

体的差异,至于它们的生物学意义及细胞分化与 AFP 糖基化的改变有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 许凯黎:《生物化学与生物物理进展》3, 218, 1984。
[2] Zimmerman, E. F., et al.: *Biochemistry*, 15, 5534, 1976。
[3] Mackiewicz, A., et al.: *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 1, 251, 1980。
[4] 许凯黎等:《生物化学与生物物理进展》6, 30, 1982。
[5] Nishi, et al.: *BBA*, 278, 293, 1972。

- [6] Watanable, et al.: *Cancer Research*, 36, 2171, 1976。
[7] Smuckler, et al.: «*Onco-developmental gene expression*» (W. H. Fishman and S. Sell; eds.), 253, Acad. Press, N. Y. 1976。
[8] 强家模等:《实验生物学报》11, 1, 1978。
[9] Smith, C. J. et al.: *BBA*, 605, 1, 1980。
[10] Tsuchid, et al.: *Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 4, C53, 1983。
[11] Xu Kai. Li, et al.: *Chinese Medicine Journal*, 97 (7), 538, 1984。

[本文于 1984 年 5 月 17 日收到]

血卟啉衍生物加光对人红血球膜蛋白构象的影响

张绍斌 常金珍 王敖金 宋兰芳 陈玉玲

(中国科学院生物物理研究所北京)

大量资料表明,细胞质膜可能是光敏引起细胞死亡的临界靶结构之一^[1-4]。有的作者认为临界靶分子是膜上的蛋白质^[5],有的则认为膜上的靶事件是膜脂的过氧化^[5-6]。由此可见,为了揭示光敏的靶分子机理,必需进一步探讨膜脂和膜蛋白在光敏损伤中的地位。

血卟啉衍生物 (HPD) 除了能较多地滞留在癌细胞外,也能滞留在正常细胞膜中,它杀死正常细胞和癌细胞的靶分子机理是相似的。基于这一考虑,我们采用血影细胞为材料,观察了 HPD 对血影细胞的圆二色性的影响。

一、材料与方 法

1. HPD 北京制药工业研究所(钠盐 5mg/ml, 批号 831109)。新鲜人血堆积红血球:由北京红十字中心血站购进。一般化学试剂均为国产分析纯。

2. 血影细胞的制备 按 Steck 和 Kant^[7]法。将红血球以 5mM Na₃PO₄(pH8.0)-0.15 M NaCl 洗三次,以 40 倍体积的 5mM Na₃PO₄(pH 8.0) 低渗溶液,迅速搅匀,放置 10 分钟,以 3 × 10⁶g 离心 10 分钟,再以相同缓冲液洗三次,所得红细胞膜(血影细胞)为乳白色。

3. 加 HPD 保温与照光 将血影细胞用

5mM Na₃PO₄(pH7.6) 稀释到 100μg 蛋白/ml。取适量在暗处加 HPD 到 50μg/ml 的浓度,在 25°C 恒温水浴避光保温 20 分钟,然后用自行设计的光源照光(400W 溴钨灯,630nm 截止滤光片产生红光,并加 4cm 厚的水层,滤去产热的红外线)。样品盛在 25ml 烧杯中,上盖表面皿,下有电磁搅拌器中速搅拌,红光自水平方向射入,光源距样品 60cm。

4. 圆二色 (CD) 谱测定 将光敏的血影细胞稀释到 15μg 蛋白/ml,立即(或放在暗处 2-3 小时)在 Mark III 型圆二色仪上测远紫外 CD 谱。测试条件是:灵敏度 10 × 10⁻⁶ΔA/mm,光径为 1cm 的比色杯,波长 200-260nm,取波长 225,219 和 210nm 用三点法^[8]估算 α 螺旋含量。蛋白质氨基酸残基平均分子量按 110^[9] 计。

5. 以 Lowry 法^[10]测定蛋白质含量,标准蛋白为牛血清白蛋白。

二、结 果

一、图 1 是正常对照血影细胞的圆二色谱,它具有典型的双负峰(222nm 和 208nm),和文献报道的一致。用三点法计算的 α-螺旋含量约为 42%。

不加 HPD 照光 20 分钟或者加 HPD (50

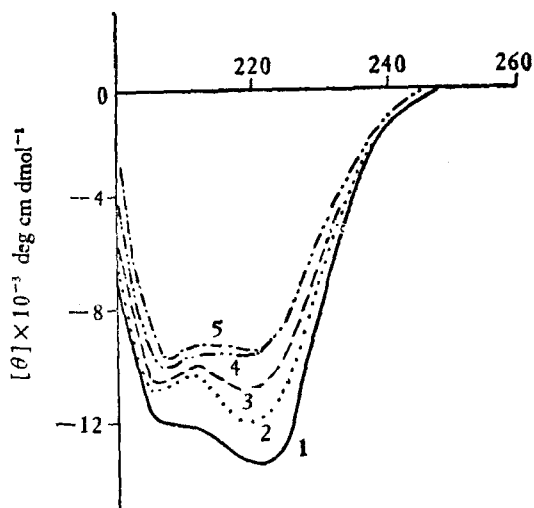


图1 不同时间照光下HPD对血影细胞CD谱的影响
HPD50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (照光时); 血影细胞浓度15 μg 蛋白/ ml
灵敏度 10×10^{-6} AA/ mm ; 样品池1cm
曲线1: 不照光不加HPD 2: 照光10分; 3: 照光
20分; 4: 照光30分; 5: 照光60分。

$\mu\text{g}/\text{ml}$)而不照光的样品,其CD谱没有明显改变(因为和不照光也不加HPD的样品的曲线基本重合,图中未划出),这表明单独照光或者单独加HPD均不能引起血影细胞构象的改变。此外,HPD本身的圆二色谱测定表明,它在所测波长范围内对圆二色性没有意义。

二、图1表明光照10分钟,血影细胞膜蛋白构象就有了显著的改变,双负峰变小, α 螺旋含量降低。随着照光时间延长(20分,30分),双负峰进行性变小;但在光照60分钟时,双负峰基本上与光照30分的相同,不再继续变小。这时 α 螺旋含量下降到29%,即下降了光敏前含量的31%。上述结果表明,当HPD剂量很小时,光敏效应即可引起血影细胞膜蛋白构象的明显变化。

三、照光后样品放暗处2—3小时,再测其CD谱,与照光后立即测定的相比,未见明显差别。这说明光敏过程对血影细胞的膜蛋白构象无后效应。

在同样条件下(例如HPD为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)光敏人红细胞悬液(2×10^7 细胞/ ml),即使光照达3小时,也未见任何程度的溶血。这说明HPD光敏引起的红细胞膜蛋白构象变化比光敏致溶血

敏感得多。

三、讨 论

血影细胞制备方法简单,重复性好,它是研究药物对细胞膜作用机理的一个良好模型材料。它的CD谱在208nm和222nm的双负峰是典型的 α 螺旋多肽的CD谱特征。故一些作者认为完整细胞膜的远紫外CD谱主要反映膜蛋白的构象^[11]。我们得到了正常血影细胞CD谱,并计算出 α 含量是42%,略高于Glaser和Singer^[12,13]的结果。

Ortner和Pasohall^[14]用原卟啉-IX-二甲脂作光敏剂,由CD谱得出血影细胞的 α 螺旋含量随光照时间加长而逐渐下降,到75分钟下降了52%。我们用HPD作光敏剂,光照30分钟后就达到了下降的最大值,而 α 螺旋含量仅下降了光敏前的31%,显然这与两个光敏剂的作用及实验条件不同有关,骨架蛋白的收缩蛋白占血影细胞 α 螺旋较高的含量,所以有人推测这现象可能与光敏引起的膜蛋白中的收缩蛋白的交联有关。关于它在膜损伤中的意义,有待探讨。我们的实验结果中,光敏剂量很小就达到了变化的最大值,因所用剂量远远小于致溶血剂量,这仿佛是血影细胞对光敏刺激的一种“应激反应”。我们用非光敏剂硫杂脯氨酸实验时也观察到这种规律性。当然这并不能排除构象的改变正是膜早期损伤的信号这一可能。

参 考 文 献

- [1] Bellnier, D. A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **36**, 43, 1982.
- [2] Volden, G. et al.: *Photobiochem. Photobiophys.*, **3**, 105, 1981.
- [3] Kessed, D.: *Biochemistry*, **16**, 3443, 1977.
- [4] Ito, T.: *Photochem. Photobiol.*, **34**, 521, 1981.
- [5] Lamola, A. A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **31**, 597, 1980.
- [6] Dezied, M. R. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **31**, 593, 1980.
- [7] Steck, T. L. et al.: *Methods in Enzymology*, XXXI part A, 172, 1974.
- [8] Goren, H. J. et al.: *Biopolymers*, **16**, 1527, 1977.
- [9] Gordon, D. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **68**, 2365, 1971.

- [10] Schleif, R. F. et al.: in *Practical Methods in Molecular Biology*, 74, 1981.
 [11] Lenard, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 56, 1828, 1966.
 [12] Glaser, M. et al.: *Biochemistry*, 10, 1780, 1971.
 [13] Holzwarth, G. et al.: *J. Supramol. Struct.*, 4, 161,

1976.

- [14] Ortner, M. J. et al.: *Photobiochem. Photobiophys.*, 4, 79, 1982.

[本文于 1984 年 4 月 18 日收到]

DNA-蛋白质相互作用的研究——EcoRI 内切酶切割 P₂-DNA

孙 连 魁*

(西北大学生物系, 西安)

限制性核酸内切酶不仅是分析和操纵 DNA 序列的工具^[1], 而且也为研究 DNA-蛋白质之间相互作用提供了一条可行的途径。核酸内切酶如何识别、结合、切割 DNA, 不少文章已有报道^[1,2,4-7,9]。至今没有解决的一个问题是: 同一 DNA 分子上具有相同核苷酸顺序的不同限制位, 为什么能以不同的速度为同一种内切酶切割。为了研究这个问题, 我们选择 P₂噬菌体 DNA 和 EcoRI 内切酶作为试验系统, 用酶促反应的动力学和热力学方法研究其切割机制, 所得资料表明, 不同限制位点的切割速度不同, 依赖于限制位两侧的碱基成分; 限制位周围的核苷酸顺序有调节切割过程的活化阈值的功能。

一、材料和方法

1. 材料

P₂-DNA, 腺病毒 5 型 DNA 分别为瑞典 G. Bertani 教授和 U. Pettersson 教授赠给; Poly[d(A-T)] 和 Poly[d(G-C)] 是西德产; EcoRI 内切酶自制^[9]。

2. 酶反应和 EcoRI 试验

EcoRI 的酶促反应是在不同温度下进行的, 反应缓冲液含有 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1MKCl, 10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mMDTT, 10% 甘油。不同稀释倍数的酶 5 μ l 和 20 μ l 或 5 μ l (含有 1 μ g 或 0.25 μ g) 的 P₂-DNA

混合; 以不同时间温育后, 加含 10% 十二烷基磺酸钠的 0.16M EDTA 20 μ l, 中止反应。

3. 琼脂糖凝胶电泳

酶促反应后, 将内切酶切割的 DNA 片段用琼脂糖凝胶电泳分离之。0.35g 琼脂糖, 溶于含有 0.04 M Tris, 0.005 M Na-Ac, 0.02 M EDTA, pH 为 7.8 的 100ml 缓冲液中, 以锡箔纸封瓶口; 100 $^{\circ}$ C 加热并电磁搅拌 3—5 小时; 冷却至 60 $^{\circ}$ C—75 $^{\circ}$ C, 将热胶注入内径 5mm, 长 190mm 的玻璃管中; 点样 20 μ l 于凝胶管的顶端, 室温下电泳 15 小时; 每管电流 1.0—1.5mA。

4. 凝胶染色及荧光测定

0.4 μ g/ml 的溴化乙锭染色电泳后的凝胶, DNA-溴化乙锭复合物在聚焦的 5145 \AA 的氩气激光束激发下发荧光, 其荧光强度与 DNA 片段的相对长度成正比; 用单光子计数器测定其荧光强度, 并计算 DNA 片段的相对长度。

5. 计算总的切割速度

不完全消化时, P₂-DNA 可被 EcoRI 内切酶切割成 A、B、C、D 四个最终片段 (其相对长度分别为 10%, 37%, 32%, 20%), 以及 AB, CD, ABC, BCD, ABCD 六个未被完全切割和未被切割的 DNA 片段 (图 1)。由文献^[1]可知:

$$R_A^{(t)} = 1 - \exp(-K_1 t)$$

$$R_B^{(t)} = [1 - \exp(-K_1 t)][1 - \exp(-K_2 t)]$$

* 本文系在瑞典卡罗林斯卡医学院医学生物物理系 Rudolf Rigler 教授指导下完成的。