子显微镜的研究还说明，膜双层结构随年龄发生着变化。看来，这种变化和膜上酶活性的年龄改变存在一定联系。

很早就有人报道[10]、不同年龄红细胞抗低渗的能力不同，认为可作为分离不同年龄红细胞的基础。以后由于超速离心技术的发展，人们大都把注意力集中到按比重差异来分离不同年龄的红细胞以制备膜。但离心法设备昂贵，往往耗时过长。分子筛方法却可有效而简便地利用抗低渗能力的差异这个特点而分离不同年龄的红细胞膜。

Luthra 等最近报道[5]，红细胞膜可能存在三种不同形式的 Ca^{2+}、Mg^{2+}ATPase，其中只有两种能与胞浆中调钙蛋白结合而被激活，这两种形式的酶表现出最大活性的钙离子浓度是不同的，一为低钙浓度、一为中等钙浓度。随着红细胞衰老，可能由于丧失了在低钙浓度表现出最大活性的 Ca^{2+}、Mg^{2+}ATPase，使得酶活性随年龄而下降，但调钙蛋白的激活百分数却随年龄增加[11]，本实验结果说明，分子筛和超离心法一样都证实了这一事实（表 3），这就进一步说明两种方法分离的膜具有相同性质。

因此我们认为分子筛分离红细胞膜不仅简易可行，而且还可用来分离不同年龄的红细胞膜。

本文电镜样品的包埋由王浩副教授协助进行，照片、图版由张德宁、岳江和王竟成等同志制备，特此致谢。

参 考 文 献

[1] Fröman, G. et al.: *Prep. Biochem.*, **10**, 59, 1980.
[2] Fornaini, G.: *Eur. J. Biochem.*, **7**, 214, 1969.
[3] Kachmar, S. F.. *in Foundamentals of Clin, Chem.*, (Tietz, N. ed) 268, 1970.
[4] Ellman, G. D. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88, 1961.
[5] Luthra, M. G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 467, 1980.
[6] Hanaham, D. J. et al: *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**(1), 170, 1978.
[7] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **191**, 265, 1951.
[8] Hanahan, D. J. et al.: *Methods in Enzymol.*, **31**, 168, 1974.
[9] Murphy, J. H.: *J. Clin. Med.*, **82**, 334, 1975.
[10] Mark, P. A. et al.: *J. Clin. Invest.*, **37**(11), 1542, 1959.
[11] Luthra, M. C. et al: *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 480, 1980.

[本文于 1983 年 5 月 11 日收到]

L_{7811} 白血病细胞质膜的分离和鉴定

甘午君　温世鼎　褚建新　覃 智　刘扬椅　叶淑琴

（中国医学科学院血液学研究所）

近年来，许多研究表明细胞表面的变化对恶性肿瘤的发生起着重要的作用。在癌变过程中，细胞组分及酶系统的变化，反映在细胞膜的性质和抗原的改变最后导致细胞“接触抑制”的丧失及分化增殖异常。因此分离和鉴定细胞膜恶性标志物，可为探讨癌变机理提出一些线索；为临床诊断和治疗寻找新的途径；并可为生物膜分子生物学的研究提供资料和依据。

本文用小鼠腹水型 L_{7811} 白血病细胞为材料，以冻溶及蔗糖分级梯度离心法分离质膜，并对其 5′-核苷酸酶等膜结合酶的活性，膜蛋白组分，胆固醇/磷脂克分子比以及磷脂类型等进行分析测定。结果显示一定的肿瘤细胞生化特征，其中有的变化可能是肿瘤细胞膜有关的标志物。

一 材料和方法

1. 质膜的分离

（1）分离 L_{7811} 白血病细胞　采用近交系 615 小鼠接种 L_{7811} 白血病细胞，8 天后取腹水，经 3000rpm 低温离心 15 分钟，分离细胞，用 0.15*M*NaCl 洗涤三次，含有少量红细胞用 0.05

*M*Tris-NH_4Cl溶液（pH7.0）溶破，经3000rpm离心10分钟后，用0.05*M*Tris-HCl（pH7.4）溶液洗涤两次，经镜检95%以上是活细胞（2—3 × 10^8细胞/ml）。

（2）破碎细胞及去除细胞核　以上细胞用CO_2干冰冻溶三次，每毫升细胞悬浮在10ml匀浆介质（0.05*M*Tris-HCl pH7.4，0.005*M* $MgCl_2$，0.05m*M* $CaCl_2$）中，用玻璃匀浆器温和地匀浆16—18次，用相差显微镜检查，可见大多数细胞已破碎，而细胞核能完整保留。所得细胞匀浆、经3000rpm离心10分钟，分得上清液，沉淀再悬浮于匀浆介质中，离心5分钟，合并上清液，加入60%蔗糖使成含10%蔗糖。

（3）用蔗糖分级梯度离心分离质膜　将含10%蔗糖上清液加在不连续蔗糖梯度（7ml45%蔗糖及14ml30%蔗糖）体系中，经40,000rpm离心1小时，收集10%—30%及30%—45%介面层，用蒸馏水稀释至含15%蔗糖悬液，再经40,000rpm离心30分钟，即得质膜。悬浮于15%蔗糖中，低温存放。

2. 几种膜酶活性的测定

（1）5′-核苷酸酶　参照Michell RH法[1]，以5′-磷酸腺苷为底物，在0.6ml反应液中含50 μM Tris-HCl（pH7.5），10μM $MgCl_2$，10μM5′-磷酸腺苷和30—40 μg膜蛋白，混匀后37℃保温30分钟。测定释放无机磷含量。酶活单位 = 1μM 无机磷/mg膜蛋白/小时。

（2）葡萄糖-6-磷酸酶　参照Tsai CM法[2]，以6-磷酸葡萄糖为底物，在0.5ml反应液中含20μM6-磷酸葡萄糖钠（pH6.5），17.5μM组氨酸（pH6.5）及2μM Na-EDTA（pH7.0）。加入50μg膜蛋白，37℃保温30分钟，测定释放无机磷。酶活单位 = 1μM 无机磷/mg膜蛋白/小时。

（3）琥珀酸脱氢酶　参照Azoulay法[3]，用100μl膜样加入1.2ml Tris-HCl缓冲液（20m*M* pH7.0含有1%牛血清白蛋白），再加入0.1ml 1%细胞色素c，混匀后加入底物溶液（含50m*M*琥珀酸钠和10m*M* KCN）0.4ml，立即摇匀，用550nm波长测定光密度，计算酶活性。

3. 蛋白含量测定

按Lowry法[4]进行，以人血清白蛋白为标准。

4. 质膜蛋白 SDS-PAG* 电泳

参照Fairbanks及Schwiodt-Ollrich[5]法，采用7.5%丙烯酰胺，0.2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺，1% SDS，0.15%过硫酸铵，0.05%四甲基二乙胺制胶。膜悬液0.3ml（2—3 mg膜蛋白/ml），加入20% SDS 0.2ml，0.1ml二硫苏糖醇处理，每管加样30—50μg膜蛋白，电泳缓冲液0.04*M* Tris-HAC pH7.4，含0.2% SDS；电流为8mA/管（7 × 110mm），用考马斯亮光蓝染色后，选用波长570nm，以光密度计CS-900（日）扫描并计算各组分%含量。

5. 质膜脂质的提取和分析

脂质用氯仿：甲醇 = 2:1（V/V）混合溶剂提取后，在氮气流下蒸馏除去溶剂，干燥即得。

胆固醇的测定　按Zak法[6]进行。

磷脂的测定　膜样加入$HClO_4$，在180°消化后，测定释放无机磷，再计算磷脂含量，进一步计算胆固醇/磷脂（Ch/PL）克分子比。

磷脂酰分类　用薄层层析法，以硅胶G制板，展开剂用氯仿：甲醇：醋酸：水 = 25:15:4:2，样品展开后，置碘蒸气中显色，以CS-900（日）光密度计扫描测定各组分百分含量，选用波长550nm。分别用标准磷脂（PC，PE，SM，PI，PS）及Ch鉴定各组分。

二　结　果

1. L_{7811} 细胞及质膜扫描电镜观察

L_{7811}细胞及分离L_{7811}质膜碎片作扫描电镜观察，结果见图1（封3）。

2. L_{7811} 细胞质膜的化学组分及酶活性

对L_{7811}细胞质膜及全细胞匀浆的蛋白、脂质、Ch、PL含量，Ch/PL，5′-核苷酸酶，葡萄糖-6-磷酸酶及琥珀酸脱氢酶活性等分别进行测定，结果见表1。从测定结果可见质膜中5′-

* SDS-PAG 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

表 1 质膜化学组分及酶活性测定结果

	蛋白	脂质	Ch	PL	Ch/PL	5′-核苷酸酶		葡萄糖	-6-磷酸酶	琥珀酸脱氢酶
	mg/10^9细胞	mg/10^9细胞	mg/10^9细胞	mg/10^9细胞	(克分子比)	μM/mg/h	比活	μM/mg/h	比活	比活
全细胞匀浆	100.26±10.11*	18.00±1.20	1.38±0.15	4.44±0.56	0.61	74.3±5.4	1	89.4±5.6	1	1
质膜	2.00±0.24	1.14±0.11	0.15±0.01	0.44±0.06	0.66	729.2±40.8	10	938.1±28.2	4.9	0.2

* 平均值±标准误

核苷酸酶活性比全细胞高约 10 倍；葡萄糖-6-磷酸酶活性比全细胞高近 5 倍。

3. 质膜蛋白 SDS-PAG 电泳分析

从图 2 可分辨出 30 余条区带，质膜蛋白组分与全细胞组分比较，其中有几种组分分布不同，从图 2 可见质膜中分子量分别为 220,000，150,000，750,00，及 40,000，等四种组分多于全细胞的组分，明显集中分布在质膜上，全细胞蛋白组分中亦有几种组分多于质膜。

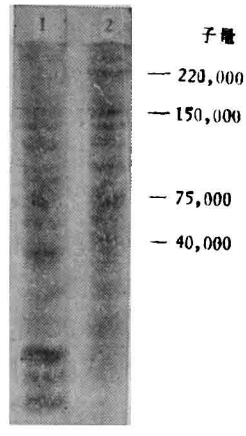


图 2 L_{7811} 质膜蛋白组分 SDS-PAG 电泳图谱
1. 细胞匀浆 2. 质 膜

4. 磷脂分类测定结果

采用薄层层析法，在质膜及全细胞匀浆脂质中各分离 6 种组分，经标准品鉴定结果含有 PE，Ch，PC，PI，SM 和 PS。经光密度计扫描计算各组分 % 含量，见表 2。比较其组分的分布情况，SM 及 PS 分布在质膜上较全细胞多，PE 及 PC 则少于全细胞。

表 2 L_{7811} 细胞质膜及全细胞膜质组分百分含量

	脂质组分					
	PE	Ch	PC	PI	SM	PS
全细胞匀浆	28.5±2.6*	18.2±1.5	24.1±1.4	17.7±1.2	9.6±0.8	1.8±0.2
质 膜	22.1±2.0	17.0±2.2	19.6±2.0	16.8±1.1	18.9±1.5	5.7±0.6

* 平均值±标准误

三 讨 论

采用冻溶、低渗及匀浆相结合的方法破碎 L_{7811} 细胞，以蔗糖分级梯度离心分离细胞质膜，可得膜制品 (2—3mg 蛋白/ml)。用一般作为细胞质膜的标志酶—5′-核苷酸酶活性鉴定其纯度，测定结果在 L_{7811} 质膜中此酶活性比全细胞匀浆增大 10 倍，说明用本方法制备的质膜具有一定纯度。目前认为葡萄糖-6-磷酸酶也是肿瘤细胞膜的标志酶之一，L_{7811} 细胞质膜中此酶活性也比全细胞增高 4.9 倍。但分离的质膜中有少量琥珀酸脱氢酶活性，此酶一般作为微粒体的标志，所以膜制品中混有少量微粒体，如重复一次蔗糖梯度离心，可以除去污染。

对质膜蛋白组分进行 SDS-PAG 电泳分析结果看来，有 30 余种组分，其中分子量分别为 220,000，150,000，75,000，及 40,000 的四种组分的含量明显大于全细胞匀浆的含量。Robbin

等曾报道[7-9] 肿瘤细胞膜上存在分子量为210,000、145,000, 96,000, 75,000的蛋白组分，与 L_{7811} 质膜中含量较多蛋白组分有相似处。其中哪些组分确属肿瘤细胞膜特异而共有的，值得进一步与不同来源的正常细胞进行比较研究。

根据 Bergelson 报道[10] 淋巴细胞白血病患者细胞膜脂质流动性大于正常淋巴细胞，可能由于患者淋巴细胞中 Ch/PL 比小于正常所致。本文作者曾测定正常 615 小鼠胸腺及脾细胞中 Ch/PL 比，为 0.81，经鉴定 L_{7811} 白血病细胞亦属淋巴细胞，在本文测定 L_{7811} 细胞及质膜中 Ch/PL 比分别 0.61 和 0.66，均低于正常淋巴细胞测定结果，说明此参数可能作为某些肿瘤细胞膜的生化特异指标。

生物膜上磷脂的分布是与胞浆不同，从本文结果亦可看出在 L_{7811} 质膜中 PS，SM 的分布多于全细胞；但 PE 及 PC 的分布则较少。再有在 L_{7811} 白血病细胞质膜中具有较高含量 PS 及 SM，也不同于正常淋巴细胞。磷脂是一些酶的主要激活剂之一，质膜上磷脂组分含量及分布异常，也能影响膜结合酶如腺苷酸环化酶，ATP 酶及葡萄-6-磷酸酶等酶系统的活性，因此影响细胞生成的调节系统，从而引起细胞分化，增殖异常。所以对 L_{7811} 细胞膜磷脂含量异常的意义，也是值得进一步研究的问题。

总之，采用腹水型 L_{7811} 白血病细胞分离质膜，取材方便，细胞来源多，用蔗糖分级梯度离心所得质膜制品，经 5′-核苷酸酶等质膜标志酶的鉴定看来，具有一定纯度。在其质膜中某些蛋白组分，Ch/PL 克分子比值，磷脂组分 PS 及 SM 的含量以及 5′-核苷酸酶，葡萄糖-6-磷酸酶活性等显示一定的变化，可能是肿瘤细胞质膜有关的生化标志物。因此认为 L_{7811} 白血病细胞质膜是可用作探讨细胞癌变机理和研究生物膜的结构和功能的一种适合材料。

参 考 文 献

[1] Michell, R. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 333, 1965.

[2] Tsai, C. H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **401**, 196, 1975.

[3] Azoulav, E. et al.: Biochem. Biophys. *Acta*, **110**, 301, 1965,

[4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.

[5] Fairbank, G. et al.: *Biochemistry*, **10**, 2606, 1971.

[6] Zak, B.: *Am. J. Clin. Path.* **27**, 583, 1957.

[7] Yamada, K. M: *Nature*, Vol. **273**, 355, 1978.

[8] Shiu, R. P. C. et al: *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3840, 1977.

[9] Robbin, R. et al: *Adv. Cancer Res.*, **22**, 203 1975.

[10] Bergelson, L. D. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **210**, 287, 1970.

[本文于 1983 年 3 月 16 日收到]

超低温含水生物样品电子显微镜技术

杨 振 藩

（中国科学院生物物理研究所）

现代电子显微镜的分辨力已达到 0.2nm，但用它观察生物结构，其分辨力几乎要低一个数量级。目前电镜观察生物结构的最好记录是对紫膜结构的研究[1]，能显示 1nm 的规则结构，表明紫膜具有二维结晶性质。对无规则生物结构的观察，以核糖体为例[2]，其分辨力只及 3—5nm。因此，目前生物样品电子显微镜分析技术的发展，电镜分辨力不是一个限制因素，许多实验说明主要限制是生物样品制样方法不完善及观察时电子束对样品结构的破坏效应[3]。

低温电镜技术可以解决以上二个限制因素。因为电子束对低温样品损伤小，另一方面冰冻制样省去了常规制样的固定，脱水、包埋等过程，明显减少了制样损伤。目前这一技术受

〈融合细胞质膜内化与过剩的估算〉一文的图

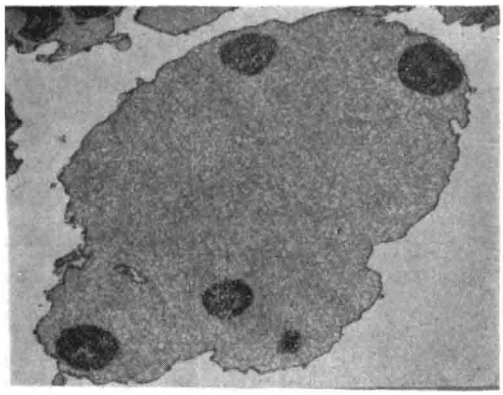


图 1　鸡红细胞自融的同核体，(胞浆膨胀)(4100×)。

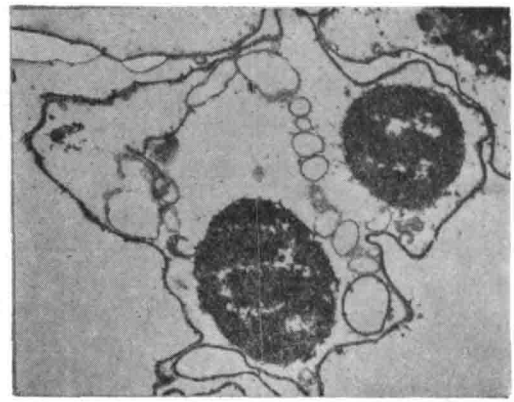


图 2　鸡红细胞融合形成的血影（内化质膜明显可见）(11000×)。

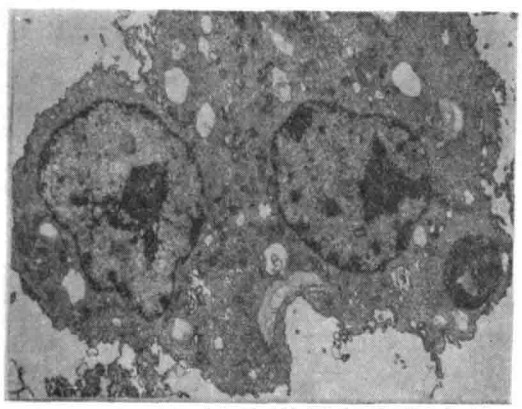


图 3　艾癌与红细胞的异核体(融合过程尚未完成)(4450×)。

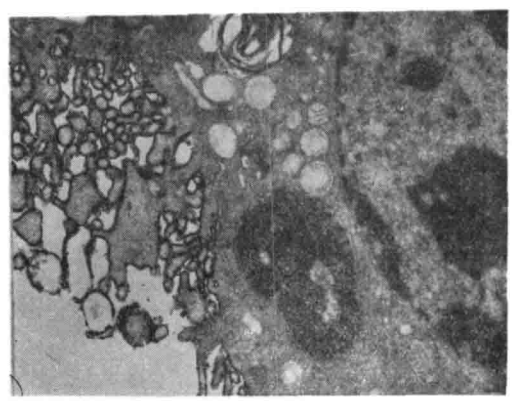
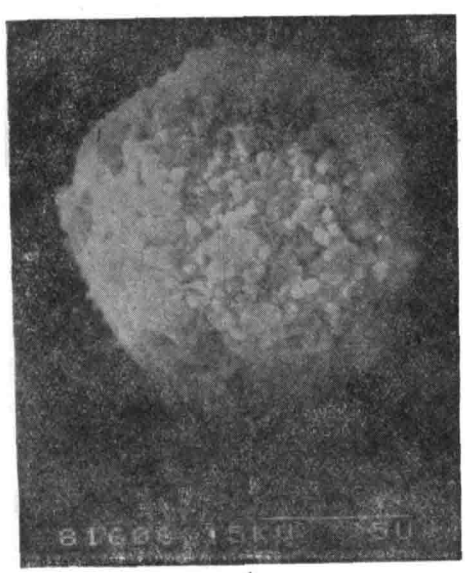


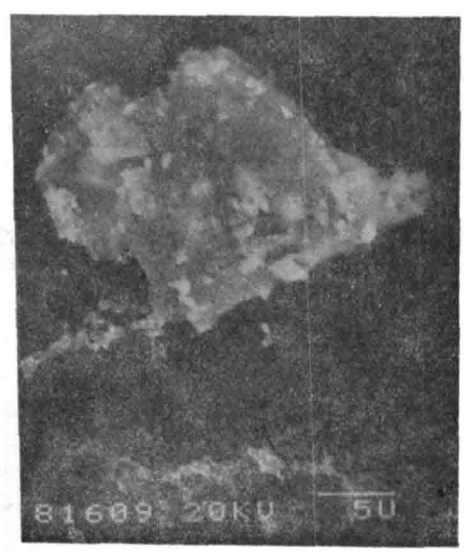
图 4　大融合细胞局部表面的胞浆微突(14000×)。

〈L_{7811} 白血病细胞质膜的分离和鉴定〉一文的图



A

A：L_{7811} 细胞（9600×）



B

B：L_{7811} 细胞质膜片段（9600×）

图 1　L_{7811} 细胞及质膜扫描电镜图