

另有特异亲和位点,而是在于 Ti^{+} 与 K^{+} 非常类似,以致 Na 泵难以区分 K^{+} 和 Ti^{+} 。换句话说 Ti^{+} 取代 K^{+} 激活 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶,是由于 Ti^{+} 非特异地通过和 K^{+} 同一个途径激活 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶。但 Ti^{+} 对 $(Na^{+}-K^{+})-ATP$ 酶激活力为什么是 K^{+} 的 7—10 倍,尚有待进一步研究。

本工作承张炯、玉高栋、吴智力同志大力协助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Gerald, M. D.: *Seminars in Nuclear Medicine*, 10 (1), 7, 1980.
- [2] Peter, A. R. et al.: *Proceedings of third world Congress of Nuclear Medicine and Biology*, Part 3, 3018, 1983.
- [3] 蒋斌,孙祺燕:《中华核医学杂志》5(1), 33, 1985.
- [4] Dodge, J. T. et al.: *Archs. Biochem. Biophys.*, 100, 119, 1963.
- [5] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [6] Lazarus, L. H. et al.: *Anal. Biochem.*, 45, 557, 1972.
- [7] Britten, J. S. et al.: *Biochim. Biophys. (Acta)*, 159, 160, 1968.
- [8] Skulskii, I. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 298, 702, 1973.
- [9] Bonting, S. L. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 416, 1961.
- [10] Israel, Y. et al.: *J. Pharmac. Exper. Therapy*, 174 (2), 330, 1970.
- [11] 王理升:《生物化学与生物物理进展》, 5, 21, 1979.
- [12] Inturrisi, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 630, 1969.
- [13] Inturrisi, C. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 173, 567, 1969.
- [14] Mullins, L. J. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 43, 759, 1960.

[本文于 1984 年 6 月 25 日收到]

激光光散射法研究 DNA-阳离子络合物的生成过程*

左 集 李乃宏 杨 彦 周逸民 袁 直 韩兴华 何炳林

(南开大学化学系)

由于抗 DNA 抗体免疫化学的发展,使人们对固定化 DNA 技术发生很大兴趣。这是因为固定化 DNA 可作为抗 DNA 抗体的免疫吸附剂去治疗一些与免疫复合物有关的疾病,例如红斑狼疮、类风湿性关节炎等,而这些疾病靠传统治疗方法疗效不佳。

以免疫吸附剂治疗免疫性疾病是 Terman 在 1979 年首次试用成功^[1]。吸附剂一般是用 DNA 和二价金属离子或有机阳离子进行络合,生成不溶于水的络合物,该络合物对一些致病的抗体及抗原抗体的复合物有吸附作用。因而以二价阳离子络合并沉淀固定 DNA 的反应引起了人们的兴趣^[2]。

Schultz^[3]提出,以激光光散射方法可以快速、高灵敏度地检测免疫复合物的存在与否,检测范畴可扩展至胶体聚集体体系。Greene 也在激光光散射法研究 DNA—阳离子络合反应方

面作过工作^[4]。本文用激光光散射技术,较系统地研究了二种阳离子络合剂络合沉淀固定 DNA 反应的动力学过程及影响因素,并在实验基础上归纳出有关反应的若干规律,对高分子免疫吸附剂制备有指导意义。

实 验 方 法

实验在多功能激光光散射装置^[5]上进行。用 2 毫升安瓶作反应瓶,使用中要严格定位。反应瓶、药品及器械需要严格除尘。记录在 35° 方向上随反应进行时散射光强的变化。检测前将反应瓶用空白液调零。采用功率稳定的 He-Ne 激光器,功率 2mW。

药品:小牛胸腺 DNA(上海市牛奶公司综合厂);蓝四唑(简称 BT, BDH 分装), $Pb(NO_3)_2$

* 本文曾在 1983 年全国高分子学术论文报告会上宣读。

(AR)。

结果与讨论

一、DNA-BT 络合反应:

1. M/P 值的影响 M/P 值是络合剂摩尔数与 DNA 磷含量摩尔数之比值。图 1 是反应液浓度不变而在不同 M/P 值时, DNA-BT 络合反应动力学曲线。图中 RLS 为相对光散射单位(以 5.6×10^{-9} 安培所对应的散射光强为

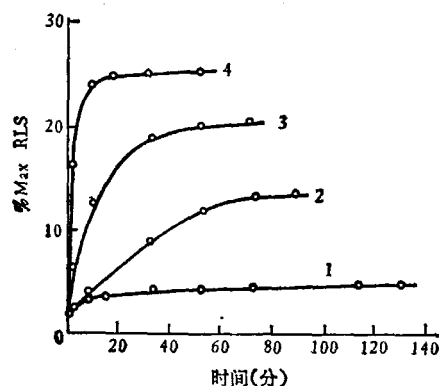


图 1 DNA-BT 络合反应动力学曲线($25 \pm 1^\circ\text{C}$)

浓度 $C_{\text{DNA(P)}} 7.25 \times 10^{-4} \text{ mM/ml}$.

$C_{\text{BT}} 2 \times 10^{-4} \text{ mM/ml}$.

M/P 1. 0.46, 2. 0.54, 3. 0.57, 4. 0.61。

100% 作比较)。由图看出,随 M/P 值增加,反应速率加快,反应在更短的时间内即已完成。不同 M/P 值最终光散射强度不同,表明生成络合物含量与 M/P 值成正比。

表 1 是图 1 中不同 M/P 值时的反应速率,其数据表明 M/P 值对反应速率影响极大,当 M/P 值由 0.46 增至 0.61,变化量仅为 0.15,而所对应的反应速率却增加 23 倍。这有力地说明在制备这种络合物时选择适合的 M/P 值是十分重要的。

若以图 1 的 RLS 对 M/P 作图(图 2),可看出,当 $M/P < 0.27$ 时,散射光强很低,基本无络合物生成。而 M/P 在 0.27—0.61 范围,随 M/P 值增大散射光强明显增大,表明络合物含量迅速增加。但当 $M/P > 0.61$ 时出现明显絮状沉淀,反应体系不再为浑浊体系,并随 M/P 值的继续增大,大片絮状沉淀逐渐增多。我们

表 1 不同 M/P 、不同温度下, DNA-BT 络合反应速率

RLS/分 T	M/P	0.46	0.54	0.57	0.61
		0.03	0.16	0.36	0.70
25°C		0.03	0.16	0.36	0.70
37°C		0.07	0.29	0.38	—

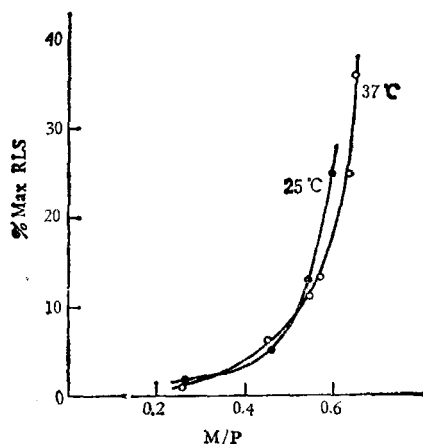


图 2 DNA-BT 络合反应在不同 M/P 值下的散射光强

将出现明显絮状沉淀的 M/P 值称为临界值,此值在曲线上的对应点称临界点。临界点左侧为浑浊体系区,右侧为絮状沉淀区。据此可按需要合理选择 M/P 值。为方便计,称图 2 临界点所在的按指数增长的曲线为临界曲线,其经验数学表达式为:

$$\ln Y = 8.4316M/P - 1.9973$$

$$\text{相关系数 } r = 0.9871$$

式中 Y 为络合物含量(以 RLS 表示)。由该式可由 M/P 值估算络合物含量。

2. 浓度的影响 由图 3 可见,浓度对反应影响也很大。自曲线 1 至 3,反应物浓度仅增约 60%,反应速率却增加近 16 倍。并且在一定 M/P 值下也存在一个出现明显絮状沉淀的临界浓度值。其规律是:随 M/P 值增大,临界浓度值下降,反之则上升。

综合上述情况, DNA-BT 络合反应速率对 M/P 值和反应物各自的浓度两个因素都十分敏感,而这两个因素实质上是浓度因素对反应的影响,应综合考虑。

3. pH 值的影响 图 4 表明络合反应对

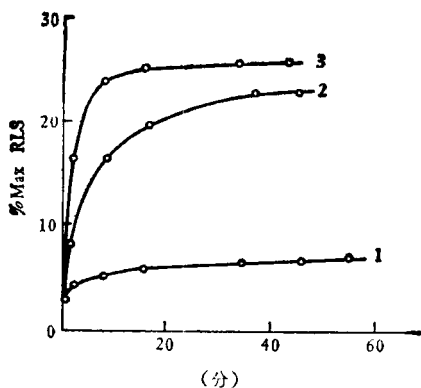


图3 浓度对 DNA-BT 络合反应的影响

	$C_{DNA(P)}(mM/ml)$	$C_{BT}(mM/ml)$
1.	4.83×10^{-4}	1.34×10^{-4}
2.	6.04×10^{-4}	1.67×10^{-4}
3.	7.25×10^{-4}	2.00×10^{-4}

pH 值也十分敏感。在相同条件下, pH = 7.5 时, 散射光强最大, 络合物含量最高; pH 值稍有偏离 7.5 时都会导致散射光强迅速下降。

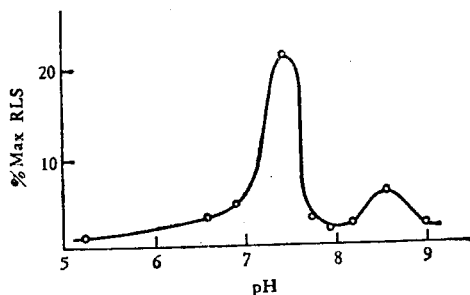


图4 DNA-BT 络合反应在不同 pH 值下的散射光强(25±1℃)

4. 温度的影响 升温对络合反应临界曲线影响不明显(图2), 但由表1看出, 在 37℃ 时反应速率值有所增加, 这和升温对化学平衡反应影响规律一致。

二、DNA-Pb²⁺ 络合反应

1. M/P 值的影响 DNA-Pb²⁺ 络合反应动力学过程受 M/P 值的影响也很大, 也存在一个临界 M/P 值, 但与对 DNA-BT 体系的影响规律不同; 当 M/P 值过高或过低时, 使反应速率与络合物含量都下降, 使反应曲线呈塔状(图5), 即有一个生成较多络合物的 M/P 值范围, 并有一最佳 M/P 值。

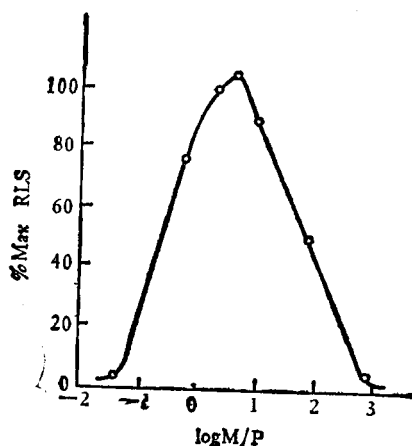


图5 DNA-Pb²⁺ 络合反应在不同 M/P 值的散射光强

2. 浓度的影响 与 DNA-BT 体系中相同。随浓度增大, 反应速率增加, 临界 M/P 值下降; 反之, 当浓度减小时, 反应速率减慢, 临界 M/P 值上升。也存在一个出现絮状沉淀的临界浓度值。可见, 对该络合反应 M/P 值和浓度的影响也应综合考虑。

综上所述, 两种络合剂络合沉淀、固定 DNA 时, 反应速率和产物含量等对 M/P 值依赖性不同。Greene 等认为这是因反应机理不同。参考 Debari^[6] 关于肝素-四唑络合机理模型, 我们初步认为 DNA 上磷酸与蓝四唑形成离子交链结构, 络合物比较稳定。当 M/P 值增大, BT 量增多, 交链机率增加, 因而络合物含量与 M/P 值成正比。而 Pb²⁺ 络合沉淀、固定 DNA 与上述机理不同, 它是 Pb²⁺ 与 DNA 上磷酸及碱基配位络合, 只有在某一 M/P 值二组分可全部配位络合, 使产物含量最高, 而当 M/P 值过低或过高, 先后会因 DNA 和 Pb²⁺ 过量, 不仅不能参加反应, 反而起稀释作用, 使产物含量下降。有的资料^[4]还认为, DNA 与金属离子的络合物一般不太稳定, 过量的金属离子会使 DNA 解聚, 降低络合物含量, 存放中也会因再水解等反应而被破坏。以上的机理分析与本实验结果相符。

参 考 文 献

[1] Terman, D. S.: *Clinical Immunology and Im-*

munopathology, 8, 90, 1977.

- [2] Debari, V. A. and Needle, M. A.: *J. Immunol. Methods*, 40, 89, 1981.
- [3] Schultz-Ellison, G. et al.: *J. Immunological Methods*, 31, 31, 1979.
- [4] Greene, Barry S., et al.: *J. Appl. Biochem.*, 3,

337, 1981.

- [5] 左渠, 黄吉甫, 胡永中等:《多功能激光散射装置及应用》(鉴定会资料), 1982, 10, 南开大学。
- [6] Dehari, V. A. and Needle, M. A.: *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 40—46, 1978.

[本文于 1984 年 6 月 30 日收到]

NaN₃ 血清等对血卟啉衍生物光敏致溶血作用的影响

张绍斌 宋兰芳 常金珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

含有血卟啉衍生物(HPD)的细胞在红光照射后,其光动力学过程的主要产物是一些 HPD 的自由基和单态氧^[1]等。这些极为活泼的物质使膜或其它细胞器上的重要大分子因过氧化而损伤,并进而可引起癌细胞或正常细胞死亡。

人血红细胞材料容易得到,其死亡指标(溶血)容易测量,是一个研究光敏作用的良好模型^[2]。已有人用红细胞研究原卟啉^[3]等光敏机理。本文用人红血球为材料,探讨 HPD 的光动力学过程,以及某些 ¹O₂ 的淬灭剂对这一过程的影响及血清等的保护效应。

一、材料与方 法

1. HPD: 北京制药工业研究所制。NaN₃: 国产分析纯, α -生育酚为国产。小牛血清上海产,人血清白蛋白及人纤维蛋白元(纯度约 20%)是北京红十字中心站产品。

2. 人红细胞: 将自北京红十字会中心血站购来的新鲜压积红血球,按 Hanahan 和 Ekhelm 法以 310mOsm Tris 缓冲液(pH7.6)洗三次,最后以同样缓冲液或生理盐水稀释成 2×10^7 细胞/毫升的悬液待用。

3. 加 HPD 保温并照光: 在暗处加 HPD 于红细胞悬液后, 25℃ 恒温水浴保温 10 分钟。用 400 瓦溴钨灯 630nm 截止滤光片产生红光,将样品放在水平方向距光源 30cm 处,用电磁搅拌器边搅拌边照光;或用透过窗玻璃的阳光直接照射盛有样品的试管(同时在旁边放一

光度计测光强度,本文因只作相对效应的比较,故省略)。

4. 溶血程度及完全溶血时间测定: 按 sik^[5]方法,将含 HPD 的红细胞悬液照光后,立即在 751 型分光光度计上测 650nm 的透光率。在所用浓度范围内,红细胞悬液的透光率与溶血程度基本是一直线关系,所以本文均以透光率直接表示溶血的相对程度。完全溶血的透光率为 78—80%,不溶血为 12%。

在 NaN₃ 和血清等的实验中,以照光开始到完全溶血所需的照光时间(以下称完全溶血时间)作为判定光敏损伤程度的指标。

二、实 验 结 果

1. 图 1 和图 2 分别表示 HPD 浓度相同,光照时间不同,以及光照时间相同、HPD 浓度不同的红细胞溶血曲线(图 1,图 2)。

由图 1 及图 2 可以看出,只加 HPD 不照光,或只照光不加 HPD 的红细胞悬液的透光率,和既不照光也不加 HPD 的红细胞悬液的透光率相同,这表明两种情况均无溶血。图 1 的溶血曲线是二级反应的“S”型曲线,即一开始随着光敏剂量增加溶血速度较小;光照近 20 分钟时,溶血速度急剧增加。由图 2 可见,光照 30 分钟,HPD 达到 20 μ g/ml 时完全溶血,低于此剂量,溶血程度与 HPD 浓度增加呈直线关系。

以上的实验样品,光敏后立即测量,没有一个出现完全溶血,在暗处放 3 小时或更多时间,