

用扫描质子微探针分析肝细胞的元素组成*

章净霞 戴维丽

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

曾宪周 姚蕙英

(复旦大学核科学系, 上海)

关键词 扫描质子微探针, 质子激发的 X 荧光分析 (PIXE)

研究细胞的元素特别是金属离子和微量元素的组成、含量、分布和细胞功能的关系以及在不同生理病理状况下的变化, 国外已有研究, 国内尚未见报道。缺乏分析手段是主要原因。扫描质子微探针是国际上近十多年来发展起来的超微量分析技术。本文应用复旦大学串列加速器和聚焦型质子微探针测定了正常及损伤肝细胞的元素组成和含量, 是国内质子微探针技术在生物医学领域的首次应用。

实验条件和方法

大鼠肝细胞用胶原酶 (IV 型) 灌注法分离, 用 Tris-HCl 缓冲液稀释后滴在作为靶衬的 Mylar 膜 (厚度 $3\mu\text{m}$) 上、空气干燥。损伤细胞是在培养液中加入由 Fenton 反应 (Fe^{2+} -EDTA 体系) 产生的羟自由基 ($1 \times 10^2 \mu\text{mol/L}$) 37°C 温育 90min 而成。

加速器产生的质子能量为 2.5MeV 。质子束点直径最小为 $2\mu\text{m}$ 。以质子激发的 X 荧光法 (PIXE) 作为分析方法。质子束轰击样品后产生的特征 X 射线和二次电子分别由 Si(Li) 探测器和塑料闪烁仪测量。数据获取由 80 Micro-XT 微机及其软件完成, 为确定质子微束的扫描范围及定点测量时束点在样品上的具体位置, 以二次电子图象显示细胞位置。

实验结果

1 正常及损伤肝细胞的脂质过氧化水平以每管细胞 (10^6) 中每克蛋白的丙二醛含量 (nmol/L) 表示, 分别为 5.19 ± 0.92 和 $9.30 \pm$

0.59。表明损伤肝细胞的脂质过氧化程度显著高于正常细胞。

2 用扫描质子微探针技术测定单个肝细胞的元素组成。

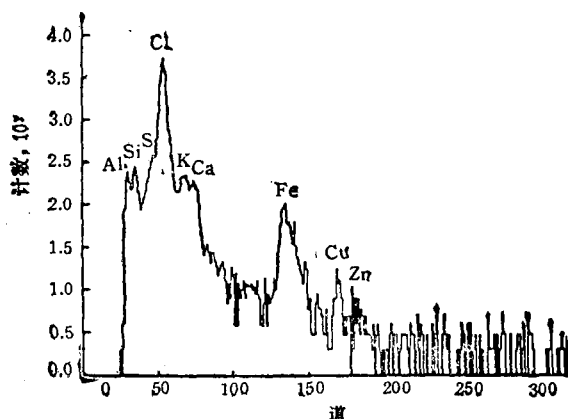


图 1 正常肝细胞 PIXE 谱

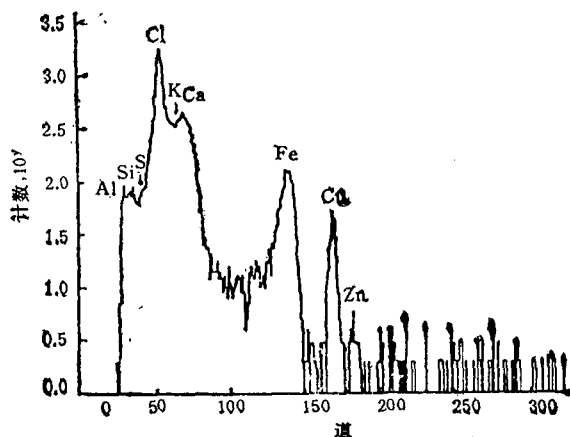


图 2 损伤肝细胞 PIXE 谱

* 本课题得到国家自然科学基金资助。

凝胶上测定糖蛋白的荧光标记法*

蒋荣庆 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 凝胶, 糖蛋白, 荧光标记

凝胶上测定糖蛋白及含糖酶是研究它们的性质和纯度的一种有效的方法。文献中报告的方法, 有的不够灵敏, 有的则非常麻烦。我们约在 20 年以前合成了一种荧光酰肼: dansyl glycy l hydrazide (DNS-Gly-NHNH₂), 用以测定寡聚核糖核苷酸的序列^[1,2]。本文报告, 我们用这种荧光酰肼在凝胶上测定了 7 种糖蛋白(蓖麻毒蛋白, 辣根过氧化物酶, 猪血清转铁蛋白等), 灵敏度可以达到 10—25ng。具体方法如下:

样品经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将凝胶取出, 浸于 10% 乙酸-20% 乙醇溶液, 换液数次(总体积 800ml—1000ml), 过夜。然后用 120ml 的 0.1% 过碘酸溶液(溶于 0.7% 乙酸)于 4℃ 避光氧化 2h, 接着用 10% 乙酸充分浸洗凝胶, 换液数次(1000ml), 至凝胶中残留

的过碘酸全部洗净。最后用 0.07% 荧光酰肼(溶于 70% 乙醇)于室温避光标记过夜。倒出荧光酰肼溶液, 4℃ 避光保存。经上述处理过的凝胶依次用 15% 丙酮及 5% 丙酮先后浸洗数次, 除去残留的荧光酰肼, 使凝胶背景清晰。紫外灯下观察, 可以看到十分明亮、清晰的荧光标记的糖蛋白条带。荧光酰肼的酒精溶液可以在 4℃ 放置三个月不变质, 并且可以反复使用。

参 考 文 献

- 1 刘望夷, 辜祥荣, 生物化学与生物物理学报, 1979; 11: 57
- 2 Liu Wangyi et al. Scientia Sinica, 1980; 23: 1296

[本文于 1991 年 7 月 12 日收到]

* 国家自然科学基金资助项目。

从上述 PIXE 谱中计算了 Fe, Cu, Zn 的净峰面积(见表 1), 代表元素的相对含量。

表 1 Fe, Cu, Zn 在 PIXE 谱中的净峰面积和比值

元素	正常细胞	损伤细胞
Fe	807	1190
Cu	58	219
Zn	27	5
Zn/Cu	0.47	0.023
Zn/Fe	0.033	0.0042

实验结果表明, 作为代谢中心和解毒场所的肝脏组织, 肝细胞元素组成丰富(本技术测定 Z > 12 的元素), 在肝细胞发生脂质过氧化损

伤时, 细胞的元素组成没有变化, 而和脂质过氧化作用密切相关的三种金属元素 Fe, Cu, Zn 的含量和比值有明显改变。目前有学者认为, 正常情况下 Zn 与膜上的 SH 基结合成复合物起到稳定生物膜结构的作用。已知 Fe, Cu 等金属元素在自由基反应中起到催化作用, 还和 Zn 竞争与膜上的 SH 基结合并将其氧化成二硫键, 此时 Zn 即从膜结合部位脱落, 这可能是肝细胞产生脂质过氧化损伤后 Fe, Cu 含量增高而 Zn 含量降低的原因。

[本文于 1991 年 6 月 20 日收到, 7 月 13 日修回]