

在正常情况下,聚合作用大大超过降解作用。但一旦当反应体系中 mRNA 耗尽(或出现不利于 cDNA 合成的其他因素),又无新的 cDNA 合成累积时,则外切酶的降解作用就突出了。随着酶量的增加,cDNA 的降解也随之增加。

2. cDNA 合成在反应初期(前 15 分钟)进行缓慢。这可能是由于我们未预先将 mRNA 和 Oligo(dT) 引物保温的缘故。因为 cDNA 是在 Oligo(dT) 引物先同 mRNA 的 poly(A) 杂交后,再按照 mRNA 模板进行延长而产生的。而 Oligo(dT) 引物同 poly(A) 杂交是需要一段过程的。因此,在开始一段时间,合成反应进行缓慢。

3. 在我们通过逆转录的方法测定邻接 poly(A) 序列一个核苷酸时,发现除 [^3H]dAMP 掺入 cDNA 的放射性计数特别高而外, [^3H]dCMP 也有少量掺入。产生这种情况,有两种可能:一是由于模板 mRNA 不纯。即在模板中,除主要以腺嘌呤核苷酸残基为末端的一种 mRNA 外,还存在一种以鸟嘌呤核苷酸残基为末端的微量 mRNA;二可能是由于 DNA 多聚酶 I 识别的错误。尽管此酶具有高度的识别能力,但也有偶尔的错误出现^[4]。

4. 我们打算用 DNA 的末端终止法来测定 mRNA 的核苷酸序列。这就要求由鱼精蛋白 mRNA 逆转录出来的 cDNA 有齐的 5'-末端(即相同的 5'-末端)。为此需要制备一专一性引物,即在 Oligo(dT) 的 3'-端,加上 1—2 个正好同 mRNA 3'-末端 1—2 个核苷酸互补的核苷酸。从这种专一性引物延伸出来的 cDNA,其 5'-末端就相同了。我们在此利用逆转录法首先测出鱼精蛋白 mRNA 3'-端邻接 poly(A) 序列的一个核苷酸,目的是为了制备这一专一性引物(即 PT_6UOH),而最终要得到具有相同 5'-末端的 cDNA,以利于序列分析。

作者十分感谢魏西平和赵鼎同志对此工作的帮助。

参 考 文 献

- [1] 蔡发兴等:《生物化学与生物物理进展》,1982 年,第 2 期,第 37 页。
- [2] Zhao Hui-zhi et al.: *The Second International Symposium on RNA in Development and Reproduction* in 1980, Peking.
- [3] Proudfoot, N. J.: *J. Mol. Biol.* **107**, 491, 1976.
- [4] Setlow, P.: *Methods in Enzymology*, **29**, 3, 1974.

[本文于 1981 年 7 月 30 日收到]

绵羊红细胞电泳用于恶性肿瘤临床诊断的研究

李殿君 夏燕冶 洪鼎铭 甘大清 王敖金 张文林

(中国科学院生物物理研究所)

田竞生 武纯净

寇丽筠

(北京市肿瘤研究所) (北京医学院第三附属医院化验室)

寻找简便、灵敏可靠的恶性肿瘤诊断方法,对于提高治愈率有着十分重要的意义。这类方法研究很多,其中 Field 和 Caspary 1970 年首先应用细胞电泳方法于恶性肿瘤的临床诊断^[1],取得了良好的结果。

Field 分离受试者的淋巴细胞,与致脑炎因子(简称 E. F.)和豚鼠巨噬细胞共同温培,以

豚鼠巨噬细胞为指示细胞,测定其电泳迁移率是否减慢,作为恶性肿瘤的诊断指标。Field 认为,恶性肿瘤病人的淋巴细胞在体内被肿瘤抗原所致敏,当它在体外与 E. F. 接触时,便释放出一种活性物质,此物质可作用于豚鼠巨噬细胞表面,降低其表面电荷,使豚鼠巨噬细胞电泳迁移率减慢,故称其为“巨噬细胞电泳致缓因

表 1

	组 别	总人数	阳性人数及致缓率%		阴性人数及致缓率%		符合率%
			人 数	致缓率均值及范围	人 数	致缓率均值范围	
羊红细胞电泳试验	正常人	37	1	12.0	36	1.81 (-3.4—5.2)	97.3
	癌病人	29	27	13.12 (7.9—23.0)	2	2.5; 2.5	93.1
	非癌病人	23	3	7.5; 8.0; 18.5	20	3.8 (-1.2—6.1)	86.9
豚鼠巨噬细胞电泳试验	正常人	12	2	9.8; 7.7	10	-5.28 (-15.3—0.6)	83.3
	癌变病人	22	19	27.5 (7.9—55.21)	3	1.7; -12.6; -4.6	86.4
	非癌病人	16	4	32.7; 10.7; 9.6; 11.95	12	-4.63 (-14.5—4.6)	75.0

注 羊红细胞电泳试验中非癌病人 23 例中, 假阳性 3 例为红斑狼疮、哮喘、结核性胸膜炎。文献报道这类病历为假阳性。

子”(简称 M. S. F.)。此后, 又有人发现此因子也可使其它细胞(如绵羊红细胞)的电泳速度减慢^[2]。而正常人(包括非癌患者)的淋巴细胞与 E. F. 接触则不产生此现象。

1977 年以来, 根据梁子钧等人的方法^[3], 我们进行了某些改进, 与北京市肿瘤所协作, 进行了豚鼠巨噬细胞电泳实验。恶性肿瘤阳性率达 86%。在此基础上, 为提高诊断, 简化程序, 与北京医学院第三附属医院协作, 进行了绵羊红细胞电泳试验。

方法与结果

一、方法

1. 受试者 (1) 恶性肿瘤(包括胃癌、食道癌、肝癌、骨髓瘤)患者。(2) 非癌症(包括胃炎、风湿性心脏病、肝炎、结核病等)患者。(3) 正常人。

2. E. F. 提取 根据文献[4]及[5]。

3. 绵羊红细胞制备 根据文献[8]。

4. 淋巴细胞分离 根据文献[3]。

5. 实验步骤 采用文献[6]的两步温培法。温培时, 淋巴细胞量 $0.3-0.6 \times 10^6$ 个, E. F. 量 $100 \mu\text{g}$, 羊红细胞量 $1-2 \times 10^7$ 个。

6. 电泳测定 采用自制细胞电泳仪(氯化银电极), 室温 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 电压 45V, 管内悬浮液 $\text{pH} = 7.0$ 。每个样品测 7 个细胞在电场中往返 $10 \mu\text{m}$ 所需要的时间。每个细胞往返误差不超过 10%, 超过者无效^[1]。为避免操作误差, 同一样品测二次。因用统计学处理。正常值定为 7% (见下); 如两次测试误差超过 6%,

无效。

$$7. \text{计算致缓率 } \frac{T_1 - T_0}{T_0} \times 100\%$$

T_1 为试验管样品电泳迁移率平均值。 T_0 为对照样品电泳迁移率平均值。

二、结果

所得结果经统计学处理, 正常人的平均电泳致缓率为 1.81%, 标准差为 2.62%, 取置信度为 90%, 最大致缓率为 6.21%, 故取 7% 以下为正常值, 大于 7% 为阳性。详见表 1。

讨 论

一、羊红细胞电泳试验重复性好, 处理一次羊红细胞可以连续使用 2 个月左右, 免去了每天分离、处理豚鼠巨噬细胞的一系列麻烦。较豚鼠巨噬细胞电泳有明显优点。

二、关于细胞电泳试验诊断恶性肿瘤的机制, 目前尚有不同的解释。Field 提出“淋巴细胞释放巨噬细胞致缓因子”的学说。Dyson^[7] 则认为, 指示细胞电泳迁移率的减慢是由于 E. F. 抗元本身的致缓能力, 而抗元与淋巴细胞的事先温培则降低抗元的这种致缓能力。对此我们做了对照试验, 进行了初步探讨, 结果如

表 2

组 别	羊红细胞致缓率平均值 %
1. E. F. + 羊红细胞	20.8
2. 癌病人的淋巴细胞 + E. F. + 羊红细胞	13.12
3. (正常) 淋巴细胞 + E. F. + 羊红细胞	1.81

注 表中 1 为 17 次实验平均值; 2 为 17 例平均值; 3 为 37 例平均值。

表 2。

表 2 说明, (1) E F. 本身对羊红细胞电泳有直接致缓作用, 致缓率达 20.8%。(2) 淋巴细胞与 E F. 温培后, 降低了 E F. 对羊红细胞的致缓作用。(3) 正常人及癌病人的淋巴细胞对 E F. 的这种作用有着明显的差别。癌病人的淋巴细胞作用小于正常人的淋巴细胞的作用。与癌病人的淋巴细胞温培后的 E F., 再与羊红细胞温培, 羊红细胞的电泳迁移率的致缓率为 13.12%, 而与正常人的淋巴细胞温培后的 E F., 再与羊红细胞温培, 羊红细胞电泳迁移率的致缓率为 1.81%。二者有显著差异。

参 考 文 献

- [1] Field, E. J., & Caspary, E. A.: *Lancet*, ii, 1337, 1970.
- [2] Hans Ludwig Jenssen: *JENA REVIEW*, 6, 274, 1978.
- [3] 上海第一医学院: 《细胞电泳》, 1977 年。
- [4] Dickson, J. P., Caspary, E. A., & Field, E. J.: *Br. J. Cancer*, 27, 99, 1973.
- [5] Caspary, E. A., & Field, E. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 122, 182, 1965.
- [6] Pritchard, J. A. V., et al.: *Br. J. Cancer*, 27, 1, 1973.
- [7] Dyson, J. E. D., and Corbett, P. J.: *Br. J. Cancer*, 38, 401, 1978.
- [8] Becht, H.: *J. Immunol.*, 101(1), 18, 1968.

[本文于 1981 年 8 月 26 日收到]

血红蛋白构象的毫微秒荧光研究

连少辉 阮康成 江寿平 王 晶*

(中国科学院上海生物化学研究所)

利用毫微秒荧光技术研究生物大分子的构象^[1], 在我国是一个有待发展的领域。最近我们用自己研制的 BIAS-100 型毫微秒脉冲荧光计^[2], 通过测定荧光探针 1.8ANS 和脱辅基血红蛋白复合物 (ANS-Apohemoglobin) 的荧光寿命来研究牛血红蛋白分子中血红素结合区域的构象, 以及溶液的 pH、脲对该区域构象的影响, 取得了一些结果。现介绍如下。

一、材料和方法

牛高铁血红蛋白、氯高铁血红素是中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂产品, 1.8ANS 是 Serva 公司产品经重结晶, 其它试剂均为国产分析纯级, 无离子水为重蒸水。

1. 脱辅基血红蛋白是用 Famelli^[3] 的酸性丙酮方法由结晶牛高铁血红蛋白制备得到, 浓度为 $5 \times 10^{-4} M$ (以牛血清蛋白为标准, 用 751 分光光度计在 280nm 处测其光密度, 经计算求得)。

2. 脱辅基血红蛋白和血红素的结合是采用 Famelli^[3] 方法。

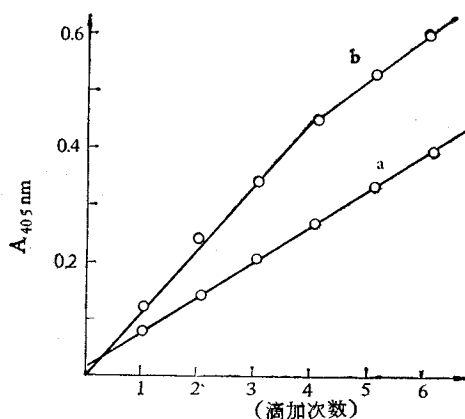


图 1 脱辅基血红蛋白与血红素的结合

(1) 在 pH7.0、0.1M 磷酸缓冲液 2.7ml 中逐次加入 $1 \times 10^{-4} M$ 的氯高铁血红素溶液 100 μ l, 在 405nm 处测其吸收值(图 1 曲线 a)。

(2) 在 2.7ml $1 \times 10^{-5} M$ 脱辅基血红蛋白的 pH7.0、0.1M 磷酸缓冲液中逐次加入 $1 \times 10^{-4} M$ 氯高铁血红素 100 μ l, 在 405nm 处测其吸收值(图 1 曲线 b)。

* 在南京肉联厂工作。