

冷冻前后人红细胞膜蛋白聚丙烯酰胺 凝胶电泳分析*

蒋金山

(中国科学院发育生物学研究所)

冷冻保存红细胞在血液保存工作中是一项新技术。以甘油为冷冻保护剂,加入新鲜红细胞中,在 -80°C 冷冻保存,可达到长期保存的目的,为了检验在血液保存过程中红细胞的质量,国外也曾对血库内保存的枸橼酸、枸橼酸钠、葡萄糖(简称ACD)全血中红细胞膜上蛋白质组分的改变情况进行研究。例如1969年布莱纳(Brener)等^[3]曾用淀粉凝胶电泳分析新鲜红细胞膜蛋白与保存一定时间后红细胞膜蛋白;1971年穆尔(Moore)对常规方法保存的全血,红细胞膜上蛋白质改变情况进行分析。本文使用硫酸十二酯钠盐(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳分析冷冻前后红细胞膜蛋白^[4,5,6],通过了解红细胞膜改变情况,进一步证明冷冻保存后红细胞结构完整,并肯定了其保存价值。

由于“冷冻血液”能半永久(几年—10年以上)的保存(目前通用的ACD血液在 $4-6^{\circ}\text{C}$ 仅能保存3周),解决了输血工作中长期存在的供需不平衡的矛盾,有利于推行“成分输血法”^[7]。

中国科学院生物物理研究所与有关单位在共同协作下,对低温保存红细胞已获得成功^[1],并且进行临床实验,收到了良好效果,为我国血液保存填补了一项空白。

材料和方法

(一)材料 抗凝全血与冷冻红细胞(系北京市输血站,天津人民医院提供)。

(二)试剂

1. 红细胞膜试剂

(1) 0.2克分子(M)三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液 pH7.4。

取Tris 4.8克(化学纯),用重蒸水溶解稀释至180毫升,用浓盐酸调至pH 7.4,再加重蒸水至200毫升,置冰箱 $4-6^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2) 10mM(毫克分子) pH7.4 Tris-HCl,缓冲液,量取0.2M Tris-HCl 50毫升,以重蒸水稀释至1000毫升,作为低渗缓冲液,供溶血用。

2. 凝胶电泳试剂

(1) 浓胶液 称取丙烯酰胺4克,甲叉双丙烯酰胺0.15克,分别以重蒸水溶解,稀释至10毫克。

(2) 10倍Tris缓冲液 量取1M Tris 40毫升,2M醋酸钠10毫升,0.2M乙二胺四乙酸(EDTA)二钠10毫升,混合,用冰醋酸调至pH7.4,用重蒸水稀释至100毫升。

* 本文承生物物理所黄芬、王苏民二位先生和我所史淑仙先生热情指导和帮助,特此致谢。

^[1] 即将血液的各种成分(红细胞、白细胞、血小板)分开保存,根据病人需要,分别输用。

(3) 20% 的 SDS。

(4) 1.5% 过硫酸铵(新鲜配制)。

(5) 0.5% N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED)。

(6) 电泳缓冲液 将 10 倍的 Tris 缓冲液 100 毫升, 20% SDS 50 毫升, 蒸馏水 850 毫升, 混合。

(7) 红细胞膜溶解液 称取 0.2 克 SDS, 1 克蔗糖, 7.45 毫克 EDTA, 分别以少量 10mM Tris-HCl 缓冲液 (0.5 毫升 0.2M 的 Tris-HCl 缓冲液以重蒸水稀释至 10 毫升, pH8.0)。溶解稀释至 10 毫升。

(8) 染色液 (A). 75 毫升异丙醇加 30 毫升冰醋酸加 150 毫升考马斯蓝, 以重蒸水稀释至 300 毫升。(B) 30 毫升异丙醇加 30 毫升冰醋酸加 75 毫升考马斯蓝以重蒸水稀至 300 毫升。

(三) 方法

1. 红细胞膜的制备 (操作均在 4°C 左右进行)

取 ACD 抗凝人的全血 5—6 毫升, 3000 转/分离心 10 分钟, 吸去上层血浆及白细胞, 脂肪粒。用等体积 0.9% 氯化钠 (NaCl) 溶液, pH 7.4, 反复洗涤离心 3 次, 再加等体积 NaCl, 5000 转/分, 离心 10 分钟, 除去上清液, 红细胞用 20 倍体积的 10 毫克分子 Tris-HCl 缓冲液, pH7.4, 搅拌 2—3 分钟, 于 4°C 放半小时充分溶血。溶血液在 15,000 转/分, 离心 10 分钟, 除去上清血红蛋白, 再用 10 毫克分子 Tris-HCl 洗涤, 以 15,000/分, 离心 10 分钟, 反复洗涤 3—4 次, 洗净全部血红蛋白, 最后获得白色红细胞膜悬液, 放 4°C 保存。

膜蛋白。按劳伦 (Lowry)^[2,6] 等人方法测定。

2. 凝胶电泳分析

(1) 样品处理 将同一人 (A 型) 冷冻前后的血样和不同人按血型分类的血样, 在 37°C 保温 15 分钟, 4000 转/分离心 15 分钟。

(2) 5.6%, pH7.4 凝胶的制备 取浓胶液 4.2 毫升, 10 倍 Tris 缓冲液 3.0 毫升, 水 15.3 毫升, 20% SDS 1.5 毫升, 0.5% TEMED

3.0 毫升, 1.5% 过硫酸铵 3.0 毫升, 迅速混匀, 分装于 12 支玻璃管的同一高处(约 8 厘米); 然后用蒸馏水覆盖于胶液面上, 在 20—30°C 下静置半小时。

(3) 加样 用微量注射器吸取 80—90 微克处理过的蛋白样品加在胶面上, 然后加入缓冲液, 接通电源, 即可进行电泳。

(4) 电泳 以每管 8 毫安的电泳, 电泳约 2.5 小时, 当溴酚蓝指示剂区带移动到距玻璃管底端 1 厘米时, 停止电泳。

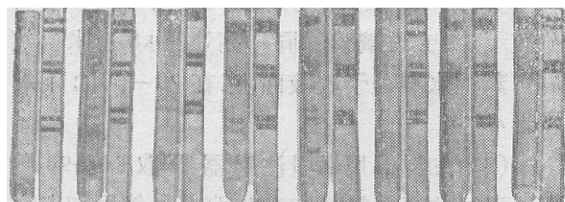
(5) 染色 先将胶与玻璃管完全剥开, 然后用 A 液染色过夜, 再用 B 液染 6—9 小时, 最后用 10% 醋酸脱色。

结果与讨论

红细胞膜蛋白采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析, 能分离出六条主要多肽带, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 以牛血清蛋白为标准测得每条蛋白的分子量为: I + II 25,000; III 89,000; IV 77,500; V 41,300; VI 36,200。至于每条蛋白带的成份, 至今尚无报道, 所以红细胞膜蛋白组成成份还不清楚。对照组人红细胞膜蛋白系采用与实验组相同人的血液, 在相同条件下制备的红血细胞。电泳结果表明, 冷冻前与冷冻后没有明显变化 (见图 I 1 与 2)。

红细胞冷冻保存的工作国外已有不少报道, 如布鲁尔 (Breuer) 做了 ACD 血液 (0—4°C) 保存不同时间正常人红细胞的实验, 保存 4 天的人红细胞膜与新鲜红细胞膜电泳图谱有明显差别。本实验曾对 ACD 抗凝放置 41 天 (4°C) 的人红细胞膜蛋白进行电泳分析, 似无明显变化, 与 Breuer 实验结果不一致, 但由于实验只用了一个样品, 尚不能说明问题, 有待于进一步重复实验。

我们认为实验需要纯净的红细胞膜样品, 在制备过程中, 若 pH 值略降低, 残留的血红蛋白量会迅速增加, 极需注意。当 pH 值保持在 7.4 时, 红细胞膜中的血红蛋白含量仅占总蛋白量的 3—5%, 相当于血液总血红蛋白的 0.1%, 但 pH 值降低至 7.0 时, 血红蛋白约增加至



1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b

图1 SDS 聚酰胺凝胶电泳图谱

1、2 系同一人 A 型血，1 为冷冻前，2 为冷冻后（a 系原图；b 示意图，下同）；3、4、5 为不同血型 A、B、O 血；6、7、8 为不同血型冷冻后的 A、B、O 血。

20%。

凝胶的浓度对电泳图谱有一定的影响，费尔班克斯（Fairbanks）认为胶浓度在 5.6% 时，分离效果最好。我们也做过 3 种不同浓度（5%、5.6%、7.2%）的凝胶电泳结果与其一致，胶浓度为 5%、7.2% 时得到的图谱不清晰。

另外，染色条件对电泳图谱的清晰度亦有较大的影响。实验开始时用甲醇：冰醋酸：水（5:1:5）染色图谱不清晰。后改用前面提到的方法染色，故得到较好的效果，说明作为蛋白质的固定剂异丙醇优于甲醇。染色时间越短，图

谱就越不清晰，一般采用 A 液染色过夜，再用 B 液染 6—9 小时，然后用 10% 醋酸脱色效果较好。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物物理所，1971，红细胞膜冷冻保存的研究——慢速冷冻糖液洗涤法。生物化学与生物物理进展，6，9—15。
- [2] 潘家秀，1973，蛋白质化学研究技术。科学出版社。12，28—29。
- [3] Brener, J.H. 1971, Amylo-Gel Electrophoresis of the proteins of erythrocyte membrane. (proc. 12 th cong int sot. Blood, transfusion. Moscow 1969 Biol.) *Hemato* 38, part II 135.
- [4] Daniels, M. J. et al. 1973 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Mycoplasma Proteins in Sodium Dodecyl Sulphate. *J. General Microbiology* 76, 239—242.
- [5] Fairbanks, G. et al. 1971 Electrophoretic Analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13) 2606.
- [6] Lowry, O.H. et al. 1951 Protein Measurement with the folin phenol Reagent. *J. Biol Chem.* 193, 265.
- [7] Polge, C. et al. 1949 Revival of Spermatozoa after Ultrigication and Dehydration at low Temperatures. *Nature (London)* 164, 666.
- [8] Takoyama, K. et al. 1966 Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the mitochondrial Electron Transfer Complexes. *Arch Biochem Biophys.* 114, 233.