

TRANSFER RIBONUCLEIC ACIDS
—STRUCTURE, FUNCTION AND SYNTHESIS

转移核糖核酸

——结构、功能与合成

● 王德宝 刘望夷 编著



浙江科学技术出版社

TRANSFER RIBONUCLEIC ACIDS
—STRUCTURE, FUNCTION AND SYNTHESIS

转移核糖核酸

——结构、功能与合成

● 王德宝 刘望夷 编著

浙江科学技术出版社

(浙) 新登字第3号

责任编辑：吕粹芳

封面设计：金 晖

转 移 核 糖 核 酸

——结构、功能与合成

王德宝 刘望夷 编著

*

浙江科学技术出版社出版

浙江新华印刷厂印刷

浙江省新华书店发行

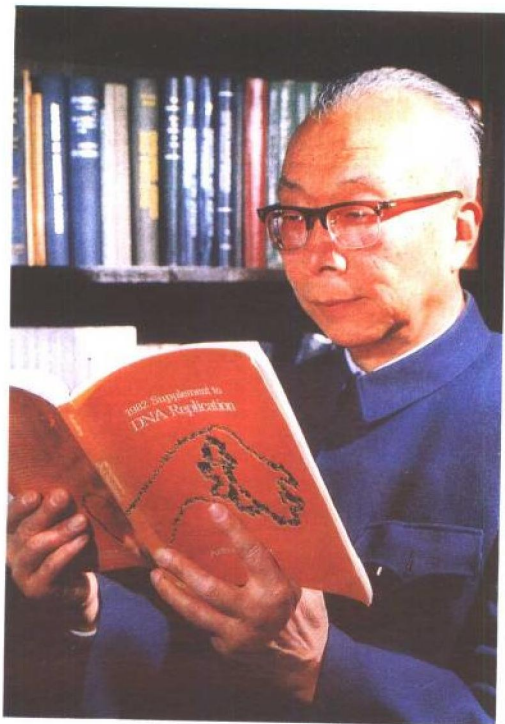
开本：880×1230 1/16 印张：17 插页：6 字数：409 000

1995年12月第一版

1995年12月第一次印刷

ISBN 7-5341-0766-0/Q·24

定价：35.00元



· 王德宝近影

王德宝于1918年出生于江苏省泰兴县。中国共产党党员,九三学社社员,研究员。1940年毕业于中央大学农业化学系。1947年赴美国路易斯安那州立大学留学,1951年在西方保留地大学获博士学位,因美方阻拦,回国未成。1951~1954年在约翰·霍普金斯大学从事博士后研究,1954年回国。现任中国科学院上海生物化学研究所研究员,1980年被选为中国科学院院士,1992年当选为中国科学院学部主席团成员(1992~1996年),是第四、五届全国人民代表大会代表,第六、七届全国人民政治协商会议委员,中国生物化学会第一、二届常务理事。主要研究核酸。

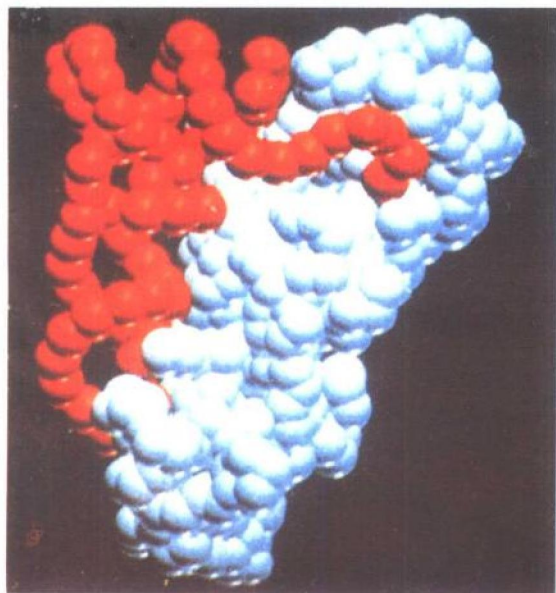
在美7年,发现了胞核苷脱氢酶、核苷水解酶、尿嘧啶氧化酶、5'核苷酸酶、DPN(NAD)激酶和脱磷酸辅酶A激酶等6种与核酸代谢有关的新酶。与人合作建立了一种直接从辅酶I制备辅酶II的酶促方法,几十年来全世界各大药厂采用此法,使药的价格大幅度下降。与人合作阐明了辅酶A中第3个磷酸根的位置。在世界著名杂志和丛书中发表论文21篇。

回国后在现上海生物化学研究所建立了我国第一个核酸研究组。在tRNA方面做了大量工作,如tRNA酶解碎片的分离和结构测定,家蚕丝腺体和酵母RNA的结构比较,tRNA中碱稳定寡核苷酸的分离鉴定,金属离子对tRNA酶解稳定性的作用和脱氨作用对tRNA结构稳定性的影响,苄氨羧酰氯对tRNA分子中碱基的选择性修饰,氨酰tRNA和tRNA的超离心沉降行为的研究以及药物对肿瘤细胞tRNA结构与功能的影响等。曾任会战指挥组组长,完成了酵母丙氨酸tRNA的人工全合成。此项目获中国科学院重大科技成果奖一等奖(1984年),第三届国家自然科学奖一等奖(1987年)和1991年度陈嘉庚生命科学奖。发展了自溶法生产4种5'核糖核苷酸方法,与上海天厨味精厂协作建立了我国第一个生产5'核糖核苷酸车间,填补了我国生化药物生产空白,获得了1978年国家重大科技成果奖。近年来,主要研究tRNA的结构与功能,证明了①酵母丙氨酸tRNA3'第4个核苷酸对tRNA与合成酶的识别有关,但不是绝对必需;②酵母丙氨酸tRNA反密码环不参与tRNA与合成酶的识别;③酵母丙氨酸tRNA分子内的某些核苷酸对tRNA的接受活力或参入活力有关。其中的第2项获得1989年度中国科学院自然科学二等奖。另外“RNA的结构、功能与进化研究”获1992年度中国科学院自然科学一等奖,1993年国家自然科学三等奖。回国后在国内外重要杂志上发表论文百余篇,主要编写了《核酸结构、功能与人工合成》上下册。

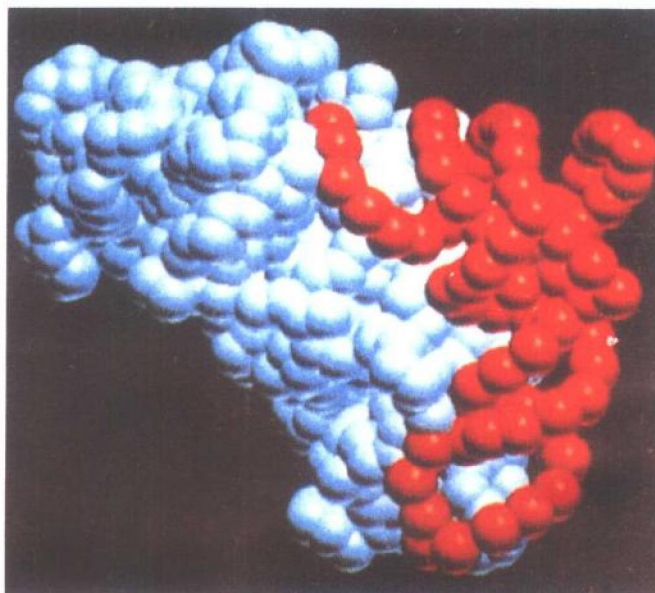


刘望夷近影

刘望夷于1934年9月17日出生于河南省民权县孙六口集。1960年北京大学生物学系生物化学专业毕业,1965年中国科学院上海生物化学研究所研究生毕业。1982~1985年作为访问学者在加拿大圭尔夫大学植物与遗传学系与美国芝加哥大学生物化学与分子生物学系从事研究工作3年;1993~1994年作为访问教授在德国柏林风湿病研究中心从事研究工作一年。现任中国科学院上海生物化学研究所研究员。



(a)

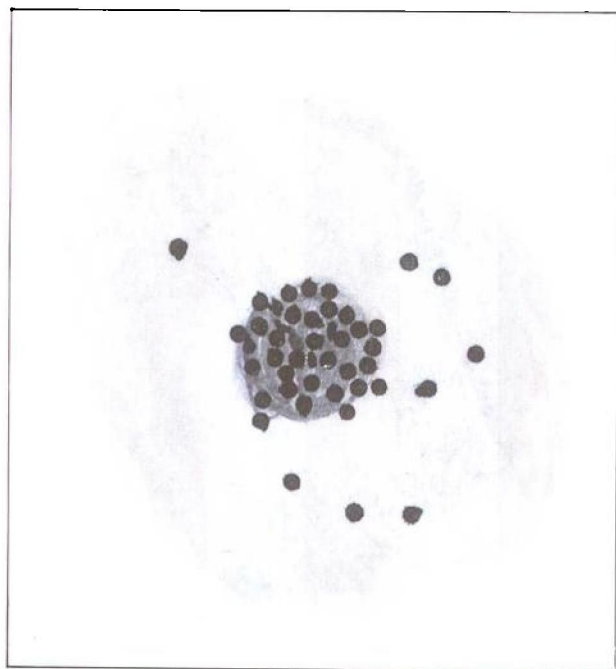


(b)

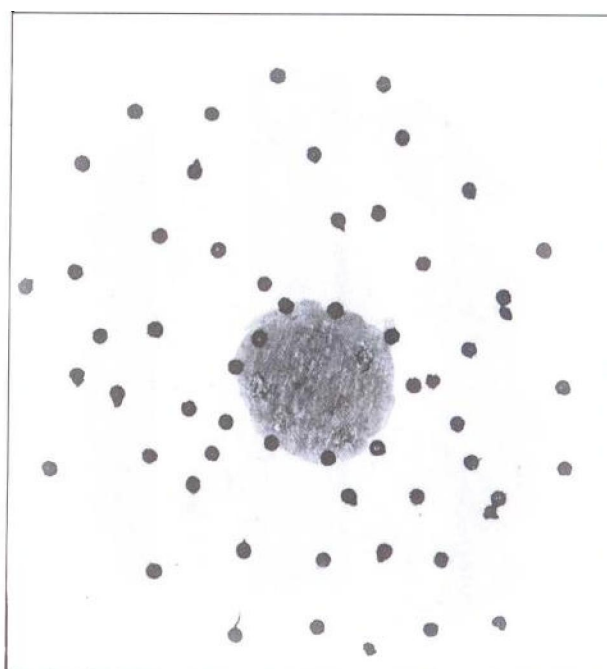
图 3-22 tRNA 与氨酰-tRNA 合成酶复合物的结构模型

(a) tRNA^{Gln}与谷氨酰-tRNA 合成酶复合物

(b) tRNA^{Asp}与门冬氨酰-tRNA 合成酶复合物



(a)



(b)

图 5-1 RNA 在细胞核内合成以后转移到细胞质的情况

(a) 四膜虫细胞在含有³H 标记的胞苷培养液中培养 15 分钟,放射自显影以后黑点显示³H 标记的胞苷参入 RNA 中,所有新合成的 RNA 几乎都集中在细胞核内

(b) 四膜虫细胞在含有³H 标记的胞苷培养液中培养 12 分钟,转移至含有非放射性标记的胞苷培养液中继续培养 88 分钟。在前 12 分钟所有³H 标记的 RNA 后来都转移到细胞质中,细胞核内的 RNA 是由非放射性胞苷合成的,所以无放射性标记的 RNA

序

核酸和蛋白质是两类最基本的生物大分子化合物。核酸的生物合成有赖于酶的催化,而酶是蛋白质,蛋白质在生物体内合成必须在模板上进行,这个模板就是核酸。因此在太古时代,究竟是先有核酸还是先有蛋白质,就类似鸡生蛋和蛋生鸡究竟哪个在先一样,成为生命起源的一个有争议的问题。

生物化学和分子生物学认为核酸是遗传信息的载体,而蛋白质则是担负着生命活动中各种重要功能的生物大分子。核酸又分为两大类,即核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。在合成蛋白质时,DNA把遗传信息通过转录传给RNA,后者作为模板翻译成蛋白质。但在20世纪80年代初期发现RNA不但具有信息,同时也具有生物功能,例如某些RNA具有酶的活力,能催化一些RNA的降解,因此又形成DNA是信息分子,蛋白质是功能分子,而RNA既是信息分子又是功能分子的概念。愈来愈多的人认为在太古时代最早出现的生物大分子应是RNA,而不是DNA或蛋白质,同时初步形成了核酸的形成应早于蛋白质,在核酸中RNA的出现又早于DNA的认识,即在太古时代最早有一个“RNA世界”。

有志于研究生命起源的科学家因此对RNA有了更大的兴趣,到今年(1995年)已进行了14次“RNA加工会议”,每年举行一次,并成立了“RNA学会”,把今年的“RNA加工会议”作为“RNA学会”的第2次学术活动。并于今年3月出版了RNA的期刊,每月一期,由剑桥大学出版社发行,作为“RNA学会”的出版物。

转移核糖核酸(tRNA)在蛋白质生物合成过程中起关键性的作用,是将核酸的遗传信息转译成蛋白质一级结构的生物大分子。它具有以下一些特点:①结构清楚;②功能明确;③在核酸分子中,除了常见的4种核苷外,还存在一些修饰核苷。到1994年年中,在RNA中的修饰核苷共发现了93种,而在tRNA中就有83种之多。因此我们对tRNA的兴趣较大,对它作了近40年的探讨,工作之暇写成本书,供有关同志参考。错误和不当之处如承指出,不胜感谢!

王德宝

1995. 6. 10

编著说明

1. 人名在正文中第1次出现时用全名或缩写名字和姓氏,以后只用姓氏。

2. 生物材料一般不写出学名,需要写出学名者用括号注明。

3. 参考文献的引用格式:

(1) 期刊:作者、年份、题目、期刊名称、卷(或期)号和起止页数。第1作者,姓氏在先名字在后(缩写),其余作者名字在先(缩写)姓氏在后。

(2) 书籍:作者、年份、题目、书名、(卷号)起止页数、编者、出版社和出版地址。

(3) 参考文献编号列在有关内容或有关标题的上角。

(4) 度量衡:米、厘米、升、毫升、微升、千克、克、毫克、微克、摩、毫摩、微摩、微微摩。分子量以kD表示,在260毫微米处光密度以 OD_{260nm} 表示,bp表示碱基对,kb表示千碱基对。

5. 专业名词的译法:除一般的专业名词按标准译法以外,一些尚无标准译名(如修饰核苷Q等)或最近出现的名词(如Lysidine),本书提出一些暂译名与读者商榷。oligo译为“寡”,poly译为“多聚”。

6. 由于要说明的问题不同,各章图中tRNA的二级或三级结构中用不同的符号表示氢键。多数用“—”表示标准碱基对间的氢键,“·”表示摆动碱基对之间的氢键;有的则用“·”表示标准碱基对之间的氢键,而摆动碱基对之间的氢键不标出;有的则用条带表示标准碱基对之间的氢键。上述表示法在有关图中皆有说明。

7. 王恩多、阮康成、陈常庆、汪成尧和祁国荣先生等分别审阅了部分章节并提出许多修改意见。全书写作过程中,刘小菱同志承担全部打字任务,沈连康同志协助绘图。作者向他们表示衷心感谢!

编著者

第1章 转移核糖核酸研究的历史概况

1.1.	从研究蛋白质生物合成中得到的启示	(1)
1.2.	“连接体”(adaptor)假说	(2)
1.3.	氨基酸激活酶与 tRNA 的发现	(3)
1.4.	酵母丙氨酸 tRNA——第 1 个测定全序列的核酸	(5)
1.5.	70 年代的研究情况	(7)
1.6.	80 年代的研究情况	(9)
1.6.1.	人工合成具有完整生物活力的酵母丙氨酸 tRNA	(9)
1.6.2.	tRNA 的生物合成	(11)
参考文献		(12)

第2章 tRNA 的制备、纯化与序列分析

2.1. tRNA 的制备	(16)
2.1.1. 超离心法制备 tRNA	(16)
2.1.2. 苯酚抽提法从完整的细胞制备 tRNA	(16)
2.1.3. 用阳离子去污剂从各种生物组织中制备 tRNA	(17)
2.1.4. 其他方法	(17)
2.2. tRNA 的纯化	(17)
2.2.1. 逆流分溶法	(17)
2.2.2. 柱层析法	(19)
2.2.3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	(26)
2.3. RNA 序列分析的战略	(28)
2.3.1. 逐步降解战略	(28)
2.3.2. 片段重叠战略	(28)
2.3.3. 凝胶直读战略	(28)
2.4. tRNA 序列分析中常用的工具酶	(29)
2.4.1. 牛胰核糖核酸酶 (RNase A)	(29)
2.4.2. 高峰淀粉酶核糖核酸酶 T ₁ (RNase T ₁)	(29)
2.4.3. 高峰淀粉酶核糖核酸酶 T ₂ (RNase T ₂)	(29)
2.4.4. 核糖核酸酶 U ₂ (RNase U ₂)	(29)
2.4.5. 核糖核酸酶 N ₁ (RNase N ₁)	(30)
2.4.6. 核糖核酸酶 Phy M (RNase Phy M)	(30)
2.4.7. 小球菌核酸酶	(30)

2.4.8. 蛇毒磷酸二酯酶	(30)
2.4.9. 牛脾磷酸二酯酶	(30)
2.4.10. 大肠杆菌碱性磷酸单酯酶 (PMase)	(31)
2.4.11. T_4 多核苷酸激酶 (PNKase)	(31)
2.4.12. T_4 RNA 连接酶	(31)
2.4.13. 多核苷酸磷酸化酶 (PNPase)	(31)
2.5. 寡核苷酸的分离	(32)
2.5.1. 柱层析	(32)
2.5.2. DEAE-纸层析和纸电泳	(34)
2.5.3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(35)
2.5.4. 薄板层析	(36)
2.6. 碱基组成分析和末端分析方法	(38)
2.6.1. 碱基组成分析方法	(38)
2.6.2. 末端分析方法	(38)
2.7. 末端标记	(38)
2.7.1. 5'端放射性同位素标记	(38)
2.7.2. 3'端放射性同位素标记	(39)
2.7.3. 3'端荧光标记	(39)
2.8. tRNA 序列分析的检测方法	(39)
2.8.1. 紫外光吸收法	(39)
2.8.2. 放射自显影法	(40)
2.8.3. 紫外荧光法	(40)
2.9. 测定 tRNA 序列的方法	(40)
2.9.1. 利用核酸碱基吸收紫外光性质的测定方法	(40)
2.9.2. 放射性同位素前标记的测定方法	(45)
2.9.3. 放射性同位素后标记的测定方法	(46)
2.9.4. 3'端荧光标记的测定方法	(53)
参考文献	(54)

第3章 tRNA 的结构

3.1. tRNA 的碱基组成特征	(60)
3.2. tRNA 的修饰核苷	(60)
3.2.1. 新修饰核苷的化学结构分析	(73)
3.2.2. 已知修饰核苷的种类及化学结构	(74)
3.2.3. 鉴定修饰核苷的方法	(75)
3.2.4. 修饰核苷酸在各种生物组织中的分布	(78)
3.3. tRNA 的一级结构	(78)

3.3.1. 1965~1990 年底 tRNA 一级结构研究概况	··· (78)
3.3.2. tRNA 一级结构的特征	····· (79)
3.3.3. tRNA 一级结构比较	····· (80)
3.4. tRNA 的二级结构	····· (80)
3.4.1. 三叶草二级结构模型	····· (80)
3.4.2. 三叶草二级结构的特殊类型	····· (81)
3.4.3. 不变核苷酸和半不变核苷酸	····· (85)
3.4.4. 修饰核苷在 tRNA 分子中的位置	····· (88)
3.4.5. 起始 tRNA 的结构特点	····· (88)
3.4.6. 校正 tRNA	····· (90)
3.5. tRNA 的三级结构	····· (91)
3.5.1. tRNA 的结晶	····· (91)
3.5.2. 酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构	····· (91)
3.5.3. 起始 tRNA 及其他 tRNA 的三级结构	····· (95)
3.6. tRNA 在水溶液中的构型及研究方法	····· (96)
3.6.1. 化学修饰法	····· (96)
3.6.2. 核磁共振 (NMR) 谱法	····· (100)
3.6.3. 核酸酶水解法	····· (101)
3.6.4. 寡核苷酸结合实验	····· (103)
3.6.5. 氨酰化对 tRNA 构型的影响	····· (104)
3.7. tRNA 3' 端核糖的 2' 和 3' 羟基氨酰化的专一性	··· (105)
3.7.1. 3' 端修饰的 tRNA 的制备	····· (105)
3.7.2. 3' 脱氧 tRNA 的氨酰化	····· (105)
3.8. 密码子诱导 tRNA 构型的转变	····· (106)
3.9. tRNA 结构小结	····· (106)
3.10. tRNA 与氨酰-tRNA 合成酶复合物的空间结构	····· (107)
3.10.1. 大肠杆菌 tRNA ^{Gln} 与谷氨酰胺-tRNA 合成酶和 ATP 三元复合物的空间结构	····· (107)
3.10.2. 酵母 tRNA ^{Asp} 与门冬氨酰-tRNA 合成酶二元复合物的空间结构	····· (108)
3.11. RNA 病毒基因组 3' 端的类 tRNA 结构	····· (108)
参考文献	····· (111)

第 4 章 tRNA 的生物功能

4.1. 氨基酸的活化	····· (117)
4.1.1. 氨酰-tRNA 合成酶	····· (117)

4.1.2. 氨酰-tRNA 合成酶对 tRNA 的识别	(120)
4.1.3. 氨酰-tRNA 合成酶识别 tRNA 的分子基础	(124)
4.2. tRNA 在启动肽链合成中的作用	(126)
4.2.1. 起始 tRNA 的作用	(126)
4.2.2. 肽链合成的起始	(127)
4.3. tRNA 在肽链延伸中的作用	(130)
4.3.1. 氨酰-tRNA · 核糖体 · mRNA 三元复合物的形成	(130)
4.3.2. 转肽反应	(130)
4.3.3. 移位	(132)
4.3.4. tRNA 结合核糖体的三点模型	(132)
4.4. tRNA 不参与肽链合成的终止	(133)
4.5. 校正 tRNA (suppressor tRNA) 的功能	(134)
4.5.1. 三类校正 tRNA	(134)
4.5.2. 研究校正 tRNA 的系统	(136)
4.5.3. 校正的机制	(137)
4.5.4. 天然的校正 tRNA	(138)
4.5.5. 硒代半胱氨酸 tRNA 参与含硒氨基酸与含硒蛋白质的合成	(138)
4.6. 修饰核苷的功能	(141)
4.6.1. 修饰核苷对 tRNA 接受氨基酸活力的影响	(141)
4.6.2. 修饰核苷在氨基酸参入蛋白质过程中的功能	(142)
4.7. tRNA 生物功能的多样性	(144)
4.7.1. 谷氨酰-tRNA 参与叶绿素的生物合成	(144)
4.7.2. 细菌细胞壁的合成	(146)
4.7.3. 氨酰磷脂酰甘油的合成	(146)
4.7.4. 在蛋白质 N 端加上一个氨基酸	(146)
4.7.5. 甘氨酰酯多糖的合成	(147)
4.7.6. 反转录酶的反转录引物	(148)
4.7.7. 酶的抑制剂	(148)
4.7.8. 对细胞物质代谢的调控	(148)
4.7.9. tRNA 与疾病的关系	(152)
4.8. tRNA 的起源	(152)
参考文献	(153)

第5章 tRNA 的生物合成

5.1. 细胞内 RNA 的合成部位及其由细胞核向细胞质的转移	(158)
5.2. tRNA 基因 (tDNA) 的组织与结构	(159)
5.2.1. tRNA 基因的特点	(159)
5.2.2. 原核细胞 tRNA 基因的组织与结构	(160)
5.2.3. 大肠杆菌、沙门氏杆菌和枯草杆菌中 tRNA 基因组织与结构的比较	(163)
5.2.4. 真核生物细胞核 tRNA 基因的组织与结构 ...	(166)
5.2.5. tRNA 基因的结构	(168)
5.2.6. 线粒体 tRNA 基因	(171)
5.2.7. 叶绿体 tRNA 基因	(174)
5.2.8. 噬菌体 tRNA 基因的组织与结构	(176)
5.3. tRNA 基因的转录	(178)
5.3.1. 原核细胞 tRNA 基因的转录	(178)
5.3.2. 真核生物细胞核 tRNA 基因的转录	(180)
5.3.3. 线粒体 tRNA 基因的转录	(182)
5.3.4. 叶绿体 tRNA 基因的转录	(184)
5.3.5. 噬菌体 tRNA 基因的转录与加工	(184)
5.4. tRNA 前体的加工	(186)
5.4.1. RNase P 和 tRNA 前体 5' 端的加工	(186)
5.4.2. tRNA 前体 3' 端的加工及有关的酶	(192)
5.4.3. tRNA-核苷酸转移酶和 tRNA 的 3' 端添加 CCA 序列	(197)
5.4.4. tRNA 前体中居间序列的切除	(198)
5.4.5. 多顺反子中 tRNA 前体的加工	(200)
5.4.6. tRNA ^{His} 前体的特殊加工	(201)
5.5. tRNA 分子中修饰核苷的生物合成	(202)
5.5.1. tRNA-修饰酶的识别信号和修饰部位	(202)
5.5.2. 细菌 tRNA-修饰酶合成的调节和遗传学	(203)
5.5.3. 修饰核苷的生物合成与细胞的代谢和发育 ...	(204)
5.5.4. 腺苷 (Q) 的生物合成	(205)
5.5.5. 假尿苷 (Ψ) 的生物合成	(208)
5.5.6. 核糖胸腺苷 (rT) 的生物合成	(209)
5.5.7. 异戊烯腺苷 (i ⁶ A) 及其衍生物 (ms ² i ⁶ A 和 ms ² io ⁶ A) 的生物合成	(209)

5.5.8. 硫尿苷 (s^2U 和 s^4U) 的生物合成	(210)
5.5.9. 硒尿苷(se^2U 和 se^4U)及其衍生物的生物合成 ...	(211)
5.5.10. 甲基核苷的生物合成	(212)
参考文献	(212)

第6章 tRNA 的人工合成

6.1. 国外核酸人工合成的概况	(217)
6.1.1. 寡脱氧核糖核苷酸的合成	(217)
6.1.2. 重复序列的多聚脱氧核糖核苷酸对破译遗传密码 的贡献	(220)
6.1.3. tRNA 基因的人工合成	(223)
6.1.4. 寡核糖核苷酸的人工合成	(231)
6.2. 酵母丙氨酸 tRNA ($tRNA^{Ala}$) 的人工全合成	(235)
6.2.1. 酵母 tRNA ^{Ala} 全合成的战略	(235)
6.2.2. 化学方法合成 2~4 个核苷酸的小片段	(237)
6.2.3. 化学与酶促反应相结合合成 3~8 个核苷酸 小片段	(237)
6.2.4. T ₄ RNA 连接酶与 T ₄ 多核苷酸激酶相结合 合成大片段寡核糖核苷酸	(238)
6.2.5. 3' 半分子 (36~76 序列) 的人工合成	(239)
6.2.6. 5' 半分子 (1~35 序列) 的人工合成	(242)
6.2.7. tRNA ^{Ala} 的人工半合成	(243)
6.2.8. 酵母丙氨酸 tRNA 的人工全合成	(247)
6.2.9. 酵母 tRNA ^{Ala} 人工全合成的理论意义	(252)
6.3. 其他 tRNA 类似物的人工合成	(253)
6.3.1. 大肠杆菌甲酰甲硫氨酸 tRNA ($tRNA^{fMet}$) 的人 工合成	(253)
6.3.2. 大肠杆菌甘氨酸 tRNA ₂ 的 5' 半分子的人工 合成	(257)
6.3.3. 大肠杆菌 tRNA ^{Ala} 的全合成	(257)
参考文献	(258)

附 录

附录1 氨基酸的中英文名称及缩写符号	(261)
附录2 tRNA 和氨酰-tRNA 合成酶等的表示方法	(262)
附录3 遗传密码字典	(262)

第 1 章 转移核糖核酸研究的历史概况

在科学史上,常有一些重大的科学成就由于远远走在时代的前面,超越了人们的认识水平,得不到同时代人的承认而遭长期埋没。孟德尔上个世纪中叶发现的遗传定律直到本世纪初才引起人们重视就是一个著名例子。另外一些科学发现,由于它们是众多科学家同时研究的热点,就容易为人们接受,立即得到科学界的承认,转移核糖核酸(tRNA)的发现就属于这一类。1957年 tRNA 一经发现,就引起人们高度重视,其原因就是一开始就认识到它在蛋白质生物合成过程中起着重要的作用。在叙述 tRNA 的结构、功能与合成前,应当首先回顾一下人们对蛋白质生物合成研究的历史概况。

1. 1. 从研究蛋白质生物合成中得到的启示^[1~9]

本世纪 30 年代, Henry Borsook 和 G. L. Keighley 指出,有机体停止生长后,其细胞内的蛋白质仍在不断地合成和分解着。几年以后, Rudolf Schoenheimer 等使用稳定同位素²H 和¹⁵N 标记的化合物证实了细胞内蛋白质的这种动态过程。Max Bergmann 和 Heinz Fraenkel-Conrat 认为,在适当条件下利用某些蛋白水解酶的逆反应可以合成蛋白质。这种观点,在 40~50 年代曾受到很多人的青睐。其实,这样的反应只能在试管中的特定条件下进行,在活细胞中是不可能发生的,因为这种合成方式无法提供由氨基酸连接成多肽链所需要的大量能量。Fritz A. Lipmann 是一位研究生物能量成绩卓著的权威。他首先提出蛋白质合成需要能量,而这种能量则储存于活化的氨基酸中。活化氨基酸是由 ATP 与氨基酸直接反应生成的。它再与另一个氨基酸反应形成肽键,如此反复多次,最终合成蛋白质的多肽链。

特定的蛋白质是由氨基酸按特定序列组成的。那么细胞内什么物质决定蛋白质中氨基酸的排列顺序呢?这个问题在 50 年代以前是无法得到令人信服的答案的。Torbjorn Casperson 和 Jean Brachet 实验室分别观察到迅速生长着(合成大量蛋白质)的组织含有高浓度的核糖核酸

(RNA)。他们最早指出 RNA 与蛋白质生物合成有密切关系。

烟草花叶病毒 (TMV) 仅由蛋白质外壳和 RNA 内核组成。重组实验结果表明, 改变 TMV 的外壳蛋白质的性质, 对后代病毒的性状没有影响; 但改变其 RNA 的性质, 则产生与亲代不同的病毒品系。这个事实说明, RNA 决定蛋白质的性质, 而不是相反。

脱氧核糖核酸 (DNA) 与蛋白质生物合成有没有关系? 这个问题在 50 年代以前是同样无法解决的。当时只知道没有细胞核的红血球可以合成血红蛋白, 似乎说明 DNA 与蛋白质生物合成没有直接关系。

另外一些实验也证明, RNA 与蛋白质生物合成是有关的, 如 RNA 的碱基类似物, 取代正常的碱基参入到 RNA 分子中对蛋白质合成会产生明显的影响, 而其他干扰 DNA 合成的物质则对蛋白质生物合成几乎没有直接的影响。

在人们认识蛋白质生物合成的过程中, 50 年代初 Alexander L. Dounce 发表的一篇文章特别值得重视。他在这篇文章中提出的几个新概念, 后来证明多数是正确的。第一, RNA 是细胞内蛋白质合成的模板; 第二, 蛋白质中氨基酸的特定序列决定于 RNA 中核苷酸的特定序列; 第三, RNA 中每 3 个核苷酸为一组决定蛋白质的一个氨基酸, 也就是说遗传密码为三联体。这一预言在 10 年以后才得到证实。1953 年 Dounce 还进一步提出, 如果基因是由 DNA 组成的, 那么 DNA 可以作为模板合成 RNA, RNA 进而作为模板合成蛋白质。不过, 他错误地认为, 氨基酸可以直接在 RNA 模板上合成蛋白质。

1.2. “连接体” (adaptor) 假说^[10~12]

1944 年, Oswald T. Avery 及其同事证明了 DNA 决定肺炎球菌的性状遗传。1952 年 Alfred D. Hershey 和 Martha Chase 研究大肠杆菌的 T2 噬菌体, 也证明 DNA 是噬菌体的遗传物质。1953 年, James D. Watson 和 Francis H. C. Crick 建立的 DNA 双螺旋模型从结构上给 DNA 作为遗传物质提供了强有力的说明, 从而奠定了现代分子生物学的坚实基础。DNA 储存细胞的遗传信息, 而蛋白质则是细胞的结构元件并催化细胞内的化学反应, 推动蛋白质和其他物质的合成与分解、氧化与还原以及能量的生产与利用等。所有这些反应共同构成了细胞的生命过程。DNA 中的遗传信息决定蛋白质的性质, 也就是 DNA 的 4 种核苷酸的排列顺序决定了蛋白质的 20 种氨基酸的排列顺序。简言之, 生命现象最基本和最重要的就是 DNA 序列中编排的密码子如何破译和何时破译为蛋白质的氨基酸序列的过程。

为了研究遗传密码问题, 英国剑桥 20 位科学家组成了一个“RNA 领带俱乐部”。每个成员佩带一条有一种氨基酸名称的领带, 另外 4 个名誉成员各带一条饰有 DNA 中一种脱氧核苷酸名称的领带, 他们经常在一起讨论遗传密码问题。1955 年 Crick 在写给该俱乐部的一篇短文中指出, 他不相信氨基酸能直接与模板结合, 因为在生理条件下模板上的碱基都不带电荷, 不能与酸性氨基酸结合, 并且模板上的碱基也不可能形成区分亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸的疏水“槽穴”。Crick 预见到, 在合成蛋白质时, 氨基酸必须通过一种“连接体”分子才能与模板结合, 这种“连接体”应该是一种 RNA。氨基酸结合在“连接体”上, 通过碱基配对方式“连接体”与

模板相结合。Crick 还认为, 20 种氨基酸应该由 20 种不同的“连接体”来携带, 氨基酸通过一种酶的催化和“连接体”连接。Crick 预言, 这种“连接体”RNA 如果有 25 个核苷酸就嫌太大了。太大的“连接体”不容易结合到模板的正确位置上, 很可能一个“连接体”分子只有 3 个核苷酸。

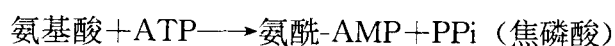
1.3. 氨基酸激活酶与 tRNA 的发现^[13~26]

tRNA 是在研究蛋白质生物合成中发现的。本世纪 50 年代到 70 年代是研究蛋白质生物合成的黄金年代, 尤其是 1957 年到 1966 年, 发现了 tRNA 和信使 RNA (mRNA), 破译了全部的遗传密码子等。国际上著名的生物化学丛书《生物化学年鉴》(Annual Review of Biochemistry) 在这期间几乎每年都刊有综述蛋白质生物合成的文章, 重点讨论 tRNA 的研究进展。我国的 tRNA 研究也是在这个时期开始的。

50 年代, 美国麻萨诸塞州总医院 Paul C. Zamecnik 领导的一个研究组对蛋白质生物合成的研究在世界上享有盛名。Zamecnik 受过医学训练, 他认为对蛋白质生物合成的研究是了解细胞生长和癌变等问题的关键。细胞内含有大量不同种类的蛋白质, 要区别哪种蛋白质是新合成的, 在当时还是一项相当困难的工作。蛋白质是由氨基酸构成的, 如果使用标记的氨基酸, 并测定它参入蛋白质的速率将是研究蛋白质生物合成的一项有效手段。在这方面, 放射性同位素标记的氨基酸是一种理想的材料。放射性同位素化合物是第二次世界大战中原子弹工程的副产物。战后不久, 它便被应用于一般的科学研究工作。在 Zamecnik 实验室成功地制备了¹⁴C 标记的氨基酸并最早用于蛋白质生物合成的研究。这一成就使他的研究组在这一领域中处于领先地位。

超离心技术在蛋白质生物合成研究中曾发挥过卓有成效的作用。使用这种技术证明, 细胞内蛋白质合成是在核糖体(当时称微粒体)上进行的。

早在 40 年代, Lipmann 等几家实验室就已认识到, 多肽链的形成需要氨基酸的活化。50 年代中期在 Zamecnik 实验室工作的一位年轻科学家 Mahlon B. Hoagland 发现, 在大鼠肝的抽提液中存在着氨基酸激活酶。在分级纯化过程中, 这种酶在 pH5 即沉淀下来, 所以又称“pH5 酶”。这种酶催化氨基酸与 ATP 反应生成氨酰-腺苷酸。这是一种羧酸和磷酸的混合酸酐, 是一种高能化合物。



通过这一反应, 氨基酸被活化。测定 pH5 酶活性的方法有两种: ①氨酰-AMP 与羟胺反应生成羟肟酸; ②³²P 标记的焦磷酸与氨酰-AMP 反应, 生成³²P 标记的 ATP。Hoagland 正是通过第 2 种测活方法发现了氨基酸激活酶的。

如果用¹⁴C 标记的氨基酸, 就可以检测这种放射性氨基酸是否在核糖体上参入到蛋白质中去。Zamecnik 实验室为了研究细胞的各个组分在合成蛋白质的同时是否也可能合成 RNA, 他们又把放射性同位素标记的核苷酸与蛋白质合成体系(含 pH5 酶和 ATP 等)一起保温, 看看这些放射性核苷酸是否也能参入到 RNA 中去。他们的这种想法, 现在看来是不现实的, 因为 RNA 的生物合成需要 DNA 模板和 4 种核苷三磷酸, 而这些物质在蛋白质合成体系中不可能都存在,