

3 讨论

本工作观察了束缚应激 12 h 后,血清对淋巴细胞转化抑制作用所持续的时间.结果表明其作用在 21.3 h 后降低一半.如果是血清的抑制作用决定于其中抑制蛋白的浓度,则可以认为此蛋白生物作用的半寿期为 21.3 h. 由于我们并未直接测定此蛋白的浓度,因此还不能排除以下两种可能性:()淋巴组织在应激结束后仍不断释放这类蛋白质,因此延长了血清抑制作用的时间;()体内是否还有另外一些能对抗此抑制蛋白的物质,它们的存在可以降低和缩短抑制蛋白的作用时间,因此,此蛋白存在的半寿期与它的作用半寿期之间是否还有一些差别,须在获得蛋白纯品后做进一步验证.

手术和烧伤后病人血清均可抑制正常淋巴细胞的转化,中等手术病人和中度烧伤病人血清的抑制作用可持续一个月左右^[6]. 因此血清对淋巴细胞转化的抑制作用,可以作为一个反映病人的抗感染能力和预后的指标. 本工作的结果表明,小鼠束缚应激后血清对淋巴细胞转化抑制作用的持续时间短于上述病人血清的作用时间. 这种差别的确切原因还不清楚,我们推测可能与应激的类型、强度、持续时间以及种属特异性有关.

参 考 文 献

- 1 范少光,查宏斌,李小蕊. 束缚应激小鼠血清中产生的免疫抑制因子及其调节. 科学通报, 1989, 34(20): 1 584~ 1 587
- 2 汪静雪,陈 微,范少光,等. 束缚应激动物血清中免疫抑制因子产生部位的初步研究. 生理学报, 1992, 44(6): 541~ 548
- 3 邵 黎,高 珊,丁桂凤. 束缚应激引起淋巴结产生淋巴细胞转化的因子. 科学通报, 1995, 40(2): 164~ 167
- 4 汪静雪,梅 林,范少光,等. 脑内 GABA 能神经元对抗应激后血清淋巴细胞转化抑制因子的产生. 科学通报, 1992, 37(7): 767~ 768
- 5 Zuo Y C, Li Y F, Fan S G. Interleukin-1 in the brain is involved in generation of the serum suppressive factor induced by restraint stress in mice. Neuroimmunomodulation, 1995, 4(2): 82~ 87
- 6 Lundy J, Ford C M. Surgery, trauma and immune suppression: involving the mechanism. Ann Surg, 1983, 197(4): 434~ 438

(1997-10-21 收稿, 1998-02-20 收修改稿)

寡聚核苷酸多种不同结构的圆二色谱研究

孙雪光 曹恩华^{*} 白春礼^④ 何裕建 秦静芬

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ④中国科学院化学研究所, 北京 100080. * 联系人)

摘要 寡聚核苷酸在一定条件下可形成双链、三链、四链等多种不同结构,这些结构的 CD 谱存在明显的不同. 其共同的谱图特征是在 240 nm 处有一负峰,而在 260~ 300 nm 处则表现出各自的特异性,许多因素诸如:各条链的极性,糖环的折叠,核苷键的取向以及碱基的堆积和序列等均不同程度地影响其结构而使其谱图展示出多样性和复杂性. 通过对这些谱图的比较和研究,将有助于我们对其结构的了解和新结构的预测,从而为进一步探索其潜在的生物学功能提供了依据.

关键词 双链 三链 四链 CD 谱

寡聚嘌呤_寡聚嘧啶区在真核 DNA 中大量存在,如组成为 $[d(G\cdot A)\cdot d(T\cdot C)]_{>20}$ 的序列约占

整个哺乳动物基因的0.4%,并且发现在许多生物过程中发挥作用. 尽管这种序列在细菌和噬菌体中极少发现,但在高等的脊椎动物中却相当普遍,且其中一些序列高度保守. 它们主要位于真核基因的非编码区,如内含子和3'/5'的flanking区,可能参与基因的转录调节,重组和进化.

这些序列无论在体内或体外都对单链核酸专一性内切酶敏感,表明其构型有别于标准的B_DNA. 通过研究已发现在不同的条件下,这些序列所形成的DNA构象具有多态性. 如d[(GA)₇G]在10 mmol/L MgCl₂,中性pH下可形成两股链均是5'_3'定位的平行双链DNA(ps_DNA)^[1];而在酸性pH和负超螺旋力的作用下,这些束道通过在双链大沟处形成Hoogsteen键而转变为分子内的三链DNA(H_DNA)^[2];此外在染色体的端粒区,还发现富含G的寡聚嘌呤序列可形成四链DNA^[3]. 这些多态结构无论在生化反应上,还是在热力学特征上都与标准的B_DNA有较大的差异,因此研究它们相互间的差异,对于深入了解各自潜在的生物学功能具有重要意义.

由于核苷和核苷酸在核酸中不同的地方连接时,表现为不同的科顿效应,所以圆二色(CD)性测定是多核苷酸结构变化最灵敏的探针之一^[4]. 目前已有文献报道采用CD光谱来作为研究寡聚核苷酸多态结构的一种手段,我们也曾用它来研究过三链DNA的结构^[5],但对这些结构的CD谱进行系统地研究则未见报道. 为此,本文测定了由寡聚核苷酸所形成的双链、三链、四链等不同构象的CD光谱,并对这些谱图进行了较为详细的比较和研究,从而在光谱学特性上进一步证实了它们结构的特异性.

1 材料与方法

各寡聚核苷酸均从Genset公司(美国)购得,经凝胶电泳和NMR检测后,其纯度大于90%. 根据制备双链,三链,四链的要求,把不同的寡聚核苷酸按适当比例混合(B型双链:d[C(TC)₅]:d[G(AG)₅]=1:1,平行双链:d[G(AG)₇]:d[G(AG)₇]=1:1,三链:d[C(TC)₅]:d[G(AG)₅]=1:2, [G₃A₄G₃]:d[C₃T₄C₃]=2:1,四链:G₃T₄G₃:G₃T₄G₃=1:1, G₄T₂TCG₄:G₄T₂TCG₄=1:1)后加入到含有钠离子或镁离子的缓冲液中,加热至80℃恒温5 min,然后慢慢冷却到室温,在4℃下孵育5~6 h,使用前经HPLC进行分离纯化(其他化学试剂均购自Sigma公司),形成的各种结构见表1.

表1 寡聚核苷酸各样品的结构简图及其形成条件^{a)}

样品	1	2	3	4	5	6
结构	B_DNA	ps_DNA	三链	三链	四链	四链
立体简图 ^{b)}	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
碱基序列	d[C(TC) ₅] • d[G(AG) ₅]	d[G(AG) ₇] • d[G(AG) ₇]	d[C(TC) ₅] • 2d[G(AG) ₅]	2d[G ₃ A ₄ G ₃] • d[C ₃ T ₄ C ₃]	2d[G ₃ TT] [G ₃ TT]	2d[G ₄ TT] [G ₄ TC]
样品浓度	20 μmol/L strand	20 μmol/L strand	30 μmol/L strand	30 μmol/L strand	20 μmol/L strand	20 μmol/L strand
溶液条件	pH 7.2, 10 mmol/L Tris/HCl, 50 mmol MgCl ₂	pH 7.0, 10 mmol/L Tris/HCl, 50 mmol/L MgCl ₂ ·H ₂ O	pH 7.2, 10 mmol/L Tris/HCl, 50 mmol/L MgCl ₂	pH 7.2, 10 mmol/L Tris/HCl, 50 mmol/L MgCl ₂	pH 7.0, 10 mmol/L Tris/HCl, 100 mmol/L NaCl·H ₂ O	pH 7.0, 10 mmol/L Tris/HCl, 150 mmol/L NaCl·H ₂ O

a) CD谱仪使用JASCO_720 Spectropolarimeter, 仪器条件为: 扫描范围320~200 nm, 石英杯径1 mm, 扫描速度为100 nm/min, 灵敏度0.5 m(°), 时间常数4 s, 温度25℃, 参比样品为缓冲溶液; b) 各简图见表1附图

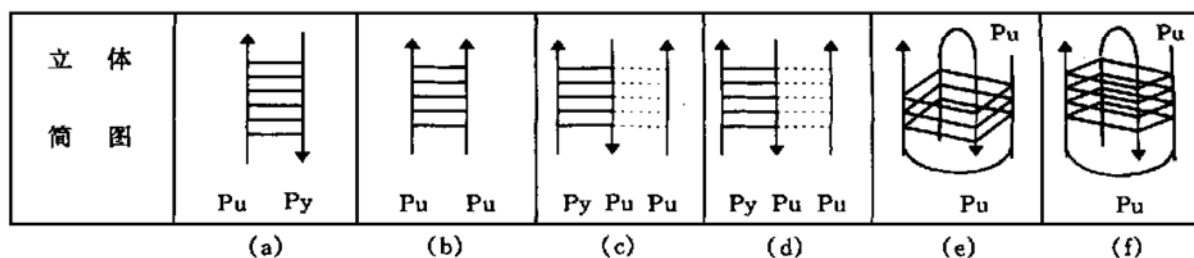


表1附图: 双链、三链、四链 DNA 立体简图

2 结果与讨论

2.1 双链的 CD 谱

谱图 1, 2(见图 1) 为双链 DNA(结构见表 1_1, 2) 的 CD 谱. 其中样品 1 为标准的 B_DNA, 它在 278 nm 处有一正峰, 250~ 265 nm 处为一正的平台, < 250 nm 后逐渐降低并在 240 nm 处形成一个小负峰, 这是典型 B_DNA 的 CD 谱. 而样品 2 为由 d[G(AG)₇] 形成的平行双链, 它在 263 nm 处有一正峰, 在 240 nm 处有一负峰, 与解离状态下寡聚嘌呤链 d[(AG)_n] 的 CD 谱有明显的不同^[6]. 根据文献报道, 我们知道在平行双链中, 主链中各磷酸残基呈锯齿状排列, 其基本单元是二核苷酸, 其中 G 糖苷键呈顺式构型, A 糖苷键呈反式构型, 这种糖苷键的顺、反式交替排列使其构型类似于 Z_DNA, 而表现出左旋的特征^[2]. 而在 B_DNA 中其基本单元是单核苷酸, 所有的碱基糖苷键均取反式构象, 使得整个分子呈标准的右旋构型. 因此这种手性的不同可能是导致谱形差异的根本因素. 如果排除序列对 CD 谱峰位的影响, 我们不难发现它们在 240~ 260 nm 之间的正、负峰刚好相反.

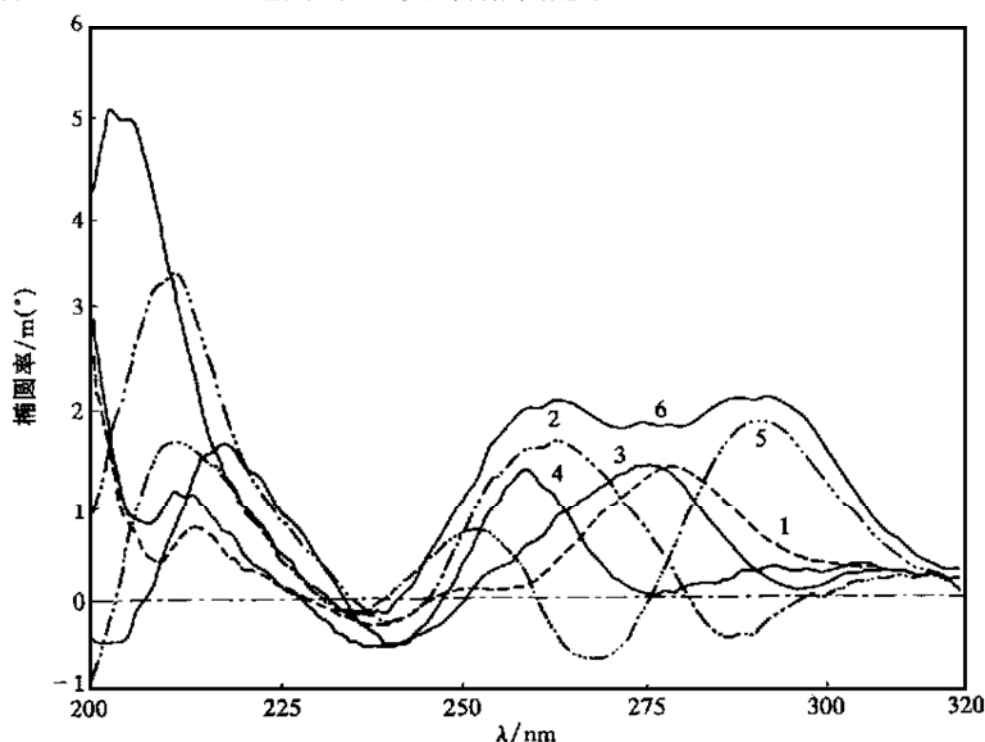


图1 双链、三链、四链的 CD 图谱

图中数字为各样品标号, 石英杯径 1 mm, 扫描速率 100 nm/min, 灵敏度 0.5 m(°), 时间常数 4 s, 参比样品为缓冲溶液

2.2 三链的 CD 谱

目前已有大量文献报道对三链 DNA 的 CD 谱进行研究,但至今仍没有发现用来判断三链形成的特征性的指纹区^[7],且各 CD 谱随体系的改变而变化较大,如一些 CD 谱在三链形成前后几乎不变^[8],而另外一些则变化明显^[9].我们在同一体系中比较两种碱基组成基本相同的 Pu* PuPy 型三链(见表 1_3, 4),从谱图 3, 4(见图 1),它们的主正峰分别为 275 和 260 nm,而在 240 nm 的负峰则没有明显变化.一般来说,三链 DNA 的 CD 谱在 210~ 240 nm 是不受序列影响的^[10],故正峰位的变化提示由于序列不同而引起的相邻碱基堆积方式的改变对三链 DNA 的 CD 谱有较大的影响.

2.3 四链的 CD 谱

谱图 5, 6(图 1)为四链(结构式见表 1_5, 6)的 CD 谱. 四链的 CD 谱主要分为两大类^[11]: 1) 平行结构的 CD 谱: 在这种构型中,相邻两链都是平行的定位且每条链中的 G 碱基都是反式构象(如图 2(a)). 其谱图特征是在 265 nm 处有一正峰,在 240 nm 处有一负峰.

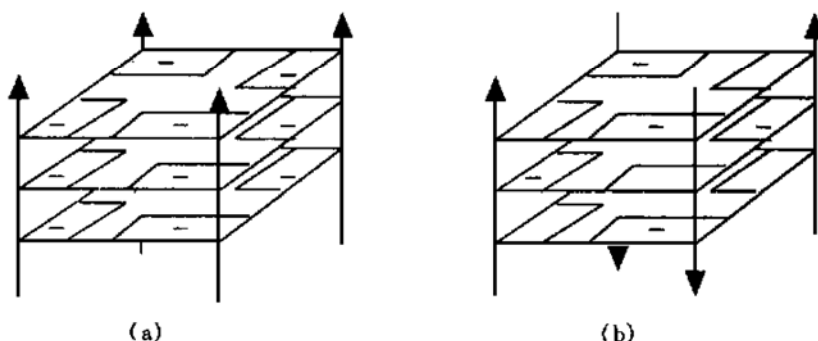


图 2 四链的两种构象

(a) 平行构象; (b) 反平行构象. —表示碱基糖苷键为反式构型, 其余为顺式构型

2) 反平行结构的 CD 谱: 与平行构型相比, 它的相邻两链都是反平行的定位且每条链中的 G 碱基呈正、反式交替分布(如图 2(b)). 其谱图特征是在 295 nm 处有一正峰, 在 260 nm 处有一负峰.

如图所示, 样品 5 是典型的 2) 类图谱, 即在 295 nm 处有一正峰, 在 260 nm 处有一负峰. 而样品 6 则表现出一定的特异性, 即它在 260~ 295 nm 处有一双正峰, 在 240 nm 处有一负峰, 这种特异图谱的出现可能与其寡聚核苷酸序列中间的胞嘧啶有关, 由于胞嘧啶存在使样品中同时存在平行和反平行等两种结构. 平行结构在 260 nm 的正峰使此处的 CD 值升高而出现一个正峰并在 240 nm 处形成一个负峰, 而当把胞嘧啶换成胸腺嘧啶后, 其谱图会呈标准的 2) 类 CD 谱^[12], 这表明位于发卡结构 loop 区的嘧啶种类会直接影响四链的构型.

2.4 双链、三链、四链的比较

通过比较序列相近的双链(1)与三链(3), 三链(4)与四链(5)的 CD 谱, 我们发现: 1) 各样品均在 240 nm 处有一负峰. 只是峰值略有不同. 这可能与核酸的共性结构有关. 2) 三链(3)与双链(1)相比, 主正峰呈明显的蓝移, 这可能与三链没有大沟, 结构更加紧凑有关. 3) 三链与平行四链的正峰位置相近, 即均在 260 nm 处, 而与反平行四链的则相差较远, 这可能与反平行四链折叠成的发卡结构有关.

以上研究表明寡聚核苷酸所形成的双链、三链、四链的 CD 谱存在明显的不同, 这种不同与它们的结构密切相关. 许多因素诸如: 各条链的极性, 糖环的折叠, 核苷键的取向以及碱基的堆积和序列均不同程度地影响其构象而使其谱图展示出多样性和复杂性, 从而为我们在光谱特性上区分各种结构提供了可能. 但需要指出的是 CD 谱只能作为判断核酸结构的一个论据, 要得到更多的结构信息还要依赖于其他技术手段如 NMR, X-ray 衍射等的研究结果.

致谢 本工作为中国科学院“九五”重大基础支持项目。

参 考 文 献

- 1 Karsten R, Valerie F, Eric W, et al. Alternating d(G₂A₂) sequences from a parallel-stranded DNA homoduplex. The EMBO Journal, 1992, 11: 3 777~ 3 786
- 2 Pilch D S, Levenson C, Shafer R H, et al. Structure, stability and thermodynamics of a short intermolecular purine-purine-pyrimidine triple helix. Biochem, 1991, 30: 6 081~ 6 087
- 3 Williamson J R, Raghuraman M K, Ceth T R, et al. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G₄-quartet model. Cell, 1989, 59: 871~ 880
- 4 郭尧君主编. 生物化学仪器指南(光谱仪器). 第一册. 北京: 科学出版社, 1988. 38~ 49
- 5 Yujian He, Enhua Cao, Bo Zhou, et al. CD spectra on triple stranded structure of λ -DNA. Chin Sci Bull, 1995, 40: 477
- 6 Vincent P A, Donald M G, Robert L R, et al. CD of six different conformational rearrangements of poly [d(A₂G₂)d(C₂T₂)] induced by low pH. Nucleic Acid Res, 1988, 2: 719~ 738
- 7 Yujian H, Scaria P V, Sharfer R H. Studies on Formation and Stability of the d[G₂(AG)₅]•d[G₂(AG)₅]•d[C₂(TC)₅] and d[G₂(TG)₅]•d[G₂(AG)₅]•d[C₂(TC)₅] triple helices. Biopolymers, 1997, 41: 431~ 441
- 8 Pulm G E, Park Y W, Singleton S F, et al. Thermodynamic characterization of the stability and melting behavior of a DNA triplex: A spectroscopic and calorimetric study. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9 436~ 9 440
- 9 Scaria P V, Will S, Levenson C, et al. Physicochemical studies of the d(G₃T₄G₃)•d(G₃A₄G₃)•d(C₃T₄C₃) triple helix. J Biol Chem, 1995, 270: 7 295~ 7 303
- 10 Daniel S P, Roland B, Richard H S, et al. Thermodynamics of helix formation: spectrophotometric studies on the d(A)₁₀•2d(T)₁₀ and d(+(C₃T₄+C₃))•d(G₃A₄G₃)•d(C₃T₄C₃) triple helices. Nucleic Acid Res, 1990, 18: 5 743~ 5 750
- 11 James R W. G₄-quartet structure in telomeric DNA. Ann Rev Biophys Biomol Struct, 1994, 23: 713~ 720
- 12 Balagurumoorthy P, Brahmachari S K, Mohanty D B, et al. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 4 061~ 4 067

(1997-09-26 收稿, 1998-01-21 收修改稿)

恶性疟原虫 DNA 疫苗的初步研究

钟 辉 曹 诚 李 平 李杰之 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 采用遗传工程技术克隆了编码含有恶性疟原虫子孢子期及红内期表位的基因片段, 与霍乱毒素 B(CTB) 亚基基因或白介素 2(IL2) 基因融合基因的重组质粒. 将纯化的质粒免疫 Bal b/c 纯系小鼠, 3 次免疫后诱导机体产生了体液免疫和细胞免疫, 抗 CTB 抗体滴度平均为 1: 1 280, 抗 NANP 及抗 AWTE 抗体平均滴度为 1: 1 000, 免疫的小鼠进行疟原虫子孢子攻击实验, 保护率在 50% 左右.

关键词 恶性疟原虫 霍乱毒素 B 亚基 DNA 疫苗

疟疾是世界上严重危害人类健康和生命的一种寄生虫病, 每年有几百万人因疟疾而死亡^[1]. 研制有效疫苗, 是预防和控制疟疾流行的重要措施. DNA 疫苗, 确切地说叫做 DNA 介导的免疫, 是指通过注射或轰击等手段, 将携带有抗原基因的表达载体导入到宿主有机体中,