

α_2M 对 SDS 热引导和巯基乙醇还原不比人 α_2M 敏感, 因而图 3 中的只有一条 130,000 分子量的电泳带(相当于人或猪 α_2M 的 125,000 的电泳带)代表有抑制活性的大鼠 α_2M 。一条较深的 29,000 和另一条较浅的 90,000 分子量的电泳带代表失去抑制活性的蛋白部分。

人 α_2M 制剂的电泳见图 4。从它的纯度来看, 它混有相当量的人丙种球蛋白, 为分子量分别为 53,000 和 22,500 的二条亚带。一条 85,000 分子量的电泳带, 代表了人 α_2M 与蛋白酶结合, 失去了抑制活力的蛋白部分经 SDS 热引导和巯基乙醇还原后的亚基带。一条较浅的 62,000 分子量的电泳带表明制剂中只存在少量有天然抑制活性的 α_2M 。近来文献报道, 失去抑制活性的 α_2M , 在炎症反应中起了反馈调节作用^[5]。该现象是否可为临床用此制剂治疗辐射灼伤病有显著疗效提供依据, 有待今后进一步研究。

SDS 凝胶电泳测定蛋白质分子量对某些特殊蛋白质会产生与实际分子量偏离较大的结果^[6], 如糖蛋白, 由于糖蛋白的糖部分不被 SDS 包被, 因而糖基的含量和性质会影响分子量的测定。 α_2M 是一种大分子的糖蛋白, 它的 185,000 的亚基带相对迁移率 Rf 值偏大, 从回归直线上查得分子量约 170,000, 比实际的小, 因而有的文献把这一电泳带称为 170,000 分子量, 这说明这一亚带含有糖基。

摘 要

甲₂ 巨球蛋白(简称 α_2M)是一种分子量为 725000 的大分子糖蛋白。天然有活性的和失活的 α_2M 经 SDS 热引导和巯基乙醇还原分解的亚基分子量有明显差别。不同来源的 α_2M 亚基分子量也略有差异。本实验用 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳来鉴定纯化的猪 α_2M 、大鼠 α_2M 和人 α_2M 制剂。结果指出猪 α_2M 和人 α_2M 均有 185000、125000 和 62000 三条亚带, 代表有活性的天然 α_2M , 大鼠 α_2M 电泳图谱指出, 130000 分子量亚带代表天然 α_2M , 29000 和 90000 分子量二带为失活部分。人 α_2M 制剂图谱表明除了混有两种球蛋白外, 只有一条 62000 分子量亚带代表少量有活性的 α_2M 。

参 考 文 献

- [1] Lorand, L., 1981, *Method in Enzymology*, 80: 737.
- [2] Harpel, P. C. et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 8669-8678.
- [3] Okubo, H. et al., 1981, *Biochim. Biophys. Acta* 668: 257-267.
- [4] Mahadik, S. P., 1974, *Anal. Biochem.* 76: 615-633.
- [5] Hoffman, M. et al., 1983, *Biochim. Biophys. Acta* 760: 421-423.
- [6] Neurath, H., 1975, *Proteins* 1: 187-191.

血清中甲₂ 巨球蛋白对胰蛋白酶抑制活力测定

范佩芳 沈芝芬*

(上海医科大学 上海放射医学研究所)

甲₂ 巨球蛋白(简称 α_2M)是存在于人和脊椎动物血清中的主要蛋白质之一, 是多种蛋白酶的抑制剂, 并有体内多余蛋白酶的“清道夫”作用。健康人 α_2M 在血清中的含量较稳定, 但当机体出现某些疾病时, 含量就会有变化^[1,2]

因为当机体出现某些炎症时, 细胞会坏死, 大量蛋白酶被释放, 机体就会动员 α_2M 抑制多余的蛋白酶; 另一方面 α_2M 是一种分子量很

* 本工作得到金为翘教授、何介薇副教授的指教, 在此表示衷心感谢。

大的糖蛋白,如患有肾功能综合症以及由此引起的糖尿病等疾病时,由于肾小球受到损坏,一些蛋白质就会从血液中流失, α_2M 则因分子量太大被留在血液中,造成血清中 α_2M 含量的相对提高。因而患有此类疾病的病人也同样会造成血清中 α_2M 含量和抑制活力的变化。所以测定血清中 α_2M 的含量或对蛋白酶的抑制活力,是观察机体是否正常的指标之一。本文就血清中 α_2M 对胰蛋白酶抑制活力的测定作方法方面的介绍。

材料和方法

一、材料

人混合血清(10个正常人血清样品),大鼠混合血清(13只大鼠血清样品)各一份。牛胰蛋白酶(Sigma公司),大豆胰蛋白酶抑制剂(Sigma公司),BAPNA合成底物(Sigma公司),Tris(E. Merck公司)。

二、溶液配制

1. Tris-HCl缓冲液: 0.1 mol/L Tris, 0.07 mol/L CaCl₂缓冲液 pH 7.6, 冰箱 4℃ 保存。

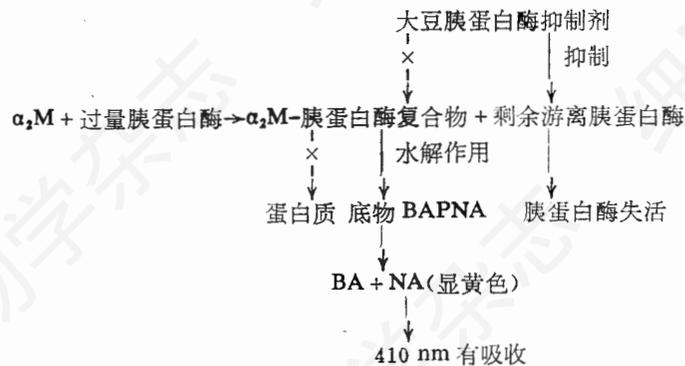
2. 牛胰蛋白酶溶液: 用上述缓冲液配成 20 微克/毫升的牛胰蛋白酶溶液, 分装后低温 -20℃ 保存。

3. 大豆胰蛋白酶抑制剂溶液: 用无离子水配成 0.1 毫克/毫升的抑制剂溶液, 4℃ 冰箱保存。

4. 底物 BAPNA 溶液: 合成底物溶于水, 在 86℃ 加热溶解, 浓度为 1 毫克/毫升, 再自然冷却, 用时现配。

三、方法

方法原理: α_2M 对蛋白酶的抑制原理不同于血清中其它蛋白酶抑制剂, 因为它是一种由许多二硫键把肽链连结成巨大空间构型的大分子蛋白质^[2]。当蛋白酶与它接触时, 就会把蛋白酶包陷进去, 而不破坏蛋白酶的活性中心, 它仍保留对小分子合成底物的水解作用。对于分子量较大的蛋白质和 大豆胰蛋白酶抑制剂, 由于不能与 α_2M -蛋白酶复合物中的蛋白酶接触, 而前者不能被复合物中的蛋白酶水解, 后者也不能对复合物中的蛋白酶起抑制作用^[1,3]。于是人们利用 α_2M 这一特点来测定它的抑制活力。现将方法的原理用图解表示如下:



具体实验步骤: 方法主要参照 Schidlow^[4] 和 Ganrat^[5], 但根据我们的需要作了改进。10 微升血清样品(人或大鼠), 用 Tris 缓冲液稀释到 0.5 毫升, 加牛胰蛋白酶溶液 0.5 毫升(含 10 微克酶)混匀, 置室温 10 分钟, 使 α_2M 包陷胰蛋白酶, 形成复合物, 再加入 0.1 毫升大豆胰蛋白酶抑制剂溶液(含 10 微克抑制剂), 混匀, 再放置 10 分钟, 使多余的胰蛋白酶被抑制掉, 最后加底物 BAPNA 1.5 毫升(含 1.5 毫克底物), 充分混匀后, 37℃ 水浴保温 30 分钟, 促使 α_2M -胰蛋白酶复合物与 BAPNA 作用, 然后放置冰浴, 再加 30% 冰醋酸 0.5 毫升中止反应。总体积 3.1 毫升。测 410 nm 光密度吸收即 O.D 值, 每一被测样品均备

有不加胰蛋白酶的实验对照。抑制活力为实验 O.D 值减去对照 O.D 值

结果和讨论

血清中成分相当复杂, 就蛋白酶抑制剂而言, 除了 α_2M 外, 还有 α_1 蛋白酶抑制剂(简称 α_1PI 或 α_1AT), α_2 抗血纤维蛋白溶酶, α_1 抗糜蛋白酶等多种蛋白酶抑制剂。测定血清中 α_2M 对胰蛋白酶的抑制活力时, 在反应系统中上述抑制剂均对胰蛋白酶起抑制作用, 要耗去相当量的胰酶, 只是被它们抑制的胰蛋白酶不

对小分子合成底物作用而已。为了使 α_2M 与胰酶充分作用,在正式实验之前,设计了胰酶对人和大鼠不同量混合血清中 α_2M 的饱和试验。实验结果见图1(人混合血清),图2(大鼠混合血清)。从图1看出,随胰蛋白酶量增加,在410nm的O.D值开始时逐渐升高。到一定阶段,胰蛋白酶量再增加,O.D值几乎不增加,此时的胰蛋白酶量可以认为已对 α_2M 达到饱和状态。图1中人10微升血清和20微升血清的两条饱和曲线均有这种趋势,只是胰蛋白酶对10微升和20微升的人混合血清中 α_2M 达到饱和所需的量不同而已。同样从图2中大鼠混合血清中的胰蛋白酶对 α_2M 饱和状态也展现了类似的情况。从图1、图2看出,无论人还是大鼠,10微升血清量的胰蛋白酶饱和曲线较20微升的曲线为好,也显示了10微克胰蛋白酶足以饱和10微升人和大鼠混合血清中的 α_2M 。为此我们在正式实验中选用了10微升血清(作为 α_2M 样品量),10微克的胰蛋白酶量。

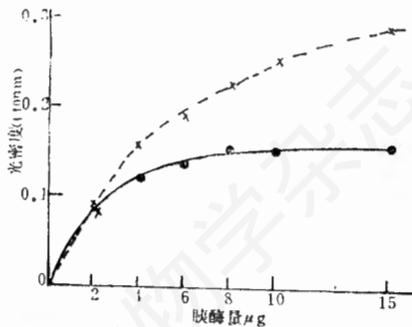


图1 胰蛋白酶对不同量人混合血清中 α_2M 的饱和曲线

——10 μ l 血清 ----20 μ l 血清

为了尽量减少实验批间误差,除胰蛋白酶溶液分小瓶装低温保存,最好装于安瓿内冰冻干燥保存外,在每次进行测定时,均要配有胰蛋白酶活力测定曲线,见图3。从图中看出,随着胰蛋白酶量的增加,开始O.D值的增加与胰蛋白酶的增加成线性关系,以后胰蛋白酶增加,O.D值虽有增加,但不成线性关系。这说

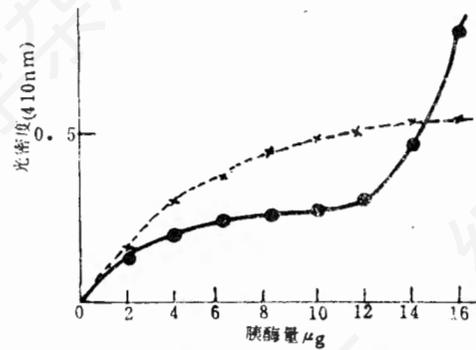


图2 胰蛋白酶对不同量大鼠混合血清中 α_2M 饱和曲线

——10 μ l 血清 ----20 μ l 血清

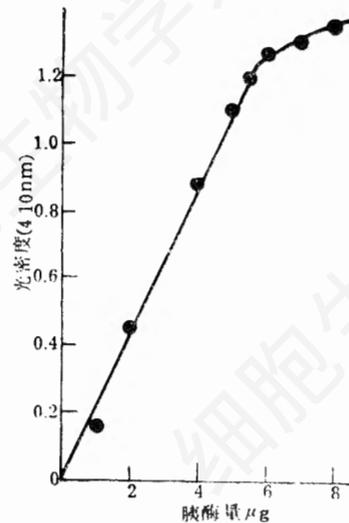


图3 胰蛋白酶活力曲线

明超过一定的O.D值,显示底物量的不足。在正式测定时,测定管的O.D值必须要落在胰蛋白酶活力曲线的线性范围内,同时从活力曲线来定 α_2M 对胰蛋白酶的抑制活力单位。

大豆胰蛋白酶抑制剂,在反应系统中的作用是抑制剩余的游离胰蛋白酶,而它本身不对 α_2M -胰蛋白酶复合物起抑制作用。因此加进去的大豆胰蛋白酶抑制剂的量必须足以能完全抑制游离胰蛋白酶,在正式进行实验前也一定要做不同剂量大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶完全抑制试验。结果见图4。大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶的抑制反应曲线的直线部分延

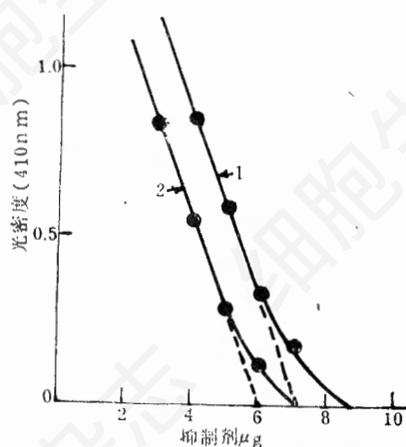


图4 不同剂量的大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶抑制试验

1. 胰蛋白酶量为 12 微克
2. 胰蛋白酶量为 10 微克

长与横座标相交点, 为全抑制胰蛋白酶所需的抑制剂的量。从图中看出 10 微克和 12 微克胰蛋白酶分别被 6 微克和 7 微克左右的大豆胰蛋白酶抑制剂完全抑制。因而在正式实验中用 10 微克大豆胰蛋白酶抑制剂已足以去抑制剩余的游离胰蛋白酶。在每次正式实验时, 除备有胰蛋白酶活力曲线外, 再备一只完全抑制胰蛋白酶的作参考对照(此时胰蛋白酶和抑制剂与正式实验的剂量相同), 以防由于大豆胰蛋白酶抑制剂的不足而造成实验结果的假阳性。

血清中甲₂巨球蛋白对胰蛋白酶抑制活力测定, 每个实验室所用的胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂等药品来源不同, 它们各自的酶活

力和抑制能力也不同, 因而在进行正式实验之前, 进行胰蛋白酶对血清中 α_2M 的饱和试验, 胰蛋白酶活力测定试验和 大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶抑制试验是完全必需的。本实验方法灵敏, 所需的血清量较少, 可用手指采血法取血清, 为实验室和临床检验提供测试方法。

摘 要

甲₂巨球蛋白(简称 α_2M) 是存在于人和动物血清中一种广谱蛋白酶抑制剂。实验利用 α_2M 对蛋白酶的特殊抑制原理: α_2M 通过包陷蛋白酶去抑制蛋白酶对天然蛋白质的水解作用, 但不破坏蛋白酶活化中心, 因而仍保留对小分子合成底物的水解, 释放显色基团, 在分光光度计上比色, 达到测定目的。本实验用人大鼠正常混合血清作样品, 对实验方法和测定系统中选择样品和试剂量作较详细介绍。方法灵敏, 血清量少。为实验室和临床检验提供测试方法。

参 考 文 献

- [1] Lorand, L., 1981, *Method in Enzymology*, 80: 737.
- [2] Allesen, A. C., 1976, *Structure of Function of Plasma Protein 2*: 207-217.
- [3] Harpel, P. C. et al., 1973, *J. Clin. Invest.*, 52: 2175-2184.
- [4] Schidlow, D. A. et al., 1980, *Amer. Rev. Respira. Dis.*, 121: 31-37.
- [5] Ganrot, P. O. et al., 1966, *Clin. Chim. Acta*, 14: 493-501.

超微结构研究中的铀-铅-铜染色方法

汤雪明 朱建国
(上海第二医科大学)

在透射电镜下观察常规染色的超薄切片时, 由于切片一般不超过 0.1 微米, 只能获得细胞结构的二维信息。如果采用特殊的染色方

法, 选择性地对某些细胞结构染色, 在电镜下观察较厚的切片, 就可能通过立体对照相获得细胞三维结构的信息^[1]。铀-铅-铜染色技术就

是其中一种特殊染色方法,能选择性地染色线粒体、内质网和高尔基体^[2]。我们曾用这一方法观察一些细胞中高尔基体的三维结构以及内质网与高尔基体的关系^[3],现就实验方法作一简单介绍。

材 料 和 方 法

实验动物为成年雄性大鼠,用血管灌注方法固定肝、肾、十二指肠和睾丸等组织,然后进行铀-铅-铜染色,具体步骤如下:

1. 用2%戊二醛固定液(pH 7.4)灌注固定大鼠的各种组织,然后取下组织、切成1立方毫米组织块,再在同样固定液中浸泡固定1小时;

2. 用0.1 mol/L二甲砷酸钠缓冲液(pH 7.4)充分漂洗组织块,并置于冰箱(4℃)过夜;

3. 将组织块放入5%醋酸铀水溶液(pH 3.5),在40℃温箱中浸染1小时;

4. 组织块经蒸馏水漂洗后,放入新鲜配制的铅-铜双重枸橼酸盐水溶液,在40℃温箱中浸染1小时;铅-铜双重枸橼酸盐水溶液配方如下:

33%硝酸铅溶液(1 mol/L)	2 毫升
10%硫酸铜溶液	0.5 毫升
4.6%枸橼酸钠溶液	19 毫升
4%氢氧化钠溶液(1 mol/L)	4 毫升

在最后加入4%氢氧化钠溶液时,不断振荡,得到透明的蓝色溶液。

5. 组织块经蒸馏水漂洗后,放入1%锍酸固定液,在4℃下过夜(12小时);

6. 组织块经逐级酒精脱水、环氧丙烷过渡后,用环氧树脂Epon 812包埋;

7. 将包埋块用超薄切片机切成0.25—0.5微米的半薄切片、在75—100 kV透射电镜下观察,或切成0.5—2微米的半薄切片、在200 kV透射电镜下观察、利用旋转样品台使切片相对于水平面倾斜,从+7°和-7°两个角度对同一结构拍摄两张照片,即立体对照相。印成照片后在双目立体镜下观察细胞结构的空间关系,有经验者可直接用肉眼观察。

结 果 和 讨 论

细胞经铀-铅-铜方法染色后,线粒体、内质网和高尔基体都呈不同程度的染色,具有较高的电子密度,而细胞的其它部分一般均不染

色,从而使这些细胞器在细胞内的分布非常突出(图1)。在我们观察的肝、肾、十二指肠和睾丸等组织中,各种细胞的线粒体都染色很深,呈圆形、长圆形、环形等多种形态;内质网的染色程度随不同细胞而异,在精子细胞和Sertoli细胞中,内质网的染色与线粒体一样深,呈网状分布,但在肝细胞和肾曲小管上皮细胞中内质网染色较浅;各种细胞的高尔基体都呈中等程度的染色,从生成面到成熟面各层膜囊都被染色,GERL的染色程度与高尔基体其他膜囊相似。在精子细胞中,高尔基体周围的伴随内质网电子密度高于高尔基体膜囊,两者关系相当清楚(图2)。

利用铀-铅-铜方法能选择性地染色线粒体、内质网和高尔基体的特点,可以开展两个方面的超微结构观察。首先,利用旋转样品台在透射电镜下拍摄立体对照片,在双目立体镜下观察细胞器的三维结构和空间分布。我们曾用这一方法观察精子细胞中高尔基体和内质网的三维结构以及这两种细胞器之间的空间关系;其次,可在透射电镜下直接观察半薄切片中线粒体、内质网和高尔基体的结构和分布,还可通过图象分析仪对这些细胞器进行形态定量分析。

铀-铅-铜染色的结果与很多因素有关,如戊二醛固定液的浓度和pH、醋酸铀染色液的浓度和pH以及铅-铜双重枸橼酸盐溶液的浓度等,其中醋酸铀溶液的pH影响较大。Thiery等人的实验表明,组织先用5%醋酸铀(pH 3.5)染色,然后用铅-铜双重枸橼酸盐染色,最后用锍酸后固定,结果对线粒体、内质网和高尔基体的染色最理想。如果用低于或高于pH 3.5的醋酸铀染色,结果会使细胞膜染色加深而上述细胞器的染色减弱。关于铀-铅-铜染色的详细机制还不很清楚,一般认为,染色液中的铀(阳离子)与细胞器中大分子的阴离子基团以静电结合可能是特殊染色的基础,而铅和铜则进一步结合在铀染色的部位,形成铀-铅-铜复合物,提高了结构的反差,最后锍酸后

固定再使铍加入到铀-铅-铜复合物上,也进一步增强了电子染色作用。

摘 要

本文介绍了超微结构研究中的铀-铅-铜技术。铀-铅-铜方法能选择性地染色细胞内的线粒体、内质网和高尔基体,细胞的其他部分一般不染色,从而使这些细胞器在细胞内的分布非常突出。利用这一特点,可在透射电镜下观

察半薄切片,研究线粒体、内质网和高尔基体的三维结构以及细胞器之间的相互关系。

参 考 文 献

- [1] Rambourg, A. et al., 1974, *Am. J. Anat.*, 140: 27-46.
- [2] Thiery, G. et al., 1976, *J. Microscopie Biol. Cell* 26: 103-106.
- [3] 汤雪明等, 1984, 电子显微学报, 3 (3): 151 (摘要)。

植物材料光学和电镜蛋白 A-金胶体结合体标记技术

徐 是 雄

(香港大学植物系)

这里介绍一种可在光学显微镜薄切片和电子显微镜超薄切片上标记的技术^[1,2]。我们初步应用这一技术来做燕麦球蛋白的定位,结果是成功的(图版图1, 2)。现将操作方法简述如下:

一、样品制备

1. 把切成2—3微米³的新鲜材料,用磷酸缓冲液(pH 7.1)配制的3—4%甲醛(加2.5%蔗糖),在室温固定2小时;

2. 用磷酸缓冲液清洗两次,每次30分;

3. 用20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%酒精脱水(每一步15分),在100%时多换一次;

4. 把材料直接放入C. R. White塑料包埋剂(由London Resin Co. Ltd. 供应)内,在室温渗透1小时后再换一次新鲜的塑料溶液,在4℃渗透2天(其间可再换一次)。

5. 包埋时把材料放在胶囊内,置60℃1天。包埋剂硬化后即可制作薄切片和超薄切片。

二、光学显微镜标记技术^[3]

(A) 显影液的配制

1. 保护胶液——把1千克阿拉伯胶溶在2升蒸馏水内,经常把溶液摇动。5天后,用纱布过滤,放4℃备用。

2. 柠檬酸缓冲液——柠檬酸25.5克,柠檬酸钠23.5克,蒸馏水100毫升。

3. 还原剂——氢醌0.55克,蒸馏水15毫升(用

前配制)。

4. 银溶液——醋酸银0.1克,蒸馏水15毫升(避尘,用前配制)。

5. 显影液——将配制好的上述溶液按60、10、15和15毫升的比例混合。

(B) 标记技术

1. 先将塑料薄切片(1—2 μm)沾在环片上;

2. 用卵清蛋白BSA溶液浸泡5分钟(卵清蛋白溶液的配制:用PBS缓冲液配制成0.5%卵清蛋白溶液。PBS缓冲液的配方:在1升水中加入氯化钠8克,氯化钾0.2克,磷酸二氢钾0.2克,磷酸氢二钠1.14克);

3. 倾去溶液(但不要用水清洗)滴上一大滴专一的抗体血清(上覆一盖片),浸泡30分钟(抗体的浓度要根据抗体的效价来决定。我们所用的燕麦球蛋白抗体血清,要稀释25倍);

4. 在PBS缓冲液中清洗2次,每次15分;

5. 放一大滴蛋白A-金胶体溶液在切片上,停留1小时(买来的蛋白A-金胶体溶液,需要用PBS缓冲液稀释25倍左右方可应用);

6. 在PBS缓冲液中清洗2次,每次15分;

7. 将玻片置放在0.5%明胶溶液内,使沾上一薄层,室温风干;

8. 第二天,将玻片放入显影液内(26℃)20—60分钟。这一步操作需把盛装显影液的玻璃器皿用黑色