

土壤腐殖酸 SDS凝胶分级及表观分子量的测定^{*}

曲凤臣 陈 硕 赵慧敏 赵雅芝 全 燮^{**}

(大连理工大学环境与生命学院, 大连, 116024)

摘 要 用 SDS-凝胶电泳技术对落叶林土壤提取出的腐殖酸进行分级, 并应用凝胶层析分析技术测定腐殖酸各组分的连续分布特征及表观分子量, 分子量分别为 $M = 77678$ $M = 49923$ $M = 32085$ 和 $M = 16531$. 结果表明凝胶电泳和凝胶层析这两种技术可以相互补充, 能更好地了解腐殖酸类大分子物质分子量的分布情况.

关键词 腐殖酸, 凝胶电泳, 凝胶层析, 分子量.

很多人尝试根据腐殖酸的分子量进行分级, 凝胶层析 (SEC)、凝胶电泳 (PAGE) 和超滤 (UF) 等分级手段广泛用于快速分级分子量各异的腐殖酸组分. 然而, 很多实验数据相互矛盾, 不能统一, 还不能清楚到底是哪种方法更适合腐殖酸的分级. 到目前为止, 最理想的 SEC 分级的条件特别是洗脱液还没有确定.

本实验首先对腐殖酸采用碱、酸等简单手段进行初级分离, 然后将碱溶部分的腐殖酸通过凝胶电泳和凝胶层析两种方法进一步分级, 并利用凝胶层析技术测定所得分级组分的分子量, 初步探讨了两种分级方法的联系.

1 实验方法

1.1 腐殖酸的提取

参照国际腐殖物质协会 (HSS) 推荐的方法, 在氮气保护下用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 从吉林省落叶林土壤中分离出腐殖酸.

1.2 腐殖酸的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分级^[1, 2]

电泳缓冲溶液为 $89\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-borate 缓冲溶液, 凝胶由丙烯酰胺 (Acry) 和交联剂 N, N-甲叉双丙烯聚酰胺 (Bis) 聚合而成.

加样后, 调节电流至 20mA, 电泳 1h. 电泳完毕, 将胶带剪下, 溶解于 0.1% SDS 中, 24h 后离心, 上清液在透析袋中透析.

1.3 腐殖酸的凝胶层析分级^[3]

取 1ml 蓝色葡聚糖凝胶 Sephadex G-2000 ($2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 通过 G-75 凝胶层析柱, 收集洗脱液, 测定其洗脱曲线 (紫外吸收 280nm), 洗脱峰顶洗出的体积即为外水体积 V_0 , 内水体积 V_i , 即凝胶颗粒内部孔隙所含水相的体积, 选用一种分子量小于凝胶工作范围下限的化合物, 吸取 1ml $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液通过 G-75 凝胶层析柱, 收集其洗脱液测定其洗脱体积 V_e , 则 $V_i = V_e - V_0$.

称取 2g 腐殖酸样品溶解在 10ml 的 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素溶液中, 取 2ml 样品在层析柱中进行洗脱层析, (洗脱液为 $4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素溶液), 洗脱速率为 $20\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, 每 3ml 流出液进行紫外-可见光光谱扫描, 记录 280nm 光密度.

2 分子量的测定

将标准分子量的蛋白质用 TRIS 溶解, 吸取 1ml 溶液 (浓度为 $2\text{--}3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 上样, 洗脱条件与 HA 相同, 根据蛋白质洗脱峰的位置, 通过紫外吸收曲线测出每种蛋白质的洗脱体积 V_e . 以蛋白质分子量对数 $\lg M$ 与 V_e 作标准曲线图, 模拟方程得:

2005 年 9 月 23 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (20477005). ^{**} 通讯人, Tel 0411-84706140 Fax 0411-84706263, E-mail quanxi@dlut.edu.cn

$$\lg M = 5.0583 - 0.0048V_e \quad R^2 = 0.9905$$

根据 HA 各组分紫外检出的洗脱峰位置得出洗脱体积， 分别由标准曲线计算样品的分子量。

3 腐殖酸的电泳分级及分级组分的分子量测定

在 DYY-6C 型电泳仪上， 经过 1h 电泳分离， 腐殖酸在聚丙烯酰胺凝胶上的分布如图 1 所示。



图 1 腐殖酸的凝胶电泳分级图

Fig 1 Electrophoresis of soil humic substance in 10% polyacrylamide gel

根据腐殖酸在聚丙烯酰胺凝胶上的迁移情况， 将腐殖酸分为 4 种分子量各异的组分， 分别为 $M = 77678$ $M = 49923$ $M = 32085$ 及 $M = 16531$ ， 这一结论与 Posner^[4]的研究基本一致。

腐殖物质常用 E_4/E_6 的比值来表征， 是腐殖物质分子量的特征函数， 与表观分子量对数的变化呈负相关^[5-6]。 4 种电泳分级组分的 E_4/E_6 比值分别为 3.71、 5.52、 6.14 和 10.98。 这说明运用凝胶电泳技术可以基于分子量的大小对土壤腐殖酸进行有效的分级。

凝胶电泳虽然能把土壤腐殖酸分为分子量各异的不同组分， 但是这种分级方法分辨率不是很高， 分离出的组分不多， 而且加样量太少， 不利于后续的表征分析。

4 腐殖酸凝胶层析分级

由于腐殖物质与凝胶色谱柱间的相互作用， 水及各种流动体系包括 NaCl、 乙酸钠、 NaOH、 焦磷酸钠等都未获成功。 Chin^[7]研究表明， 以往腐殖物质的层析流出曲线是多模式性质， 主要受凝胶固定相与腐殖物质的静电作用， 是一种非体积排除因素， 而不是真正分子量分布影响导致的一种结果。 用缓冲溶液做流动相， 并添加中性电解质如 NaCl 或 KCl 将有效减少电荷的相互作用， 使得腐殖物质的层析色谱有了统一的分布模式， 所得结果更加可信。

本实验选择 $4\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素溶液作为流动相， 以减少腐殖酸和凝胶的排斥和吸附作用。 从图 2 可以看出， 流出液的光吸收是连续的， 洗脱体积在 37、 68、 109 和 160 ml 左右时有突出峰， 这说明腐殖酸分子量的分布是连续的， 并主要集中在 4 个分子量段， 分子量分别为 $M = 75980$ 、 $M = 53938$ 、 $M = 34284$ 及 $M = 19511$ ， E_4/E_6 比值分别为 3.65、 5.48、 6.02 和 10.53。 由此可见， 用凝胶层析法可以基于腐殖酸分子量的大小进行进一步分级。

凝胶层析虽然能把土壤腐殖酸分为分子量各异的不同组分， 但是层析分级是一种连续的分选方法， 分离时不同分子量的腐殖酸组分存在着重叠， 这就导致所分离出的腐殖酸组分的相对纯度较低。 不过， 凝胶层析方法操作比较简单， 得到分级样品量比较多， 有益于后续的表征分析。

5 凝胶层析和凝胶电泳两种分析方法的联系

将通过凝胶层析分级的组分用电泳的方法进一步的分级， 从图 3 可以看出， 凝胶电泳不能把凝胶层析得到的组分进一步的分级， 说明本实验所得到的层析分级组分的相对纯度较高。

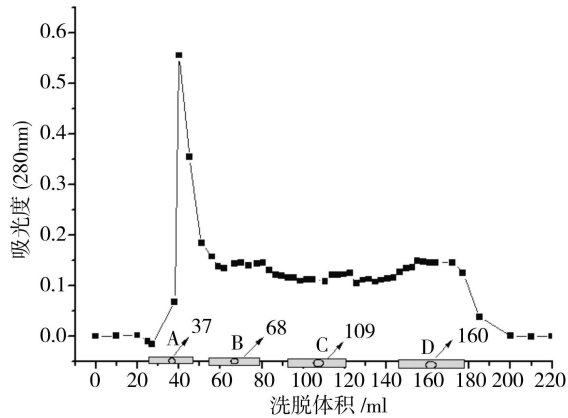


图 2 腐殖酸的 G-75 凝胶洗脱曲线

Fig 2 Absorption of humic substance at 280nm by G-75

比较电泳和层析两种方法所得的腐殖酸各组分的分子量和 E_4/E_6 比值，两种方法对应腐殖酸组分的分子量接近，通过电泳方法测得凝胶层析所得组分的纯度较高，这说明两种分级方法对土壤腐殖酸的分级是可行的，而且可以通过电泳方法来验证层析分级组分的相对纯度。

6 结论

- (1) 凝胶电泳可将腐殖酸细分为 4 种组分，分子量分别为 $M = 77678$ $M = 49923$ $M = 32085$ 及 $M = 16531$ 。
- (2) 用凝胶层析进一步细分为， $M = 75980$ $M = 53938$ $M = 34284$ 及 $M = 19511$ ，与凝胶电泳得到的对应组分的分子量和 E_4/E_6 比值接近，说明两种方法得到的组分相似。
- (3) 电泳与层析在腐殖酸分级时可以相互补充，能更好地了解像腐殖酸一样的复杂大分子物质。



图 3 腐殖酸层析组分的凝胶电泳分级图
Fig 3 Electrophoresis of soil humic substance's fraction in 10% polyacrylamide gel

参 考 文 献

[1] Trubetskoj O A, Kudryavceva L Yu, Shirshova L T, Characterization of Soil Humic Matter by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Presence of Denaturing Agents. *Soil Biol. Biochem.*, 1991, **23** (12) : 1179—1181

[2] Trubetskoj O A, Trubetskaya O A, Khmutova T E, Isolation, Purification and some Physico-Chemical Properties of Soil Humic Substances Fractions Obtained by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.*, 1992, **24** (9) : 893—896

[3] Richard C, Trubetskaya O A, Trubetskoj O A, et al., Key Role of the Low Molecular Size Fraction of Soil Humic Acids for Fluorescence and Photoinductive Activity. *Environ. Sci. Technol.* 2004, **38** : 2052—2057

[4] Posner A M, Importance of Electrolyte in the Determination of Molecular Weight by “Sephadex” Gel Filtration with Special Reference to Humic Acid. *Nature*, 1963, **198** : 1161—1163

[5] 文启孝, 土壤有机质研究法. 北京: 农业出版社, 1984 : 181—182

[6] Chen Y, Senesi N, Schnitzer M, Information Provided on Humic Substances by E_4/E_6 Ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1977, **41** : 352—358

[7] Chin Yur-P, Aiken G, O'Loughlin E, Molecular Weight Polydispersity and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28** : 1852—1858

FRACTIONATION OF THE SOIL HUMIC SUBSTANCE
BY SDS-POLYACRYLAMIDE GEL AND MEASUREMENT OF
THE MOLECULAR WEIGHT

QU Feng-chen CHEN Shuo ZHAO Huimin ZHAO Ya-zhi QUAN Xie

(School of Environmental and Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

ABSTRACT

The soil humic substance extracted from deciduous forest soil in Jilin province was fractionated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The successive distribution of various fractions of humic substance was characterized using size-exclusion chromatography, by which the molecular weights of the four fractions were tested to be 77678, 49923, 32085 and 16531, respectively. It indicated that these two SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and size-exclusion chromatography were complementary each other in helping us better understand the molecular weight distribution of soil humic substance.

Keywords humic substance, gelelectrophoresis, size-exclusion chromatography, molecular weight