

培养基中含二肽（丙氨酰谷氨酰胺）氨基酸的测定例

AS/AAA-007

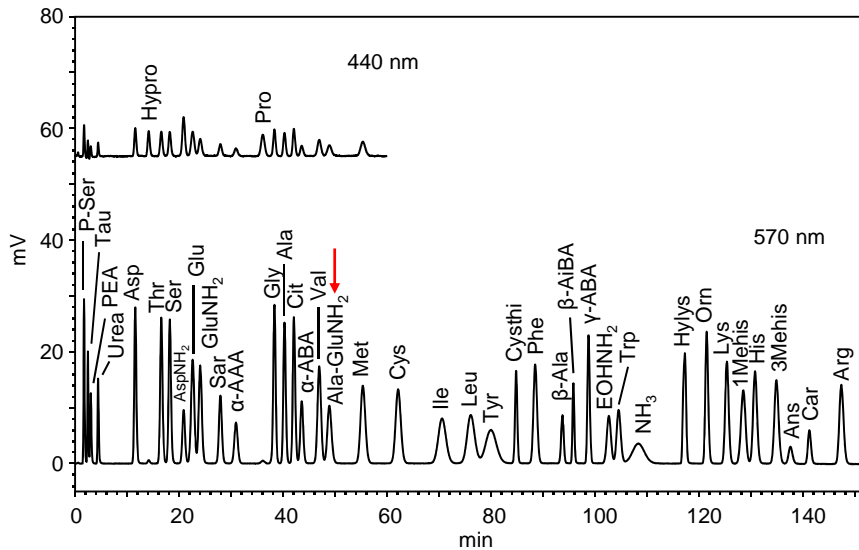
细胞培养所必需的L-谷氨酰胺在水溶液中性质不稳定，分解后会生成对细胞有害的氨。已知氨能够抑制细胞的生长及目标物的生成，于是人们开始使用L-丙氨酰-L-谷氨酰胺（丙氨酰谷氨酰胺、Ala-GluNH<sub>2</sub>）来代替L-谷氨酰胺。丙氨酰谷氨酰胺是L-丙氨酸和L-谷氨酰胺缩合而成的二肽，在水溶液中的稳定性高，不易生成氨，因此可以进行更长时间的培养。

此次将介绍使用L-8900型高速全自动氨基酸分析仪，对包括丙氨酰谷氨酰胺在内的42个氨基酸成分进行测定的例子。采取生理体液分析和高分离度生理体液分析双柱联用方式进行了测定。同时，将介绍添加了丙氨酰谷氨酰胺的培养基测定例。



【 L-8900型 日立高速全自动氨基酸分析仪 】

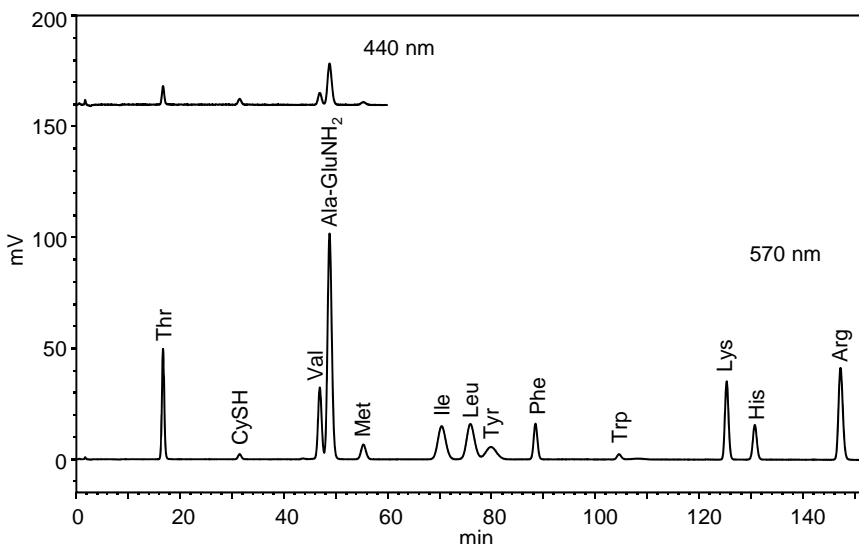
■标准样品与培养基的测定例（使用生理体液分析柱）



【氨基酸标准溶液测定例（各2 nmol/20 μL（部分成分除外））】  
（色谱图中标记的Cys表示胱氨酸（半胱氨酸的2聚体）。）

<色谱条件>

- 分析柱 : #2622 4.6 mm I.D. × 60 mm
- 脱氨柱 : #2650L 4.6 mm I.D. × 40 mm
- 保护柱 : #2619 4.0 mm I.D. × 5 mm
- 流动相 : PF-Buffer Kit
- 流速 : 0.35 mL/min
- 柱温 : 32 ~ 70 °C
- 反应液 : Ninhydrin coloring solution kit for HITACHI
- 反应液流速 : 0.3 mL/min
- 反应温度 : 135 °C
- 检测波长 : VIS 440nm、570 nm
- 进样量 : 20 μL



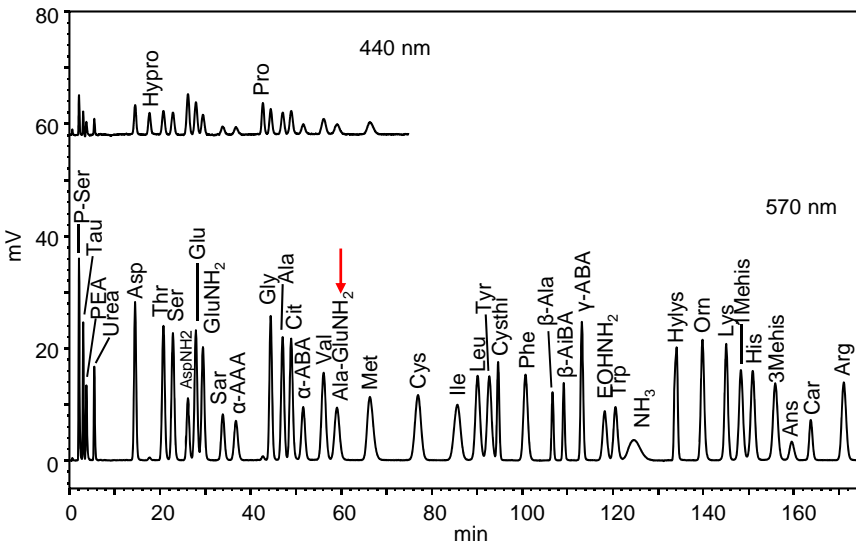
【添加了Ala-GluNH<sub>2</sub>的培养基的测定例（前处理后进样 20 μL）】

<样品前处理>

- 样品 培养基（粉末）940 mg
  - ← 纯水 100 mL
  - ← 添加Ala-GluNH<sub>2</sub> 43.4 mg
- 提取 1 mL
  - ← 5% 的三氯乙酸 1 mL
- 离心分离 10000 rpm、10 min
- 上清液
- 过滤 孔径 0.2 μm
- 分析样品（进样 20 μL）

使用生理体液分析柱对42个氨基酸成分进行了测定。在标准分析方法中，Ala-GluNH<sub>2</sub> 的出峰位置与Cys重叠，但对梯度程序进行了优化后，便可以分离出Ala-GluNH<sub>2</sub> 的峰，从而可以与其他氨基酸一样对该二肽进行定性和定量分析。

■标准样品与培养基的测定例（高分离度生理体液分析双柱联用）

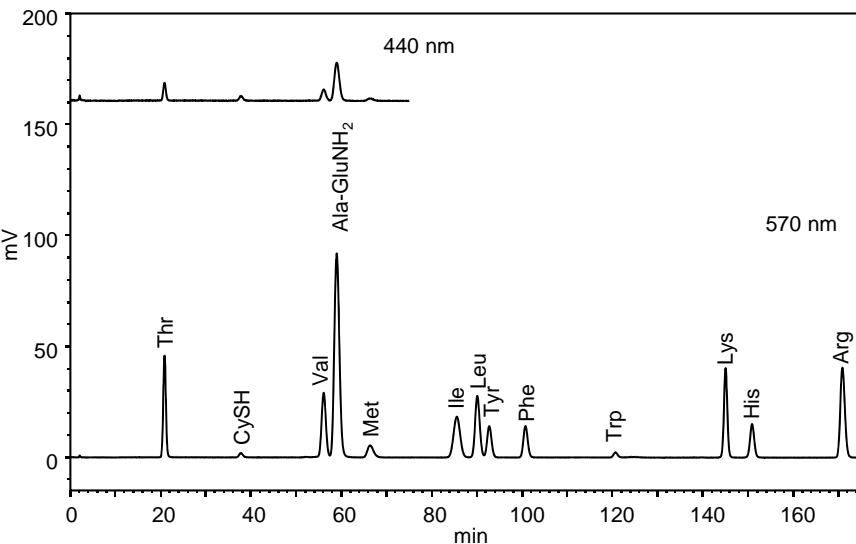


<色谱条件>

分析柱 : #2622 4.6 mm I.D. × (40+40) mm  
 脱氨柱 : #2650L 4.6 mm I.D. × 60 mm  
 保护柱 : #2619 4.0 mm I.D. × 5 mm  
 流动相 : PF-Buffer Kit  
 流速 : 0.35 mL/min  
 柱温 : 32 ~ 70 °C  
 反应液 : Ninhydrin coloring solution kit for HITACHI  
 反应液流速 : 0.3 mL/min  
 反应温度 : 135 °C  
 检测波长 : VIS 440nm、570 nm  
 进样量 : 20 μL

【氨基酸标准溶液测定例（各2 nmol/20 μL（部分成分除外））】

（色谱图中标记的Cys表示胱氨酸（半胱氨酸的2聚体）。）



<样品前处理>

样品 培养基（粉末）940 mg  
 ← 纯水 100 mL  
 ← 添加Ala-GluNH<sub>2</sub> 43.4 mg  
 提取 1 mL  
 ← 5% 的三氯乙酸 1 mL  
 离心分离 10000 rpm、10 min  
 上清液  
 过滤 孔径 0.2 μm  
 分析样品（进样 20 μL）

【添加了Ala-GluNH<sub>2</sub>的培养基的测定例（前处理后进样 20 μL）】

如果采用高分离度生理体液分析双柱联用，可以进行更高分离度的测定。由于双柱联用可以通过将两根色谱柱串联的结构对压力进行分散，因此能够实现高速、高分离度的分析。这样不仅可以完全分离Val和Ala-GluNH<sub>2</sub>，而且还能够改善中间洗脱出的Ile、Leu、Tyr的峰形，实现更高精度的定量分析。

【氨基酸成分名列表】

P-Ser	磷酸丝氨酸	Sar	肌氨酸	Ile	异亮氨酸	Hylys	羟赖氨酸
Tau	牛磺酸	α-AAA	α-氨基己二酸	Leu	亮氨酸	Orn	鸟氨酸
PEA	磷酸乙醇胺	Pro	脯氨酸	Tyr	酪氨酸	Lys	赖氨酸
Urea	尿素	Gly	甘氨酸	Cysthi	胱硫醚	1Mehis	1-甲基组氨酸
Asp	天门冬氨酸	Ala	丙氨酸	Phe	苯丙氨酸	His	组氨酸
Hypro	羟脯氨酸	Cit	瓜氨酸	β-Ala	β-丙氨酸	3Mehis	3-甲基组氨酸
Thr	苏氨酸	α-ABA	α-氨基正丁酸	β-AiBA	β-氨基异丁酸	Ans	鹅肌肽
Ser	丝氨酸	Val	缬氨酸	GABA	γ-氨基正丁酸	Car	肌肽
AspNH <sub>2</sub>	天冬酰胺	Ala-GluNH <sub>2</sub>	丙氨酰谷氨酰胺	EtOHNH <sub>2</sub>	乙醇胺	Arg	精氨酸
Glu	谷氨酸	Met	蛋氨酸	Trp	色氨酸	CySH	半胱氨酸
GluNH <sub>2</sub>	谷氨酰胺	Cys	胱氨酸				

仪器配置：L-8900型 日立高速氨基酸分析仪

注意：本资料所示数据仅为测定例用数据而非可保证仪器性能的数据。