白	2.5	鼠母乳腺	12	3.2		>90	Rosen (1976)
酪蛋白	3.0 4.6	鼠母乳腺	15	4.5		>90	Rosen (1976)
δ -晶蛋白	5.0	鸡 胚	17	6.8	2200		Zerenka (1976)
A_2 - α 晶蛋白	2.0	鸡 胚	14	3.6	1200		Bloemendal (1973)
丝心蛋白	17	蚕	47		1600	>95	Greene (1975)
珠蛋白	1.6	兔	9	2	630	>90	Lebleu (1974)
组蛋白 H-1	2	海拉细胞		2.4	720		Bos (1976)
组蛋白 H-2a, H2b, H-3	1.5	海拉细胞		1.6—1.8	480—550		Bos (1976)
组蛋白 H-4	1.1	海拉细胞		1.4	420		Bos (1976)
组蛋白 H-5	2.1	鸡 胚	10			100	Scatt (1976)
免疫球蛋白 L 链 (λ)		骨髓瘤	13—14	4	1150	100	Honjo (1976)
免疫球蛋白 L 链	2.37	骨髓瘤	14	3.8			Mach (1973)
免疫球蛋白 H 链	5.3	骨髓瘤	16—17				Premkumar (1974)
角蛋白	1.0	鸡 胚	12	2.5	800		Kemp (1974)
α -乳蛋白	2.25	鼠母乳腺	10.5			85	Chakrabarty (1977)
乳蛋白	2.5	人 胎 盘	12—13	3	1000		McWilliams (1977)
肌球蛋白 H 链	20	鸡 胚	26				Strohmman (1977)
卵清蛋白	4.3	鸡输卵管	16	6.5	1890 $\pm$ 180	>99	Woo (1975)
精蛋白	0.5	鱼 精 腺	6		165—170	100	Gedama (1976)
RuDP 羧化酶 1.5	5.5	单 胞 藻	18	8		100	Sano (1977)

(引自佐野浩“蛋白质、核酸、酵素”, Vol. 22, No. 12, 1977)

表 3 从混合核糖核酸中分离 mRNA 的方法

方 法	吸 附	洗 脱	文 献
微孔滤纸	吸附缓冲液: 0.5 M KCl-0.01 M tris-HCl (pH7.6)-0.001 M MgCl ₂	在 0.5% SDS-tris-0.1 M (pH9.0) 缓冲液中振荡	Brawerman et al. (1972) Rosenfeld et al. (1972)
poly (U) 纤维玻璃过滤器	吸附缓冲液: 0.12 M NaCl-0.01 M tris-HCl (pH7.6)	在 45°C 下用 50% 的甲酰胺(缓冲液) 0.5% SDS-0.01 M tris (pH7.4) 洗脱	Sheldon et al. (1972) Singer (1972)
poly (U) Sepharose 柱层析	吸附缓冲液: 0.1 M NaCl-0.01 M tris-HCl (pH7.4)-0.01 M EDTA 0.2% SDS	90% 甲酰胺-0.01 M EDTA-0.01 M -tris (pH7.5)-0.2% SDS	Adesnik et al. (1972)
oligo (dT) 柱层析	高盐缓冲液(0.5 M KCl-0.01 M tris-HCl pH7.5) 中吸附	低盐缓冲液 (0.01 M tris-HCl pH7.5) 或水中洗脱	Aviv and Leder (1972) Edmonds et al. (1971)
Sepharose 4B 柱层析	能将 mRNA 与 DNA, 4S rRNA 18S rRNA, 28S rRNA 分开	在 3°C 时展开, 洗脱 0.1 M NaAc-0.001 M EDTA pH5.0	Woo et al. (1975)
凝胶电泳	a. 4% 聚丙烯酰胺电泳 (99% 甲酰胺)	b. 2% agarose 凝胶 (0.025 M 柠檬酸-6 M 尿素 pH3.5)	Boedtker et al. (1973) Woo et al. (1975)

(引自 Harris, B.: «Methods in cancer research», Vol. XIII, p. 102)

提纯的一般过程通常分为两步。首先, 用冷酚法或超速离心法, 或梯度离心等方法从细胞质中抽提总核糖核酸(或聚核糖体)。之后从

总核糖核酸(或聚核糖体)中分离 mRNA, 可用免疫法, 微孔滤纸过滤, 微晶纤维素柱层析, oligo (dT) [或 oligo(U)] 纤维素柱层析, 密度

梯度离心,以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等等方法。见表 3。

最后,必须用聚丙烯酰胺凝胶电泳确定样品均一性,在体外蛋白合成体系检测 mRNA 生物活性

三、mRNA 序列分析方法和 序列分析研究概况

(一) mRNA 序列分析方法

目前,研究 mRNA 序列最常用的方法是复本法,即将 mRNA 反转录成一互补 DNA (cDNA),再用 DNA 序列分析新技术研究其一级结构。反转录能合成不同长度的 cDNA,如果得到短片段(链长为 100—200 个核苷酸),可直接分析序列,如果得到长片段,则必须用不同方法(如化学法,酶促降解等)将其降解成适宜长度,经分离后,分别测其序列。最后,将两种情况所得到的短片段各自首尾相接,排成一列,从每种排列都可推知 mRNA 的完整序列。

现现就序列分析的几步关键,分述如下:

1. mRNA 反转录合成 cDNA

体外反转录 mRNA 的反应是以 mRNA 为模板,首先,使引物与模板的特定部位杂交,再以四种脱氧核苷三磷酸(其中一种用 ^{32}P 将 α 位标记)为底物,在反转录酶作用下,形成一条与模板链-mRNA 互补标记的 DNA。引物延伸而合成的 cDNA 长度与反应条件有关(如底物浓度,酶浓度等)。

经常用的反转录酶(依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶)是从禽类或髓细胞白血病病者 (AMV) 中提取的。大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 在一定条件下也具有较高的反转录活性,也可用它来合成 cDNA。

引物有二种来源,既可分离生物来源的 DNA 特定片段,又可用化学合成制备。近年来由于人工合成核酸技术的发展,已广泛用化学合成的片段作引物。常用的 3' 端合成引物有 oligo (dT)₁₂₋₁₈ 或 oligo (dT)_{10-x-y} (x 常为 G, y 常为 C 或 A)。3' 端引物的选择是根据 mRNA

分子上与 poly (A) 相邻的核苷酸性质而定。5' 端引物选用与 5' 端已知序列呈碱基配对的人工合成寡聚物,曾用过 d(G-C-A-C-C-A) 或 d(G-C-A-C-C-A-T-T) 等。

2. 降解合成的 cDNA

目前 DNA 序列分析技术只能测定有限长度的片段,如经反转录合成的 cDNA 超过这种长度,则必须首先将其切成适宜长度。酶促降解主要包括由非特异性内切酶,如胰脱氧核糖核酸酶,大肠菌脱氧核糖核酸酶,水解产生短片段。由特异性内切酶(最常用的是内切酶 IV)水解产生特异性 DNA 短片段。用限制性内切酶水解产生双链 DNA 短片段。目前已发现数种 II 型限制性内切酶,它们能识别不同的 4—6 核苷酸顺序,合理搭配使用位点专一的不同的限制性内切酶,可将 DNA 分子降解成 30—200 个核苷酸长的片段,以便分析序列。

3. 分离 cDNA 短片段

将 cDNA 降解成短片段后,须经分离才能分析序列。另外,从合成 cDNA 到序列分析的各个步骤,都会遇到反应后分离样品的问题。

(1) 凝胶电泳

① 琼脂糖凝胶电泳 对于分离大小相差很大的 DNA 片段混合物特别有效。

② 聚丙烯酰胺凝胶电泳 链长在 1,000—5,000 个碱基对的双链 DNA 片段,用 2% 的凝胶电泳分离。500—1,000 个,可用 4—5% 凝胶分离。10—200 个,可用 8—12% 凝胶分离。7M 尿素酸性凝胶可用来分离 1—100 个核苷酸的片段。用浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶能显著改善分子量相差很大的 DNA 片段的分离效果。

(2) 双向同系层析(分离 1—50 个核苷酸的片段,这一系统既能按链长,又能按碱基分离寡聚物,对 DNA 脱嘌呤后的嘧啶片段的序列研究特别有效。

另外还有双向聚乙烯胺 (PIE) 纤维素层析(分离 1—15 个核苷酸的片段)和双向电泳(分离 1—8 个核苷酸的片段)等分离系统。

4. cDNA 短片段(链长为 100—200 个核苷酸)的序列分析方法

在此只介绍应用广泛的几个最新技术。

(1) 化学断裂法(Maxam 和 Gilbert, 1977)^[1]

利用四组不同的化学反应,在末端有 ^{32}P 标记的 DNA (单链或双链)上专一的破坏一种碱基,使 DNA 链部分地断裂,以形成一系列在该碱基重复出现部位断开的,长短不一的带 ^{32}P 标记末端的 DNA 片段。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中,这些片段根据大小依次被分离,并显示出该碱基在链上断裂的位置。分别对腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶,胸腺嘧啶专一反应的化学裂解产物,同时做凝胶电泳,就可以从放射自显影的电泳图谱直接读出各个碱基在 DNA 链上的排列顺序。这四组不同化学反应是:

① 强 G/弱 A 断裂 用硫酸二甲酯处理 DNA 时,鸟苷的第七位氮和腺苷的第三位氮将被甲基化,并进而脱去嘌呤,再用 0.1M 的碱处理,则糖与相邻的磷酸根脱开。由于鸟苷甲基化反应速度是腺苷的 5 倍,因此会形成强 G/弱 A 的断裂。

② 强 A 断裂 由于甲基化腺苷的糖苷键不如甲基化鸟苷键稳定,用稀酸处理甲基化的 DNA 链,可优先从链上释放 A,使链的断裂点发生在 A 的位置上。

③ C 和 T 的断裂 胍是嘧啶的特异性试剂,胍与嘧啶反应形成核糖酰尿素,再进一步与胍反应形成脲。标记 DNA 先在 20℃ 用 15—18M 胍的水溶液处理,再用杂环己胺处理置换掉糖与胍的反应产物,同时催化 β 消去反应,使 DNA 链断开,则形成 C 和 T 暗度相似的带。

④ C 断裂 胍化反应时加 2MNaCl,则优先抑制 T 与胍的反应,经氮杂环己胺处理的断裂发生在 C 的位置。

目前,化学断裂法的分辨率仅受凝胶电泳分辨率的限制,在 40 公分长的凝胶上,可以测出从标记端开始约 100 个碱基的序列。

(2) 加减法 (Sanger, 1975)^[2]

全部反应分二步进行(见图 2)。第一步以单链 DNA 为模板,用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 合成 DNA。使引物延伸不同长度;反应终止后,转移到“加”系统和“减”系统继续第二步反

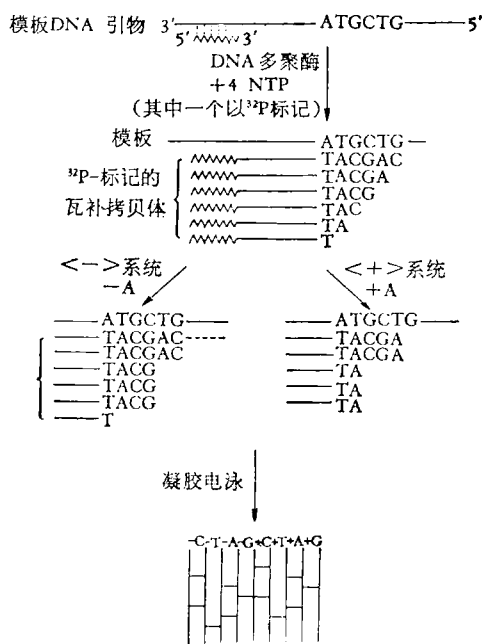


图 2 加减法原理图

应。在“减”系统中,加入三种脱氧核苷三磷酸[依次缺少某一特定的 dNTP,如 $\langle -\text{A} \rangle$ 则是缺少 dATP]和 DNA 聚合酶 I,则继续链的合成反应,当合成的 DNA 片段延伸到最初需要 dATP 位置时,反应终止。因此由 $\langle -\text{A} \rangle$ 系统得到的 DNA 片段 3'末端的下一个核苷酸应该都是 A。“加”反应系统中,加入一种 dNTP [如加入 dATP 则表示成 $\langle +\text{A} \rangle$ 系统]和 T_4 DNA 聚合酶,这酶从 3'末端降解双链 DNA,直至和加入的 dNTP 一样的核苷酸位置时,反应终止。“加,减”系统一共有 8 组,在聚丙烯酰胺凝胶板的 8 个平行板条上同时电泳,作放射自显影测定。首先找出最小的片段区带,如属于 $\langle -\text{T} \rangle$ 系统,则可以确定这个片段的 3'末端下一个核苷一定为 T,推知多一个核苷酸的片段一定在 $\langle +\text{T} \rangle$ 系统中出现,然后去找和 $\langle +\text{T} \rangle$ 系统区带移动度一致的区带,如是 $\langle -\text{A} \rangle$ 系统,说明再大一点的 DNA 片段的 3'末端排列为 A。因此,由小片段的区带到大片段的区带,通过“加、减”系统的对应,而定出核苷酸排列顺序。

(3) 加减法在 mRNA 序列分析上的应用 (Brownlee 和 Cartwright 1977)^[3]

Brownlee 和 Cartwright 用 Sanger 加减法测鸡卵清蛋白 mRNA 序列时,将方法略加改进而建立了一个直接用于 mRNA 序列测定的方法。与加减法原理相同,但操作细节有差别(见图 3)。

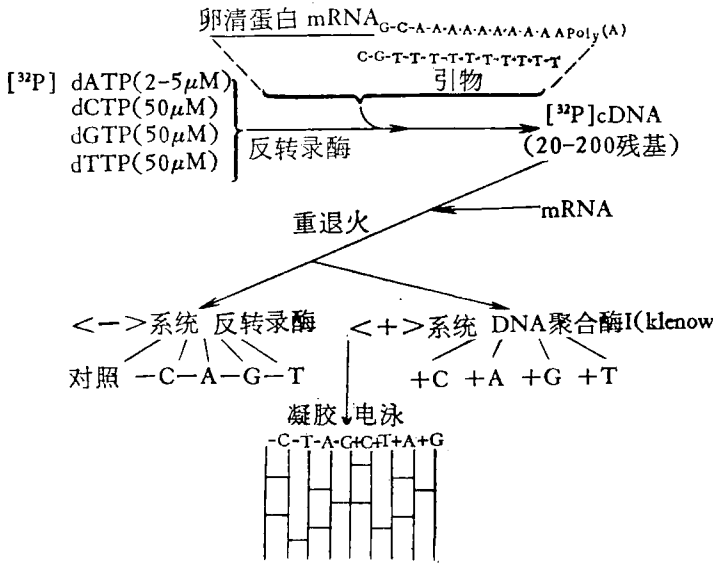


图 3 改进的加减法原理图

方法的最大优点是能够测出成串的核苷酸重复数目,很少出现放射自显影图上区带的缺失。故一次能够测量近 200 个核苷酸的排列顺序,是目前 mRNA 序列测定最常用的方法(见表 4)。

(4) 用酶的末端抑制剂测定序列 (Sanger, 1977)^[4]

Sanger 研究 ϕ X174 序列时,用链的末端抑制剂建立了比加减法更为简单快速的 DNA 序列分析新技术。用的抑制剂是 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸或阿拉伯糖核苷三磷酸。以 DNA 为模板用 DNA 聚合酶 I 延伸引物时,抑制剂与正常底物脱氧核苷三磷酸一样,也能掺入到 DNA 链中,一旦掺入即刻抑制了 DNA 聚合酶 I 继续延伸该链的作用。反应分四组平行进行,每组反应的底物采用四种脱氧核苷三磷酸,其中按比例混有一种双脱氧核苷三磷酸。每组反应的结果都会得到一套长短不同的 DNA 混合产物、其 5'端相同,3'末端都以该组加入的双脱氧

核苷三磷酸为结尾。四组反应的产物在聚丙烯酰胺凝胶的平行板条上同时电泳,就可以放射自显影区带图谱上直读 DNA 序列。方法简单,结果准确,一次能够测 15—300 个核苷酸序列。

5. cDNA 小片段(链长为10—20个核苷酸)的序列分析方法

(1) 如部分酶促降解及同层析指纹图谱法^[5],脱嘌呤分析^[6],毗邻分析^[7]等。

(2) mRNA 序列研究概况

近年来,由于 DNA 序列分析技术有了重大突破,以及新技术的广泛应用,不仅加快了 DNA 序列研究的步伐,而且也推动了 mRNA 序列研究的发展。突出的例子是近年完成了三个真核细胞——家兔 β -珠蛋白 mRNA,人 β -珠蛋白 mRNA,以及鸡卵清蛋白 mRNA 的全序列测定。

家兔 β -珠蛋白 mRNA 全序列的测定主要是两个实验室几乎同时独立完成的。英国剑桥医学研究委员会分子生物学实验室的 Baralle^[9] 测定了 5'端不编码区序列。Proadfoot 测定了 3'端不编码区序列^[10]和部分编码区序列^[11]。美国哈佛大学生物学实验室的 Efstratiadis 和 Kafatos 独立完成了 mRNA 的全序列测定。他们的结果完全一致。人 β -珠蛋白 mRNA 的全序列测定是二个实验室用不同方法完成的。美国 Marotte 等^[12]用反转录酶先将 mRNA 反转录成 cDNA,再用大肠杆菌 RNA 聚合酶将 cDNA 转录成 cRNA,通过测定 cDNA, cRNA, 以及 ¹²⁵I-mRNA 的序列,完成了接近全长的序列。英国的 Baralle^[13] 也用 Brownlee 改进的加减法测定了 5'不编码区序列。1978 年英国剑桥医学研究委员会分子生物学实验室的 L. McCreynord 等^[14]发表了鸡卵清蛋白 mRNA 1859 个核苷酸(不包括 5'末端“帽”子和 3'末端多聚腺苷酸在内)全序列排列结果。他们的工作是首先合成和分离一个几乎是

表 4 真核细胞 mRNA 序列研究概况

mRNA		已 测 序 列	测定方法	文 献
家兔 β -珠蛋白 mRNA	全 序 列	全序列(576个核苷酸)	化学断裂法	美 Efstratiadis (1977)
		5',3' 不编码区序列,部分编码区序列	Brownlee 改进的加减法	英 Proudfoot (1977, 1976)
		5' 不编码区序列	Brownlee 改进的加减法	英 Baralle (1977)
		5' 不编码区部分序列	用已知序列建立直接测 mRNA 序列的方法	美 Reymond (1978)
人 β -珠蛋白 mRNA	全 序 列	编码区序列(440个核苷酸) 3'端不编 码区序列(132个核苷酸)	测 cDNA, cRNA, 125 I- mRNA 序列	美 Marotta (1977)
		5' 端不编码区序列(50个核苷酸)	Brownlee 改进的加减法	英 Baralle (1977)
鸡卵清蛋白 mRNA	全 序 列	3' 端不编码区序列(75个核苷酸)	Brownlee 改进的加减法 化学断裂法	中 程振起(1976)
		3' 端不编码区序列(76-191个核苷酸) 全序列(1859个核苷酸)		英 Brownlee (1977) 英 McReynold (1978)
红鲱鱼精蛋白 mRNA		全序列接近完成		加拿大 Dixon
家兔 α -珠蛋白 mRNA		3' 端不编码区序列(89个核苷酸) 5' 端不编码区序列(36个核苷酸) 编码区序列(100多个核苷酸)	Brownlee 改进的加减法	英 Baralle (1977)
人 α -珠蛋白 mRNA		3' 不编码区序列(100多个核苷酸)	Brownlee 改进的加减法	Seid-Aknavan (1976)
		3' 不编码区序列(100多个核苷酸)	Brownlee 改进的加减法	英 Baralle (1977)
		3' 不编码区序列(37个核苷酸) 编码区序列(24个核苷酸)		
鼠免疫球蛋白轻链 mRNA		3' 端不编码区序列 编码区部分序列		Hamlyn (1977) 英 Milstein, 中程振起(1976)
鼠免疫球蛋白重链 mRNA		编码区部分序列 不编码区部分序列		英 Cowan (1976)
鸡珠蛋白 mRNA		部分序列		Crawford (1977)
人的 HCS mRNA		3' 不编码区部分序列 编码区部分序列	化学断裂法	加拿大 Peter (1977)
蚕白丝心蛋白 mRNA		部 分 序 列		日 本
Lela 细胞组蛋白 mRNA		5' 端部分序列		Melli (1977)
海胆胚 mRNA		5' 端部分序列		Surry (1976)
鼠骨髓瘤 mRNA		5' 端部分序列		adams (1975)

mRNA 全长的双链 DNA 复本,接着用 poly (A)/poly (T) 接尾嵌入 PM13, 质体在大肠杆菌中进行无性繁殖,再对质体进行筛选求得插入序列的大小,最后选择含有约 1,850 个核苷酸的卵清蛋白 mRNA 最长的无性系 (POV 230),用 Maxam 和 Gilbert 的化学断裂法测定序列。在此,还要指出的是我国程振起同志在英国剑桥医学研究委员会分子生物学实验室,完成了鸡卵清蛋白 mRNA 3' 端不编码区 75 个核苷酸的序列分析工作,第一个发表了关于鸡卵清蛋白 mRNA 的序列研究结果^[15]。

另外,大量 mRNA 的序列研究正在进行中,见表 4。有些,如鱼精蛋白 mRNA^[16],家兔 α -珠蛋白 mRNA,人 α 珠蛋白 mRNA^[13],序列研究接近完成。很多 mRNA 的部分序列研究成果正不断涌现。

总之,目前生化工作者对 mRNA 全序列的认识还刚刚开始,需要研究多种 mRNA 的全序列,才有可能充分了解 mRNA 的结构功能关系。这就要求我们摸索更为有效的材料纯化途径,以便能够简便、快速地提取 mRNA 的纯制剂。把 mRNA 反转录成 cDNA 的序列分析

技术与重组 DNA 纯系培养技术相结合有广阔的应用前途。序列分析技术也应在实践中不断发展, 希望有核苷酸序列分析仪代替人的繁重劳动。

研究核酸一级结构应与研究核酸空间结构, 核酸功能, 人工合成核酸, 基因调控、基因工程等密切配合, 既可促进这些研究课题的发展, 也将为核酸序列研究的发展开辟更为广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Maxam, A. M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **74**, 2, 560, 1977.
[2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **94**, 441, 1975.
[3] Brownlee, G. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **114**, 93,

1977.
[4] Sanger, F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **74**, 12, 5463, 1977.
[5] Galibert, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **87**, 377, 1974.
[6] Ling, V.: *J. Mol. Biol.*, **64**, 87, 1972.
[7] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **90**, 315, 1974.
[8] Efstratiadis, A. et al.: *Cell*, **10**, 4, 571, 1977.
[9] Baralle, F. E.: *Cell*, **10**, 4, 549, 1977.
[10] Proudfoot, N. J.: *Cell*, **10**, 4, 559, 1977.
[11] Proudfoot, N. J.: *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1811, 1976.
[12] Marotte, C. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 14, 5019, 1977.
[13] Baralle, F. E.: *Cell*, **12**, 1085, 1977.
[14] Mereynord, L. et al.: *Nature*, **273**, 5665, 723, 1978.
[15] Cheng, C. C.: *J. Mol. Biol.*, **107**, 527, 1976.
[16] Dixon, G. H. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **479**, 460, 1977.

[本文于 1978 年 7 月 5 日收到]

科技简讯

人血清肌红蛋白的放射免疫测定 ——急性心肌梗死早期诊断

急性心肌梗死时血清中肌红蛋白 (Myoglobin, 简写 Mb) 最早升高, 因此可作为诊断急性心肌梗死早期指标之一。放射免疫法 (RIA) 是现有测定血清 Mb 最灵敏、快速、简便的方法。

用新鲜人肌肉经硫酸铵分步沉淀和 DEAE-纤维素离子交换柱层析进一步纯化, 经鉴定得到 Mb 的纯品。用此纯品免疫家兔在三月内得到活度、滴度符合 RIA 要求的抗血清。参照 Bolton 和 Hunter 的方法合成 3-(4-羟基苯) 丙酸 N-羧琥珀酰亚胺酯, 以联接法用 ^{125}I 标记 Mb, 得到比活度为 20—30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 的 ^{125}I -Mb。

为了符合快速诊断的要求, 主要用 37℃ 短温育 (3 $\frac{1}{2}$ 小时) 的方法, 用硫酸铵沉淀法分离 B、F。

根据交叉反应实验、回收实验、血清稀释曲线、健全性实验, 样品测定值的变异系数及最低检出值等说明方法的特异性、准确度、重复性和灵敏度都符合要求。

初步测得 94 例正常人 Mb 值的范围为 2—78 ng/ml 血清, 参考国外文献暂定 85 ng/ml 为正常值的上限。5 例急性心肌梗死病例的血清 Mb 都明显升高 (150—600 ng/ml 以上)

最近的实验结果说明温育时间可缩短为 2 小时以更快得出结果。现正准备 Mb—RIA 的药箱工作。全文将另行刊登。

(生物物理研究所、宋兰芝供稿)

小 资 料

抗 体 的 多 样 性

用人工培育的免疫球蛋白 Kappa 链基因进行的研究表明, 免疫球蛋白基因的组织情况和结构有三个重要方面:

(1) 多个可变基因在产生免疫球蛋白的细胞以及胚胎细胞的基因组内是分别编码的, 从而建立了免疫球蛋白多样性的进化基础;

(2) 这些可变基因, 以许多紧密相关的亚类形式存在, 每一类各有共同的类似序列;

(3) 比较同类可变基因繁衍所得的两个经过人工培育的可变基因片段, 揭示出它们具有与固定基因 (即珠蛋白) 显著不同的结构特点, 并可通过周围大量的类似序列成为基因之间发生重组作用的大目标, 表明一种简单的重组机理, 可能是可变基因在胚胎细胞和体细胞系中遗传不稳定性的原因。

(摘自 “Science”, **202**, p. 11, 1978.)