



SHR大鼠前额叶、纹状体突触体的提取方法

周荣易, 韩新民, 王娇娇, 孙继超

(南京中医药大学, 江苏 210023)

【摘要】 目的 介绍 SHR 大鼠前额叶、纹状体突触体的提取方法。方法 采用 Percoll 密度梯度离心法制备突触体, 透射电镜观察其形态和结构完整性。结果 本实验所获取的突触体形态上呈连续膜封闭的椭圆结构, 周围有完整的膜包围; 突触前成分可见一个或多个线粒体和大量突触小囊泡; 突触间隙清晰可见, 且突触后部分特征性的致密部结构完整, 形态清晰, 密度较高。突触体突触前膜、突触间隙、突触后膜保存完好, 突触体分布密度较高, 具有典型的突触体形态结构特征。结论 本实验提供了一种耗时少, 产出率高, 结构完整、形态典型且可运用于精细化研究的突触体制备新技术, 补充了传统技术的不足, 为神经系统疾病的研究提供技术支持。

【关键词】 Percoll; 密度梯度离心法; SHR 大鼠; 前额叶、纹状体; 制备

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0059-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.012

An optimized extraction protocol of prefrontal cortical and striatal synaptosomes from SHR rat

ZHOU Rong-yi, HAN Xin-min, WANG Jiao-jiao, SUN Ji-chao,
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

【Abstract】 Objective To introduce an improved extraction method of prefrontal cortical and striatal synaptosomes from SHR rat. **Methods** Synaptosomes were prepared from SHR rat brain tissue by Percoll density gradient centrifugation. Transmission electron microscopy was used to assess the morphology and structural integrity of the synaptosomes. **Results** The obtained synaptosomes showed oval structures surrounded by an intact membrane. Presynaptic components contained one or more mitochondria and a large number of synaptic vesicles. The synaptic clefts were clearly visible, and prominent part of the characteristic compact structure was clear, complete and with higher electron-density. The synaptosome presynaptic membrane, synaptic cleft, and postsynaptic membrane were well preserved, and the synaptosomes were densely distributed, showing typical morphological characteristics of synaptosomes. **Conclusions** The results of our study improved the traditional preparation method and provide a less time-consuming, highly productive protocol for preparation of structurally typical and intact synaptosomes, suitable for further research on neuroscience and neurological diseases.

【Key words】 Synaptosome; Percoll; Density gradient centrifugation; SHR mice; prefrontal cortex; Striatum

突触, 是神经细胞之间在结构上互相连接、功能上密切联系的部位, 是神经化学信息传递的必经之处, 脑部功能探讨和疾病防治都与其息息相关^[1]。正因如此, 突触已受到多学科的重视和研

[基金项目] 国家自然科学基金(81273801)安神定志灵调控 ADHD 多巴胺 D1/D2 受体信号通路及脱敏/复敏的机制研究。

[作者简介] 周荣易(1990-), 男, 南京中医药大学中医儿科学博士研究生, 研究方向: 小儿精神神经系统疾病。E-mail: zhourongyitcm@sina.com。

[通讯作者] 韩新民, 男, 教授, 博士生导师, 从事小儿精神神经系统疾病研究 30 余年。E-mail: hxm1nj@163.com。

究。在实验研究中,从中枢神经系统中分离出结构完整的突触体,是进行神经生理、生化、药理和毒理研究的基础^[1,2]。我国著名神经生理学家,中国科学院院士陈宜张先生^[3]曾明确提出:“突触是脑内基本信息加工的节点部位,突触的功能失调应该是许多——即使不是所有——脑部疾病的基础”、“突触的功能和分子机制研究或是解开众多脑部疾病复杂原因的途径。”为此,从中枢神经系统中分离出完整的突触体具有重大意义。

有关突触体的制备技术,国内文献报道较少,且技术几乎全是上世纪 60 年代由剑桥大学教授 Whittaker 等^[4]发明的被奉为“经典方法”的蔗糖密度梯度离心法或其后在此基础上的部分改进方法^[5-7]。总结而论,该方法存在操作时间长、突触含量及完整性不高、可重复性不强等不足^[8]。已经不能充分满足现阶段对突触体研究的需要,而有关新的制备方法的详细技术报道非常少^[9-11],使得该技术处在一种“断代”阶段。我们课题组在研究过程中就遇到此种困境。为此,我们进行了大量的文献查找研究和技术尝试,参考国外新技术^[12],并结合自身技术条件,新的制备技术为课题组所掌握。该技术具有操作时间短、重复性强、突触产出率高、突触完整性好等优势,现将关键制备技术分享如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

该技术对实验动物无特殊要求,可根据自身实验自由安排。本实验使用 SHR 大鼠,雄性,200 ~ 250 g,委托南京中医药大学实验动物中心购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。使用许可证号:SYXK(苏)2014-0001。

1.2 实验试剂

Percoll 试剂(Sigma 货号:P1644);DL-二硫苏糖醇(Sigma 分子量 154.25,分子式 $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$,货号 D5545);乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 EDTA(Sigma 分子量 372.24,分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,货号 E5134);蔗糖(Sigma 分子量 342.30,分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$,货号 S9378);Tris(Sigma 分子量 121.14,分子式 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$,货号 RDD008);HCl(Sigma 分子量 36.46,分子式 HCl,货号 258148)其余所提及试剂均为市售分析纯,等渗培养液配制参考方法(mmol/L):NaCl 140,

KCl 3, MgCl_2 1.2, NaH_2PO_4 1.2, HEPES 10, glucose 10, 调 pH 至 7.4。

1.3 实验设备

pH 调定器 Sartorius PB-10;Beckman Coulter Allegra 64R 固定角度离心机,F0650 50 mL 固定角度转头;Rubber adaptek tubes 15 mL 橡胶适配套;Wisestir MSH-20D 磁力搅拌器;50 mL polycarbonate 离心管,15 mL 国产圆底离心管;德国 Retsch MM400 球磨仪;Eppendorf 5427R 离心机,转头型号 FA-45-24-11。

1.4 试剂配制

100 mL HCl:吸取 0.31 mL 盐酸与 9.69 mL 双蒸水混合;0.2 mol/L EDTA:称取 7.445 g EDTA,溶于 75 mL 双蒸水中,用饱和的 Tris base 溶液调 PH 至 7.4,磁力搅拌器混匀,定容至 100 mL,4℃ 保存;4X gradient buffer:称取 109.54 g 蔗糖,606 mg Tris,溶入大约 200 mL 双蒸水中,加入 5 mL 0.2 mol/L EDTA,磁力搅拌器搅拌 30 min,稀释至约 240 mL,调 pH 至 7.4,稀释并定容至 250 mL,可以分为 50 mL/份 -20℃ 保存以方便使用;Sucrose/EDTA 缓冲液:实验前将一份 50 mL 的 4 X gradient buffer 冻融稀释至 200 mL 4℃ 保存备用;50 mmol/L DTT:称取 154 mg DTT,溶于 10 mL 双蒸水,按 1 mL/份分装, -20℃ 保存。(该试剂对眼睛及呼吸系统粘膜有刺激性,称量和配制时要做好防护);Percoll 原液的配制:冻融一份 50 mL 的 4 X gradient buffer 和一份 1 mL 的 50 mmol DTT,冰上保存;用 100 mmol 的 HCl 调 pH 值至 7.4 冰上保存备用。(为节省实验时间,本试剂可于实验前配制备用,但不可超过 24 h,否则试剂容易出现结晶影响实验结果;在调 pH 值时,请用 100 mmol/L 盐酸耐心调定,切勿加 NaOH 回调。因加入 NaOH 后会产生果冻样透明沉淀,影响实验结果,原因未明)。

2 实验方法

2.1 突触体的制备

本实验所有步骤均需在冰面上进行,默认离心条件为 4℃,所有设备、器械、离心管等默认条件均为提前预冷。

2.1.1 制备梯度液:梯度液配制按表 1 进行,表 1 为每份梯度液 20 mL 的配制方法,可根据实验要求按比例扩大或缩小。

表 1 Percoll 密度梯度液配制方法
Tab. 1 Preparation of solutions by Percoll gradient density centrifugation

试剂名称	Percoll (mL)	4 X gradient buffer (mL)	50 mmol/L DTT (μ L)	双蒸水 (mL)
均质缓冲液	0	6.25	125	18.625
3% Percoll	0.6	5	100	14.3
10% Percoll	2	5	100	12.9
15% Percoll	3	5	100	11.9
23% Percoll	4.6	5	100	10.3

按表 1 所需量配制完成后,取 15 mL 离心管,先取 23% 的 Percoll 2 mL 加入离心管底部,然后依次将 15%、10%、3% 每份 2 mL 小心均匀平铺于上一梯度带上,所需配制管数依组织重量而定,一般 1 g 组织需 4~6 管。(梯度液的配制是实验的关键所在,在每层加入时务必耐心,手动加入应按照 1 mL/min 的大概速度进行,切勿扰乱层与层之间的分界,以加入后层次之间灯光下出现银白色明亮线条为准。)

2.1.2 快速处死动物取大脑中所需组织,用大量冰点的均质缓冲液洗去血液等杂质,滤纸吸干后称重,按 1:9 (W/V) 的要求将组织剪碎放入研磨管,以备研磨。此步骤速度一定要快,脑组织离体后突触即开始逐渐失活,应在所有条件准备完毕下进行此步骤。

2.1.3 按照 Retsch MM400 球磨仪操作要求进行组织研磨,研磨速度 20 次/s,研磨 15~20 s。组织研磨时间要短,长时间研磨会打碎突触体的结构,为保证研磨充分,研磨前组织一定要尽量剪切碎。

2.1.4 Eppendorf 5427R 离心机 4℃ 条件下 3 600 r/min 离心 10 min。

2.1.5 取上清液,冰点均质缓冲液稀释至 10~12 mL,冰上保存。

2.1.6 检测上清蛋白含量,适宜含量为 5~7 mg/mL,若含量太高则继续稀释,若太低则需调整稀释剂量。

2.1.7 将上清每管 2 mL 均匀缓慢的平铺于 3% 梯度带上。此步骤务必小心,用力缓慢均匀,不要在加入过程中打穿梯度层,否则影响梯度分层结果。

2.1.8 使用 Beckman Coulter Allegra 64R 固定角度离心机, F0650 50 mL 固定角度转头及 Rubber adaptek tubes 15 mL 橡胶适配套将 15 mL 离心管放入适配套中 18 000 r/min 离心 5 min。此步骤为实验另一关键点,离心机必须为此型号或相类似的固定角度转头,离心时间为离心机达到固定转速后计时运行 5 min;停机时要控制降速,先快后慢,以避免分层之间混合而致无分层结果。

2.1.9 取出离心管冰上保存,收集所需层次蛋白。取出离心管时动作要慢以免打乱分层,突触体分布于第 4 层,第 3 层也有分布,但夹杂有线粒体、细胞膜等,具体分布见图 1。

2.1.10 用预冷的 sucrose/EDTA 缓冲液将收集到的分层稀释至约 80 mL,置于烧杯中搅拌冲洗,然后分别装入两支 50 mL 离心管, F0650 转头 15 000 r/min 离心 20 min。

2.1.11 收集离心沉淀置于等渗培养液中 F0650 转头 12 000 r/min 离心 5 min 即得突触体。

2.1.12 蛋白含量测定;2.5% 戊二醛固定 2 h 以待电镜观察。

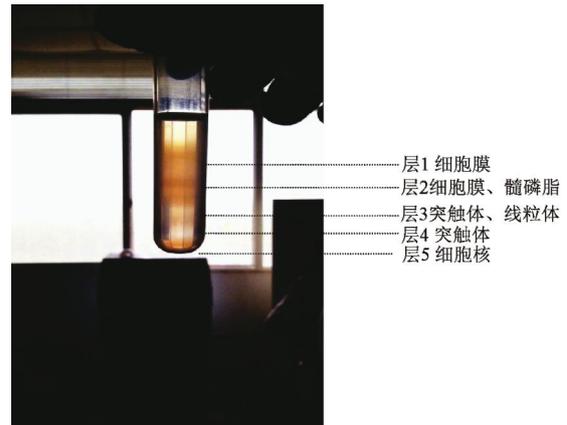


图 1 Percoll 密度梯度离心分层

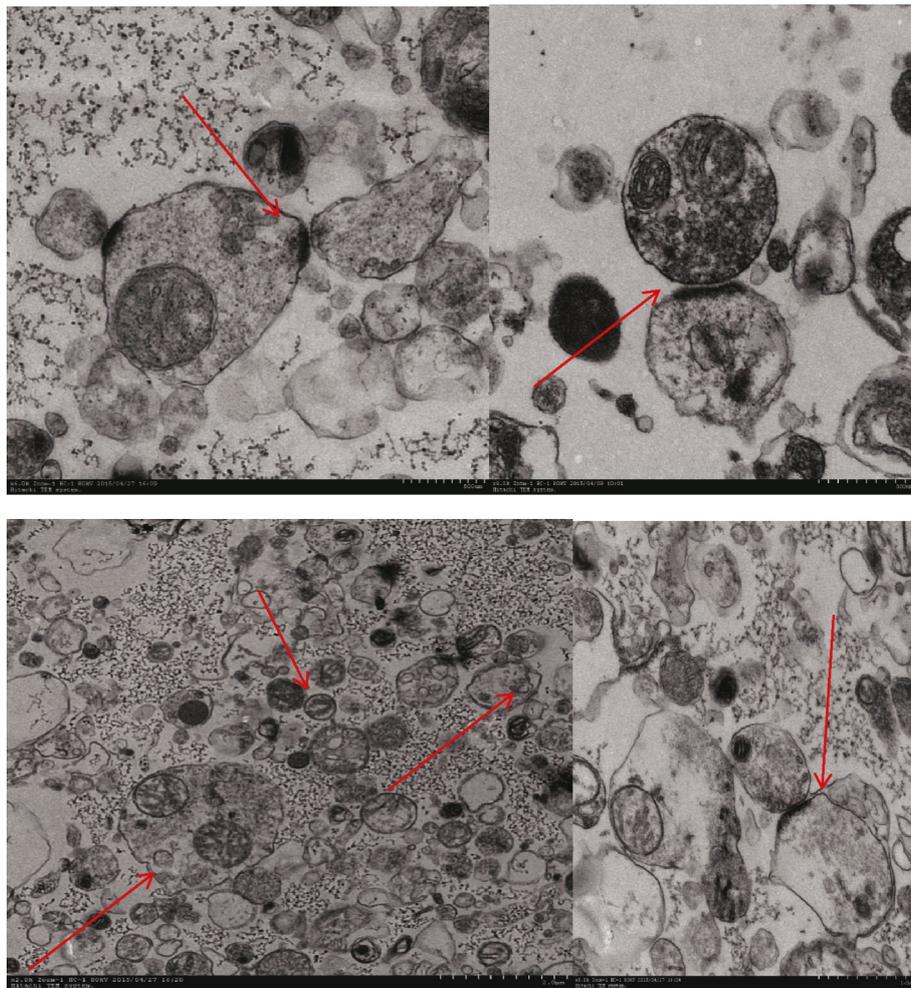
Fig. 1 Separation by Percoll gradient density centrifugation

2.2 透射电镜观察^[13]

取制备突触体 2.5% 戊二醛 4℃ 条件下固定 2 h,用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次,每次 10 min,然后换用 1% 锇酸后固定 1 h。按透射电镜常规超薄切片制作方法,进行乙醇梯度脱水、渗透、包埋、聚合、醋酸铀染色、硝酸铅染色。详细标本制备方法参考日本 Hitachi 公司日立 S-3000N 型透射电镜制备要求,观察并拍片 (图 2)。

3 讨论

突触是脑内基本信息加工的节点部位,突触的功能失调是众多脑疾病的基础,突触是未来研究脑



由电镜图可以看出,本实验所获取的突触体形态上呈连续膜封闭的椭圆结构,周围有完整的膜包围;突触前成分可见一个或多个线粒体和大量突触小囊泡;突触间隙清晰可见,且突出后部分特征性的致密部结构完整,形态清晰,密度较高。突触体突触前膜、突触间隙、突触后膜保存完好,突触体分布密度较高,具有典型的突触体形态结构特征。

图 2 突触体电镜图片

Fig. 2 Electron micrographs of the isolated synaptosomes, showing they are oval or elliptic structures, surrounded by an intact membrane, containing one or more mitochondria, and numerous synaptic vesicles. The presynaptic membrane, synaptic cleft and postsynaptic membrane are clearly visible. Arrows indicate synaptosomes.

疾病的关键所在。在国内神经系统疾病研究中,以中医药研究为例,突触几乎涉及所有神经系统疾病,常见疾病诸如癫痫^[14]、老年痴呆^[15]、蛛网膜下腔出血^[16]及抑郁症^[17]等。但多数研究并未制备突触小体,而是采用脑组织切片观察的形式进行。突触作为神经信号传递的通路,是深入研究疾病的病因、发病机制的良好材料,而突触小体内的囊泡是信号传递的载体^[18]。若能将突触小体引入到神经系统疾病的研究,将会将现阶段的生理病理学研究或基本分子生物学研究带入更深层次的信号传导,递质分泌以及机制探讨领域,拓宽延伸对神经系统疾病的研究深度和广度。因此,掌握并推广这一技术具有重要意义。

突触体的制备是一项要求较高的专业技术。目前有关突触小体的制备技术,国内实验室多采用经典制备方法。但该方法为上世纪 60 年代运用,存在操作时间长、突触含量及完整性不高等不足^[8],制约了神经生物学的实验研究。本实验以 2008 年 Peter R Dunkle 的新技术为参考^[12],并对实验存在的对实验操作人员及离心设备的特殊要求^[12]等不足进行改进,调整了实验条件和参数,降低了对实验设备的要求,使该技术能在国内大多数实验室开展。并在突触体的纯化方法上进行完善,较原有方法更加便捷省时。原有方法整个实验过程约需 3~4 h,并采用的是机械方法配制梯度液;本实验采用手工配制梯度液方法且整个制备过程约 2 h,实验耗

时和实验设备的适用性都有较大改善。突触体的制备技术自上世纪 60 年代 Whittaker VP^[4]发明至今大致经历了不连续性蔗糖密度梯度离心法(蔗糖法)^[4,19]、经典方法的改进型方法^[20]、和不连续性 Percoll 密度梯度离心法^[21]三个发展阶段。Whittaker 教授的不连续性蔗糖密度梯度离心法被奉为“经典制备方法”。虽然经典制备方法在国内有部分实验室应用比较成熟^[6,13],但该技术相对比较落后,存在制备时间较长(8~10)h、突触体完整性较差、梯度液易混淆等不足^[22],无法满足当今对突触体的神经分子生物学及递质水平的研究。本技术较经典方法和改进技术相比具有大大节约实验时间;实验离心时间短、次数少,整个实验在等渗条件下进行,对突触体的结构完整性具有较好保护作用,制备的突触体结构更为完整,形态典型,突触体的浓度较高等优势;此外,该技术可重复性强,在课题组进行的连续 8 次可重复性验证实验中,都能得到符合条件的突触体。且经过对实验条件的改进,对实验设备的要求大大降低,能够应用于国内多数实验室,值得推广应用。且该技术近几年来在国外应用日臻成熟,不断有新的实验设备或节约实验时间、降低实验难度的改进涌现^[23-26]。这些改进虽有一定优势,能将整个制备过程缩减至 90 min 左右,但诸如 José A^[24]及 Kathryn M^[26]等人的改进都是基于原有实验条件基础上发明新的研磨仪器或梯度液制备仪器,对原有实验参数几乎没有创新性改变,虽然缩短了制备时间,但增加了实验成本和实验的适应性。本实验技术耗时约需 2~2.5 h,在节约时间上虽不及以上方法,但显著降低了实验对设备的要求,且无需特殊制备设备,对离心条件等关键实验参数进行了相应的改进,降低了实验成本和实验适应性,能够满足更多实验室的要求,使新技术的可操作性和重复性大大高。此外,和经典方法相比,虽然本技术较之有对实验设备的要求相对较高;多层密度梯度液的配制较费时费力(但可提前 1 d 配制)等不足,但高要求正是保证突触体结构完整、形态典型的先决条件,且该技术的制备时间大大低于经典技术,该技术能够提供用于精细化研究的突触体,是对突触体制备新技术的一次详细报道和技术革新,意义重大。

本实验提供了一种耗时少,产出率高,结构完整形态典型且可运用于精细化研究的突触体制备新技术,可以为从事神经系统疾病实验研究的人员

提供帮助,值得推广应用。

参考文献:

- [1] 林玲, 吴馥梅. 突触体的制备与应用 [J]. 生理科学, 1986, 6(2): 89-95.
- [2] 徐蜀远, 周岐新, 黄萌. 大鼠脑突触体的制备及形态活性研究 [J]. 重庆医科大学学报 1997, 22(3): 191-193.
- [3] 陈宜张. 突触 [M]. 上海: 上海科学技术出版社. 2014: 17-21.
- [4] Whittaker VP, Michaelson IA, Kirkland RJA. The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles (“synaptosomes”) [J]. Biochem J, 1964, 90: 293-303.
- [5] 黄秀兰, 突触体的分离制备 [J]. 川北医学院学报, 1995, 10(3): 12-15.
- [6] 顾丰华, 胡骏, 陈嘉, 等. 分部离心和梯度离心制备大鼠脑突触体方法的比较 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(7): 580-583.
- [7] 耿丹丹, 刘华, 李海燕, 等. 快速老化小鼠海马突触体内 NMDA 受体的表达变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(2): 215-219.
- [8] Bai F, Witzmann FA. Synaptosome proteomics [J]. Subcell Biochem, 2007, 43: 77-98.
- [9] 阮清伟, 王正敏. 听皮质高纯度突触体的提取方法 [J]. 中国耳鼻咽喉科杂志, 2004, 4(4): 222-225.
- [10] 刘子超, 杨醒财. 除虫菊酯和迷迭香对大鼠大脑突触体 ATP 酶的活性影响 [J]. 应用于环境生物学报, 2008, 14(3): 399-402.
- [11] 孙九艳, 李昕, 刘光伟, 等. 大鼠不同脑区线粒体中 α 突触核蛋白含量与各种氧化和抗氧化指标的关系 [J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(3): 361-364.
- [12] Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes [J]. Nature Protoc, 2008, 11: 1718-1728.
- [13] 肖忠新, 魏守刚, 云少君, 等. 小鼠脑突触体制备方法的改进 [J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(10): 937-938.
- [14] 王净净, 韩萌, 张晓霞, 等. 愈痫灵对戊四氮点燃癫痫大鼠钙离子的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(10): 628-629.
- [15] 赵永青, 王振武, 景玉宏. 锁阳对痴呆病模型鼠记忆相关脑区超微结构的影响 [J]. 中国临床康复, 2002, 6(15): 2220-2221.
- [16] 李建军. 蛛网膜出血模型大鼠海马中突触素表达及其意义 [J]. 数理医药学杂志, 2014, 27(5): 209-210.
- [17] 周本宏, 刘敏, 郭志磊, 等. 香砂六君子汤对抑郁模型小鼠行为及海马神经元损伤的影响 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 2247-2250.
- [18] Tong YC, Hung YC, Lin SN, et al. Isolation of synaptosomes from the rat urinary bladder [J]. J Auton Nervous System, 1996, 58: 76-80.
- [19] Gray EG, Whittaker VP. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by

- homogenization and centrifugation [J]. *J Anat*, 1962, 96: 79 – 88.
- [20] Booth RF, Clark JB. A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain [J]. *Biochem J*, 1978, 176: 365 – 370.
- [21] Nagy A, Delgado-Escueta AV. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll) [J]. *J Neurochem* 1984, 43: 1114 – 1123.
- [22] East SJ, Hill MP, Brochie JM. Metabotropic glutamate receptor agonists inhibit endogenous glutamate release from rat striatal synaptosomes [J]. *Eur J Pharmacol*, 1995, 27: 117 – 121.
- [23] Whittaker MT, Gibbs TT, Farb DH. Pregnenolone sulfate induced NMDA receptor dependent release of dopamine from synaptic terminals in the striatum [J]. *J Neurochem*, 2008, 107: 510 – 521.
- [24] Troca-Marín JA, Alves-Sampaio A, Tejedor FJ. Local translation of dendritic RhoA revealed by an improved synaptoneurosome preparation [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43: 308 – 314.
- [25] Westmark PR, Westmark CJ, Jeevananthan A, et al. Preparation of synaptoneurosomes from mouse cortex using a discontinuous Percoll-sucrose density gradient [J]. *J Visual Exp*, 2011, 55: 1 – 9.
- [26] Murphya KM, Balsor J, Beshara S, et al. A high-throughput semi-automated preparation for filtered synaptoneurosomes [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 235: 35 – 40.

[修回日期]2015 – 10 – 29