

鸡胚肝乳糖凝集素专一性的研究

——SEM-ARG 技术的应用

陈清轩 史瀛仙

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

提 要

本文利用扫描电镜放射自显影(SEM-ARG)技术研究鸡胚肝凝集素的专一性。该凝集素经乳糖尿素液抽提和离心分离后,再用 DE-52 纤维素柱和蓝色葡聚糖柱进一步纯化。纯化后的鸡胚肝凝集素用 ^{125}I 标记。以标记的 ^{125}I -凝集素为探针再标记来自不同组织的细胞。标记的细胞经过放射自显影,用扫描电镜对细胞表面凝集素受体的位点进行直接观察。实验结果表明鸡胚肝凝集素对细胞的凝集作用具有相对的专一性。

关键词 凝集素,亲和标记,放射自显影,扫描电镜

1974 年 Stockert 首次从哺乳动物家兔肝脏中分离出凝集素^[1],以后陆续从不同高等动物的不同组织中分离出许多种凝集素,并对其理化性质和生理功能作了研究。这些研究表明凝集素在细胞分化、细胞识别和信息传递中起重要作用,因此它是研究细胞膜结构与功能的重要工具^[2]。细胞间的粘接作用在同种细胞和异种细胞间是不同的,这说明不同类细胞表面的性质不同。我们从鸡胚肝、肾、脑中分离出结合乳糖的凝集素;并通过这些凝集素对来自不同组织细胞的凝集作用的比较,以探讨细胞间识别的特异性。用放射性的鸡胚肝凝集素亲和标记不同的细胞,通过扫描电镜放射自显影^[3]直接观察鸡胚肝凝集素受体位点在不同细胞表面分布情况,以研究鸡胚肝凝集素作用的专一性。

材 料 和 方 法

一、鸡胚肝、肾、脑凝集素的制备

乳糖尿素法抽提和分离凝集素^[4]。以 12—15 天的鸡胚为材料,分别取出其肝脏、肾脏和

脑,用 4℃ 生理盐水洗净,剪碎。以 1g 组织 8 ml 的比例加入含有 0.3 mol/L 乳糖、1.0 mol/L 尿素和 100U/ml 的蛋白水解酶抑制剂(Aprotinin)的 PBS 缓冲液(75 mmol/L NaCl, 75 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 4mmol/L 巯基乙醇, 2mmol/L EDTA, pH7.2)。用玻璃匀浆器在 4℃ 条件下匀浆 4min, 100,000 × g 离心 60min。上清液对 PBS 透析三次,贮在 4℃ 冰箱待纯化。DE-52 离子交换纤维素先用 0.5mol/L 盐酸处理 30min,用蒸馏水洗至 pH 低于 5.0,再用 0.5 mol/L 氢氧化钠处理 30min,用蒸馏水洗至 pH 低于 8.0。层析柱用 PBS(pH,8.0)平衡,样品对平衡液透析后缓慢上柱(2.5 × 15cm)。用 PBS 淋洗层析柱,直至 A_{280} 低于 0.02;以 PBS 和含有 0.6mol/L NaCl 的 PBS 构成的线性梯度进行洗脱。收集活性组分,并对缓冲液 PB (10mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{O}_4$, 10mmol/L 巯基乙醇, 2mmol/L EDTA, pH7.2) 透析。浓缩后再用蓝色葡聚糖亲和柱作进一步纯化。亲和柱(1.0 × 10cm)先用 1mol/L KCl 处理,蒸馏水冲洗,再用 PB

平衡。样品缓慢上柱后, PB 洗柱至 A_{280} 低于 0.02, 以含有 0.6mol/L NaCl 的 PB 洗脱, 流速为 1ml/min, 自动收集仪收集, 每管 2ml, 收集活性组分, 在含 50% 甘油的 PB 中浓缩后, 贮存于 4℃ 冰箱备用。

二、凝集活性的测定

以胰蛋白酶处理的兔红细胞的凝集反应鉴定各凝集素活性。

兔红细胞悬浮液的制备参照 Lis 和 Sharon 的方法^[7]。在有 96 个 V 型皿的有机玻璃板上进行实验。每个试验皿中加 30 μ l 凝集素样品, 以二倍系列法进行稀释; 对照组以 30 μ l PBS 代替被测样品; 再加入以 PBS 配制的 1% 红细胞悬浮液。室温下放置 90min 后, 以肉眼观察判断反应情况。若红细胞凝集成一团或数团即为阳性反应; 若同对照组一样, 呈分散状或很快沉到 V 型皿底部则为阴性反应。

凝集素专一性实验: 用胰酶处理鸡胚肝、肾和脑组织块, 分别制成以 PBS 配制的 1% 分散细胞悬浮液。把从这三种组织中分离出的凝集素分别配制成 0.05mg/ml 的样品, 然后用三种凝集素分别对三种细胞进行凝集实验。每种细胞悬液分别加入三个实验皿, 每皿 30 μ l, 把三种凝集素分别加入三个皿中, 每皿 30 μ l, 在室温放置 90min。在光学显微镜下观察, 比较各皿凝集块大小。我们根据凝集块的大小, 把凝集反应分为强阳性、阳性和弱阳性三类。

三、放射自显影和扫描电镜观察

纯化的鸡胚肝凝集素用 125 I 标记^[6]。将浓度为 0.05mg/ml 的 125 I-凝集素和用 PBS 配制的 1% 细胞悬乳液一起保温, 37℃, 15min。对照组细胞与实验组处理相同, 但另加 0.5mmol/L 乳糖。保温后的细胞在含有 1% 丹宁酸和 2.5% 戊二醛的 0.1mol/L BP(pH7.5) 中固定 30min, 重蒸水洗三次; 再在含 2% 钨酸的 PB 中固定 30min, 重蒸水洗三次后把标记的细胞浸在含有 1% 丹宁酸的重蒸水中 30min; 再转移到含 1% 钨酸的重蒸水中 30min。上述操作均在 4℃ 下进行。样品用重蒸水洗后, 先用酒精逐级脱水, 再用 3-甲基丁基乙酸脱

水。把悬浮的细胞铺到用 0.1% 多聚赖氨酸处理过的载玻片上。干燥后喷碳。核子乳胶(购自 501 所)稀释 5 倍, 环套法把乳胶薄膜铺在样品上, 放在暗盒中, 放射自显影曝光 2 至 5 周(4℃)。用 D_{19} 显影液, 20℃, 显影 4min。在 2% 的醋酸中漂洗 30s, 用 25% 硫代硫酸钠定影 3min, 重蒸水洗后, 自然干燥。喷金后用 JSM-7200 型扫描电镜进行观察, 工作电压为 20kV。比较不同细胞表面显影银颗粒分布情况, 并统计显影银颗粒的数量。

结果与讨论

用纯化后的凝集素对不同组织的细胞作凝集实验, 结果见表 1。这个结果表明凝集素对来自相同组织的细胞的凝集活力明显高于对来

表 1 鸡胚乳糖凝集素的专一性
Table 1 The specificity of the chicken embryo lactose lectin

凝集素 Lectin 细胞 Cell	肝 Liver	肾 Kidney	脑 Brain
肝 Liver	+++	++	+
肾 Kidney	++	+++	+
脑 Brain	+	++	+++

自不同组织细胞的凝集力。而凝集素对不同类细胞亲和力的差异表明不同类细胞的表面性质不同; 这种性质的差异表现出对不同凝集素的识别和结合能力不同; 而结合力的大小与细胞表面结合凝集素受体位点的多少有关。我们用 SEM-ARG 技术对这一设想作了进一步的验证。

用 125 I 标记鸡胚肝凝集素, 标记率为 30%, 比强为 8.6 μ ci/ μ g。以 125 I-凝集素为探针亲和标记兔红细胞, 鸡胚肝细胞和鸡胚肾细胞。我们发现标记后的细胞多聚为一团, 这表明用 125 I 标记的鸡胚肝凝集素并未丧失其凝集活力。对标记的细胞用 SEM-ARG 法进行观察,

表 2 细胞表面显影银颗粒的平均数量

Table 2 The average number of developed silver grains on the cell surface

组别 Group	细胞 Cell	兔红细胞 Rabbit red cell	鸡胚肝细胞 Chicken embryo liver cell	鸡胚肾细胞 Chicken embryo kidney cell
对照 Control		1.5±0.2	1.2±0.3	1.3±0.3
实验 Experiment		60±12	120±13	75±10

可直接看到显影银颗粒均匀分布在细胞的表面;而对照组,即样品中加有 0.5mmol/L 乳糖的细胞表面几乎没有显影银颗粒(图 1, 见封二)。我们对细胞表面的显影银颗粒进行数理统计,结果见表 2。表中显影银颗粒的个数是统计 20 个以上细胞的平均值。实验中,我们发现细胞表面显影银颗粒的数量随曝光时间的延长而增加,我们采用 5 周的曝光时间。

显影银颗粒在 SEM 图象中呈球形或线状,表示出细胞表面鸡胚肝凝集素结合的受体的位点;这些位点的数量在不同细胞表面是不同的,在鸡胚肝细胞表面上的受体位点明显多于其他细胞。这可能正是鸡胚肝凝集素对鸡胚肝细胞的凝集活力高于对其他细胞凝集活力的原因。因此可以认为一种细胞,相对来说,对其自身的

凝集素,其表面有较多、较易识别的受体存在;表现为有较高的亲和力。

以上两种实验方法所得的结果是一致的,所以可以得出结论:(1) 鸡胚肝凝集素对不同细胞的凝集作用是相对专一的;对其自身细胞的凝集力表现最强。(2) SEM-ARG 技术可提供细胞表面凝集素受体位点的直接证据,它是研究细胞膜结构与功能的有用的新技术。凝集素的专一性问题实际与细胞间的相互识别是密切相关的,人们已经知道细胞识别是存在于细胞表面大量糖蛋白的功能之一^[1],但还远未弄清楚它是怎样发挥其作用的,因此若对这方面的问题进行深入的研究,还有大量的工作要做。

感谢本所高平同志协助电镜观察和摄影。

参 考 文 献

- 1 Stockert J R, Morell GA *et al.* *Science*, 1974; **186**:365
- 2 Sharon N. *Scientific American*, 1977; **236**: 108
- 3 Suzuk H, Mizuhira V. *Acta Histochem Cytochem*, 1982; **15**: 624
- 4 史源仙,梁荣梯. *动物学报*, 1983; **29**: 7
- 5 Lis H, Sharon N. *Meth in Enzymol*, 1972; **28**: 360
- 6 Bolton A E, Hunter WM. *Biochem J*, 1973; **133**: 529
- 7 张惟杰. *生物化学杂志*, 1985; **1**: 1

[本文于 1989 年 11 月 11 日收到]

THE STUDY OF SPECIFICITY OF CHICKEN EMBRYO LIVER LACTOSE LECTIN: AN APPLICATION OF SEM ARG TECHNIQUE

Chen Qingxuan Shi Yingxian

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing)

ABSTRACT

The lactose lectins we used in this experiment were extracted from chicken embryo tissues using lactose and urea method. They were further purified with DE-52 cellulose ion exchange chromatography and Dextran Blue-Sepharose 4B affinity chromatography. The purified embryo liver lectin was labeled with ¹²⁵I and its specific radioactivity was 8.6 μ ci/ μ g. We have utilized the autoradiography combined with scanning electro microscope (SEM-ARG) to observe the lectin receptors on liver cells, kidney cells and rabbit red cells. The developed silver gra-

(Continued on page 475)

表3 六价铬回收率

试样含量 ($\mu\text{g/ml}$)	加标量 ($\mu\text{g/ml}$)	总量 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.0	0.20	0.21	105	109
		0.21	105	
		0.23	116	

表4 总铬回收率

试样含量 ($\mu\text{g/ml}$)	加标量 ($\mu\text{g/ml}$)	总量 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.671	0.20	0.901	115	104
		0.901	115	
		0.835	82	

表5 样品测定结果 ($\mu\text{g/ml}$)

样品数	价态	含量范围	$\bar{X}$	S.D.	占总铬量百分数 (%)
37	Cr(VI)	0.105—0.504	0.221	0.08	36.2
	总铬	0.340—1.08	0.611	0.18	100
	Cr(III)	0.109—0.905	0.390	0.19	63.8
57	Cr(VI)		0.0		
	总铬	0.175—0.998	0.519	0.18	100
	Cr(III)		0.519	0.18	
94	总铬	0.175—0.998	0.555	0.19	

3. 在本实验条件下, Cr(III) 与邻二氮菲没有络合, 这点与施清照^[3]的报道是一致的。因 Cr(III) 形成内轨型络合物, 它的水合离子很稳定, 邻二氮菲较难取代 Cr(III) 水合离子中的水分子, 若加入 Cr(VI) (以 CrO_4^{2-} 的形式存在), CrO_4^{2-} 直接在电极表面产生非水合的 Cr(III), 随即与邻二氮菲生成具有催化活性的 Cr(III)-邻二氮菲络合物而产生催化波。为了准确测定总铬, 应将试样中的铬都转化为 Cr(VI) 再进行催化波的测定。

4. 从表 5 中可以看出, 94 例血清样品中, 仅有 37 例含 Cr(VI), 就平均值而言, Cr(VI) 占总铬量的 36.2%, 其中一例最低, 占总铬量的 15%, 一例最高, 占总铬量的 78%。57 例血清样

品中全部不含 Cr(VI), 仅含 Cr(III)。

参 考 文 献

- 1 Tanaka N, Kano T, Ogino H *et al.* *Bull Chem Soc (Japan)*. 1974;47:3064
- 2 李南强, 高小霞. 北京大学学报(自然科学版), 1980;(1): 49
- 3 施清照, 吕荣山, 郑自强. 化学学报, 1985;43: 226
- 4 郑克勤, 刘树敏. 分析化学, 1987;15(4): 340
- 5 徐先宏, 李润平, 王桂梅. 中南矿冶学院学报, 1983;(3): 63
- 6 Meret S, Henkin RJ. *Clin Chem*. 1971;17:369
- 7 Wolt W.R, Taylor ML, Hughes BM *et al.* *Anal Chem*. 1972;44:616
- 8 Kasperek K, Schicha H, Siller V *et al.* *Strahlentherapie* 1973;143:468

[本文于 1989 年 11 月 1 日收到]

(Continued from page 459)

ins could be seen clearly on these cell surfaces. The silver grains represent the lectin receptor sites on cell surfaces. We found that the grains on liver cells were more than those on cells from other tissues. This result is consistent with the result which has been performed by the experiment of the specificity of chicken lactose lectin. Therefore, it is suggested that the chicken embryo liver lectin has certain specificity.

Key words lectin, affinity labeling, autoradiography, scanning electron microscope

陈清轩等：“鸡胚肝乳糖凝集素专一性的研究——SEM-ARG 技术的应用”一文的附图 1

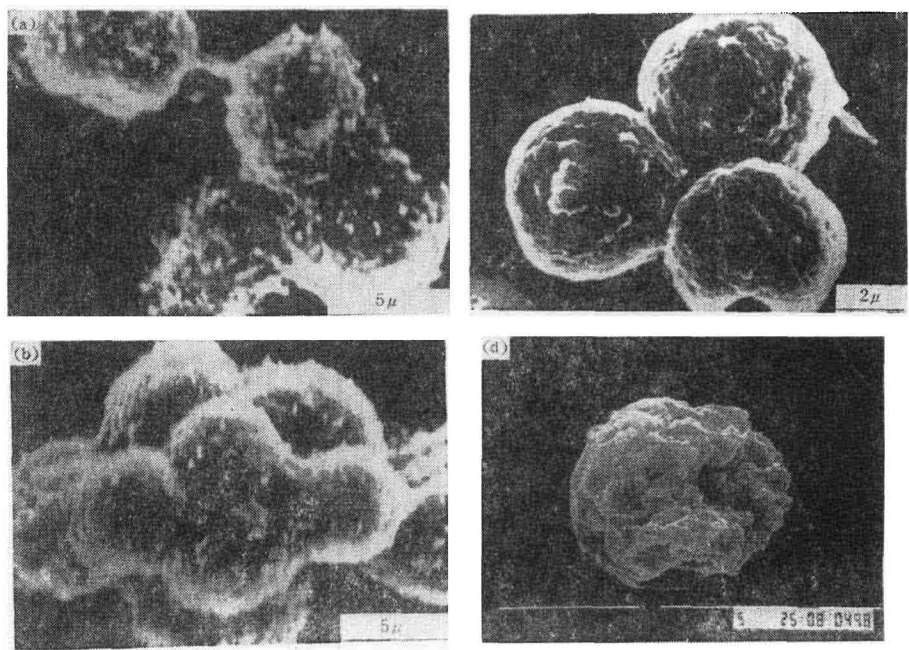


图 1 鸡胚肝凝集素受体的放射自显影扫描电镜观察

Fig 1 The observation of chicken embryo liver lectin receptors using SEM-ARG.

- (a) 凝集素受体在鸡胚肝细胞表面的分布,曝光 5 周;
- (b) 对照组,鸡胚肝细胞,曝光 5 周;
- (c) 凝集素受体在鸡胚肾细胞表面的分布,曝光 5 周;
- (d) 对照组,鸡胚肾细胞,曝光 5 周
- (a) Lectin receptors on the surface of chicken embryo liver cells. Exposure time, 5 weeks;
- (b) Control group, chicken embryo liver cells. Exposure time, 5 weeks;
- (c) Lectin receptors on the surface of chicken embryo kidney cells. Exposure time, 5 weeks;
- (d) Control group, chicken embryo kidney cells, Exposure time, 5 weeks