

家兔脑细胞核的制备

王瑞珍 饶孝标 温博贵 周炳森

(江西医学院生物化学教研室)

细胞核是遗传信息的存储部位。核内的染色质蛋白经磷酸化后在基因表达上起着种种的调控作用。在中枢神经系统中,大脑的蛋白质合成与其它器官组织相比,没有什么差别。从现有资料看来,大脑基因表达的产物——神经系统的蛋白质组分研究表明,有许多蛋白是神经系统所独有,如: S-100、 $\gamma\gamma$ -烯醇化酶;而有些蛋白质则以大脑中的含量最为丰富,如: 微管蛋白、L-谷氨酸脱羧酶等。大脑蛋白在质与量上和其它组织器官不同,显然与其基因表达的调控有关。因此,分离出纯净的脑细胞核,以获得大脑的染色质蛋白,对于研究神经细胞的功能与分化是很有意义的。

本文根据国外近年资料^[1-2],结合实验室条件,制备出纯净完整的脑细胞核,现报道如下。

材料与方 法

材料: 正常成年家兔断头后立即置实验室冰浴上。剪开皮肤、颅骨,取出全脑,除去脑血管并用冷生理盐水冲洗干净。

细胞核的制备: 将取出的全脑称重,按 1:8 (重量/体积) 加入预冷的含 3 毫克分子氯化镁的 2.2 克分子蔗糖溶液,于电动马达 (电压: 100 伏特,转速: 4000 转/分) 带动的特弗隆 (Teflon) 头玻璃匀浆器中上下匀浆 10 次。匀浆液置日立 65-P-7 超速离心机上离心 50 分钟 (RPS27-2 头, 54000 g), 小心倾去脂层和蔗糖层,用滤纸擦净管壁,收集管底核沉淀。继用冷 0.32 克分子蔗糖/1 毫克分子氯化镁/1 毫克分子磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 悬浮,置普通冰箱之冰盒中保存 (0℃) 备用。

在上述制备过程中,对破碎细胞和脑细胞核均及时作涂片,用瑞武氏染色法制片^[3],在显微镜下观察细胞破碎程度及细胞核的纯度。

结果与讨论

细胞核的制备常以蔗糖溶液作为介质。匀浆制备时采用 0.25 克分子蔗糖液,离心后获得粗提的核沉淀。再进一步用高浓度的蔗糖液垫底或悬浮,超离心获得纯核。参照这种方法,分

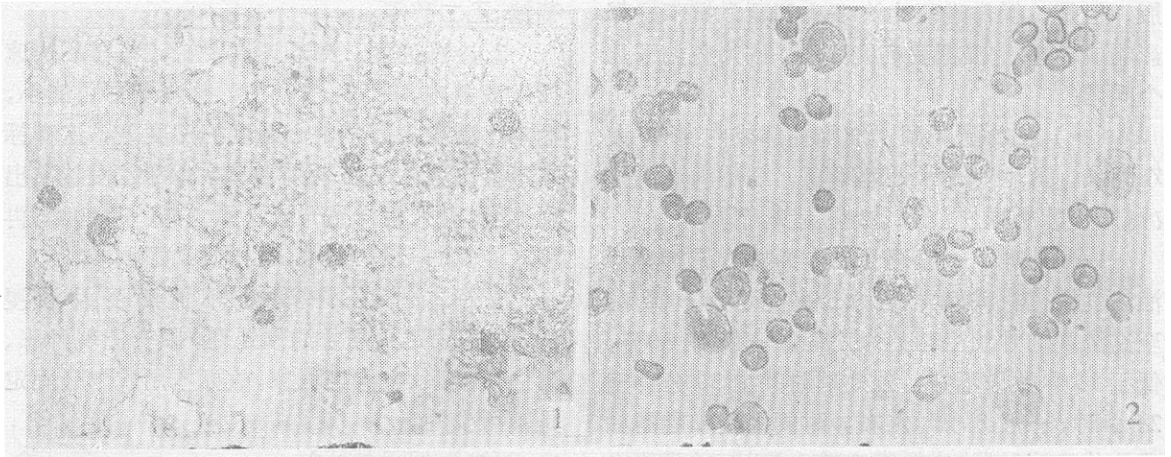


图 1 家兔脑组织细胞匀浆 (2.2 克分子蔗糖溶液中) × 800;

图 2 家兔脑组织纯细胞核 (0.32 克分子蔗糖溶液中) × 800

离脑细胞核未获成功。问题在于一般分离细胞核的离心力不能将脑细胞核沉下来，这可能与脑中脂类丰富有关。为此，参照参考文献 [2] Yanagihara 的方法，用自己装备的电动匀浆设备打碎细胞，获得了纯净的细胞核。即用 2.2 克分子蔗糖液直接匀浆，超离心后，细胞核立即沉下。此法省去了粗提的细胞核制备这一步，通过直接超离心一次获得纯细胞核，由于简便可避免因繁琐操作引起的损失和污染。在细胞破碎的匀浆过程中使用的匀浆设备，是用一个国产的电动搅拌马达(功率：80 瓦)，配可调变压器，电动马达的搅拌头用特弗隆制作。这一装置，即使在 2.2 克分子蔗糖液中仍研磨自如，细胞破碎完全(见图 1)。经此匀浆后，超离心获得的脑细胞核产率较高，形态完整，边缘清晰。在匀浆的制备及纯核的鉴定中常规采用瑞氏染色法，纯核照片显示细胞核十分清楚并保持着较为天然的形态结构，未被核外结构污染(见

图 2)。实践证明本法优于用相差显微镜观察和其余的组织染色法。

小 结

本文在 Yanagihara 法基础上采用国产设备制备脑匀浆，经 2.2 克分子蔗糖液一次超离心获得纯净的脑细胞核。核的纯度采用瑞氏染色法检查。本法简便，纯度、产率较好，为开展脑核蛋白的研究提供了良好条件。

参 考 文 献

- [1] 徐福燕编著 1965 临床血液细胞学。上海科学技术出版社，139。
- [2] Yanagihara T. 1980 Phosphorylation of chromatin proteins in cerebral anoxia and ischemia. *J. Neurochem.* **35** (5): 1209—1215.
- [3] Oh'Hara I. and T. Yanagihara 1977 Nuclear chromatin proteins from rabbit cerebrum, cerebellum and liver: Synthesis and phosphorylation. *J. Neurochem.* **29** (6): 1065—1073.