

DEAE 纤维素法测定微管蛋白

李兰戈 郭守祥 崔汝珍

(天津医学院生物化学教研室)

提 要

利用 ^3H -秋水仙碱与微管蛋白的特异性结合及 DEAE 纤维素对微管蛋白的离子交换作用,以测定 ^3H -秋水仙碱微管蛋白复合物的含量,了解脑神经原的分化状态。此法简便、快速、稳定、经济。

微管蛋白是神经原突起中的重要化学组分,因此,脑微管蛋白的含量可表示脑神经原分化的程度^[1-3]。

微管蛋白的测定可用 Sephadex G-100 或 DEAE-Sephadex A-50 柱层析法,但这些方法费时、费钱,且易污染^[2,4]。我们根据 Borisy^[4]的方法,用 DEAE 纤维素粉和国内一般的实验室条件建立了这一简便,易行,稳定的方法。

本法基于 (1) ^3H -秋水仙碱对微管蛋白有高度特异的亲合性^[4]。(2) DEAE 纤维素在中性 pH 及适宜离子强度条件下与微管蛋白有很强的离子交换作用^[4]。

材 料 和 方 法

一、试剂(除注明者外都是分析纯试剂)

1. 10mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 含 10mmol/L MgCl_2 。

2. 0.01mmol/L 秋水仙碱溶液: 0.8mg 秋水仙碱溶解于磷酸盐缓冲液中,稀释至 200 ml。

3. 0.25 $\mu\text{Ci}/0.25\text{ ml}$ ^3H -秋水仙碱溶液: ^3H -秋水仙碱(购自上海原子核研究所,放射比强度 4.74 Ci/mmol,放射浓度 0.5 mCi/ml) 64 μl 加入 0.01mmol/L 秋水仙碱溶液 40ml,混匀。

4. 闪烁液: 对三联苯 (TP) 4.0g 及 (1, 4-二-[2-(5 苯基噁唑)-苯]) (POPOP)

0.4g 先溶解于 250ml 醋酸乙酯中。加二甲苯到 1000ml,混匀,置暗处保存备用。

二、DEAE 纤维素处理: 100g DEAE-纤维素在 150 ml 0.5 mol/L HCl 中浸泡 1 小时,抽净上清液,用蒸馏水洗涤至 pH4,再加 150ml 0.5mol/L NaOH 溶液浸泡 1 小时,抽干后,再重复一次碱处理,以蒸馏水洗涤至 pH 接近中性。再加磷酸盐缓冲液平衡纤维素,直至其 pH 值和电导度相同于磷酸盐缓冲液。最后清除漂浮的细粒和杂质,将此纤维素悬液贮于冰箱,备用。

三、DEAE 纤维素滤膜的制备

取直径 3cm 的圆形滤纸片,十字对折成漏斗状,将其置于相同大小的玻璃漏斗中,滴加上述之 DEAE 纤维素悬液到滤纸上,边滴加,边抽滤压紧,直至装满漏斗为止,备用。

四、脑微管蛋白提取液的制备

动物断头处死,迅速剥取全脑,在冰冷的磷酸盐缓冲液中除去脑膜和血管,称重。每克脑组织加 1ml 磷酸盐缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下匀浆。600r/min 连续匀浆 2 分钟。然后,30000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$,离心 30 分钟,留上清液备用。

五、脑微管蛋白测定

取 0.1ml 微管蛋白提取液,加入 0.25ml (0.25 μCi) ^3H -秋水仙碱溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 小时后,放冰水浴中终止反应。然后加 2ml 0.01mmol/L 非标记的秋水仙碱溶液稀释。缓

慢地滴到 DEAE 纤维素漏斗上,边滴边抽滤。滴毕,用 10ml 冰冷的缓冲液分 10 次冲洗,除去游离的过剩秋水仙碱。然后,抽干,将 DEAE 纤维素连同纸漏斗一齐放入计数瓶中,加 6ml 闪烁液,震荡混匀,平衡过夜,计数。

六、按 Hartree 改进的 Lowry 法定脑中总蛋白含量^[5]。

结果和讨论

一、洗脱体积的确立

除去游离的 ^3H -秋水仙碱而不影响结合的 ^3H -秋水仙碱,适宜的冲洗体积是必要的。取 0.25, 0.5, 和 1.0ml 样品各 3 份,分别以 1、2、5、10、20、和 40ml 体积的缓冲液冲洗后计数。由图 1 说明 10ml 冲洗液较为合适。洗脱液多达 40ml 时,计数无明显改变。说明 ^3H -秋水仙碱与微管蛋白的结合以及 DEAE-纤维素与微管蛋白复合物的结合都是稳定和牢固的。

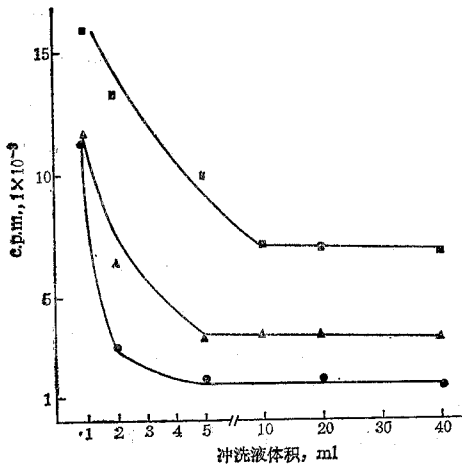


图 1 洗净游离 ^3H -秋水仙碱所需冲洗液体的确定

注: 反应液取样量: 0.25ml(●), 0.5ml(▲), 1ml(◆)

二、闪烁液浸泡时间

在计数瓶中, ^3H -秋水仙碱慢慢地释入闪烁液中。为了完全解离,一日后方可计数^[4]。我们分别在浸泡 16, 24, 40 小时后,重复测定同一组样品。结果表明浸泡 16 小时后计数已稳定(见表 1)。

三、准确度与精密度

取鼠脑和鸡脑样品液,测其总蛋白浓度分

表 1 相同样品不同时间测定的 cpm 值的方差分析

变异来源	离均差平方和 SS	自由度 n	均方 MS	F 值	P 值
总变异	1.35	23			
组间变异	0.10	2	0.05	0.83	>0.05
组内变异	1.25	21	0.06		

注: 组间均方小于组内均方,组间变异不值得考虑。

别为 5.87mg/ml 和 2.82mg/ml, 分别依次等倍稀释。鼠脑稀释液各取 0.75ml, 鸡脑稀释液各取 0.1ml, 分别加入 0.25ml ^3H -秋水仙碱溶液, 测定微管蛋白含量。结果表明微管蛋白含量与 cpm 值之间密切相关($r = 0.9998$, $p < 0.001$)。在总蛋白低于 2mg 的样品量中的微管蛋白含

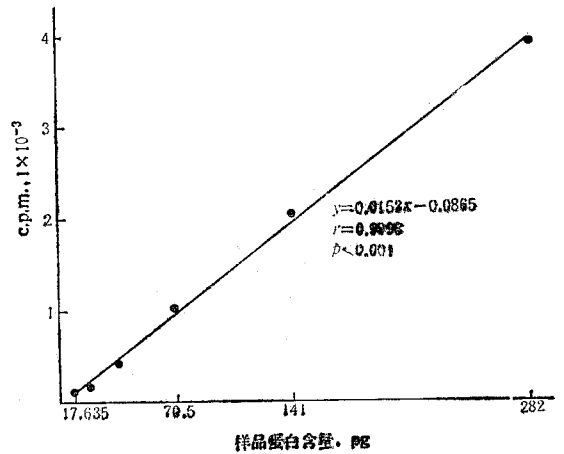


图 2 微管蛋白含量与 cpm 值之间的关系

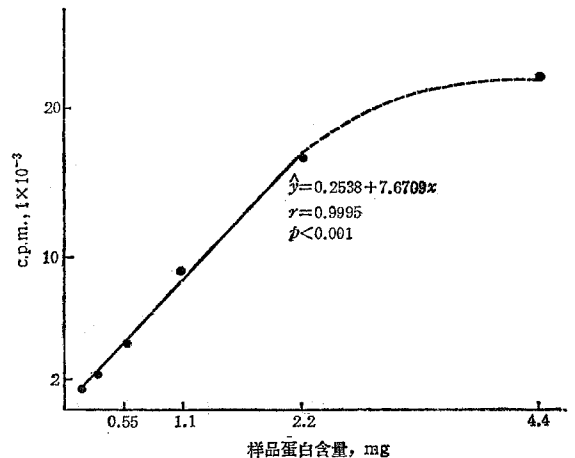


图 3 DEAE 纤维素的检测能力

(下转第 475 页)

CuSO_4 浓度对 $\cdot\text{OH}$ 的生成无多大影响,说明只要痕量 Cu^{2+} 存在就满足要求了。

表 3 不同抗坏血酸和硫酸铜浓度对生成 $\cdot\text{OH}$ 自由基的影响

	抗坏血酸 ($\mu\text{mol/L}$)	CuSO_4 ($\mu\text{mol/L}$)	$T_{550\text{nm}}$	$A_{550\text{nm}}$
1	100	200	70.3	0.1531
2	100	100	70.6 ± 1.5 ($n = 10$)	0.1516 ± 0.0091
3	100	50	70.9	0.1494
4	200	100	68.3	0.1656
5	50	100	76.3	0.1175

3. 在铜离子 (Cu^{2+}) 存在下,依赖于抗坏血酸的 $\cdot\text{OH}$ 自由基形成不受 SOD 的抑制,而硫脲对 $\cdot\text{OH}$ 有很好的抑制作用

从表 2 中还可可见,经 90 分钟 25°C 温育后,生成的 $\cdot\text{OH}$ 自由基能使约 5nmol 的细胞色素 $c(\text{II})$ 氧化,而加 SOD 液的 T 值接近 $\cdot\text{OH}$ 生成组,说明该体系在形成 $\cdot\text{OH}$ 自由基过程中几乎未见有同时产生 O_2^- 的迹象,该体系与在铁盐存在下依赖于 O_2^- 的黄嘌呤加黄嘌呤氧化酶体系^[9]产生的 $\cdot\text{OH}$ 相比,前者不受 SOD 抑制,后者同时受到 SOD 抑制。加硫脲组的 T 值与对照组基本一致 ($\Delta T \approx 0$),可见,硫脲对本体系有很好的抑制作用。

从图 1 中可见,当硫脲浓度低于 2.5mmol/L 时,不能有效地抑制 $\cdot\text{OH}$ 的生成,只有当硫脲浓度大于 3.75mmol/L 时,才能对 $\cdot\text{OH}$ 自

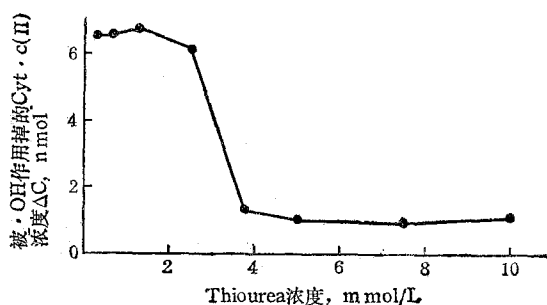


图 1

由基起到很好的抑制作用。

本工作得到本所金为翘教授、王洪复副教授和华东师大生物系胡天喜副教授的热忱指导,特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Barry Halliwell et al.: *Free radicals in Biology and Medicine*, Charendon Press, Oxford, 1985, 37—45.
- [2] 吉林医科大学:《放射医学》(上),1975,12,154—159.
- [3] Rowley, D. A. et al.: *Archs Biochem. Biophys.*, 1983, 225, 279.
- [4] Kock, C. J., et al.: *J. Cell Physiol.*, 1978, 94, 299.
- [5] Luigig, Forni et al.: *Biochem. J.*, 1986, 240, 905.
- [6] Halliwell, B.: *Biochem. J.*, 1977, 167, 317.
- [7] Massey, V.: *Biochem Biophys. Acta*, 1959, 34, 255.
- [8] Vandewalle, P. L. et al.: *FEBS Lett.*, 1987, 210, 195.
- [9] John M. C. Gutteridge et al.: *Biochem. J.*, 1982, 206, 605.

【本文于 1988 年 10 月 4 日收到】

(上接第 472 页)

量与 cmp 值成线性关系(图 2, 图 3)。一般所取样品中的总蛋白量约在 $100-300\mu\text{g}$ 之间,均在线性范围内。

分别取 0.1ml 脑微管蛋白提取液 8 份,测定微管蛋白含量,结果表明多份相同样品的组内变异系数是 0.06。

本实验以 ^3H -秋水仙碱为探针,结合微管蛋白,用 DEAE-纤维素分离结合微管蛋白,测其含量结果证明此法简单、易行、经济、可靠。

参 考 文 献

- [1] Chaudhury, S., et al.: *Developmental Brain Research*, 1983, 9, 291.
- [2] Chaudhury, S. & Saeker, P. K.: *Biochemica et Biophysica Acta*, 1983, 763, 93.
- [3] Fellous, A., et al.: *Eur. J. Biochem.*, 1979, 101, 365.
- [4] Borisy, Gary G.: *Analytical Biochemistry*, 1972, 50, 373.
- [5] Hartree, E. F.: *Analytical Biochemistry*, 1972, 48, 422.

【本文于 1988 年 9 月 16 日收到】