

- 3 Gorton L, Karan H I, Hale P D *et al.* *Analytica Chimica Acta*, 1990; **228**: 23
- 4 Tse Y, Jand P, Lever A B P. *Anal Chem*, 1994; **66**: 384
- 5 Fraser D M, Zakeeruddin S M, Gratzel M. *J Electroanal Chem*, 1993; **359**: 125
- 6 Tudos A J, Ozinga W J J, Kok W T. *J Chromatogr*, 1991; **547**: 1
- 7 Boomsma F, Alberts G, Vander Hoorn F A J *et al.* *J Chromatogr*, 1992; **574**: 109
- 8 Budantsuv A Y. *Anal Chim Acta*, 1991; **249**: 76
- 9 邓家祺, 方 跃, 蔡蓉晖. *分析化学*, 1991; **19**: 891
- 10 Gao Z Q, Ivaska A. *Anal Chim Acta*, 1993; **284**: 393
- 11 侯秀峰, 吴 祺. *无机化学*, 1990; **6**: 439

Determination of Catechols on the Modified Electrode by Electrocatalytic Oxidation. Qian Jianghong, Liu Haiying, Deng Jiaqi (*Department of Chemistry, Fudan University,*

Shanghai 200433, China).

Abstract The 5, 10, 15, 20-tetrakis (3-methoxy-hydroxyphenyl) porphyrin cobalt is absorbed on the surface of the glassy carbon electrode to make a CoTMHPP modified electrode. The modified electrode has high sensitivity and good electrocatalytic oxidation towards catechols for each range of their responses, and the response time is less than 10 s. The electrode possesses characteristics of high catalytic activity, fast response, good stability and a long lifetime under the optimal operations.

Key words cobaltporphyrin, modified electrode, catechols

一种改进的制备染色质的方法

许怀庆 陈楚楚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 介绍一种改进的制备染色质的方法, 采用此方法可减少玻璃匀浆步骤, 易于操作、易于重复、产率高, 且可以得到不同大小的染色质片段。

关键词 染色质, 分离, 制备

真核生物细胞核内的染色质是调节控制生物体新陈代谢和遗传变异的物质基础, 要了解染色质在细胞内不同生理周期结构与功能瞬时变化关系, 研究染色质体外相变, 特别是近年来利用无细胞系统诱导核的自组装时, 都需要提取染色质。许多制备方法中, 需经过几次玻璃匀浆步骤, 操作复杂, 不易重复, 且所制备的染色质片段小, 收率低, 在利用无细胞系统诱导核的自组装过程中效果不好。用我们改进的这种方法所制备的染色质, 可以得到不同大小的片段, 易于操作, 重复性好, 产率高。

1 材料与方法

1.1 材料

正常大白鼠, 体重 200 g 左右, 雌雄均可, 处死前最好空腹 12 h 以上, 用击头法将大鼠处死, 迅速取出肝脏, 放入 4℃ 的 0.9% 的 NaCl 中漂洗数次, 并将脂肪、结缔组织剔除, 备用。

1.2 方法

1.2.1 染色质的制备方法: 以下所有操作均

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-05-03

在 4℃. 取约 5 g 肝, 置于 120 ml 溶液 I 中 (24 mmol/L EDTA, 75 mmol/L NaCl, 1% 的辛醇, pH 8.0), 在组织捣碎机中, 17 000 r/min 匀浆 15 s, 3 次. 匀浆液用 8 层纱布过滤. 滤液在 1500×g 离心 15 min, 沉淀用溶液 I、溶液 II (0.05 mol/L Tris-HCl pH 8.0) 各 80 ml 洗一次, 洗后以 1500×g 离心 15 min 沉淀. 将沉淀加入 40 ml 溶液 III (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 8.5 mmol/L NaCl, 1% 吐温-20, 0.5% 脱氧胆酸钠) 悬浮, 作用 10 min, 然后 3000×g 离心 15 min, 再重复一次. 将沉淀用 80 ml 溶液 II 洗 2 次, 3000×g 离心 15 min, 将沉淀悬浮在 10 ml 的溶液 II 中, 在离心管中预先加入 25 ml 溶液 IV (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.7 mol/L 蔗糖) 在上部加入 5 ml 悬液, 然后用玻棒在上部三分之一处打匀, 使之成为自然梯度, 60 000×g 离心 3 h, 沉淀用溶液 II 洗两次, 每次洗后用 10 000×g 离心 30 min 得沉淀. 将沉淀加入 5~10 ml 溶液 II, 在组织捣碎机中刀匀浆 2 min, 将匀浆液在 10 000×g 离心 30 min, 取上清, 将沉淀再加入 5 ml 溶液 II, 搅拌 30 min, 6000×g 离心 30 min, 取上清. 将沉淀加入 5 ml 溶液 II, 搅拌 30 min, 1000×g 离心 30 min, 取上清, 以上所取 3 次上清即为所制备的染色质.

1.2.2 检测方法: 将制备的染色质适当稀释 (使样品在 260 nm 波长处光吸收值为 0.4 左右), 准确测定 260 nm 和 320 nm 处的光吸收值. 并测 220~320 nm 范围内的光吸收图谱.

2 结 果

测得大鼠肝染色质 $A_{260} = 0.41$, $A_{320} = 0.03$, $A_{320}/A_{260} = 0.073 < 0.1$.

在 220 nm~320 nm 范围内, 所制备的大鼠肝染色质的光谱吸收曲线见图 1. 此结果与《酶学方法》中提取的大鼠肝染色质结果一致, $A_{320}/A_{260} < 0.1$, 与其光谱吸收曲线 (图 2) 一致^[1]. 所以, 我们认为用此改进的方法提取的染色质为纯的染色质.

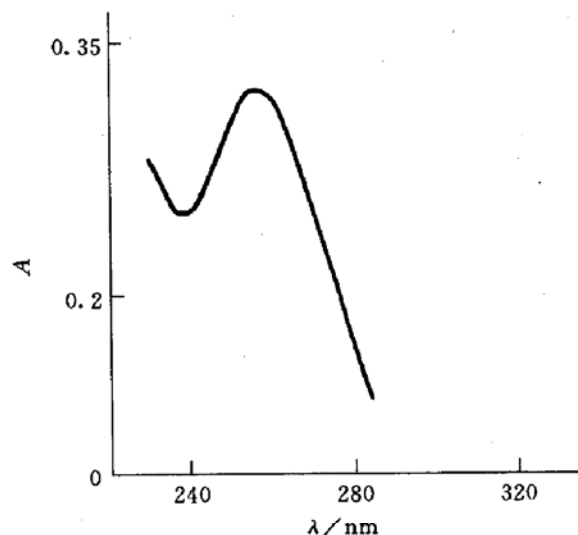


图 1 大鼠肝染色质的光谱吸收曲线

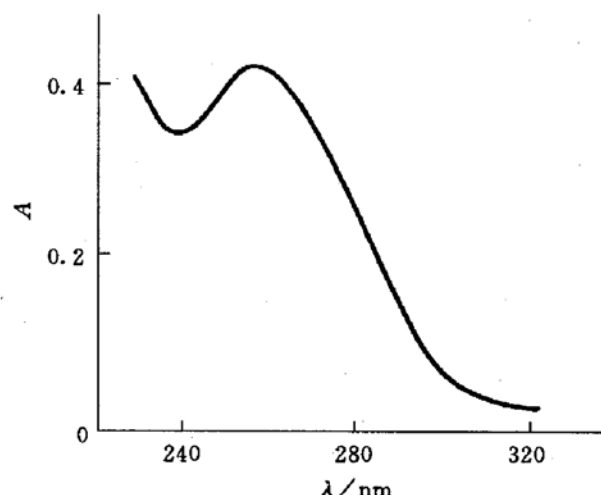


图 2 大鼠肝染色质的标准光谱吸收曲线

3 讨 论

传统的提取染色质的方法, 基本原理都是先提取核, 再将核破碎, 离心, 因染色质浮力密度最大, 所以它最先沉淀下^[1~3]. 破核一般采用玻璃匀浆, 这样在匀浆过程中虽将核破碎了, 但同时也将染色质打碎了, 因染色质很粘稠, 所以不易操作, 且影响产率. 在经蔗糖梯度离心之后, 需透析 12 h 以上, 这样就增加了制备时间, 耗时长, 对染色质活性影响也较大.

在我们改进的制备方法中, 首先, 我们取肝后直接在 4℃ 的溶液中漂洗处理, 而未冷冻.

我们发现这样能提高染色质的活性。其次, 我们采用溶液 III 破核膜^[4], 而未用玻璃匀浆, 这样, 染色质比较完整, 片段大, 易于沉淀。最后, 经蔗糖梯度离心后, 我们进行直接洗涤, 而未用透析的方法, 这样将制备时间缩短了 12 h。此方法比原来方法提高产率 3~5 倍。

根据 Bonner 等在《酶学方法》中提出的两种检测染色质的方法, 其中之一是光谱法, 此法简单、快速、准确。一个纯净的染色质样品应当几乎没有混浊, 即在核酸、蛋白质没有光吸收的波长处, 也应该没有光吸收, 如在 $A_{320}/A_{260} < 0.1$, 这样就为纯的染色质。如果在 320 nm 处光吸收太大, 就说明有染色质凝集或非染色质的蛋白污染^[1]。另外, Bonner 给出了标准大鼠肝染色质的吸收光谱, 我们测得结果与之相符, 所以, 我们认为该方法提取的染色质为纯染色质。

我们还用非洲爪蟾卵的无细胞系统检测染色质活性, 将染色质加入此无细胞系统中, 发现能围绕染色质形成核状结构(待发表)。染色质形成核状结构的这种能力, 在 0℃ 能保持一周, 但一周之后此能力消失, 在此系统中不能形成核状结构。

此方法也适于其他动物肝的染色质的制备。

参 考 文 献

- 1 Bonner J, Chalkley G R, Dahmus M *et al.* *Methods in Enzymology*, 1968; **XX** (B): 3
- 2 张龙翔, 张庭芳, 李令媛等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 242
- 3 上海实验生物研究所三室细胞研究组. 生物化学与生物物理进展, 1977; (5): 6
- 4 Fey E G, Wan K M, Penman S. *J Cell Biol*, 1984; **98**: 1973

A Modified Method of Preparing Chromatin.

Xu Huaqing, Chen Chuchu (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract A modified method of preparing chromatin is introduced here, which omits the procedure of glass-homogenization. It is easy to operate, to reproduce and has high yield. With this method, chromatin in different size can be obtained.

Key words chromatin, isolation, preparing

一种简便的肌醇磷脂微量分析方法*

马克里 刘 彦 崔肇春¹⁾

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 分析磷脂酰肌醇循环 (PI cycle) 的磷脂组分常采用双向薄层层析法。建立了一个简单快速的单向薄层层析分离肌醇磷脂方法。首先采用不同的有机溶剂体系分别提取非多磷酸肌醇磷脂和多磷酸肌醇磷脂, 然后用不同的层析展开体系, 对两部分磷脂进行单向薄层层析分离。采用无载体 ³²P 标记实验对该方法分离效果进行了观察。此法适用于同位素标记和非标记样品中肌醇磷脂组分的比较分析及多磷酸肌醇磷脂的提取、纯化和定量。

关键词 肌醇磷脂, 微量分析, 高效薄层层析

* 国家自然科学基金 39370393 项目部分工作。 ¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1995-03-18, 修回日期: 1995-09-01