

# 人及兔醛化红细胞的制备和应用

吴叶, 王昌梅, 张丽芬, 魏池泉, 杨明洁, 张田, 王敏康\* (云南师范大学生命科学学院, 云南昆明650092)

**摘要** [目的] 用4种血型的人醛化红细胞测定植物凝集素(PHA)的活性,并用标准抗血清对血型进行复查。同时初步探讨兔醛化红细胞对植物凝集素(PHA)凝集活性的测定效果。[方法] 将新鲜的人A、B、O、AB型血以及兔血进行红细胞的提取并醛化,然后用抗A和抗B血清测定醛化后的人红细胞的血型,并用醛化的人的4种血型的红细胞悬液以及兔的醛化红细胞悬液对植物凝集素进行效价的测定。[结果] 醛化后的人的4种血型的红细胞仍保持原血型不变,并且可以与植物凝集素发生凝集反应,结果与用新鲜血浆测定的效价一致。用兔醛化红细胞悬液也测定出同样的植物凝集素效价,且灵敏度与用人的醛化红细胞悬液测定相同。[结论] 醛化的人的4种血型的红细胞以及兔醛化红细胞不仅未改变其表面的抗原,而且均可用于对植物凝集素的效价测定,同时具有保存时间长的优点。从降低成本的角度考虑,也可采用兔的醛化红细胞血液对植物凝集素进行效价测定。

**关键词** 人醛化红细胞;兔醛化红细胞;血凝反应;血型测定;白芸豆凝集素

中图分类号 S829.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-0885-02

## Preparation and Application of the Aldehydated Erythrocytes Collected from Human and Rabbit

WU Ye et al (Yunnan Normal University, College of Life Science, Kunming, Yunnan 650092)

**Abstract** [Objective] Phytohemagglutinin (PHA) activity was estimated by the four types of human fresh blood erythrocytes and then the blood type was reviewed by the standard anti-serum. Meanwhile, same experiment was carried out in both fresh and aldehydated blood erythrocytes of rabbit. [Methods] Fresh human and rabbit erythrocytes were isolated and aldehydated, then the anti-A serum and anti-B serum were used to estimate the blood type before and after human erythrocytes were aldehydated. Then they were used to estimate the PHA activity. [Results] The four types of human aldehydated blood erythrocytes maintained with the same type as fresh blood. Same results can be obtained from both fresh and aldehydated rabbit erythrocytes. The estimated sensitivity to phytohemagglutinin (PHA) activity was same between human and rabbit fresh and aldehydated erythrocytes. [Conclusion] The four blood types of human and rabbit aldehydated erythrocytes did not change their surface antigens, and they also can be used to estimate the activity of PHA. The aldehydated erythrocytes can be kept for much longer time than fresh blood and very easy to use at any time. With the lower cost, the rabbit aldehydated erythrocytes can be used to substitute the human blood for the estimation of the PHA activity.

**Key words** Aldehydated human erythrocyte; Aldehydated rabbit erythrocyte; Hemagglutination test; Determination of blood type; Phytohemagglutinin (PHA)

长期以来,对于红细胞的保存一直是个难题,而经过醛化的红细胞不仅能够保持细胞骨架的完整性,增加细胞膜的硬度,使细胞不易破碎,同时还增加了红细胞的血凝活性<sup>[1]</sup>。

凝集素是一类具有至少1个非催化结构域,能与糖类专一结合并具有细胞凝集活性的蛋白质,与糖结合时不需要糖分子的还原碳原子,并具有游离的羟基。凝集素广泛存在于生物界,其中豆科植物种子的含量尤为丰富<sup>[2-4]</sup>。由于凝集素能与糖专一性结合,这样就赋予了凝集素许多的生物学作用。例如,凝集素可以凝集红细胞,刺激淋巴细胞的有丝分裂,而且还具有类似胰岛素样的作用。另外少数凝集素还具有血型专一性的特点,使其可以用于鉴别血型等,是血清学和免疫学研究的有效工具<sup>[5]</sup>。

在对植物凝集素效价测定上,一直以来采用的都是人的新鲜血浆或者是人的新鲜红细胞悬液,这不仅造价高,取血不方便,而且保存时间也很短。而醛化的红细胞不仅溶血率低,保存条件简单,而且耐渗透能力增强。在此,笔者比较了人的新鲜红细胞悬液及人的醛化红细胞对标准抗A及抗B血清的反应,并比较、观察了醛化与否的人及兔红细胞用于植物凝集素凝集活性的测定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 血浆。**人的新鲜血浆由云南省中心血站献血中心提供,其中含有EDTA·Na作为抗凝剂;兔的新鲜血浆由云南师范大学生命科学学院实验室采集,血浆与3%柠檬酸钠抗凝

剂按1:2混合。

**1.1.2 试剂。**戊二醛溶液,0.85%医用氯化钠(注射液),柠檬酸钠。

**1.1.3 保存液。**pH 7.1的PBS溶液。

**1.1.4 实验仪器设备。**离心机,倒置显微镜。

### 1.2 方 法

**1.2.1 红细胞的制备。**参照王兰芝等的方法进行<sup>[7]</sup>,并略作改变。

**1.2.2 红细胞的固定。**将上述10%的人和兔的红细胞悬液以1500 r/min离心10 min,去上清,重复3次。然后用pH 7.1的PBS稀释红细胞至血细胞的比容为0.05。

**1.2.3 红细胞的醛化。**用上述0.05比容的人和兔的红细胞4体积加入1体积2.5%戊二醛溶液醛化红细胞,室温下振荡45 min后将醛化红细胞用0.85%生理盐水洗涤<sup>[7]</sup>,3000 r/min离心5 min,共4次。最后用保存液pH 7.1的PBS配成2%的人的醛化红细胞悬液和1%的兔的醛化红细胞悬液,4℃保存备用。

**1.3 血型测定试验** 取人的4种血型的醛化红细胞50 μl各2份滴在玻璃凹板上,然后再分别滴加抗A和抗B血清,并轻摇使其混匀,5 min后观察是否有凝集反应,从而进行血型鉴定。

**1.4 植物凝集素效价的测定** 首先将提取的云南白芸豆的凝集素粗提物制备成1 ng/ml悬液(按Sigma公司的标准),并以1 ng/ml为起始浓度,记为,再在试管中作倍比稀释:1/2, 1/4, 1/8, ..., 1/256。即1/2梯度就是从 中取出1 ml原液,并向其中加入1 ml 0.85%生理盐水,而1/4梯度就是从1/2梯度中取出1 ml,再向其中加入1 ml 0.85%生理盐水,依此类推,直到1/256梯度。然后从各种梯度的凝集素中取出

**基金项目** 国家自然科学基金资助(30560056);云南省中青年学术技术带头人后备人才培养计划(2005PY01);云南省教育厅科研基金资助(5Z0239B)。

**作者简介** 吴叶(1983-),女,云南曲靖人,硕士研究生,研究方向:生殖医学。\*通讯作者, E-mail: wangmk1998@163.com。

**收稿日期** 2008-04-14

50  $\mu$ l, 与人的4种血型的2%醛化红细胞悬液以及兔的1%醛化红细胞悬液各50  $\mu$ l 分别混匀, 静置30 min, 检查各孔的凝集情况。对照组为分别加入同等体积的0.85%的生理盐水到2%人醛化红细胞悬液中及1%兔醛化红细胞悬液中。把稀释液能够与人及兔的新鲜及醛化红细胞发生凝集时的凝集素最大稀释度的倒数作为凝集素的最高效价。

**1.5 凝集程度** 按以下标准记录: 液体澄清透明, 醛化红细胞全部凝集于血板底, 轻摇可见大的凝块, 为高度凝集(++) ; 液体稍浑浊, 液体中有明显的凝集物, 凝集块较小, 为中度凝集(+); 液体浑浊, 仔细观察可看到液体中有很小的凝集块, 为轻度凝集(+); 液体与对照组相似, 血细胞的分布较为均匀, 为不凝集(-) [8]。

## 2 结果与分析

**2.1 血型反应测试** 人的4种血型醛化红细胞悬液与抗A和抗B血清各滴1滴于玻璃凹孔板上(各为50  $\mu$ l), 室温下静置30 min 以上, 用体视镜或倒置显微镜观察凝集现象, 观察结果如表1所示。

表1 人的4种血型醛化红细胞悬液与抗A和抗B血清的反应情况

Table 1 Four types of human d dehydrated erythrocytes suspensions reacted with anti- A and anti- B serums

| 血型Bloodtype  | 抗A血清          | 抗B血清          |
|--|---------------|---------------|
|  | Anti- Aserums | Anti- Bserums |
| 醛化A型细胞悬液<br>Cell suspension of aldehydated Atype   | +             | -             |
| 醛化B型细胞悬液<br>Cell suspension of aldehydated Btype   | -             | +             |
| 醛化O型细胞悬液<br>Cell suspension of aldehydated Otype   | -             | -             |
| 醛化AB型细胞悬液<br>Cell suspension of aldehydated ABtype | +             | +             |

注: “+”表示出现红细胞凝集块, “-”表示红细胞与抗血清溶合。

Note : + stands for red cell clump ; - stands for solvation of red cell and anti-serum.

**2.2 植物凝集素的血凝反应** 白芸豆凝集素PHA 均能凝集人的4种血型的醛化红细胞, 无血型特异性关系。对于兔醛化红细胞也可凝集。白芸豆凝集素的效价测定结果见表2。

表2 白芸豆凝集素的效价测定结果

Table 2 Measured results of the agglutination activity from phytohemagglutin

|   | 白芸豆凝集素PHA 浓度梯度Concentration gradient of PHA |     |     |      |      |      |       |       |
|---|---|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
|   | 1/2   | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/256 |
| 醛化红细胞<br>Aldehydated red cell             |   |     |     |      |      |      |       |       |
| 醛化A型红细胞<br>Aldehydated Atype cell         | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 醛化B型红细胞<br>Aldehydated Btype cell         | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 醛化O型红细胞<br>Aldehydated Otype cell         | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 醛化AB型红细胞<br>Aldehydated ABtype cell       | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 兔醛化红细胞<br>Aldehydated rabbit erythrocytes | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 人新鲜血浆<br>Human fresh plasma               | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |
| 兔新鲜血浆<br>Rabbit fresh plasma              | +++   | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | ++    | +     |

注: “+++”高度凝集, “++”中度凝集, “+”轻度凝集, “-”不凝集 [9]。

Nte : + + + . Hgh agglutination; + + . Middle agglutination; + . Mild agglutination; - . No agglutination.

## 3 结论与讨论

用抗A和抗B血清来鉴定血型, 是目前最常用的血型鉴定方法, 原理是血清中的抗体与人的新鲜血浆中的红细胞表面的抗原发生反应, 但是由于新鲜的红细胞保存时间较短, 很快会发生溶血, 所以不利于对血型进行复查, 而醛化红细胞就可以克服以上缺点, 因为醛化的人的4种血型的红细胞未改变其表面抗原。

植物凝集素最早的临床运用就是用来区别人的不同血型红细胞的, 后来特殊的单克隆抗体就取代了植物凝集素。现在使用醛化红细胞就可以克服以上的缺点, 更好地将醛化红细胞推广至临床运用, 主要原因是醛化红细胞不仅固定红细胞膜上的抗原, 而且使红细胞的耐渗透压能力增加, 溶血率降低, 同时保存条件简单, 只需放在4℃下冷藏保存备用, 而不会破裂、溶血。笔者在实验室条件下保存至10个月, 一天中连续不断地振荡多次, 使醛化红细胞与PBS液混匀成醛

化红细胞悬液, 也不会使醛化红细胞发生溶血和破裂, 更不会影响PHA效价测定的结果。有报道认为, 醛化后的红细胞在4℃下可保存7年 [9]。

经过2.5%的戊二醛醛化后的红细胞, 笔者用生理盐水洗涤时, 3 000 r/min 离心5 min, 共4次, 而在之前的相关文献 [7] 报道的是洗涤6次, 但是该试验选用的是新鲜血浆, 如洗涤6次, 就会使之后的醛化红细胞保存时间缩短, 并导致溶血。同时, 笔者所制备的兔醛化红细胞悬液的浓度为1%, 主要是依据于相关文献中所采用的动物鸡和豚鼠的醛化红细胞悬液的浓度为1%。近来笔者在试验中发现采用0.5%的醛化红细胞浓度, 更容易从外观上观察到凝集反应现象。

该试验中因为凝集素的效价=1/最大稀释度, 所以白芸豆PHA的效价为256, 结果表明人的新鲜血浆及兔的新鲜血浆测定的效价都一样。

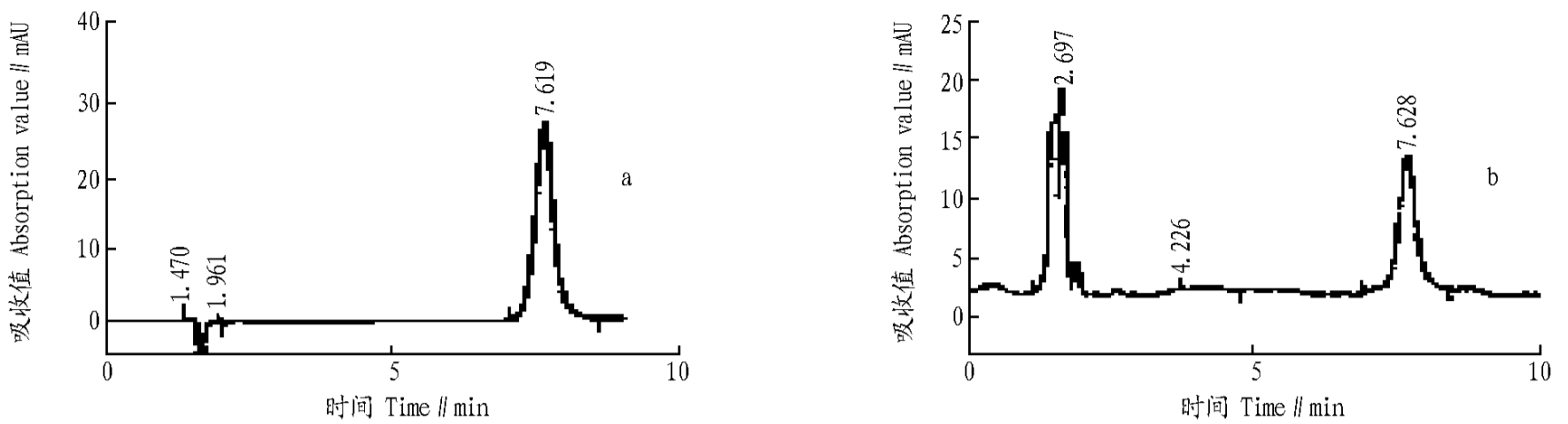


图1 标准品(a)及样品(b)的色谱

Fig.1 Chromatograms of standard (a) and sample (b)

表1 精密度试验结果(n=6)

Table 1 The results for precision test

| 样品<br>Samples | 过氧化苯甲酰含量 Benzoyl peroxide content ng/kg |      |      |      |      |      | 平均值<br>Mean | 相对标准偏差<br>Relative standard deviation |
|---------------|---|------|------|------|------|------|-------------|---------------------------------------|
|               | 1                                       | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |             |                                       |
| 1             | 46.9                                    | 46.5 | 47.6 | 46.3 | 46.1 | 45.3 | 46.4        | 1.7                                   |
| 2             | 32.1                                    | 32.7 | 31.6 | 32.2 | 32.5 | 31.9 | 32.2        | 1.2                                   |

表2 回收率测定结果

Table 2 The determination results of recovery

| 加入值<br>Addition value | 测得值 Determined value ng/kg |       |      |      |      |       | 平均值<br>Mean | 回收率<br>Recovery |
|-----------------------|----------------------------|-------|------|------|------|-------|-------------|-----------------|
|                       | 1                          | 2     | 3    | 4    | 5    | 6     |             |                 |
| 12.5                  | 12.3                       | 12.3  | 12.3 | 12.7 | 12.1 | 12.5  | 12.4        | 98.9            |
| 50.0                  | 51.6                       | 52.1  | 53.3 | 54.5 | 50.0 | 50.3  | 52.0        | 103.9           |
| 100.0                 | 101.7                      | 100.0 | 96.7 | 98.4 | 98.7 | 104.4 | 100.0       | 100.0           |

### 3 结论

将样品经乙醇溶解提取过氧化苯甲酰,用盐酸羟胺还原成苯甲酸后用高效液相色谱系统进行分离测定过氧化苯甲酰含量。试验结果表明,回收率在98.9%~103.9%,该方法的精密度、准确度和线性关系均较好,可以作为测定食品中

(上接第8886页)

该试验所用的植物凝集素(PHA)来源于云南大白芸豆,此种植物凝集素(PHA)对人的所有血型的红细胞都会发生相同程度的凝集反应<sup>[10]</sup>。试验结果表明,人的醛化红细胞和兔的醛化红细胞一样都会对PHA提取液产生凝集反应,而且测定结果与用人的醛化红细胞测定的结果一致。据报道,凝集素的凝集反应与其来源和处理方式有关。如人的红细胞就不被花生凝集素凝集,甚至其浓度高达1 ng/ml时也不发生凝集,而对唾液酸处理过的红细胞则发生凝集<sup>[11]</sup>。

该试验结果表明,运用人和兔的醛化红细胞测定PHA的效价,不仅没有影响其效价的大小,而且还可以在低倍显微镜下明显观察其凝集现象,不仅未改变其表面的抗原,而且均可用于准确地测定植物凝集素的效价。由于其保存时间长,且保存条件简单,溶血率低,因此可考虑用人的醛化红细胞替代人的新鲜血浆,同时由于醛化红细胞可保存较新鲜红细胞更长的时间,并且保存条件简单,溶血率低,这样可以解决取血不方便,做到随用随取,有利于降低成本。因此,醛化的人的红细胞不仅可以取代新鲜的红细胞进行血凝反

过氧化苯甲酰的有效方法。

### 参考文献

- [1] 食品卫生国家标准汇编.中国预防医学科学院标准处.GB2760-1996[S].北京:中国标准出版社,1999.
- [2] 王竹天,宋凤英,王永芳.面粉中过氧化苯甲酰含量的测定方法[J].中国食品卫生杂志,1995,7(2):25-26.

应,而且醛化的人及兔的红细胞完全可以代替新鲜的红细胞进行血型的测定和植物凝集素效价的测定。这样,醛化红细胞也为进一步鉴定红细胞表面的稀有抗原,制备更多的抗体奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 张再清.醛化红细胞在减蛋综合征的应用研究[J].甘肃畜牧兽医,2000(5):7-8.
- [2] 高燕会,李润植,毛雪,等.植物凝集素的防卫功能及其研究进展[J].世界农业,2000(2):33-35.
- [3] 孙册.凝集素M.北京:科学出版社,1986.
- [4] 王逸群.豆类植物凝集素及其对根瘤菌的识别作用[J].植物学通报,2000,17(2):127-132.
- [5] 江红,孙册.软体动物凝集素[J].生物化学,1996,16(5):28-31.
- [6] 王宇波,刘振华,裴增爱.对血凝试验用鸡红细胞保存条件的探讨[J].家禽科学,2005(8):16-17.
- [7] 王兰芝,范道旺,张考,等.醛化法制备试剂红细胞的方法与探讨[J].中级医刊,1998,33(11):38-40.
- [8] 于敏,袁萍萍,章莹莹.植物凝集素的部分生物学作用分析[J].安徽农业大学学报,2002,30(1):155-156.
- [9] 朱瑞良,张绍学.醛化鸡红细胞在EDS-76病毒HA和H<sub>1</sub>试验中的应用[J].中国畜禽传染病,1998,72(5):34-36.
- [10] 于敏,王志德,董志芳.植物凝集素(PHA)的提取及血凝效果研究[J].安徽技术师范学院学报,2002,16(1):23-25.
- [11] 杨远和.植物凝集素的主要生物学作用及应用[J].生物学杂志,1994,58(2):1-3.