

技术与方法

猪脑中提取高纯度神经节苷脂*

黄如彬 潘 颖 王泽生 佟大山 史小玲

(首都医学院生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 应用凝胶层析和离心液相层析法, 从猪脑中提取高纯度神经节苷脂(Gls), 按脂结合唾液酸(LBSA)计为30.1%, 经硅胶薄层层析, 580nm扫描结果表明含5种Gls, 即: GM1为19.5%, GD3为13.8%, GD1a为27.8%, GD1b为14.2%和GT1b为19.3%.

关键词 神经节苷脂(Gls), 猪脑, 离心液相层析, 纯化

神经节苷脂(gangliosides, Gls)是一类含唾液酸的酸性鞘糖脂, 是神经细胞膜的重要组成部分. 已经证明它可作为某些神经递质、激素、病毒和干扰素等的受体^[1,2]; 参与神经组织分化、再生和修复; 与神经冲动的传导、细胞间信息的识别和维持等均有密切关系. 随着神经生物化学和神经药理学的发展, 对Gls的代谢及其生物学作用研究已成为神经科学的重要课题. Gls在国内大多数依赖进口, 虽然国内外已报导了多种分离纯化的方法^[3-5], 但绝大多数以牛脑为原料, 而且有操作步骤繁琐、溶剂用量大、周期长等不足, 不宜大量制备. 本文以猪脑为原料, 以国产硅胶代替进口的Iatrobeads大颗粒硅胶, 利用离心液相层析和凝胶层析相结合的方法, 从猪脑中提取高纯度Gls.

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂 新鲜猪脑购自北京肉联厂; CL-930双波长薄层扫描仪(岛津); UV-120-02紫外可见分光光度计(岛津); LKB柱层析仪(瑞典); Labconco冷冻干燥机(美国); 超声波细胞粉碎机和电动匀浆机(芝新科技研究所); 离心液相色谱仪(新技术应用研究所); 高效薄层层析板(silica gel G-60, Merck);

Sephadex LH-20 (Pharmacia); 唾液酸和牛脑的GM3, GD3, GM1 (Sigma); 人脑白质Gls标准品(美国Virginia医学院于宽仁教授赠送); 间苯二酚(Sigma); 其余均为国产分析纯试剂.

1.2 高效薄层层析(HPTLC)法 取20cm×20cm层析板一块, 距底边1.5cm处点样, 点样量相当于脂结合唾液酸5μg, 以氯仿: 甲醇: 水(55: 45: 9, V/V/V, 含0.02% CaCl₂·2H₂O)为展层液, 用展层液饱和2h后进行展层, 待层析完后吹干, 用间苯二酚-HCl显色剂喷雾显色(按Svennerholm法^[6]配制).

1.3 唾液酸含量测定 以Sigma公司的唾液酸(含量为99%)为标准品, 配制系列标准溶液, 其唾液酸含量分别为5, 10, 15, 20和30μg. 被测样品配成一定浓度的溶液, 标准液和被测液均按以下程序进行: 各管用双蒸水补足至2ml后, 各加显色剂2ml, 100℃煮沸15min, 冷却, 加正戊醇5ml, 强烈振荡, 置冰浴15min, 离心2min(500r/min), 取蓝色上清液, 用MPS-2000自动记录分光光度计在370nm—650nm波长范围内作光谱图, 确认标准品和被测样品的最大吸收峰均为580nm后, 测定系列标准液

*北京市科委资助课题.

收稿日期: 1993-09-08, 修回日期: 1994-03-07

在 580nm 的吸收值, 作浓度-吸收值标准曲线 (图 1). 将被测液的吸收值, 通过标准曲线计算出被测样品中脂结合唾液酸含量.

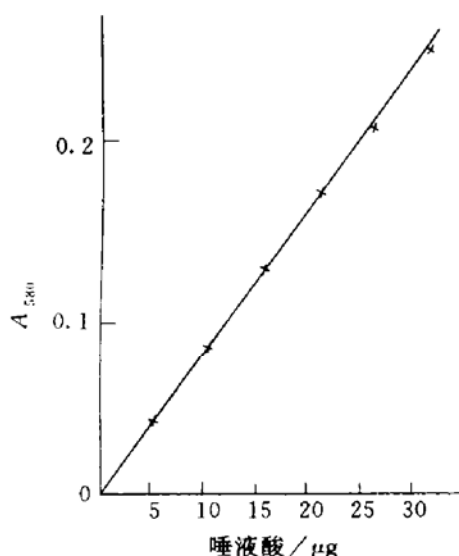


图 1 唾液酸的标准曲线

2 实验步骤

2.1 粗 Gls 的制备 500g 新鲜猪脑, 以 10 倍体积的氯仿: 甲醇混和液 (1:1, V/V), 相继在电动匀浆器和超声波细胞粉碎机中匀浆, 在 4℃ 下搅拌提取过夜, 离心取上清液, 沉淀物用上述混合液再次匀浆, 反复提取 3 次. 合并各次上清液, 40℃ 旋转蒸发浓缩至原体积的 1/4, 置 -20℃ 冰箱过夜, 过滤, 按滤液 1/5 体积加入 5% NaCl: 甲醇 (1:1, V/V) 混合液进行 Folch^[27] 分配, 使 Gls 转入水相, 收集上层液, 下层次进行分配, 合并上层液. 置 40℃ 旋转蒸发浓缩除去甲醇, 浓缩液 4℃ 透析至无 Cl^- 为止, 冷冻干燥得粗 Gls, 测定唾液酸含量和进行 HPTLC 层析.

2.2 离心液相层析 (centrifugal liquid chromatography, Clc)

2.2.1 装盘 取已活化的层析硅胶 170g, 加氯仿: 甲醇 (7:1, V/V) 700ml, 混匀, 缓慢注入直径为 30cm, 高 1cm 的离心液相色谱盘中孔, 转速为 400r/min, 待色谱盘充满硅胶后, 按 3 倍盘体积的氯仿: 甲醇: 水 (7:3:0.5, V/V) 混合液洗脱, 以除去杂质至洗脱液无色

为止.

2.2.2 上样、洗脱和收集 将粗制 Gls 溶于 50—80ml 0.1mol/L NaOH 甲醇液中, 37℃ 保温 2h 后 (去磷脂), 然后用 0.5mol/L HCl 甲醇液中和至中性, 透析, 冷干. Gls 干粉溶于氯仿: 甲醇 (7:1, V/V), 离心除去不溶物, 取上清液进样. 待样品上完后, 用 3 倍盘体积的上述溶液洗脱, 然后改用 5 倍盘体积氯仿: 甲醇: 水 (6:4:1, V/V/V) 洗脱并收集洗脱液, 浓缩, 冷冻干燥, 称重. 测定唾液酸含量和 HPTLC 分析.

2.3 Sephadex LH-20 层析 取 Sephadex LH-20 加 5 倍体积分含 0.3mol/L KOH 的甲醇: 水 (95:5, V/V) 溶液, 4℃ 浸泡过夜, 除去细小颗粒, 次日改用甲醇: 水 (95:5, V/V) 溶液以除去 KOH, 将处理好的 Sephadex LH-20 灌入层析柱中 (内径 3cm, 柱长 100cm) 至床高约 85cm, 用甲醇: 水 (95:5, V/V) 混合液平衡. 将由 Clc 得到的 Gls, 溶于 10ml 含 0.3mol/L KOH 的氯仿: 甲醇 (95:5, V/V) 溶液中, 37℃ 保温 2h 后, 离心, 上清液进行层析, 用甲醇: 水 (95:5, V/V) 洗脱收集, 待收集液呈碱性后, 停止收集. 合并各管, 浓缩, 冷冻干燥, 测唾液酸含量并进行 HPTLC 层析.

3 结果与讨论

粗 Gls 提取方法基本上与 Yu 氏法^[8] 相似, 只是增加 -20℃ 冷藏过夜, 此步骤的目的是除去中性脂类, 有利于节省后继步骤的溶剂用量, 时间和提高粗 Gls 的含量. 经测定脂结合唾液酸含量为 12%, 而未经冷藏只能达 8%—9%. 产率为 0.35%, 得 1.75g, 与 Katsumi^[9] 所得 0.34% 相似, 高于夏氏^[5] 的 0.25%.

离心液相色谱仪 (Clc) 进行 Gls 纯化是一种新方法, 至今国内外未见报道. 本仪器基本原理是根据混合样品中各组分质量不同, 在固定相和流动相分配作用不同以及所受离心力不同, 从而提高分离效果. 按此原理用国产层析硅胶分别进行离心液相层析和硅胶柱层析 (3cm × 100cm), 在同等上样量的基础上加以比

较。前者在以下几方面优于后者，上样量最高可达 5g；纯化时间从 60h 缩短为 24h；洗脱液用量节省 50%；脂结合唾液酸含量提高 4%，即经 Clc 含量达 22%；杂质（包括多肽等）由原来 22% 降低到 9.6%。经 HPTLC 及薄层扫描结果如下：Gls 的组分为 GM1 38.2%，GD3 16.7%，GD1a 14.9%，GD1b 12.3%，GT1b 4.7%。

经 Sephadex LH-20 柱层析后得精品 0.25g，脂结合唾液酸含量为 30.1%，HPTLC 层析结果见图 2。

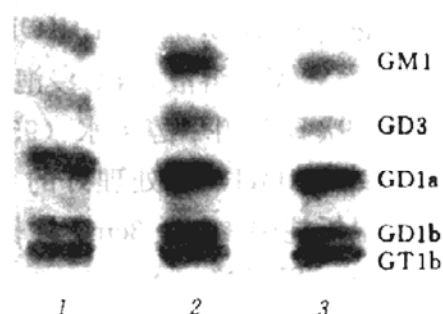


图 2 猪脑神经节苷脂 HPTLC 层析图谱
展开剂 氯仿：甲醇：水 = 55：45：9
(V/V) 含 0.02% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。1, 3: 猪
脑神经节苷脂，2: 神经节苷脂标准品。

层析板经 580 nm 扫描结果：GM 1

19.5%；GD3 13.8%；GD1a 27.8%；GD1b 14.2%；GT1b 19.3%。见图 3。

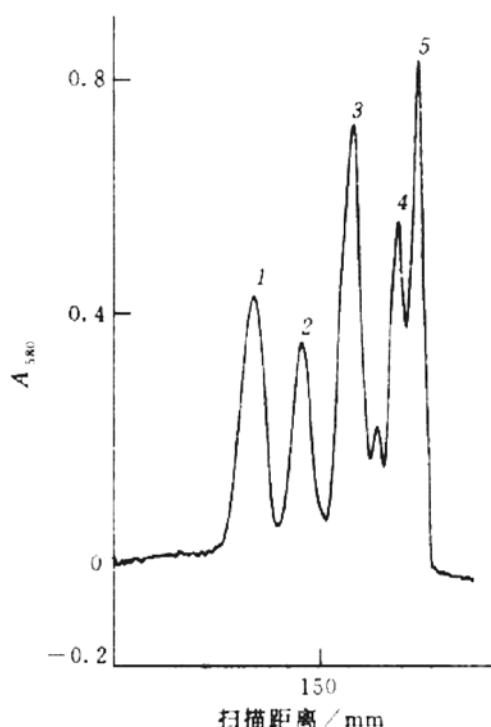


图 3 HPTLC 经 CS-930 双波长薄层扫描结果
1: GM1 2: GD3 3: GD1a 4: GD1b 5: GT1b。

各组分的百分含量与 Yu 氏和 L. Romald 结果相似，说明本方法适合于 Glcs 的提取、分离和纯化。本方法与其它方法比较见表 1。

表 1 几种方法纯化 Glcs 所需溶剂量和时间

	Katsumi ^[9]	Mary ^[10]	夏氏法 ^[8]	张氏法	本 法
投入原料/g	2150	0.4	1520	1.5-2	500
所得粗 Glcs/g	3.4	未标出	3.6	未标出	1.75
溶剂用量/ml	98 000	778	8686	1122	2300
所用时间/h	163	14	166	49	42

致谢 本室吴玉荣，张晓东，韩淑杰等同志参加部分工作，一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Allan J Y. Neurochemical pathology, 1986; 5: 309
- 2 Yusuf A H, Robert M B. Science, 1989; 243: 500
- 3 Stephan L, Baiba G. Analytical Biochemistry, 1985; 146: 220
- 4 张新波，崔肇春，生物化学与生物物理进展，1993; 25

- (3): 187
- 5 夏霞娟，崔肇春，顾天爵，生物化学与生物物理进展，1985; 12 (5): 27
- 6 Svennerholm L, Fredamn P. Biochim Biophys Acta, 1980; 417: 97
- 7 Folch J, Lees M, Sloane S. J Bio Chem, 1957; 226: 497
- 8 Yu R K, Ledeen R W. J Lipid Res. 1972; 13: 680
- 9 Katsumi M, Nobuyuki O, Yasuo K. Biochem J, 1986; 235: 755
- 10 Mary C B, Michele S, Dennis A A et al. Anal Biochem, 1985; 148: 163

type and C-17 deleted plasmids were determined using ampicillin as substrate, and the tolerances of the bacteria to ampicillin were tested. The results indicate that the C-17 deletion increases the promoter strength by about 60%. The mutant has more resistance to ampicillin. The half-inhibition concentration of ampicillin for the mutant growth is 280 µg/ml. At the same concentration, the wild-type cell density is only about half as much as that of the mutant. The causes for the promoter-up mutation were discussed.

Key words β -lactamase, promoter-up mutation, ampicillin

***In vitro* and *in vivo* Interaction of Metallothionein with Erythrocyte.** Zhang Baolin, Lu Jingfen, Wang Wenqing, Ru Binggen, Tang Wenxia. (*Coordination Chemistry Institute of Nanjing University, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 439—443

Maleimide was used as spin label for studying the effect of metallothionein (MT) on the conformation of erythrocyte membrane by ESR technique. The results show that the presence of different MTs resulted in considerable changes of the ESR parameters, W/S and τ_c , implying that MT can interact strongly with

membrane. The experiments carried out *in vitro* demonstrated that MT could be absorbed on the surface of erythrocytes. In addition, rabbits were injected s. c. with $CdCl_2$ to induce the biosynthesis of MT, the presence of MT mainly in the erythrocyte is first suggested after chromatographic separation of plasma and blood haemolysates from Cd-loaded rabbits. It is claimed that a dynamic equilibrium could be

established between MT absorbed on the surface of erythrocytes and presence in plasma. The significance of the above findings is discussed in brief.

Key words metallothionein, erythrocyte, erythrocyte membrane, absorption, spin label

Isolation and Extraction of Gangliosides with High Purity From the Pig Brain. Huang Rubin, Pan Ying, Wang Zhesheng, Tong Dashan, Shi Xiaoling. (*Department of Biochemistry, Capital Institute of Medicine, Beijing 100054*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 444—446

Sephadex LH-20 and silica gel centrifugal liquid chromatography were applied to isolation and purification of gangliosides from the pig brain. The highly purified gangliosides were obtained. The concentration of lipid-bound sialic acid determined is 30.1% (W/W). The results determined by silica gel G-60 HPTLC and 580nm scanning were GM1 19.5%, GD3 13.8%, GD1a 27.8%, GD1b 14.2% and GT1b 19.3%.

Key words gangliosides, pig brain, centrifugal liquid chromatography, purification

Purification of Metallothioneins by Metal Chelate Affinity Chromatography. Tie Feng, Ru Gang, Li Lingyuan, Liu Defu, Ru Binggen. (*Department of Biology, Peking University, Beijing 100871*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 447—450

An affinity chromatography column for isolation and purification of metallothionein (MT) was prepared with Chelating Sepharose Fast Flow gel bound with bivalent copper. Zinc-induced rabbit liver, or cadmium-induced mouse liver was homogenized and precipitated with