

关于红细胞影泡重新封闭的探讨

秦德安 何学民 姚泽民 黄琪*

(华东师范大学生物系, 上海)

红细胞低渗溶血去除血红蛋白后所得的细胞膜称影泡 (ghost)。这种去血红蛋白的影泡是不封闭的。1952 年 Teorell^[1] 指出, 在适当条件下红细胞影泡能重新封闭起来, 即恢复对大分子和阳离子的渗透屏障、形成封闭影泡 (resealed ghost)。Schwoch 和 Passow^[2] 认为, 低渗溶血制备的封闭影泡是不均一的多相群体, 其中往往混杂有不封闭影泡。为制备高度均一的封闭影泡, 作者在前文^[3] 中报道了密度梯度离心法分离纯化封闭影泡, 本文将就影响红细胞影泡重新封闭的因素作进一步探讨。

材料与方 法

1. 新鲜血液取自健康成人静脉血 (ACD 或肝素抗凝), 由上海中心血站和苏州血库供应。所用试剂均为分析纯或化学纯。

2. 红细胞分龄, 按 Murphy 法进行^[4], 90% 比积的红细胞在日立 20PR-52D 高速离心机, 30,000×g, 30℃ 离心 1 小时。去血浆, 将压积红细胞 10 等分, 取最上层为年青红细胞, 最下层为年老红细胞。

3. 等渗封闭影泡的制备按 Steck 法^[5] 进行。将 pH 8.0, 5mM 磷酸缓冲液 (简称 5P8) 制备的不封闭影泡制剂先用 PBS (5P8 中含 0.9% NaCl) 缓冲液洗一次, 然后再在 PBS 缓冲液中, 37℃ 保温 1 小时。Mg⁺⁺ 封闭影泡的制备方法见前文^[3]。

4. 影泡封闭度用 Steck 法测定^[3]。

5. 密度梯度离心法见前文^[3]。

结果与讨论

1. 制备方法对影泡重新封闭的影响

目前制备封闭影泡的方法主要有两类: 一是不封闭影泡制剂在等渗条件下再封闭; 其二是在溶血过程中有二价阳离子 (Mg⁺⁺ 或 Ca⁺⁺) 存在而形成封闭影泡。本文用 Steck 方法分别制备了 Mg⁺⁺ 封闭影泡和等渗封闭影泡。前者呈红色 (重新封闭时包进了部分血红蛋白), 血红蛋白含量约占红细胞总血红蛋白的 0.5% 以下。影泡封闭度用 Steck 采用的酶法测定。由表 1 可见, 用不同方法制备的影泡其封闭度不同, Mg⁺⁺ 封闭影泡的封闭度为 67%, 这与 Moore 等人^[6] 报道的 Ca⁺⁺ 封闭影泡的封闭度非常接近; 而等渗封闭影泡的封闭度可达 90%, 优于 Mg⁺⁺ 封闭影泡。

表 1 两种封闭影泡制剂封闭度比较

测定方法	Mg ⁺⁺ 封闭影泡制剂	等渗封闭影泡制剂
NADH-Cytc 氧化还原酶活力*		
一皂素	0.025 ± 0.002 (n = 3)	0.001 ± 0.0002 (n = 3)
十皂素	0.076 ± 0.019 (n = 3)	0.011 ± 0.002 (n = 3)
封闭度** (%)	67.1	90.0

* 酶活力单位为 $\Delta 0. D. \text{毫克膜蛋白}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$

** 封闭度 (%) = $\frac{\text{加表面活性剂的酶活力} - \text{不加表面活性剂的酶活力}}{\text{加表面活性剂的酶活力}}$

* 黄琪同志现在上海生物制品研究所工作。

2. 保温时间与温度对影泡封闭度的影响

一般认为,不封闭影泡悬浮在等渗缓冲液中即可自行封闭。由图1可见,在4℃下,封闭过程进行较慢,1小时后封闭度为70%,过夜后可达90%。当温度升高,则封闭过程可缩短。如37℃下保温1小时便可达到90%封闭度。这一结果与Steck的报道^[5]相似。而不封闭影泡在低渗条件下放置过夜或37℃保温1小时均不能重新封闭,可见等渗是影泡重新封闭的重要条件。

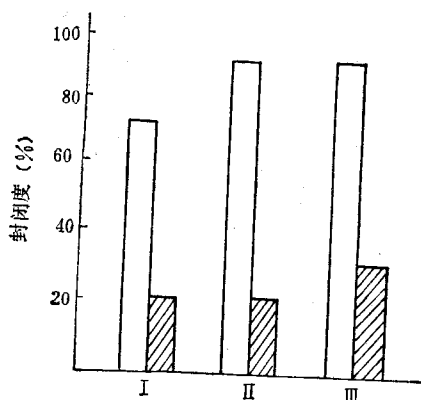


图1 温度:保温时间对影泡封闭度的影响

I. 4℃, 1小时;

II. 4℃, 过夜;

III. 37℃, 1小时;

□ 在等渗溶液中 (PBS);

▨ 在低渗溶液中 (5p8)。

提高温度能促进影泡封闭,但过高的温度又会引起膜酶(如NADH-Cytc氧化还原酶)活力下降。经35℃保温30分钟后测得的酶活力比25℃时降低25%。因此,为保持酶活力不下降,制备等渗封闭影泡以4℃过夜为宜。

3. 红细胞“年龄”对影泡重新封闭的影响

将经Murphy法分成的年青和年老的人红细胞,同样用等渗法封闭。由表2可见,影泡

表2 红细胞“年龄”对影泡封闭度的影响

等渗溶液中,红 细胞影泡制剂	NADH-Cytc 氧化还原酶活力 ($\bar{x} \pm SD$)		封闭度 (%)
	一皂素	十皂素	
年青红细胞影泡	0.0012 $\pm$ 0.0003 (n=3)	0.0155 $\pm$ 0.0033 (n=3)	92.9
年老红细胞影泡	0.0045 $\pm$ 0.001 (n=3)	0.007 $\pm$ 0.0013 (n=3)	35.71

的封闭度与细胞“年龄”有关。年老红细胞影泡封闭度为35.71%,年青红细胞封闭度可达92.9%。

由密度梯度离心的结果也证实,年青红细胞影泡为封闭影泡而年老红细胞为不封闭影泡。作者在前文中^[3]已报道红细胞封闭影泡制剂经葡聚糖密度梯度离心后,在梯度液中有上下两条区带,封闭影泡集中在上层区带,密度为1.004—1.015克/毫升;不封闭影泡分布在下层,密度为1.062—1.065克/毫升。由图2可见,年青红细胞影泡集中分布在梯度液上层(密度为1.018克/毫升)为封闭影泡;年老红细胞影泡集中分布在梯度液下层(密度为1.069克/毫升)为不封闭影泡。

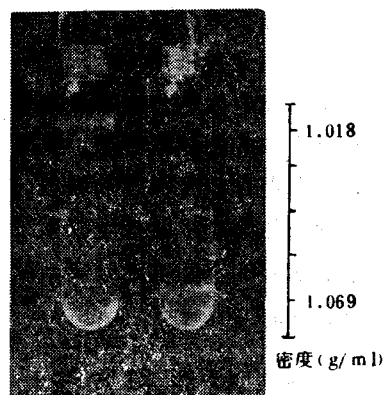


图2 等渗封闭影泡制剂经密度梯度离心后的区带分布

左 年青红细胞影泡制剂。

右 年老红细胞影泡制剂。

综上所述,红细胞影泡重新封闭的程度既与制备条件有关,又与红细胞“年龄”有关。不同“年龄”红细胞的理化性质有明显差别^[4],其质膜结构与功能的自然不同,因此青老红细胞影泡的封闭度存在差异可能与此有关。

参 考 文 献

- [1] Teorell, T.: *J. Gen. Physiol.*, 35, 669, 1952.
- [2] Schwach, G. et al.: *Mol. Cell Biochem.*, 2, 197, 1973.
- [3] 秦德安等:《生物化学与生物物理进展》2, 55, 1985.
- [4] Murphy, J. R.: *J. Lab. Clin. Med.*, 76, 202, 1973.
- [5] Steck, T. L. et al.: *Methods in Enzymology*, 31, 172, 1974.
- [6] Moore, R. B. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 179, 1981.

(下转第23页)

例如 Toh-E, A^[22] 构建的 pSLe1 就是一个仅 3.2 kb 的去除 pMB 9 之载体。pSLe1 是由 pJDB 219 衍生而来,由 pJDB 219 经 HindIII 酶切后,产生的片段自连接而成环状载体。pSLe1 具有很高拷贝数,表型十分稳定(分离率 20%/32 代),减数分裂呈现 4⁺:0⁻,只能转化入 [Cir⁺] 菌株。类似的质粒还有 Dobson 构建的 pYX 质粒^[23], Scott 构建的 TRP-R₁ Circle 质粒^[24]等。

影响外源基因在酵母中表达的因素很多,包括启动子加工,终止子加工,外源基因加工,表达产物的分泌等。但载体骨架构建好坏是影响基因表达最初一步,也是最重要的一个因素。以一个理想的载体骨架为基础加上一个高效启动子,再考虑对待表达之外源基因加工等细节问题,就能构建一个较为完善的表达型载体。目前在酵母中表达外源基因方面的工作日益增多,构建的表达型载体也日趋完善,本文仅对载体骨架构建基础及一些载体骨架的构建作一些介绍,以供参考。

参 考 文 献

[1] Struhl, K. et al.: *Nature*, 305, (29), 391, 1983.

- [2] Hitzeman, R. A.: *Science*, 219, 620, 1983.
 [3] Murray, A. W. et al.: *Nature*, 305, 189, 1983.
 [4] Scherer & Davis, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4651, 1979.
 [5] Stinchcomb, D. J. et al.: *Nature*, 282, 39, 1979.
 [6] Clarke, L. and Carbon, J. et al.: *Nature*, 287, 504, 1980.
 [7] Beggs, J. D.: *Nature*, 275, 104, 1978.
 [8] Gerbaud, D. et al.: *Gene*, 5, 233, 1979.
 [9] Botstein, D. and Ronald, W. D.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces—Metabolism and Gene Expression*, C. S. H., 607, 1982.
 [10] Hartley & Doneson, *Nature*, 285, 5768, 1980.
 [11] Broach, J. R.: *Cell*, 21, 501, 1980.
 [12] Broach, J. R.: *Symp. Quant. Biol.*, C. S. H., 47(2), 1165, 1983.
 [13] Broach, J. R.: *Cell*, 29, 227, 1982.
 [14] Broach, J. R.: *The Molecular Biology of Yeast Sacchromyces—Life Circle and Inheritance*, C. S. H., 445, 1981.
 [15] Jayaram, M. and Broach, J. R.: *Cell*, 34, 95, 1983.
 [16] Grant, A. et al.: *Gene*, 32, 267, 1984.
 [17] Blanc, H. et al.: *MGG*, 176, 335, 1979.
 [18] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 145, 1421, 1981.
 [19] Beggs, J. D.: *The Molecular Genetics in Yeast, Alfred. Benzon. Symp.*, 16, 1981.
 [20] Golf, C. G. et al.: *Gene*, 27, 35, 1984.
 [21] Lusky, M.: *Nature*, 293, 79, 1981.
 [22] Toh-e, A. et al.: *J. Bacteriol.*, 141, 413, 1980.
 [23] Dobson, M. J. et al.: *Current Genetics*, 2, 201, 1980.
 [24] Hollaender, A.: *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, 75, 1982.

[本文于 1985 年 10 月 30 日收到]

(上接第40页)

切割位点在 A 与 T 之间。

如果在生物体内存在 2', 3'-双脱氧核糖或 2-取代 3'脱氧核糖,则 DNA 的复制就不能正常进行。这种酶的存在,可以识别特异的顺序,切去不正常的核苷酸,使 DNA 的合成得以正常的延续下去。因而,此酶的生理功能是对 DNA 的不正常合成起修复作用。据此分析,它应该是能识别各种顺序的一类修复酶,本文叙述的只是其中的一种。

参 考 文 献

- [1] Maxam, A. M. and Gilbert, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74(2), 560, 1977.
 [2] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, 94, 441, 1975.
 [3] Sanger, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (12), 5463, 1977.
 [4] Messing, J. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 9, 309, 1981.
 [5] Sherman, W. et al.: *Methods of DNA and RNA Sequencing*, SBS Educational and Professional Publishing, New York, p. 68, 1983.

[本文于 1985 年 6 月 25 日收到]

(上接第57页)

[7] Mahler, H. R.: *Methods in Enzymology*, 2, 688, 1955.

- [8] Kadlubowski, M. et al.: *British Journal of Haematology*, 37, 111, 1977.

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]