

bozyme 切割谱更广, 并且不因某些碱基的突变丧失切割作用, 特别是一些病毒 RNA, 如 HIV 病毒分子. b. 底物二级结构: 切点所在基因在全长 mRNA 中应处于单链环区内, 而非发生碱基配对的茎状结构内, 在计算机模拟二级结构时, 由于 RNA 过长后不易得到正确的二级结构, 我们采用切点两翼各 30 个碱基进行二级结构预测, 理想的 ribozyme 切点应形成发夹结构. 此外还应考虑底物同细胞内蛋白质因子的相互作用: 细胞内蛋白质因子同 RNA 结合后将封闭 ribozyme 的切点, 因此 ribozyme 切点所在 mRNA 片段应为非蛋白质因子结合区, 因此 RNA 结合蛋白质的发现及 RNA 结合蛋白质功能的研究对 ribozyme 的设计将起一定的推动作用.

应用计算机模拟选择 ribozyme 切点是一种经济有效的实验手段, 但它很大程度上依赖于计算机软件的功能, 现有软件的设计是有效的, 但并不是最优的, 进一步优化软件设计, 提高计算机软件的分析功能仍在进行之中, 特别是应考虑到切点远端碱基序列对切割活性的影响, 同时上述设计结果仍有待于在体外, 细胞甚至整体动物体内得到证实.

除计算机模拟外, 国外也采用其它多种方

法选择 ribozyme 切点. 如 Draper 等^[5]采用 RNase H 消化和移动足迹方法选择最佳 ribozyme 切点, 挑选出不发生碱基配对的 ribozyme 切点. 在第三届 ribozyme 研究研讨会上^[6], 有的科学家建议采用细胞抽提液做为 ribozyme 的切割反应体系, 选择 ribozyme 切点, 从而排除蛋白质因子同切点所在 mRNA 结合的可能性. 避免蛋白质因子封闭 ribozyme 切点. 如将计算机模拟和上述功能实验结合起来, 就有可能得到更为理想的 ribozyme 设计.

参 考 文 献

- 1 Symons R. TIBS, 1989; 14 (11): 445
- 2 Hampel A, Tritz R, Hicks M *et al.* Nucleic Acids Res, 1990; 18 (2): 299
- 3 Belinsky M, DinterGottlieb G. Nucleic Acids Res, 1991; 19 (3): 559
- 4 Saville B, Collins R. Cell, 1990; 61 (4): 685
- 5 Dropulic B, Elkins D A, Sarver N *et al.* Antisense Res Dev, 1993; 3 (3): 87
- 6 Sarver N, Cantin E M, Chang P S *et al.* Science, 1990; 247: 1222
- 7 Kashami-Sabet M, Funato T, Tone T *et al.* Antisense Res Dev, 1992; 2 (2): 3
- 8 Yeung C Y, Ingolia D E, Roth D B *et al.* J Biol Chem, 1985; 260 (18): 10299

胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶基因在胃癌中的表达*

齐春会 李春海**

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 用 Dig-GST- π cDNA 探针分子杂交方法, 检测了正常胃组织、胃癌及相应癌旁正常组织中 GST- π DNA 和 GST- π RNA 水平. 发现 GST- π DNA 水平没有明显变化, 而 GST- π RNA 在 8 例胃癌组织中有 6 例高于正常胃组织, 在 12 例低分化腺癌中有 7 例癌旁正常组织高于相应癌组织. 表明 GST- π 基因表达增加与胃癌有关, 而且早于细胞形态的变化.

关键词 人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶, 胃癌, 基因表达

谷胱甘肽 S-转移酶 (EC2, 5, 1, 18; glutathione S-transferase, GSTs) 是一种多基因家族的同工酶, 在细胞解毒中起着重要作用^[1-3]. 据最新报道, 除了一种微粒体同工酶之外, 人细胞浆中的 GSTs 共有四类, 即 α , μ , π (π , 在大鼠中为 P) 和 θ ^[4, 5]. 1984 年 Sato 等^[6]证实, GST-P 在化学致癌剂诱发的大鼠肝增生结节和高分化癌灶中明显升高, 被认为是检测癌变“启动细胞”最早、最灵敏的标志酶. 鉴于不同种属间肿瘤形成过程的相似性, GST- π 随之成为人类肿瘤标志研究的一大热点. 迄今发现, GST- π 在人的肺、食管等多种癌及癌前病变组织中均有异常表达^[7-11], 但与其有关的 GST- π 基因所发生的变化报道较少. 我们用 Dig-GST- π cDNA 探针分子杂交的方法, 比较了正常胃组织、胃癌旁正常组织及相应癌组织中 GST- π DNA, RNA 水平, 以期在基因水平上为 GST- π 作为肿瘤标志提供依据.

1 材料和方法

1.1 标本

1 例正常胃组织, 20 例胃癌及相应癌旁正常组织, 12 例胃低分化腺癌及相应癌旁正常组织. 除正常组织外均为手术标本, 一般术后 1h 内放液氮保存至 DNA, RNA 提取.

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 样品的提取

组织中基因组 DNA 和总 RNA 的提取分别采用酚/氯仿抽提法^[12]和 AGPC 一步法^[13]. 提取后经紫外吸收测定和琼脂糖凝胶电泳分析, 表明分子完整, 纯度较高, 可用于分子杂交检测. 图 1 所示, 为总 RNA 样品甲醛变性琼脂糖凝胶电泳的结果.

1.3 地高辛配基 (Dig) -GST- π cDNA 及 β -肌动蛋白 DNA 探针的制备

采用随机引物法标记 (地高辛配基核酸标记和检测试剂盒为 Boehringer Mannheim Co, West Germany 产品, 按试剂盒说明书进行), 标记后经 Sephadex G-50 柱层析回收.

1.4 斑点印迹杂交检测

提取的基因组 DNA, 总 RNA 样品, 热变

性后依次抽滤点样于经预处理的硝酸纤维素膜上, 点样时注意使配对样品左右或上下相邻, 一式两份, 分别用 Dig-GST- π cDNA 和 Dig- β -肌动蛋白 DNA 探针杂交检测. 方法与上述试剂盒说明书介绍的方法基本相同.

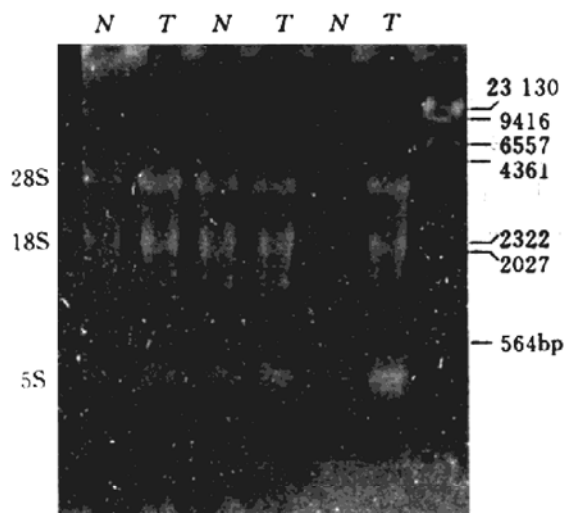


图 1 RNA 甲醛变性凝胶电泳

N, T 分别为其中三对标本的癌旁正常组织及癌组织总 RNA 样品, 分子量标准: λ DNA/Hind III.

1.5 图象分析

采用英国剑桥仪器公司 Quantimet 970 图象分析仪和 Quips 软件, 图象输入用宏观投影仪, 并在灯电压保持恒定的条件下测定每个样品点显色的积分光密度 (integrate optical density, IOD), 扩增倍数按下式计算^[14]: $(a/b) / (c/d)$, 即 ad/bc . 其中, a, b 分别为肿瘤组织 GST- π , β -肌动蛋白分子杂交显色的 IOD, c, d 分别为对应正常组织 GST- π , β -肌动蛋白分子杂交显色的 IOD.

2 结果与讨论

2.1 GST- π DNA 的扩增

正常胃组织、胃癌及相应癌旁正常组织基因组 DNA 样品杂交显色结果如图 2 所示. 可见胃癌及相应癌旁正常组织中 GST- π DNA 水平与正常胃组织基本一致, 20 例胃癌标本中 GST- π DNA 水平与各相应癌旁正常组织相比, 扩增倍数均在 2 倍以下 (数据从略), 表明

在胃癌发生发展过程中 GST- π DNA 扩增现象并不明显。

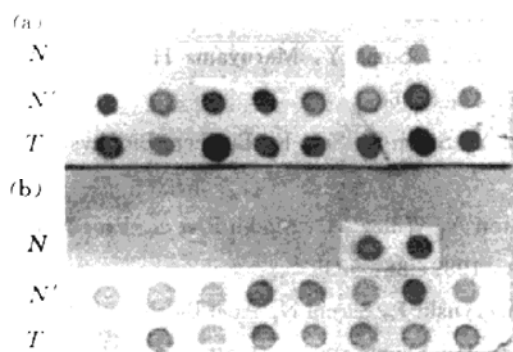


图2 正常胃组织、胃癌旁正常组织及胃癌组织中 GST- π DNA 水平

(a) 为 Dig-GST- π cDNA 探针杂交显色, (b) 为 Dig- β 肌动蛋白 DNA 探针杂交显色. N 为同一正常组织的两个样品, N', T 分别为其中 8 例胃癌旁正常组织与相应癌组织样品, 每个样品的点样量均为 10 μ g 基因组 DNA.

2.2 胃癌组织与正常胃组织中 GST- π RNA 水平比较

正常胃组织总 RNA 及胃癌组织总 RNA 的杂交检测结果如图 3 所示. 经图象分析可知, 作为内标的 β -肌动蛋白显色斑点的积分光

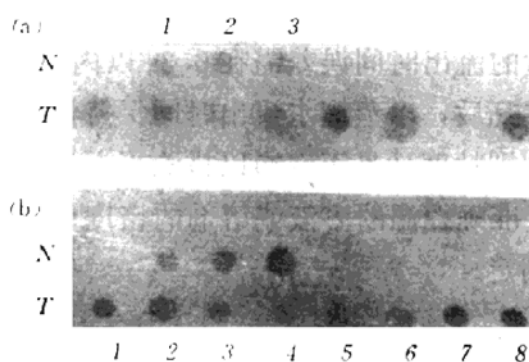


图3 正常胃组织及胃癌组织中 GST- π RNA 水平

(a) 为 Dig-GST- π cDNA 探针杂交显色, (b) 为 Dig- β 肌动蛋白 DNA 探针杂交显色. N 行中三个样品来自同一正常胃组织, 点样品量依次为 8, 10, 20 μ g 总 RNA; T 行为 8 例胃癌组织样品, 点样量均为 8 μ g 总 RNA.

密度基本一致, 1 例正常胃组织的三个样品点的积分光密度与其 RNA 点样量基本成比例, 8 例胃癌组织样品中一例未显色、其余 7 例积分光密度与正常胃组织 8 μ g 样品点的积分光密度比较, 1 例与正常接近, 6 例高于正常胃组织 (胃癌组织中 GST- π 杂交显色的 IOD 是正常胃组织的 1.5 倍以上为增高). 由此提示: 胃癌组织中 GST- π 表达的增加并不是基因扩增所致, 而是由于 GST- π 基因转录水平的升高, 引起了 GST- π 的超表达.

2.3 胃低分化腺癌及相应癌旁正常组织 GST- π RNA 水平比较

12 例胃低分化腺癌及癌旁正常组织中 GST- π RNA 检测结果如图 4. 据图象分析测

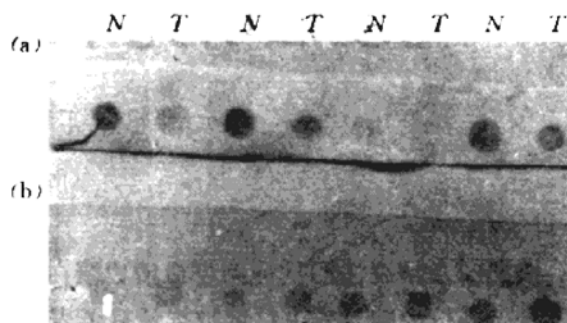


图4 胃低分化腺癌及相应癌旁正常组织中 GST- π RNA 水平

(a) 为 Dig-GST- π cDNA 探针杂交显色, (b) 为 Dig- β 肌动蛋白 DNA 探针杂交显色. N, T 分别为其中 4 对低分化腺癌标本的癌旁正常组织和相应癌组织总 RNA 样品.

定各点积分光密度, 在 12 例胃癌及癌旁正常组织配对的标本中, 有 7 例癌旁正常组织 GST- π RNA 水平高于相应癌组织, 是胃癌组织的 1.5 倍以上, 其余 5 例胃癌与癌旁正常组织中 GST- π RNA 水平基本相近. 这可能是因为在还没有发现组织形态异常的所谓癌旁“正常”组织中, GST- π 基因已经被致癌因素激活, 处于高表达状态. 但随着肿瘤的生长, 细胞分化程度降低, GST- π 的表达能力也开始降低. 因此, 可以认为: GST- π 基因表达的变化不仅早于细胞形态的变化, 而且其基因表达水平还与肿瘤细胞分化程度有关, 这为 GST- π 作为

胃癌甚至癌前病变的标志提供了重要依据。

参 考 文 献

- 1 Chasseaud L F. Adv Cancer Res, 1979; 29: 175
- 2 Mannervik B. Adv Enzymol, 1985; 57: 357
- 3 Niitsu Y, Yakahashi Y, Saito T *et al.* Cancer, 1989; 63: 317
- 4 Lai H-C J, Tu C-P D. J Biol Chem, 1986; 261: 13793
- 5 Meyer D J, Coles B, Pemble S E *et al.* Biochem J, 1991; 274: 409
- 6 Sato K, Kitahara A, Satoh K *et al.* Gann, 1984; 75: 199
- 7 Tsuchida S, Sekine Y, Shieha R *et al.* Cancer Res, 1989; 49: 5225
- 8 尹宗柱, 崔城洛, 张良和等. 中华肿瘤杂志, 1989; 11: 114
- 9 Kodate C, Fukushi A, Narita T *et al.* Jpn J Cancer Res, 1986; 77: 226
- 10 Shiratori Y, Soma Y, Maruyama H *et al.* Cancer Res, 1987; 47: 6806
- 11 Soma Y, Satoh K, Sato K. Biochem Biophys Acta, 1986; 869: 247
- 12 Weaton A, Willey J C, Modili R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 5099
- 13 Chomczynski P, Sacchi N. Anal Biochem, 1987; 162: 156
- 14 Tsuda H, Shimosato Y, Upton M *et al.* Lab Invest, 1988; 59: 321

粘度法研究牛血清白蛋白的溶液行为*

左 集 王志刚 梁 波 欧阳砥 周永洽

(南开大学化学系, 天津 300071)

摘要 经粘度法测量证明牛血清白蛋白在 NaCl, KSCN 和 KI 3 种盐溶液中的流体力学行为有较大差别, 并按经验公式由粘度数据计算了表观分子轴比和分子体积, 它们也随盐的种类不同而相应变化。

关键词 牛血清白蛋白, 相对粘度, 特性粘数, 表观分子轴比, 表观分子体积

牛血清白蛋白(BSA)的溶液行为一直是人们关注的课题^[1-3], 已积累丰富的实验数据, 然而多是研究离子强度效应, 未考虑盐种类的影响^[4-7]. 本文研究了 NaCl, KSCN 和 KI 存在下 BSA 水溶液的粘度变化特点, 并依据 K. Monkos 的经验公式定量地比较了盐的种类对 BSA 表观分子轴比和分子体积的影响。

1 实验方法

结晶 BSA (华美生物工程公司天津分公司), 电泳纯, 分子量 66 210. BSA 溶于标准 0.1mol/L NaCl, KSCN 和 KI 的水溶液中, 配成不同浓度, 4 号玻砂漏斗过滤, 4℃下静置 12h 后测浓度和 pH 值。

实验使用普通乌式粘度计, 但要求较长的流出时间, 这里蒸馏水的流出时间达 516s. 粘度计置于恒温槽 (±0.01℃) 内同一位置, 时

间计量精度 0.01s. 每种溶液进入粘度计后恒温 15min, 用它先洗毛细管后再测量数据, 几次测量的流出时间误差需在 0.2s 以内. 每个样品测定完后, 以蒸馏水流出时间保持恒定的标准来判别粘度计是否洗净以排除蛋白质的吸附效应. 准确控温的溶液或溶剂的密度用 5ml 比重瓶测定。

2 结果与讨论

2.1 BSA 在不同盐中的粘度变化

图 1 是 η_r -C 的实验曲线, 这里相对粘度 $\eta_r = t_m/t_0m_0$, 考虑了密度校正, 式中 t_0 , t 和 m_0 , m 分别是溶剂、溶液的流出时间和质量. 图 1 中的拟合曲线呈指数函数形式, 这与在 $4.0 \times$

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-10-11, 修回日期: 1994-03-21

deaminase (ADA) mRNA, which included cleavage site selection, secondary structure analysis, biological function and homology analysis of the gene fragment around the cleavage site, four hammerhead ribozymes were designed. These ribozymes targeted sequence around the cleavage site have hairpine structure in which the cleavage site is in the ring part. This gene fragment is of biological importance in ADA gene. No homologies were found between these gene fragments and other murine genes. These characteristics of the gene fragment make them easy to be paired and cleaved by their respective ribozymes.

Key words adenosine deaminase, ribozyme, computer design

GST- π Gene Expression in Gastric Tumor. Qi Chunhui, Li Chunhai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 463—466

Increased expression of the glutathione S-transferase (GST; E. C. 2. 5. 1. 18) π class isoenzyme is associated with both tumor and preneoplastic tissues. In order to further characterize the alteration of GST- π gene expression during progression of carcinoma, both the levels of GST- π DNA in one normal gastric tissue and 20 gastric tumor with perineoplastic normal tissue, and the GST- π RNA in the normal gastric tissue and 12 gastric poorly differentiated adenocarcinomas with corresponding perineoplastic normal tissues were tested using Dig-GST- π cDNA probe by Dot blot hybridization. No significant change of GST- π DNA level, but the expression level of GST- π RNA in 6 of eight gastric tumors was higher than in normal gastric tissue, and in 7 perineoplastic normal tissue of twelve poorly dif-

ferentiated adenocarcinoma was higher than that in its corresponding tumor. This suggests that the elevation of GST- π gene expression is related to gastric tumor, and earlier than the changes of cell morphology.

Key words human placental glutathione S-transferase, gastric tumor, gene expression

A Study of the Solution Behavior of Bovine Serum Albumin by Viscosimetry. Zuo Ju, Wang Zhigang, Liang Bo, Ouyang Di, Zhou Yongqia. (*Chemistry Department of Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 466—469

The various differences of the hydrodynamic behavior of bovine serum albumin in NaCl, KSCN and KI solutions were evidenced by viscosimetry. Based on the empirical formula and viscosity data, the apparent axial ratios and apparent molecular volumes were calculated, which were also affected by the salt properties, correspondingly.

Key words bovine serum albumin, relative viscosity, intrinsic viscosity, apparent axial ratio, apparent molecular volume

The Ways to Enhance Cloning Efficiency of PCR Amplification Products. Shi Yanhong, Zhao Shimin, Sun Yongru. (*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (5): 470—471

Some ways are introduced to enhance the cloning efficiency of PCR amplification products. The purification of PCR products, the speciality of PCR amplification, the remainder of Tag polymerase, the 3'-end projection of PCR products and the blunt end ligation are the main factors to affect the cloning efficiency.

Key words PCR, cloning efficiency, ligation