

DNS-氨基酸的制备和鉴定

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

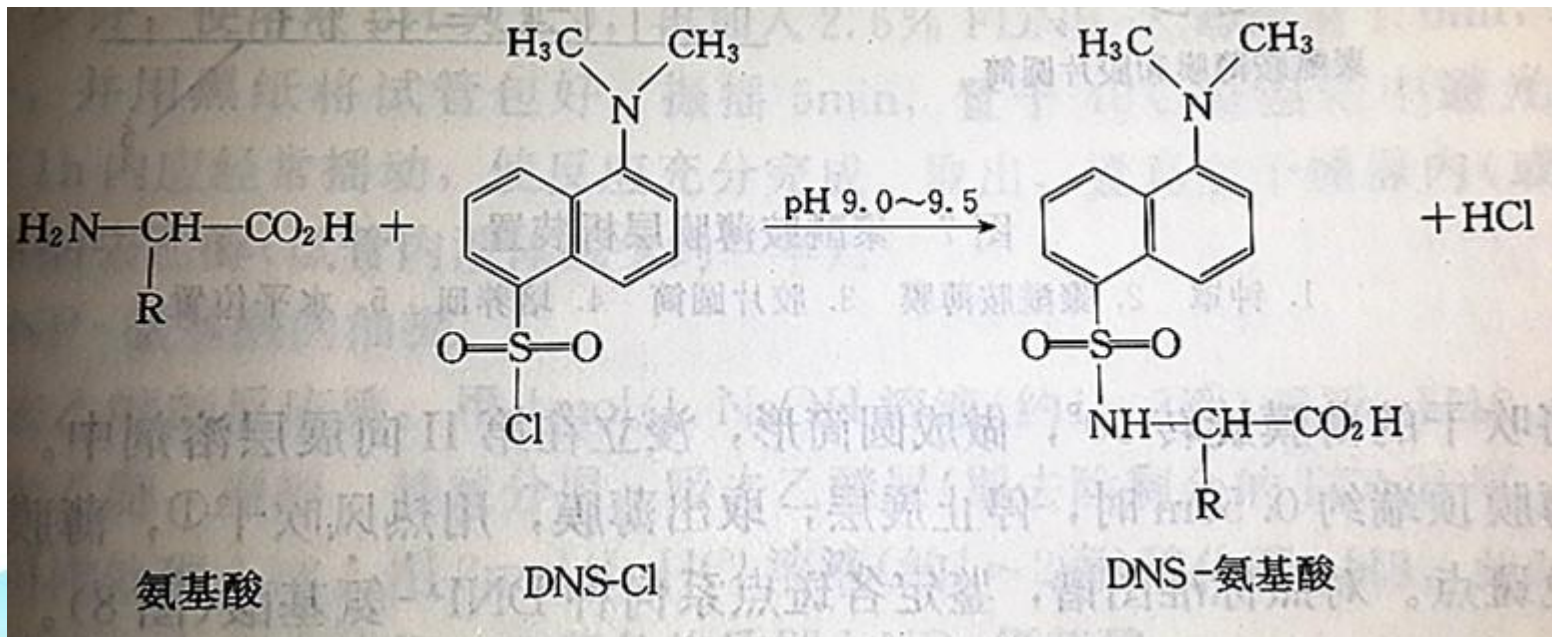
实验目的

- ◆ 了解并掌握用DNS-氨基酸的制备和鉴定。

实验原理

◆ 荧光试剂5-二甲氨基-1-萘磺酰氯

(5-Dimethylamino-1-naphthylene sulfonyl chloride, dansyl chloride, 简称DNS-Cl) 在弱碱性 (pH9.0左右) 条件下可与氨基酸的 α -氨基反应, 生成带黄绿荧光的DNS-氨基酸

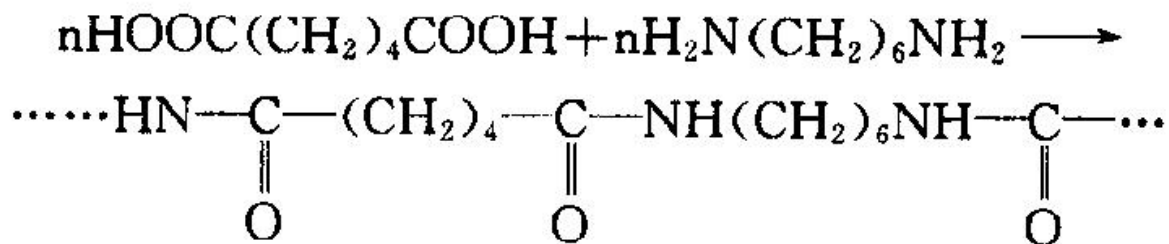


- ◆ DNS-氨基酸可用聚酰胺薄膜层析法分离，所得层析图与DNS-标准氨基酸层析图谱相对比，可借此鉴定样品中氨基酸的种类，用此法鉴定蛋白质N-端氨基酸比FDNB法灵敏100倍，仅 10^{-10} ~ 10^{-9} mol样品即可检出，产物也比DNP-氨基酸稳定，且操作简便，快速。

- ◆ 薄层层析 (Thin-layer chromatography, TLC)
是吸附剂在平滑的玻璃板或聚脂薄膜上铺成薄层作为固定相，以溶剂作为流动相，将样品中各组分分离的方法。

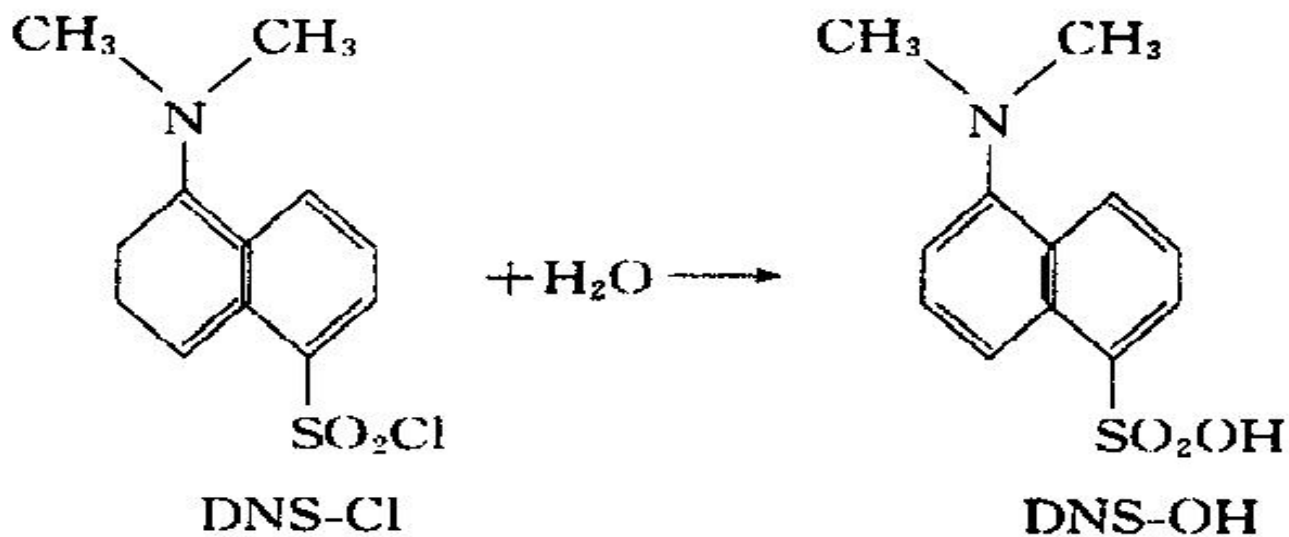
◆ 聚酰胺

是一类化学纤维原料，即锦纶（又称尼龙）。由己二酸与己二胺聚合而成。

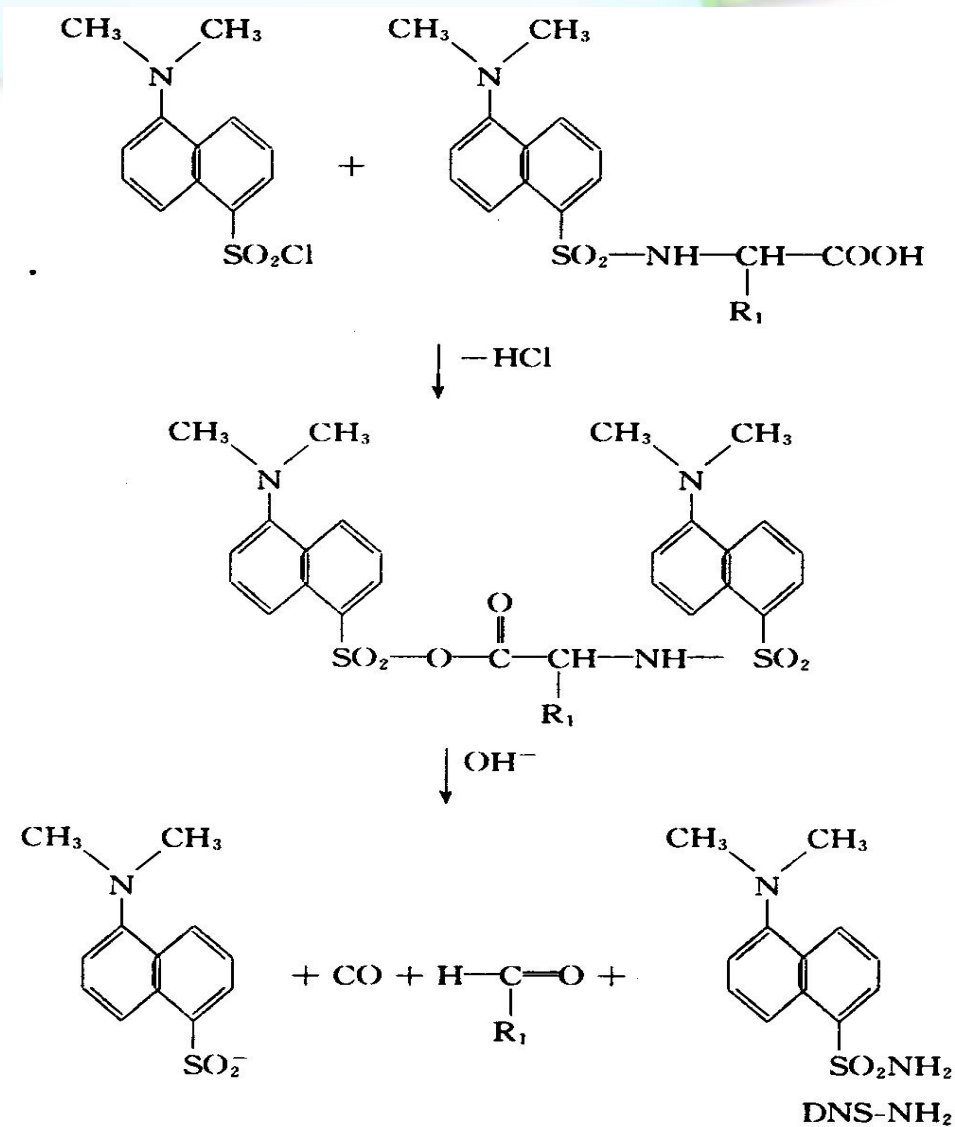


➤ 因为在这类物质分子中都含有大量酰胺基团，故统称聚酰胺。

- ◆ DNS-Cl在pH过高时，水解产生副产物DNS-OH



◆ 在DNS-C1过量时，会产生DNS-NH₂，即：



在紫外光照射下

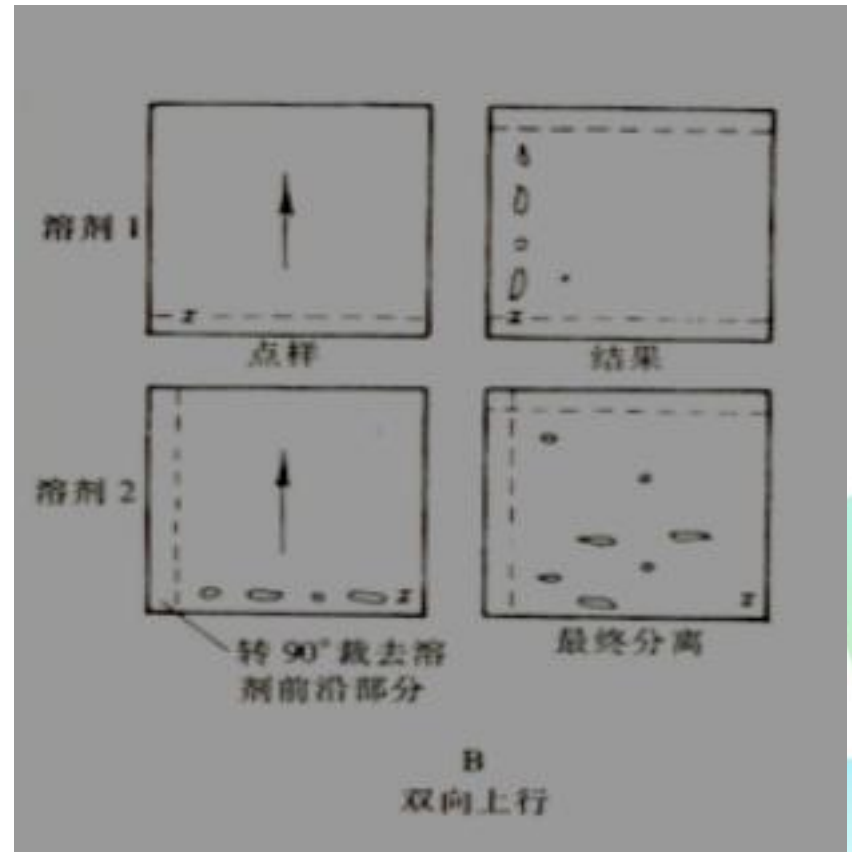
DNS-OH和DNS-NH₂产生蓝色荧光

DNS-氨基酸呈现黄绿色荧光

→可彼此区分。

本实验中，聚酰胺上胺基与氨基酸的羰基形成氢键，酰胺基团上羰基与AA中羟基或酚基形成氢键。由于有些AA结构相似，如只采用一种溶剂系统进行单向层析，难达到完全分离的目的。因此可选择另一溶剂系统进行第二向层析。

第一向——苯—冰醋酸
第二向——甲酸—水



操作：

◆ 1、DNS—氨基酸的制备

称取Gly、Phe、His各4mg，加0.2mol/L NaHCO₃ 4ml溶解，加入DNS-Cl丙酮溶液4ml，混匀，用三乙胺调pH至9.0~10.5。

分装，每组0.5ml，加塞，40℃水浴，避光反应2~3h。

2. 展层

- ◆ 取聚酰胺薄膜一张，在距离相邻边缘各1.0cm处用铅笔画一相交直线，作为点样原点。用微量注射器（或点样管）取上述DNS-氨基酸样品液进行点样，点样直径不超过2mm，可分几次点完，每次点后用冷风吹干再点下一次，吹干。光面向外卷曲（两边不相接触）外扎以牛皮筋。直立于盛有20ml展层剂的培养皿中，点样点置下端，置于展析缸中展层。
- ◆ 先用展层剂（苯-冰醋酸）进行第 I 向展层（纵向），当展层剂离顶端0.5cm时取出吹干。将吹干的薄膜旋转90°，用展层剂（甲酸-水）作展层剂，走第 II 向（横向），展至距离顶端0.5cm时取出，吹干。

3. 结果观察

- ◆ 将聚酰胺薄膜置于紫外灯下，观察荧光斑点，区分DNS-氨基酸，DNS-NH₂与DNS-OH，对照标准图谱找出它们各自相应的位置，用铅笔在斑点边缘轻轻画图做记号。

注意

- (1) 严格控制点样位置以及点样直径。
- (2) 展层时勿将点样浸入溶剂系统。
- (3) 展层后必须经电吹风将膜吹干。
- (4) 使用紫外照射时要注意使用时间短。