

• 检验技术与方法 •

IgM 类血型抗体 2-巯基乙醇裂解产物与 IgG 类血型抗体活性比较

张志峰,董兆华,胡凤鸣

(青岛大学附属威海医院输血科,山东 264200)

摘要:目的 探讨 IgM 类抗体经 2-巯基乙醇(2-Me)裂解后的产物是否与抗人球蛋白发生特异性反应。方法 以人 IgM、IgG 类血型抗体和鼠抗人 Rh(D)单克隆 IgM、IgG 类抗体经 2-Me 处理后的产物做为试验组,以生理盐水稀释相同倍数的上述抗体为对照组,采用酶联免疫吸附法检测各组与抗人球蛋白反应后的光密度值。**结果** 试验组人 IgM 类血型抗体裂解产物与对照组光密度值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);试验组鼠抗人 Rh(D)单克隆 IgM 类抗体裂解产物与对照组光密度值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** IgM 类抗体经 2-Me 裂解后的产物不与抗人球蛋白发生特异性反应。

关键词:免疫球蛋白 M; 免疫球蛋白 G; 二巯基乙醇

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1345-02

血清中的免疫球蛋白 M(immunoglobulin M, IgM)类血型抗体,可被 2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-Me)裂解产生 6-7s 亚单位,该亚单位仍具有与相应抗原结合的能力;IgG 类血型抗体则不被 2-Me 裂解^[1]。IgM 类血型抗体的裂解产物能够与红细胞结合,如果同时具有与抗人球蛋白(抗 IgG 抗体)结合的能力,则会干扰血型抗体效价的测定。本研究采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析 IgM 类血型抗体 2-Me 裂解产物与抗 IgG 抗体之间是否可发生特异性反应,探讨裂解产物是否会对相关试验产生干扰。

1 材料与方法

1.1 标本来源 (1)人 IgM 类血型抗体:随机选取血型为 A 型、间接抗人球蛋白试验阴性的健康男性 10 例,以含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的抗凝真空管采集静脉血,离心后吸取血浆 200 μ L,与 B 型试剂红细胞混合后进行吸收、放散试验,放散液即为人 IgM 类血型抗体。(2)人 IgG 类血型抗体:随机选取血型为 O 型、IgG 类血型抗体效价大于 1:64 的孕妇(孕 4~6 个月)10 例,以不含抗凝剂真空采血管采集静脉血,离心并分离血清,血清经 2-Me 处理后与试剂红细胞进行吸收、放散试验,放散液即为人 IgG 类血型抗体。(3)试验分组:经 2-Me 处理的血型抗体作为试验组,经生理盐水稀释至与试验组相同倍数的血型抗体作为对照组,以样本空白作为空白对照。

1.2 主要仪器与试剂 (1)仪器:Sunrise 全自动酶标仪(瑞士帝肯公司)、AutoVue 血型离心机(Ortho-Clinical Diagnostics, 美国)。(2)试剂:ABO 血型试剂红细胞(上海血液生物医药有限公司),2-Me 应用液、抗 IgG 抗体、鼠抗人 Rh(D)单克隆 IgM、IgG 抗体(上海血液生物医药有限公司),ELISA 辅助试剂盒(潍坊三维生物工程集团有限公司),牛血清清蛋白(杭州江滨生物技术有限公司),聚苯乙烯 ELISA 板(北京优尼康生物科技有限公司),多特异性抗人 IgG、C3d 抗体(美国强生临床诊断公司)。

1.3 方法

1.3.1 反应板制备 (1)包被:用包被缓冲液(0.05 mol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液)将抗 IgG 抗体稀释至蛋白质浓度为 5 μ g/mL,并按 100 微升/孔加入 ELISA 板反应孔中,4 $^{\circ}$ C 放置过夜;弃去孔内液体,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 min。(2)封闭:用洗涤缓冲液配制浓度为 0.5%的牛血清清蛋白溶液作为封闭液,并按 200 微升/孔加入 ELISA 板反应孔中,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min;弃去孔内液体,用洗涤缓冲液洗 3 次,每次 3 min;待反

应孔干燥后置密封袋或锡袋中,2~4 $^{\circ}$ C 低温保存。

1.3.2 检测步骤 检测步骤按常规 ELISA 检测进行。每个标本做双孔平行检测,计算光密度(optical density, OD)均值。

1.4 统计学处理 使用 SPSS10.0 统计软件包进行数据分析;计量资料以($\bar{x}\pm s$)或 \bar{x} 表示;采用两组均数 t 检验, $P<0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

人 IgM 类血型抗体、人 IgG 类血型抗体、单克隆 Rh(D) IgM 类抗体和单克隆 Rh(D) IgG 类抗体 OD 均值在试验组与对照组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 1。空白对照 OD 值均值为 0.054,与 IgM 类抗体在 2-Me 裂解前后的 OD 均值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 实验组与对照组 OD 值比较($\bar{x}\pm s$ 或 \bar{x})

组别	人 IgM 类 血型抗体	人 IgG 类 血型抗体	单克隆 Rh(D) IgM 类抗体	单克隆 Rh(D) IgG 类抗体
试验组	0.059 \pm 0.007	1.040 \pm 0.307	0.058	0.440
对照组	0.056 \pm 0.006*	0.997 \pm 0.324*	0.057*	0.421*

*: $P>0.05$,与试验组比较。

3 讨论

新生儿溶血病(hemolytic disease of the newborn, HDN)是由于母婴血型不合引起的免疫性溶血病。孕妇体内的 IgG 类血型抗体可通过胎盘进入胎儿体内,作用于胎儿红细胞,导致新生儿出现不同程度的溶血。因此,通过检测孕妇血清中有无 IgG 类血型抗体及其效价可预测发生 HDN 的可能性^[2]。HDN 以 ABO 血型系统最为常见,多发于 O 型孕妇分娩的 A 型或 B 型婴儿,与母体血清中存在 IgG 类抗-A(B)抗体有关^[3-4]。

血清中 IgG 类血型抗体的检测通常采用间接抗人球蛋白试验,包括试管法和微柱凝胶法^[5-7];其原理为血清中的 IgG 类血型抗体可与相应试剂红细胞结合,形成致敏红细胞,抗人球蛋白与红细胞上吸附的 IgG 类抗体结合后出现肉眼可见的凝集。2-Me 可通过裂解二硫键使 IgM 类血型抗体解聚并形成 6-7s 亚单位,该亚单位如果能与抗人球蛋白特异性结合,会对抗体效价测定产生干扰,但目前未见相关报道。

本研究采用 2-Me 裂解人源性血型 IgM 抗体、单克隆 Rh(D) IgM 抗体后,将裂解产物与固相包被的抗 IgG 抗体反应,再加入酶标记的抗 IgG 抗体,如果裂解物能够与抗 IgG 抗体特

异性结合,则最终形成抗 IgG 抗体-抗体-酶标记的抗 IgG 抗体复合物,加入底物后呈颜色反应。实验结果表明,IgM 抗体在 2-Me 裂解前与裂解后产物的吸光度值差异无统计学意义($P>0.05$),且与空白管吸光度值差异无统计学意义($P>0.05$),充分说明 IgM 及 IgM 裂解产物都不与抗 IgG 抗体发生特异性反应。

IgG 性质的血型抗体由两条重链和两条轻链通过 S-S 键连结组成,巯基试剂可还原 S-S 键连结的两条重链,使 IgG 在铰链区域有更大的柔和性,更有利于与相应的抗原和抗体发生结合反应^[8-10]。这可以解释为什么用 2-Me 处理的 IgG 抗体 OD 值大于未用 2-Me 处理的 IgG 抗体的 OD 值。

参考文献

[1] 朱铁楠. 血型鉴别标准与血制品应用技术及医院开展新技术新项目解析[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:210.
[2] British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for blood grouping and red cell antibody testing during pregnancy[J]. Transfus Med, 1996, 6(1): 71-74.

• 检验技术与方法 •

[3] 杨秀丽. O 型孕妇血清中 IgG 抗体效价与新生儿溶血病的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 1037, 1039.
[4] 孙悦玲, 孙红格, 施选性, 等. 孕期夫妇血型血清学检测与新生儿溶血病关系的探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(2): 47, 59.
[5] 孟庆宝. 微柱凝胶技术在输血相关试验中的评价及应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 848-849, 851.
[6] 周金安, 魏晴, 涂同涛, 等. 微柱凝胶卡及试管法对抗-D 效价检测的比较[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(3): 197-198.
[7] 陈才生, 翁彬, 王雷萍, 等. 微柱凝胶技术配血影响因素分析[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(6): 56-57.
[8] Deuthsch HF, Morton JI. Dissociation of human serum macroglobulins[J]. Science, 1957, 125(3248): 600-601.
[9] Forre O, Michaelesen TE, Natvig JB. Antibody activity of heavy and light chains and recombined IgG of human IgG anti-D[J]. Scand J Immunol, 1976, 5(1-2): 155-156.
[10] Judd WJ. Methods in Immunohematology[M]. 2nd ed. Durham, DC: Montgomery Scientific Publications, 1994: 33-35, 411-412.

(收稿日期: 2010-12-06)

血清 N-端脑钠肽前体对心力衰竭的诊断

欧阳旭

(湖南省宁远县人民医院检验科 425600)

摘要:目的 评价血清 N-端脑钠肽前体(NT-proBNP)对心力衰竭的诊断价值,为 NT-proBNP 在临床的应用提供循证医学证据。方法 对 448 例研究对象同时进行血清 NT-proBNP 和超声心动图等检测,用受试者工作特征曲线(ROC)曲线选取血清 NT-proBNP 诊断心力衰竭的最佳临界点,计算各项评价指标,评价血清 NT-proBNP 诊断心力衰竭的临床价值。结果 选取 362 pg/mL 作为诊断心力衰竭的最佳临界点,NT-proBNP 诊断心力衰竭敏感性与特异性分别为 90.1%、80.8%,阳性预测值与阴性预测值分别为 72.5%、93.5%,ROC 曲线下的面积为 0.876。结论 血清 NT-proBNP 对心力衰竭有较好的诊断价值,特别适合心力衰竭的筛查。

关键词:心力衰竭; ROC 曲线; 血清 N-端脑钠肽前体
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.038 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)12-1346-03

心力衰竭(heart failure, HF)是严重影响人们健康的公共卫生问题,美国 Framingham 心脏研究中心的研究表明:65~74 岁男性、女性 HF 患者 5 年病死率分别达 59%与 45%^[1];中国 HF 患者致死亡率呈逐年增加趋势。张建轩等^[2]的研究表明,B 型脑钠肽(brain natriuretic peptide)对老年慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)有良好的诊断价值,而 N 端脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)对 HF 的诊断价值尚存争议。因此,笔者以 448 例新发 HF 患者为研究对象,进行 NT-proBNP 水平检测和分析,以期进一步阐明 NT-proBNP 对 HF 的诊断价值,为临床提供可靠的循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 6 月 12 日至 2010 年 8 月 26 日于本院诊断为 HF 疑似患者 497 例,均为志愿参与本研究;排除 38 例非心源性呼吸困难、心绞痛、扩张型心肌病患者,及已接受相关外科治疗的 HF 患者;失访 11 例。研究对象最终确定为 448 例,其中 HF 患者 161 例(病例组),非心力衰竭(non-heart failure, nHF)患者 287 例(对照组);HF 诊断参照纽约心脏病学会(New York Heart Association, NYHA)制定的相关

标准。

1.2 仪器和试剂 UniCel DXI800 型免疫分析系统及配套 NT-proBNP、心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)检测试剂(贝克曼库尔特,美国),IE33 型超声心动仪(飞利浦,荷兰)。

1.3 方法 收集受试对象基本资料(性别、年龄、身高、体重、吸烟史、饮酒史等);在患者接受治疗前进行超声心动图检查,并抽取空腹静脉血 4 mL,离心半径 20.8 cm 条件下 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清后进行血清 NT-proBNP、ANP 检测和 NT-proBNP 重复性试验^[3]。

1.4 统计学处理 (1)将血清 NT-proBNP 和 ANP、超声心动图等变量结果录入 SPSS13.0 数据库。计量资料若符合正态性与方差齐性则作两组完全随机化设计资料均数的 t 检验(NT-proBNP 检测结果经对数转换后进行 t 检验),计数资料作两独立样本比率的 χ^2 检验。(2)绘制血清 NT-proBNP、ANP 诊断 HF 的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线),计算 ROC 曲线下的面积(area under the ROC curve, AUC);评价 NT-proBNP 在不同临界点时诊断 HF 的灵敏度、特异度等指标,选取最佳临界点;依据最佳临界点制作诊断试验评价四格表,分别计算灵敏度、特异度