

N-末端脑钠肽分子与 BNP 分子以 1 : 1 的比例存在于血循环中, 由于其在血液半衰期长(60~120 min), 生理活性相对稳定, 低浓度的胆红素、血红蛋白不会影响体外检测, 但高浓度的脂血, 严重的溶血或黄疸会影响到样本以及偶合物在硝基纤维膜上的层析过程, 所以在检测 N-末端脑钠肽时, 应避免此类样本。

胶体金法作为第三代检测方法, 逐渐应用于床旁检测与实验室检测, 其主要特点是速度快、便捷, 多通道仪器适用于批量分析。

通过本组研究表明, 胶体金法检测 N-末端脑钠肽来鉴别心源性呼吸困难和非心源性呼吸困难是一个可靠的快速检测方法, 且能够真实反应体内 N-末端脑钠肽水平, 能在较短时间内为临床医师提供敏感、特异的诊断指标, 为临床医师赢得时间, 及时采取干预措施, 值得为临床所推广。所以笔者认为由于胶体金法检测 N-末端脑钠肽的简便、快速(20 min 结束), 在得到严格的质量控制下, 应成为一种常规检测方法。

参考文献

[1] Januzzi JL, Camargo CA, Anwaruddin S, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study[J]. Am J Cardiol, 2005, 95(8): 948-954.

[2] Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S, et al. Head-to-head

comparison of N-terminal pro-BNP, BNP and Nt-ANP in diagnosis left ventricular dysfunction[J]. Clim Acta, 2001, 310(2): 193-197.

[3] Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, et al. Diagnostic accuracy of B type natriuretic peptide and amino terminal proBNP in the emergency diagnosis of heart failure[J]. Heart, 2005, 91(5): 606-612.

[4] Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, et al. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure; an international pooled analysis of 1256 patients; the International Collaborative of NT-proBNP Study[J]. Eur Heart J, 2006, 27(3): 330-337.

[5] Kragelund C, Grønning B, Køber L, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(7): 666-675.

[6] Rodseth RN. B type natriuretic peptide—a diagnostic breakthrough in peri-operative cardiac risk assessment[J]. Anaesthesia, 2009, 64(2): 165-178.

[7] 张丽, 张春玲, 丛祥凤, 等. N 末端 B 型钠尿肽原和大内皮素-1 对严重心力衰竭患者的预后作用及其与心血管病关系的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1237-1241.

(收稿日期: 2013-05-10)

• 检验技术与方法 •

超薄型琼脂糖凝胶板的制作及血清蛋白电泳方法的建立

王月婷, 陆桂琴, 苏照环, 于嘉屏[△]

(上海迪安医学检验所研发实验室, 上海 200433)

摘要:目的 制作超薄型琼脂糖凝胶板并建立血清蛋白电泳检测方法。方法 采用软玻璃及透明胶片自制胶板模具; 采用透明胶片刻制加样膜条; 恒压 65 V 电泳分离血清蛋白。结果 所配制的琼脂糖凝胶板厚度小于 0.8 mm; 一块板同时可分析 8 个样品; 各蛋白区带的批内 CV 值小于 16%, 批间 CV 值小于 27%; 120 名体检正常人血清的参考范围为: 清蛋白 53.1%~70.3%、 α_1 -球蛋白 0.9%~3.5%、 α_2 -球蛋白 3.5%~8.9%、 β -球蛋白 7.1%~14.3%和 γ -球蛋白 13.0%~25.4%。结论 自制的超薄型琼脂糖凝胶电泳板能清晰分离血清中 5 类蛋白质, 染色脱色时间短, 背景清楚, 性能指标稳定, 可用于血清蛋白的分离及检测。

关键词:血清蛋白电泳; 琼脂糖凝胶; 参考范围

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2155-02

血清蛋白电泳是检测血清蛋白质类的常用方法, 其电泳图谱可了解患者血清蛋白质全貌, 用于初筛试验, 为疾病诊断提供较全面的信息^[1]。目前各医疗机构检验科应用的方法大多为国外的全自动电泳仪, 价格昂贵, 分析成本很高^[2]。醋酸纤维素薄膜电泳存在灵敏度差, 重复性不佳等缺点, 且图谱难以保存^[3]。本文报道了一种超薄型琼脂糖凝胶板的制作方法并用于血清蛋白电泳检测, 价格低廉, 操作简便, 适合在中小型医院检验科应用。

1 材料与方法

1.1 样品来源 收集各个年龄段体检正常的人血清样品, 当天检测。

1.2 仪器与试剂 DYY-6D 型电泳仪电源(北京市六一仪器厂); DYCP-38C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司)。凝胶缓冲液: pH8.6 三羟甲基氨基甲烷缓冲液。称取三羟甲基氨基甲

烷 1.212 g, EDTA 0.29 g, NaCl 15.85 g, 调 pH 值至 8.6, 去离子水定容至 1 000 mL。电极缓冲液: pH8.6 巴比妥缓冲液, 离子强度为 0.075。称取巴比妥 2.76 g, 巴比妥钠 15.4 g, EDTA 0.29 g, 调 pH 值至 8.6, 去离子水定容至 1 000 mL。琼脂糖凝胶板: 0.65% 的琼脂糖凝胶。称取琼脂糖 0.65 g, 溶于 50 mL 的凝胶缓冲液, 去离子水定容至 100 mL。氨基黑 10B 染液: 称取氨基黑 10B 0.1 g, 溶于无水乙醇 20 mL 中, 加冰乙酸 5 mL, 甘油 0.5 mL 使其溶解。再称取碘基水杨酸 2.5 g, 溶于少量去离子水中, 加入前液。最后去离子水定容至 100 mL。脱色液: 甲醇 45 mL, 冰乙酸 5 mL, 去离子水定容至 100 mL。

1.4 方法

1.4.1 模具及胶板的制作 取一块长 20 cm、宽 15 cm、厚 0.8 mm 的台面软玻璃, 将中央长 9.5 cm、宽 6.5 cm 的面积裁空, 下衬 10 cm×7 cm 的透明胶片, 胶片需紧贴挖空部分的边缘, 不能漏胶。将沸水浴融化后的琼脂糖凝胶冷却至 60 ℃ 左右,

[△] 通讯作者, E-mail: yujp60@163.com。

倒在模具的胶片上,用载玻片从裁空的一边拉向另一边,使凝胶均匀布满整个胶片,防止气泡产生。待凝胶凝固后,用小刀沿中空软玻璃边缘分离凝胶,之后从一端将软玻璃模具小心的揭除,即完成凝胶板的制作。再将一裁成与胶板同样大小的保鲜薄膜贴于凝胶板上,放置塑料盒中,放 2~8 ℃ 冰箱待用。

1.4.2 加样模条的制作 取一长 17 cm、宽 2 cm 的透明胶片,在中央用手术刀片等间距刻长 4 mm,宽 0.8 mm 共计 8 个加样微孔,孔间距约 3 mm。

1.4.3 电泳操作 (1)从冰箱取出凝胶板,恢复至室温后,在距凝胶板一侧的边缘约 1 cm 处覆盖一条宽为 2 cm 的滤纸条,吸去多余水分,然后将加样膜条置于其上并使其紧贴胶板,避免气泡产生。将 2 μ L 血清样品加入孔中,注意使加入的样品均匀的充满孔内,静置 5 min,待血清样品扩散进入胶内,用一条新的滤纸条覆盖于加样孔膜上,吸去多余的样品,然后除去加样孔膜。(2)将琼脂糖凝胶板放在电泳槽上,加样侧置于阴极,两端用八层纱布搭桥,电泳条件为恒压 65 V,时间 30 min。(3)电泳毕,取出凝胶板,氨基黑 10B 染色 20 min。再置于脱色液中脱色至背景干净为止。(4)把脱色干净的凝胶板置于全自动凝胶成像分析仪下扫描,计算各条带的光密度百分比。

1.5 统计学处理 血清蛋白电泳结果采用百分比的形式,因结果服从正态分布,参考值范围用 $\bar{x} \pm 1.96s$ 。

2 结 果

2.1 电泳图谱 超薄型琼脂糖凝胶电泳分离血清蛋白图谱,见图 1。

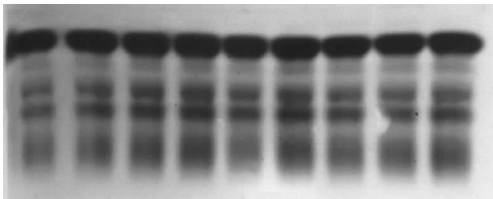


图 1 超薄型琼脂糖凝胶分离血清蛋白条带图谱

2.2 批内精密度试验 取同一份血清在同一张凝胶板上点样 8 份,电泳后扫描求得结果。分别计算平均值($\bar{x}$),标准差(s),变异系数(CV)。如表 1 所示。

表 1 批内精密度试验结果			
蛋白	平均值($\bar{x}$,%)	标准差(s ,%)	CV(%)
清蛋白	63.79	2.81	4.40
α_1 -球蛋白	2.1	0.32	15.25
α_2 -球蛋白	6.73	0.52	7.79
β -球蛋白	10.14	1.24	12.24
γ -球蛋白	17.20	1.49	8.69

2.3 批间精密度试验 取同一份血清在不同的 5 张凝胶板上分别电泳,扫描求得结果。分别计算平均值($\bar{x}$),标准差(s),变异系数(CV)。如表 2 所示。

2.4 参考范围的确立 取 120 份正常人的血清,进行血清蛋白电泳,计算均值($\bar{x}$),标准差(s),确立参考范围。清蛋白:53.1%~70.3%; α_1 -球蛋白:0.9%~3.5%; α_2 -球蛋白:3.5%~8.9%; β -球蛋白:7.1%~14.3%; γ -球蛋白:13.0%~25.4%。

表 2 批间精密度试验结果			
蛋白	平均值($\bar{x}$,%)	标准差(s ,%)	CV(%)
清蛋白	64.28	2.84	4.42
α_1 -球蛋白	2.02	0.42	20.83
α_2 -球蛋白	6.52	1.72	26.40
β -球蛋白	10.38	1.87	17.98
γ -球蛋白	16.84	1.68	9.95

3 讨 论

应用现有技术方法所配制的琼脂糖凝胶电泳板,其厚度往往超过 3 mm,不仅影响蛋白质迁移率,还影响染色效果,因为胶板太厚染料不易渗透进去,蛋白质条带往往形成空泡,对扫描定量结果直接造成影响;另外,脱色时间也很长,且不易脱色干净。此外,经典的加样方式是通过齿状加样模具在胶板上留下凹槽来加样,会导致电泳胶板破损,无法使用。针对现有技术存在的上述问题,本研究提供了一种超薄型琼脂糖凝胶电泳胶板的制备方法并用于分离血清蛋白。与现有技术相比,本研究采用自制的塑料薄板作为模具,所制备的琼脂糖板厚度为小于 0.8 mm,电泳通电顺畅,染色时间缩短,且染色完全,脱色时间极短,蛋白质分离的分辨率很高,且与加样薄膜配套使用,操作更简便,点样效果极佳。本法模具的材料易获得,成本低廉,制作简单,电泳操作简单,分离效果好。显色干燥后的胶片可长期保存。

血清蛋白电泳实验可将血清中的蛋白质分离为清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白和 γ -球蛋白,是了解患者血清蛋白质全貌的有价值的方法,可用为初筛实验。如急性炎症或急性时相反应时常以 α_1 、 α_2 区带加深为特征;肾病综合征、慢性肾小球肾炎时呈现清蛋白下降, α_2 、 β 球蛋白升高;缺铁性贫血时可由于转铁蛋白的升高而呈现 β 区带增高,而慢性肝病或肝硬化呈现清蛋白显著降低, γ 球蛋白升高 2~3 倍,示免疫球蛋白多克隆高,甚至可见 β - γ 桥,还可在 γ 区呈现细而密的寡克隆区带;单克隆免疫球蛋白异常症(M 蛋白血症)则在电泳区带 α - γ 区呈现致密而深染,高度集中的蛋白克隆增生区带(M 蛋白区带)^[4-6]。因此,分析血清蛋白电泳分离图谱,有助于对疾病的正确诊断,其应用前景十分广阔。

参考文献

[1] 袁瑞丽,孟昊,郭炫,等.血清蛋白电泳分布规律对多种疾病的诊断价值[J].临床和实验医学杂志,2012,11(13):1020-1022.
[2] 李美珠,温少磊,陈展泽,等.琼脂糖凝胶血清蛋白电泳对多发性骨髓瘤诊断的应用[J].国际医药卫生导报,2005,11(14):99-101.
[3] 韩青,孙国华.免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤诊断及分型中的应用[J].大连医科大学学报,2011,33(2):175-177.
[4] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:344-347.
[5] 竺彭波,关平,曾少芳.应用凝胶电泳仪检测健康人血清蛋白组分参考值评析[J].现代医院,2004,4(1):28-29.
[6] 杨俊杰,张广森,陈新瑞,等.72 例多发性骨髓瘤单克隆蛋白分析[J].中南大学学报:医学版,2001,26(2):152-154.