

快速蛋白质液相色谱仪 测定蛋白质分子量

韩永根

(中国科学院上海生理研究所)

本文介绍一种用快速蛋白质液相色谱仪(FPLC)和高效凝胶色谱预装柱(Superose™ 6HR, 10/30)测定蛋白质分子量的方法,实验结果表明:本方法不仅快速、简便,而且经测定后,仍能保持其天然结构和生物活性。

实验部分

(一) 仪器:快速蛋白质液相色谱仪(FPLC)系统。

(二) 试剂:标准蛋白质溶液 9.7mg/ml, (发玛西亚公司产品); 蛋白质激酶X的可溶性组分(本所神经化学组提供); 流动相: 0.05mol/L磷酸钾含0.15mol/L氯化钠, pH7.0 (分析纯)。

(三) 色谱条件: Superose™ 6HR, 10/30, 标准蛋白质混合液 100μl, 检测波长 280nm, 流速 0.2ml/min。

(四) 方法: Superose™ 6HR, 10/30高效凝胶色谱预装柱, 表现出在一定的分子量范围内, 蛋白质分子在流动相和固定相之间的分配系数Kav与其分子量对数呈线性关系(1), 因此我们利用这一性质, 首先对已知分子量的标准蛋白质进行测定, 求出Kav, 以此值为纵座标, 以分子量对数为横座标作图, 便得分子量标准曲线, 然后在相同色谱条件下, 再测定出未知分子量样品的Kav, 就可从标准曲线中直接查出相对应的分子量。

实验结果

未知分子量的蛋白激酶 X 的可溶性组分在与标准分子量蛋白溶液测定的色谱条件相同下进行测定, 得色谱图 1。

从图 1 中可以得到三个结果: 1. 峰 2 为该酶的可溶性组分, 其Kav为0.59, 通过分子量标准曲线查出相应的分子量为 98000, 2. 该组分经分子量测定后仍然有酶活力, 3. 峰 1 为杂蛋白, 表明该样品在测定分子量时又得到了纯化, 做到了测定与分离

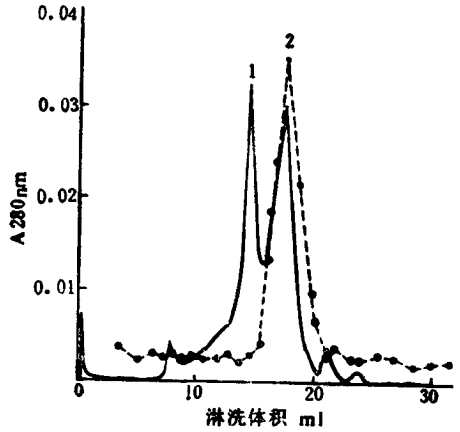


图 1 蛋白激酶X可溶性组分的分子量测定
峰1. 杂蛋白 2. 活性部分。
--- 表示活性大小。色谱条件见实验部分。

可同时进行。本方法与常用的几种测定分子量的方法, 例如凝胶色谱法(2), SDS—聚丙烯酰胺电泳法(3), 以及超离心沉降法(4)的比较见表 1。总之, FPLC法不仅快速、简便、灵敏、易回收, 而且能保持生物样品的天然结构和生物活性, 因此有可能成为一种有活性的生物高分子物质分子量测定的实用方法。

表 1 几种蛋白质分子量测定方法的比较

比较项目	测定方法	FPLC法	凝胶法	电泳法	超离心法
测定所需时间(h)		2—3	3—6	6—8	6—8
测定方法		简便	较复杂	较复杂	复杂
样品回收		容易	容易	难	难
检测灵敏度		高	低	高	低
分辨率		高	低	高	高
生物活性		有	有	有破坏	有

参考文献

- (1) Pharmacia Fine Chemicals AB: "Gel Filtration Theory and Practice", Rahms Lund, Sweden, P.25, 1982.
- (2) J.R. Whitaker, Anal. Chem., 35, 1950(1963).
- (3) H.R. Maurer, "Disc Electrophoresis", Walter de Grayter, Berlin P.8, 1971.
- (4) 刘培南等, 《仪器分析及其在分子生物学中的应用》, 科学出版社, 北京, 第一版第三册, P.187 1978. (收稿日期: 1988年4月5日)