

细胞膜的分离

侯 愉

(美国纽约罗斯维尔派克肿瘤研究所)

制备细胞膜可用①组织中的细胞；②悬浮培养的细胞；③单层培养的成纤维细胞。成纤维细胞与前两种细胞不同，它是贴在培养基上生长(贴壁生长)，细胞薄且大，所得细胞种类纯。悬浮培养的细胞较圆又小，所得细胞也较纯。从组织中分离得到的细胞，不易获得较纯的。

细胞打碎后，依其大小可分为：1. 大片(Sheet)是几微米(μ)到10微米或更大的。由于只有细胞膜能形成片，如能纯化，则纯度较高。2. 小片(fragment)约5微米，或更小。3. 颗粒小泡(Vesicle)1微米或小于1微米。显微镜下观察，有如针尖大小。其大小较均匀，密度较一致。

大片和细胞核易混在一起，不易分开，且不易匀浆。因此常利用 FMA (Fluorescein Mercuric acetate) 处理，也可用 MA 处理。处理后细胞的一面贴在瓶壁上，游离面的胞壁可以全部分离掉，因而可得到大片的细胞膜。不足的是 FMA 有固定硬化作用，细胞膜成片后就不易再打碎。

在研磨制取颗粒小泡时，其他细胞器也可能被磨碎，彼此不易分开。故取细胞膜以做成小片为最好。需要时小片还可再做成小泡。

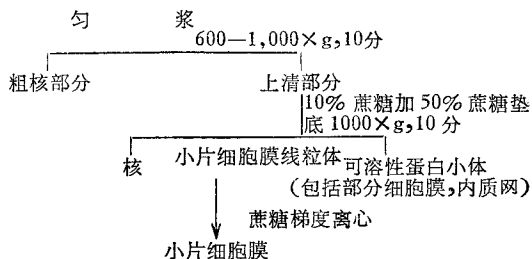
破碎细胞可采用多种物理方法。如用 N_2 的空化作用(Cavitation)，即在盛细胞的容器中充氮，加大压力(500—1000 磅/平方寸)，使细胞中溶解的 N_2 增加，然后突然减压，则溶解的 N_2 变为气泡，将细胞涨破，即可得到很好的小泡。这样一次处理，所得碎片可以较好地保持细胞膜原来的状态，因此是一种较为有效的方法。

一般用匀浆法分离细胞，多先进行低渗处理，再匀浆，这样细胞易被磨碎。低渗液用 Tris 缓冲液(1—10mM)为宜。最常用 Dounce 匀浆器(包括 A 及 B 型二种)及 P-E 匀浆器。接触面前者较小，后者较大，制取小泡多用后者。匀浆次数越多，小泡越小，次数少，则有大片膜。匀浆后须在相差显微镜下检查破碎程度。根据打碎情况决定研磨的次数。匀浆不仅要求细胞破碎，还要形成的细胞膜片大小一致，以便分离。小

泡主要成份是脂质(Lipid)和蛋白质。脂质密度低，易于分离。

匀浆时需注意二点：①在细胞质中最多的网状组织是内质网，占细胞的 20—30%。内质网也是一种膜，细胞破碎时它也可形成小泡，而且密度和细胞膜近似，故二者容易相混，分离时不易把它去掉。②选用什么缓冲液很重要，使用不当，匀浆容易凝结，很难再分离。有时细胞核破碎，染色质从核里出来，使匀浆更粘，也不利于分离。为此，可在缓冲液中加一些 Ca^{++} 、 Mg^{++} ，使细胞核固定，减小其脆性，使之在分离过程中，不易破碎。缺点是加入二价的 Ca^{++} 及 Mg^{++} 后，匀浆变粘，使细胞膜与高尔基体及小泡粘在一起，不易分离，有时需加 EDTA 以便消除 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的作用，但伴随而来是使 5' 核苷酸酶的活性消失(鉴定常使用 5' 核苷酸酶为指标)。最好是用碳酸氢钠，成纤维细胞用碳酸氢钠溶液做介质，其酶的活性不受影响；用 Tris-EDTA 也可以。

制得匀浆物后，首先进行差速离心。要分离出小片细胞膜，有一简易方法，即 600—1000 $\times g$ 差速离心 10 分钟后，去掉细胞核及可溶性蛋白、线粒体及内质网部分，再用蔗糖梯度离心分离。步骤如下：



鉴定细胞膜，一般用酶法或同位素法。

酶法 目前尚无一个表示细胞膜纯度的指标，只能用浓缩度(enrichment)表示。鉴定浓缩度(酶活力/每毫克蛋白质)的标志酶必须是外酶。而实际上很难找到仅存在于膜上而不在细胞内的酶，因为膜上的蛋白质是在细胞内合成后再转到膜上的。因此，需找出有特异活性的质膜酶。确定质膜酶的方法是先测完

整的单层培养细胞,某一酶的活力,然后再测定破碎细胞分离膜的酶活力,如果后者强于前者,则表明细胞内存在这种酶,如果两者无大差别,表明酶只存在于细胞膜上,即可确定为膜的标志酶。这类标志酶有 5'-核苷酸酶,磷酸二酯酶、(Na⁺K⁺)ATP 酶等。

酶测定法有其缺点,①标准的细胞膜酶较难找到;②经过试剂处理,机械磨碎、离心及蔗糖梯度离心等步骤,酶活力容易受影响。因此,在匀浆前后,均需测定酶活力,以便对照检查。因处理过程易造成酶失活,实际的酶活力应大于实测的数字。③成纤维细胞膜的分离采用小泡形式较好。小泡内可能含有可溶性蛋白质及细胞膜标志酶。这些东西影响测定结果,即影响细胞膜浓度计算上的准确性。

同位素法 一般直接或间接用 ¹²⁵I 标记细胞膜。膜上的蛋白质的 —NH₂, —SH, 经氧化作用与 ¹²⁵I 联在一起。然后测定匀浆中 CPM/mg 及分离出的细胞膜的 CPM/mg, 从而得到浓度。

同位素法存在一些缺点:①由于细胞膜成份经常有转换,膜上的 ¹²⁵I 能被带入细胞内,这时做 CPM 测定到的浓度就较低。为减少这种影响,标记操作需在低温(4℃)进行,时间应尽量短,并尽快进行匀浆。②材料中或多或少会有死细胞,¹²⁵I 和乳酸过氧化物酶能进入其中,因而非细胞膜的部分被标记上了。③¹²⁵I 标记细胞膜常以酶为媒介,常用的是乳酸过氧化物酶,通过这个酶可形成 ¹²⁵I₂,一部分 ¹²⁵I₂ 进入细胞内,与高尔基体、内质网的脂类结合,这样就又使浓度加大,增加了误差。

由于匀浆时内质网可能附着到细胞膜的片断上,结果也会降低细胞膜的浓度。在分离过程中,核、小体及片膜(fraction)中都不同程度地标记有 ¹²⁵I。实际上,核、小体或线粒体上都可能附有细胞膜的小泡或小片。

总之,评价上述两种方法,不能简单地根据所测得的数据;有时浓度大小并不一定真正反映方法有效。

最后结果,应以浓度和产量共同表示。虽然在细胞膜的分离制备方面已做了许多改进,但得到的样品,仍不可能很纯。根据酶活力及 CPM 测定,细胞膜经分离后一般要损失约 50%。细胞的形态如何,对产量有影响,例如,都是单层培养细胞,但人类成纤维细胞薄,膜与质的比高于 L₉₂₉ 细胞,其细胞膜的产量就可能高于 L₉₂₉, 最高浓度也就不同,可以由几倍到几十倍;一般可用的浓度,是十倍左右。在不知实际的细胞膜重/细胞重时,可根据细胞情况做合理估计。

分离得的细胞膜仅占细胞重量的 0.2—5%。制备细胞膜,需要的细胞数量相当大,悬浮培养及组织中的细胞多,数量上容易满足,而采用单层培养要得到大量细胞,过程很长,工作量大,且艰巨。下面介绍一种简化分离人成纤维细胞膜的方法:

将细胞用下述液体进行低渗处理 10 分钟。1mM NaHCO₃ 为低渗缓冲液;0.25mM PMSF (phenyl methylsulphonyl fluoride, 为蛋白水解酶抑制剂) 不溶于水,须先溶于 0.01% 二甲亚砜中,再溶在 NaHCO₃ 中。搅拌 2 小时左右,待细胞涨开后,用 1mM NaHCO₃ 做介质,手摇培养瓶即可把细胞分离下来,并能形成许多小泡,不必用匀浆器。

关于蔗糖梯度分离,一般可用陡度梯度。但在决定梯度之前,应该做连续密度梯度离心。因为实验开始前可能不知道细胞膜材料的密度。连续密度梯度离心为渐进的,例如蔗糖浓度为从 5%—50%。经离心 18—24 小时后,达到真正平衡,可求出密度,然后根据这种梯度,决定陡度梯度分离。

[北京市肿瘤防治研究所细胞生物研究室

赵孟莲 高 燕整理]

科技消息

用银染色聚丙烯酰胺凝胶上的核酸

这是一种快速,简单灵敏的染色技术,整个染色过程仅需 30 分钟,而灵敏度比溴化乙锭法至少提高 20 倍。它适用于变性 DNA、单链 DNA 和双链 DNA 片断。

因为凝胶上的指痕可被银染色,因此在取凝胶时必须戴聚丙烯手套。现将染色方法简单介绍如下:

1. 氨性硝酸银溶液的配制:在 40 毫升 0.1M NaOH 溶液中,加入 15M 氢氧化铵 3ml,再加 16%(W/V) 硝酸银水液 10ml,待最初形成的黑色沉淀物溶解后,加水到 200ml。

2. 把胶板浸入上述溶液中,10 分钟后倒去氨性硝酸银溶液,胶板进一步用蒸馏水冲洗 2—5 分钟。

3. 最后将凝胶浸泡在 500ml 含有 5ml 1%(W/V)

析鲜配制的柠檬酸溶液和 0.5ml 35% 甲醛的蒸馏水中振荡,DNA 带在 3—5 分钟内开始显现,10—20 分钟后显示完毕。要检测 0.001—0.005 微克相当于 500 个碱基对的 DNA,最合适的浸泡时间是 20 分钟。

4. 如将凝胶放入 45% 甲醇,10% 醋酸中即可停止染色。在氨性硫酸铜和硫代硫酸钠混合液(15M 硫代硫酸钠 100ml 与等体积 0.15M 硫酸铜/0.6M 氯化钠/0.9M 氢氧化铵混合)中浸泡 2—10 分钟,带重叠区域即部分脱色,如适当延长浸泡时间可达到完全脱色。用大量蒸馏水冲洗并在 50% 的甲醇中平衡后,可再用银复染。欲停止脱色,可用 10% 柯达清洁剂。

[J. of Biochem. and Biophys. Methods,

5, 219, 1981 马顺富摘译]