

聚酰胺(尼龙)薄板层析分离碱基、核糖核苷及 3'-核糖核苷酸

蔡菊娥 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所)

研究核糖核酸的一级结构,以及在临床化验中,往往需要分离鉴定碱基、核糖核苷及核糖核苷酸。分离鉴定的方法一般是纸层析、纸电泳或柱层析。分离效果尚好,但不够灵敏,花费时间也较长。薄板层析的特点是快速、灵敏。使用聚酰胺薄板层析分离鉴定碱基、核糖核苷及核糖核苷酸,文献中虽有报道^[1,2],但无胞嘧啶的层析数据,并且报道的一些溶剂系统,有的分离效果不好。我们摸索了几种不同的溶剂系统,不仅能够很好地单向分离鉴定四种碱基、四种核糖核苷和四种 3'-核糖核苷酸,而且使用双向层析还可以分离四种碱基与四种核糖核苷的混合样品。

材料与 方法

聚酰胺系上海化纤九厂产品。涤纶片基,上海感光胶片厂产品。碱基和核糖核苷为 Cambian Chemicals Ltd. 产品。3'-核糖核苷酸,上海试剂二厂产品。涤纶片基聚酰胺薄板按陈远聪等方法铺制^[3]。用玻璃板铺制聚酰胺薄板,预先将玻璃板裁为 10 厘米 × 10 厘米,洗净后晾干,逐块平放在一块大玻璃板上,再均匀铺上聚酰胺的甲酸溶液。其方法,与铺制涤纶片基聚酰胺薄板相同。

层析溶剂:

I. 乙酸乙酯:冰醋酸:甲醇:水 (20:2:1:1, V/V);

II. 四氯化碳: 冰醋酸: 丙酮 (4:1:4, V/V);

III. 水: 85% 甲酸 (30:0.2, V/V);

IV. 正丁醇: 水 (4.3:0.7, V/V);

V. 正丁醇: 水: 85% 甲酸 (77:13:10,

V/V);

VI. 异丙醇: 水: 85% 甲酸 (40:5:0.5, V/V)。

涤纶片基聚酰胺薄板剪为 10 厘米 × 10 厘米。使用前,先用展层溶剂处理,可以除去紫外吸收杂质。样品溶于水中(碱基核糖核苷加少量醋酸助溶;核糖核苷酸加少量氨水助溶)。层析条件:室温,上行,15 分钟。层析后,于紫外光灯 (254 毫微米) 下观察分离结果,用铅笔圈出各紫外吸收点。一般点样约 1—2 微克,用 SP-800 紫外分光光度计定量测定样品浓度。

结果 与 讨论

一、碱基和核糖核苷单向层析:

溶剂 I 单向层析,可以将四种碱基分开。四种核糖核苷分离效果也很好。但是,这个溶剂不能分离胞嘧啶和尿苷、尿嘧啶和腺苷(图 1)。在图 1 中还可以看出,碱基与核糖核苷的层析行为相似,即碱基的层析顺序为腺嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶和鸟嘌呤;核苷的顺序为腺苷、尿苷、胞苷和鸟苷。除鸟嘌呤(原点不动)外,碱基比相应的核糖核苷移动较快。

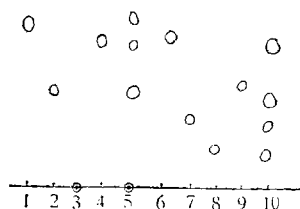


图 1 碱基、核糖核苷单向层析

1. 腺嘌呤 2. 胞嘧啶 3. 鸟嘌呤
4. 尿嘧啶 5. 四种碱基混合样品
6. 腺苷 7. 胞苷 8. 鸟苷 9. 尿苷
10. 四种核糖核苷混合样品

二、四种碱基和四种核糖核苷混合样品双向层析:

用溶剂 I 和 II 双向层析,可以分离四种碱基和四种核糖核苷的混合样品,在这两种溶剂中,鸟嘌呤皆不移动,仍留在原点(图 2)。

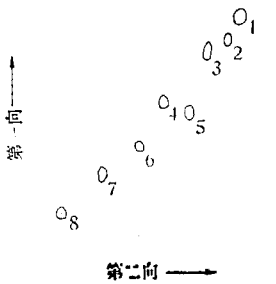


图 2 四种碱基、四种核糖核苷混合样品双向层析

1. 腺嘌呤 2. 腺苷 3. 尿嘧啶
4. 尿苷 5. 胞嘧啶 6. 胞苷
7. 鸟苷 8. 鸟嘌呤 (原点不动)

第一向,溶剂 I。第二向,溶剂 II。

样品在聚酰胺薄板上展层后,因为比较集中,在紫外光灯下的灵敏度很高,0.05 微克样品即可检出,比文献报告的灵敏 5—10 倍(表 1)。用玻璃板代替涤纶片基铺制的聚酰胺薄板,使用效果更好,层析点更集中。另外,玻璃板可以多次使用,较之涤纶片基物美价廉。

表 1 碱基、核糖核苷在聚酰胺薄板上的灵敏度

碱基、核糖核苷	腺嘌呤	胞嘧啶	尿嘧啶	腺苷	胞苷	尿苷
灵敏度(微克)	0.05	0.06	0.05	0.05	0.195	0.06

三、3'-核糖核苷酸单向层析:

在溶剂 III 中,四种 3'-核糖核苷酸的层析结果较好(图 3)。溶剂 III 还可以将核糖核苷与相应的 3'-核糖核苷酸分开(表 2)。

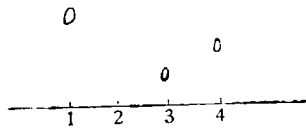


图 3 3'-核糖核苷酸单向层析
1. 3'-腺苷酸 2. 3'-胞苷酸
3. 3'-鸟苷酸 4. 3'-尿苷酸

表 2 碱基、核糖核苷及 3'-核糖核苷酸的 R_f 值

碱基、核糖核苷	展层溶剂 (R _f)			
3'-核糖核苷酸	III	IV	V	VI
腺嘌呤		0.79	0.76	0.83
胞嘧啶		0.62	0.64	0.68
鸟嘌呤		0.43	0.52	0.50
尿嘧啶		0.67	0.68	0.75
腺苷	0.84	0.79		
胞苷	0.94	0.62		
鸟苷	0.62	0.41		
尿苷	0.87	0.67		
3'-腺苷酸	0.52			
3'-胞苷酸	0.86			
3'-鸟苷酸	0.17			
3'-尿苷酸	0.19			

此外,表 2 中列出的其他溶剂,有的可以分离碱基,如溶剂 IV、V、VI; 有的可以分离核糖核苷,如溶剂 III、IV。

参 考 文 献

[1] Wang, K. T. and Wang, I. S. Y.: *Biochem. Biophys. Acta*, **142**, 280, 1967.
[2] Wang, K. T. and Wu, P. H.: *J. Chromatography*, **38**, 153, 1968.
[3] 陈远聪等:《生物化学与生物物理进展》,1975 年,第 1 期,第 38 页。

[本文于 1979 年 3 月收到]

1979 年第 6 期勘误

第 48 页作者“朱晴芳”、“李宝琰”应改为“朱晴蓉”、“李宝珪”。
第 51 页表 2 中 -20℃ 保存“一周”应改为“一月”。
第 51 页表 3 中完整系统 + 血红蛋白一项漏掉 5.3 微克。

1980 年第 1 期勘误

第 63 页左栏倒数第 1 行中:“长 2 毫米的不锈钢柱中”应改为“长 2 米的不锈钢柱中”。
第 64 页右栏的反应式中“3ROSi(CH₃)₃”应改为“ROSi(CH₃)₃”。
第 67 页表 3“文献值%^[1]”一栏中,A 与 D 间横线去掉,两个 98±22 应并为一个。