

## 重组 DNA 技术在神经科学中的应用\*

邹 冈

(中国科学院上海药物研究所)

重组 DNA 技术是生物工程的主要技术,它在神经科学研究中发挥着重要的作用,形成一个新的前沿——分子遗传神经科学。重组 DNA 技术主要包括四方面:(1)用限制性内切酶将 DNA 切割成特定的片段,(2)用核酸杂交钓出特定的 DNA 或 RNA 顺序,(3)DNA 克隆和扩增,(4)DNA 顺序测定,再根据三联密码推断蛋白质的氨基酸排列顺序,其速度远超过经典的蛋白质化学方法。换言之,重组 DNA 技术可以将特定的基因从基因库中分离开来,进行扩增或表达,并把蛋白质的语言转变为核酸的语言。通过这一技术许多神经功能找到了分子基础,另一方面又发现了许多神经系统特有的分子,但他们的功能尚待确定,这将推动了神经科学的不断前进。

本文试图从六个方面介绍这个领域的进展,重点介绍神经肽前体的研究。

### 一 神经肽前体的研究

神经肽前体大分子合成于核糖体,装入囊泡后在轴浆运输中被切割(翻译后加工)成活性片段——神经肽。用重组 DNA 技术研究神经肽前体结构的基本方法是:先提取细胞总 mRNA,经 Oligo-dt 纤维素柱分得 3'-多聚腺苷酸 mRNA,通过逆转录酶形成互补 DNA (cDNA)。将后者与质粒(plasmid)拼接然后转化受体菌(通常是大肠杆菌)制成 cDNA 库。将大肠杆菌的菌落转移到硝酸纤维滤纸上,变性后单链 cDNA 即固定在滤纸上。同时合成已知神经肽中兼并性最小片段的 DNA 探针,标记

后与上述单链 cDNA 杂交,钓出阳性克隆。测定阳性克隆 DNA 的核苷酸顺序,根据三联密码可以推断出前体大分子的氨基酸顺序。

以内阿片肽为例,继脑啡肽之后迅速发现了许多其他内阿片肽,通过重组 DNA 技术找到了三种前体,即前阿黑促皮原(pre-proopiome-lanocortin, pre-POMC)<sup>[1]</sup>、前脑啡肽原(pre-pro-enkephalin 又名 pre-proenkephalin A)<sup>[2]</sup>和前强啡肽原(pre-prodynorphin 又名 pre-proenkephalin B)<sup>[3]</sup>,绝大多数已知的内阿片肽是这三种前体的片段,从而弄清了它们的来龙去脉。这三种内阿片肽前体都含有 260 个左右氨基酸,N 端 18—25 个氨基酸组成“信号肽”,是核糖体根据 mRNA 指令首先合成的片段,当神经肽前体合成完毕后进入高尔基氏器时,信号肽部份即脱落,前神经肽原即变成为神经肽原,如前脑啡肽原即成为脑啡肽原(proenkephalin)。通过重组 DNA 技术弄清前体结构的神经肽已有十几种(表 1)。

在研究神经肽前体过程中有几个重要发现:

1 几种神经肽可以起源于同一前体。如 POMC 中的  $\beta$ -内啡肽、ACTH、 $\alpha$ MSH 及  $\beta$ -MSH, VIP 前体中的 VIP 和 PHM, P 物质前体中的 P 物质和 K 物质,提示它们功能上的联系。例如已知海兔袋细胞下卵激素(egg laying hormone)基因具有三种肽的密码(ELH,  $\alpha$  及  $\beta$ BCP),它们在下卵过程中起的作用是互相配

\* 曾在中国科学院第五次学部大会上报告。

表1 前体结构已阐明的神经肽

神经肽	文 献
$\beta$ -Endorphin/ACTH	<i>Nature</i> , 1979, <b>278</b> : 423. <i>Nucleic Acids Res.</i> , 1983, <b>11</b> : 8063.
Enkephalins	<i>Nature</i> , 1982, <b>295</b> : 202. <i>Nature</i> , 1982, <b>295</b> : 206. <i>Nature</i> , 1982, <b>295</b> : 663.
Dynorphin	<i>Nature</i> , 1982, <b>298</b> : 245.
Angiotensinogen	<i>PNAS USA</i> , 1980, <b>80</b> : 2196. <i>Biochemistry</i> , 1984, <b>23</b> : 3603.
Bradykinin	<i>PNAS USA</i> , 1983, <b>80</b> : 90.
CCK	<i>PNAS USA</i> , 1984, <b>81</b> : 4307. <i>PNAS USA</i> , 1984, <b>81</b> : 726.
CGRP	<i>Nature</i> , 1983, <b>304</b> : 129.
CRF	<i>Nature</i> , 1983, 301: 537.
ELH	<i>Cell</i> , 1983, <b>32</b> : 7.
GRF	<i>Nature</i> , 1983, <b>306</b> : 86. <i>PNAS USA</i> , 1983, <b>80</b> : 4311.
LHRH	<i>Nature</i> , 1984, <b>311</b> : 666.
Neuropeptide Y	<i>PNAS USA</i> , 1984, <b>81</b> : 4577.
Oxytocin/NP I	<i>Nature</i> , 1983, <b>302</b> : 342.
Vasopressin/NP II	<i>Nature</i> , 1982, <b>295</b> : 299.
Somatostatin	<i>PNAS USA</i> , 1982, <b>79</b> : 4575. <i>J Biol. Chem.</i> , 1983, <b>258</b> : 8781.
Substance P/Substance K	<i>Nature</i> , 1983, <b>306</b> : 32.

合协调一致的。

2 同一前体在不同组织中的后加工可以不同。如 POMC 在垂体前叶加工为 ACTH 和  $\beta$ -LPH, 在中叶加工为  $\alpha$ MSH 和  $\beta$ -内啡肽。POMC mRNA 在两种组织中表达的调控机制也不同, 如 CRH 和切除肾上腺增加垂体前叶 POMC mRNA 含量 10 倍, 皮质激素地塞美松则使之降低 30—50 倍, 这些处理并不影响中叶。反之, 垂体中叶受多巴胺能神经支配, 用多巴胺受体拮抗剂氟哌啶醇 (haloperidol) 则增加中叶 POMC mRNA 4—6 倍, 用激动剂 Ergocriptine 则降低 2—3 倍, 而这两种药物都不影响前叶 POMC mRNA 含量<sup>[4]</sup>。

3 发现新的神经肽。在前体大分子中发现一些片段是未知的, 如 POMC 中的 r-MSH<sup>[5]</sup>。寻找新的神经肽的经典方法是从大量生物组织中

去提取分离, 而且要有明确的生物检定模型配合, 由于新的未知的神经肽究竟有何作用并不清楚, 因此需要多种模型; 然而模型一多, 样品需要量也越多, 但分离到的肽量极少。近年来沿用经典方法发现新的神经肽数目越来越少。而用重组 DNA 技术却找到了许多新神经肽。例如降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)<sup>[6]</sup>。在研究大鼠甲状腺髓细胞瘤组织培养时发现降钙素产量高低不等, 有的由高变低。用降钙素前体 cDNA 与降钙素产量低的瘤株 mRNA 杂交, 钓出的是另外一种 mRNA, 比降钙素前体 mRNA 大 50—250 个核苷酸, 在试管中表达产生分子量为 16K 的蛋白。根据这一种 mRNA 得到的 cDNA 的核苷酸顺序推断有一个新的 37 肽。人工合成其中 15 肽作为抗原, 建立放射免疫及免疫组织化学, 发现正常情况下这种新肽——CGRP 只存在于脑内, 而降钙素只存在于甲状腺。但它们都来源同一基因, 只是在核非均一 RNA 加工时剪接成两个 5'-端相同的 mRNA。CGRP 在脑内的分布有特异性, 不同于任何已知的神经肽, 估计与摄食和痛觉调制有关, 从而发现了一个崭新的神经肽系统。

## 二 受体研究

N-胆碱受体已经提纯, 有五个亚基即  $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 。因分子量大, 只测得部份结构。采用重组 DNA 技术, 方法与研究神经肽前体相同, 得到了  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  亚基的 cDNA 克隆, 从而测出它们的全部一级结构<sup>[7-9]</sup>。这四种亚基的氨基酸顺序及亲水性很相似, 提示它们起源于同一个祖先基因。将这四种 cDNA 分别用猴 Simian virus 40 作为载体携带, 在爪蟾 (xenopus) 卵和 COS 猴细胞混合表达系统中产生 N-胆碱受体。去除任何一个亚基都会影响受体的功能, 但只是缺少  $\alpha$ -亚基才影响  $\alpha$ -银环蛇毒与受体的结合。人工改变亚基 cDNA 的某些核苷酸顺序 (site-directed mutation) 以改变表达的受体蛋白的结构, 就可以研究受体本身的结构与功能关系。

### 三 离子通道研究

除受体蛋白外,其他功能蛋白质如离子通道也正在用重组 DNA 技术研究之中。果蝇突变型 Shaker KS 133 在乙醚麻醉下全身摇晃。电生理研究发现其神经和肌肉都缺乏快钾离子通道 ( $I_A$ )。这种果蝇唾液腺染色体特定位置上有缺损,若断裂在临近部位则不出现上述现象。因此快钾离子通道蛋白的基因在此。目前正在克隆这一段基因<sup>[10]</sup>。

电压敏感性钠离子通道是研究得较多的离子通道,它有三个结合位点,第一个与河豚毒 (TTX) 结合,第二个与藜芦碱及箭毒蛙毒素 (BTX) 结合,第三个与蝎毒相结合。利用这些毒素作为标记,钠离子通道蛋白已经提纯。利用其中一小片段的氨基酸顺序合成相应的 DNA 探针,根据研究神经肽前体相同的战略,克隆到电鳗电器官的钠通道蛋白的 cDNA。这个蛋白共含有 1820 个氨基酸残基,其中共有四个重复顺序区(有 50% 以上氨基酸排列顺序相同),每一区域又可分为六个亚区。六个亚区中有两个具有疏水性是贯穿细胞膜的,两个亚区有负电荷,一个亚区带正电荷,另一个为中性<sup>[11]</sup>。

接下来应该做的工作是将这种 cDNA 转录成 mRNA,然后将 mRNA 注入爪蟾卵进行表达,看看钠通道是否会出现。另一项应该做的是寻找其他动物的钠通道蛋白的 cDNA,并与电鳗电器官的作比较。

### 四 原位杂交 (*In situ hybridization*)

#### 组织化学

利用神经肽的抗体作免疫组织化学可以定位神经肽,但只能看到神经末梢;要用秋水仙碱预先处理动物才能看到胞体。若用标记的 cDNA 与神经原 mRNA 进行原位杂交放射自显影,可以定位合成该神经肽的胞体。由于 cDNA 是克隆而来,其选择性远超过免疫组化。例如用 POMC 的 cDNA,可选择性地显示垂体中叶,而催乳素的 cDNA 则显示垂体前叶<sup>[12]</sup>。垂体前叶内的 POMC 细胞也可以明确地显示出

来。将原位杂交组织化学与免疫组织化学相结合,则可以同时看到胞体与末梢,如下丘脑 POMC 神经原的研究。利用原位杂交技术还可以研究海兔下卵激素 (egg laying hormone, ELH) 神经原的起源,即含有 ELH mRNA 神经原的起源,追踪到来自外胚层。

### 五 神经系统遗传性疾病基因定位

通常用表型多态性连锁分析进行基因定位,但这类多态性标志 (polymorphic marker) 数目有限,只能定 20% 的染色体位置。利用重组 DNA 技术制得基因组 DNA 库,从中选出无重复 DNA 顺序的片段标记后作为探针,与人类染色体限制性内切酶切下的片段杂交,根据各个杂交片段长短的多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 与遗传性疾病的连锁,结合细胞遗传学细胞融合方法,把疾病基因定位到特定的染色体上。RFLP 均匀分布在基因组所有组分上,估计 150—160 种标志就可以把所有基因定位到染色体上。进行性肌营养不良症基因已定位到 x 染色体短臂的中央。Huntington 氏舞蹈症是一种神经系统退化性疾病,虽然发病率不高,但往往在 30 岁以后才出现症状,这时已过了病人的生育年龄,很可能已把病变基因传给第二代,因此危害极大。最近利用 RFLP 已把病变基因定位到第 4 对染色体上,今后用更多的 DNA 克隆作为探针,可望进一步缩小基因定位范围和最终这种基因。这种方法也可以作为遗传性疾病早期诊断的手段<sup>[13]</sup>。

### 六 发现神经系统特有的蛋白质或肽类

先制备脑的多聚腺苷酸 mRNA,反转录为 cDNA,克隆后随机挑选 191 种与脑、肝、肾三个器官的 mRNA 杂交,发现 18% 在三个器官中均匀分布,26% 选择性分布二种器官,30% 只与脑 mRNA 杂交,其余 26% 不与任何组织的 mRNA 杂交。这最后一类说明 mRNA 表达得很少或分布很局限。按第三和第四类的 cDNA 的核苷酸顺序推断出的氨基酸顺序合成的肽作为抗原,制得抗体进行免疫组化研究,果然发现

了新的神经肽<sup>[14]</sup>。根据计算,脑特有的 mRNA 有 30,000 种,因此现在已知的神经肽 30 多种仅占一小部份,寻找新的神经肽还有极大的机会。同样,采用两种神经原 cDNA 互相杂交的战略,还可以研究某种神经原特有的蛋白质或肽。这些研究有极大的开创性意义。

总之,由于重组 DNA 技术的到来,神经科学又进入了一个新的蓬勃发展的阶段。要赶上日益更新的科学发展步伐,神经科学工作者必须学习和熟悉分子生物学,同时加速培养有两方面知识背景的新的一代神经科学工作者。

### 参 考 文 献

[1] Nakanishi, S. et al.: *Nature*, 278, 423, 1979.

- [2] Noda, M. et al.: *Nature*, 295, 202, 1982.  
[3] Comb, M. et al.: *Nature*, 295, 663, 1982.  
[4] Roberts, J. L. et al.: *Trends Neurosci.*, 5, 314, 1982.  
[5] Bloom, F. E. et al.: *Regulatory Peptides*, 1, 205, 1980.  
[6] Rosenfeld, M. G. et al.: *Nature*, 304, 129, 1983.  
[7] Noda, M. et al.: *Nature*, 299, 793, 1982.  
[8] Noda, M. et al.: *Nature*, 301, 251, 1983.  
[9] Noda, M. et al.: *Nature*, 305, 818, 1983.  
[10] Salkoff, L. and Wyman R.: *Trends Neurosci.*, 6, 128, 1983.  
[11] Noda, M. et al.: *Nature*, 312, 121, 1984.  
[12] Hudson, P. et al.: *Endocrinology*, 108, 353, 1981.  
[13] Gusella, J. et al.: *Nature*, 306, 234, 1983.  
[14] Milner, R. J., Sutcliffe J. G.: *Nucleic Acids Res.* 11, 5497, 1983.

[本文于 1984 年 12 月 6 日收到]

## 激光生物学的概况及展望

赵 白

(山东海洋学院物理系, 青岛市)

### 引 言

用描述无生命物质基本运动规律的物理学定律,是否能完整地阐明生命过程?还是生命过程中尚蕴藏着未知的基本定律?从现有的实验结果和分析看来,这个问题的解决,有可能从激光机理中得到启发。同时,目前激光生物学的探索和发展虽还处在实验及唯象理论阶段,但即使个别环节的突破,其应用成果也可能引起社会生产力的巨大变革。例如,国际上目前正利用选择性光化作用对 DNA 分子实现“剪裁”与“拼接”的研究。这类人工改造生物品种如能成功,无疑会揭开人工合成生命物质以及工厂制造“生物产品”这样一个“工程生物”时代的序幕。

光与生物分子的相互作用,一般说来可分为三个过程进行研究:(1)生物分子吸收激发的原初过程( $10^{-9}$ — $10^{-12}$ 秒);(2)吸收了光子的激活中心,其能量的弛豫过程( $10^{-7}$ — $10^{-13}$

秒),以及这一过程的化学变化与动力学性质;(3)构象弛豫过程( $10^{-3}$ — $10^{-8}$ 秒)及整个系统(细胞体或生物体)的生理反应。研究这些过程的主要目的之一,是从分子、亚分子和电子水平上探索生物大分子中的能量迁移和相互作用,以及化学变化的机制。要获得这些微观过程的信息,主要依靠光谱技术。其中一些超快过程所要求的时间分辨光谱,目前只有超短脉冲激光及微微秒探测技术才能给出。因此,激光光谱技术是目前研究生化超快过程的唯一信息工具。另一个目的,是根据已查明的这些生化过程弛豫时间,不追索机制,只研究激光与不同生物分子的亚细胞物质或整个细胞相互作用后的生理反应,再根据这些生理反应进行开发应用研究。此处,激光只是作为一种引发生理反应的工具来应用。近期有关生物系统中相干电磁辐射的实验结果,使激光与生物学又发生另外一种重要关系,即用相干性概念来说明生命现象。提出这一思想是 1967 年由著名超导专家