

血红蛋白的分子杂交

秦文斌

(内蒙古医学院生化教研组)

血红蛋白的“分子杂交”，实际上就是两种血红蛋白在解离再结合过程中发生亚单位的交换。由于交换亚单位后产生的“新分子”，各有一半来自原来的血红蛋白分子，这与生物界的杂交现象有些类似、与血红蛋白的分子遗传学关系也一致，故简称为血红蛋白“杂交”或“分子杂交”。这种分子杂交技术，将人们从过去对血红蛋白完整分子的了解，引入到对半分子的认识。过去有关这种蛋白质的各种问题，都可从亚单位角度重新研究，从而使我们对血红蛋白的认识又深入了一步。

分子杂交的研究现在已延伸到其他蛋白质、酶类以及核酸分子。在血红蛋白方面，近来又有一种天然分子杂交的概念。它与前述“经典的”分子杂交不同，对于它在理论和实践中的重要性，人们已经有了一些认识，今后可能更有发展前途。

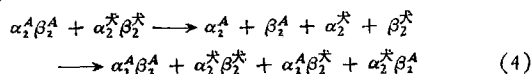
本文中所用“血红蛋白分子杂交”，一般均指前述“经典的”杂交而言，新的分子杂交则专门称做“天然的”分子杂交，以便与前者区别。

一、血红蛋白的分子杂交

Itano 等人在这方面做过一系列工作。他们发现，两种人类血红蛋白可以交换亚单位，不同动物血红蛋白有时也可发生类似过程。人类不同血红蛋白之间交换亚单位后，可以出现两种情况：产生新分子（发生杂交）或不产生新成分（未杂交，或属广义杂交）。它们的分子杂交反应式见（1）、（2）及（3），由这些反应式可以看出，两种血红蛋白具有共同多肽链者，就不出现新分子；亚单位互异者才能产生新成分。这里说的是同种动物血红蛋白的（种内）杂交，不同动物血红蛋白的（种间）杂交则不存在共同链的问题。人血红蛋白与犬血红蛋白的分子杂交反应式见（4），此时只要交换亚

单位，就能够出现新成分（有时称为“杂交分子”）。

判定有无新成分的最常用方法为电泳法。最早用的是自由电泳（移动界面法），后来则多用区带电泳。区带电泳中对杂交分子分辨能力最高的还是淀粉胶电泳。



此外，还可将电泳法与同位素技术结合起来。没有同位素的条件下尚可使用“正铁血红素标记法”。“部分琥珀酰化法”也是一种手段，曾经有人用它来研究蚯蚓血红蛋白。

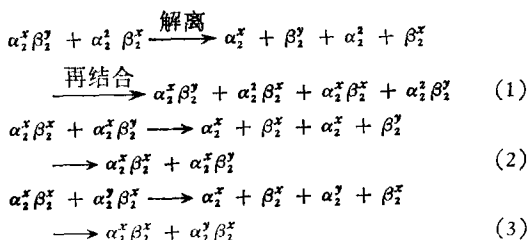
二、血红蛋白分子杂交的应用

1. 血红蛋白的比较和进化

自从 Itano 等人发现人血红蛋白可与犬血红蛋白进行种间分子杂交之后，世界各地陆续又发现不少杂交对：人 Hb-兔 Hb、驴 Hb-小鼠 Hb、象 Hb-小鼠 Hb、蝌蚪 Hb-小鼠 Hb、蛙 Hb-象 Hb、蝌蚪 Hb-象 Hb。1964 年我们发现羊 Hb 可与犬 Hb 或兔 Hb 发生分子杂交，1965 年进一步证明羊 Hb I 和 Hb II 都能与上述血红蛋白进行杂交。血红蛋白的种间杂交，对理解不同动物血红蛋白中亚单位的同源关系具有重大意义。特别是，象大象之类庞大的陆栖动物的血红蛋白，可以和蝌蚪那样两栖类幼小动物的血红蛋白进行分子杂交，说明它们在进化过程中虽相距较远，但其血红蛋白的亚单位在立体结构上仍保留着一定程度的相似之处。

2. 血红蛋白分子中正常亚单位的定同

Jones 等人（1959）曾用 ^{14}C 标记的 Hb A 与未处理的 Hb F 进行分子杂交，结果是：交换了亚单位，但未出现新分子，从而证明二者具有共同的多肽链。Huehns 等人（1961）还利用杂交方法证明 Hb A 的 α 链与 Hb F 的 α 链在抗硷性方面也相同。杂交方法还证明 Hb A₂ 分子中也有一种亚单位与 Hb A 及 Hb-F 者相同（Huehns 等人 1961；Huisman 等人，1961）。1965 年，我们还证明了正常羊血红蛋白 Hb I 与 Hb II 之间具有相同的亚单位：羊 Hb I = $\alpha_2^{\text{H}} \beta_2^{\text{H}}$ ，羊 Hb II = $\alpha_2^{\text{H}} \beta_2^{\text{H}}$ 。



3. 血红蛋白分子中异常多肽链的检出

早期多用人类血红蛋白种内杂交的规律来判定异常链,后来则主要用人 Hb 与犬 Hb 的种间杂交进行此项工作。1972 年,我们于呼和浩特地区检出一种 G 型异常血红蛋白,也用种间杂交方法鉴定其为 α 链异常,故其全称可写成: Hb G α 呼和浩特。1965 年,吴文彦等曾于上海发现两例 M 型异常血红蛋白。当时,他们根据患者出生时的发绀情况,推测此二例都是 α 链异常的变异物。但是,根据 1974 年资料,曾溢滔等利用分子杂交方法证明了二者都是 β 链异常。可见,用出生时发绀情况来推断异常链是比较粗略的,准确地弄清这个问题还需做亚单位的深入分析。同上文章还证明了在上海发现的一种不稳定血红蛋白属于 α 链异常。最近,我们在包头地区又遇到四例慢泳异常血红蛋白和一例快泳血红蛋白变异物,分子杂交结果表明,它们都是 β 链异常的血红蛋白。

4. 比较亚单位的净电荷

在研究哺乳动物血红蛋白的种间杂交时,我们曾注意到某些杂交分子(如人 Hb-犬 Hb、人 Hb-兔 Hb、羊 Hb-犬 Hb 以及羊 Hb-兔 Hb 分子杂交时的阴极侧电泳成分)与人 Hb A₂ 的电泳位置几乎相同。开始时,先根据 $\alpha_1^A\beta_2^F \approx \alpha_1^A\beta_2^{A_2}$ 的电泳关系,推定亚单位间净电荷关系为 $\beta^F \approx \delta^{A_2}$ 。后来,又证明到 $\alpha_2^F\beta_1^F \approx \alpha_2^F\beta_2^F \approx \alpha_1^F\beta_2^F$ 的电泳关系,故进一步推定 $\beta^F \approx \beta^B$ 、 $\alpha^F \approx \alpha^A$ 。分子杂交实验中犬 Hb-兔 Hb 以及人 Hb-羊 Hb 未出现新的电泳成分,我们认为可能与上述亚单位的净电荷相近有关。过去,人们对完整血红蛋白分子的净电荷知道较多,对半分子或亚单位则所知很少,分子杂交在这方面也提供了新的知识。

5. 抗硷性与亚单位关系

人们早就知胎儿血红蛋白的抗硷性很强,但并不了解其与亚单位的关系如何。Huehns 等人(1961)取 Hb A 及 Hb F 分别与犬 Hb 进行杂交,然后分出 $\alpha_1^A\beta_2^F$ 、 $\alpha_2^A\beta_1^F$ 、 $\alpha_1^F\beta_2^A$ 、 $\alpha_2^F\beta_1^A$, 分别测定它们的硷变性速度。所得结果是: $\alpha_1^A\beta_2^F$ 与 $\alpha_1^F\beta_2^A$ 的变性速度相同,而 $\alpha_2^A\beta_1^F$ 与 $\alpha_2^F\beta_1^A$ 则大不一样。前者变性快,似 Hb A, 后者变性慢,似 Hb F。因此,他们认为, Hb F 的抗硷性与其 γ 链有关, α 链在这方面不起主要作用。

6. “结合 ^{51}Cr ”与亚单位关系

放射性铬酸盐用于检查红细胞寿命,早为人所熟悉。近来研究得知,它主要是与血红蛋白相结合,并且很可能是与其分子中的一种多肽链相结合。Pearson 等人首先用分子杂交方法证明 ^{51}Cr 是与 Hb A 的 β 链相结合,但是 Chernoff 却得出相反结论:与 α 链结合。后来,Heisterkamp 等人又进一步证实 ^{51}Cr 是与 Hb A 的 β 链相结合,并认为 Chernoff 的结果可能与实验条件有关。

7. 对-汞苯甲酸的解离作用与亚单位

有人发现,对-汞苯甲酸(pMB)能在中性介质中使人 Hb 解离成亚单位,并将这类方法应用于制备和分析人 Hb 的多肽链。进一步比较研究时,又发现这种办法对兔或小鼠(C₅₇B1) Hb 无效。沉降平衡分析结果表明,用 pMB 处理时,人 Hb 可部分地解离成单位亚单位,而另两种血红蛋白则解离不到这种程度。为了弄清上述情况与 Hb 分子中 α 或 β 链结构的关系, Scheffer 等人(1969)又借助分子杂交来分析这一问题。他们首先通过种间杂交制备出 $\alpha_1^A\beta_2^B$ 和 $\alpha_2^B\beta_1^A$, 然后分别用 pMB 处理,观察其解离情况,所得结果是: $\alpha_2^B\beta_1^A$ 与人 Hb ($\alpha_2^A\beta_1^A$) 类似,也能解离到单体程度;而 $\alpha_1^A\beta_2^B$ 则否,它和兔 Hb ($\alpha_2^B\beta_2^B$) 一样,并不能解离到上述水平。他们对小鼠 Hb 也进行了同上实验,结果类似。根据这些结果,他们认为,在 pMB 作用下 Hb A 能够解离成 α 和 β 亚单位,是与其分子中的 β 链结构有关。对于 pMB 来说, β^A 链中两个 -SH 基的存在和位置可能具有重要意义。

8. “Hb 间交换血红素”与亚单位关系

人们早就推测血红素与珠蛋白之间的结合并非十分牢固,在一定条件下二者可能互相脱离。后来, Bunn 等人(1966)进一步证实了这一问题。他们将 Hb A 与 ^{59}Fe 标记的 Hb F 在中性环境下保温(37℃) 16 小时,然后观察其放射性。结果发现,此时有半数左右 ^{59}Fe 转移到 Hb A 分子上去。用 ^{14}C -亮氨酸标记珠蛋白时,放射性并不转移。若用 ^{14}C -甘氨酸同时标记血红素和珠蛋白,则又可看到 ^{14}C 的转移。作者由此断定,在 Hb A 与 Hb F 之间有血红素的交换,但是,这个交换有一前提,即血红素必须是正铁型,氧合或一氧化碳型交换很慢,而氰化正铁型则根本不交换。血红素交换与亚单位有何关系? Bunn 等人(1968)进一步研究了这一问题。他们利用血红蛋白分子杂交方法分别制备出只标记一种亚单位的 Hb A (如 $\alpha_1^A\beta_2$) 和 Hb F (如 $\alpha_1^F\gamma_2$), 然后再做前述实验。结果表明, α 链上的血红素比 β 或 γ 链上者难以解离。再根据反应速度方面的研究,已经计算出它们的解离速度常数为: α 链上的血红素 = 3.5×10^{-5} 秒; β 链上的血红素 = γ 链上的血红素 = 2.9×10^{-4} 秒。

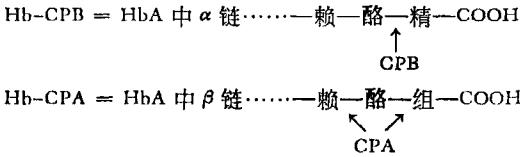
9. 氧平衡与亚单位的关系

Riggs 与 Herner 首先利用分子杂交方法来研究这一关系。鉴于陆栖哺乳动物中动物越小,其血红蛋白与氧结合时释放质子越多,他们选用了驴和鼠的血红蛋白,以便比较。实验结果表明,小鼠 Hb ($\alpha^M\beta^M$) 对氧的亲合力大于驴 Hb ($\alpha^D\beta^D$), $\alpha_1^D\beta_2^M$ 大于 $\alpha^M\beta^D$; $\alpha_1^D\beta_2^M$ 对氧的亲合力与小鼠 Hb 相近, $\alpha_1^M\beta_2^D$ 与驴 Hb 类似。上述作者由此得出结论: β 链控制着血红蛋白的生理功能,它在进化过程中起着特殊作用。1965 年, Antonini 等人又用人 Hb-犬 Hb 分子杂交来研究这一关系。他

们的结果是：杂交分子 $\alpha_1\beta_2$ 的行为与两个“亲代分子”相似，而 $\alpha_1\beta_1$ 则有较多不同之处。作者们强调，来自不同种属的 Hb 链，在基本结构方面有其相似之处。但也指出，不同 Hb 的 α 及 β 链，在相互作用时又有其特异性存在。他们认为，杂交分子的氧平衡结果不易详细解释，但至少表明 Riggs 与 Herner 的前述结论未免有些过于简单化。1967 年，Enoki 等人还利用含半个氰化正铁 Hb 的杂交分子进行了同上问题的研究，所得结论与 Antonini 等人相似。

10. α : β 结合中 C-末端的地位

Antonini 等人在研究羧肽酶 A (CPA) 及羧肽酶 B (CPB) 对 Hb A 的作用时发现，这些酶水解下来一些 C-末端氨基酸之后，就与剩余的巨大 Hb 分子结合起来，形成一种 Hb-CPA 及 Hb-CPB 之类复合物。1965 年，Bucci 等人较详细地研究了这一作用和结合部位，其结果如下(箭头指示酶所水解和结合的地方)：



因为这是在血红蛋白的 C-末端发生了较大的变化，人们很容易想到它对分子结构是否会有影响。为此，上述作者用 Hb-CPA ($\alpha_1^A\beta_2^{\text{CPA}}$) 以及 Hb-CPB ($\alpha_1^A\beta_2^{\text{CPB}}$) 与 HbC, HbS 及犬 Hb 进行了分子杂交。结果发现，虽然 C-末端有了重大改变，亚单位的交换过程仍能进行。所以，他们得出的结论是： α 链与 β 链相结合的部位与 C-末端氨基酸无关。

11. 小结

通过上述一系列研究，我们对不同亚单位在血红蛋白分子中的作用有了一些了解。如果将亚单位分成 α 与非 α 两类，比较它们在物理化学性质及生理功用方面所起的作用，可以将前述研究的主要结论归纳成表 1。由此表不难看出，在血红蛋白分子的物化性质及生理功用方面，非 α (β 或 γ) 亚单位起到更为重要的作用。一般认为，在进化过程中 α 亚单位出现较早，非 α 亚单位出现较晚。现在我们将这一知识与表 1 结果联系起来，可以很自然地推论：在进化过程中血红蛋白分子功能的日趋完善，可能与非 α 亚单位的出现有关。

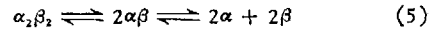
表 1 不同亚单位作用的比较

	α 亚单位	非 α 亚单位	备 注
抗酸性		+	HbF
^{51}Cr 结合能力	?	+	HbA
pMB 解离作用		+	HbA
交换血红素	+	++	HbA, F
氧平衡	+	++	动物 Hb

三、血红蛋白分子杂交的机制

关于血红蛋白可能解离成亚单位，在 Svedberg 的早期工作中就有过推测。利用超速离心法及渗透压法测定分子量技术的进展，进一步弄清了在 pH 5 以下、10.5 以上，高浓度盐类及尿素存在下血红蛋白很容易解离成二聚物。现在的问题是，这个二聚物是什么？是 $\alpha\beta$ (对称解离产物)，还是 $\alpha_2 + \beta_2$ (非对称解离产物)。如前所述，Itano 等人根据血红蛋白分子杂交实验结果，推测此二聚物为 $\alpha_2 + \beta_2$ ，亦即其过程为非对称解离 (至少有一部分是如此)，因为用这种假定很容易解释血红蛋白分子杂交现象。但是，这里也有一些问题，不好说明。第一，血红蛋白分子杂交只有在 pH 4.7 以下及 11.0 以上才能实现，而其解离过程则在 pH 4.7 以上，11.0 以下就已显著进行。第二，杂交过程需时较长，而一般的酸、硷解离则非常迅速。第三，在其他比较温和的解离条件下 (例如在浓盐溶液中去掉血红素后)，则看不到杂交现象。第四，牛血红蛋白，它和其他血红蛋白一样在酸中可以解离，但实验中并不出现杂交分子。

由于这类问题的存在，Vinograd 与 Hutchinson 对血红蛋白分子杂交的机制提出了另一种解释。他们认为，在杂交条件下长时间解离时，血红蛋白分子首先对称地解离成两个相同的半分子 ($\alpha\beta$)。然后再进一步解离成 1/4 分子 (α 及 β)。其过程如式 (5)。最后，两种血



红蛋白的这些 1/4 分子再重新结合而形成杂交分子。这一解释有许多优点，它对前述四个问题基本上都能给以适当说明。首先谈杂交时的解离条件过酸或过硷问题。这一点恰好是二聚物变成单体的有利因素，因此学说很好解释。其次谈杂交时解离时间较长的问题。Vinograd 等人认为，这是与二聚物变成单体过程的速度缓慢有关。再次是，为什么在其他比较温和条件下看不到杂交现象？这一点，需要从 Perutz 的血红蛋白分子模型谈起。在此模型中，异名链之间的接触既广泛，又紧密，参与的残基多数为非极性的，而同名链之间的接触则相差很远 (Perutz 等人，1968；Klotz 等人，1970)。这一事实，首先说明对称解离比较合理，进一步它也给浓盐溶液中不杂交找到理由：因为异名链间接触面上非极性残基很多，浓盐可抑制其解离成单体，故无法杂交。最后谈牛血红蛋白的特殊性，近来 Hanlon 等人 (1971) 专门研究了这个问题。他们利用超速离心法证明，在酸解离条件下牛血红蛋白所产生二聚物 ($\alpha\beta$) 的浓度与一般血红蛋白相同。但是，此时进一步解离而产生 1/4 分子的浓度，则只有 0.02%，作者们认为，牛血红蛋白不能与其他血红蛋白进行杂交的原因，有一部分是由于可供交换的单体太少；另一部分原因，可能是牛血红蛋白亚单位与其他 Hb 没有互

补区,不易形成稳定的杂交分子。

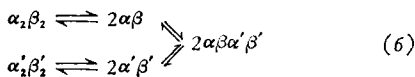
上述资料表明,用进一步解离成 1/4 分子的说法,确能解释过去杂交实验中遇到的一些难以理解的现象。但是,这一理论本身也带来了一些新的问题:若是 1/4 分子进行杂交,岂不要产生像 $\alpha\beta\alpha'\beta'$, $\alpha\beta\alpha'\beta'$ 之类杂交分子?而这些都是过去未能证明过的。对此问题, Vinograd 等人曾企图用特异性来解释。例如,他们假定 $\alpha\beta$ 与 $\alpha'\beta'$ 不结合, β 与 β' 不结合等。后来,又有人想用反应的动力学来说明问题 (Guidotti 1967)。他们认为,式 (5) 的平衡速度可能比任何分离过程都快,分离的结果只能得到原分子。

现在看来,在杂交条件下血红蛋白按 (5) 式解离的可能性是很大的,用 1/4 分子解释若干现象也是有利的。但是,旧的矛盾解决了,新的矛盾又产生出来。为了解决新提出的问题,人们又必须做出一系列假定,而这些假定,到目前为止还不能完全令人信服。

四、天然的“Hb 分子杂交”

前面所谈的分子杂交,都是在解离条件下,特别是在一定的实验介质中,人工造成的分子间亚单位的交换。利用这种方法,人们对 Hb 半分子在各方面的作用进行了较为详细的研究。但是,必须指出,近来又开始出现一种“天然的”血红蛋白分子杂交的概念。这种分子杂交过程可在体内红细胞中进行,其产物与前述杂交不同,它们的意义也互异,下面介绍这方面情况。

前面曾经谈过,在生理条件下,血红蛋白分子是处于 $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ 的平衡状态。那么,若是红细胞中同时含有两种 Hb,是否会出现下述分子杂交?



关于这个问题,也曾有人做过推测。首先, Benesch 等人 (1965, 1966) 曾发现 O_2 -Hb 与正铁 Hb 的当量混合液也有 Darling-Roughton 效应,并根据这一事实提出了“亚单位交换说”。这个假说的主要内容是推测杂交四聚物 $\alpha^+\beta^+\alpha\beta$ (右肩上有 + 号者表示正铁状态) 的存在。他们认为,在血红蛋白氧合过程中有这样半氧化杂交分子的生成。无氧型亚单位 $\alpha\beta$ 受氧化型亚单位 $\alpha^+\beta^+$ 的影响,发生由 R 状态到 O 状态的立体异构性 (allosteric) 转移,从而对 O_2 的亲合力增加。上述作者由这一设想出发,导出一种将二聚物解离平衡考虑在内的反应模型,比较巧妙地解释了氧平衡曲线的 S 型性状。

其次, Perutz 和 Lehmann (1968) 在解释镰状细胞贫血的分子病理学机制时,也使用了这种分子杂交的概念。他们提出,去氧过程可能造成 HbS 结构的改变,使 $\beta\beta$ 在缬氨酸处出现一个“粘稠 (sticking)”区,它可与其本身或其他 Hb 的“互补 (complementary)”区

相反应,而形成一种线状凝集物。但是,在杂合体患者红细胞中,由于同时存在 HbS 和 HbA,它们可经天然分子杂交而形成 $\alpha_2^A\beta^A\beta^S$, 这种杂交分子缺少一个 $\beta\beta$ 缬氨酸,它容易造成线状凝集物中断,故其长度较短。

必须指出,到此时为止,人们还没有真正拿到这种 $\alpha\beta\alpha'\beta'$ 之类天然杂交分子。1969 年,有人发现一种特殊的异常血红蛋白 (Efremov 等人)。这种异常 Hb 是由美国一个黑人家族检查出来的,名称为 Hb Richmond, 结构变异为 $\beta 102 (G4) \text{天-NH}_2 \rightarrow \text{赖}$, 简单表示之粗结构为 $\alpha_2^A\beta_2^R$ 。它的特点是能与各种人类 Hb 形成杂交分子: $\alpha^A\beta^R\alpha^X\beta^X$, 而且很容易用电泳方法检查出来。这是到目前为止在异常血红蛋白唯一发现的这类变异物,它给天然分子杂交提供出有利支持。

1970 年,有人利用这种分子杂交概念来解决 $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ 平衡中 $\alpha\beta$ 的性质问题。大家都知道上述平衡的存在。但是,从立体结构来看,二聚物中的 $\alpha\beta$ 是由四聚物中哪个 α 和 β 结合而成 ($\alpha'\beta'$? 还是 $\alpha'\beta''$?) 的问题尚未解决。X 线衍射法, (Perutz 等人 1968) 以及硫氢基反应法 (Rosemeyer 等人, 1967) 都推测:带配位基的血红蛋白是在其 $\alpha':\beta'$ 接解面“裂开”和“再合拢”。然而,近年 Brich 等人 (1970) 提出,带配合基与不带配合基的血红蛋白,其断裂面可能不一样。为了解决这个问题, Park (1970) 利用天然杂交方法进行了研究。其所得结论是,带配合基与不带配合基的血红蛋白,其解离成二聚物时,都是在同一接触面发生“断裂”。

1972 年, Bunn 进一步 Hb 的天然分子杂交问题。他根据 $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ 过程中氧合 Hb 与去氧 Hb 的解离平衡常数不同,设计出来在无氧条件下分析天然杂交分子的技术。作者所用的方法是,先使两种不同 Hb 的混合物去掉所结合的 O_2 , 然后在无氧环境中用等电聚焦法分析上述混合物。所用的混合物有 HbA + HbS, HbS + HbC, HbS + HbF 以及 HbS + 犬 Hb。实验结果表明,此时确实能证明到 $\alpha_2\beta^A\beta^S$, $\alpha_2\beta^S\beta^C$, $\alpha_2\beta^S\beta^r$ 以及 $\alpha^S\alpha^R\beta^S\beta^R$ 之类天然杂交血红蛋白的存在。如前所述,过去人们曾经推测有 $\alpha_2\beta^A\beta^S$, 现在 Bunn 已经能在体外实验中将其检查出来。

1973 年, Maclead 等人又用另外一种方法证明了 $\alpha_2\beta^A\beta^S$ 的存在。他们使用一种交连剂 P. P'-二氟-m, m'-二硝基二苯砜 (简称 FNPS), 用它来固定 HbA 与 HbS 混合物中的各种四聚物。固定后,用淀粉胶电泳检查,用 Sulfopropyl-Sephadex 柱式层析分离,经胰蛋白酶水解后再进一步分析,以判定所分出成分是否同时含有 β^S 和 β^A 。电泳和层析时都看到三个成分,其中有两个成分分别相当于 HbA 和 HbS。另一个成分,经过一系列分析,证明其为 $\alpha_2\beta^A\beta^S$ 。这样,人们又用固定方法证实了天然杂交分子的存在。

(下转第 40 页)

配制凝胶所用的几种试剂的纯度,对电泳分离效果影响颇大。故两种单体均须重结晶后再用^[1]。缓冲液和染液中如有不溶物存在,皆应先行过滤除去。试液(1)、(2)、(3)、(4)应贮放于低温避光处,但不宜放置过久(不超过二个月)。过硫酸铵则应每周新鲜配制。

3. 缓冲系统的影响

我们曾比较过两种缓冲液系统(0.4 M Tris-0.2 M NaAc-0.02 M Na₂-EDTA, pH 7.8 及 0.89 M Tris-0.89 M 硼酸-0.025 M Na₂-EDTA pH 8.3) 使用前者,得到的色带松散,模糊变宽;用后者,则色带窄细清晰,提高了分辨效果。

4. RNA 样品纯度

RNA 样品中未除尽的杂质(如蛋白质,多糖等)皆可能造成区带模糊,拖尾,底色洗不清,甚至有的带被歪曲等现象。因此,改进样品提取方法,努力提高其纯度是十分重要的。

5. 铺样量

如果铺样量过多或体积过大,都会影响分离效果。我们认为,每个凝胶柱铺样 10—60 微克,体积 5—30 微升为宜。样品纯度高时,铺样量可适当放大,仍能取得好的分离效果。

(上接第 57 页)

五、结 束 语

血红蛋白的分子杂交技术虽然建立不久,但它已广泛地应用于这种蛋白质的许多研究领域,得到不少成果。分子杂交开始于血红蛋白,现在已延伸到其他蛋白质、酶和核酸。不过,我们对血红蛋白分子杂交的认识并没有完结。目前看来,血红蛋白不仅在人工条件下可以杂交,就是在自然的生理条件下也能发生亚单位的交换,它们的过程和关系可归纳成(7)式:

$2\alpha\beta\alpha'\beta'$天然杂交分子

(上接封3)

附表 4 K 组(包括对照组)比较用 t 值表 ($df \rightarrow \infty$)

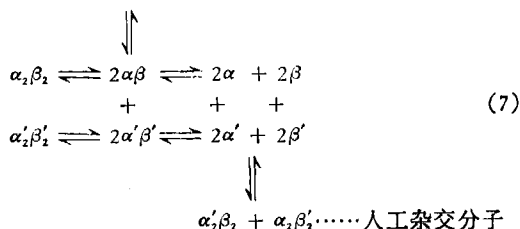
	$t_{0.05}$	$t_{0.01}$
2	1.96	2.58
3	2.21	2.79
4	2.35	2.92
5	2.44	3.00
6	2.51	3.06
7	2.57	3.11
8	2.61	3.15
9	2.65	3.19
10	2.69	3.22

其它,如电泳需在低温环境下进行,串流电压要稳定以及精细的操作等,对于得到好的能重复的结果,也是必要的。

参 考 资 料

- [1] Slater, G.: *Fed. Proc.*, 24, 225, 1965.
- [2] Dale, G. et al.: *Lancet.*, 1, (7547), 847, 1968.
- [3] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, 102, 251, 1967.
- [4] Peacock, A. C. et al.: *Biochem.*, 7, (2), 668, 1968.
- [5] Watcher, R. et al.: *Methods in Enzymol.*, XXI, part D, p. 167.
- [6] Pollard, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 42, 286, 1971.
- [7] Zubay, G.: *J. Mol. Biol.*, 4, 347, 1962.
- [8] Kirby, K.: *Methods in Enzymol.*, XII, Nucleic Acid, part B, p. 87.
- [9] Bishop, D. H. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, 26, 373, 1967.
- [10] Athuton, K. et al.: *Anal. Biochem.*, 57, 403, 1974.

[本文于 1975 年 3 月 15 日收到]



人工分子杂交的机制尚未完全弄清,但是,可以相信,随着分子杂交理论的深入和其应用面的扩大,这一问题会很快得到解决。天然分子杂交是最近才逐步产生的新知识,估计今后它会解决更多理论和实践中的问题。

参 考 资 料

- [1] 中国科学院数学研究所统计组编: 常用数理统计方法, 科学出版社, 1973.
- [2] 中国科学院数学研究所概率统计室编: 常用数理统计表, 科学出版社, 1974.
- [3] Steel, R. G. D. & Torrie, J. H.: *Principles and procedures of statistics*, 1960.
- [4] 王广仪: 简易医用数理统计方法初稿, 吉林省医学科学情报室、吉林医大科研处编: 《学术活动资料》, 1964.

(待续)