

36: 1237

- 8 Palmiter R D, Norstidt G. Science, 1983; 22: 809
- 9 Dyer K R, Messing A. Am J Pathol, 1989; 135: 401
- 10 Bailleul B, Surani M A, White S *et al.* Cell, 1990; 62: 697
- 11 Jahner D, Haase K, Mulligan R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 6927
- 12 Schwartzberg P L, Goff S P, Robertson E J. Science, 1989; 246: 799
- 13 Andreason G L, Evans G A. Biotechnology, 1988; 6: 650
- 14 Lin C S, Magnuson T, Samols D. DNA, 1989; 8: 297
- 15 David G K, Orkin S A. Biotechnology, 1990; 8: 32

Production of Transgenic Mice from Eggs Microinjected With MT - BNLF 1 Fusion Gene .

Xiao Zhiqiang, Yao Kaitai (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*); Liu Wei, Lu Guangxiu (*Reproductive Engineering Laboratory, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract In order to study the oncogenic ef-

fects of EB virus latent membrane protein, the putative oncogene product encoded by EB virus BNLF1 gene. The MT-BNLF1 gene containing the promoter of the mouse metallothionein-1 gene fused the structural gene of EBV BNLF1 gene was constructed. This gene was microinjected into the pronuclei of fertilized mouse eggs to build up a transgenic mouse line. The results were as follow (1). The zygote's survival rate and birth rate were 73% and 13%, respectively. (2) After analysing the mice that developed from the microinjected eggs by southern hybridization and PCR, 8% mice carry MT-BNLF1 fusion gene. This approach was a preliminary attempt to study the onset mechanism of the nasopharyngeal carcinoma.

Key words transgenic mice, metallothionein-1, BNLF1, epstein-barr virus, nasopharyngeal carcinoma

红细胞内翻外囊泡带3蛋白活性测试方法的研究*

冯 昶 关志英 屠亚平

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 从人血中提取红细胞膜, 用注射器加压推打的方法首次获得了包含 80mmol/L 吡啶二羧酸(DPA)的封闭完好的内翻外囊泡(IOVs)。离心除去囊泡外DPA, 即可按Newton法测其阴离子转运活性。此法在红细胞膜内翻外囊泡体系上成功地建立了带3蛋白(Band 3)测活方法, 具有简便迅速, 重复性好等优点。

关键词 红细胞膜, 带3蛋白, 内翻外囊泡

带3蛋白(Band 3)是人红细胞膜上的主要蛋白, 占膜蛋白总量的25%左右, 具有阴离子转运的功能。它在体内中介红细胞膜内外 HCO_3^- 与 Cl^- 的交换, 而使红细胞完成将毛细

血管处的高浓度二氧化碳运送至肺泡的功能。它也是目前被研究得最广泛的蛋白之一^[1,2]。

*国家自然科学基金及中国科学院资助项目。

收稿日期: 1994-04-06, 修回日期: 1994-09-14

建立带 3 蛋白合适、简便的测活体系,对深入研究带 3 蛋白的功能,以及它与红细胞膜上膜脂、膜蛋白的相互作用都是很重要的。

最早的带 3 蛋白测活方法是用放射性同位素作运转底物的方法^[3],但此法需将细胞与转运介质分离,操作费时,且重复性差。因而很难用于动力学过程的研究。近来,一些运用荧光技术的方法使得对带 3 蛋白阴离子转运过程的连续追踪成为可能。这些方法包括 NBD-*taurine* 法^[4,5]和 DPA-Tb³⁺ 荧光法 (Newton 法)^[6]。Newton 法是将吡啶二羧酸(DPA)包入红细胞或封闭血影膜 (resealed ghosts) 内,然后在含 Tb³⁺ 的转运缓冲体系中检测 Tb³⁺-DPA³⁻ 复合物荧光强度。当 DPA 阴离子由 Band 3 转运出来时,它与 Tb³⁺ 结合使 Tb 荧光增强 10 000 倍以上。此法反应迅速,灵敏度高,很适合动力学的研究,目前已广泛用于各种对 Band 3 的研究中。

Newton 的报道中,举出了此法用于完整红细胞和封闭血影膜的实例,但未提及对内翻外囊泡 (IOVs) 的试验。而在研究红细胞膜骨架蛋白的结构与功能,以及它与膜脂、膜蛋白的相互作用研究中,内翻外囊泡是一种相当重要的模型。我们在做内翻外囊泡上 Band 3 的转运时,发现 Newton 体系并不适合该模型。本文在 Newton 法的原理上对其缓冲体系及 IOVs 的制备作了改进,获得了包含 80mmol/L DPA 的 IOVs,并成功地在 IOVs 上建立了 Band 3 的测活体系。本方法具有简便迅速,重复性好等优点,它的建立使得对红细胞膜内侧面膜脂、膜蛋白及细胞膜骨架的研究更为直接和方便。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 人血红细胞来自北京市中心血站。

1.1.2 试剂 4, 4', -二异硫氰基-2, 2' 二苊磺酸 (DIDS), N' -三 [羟甲基] 甲基-2-氨基乙磺酸 (Tes), 吡啶二羧酸 (DPA) 为 Sigma 产品。三氯化铽 (TbCl₃) 为 Aldrich 产品。十二烷

基硫酸钠 (SDS) 为 ICN 公司产品。苯甲基氟硫酸 (PMSF) 购自 Merck 公司。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人血红细胞膜 (ghost) 的提取 按 Dodge 方法^[7]。人血红细胞用生理盐水 (0.9% NaCl 溶液) 洗涤, 4000g 离心 5min, 吸去血浆及红细胞表层的脂肪粒, 白细胞及血小板等, 然后用生理盐水重复洗两次。1 : 40 快速混合红细胞和 5P8 溶液 (5mmol/L NaH₂PO₄, pH7.4) 进行低渗破膜。加入 PMSF (20mg/L) 抑制蛋白水解酶活力。22 000g 离心 10min 沉降血影膜。重复三次, 得到乳白色膜。

1.2.2 红细胞膜内翻外囊泡的制备 按 Steck 方法^[8]。1 : 40 将膜溶于 0.5P8 溶液 (0.5mmol/L Na₂HPO₄, pH8.0), 冰浴 0.5—1h。28 000g 离心 30min 沉降得到内翻外囊泡 (IOVs)。

1.2.3 制备含 80mmol/L DPA 的内翻外囊泡

将上述制得的 IOVs 溶于 80mmol/L DPA 溶液 (用 0.5P8 配制, pH7.0) 中, 用注射器压推打 3—5 次, 即制得内含 80mmol/L DPA 的内翻外囊泡, 并具有离子不通透性。

1.2.4 带 3 蛋白活力测定 将含 80mmol/L DPA 的 IOVs 取 200μl 每 eppendorf 管 (约 400μg 膜蛋白) 100 000g 离心 25min, 除去含 DPA 的上清液, 用 4℃ 的转运缓冲液 (10mmol/L 柠檬酸 (citrate), 120mmol/L NaCl, 5mmol/L N-三 [羟甲基] 甲基-2-氨基乙磺酸 (Tes), 2mmol/L 组氨酸 (His), pH7.0) 洗两次, 用 200μl 4℃ 的转运缓冲液将沉淀冲匀。取 20μl 膜液加入到 2ml 含 20μmol/L Tb³⁺ 的转运缓冲液测活体系中。在日立 F-4010 荧光仪上 278nm 激发, 544nm 发射, 对时间扫描检测发射荧光强度变化, 温度 37℃。间隔 10s 记录读数。读数 2—3min 后加入 20μl 10% SDS 溶液破膜并读取荧光最大值。

1.2.5 数据处理 将读数输入计算机内专用程序, 由程序自动对照 Tb³⁺-DPA 荧光标准曲线将荧光值转换成 DPA 的浓度值, 并算出表

观转运常数 K . 表观转运常数 K 的计算, 按公式 (1) 进行^[9]:

$$\ln[(C_{\max}-C_t)/(C_{\max}-C_0)] = -Kt, \quad \dots (1)$$

其中 $C_{\max}$, C_t , C_0 分别为与最大荧光强度值 $F_{\max}$, t 时间荧光强度值 F_t 和初始荧光强度值 F_0 . 相对应的 DPA 浓度, t 为转运时间, K 为表观转运常数.

用 $\ln[(C_{\max}-C_t)/(C_{\max}-C_0)]$ 对 t 作图, 线性回归, 直线斜率即为表观转运常数 K . 现按公式 (2)

$$\tau = 6.02 \times 10^{23} \times KC_s V_i / q, \quad \dots (2)$$

即可算出 Band 3 每分钟转运的阴离子个数 τ ^[9]. 其中 K 为表观转运常数, C_s 为转运底物浓度, 在此为内包 DPA 的浓度, V_i 为封闭囊泡的体积, 由电镜测得囊泡直径后计算而得, q 为囊泡上蛋白/脂摩尔比.

1.2.6 蛋白浓度测定 按 Lowry 法^[10]测定.

1.2.7 SDS-PAGE 检测 IOVs 成分 按 Fairbanks 系统^[11]检测. 5%胶, 考马斯亮蓝染色.

1.2.8 红细胞膜标记酶测定 分别检测定位于膜内侧面的酶 NADH-细胞色素 c 氧化还原酶^[12] 及定位于膜外侧面的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase)^[13] 的活性.

2 实验结果

2.1 标记酶实验证实红细胞膜内翻外囊泡的获得

红细胞膜的方向性可用检测一些膜上的标记酶来鉴定. NADH-细胞色素 c 氧化还原酶是位于红细胞膜内侧面的酶, 在血影膜或内翻外囊泡上可测得其活力, 而在封闭血影膜 (resealed ghosts) 上, 由于无法接触到底物而不表

现其活力. 分别在血影膜和本实验得到的封闭内翻外囊泡上测定此标记酶活力, 结果见表 1.

表 1 数据表明, 在加或不加去污剂皂角甙 (saponin) 的情况下, 血影膜和 IOVs 上该酶活力没有明显变化. 血影膜上酶活性的轻微变化可能是由膜对细胞色素受体的部分不通透性造成. 另外, 去污剂 saponin 能引起该酶的轻微失活 (见表 1 IOVs 一栏). 文献报道, IOVs 只有在低离子强度条件下才能获得^[7]. 而本方法关键的一步就是将低离子强度条件下获得的 IOVs 置于 80mmol/L DPA 溶液中并用注射器推打. 本结果排除了最后获得的封闭囊泡为封闭血影膜 (resealed ghosts) 的可能性.

检测另一个位于膜外侧面的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase), 实验结果见表 2.

表 2 IOVs 上乙酰胆碱酯酶活性

样 品	血影膜	内翻外囊泡
不加 Triton X-100 ¹⁾	2.8	0.46
加 Triton X-100 ¹⁾	3.02	3.82
通透率/% ²⁾	93	12

1) 用每毫克蛋白每分钟催化的产物的毫摩尔数表示.

2) (不加去污剂时的值/加去污剂时的值) $\times 100$.

在 IOVs 上, 该酶的活性位点位于囊泡内侧, 无法接触到底物. 而加去污剂破膜后, 该酶即可接触底物并表现催化活性. 所以不加去污剂时的酶活力比加去污剂时小得多. 表 2 数据显示, 前者只占后者的 12% (IOVs 上不加去污剂时的部分酶活性表现是由于未封闭的膜碎片造成的), 而在血影膜上, 两者基本接近. 本结果证实了红细胞膜内翻外囊泡的获得.

2.2 IOVs 的蛋白组成

SDS-PAGE 的电泳图谱可以看出 IOVs 的蛋白组成 (图 1).

图 1 表明 IOVs 上膜骨架蛋白主要组分——血影收缩蛋白 (spectrin) 的含量有明显减少. 而 Band 3 含量基本上没有变化.

2.3 IOVs 上 Band 3 阴离子转运活力的测定

典型的测活曲线如图 2 所示. 实线表示

表 1 IOVs 上 NADH-细胞色素 c 氧化还原酶活性

样 品	血影膜	内翻外囊泡
不加皂角甙 ¹⁾	0.020	0.033
加皂角甙 ¹⁾	0.024	0.024
通透率/% ²⁾	83	137

1) 用每毫克蛋白每分钟催化的产物的毫摩尔数表示.

2) (不加去污剂时的值/加去污剂时的值) $\times 100$.

IOVs 上 Band 3 对阴离子 DPA 的转运活力, 虚线为 IOVs 与 Band 3 专一性抑制剂 DIDS 作用后的转运曲线. 将每隔 10s 收集的读数输入计算机, 计算出转运常数 K 值, 并根据公式 $\tau = 6.02 \times 10^{23} \times KC_s V_i / q$ 求得转运速率 τ . 结果如表 3 所示. 其中, DPA 浓度为 80mmol/L, 内翻外囊泡体积取 $50\mu\text{m}^3$, 蛋白/脂比例约为 1. 表 3 结果表明, 制备的 IOVs 具有 DPA 阴离子转运曲线而且 2mmol/L DIDS 能抑制 Band 3 90% 以上活力.

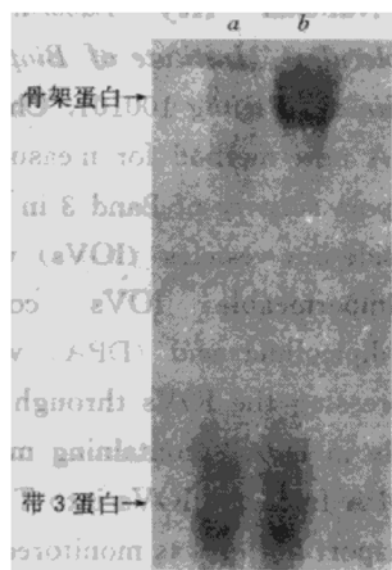


图 1 人血红细胞血影膜及内翻外囊泡的 SDS-PAGE 电泳图谱

a: 内翻外囊泡 (IOVs); b: 血影膜 (ghosts).

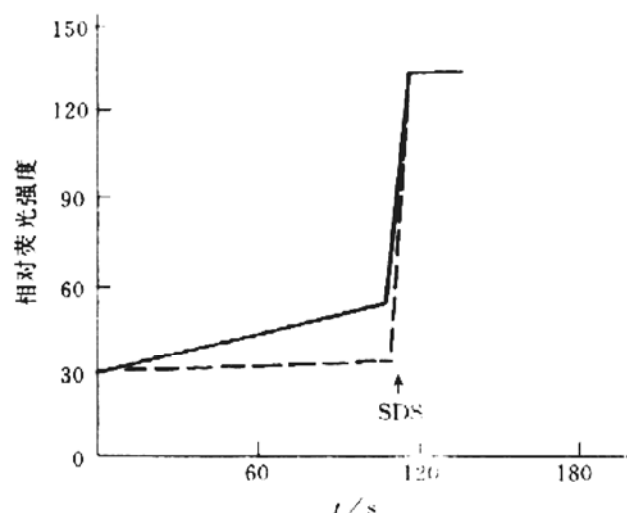


图 2 IOVs 上 Band 3 阴离子转运曲线

——: 对照 - - - -: 加 DIDS.

表 3 IOVs 上 Band 3 阴离子转运活性

样 品	转运常数 K/min^{-1}	转运速率 τ/min^{-1}
IOVs	0.131	315
IOVs+DIDS	0.010	24

3 讨 论

本方法采用 Newton 法的原理, 即用检测转运出来的 DPA 与 Tb^{3+} 结合产生的荧光强度的变化来检测 Band 3 的活性. 但是, Newton^[6] 仅给出此法在完整红细胞膜和封闭血影膜上的应用. 它的一般方法是将完整红细胞膜或制得的封闭血影膜与含 70mmol/L DPA 的转运缓冲液 (NaCl/Pi 缓冲液或者柠檬酸缓冲液) 37°C 保温 1h 或 4°C 过夜, 使内外 DPA 达到平衡, 然后除去外部 DPA 后于转运缓冲液中测活. 但他并未提及此法是否适合于 IOVs 上阴离子转运活性的测定. 内翻外囊泡技术是研究红细胞膜内侧膜脂和膜蛋白结构与功能的有力工具, 也是研究膜骨架和膜脂膜蛋白相互作用的重要模型. 我们在应用此方法测定 IOVs 上 Band 3 活性时发现它有几个缺陷, 其一是 Newton 法采用的 NaCl/Pi 缓冲液体系中, 细胞 (或囊泡) 外 Tb^{3+} 和 PO_4^{3-} 结合, 当 DPA 转运出来时, 与 PO_4^{3-} 竞争夺取 Tb^{3+} , 这个过程相对于动力学研究过于缓慢, 甚至在几分钟范围内, 直接将 DPA 加入到含 Tb^{3+} 的 NaCl/Pi 缓冲液中, 荧光值也有类似于转运曲线的增长 (图未给出). 因而数据的重复性差, 基本上只能给出定性的结果. 其二, 红细胞膜内翻外囊泡的制备要求在极低的离子强度和无二价金属离子的条件下. 而将按 Steck 法制得的 IOVs 溶于柠檬酸缓冲液 (150mmol/L citrate, 2mmol/L Tes, 2mmol/L His, pH 7.4) 中 37°C 保温 1h 或 4°C 过夜后测活, 发现囊泡破裂, 表现为加 SDS 后荧光值无增长, 原因是 IOVs 在如此高离子强度条件下难以维持完整. 本实验方法改用在 Steck 法制得 IOVs 时, 先加入 80mmol/L DPA, 再用注射器加压推打, 在压力下, 形成对离子不通透的内翻外囊

泡,并在封闭过程中包入 80mmol/L DPA,然后即可离心测活.此法制得的 IOVs 成功地包入了高浓度的 DPA,并可用于冰浴下存放一周时间,于 pH6.0—8.5 下稳定. Band 3 活性测量的结果表明此体系数据重复性好,能给出定量的结果.本方法的建立,使得对 Band 3 暴露于胞内的 C 端和 N 端结构与功能的研究更为直接,同时也可以 Band 3 的活性为指标研究各种因素对红细胞膜脂状态和膜蛋白功能的影响.

参 考 文 献

- Jennings M L. J Membr Biol, 1984; **80**: 105
- Jay D, Cantley L. Ann Rev Biochem, 1986; **55**: 511
- Eliam E, Stein W D. In: Korn E D ed. Methods in Membrane Biology, New York: Plenum Press, 1974; **5**: 117
- Eidelman O, Cabantchik Z I. Anal Biochem, 1980; **106**: 335
- Darmon A, Eidelman O, Cabantchik Z I. Anal Biochem, 1982; **119**: 313
- Newton A C, Huestis W H. Anal Biochem, 1986; **156**: 56
- Dodge J T, Mitchell C, Hanahan D J. Arch Biochem Biophys, 1963; **100**: 119
- Steck T L, Kant J A. Methods in Enzymology, 1974; **31**: 174
- Lindenthal S, Schubert D. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; **88**: 6540
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951; **193**: 265
- Fairbanks G, Steck T L, Wallach D F H *et al.* Biochemistry, 1971; **10**: 2606
- Zamudio I, Cellino M, Canessa-Fischer M. Arch Biochem Biophys, 1969; **129**: 336
- Bender W W, Garan H, Berg H C. J Mol Biol, 1971; **58**: 783

A New Method for Measuring Anion Transfer Across Membranes of Red Cell Inside-Out Vesicles. Feng Chang, Guan Zhiying, Tu Yaping (National Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China).

Abstract A new method for measuring the anion transport activity of Band 3 in the erythrocyte inside-out vesicles (IOVs) was presented. Impermeable IOVs containing 80mmol/L dipicolinic acid (DPA) were obtained by pressing the IOVs through a No. 9 gauge needle in DPA - containing medium. Efflux of DPA from the IOVs into Tb³⁺-containing transport buffer was monitored fluorometrically. The technique is highly sensitive, reproducible and much convenient as well.

Key words erythrocyte membrane, band 3 protein, inside-out vesicles