

解期维持时间长。

3 讨 论

总 RNA 的提取尽量保持完整不被降解的关键是尽可能防止 RNA 酶起作用, 所有器皿包括试剂均应用 DEPC 水处理, 高压灭菌。

本实验扩增和克隆的片段较短, RNA 有一些降解也是可以经 RT-PCR 扩增出来。扩增这样短片段时, 变性温度略低些, PCR 产物的得率会提高, 例如变性温度可保持 90~92℃。

平端连接效率低, 特别是 PCR 产物在平连时效率更低, 经过三次酚抽提并且在连接时加大外源片段的比例, 有利于重组。

用双链模板直接测序时, 最重要的是将蛋白质去除干净, 少量的 RNA 杂质不影响测序效果。模板量偏少时合成小片段比较少, 模板量偏大时, 合成的大片段偏少, 一般用 2~3 μg 为好。

检测 Mdr1 有多种方法, 只有用分子原位杂交的方法能够检测出单个细胞中 Mdr1 的表达水平, 特别是能检测癌细胞中 Mdr1 的表达水平, 而不是检测全部细胞的平均水平。本文克隆的 Mdr1 特异的探针可用于分子杂交包括原位杂交。

参 考 文 献

- 1 Chen C-J, Chin J-E, Ueda K *et al.* Cell, 1986; 47: 381
- 2 汲言山. 中华流行病学杂志, 1992; (特刊 2 号): 396
- 3 Chomczynski P, Sacchi N. Analytic Biochemistry, 1987; (162): 156

- 4 汲言山, 沈倍奋, 王文香等. 生物化学杂志, 1993; 9 (3): 327
- 5 Sambrook J, Fritsch E-F, Maniatis T 著, 金冬雁等译. 分子克隆, 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 34~35
- 6 艾辉胜, 朱元晓, 赖春宁等. 山西白血病杂志, 1993; 2 (4): 325

Cloning of Mdr1 Gene Probe. Hu Meiru, Ji Yanshan, Shu Cuiling, Chen Lijun, Shen Beifen (*Institute of Basic Medical Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Mdr1 gene contributes to multidrug resistance. Because of the level of Mdr1 gene expression is correlated with the response of chemotherapy, it is a valuable method to measure the expression level of individual patients. The cDNA cloning of the human Mdr1 gene has made it possible to measure levels of Mdr1 RNA with hybridization in human cancer cells. A special part of Mdr1 cDNA was obtained by use of RT-PCR and inserting it into pUC18 vector. The DNA sequencing result is identical with the sequence of Mdr1 cDNA reported. This probe can be used to detect the level of Mdr1 gene expression in clinical specimen. The measurements can be useful in the design of chemotherapeutic protocols for certain tumors.

Key words Mdr1, MDR, gene cloning

大脑皮层神经元膜蛋白构象改变的 ESR 研究*

章 茜¹⁾ 吴本玠 于桂芬 卢景露²⁾

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 采用马来酰亚胺标记完整的大脑皮层细胞, 观察由低氧引起的 ESR 谱线的变化及脑细胞脂质过

*国家“八五”攻关课题一部分 (85-915-03-07). ¹⁾河南医科大学生理教研室。

²⁾北京医科大学天然药物和仿生药物国家重点实验室。 收稿日期: 1994-08-04, 修回日期: 1994-11-20

氧化程度. 低氧引起细胞过氧化物生成增加, 膜蛋白构象改变. 金属硫蛋白 (10^{-5} mol/L) 能明显抑制过氧化反应, 具有一定的抗氧化作用. 并对实验的分子机理进行了简要的讨论.

关键词 大脑皮层, 神经元, 电子自旋共振, 自旋标记, 低氧, 金属硫蛋白

细胞是生物体的基本单位, 在不同的生理和病理状态下, 其形态和结构均会有特征性的变化. 利用电子自旋共振技术 (electron spin resonance techniques, ESR) 可从细胞水平进一步分析膜脂和膜蛋白分子构象的改变及运动状态的改变, 为人们认识自由基脂质过氧化损伤在疾病发生发展中的作用提供实验依据. 由于分离制备方面的困难, 对神经元 ESR 研究, 国内外少有报道, 本研究以大脑皮层神经细胞作为测试材料, 观察电子自旋标记的细胞在低氧状态下 ESR 谱线的变化, 以此表明膜蛋白构象改变与细胞脂质过氧化的关系.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

金属硫蛋白 (metallothioneins, MT), Sigma 产品, $M_r = 6300$, 含镉、锌. 马来酰亚胺, Sigma 产品.

1.2 大脑皮层神经元的分离

取新生 Wistar 大鼠大脑皮层组织, 剪碎, 0.5% 胰蛋白酶消化并制备成细胞悬液. 细胞存活率约 92%. 37°C 、95% 空气 + 5% CO_2 温箱内孵育 1 h.

1.3 实验分组

细胞悬液 5×10^{10} 个/L. 实验分为四组, 各组 $n = 5$. 常氧对照组: 细胞悬液通入 95% 空气 + 5% CO_2 混合气, 37°C 温浴 1 h; 低氧组: 细胞悬液通入 95% N_2 + 5% CO_2 混合气 ($P(\text{O}_2) = (3.325 \pm 0.665) \text{ kPa}$), 37°C 温浴 1 h; MT 保护组: 预先向细胞悬液中加入金属硫蛋白 1×10^{-5} mol/L, 再通入 95% N_2 + 5% CO_2 混合气 1 h; MT 对照组: 预先向细胞悬液中加入金属硫蛋白 1×10^{-5} mol/L, 其它条件同常氧对照组.

1.4 自旋标记

分别取各组细胞悬液 0.5 ml, 加入马来

酰亚胺自旋标记物 2×10^{-3} mol/L, 25 μl 37°C 温浴 3 h.

1.5 ESR 测量

ESR 测试前将细胞用 PBS 洗涤三遍至上清液无信号时, 将细胞吸入石英毛细管. 在 Bruker ESP 300, X 波段顺磁共振仪测定, 室温记录 ESR 波谱. 中心磁场 335 mT, 扫描宽度 10 mT, 微波功率 5 mW. 增益 5×10^4 .

1.6 脂质过氧化物的测定^[1]

根据脂质过氧化物 (lipid peroxide, LPO) 与硫代巴比妥酸的呈色反应测定细胞内 LPO 含量, 结果以 10^6 细胞含有 LPO 的 nmol/L 数表示.

1.7 统计资料的处理

各组间差异比较采用方差分析. 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示.

2 结果和讨论

2.1 脂质过氧化物含量的变化见表 1. 大脑皮

表 1 各组间脂质过氧化物的变化

	nmol/L			
	对照组	缺氧组	MT 保护组	MT 对照组
$c(\text{LPO})^{1)}$	0.246	0.293 ²⁾	0.262 ³⁾	0.267
	± 0.013	± 0.011	± 0.020	± 0.017

¹⁾ 每 10 个细胞中 LPO 浓度, ²⁾ $P < 0.01$ 与对照组相比较,

³⁾ $P < 0.05$ 与缺氧组相比较. $n = 5$. ($\bar{x} \pm s$).

层细胞在低氧状态下, LPO 生成增加, 与常氧对照组相比, $P < 0.01$. 预先给予 MT, 30 min 后再给细胞通以 95% N_2 + 5% CO_2 1 h, LPO 生成受到明显抑制, 与低氧组比较, $P < 0.05$. 结果表明缺氧可引起离体脑细胞脂质过氧化. LPO 升高反映脂质过氧化反应增强. 活性氧损伤细胞的重要机制之一即引起质膜上多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化^[2]. 由于 LPO 具有细

胞毒性, 可导致膜结构和功能改变, 本实验利用 ESR 技术进一步分析了脂质过氧化对膜蛋白构象的影响。

2.2 细胞膜的完整性和运动状态可用自旋标记的膜蛋白巯基描述^[3,4]。自旋标记物能特异性地与膜蛋白巯基结合, 产生弱固定化和强固定化 ESR 谱^[5] (见图 1)。强固定化和弱固定化

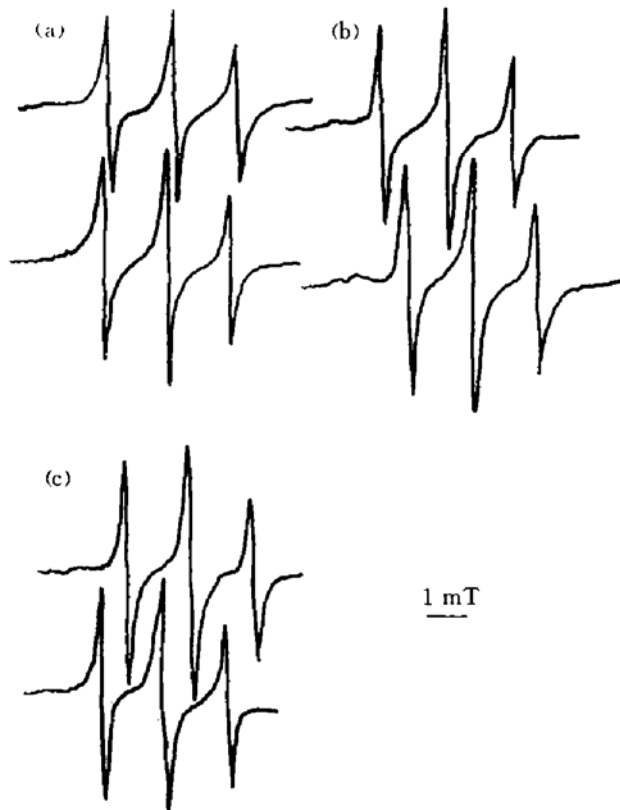


图 1 马来酰亚胺自旋标记大脑皮层细胞 ESR 谱
(a) 对照组, (b) 低氧组, (c) MT+低氧组。

波谱分别反映膜内部结合的自旋标记物和膜表面结合的自旋标记物的运动状态, 实际 ESR 谱 (图 1) 为二者的迭加。旋转相关时间 τ_c 表征膜蛋白巯基构象的变化。 τ_c 的计算^[6]: $\tau_c = 3.14 \times 10^{-10} \Delta H_0 (\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}})$ (单位: s)。计算结果于表 2。低氧组细胞 ESR 谱 h_0/h_{-1} 比值增大, τ_c 延长, 与常氧对照组相比, 分别为 $P < 0.05$, $P < 0.01$; h_0/h_{+1} 在低氧组与常氧对照组之间无明显差异, $P > 0.05$ 。结果表明低氧使蛋白旋转相关时间延长, 经 ESR 谱线分析, τ_c 增大是由于 h_0/h_{-1} 比值的改变, 对于这种变化

的机理并不清楚。LPO 测定表明低氧可引发脂质过氧化。已有研究报道, 缺氧可使脑组织 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATP 酶和 Ca^{2+} -ATPase 的活性显著下降, 游离脂肪酸含量显著增高^[7]。能量代谢异常可导致细胞内 Ca^{2+} 增多, 过多的 Ca^{2+} 可通过激活多种酶干扰细胞内环境的稳态, 例如, 黄嘌呤氧化酶活性增强使活性氧生成增加, 引发脂质过氧化损伤。脂质过氧化的代谢产物可与质膜上的蛋白或其它分子发生共价结合, 从而改变它们的构型、通透性或活性。

表 2 低氧对大脑皮层神经元 ESR 谱参数的影响
($\bar{x} \pm s$)

	对照组	低氧组	MT+ 低氧组	MT 对照组
$\tau_c/10^{-10}\text{s}$	1.0984 ± 0.2701	1.5355 ¹⁾ ± 0.3073	1.1462 ³⁾ ± 0.0774	0.9736 ± 0.2077
h_0/h_{-1}	7.8751 ± 0.0449	8.2738 ²⁾ ± 0.0812	7.9517 ± 0.0212	7.9012 ± 0.0332
h_0/h_{+1}	5.6426 ± 0.0213	5.7632 ± 0.0296	5.7454 ± 0.0287	5.7004 ± 0.0301

¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 分别与对照组比较, ³⁾ $P < 0.05$, 与低氧组比较。 $n=5$ 。

实验 ESR 谱中强固定化信号较弱, 见图 1a, b, c。此现象与其它作者^[8,9]报道不同, 可能与神经细胞与其它体细胞结构和功能差异有关。

2.3 预先向马来酰亚胺自旋标记的大脑皮层细胞悬液中加入 MT, 使其终浓度为 1×10^{-5} mol/L, 再通入 95% $\text{N}_2 + 5\%$ CO_2 混合气。蛋白旋转相关时间趋向对照样品 τ_c 值 (表 2), 与低氧组比较 $P < 0.05$; h_0/h_{-1} 减小。结果表明 MT 对低氧所致的膜蛋白构象改变具有一定的抑制作用, 与其他作者^[8,9]选用其它实验对象所得结果一致。金属硫蛋白是一种富含半胱氨酸和金属离子的低分子量蛋白质, 其抗氧化机制有待进一步研究。

致谢 此项目得到美国-中华医学基金会奖学

金项目的资助, 谨此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 石体仁, 雷淑萍, 刘春梅. 中华老年医学杂志, 1986; 5 (2): 114
- 2 Jain S K, Mohandas N, Clark M R *et al.* Bri J Haematology, 1983; 53: 247
- 3 陈建文, 张兰萍, 宋剑陶等. 生物物理学报, 1992; 8 (3): 582
- 4 Perussi J R, Tinto M H, Nascimento O R *et al.* Anal Biochem, 1988; 173 (2): 289
- 5 Sharom J F, Ross T E. Biochim Biophys Acta, 1986; 854 (2): 287
- 6 程龙生, 唐 祥, 郑建华等. 生物化学与生物物理学报, 1988; 20: 155
- 7 张锦楠, 阎淑莲, 刘永利等. 见: 中国生理学会等编. 生理通讯, 增刊 3. 第一届全国神经科学学术会议, 上海, 1992, 北京: 《生理通讯》编辑部, 1992: 180
- 8 张保林, 卢景雾, 王文清等. 生物物理学报, 1992; 8 (3): 539
- 9 程 时, 谢一琳, 华 钊. 生物物理学报, 1992; 8 (1): 104

ESR Study on Conformation of Membrane Proteins of Cerebral Cortex Neurons. Zhang

Qian, Wu Benjie, Yu Guifen (*Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); Lu Jingfen (*National Laboratory of the Nature and Biomimetic Drugs, Medical University of Beijing, Beijing 100083, China*).

Abstract Maleimide was used as spin label for studying the effect of hypoxia on rat cerebral cortex neurons. Results showed that hypoxia induced the lipid peroxidation in cerebral cortex cells and increased the formation of LPO. By comparing the characteristics of ESR spectra, it was found that values of τ_c were significantly higher in hypoxic group than that in control ($P < 0.01$). The increase in the ratio of h_0/h_{-1} was well correlated with the enhance in hypoxia group. It was also found that MT could inhibit the lipid peroxidation in cerebral cortex cells.

Key words cerebral cortex, neuron, electron spin resonance techniques, spin label, hypoxia, metallothionein

聚乙二醇修饰对酶活性和稳定性的影响

杨 隼

(Center for Biotechnology and Bioengineering, Department of Chemical Engineering,
University of Pittsburgh, Pittsburgh PA 15219, USA.)

摘要 经氰尿酸氯和对硝基苯碳酸酯活化过的甲氧基聚乙二醇分别用来对枯草杆菌蛋白酶进行化学修饰. 修饰后的酶在水溶液和有机溶剂中均保持活性. 酶在水溶液里的 k_{cat} 增加, K_m 不变. 酶对温度和 pH 的稳定性都显著升高, 但最佳反应温度不变.

关键词 枯草杆菌蛋白酶, 聚乙二醇, 酶活性, 酶稳定性

由于聚乙二醇具有与蛋白质相容的特性, 用其对蛋白质进行化学修饰已经成为医学和生物工程领域的热门课题, 得到了广泛的研究和应用^[1]. 例如, 聚乙二醇与蛋白质分子的共价结合可降低蛋白质的免疫性和抗原性, 促进了蛋

白质和酶在临床上的应用^[2]. 聚乙二醇也可用于对酶和似酶催化剂的重新设计. 比如, 可以通过聚乙二醇长链把一个脱氢酶分子与其辅助