

可见样品蛋白染色完全,结果见图 1。

2. 染色灵敏度的观察 同其它考马斯亮兰 G、R 的染色法^[3]相比,本法较灵敏。以 BSA 染色为例,0.5 微克的 BSA 仍可染出清晰的蛋白色带,结果见图 2。

3. 各种蛋白样品不同电泳方法的染色结果 采用这一染色方法,分别对鼠干扰素粗制液及纯化后样品进行 PAGE、SDS-PAGE 胶条蛋白带染色,(见图 3—4),对狗血清和小牛血清的等电点聚焦电泳蛋白带染色(图 5),效果都较满意。染色后胶条蛋白浸于 7% 乙酸中可长期保存。

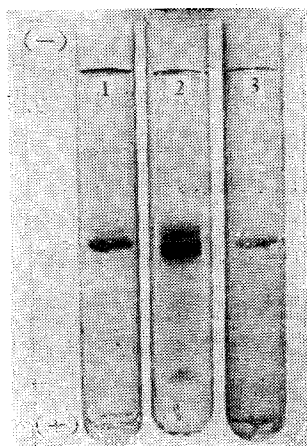


图4 粗制鼠干扰素纯化前后的 SDS-PAGE 分析

T = 7%。2mA/管胶,不连续系统

1. 粗制 MIFN, 2. 超滤浓缩粗 MIFN, 3. 纯化 MIFN

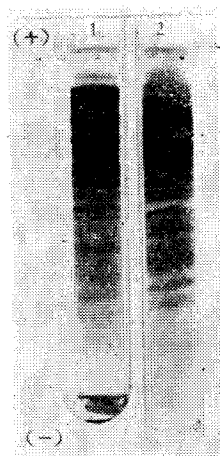


图5 狗血清(1),小牛血清(2)的等电点聚焦电泳的分析

T = 7.9% DAG, Ampholine: 2%, pH3.5—10, 150 V, 电泳 4 小时

实验结果表明,这一染色方法特异、灵敏、快速。建立此方法的过程中,我们还观察到提高酸浓度染液灵敏度降低;增加染料浓度则可使无蛋白的胶条着色。因此本方法所用染液浓度较低,最多重复使用三次,即需重新配制。

参 考 文 献

- [1] Marion, M.: *Analytical Biochemistry*, 72, 248, 1976.
- [2] 李成文: 军事医学科学《免疫学实验技术汇编》(内部) 1982, 10, 108.
- [3] 李成文等: 同上第 112 页.
- [4] 李成文等: 同上第 105 页.

[本文于 1983 年 2 月 18 日收到]

人胃粘膜细胞核的制备

程寿宜 周炳森 张纪宁* 万福生 温博贵 郭菊美

(江西医学院生化教研室, 南昌)

真核细胞的遗传信息存留在细胞核中,欲深入研究细胞核的免疫学和基因调控等,必须首先分离出纯净度好,产率较高的细胞核。关于人胃粘膜细胞核的研究报道甚少。为了寻找适合人胃粘膜细胞核制备的较好方法,本文采用三种不同的蔗糖密度梯度方法平行制备人胃

粘膜细胞核。结果发现稍加改良的 Chauveau 法^[1]及 Chiu 法^[2]均可得到纯度较好,产率较高的细胞核,尤其是前者,既有操作简便,又有节约试剂的优点。

* 江西医学院组织胚胎教研室。

一、材料与方法

1. 材料

将病理确诊为非肿瘤疾患的胃大部切除手术标本,迅速移至 -20°C 贮存备用。将冰冻的人胃组织移入冰箱(4°C)内过夜解冻后,用冷生理盐水洗2—3次,然后用载玻片刮下胃粘膜。在滤纸上吸干过多水份,称重,置冰箱内备用。

2. 化学试剂

苯甲基磺酸氟(PMSF)上海生物化学研究所东风厂生产。

其他试剂均为分析纯级

3. 人胃粘膜细胞核的制备

分别参照 Chauveau 法^[1], Chiu 法^[2]和 Blobel 法^[3],细节上稍加修改。所用试剂:溶液 A (0.25M 蔗糖/5mM MgCl_2 /25mM Tris-HCl, pH 7.4/0.1mM PMSF) 及溶液 B (2.2M 蔗糖/5mM MgCl_2 /25mM Tris-HCl pH 7.4/0.1mM PMSF)。具体过程见图 1。

4. 人胃粘膜组织匀浆及细胞核悬浮液

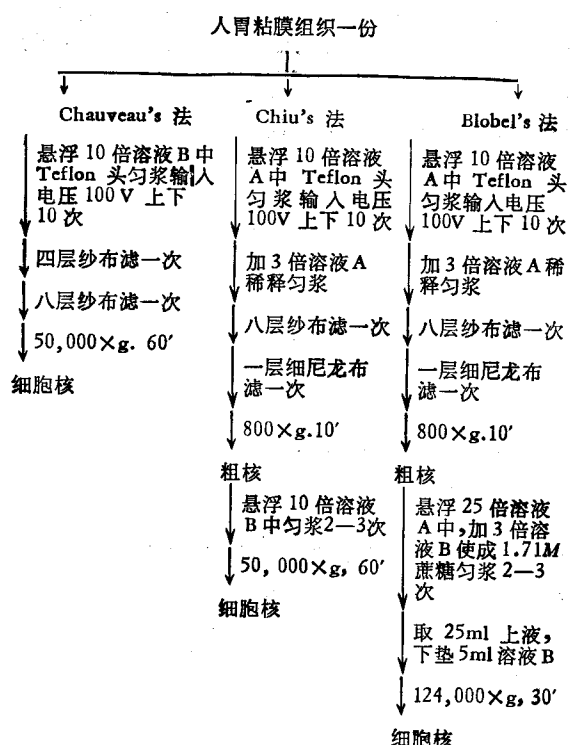


图 1 人胃粘膜细胞核的制备

DNA 的分离和定量

按 Schneider^[4] 法分别用冰冷 10% 三氯醋酸及 95% 乙醇、乙醇-乙醚混合液及乙醚除去酸溶性物质及磷脂,然后与标准 DNA 同时加 5% 三氯醋酸于 90°C 加热 15 分钟,沉淀并除去蛋白质,最后获得的核酸上清液分别用 Dische 的二苯胺反应法,沸水浴内煮沸 10 分钟,显色后,测定 600 毫微米波长的吸收,从标准曲线读出样品 DNA 含量。

5. 人胃粘膜组织常规石蜡切片,苏木素伊红染色 (图 2 见封 3)。

6. 人胃粘膜细胞核电镜观察

纯化的细胞核先用 5% 戊二醛溶液固定,以后再用 1% 锇酸固定。各级丙酮脱水后用 Epon 812 包埋,用 LKB-8800 型切片机作超薄切片,用醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,在日立 H-500 型电镜下观察。

二、结果与讨论

制备细胞核的方法有水溶剂和非水溶剂两大类^[5],非水溶剂方法复杂,且去脂过程中破坏脂蛋白能引起生物膜形态改变,现应用较少。水溶剂的方法主要用柠檬酸溶液及蔗糖溶液两种,应用于不同组织时还有许多改进的方法。柠檬酸方法因酸性太高,在分离核过程中会丧失一些蛋白质,特别是一些具有调节功能的蛋白质,如 H_1 组蛋白等^[6],从而影响核蛋白质质量的测定,及基因调控的研究。不少人认为,用蔗糖溶液做介质制备的细胞核可保持较好的形态^[7],故我们采用三种不同的蔗糖密度梯度方法平行制备同一标本的细胞核,以核悬液中 DNA 含量占组织匀浆 DNA 含量的百分比表示产率。见表 1。

从表 1 可以看出, Blobel's 法不适于制备

表 1 三种方法制备人胃粘膜细胞核的产率*

方法	Chiu's 法	Chauveau's 法	Blobel's 法
产率**	9%	7%	0

* 细胞核产率 = $\frac{\text{核悬浮液 DNA 量}}{\text{组织匀浆 DNA 量}} \times 100\%$

** 二次实验平均数

人胃粘膜细胞核。而 Chiu's 法产率也很低,约 1% 左右(预备实验结果)。可能主要是因为胃组织粘液较多,按 Chiu's 法制备的 1:10 匀浆过滤,会损失大量细胞核,这是产率极低的主要原因。如何去掉粘液是提高产率的关键,为此我们曾设法充分洗涤人胃组织,但因损失粘膜细胞较多,仍不能提高产率。现改为 1:10 匀浆过滤前,用大量溶液 A 稀释匀浆(使成 1:40),再过滤,结果极大地提高了产率。由 1% 提高到 9%。这样的产率虽不够高,但已能基本满足深入工作需要。Chauveau's 法产率略低于 Chiu's 法,这主要是因为我们增加了二次纱布过滤,但这一改进能提高细胞核的纯净度。Chauveau's 法的产率虽略低于 Chiu's 法,但却具有操作简便,节约试剂等优点,我们认为,如取材时能尽量去除结缔组织和粘液,使之在 2.2M 蔗糖中能顺利匀浆,则采用 Chauveau's 法为好。如在 2.2 M 蔗糖中,取材不易匀浆,则可采用 Chiu's 法,再用大量稀释过滤方法提高产率。另外在所有试剂中均应加蛋白水解酶的抑制剂——PMSF,以便减少分离过程中核内蛋白质降解,以提高产率。

Chauveau's 法及 Chiu's 法制备的人胃粘膜细胞核经苏木素伊红染色,光学显微镜下观察,核形态完整,纯净度也较好(图 3、4 见封 3)。为了提高纯度,2.2M 蔗糖超速离心获得的细胞

核经溶液 A 洗 2—3 次,再用含去垢剂 Triton X100 的溶液 A 处理一次。组织不同,去垢剂所需浓度各异,我们则采用 0.2%、0.5% 及 1% 三种浓度平行处理同一标本,结果发现含 0.2% Triton X100 的溶液 A 处理后细胞核完整未破,浓度大的细胞核易破碎。经 Triton X100 处理的纯核电镜观察,核形态完整,核膜上污染较少(图 5 见封 3)。

以上结果为深入研究胃粘膜细胞核的生化性质提供了有利条件。

本研究得到中国科学院科学基金资助。

本文得到赵天睿教授的大力支持;上海生物化学研究所李宝珪的热情帮助,文中电镜照片承江西省家畜防疫站电子显微镜室协助,在此一并表示深切谢意。

参 考 文 献

- [1] Chhauveau, J. et al.: *Exp. Cell Res.*, 11: 317, 1956.
- [2] Chiu, J. F. et al.: *J. National. Cancer Inst.*, 59(1), 151, 1977.
- [3] Blobel, G. et al.: *Science*, 154, 1662, 1966.
- [4] Schneider, W. C.: *Method in Emsymol. Vol C*, 680, 1957.
- [5] Siebert, G.: *Methods in Cancer Res.*, Vol 11, 287, 1967.
- [6] Olson, M. O. J. et al.: *The Cell nucleus*, 3, 211, 1974.
- [7] Roodyn, D. B.: *Subcellular Components* (Ed. by Birnie, C. D. et al.: press) p. 15, 1972.

(本文于 1983 年 1 月 28 日收到)

用国产大网格聚合物吸附剂从蛋白溶液中除去 Triton X-100

周德和 倪崇虎 李志毅 池志强

(中国科学院上海药物研究所)

Triton X-100 是一种良好的、常用的溶解膜蛋白的非离子型去垢剂。但过量的 Triton X-100, 往往要影响蛋白质溶液的精确测定与分析, 因此希望 Triton X-100 的浓度仅维持在

膜蛋白不至于从溶液中析出即可。有人曾用 Sephadex G-200^[1] 和 Bio-gel A_{5m}^[2] 凝胶过滤法从蛋白溶液中除去 Triton X-100, 但仅对于 100,000 daltons 左右的大分子量的蛋白质而言,

“限制性内切酶 MboI 的提取与纯化”一文的图 1 与 2



图 1 1% 的琼脂糖凝胶电泳图谱

(1) 以 1 微克 λ -DNA 为底物, 5 微升磷酸纤维素 P_{11} 柱酶的洗脱液

(2) 活性部分在 5—15 之间中间出现的 10—12 是梯度洗脱、仪器上的误差所引起的。

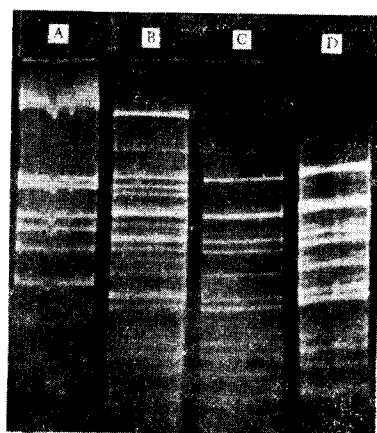


图 2 5% 的丙烯酰胺电泳图谱

A: HinfI 酶解 pBR 322, B, C: 用 HinfI 酶纯化的 MboI 酶解 pBR 322, 但 B 降解不完全。D: 未纯化的 MboI 酶解的 pBR 322。

“人胃粘膜细胞核的制备”一文的图 2—5

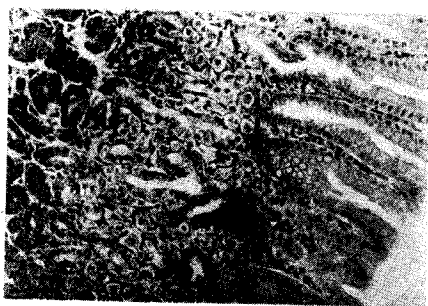


图 2 人胃粘膜组织常规石蜡切片
(光学显微镜 100 $\times$)

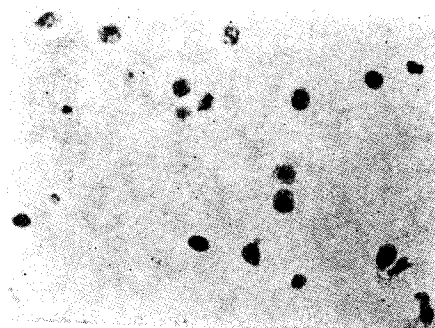


图 3 Chiu's 法制备的人胃粘膜细胞核
(光学显微镜下 400 $\times$)

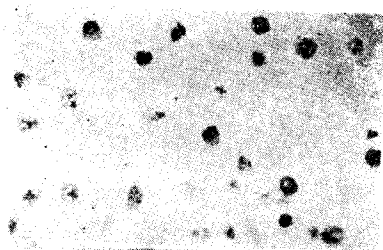


图 4 Chauveau's 法制备的人胃粘膜
细胞核(光学显微镜下 400 $\times$)

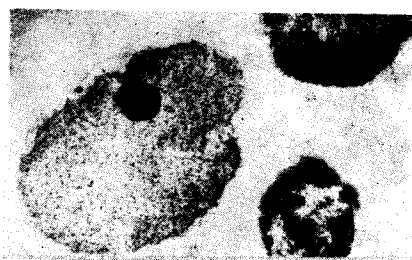


图 5 纯化后的人胃粘膜细胞核的电镜图 3,900 $\times$