

Хроматоелектрофоретичне визначення вільних амінокислот сироватки крові людини

В. Д. Гоцуляк, С. Д. Расін

*Інститут фізіології захисту рослин; Інститут фізіології
ім. О. О. Богомольця Академії наук УРСР, Київ*

Створюючи дану методику ми користувались раніше опублікованими методами хроматоелектрофоретичного визначення амінокислот в рослинах [1, 2].

Цей метод придатний для якісного і кількісного визначення амінокислот. Його перевага над двовірною хроматографією полягає в тому, що він дозволяє швидше і більш точно визначати повний амінокислотний склад на одній хроматоелектрофореграмі.

Суть хроматоелектрофоретичного методу полягає в тому, що застосовується однірна висхідна хроматографія, що розподіляє окремі амінокислоти і групи амінокислот по одній лінії у вертикальному напрямку. Розчинник пропускається один раз на протязі 72 год. Як розчинник використовували *n*-бутанол-оцтову кислоту — вода у співвідношенні 4,75 : 1,25 — 2,0.

Через 72 год хроматограм виймають, просушують під витяжною шафою при кімнатній температурі і підготовляють для наступного розподілу амінокислот в горизонтальному напрямку при допомозі електрофорезу.

Кров для одержання гомогенізованої сироватки брали у здорових і у хворих на епілепсію людей, із літкової вени натще сухим шприцом у суху пробірку під слабким тиском. Після 20–30-хвилинного відстоювання при кімнатній температурі згусток легко відокремлюється тонкою скляною паличкою від стінки пробірки. Потім його центрифугують при 3000–4000 обертах протягом 10–15 хв. Сироватка відсмоктується піпеткою в суху пробірку.

До 2 мл очищеної сироватки у центрифужну пробірку додають 18 мл дистильованої води і 5 мл 10%-ного розчину трихлороцтової кислоти для осадження білка. Пробірку вміщують у водяну баню на 10 хв при температурі 80°С, потім охолоджують і центрифугують при 7000 обертах. Центрифугат зливають у склянку і осад білка промивають три рази дистильованою водою (по 5 мл). Одержаний таким чином безбілковий фільтрат або розчин амінокислот пропускають через колонку з іонообмінною смолою КУ-2 у водневій формі із швидкістю 15—20 крапель за хвилину. Застосування цієї смоли дозволяє повністю відокремити амінокислоти від цукрів і органічних кислот.

Підготовка іонообмінника. Іонообмінну смолу заливаеть 40%-ним концентрованим лугом на дві доби. Потім смолу промивають проточною і дистильованою водою протягом кількох годин. Колонка заповнюється вогкою смолою, поступово, щоб не утворювалося порожніх місць. Вузька частина колонки (над краєм) щільно заповнюється скляною ватою. В колонці смола вісім раз промивається 5%-ним розчином HCl, а потім 12 раз дистильованою водою до усунення Cl (до AgNO_3).

Після того, як через колонку пройде безбілковий центрифугат сироватки, її промивають дистильованою водою до повного видалення цукрів і органічних кислот (30—40 мл).

Елюція амінокислот із смоли здійснюється 4 н. розчином аміаку (50—100 мл). Перші порції розчину аміаку, до появи жовтизни вилівають. У склянку збирають пофракційовану в жовтий колір рідину доти, поки є реакція з нітгідреном. Звичайно, збирання рідини ми припиняли о 15 год, залишаючи колонку заповненою 4 н. розчином аміаку і продовжували промивання на другий день. Збирання рідини закінчується промиванням смоли дистильованою водою (10 мл).

Зібрана рідина амінокислот переноситься у фосфорову посудину і випаровується на водяній бані до одержання сухого залишку. Сухий залишок двічі змочується 5 мл води і випаровується досуха. Осад амінокислот розчиняється в 1 мл 10%-ного ізопро-

пілового спирту. В такому тисся в холодильнику довгий

Після елюції амінокислоти промивають 5%-ним розчином

Хроматографічний роз
ки шириною 40 см; висото
лівого краю і 7 см від ни
папір підсушують теплим
скріплюють по краях алюм

Рис. 1. Хроматоелектрофор
рової людини (Р-с

1 — глютамон; 2 — гліцин; 3 — аспаргін;
4 — метіонін; 5 — аланін; 6 — аргінін; 7 — гістидин;
8 — пролін; 9 — фенілаланін; 10 — треонін;
11 — валерій; 12 — треоїн; 13 — глютамінова кислота;
14 — лізін + оксипролін; 15 — тирозин; 16 — метіонін;
17 — тирозин; 18 — лейцин; 19 — метіонін;
20 — метіонін; 21 — метіонін.

меру діаметром 30 см, висотою 120 см, товстої кислоти — води (120 + 30)

При нанесенні на папір метіонін, цистин, цистеїн, мовсім не проявляється. Тому, одержати дві хроматоелектро-війної кількості розчину аміно-ду досліджуваної речовини; і кількісного аналізу. Для кі-даносити в такій кількості, що розчинив прямої пропорціо-ньому амінокислоти.

Одержана хроматограма горизонтальному напрямку з дрібною смужкою паперу відрізається для виявлення речовин. Для цього папір промивають водним розчином нітратної кислоти, від хроматограми відокремлюють смужку паперу. Після цього хроматограму

Електрофорез здійснювався за допомогою апарату, який виготовлений із пластмаси. Катоди платинові, діаметром 0,5 см, під'єднані до електричного струму 750 в, синхронно з пульсерами протязі трьох годин. Перед використанням розчиним із скляного пульверизатора, який забезпечує чистоту мети, покриває камеру

пілового спирту. В такому вигляді, в пробірці закритій пробкою, розчин може зберігатися в холодильнику довгий час.

Після елюції амінокислот для відновлення іонообмінної смоли, колонку вісім раз промивають 5%-ним розчином HCl , а потім 12 раз — дистильованою водою.

Хроматографічний розподіл амінокислот. На листі паперу (ленінградської фабрики шириною 40 см; висотою 60 см) наносять стартову пляму, відступаючи на 5 см від лівого краю і 7 см від нижнього краю. Розчин наноситься мікропіпеткою на 0,1 мл, папір підсушують теплим повітрям із фена. Після нанесення розчину, лист паперу скріплюють по краях алюмінієвими скріпками і вміщують на 72 год в циліндричну ка-

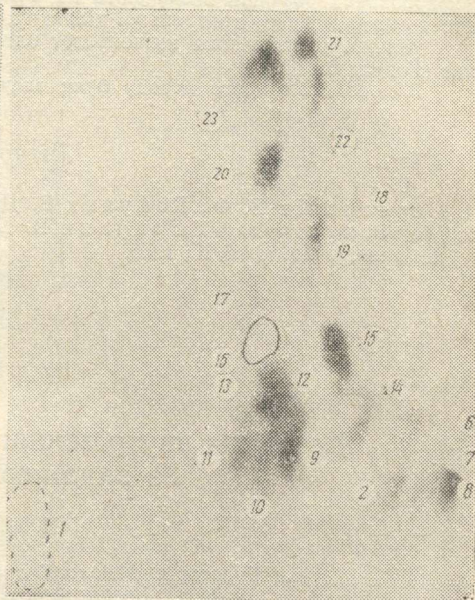
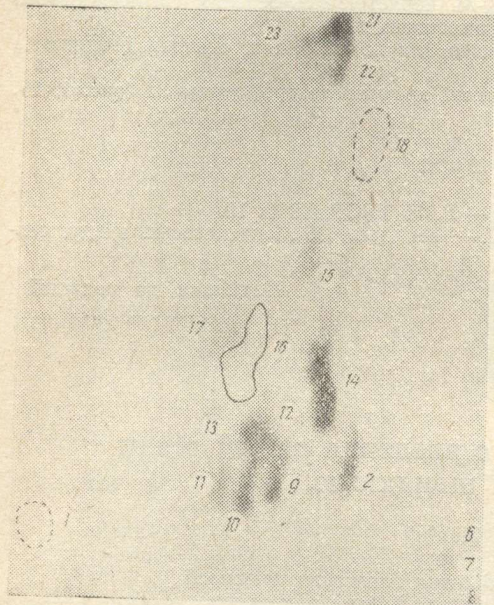


Рис. 1. Хроматоелектрофореграми здорової людини (Р-сін).

Рис. 2. Хроматоелектрофореграми хворої на епілепсію.

1 — глутатіон; 2 — гліцин; 3 — аспарагін (відсутній); 4 — цистеїн (відсутній); 5 — цистин (відсутній); 6 — аргінін; 7 — гистидин; 8 — лізин; 9 — серин; 10 — глутамин; 11 — аспарагінова кислота; 12 — треонін; 13 — глутамінова кислота; 14 — аланін; 15 — гамма-аміномасляна кислота; 16 — пролін+оксипролін; 17 — тирозин; 18 — валін-норвалін; 19 — метіонін (відсутній); 20 — триптофан (відсутній); 21 — лейцин; 22 — ізолейцин; 23 — феніл-аланін.

меру діаметром 30 см, висотою 80 см. На дно камери наливають розчин *n*-бутанол-оцтової кислоти — води (120+32+48 мл).

При нанесенні на папір малої кількості розчину, деякі амінокислоти (триптофан, метіонін, цистин, цистеїн, моноетаноламін) можуть слабо проявлятися нінгідрином, або зовсім не проявлятися. Тому, починаючи роботу з новим біологічним об'єктом, треба одержати дві хроматоелектрофореграми: одну для якісного аналізу з нанесенням подвійної кількості розчину амінокислот для встановлення повного амінокислотного складу досліджуваної речовини; другу — з одинарною кількістю розчину амінокислот, для кількісного обліку досліджуваній розчин амінокислот слід наносити в такій кількості, щоб вона не виходила за межі встановленої для зразкових розчинів прямої пропорційної залежності між інстинкцією розчину і вмістом в ньому амінокислоти.

Одержана хроматограма підготовляється для наступного поділу амінокислот в горизонтальному напрямку з допомогою електрофорезу. Від хроматограми з лівого боку відрізається смужка паперу з контрольною плямою шириною 6 см і фарбується нінгідрином для виявлення розміщення амінокислот. Знаючи місце розташування амінокислот, від хроматограми відрізаються вгорі і низу вільні від амінокислот ділянки паперу. Після цього хроматограма вміщується в електрофорезну камеру.

Електрофорез здійснювався в апараті нашої конструкції. Електрофоретична камера виготовлена із пластмаси (5 мм органічне скло). Розмір камери 50×45 см. Електроди платинові, діаметром 0,8 мм. Буферний розчин — 1 н. оцтова кислота. Напряга електричного струму 750 в, сила струму від 3 до 10 ма. Електрофорез проводиться на протязі трьох годин. Перед включенням приладу хроматограми змочуються буферним розчином із скляного пульверизатора з допомогою компресора. Для досягнення герметичності, кришка камери обклеюється лейкопластиром.