

syndrome but no troponin I elevation[J]. Circulation, 2003, 108(16):1924-1926.

[25] Wang J, Xu N, Feng X, et al. Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Circ Res, 2005, 97(8):821-828.

[26] Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute

coronary syndrome[J]. Circulation, 2007, 115(8):962-971.

[27] Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2007, 116(14):1540-1548.

(收稿日期:2011-07-21)

• 综 述 •

丙型肝炎病毒基因分型检测策略

赵 荣¹, 彭劲松¹, 黄汉菊¹综述, 陈维贤²审校

(1. 广东省妇幼保健院 510010; 2. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400010)

关键词: 肝炎病毒属; 基因分型; 检测策略

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)02-0191-04

自 1989 年以来^[1], 丙型肝炎病毒感染已成为全世界最关注的问题。据 WHO 报道, 全世界有 1.7 亿感染者, 其流行率约 3%^[2]。HCV 感染后病情隐匿, 50%~80% 会转变成慢性肝炎, 如未经任何合理的治疗, 在 10~20 年后, 有 10%~30% 会发展成为肝硬化, 1%~5% 甚至会发展成原发性肝癌^[3], 严重危害患者的健康和生命。

丙型肝炎病毒(HCV)是一类球形、单股正链 RNA 病毒, 其基因组序列具有高度变异性。根据不同区域的基因序列变异情况, HCV 分为 6 个基因型, 80 多种基因亚型, 最近在加拿大还报道出 7a 这个新的亚型^[4]。由此可以看出, 随着时间推移和分子生物学技术的不断发展, 越来越多新的基因亚型将被人类所发现。而本文将根据近几年来对 HCV 基因分型的检测经验, 分别从以下几个方面来探讨 HCV 基因分型的检出策略。

1 HCV 感染的确定

HCV 感染的确定, 是基因分型的前提。目前, 可以从三个方面来确定机体是否感染了丙型肝炎病毒。

1.1 HCV 抗体的筛查 抗-HCV 是非中和性的抗体, 是 HCV 感染的标志。它的检测是临床上较为常用的诊断方法。现今有两种方法来检测血清中 HCV 的抗体: (1) 酶免疫法(EIA 法): 市面上基于 EIA 的抗-HCV ELISA 诊断试剂盒众多, 分国产试剂和进口试剂两种。因厂商的不同其灵敏度和特异性存在着一定的差异, 在使用过程中一般会挑选 2 种不同厂商的试剂同时进行检测。(2) 免疫印迹法(RIBA 法): 主要解决 ELISA 实验中出现的假阳性问题, 在操作上较 EIA 法困难, 费时, 成本也很高, 因此限制了此项技术在临床上的普遍使用。目前, 主要用于科研或参比实验室中。

1.2 HCV 抗原的检测 主要是 HCV 核心抗原的检测。目前已开发出两种 HCV 核心抗原的 ELISA 检测试剂, 一种是直接检测血清或血浆样本中的游离 HCV 核心抗原, 主要用于血液筛查; 另一种是检测血清或血浆中的总 HCV 核心抗原, 不仅可用于血液的筛查, 还可用于指导慢性丙型肝炎患者的治疗^[5]。该试剂的价格较便宜, 而且可实现对 HCV 早期感染的发现, 因而可以大力推广。

1.3 HCV RNA 检测 HCV RNA 检测能较直观地反映出病毒的存在, 常作为 HCV 感染的主要确诊手段。RNA 检测可分为定性与定量两种。定性检测: 常采用逆转录套式聚合酶链

反应, 此技术主要用于血液及相关的生物制品中 HCV 的筛查, 其灵敏度和特异性都比较高, 但该技术复杂, 受多种因素的影响。定量检测: 反映机体内病毒活跃程度及实际水平, 此项技术适合于临床样本的检测, 具有快速、特异、高灵敏度等优点, 对 HCV 患者的早期确诊, 感染人群的筛查、污染源的监测以及预测和观察抗病毒药物的疗效具有较高的实用价值。目前国内外 HCV 核酸定性、定量检测试剂较多, 其性能参照表 1。

2 HCV 基因型的检测

HCV 基因分型及准确的亚型识别问题, 对更好地了解 HCV 病毒进化、探讨传播途径、判定病情变化、评价抗病毒治疗效果等具有重要的意义, 下面将结合工作经验, 探讨 HCV 基因型的检出策略。

2.1 HCV 基因分型方法的选择 HCV 基因分型方法是以 PCR 技术为基础的, 主要有以下几种。

2.1.1 测序法 直接对 HCV 的核酸序列进行测序, 是 HCV 基因分型的“金标准”。

2.1.2 型特异性引物扩增法 根据不同 HCV 基因型在某一区段序列的差异, 设计一系列型特异性引物, 针对不同 HCV 基因型, 可扩增出长度大小不同的片段, 以此进行分型。

2.1.3 基因芯片和型特异性探针杂交法 HCV 基因分型芯片法是将型特异性的寡核苷酸探针固定在经处理的玻片上, 荧光标记的 PCR 产物与之特异结合, 杂交后, 经过扫描, 在相应的型特异性探针位置上出现荧光点, 根据点位置确定 HCV 的基因型和基因亚型。

2.1.4 限制性片段长度多态性分析 根据 HCV 不同基因型某一区段个别碱基的变异直接导致了某些酶切位点的改变而进行基因分型的。

2.1.5 遗传发育关系进化树分析 是在测序法的基础上所建立的。

2.1.6 异源分子迁移率法 但无论是哪种方法, 一般都是围绕 5'UTR、C-E1 和 NS5b 这三个区来进行的。单独扩增这三个区域中的任何一个区的基因序列对 HCV 进行基因分型, 都存在着一些漏诊或误诊的可能性^[6], 因此, 根据实验室现有条件以及分型的主要目的, 选择合适的方法来检测 HCV 的基因型别。

2.2 HCV 基因分型区域的选择 检测 HCV 基因分型最准

确的方法是对基因组的某个区进行 PCR 扩增、测序及进化树分析。目前,国际上常用于基因分型的有下列几个基因区域。

2.2.1 5'UTR 区 5'UTR 区,即 5'-非编码区,包含 HCV 基因组 5'端的 341 个核苷酸,是 HCV 基因组中最保守的区域,保守率在 92.8%~99.6%之间,临床上对 HCV 的核酸诊断及病毒载量的检测试剂就是根据这段基因序列保守而易于扩增的特性研制而成。此区域有一套良好的限制性片段长度多态性(RFLP)的特征,常常作为 RFLP 基因分型选择特异性酶切位点的靶基因部位^[7]。目前,为了评价抗病毒治疗效果及药物剂量方案的选择,以 5'UTR 区为基础所建立的基因分型方法,在很大程度上已被接受^[8-9],但是将该区域作为整个 HCV 基因分型或者区分不同亚型的手段还存在着下列许多问题:(1)针对不同基因型的分型准确率有较大的差异,Halfon 等^[10]研究提示针对该区分型方法的总准确率仅有 76%,虽然对 2、3 型的分型准确率高,但几乎不能对一些 6 型的样本进行区分,而是错把它分成 1a 或 1b,主要由于它们之间基因序列差别太

少^[11]。(2)同一型别不同亚型的分型准确率有较大差异^[12],对 1b、1a、2a、2b、2c、3a 亚型的分型准确率分别为 76%、91%、20%、50%和 96%,几乎不能对 4a、4b 和 4c 亚型进行区分,总准确率仅有 76%,这与此区域的差异度仅为 1%~3%有关^[13]。(3)不能检测到基因重组或混合感染的现象^[13]。(4)一般情况下,由于 HCV 阳性样本病毒载量比较低,在进行基因分型时,需采用套式 PCR 技术进行扩增。在第一轮 PCR 过程中,引物的序列设计强调它的通用性,尽量使其与所有基因型别匹配,而此区亚型间基因序列变异较大,不易找到共同的引物结合位点,导致引物的敏感性低,故不常作为型特异性引物设计的参考序列区。因此,由于 5'UTR 区核苷酸序列的保守性较高,难于通过检测核酸序列变异达到区分亚型的目的,基于此区所建立的基因分型方法具有一定的局限性。为了改变这一局限,并提高 HCV RNA 的检出水平,在设计引物的过程中,可以适当地把设计引物的区域扩大到核心区(C 区)的范围内,此方案的应用,已从实验中得到了验证。

表 1 目前国内外常用的 HCV RNA 检测试剂及其性能

检测试剂盒名称(类型)	生产商	技术类型	最低检测限值(IU/mL)
Amplicor HCV 2.0 qualitative test(定性)	罗氏	PCR	50
Cobas AmpliScreen HCV 2.0(定性)	罗氏	PCR	25
Versant HCV qualitative Assay(定性)	西门子	TMA	10
Chiron Procleix TMA HIV-1/HCV assay(定性)	Chiron	TMA	50
Versant HCV RNA 3.0 Assay(定量)	拜耳	bdNA	615~(7.7×10 ⁶)
COBAS TaqMan HCV with HPS(定量)	罗氏	实时定量 PCR	15
COBAS TaqMan HCV with Cobas Ampliprep(定量)	罗氏	实时定量 PCR	15
Amplicor HCV Monitor v2.0(定量)	罗氏	竞争性 PCR	500~(5×10 ⁶)
Abbott HCV RNA quantitative assay(定量)	美国雅培	实时定量 PCR	12
深圳匹基 HCV 核酸定量检测试剂盒(定量)	深圳匹基	实时定量 PCR	500
广州达安 HCV 核酸定量检测试剂盒(定量)	广州达安	实时定量 PCR	1 000
上海科华 HCV 核酸定量检测试剂盒(定量)	上海科华	实时定量 PCR	500

2.2.2 C-E1 区 C-E1 区,即核心区-包膜 E1 区,核苷酸的位点在 342~1 490 nt 之间。此区是 HCV 基因组的高度变异区,存在着许多有意义的位点,为了对 HCV 结构区基因变异进行总体研究,很多学者都会把此 2 个区作为他们研究首选的区域^[14-15]。但因高变区变异程度较大,PCR 扩增时难以找到完全匹配的引物而使得核酸检出率低下,进而影响分型效果。特别是因既往采血或静脉注射毒品而感染的艾滋病病毒感染者,HCV 合并感染率高,且由于 HIV 导致的机体免疫缺陷而使得 HCV 复制可能更活跃,因此 HCV 的基因变异率增大,分型更加困难。目前一般采用简并突变点的方法提高引物通用性^[16]。C-E1 区用于基因分型的检测稳定性已达到 5'UTR 区的水平,并且 C-E1 区基因分型方法比 5'UTR 区分型方法更加精确和灵敏,发现混合感染的能力也较强^[17],在作者这几年的研究中也证实了这一观点,并且检测样本发现可重复性也达到了 100%。

2.2.3 NS5B 区 HCV 非结构蛋白 5B(NS5B)区,位于病毒基因组的 7 602~9 371 核苷酸位点之间,可编码 NS5B 非结构蛋白,具有 RNA 依赖性的 RNA 多聚酶活性。此区含有两个重要的位点,活性位点:是抗 HCV 药物研究的重要靶位;识别位点:能够识别具有 HLA 限制的杀伤性淋巴细胞,使 HCV 逃避宿主淋巴细胞的攻击。HCV NS5B 区的基因序列变异情况

也具有代表性,据研究显示,序列的差异度为 16.5%~20.1%^[18],可以较好地反映 HCV 全基因组的变异情况。根据对多株 HCV NS5B 区的序列分段发现,此区的变异足以区分不同型和亚型,以及株。从生物信息学的角度来比较丙型肝炎病毒五个区域(5'UTR 区、Core 区、E1 区、E2 区和 NS5B 区)的基因分型结果及演化距离,确定最能反映丙型肝炎病毒株的演化关系的区域是 NS5B 区^[19]。虽然 HCV 基因分型方法有多种,而根据 HCV NS5B 区基因序列进行的基因分型及序列的系统进化树分析一直被公认为 HCV 基因分型的“金标准”,只是在分亚型时,会出现 10%的失误^[20]。

3 引物的选择

用于 HCV 基因分型的引物序列,其参照物基本上都有涉及到 HCV 基因组中的每个区域,但最多的是 5'-UTR、Core、C-E1 和 NS5B 这几个区域^[4,21]。见表 2。表 2 列举一些引物相关信息,分别在这几年的 HCV 基因分型研究工作中得到了很好的证实,但不同区域所涉及到的引物,检出率有所不同,而且与人群、感染的途径存在着一定的关联,根据近年来国内外文献报道以及作者对不同人群的 HCV 基因分型研究结果,不同区域的检出率,吸毒人群:C-E1 区>NS5b 区>5'UTR-C 区^[14,22];肝病人群:NS5b 区>C-E1 区>5'UTR-C 区^[23];HIV 感染者人群:5'UTR-C 区>C-E1 区>NS5b 区^[24-25]。

表 2 HCV 基因分型的扩增引物

区域	引物名称	引物序列 (5'-3')	引物位点	片段大小(bp)	
5'UTR	HCV-F1	GACACTCCACCATGAATCAC	21→40	382	
	HCV-R1	GTGCTCATGGTGCACGGTCT	330←349		
	HCV-F2	CACGCAGAAAGCGTCTAGCC	65→84	249	
	HCV-R2	GCACTCGCAAGCACCTATC	295←314		
Core	Se2	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG	318→344	441	
	Ac2	GAGMGGKATRTACCCCATGAGRTCGGC	732←758		
	S7	AGACCGTGCACCATGAGCAC	330→349	335	
	A5	TACGCCGGGGTCAKTRGGGCCCA	660←684		
	C1	AGGCCTTGTTGGTACTGCCTGATA	276→298	481	
	C2	GTATGTACCCCATGAGGTGGC	736←757		
	C3	CGGGAGGTCTCGTAGACCGT	317→336	401	
	C4	AGGGTATCGATGACCTACCCA	698←718		
C/E1	493S-H77	GCAACAGGGAACCTTCTGGTTGCTC	493→518	494	
	987R-H77	CGTAGGGGACCAGTTCATCATCAT	964←987		
	502S-H77	AACCTTCTGGTTGCTCTTTCTCTAT	502→527	473	
	975R-H77	GTTTCATCATCATATCCCATGCCAT	952←975		
	E1	TTGGGTAAGGTCATCGATACCC	697→719	911	
	E2	TGATGTGCCAACTGCCGTTGGT	1 587←1 608		
	E3	TTCGCCGACCTCATGGGGTACAT	729→757	593	
	E4	GGACCAGTTCATCATCATATCCCA	1 299←1 322		
	NS5b	EN02	TGGGSTTYKSTATGAYACYCGMTGYTTTGA	8 245→8 275	395
		EN04	ARTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	8 616←8 640	
NS5S3		TATGATACCCGCTGCTTTGACTCCAC	8 256→8 281	375	
NS5A5		GTCATAGCCTCCGTGAAGGCTC	8 611←8 632		
OF		TATGACACCMGYTGCTTTGAYTC	8 256→8 278	451	
OR		TTGGAGGAGCADGATGTTATSAGCTC	8 682←8 707		
IR		GARTACCTGGTCATAGCCTCCGT	8 619←8 641	385	
DM101		TTCTCRTATGAYACCCGCTGYTTTGA	8 250→8 275		
DM100		TACCTVGTTCATAGCCTCCGTGAA	8 616←8 638	389	
DM107		CCHATGGGGTTYTCCTAYGACACCAG	8 241→8 266		
DM106		GGNGCYGAGTAYCTGGTCATGGC	8 625←8 647	407	
DM105		TTCTCTAYGACACCAGRTGYTTTGA	8 250→8 275		
DM104		TAYCTGGTCATAGCNTCCGTA	8 616←8 638	389	

因此,为了更好地了解 HCV 的感染情况以及基因型在一个人群中的分布概况,一般采用以丙型肝炎病毒 C-E1、NS5b、5'-UTR 三个基因区域中任意两个区域作为分型依据^[26],设计相应的引物应用套式 PCR 技术依次对其扩增,通过测序得到相应的序列并辅以系统进化树的分析,最终分出 HCV 基因型别是较理想的型别检出策略。

参考文献

[1] Choo QLKG, Weiner AJ, Overby LR, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome[J]. Science, 1989, 244: 359-362.

[2] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on[J]. J Gen Virol, 2004, 85: 3173-3188.

[3] Leone NRM. Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2005, 51: 1050-1072.

[4] Murphy DCJ, Dandavino R, Sablon E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa[J]. Hepatology, 2007, 46: 623A.

[5] 徐淑芹, 黄兴富. 丙型肝炎抗原检测[J]. 医学检验与临床, 2008, 9 (3): 39-40.

[6] Castillo I, Bartolome J, Quiroga JA, et al. Comparison of several PCR procedures for detection of serum HCV-RNA using different regions of the HCV genome[J]. J Virol Methods, 1992, 38: 71-79.

[7] 李伟琴, 袁致海, 徐光华, 等. 丙型肝炎基因分型进展及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(6): 589-593.

[8] Altindis M, Aktepe OC, Cetinkaya Z, et al. Short communication: determination of hepatitis C virus genotypes by INNO-LIPA and sequence analysis methods[J]. Mikrobiyol Bul, 2007, 41: 121-126.

[9] Yasmeen A, Siddiqui AA, Hamid S, et al. Genetic variations in a well conserved 5'-untranslated region of hepatitis C virus genome isolated in Pakistan[J]. J Virol Methods, 2009, 160: 38-47.

[10] Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis (Trugene) [J]. J Virological Methods, 2001, 13: 1771-1773.

[11] Hrabner PT, Fischer W, Bruno WJ, et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes[J]. Virol J, 2006, 3: 103.

[12] Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans[J]. J Gen Virol, 2001, 82: 693-712.

[13] Kuiken C, Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus[J]. Methods Mol Biol, 2009, 510: 33-53.

[14] Peng JS, Wang X, Liu MQ, et al. Genetic variation of hepatitis C virus in a cohort of injection heroin users in Wuhan, China[J]. Virus Res, 2008, 135: 191-196.

[15] Sylvie CJB, Anja H, Anders F, et al. Hepatitis C virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41: 1091-1100.

[16] 徐文胜, 张瑞麒, 缪晓辉, 等. 提高乙型肝炎病毒 P 基因区聚合酶链反应检测阳性率的策略[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26: 72-75.

[17] Li H, Thomassen LV, Majid A, et al. Investigation of putative multisubtype hepatitis C virus infections in vivo by heteroduplex mobility analysis of core/envelope subgenomes[J]. J Virol, 2008, 82: 7524-7532.

[18] Sandres-Saune K, Deny P, Pasquier C, et al. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region[J]. J Virol Methods, 2003, 109: 187-193.

[19] Pawlowsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Gastroenterology, 2002, 122: 1554-1568.

[20] Jm P. Molecular diagnosis of viral hepatitis[J]. Gastroenterology, 2002, 122: 975-982.

[21] Mao H, Lu Z, Zhang H, et al. Colorimetric oligonucleotide array for genotyping of hepatitis C virus based on the 5' non-coding region[J]. Clin Chim Acta, 2008, 388: 22-27.

[22] Fang XF, Wang YM. Survey of HCV infection in intravenous drug abusers in Chongqing[J]. Chin J Drug Depend, 2001, 10: 220-222.

[23] Bokharai SFKH, Amiri A. Distribution of different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16: 2005-2009.

[24] Van Asten LVI, Lamzira S. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis[J]. J Infect Dis, 2004, 189: 292-302.

[25] Liu JY, Liu YC, Lee SS, et al. Extremely high prevalence and genetic diversity of hepatitis C virus infection among HIV-infected injection drug users in Taiwan[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(11): 1761-1768.

[26] Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevalier S, et al. Improvement of hepatitis C virus (HCV) genotype determination with the new version of the INNO-LiPA HCV assay[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45: 1140-1145.

(收稿日期: 2011-08-20)

• 综 述 •

糖化血红蛋白检测方法研究进展

蔡瑜综述, 温和审校

(安徽省合肥市第一人民医院检验科 230061)

关键词: 血红蛋白 A, 糖基化; HbA1c; 离子交换层析; 亲和层析

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 02. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)02-0194-03

目前, 糖化血红蛋白(HbA1c)可作为糖尿病筛选、诊断、长期血糖控制、疗效评估的有效监测指标^[1], 在临床中广泛应用。HbA1c 对总死亡率的预测价值超过胆固醇浓度、体质指数和血压, HbA1c 下降 1% 导致微血管并发症危险性减少 35%, 严格控制血糖水平可使眼睛病变、神经病变、心血管病变和肾脏病变降低^[2]。

1 糖化血红蛋白 HbA1c 的特性

1962~1965 年 Rahbar 在电泳溶血产物时发现一条异常快速泳带组分, 后来证实此快速泳动的 Hb 实际上与 HbA1c 的结构相同, 在糖尿病患者血清中浓度增加 2~3 倍^[3]。健康人出生后有 3 种血红蛋白, HbA($\alpha_2\beta_2$, >95%)、HbA2($\alpha_2\delta_2$, 2%~3%)、HbF($\alpha_2\gamma_2$, 1%)。血红蛋白根据所带电荷不同, 利用离子交换层析或电泳法分离 HbA, 组分被命名为 HbA0、HbA1a1、HbA1a2、HbA1b 和 HbA1c。健康人体内, 葡萄糖随着血液自由扩散到红细胞内与血红蛋白发生反应, 血红蛋白 β 链 N 末端的缬氨酸(Val)是最常见的糖基化位点。糖化血红蛋白就是红细胞中血红蛋白与葡萄糖不可逆的非酶促蛋白糖基化反应的产物, 寿命与红细胞的寿命一致。人体内红细胞的寿命约为 120 d, 因此糖化血红蛋白反映的是检测前 120 d 平均血糖水平, 较 FPG 和 OGTT 有独特的优越性, 并且与患者是否空腹、抽血时间、是否使用胰岛素等因素无关。但是几乎所有会改变红细胞寿命的因素都会导致 HbA1c 检测结果的不

准确, 如再生障碍性贫血、溶血性贫血、活动性出血、慢性酒精中毒、脾切除术后、镰刀状细胞贫血、红细胞清除障碍、遗传性球形红细胞增多症^[4]。1996 年 4 月起在日本, HbA1c 被纳入老年人保健法中糖尿病筛选的检查项目。2002 年美国糖尿病协会(ADA)已将其作为监测糖尿病控制的金标准。

2 糖化血红蛋白 HbA1c 的检测方法

WHO/WPRO 宣言建议, HbA1c 作为评估长期血糖控制情况的金标准应每 3~6 个月检测一次^[5]。HbA1c 的测定方法经过 30 多年的发展已有 30 多种, 按其理化性质大致可以分为两大类: 一类是基于糖化与非糖化血红蛋白所带电荷不同, 如离子交换层析法和电泳法等; 另一类是基于糖化与非糖化血红蛋白的结构不同, 如亲和层析、免疫法及酶法等。其中, 免疫法又可分为 RIA、EIA 和胶乳免疫凝集法等。美国临床化学协会(AACC)、糖化血红蛋白标准化分会和 IFCC HbA1c 标准化工作组建议将 HPLC 方法作为检测糖化血红蛋白的金标准^[6]。

2.1 离子交换层析法 离子交换层析法是基于血红蛋白 β 链末端缬氨酸糖基化后所带电荷不同而建立的。应用弱酸性阳离子交换树脂, 在一定低浓度洗脱液和接近中性 pH 条件下, HbA1c 末端缬氨酸糖基化后几乎不带正电荷, 首先被洗脱。非糖基化的 HbA 带正电荷, 被高浓度洗脱液洗脱, 因此可通过此方法将其与其他组分(HbA1b、HbA1a、HbF、HbA0)区分