

几种动物细胞内钙调素的免疫电镜定位

刘杰文 黄慧 刘为民 赵轶轩 褚雁 徐友涵*

张遂坡* 吴隽平* 张金红* 卢坤平** 赵开皓**

(中国医学科学院血液学研究所 天津, 300020)

钙调素在 Ca^{++} 介导的细胞活动中起着重要的调节作用^[1,2]。研究钙调素在细胞内的定位可以帮助人们认识这种蛋白在细胞内哪些部位发挥功能。Anderson B.等及 Means A. R.等采用荧光抗体发现钙调素弥散地分布于细胞浆内^[3,4]。后来人们又发现在细胞分裂期的纺锤体上有大量的钙调素存在^[5,6,7]。在一些特殊细胞内如精子^[6]及神经细胞的突触中^[9,10]也有钙调素的分布。以上研究所采用的方法大都是免疫荧光法和免疫酶标记法,在显示钙调素蛋白分布部位的同时掩盖了分布区域的亚细胞结构,而在所参阅的文献中采用胶体金技术研究其分布者也把重点放在细胞的某个特殊部位^[5-10]。李家旭采用胶体金技术首次在植物细胞上标记出钙调素的分布^[11],并对其进行整体的观察和描述。本文拟在上述研究基础上利用几种动物细胞,对钙调素在细胞内的分布进行进一步的分析与探讨。

材料与 方法

一、材料

DEAE-Cellulose A-52(Sigma 公司),3520 胶(南开大学化工厂), SDS(上海生化试剂, SERVA 公司进口分装), 葡萄球菌A 蛋白(SPA, Sigma 公司), 葡萄球菌A 蛋白胶体金(自制)。

二、方法

1. 钙调素蛋白(CaM)的提取与纯化(南开大学): 牛脑组织经 B-Sonifier 匀浆器匀浆、加热后进行超速离心、硫酸铵沉淀、透析、DEAE 离子交换柱磷酸缓冲液梯度洗脱及 3520 胶柱层析,分离出被证明有 CaM 活性的蛋白。

2. CaM 抗体的制备。用上述纯化的天然 CaM 免

疫家兔得 CaM 抗血清。

3. CaM 抗体特异性的证明(Western Blotting)^[13]: 纯化 CaM、30%CaM 粗提液以及标准分子量经过 SDS-聚丙烯酰胺电泳,确定各自相对位置。将 CaM 粗提带转移至硝酸纤维膜上,然后用天然 CaM 抗体(一抗)和葡萄球菌A 蛋白-胶体金(二抗)温育,硝酸银法显色^[14]。

4. CaM 在细胞内的免疫胶体金标记:

① 胎儿扁桃体、胎儿胸腺组织、人皮肤 淋巴瘤小鼠肝癌以及兔成纤维细胞经 0.5%戊二醛和 4%多聚甲醛混合液($\text{F}_4\text{G}_{0.5}$)固定后,钨酸再固定,丙酮脱水, Epon 812 常规包埋, LKB 超薄切片机切片捞在沾过 1%白明胶溶液的不载膜的不锈钢网上。

② 载有超薄切片的不锈钢网经 1%M-过碘酸钠处理 40 分钟,磷酸缓冲液(0.1 M)漂洗,1%脱脂奶粉阻断 30 分钟(或 5%BSA)、CaM 抗体(1:20)室温下温育 2 小时,然后再以 0.05 MTris(含 1%BSA)缓冲液漂洗,葡萄球菌A 蛋白-胶体金 1:20 室温下温育 1 小时,0.02 MTris 漂洗、蒸馏水漂洗。最后经 2.5%戊二醛固定 30 分钟,蒸馏水冲洗,醋酸铀、枸橼酸铅染色,在 H-600 电镜下观察。免疫前血清取代一抗作对照。

5. CaM 胶体金的半定量分析

随机取用 20 张淋巴细胞 CaM 标记的电镜底片,在放大机上放大,分别计数胞浆、胞核中胶体金颗粒,常染色质、异染色质上胶体金颗粒;再分别量出各个部位的面积,计算出各自每平方微米的胶体金颗粒数,最后进行统计学分析。

结 果

1. SDS 聚丙烯酰胺电泳显示提纯物在 17800 分子量附近(见插页一下方图 1,1,2 带)。

* 南开大学分子生物学研究所。

** 徐州医学院生化教研室。

2. Western Blotting 试验表明,在 30%粗提蛋白液 SDS 电泳的多个区带中, CaM 的抗体只与 CaM 单一区带发生结合反应,因而具有针对 CaM 的免疫特异性(图 1)。

3. 在扁桃体、胸腺淋巴细胞、皮肤淋巴瘤细胞、小鼠肝癌细胞以及家兔成纤维细胞中, CaM 的定位分布特点是:主要分布在细胞核,尤其在核仁及异染色质上。胞浆中的粗面内质网膜上,聚核糖体及线粒体内也有 CaM 分布。质膜及核膜上也常见较多的金标记。核仁和异染色质上的金颗粒密度明显高于常染色质,而胞核区域的金颗粒密度又明显高于胞浆。我们以淋巴细胞为例,进行了胶体金的半定量分析,经统计学处理,结果见表。免疫前血清或过量 CaM 吸附后的抗血清取代一抗作对照的细胞上未见有任何金标记(图版图 1、2、3)。

表 胎儿胸腺淋巴细胞内钙调素胶体金标记比较

	金颗粒数/ μm^2 ($\bar{X} \pm \text{SE}$)	t	p
胞浆	4.74 \pm 0.51	4.756	<0.01
核	9.19 \pm 0.91		
异染色质	15.17 \pm 1.50	6.396	<0.01
常染色质	4.84 \pm 0.60		

淋巴细胞内不同部位钙调素金标记密度比较 (n=20)

讨 论

1. 电泳系统未经任何 Ca^{++} 或 EDTA 处理,纯化天然 CaM 在电泳中出现 3—4 条距离相等的条带(图 1,带 2),且以分子量较小者为主,用此样品免疫家兔所得的抗血清与粗提蛋白中的钙调素区带的分子量最小条带有很好的亲和力,说明纯化 CaM 所产生的抗体仅与不结合钙状态的钙调素反应。

2. Michael R. Kmettel 等观察到 c-AMP 依赖性蛋白激酶在细胞核内的分布以异染色质为主^[12],与我们观察到的 CaM 分布规律基本

一致。这可能反映了 CaM 通过激活组蛋白和非组蛋白激酶而执行影响 DNA 的合成、修复、转录及表达的功能,进而达到调节细胞生长、增殖及分化的目的。

粗面内质网和聚核糖体的蛋白合成过程中需要蛋白激酶参与。CaM 在粗面内质网及聚核糖体上的分布也正反映了 CaM 调节依赖 Ca^{++} 的蛋白激酶的活性,从而调节细胞内的蛋白合成。

CaM 在胞膜上的分布可能与其影响 Ca^{++} -ATPase 的活性有关。 Ca^{++} -ATPase 影响细胞主动运输 Ca^{++} 过膜的活动,在细胞从兴奋刺激状态恢复为静止状态时, CaM 调节 Ca^{++} -ATPase 将 Ca^{++} 反馈地泵出细胞或泵入细胞器钙库中,进而调节细胞的某些重要代谢活动。

摘 要

本实验利用钙调素特异性抗体,采用胶体金技术对这种蛋白分子在几种动物细胞内进行标记定位及电镜观察,为其细胞内分布规律提出了直观的超微形态依据。

参 考 文 献

- [1] Anthony R. Means & John R. Dedman, 1980, *Nature*, 285: 73—77.
- [2] Wai Yiu Cheung, 1980, *Science*, 207: 19—27.
- [3] Andersen B. et al., 1978, *Cytobiology*, 17: 354—364.
- [4] Means A. R. et al., 1982, *Physiol Review*, 62: 1.
- [5] Lin C. T. et al., 1979, *J. Cell Biol.*, 83: 378 a.
- [6] Welsh MJ. et al., 1978, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 75: 1867.
- [7] Welsh MJ. et al., 1979, *J Cell Biol.*, 81: 624.
- [8] Jones HP. et al., 1980, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 77: 2772.
- [9] De Lorenzo RJ. et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76: 1838.
- [10] Grab DJ. et al., 1979, *J Biol Chem.*, 254: 8690.
- [11] 李家旭等, 1989, 植物生理学通讯, (6): 44—45.