

改进的薄层组织电泳技术对发育过程中 鸡胚腰段脊髓蛋白质变化的分析

殷勤伟 薛社普

(中国医学科学院基础医学研究所)

引言

近年来, Bonte^[1]和 Saravis^[2]等相继报道了用聚丙烯酰胺和琼脂糖为支持物的组织等电聚焦电泳方法, 随后此方法被应用于生物学和医学科研, 试用于临床活检和尸检标本的蛋白质和同工酶的分析^[1-5]。此方法的优点是组织切片可同时进行电泳分析和形态定位观察, 简便、快速、高效。然而分辨率和灵敏度尚嫌不高, 因而大大影响了它的推广。

胚胎脊髓发育过程中, 不同区域的蛋白质变化虽有组织化学方面的报道, 但结合电泳进行定位分析至今仍是国内外尚未涉及的一个空白。本文结合这一研究课题, 用改进的方法对发育过程中鸡胚腰段脊髓不同区域的蛋白质的变化进行了初探, 为研究脊髓在发育中的蛋白质变化规律提供资料。

材料与 方法

1. 材料: 载体两性电介质(Ampholyte)pH 3.5-10(LKB 公司和中科院上海生化所产品), 丙烯酰胺和 N, N'-甲叉双丙烯酰胺(Fluka 公司产品), 二硫苏糖醇(DTT), Triton X-100 (Merck 公司产品), 考马斯亮蓝 G-250(Fluka 公司产品)。

2. 实验动物: 白色莱亨鸡种蛋购于北京生物制品研究所。鸡胚分期根据 Hamburger 和 Hamilton 分期标准。孵化条件: 温度 38℃, 湿度 65%左右, 每天翻蛋两次。

昆明种小鼠购于本院实验动物中心, 体重 20 克以上。

3. 方法:

(1) 灌流和取材: 为了减少或消除组织中血液成分的干扰, 采用升主动脉搏管灌流方法, 灌流液为 0.9% 氯化钠-磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4)。灌流后快速取出腰段脊髓或所需的各种组织, 置液氮中

骤冷, 亦可直接置于 -20℃ 的恒冷切片机箱中备用。

(2) 样品的制备: 冷冻的组织在恒冷切片机箱中平衡 30 分钟后, 修整为 4×8 mm² 大小, 在 -17℃ 条件下切成厚度为 5-40 μm 的切片, 吸附于擦镜纸上, 置于培养皿中, 于 -25℃ 冰箱中保存供电泳分析之用。

(3) 凝胶板制备: a. 模具准备, 经硅化的玻璃板用洗净剂、双蒸水和丙酮相继洗擦后, 在两板之间对应两边各置一根 0.4 mm 厚的硬塑料条, 用夹子夹紧, 移至底架上封底, 留下朝上的一边, 以待灌胶。b. 胶液配制, 用于电泳的聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 5%, 交联度为 4%。具体配方为: 28.8% (W/V) 丙烯酰胺和 1.2% (W/V) 甲叉双丙烯酰胺的混合液 2 ml, 60% (V/V) 甘油 2 ml, 8 mol/L 尿素^[6], 0.5% Triton X-100^[4], 40% 两性载体电解质 (pH 3.5-10.5) 0.6 ml, 四甲基乙二胺 10 μl, 加双蒸水至 12 ml, 经孔径为 0.45 μl 的微孔滤膜过滤后置于冰箱中 5 分钟, 加 40% (W/V) 过硫酸铵 10 μl。c. 灌胶: 用吸管吸取配好的胶液, 通过模具的上边缝口缓慢地直接灌入于玻璃板之间, 注意及时除去气泡, 聚胶 45 分钟后, 置于 4℃ 冰箱中过夜, 以提高其机械强度。

(4) 电泳: a. 取胶: 以一薄刀片插入模具, 轻轻将两块玻璃板分开, 凝胶可随机地附着在任一玻璃板上。b. 电极安置: 用四层新华滤纸裁剪成二条 1.5 cm 宽的电极条, 其长度视具体胶板长度而定。将它们平行地放置在凝胶的两端, 小心地分别加上阳极液和阴极液, 以湿而不溢为好, 然后在电极条上分别加压上白金丝电极, 阳极液为 1 mol/L H₃PO₄, 阴极液为 1 mol/L NaOH 和 0.135 mol/L Ca(OH)₂ 以适用于广泛范围的 pH 梯度。c. 加样: 将载有组织切片的擦镜纸, 有组织面朝上直接置于胶面上适当的酸、碱端的位置, 再覆盖一层含有 1% DTT 或和 1% Triton X-100 的滤纸, 10 分钟后接通电源, 在 6 mA 恒流中电泳 30 分钟, 去除载有残余样品的擦镜纸。d. 电泳: 在 4℃ (冰箱中) 条件下, 4 W 恒功, 电泳到 1500 V 时转为恒压, 电泳 2 小时后去除电极条, 将胶板置于固定液中。

(5) 等电点值的测定: 电泳后, 立即从凝胶板的边缘上切取一条宽约 1 cm 的空白胶片, 由正极向负极

将胶片分成 1 cm 长的等份。分别浸泡在 2 ml 去气的蒸馏水中 2 小时,测定浸泡液的 pH 值,然后作出此值与分段距离间的曲线图。根据此曲线可求得胶板中蛋白质区带的等电点值。

(6) 检测蛋白质:按下列步骤进行^[7]: (1) 20%三氯乙酸固定 30 分, (2) 30%乙醇 + 10%醋酸透明 1 小时, (3) 30%甲醇 + 10%乙酸漂洗 30 分; (4) 45%甲醇 + 10%乙酸 + 0.1%考马斯亮蓝 G 250 + 0.5%硫酸铜染色 30 分, (5) 35%甲醇 + 10%乙醇 + 0.5%硫酸铜脱色, (6) 20%乙醇洗三次, (7) 0.2%硝酸银浸泡 40 分, (8) 双蒸水冲洗 10 秒, (9) 15%碳酸钠 + 0.25%甲醛 10 秒, (10) 30%硫酸钠 + 0.5%甲醛显色 15 分; (11) 双蒸水冲洗 5 分, (12) 2%乙酸定影, (13) 保存在双蒸水中。

(7) 检测糖蛋白:按下列步骤进行^[8]: 1) 20%异丙醇 + 10%醋酸固定过夜, 2) 5%醋酸漂洗, 3) 0.2%高碘酸 4℃下浸泡 1 小时, 4) 双蒸水漂洗数次, 5) 以后操作同检测蛋白质(7)以后的步骤。

结 果

一、薄层组织电泳的灵敏度

图 1 示鸡胚等 6 天、12 天、18 天和生后 5 天的腰段脊髓腹侧切片(厚度 10 μm)蛋白质的组织等电聚焦电泳图。充分展现了此方法的灵敏程度。从图中可见胚 6 天的脊髓切片中分离出 21 条主要蛋白区带, 26 条左右次要蛋白区带。胚 12、18 天以及生后 5 天的切片基本保持类似的电泳图谱。可以从中比较出 4 个不同发育阶段中脊髓蛋白质的变化。图 2 显示了用此方法比较不同组织之间的蛋白结构上的共性及其差异的组织电泳图谱。它可检测出不同发育阶段中同一组织中蛋白质的差异, 还可检出组织间蛋白质的不同, 采用二次显色法不但可显出主要蛋白的区带, 而且亦可显示痕量蛋白的区带, 以至能在同一胶面上同时分析主要蛋白和次要蛋白的变化, 提高了对蛋白质区带全貌的分析能力。

二、组织电泳对不同发育期脊髓横切面上蛋白质差异的分析

表 1 列出了不同发育阶段中变化较为明显的脊髓蛋白质主要区带和次要区带的等电点

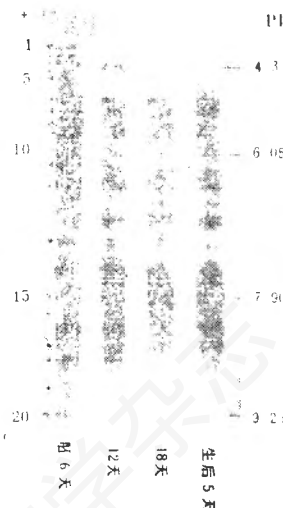


图 1 鸡胚及生后不同发育阶段中的腰段脊髓腹侧部切片(厚度 10 μm 银染)上蛋白质组织等电聚焦电泳图谱



图 2 鸡胚和鸡七种不同组织中蛋白质的组织等电聚焦电泳图谱

(切片厚度 40 μm, 考马斯亮蓝 G 250 染色)

1. 心肌 2. 骨骼肌 3. 脊髓 4. 小肠 5. 肺 6. 肝 7. 肾 A. 胚 B. 鸡

值, 并根据它们在不同发育期的变化情况, 将其归为 4 种类型: (1) I 型系在发育早期存在, 而在发育后期丢失的, 如 1, 4, 5, 6, 7, 19, 20 号蛋白条带。 (2) II 型系在发育早期不存在, 以后随发育而出现的, 如 10, 15, 16, 17 号蛋白条带。 (3) III 型系在 4 个发育期均存在, 但条带有色度深浅的变化, 如 2, 3, 8, 9, 11, 12, 13 和 18 号条带。 (4) IV 型系在 4 个发育期均无明显的变化的蛋白条带, 如图 1 中一些没有小点指示的蛋白条带。

表 1 不同发育阶段中鸡胚腰段脊髓蛋白区带的差异比较

编 号	等电点值 (ph)	离阳极距 (cm)	特 点				类 型
			6 天	12天	18天	生后 5 天	
1	4.10	2.21	次带	次带	丢失	丢失	I
2	4.25	2.50	主带	次带	次带	次带	Ⅲ
3	4.30	2.60	主带	主带	次带	次带	Ⅲ
4	4.45	3.00	次带	次带	丢失	丢失	I
5	4.90	3.55	主带	主带	主带	丢失	I
6	5.10	3.90	次带	次带	丢失	丢失	I
7	5.25	4.00	次带	次带	丢失	丢失	I
8	5.50	4.27	主带	主带	次带	次带	Ⅲ
9	5.75	4.60	主带	主带	次带	次带	Ⅲ
10	6.05	5.10	无带	无带	无带	出现	Ⅱ
11	6.15	5.30	主带	主带	主带	次带	Ⅲ
12	6.70	6.15	主带	主带	次带	主带	Ⅲ
13	6.95	6.60	主带	主带	次带	主带	Ⅲ
14	7.40	7.20	主带	主带	主带	次带	Ⅲ
15	7.90	7.80	无带	无带	无带	出现	Ⅱ
16	8.45	8.50	无带	无带	次带	主带	Ⅱ
17	8.60	8.70	无带	主带	次带	主带	Ⅱ
18	8.75	8.90	主带	主带	次带	主带	Ⅲ
19	8.95	9.10	次带	次带	无带	无带	I
20	9.25	9.50	次带	无带	无带	无带	I

三、组织电泳对脊髓不同纵切面上蛋白质的定位分析

图 3 显示组织电泳时 18 天鸡胚腰段脊髓连续纵切面切片蛋白质的定位电泳图谱。从图中可见腰段脊髓从背向腹序列切片的蛋白质条带的定位分布基本一致，不同切面的差异主要表现在蛋白质区带色度的深浅上，如酸性端腹部蛋白带的色度较深，向背部有逐渐变浅的趋势，反映出背腹区域上某些蛋白质分布的梯度变化，从图中也可发现处于背腹中间区域中的

一些偏中性的蛋白区带的着色度较深，而背腹两端较浅。

图 4 显示了 18 天鸡胚腰段脊髓连续纵切面上糖蛋白的组织电泳定位分布图，从图中可见糖蛋白主要分布于酸性和中性处。碱性端的糖蛋白较少，背部酸性端的糖蛋白区带的色度略低于腹部，其中值得注意的是等电点值为 3.7, 4.2, 4.4, 7, 7.1 和 7.8 的糖蛋白区带。前 5 条区带是脊髓背部缺少的(图中↑)，而 7.8 这条区带则在背腹交界处更为明显(图中↑)。

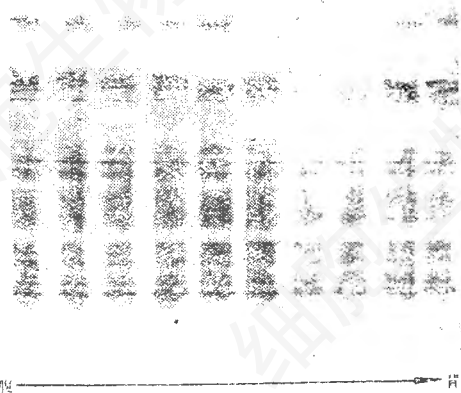


图3 鸡胚18天腰段脊髓的背腹连续纵切面上蛋白质的组织等电聚焦电泳图
(切片厚度40 μm , 考马斯亮蓝G250染色)

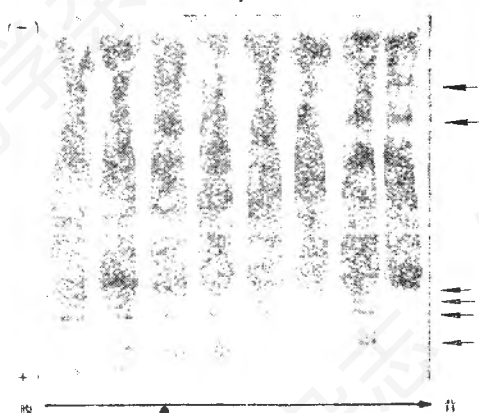


图4 鸡胚18天腰段脊髓背腹连续纵切片上糖蛋白的组织等电聚焦电泳图谱
(切片厚度20 μm , 经Triton X-100处理)

讨 论

我们对组织电泳技术中的凝胶配制、切片处理、电泳条件以及蛋白染色方法的选择使用等方面进行了改进和研究,并用此方法较为系统地比较了鸡胚不同发育阶段中腰段脊髓蛋白质的分布差异和变化。对鸡胚和鸡雏7种组织切片的蛋白质进行了组织电泳分离,论证了改进后的组织电泳的分辨力和灵敏度已达到了分析组织中微量蛋白质变化差异的要求。

一、对不同发育阶段的脊髓蛋白质变化的分析

由于中枢神经系统中的蛋白质多数是和脂

类一起构成复杂的蛋白质-脂类复合物。一般的电泳灵敏度和分辨力较低,只能得到6至15个组分^[9],几乎不能检测出蛋白质区带的变化。从而反映不出与神经元的分化和特定功能相关的特种蛋白以及微量蛋白在质与量上的变化。改进后的组织电泳方法,从10 μm 厚的组织切片中就可得到多达数十种蛋白质条带,可检测出不同发育阶段中出现或消失的蛋白带型,尤其是可溶性蛋白质中的酸、碱性蛋白质的量的改变等,由此反映出神经元的生长、分化以及与生理活动相关的物质代谢变化的动态。为进一步研究发育中神经系统组织发生的形态学变化与其蛋白质分子生物学基础的相关性提供了有效的手段。

二、对脊髓背腹区域中蛋白质差异的定位分析

Rexed 根据脊髓解剖学特点,将其由背至腹地分为10个板层,便于对其各板层的形态学特点与生理功能间的结合研究。但至今国内外尚无对这些不同区域中蛋白质和同工酶组分研究的报道。本实验首次使用组织电泳方法对鸡胚脊髓中由背至腹的连续纵切片上的蛋白质进行了定位分析,揭示了不同形态结构或不同区域分化在分子水平上可出现蛋白质区带的差异,虽说未能明确地指出脊髓由背至腹的各个板层的特征性蛋白质,但却间接地支持了Rexed的脊髓分层学说。

糖蛋白在脊髓背腹组织结构中的分布差异可能与背腹不同区域中神经元的分化和生理上的差异有关。已有大量资料表明糖蛋白是膜的外层和细胞外间质的主要成分,与细胞的功能分化、相互识别、突触吸附、受体活性等等密切相关^[10]。组织电泳可以显示糖蛋白的区域性差异,为研究神经组织的区域性分化提供了有力的手段。

总之,改进后的组织电泳将为形态学和生物化学方法学的结合提供一种新途径,从而为研究不同发育期中不同组织、不同部位的蛋白质和同工酶的变化提供了新的技术。

摘 要

本文介绍一种改进的结合组织化学和生物化学的电泳方法,用此方法对神经组织中微量蛋白质进行定性、定量和定位的分析。结果表明在不同发育阶段中,鸡胚腰段脊髓中绝大多数蛋白区带表现为色度上的深浅变化,少数区带随发育而丢失或新生,脊髓背腹区域的蛋白区带非常相似,而酸性糖蛋白却表现为腹部多于背部。此外,还分析了鸡胚和鸡雏的7种组织中蛋白质区带的差异。

参 考 文 献

- [1] Bonte, W. et al., 1981, *Science Tools*, 28:1.

- [2] Saravis, C. A. et al., 1979, *J. Immunol. Methods*, 29:97.
[3] D' Andrea, A. L. et al., 1985, *Electroresis*, 6:468.
[4] Thompson B. J. et al., 1982, *Electrophoresis*, 3:307.
[5] 陈世雄, 1984, *实验生物学报* 17:161.
[6] Chrembach, A. et al., 1973, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 209:44.
[7] Göng, A. et al., 1985, *Science Tools*, 32:5.
[8] Michial, J. et al., 1983, *Electrophoresis*, 4:97.
[9] 翟森, 1981, *神经生物化学* pp. 54, 科学出版社出版.
[10] Dubray, G. et al., 1982, *Anal. Biochem.*, 119:325.

用放线菌素D法在植物染色体上显示高分辨带*

卫俊智 朱凤媛

(中国农业科学院作物育种栽培研究所)

自从染色体显带技术被引入植物研究中来,先后发展了多种C带、N带和Q带等显带程序,使染色体显带技术在植物的核型分析、亲缘关系鉴定、染色体变异的分析、外源染色体的识别等方面得以应用,推动了植物细胞遗传学的发展。但是,这些显带程序所显示的带纹一般均较简单,远不能与高等脊椎动物中的高分辨G带相媲美,这就大大限制了染色体显带技术在植物细胞遗传学研究和植物育种工作中的进一步应用。

近几年来,国内外许多研究者在植物染色体G显带或高分辨显带的理论^[1,2]和实践上^[3-11]进行了大量有益的探索,并取得了一定的结果。但至今在植物染色体显带中,仍没有得到象高等脊椎动物的G带那样成功的显带方法,有必要对显带方法进行更深入而广泛的探索。近来,AMD(放线菌素D)在动物染色体研究中的应用越来越普遍,本研究改良了AMD

法并用该方法在多种植物染色体上进行了高分辨显带的探索。

材 料 与 方 法

一、材料

本研究中所用的实验材料有一粒小麦(*Triticum monococcum*, $2n=14$)、圆锥小麦(*Triticum turgidum*, $2n=28$)、大麦(*Hordeum vulgare*, $2n=14$)、玉米(*Zea mays*, $2n=20$)、黑麦(*Secale cereale*, $2n=14$)等植物的种子根尖。麦类植物取初生根,玉米取次生根。

二、方法

1. 将0.5—1.5 cm的根尖置于终浓度为5—10 $\mu\text{g/ml}$ 的AMD(Fluka AG公司,瑞士)和0.025%秋水仙素的混合溶液中,25℃下黑暗中进行预处理。

2. 用蒸馏水冲洗根尖,然后将根尖置于35℃预热的Ohnuki's低渗液中(0.055 mol/L KCl, 0.055 mol/L NaNO_3 和0.055 mol/L CH_3COONa ,用时以10:5:2比例混合),25℃黑暗中低渗处理30—60分钟。

* 农业部农02—01—02“七五”重点科研项目,