

# 硅胶层析法测定蚕丝丝朊分子量的探讨

李良训 王红英 汤浩 钱学军

薛金晨 卢善真 陈海宝

(苏州丝绸工学院)

早在四十年代国外已经对蚕丝丝朊分子量进行了研究。1947年 Coleman 与 Howitt 采用乙烯铜—氢氧化二胺为溶剂,以渗透压法测得丝朊的分子量为  $3.3 \times 10^4$ ; Holmes 和 Smith 于 1952 年通过测定丝朊溶液的沉降系数计算出丝朊的分子量为  $8.4 \times 10^4$ ; Kratky 和 Pity 用 X 射线小角衍射方法测得丝朊的分子量为  $27.8 \times 10^4$ ; Hyde 和 Wipplor 以光散射法测得丝朊的分子量为  $32.6 \times 10^4$ , 而 Iizuka 以同样方法得到的分子量却是  $27.8 \sim 37.0 \times 10^4$ 。可见,测定蚕丝丝朊的分子量有多种方法,所得结果也不尽相同。

硅胶层析是六十年代发展起来的一种新型液相色谱,广泛用于合成高聚物的分子量及其分布的测定,但用于丝朊分子量的研究还不多见。本文将就此作一初步的探索。

## 一、实验条件

我们用硅胶层析法在国产 SN-01A 型凝胶渗透色谱仪上测定蚕丝丝朊的分子量及其分布。用示差折光仪检测。

所用多孔硅胶是 NDG-4L, NDG-5L, 色谱柱总长为 3 米,采用 0.3% 乙醇溶液作柱效测定,结果为 2263 块塔板/米。溶剂为  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  中性混合溶液(按 1:8:2 摩尔比)。

## 二、试样制备

江苏省吴江县心田夏茧生丝经精炼脱去丝胶,溶于  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  混合溶剂中,配成 0.004~0.027% 的丝朊溶液。

精炼脱胶方法 称取 5 克左右生丝投入 0.5% 的皂片溶液中(浴比为 1:50),在  $95^\circ\text{C} \sim 98^\circ\text{C}$  下精炼 45 分钟,换以新鲜的同浓度皂片溶液在同样温度条件下再精炼 30 分钟,取出后以 1:50 的浴比将丝样投入 0.05% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中,在  $90^\circ\text{C}$  下精炼 15 分钟,然后用热水洗二次,再用冷水洗至中性,热风吹干后放入 150 毫升石油醚中浸渍过夜,再放入 150 毫升无水乙醇中浸 3 小时,最后水洗晾干备用。

## 三、实验结果与数据处理

### 1. 标准蛋白质的淋出曲线

采用硅胶层析法测定蛋白质高聚物的分子量,首先要求得各种标准蛋白质分子量的对数值与淋出体积之间的关系。我们选用五种蛋白质标样来确定校正曲线。各标样的淋出曲线如图 1 所示。

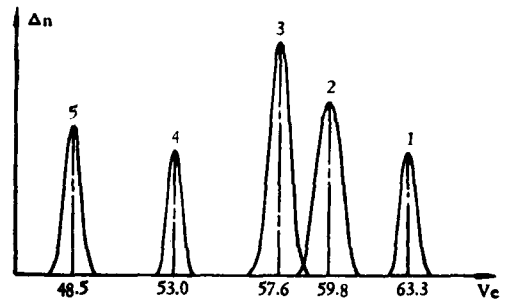


图 1 标准蛋白质的淋出曲线

1. 细胞色素 c	$M = 1.17 \times 10^4$
2. 胃蛋白酶	$M = 3.5 \times 10^4$
3. 卵蛋白片	$M = 4.3 \times 10^4$
4. 人- $\gamma$ 球蛋白	$M = 16.5 \times 10^4$
5. 狗肝铁蛋白	$M = 48.0 \times 10^4$

由于标样的分子量较单一,图形对称性尚

好，故可用峰值体积代表该蛋白质的淋出体积。

## 2. 蛋白质分子量校正曲线的获得

通过一元线性回归处理，蛋白质分子量的校正曲线方程为：

$$\lg M = 10.9290 - 0.10812 V_e$$

相关系数  $r$  为  $-0.9968$ ，证明了蛋白质分子量的对数值与淋出体积之间的线性关系。以  $\lg M$  对  $V_e$  作图，得到蛋白质分子量的校正曲线（图

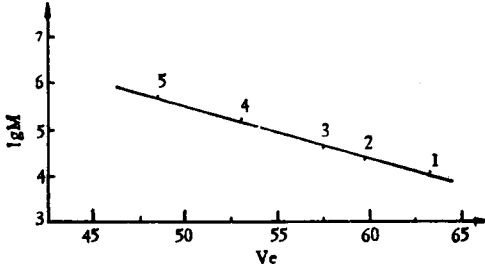


图2 标准蛋白质的校正曲线

1. 细胞色素 c; 2. 胃蛋白酶; 3. 卵蛋白片;  
4. 人- $\gamma$  球蛋白; 5. 狗肝铁蛋白。

2)。该直线斜率为  $-0.10812$ ，截距为  $10.9290$ 。

## 3. 测定蚕丝丝朊的分子量及其分布

将配制好的丝朊溶液约 1 毫升通过高压进样阀注入色谱柱中，以 0.5 毫升/分的速度进行淋洗，得到一个较窄的对称峰（图 3）

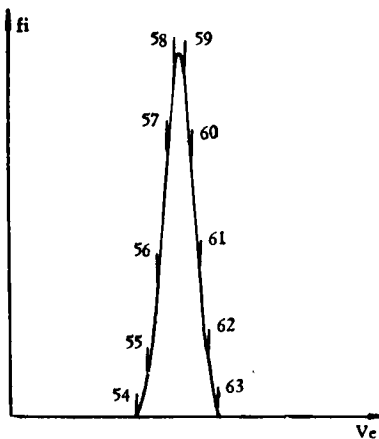


图3 蚕丝丝朊的淋洗谱图

## 4. 数据处理

(1) 用条法处理数据 将蚕丝丝朊的 GPC 谱图横坐标  $V_e$  以相等的间隔  $\Delta V_e$  分割成不少于 20 个离散点，并读出每个离散点  $V_i$ ，所对

应的谱图高度  $f_i$ ，分子量平均值采用离散型的归一化处理。其中  $F_i = f_i / \sum f_i$  得：

$$\bar{M}_{n(\text{测})} = \sum f_i / \sum \left( \frac{f_i}{M_i} \right) = 1 / \sum \left( \frac{F_i}{M_i} \right)$$

$$= 3.6868 \times 10^4$$

$$\bar{M}_{w(\text{测})} = \sum f_i M_i / \sum f_i = \sum F_i M_i$$

$$= 4.3569 \times 10^4$$

$$\text{分子量分散系数 } D_{(\text{测})} = \frac{\bar{M}_{w(\text{测})}}{\bar{M}_{n(\text{测})}} = 1.1818$$

(2) 加宽因子的改正 上述丝朊的 GPC 谱图并不完全真实地反映分子量及其分布情况，因为除了丝朊本身的分子量分布会引起峰宽以外，仪器也会引起峰加宽。

$$\sigma^2 = \sigma_M^2 + \sigma_D^2$$

式中  $\sigma$ ——标准偏差

$\sigma_M$ ——样品的标准偏差

$\sigma_D$ ——仪器产生的标准偏差

所以丝朊真实的平均分子量及其分布应为

$$\bar{M}_{n(\text{真})} = \bar{M}_{n(\text{测})} \exp \left[ \frac{(B\sigma_D)^2}{2} \right]$$

$$\bar{M}_{w(\text{真})} = \bar{M}_{w(\text{测})} \exp \left[ \frac{(B\sigma_D)^2}{2} \right]$$

$$D_{(\text{真})} = \frac{\bar{M}_{w(\text{真})}}{\bar{M}_{n(\text{真})}}$$

式中  $\bar{M}_{n(\text{测})}$ 、 $\bar{M}_{w(\text{测})}$  和  $\bar{M}_{n(\text{真})}$ 、 $\bar{M}_{w(\text{真})}$  分别表示数均分子量、重均分子量的测定值和经加宽改正后的值。 $\exp \left[ \frac{(B\sigma_D)^2}{2} \right]$  即为加宽效应的改正因子。

我们借助于标样卵蛋白的 GPC 谱图（图 4）来计算改正因子。由于其分子量近乎单一，可以认为它的峰宽仅仅是由仪器所引起的。此时  $\sigma_M = 0$ ，则  $\sigma = \sigma_D$ 。

我们用 Gauss 函数极限法来计算  $\sigma_D$  以及  $\exp \left[ \frac{(B\sigma_D)^2}{2} \right]$ 。由卵蛋白的 GPC 谱图得：

$$\sum f_i = 1488.9, \quad f_{\max} = 154.0$$

$$S_0 = 0.25 \sum f_i = 372.2$$

$$\sigma_D = \frac{S_0}{\sqrt{2\pi} \times f_{\max}} = 0.9642$$

$$\therefore \ln M = 25.1650 - 0.24896 V_e$$

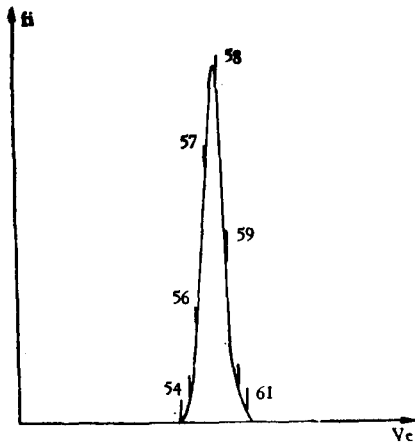


图4 卵蛋白的淋出曲线

$$\therefore B = 0.24896$$

$$\text{故 } \exp\left[\frac{(B\sigma_D)^2}{2}\right] = 1.0292$$

经加宽改正后得到丝朊真实的分子量及其分布为:

$$\bar{M}_{n(\text{真})} = \bar{M}_{n(\text{测})} \exp\left[\frac{(B\sigma_D)^2}{2}\right] = 3.7945 \times 10^4$$

$$\bar{M}_{w(\text{真})} = \bar{M}_{w(\text{测})} / \exp\left[\frac{(B\sigma_D)^2}{2}\right]$$

$$= 4.2332 \times 10^4$$

$$D_{(\text{真})} = \frac{\bar{M}_{w(\text{真})}}{\bar{M}_{n(\text{真})}} = 1.1156$$

## 四、讨 论

1. 本文仅对硅胶层析法用于蚕丝丝朊分子量测定的可能性进行了初步探索。实验结果表明用硅胶- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 体系测得的数据可多次重复,且能将不同的分子量组分分开,因此采用这种非常规体系测定丝朊的分子量是可行的,结果是可信的。

2. 用硅胶层析法测定高聚物分子量是通过试样与标准蛋白质分子量相比较而确定的,因而它是一个相对的方法。此外,采用NDG-L类为填料,以示差折光法检测其分离效率和灵敏度的方法,尚待改进。

\* 承杨百春等同志提供样品特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 北条舒正:《統絹糸の構造》。
- [2] 卢善真等:《生物化学与生物物理进展》,1982年,第6期。
- [3] 施良和:《凝胶色谱法》,科学出版社,1980年。
- [4] 袁静明:《凝胶层析法及其应用》,科学出版社,1975年。
- [5] 李良训等:《苏州丝绸工学院学报》,1982年,第1期。

[本文于1983年8月7日收到]

## 用 121 MB 型氨基酸分析仪测定山黧豆中的毒素

李天荣 路 苹 张林生

(西北农学院中心实验室,陕西杨陵)

汪沛洪

(西北农学院植物生理生化教研室,陕西杨陵)

山黧豆 (*Lathyrus sativus*) 适应性强,含蛋白质 25%, 高于小麦。近年来在世界一些干旱地区种植面积不断扩大。因山黧豆中含有毒素  $\beta$ -草酰氨基丙酸 ( $\beta\text{OAA}$ ), 所以国内外对选育低毒山黧豆品种、去毒及  $\beta\text{OAA}$  的测定方法<sup>[1-3]</sup> 做了不少研究; 测定  $\beta\text{OAA}$  多采用纸层析比色

法。本文介绍用 121 MB 型氨基酸分析仪测定  $\beta\text{OAA}$ , 其优点是测定小肽化合物不会污染层析柱。

### 1. 原理

$\beta\text{OAA}$  属双肽化合物, 溶于水、酒精、柠檬酸缓冲液中, 水溶液呈酸性<sup>[2]</sup>, 可用阳离子交换