

制肿瘤的机制。

除 RB 基因外,人们还发现了一些与 RB 基因类似的其他肿瘤抑制基因(表 2)^[20]。如果肿瘤抑制基因的失活是肿瘤的发病机制,那么通过基因治疗以恢复肿瘤抑制基因的功能无疑是治疗这些肿瘤的一个新途径。尽管人们还不十分清楚一个或多个肿瘤抑制基因的灭活是否已足够使细胞癌变,但对肿瘤细胞已失活的肿瘤抑制基因进行基因替换和修复以治疗临床恶性肿瘤已成为一个新兴的治疗手段。与传统治疗方法如细胞毒性治疗不同,基因治疗将会永久性修复受损的基因,并对正常细胞无损伤作用,这一策略的最终实现有待新的突破。

参 考 文 献

- 1 Comings D E. Proc Natl Acad Sci USA, 1973; **70**: 3324
- 2 Sparkes R S, Sparkes M C, Willson M G *et al.* Science, 1980; **208**: 1042
- 3 Bookstein R, Lee E Y H P, To H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 2210
- 4 Hong F D, Huang H J S, To H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **86**: 5502
- 5 Landschulze W H, Johnson P F, McKnight S L. Science, 1988; **240**: 1759
- 6 Ludlow J W, DeCaprio J A, Huang C M *et al.* Cell,

1989; **56**: 57

- 7 Lee E Y H P, Bookstein R, Young L J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 6017
- 8 Bookstein R, Lee E Y H P, Peccei A *et al.* Mol Cell Biol, 1989; **9**: 1628
- 9 Friend S H, Horowitz J M, Gerbert M B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 9059
- 10 Toguchida J, Ishizaki K, Sasaki M S *et al.* Cancer Res, 1988; **48**: 3939
- 11 Harbour J W, Lai S H, Whang-Peng J *et al.* Science, 1988; **241**: 353
- 12 T' Aag A, Varley J M, Chakreorty S *et al.* Science, 1988; **242**: 263
- 13 Mendoza A E, Shew J Y, Lee E Y H P *et al.* Hum Pathol, 1988; **19**: 487
- 14 Yokota J, Wada M, Shimosato Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 9252
- 15 Horowitz J M, Yandell D W, Park S H *et al.* Science, 1989; **243**: 937
- 16 Rappolee D A, Mark D, Banda M J *et al.* Science, 1988; **241**: 708
- 17 Fitchett M, Griffiths M J, Oscier D G *et al.* Cancer Genet Cytogenet, 1981; **24**: 143
- 18 Chen P L, Scully P, Wang J Y J *et al.* Cell, 1990; **58**: 1193
- 19 Huang H J S, Yee J K, Shew J Y *et al.* Science, 1988; **242**: 1563
- 20 Vogelstein B, Kinzler K W. Cell, 1992; **70**: 5

细胞电穿孔与电融合的机理及应用

汪和睦 汪 洲

(南开大学物理系, 天津 300071)

摘要 近十余年来,由于细胞生物学家、分子生物学家、免疫学家与物理学家之间在学术上的相互渗透、共同实验,已经开辟出一个生物物理技术的新领域。它既涉及细胞电磁场效应及其机理的基础研究;同时作为一种新的生物技术,又涉及对分子生物学、细胞生物学、免疫医学以及医药、食品、农业等方面的广泛应用。文章综述了本领域的最近进展。

关键词 细胞电穿孔, 细胞电融合, 生物技术

1 细胞电磁场效应及其机理的研究

1.1 单细胞电介质电泳频谱研究

在交流(AC)非均匀电场作用下,细胞受

到电介质电泳力 F_{DEP} 的作用,理论表明:

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi a^3 \epsilon_0 \epsilon_1 R_e [K_{\text{eff}}^*] \nabla E^2$$

收稿日期: 1993-06-11, 修回日期: 1993-10-05

其中系数 $K_{\text{eff}}^* = (\epsilon_{\text{eff}}^* - \epsilon_1^*) / (\epsilon_{\text{eff}}^* + 2\epsilon_1^*)$

在 F_{DEP} 的作用下, 细胞沿电力线排列成串, 形成待融合细胞之间的紧密接触. 一般说 F_{DEP} 为 AC 频率的函数. 70 年代初, Pohl 等测定了多种细胞的电介质电泳聚集率, 结果表明不同种类、不同状态的细胞频率响应特性差别很大, 而且出现明显的峰值. 长期以来人们受此影响, 在细胞电融合中常常要用很多的精力来确定最佳的 AC 频率. 为了直接测定 F_{DEP} 的频率特性, 1990 年以来包括我们在内的三个实验室利用细胞漂浮技术, 已经测定了四种动物细胞及植物原生质体的单细胞电介质电泳频谱^[1,2]; 结果表明: 不同细胞有极为相似的频率特性, 且在一很宽的频率范围内, 系数 $[K_{\text{eff}}^*]$ 存在一坪区, 其数值在理论上接近正向电介质电泳的最大值. 因此选择 1MHz 的单一频率 AC 电场, 就足以使不同细胞达到最佳条件. 这不仅节省了大量预实验的时间, 而且大大降低了 AC 电源的造价. 此外, 细胞漂浮电介质电泳技术还可以用于细胞质和细胞膜的介电特性研究, 与其它技术相比, 它具有单细胞测定, 频率范围宽和理论完善等优点.

1.2 细胞电穿孔的原初作用

细胞电穿孔的研究始于 70 年代, 1979 年首次实现了细胞电融合, 1980 年又成功地应用于导入质粒, 实现细胞转化^[3]. 细胞电穿孔的主要特点在于它是一种物理技术, 具有普遍性, 可用于动物、植物和微生物等各类细胞, 而且电穿孔操作还具有效率高、无残余毒性、参数容易控制等特点.

研究细胞电穿孔的机理, 主要研究脉冲的幅度、宽度、波形和个数等参数对细胞膜通透性变化的作用. 脉冲幅度的作用研究得最充分. 理论表明, 外电场 E_0 诱导的膜电势 $V_m = 3/2 \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos\theta \cdot (1 - e^{-t/\tau})$, 其中膜电容的充电时间常数 $\tau = aC_m(1/\lambda_i + 1/2\lambda_e)$, 用细胞质和细胞外液的导电率 λ_i 和 λ_e 的实际值代入可算得 τ 只有几微秒. 上述 V_m 与 τ 的数值曾用荧光探针测量过, 所得结果与理论值相当符合. 因此在细胞两极很快就达到了最大膜电压: $V_{\text{max}} =$

$3/2 \cdot a \cdot E_0$. 上述膜电压对膜施加一压力, 使膜的厚度变薄, 减薄的程度取决于膜的弹性模量 Y , 即 $Y \ln(h/h_0) = 1/2 \cdot \epsilon_0 \epsilon_e (V_c/h)^2$. 直至 $\ln(h/h_0) = -1/2$, 即临界厚度 $h = 0.607h_0$ 时, 细胞膜因不稳定而被击穿. 实验得出的临界电压 V_c 与已知 h_0 和 Y 值相当符合. 实际上由于细胞有相当大的自修复能力, 对酵母原生质体、鼠骨髓瘤细胞和 B 淋巴细胞等, 实验发现当 V_{max} 高达 V_c 的 3—4 倍时, 仍有 60% 左右的细胞能存活.

脉冲宽度的作用机理虽已有多种理论模型, 但对其解释仍很不完全. 一般来说有以下规律性认识: 脉冲宽度的下限必须比膜充电时间 τ ($5\mu\text{s}$) 和膜的弹性复原时间长, 才能保持孔洞的开放. 脉冲宽度和幅度之间存在互补关系, 即降低脉冲幅度, 则需要加宽脉冲时程来弥补; 穿孔的效率往往与脉冲幅度和宽度的乘积成正比^[4]. Zimmermann 早期研究认为脉冲宽度的上限为 $100\mu\text{s}$, 否则将由于不可逆击穿而发生胞溶. 近年来的大量实验结果表明, 采用数毫秒至数十毫秒的宽脉冲能显著地提高细胞电穿孔的转化率, 而在细胞电融合中, 一般仍采用数十微秒的脉冲宽度.

不同脉冲波形对细胞电穿孔也有重要的影响, 目前用得最多的是方波和指数衰减的 RC 脉冲. 研究表明: 如果电穿孔脉冲在峰电压击穿细胞膜后, 能以较低的电压维持膜孔洞开放一段时间, 则有利于提高细胞电穿孔的效率. 因此, RC 脉冲往往比相同幅度的方脉冲更有效^[4]. 可以设想特殊设计的脉冲波形会比 RC 波更有效, 但实际上 RC 脉冲最易制造, 所以用得也最广.

增加脉冲个数显然能增大细胞电穿孔的效能. 早期报导认为, 每个脉冲的细胞致死率随脉冲个数增多而递增. 我们得到的一个有趣结果是: 每个脉冲的细胞致死率随脉冲数增多而递减, 在一列 7 个脉冲作用后, 酵母原生质体仍有 57.6% 能存活. 对此可作如下解释, 由于 $V_m \propto a$, 在相同 E_0 作用下, 第一个脉冲使半径 a 大的细胞损伤致死, 续发脉冲的致死率由于半径大的细胞数减少而下降^[5]. 最近已有多次

报道,使用多个 DC 脉冲或一系列 AC 脉冲,都能显著地提高细胞电穿孔和电融合的效率。

1.3 细胞电穿孔的次级过程

早期研究电致细胞膜通透性增大主要以金属离子、蔗糖等小分子为对象,得出了细胞膜的临界击穿电压约为 1.0V,可逆电击穿的脉冲宽度为 5—40 μ s,孔洞的直径约为 1nm 等主要结论。显然它不能解释线度远大于 1nm 的 DNA 质粒是如何导入细胞的。1990 年 Chang^[6]用快速冰冻电子显微术揭示了细胞电穿孔的动力学特征,结果表明电穿孔触发细胞通透性增大的原初过程在几个毫秒内实现,这时孔洞的直径为 20—40nm。接着引发了胞内物质外喷的次级过程,在 20ms 内形成了火山口形的膜孔洞,其直径迅速扩大至以细胞骨架网孔为边界约 20—100nm 的大小,并在数秒内几乎保持不变。为了证实膜孔洞的尺寸,我们以 *E. coli* HB101 为宿主菌,用电穿孔导入经精胺缩合成直径为 88nm 的复曲面形 pCP10 (10.7kb) 质粒,得到了比超螺旋线形同一质粒高 5 倍的转化率,直接证明了 *E. coli* 细胞膜的电致孔洞直径大于 88nm 以足够几率存在。

贴壁细胞电融合的研究已表明^[7]:脉冲电场结束后,融合细胞骨架经历了形态丰富的激烈变化。

1.4 膜穿孔的复原机制

复原机制至今研究得很不充分,仍处于理论模型阶段。大致说细胞电穿孔的可逆性和复原时间是由维持孔洞边缘的能量来确定,文献认为如果维持孔洞边缘的势能比恢复双分子层的势能高,则孔洞就不稳定,膜将很快复原,否则孔洞将继续扩大。实际上细胞膜的复原要比上述模型膜复杂得多,不单只与类脂分子的极性头部的亲水作用和碳氢链的范德华引力有关,还与胶体渗透作用,溶液离子作用和膜蛋白的影响等有关,有待进一步深入研究。

2 细胞电穿孔和电融合的广泛应用

2.1 细胞电穿孔、电融合技术的实用化

细胞电穿孔、电融合技术经过 70 年代的奠

基阶段和 80 年代初的初创阶段之后,从 1984 年起已步入广泛实用化阶段,直接用于产生具有新的生物学性状的细胞株、动植物新品种。为此首要目标是改进电极系统,使之具有高效率、大容量和自动化的特点。自 1984 年以来,德、日、美、中等国已申报各种电极系统的专利不下百余种。我们报道的不锈钢丝平行多电极系统^[8],由 20 根水平安装的平行不锈钢丝(ϕ 0.3mm)组成,交替地连接到两个输入端,共形成 19 个非均匀电场间隙,其容量达 1.5ml;用于电融合,一次可以处理 3×10^7 个细胞。在每一根中间电极丝的两侧都能很好地排列成细胞株串;该系统的另一个突出优点是表观阻抗特性好,相对于两平行丝电极,它处理的细胞量增大了 19 倍,而电源的负载仅增大了 2.6 倍。电场分布与此电极相似的德国发明的两平行丝绕成的螺旋管电极系统,总长达 2 米,是一种较理想的电融合电极。此外,平行圆环电极也都能较好地产生非均匀电场。用于电穿孔的则基本是平行板式电极或平行网片式电极,最大容量可达 50ml。其次是生产配套使用的 AC, DC 电源设备;为了在电极间隙的细胞悬液中建立起 1—10kV/cm 的电场强度,要求电源输出电压达数百乃至千余伏,瞬时输出功率数百 W。另一个目标是实现放电程序的自动化并具有完善的监测功能,为此国内外厂家从 1986 年起已相继推出十多种细胞电穿孔、电融合专用设备。需要指出,许多实验失败或重复性不好往往是由于电源性能不良,空载输出电压虽很高,而带负载时输出电压极低。

2.2 细胞电融合技术的应用

应用细胞电融合技术建立分泌特异单克隆抗体的杂交瘤细胞株已经成为一种稳定高效的手段。1986 年以来,我们实验室已经建立了六种近 40 株鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株。电融合的一个特点是效率高,我们的电融合频率可比 PEG 法提高十多倍,与国外报道具有相同水平;每只 Balb/c 小鼠的 10^8 个免疫脾细胞融合后可产生近两千培养孔细胞克隆;从而有利于从中筛选出高稳定性、高分泌水平的细胞株。

细胞电融合另一个特点是残余毒性小,从而使融合产物早期生长良好.这一点特别有利于人-人杂交瘤细胞株的建立.如用于人 T 细胞杂交瘤^[9], PEG 融合的 2500 孔培养物中仅产生 116 孔杂交瘤细胞克隆,而电融合的 1100 孔培养物中产生了 496 孔杂交瘤细胞克隆.由于特异免疫的人 B 细胞很难取得,融合率高就更有意义,如用 1.2×10^5 个人的 B 细胞,电融合产生的人-人杂交瘤细胞就有 600 个.由于分泌某一特异抗体的 B 细胞一般仅有 1%,故融合后产生的杂交瘤细胞克隆绝大部分是阴性的.为了提高阳性细胞克隆率,可采用特异选择桥联细胞电融合技术;就是用抗原-抗生物素接合到高度激活的 B 细胞表面上,同时将生物素结合到骨髓瘤细胞上,将上述两种细胞混合后,只有分泌特异抗体的 B 细胞与瘤细胞连接到一起,加电穿孔脉冲后,使融合产物的阳性率很高.如用抗鼠肺血管紧张肽转化酶 (ACE) 免疫小鼠,电融合产生的 40 多个细胞克隆全部为分泌抗-ACE 单抗的阳性克隆^[10].

细胞电融合技术也广泛应用于植物和微生物的原生质体融合.我们通过电融合产生了自然界不存在的相同交配型的酵母二倍体菌株.还对可利用水溶性淀粉的茁芽短梗霉与酿酒酵母及可利用纤维二糖的季巴蒙假丝酵母与酿酒酵母进行属间原生质体融合;筛选出融合子能利用水溶性淀粉或纤维二糖生产酒精.

细胞电融合技术还是研究动物胚胎发育的有效手段,Smith 等用电穿孔诱导鼠、羊、兔、牛和猪等的胚胎细胞和去核卵母细胞间融合,已经产生出遗传上同卵的动物,这对发育学和生殖学许多方面的了解都是有益的.

Holler 等发展了细胞和组织间的电融合方法,直接把人的或非人的细胞与在体或离体组织融合杂交,已经得到人和兔角膜上皮组织间的体细胞杂种,从中可探测到人细胞特有的 HLA I 类抗原.利用这一新的生物技术可以建立新的动物模型,用于研究特异受体介导的感染、位点专一药物传递系统,甚至能用来改进外科手术.

2.3 电穿孔诱导基因转移的应用

利用电穿孔技术转化动物细胞在许多实验室已经成为一种有效的常规手段.电穿孔转化率比传统方法要高数倍至上千倍.Xie^[11]等用悬浮的 NIH3T3 细胞,对不同分子量质粒的双曲面形、超螺旋形和松弛环形(用拓扑酶)等三种形态,系统研究了细胞对 DNA 质粒的吸附、获得和表达等一系列问题,取得了良好的结果.对贴壁生长的细胞,可以在单层培养物上进行原位基因电转移,不仅操作简便,且转移效率较高.动物细胞基因电转移不仅广泛应用于建立各种转化细胞株,而且为遗传病的基因治疗开创了良好的前景.

电穿孔在植物生物工程中也有着广泛应用,它可以高效地把外源 DNA 或 RNA 拾取进受体细胞内,建立起转化新植株.例如将质粒 pCMC1020 导入大豆原生质体中,已选择出转化的愈伤组织,并生长出根.又如将 pDP23 和 pMP1 质粒导入玉米原生质体中,经选择培养已获得转化植株.由于禾本科作物耐受农杆菌感染,而电穿孔可以克服细胞膜屏障,成为单子叶植物转化的有力工具^[12].最近对带细胞壁的完整水稻和小麦等细胞进行基因电转移,证实了 β 葡萄糖苷酶得到了瞬时表达,这表明电穿孔技术可能在诱导植物嵌合遗传的修饰中起重要作用.植物细胞电穿孔诱导基因转移可以花粉为实验材料,尽管花粉颗粒有坚固的细胞壁,但由于萌芽期的花粉管已知是有通透性的;花粉管实验结果证明导入质粒得到了瞬时表达.植物细胞电穿孔可以获得耐寒、耐旱、抗虫和抗病毒等优良品种.

细胞电穿孔转移基因应用研究近几年来有了很大的发展,目前已有 100 多种细菌能成功地进行基因电转移.一般来说,对革兰氏阴性细菌进行基因电转移很有效;由于它的细胞壁很薄,对基因转移不足以形成屏障,在最佳条件下,大肠杆菌的电转化率可达到 10^{10} 每微克 DNA.对革兰氏阳性菌进行电穿孔诱导基因转移要比革兰氏阴性菌困难得多,由于它有一层很坚固的细胞壁,对基因转移形成了障碍.

不管是脱壁处理还是完整细胞的转化率都很低, 能达到 10^6 每微克 DNA 的转化率就很不错了, 最近 Allon^[13] 等改进了电穿孔方法, 对七株革兰氏阳性菌进行五种质粒的电转移, 最高的转化率达到 10^7 每微克 DNA, 比原来的电穿孔方法提高了 40 多倍, 比常规诱导方法提高了 4000 倍。

2.4 电穿孔技术的特殊应用

a. 电插入法 (electroinsertion) 将蛋白分子插入细胞膜。当外加电场稍大于或等于临界值 V_c 时, 在细胞膜上形成贯通于细胞内外的亲水孔洞, 可将外源蛋白质插入细胞质膜, 而不造成明显的细胞损伤。例如将 CD4 受体插入红细胞膜上, 不仅可以延长受体的循环生活期, 而且提供了一种治疗艾滋病的方法。

b. 将蛋白分子导入细胞。在最佳电穿孔条件下, 既可使细胞损伤最小, 又可使细胞有效地通透, 将内切酶和抗体等导入细胞。例如将肿瘤天门冬酰胺合成酶的单克隆抗体导入鼠淋巴细胞和人成纤维细胞 HT-5 中, 细胞成活率达 80%—90%, 而且其中 90% 的活细胞结合了抗体。

c. 建立基因库。电穿孔技术现已被公认为在原核细胞中进行基因转移的最有效的手段。对一些好的菌株, 其基因转化率高达 10^{10} 每微克 DNA, 从而仅用少量 DNA 即可构建综合的基因库 (gene library)。Dower 等^[14] 利用电穿孔方法已经开发构建了大于 10^9 个独立的重组

质粒库。

d. 原位研究酶活性。例如海胆卵在受精过程中, 其生理活性增强, 而酶是影响新陈代谢的因素; 研究酶调节机制是令人感兴趣的问题。电穿孔对细胞完整的干扰最小, 可以把带标记的底物导入细胞, 进行酶活性的原位研究。

参 考 文 献

- 1 Kaler K V I S, Jones T B. *Biophys J*, 1990; **57**: 173
- 2 汪和睦, 杭 军. 中国科学 (B 辑), 1992; (10): 1038
- 3 Tsong T Y. *Biophys J*, 1991; **60**: 297
- 4 Sower A E. In: Chang D C ed. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego: Academic Press, 1992; 119
- 5 汪和睦, 鲁玉瓦, 武延宽等. 生物物理学报, 1986; **2** (4): 364
- 6 Chang D C, Reese T S. *Biophys J*, 1990; **58**: 1
- 7 郑 强, 赵南明. 中国科学 (B 辑), 1988; (8): 826
- 8 汪和睦, 鲁玉瓦, 谢廷栋等. 科学通报, 1987; **32** (13): 1032
- 9 Gravekamp C, Santoli D, Vreudenhil R *et al.* *Hybridoma*, 1987; **6** (2): 121
- 10 Tomita M, Tsong T Y. *Biochem Biophys Acta*, 1990; **1055**: 199
- 11 Xie T D, Tsong T Y. *Biophys J*, 1993; **65**: 1684
- 12 Rhodes C A, Pierce D A *et al.* *Science*, 1988; **240**: 204
- 13 Allen S P, Blaschek H P. *FEMS Microbiol Lett*, 1990; **70**: 217
- 14 Dower W J, Cwirla S E. In: Chang D C ed. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego: Academic Press, 1992; 291

重组人巨噬细胞集落刺激因子的结构与功能

凌明圣 徐明波 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 重组人粒细胞——巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 已经在原核、真核细胞表达并得到纯品, 为它的结构与功能研究提供了有利条件。目前国内外对于 rhGM-CSF 的结构与功能研究主要集中在晶体结构、化学修饰、溶液中构象和稳定性以及突变和分子设计方面。分子结构与功能的关系以及与 GM-CSF 受体作用机理研究也取得了突破性进展。

inflammation

The Newest Progress of Protein Kinase C. Yang Yu, Yu Bingzhi. (*Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 308—312

Diacylglycerol (DAG), as the second messenger to activate protein kinase C (PKC), may be derived not only from hydrolysis of phosphatidylinositol (PtdIns), but also from hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), in which phospholipases of the type C and D (PLC and PLD) participate. Fatty acids (FA), the products of phospholipases A₂ (PLA₂) also activates PKC. PKC has at least 10 subspecies and 3 group, namely classical PKC, new PKC and atypical PKC. PKC also participates in regulation of gene expression.

Key words protein kinase C, diacylglycerol, phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A₂, subspecies

Vascular Endothelial Growth Factor and Tumors. Xiu Bo, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 312—317

Vascular endothelial growth factor (VEGF) with paracrine mechanism has recently been identified. Its growth-promoting activity is specific for vascular endothelial cells *in vitro*. VEGF also stimulates angiogenesis and increases blood vessel permeability *in vivo*. Because its bioactivity has a direct bearing on the growth of solid tumors, the researches on VEGF have been paid a good deal of attention and made good progress.

Key words VEGF, vascular permeability factor, vascular endothelial cell, tumor, gene

expression

RB Gene and Tumor Suppression. Gong Guosheng, Qian Liqing. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 317—322

The RB gene is located at chromosome 13q14 which spans more than 150kb, with one interal gap, and its product is a phosphoprotein of about 110kD which is constantly expressed in normal retina cells. The RB Protein can specifically bind to SV40 large T, E1A and E7 antigens. The deficiency of the RB gene is the cause of retinoblastoma. Besides, RB gene mutations are detected in osteosarcomas, breast carcinomas, small-cell lung cancer (SCLC), soft-tissuesarcomas and hematopoietic proliferative disorders. The tumorigenicity can be partially or totally suppressed by introducing the RB gene into the tumor cells.

Key words RB, tumor suppressor gene, tumor suppression

Mechanism and Application of Cell Electroporation and Electrofusion. Wang Hemu, Wang Zhou. (*Department of Physics, Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 322—326

In recent over ten years, owing to the mutual permeation and the coexperiments of biologists and physicists, a new field of biophysical technology was born and has grown up. It not only involves the basic study of cell electromagnetic effect and its mechanism, but also, as a new field in biotechnology, it relates to the wide application of many other fields, such as molecular biology, cellular biology, immunology, medicine, food and agriculture. The newest progresses in this field are summa-

rized.

Key words electroporation, electrofusion, biotechnology

Structure and Function of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor. Ling Mingsheng, Xu Mingbo, Ma Xiankai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 326—330

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) has been expressed in prokaryotic and eukaryotic cells. Purified to homogeneity, which facilitates to study the structure and function of this factor. Recently, the study of structure and function of rhGM-CSF has been mainly focused on crystal structure, including chemical modification, conformation and stability in solution, mutation and molecular design. The progress in study the structure-function relationship and the mechanism of interaction of GM-CSF with its receptor is discussed.

Key words rhGM-CSF, structure and function, crystal structure, chemical modification, conformation and stability in solution

Advances in Biological High Resolution Electron Microscopy. Xu Wei, Pan Dongri, Xing Li, Tang Jinghua. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 330—333, 371

Biological high resolution electron microscopy, a method developed recently, is comparable to X-ray crystallography for determination of high resolution structure of biological macromolecules. It overcomes some difficulties confronted by X-ray crystallography and can apply

directly to the non-crystal biological macromolecules or to those proteins which can only form two-dimensional crystals. This method contains mainly experimental recording of real structure information and image analysis of the electron micrographs. Several problems which will be encountered in the application of these techniques, e. g. natural structure preservation, radiation damage, poor contrast, and low signal-noise ratio are discussed.

Key words biological macromolecule, high resolution, electron microscopy

Expression of the Gene of the 58kD Subunit of the Vacuolar H⁺-ATPase From Human Kidney in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 334—338

The 58kD subunit gene of the human kidney vacuolar H⁺-ATPase has been successfully expressed in *E. coli*. The fragment of 58kD subunit gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR). A clone encoding 58kD subunit was obtained by directly joining PCR product into the plasmid for expression by T7 RNA polymerase (PET). Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression of 58kD subunit gene. The product of 58kD subunit accounted for 50% of cytoplasmic proteins.

Key words H⁺-ATPase, 58kD subunit, bacteria expression

Expression and Secretion of Salmon Growth Hormone From an *Escherichia coli* Secretion