

- 10 End D, Tolson N, Hashimoto S, *et al.* Nerve growth factor-induced decrease in the cell-free phosphorylation of a soluble protein in PC12 cells. *J Biol Chem*, 1983, **258** (10): 6549~ 6555
- 11 Ray L B, Sturgill T W. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 1988, **263** (25): 12721~ 12727
- 12 Gotoh Y, Nishida E, Yamashita T, *et al.* Microtubule-associated protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *Eur J Biochem*, 1990, **193** (3): 661~ 669
- 13 朱锦芳, 郑仲承, 刘新垣. 细胞因子受体及其介导的信号转导. *生命的化学*, 1996, **16** (3): 14~ 17  
Zhu J F, Zheng Z C, Liu X Y. *Chemistry of life*, 1996, **16** (3): 14~ 17
- 14 Boulton T G, Cobb M H. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation*, 1991, **2**: 357~ 371
- 15 Boulton T G, Gregory J S, Cobb M H. Purification and properties of ERK1, an insulin-stimulated MAP2 protein kinase. *Biochemistry*, 1991, **30** (1): 278~ 286
- 16 Crews C M, Alessandrini A, Erikson R L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 1992, **258** (16): 478~ 480
- 17 Thomas S M, Demarco M, D'Arcangelo G, *et al.* Ras is essential for nerve growth factor and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinase. *Cell*, 1992, **68** (20): 1031~ 1040

**Effect of Nerve Growth Factor from the Venom of *A. halys* on the Expression of Mitogen-activated Protein Kinases of PC12 Cells.** QIN Li-Ya, LIU Yu-Xin, ZHANG Lei, SONG Ling-Li (*Dalian Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Dalian 116013, China*); CUI Zhao-Chun (*Dalian Medical University, Dalian 116027, China*).

**Abstract** Mitogen activated protein kinase (MAPK) is a group of important protein kinases involved in phosphorylation cascade in the mitogen-initiated signal transduction pathways. NGF from *Agkistrodon halys* has been used to investigate its effects on MAPK and MAPKK of PC12 cells. The results showed that this kind of NGF increased MAPK and MAPKK expression and MAPK activity. The above increases were NGF concentration dependent in the range of 25~ 100 µg/L. The use of PKC inhibitor H-7 indicated that the increased expressions of MAPK and MAPKK expression were PKC-dependent.

**Key words** mitogen activated protein kinase, nerve growth factor, *Agkistrodon halys*, snake venom, PC12 cell

## 辐射敏感细胞 ku80 基因突变及其 DNA 结合活性研究\*

江国春 袁丽珍 郭学敏 魏 康 张雪峰 贾向旭

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要** RT-PCR 克隆辐射敏感细胞及其亲本细胞的 ku80 基因 cDNA, 发现辐射敏感细胞的 ku80 基因与双链断裂 DNA 末端相互作用的位置存在基因突变, 用凝胶阻滞和 DNA-蛋白质印迹进一步证实突变 ku 基因编码蛋白结合双链断裂末端 DNA 的能力下降, 暗示其细胞辐射敏感性可能与 Ku 蛋白功能异常有关。

**关键词** ku 基因, DNA-PK, 细胞辐射敏感性, 基因突变

**学科分类号** Q75

DNA 双链断裂 (DSB) 可由电离辐射等直接形成, 也可由一些间接因素所产生, 如由抗体成熟过程中 V (D) J 重组时产生。由于 DSB 能破坏基因组的完整性, 因而对细胞具有潜在的威胁。细胞内存在一套完整的机制对 DSB 进行修复, 其中就包括许多 DNA 双链断裂修复基因, 如 XRCC4、XRCC5、XRCC6 和 XRCC7 等, 这些 DNA 修复基因的功能异常将使细胞 DSB 修复缺陷, 对辐射超敏感, 因而越来越引起人们的重视<sup>[1,2]</sup>。SX-9 细胞是小鼠乳腺癌细胞 SR-1 经化学诱变而形成的辐射

敏感细胞, 我们以前的研究发现其 DNA 损伤修复缺陷<sup>[3]</sup>, 最近文献报道 DNA-PK 激酶活性降低, 与 ku80 基因正常细胞融合后存活率提高, 因而提示其辐射敏感性与 ku80 基因异常有关<sup>[4,5]</sup>。本文通过对 SX-9 细胞和 SR-1 细胞 ku80 基因片段的克隆, 研究对辐射敏感的 SX-9 细胞 ku 基因的功能异常对双链断裂 DNA 结合能力的影响。

\* 国家自然科学基金资助项目 (39900031)。

Tel: (010) 66931233, E-mail: jianggc@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1999-05-04, 修回日期: 1999-10-15

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

*EcoR* I、*Cla* I, 反转录酶等工具酶, Oligo (dT) 15、dNTPs、RNaseA、小牛胸腺 DNA、T-载体、末端平移探针标记试剂盒等均购自 Promega 公司; Taq plus I 聚合酶购自加拿大 MBI 公司;  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京亚辉公司; 1640 培养基、胎牛血清等购自 GIBCO 公司和天津血液学研究所; X 光片是日本富士公司产品。

### 1.2 细胞与菌株

SX-9 和 SR-1 细胞由日本放射线研究所佐藤弘毅教授惠赠; DH5 $\alpha$  由本室保存。

### 1.3 引物设计

ku80 基因分两段进行克隆, 即 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>。引物参照 Genebank 提供的序列并通过 Internet 上提供的 Primers 软件辅助设计, 由美国 Cybersyn 公司合成。其序列如下:

F<sub>1</sub>: 5' CAGATGTTGTGCTGTGTGGATG-3'  
(Primer5')

5' GCCTCATCATCCTTTGCTGC-3' (Primer3')

F<sub>2</sub>: 5' CAGCAAAGGATGATGAGGCG-3' (Primer5')

5' AGAGCTGGCACTCTTGATC-3' (Primer3')

### 1.4 总 RNA 的提取以及 RT-PCR

生长状态良好的细胞经 PBS 洗涤数次, 调整细胞数至  $1 \times 10^7$ , 用 Promega 总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  值, 决定细胞总 RNA 的浓度和纯度。逆转录后取出 1  $\mu$ l cDNA 反应液进行 PCR 反应, 扩增条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环。循环后以 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

### 1.5 DNA 酶切、连接、转化和质粒提取

均按《分子克隆实验手册》进行。

### 1.6 DNA 序列测定

由美国 Cybersyn 公司和日本 Takara 公司全自动核酸测序仪测定。

### 1.7 细胞照射

细胞由本所  $\gamma$ -<sup>60</sup>Co 源照射 8Gy, 照射率  $6.78 \times 10^{-4}$  C/(kg·s)。

### 1.8 细胞核蛋白的提取

$5 \times 10^8 \sim 10 \times 10^8$  个细胞 2000g 离心 20min,

将细胞重悬于低渗缓冲液, 2 000 g 离心 10 min, 用玻璃匀浆器抽提, 4 000 g 离心 15 min, 细胞核沉淀用低渗缓冲液重悬, 加入高盐缓冲液, 25 000 g 离心 20 min, 上清在透析液中透析过夜, 定量, -70  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.9 凝胶阻滞测定细胞核蛋白的粘端 DNA 结合能力

经 *Bam*H I 酶切 490 bp 长的 DNA 片段用 Promega 公司末端平移探针标记试剂盒进行 <sup>32</sup>P-末端标记, 每微克 DNA 每分钟放射性计数为  $2 \times 10^7$ , 用  $1 \times$  TBE 配制 8% 聚丙烯酰胺凝胶, 完全凝结后在 TBE 缓冲液中预电泳, 100~200 V 1 h, 用蠕动泵将上下电泳槽中的电泳液不断循环。同时配制如下 DNA-蛋白质结合反应体系: 末端标记 DNA 片段 1 ng,  $10 \times$  结合缓冲液 2  $\mu$ l, 小牛胸腺 DNA 1  $\mu$ l, 核蛋白提取液 1  $\mu$ l, 加水至 20  $\mu$ l, 混合后, 20  $^{\circ}$ C 1 h, 上样, 恒压 100~200 V 电泳。待溴酚蓝迁移到一定位置后终止电泳, 干燥, 压片, -70  $^{\circ}$ C 放射自显影。

### 1.10 DNA-蛋白质印迹测定蛋白质分子质量

100  $\mu$ g 核蛋白提取液在  $2 \times$  SDS 载样缓冲液中煮沸 3 min, 上样至 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中, 电泳至一定位置, 取出凝胶, 置干转电泳槽中恒流 (0.65A/cm<sup>2</sup> 胶面积) 转移至硝酸纤维素膜 2~3 h。剪下蛋白质分子质量参照物条带, 丽春红 S 染色。将硝酸纤维素膜装入塑料袋中, 加入杂交缓冲液预杂交, 加入 0.1  $\mu$ g 标记 DNA 探针杂交, 洗膜, 压片, -70  $^{\circ}$ C 放射自显影, 杂交带与分子质量标准物比较, 确定蛋白质分子质量。

## 2 结 果

### 2.1 RT-PCR 克隆 SX-9 和 SR-1 细胞 ku80 基因 cDNA 片段

ku80 基因编码区全长约 2 200 bp, 为了尽可能降低 PCR 错误掺入率以及提高测序的准确性, 我们对其进行分段 (F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub>) 克隆 (图 1), F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 约长 1 100 bp, 并选用高活性和高保真 DNA 聚合酶 Taq plus I (错误掺入率 0.03/1000)。PCR 产物直接克隆进 T-载体 (约 3 000 bp), 然后用不同的限制性内切酶进行初步鉴定, 结果符合预期 DNA 片段的长度 (图 2)。

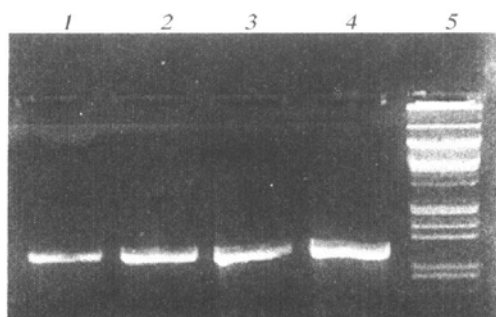


图1 RT-PCR 扩增 SX-9、SR-1 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 片段  
1、2: SX-9 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 片段; 3、4: SR-1 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 片段; 5: λDNA/ EcoRI + Hind III.

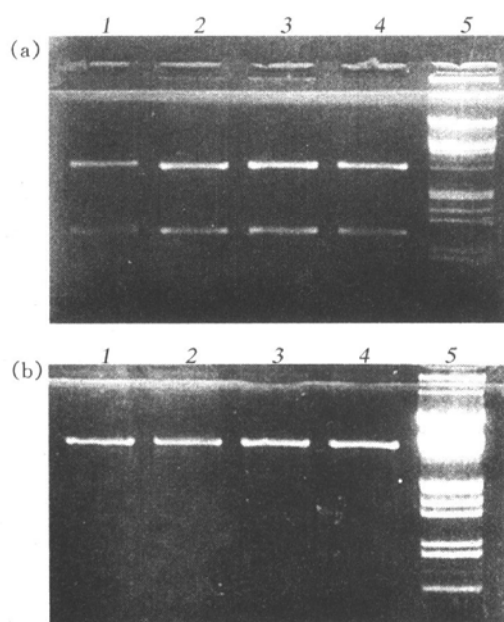


图2 限制性内切酶酶切初步鉴定克隆基因片段

(a) 1、2: SX-9 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>-T、F<sub>2</sub>-T 重组质粒 EcoRI 酶切结果; 3、4: SR-1 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>-T、F<sub>2</sub>-T 重组质粒 EcoRI 酶切结果; 5: λDNA/ EcoRI + Hind III.  
(b) 1、2: SX-9 细胞 ku80 基因 F<sub>1</sub>-T 重组质粒 ClaI 酶切结果 (约 4 100 bp); 3、4: SR-1 细胞 ku80 基因 F<sub>2</sub>-T 重组质粒 ClaI 酶切结果 (约 4 100 bp); 5: λDNA/ EcoRI + Hind III.

## 2.2 SX-9 和 SR-1 细胞 ku80 基因 cDNA 序列比较

由核酸自动测序仪完成测序, 用 Internet 上的 BLAST 软件完成所测序列与 GeneBank 上提供的小鼠 ku80 序列的比较. 与 SR-1 相比, 我们发现 SX-9 细胞存在两处基因突变, 即 G<sub>1233</sub> → A, A<sub>1707</sub> → C, 相应的氨基酸残基由 Ala<sub>411</sub> → Thr, Thr<sub>569</sub> → Pro, 这两处突变都处于其与双链断裂末端 DNA 和 Ku70 亚基相互作用的位置, 因而我们推测 SX-9 细胞 DNA 结合能力异常, 并且与其辐射敏感有关.

## 2.3 凝胶阻滞测定核蛋白提取物的双链断裂末端 DNA 结合能力

DNA-PK 参与 DNA 损伤修复的第一步就是其 Ku70/ Ku80 亚基与双链断裂 DNA 末端的结合, 然后结合了 DNA 的 Ku 亚基进一步激活 DNA-PKs. 所以如果 Ku 蛋白的 DNA 结合能力异常, 必将导致其 DNA-PK 激酶活性降低, 进而使 DNA 损伤修复水平降低以及对辐射敏感. 我们用凝胶阻滞研究 γ 射线照射后 SX-9 细胞核提取物的双链断裂末端 DNA 结合能力后发现, 未照射的 SX-9 和 SR-1 细胞核蛋白 DNA 结合能力无明显差异, 照射后 SX-9 细胞核蛋白 DNA 结合能力明显低于亲本细胞 SR-1, 且低于其未照射的水平 (图 3).

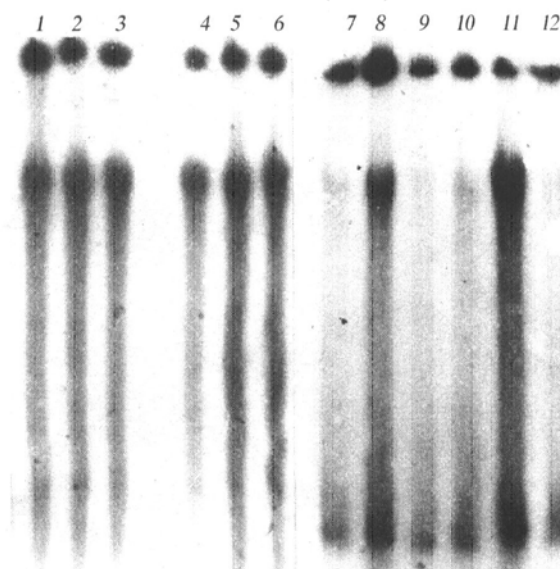


图3 凝胶阻滞测定细胞核蛋白的双链断裂末端 DNA 结合能力

1、2、3: 照射前 SX-9 细胞核蛋白的凝胶阻滞实验 (EMSA) 结果; 4、5、6: 照射后 SX-9 细胞核蛋白的 EMSA 结果; 7、8: 8Gy γ 射线照射后 SX-9 和 SR-1 细胞核蛋白的 EMSA 结果; 9、10、12: 加入 75 ng、50 ng、20 ng 竞争 DSB DNA 的 EMSA 结果; 11: 加入超螺旋 (质粒) DNA 的 EMSA 结果.

## 2.4 DNA 结合能力异常核蛋白的鉴定

细胞内与 DNA 结合的蛋白质有许多种, 如 DNA 单链结合蛋白及转录因子等, 因而有必要对 SX-9 DNA 结合能力异常核蛋白是否是 Ku 蛋白进行鉴定, Ku 蛋白与其他 DNA 结合蛋白最大不同在于其与双链断裂末端 DNA 结合, 而不是与超螺旋 DNA 结合, 根据 Ku 蛋白的这一特性我们设计了双链末端 DNA 竞争反应, 以对其 DNA 结合能力异常的核蛋白进行初步鉴定. 结果显示, 结合核

蛋白的 DNA 只能被双链断裂末端 DNA 竞争, 而不能被超螺旋 DNA 竞争, 这符合 Ku 蛋白的基本特性 (图 3).

用 DNA-蛋白质印迹进行进一步研究发现, SX-9 和 SR-1 细胞与双链断裂末端 DNA 结合的核蛋白由两个亚基组成, 分子质量分别位于 70 ku 和 90 ku 处, 此外还发现照射前 SX-9 与 SR-1 细胞核蛋白中与 DNA 结合的蛋白质有两条带, 照射后 SX-9 细胞的两条杂交带全部消失, 这与 EMSA 的结果相一致, 这证明此核蛋白就是 Ku 蛋白 (图 4).

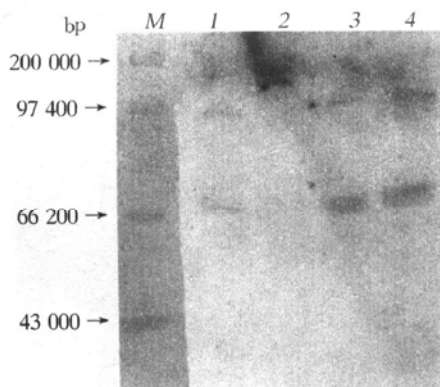


图 4 与双链断裂末端 DNA 结合的细胞核蛋白质分子质量鉴定

M: 蛋白质分子质量标准; 1、2: 8Gy  $\gamma$  射线照射后 SR-1 和 SX-9 的 DNA-蛋白质印迹结果; 3、4: 8Gy  $\gamma$  射线照射前 SR-1 和 SX-9 的 DNA-蛋白质印迹结果.

### 3 讨 论

SX-9 是小鼠乳腺癌细胞 SR-1 经化学诱变产生的辐射敏感细胞, 射线照射后 SX-9 细胞存活率明显低于亲本细胞 SR-1, 照射后 DNA 双链断裂重接速率和水平亦明显降低, 因而认为 DNA 损伤修复缺陷是其辐射敏感的主要原因. DNA-依赖蛋白激酶 (DNA-PK) 是参与 DBS 损伤修复的重要分子, XRCC5, XRCC6 和 XRCC7 基因产物组成其三个亚基, 即 Ku70, Ku80 和 DNA-PKcs, 分子质量分别为 70 ku、86 ku 和 350 ku. DNA-PK 在参与 DNA 损伤修复时, 首先由 Ku 亚基结合损伤 DNA 激活 DNA-PKcs 后启动 DNA 损伤修复机制<sup>[6-9]</sup>. Peterson 等<sup>[4]</sup>发现 SX-9 细胞核抽提物中的 DNA-PKcs 磷酸化能力降低; 文献报道的数据表明 SX-9 和 xrs-6 (ku80 基因正常细胞) 融合后存活率比 SX-9 提高, 暗示可能该细胞 ku80 基因功能异常, 并进而导致 DNA 损伤修复缺陷, 使其辐射敏感性

升高<sup>[5]</sup>.

我们研究发现, SX-9 细胞 ku80 基因存在两处基因突变, 突变碱基位于 Ku 蛋白与 DNA 相互作用位置 (334~732 氨基酸残基之间)<sup>[10,11]</sup>, 凝胶阻滞实验进一步研究发现,  $\gamma$  射线照射后 SX-9 细胞核蛋白的双链末端 DNA 结合能力低于其亲本细胞, 也低于其未照射的水平. 竞争凝胶阻滞实验和 DNA-蛋白质印迹表明其与双链断裂末端 DNA 结合异常的核蛋白是 Ku80, 从而初步验证 SX-9 细胞 ku80 基因突变导致其功能异常的判断. 最近, Fukumura 等用 RT-PCR 克隆了其 ku70 (约 1 900 bp) 和 DNA-PKcs (约 15 000 bp) 基因, 发现 ku70 基因正常, 而 DNA-PKcs 存在一处基因突变, 并认为 DNA 损伤修复异常与 DNA-PKcs 基因突变有关, 但是将正常 DNA-PKcs 导入 SX-9 细胞后, 其 V (D) J 重组只恢复到亲本细胞 SR-1 的 30%~40%, 作者未报道将正常 DNA-PKcs 基因导入 SX-9 细胞后的细胞存活率状况. 我们研究结果表明, SX-9 细胞的 ku80 基因存在突变, 并导致其功能异常, SX-9 对辐射敏感也可能与此有关, 研究功能异常 ku80 基因的双链断裂 DNA 末端结合特性, 为进一步阐明 SX-9 细胞辐射敏感的分子机理奠定了基础.

### 参 考 文 献

- 1 Cary R B, Peterson S R, Wang J. DNA-looping by Ku and DNA-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (9): 4267~4272
- 2 Ghosh A K. Autoantigen Ku and its role in multiple cellular processes. *Indian J Exp Biol*, 1997, **35** (12): 1261~1272
- 3 Zhou P K, Wei K. DNA double-stranded break and rejoining of mouse breast carcinoma derived radiosensitive cell line SX-9. *J Radiat Res Radiat Proc*, 1992, **10** (4): 44
- 4 Peterson S R, Stackhouse M, Waltman M J, *et al.* Characterization of two DNA double-stranded break repair-deficient cell lines that express inactive DNA-dependent protein kinase catalytic subunits. *J Biol Chem*, 1997, **272** (15): 10227~10231
- 5 Fukumura R, Araki R, Fujimori A, *et al.* Murine cell line SX-9 bearing a mutation in the dna-pkcs gene exhibits aberrant V (D) J recombination not only in the coding joint but also in the signal joint. *J Biol Chem*, 1998, **273** (21): 13054~13058
- 6 Ramsend D A, Gellert M. Ku protein stimulates DNA-end joining by mammalian DNA ligase: a direct role for Ku in repair of DNA double strand breaks. *EMBO J*, 1998, **17** (2): 609~614
- 7 Lee-Miller S P. The DNA-dependent protein kinase, DNA-PK: 10 years and no end in sight. *Biochem Cell Biol*, 1996, **74** (4): 5103~5129
- 8 Dynan W, Yoo S H. Interaction of Ku protein and DNA dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids*

- Res, 1998, **26** (7): 1551~ 1559
- 9 Smider V, Chu G. The end joining reaction in V (D) J recombination. *Immunology*, 1997, **45** (1): 189~ 197
- 10 Osipovich O, Durum S K, Muegge K. Defining the minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. *J Biol Chem*, 1997, **272** (43): 27259~ 27265
- 11 Cary R B, Chen F, Shen Z, *et al.* A central region of Ku80 mediates interaction with Ku70 *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (4): 974~ 979

**ku80 Gene Mutation of Radiosensitive Cell Line and Its DNA Binding Activity.** JIANG Guo-Chun, YUAN Li-Zhen, GUO Xue-Min, WEI Kang, ZHANG Xue-Feng, JIA Xiang-Xu (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical*

*Sciences, Beijing 100850, China*).

**Abstract** ku80 gene of radiosensitive cell line SX-9 was cloned by RT-PCR. Compared cDNA of the radiosensitive cell line with its parental cell line, it was found that there were two mutation sites in ku80 gene which could interact with DSB DNA and Ku70. It was confirmed by EMSA and Southwestern blot that the DSB end binding activity of Ku80 in the nucleus extract of the radiosensitive cell decreased greatly, which inferred that the radiosensitivity of the cell line is caused by dysfunction of its Ku80 protein.

**Key words** ku gene, DNA-PK, cell radiosensitivity, gene mutation

## 脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用的 ESR 谱研究\*

孙润广<sup>1)</sup> 张 静 王永昌<sup>1)</sup>

(陕西师范大学实验中心, 西安 710062)

**摘要** 用电子自旋共振 (ESR) 技术对液晶态多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用进行了研究. 并探讨了其在抑制和杀伤癌细胞过程中可能具有的生物学意义. 实验发现: 油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在 E<sub>c</sub> 腹水肝癌细胞膜上的强固定化作用减弱, 弱固定化作用增强, 使自旋标记物运动自由度增加. 亚油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在乳腺癌细胞膜上的强固定化作用增强, 弱固定化作用减弱, 使自旋标记物运动自由度受到限制. 蓖麻酸多相脂质体的影响使自旋标记物在 S<sub>180</sub> 实体瘤细胞膜上的强固定化作用增强, 弱固定化作用减弱, 使自旋标记物运动自由度受到限制. 结果表明, 多烯脂肪酸多相脂质体作用于膜蛋白引起了膜蛋白构象的变化.

**关键词** 液晶态, 生物膜, 脂质体, 多烯脂肪酸

**学科分类号** Q6.3

多烯脂肪酸作为抗癌药物一直是一个十分活跃的研究领域<sup>[1~8]</sup>. 有关多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用的研究, 对进一步了解其杀伤癌细胞的机理, 具有非常重要的意义. 本文用电子自旋共振 (ESR) 技术, 研究了多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用, 阐明药物作用于生物膜的分子机制, 探讨了多烯脂肪酸多相脂质体的液晶态结构在抑制和杀伤癌细胞过程中可能具有的生物学意义. 有助于从结构和功能上理解液晶态多烯脂肪酸多相脂质体抗癌活性的机理. 从生物膜的液晶态来认识、探索细胞膜的功能与肿瘤细胞的治疗之间的关系是一个令人鼓舞的途径, 有重要的学术价值和意义.

### 1 实验材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

油酸 (oleic acid)、亚油酸 (linoleic acid)、蓖麻酸 (ricinoleic acid)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE)、非离子表面活性剂 (polysorbatum-80)、高效分散剂 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、胆固醇 (cholesterol) 等从美国 Sigma 公司购买. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (AR), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (AR)、乙醚 (ether, AR) 等均为国产分析纯

\* 国家自然科学基金资助项目 (29672042); 西安交通大学博士论文基金资助项目 (DFXJU 1998-9).

<sup>1)</sup> 西安交通大学理学院, 西安 710049.

Tel: (029) 5307620, E-mail: sunrun@pub.xjtuonline.sn.cn

收稿日期: 1999-05-04, 修回日期: 1999-10-28