

用两向凝胶电泳分析羊毛角蛋白组成

孟进军 李 平 陈善明

(中国科学院新疆化学研究所)

【提要】 本文介绍用两向凝胶(聚丙烯酰胺)电泳方法分析羊毛角蛋白的组成。本方法不用放射性同位素标记,用二硫苏糖醇还原及8摩/升尿素,从羊毛中抽提出可溶性蛋白。从电泳图谱中可分辨出羊毛蛋白质的主要组分。此方法灵敏、简便易行。

羊毛角蛋白是一个结构复杂的不均一体系,其特征之一是含有在性质上明显不同的蛋白质组分,这些组分分布于羊毛纤维的不同结构中。微原纤维由低硫蛋白构成,嵌置在非纤维状的基质中,基质主要由高硫蛋白和高甘酪蛋白构成,这三大族蛋白质构成了羊毛角蛋白的主要成分。同时,它们本身又各自含有数量不等的亚族,每个亚族都是由一至数个蛋白质组分所组成。不同品种或同一品种不同个体,甚至同一只羊的不同部位的羊毛,其蛋白质组成都存在着不同程度的差异。羊的食料、地理环境、育种过程和毛纺织染整过程,都可能使羊毛的蛋白质组成发生变化。以前鉴定羊毛蛋白质组成^[1]操作步骤复杂、费时,且不易同时反映羊毛角蛋白组成的全貌。

自Marshall^[2]将两向凝胶电泳技术引入角蛋白的分析后,成为分析复杂蛋白质混合物的有效工具。但这方法要使用放射性同位素标记试剂,价格较昂,对实验室的条件要求较高。为此,我们对方法做了一些改进,不使用放射性同位素,改进缓冲体系,使之适用于具备一般条件的化学实验室。

一、试验材料和方法

1. 样品

澳美利奴羊毛64支,新疆巩乃斯良种细羊毛与新疆紫泥泉良种细羊毛均为64支。

2. 试剂

牛血清白蛋白系本所产品;二硫苏糖醇(DTT)和蛋白质染色剂考马斯亮蓝 G-250 系瑞典 Fluka 产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺系英国BDH产品;三羟甲基胺基甲烷(*Tris*)、十二烷基硫酸钠(SDS)系西德 Merck 产品; β -巯基乙醇、硼酸和氢氧化钠系国产分析纯试剂。

3. 羊毛的洗净

样品在石油醚(60~90°C)中浸泡振摇,每次20分钟,换液三次,再用95%乙醇浸泡,换液2次,最后用蒸馏水漂洗数次,置室温自然晾干。

4. 可溶性蛋白质的制备

按资料^[2,3]用还原法制取S-羧甲基化的羊毛蛋白质:取10毫克羊毛置于具磨口塞之试管中,加入1毫升含有8摩/升尿素、0.05摩/升 *Tris* (pH为9)、0.02摩/升 DTT 的抽提液,立即充氮气保护并将玻塞塞紧,不断振摇3小时,然后置室温下15小时抽提羊毛中蛋白质。再加入约100微摩尔碘代乙酸(溶于3摩/升 *Tris*中),在氮气保护下进行羧甲基化反应,保持反应液 pH为8.0~8.5,反应15分钟,用亚硝基铁氰化钠试液鉴定反应完全后^[4],加入30微升 β -巯基乙醇除去未反应的碘代乙酸。最后将此反应液对含8摩/升尿素的0.05摩/升 *Tris* 缓冲液(pH8.5)透析,多次换外透液后,即可用于电泳分析。

5. 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳

参照资料^[5]的方法制备聚丙烯酰胺凝胶。第一向电泳为圆盘电泳,在 pH=9 进行,按电荷差异分离蛋白质组份。电泳玻管为 110 × 3.5 毫米,其中 100 毫米装入 7.5% 的分离胶,含 8 摩/升尿素。与资料^[5]不同的是不需制浓缩胶,直接在分离胶面上加 20 微升上述羊毛蛋白质制备液,用溴酚蓝做标记物,电泳缓冲液为 0.02 摩/升硼酸-氢氧化钠, pH=9。电泳初始电压为 50 伏,1 小时后调至 100 伏,至标记物区带距玻管底端约 1 厘米时结束,约需 10 小时。第二向电泳为垂直板电泳,凝胶为不连续梯度胶,下端 20 毫米为 15% 凝胶,含 15% 蔗糖,中间 75 毫米为 10% 凝胶,最上层 20 毫米为 4.5% 浓缩胶,均含 0.1% 的 SDS,整个胶板大小为 120 × 100 × 1.2 毫米。参照资料^[6]的方法制胶,略有改变,即装入 15% 的凝胶后,不待其凝固,立即开始装入 10% 的胶液。在加入胶液时应缓慢地沿玻璃板壁使胶液流下,不可冲动已装入的 15% 的凝胶层,直待全部装好后,静置约 20 分钟即聚合。

将第一向电泳结束后的胶条浸泡在第二向电泳的浓缩胶缓冲液中(0.0625 摩/升 *Tris*-甘氨酸, pH=7.0, 含 2% SDS),适应 45 分钟后,取出嵌在第二向电泳的浓缩胶胶面上,初始电泳电压 100 伏,1 小时后升至 200 伏,直至溴酚蓝标记进入 15% 凝胶约 1 厘米后结束。取下胶板浸泡在 15% 三氯乙酸中 12 小时,然后浸泡于考马斯亮蓝染色液中(染色液中,甲醇、醋酸和水的比例(V/V)为 3:3:4),约需 10 小时,最后用脱色液(含 10% 甲醇和 5% 醋酸)漂洗直至胶板背景透明。

6. 蛋白质浓度的定量测定

采用资料^[7]的方法,以牛血清白蛋白为标准物。

二、结果和讨论

1. 样品的制备

羊毛蛋白质中二硫基被还原为巯基后,经与碘代乙酸发生羧甲基化反应,一部分蛋白质组分,如高硫蛋白增大了负电荷(在碱性条件下),反映在第一向电泳中,虽然高硫蛋白分子量比高甘酪蛋白大,但由于电荷的差异而具有较大的泳动率。为了保证有较好的重现性,则在制备可溶性蛋白过程中的羧甲基化反应必须完全。维持反应在 pH 为 8 时进行,以防止副反应的发生。

2. 电泳方法和图谱的比较

与 *Marshall* 的方法^[2]相比,由于不用放射性同位素标记,用硼酸盐缓冲系统代替了 *Tris*-甘氨酸系统,大大降低了实验费用,使方法在一般化学实验室均可进行,且第一向电泳不需制浓缩胶,亦使操作简化,与资料^[2]中结果比较,分辨率也有提高(见图 1)。

考察第二向电泳图谱,与经过放射自显影的图谱基本一致,如图 2、3 所示,羊毛蛋白质各组分在图谱上分布为 3 个区,分别为低硫蛋白、高硫蛋白和高甘酪蛋白。按 *Crewther* 的命名^[1],低硫蛋白区的斑点分别是 5、7、8 亚族的组分,低硫蛋白 7 亚族有 3 个组分为 7a、7b、7c^[8],但这 3 个组分性质极其相似,即使用双向凝胶电泳也未能分离开,故在图谱上只显示出一个较大的斑点。8 亚族的组别分别为 8a、8b、8c-1、8c-2,高硫蛋白区的斑点分别



图1 羊毛角蛋白第一向凝胶电泳谱
a-澳美利奴羊毛; b-新疆紫泥泉良种细羊毛。

为 B2A、B2B、ⅢA、ⅢB2 等亚族组分。高甘酪蛋白区分别为 I、II 两个亚族，见图 2、3、4。



图2 澳美利奴羊毛角蛋白第二向凝胶电泳谱



图3 新疆巩乃斯良种细羊毛角蛋白第二向凝胶电泳谱

澳美利奴羊毛角蛋白电泳图谱中低硫蛋白区的下方有一些低硫蛋白的小组分，而新疆巩乃斯良种细羊毛角蛋白的电泳图谱中则缺少这类小组分。

羊毛的物理性能与蛋白质组成的类型及相对含量的比例有密切关系^[9]，通过两向凝

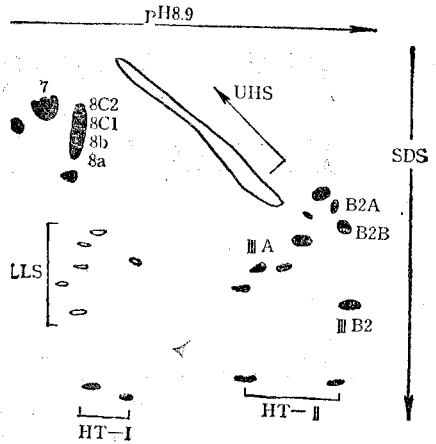


图4 羊毛角蛋白两向凝胶电泳谱示意图
UHS 为超高硫蛋白；LLS 为低硫蛋白小组分；HT 为高甘酪蛋白。

胶电泳图谱中斑点的变化，可以反映出羊毛蛋白质组分的变化，结合图谱中斑点的光密度扫描和对斑点的座标定位，能够得到准确和有意义的结果。这种方法还可能用于毛纺织染整过程中毛纤维的角蛋白组成及结构变化的分析。

本文工作得到陈卫、刘敏同志的协助，特此致谢。

参考资料

- [1] «Proc. 5th Int. Wool Text. Res. Conf. Aachen», 1975, vol. I, p. 1.
- [2] «Text. Res. J.», 1981, vol. 51, No. 2, p. 106.
- [3] «Aust. J. Biol. Sci.», 1964, vol. 17, p. 973.
- [4] «Aust. J. Biol. Sci.», 1962, vol. 15, p. 262.
- [5] «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1964, vol. 121, p. 404.
- [6] «Nature», 1970, vol. 227, p. 680.
- [7] «Anal. Biochem.», 1977, vol. 78, p. 86.
- [8] «Prep. Biochem.», 1974, vol. 4, No. 3, p. 203.
- [9] «Proc. 6th Int. Wool Text. Res. Conf. Pretoria», 1980, vol. II p. 67.