

琼脂糖悬浮电泳分离制备血红蛋白

邱长春 周文郁 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

王荣新 张尼佳 黄有文

(中国人民解放军三〇三医院, 北京)

琼脂糖 (Agarose) 悬浮电泳技术是 Hjerten^[1] 1963 年建立的。由于该方法在分离制备过程中必须通过光扫描或 Folin-Lowry 等测蛋白质步骤才能确定无色蛋白质的泳动区带, 操作颇为复杂, 应用受到一定限制。

我们利用血红蛋白样品自身易辨认和半流动性, 以及琼脂糖的离心洗脱回收简便等特点, 分离制备了多种血红蛋白。

430 nm 波长下测定光密度。合并所需组分, 12,000 转/分, 离心 5 分钟, 收集红色上清部分。如沉淀胶层中仍带有较深的红色, 可用同样缓冲液洗涤、离心, 合并两次上清液, 浓缩后保存。

用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析鉴定所得各种血红蛋白的纯度。

一、材料与方 法

1. 红细胞的收集

正常人、 α 和 β -地中海贫血患者的静脉血, 经 A. C. D. 抗凝, 3500 转/分, 离心 15 分钟去血浆。用生理盐水洗沉积的红细胞三次(离心处理同上)。所得红细胞在液氮中可保存 1~3 个月。

2. 方法

(1) 红细胞溶解液的制备 取上述压积红细胞加入等体积蒸馏水和 0.4 倍体积四氯化碳, 用力振荡 5 分钟使红细胞充分破碎。置于室温或 4℃ 冰箱内 10 分钟, 3500 转/分, 离心 15 分钟。吸取上层血红蛋白溶液, 置低温冰箱或液氮中保存。按郁知非^[2] 方法鉴定血红蛋白溶液中所含各种血红蛋白的百分含量。

(2) 0.16% 琼脂糖悬浮电泳 按潘华珍等^[3] 方法稍加改变。取 0.16 克琼脂糖(上海东海制药厂产), 加 100ml TEB 缓冲液 (80 mM Tris-硼酸缓冲液, 含 0.16 mM EDTA, pH 8.6), 100℃ 煮沸 2 分钟, 置室温下使其自然聚合。电泳装置如示意图 1., 胶柱长约 35~38 cm。加样时先取 3 ml 0.16% 琼脂糖, 12,000 转/分, 离心 5 分钟, 吸出 0.5ml 上清缓冲液后, 再补加 0.5 ml 待分离的血红蛋白溶液, 混匀后轻轻加在已装好的琼脂糖胶柱上。最好在样品层上面再加少量 0.16% 琼脂糖胶, 以防加电泳液时搅动样品。电压 700 伏, 泳动时间为 20~24 小时 (根据被分离血红蛋白成份的泳动速度, 可延长或缩短)。电泳完毕, 用带塑料管的注射针筒分段吸出红色区带的琼脂糖胶, 在

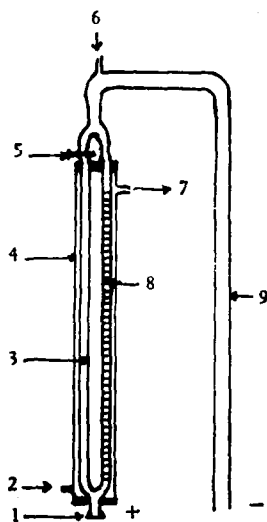


图 1 琼脂糖悬浮电泳装置示意图

1. 透析袋膜 2. 冷凝管入水口 3. 电泳液 4. 冷凝管
5. 螺旋夹 6. 吸液管 7. 冷凝管出水口 8. 琼脂糖胶柱
9. 电泳液。

二、结果与讨论

我们应用琼脂糖悬浮电泳法, 已分别从正常人、 α 和 β -地中海贫血患者的红细胞中分离制备出 HbA、HbF、HbH、HbA₂ + E、Hb Bart's 和 Hb Portland。肽链组成依次为 $\alpha_1\beta_2$ 、 $\alpha_2\gamma_2$ 、 β_4 、 $\alpha_1\delta_2$ 、 γ_4 和 $\zeta_2\gamma_2$ 。现仅以分离制备 Hb Bart's 为例作简单讨论。Bart's 水肿胎儿的红细胞溶解液, 经电泳后可见三条区带。第

一条离原点较近为碳酸酐酶，红色极微弱；第二条居中，红色较清晰，为 Hb Portland；第三条在最前边，区带宽而深红，为 Hb Bart's，其 430 nm 吸收图谱如图 2 所示。此外，从图 3 可见用琼脂糖悬浮电泳制备的各种血红蛋白，经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定均得单一区带。

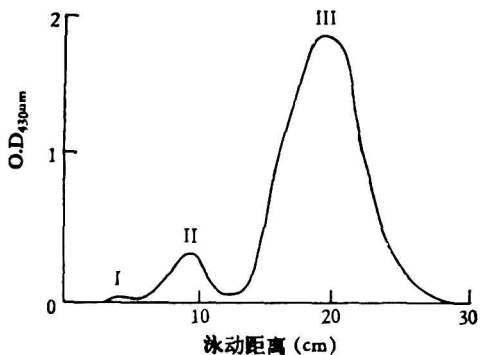


图 2 Bart's 水肿胎儿红细胞溶解液电泳扫描图谱
I——碳酸酐酶；II——Hb Portland；III——Hb Bart's

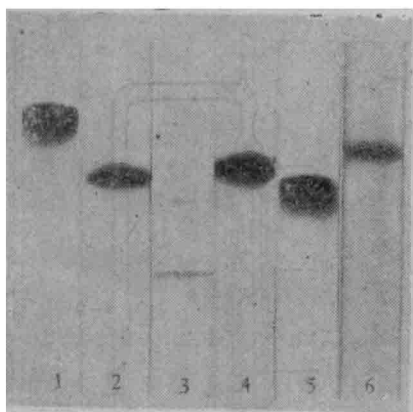


图 3 琼脂糖悬浮电泳分离产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析图谱

(电泳条件：甘氨酸-Tris 缓冲液 pH 8.6，电压 100 伏，电流 2 毫安/管，泳动 3 小时。经 0.1% 氨基黑染色 40 分钟，用 7% 乙酸脱色)

1. Hb A₂ + E
2. Hb A
3. Hb H
4. Hb F
5. Hb Bart's
6. Hb Portland

我们还比较了琼脂糖悬浮电泳法及目前常用的 CM-纤维素柱层析法^[4] 分离制备的 Bart's 血红蛋白产品。从图 4 可见用 CM-52 纤维素柱层析分离制备的 Hb Bart's 组分中仍含有杂蛋白，而用琼脂糖悬浮电泳

法分离制备的 Hb Bart's，经聚丙烯酰胺凝胶电泳呈清晰的单一区带。表明琼脂糖悬浮电泳法分离效果优于 CM-纤维素柱层析法，而基本上与聚丙烯酰胺凝胶电泳法相同，但载量 (5—6 mg/次) 却大于聚丙烯酰胺凝胶电泳法，且回收简便。

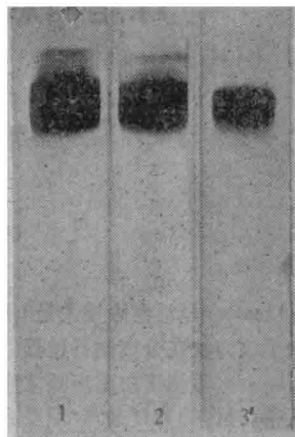


图 4 琼脂糖悬浮电泳法与 CM-纤维素柱层析法制备的 Hb Bart's 纯度比较

(聚丙烯酰胺凝胶电泳分析条件同图 3。)

1. Bart's 水肿胎儿红细胞溶解液电泳谱
2. CM-纤维素柱层析制备的 Hb Bart's 的电泳分析图谱
3. 琼脂糖悬浮电泳制备的 Hb Bart's 的电泳分析图谱

此外，由于被分离制备的是带有红色的血红蛋白样品，泳动分离出的区带清晰可见，无须测光密度即可直接吸取收集所需组分的区带，再经离心处理便可回收 90% 的 Hb Bart's。如重复洗涤三次，可回收更多产品。因此，琼脂糖悬浮电泳法是分离制备各种血红蛋白的理想方法。

本工作承蒙潘华珍、许彩民、曹淑兰同志的热情帮助，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hjerten, S.: *Journal of Chromatography*, **12**, 510, 1963.
- [2] 郁知非主编：《贫血及红细胞系疾病》，252 页，浙江人民出版社，1978。
- [3] Hjerten, S. and Pan, H. Z.: *Biochem. Biophys. Acta*, **728**, 281, 1983.
- [4] Schroeder, W. A. et al.: *The Chromatography of Hemoglobin*, **9**, 50, 1980.

[本文于 1983 年 12 月 5 日收到]