

用薄层层析法分离与检定鸭毛蛋白水解产物中的氨基酸

王 玉 梅

(中国科学院生物物理研究所)

氨基酸是构成蛋白质的基本单位,它参与体内代谢和各种生物机能活动。其中异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸在人体内是不能合成的,这八种氨基酸称为必须氨基酸。在利用废鸭毛试制水解蛋白过程中需要了解羽毛、上翻和下翻制剂中必需氨基酸的种类及其大致含量,以便判断有无利用价值。因此,我们采用简而易而快速的国产微晶型纤维素薄层层析法对鸭毛蛋白水解产物中的氨基酸组分进行分离和检定,效果良好。

试剂配制 (1) 叔丁醇-甲乙酮-氨水溶液(5:3:1 V/V): 混合 25 毫升叔丁醇, 15 毫升甲乙酮(化学纯)、5 毫升氨水及 5 毫升蒸馏水, 摇匀后即可使用。此为展开溶剂体系 I。(2) 异丙醇-甲酸水溶液(20:1:5 V/V): 混合 40 毫升异丙醇, 2 毫升甲酸及 10 毫升蒸馏水, 摇匀后即可使用, 此为展开溶剂体系 II。上述溶液需在实验时临时配制。所用试剂未注明纯度者皆为分析纯。(3) 0.5% 茚三酮之无水丙酮溶液的配制: 称 0.5 克茚三酮(上海试剂三厂, 分析纯, 按参考资料^[4]方法经活性炭脱色从热水中重结晶一次)溶于 100 毫升无水丙酮中, 即可使用。

样品处理 称取鸭毛的羽毛、上翻、下翻各 6 毫克, 分别放入玻璃小试管中, 各管中加入 0.6 毫升 5.7N 盐酸(恒沸点盐酸)。在火上封口后, 置于 110℃ 烘箱中水解 24 小时取出。打开封口, 置于真空干燥器中, 减压抽干, 以除去多余盐酸, 再用少许 10% 异丙醇溶解, 并以稀氨水调节 pH 至 7 左右, 加 10% 异丙醇至总体积为 0.5 毫升, 置于冰箱中保存备用。

薄板的制备 取 20 × 20 × 0.3 厘米玻璃

板数块, 洗涤干净, 平放摆开, 称取 15 克微晶型纤维素(北京化工厂), 加 30 毫升水和 4 毫升丙酮溶液, 充分搅匀后, 把浆液倒在玻璃板上, 然后前后倾斜玻璃板, 使浆液漫布于玻璃板上形成薄层, 置于水平架上风干, 干后即可使用。

点样 用微量注射器吸取试液 5 微升, 分次滴加在距离薄层板下端约 2 厘米处(预先用铅笔作出记号), 边点边用电风扇吹干, 使点于扩散后其直径不大于 2—3 毫米, 滴加的样品量每种氨基酸约几至十微克。

展层 薄层的展开是在室温下密闭的 25 × 25 × 10 厘米长方形扁玻璃缸中进行, 展开的方式采用双向上行法, 薄层在层析缸内, 不须用展开溶剂的蒸气预先饱和, 先将点好试样的两块薄层板的板面朝外合在一起, 放入层析缸中的玻璃船内, 然后再将两块板上部, 分开靠在缸壁上, 先进行碱向展层, 将展开溶剂体系 I 从两块板中间加入, 薄层浸入溶剂的深度约为 0.5 厘米, 盖好缸盖进行展开, 当溶剂前沿达到距原点约 11 厘米时, 所需时间约为 1—1.5 小时, 即可把薄层板从层析缸中取出, 放在冷气流中吹干, 除去溶剂, 放平, 刮掉前沿上端的黄色杂质部分, 再进行酸向展层。将薄层板重新放入另一缸中的船槽内, 与碱向体系成垂直方向, 加入展开溶剂体系 II, 加法同上, 展开 11 厘米大约需 1—1.5 小时, 取出薄层板, 吹干以除去溶剂, 然后进行显色。

显色 每块薄层板是用 7—10 毫升 0.5% 茚三酮的无水丙酮溶液, 喷雾时应控制在使薄层板恰好湿润而无液滴流下, 薄层板在冷气流中吹干, 有氨基酸存在的地方逐渐显出蓝紫色

斑点^[5], 仅脯氨酸为黄色斑点, 用软铅笔依次将薄层板上呈现的氨基酸斑点圈出, 并用铅笔和透明纸复绘或摄影保存。

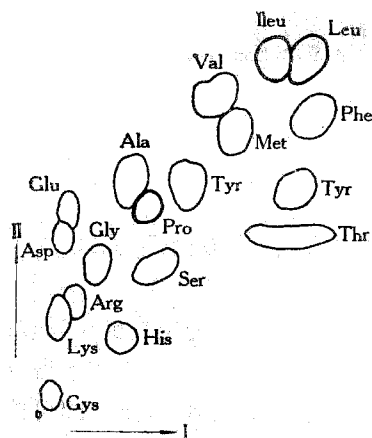


图1 标准氨基酸层析图谱

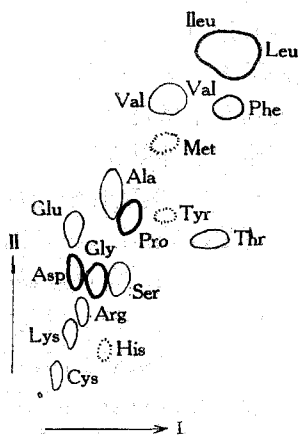


图3 上翻的氨基酸层析图谱

用国产微晶型纤维素作薄层层析, 对鸭子羽毛、上翻和下翻三种样品及十八种纯氨基酸混合物作为标准样品的分离与检定, 所得结果

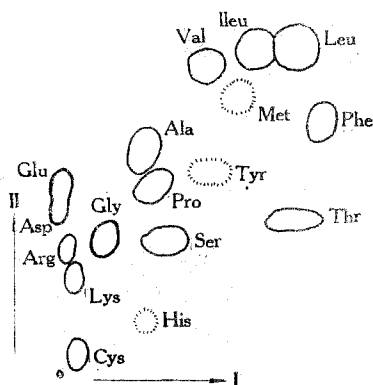


图2 羽毛的氨基酸层析图谱

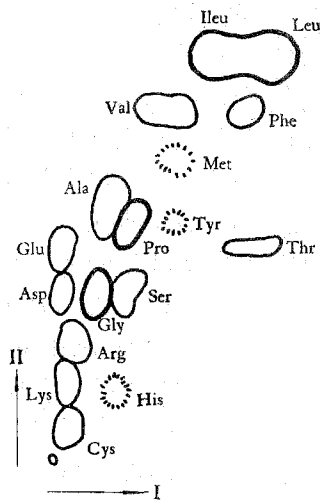


图4 下翻的氨基酸层析图谱

图中线条的粗细表示斑点颜色的深浅度, 虚线表示颜色非常浅

如图 I, II, III 和 IV。

从薄层层析图谱可以看出, 鸭子的羽毛、上翻、下翻三种样品所含的各种氨基酸都能获得较好的分离, 但上、下翻的异亮氨酸和亮氨酸分离不够好, 而色氨酸因酸水解处理时已被破坏, 所以图上找不到色氨酸斑点, 但若用碱法处理, 用对二甲基氨基苯甲醛试剂^[4] 检验, 证明含有色氨酸。甲硫氨酸含量极微。

从图中结果得知, 鸭子羽毛、上翻和下翻都含有八种必需氨基酸, 但由显出斑点颜色强弱定性估计, 其相对含量如下: 亮 + 异亮 > 缬 > 苯丙 ≈ 苏 ≥ 赖 > 组氨酸。组氨酸、酪氨酸

和甲硫氨酸都比其他氨基酸的颜色浅的多。但是, 从羽毛、上翻、下翻三者氨基酸分析图谱显色深浅来看, 羽毛较深。

由所得结果得知: 鸭子羽毛水解蛋白中所含氨基酸的种类与火鸡的羽毛^[6] 大致相似。

参 考 资 料

- [1] Jones, K. et al: *J. Chromatog.*, **24**, 106, 1966.
- [2] Clark, M. E.: *Analyst*, **93**, 810, 1968.
- [3] Heathcote, J. G. et al: *J. Chromatog.*, **78**, 181, 1973.
- [4] 潘家秀等编著: 蛋白质化学研究技术, 第27页, 30页, 科学出版社, 1962年。
- [5] 陈保仁: 化学通报, 1961年, 第6期, 第51页。
- [6] Schroeder, W. A. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3901, 1955.