实验技术与方法

柞蚕（*Antheraea Pernyi*）蛹血淋巴脂蛋白的分离和鉴定

冯 慧　关雪辰　陈娥英　　毕坎华　李小洁
（中国科学院动物研究所）　（中国科学院生物物理研究所）

昆虫血淋巴的主要功能之一是携带和输送营养及活性物质。如已证实天蚕、蝗虫等的主要脂类，如甘油脂和固醇，以及某些激素如保幼激素，从来源器官释放进入血淋巴后就与血淋巴脂蛋白相结合，然后输送到相应的器官或组织中，以供代谢所需。由于血淋巴脂蛋白在昆虫脂类及激素代谢中起着重要的作用，因此近年来这方面的研究工作受到了重视[5-7]。

柞蚕是我国养蚕业重要对象，柞蚕蛹及卵又在天敌昆虫赤眼蜂的利用中也有重要作用，因此我们对柞蚕蛹血淋巴脂蛋白进行了分离纯化，并初步研究了它的性质特征。

我们用河南一化柞蚕蛹，按 Thomas 等人的方法[8,9]，再加以改进后，以不同密度的盐溶液对血淋巴脂蛋白进行超速离心分离纯化，用电镜观察其形态和大小，用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳法鉴定脂蛋白的纯度，并对高密度脂蛋白做了进一步分离纯化。现将结果报道如下。

材料和方法

1. 材料　河南省一化柞蚕蛹。秋季将蚕蛹置于室外常温二个月，然后于 4℃ 冰箱贮存备用。

2. 柞蛹血淋巴的收集

在蛹翅处剪一小口，轻压腹部，在冰浴中分别收集雌雄血淋巴。每毫升血淋巴加入 5 微克分子苯基硫脲以防酪氨酸酶引起血淋巴黑化作用。

3. 血淋巴脂蛋白的分离和纯化

将收集的血淋巴置于 4000rpm，2℃ 离心 20 分钟，除去血细胞及脂肪体碎片等物。按每 100 毫升血淋巴加入 10 毫克 EDTA 二钠盐（乙二胺四乙酸二钠，分析纯）。然后进行超速离心分离及纯化。参照 Thomas 等方法再略作修改。用不同密度的溴化钠（分析纯）盐溶液对柞蚕蛹血淋巴脂蛋白进行超速离心分离和纯化，并进一步纯化了高密度脂蛋白。

4. 透析

将脂蛋白组分置于透析袋中，以 0.05*M* 磷酸盐缓冲液（pH6.7），其中含有 0.15*M* NaCl 和 EDTA 透析 15 小时。

5. 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

在超速离心分离纯化脂蛋白的过程中用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分析。根据 Davis[3] 的方法，用 3.75% 浓度的胶，三羟甲基氨基甲烷-甘氨酸缓冲液，pH 为 8.3。电流每管 3 毫安。电泳后的蛋白质用 1 %氨基黑染色 3—5 分钟，再以 7% 的醋酸液脱色；脂蛋白在电泳前用 0.5% 苏丹黑乙二醇溶液预染 4 小时。

6. 折射率及密度测定

用阿贝折射仪（Abbe refractometer）测定盐溶液及脂蛋白的折射率，并换算成密度。

7. 电子显微镜观察

根据 Forte[4] 的负染法，对已纯化的高密度脂蛋白进行电镜观察。

结果与讨论

1. 柞蚕蛹血淋巴脂蛋白的超速离心分离和纯化

（1）低密度脂蛋白的分离

在 OmegaI 超速离心机 8 × 35# 转头的 35 毫升离心管中，顺序加入 13.4 毫升密度为 1.26

克/毫升的 NaBr 溶液和5.5毫升密度为1.09克/毫升的 NaBr 溶液，在顶部小心铺加6.5毫升血淋巴样品(雌、雄血淋巴样品分别离心)，不使其混合，然后在39000rpm离心8小时，15—20℃。

此时在离心管顶部形成一浅黄色层，用吸管小心吸出，以备检定。此层即为低密度脂蛋白（LDL)。在浅黄色层之下形成一较宽的黄色层，此层为高密度脂蛋白（HDL)，其上均有一无色透明层间隔着。将此层小心吸出，以备进一步纯化用。以上两层在雌和雄血淋巴中是相同的。所不同的是雌性血淋巴的离心管中，在 HDL 层之下还有一绿色层，它可能是极高密度脂蛋白（VHDL)，在雄性中未见。

（2）高密度脂蛋白的纯化

将上述离心中取出的雌、雄高密度脂蛋白样品，再分别进行超速离心，使之进一步纯化。将离心所得的每一部分样品都进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，鉴定样品的纯度。

用 Hitachi 80P-7 超速离心机，使用RP80T3转头在12毫升离心管中顺序加入2.5—2.8毫升密度为1.26克/毫升的 NaBr 溶液；2毫升密度为1.20克/毫升的 NaBr 溶液。3毫升上次离心所得的 HDL 样品，加入1.5毫升密度为1.17克/毫升的 NaBr 溶液，在37000rpm离心20小时，温度为16℃。

离心后在离心管表面形成一深黄色油状层。小心将此层吸出，即为纯化后的 HDL_I 样品；其下浅黄色层为 HDL_{II} 样品。在这次离心中雌、雄样品情况差别不大。

在超速离心分离纯化过程中，对已纯化的脂蛋白样品分别测定折光率、换算成密度，每个样品至少取样四次，结果见表1。

表1 柞蚕蛹血淋巴脂蛋白的密度

柞蚕蛹血淋巴脂蛋白的种类	密度(克/毫升)	
	♀	♂
低密度脂蛋白	1.101—1.111	1.083—1.094
高密度脂蛋白	1.172—1.176	1.165—1.169

从上表可以看到我们所测的柞蚕蛹血淋巴脂蛋白的密度，略高于文献上关于天蚕蛾 *H. cecropia* LDL 的数值1.048—1.063，而高密度脂蛋白的密度和天蚕蛾HDL的数值1.158—1.170非常接近[8]。他未将雌、雄分开测定。我们分别测定的结果表明，雌性略高于雄性。

本法较为优越。Thomas 等人的原法是用数种混合的盐溶液进行离心纯化，如 NaCl，NaBr，NaF 等，我们用分析纯的 NaBr 配成不同密度的溶液，在分离纯化过程中，将 NaBr 溶液的密度变化，每一步都详细标明。比原法快速、简便且精度高。按本法进行了多次实验。每一样品至少重复三次，结果比较一致。

本实验严格按雌雄分别取样，从脂蛋白的密度，及凝胶电泳鉴定的脂蛋白条带，均表明雌雄不同。

2. 用聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分析柞蚕蛹血淋巴脂蛋白纯度

（1）低密度脂蛋白（LDL）的纯度鉴定：

雌　经苏丹黑预染电泳后有一条细条带，量很微，再以氨基黑染色，除上述条带外不再呈现其他的条带，表明已被纯化。

雄　情况与雌性相同。（见图1）

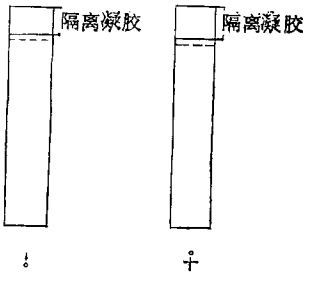

图1 低密度脂蛋白电泳图

（2）高密度脂蛋白的纯度鉴定　在离心管中有两层，表面深黄色的为 HDL_I，下层为浅黄色的 HDL_{II}。

因性别差异条带有所变动。

雌　HDL_I 用苏丹黑预染后有6个条带，再以氨基黑染色，除上述条带外不再出现其他的新条带，表明这一部分已被纯化。（图2(a)见封三）。

HDL_{II}以苏丹黑预染后的电泳行为与HDL_I类似，但再用氨基黑染色后又出现一些含量很微的新条带，表明这一部分还有一些杂蛋白。

雄 HDL_I 部分以苏丹黑预染，电泳后有5个条带，再以氨基黑染色不再出现新条带，表明已被纯化(图2(b)见封三)。

HDL_{II} 以苏丹黑预染后的电泳行为和HDL_I类似，但再以氨基黑染色后又出现一些含量很微的新条带，说明这一部分纯度不够。

经超速离心分离纯化的脂蛋白的纯度表明，第一次超速离心后所得的 LDL 和第二次离心后的 HDL_I 样品已达到"电泳纯"。HDL的脂蛋白条带比 LDL 多，一般雌性比雄性的多一条带，它可能是雌性蛋白[1]。

3. 电子显微镜观察

根据 Forte[4] 等的负染法，对已经纯化的高密度脂蛋白做电镜观察。高密度脂蛋白的分子直径为 14.35±0.34nm，呈球形。在91300倍时的电镜照象如图3(见封三)所示，从 Chino[2] 的脂蛋白（HDL）负染色电镜照片上计算出的分子直径是 13.5±0.6nm，此值与我们的结果相仿。

参 考 文 献

[1] Chino, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* **487**, 508, 1977.

[2] Chino, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 177, 1967.

[3] Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.

[4] Forte, T.: *Advances in Lipid Research*, Vol. **10** p. 1, 1972.

[5] Gamo, T.: *Insect Biochem.*, 8, 457, 1978.

[6] Gilbert, L. I. et al.: *J. Lipid Res.*, **15**, 439, 1974.

[7] Thomas, K. K. et al.: *Insect Biochem.*, 9 211, 1979.

[8] Thomas, K. K. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **127**, 512, 1968.

[9] Thomas, K. K. et al.: *Physiol. Chem. Phys.*, **1**, 293, 1969.

[本文于1981年8月19日收到]

用固定化细胞技术分离人血红细胞膜表面蛋白质

范培昌 王灵宝 毛一平 吴 玲

（华东师范大学生物学系）

细胞表面蛋白质具有较大疏水区，在水溶液中易自身聚合。一些在亲水介质中进行的生化分离分析技术不适于这类亲水脂蛋白的分离分析[1,2]。

关于人血红细胞表面蛋白质的分离，已有许多报道[3-10]。但迄今仍无一种令人满意的分离这类亲水脂分子的方法。

本文所提出的用聚乙烯醇包埋红细胞再分离表面蛋白质的方法，是一种可在室温下操作的简便快速的方法。

材 料 与 方 法

1. 固定化红细胞的制备 取新鲜人血，离心除血清，血球悬浮于20倍体积的0.9% NaCl 溶液中，2000rpm 离心20分钟取血球，重复三次。最后悬浮于25倍体积的0.9%NaCl溶液配制的3% 聚乙烯醇(简称 PVA，聚合度1700，系日本关东化学株式会社产品)。摇匀的PVA-红血球悬液倾于洁净的 18 × 22 厘米玻璃板上，并用玻棒涂成薄膜。一般10毫升悬液可涂此板三片。涂好的玻板平放在放有硅胶的干燥器中，板间四角垫以高0.3厘米，直径0.5厘米之胶圈使之隔开，室温放置干燥成膜。

2. 红细胞表面蛋白质的分离 固定化的红血球薄膜，同玻板一起浸泡于 pH8.0，5m*M* 磷酸钾缓冲液中(简称 5P(8))。此时血球内含物和红细胞膜周围蛋白质外溢，反复换新鲜的5P(8) 液直到膜片无色透明为止，此时 PVA 薄

一步法分离 T4DNA 连接酶

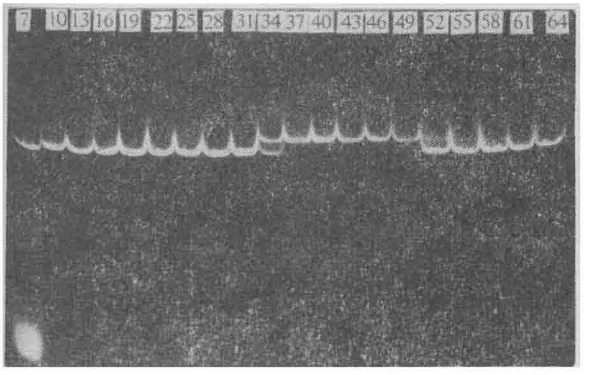

图 1 T4DNA 连接酶在磷酸纤维素层析分离中的电泳测活

图上面的数字是收集管号，自第 7 管开始是样品上完后以平衡液淋洗。第 25 管开始进行梯度洗脱。第 37 到 49 管是连接酶活力较高的部分

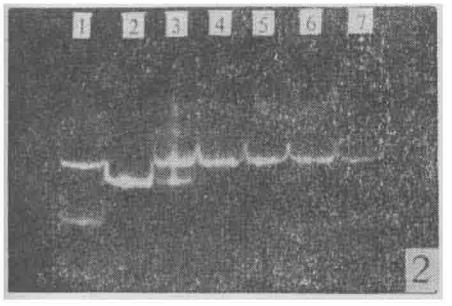

图 2 T4DNA 连接酶的连接效率

1. PBR322DNA; 2. BamHI-PBR322DNA; 3, 4, 5, 6 和 7 是 BamHI-PBR322 DNA 分别加 0.1, 0.02, 0.04, 0.08 和 0.16 单位连接酶；温度 12℃，时间 15 小时

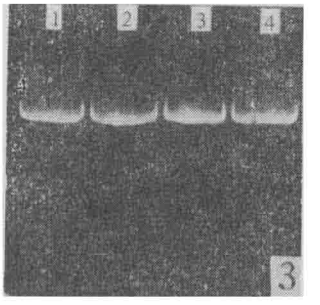

图 3 PBR322 DNA 与 T4 DNA 连接酶保温不同时间后的琼脂粉凝胶电泳

1. 不加酶的 PBR322 在 12℃ 保温 72 小时；2, 3, 4 是 0.2 单位酶和 0.3 微克 PBR322 DNA 分别在 12℃ 保温 24, 48, 72 小时

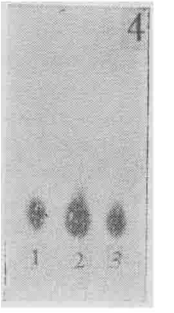

图 4 ^{32}p-d-(GpApCpGpApG) 与 T4DNA 连接酶保温后的同系层析谱

1. 未经任何处理的 ^{32}p-d-(GpApCpGpApG)；

2. ^{32}p-d-(GpApCpGpApG) 在 12℃ 保温 16 小时；

3. ^{32}p-d-(GpApCpGpApG) 与 1.75 单位酶在 12℃ 保温 16 小时。展层系统：Homomix III

柞蚕（*Antheraca pernyi*）蛹血淋巴脂蛋白的分离和鉴定

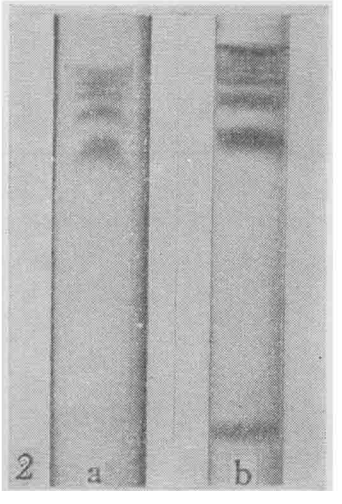

图 2 高密度脂蛋白电泳图谱 a:♀ b:♂

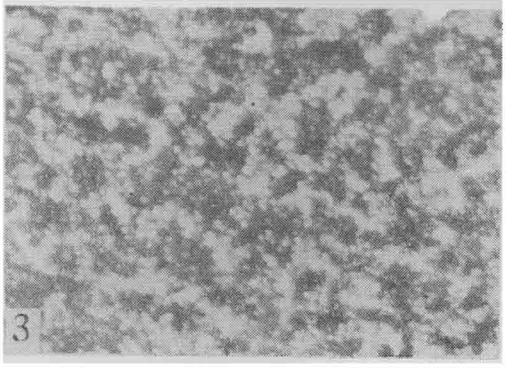

图 3