

或 $\infty-0$ 的消光值,光源就须有较高的单色性。由朗伯-比尔定律:

$$E = \lg I_0/I = KCL \quad (5)$$

如果入射光 I_0 由特征光 I_{λ_0} 和杂色光 I'_0 组成,则有

$$E = \lg (I_{\lambda_0} + I'_0)/(I_{\lambda_0} + I'_0 - \Delta I_{\lambda}) \quad (6)$$

样品物质对入射光的吸收量 ΔI_{λ} 只能由特征光 I_{λ_0} 提供。随着样品浓度的增高,吸收量 ΔI_{λ} 也随之增大,当样品溶液的浓度增高到某值,接近 $\Delta I_{\lambda} = I_{\lambda_0}$ 时, (6) 式成为:

$$E = \lg (I_{\lambda_0} + I'_0)/I'_0 = G (\text{常数}) \quad (7)$$

此后,即使样品浓度再增高, E 值也不再有了变化了。 $G-\infty$ 区间称为死区或不灵敏区域。此时

在记录仪上出现平顶峰。光源的单色性越差, I'_0 所占的比例越大。死区就越宽。

在我们的试制工作中曾得到上海生化研究所章蔚娟,刘爱琴等同志的热情帮助,本所徐敬发同志负责完成了大部分机械加工工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 徐晓利:《生物化学工具》,人民卫生出版社,1980年8月版。
- [2] 史致德:《光电管与光电倍增管》,国防工业出版社,1981年1月版。
- [3] 刘培楠、梁植权等:《分析仪器及其在分子生物学中的应用》,科学出版社,1978年6月版。

[本文于1982年10月22日收到]

简易固相微量蛋白顺序仪

徐佐杰 俞鹤年

(上海生物化学研究所)

前文^[1]介绍了用 Edman 降解原理设计的固相蛋白质顺序测定仪。该仪器简便实用,但所需样品量较大(100—200 毫微克分子),往往不能满足超微量的测定。现改用 4-N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸苯酯(DABITC)试剂,并对原仪器中的管道系统重新设计,改进后的仪器可测定 10—30 毫微克分子的胰岛素 B 链及肌红蛋白 N 端的 20 个左右氨基酸残基的排列顺序。每天可鉴定 3—4 个氨基酸残基的顺序。具有结构简单成本低,操作维修方便之优点。

仪 器 与 试 剂

改进后的仪器所采用的各部件同原仪器,只是管道系统作如下改变:即将碱性的缓冲液管道和裂解用的三氟醋酸管道分别用二个贮液瓶的淋洗液(甲醇)隔绝,以避免生成盐。玻璃样品柱长度改为 4 厘米,并紧缩了各管道长度,详见图 1。

仪器所用试剂均同前文。另加 DABITC

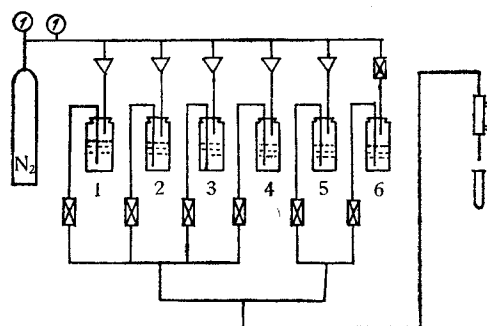


图 1 流程示意

1. 甲醇 2. 异硫氰酸苯酯 3. 有色试剂
4. 缓冲液 5. 三氟醋酸 6. 甲醇

试剂(为中国科学院上海生化所附属东风试剂厂产品)重结晶一次。裂解后的 DABTH-氨基酸用国产聚酰胺薄膜鉴定。

操 作 步 骤

1. 将 10—30 毫克(包括载体重量)待测样品装入玻璃柱。并将甲醇、异硫氰酸苯酯(溶于 DMF*, 浓度为 5%), DABITC 试剂(溶于 DMF,

* 二甲基甲酰胺。

浓度为 1mg/1ml), 缓冲液(N-甲基吗林:水:吡啶 = 58:34:60, 用三氟醋酸调至 pH8.4) 以及三氟醋酸分别装入各瓶中, 通氮气半小时后密封。将氮压调至 0.5kg/cm²。反应温度控制在 50℃。

2. 按表 1 依次开启各手控阀, 便可进行微量顺序测定。平均每降解一个氨基酸残基大约需要 130 分钟。

3. 将收集之试液在 50℃ 下用氮气吹干, 然后加数滴 40% 三氟醋酸在 50℃ 保温 50 分钟。再用氮气吹干, 使三氟醋酸挥发干净, 然后再加二滴无水乙醇, 待溶解后便可在聚酰胺薄膜上点样。所用溶剂系统第一相为 33% 冰醋酸, 第二相为甲苯:冰醋酸:正己烷 = 2:1:1。第一相展层后必须吹干。第二相展层后用盐酸蒸气熏

表 1 操作次序

次序	试剂与溶剂	时间(分)	流量(ml)	处 理
1	甲 醇 (I)	3	2	弃
2	有色试剂	50	3	弃
	缓 冲 液	50	3	
3	异硫氰酸苯脂	20	3	弃
	缓 冲 液	20	3	
4	甲 醇 (I)	10	6	弃
5	甲 醇 (II)	10	6	弃
6	三氟醋酸	10	1.5	收集
	三氟醋酸手控充氮阀间歇开三次			
7	甲 醇 (II)	3	3	收集

蒸, 便可观察到相应层析点图谱, 见图 2。

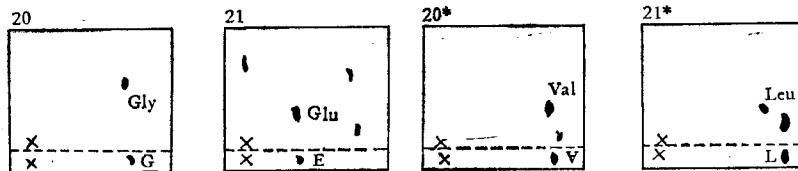


图 2

胰岛素 B 链 20 步甘氨酸 (Gly) 21 步谷氨酸 (Glu)
G——标准甘氨酸 E——标准谷氨酸
肌红蛋白 20* 步缬氨酸 (Val) 21* 步亮氨酸 (Leu)
V——标准缬氨酸 L——标准亮氨酸

讨 论

对偶合反应后的淋洗溶剂与裂解反应后的收集溶剂(均为甲醇)分别贮存, 分二路进入样品柱, 有利于隔绝偶合及裂解试剂, 避免生成盐而影响测定。整个管道系统及贮液瓶需彻底清洗并通氮气吹干。三氟醋酸有不同来源和批号, 事先须经选择并精馏, 因其质量优劣对微量测定肽链的长度影响很大。各溶剂、试剂的纯度要求亦较常量测定为高^[2]。使用国产试剂本仪器一般可测定 20 个氨基酸残基的顺序。

20 个残基以后, 由于固相载体在反应过程中逐渐剥落, 出现杂点, 但仍可区别主要层析点位置至 30 个残基左右。

本工作得到戚正武教授支持和指导, 周元聪同志提出宝贵意见, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 徐佐杰等:《生物化学与生物物理进展》, 2, 52, 1981。
- [2] 俞鹤年等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 41, 1981。

【本文于 1982 年 10 月 6 日收到】