

• 检验技术与方法 •

毛细管免疫固定电泳血清分型技术的临床应用

甘志彪, 陈 昕, 吴文苑, 马江涛, 邱灵冰, 马 云

(深圳市人民医院检验科, 广东深圳 518020)

摘要:目的 研究毛细管免疫固定电泳血清分型技术在临床肾病、血液病诊疗中的应用。方法 对临床疑似由单克隆免疫球蛋白增多引起的肾病、血液病的患者 960 例做免疫固定电泳血清分型检测。结果 阳性病例 161 例, 占 16.8% (主要指单克隆免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM κ 或 λ 型增多) 并将其中阳性 20 例主要典型代表性病例与传统琼脂糖凝胶免疫固定电泳作比较, 证实了其方法的可靠性。结论 毛细管免疫固定电泳血清分型技术有助于单克隆免疫球蛋白增多性疾病的早期诊断, 治疗效果和预后的判断, 与传统琼脂糖凝胶免疫固定电泳比较具有更好的可靠性。

关键词: 毛细管电泳; 免疫固定电泳; 单克隆免疫球蛋白; 琼脂糖凝胶电泳

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)10-1271-02

电泳技术能够较好的将人体血清蛋白质主要组份分离开并进行定量分析, 从而为临床诊断提供帮助, 但是普通电泳不能提供某些疾病诊断的直接证据。1969 年 Alper 首先利用免疫固定电泳技术进行蛋白质多态性分析, 从而很好解决了人类某些疾病诊断及预后。本研究利用的毛细管固定电泳技术对本院就诊的 960 例患者作血清免疫分型分析并与传统的琼脂糖凝胶电泳作对比分析, 结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院住院及门诊患者, 主要为肾病和血液病专科的患者。

1.2 仪器与试剂 法国 Sebeco 公司 Hydrasys、Capillays 电泳仪器及其配套的试剂盒

1.3 方法

1.3.1 将分离好的血清标本与试剂放在待测架上, 由 Capillays 自动扫描进样、吸样、反应 6 min 后显示结果图, 由仪器自动完成。

1.3.2 琼脂糖凝胶固定电泳 (1) 电泳, 将待测血清适当稀释后分别加入样梳的六个孔内于 Hydrasys 电泳仪上 20 ℃, 270 V, 9 min。(2) 孵育, 于电泳后区带上加入抗 IgG、IgA、IgM、 κ 、 λ 抗体 20 ℃, 5 min。(3) 干燥, 用滤纸吸干多余的抗血清 40 ℃, 8 min。(4) 冲洗、染色及脱色, 取出琼脂糖凝胶胶片置于染色舱内选择相应程序仪器自动完成。

2 结 果

2.1 毛细管电泳仪上结果的判断 在电泳图谱上球蛋白区位置出现相应的 IgG、IgA、IgM、 κ 或 λ 型单克隆免疫球蛋白增多时有一条窄而高的峰出现(阳性), 本院检测的 960 例患者中阳性 161 例, 阳性率 16.8%, 经骨髓穿刺及其他诊断技术确诊这些患者都为多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、轻链型肾病, 其中男 65 例, 女 96 例, 60 岁以上的 120 例, 60 岁以下 41 例, 见表 1。

表 1 各种类别单克隆免疫球蛋白增多的分布(n)

	IgG	IgA	IgM	游离
κ 型	54	24	6	0
λ 型	30	18	12	16
合计	84	42	18	16

2.2 琼脂糖凝胶电泳来验证 将其具有典型性的 20 例阳性标本用琼脂糖凝胶电泳来验证结果发现有 4 例标本为阴性即没有电泳蛋白带或者电泳很模糊无法判断。这 4 例标本在

Capillays 分析为 IgG、IgM κ 型, 游离的 κ 型、游离的 λ 型。前 2 例 IgG、IgM 含量较高, 后 2 例较低, 笔者分析认为仪器的检出量和人工加样的问题引起。后经巯基乙醇处理有多倍稀释后 IgG、IgM 在琼脂糖凝胶电泳胶片上显示蛋白带, 而后两型游离的 κ 、 λ 却没有。

3 讨 论

多发性骨髓瘤是老年人常见的恶性肿瘤, 老年患者的单克隆免疫球蛋白异常可能与老龄化出现某些免疫系统异常相关。而多发性骨髓瘤容易出现误诊, 漏诊, 主要是因为多发性骨髓瘤患者早期临床表现在肾脏、心脏等疾病上。多因为蛋白尿、肾功能不全、心血管疾病而入住肾内科或者心血管内科。本文有 5 例确诊的骨髓瘤病例即是如此。其中, 4 例以肾炎住在肾内科, 1 例心肌梗死入住心血管内科。早期生化检查免疫球蛋白定量多正常或略高, 毛细管免疫固定电泳结果为 3 例为 IgG κ 型单克隆免疫球蛋白增多, 2 例为 IgA λ 型增多。本室的报告提示多发性的骨髓瘤, 临床医生认为报告与患者的病情不符, 经沟通后由血液病专家会诊, 骨髓穿刺涂片镜检证实为多发性骨髓瘤。这表明仅凭免疫球蛋白定量、血清蛋白电泳作出判断也不准确。有报道血清蛋白电泳可作为 M 蛋白筛查试验, 从本文结果看该结论存在不妥之处^[1]。因为有些 M 蛋白患者血清蛋白电泳图是正常或球蛋白略增高, 仅从图上不易判断。而免疫球蛋白固定电泳更加直观可靠表明单克隆抗体的存在, 是某些单克隆疾病最有力的证据。

毛细管免疫固定电泳血清分型技术在临床的应用能为临床诊断 M 蛋白血症、恶性淋巴瘤、巨球蛋白血症等疾病提供最直接的证据。它比尿本周氏蛋白更敏感, 发现更早。骨髓穿刺虽然是诊断某些血液病恶性肿瘤(主要指多发性肿瘤)金标准, 但是多在发作期易见到骨髓瘤细胞, 早期更多的表现是在免疫球蛋白及单克隆抗体的增高。因此免疫固定电泳技术在即时准确筛查血液病恶性肿瘤具有无比独特的优势, 可作为临床筛查 M 蛋白血症常规方法。

免疫固定电泳技术作为临床诊断某些恶性肿瘤、肾脏疾病、血液病等主要方法之一。其检出率高低直接关系某些疾病的漏诊、误诊, 本研究显示毛细管免疫电泳血清分型方法对单克隆免疫球蛋白增多患者检出率是 100%, 琼脂糖凝胶固定电泳检出率只有 80%。这与文献^[2]的报道有差异。琼脂糖凝胶固定电泳虽然是目前最常用、传统、经典的方法, 具有直观、易懂、普遍被临床医生接受, 但是操作繁琐。人工操作的熟练程度、加样的准确性、冲洗、染色、脱色中液体 PH 值, 染料的好

坏、放置时间的长短等都对结果有影响,人为干扰因素较多。样本含量的高低都对结果有影响(即浆细胞分泌免疫球蛋白抗体的多少都有影响)。毛细管免疫固定电泳技术相比较而言,则操作简便、全自动化操作,结果快速准确、准确率高,检出单克隆抗体含量仅为 50 mg/dL。缺点是结果判断上需要有丰富的临床知识经验,对电泳技术图谱较为了解。曲线图没有电泳带直观,虽然同样为抗原抗体反映,曲线图出现窄而高的峰即可判断,峰值出现同样有主观因素的影响。客观的原因是偶尔少数的交叉反映,这主要是由于免疫学的同一性:单克隆免疫球蛋白具有同样的抗原决定簇,主要有 3 种即为同种型、同种异型和单独型。偶尔可见它们具有同样的抗体反映,在 γ 球蛋白区会出现多克隆增殖免疫球蛋白区形成较宽区带(例如某些肾病综合征、自身免疫性疾病、红斑狼疮)或寡克隆蛋白带,对结果的判断带来影响;人为主观判断为阳性或阴性。另外由于免疫固定电泳只是定性的分析,所以结果上没有一个客观的定量指标,比如什么区带即为单克隆抗体阳性,区带多宽、多高

• 检验技术与方法 •

溶血和黄疸标本对不同核酸提取方法影响的比较

林志芳,李成德,梁结玲

(肇庆市第一人民医院,广东肇庆 526021)

摘要:目的 比较溶血和黄疸标本对磁珠法、一步法和沉淀煮沸法三种不同核酸提取方法 HBV DNA 检测结果的影响。方法 制备含有不同浓度梯度血红蛋白或总胆红素的血清,使其 HBV DNA 浓度相同;检测过程中除核酸提取方法不同外,其余操作完全相同,进行实时荧光定量 PCR 检测,比较三种核酸提取方法对不同程度的溶血和黄疸标本的抗干扰能力。结果 当 $Hb \leq 0.5$ g/L 时,3 种方法均不受影响, $Hb = 5.0$ g/L 时,一步法与沉淀煮沸法呈假性升高,磁珠法受影响不明显; $Hb = 50.0$ g/L 时,3 种方法均受影响明显,一步法与沉淀煮沸法可被抑制呈阴性。不同浓度的总胆红素对磁珠法与沉淀煮沸法无明显影响,对一步法产生的影响显著,其检测结果可通过调整结果判断部分参数得到修正。结论 在相同检测条件下,磁珠法对溶血和黄疸的抗干扰能力最好,沉淀煮沸法次之。

关键词:核酸提取; 磁珠法; 一步法; 沉淀煮沸法; 溶血; 黄疸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)10-1272-03

临床血液标本中,溶血和黄疸标本十分常见,研究表明血红蛋白及其代谢产物可能与 Taq 酶相互作用,进而抑制 Taq 酶的活性,使 PCR 扩增效率明显降低,导致定量测定结果偏低^[1]。在核酸提取过程中,抑制物清除能力的大小将直接影响检测结果的质量。溶血和黄疸是临床实验室常见的干扰因素,为此,笔者采用磁珠法、一步法和沉淀煮沸法 3 种方法提取不同程度的溶血和黄疸标本核酸,在相同条件下扩增检测,比较 3 种核酸提取方法的抗干扰能力,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本制备

1.1.1 溶血血清 取体检正常者(HBsAg 阴性)EDTA-K₂ 抗凝血 1 支,离心去上清,用生理盐水洗涤 3 次后与 HBV DNA 阴性血清混合,经血细胞分析仪 CD-1700 测定 Hb 浓度 3 次取均值,再取适量稀释用血清(取自本院体检正常者,HBV DNA 阴性且总胆红素小于 17.0 μ mol/L)将 Hb 浓度分别稀释至 100.0 g/L、10.0 g/L、1.0 g/L、和 0.1 g/L,置 -20 $^{\circ}$ C 冻融成溶血标本。

1.1.2 黄疸血清 选取非乙肝患者的高浓度黄疸标本数份混匀,取稀释用血清将总胆红素浓度稀释至 352.0 μ mol/L、176.0 μ mol/L、88.0 μ mol/L 和 44.0 μ mol/L。

即可判断为某一类型的单克隆抗体增多,游离的 κ 、 λ 抗体轻链是否确定,因为本方法无法检测 IgD、IgE(琼脂糖凝胶固定电泳技术亦存在上述问题),虽然它们含量极低且少见,但并不排除。本文中有一例 λ 型轻链骨髓瘤患者后用其他方法证实为 IgE λ 型免疫球蛋白增多,这些都是今后工作、研究中值得探讨、商榷之处。另外,毛细管电泳技术的试剂成本较高也是这一技术在临床不易推广普及原因之一。

参考文献

- [1] 李伟. 毛细管蛋白电泳临床应用中的体会[J]. 检验医学与临床, 2011,8(13):1627-1628.
- [2] 顾志冬,徐汝明,王颖智,等. 应用高效毛细管电泳筛检和鉴定血清中 M 蛋白[J]. 诊断学理论与实践,2005,4(4):303-307.

(收稿日期:2013-01-11)

1.1.3 实验血清 (1)取适量阳性血清(购自中国药品生物制品检定所的 HBV DNA 标准血清稀释至 1.5×10^7 IU/mL)与稀释用血清等体积混匀作为实验对照。(2)取适量阳性血清分别与含干扰成分的血清等体积混匀成分别含 0.05 g/L、0.5 g/L、5.0 g/L 和 50.0 g/L Hb 和含 22.0 μ mol/L、44.0 μ mol/L、88.0 μ mol/L 和 176.0 μ mol/L 总胆红素的阳性血清。

1.2 仪器与试剂 试剂包括一步法和磁珠法核酸提取试剂及 HBV DNA 定量扩增试剂;磁珠分离器由湖南圣湘生物科技有限公司提供;沉淀煮沸法提取试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司;实时荧光 PCR 扩增仪 M JOPTICON II 购自美国 MJ 公司。

1.3 方法

1.3.1 一步法 吸取 5.0 μ L 血清与 5.0 μ L 提取试剂混合,加入 PCR 扩增试剂即可进行扩增,总反应体系 50 μ L。

1.3.2 沉淀煮沸法 50 μ L 实验血清与 HBV DNA 阴性血清 50 μ L 混匀与等体积浓缩液混合离心,弃上清液,加入 100 μ L 裂解液震匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后离心,取 10 μ L 上清液与 40 μ L 扩增试剂混匀。

1.3.3 磁珠法 取 50 μ L 实验血清与 HBV DNA 阴性血清 150 μ L 按试剂说明提取后,加 100 μ L 洗脱液洗脱,取 10 μ L