

猪脾可提取性核抗原的制备*

静天玉 刘建荣 王建平 赵晓瑜

(河北大学生物工程研究所, 保定)

可提取性核抗原 (Extractable nuclear antigens, ENA) 是哺乳动物细胞核的生理盐水抽提物。它包括多种核抗原成分。其中仅少数几种被鉴定, 如 Sm、RNP、La(SS-B) 和 Ro(SS-A) 等。临床抗 ENA 抗体的测定对某些风湿病的鉴别、诊断和治疗有重要作用。国外 ENA 可从商品化的鼠肝或兔胸腺丙酮干粉抽提, 对于临床广泛应用很不方便; 国内 ENA 多从小牛胸腺甚至人脾制备, 原料有限、价格昂贵、制备工艺复杂, 更不利于临床推广。为了扩大原料来源和实现 ENA 的商品化, 本文介绍以廉价、易得的猪脾(俗称沙肝)为原料, 通过几个关键性步骤, 获得了高度纯化的细胞核, 并从其中提取出不被细胞质、组蛋白和 DNA 污染的可提取性核抗原制品。经鉴定证明, 该 ENA 制品含 Sm、RNP、La(SS-B) 和 Ro(SS-A) 抗原。不经处理或稍加稀释即可用于临床抗 ENA 抗体的测定。

一、方 法

1. 猪脾细胞核的制备

细胞核制备主要根据 MacGillivray 等^[1]所用方法, 该法是为了研究染色质而设计的。由于猪脾的特殊性, 我们对它做了些必要的补充和变动。本实验大部分操作在 4℃ 下进行。

取新鲜猪脾去脂肪并剪成小块, 经组织压榨器(本所设计)处理。压出物按适当比例与甲液(0.25M 蔗糖, 4mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 7.4)混合。四层纱布过滤, 滤液经低速离心(1100g, 10 分钟)得粗核沉淀。上清与滤渣充分混合后再次过滤。滤液经低速离心, 上清与二次滤渣混合。混合物用组织捣碎机(Blender)

低速匀浆并做同样过滤、离心处理。合并四批粗核沉淀, 按 1:3 体积比与乙液(2.2M 蔗糖, 4mM CaCl₂)混合, 高速离心(4700g, 10 分钟)。沉淀为纯化细胞核。按同样比例与丙液(0.25M 蔗糖, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)混合, 低速离心。沉淀再经甲液处理, 即获得高度纯化细胞核。

2. 猪脾 ENA 的提取

将猪脾细胞核按重量/体积比 1:3 悬浮于 PBS (0.15M NaCl, 10 mM Sodium phosphate, pH 7.2) 溶液中, 超声波处理至核全部破裂。冰浴搅拌 30 分钟, 离心(11500g, 20 分钟)得上清。沉淀如上法重复抽提 1—2 次。合并上清, 搅拌下缓慢加入固体硫酸铵至 30% 饱和度, 静置 1 小时后离心(5000g, 15 分钟)。上清加固体硫酸铵至 60% 饱和度, 置 4℃ 冰箱内过夜。离心得沉淀。加入适量 PBS 至沉淀全溶。对 PBS 透析除硫酸铵, 16700g 离心 40 分钟。离心上清为猪脾 ENA。将 ENA 稀释成所需浓度, 测抗原特异性并过滤除菌, 得猪脾 ENA 制品。

3. 分析方法

用考马斯亮蓝法^[2]测定蛋白质含量; 按 Blobel 和 Poffer 法^[3]测定 DNA 和 RNA 的含量并以 DNA 含量为基础计算细胞核收率; 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳采用 Laemmli 系统^[4], 并用本所制作的微型凝胶电泳装置进行^[5], 最后用岛津生产的 CS-930 型双波长薄层扫描仪进行扫描; 猪脾 ENA 制品的抗原特异性用我室改进的对流免疫电泳技术(对流免疫扩散电泳)测定。

* 本研究已通过省级鉴定, 编号: 冀科卫字(86)001。

二、结果与讨论

猪脾含大量结缔组织和血细胞,影响细胞核的制备收率和纯度。为此,根据 Busch^[6] 设

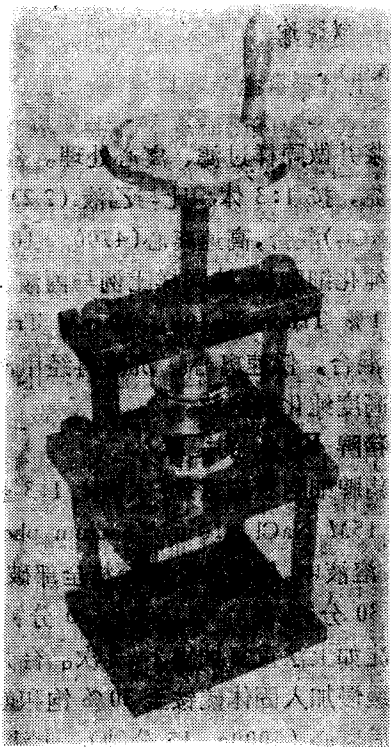


图1 组织压榨器(本所设计)

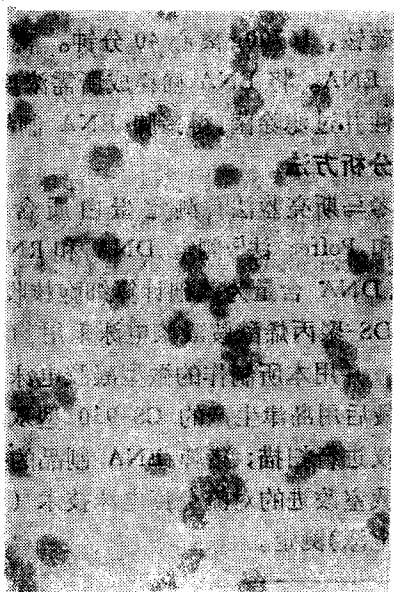


图2 高度纯化的猪脾细胞核(羟亚甲基蓝染色)

计了组织压榨器(图1)。经压榨器处理,可以除去猪脾所含的全部结缔组织,同时导致相当一部分细胞破裂,使细胞核游离出来。压出物约占脾脏(去脂肪)总重量的70%。在光学显微镜下观察,粗核沉淀含大量红细胞和细胞碎片。与乙液混合并高速离心可除去大部分红细胞并使细胞核得到明显纯化,但细胞核沉淀仍显红色,说明被红细胞或血红蛋白严重污染。丙液处理可以彻底破坏红细胞并除去核膜吸附的血红蛋白,细胞核颜色由红变白。这表明细胞核得到了高度纯化。这一效果是因为丙液选择性地除去核外膜,从而使与其相连的内质网和其它非核物质与细胞核脱离。图2为丙液处理的细胞核在光学显微镜下的形态。经上述方法制备,细胞核收率为54%。

按上述方法所提取的猪脾 ENA 为无色或淡黄色半透明溶液,260nm 和 280nm 处的紫外吸收比(OD_{260}/OD_{280})约为1.30。透析可能使染色质发生沉淀,因为蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳分析显示,沉淀物中组蛋白(H_2 、 H_3 和 H_4)是主要蛋白质成分(图3)。图4为猪脾 ENA 制品蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图

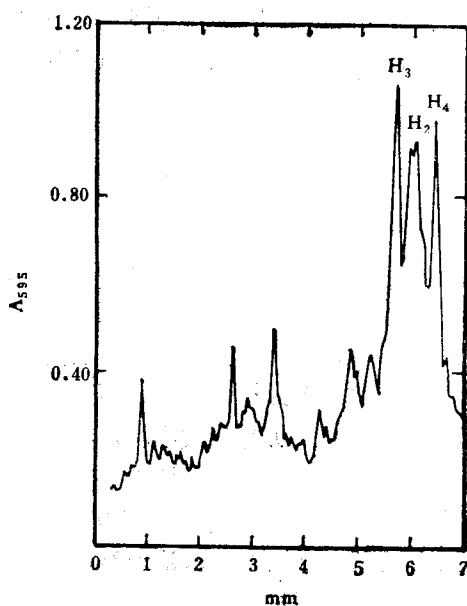


图3 透析沉淀蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱
浓缩胶4%,分离胶15%,考马斯亮蓝G-250染色,
扫描波长: $\lambda_1 = 595$, $\lambda_2 = 450$ 。

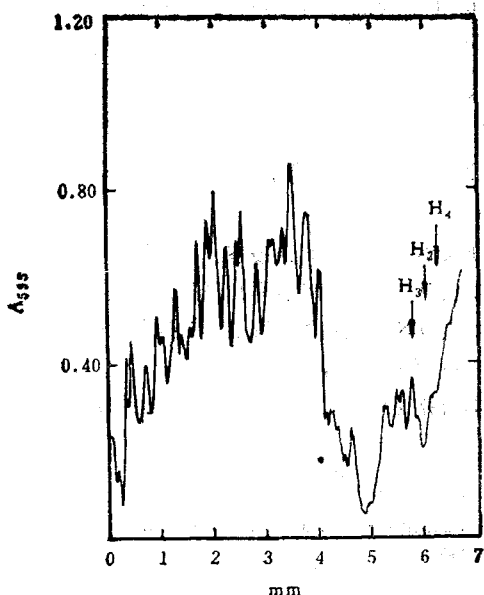


图4 猪脾 ENA 制品蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱

电泳条件与图3相同。箭头表示组蛋白区带的位置。

谱。显然该 ENA 制品由多种蛋白质成分组成,但不含组蛋白。因为图中显示多种蛋白区带,而 H_2 、 H_3 和 H_4 等三条区带消失了。化学分析表明,该制品不含 DNA,它可能是在透析过程中随组蛋白一起以染色质的形式被沉淀析出的。利用标准抗 ENA 抗体阳性血清进行对流免疫扩散电泳证明,该 ENA 制品含 Sm RNP La(SS-B) 和 Ro(SS-A) 等四种抗原。如图5所示,每种抗原与相应抗体形成一条特异性沉淀线。相同抗原-抗体系统形成的沉淀线彼此融合;不同抗原-抗体系统形成的沉淀线相互交叉。由于 Sm 和 RNP 抗原具部分免疫学同一性,故形成支线(spur)。猪脾 Sm、RNP 抗原所形成的沉淀线与兔胸腺相应抗原形成的沉淀线完全融合;猪脾 Ro(SS-A)、La(SS-B) 抗原形成的沉淀线与人脾相应抗原形成的沉淀线完全融合。所以猪脾 Sm、RNP 抗原与兔胸腺的 Sm、RNP 抗原具免疫学同一性;猪脾 Ro(SS-A) 和 La(SS-B) 抗原与人脾的相应抗原具免疫学同一性。(图6)

猪脾 ENA 制品在普通冰箱内存放两个月以上,在低温冰箱中(-30°C)存放六个月以上,

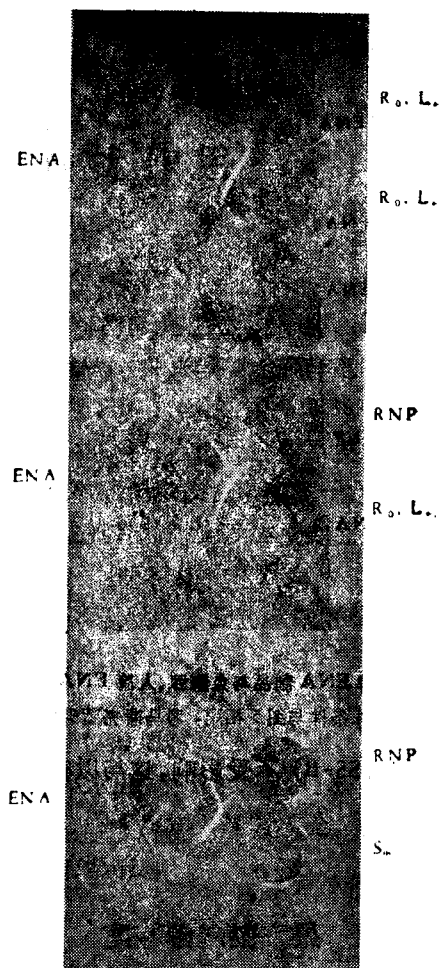


图5 猪脾 ENA 制品与抗 ENA 抗体阳性血清对流免疫扩散电泳

电泳在1%琼脂糖板上进行。阴极端样品孔加 $20\mu\text{L}$ ENA 制品(蛋白质含量 5mg/ml);阳极端样品孔加 $20\mu\text{L}$ 血清,电流 0.25mA/cm ,电泳3小时,用5%柠檬酸钠溶液洗后观察结果。

抗原特异性未发现明显变化。除 La(SS-B) 外,用乙醇沉淀将猪脾 ENA 制成干粉,然后溶于与原 ENA 等体积的 PBS 中,抗原特异性基本保持原来水平。反复融冻20次,不会引起抗原失活。但 37°C 保温过夜,ENA 溶液出现沉淀。离心上清液中除 Ro(SS-A) 外,RNP 和 La(SS-B) 完全失活,Sm 绝大部分变性。这表明本 ENA 制品含少量核酸酶和蛋白酶,应注意低温存放。以上四种抗原中,Ro(SS-A) 稳定性最好,La(SS-B) 稳定性最差。 56°C 加热一小时可使 RNP 和 La(SS-B) 完全失活,但

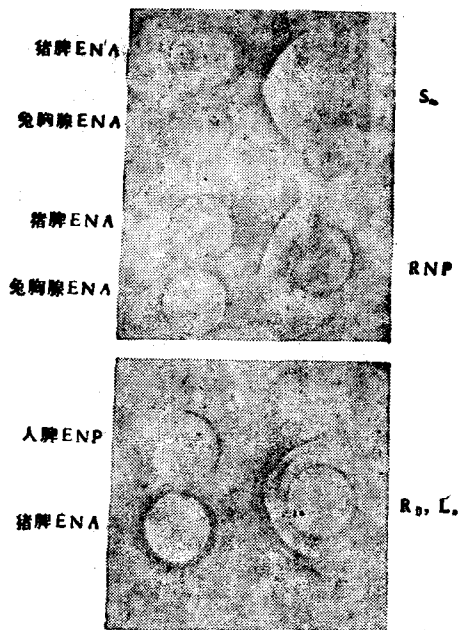


图6 猪脾ENA制品与兔胸腺、人脾ENA参比电泳
电泳条件与图5相同,考马斯亮蓝染色。

Sm 和 Ro(SS-B) 不受影响,这与以往的报道一致。

以上结果表明,猪脾 ENA 完全可以代替兔、小牛胸腺和人脾 ENA 进行临床抗 Sm、RNP、La(SS-B) 和 Ro(SS-A) 等自身抗体的测定。特别是猪脾来源广泛,价格低廉,易于实现 ENA 的商品生产。

北京协和医院内科免疫室、北京医科大学第一附属医院皮肤科实验室、解放军总医院风湿病研究室等单位曾对该 ENA 制品做了鉴定并提供抗 La(SS-B)、Ro(SS-A) 阳性血清,特此致谢。

本研究得到河北省科学技术委员会资助。

参 考 文 献

- [1] MacGillivray, A. J. et al.: *The Cell Nucleus*, 6, 263, 1978.
- [2] Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248, 1976.
- [3] Blobel, G. et al.: *J. Mol. Biol.*, 28, 539, 1967.
- [4] Laemmli, U. K.: *Nature (London)*, 227, 680, 1970.
- [5] 静天玉等:《生物化学与生物物理进展》, 4, 75, 1985.
- [6] Busch, H. et al.: *Methods in Cell Biology*, 16, 1, 1977.

[本文于 1986 年 3 月 10 日收到]

(上接第 71 页)

子器件功能的新蛋白质分子,作为制造生物芯片的材料。这一设想如能实现,将会制造出具有划时代意义的生物芯片,就可将硅芯片尺寸缩小到一个分子大小,还可能开发现有硅芯片所没有的新功能。这不仅对像人脑那样能进行分析和学习的生物计算机(bioco-

mputer)的研制,而且对人造细胞膜和人造器官的研究也将开辟新的途径。

[*Science & Technology in Japan*, Vol. 5, No. 17, 22-24, No. 19, 32-40, 1986.

[生物物理所 李 晔 编译]