

摘 要

采用浓集 G_1 相细胞的淘式离心方法分离小鼠乳癌细胞 66, 即从培养第 2 天的 P 细胞中分得 P- G_1 部分, 由培养第 7 天的 Q 细胞中分得 Q- G_1 (G_0/G_1) 部分。

淘式离心后的 P- G_1 和 Q- G_1 细胞, 其体积相应比分离前的 P 和 Q 减小; 通过 FCM 检测, 分离后两亚群中 90% 以上的细胞属 G_1 相; 但连续 H^3 标记结果显示, P- G_1 的标记指数和 P 细胞接近高达 97.1%, Q- G_1 的标记指数比 Q 细胞低仅 1.7%; 放射存活曲线表明, 分离前的 Q 细胞比 P 细胞放射敏感性高, 分离后 P- G_1 的放射反应基本与 P 细胞相同, 而 Q- G_1 的放射敏感性高于 Q 细胞。实验证明, 在具有同样 DNA 含量的 G_1 相细胞, 由于原来

所处的生长状态不同(P- G_1 来自 P 细胞, Q- G_1 来自 Q 细胞), 其细胞体积、增殖能力和放射敏感性均现出其固有的异质特性。

参 考 文 献

- [1] Bauer, K. D. et al., 1981, *J. Cell Physiol.*, 108:99-112.
- [2] Dexter D. L. et al., 1978, *Cancer Res.*, 38:3174-3181.
- [3] Potmesil, M. and Goldfeder, A., 1980, *Cell Tissue Kinet.*, 15:563-570.
- [4] Sweigert, S. E. et al., 1988, *Radiation Res.*, 116:228-244.
- [5] Ridinger, D. N. et al., 1986, *Radiation Res.*, 108:127-138.
- [6] Cheng, W. Y. et al., 1989, *Int. J. Radiat. Biol.*, 56:463-483.
- [7] Wallen, C. A. et al., 1984, *Cell Tissue Kinet.*, 17:65-77.

实验技术

新生大鼠顶盖脑组织提取液的生化分析

—Phast System 电脑快速电泳

周明华 林斯骏 赵丽萍 吴奎印
(香港大学医学院解剖学系)

任麟孙
(香港中文大学医学院解剖学系)

电泳(聚丙烯酰胺凝胶电泳, PAGE 或 SDS-PAGE 及等电聚焦凝胶电泳, IEF)对蛋白质的精确分离性能是其他任何方法都难于得到的, 目前在生命科学中已经成为许多分科研究的有效工具。一般电泳用大块凝胶, 在缓冲槽中垂直向地进行, 或在平面上作等电聚焦凝胶电泳(样品的分离距离超过 10 厘米), 而且样品量用得也多。近年来由于电泳引用电脑等技术, 在许多方面都有相应的改进。如超薄凝胶片由于使用共价键凝胶改进了玻璃板或聚酯膜^[1], 并在凝胶片裱以塑料背衬, 防止在染色或干燥时的变形; 在冷却上由于超薄凝胶片的

小切面可减低热量、缩短热输送、增大了电场强度(field strength), 并缩短了聚焦时间和分离距离(3.8 厘米); 使用微量样品能够在较短的时间里使蛋白质获得良好的分离^[2-4]; 使用缓冲条(琼脂糖加缓冲液)代替了缓冲液和缓冲槽^[5]。所以 Görg 等(1982)认为这是理想的平面电泳设备。本文用 Phast System 分离了顶盖脑组织提取液, 并用其染色槽连续地进行电脑操作染色。

材 料 与 方 法

1. 顶盖提取液的制备^[6] 4 只 Sprague Dawl-

cy 新生大鼠(香港大学实验动物中心提供)在无菌条件下断头处死,取顶盖脑组织,在解剖镜下剥离脑膜,然后用 0.03%胰蛋白酶于 37°C 下消化 30 分钟,继用 MEM 冲洗三次;再加入 1 毫升 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2,用滴管吹打,离心(1500 rpm, 10 分钟);最后用 0.2 微米滤膜过滤上清液,此滤液即顶盖提取液。

2. PhastSystem 电泳仪 此电泳仪(LKB 瑞典)由电脑控制主要程序,电极是镀钛棒,自动控制温度。微量样品一次用 1、2 或 3 微升涂于涂样器上。预制凝胶片(20%自然 PAGE、SDS-PAGE 20%凝胶、10-15%梯度自然 PAGE 和 IEF 3-9, Pharmacia, LKB 瑞典)为 50×43×0.45 毫米。选适宜的缓冲条(由缓冲液和琼脂糖制成的固体条)安放于缓冲条夹持器上,并且能够在 100、200、400、800 和 1600 Vh 电泳之后,在其表面测得它的 pH 和离子量。参照 Olsson 等的参数^[5]编制各个电泳程序(见表 1、2、3 和 4)分别输入 PhastSystem 电泳仪备用。

3. 样品涂敷 取 3 毫升顶盖提取液,滴于帕拉胶薄膜(parafilm),在称量涂样器之后蘸样品,再称量涂样器,借此算出样品总量;也可以用微量注射器直接涂于涂样器上。当输入编制的电泳程序之后,安放在涂样器架上的涂样器开始与凝胶面接触,使样品散布于凝胶,然后涂样器才离开凝胶片,开始电泳。

4. 氨银染色方法 见^[7]。

表 1 进行 20%自然 PAGE 的程序

步骤	程序	电压 (v)	电流 (mA)	电力 (w)	温度 (°C)	Vh ^a
1	预电泳	400	10.0	2.0	15	10
2	涂样期 ^b	400	1.0	2.0	15	2
3	分离	400	10.0	2.0	15	170

a. Vh(电压 X 小时)表示控制每一个程序的时间。

b. 第二个程序涂样器由累积 10 Vh 时间开始与凝胶面接触,到 12 Vh 时脱离接触。

表 2 进行 SDS-PAGE 的程序

步骤	程序	电压 (v)	电流 (mA)	电力 (w)	温度 (°C)	Vh
1	预电泳	250	10	3	15	1
2	涂样期	250	1	3	15	1
3	分离	250	10	3	15	95

表 3 进行 10-15%梯度自然 PAGE 的程序

步骤	程序	电压 (v)	电流 (mA)	电力 (w)	温度 (°C)	Vh
1	预电泳	400	20	5	15	10
2	涂样期	400	2	5	15	2
3	分离	400	20	5	15	268

表 4 进行 IEF 3-9 的程序

步骤	程序	电压 (v)	电流 (mA)	电力 (w)	温度 (°C)	Vh
1	预电泳	2000	2.5	3.5	15	75
2	涂样期	200	2.5	3.5	15	15
3	分离	2000	2.5	3.5	15	410

5. 染色 Phast System 显色染色槽是密闭的,通过共 10 个出口瓣与容器相连接,借空气压力和真空按程序自动地填充和排空液体。染色槽装有温度和液平面的传感器,使温度控制于室温到 50°C,各液体以 8 毫升/分钟的流速循环运行。凝胶片在染色槽内固定于旋转架上,在染色过程中凝胶片的旋转保障了与染液等有比较均匀的接触。作用的时间可以由 0.1 分钟到 99 分钟。Phast System 通过微型电脑处理机能够存储 9 种染色方法,每一种可以包括 20 个步骤。考马斯亮兰染色和脱色的全过程约为 30-50 分钟(表 5),氨银染色的全过程也只需要 50 多分钟。

表 5 自然凝胶电泳后考马斯亮兰染色的电脑程序

步骤	溶液	入口号码	出口号码	时间 (min)	温度 (°C)
1	染色	1	0	7	50
2	脱色	2	0	1	50
3	脱色	3	0	10	50
4	脱色	4	0	15	50
5	保存	5	0	15	50

结果与讨论

以 Phast System 电泳仪、PhastGel 和缓冲条对顶盖提取液分别进行了 20%自然

本研究由香港大学、医学院、裘槎 3600310792 和 UPGC 221400030 等基金资助。

PAGE、SDS-PAGE、10—15%梯度自然PAGE和IEF 3—9电泳,其结果:

(1) 20%自然PAGE电泳参数见表1。电泳后经氨银染色显现约有25条明显的蛋白带(图1),这些蛋白带和标准低分子量蛋白质相比较,分子量在41KD以上有6条蛋白带,在25.5KD至35KD有6条蛋白带,在14.4KD至24.8KD有7条蛋白带。此外,大于94KD有一条蛋白带,小于14.4KD有5条蛋白带。根据周明华和赵丽萍的实验表明,顶盖提取液是有生物活性的,对培养视网膜细胞的生长有促进作用^[6]。

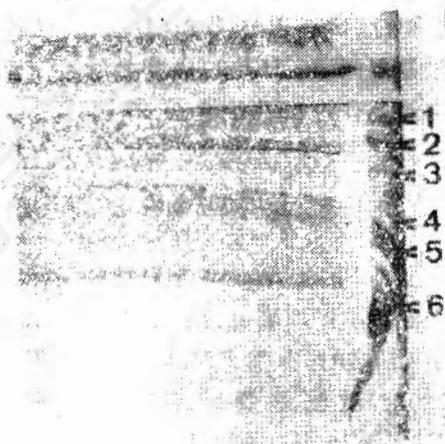


图1 顶盖提取液的20%自然PAGE后氨银染色的图相

标准分子量(KD):94(1)、67(2)、43(3)、30(4)、20(5)和14.4(6)。

(2) SDS-PAGE电泳参数见表2。顶盖提取液经过Centricon-10微浓缩器(7000 rpm, 15分钟),滤除小于10KD蛋白质和Centricon-30微浓缩器(7000 rpm, 20分钟)除去大于30KD蛋白质,剩下的滤液加等量10 mmol/L Tris-10%SDS-1 mmol/L EDTA-10%β巯基乙醇,混匀后进行电泳。经氨银染色显现19条蛋白带(图2),这些蛋白带和标准低分子量蛋白质相比较,分子量在49KD以上有7条蛋白带,25.5KD至30KD有4条蛋白带,16.2KD至24KD有3条蛋白带。此外,尚有大于94KD有2条蛋白带和小于14.4KD有3条蛋

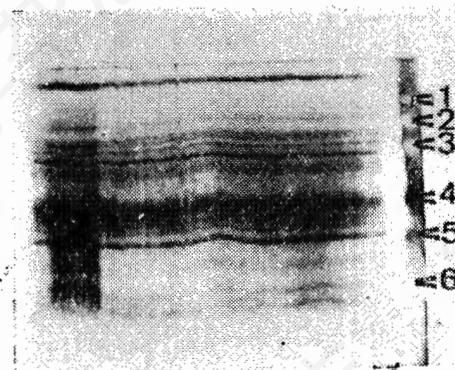


图2 顶盖提取液的SDS-PAGE后氨银染色的图相

标准分子量(KD):94(1)、67(2)、43(3)、30(4)、20(5)和14.4(6)。

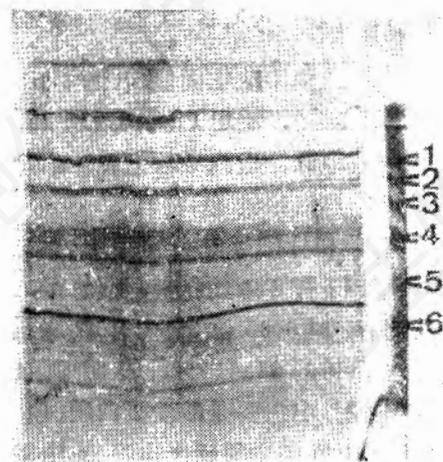


图3 顶盖提取液的10~15%PAGE后氨银染色的图相

标准分子量(KD):94(1)、67(2)、43(3)、30(4)、20(5)和14.4(6)。

白带。

(3) 10-15%梯度自然PAGE电泳参数见表3。顶盖提取液电泳后,经氨银染色显现30条蛋白带,和标准低分子量蛋白质相比较,分子量在39KD以上有5条蛋白带,25.5KD至35KD有5条蛋白带,在14.7KD至24KD有11条蛋白带。尚有大于94KD的有3条和小于14.4KD的有6条蛋白带。从梯度凝胶电泳图相中可以看出,小分子量蛋白质随梯度凝胶浓度的差增,其迁移速度逐渐减缓,这样,

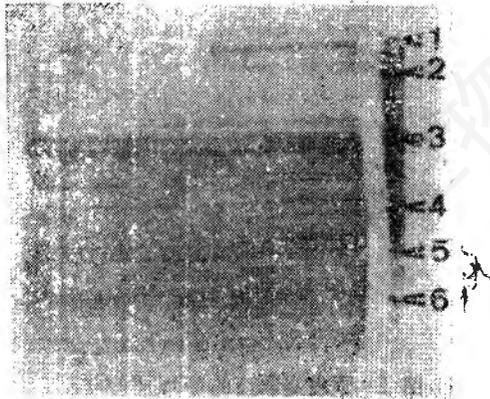


图4 顶盖提取液的IEF 3—9等电聚焦凝胶电泳后, 氨银染色图相

标准等电点(pI): 9.30(1)、8.45(2)、7.35(3)、5.85(4)、5.20(5)和4.55(6)。

有利于蛋白质的集中浓缩而显带(图3)。

(4) IEF 3—9, 使用 PhastGel 快速平面等电聚焦凝胶电泳, 电泳参数见表4。顶盖提取液电泳后, 经氨银染色显现52条等电点(pI)蛋白带, 和标准等电点蛋白质相比较, pI 9.30至7.35有8条蛋白带, 占总蛋白带的15.385%; pI 6.85至3.50有44条蛋白带, 占总蛋白带的84.615%, 表明顶盖提取液的蛋白质成分中主要是酸性蛋白质(图4)。

PhastSystem 的主要操作步骤是由电脑控制的, 用镀膜电极能够直接放在凝胶上, 既稳定又保持良好的接触。同时用平衡-电荷琼脂糖 IEF(带高浓度缓冲物), 既控制了电子内渗也具有高度缓冲性能, 使之产生低热, 从而达到高电场强度和快速分离(30分钟), 电泳后蛋白带也比较挺直, 保证了结果的准确性和可重复性。

PhastSystem 染色槽是密闭的, 能自动控制高达50℃的温度和凝胶片的旋转速度。Olsson 等指出凝胶片的适宜转速和温度的增高, 都会加快脱色, 如温度由20℃增高到40℃时, 脱色时间缩短40%^[5]。考马斯亮兰染色(样品含蛋白量不低于20-30毫微克)^[8]只需30-50分钟, 但一般在室温下进行这种染色

时, 至少需要1天的时间, 甚至长达一周。Olsson 等特别指出, 高温会使酸性银染色的三氯醋酸固定和显色的背景加深, 使碱性银染色已经沉淀的银又被凝胶重吸收, 所以, 这些步骤一定要在室温下进行^[6]。但是蛋白对银染色远比考马斯兰要敏感^[6,9]。

总之, PhastSystem 特别适合检测蛋白质的纯度和亲和层析纯化后的蛋白质特性, 也适合酶解之后的检测。由电脑控制的自动染色, 条件稳定, 排除人为的影响。此外, 应用预制的 PhastGel 也免除丙烯酰胺聚合时对人的直接影响。顶盖提取液经过 Phast System 的自然凝胶电泳、SDS-PAGE 和梯度凝胶电泳所得的结果是相似的。IEF 3—9 电泳的结果表明, 此提取液含有约85%酸性蛋白质, 而且经过电泳分离的蛋白仍保持其生物活性。

摘 要

本文用 Phast System 电脑快速电泳仪, 对新生大鼠顶盖提取液进行了分离和自动染色。结果: (1) 20%自然 PAGE 显现25条蛋白带; (2) 经微浓缩器10、30处理后的 SDS-PAGE 显现19条; (3) 10—15%梯度自然 PAGE 显现30条; (4) IEF 3—9 电泳显现52条, 其中约85%是酸性蛋白质。顶盖提取液中蛋白的分子量主要介于14 KD 和100 KD 之间。此外, 对自动染色作了比较。

参 考 文 献

- [1] Radola, B. J., 1980, *Electrophoresis*, 1, 43-46.
- [2] Allen, R. C., 1980, *Electrophoresis*, 1, 32-37.
- [3] KinzKofer, A. and Radola, B. J., 1981, *Electrophoresis*, 2, 174-183.
- [4] Lääs, T. and Olsson, I., 1981, in: Allen, R. C. and Arnaud, P. (Eds.), *Electrophoresis '81*, p. 191-203, Walter de Gruyter, Berlin.
- [5] Olsson, I. et al., 1983, *Electrophoresis*, 9, 16-22.
- [6] 周明华、赵丽萍, 1990, *解剖学报*, 21(1):

(印刷中)。

[7] 林斯骏等, 1981, 细胞生物学杂志, 2: 33-36。

[8] Pharmacia Laboratory, PhastSystem dev-

elopment technique file No. 200, 1989.

[9] 林斯骏和周明华, 1990, 解剖学报, 21: 291-296。

胶体金免疫电子显微技术用于病毒抗原的检测

陈保平

(湖北医学院医学基础实验中心电镜室)

陈敏诗

(湖北医学院病毒学研究所细胞生物室)

为了特异地显示抗原-抗体复合物在细胞超微结构内的定位, Singer(1959)首先提出了用电子致密物质铁蛋白标记抗体的方法, 并得到了广泛的运用。但由于经铁蛋白标记的抗原——抗体复合物的颗粒直径过大, 以致达不到抗原在超微结构上的准确定位。

自1983年以来, 一种以胶体金作为标记的免疫细胞化学方法得到普遍的应用, 并在应用中发展成为一种新的免疫电子显微镜技术。它的特点是根据需要制备出各种大小不同的金颗粒。亦可用两种大小不同的金颗粒标记两种不同的抗体, 用以在同一标本上显示两种不同的抗原。这种方法曾广泛运用于细胞内某些生物活性物质的定位, 如胰腺腺泡细胞内各种分泌蛋白的定位, 肝细胞线粒体内结构蛋白的定位等。但是很少应用于病毒抗原的检测。此外为了抗原的良好保存及金颗粒易于进入到细胞内部, 在国外一般均采用冰冻超薄切片。在国内目前由于超薄冰冻切片机的数量少, 使此方法的推广应用受到一定的限制。本实验参照有关文献^[1-6], 将超薄冰冻切片改为低温包埋的常规超薄切片, 以II型单纯疱疹病毒(HSV-2)为例, 进行了显示病毒抗原的实验, 现将结果报道如下:

材料与方 法

一、金探针的制备

1. 胶体金的制备

本实验根据鞣酸-柠檬酸钠还原法^[1], 并采用10 nm大小的金颗粒。

A液: 1%HAuCl ₄	1 ml
双蒸水	79 ml
B液: 1%柠檬酸钠	4 ml
1%鞣酸	0.1 ml
0.1 mol/L K ₂ CO ₃	0.025 ml
双蒸水加至 20 ml	

将A、B两液分别加热至60℃, 在搅拌下将B液加入A液之内, 并继续加热至沸腾1分钟, 此时液体颜色由蓝变红, 最后出现紫红色, 表明胶体金颗粒已经形成。使用前将其pH值用0.1 mol/L的K₂CO₃调至6.0。

2. A蛋白-金颗粒复合物(pAg)的制备

实验证明用以稳定1 ml胶体金所需A蛋白量大约为5 μg, 所以将255 μg(溶于0.3 ml的双蒸水中)的A蛋白加入到50 ml的胶体金内, 5分钟后再加5%聚乙二醇(PEG)(Carbowax 20 mol/L)0.5 ml, 以保证金颗粒的最大稳定性。然后以60,000 rpm离心45分钟。将红色疏松之沉淀物用PBS混悬至原体积的1%, 并4℃储存, 备用。

二、病毒样本的制备

以常规组织培养方法(Eagle培养液, 内含小牛血清10%, 青、链霉素各100单位/ml)培养原代兔肾细胞(BRK)。待单层形成时, 接种HSV-2(333)株, 24小时后立即收集细胞, 同时收集未感染细胞作为对照。

三、兔抗HSV-2血清系由湖北医学院病毒所细胞生物室提供, 免疫荧光效价为1:500。

四、电镜标本之制备

将培养细胞的培养液吸去, 用PBS将培养瓶洗刷多次, 然后用橡皮刮子将附壁的细胞轻轻刮下, 连带少量的PBS, 低速(500 rpm)离心15分钟, 弃上清液, 加1%戊二醛于离心管内, 固定1小时。为避免