

用柱层析与薄层层析法从面粉中分离糖脂

赵宝贞 文德成 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

生物膜主要由脂质和蛋白质组成, 脂质中除磷脂占主要成分外, 还包括少量糖脂, 它占总脂质的 2% 左右。一般植物及微生物膜上糖脂含量较高, 如莱氏衣原体膜上糖脂占膜脂 50% 以上^[1]; 动物细胞膜上糖脂含量低。

面粉中含有 0.5—3% 的脂质, 其中糖脂占 26.4%。而单半乳糖甘油二酯(monogalactosyl diglyceride, MGDG), 和双半乳糖甘油二酯(digalactosyl diglyceride, DGDG)又占糖脂的 69%^[2]。面粉来源广, 价廉, 糖脂含量高, 是制备糖脂的理想原料。选用水饱和正丁醇为溶媒以柱层析与薄层层析方法分离糖脂, 可获得较满意的结果^[3]。目前研究工作中用的糖脂, 依靠国外进口, 不但价格昂贵, 品种不全, 而且在运输过程中又常发生变质。本文参照文献中分离糖脂的方法, 作了一些改进, 例如缩短分离时间, 提高了糖脂产量, 用测定单糖的方法代替放射自显影法, 可鉴定糖脂种类, 方法简便易行, 适于制备少量标准糖脂。分离出的单半乳糖甘油二酯与双半乳糖甘油二酯, 经薄层层析鉴定, 结果满意。

材料和方法

一. 材料

1. 原料与试剂 面粉为市售食用面粉。正丁醇, 氯仿, 丙酮等均为国产分析纯。硅酸, 单半乳糖甘油二酯均为美国 Sigma 公司产品。硅胶为青岛海洋化工厂产品。双半乳糖甘油二酯为德国 Serva 公司出品。半乳糖为上海试剂二厂出品。

2. 薄层层析硅胶板 以硅胶 15 克加入少

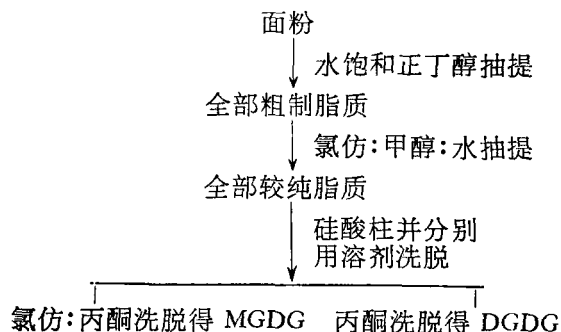
量有机粘合剂, 调匀成糊状涂布于 5×15 厘米玻璃板上, 室温干燥, 使用前在 110°—120℃ 活化 1—3 小时。

3. 层析柱 2×15 厘米玻璃层析柱用 100—300 目硅酸作为吸附剂, 使用前硅酸在 120℃ 活化一小时。

二. 方法

1. 脂质的提取 面粉加水饱和的正丁醇研磨浸渍, 用布氏漏斗抽滤, 滤液为黄色透明。置旋转蒸发仪上蒸发至微量(水浴温度在 40℃ 以下), 用氯仿: 甲醇: 水(8:4:3)^[4]提取脂质; 待溶剂分相, 取下层黄色溶液; 用氮气除去多余溶剂, 再用氯仿反复洗涤 2—3 次, 获黄色油状样品, 供进一步分离分析。

2. 粗制单半乳糖甘油二酯和双半乳糖甘油二酯的分离 取一定量上述脂质样品加至硅酸柱上, 用不同溶剂洗脱分离糖脂。先用氯仿: 丙酮(1:1V/V)为洗脱剂, 洗脱含有 MGDG 糖脂部分。再用丙酮为洗脱剂, 洗脱含有 DGDG 糖脂部分。操作流程如下:



3. 纯化 MGDG 和 DGDG 利用薄层层析法进一步纯化。将所得粗制 MGDG 和 DGDG

样品分别用 5×15 厘米硅胶薄板进行纯化。展开剂为氯仿:丙酮:醋酸 (6:6:1V/V), 碘蒸气熏蒸, 用标准糖脂作为对照, 将相应糖脂斑点从硅胶薄板上挖下, 分别加入适量氯仿溶解, 使其成分完全溶出, 然后过滤。用氮气浓缩至少量, 即为 MGDG 和 DGDG 纯品。

4. MGDG 和 DGDG 的分析鉴定 用糖脂显色剂确定上述提纯的糖脂, 我们采用了 5-甲基间苯二酚显色, 加热糖脂显出紫红色斑点。为了进一步鉴定糖脂种类, 可将薄层层析板上 MGDG 和 DGDG 糖脂刮下合并 (根据图 1 二者皆系半乳糖脂), 用 1 当量盐酸 100℃水解 24 小时, 除去盐酸, 用吡啶溶解糖, 再经薄层层析用标准糖鉴定糖的种类。

结果和讨论

图 1 为面粉中分离 MGDG 和 DGDG 的薄层层析图谱, 图中的 MGDG 和 DGDG 的 R_f 值分别为 0.55 和 0.07, 与标准糖脂 R_f 值比

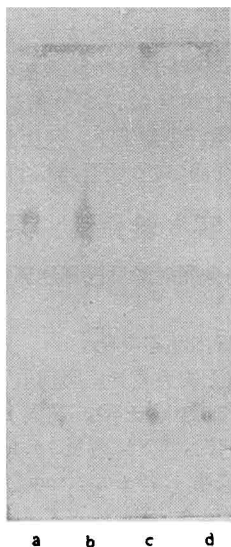


图 1 面粉中分离 MGDG 和 DGDG 的薄层层析图谱

硅胶 H 薄板, 展层溶剂: 氯仿-丙酮-冰醋酸 (6:6:1)
显色剂: 5-甲基间苯二酚。
a. 样品 MGDG b. 标准 MGDG
c. 标准 DGDG d. 样品

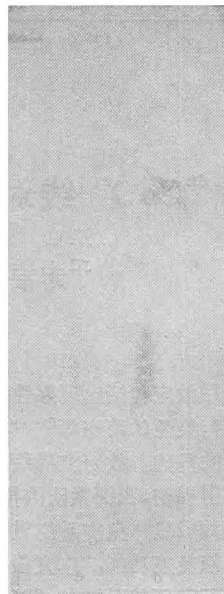


图 2 MGDG 和 DGDG 水解后之半乳糖与标准半乳糖薄层层析图谱

硅胶 H 薄板, 展层溶剂: 丙酮:正丁醇:水 (53:40:7)。显色剂: 5-甲基间苯二酚
a. 样品 b. 标准半乳糖

较很相近。从二种糖脂显色斑点判断, 面粉中的 MGDG 和 DGDG 含量均较高。

为了进一步确定上述两种糖脂, 我们将提纯后的两种糖脂进行水解, 再经薄层层析水解后的糖, 与标准半乳糖比较, 确定均为半乳糖, 见图 2。

Caffer 等首次从面粉中抽提脂质, 并发现 MGDG 与 DGDG 为面粉中主要糖脂。Mac-murray 等^[2]曾用水饱和和正丁醇, 氯仿-甲醇以及乙醇-乙醚-水三种溶剂系统抽提面粉脂质, 发现用水饱和和正丁醇抽提效果最好。我们将面粉在水饱和和正丁醇浸渍 3—4 天抽提效果最佳, 分离后的两种糖脂质比较稳定。

薄层层析分离糖脂, 溶剂系统的选择至关重要。我们比较了“氯仿:甲醇:水”; “氯仿:丙酮:水”以及“氯仿:丙酮:醋酸” (6:6:1) 三种溶剂系统, 结果以末一种最为理想, 可获清晰的糖脂分离图谱。

低剂量 ^{60}Co γ 线对淋巴细胞环核苷酸和 DNA 水平的影响

于志浩 王宗伍 韩玲 陈铁河 潘予沙 苏福强

(海军医学研究所,上海)

辐射损伤晚后效应包括出现恶性新生物,机体老化,免疫功能异常,染色体畸变等^[1-3]。其中免疫功能低下是形成病变的基础,故研究射线对机体免疫系统的作用对了解辐射损伤,及探索防治措施至为重要。

淋巴细胞是构成机体免疫系统重要组成部份,承担细胞免疫和体液免疫功能。本文报告低剂量 γ 线对动物外周血淋巴细胞环核苷酸和 DNA 水平的影响。

材 料 和 方 法

一、材料

1 动物 长耳白兔,64 只,雄性,体重为 $2.55 \pm 0.41\text{kg}$ 。

2. 照射条件 ^{60}Co γ 线外照射,一次全身照射的剂量率为 26.5R/分 ,分次全身照射的剂量率为 0.25R/分 。

二 实验方法

1. 正常值测定 以 1—3 个月内的三批共 15 只正常兔子的 9 次测定值,及 49 只兔子照前半月内的 3 次测定值的平均数作为正常值。

2. 实验分组:

(1) 一次全身照射实验: 25 只兔子,分 5 组,即正常组(不照射)、50、100、200、300rads 照射组。

(2) 分次全身照射实验: 25 只兔子,分 5 组,即正常组(不照射)、每天照射 5rads 累积剂量为 50、100、200、300rads 组。

(3) 分次全身照射并给外源性 cAMP 实验: 14 只兔子,分 3 组,即正常组(不照射)、对照组(照射并肌注注射用水)、治疗组(在全身照射 1—5 天,11—15 天,

21—25 天肌注 cAMP 水溶液 $5\text{mg/kg}/0.5\text{ml/天}$,分别称为第 1、2、3 疗程)。

3. cAMP、cGMP 及 DNA 测定

照后 2 小时、1、3、7、14、21、29 天测定下述指标。

(1) 淋巴细胞 cAMP、cGMP 含量: 取耳静脉血 2ml, EDTA-Na 抗凝。用淋巴细胞分离液(比重为 1.077)分离,得淋巴细胞浓度约 $4.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。淋巴细胞沉淀加 6% 三氯醋酸 0.5 消化,分离,取上清用水饱和和乙醚洗涤 4 次。取水相用放射免疫法测定 cAMP、cGMP 含量。

(2) 淋巴细胞 DNA 含量: 淋巴细胞沉淀用 0.2N 过氯酸消化。90℃ 水浴保温 15 分钟,过滤,滤液在 260nm 中测光密度。

(3) T 淋巴细胞 DNA 合成率: 取肝素化静脉血 50 μl ,加入 0.4ml RPMI 1640 培养液中,加 PHA $1\mu\text{g}/\text{ml}$,置 $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 保温 72 小时。保温期间加 $^3\text{H-TdR}$ $1.2\mu\text{Ci}$ 。保温后置纤维滤纸上,经生理盐水、5% 三氯醋酸、无水乙醇洗涤,30℃ 烘干,测 cpm 计数。

实 验 结 果

一、一次全身照射对淋巴细胞环核苷酸和 DNA 的影响

1. 照后 30 日内动态变化

各组照前值无明显差异。照前值: cAMP $3.19 \pm 0.80\text{pmol}/10^6$ 细胞 ($\bar{x} \pm \text{SD}$,下同), cGMP $0.28 \pm 0.08\text{pmol}/10^6$ 细胞, DNA 含量 $70.16 \pm 25.78\mu\text{g}/10^6$ 细胞, DNA 合成率 $4.49 \pm 0.24\text{cpm/分}$ (10g)。

参 考 文 献

- [1] 黄芬: 《生物科学参考资料第十三集》,科学出版社,143,1981。
- [2] Macmurray, T. A., et al.: *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 21(10), 520, 1970.
- [3] Clayton, T. A., et al.: *J. Chromatog.*, 47, 277, 1970.

- [4] Folch, J., et al.: *J. Biochem.*, 226, 497, 1957.
- [5] Malpress, F. H., et al.: *Nature*, 164, 963, 1949.
- [6] Berzelson, L. D. (Ed.): *Lipid: Biochemical Preparations*, 250, 1980.
- [7] Carter, H. E., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 178, 3735, 1956.

[本文于 1985 年 7 月 10 日收到]