

红细胞血影的制备及装载蛋白质分子和噬菌体的试验*

李昌本 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所)

遗传学、细胞学和医学等方面的研究工作,已注意应用红细胞血影(ghost cell)装载遗传物质、蛋白质、酶和抗体等,通过类似于细胞融合的过程,把所包含的物质“注入”或转移到受体细胞^[1-7]。哺乳动物红细胞制成的红细胞血影由于不含细胞质和细胞核,在装载转移物质时,不会被细胞内含物“污染”,所以是很合适的“注射器”和运载体。在已经过试验的哺乳动物红细胞中,人、狗和兔的红细胞表现出很高的融合能力^[8]。我们用人体红细胞制备了红细胞血影,并研究了装载蛋白质分子和噬菌体的方法,以进一步探讨红细胞血影在真核生物遗传工程中作为载体的可能性。

材 料 和 方 法

1. 制备人体红细胞(HRBC)悬液

肝素抗凝的人体静脉血2毫升(新鲜血样或血库贮存的血液均可),加6毫升rPBS(KCl 137 mM, NaCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) 2000 rpm 离心5分钟,弃去上清液,再加7—8毫升rPBS, 2000 rpm 离心5分钟,如此重复离心洗涤5次,除去白细胞和血清,最后悬浮在rPBS中,制成10%(V/V)的HRBC悬液,4℃贮存备用。

2. 制备荧光素标记的牛血清白蛋白(BSA)^[9]

本实验用异硫氰酸荧光素(FITC-Fluorescein-isothiocyanate, 上海第二军医大学朝晖制药厂出品)标记牛血清白蛋白(上海市牛奶公司综合厂生产,电泳纯)。先将FITC研磨成粉末,在研磨中慢慢滴加0.5M NaCO₃缓冲液(pH9.5)。最终浓度约为1毫克/毫升。

用rPBS或生理盐水配制2%(20毫克/毫升)的BSA溶液,室温(20—25℃)下搅拌(注意不要搅起泡沫),缓慢滴入上述FITC溶液,使FITC与BSA之比为1:100,继续搅拌二小时。然后在4℃下在大体积5mM磷酸缓冲液(pH7.2)中透析,每1—2小时

换一次透析液,3—4次后静置过夜,次日起每天换透析液2次,至少连续透析8天。

用分光光度计分别测定波长2800Å (BSA的吸收波长)和4900Å (FITC的吸收波长)的光密度(O.D.)值,按下列公式计算蛋白质的荧光标记度(F/P)^[10]:

$$F/P = 2.8 \times \frac{O.D._{4900\text{\AA}}}{O.D._{2800\text{\AA}} - 0.35 \times O.D._{4900\text{\AA}}}$$

3. 制备装载FITC-BSA的红细胞血影

红细胞血影有三种制备方法:预先膨胀法^[11]、低渗透析法^[12,13]和快速裂溶法^[14]。我们参考了Mekada等^[15]、Furusawa等^[16]和Loyter等^[13]的方法,把0.4毫升10%(V/V)HRBC和1.6毫升FITC-BSA装入透析袋内,在室温下对480毫升稀释了六倍的rPBS透析30分钟,然后对500毫升PBS(NaCl 137 mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.5mM, Na₂HPO₄ 8.1mM)透析30分钟,用PBS或BSS⁺(NaCl 140 mM, KCl 5.4mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44mM, CaCl₂ 1mM, Tris-HCl 10mM pH7.6)离心洗涤,2000rpm5分钟,弃去上清液,重复进行四次,即可得到装载了FITC-BSA的红细胞血影。

4. 制备装载噬菌体的红细胞血影

0.4毫升10%(V/V)HRBC悬液加1.6毫升λ噬菌体Charon 4A悬液(噬菌体悬液的浓度分别为10⁶/毫升, 10⁷/毫升和10⁸/毫升)装入透析袋,然后按照制备装载FITC-BSA红细胞血影的方法,透析、离心、洗涤,即得到装载了噬菌体的红细胞血影。

为了证明噬菌体确是装载在红细胞血影里面,不是吸附在红细胞血影表面,我们设计了一个简单可靠的噬菌体效价测定试验。把0.4毫升HRBC 10%(V/V)的悬液和1.6毫升Charon 4A噬菌体悬液(10⁸/毫升)混合,室温下放置60分钟作为对照组(吸附试验组)。对照组和装载了噬菌体的红细胞血影试验组分别用PBS 2000 rpm 5分钟离心洗涤4次,收集第4次(最后一次)离心洗涤后的上清液。沉淀的红

* 潘家瑾同志协助显微摄影,袁汉英、严维耀同志协助制备和测定噬菌体效价,特此致谢。

细胞血影和对照组的 HRBC 重新制成悬液, 计数后都分别稀释到 0.7×10^8 细胞/毫升, 按 1:0.05 (细胞悬液: 氯仿) 的体积比加入氯仿, 使细胞裂解, 经吸管反复吹打后 2600 rpm 离心 10 分钟, 分别收集上清液。把这种上清液和上面提到的第 4 次洗涤离心后的上清液去感染大肠杆菌, 统计出现的噬菌斑的数目*。

NZYDT 培养基的配方是 NZamine 10 克 (或用日本产的细菌培养用的蛋白胨代替), NaCl 5 克, 酵母浸膏 5 克, DAP 12 毫克, 胸腺嘧啶 40 毫克, 琼脂 1.5 克, 加水至 1000 毫升, pH 7.2, 使用前加 1M $MgCl_2$ 10 毫升。

半固体培养基的配方 成分同 NZYDT 培养基, 只是琼脂含量为 0.7%。

结 果

1. 相差显微镜和荧光显微镜观察装载 FITC-BSA 的红细胞血影

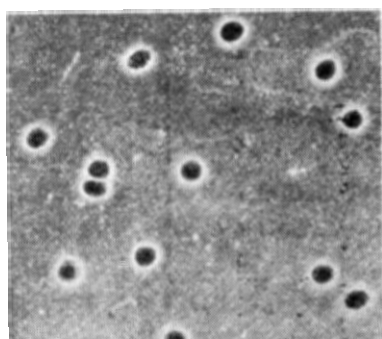


图 1—人体正常红细胞的相差显微照片
细胞具有强烈的折光性, 周围有明亮的光环

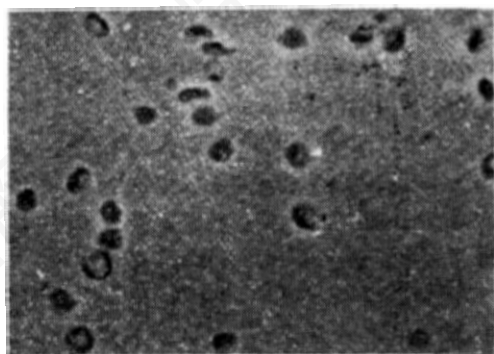


图 2 正常人红细胞血影的相差显微照片
可见到两种细胞, 一种是黑色的破碎红细胞, 具有很低的折光性和反差。另一种是黑灰色的红细胞血影, 具有低的折光性和高的反差, 红细胞血影的形状有多种, 球形、帽形和正常红细胞的双凹碟形

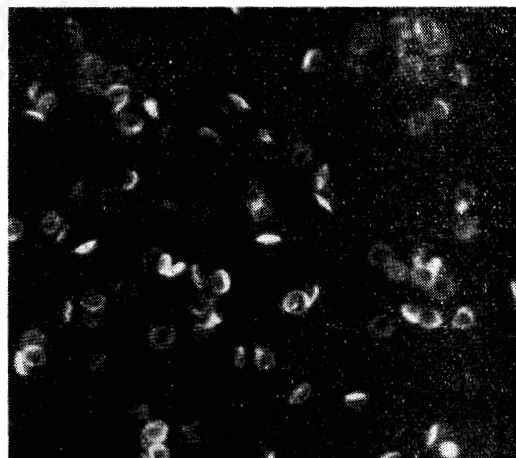


图 3 装载 FITC-BSA 的人红细胞血影的荧光显微照片

用相差显微镜观察红细胞血影时, 可看到三种类型的细胞。

一是正常的人体红细胞, 在视野中折光性强, 细胞周缘有一圈明亮的光环 (图 1); 二是破碎的人体红细胞, 折光性弱, 反差低, 呈黑色 (图 2); 三是折光性弱, 反差高, 呈黑灰色的红细胞血影 (图 2)。红细胞血影的形态变化较多, 有球状、帽状和象正常红细胞那样的双凹碟状, 并且都比正常红细胞稍大一点。当制备红细胞血影所用的 HRBC 悬液浓度增高到 20—50% 时, 第一种类型的细胞在视野中所占的比例也相应增加, 但完整的红细胞血影的得率始终保持 50% 以上。

用荧光显微镜观察时, 只见到球状、帽状和碟状的红细胞血影, 由于含有 FITC-BSA 而呈现细胞轮廓明显的强烈荧光 (图 3)。在荧光显微镜下未见到完整的或破碎的 HRBC。

2. 红细胞血影的稳定性试验

为了测定制备好的红细胞血影的稳定性,

* λ 噬菌体 Charon 4 A 效价的测定方法: NZY-DT 培养基倒底层平板, 37°C 烘 4 小时; 0.2 毫升指示菌 (*E. coli* DP₅₀ SupF) 和适当稀释的噬菌体样品 0.1 毫升在 37°C 下吸附 15 分钟, 加入 3 毫升半固体培养基 (均匀混合), 倒在底层平板上, 37°C 过夜, 统计培养皿中出现的噬菌斑的数目。

我们把制备装载 FITC-BSA 红细胞血影时最后一次(第4次)洗涤离心的上清液收集起来,测定其 $O.D_{.4900\text{\AA}}$ 值,以此时溶液中的荧光素含量作为对照数据。然后把离心沉淀的红细胞血影重新悬浮,制成1%的悬液,分别装入7个玻璃指管,4℃保存,在第1、2、3、5、7、9天后取出一管,摇匀,2600 rpm 离心5分钟,测上清液的 $O.D_{.4900\text{\AA}}$,此时上清液中荧光素含量如有增加,则是从红细胞血影中渗漏出

来,或是由于红细胞血影自然破裂而释放出来的。取存放了9天的玻璃指管,摇匀后离心,去掉沉淀,加入等体积的 PBS 或 BSS⁺,重新制成1%的红细胞血影悬液,按1:0.05(V/V)加入氯仿,用吸管反复吹打悬液使细胞破碎,2600 rpm 离心5分钟,测定上清液的 $O.D_{.4900\text{\AA}}$,这是从红细胞血影里释放出来的 FITC;以此同对照组和其余各组的 $O.D_{.4900\text{\AA}}$ 进行比较,结果列于表1。

表1 红细胞血影4℃存放天数同装载物渗出量之间的关系

FITC 量	处 理	对 照 组 (第4次离心洗涤液)	4℃存放不同天数后的离心上清液						红细胞血影裂解液
			1天	2天	3天	5天	7天	9天	
$O.D_{.4900\text{\AA}}$		0.024	0.039	0.057	0.077	0.090	0.103	0.115	0.681
微克/毫升*		0.12	0.22	0.31	0.45	0.55	0.60	0.67	3.90

* 按照 FITC 的 $O.D_{.4900\text{\AA}}$ 标准曲线换算。

从表1可见红细胞血影里的 FITC 含量是最后一次离心洗涤上清液中的30多倍(3.90/0.12)。在存放的前5天里,上清液中的 FITC 含量呈线性增加;第7、9天时增加量减少,渐趋稳定。到第9天时 FITC 泄出量约占装载量的17%左右,说明制备好的红细胞血影在

4℃下至少可存放9天左右。

3. 红细胞血影装载了噬菌体的验证

现将λ噬菌体 Charon 4A 噬菌斑效价测定试验的结果列于表2。对照组为吸附试验组,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组分别为红细胞血影装载噬菌体的试验组。

表2 红细胞血影装载λ噬菌体 charon 4A 的试验*

项 目	分 组	对 照 组	组 I	组 II	组 III
噬菌体悬液浓度/毫升		1.6×10^8	1.6×10^8	1.6×10^7	1.6×10^6
加入 HRBC 数		1.4×10^8	1.4×10^8	1.4×10^8	1.4×10^8
洗涤液的噬菌斑效价/毫升		1.7×10^3	0.6×10^3	1.7×10^2	0.6×10^2
裂解液的噬菌斑效价/毫升		2.4×10^3	3.2×10^3	5.5×10^2	1.7×10^2

* 噬菌体原液的浓度为每毫升 1.6×10^8 。

从表2可得出以下几点认识:装载到红细胞血影里的噬菌体的量,同加入的噬菌体的浓度成正比;对照吸附试验中,最后一次离心洗涤的上清液同 HRBC 裂解液中所含的噬菌体的数量相差无几;在装载试验中,红细胞血影裂解后释放出来的噬菌体数目,是最后一次离心洗涤上清液中的三到五倍,这说明噬菌体是

包在红细胞血影里,没有或是很少吸附在红细胞血影的表面。

讨 论

1. 红细胞血影是制备方便的“微注射器”

本实验表明红细胞血影制备方便,且可用简易的方法证明红细胞血影确是装载了实验所

要求的物质。此外,还可用相差显微镜和荧光显微镜直接观察红细胞血影的外形,及其同正常人体红细胞的差别。表1和表2所列数据清楚地证明FITC-BSA是装载在红细胞血影里,而不是吸附在其表面。因为红细胞血影裂解后,离心后得到的上清液中FITC的含量比裂解前增加了30倍,如果FITC-BSA是吸附在红细胞血影表面,则在红细胞血影裂解后将随细胞碎片一起沉淀,上清液中的荧光素含量就不可能有如此明显的上升。同样道理也证明了噬菌体是装载在红细胞血影里,因为吸附试验的结果证明HRBC裂解前后,上清液中噬菌体的数量没有明显变动;而当红细胞血影裂解后,上清液中的噬菌体数目明显增多,表明噬菌体确已装入红细胞血影,表2数据证明确是这种情况。尽管由于离心洗涤时残留的洗涤液的体积很难做到各组都完全相同,以致试验组之间的噬菌斑效价有一定差异,但同一组的洗涤液同红细胞血影裂解液的噬菌斑效价相比较时,是很能说明问题的。

2. 红细胞血影装载生物大分子的效率

在我们的实验中,红细胞血影装载的牛血清白蛋白的分子量为67,000,λ噬菌体Charon 4A的头部直径为500 Å和尾部长约1500 Å。红细胞血影装载BSA的效率较高。将表1红细胞血影裂解液中FITC的量(W_{FITC})除以FITC的分子量($MW_{\text{FITC}}=389$)即算出FITC的克分子数,再乘以阿佛加德罗常数(6.023×10^{23}),即为裂解液中FITC分子的数目。根据F/P值知道一个BSA分子为3个FITC分子所标记;我们在制备红细胞血影时用的HRBC的浓度是 3.5×10^7 /毫升,因此可按下列公式算出每个红细胞血影大约装载了 5.8×10^7 个BSA分子:

$$\begin{aligned} & \frac{W_{\text{FITC}} \times \text{阿佛加德罗常数}}{MW_{\text{FITC}} \times \frac{F}{P} \times \text{HRBC数目}} \\ &= \frac{3.9 \times 10^{-6} \times 6.023 \times 10^{23}}{389 \times 3 \times 3.5 \times 10^7} \\ &= 5.8 \times 10^7 \text{ 个 BSA 分子/细胞} \end{aligned}$$

Wasserman等报道,待装载的BSA浓度在2—4毫克/毫升时,每个红细胞血影里可装载 10^6 个BSA分子^[18];这低于我们的实验结果。

λ噬菌体Charon 4A的装载效率很低。表2指出,噬菌体原液的浓度为 1.6×10^8 /毫升,红细胞血影裂解后释放出来的噬菌体量约为 3×10^3 /毫升,由此算出的装载效率约为 2×10^{-5} 。影响噬菌体装载效率的因素较多^[17],但主要原因也许是HRBC在溶血过程中形成的孔隙较小,这样就减少了噬菌体进入红细胞血影的机率^[12]。

3. 红细胞血影的稳定性

红细胞血影制成后的稳定性同红细胞血影转移有关物质的效率有关,如制成后严重渗漏或很易破裂,红细胞血影就不能有效地把所包含的物质“注入”受体细胞。从表1数据来看,本实验制成的红细胞血影是稳定的,在4℃下存放9天,释放出的FITC约占装入量的17%。同时,第1天到第5天间释放出的FITC较多,绝对量为每毫升10微克到15微克,第7天起减少到5微克,这表明FITC的释出不象是红细胞血影破裂的结果,否则随着存放时间的延长,红细胞血影破裂的数目会相应增多,FITC的释出量也应增多;可是,实际上是存放一段时间后FITC释出量渐趋减少。因此,这表明可能是红细胞血影渗漏所造成,尤其是我们制备的FITC-BSA的F/P=3,可能有一些非特异标记的FITC分子随着时间的推移而游离出来,通过红细胞血影的双层膜进入周围的介质。

参 考 文 献

- [1] Kalsoft, K., J. Zeuthen, F. Engback, P. W. Piper, J. E. Celis, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73:2793—2797.
- [2] Capecchi, M. R., R. A. Vonder Haar, N. E. Capecchi and M. M. Sveda, 1977. *Cell*, 12:371—381.
- [3] Schlegel, R. A., and M. C. Rechsteiner, 1975. *Cell*, 5:371—379.
- [4] Anderson, W. F. and L. J. Krueger, 1977. *Cell Biol*, 70:185a.

- [5] Yamaizumi, M., T. Uchida, Y. Okada, 1978. *Nature*, 273:782—784.
- [6] Yamaizumi, M., T. Uchida, Y. Okada and M. Furusawa, 1978. *Cell*, 13:227—232.
- [7] Yamaizumi, M., T. Uchida, E. Mekada, Y. Okada, 1979. *Cell*, 18:1009—1014.
- [8] Furusawa, M., T. Mishimura, M. Yamaizumi and Y. Okada, 1974. *Nature*, 294:449—450.
- [9] 中山大学生物系生化微生物学教研室编 1978, 生化技术导论, 259—267, 人民教育出版社.
- [10] 王世中主编 1980, 免疫化技术 120—121 科学出版社.
- [11] Rechsteiner, M. C., 1975. *Exp. Cell. Res.*, 93:487—492.
- [12] Seeman, P., 1967. *J. Cell Biol.*, 32:55—70.
- [13] Loyter, A., N. Zakai and R. G. Kulka, 1975. *J. Cell Biol.*, 66:292—304.
- [14] Ihler, G., R. Glew and F. Schnure, 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70:2663—2666.
- [15] Mekada, E., M. Yamaizumi and Y. Okada, 1978. *J. Histochem. Cytochem.*, 26:1067—1073.
- [16] Furusawa, M., M. Yamaizumi, T. Mishimura, T. Uchida and Y. Okada, 1976. *Methods in cell Biology*, Vol. XIV: 73—80.
- [17] Schlegel R. A. and M. C. Rechsteiner, 1978. *Methods in cell Biology*, Vol. xx: 341—354.
- [18] Wasserman, M., N. Zakai, A. Loyter and R. G. Kulka, 1976. *Cell*, 7:551—556.

人参细胞悬浮培养的研究*

I、悬浮培养细胞的形态结构和繁殖

丁葆祖 柏淑华 吴逸 樊小平

(山西省生物研究所)

人参是一种珍贵的药材,为人所知至少有四千年的历史。对人参的研究,由来已久^[3]。然而研究人参的组织培养只是近十几年的事。罗士韦(1964)^[5]、朱蔚华等(1978)^[4]先后诱导出了人参的愈伤组织并进行了继代培养,德国(1972)、日本(1973)已有用组织培养法生产与天然人参相同成分的皂甙和甙元的专利^[6],丁家宜等(1979)^[1]报道了人参细胞的液体培养及粗皂甙含量。但是,在悬浮培养条件下人参细胞的形态结构和繁殖方式的研究还未见报道。本文是研究人参悬浮培养细胞的形态结构和繁殖方式的初步结果。

材 料 和 方 法

供试人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)由山西降县南繁药材场、吉林特产所、抚松第一参场供给。悬浮

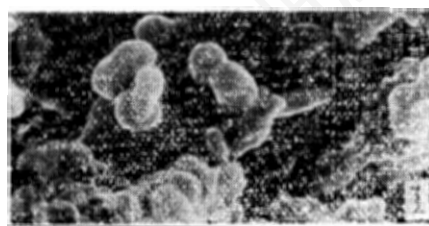


图 1 人参愈伤组织细胞形态

培养细胞来源于人参鲜根诱导的愈伤组织,参龄为二年和五年。愈伤组织经六次继代培养,已分化出根,根上又长愈伤组织(图1)。将这样的愈伤组织接种于液体培养基 V-MS(6,7-V 培养基^[11]的大量元素,MS 培养基^[9]的微量部份,附加 2,4-D, 1毫克/升)。用 150 毫升三角瓶装 30 毫升培养基,在每分钟 25 转的转床上进行悬浮培养。30—40 天换一次新鲜培养液

* 本文承王伏雄、段续川教授审阅,并提出宝贵意见。扫描电镜制片、照相由山西电镜中心范建、孔繁荣,白春生、高小丁协助,特此致谢。