

离子交换树脂在各别分离碱性氨基酸中的应用

季钟煜* 韩沾元

(中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)

利用离子交换树脂方法,可从全氨基酸混合液中把三种碱性氨基酸(组氨酸、赖氨酸和精氨酸)分离成单一成分,五十年代已有专书记载其分离方法^[1]。基于前人工作,我们改用国产树脂,建立了制备方法,生产了以公斤计算的组氨酸、赖氨酸和精氨酸。

现以最小量原料(5公斤血球)为例,着重说明蛋白质水解后之二十多种氨基酸混合液经过氢型 732 树脂分离成五大部分:(一)酸性氨基酸和中性氨基酸的混合液,(二)中性氨基酸和组氨酸的混合液,(三)组氨酸和赖氨酸的混合液,(四)赖氨酸和(五)精氨酸,其中(二)和(三),可再分别用氢型 732 树脂和氢型 101×4 树脂分离。此法工艺简单,分离层次分明,各氨基酸之间的重叠部分不多,经过多年实践,证明切实可行,实为碱性氨基酸全分离的较好的生产方法,并可应用于扩大生产。

材料和方法

离子交换树脂之处理 按东风生化试剂厂的常用方法^[2],处理成氢型 732 树脂(强酸性阳离子交换树脂)、氢型 101×4 树脂(弱酸性阳离子交换树脂)和氢氧型 717 树脂(强碱性阴离子交换树脂)。

各氨基酸的鉴别试剂 茚三酮磷钨酸 Pauly 试剂和坂口试剂,分别为鉴别氨基酸、碱性氨基酸、组氨酸和精氨酸的特征试剂^[3,4]。

纸层析 按 Sibalic-Radel 方法^[5]。

纸电泳 使用 pH 9.0 低离子强度缓冲液^[4]。

氨基酸混合液之制备 基本上按 Schein-Berg^[6]法。5 升新鲜血球,经 50% 硫酸水溶液,

回流 24 小时,约得 20 升 L-氨基酸混合液。

实验和结果

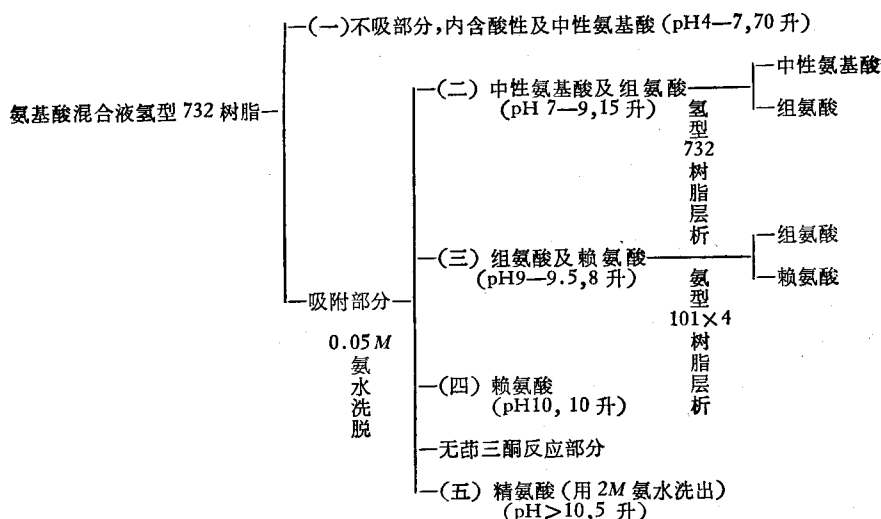
氢型 732 树脂的初步分离效果 20 升氨基酸混合液加水稀释 5 倍,在室温以 2.5 升/时之流速通过氢型 732 树脂柱(6.5×80cm)(简称 A 柱),排出液内依次出现酸性氨基酸和中性氨基酸,这是树脂的不吸收部分。然后先后以 20 升水,20 升 0.05 M 氨水(每 10 升中含 33 ml 25—28% NH₃ 的浓氨水)流过此柱,弃去流出液。最后在 A 柱后面连接一根氢型 732 树脂柱(3.8×80cm)(简称 B 柱)。继续用 0.05 M 氨水自 A 柱流过 B 柱,柱下收集液的 pH 逐渐上升,当它到达 pH7 时,开始出现 Pauly 反应,此时才分瓶收集(每 2 升为一份)。各份收集液经纸电泳和纸层析分析,可分为四大部分,现列于表 1。表中指出赖氨酸与精氨酸可完全分开,即全部赖氨酸从树脂上解离后,以后的收集液已无茚三酮反应,此时可用 2 M 氨水洗出吸附在树脂上的精氨酸。

以上过程,若树脂用量减少,或则一开始就以 0.1 M 氨水为洗脱液,则氨基酸会提前洗出来,纯赖氨酸部分减少,且精氨酸也混在赖氨酸内洗出来了。如果得到了赖氨酸和精氨酸的混合液,则用盐酸调至 pH 8 后,通过氢氧型 717 树脂(每公斤氨基酸需 12 升树脂),精氨酸排出,赖氨酸吸附于树脂上,可用 0.2 M HCl 洗出之。

从组氨酸和赖氨酸混合液中分离出纯赖氨酸的方法 把初分得到的混合液(三),(pH 9—10,8 升)用 2 M HCl 调至 pH7.5—8,然后通过

* 现在在中国科学院上海生物化学研究所工作。

表1 碱性氨基酸的分别分离



氨型 101 × 4 树脂柱 (6.5 × 80cm), 则组氨酸排出, 赖氨酸吸附于树脂上, 用水洗去滞留在树脂上的组氨酸后, 可用 1M 氨水洗出赖氨酸, 纯赖氨酸溶液可按东风厂方法^[7]制得 100 克 L-赖氨酸, 纸层析纯, $[\alpha]_D^{25} + 25^\circ \pm 2^\circ (C = 2, 6NHCl)$ 。

从组氨酸和中性氨基酸混合液中分离出组氨酸的方法 把初分得到的混合液 (二) (pH 7—9, 15 升), 用盐酸调至 pH 4, 使其流过氢型 732 树脂柱 (每公斤氨基酸需 6 升树脂, 简称 C 柱), 吸毕后, 在 C 柱后面连接一根等体积之氨型 732 树脂柱 (简称 D 柱), 然后用水自 C 柱流过 D 柱, 直至排出液 pH 达 4。再改用 3MHCl 洗出组氨酸, 按东风厂方法制得 L-组氨酸盐酸盐后, 再除去盐酸盐, 即成 L-组氨酸, 重 60 克, 纸层析纯, $[\alpha]_D^{25} - 40^\circ \pm 1^\circ (C = 1, H_2O)$ 。

讨 论

本法之要点在于: 第一先将氨基酸混合液流经强酸性树脂, 使其中二十多种氨基酸各以其特有的 pK 值以及它们对树脂的亲合力之差异而进行色层分离。第二, 即使这种强酸性树脂的吸附能力已达饱和 (指当柱下排出液已开始具茚三酮反应时), 此时仍能继续吸附着大 pK 值的碱性氨基酸, 而把吸附力较小的酸性氨

基酸和中性氨基酸一一置换排除。第三, 若用 0.05 M 氨水为洗脱液, 则组氨酸和赖氨酸可依次洗出, 只有再增大氨水浓度, 才能洗出精氨酸。第四, 我们也利用了 pH 8 的弱酸性树脂之性能, 在不含有精氨酸情况下, 它只能吸附赖氨酸而不能吸附其它氨基酸。而强碱性树脂只能吸附除精氨酸以外的其它氨基酸而不能吸附精氨酸。从而将此三种碱性氨基酸方便地各别分离开来了。5 升新鲜血球经分离制得 100 克 L-赖氨酸, 60 克 L-组氨酸和 40 克 L-精氨酸。纸层析纯, 旋光合格。此法曾扩大到 20 倍, 收效甚好。

参 考 文 献

- [1] 赤堀四郎等编: 蛋白质化学 1, 35, 1954。
- [2] 东风生化试剂厂: 生物化学与生物物理学报, 1965 年, 第 5 期, 第 535 页。
- [3] Block, R. J.: *Arch. Biochem.*, 11, 235, 1946。
- [4] 潘家秀等编: 《蛋白质化学研究技术》1962 年, 第 16 页; 第 152 页。
- [5] Sibalic, S. M. and Radcl. N. V.: *Anal. Chem.*, 33, 1223, 1962。
- [6] Schein, A. H. and Berg, C. P.: *Arch. Biochem.*, 11, 215, 1946。
- [7] 邵丹萍、吴保生、季钟煜、武汉大学生化厂编: 《氨基酸通讯》1980 年, 第 8 期, 第 57 页。

[本文于 1981 年 3 月 30 日收到]