

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院主编《医用生物化学》(下册) 1085 页, 1979 年。
- [2] William D. Bostick et al.: *Anal. Biochem.*, **88**, 78, 1978.
- [3] Horvath C. G. et al.: *Anal. Chem.*, **39**, 1422, 1967.
- [4] Kirkland J. J. *J. Chromatog. Sci.*, **8**, 72, 1970.
- [5] Iida, Y. *Japanese Journal of Hygiene*, **33**, 2,

- 410, 1978.
- [6] 《上海市药品标准》, 1980 年版(上册) p 25.
- [7] L. R. 斯泰德, J. J. 柯克兰著, 杨明彪等译《现代液相色谱法导论》**9**, 150, 1980.
- [8] Kirkland J. J. *Anal. Chem.*, **43**, 36A, 1971.
- [9] 堀川秀男: 《临床检查》**19**, 2, 188, 1975.
- [10] 中野昭一: 《诊断与治疗》**59**, 2, 366, 1971 年.
- [11] Bergmeyer. H. U. *Method of Enzymatic Analysis*, **4**, 1974.

[本文于 1983 年 1 月 15 日收到]

低速离心法制备人红细胞影泡的探讨

秦德安 何学民 左大珏 鲁心安*

(华东师范大学生物系)

关于人红细胞影泡的制备和性质, Schwoch 和 Passow (1973) 已有评述^[1]。分离红细胞质膜的一般方法是低渗溶血和高速离心分离, 即将人^[2]或哺乳动物^[3]红细胞在低渗溶液中溶血, 释放出血红蛋白, 然后反复洗去残留的血红蛋白, 所得红细胞膜即所谓红细胞“影泡”(ghosts)。

由于高速离心机设备目前国内尚未普及, 我们尝试在低速离心 (4°C , $1200 \times g$, 45 分钟) 条件下进行人红细胞影泡制备。并与高速法 (4°C , $20,000 \times g$, 40 分钟) 制得的影泡进行比较, 结果看到在形态和膜蛋白电泳图谱等方面都是相同的, 但膜蛋白产率较低, 约为高速离心法的 63%。

一、材料与方 法

1. 材料 柠檬酸钠抗凝的新鲜健康成人静脉血(由上海中心血站提供), 药品均为化学纯, 缓冲液用重蒸水配制, pH 经 pH-3 型酸度计测定。

2. 制备方法

(1) 制备人红细胞悬浮液 7 毫升抗凝血在 4°C $1200 \times g$ 离心 10 分钟, 吸去上清液并完全去除覆盖在红细胞沉淀上的一层白色绒毛状物质 (buffy coat), 这可避免其他细胞的

混入。然后用 0.9% NaCl 溶液洗涤红细胞二次, 最后一次洗涤的离心时间为 20 分钟。得压积红细胞 3 毫升, 悬浮在等体积的 0.9% NaCl 溶液中, 即 1:1 的人红细胞悬浮液。

(2) 低速离心法制备红细胞影泡 除离心速度不同外, 基本按 Dodge (1963) 方法^[2]进行。具体操作步骤是: 各取 2 毫升 1:1 红细胞悬浮液滴加到盛有 28 毫升 (4°C 冷却的) 5mM, pH8 的磷酸缓冲液 (简称 5P8), 10mM pH7.4 磷酸缓冲液 (简称 10P7.4) 和重蒸水 (pH6) 中, 待溶血后 (在 4°C 冰箱内放置 1 小时), 在日立冷冻离心机 4°C , $1,200 \times g$, 离心 45 分钟。仔细吸去上清液, 然后将沉淀分别悬浮在上述三种低渗液中 (约 40 毫升), 再在 4°C , $1200 \times g$ 离心 45 分钟, 以便洗去影泡中的血红蛋白。

如此洗涤三次后, 用 5P8 及 10P7.4 溶液所得的影泡样品接近乳白色, 重蒸水制备的影泡呈红色。

将上述三种影泡样品分别用原来溶血用的低渗溶液稀释到 10 毫升, 为 1:10 影泡稀释液, 供分析用。

(3) 高速离心法制备红细胞影泡 除离心条件是 4°C , $20,000 \times g$, 40 分钟外, 其他条件均与上述低速法相同。

* 汪志和、叶介明、谢维勤等同志曾参加部分测定工作。

3. 分析方法

(1) 血红蛋白测定按照 Dodge (1963) 采用的方法稍加修改。

(2) 膜蛋白含量测定, 以结晶牛血清白蛋白(上海产品)为标准, 按 Folin-酚试剂法^[4]进行。

(3) 乙酰胆碱酯酶活力用 Ellman 方法^[5]测定。

(4) 膜蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 按 Fairbank 方法^[6]在夹芯垂直平板型电泳仪(中国科学院动物研究所研制)上进行。

(5) 等密度梯度离心 如另文所述^[7], 按 steck (1970)^[8]方法进行等密度梯度离心, 介质为葡聚糖(分子量 70,000), 用 MSE prepspin-75 型超速离心机 (3×5 水平转头) 36,000 转/分, 4℃, 离心 16 小时。

(6) 形态观察 影泡样品用相差显微镜观察和摄影, 或将影泡样品稀释后固定在铜网上, 经磷钨酸负染色, 在国产 DXA₄-10 型电镜下观

察和摄影。

二、结 果

在 10P7.4, 5P8 和重蒸水 (pH6) 三种个同的低渗条件下, 分别对经低速和高速离心法制得的影泡进行了比较, 结果如下:

1. 生化分析

(1) 血红蛋白残留量 从表1我们可看到, 在 10 P7.4, 5P8, 和重蒸水 (pH6) 三种不同 pH 和离子浓度条件下制得的影泡, 其血红蛋白含量不同, 其中 5P8 和 10P7.4 制得的影泡含血红蛋白约占红细胞总血红蛋白的 0.02—0.06%, 而重蒸水制得的影泡含大量血红蛋白 (约占红细胞总血红蛋白的 0.4—0.5% 以上)。用低速法和高速法所得制剂中血红蛋白残留量相近。

(2) 膜蛋白产率 在高速离心法中每毫升压积红细胞可得膜蛋白 6 毫克左右, 而低速离心法则得约 3.8 毫克, 低速离心法的产率约为高速离心法的 63% (见表 1)。上述三种不同溶血

表 1 不同制备条件对血红蛋白含量、膜蛋白产率的影响

制备条件	10P7.4		5P8		重蒸水 (pH6)	
	高速法	低速法	高速法	低速法	高速法	低速法
影泡中血红蛋白残留量* (毫克/毫升)	0.08±0.02 (3)**	0.04±0.02 (6)	0.04±0.01 (3)	0.02±0.02 (6)	0.59±0.06 (3)	0.65±0.15 (6)
占红细胞原有血红蛋白的 比例(%)	0.06	0.03	0.03	0.02	0.41	0.51
膜蛋白量(毫克/毫升)*	0.61±0.001 (3)	0.38±0.04 (6)	0.59±0.01 (3)	0.35±0.04 (6)	0.61±0.01 (3)	0.38±0.05 (6)
膜蛋白产率*** (毫克/毫升)	6.1	3.8	5.9	3.5	6.1	3.8

* 指 1:10 影泡稀释液
** 括号内的数字为实验例数
*** 指每毫升压积红细胞分离后得到的膜蛋白毫克数

条件对膜蛋白产率的影响相同。

(3) 乙酰胆碱酯酶的回收率 乙酰胆碱酯酶是红细胞膜上的一种重要标志酶。从表 2 可见;用高速法制备时,在三种不同制备条件下酶活力能全部回收,而低速法中则有部分酶活力保留在上清液及洗涤液中,沉淀中约可回收 80% 左右。

(4) 膜蛋白 SDS-聚丙烯酰胺 凝胶电泳

将低速离心法和高速离心法制得的影泡样品在同样条件下进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。由图 1 可见两者的电泳图谱没有明显差别。

2. 等密度梯度离心

在相同条件下, 将低速法与高速法制得的影泡样品同时进行葡聚糖等密度梯度离心, 看到低速法制备的样品也呈现二条区带, 其区带位置与高速法所得者相同 (见封 2 图 2)。说

表 2 不同制备条件对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 回收率的影响

制备条件	10P7.4		5P8		重蒸水 (pH6)	
	高速法	低速法	高速法	低速法	高速法	低速法
溶血液中 AChE 的总活性*	52.50±2.9 (3)**	51.11±2.3 (5)	52.68±2.9 (3)	52.52±1.5 (5)	52.20±3.2 (3)	51.11±0.9 (5)
膜制剂中 AChE 的总活性	52.66±3.5 (3)	40.74±3.1 (5)	53.60±2.8 (3)	39.9±1.8 (5)	52.80±3.9 (3)	41.58±1.8 (5)
溶血上清液中 AChE 的总活性	测不出	3.11±0.8 (5)	测不出	4.02±2.4 (5)	测不出	5.73±1.3 (5)
洗涤液中 AChE 的总活性	测不出	10.48±2.9 (5)	测不出	9.22±1.4 (5)	测不出	5.51±1.5 (5)
膜制剂中 AChE 的回收率(%)	100	79.71	102	75.97	101	81.35

* AChE 活性单位为 $\Delta 0.D/min$

** 括号内的数字为实验例数

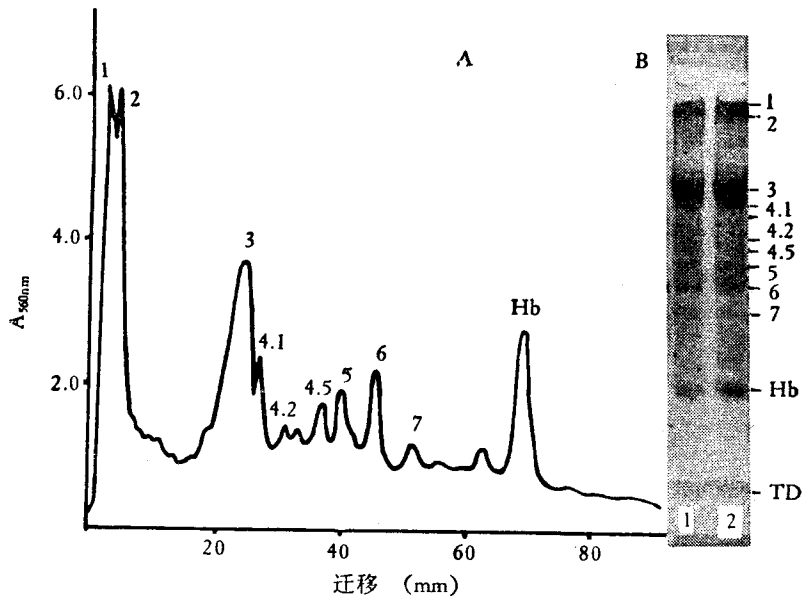


图 1 人红细胞膜蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

图中 A 为 B-2 的凝胶电泳扫描图。B-1 为低速法所得样品；B-2 为高速法所得样品。电泳条件：样品均为 10P7.4 制得影泡。膜蛋白浓度均为 45 微克。5.6% 聚丙烯酰胺凝胶（内含 1% SDS），pH7.4，电压 50V，电流 30mA，电泳 3.5 小时。考马斯亮兰染色。

明低速法所得样品也有封闭与不封闭两种影泡^[7]。

3. 影泡形态

上述条件制备的影泡样品用相差显微镜和电镜观察并进行显微摄影。两种方法制得的影泡形态上没有区别，相差显微镜观察其中大多数为完整圆形（见封 2 图 3 甲）。当样品较浓时，影泡相互连接，紧密排列（见封 2 图 3-乙）。重蒸水中制备的影泡较小，且有很多颗粒状物，

此情况与 Dodge 的报告相似。影泡在 4℃ 存放一周，形态不变（需加防腐剂以防染菌）。

在电镜视野中；两法所得影泡形态相似。其中 10P7.4 或 5P8 磷酸缓冲液中所得的影泡，表面光滑透明，多折皱（见封 2 图 4-甲）而重蒸水所得影泡，表面粗糙，少折皱（见封 2 图 4-乙），可能是因为膜上残留了较多血红蛋白

由影泡的形态观察，膜样品中的影泡是完整的，似不存在质膜碎片。至于膜样品经等密

度梯度离心后与高速法所得样品一样可分成上下二条区带,这是因为样品中存在封闭与不封闭两种影泡之故^[7]。

综上所述,低速法分离影泡虽然膜蛋白产率低,但由于不需高速离心机等设备,作为一种分离红细胞影泡的简易方法仍是可取的。本法除适用于人红细胞影泡的制备外,亦可用于家兔等动物红细胞影泡的制备。

三、讨 论

分离影泡,一般常用高速离心法(20,000 × g, 40 分钟左右)^[2],近来也有人用分子筛、琼脂糖 4 B 柱分离法^[9],而用低速离心法的报道尚不多见。本文用低速离心法制备影泡,在形态、膜蛋白电泳图谱和其他性质等方面均和高速离心法所得者相同,所不同的是膜蛋白产率较低。这主要是由于低速离心法的离心速度低,影泡不能全部沉淀最终影响膜蛋白产率。

由表 2 可见,在高速离心法中,人红细胞影泡膜上的乙酰胆碱酯酶能全部回收,这和

Hanahan (1974)^[10] 的报道是一致的。而在低速离心法中,乙酰胆碱酯酶活性不能全部回收,这可能和低速法的分离效率有关。

文中的电镜照片,由本校电镜室姜福民同志摄制,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Schwoch, G. et al.: *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2**, 197, 1973.
- [2] Dodge, J. T. et al.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **100**, 119, 1963.
- [3] 中国科学院北京动物研究所细胞室、生物膜组:《生物化学与生物物理进展》, **1**, 22, 1977.
- [4] Lowry, O. H.: *J. B. C.*, **193**, 265, 1951.
- [5] Ellman, G. L. et al.: *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88, 1961.
- [6] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, **10**(13), 2607, 1971.
- [7] 秦德安,何学民、左大珏:《华东师范大学学报》(自然科学版), **3**, 103, 1982.
- [8] Steck, T. L. et al.: *Science*, **168**, 255, 1970.
- [9] Fröman, G.: *Preparative Biochemistry*, **10**(11), 59, 1980.
- [10] Hanahan, D. J. et al.: *B. B. A.*, **363**, 283, 1974.

[本文于 1982 年 1 月 15 日收到]

原位杂交技术的新进展

原位杂交是 60 年代末期开始建立的在染色体上或细胞内对特殊基因进行定位的技术。根据具有互补碱基序列的两条多核苷酸链,在适当的反应条件下可形成杂交双链的原理,用一个带放射性标记的多核苷酸(DNA 或 RNA)作为探针,与经过预处理使其中 DNA 变性或外露的染色体或细胞样品共同保温,然后用放射自显影法对杂交位置做出鉴定。近年来,随着探针提纯和标记技术的改进,以及多种新型探测技术的出现,不但提高了原位杂交技术的分辨率,而且扩大了此技术的应用范围。成为研究基因在细胞核内的空间组编方式,及其在分化和发育过程中作用和表达方式等重要课题的有效手段。这里准备介绍一些技术方面的新成就。

原位杂交技术,最初用来确定许多物种基因组内大量重复序列在染色体上的位置,取得成功。但在用于测定特异基因在染色体上的位置时却遇到了困难。首先是这些基因在基因组内的复份不多,所占比例也少,难于用普通的物理方法进行提纯;其次是用一般方

法标记的探针,在其基因部位给出的信号比较微弱;再有就是用提纯的 RNA 作为探针时,如果探针内混有少量由 DNA 重复序列编码的 RNA 杂质,那么这些杂质就不仅可能在其本身的基因位置上给出信号,而且有时信号很强,甚至可以超过主要 RNA 探针产生的信号。一个突出的实例是有人用“提纯的” tRNA 作为探针,在果蝇染色体上进行基因定位,曾发现在 5S RNA 的基因部位出现杂交信号,强度可与 tRNA 基因处的信号媲美。定量观察表明:果蝇体系中, tRNA 探针内即使混入 0.1% 的 5S RNA 也能给出可观的信号,因此在使用提纯的 RNA 作为探针时,对结果进行解释必需十分慎重。近年来重组 DNA 和 DNA 克隆技术的不断发展,从基因组内分离出特定的基因或规定的 DNA 段落已经成为许多实验室的日常工作。现在已可制成分析任何基因在染色体上定位用的探针,克服了原位杂交技术中探针提纯带来的困难。

曾有人采用比活为 $1-5 \times 10^9$ dpm μg^{-1} 的标记探针,根据果蝇多丝染色体和人二倍体染色体上 5S RNA

神经组织特异 S-100 蛋白的分离和提纯一文的图 4

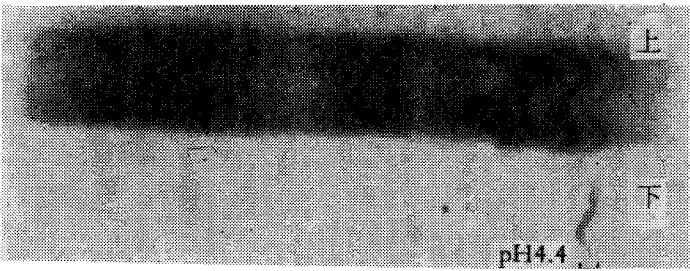


图 4 S-100 蛋白制品的醋纤膜等电聚焦电泳图
上: 血清(对照) 下: S-100 蛋白制品

低速离心法制备人红细胞影泡的
探讨一文的图 2—4

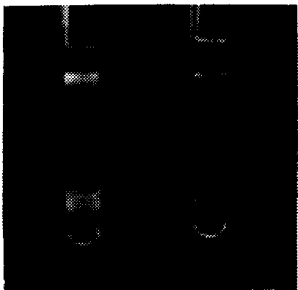


图 2 人红细胞影泡制剂经等密度离心的区带分布
左管为 10P7.4 高速离心法制得影泡
右管为 10P7.4 低速离心制得的影泡

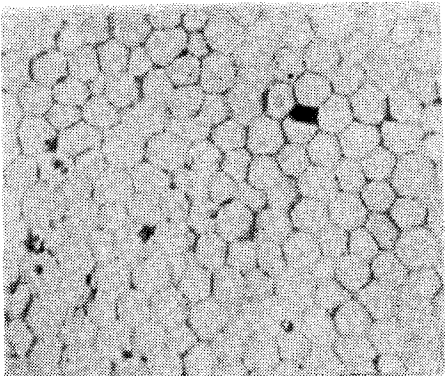
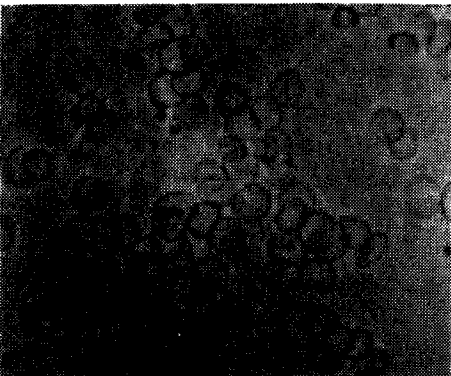


图 3 相差显微镜下人红细胞影泡的照片
甲: 分散时(800X) 乙: 密集时(1000X)

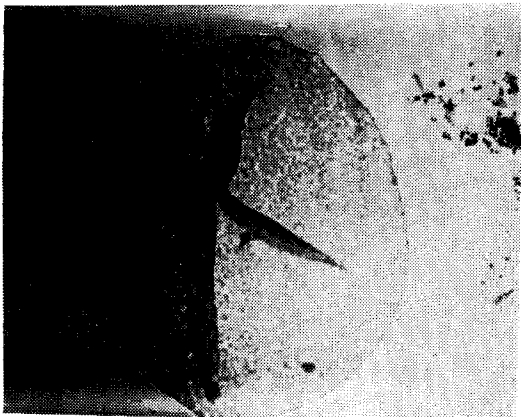


图 4 人红细胞影泡的电镜照片
甲: 10P7.4 制备的(7,900X) 乙: 重蒸水制备的影泡(6,100X)