

叶绿体核糖体的简易制备法

李家洋 李继耕

(中国科学院遗传研究所, 北京)

高等植物中有两类核糖体: 一类为原核型的, 存在于叶绿体与线粒体中; 另一类为真核型的, 存在于细胞质中。核糖体是细胞进行蛋白质生物合成的部位, 同时又与生物体的若干性状, 如抗性突变有关。随着高等植物分子生物学的发展, 分离、鉴定并利用这些核糖体显得日

益重要。现将这两类核糖体蛋白质的提取与双向电泳方法报道如下。

材 料 与 方 法

甜菜与番茄的鲜嫩叶片, 除去叶柄和中脉后, 称重。用自来水洗三次, 再用预冷的去离子

(2) 固相载体-抗体量的影响 Reichard & Miller^[8] 用双抗体法测定委内瑞拉马脑脊髓炎时, 化学发光强度与聚丙烯酰胺微球-委马抗体结合第二抗体-辣根过氧化物酶量呈正比, 委马抗体-微球量越大, 则化学发光反应越强(图4)。

六、结 语

化学发光法能够直接测出 10^3 — 10^5 菌/毫升, 整个过程数分钟即可完成, 而且也实现了自动化, 适于快速测定水中细菌总数。化学发光免疫测定法, 不但具有免疫酶联技术的全部优点, 而且具有放射免疫法灵敏度高特点。除此之外, CLIA 法还具有下列优点: ① 可将抗体球蛋白共价结合在固相载体上, 因此 CLIA 没有免疫酶联法 (ELISA) 中洗涤时解脱抗体的缺点。② CLIA 中不用同位素, 故没有使用同位素的缺点, ③ 对酶活性的要求没有 ELISA 那样严格。可见, 化学发光免疫测定法将有良好的发展前途。

参 考 文 献

- [1] Pazzagli, M.: *J. Steroid Biochem.*, 14: 1005, 1981.
- [2] Schrider, H. R.: *Methods in Enzymol.*, 84: 303, 1982.
- [3] Hersch, L. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 93: 267,

- 1979.
- [4] Oleniacz, W. S. et al.: *Environ. Science Technology*, 2: 1033, 1968.
- [5] Ewetz, et al.: *Acta. Path. Microbiol. Scand. B.*, 82: 375, 1974.
- [6] Halmann, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 34: 473, 1977.
- [7] Velan, B. et al.: *Immunochemistry*, 15: 331, 1977.
- [8] Reichard, D. M. et al.: *AD: A09043*, 1980.
- [9] Schroder, H. R. et al.: *Clin. Chem.*, 27: 1378, 1981.
- [10] Allon et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 345, 1982.
- [11] Pronovost, A. D. et al.: *ibid.*, 13: 96, 1981.
- [12] Korishi, E. et al.: *ibid.*, 12: 140, 1980.
- [13] Nakamura, R. M. et al.: *Immunoassay for the 80 S. P. 171—187*. Alan R. Liss, Inc.,
- [14] Goding, J. W.: *J. Immunol. Methods*, 13: 125, 1976.
- [15] Aryameas, S. et al.: *Immunochemistry*, 6: 43, 1969.
- [16] Nakane, P. K. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084, 1974.
- [17] Inman, J. K. et al.: *Biochemistry*, 8: 4074, 1969.
- [18] Raitenberg, E. J. et al.: *Bull. WHO*, 51: 105, 1974.
- [19] Ewetz, L. et al.: *Anal. Biochem.*, 71: 546, 1976.
- [20] Neufeld, H. A. et al.: *ibid.*, 12: 303, 1965.
- [21] Cox, R. et al.: *J. Bact.*, 113: 112, 1973.
- [22] Ewetz, L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 796, 1978.
- [23] Miller, C. A. et al.: *ibid.*, 35: 831, 1978.
- [24] Puget, K.: *Anal. Biochem.*, 79: 477, 1977.
- [25] Reichard, D. W. et al.: *Fed. Proc.*, 1013, 1979.

[本文于 1984 年 12 月 5 日收到]

水淋洗两次,剪碎备用。

1. 叶绿体核糖体蛋白质的制备

(1) 叶绿体的制备 主要参考李继耕^[1], Mache^[2] 和 Andrews^[3] 的程序。将预处理过的叶片按 1:3 加入缓冲液 A (0.4 M 蔗糖, 40 mM KCl, 5mM β -巯基乙醇, 40 mM Tris-HCl, pH 7.6) 匀浆。所得匀浆先后用两层与 10 层纱布过滤, 滤液以 3,800 rpm (MSE 7000, COOLSP-IN, 43124-704 转头) 4℃ 离心 3 分钟。上清液中含细胞质 80S 核糖体, 沉淀部分即为叶绿体。将此沉淀悬浮于 A 液中, 2,800 rpm、4℃ 离心 6 分钟。然后再将这一洗涤过程重复 1—2 次。完整的叶绿体在相差显微镜下为光亮的圆形。

(2) 叶绿体核糖体粗沉淀的制备 将叶绿体沉淀充分悬浮于适量的缓冲液 B (20mMKCl, 10 mM MgCl₂、5 mM β -巯基乙醇, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6) 中, 4℃ 静置 5 分钟以上, 再加入 2% Triton X-100 至终浓度为 5%, 冰浴搅拌 10 分钟。或不加 TritonX-100, 直接用玻璃匀浆器匀浆亦可^[2]。35,000 g、4℃ 离心 20 分钟。小心地将上清液铺加到含适量的 34.2% 蔗糖溶液 (用缓冲液 B 配制) 的离心管中, 175,000 g、4℃ 离心 120 分钟^[4], 所得沉淀即为叶绿体核糖体粗沉淀。

(3) 核糖体蛋白质干粉的制备 基本上按照 Sherton^[5] 的方法。将核糖体粗沉淀重新悬浮于缓冲液 B 中, 低温下用震荡器震荡 3—4 次, 每次 30 秒钟。35,000 g、4℃ 离心 15 分钟。在上清液中加入 2.0 M 乙酸镁和冰乙酸, 使其终浓度分别达到 67 mM、和 67%。轻轻震荡 30 分钟后, 用 30,000g、4℃ 离心 15 分钟。上清液对 1N 乙酸透析 24 小时以上, 中间换透析液 1 次。经冰冻干燥后即得核糖体蛋白质白色干粉。—20℃ 保存备用。

2. 细胞质核糖体蛋白质的制备

将前述离心沉淀叶绿体时所得到的上清液, 再以 35,000 g、4℃ 离心 15 分钟。所得上清液再进行 175,000 g 的超速离心, 以沉淀 80S 核糖体。各步骤的操作及条件, 均可参照上述 70S 叶绿体核糖体蛋白质的制备。

3. 核糖体蛋白质的双向电泳

主要参考 Madjar^[6], Kaltschmidt^[7], O'Farrell^[8], Capel^[9] 和丁家炳^[10] 等人的方法, 并做了一些修改。

(1) 第一向电泳 将核糖体蛋白质干粉溶解于样品缓冲液中, 取出 10 μ l, 用双蒸水稀释 50 倍后, 测定 A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 光吸收值, 并按下式计算蛋白质含量, 并配制 4.0 mg/ml 电泳样品溶液:

$$\text{蛋白质 mg/ml} = (1.54A_{280} - 0.76A_{260}) \times \text{稀释倍数}$$

样品缓冲液: 1 mM EDTA, 8M 脲, 1% β -巯基乙醇, 20 mM Tris-硼酸, pH 8.3。

分离胶: 4% 丙烯酰胺 (Acry.), 0.13% 甲叉双丙烯酰胺, (MBA), 10mM EDTA, 8M 脲, 200 mM Tris-硼酸, pH8.6。

电极缓冲液: 3mM EDTA, 60 mM Tris-硼酸, 上槽 pH 8.3, 下槽 pH 8.6。

第一向电泳为圆盘电泳, 胶管内径 3 mm, 长 120 mm。每毫升胶液中加入 4.5 μ l 10% AP 和 1.5 μ l TEMED, 立即灌胶, 胶面以异丁醇覆盖。聚合后换为 8M 脲液覆盖, 经 2 小时后, 吸去脲液, 每管点样 50 μ l, 上正下负, 150 V 稳压电泳 8 小时左右。

(2) 第二向电泳 第二向电泳采用垂直双板电泳。140 × 140 × 1.3 mm 胶板。采用两种电泳系统:

A. 酸系统 用乙酸-KOH, pH 4.5 的缓冲系统。电极缓冲液为 93 mM 甘氨酸-乙酸, pH 4.0, 上下槽相同。分离胶为 18% Acry. 0.5% MBA, 6M 脲, 0.44M 乙酸-KOH, pH 4.5。

每毫升胶液中加 30 μ l 10% AP, 抽气后再加入 6 μ l TEMED, 于 30℃ 温箱中聚合。

将走完第一向电泳的胶条, 从玻管中小心取出, 平行放在第二向玻板内, 从它的一端注入第二向胶液, 灌胶后使第一向胶条被封闭在第二向胶板之中。防止胶条下面出现气泡。灌完胶后, 上面用 2 ml 双蒸水覆盖, 置温箱中聚合, 然后进行电泳, 上正下负, 150 V 稳压。

B. SDS-PAGE 系统 分离胶为 12.5%

Acry, 0.33% MBA, 0.1% SDS、0.375M Tris-HCl, pH 8.8。浓缩胶为 4.4% Acry, 0.12% MBA, 0.1% SDS, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8。

每毫升分离胶中加 3.3 μ l 10% AP, 抽气后再加入 0.5 μ l TEMED。灌胶后胶面用 2 ml 双蒸水覆盖, 聚合后换为用分离胶缓冲液覆盖, 放置过夜。浓缩胶液中每毫升加入 3 μ l 10% AP 及 1 μ l TEMED, 灌胶后以异丁醇覆盖, 聚合后换成浓缩胶缓冲液。

将走完第一向电泳的胶条小心取出, 在平衡浸析液 (10% 甘油、5% β -巯基乙醇、2.3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8) 中浸析 30—60 分钟, 并不时摇动。然后取出, 平放在第二向胶板上, 用 1% 琼脂糖胶 (用浸析液配制) 联结, 并注意排除可能产生的气泡。上负下正电泳。电极缓冲液为 0.192 M 甘氨酸, 0.025 M Tris, 0.1% SDS。下槽电极液也可不含 SDS。20 mA 稳流电泳至溴酚蓝指示剂距下端 1 cm 为止。

电泳结束后, 将胶板放入染色液 (0.1% 考马斯亮蓝 R 250, 40% 甲醇, 10% 乙酸) 中染色 8 小时或过夜。换几次脱色液 (40% 甲醇、10% 乙酸) 直至背景无色为止, 即可观察与拍照。

结果与讨论

图 1 (见封 3) 的双向电泳只反映被分离物质的电荷情况; 而图 2 (见封 3) 的双向系统不仅反映出核糖体蛋白质分子的电荷性质, 而且也反映蛋白质分子量的大小。从图中可以看出, 核糖体蛋白质分子量主要分布于 10 kd—50 kd 之间

在制备叶绿体核糖体蛋白质时, 由于受细胞质 80 S 核糖体的污染和叶绿素等色素物质的干扰, 影响制备。为了避免这些干扰, 通常采用长时间蔗糖密度梯度离心。但梯度离心既费时间, 也涉及样品回收问题, 不适于大量样品的处理。如用一般的超离心法制备叶绿体 70 S 核糖体蛋白质, 由于 80 S 核糖体蛋白质的污染和绿色物质的干扰, 往往得不到正常的双向电泳图谱。通过我们的摸索, 从以下三个方面作了改

进, 解决了这一问题。

第一, 在胞溶叶绿体之前, 通过用 A 液反复洗涤叶绿体 2—3 次, 除去吸附在叶绿体外的细胞质 80 S 核糖体, 减少了 80 S 核糖体对 70 S 核糖体的污染。而未修改的程序, 是在一得到叶绿体沉淀就进行胞溶, 其 80 S 的污染是通过后来的蔗糖梯度离心与 70 S 分开而除去的。

第二, 在超离心沉淀叶绿体 70 S 核糖体时, 改用了 34.2% 蔗糖溶液垫底, 其作用在于阻挡一大部分绿色物质随核糖体一起沉淀。在实验中发现, 若无蔗糖垫底, 核糖体的粗沉淀呈不透明的暗绿色; 而有蔗糖垫底时, 所得沉淀为半透明黄绿色。这反映了在有蔗糖垫底时所得沉淀中绿色物质的减少。

第三, 在用乙酸抽提叶绿体核糖体蛋白质之前, 先对核糖体沉淀进行洗涤, 这样基本上清除了核糖体中的绿色污染物质。但是, 需要注意的是, 离心前核糖体的悬浮一定要充分, 彻底。否则, 核糖体的损失就会大大增加。

最后需要指出的是, 虽然省去了蔗糖密度梯度离心, 但仍有可能会有微量绿色物质的污染。经对比实验结果表明, 这对双向电泳的结果无任何影响。事实上, 采用上述简易程序制备的菠菜叶绿体核糖体蛋白质和 Mache^[2] 等人用蔗糖密度梯度离心制备的样品所得到的双向电泳图谱是一致的, 从而证明, 上述简易方法是可靠易行的。

参考文献

- [1] 李继耕等: 《遗传学报》, 9(3), 203—208, 1982。
- [2] Mache R. et al.: *MGG*, 177, 333—338, 1980。
- [3] Ardrews W. H. et al.: In *Methods in Chloroplast Molecular Biology* (eds. Edelman M. et al.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 565—571, 1982。
- [4] Gualerzi C., *J. Biol. Chem.*, 249, 3347—3355, 1974。
- [5] Sherton C. C. et al.: *MGG*, 135, 97—112, 1974。
- [6] Madjar J. J. et al.: *Anal. Biochem.*, 92: 174—182, 1979。
- [7] Kaltschmidt E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 67, 1276—1282, 1970。
- [8] O'Farrell P. H.: *J. Biol. Chem.*, 250, 4007—4021, 1979。

用核孔滤膜过滤法研究红细胞的变形性

王世成 崔浣华 吴日升

(中国科学院高能物理所, 北京)

张之南 肖 威 李德高

(北京协和医院)

正常红细胞有很大的变形能力, 因此能够通过比本身小得多的微孔和微血管。若红细胞因病变, 变形能力减少, 则不能或较难通过上述微孔, 这样就会影响血流及红细胞的运氧功能。红细胞通过微孔的能力——可滤过性, 能反映出红细胞的变形性。孔径均匀, 孔形规则的核孔滤膜是测定红细胞可滤过性的理想滤膜。用它研究红细胞可滤过性, 方法简单, 能为研究某些缺血性疾病的发生机理提供重要资料^[1-5]。

一、方法原理

在一定的负压下, 将红细胞悬浮液通过孔径 5 微米的核孔滤膜, 测量红细胞悬浮液的滤速 FR (Filtration Rate) 和红细胞压积 PCV (packed cell volume) 按(1)式计算红细胞的滤速 EFR (Erythrocyte Filtration Rate):

$$EFR = FR \cdot PCV \dots \dots (1)$$

EFR 值是红细胞可滤过性的量度, 我们把 EFR 值作为衡量红细胞变形性的指数, EFR 值愈大, 说明红细胞的变形能力愈大。

二、实验方法

1. 过滤装置 (见图 1)

用 50 ml 注射器抽出真空贮槽内的空气, 使系统保持负压。水柱上升高度是系统内负压大小的量度。装置的接头部分用玻璃磨口连接, 以保证系统有良好的密封性。

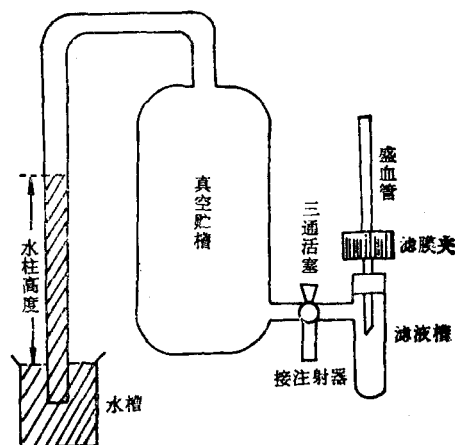


图 1 过滤装置的示意图

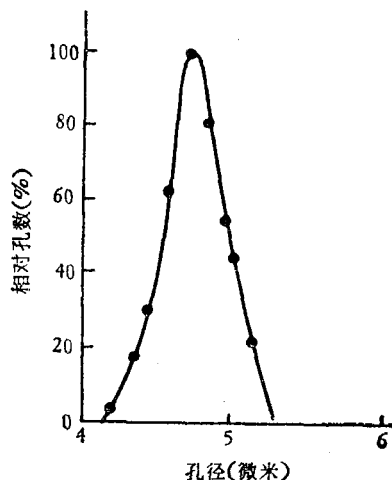


图 2 核孔滤膜的孔径分布

2. 核孔滤膜: 它是用反应堆的中子照射浓

[9] Capel M. et al.: 同文献 [3] pp. 1029—1043, 1982.

[10] 丁家炳等: 《遗传》, (5), 39—41, 1980.

[本文于 1985 年 7 月 17 日收到]

“补体与红细胞膜的结合作用”一文的图 1, 3

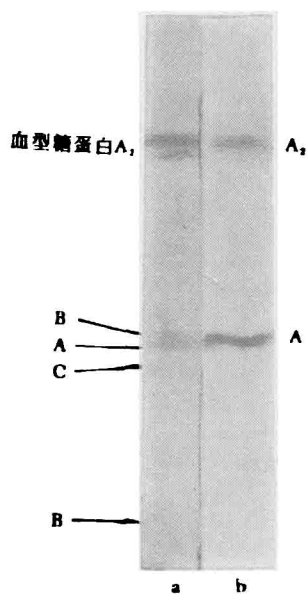


图 1 PAGE 糖蛋白染色及硝酸纤维膜电转移酶标 C_{1b} 染色图谱

1a: PAGE 糖蛋白染色图谱

1b: 硝酸纤维膜电转移酶标 C_{1b} 染色图谱



图 3 经唾液酸酶处理与未处理的红细胞膜聚丙烯酰胺 PAS 染色图谱

3a 经唾液酸酶处理

3b 未经酶处理

~~~~~

“叶绿体核糖体的简易制备法”一文的图 1—2

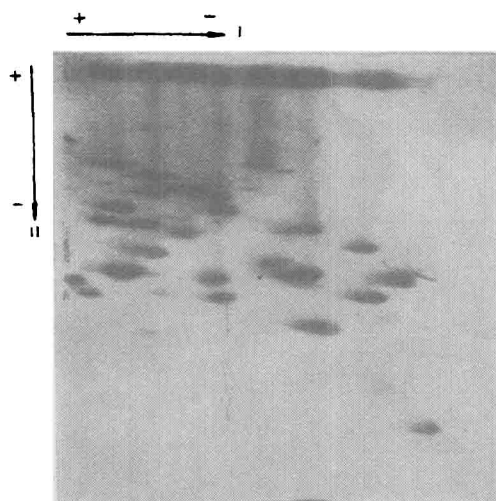


图 1 甜菜叶绿体核糖体双向电泳

I: Tris-硼酸, pH8.6 缓冲系统  
II: 乙酸-KOH pH4.5 缓冲系统

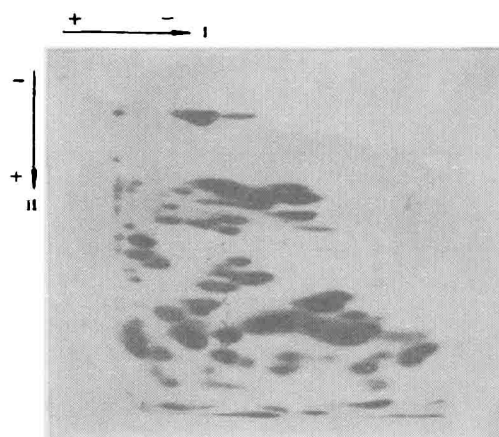


图 2 番茄细胞质核糖体双向电泳系统

I: Tris-硼酸 pH8.6 系统  
II: SDS-PAGE pH8.8 系统