

• 论 著 •

1 种血红蛋白电泳液标本改良方法的探讨^{*}

张 玲, 胡朝晖, 郭周萍, 林晓东, 潘建华, 朱庆义

(广州金域医学检验中心血液病理中心实验室, 广东广州 510330)

摘 要:目的 探讨 1 种血红蛋白电泳液改良制备方法的运用。方法 对一批 EDTA 抗凝全血标本先用加样器吸取血液中沉降的红细胞, 滴入到生理盐水中, 借助吸液嘴从液面自上至下反复冲打, 使红细胞均匀地悬浮在液体当中, 上机离心, 使红细胞充分沉淀在底部, 倾倒入离心后的上清液, 以去除血浆及杂质, 留余量的红细胞, 加蒸馏水或溶血素, 溶解红细胞, 双手端起试管架利用手腕轻轻前后摇动数次至溶血液澄清透明。结果 该方法与传统方法作比较, 将二者结果再与国际地贫协会推荐的方法高效液相色谱法(HPLC)测得的结果比较, 3 种初筛方法再与地贫基因确认方法比较结果符合性, 从而可以客观地评价试验的可靠性。结论 该方法 SOP 操作所电泳图效果一致、省时省力、节省试剂成本、而且整个制备血红蛋白液的过程中不需接触任何化学试剂, 不会对环境有污染, 减小了有毒试剂对人体的伤害。

关键词: 血红蛋白液; 制备方法; 有毒化学品

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.12.046

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)12-1746-03

Introduce a improved method for the production of hemoglobin liquid by use of the hemoglobin electrophoresis alkaline^{*}

Zhang Ling, Hu Zhaohui, Guo Zhouping, Lin Xiaodong, Pan Jianhua, Zhu Qingyi

(Hematopathology Central Laboratory, Guangzhou Kingmed Center for Clinical

Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510330, China)

Abstract: **Objective** To introduce a improved method for the production of hemoglobin liquid by use of the hemoglobin electrophoresis alkaline. **Methods** First, we used the pipette to absorb the settlement of red blood cells from a batch of EDTA anticoagulated whole blood specimens, then dropped them into the 0.9% saline washed human erythrocytes. With the help of the pipette nozzle we pipet from the liquid surface to bottom repeatedly, made the red cells suspended in the liquid evenly. The samples should be centrifuged and the red blood cells fully deposited at the bottom, then poured the supernatant after centrifugation to remove the impurities in plasma and leave the allowance of red blood cells. We add distilled water or hemolysin to lysis RBC. Hands up test tubes rack using wrist gently back and forth several times until the hemolysis was clear and transparent. **Results** Compared the results of the modified method and the traditional method, then the two results compared with the results of HPLC recommended by international association of thalassemia method. Compared the results of three screening methods with that of the thalassemia gene identification method. So we could objectively evaluate the reliability of the test. **Conclusion** The result of the improved method are same to the electrophoretogram by SOP operation, it will be more efficient and reduce the cost of reagent. The whole process of preparing hemoglobin solution doesn't contact with any chemical reagent. So there will be no pollution to the environment, and it also reduces the harmful of toxic reagent to the human body.

Key words: hemoglobin liquid; preparation method; toxic reagent

血液的主要蛋白成分是血红蛋白, 是血红细胞中的最主要蛋白成分, 而在红细胞中含有微量的超氧化物歧化酶(SOD), 碳酸酐酶、糖酵解酶系等^[1]。在血液部分则含有 200 多种功能不同的蛋白组分^[2], 因此, 血红蛋白制备的第一步即要将红细胞与其他组分进行分离(即分浆处理), 最后通过溶解洗涤红细胞以获得所需的血红蛋白液。目前, 常用的血红蛋白电泳液的制备方法主要有四氯化碳溶血法、氯仿溶血法、皂素氰化钾溶血法, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 实验组 200 例来自当天送来本中心做地贫电泳初筛和基因诊断的孕前、产前、婚检及体检的样本。

1.2 方法

1.2.1 血红蛋白分析 美国 Helena 全自动快速电泳系统

(SPIFE 3000) 配套试剂电泳法, EDTA-K₂ 抗凝血 2 mL, 采用美国 Helena 公司全自动快速电泳系统(SPIFE), 于 pH 8.6 琼脂糖凝胶电泳, 在碱性条件下琼脂凝胶, 由于各种 Hb 具有不同的等电点, 可分离出各种 Hb 区带, 进行定性或定量检测各种 Hb 区带。

1.2.2 血常规分析 贝克曼 COULTER 全自动血球分析仪配套试剂仪器法, 对样本进行有关红细胞参数的分析。

1.2.3 弱阳离子交换色谱法 w-HPLC 美国 PRIMUS CLC385 System-HPLC、2.7 mL 全血加入含 0.3 mL EDTA-K₂ 试管或柠檬酸盐缓冲液中, 样本直接上机或稀释后上机均可同时进行。使用 Primus CLC 385 机型及 Primus 公司地贫试剂盒, 在该系统检测中有 3 套程序供选用: Quick Scan (5.5 min)、High Resolution (10.5 min) 或 Quick reflex (先作 quick

^{*} 基金项目: 广州市医药卫生科技项目(20151A011100)。 作者简介: 张玲, 女, 检验主管技师, 主要从事血液学工作研究。

scan,若有不正常的则自动 reflex 作 High resolution)。原始数据自动储存并同时打印色谱报告。实验操作完全按照仪器使用说明。

1.2.4 红细胞渗透脆性试验 严格按照试剂说明书进行操作,正常值为溶血百分率大于 60%,如果小于 60%可判定为脆性阳性。

1.2.5 THal 基因检测 GAP-PCR 检测 3 种常见的缺失型 α -Thal 基因($-^{SEA}$ 、 $-a^{3.7}$ 与 $-a^{4.2}$),试剂由亚能公司提供,采用 PCR 结合反向点杂交法检测 β -珠蛋白基因 17 个位点的 18 种突变,试剂由深圳益生堂生物公司提供。

1.3 判断标准 根据《血液病诊断及疗效标准》^[3]电泳法结果诊断 α -地中海贫血时 HbA2 临界值为小于或等于 2.6%,诊断 β -地中海贫血时 HbA2 临界值为大于或等于 3.8%,wHPLC 结果诊断前者为小于或等于 1.9%,后者为大于或等于 3.0%(wHPLC 参考值为本室自建中国正常成人参考范围),以基因检测为金标准。

1.4 统计学处理 JMTJFX10.34 计数资料,多个样本率的比较运用 R×C 表进行 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 四氯化碳溶血法 将 EDTA 抗凝全血除去血浆,用生理盐水洗去细胞外的杂质,加入蒸馏水溶血,用四氯化碳(AR)溶解,提取脂溶性物质,沉淀细胞膜及基质蛋白,经离心后,上层为澄清透明的血红蛋白液,其具体操作步骤是:新鲜抗凝静脉血离心除去血浆。用生理盐水洗涤红细胞 3~4 次,每次盐水与红细胞之比少于 8:1。最后一次以 3 000~4 000 r/min,快速离心 20 min,尽量吸去生理盐水,按压积红细胞之体积加入等体积的蒸馏水和 0.5 体积的四氯化碳,剧烈震荡 3 min,使彻底溶血,用 4 000 r/min 离心 20 min,吸出上层血红蛋白溶液,待用。该方法制成的 Hb 液清晰、稳定,膜蛋白及四氯化碳在试管底部,容易分离,但毒性较大,花费时间较长。

2.2 氯仿溶血法 该方法操作同四氯化碳溶血法,只是在萃取血红蛋白液时加入两种不同的有机溶剂,即:加四氯化碳和氯仿。该方法制成的 HB 液与四氯化碳法的基本一致,且毒性较小,但能沉淀 UHb,故不适于 UHb 检查。

2.3 皂素氰化钾溶血法 对全血标本做洗涤压缩细胞和溶血的准备,离心 10 min,从血浆中分离出细胞,去除血浆,重新悬浮在 5~10 倍体积的生理盐水溶液(0.85%NaCl)中离心去除悬浮液洗涤压缩细胞 3 次,洗涤标本后,准备样本混合,10 μ L 标本和 100 μ L 溶血液,用力振动 15 s。该方法由于含有氰化物,会对环境有污染。

2.4 其他方法 中国卫生部制定的《全国临床检验操作规程》(第 3 版)提到的方法,血红蛋白溶液的制备,取新鲜抗凝血液,离心后去血浆,用生理盐水洗涤红细胞 3~4 次,最后一次应尽

量移去盐水部分,再加相当于红细胞压积 2~3 倍的蒸馏水,加 1 体积四氯化碳或氯仿,猛烈振摇 5~6 min,静置片刻,高速离心,将上层 Hb 溶液分离出来备用。3 000 r/min 离心 5 min,吸出上层清亮的血红蛋白液。

2.5 改良前操作步骤 现有技术在制备过程中,漩涡器每次混匀只能一只手拿 1~2 支,每次双手最多能处理 4 支样本,且用力充分混匀,标本量大时,耗时太多,混匀时间要求每支溶液保证在 15 s 以上较佳,在此过程中试管底部与设备表面接触所散出的热量相对较高,促使四氯化碳气体挥发更快,操作人员吸入也就相应增加。样本离心 10 min 的时间,每个标本要洗 3 次,(在离心过程需要循环放进与取出样本,离心的次数越多,耗时也就越多),完成整个制备过程耗时非常长的时间。

2.6 改良后操作步骤 本文方法的目的是克服上述技术上的障碍,提供一种毒性小且能快速制备血红蛋白电泳液的方法,现将本文方法介绍如下:(1)用吸管吸取血液中沉降的红细胞 135 μ L,滴入到 7 mL 浓度为 0.9%NaCl 的生理盐水中,借助吸嘴从液面自上至下反复冲打 3~5 次,洗去杂质,使清洁的红细胞均匀地悬浮在液体当中。(2)上机 3 500 r/min 转速下离心 5 min,使红细胞充分沉淀在底部,倾出离心后的上清液,以去除血浆及杂质,留余量的红细胞。(3)加蒸馏水 320 μ L,溶解红细胞,双手端起试管架利用手腕轻轻前后摇动数次至溶血液澄清透明即可。(4)为了获得更好效果,可以再次上机 3 500 r/min 转速下离心 5 min。(5)制备好的血红蛋白电泳液,根据带电粒子在电场中作定向运动,可将可溶性被测物的各个蛋白质进行分离,然后对分离后的凝胶进行染色扫描分析,采用琼脂糖凝胶电泳法,用于筛查地中海贫血和血红蛋白病。根据电泳结果作出判断,如果显示 4 条血红蛋白区带,从阳极端依次为 HBA, HBF, HBA2, CE,则属于正常,除上述出现的区带外,其他区带均属异常区带,目前国内已发现的最常见和重要的异常 Hb 以 HbA 为标志,在 PH8.5TEB 不连续电泳中大致分为 6 组,包括快速异常血红蛋白 H 组和 J 组、慢速异常血红蛋白 G 组、D 组、E 组。此改良方法均可检出且效果较其他方法清晰。需要说明:无论哪种方法对于陈旧血红蛋白区带分散,效果差,不稳定血红蛋白易发生沉淀,所以,制作血红蛋白液采用新鲜血液是最理想的。本文方法制备的 Hb 液电泳图见图 1。(6)将传统方法与本专利方法作比较,将二者结果再与国际地贫协会推荐的方法 HPLC 测得的结果比较,3 种初筛方法再与地贫基因确认方法比较结果符合性,从而可以客观地评价试验的可靠性。目前,国内外已较普遍应用 MCV^[4]和红细胞渗透脆性试验^[5]低于正常值来初筛地贫携带者。地贫携带者的筛查方法有很多^[6],表 1 为所取样本的辅助诊断检测,表 2 为电泳所测数据(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 部分样本红细胞参数及红细胞渗透脆性实验

编号	性别	年龄	OFT (%)	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	RDW(%)	RBC(×10 ¹² /L)
1	女	31 岁	47	115	72	22	311	16	5.2
2	女	27 岁	78	96	74	24	321	17	4.0
3	男	38 岁	30	138	69	22	318	15	6.3

续表 1 部分样本红细胞参数及红细胞渗透脆性实验

编号	性别	年龄	OFT (%)	Hb(g/L)	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/L)	RDW(%)	RBC(×10 ¹² /L)
4	男	43 d	70	123	81	26	321	18	4.7
5	男	19 岁	18	103	65	20	303	22	5.2
6	男	6 岁	18	88	57	16	288	21	5.3
7	女	19 岁	28	101	64	20	319	17	4.9
8	女	5 岁	15	93	59	17	290	22	5.4
9	女	27 岁	21	111	67	22	327	18	5.1
10	男	1 d	81	168	113	37	327	18	4.5

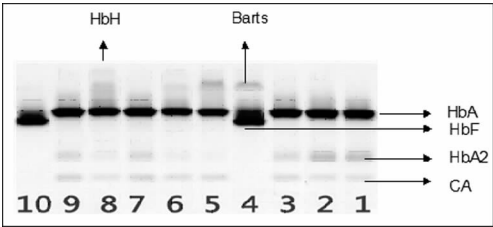


图 1 改良方法制备 Hb 液的电泳图

3 讨 论

与现有技术相比,本文方法的有益效果是本文方法省掉了溶血素和四氯化碳两种有毒化学试剂接触,减少了加溶血素后等待红细胞溶解缓慢的时间,省掉了前后两次漩涡充分混匀时间,整个制备血红蛋白液的过程中不需接触任何化学试剂,不会对环境有污染。离心过程最多只需 5 min,检测临床标本效率高。制备过程中,一只手一次性可以握 4~6 支管,替代了传统方法用真空泵一支支吸走上清液,节省人力,节省时间,为患者提前发报告,节省试剂成本,减小人体伤害。整个制备过程中不需接触任何化学试剂,不会对环境有污染,离心过程最多只需 5 min,检测临床标本效率高,节省人力。本文方法与传统方法、国际地贫协会推荐的 HPLC 方法所测结果与地贫基因确认方法比较结果符合性较高,能客观地评价试验的可靠性,

值得临床推广运用。

参考文献

[1] 曾溢滔. 血红蛋白疾病的诊断和治疗[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(1): 393-394.

[2] 龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2003.

[3] 黄有文. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 49-58.

[4] Kenneth WD, Boehn C, Jemes R, et al. Proectical guide to the diagnosis of thalassemiaet[J]. Am J Med Genet, 1996, 62(2): 29-37.

[5] Silvestroni E, Biancoo I. A highly cost effective method of meas screening for thalssemia[J]. Br Med J, 1983, 286(2): 1007-1009.

[6] 周玉球, 李文典. a-地中海贫血的表型筛查和基因诊断[J]. 中国优生优育, 2001, 12(3): 143-144.

(收稿日期: 2015-01-18)



(上接第 1745 页)

综上所述,全自动化生化分析仪测定时 TBA 存在项目之间的互相污染,因此设定有效、合理的特殊冲洗程序能够有效地对消灭携带污染对测定 TBA 干扰。

参考文献

[1] 唐芳, 何文军, 尹向阳等. 生化分析仪总胆汁酸试剂的携带污染对总二氧化碳测定的干扰分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(17): 1739-1741.

[2] 汪亮. 生化分析仪试剂间交叉污染对总胆汁酸测定的影响研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): 1069-1070.

[3] 朱武军, 邵飞, 邵燕丽, 等. 循环酶法测定总胆汁酸试剂交叉污染及预防措施[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(9): 990.

[4] 沈金华, 刘琴. 协和高密度脂蛋白、总胆固醇、肌酐试剂对总胆汁酸测定影响初探[J]. 中国血液流变学杂志, 2010, 20(4): 666-667.

[5] 易向民, 郑敏. 生化分析仪试剂间交叉污染对总胆汁酸测定的影

响及分析[J]. 临床医学工程, 2010, 17(3): 21-23.

[6] 高磊. 关于血脂检测试剂对总胆汁酸测定结果的影响研究[J]. 健康必读中旬刊, 2013, 12(2): 120-121.

[7] 谢祺, 杨绍敏. Cobas 6000 生化分析仪检测总胆汁酸试剂性能验证[J]. 世界最新医学信息文摘: 电子版, 2013, (25): 147-148.

[8] 刘香萍, 程明刚, 许伟珊, 等. 甘油三酯试剂与总胆固醇试剂对总胆汁酸测定的干扰[J]. 中华全科医学, 2013, 11(4): 621-622.

[9] 王林武. 肌酐酶法试剂对总胆汁酸测定的干扰作用[J]. 医学检验与临床, 2012, 23(3): 7-8.

[10] 张翠莉. 三酰甘油总胆固醇试剂对总胆汁酸测定结果的影响分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 12(20): 2738-2739.

[11] 林雪丹, 杨天兴. 脂肪酶试剂对血清总胆汁酸测定结果的影响[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(1): 51,

(收稿日期: 2015-02-28)