

猪红细胞膜中铜锌超氧化物歧化酶存在的初步观察

王少华 范秀娣 鲁 瑜

(苏州医学院生化教研室)

提 要

将猪红细胞分离纯化所得的 SOD, 免疫家兔, 获得 SOD 抗体, 再制备为荧光抗体, 成功地标记在猪红细胞膜中的 SOD 上。

铜锌超氧化物歧化酶 (Cu, Zn-Superoxide Dismutase, SOD) 在红细胞中含量较多, 它可清除部分载氧血红蛋白产生的超氧化物阴离子 (O_2^-), 起保护红细胞的作用^[1]。自从 McCord 和 Fridovich 从牛红细胞中分离出此酶后^[2], 对不同动物的红细胞和组织中的 SOD 研究较多^[3], 而对细胞膜中 SOD 的存在及其保护膜层的作用研究较少。采用荧光抗体法直接显示细胞膜中的 SOD, 国内外尚未见报道。本文主要采用荧光抗体法标记红细胞膜中 SOD, 为研究细胞膜疾病与 SOD 的关系建立基础。

材 料 与 方 法

异硫氰酸荧光黄 (FITC) 上海二军大朝晖药厂产品; NBT (氯化硝基四氮唑蓝) 上海前进试剂厂产品; Sephadex G-25 Pharmacia 产品。其余试剂为分析纯。

1. 猪红细胞膜的制备 基本按 Hoogveen 法^[4]。取柠檬酸盐抗凝的新鲜猪血液, 离心收集红细胞, 用生理盐水洗涤后, 再用低渗磷酸钠缓冲液 (0.01mol/L, pH7.4, 含 1mmol/L EDTA) 使之充分溶血。离心收集细胞膜, 再用上述缓冲液反复洗涤, 得到乳白色的细胞膜。将未经溶血的红细胞和制备的红细胞膜置于相差显微镜下, 以比较观察制备的细胞膜中是否杂含有红细胞。见图 1。

2. 红细胞膜中 SOD 活性的检测 取制备

的红细胞膜, 用氯仿-乙醇混合液抽提^[5], 离心后取上层液浓缩, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 并经 NBT 活性染色^[6]。见图 2。

3. 荧光抗体的制备 用本实验室制备的猪红细胞 SOD^[7] 免疫家兔, 制备 SOD 抗体^[8]。经琼脂双扩散, SOD 与抗体间呈现单一的沉淀线, 见图 3。用异硫氰酸盐荧光黄 (FITC) 标记抗体^[9], 并经 Sephadex G-25 过滤以除去游离荧光素, 收集已标记的荧光抗体。

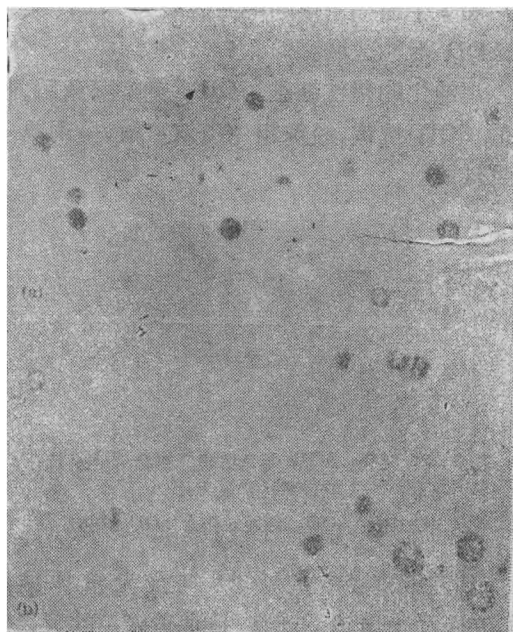


图 1 猪红细胞(a)和制备的猪红细胞膜(b)的相差显微镜照片 (800×)

4. 用制备的猪红细胞膜加上上述荧光抗体, 在 37℃ 水浴中振荡 30 分钟, 离心收集细胞膜-荧光抗体沉淀, 用磷酸缓冲液反复洗涤, 去除游离荧光素后, 将细胞膜沉淀, 置荧光显微镜下观察荧光抗体标记的 SOD。见图 4。

结果与讨论

完整的猪红细胞为圆形, 边缘整齐, 大小较均一, 中间不透明(图 1a)。制备的猪红细胞膜呈扁圆形, 边缘不整齐, 大小不均一, 中间透明, 其中不杂含红细胞(图 1b.)。

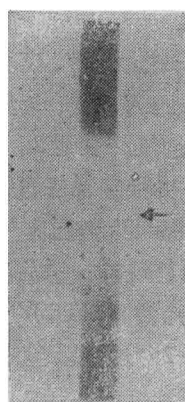


图 2 红细胞膜中 SOD 经 PAGE 后的酶活性染色照片
T⁺ 7.5%; Tris-Glycine
pH8.3; 电流 3mA/管

图 2 中箭头所指的明亮区域为 NBT 染色的 SOD 活性区域。

用纯化的猪红细胞 SOD, 免疫家兔后, 制备的 SOD 抗体, 经琼脂免疫双扩散, 呈现单一的沉淀线。

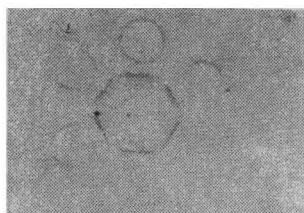


图 3 猪红细胞 SOD 与兔抗猪红细胞 SOD 抗体的琼脂双扩散照片

中心孔为 SOD, 外周 6 孔为 SOD 抗体

猪红细胞膜中的 SOD 与荧光抗体结合后, 在荧光显微镜下观察, 呈现黄绿色的荧光点(图中单箭头所指; 双箭头为游离荧光素), 由此证明猪红细胞膜中存在铜锌超氧化物歧化酶。

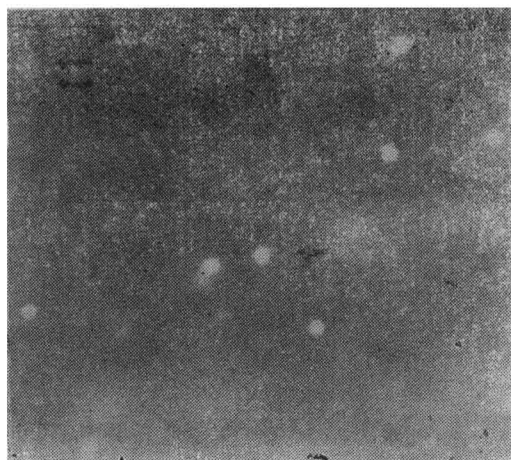


图 4 猪红细胞膜中的 SOD 与荧光抗体结合后的照片

红细胞膜中的 O_2^- , 可引发其它“活性氧”($\cdot OH$, H_2O_2) 的产生^[10], 它们与细胞膜脂质发生过氧化作用, 产生过氧化脂质及其分解产物醛和醇等, 致使细胞膜中的结构蛋白及酶等物质发生交联聚合, 从而破坏细胞膜, 引起溶血^[11]。上述实验用 SOD 荧光抗体标记和 NBT 染色的方法, 均证实猪红细胞膜中含有 SOD, 它对防御 O_2^- 对细胞膜的破坏, 起着十分重要的作用。

参考文献

- [1] Hodgson, E. K. et al.: *Biochemistry*, 1975, 14, 5294.
- [2] McCord, J. M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6049.
- [3] Larry W. Oberley: *Superoxide Dismutase*, CRC Press, U. S. A., 1982, Vol. I, 14—16.
- [4] Hoogveen, J. T. et al.: *Membrane Biol.*, 1979, 3, 156.
- [5] Petkau, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, 645, 71.
- [6] Beauchamp, C. et al.: *Anal. Biochem.*, 1971, 44, 276.
- [7] Wang Shaohua(王少华) et al.: *International Meeting on Biochemistry Abstract*, Beijing, 1987, p. 85.
- [8] Clausen, J.: *Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 1981, 218—222.
- [9] Goldman, M. et al.: *Fluorescent Antibody Methods*, Academic Press, 1968.
- [10] Cohen, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 2447.
- [11] Hochstein, P. et al.: *The Red Cell: Fifth Ann. Arber Conference*, New York, AR Liss Inc., 1981, p. 449.

[本文于 1987 年 11 月 28 日收到]