

经验交流

兔脑中磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸的分离纯化*

陈庆辉 梁念慈
(广东省湛江医学院生化教研室)

多磷酸肌醇磷脂 (polyphosphoinositides, PPI) 包括磷脂酰肌醇-4-磷酸 (phosphatidylinositol-4-phosphate, PIP) 和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate, PIP₂)。近年来发现它们在细胞跨膜信号传递中起重要作用^[1]。为了深入了解其代谢及生理作用,有必要把它们分离纯化。前人报道过几种纯化方法^[2-4],但操作复杂。目前国外仅几家公司生产,价格昂贵;国内仍无生产,也未见类似报道。本文主要报告一种分离纯化兔脑中 PIP₂ 的新方法及用硅胶板薄层析法 (TLC) 分离鉴定兔脑中 PIP 和 PIP₂。

材料和方法

标准 PIP 和 PIP₂ 购自 Sigma 公司,硅胶 H 购自上海化学试剂采购站,其余试剂用分析纯。

磷脂抽提 将兔断头后即取 4 g 脑,加入 5 ml 冷 1 mol/L CaCl₂,匀浆后加 10 ml 甲醇振摇 2 分钟,再加入 25 ml 氯仿: 甲醇: 1.2 mol/L HCl (20:10:1, V/V, 以下均为体积比),振摇 10 分钟,静置分三层,去上层,吸取下层,中层继续用 25 ml 上述混合液抽提 (方法同上),两次抽提液合并,用 1.2 mol/L HCl: 甲醇 (1:1) 30 ml 洗两次,振摇后分两层,下层为磷脂抽提液。

TLC 分离鉴定 PPI 1. 制板,取 50 g 硅胶 H 加入 120 ml 0.5% 羧甲基纤维素钠,拌匀后铺板,板厚 0.5 mm,在 110℃ 下 30 分钟,后用 1% 草酸钠湿润,再在 100℃ 下活化 30 分钟取出。2. 点样后风干。3. 用碱性展开剂 (氯仿: 甲醇: 水: 氨水, 103:54:10:3),展开距离 8 cm。4. 用磷显色法使磷脂显色^[5]。

硅胶柱层析法分离纯化 PIP₂ (1) 制柱: 取 20 g 硅胶 H 加入 45 ml 0.5% 羧甲基纤维素钠,拌匀后在 110℃ 下 30 分钟;再用 15 ml 1% 草酸钠湿润,在 100℃ 下 60 分钟,研碎后加入氯仿: 甲醇 (2:1) 80 ml,拌匀 30 分钟后装柱 (采用 1.5 × 25 cm 层析柱),柱高 12 cm。(2) 加样: 取磷脂抽提液 15 ml 过柱,速度约 20 滴/分钟。(3) 洗脱: 依次用 8 ml 洗脱液 A (纯氯

仿)、60 ml 洗脱液 B (氯仿: 甲醇: 水, 40:35:9) 和 50 ml 洗脱液 C (氯仿: 甲醇: 水: 氨水, 45:45:12:3.3) 洗脱,速度均约 20 滴/分钟。(4) 收集: 每管 10 ml。从每管中取少量洗脱液作含磷测定及磷脂鉴定。(5) 磷测定: 磷钼酸铵显色法^[6]。(6) 磷脂分离鉴定: 采用上述碱性展开剂及酸性展开剂 (见图 4) 作 TLC。

结果与讨论

TLC 分离 PPI 图 1 表明脑中磷脂达十种以上,但分离较清楚,PIP 和 PIP₂ 的含量分别约占总磷脂的 1%。

硅胶柱层析法分离纯化 PIP₂ 图 2 表示磷的洗脱曲线。有关洗脱液的磷脂鉴定结果见图 3: 大部分磷脂分布在第 4 管; PIP₂ 分布在第 10、11、12 三管,把这三管合并,加入 10 ml 1.2 mol/L HCl,振摇后分层,去上层,下层用 N₂ 吹干浓缩,即为 PIP₂ 溶液。取少许浓缩 PIP₂ 与标准比较 (见图 4),分离出来的 PIP₂

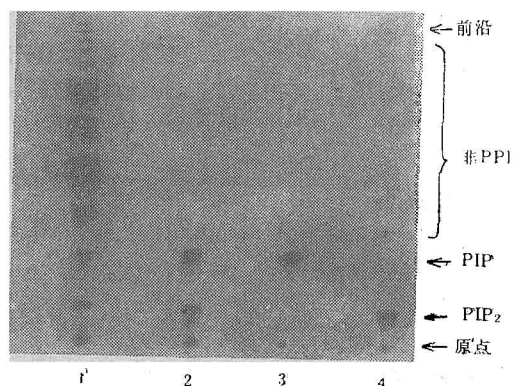


图 1 硅胶板薄层析法分离多磷酸肌醇磷脂
PIP $R_f \approx 0.25$, PIP₂ $R_f \approx 0.1$; 1. 脑中磷脂抽提液; 2. 标准 PIP 与 PIP₂ 混合液; 3. 标准 PIP;
4. 标准 PIP₂; PPI, 多磷酸肌醇磷脂

* 本课题属国家自然科学基金资助项目

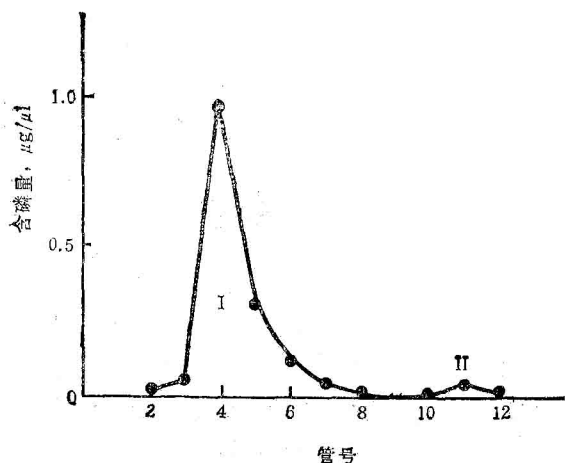


图2 硅胶柱层析中磷的洗脱曲线

1, 2 管为 A 洗脱液, 3 至 8 管为 B 洗脱液, 9 至 13 管为 C 洗脱液, I 峰含多种磷脂, II 峰含较纯的 PIP_2 (见图 3)

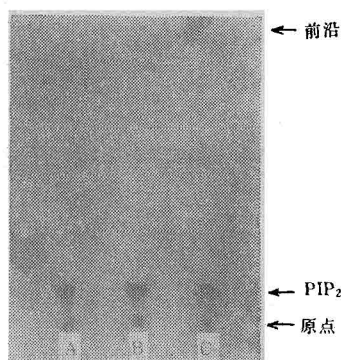


图4 被纯化的 PIP 与标准 PIP_2 的 TLC 图谱
采用硅胶板 TLC; 展开剂组成: 氯仿: 丙酮: 甲醇: 乙酸: 水 (70:15:25:9:5, V/V); A: 被纯化的 PIP_2 ; B: 标准 PIP_2 ; C: A + B

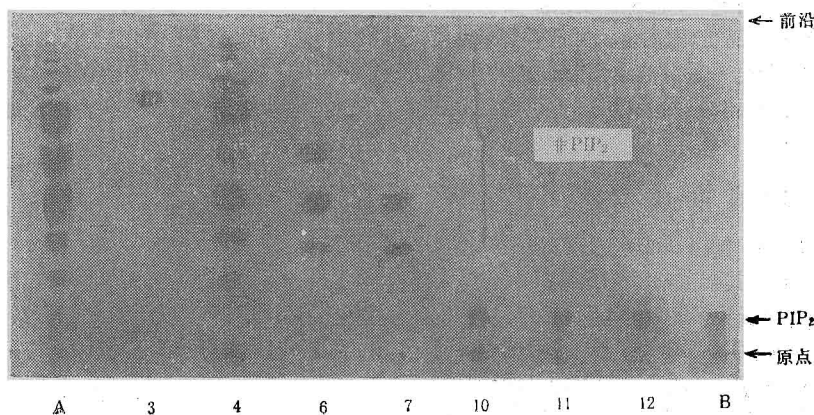


图3 硅胶柱层析法磷脂的洗脱 (TLC 图谱)

采用上文中硅胶板薄层层析法分离磷脂, 磷显色法显色; A 脑中磷脂抽提液; B 标准 PIP_2 ; 3、4、6、7、10、11、12 均为管号; 10、11、12 管中含有一种较纯的磷脂, 即 PIP_2

与标准 PIP_2 具有相同 R_f 值。本实验共用 4 g 鲜脑, 纯化出约 2mg PIP_2 。

本法具有加样量大、产物 PIP_2 较纯, 操作简单等优点。可作为分离纯化 PIP_2 的一种方法。

参 考 文 献

- [1] Hokin, L. E.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, **54**, 205.
- [2] Schacht, J.: *Journal of Lipid Research*, 1978,

19, 1063.

- [3] Dittmer, J. C. et al.: *Biochem. J.*, 1961, **81**, 535.
- [4] Hendrickson, H. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 1369.
- [5] Smith, I.: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, 1976, **1**, 355.
- [6] Dittmer, J. C. et al.: *Journal of Lipid Research*, 1961, **5**, 126.

[本文于 1988 年 5 月 6 日收到]