

升, 在 pH S-3 型酸度计 (上海第二分析仪器厂) 上, 用 0.02N 氢氧化钠滴定, 测定各自的缓冲容量, 所得的结果见图 1。

另外, 上海生物制品研究所中心研究室, 在疟原虫体外培养基时, 分别加入我厂生产的 HEPES 和 E. Merck 的同类产品 25 毫克分子, 各培养两瓶, 比较疟原虫的寄生率的百分比及培养液 pH 变化情况, 见表 1。

由此可见, 我厂制备的 HEPES 与 E. Merck 同类产品, 具有相等的缓冲容量。在疟原虫的体外培养方面效果相似。对细胞无毒性影响。都能维持培养液的 pH 在 7.45 左右。

四、几点说明

1. 最后产品重结晶时, 滴加水不宜过多, 否则影响结晶的完全析出。此外, 加入乙醇后, 要

在室温下慢慢地自然冷却; 如果冷却过快, 结晶容易含水。含水结晶在烘干时, 会出现熔融。

2. HEPES 的熔点, 文献上报导为 234°C^[1]。实际上, 它的熔点差异很大, 一般在 210—234°C 之间。这可能是由于它容易吸潮的性质决定的。产品干燥越彻底, 熔点越接近 234°C, 反之越低。然而熔点的高低, 对作为缓冲剂使用并无影响。

参 考 文 献

- [1] Norman, E. G.: *Biochemistry*, 5, 467, 1966.
- [2] Norman, E. G. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 24 (part B), 53, 1972.
- [3] John, D. M.: U. S. 2541260, Feb., 13, 1951.
- [4] Albert, S.: *C.A.*, 53, 11, 231 1959.

[本文于 1979 年 10 月 15 日收到]

血清乳酸脱氢酶同工酶的测定 ——琼脂糖凝胶电泳法

王 金 寿

(湖北黄石矿务局医院)

乳酸脱氢酶 (LDH) 是一种参与糖酵解过程的重要的酶, 广泛存在于机体各器官、组织中, 当这些组织有炎症或坏死时, 血清中 LDH 总活性和同工酶酶谱都有改变。在心脏疾患时, 血清中 LDH₁ 明显增高, 而肝脏疾患时 LDH₅ 明显增高。因此, 临床上日益广泛应用 LDH 同工酶分析、作为某些疾病的早期诊断和鉴别诊断方法, 生物学上可用作肿瘤研究、生物分类, 遗传学研究的新手段。

LDH 同工酶的分离及测定方法有区带电泳法、层析法及免疫化学法等, 其中以区带电泳法较常用。我们曾对醋酸纤维素薄膜电泳, 琼脂糖凝胶电泳及聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离 LDH 同工酶的方法, 作初步比较, 认为用琼脂糖凝胶电泳分离及测定 LDH 同工酶具有操作

简便、分离较好、区带整齐、显色清晰、无拖尾、容易定量, 便于保存等优点, 适于一般基层单位应用。现将此法简介如下:

材 料 与 方 法

1. 试剂

(1) 巴比妥钠—盐酸缓冲液 (pH 8.6, 0.06M)

(2) 0.5% 琼脂糖 琼脂糖 0.5 克, 巴比妥钠—盐酸缓冲液 50 毫升, 蒸馏水 48 毫升, 10 mM EDTA Na₂ 2 毫升, 隔水加热溶解。

(3) 脱色固定液 95% 乙醇 140 毫升; 冰乙酸 (1% 或 5%) 10 毫升; 蒸馏水 50 毫升; 混匀即成。

(4) 染色液 (以每块凝胶板之用量计算)

1M 乳酸钠 (溶于 pH7.4 0.1M 磷酸盐缓冲液) 0.1 毫升; 氯化硝基四氮唑兰水液 (NBT) (1.0 毫克/毫升) 0.3 毫升; 氧化型辅酶 I 水液 NAD^+ (2.5 毫克/毫升) 0.1 毫升; 吩嗪甲酯硫酸盐水液 (PMS) (1.0 毫克/毫升) 0.05 毫升; 0.5% 琼脂糖 (预先已溶化) 0.5 毫升; 临用前 10 分钟配制, 避光存于 37℃ 恒温水箱内。

(5) 0.4N 氢氧化钠溶液

2. 实验方法

取溶化的 0.5% 琼脂糖 2.0 毫升, 加在洁净的载玻片 (76×26×1 毫米) 上, 凝固后, 凝胶板三分之一处刻槽 (18×2 毫米), 往槽内加入新鲜无溶血之血清 20 微升, 凝胶板移入电泳槽内, 点样端放在负极, 电压 100—140 伏, 通电 25—30 分钟, 电泳毕, 凝胶板上立即加入预先配好的染色 0.5 毫升中, 覆盖均匀, 放 37℃ 恒温箱内保温 60 分钟, 显出兰紫色的 LDH 区带五条、(图 1 见封 3)。将染色后的凝胶板先放入 1.0% 冰乙酸中 30—90 分钟, 再放入 5% 冰乙酸中 30 分钟, 再用蒸馏水漂洗 2—3 次, 每次约 10 分钟。然后用刮膜胶片准确地将 LDH 同工酶各区带切下, 另在 LDH₅ 谱带后切下同大小的凝胶作空白, 分别放在小试管中, 每管加 0.4N 氢氧化钠溶液 1.0 毫升, 加热溶化, 冷却后混匀, 用 72 型分光光度计, (0.5 厘米比色杯) 测 560nm 处光密度, 并计算 LDH 同工酶各区带的百分含量。显色漂洗后的琼脂糖凝胶板放 37℃ 恒温箱烘干, 作标本或供光密度扫描及照相之用。

3. 结果与讨论

(1) 溶液色泽浓度与光密度的关系 按上

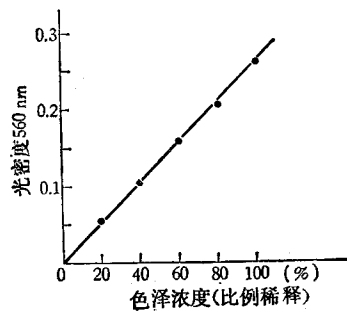


图 2 LDH 同工酶色泽浓度与光密度关系

述方法配制的 LDH 同工酶染色区带的氢氧化钠溶液按 5:0、4:1、3:2、2:3、1:4 之比例用 0.4N 氢氧化钠稀释, 测得其最大吸收峰在 560 nm, 且溶液色泽浓度与 560 nm 的光密度基本呈直线关系(图 2)。

(2) 色泽稳定时间 将 LDH 同工酶色泽区带按定量操作, 冷却后在 72 型分光光度计上比色, 光密度已达最大值, 120 分钟内光密度基本稳定, 以后随时间延长逐渐降低。

(3) 重复性测定 详见表 1

(4) 琼脂糖的浓度对分离效果的影响 我们用上海东海制药厂生产的琼脂糖粉, 其浓度在 0.4—0.6% 均可应用, 并以 0.45—0.5% 较为适宜。浓度太高, 泳动慢, 区带分离不开, 不易定量; 浓度太低, 凝固性较差, 有时可使区带发生畸形。

(5) 染色液 LDH 同工酶染色液的配法很多, 试剂昂贵, 且不易保存。经我们改进后, 染色液配方中, 辅酶 I 用量只相当于原法的 20%, 染色效果基本符合要求。染色液中几种试剂应避光, 冰箱保存。配好后的染色液置 37℃ 恒温水浴中保存。

(6) 红细胞内 LDH 活力比血清约高 100 倍, 因此, 绝对不能采用溶血标本。

(7) 染色过程中的温度、湿度是同工酶区带显色成败的重要因素。温度太低, 不易显色;

表 1 血清 LDH 同工酶含量重复测定结果(%)

标本	测定次数	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
1	1	22.5	33.8	22.2	7.8	13.6
	2	19.6	34.4	24.4	7.4	14.3
	3	21.4	32.9	23.7	7.7	14.3
2	1	26.2	26.6	23.3	11.6	12.4
	2	27.5	26.7	22.3	11.3	12.3
3	1	20.9	33.7	22.2	11.6	11.6
	2	22.8	35.3	23.3	8.9	9.6
4	1	15.0	36.6	34.0	7.8	6.4
	2	15.4	39.0	30.8	8.3	7.3
5	1	25.3	29.5	21.0	10.5	13.7
	2	27.3	28.6	21.6	9.4	13.1
6	1	26.5	28.5	22.0	9.8	13.1
	2	28.6	28.6	21	9.4	12.3

如温度适宜,湿度不够,则区带显色虽好,但多余的染色液干固在琼脂凝胶板上无法洗净。

(8) 用本法测定 30 名健康男女血清 LDH 同工酶——得到各电泳区带酶活性百分含量的平均值及标准差如下:

LDH, 25.3 ± 3.5 ; LDH₂ 38.1 ± 4.8 ; LDH₃ 23.3 ± 2.2 ; LDH₄ 8.3 ± 2.7 ; LDH₅ 4.5 ± 2.7 , 与国内有关文献报道的正常值基本相符。

[本文于 1979 年 11 月 20 日收到]

制备大鼠腹腔巨噬细胞质膜囊泡的简便方法

曾庆镓 季瑞华 胡世真

(中国科学院上海生物化学研究所肿瘤组)

目前认为对肿瘤细胞具有杀伤作用的免疫活性细胞主要有四类,即 T 淋巴细胞、K 细胞(杀伤细胞)、NK 细胞(天然杀伤细胞)和巨噬细胞(以下简称为 MΦ)。但在自发肿瘤的宿主体内,这些细胞的免疫活性受到抑制。目前认为这是因为肿瘤细胞释放免疫抑制因子,抑制了上述细胞的免疫活性。为了探讨肝癌的免疫抑制原理和甲胎蛋白的生物学功能,我们曾研究了 MΦ 与甲胎蛋白的作用,观察到胎儿和肝癌来源的甲胎蛋白都具有抑制 MΦ 吞噬异物的能力,其作用部位在 MΦ 的表面,并推测 MΦ 表面可能存在甲胎蛋白受体^[1]。为了进一步探讨甲胎蛋白作用于 MΦ 表面的有效成分和作用原理,我们打算从细胞质膜上的受体着手进行研究,为此我们摸索了质膜的制备方法。本文将介绍如何从组织培养的途径制备大鼠腹腔 MΦ 的质膜。此法较为简便,不需复杂的设备。

材 料 和 方 法

一、大鼠腹腔 MΦ 的诱发

1. 诱发剂巯基乙酸钾盐 (Thioglycolate) 的制备 在搅拌条件下,将巯基乙酸 60 毫升滴入 48 克 KOH (事先溶于 210 毫升水中),此时溶液呈桃红色,然后 50℃ 减压浓缩至糊状,过滤即得粗制品,用无水乙醇复结晶二次,得白色结晶,干燥后贮于棕色瓶内备用。

2. MΦ 粗制剂的制备 1.2 克巯基乙酸钾盐溶解于 100 毫升 0.2% 的琼脂中(用生理盐

水配制),然后沸水浴煮沸 30 分钟,再常规高压消毒,放置一周后使用。选用♂、体重 200—300 克大鼠。每只大鼠腹腔注射上述巯基乙酸钾-琼脂溶液 4 毫升,4—7 天内剖腹,每只鼠用约 10 毫升无菌磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 洗涤腹腔,搜集细胞。将洗出物静置数分钟,去掉下沉的组织块和悬浮于液面的脂肪滴,即得 MΦ 粗制剂。

二、MΦ 的贴壁培养纯化法

上述 MΦ 粗制剂经 500 × g 离心 5 分钟,所有细胞沉积于管底,平均每只大鼠所得沉积物用 2 毫升 772 培养液 (中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂产品)(另加小牛血清 15%) 悬浮,转移至平底培养瓶内,于 37℃、5% CO₂ 中培养 45 分钟至 1 小时,使巨噬细胞贴壁,然后轻轻振摇培养瓶,使不贴壁的细胞悬浮起来,倾去培养液,再用等体积 Hanks 液洗培养瓶两次,剩下的贴壁细胞经 Giemsa 染色后,光学显微镜检查证明为巨噬细胞(其中包括部分大单核细胞)。

三、MΦ 质膜囊泡的制备

主要根据 Scott 的方法^[2]。细胞质膜囊泡的发泡剂选用新鲜配制的多聚甲醛。配法如下:将固体多聚甲醛溶于 65℃ 的 PBS 中,加少许稀 NaOH,振摇使溶解,冷却后过滤去未溶解的多聚物,然后配入上述含 15% 小牛血清

* 丁昌荣、沈菊英协助电泳标本制作和观察,特此致谢。

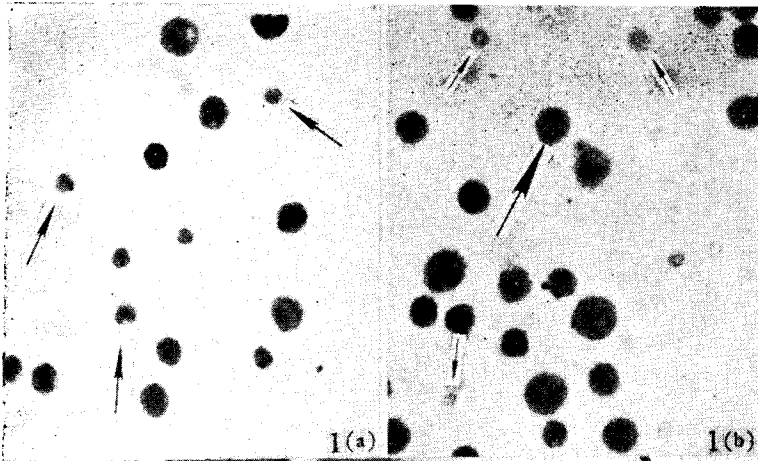


图1 贴壁培养前后的镜检(300×)

a——培养前

b——贴壁后

(大箭头所示为MΦ; 中箭头所示为小淋巴、红血球; 小箭头所示为从壁上脱落细胞的痕迹)

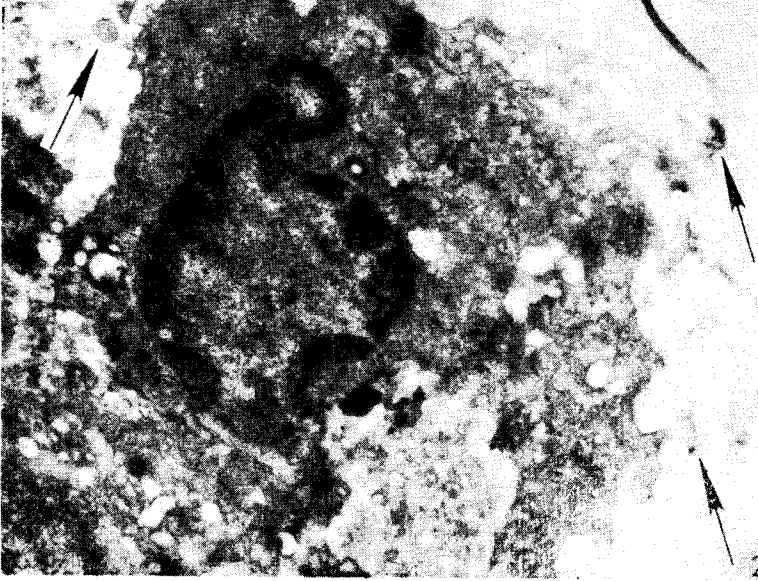


图2 产生质膜囊泡的MΦ(24,000×)

(箭头所指为释放的质膜囊泡)

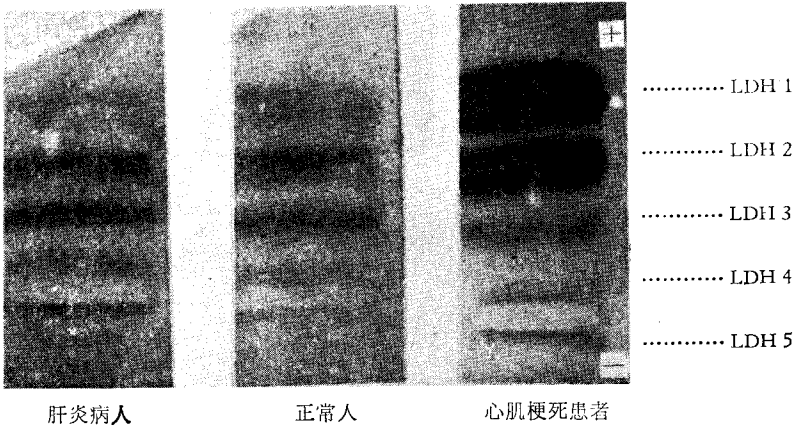


图1 血清乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱