

## 硅胶层析法在研究蛋白质分子量中的应用

卢善真 李良洲 陈海宝

(苏州丝绸工学院)

以多孔硅胶为凝胶的硅胶层析法, 目前国内主要用于测定合成高聚物的分子量及其分布, 测定结果和经典方法一致, 但在速度上要快得多, 因而获得广泛的应用。然而, 它在生化测定中应用还不多。我们尝试用多孔硅胶代替交联葡聚糖进行蛋白质分子量的测定, 结果较为满意。

### 一、试验方法和条件

**1. 试验方法** 在SN-01型凝胶色谱仪上进行。该仪器采用双柱塞泵恒流输送淋洗剂。为了连续地检测色谱柱淋出各级分的含量, 采用示差折光检测器和紫外检测器。分子量检测采用体积指示法, 以一定体积的虹吸管(约2ml)连续接收淋出液, 分子量大的成分先被淋出, 分子量小的成份后被淋出, 从而达到分离目的。通过光电信号的转换, 在记录仪上得到被测高聚物分子量分布的凝胶色谱图。

硅胶层析法用于测定蛋白质的分子量的原理和实验步骤都与测定合成高聚物时完全一样。在仪器的各项技术指标都正常的情况下, 首先根据被测蛋白质的分子量大小选择适当规格的硅胶, 装柱, 测定柱效; 根据被测蛋白质的性质确定所用的溶剂和淋洗剂体系及进样浓度。然后从单一分子量的蛋白质标样的测定求出分子量的对数值与淋出体积之间的关系曲线(即 $\log M-V_e$ 的校正曲线)。最后依照被测蛋白质试样的淋出体积, 经过数学处理求得蛋白质试样的分子量及其分布。

**2. 试验条件** 用硅胶层析法测定蛋白质有

它的特殊性, 因此必须注意以下几个方面:

(1) 硅胶的选择 试验采用的是天津化学试剂二厂生产的NDG型L类多孔硅胶, 由于它的渗透极限, 分离范围等指标都是以聚苯乙烯为标准的, 因此在测定蛋白质分子量时, 必须重新进行选择。选择方法是作出每一种型号硅胶的标定曲线, 由曲线确定分离上限和分离范围。这样做比较准确但费时。我们采用的是估算法, 从理论上计算出色谱柱的 $V_0$ 和 $V_i$ 值。选择的硅胶必须使被测蛋白质的淋出体积 $V_e$ 满足 $V_0 < V_e < V_i$ 。如果蛋白质分子量在1万到40万之间, 则选用5L, 6L多孔硅胶有分离效果。

(2) 试样浓度的选择 测定合成高聚物的分子量及其分布时, 试样浓度一般取0.05—0.3%。在测定蛋白质时, 选择试样浓度必须考虑以下三个因素: 由于检测器的灵敏度有限, 试样的浓度不能配得太稀; 色谱柱的负载不能过高, 如试样的浓度太大, 容易发生淋出体积后移的所谓“超载”现象; 由于蛋白质以水作溶剂, 溶剂化作用很强烈, 溶解后会在高分子链的周围形成一层分子排列较规整的溶剂化层, 使高分子链变得较为僵硬, 构象不易改变, 构象熵变小, 甚至 $\Delta S$ 也可能成为负值。此时, 可能出现蛋白质先溶解, 然后析出现象。为此, 以水作溶剂时, 我们取试样浓度为0.2—4%。

(3) 标样的选择和校正曲线的确定 根据被测蛋白质试样的分子量范围来选择标样, 并要求标样分子量单一、含杂质尽可能少, 过柱后谱图对称性好, 方便易得。我们用细胞色素

c, 胰蛋白酶、胃蛋白酶、卵蛋白片、牛血清白蛋白, 人- $\gamma$  球蛋白、狗肝铁蛋白等七种蛋白质作为标样, 分子量范围在 1.17 万到 48 万之间。

表 1

| 蛋白质标样*          | 分子量    | 淋出体积( $V_e$ 级分) |
|-----------------|--------|-----------------|
| 细胞色素 c          | 11700  | 66              |
| 胰蛋白酶            | 23300  | 60.4            |
| 胃蛋白酶            | 35000  | 59              |
| 卵蛋白酶            | 43000  | 57.4            |
| 牛血清白蛋白          | 68000  | 56              |
| 人- $\gamma$ 球蛋白 | 165000 | 52              |
| 狗肝铁蛋白           | 480000 | 46              |

\* 蛋白质浓度: 0.6%。

实验证明, 采用硅胶为凝胶时, 蛋白质分子量的对数值与淋出体积之间的线性关系可以通过实验, 用一元线性回归处理实验数据, 以相关系数  $r$  来检验计算结果为:  $r = -0.9932$ 。回归方程为一直线方程:

$$\log M = -9.5523 - 0.08448 V_e$$

可见, 采用多孔硅胶为凝胶的硅胶层析, 蛋白质分子量的对数值与淋出体积之间存在良好的直线关系 (图 1)。

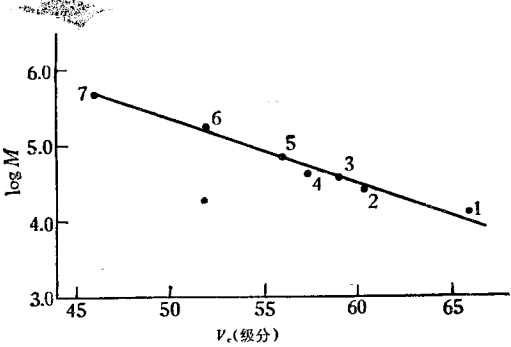


图 1 蛋白质的  $\log M-V_e$  校正曲线 (紫外检测)

1. 细胞色素 c 2. 胰蛋白酶 3. 胃蛋白酶 4. 卵蛋白片  
5. 牛血清白蛋白 6. 人- $\gamma$ 球蛋白 7. 狗肝铁蛋白

二、实 例

应用硅胶层析法测定苏春蚕绢丝腺中的液状绢蛋白质的分子量。

1. 试样制备 取苏 16  $\times$  17 的熟蚕一至二条, 取出它的一对绢丝腺, 在 0.5MNaCl 溶液中漂洗五次, 舍去其中前部绢丝腺, 其它部分浸入

去离子水中数分钟, 以除去腺细胞; 再移至数毫升去离子水中, 并放入 4 $^{\circ}$ C 的冰箱内过夜; 过滤, 所得溶液就是液状绢蛋白质试样。其浓度为 2—2.4mg/ml。

2. 测试条件 采用 SN-01 型凝胶色谱仪。色谱柱总长为 3 米, 多孔硅胶为 NDG-5L, NDG-6L, 以去离子水为溶剂和淋洗剂, 淋洗速度为 1 毫升/分, 浓度检测用 751 型分光光度计, 波长 276m $\mu$ 。

3. 测定结果 由于蛋白质分子结构与介质环境关系很大, 试样以水为溶剂时, 在整个测定过程中温度都不超过 40 $^{\circ}$ C, 放置时间较短, 条件是很温和的, 可以认为不会发生引起蛋白质分子断裂和聚合的化学反应。分离得的蛋白质和测定得到的分子量与其它制备方法相比较, 最为接近它本身应有的值。

根据实验得到绢丝腺各部位分泌的液状绢蛋白质的淋出曲线 (图 2)。由淋出曲线和蛋白质的校正曲线可以求出各部位的分子量数据。

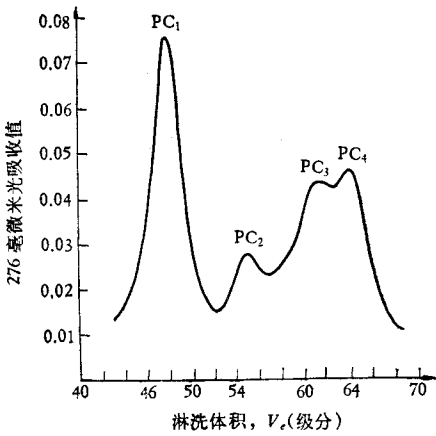


图 2 中部绢丝腺的液状绢蛋白质的淋出曲线

根据图 2 的峰值可确定被分离的绢丝腺液状绢蛋白质组分的淋出体积  $V_e$ , 对应校正曲线就可求得相应的分子量, 见表 2。

表 2

| 名称                    | PC <sub>1</sub>    | PC <sub>2</sub>    | PC <sub>3</sub>    | PC <sub>4</sub>    |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 淋出体积( $V_e$ )<br>(级分) | 48.0               | 55.0               | 61.0               | 64.0               |
| 分子量                   | $3.14 \times 10^5$ | $8.05 \times 10^4$ | $2.50 \times 10^4$ | $1.40 \times 10^4$ |

对蚕丝蛋白质分子量测定的研究，近五十年来国内外从未间断过。由于制备方法、测试手段不同，因而结果相差悬殊。现将有关报道的主要结果与本文的实验结果对比见表 3。

表 3

| 作者                     | 分析方法  | 分子量      | 样品来源及制备条件      |
|------------------------|-------|----------|----------------|
| Sprague<br>(1975年)     | 凝胶电泳法 | 2.0—22 万 | 中部绢丝腺前区提取的丝胶   |
| Gamo et al.<br>(1977年) | 凝胶电泳法 | 8.1万     | 中部绢丝 S-4       |
|                        |       | 30.9万    | S-1            |
|                        |       | 14.5万    | 腺后区分 S-3       |
|                        |       | 17.7万    |                |
|                        |       | 13.4万    | 泌出的 S-2        |
| 本文<br>(1981年)          | 凝胶层析法 | 1.4万     | 中部绢丝腺液状绢蛋白质水溶液 |
|                        |       | 2.5万     |                |
|                        |       | 8.0万     |                |
|                        |       | 31.0万    |                |

从上述数据可见，本文测得的分子量与文献记载的数值在范围上大体接近，有部分结果基本一致。

三、 讨 论

1. 以硅胶层析法测定蚕丝蛋白质的分子量，通过相关系数  $r$  的计算，表明了蛋白质分子量与淋出体积之间的线性关系。从理论上证实了这种测定的可能性。

2. 通过实际测定蚕丝蛋白质的分子量，并与有关文献报道的数据进行比较，表明实验结果大体上比较接近。从实验的角度证实了采用硅胶层析法测定蛋白质分子量是完全可能的

3. 我们曾将层析法与电泳法进行对比试验，发现硅胶层析法峰的容量小，不能分离具有相同或非常相近分子量的分子。这是硅胶层析法的缺点。然而，这些缺点随着高效填料的出现将逐渐得到一定程度的弥补。

4. 用多孔硅胶的凝胶层析法在 SN-01A 型凝胶色谱仪上测定蛋白质的分子量，与经典的层析法（以 Sephadex 为凝胶）比较，测定时间短，分析一个样品，一般只需 3—4 小时，仪器操作简便，层析柱维护方便，是一个有前途的方法。

参 考 文 献

[1] 鲁子贤：《生物化学与生物物理进展》，1974 年，第一期。  
[2] 施良和：《凝胶色谱法》，科学出版社，1980 年。  
[3] 袁静明：《凝胶层析法及其应用》，科学出版社，1975 年。  
[4] Takuma Gamio Inokuchi, et al.: Insect Biochem., 7, 285, 1977。

[本文于 1982 年 2 月 11 日收到]

本工作曾得到中国科学院上海生物化学研究所鲁子贤先生指导，特此致谢。

核酸序列分析中应用的超薄凝胶技术

方 荣 祥

(中国科学院微生物研究所)

在核酸序列分析中已普遍使用厚度为 0.4mm 左右的聚丙烯酰胺凝胶<sup>[1]</sup>。与早先使用的厚度 1—2mm 的凝胶相比，这种薄胶技术具有分辨率高、带谱平整、电泳速度快等优点。

为进一步提高放射自显影图上核酸带谱的分辨率，目前正在推广使用超薄胶<sup>[2]</sup>。这种超

薄胶技术的要点是：(1)凝胶厚度为 0.2mm，经干燥后厚度约为 0.02mm；(2)电泳时保持凝胶各部分温度均匀；(3)电泳后凝胶经过固定、烘干后再进行放射自显影。

下面介绍超薄胶技术的操作方法。

1. 玻璃板处理 构成凝胶模子的二块玻璃