DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.01.014

骨骼肌、心肌细胞核的制备

茆象千 石成德 王仁鹏* 董燕麟（生化教研室）

真核细胞遗传信息贮存在细胞核中，欲研究基因调控机理，首先必须分离出纯度好、产率高的细胞核。由于肌肉组织内肌纤维之间连接比较牢固，过度匀浆，常同时破坏细胞核，加之细胞核不稳定[1]，要从中制得理想的细胞核是较困难的。我们实验室由于研究大鼠骨骼肌和心肌细胞核体外转录活性的需要，改进了Kuehl[2]制备骨骼肌细胞核的方法，采用内切式组织匀浆器和玻璃匀浆器两步匀浆法，结果发现制得的细胞核不仅产率高，纯度好，而且通过光镜、电镜和酶学方法检查，形态完整、功能正常。

材料和方法

一、材料

体重150～200g大鼠，实验前饥饿16h，断头放血取材。心肌去心内、外膜得心肌层，而骨骼肌除去肌肉外面的结缔组织成份。

四种核苷三磷酸盐，上海东风试剂厂产品。[^{3}H]-UTP，20 Ci/mmol，上海原子核研究所产品。

MSE-75型超速离心机。LKB1217型液体闪烁计数器。SP8-100型紫外分光光度计。ZS83-1型内切式组织匀浆器。日本H-300型电镜。

二、细胞核的制备

参照Kuehl方法，改进匀浆方法。所用试剂：A液（0.25mol/L蔗糖、1%小牛血清、5mmol/L $MgCl_2$）；B液（0.25mol/L蔗糖、0.5% Triton X-100、1mmol/L $MgCl_2$）；C液（2.3mol/L蔗糖、1%小牛血清、5mmol/L $MgCl_2$）；D液（2.4mol/L蔗糖、1%小牛血清、5mmol/L $MgCl_2$）。具体过程见图1。全部操作均在0 ℃～4 ℃进行。

三、细胞核光镜观察

已制备的骨骼肌及心肌细胞核悬液，用甲醇、冰醋酸(3:1)固定液固定30min，制片后用Giemsa氏液染色，结果见图2、4。

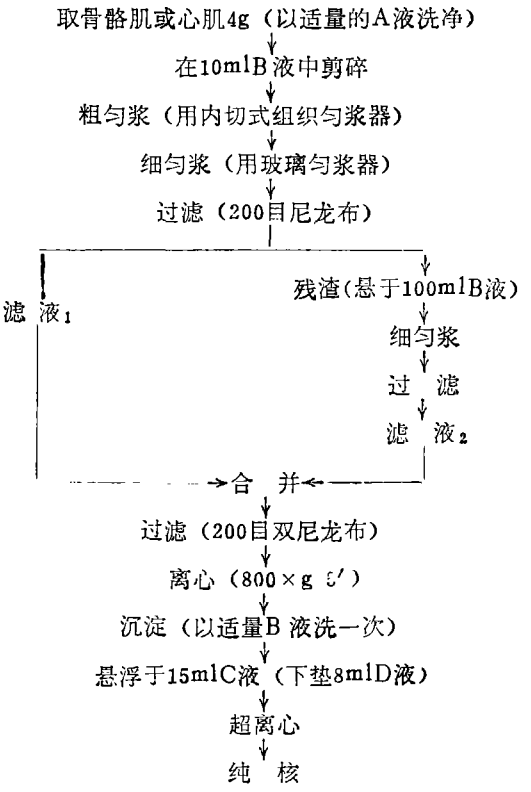


图1 骨骼肌、心肌细胞核的制备

四、细胞核电镜检查

细胞核先用戊二醛、锇酸二重固定，经丙酮系列脱水和618环氧树脂包埋，用LKB-V型切片机作超薄切片，以醋酸铀柠檬酸铅双重染色，在日立H-300型电镜下观察，结果见图3、5。

五、肌匀浆和细胞核DNA含量测定

基本参照Kuehl方法[3]进行。样品用10%三氯醋酸沉淀DNA，5%三氯醋酸洗一次，在5%三氯

* 组胚教研室

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

醋酸中加热90℃水解15min，离心得上清，用二苯胺反应显色，测定600nm波长光吸收，由标准曲线读出DNA含量。

六、细胞核转录活性的测定

参照Marzlnff等[4]法进行。在100μl总反应体系中含细胞核悬液50μl，各组份的最终浓度为25 mmol/L pH8.0 Tris-HCl缓冲液；25 mmol/L α-巯基乙醇；0.05mmol/L EDTA；ATP、GTP、CTP均为1mmol/L；UTP为0.2 mmol/L；[^{3}H]-UTP为2μCi。反应体系于30℃保温30min，加2 ml冰冷10%TCA—20mmol/L焦磷酸钠液终止反应，并沉淀生成RNA。于玻璃纤维滤膜上相继用10% TCA，5%TCA和75%乙醇各冲洗三次，滤膜置80℃烘干30min，于二甲苯闪烁液中计数。

结果和讨论

利用本法制备了大鼠骨骼肌细胞纯核，表1为纯化过程中不同步骤的DNA含量与细胞核产率。从肌肉匀浆中DNA含量为100%计算，本法得纯核为23.6%（n=3）。Edelman等法的产率为0.6%，Kuehl法报告产率为9.3%，本法的产率明显高于前两种方法的结果。表2为大鼠心肌细胞核制备中各步DNA含量与细胞核产率。用本法得纯核为心肌匀浆的16.8%。

表1 骨骼肌细胞核纯化不同步骤DNA含量和产率

纯化步骤	DNA含量(mg)（4 g骨骼肌）	细胞核产率（%）
匀浆	1.06	100
滤液	0.53	50
粗核	0.29	28
纯核	0.25	23.6

三次制备的平均值

表2 心肌细胞核纯化不同步骤DNA含量和产率

纯化步骤	DNA含量(mg)（4 g心肌）	细胞核产率（%）
匀浆	2.58	100
滤液	1.35	52.4
粗核	0.65	52.3
纯核	0.43	16.8

三次制备的平均值

从表1、2可以看出，DNA丢失最多的是发生在过滤步骤，丢失DNA总量的50%左右。而Kuehl在纯化骨骼肌细胞核时此步丢失DNA为76%，本法为50%，这是提高细胞核产率最关键的一步。这主要取决于匀浆方式、程度和条件。剪碎肌组织直接使用玻璃匀浆器，一般细胞核分离介质进行匀浆，肌纤维不易破碎，细胞核不能充分释放，产率很低。为此，往往必须延长匀浆时间或加大匀浆器转速，但这样又常常伴随有大量细胞核的损伤和破坏，不仅不能提高细胞核的产率，而又直接影响细胞核的纯度[3]。

本法一方面采用Kuehl法的优点，在分离介质中加入0.5% TritonX-100和1%小牛血清有利于细胞核的释放及增强细胞核的稳定性。另一方面，改进了匀浆方式，采用内切式组织匀浆器和玻璃匀浆器两步匀浆法，前者能促使不易破碎的肌组织迅速切碎成小段肌细胞碎片，不易损坏细胞核，后者只要在温和的条件下就能使足够量的细胞核从切碎的肌纤维中释放。这一改进既克服了玻璃匀浆器匀浆不易操作的困难，又避免了过度剧烈匀浆条件而损伤和破坏细胞核。实验结果表明，这样做不仅提高了产率，而且制得的骨骼肌和心肌细胞核形态完整，纯净度也较好（图2、3、4、5）。

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

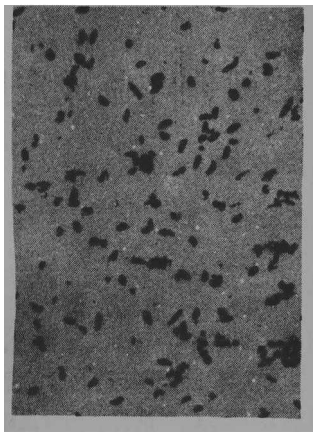


图 2　骨骼肌细胞核×66



图 3　骨骼肌细胞核×5000
（箭头指向是核膜）

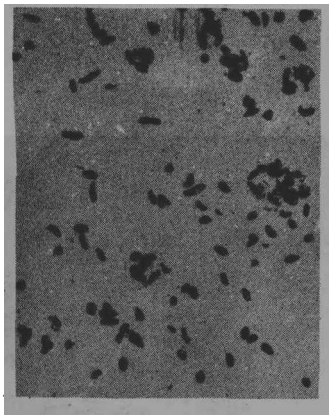


图 4　心肌细胞核×66



图 5　心肌细胞核×5000
（箭头指向是核膜）

表 3　骨骼肌和心肌细胞核体外转录活性

核的来源	^{3}H-UTP掺入 (cpm/mgDNA)	
	$-(NH_4)_2SO_4$	$+(NH_4)_2SO_4$
骨骼肌	39000	55000
心　肌	32000	50000

为进一步观察制得的细胞核的生物学功能，我们将骨骼肌和心肌细胞核同时进行体外转录。从表 3 结果表明，制得的两种细胞核均能使[^{3}H]-UTP掺入到 RNA 的合成，当加入200mmol/L $(NH_4)_2SO_4$时，对RNA聚合酶起到明显的激活作用，提示细胞核功能良好，基本满足研究工作的需要。

参 考 文 献

1. Edelman JC, et al. Isolation of skeletal muscle nuclei. J Cell Biol 1965; 27:365
2. Kuehl L. Isolation of skeletal nuclei methods in cell. Biol 1977; 15:79
3. Kuehl L. Isolation of skeletal nuclei. Experimental Cell Research 1975; 91:441
4 Maryluff WF, et al. Transcription ribonucleic acid in isolated myeloma nuclei. Biochem 1973; 12:3440

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