

介绍两种自制的简易细胞电泳装置

李文简 王香云

(第一军医大学微生物教研室)

细胞电泳技术,是通过测定细胞表面电荷的性质和密度,来研究细胞表面的结构和功能变化的一种精细的和灵敏的生物物理学方法。在医学范围内曾应用于研究癌细胞表面特性和表面分子结构的改变;抗原-抗体反应过程中细胞表面电荷密度的变化;抗菌素、消毒剂对细菌表面的组成、结构和功能的影响;病毒与感染细胞的表面结构和功能变化的关系,病毒与感染细胞上特异受体的结合;电离辐射所引起的细胞表面的微结构的破坏、细胞表面酶系统的失活等等^[1]。此外,在研究细胞免疫方面,巨噬细胞电泳和淋巴细胞电泳亦能反应出“巨噬细胞电泳缓慢因子”和T淋巴细胞与B淋巴细胞的百分率。总之,细胞电泳是值得重视的一项技术。

总的来讲,细胞电泳装置有开放型和封闭型两种,国外曾出现各种形式的细胞电泳装置,但最常用的是蔡氏细胞电泳计。这些装置总的缺点是结构复杂、样品用量大等。上海第一医学院曾试制一种简便、微量方形玻璃毛细管式的细胞电泳装置,我们认为这是一项有价值的技术改革^[1]。我们曾研制了两种形式的细胞电泳装置,并作了初步试验,今将其结果简介于下。

一、材料和方法

(一) 介质——9%蔗糖溶液, pH7.2。

(二) 标本——正常青壮年20名,从耳垂取血一滴,放于含有肝素的9%蔗糖液(40单位/毫升)的小试管中(2毫升)。标本取回后再加入9%蔗糖液2—3毫升,混匀后进行离心(约1200转/分,5分钟),然后配成适当浓度的细胞悬液,

达到在目测微尺下可以见到每方格约1—2个红细胞(约稀释3—4毫升)。

(三) 3%琼脂——9%蔗糖溶液100毫升加普通琼脂3克。

(四) 细胞电泳装置

1. 封闭型微量圆形毛细管式电泳装置(图1)

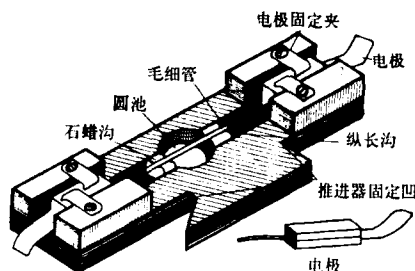


图1 封闭型微量圆形毛细管式细胞电泳装置

(1) 电泳板——电泳板为长13厘米,宽3.5厘米,中部宽5厘米(为显微镜载物台移动器的夹持部),厚0.4厘米的有机玻璃板所构成。在板上作一平底长沟,沟长约11.6厘米,宽约0.6厘米,深约0.35厘米(即纵长沟)。在沟的中央部位做一圆形小池(即细胞电泳观察窗),池直径1.5厘米,深0.4厘米,底部粘一块厚1毫米的有机玻璃。在圆池两端的长沟中灌入固体石蜡,在石蜡尚柔软时用圆形毛细管(略大于装细胞悬液的毛细管),按压一小槽,圆池两端的石蜡沟各长为1.7厘米(即石蜡沟)。在电泳板的两端,沟的两侧各粘上两小块厚0.4厘米的有机玻璃,再于其上安装四个电极固定夹(两端各2个)。

(2) 电极——电极铜丝或白金丝。将此金属丝粘于长1.5厘米,厚0.4厘米,宽约0.6厘

米及同长同宽而厚是 0.3 厘米的有机玻璃条之间。将电极安装在电泳板长沟的两端,用电极固定夹固定。

(3) 圆形毛细管——毛细管长 6 厘米,直径 0.2 厘米(内径约 0.18 厘米)。使用时将毛细管一端插入细胞液中,将小试管倾斜,借助于毛细作用使细胞悬液充满于毛细管腔内,与此同时加溶化的琼脂(3%)于电泳板纵长沟的两端,待琼脂凝固后将装好细胞悬液的毛细管按入槽内,毛细管两末端再用琼脂覆盖。毛细管两端距电极约 0.2 厘米。此时向小池中注入 15% 蔗糖溶液,盖上盖玻片放在载物台上通电后即可进行观察。用过的毛细管经冲洗可再用。

此种装置在使用时须注意下列各点:

A. 毛细管内无气泡,因气泡可以阻断电流;

B. 防止琼脂进入毛细管腔内,进入的琼脂可影响细胞电泳速度;

C. 未通电前须无“自然流动”现象,“自然流动”现象的发生是由于两端琼脂封固不严所致,它造成变换电极前后细胞电泳速度差距甚大。

2. 开放型长方扁平式细胞电泳装置(图2)

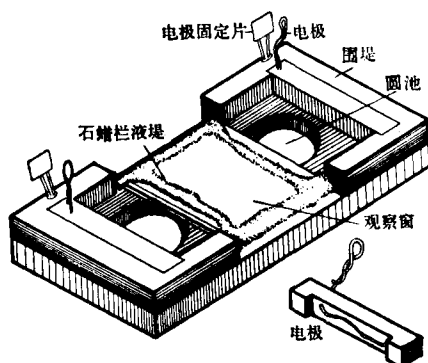


图2 开放型长方扁平式细胞电泳装置

(1) 电泳板——电泳板为长 7.3 厘米,宽 4.2 厘米,厚 0.4 厘米的有机玻璃板。在板的两端各做一圆池,直径为 2 厘米,深约 0.25 厘米。在电泳板的两端、池的外围用厚 0.4 厘米、宽 0.5 厘米的有机玻璃条作围堤。电泳板中央部位为电泳室,两侧围堤止于电泳室(即电泳室两侧不

做围堤)。在板一侧的两末端侧端各安装一电极接触金属片,其对侧有一电极固定孔。

细胞电泳室是在电泳板中央部位垫一张盖玻片(24×24 毫米²),在其上放一张 24×32 毫米²的盖玻片,两盖玻片的距离为 1.6 毫米,再用熔化的石蜡固定两侧边,这样就构成一个长方形扁平电泳室。在 24×32 毫米² 盖玻片两端也用石蜡作一“拦液堤”,此堤与电泳板两边有机玻璃侧堤相联接。

(2) 电极——电极为白金丝。将白金丝镶于长 2.5 厘米,宽 0.4 厘米,厚 0.2 厘米的有机玻璃条上,两端各用一小块有机玻璃固定。在使用时将电极安于电泳板两端,一头插入电极固定孔内。一端用电夹(联接电线的金属小夹)夹在电极接触板上。

(3) 细胞悬液输入注射器——用结核菌素注射器配以 5 号针头,将针头作 90° 弯曲。在试验时先在电泳板两端及电泳室灌满 9% 蔗糖液,再用上述注射器吸细胞悬液注入扁平电泳室内,通电后进行观察。

此种装置在使用时须注意下列事项:

A. 电泳室无气泡。

B. 电极周围无气泡。

C. 细胞悬液须成直线或略成斜线(电泳五小格其斜度不超过半格)。

D. 未通电前细胞呈静止状态,无“自然流动”。

(五) 晶体管稳压电源

电源为交流电,通过晶体管稳压电源(广东省庆德县无线电厂出品)。电压为 0—30 伏,有粗调和微调。用两条细电线一条接输出阳极,一条接输出阴极,中间接一变极开关。使用时将这两条细电线分别与电泳室两端的电极联接。

(六) 显微镜保温箱

在天气冷时须用保温箱,保温箱的温度可调节到 37°C 。本次试验在室温中进行,试验期间的室温为 $19-21^\circ\text{C}$ 。

(七) 细胞电泳观察和计算

每份标本我们观察 20 个红细胞,每观察

5 个细胞后变换电极。在同一电场强度条件下各高度层的细胞电泳速度相差甚大,我们固定观察 700 微米高度的细胞。计算细胞电泳速度是于接目镜(10×)中安装一方格测微尺,此测微尺为 0.5² 厘米² 的大方格中有 100 个小方格,观察每一个红细胞通过 5 小格所需要的时间(秒),然后再求出通过一个方格所需之时间。所观察的细胞须有同等的清晰度,通过 5 小格距离时亦保持相同的清晰度。观察区固定在电泳室中央部位,将镜筒用粗调节螺旋拧紧,焦点调节到 700 微米高度处不变动(每天)。

二、结果与讨论

(一) 试验条件的研究*

1. 不同电压对细胞电泳速度的影响

用同一份标本观察不同电压(不同电场强度)对同一高度(700 微米)细胞电泳速度的影响。观察红细胞通过 5 小格所需的时间(秒),再求一格所需的时间,其结果如表 1。

表 1 不同电压对细胞电泳速度的影响

电压 (伏)	细 胞 数	细胞电泳速度(秒/格)				
		变 极 前		变 极 后		总 平均
		速度变动 范围	平均 速度	速度变动 范围	平均 速度	
10	7	5"30—5"90	5"56			5"56
15	10	3"48—3"83	3"65	3"33—3"69	3"59	3"62
20	14	2"33—2"56	2"47	2"44—2"68	2"53	2"50
25	15	1"92—2"00	1"97	1"97—2"08	2"02	1"99
30	15	1"57—1"66	1"63	1"54—1"68	1"62	1"62

从表 1 可以看出,细胞电泳速度与电压成正比,电压愈高时每个细胞电泳速度差异愈小(25 伏及 30 伏)。在以后试验中工作电压为 30 伏。

2. 不同高度细胞电泳速度的差异

电压固定在 30 伏,观察电泳室悬液中处于不同高度细胞电泳速度的差异,共做了四个正常人的血标本,计算方法同前,所不同的是每个高度只观察 2 个细胞,其结果如图 3。

从图 3 中可以看出,越接近底层的细胞其电泳速度越慢,而且差异也越大,在 600 微米到

800 微米高度时,四份血标本的细胞电泳速度较一致,差异比较小。在以后试验中,由于细胞向下沉降,800 微米高度的细胞数往往不能满足细胞计数需要,因此我们在 700 微米高度的位置测定(即以电泳室中底部细胞为起点,用细调节螺旋刻度进行调节)。

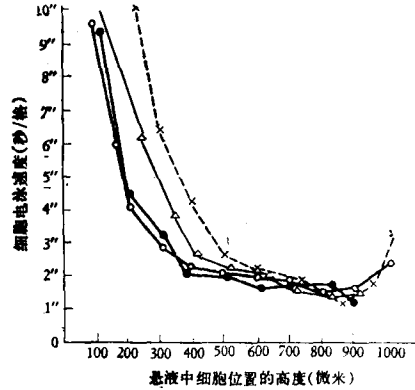


图 3 不同高度细胞电泳速度的差异

3. 洗涤对细胞电泳速度的影响

在同一强度电场中,细胞由于吸附离子和蛋白质因而电泳缓慢。为排除这些因素,我们将同一人的一滴耳垂微量血用 4 毫升蔗糖溶液分次进行洗涤,其电泳结果如下:

表 2 洗涤对细胞电泳速度的影响

洗 涤 次 数	细 胞 数	平均电泳速度(秒/格)
1	20	1"76
2	20	1"72
3	20	1"71

从表 2 中可以看出,一滴微量肝素化血液,用 4 毫升蔗糖液只须洗涤一次,基本上可以完全洗去血浆蛋白,因此我们以后试验中的血球只洗一次。

(二) 两种类型细胞电泳装置的实验比较

在上述试验基础上,我们确定试验条件的要求为:(1)细胞用 4 毫升蔗糖液洗一次;(2)电压 30 伏;(3)细胞为 700 微米高度的细胞;(4)

* 所列举的资料为用开放型长方扁式细胞电泳装置所作的试验,一般认为开放型影响因素较多

毛细管内不进入琼脂和气泡;(5)长方扁平电泳室内无气泡,细胞电泳路线的倾斜度不超过半格(通过5格距离);(6)无“自然流动”现象;(7)所观察的细胞均须有相同的清晰度;(8)每份标本观察20个细胞通过五格距离所需时间,再求出通过一格所需时间,每观察5个细胞后变换电极。(9)血球在蔗糖液中时间不宜过长。

在上述条件下,毛细管式电泳装置进行了20个人的血标本,长方扁平式电泳装置进行8个人的血标本,其结果如表3。

表3 两种类型细胞电泳装置试验结果的比较

电泳装置	血标本数	血球数	平均值与标准差 (秒/格)
圆毛细管 (封闭式)	20	400	$1''68 \pm 0.1520$
长方扁平 (开放式)	8	160	$1''66 \pm 0.2722$

从表3中可以看出,两者平均值比较接近,按统计学处理, $P > 0.05$, 相差不显著,也就是说两者具有同等的效果。从操作上来讲,前者较复杂,后者较简单。前者应该特别注意的是防止琼脂进入毛细管而引起误差,另有四份标本由于琼脂进入毛细管内,其平均值高达 $1''93$ — $1''96$; 后者应予以改进的是克服电泳线路倾斜的缺点。

对于温度,资料报道中常用 23°C , 一般实验室做到这一点是有困难的,若提高到 37°C , 用显微镜保温箱尚可解决。对此我们未做比较。

此次温度波动较大, $19-21^{\circ}\text{C}$ 。关于电源问题,我们是用交流电(通过晶体管稳压电源,参看材料与方法),看来交流电源尚可应用,这样既省事又节约。

关于细胞电泳读数,一般用观察同一个细胞往返一定距离所需的时间。跟踪一个细胞往返,在操作上有困难,弄不好就容易产生误差,我们是观察20个细胞,观察5个细胞变换一次电极(变极开关),这样可以更方便一些。

圆形毛细管制作较为简单,在圆形池(观察窗)中加入一定浓度的蔗糖液(15%)可以克服由于凹面在镜下成像畸变的缺点。此外,两种类型细胞电泳装置用量较少(一滴耳垂血可做多次实验),这有利于病人和推广。

三、小 结

本文通过少数血标本对两种自制的细胞电泳装置进行了比较,同时对稳定细胞电泳有关的因素进行了摸索。

通过初步试验证实,此两种细胞电泳装置还是可以应用的,但这是一个初步尝试,自然还存在很多缺点,有待于以后改进。

参 考 资 料

- [1] 梁子均、施永德:生物化学与生物物理进展,1976年,第1期,第54页。

[本文于1976年5月10日收到]