

# 牛脑中多磷酸肌醇磷脂的制备\*

丁克宏\*\* 梁念慈

(湛江医学院, 湛江 524023)

**关键词** 磷脂酰基肌醇类, 羧甲基纤维素, 色谱法

多磷酸肌醇磷脂 (polyphosphoinositides, PPI) 在细胞跨膜信号传递中起重要作用, 并与细胞增殖和肿瘤发生有密切关系<sup>[1]</sup>. 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-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>), 目前国内无生产, 产品依赖进口, 价格昂贵. 本室已报道分离纯化兔脑中 PIP<sub>2</sub> 的硅胶柱层析法<sup>[2]</sup>, 国内未见分离 PIP 的报道. 本文报告一种制备牛脑中 PIP 和 PIP<sub>2</sub> 的新方法, 这对研究 PPI 的代谢及生理作用有重要意义.

## 1 材料与方法

**1.1 试剂** 标准 PIP 和 PIP<sub>2</sub> 购自 Sigma 公司及剑桥大学 RF Irvine 教授惠赠, 羧甲基纤维素 (CM<sub>52</sub>) 和硅胶 H 购自上海化学试剂采购站, 其余试剂用市售分析纯.

**1.2 粗 PPI 制备** 新鲜牛脑用冷 25 mmol/L Tris-295 mmol/L 蔗糖缓冲液 (pH 9.5) 洗涤后, 加入 10 倍湿脑重体积的氯仿: 甲醇 (1:1, 体积比, 以下均同). 用高速组织捣碎机以最大转速匀浆 10 min, 匀浆液于 1000 × g 离心 10 min. 上清液含大部分的非 PPI 磷脂, 沉淀中加入 10 倍体积氯仿: 甲醇 (1:1) 同上离心洗涤一次. 沉淀中加入 10 倍体积氯仿: 甲醇: 1 mol/L HCl (8:4:3) 进行抽提, 下层用甲醇: 1 mol/L HCl (1:1) 洗涤后, 所得有机相即为粗 PPI 抽提液. 以上操作均在 4℃ 下进行.

**1.3 CM<sub>52</sub> 纤维素柱层析分离纯化 PPI** a. CM<sub>52</sub> 的处理: CM<sub>52</sub> 用无水乙醇浸泡后, 蒸馏水洗至无醇味. 1 mol/L HCl (约 5 倍体积) 浸泡后, 蒸馏水洗至 pH 6.0. 再用 1 mol/L KOH 洗涤, 蒸馏水洗至 pH 8.0, 此时树脂由钠型转为钾型. 抽滤后用氯仿: 甲醇 (1:1) 洗涤, 使 CM<sub>52</sub> 在有机溶剂中充分膨胀. b. 制柱: 预处理的 CM<sub>52</sub> 装于 1.5 cm × 25 cm 的玻璃柱中, 柱高 14 cm, 以 10 倍柱床体积氯仿: 甲醇 (1:1) 平衡柱. c. 加样: 取相当 5 g 湿脑所得的粗 PPI 抽提液过柱, 流速约 30 ml/h. d. 洗脱: 先用 7 倍柱床体积氯仿: 甲醇 (1:1) 洗去色素等杂质, 然后用总量 500

ml 氯仿: 甲醇 (1:1) 至氯仿: 甲醇: 水 (5:10:4) 作线性梯度洗脱, 流速 30 ml/h. e. 收集: 每管 10 ml. 以上操作均在 4℃ 下进行. 每管中取少量洗脱液作含磷测定及磷脂鉴定. f. 磷测定: 磷钼酸铵显色法<sup>[3]</sup>.

**1.4 薄层层析 (TLC) 分离鉴定 PPI** a. 制板, 取 50 g 硅胶 H 加入 120 ml 0.5% 羧甲基纤维素钠, 研匀后推板, 板厚约 0.5 mm, 在 110℃ 下 30 min, 然后用 1% 草酸钾湿润, 再在 110℃ 下活化 30 min, 贮存于干燥器内备用. b. 点样后风干. c. 用碱性展开剂 (氯仿: 甲醇: 水: 氨水 = 48:45:11.5:3.3) 或酸性展开剂 (氯仿: 甲醇: 36% 乙酸: 水 = 45:20:6:1), 展开距离 10 cm. d. 用磷显色法使磷脂显色<sup>[4]</sup>. e. 过碘酸氧化检验邻位二醇, 将 1% 过碘酸喷于含样品的硅胶板上, 室温下 15 min 后, 电吹风烘干, 加西佛试剂显紫红色, 再加 1.2 mol/L 盐酸紫红色不退去, 证明含邻位二醇.

## 2 结果与讨论

**2.1 CM<sub>52</sub> 纤维素柱层析分离纯化 PPI** 每管洗脱液取少量作磷含量测定得磷洗脱曲线如图 1. 图中显示两个峰, A 峰小, B 峰大而宽. 经 TLC 鉴定两峰均为单一斑点, 且分别与标准 PIP 和 PIP<sub>2</sub> 有完全相同的 R<sub>f</sub> 值. 将峰下各管合并, 加入 1/3 体积 1.2

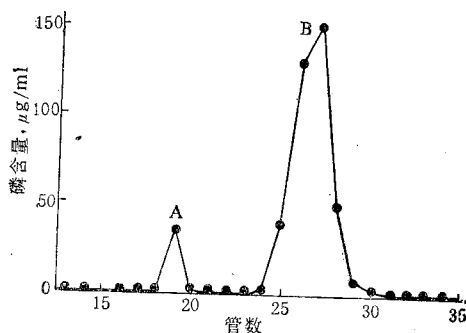


图 1 CM<sub>52</sub> 纤维素柱层析磷洗脱曲线

\* 国家自然科学基金资助项目.

\*\* 现在衡阳医学院生化研究室.

收稿日期: 1991-08-23 修回日期: 1991-10-21

mol/L HCl, 充分振摇后分层, 去上层, 下层用  $N_2$  吹干, 充入  $N_2$  后密封, 于  $-20^\circ\text{C}$  下保存备用。

**2.2 TLC 分离鉴定 PPI** 分别取少量洗脱液, 浓缩后作 TLC。磷显色结果表明, A, B 峰分别与标准 PIP,  $PIP_2$  有相同  $R_f$  值, 两峰分别与标准混合后层析均为单一斑点, 且蓝色加深。此外说明, 中性氯仿: 甲醇主要抽提非 PPI 的磷脂, 而酸性氯仿: 甲醇可抽提出 PPI (见图 2)。

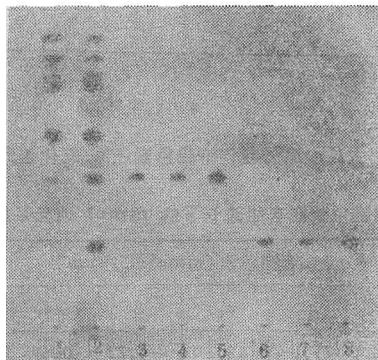


图 2 磷脂抽提液、纯化 PPI 与标准 PPI 的 TLC 图谱

磷显色法, 碱性展开剂展层。1: 中性抽提液, 2: 酸性抽提液, 3: A 峰, 4: 标准 PIP, 5: 3 + 4, 6: B 峰, 7: 标准  $PIP_2$ , 8: 6 + 7

图 3 表明, A, B 峰经 TLC 后, 过碘酸氧化法检验呈紫红色, 两峰  $R_f$  值分别与标准 PIP 和  $PIP_2$  的相

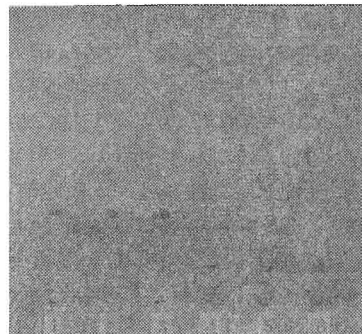


图 3 纯化 PPI 与标准 PPI 的 TLC 图谱

过碘酸氧化法显色, 酸性展开剂展层。1: A 峰, 2: 标准 PIP, 3: 1 + 2, 4: B 峰, 5: 标准  $PIP_2$ , 6: 4 + 5

等, 加入盐酸后紫红色不消退。

本法分离纯化 PPI 无需脱盐, 经一次柱层析即可获得较高纯度的 PIP 和  $PIP_2$ , 操作简单, 产率每克鲜脑可得 PIP 0.1 mg,  $PIP_2$  0.8 mg, 故不失为一种分离纯化 PPI 的简便实用方法。

## 参 考 文 献

- 1 Berridge M J, Irvine R F. *Nature*, 1989; **341**: 197
- 2 陈庆辉, 梁念慈. 生物化学与生物物理进展, 1989; **16**: 321
- 3 Dittmer J C. *J Lipid Res*, 1961; **5**: 126
- 4 Smith I. *Chromatog Electropho Tech*; 1976; **1**: 355

## 测定线粒体细胞色素 $c, c_1, b, aa_3$ 含量的简单方法

赵 建 钢

杨 同 书

(中国康复研究中心康复医学基础研究所, 北京 100077)

(白求恩医科大学地方病研究所, 长春 130021)

**关键词** 还原-氧化差光谱, 细胞色素  $c, c_1, b, aa_3$ , 线粒体

线粒体是细胞中的重要细胞器, 能量代谢的主要场所。在呼吸链中, 细胞色素  $c, c_1, b, aa_3$  起着电子传递中间体的作用, 其任何一种含量的减少或缺失将影响细胞的呼吸功能。由于细胞色素是一类带有卟啉环的蛋白质, 在可见光区域有明显的吸收, 可以利用这一性质进行比色定量。J. N. Williams<sup>[1]</sup> 首先建立了测定线粒体还原-氧化差光谱计算细胞色素含量的方法。W. H. Vanneste<sup>[2]</sup> 进行了改进, 修正了计算含量的方程组系数, 简化了计算步骤。本文在前人工作基础上对差光谱测定方法进行简化, 并应用计算机使细胞色素含量的计算快速而准确。

## 1 材 料 和 方 法

取新鲜待测组织, 按 1:9 (W:V) 与匀浆液 (0.25 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 7.4) 混合, 玻璃匀浆器匀浆, 然后进行差速离心。第一次离心, 2000 r/min,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min, 弃去沉淀。第二次离心, 10 000 r/min,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min, 弃去上清。借助匀浆器用匀浆液洗沉淀, 重复第二次离心, 得到沉淀线粒体。用改进的 Lowry 法<sup>[3]</sup> 测蛋白含量, 以牛血清白蛋白作标准。

收稿日期: 1991-06-28

修回日期: 1991-11-25