

硅胶薄层层析技术在分离纯化鱼类性类固醇激素中的应用

赵 维 信

(上海水产大学)

摘要 应用硅胶薄层层析技术结合放射照相定位方法,进行鱼类血清和性腺离体培养液中六种性类固醇激素的分离、纯化。文章具体介绍了样品抽提,点样,层析溶剂系统选择,照相定位,洗脱等技术步骤。

在进行定性和定量研究中,为了将某种类固醇物质从血浆、血清或组织中分离出来,最常用的有效方法可说是层析法。层析法包括吸附剂柱层析、纸层析和薄层层析。而其中薄层层析兼有纸层析和柱层析的优点,物质在薄层层析分离时,除了由于分配系数的不同外,还包括吸附层析的原理,从而达到分离的目的。所以,目前薄层层析已发展成为现代实验技术中一种广泛应用的方法。亲脂性物质的混合物在硅胶薄层上的微量分析十分迅速,方便,而且检测的灵敏度高,一般比纸层析的检测灵敏度高10—100倍,因此,硅胶薄层层析宜用于少量样品的分析。本文主要介绍运用硅胶薄层层析分离纯化鱼类性类固醇激素的方法。

材 料 与 方 法

(一) 薄层层析板与层析容器

Merck TLC 硅胶 60 F254 (TLC Aluminium sheets silica gel 60 F254 pre-coated) 是一种用硅胶铺层于铝箔上的薄层层析板,硅胶厚度为0.2毫米,薄层板大小为20×20厘米见方。使用前,层析板必须用无水乙醇预洗一次,即用无水乙醇上行层析一次。由于硅胶中加有有机荧光物质,在254毫微米波长紫外光下呈强烈荧光背景,类固醇激素的斑点呈现紫色。

采用上行法展层,展层容器为具有密闭盖子的玻璃方缸,长240毫米,宽90毫米,高230毫米。展层溶剂50毫升。玻璃缸的内面用滤纸按缸的形状将三面围衬(留出一面便于观察层析进行情况),使缸内蒸气均匀饱和。

(二) 标准品(纯品)层析

鉴定样品物质在薄层上展开的位置,一般

用与已知类固醇激素的标准品作对照的方法。将欲分离的类固醇激素的标准品(纯品)5毫克各自溶解于1毫升无水乙醇中,用于点样。每个样点约滴加标准品2微升。各样品点间距为2—3厘米。然后在选用的展层溶剂系统中采用上行法层析两次,每次约一小时。层析后在紫外光灯下观察层析图谱,用铅笔描绘下斑点的位置,以使用作为与未知样品层析图谱对照的依据。

(三) 鱼类血清和卵泡离体培养液的硅胶薄层层析

1. 用乙酸乙酯或二氯甲烷抽提样品 取0.1毫升血清或培养液样品放入小试管中,加入某种或数种欲分离的类固醇激素的氚(^3H)标记品,如果欲分离样品中的雌二醇(E_2)和睾酮(T),则加入氚标雌二醇($^3\text{H}-\text{E}_2$)和氚标睾酮($^3\text{H}-\text{T}$)各0.1毫升,其放射性脉冲数各自约为1000cpm。然后放入4°C冰箱,经18—24小时温育平衡后,加入1.5毫升重蒸的乙酸乙酯或二氯甲烷进行抽提,试管加塞,在滚动式搅拌器上搅动半小时后,小心地将上层脂溶性抽提液吸出,放入一梨形瓶中,弃去下层水溶性

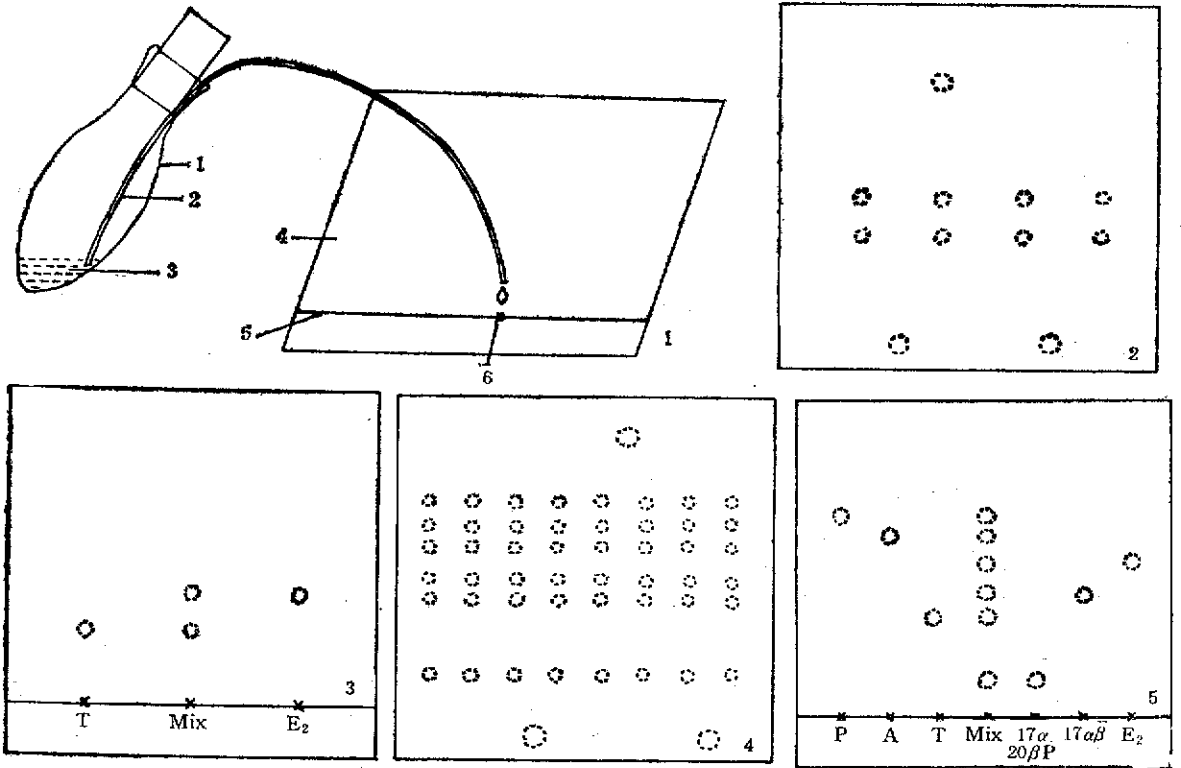


图1 层析点样图示。1.梨形瓶, 2.尼龙细管, 3.样品, 4.硅胶薄层层析板, 5.点样线, 6.点样点。

图2 鲑鱼血清样品层析照片图。示四个血清样品中 E_2 和 T 的分离。(照片上方和下方的三个大圆亮点为定位辅助标记,不是层析斑点)

图3 E_2 和 T 标准品的层析图谱。Mix. 为两种标准品的混合点样点。

图4 鲑鱼卵泡培养液的层析照片图。示八个卵泡培养液样品中 P 、 A 、 T 、 E_2 、 $17\alpha\text{P}$ 和 $17\alpha20\beta\text{P}$ 的分离。(照片上方和下方的三个大圆亮点为定位辅助标记,不是层析斑点)

图5 P 、 A 、 T 、 E_2 、 $17\alpha\text{P}$ 和 $17\alpha20\beta\text{P}$ 标准品的层析图谱。Mix. 为六种标准品的混合点样点。

部分。然后用氮气吹干抽提液,加入 0.2 毫升二氯甲烷溶解梨形瓶四周壁上的物质,即制备成点样溶液,可用于点样。

2. 层析样品的点样 选用一根内径为 0.5 毫米,长约 14 厘米的尼龙细管,虹吸二氯甲烷洗涤三次。插入梨形瓶中,梨形瓶轻轻加上玻璃瓶塞,一只手握着梨形瓶,另只手提着尼龙细管,将梨形瓶略微提高,倾斜,瓶内的溶液就经虹吸作用从尼龙细管的另一端一滴滴缓慢流出(见图 1)。样品滴在预先用无水乙醇洗涤过的硅胶薄层层析板上的点样线上。当 0.2 毫升二氯甲烷点样结束后,再加入 0.1 毫升二氯甲烷洗容器,并追加点样在原先的样点上。为了尽量缩小样点的直径,使样品尽量少扩散,点样时用氮气边吹边点,还可将点样的层析板放在加热台上,点样的效果就更好。然后根据所要求的层析系统配制溶剂,倒入层析缸内,约 10 分钟后,待缸内溶剂蒸气均匀,即可放入层析板,盖好层析缸。经一小时左右溶剂上行至层析板前缘时(切勿使溶剂走出层析板),取出层析板,在室温下待干燥后,再放入原缸内层析一次(溶剂不必更换)。

3. 照相定位和洗脱 两次层析完毕,取出层析板,悬挂在室温下,待完全干燥后,用 β 放射层析谱感光仪 (Betagraph Radiochromatogram Imaging System) 照相^[1],采用一次成相照片 (polaroid) 拍照。取出照片,通过投影将照片上的光亮点投影在层析板上,用铅笔轻轻在层析板上描绘下各亮点的相应位置和形状。然后将描绘下来的各斑点的位置与预先在相同层析溶剂系统中的已知成分的层析位置相对照,以确定样品层析斑点的性质。如欲进一步测定各斑点物质的准确含量,即可剪下各样品斑点,分别放入各个小瓶中,用 1 毫升无水乙醇将该物质从硅胶上洗脱下来。半小时后吸出洗脱液放入另一小瓶中,经氮气吹干无水乙醇(洗脱液),加入 1 毫升磷酸缓冲液,即得到分离纯化的类固醇,可供放射免疫测定用于定量。(实验中所用有机溶剂均为分析纯,并需再经重蒸后使用)。

结 果

(一) 鲑鱼血清中雌二醇(E_2)和睾酮(T)的层析分离。

体重 1000—2000 克,性成熟的鲑鱼 (*Salmo salar*), 用注射器从尾静脉穿刺取血,制备成血清,分装低温 (-40°C) 保存待用。0.1 毫升血清经上述方法抽提、点样后,在环己烷:乙酸乙酯 = 20:40 展层溶剂系统中,上行层析两次,进行照相定位。层析板的感光照片见图 2,与 E_2 和 T 标准品层析斑点的所在位置(图 3)相符。在上述层析系统中移动较快的一点为 E_2 ,移动较慢的一点为 T。

(二) 鲑鱼卵泡培养液中孕酮(P),雄烯二酮(A),睾酮(T),雌二醇(E_2), 17α -羟孕酮($17\alpha\text{P}$)和 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮($17\alpha 20\beta\text{P}$)的层析分离。

鲑鱼的成熟卵泡,直径约 5 毫米,卵黄已充分积累完成,经用 1 微克/毫升鲑促性腺激素刺激后^[2],取培养液分装低温 (-40°C) 保存备用。0.1 毫升培养液样品经上述方法抽提、点样后,在二氯甲烷:乙酸乙酯:丙酮 = 40:20:2 展层溶剂系统中上行层析两次,进行照相定位。层析板的感光照片见图 4,与该六种类固醇激素标准品层析斑点的所在位置(图 5)相符。在该层析系统中,层析斑点由快到慢依次为

$P > A > E_2 > 17\alpha\text{P} > T > 17\alpha 20\beta\text{P}$,
各自分离。

讨 论

样品经抽提,层析和照相,所得之斑点清晰,说明该层析溶剂系统分离效果良好。本方法宜用于血清、组织提取液,组织培养液中类固醇激素的分离。样品在抽提时加入放射性同位素标记激素的目的,是为了在作定量分析时便于计算回收率,即计算样品在抽提,层析等操作过程中损失的量;另外,血清样品中所含的类固醇量极微,经层析后的斑点,一般在紫外灯光下难以显示出来,因此无法直接用紫外光灯定位。而由于加入放射性物质,就可利用放射性物质

的感光作用进行照相,以确定各种物质移动后的所在位置。采用放射照相技术进行样品层析斑点定位,还可省去每次样品层析时用已知标准品在同一张层析板上作对照层析,既避免了高浓度标准品污染样品的可能性,又提高了定位的准确性,使定位分析和定量分析都更精确。

样品在用乙酸乙酯或二氯甲烷抽提过程中的损失较小,回收率达94%左右,而层析过程的回收率仅为50%左右。因此在应用层析技术分离的基础上再做定量测定时,常辅以该物质的回收率测定,以便正确计算结果。

环己烷:乙酸乙酯=20:40层析系统,虽然不能同时有效地分离六种性类固醇,但用于

E₂和T的分离还是很有效的。在这一层析系统中,其它四种类固醇的层析斑点与该两种类固醇的层析斑点并不重叠。

参 考 文 献

- [1] Simpson, T. H. and Wright, R. S. 1977 A radioimmunoassay for 11-oxotestosterone: its application in the Measurement of Levels in blood serum of rainbow trout (*S. gairdneri*). *steroids*, 29:383—398.
- [2] Zhao Weixin and Wright, R. S. 1985 The course of steroid release by intact ovarian follicles of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) incubated in vitro with and without gonadotrophin. *Gen Comp. Endocrinol*, 57:274—280.