

利用乙醇系统 RP-HPLC 分析 PTC-氨基酸

朱曙东 赵惠仁 赵昇皓

(徐州医学院生物化学研究室, 徐州 221002)

摘要 首次报道了用乙醇作梯度洗脱有机相分离 PTC-氨基酸的新方法. 同乙腈相比, 乙醇毒害性小、价廉、易得. 在优化的色谱条件下, 乙醇洗脱分辨率、灵敏度、准确度均佳, 可成为 PTC-氨基酸分析的一种极有前途的新方法.

关键词 乙醇, PTC-氨基酸, HPLC

氨基酸定量分析是生命科学和医学研究中最重要的一项技术. 在当今常用的氨基酸 HPLC 分析方法中, 传统柱后衍生离子交换法, 柱前衍生 OPA 法、FMOC 法、DANSYL 法、DABSYL 法、PTH 法、NBD 法、ILITC 法等各有其局限性. 而 Koop^[1]于 1982 年首先提出, 由 Henrikson 等^[2]与 Bidlingmeyer 等^[3]发展成熟的柱前衍生 PTC 法衍生简便、检测灵敏、分析快速、结果准确、重现性好、能分析包括亚氨基酸在内的各种复杂氨基酸成分, 应用领域广泛, 在目前各种分析方法中最为优越. 但 PTC 法需用色谱纯乙腈, 它毒害性强、货源少而运输困难、且价格昂贵. 有鉴于此, 作者试用溶剂强度与乙腈相近而毒害性小、价廉易得的乙醇(AR)经蒸馏处理后代替乙腈作有机流动相. 试用结果表明乙醇洗脱分离效果良好、分析快速、灵敏度佳、准确度高, 可作为 PTC-氨基酸分析的一种极有前途的新方法. 系统的文献检索表明迄今国内外尚无类似报道.

1 材料与方 法

1.1 试剂 异硫氰酸苯酯(PITC)与含 17 种氨基酸的标准混合液为 Sigma 产品. 恒沸盐酸为 Pierce 产品. 无水乙醇(AR 级)购自上海振兴化工一厂, 经蒸馏后应用. 乙腈(HPLC 级)购自南通三余科医服务部. 超纯水用 Milli-Q I 纯水系统(Millipore)自制. 各氨基酸为国产层

析纯. 三乙胺(TEA)、苯酚、无水乙酸钠与冰醋酸均为国产分析纯, 前两种试剂经蒸馏后应用.

1.2 样品水解 卵清溶菌酶为 Sigma 产品. 牛脑钙调素按 Gopalakrishna 等^[4]的方法制备, 含量 100%. 将蛋白样品溶于水配成 1.0mg/ml, 取 20 μ l 置真空水解管(Pierce)中真空干燥. 加入 200 μ l 含有 1% (V/V) 苯酚的 6mol/L 恒沸盐酸. 抽真空(100Pa), 然后通入经过除氧装置的高纯氮, 反复 4—5 次, 最后仍抽真空, 110 $^{\circ}$ C 水解 24h. 在衍生前真空干燥(以 Savant SpeedVac 浓缩干燥器进行旋转真空干燥, 真空度 100mtorr, 以下衍生中各步干燥均同).

1.3 衍生 氨基酸样品置 Reacti-vial(Pierce)中真空干燥, 然后溶于 50 μ l 偶联试剂(乙醇: 水: TEA=2: 2: 1). 将此溶液真空干燥后再次溶于 50 μ l 偶联试剂中, 然后加入 2 μ l PITC, 在 25 $^{\circ}$ C 下保温 20min 进行衍生反应, 最后再次真空干燥, 如此生成的 PTC-氨基酸置 -30 $^{\circ}$ C 贮存. 分析前将衍生物溶于适量流动相 A 中, 2000r/min 离心 5min 去除不溶物, 取 10—20 μ l 溶液上柱定量分析.

1.4 色谱分析 用组合 Waters HPLC 仪进行, 包括 510 型溶剂输送泵(2 台)、U6K 型进

样器、柱恒温器、481型紫外检测器、680型自动梯度控制器与740型数据处理机。色谱分析柱为Waters NOVA-PAK C18柱(3.9mm×150mm)。溶剂系统的两种洗脱液A液为缓冲水溶液, B液为100%乙醇。初试洗脱条件参照Waters PICO·TAG^[3,5]标准分析条件: A液含0.14mol/L 乙酸钠、0.05% TEA, 用冰醋酸调pH至6.40; 柱温35℃。调整以上各项参数与梯度程序达到最适分离条件。

2 结果与讨论

2.1 乙醇洗脱 PTC-氨基酸的分离

为获得混合 PTC-氨基酸最佳分离效果, 分别依次调试获得各项最佳参数: 流动相 A pH 6.35, TEA 0.075%, 乙酸盐浓度未作改变, 柱温 30℃。优化洗脱梯度使在最短的分析时间内达到最佳分辨率(最佳洗脱梯度见表1)。关于分离条件发展的详细讨论将另文发表。以各 PTC-氨基酸分别进样鉴定各峰。图1示 PTC-氨基酸最终分离结果。

表1 PTC-AA 分析的最佳梯度条件

时间/min	A/%	B/%	梯度曲线
0	100	0	—
10	98	2	6
20	96	4	9
25	90	10	6
32	78	22	6
42	78	22	6
50	60	40	6
55	60	40	6
60	100	0	6

从图中可见, 17种标准混合衍生物中除Met与Val共洗脱外, 其余氨基酸均在42min内基线分离。用同一支NOVA-PAK C18柱、以优化的乙腈梯度较好地分离17种氨基酸(分析结果见表2), 需时25min, 与其比较本法分析时间略有增加。预计选用其它反相C18柱或添加其它有机修饰剂可将Met与Val充分分离。另外, 在调试所得优化条件下, 与乙腈洗脱的结果略有不同, Arg的洗脱峰发生位移, Phe与

Lys的洗脱顺序反转^[3]。

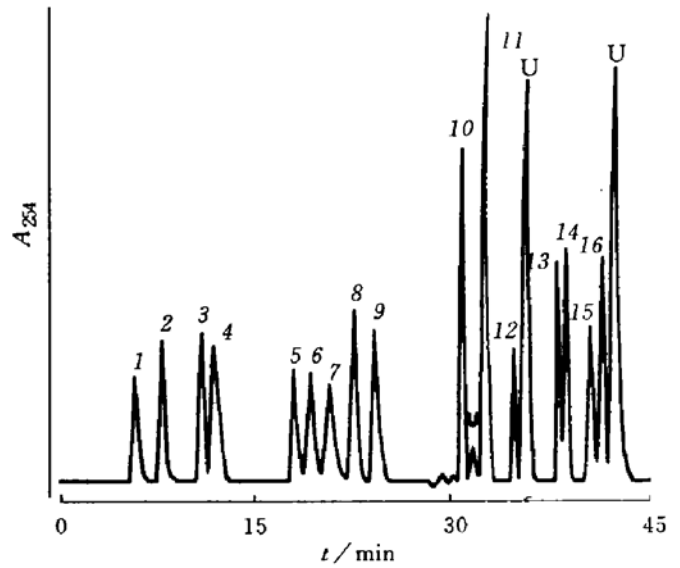


图1 RP-HPLC分离 PTC 衍生标准混合氨基酸

色谱条件: 柱, NOVA-PAK C18 (3.9mm×150mm); 流动相 A, 0.075% TEA-0.14mol/L 乙酸钠 (pH6.35); 流动相 B, 100%乙醇; 流速 1.0ml/min; 梯度见表1; 柱温 30℃; 检测波长 254nm; 进样量, 各氨基酸 1nmol (胱氨酸 0.5nmol)。峰 1: 天冬氨酸; 2: 谷氨酸; 3: 丝氨酸; 4: 甘氨酸; 5: 组氨酸; 6: 苏氨酸; 7: 丙氨酸; 8: 精氨酸; 9: 脯氨酸; 10: 酪氨酸; 11: 甲硫氨酸+缬氨酸; 12: 胱氨酸; 13: 异亮氨酸; 14: 亮氨酸; 15: 赖氨酸; 16: 苯丙氨酸; U: 试剂相关峰。

2.2 乙醇洗脱的灵敏度

实验证明蒸馏乙醇的色谱纯度直接影响氨基酸检测的灵敏度。图2示使用蒸馏 AR 级乙醇($A_{254}=0.020$)作有机流动相分析 30 pmol 标准混合氨基酸的结果, 大多数氨基酸衍生物的信噪比约为 15:1。按定义信噪比为 5 时确定检测极限^[3], 可知使用 AR 级乙醇洗脱检测极限约为 10 pmol。倘使用色谱纯乙醇并结合 HCL 气相水解, 高温 (450℃) 焙烤玻璃皿, 采用更高纯度试剂等措施, 避免杂质污染干扰, 应能提高灵敏度, 接近或达到色谱纯乙腈洗脱 1 pmol 的检测极限。如再结合微孔柱技术尚可进一步提高检测极限, 达到 fmol 水平。

在实际检测中, 很难完全杜绝干扰, 不可

能在检测极限水平进行准确的定量分析. 根据作者经验, 应用蒸馏乙醇 ($A_{254}=0.020$) 作蛋白组分分析时, 需要 $2\mu\text{g}$ 以上才适于准确定量.

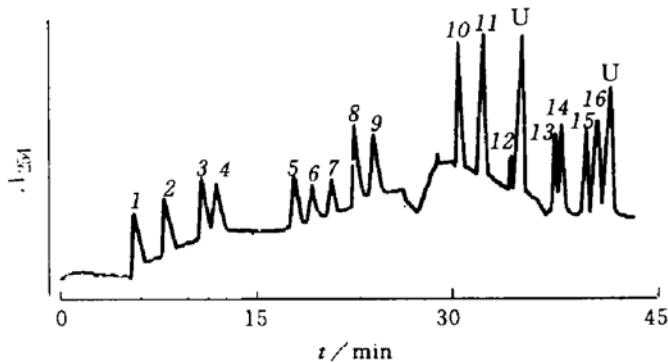


图 2 高灵敏度 PTC-AA 分析

进样量, 各氨基酸 $30\mu\text{mol}$ (Cys_2 $15\mu\text{mol}$). 色谱条件与各峰标记同图 1.

2.3 乙醇洗脱的准确度

使用同一支 NOVA-PAK C18 柱, 比较乙醇洗脱新法与乙腈洗脱法 (HPLC 条件参照 Bidlingmeyer^[3]) 分析 PTC-氨基酸含量的结果, 并与蛋白质序列分析值相比较 (表 2). 结果表

表 2 乙醇、乙腈系统 RP-HPLC 分析溶菌酶与钙调素氨基酸组分

氨基酸	溶菌酶			钙调素		
	乙醇洗脱	乙腈洗脱	序列分析结果 ^[6]	乙醇洗脱	乙腈洗脱	序列分析结果 ^[7]
Asp	21.0	21.1	21	23.0	23.2	23
Glu	5.3	5.1	5	26.5	27.4	27
Ser	10.1	10.0	10	4.3	4.2	4
Gly	12.7	12.2	12	10.5	12.3	11
His	0.7	0.9	1	1.3	0.8	1
Arg	10.3	10.6	11	5.7	5.8	6
Thr	6.3	6.7	7	11.2	12.1	12
Ala	11.6	11.7	12	12.5	9.8	11
Pro	2.0	2.4	2	2.0	2.6	2
Tyr	3.7	3.2	3	2.7	2.1	2
Val	— ¹⁾	5.8	6	— ¹⁾	7.4	7
Met	— ¹⁾	1.8	2	— ¹⁾	8.0	9
Iso	5.9	6.1	6	8.0	7.4	8
Leu	7.5	8.2	8	8.6	9.3	9
Phe	3.4	3.3	3	7.2	7.5	8
Lys	5.5	5.8	6	6.8	6.6	7

¹⁾ 为不能检测的氨基酸.

明两种方法相当一致, 新法分析结果准确可靠. 另外, 作者注意到衍生时存在的盐可明显减少 PTC-Asp 产量, 因而蛋白水解前应保证无盐.

2.4 乙醇洗脱优越性的探讨

PTC-氨基酸检测要求有机流动相能通透紫外光和能与水混溶. 在 7 种符合这两项要求的反相洗脱溶剂 (甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、二甲替甲酰胺、正丙醇、二氧杂环己烷) 中, 乙醇洗脱强度 (C8, C18 柱) 仅高于甲醇, 与乙腈相同, 而远小于其它四类溶剂^[8]. 根据分配色谱规律, 在混合溶剂中采用高浓度弱的洗脱液优于采用低浓度强的洗脱液, 因此乙醇洗脱色谱行为优于其余四类强洗脱溶剂. 甲醇剧毒, 色谱纯难以获得, AR 级蒸馏后仍有较高的紫外吸收, 显著影响检测灵敏度; 乙腈虽洗脱色谱性能优良, 但毒性强, 且价格昂贵、供应困难, 都有其不足之处.

本文首次报道乙醇 RP-HPLC 分析 PTC-AA. 虽然乙醇作为反相 HPLC 的有机流动相早期曾有报道, 但因其本身粘度较大, 致使分析柱压较高^[9], 因而不适用于普通长柱或较高流速的分析. 但在 PTC-AA 分析中则不成问题, 因为 PTC-AA 分析常用分析柱 (如 NOVA-PAK C18, Super Pac C18 或 Pico Tag 专用柱) 较短 (一般 12.5—15cm), 且流动相流速不高 ($\leq 1.0\text{ml/min}$), 柱压极低 (1500—2000psi, 略高于乙腈, 但远小于规定的最高柱压 3500psi), 不致造成柱的损坏, 因而采用乙醇作为洗脱有机相进行 PTC-氨基酸的定量是完全可行的. 现存的唯一不足即 Met-Val 两者的共洗脱现象, 从原理上讲是可以解决的. 通过选用不同类型的反相柱或添加其它有机修饰剂可使其彻底分离^[10]. 本室目前限于条件未进行深入研究. 即使如此, 这一方法正如其它许多被频繁使用的 RP-HPLC 氨基酸分析方法一样, 个别氨基酸衍生物的共洗脱并不妨碍其作为一种有效的、实用的检测手段. 乙醇除上述色谱性能与乙腈相近外, 还具有无毒、价廉、易得的独特优点. 本文报道的分析方法已可满足对包括食品、某些神经递质、复合氨基酸制剂、合成

肽等的一般氨基酸组成分析, 用作 PTC-氨基酸分析的流动相有广阔的前景.

参 考 文 献

- 1 Koop D R, Morgan E T, Tarr G E *et al.* J Biol Chem, 1982; **257**: 8472
- 2 Heinrikson R L, Meredith S C. Anal Biochem, 1984; **136**: 65
- 3 Bidlingmeyer B A, Cohen S A, Tarvin T L. J Chromatogr, 1984; **336**: 93
- 4 Gopalakrishna R, Anderson W B. Biochem Biophys Res Commun, 1982; **104**: 830

- 5 Pico-Tag amino acid analysis system, operator's manual (Millipore-Waters Chromatography Division). 1984
- 6 Perham R N, Thomas J O. In: Young G T ed. Amino-acids, peptides and proteins, London: The Chemical Society, 1972; 107
- 7 Marme D, Dieter P. In: Cheung W Y ed, Calcium and cell function (vol. 4), New York: Academic Press, 1983; 268
- 8 Engelhardt H 著, 杨文澜等译. 高效液相色谱法. 北京: 机械工业出版社, 1982: 128
- 9 Oliver R W A. HPLC of macromolecules. New York: IRL Press, 1989: 142
- 10 Wilkinson J M. J Chromatogr Sci, 1978; **16**: 547

从少量转染细胞中同时快速提取 总 RNA 和基因组 DNA *

张宏权 王会信 周廷冲 王允玲

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用 4mol/L LiCl 将 DNA 和 RNA 分相, 建立了同时从少量转染细胞中快速提取细胞总 RNA 和大分子基因组 DNA 的方法. 与以前的方法相比, 本法快速、简便、经济, 尤其适合应用在哺乳动物细胞基因表达与调控的研究中.

关键词 总 RNA, 基因组 DNA, 基因表达与调控

在利用培养细胞进行真核基因表达与调控研究时, 需要从 DNA, RNA 及蛋白质三个方面来同时评估某一表达系统的外源基因整合水平 (拷贝数), mRNA 的转录水平和目的蛋白表达的水平, 进行这种研究时需要提取细胞基因组 DNA 和细胞浆总 RNA. 然后, 通过 DNA 印迹确定外源基因的整合状态, 通过 RNA 印迹确定 mRNA 的转录水平. 以往提取细胞 DNA 和总 RNA 的方法有很多^[1,2], 各有特色, 但解决上述问题时, 它们的共同弊端是, 不能从一份细胞样品中同时将 DNA 和总 RNA 提取出来, 而要对调控水平做出正确的评价又必须对同一份细胞样品进行分析. 我们参照并改进了 Karlinsey 等^[3]人建立的方法,

建立了从少量转染细胞中同时提取细胞基因组 DNA 和细胞浆总 RNA 的方法. 具体实验方法如下:

细胞裂解: 将培养于 28cm² 培养瓶中的 COS-7 细胞 (约 2×10⁶—4×10⁶ 个) 经细胞洗液 (0.1mol/L PBS, 无 Ca²⁺, Mg²⁺, pH 7.2) 洗涤一次后, 用胰蛋白酶消化下来, 1000g 离心 10min, 细胞泥溶于 1ml 细胞洗液中, 然后转入 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 1000g 离心 10min, 弃上清. 加入 100μl 细胞裂解缓冲液 (5mol/L 异硫氰酸胍, 10mmol/L EDTA; 50mol/L Tris, pH 7.5, 8% 2-巯基乙醇), 于

*国家自然科学基金 (青年) 39100065 号资助.

收稿日期: 1993-03-01, 修回日期: 1993-06-13

food industry.

Key words superoxide dismutase, chemical modification, enzyme engineering, cosmetics

Phase-Resolved Photoacoustic Spectroscopy and Photoacoustic Phase Spectrum of the Intact Leaf. Du Hao, Fang Jianwen, Zheng Jinju. (*Dept. of Phys., Zhejiang Normal University, Jinhua 321004*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 158

The phase-resolved photoacoustic spectroscopy has been used to analyse the pigmental distribution in intact plant leaves and has been compared with the photoacoustic phase spectrum of the leaves. The inverse correlation between the photoacoustic phase spectrum and absorption bands of chloroplasts has been observed. The characteristic valley exists in the photoacoustic phase spectrum of the leaf cuticle. In addition, there are some differences in the photoacoustic phase spectra obtained at different modulation frequency. The phenomena show that photoacoustic phase spectra can also be used for the nondestructive depth-profile analyses of biological sample as good as photoacoustic spectroscopy.

Key words phase-resolved photoacoustic spectroscopy, photoacoustic phase spectrum, phase-resolved method, intact plant leaf, depth-profile analysis

A New HPLC Separation for PTC Derivatives of Amino Acids by Ethanol Elution. Zhu Shudong, Zhao Huiren, Zhao Shenghao. (*Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 162

Analysis of phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids with ethanol as organic eluent is described. Compared with acetonitrile elution

system, ethanol is less toxic, easier to obtain and much cheaper. Under optimized chromatographic conditions, the resolution, sensitivity and accuracy are excellent.

Key words ethanol, PTC amino acid, HPLC

Simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Zhang Hongquan, Wang Huixin, Zhou Tingchong, Wang Yunling. (*Inst. Bas. Med. Sci, Acad. Mil. Med. Sci. Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 165

A protocol by using 4 mol/L LiCl phasing the DNA and RNA could lead to simultaneous and rapid purification of total cytoplasmic RNA and genomic DNA from small numbers of transfected mammalian cells. Comparing with other methods, this protocol shows rapid, easy and economic, and can be used in many aspects especially in the studies of mammalian cell gene expression and regulation.

Key words total cytoplasmic RNA, genomic DNA, gene expression and regulation

The Method of PCR Direct Sequencing and It's Application in Cancer Research. Li Huachuan, Lu Shixin. (*Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (2): 167

PCR direct sequencing is a method which combined PCR amplification with nucleic acid sequencing technique. According to this technique, direct sequencing DNA strand of PCR amplification using PCR primer, α -³⁵S dATP and Taq DNA polymerase. The experiment showed that it is simple, rapid and stable. This method was used to analyze the tumor