

蛋白质的定量法

第二版

农业出版社

张

旭

译

〔日〕菅原洁·副岛正美著

0.3

蛋白质的定量法 (第2版)

〔日〕菅原洁·副岛正美 著

张 旭 译

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 烟台日报社印刷厂印刷

787×1092毫米32开本 8.125印张 1插页 180千字

1981年9月第1版 1981年9月烟台第1次印刷

印数1—5,200 册

统一书号 16144·2308 定价 0.86 元

译 者 的 话

日本茨城大学菅原潮和副岛正美合著的“蛋白质的定量法”一书，自1972年出版以来经过五年半的时间，著者们几经修改后，于1977年刊出了第二版，1978年接着又进行了第二次印刷。译者认为书中阐述的八种蛋白质定量分析方法，不但具有独立的系统性和完整性，而且具有较强的科学性，包括基本原理、材料方法、操作步骤和结果讨论等等，著者们均力求描述得深入浅出简明易懂。另外，把各定量法的基础理论和实验技术有机地结合起来进行叙述，又是本书的一个特色，这无疑对初学者或者是有经验的农业化学和生物化学工作者也是有利的。

在本书的翻译过程中，蒙朝井小太郎先生热情帮助，吴干源、钱毓如二同志协助设计封面和绘制插图，译者于此谨致忱谢。

张 旭

1979.9.5

序

“Proteios”根据希腊语的意思是对人们“最重要的东西”，或者是人们“必须将其提到第一位的东西”，把蛋白质命名为“Protein”乃是约150年前的事了(马尔德,1839)。生命现象的出现，进而在这种生命现象的传递继承过程中，就与核酸同时起着重大作用和机能的蛋白质而言，到现在为止，世界上有多少研究人员和技术人员对它的研究寄予直接和间接的关心呵。我们亦长期被此魅力所吸引，梦想能够参加和阐明蛋白质在生命活动过程中的存在方式，并为此而一直不断地在暗中摸索着。

数年前，受到包括我们共同的老师——志村教授在内的编辑委员会诸位先生之委托，而很简单地承担了有关“蛋白质的定量法”的总结工作。但实际上笔者们一着手对“定量法”汇总时，就模糊地感觉到它是一个最基本的操作，的确在其内容中有很多意外的、不甚理解之处，另外还涉及到其手段之复杂和多样，也没有找到有关此题目的其他类似文献等等，总之面临着种种困难问题。现试举有问题的一例来说吧，既然是“蛋白质的定量法”，我们希望这种方法能应用普遍的特性于所有的蛋白质之中，但是一经严密地讨论，就发现目前作为定量法而利用的性质很多不一定能满足普遍性的方面。另外，根据能满足普遍性的性质来实行定量的时候，又发现存在着其他重大的限制条件。因此我们打算首先

稍稍详细地叙述那种经过，在介绍个别定量法以前，于阐明面临问题的同时，把定量法进行分类，而且按研究目的，对选择定量法之基准提出我们的建议和看法。此书如能对读者稍有裨益的话，亦使笔者等欣慰之至。

另外，本书之执笔第3章、第4章、第5章以菅原为主，其他各章主要由副岛担任。笔者们虽想尽可能正确地加以记述，但因水平所限，书内不妥处颇多，每当我们重读时就会发现内容中文理不通之处甚多，故请读者们大力予以斧正和指教，这将使笔者们感到喜出望外。

最后当本书结束之时，对我们给予诸多帮助和指正的东京大学中村道德教授、物理化学研究所的中村启治以及一开始就予以颇多协助的各位朋友们，以次表示衷心的感谢！

1971年8月

副岛正美

菅原 潔

第 二 版 序

这本“蛋白质的定量法”自1971年9月出版发行以来，大至已有5年半的时间了，在这5年半期间，生物化学的实验方法以氨基酸分析为例，层析柱的内径由9毫米变为6毫米，进而从自动进样到积分仪的应用，其分析手段变的更微量化、高性能化，分析单位也从微克分子 (μ mole) 变到毫微克分子 (n mole)。诚如从真空管向晶体管变化那样，在现今生物化学领域内的研究方法中也能够见到此类似的现象。必然地以酶为始端，处理蛋白质的实验室也正在逐渐进行着微量化。

以这样的形势为背景，有关蛋白质微量化的要求也很强烈，包括萤光法等等的应用在内，蛋白质定量由微克 (μ g) 向毫微克 (ng) 不断地进行着微量化。但另一方面，从前在生物化学领域内最广泛使用的劳里法，目前对它的期望也依然很高，由于此法受多种物质之干扰，例如在Triton X-100存在下的蛋白质定量法等，近来有关此法的改良法、干扰排除法的报告也不少。不过实事求是地讲，这些新的定量法或者改良法各有优缺点，不可把它们说成是适用于一切情况下的唯一定量法。本书根据各种研究目的、研究条件、作为研究对象的蛋白质的种类、或者夹杂物的种类等多种条件，以选择最合适的方法作为前提而总结的。如果本书对提高读者

的研究效率和研究质量等有几分作用的话，将使著者们不胜高兴之至。

1977年4月

菅原 潔

副島正美

目 录

第一章 序言	(1)
第二章 蛋白质定量法的分类和方法的选择	(10)
第一节 凯氏法	(12)
(i) 原理	(12)
(ii) 优点	(12)
(iii) 缺点	(12)
第二节 酚试剂法 (劳里改良法)	(13)
(i) 原理	(13)
(ii) 优点	(13)
(iii) 缺点	(13)
第三节 双缩脲法	(14)
(i) 原理	(14)
(ii) 优点	(14)
(iii) 缺点	(14)
第四节 紫外光谱吸收法	(15)
A. 用280毫微米测定法	(15)
(i) 原理	(15)
(ii) 优点	(15)
(iii) 缺点	(15)
B. 用215—225毫微米测定法	(15)
(i) 原理	(15)
(ii) 优点	(16)
(iii) 缺点	(16)
第五节 色素结合法	(16)
(i) 原理	(16)

(ii) 优点	(17)
(iii) 缺点	(17)
第六节 各种微量定量法的特征和方法的选择	(20)
第三章 凯氏法	(29)
第一节 消化	(29)
(i) 凯氏法的原理	(29)
(ii) 蛋白质成分的分离	(30)
(iii) 样品的消化条件	(32)
第二节 氮的定量法	(39)
(i) 蒸馏滴定法	(40)
(ii) 康韦微量扩散分析法	(44)
(iii) 内斯罗法	(52)
(iv) 靛酚法	(54)
第三节 直接比色定量法	(69)
(i) 应用碘量滴定的方法	(69)
(ii) 内斯罗法的应用	(70)
(iii) 靛酚法的应用	(72)
第四节 蛋白质含量的计算	(75)
第五节 自动化分析的尝试	(77)
第六节 共存硝酸盐的氮化	(79)
第七节 二氧化钛和硫酸铜作为催化剂的消化方法	(82)
第四章 双缩脲法	(83)
第一节 可见领域内测定的双缩脲法	(88)
(i) 戈奈尔等的方法	(89)
(ii) 韦斯特利——兰贝思法	(92)
(iii) 食品及其他固体样品中可使用的方法	(94)
第二节 紫外领域内测定的微量双缩脲法	(100)
(i) 伊特扎基和吉尔的微量双缩脲法	(100)
第五章 酚试剂法	(108)
第一节 原理	(108)
第二节 劳里法	(112)

第三节	米勒改良法	(121)
第四节	劳里法在测定蛋白酶作用中的应用	(123)
第五节	磷酸浓度高的样品应用劳里法的实例	(124)
第六节	薄膜过滤和劳里法的结合	(125)
第七节	劳里法的干扰物质	(127)
第八节	在干扰物质存在下的劳里法	(134)
第九节	SH化合物存在下的劳里法	(139)
第十节	Triton X—100 存在下的劳里法	(141)
	(i) 钱德拉·雷简——克莱因 (B) 法	(144)
	(ii) 著者们的方法	(146)
	(iii) 旺——史密斯法	(148)
	(iv) 杜利——格里夫法	(149)
	(v) 钱德拉·雷简——克莱因 (A) 法	(150)
第十一节	其他改良法	(151)
第六章	紫外光谱吸收法 (UV法)	(153)
第一节	用280毫微米测定法	(153)
第二节	用215—225 毫微米测定法	(158)
	(i) 操作方法	(158)
	(ii) 注意	(159)
第三节	用191—194毫微米测定法	(160)
第四节	用224—233.3毫微米测定法	(164)
第五节	各种蛋白质的 ϵ_M 及 $A_{1cm}^{1\%}$	(167)
第七章	色素结合法	(168)
第一节	甲基橙法	(171)
第二节	酰氨黑10B法	(174)
第三节	曙红Y法	(175)
第四节	用薄膜过滤和色素相结合的微量定量法	(177)
第五节	用滤纸和色素的微量定量法	(182)
第六节	酰氨黑10B	(184)
第七节	库马斯亮蓝	(186)

第八节	TNBS法	(189)
第八章	物理方法及其他	(190)
第一节	折射率法	(190)
第二节	放射性同位素法	(193)
第三节	比浊法	(194)
第四节	用放射性 Ni^{63} 的微量定量法	(196)
第九章	茚三酮法	(199)
第十章	荧光法	(205)
第一节	荧光胺法	(205)
	(i) 波伦等的荧光胺法	(206)
	(ii) 用薄膜过滤的荧光胺法	(210)
第二节	用维生素 B_1 的微量定量法	(212)
第三节	DNS法	(216)
第十一章	结束语	(217)
参考文献		(220)
索引		(237)
译名对照		(244)

第一章 序 言

近数年间，包括立体结构、结晶结构已经搞清的蛋白质有溶菌酶，肌红蛋白等十种以上。蛋白质构造分析这门科学如此急速发展的主要原因，当然是由于：构造分析中应用的各种物理化学手段在飞跃地进步。

定量法可以说是蛋白质构造分析的基础，但是，有关蛋白质定量法的报道虽然颇多，而至今依旧把十九世纪末丹麦化学家凯道尔 (Kjeldahl) 发现的凯氏法称之为标准法，凯氏法在各种定量法中仍占中心位置，其理由是因为它的分析原理极佳。但另一方面也不能忽视“蛋白质的定量法”这种说法的复杂和概念含糊不清，从而妨碍了其他方法发展的事实。

所以在介绍具体的方法之前，首先想从定量的目的进行讨论并由此指出存在的问题。蛋白质定量法的目的简单来说乃是“测定或算出一定数量或容量的样品中所含蛋白质成分的数量”。不过在蛋白质，糖类，脂肪，无机盐等定量的过程中，除了与维生素和激素定量时那样用化学纯粹成分的个别定量方法之外，往往需要把全体蛋白质成分一起定量的方法。如前者那样，打算定量在化学乃至生物学意义上纯粹的特定蛋白质成分的个别定量法时，根据其成分存在的状况不同，其方法的难易程度就不同。即在粗原料中含有各种成分时，如果抓不住该成分的显著特征，便成为非常困难的操

作；又在进行精制、而大体上接近单一成分的情况下，只要利用它与共存物质不同性质的话，不管用什么样方法定量，按道理都可以。与此相反，在全蛋白质总定量的时候，有必要抓住蛋白质的共同特征，正因为这样，我们就不得不从有限的范围内去选择适当的方法。

为了更正确地理解上述问题，试就某生物体组织中一种酶分离、精制过程的一个阶段作为例子来看吧。

为了知道精制的程度，必须测定在其精制阶段内样品中酶的比活性 (specific activity)。酶比活性的定义根据国际生化学联合会 (IBU) 1961 年的报道是：“每 1 毫克蛋白质的酶单位 (enzyme unit)”，但酶单位是测定酶强度的尺度，其定义是：“在酶显示活性最大的状态，通常在 25℃ 的条件下，每 1 分钟内使 1 微克分子基质发生变化的酶量，作为一个单位的相对表示法。”所以，从基质的变化量来测定酶单位的方法，竟可说“是某活性酶蛋白的个别定量法”，因为一方面样品中的蛋白质量 (毫克) 是包含失活的酶蛋白质和共存蛋白质，所以当然有必要选择不同的适当的定量法。但是在酶精制的最后阶段，就比活性成为最大的纯粹标准样品而言，只要完全保证稳定的活性度，为算出一定量样品中的蛋白质量，若测定酶单位的话，那是足够了。

那末，我们现在来考虑一下关于选择样品中蛋白质量，即全蛋白质 (total proteins) 量的定量方法吧！例如在上述酶精制的各阶段，采取一部分样品，将其中的蛋白质成分和其他成分分开，干燥后称量，这种直接定量法很多情况下在理论上是可能说得通的。然而，考虑到此法操作过于烦杂，且在各个操作环节中累积的重量损失，因此实际上不可能作为定量方法来推荐。当然，操作烦杂和累积重量损失的

主要原因，是由于蛋白质成分的多样性，如各种溶解性（参考表I—1）。另外，正确测定干燥蛋白质标准样品的结合水量通常也是有很多困难的。

那末，如从其他简便的理化方法当中挑选全蛋白质定量方法又怎样呢，这里还有别的困难。首先，想比较一下各种代表性蛋白质的氨基酸组成成分（表1—2）。在氨基酸的组成和溶解性等物理性质之间，可以见到若干相关关系，“例如在天然（native）蛋白质的立体构造和氨基酸组成中，已知有一定关系（库克，1967）”，蛋白质相互间氨基酸的组成和溶解性也都可以见到很大的差异。所以大部分理化定量方法的首要限制条件是：样品溶解呈透明、并且尽可能得到无色溶液这一点上。正是这点，与凯氏法相匹敌的方法是没有的。

如进而提出更加严密看法的话，这些方法至关重要的问题乃是所谓“什么作为标准样品？”作为蛋白质的氨基酸组成成分不太偏、较易得到在水里可溶性的、处理方便的纯品、且能廉价取得，因此便每每将血清白蛋白、卵白蛋白等作为标准蛋白质来使用。然而，生物体组织中的蛋白质，其氨基酸组成偏差的确是较多的，例如认为蛋白质的含氮量是16%，甚至从统计的角度来看，通常就有 $\pm 10\%$ 的变动（参考表I—2）。进而，在上述精制酶的过程中，各种蛋白质成分的混合比在每个阶段是变化着的。同样，对一种定量法而言，也不可能保证样品中的蛋白质常与标准物质呈一定的相关关系。因此，若以这样消极的观点来看问题，就作者们也不得不同意大阪大学蛋白质研究所某教授曾经有过的说法：“很遗憾，在现在的蛋白质定量法中，还没有找到一个称之为完损无缺的方法。”就以下介绍的各种总定量法而言，对“不

表 I—1 单纯蛋白质的一些物理性质

蛋白质	结晶化	溶 解 性					热凝固 60~80℃	硫酸盐析	分 布 情 况
		蒸馏水	0.9%食盐水	pH 3~4	pH 8~9				
					60~70%乙醇				
白蛋白	大多能够结晶	溶	溶	溶	溶	不溶	凝固	2/3饱和以上	广泛分布于动植物组织细胞内, 也有显出酶活性的
真球蛋白	有的能够结晶	不溶	溶	溶	溶	不溶	凝固	1/3饱和以上	广泛分布于动植物组织细胞内, 也有显出酶活性的
假球蛋白	有的能够结晶	溶	溶	溶	溶	不溶	凝固	1/3~2/3饱和	广泛分布于动植物组织细胞内, 也有显出酶活性的
谷蛋白	困难	不溶	不溶	溶	溶	不溶	不凝固	——	禾谷类的种子中多, 与水混合搅拌就变为富有弹性
醇溶蛋白	困难	不溶	不溶	溶	溶	溶	不凝固	——	禾谷类的种子中多, 与水混合搅拌就变为富有弹性
精蛋白	——	溶	溶	溶	溶	不溶	不凝固	——	局限于鱼精及某种花粉中, 作为核蛋白而存在
组蛋白	——	溶	溶	溶	不溶	不溶	不凝固	——	作为核蛋白存在, 变性难
硬蛋白	困难	不溶	不溶	不溶	不溶	不溶	不凝固	——	作为构造蛋白存在, 稳定

可忽视的误差(数%以上的误差)”不能置之不理，而只以相对的测定来满足为前提。可是，在同一组织中蛋白质（例如血液，乳，肌肉，种子等一起源的样品）比较定量的时候，上述误差也能减少很多。这两点是想请诸位读者首先要留意的。

另外，诸位读者，我们认为您关于蛋白质方面已经具有相当的知识，因此就蛋白质本身的说明只限于我们认为必须的部分。当然，蛋白质的分子量在数千以上，大部分是数万至数百万的生物体高分子化合物，实际的分子长轴为数毫微米—100毫微米，其溶液是典型的胶体溶液（图 I—1）。全部或大部分的分子构造，是由约二十余种L— α 氨基酸缩合所生成的肽链而形成光学活性两性物质。因此至今报道的蛋白质定量法，也是根据这种分子的物理化学特征为基础而进行的。这些方法可大体区别为利用蛋白质共同性质（含氮量，肽键，折射率等）和利用蛋白质含有特定氨基酸残基（芳香族，酸，碱性基等）两类。

作为一般的定量分析法，我们希望精密度（accuracy）、灵敏度（sensitivity）好，有满足定量目的的特异性（specificity）、共存物质的干扰少，另外，操作尽量简便，一方面使用机器及试剂不过于危险，一方面价格又不高。然而在实际上选择方法时，如上所述，考虑到定量目的和可能的实验条件、改从其他的观点去探讨亦是有必要的。试看具体的例子。

首先，第一个问题就是是否希望从各种蛋白质成分系统内，把各成分细分为血清白蛋白、 γ -球蛋白那样之后，才对各种成分进行定量呢？亦或如前所示——在精制酶的时候那样，作为目的产物之特殊蛋白质及其他全蛋白质的定量值两方均

表 I—2 几种单纯蛋白质的含氮量, 氨基酸组成(%)及分子量
特里斯特拉姆和史密斯 (Tristram & Smith, 1963)

分 类	血清白蛋白	卵蛋白	乳球蛋白	麸蛋白	组蛋白	蛙精蛋白	凝 胶	丝心蛋白
	白蛋白	白蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	组蛋白	精蛋白	硬蛋白	硬蛋白
N(%)	15.8	15.76	16.0	17.66	17.9	30.7	18.14	18.3
分 子 量	65000	46000	37700	(约40000)	15500	4000	—	—
甘 氨 酸	1.49	2.32	1.22	0	4.18	2.51	20.9	32.57
丙 氨 酸	6.30	5.36	5.50	1.70	6.46	1.20	8.78	26.73
丝 氨 酸	3.12	6.75	3.32	4.06	3.60	5.80	3.49	13.54
苏 氨 酸	4.85	3.42	4.41	1.78	4.79	0	1.88	1.19
脯 氨 酸	4.33	3.04	5.40	11.43	3.55	7.25	13.79	0.38
羟脯氨酸	0	0	0	0	0	—	12.17	0
缬 氨 酸	4.95	5.96	5.41	2.25	4.70	3.47	2.19	2.85
异亮氨酸	2.28	6.04	5.01	10.27	4.06	1.04	1.48	1.04
亮 氨 酸	9.24	7.94	12.17	10.27	7.77	0	2.87	0.86