

了温度梯度对电泳分离的不利影响。

2.4 采用强度较高的正、负离子膜隔开分离室和电极室，消除了电极室产生的气泡对分离效果的影响。该膜为离子导电方式，水不能透过，因而可以用高于样品缓冲液流速的电极液洗掉电极上的气泡，为气液分离问题的解决创造了一定条件。也试过其他的膜，各有优缺点。

2.5 本机分辨率较高。电泳分离室厚度从 0.05 cm 至 0.3 cm 的 5 个厚度下，均可将牛血红蛋白和细胞色素 c 的混合液分开。

2.6 分离室和电极室消耗功率低，直流功率 10 W 以内。

2.7 温控箱在 0 至 30 ℃连续可调，可以在地面较低温度下进行电泳分离制备样品，也可以模拟在航天温度范围下进行电泳实验。

致谢 中国科学院空间中心吴汉基先生等提供宝贵意见，特此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 McDonnell Douglas Corporation. Electrophoresis operations in space. USA, 1986. 1~ 15
- 2 Snyder R S, Rhodes P H, Miller T Y. Polystyrene latex

separations by continuous flow electrophoresis on the space shuttle. Separation Science and Technology, 1986, 21 (2): 157~ 185

- 3 Michael J C, Balmann H R, Sanchez V *et al.* Purification of biological molecules by continuous flow electrophoresis in the second international microgravity laboratory. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 341~ 352
- 4 Francois J C, Michael C. First Step of the space bio separation/sbs program: the project ramses as an IML-2 payload. Abstract Proceedings, International Symposium on Microgravity Science and Applications. Beijing, 1993, 10~ 13, 110~ 111
- 5 Hanning K. New aspects in preparative and analytical continuous free-flow cell electrophoresis. Electrophoresis, 1982, 3: 235~ 243

Studies on Continuous Flow Electrophoresis System. LI Qin, LI Li, WANG Zhao-jie, QIAN Shi-jun (*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract A new continuous flow electrophoresis system was fabricated. The principle, the composition and the structure of the prototype were discussed.

Key words continuous flow electrophoresis, prototype, development

连续自由流电泳样机的应用*

李 丽 李 钦¹⁾ 王兆捷 叶 军 钱世钧

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 用连续自由流电泳 (continuous flow electrophoresis, CFE) 成功地将细胞色素 c (Cyt c) 和牛血红蛋白 (Hb) 两种模式蛋白分开, 电泳分离后的样品经过紫外分光光度计和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。样品的分离结果与众多性能参数有关, 如: 分离室间隙, 样品流速, 缓冲液流量、pH、电导率及分离功耗等。

关键词 分离室, 细胞色素 c, 牛血红蛋白, 缓冲液

学科分类号 Q503

* 国家“863”计划资助项目 (863-205-2-10) 和国家载人航天工程资助项目。 ¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1997-11-10, 修回日期: 1997-03-20

电泳技术是一种分离蛋白质和其他生物大分子极有效的方法。它的广泛应用是在 1937 年用滤纸作为支持物, 成功地进行纸电泳之后, 尤其是近年来, 随着生物科学和医学的迅速发展, 电泳技术使用的范围越来越广, 如血清蛋白、球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、同工酶等方面的分离分析和性质的研究。电泳是指带电离子在电场中向其与自身带相反电荷的电极移动^[1]。纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、凝胶电泳等, 它们均是在静止的缓冲系统中, 外加电场, 根据被分离物质所带电荷及分子质量不同而进行分离, 得到的分离物多用于物质纯度的分析和分子质量的测定等^[2]; 然而, 连续自由流电泳是样品和缓冲液系统均在流动状态下进行样品的连续分离, 如在一矩形容容器内, 从底部到顶部, 样品被连续注入流动的缓冲液中, 电极分布在左右两侧, 根据样品中所带电荷数及分子质量不同, 则以不同速度横向移动, 分离的样品可以从容器顶部的许多收集口流出^[3]。因此, 连续自由流电泳与前者相比, 得到的分离物多用于生物大分子和细胞的连续制备及实现生物样品的高效分离, 在生命科学及医学制药方面具有许多优势, 预计在生产实践中将有广阔的开发前景^[4, 5, 7]。

我们已成功地研制了连续自由流电泳样机^[8]。本文主要介绍利用该样机将两种模式蛋白进行分离的条件及结果等。为其他生物大分子样品在该机上的应用提供了一些有价值的参数。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂: 细胞色素 c (天津生化制药厂提供的精馏样品), 22.6 g/L; 牛血红蛋白, Sigma 公司产品; Tris (北京经科化学试剂公司); 甘氨酸 (分析纯, 中国第二军医大学产品); 丙三醇 (分析纯, 北京化学试剂公司); 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器和设备: 电泳槽, 四种规格 9 cm × 20 cm × (1.0、1.5、2.0、3.0) mm;

蠕动泵 (Pharmacia LKB Pump P-1 产品); 多通道配比电子蠕动泵 DDB-600 (石浦生化电子仪器厂产品); 电泳仪 DF-1 (北京东方仪器厂产品); 高精度交流稳压器 (上海精乐电器厂产品); 紫外分光光度计 UV 120-02 (日本岛津公司产品); pH 计及电导仪 (Cole-Parmer 公司生产); 密度分析比重计 (星河计量仪器厂生产)。

1.2 方法

1.2.1 缓冲液的配制: Tris 6 g, 甘氨酸 28.8 g, 溶于 1 000 ml 蒸馏水中, 调 pH 至 8.3 左右, 作为储备液。使用分离室间隙为 1.0 mm 或 1.5 mm 电泳槽, 将储备液加入 2.5% 丙三醇稀释至 10 倍, 充分搅拌后得到缓冲液并测定 pH、电导和密度; 使用分离室间隙为 2.0 mm 或 3.0 mm 电泳槽, 将储备液加入 2.5% 丙三醇稀释至 7 倍, 充分搅拌后得到缓冲液并测定 pH、电导和密度。分离室及电极室使用相同缓冲液。

1.2.2 样品的制备: Cyt c 及 Hb 浓度分别为 22.6 g/L 和 20 g/L, 用缓冲液配制, 混合后用三层滤纸过滤, 对水及缓冲液分别透析 (4℃ 冰箱) 12 h, 或离心 (6 000 r/min, 10 min), 并测定混合样品的密度和电导。

1.2.3 电泳分离: 分离室及电极室均用缓冲液快速冲洗 2 min, 检查管道及电泳槽是否堵塞或渗漏。根据分离室间隙的大小, 选择缓冲液的流量及样品的流速。用蠕动泵注入缓冲液和样品。接通 DF-1 型电泳仪, 根据限定的条件 (功率为 12 W), 设置电压, 使分离效果达到最佳状态。电泳过程中拍照。结束后分别测定初终两状态下的温度、阴阳电极缓冲液的 pH、电导; 对各收集管进行 A_{280} 和 A_{415} 的紫外吸收测定; 峰尖样品进行 $A_{350} \sim A_{600}$ 扫描, 峰尖、峰两腰及谷底样品进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.4 分离室电泳运行重要性能参数: 电泳过程重要参数选择、pH 值、电导率和温度变化的数据见表 1。

表 1 有关电泳运行的重要性能参数

分离室间隙/mm	1.0	1.5	2.0	3.0
样品流速/ $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$	11	11	11	11
分离缓冲液/ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	10~15	10~15	10~15	10~15
电极缓冲液/ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	30~35	30~35	30~35	30~35
分离电压 U/V	570	420	370	320
分离电流 I/mA	17	23	36	30
分离功率 W/W	10	10	10	10
缓冲液 (始) pH	8.70	8.64	8.62	8.54
缓冲液 (终) pH 阳极	8.48	8.36	8.36	8.37
缓冲液 (终) pH 阴极	8.70	8.66	8.70	8.60
缓冲液电导/ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	81	83	87	86
电极缓冲液电导 (终) 阳极/ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	105	102	120	120
电极缓冲液电导 (终) 阴极/ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	58	53	80	81
分离室尺寸/cm	$6.0\times 0.10\times 27$	$6.0\times 0.15\times 27$	$6.0\times 0.20\times 27$	$6.0\times 0.30\times 27$
电极室尺寸/cm	$1.5\times 0.10\times 27$	$1.5\times 0.15\times 27$	$1.5\times 0.20\times 27$	$1.5\times 0.30\times 27$

1.2.5 电泳分离后样品的测定: a. 紫外分光光度计测定各收集管的 A_{280} 和 A_{415} 的紫外吸收值; b. 峰尖样品进行 $A_{350}\sim A_{600}$ 吸收扫描; c. 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[6]; d. 电泳过程拍照。

2 结 果

2.1 样品的分离

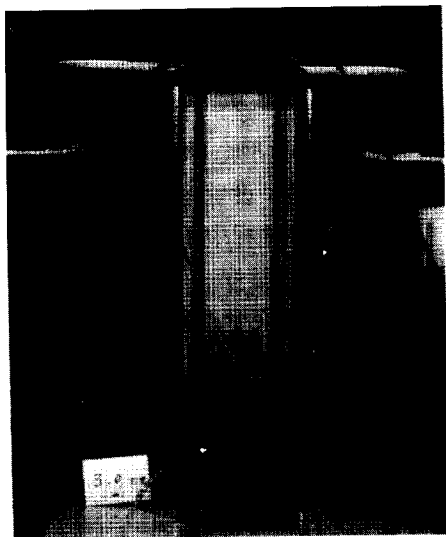


图 1 连续自由流电泳分离 Cyt c 和 Hb 的照片
左边带为 Hb; 右边带为 Cyt c.

按上述方法, 将样品 Cyt c 和 Hb 做连续自由流电泳, 可明显发现样品呈 V 字型状分离, Cyt c 向阴极泳动, Hb 向阳极泳动, 两条带细而清晰, 随着电泳槽分离室间隙的增大缓冲液流量也增大, 在设定的功率下, 随分离室间隙减小, 电流降低; 也可以使电压升高电流降低, 两条带更为清晰, 且无扩散, 更稳定, 两条带分开约 1.5 cm. 随分离室间隙的增大, 电压降低, 电流升高, 两条带清晰且稳定, 分开约 0.5 cm 左右, 见图 1. 电泳进行 2 h. 电泳完成后, 电极缓冲液阳极的 pH 降低, 电导升高; 阴极的 pH 稍升高, 电导稍降低; 进出口温度差为 2~3℃.

2.2 样品收集管在 A_{280} 和 A_{415} 下测试结果见图 2, 图 2 中看到两条明显的蛋白质吸收峰.

2.3 峰尖样品 $A_{350}\sim A_{600}$ 扫描图, Cyt c 特征吸收峰 415 nm、520 nm 和 550 nm. Hb 特征吸收峰 410 nm. 每批收集样品中, 有两处明显的蛋白质吸收峰, 一个峰尖为 Cyt c, 另一个峰尖为 Hb.

2.4 峰尖、峰两腰及谷底样品的不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳. 峰尖及峰两腰样品带与标准蛋

白带对齐，得到凝胶电泳均一的结果，见图 3.

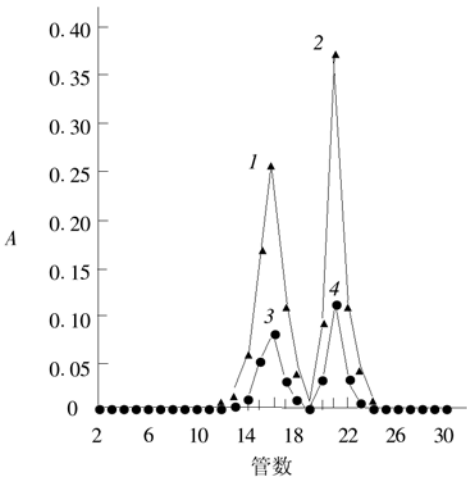


图 2 连续自由流电泳分离Cyt c 和 Hb 的蛋白吸收图谱图

1 和 3: 415 nm 和 280 nm 时的Cyt c 吸收峰; 2 和 4: 415 nm 和 280 nm 时的Hb 吸收峰.

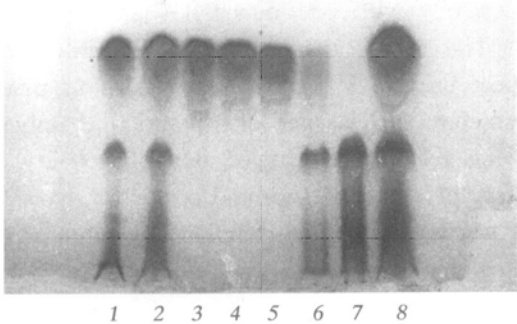


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1, 2, 8: 标准带; 3, 4, 5: Cyt c; 6, 7: Hb.

2.5 进样速度及样品浓度对分离的影响

采用三种不同的进样速度，缓冲液流量不变，流速比（缓冲液：样品）分别为 500: 1、800: 1、1 100: 1。可得到流速比大，分离样品两条带的间距也较大的结果；采用三种不同浓度的样品（0.5%、1.0%、1.5%），在相同的流速比（800: 1）下，样品浓度大，分离样品两条带的间距稍窄；反之，两条带间距稍宽。

3 讨 论

3.1 被分离的样品与缓冲液密度必须相当，

这才有可能使样品分离效果好。若样品密度明显比缓冲液密度大，样品将会发生“下沉”，并且分离区带宽，流动容易“倒塌”；反之，样品将会发生“上漂”，无法实现分离。因此，用甘油调节样品和缓冲液密度，使之等同，否则减弱分离效果^[4]。

3.2 样品溶液的电导不能太高。若电导过高，样品几乎没有电位梯度，以至样品泳动速度近于零；且也因为电导过高，会降低蛋白质的电动电位，会引起分界面模糊不清。电泳完成后，电导率增加，pH 值减小^[3]。

3.3 电泳过程中，电流保持稳定，并且在保证样品分离效果好的状态下尽可能的小，否则电流强度高，会造成过高的电阻热，造成温度梯度，这样会使流动产生很大变形，破坏了整个的均一流动，降低分离效果。我们在电泳槽后面紧贴着装置一块铝板，由于铝板散热较快，可以起到热均衡作用。

3.4 根据国外文献报道，样品采用模式蛋白，使分离样品容易检测。我们选择两种有色蛋白作为样品：Hb，等电点 6.9~ 7.1，分子质量 66.0 ku；Cyt c，等电点 9.8~ 10.1，分子质量 12.3 ku。加电场后，Cyt c 逐渐向负极泳动；Hb 逐渐向正极泳动。在电泳过程中，很容易看到蛋白质样品呈 V 字型分离，样品的分离程度与设置的电场、分离室间隙的大小及分离带的清晰度与设置的电场及样品本身性质都有密切的关系。经过反复试验，我们选定的主要性能参数如表 1^[3,4,7]。

3.5 电泳过程中，随着时间延长，电流减小。由于电解作用会使阴阳极 pH 有所变化，因此，为了保持电极缓冲液的 pH 值的稳定，电极缓冲液储瓶内所装缓冲液体积尽量大；电极缓冲液速度较分离室缓冲液速度快，可以在循环过程中不断带走气泡，减小了气泡对电场稳定性的影响。

3.6 所选择的缓冲液电导率低，在一定功率下，电流值小，保证分离室尽可能大的电位梯度，有利于样品的分离。缓冲液浓度对电泳影响很大，在其他参数相同的条件下，缓冲液浓

度高, 分离效果好, 但电流也相应增大. 我们选择分离室间隙 1.0 mm、1.5 mm, 储备液稀释 10 倍; 间隙 2.0 mm、3.0 mm, 稀释 7 倍, 分离结果较好.

3.7 实验采取 25℃、21℃、18℃ 三种温度. 温度高, 随着电泳时间的增加, 电极腔中的气泡也有增加. 可采用加大电极缓冲液速度等方法, 缓和试验结果的影响^[4].

3.8 电泳过程中, 采用样品的不同的进样速度, 得到如下结果: 样品进样速度大, 分离样品的两条带间距小; 样品进样速度小则两条带间距大.

3.9 在相同的流速比 (缓冲液流量: 样品流速) 状态下, 样品浓度大, 分离样品的两条带间距小; 浓度小则两条带间距大.

参 考 文 献

- 1 Rickwood D, Hames B D. Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach. 2nd. Oxford: IRL Press, 1990. 17~ 45
- 2 Hanning K, Heidlich H-G. Free flow electrophoresis: an important preparative and analytical technique for biology, biochemistry and diagnostics. Darmstadt: GIT verlag, 1990. 114~ 118
- 3 McDonnell Douglas Corporation. Electrophoresis Operations in Space. USA, 1986. 1~ 15
- 4 Hidesaburo K, Naoaki I, Shunji N. Bioprocessing in microgravity: free flow electrophoresis of *C. elegans* DNA. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 367~ 376

- 5 Hannig K. New aspects in preparative and analytical continuous free flow cell electrophoresis. Electrophoresis, 1982, 3: 235~ 243
- 6 Snyder R S, Rhodes P H, Miller T Y. Polystyrene latex separations by continuous flow electrophoresis on the space shuttle. Separation Science and Technology, 1986, 21 (2): 159~ 185
- 7 Michael J C, Balmann H R, Sanchez V *et al.* Purification of biological molecules by continuous flow electrophoresis in the second international microgravity laboratory. Journal of Biotechnology, 1996, 47: 341~ 352
- 8 李 钦, 李 丽, 钱世钧等 (Li Q, Li L, Qian S J *et al.*). 连续自由流电泳样机的研制. 生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics), 1998, 25 (4): 338~ 340

Application of Continuous Flow Electrophoresis System LI Li, LI Qin, WANG Zhao-jie, YE Jun, QIAN Shi-jun (*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract Two types of protein mixture of hemoglobin and cytochrome c were separated successfully with continuous flow electrophoresis. The result that separated samples were inspect using UV and PAGE relates to many parameters such as gap of separation chamber, flowing velocity of sample, flowing velocity of buffer, pH, conductance and power.

Key words separation chamber, cytochrome c, hemoglobin, buffer

钙离子通道 A23187 对血小板聚集和蛋白质磷酸化的影响*

陈日炎 江黎明¹⁾ 覃燕梅 梁念慈

(广东医学院生化教研室, 湛江 524023)

摘要 以 ^{32}P - Na_2HPO_4 标记猪血小板, 在阿斯匹林阻断花生四烯酸代谢, Apyrase 去除分泌的 ADP 情况下, 以 A23187 和 PMA 为血小板激动剂, staurosporine 为 PKC 抑制剂, 研究 Ca^{2+} 和蛋白激酶 C 在血小板聚集中的作用. 结果表明, a. A23187 在 1~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 引起血小板聚集, 相应地, 明显地引起 40 ku、20 ku 蛋白质磷酸化, 且存在剂量和时间效应关系. b. A23187 和 PMA 在血小板聚集和蛋白质磷酸化上都存在着协同效应. c. 1 $\mu\text{mol/L}$ staurosporine 可大部分抑制 20 $\mu\text{mol/L}$ A23187 诱导的血小板

* 国家自然科学基金资助项目 (39070505). ¹⁾ 广东医学院附属医院中心实验室, 湛江 524001.

收稿日期: 1997-04-10, 修回日期: 1998-01-12