DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.03.034

变化,以其等电点为界,在酸性条件下带正电荷,在碱性条件下带负电荷。等电点处于极端(pI< 5或 pI> 8)位置的基因工程产物首选离子交换色谱方法,往往一步即可去除几乎全部的杂质。

根据以上理论,我们进行了纯化条件的优化。rhTNF-α以可溶性蛋白的形式存在于胞浆中,故可通过菌体破碎、离心去除不溶性杂质,通过分步盐析去除部分可溶性杂质。由于 rhTNF-α的等电点为 pI= 5.3,本实验采用阴离子交换层析,NaCl梯度洗脱,rhTNF-α的纯度达到 95%以上,回收率也达到了 47.4%,比活性 3.44×10^7 U/mg,并且具有良好的重复性,见附表。与 Sigma公司的产品相比,各项指标均达到其公布的参数(比活性 2×10^7 U/mg,纯度> 95%,Mr 17×10^3u),说明本实验建立的方法是可行的。

本方法中使用的 DEAE-8HR柱,其填料直径为 8μm,有良好的分辨率,并且可以耐受较高的柱压,清洗方便。预实验中我们曾使用直径为 40μm的填料,发现在低分子段(约 Mr 14×10^3u)有一条带,影响了 rhTNF-α的纯度。将 DEAE-8HR柱与 P650蛋白纯化系统一起使用,分离过程时间较短(30 min左右)。

国外报道的 rhTNF-α纯化方法,皆以 HPLC作为一必行的重要步骤[2],此方法要求较高的设备条件和技术条件,且成本高,制备量有限。本实验利用现有的实验条件,将 rhTNF-α的粗制品经盐析、离心、透析、DEAE-HR阴离子交换层析,得到高纯度、高比活、高回收率的 rhTNF-α,Mr 17×10^3u,与文献报道一致[6]。进一步的 N端氨基酸序列分析表明,我们制备的 rhTNF-α其 N-端序列符合天然人 TNF-α的一级结构[7]。

关键词 肺瘤坏死因子;层析;纯化

中图法分类号 R730.3

参考文献

1 吕兆海,王子海,闵永洁等.人α-肿瘤坏死因子基因的高效表达.生物工程学报,1995;11(1):27

2 Kunitani M, Cunico R L. Reversible subunit dissociation of tumor necrosis factor during hydrophobic interaction chromatography. J Chromatography, 1988; 443(1): 205

3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976; 72(2): 248

4 Flick D A, Gifford G E. Comparison of *in vitro* cytotoxic assays for tumor necrosis factor. J Immunol Methods, 1984; 68(1-3): 167

5 任 园,陈鸿珊,叶应妩.肿瘤坏死因子细胞毒活性测定方法的比较.中华医学检验杂志,1995;18(2):89

6 Marmenout A, Fransen L, Tovernier J *et al*. Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. Eur J Biochem, 1985; 152(4): 515

7 万晓余,吴淑华.肿瘤坏死因子结构研究进展.生物化学与生物物理进展,1993;20(5):351

(收稿: 1996-07-03;修回: 1996-12-30)

(编辑 王 红、沈锡庚)

大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录模型

Single channel recording model in rat cortical neurons

王中峰* 薛春生** 肖家思 闫淑枝 万子兵 (第三军医大学基础部生理学教研室)重庆,630038

提 要 目的:介绍我室建立的大鼠大脑皮层神经元膜片钳单通道记录模型。方法:大鼠大脑皮层神经元急性分离和膜片钳单通道记录技术。结果:急性分离的皮层神经元经鉴定成活良好,记录的 L-、N-和 T型钙通道的单通道电活动与文献报道基本一致。结论:我室建立的膜片钳实验方法是可靠的。

细胞的电活动是生命活动的基础,而这些电活动则是通过细胞膜离子通道而实现的,因此,探讨细胞膜离子通道的活动规律,对揭示生命现象本质、探讨疾病的发病机理等具有重要的意义。随着膜片钳实验技术的建立和推广[1],使得我们能够在单个的细胞上观察单个的离子通道电活动,对离子通道的认识向前跨进

* 王中峰,男,33岁,讲师,博士

** 重庆医科大学药理学教研室 重庆,630046

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

到了分子水平。目前,膜片钳技术已广泛应用于生理、药理、生物学等研究领域,对推动生命科学的发展起到了重要的作用。现介绍我室建立的大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录模型。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

微电极拉制器(PP-83,Narishige公司,日本);微电极抛光仪(自制);摄像监控倒置显微镜(XSJ-D,重庆光学仪器厂);微推进器(NO-202,Narishige公司,日本);膜片钳放大器(CEZ-2200,日本光电);记忆示波器(DSS-6522,中国);AD/DA转换板(Digidata 1200,美国 Axon公司);pClamp 6.02软件(美国 Axon公司);微机(IBM-486DX)。

1.2 药品试剂

胰蛋白酶(Sigma);多聚赖氨酸((Sigma);天门冬酸钾(Sigma);N-trimethylsilyldiethylamine(Sigma);HEPES(Fluka);Verapamil(Sigma);其它试剂均为国产分析纯。

1.3 溶液配制

人工脑脊液(mmol/L):NaCl 126;KCl 5;NaH_2PO_4 1.25;$NaHCO_3$ 26;$CaCl_2$ 2;$MgSO_4$ 2;葡萄糖 10,pH 7.2(NaOH调制),暂不加 $CaCl_2$和糖,用时再加。

浸浴液(mmol/L):天门冬酸钾 130;HEPES 10;EDTA 10;$MgCl_2$ 5;葡萄糖 10;pH 7.3(用 KOH调制)。

电极冲灌液(mmol/L):$BaCl_2$ 110;HEPES 10;pH 7.3

1.4 大鼠皮层神经元分离

将2周~4周的 Wistar大鼠快速断头取脑,将一侧脑用手工切成厚约 400μm~500μm的冠状脑片,边切边置入通混合气(95% O_2+5% CO_2)的 250 ml人工脑脊液内,30 min后用大 Pasteur吸管吸取2片脑片置入含 0.1%胰蛋白酶的2 ml人工脑脊液内消化,消化过程中仍通混合气,30 min后将脑片用大 Pasteur吸管移入含 HEPES(10 mmol/L)的人工脑脊液内,用眼科剪将脑片稍加剪碎,移入2 ml人工脑脊液内,用尖端火抛光的 Pasteur吸管(直径从大到小)顺续吹打,直到看不到明显的组织块为止。将此液静置7 min~10 min,吸取上清液,滴加于事先涂有 0.1%多聚赖氨酸的盖玻片上,沉淀8 min~10 min后细胞便贴壁,用浴液冲洗盖玻片3次~4次,以洗去细胞碎片和未贴壁的细胞,加入2 ml浴液即可开始膜片钳记录。分离过程均在室温(20℃~25℃)下进行。

1.5 玻璃微电极的制备

用两步拉制法将 GG-17硬质玻璃毛坯(中科院上海脑研究所)拉制成电极,一拉加热电流 13.0 A,将毛坯拉长4 mm~5 mm,调节加热中心距,二热加热电流为 9.5A。

在拉制好的电极尖端涂以 N-trimethylsilyldiethylamine,以减少电极入水后所产生的对地电容。

将白金丝弯成"V"型,在其尖端涂上玻璃层,以减少加热时散发出来的金属原子吹到电极尖端,微电极尖端热抛光时,加热电流1A左右,在100× 显微镜监视下,将微电极用推进器缓慢推向加热丝的"V"型尖端,加热数秒后,当观察到电极尖端略变钝,缩短即可。

将电极冲灌液用孔径 0.2μm的微孔滤膜滤过,用负压冲灌微电极的尖端,然后用微量注射器冲灌电极尾部,用手指轻弹电极,将气泡排出。此电极在冲灌电极液后电极电阻 2MΩ~4MΩ。

1.6 单通道记录

1.6.1 仪器连接如图1

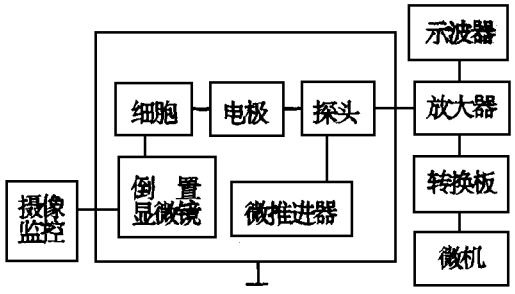


图1 仪器连接框图

1.6.2 通道电活动记录

1.6.2.1 高电阻封接形成 用孔径 0.2μm的微孔滤膜滤过浴液,将贴附有细胞的盖玻片放入直径 30 mm的培养皿内,加入 2 ml经滤过的浴液。膜片钳放大器的功能选择置 Seal状态,增益 100mV/pA,STIM IN 1/10,滤波 1 KHz 调用 pCelamp软件的 Test脉冲,参数 50 ms,0.1 mV。选用贴壁良好、呈锥形或星形、有较明显突起、细胞边界清楚、胞浆均匀一致、整个细胞轮廓反光好的细胞,用微推进器推进电极使之尖端压向细胞表面,稍加负压即可见示波器上的方波波幅渐降低,并变成一直线,再增大脉冲,直到方波再成直线,即形成高电阻封接(电阻>10GΩ),调节电容补偿(一般1-4pF),以消除电容性尖脉冲,封接即完成。由此形成的结构即 cell-attached结构,可用于单通道记录。

1.6.2.2 钙通道的单通道记录 将放大器的功能选择置 Vc,STIM IN 1/1000,调用 pClamp软件的 Clampex 程序,由微机发出去极化脉冲,同步采集通道开放电流,一次采集 50条曲线并存入硬盘,以备进一步分析。各型钙通道记录的参数设置为:L-型钙通道,钳制电位 -40 mV,阶跃至 0 mV;N型钙通道为 -60 mV→10mV;T型钙通道为 -80 mV→0 mV,持续时间均为 150 ms。

所有实验均在室温(20℃~25℃)下进行。

2 结果与讨论

2.1 细胞成活鉴定

在浴液中加入 0.1%的台盼蓝作染色,贴壁细胞不着色,说明分离的细胞是成活的。

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

2.2 封接效果评价

在操作熟练后,共封接 78个细胞,除个别细胞外,基本都可形成高电阻封接,成功率较高,封接电阻一般在 5 GΩ~ 30 GΩ,个别可达 90 GΩ~ 100 GΩ。在给予不同的钳制电位时,大部分细胞不脱落,基本满足实验要求。

2.3 钙通道的单通道电活动记录

记录到的 L型钙通道如图 2所示,该通道在去极化的整个过程均可开放,通道电流 1.5 pA左右,通道的开放时间较长,在浴液中加入 Verapamil 20μmol/L, 5 min后再次记录,发现 L型钙通道明显被抑制;记录到的 N型钙通道如图 3所示,该通道的电流比 L型稍小,开放时间稍短;记录到的 T型钙通道如图 4所示,该通道电流更小,开放时间更短,且对 Verapamil不敏感。

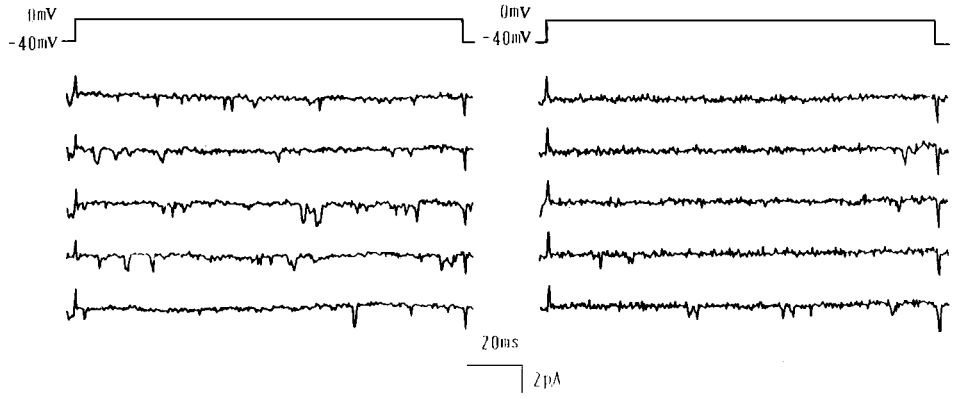


图 2　皮层神经元 L-型钙通道单通道电活动记录

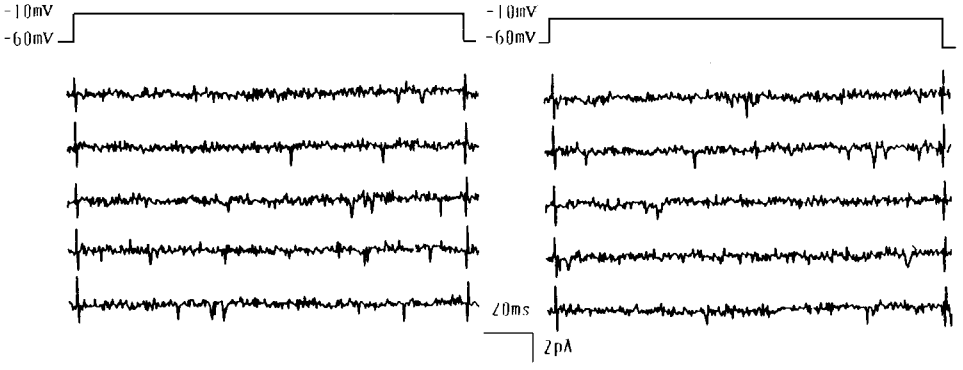


图 3　皮层神经元 N-型钙通道单通道电活动记录

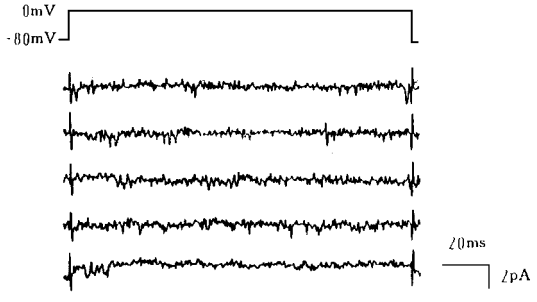


图 4　皮层神经元 T-型钙通道单通道电活动记录

应用膜片钳技术,已成功地在中枢神经系统的海马,纹状体,基底神经节等部位神经元膜上记录出了钙通道单通道电流[2-4],但在皮层神经元膜上记录出钙通道单通道电流还未见报道。从本实验结果可见,建立的单个皮层神经元分离方法是成功的,细胞成活较好,因消化用酶量较小,减少了胰蛋白酶对细胞的损伤,保证了通道电活动的记录;本实验记录到的三型钙通道,与在海马、纹状体等神经元膜上记录的结果基本一致,说明我室建立的大鼠皮层神经元膜片钳单通道记录方法是成功的、可靠的,为进一步研究大鼠皮层神经元的膜通道生理、病理变化奠定了基础。

参考文献

1 Hamill O, Marty A, Neher E *et al*. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch, 1981; 391

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

(1): 85
2 Mogul D J, Fox A P. Evidence for multiple types of Ca^{2+} channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurones of the guinea-pig. J Physiol, 1991; 433(1): 259
3 Hoehn K, Watson T W J, MacVicar B A. Mutiple types of calcium channels in acutely isolated rat neostriatal neurons. J Neurosci, 1993; 13(3): 1244
4 Umemiya M, berger A J. Single-channel properties of four calcium channel types in rat motoneurons. J Neurosci, 1995; 15(3): 2218

(收稿: 1996-09-01;修回: 1996-12-04)
(编辑 张大春)

彩色多普勒超声检查在肾移植中应用的体会

Experience of application of color Doppler flow image in renal transplantation

徐光辉* 王淑清 周 毅 李黔生 (第三军医大学附属大坪医院超声诊断科) 重庆, 630042

提 要 目的: 研究彩色多普勒超声对移植肾的监测价值。方法: 采用 ACUSON 128× P-10型彩色多普勒超声诊断仪,对移植肾进行形态学和血流动力学监测。结果: 移植肾在出现急性排斥反应时,其声像图有特征性改变,四级动脉血流指数高于正常功能的肾脏。结论: 彩色多普勒超声对移植肾的监测及愈合评估有较高的临床价值。

彩色多普勒超声(CDFI)检查是肾移植术后监测移植肾的一种新的有效的无创伤手段,特别是对移植肾血流动力学的改变以及术后早期合并症的诊断与鉴别诊断有重要意义。现报告应用 CDFI对移植肾术后监测的初步经验如下。

1 资料和方法

1994年 1月至 1996年 11月,共接受肾移植患者 69例,其中女性 43例,男性 26例。年龄 23~ 63岁。均在术后 24 h内作首次 CDFI检查,以后每周复查 1次或根据病情需要随时检查,必要时在超声引导下进行肾脏穿刺以辅助诊断。使用仪器为 ACUSON 128× P-10型彩色多普勒超声诊断仪。探头频率为 3.5 MHz,凸阵式探头。穿刺活检细针 1套。

2 结果

69例肾移植患者术后 24 h内,移植肾大小、实质回声、四级动脉 RI值与正常位置的肾脏无明显差异。长径 9.5 cm~ 11.0 cm,厚径 3.9 cm~ 4.8 cm,宽径 5.2 cm~ 6.4 cm,四级动脉阻力指数(RI)值: 0.52 cm~ 0.69 cm。1周后,69例移植肾患者中 45例呈正常的临床经过,17例出现急性排斥反应,7例出现急性肾小管坏死。

(1)术后经过正常 45例,首次 CDFI检查,移植肾形态、大小、包膜、肾实质回声、四级动脉 RI值正常位置的肾脏无明显差异,术后多次检查均无明显改变,RI值平均在 0.65~ 0.675之间。

(2)急性排斥反应 17例,首次 CDFI检查移植肾脏体积较正常略大,其余包膜紧绷感明显,肾实质回声减低呈斑片样的透声区,肾锥体增大,四级动脉 RI值增高为 0.865± 0.025,临床出现高热、血压升高。

(3)急性肾小管坏死 7例,首次 CDFI检查,移植肾形态体积与正常的肾脏无明显的差异,肾实质回声略减低;肾包膜欠光滑,呈紧绷感,皮质与髓质较清晰可见,四级动脉显示欠清晰,术后 3周~ 6周可探及四级动脉,其 RI值为 0.705± 0.055

3 讨论

功能正常的移植肾与正常肾脏相似,灰阶超声可以从移植肾大小、肾窦脂肪的显示,肾锥体情况以及集合系统管壁厚度等方面进行判断[1]。移植肾术后出现的合并症如排斥反应、肾脏破裂、肾周积液、输尿管梗阻等均可表现为肾功能异常、临床表现为少尿或者无尿等,这时鉴别诊断有一定的困难。鉴于这些合并症的治疗原则和方法不尽相同,因此明确判断病情,及时正确诊断非常重要。CDFI是一种无创伤性的手段,它不仅可以从移植肾的形态学上,还能从血流动力学角度为移植肾术后合并症的早期诊断与鉴别诊断提供依据,为临床上采取治疗措施提供重要依据。

移植肾术后出现排斥反应是最常见的合并症,大

* 徐光辉,男,29岁,医师,硕士研究生

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