

专论与综述

生物大分子印渍术

范培昌

(华东师范大学生物系生化教研室, 上海)

生物大分子印渍术是近十年来开创的又一生化新技术^[1]。在国内, 有关报道仅数篇, 且把印渍术 (Blotting) 改称为“转移电泳”^[2], 致使生产厂家称其商品为转移电泳仪 (如江苏兴化分析仪器厂) 和转移电泳纸 (如浙江黄岩曙光化工厂)。其实, 印渍术不一定用电作动力, 即使用电的印渍术, 使用的实为电洗脱装置, 而不是电泳装置。其电源虽可用常规电泳仪电源替代, 但必须小心操作, 否则将烧毁电流表, 因为电印渍术 (electroblotting) 所用电源应是可输出 1—5 安的高电流电源。凡此种种, 都说明有必要对印渍术作一较全面的介绍, 既为了正名, 更为了能正确运用这种新技术。

一、印渍术的由来

各种凝胶电泳是当代分析生物大分子最有效的技术之一。目前, 其分辨率已达惊人程度。如 O'Farrell 双相凝胶系统一次能分辨近 1,600 种蛋白质。这就出现了新问题: 要想精确地从这上千条区带中辨别出一种我们感兴趣的功能性蛋白质, 常是困难的。迄今, 虽已创立了许多能灵敏检测出特异性酶、抗原、糖蛋白、激素受体的方法, 以及其它 DNA-RNA 和蛋白质-蛋白质之间相互作用的方法^[3,4], 但它们要求: (1) 被鉴定的生物大分子能亲和并结合于一种易被检出的配体上; (2) 作为探针的配体应能进入凝胶, 以便和胶内亲和物结合; (3) 电泳时生物大分子的活性应能保持; 或者 (4) 电泳时虽已失活, 但电泳后能通过某种处理使之

恢复活性。显然, 要做到上述各项势必要对凝胶进行各种处理: 保温、浸泡、反复洗涤等。这就可能使凝胶破损、断裂, 致使前功尽弃。更何况湿的凝胶难以贮存, 必须及时处理。

为了解决上述问题, 苏格兰爱丁堡大学的 E. M. Southern, 于 1975 年创立了一种把凝胶电泳、固定化技术和分子杂交融为一体的新方法^[5]。他把限制性内切酶消化后的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳分离, 再用图 1 的设计, 借助毛细作用把凝胶上的区带转移并吸附于硝酸纤维素滤纸上并使之固定化。最后用特定的放射性 RNA 作为探针, 使之和固定化纸上特异性区带进行 DNA-RNA 杂交, 通过放射自显影检出了所需 DNA 片段^[5]。由于此过程类似于把墨渍吸到吸墨纸上而称为 blotting^[5] 故理应译为印渍术。

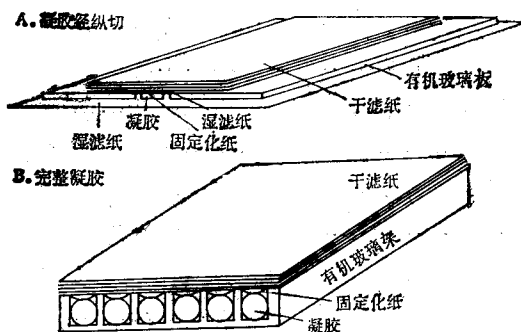


图 1 Southern 设计的两种印渍装置

1977 年, 法国 Chambon 小组采用 Southern 印渍术研究鸡胚卵清蛋白基因时, 发现了真核生物基因有不编码的插入顺序 (现称内含子;

intron)^[6]。后来这种被 Crick 誉之为分子遗传学中一次微型革命的杰出成果,使印渍术名声大振。同年, Alwine 等人将此法应用于 RNA^[7],并把人们原来以 Southern 姓氏命名的印渍术,取其姓含南部之意,风趣地称他的 RNA 印渍术为北部印渍术 (Northern blotting)。1979 年, Towbin 等人又把此技术扩展到蛋白质^[8],并在 1981 年由 Burnette 所作蛋白质印渍实验中称为西部印渍术 (Western blotting)。1982 年, Reinhart 进行了电聚焦后的蛋白质印渍,创造了双方向印渍术^[9]。这一方法又被称为东部印渍术 (Eastern blotting)。由上可见,除 Southern 印渍术系取发明人姓氏外,其余均系

一种诙谐的称谓,虽说别有风趣,却造成了名称上的混乱。近来有人建议还是直呼 DNA 印渍术、RNA 印渍术、蛋白质印渍术等名称为好^[10]。

二、印渍过程

利用各种动力(毛细作用、接触扩散、电动方等),使凝胶电泳分离开的大分子区带印渍于固定化纸上而被固定化,由于各区带转化成稳定而又容易和各自特异性探针接近,从而检出所需功能分子的方法谓之生物大分子印渍术^[10]。图 2 和图 3 分别列出了 DNA 印渍术和蛋白质印渍术的基本过程,都包括了平衡、印渍、猝灭 (quenching)、亲和结合和检出诸步骤

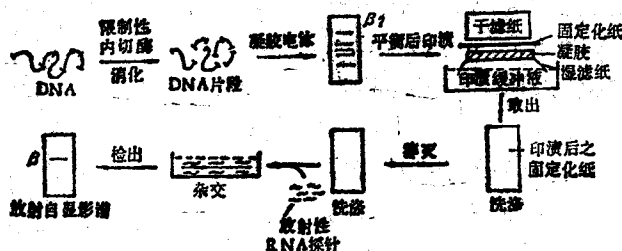


图 2 检出某种 β -蛋白基因的印渍过程

(详见后述)。其重点在于把凝胶电泳已分离区带固定化,使生物大分子转化在可以承受种种处理、多次应用又能长期贮藏的固定化纸上。这是因为: (1) 湿的固定化纸是柔韧的,容易操纵; (2) 固定于固定化纸表面上的生物大分子,可以均等地和各种作为探针的配体接近,不会像凝胶那样受孔径阻隔; (3) 因生物大分子被印渍于固定化纸表面,其后的鉴定只需用少量试剂,可以节省价格昂贵的配体用量; (4) 也因此加工处理固定化纸的时间大为减少; (5) 由于大分子已被固定,经得起各种处理和连续分析,又可长期贮存; (6) 现已能把一根凝胶同时印渍于多张固定化纸上,故可同时作多种鉴定与分析; (7) 若生物大分子被共价连接于固定化纸(如用重氮化纸),由于探针与区带系非共价亲和吸附,故可像录音带那样把探针“抹掉”,再用第二探针进行新的探测。

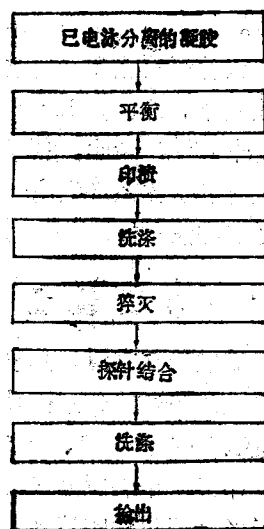


图 3 蛋白质印渍全过程

三、凝胶的平衡和印渍缓冲液的选择

如图 3 所示,已分离好的凝胶在印渍前常需用印渍缓冲液平衡。主要目的有二: 首先,

防止印渍时因凝胶转入离子强度不同的印渍缓冲液后发生膨胀或皱缩,从而使印渍区带扭曲变形。为此,一方面要在印渍前取一条凝胶作常规染色,并和印渍后固定化纸上的染色谱进行比较,以确证印渍谱和原有凝胶谱相同。另一方面要做好预防措施,即印渍前先把凝胶浸入印渍缓冲液中1小时,使其充分胀、缩后再印渍,此即平衡。如果想省去此步,也可在印渍缓冲液中加入总量达20%的甲醇或乙醇来防止凝胶尺寸的改变。但甲醇会影响印渍效率,在只需短时间的电印渍中不宜采用^[1]。其次,许多蛋白质,尤其是嵌入膜蛋白,需用去污剂(如SDS等)增溶。加有去污剂的蛋白质常无活性,印渍后不能用功能性探针检出。为此印渍前需用复性剂处理凝胶。如用0.5% (v/v) Triton X-100浸泡凝胶使之置换出SDS而复性。这也属于凝胶的平衡处理。

印渍术仅有十年历史,有关印渍缓冲液的选择尚无可循规律。通常,所选印渍缓冲液的组分和pH,应能使所需大分子具有最大溶解度,使之容易从凝胶中洗脱。在电印渍术中,目前最常采用的是pH 8.3, 15.6mM Tris-120mM甘氨酸缓冲液。但在蛋白质印渍中,若用重氮化固定化纸,因甘氨酸能和蛋白质争夺重氮基团而减弱印渍效率。为此, Bittner改用pH6.5, 25mM磷酸缓冲液^[11]。除此,在电印渍时,所选印渍缓冲液应有利于体系产生高电流。为此应选低离子强度缓冲液^[12]。

四、印渍装置

就迄今报道过的文献看,几乎所有类型的凝胶都被成功地印渍过。包括: 豚凝胶、SDS凝胶、双相凝胶、琼脂糖凝胶、十二烷基硫酸锂凝胶^[13]等等。印渍所用装置大多由实验室自行设计。型式虽多,但可按印渍动力归为三类:

1. 毛细作用印渍 (capillary blotting)

Southern 开创本技术时即用这种方式^[9],他设计的两种装置已如图1所示。此时,凝胶放在一张用印渍缓冲液浸透的湿滤纸上,凝胶上放一张固定化纸,其上再叠放一堆干的吸水纸。

通过毛细作用使凝胶中的各区带被印渍缓冲液洗脱,并转移于固定化纸。本法最大优点是不需任何专门装置,操作简便,干扰因素少。缺点是费时,一些分子量较大的区带因孔径位阻,印渍缓慢。为此,有人把整个装配件放入大型真空干燥器中,利用减压真空来缩短印渍时间^[14]。

2. 接触-扩散印渍 (contact-diffusion blotting)

所用装配件如图4所示。凝胶夹在两张固

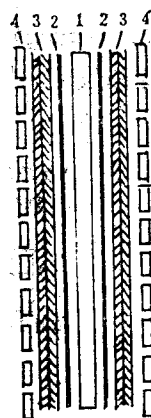


图4 接触-扩散印渍

所用夹层装配件: 1.凝胶; 2.固定化纸;
3.一叠吸水纸; 4.多孔有机玻璃板

定化纸间,纸外侧复以泡沫塑料软垫或一叠吸水纸,其外再放多孔有机玻璃板。整个装配件用螺旋或夹槽固定后浸没于大体积(如2升)印渍缓冲液中。此法也需较长时间(36—48小时),但印渍效率可达75%左右。此法可同时获得两张相同的印渍谱。

3. 电印渍 (electroblotting)

电印渍先由 Towbin 创建^[8],所用装置也如图4,只是整个装配件平行放置于两块网状电极间。又因为通电后发热厉害,常在装配件外,加一冰水循环管(图5)。由此可见,电印渍装置实为电洗脱装置而不是电泳装置。为了使凝胶,尤其是板形凝胶上各区带承受均等的电压,必须采用网状电极。最好用铂网电极^[15],但价格昂贵,故常用不锈钢网电极。电极的设计公认为 Bittner 方案最佳^[11],这是由并联弯曲

的一排铂丝所组成。每一铂丝间的距离要保证能得到相同的电场。通常,较好的电极材料能得到电洗脱系统较低的电阻抗。低阻抗要求较高的电流,才能获得合适的电压来驱动洗脱过程。因此,用于电印渍的电源应是高达1—5安的高电流电源。

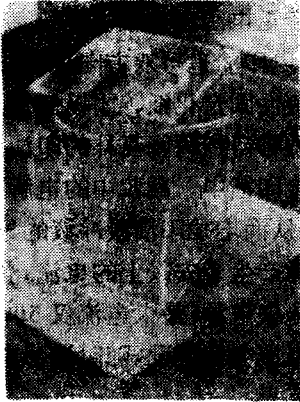


图5 电印渍装置

五、印渍用纸

印渍术发展极为迅速,作为印渍用的固定化纸种类越来越多。目前主要有三种类型:

1. 硝酸纤维素滤纸 (nitrocellulose filter)

简称 NC 纸,国内、外均有商品市售。生物大分子和 NC 纸发生化学吸附的机理尚未完全清楚。通常在 pH 8.0 时,蛋白质较易吸附于 NC 纸。认为,此时 NC 纸带负电,能以静电引力吸附蛋白质。Triton X-100 能促进蛋白质从 NC 纸上解脱,因此认为疏水作用对 NC 滤纸吸附蛋白质也起一定作用。某些蛋白质,尤其是低分子量蛋白质,对 NC 纸的亲合力较低,会在印渍后的各种处理中不断损失。为此,有人曾把 NC 纸进行共价交联^[13];有人则改用平均孔径为 0.2 μ m 的 NC 纸。

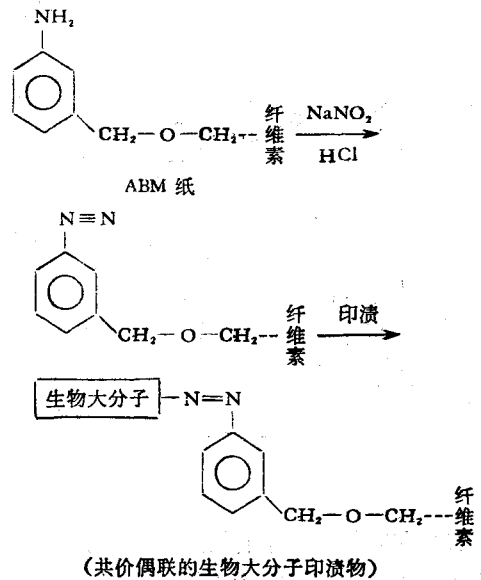
DNA 印渍中也广泛采用 NC 纸。有人建议采用纯的 NC 滤纸比混有乙酸钠纤维素的 NC 纸(如商品 Milipore NC)能更有效地吸附 DNA。

NC 纸比较便宜,使用时不需作任何加工处理,故被广泛作为印渍用纸。NC 滤纸一般可在 4℃ 下贮存一年。

2. 重氮化纸 (diaz paper)

这类固定化纸的商品均为苯胺基化合物,使用时用户需自行重氮化。目前较广泛使用的有两类:

(1) 重氮苯氧甲基纤维素纸 (diazobenzyl oxymethyl cellulose paper; 简称 DBM 纸): 市售商品实为氨基苯氧甲基纤维素 (Aminobenzyl oxymethyl cellulose paper; 简称 ABM 纸),或硝基苯氧甲基纤维素纸 (Nitrobenzyl oxymethyl cellulose paper; 简称 NBM 纸)。临用时,用亚硝酸处理使成重氮衍生物,然后再用于印渍,使其和生物大分子共价偶联:



NBM 纸的保存寿命较长,4℃ 下可贮藏一年。ABM 纸在 4℃ 下只能贮存 4 个月,且需通氮气。单链核酸和长度为 30 个碱基的单链 DNA 片段都曾用 DBM 纸印渍检出过。

(2) 重氮苯硫醚纤维素纸 (Diazophenylthioether cellulose paper; 简称 DPT 纸): 其商品也系未活化的氨基苯硫醚纤维素 (Aminophenylthioether cellulose; 简称 APT 纸)。临用时把 APT 纸用酸性硝酸钠使之重氮化而成 DPT 纸。APT 纸 4℃ 下可贮存半年。

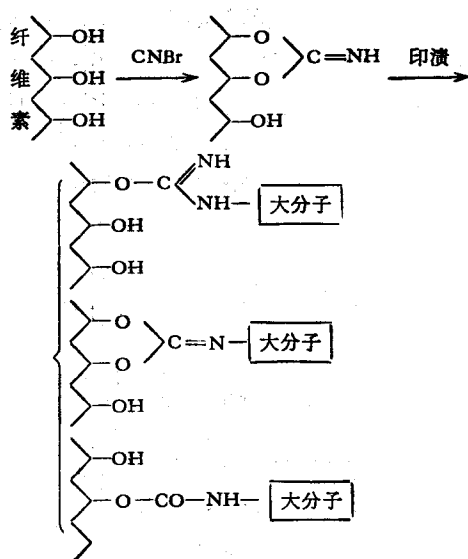
由于重氮化纸比较粗糙,印渍效率不如 NC 纸。但因印渍物系共价偶联,故经得起各种处理;也可象录音带那样“抹去”探针,从而用第二

种探针作新的探测,如此反复使用可达4、5次之多^[16],重氮纸上的印渍物都不会丧失。这一性能使我们能在同一印渍谱上检出各具不同功能的区带,或探测同一区带所具有的多种功能。

需要指出的是,重氮基团只能停留较短时间,因此印渍只能用仅需短时间的电印渍术。

3. 溴化氰活化纸 (Cyanogen bromide activated paper; 简称 CBA 纸)

目前,国内、外均无用于印渍的 CBA 纸商品。可用 Clarke 法^[17]方便地制得,反应式如下:



由式可见,被印渍的生物大分子也是共价偶联,故也耐处理和多次使用探针。Rhullar 等人曾用 CBA 纸成功地印渍蛋白质。

除上述三类印渍用纸外,其它材料的零星报道也不少。例如商品名为 Zetabinal, 用尼龙衬底的膜(简称 ZB 膜)^[10,18],是用众多的叔胺基修饰过的尼龙 66。由于膜上具有颇多可逆的、由多阴离子形成的静电作用电位,它对蛋白质有很强的结合能力(480 μ g/cm²)。又如,有人曾使用过 DEAE 阴离子交换膜成功地印渍过各种 DNA 片段^[19]。

六、影响印渍的重要因素

1. 凝胶和固定化纸间、凝胶和湿滤纸之间必需严防气泡。气泡会产生高阻抗点,形成低

效印渍区,这在印渍术中称为“秃斑 (bald spots)”^[20]。同样理由,各夹层间务要紧密贴在一起^[21]。

2. 电印渍中,因为电流方向性,固定化纸通常只放在凝胶一侧,故需预先了解所需印渍分子带何种电荷。若带负电,应选用带负电固定化纸(如 NC 纸),并把纸放在凝胶阳极侧。反之,选用带正电固定化纸(如 ZB 膜),放阴极侧。当然,电印渍也可双方向进行,此时凝胶的阳极侧放负性固定化纸,阴极侧放正性固定化纸。印渍后将得到两张互补的印渍谱。

3. 在电印渍中,凝胶中的电解质也将从凝胶中洗脱,从而增加印渍缓冲液的导电性,使体系电阻下降产生 1 安以上的电流。因此,若采用常规电泳仪电源(最大电流仅 500 毫安),需密切注意电流变化情况,随时调节电源电压,防止烧毁电流表。

4. 印渍效率和大分子的分子量有密切关系。Howe & Hershey^[19]曾做过系统研究。他们在印渍时每小时换一张固定化纸,发现在 2 小时处低分子量分子已被有效印渍,而高分子量多肽在 6—12 小时才被有效印渍。为了克服或减轻这一不足,曾提出许多建议:(1)改用可逆性交联剂代替甲叉双丙烯酰胺,以便印渍前使凝胶解聚,利于高分子量分子迁出凝胶;(2)用蛋白酶消化高分子量多肽,使形成小片段^[22]。当然,这种处理应不会破坏所需区带印渍后与探针结合的亲和位点;(3)加 0.1% SDS 于印渍缓冲液中,以促使高分子量多肽的转移^[24]。当然,这种处理不能用于功能性检出的实验目的。

5. 在电印渍中有时会出现低或中等分子量的区带,任你加长印渍时间也不会迁出凝胶的现象^[22]。这是印渍体系恰好使蛋白质处于等电点所致,应改变印渍缓冲液之 pH。

6. 在 DNA 印渍中,双链 DNA 是不能被印渍于 NC 滤纸上的^[21],应先用 NaOH 浸泡凝胶使 DNA 双链解链后再印渍。单链 DNA 片段大于一万碱基时也难迁出凝胶,需在印渍前使凝胶解聚,或在 NaOH 处理前用短波紫外线照

射。或者先用稀盐酸,再用碱处理凝胶使之裂解。

7. 印渍时间的长短也取决于凝胶之厚度和孔径。含琼脂糖的凝胶中琼脂糖含量越高,孔径越大,也越易印渍。

8. 现在已能对同一凝胶进行多考贝复制。此时,在凝胶的一侧同时放 10 张 NC 滤纸。电印渍后凝胶上的区带能穿过 NC 滤纸,产生浓度渐减的 10 序列复制品。在进行这种多考贝电印渍时缓冲液中不能加甲醇,否则会降低印渍效率。

七、染色、猝灭及探针结合

凝胶区带经印渍后,生物大分子就被固定于固定化纸上。为了了解印渍效率,按常规凝胶染色法,用考马斯亮蓝或氨基黑 10B 等使固定化纸染色。所得染色谱与未经印渍的凝胶染色谱对照,求得印渍效率,并作为其后探针检出的对照。一张干的固定化纸在染色时应先浸于水中,否则它在含有高浓度甲醇的染料中会严重变形,甚至溶解。

采用印渍术的重要目的在于检出其中某已知功能的区带,而不是全谱的检出。这就要利用蛋白质的生物活性,利用 DNA 或 RNA 的可杂交性。也即利用一对亲和物中之一方作为探针,检出被印渍于固定化纸上的另一方。为了检出,非酶探针或用酶标,或用荧光化物、放射性同位素来标记。由于探针大多数仍是蛋白质或核酸,直接用它们去处理已印渍的固定化纸,它们势必去占领各区带间所剩余的固定化纸活性基团,使探针固定化而产生“高背景”,难以检出所需区带。因此必须把固定化纸上这些剩余的活性基团在使用探针前先封闭,这在印渍术中称为猝灭或退火^[10]。就 DNA 印渍而言,常用 Denhardt 创立的高分子量多聚物^[23]。就蛋白质印渍而言,常用牛血清清蛋白^[18,20]或血红蛋白^[24]作为猝灭剂。操作时只需在 25—60℃ 下把固定化纸浸于猝灭剂中 1—12 小时即可。

经猝灭后的固定化纸可通过保温使和探针反应。现已知,外源凝集素-糖蛋白复合物的解

离常数为 10^{-2} — $10^{-5}M$ 之间;抗体-抗原复合物为 10^{-4} — $10^{-10}M$ 之间。因此,凡其它蛋白质-配体相互作用的解离常数落在这两种极端值区间内,即 10^{-2} — $10^{-10}M$ 内,均经得起印渍实验。

探针结合缓冲液的选择应以探针结合完全,非特异性结合达最小值为原则。探针结合反应有两种方式:第一种,也是最常用的,是把所有凝胶上的区带印渍于固定化纸,经猝灭后再和探针保温,使只有能和探针亲和结合的区带显示出来。第二种方式是把探针先固定于固定化纸,然后再印渍,经洗涤后只有能和固定化探针亲和结合的区带才被保留下来。通常,想用几种不同探针对有限数量的区带作几种功能分析时就用第一种方式。若想用一种探针去屏蔽其它所有非特异性区带时宜采用第二种方式。

所用探针必须容易检出又有很高检出灵敏度,故常把探针用同位素或荧光化合物标记。探针结合后应立即进行放射自显影或用紫外灯检出荧光区带。这类检出法的灵敏度可达 $1\mu\text{g}$ — 1ng 。

印渍术的应用越来越广泛,尤其在免疫学领域,因为它是一种既简便又灵敏的抗原和抗血清筛选技术。印渍术也是研究生物大分子之间在活体内如何装配的手段^[25]。不久前 Hayman 等人^[26]开创了用印渍术研究蛋白质与细胞间相互作用的新领域。除此,印渍术还可以检出核蛋白复合物、鉴定酶亚单位^[27]、证明基因中含子数目^[6]、探查 DNA 顺序中的甲基化程度、分析遗传病中的功能畸变基因 (mulfunctioning gene)^[1]、研究基因活化等等。限于篇幅不能详细列举。总之,印渍术虽仅十年历史,但其功绩已极辉煌。可以相信,随着本技术的进一步发展,应用将更广泛。更由于设备简单、操作容易,它必然会成为有关实验室中一项十分重要的常规技术。

参 考 文 献

- [1] Walker, J. M. et al.: in "Technique in Molecular Biology", Croom Helm Ltd., pp. 273—285; 287—307, 1983
- [2] 朱运松等:《生物化学与生物物理进展》, 6: 56, 1984.
- [3] Massague, J. et al.: J. Biol. Chem., 256, 9419,

蛋白质空间结构的运动性与功能关系的研究

李家瑶

(中国科学院生物学部, 北京)

在大分子晶体学发展的初期, 人们基于对刚性分子的认识来讨论蛋白质的结构与功能的关系, 有关分子柔性的讨论在那时还很不时兴。七十年代中期以前, 关于大分子柔性的研究才逐渐兴起, 比如氨基质子交换的研究指出球蛋白分子具有柔性, 多肽骨架的片段和氨基酸侧链具有运动性。¹H NMR 研究观察到了芳香环的翻转运动。另一方面, 不同功能态的晶体结构研究也揭示了诸如血红蛋白等蛋白质亚基四级结构的运动(分子肺), 以及通过不同晶态条件下的分子构象的比较所获得的局部构象变化的信息。在这一阶段甚至通过荧光去极化实验还推断出免疫球蛋白结构域的运动性。七十年代中期以后, 这方面的研究大大增加了, 首先是发展了各种实验方法可以提供原子分辨率水平的蛋白质分子运动状态的详细信息, 如晶体学向高分辨率的发展, 结构的修正包含了温度因子参数, 它提供了原子的高频振动状态及分

子静态运动性的信息。中子衍射对质子、氘的快慢交换研究, NMR 对溶液中大分子构象的定量描述等等都达到了很高的水平。此外, 理论计算加上计算机模型显示系统, 已经可以把蛋白质分子在执行功能过程中的运动变化象放电影一样连续显示在电视屏幕上, 尽管这种分子的运动离真实情况还有一段距离。现在已经可以说, 大分子在执行其生物功能时, 整体分子是处于主动的不断运动之中, 这种运动在 10^{-12} 秒到 1 秒以上的一个很宽的时间范围内都有反映。所以, 只用柔性已不能完全说明这种主动运动性及其动力学性质了。因此, 当我们现在说‘蛋白质结构’时, 决不意味着这个结构只是一个具有一定三维坐标的静态原子排布, 而是包含了各原子在其平均位置上的不断振动, 以及局部或整体分子的不断运动。同时, 也可以肯定的说, 大分子的构象运动性对其功能的执行是本质性的, 虽然现在离定量描述它们之间

- 1981.
- [4] Carlin, R. K. et al.: *J. Cell Biol.* 89, 449, 1981.
- [5] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.* 98, 503, 1975.
- [6] Breathnach, R. et al.: *Nature*, 270, 314, 1977.
- [7] Alwine, J. C. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5350, 1977.
- [8] Towbin, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 100, 264, 1979.
- [9] Reinhart, M. P. et al.: *ibid.* 123, 229, 1982.
- [10] Gershoni, J. M. et al.: *ibid.* 131, 1, 1983.
- [11] Bittner, M. et al.: *ibid.*, 102, 459, 1980.
- [12] Nielsen, P. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257, 12316, 1982.
- [13] Gershoni, J. M. et al.: *J. Cell Biol.*, 95, 422a, 1982.
- [14] Peforoen, M. et al.: *FEBS Letters*, 145, 369, 1982.
- [15] Stellwang, E. J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 8, 299, 1980.
- [16] Renart, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3116, 1979.
- [17] Clarke, L. et al.: *Methods in Enzymology*, 68, 436, 1979.
- [18] Taylor, G. R.: *Anal. Biochem.*, 148, 524, 1985.
- [19] Howe, J. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 12836, 1981.
- [20] Gibson, W.: *Anal. Biochem.*, 118, 1, 1981.
- [21] Erickson, P. F. et al.: *J. Immunol. Methods*, 51, 241, 1982.
- [22] Legocchi, R. P. et al.: *Anal. Biochem.*, 111, 385, 1981.
- [23] Denhardt, D. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 641, 1966.
- [24] Fisher, P. A. et al.: *J. Cell Biol.*, 92, 674, 1982.
- [25] Bartles, J. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 140, 284, 1984.
- [26] Hayman, E. G. et al.: *J. Cell Biol.*, 95, 20, 1982.
- [27] Gregory, A. et al.: *Anal. Biochem.* 148, 288, 1985.

[本文于 1985 年 12 月 30 日收到]