

红细胞的毛细管区带电泳

陈 义 竺 安

(中国科学院化学研究所, 北京 100080)

提 要

系统研究了毛细管区带电泳对红细胞测定的操作条件和方法特点。对人、鸡、兔和猪的红血球进行了分析, 结果与经典方法无异。在半小时内可一次测定 10^5 个细胞, 简便、精确。保留值的变异系数小于 2%。实验中发现了间歇时间现象并予解释。

关键词 电泳, 红细胞电泳, 毛细管区带电泳

导 言

细胞电泳在生物和医学中有重要用途^[1,2]。但现行细胞电泳法大多不太理想^[1], 或者费时费力、重现性差, 或者装置复杂昂贵, 难以用于普通实验室, 阻碍了细胞电泳的推广应用。

毛细管区带电泳 (CZE) 是近年发展起来的一种高效快速的液相分离分析技术^[3,4]。原理简单, 操作方便, 费用低, 易于自动化。它广泛用于氨基酸、多肽、蛋白质、DNA、RNA 等生化样品分析^[1,3]。我们探讨了 CZE 对悬浮液的分析, 发现它适合于细胞测定。细胞电泳的主要目的是通过测定淌度进而求算膜电荷密度来研究结构与功能间的关系^[1,2,7]。CZE 给出的保留值可用于此种分析, 给出峰形状 (高低、宽窄) 可用于分析不同种细胞的淌度分布或同种细胞 (如白细胞) 不同子群间的比例关系, 这在各种病因研究中极为重要^[2]。

本文报告 CZE 用于红细胞分析的结果及操作条件选择方法。

原 理

CZE 是以具有 pH 缓冲能力的电解质溶液为载体、以毛细管为分离室的一种高压区带电

泳。毛细管通常水平放置。但细胞有沉降现象, 毛细管应垂直安置, 因而测得细胞速度 U 是电泳速度 U_m 、电渗速度 U_{os} 和沉降速度 U_g 的和

$$U = U_m + U_{os} + U_g \quad (1)$$

U_g 相对于 U_m 和 U_{os} 是很小的, 可以略去。所以淌度 m 仅由 U 和 U_{os} 决定:

$$m = -(U - U_{os})/E \quad (2)$$

$$\text{或: } m = -(L_u/t_R - U_{os})/E \quad (3)$$

其中 E 为电场强度; L_u 为迁移长度 (从进样口到检测口的距离); t_R 为保留时间 (最大峰高出峰时间)。(3) 式表明, 在固定装置和操作条件下, m 仅与 t_R 成反比。所以在只需比较 m 大小时, 可直接用 t_R 代替 m , 以免计算麻烦。如在癌症诊断中, 常只测定病细胞的 m 并与正常组对照^[2], 此时用 t_R 比较非常方便。在巨噬细胞电泳中也可用 t_R 计算减缓因子 f ^[2]:

$$f = -[(t_R)_1 - (t_R)_2]/(t_R)_1 \quad (4)$$

$(t_R)_1$ 和 $(t_R)_2$ 分别表示巨噬细胞与病细胞作用前和作用后的保留时间。

实 验 方 法

1. 药品 N-(2-羟乙基) 哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) 和 2-(N-吗啡啉) 乙磺酸 (MES) 为

日本中仁堂实验室赠品;羟丙基甲基纤维素, II 型 (HPMC) 为美国 Sigma 公司产品; Tris、葡萄糖 (G)、蔗糖 (S) 及其他无机盐 (A.R. 级) 均为北京化工厂产品。

2. 电泳载体 所用载体见表 1, 均为等渗溶液, 用自制三蒸水配制。

表 1 电泳载体及其组成

代号	组 成 ¹⁾	pH 调节物
HI	0.012mol/L HEPES, 5.14%G	Tris
III	0.012mol/L HEPES, 4.70%S, 2.50%G	Tris
MI	0.0055mol/L MES, 5.30%S, 2.50%G	Tris
PI	2.2×10^{-4} mol/L KH_2PO_4 , 4.0×10^{-4} mol/L KCl , 1.14×10^{-4} mol/L MgCl_2 , 5.30%S, 2.50%G	Na_2HPO_4
PII	4.4×10^{-4} mol/L KH_2PO_4 , 8.0×10^{-4} mol/L KCl , 2.3×10^{-4} mol/L MgCl_2 , 7.60%S, 1.00%G	Na_2HPO_4

1) pH 值及添加剂 HPMC 的浓度在文中注明。

3. 样品制备 取鸡和猪的颈静脉血, 柠檬酸三钠抗凝, 常规洗涤。鸡红血球用甲醛固定,

猪红血球用戊二醛固定。兔血取自耳动脉、人血由针刺指尖获得, 均用柠檬酸三钠抗凝, 以 100 倍体积的磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 洗 4 次。用相应的电泳载体配成约 10^5 个细胞/ μl 的悬液, 4°C 贮存, 待用。

4. 装置 电泳装置如图 1 所示。毛细管 (FEP, 聚乙烯丙烯氟化物): 0.45mm I.D. $\times$ 600mm $L_w/800\text{mm}$ L (总长)。检测器: 瑞典 LKB 公司产的 2238 型 UV 检测器, 上部开一小孔使毛细管可以垂直通入, 检测波长 206nm 。高压源: 美国 Spellman 公司产的 RHR 40PN 型直流高压源, 恒压范围 $0-40\text{kV}$, 限流 $0-3\text{mA}$ 。半透膜 (12) 用以阻止载体流动。

5. 电泳 系统用三蒸水洗涤干净后装上载体, 静置约 3 min 后即可进样电泳。毛细管中载体可通过针筒 4 推入。出峰完毕后, 须将管内载体放出并用三蒸水冲洗约 2 min, 装入新鲜载体。电极槽中的载体可用 3 至 5 次, 然后更换。

结果与讨论

1. 红细胞的分离和淌度测定 CZE 对于醛固定红细胞加未固定红细胞样品的分离效果不太理想, 但对同是固定的混合红细胞或同是未固定的混合红细胞都能很好地分开。图 2 b 是人和兔红细胞混合样的电泳谱图, 其人红血球的峰形和位置与单独测定 (图 2 a) 的结果无明显差异。兔红血球情况相同。由图 2 可读出人红血球的 t_R 为 13.9min 。同样条件下, 用吡啶^[7]测得 U_{os} 为 $+0.0114\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。根据 (3) 式得 $m = -3.55\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ 。如对粘度进行校正^[6]则为 $-4.7\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$, 与经典结果 $-4.3\mu\text{m} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1[7,8]}$ 是一致的。

2. 重现性 CZE 测定结果精密度非常高, 关于保留时间的变异系数不超过 2% (见表 2—4)。经典的细胞电泳方法要达到此种精度几乎是不可能的。

3. 间歇时间 τ τ 指的是在两次连续电泳间让系统在无电场下静置的间隔。它是影响重现性的关键因素。 τ 值不够得不到重复的结

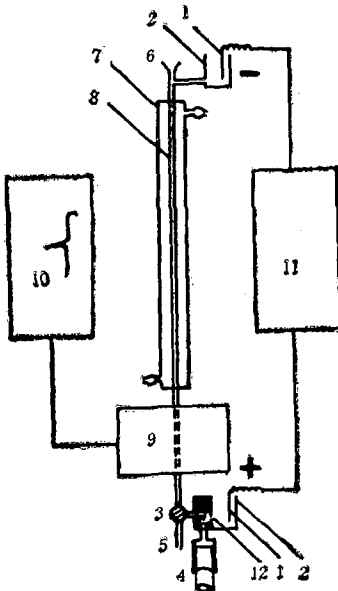


图 1 电泳装置示意图

1:Pt 电极; 2:电极槽; 3:三通阀; 4:20ml 塑料注射器; 5:排出口; 6:进样口; 7:水冷却套; 8:毛细管; 9:UV 检测器; 10:记录仪; 11:高压源; 12:半透膜

表 2 各种红血球之保留时间的重现性

红细胞种类	载体与电泳条件	$\bar{t}_R^{(1)}$ (min)	n	CV(%)
鸡, 甲醛化	PII + 0.008%HPMC, pH7.40; 15kV(140 μ A), 约 20℃	23.9	5	1.8
	PI + 0.020%HPMC, pH7.40; 15kV(110 μ A), 约 16℃	27.5	5	1.6 ⁽²⁾
	M1 + 0.010% HPMC, pH7.33; 15kV(110 μ A), 约 16℃	28.5	4	0.3
鸡	M1 + 0.010% HPMC, pH7.33; 15kV (130 μ A), 20℃	23.5	5	1.2
人	HI + 0.10% HPMC, pH7.40; 20kV(150 μ A), 18℃	15.1	5	0.5 ⁽³⁾

1) 平均值; 2) 改变浓度: $1.1 \times 10^5, 0.64 \times 10^5, 0.89 \times 10^5, 0.5 \times 10^5$ 细胞/ μ l, 进样 1 μ l;

3) 改变进样体积: 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ l, 浓度: 1×10^5 细胞/ μ l。

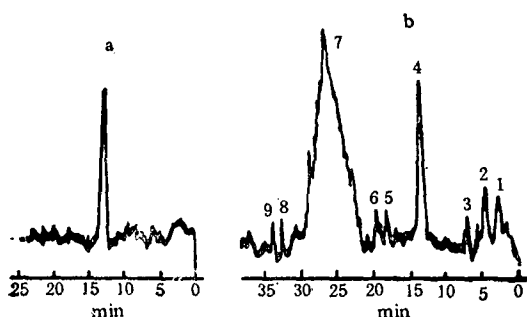


图 2 人和兔红血球的电泳谱图

载体: HI + 0.10% (W/V) HPMC, pH7.18;

进样: 1 μ l; 电泳条件: 20kV(120 μ A), 19℃

a. 人红血球谱图; b. 人+兔红血球谱图: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9: 未知; 4: 人红血球, 7: 兔红血球

表 3 健康个体人红血球的保留时间⁽¹⁾

序 号	性别	年龄	t_R (min)	$\bar{t}_R$ (min)	CV(%)
1	男	20	14.0	13.8	1.32
2	女	28	13.6		
3	男	23	13.7		
4	男	30	13.6		
5	女	21	13.8		
6	男	27	14.1		

1) 载体: HI + 0.10% HPMC, pH7.18; 20kV (120 μ A), 19℃。

果。 τ 值随电泳次数增加而变大(表 5), 最终导致电泳不能进行, 除非更换新的毛细管。

τ 的来源有: 一是毛细管在装入载体后内

表 4 各种红细胞在单独和混合时的保留时间

编号	红细胞种类	载体与电泳条件	t_R (min)	
			单独	混合
a	鸡, 甲醛固定	M1 + 0.010% HPMC, pH7.33; 15kV(110 μ A), 约 17℃	28.3	28.3 (a + b)
b	猪, 戊二醛固定	同上	32.8	32.5 (a + b)
c	兔	HI + 0.10% HPMC, pH7.18; 20kV(120 μ A), 18℃	26.6	26.9 (c + d)
d	人	同上	14.0	14.1 (c + d)

表 5 最小 τ 值与电泳次数的关系

电泳次数	0—10	10—50	50—100	>100
最小 τ 值 (min)	约 10	15	30	>40

部应力不平衡(约 3min); 二是管内壁受高压损伤并随电泳次数增加而加重。对 FEP 废管进行电子能谱研究发现, CHF 基团已断裂(图 3)。但详细机理尚未清楚。

4. 添加剂和等渗维持物 添加剂的作用是克服细胞在管壁上的吸附、红细胞之间的相互作用以及抑制电渗流等。实验发现使用 0.005—0.10% HPMC 效果甚佳。常用的中性等渗物是蔗糖, 但载体含蔗糖时电泳峰会严重加宽, 不利于精确分析。用葡萄糖代替蔗糖结果比较满意。

用基因克隆大肠杆菌发光体系测定长链脂肪醛

吴 自 荣

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提 要

利用基因克隆大肠杆菌发光体系分别测试了五种长链脂肪醛和脂肪酸。结果表明: 可在几分钟内测出癸醛, 正辛醛和十二烷醛的极限浓度分别为 $1 \times 10^{-14} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ 和 $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 是一种灵敏、快速的测试方法。

关键词 发光细菌, 生物测试, 脂肪醛

发光细菌的发光反应包括细菌荧光酶催化(通过分子氧)还原型黄素单核苷酸 (FMNH_2) 和长链脂肪醛 (RCHO) 的混和氧化作用。反

应的结果产生了生物光^[1](如图 1 所示)。因而, 长链脂肪醛或脂肪酸是细菌发光反应必不可少的物质。有些发光细菌的“暗醛突变体”,

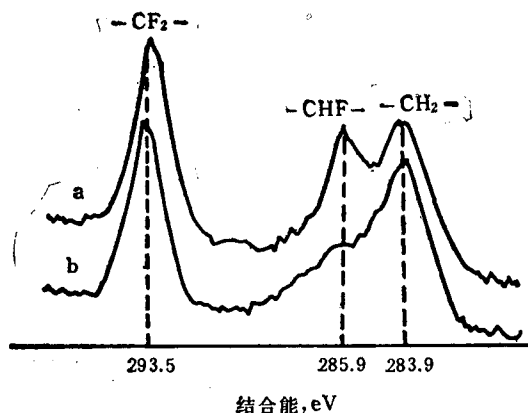


图 3 FEP 管内表面电子能谱

a. 新管; b. 废管(电泳次数大于 200 次)

5. 细胞的洗涤和贮存 最佳洗涤剂是 PBS。最佳洗涤次数为 4—6 次, 少于 4 次, t_R 增加, 多于 6 次易出现溶血。传统红细胞贮存方法不适合于 CZE。我们发现: 红细胞的 PBS 悬液 4°C 下存放两天后就难以出峰, 而用含 HPMC 的载体配制悬液 4°C 下存放 7 天后仍可得到很好的谱峰, 不过 t_R 会有所增加。但在三天内 t_R 变化不大。

6. 电压、电流和温度 电泳电压要小于 25 kV, 最佳范围为 15—20 kV。电流要控制在 200 μA 以内, 否则应减小载体的电解质浓度^[1]。毛细管要置于恒温环境, 环境温度在 $15\text{—}20^\circ\text{C}$ 为宜, 不得超过 35°C 。

7. 小结 在较优化条件下, 用 CZE 测定红细胞结果可靠, 重现性高, 分析速度快, 操作简单。但对于其他细胞, 如白血球、粒细胞等, CZE 能否适用有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈义, 竺安. 色谱, 1989; 7(4): 209
- 2 孙玲. 生物化学与生物物理进展, 1985; (1): 68
- 3 Cohen A S, Paulus A, Karger B L. *Chromatographia*, 1987; 24: 15
- 4 竺安. 分析测试通报, 1988; 7(2): 1
- 5 Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G. *J Chromatogr*, 1983; 264: 385
- 6 Levine S, Levine M, Sharp K A, Brook D E. *Biophys J*, 1983; 42: 127
- 7 Heard D H, Seaman G V F. *J Gen Physiol*, 1960; 43: 635
- 8 Uzgiris E E, Kaplan J H. *J Colloid Interface Sci*, 1976; 55: 148

[本文于 1989 年 9 月 15 日收到]