

的2%用于囊胚 mRNA 的密码)与实际情况相比是偏低了。

参 考 文 献

[1] Britten, R. J. et al.: *Methods in Enzymology*,

Vol. 29, 363, Academic Press, New York, 1974.

[2] Britten, R. J. et al.: *Science*, 161, 529, 1968.

[3] Wetmur, J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 31, 349, 1968.

[4] Davidson, E. H. et al.: *Cell*, 4, 217, 1975.

[5] Galau, G. A. et al.: *Cell*, 2, 9, 1974.

[本文于 1983 年 4 月 14 日收到]

高效凝胶色谱测定蛋白质分子量

姚志建 马立人

(军事医学科学院, 北京)

自从 1959 年凝胶过滤色谱出现以来^[1], 很快就提出这种方法可做为一种测定蛋白质分子量的手段^[2]。但经典的凝胶过滤色谱流速慢、柱效低、检测灵敏度和操作的自动化程度也不高。因此, 长期以来凝胶过滤主要还是作为一种分离的手段, 并不经常用来测定分子量。

近年来高效凝胶过滤色谱法的出现, 使这项技术有了进一步的发展^[3,4]。一些新型的高效液相色谱柱也表现出在一定的分子量范围内分配系数 (K_d) 与分子量对数呈近似线性的关系^[5], 因此利用高效液相色谱的高效、高速、高灵敏度的特点, 就有可能建成一种快速、微量的测定蛋白质分子量的实用方法。

本文报告了我们在测定蛋白质分子量时所用基本色谱条件的选定及对几种蛋白质提取物的应用实例。

一、材料和设备

高效液相色谱仪由 Waters 6000 输液泵及 U6K 阀式进样器, 配用 Pharmacia 214 nm. 单波长紫外检测器组成。选用的高效凝胶色谱柱为瑞典 LKB 公司出售的 UltroPak TSK-SW 系列预装柱, 柱长 600 毫米, 内径 7.5 毫米。

右旋糖酐蓝、甲腺球蛋白、铁蛋白、过氧化氢酶、乳酸脱氢酶、牛血清白蛋白均为 Pharmacia 产品。卵清蛋白、细胞色素 C、糜蛋白酶原、二硝基苯丙氨酸 (DNP- 丙氨酸) 为 Serva

产品。其它试剂均为北京化工厂产之分析纯制品。

二、结 果

1. 色谱条件

(1) 移动相的离子强度 高效凝胶色谱填料是由硅胶表面键合亲水官能团制成的。实际使用的结果却发现填料表面仍有残留的极性基团存在。为了减少这些残留极性基团对蛋白质分子的吸附或排斥作用, 需对移动相中的离子强度做适当的调整。图 1 示出改变移动相离子强度对牛血清白蛋白在柱上保留行为的影响。根据图 1 所示的关系, 我们一般选用 0.1 M (离子强度 $\mu = 0.2$) 的磷酸缓冲液为移动相。

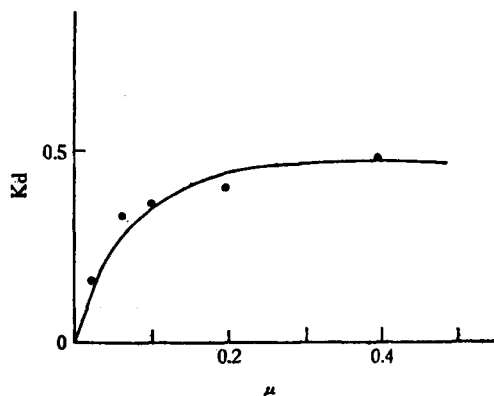


图 1 离子强度对分配系数的影响

分离条件: 柱: TSK 3000SW 移动相: 磷酸缓冲液 pH6.8 流速: 1.0 毫升/分 样品: 牛血清白蛋白 4.5 微克溶于 5 微升水中

(2) 流速 流速与柱效有一定的关系，同时流速又决定了每次测定所需的时间。根据表 1 的结果我们一般选用 1.0 毫升/分的流速。

(3) 选择性 是指不同孔隙柱填料对不同分子量范围样品的适用性。测试的结果见图 2。测定时，用右旋糖酐监测空体积 (V_0)，以 DNP-丙氨酸测总体积 (V_t)。

表 1 流速的影响*

流速(毫升/分)	N/米	HETP (毫米)	完成一次分离的时间(分)
0.1	8360	0.12	300
0.5	5443	0.18	150
1.0	4778	0.21	30
1.2	3573	0.28	25

注: N: 理论板数, HETP: 理论等板高度,
 $N = 5.54 \times (tr/W_{1/2})^2$, $HETP = L/N$
 tr : 保留时间, $W_{1/2}$: 半峰宽, L: 柱长
* 色谱条件 柱: TSK 3000 SW 移动相: 磷酸缓冲液,
0.1 M ($\mu = 0.2$), pH 6.8 样品: 9 微克牛血清白蛋白溶于 10 微升水中

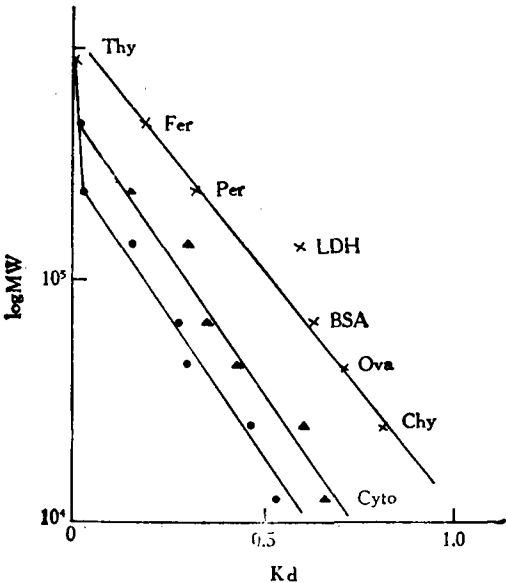


图 2 柱的选择性

分离条件: 柱×—×TSK 4000 SW; ▲—▲ TSK 3000 SW, ●—●TSK 2000 SW; 移动相 0.1M 磷酸缓冲液, pH6.8; 流速 1 毫升/分

Thy: 甲状腺球蛋白 Fer: 铁蛋白 Per: 过氧化氢酶 LDH: 乳酸脱氢酶 BSA: 牛血清白蛋白 Ova: 卵清蛋白 Chy: 糜蛋白酶原 Cyto: 细胞色素 C

(4) 内标准 凝胶过滤法测定分子量是基

于对洗脱体积(V_e)的测量,可由保留时间 (T_r)来推算。流速的稳定性直接关系到测定结果的准确性,特别是当几次测定之间的间隔时间较长,仪器的状况等因素可能有较大的变化时更是如此。因此我们采用了内标准法,选用右旋糖酐蓝和 DNP-丙氨酸为内标,与样品同时进样,这样在测得样品保留时间的同时,也测得了完全排阻和完全进入填料孔隙的两种内标的保留时间 (T_0 和 T_t),使计算出的 K_d 保持恒定。表 2 显示,当使用内标准后,即使流速有较大的改变,仍可保持基本恒定的 K_d 值,这就保证了据此得出的分子量有较好的重复性。

表 2 用内标准法测不同流速下的 K_d 值

	T_0	T_r	T_t	K_d
0.5	22.87	34.07	56.67	0.331
0.8	14.20	21.25	35.16	0.336
1.0	11.42	17.08	28.25	0.336
1.2	9.57	14.23	23.55	0.333

2. 应用实例

表 3 是对一些分离提取产品的分子量测定结果。用本法测出的分子量,是样品在移动相的缓冲体系中呈自然状态下的分子量。如果某种蛋白分子是由几个亚单位构成,则色谱图中最明显的峰就代表了该样品在这种移动相中最多出现的亚单位缔合形式。

表 3 几种蛋白质分子量的测定

	K_d^{**}	分子量
放射病“极期”蛋白 ^[6]	0.35	74.000
兔抗狗免疫球蛋白	0.11	260.000
	0.26	120.000*
花生凝集素	0.39	60.000
炭疽抗原	0.34	78.000
	0.52	30.000*

* 最明显的峰
** 在 TSK 3000SW 柱上测定

三、讨 论

本文报道了用高效凝胶色谱测定蛋白质分

子量的方法,其特点是快速,微量。一次测定的时间仅需半小时左右,柱效可达到每米近 5,000 块理论板;当配有合适的检测器时,其检测灵敏度高于普通的电泳显色,可测出约 10^{-11} 克分子浓度的蛋白。作为一种色谱方法,其分离和测定是同时进行的,因此就可以对一混合样品中的数种成份同时进行测定,从而得到各种成份相对含量。必要时,还可对各个成分分别加以收集,进行小量制备,供进一步的研究。

Imamura 等曾报告在变性剂 (SDS) 存在下用高效凝胶柱测定蛋白质分子量的方法^[7], Takagi^[8] 将这种方法与 SDS 电泳法进行了比较。我们采用的色谱条件是希望保持蛋白质的自然状态,因为目前对自然状态下的蛋白质分子量尚缺乏简便易行的测定方法,而蛋白质的自然状态经常是表现其生物活性的必要条件。

球形蛋白质分子,进入一定孔隙填料的程度取决于这些分子的水化半径。如果是不对称的蛋白分子,则应考虑由于所谓“末端插入”效应 (“end-on insertion”) 而使测出的分子量数值偏低^[9]。另外,由于目前填料发展水平所限,虽然

采用了有一定离子强度的移动相,但对某些蛋白样品来说,仍可能存在着填料对样品的排斥或吸附。例如图 2 中乳酸脱氢酶就与其它蛋白样品的色谱行为有较大的差别,从而造成一定的误差。

总之,这种方法不仅具有微量,快速,能对混合物进行分析、简便易行等优点,又能在各种蛋白质分离提取过程中,作为可对大量的产品和中间产物进行分子量估测的方法,以及直接作为小量制备的手段。

参 考 文 献

- [1] Porath, J. et al.: *Nature*, **183**, 1657, 1959.
- [2] Whitaker, J. R.: *Anal. Chem.*, **35**, 1950, 1963.
- [3] 姚志建:《生物化学与生物物理进展》, 4, 54, 1983.
- [4] Hearn, T. W. et al.: *Amer. Lab.*, **14** (10), 18, 1982.
- [5] Kato, Y. et al.: *J. Chromatogr.*, **190**, 297, 1980.
- [6] 李晋萍:《硕士学位论文》, 1983.
- [7] Imamura, T. et al.: *J. Liquid Chromatogr.*, **4**, 613, 1981.
- [8] Takagi, T.: *J. Chromatogr.*, **219**, 123, 1981.
- [9] Meredith, S. C. et al.: *Anal. Biochem.*, **121**, 234, 1982.

[本文于 1983 年 6 月 24 日收到]

Con. A-Sepharose 亲和吸附剂的制备 及其纯化某些蛋白质的性能

赵永芳 祝兵*

(武汉大学生物系)

伴刀豆球蛋白 A (Con. A) 与溴化氰活化的琼脂糖 (Sepharose) 偶联制成的 Con. A-Sepharose 亲和吸附剂具有纯化某些糖蛋白一类物质的性能。因此,人血清中的胰蛋白酶抑制剂,碱性磷酸酯酶,小牛脾磷酸二酯酶,不同变种的甲胎球蛋白和某些激素如绒毛膜促性腺激素 (HCG), 促黄体激素 (LH) 等物质都可用它纯化^[1-2]。此法操作简单、样品回收率较高,故它已成为纯化上述一类物质的有效工具。

我们参考 Steven^[3] 的方法,用自己制备的

Con. A^[8] 与溴化氰活化的 Sepharose 偶联制成的 Con. A-Sepharose 亲和吸附剂性能较好,经过十三次重复使用,活力未见明显下降。将其置冰箱存放七月余仍有相当活力。用它纯化小牛脾磷酸二酯酶粗提取液,纯化倍数达 55,回收率达 50%,用它分离人血清中的糖蛋白效果良好。本文就这方面的研究进行概述。

* 本校 78 届学生。