

2. 在其它工业中的应用

短梗霉多糖还可应用于化妆品^[9], 涂料^[10], 光敏树脂^[11-13], 肥料^[14,15], 铸造^[16], 烟草工业^[17]以及制药工业^[18,19]等。例如: 在制药工业中用20%的短梗霉多糖代替动物胶, 可简化防氧化胶囊的生产^[18,19]; 添加5—10%的短梗霉多糖, 可适当提高软胶囊的柔性, 弹性, 粘着性, 使它在肠胃预定区域溶解, 释放内容物, 以提高药物的疗效。短梗霉多糖还可经醚化, 酯化, 氧化和交联等化学改性制成非水溶性, 低膨胀性的其它衍生物, 扩大应用范围。总之, 短梗霉多糖的应用前景是广阔的。

参 考 文 献

- [1] 杉本要: 発酵と工業, Vol. 36. No. 2 p 98—108, 1978.
- [2] H. Bender et al.: *Biochem. Z.*, Vol. 334, p97, 1961.
- [3] S. Ueda et al.: *Appl. Microbiol.*, Vol. 11, p211,

- 1963.
- [4] B. J. Catley: *Appl. Microbiol.*, Vol. 22, p641, 1971.
- [5] 二宮英治, 木崎忠雄: 農化誌, 43, 115, 1969.
- [6] K. Wallenfels et al.: *Biochem.*, 7, 341, 433 1965.
- [7] 杉本要: 化学工業, p71—77, 1983年1月号.
- [8] *Unexamined Patent Application Gazette*, S52—41252 (HBLI)
- [9] *Published Examined Patent Application Gazette*, S52—31019 (HBLI)
- [10] *Unexamined Patent Application Gazette*, S50—145447 (HBLI) (SCCL)
- [11] *ibid.*, S50—79322 (HBLI) (SCCL)
- [12] *ibid.*, S50—77102 (HBLI) (SCCL)
- [13] *ibid.*, S50—77103 (HBLI) (SCCL)
- [14] *ibid.*, S50—100470 (HBLI) (SCCL)
- [15] *ibid.*, S51—107954 (HBLI) (SCCL)
- [16] *ibid.*, S51—119321 (HBLI) (SCCL)
- [17] *ibid.*, S51—1699 (HBLI) (SCCL)
- [18] *ibid.*, S50—135215 (HBLI) (SCCL)
- [19] *ibid.*, S51—101117 (HBLI) (SCCL)
- [20] *Published Examined Patent Application Gazette*, S52—24110 (HBLI)

【本文于1985年1月3日收到】

研究工作

水牛脑神经节苷脂的分离纯化

夏霞娟 崔肇春* 顾天爵

(上海第一医学院 生化教研室)

因神经节苷脂(gangliosides, 简称 GLS)的生物学功能的研究日益受到重视^[1-4], 对各种 GLS 纯品的需求越来越迫切, 而目前市场上尚无供应。本文选用水牛脑为材料, 参考有关方法^[5-9], 择优组合或略加改进, 提取纯化了水牛脑中四种主要的 GLS。

提取 GLS 是利用其亲水脂分子特性, 用氯仿-甲醇混合液抽提脑组织的丙酮粉, 将抽提物进行 Folch 分配^[10], 使 GLS 从有机相溶媒转移到水相, 然后进行 DEAE-Sephadex A-25 离子交换与 Iatrobeds 吸附柱层析。Iatrobeds 是近年发展起来的新型多孔性硅胶球状物, 具有颗粒大, 表面光滑、流速高、分辨力强的特点^[8]。

一、材料与方 法

1. 新鲜水牛脑; DEAE-Sephadex A-25, Pharmacia 厂; Iatrobeds 6RS-8060, 颗粒直径 60 μ m, 日本 Iatron 厂; 高效薄板层析(HPTLC)板, Silica gel60, Merck 厂; 硫代巴比妥酸, Fluka 厂; N-乙酰神经氨酸, Sigma 厂; 人脑灰质 GLS 标准品和间苯二酚系由 Yale 大学于宽仁(K. R. Yu)教授赠送; 其他试剂均系分析纯或化学纯。

中国科学院科学基金资助的课题。

* 大连医学院生化教研室交换师资。

2. 高效薄板层析 (HPTLC) 每次点样量约相当于 $2\mu\text{g}$ 唾液酸的 GLS。展开剂系统^[22] I 为氯仿/甲醇/水 (C/M/W, 55:45:10, V/V, 含 0.02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), II 为 C/M/5M NH_4OH /2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /W (60:40:4:1:4)。GLS 显色剂^[23]: 0.1 M CuSO_4 0.025ml + 浓 HCl 8ml + 1ml 2% 间苯二酚 + 1ml H_2O , 混匀, 放置 4 小时后使用, 冰箱中可保存一周。喷雾后, 盖以玻片, 120°C 烘烤 15 分钟。磷脂 TLC 时, 其展开剂系统为 I, 显色剂系采用 Vaskovsky 配方^[24]。

3. 唾液酸的测定 按 Aminoff 法^[25], 略有改动。将 3—40 μg 与 GLS 结合的唾液酸放带磨口塞试管中, 用 N_2 吹干, 除去有机溶媒。加 0.25ml 0.9% NaCl 及 0.25ml 0.125N H_2SO_4 , 塞紧, 放 80°C 水浴 2 小时, 冷却后, 加入 0.125ml 25mM NaIO_4 , 37°C 保温 10 分钟。过量的 NaIO_4 以 0.15ml 2% 亚砷酸钠还原, 待黄色消失后, 加 1ml 0.1M 硫代巴比妥酸 (以 6N NaOH 调 pH 至 9), 加塞, 沸水浴中加热 7.5 分钟。立即冷却, 加 2.5ml 酸性正丁醇 (190ml 正丁醇 + 10ml 12N HCl)。回旋振荡 20 秒, 3000rpm 离心 10 分钟, 取出正丁醇层, 549nm 读取光吸收。以光吸收为纵坐标, 管号为横坐标绘制洗脱曲线。欲求唾液酸含量, 可借助于同法制做的唾液酸标准曲线进行换算。

二、实验部分

1. 粗 GLS 的制备^[26,27] 剥去新鲜水牛脑的血管与脑膜, 分出灰质, 加两倍体积的生理盐水, 用电动组织搅碎机制成匀浆。以粗纱布挤压过滤匀浆, 以除去残存的血管及脑膜, 立即倒入 10 倍体积的 -10°C 丙酮中, 迅速搅拌, 过滤, 风扇吹干滤渣, 得丙酮粉, 真空干燥至恒重, 压成细粉。从 1520 克水牛脑灰质制得干丙酮粉 170.5 克。将干丙酮粉放 5 倍体积 (850ml) 的氯仿 (C)/甲醇 (M) (2:1, V/V) 混合液中, 不时振摇, 室温放置过夜。过滤, 再以 5 倍 C/M (2:1, V/V) 同样提取。过滤, 以 C/M (1:2, V/V) 600ml 在 50°C 提取 3 小时, 再电动搅拌 1 小时。过滤, 再以 C/M (1:2, V/V) 300ml 在

50°C 电动搅拌提取 2 小时。合并各次滤液, 在回旋蒸发器中 40°C 减压蒸干, 真空干燥得固体物 55 克。加 550ml 丙酮, 振摇片刻, 放 4°C 过夜。次晨放冰盐水浴中 (0°C), 电动搅拌 3 小时, 过滤, 收集不溶物。将后者放 300ml C/M (2:1, V/V) 中, 40°C 振摇 15', 趁热过滤, 滤渣再以 C/M (2:1, V/V) 提取两次, 一次 100ml, 一次 50ml, 都在 40°C 用力振摇各 15'。合并各次提取液, 加 1/5 体积的 0.1M KCl, 在分液漏斗中猛烈振荡, 进行 Folch 分配^[7], 使 GLS 转入水相, 4°C 放置过夜, 分出上层水相, 下层有机相以理论上层液 C/M/ H_2O (3:48:47, V/V) 再洗涤两次, 每次 90ml。合并各次上层水相 (约 600ml), 40°C 减压浓缩少许 (因起泡严重), 移 4°C 用水透析 3 天 (每日换水 3 次), 冰冻干燥后, 得粗 GLS 3.6 克。

2. DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析

(1) 醋酸型树脂的制备^[21]: 将 DEAE-Sephadex A-25 悬于 5 倍体积的 C/M/0.8M NaAc (30:60:8, V/V, 又称 B 液) 混合液中, 用力振摇片刻, 放置 30 分钟, 过滤。上述过程再重复三次, 第三次重复时放 4°C 过夜。将如上活化的树脂过滤, 再以 C/M/W (30:60:8, V/V, 又称 A 液) 混合液洗三次, 以除去过剩的 Ac^- 离子。将活化树脂悬于 A 液中, 加到层析柱 (内径 2.5 cm, 柱长 65cm) 中, 至床高约 55cm。

(2) 上样、洗脱及后处理: 将粗 GLS 溶于 75ml C/M (2:1, V/V) 中, 离心除去少许不溶物, 将溶液调整到 C/M/W 的比值为 30:60:8 (V/V), 总体积为 163ml。将此样品液加到柱上, 待样品液面流至与柱床表面在同一平面时, 任其放置过夜。次晨以 3 倍柱体积的 A 液洗柱, 以除去未被交换的中性脂类。再以 1 体积的甲醇洗柱。最后以溶解在甲醇中的醋酸铵线性梯度洗脱 GLS。在与柱先后相连的三个容器中, 依次加入 0.05M、0.15M 及 0.45M NH_4Ac (在甲醇中) 各 1000ml, 开始洗脱, 洗脱速度控制在 1.2ml/分, 每管收集 10ml。每隔一管测唾液酸含量。将各主要峰的各管洗脱液合并, 减压

浓缩,对蒸馏水透析3天,再行冻干。将各峰冻干物少许溶解,用TLC检测磷脂。将含磷脂的冻干物溶于30~50ml 0.1N NaOH(在甲醇中)中,40℃保温2小时,以消化磷脂,然后以5NHAc(在甲醇中)中和至中性,用正己烷提取去除脂肪酸甲酯。再透析冻干。

粗 GLS 3.6 克,经离子交换柱层析后,共得峰7个(图1),各峰经浓缩、透析、冻干,其得量见表1。从各峰的HPTLC图谱(图2)看,冻干物仍为混合物。

表1 3.6克粗 GLS 经过 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析梯度洗脱后各峰的得量

峰号	I	I _a	II	II _a	III	III _a	IV
GLS 干重(mg)	156	38	130	158	590	15	350

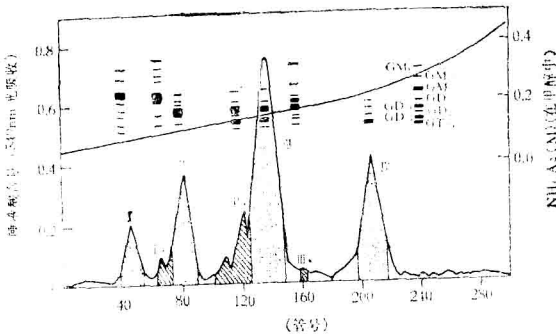


图1 DEAE-Sephadex A-25 柱层析粗 GLS 的洗脱图

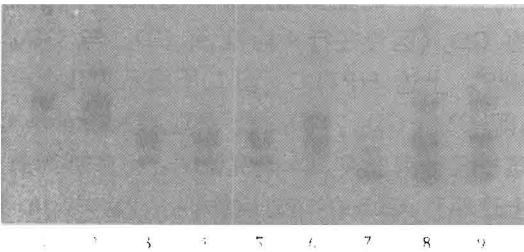


图2 DEAE-Sephadex A-25 柱层析各峰的HPTLC图谱

各样品上样量相当于2μg 唾液酸的 GLS;展开剂为 C/M/H₂O (55:45:10, V/V, 含 0.02% CaCl₂·2H₂O)。1:峰 I; 2:峰 I_a; 3:峰 II; 4:峰 II_a; 5:峰 III; 6:峰 III_a; 7:峰 IV; 8. 水溶性粗 GLS; 9. 人脑灰质标准 GLS。

3. Iatrobeds 吸附柱层析 上述各峰进一步用 Iatrobeds 柱分离纯化。将 130 克 Iatrobeds 放置于不同比值的 C/M/W 混合液中

过夜。层析不同的 DEAE-Sephadex A-25 洗脱峰的冻干物时,混合液的 C/M/W 比值按表2中容器 I 栏所列的数值。将此悬液过夜装柱(1.7×120cm)。将待层析的冻干样品溶于相应的 C/M/W 混合液中,离心,除去不溶物,上柱。以 C/M/W 混合液中的甲醇线性梯度洗脱各峰,梯度由分别盛于两个容器中的不同比值的 C/M/W 混合液(表2)组成。洗脱速度为 0.8—1.0ml/分,每管收集 10ml。隔管测唾液酸含量,绘出各次的洗脱曲线。合并各峰洗脱液,浓缩、透析、冻干。所得产品以 HPTLC 检测纯度。

表2 Iatrobeds 吸附柱层析梯度洗脱液的组成

DEAE-Sephadex A-25 洗脱峰	容器 I		容器 II	
	C/M/W (V/V) 比值	总体积 (ml)	C/M/W (V/V) 比值	总体积 (ml)
I	60:40:2	790	30:70:4	930
II _a	57:43:2	800	20:80:4	935
III	55:45:2	820	20:80:4	940
IV	50:50:2	800	20:80:4	900

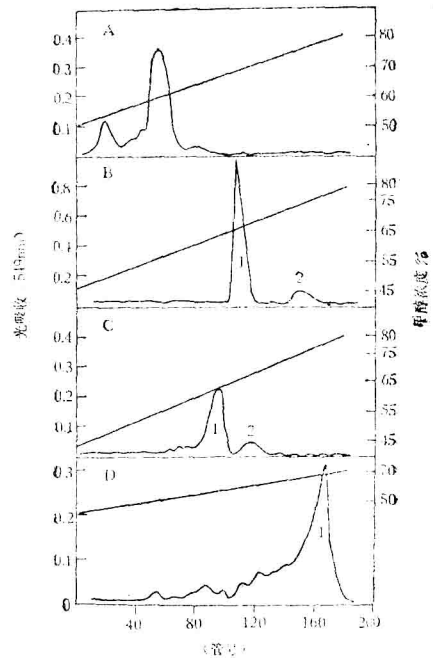


图3 离子交换层析后 I, II_a, III, IV, 峰的 Iatrobeds 柱层析的洗脱曲线 A.峰 IV; B.峰 III; C.峰 II_a; D.峰 I。

离子交换层析得量较多的四个主峰(I,II_a, III,IV)分别再经上述 Iatrobeds 柱层析的洗脱

表3 离子交换层析后 I、II_a、III、IV 峰经 Iatrobeds 柱层析梯度洗脱后各峰的得量

离子交换 层析峰	I		II _a		III		IV	
Iatrobeds 层析峰	1	1	2	1	2	1	2	
GLS 种类*	GM ₁	GD _{1a}	GD _{1b}	GD _{1a}	GD _{1b}	未定	GT _{1b}	
GLS干重 (mg)	87	70	35	134	62	49	120	

* 系与人脑灰质标准 GLS 样品对照而定

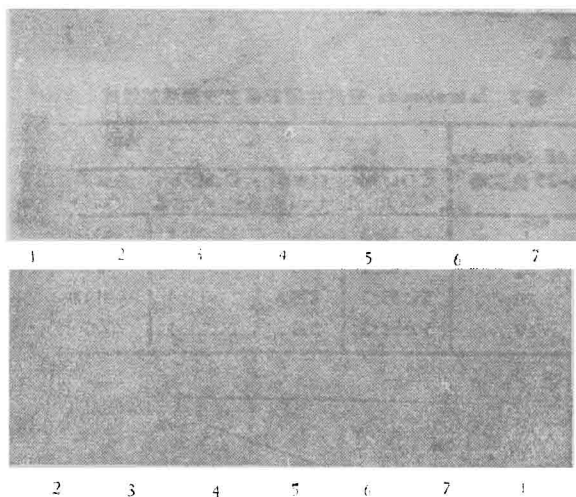


图4 经 Iatrobeds 柱层析后各样品的 HPTLC 图谱

- A. 展开剂系统为 C/M/H₂O (55:45:10, V/V), (含 0.02% CaCl₂·2H₂O);
 B. 展开剂系统为 C:M:5M NH₄OH:2% CaCl₂·2H₂O:W (60:40:4:1:4)
 1. 人脑灰质 GLS 标准品; 2. I 峰, GM₁; 3. II_a 峰, GD_{1a}; 4. II_a 峰, GD_{1b}; 5. III 峰, GD_{1a}; 6. III 峰, GD_{1b}; 7. IV 峰, GT_{1b}

峰见图3, 各峰得量见表3。各纯品的 HPTLC 图谱见图4。

三、讨 论

本文报道了水牛脑灰质 GLS 的分离纯化。粗 GLS 获得后, 一般只需经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析与 Iatrobeds 柱层析, 即可获得层析纯的个别 GLS。若尚混有少许杂质, 再进行一次 Iatrobeds 柱层析即可。这种层析体系的效率很高。被称为 GLS 的高效制备体系^[9]。在大量制备时, 先制成丙酮粉, 再用 C/M 混合液

提取, 可以节省大量有机溶剂^[10]。

根据本研究的经验, 我们认为用碱水解去除磷脂的步骤宜放在 DEAE-Sephadex A-25 柱层析之前, 这样就可以不用在洗脱之后做磷脂的 TLC, 也不用对磷脂阳性的峰逐个进行碱水解、正己烷提取、透析等费时操作。在碱水解时, 溶液中不宜含水(可将洗脱液完全蒸干, 再加 NaOH-甲醇溶液), 这样可避免在用正己烷提取脂肪酸甲酯时, GLS 进入正己烷而丢失。若正己烷相在分层后显混浊, 就表明有水的微滴存在, 因而有 GLS 的丢失。

从 HPTLC 图谱(图2, 行1, 2)可以看出 DEAE-Sephadex A-25 柱层析洗脱的峰 I 和峰 I_a 的主要成分都是 GM₁, 而且峰 I_a 中的 GM₁ 的百分含量较峰 I 中的更高。此外峰 I 与峰 I_a 相比, 后者中 GM₂ 的百分含量较前者为高, 但 GD_{1b} 与 GT_{1b} 则以前者为多。峰 II 的主要成分与峰 II_a 及峰 III 的相同(图2行3—5), 都是 GD_{1a} 与 GD_{1b}。峰 II 因绝对量较峰 II_a 及 III 的少, 故未进一步分离。峰 III_a 中, 除含 GD_{1a} 外, 还含较多的 GD₂ (其区带在行9标准品的 GD_{1a} 与 GM₁ 之间)。峰 II_a 与 III 的 HPTLC 图谱(图2, 行4, 5)与其 Iatrobeds 柱层析的洗脱曲线形状完全一致, 这提示峰 III 左侧的由两个小峰(图1)组成的 II_a 峰, 实即峰 III 的组成部分, 两个小峰的出现系唾液酸测定上的误差所致。峰 IV 中的主要成分是 GT_{1b}, 还含相对较多的 GD₂ (区带在行9标准品 GD_{1a} 与 GD_{1b} 之间^[12])。上述 HPTLC (图2)所提示的几个成分, 即 GM₁, GD_{1a}, GD_{1b} 及 GT_{1b}, 经 Iatrobeds 柱层析又得到证实。本研究证明, 水牛脑灰质是上述四种 GLS 的丰富原料。

参 考 文 献

- [1] Hakomori, S.: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 733, 1981.
- [2] Nudelman, E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 12752, 1982.
- [3] Urdal, DL.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 6869, 1983.
- [4] Pukel, CS. et al.: *J. Exp. Med.*, **155**, 1133, 1982.
- [5] Svennerholm, L.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 740, 1973.
- [6] Esseman, W. J. et al.: *Methods in Enzymol.*, **28**,

- 140, 1972.
 [7] Nilsson, O.: *J. Lipid Res.*, 23, 327, 1982.
 [8] Momoi, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 441, 488, 1976.
 [9] Ariga, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 257(5), 2230, 1982.
 [10] Folch, J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957.
 [11] Ledeen, R. W. et al.: *J. Neurochem.*, 121, 829, 1973.

- [12] Ledeen, R. W. et al.: *Methods in Enzymology*, 83, 139, 1982.
 [13] Svennerholm, L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 604, 1957.
 [14] Vaskovsky, VE, et al.: *J. Lipid Res.*, 9, 396, 1968.
 [15] Aminoff, D.: *Biochem. J.*, 81, 384, 1961.
 [16] Kanfer, JN.: *Methods in Enzymol.*, 19, 14, 660.
 [本文于 1984 年 9 月 15 日收到]

不同地理株白纹伊蚊同工酶和可溶性蛋白的比较研究

李成文 邵军石 时华富 张京生 陆宝麟

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

采用生化技术进行蚊虫分类学和亲缘关系的研究,国外已有不少报道。Robert^[1]等综述了昆虫同工酶及其意义; McDonald 等^[2]和我国的廖建吾^[3]都分别报道了白纹伊蚊的酯酶及可溶性蛋白的电泳图谱,但目前尚未见到对不同地理株的同种蚊虫的生化分析结果。

我们采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和等电点聚焦电泳(IFE),先后对三属六种十二株伊蚊、库蚊及按蚊作了酯酶、 α -磷酸甘油脱氢酶及蛋白的生化分析。现将结果报告如下。

一、材料和方法

1. 实验材料 采用本所饲养的白纹伊蚊 [*Aedes albopictus* (Skuse)] 广州株、南宁株、上海株、海南株、云南株及宜兴株;埃及伊蚊 [*Aedes aegypti* (Linnaeus)] Bora-Bora 株和海南株;黄斑伊蚊 (*Aedes flavopictus* Yamada)。淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens* Coquillett); 三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus* Giles) 及中华按蚊 (*Anopheles Sinensis* Wiedemann)。

2. 同工酶和可溶性蛋白的分析方法

(1) 材料处理 取羽化三日龄虫体于 0℃ 冰箱低温麻醉一小时左右,数 50 只雌或雄蚊分别放于匀浆器内,加入 0.5ml 蒸馏水,在冰浴上匀浆,4℃,10,000rpm/ 分离心 10 分钟,取上清放 2℃ 冰箱备用(3 天之内)。

(2) 蛋白浓度测定 分别测出样品的 OD_{280nm} 和 OD_{260nm} 值后,根据 Warbury^[4]公式计算蛋白浓度

$$(\text{mg/ml}) = 1.45\text{OD}_{280} - 0.74\text{OD}_{260}$$

(3) 等电点聚焦电泳^[5] T = 8%, pH3.5—10.2% 两性载体,每根胶柱 3—4mA,电泳 3—4 小时。以 0.01% 考马斯亮蓝 G-250 快速染色^[6],或酯酶同工酶染色。

(4) PAGE 技术 不连续系统, T = 7%, 每根胶柱 3mA, 电泳 50 分钟左右,其它条件同(3)。

(5) 酯酶同工酶 (EST) 染色法 为本组改进方法。称重氮蓝固蓝 RR140mg 溶于 100ml 0.1M pH 6.5 P.B. 中,过滤后新鲜使用。取上述染液 100ml 加入 1% α -乙酸萘酯 (1 克溶于 70% 乙醇至 100ml) 2.5ml。将电泳后胶条放入上述溶液中,水浴 37℃ 保温 50 分钟,用水漂洗数次,固定于乙酸:甲醇:水 = 1:5:5(V/V) 的溶液中 24 小时,然后放 7% 乙醇中保存。

(6) α -甘油磷酸脱氢酶 (α -GPDH) 同工酶染色^[7] 取 100ml 0.1M pH8.5 Tris-HCl, 内含 0.1M α -甘油磷酸钠 3.15 克, 10mg 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 10mg 硝基蓝四氮唑, 2mg 酚嗪甲酯硫酸盐 (N-MPM), 0.001MEDTA-Na50 μ l, 混合后新鲜使用。染色方法同(5)。

(7) 同工酶带及蛋白带扫描均采用 CS-90