

性大小顺序是皮质醇>皮质素>醛固酮>皮质酮>脱氧皮质酮,相应 R_f 值见表1。在实际工作中,按以上规律选择溶剂即可预期地改变 R_f 值。

聚酰胺的吸附力,与其分子量大小有关。我们所用荷兰产尼龙-6,分子量(20,000)比上海化纤九厂的尼龙-6(16,000)稍大,它对皮质激素的吸附力也较强。用相同的溶剂展开,以荷兰产尼龙-6作薄层,皮质激素的 R_f 值相应较小(见表1)。

尼龙薄层层析后,甾体激素的检出可采用纸层析所用的显色反应试剂。对皮质激素可用

四氮唑兰或碱荧光试剂,对雌激素可用三氯化铁-铁氰化钾试剂,均很方便。对雄激素我们利用间位二硝基苯反应试剂,按B. P. Lisboa(1964)加以改进,以氢氧化钾水溶液代替氢氧化钾甲醇溶液,并将间二硝基苯的用量减少至1/10,亦取得满意效果。但是,各种强酸性反应试剂(如硫酸、磷酸)不能用于尼龙薄膜。

尼龙薄层具有一定程度的坚韧性,可用铅笔在上面写字或作标记。可从玻璃板上揭下保存。亦可任意裁剪,便于作光密度测定或紫外光吸收测定。

[本文于1978年10月11日收到]

微生物培养液中有有机酸纸谱法的改进

齐义鹏 刘淑华

(中国科学院成都生物研究所)

现有的有机酸层析法对测定微生物培养液中的乳酸不适用。我们经过改进,提出了预处理样品的指示层析、薰蒸显色法,用以测定两株啤酒病源菌培养液中的乳酸,取得较好效果。两株病源菌(P_1 , P_2)均由重庆啤酒厂的病酒样品中分离得到;属乳酸菌科,片球菌属(*Pediococcus*)。

方法与结果

一、微生物培养液层析中的问题

我们首先采用一般层析法以两种溶剂试验:(1)乙醇:浓氨水(比重0.88):水=80:4:16(V/V);(2)正丁醇:甲酸:水=4:15:1(V/V)。样品为啤酒病源菌 P_1 、 P_2 的葡萄糖酵母膏培养液。层析后,分别用0.1%的溴酚蓝和0.1%的溴酚蓝喷雾显色。标准酸(2.0%乳酸)出现黄色斑点,样品不显色。将溴酚蓝溶液分别调到pH6.8和8—9^[1],显色结果,酸性指示剂喷雾出现花斑,碱性指示剂仍只有标准酸的斑点,样品在原点未移动或移动很少(表2)。

二、微生物培养液纸层析的改进

1. 进行预处理:

(1)取 P_1 、 P_2 的啤酒病源菌培养液2.0毫升,加5.0%三氯醋酸(TCA)8.0毫升,90℃加热15分钟,离心2,000rpm 10分钟。

(2)取上清液5.0毫升,加2.0%硫酸铜1.0毫升和碳酸钙1.0克,静置30分钟以上,并经常振荡,离心2,000 r. p. m. 15分钟,收集上清液,过夜后,次日再过滤,用滤液作层析样品。

将2.0%乳酸加入啤酒中,按上述操作同样处理,作为对照。

2. 指示层析: 溶剂用乙醇:水:浓氨水(比重0.88)=35:13:2(V/V),加入百里酚蓝0.03%(V/V)^[2],用Whatman 1号滤纸点样0.01毫升,饱和后,进行单向上行一次或二次层析4小时,在层析过程中,滤纸被溶剂染成蓝色,样品为黄色斑点,随溶剂前沿移动,与标准酸相似,可以直接观察斑点移动和整个层析情况。滤纸取出凉干后,变成黄色,斑点消失。

3. 薰蒸显色: 凉干滤纸,在浓盐酸蒸汽显色缸中,密闭薰蒸1分钟,滤纸背景立即变成均匀而美丽的玫瑰红色,衬托出一个清晰的黄色斑点。取出凉干后,计算 R_f 值。

4. 结果: 经过多次试验, 样品与标准酸混合点样, 结果相同, 证明样品为乳酸, 其层析图谱和 R_f 值分别见图 1 和表 1。

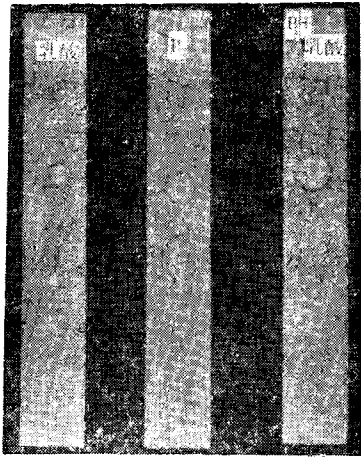


图 1 P_1 培养液的层析图谱

有时, 滤纸从显色缸中取出后, 黄色斑点消

失, 此时可将滤纸再放入层析缸中饱和过夜, 次日取出凉干后, 再显色, 于是红色背景上的黄色斑点更为清晰, 并能保存较长时间。

表 1 微生物培养液有机酸及标准酸的 R_f 值

试验次数	1	2	3
P_1	70.8		64.7
P_2			65.8
未处理乳酸	70.9	69.5	62.4
处理乳酸	70.5		
$P_1 + \text{乳酸}$		69.3	
$P_2 + \text{乳酸}$		69.4	61.9

三、两种方法分析结果的比较

最后将啤酒病源菌培养液用一般纸层析法与改进后方法的分析结果加以比较。结果见表 2。

表 2 一般层析法与改进的层析法分析结果的比较*

溶 剂	显 色			培养液	结 果			
	指示剂	方 式	显 色		滤 纸	标准酸	样品	标准酸 + 样品
乙醇: 氨水: 水	溴酚绿	单 独	喷 雾	未处理	花 斑	—	—	
正丁醇: 甲酸: 水	溴酚蓝	单独	喷雾	未处理	蓝色	+	—	
正丁醇: 甲酸: 水	溴酚蓝	单独	喷雾	预处理	蓝色	+	—	
正丁醇: 甲酸: 水	pH 6.8 溴酚蓝	单独	喷雾	预处理	花斑	—	—	
乙醇: 氨水: 水	百里酚蓝	加入溶剂中	盐酸薰蒸	未处理	红色	+	±	
乙醇: 氨水: 水	百里酚蓝	加入溶剂中	盐酸薰蒸	预处理	红色	+	+	+

* + — 正常显色 — — 不显色不移动 ± — 显色, 位置低, 拖尾。

讨 论

微生物培养液是一个复杂的多相胶体溶液或悬浊液, 含有菌体蛋白, 代谢产物、培养基残余成分等, 不适于用常规层析方法。点样后, 样点上有明显的沉积物, 致使溶剂不易浸透; 加之高分子物质间的引力, 使其中有机酸分子移动缓慢, 作者用指示层析观察到了这一现象。因此, 微生物培养液样品在层析前进行预处理很有必要。我们以 TCA 脱脂, Cu-Ca 脱糖, 可得到清亮透明的溶液, 又不影响有机酸的层析。

本文介绍方法的特点是: 样品需进行预处理; 其次, 在含有指示剂的溶剂中进行指示层析; 第三, 用浓盐酸蒸汽薰蒸显色代替喷雾显

色; 第四, 能直接观察斑点移动, 又能得到清晰均匀的图谱, 其颜色变化如表 3; 第五, 显色后, 有时斑点消失, 可将滤纸再次饱和并重新显色。

表 3

操作过程	滤纸背景	斑 点
层 析 时	蓝 色	黄 色
凉干滤纸	黄 色	黄 色
显 色 后	红 色	黄 色

参 考 文 献

[1] 曹真: 《微生物》, 1960 年, 第二卷, 第 4 期, 第 186 页。
[2] Hartley, R.D. and Lawson, G. S.: *Chromatography* 7(1): 69—76, 1962.

[本文于 1979 年 5 月 21 日收到]