

应用磺酸水解法进行人血白蛋白氨基酸组成分析

赵宗建

(吉林大学分子生物学系, 长春)

赵宗英

(长春市粮科所)

磺酸对色氨酸无破坏作用, 因此, 磺酸水解蛋白质可以同时测定出色氨酸。但, 磺酸溶液制备比较繁琐, 因此, 至今在我国尚无人使用。本文用对甲苯磺酸法^[1]水解人血白蛋白, 用氨基酸自动分析仪进行其氨基酸组成分析, 其结果与理论值基本相符^[2]。

材 料 与 方 法

1. 样品 人血白蛋白(光谱纯), 自制。

2. 仪器 日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。

3. 试剂(均用重蒸水配制)

3mol/L 对甲苯磺酸溶液: 每 100ml 加色胺(光谱纯)0.2 克。

稀释液: 取 1.66 毫升浓盐酸 (GR) 于 1000 毫升的容量瓶中, 用重蒸馏水定容至刻度。

4. 人血白蛋白的水解^[3,4]

精确称取人血白蛋白 5 毫克, 加 3mol/L 对甲苯磺酸溶液 10 毫升, 在液氮内速冻, 抽真空 30 分钟后封管。然后于 110℃ 烘箱中水解 24 小时。水解后加 3mol/L 氢氧化钠溶液 10 毫升, 再用旋转蒸发器在 60℃ 水浴条件下蒸干, 用重蒸馏水重复洗沉淀三次后加稀释液 30 毫升。从中取出 2 毫升蒸干, 加 0.01mol/L 氢氧化钠溶液 1 毫升, 然后于室温下放置 5 小时, 再

表 1 人血白蛋白氨基酸组成分析条件

分析条件	参 数
层析柱 内 径	2.6mm
柱 高	105mm
离子交换树脂	2619# (日立株式会社)
分析时间	72min
缓冲液流速	0.225ml/h
茚三酮流速	0.30ml/h
柱压	80—130kg/cm ²
茚三酮泵压	15—35kg/cm ²
缓冲液改变次数	5
柱温	53℃
样品进样量	50μl
标样进样量	3nmol/50μl
氮气压力	0.28kg/cm ²

蒸干后加稀释液 2 毫升, 用氨基酸自动分析仪测定。

5. 分析条件^[1](详见表 1)

结 果 与 讨 论

表 2 人血白蛋白氨基酸收率

氨基酸名称	理论值 ^[2]	实验测定值	百分比收率
ASP	53	54.08	102
Thr	28	28.02	100
Ser	24	23.91	99
GLu	82	83.06	101
GLy	12	12.21	102
ALa	62	62	100
Cys	35	32.08	92
Val	41	41.99	102
Met	6	6.09	102
Zle	8	7.87	98
Leu	61	61.96	102
Tyr	18	17.64	98
Phe	31	30.89	100
Lys	59	60.07	102
His	16	16.07	100
Trp	1	0.88	88
Arg	24	24.97	104
Pro	24	25.02	104
总平均偏差			2.5
总平均收率			105

注: 实验值为 3 批平行实验的平均值。

1. 由表 2 可见, 在该水解条件下, 大多数氨基酸的收率均在 98% 以上, 总平均收率为 105%, 平均偏差为 2.5%, 这说明该方法是完全可行的。

2. 通常使用的盐酸水解法, 由于色氨酸全部氧化变为腐黑质而无法测定, 蛋氨酸最高收率仅达 85%, 酪氨酸也仅为 90% 左右。但在此法中色氨酸收率达到 88%, 蛋氨酸收率达到 102%, 酪氨酸收率也达到 98%, 这在以前报道的方法中是少见的。

综上所述, 该水解方法具有简便易行, 可同时测定 18 种氨基酸, 因此, 有推广应用价值。

(下转第 301 页)

图形发生器中控制对比度的外部接口上,使事先调好的一个光栅图像以一定对比度呈现出来;同时,将一个视觉生理刺激参量——光栅的取向值($0^{\circ}\sim 360^{\circ}$)转变成 10 比特的数字信号,然后由 8255 并行接口输出到图形发生器的取向外部接口上,使光栅呈一定取向,同时计数器 II 开始计数。相继地每 10 毫秒(或其它值,由计数器 IV 定时)将计数值移入保持寄存器中,再由 CPU 读数。由于每次转移和读数都不中断计数,新转移的值不断将保持寄存器中的旧值覆盖,一直到完成规定的次数,故每次读数都是从开始计数到读数时的累积值,需作一次减法运算才能转换成每 10 毫秒的脉冲数。另外,因为 IBM 数据总线为 8 比特而寄存器都是 16 比特,故赋值和读数都分为两步,即先作低 8 位比特后作高 8 位比特。读数值为 BCD 进制,需用一个函数转换成十进制数。

4. 记录一定次数后,停止计数和刺激,由计数器 V 延时并作部分数据处理,等待神经系统恢复。

5. 改变刺激参量(例如光栅取向),重复 2、3、4 步。待全部刺激参量作完后,再回到第一个刺激参量进行第二次循环,一直循环 N 次(作 N 次迭加)。

6. 进行数据处理:对于每个刺激参量,将各次循环中同一时间间隔内的发放速率减去各次的自发速率后分别进行迭加,得到脉冲密度序列直方图,通过屏幕显示出来。我们采用产生随机数的方法使不同刺激参量的刺激在各次循环中出现的次序是随机的,再经过迭加,使每个参量刺激基本作用在相同的生理状态下,有效地减小了系统涨落的影响,这种方法国外叫作复直方图法 (Multihistogram Method)^[4]。最后,将数据移存到软盘中和进行结果打印。

(上接第 316 页)

参 考 文 献

- [1] Matsubara, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969, **35**, 175.
- [2] T. Y. Liu, et al.: *J. Biol. Chem.* 1971, **246**, 2842.
- [3] B. A. Lang, et al.: *Experientia*, 1979, **35**(3), 316.

讨 论

本系统的最大优点就是刺激参量与反应之间的精确定量和完全的、可多次重复的计算机操作。它的适用性并不限于视觉神经电生理的范围。例如,只要把刺激器改为听觉刺激器,刺激参量改为频率或方向,就可完全类似地进行听觉中枢的单细胞研究,也可由 A/D 采样进行各种慢电位的研究和波形分析,还可以进行动物行为的训练等等。但使用这一系统也有个条件,就是刺激器要有可从外部用模拟量或数字量进行控制的接口,即应能与计算机联机,否则,将不能作到完全自动化。

最近,IBM 机以及国内的同类机如长城 0520 和 DS-PC 等在国内越来越普及,价格也较便宜,使用单板机的控制由于不能同时进行复杂的计算处理而具有很大的局限性;对于非实时的磁带机记录加计算机采集,由于没有同步的刺激控制以及不能迅速反馈采集处理结果,无法与实时的微机采集-控制系统媲美;就微机来讲,一度流行的 APPLE-II 型微机除了内存小速度慢外,配套的软硬件也已很少发展,处于被淘汰地位。由此看来,兼有多路采集和控制以及高速计算和迅速反馈功能的 IBM 系列微机及采集板构成的实时采集-控制系统实为未来实验科学研究之利器。

本工作得到国家自然科学基金和中国科学院研究生基金的支持。

参 考 文 献

- [1] 陈洪文等:《生物化学与生物物理进展》,1984,(4), 50.
- [2] 余敏忠:《生物化学与生物物理进展》,1985,(6), 66.
- [3] 陈俊强:《生理科学进展》,1986, **17**(1), 66.
- [4] Henry, G. H. et al.: *Vision Res.*, 1973, **13**, 1771.

[本文于 1987 年 6 月 29 日收到]

- [4] 赵宗建:《氨基酸杂志》1987,, 总第 33 期, 21.
- [5] 张今,赵宗建:《高等学校化学学报》1985, **6**(4), 376.
- [6] *Instruction Manual for the Model 835 Highspeed Amino Acid Analyzer*, Hitachi Ltd., Tokyo Japan, 74. 1979.

[本文于 1987 年 7 月 8 日收到]