

一种新的人扁桃体淋巴细胞质膜制备法

宋千里 沈明 张惠珠 余 滨

(上海市免疫学研究所)

质膜的制备法很多。作者曾试用经典的低渗匀浆破膜、差速离心及密度梯度离心法^[1],但得量低,纯度差,核膜,线粒体膜和内质网膜污染严重,加之流程长,结果不稳定,又需超速离心机,所以实用价值不大。针对这些缺点,我们进行了探索,发现 Jatt^[2]在分离 Raji 细胞质膜时,应用甘油低渗法破膜,核膜污染少;而 Kannel^[3]在分离人 WIL₃ 细胞质膜时,曾以两相分配法取代差速和密度梯度离心法,大大缩短了流程。我们取两者之长,应用于人扁桃体淋巴细胞质膜的分离中,摸索出一种较为理想的质膜制备法,即甘油低渗——两相分配法。

材料和方法

1. 材料 手术摘除人扁桃体,冰壶冷藏不超过 3 小时。

2. 试剂

(1) 低渗 Tris-HCl 缓冲液(简称 T-H) 10mM T-H, pH7.4, 含 1mM MgCl₂ 及 1mM CaCl₂。

(2) 两相分配液^[40] 取 30%W/W 聚乙二醇(PEG 6000)水溶液 103 克, 20%W/W 葡聚糖(Daxtran T500)水溶液 200 克, 0.2M 磷酸钠缓冲液(pH 6.4) 333 毫升, 0.5M MgCl₂ 7.2 毫升及蒸馏水 172 毫升, 置分液漏斗中充分摇匀, 于 4℃ 静置 48 小时, 分别收集上下两液层, 置 4℃ 冷藏备用。上层(Top phase, 简称 T 液)为葡聚糖饱和的聚乙二醇溶液, 下层(Bottom phase, 简称 B 液)为聚乙二醇饱和的葡聚糖溶

液。

3. 方法

(1) 淋巴细胞质膜的制备过程见下页。

(2) 生化鉴定: 对 W.C(淋巴细胞悬液)、P₁(匀浆沉渣)及 PM(纯化质膜)等分部做下列定量测定: 蛋白质(Folin 法), DNA(二苯胺法), 5'-核苷酸酶(质膜标志酶、简称 5'-NT, Michall 法)、NADH 脱氢酶(内质网标志酶、简称 NDH, Wallach 法)及琥珀酸-细胞色素 C 还原酶(线粒体标志酶、简称 SCR, Cooperstain 法)^[6]; 对 S(离心所得上清液)及 P₂(沉渣)分部则只测 DNA。

(3) 形态学观察 用相差显微镜及电镜观察(略)。

(4) 功能鉴定 做三种试验, 即质膜 5'-NT 活性保存试验, ConA 及青豌豆凝集素(GPA)对细胞和质膜 5'-NT 活性的抑制试验, 以及半乳糖和甘露糖对 ConA 及 GPA 上述抑制作用的阻断试验(方法另文介绍)。

结 果

1. 甘油低渗法破膜

结果证明此法能避免核膜破碎所致的核膜污染。甘油低渗破膜后所得细胞匀浆, 按以上方法离心得 P₁ 及上清液 S。测定 P₁ 及 S 中的 DNA, 按下式求破碎率

$$\text{核破碎率} = \frac{S \text{ 的 DNA 含量}}{S \text{ 的 DNA 含量} + P_1 \text{ 的 DNA 含量}}$$

我们的结果核破碎率为零(国外用低渗匀

淋巴细胞质膜的制备过程

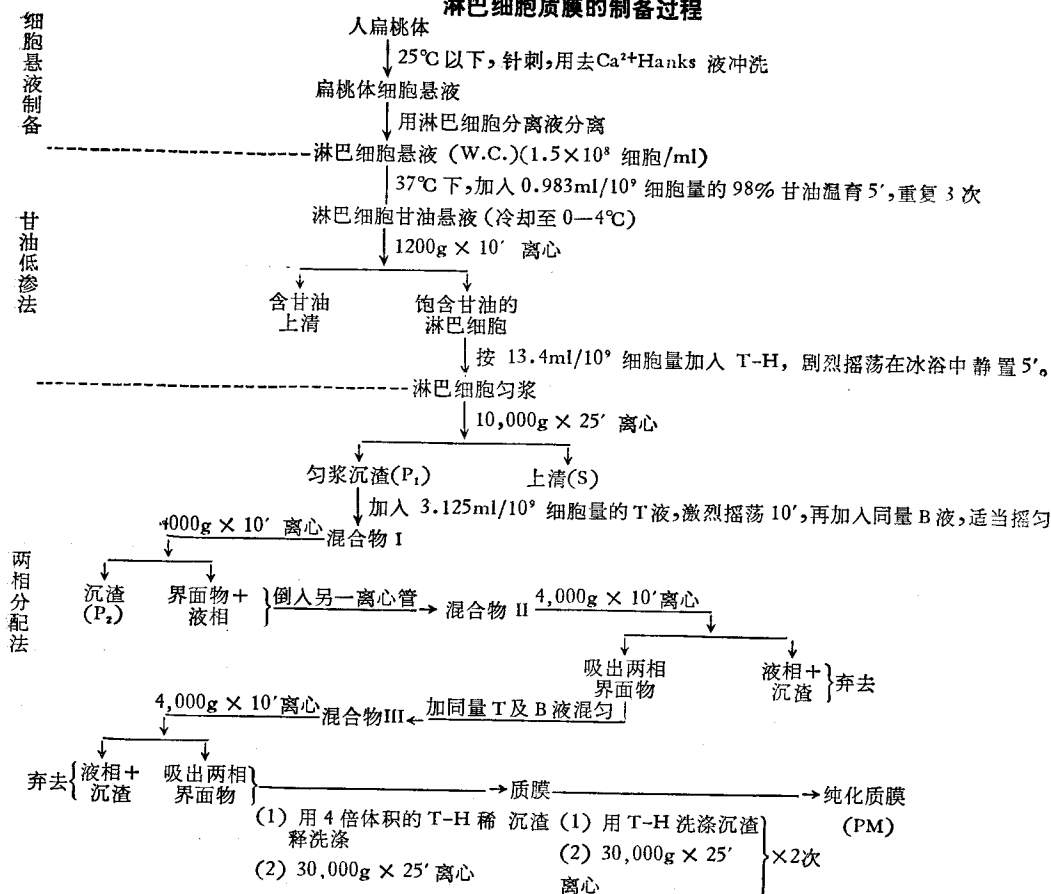


表 1 匀浆离心条件与质膜得量和纯度的关系

方 案 号	匀 浆 离 心 条 件	方 案		结 果							
		两相分配条件		从 W.C 到 P ₁ 的		从 P ₁ 到 PM 的		从 W.C 到 PM 的		质膜纯度	
		离心条件	换 新 液 次	回 收 率		回 收 率		总回收率			
				蛋白质	5'-NT	蛋白质	5'-NT	蛋白质	5'-NT	5'-NT 比活	5'-NT 纯化率
1	700g × 10'	4000g × 10' × 3	0	31.73	21.20	10.76	59.32	3.8	16.80	4.69	5.65
2	10000g × 15'	同 上	0	45.67	27.65	2.29	17.76	1.04	4.95	8.91	5.11
3	10000g × 25'	同 上	0	38.85	39.51	0.85	19.69	0.33	7.78	20.88	23.64

浆法时为 30%)^[1]; 相差显微镜观察亦未见破碎核。此法破膜后以 10,000g × 25' 离心不会引起核破碎; 所得 P₁ 中含有全部完整核、大部线粒体、质膜及内质网。这一离心条件同时为后面提高质膜得量创造了条件。

2. 两相分配法分离

(1) 从表 1 可见, 用不同离心条件沉降匀浆所得的 P₁ 再进行两相分配, 分离到的质膜其

纯度和回收量各不相同; 离心条件增强, 可使 P₁ 的 5'-NT 回收率增加, PM 的 5'-NT 回收率、比活及纯化率都显著提高。因此我们推荐方案 3 的匀浆离心条件。

(2) 测定经一次分配所得沉淀 P₂, 其中 DNA 含量与 P₁ DNA 比较, 二者极其相近, 说明经一次两相分配, 即可使 P₁ 中的质膜集中并与核分离; 核被完整又完全地沉淀于 P₂ 部分,

表 2 两相分配条件对质膜回收率及纯度的影响

方 案				结 果		
方 案 号	匀 浆 离心 条件	两相分配条件		从 W.C 到 PM 5'-NT 总回收率	从 W.C 到 PM SCR 纯化率	从 W.C 到 PM N.D.H 纯化率
		离心条件	换 新 液 次			
3	10000g × 25'	4000g × 10' × 3	0	7.78	2.43	4.16
4	同 上	4000g × 10' × 3	1	7.72	0	3.56
5	同 上	4000g × 20' × 3	2	5.38	0	0.95
6	同 上	4000g × 20' × 1 15000g × 20' × 1 15000g × 10' × 1	1	3.60	0	0.71

相差显微镜观察也证明核绝大多数是完整的。

(3) 改变两相分配时的离心条件和更换新鲜两相液，可减少污染，提高质膜纯度(见表 2)。

更换一次新鲜两相液，即可使 SCR 纯化率下降到零，全部清除了线粒体膜的污染。

单纯增强两相分配的离心条件，或再加上更换两次新鲜两相液，能使 NDH 纯化率下降至 0.71(国外为 1.0)^[7]，但 5'-NT 总回收率亦显著下降。

3. 质膜的形态学观察及功能鉴定 电镜(37,500—45,000 倍)观察可见 PM 纯化质膜中存在光滑膜束结构。PM 的 5'-NT 活性在 5—6℃ 可保存 21 天;PM 还保留着与 ConA 及 GPA 结合的功能，因而凝集素仍表现对质膜 5'-NT

活性的抑制作用(表 3)，并发现 GPA 的抑制作用可被甘露糖阻断而不被半乳糖阻断(图 1)。

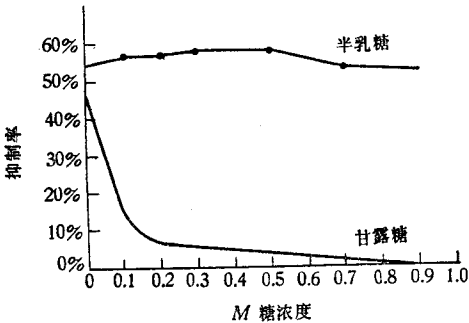


图 1 糖对 GPA 抑制 5'-NT 作用的阻断

讨 论

在多种试验的基础上，我们选用表 2 方案 4 为最佳方案。甘油低渗——两相分配法与经典低渗匀浆离心法结果相比，本法具有得率高、无核无线粒体膜污染，内质网污染较少，以及流程短，不需超速离心机等优点。所得产物的蛋白质与 5'-NT 回收率分别为 0.36% 及 7.7%，是经典法的 2.6 倍与 6 倍；质膜 5'-NT 的比活为 20 微克分子无机磷/小时·毫克蛋白质，质膜的纯化率则可达 23.6 倍。所得质膜还具有一定的功能稳定性与完整性，和 ConA 及 GPA 的可逆性结合又具有一定糖特异性，因而可用于研究淋巴细胞质膜上受体与其配体的相互作用。

其原理是利用甘油能进入细胞膜内而不能进入核内的特点，造成胞浆高渗状态，继而在低

表 3 凝集素对 5'-NT 活性的抑制作用

	作用对象	凝集素浓度范围	最低浓度 时抑制率 %**	最高浓度 时抑制率 %
ConA	细胞	0.02—8r/10 ⁶ 细胞	11.87	94.12
	质膜	10—50r*/31.7r 质膜蛋白质	100	100
青豌豆	细胞	0.02—10r/10 ⁶ 细胞	1.97	65.35
凝集素	质膜	0.02—8r/10.45r 质膜蛋白质	5.3	62.20

* 因所用质膜 5'-NT 比活是以上细胞实验的 1/2，所用 ConA 浓度又过高，所以全部实验凝集素浓度结果都是 100% 抑制

**

抑制率 =
$$\frac{\text{无凝集素时 5'-NT 活性} - \text{有凝集素 5'-NT 活性}}{\text{无凝集素时 5'-NT 活性}}$$

渗条件下,使大量水份进入饱含甘油的细胞,胀破质膜但不影响核膜,因而克服了匀浆破膜易使核破,致使核膜污染质膜的缺点。甘油进入细胞可能是主动过程^[2],因而本法应注意尽量保持淋巴细胞活性。

目前认为两相分配法中起主要作用的因素有三:界面吸附力^[8]、静电引力^[9]和离心力。各种颗粒在两相液系内进行分配时,三种力综合地起作用,使它们以不同的比例分配停留于不同的位相,从而达到分离的目的。按照本法分配停留在两相界面上的主要是质膜,还有少量内质网。根据 Albertsson 公式^[8],两相界面吸附物的得量取决于参加分配样品的浓度、温度、分配颗粒的表面积、两相液间的亲和力,以及两相分别对分配颗粒的亲和力。样品浓度越大,分配时温度越低,分配颗粒表面积越大,两相液间及分别对分配颗粒的亲和力越小,则界面吸附量越大。所以在进行两相分配时必须注意上述诸因素。本法的质膜产物中尚有内质网污染,今后要设法扩大二者所受三种力的差别,以便

做进一步改进。

本实验所用 GPA 由中科院生化所王克夷同志提供,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Evans, W. H.: *Preparation & Characterisation of Mammalian Plasma membranes*, Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1978.
- [2] Jett, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 2134, 1977.
- [3] Kennel, S. T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **76**, 485, 1973.
- [4] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.
- [5] Wallach, D. J. H.: *Methods in Enzymol.*, Vol. VIII, p. 165.
- [6] Cooperstein, S. J.: *J. Biol. Chem.*, **186**, 129, 1950.
- [7] Korn, E. D.: *Methods in Membrane Biology*, Vol. III, p. 21.
- [8] Albertsson, P-A: *Partition of Cell Particles & Macromolecules*, New York: John Wiley & Sons, 1960.
- [9] Walter, H. et al.: *Biochemistry*, **15**, 2959, 1976.
- [10] Homani, B. T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **328**, 520, 1973.

[本文于1982年2月6日收到]

溴化法制备 5-溴脱氧尿嘧啶核苷

黄 婴 陆应钰

(科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(简称 5-BrduR)具有抗 DNA 类病毒的功能^[1,2],它被广泛用于 DNA 的遗传突变研究及 DNA 的遗传复制性状的观察,它可取代 TdR 掺入 DNA 中,以便研究 DNA 的复制和观察姐妹染色单体交换数目。也可用于测定环境诱变因子诱变活性和细胞周围动力学的研究等方面。

早期生产 5-BrduR 均采用 DNA 为原料,而制取 DNA 的小牛胸腺及鱼精蛋白。取材不易,加之工艺繁琐,周期长,成本高,限制了 5-BrduR 的生产。60 年代由于我国呈味核苷酸

工业的建立^[3], (5'-IMP; 5'-GMP), 为人工半合成 5-BrduR 提供了廉价的原料——尿嘧啶核苷酸(UMP)。

本文采用半合成法,以 UMP 为原料,生产 5-BrduR^[4,5]。我们对 Thomas 的溴化法加以改进^[6],用低温浓缩代替冷冻干燥,工艺简单,产率高(最后一步文献产率为 36%,本法为 66%)。

本文介绍的工艺路线比经典方法简单^[7-9],主要反应步骤从 6 简为 4 步,得率从 1% 提高到 15%,含量 99%,达到国际同类商品水平。