



图6 酵母 tRNA^{Ala} 的 RNaseA
全酶解后标记图谱
(图中深点为未标完的 r-³²P-ATP)

参 考 文 献

- [1] Sanger, F. et al.: *J. Mol. Biol.*, **13**, 373, 1965.
- [2] Brownlee, G. G., et al.: *J. Mol. Biol.*, **34**, 379, 1968.
- [3] Vögeli, G.: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1059, 1979.
- [4] Martin, R. P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4579, 1978.
- [5] Brown, R. S.: *Nucleic Acids Res.*, **5**, 23, 1978.
- [6] 李文琴等: 待发表。(生化通讯 1980 第 5 期有简短摘要)
- [7] Zúñiga, M. C. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4175, 1977.
- [8] Brownlee, G. G.: *Determination of Sequences in RNA*, **100**, 1972.

[本文于 1981 年 2 月 12 日收到]

脑内游离氨基酸的微量测定

朱剑琴 李春宝 王新昌

(南京大学生物系)

近年来,由于神经系统内氨基酸递质的发现,使测定脑内游离氨基酸含量变化,不仅和脑蛋白代谢研究有关,而且是脑神经元兴奋或抑制的一种指标。因此对脑内游离氨基酸的测定,已是研究脑代谢和脑功能活动的一个重要指标。

本文介绍在一般实验室条件下如何提取脑内游离氨基酸的方法。干燥样品,可以保存相当时间,最后集中上氨基酸自动分析仪测定,它为一般实验室开展脑生理生化的研究提供方便,并可供测定其它组织中的游离氨基酸含量参考。

一、测定方法

1. 脑内游离氨基酸的提取 取脑组织

500 毫克左右(根据需要可增减)放入冰冷的 10 毫升 75% 酒精中匀浆,然后将匀浆液倒入 50 毫升 14 英寸磨口圆底小烧瓶中,再将匀浆管用 5 毫升酒精洗涤一次,一并倒入小烧瓶内。在小烧瓶口按上 14 英寸磨口 25 厘米长回流冷凝管,在 100℃ 水浴中回流提取 20 分钟。从水浴中取出小烧瓶,把液体倒入 15 毫升离心管中,4000 转/分离心 20 分钟。把上清液倒入 50 毫升小三角烧瓶内,放入 100℃ 水浴中蒸发酒精,至起泡沫后立即拿出。将小三角烧瓶放入冰箱内冷却半小时左右,然后将液体倒入 15 毫升离心管,4000 转/分离心 2 小时。把上清液倒入一干净的 50 毫升圆底烧瓶内,放在 90℃ 水浴中继续蒸发酒精,如起泡沫,用干净的洗耳球轻轻吹散,不使泡沫满至瓶颈,至不发生泡沫,酒精

蒸发为止。将小烧瓶内的淡黄色水溶液小心倒入 25 毫升分液漏斗中,然后用 2 毫升重蒸馏水洗一次,并入分液漏斗中,再用 10 毫升乙醚,分二次洗涤小烧瓶后也并入分液漏斗中。充分摇动分液漏斗,洗去脂类,停顿 10 分钟后,把下部水相部分灌进一干净的 14 英寸磨口圆底小烧瓶中。在 40℃ 水浴上蒸发乙醚,然后移至不超过 100℃ 水浴中,减压抽干样品。小烧瓶内的干燥样品加盖保存,集中待测。

2. 样品上机 仪器 日立牌 835 型氨基酸自动分析仪,流速 0.225 毫升/分,柱 2.6 毫米×150 毫米,树脂 2619 号,样品 30 毫微克分子/50 微升,时程 70 分钟。

操作 先测定脑内含有的游离氨基酸的标准样品,结果如图 1。

发现溶液混浊必须再离心 20 分钟,至无色澄清才能上机。

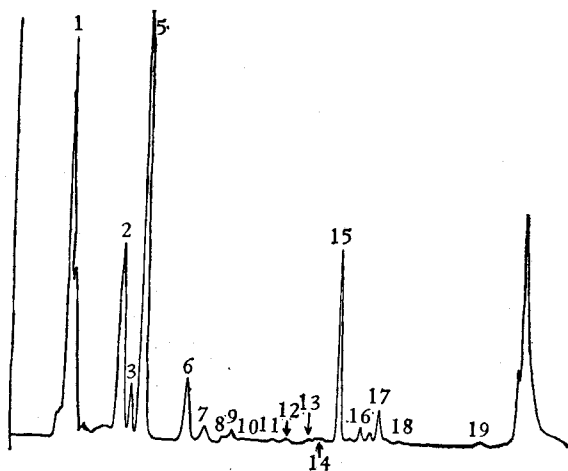


图 2 脑内游离氨基酸分析图谱(20 毫克脑/毫升)

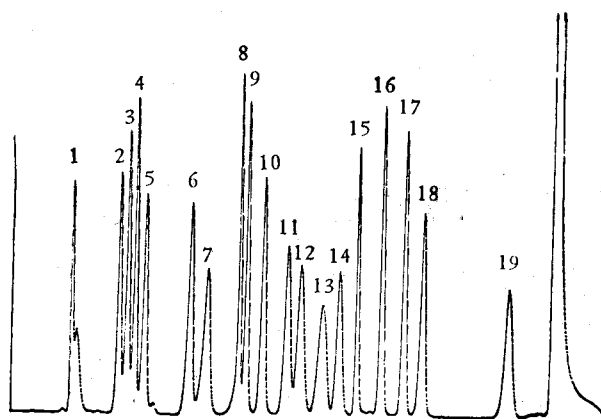


图 1 标准氨基酸的分析图谱

1. 牛磺酸 2. 门冬氨酸 3. 苏氨酸 4. 丝氨酸
5. 谷氨酸 6. 甘氨酸 7. 丙氨酸 8. 胱氨酸
9. 缬氨酸 10. 甲硫氨酸 11. 异亮氨酸 12. 亮氨酸
13. 酪氨酸 14. 苯丙氨酸 15. γ -氨基丁酸 16. 赖氨酸 17. 游离氨 18. 组氨酸 19. 精氨酸

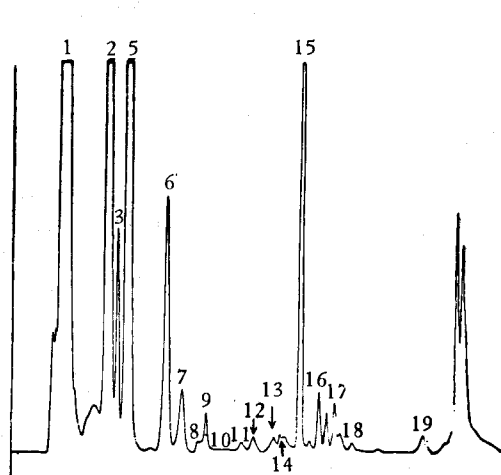


图 3 脑内游离氨基酸分析图谱
(100 毫克脑/毫升)

注: 图 2 及图 3 上的数码说明同图 1

二、结 果

测定步骤 标准样品分离清晰, 测验稳定后, 将待测样品中加 0.01 NNaOH 1 毫升, 4 小时后用 0.02 NHCl 定溶。由于脑内各种游离氨基酸相差悬殊, 应按下述浓度稀释样品: 如需测定脑内含量较高的牛磺酸、门冬氨酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸、游离氨, 则以 20 毫克左右脑组织/毫升定溶液为宜。如需测定脑内含量较低的其他游离氨基酸, 则以 100 毫克左右脑组织/毫升定溶液为宜。见图 2、图 3。定溶后如

本实验共测定了 13 只昆明种系小白鼠游离氨基酸的含量, 结果见表 1。从表中可见本法与 Agrawal 等人所得的结果是相符的。同时我们又对脑内三种主要氨基酸即牛磺酸、谷氨酸和 γ -氨基丁酸做了回收试验, 并按下列公式测定回收率:

$$\text{回收率} = \frac{X_2}{(X_2 - X_1) + X_1} \times 100$$

X_1 为样品测定均值
 X_2 为回收测定均值
 $X_2 - X_1$ 为经过混合提取后的标准样品的测定均值

测得：牛磺酸的平均回收率为
 $100 \pm 7.19\%$

谷氨酸的平均回收率为
 $99.99 \pm 4.80\%$

γ -氨基丁酸的平均回收率为
 $99.92 \pm 7.71\%$

表1 小白鼠全脑游离氨基酸的含量
(微克分子/克鲜脑重)

氨基酸 \ 含 量	本实验室 改良方法	Agrawal 等人方法
牛磺酸	8.78±0.94	9.13±0.34
门冬氨酸	2.75±0.16	3.38±0.03
苏氨酸	1.38±0.25	0.39±0.01
丝氨酸	0.61±0.07	0.78±0.05
谷氨酸	9.91±0.66	11.50±0.44
甘氨酸	0.95±0.22	1.61±0.03
甲硫氨酸		0.03±0.01
丙氨酸	0.49±0.18	0.66±0.01
胱氨酸	0.12±0.02	0.01
缬氨酸	0.54±0.34	0.13
异亮氨酸	0.10±0.05	0.04±0.01
亮氨酸	0.09±0.06	0.08±0.00
酪氨酸	0.12±0.04	0.05±0.01
苯丙氨酸	0.69±0.13	0.04±0.01
γ -氨基丁酸	2.21±0.19	2.52±0.03
赖氨酸	0.17±0.46	0.18±0.00
游离氨	0.14±0.02	0.45±0.00
精氨酸	0.15±0.02	0.13

三、讨 论

本方法是根据原仪器说明书中提取氨基酸方法改良而成；原法不适用于提取脑内游离氨基酸。

脑组织经匀浆后，成胶体溶液，据文献报道，此时一般都用超速离心机沉淀蛋白。本法采用说明书中的热回流提取法，使蛋白质充分变性，然后不用原法中的过滤，而用一般离心，即得到第一步上清液。

按原法只要蒸发酒精即成，但在试验过程中发现脑组织中脂类物质较多，主要是脑磷脂及神经磷脂(这二种脂类的溶解性质不同，脑磷脂不溶于酒精而溶于乙醚，神经磷脂不溶于乙醚而溶于热酒精)，它们在酒精蒸发到一定程度时会起泡沫，直接影响酒精蒸完和上机测定，所以必须事先除去这二种脂类。经本方法第一步离心所得的上清液，在水浴上把酒精蒸发到一定程度时，即起泡沫，这是由于溶液中酒精量逐渐减少，大量神经磷脂析出之故，此时应立即停止蒸发，利用神经磷脂溶于热酒精的特性，把溶液放入冰箱中冷却，使神经磷脂充分析出，然后在一般离心机上作较长时间离心，就能得到第二步上清液，其中尚剩下的脑磷脂和其它脂肪物质，最后用乙醚除去。

原法中最后用冷冻薄膜干燥法，考虑到一般实验室内不具备这种设备，我们采用了简易冰冻减压干燥法。由于样品的体积小，干燥并不困难，且得到了良好的结果。

从13只小白鼠全脑各种游离氨基酸峰值分离图谱和测定值观察，本方法中脑内各种氨基酸的峰值分离清晰，数值稳定，误差较小，灵敏度可测至100微微克分子数量级，测定值和文献记载基本一致。

参 考 文 献

[1] 潘家秀等编著：《蛋白质化学研究技术》，1973年。
[2] Agrwal H.C. et al.: *J. Neurochem.*, 15: 917, 1968.
[3] 刘思职等编：《生物化学大纲》，67, 1954年。

[本文于1980年11月4日收到]