DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.028
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2245-03

论著

核小体的提取纯化及鉴定

钟白玉,郝 进,郝 飞,徐云升 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索一种操作简便、实用的核小体提取方法。方法 取无菌新鲜鸡血,提取细胞核,用葡萄球菌核酶消化后裂解、离心,获得上清组分用连续性密度梯度蔗糖进行分离,收集分子量350 bp左右的组分。结果 2%琼脂糖电泳显示该组分含有长度为150 bp的双链DNA,15%SDS-PAGE电泳显示该组分含有组蛋白H2A、H2B、H3和H4;本实验分离的核小体在0 ℃条件下存放4周未见DNA成分和组蛋白成分发生解聚。结论 该方法可以正确的分离出核小体,且具有良好的稳定性,为深入研究核小体在SLE自身抗体产生中的作用打下基础。

关键词:核小体;提取;纯化;连续性密度梯度离心
中图法分类号:R329.24;R446.1 文献标识码:A

Isolation, purification and identification of nucleosomes from chicken erythrocytes

ZHONG Bai-yu, HAO Jin, HAO Fei, XU Yun-sheng (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a simple and practical method for isolating and purifying nucleosomes. Methods Nuclei were isolated from chicken erythrocytes, and then digested with staphylococcal nuclease. After centrifugation, the supernatant of digestion was separated and centrifugated on sucrose gradients. Results Nucleosomes with good stability were isolated properly by gradient centrifugation. Conclusion This method for the isolation and purification of nucleosomes is simple and effective, which might contribute to the further researches of the roles of nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.

Key words: nucleosome; isolation; purification; identification

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种非器官特异性自身免疫性疾病,其发病与外周血单个核细胞凋亡相对增加导致大量自身抗原释放有关[1]。核小体是细胞凋亡过程中,核酸内切酶被激活后切割染色质形成的产物,其基本结构是组蛋白8聚体(H2A、H2B、H3、H4)及外面缠绕的150~200 bp左右ds-DNA形成的复合物。动物实验研究提示,核小体是诱导致病性ds-DNA抗体生成的关键自身抗原,因此对核小体的研究引起人们的重视,并逐渐成为SLE致病性自身抗原研究的热点[2]。由于核小体的分离、纯化过程复杂,而且价格昂贵,一般实验室很难完成,这也是限制国内开展这方面相关研究的重要原因。本研究旨在寻求一种简单、价格低廉的分离纯化核小体的方法,为进一步研究核小体在SLE自身抗体生成中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

来源于新鲜鸡血,市售成年公鸡,消毒后由颈部采血,肝素抗凝,20 IU/ml。

1.2 主要试剂

葡萄球菌核酶(staphylococcal nuclease)为Oncogene公司产品;标准组蛋白为Wortnington公司产品,提取自小牛胸腺。

1.3 方法

1.3.1 核小体的提取 新鲜抗凝鸡血800× g 离心10 min,获得细胞团用约10倍体积的缓冲液A(15 mmol/L Tris, 15 mmol/L NaCl, 60 mmol/L KCl, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 0.15 mg/ml 精胺,0.5 mmol/L 亚精胺,0.34 mol/L 蔗糖,15 mmol/L 2-巯基乙醇,0.2 mmol/L PMSF, pH 7.5, 4 ℃)洗3次;800× g 再次离心10 min,获得细胞用裂解液B(缓冲液A 加0.5%TritonX-100, pH 7.5)冰上裂解10 min,2 500× g 离心10 min获得细胞核,用缓冲液A洗3次;缓冲液C(4 mmol/L $MgCl_2$, 25 mmol/L

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200258)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200258)
作者简介:钟白玉(1958-),男,四川省邻水县人,副主任技师,主要从事皮肤病理技术、医学真菌检验技术等方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68754491
通信作者:郝 进,电话:(023)68754773
收稿日期:2004-05-27;修回日期:2004-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

KCl, 1 mmol/L $CaCl_2$, 50 mmol/L Tris, pH 7.5)悬浮细胞核,加入葡萄球菌核酶(浓度约40 IU/mg DNA),37 ℃孵育1.5 h;4 000× g 离心10 min,获得细胞核团用溶解缓冲液(1 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, pH 7.8)冰上裂解1 h,4 000 × g 离心,收集上清。取15 ml离心管,利用加样泵形成蔗糖连续性密度梯度(5% ~29%, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF, 0.15 mmol/L 精胺, 0.5 mmol/L 亚精胺, pH 7.8),将上步获得的含核小体的上清液约2 ml轻轻铺在蔗糖液面,130 000× g,离心21 h,离心完毕后,从上到下吸取离心液,每管0.5 ml。将获得的离心液,2%琼脂糖凝胶电泳,收集电泳速度在DNA 350 bp左右的离心组分,A_{260}处测定核小体浓度。上述所有离心步骤均在4 ℃条件下进行。

1.3.2 核小体DNA组分的鉴定 取上述收集核小体溶液,酚-氯仿抽提所含DNA成分,乙醇沉淀后,2%琼脂糖凝胶电泳,观察DNA片段长度。

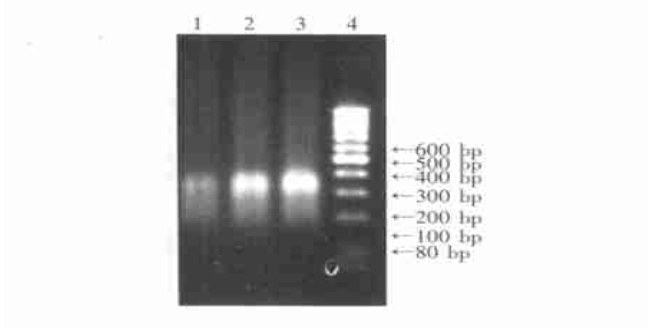
1.3.3 核小体组蛋白组分的鉴定 取上述收集的核小体溶液,与加样缓冲液(0.08 mmol/L Tris-HCl, 24%甘油, 8%SDS, 0.2 mol/L DTT, 0.02%考马斯亮蓝)混合,100 ℃加热5 min后放置冰上冷却,15%SDS-PAGE在Tincine电泳缓冲系统电泳。标准组蛋白提取自小牛胸腺,含有组蛋白H1、H2A、H2B、H3、H4,1% PBS稀释,磁力搅拌器搅拌2周,离心(800× g) 10 min,去除不溶物。

1.3.4 核小体稳定性的检测 将离心获得的核小体放置于冰桶中,在0 ℃条件下保存4周,然后2%琼脂糖电泳,观察有无游离DNA组分。

2 结果

2.1 核小体的提取、纯化

根据文献[3]报道,收集电泳速度在350 bp作用的离心组分,初步明确此组分含核小体,测得光密度值 A_{260} 为10.023,换算成核小体浓度为0.85 μg/μl(图1)。



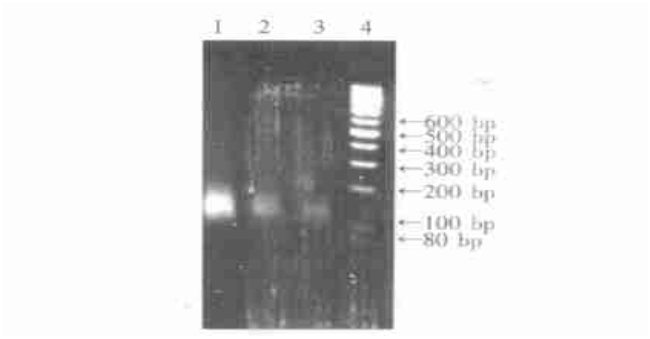
1, 2, and 3: Nucleosomes; 4: DNA marker

图1 2%琼脂糖电泳结果

Fig 1 Electrophoretic results of nucleosomes on 2% agarose

2.2 核小体DNA组分的鉴定

酚-氯仿抽提后,进行2%琼脂糖电泳,DNA分子量在150 bp左右(图2)。



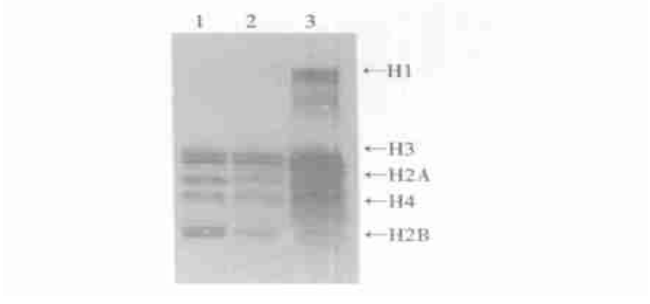
1, 2, and 3: DNA of nucleosomes by phenol extraction; 4: DNA marker

图2 核小体DNA组分的鉴定(2%琼脂糖)

Fig 2 Identification of nucleosomes DNA (2% agarose)

2.3 核小体组蛋白组分的鉴定

核小体经变性处理后,核小体的DNA成分和组蛋白各成分解聚,然后用15% SDS-PAGE在Tricine系统电泳,以从小牛胸腺提取的组蛋白成分为标准对照,提取的核小体含有组蛋白H2A、H2B、H3、H4(图3)。



1 and 2: Histones of nucleosomes; 4: Standard histone

图3 15%DSD-PAGE电泳(Tricine缓冲系统)

Fig 3 SDS-PAGE results of histones of nucleosomes

2.4 核小体的稳定性

离心获得的核小体0 ℃条件下保存4周后,然后行2%琼脂糖电泳,没有发现游离DNA成分出现,即核小体DNA和组蛋白未发生解聚。

3 讨论

SLE是由抗原抗体复合物介导的自身免疫性疾病,以血液内存在的多种自身抗体包括抗核抗体为特征,这些自身抗体的产生由自身抗原驱动、Th细胞介导的[4]。目前认为SLE自身抗原主要来源于凋亡的外周血单个核细胞(PBMC),一些动物实验提示其凋亡过程中产生的核小体是诱导包括ds-DNA抗体在内的抗核抗体形成的关键抗原,但是目前关于核小体的具体致病机制仍有许多不清楚的地方,仍有待于进一步研

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究,这也是目前 SLE 自身抗原研究中的热点。核小体组蛋白高度保守,从取材方便方面考虑,目前国外实验室多以鸡血红细胞或小牛胸腺为原材料提取核小体来开展自身抗体方面的研究。核小体的提取和纯化非常困难,不易进行大批量生产,另外,其本身的物理和化学性质极不稳定,组蛋白和 ds-DNA 很容易解聚,解聚后整个核小体的免疫活性即丧失,因此目前市场上没有商品化的核小体出售,这是进一步开展核小体相关研究的障碍。

目前国外几家实验室核小体的提取技术已经基本成熟。这些方法均利用凝胶层析方法,这种方法虽然稳定,但价格昂贵,普通实验室很难达到要求。因此,本实验在文献的基础上,利用蔗糖连续性密度梯度分离核小体。从分离结果可以看出,这种方法同样可以分离出单个核小体,其核小体 DNA 和组蛋白成分检测均与国外报道的层析法分离的核小体相关结果一致,提取量足够达到实验要求。这种方法相对于凝胶层析方法,价格低廉,可以满足不同实验室的要求。我们同时对所提取的核小体的稳定性也作了初步检测,对提取的核小体分别在 0 ℃条件下保存 4 周,然后进行检测,没有发现核小体的 DNA 和组蛋白成分发生解聚,说明应用密度梯度离心提取核小体简便可行,为进一步研究核小体在 SLE 自身抗体生成中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated *in vitro* apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 1994, 152(7): 3685-3692.

[2] Stuart L, Hughes J. Apoptosis and autoimmunity[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(5): 697-700.

[3] Yager T D, McMurray C T, van Hold K E. Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles[J]. Biochemistry, 1989, 28(5): 2271-2281.

[4] Hoffman R W. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. Front Biosci, 2001, 6: D1369-1378.

(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2004)24-2247-01

个案与短篇

阑尾周围脓肿一期手术 37 例

One-stage operation on periappendicular abscess: a report of 37 cases

周 雄,高海军 (武警重庆总队医院外一科,重庆 400061)

我科从 2000 年 1 月至 2004 年 1 月行阑尾周围脓肿一期手术 37 例,现报告如下。

1 临床资料

本组病例 37 例,男性 20 例,女性 17 例,年龄 13~65 岁,病程 3~11 d。所有患者均表现为右下腹肿块伴压痛,肿块直径 5~20 cm。根据病史、查体及 B 超检查诊断为阑尾周围脓肿。

手术探查及治疗经过:采用右下腹直肌切口,术中见回盲部脓肿 27 例,升结肠旁脓肿 5 例,腹膜后脓肿 3 例,盆腔脓肿 2 例。术中先找到脓肿壁两种组织粘连的间隙,用手指钝性分离,进入脓腔,吸尽脓液,仔细钝性分离脓肿壁,直到找到阑尾。切除阑尾后根据阑尾根部和盲肠壁炎症水肿程度,采用不同方式处理残端,本组行阑尾残端结扎、荷包包埋 23 例,单纯结扎、周围组织覆盖 11 例,全阑尾切除、盲肠壁间断缝合 3 例。所有患者常规用 1%双氧水冲洗脓腔及切口,脓腔处放置软橡胶引流管,由切口外侧腹壁戳孔引出。引流管放置时间 3~9 d。应用头孢类抗生素或氨苄青霉素+甲硝唑 5~10 d,平均 6 d。

2 结果

37 例全部治愈,切口一期愈合 33 例,感染 4 例。未发生肠瘘,术后远期并发粘连性不全性肠梗阻 2 例,保守治疗后痊愈。住院时间 7~15 d,平均 10 d。

3 讨论

阑尾周围脓肿作为急性阑尾炎一个常见病理类型,其发生率约占急性阑尾炎 4%~10%[1]。对阑尾周围脓肿的处理至今仍有不同的观点[2,3]。一般认为阑尾周围脓肿是炎症局限化的表现。如果立即采取手术易造成感染扩散、肠瘘、切口感染等并发症。所以主张保守治疗以待脓液自行吸收,仅在保守治疗效果不佳、脓肿有再破裂的危险时或全身中毒症状严重时才主张手术,手术也多采用单纯引流以防止并发症的发生[4]。但根据我们的体会,阑尾周围脓肿保守治疗有如下不利之处:①由

(下转 2253 页)

作者简介:周 雄(1975-),男,重庆市长寿县人,医师,主要从事胃肠外科方面的研究。电话:(023)62511985-24901

收稿日期:2004-09-20;修回日期:2004-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net