

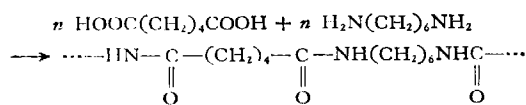
聚酰胺薄膜层析及其用于蛋白质化学分析

陈远聪 吴克佐 罗珊珊

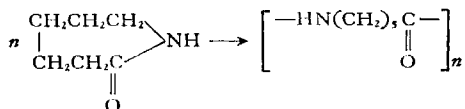
(中国科学院上海生物化学研究所)

聚酰胺薄膜层析是1966年后发展起来的一种新层析技术。特别在用于分析氨基酸衍生物——DNS-氨基酸、DNP-氨基酸和PTH-氨基酸时,具有灵敏度高、分辨力强、速度快、操作方便等优点,超过了过去分析这类化合物使用的纸层析、纸电泳、硅胶薄板层析等方法。在蛋白质化学结构分析中,聚酰胺薄膜层析结合Edman-DNS法作为一种顺序分析的超微量法,已被普遍采用。聚酰胺薄膜在国际市场上出售的商品名为聚酰胺片。我们用国产原料制成了聚酰胺薄膜,已在实验室应用,性能良好,优点显著。

聚酰胺是一类化学纤维原料,即锦纶,国外称尼龙。由己二酸与己二胺聚合而成的叫锦纶66:



由己内酰胺聚合而成的叫锦纶6:



此外还有锦纶1010等;因在这类物质分子中都含有大量酰胺基团,故统称聚酰胺。自1955年发现聚酰胺对极性物质有吸附作用以来,用聚酰胺做层析分离分析方面有许多报道,如用于柱层析分离制备,浸在滤纸上做分析,用于薄板层析等。现在用的聚酰胺薄膜,又是进一步的发展。将聚酰胺固定在载片上,做成质地均匀紧密的多孔薄膜,层析性能更加优越。目前此薄膜已用于十六类化合物(酚类,酚类糖苷,醌类,硝基化合物,氨基酸及其衍生物,核酸碱基,核苷,核苷酸,杂环化合物,合成染料,磺胺,抗菌素,环酮,杀虫药,维生素B₁,抗热药物)的分析^[1]。

作用原理

聚酰胺具有特异的层析分辨性能,对其作用原理已有报道^[1]。聚酰胺对极性物质的吸附作用,是由于与被分离物之间形成氢键:如酚类(包括黄酮类、鞣质等)和酸类是以其羟基与酰胺键的羰基形成氢键;硝基化合物与醌类是与酰胺键的氨基形成氢键(图1)。被

分离物质形成氢键能力的强弱,确定吸附能力的差异。在层析中,展层溶剂与被分离物在聚酰胺表面竞相形成氢键。选择适当的展层溶剂,使被分离物在溶剂与聚酰胺表面之间的分配系数能有较大差异,经过吸附与解吸的展层过程,形成一个分离顺序;因此,选择适当的溶剂系统是层析分离的关键因素。

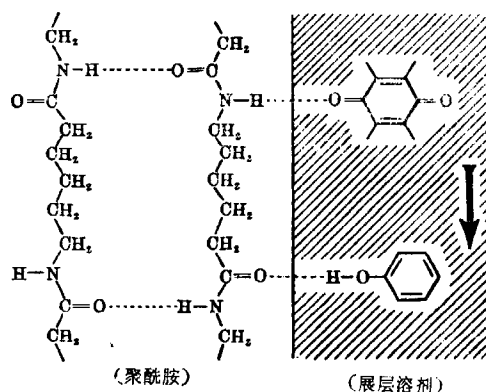


图1 聚酰胺层析示意图

聚酰胺薄膜

聚酰胺薄膜是将锦纶在涤纶片基上涂一层薄膜制成;也可涂在玻璃片上,但不如涤纶片基便于操作和保存。锦纶易溶于强酸。将锦纶溶于浓甲酸,成粘稠溶液,然后涂在涤纶片基上;当甲酸缓慢挥发后,形成一层均匀紧密的多孔薄膜。层析展层时,溶剂沿着细孔上升。如果锦纶浓度过高,细孔较少,展层速度慢。反之,浓度过低,膜就疏松、孔多,展层速度快,被分离物极易扩散。锦纶溶液浓度以20%为宜。薄膜的厚度对层析分离及灵敏度的影响也很大,以0.15毫米左右的厚度为宜。聚酰胺原料的聚合分子量也影响膜的质量。商品聚酰胺片是用日本生产的聚己内酰胺及涤纶片基制成。我们对国产锦纶66和锦纶6用作薄膜原料做过比较试验,两者都适用,唯锦纶6的吸湿性较强,层析时需注意干燥。聚合分子量大的原料,当溶解后粘度高,制成的膜牢固紧密,层析时样品的点子集中,扩散小。分子量过小的原料,不适于制膜,因为制成的膜容易从片基脱落,层析点子扩散。上海第九化纤厂生产的纺丝用锦纶,一般分子量在12,000左右,制成膜

的性能差；但该厂当废品的锦纶，分子量在 16,000 以上，却适合做聚酰胺薄膜。上海塑料制品十八厂生产的压模用锦纶，一般分子量在 20,000 左右，制成的膜质量较好。商品聚酰胺片是双面薄膜，我们据有关报道介绍的方法制成的膜，由于不均匀，分离效果差。现在改用平板铺膜法制成的单面膜，比较均匀，能满足实验需要。层析时可卷成圆筒形，膜在内层，底面在外层，套上一个涤纶圈。可做双向层析。制膜的设备 and 操作都简易方便。关于涤纶片基的处理，有的报道介绍用砂皮纸把表面磨粗糙，此法操作太繁，且不均匀。我们改用 10% 氢氧化钠的水溶液与工业酒精(1:1)混合液浸泡过夜，除去涂在片基表面的苯丁树脂和油质，直至表面不挂水为止。1974 年，上海试剂四厂已试产单面聚酰胺薄膜。

聚酰胺薄膜可反复使用。层析后可用丙酮和 25—28% 浓氨水(9:1 v/v)，或丙酮与 90% 甲酸(9:1 v/v)浸泡 6 小时，把污物洗去，再用甲醇洗涤，凉干后可再使用。如膜的表面保护得好，一般可反复用 10 次以上。即使膜的表面损坏，片基还可回收再用。用废旧洗液或粗浓盐酸浸泡，除去表面上的涤纶，洗净后又可用于制膜，这样就节省费用了。

制膜方法 将洗净的涤纶片基(厚度为 0.1 毫米左右)趁湿紧贴在玻璃板上，片基两侧贴上厚度为 0.4 毫米的聚氯乙烯条，待片基表面凉干后，将其置于通风橱内的一木板平面上；木板的四角装有可调节高低的螺钉，利用木工水平器，把木板调至水平。只有这样，才能保证膜的均匀。

在 250 毫升烧杯内，称取锦纶(湿切片，一级品)20 克，加甲酸(85%)100 毫升，盖上培养皿，电磁搅拌溶解，约需 2 至 3 小时成透明清液。必要时，可在水泵上用砂芯漏斗吸滤，除去难溶固体。将滤得的清液倒在涤纶片基上，立即迅速用玻璃棒推动，把液体均匀的铺在片基上。甲酸是极易挥发的腐蚀性酸类，需戴口罩和手套，在通风橱内操作。膜铺好后，立即关闭通风橱，让甲酸缓慢挥发过夜；次日，在空气中吹干。不能用高温烘干，高温易使膜变形和断裂。干后，裁成所需大小。20 克锦纶可制膜面积约 30×90(厘米)。做层析时，膜上可用炭画铅笔书写，做图谱标记。

DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析

DNS-氨基酸是用荧光试剂 DNS-Cl(二甲基氨基萘磺酰氯)与氨基酸结合成的衍生物。用作蛋白质的氨基酸组成的微量分析，灵敏度可达 10^{-9} 至 10^{-10} 克分子水平，比茚三酮法高 10 倍以上，比过去用的 DNP-氨基酸分析高 100 倍。用纸层析分析氨基酸组成，做双向图谱需一天时间。做 DNP-氨基酸双向纸层析需两天时间。现在用 DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析，在 10×10 (厘米)的薄膜上，三小时内即可得到分析很

好的双向层析图谱。用于蛋白质化学结构顺序分析的 Edman-DNS 法，大大加快了分析速度。一般只做定性分析，也可用于定量，但需特制的测定仪器。

荧光试剂 DNS-Cl(生物化学所东风生化试剂厂的产品)，是从染料厂的一种中间体(1-萘胺-5-磺酸)经硫酸二甲酯甲基化和五氯化磷反应后制备。DNS-Cl 在 pH9.5—10.5，能与一级氨、二级氨、酚的羟基、羧基和咪唑基反应，但不与胍基及脂族羟基反应。DNS-Cl 能与所有的氨基酸作用生成衍生物，这些衍生物相当稳定，在 6N HCl 中 105℃、22 小时水解条件下，除 DNS-色氨酸全破坏和 DNS-脯(77%)、丝(35%)、甘(18%)、丙(7%)部分破坏外，其余很少破坏。故 DNS 法可用于蛋白质和肽的 N 末端分析。

1. 操作方法

(1) DNS 溶液 配制 2.5 毫克/毫升的丙酮(分析纯)溶液，放置冰箱避光保存备用，可稳定使用一月。

(2) 0.2M NaHCO₃ 溶液 用无氨蒸馏水或离子交换水配制。

(3) 氨基酸组成分析 取 1 至 5 毫微克分子的蛋白质或肽，经 6N HCl、110℃ 水解 24 小时；为了减少氨基酸因水解引起破坏，一般在真空或通氮的封闭玻璃管中水解。水解后，开管，真空蒸发除去盐酸，加少量水，再蒸干。加 10 至 15 微升 NaHCO₃ 溶液，真空蒸干，除去微量氨。加 50 微升 NaHCO₃ 溶液溶解，转移到 5 毫升玻塞小管中，加等体积 DNS-Cl 丙酮溶液，混合、塞好，40℃ 烘箱中保温 2 小时，或室温放置过夜。取出，蒸去丙酮，加少量水，用 2N 醋酸酸化或用 1N 盐酸酸化至 pH 2—3；乙酸乙酯抽提二至三次，每次约用乙酸乙酯 1 毫升；合并抽提液并在小管中蒸干，然后加 10 微升丙酮溶解，用毛细管点在聚酰胺薄膜上，点直径不超过 2 毫米。鉴定未知的个别氨基酸时，在与原点平行的另一边缘，点上对照用混合 DNS-氨基酸。做完第一向后，根据初步判断样品可能是某种氨基酸时，可选择相当的 DNS-氨基酸做第二向对照。

2. 层析溶剂系统

(1) 甲酸(85—90%):水 = 1.5:100(v/v)

(2) 苯:冰醋酸 = 9:1(v/v)

(3) 乙酸乙酯:甲醇:冰醋酸 = 20:1:1(v/v)

(4) 0.05M 磷酸三钠:乙醇 = 3:1(v/v)

图 2 表示 DNS-混合氨基酸层析图谱。图中系统 2+3 是先做系统 2，取出后在同一方向再用系统 3 层析，只走 1/2 的距离，目的是把 DNS-Glu 和 -Asp，DNS-Thr 和 -Ser，DNS-Ala 与 -NH₂ 分开。系统 4 能把 DNS-Arg，-His，-ε-Lys 分开，如图 3 所示。

做双向层析时，因系统 1 含水、不易干燥，先做 2+3 向则只需取出真空干燥 1 小时，就可做第二向。系统 2+3 的对照用标准 DNS-氨基酸混合液：DNS-Pro，-Leu，-Phe，-Ala，-Gly，-Glu，-Arg。各种对照

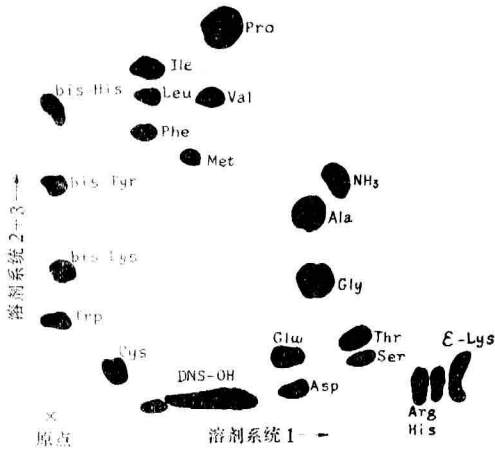


图 2 DNS-混合氨基酸层析图谱

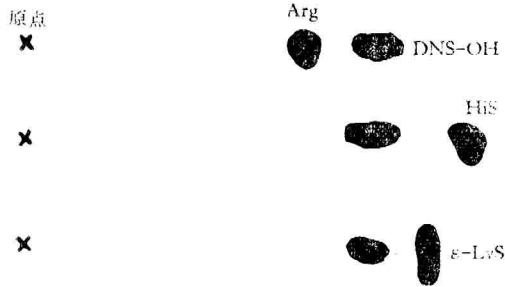


图 3 碱性 DNS-氨基酸层析图谱(溶剂系统 4)

用 DNS-氨基酸的制备法是称取层析纯的氨基酸,溶于 0.2M NaHCO₃ 溶液中,加入少于等当量的 DNS-Cl 丙酮溶液(2.5 毫克/毫升),室温放置过夜,酸化,乙酸乙酯抽提,储存于冰箱中备用。标准 DNS-氨基酸,一般可能出现几个点,这是因为试剂中含少量氨和杂质, DNS-Cl 试剂水解产物含 DNS-OH,但极易区分、不影响鉴定,因 DNS-OH 显绿色荧光, DNS-氨基酸显黄色荧光;用系统 3 可将 -NH₃ 与 -Ala 区别开。

3. 仪器装置

DNS-氨基酸的荧光,需在波长为 360 毫微米或 280 毫微米的紫外灯下观察。我们用国产原件装配紫外灯:GGZ 125 型高压汞灯,额定功率 125 瓦,电源电压 220 伏,上海灯泡一厂出品;滤光片,上海电器原件厂出品。

DNP-氨基酸的聚酰胺薄膜层析

用 DNP-氨基酸层析法测定蛋白质的 N 末端组成,是蛋白质化学分析的常用方法之一。过去用滤纸做 DNP-氨基酸层析,层析条件要求高,如展层溶剂在层析缸里的饱和度、温度、湿度等对层析分离的影响都很大。做一张双向图谱要化两天时间,且不易做好。由于在滤纸上层析时间长,层析点扩散大,降低了分析的灵敏度。现在用聚酰胺薄膜层析,由于聚酰胺对硝基

化合物有特异的分辨能力,其分离效果较用纸层析好,层析条件要求低,容易做好。层析时间只需三小时,层析点在聚酰胺薄膜上集中,分析的灵敏度大大提高,每种氨基酸的量可达 10⁻⁸ 克分子,较纸层析法提高数十倍。层析图谱可在波长 360 毫微米的紫外灯下观察。DNP-氨基酸吸收紫外光,呈黑色斑点,较在日光下呈黄色斑点灵敏。DNP-试剂自身的水解产物 DNP-OH,不需做纸层析时的升华处理,因 DNP-OH 在层析溶剂移动的前沿,对其他 DNP-氨基酸鉴别无影响。

1. 操作方法

DNP-试剂:FDNB(2,4 二硝基氟苯,东风生化试剂厂出品),配成 2.5% 无水乙醇溶液;0.25M NaHCO₃ 溶液(用不含 NH₃ 的蒸馏水配制)。

蛋白质水解液的处理,与前述 DNS-氨基酸层析法相同。每种氨基酸的最低量约 10 毫微克分子(1—3 微克),加 NaHCO₃ 溶液 100 微升,FDNB 乙醇溶液 100 微升,摇匀;40℃ 避光保温 2 小时,经常取出振摇,保证反应均匀。取出,真空蒸去乙醇,1N NaOH 调至 pH 10 左右,用乙醚抽去过量的 FDNB,然后用 2N 醋酸酸化至 pH 3,用乙酸乙酯抽出 DNP-氨基酸。母液含少量 DNP-Arg, -His, -CysO₃H, -Lys, 需用正丁醇抽提。抽提液蒸干后,用少量丙酮溶解,点在聚酰胺薄膜上层析。

2. 层析溶剂系统

- (1) 甲酸(85%):水 1:1(v/v)
- (2) 苯:冰醋酸 8:2(v/v)
- (3) 氯仿:冰醋酸 8:2(v/v)

混合 DNP 氨基酸层析图如图 4 所示。

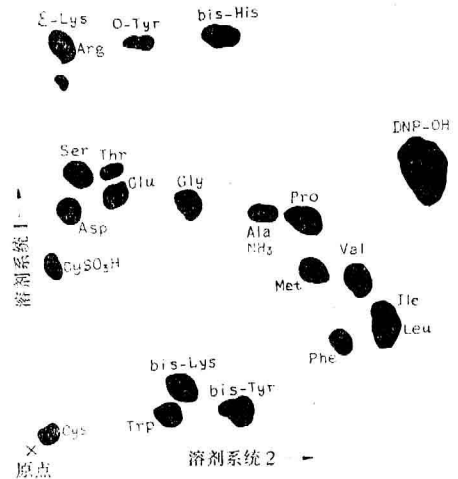


图 4 DNP-氨基酸双向层析图谱

参 考 资 料

- [1] Wang, K. T., Boris, W.: Progr. Thin-Layer Chromatog. Related Methods, 3, 177, 1972.
- [2] Zawta Pharmazie, 23, 174, 236, 296, 1968.

[本文于 1974 年 6 月 25 日收到]