

# 类固醇激素受体分析的样品制备

## ——胞液和细胞核的分离及纯化

邹 继 超

(中国科学院动物研究所内分泌室)

在激素——受体相互作用，激素及其受体复合物在细胞内的动态变化，受体分子的物理化学特性分析以及某些与激素或受体有关的疾病诊断和治疗等很多方面的研究中，受体的分析和测定技术的应用已日益广泛，并要求操作

过程和方法的标准化和常规化。但由于在分析中所用的激素和材料来源不同，操作过程，仪器设备等在不同实验室中也有所区别，因此，往往会影影响结果的一致性。在上述因素中，除了一些客观因素外(如仪器设备，材料来源)，在实验

设计,操作步骤,有关参数的测定,结果的计算等方面,是有可能经过改进,从而尽力避免或减少它们对分析结果的影响的。本文仅就类固醇激素受体分析中较重要的步骤——样品制备,包括胞液和细胞核的分离和纯化予以介绍和讨论。

**(一) 受体在细胞内动态变化的特点** 要确定和选择受体分析的步骤和方法,首先应对激素及其受体复合物在靶细胞内的作用方式和特点有所了解。以雌二醇为例,它在哺乳动物的靶器官(如子宫)中有促进子宫生长的作用,当这种激素经血循环进入子宫细胞时,即与细胞质内的特异受体相结合,然后移位进入细胞核,在核内有一段滞留时间,与核的染色质结合部位结合,行使雌激素的功能,如核酸和蛋白质的合成,其中包括受体本身的合成,从而使细胞质中的受体得到新的补充。激素及其受体复合物在细胞内的移位,滞留和补充的一系列动态变化是有一定时间过程的,并与激素的生物学效应有密切关系(见图1)。图1表明受体动态变化的过程及在细胞质(从胞液中测得)和细胞核的分布情况。

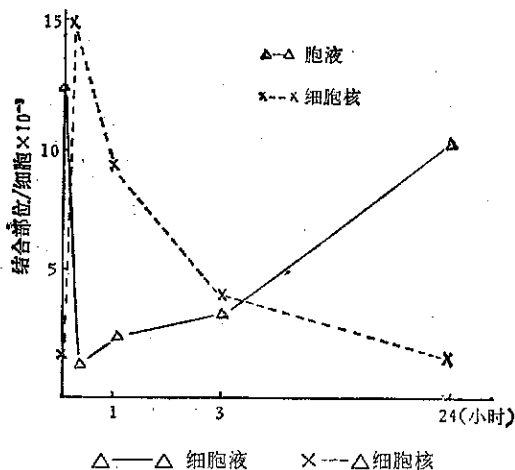


图1 大鼠子宫一次给予雌二醇后胞液和细胞核受体的变化

从受体在细胞内的变化特点来看,在分析受体时,应注意样品来源的不同生理状况(如周期性,激素水平等),还要区分不同的亚细胞组分,因为细胞质和细胞核内受体的浓度有时都处于较低水平,但有时却高、低相差很多,所以

在样品制备过程中应尽可能使亚细胞组分得到充分的分离,减少相互污染,否则,影响受体分析结果的真实性和准确性。除了细胞质的可溶部分(胞液)和细胞核以外,其它亚细胞组分也会有受体结合部位,例如微粒体,在一定的条件下,也可以测到与激素的结合部位(见图2)。图2表明给猪子宫内注射雌二醇不同时间后微粒体受体的分析结果。从图1和图2以及上述说明中,可看出激素及其受体在靶细胞内动态变化是有其特点的,同时也表明分离以至纯化亚细胞组分的重要性。

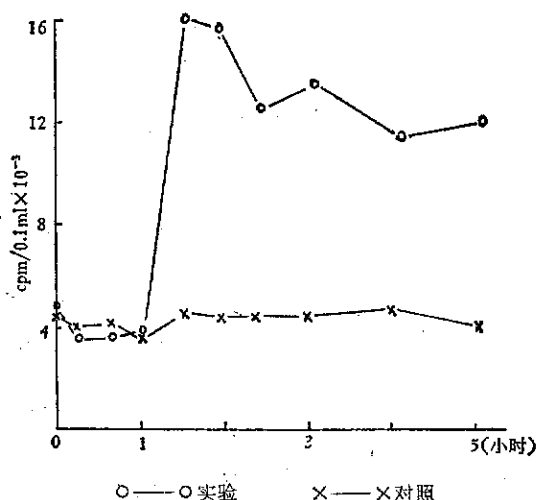


图2 猪子宫一次给予雌二醇后微粒体受体含量的变化

## (二) 细胞分离和制备的方法

1. 组织的取材和保存 通常采用新鲜组织,剥去附着的脂肪或系膜,并用冷生理盐水或缓冲液洗净,即可用于制备。如果需用冷冻组织,最好保存于液氮中,或低温冰箱中备用。

2. 匀浆 常用的匀浆缓冲液为 Tris-HCl 缓冲液[10 毫克分子浓度(mM)],其中含有 1.5 毫克分子 EDTA, pH7.4;有时其中加入 10% 甘油;5 毫克分子叠氮钠,或二硫苏糖醇(DTT);还可以把 Tris-盐酸换成 10 毫克分子浓度的磷酸缓冲液。

匀浆器常用的是全玻璃电动(或手动)匀浆器,并且要始终使匀浆在冰浴中进行。在电动匀浆器中,小型快速捣碎器(Ultraturax)也得到较多的应用。匀浆液中常有未碎的组织,在离

心之前,最好能经过滤步骤。通常可经数层纱布,或不同孔径的尼龙网。特别是在制备核或纯核时,过滤步骤是必要的。

3. 离心 如同时需分析细胞质和细胞核受体,匀浆液应先经一次低速离心 ( $600 \times g$ , 10 分钟),将上清和沉淀继续分别操作。上清中含有细胞质的可溶部分,即胞液,还有线粒体,溶酶体和微粒体等。沉淀部分包括细胞核(完整的和破的),膜碎片等。

4. 胞液的制备 如在实验中只需要胞液,可将匀浆液一次超速离心(通常为  $105000 \times g$ , 或  $200000 \times g$ ),30—60 分钟,得上清即胞液;如需胞液和细胞核,则将低速离心后的上清液再经超速离心,得到的上清为胞液。有时由于设备条件关系,也可以用  $40000-50000 \times g$  离心的上清。

5. 细胞核的制备 根据不同的实验要求和设备条件,在分析核受体时可制备粗核或较纯的核。

(1) 粗核 通常认为粗核是未经仔细分离以去除在低速离心过程中与核一起沉淀的其它细胞器的部分。在不少实验中,粗核即可满足要求,因此,应用较为普遍。操作过程是将低速离心所得的沉淀,用制备匀浆时的缓冲液,经过至少二次洗涤,目的是洗去粘附在沉淀上的细胞质(低速上清)成分。每次洗的时候都要将沉淀搅散,使成均匀的悬浮液,低速离心后的沉淀即可用于受体分析

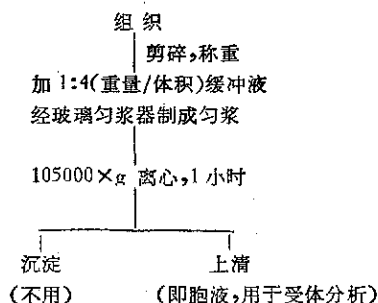
(2) 纯核 细胞核比细胞中的其它成分重,在不同浓度的蔗糖溶液中沉降,所需的离心力不同,利用这种原理,可以将核与其它成分分开。例如在 2.2 克分子浓度的蔗糖溶液中,细胞核沉降需  $50000 \times g$  的离心力,而在这种条件下,细胞的其它成分不沉淀。还可以将匀浆液或粗核悬浮液在不同的蔗糖浓度梯度上低速离心,从而得到比较干净的核。核膜与内质网相连,也属于细胞质,所以纯的核应去除核膜,通常在悬浮液中加入曲拉通 (Triton X-100) 即可。

下面以图解方式分别叙述几种方法(操作

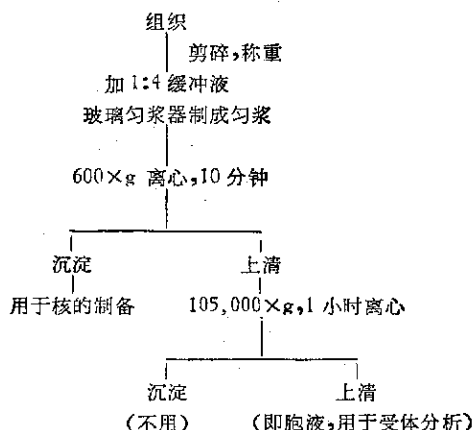
均在  $0-4^{\circ}\text{C}$ ):

## 1. 胞液的分离

### (1) 只需制备胞液

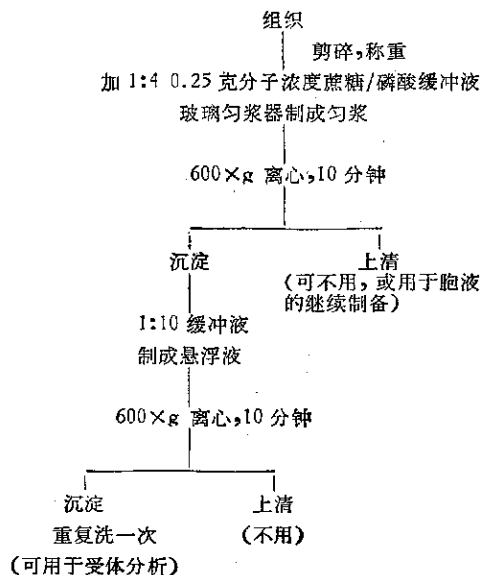


### (2) 同时需制备胞液和细胞核

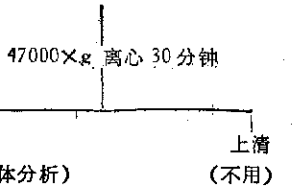
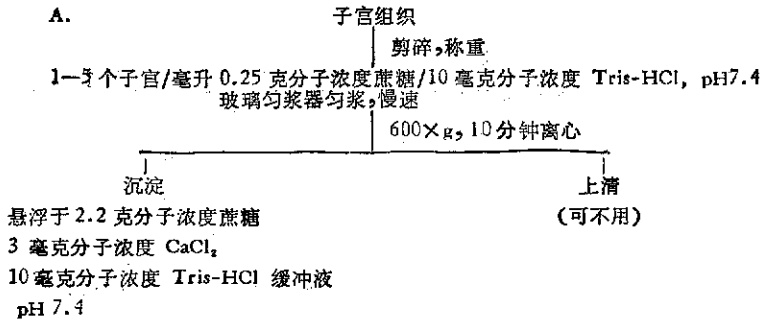


## 2. 细胞核的制备

### (1) 粗核

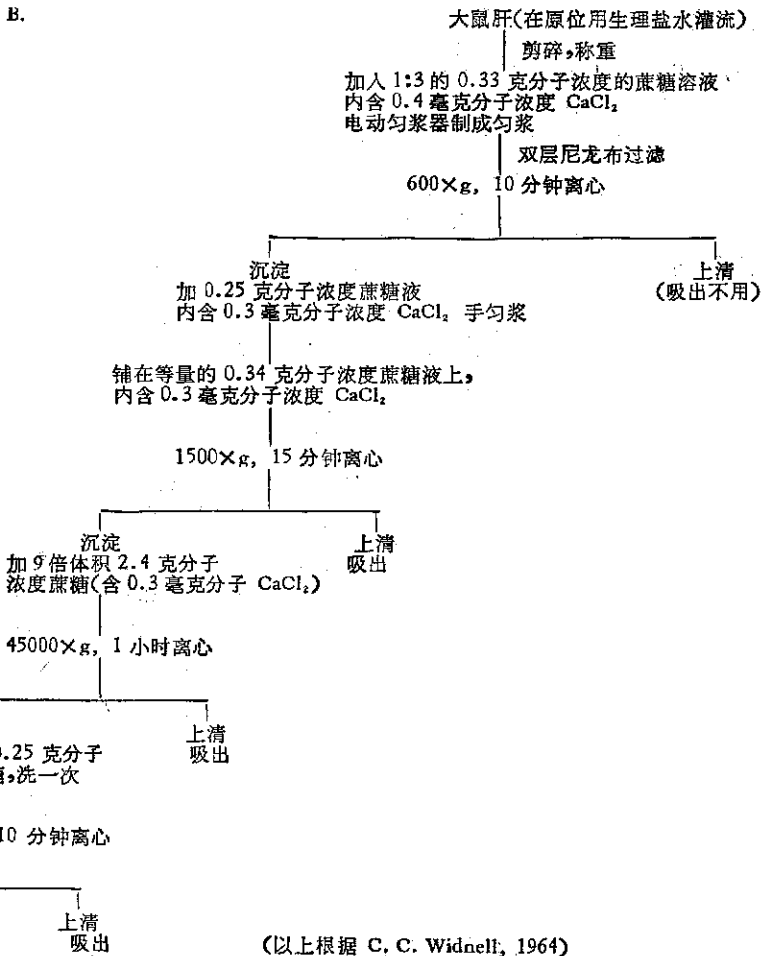


(2) 纯核

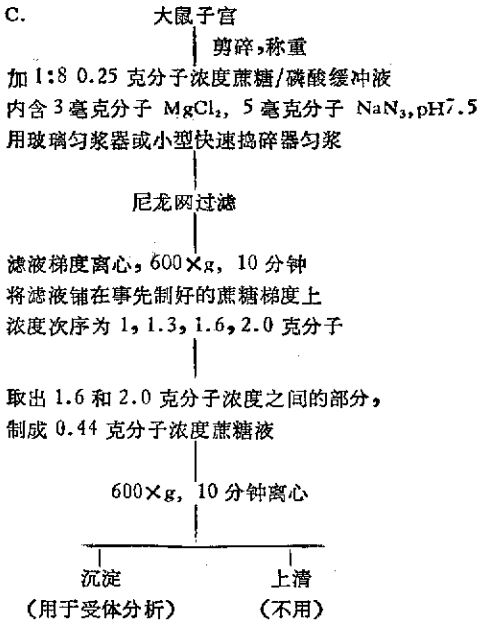


上述核沉淀中, 经相差显微镜检查, 核完整, 干净; 用电镜检查, 有少量胶元纤维污染, 无其它胞质污染, 但由于匀浆为慢速, 细胞破碎不

完全, 特异结合部位可能有损失。(以上根据 D. Williamms 和 J. Gorski, 1975)



(以上根据 C. C. Widnell, 1964)



(以上根据 K.Chwalisz, J.C. Zou 和 P. W. Jungblut 1983)

上述几种方法, 根据实验的不同要求, 样品的多少和已具备的仪器设备条件, 可选择采用。值得提出的是子宫、心肌等不容易匀浆的样品, 最好经不同孔径(10 微米—300 微米)的尼龙网过滤; 为了使核和膜碎片等细胞质污染物分开, 最好经不同浓度蔗糖梯度离心; 在有的实验中, 如去除核膜可有助于分析受体结合部位的亚细胞分布。

二价离子加入缓冲介质中是必要的, 例如钙离子, 可防止核碎片的聚集, 减少核的脆性, 镁离子有与钙相同的作用。但钙、镁离子浓度不能过高, 因为在匀浆过程蛋白会与钙结合。离子浓度对沉降过程有影响, 会增加细胞质成分对细胞核的污染。目前, 用二价镁离子似已代替了钙离子。

对细胞核部分的评定, 通常以 DNA 含量为基础, 形态学检查则经光学(相差)显微镜和

(上接第 51 页)

板突起与肛足前股节的隅棘等特征与赤蜈蚣区别。

我们根据察隅的标本(共 17 条), 指出马氏蜈蚣具有如下的主要特征, 有别于蜈蚣属的其他种类: (1)头板具有 1 条纵沟线; (2)肛节背

电子显微镜。

在进行受体分析时选用何种方法, 往往需要经过试验。本文图 1 所示是作者按粗核制备方法所得的结果, 在另外实验中, 曾用粗核与纯核方法对结果比较, 发现对分析数据无影响。但应用抗雌激素(如羟泰米芬)后, 则看到了粗核, 纯核(包括去除或未去除核膜的样品)的受体结合部位是不相同的, 可能有一部分抗雌激素结合在核膜上。

当有足够量的样品时(至少在 5 克以上), 可以制备纯核, 但如样品量过少(如肿瘤组织等), 就只能做粗核或使粗核悬浮液在 2.2 克分子浓度蔗糖中高速离心, 然后将沉淀用于受体分析。

## 参 考 文 献

- 邹继超 1983 类固醇激素受体分析的方法和应。中华核医学杂志 3(1): 21—23
- 抗雌激素与雌激素受体相互作用的研究。中华核医学杂志 3(1): 23—26
- Chwalisz K. et al. 1983 A nonsurgical technique for the transcervical administration of physiological and pharmacological agents into rat uteri. Acta Endocrinologica 103; 131—137.
- Jungblut, P. W. et al. 1976 Activation of transcription-regulating proteins by steroids. J. Steroid Biochem. 7: 1109—1116.
- 1976 Mechanisms involved in the regulation of steroid receptor levels. J. Steroid Biochem. 11: 273—278.
- Jungblut, B. J. et al. 1978 Sequential extraction of various forms of estradiol receptor. Acta Endocrinologica Suppl. 215, 87, 137.
- Widnell, C. C. 1964 A procedure for the isolation of enzymically active rat-liver nuclei. J. Biochem. 93: 313—317.
- Williams, D. et al. 1975 Techniques for monitoring the distribution of the estradiol-binding protein complex between cytoplasm and nucleus of intact cells. Methods in Enzymology 36: 275—283.

板无纵沟线; (3)肛足股节及胫节无雌雄有别的两性型; (4)雄性前生殖节胸板无生殖肢。

据格雷夫里记述, 产于罗龙的此种标本的肛足前股节背面内侧缘具有 2 棘, 但是我们发现察隅的标本, 仅有 1 棘; 这或是种群(population)之间的差异。