

## 参 考 文 献

- [1] Rossi, G. L. 1975. *Experientia* 31:998.  
 [2] Hayat, M. A. 1978. *Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy*. Uni-

versity Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A.

- [3] Bohmon, S. -O. 1974. *J. Ultrastruct. Res.* 47:329.  
 [4] Larsson, L. 1975. *J. Ultrastruct. Res.* 51:140.

## 细胞和细胞膜内过氧化脂质的微量定量

翁玉椿 王秀平 卢泳才 郭肇铮 石方

(北京中医学院)

近年来许多学者报道了机体衰老以及脏器退行性变化与脂质过氧化作用有着密切关系<sup>[1-3]</sup>。了解细胞内脂质过氧化作用有助于探讨某些病变以及某些药物的作用机制。目前测定细胞或细胞膜内过氧化脂的方法均采用硫代巴比妥酸比色法<sup>[2-6]</sup>，但该方法需要细胞量较多，而且受到细胞内糖类、醛类、胆红素等干扰。考虑到荧光微量法测定人血清中过氧化脂质在灵敏度和选择性等方面优于比色法，为此本文探讨了该法应用于测定细胞和细胞膜内过氧化脂质的可能性。

## 材 料 和 方 法

## 材 料

(1) 兔主动脉平滑肌细胞采用贴壁法培养<sup>[7]</sup>。本实验所用者是经连续传代并冻存后，复苏生长的第15~25代细胞。将40万细胞种入25ml培养瓶中，稳定生长6天后供实验用。

(2) 兔红细胞膜的制备按低渗溶血法进行<sup>[8]</sup>，溶血后低温离心(10,000转/分，10分钟)，沉淀用缓冲溶液洗涤2~3次，最后悬浮于磷酸缓冲液中。用福林酚法测定膜蛋白浓度或细胞蛋白量。

(3) 硫代巴比妥酸(下简称TBA)(Fluka AG Buchs)。

(4) 1,1,3,3-四甲氧基丙烷(1,1,3,3-Tetramethoxypropan)(Fluka AG Buchs)。

其余试剂均为国产分析纯。仪器为国产721分光光度计和日立MPF-4型荧光分光光度计。

## 实验操作步骤

方法主要原理：细胞或细胞膜在稀硫酸酸性条件下用磷钨酸沉淀，脂质过氧化物也随之沉淀(为防止脂质过氧化物在沉淀操作中进一步被氧化，稀酸性条件是必要的)，在醋酸酸性条件下与TBA反应(95℃)，产物被正丁醇提取，该产物荧光激发峰波长为532nm，发射峰波长为553nm，由于两峰位波长相近，实际测定采用激发波长515nm，发射波长553nm，其详细步骤如下<sup>[6]</sup>。

(1) 细胞悬液离心(3000转/分，10分钟)，细胞用生理盐水洗涤1~2次。(细胞膜悬液直接按下步操作)。

(2) 在细胞或细胞膜中加入N/12硫酸4ml，10%磷钨酸0.5ml，室温放置5分钟，离心(3500转/分10分钟)。

(3) 在沉淀中再加入N/12硫酸2ml，10%磷钨酸0.3ml，摇匀，离心(3500转/分，10分钟)。

(4) 在沉淀中加入4ml双蒸水和1ml TBA冰醋酸溶液(0.67%TBA溶液与冰醋酸等体积混匀)，充分悬浮。

(5) 悬液于95℃油浴中加热1小时。

(6) 急冷至室温后加入5.0ml正丁醇，充分摇匀，离心(3500转/分，15分钟)。

(7) 取上清液测量其荧光强度f。

(8) 过氧化脂质(Lipid peroxide简写Lp)的计算：

$$Lp = 0.5 \times \frac{f}{F} \times \frac{1}{\text{mg 蛋白质}}$$

式中F值为标准管的荧光强度，即每管含0.5nmol标准物按(4)至(7)步骤操作。对于整个细

胞, 式中细胞蛋白量可用细胞数量(百万)直接计算, 此时  $L_p$  值单位为  $n \text{ mol}/\text{百万细胞}$ 。

### 工作曲线的制作

#### 细胞数量线性范围的试验

分别量取细胞数量为 10、20、30、40、50、60、80 (万) 的细胞悬液, 或分别量取细胞膜浓度为  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  悬液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 ml, 按上述步骤进行操作, 所得结果以细胞数量(或细胞膜蛋白量)对测得的相对荧光强度作图(见图 1, 2)。

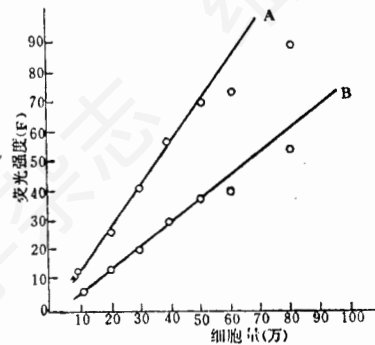


图 1 细胞量与过氧化脂质 TBA 反应生成物的荧光强度的关系

A. 培养液中加入 2% 高脂和 8% 小牛血清;  
B. 培养液中加入 10% 小牛血清。

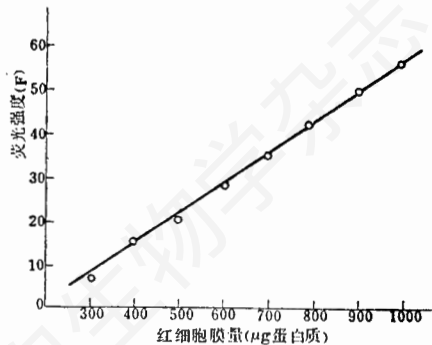


图 2 红细胞膜浓度曲线

从图 1、2 中可以看出: 细胞数量 10~50 万范围内或细胞膜蛋白量 300~1000  $\mu\text{g}$  范围内两者有良好的线性关系。图 1 还表明改变细胞培养的环境, 细胞内脂质过氧化作用的程度也不同。

### 回收实验

(1) 含 30 万细胞的悬液(或 600  $\mu\text{g}$  红细胞膜悬液)。(2) 标准物溶液分别为 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50  $n \text{ mol}$ 。(3) 细胞(膜)悬液加入一定量标准物溶

液, 分别按上述步骤测定, 并按③÷(①+②)式子计算回收率, 结果表明细胞组平均回收率为 96.61%, 标准偏差 3.212, 变异系数 3.33%; 红细胞膜组平均回收率为 99.4%, 标准偏差 4.186, 变异系数 4.21%。

### 方法重复性实验

同一份新鲜制备的红细胞膜悬液, 由三位操作者分别独自测定, 其结果分别为  $0.276 \pm 0.0191 n \text{ mol}/\text{mg}$  蛋白质( $n=20$ ),  $0.304 \pm 0.0194 (n=20)$  和  $0.280 \pm 0.0214 (n=20)$ 。平均值为  $0.288 \pm 0.0246 n \text{ mol}/\text{mg}$  蛋白质( $n=60$ ), 由此可见, 本法重复性良好。

## 结果和讨论

1. 试验表明细胞培养中各成份以及 TBA 本身在本实验条件下没有荧光, 故不干扰本测定。文献报道<sup>[9,10]</sup>在醋酸酸性条件( $\text{pH}=3.5$ )下一定量的糖类、醛类、血红蛋白等不干扰测定, 而且在酸性条件下反应物被正丁醇提取最完全。

2. 由于荧光方法灵敏度受试验用试剂和蒸馏水等的荧光空白所限, 本法最低检出浓度为: 细胞数量 10 万和细胞膜蛋白量为 300  $\mu\text{g}$  (以牛血清蛋白为标准物)。

3. 仪器(荧光计)的工作状态的一致性和每批实验随做标准管, 并以内标法计算测得结果, 方法可获得稳定可靠的结果。

4. 鉴于方法灵敏、准确且重现性好, 干扰因素少, 本法可微量测定细胞培养过程中不同环境对细胞内脂质过氧化作用的程度, 以及定量了解体内或体外环境对细胞膜内脂质过氧化作用的程度, 这就为以细胞为模型探讨某些病变机理或药物作用的机理提供一个微量定量方法。

## 参考文献

- [1] 八木国夫, 1978, 最新医学, 33(4):653-757.
- [2] Gavino, V. C. et al., 1981, *J. Lipid Res.* 22(5):763-769.
- [3] Packer, L. et al., 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)* 71:4763-4767.
- [4] Evans, R. C. et al., 1981, *Biochem. Biop-*

- hys. Res. Comm.* 100:1537—1542.
- [5] Stocks, J. et al., 1971, *Br. J. Haematology* 20:95—111.
- [6] 八木国夫, 1975, *ビタミン* 49:403—405.
- [7] 卢咏才等, 1983, 北京中医学院学报, 1: 61—63.
- [8] 中国科学院动物所细胞室生物膜组, 1977, 生物化学与生物物理进展, (1):22—23.
- [9] 大石诚子, 1978, 最新医学, 33(4):660—663.
- [10] 八木国夫, 日本医事新报, NO:2748:100—101.

## 超薄切片套片法

肖露 王玉芝

(军事医学科学院放射医学研究所)

超薄切片捞取方法很多,近年来,我们采用铂金丝环套片法,与目前采用的沾片法和水底捞片法相比,具有较多的优点。

铂金丝环套片法操作简单,易于掌握,而且能使切片平整地铺在铜网中央。沾片法易将带状的连续切片打乱,切片也往往有皱折。水底捞片法,固然可以使切片保持平整,但操作不易掌握,对于缺乏经验的新手来说,很容易将切片捞偏,即使是熟练的操作者,也难于把漂散的切片捞在铜网中央。用铂金丝环套片,无论是连续切片带,还是漂散的切片,都可准确地捞在铜网中央。不受切片多少的限制,成功率较高。

铂金丝环的制作方法很简单。取直径0.1毫米的铂金丝,做成不同规格,最大直径的环,不得超

过铜网大小(直径约2.5毫米)。把做好的环烧接在玻璃棒上。切片少时选用直径较小的铂金丝环(小于2.5毫米直径的环);切片多时则选用直径较大的铂金丝环(直径接近于2.5毫米的环)。具体选择视情况而定。

具体操作是,左手持眉毛笔,将切片带或漂散的切片集中于水槽中央。右手持有铂金丝环的玻璃棒,将铂金丝环平放,准确地套在切片上。旋转玻璃棒,使铂金丝环的平面与水面呈45°角度。轻轻提起铂金丝环。把带有水膜的切片平稳、准确地放在铺有支持膜的铜网上,待水膜吸附在铜网上后,轻轻提起铂金丝环。如果套片时切片捞不起来,可能是由于铂金丝环上有污物。把铂金丝环放在酒精灯上烧一下,然后浸入干净的蒸馏水中清洗干净,重新使用。

### 纪念 Robert Hooke 诞生 350 周年、上海市细胞生物学学会成立

1985年7月18日上午中国细胞生物学学会和上海细胞生物学学会筹委会在上海联合召开了“纪念胡克诞生350周年暨上海市细胞生物学学会成立大会”。出席会议的有上海市科协代表、在沪参加中国细胞生物学学会第二届三次理事会的理事及上海地区会员共150余人。上海市科协付主席刘吉和张作人教授,陈瑞铭教授应邀参加了会议。

大会由中国细胞生物学学会理事长姚鑫主持。上海细胞生物学研究所名誉所长庄孝德和所长王亚辉分别作了“从胡克到细胞生物学”和“细胞生物学发展趋势”的报告。

报告之后,胡兆庆同志向代表们汇报了上海市细胞生物学学会的筹备经过,宣读了上海市科技协会“关于同意上海市细胞生物学学会建立”的批复,并宣布了7月6日由会员通信选举理事的结果:庄孝德、鲍曙、李文安、汤雪明、陈丽蕊、徐永华、张志鸿、唐惕、王代学、黄世楷、沈大棱、严缘昌、胡兆庆、庞延斌、盛民立和黄祥辉等16位同志当选为上海细胞生物学学会理事。此外考虑到开展生物教学的需要,为中学教师保留理事名额一名。接着上海市科协付主席刘吉在会上讲话,对上海细胞生物学学会的成立表示祝贺。

下午举行了上海细胞生物学学会第一届理事会第一次会议,推选庄孝德任理事长,汤雪明、唐惕任付理事长,胡兆庆任秘书长。并从提高与普及二方面讨论了开展学术活动等事宜。

(胡兆庆)