

凝胶过滤法测定羊毛角朊分子量分布

冯美玲

(上海市纺织科学研究院)

【提要】 本文在应用已知分子量对数与其相对应的蛋白洗脱液毫升数呈线性关系的基础上, 摸索和选择了测定羊毛蛋白角朊 α 、 γ 分子量分布的可能途径。实验确定了 Sephadex G-75 凝胶过滤柱层析的测试条件和方法, 从而用定量表示法测定了三种典型油汗羊毛角朊的分子量分布。测定的蛋白角朊分子量范围在 3,000~80,000 之间, 测定误差 $\pm 5\%$ 。

一、前 言

羊毛纤维的性能与其结构密切相关, 分子量分布是高分子物分子链的重要结构参数, 所以羊毛分子量测定, 对羊毛品质的评定是一个较为重要的依据。由于羊毛是由主肽链通过双硫键(及其它氨基酸侧链)交链呈一网状结构, 分子量分布极不均一, 它的范围高达十万, 低至几千; 羊毛蛋白溶解性能又差, 要用一般的化学分析手段来快速分离, 定量测定单一角朊分子量是难以实现的。

我们曾采用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定了羊毛角朊分子量(图6), 证明了羊毛分子量的多分散性, 但不能进一步阐明羊毛之间分子量分布的差异。

本实验摸索和选用球状类型 Sephadex 的凝胶过滤柱层析, 确定了测定羊毛中 α 、 γ 分子量分布的柱层析方法^[1], 此方法作为实验本身具有单一性和一定的重复性。方法直接, 需要设备少, 方法的可靠性取决于蛋白样品的稳定性、过滤介质的可靠性和操作的熟练程度。

我们应用凝胶过滤法分别测定了三种不同色泽油汗公羊毛纤维的分子量分布(A型一代横交公羊淡黄油汗, 代号80-7; A型三代种公羊白油汗, 代号80-5; A型一般公羊黄油汗, 代号80-8)。

二、实验部分

(一) G-75 凝胶过滤原理

凝胶过滤是一种按分子量大小分离物质的层析法。凝胶过滤的分离取决于各种试样溶液进入填料孔穴的不同能力, 比填料孔径大的分子只能通过填料颗粒之间空隙流出柱外, 中等大小的分子进入填料中一部分孔穴, 只有那些最小的分子才能进入填料中全部孔穴。这样各种大小的分子在柱中所走的路程不同, 因而在不同的淋洗体积(或时间)被淋洗出来时, 大分子先被洗脱出来, 小分子后洗脱, 从而达到大小分子分离目的。

Sephadex G-75 Fine是由交链右旋糖酐与环氧氯丙烷共聚制备的一种球状凝胶, 在水中溶胀, 化学稳定。

本实验羊毛中 α 角朊高分子部分首先被洗脱出来, α 角朊的低分子及 γ 角朊低分子蛋白后洗脱出来。

(二) 材料及仪器

1. 洗脱液: 0.2M NH_4OH 用 HCl 调至 pH8.5,
2. 填料: 称取 Sephadex G-75 Fine (Pharmacia 出品) 1克干粉用 12~15 毫升蒸馏水溶胀, 在溶胀期间避免剧烈搅拌, 以免破坏凝胶球体。
3. 标准蛋白混合物: Pharmacia Co. MW Calibration Kit.
4. 羊毛样品准备^[2]: 羊毛样品在准备之前首先去除各种草屑和杂质, 然后经索氏抽提器去除油汗。称取 2.3 克纯净羊毛, 经

2%过乙酸氧化,用0.2N NH₄OH 搅拌过滤去除不溶物β角朊,滤液含有α、γ角朊,用洗脱液稀释至1000毫升,瓶口盖紧,放入冰箱备用。

5. 仪器:使用瑞典 Pharmacia 公司出品的层析装置,包括层析柱、泵 P-3、紫外检测器 UV-1、记录仪及 500 毫升洗脱液储器。

(三) 操作条件

填料:已溶胀的 Sephadex G-75 Fine, 柱:1.6×90厘米(填料高度63.8厘米); 洗脱液:0.2M NH₄OH 用 HCl 调至 pH 8.5;

流速:8.5 毫升·厘米⁻²·小时⁻¹;

样品用量:用注射器吸取已制备蛋白样品 2 毫升;

检测器:UV-1 灵敏度 0.05AU (吸收);

记录仪:REC-1 灵敏度 10 毫伏;

纸速:120 毫米/小时。

(四) 操作方法

首先将层析柱垂直安装在实验台上,卸下柱底部,将灌有洗脱液的注射器接到柱的出口管上。打开阀门,将液体徐徐注入以充满柱底部滤网下的空间,滤网下面注意不得留有气泡。关闭阀门,取下注射器,将柱底部装好。然后将层析柱与储蓄器、压缩泵相连。储蓄器内加 300 毫升洗脱液,并接通检测器和记录仪。取下柱顶部,柱内先装入洗脱液,边流动边加填料 Sephadex G-75,保证柱内没有气泡,柱上端加一杯子,使凝胶表面不受破坏。然后装好柱顶部,起动泵,调节泵的管系加压手柄增加压缩泵 P-3 压力盘上的压力,使洗脱液正常流出,连续进洗脱液使层析柱运转 1~2 小时,以达到柱的平衡、稳定,然后进样。在进样前去除凝胶表面上的洗脱液,但决不能使其跑干,2 毫升样品沿柱壁加入凝胶顶端,允许样品进入床内,但决不允许床跑干。用少量洗脱液洗涤留在床表面和柱壁上的样品,重新用洗脱液充满柱,在加样时要留心勿使气泡进入床内。然后在

选择的层析条件下进行正常凝胶分离、检测和图谱记录。

(五) 分子量分布表示法

1. 在确定的层析条件下首先将已知分子量混合蛋白标准进行凝胶过滤层析分离。通过已知分子量分布图绘出 Log M~V。标准曲线(即已知分子量对数与对应蛋白洗脱液最高峰的流出体积 V。作图),作为测定蛋白样品分子量分布的依据。

2. 在同样层析条件下测定样品分子量分布,根据标准曲线洗脱液毫升数在样品分子量分布的洗脱图谱上分别定出分子量范围:

70,000~50,000; 50,000~30,000; 30,000~20,000; 20,000~10,000; 10,000 以下等五个片段。

3. 取厚薄均匀的纸分别表示样品分子量范围的片段大小,分别称其重量,算出各分子量范围占其总重量的百分含量(以重量计)。

4. 纸片称量误差 ± 1% (在实验误差之内)。

(六) 实验结果

表1 标准蛋白混合物

蛋白名称	分子量	来源
磷酸化酶	94,000	兔肌肉
白蛋白	67,000	血清
卵清蛋白	43,000	蛋白
碳酸酐酶	30,000	红血球
胰蛋白酶	20,100	大豆
乳清蛋白	14,400	牛奶

表2 标准蛋白已知分子量对数与各蛋白洗脱流出液最大值

蛋白名称	LogM	洗脱液波峰最大值 (毫升) V。
磷酸化酶	Log 94,000	—
白蛋白	Log 67,000	45
卵清蛋白	Log 43,000	51.5
碳酸酐酶	Log 30,000	59
胰蛋白酶	Log 20,100	72
乳清蛋白	Log 14,400	81

表3 羊毛中 α 、 γ 角朊分子量分布(重量百分比)

分子 量范围	羊毛 代号		80-5		80-7		80-8	
	毫克	%	毫克	%	毫克	%	毫克	%
70,000~50,000	284.0	26.9	328.7	31.4	312.5	29.7		
50,000~30,000	213.4	20.2	217.4	20.8	162.3	15.4		
30,000~20,000	108.1	10.2	121.8	11.6	88.1	8.4		
20,000~10,000	175.0	16.5	154.8	14.8	161.0	15.3		
10,000 以下	277.7	26.2	224.4	21.4	328.4	31.2		

表4 三种不同油汗种羊纤维的理化性能

编 号	油汗色泽	羊 种	物理性能			部分化学 组成	
			强力 (克)	伸长 (%)	断裂功 (克·厘米)	胱氨酸 (%)	磺基 丙氨酸 (%)
80-5	白	A型三代 种公羊	10.81	53.39	3.501	7.99	0.26
80-7	淡黄	A型一 代横交	15.14	53.10	5.726	8.76	0.78
80-8	黄	一般公羊	5.51	49.57	1.717	7.58	0.15

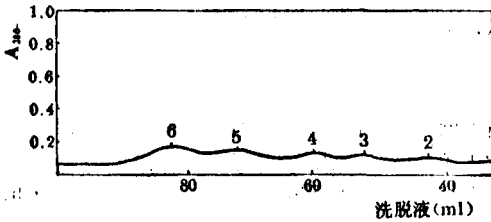


图1 标准蛋白混合物在 Sephadex G-75 凝胶过滤分子量分布图

波峰洗脱液最大值(毫升):
 2. 白蛋白45; 3. 卵清蛋白 51.5; 4. 碳酸酐酶
 59; 5. 胰蛋白酶 72; 6. 乳清蛋白81。
 柱: 1.6×90厘米。
 洗脱液: 0.2M NH₄OH, pH8.5。
 流速: 8.5毫升·厘米⁻²·小时⁻¹。

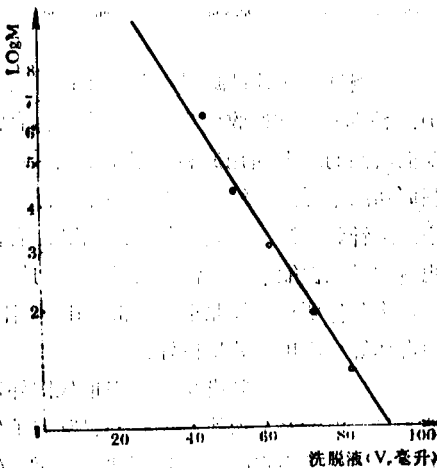


图2 标准蛋白混合物(LMW)凝胶过滤柱层析 LogM-V. 标准曲线

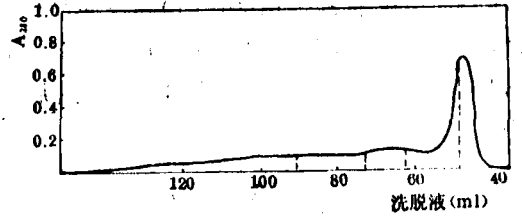


图3

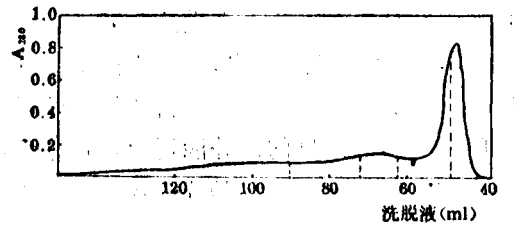


图4

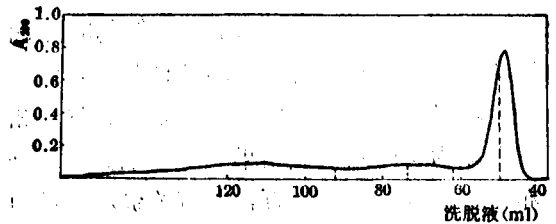


图5

图3、4、5 分别是 80-5、80-7、80-8 在洗脱液 0.2M NH₄OH pH8.5, 柱内径1.6厘米, 流速8.5毫升·厘米⁻²·小时⁻¹ Sephadex G-75 凝胶过滤获得的分子量分布图。

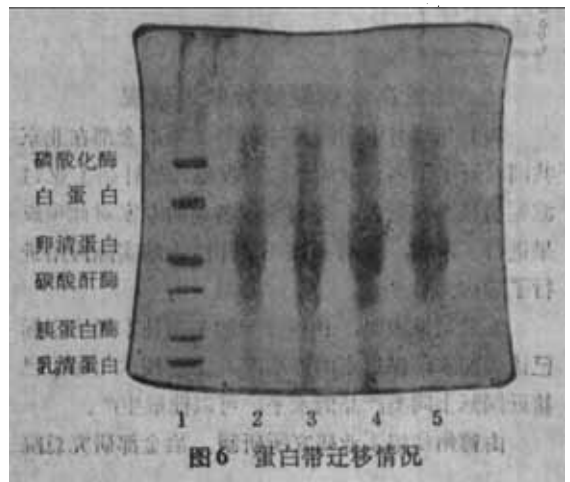


图6 蛋白带迁移情况

图6显示了在0.2% SDS存在下 Pharmacia LMW 标准蛋白 $3\mu\text{l}$ (1) 和不同品种国产A型种公羊 α 角朊(2、3、4、5)在聚丙烯酰胺梯度凝胶板上经Comassie blue着色后蛋白带迁移情况。

三、结论和讨论

1. 从图2看出,在选择的层析条件下,已知分子量对数与其相对应的蛋白洗脱液毫升数呈一线性关系,相关系数达0.9905。

2. 从图3、4、5看出,三种不同羊毛纤维中 α 、 γ 角朊采用凝胶过滤层析法按分子量大小顺序可达分离目的,并能用重量百分法定量表示。从表3中得出,80-7即A型一代淡黄油汗的分子量分布较其余两种颜色油汗羊毛为均匀,其结果与羊毛的部分物理、化学指标相符,见表4。

3. 本方法通过对不同品种羊毛蛋白测定,仪器能在操作条件下较长时间运转,性能稳定,分子量分布测定结果重复性良好,相对误差为 $\pm 5\%$ 。实验结果表明羊毛分子量分布范围从数千到近十万,与有关资料报道的数值基本相符^{[3][5][6]}。

由于设备简单,操作方便,仪器小型化,并能用定量表示法来区别不同羊毛之间分子量分布,因此该测试方法有一定实际意义。

4. 羊毛蛋白按其氧化法可分离成一种形成微原纤的分子量高而均匀的 α 角朊,属角朊的低硫部分,占总蛋白60%;一种是存在于基质中的无定形 γ 角朊,即角朊的高硫部分,占30%;而另一种是仅占少量的作为羊毛角质细胞膜不溶解的 β 角朊。羊毛的高硫、低硫两类形式分配在微原纤和基质集合体中^{[4][3]},直接组成羊毛结构,影响纤维物化性质,故测定羊毛中 α 、 γ 角朊分子量分布的方法还是可取的。

5. 由于凝胶过滤柱层析是在常压进行,整个测试方法时间较长。另外,要获得正确结果,除了选择最佳的柱层析条件外,羊毛蛋白制样非常重要,制备的蛋白要放在低温保存,保持样品的稳定,以提高实验结果的可靠性。在方法的定量表示中宜改进数据处理方法,以减少操作误差来提高方法的正确性。

参 考 资 料

- [1] The Pharmacia Gel filtration practice.
- [2] 羊毛纤维 α 、 β 、 γ 角朊含量测定。
- [3] Proc 5th Int Wool Text. Res. Conf. Aachen, 1975, I 233~241, 277~283.
- [4] Proc 6th Int Wool Text. Res. Conf. Aachen 1980, I 67~74, 1~11.
- [5] Pefer Alexan & Robert F Hudson "Wool Its Chemistry and Physics".
- [6] J. Biol Chem Vol 244 No. 16 4406~4412 (1969).