

三硝基苯磺酸(TNBS)用于氨基酸及 谷物蛋白质中赖氨酸的测定

中国科学院上海生物化学研究所四室

随着农业学大寨群众运动的进一步开展,农业战线的形势越来越好。谷物品种不断改良,产量和质量都有明显地提高。因此,很多单位都希望能提供一种简便的生化方法来测定谷物的营养价值。赖氨酸是重要的必需氨基酸之一,它在谷物中含量常常作为营养价值的主要指标。本文介绍了一种测定谷物蛋白质中赖氨酸含量的简便易行的方法。它不需要象氨基酸自动分析仪那样的贵重仪器,所需主要试剂——三硝基苯磺酸(TNBS),已在上海生化研究所东风生化试剂厂开始生产。因此在一般农业科技单位都能推广。

各行各业都要支援农业,我们欢迎今后能有更多这样的稿件。

编者

赖氨酸是体内重要的必需氨基酸之一,它在谷物中的含量常作为营养价值的主要指标。随着农业学大寨运动的深入发展,谷物品种不断改良,以求产量与质量明显地提高。因而寻找一简便易行的方法,以测定谷物中赖氨酸的含量,已成为农业战线上急待解决的问题之一。使用国外氨基酸自动分析仪虽然可测定赖氨酸含量,但费用昂贵,操作复杂,而且也无必要作全部氨基酸的分析,很难在国内推广。为此,我们介绍三硝基苯磺酸的方法,测定面粉中赖氨酸的含量,与离子交换树脂柱层析法比较,两者测得结果相近。此法无需复杂的仪器设备,并能同时测定较多样品,便于基层农业科技单位推广采用。

三硝基苯磺酸(TNBS)除用于谷物蛋白质中赖氨酸的定量测定外,也是定量测定氨基酸的重要试剂。它具有与茚三酮相当的灵敏度,且操作简便,无需添加有机溶剂或特殊处理,也不易受游离氨,尿素等外界因素的干扰,值得推广。本文还探讨了 SO_3^- 对 TNBS 显色反应的影响,

加入适量的 SO_3^- ,可使灵敏度提高一倍以上,从而提供了一种简便易行、灵敏度又高于茚三酮法的氨基酸定量方法。

一、TNBS 与氨基反应的特性及其应用

1. TNBS 的制备

先制备三硝基氯苯。取 25 克苦味酸与 50 克五氯化磷混合,于沸水浴中加热搅拌。由于反应时本身发热,固体开始熔化,此时可停止加热。继续搅拌,最后全部呈暗褐色。将反应物倾入大量冰水中,即产生褐色稠状沉淀。过滤并用冷水洗涤。干燥后将粗制品溶于甲醇,活性炭脱色,加水或 1N HCl 使析出,过滤即得三硝基氯苯,熔点 83°C ,得率 85%。

取上述制备的三硝基氯苯 15 克溶于 60 毫升经镁条处理过的无水甲醇,于三颈瓶中分批加入无水 NaHSO_3 粉末 50 克,于 $50-60^\circ\text{C}$ 水浴中回流搅拌 1.5 小时。反应后溶液呈棕褐色。产物 TNBS 溶于甲醇,置换下来的 NaCl 及未作

用的 NaHSO_3 不溶于甲醇可过滤除去。沉淀用甲醇洗涤数次, 洗涤液与滤液合并后用活性炭脱色。然后用 2N HCl 将 pH 调至 1—2, 减压浓缩, 即得微黄色 TNBS 结晶, 得率 50%。在 1N HCl 中重结晶一次。由于产品部分成钠盐, 不能测熔点。但此钠盐产品并不影响使用。若欲除去钠盐可将产品再通过 H 型阳离子柱, 由于 TNBS 不吸附可用水洗脱, 钠离子则被交换在柱上。由此所得的 TNBS 为白色含一结晶水的针状结晶, 熔点 186°C 。保存于棕色瓶内。我所东风生化试剂厂已开始生产。

2. ϵ -TNP (ϵ -三硝基苯)-赖氨酸的合成及其光学特性

为了了解 TNP-氨基酸的光学特性及 TNBS 与赖氨酸上 α 或 ϵ 氨基反应的异同, 以及作为在谷物蛋白质中赖氨酸测定时的标准曲线, 特制备 ϵ -TNP 赖氨酸。

取 280 毫克 α -N-苄氧羰酰-赖氨酸 (1 毫克分子) 溶于 15 毫升 4% NaHCO_3 , 加入 400 毫克 TNBS, 于 40°C 保温 2 小时。反应后用 2N HCl 调 pH 至 1—2, 即产生 α -N-苄氧羰酰- ϵ -TNP

赖氨酸黄色沉淀。过滤后将沉淀溶于乙酸乙酯, 此有机溶液用 pH 1 的水洗涤数次以除去未作用的 α -N-苄氧羰酰-赖氨酸。然后用固体无水硫酸钠干燥, 过滤后减压浓缩至小体积, 加过量石油醚使析出。此沉淀经真空干燥后溶于 6 毫升含 36% HBr 的冰醋酸溶液中, 在 30 — 40°C 水浴上振摇半小时以脱去苄氧羰基。反应结束后减压浓缩至干, 加无水甲醇使溶, 再减压浓缩以除去 HBr 及冰醋酸。如此反复数次, 最后加乙醚使沉淀析出。产物再溶于少量 pH 1—2 的水溶液, 然后用乙酸乙酯抽提 2—3 次以除去少量未去苄氧羰基的杂质, 水相再减压浓缩, 即得层析纯的黄色 ϵ -TNP-赖氨酸结晶*, 熔点 196°C , 得率约 50%。将上述 ϵ -TNP-赖氨酸配成 $0.5 \times 10^{-3}\text{M}$, 取 0.6 毫升 (0.3 微克分子), 分别加 4% NaHCO_3 或 1N HCl 各一毫升, 最后用水各补充至 4 毫升, 在 SP-1800 紫外分光光度计上自动扫描记录 (见图 1)。在碱性条件下吸

收峰波长在 352 毫微米处, 并在 420 毫微米附近有一小峰。在酸性条件下峰形上大致相重叠, 但略为紫移。光吸收也略低。其它 TNP-氨基酸在酸溶液中吸收峰有所紫移, 由约 350 毫微米移至约 340 毫微米, 因而一般 TNP-氨基酸在酸性条件下都在 340 毫微米处测定。

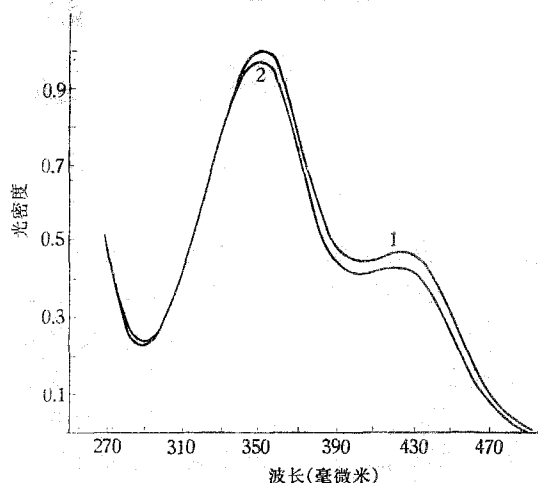


图 1 ϵ -TNP-赖氨酸的紫外全波吸收

曲线 1: 取 0.3 微克分子 ϵ -TNP-赖氨酸于 1 毫升 4% NaHCO_3 中, 用水补充至 4 毫升, 在 SP-1800 紫外分光光度计上扫描记录。

曲线 2: 取 0.3 微克分子 ϵ -TNP-赖氨酸于 1 毫升 4% NaHCO_3 中, 加 1N HCl 1 毫升酸化, 然后仍补充至 4 毫升, 紫外测定。

按上述条件取 0.1—0.5 微克分子 ϵ -TNP-赖氨酸, 加 1N HCl 1 毫升, 最后体积为 4 毫升, 在 340 毫微米下测定光吸收 (见图 2, 曲线 1)。光密度至 1.5 仍呈很好的线性关系, 由此算得克分子消光系数为 1.32×10^4 。其它 α -TNP-氨基酸衍生物的克分子消光系数数据文献报道也在 1.3 — 1.4×10^4 之间, 这说明赖氨酸上 ϵ -氨基与其它氨基酸上 α -氨基一样能与 TNBS 起等当量反应。

若 ϵ -TNP-赖氨酸再与 TNBS 反应, 所生成的 α, ϵ -双 TNP-赖氨酸在酸性溶液中沉淀析出, 因而不能测定。

3. TNBS 与氨基酸反应的特性

当 TNBS 在偏碱性下与氨基酸反应时, 先形成一帶有等克分子 SO_3^- 的中间络合物, 如下

* α -N-苄氧羰酰-赖氨酸由本所一室多肽合成组提供。

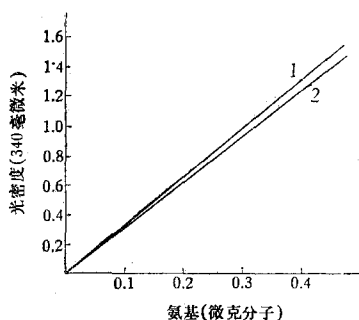
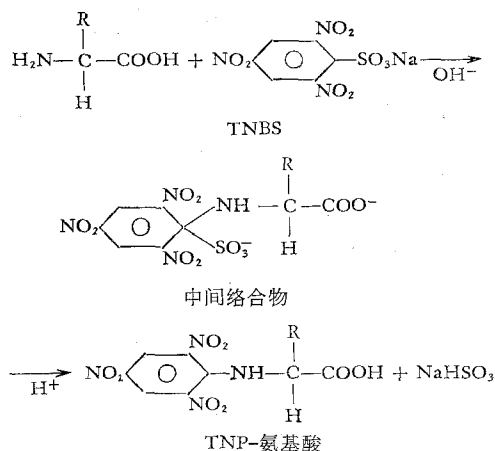


图2 ϵ -TNP-赖氨酸与 α -TNP-亮氨酸的标准曲线

曲线1: 取 $0.5 \times 10^{-3} M$ ϵ -TNP-赖氨酸 0.1—1.0 毫升, 加 1 毫升 4% NaHCO_3 , 最后用水补充至 4 毫升。

曲线2: 取 $0.5 \times 10^{-3} M$ 亮氨酸 0.1—0.8 毫升补充至 1 毫升, 加 4% NaHCO_3 1 毫升, 0.1% TNBS 1 毫升, 40°C 反应 2 小时后加 1N HCl 1 毫升, 总体积 4 毫升, 于 340 毫微米处测定。若反应后不酸化, 用 1 毫升水补充至 4 毫升, 则于 420 毫微米处测定, 此两曲线大致吻合。

式所示:



此中间体在光谱上有两个吸收值相近的高峰, 分别位于 355 毫微米及 420 毫微米附近(见图3, 曲线1)。这与不带 SO_3^- 的 ϵ -TNP 赖氨酸的吸收峰有明显的不同(图1)。其次在 420 毫微米处的吸收值随氨基酸的不同性质而有所不同, 碱性氨基酸精氨酸偏高, 酸性氨基酸门冬氨酸、谷氨酸则偏低(表1)。然而一旦溶液酸化后, 在 420 毫微米处的吸收值就显著下降, 此时中间络合物都转化成 TNP-氨基酸。在 350 毫微米附近的吸收峰则移至 340 毫微米处, 各氨基酸的吸收值也大致上一致(表1)。这样紫外吸收图谱就与图1的 ϵ -TNP-赖氨酸相类似。

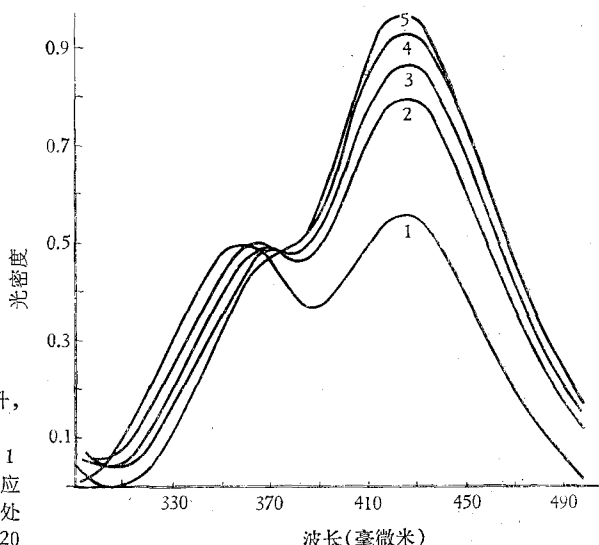


图3 在不同 SO_3^- 浓度下亮氨酸与 TNBS 反应后的紫外吸收图谱

取约 0.2 微克分子亮氨酸于 1 毫升水中, 加 4% NaHCO_3 1 毫升, 曲线 2 至 5 分别为加不同浓度的 Na_2SO_3 溶液 1 毫升 ($8 \times 10^{-3} M$ 、 $4 \times 10^{-3} M$ 、 $2 \times 10^{-3} M$ 、 $1 \times 10^{-3} M$ 。各相当于氨基酸浓度的 40 倍、20 倍、10 倍、5 倍)。曲线 1 用 1 毫升水代替, 然后加 0.1% TNBS 1 毫升, 于 40°C 反应 2 小时, 在 SP-1800 紫外分光光度计上扫描记录。

TNBS 与二硝基氟苯不同, 它主要与氨基酸中的伯氨基起反应, 不与组氨酸的咪唑基、酪氨酸的羟基及精氨酸的胍基起作用, 与脯氨酸中的仲氨也几乎不作用(表1)。除氨基外 TNBS 也能很快与半胱氨酸的巯基起反应, 但在偏碱性条件下巯基本身也很容易氧化成二硫键。因此欲避免样品中巯基对 TNBS 反应的干扰, 可先在碱性溶液中 30°C 保温数小时, 使巯基都氧化成二硫键, 然后再与 TNBS 起反应, 这样就可定量测定样品中的氨基酸含量。

TNBS 与氨基酸中 α -氨基的反应速度决定于溶液中的 pH 值, 当 pH 低于 6.2 时几乎不起反应, 随着 pH 值升高反应速度加快。pH 大于 11 时反应迅速, 在 2—3 分钟内即完全, 但 TNBS 本身的破坏也加快, 空白提高, 因而一般取 pH 9—10 为宜, 通常用 NaHCO_3 溶液, 最后浓度为 1% 较理想。

TNBS 与不同性质氨基酸的反应速度不同, 与碱性氨基酸的反应较快, 在 40°C 30 分钟内

表1 各种氨基酸与 TNBS 反应后在不同条件下所测定的光密度值

氨基酸	碱性溶液 ^[1]	碱性溶液加SO ₃ ²⁻ ^[2]	酸性溶液 ^[3]
甘氨酸	0.30	0.54	0.31
丙氨酸	0.31	0.59	0.30
甲硫氨酸	0.30	0.53	0.30
缬氨酸	0.31	0.57	0.31
亮氨酸	0.30	0.60	0.30
异亮氨酸	0.30	0.56	0.31
苏氨酸	0.30	0.59	0.30
丝氨酸	0.30	0.60	0.30
门冬氨酸	0.19	0.43	0.30
谷氨酸	0.23	0.53	0.30
门冬酰胺	0.30	0.46	0.30
谷氨酰胺	0.31	0.53	0.30
酪氨酸	0.30	0.48	0.30
苯丙氨酸	0.30	0.60	0.30
色氨酸	0.16	0.31	沉淀
组氨酸	0.30	0.50	0.30
赖氨酸	0.60	0.90	沉淀
精氨酸	0.40	0.58	0.30
α -N-苄氧羰酰-赖氨酸	0.32	0.45	沉淀
脯氨酸	0	0	
α -N-苄氧羰酰-精氨酸	0	0	

[1]: 取不同量氨基酸于1毫升,加4% NaHCO₃ 1毫升,0.1% TNBS 1毫升,于40℃反应2小时,用水补充至4毫升,在420毫微米处测定,从曲线中求得各氨基酸于0.1微克分子时的光密度值。

[2]: 条件同上,但在与TNBS反应时加0.01M Na₂SO₃ 1毫升,最后总体积也是4毫升,同样在420毫微米处测定。

[3]: 条件同注[1],但与TNBS反应后加1N HCl 1毫升酸化,在340毫微米处测定。

反应即完成,而这时酸性氨基酸的反应还不到一半。提高温度可使反应速度加快,但TNBS本身的破坏也将显著,空白提高。因而一般不采用升高温度,而是延长反应时间。在40℃保温二小时对各种氨基酸的反应均可完全,这时空白本身在420毫微米处的光密度约在0.15左右。

4. SO₃²⁻或HSO₃⁻对TNBS氨基显色反应的影响

上节已提到,当TNBS在偏碱溶液中与氨基反应时,先形成带有SO₃⁻的中间络合物,后者在420毫微米处有明显的吸收峰(TNP-氨基酸本身无此特征)。此吸收峰随着反应液中SO₃²⁻浓度的升高而增高(图3,曲线2,3,4,5),并在374毫微米处有一共同交点。对于大多数氨基酸,当所加的SO₃²⁻克分子浓度相当于氨基酸

浓度的50倍时,光吸收达最高值,约为原光密度的一倍左右。若浓度再升高,光密度反略为下降(图4,曲线1)。同时空白本身也高,因而在实际测定氨基酸时应以过量50倍为宜。对于TNBS反应较慢,在420毫微米处光密度也偏低的酸性氨基酸,SO₃²⁻浓度要过量100倍才达最高值(图4,曲线3)。这可能由于酸性氨基酸本身带有 β 或 γ 羧基,因同性离子相斥不利于与SO₃²⁻形成中间络合物,反之碱性氨基酸精氨酸上的胍基由于带正电荷则易形成中间络合物,因而表现在420毫微米处的光密度值也偏高(表1)。若上述含有过量SO₃²⁻的反应液再酸化,则此现象又复消失,紫外吸收图谱又与 ϵ -TNP-赖氨酸相同(图1)。

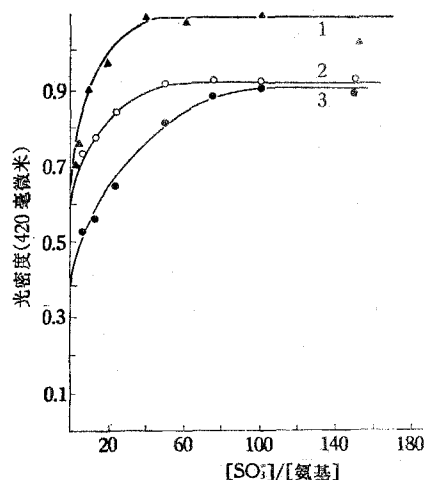


图4 SO₃²⁻对不同性质氨基酸在与TNBS反应时的影响

曲线1: 为0.2微克分子亮氨酸。

曲线2: 为0.1微克分子赖氨酸。

曲线3: 为0.2微克分子门冬氨酸。

反应条件同图3,横坐标为SO₃²⁻对氨基酸克分子浓度的倍数。

如用HSO₃⁻代替SO₃²⁻也可得到完全相同的结果,但其它阴离子例如SO₄²⁻, NO₂⁻, HPO₄²⁻等均无此现象。

5. TNBS用于氨基酸及蛋白质的定量测定

根据上述TNBS与氨基酸反应的特性,可在420毫微米处(偏碱性溶液中)或在340毫微米(偏酸性溶液中)对氨基酸进行定量测定,对各种不同氨基酸当含量为0.1微克分子时在相同的条件下分别测得的光密度值见表1。不论

在偏碱性或偏酸性下测定,都各有利弊,可根据具体情况决定。

在碱性条件下各种 TNP-氨基酸衍生物的水溶性均很好,如加入过量 SO_3^{2-} 还可使灵敏度提高,若无紫外分光光度计,可用普通分光光度计代替,测定波长可改在 440 毫微米处,这时光密度值约相当于 420 毫微米处的 85%。缺点是对不同性质的氨基酸克分子消光系数略有不同,精氨酸偏高,门冬氨酸、谷氨酸及色氨酸偏低(表 1)。

在酸性条件下测定的最大优点是,对不同性质氨基酸的克分子消光系数基本上一致。其不足之处是,必须在紫外分光光度计下测定。此外某些氨基酸如色氨酸、赖氨酸经 TNBS 反应后在酸性条件下产生沉淀不能测定。

用 TNBS 法定量测定氨基酸与常用的茚三酮法相比有如下明显的优点:①灵敏度与茚三酮法大致相当,若添加 SO_3^{2-} ,还超过后者,反应条件简单,无需加温及添加有机溶剂。②试剂不必经特殊处理,也无需加还原剂。在茚三酮方法中往往由于还原不当而严重影响显色反应。③由于 TNBS 与 NH_4^+ 及尿素不起反应就不会象茚三酮法那样往往会受到这些物质的干扰。④光密度达 1.5 以上仍与浓度呈很好的线性关系。因而有用 TNBS 代替茚三酮作为氨基酸自动分析仪上的显色反应。TNBS 法的缺点是与脯氨酸几乎不起反应。

TNBS 与蛋白质作用后在 420 毫微米及 350 毫微米处也同樣有两个明显的吸收峰,因而也可用于蛋白质的定量测定,其光密度值决定于蛋白质中所含的 N 末端 α -氨基及赖氨酸中 ϵ -氨基的含量,但只能在碱性条件下 420 毫微米处测定,因 TNP-蛋白质一经酸化后大都沉淀析出。今以胰岛素为例,它含两个 α -氨基一个 ϵ -氨基。若以胰岛素中氨基含量为克分子浓度单位,则其光密度值恰好与氨基酸的值相同(图 5 与图 2)。其它小分子多肽如胰岛素 B 链(含 α -及 ϵ -氨基各一),或蛋白质如绿豆胰蛋白酶抑制剂(含一个 α -氨基,六个 ϵ -氨基)也得到相同的结果。若已制得纯的蛋白质,也可用

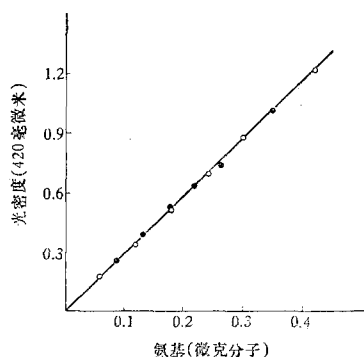


图 5 TNBS 用于胰岛素中氨基的测定

—●—●— 取不同量胰岛素(以其氨基含量为克分子浓度单位)于 1 毫升,加 4% NaHCO_3 1 毫升,0.1% TNBS 1 毫升,于 40℃ 反应 2 小时,最后体积补充至 4 毫升,于 420 毫微米处测定。

—○—○— 先将胰岛素制成 TNP-胰岛素,然后取不同量溶于 4% NaHCO_3 1 毫升,用水补充至 4 毫升,于 420 毫微米处测定。

TNBS 法定量测定其 ϵ -氨基的含量。对一些大分子蛋白质部分 ϵ -氨基埋于分子内部,由于受到构型上的阻碍与 TNBS 反应有可能不完全,光密度值也就相应会偏低,因此应尽可能使蛋白质变性,使分子内氨基充分暴露后再与 TNBS 反应。对一些能自溶的蛋白水解酶就不能按此方法测定,因在反应过程中不断释放出新的 α -氨基使光密度值大大升高。

二、TNBS 用于谷物蛋白质中赖氨酸的测定

1. 原理:

由于 TNBS 只与蛋白质中 N 末端的 α -氨基及赖氨酸残基的 ϵ -氨基起反应,反应后所生成的 TNP-蛋白质经部分酸水解后分别产生含有 α -TNP-氨基及 ϵ -TNP-氨基的小肽碎片。在酸溶液中前者可用有机溶剂抽提除去,而酸溶液中留下的 ϵ -TNP-氨基含量即可在 340 毫微米处定量测定,此含量即相当于蛋白质中赖氨酸的含量。

这里有几点应加以注意:①若蛋白质中 N 末端也是赖氨酸,在用有机溶剂抽提时也将被除去,因而实际所测得的赖氨酸含量将偏低。但由于蛋白质的分子量很大,即使谷物中某些蛋白质的 N 末端也是赖氨酸,总的 ϵ -氨基远多于

此 α -氨基, 因而影响不大。②当 TNP-蛋白质在 6N HCl 中水解时, 为了避免 TNP-基团本身的破坏, 水解时间不宜过长, 一般在 110℃ 2 小时即可。因 ϵ -TNP 小肽在 340 毫微米处的光吸收值与游离 ϵ -TNP-赖氨酸的值大致上相当, 酸水解就不必彻底。③为了使 TNBS 能与蛋白质的 α -及 ϵ -氨基充分作用及避免可能有 -SH 基团的干扰, 最好先将蛋白质在碱性条件下保温数小时使变性, 这样, 既可使蛋白质中的所有氨基暴露, 同时在此条件下 -SH 基也将氧化成二硫键。

为了说明 TNBS 与蛋白质反应后, 其产物 TNP-蛋白质的回收是否完全, 以及酸水解后用有机溶剂抽提是否能将含 α -TNP-氨基的小肽除尽, 因而先用标准蛋白质胰岛素及标准肽 S-磺胺型胰岛素 B 链分别加以鉴定。

取胰岛素 7.2 毫克 (1.2 微克分子, 由于胰岛素有两个 α -氨基及一个 ϵ -氨基, 若以氨基为单位, 则为 3.6 微克分子) 溶于 1 毫升 4% NaHCO₃, 加 10 毫克左右固体 TNBS 使溶, 40℃ 保温 2 小时。反应后加过量 5% 三氯乙酸, 使 TNP-胰岛素沉淀析出, 离心, 沉淀再用 5% 三氯乙酸洗涤数次, 以除去过量未作用的 TNBS 及 NaHCO₃ 盐, 直至洗液不再呈黄色为止。沉淀再用丙酮洗涤数次以除去三氯乙酸。最后将 TNP-胰岛素真空干燥得 8.6 毫克, 回收率略高于理论值 (可能还略含有未除尽的盐)。将此沉淀溶于 3 毫升水, 取 0.05 至 0.30 毫升 (相当于 0.06 至 0.36 微克分子氨基), 用水补充至 3 毫升, 然后加 1 毫升 4% NaHCO₃, 在 420 毫微米处测定光密度, 完全与图 5 相符合, 这说明在上述条件下 TNBS 与蛋白质的反应完全, 在处理 TNP-蛋白过程中也无损失。

按上述条件先制成 TNP-S-磺胺型胰岛素 B 链, 真空干燥后取 4 毫克 (1 微克分子, 由于含有一个 α -氨基及一个 ϵ -氨基, 若以氨基为单位则为 2 微克分子), 溶于 1 毫升 4% NaHCO₃, 分别取 0.15 毫升于小玻璃管内 (0.6×6 厘米)。真空干燥, 再分别加 0.5 毫升 6N HCl 后封口, 在 110℃ 下取不同水解时间 1 至 4 小时, 启口

后用滴管小心将水解液分别移至 10 毫升磨口小量筒内, 并用水将小玻管洗涤数次, 洗液一并移至量筒内, 最后将体积补充至 4 毫升。在 340 毫微米处测定光密度值 (表 2)。测定后再移至量筒内用 2 毫升乙醚摇荡抽提以除去 α -TNP-氨基酸或小肽, 乙醚层用滴管移去。如此反复 4—5 次, 最后在 60℃ 水浴上略加温以除去水层中的乙醚。若水层体积有所减少仍补充至 4 毫升, 再在 340 毫微米处测定 (见表 2)。从表中结果说明, 不同水解时间的光密度值大致相同。在 4 小时内 TNP-基团本身并无显著破坏, 此外经乙醚抽提后的光密度值相当于原来的一半, 也即 α -TNP-氨基经乙醚抽提后可以除去。

以上实验说明 TNBS 方法可用于蛋白质中 ϵ -氨基也即赖氨酸的测定。

表 2 TNP-S-磺胺型胰岛素 B 链酸水解后乙醚抽提前后的光密度值

水解液	水 解 时 间				平均值
	1 小时	2 小时	3 小时	4 小时	
乙醚抽提前	975	940	955	965	959
乙醚抽提后	540	420	510	460	482
比 值	1.8	2.2	1.8	2.1	2.0

2. 应用实例: 面粉中赖氨酸含量的测定

将市场上供应的精白面粉用过量 20 倍的丙酮脱脂两次, 第一次丙酮抽提液呈淡黄色。最后再用乙醚处理并干燥, 得脱脂面粉率约 88%。

取脱脂面粉 400 毫克于离心玻管, 加 4 毫升 4% NaHCO₃, 不断用玻棒搅拌抽提数小时, 离心后再用 2 毫升 4% NaHCO₃ 抽提三次, 总共得抽提液 9.6 毫升。加 10 毫克左右固体 TNBS 于 40℃ 保温 2 小时。反应后用 50% 三氯乙酸酸化, TNP-蛋白质即沉淀析出, 离心弃去上清液, 沉淀再用 5% 三氯乙酸洗涤五次, 丙酮洗涤五次, 干燥后得 TNP-蛋白质 11.5 毫克。取 1 毫克于小玻管内, 加 6N HCl 0.5 毫升, 封口, 于 110℃ 水解 2 小时。启口后将水解液移至 10 毫升磨口量筒内, 连同洗液补充至 3 毫升左右, 用 2 毫升乙醚抽提 4—5 次, 然后水相在

(下转第 18 页)

浓度: $1-5 \times 10^{-6}$ 克/毫升

激发光波长: 350 毫微米

发射光波长: 447 毫微米

狭缝谱带宽度: 2 毫微米

2. 硫酸奎宁的发射光谱

浓度: 5×10^{-6} 克/毫升

激发光波长: 363 毫微米

狭缝谱带宽度: 2.4 毫微米

3. 葱的发射光谱

浓度: 5×10^{-5} 克/毫升乙醇溶液

激发光波长: 296 毫微米

狭缝谱带宽度: 2.4 毫微米

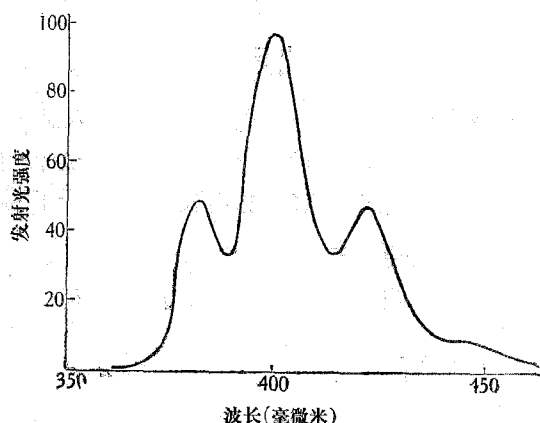


图 7 葱的发射光谱

4. Rhodamine 6 G 的发射光谱

浓度: 2×10^{-5} 克/毫升乙醇溶液

激发光波长: 544 毫微米

狭缝谱带宽度: 1.6 毫微米

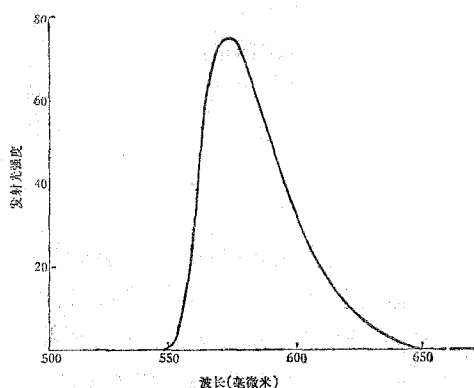


图 8 Rhodamine 6 G 的发射光谱

参 考 资 料

- [1] Udenfriend, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, New York (1962).
- [2] Guilbault, G. G. ed., Fluorescence, Theory, Instrumentation and Practice (1967).
- [3] 山鳥村輝郎, 分光研究, 第21卷第6号, 1972.
- [4] 瀧谷正男, 分光研究, 第19卷第1号, 1970.
- [5] Electronics, 36, 67, 1963.
- [6] Rev. Sci. Instr., 36, 809, 1965.
- [7] Electrical Design News, 4, 34, 1961.

【本文于 1975 年 8 月 25 日收到】

(上接第 24 页)

60℃水浴中略保温以除去少量乙醚, 最后将体积补充至 4 毫升。在 340 毫微米处测得光密度值为 0.79。由图 2 σ -TNP-赖氨酸的标准曲线查得为 0.24 微克分子氨基, 这样折算至每克脱脂面粉中赖氨酸的含量应为:

$0.24 \text{ 微克分子} \times 11.5 \times 1,000 / 400 = 6.9 \text{ 微克分子/克}$, 若以重量计算则为 6.9×145.2 (赖氨酸分子量), 也即每克脱脂面粉在碱可溶

性蛋白质中约含 1 毫克赖氨酸。

取同样样品另行测定为 6.6 微克分子/克, 两次实验间的误差低于 5%, 为了证实此方法的可靠性, 将上述蛋白抽提液在 110℃5.7N HCl 中水解 24 小时, 然后在柴田 A. A-600 型氨基酸自动分析仪上分析, 测得每克脱脂面粉中赖氨酸的含量为 6.7 微克分子, 与 TNBS 法所测得的颇为一致。