

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

10^{-5} — 6.3×10^{-3} mol/L 浓度范围 BSA 的 η_r - C 依赖性曲线呈指数关系的报导一致^[8]. 从图 1 还可见, η_r 的数值大小及随 BSA 浓度增加而增大的速率皆与盐的种类有关, 规律是按 KSCN, NaCl, KI 的次序递减, 也即在 KSCN 盐中 η_r 值最大. 随浓度变化的速率也相对最快, 然后依次减小. 图 2 是比浓粘度 (η_{sp}/C , $\eta_{sp} = \eta_r - 1$) 对浓度作图, 由 η_{sp}/C 对 C 作图外推至零浓度而得到特性粘数 $[\eta]$, 在上述三种盐中该值依次是 257.1, 246.7 和 194.5 与图 1 中的数值大小顺序相同

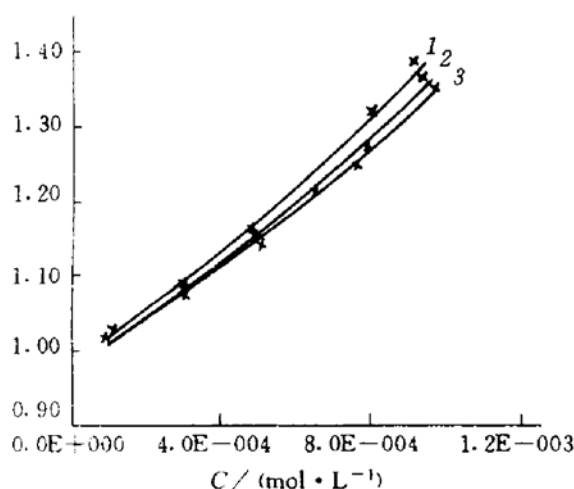


图 1 BSA 相对粘度 η_r 对 BSA 浓度作图 (25°C)
1: KSCN; 2: NaCl; 3: KI

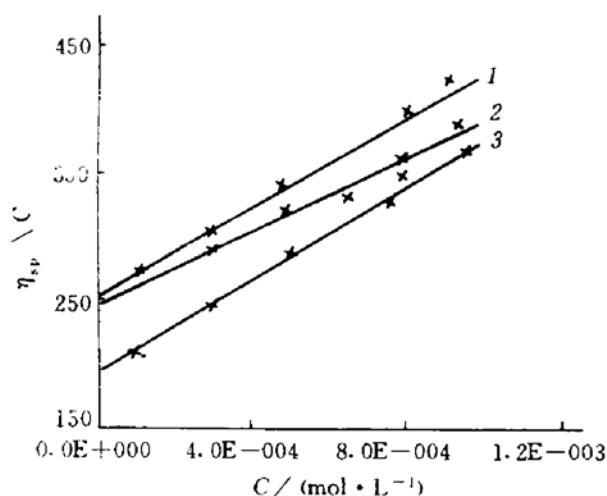


图 2 在三种盐溶液中 BSA 比浓粘度 η_{sp}/C 对 BSA 浓度作图

25°C, 离子强度 0.1 mol/L, 等离子点时
1: KSCN; 2: NaCl; 3: KI

图 1, 图 2 的实验结果表明盐的种类对 BSA 水溶液的流体力学行为有着不可忽视的影响. 文献报导^[1], 在等电点处, BSA 分子为紧密椭圆形; 在含盐溶液中, 蛋白质分子表面携带相对较多的电荷, 与围绕蛋白质分子的离子氛产生静电相互作用, 即所谓“电粘效应”, 将导致 $[\eta]$ 增大. Edsall^[7,9] 又曾计算了 BSA 携带的阴离子数目, 在离子强度为 0.183 mol/L 时, 在 NaCl, NaSCN 中 Cl^- , SCN^- 的数目分别为 10.1 及 24; 在 0.1 mol/L KSCN 中达 99.0. 这些数据表明在 0.1 mol/L 盐中 BSA 表面 SCN^- 数目远高于 Cl^- 数目^[7,9], 前者的“电粘效应”也就大于后者, 因此就导致了粘度的差异. 但 BSA 携带的 I^- 数目并不是很低而其 η_r 却最低, 特别是 $[\eta]$ 也显著的低, 这可能与 I^- 在 BSA 表面的分布或 I^- 诱导下某些键重排引起分子构象收缩有关^[5].

图 3 是 $[\eta]$ 与温度的关系. 图中曲线表明在三种盐溶液中 $[\eta]$ 都有较复杂的温度依赖性,

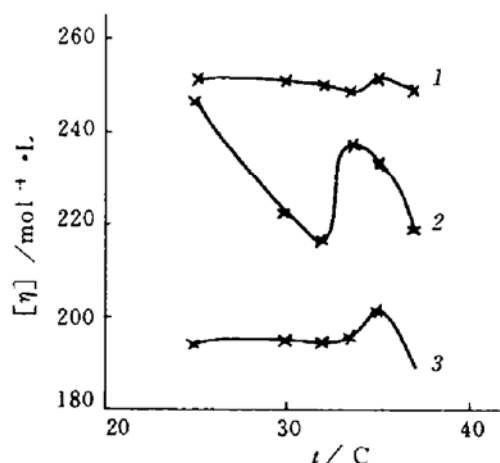


图 3 在三种盐溶液中 BSA 特性粘数 $[\eta]$ 对温度作图

离子强度 0.1 mol/L

1: KSCN; 2: NaCl; 3: KI

而且其中以在 NaCl 中最为明显. 这与天然球形蛋白 $[\eta]$ 对温度、溶剂无明显依赖性的情况不同, 而与无规线团构象的蛋白质通常 $[\eta]$ 对温度、溶剂性质有依赖性的规律相符^[10], 并与无规线团构象的变性卵蛋白的 $[\eta]$ 的温度依赖

性曲线相似. 他们认为是因变性卵蛋白的分子链的键旋转受温度影响, 构象和尺寸改变就导致了 $[\eta]$ 的变化. 类似地, BSA 中也可能是因盐的存在导致构象、尺寸变化的温度依赖, 从而产生 $[\eta]$ 的温度敏感性, 但因 BSA 分子中存在大量二硫键, 要限制构象过大的变化, 因而 $[\eta]$ 的变化范围在本实验条件下还是比较窄的 (218—246L/mol). 而 NaCl 溶液中 BSA 仅与 Cl^- 结合且数目较少, 接近无盐体系, 故而对温度改变的反应相对最为敏锐^[1], 因此 $[\eta]$ 随温度改变涨落幅度最大.

图 4 是 η_{sp}/C 对 pH 值作图, 这些曲线的特点一是与文献中报导的 pH 对蛋白质 η_r 影响的

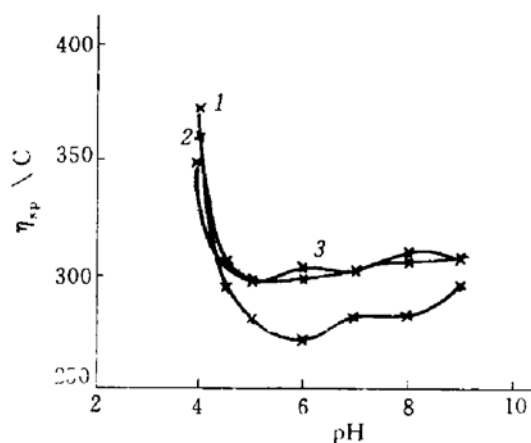


图 4 BSA 在 NaCl, KSCN 和 KI 溶液中的比
液粘度 η_{sp}/C 对 pH 作图

离子强度 0.1mol/L, 温度 30℃, 浓度 3.0×10^{-4} mol/L 1: KSCN; 2: NaCl; 3: KI

规律一致^[4], 是因 pH4—6 是 F→N 过渡区^[12], 因而 η_{sp}/C 变化明显, 随后趋于平稳; 另一是在不同盐中也有区别, 如在 KSCN 和 KI 中受 pH 影响明显较弱, 而在 NaCl 中影响相对较大, 这估计也与接近无盐体系的特征相符.

综上所述, 由于在不同盐溶液中 BSA 的“电粘效应”、构象对温度的敏感性及 F→N 过渡性能的差异, 而表现出较为明显的流体力学行为对盐种类的依赖关系.

2.2 BSA 在不同盐溶液中的分子轴比和分子体积

为了更清楚定量地表明盐对 BSA 分子构象的改变, 本文借 Monkos^[8]等关于 η_r , 轴比 P 和浓度 C 的下列经验式定量地计算了不同盐种类, 不同浓度 C 下的 P 值:

$$\eta_r = \exp[(\alpha + \gamma P^2)C + \beta C^{3/2} + \delta P^2 C^2] \dots (1)$$

其中 α , β , γ 和 δ 是拟合参数, 根据 polson 的经验式得到分子体积 V :

$$\eta_r = 1 + (4 + 0.098P^2)N_A V_C / M$$

$$= 1 + (4 + 0.098P^2)N_A V m' \dots \dots \dots (2)$$

其中 N_A , m' 和 M 分别为阿佛加德罗常数、摩尔浓度和分子量. 如果已知 η_r 和 C , 则由式 (1), (2) 可计算 P 和 V , 分别对应于特定条件下的轴比和体积称为表观分子轴比和表观分子体积, 可定量表征 BSA 的构象变化. 表 1 是我们计算的结果, 它们表明随 BSA 浓度增加, 分子间作用增强, 静电排斥加大, 结果 P , V 分别呈下降及上升趋势, 而且又以 NaCl 中表现最为明显, 但在相同 BSA 浓度处, 在 KSCN 和 KI 存在下, 它们的 P , V 值又分别高于和低于相应于 NaCl 中的 P , V 值, 这一方面可能是受电荷数目的影响, 另一方面可能是因为电荷分布不均衡, 在 SCN^- 中电荷可能相对集中分布于长轴的两个侧面, 而 I^- 则相对集中分布于长轴的两个端面, 但这种解释尚需进一步得到实验的证实. 不过无论如何从盐种类对 P , V 的影响已足以旁证盐种类确实明显地影响着 BSA 的流体力学行为.

表 1 在不同浓度的 NaCl, KSCN, KI 三种盐溶液中 BSA 的 P , V 值

NaCl			KSCN			KI		
$m/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	P	$V/\text{\AA}^3$	$m/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	P	$V/\text{\AA}^3$	$m/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	P	$V/\text{\AA}^3$
2.99×10^4	4.84	76418	2.99×10^4	5.00	77756	3.02×10^4	4.24	71464
4.87×10^4	4.69	86550	4.80×10^4	4.95	88576	5.07×10^4	4.20	83127
6.52×10^4	4.37	93260	8.06×10^4	4.72	106874	7.63×10^4	4.07	96527
7.93×10^4	4.24	100342	9.13×10^4	4.69	114009	9.69×10^4	4.04	108540
9.41×10^4	4.32	110472						

参 考 文 献

- 1 Tanford C, Buzzell J G. J Phys Chem, 1956; **60**: 225
- 2 Weissman M B, Pan R C, Ware B R. J Chem Phys, 1979; **70** (06): 2897
- 3 Arora J P S, Balyan Km K L. Tenside Surf Det, 1992; **29** (1): 48
- 4 Sun S F. Arch Biochem Biophys, 1969; **129**: 411
- 5 Sun S F, Del Rosario N O. Chemical Communications, 1971; 669
- 6 Van Holde K E, Sun S F. J Am Chem Soc, 1962; **84**: 62
- 7 Del Rosario N O, Sun S F. Can J Chem, 1973; **51**: 3781
- 8 Monkos K, Turczynski B. Int J Biol Macromol, 1991; **13**: 341
- 9 Edsall J T. J Am Chem Soc, 1950; **72**: 4641
- 10 Ahmad F, Salahudin A. Biochemistry, 1974; **13** (2): 245
- 11 Iqbal M, Verrall R E. J Phys Chem, 1987; **91**: 1935
- 12 Jr Zurawski V R, Foster J F. Biochemistry, 1974; **13**: 3465

~~~~~

(上接第 456 页)

将其和大豆磷脂重建形成脂酶体, 相似于在体外建立了一种 $G_s$ 缺陷的人工膜的测试体系, 且在一定量 $G_s$ 范围内, 重建的 AC 脂酶体在含 AMF 的反应体系中, 其所催化 cAMP 的生成量与 $G_s$ 加入量成直线关系 (图 5). 由此可知, 用这种重建脂酶体的方法检测 $G_s$ 的活力简便、快速、灵敏而且准确, 是一种可行的方法.

$G_s$  的分离、纯化及其与效应器的体外重建实验是研究信号跨膜传递机理的重要方法之一. 我们改进的纯化和鉴定 $G_s$ 的方法将为进一步探讨 $G_s$ 的结构和功能提供有用的实验手段.

## 参 考 文 献

- 1 Higashijima T, Graziano M P, Suga H *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 3396
- 2 Sternweis P C, Pang I H. Meth Enzymol, 1991; **195**: 1
- 3 Sternweis P C, Robishaw J D. J Biol Chem, 1984; **259**: 13806
- 4 Shaltiel S. Meth Enzymol, 1974; **34**: 126
- 5 屠亚平, 杨福愉. 中国科学 (B 辑), 1991; (6): 621
- 6 Cerione R A, Sibley D R, Codina J *et al.* J Biol Chem, 1984; **259**: 9979
- 7 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951; **193**: 265
- 8 Laemmli U K. Nature, 1970; **227**: 680
- 9 Sternweis P C, Northup J K, Smigel M D *et al.* J Biol Chem, 1981; **256**: 11517

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- $\pi$  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)  $\pi$  class isoenzyme is associated with both tumor and preneoplastic tissues. In order to further characterize the alteration of GST- $\pi$  gene expression during progression of carcinoma, both the levels of GST- $\pi$  DNA in one normal gastric tissue and 20 gastric tumor with perineoplastic normal tissue, and the GST- $\pi$  RNA in the normal gastric tissue and 12 gastric poorly differentiated adenocarcinomas with corresponding perineoplastic normal tissues were tested using Dig-GST- $\pi$  cDNA probe by Dot blot hybridization. No significant change of GST- $\pi$  DNA level, but the expression level of GST- $\pi$  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- $\pi$  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