

P 酶的比活是在 0.9—3.05 之间^[5], 本方法得到的结果是 2.94。鉴于迄今尚无证明质膜上不存在 G-6-P 酶或其他可催化 G-6-P 水解的酶的确切证据,故将 G-6-P 酶作为内质网污染率的唯一指标,在考虑到细胞内膜体系之间连续性的可能性的问题时,是值得商榷的。

在本文方法成为常规之后,我们尝试了用等渗介质(0.25M 蔗糖-0.5 毫克分子 CaCl_2 -5 毫克分子 Tris-HCl, pH = 7.4) 制备肝细胞质膜的方法。结果表明,在同样的匀浆器情况下,研磨次数需达 100 次,在用该介质进行的低速离心的反复洗涤过程中,线粒体可以去除得较彻底,但 G-6-P 酶活性则不如使用低渗介质时那

么容易去掉。另外,我们发现使用等渗介质中破碎细胞时,不象有些报道所说的那样,仍可以获得较大片的质膜。如两种介质并用,也许可以获得更好的结果。

主要参考资料

- [1] 伊藤明夫: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生体膜实验法(上), 20, 1974。
- [2] 中村 通: 细胞, 7, 283, 1975。
- [3] S. W. Fox et al: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生命の起源と進化, 116, 1972。
- [4] J. W. De Pierre et al: *J. Cell Biol.* 56, 275, 1973。
- [5] 南部滋郎等: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生体膜实验法(上), 274, 1974。
- [6] 顾国彦等: 实验生物学报, 1963 年, 第 8 卷, 第 390 页。

细胞膜的研究(二)

——大白鼠红血球膜的制备

中国科学院北京动物研究所细胞室生物膜组

哺乳动物的红血球膜在分离的状态下, 一般称为“血影”或“基质”。由于: (1) 在哺乳动物的成熟红血球中没有通常真核细胞内所含有的任何细胞器, 容易得到纯粹的细胞质膜; (2) 可以借助低渗溶血等简便操作除尽细胞内容物获得膜样品; (3) 来源方便; 因此多年来广泛应用它作为研究细胞膜的材料。

事物都是“一分为二”的, 在把红血球膜作为细胞膜的一般模型时, 必须充分估计到它的局限性: (1) 红血球是极端分化了的特殊细胞, 它作为单独的细胞行动, 已失去了细胞器和许多代谢系统, 它的膜同一般组织细胞的细胞膜可能会有很大的差异; (2) 由于不同动物种属间分化程度的差别, 在膜的组成和功能上的种属间差异非常显著; (3) 红血球在体内的寿命约 120 天, 故在血液中的红血球是各种老幼血球的群体, 即在年龄上是不均一的; (4) 制备得到的膜样品同无损伤的红血球膜比较, 在膜结构和性质上可能有若干变化。

当我们想研究最单纯的细胞的细胞质膜保持什么样的最低限度的膜功能时, 或者想查明随着分化过程在膜上发生了什么变化时, 红血球膜无疑还是较好的研究材料。目前已经知道有许多疾病同细胞膜系的结构和功能的异常有关。红血球膜的异常也会造成某些疾病(例如遗传性球状红血球症)。因此七十年代有关红血球膜研究的资料日益增多。

我们在生物膜蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析工作中需要大量纯净的生物膜材料, 因此对人及大白鼠红血球膜的制备进行了研究。现将我们对大白鼠红血球膜的常规制备法报道如下:

基本条件

红血球经溶血作用可以将其内容物(即细胞质成分)释放出来, 通过洗涤除去附着于膜上的内容物后, 即可获得红血球的细胞质膜。这种极其简单的细胞质膜制备方法只适用于哺乳

动物的成熟红血球。对于象鸟类那样的有核红血球和哺乳动物的未成熟红血球则不适宜。

在采用温和的方法溶血时,血球膜不会破碎,只是暂时出现一些足以让蛋白通过的小孔。当血红蛋白及其它细胞成分释放出去后,这些小孔重新封闭(虽然不完全),可以获得外观似乎无异于未损伤的红血球那样的袋状“封闭”的细胞质膜。如此获得之血影在膜透性的屏障等性质上多少有些丢失,即在膜的一些功能及高级结构上有若干变化,但膜的化学组份几乎保留完整。因此宜作为供膜成分的分析材料。

溶血方法包括物理的(低渗处理)、化学的(酸、硷及表面活性剂处理)和生物的(酶及抗体)方法。以低渗溶血最适宜。低渗溶血法又有两种,即一步溶血法和梯度溶血法。一步溶血法是将洗净的血球突然置于极低渗的盐溶液或缓冲液中,使其迅速发生溶血。此方法操作简便,短时间即可获得几乎完全不含血红蛋白的白色红血球膜。梯度溶血法一般操作复杂,费时较长,很难完全除净血红蛋白,但可获得膜透性变化不大的膜样品。一般采用一步溶血法。

溶血过程中,需要严格控制条件,否则完全除净细胞质成分有困难。尤其血红蛋白是硷性蛋白,对于呈酸性的细胞表面具有强烈的吸附性。一般来说,渗透压愈低,溶血效率愈高,但缓冲液浓度过低,不但 pH 值很难保持,而且由于离子强度低,血红蛋白更易吸附在膜上面。此外,血红蛋白的吸附和 pH 值有关,即 pH 值升高时吸附减少。但 pH 值过高将导致细胞质膜破碎,不能获得完整的血影。

操 作 步 骤

试验动物选体重约 200 克的大白鼠。乙醚麻醉后剖腹。以肝素抗凝,自心脏取血。每只大白鼠可收集抗凝血 4—5 毫升。通常每批制备用 3—5 只大白鼠。为避免膜上含有的或膜上吸附的蛋白酶使膜蛋白发生变化,以下操作应在 0—4℃ 低温下进行。血液以 3,000 转/分离心 20 分钟,使红血球沉淀。用虹吸方法吸尽血浆及红血球沉淀表层的绒毛状沉淀层。这对

避免其他类型细胞的混入十分重要。

将红血球置于 3 倍量预冷的 5 mM 磷酸缓冲液配制的 0.15M NaCl 溶液 (pH = 7.4) 中,用玻璃棒温和地搅拌悬浮,在 5,000 转/分下离心 15 分钟,除去上清液及沉淀表层,重复洗涤 3 次。

在洗净的红血球中,按照 1:40 的比例加入预冷的 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4),温和地搅拌 2—3 分钟,置于冰箱(4℃)中放置 1—2 小时,使之完成溶血。然后以 9,000 转/分的转速离心 20 分钟,使红血球膜沉淀。溶血时缓冲液的用量愈多,血影中血红蛋白的残留量愈少,但体积大,离心费时。因此,红血球与缓冲液的容量比例,以 1:40 为宜。重复上述离心洗涤 3—5 次,即可获得白色的红血球膜样品。最后用 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4) 将红血球膜稀释成膜蛋白浓度为 2—3 毫克/毫升悬浮液,冰冻保存。

讨 论

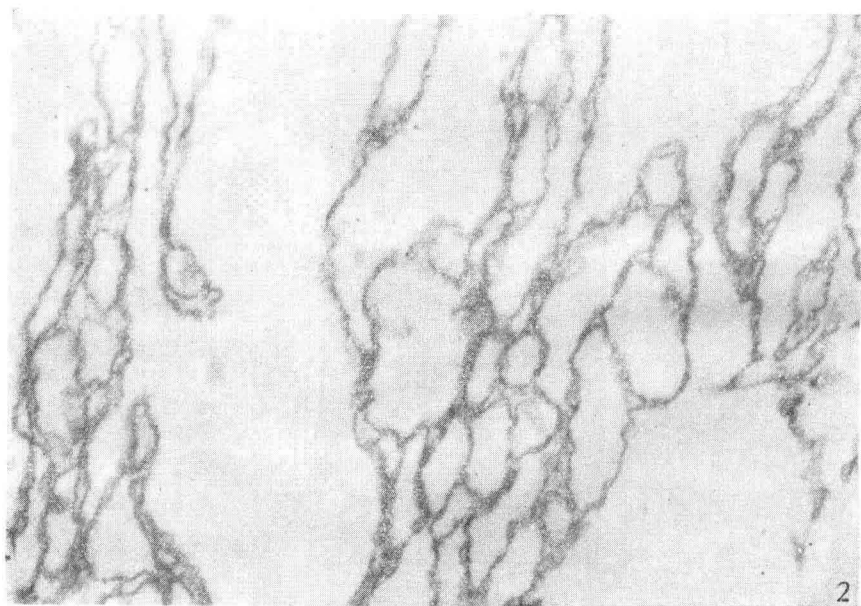
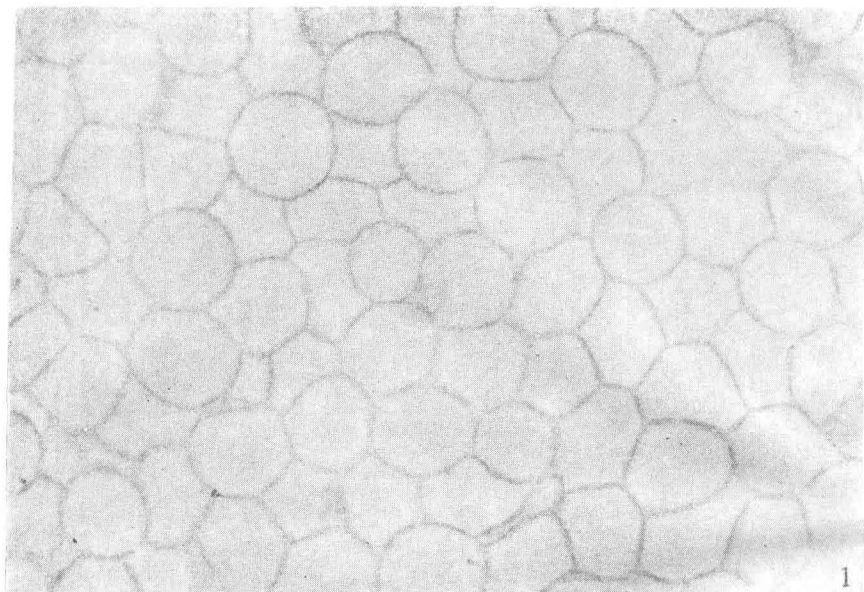
以上介绍的制备方法比较简单,能获得优质的红血球膜。膜样品的相差显微镜(图 1——见封二图版 V)和电子显微镜(图 2——见封二图版 V)的观察表明,所得样品没有白血球及其它成份的混杂。

在制备过程中,若 pH 值略降低,残留的血红蛋白量会迅速增加,极需注意。根据佐藤(1971)的报导,当 pH 值保持在 7.4 时,红血球膜中的血红蛋白含量仅占总蛋白量的 3—5%,相当于血液中总血红蛋白的 0.1%,但 pH 值降低至 7.0 时,血红蛋白约增加至 20%。

这样制备的膜样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图,没有出现血红蛋白带,说明得到的红血球膜样品是纯的,没有血红蛋白的污染。

以上方法适用于大白鼠和人红血球膜的分离。牛、猪等红血球膜的制备,若反复进行上述的低渗处理,将造成膜外表面上包含具有乙酰胆硷脂酶活性的脂蛋白脱落,使膜容易破碎,得不到人红血球膜那样完整的膜样品。此时若在低渗缓冲液中加入 1mM 的 CaCl_2 ,即可完全防止这种膜的不稳定性。

(上接第 27 页)



图版 V

图 1 大白鼠分离红血球膜的相差显微镜观察图 ($1,000\times$)

图 2 大白鼠分离红血球膜的电镜观察图 ($27,000\times$)