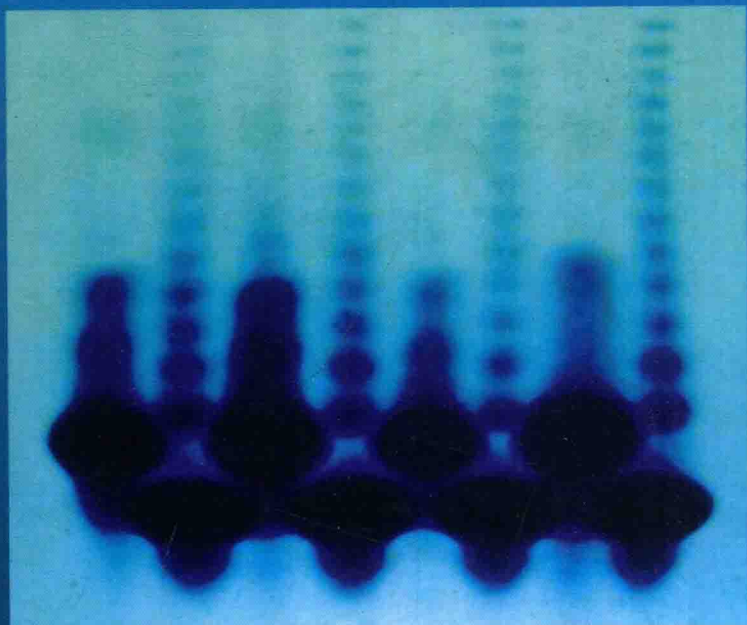


无氧条件下 红细胞内血红蛋白的电泳释放 ——发现和研究

Electrophoresis Release of Hb from RBC
under Anaerobic Conditions
——Discovery and Research

秦文斌 著
Author Qin Wenbin



科学出版社

无氧条件下红细胞内血红蛋白的 电泳释放

——发现和研究

**Electrophoresis Release of Hb from RBC
under Anaerobic Conditions
——Discovery and Research**

秦文斌 著

Author Qin Wenbin



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书内容是秦文斌教授在红细胞释放血红蛋白方面的新发现——无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放。

无氧条件下较有氧条件下的许多情况都发生了明显变化：①有氧条件下的初释放，有血红蛋白 A_2 现象，无氧条件下此现象消失，即红细胞内 HBA_2 与 HBA_1 不发生相互作用。②有氧条件下 HBA_2 与 HBA_1 有“交叉互作”，无氧条件下此相互作用消失。③有氧条件下的再释放，有再释放现象，无氧条件下此现象变化较大，轻度无氧时有的减弱、有的增强，深度无氧时再释放现象完全消失。人体血液循环中，红细胞到了肺部，接受大量氧气，处于有氧状态；到了末梢组织，大量放氧，处于无氧状态，作者发现这两种状态下红细胞内血红蛋白的释放情况明显不同。

本书可作为生物专业及医学相关专业研究人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放：发现和研究 / 秦文斌著.
—北京：科学出版社，2017.11

ISBN 978-7-03-054855-9

I. ①无… II. ①秦… III. ①血红蛋白—电泳—释放—研究 IV. ①Q513

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 248332 号

责任编辑：周 园 / 责任校对：郭瑞芝
责任印制：张欣秀 / 封面设计：陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 11 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2018 年 1 月第二次印刷 印张：15

字数：365 000

定价：120.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

作者简介



秦文斌，男，1928年生，沈阳人，1953年中国医科大学研究生班毕业，留校任助教，1956年支援边疆来到内蒙古，扎根边疆直至今日。现虽已离休，仍坚持做实验研究、继续写书。

作者的科研生涯可分成三个阶段：

第一阶段是研究血红蛋白，由1964年开始。第一本专著《血红蛋白病》由人民卫生出版社出版(1984年)。

第二阶段是研究红细胞电泳释放血红蛋白，这是本土性、原创性发现，由1981年开始。学术成果《红细胞内血红蛋白的电泳释放——发现和研究》，由科学出版社出版(2015年)。

第三阶段是研究疾病的基因诊断。学术成果《基因诊断多重PCR和通用引物PCR》，还是科学出版社出版(2016年)。

现在这本书，是第二阶段的延续，发现无氧条件对红细胞释放血红蛋白影响很大，仍然属于本土性、原创性发现，定名为《无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放——发现和研究》，继续由科学出版社出版(2017年)。

我们曾发现地中海贫血时血红蛋白释放试验(HRT)异常，准备用这种方法再来研究另一种人类血红蛋白病——血红蛋白S病(镰状细胞贫血)，但此病多见于美国黑人，在国内未拿到这种标本。此时想到梅花鹿的红细胞也是镰状，故决定取其红细胞进行HRT，观察梅花鹿血镰状红细胞的血红蛋白释放情况。经过一系列实验，发现电泳缓冲液中加入偏重亚硫酸钠，能使电泳环境变成无氧，对红细胞释放血红蛋白影响很大。

以往的实验都是在空气中进行，也就是有氧的环境里进行。有氧条件下进行释放电泳时，我们能看到血红蛋白A₂现象，此时红细胞内HBA₂与HBA₁之间存在相互作用。也就是说，有氧条件下红细胞内这两种血红蛋白是结合存在的。无氧条件下，释放情况发生重大变化，血红蛋白A₂现象消失了，红细胞内HBA₂与HBA₁之间没有相互作用，它们不再互相结合，变成孤立存在。在A₂现象启发下，我们曾发现红细胞外HBA₂与HBA₁之间的交叉互作，即HBA₁穿过HBA₂时后者区带变形。无氧条件下A₂现象消失，交叉互作是否也消失？实验结果证实了这一点。无氧条件下，HBA₁穿过HBA₂时后者区带没有变形，即没有发生相互作用。现在看来，无氧与有氧时血红蛋白结构不同，有氧时血红蛋白为HB-(O₂)₄，无氧时为HB，它们之间的平衡是：
$$\text{HB} + 4\text{O}_2 \longleftrightarrow \text{HB}-(\text{O}_2)_4$$
。平衡式右侧是有氧条件下的血红蛋白，相当于人体的肺侧红细胞内血红蛋白的存在状态；平衡式左侧是无氧条件下的血红蛋白，相当于人体的组织侧红细胞内血红蛋白的存在状态。这样，我们用红细胞释放血红蛋白的方法，展示出来体内的运氧情形。这就是有氧与无氧条件下红细胞内发生的有趣变化。

主要参与者

第一篇参与者:	高丽君	宝勿仁	周立社	高雅琼	秦良谊	徐春忠	韩丽红	苏 燕
	邵 国	王占黎	于 慧	裴娟慧				
第二篇参与者:	苏 燕	高丽君	王彩丽	刘丽萍	魏 枫	张晓燕	闫少春	贺其图
	马宏杰	张宏旺	贾国荣	韩丽莎	郭 俊	孙小荣	高雅琼	杨鹏飞
	任建民	宝勿仁	韩丽红	闫 斌	周立社	张永红	乔 姝	秦佩媛
	高永生	邵 国	王占黎	于 慧				
第三篇参与者:	乔 姝	沈木生	高丽君	韩丽红	苏 燕	周立社	秦良谊	马宏杰
	贾国荣	贺其图	卢 艳	李 喆	李 静	张宏伟	闫 斌	郭春林
第四篇参与者:	苏 燕	高丽君	马 强	周立社	秦良谊	韩丽红	沈 靖	田慧芳
	田志华	马宏杰	贾国荣	贺其图	卢 艳	李 喆	李 静	张宏伟
	闫 斌	郭春林						
前期研究参与者:	睢天林	岳秀兰	闫秀兰	梁友珍	陈启明	秦良伟	崔丽霞	
	秦良光	王海龙	崔珊珊	刘素梅	刘 健	侯安国	赵明清	
	高 敏	张志杰	秦艳晶	尹卫东	刘 睿	曹国栋	武莎莎	
	李金萍	陈德喜	李豪侠	王小明	孟 俊	邢 娟	杨 东	
	折志刚	邢晓雁	谢基明	刘 芬	王大光	丁海涛	王玉珍	
	于 玲	王步云	孙 桥	周俊红	李 琴	杨艳红	杨文杰	
	白利平	张巨峰	于 慧	王建勋	郝艳梅	焦勇钢	赵喜君	
	黄 颖	居红格	张永强	王 程	沈木生	苏丽娅	张 坤	
	张 园	龙桂芳	沈 靖	丁慧荣	田慧芳	田志华	陈晓东	
	潘桂兰	吴 刚	杨 静	姜树媛	冯慧琼	孙 刚	孙丽蓉	
	邢少姬	辛佳音	贾彦彬	周成江	常 江	宋 芳	张咏梅	
	乌 兰	王翠峰	乔 姝	石瑞丽	王颖慧	石继海	霍秀丽	
	洪高明	贾 璐	闫春华	贾尼娅	焦健霞	宋玉娥	王媚媚	
	金树琦	郭晓玲	吴 涤	李俊峰	李丕宇	葛 华	刘文学	
	孟祥军	张茂林	南 蕾	孙洪英	张利荣	宋瑞琪	和姬苓	
	和彦苓	额尔登	田园青	乌 兰	吴玉娥	杨国安	杨 森	
	刘 佳	袁晓俊	朱王亮	郑玉云	林爱卿	张永红	张 敏	
	康耀霞	王宇晗	卓 纳	白秀梅	赵淑梅	贾存德	王迎新	
	斯 琴	焦玲君	焦健霞	赵 敏	王 琪	马登峰	霍建新	
	高 阳	党 彤	陈言东	王秋凤	申 玲	石继海	常建萍	
	李月春	贾瑞平	王 英	袁桂梅	李 莉	李 薇	白桂兰	
	郝亚胜	贾春梅	张爱萍	张秀兰	何海英	于昌连	曹俊峰	
	尚忠义	刘 斌	那日苏	李嘉欣	张学明	孔凡青	张晶晶	
	李 斌	李晓晶	丁海麦	席海燕	魏春华	闫巧梅		

序 言

秦文斌教授是我的同行，共同研究过血红蛋白，并寄送过血红蛋白病患者血液标本以配合秦教授的血蛋白释放研究。我曾博导，评审博士生毕业论文时，多次请秦教授为评委，帮助完成博士生的论文答辩。

20 世纪 60 年代，中国研究血红蛋白的人很多，比较有影响的带头人是：中国医学科学院的梁植权教授(院士)(已过世)，上海儿童医院的曾溢滔教授，包头医学院血红蛋白研究室的秦文斌教授，广西医科大学儿科梁徐教授(已过世)和我本人。那时候全国有一个血红蛋白科研协作组，组长是梁徐教授，副组长是秦文斌教授和曾溢滔教授。这几位都出过书，秦教授于 1984 年出版《血红蛋白病》(人民卫生出版社)，曾溢滔教授(院士)于 2003 年出版《人类血红蛋白》(科学出版社)，同年，我和医科院基础所的张俊武教授共同出书《血红蛋白与血红蛋白病》(广西科学技术出版社)。2015 年，秦文斌教授又出版《红细胞内血红蛋白的电泳释放——发现和研究》(科学出版社)，曾溢滔院士作序。

前边那几本书里研究的“血红蛋白”，都是使红细胞溶血，游离出来血红蛋白，研究它的结构以及与疾病的关系。秦文斌教授 2015 年这本书，是用电泳的方法使血红蛋白离开红细胞，看看电泳释放出来的血红蛋白与来自溶血液的血红蛋白有无差异。实验结果显示，红细胞释放出来的血红蛋白与来自溶血液者不尽相同，其中包括“初释放现象”(也称“血红蛋白 A_2 现象”)和“再释放现象”。 A_2 现象的核心内容是，红细胞内 HBA_2 与 HBA_1 结合存在，而溶血液里二者是彼此分开的。“再释放现象”显示，红细胞内有一部分血红蛋白与细胞膜结合牢固，第二次通电才能释放出来，与多种疾病相关。

以上说的是秦文斌教授 2015 年出版的书。在本书《无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放——发现和研究》中，秦教授想研究镰状细胞贫血患者红细胞的电泳释放，此病多见于美国黑人，在国内未能找到标本。此时，他想到梅花鹿的红细胞也是镰状，决定用它研究。实验过程中，普通电泳看不出梅花鹿红细胞的特点，后来，在凝胶里加入偏重亚硫酸钠，发现多带释放明显增强。将这套办法应用于人体红细胞，又发现一系列新情况。偏重亚硫酸钠还原能力很强，此时血红蛋白处于还原状态和无氧状态，所以称之为“无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放”。无氧条件下，人体红细胞的血红蛋白 A_2 现象消失，红细胞内的血红蛋白的相互作用消失，红细胞外的血红蛋白之间的交叉互作也消失，当 HBA_1 穿过 HBA_2 时，后者不出现应有的区带变形。电泳过程中，无氧条件时血红蛋白区带拐弯，而有氧条件时不拐弯，说明无氧血红蛋白(HB)与有氧血红蛋白(HB- $4O_2$)的电泳行为明显不同。这样，就可以推测出，肺侧(有氧)和组织侧(无氧)红细胞内血红蛋白的存在状态。

科研无止境，永远在路上。秦文斌教授今年已经八十九岁，还在进行实验研究，还在专心写作，我钦佩他的治学精神，预祝他身体健康，安度晚年。

赵粹芳

2017 年 4 月于广西

前言

我今年已经八十九岁。五十多年前(1964年)发现“几种哺乳动物血红蛋白的种间杂交”。研究成果先发表于《生物化学与生物物理学报》，后来收到《中国科学》的邀稿，用英文对国外发表。为此我出席了1978年在北京举行的第一届全国科学大会，获先进个人奖，相当于全国劳模的待遇。

1981年，我们开始将完整的红细胞加入凝胶进行电泳(国内外尚无人这样操作)，实验结果出现一系列新的发现：血红蛋白的“初释放”、“再释放”和“交叉互作”，学术成果集中后出版《红细胞内血红蛋白的电泳释放——发现和研究》(科学出版社，2015年)。

以上是我们研究室三十多年所进行的中国本土性、原创性研究成果的阶段总结。这里所说的原创性研究，是指我们将完整的红细胞直接加入淀粉琼脂糖凝胶进行电泳，这是前所未有的。这里所说的本土性研究，是指我们的全部研究成果都是在中国内地(包头)完成的。

上书出版后，我们又发现了无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放，这仍然属于本土性、原创性发现，国内外没有同类成果。这本书是前一本书的延伸和扩展，以下介绍其主要内容*。

我们曾发现地中海贫血时血红蛋白释放试验(HRT)异常，准备用这种方法再来研究另一种人类血红蛋白病——血红蛋白S病(镰状细胞贫血)，但此病多见于美国黑人，在国内未拿到这种标本。此时想到梅花鹿的红细胞也是镰状，决定取它的红细胞进行HRT，观察梅花鹿血镰状红细胞的血红蛋白释放情况。经过一系列实验，我们发现，使用常规电泳缓冲液看不到梅花鹿红细胞的特殊性，在电泳缓冲液中加入偏重亚硫酸钠后，电泳环境变成还原、无氧，则对红细胞释放血红蛋白发生重大影响。

以往的实验都是在空气中进行，也就是说在有氧的环境里进行。有氧条件下进行释放电泳时，我们发现过血红蛋白 A_2 现象，此时红细胞内 HBA_2 与 HBA_1 之间存在相互作用。也就是说，有氧条件下红细胞内这两种血红蛋白是结合存在的。无氧条件下，释放情形发生重大变化，此时血红蛋白 A_2 现象消失！也就是说，红细胞内 HBA_2 与 HBA_1 之间没有相互作用，它们不再互相结合，变成孤立存在。

在血红蛋白 A_2 现象的启发下，我们曾发现有氧条件下红细胞外 HBA_2 与 HBA_1 之间发生“交叉互作”，即 HBA_1 穿过 HBA_2 时后者区带变形。无氧条件下血红蛋白 A_2 现象消失，“交叉互作”是否也消失？实验结果证实了这一点，无氧条件下， HBA_1 穿过 HBA_2 时后者区带没有变形，即没有发生相互作用。

有氧和无氧，血红蛋白释放实验结果明显不同，这些变化告诉我们，血红蛋白释放研究远未结束，科研无止境，永远在路上！

秦文斌

2017年5月于鹿城包头

* 本书为作者在不同时期的论文和作品，有的已公开发表，在编辑形成本书时，为与原文保持一致，部分未进行统一处理，因此存在个别单位、体例等方面的不一致。

目 录

第一篇 无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放

第一章	梅花鹿镰状红细胞内血红蛋白的电泳释放——偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳	3
第二章	无氧条件下的血红蛋白电泳释放——偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳	7
第三章	比较有氧和无氧电泳结果的三种方法	12
第四章	无氧条件下正常分娩者红细胞内血红蛋白的电泳释放——将偏重亚硫酸钠加入标本, 无氧与有氧同在一胶板	13
第五章	无氧条件下脑出血患者红细胞内血红蛋白的电泳释放——将偏重亚硫酸钠加入标本, 无氧与有氧同在一胶板	16
第六章	无氧条件下乳腺癌患者红细胞内血红蛋白的电泳释放——将偏重亚硫酸钠加入标本, 无氧与有氧同在一胶板	19
第七章	无氧条件下胃癌患者红细胞内血红蛋白的电泳释放——将偏重亚硫酸钠加入标本, 无氧与有氧同在一胶板	22
第八章	四种情况(正常分娩、脑出血、乳腺癌、胃癌)的比较和分析——将偏重亚硫酸钠加入标本, 无氧与有氧同在一胶板	25
第九章	无氧条件下血红蛋白之间不能交叉互作——交叉电泳, 一个电泳槽里两个胶板, 一个无氧胶, 一个有氧胶, 都是用纯 HBA ₁ 穿过溶血液	27
第十章	糖尿病患者的红细胞指纹图, 有氧和无氧条件下	31
第十一章	发现无氧胶中血红蛋白的泳动拐弯现象	34
第一节	在比较糖尿病红细胞指纹图电泳过程中, 发现无氧胶血红蛋白泳动拐弯现象	34
第二节	在比较糖尿病红细胞指纹图电泳过程中, 发现有氧胶血红蛋白泳动没有拐弯现象	34
第三节	拐弯现象的连续观察	35
第四节	拐弯现象的机制探讨	35
第十二章	无氧条件对红细胞再释放血红蛋白的影响	37
第十三章	无氧条件对血红蛋白 A ₂ 现象的影响	40
第十四章	无氧条件对不同疾病时红细胞再释放血红蛋白的影响	45
第十五章	无氧释放总结	51

第二篇 有氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放

第十六章	α -地中海贫血与球形红细胞增多症血红蛋白电泳释放的比较研究	55
第十七章	血浆成分对红细胞释放血红蛋白的影响	73
第十八章	2型糖尿病患者红细胞的血红蛋白释放试验——与血糖浓度及胰岛素关系的初步研究	93
第十九章	肝内胆管癌与血红蛋白释放试验	107
第二十章	纤维蛋白原现象的发现和研究的	117
第二十一章	多发性骨髓瘤患者全血没有纤维蛋白原现象	125
第二十二章	ABO血型的双向全程释放电泳图谱	129
第二十三章	蒿甲醚抗疟机制的研究	133
第二十四章	青蒿素类药物与一些物质的凝集反应	141
第二十五章	红细胞内血红蛋白的存在状态——来自血红蛋白释放试验	155
第二十六章	红细胞和全血再释放电泳类型及临床意义	163

第三篇 其他细胞内成分的电泳释放

第二十七章	血小板成分电泳释放的初步研究	183
第二十八章	粒细胞内蛋白质电泳释放的初步研究	188
第二十九章	淋巴细胞内蛋白质电泳释放的初步研究	192
第三十章	胃癌细胞内蛋白质电泳释放的初步研究	198
第三十一章	小鼠胚胎成纤维细胞内蛋白质电泳释放的初步研究	202
第三十二章	比较几种细胞的释放结果	203

第四篇 电泳释放蛋白质组学

第三十三章	红细胞电泳释放蛋白质组学	207
第一节	红细胞初释放的电泳释放蛋白质组学	207
第二节	红细胞再释放的电泳释放蛋白质组学	218
第三十四章	其他细胞的电泳释放蛋白质组学——展望	224
第一节	血小板	224
第二节	粒细胞	225
第三节	淋巴细胞	226
第四节	胃癌细胞	227

第一篇

无氧条件下红细胞内血红蛋白的电泳释放

以往的实验都是在空气中进行，也就是说在有氧的环境里进行。

本篇实验是在缓冲液里加入偏重亚硫酸钠，凝胶内部的环境是还原、无氧的，此时的电泳结果会怎么样？这就是本篇的研究内容。怎么想起做这个实验呢？来自对梅花鹿镰状细胞的研究！

我们发现地中海贫血患者红细胞内血红蛋白的电泳释放异常，于是想到研究镰状细胞贫血患者的情况，但在国内找不到患者，无法获取标本。此时想到梅花鹿红细胞也是镰状，可以通过梅花鹿镰状红细胞的血红蛋白释放情况进行研究。但是，常规电泳未能检出镰状细胞的特点，而在淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳中加入偏重亚硫酸钠后效果则显现出来(详见本篇第二章)。

第一章 梅花鹿镰状红细胞内血红蛋白的电泳释放

——偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳

徐春忠¹ 秦良谊^{1,2} 高丽君² 韩丽红² 高雅琼² 苏燕² 秦文斌^{2*}

(1 上海野生动物园, 上海 201399; 2 包头医学院 血红蛋白研究室, 包头 014010)

摘 要

背景和目的: 我们曾发现地中海贫血时血红蛋白释放试验(HRT)异常, 准备用这种方法再来研究另一种人类血红蛋白病——血红蛋白 S 病(镰状细胞贫血), 但在国内拿不到此标本。此时想到梅花鹿的红细胞也是镰状, 故决定取它的红细胞进行 HRT, 观察梅花鹿血镰状红细胞的血红蛋白释放情况。

方法: 显微镜观察梅花鹿血中的镰状红细胞, 双向双层对角线电泳比较观察梅花鹿标本与人标本结果, 等低渗全程 HRT 观察不同渗透压情形下鹿血与人血红蛋白的释放情况。建立偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳, 比较人血与鹿血在无氧条件下的电泳行为。

结果: 显微镜下看到梅花鹿血出现非常漂亮镰状红细胞。双向双层对角线电泳时梅花鹿血与人血红细胞的再释放都强于全血, 二者差别不大。等低渗全程 HRT 结果是, 室温不如 37℃ 保温明显, 保温实验中也是红细胞的再释放强于全血, 从鹿血与人血比较角度来看, 相差仍不太明显。偏重亚硫酸钠电泳结果特殊, 鹿血红细胞与人血红细胞差别明显, 前者的多带再释放明显强于后者。

结论: 无氧条件下鹿血红细胞的电泳再释放明显强于人血红细胞, 这是鹿血镰化红细胞特殊之处。

关键词 梅花鹿; 镰状红细胞; 无氧; 镰状细胞贫血; 血红蛋白电泳释放; 偏重亚硫酸钠电泳

1 前言

人们早就发现梅花鹿(以下简称鹿)血含有镰化红细胞。1936 年 Earl C 首次发现有些鹿中有镰状细胞贫血^[1], 1960 年 Undritz E 等在 *Nature* 上发表文章, 明确鹿血红细胞有镰化现象^[2], 1964 年 Kitchen H 等在 *Science* 上发表关于血红蛋白多态性与鹿血红细胞镰化的关系^[3]。1967 年 Whitten C F 提出鹿血含有镰化红细胞对机体无害^[4], 1974 年 Taylor W J 和 Simpson C F 报道鹿血镰化红细胞的超微结构^[5], Amma E L 等人研究鹿红细胞的镰化机制^[6], 1983 年 Seiffe D 进行了鹿血镰化红细胞的血液流变学研究^[7]。多年来, 我们研究室一直进行一种红细胞内血红蛋白的电泳释放研究^[8-12], 曾发现地中海贫血时血红蛋白释放异常^[13], 准备用这种方法再研究人类的镰状细胞贫血(血红蛋白 S 病), 但在国内拿不到这种标本, 此时想到

* 通讯作者: 秦文斌; 电子信箱: qwb5991309@tom.com

鹿的红细胞也是镰状,故取它的红细胞进行研究,观察鹿血镰状红细胞的血红蛋白释放情况。

2 材料与方方法

2.1 材料 梅花鹿血来自上海动物园。

2.2 方法

2.2.1 显微镜观察 载物片上加一滴盐水,用 tip 头蘸少许鹿血与盐水混匀,盖上盖玻片,30min 后,40×10 倍镜下观察结果,并照相留图。



图 1-1 梅花鹿血显微镜结果

2.2.2 双向双层对角线电泳 参见文献[12]。

2.2.3 室温等低渗全程电泳 参见文献[12]。

2.2.4 37℃等低渗全程电泳 参见文献[12]。

2.2.5 淀粉-琼脂糖凝胶偏重亚硫酸钠电泳 我室常规淀粉-琼脂糖凝胶电泳 TEB 缓冲液中加入 0.1% 偏重亚硫酸钠,其他操作都不变。

3 结果

3.1 梅花鹿血显微镜结果 见图 1-1。

由图 1-1 可以看出,鹿血涂片中出现许多镰状红细胞。

3.2 鹿血与人血的双向双层对角线电泳结果 见图 1-2。

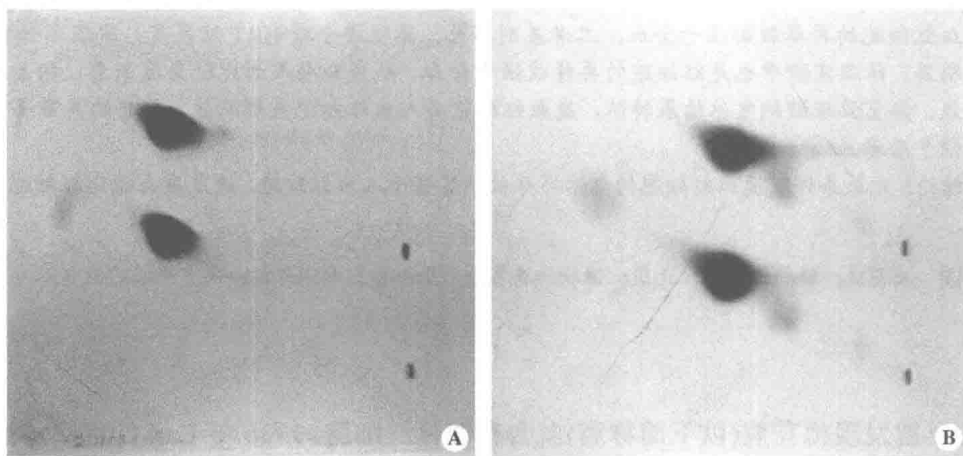


图 1-2 双向双层对角线电泳

注释:上层为红细胞,下层为全血;图 A 为鹿血,图 B 为正常人血

由图 1-2A 和图 1-2B 可以看出,鹿血和人血红细胞都有一些多带释放,它们的全血多带释放不明显。

3.3 室温等低渗全程结果 见图 1-3。

由图 1-3A 和图 1-3B 可以看出,人血红细胞都有一些多带释放,鹿血红细胞的多带释放更弱。它们的全血多带释放也如此。

3.4 37℃等低渗全程结果 见图 1-4。

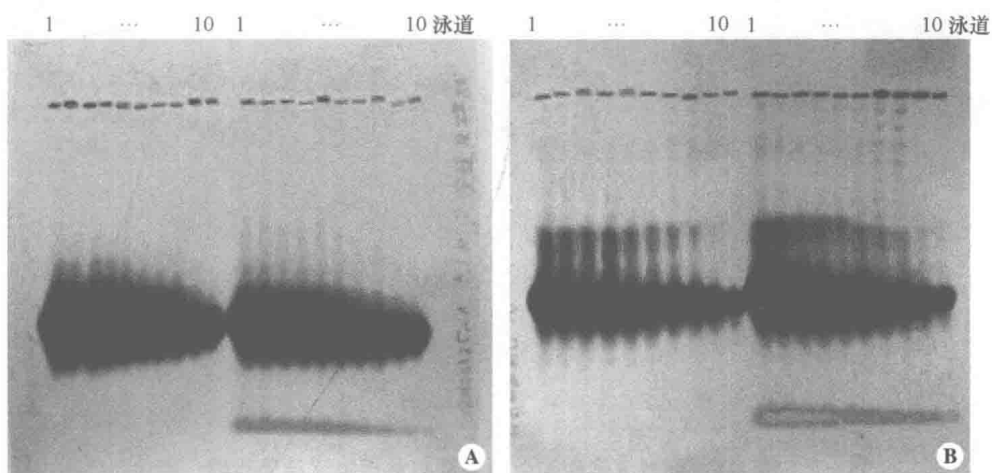


图 1-3 室温等低渗全程结果

注释：全程室温，左侧 10 个泳道为红细胞，右侧 10 个泳道为全血；图 A 为鹿血，图 B 为正常人血

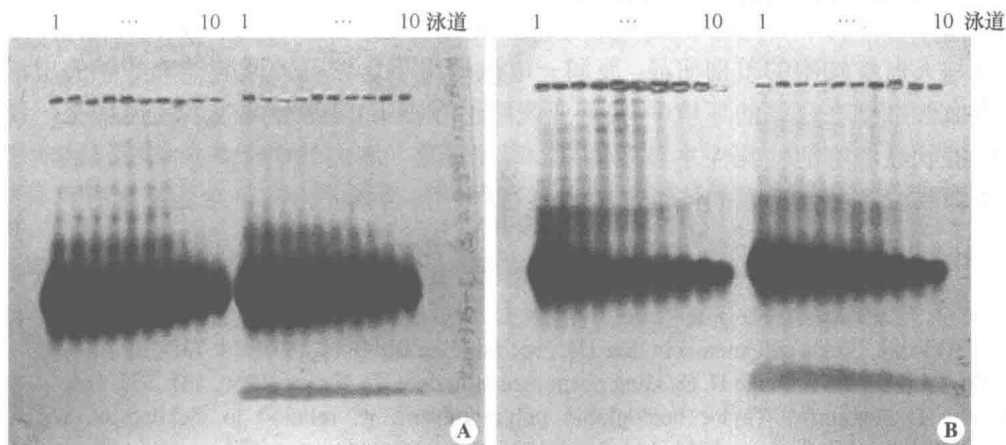


图 1-4 37℃等低渗全程结果

注释：全程 37℃，左侧 10 个泳道为红细胞，右侧 10 个泳道为全血；图 A 为鹿血，图 B 为正常人血

由图 1-4A 和图 1-4B 可以看出，人血红细胞有较强的多带释放，鹿血红细胞的多带释放相对弱一些。它们的全血多带释放都不明显。

3.5 偏重亚硫酸钠电泳结果与常规电泳结果比较 见图 1-5。

由图 1-5A 可以看出，在无氧条件下人红细胞多带释放不明显，鹿红细胞多带释放明显。图 1-5B 表明，在有氧条件下人红细胞与鹿红细胞多带释放都不明显。

4 讨论

如前所述，已知轻型 β 地中海贫血时红细胞和全血的电泳释放都增强^[13]，想看血红蛋白 S 病时情况，但是在国内拿不到这种标本。现在观察类似血红蛋白 S 病镰状细胞的鹿镰状细胞，它的电泳释放情况如何？从双向双层对角线电泳看来，鹿血的电泳释放与地中海贫血不同，它的全血释放比红细胞弱，红细胞本身的释放也不太强，与正常人血差不多。等低渗全程释放方面鹿血与人血略有差别，但鹿血仍无明显独特之处。鉴于镰状细胞贫血患者血红蛋白在还原状态下更容易镰化，我们将镰状细胞贫血快速诊断试验^[14]中使用偏重亚硫酸钠的办

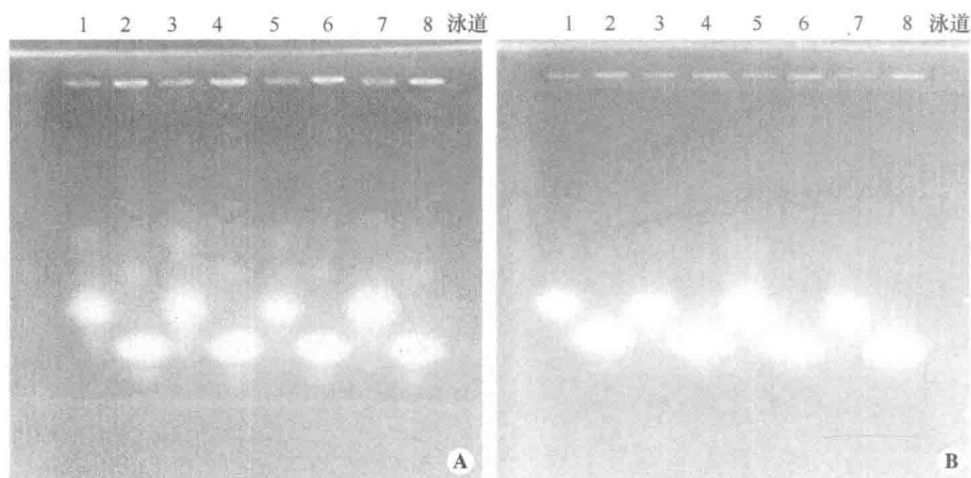


图 1-5 偏重亚硫酸钠电泳结果与常规电泳结果比较

注释：相同标本(泳道由左向右，1、3、5、7 为人血红细胞，2、4、6、8 为鹿血红细胞)，比较两种电泳的效果：图 A 为偏重亚硫酸钠电泳结果，图 B 为常规电泳结果，两者同时在一个电泳槽中进行电泳

法引入电泳分析，观察它对鹿血红细胞中血红蛋白的电泳释放情况。结果发现，此条件下鹿血红细胞与人血红细胞的差别明显，而同一电泳槽中不含偏重亚硫酸钠硫酸钠的电泳则未见差异。鹿血红细胞在还原的环境中(偏重亚硫酸钠存在下)多带释放强度明显增强，说明此条件下鹿血镰状红细胞的特殊性才显现出来。现在看来，鹿血的电泳释放情况已经明了，我们推测人类镰状细胞贫血患者的电泳释放也是这样，是否如此，等待拿到标本时再来验证。

参 考 文 献

- [1] Earl C. O'Roke. Sick cell anemia in deer [J]. Proc Soc Exp Bio Med, 1936, 34: 738-739.
- [2] Undritz E, Lehmann K Betke H. Sickling phenomenon in deer [J]. Nature, 1960, 187: 333-334.
- [3] Kitchen H. Putnamfw, Taylor hemoglobin polymorphism: its relation to sickling of erythrocytes in white-tailed deer [J]. Science, 1964, 144: 1237-1239.
- [4] Whitten C F. Innocuous nature of the sickling (pseudosickling) phenomenon in deer [J]. Br J Haematol, 1967, 13(5): 650-655.
- [5] Taylor W J, Simpson C F. Ultrastructure of sickled deer erythrocytes. II. The matchstick cell [J]. Blood, 1974, 43: 907-914.
- [6] Amma E L, Sproul G D, Wong S, et al. Mechanism of sickling in deer erythrocytes [J]. Ann N Y Acad Sci, 1974, 241: 605-613.
- [7] Seiffe D. Haemorheological studies of the sickle cell phenomenon in european red deer (cervus elaphus) [J]. Blut, 1983, 47: 85-72.
- [8] 秦文斌, 梁友珍. 血红蛋白 A_2 现象 1 A_2 现象的发现及其初步应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1981, 13(2): 199-205.
- [9] 秦文斌. 红细胞外血红蛋白 A 与血红蛋白 A_2 之间的相互作用[J]. 生物化学杂志, 1991, 7(5): 583-587.
- [10] 秦文斌. 血红蛋白的 A_2 现象发生机制的研究——“红细胞 HbA_2 ”为 HbA_2 与 HbA 的结合产物[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 286-288.
- [11] Su Y, Gao L J, Ma Q, et al. Interactions of hemoglobin in lived red blood cells measured by the electrophoresis release test [J]. Electrophoresis, 2010, 31: 2913-2920.
- [12] 秦文斌. 活体红细胞内血红蛋白的电泳释放[J]. 中国科学生命科学, 2011, 41(8): 597-607.
- [13] Su Y, Shao G, Gao L J, et al. RBC electrophoresis with discontinuous power supply—a newly established hemoglobin release test [J]. Electrophoresis, 2009, 30: 3041-3043.
- [14] Itano H A, Pauling L. A rapid diagnostic test for sickle cell anemia [J]. Blood, 1949, 4(1): 66-68.

第二章 无氧条件下的血红蛋白电泳释放

——偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳

秦良谊^{1, 3#} 高丽君^{1#} 苏燕^{1#} 高雅琼¹ 裴娟慧^{2, 4} 秦文斌^{1*}

(1 包头医学院 血红蛋白研究室, 包头 014010; 2 包头医学院 病理生理教研室, 包头 014010;
3 上海杨思医院 检验科, 上海 200126; 4 北京航天总医院 心血管内科, 北京 100076)

摘 要

在梅花鹿镰状红细胞释放血红蛋白的研究中, 我们发现偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳显示出独特作用。此时, 全血或红细胞标本都处于还原状态、无氧状态, 其中血红蛋白的电泳行为与众不同。本文比较研究了四组血液标本: 正常人、HBE 病患者、梅花鹿、大鼠。结果表明, 偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳表现出一系列独特之处: ①无氧条件下梅花鹿红细胞内血红蛋白的电泳释放增强; ②无氧条件下大鼠红细胞内血红蛋白之间的相互作用明显减弱; ③正常人的血红蛋白 A₂ 现象反常; ④病人的血红蛋白释放试验结果更清晰, 有利于鉴别某些异常血红蛋白。可以认为, 偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳技术成为血红蛋白电泳释放的又一新分支——无氧条件下的血红蛋白释放试验。

关键词 偏重亚硫酸钠淀粉-琼脂糖混合凝胶电泳; 无氧条件; 血红蛋白 A₂ 现象; 红细胞; 大鼠; 梅花鹿

1 前言

偏重亚硫酸钠处理, 能够促进血红蛋白 S 病患者的红细胞镰化^[1], 我们把它加入制胶缓冲液, 用于梅花鹿的红细胞, 发现它能改善梅花鹿红细胞内血红蛋白的电泳释放^[2, 3]。这是梅花鹿红细胞, 偏重亚硫酸钠处理, 无氧条件, 对人类红细胞如何、各种疾病时如何, 更是一无所知。本文就进入这个领域进行研究, 本书的中心内容也是如此。

2 材料和方法

2.1 血液标本 大鼠为 SD 雄性大鼠, 体重 250~300g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。梅花鹿来自上海市动物园。正常人为本室科研人员(健康体检正常)。病人来自包头医学院第一附属医院和广西医科大学实验中心。

2.2 实验操作

2.2.1 缓冲液

(1) 普通淀粉-琼脂糖混合凝胶(简称淀琼胶)电泳的制胶缓冲液, 同文献[2, 4], 为 TEB 缓冲液, pH8.6。

#并列第一作者

*通讯作者: 秦文斌; 电子信箱: qwb5991309@tom.com

(2) 偏重亚硫酸钠-淀粉琼胶制胶缓冲液：在上述 TEB 缓冲液中加入 0.1% 偏重亚硫酸钠^[2, 3]。

(3) 电泳槽中的缓冲液，同文献[2, 4]，为硼酸盐，pH9.0。

2.2.2 制胶 取 17cm×17cm 的玻璃板一块，称马铃薯淀粉 1.7g，琼脂糖 0.24g，加于装有 90ml 上述制胶缓冲液(普通缓冲液或含偏重亚硫酸钠的缓冲液)于三角烧瓶内，摇匀后，于沸水锅内煮，边煮边摇 8min。取出后凉至 50℃ 左右平铺于玻璃板上。待完全凝固即可使用。

2.2.3 加样 将样品加入滤纸条后插入凝胶，加样后凝胶在槽中放置 2h，让还原剂充分作用，然后再电泳(普通淀粉琼胶与含偏重亚硫酸钠的淀粉琼胶同样处理)。

2.2.4 电泳 电泳条件参见文献[2-4]。

3 结果

3.1 病人与鹿血红细胞单向释放电泳 见图 2-1。

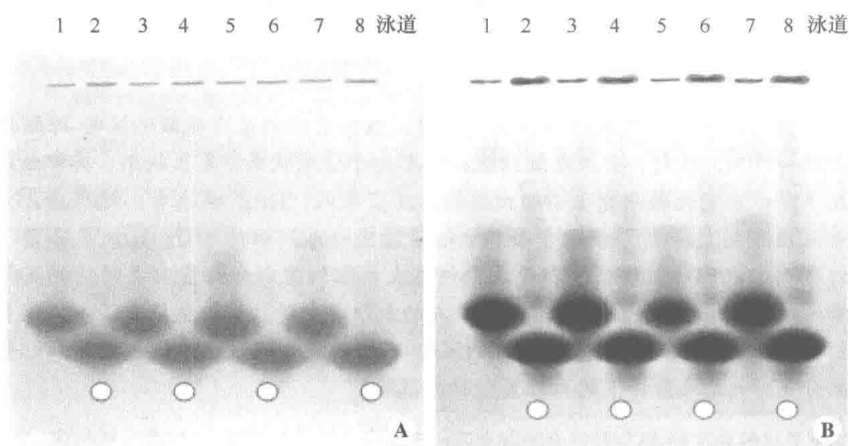


图 2-1 病人与鹿血红细胞单向释放电泳

A. 普通电泳；B. 偏重亚硫酸钠电泳

注释：由左向右 1, 3, 5, 7 泳道为病人红细胞；2, 4, 6, 8 泳道为鹿血红细胞标本(见○处)

由图 2-1A 和 B 可以看出，与普通电泳结果相比，偏重亚硫酸钠-淀粉琼胶电泳时鹿血红细胞多带释放明显增强。这说明，梅花鹿的镰状红细胞在无氧条件下才能释放出来多个血红蛋白区带。

3.2 大鼠红细胞的双向对角线电泳 见图 2-2。

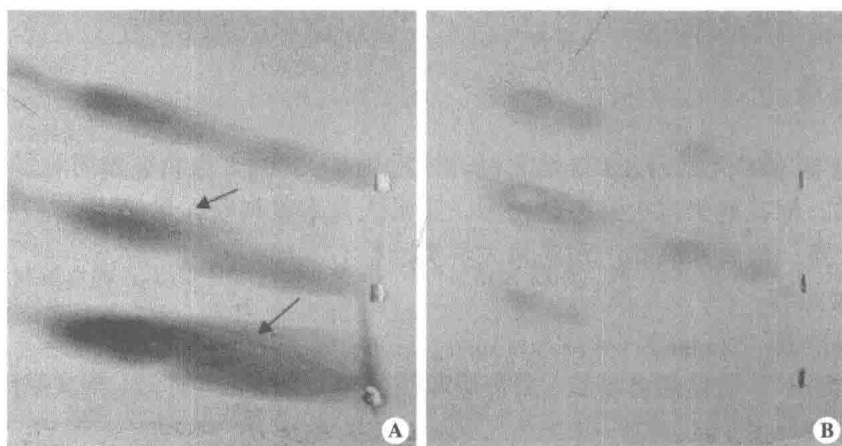


图 2-2 大鼠红细胞的双向对角线电泳

A. 普通电泳；B. 偏重亚硫酸钠电泳

注释：标本为大鼠红细胞，上层为溶血液，中层为红细胞，下层为红细胞基质