

连续自由流电泳微重力下 分离模式蛋白质的研究^{*}

丁士健 刘 韜 宋金芳 吴高德 邵晓霞 夏其昌

(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

吴汉基 蒋远大 张志远 刘文喜 冯学章 马玉立

(中国科学院空间科学与应用研究中心)

李 钦

(中国科学院微生物研究所)

摘 要

以连续自由流电泳的区带电泳模式分离血红蛋白和细胞色素 C, 比较了不同缓冲液甘油浓度下的分离效果, 确定了最终装载在神舟 4 号飞船上 A3-2 型电泳仪的电泳分离条件, 通过地面和空间实验, 初步探讨了微重力对连续自由流电泳分离的影响, 并对电泳的分离产物做了多种检测.

关键词 连续自由流电泳; 微重力; 血红蛋白; 细胞色素 C; 甘油; 产物检测

1 引言

连续自由流电泳是 20 世纪 70 年代由 Hannig 首先提出的一种制备型电泳技术, 具有全液相无介质支撑、条件温和、能连续进样等优点, 已经用于蛋白质、核酸、细胞器和细胞等多种生物材料的分离^{[1],[2]}. 特别是在新兴的蛋白质组学研究中, 连续自由流电泳能弥补目前蛋白质组主流分离技术——双向凝胶电泳的一些不足之处, 在分离难溶的膜蛋白和复杂蛋白质混合物以及低丰度蛋白质等方面发挥其独特的优点^{[3],[4]}.

连续自由流电泳是一种高效的制备型电泳, 地面实验时受重力加速度影响其分辨率和产率有所限制. 在微重力下, 沉降和热对流效应几乎完全消除, 可以在增加样品流通量的同时减小电动力学和流体力学变形, 其分离效果比 1g 下有显著改善. 美、德、法、前苏联和日本先后有 8 种型号的电泳仪进行了空间试验和 30 余次的生物样品分离实验. 美国的 CFES (Continuous-Flow Electrophoresis System) 系统重达 2000 kg, 分离腔尺寸为 $1200 \times 160 \times 3$ (mm), 分 197 管收集, 在这种装置上已经成功进行了垂体细胞和生长激素分泌颗粒以及其他多种细胞和蛋白质的分离^{[5],[6]}. 法国的 RAMSES (Recherche Appliquee sur les Methodes de Separation en Electrophorese Spatiale) 装置分离腔尺寸为 $300 \times 41 \times 3$ (mm), 可以在线监测 40 管的 278 nm 紫外吸收, 在第二国际微重力实验室 (IML-2) 成功进行了不

^{*} 国家载人航天工程项目资助

2003-07-19 收到原稿, 2004-03-05 收到修定稿

同模式下几种标准蛋白质的分离研究和纯化生物工程产品 γ 干扰素的工作^{[7]、[8]}。日本的 FFEU (Free Flow Electrophoresis Unit) 分离腔尺寸为 $100 \times 60 \times 4$ (mm), 分 60 管收集, 在线紫外检测波长为 254 nm, 同时可以由计算机输出三维的检测结果, 在 FFEU 上进行的是线虫 DNA 的分离^[9]。德国的 CFPE (Continuous Free Flow Electrophoresis) 装置重 113 kg, 直径 438 mm, 高 1270 mm, 为减少电渗流的影响, 整个分离腔用 3% 的人血清白蛋白处理, 在探空火箭上进行了 3 种红细胞的分离, 分辨率有显著提高^[10]。本次实验所用的 A3-2 型电泳仪是我国自行设计和制造的, 重 20 kg, 分离腔尺寸为 $270 \times 60 \times 3$ (mm), 分 30 管收集, 具有体积小、重量轻、功耗低等特点。电泳分离过程中有在线的红蓝发光二极管检测, 特色的单向阀设计消除了气泡对分离的影响, 电泳仪分离为全自动控制, 并且有自主开发的软件全程记录电泳仪分离参数。

连续自由流电泳的分辨率主要由分离样品的最高峰间距和条带的扩散程度来决定^[11]。我们应用自主研制的连续自由流电泳仪在神舟 4 号飞船上进行了微重力条件下分离蛋白质的实验, 结果表明: 微重力下连续自由流电泳的分辨率有显著提高, 两种标准蛋白质血红蛋白和细胞色素 C 的最高峰间距比地面增加 3 个检测点间距, 血红蛋白的扩散明显减少。本项研究的内容还包括以下几个方面。(1) 不同电泳缓冲液甘油浓度对地面电泳分离的影响, 确定空间电泳的分离条件。(2) 分离产物的地面检测。为确定空间电泳的分离条件, 将电泳缓冲液甘油浓度从 10% 逐渐调整到 0%, 最终确定没有甘油也可以进行分离, 从而消除了缓冲液中加甘油对设备清洗保存等带来的一系列不利影响; 用分光光度计和凝胶电泳对分离产物的进行了定量和纯度检测, 用质谱对分离产物进行了精确分子量测定, 证明两种蛋白质已被有效分开。本项目的研究为未来的生物材料加工和空间制药奠定了一定的技术基础。

2 材料和方法

2.1 设备

电泳分离实验用的设备是自主研制的 A3-2 型连续自由流电泳仪, 它是 A3 型电泳仪^[12]的飞行样机。该装置包括电泳仪装置和电泳仪电控箱两台设备, 总重 25 kg, 总功耗 < 27 W。电控箱接受来自飞船的母线电压 (27 V) 和控制信号, 并把该电压变换成电泳仪其他组成部分所需的电压; 它还控制和监测电泳分离及设备运行情况并把结果通过遥测送到地面测控中心。电泳仪装置是生物样品进行电泳分离的场所, 它由缓冲液和样品储箱、4 通道流体驱动泵、分离室、LED (发光二极管) 在线光检 (430 ± 20 nm)、单向阀收集器和气液分离器等主要部分组成。分离室呈长方形, 高 270 mm, 宽 60 mm, 分离间隙为 3 mm; 分离电压为 360 V, 分离功率约为 10 W。在分离室的上方设有 LED 光检 (由 15 个蓝光发光二极管和 15 个光敏二极管组成) 窗口, 缓冲液及被分离的样品向上流动, 被光检后, 经 30 根收集管及其单向阀流到收集器中各自的收集袋内以便回收检测。这种采用在线光电检测及回收分离产物互为备份的方法, 确保能获得空间电泳分离实验的结果。

2.2 材料

血红蛋白和细胞色素 C 为 Sigma 公司产品; 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 三 (羟甲基) 氨基乙烷 (Tris), 甘氨酸, 十二烷基磺酸钠 (SDS), 过硫酸铵, TEMED 为 Bio-Rad 公

公司产品, 芥子酸 (SA) 和分子量标准蛋白为 Bruker 公司产品, 乙腈 (ACN) 和甲酸 (FA) 为 Fisher 公司产品, 三氟乙酸 (TFA) 为 Merck 公司产品, 其余试剂为国产分析纯. 所有缓冲液均用 Milli-Q 水配制.

2.3 方法

2.3.1 连续自由流电泳

连续自由流电泳采用区带电泳分离模式, 根据组份的电荷/质量比得到分离. 电泳缓冲液为 4 mmol/L 三乙醇胺 (TEA), 0.8 mmol/L 醋酸钠 (NaAc), 血红蛋白和细胞色素 C 以 0.5 mg/mL 的浓度溶于电泳缓冲液中. 分离电压 360 V.

2.3.2 分离产物的鉴定

1. 分光光度计检测

电泳仪收集的 30 管分离产物, 用量筒称量体积, 取 1 mL 读取分光光度计 410 nm 的光密度吸收值.

2. 凝胶电泳法纯度鉴定

(1) SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)

电泳仪收集的分离产物取 1 mL, 冷冻离心至约 200 μ L 体积, 每管取 70 μ L 上样. 使用 Hoefer SE 垂直凝胶电泳系统 (Amersham Pharmacia, Sweden), 5%T 浓缩胶, 13%T 分离胶. 电流设置为浓缩胶 10 mA/胶, 分离胶 30 mA/胶. 凝胶用 Coomassie R 350 染色.

(2) Mini-IEF (微型等电聚焦电泳)

电泳仪收集的分离产物取 1 mL, 冻干, 以 10 μ L 水溶解. 每管取 2 μ L 上样. 使用 Mini-IEF 等电聚焦仪 (Bio-Rad), 100 V 和 200 V 各聚焦 15 min, 450 V 聚焦 60 min. 凝胶用 Coomassie R350 染色.

3. 质谱测定分子量

(1) 液相色谱-离子阱-质谱 (LC-IT-MS)

配有标准电喷雾源的 Finnigan MAT LCQ 离子阱质谱仪 (ThermoQuest) 与高压液相色谱仪 HP1100 (Hewlett Packard) 在线联用分析蛋白质斑点的酶解产物. 液相分离用 microbore 反相柱, C8 30 $\times$ 2.1 mm I.D., 5 μ m (ABI, RP-300); A 液, 0.1%FA; B 液, 0.1%FA/ACN; 流速, 200 μ L/min; 洗脱梯度, 0—2 min, 0%B 液; 2—15 min, 0—100%B 液. IT-MS 以 AGC (Automatic Gain Control) 模式进行, 实验条件用 Ultramark 优化.

(2) 基质辅助激光解析离子化-飞行时间-质谱 (MALDI-TOF-MS)

1 mL 分离产物冻干后溶于 80 μ L 0.1% 甲酸中, 取 1 μ L 和 SA 基质 1:1 混合, 取 1 μ L 点到样品靶上. 室温自然干燥, 送入 MALDI-TOF 质谱仪 (Bruker REFLEX III) 分析, 以低分子量标准蛋白质为内标校正. 质谱仪设置为 IS/2 电压 20 kV, IS/2 电压 8.593 kV, Linear 飞行方式, cutoff mass value: 8000, 每个样品取约 200 次激光轰击结果累加.

3 结果和讨论

3.1 不同缓冲液甘油浓度对地面电泳分离的影响

在早期的连续自由流电泳分离蛋白质的研究^[13]中, 我们对不同分离模式、不同分离介质等的电泳条件进行了系统研究. 最终确定采用 TEA-NaAc 分离体系和区带电泳模

式来进行模式蛋白质的分离,为了保证样品和电泳缓冲液的比重一致,降低样品的沉降作用,在分离缓冲液中加入了 10% 的甘油,以获得稳定的分离结果.但甘油容易黏附在分离腔壁和管路中,对设备的清洗和保存不利.因此在发射前一系列地面实验中,逐步降低了甘油浓度以观察其对电泳分离结果的影响,结果如图 1 所示.

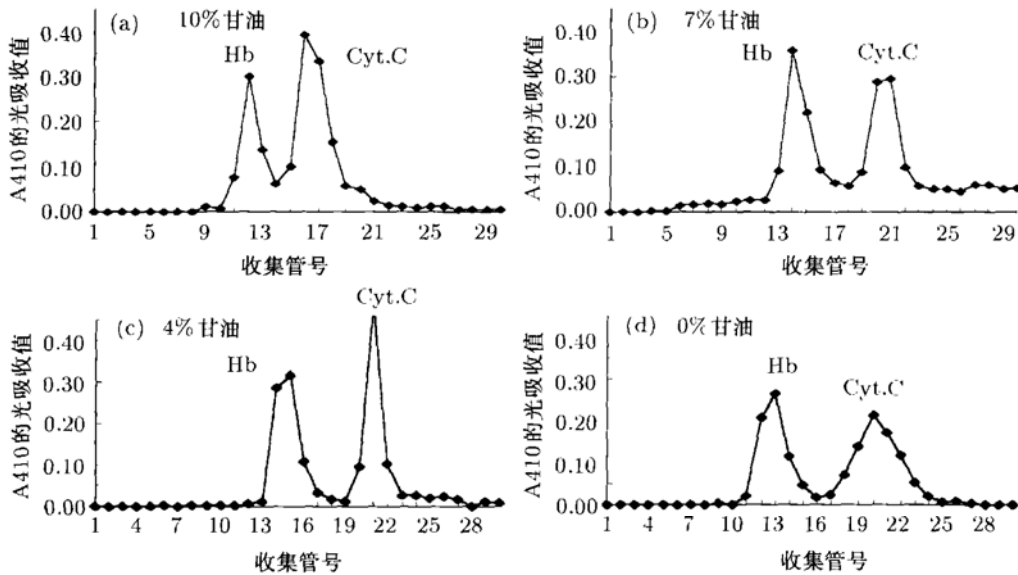


图 1 电泳缓冲液中不同甘油浓度下的分离结果

Fig.1 Separation result of the different glycerol concentration in the electrophoresis buffer.
(a) 10% glycerol, (b) 7% glycerol, (c) 4% glycerol, (d) 0% glycerol. x axis is the fraction number of A3-2 device. y axis is the optical absorbed of the photometer

不同甘油浓度下的分离结果表明,甘油对分离效果不产生决定性影响,在仪器得到改进和完善的情况下,可以不加甘油.因此在确定最终的空间分离实验条件中,我们去掉了甘油.

3.2 地面和空间飞行实验检测结果

3.2.1 在线光检结果

电泳仪微重力条件下和发射前在地面 1g 条件下的 430 nm 在线光检如图 2 所示,血红蛋白的光检比地面升高了近 2 个检测点间距,显示分离过程中条带浓缩,扩散有明显减少.但细胞色素 C 无明显改善.在微重力条件下,血红蛋白和细胞色素 C 的最高峰间距增加了 1 个检测点间距.通过在北京地面控制中心显示出的实时在线光检曲线,我们也观察到微重力条件下两个蛋白质的条带分离状态在前 30 min 内并不稳定,这部分影响了微重力效应的体现.原因可能是因为电泳仪加电初期飞船处于椭圆形轨道,流体不稳定和微重力变化造成的.

图 2 连续自由流电泳仪在线分离检测模式蛋白质.横坐标为在线的发光二极管在分离室内部的检测点数,纵坐标为约 430 nm 的光吸收值.

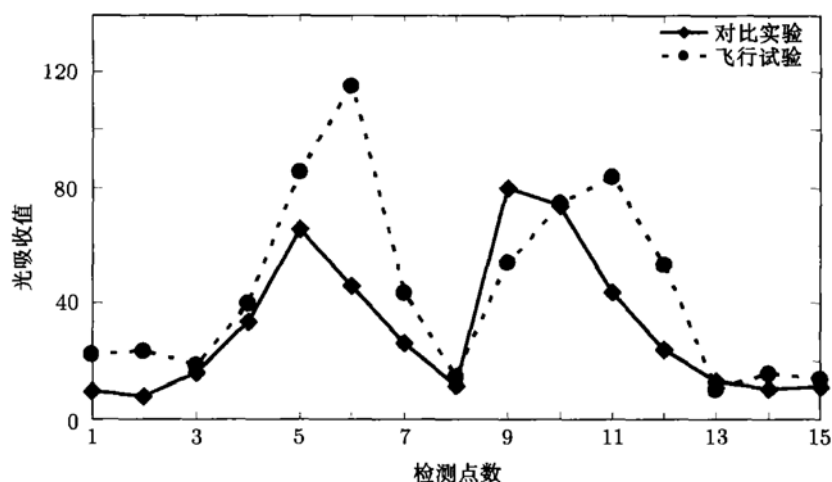


图 2 在线的发光二极管检测分离室内 Hb 和 Cyt.C 的光吸收

Fig.2 Electrophoretic separation of Hb and Cyt.C, optical profile provided in real time by on-line LED

3.2.2 分离产物光检结果

电泳仪地面试验和回收后的分离产物的 410 nm 光检如图 3 所示 (在线光检和分离产物的光检波长略有不同, 是由光源器件的固有特点决定的, 不影响检测结果). 地面试验, 血红蛋白和细胞色素 C 的最高峰间距为 7 (以收集管数计算), 而在微重力条件下, 为 10, 增加了 3. 血红蛋白的扩散明显减少, 细胞色素 C 无明显变化. 分离产物的检测结果和在线检测的结果基本一致. 两种蛋白质的分离效果差异原因可能与微重力条件, 仪器本身的

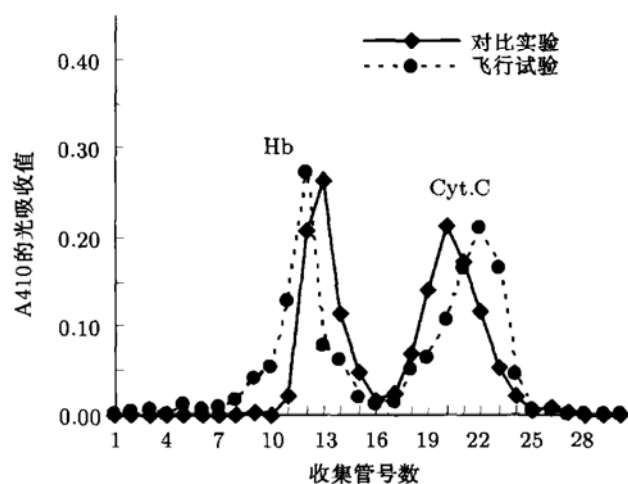


图 3 分光光度计检测电泳分离后的 Hb 和 Cyt.C 光吸收

Fig.3 Electrophoretic separation of Hb and Cyt.C, optical profile provided in each fraction by photometer

重复性有关等多种因素有关. 由于连续自由流电泳是在全液相无支撑介质条件下进行分离, 重复性难以精确控制. 收集均一性检测 (以收集管的产物体积来衡量, 未发表的数据) 也发现, 电泳仪在微重力条件下的收集均一性和地面对照实验的有所不同.

3.3 分离产物鉴定结果

3.3.1 SDS-PAGE

我们用 SDS-PAGE 和 Mini-IEF 对 1g 和微重力条件下所得到的分离图谱中最高峰及其临近峰的蛋白质做了纯度鉴定, 证明两种蛋白质已被有效分开, 不同收集管的蛋白质含量和分光光度计比色的结果一致, 如图 4 所示。

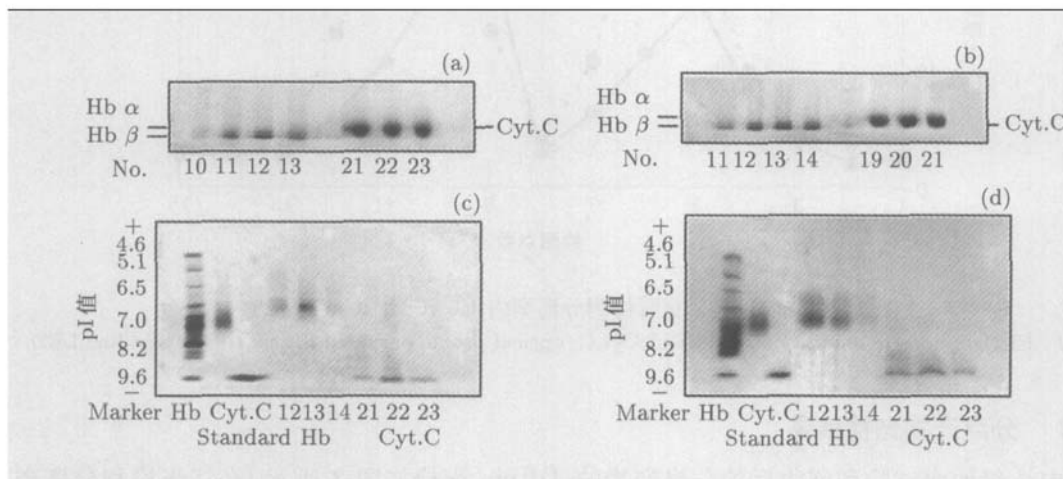


图 4 SDS-PAGE 和 Mini-IEF 分析收集管内的分离样品。(a), (c) 为地面上, (b), (d) 为微重力下
Fig.4 SDS-PAGE (a, b) and Mini-IEF (c, d) analysis of the separation results in the part of fractions.
(a), (c): on the ground; (b), (d): under the microgravity

3.3.2 质谱

运用 LC-IT-MS 和 MALDI-TOF-MS 对地面和回收产物中的最高峰进行了精确分子量测定。LC-IT-MS 实际测得的细胞色素 C 分子量 (12 361) 和理论分子量一致, MALDI-TOF-MS 实际测得的分子量为误差和牛血红蛋白理论分子量 (15 054, 15 953) 在 0.1% 以内, 说明两峰和预测的结果一致, 为血红蛋白和细胞色素 C。在质谱分析过程中我们也发现, 地面分离产物第 13 管和回收产物第 12 管用 LC-IT-MS 分析时只检测到 15 054 一个峰, 与血红蛋白 α 亚基分子量一致, 但 β 亚基并未出现。为此我们对分离前的血红蛋白样品做了胰蛋白酶酶解, LC-IT-MS 检测到 β 亚基的 3 段肽和 α 亚基 2 段肽 (数据没有显示), 提示样品中存在 β 亚基。因此我们又对分离产物做了 MALDI-TOFMS 检测, 成功检测到 β 亚基。LC-IT-MS 未检测到的原因与血红蛋白的两个亚基含量并不相同, α 亚基较多, 因此离子化时抑制了 β 亚基有关。

4 结语

以连续自由流电泳的区带电泳模式分离血红蛋白和细胞色素 C, 比较了缓冲液不同甘油浓度下的分离效果, 确定了最终在神舟 4 号飞船上 A3-2 型电泳仪的电泳分离条件。通过地面和空间实验, 确认微重力可以改善连续自由流电泳对蛋白质分离的分辨率。电泳分离产物飞行后的多种检测, 证实两种标准蛋白质已被有效分开。本项目的研究使我们掌握了连续自由流电泳技术, 为我国未来的生物材料加工和空间制药奠定了一定的技术基础。

参 考 文 献

- [1] Hannig K, Stahn R. A new method for the separation of rat liver lysosomes, separation of cell organelles of rat liver by carrier free continuous electrophoresis. *J. Cell Biol.*, 1970, **46**(3):576—591
- [2] Kobayashi H, Ishii N, Nagaoka S. Bioprocessing in microgravity: free flow electrophoresis of *C. elegans* DNA. *J. Biotechn.*, 1996, **47**(2-3):367—76
- [3] Nath S, Schutte H, Weber G, Hustedt H, Decwer W D. Separation of enzymes from *Candida biodinii* crude extract by continuous flow zone electrophoresis. *Electrophoresis.*, 1990, **11**:451—456
- [4] Hoffmann P, Hong J, Moritz R L, Connolly L M *et al.* Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM1215: a non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy. *Proteomics.*, 2001, **1**:807—18
- [5] Srinivasl P R, Verma M, Zhao Y M, Srivastava S. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clin. Chem.*, 2002, **48**:1160—1169
- [6] Hymer W C, Barlow U H, Blasidell S J, Cleveland C *et al.* Continuous flow electrophoretic separation of proteins and cells from mammalian tissues. *Cell Biophys.*, 1987, **10**:61—85
- [7] Hymer W C, Salada L, Krishnan K, Seaman G V F *et al.* Bioprocessing in microgravity: applications of continuous flow electrophoresis to rat anterior pituitary particles. *J. Biotechn.*, 1996, **47**:353—365
- [8] Clifton M J, Balmann H R, Sanchez V. Protein separation by continuous-flow electrophoresis in microgravity. *AIChE J.*, 1996, **42**:2069—2079
- [9] Clifton M J *et al.* Purification of biological molecules by continuous flow electrophoresis in the second international microgravity laboratory. *J. Biotechn.*, 1996, **47**:341—352
- [10] Kobayashi H, Ishii N, Nagaoka S. Bioprocessing in microgravity: free flow electrophoresis of *C. elegans* DNA. *J. Biotechn.*, 1996, **47**:367—376
- [11] Hannig K, Kowalski M, Klock G, Zimmermann U, Mang V. Free-flow electrophoresis under microgravity: evidence for enhanced resolution of cell separation. *Electrophoresis.*, 1990, **11**:600—604
- [12] Simpson C F, Whittaker M. Free-flow Electrophoresis. In: Thomson A R ed. *Electrophoresis Techniques*. London: Academic Press, 1983. 253—274
- [13] Wu H J *et al.* The hardware system used for the research of electrophoresis in space. *Chin. J. Space Sci.*, 1999, **19**(Supp):43—50. in Chinese (吴汉基等. 空间电泳研究的硬件系统. 空间科学学报, 1999, **19**(增刊):43—50)
- [14] Song J F *et al.* A study of the separation of protein with free-flow electrophoresis. *Chin. J. Space Sci.*, 1999, **19**(Supp):162—169. in Chinese (宋金芳等. 连续自由流电泳分离蛋白质的研究. 空间科学学报, 1999, **19**(增刊):162—169)

FREE FLOW ELECTROPHORESIS SEPARATING MODEL PROTEINS UNDER THE MICROGRAVITY

DING Shijian LIU Tao SONG Jinfang WU Gaode
SHAO Xiaoxia XIA Qichang

*(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)*

WU Hanji JIANG Yuanda ZHANG Zhiyuan LIU Wenxi
FENG Xuezhang MA Yuli

(Center for Space Science and Applied Research, The Chinese Academy of Sciences)

LI Qin

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences)

Abstract

Separation of two colored model proteins, cytochrome C and hemoglobin, were conducted in the specially self-designed free flow electrophoresis device A3-2 using zone electrophoresis mode under 1 g- and μ g- conditions. The results demonstrated that the higher resolution of free flow electrophoresis acquired under the microgravity is obtained. Both onboard LBD detection and measurement of the separation by the spectrometer demonstrated that the distance between the zone maxima of the two proteins were increased and the dispersion of hemoglobin decreased. The experiments also included: (1) The effect of the glycerol concentration on the separation results; (2) Post-flight analysis of the contents of the fractions. The separation results of 10%, 7%, 4%, 2% and 0% glycerol concentration in the electrophoresis buffer are compared and no significant effect of the glycerol on the separation results are found. So the glycerol and its disadvantages for the clean and storage of the device were excluded finally. Gel electrophoresis and mass spectrometry analysis of the contents of the fractions confirmed that two proteins have been effectively separated.

Key words Free flow electrophoresis, Microgravity, Hemoglobin, Cytochrome C, Glycerol, Post-Flight Analysis