

连续自由流电泳的研制和 应用于分离蛋白质和细胞

邵晓霞 宋金芳 万谦 方文耀 夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

连续自由流电泳(Continuous free-flow electrophoresis, CFE)自 1980 年起有了相当大的发展,其主要特点是将只能分析少量物质($1\mu\text{g}$)的分析型电泳转变成能分离 1g 左右物质的制备型电泳,以达到分离和纯化各种生物产品目的^[1]。近年来 CFE 广泛应用于蛋白质和细胞分离,是一种很有前途的制备级电泳方法^[2,3]。在连续自由流电泳中,一种恒定 pH 称为载体缓冲液的液体,沿垂直方向缓慢流过一矩形的电泳薄腔,电泳腔的两侧是电极室,能被横向地加上直流电场,欲分离的蛋白质混合物通过一根细管从样品入口处连续注入腔体,随缓冲液沿径向流动,同时又向与液流垂直的方向迁移,每种蛋白质的侧移距离与它的泳动率、电场强度及它在分离腔中的保留时间成正比。在分离腔出口处,混合物中各种蛋白质根据它们的泳动率被分配在各股液流中并由腔体出口处的一组收集管收集。但是有许多次级现象能损害连续自由流电泳的分离结果,诸如沉降效应、电渗流、焦耳热和自然对流。本文报道了仪器的研制和我们对模型蛋白分离条件进行了优化,并成功地将人和兔的红细胞分开。

1 材料与方 法

1.1 电泳仪

进行模型蛋白分离的电泳仪是由本实验室设计并制作的。电泳腔是由两块平行的有机玻璃板构成的矩形薄腔,腔体两侧各有一个电极室,通过纤维素膜或离子交换膜与分离腔隔开。在分离腔出口处,有一收集口将液流分成 30 股,按腔体宽度每隔 2mm 进行收集。在两个电极之间可加上电压产生一个与载体缓冲液方向垂直的电场。我们设计了不同尺寸分离腔的电泳仪,常用规格:长 300mm,宽 60mm,厚 0.8mm。

1.2 缓冲液与样品

分离模型蛋白质的缓冲液与电极液均为 10mmol/L 三乙醇胺,含 10% 甘油,用醋酸调节 pH 至 6.5,电导为 $500\mu\text{s}/\text{cm}$ 。模型蛋白为牛血清白蛋白(Sigma 公司),血红蛋白(上海东风试剂公司)和细胞色素 C(上海东风试剂公司)。

分离红细胞的缓冲液(mmol/L)为三乙醇胺 15、醋酸钾 4、葡萄糖 10、甘氨酸 240、蔗糖 30,用醋酸调 pH 至 7.2,电导为 $900\mu\text{s}/\text{cm}$ 。电极液(mmol/L)为三乙醇胺 150、醋酸钾 40、甘氨酸 240,用醋酸调至 pH7.2。

1.3 方 法

张丽华和蔡嘉坤参加部分工作。

本文于 1996 年 4 月 8 日收到。

模型蛋白实验结果通过检测各收集管的蛋白质吸收而获得,取波长 410nm 和 280nm 检测,收集组分同时还用 mini-IEF 作分析。红细胞分离实验结果用 420nm 波长检测。

2 结果和讨论

2.1 仪器的研制

仪器的形状、样品导入的部位和尺寸,对分离结果影响很大,图 1 是连续自由流电泳原理示意图。

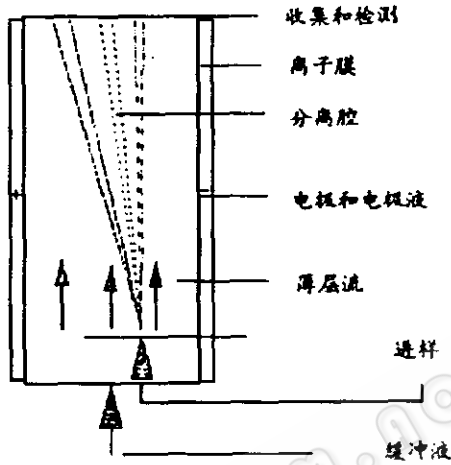


图 1 CFE 的原理示意图

2.2 模型蛋白的分离

牛血清白蛋白(BSA)的等电点为 4.7~4.9,血红蛋白(Hb)等电点为 6.9~7.1,对这两种模型蛋白质,分离腔的缓冲液 pH 为 6.5。

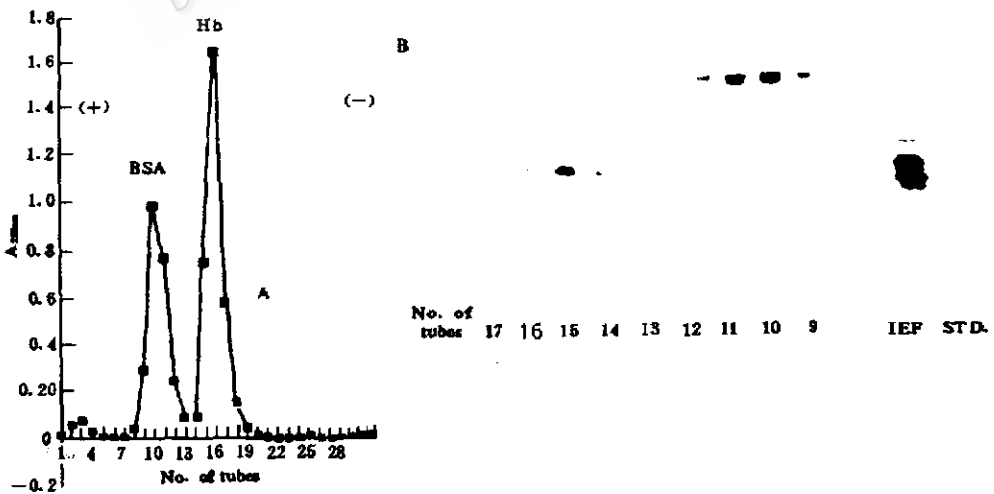


图 2 BSA 和 Hb 的 CFE 分离(A)和 mini-IEF 鉴定(B)

分离槽: 205mm × 60mm × 0.8mm, 分离缓冲液流速: 2.0ml · min⁻¹, 电极缓冲液流速: 3.5ml · min⁻¹, 样品流速: 1.0ml · min⁻¹, 电压: 300V, 电流: 32mA

2.3 红细胞的制备和分离

抽取新鲜的兔血 1ml, 加入 EDTA 饱和分离缓冲液中, 离心(2000r/min, 5min), 吸去上清, 用同一缓冲液重复洗涤 3 次, 直至上清澄清, 尽量吸取上清, 按红细胞体积加入分离缓冲液, 使其浓度为 5% (V/V), 人红细胞处理同上。上样前将兔、人红细胞等体积混合后进样。

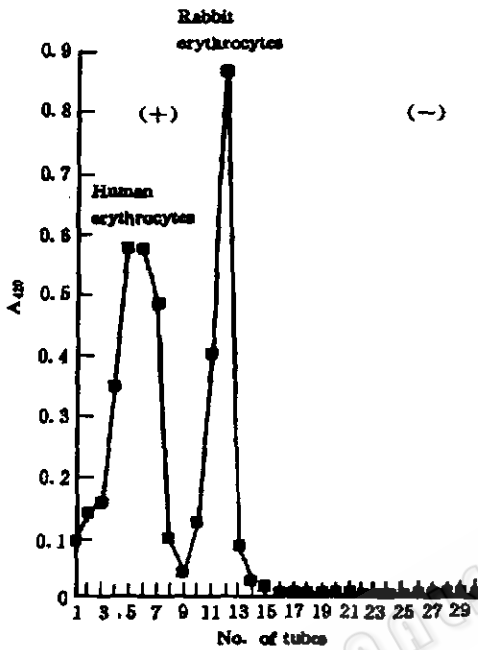


图3 人和兔红细胞的CFE分离

分离槽: 205mm×60mm×0.8mm, 分离缓冲液流速: 2.7ml·min⁻¹, 电极缓冲液流速: 3.5ml·min⁻¹, 样品流速: 1.38ml·min⁻¹, 电压: 400V, 电流: 63mA

2.4 讨论

我们设计了几种电泳装置, 其分离间隙从 0.8mm-2.5mm。薄腔能减少温度梯度及由此产生的密度不均一性的对流扩散, 但样品通量较小, 增加分离腔厚度会提高样品通量, 有利于制备级分离, 但降低了可允许的温度差异及单位面积的散热率。而在微重力情况下进行上述实验则可减少热对流效应。增加电压或降低缓冲液流速会增加混合物之间的分离度, 也增加了样品在腔内的保留时间。但电压提高后, 会产生更多的焦耳热, 增加电渗流的影响。改变温度将影响缓冲液的 pH 和粘度, 两者又将影响样品在腔内的保留时间。泳动率和电渗流速率都与粘度成反比, 在室温下每变化 1℃, 两者要改变 2~3%。连续自由流电泳正在逐步发展, 它不仅可用于可溶性蛋白质和多肽的分离, 更广泛应用于各种生物粒子、单抗、膜蛋白、细胞器和细胞的分离上, 制备级(g 级)的液相电泳将在生物工程产品的产业化中显示它的巨大潜力。

参 考 文 献

- [1] Hannig K. *Electrophoresis*, 1982, 3: 235.
- [2] Roman M C, Brown P R. *Anal Chem*, 1994, 66: 86A.
- [3] Bauer J. *Cell Electrophoresis*, CRC Press Inc. 1994.

Separation of Proteins and Cells by Preparative Continuous Free-flow Electrophoresis

Shao Xiaoxia Song Jinfang Wan Qian Fang Wenyao Xia Qichang

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

Abstract Continuous free-flow electrophoresis (CFE) is a preparative liquid electrophoresis without support medium. It is easy-operation and have good biological compatibility, so as to separate and purify various proteins or cells. We report the instrumental design and making and the separation model proteins and cells. The method has potential value in the production of recombinant proteins.

Key words Continuous free-flow electrophoresis, separation of proteins, separation of cells