

技术与方法

猪脑神经节苷脂的测定及其分析

潘 颖 黄如彬 王泽生 佟大山 史小苓

(首都医学院生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 神经节苷脂是神经酰胺寡糖苷类物质, 在脊椎动物的中枢神经系统中含量十分丰富. 猪脑神经节苷脂经分离、纯化后的成分和含量的分析显示, 猪脑神经节苷脂的含量占猪脑组织重量的0.0894% (W/W), 是猪脑总脂含量的0.39% (W/W). 主要成分是GM1, GD3, GD1a, GD1b 和 GT1b, 其中GM1和GD1a明显高于人脑.

关键词 神经节苷脂 (Gls), 猪脑, 含量测定

神经节苷脂 (gangliosides, GlS) 是含单糖和唾液酸 (sialic acid, SA) 的神经酰胺寡糖苷 (glycosylceramide) 类物质^[1], 是正常膜结构的成分, 具有多种生物学功能^[2]. 中枢神经细胞特别是脑细胞中含量丰富, 对神经细胞的发育, 再生和修补起重要作用^[3]. 目前在国际市场上只有牛脑Gls制剂. 大多数的实验室也采用牛脑神经节苷脂作神经生物化学、药理学和肿瘤学分析^[2-5]. 为了将 GlS 用于我国神经组织损伤和修复的临床实践, 寻找适合国情的 GlS 的来源, 我们测定了猪脑 GlS 的含量和成分.

1 材料和方法

1.1 材料 新鲜猪脑 (丰台肉联厂提供); 离心液相色谱仪 (北京新技术应用研究所制造); CS-900扫描光密度计; UV-120-2紫外可见分光光度计 (日本岛津公司制造); 硅胶高效薄层层析板 (浙江黄岩红旗化工厂产品); 硅胶 G-60 (Merck 公司产品); GlS (Sigma 公司产品), 其它试剂均为分析纯.

1.2 提取 取新鲜猪脑加入10倍体积的氯仿-甲醇混合液 (1:1, V/V). 匀浆后, 按照 R. K. Yu等^[6]的方法抽提总脂, 并且用Folch^[7]方法将两性脂类分子转入水相. 冷冻干燥后,

称为总脂或粗提 GlS.

1.3 分离、纯化 调整离心液相色谱仪转速为400r/min. 硅胶G注入色谱分析盘. 用氯仿-甲醇-水混合液 (7:3:0.5, V/V) 淋洗, 直至淋洗液为无色为止. 将预先溶于少量氯仿-甲醇混合液 (7:1, V/V, 下同) 的粗提 GlS 加到色谱仪分析盘. 先用氯仿-甲醇-水混合液 (7:3:0.5) 淋洗5个体积, 再换用氯仿-甲醇-水混合液 (6:4:1) 洗脱, 分部收集, 每管100ml. 合并显色反应阳性各管, 减压蒸干, 放4℃保存备测.

1.4 脂结合唾液酸 (LBSA) 含量的测定 利用 Svennerholm^[8]的方法, 取5—35μg 标准 SA 的溶液放入具塞离心管内, 加入2ml 水和2ml 间苯二酚-盐酸试剂. 沸水浴中放置15min, 流水冷却后, 再加入5ml 新蒸戊醇. 剧烈震荡后, 于冰浴中静置10min, 取上层戊醇相测定580nm 波长的吸光值并绘制标准曲线. 依同样的方法, 检测由猪脑抽提的粗提 GlS 和经离心液相色谱分离后产物的 LBSA 含量, 并换算成 GlS 含量.

1.5 成分检测 采用 Mullin^[9]方法, 作高效硅胶薄板层析 (HPTLC) 分析. 取相当于1.5μg

SA 含量的 Gls 点于 20cm × 20cm HPTLC 板上. 以氯仿-甲醇-水 (55:45:9) 内含 0.02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的混合液为展层剂. 间苯二酚-盐酸试剂作为显色剂. 喷雾后, 在 140℃ 烘箱中烤 10min 显色. 在 580nm 扫描 HPTLC 板. 计算各种 Gls 成分的百分比含量.

1.6 猪脑实际脂类含量测定 选用 Weibul^[10] 方法. 在 2g 猪脑组织匀浆中加入 8.3mol/L 盐酸 10ml, 在 75℃ 水浴中消化. 用乙醚和石油醚反复抽提, 再置索氏脂肪提取器提取, 水浴蒸干有机溶剂. 待 100℃ 烘烤恒重后, 视为猪脑实际脂含量.

2 实验结果

2.1 SA 标准曲线 图 1 中以标准 SA 浓度为横坐标, 以 A_{580} 值 (ABS) 为纵坐标, 绘制标准曲线. 在 15μg 到 105μg 的 Gls 测定范围中, 吸光值和 LBSA 含量的变化呈良好的线性关系 ($r=99.8$), 与文献 [11] 相似. 依同样的方法测定离心液相色谱产物的 (LBSA) 含量 $CV < 4$.

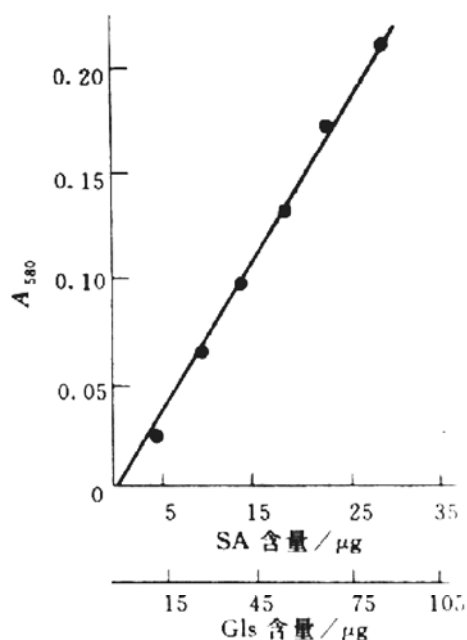


图1 LBSA 的浓度变化和检测器 A_{580} 的响应曲线

2.2 Gls 含量 应用离心液相色谱技术从猪脑分离、纯化 Gls. 经检测 LBSA = 24%, 相当于 Gls 含量大于 70%. 每 100g 新鲜猪脑组织中

可提取 Gls 0.0894g ($n=3$).

2.3 猪脑总脂含量 Weibul 法测定结果, 每克猪脑组织实际脂含量 $0.225 \pm 0.2\text{g}$ ($n=3$). 而依照 Folch 方法转入水相的两性脂类 (总脂或粗提 Gls) 含量相当于每克猪脑中含 $1.878 \times 10^{-3}\text{g}$. 此结果和文献 [11—13] 的结果比较见表 1.

表1 纯化神经节苷脂的若干方法比较

方 法	K. Miyazaki 法	夏霞娟 法	S. Ando 法	本方法
样品量/g	2130	1520	1000	500
Weibul 法 总脂/g	—	—	—	112.5 ± 10.0
Folch 法 总脂/g	3.4	3.6	—	0.939 ± 0.14
Gls 提取 量/g	1.1424	0.557	0.406	0.447 ± 0.25
Gls/Folch 总脂	33.6%	15.47%	—	47.5%
Gls/湿 脑组织	0.0536%	0.0366%	0.0406%	0.0894%

注: 上述文献中的样品来自牛脑, 唯本法的样品来自猪脑.

2.4 成分分析 标准人脑白质 Gls (Virginia 医学院 R. K. Yu 教授提供) 和猪脑组织的 Gls

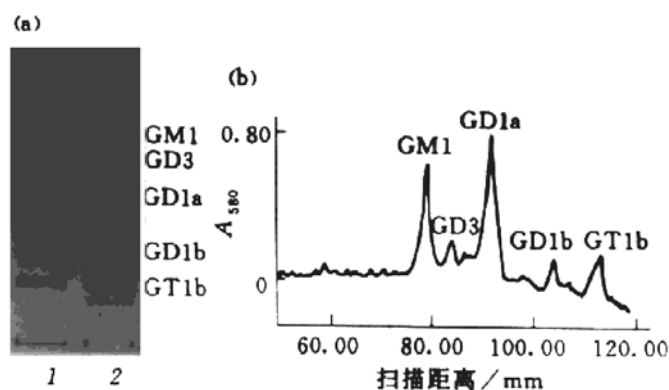


图2 Gls 的 HPTLC 分析图谱

(a) 猪脑 (1) 和人脑白质 (2) 的 Gls HPTLC 分析图谱. (b) 猪脑 Gls 图谱经 CS-900 光密度计扫描的谱图. 展层剂是氯仿-甲醇-水混合液 (55:45:9, V/V) 内含 0.02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 扫描波长 580nm.

在同一 HPTLC 板上展层分析, 表明猪脑组织中含有 5 种主要的 Gls. 它们是 GM1, GD3,

GD1a, GD1b 和 GT1b, 见图2.

本法所测猪脑 Gls 的各种成分的百分比含量与文献[11, 14]报导的人脑和牛脑的 Gls 各种成分比较见表2.

表2 猪脑、人脑及牛脑 Gls 成分百分比含量比较
不同成分的含量/%

脑组织	方法	GM1	GD3	GD1a	GD1b	GT1b
人	K. Suzuki 法	21.5 ± 1.7	7.40 ± 0.5	16.6 ± 1.0	17.9 ± 0.6	13.7 ± 0.5
牛	M. C. Byrne 法	31	2.6	26.6	11.2	17.1
猪	S. Ando 法	32.9	14.8	22.7	8.2	6.7
猪	本方法	32.4 ± 1.4	7.53 ± 1.4	35.7 ± 2.3	6.97 ± 1.1	9.40 ± 1.6

(n=3)

3 讨 论

神经酰胺寡糖苷包括神经酰胺二糖、红细胞糖苷脂和 Gls. 脊椎动物的中枢神经系统中 Gls 的含量最高, 其成分主要是 GM1, GD3, GD1a, GD1b 和 GT1b. 猪脑中这五种 Gls 含量丰富, 各种成分的百分比含量接近牛脑, 而与人脑有较大差别 (表2), 主要表现是 GD1a 和 GM1 的含量高于人脑. 在各种 Gls 中, GM1 和 GT1b 对神经突起生长的促进作用最大^[15], 值得注意的是 GM1 对中枢神经系统损伤的治疗作用是近年药理学领域的一个创新. 可以改善脑功能的多种参数, 是医学专业的一个有价值的新工具^[16]. GD1a 在神经元树突和轴突分支以及建立功能性突触中起重要作用^[3, 15]. 猪脑中 GM1, GD1a 和 GT1b 含量较丰富, 提示了猪脑 Gls 制备可能成为治疗神经系统疾患的理想制剂, 显示出良好的应用前景.

测定的结果表明, Gls 是猪全脑湿重的 0.0894% (W/W) 和 S. Ladisch 所述基本一致^[17]. 猪脑 Gls 是猪脑实际脂含量的 0.39%

(W/W) (表1). 可见猪脑 Gls 的总含量不低于牛脑, 具有开发价值.

以上各表比较的结果还提示, 不同的提取方法对组织中的 Gls 回收和组成百分比含量影响比较大. 我们采用的方法结果和 S. Ando^[11]的报导相吻合 (表2), 虽然本法的离心液相色谱分离、纯化步骤的回收实验表明, 回收率为 90.25%, 略低于硅胶柱层析法. 但是总的分离、纯化效率明显优于其它方法 (表1).

利用 Svennerholm 方法分析 LBSA (n=3) 结果显示 CV<4, 重复性良好. 若在显色阶段采取较好的密封措施, 减少盐酸的蒸发, 结果会更为理想.

我们的实践表明, 无论是制备还是测定 Gls, 都应尽可能的采用新鲜的组织. 而且分离、纯化过程要迅速、简便. 冷冻保存或多次反复提取都将使 GM1 含量明显下降. 可能的原因是 GM1 转化成 GT 或 GD. 测定过程中表现的 GM1 含量下降, 而 GD1a 等成分含量下降不明显, 可能有助于说明这个问题.

参 考 文 献

- 1 Murray R K, Granner D K, Mayes P A *et al.* Harper's biochemistry 22 Edition. California: Prentice Hall, 1990: 231
- 2 Kant N, Joshi A P, Gupta K C. J Chromatogr, 1989; **494**: 289
- 3 范振华. 中国康复医学杂志, 1993; **8** (1): 42
- 4 Ledeen R W. J Neurosci Res, 1984; **12**: 147
- 5 Ando S, Waki H, Kon K. J Chromatogr, 1987; **405**: 125
- 6 Yu R K, Ledeen R W. J Lipid Res, 1972; **13**: 680
- 7 Folch J, Lees M B, Eng L F. J Biol Chem, 1957; **226**: 497
- 8 Svennerholm L, Fredamm P. Biochim Biophys Acta, 1980; **417**: 97
- 9 Mullin B R, Poore C M B, Rupp B H. J Chromatogr, 1983; **278**: 160
- 10 营养与卫生研究所. 食品营养成分测定法, 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 29
- 11 Ando S, Nan-Chon Chang, Yu R K. Anal Biochem, 1978; **89**: 437
- 12 Miyazaki K, Okamura N, Kishimoto Y *et al.* J Biochem, 1986; **252**: 735

- 13 夏霞娟, 崔肇春, 顾天爵. 生物化学与生物物理进展, 1985, (5): 27
- 14 Byrne M C, Agler M S, Aquino D A *et al.* Anal Biochem, 1985; 148: 163

- 15 吴谷盛. 细胞生物学杂志, 1986; 8 (4): 145
- 16 Samson J C. Drug Ves Res, 1990; 19 (3): 209
- 17 Ladisch S, Gillard B. Anal Biochem, 1985; 146: 220

用固相 pH 梯度等电聚焦分析 Gc 蛋白亚型

郭尧君 郭 强*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

黄力力 喻忠义

(法庭科学研究所, 北京100038)

摘要 用固相 pH 梯度等电聚焦技术及免疫固定技术对201名北京地区无关汉族群体的人血清 Gc 蛋白亚型进行了分型鉴定及基因频率的调查. Gc^{1F} 为0.3698, Gc^{1S} 为0.2812, Gc^2 为0.3490. 观察值与期望值吻合良好 ($\Sigma\chi^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

关键词 固相 pH 梯度, 等电聚焦, 人血清 Gc 蛋白亚型, 免疫固定

固相 pH 梯度等电焦 (immobilized pH gradients isoelectrofocusing, IPG IEF) 技术是1975年由瑞典科学家 Gasparic 等人^[1]建立的, 并在80年代由意大利科学家 Righetti^[2]不断完善. 由于这种技术克服了阴极沉淀, pH 梯度稳定, 导电性和缓冲能力均一可控, 上样量大以及可达到超窄 pH 范围 (0.1pH) 及超高分辨率 (0.001pH), 所以在法医血型鉴别及分子生物学领域中得到了广泛应用.

“型特异成分” (group-specific component, Gc), 又称维生素 D 结合蛋白 (DBP), 是存在于人类血清中的一组生物活性相同、结构相似的 α_2 球蛋白. 1959年 Hirschfeld^[3] 通过免疫电泳首先发现其遗传多态性及三种常见表型 $Gc1-1$, $Gc2-1$, $Gc2-2$, 并证实由一对常染色体共显性等位基因控制 (Gc^1 , Gc^2). 1977年 Constans^[4] 用 IEF 技术将 Gc 又分成 $Gc 1F$, $Gc 1S$, $Gc 1F-1S$, $Gc 2$, $Gc 2-1S$, $Gc 2-1F$ 6种表型, 由复等位基因 Gc^{1F} , Gc^{1S} 和 Gc^2 控制^[5-7]. 我国北方汉族人 Gc 的血型鉴别机率 (D. P) 在 0.5566-0.5758 之间, 非父排除率为 16%^[8]. 按 Gc 复等位基因计算, 其 D. P 和非父排除率更高, 如香港地区汉族人 D. P 为 0.7983, 非父

排除率为 34.12%, 均大于 ABO, Rh, MN 等血型系统^[9]. 所以 Gc 遗传标记在个体识别及群体进化遗传理论上有着重要意义. 我们用国内未见有报导的 IPG IEF 技术对血清 Gc 蛋白亚型进行了研究, 以期得到更高的分辨率.

1 材料与方法

1.1 样品来源

201份血样采自北京地区无亲缘关系健康汉族未抗凝全血, 分离血清在 -20°C 保存.

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 瑞典 Pharmacia LKB 公司 Multiphor I 电泳仪及梯度凝胶灌胶附件.

1.2.2 试剂 a. 贮液: 29.1% 丙烯酰胺 / 0.9% 甲叉双丙烯酰胺, LKB 公司产品.

b. 电极缓冲液: 阳极 10mmol/L 谷氨酸, 阴极 10mmol/L NaOH.

c. Immobiline pK4.6, pK9.3 和 Ampholine pH4-6, 分别为 LKB 1985 年和 1979 年产品.

d. 脱色液: 甲醇: 冰乙酸: 水 = 4:1:5.

* 合肥中国科技大学生物系88届毕业生.

收稿日期: 1993-06-11, 修回日期: 1993-09-23

It has been reported that angiotensin I (A I) has antioioid effect. However, the mechanism of this action is still not understood. To evaluate a possible interaction on c-fos protooncogene expression between A I and DPDPE (δ receptor agonist) or NDAP (κ receptor agonist), the changing patterns of Fos protein in rat brain (less cortex and cerebellum) tissue induced by them were determined by immunoprecipitation. The results indicated that A I at $0.1 \mu\text{mol/L}$ markedly evoked the Fos protein expression in brain tissue. Meanwhile, both DPDPE ($0.1 \mu\text{mol/L}$) and NDAP ($0.1 \mu\text{mol/L}$) could induce Fos protein increase in brain although their effects were less than that induced by A I. The levels of Fos protein expression by A I plus DPDPE or NDAP are lower than that induced by A I individually. It is suggested that the action on c-fos expression between A I and opioids is antagonistic. And opioids may weaken the evoked action of A I on c-fos expression in the brain.

Key words Fos protein, brain, angiotensin I, opioids

Determination and Analysis of Pig Brain Gangliosides. Pan Ying, Huang Rubin, Wang Zesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 353—355
Gangliosides are one of the glycosylceramides, which are particularly abundant in the central nervous system of vertebrates. The content and components of pig brain Gls were detected. There were 0.0894% (W/W) Gls presented in the pig brain. It was about 0.39% (W/W) of total lipid. The main components were GM1, GD3, GD1a, GD1b and

GT1b. GM1 and GD1a of the pig brain were higher than that of human brain.

Key words gangliosides (Gls), pig brain, determination of content

Subtyping of the Gc System by Immobilized pH Gradients Isoelectrofocusing. Guo Yaojun, Guo Qiang, Huang Lili, Yu Zhongyi. (Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 356—359

The distribution of Gc subtypes of 201 unrelated, healthy donors in the Han population in Beijing were investigated. Gc^{1F} is 0.3698, Gc^{1S} , 0.2812, Gc^2 , 0.3490. There was good agreement between the observed and the expected value. ($\Sigma x^2 = 1.057$, $P > 0.70$).

Key words immobilized pH gradients, isoelectrofocusing, Gc subtypes of human serum, immunofixation

Determination of Globin Gene Expression by RNase Protection Assay. Liu Qinghui, Liu Depei, Liang Zhiquan. (Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 359—362

Quantitative analysis of mRNA is an important technique in the study of gene expression regulation. RNase protection assay shows higher sensitivity and easier operation than Dot blot and Northern blot. The expressions of human β E-globin gene and mouse α -globin gene in transgenic mice were successfully analyzed by RNase protection assay.

Key words RNase protection, globin gene, transgenic mice

Direct Micro Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Mice Blood. Rong