·检验技术与方法·

人外周血淋巴细胞 FMRP 的免疫细胞化学分析方法的建立*

富显果，廖　娟，郭小燕，严爱贞，张　朵，兰风华△
（南京军区福州总医院临床遗传与实验医学科，福建福州 350025）

摘　要：目的　建立免疫细胞化学方法检测脆性 X 智力障碍蛋白（FMRP），进而实现脆性 X 综合征（FXS）的初步筛查。**方法**　对 20 份正常样本及疑似 FXS 患者的标本进行免疫细胞化学染色和免疫荧光染色并计数阳性率。**结果**　带绿色荧光的 FMRP 在淋巴细胞胞浆中表达与免疫组化相一致，正常标本正常阳性表达率范围为 82%～96%，该疑似 FXS 患者的阳性细胞表达率为 90%。**结论**　可采用外周血淋巴细胞 FMRP 免疫细胞化学方法进行 FXS 的初步筛查。

关键词：脆性 X 综合征；　脆性 X 智力障碍蛋白；　免疫细胞化学
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.040　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)20-2527-02

脆性 X 综合征（FXS）是一种常见的遗传性智力低下综合征。其全突变相关表型发病率在男性约为 1/4 000，女性约为 1/8 000[1]。该病发病具有明显的性别差异，主要表现为轻到重度的智力低下及其他多种临床表型。该病的疾病基因是脆性 X 智力障碍 1 基因（FMR1）。FMR1 基因非编区 CGG(n)重复序列的动态突变或 FMR1 基因缺失或点突变，使其编码的脆性 X 智力障碍蛋白（FMRP）表达减少或者缺失，从而导致 FXS。通过对 20 份正常样本及疑似 FXS 患者的鉴别诊断，建立免疫细胞化学方法检测 FMRP，进而实现 FXS 的初步筛查。

1　资料与方法

1.1　一般资料　1 疑似 FXS 家系患者，男，25 岁，具有 FXS 表型，如大耳、尖下巴及智力低下，其弟及两个姐姐所生的儿子有相似的表现。另以 20 例健康者（男 10 例，女 10 例，均来自本院体检中心）外周血为对照。

1.2　试剂　鼠抗人 FMRP 单克隆抗体为 Abnova 公司产品，抗荧光淬灭剂、DAPI 染液为碧云天公司产品，FITC－山羊抗小鼠 IgG（H＋L）为北京中山金桥产品，UltraSensitiveTMS-P 超敏试剂盒（鼠/兔）、AEC 显色试剂盒为福州迈新公司产品。

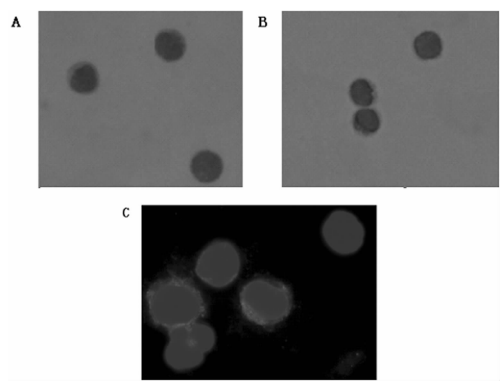
1.3　方法

1.3.1　FMRP 免疫细胞化学染色　参照 Willemsen 等[2]建立的检测方法：(1)外周血 6 h 内制成血涂片，每例至少 2 张涂片，自然风干；(2)3%多聚甲醛固定 10 min，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，5 min/次；(3)100%甲醇破膜 20 min，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，5 分/次；(4)加 50 μL 过氧化氢溶液，室温下孵育 10 min，以阻断内源性过氧化物酶的活性，0.01 mol/L PBS 洗 3 次，5 分/次；(5)除去 PBS 液，加 50 μL 正常非免疫动物血清，室温下孵育 10 min；(6)除去血清，加入鼠抗人 FMRP 单克隆抗体（1∶75，0.01 M PBS 稀释），空白对照用稀释液（0.01 mol/L PBS）替代鼠抗人 FMRP 单克隆抗体，37 ℃孵育 1 h。0.01 M PBS 洗 3 次，5 分/次；(7)除去 PBS，加入 50 μL 生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG 抗体，室温孵育 10 min。0.01 M PBS 洗 3 次，5 分/次；(8)除去 PBS，加入 50 μL 链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液，室温孵育 10 min。0.01 M PBS 洗 3 次，5 分/次；(9)除去 PBS，AEC 显色，显微镜下观察 10～15 min；(10)自来水冲洗，苏木素复染 10 s，0.01 mol/L PBS 冲洗返蓝；(11)水性封片剂封片，封固及加盖玻片；(12)计数 100 个淋巴细胞中阳性细胞数。结果判断：每份样本均进行两次免疫细胞化学染色。FMRP 主要分布于细胞质内，油镜（10×100）下胞浆有红色颗粒沉淀淋巴细胞为阳性细胞，胞浆不显色为阴性细胞，计数 100 个淋巴细胞中的阳性细胞数。外周血淋巴细胞 FMRP 界定点根据 Willemsen 等[3]对完全突变患者 FMRP 水平的研究，确定 42%作为诊断男性 FXS 全突变患者的界定点。

1.3.2　FMRP 免疫荧光染色　(1)、(2)步骤同免疫细化学染色；(3)0.5% Triton 破膜 30 min，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，5 分/次；(4)除去 PBS 液，加 50 μL 正常山羊血清，室温下孵育 30 min；(5)除去血清，加入鼠抗人 FMRP 单克隆抗体（1∶50，正常山羊血清稀释），空白对照用稀释液（0.01 mol/L PBS）替代 FITC－山羊抗小鼠 IgG 抗体，4 ℃孵育过夜；(6)再置 37 ℃复温 15 min，0.01 mol/L PBS 洗 3 次，5 分/次；(7)除去 PBS，加入 FITC－山羊抗小鼠 IgG 抗体（1∶100，正常山羊血清稀释），37 ℃避光孵育 40 min，0.01 mol/L PBS 洗 3 次，5 分/次，再用蒸馏水洗涤 2 min；(8)除去残余液体，加 DAPI 染液（1∶1 000），室温染 5 min，蒸馏水浸泡 1 min；(9)除去残余液体，滴加抗荧光淬灭剂，中性树胶封片，封固及加盖玻片；(10)高倍油镜下观察淋巴细胞（10×100）。

2　结　　果

对 20 份正常对照样本和一疑似 FXS 患者样本进行免疫细胞化学染色，并计数 100 个淋巴细胞中的阳性细胞数，见图 1A、1B。20 份健康者 FMRP 阳性细胞表达率范围为 82%～96%。该疑似 FXS 患者的阳性细胞表达率为 90%，远高于 42%的诊断界定点。通过荧光显微镜观察外周血涂片淋巴细胞中带绿色荧光的 FMRP 的表达情况，结果与免疫组化相一致，带绿荧光的 FMRP 在淋巴细胞胞浆中表达，见图 1C。



A：FMRP 阴性淋巴细胞；B：FMRP 阳性淋巴细胞；C：FMRP 免疫荧光染色。

图 1　外周血淋巴细胞 FMRP 染色

*　基金项目：福建省重点科技项目（2010Y0045）。　△　通讯作者，E-mail：fhlan009@qq.com。

3 讨　论

本研究依据 Willemsen 等[2]的方法建立了抗体检测外周血 FMRP 进行 FXS 快速诊断的方法，其依据是正常淋巴细胞均有 FMRP 表达，而 FXS 患者 FMRP 表达缺陷的现象，通过计数外周血中 FMRP 有表达的淋巴细胞数，把淋巴细胞 FMRP 表达的男性全突变患者诊断界定点定为 42%，低于该比率就认为可能患 FXS[3]，也有报道将其界定点设为 50%[4]。有研究表明，男性完全突变患者外周血淋巴细胞 FMRP 表达率多在 10%以下，而健康男性其表达率可达 80%以上，两者表达率无重叠从而容易区分[3-4]。但由于女性的 1 条染色体失活(Lyon 化)，具有全突变的女性患者(尤其成年女性)其淋巴细胞的正常染色体有优先表达的倾向，大多数的淋巴细胞 FMRP 呈阳性，有高度假阳性的危险。本研究对 20 份健康者样本进行 FMRP 免疫细胞化学染色，其 FMRP 阳性淋巴细胞率为 82%～96%，和 Willemsen 等的报道相近[2,5-6]。本研究通过间接免疫荧光染色方法观察外周血涂片淋巴细胞中 FMRP 的表达情况，免疫荧光技术具有特异性强、灵敏度高的特点，并可确定 FMRP 在淋巴细胞中的准确定位。结果显示，FMRP 表达与细胞免疫组化一致，在淋巴细胞胞浆中呈均一绿色荧光。但由于荧光标本不能长期保存以及需要荧光显微镜才能观察。因此，免疫细胞化学方法更适用于男性 FXS 患者的常规筛查。

FXS 临床表现各异、复杂多样，单从临床特征无法进行早期诊断，诊断更多的诊赖于实验室检查[7-10]。而外周血淋巴细胞 FMRP 免疫细胞化学方法，具有简便快速等特点，虽然在诊断女性患者还存在很大的局限性，但利用该方法进行 FXS 的初步筛查，同时结合特异性 PCR 分析方法则可形成较为完善的 FXS 的实验室诊断体系。

参考文献

[1] Jin P, Warren ST. Understanding the molecular basis of fragile X syndrome[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(6): 901-908.

[2] Willemsen R, Mohkamsing S, De Vries B, et al. Rapid antibody test for fragile X syndrome[J]. Lancet, 1995, 345(8958): 1147-1148.

[3] Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S, et al. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: a validation of the technique [J]. Hum Genet, 1997, 99(3): 308-311.

[4] Tassone F, Hagerman RJ, Ikle Dn, et al. FMRP expression as a potential prognostic indicator in fragile X syndrome[J]. Am J Med Genet, 1999, 84(3): 250.

[5] Romero-Espinoza P, Rosales-Reynoso MA, Willemsen R, et al. FMR1 protein expression in blood smears for fragile X syndrome diagnosis in a Mexican population sample[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2010, 14(4): 511-514.

[6] Ravindran MS, Patel ZM, Adhia RA, et al. Validity of analysis of FMRP expression in blood smears as a screening test for Fragile X Syndrome in the Indian population[J]. J Clin Lab Anal, 2005, 19(3): 120-123.

[7] 李长民，刘巍，谭文华. 家族遗传性疾病-脆性 X 综合征的筛查及产前诊断[J]. 中国优生与遗传杂志，2007，15(5)：53-54.

[8] 杨建一，白爱萍. 脆性 X 综合征的诊断方法[J]. 医学综述，1999，5(12)：537-539.

[9] 富显果，张朵，兰风华. 脆性 X 综合征实验室诊断研究进展[J]. 福建医科大学学报，2008，42(4)：384-386.

[10] 徐学刚，刘睿智. 脆性 X 综合征及其实验室检测研究进展[J]. 中国妇幼保健，2008，23(35)：5083-5086.

(收稿日期：2012-01-09)

·检验技术与方法·

高效液相色谱法检测 HbA1c 未检出结果的原因分析

刘世文，崔海丽，侯云修

(滨州医学院附属医院中心实验室，山东滨州 256603)

摘　要：目的　探讨 HA-8160 高效液相色谱仪在全血模式下糖化血红蛋白(HbA1c)结果未能检出的原因及解决办法。**方法**　首先检测 38 例全血模式下 HbA1c 未能检出结果样本的 Hb 浓度和红细胞沉降率(ESR)，然后检测 8 例 ESR 正常 Hb 浓度不同样本的 HbA1c，低速离心，弃去不同量血浆后再测定 HbA1c，最后检测 10 例 Hb 浓度大于 65 g/L 伴有 ESR 明显增高样本的 HbA1c。**结果**　ESR 正常样本，能测出结果所需最低 Hb 浓度为 65 g/L；轻度贫血伴有 ESR 明显增高的样本即使 Hb 浓度大于 65 g/L 也不能检出结果。未能检出结果的样本弃去部分血浆后可测出结果，弃去不同量血浆后其结果间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　HA-8160 高效液相色谱仪测定 HbA1c 能否检出结果与 Hb 浓度及 ESR 有关系，与 HbA1c 百分含量无关。未能检出结果的样本，低速离心弃去部分血浆后即可测出结果。Hb 浓度正常的样本不受 ESR 影响均能检出结果。

关键词：糖化血红蛋白；　色谱法，高效液相；　血红蛋白；　血沉

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.041　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2012)20-2528-03

糖化血红蛋白(HbA1c)能反映长期血糖水平，是监测糖尿病治疗的重要指标[1-5]。高效液相色谱法具有全自动、快速、高效、特异性强及精密度高的特点，是目前公认检测 HbA1c 的金标准[6-7]。HA-8160 高效液相色谱仪是由日本生产的 HbA1c 检测仪器，工作中发现在全血模式下一些样本未能测出结果，为探究其原因及解决办法做了以下研究。

1　材料与方法

1.1　标本来源　来自本院住院及门诊患者的全血标本。

1.2　仪器与试剂　HA-8160 高效液相色谱仪(日本)，试剂 ARKRAY 株式会社(日本)；Sysmex SF-3000 全自动五分类血球计数仪(日本)，试剂 Sysmex 生产；全自动血沉仪 ALIFAX Test1(意大利)；微量移液器(eppendorf 股份公司德国)；ED-