

人红细胞封闭影泡的分离及其封闭度的测定

秦德安 何学民 姚泽民

(华东师范大学生物系,上海)

五十年代, Teorell 等^[1]证实红细胞影泡在等渗条件下能“再封闭”,此后,封闭影泡就成为研究生物膜结构与功能的不对称性及细胞膜对介质的通透性等问题的重要材料。近几年来,红细胞影泡作为一种携带药物或核酸的载体,已初步应用于医药临床或遗传工程技术^[2],受到人们的重视。

关于封闭影泡的制备和性质 Schwoch 和 Passow^[3] 已有评述。他们提出影泡是不均一的。为了分离纯化影泡制剂, Bodemann^[4] 曾采用蔗糖梯度离心法。我们考虑到蔗糖的渗透压效应,改用葡聚糖作介质,对按 Steck^[5] 方法制备的 Mg^{++} 封闭影泡制剂进行速度区带离心,结果明显地分成上下两条区带,封闭影泡分布在上层区带。影泡的封闭度由分离前的 67% 提高到 100%。

一、材料与方法

1. 材料 新鲜的健康成人静脉血(枸橼酸钠抗凝)(上海市中心血站供应。葡聚糖(Dextran T₁₀, Pharmacia 出品)。辅酶 I (NAD⁺), 还原辅酶 I (NADH, 系中国科学院生物化学研究所东风试剂厂出品)。细胞色素 C* (上海长城生化制药厂出品)。3-磷酸甘油二乙基缩醛** (西德 Boehringer Mannheim GmbH 出品)。

2. 红细胞影泡制备

(1) 不封闭影泡制剂 红细胞在 pH 7.4、10 mM 磷酸缓冲液(简称 10 p7.4)或 pH 8.0、5 mM 磷酸缓冲液(简称 5 p8)中溶血,分别获得 10 p7.4 影泡和 5 p8 影泡。详见文献^[6]。

(2) Mg^{++} -封闭影泡制剂 参照 Steck

(1974)^[5] 法制备。用含有 1 mM $MgSO_4$ 的 5 p8 缓冲液(简称 5 p8- Mg^{++})代替 5 p8 缓冲液,其他操作和 5 p8 影泡的制备相同。

3. 速度区带离心法 用 10 p7.4 缓冲液分别配制 10%, 15%, 20% 和 30% 的葡聚糖溶液,并按下列顺序将它铺加在 11 毫升聚碳酸酯离心管中: 30% (1 毫升), 20% (2 毫升), 15% (2 毫升) 和 10% (2 毫升), 制成不连续密度梯度液。然后铺加 Mg^{++} -封闭影泡制剂 2 毫升(约 1.5 毫克蛋白质/毫升)。在日立 20 pR-52 D 高速冷冻离心机、RPRS-15 水平转子, 20,000 × g, 4°C 离心 2 小时。离心后分别收集影泡区带,用 5 p8- Mg^{++} 缓冲液洗涤一次(20,000 × g, 4°C 离心 40 分钟), 除去葡聚糖, 供分析用。

4. 分析方法

(1) 形态鉴定 参照文献^[6]。

(2) 还原辅酶 I-细胞色素 C 氧化还原酶活力测定 参照 Zamudio 方法^[7]。

(3) 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (G3PD) 活力测定 参照 Ferdinand 方法^[8]。

二、结 果

1. 按 Steck 法制备的 Mg^{++} -封闭影泡制剂呈红色, 血红蛋白含量约占红细胞总血红蛋白的 0.5%。多数呈帽状或碟状(图 1)。

2. Mg^{++} -封闭影泡制剂经葡聚糖速度区带离心后, 在梯度液上明显地分为上下两条区带(图 2)。上层位于 10% 的梯度液界面(密度

* 参照 Frieden 法^[10]处理, 得氧化型细胞色素 C。

** 使用时, 3-磷酸甘油二乙基缩醛经水解生成 3-磷酸甘油醛。

1.004—1.015 克/毫升)呈红色(影泡中包有血红蛋白);下层位于30%的梯度液界面(密度1.062—1.065 克/毫升)为白色,管底还有少量红色沉淀(近似红细胞,在视野中折光性强)。

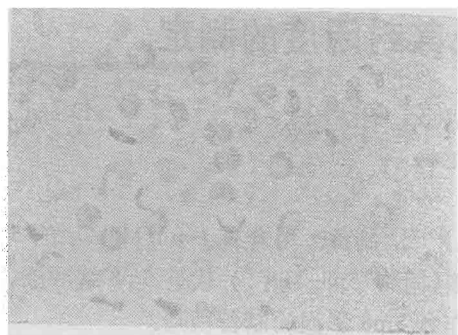


图1 Mg^{++} -封闭人红细胞影泡(800 $\times$)



图2 Mg^{++} -封闭影泡制剂经速度区带离心后的区带分布

根据还原辅酶 I-细胞色素 C 氧化还原酶量,可粗略估计,上层区带影泡量为下层区带的 4 倍以上。相差显微镜观察上层区带影泡多数呈帽状或碟状(图 3),下层区带影泡多数呈圆球形(图 4)。

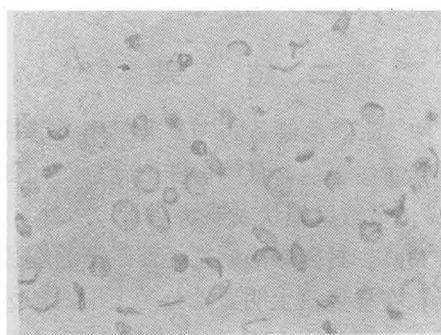


图3 上层区带影泡(800 $\times$)

3. 用酶法分析影泡的封闭度,据 Steck 等人的报道^[2], NADH-细胞色素 C 氧化还原酶

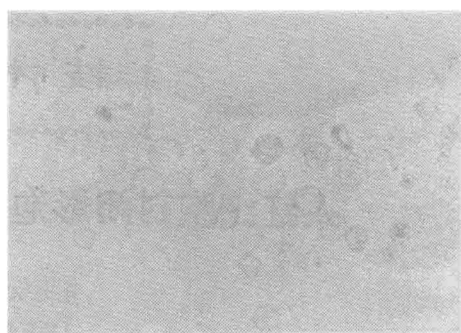


图4 下层区带影泡(800 $\times$)

(E. C. 1. 6. 99. 3) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(E. C. 1. 2. 1. 12) 是位于红细胞膜内侧表面的酶。影泡封闭程度可用下式表示:

$$\text{封闭度}\% = \frac{\text{加表面活性剂酶活力} - \text{不加表面活性剂酶活力}}{\text{加表面活性剂酶活力}} \times 100$$

其中加表面活性剂以消除膜的通透屏障,这时膜内侧表面的酶可和底物充分接近以显示其最大酶活力。

表1为几种影泡制剂的封闭度,其中 Mg^{++} -封闭影泡制剂的封闭度为 67.1%,与 Moore 等人(1981)^[9]报道的 Ca^{++} -封闭影泡的封闭度为 65% 的结果非常接近。

Mg^{++} -封闭影泡制剂经速度区带离心前后的封闭度见表 2。用两种标志酶法测定的封闭结果是一致的。

三、讨 论

由本文的结果可见,应用上述方法制备的 Mg^{++} -封闭影泡制剂中含有部分不封闭影泡。对此种影泡制剂 Bodemann^[4] 曾用蔗糖密度梯度法进一步分离纯化,获得两条主要区带,并指出封闭的 II 型影泡分布在上层,不封闭的 III 型影泡在下层,少量 I 型影泡在中间。他们认为不封闭影泡的密度取决于膜物质的密度,所以密度最大,而 II 型封闭影泡的密度是包裹的溶液和膜物质的平均密度,比单纯的膜密度低,因此,封闭影泡分布在梯度液上层,而不封闭影泡在下层。

本文则用葡聚糖速度区带离心法分离封闭影泡制剂,也分成上下两条区带。上层影泡量

表 1 不同影泡制剂的封闭度

影 泡 制 剂	NADH-Cytc 氧化还原酶活性* ($\bar{x} \pm SD$)		封 闭 度 %
	不 加 皂 素	加 皂 素	
(1) 5p8 影泡	0.053 $\pm$ 0.008(3)**	0.057 $\pm$ 0.01 (3)	7.0
(2) 10p7.4 影泡	0.05 $\pm$ 0.006(4)	0.061 $\pm$ 0.007(4)	18.0
(3) Mg ²⁺ -封闭影泡	0.025 $\pm$ 0.002(3)	0.076 $\pm$ 0.019(3)	67.1

* 还原辅酶 I: 细胞色素 C 氧化还原酶活性单位为 $\Delta O.D.$ 毫克膜蛋白⁻¹·分⁻¹。

** 括号内的数字表示实验次数。

表 2 Mg²⁺-封闭影泡制剂在速度区带离心前后的封闭度

测 定 方 法	分离前平均封闭度(%)	分离后平均封闭度(%)	
		上层区带	下层区带
(1) NADH-Cytc 氧化还原酶	67.1(3)*	100(3)	56.3(3)
(2) 3-磷酸甘油醛脱氢酶	65.7(2)	100(2)	56.4(2)

* 括号内的数字表示实验次数

为下层的 4 倍以上, 呈红色, 封闭度为 100%, 总之, 与 Steck 等人^[5] 描述的 Mg²⁺-封闭影泡特征非常一致。可以认为封闭影泡集中在上层区带, 至于下层区带, 则主要是不封闭或不完全封闭影泡。

文中显微照片由顾福康同志摄制, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Teorell, T.: *J. Gen. Physiol.*, **35**, 669, 1952.
 [2] 李才元: 《生物化学与生物物理进展》**3**, 62, 1982.
 [3] Schwach, G. and Passow, H.: *Mol. Cell. Bio-*

chem., **2**, 197, 1973.

- [4] Bodemann, H. et al.: *J. Membrane Biol.*, **8**, 1, 1972.
 [5] Steck, T. L. and Kant, J. A.: *Methods in Enzymology*, **31**, 172, 1974.
 [6] 秦德安等: 《生物化学与生物物理进展》, **5**, 67, 1983.
 [7] Zamudio, I. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 336—1960.
 [8] Ferdinand, W.: *Biochem. J.*, **92**, 578, 1964.
 [9] Moore, R. B. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 179, 1981.
 [10] Frieden, C.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **24**, 241, 1957.

[本文于1983年12月26日收到]

数 据 处 理 程 序

——显微光度术生物医学应用程序研究之二

李素文 薛绍白

(北京师范大学生物系)

显微光度测量中积累的数据量大, 而所配备的软件缺乏处理这些数据的功能。即使软件较全, 也只给出单个细胞的一些信息, 没有给出

群体分布的信息, 往往需要在测量后花很多时间另作处理, 因此数据处理程序的设计非常必要。数据处理程序分较通用和专用的两种, 例