

医学分子生物学进展

论文集(三)

祝贺吴冠芸教授八十华诞

方福德 杨善蓉 沈岩 主编

中国协和医科大学出版社

医学分子生物学进展论文集 (三)

ADVANCES IN MEDICAL MOLECULAR
BIOLOGY

祝贺吴冠芸教授 80 华诞

In Celebration of the 80th Birthday of Professor
Wu guanyun

方福德 杨善蓉 沈 岩 主编

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学分子生物学进展论文集. (三) / 方福德, 杨善蓉, 沈岩主编. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004.5

ISBN 7-81072-509-2

I. 医… II. ①沈…②杨… III. 医药学: 分子生物学-文集 IV. Q7-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 023123 号

医学分子生物学进展论文集 (三)

主 编: 方福德 杨善蓉 沈 岩
责任编辑: 陈永生

出版发行: 中国协和医科大学出版社
(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com
经 销: 新华书店总店北京发行所
印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 850×1168 毫米 1/16 开
印 张: 25.5
彩 图: 4
字 数: 700 千字
版 次: 2004 年 6 月第一版 2004 年 6 月第一次印刷
印 数: 1—400
定 价: 120.00 元

ISBN 7-81072-509-2/R·504

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

目 录

吴冠芸教授论文选

1. 大肠杆菌可溶性核糖核酸的提取及其性质的研究 (3)
2. 靛玉红治疗慢性粒细胞白血病疗效原理的研究——靛玉红与 DNA 的结合作用及其结合键型的鉴别 (10)
3. α -地中海贫血的早期产前基因诊断 (17)
4. 广西地区 19 例 HbH 病人的 α -珠蛋白基因组织 (21)
5. 甲型血友病基因诊断的研究 (28)
6. 中国广西、广东、四川三省区 β -地中海贫血基因突变类型及产前基因诊断研究 (33)
7. 安徽省铜陵市脆性 X 综合征的分子生物学调查和遗传学分析 (38)
8. Application of capillary nongel sieving electrophoresis for gene analysis (42)

吴冠芸教授发表的论文和著作目录

- 论文目录 (53)
- 综述与译文目录 (67)
- 书籍目录 (68)

祝贺吴冠芸教授 80 华诞

- 著名生物化学与分子生物学家吴冠芸教授 (71)
- 我的导师吴冠芸教授 杨善蓉 (74)
- 祝贺论文选 (以作者姓氏拼音为序)
1. RanBPM is a novel binding protein for p75NTR
..... Dong Bai, Bing-Ren Huang (黄秉仁) et al (75)
 2. Transgenic study of the function of chymase in heart remodeling
..... Lan-Ying Chen (陈兰英) et al (83)
 3. Hb F-Forest Park, a new γ variant with two amino acid substitutions, 75 (E19) Ile
→ Thr and 73 (E17) Asp → Asn, which can be identified in adults by gene-mapping analysis
..... Song-sen Chen (陈松森) et al (97)
 4. High-level expression of foreign genes via multiple joined operons and a new concept regarding

- the restricted constant of total amount of plasmid DNA per *Escherichia coli* cell
..... Chen Weijing、Lu Shengdong (卢圣栋) et al (105)
5. Association between Genetic Variation of CACNA1H and Childhood Absence Epilepsy
..... Yucai Chen, Yan Shen (沈岩) et al (112)
6. The expression of human α -like globin genes in transgenic mice mediated by bacterial artificial
chromosome Dong-Xiao、Chih-Chuan Liang (梁植权) et al (119)
7. Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast
cancer Sidney W Fu (付四东) et al (127)
8. Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation
of the β -globin gene Sidong Fu (付四东) et al (136)
9. Effects of point mutation C $\rightarrow$ T at-64 of human δ globin gene promoter on DNA binding
proteins Kou Haiping、Liang Zhiqun (梁植权) et al (148)
10. The effect of chemical carcinogenesis on rat glutathione S - transferase PI gene transcriptional
regulation Dongyuan Liu、Fude Fang (方福德) et al (154)
11. Heterogeneity of Adult Polycystic Kidney Disease Analysis of an APKD Family Unlinked to
3'HVR LIU Guo-Yang (刘国仰) et al (163)
12. A CASE OF HEMOGLOBIN IWATA [α 87 (F8) HIS $\rightarrow$ ARG] IN CHINA
..... Liu Guoyang (刘国仰) et al (167)
13. PCR assay for the inversion causing severe Hemophilia A and its application
..... Liu Jingzhong (刘敬忠) et al (170)
14. STUDIES OF β - THALASSEMIA MUTATIONS IN FAMILIES LIVING IN THREE
PROVINCES IN SOUTHERN CHINA J. Z. Liu (刘敬忠) et al (177)
15. 多基因疾病相关基因定位的研究策略 刘天承、邱长春等 (184)
16. Tyrosine mutation in CD3 ϵ - ITAM Blocked T Lymphocyte Apoptosis Mediated by
CD3 ϵ Yanxin Liu、Dexian Zheng (郑德先) et al (192)
17. Deficiency of the Mouse Complement Regulatory Protein mCd59b Results
in Spontaneous Hemolytic Anemia with Platelet Activation and Progressive
Male Infertility Xuebin Qin (秦学斌) et al (202)
18. 重组可溶性 TRAIL 的表达与生物学活性 史 娟、刘士廉、刘彦信、郑德先等 (218)
19. Multiplex Allele-specific Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of
Phenylketonuria SONG Fang (宋 昉) et al (223)
20. 中国人苯丙氨酸羟化酶基因的 10 种新突变 宋 昉等 (227)
21. Detection of Erythrocytes Deficient of Glycosylphosphatidylinositol Anchored Membrane
proteins in patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria by the toxin HEC secreted
by *Aeromonas hydrophila* J - 1 Jian Wang、Caimin Xu (许彩民)、

-
- Huazhen Pan (潘华珍)、Zhinan Zhang (张之南) et al (232)
22. 苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因的两个新突变
..... 徐陆亭、苗世荣、刘国仰、黄尚志、罗会元等 (239)
 23. Overexpression and purification of recombinant atrial natriuretic peptide using hybrid
fusion protein REF-ANP in *Escherichia coli* Jun Wang、Shengdong Lu (卢圣栋) et al (243)
 24. ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic
differentiation of multipotential leukemia cell line Yan Shen (沈 岩)、
Jiangang Yuan (袁建刚)、Boqin Qiang (强伯勤)、Junhua Wang et al (254)
 25. 人干细胞因子受体 c-Kit 稳定表达细胞株的构建 熊安琪、陈松森等 (264)
 26. PKC ϵ Is a Unique Regulator for *hsp90 β* Gene in Heat Shock Response
..... Jianmin Wu、Lian-xian Cui (崔莲仙)、
Ninghua Wu (吴宁华)、Yufei Shen (沈羽非) et al (270)
 27. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular
development Jianhua Yang (杨建华) et al (282)
 28. Calcineurin/Nuclear Factors of Activated T Cells (NFAT) -activating and Immunoreceptor
Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) -containing Protein (CNAIP), a Novel
ITAM-containing protein That Activates the Calcineurin/NFAT-signaling pathway
..... Jianhua Yang (杨建华) et al (291)
 29. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation
..... Jianhua Yang (杨建华) et al (301)
 30. Molecular Characterization of a Novel form of ($A\gamma\delta\beta$)⁰ Thalassemia Deletion in a Chinese
Family JunWu Zhang (张俊武) et al (310)
 31. A novel gene, RSD-3/HSD-3.1, encodes a meiotic-related protein expressed in rat and
human testis Xiaodong Zhang、Shiying Miao (缪时英)、
Linfang Wang (王琳芳) et al (319)
 32. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II
..... Xiaohai Zhang、Boqin Zhang (强伯勤)、Yan Shen (沈 岩) et al (332)
 33. The 3' breakpoint of the Yunnanese ($A\gamma\delta\beta$)⁰-thalassemia deletion lies in an L1 family
sequence: implications for the mechanism of deletion and the reactivation of the $^G\gamma$ -globin
gene Xue - Qing Zhang & Jun - Wu Zhang (张俊武) (336)
 34. 原发性高血压相关新基因的发现——D1S249 位点与汉族 EH 相关联
..... 郑 勇、邱长春等 (345)
 35. Inhibition of L ZIP-mediated Transcription through Direct Interaction
with a Novel Host Cell Factor-Like Protein
..... HaiJun Zhou、BoQin Qiang (强伯勤)、JianGang Yuan (袁建刚) et al (352)

36. Fudenine, a C-Terminal Truncated Rat Homologue of Mouse prominin,
Is Blood Glucose-Regulated and Can Up-Regulate the Expression of GAPDH
..... Guozhi Zhu、Jin Zuo (左 瑾)、Fude Fang (方福德) et al (364)
37. Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain,
which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function
..... Yijun Zhu (朱益军) et al (373)
38. Coactivator PRIP, the Peroxisome Proliferator-activated Receptor-interacting Protein,
Is a Modulator of Placental, Cardiac, Hepatic, and Embryonic Development
..... Yi-Jun Zhu (朱益军) et al (385)
- 编后记..... (395)



吴冠芸教授论文选

大肠杆菌可溶性核糖核酸的提取 及其性质的研究

吴冠芸 胡炳晟 杨秋霜 刘树忠 张福徽 陈煜清
魏文玲 刘承斌 陈海深 梁植权

(中国医学科学院实验医学研究所生物化学系, 北京)

自 1957 年 Hoagland 等人^[1,2]发现可溶性核糖核酸 (sRNA)* 的存在以来, 在文献中出现了许多有关 sRNA 的提取, 理化性质及其生物活性的报导^[3-13]。sRNA 在蛋白质生物合成中有着重要的作用, 能将激活了的氨基酸传递给微粒体核蛋白, 而且 sRNA 的分子量较小是研究核酸结构的良好材料。为了进一步研究 sRNA 的结构和功能, 寻找比较简易的方法制备大量的 sRNA 是很必要的。

在 sRNA 提取方法中, 一般先将细胞破碎, 制成匀浆, 经超速离心 (100,000g) 上清液用酚提取, 再反复纯化即得 sRNA 制品。Tissieres^[11]及 Brown^[3]相继用超速离心的方法, 从大肠杆菌中制得超速离心图谱上均一的 sRNA。Ofengand 等^[9]用热的去污剂处理大肠杆菌, 再经柱层离也得到了均一的 sRNA 制品。但是这些方法还是比较繁琐, 尤其是使用超速离心, 在产量上受到很大限制。自从 Monier 等^[8]从酵母直接用酚抽提得到 sRNA 后, Lipmann 等^[6]也用酚直接抽提大肠杆菌 sRNA, 并以 1M 氯化钠除去大分子 RNA, 但是对得到的 sRNA 制品的纯度与均一性并无说明。最近见到 Zubay^[12]的报导, 他在 Monier 的工作基础上提出了进一步的改良, 除以 1M 氯化钠分离高分子 RNA 外, 又用异丙醇分部分离, 得到了均一的 sRNA 制品。

本工作在 Monier 的直接酚提取法的基础上用硫酸铵除去大分子 RNA, 提出了一个比较简单和可以大量获得 sRNA 的方法 (初步结果已在北京市生理学会报导^[14]), 并对制品进行了理化性质及活性的测定, 证明制品是均一的和具有较高的活性。

实验方法

(一) 大肠杆菌 (生物制品检定所 44102) 的培养** 培养基含有下列成分, 蛋白胨 0.1%, 葡萄糖 0.3%, 肉膏 0.03%, 氯化钠 0.5%, 酵母提取物 0.6%, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.85%, KH_2PO_4 0.2%。将大肠杆菌用上述培养基在发酵罐中通气培养 (37℃) $5\frac{1}{2}$ 小时后, 冷却菌液以连续离心机分离菌体。得到的菌体可以直接用以制备 sRNA, 也可以冷冻贮存 (-30℃ ~ -40℃), 但是贮存时间不宜过长, 以免 sRNA 的产量降低。

(二) sRNA 的制备 将收获的大肠杆菌用 0.01M $MgAc_2$ ~ 0.001M Tris 缓冲液 (pH7.4) 洗涤三次, 称重, 加入二倍体积的水及三倍体积的 90% (w/w) 苯酚, 在 25℃ 左右搅拌 2 小时。旋离

本文于 1963 年 5 月 10 日收到。

* 本文所用简称如下: sRNA, 可溶性核糖核酸; $\epsilon(P)$, 克原子磷消光系数。

** 承本院抗菌素研究所协助培养, 特此致谢。

(1350g, 20 分钟), 取出上清液, 加入 1/2 体积的 90% 苯酚, 振摇 10 分钟, 旋离。上清液重复用 1/4 体积苯酚处理一次。旋离后, 在上清液中加入硫酸铵 (0.365 克/毫升), 旋离 (19,000g, 30 分钟), 除去浮在液面的高分子 RNA, 清液用乙醚抽提三次, 以除去残留的苯酚, 再经透析除去硫酸铵; 然后加入 1/10 体积的 20% 醋酸钾 (pH5) 和 2.5 体积的冷乙醇于处理后的清液以沉淀 sRNA。其中所含的多糖按 Kirby^[15] 的方法用 2-甲氧基乙醇抽提, 旋离, 取出上层, 加入 1/10 体积的 20% 醋酸钾 (pH5) 和 2.5 倍体积的乙醇, 旋离, 得到的沉淀, 再重复用 2-甲氧基乙醇处理一次。在正常情况下, 每 100 克菌 (湿重) 可以得到 100-180 毫克 sRNA。

(三) 蛋白质含量的测定 按 Lowry^[16] 法测定。

(四) 磷含量的测定 按 Taussky 和 Shorr^[17] 法测定 (经刘培楠, 黄华璋改良)。

(五) 脱氧核糖核酸的测定 按 Ceriotti^[18] 法测定。

(六) 多糖的测定 将样品用 0.3N KOH 在 37℃ 保温 20 小时, 经透析除去核苷酸后^[19], 多糖按 Kahan^[20] 法测定。

(七) 紫外吸收光谱用 Unicam SP500 型分光光度计测定。

(八) 比旋光度用 Franz Schmidt 与 Haensch 型旋光仪测定, 以钠灯为光源, 温度 18℃, 样品浓度为 0.6%, 用 0.1N NaCl 作溶剂。

(九) 电泳用 Antweiler 微量电泳仪测定, 以 0.1M NaCl—0.03M Tris (pH7.1) 缓冲液为溶剂, 样品浓度为 0.48%, 电压 20V, 电流 1.5mA, 进行时间为 14 分钟。

(十) 扩散系数以 Antweiler 电泳仪的扩散装置测定, 用半距离法^[21] 计算, 样品浓度在 0.5-1% 之间, 以 0.1M NaCl—0.03M Tris (pH7.1) 缓冲液为溶剂。

(十一) 沉降分析用 Phywe 超速离心机进行*, 以 0.1M 氯化钠为溶剂, 样品浓度 2-3 毫克/毫升, 温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 转速每分钟 50,000 转。

(十二) 核碱组成的测定 根据 Wyatt^[22] 的方法, 样品用 11.9N HClO₄ 在 100℃ 水解 1 小时。水解液冷却后用蒸馏水稀释至 HClO₄ 浓度为 0.2N, 离心, 用纸层析法 (Whatman1 号纸) 分离, 以异丙醇-盐酸 (比重 1.19) - 水 (17 毫升:4.1 毫升加水至 25 毫升) 为推进剂, 温度 22-24℃, 下行 24 小时。

(十三) sRNA 末端基的测定 按每 1 毫克 sRNA 加入 0.5 毫升 0.5N KOH 的比例, 将 sRNA 在 37℃ 水解 20 小时后, 用 HClO₄ 中和, 旋离, 取上清液进行纸层分离 (Whatman 1 号纸, 3 × 46 厘米), 以四种核苷的混合液作为对照。用正丁醇-水 (86:14v/v) 为推进剂, 在 22-24℃ 进行下行层析 15 小时。取出滤纸, 吹干。将原点处吸收紫外线部分挖除, 改用异丙醇-盐酸-水 (17:4.1 用水稀释至 25 毫升) 为推进剂, 以同一方向进行下行层析 24 小时。剪下与对照腺嘌呤核苷相应位置的斑点, 用 0.01N 盐酸洗脱, 在 220~320mμ 紫外线区测定吸收光谱, 以进行鉴别。

(十四) sRNA 氨基酸接受能力的测定

(1) pH5 酶液的制备 大致按 Matthaei 与 Nirenberg^[23] 的方法进行。大肠杆菌经 0.01M MgAc₂-0.001M Tris (pH7.4) 缓冲液洗涤 2~3 次, 称重, 用 2~3 倍重量的玻璃粉研磨 30 分钟。徐徐加入 2.5 倍体积 pH7.4 Tris 缓冲液 (含有 0.01M Tris, 0.01M MgAc₂, 0.06M KCl 和 0.006M 乙硫醇) 混匀, 旋离除去玻璃粉及细胞残渣。取出上层悬液, 在 100,000g 旋离 2 小时。上清液对上述 Tris 缓冲液透析过夜 (4℃)。每毫升酶液约含 10 毫克蛋白质。

(2) sRNA 接受氨基酸能力的测定^[3] 将 sRNA (0.4~2 微克分子 RNA 核苷酸) 与 8 微克分

* 超速离心分析承本院病毒系刘崇柏同志协助, 特此致谢。

子 ATP 钠盐, 0.3 毫升酶液, 0.05 毫克 S^{35} -甲硫氨酸 (比活性 4.1×10^6 次/分/毫克), 30 微克分子 $MgCl_2$ 及 100 微克分子 Tris 缓冲液 (pH7.4)。最后体积为 1 毫升, 在 $37^\circ C$ 保温。30 分钟后, 冷却反应液, 加入 4 毫升 0.5N 过氯酸以沉淀 sRNA, 旋离, 弃去上层清液。沉淀用冷的 0.4N 过氯酸及 0.2N 过氯酸各洗一次, 95% 冷乙醇洗涤两次, 每次体积均为 5 毫升。固体铺样, 用钟罩型计数管测定放射性强度。对照管除在过氯酸停止酶作用后加入 sRNA 外, 其他条件均相同。sRNA 的浓度以核苷酸量表示, 在 0.01N KOH 溶液中 $260m\mu$ 光密度为 10 即相当于 1 微克分子 RNA 核苷酸。

结果与讨论

(一) sRNA 的纯度 化学分析的结果显示本制品约含蛋白质 1%, DNA 含量不超过 1%, 一般在 0.4%, 多糖含量在 1%。制品具有典型的核酸紫外光谱 (图 1), 在 pH7.1, 0.01M 磷酸缓冲液中, 其最高峰在 $258m\mu$, 最低在 $230m\mu$; $258m\mu$ 与 $280m\mu$ 光密度之比为 2.1~2.3, $258m\mu$ 与 $230m\mu$ 之比则为 1.9~2.1。克原子磷消光系数在 7,000~7,500 之间。比旋光度为 +157。自由电泳 (图 2) 及沉降图谱 (图 3) 皆呈现单一峰。我们会按 Monier 方法以酚直接抽提大肠杆菌, 但未经硫酸铵处理, 得到的 sRNA 在超速离心图谱上显示有大分子 RNA 的存在。

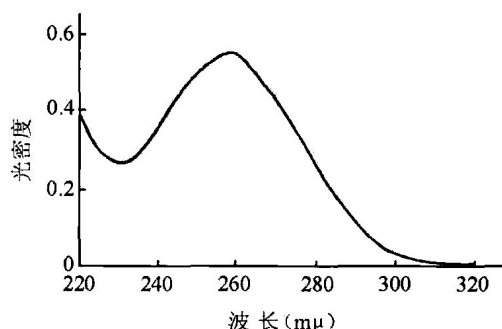


图 1 sRNA 的紫外线吸收光谱

样品浓度 25.6 微克/毫升, 溶剂 0.01M 磷酸缓冲液 (pH7.1)。

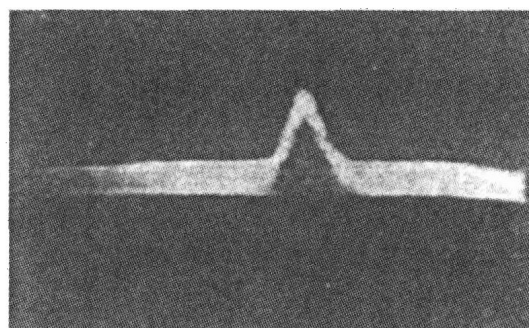


图 2 电泳图谱

在 Antweiler 微量电泳仪中进行, 样品浓度为 0.48%, 以 0.1M NaCl-0.03M Tris 缓冲液 (pH7.1) 为溶剂, 电压 20V, 电流 1.5mA, 时间 14 分钟。

Cox 与 Littauer^[4] 会用溶菌酶处理大肠杆菌成为原生质体, 再经酚抽提及硫酸铵的进一步分离制得低分子 RNA (作者推论相当于 sRNA)。从我们的工作证明硫酸铵分离得到的是具有活性的 sRNA, 但是溶菌酶的处理是可以省略的。

我们的 sRNA 制品的成分分析和理化性质结果与 Brown, Tissieres 及 Ofengand 等的数据比较 (表 1), 由于应用苯酚直接抽提, 避免了核质中 DNA 的释放, 因此制品中 DNA 含量显然较其他方法制得的为低。蛋白质含量在 Brown 的结果中虽然较本制品为低, 但是很可能是由于采用的测定方法不一致所引起的, 因为用 Lowry 法测定蛋白质时, 由于自由鸟嘌呤的干扰, 结果往往偏高^[9]。

表 1 大肠杆菌 s-RNA 的一些成分分析及理化性质的比较

成 分 \ 作 者	Tissieres ^[11]	Brown ^[3]	Ofengand ^[9]	本方法
多糖	少许	< 0.9%	-	1%
蛋白质	< 2.5%	< 0.3%	2~3%	1%
DNA	-	1.3	< 4	< 1%
η (P)	7000	-	7700	7000~7500
旋光度 $[\alpha]_D$	+ 160*	-	-	+ 157*
O. D. 258m μ O. D. 280m μ	2.06~2.14	-	2.0~2.3	2.1~2.3
O. D. 258m μ O. D. 230m μ	2.20~2.35	-	2.0~2.3	1.9~2.1

* Tissieres 用 27℃，本方法在 18℃测定。

(二) sRNA 的组成、末端、链长与分子量的测定 用本方法制得的 sRNA 经过氯酸水解后，以纸层法分离出四个主要核碱，其组成（见表 2）与 Dunn 等^[5]的数据近似。Dunn 等证明用盐酸水解时，假尿嘧啶核苷酸即转变成其他化合物。我们也曾用盐酸水解，测出的核碱组成与用过氯酸水解的结果一致。因此推测用过氯酸水解时，假尿嘧啶核苷酸亦转变成其他化合物，结果尿嘧啶含量中不包括假尿嘧啶核苷酸，所以我们测得的尿嘧啶含量和 Dunn 等^[5]的（假尿嘧啶核苷酸含量另列）近似而与 Ofengand^[9]及 Zubay^[12]等的结果（包括假尿嘧啶核苷酸的含量）相较显示数值较低。本 sRNA 制品嘌呤与嘧啶之比为 1.18，6-氨基与 6-酮基之比近于 1 和大肠杆菌核糖核蛋白体 RNA 的组成显然不同。

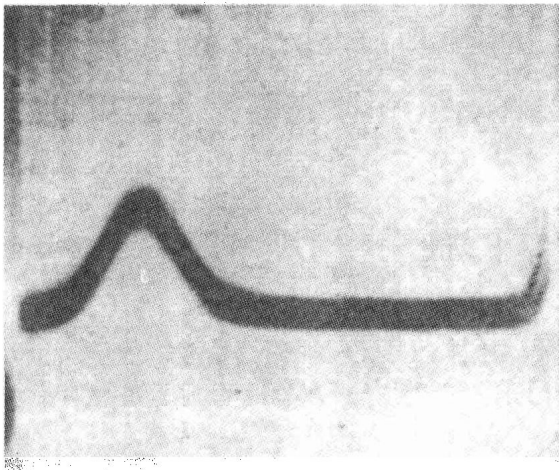


图 3 沉降图谱

溶剂：0.1N 氯化钠，样品浓度 3 毫克/毫升
温度：20±2℃ 转速：50,000 转/分钟

表 2 大肠杆菌 sRNA 的核碱组成

核碱	微克分子/毫克 sRNA	克分子%
腺嘌呤	0.432	20.9±0.1
鸟嘌呤	0.689	33.3±0.5
胞嘧啶	0.624	30.2±0.4
尿嘧啶	0.322	15.6±0.9

sRNA 的水解条件：11.9N HClO₄ 在 100℃加热 1 小时。水解液以纸层法分离。推进剂为异丙醇-盐酸（比重 1.19）-水（17 毫升：4.1 毫升加水至 25 毫升）。层析温度 22-24℃。

本 sRNA 制品用 KOH 降解后经纸层法分离，只有与对照腺嘌呤核苷相应的位置上有紫外线吸收斑点，未发现其他核苷的存在。剪下斑点用 0.01N 盐酸洗脱，洗脱液经分光光度法测定表明具有典型的腺嘌呤核苷光谱。单一的核苷出现也说明了制品的均一性。腺嘌呤核苷的含量为 0.0268 微克分子/毫克 sRNA，经计算

后腺嘌呤核苷与核苷酸分子数之比为 1:77；如果腺嘌呤核苷只是从 sRNA 末端得到的，那末它的链长是 78 个核苷酸，分子量应为 25,000±1000。

用 Antweiler 电泳仪扩散装置测定 sRNA 的扩散系数为 7.7~8.5×10⁻⁷厘米²/秒，不同样品有一定范围的变化，是否与样品所含的杂质有关，尚不了解。在 0.1N 氯化钠溶液中，sRNA 浓度

在 2.4 毫克/毫升时，沉降系数为 4.2 ± 0.2 ，由此两数字可以粗略地计算（采用了 Tissieres 的微分比容值）sRNA 的分子量为： $26,000 \pm 1,300$ ，和用化学分析所得的数据相符。根据文献资料，大部分作者如 Tissieres，Brown 与 Zubay 等都认为大肠杆菌 sRNA 的分子量在 25,000 左右。Zubay 从末端核苷含量计算分子量也得到相似的数据，这些结果均与我们的观察相符。但 Zillig^[13] 等认为大肠杆菌 sRNA 是由 62 个核苷酸组成，分子量为 18,500，恰巧是从沉降系数与扩散系数求得的分子量 35,000 的一半，这一结果在我们的工作中未得到证实。

（三）sRNA 接受甲硫氨酸的能力 按本方法制备的 sRNA 具有接受 S^{35} - 甲硫氨酸的活力，在没有 ATP 或酶存在时均无氨基酸并合。以大鼠肝高分子 RNA 代替 sRNA 时，似有极少量的并合，可能与高分子 RNA 中杂有的 sRNA 有关。

sRNA 的加入量与 S^{35} - 甲硫氨酸 sRNA 形成的多寡有着直线关系（图 4）。

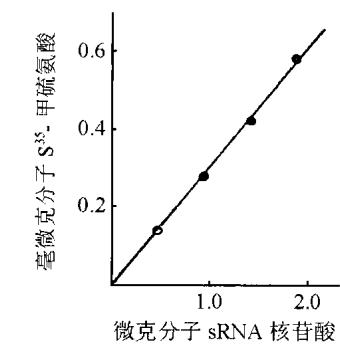


图 4 sRNA 浓度对 S^{35} - 甲硫氨酸 - sRNA 形成的影响反应条件与表 3 同。

表 3 S^{35} - 甲硫氨酸 - sRNA 形成所需的条件

反应液	脉冲数 (次/分)
完全反应混合液	848
减去 ATP	0
减去酶	0
减去 sRNA，加入大鼠肝高分子 RNA	74

完全反应混合液含有 8 微克分子 ATP，30 微克分子 $MgCl_2$ ，0.05 毫克 S^{35} - 甲硫氨酸（比活性 4.1×10^6 次/分/毫克）0.96 微克分子 sRNA 核苷酸，0.3 毫升大肠杆菌抽提液（约含 3 毫克蛋白）100 微克分子 Tris 缓冲液（pH7.4）最后体积为 1.0 毫升。在 37℃ 保温 30 分钟，对照管除 sRNA 在反应应用 $HClO_4$ 终止后加入外，其余的条件均相同。

根据实验结果计算，每微克分子 sRNA 核苷酸可以结合 0.3 ~ 0.35 毫微克分子的 S^{35} - 甲硫氨酸。Ofengand 等^[9] 在用去污剂法制备大肠杆菌 sRNA 的报导中指出每微克分子 sRNA 核苷酸可以结合 0.25 ~ 0.28 毫微克分子的甲硫氨酸。可见由本方法制得的 sRNA 制剂具有较高的接受甲硫氨酸的活力。至于其接受其他氨基酸的能力，尚有待于今后的研究。

提 要

大肠杆菌经酚直接抽提后以硫酸铵处理，可以得到在电泳与超速离心图谱上均一的，具有单一末端及接受甲硫氨酸活力较高的 sRNA。对 sRNA 制品的蛋白质，DNA，多糖含量，比旋光度，紫外光吸收光谱，克原子磷消光系数，核碱组成与链长也进行了测定。

参 考 文 献

[1] Hoagland, M B, Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1957, 24, 215

[2] Hoagland, M. B. Stephenson, M. L. Scott, J. F., Hecht, L. I. & Zamecnik, P. C. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis, *J. Biol. Chem.*, 1958, 231, 241.

[3] Brown, G. L. & Zubay, G. Physical properties of the soluble RNA of *Escherichia coli* J, *Mol. Biol.*, 1960, 2, 287.

[4] Cox, R. A. & Littauer, U. Z., Properties of low molecular weight RNA from *E. coil. ibid.*, 1960, 2, 166.

- [5] Dunn, D. B., Smith, J. B. & Spahr, P. F. Nucleotide composition of soluble ribonucleic acid from *Escherichia coli*, *ibid.*, 1960, 2, 113.
- [6] Von Ehrenstein, G. & Lipmann, F. Experiments on hemoglobin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1961, 47, 941.
- [7] Hecht, L. I., Stephenson, M. I. & Zamecnik, P. C. Binding of amino acids to the end group of a soluble ribonucleic acid. *ibid.*, 1959, 45, 505.
- [8] Monier, R., Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. The preparation and some properties of a low molecular weight ribonucleic acid from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1960, 43, 1.
- [9] Ofengand, E. J., Dieckman, M. & Berg, P. The enzyme synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. III. Isolation of amino acid acceptor ribonucleic acids from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 1741.
- [10] Osawa, S. Preparation and some properties of a soluble ribonucleic acid from yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 43, 110.
- [11] Tissieres, A. Some properties of soluble ribonucleic acid from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 1959, 1, 365.
- [12] Zubay, G. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid. *ibid.*, 1962, 4, 347.
- [13] Zillig, W., Schachtchabel, D. & Krone, W. Untersuchungen zur biosynthese der proteine IV. Zusammensetzung, funktion und spezifität der löslichen ribonucleinsäure aus *E. coli*, Hoppe - seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 1960, 318, 100.
- [14] 吴冠芸、张福徽、杨秋霜、魏文玲、陈煜清、刘树忠、陈海琛、梁植权：可溶性核糖核酸的提取及其理化性质的研究。北京市生理学会，1961年学术年会论文摘要。4-4-1。
- [15] Kirby, K. S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from Mammalian tissues. *Biochem. J.*, 1956, 64, 405.
- [16] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [17] Taussky, H. & Shorr, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *ibid.*, 1953, 202, 675.
- [18] Ceriotti, G. A microchemical determination of desoxyribonucleic acid. *ibid.*, 1952, 198, 297.
- [19] Littauer, U. Z. & Eisenberg, H. Ribonucleic acid from *Escherichia coli* preparation, characterization and physical properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 32, 320.
- [20] Kahan, J. A. A rapid photometric method for the determination of glycogen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, 47, 408.
- [21] 张英珊、方慈祺、梁植权：用 Antweiler 微量电泳仪测定扩散系数的准确性。中国医学科学院实验医学研究所年刊。1958年，216页。
- [22] Wyatt, G. R. The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids. *Biochem. J.*, 1951, 48, 584.
- [23] Matthaei, J. H. & Nirenberg, M. W. Characteristics and stabilization of DNA ase - sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1961, 47, 1580.

PREPARATION AND CHARACTERISTICS OF SOLUBLE RIBONUCLEIC ACID FROM *ESCHERICHIA COLI*

W_U K_{UAN}-YUN, H_U P_{ING}-CHENG, Y_{ANG} C_{HUI}-SHUANG, L_{IU} S_{HU}-CHUNG, C_{HANG} F_U-HUI,
C_{HEN} Y_U-CHING, W_{EI} W_{EN}-LING, L_{IU} C_{HENG}-PIN, C_{HEN} H_{AI}-SHENG AND L_{IANG} C_{HUI}-CHUAN

(Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Chinese Academy of Medicine Sciences, Peking)

ABSTRACT

A simple method is suggested for the preparation of relatively large quantity of soluble ribonucleic acid from *E. coli* by direct extraction of the bacterial cells with phenol, followed by fractionation with ammonium sulphate. The product is found to be homogeneous as judged by its electrophoretic and sedimentation patterns. It contains only adenosine as the terminal nucleoside and from the content of which, the chain is estimated to consist of 78 nucleotides. Its ability to

accept S^{35} - methionine is rather high as compared with that reported in the literature.

The chemical and physico - chemical characteristics of the product, such as protein, polysaccharide, deoxyribonucleic acid and nucleo - base contents, specific rotation, ultraviolet absorption spectrum, and atom phosphorus extinction coefficient, have also been determined.

[全文刊登在: 生物化学与生物物理学报, 1963, 3 (4) :419 ~ 425]

靛玉红治疗慢性粒细胞白血病 疗效原理的研究

——靛玉红与 DNA 的结合作用及其结合键型的鉴别

吴冠芸 刘敬忠 方福德 左 瑾

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

摘要 本文应用吸收光谱分析法、同位素结合法、DNA 融解曲线法及其他一些方法, 证明了靛玉红与 DNA 之间具有结合作用。二者结合的最大分子比例(以靛玉红:脱氧核苷一磷酸计)为 46:1000, 结合反应的平衡常数 $K = 5.7 \times 10^6$; 结合作用发生迅速, 无碱基特异性; 热变性 DNA 能结合更多的药物分子; 靛玉红与 DNA 结合的主要键型为氢键, 但当靛玉红浓度大于一定限度时, 还出现另一种形式的结合。

靛玉红是我国首创的抗白血病药物。在临床上对慢性粒细胞白血病有较好的疗效, 在其疗效原理的研究中, 发现对人粒细胞白血病细胞及某些类型动物可移植性肿瘤细胞 DNA 合成具有显著的抑制作用^[1,2], 并观察到, 在药物作用的最初阶段, 靶细胞内 dNTP* 库显著增大^[3]。这些结果表明靛玉红阻碍了 dNTP 聚合成 DNA 的过程。众所周知, 在 dNTP 的合成不受抑制的情况下, DNA 聚合过程受阻的原因有二: 一是药物与 DNA 模板直接作用, 从而影响模板的结构和功能; 二是药物对 DNA 聚合酶的抑制作用, 或与两者均有关。为了进一步探明靛玉红抑制 DNA 合成的机制, 我们应用吸收光谱分析法, 同位素结合法, DNA 融解曲线法及其他一些方法研究证明了靛玉红在体外系统中与 DNA 之间有结合作用, 并对这种结合作用的性质及键型作了研究和鉴别。

一、材料和方法

1. 药品和试剂 靛玉红, 中国医学科学院药物研究所产品, 溶于乙二醇乙醚后使用。¹⁴C-靛玉红, 中国医学科学院放射医学研究所产品, 比放射性为 57 毫居里/毫克分子, 使用前称取少量用乙二醇乙醚溶解之。小牛胸腺 DNA, 中国科学院生物物理研究所试剂厂产品, 纯度 98%, 溶于 PEB 液(见下)后使用。热变性的条件是: DNA 溶液在 100℃ 水浴中放置 15 分钟, 立即转入冰水浴中半小时以上。A, T, G, C 及其相应的核苷和核苷酸: Serva 产品。脱氧核糖核酸酶(DNase): Carl Roth (西德) 产品。眼镜蛇毒由中山医学院提供。其他所用试剂均为分析纯。

2. 实验方法

(1) 靛玉红与 DNA、核苷酸、核苷和核碱之间反应的分光光度法测定 反应介质为 PEB - (1mM 磷酸钠 - 0.1mM EDTA 缓冲液, pH7.6) - 乙二醇乙醚 (2:1, V/V)。靛玉红及其与 DNA、核苷酸、核苷及核碱在室温反应后的吸收光谱, 用岛津 UV - 300 型分光光度计(单波长双光束

本文 1981 年 10 月 16 日收到。

* 本文简写如下: dNTP - 脱氧核苷三磷酸, DNA - 脱氧核糖核酸, A, T, G, C 分别为腺嘌呤, 胸腺嘧啶, 鸟嘌呤和胞嘧啶。