

用 Bialsche 试剂直接测定红细胞膜上唾液酸量

秦德安 钮晓达 陈跃春

(华东师范大学 生物系)

提 要

唾液酸是红细胞膜上的重要组分。我们改进了红细胞膜上唾液酸含量测定方法不需预先水解膜样品而用 Bialsche 试剂直接测定唾液酸含量。本法具有准确、操作简便、快速等优点,尤适用于测定去血红蛋白的红细胞膜上唾液酸量。本文应用直接法分析比较了不同“年龄”红细胞膜上唾液酸含量,发现年老红细胞的唾液酸量明显下降,与年青红细胞相比下降 33%。

唾液酸是红细胞膜上的重要组分,存在于糖链的末端。唾液酸有种属差异,人红细胞表面的唾液酸为 N-乙酰神经氨酸。唾液酸有多种生物功能,参与细胞的识别、粘着和接触抑制;在红细胞的衰老中起关键的作用;红细胞唾液酸含量变化还和某些疾病有关。因此,人们亟需一种快速、灵敏和可靠的分析方法来测定细胞膜上的唾液酸。

目前常用的有高碘酸-硫代巴比妥酸法^{[1][2]}、Seaman 报道的 Bialsche 试剂法^[3],但 these 方法均需将膜样品预先水解释放唾液酸,然后再测定其含量,往往不能快速分析。本文在 Seaman 法基础上作了改进,可不需预先水解膜样品而用 Bialsche 试剂直接测定膜上唾液酸量(下称直接法)。本文报道用直接测定人红细胞膜上唾液酸含量的方法,并分析比较了唾液酸含量变化与红细胞“年龄”的关系。

材 料 与 方 法

1. 红细胞膜制备 按 Dodge 法^[4]制备,最后配成 1:10 膜悬浮液(1 份压积红细胞制得的膜加 9 份 pH 7.4 磷酸缓冲液),置冰箱(4℃)备用。

先按 Murphy 法^[5]分离得到年青和年老红

细胞,再分别制成膜悬浮液,方法同上。

2. 唾液酸量测定

(1) 直接法 取 0.5ml 待测液(1:10 膜悬浮液)直接用 Bialsche 试剂测定唾液酸量,具体操作步骤见表 1。

表 1 唾液酸测定程序

试 剂	空 白 管	标 准 管	样 品 管
N-乙酰神经氨酸	—	0.5	—
待测液	—	—	0.5
磷酸缓冲液	1	0.5	0.5
Bialsche 试剂*	1	1	1

沸水浴加热 12 分钟后冰水浴冷却 3 分钟

正戊醇	5	5	5
-----	---	---	---

充分振摇,1000×g 离心 10 分钟,取正戊醇相在 751 型分光光度计比色(569nm)。

注:① Bialsche 试剂:0.1g 地衣酚 (Orcinol) 于 50ml 容量瓶中,加入 40.7ml 浓 HCl (12N),再加 1ml 1%FeCl₃ 溶液,加蒸馏水至 50 ml。

② 本表加液量为 ml。

(2) Seaman 法^[3] 取红细胞膜悬浮液 1 ml 加 pH 7.4 磷酸缓冲液至 2ml,然后加入神经氨酸酶 100 μl (Calbichem 出品,11u/ml),37℃保温 90 分钟,反应结束立即离心(20,000×g,40 分钟),取上清液按表 1 操作步骤测定唾液酸。

另取 1 ml 红细胞膜悬浮液,不加神经氨酸酶作对照(操作同上)。

3. 膜蛋白量用 Dodge 报道的 Lowry 法^[4]测定。

结 果

1. 有关方法学的几项指标

1) N-乙酰神经氨酸标准曲线 将 N-乙酰神经氨酸配成 100 μg/ml 标准液,测定不同量标准液的光密度,绘制标准曲线(见图 1)。

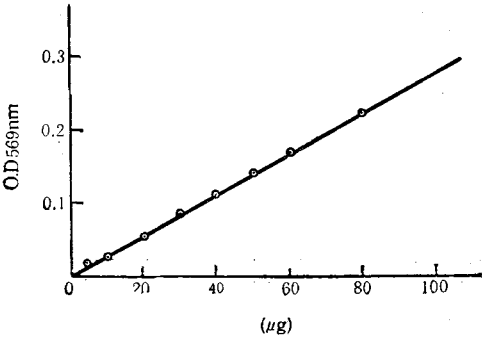


图 1 N-乙酰神经氨酸标准曲线

表 2 重复性试验

	重复次数	唾液酸量 (μg) ($\bar{X} \pm SD$)	变异系数 (CV%)	平均值 (CV%)
批内				
1	8	38.57±1.39	3.6	2.2
2	8	36.43±0.75	2.1	
3	8	37.50±0.75	2.0	
批间				
1	5	44.50±0.44	1.0	2.4
2	5	52.18±1.52	2.9	
3	5	48.75±1.19	2.4	
4	5	48.57±1.67	3.4	

注: $CV\% = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

2) 精密度 取 3 份膜样品同时重复测定 8 次,批内变异系数平均为 2.2%;另取 4 份膜样品于不同时间各重复测定 5 次,批间变异系数平均为 2.4%(见表 2)。

3) 准确性 在 3 份膜样品中加入已知量 N-乙酰神经氨酸进行测定,回收率为 94%、100%、96%,平均 96.6%。

4) 红细胞膜用量选择 取不同量膜悬浮

液测定唾液酸,每管膜蛋白 1 mg 以下时,膜量与光密度有较好的线性关系。

2. 直接法与 Seaman 法比较 将同一浓度的膜样品分别用直接法和 Seaman 法测定,结果有较好的相关性(见表 3)。将两种方法所得的显色物质进行光谱测定,它们的吸收光谱曲线十分相似,其最大吸收峰值均在 566 nm 左右。

3. 红细胞“年龄”对膜上唾液酸量的影响 作者以前曾用 Murphy 法分离不同“年龄”红细

表 3 不同“年龄”红细胞膜上唾液酸量的比较

方 法	唾液酸 (μg/mg 膜蛋白)		下降%
	年青红细胞膜 ($\bar{X} \pm SD$)	年老红细胞膜 ($\bar{X} \pm SD$)	
Seaman 法	34.8±1.7 (n=5)	22.0±1.4 (n=5)	36.8
直接法	36.4±3.3 (n=7)	24.0±2.4 (n=7)	33.1

胞^[6],发现老、中、青不同“年龄”红细胞在形态、酶活性和表面电荷等方面均有明显的不同。由表 3 可见,红细胞膜上唾液酸量亦受细胞“年龄”的影响,其中年老红细胞的唾液酸量明显下降,与年青红细胞相比约减少 1/3 左右。这和 Kahane 等人^[7]引用的数据(老年红细胞唾液酸下降 20—30%)较为一致。最近,董伟等人^[8]报道红细胞唾液酸含量随人年龄而变化,健康人 2—12 岁,红细胞膜唾液酸量平均 36.26 μg/mg 膜蛋白,13—70 岁平均为 33.78 μg/mg 膜蛋白(其中 59—70 岁的 3 例平均为 30.43 μg/mg 膜蛋白)。他们认为这是因为随人年龄老化,血液中衰老红细胞相应增多,本文结果进一步证实了这一看法。

讨 论

上述结果表明,本法不仅在方法学上是可靠的,而且操作简便、快速,但在测定过程中尚须注意下列几点。

1. Bialsche 试剂与唾液酸显色反应时,需 100℃ 加热 12 分钟。由图 2 可见,加热时间与显色程度有关。图中曲线 I 为 N-乙酰神经氨酸标准液,显色反应需加热 12 分钟后才达稳定,而膜样品显色反应有所不同,加热 12 分钟后,

随着加热时间延长, O.D 值仍有上升(见曲线 II), 其原因尚有待进一步探讨。为了测试结果有较好的重复性, 必须严格控制加热时间, 加热 12 分钟后应立即将试管放入冰水浴中冷却, 以终止反应。

2. 待测膜悬浮液务必充分混合均匀, 并需

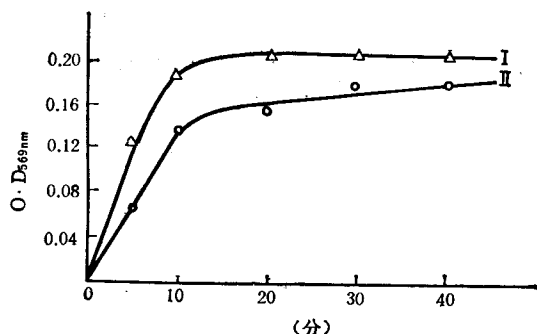


图 2 显色反应进程曲线

新鲜, 膜样品制备后应立即测定, 若 4℃ 保存 2 天以上则唾液酸量减少。

3. 本法不宜测定完整红细胞表面唾液酸, 因为大量血红蛋白对比色有干扰。

何学民同志参加部分工作, 谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Warren, L.: *Journal of Biological Chemistry*, **234**, 1971, 1959.
- [2] Aminoff, D. et al.: *Biochem. J.*, **81**, 384, 1961.
- [3] Seaman, G. V. F.: *Archives of Biochem and Biophy.*, **100**, 493, 1963.
- [4] Dodge, J. T. et al.: *Archives of Biochem and Biophy.*, **100**, 119, 1963.
- [5] Murphy, J. R.: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **82**, 334, 1973.
- [6] 秦德安等: 《华东师范大学学报》(自然科学版), **3**, 92, 1985.
- [7] Kahane, I. et al.: *Nature*, **271**, 2674, 1978.
- [8] 董伟等: 《生物化学与生物物理进展》, **2**, 66, 1985.

[本文于 1986 年 10 月 3 日收到]

(上接第 42 页)

$\text{Na}_2[\text{Cu}(\text{sal})_2]$ 的活性数据加以比较, 可以看出, 黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶法与光照法测得的数据很接近, 故证明了本实验的可靠性, 见表 3。其中光照法数据引自表 4, 其余引自 Weser 的报告^[9]。

由图 3 可得到各种配合物 1 个活性单位时的浓度, 见表 4。

由表 4 可见, 双核配合物较单核配合物有较高的活性。当配体均为咪唑和二乙烯三胺时, 铜的双核咪唑桥配合物的活性高于结构相近的单核配合物, 这可能是由于前者的结构与 SOD 的活性中心的结构较为相近之故。

铜的两种双 Schiff 碱配合物具有较高的歧化超氧离子的活性, 可能是由于具有大的共轭体系, 便于传递电子, 因而有利于超氧离子的歧化。这两种配合物的结构基本相同, 只有苯环上的取代基不同, 所以两者的抑制曲线几乎重

合, 歧化超氧离子的活性很相近。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Matkovis, B.: In "Superoxide and Superoxide Dismutase" edited by Michelson, A. M. et al., p. 501, Academic Press, New York, 1977.
- [3] 方允中等: 《超氧化物歧化酶对辐射所致细胞溶血及其酯类过氧化影响的初步观察》, 1980.
- [4] Louis, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 687, 1976.
- [5] Haddad, M. S., et al.: *Inorg. Chem.*, **18**, 141, 1979.
- [6] 胡跃飞, 胡宏纹: 《高等学校化学学报》, **1**, 132, 1986.
- [7] Beauchamp, C. et al.: *Anal. Biochem.*, **44**, 276, 1971.
- [8] Sillen, L. G. and Martell, A. E.: *Stability Constants of Metal-ion Complexes*, P. 534, Metcalfe & Cooper. Ltd., London, 1964.
- [9] Weser, U. and Schubotz: *Agents Actions Suppl.* **8**, 108, 1981.

本工作为中国科学院科学基金资助课题。

[本文于 1986 年 9 月 8 日收到]