

总神经节苷脂的简便纯化方法

张新波 崔肇春 朱正美

(大连医学院生化教研室,大连)

关键词 神经节苷脂的纯化,快速层析法

许多研究者先后提出了多种分离纯化神经节苷脂(Gls)的方法^[1-4],其中 Yu 等^[1]建立的相继用离子交换剂、吸附剂分别层析的方法在国内较为常用,但其周期较长、步骤较繁。本文将离子交换剂与吸附剂装入同一柱内一次完成 Gls 的层析纯化,并用含盐氯仿(C)-甲醇(M)混合液(C/M = 2/7, V/V, 含 0.1mol/L NaAc)代替 Yu 法 B 液进行洗脱,用国产硅胶代替价格昂贵的 Iatrobeds,取得了良好的效果。本法的优点是能节省时间及有机溶媒。

材料与方 法

1. 材料 DEAE-Sephadex A-25, 瑞典 Pharmacia; Iatrobeds, 日本 Iatron; 层析用硅胶, 200-325 目, 上海五四化学试剂厂; 高效薄板层析板(硅胶 60), 西德 E. Merck Darmstadt; Sep-Pak C₁₈ 反相层析柱, 美国 Waters Associates; CS-910 双波长薄层扫描仪, 日本岛津; Camag II/PC/CATS Version-2.10 薄层扫描仪, 瑞士。所用试剂均为分析纯。标准 Gls 为牛脑混合 Gls, 标准 Gls 和狗红细胞 GM₁, 均由本室提纯。肝组织和睾丸组织均取自正常大鼠。

2. Gls 的粗提 取 1.5—2g 肝组织或 1g 睾丸组织, 加 10—15 倍体积 C/M 混合液(1:1, V/V), 室温下匀浆, 超声, 过滤, 反复抽提 3 次。合并滤液, 调整 C/M/H₂O 的比例, 使达 30/60/8 (体积比, 即 A 液的比例), 或调整 C/M 的比例, 使达 2/7(V/V)。最终体积约为 120ml。

3. 混合柱层析 本改良法将离子交换剂与吸附剂装入同一柱内以纯化 Gls, 这是与 Yu 法^[1]用两个层析柱的主要区别。根据柱内吸附剂及洗脱液的不同, 本改良法分为四种类型(表 1)。

DEAE-Sephadex A-25 和 Iatrobeds 的预处理: 在改良法 1、2 (表 1) 中, 处理所用试剂同 Yu 法; 而在改良法 3、4 中, 则用 C/M(2/7) 混合液及含盐 C/M(2/7) 混合液分别代替 Yu 法中所用的 A、B 液, 其余操作均同。将处理好的 DEAE-Sephadex A-25 装入长 15cm, 内径为 1cm 的柱内, 树脂高度为 12cm。待

树脂平衡后, 其上再加一滤纸片。再在滤纸片上加已处理好的 Iatrobeds (处理时改良法 1 用 A 液, 改良法 3 用 C/M = 2/7 液), 或硅胶(处理时改良法 2 用 A 液, 改良法 4 用 C/M = 2/7), 其厚度约为 1cm。用 80 ml A 液(改良法 2)或 C/M(2/7) 液(改良法 4)洗柱以除去 NaAc。将样品粗提取液上柱。最后用 180ml B 液(改良法 1、2)或含盐 C/M(2/7) 混合液(改良法 3、4)洗脱。收集洗脱液, 减压蒸干。以甲醇 NaOH 水解除磷脂和 C₁₈ 反相柱层析除盐^[5]。

表 1 Yu 法与四种改良法的比较

方法	柱内填充物	洗脱液
Yu 法	第 1 柱: DEAE-Sephadex A-25 第 2 柱: Iatrobeds	第 1 柱用 B 液 ¹⁾ 第 2 柱 ^[2]
改良法 1	下层: DEAE-Sephadex A-25 上层: Iatrobeds	B 液
改良法 2	下层: DEAE-Sephadex A-25 上层: 硅胶	B 液
改良法 3	下层: DEAE-Sephadex A-25 上层: Iatrobeds	含盐 C/M 液 ¹⁾
改良法 4	下层: DEAE-Sephadex A-25 上层: 硅胶	含盐 C/M 液

1) B 液: C/M/0.8mol/L NaAc = 30/60/8 (V/V/V)

2) 含盐 C/M (2/7) 液: C/M = 2/7, 内含 0.1mol/L NaAc

4. 高效薄板层析 (HPTLC) 将纯化好的 Gls 样品进行 HPTLC, 以 C/M/H₂O (60/35/8, V/V/V) 混合液展开。以间苯二酚试剂显色。用薄层扫描仪对 Gls 的 HPTLC 图谱进行线性扫描。计算各组分的相对百分含量。

结果与讨论

用四种改良法纯化所得的大鼠肝与睾丸组织总 Gls, 其 HPTLC 图谱与 Yu 法的相比, 基本一致, 没有丢带现象(图 1、2)。HPTLC 扫描结果表明, 用改良法纯化的睾丸组织 Gls, 其 GT_{1b} 所占百分含量较 Yu 法增加 2.78 倍, 而肝组织的 Gls, 其 GD_{1b} 所占百分含量较 Yu 法多 2.17 倍。这一结果提示改良法可能在

滴定液电子自动计量装置

杨学田 王纯青* 徐以玲*

(新疆石河子医学院图书馆)

关键词 滴定管, 电子自动计量装置

在容量分析中, 滴定管的使用直接影响到分析结果的准确性。我们运用杨学田等^[1]的自动直读输液计量装置的原理, 改装成滴定液电子自动计量装置。它易于操作、计量准确而迅速, 有一定的推广价值。

图 1 为该装置的全貌, 图 2 为它的部件组合。

各部件的装置工艺如下:

1. 受滴传感器

用两根长约 4cm 不锈钢丝(或针灸针)作为电极, 将其一端焊上一根细导线, 另一端弯成“L”形。将其连线端用环氧树脂粘合胶固定在一个长约 5cm 的鳄鱼

鱼夹背侧外 1/3 处(双导线均需与夹子绝缘)。使用时将其夹在玻璃滴管下段, 令两个电极的“L”端置于滴管下口 1cm 处。其导线末端焊一个插头, 再将此插头插入改装的计算器上的“=”键引出线所连的插座上。

2. 玻璃滴管

取一根长约 15cm 的普通滴管, 其下段套一根长 2cm 的胶管, 将受滴传感器夹在胶管上, 上端用输液胶管与盛液瓶相连。

* 石河子医学院化学教研室。

组分回收方面更具优点, 但这有待进一步探讨。

本法因用一个层析柱代替 Yu 法的两个层析柱去纯化 GIs, 故节省了时间和有机溶媒。用含盐 C/M(2/7) 液代替 Yu 法 B 液洗脱 GIs, 既可加快洗脱液的减压蒸干速度, 又可避免在蒸干时因起泡而引起的 GIs 的丢失。用国产硅胶代替 Iatrobeds, 不仅易购买, 而且价廉。综上所述, 改良法 4 为最优选择。

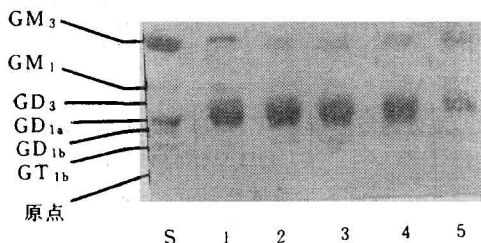


图 1 大鼠睾丸组织 HPTLC 图谱

S: 标准 GIs (牛脑 GIs + GM₃); 1: Yu 法;

2, 3, 4, 5: 改良法 1, 2, 3, 4 (最浓条带 (GD_{1a}))

上下各有一条明显弱带, 制版后显示不清, 上带相当于 GD₃ 的位置, 下带相当于 GT_{1b} 的位置)

HPTLC 结果表明, 大鼠睾丸组织中至少含有 5 种 GIs (图 1), 其中 GD_{1a} 含量最高, 占 70.76 ± 5.84%, 而肝组织中主要含 6 种 GIs (图 2), 其中

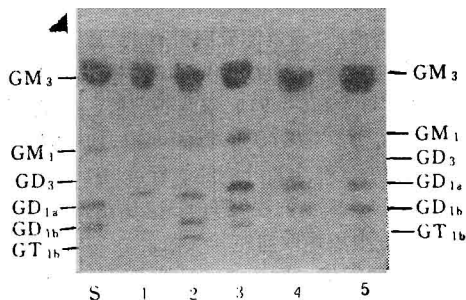


图 2 大鼠肝组织 HPTLC 图谱

S: 标准 GIs (牛脑 GIs + GM₃); 1: Yu 法;

2, 3, 4, 5: 改良法 1, 2, 3, 4

GM₃ 含量最高, 占 65.67 ± 7.23%。GD_{1a} 与 GM₃ 在睾丸与肝脏执行其功能中所起的作用值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Folch J *et al.* *J Biol Chem*, 1957; 226: 497
- 2 Yu R K *et al.* *J Lipid Res*, 1972; 13: 680
- 3 Irwin C C *et al.* *Anal Biochem*, 1979; 94: 335
- 4 Ladisch S *et al.* *Anal Biochem*, 1985; 146: 220
- 5 Ledeen R W *et al.* *Methods in Enzymol*, 1982; 83: 139

[本文于 1989 年 4 月 10 日收到]