

琼脂糖的制备、鉴定及应用

——对流免疫电泳检测肝炎相关抗原和甲胎蛋白灵敏度的观察

中国科学院上海生物化学研究所

东风生化试剂厂琼脂糖小组

上海第一医学院中山医院化验室

琼脂糖是由 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖相间结合的链状多糖,存在于多种海藻的琼脂胶质中,应不含硫和灰分,可作为电泳支持物和亲和层析载体。琼脂中另一主要组成成分是果胶,含硫和羧基。如琼脂糖中含有较多的果胶,作电泳支持物使用时,电渗较大;用于亲和层析,非特异性吸附蛋白质能力较强^[1],均影响分离效果。

1971年 S. Hjerten 曾将每克琼脂干粉以150毫升 pH6.8, 0.03 M 磷酸缓冲液抽提,每天更换一次缓冲液,共抽四天,可得到含硫量 0.25%的产物。进一步用 DEAE-Sephadex A-50 (每克中间产品用 0.5 克) 搅拌保温过夜,最后得到含硫量 0.04%的琼脂糖,但未定量测其对细胞色素 C 的吸附。

本文介绍以我国北方和南方出品的市售食用琼脂为原料,制备对细胞色素 C 吸附量较低(0.0—0.1%)的琼脂糖,并在制备和检定方法上作了一定的改进。初步观察了吸附细胞色素 C 量不同的琼脂糖对甲胎蛋白(AFP)定量测定及乙型肝炎表面抗原(HBSAg)和血清 AFP 对流免疫电泳检测灵敏度的影响。

一、材料与测定方法

1. 琼脂

青岛海洋渔业公司水产品加工厂生产的海燕牌条状食用琼脂和湛江第一人民食品厂生产

的食用条状琼脂。

2. 细胞色素 C

上海酵母厂出品的针剂溶液,经冷冻干燥后使用,含铁量 0.35%,280 毫微米光密度为 1.64 厘米²/毫克。

3. 二乙基氨基乙基纤维素(简称 DEAE-纤维素)

中国科学院上海有机化学研究所实验厂出品,交换量为 1.0 毫克当量/克(干)。

4. 大孔隙强碱型离子交换树脂

上海化工学院供给,16—56 目,交换量为 3.0 毫克当量/克。

5. 琼脂和琼脂糖吸附细胞色素 C 的测定

琼脂或琼脂糖按照 S. Bengtsson 和张先扬等人方法^[1,2]制成珠状(相似于 Sepharose 4B)取 60—120 目部分,一般每克琼脂糖可得到 15 毫升合格珠体。

由于琼脂糖不吸附细胞色素 C,产品纯度越高,洗脱出的细胞色素 C 浓度越低,不易测准,我们采取定量加入过量细胞色素 C 测定未被吸附的细胞色素 C 量。

细胞色素 C 吸附百分率

$$= \frac{\text{加入细胞色素 C} - \text{未吸附细胞色素 C}}{\text{珠体干重}} \times 100$$

在内径约 0.5 厘米层析柱中,标记其 1.5 毫升体积的柱高位置,装入琼脂糖珠体(可略高出标志 0.5 厘米)。以 pH 4.1, 0.01 M 醋酸铵缓

冲液平衡过夜。流出液在 280 毫微米光密度 ≤ 0.010 。调整柱内待测载体容积至标志处。准确加入一定体积的 0.25% 细胞色素 C (溶于 pH 4.1, 0.01M 醋酸铵缓冲液中), 流速为 4 毫升/小时, 至柱上下端均为细胞色素 C 饱和为止, 不够需补加。然后, 以 pH 4.1, 0.01M 醋酸铵缓冲液洗脱, 至流出液 280 毫微米光密度 ≤ 0.010 。合并全部洗出液, 于 280 毫微米测定细胞色素 C 的总量。

将柱中吸附细胞色素 C 的琼脂糖珠全部倒入 F_{73} 砂芯漏斗, 以 20—30 毫升 0.5 M NaOH 洗去吸附的细胞色素 C (这步不宜过长), 依次用水, 丙酮和乙醚泡洗 4—5 次, P_2O_5 真空干燥, 恒重后称得载体重量。

6. 结晶紫电泳

用 pH 8.6, 离子强度 0.02 巴比妥钠-醋酸-盐酸缓冲液配制 1% 琼脂或琼脂糖溶液, 铺于反面刻有长度标记的有机玻璃板 (2×10 厘米) 上。电位梯度 4—5 伏/厘米, 电泳 2 小时, 测定结晶紫由正极向负极移动速度 (厘米/小时)。

7. 火箭电泳测定 AFP

AFP 按 Laurell 法^[3] 测定蛋白, 1% 琼脂糖于离子强度 0.1, pH 8.6 巴比妥钠-盐酸缓冲液中, 在 56℃ 左右与抗体混匀, 在玻璃片 (6×9 厘米) 上做成 1.5 毫米厚的凝胶板, 并在板上制成孔径 3.5 毫米、孔距 2—3 毫米小孔。于各孔分别加 20 微升各种不同浓度的标准 AFP 溶液 (8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.13、0.06 毫克/100 毫升), 电泳 (电流强度 3 毫安/厘米) 4 小时后测其沉淀峰高度。

8. 对流免疫电泳检测 HBSAg 和 AFP

按照一般医院常规方法^[4]。

二、市售商品珠状琼脂糖、琼脂糖和琼脂吸附细胞色素 C 和结晶紫结果比较

琼脂糖的原料——琼脂产地不同, 生产工艺各异, 因而得到的琼脂或琼脂糖对细胞色素 C 吸附性质也有较大差别, 这是制备琼脂糖应注意的问题之一。现将部分国内、外琼脂和琼脂糖吸附细胞色素 C 和结晶紫电泳结果列于表 1 供参考。

表 1 几种琼脂糖和琼脂吸附细胞色素 C 和结晶紫电泳的比较

商 品 名 称	生 产 工 厂	吸附细胞色素 C 百分率 (%)	结晶紫电泳 (cm/小时)
Sepharose 4B	Pharmacia (瑞典)	12.5	
Agarose	B. D. H. (英)	4.0	0.8
Agar fine powder	日本进口分装 [批号 66-02-20C(3)]	5.4	0.2
Agar-Agar powder	日本进口分装 (批号 74-01-03)	3.9	
琼脂 (条状)	湛江第一人民食品厂	4.4	0.3
琼脂 (条状海燕牌)	青岛水产品加工厂	19.4	0.0
琼脂 (条状红旗牌)	广东汕头水产品综合加工厂	22.0	
琼脂 (条状红岛牌)	广东文昌海水养殖场	28.9	

表 2* 海燕牌琼脂纯化简要工艺流程和中间产品性质

纯 化 步 骤		温 度 (°C)	吸附细胞色素 C 百分率 (%)	结晶紫电泳 (cm/小时)	产 率 (%)	所需时间 (天)
	琼 脂 片		19.5	0.0	100	
1	pH 4.0, 0.04M 醋酸缓冲液 (抽提二次)	室 温				1
2	pH 9.0, 0.05 M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (抽提二次)	40	5.9	0.6	50**	2
3	DEAE-纤维素 (Cl 型) 用量: 0.8 克/克琼脂	65—70				1
4	脱水 (丙酮沉淀法)	55—60	0.1	1.5	25—30	1

* 每次抽提每克原料 (琼脂) 用 50ml 缓冲液

** 经抽提的琼脂片依次用丙酮乙醚浸泡 P_2O_5 真空干燥

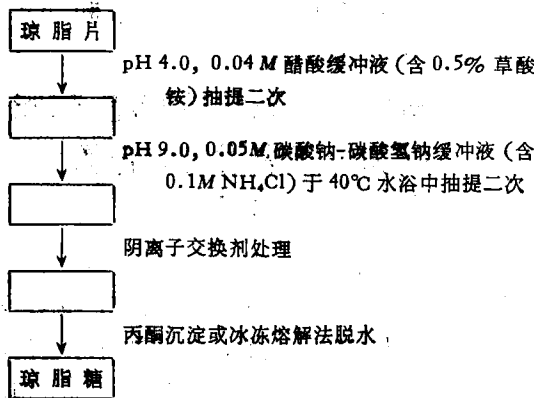
三、琼脂糖制备

1. 工艺流程

将条状琼脂 80℃ 真空烘干, 粉碎 (约 20 目) 后使用。

(1) 从海燕牌琼脂制备琼脂糖的工艺和中间产品性质见表 2。

(2) 从湛江食品厂琼脂制备琼脂糖的工艺如下:



2. 生产方法

分为抽提, 离子交换剂处理和脱水三部分。

(1) 缓冲液抽提 我们发现采用 S. Hjerten 的缓冲液 (pH 6.8, 0.03 M 磷酸缓冲液) 不能有效地除去琼脂中吸附细胞色素 C 的成分。取 45 克海燕牌琼脂片, 水洗 2—3 次, 过滤沉淀物分为三份。分别按三种不同方法抽提。

方法 I: 用 750 毫升 pH6.8, 0.03 M 磷酸缓

冲液搅拌抽提, 隔 3 小时更换一次缓冲液, 二次抽提后过滤沉淀物, 水洗 2—3 次后放置过夜。次日, 沉淀物以 750 毫升上述缓冲液搅拌抽提 5—6 小时并放置过夜。第三天, 过滤沉淀物水洗 2—3 次, 再重复第二天方法抽提, 最后依次用丙酮和乙醚浸泡沉淀物 2—3 次, P_2O_5 真空干燥。

方法 II: 和方法 I 基本相同, 仅第一天是以 pH4.0, 0.04 M 醋酸缓冲液代替磷酸缓冲液, 以后是以 pH9.0, 0.05 M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液代替磷酸缓冲液。

方法 III: 在 pH9.0 抽提时将温度升至 40℃, 其它条件与方法 II 完全相同, 结果见表 3。

表 3 不同抽提条件所得琼脂糖的比较

琼脂及其抽提条件	温度(℃)	吸附细胞色素 C 百分率 (%)	结晶紫电泳 (cm/小时)	产率 (%)
琼脂片 (海燕牌)		19.4	0.0	100
方法 I	室温 (20℃左右)	18.7		75
方法 II	室温 (同上)	14.6		70
方法 III	40	5.9	0.6	50

湛江食品厂出品的琼脂是以江蓠为原料, 可能含有较多的金属^[4], 除在 pH4.0 抽提时需加入 0.5% 的草酸铵和 0.1 M 氯化铵, 在 pH9.0 抽提时仍需加入氯化铵外, 其它抽提条件与表 2 相同。将得到的产品溶解并用冰冻熔解法脱水结果见表 4。

(2) 离子交换剂处理 缓冲溶液抽提过程

表 4* 湛江第一人民食品厂琼脂纯化结果和中间产品性质

纯 化 步 骤		温 度 (℃)	吸附细胞色素 C 百分率 (%)	结晶紫电泳 (cm/小时)	产 率 (%)	所需时间 (天)
	琼 脂 片		4.4	0.3	100	
1	pH4.0, 0.04 M 醋酸缓冲液 (含 0.5% 草酸铵) 抽提二次	室 温				1
2	pH 9.0, 0.05 M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, (含 0.1 M NH_4Cl) 抽提二次后脱水干燥	40	1.0	1.4	80**	2
3	DEAE-纤维素 (Cl 型, 0.2 g/g 琼脂) 处理后脱水干燥	65—70	0.0	1.8	40**	2—3
	或以大孔隙强碱型离子交换树脂代替 DEAE-纤维素 (Cl 型 2 g/g 琼脂)	70—80	0.0	1.7	60**	2—3

* 每次抽提每克原料 (琼脂) 用 50 ml 缓冲液

** 脱水均用冰冻熔解法

表明：酸性成份中尚有 25—30% 未能抽出，我们选用 DEAE-纤维素作进一步处理，同时亦初步观察大孔隙强碱型离子交换树脂处理湛江食品厂出品的琼脂情况。其过程如下：

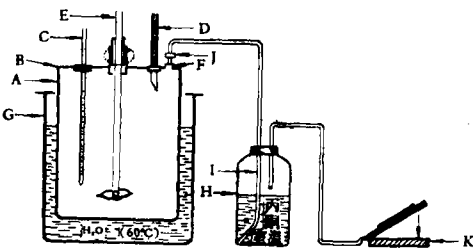
经过缓冲液抽提的琼脂片加水配成 4—5% 浓度(按抽提前所用琼脂干重计算)，高压(1.4 千克/厘米²)溶解 40—50 分钟，布氏漏斗过滤除去不溶物，待滤液温度降至 65—70℃ 加入 DEAE-纤维素(CI 型)，每克海燕牌琼脂用 0.6—0.8 克 DEAE-纤维素(每克湛江食品厂出品的琼脂用 0.15—0.2 克)，用 2 N NH₄ OH 将琼脂溶液调至 pH 7.5，65℃ 水浴保温搅拌 3—4 小时，用布氏漏斗(预热)连续二次过滤(第一次用涤纶布为滤布，第二次用较密的绸布为滤布)，滤液倾入丙酮脱水装置中脱水或用冰冻熔解法脱水。

用大孔隙强碱型离子交换树脂处理湛江食品厂琼脂时，用量虽多(2 克湿重/克琼脂)，但具有易于热过滤和产率较高的优点。DEAE-纤维素用量应随使用原料中酸性物质含量而适当增减，盲目大量使用不仅会造成热过滤困难且降低产率。

(3) 脱水干燥 我们采用丙酮沉淀和冰冻熔解两种方法脱水。

(A) 丙酮沉淀法。装置如右图。

将经离子交换剂处理过的琼脂糖滤液(60℃)倒入玻璃缸(A)中，启动搅拌器(E)，断水浴(G)电源并抽出热水。待琼脂糖溶液温度约降至 55℃，将(J)塞(F)管孔，不断用脚踏皮老虎(K)，将瓶(H)中丙酮压入缸(A)中，至



丙酮沉淀琼脂糖装置图

- A——玻璃缸(缸口有橡皮垫圈)
- B——不锈钢板
- C——温度计
- D——冷凝管
- E——搅拌器(水封)
- F——加样或丙酮管孔
- G——水浴(电热)
- H——盛丙酮容器
- I——小管
- J——橡皮塞
- K——皮老虎(压缩空气的装置)

丙酮最后浓度达 60% 为止。如原料为海燕牌琼脂，则具有弹性的大块状产物迅速析出。相反，如使用的原料为红旗牌或湛江食品厂出品的琼脂则形成白色粉末状产物，待温度降至 40℃ 停止搅拌于冰库或室温放置过夜，虹吸除去上层丙酮溶液和绒毛状悬浮物，过滤，如呈块状产物则需剪成小块，依次用丙酮和乙醚洗 2—3 次，P₂O₅ 真空干燥。

我们观察到吸附细胞色素 C 较强的琼脂糖溶液，如无氯化钠存在，用 2—3 倍体积丙酮不能将其沉淀出，补加氯化钠则沉淀立即形成，过滤也极容易。吸附细胞色素 C 较少的琼脂糖溶液(指经离子交换剂处理过)，直接用 1—2 倍体积丙酮就能将其迅速沉淀出。加氯化钠丙酮沉淀的琼脂糖沉淀物，干燥前需用 60% 丙酮洗至滤出液无氯离子，结果见表 5。

(B) 冰冻熔解法。将待脱水琼脂糖热溶液

表 5 NaCl 对丙酮*沉淀琼脂糖的影响

产 率 与 质 量	处 理 条 件 琼脂 糖溶液 (ml)	加 NaCl (每份 50 克)		不 加 NaCl	
		经 DEAE-纤维素处理	未经 DEAE-纤维素处 理	经 DEAE-纤维素处理	未经 DEAE-纤维素处理
		3700	3200	3700	3200
产 量 (克)		72	115**	72	0***
产 率		36	58	36	
吸附细胞色素 C 百分率(%)		2.3	5.9	1.4	

* 丙酮均为二倍于琼脂糖溶液的体积
 ** 由外表看是二种沉淀物，一种是白粉末状，另一种为颜色较深的颗粒状产物
 *** 溶液微混浊，缸底无沉淀

置于室温使其成冻,切成小块装入 60 目网孔尼龙袋,挤压使其通过网孔,置于冰箱(或低温冰箱)中使其结冰,取出放入烘箱中解冻,过滤除去水份,水洗沉淀物 2—3 次,冷冻干燥或依次用丙酮(乙醇)和乙醚浸泡沉淀物 2—3 次, P₂O₅ 真空干燥。

四、吸附不同量细胞色素 C 的琼脂糖对 AFP 测定(火箭电泳法)以及对流免疫电泳检测 HBSAg 和 AFP 等灵敏度的影响

1. 火箭电泳法测定 AFP

表 6 吸附不同量细胞色素 C 的琼脂糖对“火箭”电泳法测定 AFP 灵敏度的影响

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
吸附细胞色素 C 百分率(%)	0.0	0.0	0.1	1.0	1.4	2.3	3.9	4.0	4.4	5.9
灵敏度 (mg/100 ml)	0.06	0.123	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5

表 7 吸附不同量细胞色素 C 的琼脂糖对检测 HBSAg (对流免疫电泳法) 灵敏度的影响

编 号		1	2	3	4	5	6	7*	8**	9	10
阳 性 血 清 稀 释 度	吸 附 细 胞 色 素 C 百 分 率 (%)	0.0	0.0	0.1	1.0	1.4	2.3	3.9	4.0	4.4	5.9
		++	++	++	+	+	+	±	±	—	—
1:4		+	±	+	±	±	±				
1:8		+	±	+	±						
1:16		+	±	+	±						

* 为日本琼脂粉 (Agar-Agar powder)

** 为 B. D. H. 出品琼脂糖

表 8 两种琼脂糖对肝炎及可疑肝炎患者血清检测 HBSAg 的比较

表 7 编号 (3) 琼脂糖	日 本 琼 脂 粉 (Agar-Agar powder)
阳性 41 例 (阳性率 35%)	阳性 21 例 (阳性率 17.9%)

(2) 对 AFP 检测 结果见表 9。

五、讨 论

1. 琼脂中酸性多糖的酸性基团可与二价金属离子 (如 Ca⁺⁺) 结合,或以酯的形式存在。用碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液抽提,可能由于除去酸性基团上的金属离子,增加酸性多糖溶解度,从

结果见表 6。

2. 对流免疫电泳检测 HBSAg 和 AFP

以琼脂糖为对流电泳支持物,检测 HBSAg 和 AFP 所需设备简单,操作方便,得到结果快而准确,目前仍为一般医疗单位所采用。考虑到电泳支持物电渗大小可能影响检测灵敏度,因此,我们观察了吸附细胞色素 C 量不相同的琼脂糖对检测的影响。

(1) 对 HBSAg 检测 结果见表 7。进一步将表 7 中编号 (3) 和 (7) (日本琼脂粉) 用对流免疫电泳法检测 117 例肝炎及可疑肝炎患者血清 HBSAg 结果比较列于表 8。

表 9* 吸附不同量细胞色素 C 的琼脂糖对检测 AFP (对流免疫电泳法) 灵敏度的影响

编 号		1	3	5	6	7	8
阳 性 血 清 稀 释 度	吸 附 细 胞 色 素 C 百 分 率 (%)	0.0	0.1	1.4	2.3	3.9	4.0
		—	—	—	—	+	+
1:4						+	+
1:8						+	+
1:16						+	+
1:32						+	+
1:64							±

* 此表编号与表 7 相同,所用血清为某患者同一阳性血清

而提高了抽提效率。当然,除去金属离子也有利于离子交换剂处理。

我们观察到纯度较低的琼脂糖或琼脂粉,吸附细胞色素C后,用 pH4.1, 0.15M 醋酸铵缓冲液不能将其所吸附的细胞色素C全部洗脱,相反纯度较高的琼脂糖则能全部洗脱,这表明可能有两类或两类以上的酸性物质可吸附细胞色素C,可能是琼脂中不同的酸性多糖。

2. 60%丙酮(包括乙醇在内)在无氯化钠存在条件下,能有效地将琼脂糖脱水沉淀出,表明琼脂糖可能属中性多糖。相反吸附细胞色素C较强的琼脂糖,其溶液需有氯化钠存在才能有效脱水沉淀。可能盐改变了带电胶体的性质,因此使其沉淀。

3. 用红旗牌和海燕牌两种不同海藻来源的琼脂制备的琼脂糖,虽制备过程相同,产物吸附细胞色素C亦相同,但以60%丙酮脱水沉淀时,前者以白色粉末沉淀析出,后者常为大块状(有时几乎为一整块)产物析出,很可能由于不同海藻中琼脂糖结构上存在某些差异。本文所用的两种脱水方法,丙酮沉淀法能除去某些小分子物质(包括制备过程中产生某种程度的降

解产物)有利于提高产品的凝胶强度。

4. 离子交换剂处理过程中,加入离子交换剂的数量取决于所用琼脂对细胞色素C的吸附量。可控制加入离子交换剂的数量制备不同电渗大小的琼脂糖以用于不同目的。

5. 由于HBSAg分子量及其电荷特点,以低电渗琼脂糖为对流免疫电泳支持物,增进抗原移动速度。又因纯度高的琼脂糖透明度高,形成的沉淀线清晰,所以提高了检测的阳性率。反之,对流免疫电泳检测AFP时,由于支持物电渗小影响到抗体向与抗原相反的方向移动,因而对检测不利。“火箭”电泳测定AFP,由于不依靠支持物电渗,因此用低电渗琼脂糖就提高了测定灵敏度。

参 考 资 料

- [1] 张先杨等: 本刊, 1974年, 第2期, 第36页。
- [2] Porath. J: J. Chromatography, 60, 167, 1971.
- [3] Laurell. C. B.: Analyt. Biochem., 15, 45, 1966.
- [4] 浙江医科大学附属第一医院等: 肿瘤工作简报, 1972年, 第17期, 第34页。

[本文于1975年11月14日收到]

(上接第37页)

一般认为,癌变的早期阶段是可逆的,晚期阶段则是不可逆的。的确,很难设想,具有明显染色体畸变、异常的形态和代谢方式的晚期癌细胞,能够遵循原来的演化途径一步步地变回到正常;但是,不可逆转并不意味着不能通过内部矛盾的转化改变其演化的方向,使恶性细胞转到分化成熟乃至死亡的轨道(见前)。对于晚期癌症患者开辟这一对机体无害的治疗途径可能是十分有益的。

小 结

细胞生物学和分子生物学的最新进展已经使我们对癌细胞的生物学特性、癌的生长和变异规律的认识更深入了。临床上观察到的某些难以理解的现象现在已经可以在细胞和分子的水平上得到初步的解释。虽然有待阐明的问题还很多,但是肿瘤生物学的发展历史表明,人类认识和改造世界的能力是无穷无尽的,最复杂、

最奥秘的生命现象,如遗传信息的组成,遗传密码的转录和翻译,基因活动的调节控制(包括癌变时的变化)等都是可以通过人类的生产实践和科学实验(包括对肿瘤的防治实践)而逐步认识清楚的。这方面的进展可以为预防肿瘤的发生和治疗临床上各期肿瘤病人开辟新途径提供理论依据。

肿瘤生物学研究的进展也大致体现了人类由粗到细、由浅入深、由此及彼和由个别到一般的认识过程。但应指出,本篇中的资料大部分来自体外培养的细胞和动物实验。而人体肿瘤的防治是涉及整个人体乃至社会的问题,因此,在利用肿瘤生物学知识服务于防治我国的多发肿瘤时,还需要经过一番去粗取精,去伪存真的加工过程,并与群众性的抗癌实践、中医理论和经验相结合,才能做到有所发现、有所发明、有所创造和有所前进,在抗癌斗争中为人类作出较大的贡献。