

泳,但后者需时稍长。这可能与蛋白质在等电点聚焦后处于电中性有关。一般用电泳方法洗脱 4mm 厚凝胶片内的蛋白,需 1—3 小时。用本法洗脱 Hb, Cyt. c 和铁蛋白(分子量分别为 6.7 万, 1.3 万和 80 万)的时间分别为 1、2 和 2.5 小时。

在样品凝胶片上铺一薄层琼脂糖,既防止了低浓度凝胶片在 30% 甘油中漂浮,又为收集蛋白样品提供了一个完整而密封的底,以免样品液流失。3M NaCl 覆盖在 30% 甘油上后,二层间如无明显界面,则蛋白质的电泳速度将大大减慢。而且蛋白质进入 D 层后会向 E 层扩散,这可能与高电导 E 层和低电导 D 层所组成的不连续电导梯度被破坏有关。我们在洗脱三种蛋白 (pI 分别为 4.6、6.79 和 10.6) 时分别采用 pH8.8 和 pH10.8 两个缓冲系统,结果洗脱效果完全相同。关于平板凝胶电泳和等电点聚焦电泳后蛋白的电泳洗脱的原理及操作步骤基

本相同。

参 考 文 献

- [1] Bray, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 55, 213, 1973.
- [2] Malcolm, A.J. et al.: *J. Immunol.*, 128, 2599, 1982.
- [3] Ahmadi, B. et al.: *Anal. Biochem.*, 97, 229, 1979.
- [4] Hanaoka, F. et al.: *Anal. Biochem.*, 99, 170, 1979.
- [5] Brown, A. S. et al.: *Anal. Biochem.*, 103, 184, 1980.
- [6] Karsnas, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 77, 168, 1977.
- [7] Ziola, B. R. et al.: *Anal. Biochem.*, 72, 366, 1976.
- [8] Wachslight, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 84, 533, 1978.
- [9] Otto, M. et al.: *Anal. Biochem.*, 111, 111, 1980.
- [10] Stralfors, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 128, 7, 1983.

[本文于 1984 年 11 月 21 日收到]

一种简便适用的蛋白质水解方法

章 蓓 倪大洲 刘祖洞

(复旦大学遗传研究所, 上海)

进行蛋白质的氨基酸的组成分析时,蛋白质水解液的制备是十分重要的一步。样品水解的好坏直接影响测定结果的准确性。经典水解条件是: 6N HCl, 110°C 在封管条件下恒温水解 24 小时。在这条件下进行水解,蛋白质分子中的 Ser, Thr, Trp, Cys, Tyr, Met 仍可能因氧化、降解等反应影响回收率^[1]。为此,要求在封管时减压或充氮以提高回收率,但这又需要特殊装置^[2], 国内一般实验室不具备这样的条件。我们试用 1.5ml 聚丙烯带盖的离心管代替玻璃指管进行蛋白质水解。实验结果表明用这二种管子水解结果相同,而使用聚丙烯离心管可以免去加热封管等步骤,减少了样品的损

失,确实是一种较为简便适用的蛋白质水解方法。

材 料 与 方 法

1. 胰岛素、细胞色素 c 均为分析纯。
2. 氨基酸标准样品 17 种氨基酸和氨(Beckman 公司产), 稀释成 250nmol/ml 的各种氨基酸混合液。
3. 玻璃指管水解 胰岛素、或细胞色素 c 各 1 mg, 分别置于玻璃指管 (10 × 100mm) 中, 加入 6N HCl 1ml, 煤气灯上加热封口, 110°C 水解 24 小时, 尔后挥发 HCl, 用无离子水洗涤三次, 加入 pH 2.2 柠檬酸缓冲液 1ml, 从中取

100 μ l 上柱。

4. 聚丙烯离心管水解: 除用聚丙烯离心管代替玻璃指管外, 其他水解方法同(3)。

5. 氨基酸分析仪操作及氨基酸定性、定量方法参照文献[3]。

结果与讨论

为了使分析结果准确, 减少其他误差因素, 各组样品在进行蛋白质水解时均未抽真空或充

氮气, 也未加各种保护剂, 以便直接比较水解蛋白质的效果。

图 2(a)(b) 和图 3(a)(b) 分别为胰岛素和细胞色素 c 的玻璃指管和聚丙烯离心管水解液的柱层析色谱图。图中的每种氨基酸是根据氨基酸标准液的柱层析色谱(图1)鉴定出。从表 1 和表 2 可见, 胰岛素在玻璃指管中水解, 其 Asp, Thr, Ser, Glu 含量明显低于在聚丙烯离心管中水解, 而用这两种管子水解细胞色素 c, 结果相差不大。这可能是在室温下细胞色素 c 易溶于 HCl 而胰岛素则不溶, 沾在管壁, 在玻璃指管封口时遭到破坏。因此在常温下不易溶解的蛋白质, 使用聚丙烯离心管水解更为合适, 其氨基酸回收率明显高于用玻璃指管。

从表 2 可见, 细胞色素 c 在玻璃指管中水解, Met 完全被破坏而在聚丙烯管的水解液中尚可测出(尽管它的含量低于理论值)。这是因为 Met 在玻璃指管中水解时, 约有 20% 氧化为 Met 的衍生物, 通过柱层析又有 65% 的衍生物不能收回^[4]。而用聚丙烯离心管水解, 由于聚丙烯管体积小, 加以操作简便, 与空气接触时间短, 所以 Met 被降解的也少, 回收率就提高。同样, 胰岛素和细胞色素 c 中的 Val 和胰岛素中的 Cys, 用聚丙烯离心管水解比用玻璃

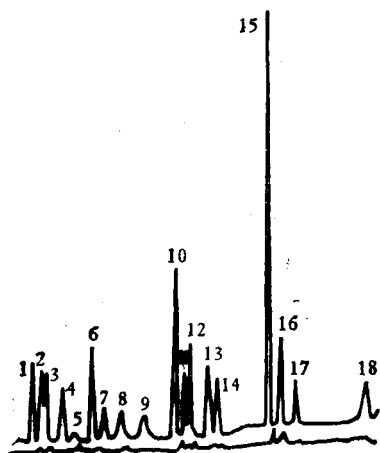


图 1 氨基酸标准液的柱层析色谱图

1. Asp, 2. Thr, 3. Ser, 4. Gly, 5. Pro, 6. Glu, 7. Ala, 8. Cys, 9. Val, 10. Met, 11. Ile, 12. Leu, 13. Tyr, 14. Phe, 15. His, 16. Lys, 17. NH₃, 18. Arg.

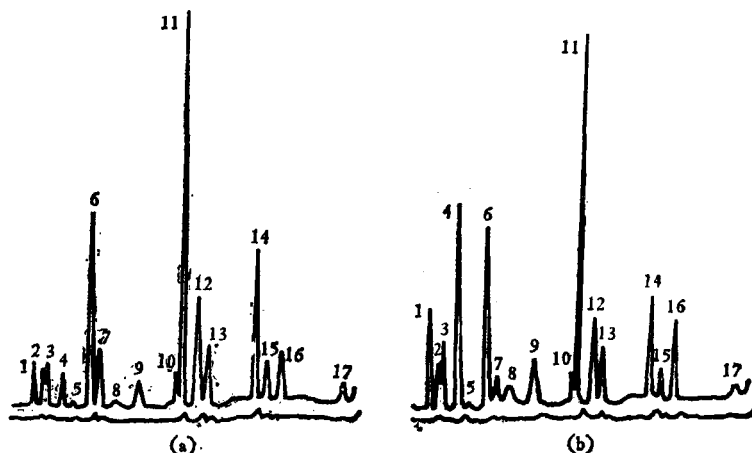


图 2 胰岛素水解液的柱层析色谱图

a. 玻璃指管水解。

b. 聚乙烯离心管水解。

1. Asp, 2. Thr, 3. Ser, 4. Gly, 5. Pro, 6. Glu, 7. Ala, 8. Cys, 9. Val, 10. Ile, 11. Leu, 12. Tyr, 13. Phe, 14. Lys, 15. His, 16. NH₃, 17. Arg.

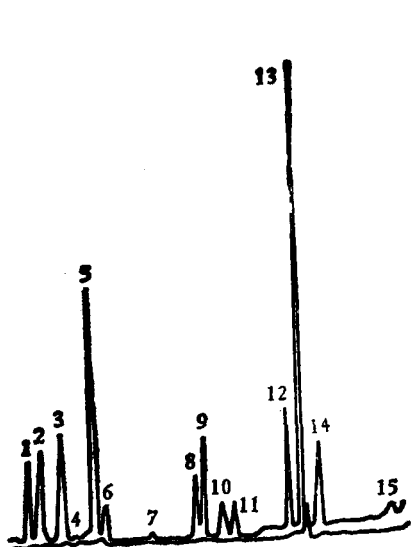


图 3(a) 用玻璃指管水解的细胞色素 c 柱层析色谱图
1.Asp, 2.Thr, 3.Gly, 4.Pro, 5.Glu,
6.Ala, 7.Val, 8.Ile, 9.Leu, 10.Tyr,
11.Phe, 12.Lys, 13.His, 14.NH₃, 15.Arg.

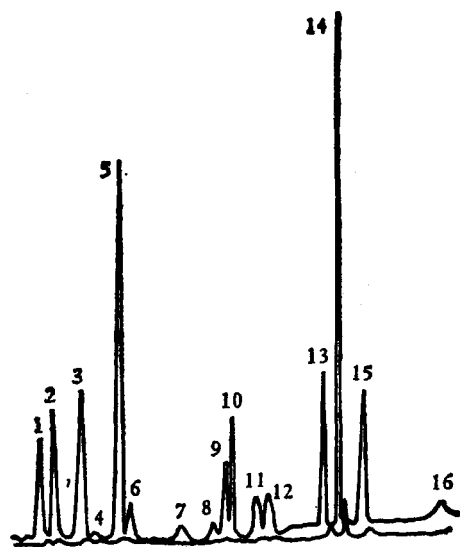


图 3(b) 用聚丙烯离心管水解的细胞色素 c 柱层析色谱图
1.Asp, 2.Thr, 3.Gly, 4.Pro, 5.Glu
6.Ala, 7.Val, 8.Met, 9.Ile, 10.Leu
11.Tyr, 12.Phe, 13.Lys, 14.His, 15.NH₃, 16.Arg.

表 1 胰岛素测定结果与理论值的比较
(克分子比值)

氨基酸	玻璃管水解结果	聚丙烯管水解结果	理论值 ^(*)
Asp	1.7	3.0	3.0
Thr	1.5	1.5	1.0
Ser	2.0	3.0	3.0
Glu	2.0	7.1	7.0**
Pro	1.2	1.1	1.0
Gly	4.1	4.3	4.0
Ala	3.4	2.8	3.0
Cys	0.7	1.5	3.0
Val	3.7	5.4	5.0
Ile	1.1	1.3	1.0
Leu	6.0	6.1	6.0
Tyr	4.0	3.7	4.0
Phe	3.2	3.2	3.0
His	1.2	1.3	2.0
Lys	1.1	1.0	1.0
Arg	1.0	1.0	1.0

** 为样品中 Glu 与 Gln 之和

表 2 细胞色素 c 测定结果与理论值比较
(克分子比值)

氨基酸	玻璃管水解结果	聚丙烯管水解结果	理论值 ^(*)
Asp	7.2	7.6	8.0*
Thr	9.9	10.1	10.0
Ser	0	0	0
Glu	11.6	11.7	12.0
Pro	2.8	3.9	4.0
Gly	11.5	11.5	12.0
Ala	5.5	5.5	6.0
Val	2.7	3.1	3.0
Met	0	0.6	2.0
Ile	5.4	5.3	6.0
Leu	5.9	5.7	6.0
Tyr	2.9	3.1	4.0
Phe	3.5	3.4	4.0
His	1.4	1.4	3.0
Lys	19.0	19.3	19.0
Arg	1.5	1.6	2.0

* 为样品中 Asp 和 Asn 之和

指管好。

文献记载^[5]聚丙烯熔点 176℃, 静弯曲强度 675kg/cm², 压缩强度 560kg/cm², 吸水率(24h) 0.03%, 内圆光洁度 △8, 并能耐受酸、碱、氯仿等有机溶剂。我们经过几十次反复试验也证实聚丙烯离心管在 110℃, 6N HCl 密闭条件下加热 24 小时, 均未发现有变形熔化等现象, 确保样品。所以用聚丙烯离心管代替玻璃指管用于蛋白质水解是一个比较简便实用的方法。

参 考 文 献

- [1] Blackburn, S. et al.: *Amino Acid Determination Methods and Techniques*, 2nd. ed., 1978, p61.
- [2] Beckman Instruction Company: *Beckman 119 CL Amino Acid Analyzer Instruction Manual*, 1977, P.4—2.
- [3] Beckman Instruction company: *Beckman 119 CL Amino Acid Analyzer Instruction Manual*, 1977, P.7—2, 3—1.
- [4] 方深高:《蛋白质化学讲义》, 上册, 1981, p.61.
- [5] 丁浩主编:《塑料加工基础》, 上海科学技术出版社, 1981, p.307.

[本文于 1984 年 10 月 15 日收到]

过 氧 化 物 酶 活 性 测 定

朱 展 才

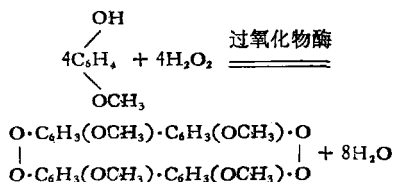
(南京粮食经济学院)

过氧化物酶是卟啉环中含有铁的蛋白质, 存在于所有的谷物中, 与谷物的呼吸作用有关, 是谷物品质变化的指标之一。

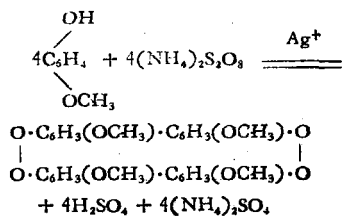
通常测定过氧化物酶活性的方法重复性不好。本文报道我们对下述方法[注1]的改进和发展, 实际应用证实, 改进的方法操作方便灵敏度高, 结果准确。

一、方 法 原 理

有过氧化物酶存在时, 愈创木酚能被过氧化氢氧化成四愈创木酚:



溶液呈橙色或橙红色。而在有银离子存在时, 愈创木酚也能被过硫酸铵氧化成四愈创木酚:



在 20℃ 条件下, 15 分钟以内, 过氧化物酶的活性和银离子的浓度是一致的, 因此, 根据银离子的标准曲线, 即可求出过氧化物酶的活性。

二、测 定 方 法

1. 标准曲线: 在一组 25ml 比色管中 (1—5 号), 分别加入硝酸银标准溶液 (0.0787g AgNO₃/100ml H₂O) 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0ml, 补加水至 8ml, 再加入 1 毫升 0.3% 愈创木酚, 混匀, 将试管浸入 20℃ 水浴中, 待试管内溶液达到 20℃ 后, 迅速地同时向各管加入 1ml 3% 过硫酸铵溶液, 立即摇匀并浸入 20℃ 水浴中, 15 分钟 (从加入过硫酸铵算起) 时, 立即同时加入 2.0 毫升 0.54N 硫酸并摇匀。在波长 475nm 处, 用 1 厘米比色槽, 以水做参比, 测定吸光度, 绘制标准曲线。

2. 过氧化物酶活性的测定: 称取 1—4 克 (视酶活性而定) 粉碎试样于 150ml 有塞三角瓶中, 加入 50ml 5% 硝酸钙 (或氯化钙) 溶液, 振荡 15 分钟后静置 20 分钟。过滤, 吸取滤液 1—8ml (视酶活性大小而定), 补加水至 8ml, 再加入 1ml 0.3% 愈创木酚, 摇匀并浸入 20℃ 的水浴中, 待试液达到 20℃ 后, 加入 1ml 0.05N 过氧化氢溶液, 立即摇匀并浸入 20℃ 水浴中, 从加入过氧化氢时算起, 15 分钟后准时立即加入 2ml 丙酮并摇匀, 然后测定吸光度 (颜色物同上述标准液一样在一段时间内稳定)。用此吸光度在标准曲线上找出相当的

(下转第72页)