

胶原水解液的氨基酸分析

张林生 路 苹 曹 让

(西北农业大学中心实验室, 陕西杨陵)

胶原 (Collagen) 是一种结构蛋白, 呈纤维状, 是细胞间质的主要有机成分, 是动物体内含量最丰富的蛋白质, 占动物体内总蛋白质的 25—30%。人体的许多生理现象都与胶原蛋白的代谢有密切关系。

胶原的氨基酸组成有一个特点, 即具有两种不平常的氨基酸——羟脯氨酸 (Hyp) 和羟赖氨酸 (Hyl), 这在其它蛋白质内是没有的。羟赖氨酸残基是胶原分子中糖苷化所必需的, 它和赖氨酸与胶原分子的交联及纤维的形成密切相关; 羟脯氨酸残基对维持胶原三股螺旋体的稳定性具有重要的作用。

氨基酸分析仪已广泛用于一般蛋白质水解液的氨基酸分析, 而对胶原分析使用较少。有的人按一般蛋白质水解法测定胶原氨基酸, 往往忽略了 Hyp 和 Hyl 的分析或者不予以报告; 还有采用单柱分析, 用时长, 费试剂。我们利用 Beckman 121 MB 型氨基酸分析仪的特点, 系统试验了胶原水解氨基酸的双柱分析方法, 以及新的缓冲液配方, 成功地进行了胶原蛋白水解氨基酸的分析。

1. 标准氨基酸混合液

配制含有天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、羟脯氨酸和羟赖氨酸, 浓度均为 100n mol/ml 的标准液。

2. 缓冲液

氨基酸组分的柱层析分离取决于洗脱用缓冲液的 pH 值。既要分析 Hyp 和 Hyl, 又要兼顾其它氨基酸的分离, 所以我们将原来 pH 3.28 缓冲液更换为 pH 3.20 和 pH 3.50 两种缓冲液; 将原来单柱分析

碱性氨基酸的 pH 4.95 缓冲液更换为 pH 5.20 缓冲液, 专用于短柱分析。经调试试验得出的缓冲液配方如下 (表 1)。

3. 分析结果

用上述配方制成的缓冲液分析组成胶原蛋白的十九种标准氨基酸混合液。结果见图 1。

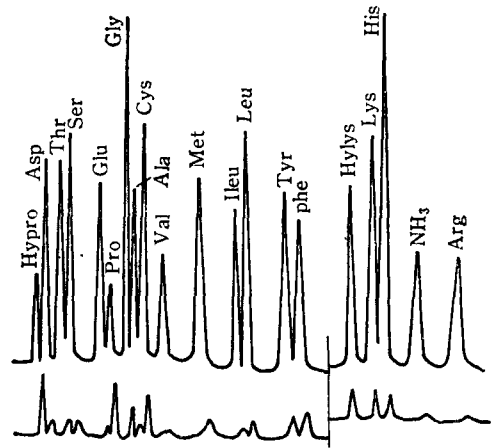


图 1 组成胶原的十九种标准氨基酸分析图谱

本文叙述的方法是经过多次分析后选择出的最佳条件。调节缓冲液的 pH 值可改变分辨率。增大缓冲液 pH 值, 氨基酸可提前洗脱; 降低缓冲液 pH 值, 氨基酸则延迟洗脱。胱氨酸和赖氨酸对缓冲液 pH 很敏感, pH 3.50 缓冲液使胱氨酸的分离位于丙氨酸和缬氨酸之间; pH 5.20 缓冲液使赖氨酸位于羟赖氨酸和组氨酸之间。若缓冲液更换时间不恰当, 赖氨酸和羟赖氨酸两个峰可能重叠在一起, 影响分离效果。

从图 1 看出, 用该法测定胶原蛋白十九种氨基酸, 图谱清晰, 基线稳定, 分辨率高。羟脯氨酸和羟赖氨酸分离完好, 其它氨基酸组分的分离未受任何影响。苏氨酸-丝氨酸、甘氨酸-丙氨酸、异亮氨酸-亮氨酸、和酪氨酸-苯丙氨酸的分辨率分别为 86.7%、92.5%、97.8% 和 96.2%。连续分析时间由单柱的 80.1 分钟缩短到 64.2 分钟, 节省 15.9 分钟。

用这种方法, 我们分析了皮革、食用明胶、牛肉、羊肉、猪肉、骨骼和混合饲料等含有胶原蛋白的样品, 分

表 1 各种缓冲液的配制

试 剂	pH 2.20	pH 3.20	pH 3.50	pH 4.95	pH 5.20
柠檬酸钠 (g)	19.6	15.7	19.6	34.3	34.5
浓盐酸 (ml)	16.5	10.3	11.2	16.5	6.5
25% 硫二甘醇 (ml)	20.0	10.0	10.0	10.0	—
苯酚 (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
总体积 (ml)	1000	1000	1000	1000	1000
异丙醇 (ml)	—	—	—	20.0	50.0

饭豇豆凝集素等电点的快速测定

赵永芳 周济兰* 叶明*

(武汉大学生物系)

目前多数人采用凝胶等电点聚焦电泳法测定蛋白质等电点(pI)。此法受多种因素的影响^[1,2,4],加之所用试剂 Ampholyte 价格昂贵,故使用不甚方便。根据溶液 pH 值大小直接影响蛋白质和离子交换剂束缚力的原理, Yang (1985) 报道了一种 pI 测定方法,我们参照这一方法对饭豇豆 (*Vigna cylindrica*) 凝集素(详见另文)的 pI 值进行了测定,结果表明此法快速、准确(<0.2 pH 单位)、成本低(离子交换剂可反复使用)。

方法与结果

一、方法

1. 蛋白质含量的测定: 用 A_{280nm} 消光值表示,以牛血清白蛋白(进口产品)作对照;

2. 饭豇豆凝集素的制备及效价测定: 按文献[5]进行;

3. 凝集素等电点的测定: 选用 pH 变化范围在 4.8—6.0 的离子交换剂 SP-Sephadex C-50 (进口产品),饭豇豆凝集素用生理盐水稀释,其浓度为 2mg/ml。操作步骤参照文献[3]进行。

二、结果

用离子交换剂测出饭豇豆凝集素的等电点为 5.3。饭豇豆凝集素溶液在 pH 4.8—6.0 时,用它与 SP-Sephadex C-50 交换后,其上清液的凝集效价列于表 1(I)。以表中所列效价数为纵坐标,以相应的 pH 值为横坐标即可绘出饭豇豆凝集素的等电点测定曲线(图 1 中 A)。从图看出,该曲线分为三段:第(1)段是饭豇豆凝集素被 SP-Sephadex C-50 所吸附,凝集效价为 0。这表明饭豇豆凝集素在 pH 5.2 以下的溶液中带正电荷,能被阳离子交换剂吸附;第(3)段凝集效价为 16。这表明饭豇豆凝集素在 pH 5.4 以上的溶液

中带负电荷,不能被阳离子交换剂吸附;第(2)段是等电点区段,将该区段的首、尾 pH 值相加被 2 除就可得

表 1 凝集效价与 pH 的关系

管号	1	2	3	4	5	6	7
凝集效价	4.8	5.0	5.2	5.4	5.6	5.8	6.0
样品							
I*	0	0	0	16	16	16	16
II*	8	8	8	0	0	0	0

* Sp-Sephadex C-50 吸附饭豇豆凝集素后的上清液。

** Sp-Sephadex C-50 吸附饭豇豆凝集素后的沉积胶加 1ml 0.4mol/L 磷酸缓冲液(含 0.15 mol/L NaCl), pH 7.0, 充分洗涤,离心后收集的上清液。

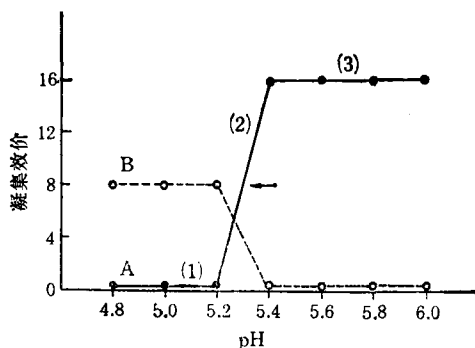


图 1 饭豇豆凝集素的等电点测定曲线

A. 交换剂吸附凝集素后的上清液;

B. 交换剂吸附凝集素后的沉积胶再洗脱的溶液。箭头所指表示等电点处。

* 湖北省肿瘤研究所。

析结果获得用户满意。重复性、再现性均好。

参考文献

[1] P. 卡尔森等著,张增明译:《病理生化学》,科学出版社,北京,1984,63页。

[2] M. S. 卡南高著,陆中定译:《衰老生物化学》,人民卫生出版社,北京,1980,164页。

[3] Beckman Instrument Inc: Training Course for 121MB Amino Acid Analyzer, 1979.

[本文于 1987 年 10 月 28 日收到]