

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 M Φ)。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 M Φ 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 M Φ 吞噬异物的能力,其作用部位在 M Φ 的表面,并推测 M Φ 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 M Φ 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 M Φ 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 M Φ 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. M Φ 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 M Φ 粗制剂。

二、M Φ 的贴壁培养纯化法

上述 M Φ 粗制剂经 500 $\times$ 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、M Φ 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。

表 1 贴壁培养法纯化 MΦ 的纯度和得率

大鼠只数	贴 壁 前			贴 壁 后			得率 (%)
	总细胞数	MΦ (%)	MΦ 总数	贴壁细胞数	MΦ (%)	MΦ 总数	
12	4.03×10^8	53	2.14×10^8	3.54×10^7	>98	$\sim 3.54 \times 10^7$	16.5
15	6.90×10^8	75	5.17×10^8	2.72×10^7	>98	$\sim 2.72 \times 10^7$	5.3

的 772 培养液,使多聚甲醛的最后浓度约为 170 mM。按每只大鼠 2 毫升的量加至上述贴壁 MΦ 中,再继续培养 1 小时后取出培养液;此培养液经 $500 \times g$ 离心 5 分钟去除从壁上脱落的细胞,所得上清液再经 18000 转/分离心 20 分钟;小心吸去上清液,并用质膜囊泡洗涤液(组分见下)洗沉淀物三次,平均每只大鼠最后用 0.06 毫升质膜囊泡洗涤液悬浮沉淀物,即为质膜制剂。制剂的蛋白浓度用 Folin 酚试剂法测定,以牛血清白蛋白作标准。

质膜囊泡洗涤液组分:内含 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 50mM、KCl 100 mM、MgCl₂ 10 mM、酒石酸钾钠 10 mM。

四、电镜样品制备

贴壁纯化的 MΦ 在上述含多聚甲醛的培养液内培养 1 小时后,用软橡皮棍从玻璃壁上将 MΦ 刮下来,按 Scott^[2] 的方法固定、脱水、包埋和切片观察。MΦ 于 4℃ 下经 2.5% 戊二醛(用 0.1M 二甲砷酸钠缓冲液配)固定 12 小时,再经 2% 钨酸(用 0.1M 磷酸缓冲液配)后固定 1 小时,然后用乙醇脱水,2% 醋酸铀染色,Epon 包埋、切片。再将切片用醋酸铀和柠檬酸铅染色后进行电镜观察。

五、5' 核苷酸单脂酶活力测定^[3]

将 5' 腺嘌呤核苷酸 (AMP) 配于上述质膜囊泡洗涤液内,使浓度为 5 mM,即为底物溶液。1.0 毫升底物溶液和 2—6 微克蛋白量的质膜制剂混和,于 37℃ 保温不同时间(0—40 分钟),取 0.1 毫升定无机磷,得反应进程曲线,从曲线斜率得酶活力。酶比活单位为每分钟每毫克蛋白释放无机磷 (Pi) 量,即 Pi/分,毫克蛋白。

六、琥珀酸-细胞色素 C 还原酶活力测定

按 Tisdale 的方法^[4]。取细胞色素 C 还原态与氧化态的差克分子消光系数 $\Delta \epsilon_{550nm} = 18.5 \times 10^6 M^{-1} \cdot \text{厘米}^{-1} \cdot \text{升}$,琥珀酸-细胞色素 C 还原酶的比活计算按下式:

$$\frac{\Delta O.D._{550nm}(\text{还原-氧化})/\text{分}/\text{毫克蛋白}}{18.5}$$

= $\mu\text{mol. 细胞色素 C 被还原}/\text{分}, \text{毫克蛋白}$

七、NADH₂ 脱氢酶系活力测定

按 Wallach 等的方法^[5]。取消光系数 $\epsilon_{340nm} = 6220 \text{ 升}/\text{厘米} \cdot \text{mol.}$ 计称脱氢酶系活力,比活单位为每分钟每毫克蛋白氧化 NADH₂ 的量。

结果与讨论

一、贴壁培养法纯化 MΦ 的纯度和得率

诱发 MΦ 的最适室温为 15°—25℃,给大鼠腹腔注射诱发剂后第 4 至 7 天内巨噬细胞比例较高(45—75%)。贴壁培养的最短时间约为半小时,结果见表 1 和图 1(见封 3)。

从图 1 可见,贴壁培养后的细胞形态均一,基本上是 MΦ。表 1 结果说明一次贴壁培养可使 MΦ 的纯度提高至 98% 以上,得率约为 5.3—16.5%。

二、MΦ 质膜囊泡和得率

MΦ 在低浓度多聚甲醛作用下,MΦ 的质膜会发生囊泡化作用^[2],图 2 为贴壁纯化 MΦ 在 175 mM 多聚甲醛作用下释放质膜囊泡的电镜照片(见封 3)。表 2 给出了质膜得率。

表 2 质膜囊泡得率

大鼠只数	贴壁 MΦ 数	质膜蛋白(微克)
12	3.54×10^7	20
15	2.72×10^7	22

表3 MΦ 质膜囊泡和 MΦ 匀浆各标志酶活性比较(分⁻¹·毫克蛋白⁻¹)

	质 膜 囊 泡	匀 浆	质膜囊泡/匀浆
5'核苷酸单脂酶	1.9 n mol. pi	0.13 n mol. pi	14
NADH ₂ 脱氢酶	0.38 μmol. NADH ₂ 被氧化	17.5 μmol. NADH ₂ 被氧化	0.021
琥珀酸-细胞色素 C 还原酶	~0 μmol. 细胞色素 C 被还原	1.0 μmol. 细胞色素被还原	~0

三、MΦ 质膜囊泡的纯度鉴定

鉴定质膜纯度的指标一般选用细胞质膜和细胞器的标志酶。本文选用 5' 核苷酸单脂酶作为质膜的标志酶,琥珀酸-细胞色素 C 还原酶作为腺粒体的标志酶, NADH₂ 脱氢酶系作为内质网的标志酶^[6]。MΦ 质膜囊泡和 MΦ 匀浆中上述各酶的活性见表 3。

上述结果说明,用贴壁培养的方法可以得到纯度较高的 MΦ, MΦ 在多聚甲醛作用下,可以产生和释出质膜囊泡,方法较简便,细胞器粘连不严重。但得率较低,例如贴壁培养这一步要浪费大量 MΦ,纯化的 MΦ 在多聚甲醛作用下,释放的质膜囊泡也只占质膜的一小

部分,看来最后得到的质膜只占总质膜量的很少部分,因此这一方法可用于需要质膜量不大的研究工作。

参 考 文 献

[1] 胡世真等:《生物化学与生物物理学报》,1979 年,第 11 期,第 279 页。
[2] Scott, R. E.: *Science*, **194**, 743, 1976.
[3] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.
[4] Tisdale, H. D.: *Methods in Enzymol.*, **10**, 213.
[5] Wallach, D. F. H. et al.: *Methods in Enzymol.*, **8**, 164.
[6] Hochstadt, J. et al.: *Methods in Membrane Biology*, **5**, 117.

[本文于 1979 年 12 月 5 日收到]

单倍体、双倍体酵母线粒体生物发生的研究

(I) 从葡萄糖阻遏到去阻遏过程中酵母线粒体内膜酶系的变化及在去阻遏过程中氯霉素的影响*

林治焕 李金照 赵云鹏 李才元 史宝生 孙珊 朱以桂**

(中国科学院生物物理研究所)

线粒体,这个重要细胞器,是供给细胞活动所需能量的“动力站”,其结构的特点是由内外二层膜组成的膜系,膜上有大量固有的和外在的蛋白质。它们很多是属于酶蛋白。自从 60 年代发现线粒体中有 DNA、RNA 以及自己独立的蛋白合成系统后,大大激发了人们研究线粒体中各种蛋白质来源的兴趣,因此线粒体的自主性与生物发生就成了活跃的研究领域之一。一般认为细胞线粒体的蛋白,有些是由线粒体的蛋白合成系统与核-质的蛋白合成系统协同合成的,另有些是由线粒体内自己的基因

编码合成的,但线粒体的这种自主性是极有限的。本工作的目的是通过单、双倍体酵母线粒体自主性的比较初步探讨线粒体生物发生过程中核-质与线粒体两个系统的相互关系。

兼性的酵母细胞,从无氧转移到有氧条件或从葡萄糖浓度较高(阻遏状态)转移到较低介质(去阻遏状态)中生长时,线粒体的数量和质量都发生剧烈的变化,在这些过程中至少线粒

* 此工作完成于 1974 年。
** 本工作是在杨福愉同志指导下进行。张克、张淑秀同志参加部分实验工作。

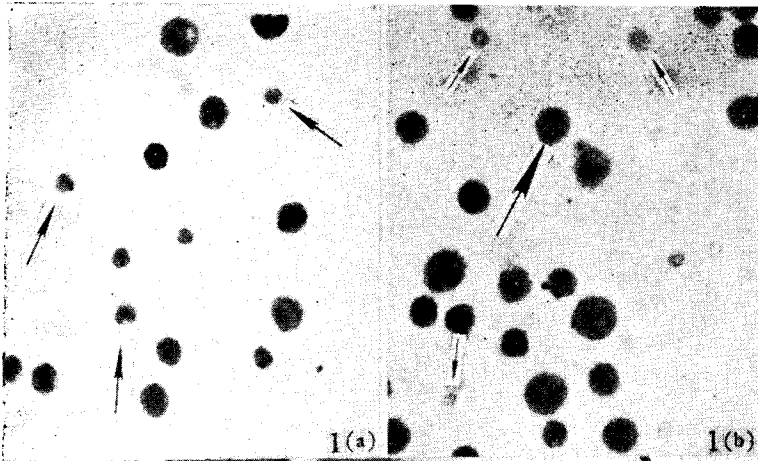


图1 贴壁培养前后的镜检(300×)

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)

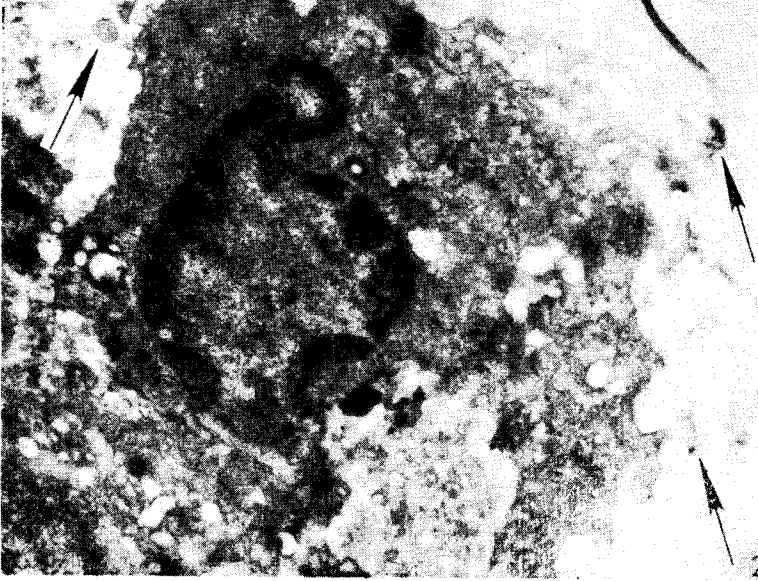


图2 产生质膜囊泡的MΦ(24,000×)

(箭头所指为释放的质膜囊泡)

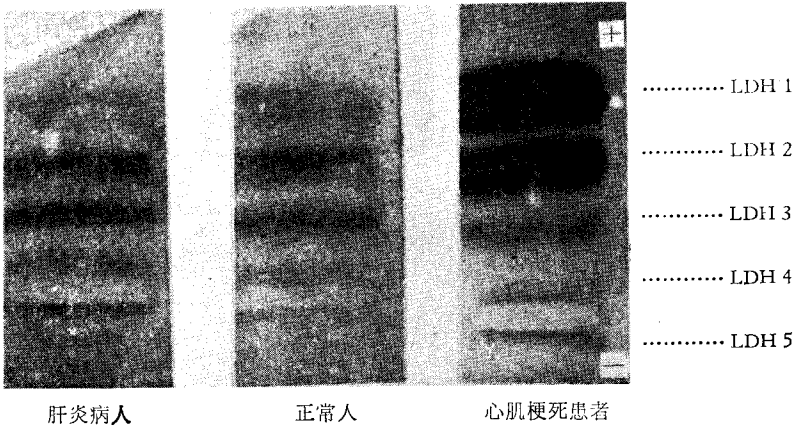


图1 血清乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱