

条件。这方面的工作我们将进一步加以研究。

综上所述,可初步归纳出三点结论:

(1) 我们采用硫酸铵与硫酸链霉素相结合的方法去除 DNA, 已从小牛胸腺与大白鼠肝脏提取了染色质非组蛋白, 对 DNA 模板都有明显的激活作用, 而且基本上都没有 DNA 和 RNA 聚合酶的污染, 说明此种抽提方法简便可行。

(2) 小牛胸腺与大白鼠肝脏的非组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱可以观察到两者具有共同的成份(可能是两种组织共同具有酶系或结构蛋白), 各自也具有特异的成份。

(3) 无论用羟基磷灰石柱分离获得的两部分的鼠肝非组蛋白或用 QAE-Sephadex A-50 柱分离获得的鼠肝非组蛋白组份(pH3.7 左右)都初步观察到对鼠肝 DNA 模板活力有明显的激

活作用。

主要参考资料

- [1] Basse, W. A. and Wang, J. C.: *Biochemistry*, 13, 4,299—4,303, 1974.
- [2] Gronow, M. and Griffiths, G.: *FEBS Lett.*, 15, 340, 1971.
- [3] Burgess, Richard, R.: *J. Biol. Chem.*, 244 (22) 6160, 1969.
- [4] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [5] Artman, M., Roth, T. S.: *J. Mol. Biol.*, 60, 291, 1971.
- [6] 上海实验生物所细胞研究组: 《生物化学与生物物理进展》1977年, 第5期, 第3页。
- [7] 上海实验生物所细胞研究组: 《生物化学与生物物理进展》1978年, 见本期。
- [8] Paul, J. and More, I. A. B.: *Exptl. Cell Res.*, 82, 399—410, 1973.

[本文于1977年8月9日收到]

细胞电泳测量条件及影响因素

施永德 梁子钧

(上海第一医学院生物物理教研组)

细胞电泳技术是测量细胞表面电荷性质和密度, 以研究细胞表面结构和功能变化的一种精密的生物物理方法。为便于细胞电泳技术在临床医学和生物学上的应用, 我们曾试制了一种操作简便且样品用量少的方形毛细管式细胞电泳装置^[1,2], 并应用于诊断肿瘤、细胞免疫反应、活血化瘀等中医理论的探讨、中风及冠心病的防治等方面^[1-6]。细胞电泳技术在国外还应用于探知癌细胞与正常细胞的表面结构及带电特点, 了解药物对细菌等微生物表面的作用, 研究血液中有形成分(红细胞、白细胞及血小板), 在正常及病理条件下, 表面结构及电荷密度的变化, 特别是血小板在凝集、粘附、血栓形成、血液凝固中所起的作用与其表面结构及电荷密度变化的关系等^[1]。

细胞电泳的应用是比较广泛的, 但其测量

条件较严, 受干扰的因素较多, 只有严格地控制好操作条件, 才有可能把细胞表面结构及带电状况准确地反映出来。为此本文对细胞电泳测量条件及影响因素作一讨论。

1. 不同介质的电泳率-深度曲线

在直流电场的作用下, 质点的电泳率观察小室(即方形玻璃毛细管)的深度呈对称抛物线关系, 人红血球也同样如此。分别把人血液稀释在9%蔗糖和0.145M NaCl 溶液中, 离心, 弃上清液, 分别把如上经清洗的血球悬于这两种溶液中, 即成为供细胞电泳用的红血球悬液。当人血液加入自身血清或血浆中配制红血球悬液时, 事先不需经过清洗(以下同)。图1示人红血球在9%蔗糖、0.145M NaCl 和自身血清中测得的电泳率与深度的关系(见图1)。可以看出在这三种不同的介质中, 均呈对称抛物线关

系,但其曲率大小不相同:9%蔗糖曲率最大,0.145M NaCl次之,血清最小。这是因为质点的电泳率,即其表面与溶液间所产生的 ζ 电位与溶液中的电解质浓度成正比,电解质浓度愈高,

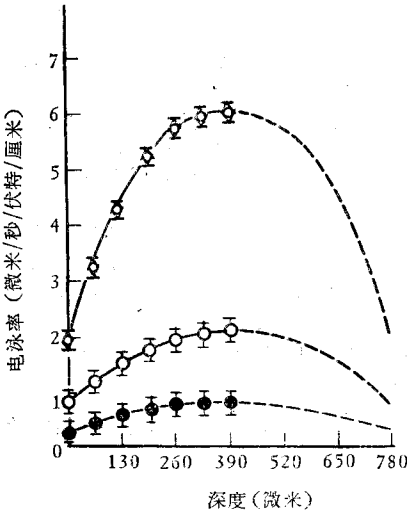


图1 红血球在各种不同介质中的电泳率-深度曲线
◇: 9%蔗糖; ○: 0.145M NaCl; ●: 血清

ζ 电位愈小;反之愈大。在非离子溶液的蔗糖中,电解质浓度几乎为零,红血球与溶液间的 ζ 电位最大,因此泳动最快。在离子溶液0.145M NaCl中,电解质浓度较高,红血球表面与溶液间 ζ 电位亦较小,因此泳动也较慢。至于在电解质浓度大体相等的0.145M NaCl溶液和血清中,电泳率的差异一方面是由于单纯电解质溶液与含有蛋白、血脂的血清相比,粘度不同所致。一般情况下,血清粘度要高于0.145M NaCl溶液的50%左右;另一方面是由于红血球表面还吸附这些蛋白、血脂等成份,而这些成份又吸附周围离子,这样使红细胞表面的吸附层比较厚,而泳动时连同吸附层一起泳动,故泳动速度更慢。对以上三种电泳介质的性能,我们作了

比较(表1),可根据实验的要求,进行选择。

表1 9%蔗糖、生理盐水、血清三种电泳介质性能比较

项 目 \ 介 质	9%蔗糖	生理盐水 (即0.145M NaCl)	血 清
1.金属电极的使用: Pt Ag	可 可 用	不 尚 可	不 尚 可
2.同样电压条件下的电泳速度	快	中	慢
3.同样电压条件下通过方管的电流	小	大	中
4.电泳率对温度的依赖性	大	中	小
5.血球下沉速度	中	快	慢
6.溶血现象	中	快	慢

2. 静止层和测量层

我们测定了方形毛细管的静止层是处在整个管深离壁0.10处^[2],在该处测定人红血球电泳率与其他作者相比基本符合,但由于该处速度梯度较大,若在调节静止层的部位上略有出入,就会引起较大的实验误差。为了克服这一缺点和简化操作手续,我们研究了在静止层(即0.10深处)和1/4深度的测量层之间所观察到的电泳率的关系(EPM_s示静止层处电泳率,EPM_{1/4}示在1/4深度处所观察的电泳率),从图1可以看出,在某一介质中,人红血球电泳率-深度曲线的形状是恒定的,因此这两处所测定的电泳率EPM_s、EPM_{1/4}以及它们的比值EPM_s/EPM_{1/4}也应是恒定的。从表2可见,确是这样,而且多数场合,在1/4深度测定电泳率的相对误差较少。说明对方形毛细管而言,在1/4深度观察更为合适,为了便于将该深度下测定值与其他作者进行比较,乘以比值EPM_s/EPM_{1/4}即可。

表2 EPM_s和EPM_{1/4}的比较*

介质 (pH 7)	实验次数	EPM _s ± S.D	相对误差	EPM _{1/4} ± S.D	相对误差	$\frac{EPM_s}{EPM_{1/4}}$ 比值
生理盐水	13	1.35 ± 0.09	7.0%	1.98 ± 0.104	5.3%	0.684
9%蔗糖	6	3.83 ± 0.325	9.1%	5.71 ± 0.278	4.85%	0.681
血 清	13	1.133 ± 0.0391	3.5%	1.628 ± 0.0558	3.4%	0.697

* 电泳率的单位:微米/秒/伏特/厘米,下同

3. 电极

从表 3 可见,对非离子介质而言,用各种金属电极和可逆电极,进行悬于各种介质中的人红血球电泳率 $EPM_{1/4}$ 的测定,金属电极 Pt 及 Ag 和可逆电极 $Cu-CuSO_4$ 、 $Ag-AgNO_3$ 及 $Zn-ZnSO_4$

均可得到满意结果;对离子介质而言,除 Pt 外,其他均可使用,但 Ag 电极不宜通电时间过长,而且换相通电时间要尽量相等。用可逆电极连续测量 15 分钟,在方形毛细管的介质中,没有可觉察的可逆电极 Cu^{++} 、 Zn^{++} 、 SO_4^{--} 、 Ag^+ 、 NO_3^-

表 3 各种电极的 $EPM_{1/4}$ 的比较

介 质 \ 电 极	Ag	Pt	Cu-CuSO ₄	Zn-ZnSO ₄	Ag-AgNO ₃
9% 蔗 糖	5.14 ± 0.100	5.14 ± 0.394	5.39 ± 0.217	5.43 ± 0.373	5.67 ± 0.431
生 理 盐 水	2.28 ± 0.094	—	2.03 ± 0.090	1.90 ± 0.079	1.98 ± 0.095

等离子进入,说明使用可逆电极是安全的。

4. 电压和电压梯度

我们观察了电压、电压梯度与电泳速度之间的关系,从图 2 (1)、(2) 及 (3) 中可以看出,

不论在 9% 蔗糖溶液或在 0.145M NaCl 中,应用 5 厘米长的方形毛细管,在电压 10 伏特(即电压梯度 2 伏特/厘米)以上,人红血球电泳速度(微米/秒)与电压或电压梯度成正比,而电泳

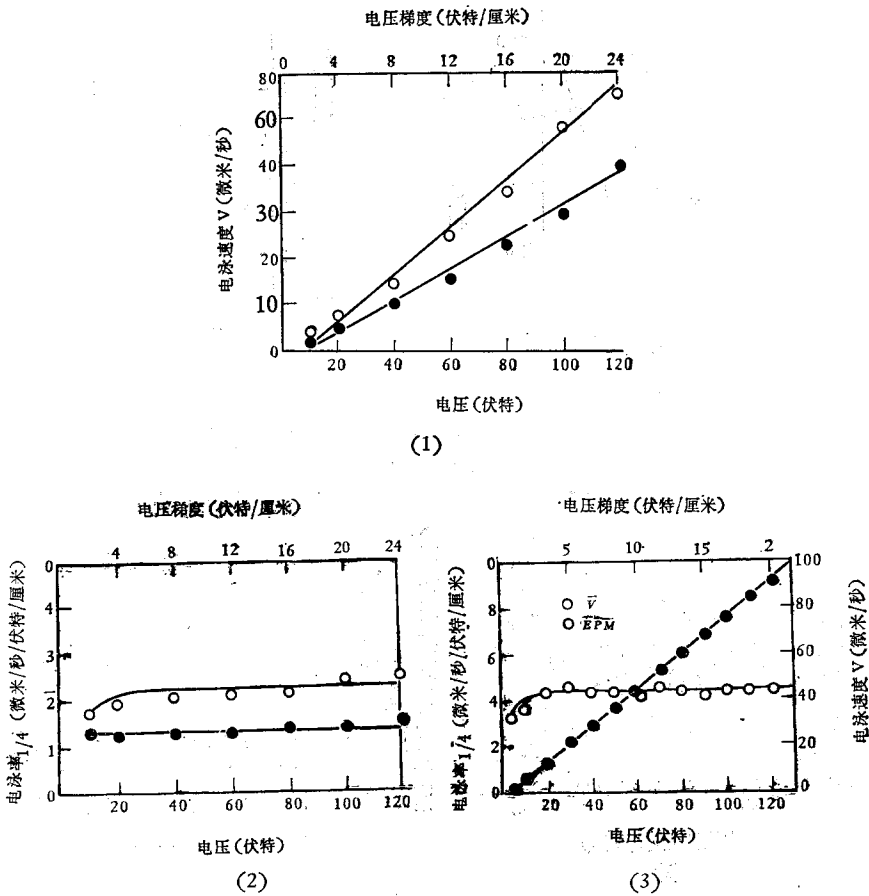


图 2 电压、电压梯度与电泳速度、电泳率的关系

(1)、(2) 红血球在生理盐水 (pH 7.4) 中 (在静止层上的电泳率即 EPM_s , 在测量层上的电泳率即 $EPM_{1/4}$); (3) 红血球在 9% 蔗糖中

率 EPM_5 和 EPM_4 (微米/秒/伏特/厘米) 是一个恒值,因此在一定介质中,某种细胞的电泳率标志着该细胞的一个恒定的生物物理特性。

从理论上来看,可以在任何条件下进行电泳率的观测;但实际上,电压过大过小都是不适宜的。因为电压梯度过大,一方面细胞泳动速度过快,经历视野时间过短,操作者在使用停表时,反应能力跟不上;另一方面热效应等干扰亦愈大,因而会增加实验误差。但电压太小、细胞经历视野时间过长,细胞下沉的位移增加,而且每次实验所能观测细胞数也减少,影响实验的准确性。我们认为电压条件可以根据不同介质、在 5—15 伏特/厘米的范围内选择较为适宜。

5. 电流强度与离子浓度的关系

在同样测量条件下,我们仅改变方管中的离子浓度,测定在不同离子浓度的等渗溶液中

人红血球电泳率及通过方管的电流强度(微安),从图 3 (1) 可以看出,方管中离子浓度增大,电流强度随之增大,而电泳率随之减慢。又从图 3 (2) 可以看出电流强度与电泳率之间成反比的关系。这与图 1 所示的情况,即在非离子溶液(离子浓度=0 时)中,电泳率大;而离子溶液中(氯化钠浓度=0.145M),电泳率小的结论完全一致。

6. 血球浓度

把经 9% 蔗糖溶液清洗的血液按不同浓度稀释到 9% 蔗糖溶液中,分别测定其电泳率,从图 4(1) 可见其红血球电泳率是不变的,说明与血球浓度无关。相反,把全血按不同浓度稀释到 9% 蔗糖中时,红血球未经清洗,测定其电泳率,发现电泳率与全血稀释度有密切关系,血球愈浓,电泳率愈慢;血球愈稀电泳率则愈接近经

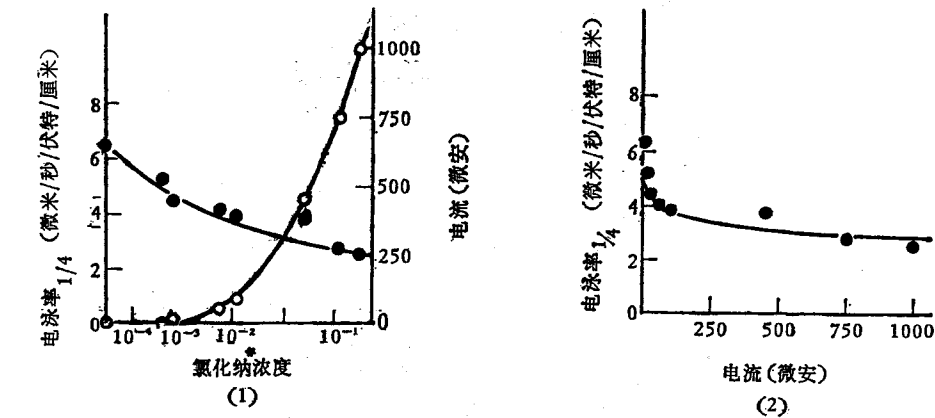


图 3 离子浓度与电泳率、电流强度间的关系
(1) 氯化钠浓度-电泳率-电流关系; (2) 电流-电泳率的关系
* 氯化钠溶解在适当浓度的蔗糖中构成等渗溶液; ○: I; ●: $EPM_{1/4}$

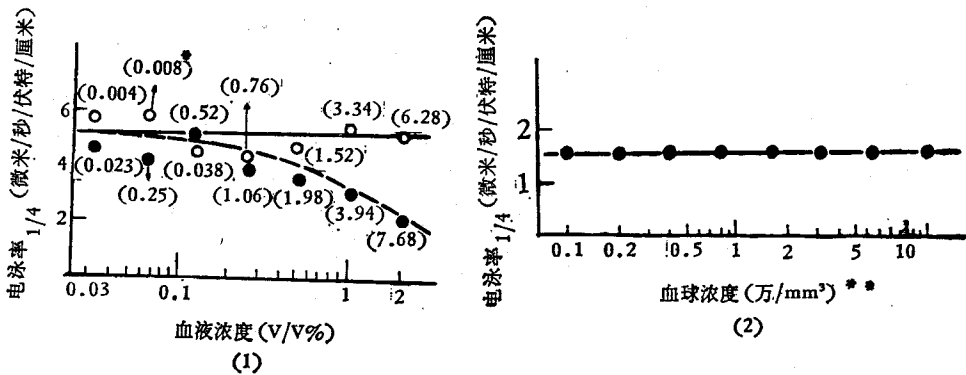


图 4 血球浓度与电泳率的关系
(1) 红血球在 9% 蔗糖中; (2) 红血球在自己血清中
* 括号内数目为血球浓度($10^6/\text{mm}^3$),经洗三次红血球略有损失;
** 横座标为对数; ○: 经洗; ●: 未洗

9% 蔗糖溶液清洗的红血球的水平。这是由于全血的离子、血浆蛋白成份及其他成份混入蔗糖溶液、影响细胞表面带电状况,改变细胞表面吸附离子及蛋白分子层的厚薄,因而改变 ζ 电位所致。假如将自身未经清洗的红血球按不同浓度稀释到自己血清中,测定其电泳率[见图 4 (2)],证明又与血球的浓度无关。以上情况说明,在均一恒定的介质中,电泳率与细胞浓度(即单位体积中细胞数)无关。

从理论上讲,似乎在任何细胞浓度下均可测定电泳率;但在实际操作时,细胞层太浓太薄均会影响测定结果。若细胞层太浓,整个视野布满细胞,看不清细胞形态。由于对每一标本要连续测量 10 个细胞泳动一定距离所需要的时间(秒),而且每一个细胞需往返两个方向各泳动一次,在细胞层太浓的情况下,操作者不易记住哪一个细胞已被测,跟踪一个细胞测往返两向也有困难。反之若细胞层太薄,视野中所见细胞数甚少,完成 10 个细胞的往返测量也有困难。根据我们体会,红细胞(或淋巴细胞、白细胞)为 1—2 万/立方毫米的浓度较为适宜,血小板 1.5—5 万/立方毫米较妥,巨噬细胞 5 千—1 万/立方毫米。体积较大的细胞需较稀一些为好(如巨噬细胞),体积较小的可以较浓(如血小板)一些。

7. 温度和粘度

(1) 温度对电泳率的影响 在 4—30℃ 的各种温度条件下,测定了人红血球在等渗蔗糖溶液、生理盐水及血清中的电泳率[见图 5(1)],

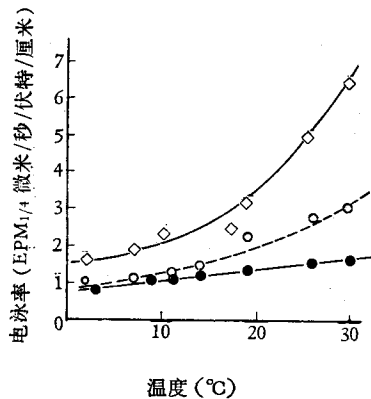


图 5(1) 电泳率与温度的关系

发现在这三种介质中,电泳率均随着温度的增加而增加。以蔗糖对温度的依赖关系最大。

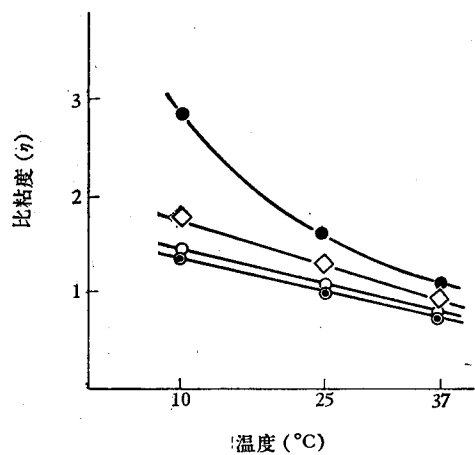


图 5(2) 几种液体在不同温度下测定粘度值的比较

* 纵座标为比粘度,以 25℃ 的蒸馏水的粘度为 1,其数值为相对于 25℃ 蒸馏水的比粘度; ●: 血清; ◇: 9% 蔗糖; ○: 生理盐水; ○: 蒸馏水

(2) 温度对粘度的影响 分别在 10、25 和 37℃ 三个不同温度条件,测定了血清、9% 蔗糖、生理盐水及蒸馏水这四种液体的粘度。以 25℃ 的蒸馏水的粘度为 1,求出它们相对于 25℃ 蒸馏水的比粘度[图 5(2)],发现随温度增加,而粘度下降。它们之间的依赖关系,以血清为最甚,蔗糖次之,生理盐水与蒸馏水相近,居前两者之下。温度的变化,引起介质粘度的变化,似乎是使其电泳率改变的原因之一。温度对电泳率和粘度的作用,似起相反作用,即温度增高,电泳率增大,粘度下降;温度下降,电泳率下降,粘度增大。但血清粘度对温度依赖性很大,而电泳率对温度的依赖性却较小,现尚难说出确切的解释。可能是因为血清中离子以外的成份(如蛋白、血脂)对红细胞表面的吸附作用是保持其 ζ 电位稳定性的主要原因,故介质温度及粘度的变化的影响居于次要地位,依赖性不像蔗糖及生理盐水那样明显。

(3) 粘度对电泳率的影响 配成不同浓度的蔗糖溶液,造成不同的粘度液体,同时测定这些液体的粘度,以及人红血球在这些液体中的电泳率,观察粘度与电泳率之间的关系,从图 6 (1)可以看出当蔗糖浓度由稀变浓时,粘度由小

变大,电泳率却由大变小。从图 6(2) 还可见电泳率与粘度互成反比的关系,这与公式 $EPM = \zeta D / 4\pi\eta$ 基本相符(式中 EPM 为电泳率、 D 为介电常数, ζ 为细胞表面与介质间的电位差, η 为粘度)。

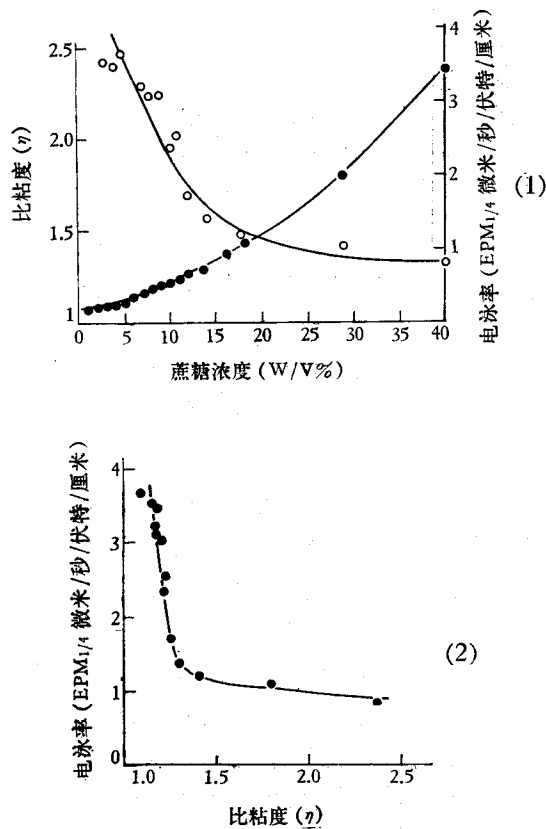


图 6 粘度与电泳率的关系
(1) 人红血球在不同蔗糖浓度中的比粘度和电泳率的数值; (2) 电泳率与比粘度的关系
●: η ; ○: $EPM_{1/4}$ 。

8. 盐桥中的离子浓度

方形毛细管之两端连接的盐桥(即内灌适当氯化钠浓度和琼脂浓度的塑料管^[1]), 有两个作用: 一是密封方形毛细管两端; 二是连接银或其他可逆电极。盐桥中氯化钠浓度、方形毛细管中电泳介质的氯化钠浓度及其电泳率测定值的关系见图 7。可见只有在盐桥中氯化钠的浓度大大地大于方形毛细管中电泳介质的氯化钠浓度时, 电泳率测定值与方形毛细管中介质的氯化钠浓度的关系曲线呈良好的连续性变化。反之, 当盐桥中氯化钠的浓度小于或

接近方形毛细管中氯化钠的浓度时, 电泳率测定值大幅度下降, 说明这种情况下, 电压降不是发生在方形毛细管的两端, 而是发生在盐桥的两端, 从而影响了电泳率的测定。由此可见, 只有盐桥中离子浓度维持高于细胞电泳管中离子浓度下, 进行细胞电泳测量是适宜的。若方形毛细管中电泳介质是生理盐水、199 培养液和 Hank's 液, 我们选用盐桥中氯化钠的浓度为 1.5M。

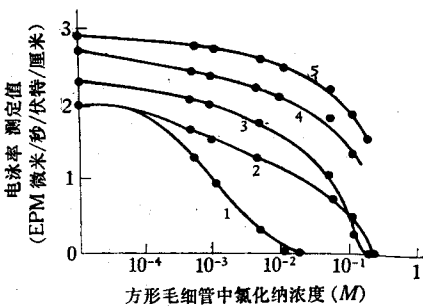


图 7 盐桥及方形毛细管中氯化钠浓度的变化与红细胞电泳率测定值的关系曲线
盐桥中氯化钠浓度: 1 示氯化钠浓度为零; 2 示随方形毛细管中氯化钠浓度而变; 3 示 0.0145M NaCl; 4 示 0.145M NaCl; 5 示 1.5MNaCl

9. 红血球和血小板在血浆中电泳率的测定

用肝素抗凝的全血, 在硅油化器皿中, 经 300g, 离心 10 分钟, 吸出其上清液 P_1 , 内含丰富血小板的血浆。继续离心肝素抗凝血的剩余部分, 1,000g, 离心 10 分钟, 吸出其上清液 P_2 , 内无血球与血小板, 把 P_2 分为两部分, 分别悬入 P_1 部分和沉于管底的红血球, 使血小板浓度为 1.5—5 万/立方毫米, 红血球为 1—2 万/立方毫米; 即可进行血小板和红血球在血浆中的电泳测量, 以求得血小板和红血球在血浆中的电泳率, 该值较准确地反映了血小板和红血球在体内的带电情况。

同样, 将红血球悬入血清, 也可求出该人红血球在血清中的电泳率, 正常值见表 4。红血球加入异型血清或血浆(如 A 血型血球加入 B 血型血清或血浆中)则发生凝集反应, 在电场中也显示电泳率下降。表 4 中测定值均为该人红血球(或血小板)在该人血浆或血清中的电泳率。

表 4 正常人红血球与血小板电泳率
(微米/秒/伏特/厘米)

介 质 细 胞	血 浆 中		血 清 中	
	例数	电泳率 (EPM _S)	例数	电泳率 (EPM _S)
红血球	总 108	1.149 ± 0.05	总 67	1.154 ± 0.074
	男 56	1.140 ± 0.05	男 43	1.154 ± 0.065
	女 52	1.160 ± 0.05	女 24	1.154 ± 0.078
血小板	总 10	1.050 ± 0.05	—	—

10. 在医学中的某些应用

注意了上述工作条件和影响因素以后,我们在诊断肿瘤、中风及冠心病的防治及祖国医学中活血化瘀原理等研究中应用细胞电泳技术取得了较好结果(表 5、6 和 7)。

表 5 几种巨噬细胞电泳试验结果比较*

组 别	例数	平均巨噬细胞电泳致缓率(%)		阳性率 (%)
		单步温培法	双步温培法	
正 常 人	18	0.05	1.8	5.5
恶性肿瘤	7	17.7	20.1	100
脑瘤 1 组	10	17	23.8	90
脑瘤 2 组	18	16.4	15.9	89

* 本表巨噬细胞电泳致缓率(%)

$$= \frac{\text{对照管电泳率} - \text{实验管电泳率}}{\text{实验管电泳率}} \times 100;$$

本表中巨噬细胞电泳试验原理、操作方法、单步温培、双步温培方法请见资料 [6], 脑瘤 1 组为恶性程度较高的脑瘤, 为髓母细胞瘤和 2—3 级星形细胞瘤; 脑瘤 2 组为恶性程度较低的少枝胶质瘤, 1 级星形胶质瘤以及良性的脑膜瘤等

从表 5 可见,恶性肿瘤、脑瘤与健康人的巨噬细胞电泳致缓率有明显区别,提示作为诊断脑部肿瘤尚是一个较好的方法^[6]。

从表 6 可见,中风、冠心病、心肌梗塞、系统性红斑狼疮、高血脂各组红细胞在血浆或血清

表 6 各组病种红细胞电泳率
(微米/秒/伏特/厘米)

电泳条件	组 别	例数	男	女	平均电泳率	P 值
血 浆 中 电 泳	健 康 人	237	120	117	1.16 ± 0.06	
	缺血性中风	91	46	45	1.07 ± 0.07	<0.05
	出血性中风	33	19	14	1.08 ± 0.065	<0.05
	冠 心 病	81	56	25	1.09 ± 0.06	<0.05
	心 肌 梗 塞	14	14	0	1.07 ± 0.07	<0.05
	系统性红斑狼疮	23	0	23	1.08 ± 0.07	<0.05
血 清 中 电 泳	健 康 人	67	43	24	1.15 ± 0.05	
	冠心病伴高血脂	66	47	19	1.01 ± 0.07	<0.05
	其他高血脂症	53	38	15	1.00 ± 0.07	<0.05

表 7 丹参治疗前后红细胞在血浆中电泳率的变化

组 别	例 数	治 前	治 后	P 值
缺血性中风	16	1.09	1.24	<0.05
冠 心 病	42	1.05	1.26	<0.05

中电泳率比相应健康人低,示红细胞表面电荷的下降与以上发病原因存在着一定的关系^[3-5]。

从表 7 可见,缺血性中风及冠心病经丹参活血化瘀治疗以后,红细胞电泳率加快,说明该药有升高表面电荷的作用^[3-5]。

参 考 资 料

- [1] 梁子钧等:《生物化学与生物物理进展》,1976年,第1期,第54页。
- [2] 上海第一医学院生物物理教研组等:《上海第一医学院学报》,1976年,第1期,第80页。
- [3] 上海第一医学院华山医院神经科等:《中华内科杂志》1976年,第2期,第92页。
- [4] 上海第一医学院华山医院内科等:《中华医学杂志》,1976年,第11期,第689页。
- [5] 上海第一医学院生物物理教研组等:《医学情况交流》,1975年,第10期,第22页。
- [6] 上海第一医学院华山医院神经病学研究室:《肿瘤防治简报》,1975年,第3期,第24页。

[本文于 1976 年 4 月 12 日收到]

科技消息

体细胞核注入两栖类卵母细胞后基因的激活

将蛙的培养细胞核注入蟾蜍卵母细胞内,体细胞内不表现的基因就被激活。被激活的基因在卵母细胞内表现正常,但不能在培养细胞内表现。相反,基因在培养细胞内表现正常的,就不能在卵母细胞内表现。将培养的细胞核注入卵母细胞后,基因就失活了。这些基因活性的改变,是将体细胞核注入卵母细胞后,卵

母细胞合成蛋白质,用双向凝胶电泳法分析而测得的。用 α -鹅膏蕈碱作对照表明,蛋白质合成中的这些变化决定于基因的转录。可以得出这样的结论:在没有细胞分裂的条件下,细胞分化期间失活的基因,能够由卵母细胞胞浆中的正常组份重新激活。

译自 *PNAS*, 6, 1977.