

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616-008.935.932.61-074:543.544

В. М. Мацуль, А. В. Карганолов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ГОРИЗОНТАЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЕЙ

Калининский медицинский институт

Инозитсодержащие липиды участвуют в регуляции биохимических процессов [9, 10, 14, 15], поэтому разработка методов, позволяющих быстро выделять из различных тканей чистые препараты этих соединений, представляется важной задачей.

Наиболее распространенными способами получения фосфатидилинозитов являются высокоэффективная жидкостная и колоночная хроматографии. Однако для процедуры выделения липидов этими методами необходимы специальное оборудование, большие объемы растворителей и дополнительный контроль чистоты выделяемой фракции [11, 19]. Небольшие количества фосфатидилинозитов сравнительно быстро можно получить при использовании препаративной тонкослойной хроматографии (ТСХ), но использование этого способа ограничивается тем, что не удается достаточно четко отделить фосфатидилинозиты от фракций, имеющих с ними близкую хроматографическую подвижность [6, 17]. Гораздо большими возможностями для фракционирования липидов со сходными значениями R_f обладает проточная ТСХ [7]. Однако этот метод не получил широкого распространения из-за того, что большинство используемых для этих целей камер негерметичны и неудобны.

Нами предложен усовершенствованный метод анализа фосфатидилинозитов, позволяющий с помощью проточной ТСХ четко выделять, а затем денситометрически количественно определять эти соединения одновременно в 12—15 образцах, представляющих собой сложные смеси природных липидов.

Методика

В качестве адсорбента для ТСХ использовали фракцию силикагеля (ЧССР) с размером частиц, от 45 до 32 мк (330—460 меш). Адсорбент наносили на пластинки методом осаждения его из водных суспензий, получая таким образом без закрепителя прочно удерживавшиеся на стекле однородные, равномерные слои [2]. Для улучшения качества разделения фосфолипидных фракций, имеющих близкие с фосфатидилинозитами значения R_f , в суспензию, из которой проводили осаждение частиц силикагеля, добавляли углекислый калий (2,8 г K_2CO_3 на 1 л воды). Сложные многокомпонентные смеси природных липидов, необходимые для отработки метода, получали из наиболее богатых фосфатидилинозитами органов крыс (мозг, печень, легкие), липидный состав которых достаточно хорошо изучен. При этом для аналитических целей достаточно 10—25 мг ткани, для препаративного выделения фосфатидилинозитов необходимо около 25 г ткани. Извлечение фосфатидилинозитов осуществляли двумя способами: одно- и двухэтапной экстракцией. При одноэтапной экстракции фосфолипиды извлекали

смесью хлороформ — метанол — концентрированная соляная кислота (2:1:0,5 %, по объему) [8], из расчета 30-кратный объем растворителей на 1 г анализируемого образца. Для этого ткань гомогенизировали в присутствии указанных растворителей (на 1 г ткани 5 мл экстрагирующей смеси, приготовленной из свеженегранинных растворителей и содержащей антиоксидант; в качестве антиоксиданта использовали инол в количестве 0,05 % от веса липида). К полученному гомогенату добавляли половинный объем смеси экстрагентов и инкубировали 1 ч при 37 °С. Остаток ткани после экстракции отфильтровывали и трижды промывали на фильтре оставшимся объемом растворителей. К объединенному фильтрату добавляли 0,02 % раствор $CaCl_2$ ($1/5$ от объема экстракта), тщательно встряхивали. После расслаивания верхнюю фазу отбрасывали, нижнюю для удаления нелипидных примесей трижды промывали смесью хлороформ — метанол — 0,02 % хлорид кальция (3:48:47). В процессе отмывания происходила нейтрализация экстракта за счет перехода ионов водорода из нижней фазы в верхнюю, что контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги после 4-кратного отмывания. Отмытую хлороформную фазу упаривали в токе азота, предварительно внося в нее свежую порцию антиоксиданта. Сухой остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол (9:1), фильтровали и хранили при низкой температуре. Полноту экстракции проверяли путем кипячения остатка ткани в метаноле, содержащем 1 % H_2SO_4 , в колбе с обратным холодильником в течение 4—6 ч. Двухэтапная экстракция осуществлялась по методике, изложенной в работе [6], с некоторыми модификациями и заключалась в следующем: 1 г ткани гомогенизировали в 10 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) до получения однородной массы. Этот гомогенат количественно переносили на фильтр, где его трижды промывали 20 мл указанной смеси растворителей. Таким образом из исследуемого образца удаляли основную часть липидов. Для извлечения оставшихся липидных компонентов осадок, находившийся на фильтре, заворачивали в виде гильзы, которую инкубировали 20 мин при 37 °С в 6 мл смеси хлороформ — метанол — концентрированная соляная кислота (2:1:0,5 %, по объему), после чего экстракт сливали, гильзу вновь выдерживали в свежей порции растворителей. Эту процедуру повторяли трижды. Экстракты объединяли. Отмывание, упаривание в токе азота, растворение сухого остатка и его хранение, а также проверку полноты извлечения липидов осуществляли по схеме, описанной при одноэтапной экстракции. Фракционирование фосфолипидов проводили в системе хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (13:7:1) [18], активация пластин 15 мин при 120 °С, длительность хроматографирования 50 мин (при использовании слоев адсорбента, получаемых путем осаждения силикагеля из 0,25 % водного раствора K_2CO_3). Количество липидного материала, наносимого на пластинку в аналитических целях, составляло 10—50 мкг. Идентификацию фосфолипидных фракций осуществляли с помощью значений R_f [2], цветных тестов [5, 4] и «свидетелей»: фосфатидилинозитов из бобов сои («Sigma», США), фосфатидилинозитов из растений («Serva», ФРГ), фосфатидилэтанолламинов, фосфатидилсеринов, сфингомиелинов из мозга быка («Sigma», США), кефалина из мозга животных («Fluka», Швейцария), фосфатидилхолинов, лизофосфатидилхолинов, лизофосфатидилэтанолламинов, фосфатидных кислот из яичного желтка («Koch-Light», Англия), кардиолипинов (Предприятие по производству бактериальных препаратов, Харьков). Лизофосфатидилсерин и лизофосфатидилинозиты получали путем обработки соответствующих диацильных форм фосфолипазой A_2 , выделенной из *Crotalus terrestris* («Calbiochem», США). Установлено, что фосфолипидные фракции на наших хроматограммах располагались в порядке возрастания R_f следующим образом: лизофосфатидилинозиты, лизофосфатидилхолины, фосфатидилинозитдифосфаты, лизофосфатидилсерин, сфингомиелины, лизофосфатидилэтанолламины, фосфатидилинозитфосфаты, фосфатидилхолины, фосфатидилинозиты, фосфатидилсерин, фосфатидилэтанолламины, кардиолипины. Фосфатидные кислоты обнаруживались на некоторых хроматограммах между сфингомиелинами и лизофосфатидилсеринами. Фосфатидилинозиты имеют хроматографическую подвижность, равную 0,44, которая существенно отличается от значений R_f расположенных рядом пятен (см. таб-

Влияние предварительной обработки силикагеля растворами различных солей на R_f фракций фосфолипидов мозга крыс

| Фракция фосфолипидов | Система хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (13:7:1) | | | | Данные литературы | |
|----------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|----------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| | без предварительной обработки силикагеля | обработка силикагеля 0,25 % растворами солей | | | [13] хлороформ — метанол — 7 н. аммиак 65:25:5 | [16] хлороформ — метанол — 7 н. аммиак 60:35:5 |
| | | карбонат кальция | оксид калия | карбонат калия | | |
| Лизофосфатидилэтанол-амины | 0,09 | 0,13 | 0,13 | 0,24 | 0,20 | — |
| Фосфатидилхолины | 0,17 | 0,26 | 0,20 | 0,34 | 0,33 | 0,20 |
| Фосфатидилинозиты | 0,23 | 0,26 | 0,20 | 0,44 | 0,11 | 0,41 |
| Фосфатидилсерины | 0,20 | 0,26 | 0,20 | 0,59 | 0,05 | 0,45 |

лицу), что позволяет легко осуществлять последующее препаративное выделение этой фракции. Количественное содержание фосфатидилинозитов определяли денситометрическим методом. Для этих целей может быть использован любой денситометр, позволяющий анализировать тонкослойные хроматограммы. Перед нанесением исследуемого экстракта слой силикагеля разделяли на 12—15 узких дорожек (4—5 мм), что обеспечивало одинаковую ширину денситометрируемых пятен, соответствующую размеру пучка света прибора. При таких условиях распределение анализируемого вещества в процессе хроматографии происходило только по ходу растворителя, продольная сорбция исключалась. Этот способ позволял оценить интенсивность окраски всего пятна фосфатидилинозитовой фракции и исключить влияние краевых эффектов. Распределение липидного материала в пятне практически соответствовало гауссовой кривой и обеспечивало пропорциональность между количеством фосфатидилинозитов и площадью их пиков на денситограммах. При этом имелась возможность одновременно анализировать на одной пластинке 12—15 проб. Для построения калибровочной кривой на отдельные дорожки силикагеля наносили фосфатидилинозиты («Serva», ФРГ), содержавшие соответственно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 мкг липидного фосфора. После хроматографии пластинку проявляли, помещая ее над раствором хромовой смеси на 30 мин при 200 °С. Затем денситометрировали и строили калибровочную кривую (рис. 1). Как видно на рисунке, фосфатидилинозиты можно определять этим способом в диапазоне концентраций липидного фосфора от 0,2 до 8 мкг. Для стандартного препарата фосфатидилинозитов чувствительность метода 0,1 мкг, ошибка $5 \pm 0,35$ %.

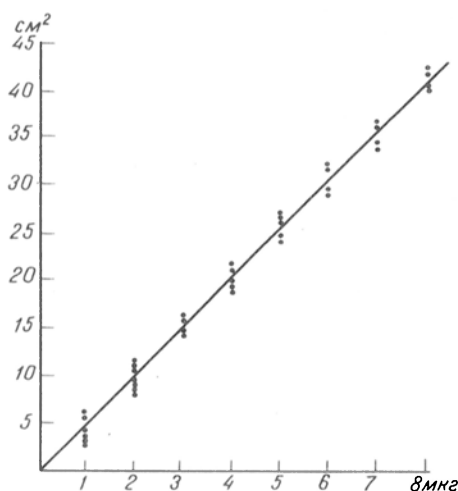


Рис. 1. Зависимость между количеством фосфора во фракциях фосфатидилинозитов и данными денситометрического анализа. По оси абсцисс — содержание фосфора в фосфатидилинозитах (в мкг); по оси ординат — площадь соответствующих пиков на денситограммах (в см²).

Для препаративного выделения фосфатидилинозитов количество адсорбента, приходившееся на 1 см² поверхности пластинки, было больше, чем при аналитической ТСХ, и составляло 8—10 мг, что позволяло увеличить нагрузку анализируемого материала. 5—10 % раствор липидов в смеси хлороформ — метанол (9:1) наносили на препаративные пластинки в количестве 50—100 мг в виде ряда точек (объемом 2—3 мкл) или сплошной узкой полосы на расстоянии 1,5—2 см от нижнего края пластинки. Фракционирование проводили в системе хлороформ — метанол — 7 н. аммиак (13:7:1) в течение 1 ч 30 мин. При этом фронт растворителя достигал края пластинки через 1 ч, после чего хроматография продолжалась в условиях «протока», что способствовало увеличению разницы в хроматографической подвижности фосфатидилинозитов и расположенных рядом фракций. По окончании хроматографии пластинку высушивали до полного удаления растворителей. Для обнаружения компонентов хроматограмму проявляли водой, при этом разделенные липиды выявлялись в виде сплошных матовых полос. Для выделения фосфатидилинозитов с пластинки участок сорбента, подлежащий переносу, обводили препаративной иглой и собирали в пробирку со смесью хлороформ — метанол — вода (1:2:0,8) [2] при помощи водоструйного насоса. Для элюирования фосфатидилинозитов собранный силикагель встряхивали 5 мин с 10—15 мл указанной смеси растворителей, затем центрифугировали и декантировали. Процедуру повторяли трижды. Объединенный элюат упаривали в токе азота, предварительно внося в него антиоксидант. Сухой остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол (9:1). Полученный препарат фосфатидилинозитов хранили при низкой температуре в виде 1—5 % раствора. Чистоту выделенной фракции контролировали с помощью повторной тонкослойной хроматографии при использовании «свидетеля» и цветных тестов. Проведение цветных тестов показало, что полученное вещество не дает реакции на свободную аминогруппу, четвертичный азот и окрашивается в коричневый цвет при обработке щелочным раствором нитрата серебра, что свидетельствует о наличии в его молекулах инозита.

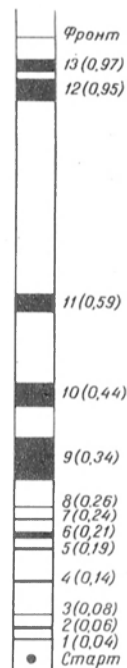
Результаты и их обсуждение

Предложенный нами усовершенствованный метод позволил с помощью проточной ТСХ четко выделить в виде отдельной фракции и количественно определить фосфатидилинозиты, входящие в состав сложных многокомпонентных смесей (рис. 2).

При проточной горизонтальной хроматографии добавка к адсорбенту различных солей существ-

Рис. 2. Схема хроматограммы фосфолипидов мозга крысы.

1 — лизофосфатидилинозиты; 2 — лизофосфатидилхолины; 3 — фосфатидилинозитидфосфаты; 4 — лизофосфатидилсерины; 5 — фосфатидные кислоты; 6 — сфингомиелины; 7 — лизофосфатидилэтанол-амины; 8 — фосфатидилинозитидфосфаты; 9 — фосфатидилхолины; 10 — фосфатидилинозиты; 11 — фосфатидилсерины; 12 — фосфатидилэтанол-амины; 13 — кардиолипины. В скобках указаны значения R_f . Использована система хлороформ — метанол — 7 н. аммиак 13:7:1; силикагель, обработанный 0,25 % раствором углекислого калия; длительность хроматографии 50 мин.



венно изменяет хроматографическую подвижность наиболее полярных фракций фосфолипидов — фосфатидилсерина и фосфатидилинозита (см. таблицу). Учитывая многообразие форм и высокую полярность инозитсодержащих липидов, можно заключить, что неэффективное выделение их из многокомпонентных смесей природных липидов широко используемыми методами ТСХ может быть обусловлено близкими значениями R_f некоторых молекулярных видов фосфоинозитидов с отдельными фосфолипидными фракциями, находящимися в исследуемом материале в виде солей одно- и двухвалентных катионов. В предлагаемых нами условиях хроматографии обеспечивается обмен катионов в фосфолипидных молекулах, способствующий четкому и полному отделению фосфатидилинозита от других фосфолипидных фракций. Это достигается как непосредственной добавкой углекислого калия в адсорбент, так и увеличением длительности протока, в течение которого происходит интенсивный обмен катионов в молекулах фосфолипидов при участии ионов аммония, входящих в состав системы растворителей.

Основная часть фосфатидилинозита может быть извлечена из исследуемых тканей как подкисленными смесями растворителей, так и обычной, хлороформ-метаноловой экстракцией. При этом отмечена тканевая специфичность, оцениваемая количеством извлекаемых фосфатидилинозитов. Установлено, что экстракция хлороформ-метаноловой смесью, содержащей кислоту, позволяет выделить наибольшее количество фосфатидилинозита из мозга крыс (100—110 мкг фосфора на 1 г влажной ткани), в то время как из печени и легких — приблизительно в 2 раза меньше (50—55 мкг). При извлечении фосфолипидов нейтральными смесями растворителей значительное количество фосфатидилинозита можно получить из легких (100—110 мкг на 1 г ткани). Из мозга и печени этим способом удается выделить фосфатидилинозита соответственно 60 и 90 мкг. При этом после применяемой нами обычной, хлороформ-метаноловой экстракции дополнительная обработка остатков ткани подкисленными смесями растворителей позволяет получить всего 2—3 % фосфатидилинозита от общего их количества.

Различие в количестве фосфатидилинозита, извлекаемых разными способами из одной и той же ткани, свидетельствует, что в создаваемых во время экстракции условиях, характерных для каждой исследуемой ткани, возможно образование фосфоинозитид-белковых комплексов различной устойчивости [3, 12, 13, 16]. Подкисление экстрагирующей смеси способствует обмену катионов в молекулах фосфатидилинозита, характер которого в значительной степени будет определять эффективность их последующего фракционирования. Общепринятые методы одномерной хроматографии в герметических камерах в аналогичной системе не позволяют добиться четкого и полного выделения фракции фосфатидилинозита. В этом случае они обнаруживаются либо с фосфатидилсеринами, либо с фосфатидилхолестеринами (см. таблицу). Высокая емкость используемых слоев адсорбента позволяет выделять в процессе хроматографии 2—3 мг фосфатиди-

линозита на 1 г силикагеля, затрачивая при этом 18—20 мл смеси растворителей. Хроматографический анализ, выполняемый на одной пластинке в течение 1 ч 30 мин, дает возможность получить фосфатидилинозиты, чистоту которых не требуется дополнительно контролировать.

Таким образом, предложенный усовершенствованный метод позволяет серийно с высокой чувствительностью и эффективностью количественно анализировать и препаративно выделять фосфатидилинозиты из сложных многокомпонентных смесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каргаполов А. В. // Биохимия.— 1981.— Т. 46, № 4.— С. 691—698.
2. Кейрс М. Техника липидологии: Пер. с англ.— М., 1975.
3. Кренс Е. М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга: адаптационная функция липидов.— Л., 1981.
4. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой.— Л., 1982.
5. Новицкая Г. В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов.— М., 1972.
6. Препаративная биохимия липидов / Бергельсон Л. Д., Дятловская Э. В., Молотковский Ю. Г. и др.— М., 1981.
7. Италья Э. Хроматография в тонких слоях: Пер. с нем.— М., 1965.
8. Ansell G. V., Hawthorn J. N., Dawson R. M. C. Form and Function of Phospholipids.— Amsterdam, 1973.
9. Burgess G. M., Irvine R. F., Berridge M. J. et al. // Biochem. J.— 1984.— Vol. 224.— P. 741—746.
10. Choquette D., Hakim G., Filolep A. G. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1984.— Vol. 125, N 3.— P. 908—915.
11. Colacicco G., Rapport M. M. // J. Lipid Res.— 1967.— Vol. 8, N 5.— P. 513—515.
12. Fullington J. G. // Ibid.— N 6.— P. 609—614.
13. Green D. E., Tzagoloff A. // Ibid.— 1966.— Vol. 7, N 5.— P. 587—600.
14. Kirk C. J., Guillon G., Balestre M. N. // Biochimie.— 1985.— Vol. 67.— P. 1161—1167.
15. Maucio G., Dangelmaier C. A., Smith J. B. // Biochem. J.— 1984.— Vol. 224.— P. 933—940.
16. Rietveld A., de Kruijff B. // Biosci. Rep.— 1986.— Vol. 6, N 9.— P. 775—782.
17. Rossi F., Bianca V. D., Grzeskowiak M. // FEBS. Lett.— 1985.— Vol. 181, N 2.— P. 253—258.
18. Rouser G., Simon G., Kritchevsky G. // Lipids.— 1969.— Vol. 4.— P. 599—606.
19. Shimbo K. // Agricult. biol. Chem.— 1986.— Vol. 50, N 10.— P. 2643—2645.

Поступила 05.04.89

ISOLATION OF PHOSPHATIDYL INOSITOLS FROM VARIOUS TISSUES BY MEANS OF HORIZONTAL FLOW CHROMATOGRAPHY

V. M. Matsul, A. V. Kargapolov
Medical School, Kalinin.

A procedure is described which enabled to isolate rapidly at the preparative scale as well as to estimate with high rate of sensitivity the phosphatidyl inositols in mixtures of native lipids. Efficiency of the procedure developed is based on some advantages of the technique of horizontal flow chromatography as well as on use of silica gel containing potassium carbonate obtained after precipitation. Quantitative estimation of phosphatidyl inositols involved densitometry of narrow silica gel strips containing 10—15 samples simultaneously.