

为异构化过程，第二步按吡唑法测果糖含量。异构酶每活计算公式为：

GIU (国际酶活单位)/毫升(酶量)

$$= \frac{\text{反应总体积(毫升)} \times \text{微克/毫升(果糖量)} \times \text{稀释倍数}}{1.5 \text{ 毫升(酶量)} \times 180.17 \text{ (果糖量)} \times \text{反应时间(分)}}$$

本法的特点是：精密度较好，相对偏差为千分之

三，它克服了高渗法在遇到酶活力高的样品(例如半纯化的酶制剂)时不易测准的缺点，分析所需时间短，采用国际酶活计量。

[本文于 1980 年 10 月 20 日收到]

# 蛋白质样品水解方法的改进 ——盐酸水解中一种新保护试剂

徐 秀 璋

(中国科学院生物物理研究所)

在蛋白质样品水解过程中，如何减少氨基酸的损失，以获得精确结果，是大家非常关心的问题。目前用得最广泛的盐酸水解法使色氨酸全部破坏，苏氨酸、丝氨酸等也受到部份破坏。

近十年来，科学工作者对蛋白质样品的水解条件及方法进行了大量研究，如 Liu 和 Chang 的磺酸水解

法<sup>[1]</sup>，Matsubara 和 Sasaki 用盐酸加少量巯基乙酸等作为保护剂水解法<sup>[2]</sup>以及酶水解法<sup>[3]</sup>，碱水解法<sup>[4]</sup>等。这些方法各有所长，但也都存在某些不足。

另外，在水解中，由于色氨酸或样品中的碳水化合物等的破坏，产生有色素的分解产物，就会干扰氨基酸的正常测定，所以水解脱色也常被人们关注<sup>[5]</sup>。

表 1 用不同方法水解溶菌酶测定的氨基酸含量的比较  
(单位：氨基酸克分子数/1克分子溶菌酶)

| 氨基酸名称 | 溶菌酶 I            |                 | 溶菌酶 II           |                 | 文献值                                              |                   |                                 | 理论值<br>(残基数) |
|-------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------|
| 水解方法  | 盐酸<br>巯基乙醇<br>草酸 | 盐酸<br>巯基乙酸<br>酚 | 盐酸<br>巯基乙醇<br>草酸 | 盐酸<br>巯基乙酸<br>酚 | 3NP-甲苯<br>磺酸内含3-(<br>2-乙氨基)<br>吡啶 <sup>[1]</sup> | 盐酸 <sup>[1]</sup> | 盐酸 <sup>[2]</sup><br>2%巯基<br>乙酸 |              |
| 门冬氨酸  | 21.1             | 20.5            | 21.3             | 20.5            | 21.4                                             | 21.4              | 21.1                            | 21           |
| 苏氨酸   | 6.9              | 6.5             | 6.8              | 6.8             | 6.95                                             | 6.75              | 7.35                            | 7            |
| 丝氨酸   | 9.0              | 7.9             | 9.0              | 5.9             | 10.3                                             | 8.87              | 9.77                            | 10           |
| 谷氨酸   | 5.2              | 5.4             | 4.5              | 5.2             | 4.90                                             | 4.84              | 4.98                            | 5            |
| 甘氨酸   | 12.0             | 12.1            | 12.1             | 12.0            | 11.9                                             | 12.1              | 12.1                            | 12           |
| 丙氨酸   | 12.0             | 11.9            | 12.1             | 12.0            | 12.0                                             | 12.0              | 12.2                            | 12           |
| 半胱氨酸  | —                | —               | —                | —               | 7.64                                             | 7.36              | —                               | 8            |
| 缬氨酸   | 5.9              | 6.1             | 5.7              | 5.7             | 4.73                                             | 5.59              | 3.87                            | 6            |
| 甲硫氨酸  | 1.9              | 2.2             | 1.8              | 1.7             | 1.95                                             | 1.89              | 1.93                            | 2            |
| 异亮氨酸  | 6.0              | 6.1             | 5.5              | 5.4             | 4.71                                             | 5.78              | 4.52                            | 6            |
| 亮氨酸   | 8.4              | 8.4             | 7.8              | 7.8             | 7.75                                             | 7.84              | 7.65                            | 8            |
| 酪氨酸   | 2.8              | 2.9             | 2.9              | 3.9             | 2.96                                             | 2.94              | 3.24                            | 3            |
| 丙苯氨酸  | 3.4              | 3.6             | 2.9              | 3.3             | 2.81                                             | 2.91              | 2.90                            | 3            |
| 赖氨酸   | 5.8              | 5.8             | 5.9              | 5.9             | 6.0                                              | 6.0               | 6.08                            | 6            |
| 组氨酸   | 0.8              | 0.8             | 1.0              | 0.9             | 1.0                                              | 0.6               | 1.00                            | 1            |
| 色氨酸   | 5.5              | 10.8            | 4.1              | 10.5            | 5.5                                              | —                 | 5.04                            | 6            |
| 精氨酸   | 11.2             | 11.2            | 11.1             | 10.9            | 11.3                                             | 9.01              | 10.9                            | 11           |
| 脯氨酸   | 1.4              | 1.9             | 1.6              | 1.5             | 1.84                                             | 2.06              | 6.33                            | 2            |

[1] Liu, T. Y. and Chang, Y. H.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842-2848, 1971.  
[2] Matsubara, H. and Sasaki, R. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 175, 1969.

表 2

| 水解后样<br>品颜色<br>水解条件 | 样品<br>名称 | 溶 菌 酶      | 纤维素酶抑制剂     | 蜂 王 浆       |
|---------------------|----------|------------|-------------|-------------|
| 盐酸+巯基乙醇+草酸          |          | 液体无色;有白色沉淀 | 液体无色;有白色沉淀  | 液体无色;有白色沉淀  |
| 盐 酸                 |          | 淡 黄 色      | 淡 黄 色       | 液体淡黄色;有黑色沉淀 |
| 盐酸+巯基乙酸+酚           |          | 浅桔黄色       | —           | 液体淡黄色;有黑色沉淀 |
| 盐酸+酚                |          | —          | 液体桔黄色;有黑色沉淀 | 同 上         |
| 水解前                 |          | 无 色        | 淡 黄 色       | 无 色         |

这里介绍一种用盐酸加少量巯基乙醇和草酸为保护试剂的水解方法,它能保护色氨酸和其他氨基酸不被氧化,并具有明显的脱色效果。具体方法如下:

溶菌酶 I: 英国 (Koch-Light) 进口。

溶菌酶 II: 中国科学院生物化学研究所东风生化试剂厂生产。

巯基乙醇和巯基乙酸: 西德 (E.Merck) 产品。

草酸(国产分析纯)溶液 (100 毫克/毫升)和酚(国产分析纯)溶液 (50 毫克/毫升)均用去离子水配制。

5.7N 盐酸 日制 (キシゲ化学株式会社) 优级浓盐酸加等体积去离子水重蒸三次。

称取溶菌酶 I 4.4 毫克,加 5.7N 盐酸 4.4 毫升,搅拌溶解后,分别取 1.0 毫升移入四个水解管中,其中 1、2 两管、用微量注射器再加 20 微升巯基乙醇和 10 微升草酸溶液,3、4 两管各加 20 微升巯基乙酸和 10 微升酚溶液,然后将四个水解管置于冰中冷冻,抽真空封口。并在 110℃ 水解 24 小时。

并按上述方法水解溶菌酶 II

水解后,开管,真空干燥。残物加 0.02N 盐酸溶解,最后浓度为每毫升约 150 微克酶量,并进行分析。

氨基酸种类和含量分析是在日立 835-50 型自动氨基酸分析仪上完成的。分析条件除四号柠檬酸钠型缓冲液中多加 7 毫升(总共 12 毫升)苯甲醇(为使色氨酸与精氨酸分开)外,其他与该仪器说明书提供的条件一致。

表 1、表 2 和图 1、图 2 是所得到的实验结果;表 1 还附有理论值和有关方法的文献值。从表 1 可见,用盐酸加少量巯基乙醇和草酸水解溶菌酶 I、II,色氨酸的回收率分别达到 90% 和 70%;造成这一差异可能与样品本身的纯度有关。除半胱氨酸外,其他氨基酸的残基数与理论值相接近。如果在水解前,用过甲酸氧化处理<sup>[6]</sup>,使胱氨酸(或半胱氨酸)氧化成稳定的半胱磺酸(峰的位置在门冬氨酸前),就能定量测定半胱氨酸的值。

在盐酸水解中,用巯基乙酸<sup>[5]</sup>或用巯基乙酸和酚<sup>[7]</sup>作保护剂,在图谱上均出现假峰(见图 2)这

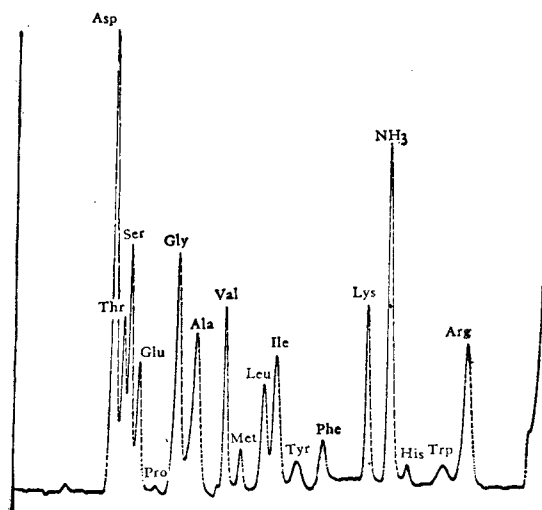


图 1 盐酸加巯基乙醇和草酸水解溶菌酶 I

上机浓度 0.546 毫微克分子/50 微升

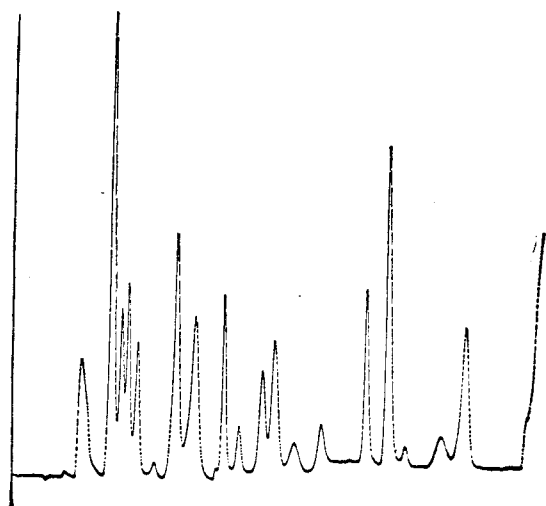


图 2 盐酸加巯基乙酸和酚水解溶菌酶 I

上机浓度 0.516 毫微克分子/50 微升,左第一峰为假峰,其它各峰的氨基酸名称与图 1 相同

是—SH 转化为相应的衍生物造成的,而用巯基乙醇和草酸作为保护剂水解就无此现象。单独用盐酸或用盐酸加草酸水解,结果均无假峰出现。这说明在水解中,胱氨酸主要是形成了半胱氨酸,而半胱氨酸与茚三酮反应不生成颜色<sup>[8]</sup>,因而测不出来,在图谱上也就没有表示。从水解溶菌酶的结果看,用巯基乙醇和草酸作为保护试剂要比用巯基乙酸或用巯基乙酸加酚为保护试剂所得到的各氨基酸回收率好。至于用盐酸加巯基乙酸和酚水解,测定的色氨酸量为什么高于理论值许多,有待今后研究。

从表 2 可看出,本方法具有明显的脱色效能。实验证明,对含有碳水化合物或其他容易成色的天然生物材料如甜菜、谷物等也具有一定的脱色作用。巯基乙醇是容易被氧化的酸性物质,当水解样品中含有氧或其他氧化物时,巯基乙醇能首先和它们起反应,从而起到保护氨基酸不被氧化的作用。草酸虽也有一定的保护作用,但在这里主要起脱色作用。因此水解液中的巯基乙醇和草酸的含量可根据水解样品的情況适当增减。如对于谷物等含有较多碳水化合物的样品就应加大巯基乙醇和草酸的量。

近年来,磺酸水解法已越来越被人们所重视。如表 1 中所示,用磺酸水解,苏氨酸,丝氨酸和色氨酸等的回收率接近理论值。但此方法操作比较复杂<sup>[1]</sup>,且试剂较不易得。而选用巯基乙醇和草酸作为盐酸水解中的保护试剂,不仅具有磺酸水解的类似优点,而且取材容易,操作比较简便,脱色效果较好,因此在蛋白质样品的水解方法中是可供采用的一种较好的方法。

## 参 考 文 献

- [1] Liu, T. Y. and Chang, Y. H.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842, 1971.
- [2] Matsubara, H. and Sasaki, R. M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 175, 1969.
- [3] Castel, A. et al.: *J. Chromatogr.*, **174**, 474, 1979.
- [4] Hugli, T. E. and Moora, S.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 2828, 1972.
- [5] James, L. B.: *J. Chromatogr.*, **68**, 123, 1972.
- [6] Albert, Light: *Amino Acids Peptides and Proteins*, 162, 1974.
- [7] Salmkom, et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 1480, 1973.
- [8] 潘家秀等:《蛋白质化学研究技术》,第 77—78 页,1973 年。

[本文于 1980 年 12 月 27 日收到]



(上接第 31 页)

这种电池可连续地输出稳定的光电流。

## 结 语

生物化学电池,大多存在电流小、不稳定等弱点,因而距实用还有一定的距离,但从长远看,只要进一步弄清生化反应和电化学反应的机理及其关系,同时积极寻找新的生物催化剂、电极材料,改进电池的结构等,研制出有实用价值的生物化学电池的前景是存在的。

## 参 考 文 献

- [1] H. J. 李姆著,徐浩译:《工业微生物学》科学出版社,1975 年,第 552 页。
- [2] 铃木周一等:《化学と生物》,**12**, 155, 1974。
- [3] 高桥不二雄等:《工化誌》**73**, 62, 66, 1970。
- [4] Allen, M. J. et al.: *Electrochim. Acta*, **11**, 1, 7, 15, 1966.

- [5] 水口等:電化協会第 29 回大会講演发表,1962,水口:電化,30,636,1962。
- [6] 古货布村:第 4 回電池讨论会要旨集, p49, 1963。
- [7] 匕字三郎著:《微生物工学の応用》,1972,196—198,共立出版株式会社。
- [8] 鈴木周一:《醗酵協会誌》, **26**(7),297,1968。
- [9] Karube, I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **444**,338, 1976。
- [10] 押田勇雄:《化学と生物》, **1**, 126, 1963。
- [11] Berk, R. S. et al.: *Appl. Microbiol.*, **12**, 10, 1962。
- [12] J. Brake et al.: *Chem. Eng. News*, **42** (17), 93, 1964。
- [13] Konikoff, J. J. et al.: *U. S. Gov. Res. Rept.*, **38**, 44, 1936。
- [14] Tien, H. et al.: *Nature*, **227**, 1232, 1970。
- [15] Fong, F. K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 2287, 1976。
- [16] 鈴木周一、相沢益男:《化学工業》, **30**(4), 58, 1979。
- [17] 相沢益男、鈴木周一:《高分子金属錯本》(畑英俊编),化学同人,1978。

[本文于 1981 年 2 月 10 日收到]