

纤维素板微量氨基酸的分离 及几种显色方法的比较

钱肖贞 方继康

(中国科学院上海生物化学研究所)

氨基酸分析是研究蛋白质化学的最基本的实验技术之一。现在已经普遍地使用离子交换层析、纸层析、纸电泳、薄层层析等方法分离、分析氨基酸。其中自动化的离子交换层析方法分析具有快速、微量和准确等特点,但需要昂贵的仪器设备,在一般实验室里不易办到。纸层析和薄层层析的方法,设备要求简单,操作方便,操作熟练时也可达到定量的要求。也可以用纤维素薄层层析的方法分离分析氨基酸^[1],并已用于尿和血样品以及其他蛋白质中的氨基酸测定^[2,3]。经我们初步摸索,使用一种小型的纤维素板层析,并将茚三酮试剂直接加入展层溶剂中,蛋白质经酸水解后,可得到完全分开的普通的十五种氨基酸(除亮氨酸和异亮氨酸外),且得到较清晰的图谱。此方法的重复性好,每一种氨基酸的检测范围在10—100毫微克间。配用光密度计测定时,可获得定量的结果。本文就三种显色试剂茚三酮、邻苯二甲醛和荧光胺作了一些比较。

一、实验方法

1. 制板

称取 Whatman MN-300 微晶纤维素 30 克(北京化工一厂和上海试剂二分厂出品的微晶纤维素也可用),加蒸馏水 200 毫升,在组织捣碎机内高速搅拌 3 分钟,然后小心地转移到圆底烧瓶内用水泵去气后铺板。将预先洗净烘干的玻璃板平放在较大的玻璃板上(用水平仪校正水平),均匀地铺上纤维素,其方法与铺硅胶板相同。铺好的层析板先在室温下水平放置风干,然后移置在 40℃ 保温箱内烘干过夜,即可

使用。一般纤维素板厚度以 0.2 毫米为宜。30 克纤维素粉,可铺板数量大致如下:

7.5×9.0 厘米 16 块; 3×17 厘米 12 块;
5×17 厘米 11 块; 15×15 厘米 2 块。

2. 氨基酸的分离

(1) 十五种氨基酸混合液的配制

分别称取精氨酸、赖氨酸、组氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天门冬氨酸、谷氨酸、缬氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等十五种氨基酸配成标准溶液,每种氨基酸的浓度为 50 微克/毫升。

(2) 氨基酸分离

A. 加样: 用 10 微升微量注射器吸取标准氨基酸混合液,滴加在 7.5×9.0 厘米薄层板下端 1 厘米处,边点边用冷风吹干,使点子扩散后直径不超过 1—1.5 毫米。

B. 展层: 薄层板在密闭的 20×20×20 厘米的方形玻璃缸内层析,用单向上行或双向上行法展层,不需和层析溶剂预先平衡。层析时间约为 2—3 小时,层析温度在 25℃ 左右。展开的溶剂系统第一向可用正丁醇:吡啶:冰醋酸:水(30:24:6:20)或叔丁醇:甲乙酮:氨水:水(5:3:1:1),第二向可用异丙醇:甲酸:水(20:1:5),以上均为体积比。

C. 显色: 为改进显色时因喷雾而引起茚三酮溶液分布不匀而造成底色不清楚的现象,我们先配制 0.4 克分子浓度的茚三酮异丙醇:甲酸:水(20:1:5)展层储备溶液,该溶液在冰箱内至少可保存三个月,在进行第二向酸性系统时,每 10 毫升展层溶剂中加入 0.05 毫升储备溶液。层析毕吹干,将薄层板放在 50℃ 左右烘

箱内,保温半小时后即可显色。

(3) 几种显色方法

A. 茚三酮显色除了采用茚三酮加入层析溶剂中的方法外,还可采用展层后直接喷茚三酮试剂的方法。配制 0.025% 茚三酮酒精溶液,用喷雾器均匀地喷在层析板上,放在 50—60℃ 烘箱内半小时即可显色。

B. 邻苯二甲醛*(简称 OPT)显色方法:将展层吹干后的薄板先用 0.1% OPT 和 0.1% 巯基乙醇的丙酮溶液喷雾,自然风干 5 分钟后,再喷以 1% 三乙胺丙酮溶液,放在普通的紫外灯下即可观察荧光斑点,此试剂需用现配。

C. 荧光胺显色方法:展层吹干后的薄板先喷以 1% 三乙胺丙酮溶液,数分钟后,再喷 0.03% 荧光胺(荧光胺为本实验室合成)丙酮溶液,干后在紫外灯下即可观察到荧光斑点。经荧光显色后仍可用茚三酮试剂显色,喷 0.1% 茚三酮的乙醇溶液,蓝紫色斑点仍可显现出来。

二、结 果

标准氨基酸混合液经双向上行层析后的分离谱见图 1。LRH (促黄体生成激素释放因子) 类似物和胰岛素的定性氨基酸组成分析分别见图 2 和图 3。

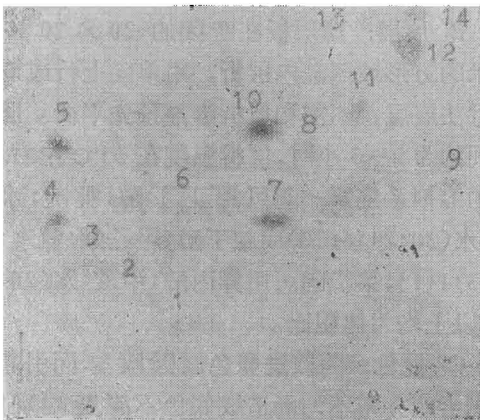


图 1 混合氨基酸层析谱

1. Lys, 2. His, 3. Arg, 4. Asp, 5. Glu, 6. Gly, 7. Ser, 8. Pro, 9. Thr, 10. Ala, 11. Tyr, 12. Phe, 13. Val, 14. Leu, iLeu.

纤维素板为 7.5×9.0 厘米,每种氨基酸量为 50 毫微克。茚三酮显色法。其中脯氨酸茚三酮显黄色

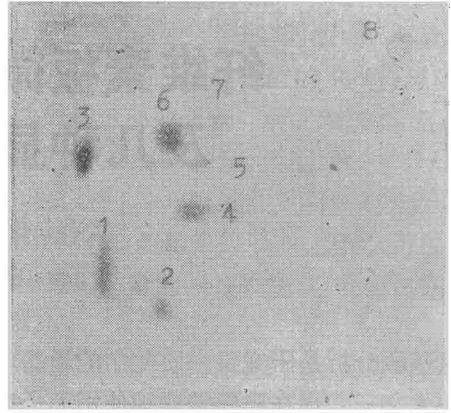


图 2 LRH 类似物氨基酸层析谱

1. Arg, 2. His, 3. Glu, 4. Ser, 5. Pro, 6. Ala, 7. Tyr, 8. Leu.

LRH 类似物氨基酸排列顺序: p-Glu, His, Trp, Ser, Tyr, D-Ala, Leu, Arg, Pro. 常规酸水解 24 小时,点样量为 1 微克,茚三酮显色。纤维素板 7.5×9.0 厘米

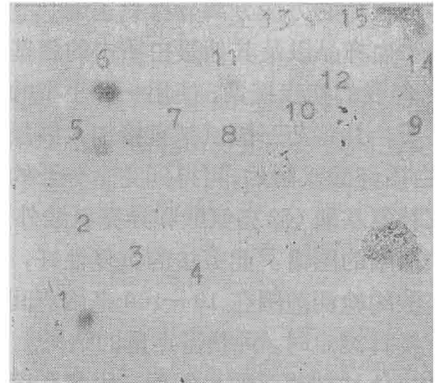


图 3 胰岛素氨基酸层析谱

1. Cys, 2. Lys, 3. His, 4. Arg, 5. Asp, 6. Glu, 7. Gly, 8. Ser, 9. Thr, 10. Pro, 11. Ala, 12. Tyr, 13. Val, 14. Phe, 15. Leu, iLeu.

常规酸水解 24 小时,点样量为 2 微克,茚三酮显色。纤维素板 7.5×9.0 厘米,上述三图第一向展层溶剂为: 叔丁醇-乙醇系统,第二向为异丙醇-甲酸系统

三种显色剂在纤维素板层析上显色,灵敏度比较结果见表 1。邻苯二甲醛方法为最灵敏,茚三酮与荧光胺方法相差无几。但对多肽显色荧光胺最灵敏,邻苯二甲醛次之。

* 市售 OPT 试剂需用乙醚-石油醚重结晶。

三、讨 论

小型纤维素板层析分离分析氨基酸较纸层析、大型纤维素板层析(20×20厘米)具有样品用量少、分析时间短等优点,单一的氨基酸检测量为10—50毫微克,多肽和蛋白质氨基酸组

表1 显色剂显色灵敏度比较

显色方法	最低检出量	最适范围
茚三酮	20毫微克左右	20—100毫微克
邻苯二甲醛	1毫微克左右	1—20毫微克
荧光胺	10毫微克左右	10—50毫微克

成分析仅需1—2微克。层析时不必平衡,双向层析谱一天内即可完成。氨基酸显色斑点小而集中,层析谱较清晰,易于定量测定。一般纸层析展层时间长,样品用量大,层析显色后不易得到很清晰的图谱。展层前必需经平衡,否则影响层析分离。显色后斑点扩散,定量误差较大。硅胶板层析分辨力较纤维素板差。但纤维素板层析不如纸层析方便,必须自己铺制板。

小型纤维素板层析适合作小肽(如激素多

肽)的氨基酸组成分析,当配用光密度薄层扫描仪时,可作定量分析。由于此方法灵敏度高,所以也可用于血清中微量游离氨基酸的测定。

三种显色剂在板层析上对氨基酸显色灵敏度的比较相差不大,其中邻苯二甲醛的灵敏度稍高一些。Schiltz等人^[4]也曾报道相似的结果。茚三酮仍是一种很好的显色剂,显色斑点肉眼就可见,不必用紫外灯。尤其是将茚三酮预先加入到第二向展层溶剂中一起展层,可得到更清晰的背景,避免了茚三酮喷制不匀的缺点。这三种显色试剂也适用于多肽的显色,荧光胺最灵敏,对多肽的薄层层析显色的价值更大。

参 考 文 献

- [1] Heathcote, J. G. et al.: *J. Chromatogr.*, 43, 84, 1969.
- [2] Heathcote, J. G. et al.: *J. Chromatogr.*, 78, 193, 1973.
- [3] 王玉梅:《生物化学与生物物理进展》, 1976年, 第3期, 第25页。
- [4] Schiltz, E. et al.: *Anal. Biochem.*, 79, 33, 1977.

【本文于1978年5月24日收到】

酶法生产三磷酸腺苷(ATP)

袁 惠 民

(北京首都啤酒厂)

以腺苷酸(AMP)为前体,用酵母发酵生产三磷酸腺苷已有很多报道^[1,2]。此法的缺点是:伴有大量酵母发酵,转化不稳定,转化终点不易判断,且“回返”现象严重,因此纯化困难、产率低、消耗大。

我们采用啤酒新鲜酵母在葡萄糖、磷酸盐、镁盐培养基中先发酵,除去菌体后用发酵液(酶液)转化腺苷酸成三磷酸腺苷。结果转化稳定、可靠,转化率在80%以上,终点易判断,无明显“回返”现象,纯化简便,可用一次阴柱纯化。三

磷酸腺苷总收得率稳定在65%以上,消耗低,质量完全达到药检要求,已被北京市卫生局药检所批准投入正式生产。由于发酵形成的酶液具有良好的保存性,适合于大规模均衡生产。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 酵母(*S. Casbergensis* Hansen) 系我厂生产菌株。使用菌体取自生产现场,水洗两次,10℃以下保存。使用时1,400转/分离心