

中国科学院生物化学研究所生化丛书

蛋白质化学研究技术

潘家秀 **任梅轩** 編著
徐俊杰 戚正武

科学出版社

1973

内 容 简 介

本书对氨基酸、多肽及蛋白质的一些重要的分离、分析和鉴定实验技术作了具体介绍，并引有主要的参考文献，使读者能了解各项技术最新发展概况。

本书可供科学研究机关、高等学校及其他有关单位从事生化工作者使用。

蛋白质化学研究技术

潘家秀 任梅轩 编著
徐俊杰 戚正武

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1962 年 7 月 第 一 版 开本：850×1168 1/32
1973 年 7 月 第四次印刷 印张：8 插页：3
印数：7801—15,600 字数：209,000

统一书号：13031·105

本社书号：215·13—10

定 价：1.40 元

5577/101

略 字 表

原 名	中 文 簡 称	外 文 簡 称
丙氨酸	丙	ala
γ -氨基丁酸		γ -B
精氨酸	精	arg
门冬酰胺	门酰胺	asp-NH ₂
门冬氨酸	门	asp
瓜氨酸	瓜	cit
半胱磺酸	半磺	cySO ₂ H
半胱氨酸	半胱	cys
胱氨酸	胱	cyss
谷氨酸	谷	glu
谷氨酰胺	谷酰胺	glu-NH ₂
甘氨酸	甘	gly
组氨酸	组	his
羟脯氨酸	羟脯	pro-OH
异亮氨酸	异亮	ileu
亮氨酸	亮	leu
赖氨酸	赖	lys
甲硫氨酸	甲硫	met
甲硫氨酸砷		met-SO ₂
甲硫氨酸亚砷		met-SO
缬氨酸	缬	val
鸟氨酸	鸟	orn
苯丙氨酸	苯丙	phe
脯氨酸	脯	pro
丝氨酸	丝	ser
苏氨酸	苏	thr
色氨酸	色	try
酪氨酸	酪	tyr
二硝基氟苯		FDNB
二硝基苯胺		DNP-NH ₂
二硝基苯酚		DNP-OH
二硝基苯基		DNP-
二异丙氟磷酸		DIP
苯氨基硫甲酰		PTC
苯乙内酰硫脲		PTH
三羟甲基氨基甲烷		tris-

2.5
35

目 录

第一章 蛋白質的透析、冷冻干燥及一些基本分析方法	任梅轩 (1)
一、样品处理	(1)
(一)透析(1) (二)冷冻干燥(2)	
二、分析方法	(3)
(一)灰分测定(3) (二)水分测定(4) (三)总氮量的测定(4)	
(四)酰胺氮的测定(8) (五)蛋白質浓度的测定(11)	
1.縮脲法 2. Folin-酚試剂法 3.紫外吸收法	
第二章 蛋白質、多肽及氨基酸的显色反应	潘家秀 徐俊杰 任梅轩 (16)
一、紙上显色法	(16)
(一)茚三酮法(16) (二)吡啶法(18) (三)pH 指示剂显色法(20)	
(四)氣气显色法(20) (五)个别氨基酸的特殊显色法(22)	
1.甘氨酸的显色 2.酪氨酸的显色 3.組氨酸、酪氨酸及它們的多肽的显色 4.精氨酸的显色 5.半胱氨酸及胱氨酸的显色 6.脯氨酸的显色	
(六)蛋白質的特殊显色法(24)	
1.蛋白質的显色法 2.脂蛋白的显色法 3.糖蛋白的显色法	
二、溶液显色法	(27)
(一)茚三酮溶液显色法(27) (二)Folin-酚試剂显色法(28) (三)直接光譜測定法(29)	
1.肽鍵測定法 2.酪氨酸和色氨酸測定法	
(四)色氨酸的測定(30)	
第三章 蛋白質及多肽的氨基酸分析	潘家秀 徐俊杰 任梅轩 戚正武 (34)
一、緒言	(34)
二、滤紙层析法	(35)
(一)基本原理(35)	
1.层析的机制 2.影响氨基酸 R_f 值的几种主要因素 3.影响层析斑点、形状、大小和溶剂前沿的几种因素	
(二)室溫滤紙层析法(51)	
1.样品处理及点样 2.溶剂系統 3.单向和双向层析	
(三)高溫滤紙层析法(58) (四)小紙快速层析(小层析)(59) (五)定	

性检定和定量比色测定(61)	
三、高压电泳高温层析双向纸上分离法	(63)
(一)操作步驟(63)	
1. 高压电泳 2. 高温层析	
(二)討論(65)	
四、二硝基氟苯法	(66)
(一)原理(66) (二)实验部分(67)	
1. 水解与水解液处理 2. 二硝基氟苯作用 3. DNP-氨基酸的抽提	
4. 二硝基酚(DNP-OH)的去除 5. DNP-氨基酸的检定	
6. 改正因数的测定	
(三)計算(71)	
五、氨基酸柱层析定量分析法	(71)
(一)原理(71) (二)实验部分(72)	
1. 树脂的浮选、处理和装柱 2. 缓冲液的配制 3. 样品的处理、上柱和收集	
4. 定量测定步驟 5. 树脂再生	
(三)实验結果計算(81) (四)討論(86)	
第四章 蛋白質及多肽的末端分析技术	任梅轩 (95)
序言	(95)
一、N-端測定	(96)
(一)二硝基氟苯法(FDNB法)(96)	
1. 原理 2. 二硝基氟苯(FDNB)的制备 3. DNP-氨基酸的制备	
4. DNP-蛋白的制备 5. DNP-蛋白的水解及DNP-氨基酸的抽提	
6. DNP-氨基酸的鉴定 7. N-末端計算方法及回收率 8. 实例	
(二)异硫氰酸苯酯法(PTH法)(113)	
1. 原理 2. 异硫氰酸苯酯的制备 3. 苯乙内酰硫脲氨基酸(简称PTH-氨基酸)的制备	
4. 苯氨基硫甲酰蛋白或肽(简称PTC-蛋白或肽)的生成 5. PTC-蛋白或肽的环化作用	
6. 苯乙内酰硫脲氨基酸的鉴定 7. 实例	
二、C-端測定	(119)
(一)胍解法(119)	
1. 原理 2. 无水胍的制备 3. 胍解步驟 4. 回收率 5. 实例	
(二)羧肽酶法(124)	
1. 原理 2. 羧肽酶的制备 3. 羧肽酶的重结晶与二异丙基磷酸酯(DFP)处理	
4. 測定方法 5. 实例	
第五章 区带电泳	潘家秀 张友尚 (135)
一、区带电泳	(135)
(一)緒言(135)	
1. 基本原理 2. 电泳的分类	
(二)区带电泳的分类和比較(138)	
二、高压紙上电泳	(142)
(一)緒言(142) (二)装置(143)	
1. 高压电源 2. 电泳器	

(三)操作步驟(150)	
1.緩沖液的选择与配制	2.紙的选择和裁剪
3.样品处理	4.点
5.电泳	6.烘干
7.显色	
(四)关于区带异常現象的分析(158)	(五)示例(158)
三、粉末电泳.....	(162)
(一)淀粉平板电泳(162)	
1.緒言	2.操作步驟
3.分离示例	
(二)纖維素粉平板电泳(166)	
1.緒言	2.纖維素粉板的制备和操作步驟
3.分离示例	
四、琼脂平板电泳.....	(167)
(一)緒言(167)	(二)裝置(168)
(三)操作步驟(169)	
1.琼脂的淨化	2.制板
3.緩沖液的选择与配制	4.样品的处理
5.加样方法	6.电压的选择
7.电泳	8.区带检出
9.制备电泳	
(四)討論(176)	
第六章 逆流分溶.....	戚正武 徐俊杰 (180)
一、緒言.....	(180)
二、基本原理.....	(181)
三、逆流分溶的理論曲綫.....	(184)
四、影响分溶理論曲綫的几个因素.....	(186)
(一)K值(186)	(二)分离因子 β (186)
(三)容积因子 α (187)	(四)曲綫相对寬度 $\Delta r_{\text{相对}}$ (188)
(五)轉移次数(190)	(六)偏差因素(191)
五、逆流分溶的操作方法.....	(193)
(一)基本操作法(193)	(二)单提取法(194)
(三)輪轉法(194)	
(四)方块法(195)	(五)逐段法(196)
六、逆流分溶仪.....	(197)
七、溶剂系統和实验溫度的选择.....	(202)
(一)溶剂系統的选择(202)	(二)溫度的选择(203)
八、实验步驟.....	(211)
(一)溶剂系統的配置(211)	(二)分溶管的洗滌(211)
(三)下相溶剂的加入(211)	(四)預行(212)
(五)样品的加入(212)	(六)振蕩次数、定清時間和轉移次数的选择(212)
(七)測定方法(213)	(八)样品的回收(214)
(九)分溶管的洗滌(215)	(十)分溶曲綫的繪制及計算(215)
九、实例.....	(216)
(一)逆流分溶法作为分离之用(216)	(二)逆流分溶法作为分析之用(217)
(三)分子量的測定(225)	
十、逆流分溶法的特点和应用范围.....	(226)
附录 1 酸碱指示剂.....	(229)
附录 2 緩沖液之配制方法.....	(230)
附录 3 氨基酸的一些物理常数表.....	(236)

第一章 蛋白質的透析、冷冻干燥及 一些基本分析方法*

任 梅 軒

一、样品处理^[17]

(一) 透 析^[19]

提純的蛋白質制剂有时以硫酸銨糊状态保存。在进行分析工作时必須先将硫酸銨充分除尽。將蛋白質裝于一半透膜小袋，緊扎袋口，并于袋中留一气泡，使透析袋飄于水面。置于量筒中，加入二十倍容积的水，并以2—3滴甲苯防腐，放置冰箱透析。过2—3小时換一次水，約4—5次后再对0.1M KCl透析，以去除殘留的硫酸銨，再充分对水透析，去尽盐离子。

透析小袋一般用玻璃紙、火棉胶、羊皮紙或动物膜等制成。使用前应先裝滿清水，輕輕挤压、检查有无小孔存在，然后傾去清水，再裝入蛋白質溶液。国产玻璃紙虽未制成小袋形状，但性能很好，經适当包扎后做成袋形还是非常适用于透析的。

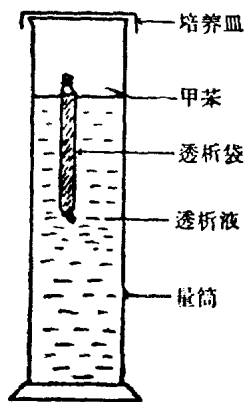


图1 透析裝置

* 在本书各章編著过程中曹天欽先生自始至终給以热心的关怀和指导，最后并耐心审閱，才促使本书如期出版，特此銘謝。
肖嘉瑾同志大力协作抄写和繪圖，方阿泉、陆应銜同志印制照片，特此一并致謝。

透析是一扩散过程,故需时较长,在室温下容易遭受细菌的侵蚀,最好在冰箱进行之。假使将透析袋缚在搅拌器上,外面以流动水透析,就可以缩短透析时间。

(二) 冷冻干燥^[6]

蛋白质制剂在干粉状态下比较容易保存。将蛋白质溶液冻成固体,置于高度真空的容器中,冰自冷冻的蛋白质表面升华而被吸水物质所吸收,或利用低温将水蒸汽凝结而于半途除去。这样就可以得到蛋白质的干粉,此法即称冷冻干燥法,在生物制品方面应用颇广。大多数蛋白质样品经过冷冻干燥处理后,仍能保持其天然状态。

冷冻干燥已有专门机器,例如德制 Leybold 牌冷冻干燥机。其实用一只真空油泵和干燥器,以及一些固体氢氧化钠,五氧化二磷等干燥剂就可以达到目的,效果颇佳。

将透析后的蛋白质溶液置于培养皿内,使厚度不超过 1 厘米为适宜,在低温冰箱中放平使冻成固体。另外准备一个真空干燥器,内放固体氢氧化钠及五氧化二磷。迅速取出冻成固体的蛋白质溶液,置于这一干燥器中,通过 P_2O_5 干燥塔而与真空油泵联结,抽成真空,经过 5—10 小时后,即可以得到海绵状、松软的固体。图 2 就是上述方法的操作图片。

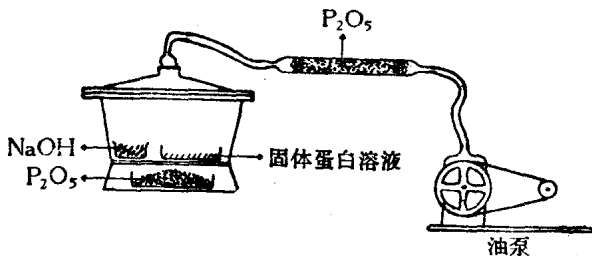


图 2 冷冻干燥装置

冰的升华是吸热过程,因而使周围温度降低,这样在高真空中能维持冷冻的蛋白质固体不融化。若室温较高时,往往会引起冰

的熔化,这样干燥的效果就不好,所以在干燥器外壁要用盐冰浴保护。凡在干燥过程中发生严重的熔化现象时,应该立刻停止减压,重新冷冻,以免蛋白质溶液变成泡沫造成损失。

假使干燥器内不放 P_2O_5 ,全部用固体 $NaOH$ 亦可。冷冻如不用低温冰箱,亦可将蛋白质溶液置于普通冰箱的结冰格内冷冻之。另法是将蛋白质溶液置于容器,然后浸入干冰(固体 CO_2)-乙醇混合物内,亦能迅速冻成固体,再联上油泵进行减压干燥^[12],如图3。

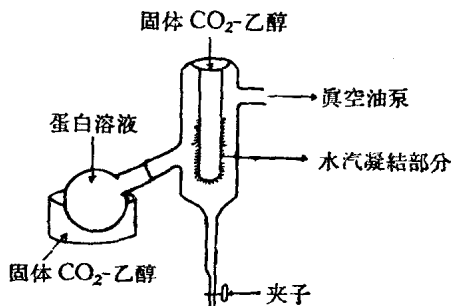


图3 冷冻干燥装置

冷冻干燥的主要关键在于油泵的真空度要高以及管道的口径要适合,不宜太小。

二、分析方法^[18]

在计算蛋白质氨基酸组成及一些物理化学的数据时,常常需要总氮量和含水量等一些基本数据。含灰分较高($>2\%$)的某些蛋白质也需要测定其灰分来校正蛋白质的真实含量。若灰分在 1% 以下常可略而不计。其次,蛋白质浓度的测定在实验室中是经常遇到的问题。当以含氮量的百分数表示氨基酸组成时,就需要知道酰胺氮的数值。同时,它亦是作为蛋白质重要基团分布数值之一。因此,这些基本分析方法都占有很重要的地位。今分别介绍如下。

(一) 灰分测定^[3]

取一磁坩锅,在煤气灯上加热灼烧,然后置干燥器中冷却,称其重量。如此往复三次,直到恒重。

取一定量干燥的蛋白质样品,以煤气灯(约 $550-600^{\circ}C$)灼烧20—30分钟,置干燥器中冷却,并称至恒重(两次数值相差不超过

0.3—0.5 毫克)。从下式即可求得灰分含量。

$$\frac{\text{灰分}}{\text{样品重量}} \times 100 = \text{灰分含量}\%$$

(二) 水分测定^[3]

蛋白质是一亲水物质,即使是固体的蛋白质样品,一般仍含有7—9%的水分。个别蛋白质如对虾、鸭肫原肌球蛋白样品往往可达15%左右。因此在称取样品时,实际上是蛋白质样品与其附着的水分的总重。所以常常需要将待测定样品预先放置于天平室中平衡3—5小时,再行称取样品二份。一份作水分含量测定,另一份作其他试验。待含水量测得后,再来校正实验所用蛋白质样品的重量。

蛋白质中含水量的测定方法,一般常用的有下述二种。

1. 将一定量样品(W_1)置于105℃烘箱烘3—12小时,取出,置 P_2O_5 干燥器中冷却约1小时,并称至恒重(W_2)。一般烘3—5小时已够,继续烘至12小时其减轻的重量不会超过0.1%。Brand与Kassell^[2]曾用同位素 O^{18} 作指标,证明在105℃无论在空气中或在真空干燥器中都可以将附着的水汽去尽。经此法测定过的样品常已变性,不宜再作其他测定的用途。

2. 将一定量样品(W_1)置于已知重量的称量瓶中,于 P_2O_5 干燥器中抽至真空,放置2—4小时,并于天平室中打开干燥器,迅速称其重量。再置干燥器中抽空、称重,如此往复3—5次直至恒重(W_2)。从下式即可求得水分含量。经此法测定过的样品可以用作其他测定。

$$\frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 = \text{水分含量}\%$$

(三) 总氮量的测定^[3]

蛋白质是一复杂的含氮化合物。每一蛋白质都有其恒定的含氮量(约在14—18%)。将一定量的蛋白质(W_1)用浓硫酸分解,并

使其中的氮变成铵盐状态,再与浓 NaOH 作用,使氨气放出而被吸收于标准酸液中,用反滴定法滴定余酸,或用硼酸吸收后,再用标准酸直接滴定,求得该蛋白质样品中的含氮量(W_N)。从而即可求得总氮量的百分数。

$$\text{总氮量}\% = \frac{W_N}{W_1 - W_1 \times \text{水分含量}\%} \times 100$$

1. 样品的消化 称取适量样品(含氮量约在 1—2 毫克左右),置于微量克氏管(图 4)中,加 2 毫升纯浓硫酸,在特制的架子(图 5)上微火加热,俟水分驱尽后,关闭火焰。待稍冷,即加入约 2—5 毫克接触剂,再以微火加热。待白烟自管口逸出,即可加大火焰,并开启水泵,轻轻抽去白烟,务使硫酸沸腾而不致跳荡。俟硫酸溶液从棕黑色变成澄清后,继续沸腾 4 小时。如果蛋白质样品中含赖氨酸或组氨酸较多,则消化时间要延长,往往需要一昼夜。消化完毕,静置使冷,仔细加入 5—6 毫升蒸馏水,洗涤管壁。每分析一样品,最好同样做三管。又因试验室中空气往往含有极微量的氨,每日有所变异,所以每次分析时都要另取两管作为空白



图 4 微量克氏管

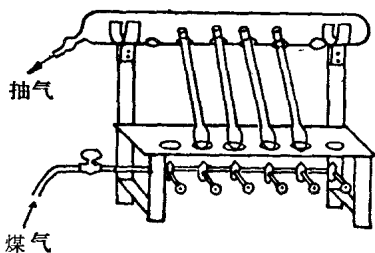


图 5 样品消化装置

对照。(即一切处理相同,但不加蛋白质样品)。

2. 氨的蒸汽蒸馏 氨的蒸汽蒸馏是在微量克氏定氮仪中进行。克氏定氮仪是由蒸汽发生,氨的蒸馏及氨的吸收三部分组成。图6中A是一1—2升容积的烧瓶,其中盛蒸馏水,作为发生蒸汽

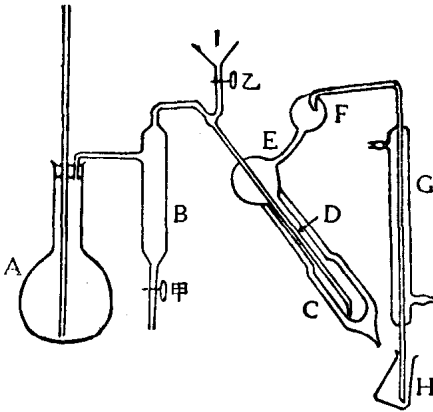


图6 克氏定氮仪装置

之用。B是空管,冷凝的水及废液从此管底部排出。C是蒸汽蒸馏部分,其中心有一细长管D,一端与蒸汽发生部分联结,另一端直插C瓶底部。C瓶上端有一出口E,通过定氮球F及冷凝管G,直接通于吸收瓶H中。仪器中有甲、乙二个开关,样品及

40% NaOH 都从开关乙的上部漏斗 I 加入。消化后的样品就在此仪器中蒸馏、吸收,从而测定氮的含量。其操作步骤叙述于下。

先将A瓶中的水烧开,关闭甲、乙使蒸汽充分洗涤仪器,并检查仪器是否正常。约15分钟左右,即可停止加热。略等2—5秒钟,C瓶中的水液就回吸到B管中,开启开关甲,废液即从B管底部排出。将样品加于漏斗I,开启开关乙,样品即从D管流入蒸馏瓶C中。以少量水洗涤克氏管1—2次,洗涤液一并加入C中。然后,将冷凝管G的出口与吸收瓶H中之标准酸液接触。标准酸液中滴加田代(Tashiro)指示剂3小滴,此时溶液呈红色。再于漏斗I中加入8—10毫升40% NaOH,开启开关乙,使NaOH溶液流入C,俟刚流完而还剩余一点的时候就立刻关闭乙,并于漏斗I中加入少量水掩盖之。立刻加热,待蒸汽发生时,再关闭开关甲,此时蒸汽即从D管通入C瓶中。约5—10分钟,氨气就完全蒸入已知体积的0.02N盐酸中。此时即可将吸收瓶H移开。试验完毕,停止加热,废液即会倒吸入B管而排出,继续进行实验。

3. 氮的滴定 将标准 NaOH 溶液(約 0.01N) 来滴定剩余酸液,待紅色刚一消失就表示已达終点,记录所用体积,依下式求算氮的含量。

$$W_N(\text{克}) = [V_{\text{HCl}}N_{\text{HCl}} - N_{\text{NaOH}}(V_{\text{NaOH}} + B_{\text{NaOH}})] \times 0.014$$

式中 V_{HCl} = 标准酸的体积(毫升)

N_{HCl} = 标准酸的当量浓度

V_{NaOH} = 标准硷的体积(毫升)

N_{NaOH} = 标准硷的当量浓度

B_{NaOH} = 空白所消耗的酸相当于标准 NaOH 溶液的毫升数。

W_N = 含氮量

4. 討論

(1) 消化時間一般約 5—6 小时即可。消化時間过长会引起氮的損失^[9]。假使样品中含賴氨酸或組氨酸較多时,消化時間需要延长 1—2 倍^[13]。因为这二种氨基酸中的氮在短期内不易消化完全,往往导致总氮量偏低。

(2) 接触剂是加速消化的試剂。通常应用的接触剂是由 80 克 K_2SO_4 , 20 克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与 0.3 克 SeO_2 或 0.34 克 Na_2SeO_4 在研鉢中充分研細混和就可应用。有时样品中含賴氨酸較多,又欲縮短消化時間,常常于上述接触剂中再加入少量 HgCl_2 (約 0.032 克/克接触剂),則賴氨酸中之氮在 4—5 小时就可释放完全。組氨酸需 8 小时才能释放完全。

(3) 田代指示剂^[4]是由 50 毫升 0.1% 甲烯藍酒精溶液与 200 毫升 0.1% 甲基紅酒精溶液混合配成,貯于棕色瓶备用。此指示剂在酸性范围是紫紅色,碱性范围呈綠色,变色范围很狹($\text{pT} = 5.4$)故頗灵敏。

(4) 使用克氏定氮仪时,开关甲、乙的掌握与实验成败很有关系。在加样品时,开关甲一定要开启着,而且一定要俟蒸汽发生后才能关闭。否則,就会发生样品倒吸現象。开关乙亦要关闭及时,防止氨气逸出。

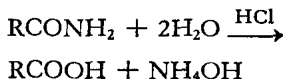
(5) 若需用标准酸直接滴定,可用2—5%的硼酸溶液吸收蒸出的氨气,加入2—3小滴甲基红作指示剂,再以标准酸液直接滴定之。

(6) 测定过程中切忌碱性雾气。待测定的样品或溶液中亦不应有其他含氮化合物。否则影响结果的准确度。

(7) 碱的浓度比酸的浓度小一倍可以减少误差。

(四) 酰胺氮的测定

蛋白质的总氮是 α -氨基和某些特殊基团上的氮,以及双羧基氨基酸的侧链上的酰胺氮三者的总和。酰胺基上的氮比较容易释放,在较温和或短时间的水解条件下,即可释放完全。由于酰胺氮比总氮少得多,用微量克氏定氮法往往需要消耗较多的样品(0.25—0.5克),所以常常采用微量弥散法。



原理是在弥散盘(图7)外室使样品与KOH混合, NH_3 被释放出来,经过弥散,吸收于中央室含有指示剂的硼酸溶液中,反应完全后,直接在中央室用标准盐酸滴定,即可算出酰胺氮之含量。

1. 仪器及试剂^[4,5,8]

(1) 微量康氏弥散碟是由白瓷制成,分成中央及外圈二室。外圈周围齐平磨砂,中圈则稍低(图7)。

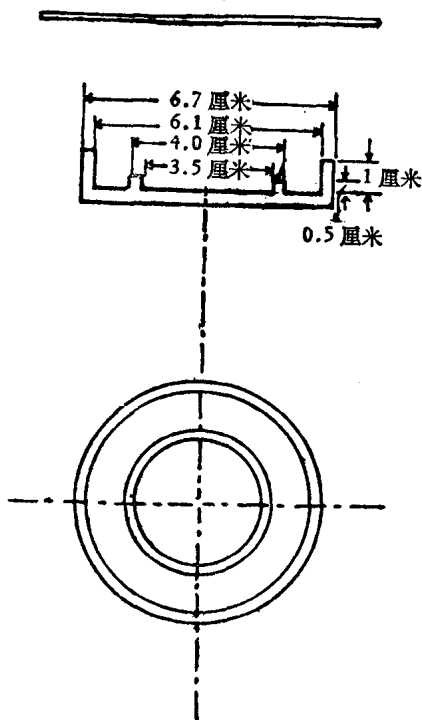


图7 微量弥散碟(Conway碟)

(2) 微量滴定管由毛细管做成。一端拉尖便于滴定，一端套一小段橡皮管，便于吸取溶液。毛细管固定于一标尺上，整个装置见图 8。刚制成的滴定管需要用水银标定。标定时在橡皮管的一端套一支 5 毫升针筒以便吸取水银，从 $D = M/V$ (D 为密度， M 为重量， V 为体积) 求得每一厘米毛细管的真实体积。由于毛细管的内径往往并不完全均一，所以需要每一厘米逐段标定，并将标定结果列成一表，例如表 1 所示。在滴定时就可以从表查得滴定所用的体积。

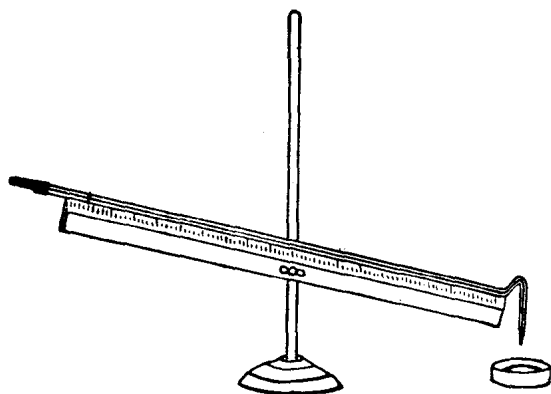


图 8 微量滴定管

(3) 1% 硼酸溶液的配制：称取 10 克硼酸(G. R.)，溶解于无氨蒸馏水中，稀释至 1,000 毫升。

(4) 吸收剂的配制：33 毫克之溴甲酚绿及 66 毫克的甲基红一起溶于乙醇，并稀释至 100 毫升。将此混合指示剂 2 毫升加入一干净的 100 毫升容量瓶中，以 1% 硼酸稀释至刻度，并以几滴稀碱调节至灰红色，保存备用。

(5) 水溶性胶的调制：10 克阿拉伯胶与 15 毫升水，5 毫升甘油及 5 克的 K_2CO_3 在研钵中研磨均匀，置真空干燥器内，减压并放置一星期后就可应用。若浓度太大，可用水稀释至适当浓度。

表1 滴定管二号容积表

标尺刻度 (厘米)	真实体积 (微升)	累 計 数 (微升)	标尺刻度 (厘米)	真实体积 (微升)	累 計 数 (微升)
0—1	4.11		20—21	4.11	85.51
1—2	4.11	8.22	21—22	4.09	89.60
2—3	3.99	12.21	22—23	4.09	93.69
3—4	3.96	16.17	23—24	4.10	97.79
4—5	4.07	20.24	24—25	4.05	101.84
5—6	4.11	24.35	25—26	4.05	105.89
6—7	4.11	28.46	26—27	4.04	109.93
7—8	4.03	32.49	27—28	4.06	113.99
8—9	4.03	36.52	28—29	4.09	118.08
9—10	4.05	40.57	29—30	4.09	122.17
10—11	4.05	44.62	30—31	4.11	126.28
11—12	4.06	48.68	31—32	4.11	130.39
12—13	4.11	52.79	32—33	4.03	134.42
13—14	4.11	56.90	33—34	4.11	138.53
14—15	4.07	60.97	34—35	4.11	142.64
15—16	4.11	65.08	35—36	4.11	146.75
16—17	4.11	69.19	36—37	4.08	150.83
17—18	4.11	73.30	37—38	4.09	154.92
18—19	4.03	77.33	38—39	4.05	158.97
19—20	4.07	81.40	39—40	4.10	163.07

2. 酰胺氮的释放及测定

1 毫升已知浓度(0.5—1%)的蛋白质溶液与0.25毫升的12N HCl 混和,再加入0.25毫升的水,封于硬质玻管中,在125—130°C 水解3小时^[1]。水解完毕,取出待冷,打开玻管,适当稀释使其含氮量约为每毫升含50—70微克左右。

在微量弥散碟的中央加入0.5毫升左右吸收剂,外圈中加0.2毫升样品溶液,并在外圈周围涂以水溶性胶水,然后左手持玻片,右手加入0.5毫升40%的KOH,立刻盖上玻片,轻轻摆动,使外圈中之溶液混和,平放桌上。等待2—3小时即可测定。室温较低时(5—10°C)需要适当延长至4—5小时。待作用完毕,移开玻片,此时中央碟中硼酸溶液呈绿色,用0.02N的标准HCl滴定至灰色

略帶微紅，所消耗的酸体积就可从校正的容积表上查得。

$$W'_N = N_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} \times 14$$

W'_N = 含氮量(微克)

N_{HCl} = 标准酸的当量浓度

V_{HCl} = 标准酸的体积(微升)

以酰胺氮占总氮的百分数表示則：

$$\frac{W'_N \times T \times 10^{-6}}{V_s \times C \times N\%} \times 100$$

T = 稀释倍数即等于总体积/取用体积

V_s = 取用蛋白样品体积

C = 取用蛋白样品浓度%

$N\%$ = 总氮量

3. 討論

(1) 使用以前，仪器的清洗工作是实验成败的关键。微量弥散碟应该先用肥皂洗刷，再用水洗净后放入浓硫酸-重铬酸钾洗液中浸 2—3 小时，以水冲净，然后放入稀 NaOH 溶液中浸 10—20 分钟，冲洗完毕，最后再用无氨蒸馏水冲洗 3 次，置于专用烘箱中烘干。

(2) 酰胺氮的测定除了上述方法外，尚有用 10 N HCl 在 37°C 水解^[7]，5% HCl 在 100°C 水解 2 小时^[16]，或用 NaOH 水解^[21]等方法。经常用的是酸水解的条件。但是，也要注意，酸水解的过程中，常因苏氨酸及丝氨酸部分分解而引起酰胺氮偏高。在 20% (W/W) HCl 中水解 24 小时丝氨酸及苏氨酸遭到破坏。然而在低温 37°C，用浓 HCl 水解 220 小时对苏氨酸、丝氨酸、瓜氨酸的分解并不显著，其由于分解而产生的氨不超过 0.1%。同时，在这一条件下对門冬酰胺的酰胺氮 99% 释放完全^[15]。故一般均采用 37°C 而水解时间较长，采用 6N HCl 高温，则水解时间缩短。

(五) 蛋白质浓度的测定^[10]

蛋白质浓度可从它们的物理化学性质如，折射率、比重、紫外