DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.061

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)05-0612-02

从肝脾组织快速分离核蛋白抽提物

Rapid method for preparation of nuclear extract from liver and spleen tissues

徐迪雄[1],叶治家[2],曹廷兵[2],彭家和[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院医教部;[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室;重庆 400038)

提 要:目的 改进传统的从组织中分离核蛋白抽提物方法,使之简化,能在一般实验室开展应用。方法 先将肝脾组织制备成细胞液,再从细胞中快速分离核蛋白抽提物。结果 通过凝胶阻滞实验证实,用改进的方法所分离出的核蛋白抽提物与传统方法所分离出的核蛋白抽提物相比,得量相当,且具有能与DNA顺式作用元件结合的活性。结论 所改进方法与传统方法相比,具有简便、快速、不需要特殊仪器设备等优点,适合在一般实验室应用,值得推广。

核蛋白的分离制备是基因表达调控研究中常用的方法。体外转录分析、凝胶阻滞分析,DNaseI足迹分析等实验都需要制备核蛋白抽提物。目前,从培养细胞中分离有转录活性的核蛋白抽提物通常采用Dignam[1]的方法;从组织中分离得到有转录活性的核蛋白抽提物通常采用Gorski等[2]的方法。Gorski的方法步骤较为复杂,需要超速离心机等大型仪器设备,在一般实验室开展较为困难。本研究旨在对Gorski的方法进行改进。通过摸索找到了一种从肝、脾等实质器官组织中分离出核蛋白抽提物的简便、快速和有效的方法。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 核蛋白的抽提

1.1.1 主要试剂 缓冲液A:10 mmol/L HEPES-KOH(pH 7.9),1.5 mmol/L $MgCl_2$,10 mmol/L KCl,0.5 mmol/L DTT,0.2 mmol/L PMSF。缓冲液B:20 mmol/L HEPES-KOH(pH 7.9),25% Glycerol,1.5 mmol/L $MgCl_2$,420 mmol/L NaCl,0.2 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT,0.2 mmol/L PMSF。Bradford试剂:20 mg考马斯亮蓝G250溶解于10 ml 95%乙醇中,加入20 ml浓磷酸(80%),混匀,加ddH_2O定溶至200 ml。

1.1.2 核蛋白的抽提 取新鲜正常大鼠肝脏、脾脏各2~3 g,用冰冷的PBS洗去表面的血迹,在少量冰冷PBS中,将组织充分剪碎,再倒入细胞匀浆器中适当磨碎,40~100目筛网过滤,除去结缔组织及纤维,制备细胞悬液,细胞计数,调整细胞浓度,收集1.0×10^7细胞于1.5 ml EP管,用冰冷PBS洗2次,离心5 000× g 3 min,沉淀细胞。加10倍于细胞体积的冰浴的buffer A洗细胞1次;加3倍于细胞体积的冰浴的缓冲液A悬浮细胞,0 ℃放置10 min,显微镜观察,70%细胞破裂,快速混悬细胞数次,4 000× g,15 min,离心去上清得细胞核;加与细胞核等体积、冰浴的缓冲液B充分混匀,0 ℃放置30 min,15 000× g,4 ℃离心15 min,上清即为核蛋白抽提物,取10 μl核抽提物测蛋白浓度。其余分装置-70 ℃保存备用。

1.1.3 核蛋白的分离 从组织中分离核蛋白抽提物的方法按Gorski等[2]的方法进行。

1.1.4 核蛋白浓度的测定 参照文献[3]的方法。

1.2 凝胶阻滞分析

1.2.1 主要试剂 5× 蛋白结合反应缓冲液:125 mmol/L HEPES(pH 7.9),5 mmol/L EDTA,25 mmol/L DTT,750 mmol/L NaCl,50% Glycerol。上样缓冲液:30% Glycerol,0.1% Bromophenol Blue,0.01% Xylene Cyanol FF。5× TBE:0.445 mol/L Tris-borate,0.445 mol/L Boric acid,0.01 mol/L EDTA。30%丙烯酰胺贮液(AA:Bis=29:1),10%过硫酸铵(新鲜配制),TEMED。cAMP反应元件(cAMP reaction element,CRE),T4 DNA kinase,polydI-polydC为boehringer mannhein公司产品。γ-^{32}P-[dATP]为Amersham公司产品。

1.2.2 DNA探针的标记 γ-^{32}P-[dATP]标记CRE探针,参见文献[4]方法进行。

1.2.3 凝胶阻滞分析 反应体系为20 μl,含10 μg核蛋白抽提物,2 μg非特异性竞争剂Poly(dI-dC),4 μl 5× 结合缓冲液,0 ℃预保温20 min;再加入(0.6~1)× 10^5 cpm/pmol标记探针,加入探针后,25 ℃反应30 min。反应结束后加入10× 上样缓冲液,用6%聚丙烯酰胺胶(预电泳过)分离片段,0.5× TBE为电泳缓冲液,室温下稳压电泳一定时间(电压大小、电泳时间根据电泳装置及靶DNA长度决定),抽干凝胶,放射自显影。

2 结果

2.1 核蛋白浓度

利用改进的方法从每克肝、脾组织可分别获得约420、250 μg核蛋白抽提物,产率与Gorski的方法相当。

2.2 凝胶阻滞分析

γ-^{32}P标记的CRE与上述两种核蛋白抽提物反应后,都观察到明显的电泳迁移条带。当加入50倍分子数的冷探针时,此条带消失,说明这一条带是探针DNA与核蛋白抽提物的特异性结合条带。这一结果表明,通过改进的方法所分离的两种核蛋白抽提物都具有与CRE特异性结合的活性,见图1。传统

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070358)

作者简介:徐迪雄(1966-),男,湖南省娄底市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事微量元素与健康方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754024

收稿日期:2001-02-08;修回日期:2001-04-05

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

Gorski 的方法也得到相同的结果(结果未给出)。

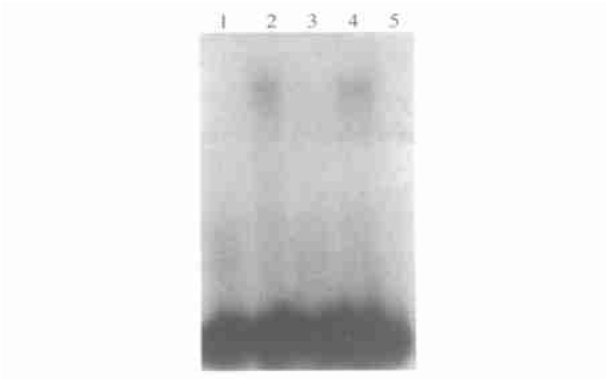


图 1 ^{32}P 标记的 CER 与从肝脾组织分离核蛋白抽提物的结合
1: 标记探针; 2: 标记探针加肝组织核蛋白抽提物; 3: 标记探针加肝组织核蛋白抽提物及 50 倍体积未标记探针; 4: 标记探针加脾组织核蛋白抽提物; 5: 标记探针加脾组织核蛋白抽提物及 50 倍体积未标记探针

3 讨论

随着后基因组计划时代的到来, 真核基因表达调控的研究方法将成为从事分子生物学研究有关实验室的常规方法[5]。核蛋白的分离制备又是基因表达调控研究中常用的技术。一个好的核蛋白抽提物需符合以下两个条件: ①含有所有的核蛋白质; ②这些蛋白质未被降解, 具有转录活性。由于此类蛋白质数量多, 浓度不一, 因此制备时需: ①核纯, 无胞浆蛋白污染; 核完整, 无核蛋白的泻漏; ②将所有核蛋白质从 DNA 解离下来, 易于抽提, 也无 DNA 干扰; ③操作中注意温度, 加蛋白酶抑制剂。传统从组织中分离核蛋白的方法, 先将组织匀浆, 再通过超速离心分离出细胞核, 然后从细胞核中分离核蛋白, 但步骤繁琐。通过摸索, 我们所建立的从肝脾组织分离核蛋白抽提物的方法, 吸收了 Dignam 和 Gorski 的两种方法的优点。首先从肝脾实质性器官中分离细胞, 再从细胞中快速分离核蛋白抽提物。大大简化了操作步骤, 且无需超速离心机等大型仪器设备。所分离获得的核蛋白抽提物具有与顺式作用元件结合的活性, 可满足后续实验研究的要求, 值得推广。

关键词: 组织; 核蛋白抽提物; 分离
中图法分类号: R394-33 文献标识码: B

参考文献:

[1] Dignam J D, Lebovitz R M, Roeder R G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase Ⅱ in soluble extract from isolated mammalian nuclei [J]. Nucleic Acids Res, 1983, 11(4): 1 475—1 489.
[2] Gorski M, Somasekhar M D. An enstrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene functions in MCF-7 but not in Hela cells[J]. Gene, 1988, 69(1): 23—28.
[3] Darbre A. Analytical methods[A]. In: Darbre A. Practical protein chemistry: A handbook[M]. New York: John Wiley and Sons, 1986. 227—335.
[4] Frederick M A, Roger B, Robert E K, *et al*. Short protocol in molecular biology[M]. 3rd ed. Boston: John Wiley and Sons Inc, 1995. 442—447.
[5] 陈 竺, 李 伟, 俞 曼, 等. 人类基因组计划的机遇和挑战[J]. 生命的化学, 1999, 18(5): 5—17.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)05-0613-02

技术方法

PCR 结合反相膜杂交在淋病诊断中的应用

Detection of *Neisseria gonorrhoeae* with PCR and reverse membrane hybridization

鲁卫平[1], 安 琳[2], 吴丽娟[1] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所: [1] 检验科; [2] 泌尿外科; 重庆 400042)

提 要: 目的 探讨 PCR 结合反相膜杂交用于临床诊断淋病的可行性。方法 以培养法为金标准, 对 PCR 电泳法和 PCR 反相膜杂交法进行了比较研究。结果 PCR 反相膜杂交特异性高, 灵敏度是 PCR 电泳法的 40 倍。结论 PCR 反相膜杂交技术不仅可以提高 PCR 特异性、敏感性, 且操作简单, 无污染, 适合临床开展。

淋病奈瑟氏菌是性传播疾病的主要病原菌之一。淋病的临床表现缺乏特异性, 诊断主要依靠实验室检查。自 PCR 技术问世来, 由于其灵敏度高, 特异性好, 快速等特点, 在淋病的诊断上得到了广泛的应用[1], 但 PCR 技术还存在一定局限性。考虑到采用 PCR 结合反相膜杂交技术判断扩增产物, 可能会提高淋病诊断的特异性, 灵敏度及重复性。为此, 本研究对用 PCR 结合反相膜杂交技术和 PCR 电泳检测淋菌标本进行了比较, 以证实其诊断价值。

作者简介: 鲁卫平(1971—), 男, 河北省唐山市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事临床检验诊断方面的研究。电话: (023)68757272
收稿日期: 2000-06-23; 修回日期: 2001-03-07

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