

植物组织中氨基转移反应及氨基酸的层析分离

一、目的

转氨基作用是植物界普遍存在的一种生化反应，它使蛋白质、氨基酸代谢与碳水化合物、脂肪等代谢沟通起来，在一定程度上起平衡蛋白质、脂肪等代谢的作用。研究植物体转氨基作用，可以使我们了解植物体不同发育阶段代谢动态的一个侧面，从而探索控制其代谢的途径。

二、原理

通过转氨基作用， α -氨基酸上的氨基可能转移到 α -酮基的位置上，结果形成一种新的 α -酮酸和一种新的 α -氨基酸。所生成的氨基酸可用纸上层析法检出。

三、仪器和试剂

1. 仪器：

研钵 恒温箱 量筒（10 毫升） 离心机 试管 3 支 层析缸 滤纸 吹风机 移液管（0.5ml×3；2ml×1） 毛细管 漏斗 离心管

2. 试剂：

- (1) 0.1M 丙氨酸
- (2) 0.1M α -酮戊二酸（NaOH 中和至 pH7）
- (3) 含有 0.4M 蔗糖的 0.1M pH8.0 磷酸缓冲液
- (4) 0.1M 谷氨酸、0.1—0.25%茛三酮丙酮溶液
- (5) 推动剂（酚：水=3：1 或 4：1）

四、操作

1. 酶液的制备：取发芽 2-3 日的绿豆芽 3 克（去皮），放入研钵中，加 2 毫升 pH8.0 磷酸缓冲液研成匀浆，转入离心管。研钵再用 2 毫升缓冲液冲洗，并入离心管，于 8000 转/分离心 10 分钟，取上清液备用。

2. 酶促反应：取三支试管，按下表分别加入试剂和酶液：

管 号	0.1M α -酮戊二酸 (ml)	0.1M 丙氨酸 (ml)	酶 液 (ml)	pH7.5 缓冲液 (ml)
1	0.5	0.5	0.5	1.5
2	0.5	—	0.5	2.0
3	—	0.5	0.5	2.0

摇匀后置试管于 37℃ 恒温中保温 30 分钟。取出后各加 3 滴 30% 乙酸终止酶活动，于沸水浴上加热 10 分钟，使蛋白质完全沉淀，冷却后离心或过滤、取上清液或滤液备用。

3. 层析：取层析滤纸一张，在距底边 2 厘米处用铅笔划一水平线，在线上等距确定 5 个点，作点样位置。相邻各点相距 2.5 厘米。取上述上清液或滤液及谷氨酸、丙氨酸标准液用五支毛细玻管分别点样。反应液点 5-6 滴，标准液点 2 滴。每点一次用吹风机吹干后再点下一次。不要点得太多，斑点直径不超过 3 mm 为宜（5 支毛细管勿混淆）。

在层析缸中放入酚水推动剂(3: 1 或 4: 1)，待缸内蒸气饱和后，将滤纸垂直放入，展层，层析纸纸边不能迭在一起或与缸壁接触。盖好缸盖，待溶剂上升至 10-15 cm 时，小心取出滤纸用铅笔划出溶剂前沿线，用电吹风烘干。

4. 显色：用喷雾器喷上 0.1% 茚三酮丙酮溶液，置烘箱(80℃)或用热吹风机加热显色，此时可见紫色斑点。

五、结果分析

样品层析后，常用相对移动速率 R_f 来表示各组分在层析谱上的位置：

$$R_f = \frac{\text{原点至斑点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}}$$

R_f 值与欲分离物质的性质存在一定的关系，在一定条件下是常数。从层析图谱上鉴定 α -酮戊二酸和丙氨酸是否发生了转氨基反应并写出反应式。

六、注意事项

1. 品不要点得太多，斑点直径不超过 3 mm 为宜。
2. 层析纸质量要好一点，否则容易弯曲，层析效果不好。层析时，且纸边不能迭在一起或与缸壁接触。