

Для выбора оптимальных условий гидролиза в ходе первоначального анализа белка неизвестного состава, варьируют продолжительность гидролиза и температуру его проведения.

МЕТОД 1

Кислотный гидролиз с использованием хлористоводородной кислоты, содержащей фенол, является наиболее общей процедурой, используемой для гидролиза белка/пептида при аминокислотном анализе. Добавление фенола предотвращает реакцию галогенирования тирозина.

Гидролизующий раствор. 6 М кислота хлороводородная, содержащая от 0,1 % до 1,0 % фенола.

Выполнение гидролиза

Гидролиз в жидкой фазе. Образец белка или пептида помещают в ампулу для гидролиза и высушивают (образец сушат для того, чтобы вода, содержащаяся в образце, не разбавляла гидролизующий раствор). Прибавляют гидролизующий раствор из расчета 200 мкл на 500 мкг лиофилизированного белка. Образец в ампуле замораживают в бане с сухим льдом и ацетоном (-78 °С) и запаивают ампулу под вакуумом при помощи пламени. Образцы обычно гидролизуют при температуре 110 °С в течение 24 ч в вакууме или в атмосфере инертного газа для предотвращения окисления. Если есть подозрение, что испытуемый белок полностью не гидролизуется, рассматривают возможность проведения гидролиза в течение более продолжительного времени (например, 48 ч и 72 ч).

Парофазный гидролиз. Является одним из наиболее общих методов кислотного гидролиза. Предпочтителен для микроанализа, когда доступны лишь небольшие количества образца. При использовании парофазного гидролиза загрязнение образца кислотными реактивами минимизировано. Флаконы с высушенными образцами помещают в сосуд, содержащий подходящее количество гидролизующего раствора так, чтобы гидролизующий раствор не контактировал с испытуемым образцом. В