

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^[3]。

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 $14.35 \pm 0.34\text{nm}$,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 $13.5 \pm 0.6\text{nm}$,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, 5mM 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

膜中即残留有细胞膜表面成份。用刀片自玻板上取下 PVA 膜片,置于新鲜 5P(8) 液中稍加洗涤,再用滤纸稍为吸干,置刻度试管中于沸水浴中 40 秒,此时 PVA 液化,表面蛋白与之分开,可作凝胶电泳分析。

3. 人血红细胞影泡的制备与固定化 按 Dodge (1963) 等人所述方法用超离心法制得红细胞影泡。如同上述固定完整红血球的步骤,用 PVA 包埋之。

4. 表面蛋白质的鉴定与定量 所得表面蛋白质,按 Fairbanks 等人所述^[9],用十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺凝胶电泳 (简称 SDS/PAGE) 法鉴定。所用 SDS 经重结晶,聚丙烯酰胺贮备液经混合型离子交换树脂去离子,电导小于 10 毫姆。凝胶上显示的蛋白带用上海生化所制造的光密度扫描仪定量。考马斯亮蓝染色带选用 550 毫微米波长;过碘酸-Schiff 试剂 (PAS) 染色带选用 560 毫微米波长。

结果与讨论

1. 表面蛋白质的鉴定 图 1 所示系红细胞影泡(右)、固定化影泡(中)及固定化红血球分离出的表面蛋白质(左)之 SDS/PAGE 谱。由固定化红血球分离出的蛋白质经考马斯亮蓝染色只得一条带(图 1 左),它位于红细胞膜带 3 蛋白的位置上。图 2 系图 1 各胶用过碘酸-Schiff 试剂染色的结果示意图,也说明用固定化红血球分离出的糖蛋白与 Fairbanks 等人从红细胞影泡中分离出的糖蛋白相同,即他们命名的 PAS1—4。由此可知用固定化技术分离得到的确实是细胞表面蛋白质^[1]。

2. 带 3 蛋白区的疑点

我们发现,当用固定化红细胞分离的带 3 蛋白,加到凝胶柱上的浓度达 50 微克左右时,带 3 蛋白区显示出两条(见图 3 谱带)。重复实验达 14 次,结果相同,因此我们暂命名为带 3.1 和 3.2。目前所有报道,均把带 3 蛋白的 SDS/PAGE 谱描述为“有着尖锐前缘和扩散拖尾的带”^[1,9],如同我们用红细胞影泡所得凝胶谱(图 1 右)。最近有人^[10]用等电点聚焦加 SDS/

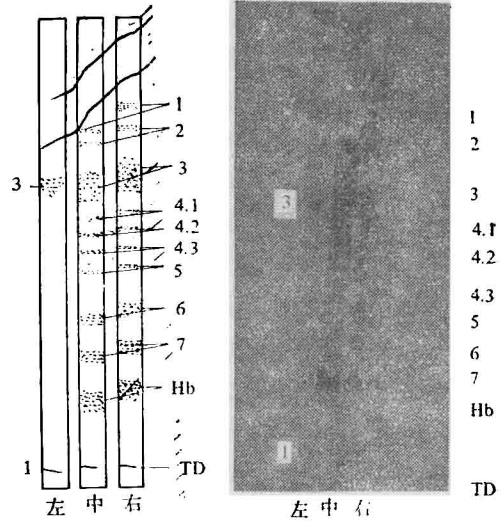


图 1 表面蛋白质的 SDS/PAGE 图谱比较

左: 用固定化红血球分离所得带 3 蛋白
中: 固定化红细胞影泡
右: 未固定的红细胞影泡
所有谱带名沿用 Fairbank 等人^[9]。Hb 为血红蛋白, TD 是指示染料,凝胶用考马斯蓝染色

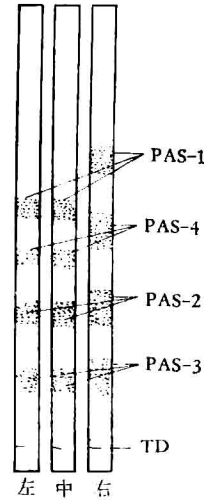


图 2 不同方法分离的糖蛋白 SDS/PAGE 谱比较 (示意图)

左: 用固定化红血球分离的糖蛋白
中: 固定化细胞影泡分离的糖蛋白
右: 未固定的红细胞影泡分离的糖蛋白

PAGE 作二元电泳分离人红细胞膜蛋白时,发现带 3 区可检出六种带不同电荷的成份,但只作 SDS/PAGE 时仍只能分辨出一条散漫的带。他们认为,带 3 蛋白由两个迁移率相同的均质亚单位组成^[1]。这和我们结果不一样。由此

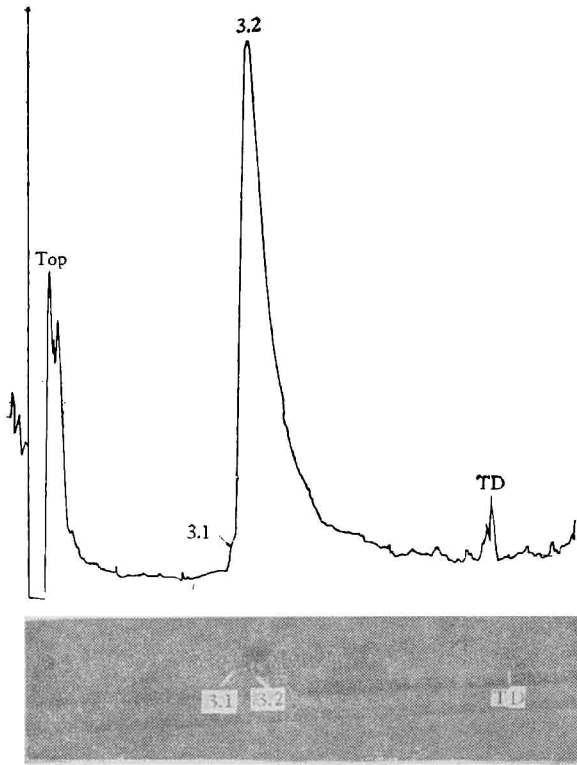


图3 用固定化细胞分离出的带3区蛋白
紧密相连的双带谱与扫描谱
(带3.2浓度是62.7微克)

我们推论,带3蛋白组份中可能还存在一种分子量近似的而极微量的亚单位,或者是另一种属于表面成分的新蛋白质。但也可能是一种矫作物,应用其他方法加以论证,实验正在进行中。

3. 固定化红血球的稳定性与影响因素

上述 PVA 包埋的红血球,可以长期在室温下贮于干燥器。图4是贮藏两个月的 PVA

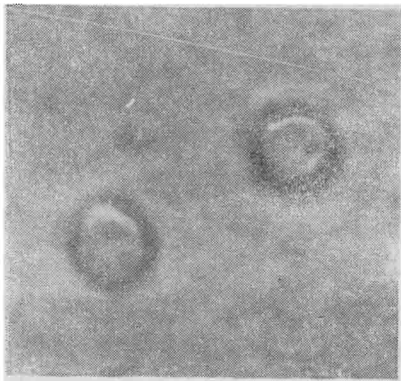


图4 用 PVA 包埋的红血球
室温下贮于干燥器 60 天,放大 4500×

固定化红血球,外形未变化。除保持原有鲜红色外,还能看到它在灯光照射下受热收缩活动。室温贮藏达 210 天的固定化红血球仍能分离出表面蛋白质,可见用固定化技术制取和保存实验样品有其优越性。

我们曾进行过多次实验,证实不同的血球浓度 ($1.10 \times 10^4 - 8.78 \times 10^5$ 个/ mm^3) 均能获得表面蛋白质,但并未发现随血球浓度增加而所获表面蛋白质也增多的规律。实验也证实不同浓度 SDS 对表面蛋白分离无明显影响。过去认为,SDS 是防止膜蛋白自身聚合必不可少的步骤^[1,9]。但我们实验证实不用 SDS 增溶也不会引起表面蛋白的自身聚合。这可能是因为 PVA 溶液高粘度的作用。

4. 固定化表面蛋白质与固定化红血球影泡

PVA 包埋的红血球经低渗溶液溶胞后再干燥,所得含表面蛋白质的 PVA 薄膜,贮于干燥器 2 个月,如同由离心法制得的红血球影泡经固定化贮于干燥器 2 个月,同样能得到完整的影泡 SDS/PAGE 谱。所以本法不需要预先分离影泡。

5. 红血球分离表面蛋白质的各种固定介质比较

曾试验了多种包埋介质。用琼脂糖凝胶时,因其需要加热熔融,趁热包埋易导致红细胞破裂。采用聚丙烯酰胺凝胶包埋,或者只能得到极小量的表面蛋白,或者得到一种抗溶血的水不溶血球制剂。可能是因为聚丙烯酰胺凝胶只是把细胞包埋于介质的格子中,二者并不发生结合和偶联反应。PVA 是一种具有大量强亲水性羟基的聚合物,它和蛋白质分子间可能形成氢键。根据喜田等人^[11,12]提出的聚乙烯醇吸附带负电的粘土粒子机理模型,我们认为 PVA 包埋红细胞的作用机制是:(1) 表面嵌有糖蛋白的红血球悬浮于含众多羟基的 PVA 聚合物溶液中,二者有一定的吸附作用(可能形成氢键),(2) 当脱水成膜时二者紧密“接触”,(3) 当用低渗溶液溶胞时因这种紧密“接触”,使表面蛋白不能随细胞内含物一起溢出而残留于 PVA 之薄膜中。

参 考 文 献

- [1] Tomita, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 667, 1976.
- [2] Delaunay, J.s *Pathol. Biol.*, **26**(2), 117, 1978.
- [3] Findlay, J. B. C.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398, 1974.
- [4] Kahane, I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 464, 1976.
- [5] Liljas, L. et al.: *ibid.*, **426**, 526, 1976.
- [6] Bouma, S. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252** 6759,

1977.

- [7] Wennogle, L. P.: *J. Mol. Biol.*, **124**, 689, 1978.
- [8] Wells, E. et al.: *Biochem. J.*, **187**(3), 719, 1980.
- [9] Fairbanks, G. et al.: *Biochemistry*, **10**, 2607, 1971.
- [10] Harel, D. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **193** 158, 1979.
- [11] 喜田:《高分子》, **10**, 962, 1961.
- [12] 喜田和川口:《土肥学会讲演要旨》, 第6集, 1960.

[本文于1981年6月18日收到]

不同方法制备的大鼠肝染色质化学组分 及模板活性的比较研究

王 智 李士谔 马金鉴

(中国医学科学院基础医学研究所生物化学及分子生物学研究室)

在真核细胞内, DNA 的转录、复制和修复都与染色质上的组蛋白、非组蛋白、RNA 有密切关系,因此染色质结构和功能的研究,是当前分子生物学及分子遗传学的重要课题。近年来许多资料表明,肿瘤的发生可能与细胞内 DNA 的转录、修复和复制的异常有关,因此染色质结构与功能的研究,也是癌变原理研究中的重要课题。我们初步观察到在二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌过程中某些酶活性的变化,是由于酶蛋白生物合成速度的改变。看来癌变过程中酶的变化是由于酶的基因调控异常引起的。为此我们开展了肿瘤染色质与基因调控的研究。

染色质是非常复杂的大分子复合物,其结构受许多因素的影响,因此制备染色质所用的方法不同,所得的结果也可能不同。我们比较了用不同方法制备的染色质的理化性质以及体外转录,为进一步研究肿瘤染色质的结构与功能打下基础。

一、材 料 和 方 法

1. 试剂 对苯甲基磺酰氟 (PMSF)(Merck) 0.1M 异丙醇贮存液。Triton X-100 (BDH), 精胺盐酸盐 (Sigma), [³H]-UTP, 比放射性为 25 毫居里/毫克分子 (上海原子能研究所),

ATP (Boehringer), GTP (Serva), CTP (BDH), 小牛胸腺 DNA (BDH 及中国科学院生物物理所制), 40 号玻璃纤维滤膜 (上海红光造纸厂), PPO-POPOP 闪烁液 (3 克 PPO 与 0.3 克 POPOP 溶解在 1000 毫升甲苯中)。E. coli RNA 聚合酶, 4100 单位/毫升 (Miles)。其余试剂都为分析纯。

2. 细胞核的制备 将 Wistar 大鼠 (250 克左右, 雄性) 饥饿过夜, 断头处死, 迅速用冷的 0.154M KCl 作肝静脉灌注或取出肝脏漂洗, 称重。以下操作在 0—4℃ 进行。剪碎肝组织, 按 1:10(W/V) 比例加入 0.25M 蔗糖缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 5mM MgCl₂, 3mM KCl, 0.1mM PMSF, 0.1% Triton X-100), 于 Teflon 玻璃匀浆器中匀浆 1—2 次, 或用普通玻璃匀浆器匀浆 4—5 次。用 200 目单层尼龙布过滤, 除去血管, 结缔组织。滤液离心 (900g, 15 分钟, 4℃)。将沉淀悬浮于 2.2M 蔗糖缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.6, 5mM MgCl₂, 3mM KCl, 0.1mM PMSF, 0.1% Triton X-100)。另取一个离心管, 以 1/5 体积的 2.2M 蔗糖缓冲液垫底, 铺上 2.2M 蔗糖粗核悬液, 离心 (105,000×g, 30 分钟)。再将细胞核用 0.25M 蔗糖缓冲液洗 1—2 次, 离心 (900×g, 5 分