

我们发现这样能提高染色质的活性。其次, 我们采用溶液 III 破核膜^[4], 而未用玻璃匀浆, 这样, 染色质比较完整, 片段大, 易于沉淀。最后, 经蔗糖梯度离心后, 我们进行直接洗涤, 而未用透析的方法, 这样将制备时间缩短了 12 h。此方法比原来方法提高产率 3~5 倍。

根据 Bonner 等在《酶学方法》中提出的两种检测染色质的方法, 其中之一是光谱法, 此法简单、快速、准确。一个纯净的染色质样品应当几乎没有混浊, 即在核酸、蛋白质没有光吸收的波长处, 也应该没有光吸收, 如在 $A_{320}/A_{260} < 0.1$, 这样就为纯的染色质。如果在 320 nm 处光吸收太大, 就说明有染色质凝集或非染色质的蛋白污染^[1]。另外, Bonner 给出了标准大鼠肝染色质的吸收光谱, 我们测得结果与之相符, 所以, 我们认为该方法提取的染色质为纯染色质。

我们还用非洲爪蟾卵的无细胞系统检测染色质活性, 将染色质加入此无细胞系统中, 发现能围绕染色质形成核状结构(待发表)。染色质形成核状结构的这种能力, 在 0℃ 能保持一周, 但一周之后此能力消失, 在此系统中不能形成核状结构。

此方法也适于其他动物肝的染色质的制备。

参 考 文 献

- 1 Bonner J, Chalkley G R, Dahmus M *et al.* *Methods in Enzymology*, 1968; **XX** (B): 3
- 2 张龙翔, 张庭芳, 李令媛等. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981: 242
- 3 上海实验生物研究所三室细胞研究组. 生物化学与生物物理进展, 1977; (5): 6
- 4 Fey E G, Wan K M, Penman S. *J Cell Biol*, 1984; **98**: 1973

A Modified Method of Preparing Chromatin.

Xu Huaqing, Chen Chuchu (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

Abstract A modified method of preparing chromatin is introduced here, which omits the procedure of glass-homogenization. It is easy to operate, to reproduce and has high yield. With this method, chromatin in different size can be obtained.

Key words chromatin, isolation, preparing

一种简便的肌醇磷脂微量分析方法*

马克里 刘彦 崔肇春¹⁾

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 分析磷脂酰肌醇循环 (PI cycle) 的磷脂组分常采用双向薄层层析法。建立了一个简单快速的单向薄层层析分离肌醇磷脂方法。首先采用不同的有机溶剂体系分别提取非多磷酸肌醇磷脂和多磷酸肌醇磷脂, 然后用不同的层析展开体系, 对两部分磷脂进行单向薄层层析分离。采用无载体³²P 标记实验对该方法分离效果进行了观察。此法适用于同位素标记和非标记样品中肌醇磷脂组分的比较分析及多磷酸肌醇磷脂的提取、纯化和定量。

关键词 肌醇磷脂, 微量分析, 高效薄层层析

* 国家自然科学基金 39370393 项目部分工作。 ¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1995-03-18, 修回日期: 1995-09-01

已知, 肌醇磷脂代谢参与的细胞外信号跨膜传递在细胞的增殖、分化及许多活动中发挥调节作用. 为阐明其调节机制, 有必要对其组分进行分离、纯化及测定. 目前, 分离肌醇磷脂组分常采用薄层层析法^[1,2]. 分析肌醇磷脂代谢循环的所有磷脂组分包括磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰肌醇磷酸 (PIP)、磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂)、溶血磷脂酰肌醇磷酸 (lyso-PIP) 和溶血磷脂酰肌醇二磷酸 (lyso-PIP₂), 必须采用双向层析法. 双向层析的一个主要缺点是一块高效层析板一次只能分析一个样品, 多个样品的分析就要耗费大量昂贵的高效层析薄板, 更重要的是耗费时间较长. 另外, 在大多数组织中, 多磷酸肌醇 (PPI) 磷脂属于微量磷脂组分, 其含量不足细胞总磷脂的 1%, 对其进行定量测定先要采用薄层层析将其分离, 然后采用定磷法对其定量. 层析时样品点样量少, 往往不能满足目前常用的定磷方法的要求. 若加大样品点样量又会产生严重的拖尾现象, 使各种磷脂组分不能得到满意的分离. 为解决上面提到的问题, 本文建立了一个简单有效的肌醇磷脂微量分析方法. 该方法先用中性有机溶剂体系提取样品中非 PPI 磷脂组分, 然后用酸性有机溶剂体系提取 PPI 磷脂组分, 最后将两部分磷脂样品分别于不同的展开体系中进行单向薄层层析. 层析后可将各磷脂组分进行液闪计数或定量测定.

1 材料与方法

1.1 材料

无载体³²P, 购自北京中国原子能研究院同位素研究所; 各种磷脂标准品, 购自美国 Sigma 公司; 高效层析薄板, 购自德国 E. Merck 公司; 白血病 J6-2 细胞系, 由中国医学科学院天津血液病研究所提供; 小鼠腹水型肝癌细胞 Hca-F25/CL-A₂, 由大连医科大学病理教研室凌茂英教授提供; 其余试剂均为国产分析纯. 各种有机溶剂使用前进行重蒸.

1.2 方法

1.2.1 方法的建立: 人白血病 J6-2 细胞于

RPMI 1640 培养液中传代培养. 收集生长良好的细胞, 细胞以无血清 DME/F12 培养液洗两次. 向细胞加入无血清 DME/F12 培养液, 加 [³²P] Pi 至 100 mCi/L, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中标记 1 h. 离心收集细胞, 细胞以 20 mmol/L, pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液洗两次. 向细胞加入氯仿 (C): 甲醇 (M): 水 (W) (8:4:3, 体积比, 以后均为体积比) 7.5 ml, 混匀后静置分层. 3000 r/min 离心后收集下相. 上相再依次用 4.5 ml 氯仿、4.5 ml 氯仿和 4.5 ml C:M:HCl (100:50:1) 按上述方法重复提取 3 次. 分别收集 4 次提取的下相, 用氮气吹干. 各样品定容于 50 μl 氯仿中. 将每份样品分为 2 等份, 分别点样于两块高效层析薄板上 (每份样品点样量相当于 1.0×10⁷ 个细胞). 其中一块层析板在 C:M:乙酸:甲酸:W (70:30:12:4:2) 溶剂体系中展开, 用来分离非 PPI 磷脂组分^[3]. 另一块层析板以 C:M:W:NH₄OH (40:48:10:5) 溶剂体系展开, 用来分离 PPI 磷脂组分^[1]. 层析后于层析板上放 X 光感光胶片一张, 置暗盒中曝光 2 d. 待胶片感光后将层析板以碘蒸气显色, 刮下各磷脂组分条带处的硅胶, 进行液闪计数. 分别计算非 PPI 磷脂组分和 PPI 磷脂组分在 4 次提取下相中分布的百分比.

1.2.2 PPI 磷脂的提取及薄层层析: 小鼠腹水型肝癌 CL-A₂ 细胞于 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中传代培养. 收集细胞, 向细胞加入 DME/F12 培养液, 加入 [³²P] Pi 至 3.7 GBq/L, 于 5% CO₂ 培养箱中, 37℃ 标记 1 h. 收集细胞后按前述方法先用中性有机溶剂提取 3 次, 以除去非 PPI 磷脂组分, 然后用 C:M:HCl (100:50:1) 提取 PPI 磷脂. 收集第 4 次提取液, 用氮气吹干, 得 PPI 磷脂样品. 将 PPI 磷脂样品点样于层析薄板 (每组样品点样量约相当于 1.0×10⁷ 个细胞), 以 C:M:W:NH₄OH (40:48:10:5) 溶剂体系展开. 展开后的层析板按前述方法进行放射自显影.

1.2.3 小鼠肝脏 PPI 磷脂提取及薄层层析分离: 实验设对照组和实验组, 每组称取小鼠肝

组织0.25 g. 对照组肝组织磷脂的提取按经典方法^[1,2]进行, 即将肝组织中加入蒸馏水1.25 ml, 匀浆后加入C:M:HCl(100:100:1)6 ml, 使C:M:W:HCl最终比例为100:100:50:1, 混匀后静置, 3000 r/min离心使分层, 吸取下相用氮气吹干, 得总磷脂样品. 实验组磷脂样品按照本文建立的方法提取. 即先用中性有机溶剂提取非PPI磷脂, 然后用酸性有机溶剂提取PPI磷脂, 对二者分别进行薄层层析. 各磷脂样品点样后以C:M:W:NH₄OH(48:48:10:5)溶剂体系展开, 展开后的展析板以醋酸铜-磷酸试剂显色(显色剂配制: 取醋酸铜3 g, 加入8%的磷酸至100 ml. 将层析板于显色剂中浸湿后, 于160℃烤箱中烘烤至磷脂条带显色).

2 结 果

2.1 方法的建立

[³²P] Pi 标记 J6-2 细胞磷脂后, 先以中性有机溶剂体系提取 3 次, 然后以酸性有机溶剂提取. 将 4 次提取的磷脂样品点样于两块层析板上, 分别以不同的展开体系进行展开. 图 1 为

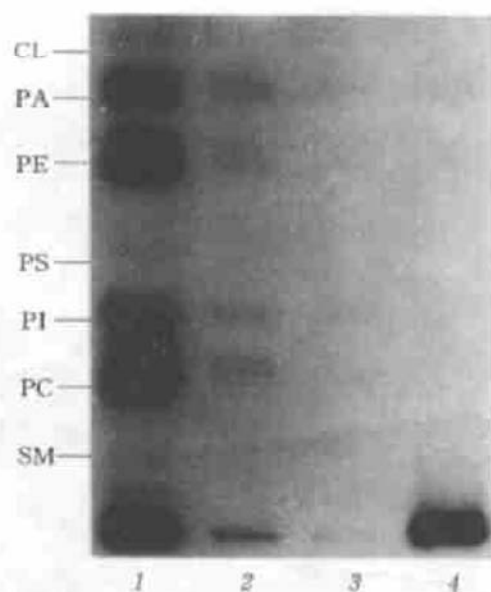


图 1 4 次有机溶剂提取下相中非 PPI 磷脂高效薄层层析后的放射自显影图谱

1、2、3、4: 分别代表 4 次下相中的磷脂样品; CL: 心磷脂; SM: 鞘磷脂.

4 次提取下相中非 PPI 磷脂高效薄层层析后的放射自显影图谱 (以 C:M:乙酸:甲酸:W 展开体系展开). 由图 1 可见, 非 PPI 磷脂主要存在于中性有机溶剂提取的下相中 (以第 1 次下相中含量最高). 第 4 次酸性有机溶剂提取下相中仅含少量的非 PPI 磷脂. 图 2 为 4 次提取下相中 PPI 磷脂经高效薄层层析后的放射自显影图谱 (以 C:M:W:NH₄OH 溶剂体系展开). 由图 2 可见, PPI 磷脂主要存在于第 4 次酸性有机溶剂提取的下相中, 3 次中性溶剂提取仅损失少量的 PPI 磷脂.

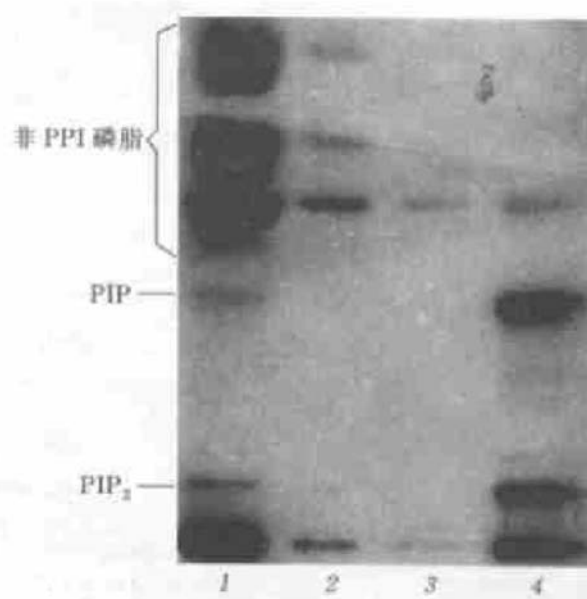


图 2 4 次有机溶剂提取下相中 PPI 磷脂高效薄层层析后的放射自显影图谱

1、2、3、4: 分别代表 4 次下相中的磷脂样品, 此图与图 1 为同一份样品.

表 1 为 4 次提取下相中非 PPI 磷脂和 PPI

表 1 J6-2 细胞非 PPI 磷脂和 PPI 磷脂中 [³²P] Pi 放射强度在 4 次提取下相中的分布

提取 下相	PPI 磷脂(PIP 和 PIP ₂)		非 PPI 磷脂	
	cpm	%	cpm	%
第一次	4807	15.3	83760	87.6
第二次	ND ¹⁾	—	4860	5.1
第三次	ND	—	1210	1.2
第四次	26557	84.7	5800	6.1

注: ¹⁾未检测. n=3.

磷脂的 [^{32}P] Pi 放射强度液闪计数结果, 反应了非 PPI 磷脂和 PPI 磷脂在 4 次提取下相中的分布情况. 3 次中性有机溶剂提取了大约 93.8% 的非 PPI 磷脂, PPI 磷脂主要存在于第 4 次酸性有机溶剂提取下相中, 约占 PPI 磷脂总量的 85%.

2.2 PPI 磷脂的提取及高效薄层层析分离

2.2.1 采用本文建立的方法对小鼠腹水型肝癌细胞株 Hca-F25/CL-A₂ 细胞的 PPI 磷脂进行了提取分离. 图 3 为该细胞 PPI 磷脂高效薄层层析后的放射自显影图谱. 由图 3 可见, 本方法对 PPI 磷脂具有较高的分辨率. 5 组样品层析后得到相同的图谱, 说明该方法结果稳定, 具有较高的重复性.

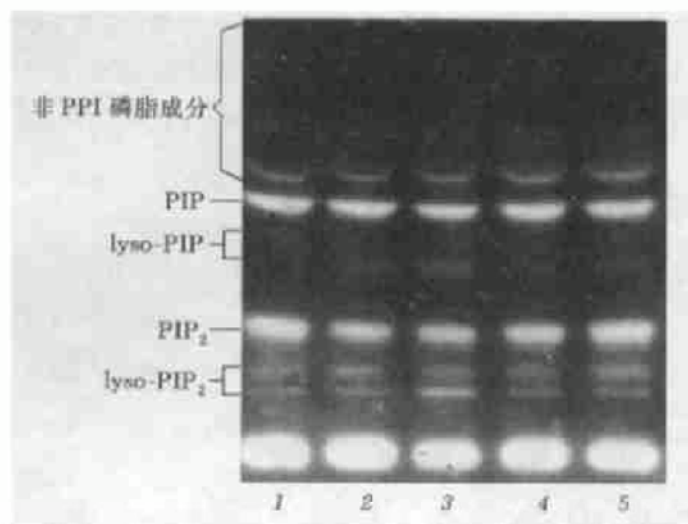


图 3 Hca-F25/CL-A₂ 细胞 PPI 磷脂的高效薄层层析图谱

1、2、3、4、5: 分别代表 5 个平行实验组的样品.

2.2.2 图 4 为正常小鼠肝组织 PPI 磷脂的高效薄层层析图谱. 由图 4 可见, 采用经典方法提取的 PPI 磷脂样品 (样品 1) 因同时提出大量的非 PPI 磷脂, 点样量仅为 10 mg 肝组织所含磷脂即出现严重的拖尾现象, 使 PPI 磷脂得不到满意的分离. 样品 2 和样品 3 为采用本文建立的方法所提的磷脂样品. 样品 2 为前 3 次中性有机溶剂提取的样品, 主要含非 PPI 磷脂, 图中 PPI 磷脂部位未显示条带, 说明含 PPI 磷脂很少. 样品 3 为经中性有机溶剂提取后, 再

用酸性有机溶剂提取的样品, 主要含 PPI 磷脂. 因除去了大量的非 PPI 磷脂, 点样量增大到相当于 100 mg 肝组织所含磷脂时 (约为样品 1 点样量的 10 倍), 仍未出现拖尾, PPI 磷脂条带清晰可见.

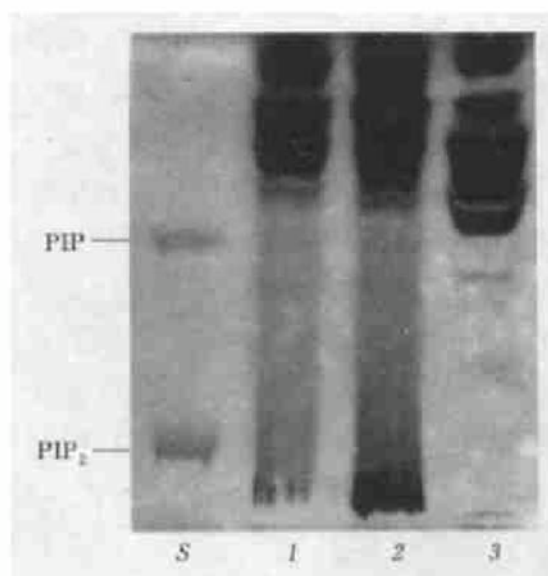


图 4 正常小鼠肝脏 PPI 磷脂的高效薄层层析图谱

S: PIP 和 PIP₂ 标准品; 1: 经典方法提取的磷脂样品; 2: C:M:W (8:4:1) 提取的磷脂样品; 3: 用 C:M:HCl (100:50:1) 提取的磷脂样品; 样品 1、2 和 3 的点样量分别为 10、20 和 100 mg 肝组织所含磷脂.

3 讨 论

研究信息跨膜传递的肌醇三磷酸 (IP₃) 和 二脂酰甘油 (DAG) 双信使系统, 常需要对肌醇磷脂循环的磷脂组分进行分析. 经典的方法是先用酸性有机溶剂提取细胞总磷脂, 然后用薄层层析对其分离. 但目前为止, 尚没有一种薄层层析展开体系能兼顾 PI 循环的全部磷脂组分. 低极性的酸性有机溶剂展开体系能使 PI 和 PA 与细胞其他主要磷脂组分分离, 但 PPI 磷脂仍在原点. 高极性的碱性有机溶剂展开体系能使 PPI 磷脂组分得到满意分离, 但不能分离 PI 和 PA. 因此必须同时用数种有机溶剂展开体系配合双向层析才能使 PI 循环的全部磷

脂组分得到满意的分离^[4,5]. 如能将细胞总磷脂分为 PPI 和非 PPI 磷脂两部分, 再分别进行层析就可解决上述矛盾. 我们在提取细胞总磷脂时, 首先用中性有机溶剂提取, 再用酸性有机溶剂提取. 由实验结果可见, 中性有机溶剂提取的主要是非 PPI 磷脂(图 1), 约占细胞非 PPI 磷脂总量的 93.8%. 酸性有机溶剂提取的主要是 PPI 磷脂(图 2), 约为细胞 PPI 磷脂总量的 85%. 说明这一方法是可行的. 采用这一方法对小鼠肝癌细胞株 CL-A₂ 细胞的 PPI 磷脂进行了提取分离, 5 个平行实验组的 PPI 磷脂样品层析图谱完全一致, 表明这一方法稳定, 有较好的重复性. 因采用中性有机溶剂提取能除去大部分非 PPI 磷脂, 这一方法也适用于对含微量 PPI 磷脂组分的组织样品的 PPI 磷脂采用非同位素标记法进行分析. 由图 4 可以看出, 用经典方法提取的肝组织 PPI 磷脂因含有大量的非 PPI 磷脂组分, 层析点样量仅相当于 10 mg 肝组织时, 在 PPI 磷脂区域即出现拖尾, 使 PPI 磷脂不能显示(图 4, 样品 1). 如用中性有机溶剂先除去大部分非 PPI 磷脂, 层析样品点样量即使增大 10 倍, 在层析板 PPI 磷脂区域仍不出现拖尾, 使 PPI 磷脂得到满意的分离(图 4, 样品 3). 本法的优点是操作简单, 仅用不同的有机溶剂体系分配就可把 PPI 磷脂和非 PPI 磷脂分开. 因采用的是单向层析, 一块层析板可同时分析多个样品, 节省层析板和层析时间, 大大提高了实验效率, 是一个可以推广的方法.

参 考 文 献

- 1 Mitchell K T, Ferrell J E, Huestis W H. *Anal Biochem*, 1986; **158**: 447
- 2 Ferrell J E, Huestis W H. *J Cell Biol*, 1984; **98**: 1992
- 3 Vance J E, Pan D B, Vance D E *et al.* *J Cell Biol*, 1991; **115**: 1061
- 4 Allan D, Cockroft S. *Biochem J*, 1983; **213**: 555
- 5 Billah M M, Lapatina E G, Cuatrecasas P. *J Biol Chem*,

1980; **255**: 10227

A Simple and Rapid Micro-analytical Method for Phosphoinositides. Ma Keli, Liu Yan, Cui Zhaochun (*Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116027, China*).

Abstract Analysis of all of the PI cycle phospholipids is usually performed by two-dimensional thin-layer chromatography. A simple and rapid method for analyzing the phosphoinositides by one-dimensional thin-layer chromatography has been developed. The non-polyphosphoinositides in cells were first extracted with chloroform : methanol : water (8 : 4 : 3), and then the polyphosphoinositides were extracted with chloroform : methanol : water : concentrated HCl (100 : 100 : 50 : 1). Each part of phospholipids were further separated by one-dimensional thin-layer chromatography with different developing systems, i. e., chloroform : methanol : acetic acid : formic acid : water (70 : 30 : 12 : 4 : 2) for non-polyphosphoinositide phospholipids and chloroform : methanol : water : NH₄OH (40 : 48 : 10 : 5) for polyphosphoinositides. The method can be used for comparative analysis of phosphoinositides in small samples, and also for the extraction, separation and quantitation of polyphosphoinositides, separation and quantitation of polyphosphoinositides in samples which are not labelled with isotope.

Key words inositolphospholipids, micro-analysis, high performance thin layer chromatography