

麦胚凝集素红细胞凝集活性检测方法的改进

单 良, 姚惠源

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 对红细胞进行蛋白酶处理、戊二醛固定, 采用 pH 7.2 等渗磷酸盐作为缓冲液, 用光径 0.5 cm 比色池测定凝集活性, 读取测定终点的时间以 2 h 为宜. 建立的检测方法简单易行, 得出的结果具有良好的灵敏度及重现性.

关键词: 麦胚凝集素; 红细胞凝集活性; 检测方法

中图分类号: R 446

文献标识码: A

An Improved Protocol for Determination of Hemagglutinating Activity of Wheat Germ Agglutinin

SHAN Liang, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The procedure for determination of hemagglutination activity (HA) of wheat germ agglutinin (WGA) was improved. Major improvements include: 1). the self sedimentation of erythrocytes was deducted in the definition and calculation of HA; 2). erythrocytes were sensitized with trypsin and fixed with glutaraldehyde prior to HA tests; 3). pH 7.2 isotonic phosphate buffered saline was used as the working liquid; 4). UV absorption of erythrocyte suspensions was taken using 0.5 cm path-length cells; and 5). appropriate end-point was determined as 2 hours after adding WGA into the suspension. The protocol thus derived was proved to be convenient, capable of having good sensitivity and reproducibility.

Key words: wheat germ agglutinin (WGA); hemagglutinating activity (HA); determination

麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)是具有结合甲壳素功能的凝集素家族(Gramineae)中的一员, 与其它家族相比, 这类凝集素的独特性在于其分子内部的四重折叠结构具有多个结合位点. WGA 以 3 种变体(同功凝集素)的形式存在, 三者都是 36 000 的二聚体, 由 2 个相同的具有 171 个残基的多肽链缔合而成, 每条多肽链包含 4 个重复的 42~43 个残基的橡胶蛋白型结构域. 这些结构域以相似的方式折叠而成, 并由相对位置相同的 4

个二硫键稳定其结构, 这些结构域依次排列, 以“头对尾”的方式形成二聚体, 形成广泛的单体/单体界面. 这种界面容纳接触亚基之间 8 个独立的糖结合位点(4 个异常位点), 其特点是具有一簇 2~3 个芳香氨基酸^[1, 2]. 凝集素与复合多糖的特异性相互作用参与噬菌作用、细胞内吞作用、细胞内运送、信号转换、细胞-细胞识别、发炎过程、细胞基质粘着、调理作用、细胞生长控制、细胞调节和分化、细胞运送以及肿瘤细胞转移等^[5].

收稿日期: 2003-05-13; 修回日期: 2003-09-11.

作者简介: 单良(1969-), 男, 山东新泰人, 食品科学与工程博士研究生.
万方数据

WGA 具有特定的细胞凝集活性,其活性可以利用天然的、酶处理的、戊二醛固定的人、兔、绵羊红细胞,或者(KB)细胞、成纤维细胞配制成一定浓度的悬液,将 1 mg/mL 的 WGA 溶液进行系列 2 倍稀释,然后向其中加入等量的细胞悬液,在一定条件下静置一定时间后,利用肉眼观测、比色等方法进行判定.在建立标准的红细胞凝集-红细胞抑制实验方法时,有 2 个方面值得注意:首先,在诊断学中,病毒的红细胞凝集-红细胞凝集抑制实验必须尽可能敏感可靠;其次,需要有一个标准化的操作过程,不同实验室测定时可作为参照^[4].现有的 WGA 红细胞凝集活性检测方法主要存在以下问题:(1)是配制标准细胞悬液方法不一,重现性差,而且许多方法要求用新鲜血液当天配制红细胞悬液;(2)确定读取终点时间的随意性较大;(3)测定方法繁多,测定结果难以进行比较.对于上述问题的解决,将有助于改善测定方法的适用性、测定结果的灵敏度和重现性.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

WGA 标准品:Sigma 公司产品,批号 L-9640;测试样品 WGA:作者自行纯化,在 SDS-PAGE 上显示单带;人全血 A 型;Rh(-),购自无锡市红十字中心血站;胰蛋白酶:PTN6.0S 无盐型,Novozymes 公司上海代表处提供;戊二醛 25% 水溶液:上海生化试剂公司产品.

冷冻离心机:20PR-52D 型,日本 Hitachi Koki Co. Ltd. 产品;UV-1100 紫外-可见分光光度计:北京瑞利分析仪器公司产品.

1.2 实验方法

1.2.1 标准红细胞悬液的配制 红细胞的分离:采用参考文献^[5]方法分离;红细胞的胰蛋白酶处理:Vretblad 方法^[6];红细胞的戊二醛固定及贮藏悬液的配制:采用 Vretblad 和 Turner 和 Liener 方法^[7];标准红细胞悬液的配制:采用 Turner 和 Liener 方法.在上述步骤中,溶液均采用 pH 7.2 等渗磷酸盐缓冲液^[5](等渗 PBS),超过 24 h 需重新配.

1.2.2 标准红细胞悬液标准曲线的制作 采用 Turner 和 Liener 方法.

1.2.3 红细胞在悬液中沉降监测 将购自 WGA 标准品用等渗 PBS 配制成 1 mg/mL 溶液,然后进行系列 2 倍稀释.将洗涤后的天然红细胞(nRBC)和经过敏化、固定化处理的红细胞(tRBC)分别按照 1.2.1 和 1.2.2 配制标准悬液并制作对应的标准

曲线.取不同稀释倍数的 WGA 溶液和标准红细胞悬液各 1 mL,先后装入 0.5 cm×8 cm 的试管,盖紧橡皮塞后立即上下颠倒 3 次,随即装入光径 0.5 cm 比色池,在分光光度计上对其 A_{620} 进行时间扫描.根据读取的 A_{620} 可以从对应的标准曲线上换算得到留在悬液中红细胞的百分数.

1.2.4 WGA 红细胞凝集活性的测定 将 WGA 配制成 1 mg/mL 溶液,然后进行系列 2 倍($2^1 \sim 2^{14}$ 倍)稀释后依次进行如下操作:吸取上述溶液各 1 mL 分别装入 15 支 0.5 cm×8 cm 的试管,再分别取 1 mL 标准红细胞悬液加入每支试管,用橡皮塞盖紧后立即上下颠倒 3 次,随即装入光径 0.5 cm 比色池并静置一段时间,尽量减小摇动将每支试管放入分光光度计测定 A_{620} .再将上述操作中的 WGA 溶液换成等渗 PBS,平行测定红细胞的自沉降数值(对照悬液),计算 WGA 红细胞凝集活性,同时采用 Liener^[8]法进行测定并对结果进行比较.

2 结果与讨论

2.1 标准红细胞悬液吸收标准曲线

标准红细胞悬液在 620 nm 处吸收测定结果见图 1.由图 1 可见, A_{620} 与悬液中红细胞数量百分数之间呈现显著的线性关系.因此,可以直接利用 A_{620} 数值表示处于悬浮状态红细胞的相对数量.

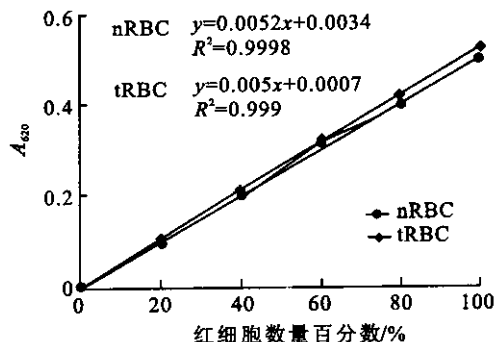


图 1 吸光度与悬浮红细胞百分数关系标准曲线

Fig. 1 Standard curve relating the absorbance to the percentage of cells in suspension

2.2 红细胞的沉降过程

WGA 的质量浓度越高,引起 nRBC 或 tRBC 在悬液中的沉降速度越快(见图 2,3).在前 2 h 内,加入不同质量浓度 WGA 的 nRBC 悬液比对照悬液的沉降速度快;而在后 2 h 内,含有较高质量浓度 WGA 的 nRBC 悬液比对照悬液的沉降速度快,但是含有较低质量浓度 WGA 的 nRBC 悬液反而比对照悬液的沉降速度慢(见图 2).在全部扫描时间和测试的 WGA 溶液稀释倍数范围内,加入不同质量浓度 WGA 的 tRBC 悬液均比对照悬液的沉降速度

快(见图 3)。估计如果进一步增大 WGA 溶液的稀释倍数,则可能出现与 nRBC 悬液相似的沉降行为,即在后 2 h 内,含有较低质量浓度 WGA 的 tRBC 悬液反而会比对照悬液的沉降速度慢。其主要原因可能是在加入 WGA 溶液的初期,混合液中的 WGA 优先使容易沉降的红细胞发生沉降,这些红

细胞可能具有较大的比重和较多的膜上受体;但是到了后期,悬液中剩余的主要是相对不易沉降的红细胞,而且悬液中可供结合的 WGA 质量浓度也降低,而对照悬液在此期间剩余的相对容易沉降的红细胞数目更多,以致其沉降速度反而超过加入 WGA 的红细胞悬液。

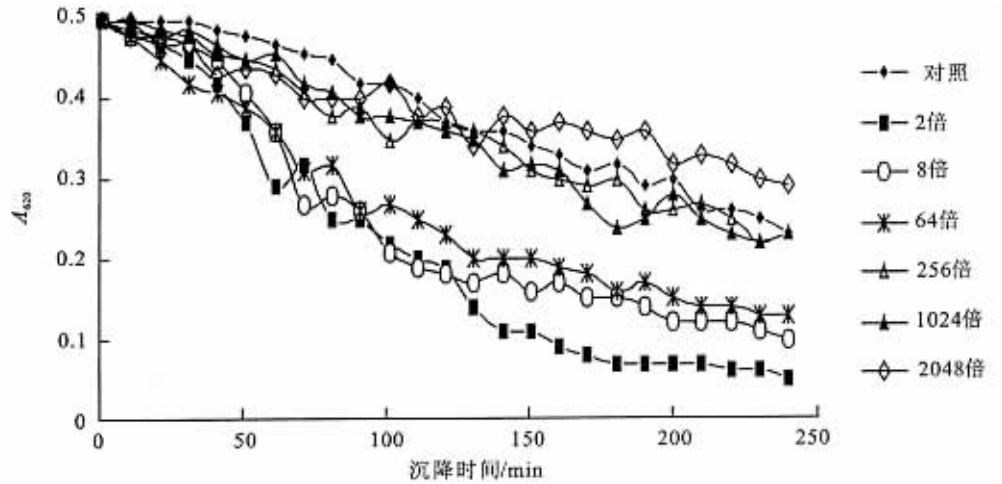


图 2 含有不同质量浓度 WGA 的新鲜 nRBC 沉降过程

Fig. 2 Sedimentation process of fresh nRBC suspensions at different WGA concentrations

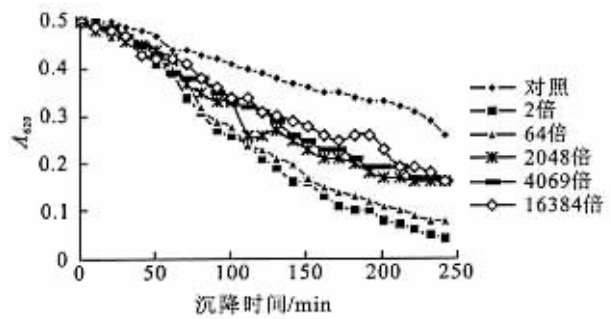


图 3 含有不同质量浓度 WGA 的新鲜 tRBC 悬液的沉降曲线

Fig. 3 Sedimentation process of fresh RBC suspension at different WGA concentrations

对于同一批次的自制 WGA,测得其对于冷藏 1 个月的 tRBC 的凝集活性降低见图 4,这可能是由于 tRBC 在存放过程中发生一定程度的溶血现象,导致细胞内含物的渗出,以及细胞膜上受体的状态、数量、分布变化引起的。

利用 UV-1100 紫外-可见分光光度计的图谱对比与计算功能,可以作出对照悬液和加入不同质量浓度 WGA 的标准红细胞悬液的 A_{620} 差值随时间的变化曲线。这种曲线反映扣除红细胞自沉降之后 WGA 引起的沉降情况。读取的 2 种标准红细胞悬液对应的上述差值(数据略)在前 2 h 内逐渐升高,在后 2 h 内则变化较小,而且波动较大。这一规律与不扣除红细胞自沉降时 A_{620} 的变化规律相吻合,推测其原因也应该相近。

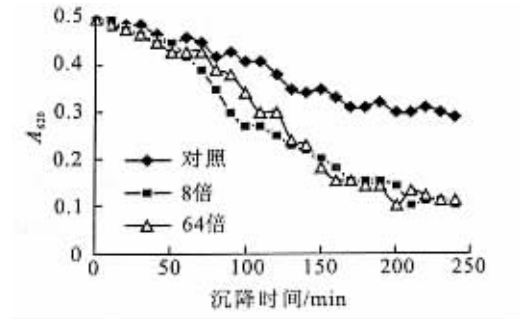


图 4 含有不同质量浓度 WGA 冷藏 1 月的 tRBC 悬液的沉降曲线

Fig. 4 Sedimentation process of 1-month-old tRBC suspension at different WGA concentrations

观察 WGA 与标准红细胞悬液混合均匀静置开始 2 h 处,可以发现以下 2 点:(1) 不加 WGA 的 2 种标准红细胞悬液 A_{620} 降低幅度小于 25%(均约为 23%);(2) 扣除红细胞自沉降之后的 WGA 引起的沉降达到最大值。因此,选择静置时间 2 h 进行测定。

2.3 红细胞凝集活性的测定和计算

考虑到对照悬液中红细胞的自沉降,在加入 WGA 的情况下虽然有可能被加速,但是其自沉降特性的贡献可能更大。所以在实验确定的测定方法中,1 个红细胞凝集活力单位(U)的定义公式为,在沉降开始 2 h 处的 WGA 质量浓度(mg/mL),该质量浓度引起(扣除红细胞自沉降之后)的沉降增加值达到不加 WGA 的标准红细胞悬液 A_{620} 的 50%,即在沉降开始 2 h 处满足下式的 WGA 质量浓度:

$$\frac{A_{\text{ctrl}} - A_{+}}{A_{\text{ctrl}}} = 50\%$$

(1)

式中, A_+ 指 2 h 处含有 WGA 的悬液吸收值, A_{ctrl} 为对照悬液的吸光度.

由式(1) 可得出满足要求的悬液吸光度:

$$A_+ = 0.5 \times A_{\text{ctrl}} \tag{2}$$

应用 Hirst-Pickels 公式^[8], 可以计算出满足式(2) 要求的 WGA 受试溶液的稀释倍数 n :

$$\begin{aligned} \lg n &= \lg n_A + \frac{A_+ - A_A}{A_B - A_A} \times \lg 2 \\ &= \lg A + \frac{0.5 \times A_{\text{ctrl}} - A_A}{A_B - A_A} \times \lg 2 \end{aligned} \tag{3}$$

式中, n_A 为管 A 的稀释倍数, A 为吸光度数值低于但最接近 $0.5 \times A_{\text{ctrl}}$ 的试管; A_A 为管 A 的吸光度; A_B 为管 B 的吸光度, 管 B 为吸光度数值高于但是最接近 $0.5 \times A_{\text{ctrl}}$ 的试管.

根据式(3) 求出 n 的数值之后, 将 n 取倒数即为 1 U 的数值:

$$1 \text{ U} = \frac{1}{n} \tag{4}$$

采用 Sigma 公司 WGA 标准品作为外标, 测定 1 U 对应的质量浓度, 根据以下公式即可计算受试 WGA 的校正 U 数值:

$$U_t = \frac{U_s \times U_{to}}{U_{so}} \tag{5}$$

式中, U_t 为受试 WGA 换算成初次测定外标 WGA 条件下的红细胞凝集活力数值; U_s 为初次测定外标 WGA 的红细胞凝集活力数值; U_{to} 和 U_{so} 分别为受试 WGA 和外标 WGA 在随后某次测量中得到的数值.

Liener 采用天然红细胞作为效应细胞, 他给出的红细胞凝集活力单位(U) 的定义为: 在 2.5 h 内引起标准红细胞悬液 50% 沉降的受试溶液水平(质量浓度), 他计算 n 的 Hirst-Pickels 公式为

$$\lg n = \lg n_A + \frac{A_{50} - A_A}{A_B - A_A} \times \lg 2$$

表 1 用 nRBC 测定的自制 WGA 红细胞凝集活力

Tab. 1 HA determination of self-prepared WGA using nRBC suspensions

测定法			凝集素数值			
			第 1 批		第 2 批	
			冷藏当日	冷藏 7 d 后	冷藏当日	冷藏 7 d 后
Liener 法	测定	外标	183±11	169±12	194±10	174±12
		自制	136±9	131±10	147±7	140±9
	校正		143	149	145	154
实验法	测定	外标	90±4	94±4	103±6	101±5
		自制	63±6	61±4	69±6	66±5
	校正		69	64	66	64

注: 以 5 次测定平均数值±标准方差表示.

$$= \lg n_A + \frac{0.25 - A_A}{A_B - R_A} \times \lg 2 \tag{6}$$

式中, n 为满足 Liener(1955) 定义的 WGA 溶液稀释倍数; A_{50} 是从标准曲线得到的相当于标准红细胞悬液 50% 的吸光度; A 为管 A 的稀释倍数, 管 A 为吸光度数值低于但最接近 A_{50} 的试管; A_A 为管 A 的吸光度; A_B 为管 B 的吸光度, 管 B 为吸光度数值高于但最接近 A_{50} 的试管. 采用的工作溶液是 0.9% 盐水. 迄今为止, Liener 法是一种广为采用而且效果较好的测定方法. 作者采用他给出的测定规程对 WGA 的红细胞凝集活性进行平行测定, 以进行比较. Liener 法使用试管进行测定, 考虑到试管的制造均一性不好以及光散射可能带来的误差, 测定过程中改用光径 0.5 cm 比色池代替, 参照标准改用 Sigma 公司的 WGA 标准品.

2.4 测定结果的灵敏度和精确度

对于自行提取的同一批次的 WGA, 使用 2 个批次的 A 型人红细胞, 在采血当日进行处理, 在不同冷藏时间后分别用 nRBC 和 tRBC 测定 WGA 的红细胞凝集活力数值, 对测定方法的灵敏度和精密度进行检验, 测定结果分别见表 1~3. 与 Liener 法相比, 实验确定的测定方法给出的凝集活力绝对数值较低, 这是由于定义读取终点吸收值的时间较短, 以及扣除红细胞自沉降的贡献所引起的(见表 1, 2). 在采用 tRBC 替代 nRBC 测定 WGA 凝集活力的情况下, Liener 法和此实验法均能大幅度提高测定结果的灵敏度, 其中前法的提高幅度更高, 但是, 前法测定结果的相对误差也较高(见表 3). 本实验法所提供的灵敏度可以满足测定分析的灵敏度要求, 而且相对误差更低, 可以作为麦胚凝集素红细胞凝集活性测定的规程. 而且, 天然状态的红细胞悬液只能存放 14 d, 而采用本实验法处理的红细胞悬液冷藏期达 150 d 之久, 仍能给出较为理想的测定结果, 为研究人员提供了极大的便利.

表 2 用 tRBC 测定的自制 WGA 红细胞凝集活力

Tab.2 HA determination of self-prepared WGA using tRBC suspensions

测定法			凝集素数值					
			第 1 批			第 2 批		
			冷藏当日	冷藏 30 d	冷藏 150 d	冷藏当日	冷藏 30 d	冷藏 150 d
Liener 法	测定	外标	5693±189	3860±138	3967±138	6239±224	4206±202	4025±230
		自制	3240±54	2451±45	2591±45	3559±82	2691±73	2089±87
	校正		3482	3885	3997	3491	3915	3176
实验法	测定	外标	644±23	447±31	479±19	711±30	512±21	487±13
		自制	601±27	440±14	464±14	665±16	497±22	468±14
	校正		651	686	675	652	677	670

注:以 5 次测得 $\bar{x}$ 平均数值±标准方差表示.

表 3 用 tRBC 和 nRBC 测定的自制 WGA 红细胞凝集活力比较

Tab.3 Sensitivity and accuracy comparison of HA determination results of self-prepared WGA using nRBC and tRBC as effector cells

测定方法	灵敏度 ^a	精密度 ^b
Liener 法	24.95	0.33
实验法	10.12	1.45

注:a. 用 tRBC 和 nRBC 测定并且经过校正的外标 x 数值平均值的比值表示;b. 用 nRBC 和 tRBC 测定并且经过校正的外标 x 数值相对误差的比值表示.

3 结 论

对于红细胞进行蛋白酶处理、戊二醛固定,可

以提高红细胞的感受性和稳定性,从而增加检测的灵敏度和重复性;采用 pH 7.2 等渗磷酸盐作为缓冲液,可以控制红细胞的溶血;测定过程中改用光径 0.5 cm 比色池代替 Liener 法采用的试管,以避免后者均一性差异以及光散射可能带来的误差;更具科学性地确定读取测定终点的时间为 2 h,扣除红细胞自身的沉降,引入外标对于测定结果进行校正. 以上改进措施显著地提高了测定结果的灵敏度和精密度. 据此建立的测定标准操作过程具有灵敏、可靠、简单易行的特点,同时也避免了使用天然红细胞测定时由于保存期较短而频繁需要重新配制的问题.

参考文献:

[1] Spinosa J F, Asensio J L, García J L, *et al.* NMR investigations of protein-carbohydrate interactions binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacyetylchitotriose[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2000, 267: 3965—3978.

[2] Wright C S, Kellogg G E. Differences in hydropathic properties of ligand binding at four independent sites in wheat germ agglutinin-oligosaccharide crystal complexes[J]. **Protein Science**, 1996, 5: 1466—1476.

[3] Monsigny M, Mayer R, Roche A C. Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity[J]. **Carbohydrate Letters**, 2001, 4(1): 35—52.

[4] Hierholzer J C, Suggs M T. Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests[J]. **Applied Microbiology**, 1969, 18(5): 816—823.

[5] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,1997. 11—13.

[6] Vretblad P. Purification of lectins by biospecific affinity chromatography[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1976, 434: 169—176.

[7] Turner R H, Liener I E. The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins [J]. **Analytical Biochemistry**, 1975,68: 651—653.

[8] Liener I E. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1955, (54): 223—231.

(责任编辑:杨 萌)