

•基础研究•

原位心脏移植术后早期的血流动力学实验研究

刘志平¹, 王亮², 朱宪明¹, 张玉龙¹, 王坚¹, 李淑珍¹,
赵龙¹, 郭俊晓¹, 任杰¹, 高荣¹, 邱能庸¹

(1. 内蒙古医学院第一附属医院胸心外科, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 北京 101149)

摘要: **目的** 通过心脏移植的实验研究, 比较双腔静脉法同种异体原位心脏移植术与全心脏移植法同种异体原位心脏移植术的出血量, 移植后心脏的早期血流动力学方面的不同。**方法** 供、受体杂种犬 16 只, 将实验动物分成双腔静脉心脏移植术组和全心脏移植术组, 每组各 8 只, 分别在全麻、中度低温体外循环下进行手术。记录术中出血量, 术后采用 GE-vivid7 型彩色多普勒超声诊断仪, 心电图监护仪观察血流动力学指标。**结果** 5 例移植心脏自动复跳 (双腔静脉心脏移植术组 3 例, 全心脏移植术组 2 例), 3 例移植心脏通过电除颤复跳 (双腔静脉心脏移植术组 1 例, 全心脏移植术组 2 例), 双腔静脉法心脏移植与全心脏移植法出血量对比为 $(475 \pm 20.81 \text{ ml} \text{ vs } 545 \pm 26.45 \text{ ml})$, 术后早期血流动力学参数两组均比较稳定。**结论** 提高手术技术, 避免吻合口出血, 加强心肌保护是心脏移植手术的关键, 双腔静脉法心脏移植在出血量方面少于全心脏移植术, 两组心脏移植术后早期血流动力学方面无明显差异。

关键词: 心脏移植; 血流动力学; 术式**中图分类号:** R 617 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-9388 (2009) 06-0321-04

Experimental Research Of Early Hemodynamic Changes After Orthotopic Heart Transplantation LIU Zhi-ping, WANG Liang, ZHU Xian-ming, et al. (Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010050, China)

Abstract: **Objectives** Through experimental study of canine heart transplantation, it was the comparison of blood loss and early hemodynamic changes after orthotopic homologous heart transplantation between bicaval orthotopic cardiac transplantation and total orthotopic cardiac transplantation. **Methods** Donor, receptor 16 hybrid dogs. Experimental animal were divided into 2 groups each group 8 dogs. Operations were performed on general anesthesia and moderately low temperature cardiopulmonary bypass. Respectively reported blood loss, postoperation hemodynamics parameters in were observed by GE-vivid7 color doppler ultrasonic diagnostic apparatus and ECG monitor. **Results** Spontaneous recovery of heart beat occurred in 5 cases (bicaval orthotopic cardiac transplantation group 3 cases, total orthotopic cardiac transplantation. Group 2 cases) and recovery of heart beat by defibrillation in 3 cases (bicaval orthotopic cardiac transplantation group 1 cases, total orthotopic cardiac transplantation. Group 2 cases). Respectively blood loss $(475 \pm 20.81 \text{ ml} \text{ vs } 545 \pm 26.45 \text{ ml})$, postoperative early Hemodynamic parameters were relatively stable. **Conclusion** Gentle manipulation, reduce bleeding at anastomosis and improvement of myocardial protection are key to cardiac transplantation. Bicaval orthotopic cardiac transplantation is better than Total orthotopic cardiac transplantation in blood loss. There is not remarkable different in early hemodynamic changes after orthotopic homologous heart transplantation between bicaval orthotopic cardiac transplantation and total orthotopic cardiac transplantation

Key words: cardiac transplantation; hemodynamics; operative methods

心脏移植已被公认为是治疗各种终末期心脏病最有效的方法之一。自 1967 年人类首例同种心脏移植成功以来, 全世界共完成了心脏移植 7 万余例^[1]。随着移植技术的提高和其他相关学科的发展, 心脏移植疗效有了很大的提高, 在发达国家已成为常规手术, 最长存活者达 30 余年。原位心脏移植术用于临床已近 40 年, 手术方式主要包括三种: (1) 标准原位心脏移植 (standard orthotopic cardiac transplantation, SOCT): 1960 年 Lower 和 Shumway^[2] 采用供体左房和右房后部与受体左、右房分别吻合, 供体和受体的主动脉, 肺动脉分别吻合, 成功的完成了原位心脏移植的动物实验。随后, 许多外科医生沿用他们的方法完成了原位心脏移植手术。由于这种方法操作相对简单, 技术安全可靠, 移植后近期临床效果明显, 被公认为原位心脏移植的标准术式。但是, 近年有资料研究表明, 按标准术式植入的心脏在解剖学和生理学上存在一些缺点^[3], 这种术式正面临着许多挑战。两种全新的术式: 双腔静脉原位心脏移植术和全心脏原位移植术逐渐被各大移植中心所采用。(2) 双腔静脉原位心脏移植 (bicaval orthotopic cardiac transplantation, BOCT): Sarsam^[4] 提出保留右心房完整性的原位心脏移植法, 供体心脏的完整右心房、窦

房结、上腔静脉近心段及下腔静脉开口完整保留。术中接受体的右心房及窦房结一并切除, 左心房、主动脉、肺动脉的手术方法同标准的心脏移植术, 这种术式近年来也被用于临床^[5]。(3) 全心脏原位移植术: (total orthotopic cardiac transplantation, TOCT) 1991 年, Reitz 等^[6] 提出保留完整的右心房和左心房的全心脏原位移植术。这种术式保存了供体心房结构的完整性, 左、右心房的大小和几何形状不变, 移植后的房间隔完整, 三尖瓣和二尖瓣不会因心房的过分牵拉而变形^[7]。目前世界各大心脏移植中心多采用后两种心脏移植手术方式。我们通过心脏移植的实验研究, 比较 BOCT 与 TOCT 同种异体原位心脏移植术的出血量, 移植心脏术后早期血流动力学方面的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物 呼和浩特市郊杂种犬 16 只。体重 15~20kg, 性别无特定限制, 供、受体体重适当进行匹配, 相差 < 3kg。

1.2 实验方法 将实验动物分成 BOCT 组和 TOCT 组, 每组各 8 只, 进行手术。

1.2.1 双腔静脉原位心脏移植 (BOCT) 组 (1) 供、受体分别气管插管+静脉复合全身麻醉。(2) 供、受体分别穿刺颈外静脉、桡动脉、心电图监测各项生命体征。(3) 心脏供体的制备: 供体快速横断胸骨进胸, 静脉肝素化 3mg/kg, 切开心包, 游离上腔静脉至奇静脉水平, 游离下腔静脉至膈肌, 套上、下

基金项目: 内蒙古自治区卫生厅科研基金资助。编号: 2006028

作者简介: 刘志平 (1967-), 男, 医学硕士, 内蒙古医学院附属医院胸心外科教授, 硕士研究生导师。研究方向: 胸心外科基础与临床。
王亮: 北京胸部肿瘤研究所在读博士。

阻断带, 阻断升主动脉, 在主动脉根部灌注 4℃ 的 st. thomas 冷停跳液 500 毫升, 使心脏迅速停搏。

上腔静脉在奇静脉汇入处切断, 在与膈肌交界处切断下腔静脉。在近头臂动脉干起始处切断升主动脉。在肺动脉分叉处切断肺动脉主干。其后依次切断左侧 2 根肺静脉和右侧 2 根肺静脉, 将供心取下后依次装入装有 4℃ 冷生理盐水的塑料盆中, 其后塑料盆周围包裹覆盖冰屑保存, 待受心组完成受心切除后, 修剪供心备用。同时回收供体血液到储血瓶备用。(4) 受体准备和受体心脏的切除: 正中劈胸骨, 静脉肝素化 3mg/kg, 剪开心包, 主动脉靠近头臂动脉起始部插体外循环动脉灌注管或切开右侧股动脉插体外循环动脉灌注管, 上、下腔静脉尽量向远端游离后套阻断带, 插引流管。经右上肺静脉开口插左房引流管, 转机降温至 30℃ 时, 在靠近主动脉瓣和肺动脉瓣环稍上方横断主动脉和肺动脉, 在远离右房处横断上、下腔静脉。沿左房室沟切开左房壁, 上方达左心耳根部, 并将左心耳一并切除, 向右上绕行切除左心房顶部房壁。再沿此切口延续剩余左房, 将受体心脏取出后可见左心房呈四方型口, 4 根肺静脉开口位于其中。(5) 开始吻合: 左房: 将供体心脏按正常位置放入受体心包内, 并以长轴方向向左, 后方旋转, 充分暴露后方左房壁的外切缘。吻合开始于受体心脏左房切口的左肺上静脉处, 与供体心脏左心耳根部切缘相对应。用 6/0 prolene 线, 先缝下缘, 后缝上缘, 直到绕左心房切口一圈为止, 最后缝线两端在房间隔中部相遇时结扎。上、下腔静脉: 根据受体下腔静脉和上腔静脉之间切除右房范围, 裁剪供体的上腔静脉和下腔静脉, 必须保留较长的长度才能进行吻合。裁剪过短会造成吻合时的困难。吻合时可以从腔内后壁开始, 用 6/0prolene 线以连续缝合法进行吻合, 先向两侧, 后转向前方, 缝线的两端在前壁中点结扎。主动脉吻合: 无论是受体还是供体, 都保留有较长的主动脉。吻合主动脉时, 首先是裁剪成理想的长度, 开始于受体及供体主动脉的左后缘, 从动脉腔内做吻合, 缝至主动脉右侧壁时, 缝针自主动脉腔内穿出主动脉壁主动脉腔外, 然后在主动脉腔外以连续缝合法进行吻合, 两端缝线缝至主动脉前壁中央部时相互结扎。肺动脉吻合: 肺动脉吻合方法与主动脉相似, 首先也是将受体及供体肺动脉裁剪成合适的长度, 方法与主动脉吻合相同, 吻合操作的方法也与主动脉相同^[4]。

1.2.2 全心脏原位移植术 (TOCT) 组 (1) 供, 受体分别气管插管+静脉复合全身麻醉。(2) 供, 受体分别穿颈外静脉、桡动脉, 心电监测各项生命体征。(3) 心脏供体的制备: 同双腔静脉组。(4) 受体的制备: 建立体外循环时, 主动脉插管按常规方法施行, 而上腔静脉插管必须经上腔静脉本身插入, 下腔静脉插管必须紧靠膈肌处的下腔静脉插入。先按常规方法切除心脏, 再游离左房、右房、上腔静脉及下腔静脉的后方, 自上、下腔静脉心房的

的入口处切断, 切除右房及左房, 但保留右肺上、下静脉在一个袖状的切口内, 左肺上、下静脉在另一个袖状切口内。(5) 开始吻合: 上、下腔静脉, 主动脉, 肺动脉吻合同双腔静脉组。左肺静脉组的吻合: 供体的左肺上、下静脉已被裁剪成一椭圆形孔, 将与受体左肺上、下静脉保留的袖状切口相吻合, 使用 6/0prolene 缝合线, 从袖状切口的内上方开始, 以连续缝合法作吻合。缝线的两端在左前方中点相互结扎。右肺静脉组的吻合: 吻合的方法、操作及注意事项与左肺静脉组吻合完全相同^[7]。

1.2.3 记录两组手术中出血量。

1.2.4 术后用美国产 GE-vivid7 型彩色多普勒超声诊断仪观察血流动力学指标 (1) 采用二维超声心动图观察心脏各标准切面, 测量各房室内径, 主动脉内径(aortic dimension, AoD), 重点观察供、受心连接吻合口处。观察室壁的运动情况。(2) 应用 M 型超声计算射血分数 (Ejectionfraction, EF), 每搏输出量 (stroke volume, SV), 评价左心功能。(3) 应用脉冲多普勒频谱测量 E、A 峰值流速, 评价心脏舒张功能。(4) 应用彩色多普勒观察主动脉瓣, 肺动脉瓣, 三尖瓣, 二尖瓣返流情况。(5) 监测 ECG、心率 (Heart rate, HR) 等数据^[8]。

检查于术后立刻开始, 每次由同一操作者检查, 避免主观误差。以连续测量 5 个心动周期的平均值作为最后的检测数据。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件包处理数据, 分别比较两组实验结果各指标, 采用两个独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

5 例移植心脏自动复跳 (BOCT 组 3 例, TOCT 组 2 例), 3 例移植心脏通过电除颤复跳 (BOCT 组 1 例, TOCT 组 2 例)。

2.1 出血量 BOCT 组出血量 ($475 \pm 20.81\text{ml}$) 与 TOCT 组出血量 ($545 \pm 26.45\text{ml}$)。两组比较 $P < 0.01$, 差异有统计学意义, 见表 1。

表 1 BOCT 组与 TOCT 组出血量

	BOCT (ml)	TOCT (ml)
例 1	500	580
例 2	450	550
例 3	470	530
例 4	480	520

2.2 血流动力学结果 术后早期血流动力学参数两组均比较稳定, BOCT 组与 TOCT 组各项指标之间 $P > 0.05$, 差异均无统计学意义, 见表 2。

3 讨论

3.1 出血量 由于原位心脏移植手术操作的复杂性, 我们实验两组均出血较多。原因如下: 犬的心房壁及上、下腔静脉壁非常薄, 韧性差, 易撕裂, 与文献报道一致^[9]。实验前两只动物均因为出血而死亡。在后边的手术中我们采用了 6~0 prolene

表2 BOCT组与TOCT组手术前后心脏超声指标 ($\bar{x} \pm s$)

	BOCT	TOCT
HR(次/min)	177.50±6.45	170.00±4.08
LAd(mm)	21.25±0.95	22.75±0.95
RAd(mm)	23.00±1.15	23.25±1.25
RVd(mm)	21.00±1.41	20.00±0.81
LVd(mm)	21.25±1.70	20.25±1.25
AoD(mm)	18.00±0.81	20.25±0.95
IVS(mm)	6.25±0.95	6.00±0.81
LVPW(mm)	7.25±0.50	7.75±0.95
EF%	68.50±5.32	65.80±4.35
SV(ml)	14.42±0.45	14.97±0.27
ME(cm/s)	51.50±3.40	51.75±3.86
MA(cm/s)	36.50±3.41	37.75±2.98

注: HR: 心率; LAd: 左心房内径; RAd: 右心房内径; RVd: 右心室内径; LVd: 左心室内径; AoD: 主动脉内径; IVS: 室间隔; LVPW: 左心室后壁; EF: 射血分数; SV: 每搏输出量; ME: 二尖瓣峰值; MA: 二尖瓣A值峰。

线吻合,保持针距在1.5mm~2.0mm,边距5.0mm,同时特别注意操作要轻柔,按针的弧度进出针,不过度牵拉缝线,以防切割撕裂。受供体因年龄及个体差异,主、肺动脉壁的厚度不一,口径不完全匹配,给吻合造成一定的难度,易导致吻合口出血或扭曲。因此,在行主、肺动脉吻合时,壁薄的一端进针的边距适当要大一点,每针之间的距离大口径动脉端要略大于小口径端,使缝线均匀、严密、确实、牢固。另外,对主动脉外膜脂肪不要修剪切除过多,一旦出血时可以缝合外膜压迫止血。经按以上方法改进处理,使出血问题得到了有效的解决。由于TOCT在手术操作上较BOCT多了一个吻合口,手术时间较长,出血量多于BOCT。

3.2 左心房 两种术式最主要是区别在于左心房的吻合^[10]。有文献报道^[11],标准原位心脏移植(SOCT)移植后的心房是由受体和供体共同组成,故两个心房间较正常明显扩大,供受体心房吻合缘形成一道堤状隆起凸入心房内。心房内血液易形成涡流,很容易形成血栓。由于双腔静脉原位心脏移植(BOCT)同样是房-房吻合(左房),也存在心房间过大,吻合口容易形成堤状隆起,易形成血栓等问题。本实验重点观察移植心脏后的左心房,二维超声下观察BOCT和TOCT的心脏未见此表现。考虑可能由于术后观察时间较短所致。

3.3 心功能 在M型超声下测量左室舒张末期内径及收缩末期内径,用辛普森法计算左室射血分数(EF值),从评价心脏的收缩功能。我们观察到实验动物EF值在心脏移植术后的监测过程中均变化不明显。有文献报道:排斥反应所导致的心肌损害、室壁增厚、心包积液、心房压的改变以及心脏移植性血管病可引起心脏收缩及舒张功能的异常而引起血流动力学变化。我们实验4例动物心脏移植术后早期左室均呈高收缩性,与文献报道一致。其机制可能为无神经支配的移植心脏的β受体数量和亲和力增加所致^[12]。

3.4 房室瓣返流 术后早期两组实验均未出现明显的房室瓣返流。原因可能为:(1)两种术式都较好的保留了心房完整性和心房的容积而避免了血液

涡流和房室瓣返流的发生^[13]。(2)考虑可能由于术后观察时间较短所致。移植心脏出现房室瓣返流的主要原因为:受体心房残留越多,与供体心房比值越大,因电生理活动不同步和机械运动的不同步,两者之间的扭曲也越大,从而影响房室瓣环运动。3.5 心肌肿胀 我们实验中共有2只动物在手术中死亡(未包括实验结果内),我们分析原因可能为心肌肿胀所致。移植吻合过程中我们发现左心室膨胀,张力很高,被迫停止灌注心肌保护液,检查二尖瓣口关闭严密。其原因可能是操作过程中致使主动脉瓣关闭不全,心肌停搏液直接流入左心室。术中尽量保持主动脉瓣在正常位置状态,另外要保持二尖瓣口开放,可将左房引接管深插入左心室,保持通畅的引流,可预防左心室膨胀,进而防止心内膜下心肌缺血和坏死。心肌保护不良也是实验发现的一个重要问题,从剖开的心室肌断面肉眼可见有的心室壁增厚、苍白、水肿、体积和重量增加。我们在建立确切的心肌保护系统时费时较多,建立冠状静脉窦逆灌时要选择最小号的灌注管,冠状静脉窦口周围的荷包线缝扎实,保证不脱出。灌注标准的托马氏液,不要随意改变成分,确保渗透压、pH值在合理的范围内。供心的保护关系到心脏移植手术的成败,在提取供心时,先进行气管插管和辅助呼吸,维持心脏的血液循环和氧供,避免和缩短供心的缺血时间。供心的心肌保护是否良好关键在于心脏的快速停跳和可靠的降温。

4 结论

心脏移植已被公认为是治疗各种终末期心脏病最有效的方法之一,但对于BOCT和TOCT两种术式,哪种术式的血流动力学更完善,心功能更好,对患者的长期生存更有益,目前尚无定论。我们实验研究表明:提高手术技术,避免吻合口出血,加强心肌保护是心脏移植手术的关键。两组动物都获得短期存活。BOCT在出血量方面少于TOCT,两组心脏移植术后早期血流动力学方面无明显差异。但对于长期存活,还需进一步实验研究和临床观察。我们认为应在保证手术操作顺利完成的基础上,尽量保留心房解剖和功能上完整性。因研究例数尚少,部分指标的变化趋势不明显,有待进一步对大样本,移植后长期生存犬的观察。

参考文献

- [1] 王春生.中国大陆心脏移植的现状与进展[J].继续医学教育,2007,21(11):6~9.
- [2] 朱晓东.心脏外科指南[M].第1版.北京:世界图书出版公司,1990,620.
- [3] Schnoor M,Schafer T,Luhmann D,et al.Bicaval versus standard technique in orthotopic heart transplantation: a systematic review and meta-analysis[J].Thorac Cardiovasc Surg,2007,Nov137(5):1322~1331
- [4] 廖崇先.实用心肺移植学[M].第1版.福建:福建科学技术出版社,2003,145.
- [5] Tsilimigias NB.Modification of bicaval anastomosis: an alternative technique for orthotopic cardiac transplantation[J].Ann Thorac Surg,2003,75(4):1333~1334.
- [6] Aleksić I,Freimark D,Blanche C,et al.Does total orthotopic heart transp

- lantation offer improved hemodynamics during cellular events [J]. Tran splant Proc, 2003, 35(4): 1532~1535.
- [7] 臧旺福. 可供选择的肝脏移植术式——全心脏原位移植术[J]. 中华器官移植杂志, 1998, 19(2): 127~128.
- [8] 谷笑蓉, 卢中秋, 倪显达, 等. 原位心脏移植术后多普勒超声心动图的动态监测[J]. 中国超声诊断杂志, 2005, 6(3): 167~169.
- [9] 马胜军, 马增山, 董铭峰, 等. 10例犬心脏移植实验手术技巧体会[J]. 实用心脑血管病杂志, 2003, 11(6): 321~322.
- [10] Morgan JA, Edwards NM. Orthotopic cardiac transplantation: comparison of outcome using biatrial, bicaval and total techniques[J]. Card Surg, 2005, 20(1): 102~106.
- [11] Angerman CE, Spes CH, Tammen A, et al. Anatomic characteristics and valvular function of the transplanted heart: Transthoracic versus transthoracic echocardiographic findings[J]. Heart Transplant, 1990, 9: 331~338.
- [12] 钟玲, 陈良龙, 陈道中, 等. 超声心动图对移植心脏的动态观察[J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(3): 176~178.
- [13] Koch A, Remppis A, Dengler TJ, et al. Influence of different implantation techniques on AV valve competence after orthotopic heart transplantation[J]. Eur Cardiothorac Surg, 2006, Apr 29(4): 634~635.

[收稿日期: 2009-02-11]

金属螯合亲和介质吸附重组类人胶原蛋白条件研究

王晓军¹, 范代娣²

(1. 西安工程科技学院环化学院, 陕西 西安 710048; 2. 西北大学化工学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 本研究对利用金属螯合亲和方法纯化重组类人胶原蛋白的吸附条件进行了优化。采用分批式操作对金属离子、平衡缓冲液的类型、pH值、离子强度及上样量进行了选择, 结果显示当采用Cu²⁺离子进行螯合, pH 7.5、含0.5 mol·L⁻¹ NaCl的磷酸盐缓冲液作为平衡缓冲液, 上样量为1.5 ml/ml介质时, 吸附效果最佳。

关键词: 金属螯合亲和; 重组类人胶原蛋白; 吸附条件

中图分类号: R 318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-9388 (2009) 06-0324-02

Study On Metal-Chelated Affinity Adsorption Conditions For Recombinant Human-Like Collagen WANG Xiao-jun^{1,2}, FAN Dai-di¹ (1. Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Department of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an University of Engineer Science & Technology, Xi'an 710048, China)

Abstract: Recombinant human-like collagen with a hexahistidine tail attached to the carboxyl end could be purified by Metal-chelated affinity adsorption. To choose the best adsorption conditions, the metal ion, equilibrate buffer, pH, ionic strength and the volume of sample were optimized by using the batch chromatography. The results were that Cu²⁺ as the metal ion, 20mM Na-phosphate buffer pH 7.5 containing 0.75M NaCl as the equilibrate buffer and 1.6ml sample per millilitre matrix.

Key words: Metal-chelated affinity; Recombinant human-like collagen; Adsorption condition

金属螯合亲和吸附是利用蛋白质分子表面的组氨酸咪唑基、半胱氨酸巯基和色氨酸吲哚环能与铜、锌、镍等离子间形成稳定的螯合而对蛋白质加以分离的。该技术具有简便、快速、专一和高效等特点, 已应用于生命科学的各个领域^[1]。目前国内所采用的胶原蛋白制备方法多为动物组织提取或人胎盘中提取^[2]。本实验室用基因工程技术对人源性胶原水溶性、免疫排异性、稳定性等特性进行了改进, 并在羧基端加了6个组氨酸, 之后重组并转化于大肠杆菌内, 该基因工程菌经高密度发酵后应用金属螯合亲和技术纯化。本研究主要采用分批式操作对金属螯合亲和过程中的吸附条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 所用试剂均为国产分析纯。超声破碎仪 (JY98-III 宁波新芝仪器研究所)、超滤系统 (美国 Pall 公司)、亲和层析柱 (1.2×12cm)。

1.1.2 实验材料 基因工程菌 E. coli BL21 3.7 his, 质粒 pRC-NWCP (卡那抗性, 温度诱导) 由本实验室构建并保存。该工程菌经高密度发酵后 5000r·min⁻¹ 离心 30min 收集菌体。

1.2 方法

1.2.1 类人胶原蛋白的分离 以质液比 1:6 将菌体悬浮于细胞破碎缓冲液 (1mmol·L⁻¹ EDTA、5mmol·L⁻¹ Tris), 用超声破碎仪 (1500w) 间断超声 10 次 (每次 90 秒)。破碎液于 4℃、5000 r·min⁻¹

离心 1h, 收集上清液。上清液用硫酸铵分级沉淀, 收取 15% ~ 65% 饱和度的蛋白沉淀溶于 20mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0) 的缓冲液, 用截留分子量为 30ku 的超滤膜包脱盐、浓缩。

1.2.2 金属螯合亲和和吸附

1.2.2.1 螯合离子的选择 在五份各 10mL 已偶联了亚氨基二乙酸 (IDA) 的介质中各分次加入 50mL 50mmol·L⁻¹ 的 ZnCl₂、CuSO₄、CoCl₂、CaCl₂、NiSO₄ 溶液螯合 1h, 均加入 pH7.0 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液平衡, 将已超滤的样品上样, 取上清测定总蛋白浓度和胶原蛋白的浓度。

1.2.2.2 平衡缓冲体系及 pH 的确定 在各 10mL 螯合了金属离子的介质中分别加入 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 100mL 平衡, 将已超滤的样品上样, 取上清测定总蛋白浓度和胶原蛋白的浓度。

1.2.2.3 平衡体系离子强度的确定 在各 10mL 螯合了金属离子的介质中分别加入 NaCl 浓度为 0、0.25、0.5、0.75、1.0 mol·L⁻¹ 的平衡缓冲液平衡, 将已超滤的样品上样, 取上清测定总蛋白浓度和胶原蛋白的浓度。

1.2.2.4 上样量的确定 在各 10mL 螯合了金属离子且用平衡缓冲液平衡好的介质中将样品各加入 5、10、15、20mL 吸附, 取上清测定总蛋白浓度和胶原蛋白的浓度。

1.2.3 鉴定方法 总蛋白定量采用 Bradford 法^[3];