技术与方法

一种改进的神经突触膜制备方法*

郭 佐 陈宜张
(第二军医大学生理教研室,上海 200433)

郑 尊
(第二军医大学中心实验室,上海 200433)

提 要

介绍一种改进的神经突触膜（SPM）的制备方法。采用此方法,可简化制备过程,缩短制备时间，提高 SPM 产率，特别是可以完全排除胞液对 SPM 制备物的污染。

关键词 突触膜,制备方法,胞液

神经突触膜(synaptic plasma membrane, SPM）是神经细胞膜上一种特化的结构，它在神经细胞信息传递的过程中起着重要的作用。分离 SPM 是许多神经科学研究工作的基础。分离的原理是：根据 SPM 的特定比重，用密度梯度超速离心法进行分离制备。因实验工作的特殊需要，我们对常用的 SPM 制备方法进行了改进。

1 材料与方法

1.1 动物

Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不拘，体重约 150—250g，本校动物所提供。

1.2 试剂

辅酶 I,5′-一磷酸腺苷为美国 Sigma 公司产品;5,5′-二硫对 2-硝基苯甲酸、硫代碘化乙酰胆碱、2,4-二硝基苯肼、甘氨酸等为国产生物纯制剂;乳酸钠、巴比妥钠、戊巴比妥钠、氯化镍、硫酸锰、钼酸铵、氨荼磺酸等均为国产分析纯或化学纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 SPM 制备

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,开胸,经左心室插塑料导管至主动脉，剪破左、右心房，用注射器注入冷生理盐水 200—300ml，直至灌流液清亮为止。开颅取出鼠脑,称重后剪碎,加入 0.32 mol/L 蔗糖溶液，用玻璃匀浆管匀浆(1600r/min, 5—8min)，然后按图 1 所示的流程操作。

1.3.2 蛋白含量测定

采用 Bradford 蛋白染料结合法[3]。

1.3.3 标志酶测定

乳酸脱氢酶（LDH）：参见文献[4]。

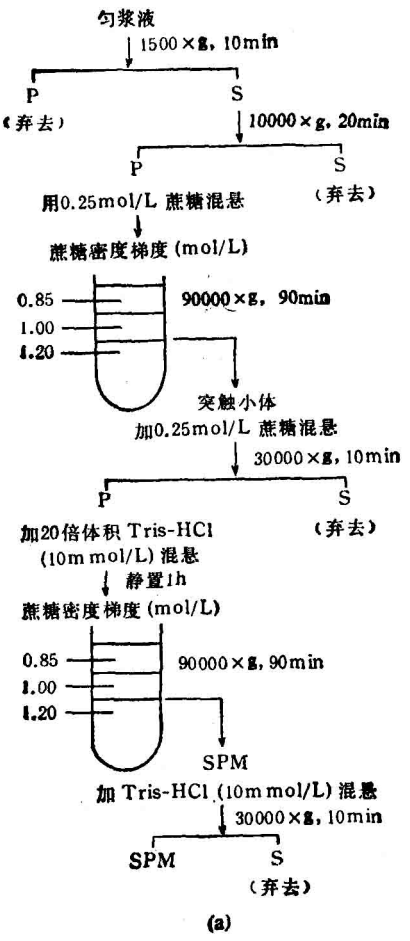
乙酰胆碱酯酶（AChE）：参见文献[5]。

5′-核苷酸酶（5′-NT）：参见文献[6]。

1.3.4 电镜方法

标本用常规方法制备，多聚甲醛及锇酸固定，Epon 812 包埋,超薄切片,日立 H-800 电镜作透射观察。

* 国家自然科学基金资助项目。
收稿日期：1992-01-14 修回日期：1992-05-25



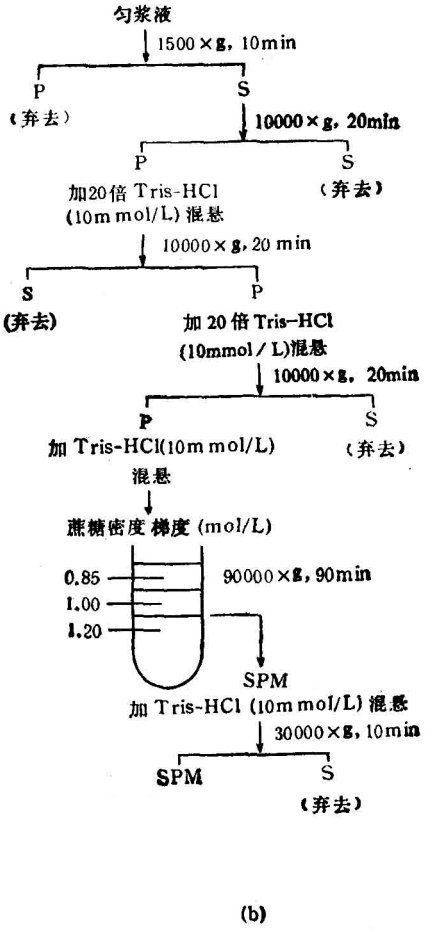


图 1　SPM 的制备流程

(a) 原方法[1,2]; (b) 改进方法
P: 沉渣; S: 上清

2 结　果

表 1 对两种制备方法进行了比较。

表 1　两种 SPM 制备方法的比较

	原方法	改进方法
制备时间(不包括灌流及匀浆)	8—9h	5h
每克脑湿重 SPM 产量(以蛋白计)	0.2—0.4mg	>1.0mg
标志酶活性[1]:		
LDH	42.7±13.1 ($n=8$)	0($n=10$)
5′-NT	624.6±543.5 ($n=8$)	341.6±35.4 ($n=3$)
AChE	298.7±19.0 ($n=2$)	282.6±78.1 ($n=6$)

[1] 以匀浆液中的酶活性为 100%, $\bar{x}$±SD

图 2 为两种制备方法所得标本的电镜照片，可见到清晰的膜结构，并可见突触结构（箭头所指），与文献[2]的结果相近。两种方法所得标本未见明显的超微结构的差异。

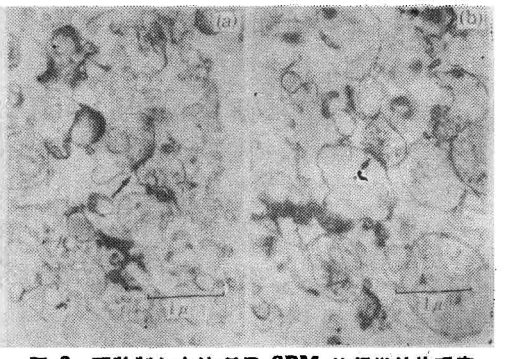


图 2　两种制备方法所得 SPM 的超微结构观察

(a) 原方法; (b) 改进方法

3 讨 论

目前分离 SPM 的方法主要是不连续蔗糖密度梯度超速离心法.因 SPM 是由增厚的突触前膜和突触后膜组成的复合结构，具有一定的比重,故在超速沉降后,停留在 1.0 和 1.2mol/L 蔗糖溶液的交界处[1,2].

根据文献[1,2]采用的 SPM 分离方法,分离步骤较多，需要两次超速离心. 第一次超速离心时，样品是用等渗蔗糖溶液混悬的 P_2 成分，而在等渗溶液中，质膜膜片又自行形成小泡，其中包含有胞液等成分，故分离后得到的是突触小体 (synaptosome); 然后再用低渗的 Tris-HCl 溶液对其进行处理，使小泡低渗溶破释出包含物，再经第二次超速离心分离才制得较为纯净的 SPM，但经检测 SPM 中仍含较高 LDH 活性.

本文介绍的改进方法，主要是将低渗处理提前,即在得到 P_2 后，马上加入低渗的 Tris-HCl 溶液,高速离心,在低渗和离心力的作用下将可能形成的小泡破坏掉,将其包含物洗去.这样在超速离心上样时，样品已是较为纯净的膜片，经离心便可一步制成很纯的、不含胞液的 SPM. 经改进后,减去了一次超速离心,相应地减少了制备过程中样品的损失(产率提高); 减少了 SPM 制备时间，也就相对有利于样品活力的保存;特别重要的是使 LDH 活性降至零，表明不存在胞液的污染. 虽然很多关于质膜受体或酶的实验甚至可以在 P_2 成分上便可进行，但其理论基础在于已知实验对象在胞液中不存在、或含量极低而不影响结果. 如果实验对象的分布是未知的，或者胞液成分中对质膜上实验对象的影响是未知的，或者是要区分某成分在亚细胞结构上 (质膜上或胞液中) 的分布情况，那么采用本改进方法则有其特殊意义. 例如，作者分别以 P_2 和 SPM 为标本测定其甘氨酸受体,结果 SPM 上受体数量较 P_2 高 4—6 倍，表明胞液中有影响受体测定的成分存在，用 SPM 所得的结果较用 P_2 更为合理、准确.

参 考 文 献

1 Cohen R S, Blomberg F, Berzins K *et al*. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex, I Overall morphology and protein compesition. *J Cell Biol*, 1977; **74**: 181

2 Towle A C, Sze P Y. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem*, 1983; **18**(2): 135

3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976; **72**: 248

4 Amador E, Dorfman L E, Wacker W E C. Serum lactin dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. *Clin Chem*, 1963; 9(4): 391

5 Ellman G L, Courtney K D, Andres V Jr *et al*. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961; 7: 88

6 李其英,徐勉忠,孔祥云. 实用临床医学检验. 武汉: 湖北人民出版社,1980: 346—348

肌醇的制取与生产 (925233)

肌酶是粮油加工副产品综合利用所得的化工产品,一种高级营养滋补剂,价格昂贵,应用广泛,又是重要的出口创汇产品. 本文在概要阐述肌酶性状基础上，论述肌酶的制备与生产方法，探讨肌酶生产中的工艺和操作技术,提出现有生产可供考虑的改进途径. 根据试验,利用现有工厂设备,从原料,水解、中和等工艺以及后续的制取与精制方法,掌握优选条件可使肌酶生产的实际收得率得到较大的提高,如果能在所提供的若干方面进行深入研究,相信还可以获得更好的收得率,从而大大增加社会和经济效益. 委托检索费: 单位 15 元，个人 13 元.

[北京 867 信箱 20816 组李群,邮码: 100024 电话: 5762127,5762194]