

相同。故我们认为可省略分离这一步,以缩短时间,并可完全回收探针。实验中发现乙醇沉淀法及 Sephadex G-50 离心小柱法都不能完全回收标记探针。

应用放射性同位素标记核酸探针杂交时,一般在 16h 以上,如提高探针浓度以缩短杂交时间,则使本底增高;而生物素标记探针在高浓度时亦不会加深本底^[1]。我们发现生物素探针在 200 ng/ml 浓度时,杂交 0.5 和 1h 即可检出 160pg 的同源 DNA,杂交 2h 至 18h,可检出 32pg 至 6pg 的同源 DNA,2 至 4h 杂交时间即可达到原来 18h 的检测水平。因此,只要稍提高探针浓度 (200ng/ml),就可缩短杂交时间 (2 至 4h),这样即可在一天内完成整个分子杂交试验,这对

于大量筛选性试验以及在实际应用时建立快速检测方法均有实用意义。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989:E37
- 2 马凤森. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(2):107
- 3 刘钟瑛,杨贵贞. 中国免疫学杂志, 1990;6(4):244
- 4 Dillon J R *et al.* *Recombinant DNA Methodology*. New York: John Wiley and Sons Inc. 1985: 76
- 5 Leary J J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80:4045

神经节苷脂纯化方法的改进

张新波 汤乃梅* 张席锦

(北京医科大学生理教研室, 北京 100083)

程 时

(北京医科大学生物物理教研室, 北京 100083)

关键词 神经节苷脂, 神经节苷脂纯化方法, 层析

神经节苷脂 (ganglioside, Gl_s) 的分离与纯化是研究组织细胞 Gl_s 组成、含量及代谢的基本手段。由于 Gl_s 在神经以外组织中含量甚微,而且因组织、细胞的不同,影响 Gl_s 纯化的因素也不同。在实验过程中常常由于方法选择不当致使实验失败。本文介绍一种改进的方法,它操作简单,适用于大鼠多种组织,因此具有通用性。

1 材料与方 法

1.1 材料 DEAE-Sephadex A-25, 瑞典 Pharmacia; 高效薄层层析板 (硅胶 60), 德国 E. Merck Darmstadt; Sep-Pak C₁₈ 反相层析柱, 美国 Waters Associates; 所用试剂均为分析纯。标准 Gl_s 为牛脑混合 Gl_s 和狗红细胞 GM3, 均自提。

1.2 Gl_s 的分离纯化 取大鼠红细胞 2—3ml 及不同组织各 1—2g 分别用少量水匀浆,加 10 倍体积的氯仿-甲醇 (1:1, V/V) 混合液,室温超声,离心 (3 000 r/min, 10min), 反复抽提三次,合并上清液,调整使氯仿、甲醇和水的体积比为 30:60:8 (A 液)。按 Ueno 等方法^[1]进行 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析,洗脱过程改为:先用 100ml A 液洗柱,再用 100ml 甲醇洗柱,最后用 200ml B 液 (氯仿、甲醇和 0.8mol/L NaAc 的混合液,三者体积比为 30:60:8) 洗脱,收集洗

脱液,减压蒸干。用 0.1mol/L NaOH 甲醇液 10ml,于 35—40℃水浴中水解 2—3h,用 0.5mol/L HAc 甲醇液中和,然后加入 30ml 正己烷分配 2—3 次,以除去脂肪酸甲酯,减压蒸干。蒸干物用水溶解,并对三蒸水透析除盐。再加入甲醇使甲醇与水的比例为 1:1 (V/V)。

将 Sep-Pak C₁₈ 反相柱用 15ml 氯仿-甲醇 (2:1, V/V) 和 10ml 甲醇分别洗三次,并用 10ml 甲醇与水为 1:1 的溶液平衡,透析除盐后的溶液上柱,流速为 2ml/min,用 10ml 三蒸水洗柱,用 2ml 甲醇和 15ml 氯仿-甲醇 (1:1, V/V) 溶液洗脱 Gl_s。C₁₈ 反相柱再用 10ml 甲醇洗,甲醇与水为 1:1 (V/V) 的混合液平衡后可重复使用^[2]。

1.3 高效薄层层析 (HPTLC) 将纯化好的 Gl_s 样品进行 HPTLC,以氯仿、甲醇和 0.25% CaCl₂ 为 60:40:9 的混合液展开,间苯二酚 (resorcinol) 试剂显色。

2 结果与讨论

Gl_s 的纯化方法已有许多报道^[1-3]。我们曾用其

* 大连医学院生化教研室。

收稿日期: 1991.07-31

修回日期: 1991-10-11

中多种方法对多种组织和细胞进行实验,结果发现,不同的方法仅适用于某一定的组织和细胞,分配条件的选择、柱层析过程中洗脱液的变化等都直接关系着实验的成败。为了寻求一种较为方便、通用的方法,我们对 Ueno 等人^[1]的方法进行了以下改进: a. 在 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析中,用 B 液代替 Ueno 方法中的含 0.2 mol/L NaAc 的甲醇溶液洗脱 GIs。因为 GIs 更易溶解于含有一定水分的氯仿-甲醇 1:2 的混合液中^[4]。另外, B 液盐浓度较低,有利于进一步纯化。 b. 用透析除盐和 C_{18} 反相柱层析代替 Sephadex

G-50 凝胶过滤除盐和 Iatrobeads 吸附层析, 这样不仅操作简便, 而且可节省进口 Sephadex G-50 和 Iatrobeads 的昂贵开支及洗脱用的大量有机溶剂。 c. 有人报道用 Sep-Pak C_{18} 反相柱除盐^[2]。我们则先将样品透析除盐, 再过 C_{18} 反相柱。实验结果表明, 过 C_{18} 反相柱前, 样品的 HPTLC 分离效果很差, 甚至难以进行, 而过 C_{18} 反相柱后, HPTLC 效果很好 (图 1), 说明 C_{18} 反相柱也能除去许多杂质 (小样品及盐浓度低时可不透析, 直接 C_{18} 反相柱层析)。

本方法是对多种 GIs 分离纯化方法^[1-3] 的重新组合。实验结果与已报道的大鼠肝脏、睾丸组织的 HPTLC 图谱基本一致^[1], 无拖带现象。因此, 它是一种较为通用并适合于国内实验条件的方法。

参 考 文 献

- 1 Ueno, K, Ando S, Yu R K. *J Lipid Res*, 1978; 19 (7):863
- 2 Ledeen R W, Yu R K. *Methods in Enzymology*, 1983; 83:139
- 3 Yu R K, Ledeen R W. *J Lipid Res*, 1972; 13(5): 680
- 4 Svennerholm L, Fredman P. *Biochim Biophys Acta*, 1980; 617(1): 97
- 5 张新波, 崔肇春, 朱正美. 生物化学与生物物理进展 1990; 17(3):243

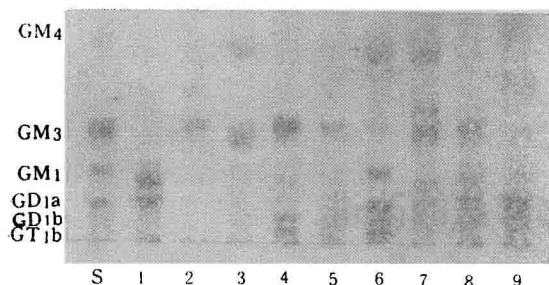


图 1 大鼠九种组织 GIs 的 HPTLC 图谱

S, 标准(牛脑混合 GIs + 狗红细胞 GM3); 1, 红细胞; 2, 心肌; 3, 小肠粘膜; 4, 肝脏; 5, 胰腺; 6, 脑; 7, 肾; 8, 脾; 9, 睾丸。箭头所指为间苯二酚阴性条带

生物素标记 DNA 探针杂交条件探讨

刘钟瑛 杨贵贞* 王文余

(哈尔滨医科大学免疫学教研室, 哈尔滨 150086)

关键词 生物素标记 DNA 探针, DNA 杂交

DNA 探针技术正越来越广泛地应用于医学基础研究和临床检测^[1]。生物素标记探针已在某些领域部分取代同位素标记探针而发挥作用。杂交是 DNA 探针技术中重要一环。各种杂交条件的变化均会对杂交结果并最终对检测结果产生影响。文献中关于杂交条件的报道常常不一致, 而国内尚未见对杂交条件作系统探讨的文章。而且生物素探针和常用的同位素探针由于标记物不同, 两者的杂交条件也存在一定差异, 为此我们在用化学方法制备了生物素化 DNA 探针的基础上, 对生物素探针的杂交条件进行了探讨, 以为生物素探针的进一步应用提供必要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

乙二醇(分析纯、沈阳试剂二厂), 亚硫酸氢钠(分析纯, 天津塘沽新华化工厂), λ 噬菌体 DNA (华美公司), 硝酸纤维素膜 (NC 膜, 浙江黄岩化工厂), 生物素- α -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、碱性磷酸酶标记亲和素、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐(BCIP)、硝基蓝四氮

* 白求恩医科大学免疫学教研室

收稿日期: 1991-08-12 修回日期: 1991-12-23