

研究工作

血红蛋白 A₂ 现象发生机制的研究

“红细胞 HbA₂”为 HbA₂ 与 HbA 的结合产物

秦 文 斌

(包头医学院血红蛋白研究室, 包头 014010)

提 要

为了弄清血红蛋白 A₂ 现象的发生机制, 我们对“红细胞 HbA₂”的化学组成进行了分析。“红细胞 HbA₂”的双向电泳结果表明, 它含有两种血红蛋白成分: 一种相当于 HbA, 另一种很可能是溶血液 HbA₂。其单向二次电泳结果也证明, 它是由溶血液 HbA₂ 和 HbA 所组成。结果初步说明, 在红细胞中 HbA₂ 可能与 HbA 结合存在。两者可能有相互作用, 也许这是产生血红蛋白 A₂ 现象的原因。

关键词 血红蛋白 A₂, 血红蛋白 A, 血红蛋白相互作用, 血红蛋白 A₂ 现象

我们在科学实践中发现了血红蛋白 A₂ 现象^[1], 并且对它的出现规律进行了研究^[2-3]。注意到“红细胞 HbA₂”在化学组成上的不均一性。根据血红蛋白 A₂ 现象的一些特点, 我们推测血红蛋白之间有相互作用的可能性。本文用普通琼脂凝胶电泳、双向电泳、单向二次电泳等技术证明“红细胞 HbA₂”中含有 HbA 及溶血液 HbA₂。这说明, 在红细胞中 HbA₂ 和 HbA 呈结合形式。作者认为, 血红蛋白 A₂ 现象的产生原因很可能是红细胞内 HbA₂ 与 HbA 之间有相互作用, 并非孤立存在。

材 料 与 方 法

1. 血样 正常成人血样取自包头市血站。

2. 红细胞(悬浮液)及其溶血液的制备 方法同前^[1]。

3. 电泳分析

(1) 淀粉琼脂混合凝胶薄层电泳(简称淀粉电泳): 取淀粉和琼脂按 4:1 混合, 用 pH

9.0TEB 缓冲液^[4]配成 2.5% 浓度制胶, 趁热将 25ml 胶液倒在 10cm × 10cm 玻璃板上(改变玻璃板尺寸时, 胶液量也相应增减), 待凝固。电极槽中放入 pH9.0 硼酸-NaOH 缓冲液。其余条件同前。

(2) 双向淀粉电泳: 加样、转向等操作同一般双向电泳。做第二向电泳时缓冲液不变。

(3) 单向二次电泳法: 支持体仍为淀粉-琼脂混合凝胶。第一次电泳后, 将某一区带及其所在凝胶留下待用, 切掉其周围的所有凝胶及其所含区带。然后, 在此周围处, 再倒上新的凝胶。凝固后再电泳(缓冲液不变), 可以保持原来方向, 或者改变方向。

4. 染色方法 可以不染色, 靠血红蛋白本身的红色来观察结果。必要时, 采用氨基黑 10B 或者联苯胺法进行染色。

5. 电泳结果的保存 淀粉电泳后氨基黑 10B 染色, 室温晾干, 电泳结果就被固定在玻璃板上, 可以长期保存。染色后的淀粉凝胶, 还可

转到X光胶片上或者滤纸上晾干,这样保存起来更为方便。

结 果

1.正常成人血样的“HbA₂现象” 将正常成人红细胞与其溶血液并排电泳,然后染色,结果如图1。由图1可以看出:样品为溶血液时,由原点(加样处)向阳极按泳速快慢为序,出现HbA, HbA₂及CA(碳酸酐酶)三个区带。样品为红细胞时也可看到HbA和CA,但有两点与溶血液不同:(1)没有与溶血液HbA₂相对应成分,但在其稍前方(阳极侧)出现一蛋白区带,未染色时为红色。这个区带有些特殊,它不整齐、不像溶血液HbA₂那样集中,甚至变形。将此成分称为红细胞HbA₂或者“HbA₂”,

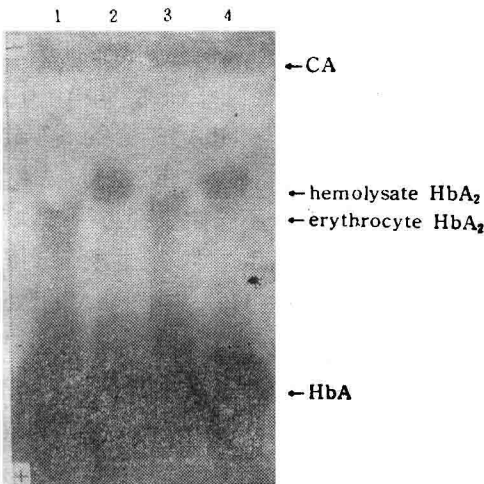


图1 正常成人血样的血红蛋白A₂现象
Fig. 1 HbA₂ phenomenon of blood sample from normal adult
1,3: 红细胞; 2,4: 溶血液
1,3: erythrocyte; 2,4: hemolysate

以区别于溶血液HbA₂。(2)HbA与HbA₂之间的拖尾现象比溶血液明显。这种情况给人的印象是:红细胞中的HbA₂与HbA,似乎不易分开;而溶血液中的HbA₂与HbA,则分离良好、界限清楚。暂命名为“血红蛋白A₂现象(HbA₂现象)”,以便于讨论和进一步研究。

2.红细胞HbA₂的双向电泳 用20cm×20cm玻璃板做琼脂凝胶电泳。样品为红细胞悬浮液,加在玻璃板的右下角(靠两边各2cm

处),电泳条件同上。第一次电泳后,可看到两个红色区带(红细胞HbA₂和HbA);然后转90度角进行第二次电泳,用氨基黑10B染色结果如图2。

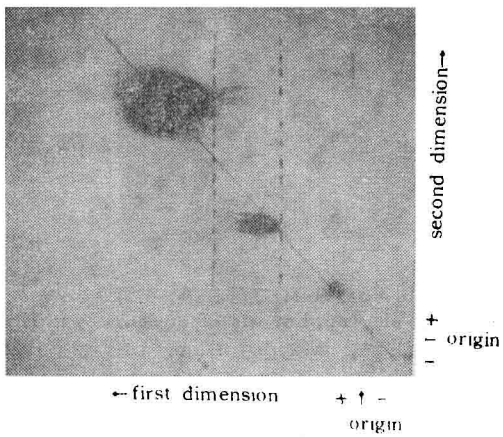


图2 正常成人血样的HbA₂现象的双向电泳分析
Fig. 2 Two dimensional electrophoresis of HbA₂ phenomenon of blood sample from normal adult

由图2可以看到,双向电泳后红细胞HbA和CA停留在对角线上,而红细胞HbA₂不在此线上并分成两个区带:主要成分在对角线的稍下方,次要成分在对角线的上方较远处,相当于HbA的位置。由于溶血液HbA的泳速比红细胞HbA₂慢,推测对角线下边的成分很可能是溶血液HbA₂。说明红细胞HbA₂可能含有溶血液HbA₂和HbA,它们在第二次电泳时彼此分离出现两个电泳成分。

3.红细胞HbA₂的单向二次电泳 用琼脂电泳做“血红蛋白A₂现象”实验。电泳结束后不染色,在玻璃板上留下四块含有红色区带的凝胶(红细胞HbA₂和HbA两个区带,以及溶血液HbA₂和HbA两个区带),切除其余无色琼脂凝胶,含红细胞HbA₂的凝胶原位不动,将其它含Hb凝胶都推到(在玻璃板上滑动)两旁,并排在一条线上。它们的位置关系是:红细胞HbA、红细胞HbA₂、溶血液HbA₂、溶血液HbA。位置调好后,在它们的周围再倒上新的琼脂凝胶,厚度相当,室温放冷,胶液凝固后再通电,条件同前。电泳结束后氨基黑10B染色,结果如图3。

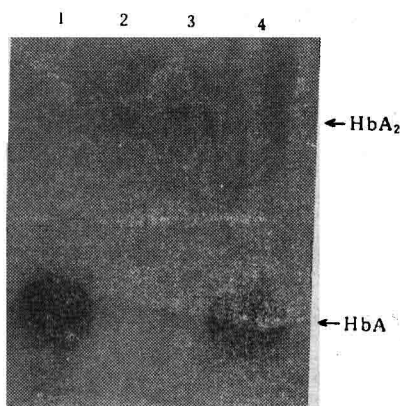


图3 红细胞血红蛋白 A₂ 的再电泳

Fig. 3 Re-electrophoresis of erythrocyte HbA₂

1: 溶血液 HbA₂; 2: 溶血液 HbA; 3: 红细胞 HbA₂;
4: 红细胞 HbA

1: hemolysate HbA₂; 2: hemolysate HbA; 3: erythrocyte HbA₂; 4: erythrocyte HbA

由图3可以看到,再电泳时红细胞 HbA 与溶血液 HbA 的速度仍然相同,和原来血红蛋白 A₂ 现象实验时的结果一致。图3中溶血液 HbA₂ 仍然是一个区带,但红细胞 HbA₂ 却分成两个区带:一个与溶血液 HbA₂ 的电泳位置相同;另一个相当于 HbA。这说明,红细胞 HbA₂ 中确实含有溶血液 HbA₂ 和 HbA,进一步证实了对双向电泳结果的判断。

讨 论

血红蛋白 A₂ 现象的发现以及它与几种类型异常血红蛋白的关系,已见前文^[1-3]。为了进一步弄清这一现象的发生机制,我们研究了各种可能情况,这里主要报告“红细胞 HbA₂”化学组成方面的工作。所谓“血红蛋白 A₂ 现象”,其关键是“红细胞 HbA₂”与“溶血液 HbA₂”不同。这种差异的主要表现是:在电泳图谱中,“红细胞 HbA₂”比“溶血液 HbA₂”泳速快(向阳极方向)。说明“红细胞 HbA₂”的净电荷中负电性因素较“溶血液 HbA₂”多。假定“溶血液 HbA₂”就是 HbA₂ 本身。可以认为,在红细胞中 HbA₂ 可能与某种负电性较强的物质 X⁻ 结合存在。

还有另外一种假设:“红细胞 HbA₂”是 HbA₂ 本身,在制备溶血液过程中它与红细胞中一种带较多正电荷的成分 Y⁺ 结合,电泳时表现为“溶血液 HbA₂”与“红细胞 HbA₂”不同。

将本文实验结果与上述两个假设联系起来,可以认为, HbA 就是 X⁻,而不是 Y⁺。因为 HbA 的负电荷多于 HbA₂,符合对 X⁻ 的要求。由于 HbA₂ 与 HbA 的结合存在,势必影响到结合产物的电荷和分子量。HbA₂-HbA 的负电性大于 HbA₂ 的负电性,可以认为红细胞 HbA₂ 快于溶血液 HbA₂ (阳极方向)。至于红细胞 HbA₂ 区带的具体位置比溶血液 HbA₂ 靠前一点,可能是 HbA₂-HbA 的分子量大于 HbA₂,凝胶电泳的分子筛作用影响了它的泳速。

红细胞 HbA₂ 区带不集中、与 HbA 之间拖尾比较严重。可能是红细胞 HbA₂ 中两种 Hb (溶血液 HbA₂ 与 HbA) 结合的不牢固。由红细胞制备成溶血液,血红蛋白 A₂ 现象就消失。表明这种结合很不稳定,经过第二次电泳(不管单向或者双向)时这种结合也会遭到破坏,推测在最初的红细胞 HbA₂ 中 HbA 的数量可能比较多,随着第一次电泳过程的进行,陆续有少量 HbA 脱离下来。造成了区带不集中和明显的拖尾。第二次电泳时,残余的少量 HbA 与 HbA₂ 彻底分开,才出现图2的情况。

总之 HbA₂ 和 HbA 不是孤立存在于红细胞之中,而是彼此结合存在。不一定全部 HbA 都与 HbA₂ 结合,至少有一部分是这样的。这种结合并非十分紧密,比较容易分离,所以过去没有被发现。

参 考 文 献

- 1 秦文斌,梁友珍. 生物化学与生物物理学报, 1981; 13:199
- 2 阎秀兰,秦文斌. 生物化学与生物物理学报, 1989; 21:1
- 3 秦文斌等. 生物化学与生物物理学报, 1991; 23:85
- 4 Efremov G D et al. J Biol Chem, 1969; 244: 6105

[本文于1990年5月8日收到,9月28日修回]

MECHANISM OF HEMOGLOBIN A₂ PHENOMENON

"ERYTHROCYTE HbA₂" IS A BINDING PRODUCT OF HbA₂ AND HbA

Qin Wenbin

(Laboratory of Hemoglobin, Baotou Medical College, Baotou 014010)

ABSTRACT

1. Chemical composition of erythrocyte HbA₂ was analyzed in order to clarify the mechanism of hemoglobin A₂ phenomenon. The paper reports the hemoglobin composition of erythrocyte HbA₂.

2. The results of two-dimensional electrophoresis showed that erythrocyte HbA₂ contains two Hb components: one corresponds to HbA and the other most probably is hemolysate HbA₂.

3. The results of one-dimensional re-electrophoresis showed definitely that erythrocyte HbA₂ is composed of hemolysate HbA₂ and HbA.

4. Tentative conclusion: HbA₂ may be combined with HbA in erythrocyte, i.e. there is probably interaction between the two hemoglobins. This is perhaps the possible cause of hemoglobin A₂ phenomenon.

Key words HbA₂, HbA, interaction of Hb, HbA₂ phenomenon

(上接第 259 页)

微量元素的代谢有关;而体内自由基与疾病,特别是肿瘤的发生及衰老等有密切关系.由于MT在微量元素代谢中起关键作用,而且它也可清除自由基,所以,对MT的深入研究也为研究疾病的机理及其治疗展示了广阔的前景.

利用克隆了 MT 基因的工程菌或植物(包括藻类)具有摄取某些金属的特征,可用于探矿、采矿和某些贵重金属的富集和回收.海洋中贵重金属的贮量远远大于陆地,但用常规方法要从海洋中提取这些金属是非常困难的.若可利用克隆 MT 基因的海洋生物来摄取这些金属,则是比较理想的.此外,还可将克隆了 MT 基因的工程菌、植物和水生生物用于被重金属污染的土壤或污水来排除有毒金属,也是一种十分有前途的环保措施.因此,MT 的研究既有理论意义,又有重大的应用价值.

参 考 文 献

- 1 Margoshes M, Vallee B L. *J Am Chem Soc*, 1957; 79: 4813
- 2 Obata I, Umehauashi M. *Soil Sci Plant Nutr*, 1986; 32 (3): 461
- 3 Furey W F et al. *Science*, 1986; 231: 704
- 4 Nielson K B, Winge D R. *J Biol Chem*, 1984; 259: 4942
- 5 Nielson K B, Winge D R. *J Biol Chem*, 1985; 280: 8698
- 6 Kagi J H R, Nordberg M. *Metallothionein*, Boston: Basel Birkhauser-Verlag, 1979: 331
- 7 Durnam D M, Palmiter R D. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 484
- 8 Dunn M A, Cousins R J. *Fed Proc*, 1987; 46: 598
- 9 Swerdel M R, Cousin R T. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1984; 175: 522
- 10 Hidalgo J et al. *Life Sci*, 1986; 39: 611
- 11 Varshney U et al. *Mol Cell Biol*, 1986; 6: 26
- 12 Blalock T L et al. *Fed Proc*, 1987; 46: 884
- 13 Cousins R I. *Physiol Rev*, 1985; 65: 238
- 14 Thornalley P J, Vasak M. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 827: 36
- 15 Cherian M G, Nordberg M. *Toxicol*, 1983; 28: 1
- 16 Oh S H et al. *Am J Physiol*, 1978; 234: E282
- 17 Lehman L D, Klaassen C. D. *Anal Biochem*, 1986; 153: 305
- 18 Tsunoo H et al. *J Biol Chem*, 1978; 231: 4172
- 19 Riordan J R et al. *J Bio Chem*, 1982; 257: 4639
- 20 Brewer G J et al. *Ann Intern Med*, 1983; 99: 314
- 21 Kimoto S et al. *Okayama Igakukai Zasshi*, 1987; 97: 871
- 22 Akira N et al. *Cancer Res*, 1986; 47: 983
- 23 Tsutomu M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 151: 725

[本文于1990年5月17日收到,10月19日修回]