

RNA聚合酶的专一性抑制剂——利福霉素(Rifomycin)和DNA模板的专一性抑制剂——放线菌素D(Actinomycin-D)对我们从大肠杆菌K12中提取的RNA聚合酶具有强烈的抑制作用(表1)。这和Burgess(1971)以及Wells的报道一致。

Burgess认为,经DEAE-纤维素柱层析分离后收集起来的酶蛋白中,仅仅10—20%是RNA聚合酶,在凝胶电泳图谱上除 β' 、 β 、 α 和 ω 这几条RNA聚合酶亚单位带之外,还有几条杂蛋白带。我们提得的E.coli K12-RNA聚合酶的凝胶电泳图谱也证实了这一点。

McConnell和Bonner(1972)发现在RNA聚合酶中,有多核苷酸磷酸化酶的污染,这种酶不需要DNA模板,而用核苷二磷酸作底物合

成RNA。由于在测定RNA聚合酶所用的核苷三磷酸底物中难免会有核苷二磷酸的污染,因此在测定RNA聚合酶活力时,往往会产生由多核苷酸磷酸化酶引起的不依赖于DNA模板的“假参入”。这种现象只要在RNA聚合酶测活系统中加入一定量的磷酸氢二钾即可避免。

4. 储存

我们先后采用两种办法将RNA聚合酶储藏起来。一种办法将酶溶解在储存液里,于4℃冰箱中保存,二、三个月后酶活力就开始有所下降。另一种办法将酶溶解在储存液里,置安瓿瓶中充氮气后保存于-20℃冰箱中,则在二、三个月之内酶活力没有明显降低。看来充氮和低温对RNA聚合酶的保存是适宜的。

[本文于1977年1月5日收到]

红细胞冷冻保存的研究(一)

——慢速冷冻糖液洗涤法

中国科学院生物物理所三室
北京市输血站
北京医学院附属人民医院

二十世纪四十年代初期Woodcock、Florio等人曾探索过血液的冷冻保存问题,但未能引起人们的重视。1949年Polge和Smith^[1]等发现甘油对精子的冷冻有保护作用。翌年Smith^[2]应用甘油作保护剂冷冻保存红细胞试验成功。这个重要发现使冷冻保存血液的工作迅速发展起来,并有大量的工作报道,但一直未解决去除保护剂的方法。

1956年Tullis^[3]使用Cohn分离器将解冻的红细胞与甘油分开,从而使冷冻红细胞最早应用于临床。但由于方法过分复杂,未能得到大量推广应用。1963年Huggins^[4]利用红细胞的可逆聚集反应,设计出红细胞脱甘油的糖液

洗涤法之后,才使冷冻红细胞(简称“冷冻血液”)开始逐渐在临床广泛应用^[5,6]。

由于“冷冻血液”能半永久(几年以至10年以上)的保存(目前通用的ACD血液在4—6℃保存有限期仅三周),因此它不仅解决了输血工作中长期存在的供需不平衡的矛盾,而且有利于备战,能时刻储备大量的备战用血。例如,美帝国主义曾将“冷冻血液”用于侵越战争和第四次中东战争抢救伤员的输血。此外,它有利于推行“成份输血法”^[1],使宝贵的血液得到最合理、最有效的利用。“冷冻血液”输血基本上可

1) 指将血液各种成份(如红细胞、白细胞、血小板、血浆等)分开保存,根据病人需要,分别输用。

以消除目前通用的 ACD 血液输血法血清性肝炎的感染问题。同时解决了“稀有血型”输血的困难。它可以去除血液中存在的各种免疫抗体、异种蛋白质等引起的副作用，大量输血时不致发生酸中毒或高钾血症的危险，因此“冷冻血液”输血的成功被认为是输血学上一项重大成就。

为适应我国现代医学发展和战备的需要，应该加速开展“冷冻血液”的研究和应用，加速推行“成份输血法”，促进我国输血学的发展，使我国输血工作尽快达到国际先进水平。我们按科研、生产、使用三结合的精神组织协作，克服了物质设备条件上的种种困难，联系我国实际情况，经过两年多的共同努力，初步建立了适合我国情况的“冷冻血液”制备工艺，建立了各种分析检定方法，并进行了 30 余人次的临床输血试验，初步结果比较满意，为我国输血工作填补了一项空白。

在冷冻方法方面，我们采用了慢速冷冻法。在去除冷冻保护剂（甘油）方法方面，我们采用了离心洗涤和糖液洗涤两种方法。前者我们以盐水为洗涤液，红细胞溶血率低，回收率高，但需要较复杂的特殊设备。后者我们用 10% 蔗糖做洗涤液，红细胞溶血率较离心法高，回收率较离心法低，但设备比较简单，便于在一般条件下采用。

本文主要介绍糖液洗涤法实验工作结果。糖液洗涤法利用红细胞的可逆聚集反应，即在通常条件下红细胞与血浆中的 γ -球蛋白是分别存在的。但当 pH 降到 5.2—6.1 之间时，红细胞膜上的脂蛋白与血浆中的 γ -球蛋白之间便形成可逆的结合。此时如使电解质浓度下降（加糖液），离子引力减小时，与脂蛋白结合的 γ -球蛋白互相之间又形成可逆的结合，结果使红细胞聚集成团而沉降，然后除去上清液。再用糖液洗涤两次，可将绝大部分甘油除去。聚集成团的红细胞再加入电解质溶液（盐水），使离子引力增强，pH 增高，以上两种可逆性结合又被断开，红细胞又恢复到原来悬浮状态，从而达到去除冷冻保护剂甘油的目的。

一、材料及试剂

1. 材料

红细胞：采血后两天以内分浆的 ACD 血红细胞。

分浆条件：2,500 转/分，4℃，离心 30 分钟。

分浆后保存温度：4—6℃。

分浆后的有效时间：12 小时。

2. 试剂

(1) 甘油化试剂（冷冻保护剂）采用 Huggins 配方^[5]。

甘油（化学纯）79.2 克%（重量/容量）；葡萄糖（注射用）8.0 克%（重量/容量）；果糖（分析纯）1.0 克%（重量/容量）；乙二胺四乙酸二钠盐（分析纯）0.3 克%（重量/容量）。

按上述比例将甘油以外的三种试剂以适量的水完全溶解后再与甘油混合，然后以水稀释到规定的容量。

(2) 脱甘油试剂 50% 葡萄糖液用适量的水倒入称好的葡萄糖中，加热溶解后再稀释到 50%。

(3) 洗涤试剂 10% 化学纯蔗糖液。

(4) 悬浮试剂 生理盐水。

以上四种试剂全部用无热原水配制，经蔡氏滤器过滤，分装于各种塑料袋中。排出袋中气体然后将管口热合。高压杀菌后，各种试剂经热原试验，细菌试验，合格后备用。

二、实验方法

1. 红细胞冷冻保存及解冻洗涤方法

全部操作在无菌的塑料袋及塑料管道的密闭系统内进行。为了保证无菌，甘油化、脱甘油洗涤、悬浮等操作在无菌室内进行。

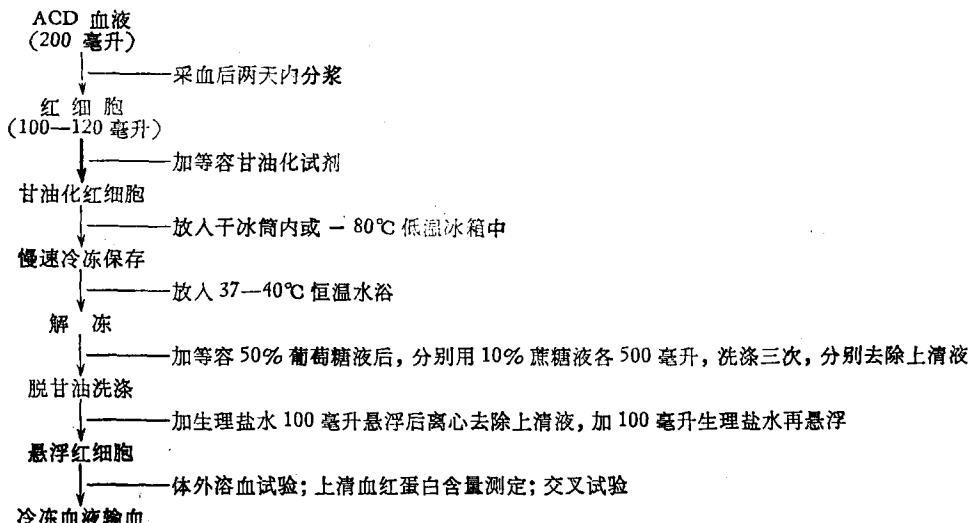
(1) 甘油化 将分浆后的红细胞转移至洗涤用塑料袋中（袋子使用国产医用筒状塑料薄膜压制，长 60 厘米，直径 10.7 厘米，两端各带一根塑料管，内部装入一支用塑料管密封的电磁搅拌用铁棍，使用前用环氧乙烷或高压杀菌），在电磁搅拌条件下，通过无菌的塑料管道慢慢加

人与红细胞等容的甘油化试剂（每个单位红细胞约 100—120 毫升），添加时间约 15 分钟，将袋中气体挤到空袋中去，室温放置半小时使之完全平衡。

(2) 冷冻保存 使甘油化红细胞与塑料袋内壁全部接触，放平折叠后放入盒中，然后放进干冰筒中冷冻（-79℃）保存。部分保存时间较长的样品先放入干冰筒中冷冻后，放到国产低温冰箱（-80℃—65℃）中保存。

(3) 解冻 将冷冻血液袋放进 37—40℃ 恒温水浴中迅速解冻，时间约 3 分钟。

(4) 脱甘油，洗涤 将冷冻血液袋放在洗



2. 分析检定方法

(1) 血红蛋白测定 采用氰化高铁血红蛋白法。

(2) 甘油含量测定 用过碘酸氧化甘油，除去过量试剂，所产生的甲醛用变色酸，硫酸试剂显色，于 570 毫微米测定其光密度。

(3) 2, 3-二磷酸甘油酸 (2, 3-DPG) 测定 利用 2, 3-DPG 在 1 当量浓度硫酸溶液中煮沸时极少水解，而其他有机磷（如 ATP、ADP 以及己糖磷酸盐等）均先后水解的特性，先测出全部酸溶性磷减去 1 当量浓度硫酸溶液中煮沸时水解的磷，余下的磷基本为 2, 3-DPG 组成中的磷。

(4) ATP 测定 采用酶法。

(5) 脆性测定 用 San Ford 法。使不同浓

度的低渗氯化钠溶液作用于红细胞膜，观察膜的最小抵抗力（开始溶血）及最大抵抗力（完全溶血）的界限，以鉴别其质量。

(6) 悬浮 洗涤后的聚集沉降红细胞加入 100 毫升生理盐水悬浮后，2,500 转/分离心 10 分钟去除上清液，加入 100 毫升生理盐水再悬浮。经体外溶血试验和上清液血红蛋白含量测定合格后，供临床输血用。

(6) “冷冻血液”制备工艺流程如下：

度的低渗氯化钠溶液作用于红细胞膜，观察膜的最小抵抗力（开始溶血）及最大抵抗力（完全溶血）的界限，以鉴别其质量。

(6) 钾含量测定 用快速比浊法。

(7) 体外溶血试验 取供输血用红细胞悬浮液 3 毫升加入试管中，在 37℃ 水溶液中保温 30 分钟后测定其上清液中血红蛋白含量。上清液血红蛋白增加量不得超过原来含量的一倍以上，通常约增加 20%。

(8) 细菌培养试验 用通常血液培养基（肉汤 1,000 毫升，葡萄糖 7 克，枸橼酸钠 3 克，蛋白胨 3 克，pH 7.4）40 毫升，接种供输血用红细胞悬浮液 5 毫升，30℃ 培养一周。

(9) 体内红细胞存活率测定 采用选择性凝集法（Ashby 氏法）测定，将解冻悬浮的 O 型

红细胞输入 A 或 B 型受血者体内，测定输后 24 小时存活率。

三、实验结果

我们首先用小量的红细胞（几毫升到几十毫升）在不封闭的条件下，观察了分浆后红细胞放置时间、甘油化速度、甘油化红细胞放置温度时间，电磁搅拌条件等对红细胞溶血的影响。比较了不同浓度果糖与蔗糖洗涤对红细胞溶血

率、沉降速度和回收率等的影响。然后在选定的工艺条件下用 10 个单位红细胞（100—120 毫升）进行密闭灭菌的甘油化、冷冻、解冻、脱甘油洗涤、悬浮等冷冻工艺全过程的放大试验。在各项质量控制指标合格后，开始进行临床输血试验。

1. 红细胞冷冻工艺全过程放大试验

结果见表 1。

从十个单位红细胞样品的分析检定结果来

表 1 红细胞冷冻工艺全过程放大试验结果

项 目		冷冻血液号										平均 值
		H 74	H 75	H 76	H 77	H 78	H 79	H 80	H 81	H 82	H 83	
献血人		于××	郑××	占××	邓××	王××	刘××	刘××	魏××	郑×	董××	5—21
冷冻时间(天)		8	12	9	21	8	8	7	6	5	7	
解冻洗涤溶血(%)		5.6	5.3	5.3	4.4	3.9	5.1	8.8	7.7	5.8	10.0	6.1±2.0
输注前 上清液	血红蛋白量 (毫克/单位红细胞)	82	66	55	59	40	58	83	53	1.66	81	74±35
	甘油残量 (克%)	0.14	0.16	0.18	0.05	0.14	0.17	0.09	0.18	0.18	0.61	0.19±0.15
	钾含量 (毫克当量/升)	6.7	5.7	4.7	6.9	—	—	4.5	5.0	6.9	5.4	5.7±1.0
	pH	7.5	7.3	7.0	7.2	7.5	—	7.1	6.3	7.0	7.5	7.2±0.4
红细胞悬浮液	2,3-DPG 冷冻前 μM/克(Hb)	20.0	20.3	17.6	21.1	18.3	16.4	16.8	17.1	17.2	18.1	18.3±1.6
	冷冻后 μM/克(Hb)	20.9	19.8	18.4	19.3	18.0	18.4	17.7	16.5	16.9	17.5	18.3±1.3
	脆性 开始溶血 (NaCl %)	0.40	0.42	0.46	0.48	0.46	0.46	0.46	0.48	0.46	0.46	0.45±0.03
	完全溶血 (NaCl %)	0.28	0.28	0.32	0.28	0.28	0.32	0.28	0.32	0.32	0.28	0.30±0.02
	回收率(%)	82	83	72	80	89	—	74	70	78	92	80±7
	体外溶血试验 (上清液血红蛋白增加量%)	11	18	17	5	11	63	22	30	5	33	20±17
细菌培养试验(±)		—	—	—	—	—	*	—	—	—	—	全部阴性

* 离心时因袋子破，培养、收率等未计算。

看，甘油化、冷冻、解冻、脱甘油洗涤总溶血率为 $6.1 \pm 2.0\%$ 。解冻洗涤的新鲜红细胞悬浮液的上清液，其血红蛋白含量为 74 ± 35 毫克/单位红细胞，甘油残存量为 0.19 ± 0.15 克%，钾含量为 5.7 ± 1.0 毫克当量/升，pH 为 7.2 ± 0.4 ，解冻洗涤的红细胞，其 2,3-DPG 含量与解冻前的大致相同。其脆性，开始溶血为 $0.40—0.48\%$ NaCl，完全溶血为 $0.28—0.32\%$ NaCl。解冻洗涤的红细胞悬浮液的体外溶血增加 $20 \pm 17\%$ ，细菌培养全部为阴性，红细胞回收率为 $80 \pm 7\%$ 。

2. “冷冻血液”临床输血试验

为安全起见，我们首先给几例正常人（大部分为参加本实验的工作人员）少量输注。每人输 50 毫升，未发现不良反应。以后再加大到 100—200 毫升，然后给病人输注。

共计输血 31 人次，总输血量为 7,050 毫升。冷冻保存的红细胞最长保存时间为 9 个月。其中一次输血 50 毫升者 3 人，一次输血 100 毫升者 5 人，一次输血 200 毫升者 14 人次，一次输 400 毫升者 9 人次，重复输血两次者 2 人，重复输血 3 次者 1 人。临床输血试验结果见表 2 及

表2 “冷冻血液”临床输血试验结果

受血人分类	一次受血量 (毫升)	受血人次	冷冻保存时间 (天)	解冻洗涤溶血 (%)	上清液血红蛋白含量 (毫克%)	体外溶血试验(上清液血红蛋白增加%)	输血反应
正常人	50	3	2—7	3.0—3.3	35—46	29	无
	100	3	7—9	2.3—5.0	26—44	19—29	无
	200	2	202—276	4.4—9.5	44—57	30—32	无
白 血 病	100	1	18	2.6	92	18	无
	200	1	4	2.3	57	30	发热
红白血病	200	1	13	5.9	—	—	无
	400	1	3	2.1—2.7	37—39	16—33	无
急性粒细胞性白血病	200	1	6	3.5	39	15	无
	400	2	14	2.8—9.4	31—74	17—24	无
再生障碍性贫血	200	9	5—48	1.3—5.4	35—73	5—27	*
	400	2	6—72	4.2—7.8	35—91	6—29	无
阵发性血红蛋白尿	100	1	18	3.2	99	40	无
	400	1	13	1.4—2.3	22—48	8—27	无
消化道出血	400	1	70	5.5—9.4	62—74	12—61	无
胃 癌	400	1	29	10.2—11.1	37—61	28—61	无
膀 胱 癌	400	1	210	9.0—13.0	87—91	15—20	手脚发凉，恶心，体温 37.3℃
合 计	7050	31	3—276	1.3—13.0	22—99	5—61	3

* 此例输血前有寒战，体温 38.4℃，输后寒战加剧，体温达 40.3℃，一周后第二次输用无反应。

表3 “冷冻血液”输血 24 小时后红细胞的存活率

项 目	冷 冻 血 液 号		H 93	H 94	H 95	H 118	H 132	H 133	H 137	H 138
献血人	金××	梁××	赵××	徐××	王××	罗××	王××	张××		
血 型	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
冷冻保存时间(天)	9	9	276	202	70	70	29	29		
解冻洗涤溶血(%)	2.3	5.0	4.4	9.5	9.4	5.5	11.1	10.2		
红细胞悬浮液上清液血红蛋白含量(毫克%)	30	26	57	44	62	74	61	37		
体外溶血试验(上清液血红蛋白增加量%)	27	19	30	32	61	12	28	61		
受 血 人	郭××	赵××	徐××	张××	刘××		孔××			
血 型	A	B	B	B	B		B			
健康状况	正常	正常	正常	正常	消化道出血		胃 癌			
受血量(毫升)	100	100	200	200	400		400			
输 血 反 应	无	无	无	无	无		无			
输注 24 小时后红细胞存活率(%)	84	88	78	96	94		100			
附 注	H137, H138 系采血分浆后 4℃ 放置 24 小时，然后甘油化冷冻的									

表 3。

由表 2 知有 3 例病人有输血反应，其中两例过去曾多次输血，发生过类似反应。其中一例(再生障碍性贫血病人)一周后第二次输冷冻红细胞并无不良反应。所以不能确定是由于红细胞经冷冻保存后的特殊反应。

输血疗效：输冷冻红细胞后，对病人的无力、气促、心悸等贫血症状有所改善。病人皮肤红润，血红蛋白值上升，其上升程度与输新鲜血液大致相同。

由表 3 可见，4 例正常人和 2 例病人输冷冻血 24 小时后，红细胞存活率平均达 90%，可见采用蔗糖洗涤的冷冻红细胞输入人体后，24 小时的存活率与输新鲜血时大致相同。

此外，我们还测定了部分冷冻红细胞样品的 ATP 值，由于 ATP、2, 3-DPG 的含量变化均反映红细胞质量(主要指带氧能力)，2, 3-DPG 在红细胞冷冻前后变化不大。ATP 在红细胞冷冻前后短期保存的样品数值变化不明显，而经长期(数月)保存者，ATP 值有降低趋势(数据略)。

四、讨 论

1. 红细胞甘油化

在红细胞冷冻保存工艺中，甘油化是关键的步骤。甘油的渗透压和粘度远比水大，甘油分子虽然能自由通过红细胞膜，但其透过速度远比水分子的透过速度慢，因此，当较浓的甘油与红细胞膜接触时，在膜的内外必然会产生渗透压梯度。当渗透压梯度超过膜的耐受限度时，便会产生溶血。所以甘油化速度控制的好坏(特别是初速度的控制，影响较大，必须迅速使之均匀混合，不能使甘油有任何堆积现象)不仅对甘油化溶血而且对冷冻保存后，解冻脱甘油洗涤溶血均有明显的影响。这是由于甘油化时控制不当，使某些红细胞受到部分损伤，当解冻洗涤时才表现出溶血。

每个单位红细胞甘油化的速度约 15 分钟左右。若控制适宜甘油化溶血率约在 0.2—0.6% 左右，一般在 1% 以下。在通常情况下甘油化

溶血率低的样品，解冻脱甘油洗涤的溶血率也比较低，在 5—6% 以下。这个数据远比 Huggins^[7] 和隅田^[8] 等发表的数值为低。

2. 洗涤用糖液

Huggins 的糖液洗涤法在国外均采用大量果糖做洗涤液。根据我国目前情况使用果糖有困难，而且价格昂贵。我们采用 10% 蔗糖为洗涤液，它与 5% 果糖比较，发现在第一次洗涤时，用 5% 果糖者上清液透明度好些，红细胞聚集速度稍快。但用 10% 蔗糖液第一次洗涤时，红细胞聚集速度一般在 5—10 分钟也可以完成沉降。第二、第三次洗涤也是在 1—2 分钟内即可完成沉降。

从脱甘油洗涤溶血率的比较来看，用蔗糖洗涤比用果糖洗涤的溶血率还低。这可能是蔗糖分子虽不能透过红细胞膜，但对膜有一定的保护作用。另外，从表 1 所列红细胞脆性试验的数据也可以看出，用蔗糖洗涤的红细胞膜^[9]，其最小抵抗力与最大抵抗力的耐受界限为大，表明蔗糖对红细胞膜似有一定的保护作用。

从各项分析数据和临床试验的结果，可以认为蔗糖作为洗涤液是可行的。

3. 解冻悬浮红细胞的质量控制指标

我们参考国外有关资料，并根据我国目前具体情况，初步拟定解冻悬浮红细胞的质量控制指标如下：

- (1) 上清液血红蛋白含量不得超过 100—150 毫克/单位红细胞。
- (2) 37℃ 保温 30 分钟后，其上清液血红蛋白的增加，不得超过保温前一倍以上。一般增加 20% 左右。
- (3) 上清液残存甘油量在 1% 以下。
- (4) 红细胞回收率在 80% 以上。
- (5) 细菌培养试验阴性。
- (6) 保存温度 4—6℃。
- (7) 使用有效期限解冻洗涤后 6 小时内应用。

根据红细胞冷冻工艺全过程放大试验和冷冻红细胞临床输血试验各项分析数据表明，采用我们选定的工艺条件和方法制备的冷冻红细

胞达到了美、日等国文献报道的同样制品的质量指标，它可以在临幊上逐步推广使用。

由于当时冷冻设备条件的限制，大部分样品是在干冰筒中冷冻保存的，冷冻时间较短，最长的只9个月。我们认为冷冻时间长短对红细胞的溶血等固然有一定影响，但影响最大的因素仍是甘油化、冷冻、解冻和洗涤等几个变化过程。

一般洗涤溶血不严重的样品，其再悬浮的上清液血红蛋白含量不致超过质量控制指标。有时由于去除上清液的操作不当，血红蛋白含量超过控制指标时可再悬浮一次。有几个临床样品是这样做的。

我们准备在推广使用过程中继续总结经

验，并进一步改进和提高。

主要参考資料

- [1] Polge, C., et al.: *Nature (London)*, 164, 666, 1949.
- [2] Smith, A. U.: *Lancet*, 2, 910, 1950.
- [3] Tullis, J. L. et al.: *Science*, 124, 792, 1956.
- [4] Huggins, C. E.: *Science*, 139, 504, 1963.
- [5] Huggins, C. E.: *Modern problems of blood preservation*, 138, 1970.
- [6] Huggins, C. E. et al.: *Preservation of red blood cells*, 321, 1973.
- [7] Huggins, C. E.: *Modern problems of blood preservation*, 172, 1970.
- [8] 隅田幸男: «冷凍血液輸血», 69, 1972。
- [9] 隅田幸男: «冷凍血液輸血», 90, 1972。

[本文于1977年7月12日收到]

次黃嘌呤核苷-5'-二磷酸鉀鹽的制备

中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂

次黃嘌呤核苷-5'-二磷酸(5'-IDP)是多聚核苷酸磷酸化酶的底物，也是制备多聚次黃嘌呤核苷酸(poly I)的基本材料。后者与 poly C 在一定条件下以等克分子混合后，按碱基配对原理，形成双链多核苷酸 poly I: C。它是目前最有效的干扰素诱导物，具有使用剂量小，诱导效价高等优点^[1]。

关于 IDP 的制备方法有：发酵法^[2]、有机合成法^[3]和腺嘌呤核苷二磷酸(ADP)脱氨法。其中以 ADP 用亚硝酸脱氨法最为简便。但以往报道的方法^[1,4]，均过于简略，脱氨程度难以掌握。本文详细介绍了 ADP 用亚硝酸脱氨的反应情况。由于脱氨反应是在较缓和条件下(25℃, pH3—3.5 和分五次加入 10 N 醋酸及亚硝酸钠溶液)进行，既使脱氨反应完全，又避免了副反应的发生。因而，反应后不需再经其他的提纯步骤，直接加入醋酸鉀溶液和乙醇，即可得到 IDP 鉀盐。产物纯度可达 95% 以上，产率在 80% 以上。

制 备 方 法

ADP Na H₂ · 2 H₂O 为本厂产品，纸层析：合格，纯度在 90% 以上。其他试剂均用化学纯。

注意：由于反应时产生的亚硝酸极易分解成很毒的氧化氮和二氧化氮气体。因此，操作

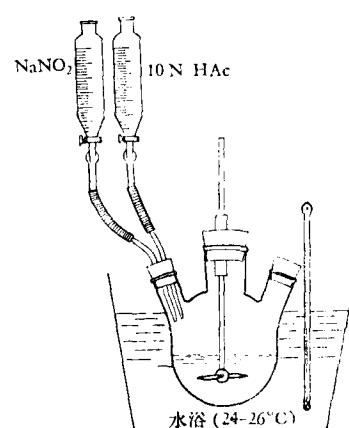


图 1 反应装置