上皮桥粒的提取及其蛋白组份初步分析

习庆春　刘荣卿　叶庆俏　（第三医大学西南医院皮肤科）630038

提　要　上皮细胞中含有一种细胞连结结构—桥粒。我们从牛鼻表皮组织中初步将桥粒成份提取出来，桥粒结构保存较好。提取的桥粒成份作 SDS-PAGE，初步认为 DP Ⅰ可能有 3 种成份，DP Ⅰa、Ⅰb、Ⅰc，分子量分别为 235kd、226kd 和 215kd；DP Ⅱ可能有 DP Ⅱa、Ⅱb、Ⅱc 三种成份，分子量分别为 206kd、198kd 和 186kd；DP Ⅲ有两种成份 DP Ⅲa、Ⅲb，分子量为 87kd 和 86kd。其它蛋白成份与文献报道相似。

关键词　桥粒；蛋白质；电泳

桥粒是一种细胞连结结构，主要位于上皮组织中。我们初步将桥粒分离出来，并用 SDS-PAGE法作初步分析。现将结果报告如下。

1　材料和方法

1.1　上皮组织处理及梯度离心

取新鲜水牛鼻皮肤，经含 2mM EDTA 的 PBS 处理后分离出表皮。去掉角质层，得到主要由基底细胞和棘细胞组成的上皮组织，剪碎后浸入 pH2.3 0.1M 柠檬酸缓冲液中（含 0.01mM DTE，0.05mM PMSF，简称 CA 液），用 VirTis "45"超速匀浆器匀浆处理后过滤，滤液用 CAT 液（含 0.1% Triton X100 的 CA 液）稀释后 10 000g 离心 15min，沉淀用 40%蔗糖溶液（CA 液配制）稀释，研磨制成悬液。将该悬液加于预先准备好的 50%、55%与 60%蔗糖梯度溶液上，80 000g 离心 3 h，收集 40%～50%界面物作电泳。

1.2　电镜观察

收集三部分沉淀物：(1)40%～50%蔗糖界面悬浮物；(2)55%～60%蔗糖界面悬浮物；(3)密度梯度离心后管底之沉淀物。将此三部分物质常规制成超薄切片作电镜观察。

1.3　SDS-PAGE

采用 5%～15%垂直板连续梯度凝胶电泳。

样品处理：将粗提的桥粒成份（即 40%～50%蔗糖界面之悬浮物）超声粉碎后电泳、染色及测蛋白质分子量。

2　结果

2.1　密度梯度离心及电镜观察结果

2.1.1　40%～50%蔗糖梯度界面物质在电镜下观察，见大量桥粒。桥粒周围为一些细纤维状物质，另外可见少量散在的电子密度较高的无定形物质（见图 1）。在 40 000～60 000 倍观察桥粒的结构，见致密斑结构清楚，厚约 15nm，致密斑与周围的张力细丝相连。桥粒间隙宽约 30～40nm。桥粒间隙的中线结构可见，电子密度较低（见图 2）。

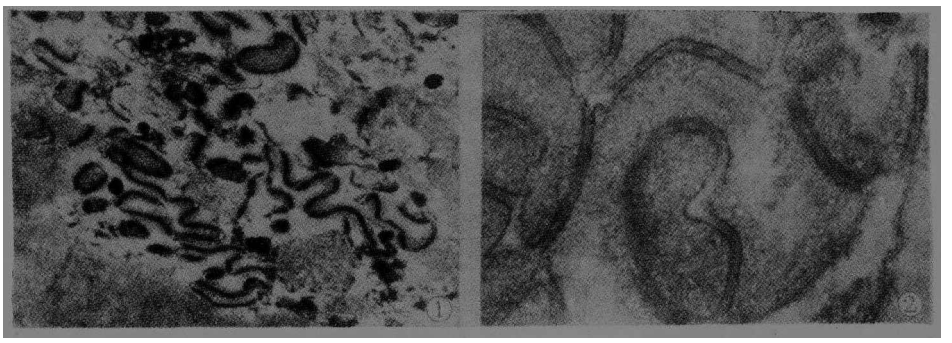


图 1　初提桥粒电镜观察结果　×10 000

Fig 1　EM result of isolated desmosomes　×10 000

图 2　提取桥粒电镜观察结果　×40 000

Fig 2　EM result of isolated desmosomes　×40 000

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.1.2 55%～60%蔗糖界面为少量细颗粒状物质悬浮，电镜下观察该部物质未见桥粒结构。

2.1.3 离心管底物仅有少许桥粒散在分布于细胞碎片中。

2.2 SDS-PAGE 结果

参考蛋白：(1)德国 Boehringer Manheim 公司产品：分子量 170kd-20.1kd。(2)上海东风生化试剂厂产品：分子量 94kd-17.5kd。

初提桥粒蛋白电泳结果可见有约 22 条带。D1：MW 约 280kd。D2：MW 约 235kd。D3 和 D4 为很细的带，MW 约 226kd 和 215kd。D5-7：三条带很均一，MW 分别约为 206kd、198kd 和 186kd。D8-10：这三条带宽，染色浅，MW 分别约为 150kd、135kd 和 118kd。D11：实际为两条相距极近的两条带，MW 约为 87kd 和 86kd。D12：MW 约 82kd。D13-17：带宽而染色深，MW 介于 67kd 至 47kd 之间。D18：MW 约 42kd。D19：MW 约 31kd。D20：MW 约 28kd。D21：MW 约 22kd。D22：MW 约 17kd。

3 讨论

3.1 上皮桥粒的提取方法及结构

我们从牛鼻表皮组织中提取桥粒，组织匀浆后作不连续密度梯度离心，采用 40%、50%、55%和 60%的蔗糖梯度，80 000g 离心 3 h，结果发现 55%～60%梯度界面物无桥粒；而在 40%～50%界面之间物质有丰富的桥粒。离心时间由 3 h 改为 1 h，结果不变。这与文献报道桥粒成分位于 55%～60%[1]蔗糖界面不同。根据我们的试验结果，我们认为用 EDTA 分离得到的表皮组织易被匀浆粉碎，可延长匀浆器刀具的使用寿命。提取桥粒时梯度离心时间可由 3 h 缩短为 1 h，蔗糖梯度只需 40%和 50%，这样既缩短了离心时间也减少了制备梯度的时间，使得提取桥粒的方法较为简便、快速且不影响结果。

电镜观察，提取的桥粒致密斑清楚而完整，但中线结构较细且电子密度较低，说明我们初步提取的桥粒结构保存较好，但提取的桥粒不够纯，除与 TF 相连外还混有少量其它杂质。

3.2 桥粒蛋白成份

用 SDS-PAGE 法分析桥粒蛋白组份，根据现有资料，可分为两类蛋白。一组为致密斑的蛋白成份，称为 Desmoplakins（桥斑蛋白，DP），一般认为有 4 种[2]。DP Ⅰ，分子量 230kd；DP Ⅱ，分子量 205kd；DP Ⅲ，86kd；DP Ⅳ，82kd。另一组蛋白为桥粒中心蛋白成份，称为 Desmogleins（桥糖蛋白，DG），该组蛋白为糖蛋白成份。DG Ⅰ，分子量 150kd，为一三体带（Triplet）；DG Ⅱa、Ⅱb，分子量 115kd、100kd；DG Ⅲ，分子量 22kd。不同作者报道的桥粒蛋白分子量之间有一定差异。如 Franke 等[3]报道的结果为 DP Ⅰ分子量 250kd，DP Ⅱ 215kd，DP Ⅲ 83kd，DP Ⅳ 75kd，DG Ⅰ 164～175kd，为一很宽的带，DG Ⅱa、Ⅱb 分别为 130kd、115kd。

我们对初提的桥粒用 SDS-PAGE 法分析，D2 分子量为 235kd，D5 分子量为 206kd，这与 Gorbsky 等报道的 DP Ⅰ、Ⅱ分子量相吻合。但与其它作者报道的结果有不同之处，在 D2 的蛋白带下面还有两条带即 D3、D4，分子量分别为 226、215kd，这与 DP Ⅰ的分子量亦很接近。在 D5 下面有 D6、D7，分子量分别为 198kd 和 186kd，而这又与 DP Ⅱ的分子量基本一致。此结果提示 DP Ⅰ和 DP Ⅱ可能均由三条多肽链组成。D11 实际由两条相距极近的带组成，分子量为 87kd、86kd，与 DP Ⅲ分子量相吻合。

D8 分子量 150kd 左右，带宽而染色浅，可能是 DG Ⅰ。D9 分子量 135kd，D10 分子量 118kd，染色浅，推测为 DG Ⅱa、Ⅱb，根据 DG Ⅰ、Ⅱ两种成份染色均淡的观象，提示我们采用的提取方法对桥粒中心有一定破坏。

D13-D17：分子量 67kd 至 47kd，这部分

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛋白已被证实是角蛋白，即是在电镜下观察到的附着在桥粒上的 TF 成份[4]。

D18、D19、D20、D21 和 D22 均为小分子量蛋白，可能为细胞质内的小分子蛋白质[5]。

以上只是我们对粗提桥粒蛋白成份用 SDS-PAGE 法初步分析后得出的初步结论，要进一步证实桥粒成份中各种蛋白质的性质，特别是要最终证实 DP Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三种成份的构成，尚需对这几种蛋白成份的氨基酸组份、等电点、肽图以及免疫学性状等多方面进行全面的分析、比较，才能最终得出比较肯定的结论。

参考文献

1. Mueller H, Franke WW. Biochemical and immunological characterization of desmoplakin Ⅰ and Ⅱ, the major polypeptides of the desmosomal plaque. J Mol Biol, 1983; 163: 647～671
2. Gorbsky G, Steinberg MS. Isolation of the intercellular glycoproteins of desmosomes. J Cell Biol, 1981; 90: 243～248
3. Franke WW, Schmid E, Grund C, et al. Antibodies to the high molecular weight polypeptides of desmosomes: specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissues. Differentiation, 1981; 20(3): 217～241
4. Cowin P, Kapprell HP, Franke WW. The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types. J Cell Biol, 1985; 101(4): 1442～1454
5. Skrrow CJ, Hunter I, Skerrow. Dissection of the bovine epidermal desmosome into cytoplasmic protein and membrane glycoprotein domains. J Cell Sci, 1987; 87: 411～432

(收稿：1992-06-24；修回：1993-04-20)

Isolation of epidermal desmosomes and preliminary analysis of desmosomal proteins

Diao Qingchun, Liu Rongqing, Ye Qingyi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Desmosomes with well-preserved architecture were isloated from the epidermis of bovine muzzle. The thickness of the dense plaque was about 15 nm and the width of desmosomal interspace 30～40 nm. The midline in the desmosomal interspace was shown as a moderately electrondense material.

The component proteins of the desmosomes were analyzed with SDS-PAGE. It was found that both DP Ⅰ and DP Ⅱ consisted of 3 polypeptides and the molecular weight of DP Ⅰ a, b and c was 235 kd, 226 kd and 215kd and that of DP Ⅱ a, b and c was 206 kd, 198 kd and 186 kd respectively; and DP Ⅲ was composed of 2 polypeptides and the molecular weight of DP Ⅲ a and b was 87 kd and 86 kd. The above mentioned data were different from those of other reports, while the data of the other component proteins were similar to those of others. The molecular weight of DG Ⅰ was 150 kd, that of DG Ⅱ a and b was 135 kd and 118 kd, that of DG Ⅲ was probably 22 kd, and that of DP Ⅳ was 82 kd.

According to our findings, it is concluded that both DP Ⅰ and DP Ⅱ consist of 3 polypeptides and DP Ⅲ of 2 polypepties.

Key words desmosomes; proteins; electrophoresis

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net