

一种简易的 picomole 水平的氨基酸定量测定法

罗喜牛 于志江* 王新昌

(南京大学生物化学系, 南京)

茚三酮显色法, 是氨基酸分析仪最早使用和经常使用的检测方法^[1,2], 但是用此法检测, 氨基酸分析仪, 灵敏度通常限制在 nanomole 水平^[4]。Beckmen 121M 和 D-500 型氨基酸分析仪的比色分析据称能在 100p mol 水平进行, 但这已是灵敏度的极限^[3,4]。

随着荧光技术的应用和发展, 荧光检测技术与氨基酸分析仪相结合^[2-5], 与高效液相色谱相结合^[6,7], 使氨基酸、多肽和蛋白质的检测灵敏度达到 P mol 水平。

本文介绍一种简单易行的改进方法, 即用邻苯二甲醛/ β -巯基乙醇 (OPA/ME) 试剂代替茚三酮与氨基酸 (aa) 进行柱后反应, 测定 aa-OPA 衍生物的荧光强度, 从而计算氨基酸的含量。这个方法可使日立 835-50 型氨基酸分析仪的灵敏度从 3nmol 提高到 P mol 水平。

一、材料和方法

1. OPA/ME 试剂的配制 OPA (瑞士产) 溶于甲醇, 浓度为 50mg/ml。1 体积该溶液与 9 体积 0.4 M, pH 10.5 的硼酸缓冲液混和。每毫升混和液加入 4 μ l ME。

2. 氨基酸标准溶液

标准氨基酸(美国标准品)溶于 0.02N 盐酸分别配制成 50, 100, 150, 200, 300p mol/50 μ l 的系列标准溶液。

3. 仪器及操作

所用仪器为氨基酸分析仪 (日立 835-50 型) 和荧光分光检测仪 (岛津 RF-530)。

将检测仪的信号输出接头接到氨基酸分析仪 TB18 的 4、5、6 号接头上, 信号进入分析

仪的数据处理系统, 图谱及数据仍由打字机给出。

原来用于输送茚三酮的 2 号泵, 改为输送 OPA/ME 试剂。OPA/ME 与柱流出液混合后, 通过较短的 Teflon 管进入荧光检测仪。OPA/ME 试剂的流速为 0.30ml/min。aa-OPA 衍生物的激发波长为 330nm, 发射波长为 420nm。

柱: 2.6 $\times$ 150mm, 离子交换剂 #2619。

分析使用原来日立 835-50 型分析仪自动分析氨基酸的程序。

二、结果和讨论

1. 标准氨基酸层析图谱 比较图 1A 和图 1B, 可以明显地看出, 采用 OPA/ME 试剂后, 可以使日立 835-50 型氨基酸分析仪的分析达到 P mol 水平。

OPA 与氨基酸在室温下短时间内完成反应生成 aa-OPA 衍生物^[6], 不象茚三酮反应需要较长时间保温。由于进入检测之前的 Teflon 管很短, 图 1A 中的各峰都比图 1B 中的对应峰提前出现。即荧光检测法分离率和茚三酮显色法相同而各峰保留时间缩短。

2. 用 OPA/ME 试剂后标准氨基酸分析的有关参数 在检测仪的衰减为 2 进行测定时, 100—300p mol 范围内的氨基酸分析得到较好的线性关系 (见表 1 中的线性相关系数)。在另一组实验中 (检测仪衰减为 1), 50p mol 样品也能清晰分离。这说明荧光检测法的灵敏度还可进一步提高。

* 1985 届南京大学生化专业毕业生。

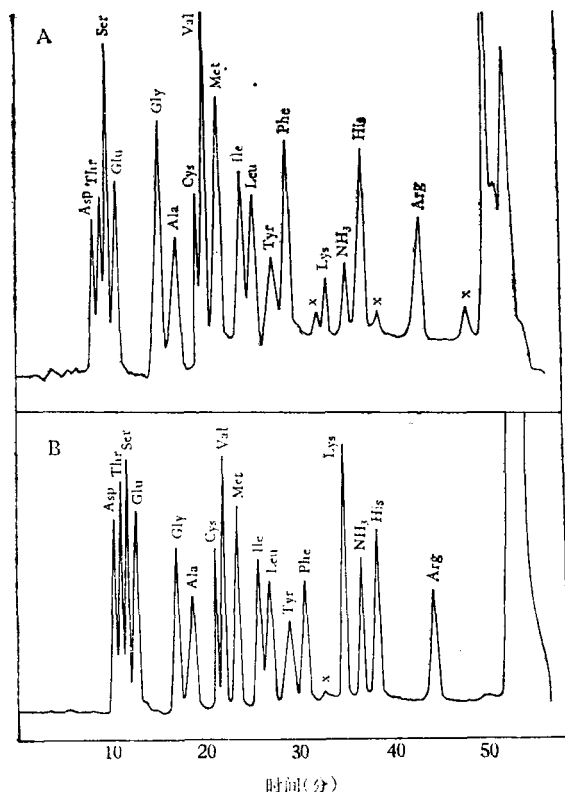


图1 标准氨基酸层析图谱

A. OPA/ME 试剂 (300p mol 的标准氨基酸混合液)

B. 茚三酮试剂 (3nmol 的标准氨基酸混合液)

除了亚氨基酸脯氨酸和羟脯氨酸外,其余的氨基酸都能与 OPA 反应产生荧光衍生物。以 Glu 的显色率为 1.00 计,除了 LYS 为 0.36 外,其余都在 0.60 以上(表 1,标准品中无 Trp)。六次连续的分析表明,每种氨基酸的保留时间重现性非常好(表 1)。

用 200pmol 标准样品的三次连续分析结果表明,大部分氨基酸定量的重复性结果还是比较好的。Lys 和 GLu 的误差偏大。估计 Lys 的偏差大与其低显色率有关。

3. OPA/ME 试剂的流速对分析的影响

改变 OPA/ME 试剂的流速,为 0.30、0.20、0.10ml/min 时,以 Glu 峰和 Val 峰为界,可将图谱分成三部分[图 1A]:

第 I 部分,峰面积在流速为 0.30ml/min 时最大,而流速为 0.10ml/min 时明显减小;

第 II 部分,峰面积在流速为 0.20ml/min 时最大;

图1 在 pmol 水平上标准氨基酸混合液分离、定量的有关参数

氨基酸	保留时间 ^a ±均差(分)	线性相关 系数 ^b	相对荧光 显色率 ^c
Asp	8.18±0.04	0.998	0.64
Thr	8.89±0.04	0.998	0.60
Ser	9.57±0.04	0.999	1.23
Glu	10.83±0.04	0.997	1.00
Gly	15.33±0.06	0.999	1.54
Ala	17.30±0.10	1.000	0.89
Cys	18.77±0.03	0.945	0.89
Val	19.81±0.02	0.998	1.51
Met	21.44±0.03	0.974	1.79
Ile	23.85±0.05	0.973	1.16
Leu	25.17±0.04	0.996	1.09
Tyr	27.38±0.02	0.980	1.03
Phe	28.67±0.06	0.973	1.76
Lys	32.62±0.05	0.979	0.36
His	36.35±0.05	0.969	1.03
Arg	42.24±0.03	0.993	1.37

a. 氨基酸保留时间根据六次标准氨基酸混合液连续分析结果经统计处理所得。

b. 线性相关系数用每个氨基酸的含量(100, 150, 200, 300p mol) 与其相应的峰面积计算而得。

c. 相对荧光显色率为同一个标准氨基酸混合液(200 pmol) 三次连续分析后按各氨基酸的相对荧光强度平均值之比,以谷氨酸的相对荧光强度为 1.00。

第 III 部分,峰面积在流速为 0.10ml/min 时最大。

从峰面积及氨基酸的相对显色率来看,即使是 0.10ml/min 的流速,OPA 的流量也足够与氨基酸反应。出现上述现象,可能是由于 pH 变化的缘故。

荧光剂与氨基酸的反应,需要合适的 pH,过高或过低都影响显色率。

带有荧光检测系统的氨基酸分析仪,除了一只输送洗脱液的泵外,另有三只泵,分别输送:① 缓冲液(用以维持合适的反应 pH);② 氧化剂(用于帮助测定脯氨酸和羟脯氨酸);③ 荧光试剂^[2]。

而日立 835-50 型氨基酸分析仪只有一只输送洗脱液的泵和一只输送茚三酮试剂的泵。现将输送茚三酮试剂的泵改为输送 OPA/ME 试剂。因此,输送 OPA/ME 泵流速的改变不仅仅改变了输送 OPA 的量,也改变了氨基酸与

家蝇飞行轨迹的三维重现的一种方法

孙其坚 王 翔 张少吾

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

夏季常可看到家蝇互相追逐。这种追逐有时候要持续 1、2 秒钟, 甚至更长的时间。有时候还会看到一只蝇捕获另一只蝇, 然后双双就近着陆的情景。从它们这种灵活多变的飞行轨迹推测, 蝇具有快速准确的飞行控制系统, 因此可以在很短的时间内测出被追逐蝇的方位和速度, 并迅速做出自己的反应。

为了研究家蝇追逐行为, 首先要对一段飞行轨迹做出定量的描述。家蝇在飞行中, 除了三个平移自由度外, 还有三个旋转自由度以及头部相对于躯体的扭动。因此严格地说起来, 描述家蝇的飞行运动是比较困难的。为使问题简化, 可以假定蝇为一个质点, 然后对这个质点的运动轨迹进行描述。以下介绍了我们的三维重现方法及其应用实例。

方 法

家蝇 (*Musca domestica*) 取自动物研究所,

7—14 日龄。实验前一天放入实验箱中使其适应环境。室温在 25°C 左右。实验箱用有机玻

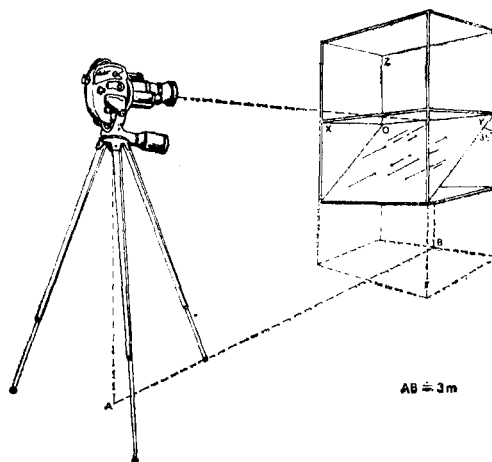


图 1 实验装置图

家蝇放在拍摄箱中, 自由飞行。光源从两侧均匀照明, 下边是一块与箱底成 45° 夹角的反射镜。图中 X 表示深度, Y 表示宽度, Z 表示高度。摄影机摆在箱子前面 3 米左右, 对焦到箱子后平面, 摄影速度为 64 张/秒。

OPA/ME 试剂反应时的 pH 值。

OPA 与氨基酸的最适反应 pH 约为 9^[6], 而离子交换柱采用分步洗脱, 首先使用的是低 pH 的洗脱液。柱流出液需要较多的 OPA/ME 硼酸缓冲液中和并达到或接近 pH 9。流速稍大, 对首先出现的几个峰无疑是有利的。

要使日立 835-50 型氨基酸分析仪与荧光检测联用并成为一种常规的方法, 某些方面尚需作进一步地改进, 但从本文的结果可见, 这个方法是可行的。

参 考 文 献

[1] Spackman, D. H., et al.: *Anal. Biochem.*, 30,

1190—1205, 1958.

[2] Needleman, S. B., et al.: *Protein sequence determination*, 205—231, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.

[3] [美国]哈罗德·盖纳编(邹冈等译):《神经肽》, 科学出版社 7—24, 1980.

[4] Stein, S., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 203—212, 1973.

[5] Weigle, M., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 352—356, 1973.

[6] Burbach, J. P. H. et al.: *J. Chromatog.*, 237, 339—343, 1982.

[7] Fernstrom, M. H., et al.: *Life Sci.*, 29, 2119—2130, 1981.

[本文于 1985 年 7 月 10 日收到]