

研究快报

兔感觉神经特异蛋白的纯化及稳定性观察^{*}

蒲小平 汪家政 张 杰 顾晓松¹⁾ 范 明

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 以兔脊神经节及背根纤维为材料, 通过制备匀浆, DEAE-Sephacel 阴离子交换层析, 高压液相凝胶过滤层析分离纯化了感觉神经特异蛋白 29 ku, 并进行了该蛋白的稳定性观察。
关键词 感觉神经特异蛋白, 纯化, 稳定性

感觉和运动神经纤维的识别一直是困扰着神经科学家及显微外科医生的一个难题。在哺乳类动物感觉神经, 目前还没有一个确切的分子标记物^[1]。顾晓松等^[2]用随机单抗筛选法发现 29 ku 蛋白质特异地存在于脊神经一级感觉神经元, 它呈现特有的分布规律, 即分布在后角周缘、背根、脊神经节细胞与外周感觉神经的皮支中。为进一步研究该蛋白质的结构与功能, 我们用层析的方法纯化了感觉神经特异蛋白 29 ku, 并进行了该蛋白的稳定性观察。

新西兰大白兔放血处死, 取全长脊柱。在解剖镜下, 分离脊神经节及背根纤维作为感觉神经组织材料, 腹根纤维作为运动神经组织材料, 制备组织匀浆, 低温高速离心。两种神经的离心上清进行 SDS-PAGE 电泳 (分离胶浓度 12.5%) 及银染, 感觉神经匀浆上清液有特异的 29 ku 条带存在 (图 1)。

该上清液上样 DEAE-Sephacel 柱, 用 50 ~ 300 mmol/L NaCl 进行线性洗脱, 29 ku 特异蛋白在 100 mmol/L 的 NaCl 处被洗脱下来, 超滤浓缩再经 HPLC 凝胶过滤柱 TSKG3000 SW 进一步分离纯化, 据 SDS-PAGE 薄层扫描鉴定, 其纯度在 80% 以上 (图 2)。该蛋白质单克隆抗体的蛋白质印迹反应 (Western blot) 呈阳性反应。从约 500 mg 的感觉神经中得到部分纯化的 29 ku 蛋白 30 μ g。进一步的纯化还在进行中。用 SDS-PAGE 测定的分子质量

和凝胶过滤层析法测定结果相近, 说明它的蛋白质结构为单体而非多聚体。稳定性观察是将 - 20 $^{\circ}$ C 保存的纯化样品, 分别在 2、4、6 周后解冻, 进行 SDS-PAGE 电泳及银染, 发现第 6 周后该蛋白质的条带降解消失。我们在纯化过程中也发现: 该蛋白质非常不稳定, 易被降解, 建议尽量缩短纯化周期, 并控制操作温度在 4 $^{\circ}$ C。

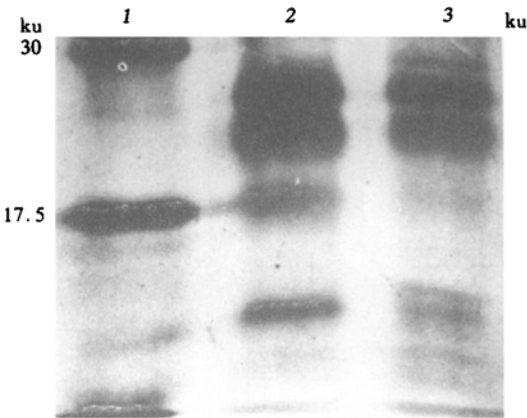


图 1 脊感觉神经、运动神经 SDS PAGE
1: 蛋白质分子质量标准; 2: 运动神经匀浆上清;
3: 感觉神经匀浆上清。

^{*} 国家自然科学基金 (39470156) 和国家教委留学回国人员科研启动基金 (1996-644) 资助。
¹⁾ 南通医学院神经科学研究所, 南通 226001。
收稿日期: 1997-04-09, 修回日期: 1997-07-11

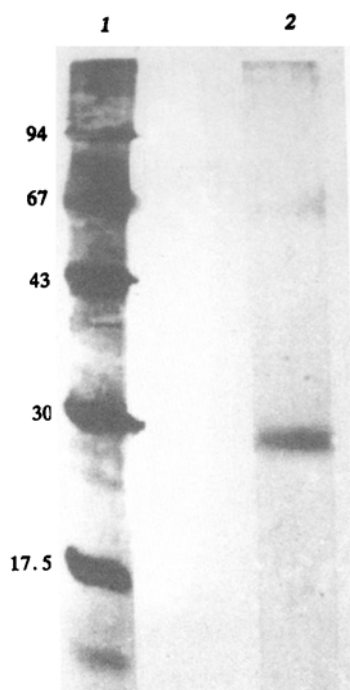


图2 HPLC TSK G3000 层析组分
SDS PAGE

1: 蛋白质分子质量标准; 2: 感觉
神经特异蛋白 29 ku.

感觉神经特异蛋白的纯化成功为其结构与功能的研究, 为探讨该蛋白作为鉴定神经元及其纤维的标志物, 和研究感觉神经元的发生、发育及其在某种疾病情况下的演变过程的分子机理提供良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Saito T, Grebbwood A, Sun Q *et al.* Identification by differential RT-PCR of a novel paired homeodomain protein specifically expressed in sensory neurons and a subset of their CNS targets. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1995, **6**: 280~ 292
- 2 顾晓松, 陈昌富, 张沛云等. 免疫组化法鉴别感觉与运动神经纤维. *中国临床解剖学杂志*, 1992, **10**: 119~ 121

Purification and Stability Observation of Sensory Nerve specific Protein in Rabbit. PU Xiaoping, WANG Jiazheng, ZHANG Jie, GU Xiaosong¹⁾, FAN Ming (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* ¹⁾ *Nantong Medical College, Nantong 226001, China*).

Abstract A 29 ku protein, the sensory nerve-specific protein was isolated and purified from rabbit spinal ganglion and its fibers by anion exchange chromatography using DEAE-Sephacel and gel filtration HPLC. The purity was estimated to be over 80% by UV scanning. Western blot demonstrated that it immunoreacts with anti-rabbit the 29 ku protein monoclonal antibody. The stability also has been observed.

Key words sensory nerve-specific protein, purification, stability

《化学通报》在 INTERNET 上出版网络版

为促进国内外化学工作者的学术交流,《化学通报》网络版于 1997 年 1 月正式创刊,登上 Internet,成为中国科学院主管期刊中第一个进入 Internet 的期刊,也是世界上第一个网络版中文化学期刊。

《化学通报》网络版具有以下优点: 周期缩短; 时效性强; 易于检索; 便于交流——在新闻服务器 news.chinaroad.cn.net 中,有专门为本刊读者、作者开设的“读者论坛”,用户在其新闻阅读程序中选中“a7”讨论组,即可自由发表自己的意见,并浏览别人的观点。

读者用 WWW 浏览器程序进入 www.chinaroad.cn.net 后,在主页中选“在线阅览”,再点“化学通报”便进入登录页。登录之后,进入本刊的主页,根据需要查找、阅读、存储或打印刊物论文。读者与编辑部联系可使用 E-mail: hxtb@mail.chinaroad.cn.net。

《化学通报》网络版国内定价为每年 50 元,国外定价为每年 100 美元。印刷版国内定价为每年 96 元,邮发代号 2-28。网络版订阅联系人: 100080 北京 2709 信箱《化学通报》徐瑞亚。