

研究工作

用 DANS 反应-聚酰胺薄膜层析-荧光扫描法 测定大白鼠脑中氨基酸

任家鸣 赵天睿 南国华

(江西医学院生物化学教研室, 南昌)

提 要

本文介绍采用改进的 DANS 反应-聚酰胺薄膜层析-荧光扫描方法, 分离了 22 种氨基酸, 并对大鼠脑中六种氨基酸进行了超微量测定, 此法简便、灵敏。

分离检测氨基酸的方法有多种, 各有特色。如纸层析^[1]、醋酸纤维薄膜电泳^[2]、薄板层析^[3]、氨基酸自动分析仪^[4]、高效液相层析等^[5]。最近, 我们采用改进的 DANS 反应-聚酰胺薄膜层析-荧光扫描方法, 分离了 22 种氨基酸, 并对大白鼠大脑中的谷氨酸 (Glu)、门冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly)、 γ -氨基丁酸 (GABA)、丙氨酸 (Ala)、谷氨酰胺 (Gln) 进行了超微量测定。此法简便、快速、灵敏。

一 材料与方 法

1. 材料

(1) 标准氨基酸储存液: 分别配制甘、丙、缬、亮、异亮、丝、苏、门冬、谷、精、赖、组、半胱、蛋、苯丙、色、酪、脯、牛磺、 γ -氨基丁酸等氨基酸, 以及门冬酰胺和谷氨酰胺储存液, 浓度为 5×10^{-2} mol/L。实验时混合并作相应的稀释。

(2) NaHCO_3 : 0.05 mol/L, pH 10.2。

(3) DANS-Cl : 5 μ mol/ml 无水丙酮液。

(4) 层析聚酰胺薄膜: 浙江黄岩化学实验厂产品 (7 $\times$ 7 cm)。

(5) 展开溶剂: I: 苯: 冰醋酸 (9:1 V/V);

II: 88% 甲酸: 水 (1.5:100 V/V); III: 乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸 (20:1:1 V/V)。

(6) 仪器: 双波长薄层层析扫描仪 (CS-930 岛津)。附: 数据记录仪 DR-2。

2. 方法

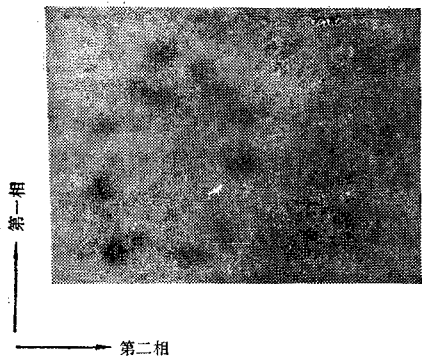
(1) 氨基酸的提取: 雄性大白鼠 (180—250 g), 饥饿 24 小时, 断头迅速取大脑 (在冰浴中进行), 称重, 立即放入在冰浴中预冷的匀浆器, 用 80% 乙醇制成 1:10 匀浆。以上操作在 2 分钟内完成^[2]。取 5 ml 匀浆, 以 3500 r/min 离心 15 分钟。上清液转入蒸发皿中, 置沸水浴上蒸干, 加 NaHCO_3 1 ml 溶解残渣, 以水饱和氯仿 4 ml 分二次洗涤蒸发皿, 均并入上述液体中, 充分摇匀, 3500 r/min 离心 15 分钟, 上层水溶液即为氨基酸提取液。

(2) 丹磺酰化反应: 取氨基酸提取液 0.4 μ l, 加 NaHCO_3 5 μ l, DANS-Cl 液 20 μ l, 充分混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 分钟。反应完毕后真空抽干, 加 50 μ l 丙酮溶解 DANS-氨基酸 , 取 2 μ l 点于聚酰胺薄膜上。

(3) 层析操作^[6]: 薄膜用展开剂 I 沿一相层析, 并重复一次。为了使 Glu 与 Asp 进一步分离, 用展开剂 III 再沿一相层析一次。将薄

膜转 90°, 以展开剂 II 沿二相层析一次。每次层析后均用电风吹干。

(4) 荧光原位扫描: 按下述条件进行: 汞灯光源, 单波长, 反射方式, 激发波长为 265nm, 4 号滤光器, 扫速为 9mm/min。



二 结果与讨论

1. DANS-氨基酸的分离

取氨基酸储存液 22 种混合, 使与 DNAS-Cl 反应, 经展开剂 I 和 II 层析后, 获得分离图

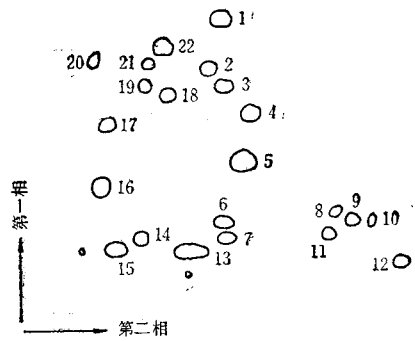


图 1 标准氨基酸混合液的 DANS 反应后层析图谱

1. 脯氨酸 2. 缬氨酸 3. γ -氨基丁酸 4. 丙氨酸 5. 甘氨酸 6. 谷氨酸 7. 门冬氨酸 8. 苏氨酸 9. 谷氨酰胺 10. 门冬酰胺 11. 丝氨酸 12. 精氨酸 13. 水解 DANS 14. 半胱氨酸 15. 牛磺酸 16. 色氨酸 17. 赖氨酸 18. 蛋氨酸 19. 苯丙氨酸 20. 组氨酸 21. 亮氨酸 + 异亮氨酸 22. 酪氨酸

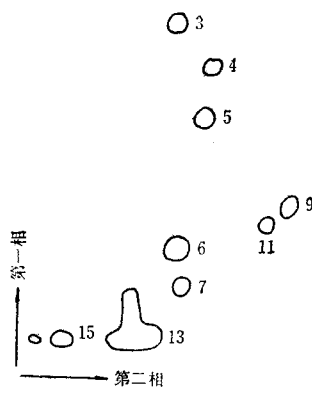
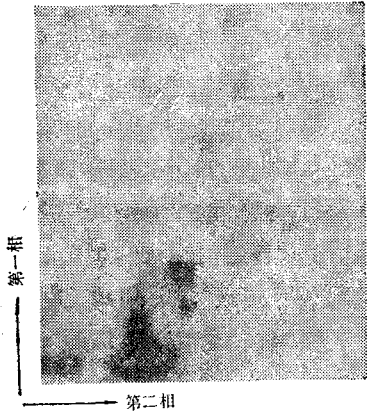


图 2 大白鼠大脑游离氨基酸 DANS 反应后的层析图谱

谱, 见图 1。

同时, 用每种标准氨基酸分别与 DANS-Cl 反应, 以层析后的 Rf 值确定每个氨基酸在图谱中的位置。另外, 在混合氨基酸液中, 分别加入一定量的 Glu、Asp、Gly、Ala、GABA、Gln, 发现图谱中这些氨基酸所在斑点荧光明显增强, 从而进一步肯定了这些氨基酸在图谱中的位置。

大白鼠大脑的氨基酸提取液经展开剂 I 和

II 层析, 及展开剂 III 进一步分离 Glu 与 Asp 后的层析图谱见图 2。

2. 氨基酸标准曲线的制备

按前述方法制作 Glu、Ala、Asp、Gly、GABA 和 Gln 的标准曲线(见图 3)。6 种氨基酸含量与其相应 DANS 衍生物的荧光强度呈线性关系。

3. 氨基酸的回收率

在大白鼠大脑匀浆中, 加入一定量的 GABA

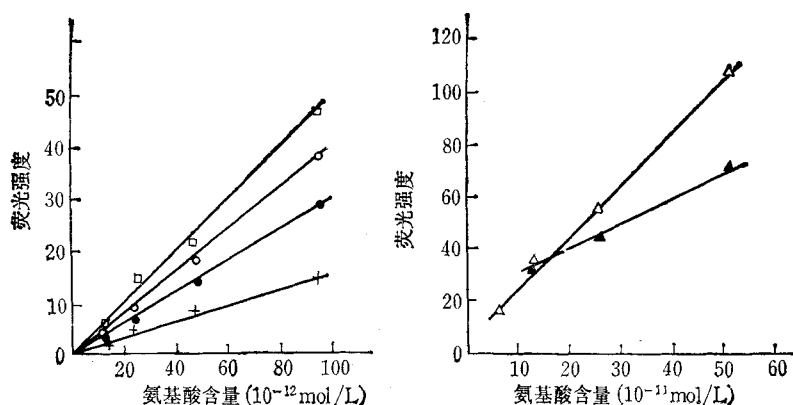


图3 GABA、Gly、Ala、Gln、Glu、Asp 的标准曲线
□: GABA; ○: Ala; ●: Gly; ×: Gln; △: Glu; ▲: Asp。

表1 回收率的测定

γ-氨基丁酸			甘氨酸		
加入量 $10^{-12}M$	测定量 $10^{-12}M$	回收率 %	加入量 $10^{-12}M$	测得量 $10^{-12}M$	回收率 %
0	8	86.8	0	16	94.7
19	24.5		19	34	
0	7.5	97.4	0	14	89.5
19	26.0		19	31	
0	8.5	94.7	0	8.5	86.8
19	26.5		19	25	

和 Gly 进行回收实验。结果见表 1。

由表 1 可见, GABA 的回收率为 86.8—97.4%, 平均为 $92.97 \pm 5.51\%$, Gly 的回收率

为 86.8—94.7%, 平均为 $90.33 \pm 4.02\%$ 。说明方法是可靠的。

4. 大白鼠大脑中某些氨基酸的测定

用此法测定了大白鼠大脑中六种氨基酸的含量(见表 2)。由表 2 可见, 测得的结果与文献^[7,8]报道相近。

本法与洗脱法^[9]相比, 制备氨基酸提取液比较简便, 在一般实验室即可进行, 由于重复了一次展开剂 I 层析, 分离效果更佳, 使薄层扫描效果好。用薄层扫描技术, 省去了洗脱时间, 数小时内即可完成整个操作过程。

本文承吴有光、叶小兵同志指导荧光扫描, 熊丽萍

表2 正常大白鼠大脑游离氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{克鲜脑}$)

氨基酸	鼠 数	均数±标准差
甘氨酸	6	1.75 ± 0.46
丙氨酸	6	1.14 ± 0.36
γ-氨基丁酸	6	2.13 ± 0.75
门冬氨酸	6	1.66 ± 0.67
谷氨酰胺	6	6.16 ± 1.02
谷氨酸	6	8.35 ± 1.48

同志协助部分技术工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 陈丽筠等:《生理学报》, **21**, 317, 1957。
[2] 李竹芳等:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 63, 1982。
[3] 董景明等:《中国药理学报》, **5**(1), 14, 1984。
[4] Agrawal H. C. et al.: *J. Neurochem.*, **15**, 917, 1968。

- [5] Lenda K. et al.: *J. Chromatogr.*, **198**, 516, 1980。
[6] 陈远聪等:《生物化学与生物物理进展》, **1**, 38, 1975。
[7] Shaw R. K. et al.: *J. Neurochem.*, **12**, 151, 1965。
[8] Agardh C. D. et al.: *J. Neurochem.*, **31**, 1135, 1978。
[9] 王自勉等:《生理学报》, **33**(1), 103, 1981。

[本文于 1986 年 6 月 24 日收到]

《生物物理学的实际应用》科普作品有奖征文通知

为宣传普及生物物理学这一新兴边缘学科,使更多的人了解生物物理学与国民经济建设的密切关系及其广泛的应用前景。中国生物物理学会教育普及委员会特举办《生物物理学的实际应用》科普作品有奖征文活动。

征文截止时间: 1987 年 7 月 31 日 (以邮戳为准)

征文要求:

1. 内容: 应用生物物理学理论方法解决工业农业医疗及日常生活等方面实际应用问题的实例(包括作者本人的工作,国内外文献报导的实例)。要求文章有理论,有方法,有应用或经济效益。应征稿件要讲求科学性实用性知识性和趣味性相结合,形式多样,通俗易懂。

2. 应征稿件一般不超过 3000 字,并用稿纸抄写清楚,自留底稿,来稿一律不退。凡有附图表及参考文献者,请按撰写论文的标准提供。

3. 来稿请写明作者真实姓名年龄性别职业职务工作单位及详细通讯地址。

评选办法:

来稿将由评委会根据:

(1) 在宣传生物物理学的科技成果,推动生物物理学的研究和应用,促进工农医等方面取得的效果。

(2) 将根据内容准确充实,叙述通俗易懂,文字生动活泼,引人入胜,富有特色等标准,评选出优秀科普作品,并赠送纪念品。再从其中根据作品的科学性思想性通俗性等方面的完美程度评选出一等奖一名,二等奖三名,三等奖五名,并授予证书和奖金。优秀科普作品将编辑成册,争取出版发行。

评委会名单:

王书荣 程极济 沈淑敏 郑竺英 金少楨 李瑞雯 刘力生 顾凡及 程 时 罗林儿
施永德 金厚家 胡天喜

联系人: 李瑞雯

稿件请寄: 北京 349 信箱中国生物物理学会

中国生物物理学会

教育普及委员会

1987 年 2 月 17 日