

表1 一步肝素琼脂糖柱层析法结果 (50 克菌体)

步 骤	活力体积(毫升)	总活力(单位)	总蛋白量(毫克)	比 活 (单位/毫克蛋白)
粗提液			1900	
肝素琼脂糖柱层析	65	97500	12.1	8058

得率: 1950 单位/克 (湿菌)

表2 Greene 法的步骤和结果 (50 克菌体)

步 骤	活力体积(毫升)	总活力(单位)	总蛋白量(毫克)	比 活 (单位/毫克蛋白)
粗提液			2160	
磷酸纤维素柱层析	96	96000	73.9	1299
羟基磷灰石柱层析	48	48000	5.7	8421

得率: 960 单位/克 (湿菌)

性内切酶的提纯工作。他们在纯化 Bgl I 等酶时,先用聚乙烯亚胺除去核酸,然后用硫酸铵分部沉淀,再进行肝素琼脂糖柱层析。我们认为肝素是聚阴离子化合物,具有强负电性,能和许多含阳离子的生物物质结合。核酸的等电点比较低,在我们的实验条件下一般是不会与肝素相结合,故可省去除核酸这一步骤。肝素琼脂糖柱除杂蛋白的能力亦很强,许多杂蛋白或不结合于柱上,或可在低盐浓度下洗脱,而多数限制性内切酶要在相当高的盐浓度下才能被洗脱,所以硫酸铵分部沉淀也可省去。

本文所介绍的一步法与 Greene 法相比,所得酶的比活相似,酶的质量相似,但酶的得率要高 1 倍左右。同时此法还有以下优点:实验手续简化;亲和吸附剂吸附容量大,柱床体积和洗脱体积较小,所得酶的浓度亦较高;柱流动性

好;层析柱再生方便,稳定性好,可反复使用数十次;层析过程中配基与酶结合对酶的稳定性有一定的保护作用。我们认为此一步法也可适用于其它一些限制性内切酶的提纯。

参 考 文 献

- [1] Greene, P. J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5, 2373, 1978.
- [2] Baksy, K. et al.: *Biochemistry*, 17, 4136, 1978.
- [3] George, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 5, 2223, 1978.
- [4] 中国科学院生物化学研究所代谢调节控制组:《生物化学与生物物理进展》, 1976年 1 期, 24页。
- [5] 戚德芳等:《生物化学与生物物理学报》, 1981年, 13卷, 275页。
- [6] Sica, V.: *Biochemistry*, 18, 2369, 1979.
- [7] Lowry, O. H., et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [8] Bickle, T. A., et al.: *Nucleic Acids Res.*, 4, 2561, 1977.

[本文于1983年12月5日收到]

人红细胞膜唾液酸的测定

董 伟 沈定国 李新建

(中国人民解放军总医院酶学实验室, 北京)

大多数哺乳动物的细胞膜(包括红细胞膜)含有糖蛋白。唾液酸是糖蛋白末端糖的残基,位于细胞的外表面,参加细胞的识别,粘着和接

触抑制^[1]。唾液酸也是循环系统中红细胞存活的主要决定因素,它在正常红细胞的衰老以及衰老细胞被清除中起着关键作用^[2]。红细胞唾

液酸含量减少,将增加细胞的凝集,促进溶血,并可改变抗原和抗体的性质。国外文献报道某些溶血性疾病^[3]、肌肉病^[4]、心肌梗塞^[5]等患者红细胞唾液酸的含量有改变。国内有人测定了血清中唾液酸的含量^[6],但对细胞膜表面唾液酸含量的变化报道很少。我们研究了此种变化以便为某些疾病的诊治及发病机理探索新的生化指标。

一、材料和方法

1. 红细胞膜的制备^[7]

取静脉血 2 ml,离心去血浆。再用等渗溶

液洗三次,然后加入预冷的 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4),使红细胞溶血,离心去血红蛋白,将红细胞膜再用 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4)洗三次,即可得到乳白色红细胞膜。用改良的 Lowry 氏法^[8]测膜蛋白。然后用双蒸水稀释至 1—2 mg 蛋白/ml 膜液,放 4℃ 冰箱备用。

2. 红细胞膜唾液酸的测定

先将 0.1ml 红细胞膜液用等量 0.1 N 硫酸水解,然后用文献 [6] 和 [9] 方法测定唾液酸。具体操作见表 1。

表 1 唾液酸测定程序

试 剂	空 白 管	标 准 管	样 品 管
N-乙酰神经氨酸 膜 液 0.1N 硫酸	— — 0.1	0.1 — 0.1	— 0.1 0.1
80℃ 水解 50 分钟			
双蒸水 25m M 过碘酸	0.4 0.25	0.3 0.25	0.3 0.25
37℃ 水浴 20 分钟			
2% 亚硝酸钠 0.1M 硫代巴比妥酸	0.2 2	0.2 2	0.2 2
100℃ 水浴 8 分钟、3000 rp 离心 12 分钟、弃沉淀			
乙二醇独甲醚	2	2	2
550 nm 波长比色			

(注:加液量为 ml)

二、实验结果

1. 有关方法学的几项指标

(1) N-乙酰神经氨酸标准曲线 将 N-乙酰神经氨酸用双蒸水配制成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 应用液,测定不同量标准液的光密度,绘制标准曲线,见图 1。

(2) 方法的精密度 取两份红细胞膜液,同时各测定 10 管,批内变异系数分别为 1.4 和 2.5。另取四份红细胞膜液,于不同时间,各测定 5 次,批间变异系数分别为 1.69, 2.13, 2.73, 1.15, 平均为 1.93 (表 2)。

(3) 方法的准确性 分别向 6 份混合红细胞膜液中加入已知量的 N-乙酰神经氨酸,进行

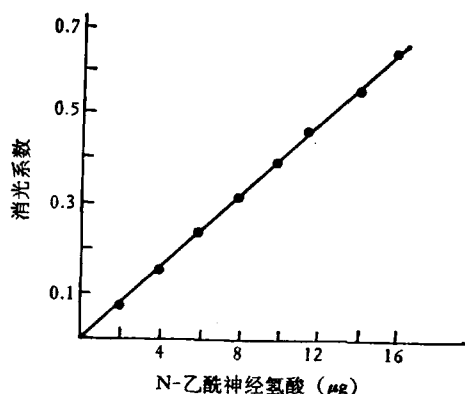


图1 N-乙酰神经氨酸标准曲线

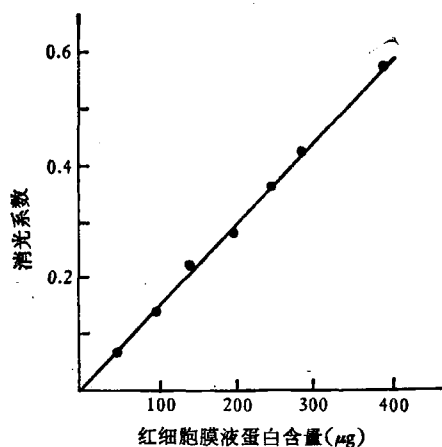


图2 红细胞膜用量的选择

回收试验,回收结果为 94.4—101.8%, 平均 98.1%。

表2 批内批间变异系数

	重复次数	唾液酸含量 (μg)		CV(%)
		平均值	SD	
批内 1	10	37.15	0.53	1.4
2	10	31.31	0.80	2.5
批间 1	5	39.66	0.67	1.69
2	5	35.56	0.76	2.13
3	5	32.22	0.88	2.73
4	5	27.02	0.37	1.15

表3.

表3 健康人红细胞膜唾液酸 (μg/mg 蛋白)

组别	年龄(岁)	例数	唾液酸
A	2—12	63	36.26±0.73
B	13—70	69	33.64±0.48

由表3看出A组唾液酸的含量比B组高7.8%,经统计学处理, t 值为3.024, $P < 0.01$,差别非常显著。

3. 某些疾病患者红细胞膜唾液酸的含量

共测定了34例,结果见表4。

从表3、4看出,术前胃及食道癌患者红细胞膜唾液酸含量比相应年龄对照组高23%。经统计学处理 $P < 0.01$,差别非常显著;术后10天红细胞膜唾液酸的含量恢复到正常。肺癌患者红细胞膜唾液酸的含量术前、术后均与

(4) 红细胞膜用量的选择 取不同量膜蛋白进行唾液酸测定,结果见图2。可以看出当每管膜蛋白含量在 0.4 mg 时蛋白含量与光密度呈很好的线性关系。

2. 健康人红细胞膜唾液酸的含量

选择无特殊病史,身体健康的献血员132人,男女各半,年龄2—70岁,进行测量,结果见

表4 病人红细胞膜唾液酸含量

分 组	例 数	唾液酸 (μg/mg 蛋白)	与年龄匹配组比较 (P 值)
胃、食道癌	9	41.30±4.03 ^a (32.60±3.0) ^b	<0.01
肺癌	6	34.20±0.40(33.88±3.19)	>0.05
心肌梗塞	5	20.69±2.71	<0.001
婴儿型脊肌萎缩	9	31.4 ±2.99	<0.05
肢带型肌营养不良	4	36.49±3.37	<0.05
萎缩性肌强直	1	52.5	

注:表中^a表示术前S.A含量,^b表示术后S.A含量

对照值无明显差别。急性心肌梗塞及婴儿型脊肌萎缩患者唾液酸含量分别比相应对照低38%、16%，经统计学处理 $P < 0.01$ ，差别非常显著。肢带型肌营养不良和萎缩性肌强直患者唾液酸含量分别比相应对照高8%、15%，差别显著。

三、讨 论

为了检验本方法的可信性，我们首先做了回收实验，回收率平均为98.1%。另外膜液不经酸水解，直接用它测定唾液酸的含量，结果证明我们所用的反应系统基本无其他物质干扰。此外，实验结果表明，0.1 N 硫酸80℃水解50分钟，550 nm 波长比色，这是测定红细胞膜唾液酸的最佳条件。

文献报道^[2,10]在红细胞的生命周期中，唾液酸的含量有变化，新生的红细胞唾液酸的含量比衰老的高。我们的结果是，健康人2—12岁红细胞膜唾液酸含量平均为36.26，13—70岁平均为33.78，其中59—70岁的3例平均为30.43，可见红细胞膜唾液酸含量随年龄变化。幼年机体由于生长发育的需要，新生的红细胞数超过衰老的红细胞，唾液酸的含量就高些。随着年龄的增长，新生的与衰老的处于平衡，膜唾液酸的含量也趋于恒定。年老时，血液中衰老的红细胞增多，膜唾液酸的含量相应减少，因此，红细胞膜上唾液酸的含量有可能是机体衰老程度的一项有意义的生化指标。

关于红细胞膜唾液酸的正常含量，文献报道很不一致，原因是多方面的，如膜的分离技术，唾液酸的测定方法，样品例数多少等，其中主要是分离技术。分离时如果不把富含蛋白酶

的白色沉淀物去掉，会导致测定值增加4倍^[4]。本实验室测得的唾液酸的正常值为33.64—36.26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白，与 Stibler^[4] 等的结果接近。此外，各作者用的单位也较混乱。我们认为唾液酸用 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白或 $\text{n mol}/\text{mg}$ 蛋白表示较为合适。

我们检查了15例癌症患者，发现消化道癌患者术前唾液酸含量明显高于正常，而术后10天即可恢复至正常水平。看来红细胞膜唾液酸含量有可能成为消化系统癌症监测的一种指标。

另外，我们还发现心肌梗塞，婴儿型脊性肌萎缩患者红细胞膜唾液酸含量比正常值明显降低，而肢带型肌营养不良和萎缩性肌强直患者，其红细胞膜唾液酸含量比正常值明显增高，说明上述几种疾病的患者红细胞膜的结构均有异常，但异常程度因疾病种类而不同。这些研究只是初步的结果。

参 考 文 献

- [1] Greig, R. et al.: *Bio-Systems*, **9**, 43, 1977.
- [2] Gattegno, L. et al.: *Biomedicine*, **30**, 194, 1979.
- [3] Chien, S. et al.: *Blood*, **43**, 445, 1974.
- [4] Stibler, H. et al.: *J. neurol. Sci.*, **59**, 389, 1983.
- [5] Hanson, V. A. et al.: *American Heart J.*, **99**, 483, 1980.
- [6] 中国医学科学院肿瘤防治研究所生化室:《肿瘤防治研究》, **1**, 27, 1978.
- [7] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》, **3**, 31, 1983.
- [8] Mary, A. K. M.: *Anal. Biochem.*, **87**, 206, 1978.
- [9] Aminoff, D. et al.: *Biochem. J.*, **81**, 384, 1961.
- [10] Balduini C et al.: *Biochem. J.*, **140**, 557, 1974.
- [11] 上海实验生物研究所译:《细胞生物学》, 科学出版社出版, 1977.

[本文于1983年12月5日收到]