

neurons were diverse obviously and revealed a variety of mode in discharge. When absolute value of polarization current was lesser than 1.0 nA, the relation of $I-V$ in NCNs was more significant ($r = 0.96$) and the rectification insignificant; when the polarization current larger than 1.0 nA, the rectification occurred on both ends of the curve and then $I-V$ curve showed S-type. The rectification of somatic NCNs was much significant than non-nociceptive ones (NNCNs). R_m , τ and C_m of the NCNs were evidently larger than those of NNCNs ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The materials obtained indicated that

morphology and structural of cell membrane, volume of the soma between NCNs and NNCNs might have meaningful differences. It also means that physiological functions were unlike. The specificity of the electrical parameters in cell membrane might provide experimental materials for specific theory of pain sensation. Reporting to investigate electrical properties (R_m , τ and C_m) of the membrane in primary cortical nociceptive neurons had not found in literatures.

Key words primary sensory cortex (SI), nociceptive neuron, intracellular record, cell membrane parameter

真核生物 mRNA 二级结构与内含子剪接

张 静

(云南大学统计系, 昆明 650091)

刘次全¹⁾

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 对 68 个外显子-内含子-外显子序列片段以及相应的外显子-外显子序列片段的二级结构进行分析后发现, 内含子 5' 端和 3' 端的碱基 G (剪接位点) 中大约 90% 位于二级结构的环区或是茎区的端部并靠近环, 而且位于环区的 G 也多靠近环的基部; 92% 的外显子拼接位点也有类似性质. 约 82% 的分枝点 A 位于环区或环与茎的连接部位. 折叠结构的形成使剪接位点和分枝点在空间上彼此靠近.

关键词 mRNA, 外显子, 内含子, 剪接位点, 分枝点, 二级结构

学科分类号 Q522.2

真核细胞中经转录得到的前体 mRNA, 还要经过一系列的加工过程才能成为合成蛋白质的直接模板, 其中一个重要的加工过程是内含子的剪接. 研究显示, 基因的调控表达很多是在 mRNA 水平上进行的, 内含子的可变剪接即是基因表达调控的一种重要方式^[1]. 因此, 研究内含子的剪接过程以及剪接的方式, 对于了解基因的调控表达具有重要的意义.

实验表明, 内含子两末端的碱基一般是恒定的, 即为 5'-GU...AG-3', 在内含子上游 10 到 50 个核苷之间 (有些在 100 个以上) 存在一个“分枝点” (branch point) A. 内含子的剪接过程包含两个转酯反应. 第一个转酯反应是由分枝点 A 的 2'-羟基进攻 5' 剪接位点 G 与其上游外显子之间的磷酸二酯键, 使磷酸二酯键断开, 释放出 5' 外显子, 并在 A 与 G 之间生成 2'-5' 磷酸二酯键的叉链, 形成一个马套 (lariat) 状中介物. 第二个转酯反应是 5' 外显子的 3'-羟基进攻内含子 3' 剪接位点 G 与其

下游外显子之间的磷酸二酯键, 使其断开, 同时上游的外显子与下游外显子拼接起来, 并释放出“马套”结构的内含子. 内含子的精确切除是在顺式作用元件与反式作用因子的特定相互作用下完成的, 从实验结果看, 这种特定的相互作用除了碱基序列的配对 (事实上, 由于 RNA 中存在大量的碱基错配现象, 所以不排除碱基错配的相互作用) 外, 似乎还涉及到空间结构, 例如酵母中参与外显子拼接的 U5 snRNA 的功能部分是一个保守的发夹环^[2]. 既然是相互作用, 那么反式作用因子的结构特性必然要求顺式元件具有相应的结构特性. 然而目前有关结构特性的研究主要集中在反式作用因子上, 对顺式元件结构的研究还不多见. 注意到 mRNA 分子在活细胞内以折叠形式存在, 于是我们考虑从 mRNA 折叠结构上对顺式元件的结构进行探究.

¹⁾ 云南大学现代生物学中心, 昆明 650091.

收稿日期: 1998-03-18, 修回日期: 1998-07-01

作者曾对内含子的二级结构进行过详细的分析, 发现了剪接位点的一些有意义的结构特征, 如内含子两末端的碱基 G 在二级结构中通常是游离的; 绝大多数分枝点 A 位于二级结构的环区等等^[3]. 这些结构特征与剪接过程的化学反应机制相吻合, 后一特征还有助于较准确地寻找分枝点. 在此基础上, 我们对内含子的剪接位点在 mRNA 二级结构中的分布做进一步的研究. 结果表明, 剪接位点在 mRNA 二级结构中的分布的确具有一定的规律, 亦即是说, 顺式元件也具有一定的结构特性.

1 方 法

1.1 我们从 GenBank 核酸数据库中随机挑选了包括啮齿类、灵长类和无脊椎动物的 32 个基因, 共 68 个内含子, 所选取的每个内含子序列的长度均不超过 190 个核苷酸. 选出的基因在 GenBank 中的 Locus 及所用内含子的序号见表 1 (注: 除增加了 HUMADH221 外, 其余均为文献 [3] 中所分析的样本). 然后再取出每个内含子两端的外显子序列, 与内含子序列一起组成“外显子-内含子-外显子”

表 1 分析 mRNA 二级结构与剪接位点所用基因在 GenBank 中的 Locus 及内含子序号

Locus	内含子序号	Locus	内含子序号	Locus	内含子序号
HUMADH221	1	GCRHBBA6	1, 2	HUMCPH70	2
MUSKAPG	2	HUMADREDB	11	HUMCRELA	2
RATRLCA23	3	HUMACT101	1	HUMCRYA1	1
MUSPO	1, 4, 5	HUMAPC3G	1	HUMCRYGBC	3
DROHOXNK3	1	ACAMHCA	2, 3	HUMCRYGQ3	1
DROSUWA	3, 5~7	HUMAPOC2	2	HUMCRYGQ5	1
DROH2AVDG	2	HUMAPRTA	2	HUMCS5	3
PLOHRP	1	DRONOTCH3	5, 7	HUMCSFGMA	1
ATRBIGLOP	1	HUMCFTRA06	2, 4, 8	ACAACO1	1
ATRINS	1	HUMACFXI09	9	ACAMYHCIB	3~22
GCRHBBA1	1, 2	HUMCFXI13	2, 4~9		

的序列片段. 由于我们所用的 RNA 二级结构预测程序 PCFOLD 只能折叠 425 个核苷酸的序列, 所以选取的外显子-内含子-外显子序列的碱基数不超过 425.

1.2 将 **1.1** 的外显子-内含子-外显子序列中的内含子去除, 余下由两个相邻外显子组成的序列片段 (外显子-外显子).

1.3 本研究的目的在于寻找剪接位点在 mRNA 二级结构中的位置分布特征, 故需要先确定内含子 5' 和 3' 剪接位点、分枝点在外显子-内含子-外显子序列中的位置. 5' 和 3' 剪接位点均由 GenBank 数据库给出; 内含子分枝点则按以下方法寻找: 在内含子 3' 末端 G 上游 10 到 50 个碱基范围内先搜索形如 $P_yUP_uAP_y$ (P_y 代表嘧啶碱基, P_u 代表嘌呤碱基, A 为分枝点) 的片段, 若无此种片段, 则找与它最接近的且与表 2 所列百分比比较符合的序列片段^[4], 当然, 这样找出的“A”只是可能的“分枝点”, 即只是预测的结果.

1.4 在微机上用 Zuker 的二级结构预测程序 PCFOLD 对所选出的 68 个外显子-内含子-外显子序

列以及相应的外显子-外显子序列进行折叠, 并用 Thompson 的二级结构作图程序 MOLECULE 画出二级结构图. 能量计算用的是 Turner 等^[5]于 1987 年提出的能量模型 (温度为 37°C). 所得二级结构是具有全局最小生成自由能的折叠结构^[6,7]

表 2 分枝点信号序列

位置	- 3	- 2	- 1	0	+ 1
(a)	C	U	G A	A	C
(b)					
A	1	0	39	99	11
C	76	8	15	1	45
G	2	0	42	0	6
U	21	91	4	0	38

(a) 契合序列; (b) 人、老鼠、鸡、植物和果蝇分支点序列中各位置核苷酸的百分比. 0 表示分枝点位置.

2 结 果

对所选的 68 个外显子-内含子-外显子序列以

及相应的外显子-外显子序列的二级结构进行分析, 得到如下结果:

2.1 内含子5'端和3'端的碱基G(剪接位点)中大约90%位于二级结构的环区或茎区的端部并靠

近环, 而且位于环区的G也多靠近环的基部. 关于3'剪接位点还有一个有趣的特征, 即其附近一般都有两个比较靠近的环, 且这两个环还比较大, 见图1和图2.

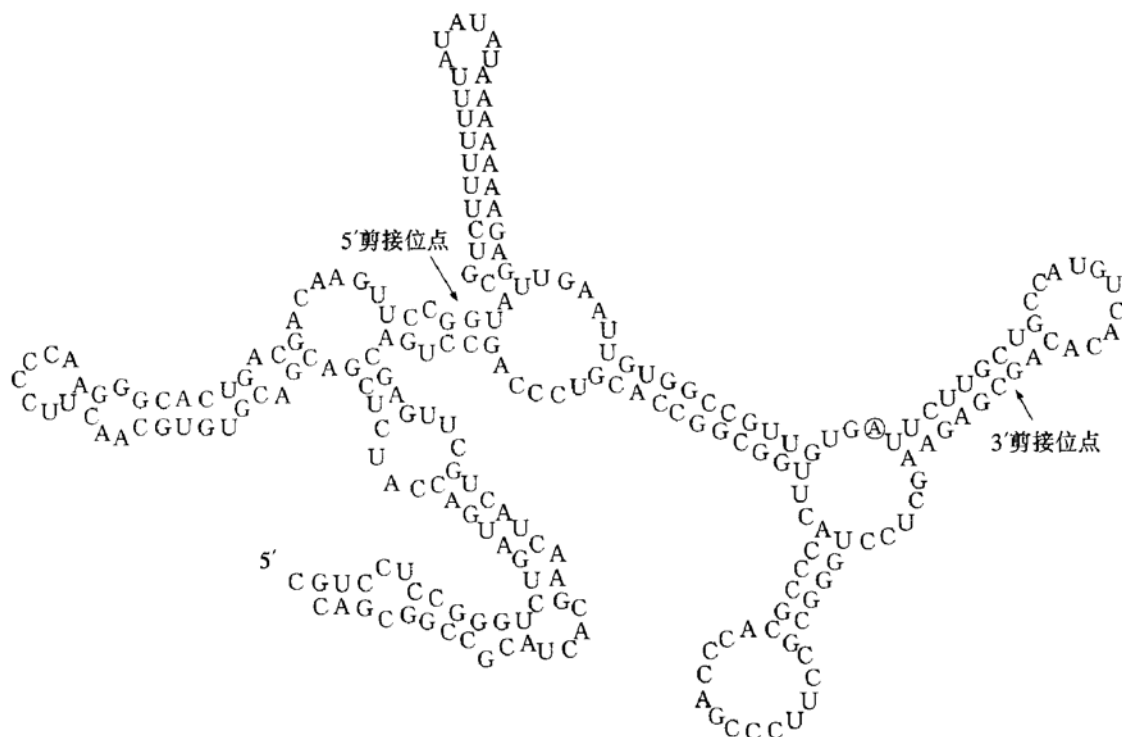


图1 *A. castellanii* myosin IB heavy chain gene (ACAMYHCIB) 外显子-内含子 (13) -外显子的二级结构

○标注的碱基为内含子的分枝点, 箭头所指位置为内含子剪接位点.

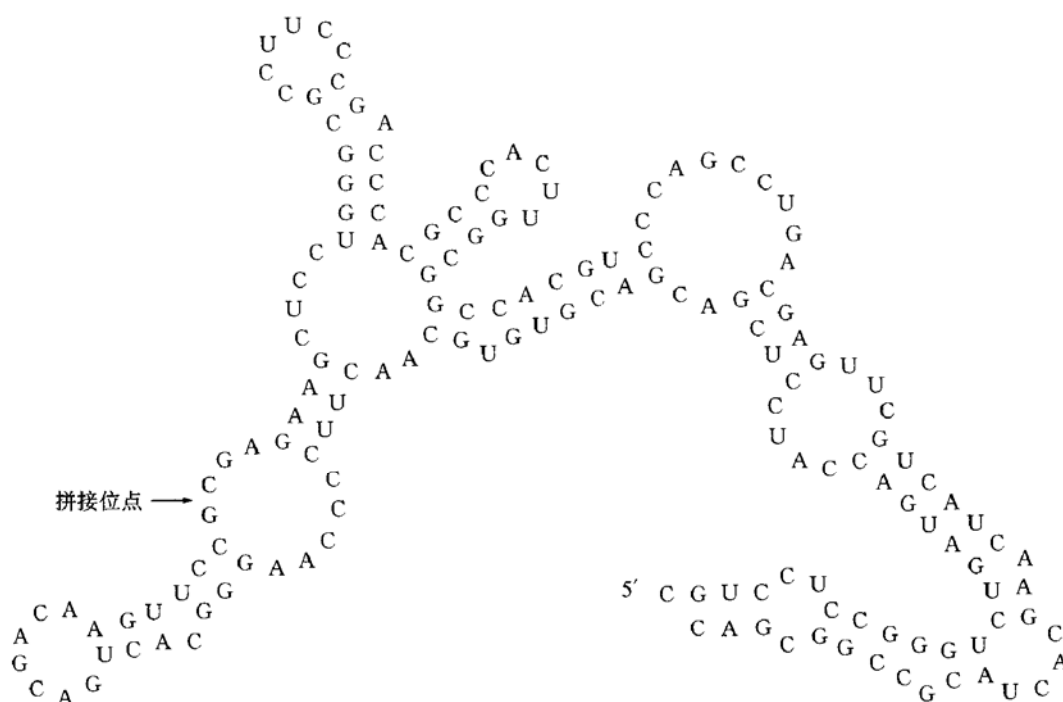


图2 *A. castellanii* myosin IB heavy chain gene 外显子 (13) -外显子 (14) 的二级结构

箭头所指位置为两个外显子的拼接位点.

of Statistics, Yunnan University, Kunming 650091, China); LIU Ci-Quan (Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China).

Abstract After analyzing the secondary structures of 68 exon-intron-exon and the corresponding exon-exon sequence segments, it is found that about 90% of 5' and 3' terminal bases G (splicing sites) of introns are situated in the loops of secondary structures or at the ends of stems near the loops, and most of "G"s in

loops are closed to the ends of loops. Approximately 92% of the connecting sites of the adjoining exons also show the similar features. About 82% of the branch point "A"s are situated in loops or at the ends of stems near the loops. Splicing sites and branch points approach each other in space because of the folding.

Key words mRNA, exon, intron, splicing site, branch point, secondary structure

多形核白细胞上嘌呤受体的初步研究*

陈 涉 聂玉生¹⁾ 胡坤生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 ATP和ADP能激活多型核白细胞引起细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的明显升高, AMP则无此作用. 多型核白细胞对ATP和ADP具有不同的浓度依赖性. 当细胞外的钙离子被螯合后, ATP和ADP仍能引起细胞内游离钙浓度的升高. 结果表明多形核白细胞存在着对ATP和ADP敏感的P2型嘌呤受体, 并且属于P2型受体中的P2Y亚类.

关键词 白细胞, 嘌呤受体, ATP, Ca^{2+}

学科分类号 Q26

细胞表面对嘌呤核苷化合物敏感的受体称为嘌呤受体. 嘌呤受体分为两大类: P1型受体和P2型受体^[1]. P1型受体对腺嘌呤核苷(AD)和腺嘌呤核苷一磷酸(AMP)敏感, 为一类与G蛋白相偶联的受体, 其信号转导途径伴有cAMP的生成; P2型受体则对ATP和ADP敏感, 可分为两个主要的亚类: P2X型和P2Y型. P2X型嘌呤受体为离子通道型受体, 与配体结合后发生膜的去极化, 使细胞外离子内流; P2Y型受体则与G蛋白相偶联, 与配体结合后激活磷酸肌醇信号通路, 最终使胞内钙离子浓度升高^[2]. P2型嘌呤受体广泛存在于各类组织细胞中, 并对其特定的生理功能起着非常重要的调节作用, 如血小板的凝聚, 胰腺细胞的分泌, 血管平滑肌的舒张, 前列腺素的合成等^[3]. 随着研究的深入, 在越来越多的细胞类型中发现了嘌呤受体. 然而对白细胞中的嘌呤受体的研究很少有报道. 在这里我们以细胞内的钙离子浓度为指标, 采用三种腺嘌呤核苷化合物ATP, ADP和AMP作为激活剂对猪多型核白细胞进行研究, 对其存在的嘌呤受体的类别作了初步分析.

1 材料与方法

1.1 试剂

ATP (adenosine 5'-triphosphate), ADP (adenosine 5'-diphosphate) 和 AMP (adenosine 5'-monophosphate) 购自Sigma公司. Fura-2/AM 购自中国医学科学院药物研究所. 样品制备和测量过程中均使用Hanks缓冲溶液 (pH7.2~7.6, Ca^{2+} 浓度约为1.3 mmol/L).

1.2 多型核白细胞的制备

多形核白细胞由新鲜猪血制得, 参照文献[4]上的方法并加以改进. 纯化后的细胞制成浓度为 1×10^7 个/ml的悬液, 经台盼蓝排斥实验检查细胞存活率达到95%以上.

1.3 Fura-2/AM的负载和荧光的检测

纯化后的多形核白细胞用终浓度为2 μ mol/L的 Ca^{2+} 荧光指示剂Fura-2/AM在37℃负载

* 国家科委试点基金.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-04-17, 修回日期: 1998-06-11