



凝胶过滤法测定蛋白质的分子量

鲁 子 贤

一、分子筛的概念

凝胶过滤是分子筛的一种，在介绍凝胶过滤法之前，首先介绍分子筛的由来。1928年，McBain 提出了分子筛的概念。后来发现这一现象在许多地方都存在。1950年，Synge 与 Tiselins 在解释凝胶层中的电泳和电渗现象时引用了分子筛的概念。此后发现在柱层析中也有这种现象，于是许多工作者尝试了一系列能适用于生物高分子分离纯化用的分子筛。到1959年，Porath 与 Flodin 找到部分水解的葡聚糖凝胶，将其交联，得到了商品名为交联葡聚糖 (Sephadex) 的分子筛。此分子筛具有许多良好的性能，因此在蛋白质的分离分析中被广泛采用。

1956年，Lathe 与 Ruthven 进行了利用分子筛效应测定分子大小与分子量的尝试。1961年，Flodin 与 Granath 发现不同分子量的葡聚糖级份其凝胶过滤行为与分子量的大小有关。1962年，Andrew 发现在蛋白质中也有类似的性质。此后经过不少人的实际应用，完善了这一方法，变成了一个可靠的测定高分子分子量的方法。

就蛋白质讲，在理论研究或实际应用中经常需要知道它的分子量。但是蛋白质分子量的测定，在此以前是一件比较复杂的工作，大多需要特殊的仪器。凝胶过滤这个方法设备简单，结果处理方便，同时还有它独到的方面，因此近十几年来应用较广。

本文就此方法作一简介，作为实验室操作时的参考。

二、分子筛原理

分子筛的原理可以用图1来说明。长玻璃柱中的介质颗粒内充满着孔隙，几种蛋白质的混合溶液从顶部上柱，然后用缓冲液洗脱。这时候溶液中分子体积小的溶质组份 I 进入介质颗粒内的孔隙中，而分子体积大的蛋白质 III 完全不能进入介质颗粒内的孔隙，只能经过介质颗粒之间的孔隙(自由空间)流出，在流完自由空间后就从柱的下端流出，而组份 I 由于能进入颗粒内孔隙，因此要流完自由空间的全部介质内孔隙后，才从柱的下端流出。假如组份 II 是一种介于中间情况的蛋白质，它只能进入一部分颗粒内较大的孔隙，因此组份 II 流过的空间大小是颗粒之间的全部自由空间加上它能进入的颗粒内的孔隙的体积。于是分子大的先流出，分子小一点的后流出，分子最小最后流出。

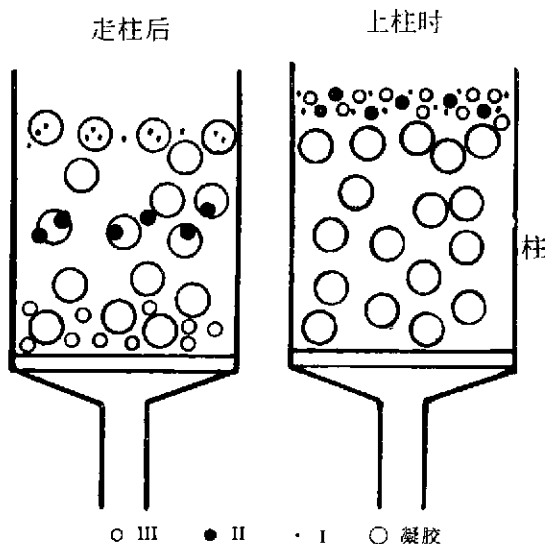


图1 分子筛示意图

这个现象和普通的筛子先筛出较细的成分相反,叫做分子筛效应。多孔介质就是分子筛。

对于两种大小不同的蛋白质,假如它们都属于组份 II 的范围,但它们能进入的孔隙大小不同,因此从柱上洗脱的体积不同,形成分离的两个峰,于是这两种蛋白质就被分离提纯。但是各种分子筛的孔隙大小分布有一个范围,有最大极限和最小极限。分子直径比最大孔隙的直径大,这种分子就全部被排出在介质颗粒之外,这种情况叫做全排出。两种全排出的分子即使大小不同,也不能有分离效果,直径比最小孔隙直径小的分子能进入介质的全部孔隙。两种分子如都能进入全部孔隙,它们即使分子大小不同,也没有分离效果。因此一定的分子筛,有它一定的使用范围。

在这里,我们完全用孔隙的几何形状来说明分子筛效应。但是长链分子组成三度空间的网状结构时,大的分子进入这种网状结构中的孔隙时阻力比较大,小的分子阻力比较小。这样,多元组份进入这种柱时,也同样表现出分子筛效应。

凝胶过滤是分子筛效应的一种,所用的分子筛是一类特殊的凝胶。这里将介绍蛋白质研究工作中常用的凝胶,关于分离小分子用的分子筛不在此介绍。

几个名词的含义

如图 1 所示,柱内凝胶床中颗粒间的自由空间内所含水或缓冲液的体积 V_0 称为外水体积 (the void volume)。凝胶颗粒内部孔隙体积

的总和 V_i 称为内水体积 (the inner volume)。如上节所述,一种蛋白质的分子是全排出时,其洗脱体积就是 V_0 ; 而分子小于孔隙的下限时,其洗脱体积是 $(V_0 + V_i)$ (图 2)。

如有一个蛋白质其分子大小在上述两极限之间,其洗脱体积是 $(V_e + V_0)$, 则

$$V_e = K_d V_i \quad (1)$$

此处 K_d 是一个常数,称为分配系数。按分子筛的性质, $0 \leq K_d \leq 1$, 它与蛋白质分子的大小及介质孔隙的大小分布有关。将 (1) 重写,可得到

$$K_d = \frac{V_e}{V_i} \quad (1a)$$

从公式右端看,柱的长短粗细与 K_d 无关,因此 K_d 只与分子筛的性质有关。柱的尺寸只影响洗脱峰的形状与两个峰相隔的距离。

分配系数与分子量的关系

蛋白质从柱上洗脱的先后与该分子的大小有关,这是分子的流动性质,因此可以用分子的流体力学的等当半径即 Stock 半径作为衡量分子大小的参数。

假设在单位长度的柱长内其内水体积是 v_i , 凝胶颗粒内部能允许某蛋白质进入的体积是 v_p ; 该蛋白质溶液流过此单位柱时颗粒内外蛋白质分子的分配达到平衡,此时凝胶颗粒外的蛋白质浓度是 c 。颗粒内蛋白质的量在此时是

$$Q_i = \sigma v_i c$$

σ 代表该蛋白质在凝胶颗粒内外的分配比,称为分配分数,是一无因次常数。

如凝胶颗粒内此蛋白质能进入的那部分体积中其浓度是 c_i , 则

$$Q_i = v_p c_i$$

对于一个理想的系统, $c_i = c$

$$\therefore \sigma = \frac{v_p}{v_i}$$

从 (1a), K_d 的含义与 σ 相同,所以

$$K_d = \sigma = \frac{v_p}{v_i}$$

假设蛋白质分子的 Stock 半径是 a , 凝胶颗

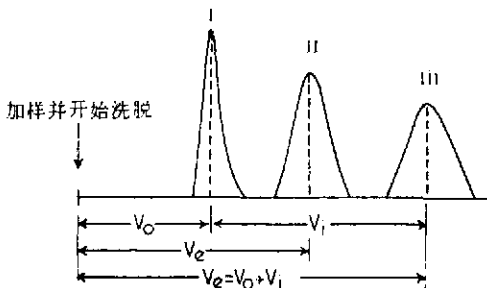


图 2 从凝胶过滤柱洗脱的三个部分

- I: 完全排除从凝胶孔洗脱 ($K_d = 0$) 部分;
- II: 排除从较小孔 ($K_d \sim 0.5$) 洗脱部分;
- III: 不排除任何部分洗脱液 ($K_d = 1$)。

粒的孔隙是均一的圆锥体, a 值不同的分子能进入圆锥体的深度不同。令圆锥体的底面圆半径是 r , 高是 H ; 某蛋白质分子能透入的圆锥台高(即深度)是 h , 则圆锥体的总体积是

$$v_i = \frac{\pi H r^2}{3}$$

此蛋白质分子能透入的体积是

$$v_p = \frac{\pi h (r - a)^2}{3}$$

所以

$$K_d = \frac{v_p}{v_i} = \frac{h}{H} \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$$

但

$$\frac{h}{H} = 1 - \frac{a}{r}$$

所以

$$K_d = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (2a)$$

对于一个非理想的体系讲, $c_i \neq c_o$ 。可以设想

$$c_i = k c$$

式中 k 是一个校正非理想与理想体系的偏差的常数。此时

于是

$$K_d = k \sigma$$

$$K_d = k \left(1 - \frac{a}{r}\right)^3 \quad (2b)$$

从下面的讨论可以看出, k 的出现对问题并不复杂化。

Anderson 与 Stoddart 用不同的 $\frac{a}{r}$ 值计算

K_d , 然后以 K_d 对 $\log \frac{a}{r}$ 作图, 得到一根 S 形的曲线, 此曲线的中间一段是直线。因此对于中间部分讲, 应有

$$K_d = -b \log \frac{a}{r} - c \quad (3)$$

分子量与 Stock 半径之间应有下列关系:

$$M = m a^n$$

式中 M 是分子量, m 与 n 是常数, 对于结构相似的球状蛋白来讲 m 与 n 值是相同的。注意到对于某一凝胶讲, r 是常数, 应有

$$K_d = -b' \log M + c' \quad (4)$$

Andrew 用实验证明, 凝胶用交联葡聚糖时, 一系列球状蛋白质的分子量与分配系数的关系遵守公式(4)(见图3)。

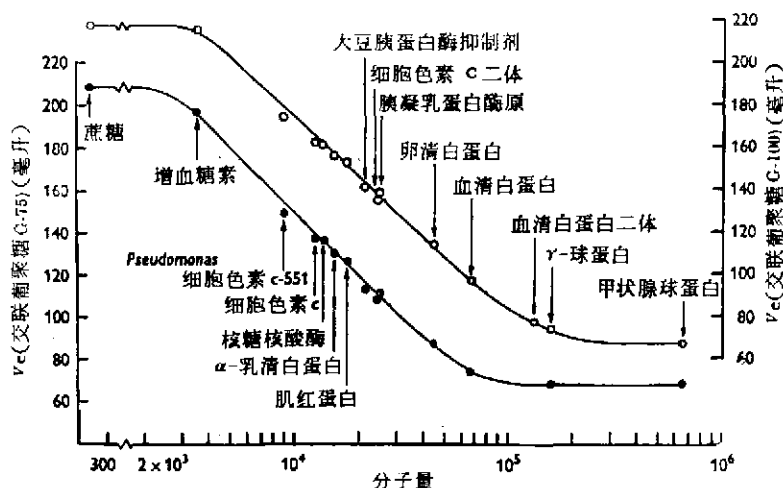


图3 V_c 对 $\log M$ 作图
0.05 M tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl

有了这种简单的直线关系后, 蛋白质的分子量测定就比较简单了。可以这样: (1) 利用分子量已知的蛋白质在一种合适的凝胶上测出公式(4)的直线关系, 解出 b' 与 c' 值; (2) 测出未知蛋白质的 K_d 值, 利用(1)的结果算出 M

值。

三、凝 胶

凝胶过滤法的主要条件是合适的凝胶。从公式(1)可以知道, 凝胶孔隙的大小分布要合

适。就本质上讲,公式(4)的关系能否建立,决定于凝胶的颗粒中孔隙大小的分布规律。经过一些人的工作,找到了一些合适的凝胶,主要有下列三种。

交联葡聚糖 (Sephadex)

由细菌葡聚糖在糖的长链间用交联剂1-氯代-2,3-环氧丙烷交联而成。交联剂多,链间交联就多,孔隙就小。早期产品颗粒是无定形

的,近年来都是珠状的。国内已有一些单位开始生产,产品规格沿用瑞典 Pharmacia 厂的规格,各种规格和有关性质见表1。

表1中所列交联葡聚糖的各种型的G值系不同交联度的制剂,G值越大,交联度越小,因此吸水量越大。G后所附数值是这种型的交联葡聚糖每克干重吸收水的重量。如G-25就是一克交联葡聚糖吸2.5克水。床体积是每克干

表1 交 联 葡 聚 糖

型	吸 水 量 克水/克干凝胶	床 体 积 毫升/克干凝胶	工 作 范 围		全排出($K_d=0$) 的最小分子量		最小溶胀时间(小时)	
			肽与蛋白质	多 糖	蛋白质	多 糖	20—25℃	90—100℃
交联葡聚糖 G-10	1.0±0.1	2—3	<700	<700	—	700	3	1
交联葡聚糖 G-15	1.5±0.2	2.5—3.5	<1500	<1500	—	1500	3	1
交联葡聚糖 G-25	2.5±0.2	5	<5000	<2000	15000	5000	3	1
交联葡聚糖 G-50	5.0±0.3	10	1500—20000	500—5000	50000	10000	3	1
交联葡聚糖 G-75	7.5±0.5	12—15	3000—70000	1000—20000	100000	50000	24	3
交联葡聚糖 G-100	10.0±1.0	15—20	4000—150000	1000—50000	250000	100000	72	5
交联葡聚糖 G-150	15.0±1.5	20—30	5000—300000	1000—100000	600000	150000	72	5
交联葡聚糖 G-200	20.0±2.0	30—40	5000—500000	1000—150000	≥10 ⁶	200000	72	5

生 物 胶-P

生 物 胶 P-2	1.5	3.8	200—2000		3000		2—4	
生 物 胶 P-4	2.4	5.8	500—3000		3000		2—4	
生 物 胶 P-6	3.7	8.8	1000—4000		5000		2—4	
生 物 胶 P-10	4.5	12.4	3000—17000		25000		2—4	
生 物 胶 P-30	5.7	14.8	3000—30000		40000		10—12	
生 物 胶 P-60	7.2	19.0	3000—50000		60000		10—12	
生 物 胶 P-100	7.5	19.0	5000—100000		200000		24	
生 物 胶 P-150	9.2	24.0	5000—150000		250000		24	
生 物 胶 P-200	14.7	34.0	5000—200000		300000		48	
生 物 胶 P-300	18.0	40.0	10000—300000		≥500000		48	

表2 交联葡聚糖的几种颗粒表示法(大致相当)

	珠状干粉的直径(微米)	通过的筛孔(目)
粗	100—300	
中	50—150	
细	20—80	
超细	10—40	400

凝胶溶胀以后在柱中自由沉积所成床的体积。

表1中没有列出颗粒度,一般产品分粗、中、细、超细四级,近年来改用干颗粒的直径表示。二者的大致关系如表2,其中超细可用于板层析凝胶过滤。

交联葡聚糖有很弱的酸性,因此有可能与蛋白质的碱性基团相互吸引,吸附部分蛋白质。如果是碱性蛋白质,这种作用就更突出。但是这种吸力可以用提高洗脱液的离子强度来克服。离子强度大于0.05时,一般碱性不强的蛋白质就不会有这种吸附现象。因此交联葡聚糖柱的缓冲液中经常加氯化钠之类的盐,以提高缓冲液的离子强度。

新用的交联葡聚糖颗粒表面上有一些不可逆吸附蛋白质的作用点,当然数量是很小的。所以新使用的葡聚糖凝胶应在使用前用所研究的蛋白质走几次,然后再用。蛋白质的样品不

容易得到时,也可以用一个分子量不大而容易得到的蛋白质走几次。

交联葡聚糖在洗脱过程中会溶解极少量的糖。这不影响分子量的测定,但如用于蛋白质的分离纯化,就需要加以注意。强酸强碱和氧化剂会破坏交联葡聚糖,应该避免使用。

交联葡聚糖在使用完毕后用水洗去缓冲液,然后在漏斗中尽可能滤去水,搅拌下将其投入较大的丙酮中,脱水后去丙酮然后在真空干燥器中干燥,可得到分散得比较好的干粉。这种处理的缺点是容易将颗粒弄碎。交联葡聚糖在水或缓冲液中保存很容易长霉变质,因此回收应该及时,并加防腐剂。防腐剂有下列几种:叠氮钠 0.02%;三氯丁醇 0.02%;硫柳乙基汞 0.01%;醋酸苯基汞 0.01%。

生物胶-P

系丙烯酰胺用交联剂 N,N' -次甲基二丙烯酰胺聚合而成。交联剂越多,孔隙越小。商品以细珠状干粉供应,商品规格见表 1。

生物胶-P 的使用范围与效果与交联葡聚糖相似,大体可以相互代用。但是生物胶-P 的化学性质比交联葡聚糖稳定,对于蛋白质制备讲不会有东西溶解下来,这是它的优点,因此近年来在蛋白质制备中用生物胶-P 的越来越多。

琼脂糖

较早的时候用琼脂制成凝胶来进行凝胶过滤,但是琼脂有相当强的吸附作用,因此很难使用。后来从海藻琼脂中分离出一个中性级分——琼脂糖,克服了上述缺点。

琼脂糖凝胶不用化学交联,主要依靠糖链之间的次级键如氢键来稳定网状结构。网状结构的疏密依靠改变琼脂糖浓度的方法来控制。

琼脂糖的稳定性很差,国外商品都以含水状态供应。使用条件限制较严: 0—40℃; pH 4—9; 不能用硼酸缓冲液。但是它的最大优点是分子量的使用范围宽,最大可以到达分子量 10^6 ,这一点是前两种凝胶所无法达到的。

琼脂糖在国外商品名称混乱,名目繁多,如 Sepharose (瑞典的 Pharmacia 厂)、Sagavac (英国 Seravac 厂)、Bio-Gel A (美国的 Bio-Rad 厂)、

Gelarse (丹麦 Litex 厂)、Super Ago-Gel (美国 Mann 厂)等。牌号规格也是很混乱的,使用时需参看商品说明书。在没有现成商品时实验室也可以从琼脂中自己制备。

除上述三种凝胶外,还有多孔珠状玻璃珠也可用于蛋白质的分子量测定,但应用尚不广。多孔珠状聚苯乙烯用于疏水有机溶剂,对于合成肽等有用,但在蛋白质上应用不多。

综观上述几种凝胶,都能满足下述几个条件: 多孔、孔隙大小分布均匀; 亲水(因为蛋白质绝大多数亲水); 与蛋白质没有吸附,或者这种吸附很容易克服; 有化学与物理的稳定性及足够的机械强度。从原则上讲,按照需要,就可以能继续找寻出新的合用的凝胶。

四、实验操作

柱

与一般离子交换用的柱结构相同。近时都用多孔的聚乙烯片做底板,因为这种底板不致被凝胶的细颗粒所堵塞。如无这种多孔板,也可以用几层尼龙滤布叠成。常用的玻璃砂熔结片(3号)做底板的玻璃柱也是可以的。如这些条件都有困难,可以用长玻璃管在底部铺玻璃棉,然后在上面铺 1—2 厘米高的石英砂。当然这样做回收凝胶比较困难,同时样品在洗脱离开凝胶后经过的死空间太大,洗脱峰比较扩散。

设计柱时死空间越小越好。柱的尺寸比较常用的是直径 2—2.5 厘米,高 50—60 厘米和直径 0.9—1.2 厘米,高 1—1.5 米两种。柱细而长,洗脱速度加不快,但峰的分离效果好一些。柱用得长一些还是粗一些,视所用凝胶和其它条件而定。总之,希望装柱后凝胶床的内水体积能大于 100 毫升,这样如每 1 毫升读一次数,就可以有 1% 的准确度。当然随着蛋白质自动分析仪的出现,能够在更细的体积间隔内读数,因此可以用更小的柱。

柱最好有外夹套,这样可以通恒温水控制温度。

装柱

交联葡聚糖与生物胶-P 商品都是干粉,在

装柱前要预先溶胀。最好先量出柱的体积,然后根据凝胶床体积算出干重,称重后用水溶胀。溶胀时间因交联度不同而异,温度提高能缩短溶胀时间。表1中列有各种凝胶的溶胀时间,可参照处理。溶胀平衡后将细颗粒倾析除去,就是说在烧杯中凝胶颗粒面上加较多的水,用搅棒将凝胶搅匀,放置数分钟,将沉降很慢的细颗粒随着上层水倒掉。如此反复至上层没有细颗粒为止,这时就可以去气装柱。

装柱前需去气,其方法是升至较高温度后减压,至不再出气泡时即可上柱。

装柱的方法有两种。比较粗略的方法是将柱中装约三分之一高的水,底板以下全部充满水,不留气泡。凝胶置烧杯中,上面稍加一些水。在搅拌下将凝胶倒入柱中稍许,待底面上积起约1—2厘米的凝胶床后,打开柱的出口,随着下面水的流出,上面不断加凝胶,使形成的凝胶床面上有凝胶颗粒连续降下,就能得到均匀的柱。如凝胶床面上已不再有凝胶颗粒下降,就不能继续加凝胶,应用搅棒均匀地搅起数厘米高的凝胶床,然后再加凝胶,不然就会形成

界面,不利于以后的工作。沉积面到离柱的顶端约5厘米处就可停止装柱。

这种装柱的方法比较简单,但要求操作上比较熟练。还有一种比较可靠的装柱方法,如图4,在电动搅拌下连续将凝胶流入柱中沉积,用这种方法装的柱一般都较理想。

新柱装成以后,改用缓冲液平衡,一般用三到五倍床体积的缓冲液在恒定的压力下流过柱就可以了。如是交联葡聚糖,需再用一蛋白质溶液流过,然后用一有色的蛋白质如细胞色素c等在柱上走一次,看色带是否均匀下降,如均匀下降,说明柱是均匀的,可以使用。检查柱是否均匀,应以带色的高分子葡聚糖更好。如Pharmacia厂的蓝色葡聚糖-2000,上海长征药厂的红色葡聚糖等都比带色的蛋白质方便。

上柱、洗脱与收集

样品上柱量与测定方法有关。一般以紫外吸收法测定蛋白质的浓度为最方便。用230nm读光密度比280nm灵敏,但要注意缓冲液有无吸收。由于蛋白质不同消光系数也不同,因此上柱量有些出入,具体用量参看表3,蛋白质不宜多加。样品最好直接溶解在缓冲液中,但即使不用缓冲液,影响也不大。样品体积最好小于2毫升,如0.4—0.5毫升则出来的峰形更好。

上柱时将凝胶床面上的缓冲液吸掉,面上留下一些缓冲液从柱的出口流出。等到凝胶床面上正好流干时用吸管将样品滴到凝胶床面上,注意不要将床面凝胶冲起。沿柱壁滴加样品时样品容易从凝胶床与柱壁之间滑下,应避免这样做。待样品正好流干时用少量缓冲液同加样品一样加入,待其流干后再加缓冲液,使凝胶床面以上有高约5厘米以上的缓冲液,这样滴入缓冲液时不会冲动凝胶床面。

凝胶过滤用的洗脱液比较简单,除极个别特殊外都用单一的缓冲液。洗脱液加在柱上的压力是一个重要的因素,它与一般交换树脂不同,加压超过一个极限值不仅不能增加速度,反而使流速急剧下降。特别是在使用交联度小的交联葡聚糖时要特别注意。压力对流速的影响见图5。

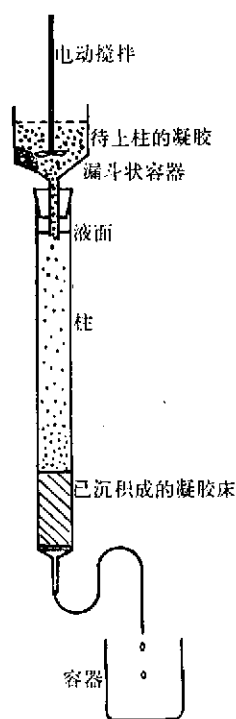


图4 一种装柱的方法

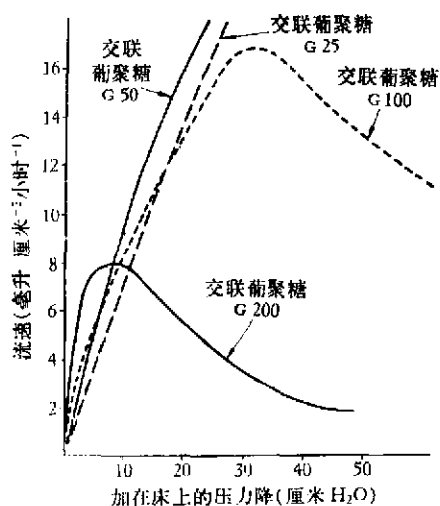


图5 凝胶床上所加的压力与洗脱速度的关系曲线
床体积: 2.5×50 厘米

分部收集是一个重要的条件,一般都用部分收集器。计时的部分收集器容易得到,因此洗脱时流速的控制比较重要。有了恒速就有了恒定体积的级份。恒定流速可以按图6的安排达到,在上端贮存器直径相当大时不插管子T也能维持压力恒定。

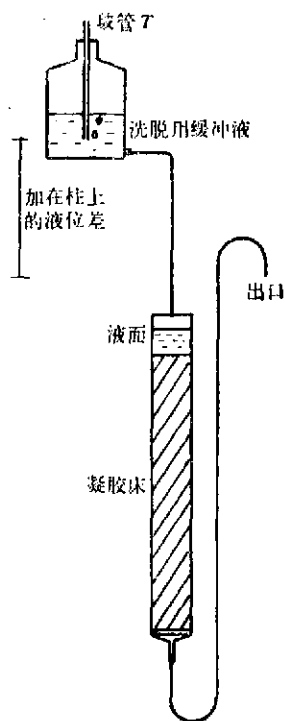


图6 维持恒压的安排

洗脱速度可以在比较宽的范围内变化,一般讲,凝胶颗粒大洗脱就应慢一些。早期的报导强调慢,约每小时数毫升,这是不必要的限制,速度可以大大增加。

外水体积与内水体积的测定

蓝色葡聚糖-2000对各种G值的交联葡聚糖都是全排出的,因此可用它来测定 V_0 。它的颜色给工作带来了很大的方便,如没有这类试剂,选用分子量大于全排出的蛋白质也能测出 V_0 。只是峰的位置要用紫外读数读出,表1中列有全排出的数值。

V_i 的测定与上述原则相同。选一种分子量小于凝胶工作范围的下限的化合物,测出其洗脱体积,减去 V_0 就是 V_i 。常用铬酸钾(黄色),也有用硫酸铵的。后者可简单地用硝酸银检出洗脱峰,当然也可用有紫外吸收的物质,如N-乙酰酪氨酸乙酯。可根据自己实验室的条件灵活掌握。

V_i 也可用计算法求出,只是准确性较差。其方法如下:

根据吸水量(W_i)的定义:

$$V_i = gW_i \quad (5)$$

式中 g 是柱中凝胶的干重, W_i 在商品标签上都标明。要准确知道一根柱中所含凝胶的干重,可以称固定重量如1克的干凝胶,溶胀后全部装入要装测量用凝胶的柱中,待溶胀平衡后测出其高度,然后用(5)就能算出 V_i 。

V_i 一般都用实测,上述计算方法可以核对 V_i 数据可靠与否。

K_d 对 $\log M$ 标准线

按公式(4),可利用已知分子量的蛋白质测出 K_d 而算出 b' 、 c' 或作出 K_d 对 $\log M$ 的标准线。

已知分子量的蛋白质虽很多,但能用于标准线的测定者不多。表3列举的是经过前多次试用而认为是满意的蛋白质,称为标准蛋白质(Marker)。

标准线的测定方法有两种,一种是上柱样品中一次包括几个标准蛋白质,洗脱后分出相应的几个峰,根据峰顶端的洗脱体积确定各个

表3 标准蛋白质*

蛋 白 质	分子量 ($\times 10^{-3}$)	用量 (毫克)	测 定 方 法
胰蛋白酶抑制剂(扁豆)	9.0	1—2	O.D230nm
细胞色素 c	12.4	0.5—2	O.D410nm 或 230nm
核糖核酸酶	13.7	1—2	O.D230nm
α -乳清蛋白	15.5	1—2	O.D230nm
肌红蛋白	17.8	0.5—2	O.D410nm 或 230nm
胰蛋白酶抑制剂(大豆)	21.5	1—2	O.D230nm
α -胰凝乳蛋白酶	22.5	1—2	O.D230nm
胰蛋白酶	24	1—2	O.D230nm
胰凝乳蛋白酶原	25	1—2	O.D230nm
胃蛋白酶	35.5	1—2	O.D230nm
卵清蛋白	45	1—3	O.D230nm
血清白蛋白(单体)	67	1—3	O.D230nm
醛缩酶	150	1—2	O.D230nm
γ 球蛋白(人或牛)	205	1—2	O.D230nm
脱铁铁蛋白	480	1—2	O.D230nm
尿酸酶	490	1	尿素中氮的释放
甲状腺球蛋白	670	2—3	O.D230nm
α -眼晶体蛋白	820	1—2	O.D230nm

* (1) 凡用 O.D230nm 测定者都可用 O.D280nm 代替,但此时蛋白质的用量约 5 毫克。

(2) 蛋白水解酶应在非最适 pH 的条件下使用。

(3) 白蛋白制剂中有时有二体存在,其分子量是 $2 \times 67 \times 10^3 = 134,000$ 。

标准蛋白质的 K_d , 这样一次走柱就能测出一根标准线。将已知的蛋白质走完后,再在混合样品中加入未知样品,走柱后出现的新峰就属于未知样品的。这种方法叫做内插法,优点是工作量较小,但常常是不能根据峰值确定是何种成分。另一种做法是走柱一次测一个标准蛋白质的 K_d , 经几次走柱,测出 K_d 对 $\log M$ 的标准线。未知样品也单独测出其 K_d , 从 K_d 对 $\log M$ 标准线求出其 M 。这种方法叫外插法,比较费事,同时各次测定间会有误差,但是解释没有困难,因此经常用此法来测定。

还需注意,要使未知样品尽可能处于标准线的中间段(这可以通过选择不同吸水量的凝胶而达到),并且还要在它的两侧都有标准蛋白质的点子。如确有困难而无法满足上述要求时,至少应在它的一端尽可能接近的地方有一

个标准蛋白质的点子,在外延线上测出未知样品的分子量一般都需要加以避免。

从操作方法来讲,按上述要求去做即可将蛋白质的分子量测出。

局限性

凝胶过滤法有其一定的局限性。它在 pH6—8 的范围内,公式(4)的直线关系比较好,但在极端 pH 时要注意,这时一般蛋白质有可能因变性而引起偏离,表3所列标准蛋白质中也有一些因变性而不能使用。

一般球状蛋白质的轴比虽然有所不同,但 K_d 对 $\log M$ 的直线关系依然维持。但轴比很大的纤维状蛋白质公式(4)不能适用。糖蛋白在含糖量大于 5% 时,测得的分子量比真实分子量大,这可能是糖在溶液中有比较大的水合值所致。找不到含糖量与偏离值的关系,但最大的变化不超过一倍。铁蛋白与糖蛋白相反,测出的分子量比真实分子量小,脱铁铁蛋白的分子量恢复正常,脂蛋白虽有人用凝胶过滤测分子量,但数据可靠与否尚有争论。有一些底物是糖的酶,如淀粉酶,溶菌酶等会与交联葡聚糖形成络合物,它们在交联葡聚糖上的分子筛行为表现异常。

变性剂如脲或胍存在时只要在同样条件下测出标准线,公式(4)同样可用。此时蓝色葡聚糖-2000 依旧可用。与 SDS(十二烷基硫酸钠)作用后的蛋白质大体上还能应用一般条件下测出的标准直线,但也有认为应该用与相同量 SDS 作用的标准蛋白质测出标准线,然后再用。近年来有人用胍彻底使蛋白质变性,再将 K_d 与链长联系起来的方法测蛋白质的分子量,这种方法尚需经受时间的考验。

参 考 文 献

- Andrews, P.: in "Methods of Biochemical Analysis", 18, p. 1—53, 1970.
Ackers, G. K.: in "Advances in Protein Chemistry", 24, p. 343—446, 1970.