

Jianxin (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

**Abstract** A simple and efficient method for the purification of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) from a genetically manipulated CHO cell line (SGG) has been developed. The conditioned medium containing about 1500 U/ml of rt-PA from cultures of SGG cell in DMEM: F12 (1: 1) supplemented with 1% NBS was purified by a combination of absorption chromatography on MPG and affinity chromatography on Lysine-Sepharose 4B. The final prod-

uct has a specific activity of 390 000 U/mg protein. The overall activity recovery was about 140% with 380 fold increase in specific activity. Analysis by SDS-PAGE in the presence of a reducing agent followed by silver staining showed one band with mass of molecular about 65 000 and two bands of 33 000 ~ 35 000. Reverse fibrin autography and Western blotting analysis showed that the product has natural t-PA characterization.

**Key words** recombinant tissue-type plasminogen activator, MPG, lysine-sepharose 4B

## 微型离心柱法快速分离纯化神经节苷脂

王江雁 张卫宁<sup>1)</sup> 王仁杰 许玉茹 王梦寅<sup>1)</sup>

(解放军石家庄医学高等专科学校生化教研室, 石家庄 050081)

**摘要** 神经节苷脂的分离与纯化是研究组织细胞 Gls 组成、含量及代谢的基本手段。但是以往的方法周期长、溶剂用量大, 为此建立了一种新的微型离心柱快速分离 Gls 纯化法, 标准 Gls 的回收率为 97.64%,  $n=7$ ,  $CV<3\%$ , HPTLC 图谱显示无拖带现象。纯化样品只需十几个小时, 操作简单, 溶剂用量小, 重复性好, 为微量样品组分的研究提供了一个有效的手段。

**关键词** 微型离心柱, 分离, 纯化, 神经节苷脂

神经节苷脂 (ganglioside, Gls) 是一类含有唾液酸的酸性鞘糖脂, 广布于脊椎动物细胞膜的外侧面, 是细胞膜的重要组成部分之一, 具有多种生物学功能, 已经引起人们的极大兴趣。神经节苷脂的分离与纯化是研究组织细胞 Gls 组成、含量及代谢的基本手段。1976 年, Cham 等<sup>[1]</sup>建立了一种用异丙醚/正丁醇提取脂类的方法。Ladisch 等<sup>[2,3]</sup>用异丙醚-正丁醇-50 mmol/L NaCl 水溶液分配法及 Sephadex G-50 凝胶过柱法提纯了 Gls。最近, 潘颖等<sup>[4]</sup>报道采用离心液相色谱法快速分离纯化 Gls。但

这些方法周期长, 溶剂用量大。在此基础上, 我们建立了一种新的微型离心柱快速分离 Gls

### 1 材 料

新鲜 Wistar 大鼠脑, Sephadex G-25 (Pharmacia 产品), 高效薄层层析板 Silica gel 60 (青岛海洋化工厂), 标准 N-乙酰神经氨酸 (Sigma 产品), 标准神经节苷脂 GM<sub>1</sub>、GD<sub>3</sub>、GD<sub>1a</sub>、GD<sub>1b</sub>、GT<sub>1b</sub>, 薄层层析纯 (Fluka 产品), 系加拿大 MNI 生化实验室馈赠, CS-9000 薄层扫描仪 (岛津公司), UV-265FW 紫外分光

<sup>1)</sup>解放军白求恩国际和平医院神经外科, 石家庄 050082.

收稿日期: 1996-02-08, 修回日期: 1996-07-17

光度计 (岛津公司), 所用试剂均为分析纯.

## 2 方 法

### 2.1 总脂的提取

取新鲜大鼠脑冰浴中制成匀浆液, 加 15 ml 氯仿/甲醇 (C/M, 1: 2), 超声 30 min, 混匀过夜 (4℃), 1000 g 低温离心 10 min, 收集上清液, 沉淀加 C/M 5 ml (1: 1) 超声混匀再提取, 合并提取液, 在 4℃ 水浴中减压蒸干.

### 2.2 GIs 的分离纯化

2.2.1 根据 Ladisch 分配法<sup>[2]</sup>, 将上述提取的总脂加入 10 ml 异丙醚-正丁醇 (3: 2) 混合液, 充分振荡并超声混匀, 再加入 50 mmol/L NaCl 水溶液, 使异丙醚-正丁醇-50 mmol/L NaCl 溶液的体积比为 6: 4: 5, 充分振荡并超声至总脂提取物完全溶解, 1000 g 离心 10 min, 吸去上层液, 保留中层和下层液, 加入与第一次等量的异丙醚-正丁醇 (3: 2) 混合液进行再次分配, 1000 g 离心 10 min, 收集中、下层液, 减压蒸干.

2.2.2 微型柱的制备及分离纯化 GIs: 取一个 1 ml 注射器外套底部放一片略小于其内径的圆形尼龙网, 加入适量经双蒸水浸泡的 Sephadex G-25 (50~ 150 μm) 凝胶, 将装好的注射器放入干燥离心管内 1000 g 离心 10 min 备用<sup>[5]</sup>. 将分配好的样品加 200 μl 双蒸水超声混匀后, 加 100 μl 至制备好的微型柱顶部, 再将柱子放入另一干燥管中, 1000 g 离心 2 min, 收集离心液待测.

### 2.3 高效薄层层析

高效薄层层析板 (10 cm × 10 cm) 用 C/M (2: 1) 预处理, 105℃ 活化后, 在底边 2 cm 处作标记点样. 展开剂为 C: M: 0. 2% CaCl<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O (55: 45: 2: 8). 展开时间为 1 h. 间苯二酚显色剂喷雾后, 140℃ 烘箱中烘烤 10 min, 显紫色斑点, 1 h 内用 CS-9000 扫描仪扫描, 扫描波长 λ= 590 nm, 输出形式用面积来确定各组分百分含量.

### 2.4 脂结合唾液酸 (LBSA) 含量测定

利用 Svennerholm 法<sup>[6]</sup> 和改良 Svenner-

holm 法<sup>[7]</sup> 测定. 间苯二酚显色剂为 2% 间苯二酚 10 ml, 加 12 mol/L 浓 HCl 78 ml, 0.1 mol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液 1.5 ml, 再加水至 100 ml. 测定 A<sub>590</sub>, 取标准唾液酸溶液作标准曲线.

### 2.5 回收率的测定

将高纯度的牛脑混合标准 GIs 进行上述纯化过程, 测定不同纯化步骤中 GIs 所含脂结合唾液酸的量, 计算 GIs 的回收率.

## 3 结果与讨论

大鼠脑组织中 GIs 的薄层层析图谱 (TLC 图谱) 及各组分含量 (图 1 和表 1). 结果表明大鼠脑组织中至少有 8 种 GIs 组分, 其中以 GD<sub>1a</sub>、GT<sub>1b</sub> 为主, 最上面的层析带可能是脑硫苷酯 (sulfatide), 另外还有三种未知成分. 该图谱及各组分含量与已报道<sup>[2, 8]</sup> 的结果基本一致, 无丢带现象. 从图 1 上看, 鼠脑的 GT<sub>1b</sub> 与标准 GT<sub>1b</sub> 在 R<sub>f</sub> 上似乎不一致, 但从扫描图 (图 2b, d) 上看, 二者最大吸收峰的位置基本是一致的, 这可能是由于标准与样品浓度相差过大的缘故.

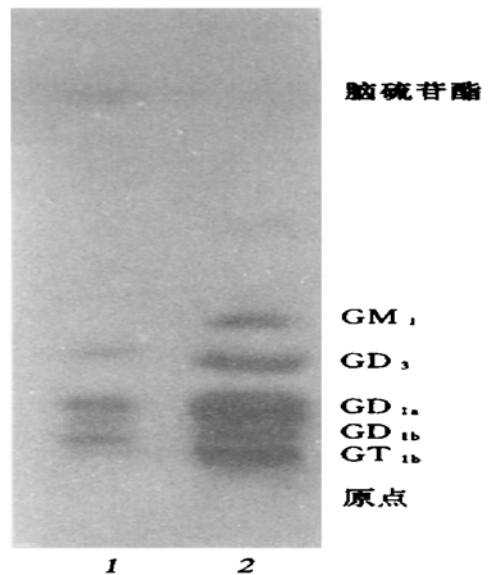


图 1 标准 GIs 及大鼠脑组织 GIs 的 HPTLC 图谱  
1: 大鼠脑组织 GIs; 2: 标准 GIs.

表 1 大鼠脑组织 GIs 主要组分含量

样品/%	GT <sub>1b</sub>	GD <sub>1b</sub>	GD <sub>1a</sub>	GD <sub>3</sub>	GM <sub>1</sub>
脑	16.42 ± 1.76	5.98 ± 1.50	22.34 ± 4.68	13.86 ± 2.75	1.90 ± 2.76

回收实验结果表明 (表 2 和图 2): 本实

验采用的微型离心柱纯化标准 GIs 回收率可达 97.64%, 全过程总回收率为 96.63%, 样品分离纯化 GIs 全过程的回收率为 90.23%. HPTLC 图谱表明标准混合 GIs 并无丢带现象, 样品过柱后分配提取的 GIs 所含的杂质被除掉.

表 2 标准 GIs 和大鼠脑 GIs 每一步分离纯化的回收率测定

方法	标准 GIs		脑	
	含量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	回收率/%
1. 直接测定	15.01 ± 0.03		0.762 ± 0.07	
2. 抽提 (C/M)	14.93 ± 0.02	99.47 ± 0.07	0.722 ± 0.10	94.75 ± 0.13
3. 分配	14.81 ± 0.06	99.20 ± 0.30	0.708 ± 0.09	98.06 ± 0.80
4. 过柱	14.46 ± 0.39	97.64 ± 0.50	0.688 ± 0.04	97.18 ± 1.20
5. 加 100 $\mu\text{l}$ 水洗柱	0.22 ± 0.01	1.49 ± 0.45	0.020 ± 0.03	2.82 ± 0.06
6. 总回收率		96.63 ± 0.43		90.23 ± 1.80

注: ( $\bar{x} \pm s$ )

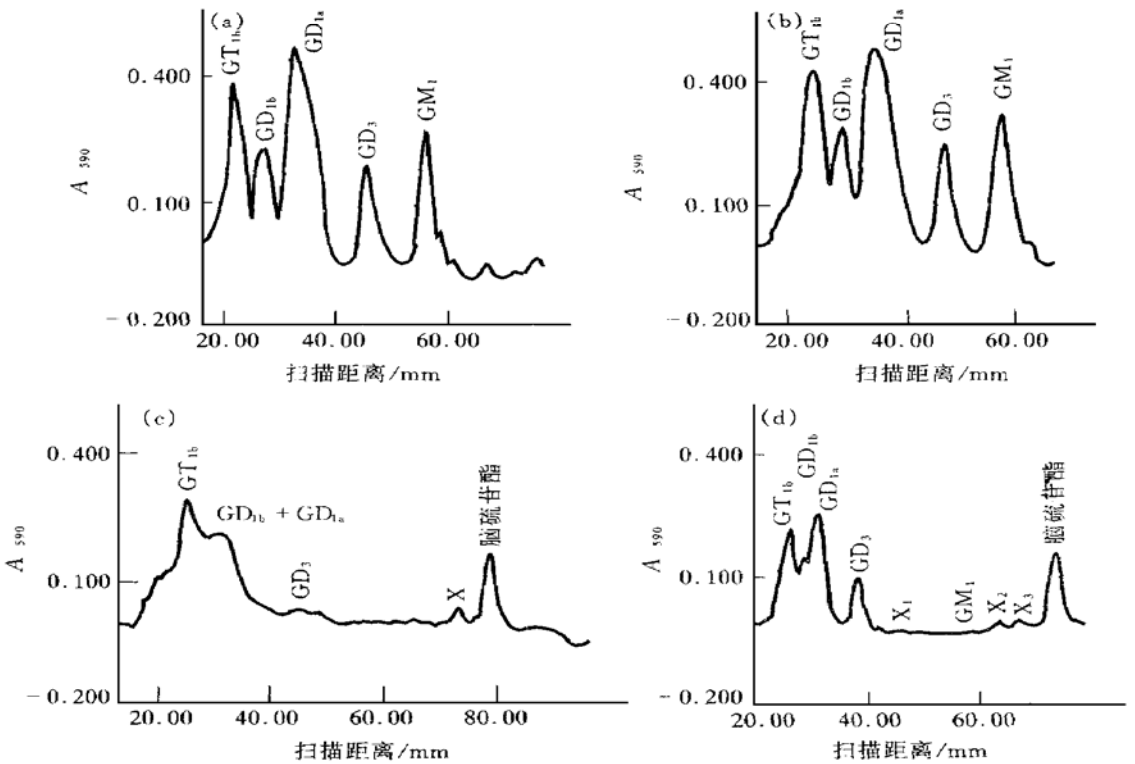


图 2 标准 GIs 及大鼠脑组织 GIs 过柱前后的 HPTLC 扫描图谱

(a) 标准 GIs 过柱前; (b) 标准 GIs 过柱后; (c) 大鼠脑 GIs 过柱前; (d) 大鼠脑 GIs 过柱后.

微型离心柱快速分离纯化 GIs 的方法是一种新方法, 过柱分离时间只需几分钟, 不消耗

有机溶剂. 而以前多数报道<sup>[2, 9, 10]</sup>所采用的 Ltraobeads 柱层析法则要花费几十个小时,

消耗有机溶剂 20~ 30 L<sup>[2]</sup>. 本法分离速度快、消耗少、回收率高是它的明显优点, 以标准 Gls 15  $\mu\text{g}$  在同样条件下分离纯化最后得到 (14.46  $\pm$  0.39)  $\mu\text{g}$ ,  $n = 7$ , 结果显示  $CV < 3\%$ . 表明本方法有良好的重复性. 采用本法分离纯化的大鼠脑组织中 Gls 主要组分含量 (如表 1 所示) 结果与文献报道<sup>[8]</sup>的结果基本一致, 与以前的方法相比, 操作简单, 回收率好, 省去了过柱后所需的紫外检测及洗脱液的冷冻干燥等繁琐步骤, 使整个过程简便快速.

本方法较适用于微量组织细胞的 Gls 纯化, 为微量样品 Gls 组分的比较学研究及 Gls 的代谢研究提供了一个有效的手段.

### 参 考 文 献

- 1 Cham B E, Knowles B R. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J Lipid Res*, 1976, **17** (2): 176~ 181
- 2 Ladisch S, Gillard B. A solvent partition method for microscale ganglioside purification. *Anal Biochem*, 1985, **146**: 220~ 231
- 3 张新波. 一种微量神经节苷脂纯化法. *生物化学与生物物理学报*, 1993, **25** (2): 189~ 190
- 4 潘 颖. 离心液相色谱法快速分离纯化神经节苷脂. *生物化学杂志*, 1994, **10** (4): 387~ 391
- 5 Penesky H S. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 1977, **252**: 2891~ 2899
- 6 Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta*, 1957, **24**: 604~ 611
- 7 蒋谷人. 血清脂质结合唾液酸改良间苯二酚测定法用于恶性肿瘤临床诊断初探. *中华医学检验杂志*, 1987, **10** (5): 257~ 261
- 8 Irwin L N, Michael D B, Irwin C C. Ganglioside patterns of fetal rat and mouse brain. *J Neurochem*, 1980, **34**: 1527~ 1530
- 9 范广胜. 成人正常大肠神经节苷脂. *生物化学与生物物理学报*, 1991, **23** (5): 443~ 447
- 10 崔肇春, 顾天爵. 水牛脑神经节苷脂的分离纯化. *生物化学与生物物理进展*, 1985, (5): 27~ 31

**Isolation and Purification of Gangliosides by Rapid Centrifugal Mini-column Chromatography.** WANG Jiangyan, ZHANG Weining, WANG Renjie, XU Yuru, WANG Mengyin (*Department of Biochemistry, Shijiazhuang Medical Higher Training School, Shijiazhuang 050081, China*).

**Abstract** A simple and rapid method for isolation and purification of gangliosides (Gls) from the rat brain is described. The gangliosides were isolated and purified by centrifugal mini-column chromatography. The rate of recovery of standard Gls was up to 97.64%,  $n = 7$ ,  $CV < 3\%$ . No detective loss of Gls was demonstrated. The novel method offers a few advantages: 1. It is simple, rapid and efficient. 2. The thin layer chromatographic patterns of total Gls of samples obtained are clear and distinct. 3. Less solvent was consumed. Thus, the method is especially applicable to comparative and qualitative studies of gangliosides of micro samples, and to ganglioside metabolism research of tissues and cells *in vitro*.

**Key words** centrifugal mini-column chromatography, isolation, purification, gangliosides

## 用 T7 RNA 聚合酶体外转录合成大鼠肝 tRNA<sup>Ile</sup>

张 璐 钟雄霖 彭朝晖 徐 铃

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

**摘要** 采用 PCR 技术从 rec-M13mp18 中扩增出 120 bp 的大鼠肝 tRNA<sup>Ile</sup> 合成基因片段, 经限制性内切