

别是在血栓形成(高凝状态)^[5]、肝脏疾病和恶性肿瘤^[6]等疾病的鉴别诊断和治疗监测方面具有较好的应用效果。

检测 D-二聚体的方法建立于 1983 年,采用免疫学原理检测抗原的含量,检测法有乳胶凝集法、酶联免疫法、免疫比浊法等^[7],其中乳胶凝集法既有快速、简便的优点,但是只能定性或半定量,小型基层医院即可开展,但是其精密度较差,而且不同批号间差异较大。酶联免疫吸附法(ELISA):特异性强,结果精确,敏感性较高,可进行定量测定,但费时,不适合急诊应用。胶体金免疫渗透法(GIA):简便、快速,也可定量,单个或成批标本可随时检测。目前,随着经济及科技的发展,一种 D-二聚体全定量测定逐渐被一些大型医院相继引进,该仪器采用激光光源(或其他光源)全定量测定,微电脑控制,单点或两点定标,操作方便,结果更加准确可靠。但是由于 D-二聚体是个多聚体片段,导致各种检测方法所检测的片段不一致从而导致了检测结果之间的差异较大,很难标准化。所以本文采用的方法仅能用于 sysmex CA-7000 血凝仪,且试剂仅限于西门子医疗诊断公司生产的 INNOVANCE D-Dimer 试剂。而且只限于在 sysmex CA-7000 血凝仪上设置的 D-二聚体线性范围内使用,至于超出线性范围两者是否有相关性还有待进一步验证。

• 检验技术与方法 •

透射比浊法测定人血纤溶酶原活性的性能评价

陈 武¹,肖 云^{2#},陈振林³,何志成³,李 毅^{1△}

(1. 湖北医药学院附属东风总医院检验部,湖北十堰 442000;2. 湖北医药学院附属人民医院检验科,湖北十堰 442000;3. 广东药学院生命科学与生物制药学院,广东广州 510006)

摘要:目的 探讨利用透射比浊法测定人血浆纤溶酶原(Plg)活性。方法 人血浆 Plg 经组织激酶(uPA)激活后,与含 1% 脱脂奶粉的低熔点琼脂糖混合,加入 96 孔板,600 nm、30 分钟终点法测定透光率计算人血 Plg 水平;采用重复试验、干扰试验、回收试验进行评价;并分别检测健康体检人群($n=30$)、糖尿病患者($n=25$)、冠心病患者($n=23$) 血浆 Plg 水平。结果 显示该方法批内变异系数平均为 4.0%;批间均值无显著差别($P=0.0018$)。葡萄糖有正干扰,尿素负有干扰,平均回收率为 90.6%。健康体检人群、糖尿病患者、冠心病患者血浆 Plg 水平分别为 (3.64 ± 0.22) U/mL、 (2.86 ± 0.35) U/mL、 (2.34 ± 0.31) U/mL,3 组之间有显著差别($F=132.26, P=0.000$)。结论 该方法可用于检测人血 Plg 活性,糖尿病、冠心病患者血浆 Plg 活性较健康体检人群低。

关键词:乳制品; 散射测浊法和比浊法; 纤维蛋白溶酶原; 冠心病; 糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0346-03

纤溶酶原(Plg)是人血液中的一种重要糖蛋白,经组织纤溶酶原激活物(tPA)激活为纤溶酶(Plm)后,通过水解纤维蛋白精氨酸-赖氨酸肽键,发挥纤溶与栓溶作用。血浆 Plg 活性下降多见于肝硬化、血栓症前期、弥漫性血管内凝血^[1]。近来研究表明,Plm 不仅发挥纤溶作用,还通过与细胞表面的蛋白酶激活受体(PAR)、annexin A2 等作用,激活巨噬细胞、血小板、血管内皮细胞,参与炎症反应、动脉粥样硬化斑形成和肿瘤迁移等过程^[2-3]。因此人血 Plg 活性的检测对了解发病机制及疾病诊断具有重要意义。

目前人血浆 Plg 活性主要采用底物显色法检测^[1,4]。生物制药中筛选产纤溶酶菌株及纯化监测多采用纤维蛋白板法^[5]和气泡法^[6]进行半定量分析。本研究探讨了以脱脂奶粉作为底物,通过 96 孔板透射比浊法测定人血 Plg 活性。

1 材料与与方法

1.1 材料 牛血浆 Plg 标准品(12U/支)购自上海瑞齐生物

参考文献

- [1] Wayne. CLSI. EP9-A2. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: Approved Guideline-second edition[S]. USA:CLSI,2002:1-35.
- [2] 李帅,吕时铭,汤杰英. 浙江地区汉族孕产妇 D-二聚体参考区间的建立及应用[J]. 中华检验医学杂志,2011,34(7):580-585.
- [3] 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,2006:234-235.
- [4] 门剑龙,任静. D-二聚体临床应用及标准化分析进展[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(8):793-796.
- [5] Eng CW, Wausaicheong G, Gob SK, et al. Exclusion of acute pulmonary embolism: computed tomography pulmonary angiogram or D-dimer[J]. Singapore Med J, 2009, 50(3): 403-406.
- [6] Ay C, Pabinger I. Testa predictive of thrombosis in cancer[J]. Thromb Res, 2010, 125(1): S12-15.
- [7] 栾耀芳. 血浆 D-二聚体检测方法及临床应用[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(4): 61-62.

(收稿日期:2012-09-23)

科技有限公司;uPA 冻干粉(100 000U/支)为北京赛生药业有限公司产品,低熔点琼脂糖购自美国 Amresco 公司,脱脂奶粉为伊利公司产品(批号:6512196);电热恒温水浴锅 HH-4 购自上海升利测试仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 透射比浊法检测 Plg 活性的标准曲线 以 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液分别配制 2% 脱脂奶粉反应底物液 10 mL、2% 低熔点琼脂糖溶液 10 mL,后者于微波炉加热煮沸 1 min,两者放入 80 ℃ 水浴锅 30 min,混合后冷却至 60 ℃,加入 uPA 40 000 U,迅速混匀即为预反应液。将预反应液分装到 EP 管(60 ℃ 水浴锅预热),每支 270 μL,再分别加入牛血 Plg 标准品(60 U/mL)0、7.5、15.0、22.5、30.0 μL,使其终浓度分别为 0、1.5、3.0、4.5、6.0 U/mL,不足 30.0 μL 者以 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液补齐。各管混匀后取 200 μL 加入 96 孔板中,37 ℃ 恒温箱反应 10 min,酶标仪 610 nm 波长

读取透光率 T10,再放回 37 °C 恒温箱反应 30 min,同样波长读取透光率 T40,以终点法计算透光率 T40 与 T10 的差值(ΔT),并对 Plg 浓度制备标准曲线。

测定人血浆 Plg 时,血样 15 μL 加入 270 μL 预反应液,再加 15 μL 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液,其他操作同上,根据标准曲线计算相应 Plg 浓度。

1.2.2 重复性试验 分批内与批间重复试验:随机取正常体检混合血浆作为样本,批内重复测 20 次,计算批内平均值、标准差、变异系数;批间重复试验为同一标本第二天进行检测,方法同上。

1.2.3 干扰性试验 采用以上正常体检血浆,分别评价不同浓度梯度的葡萄糖、尿素对 Plg 检测的干扰:反应液中加入 300.0 mmol/L 葡萄糖溶液使加入的终浓度分别为 5.0、10.0、15.0 mmol/L;尿素干扰试验为加入 360.0 mmol/L 尿素溶液使加入的终浓度分别为 6.0、12.0、18.0 mmol/L;每个浓度测定 5 次。

1.2.4 回收试验 将重复试验中已测浓度的正常体检血浆以 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.4)稀释至 2.0 U/mL,分为 3 组,分别加入牛血 Plg 标准品(60 U/mL)2.5、7.5、15.0 μL,至 Plg 终浓度分别为 2.5、3.5、5.0 U/mL,每组重复测定 5 次,计算回收率。

表 1 葡萄糖与尿素对人血浆 Plg 检测的干扰性分析(n=5)

干扰物	血浆	补加葡萄糖浓度(mmol/L)			补加尿素浓度(mmol/L)		
		5.0	10.0	15.0	6.0	12.0	18.0
Plg 浓度(U/mL)	3.42±0.21	4.08±0.33	3.66±0.28	3.52±0.27	3.35±0.24	3.08±0.16	3.02±0.15
干扰率(%)		2.9	12.3	19.2	-2.0	-9.9	-11.6

2.4 回收试验评价 回收实验结果显示:在低浓度时回收率较差,低于理论值;而接近正常检验水平和高浓度时回收率较好,接近 100%,见表 2。

表 2 透射比浊法测定血浆 Plg 的回收试验(n=5)

样本	实测浓度(U/mL)	回收浓度(U/mL)	回收率(%)
组 I (0.5U/mL)	2.37 ± 0.17	0.37	74.0
组 II (1.5U/mL)	3.40 ± 0.25	1.40	93.3
组 III (3.0U/mL)	5.13 ± 0.32	3.13	104.3
平均回收率(%)	—	—	90.6

—:无数据。

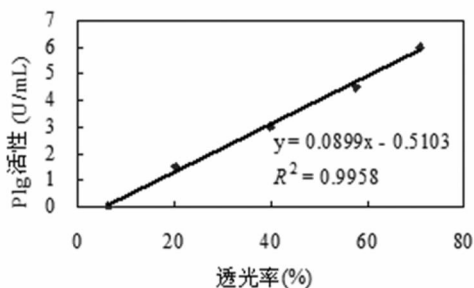


图 1 透射比浊法测定 Plg 活性的标准曲线

2.5 临床样本检测 经临床标本检测健康体检人群(n=30)、

1.2.5 临床样本检测 正常体检人群(n=30)、糖尿病患者(n=25)、冠心病患者(n=23)来自湖北医药学院附属人民医院门诊和住院部;患者清晨空腹取血 3 mL,血样正常肝素抗凝,抽血后迅速加入 1.5 mL 精氨酸溶液混匀,血浆分离后-20 °C 保存。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 12.0 对结果进行统计分析,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射比浊法测定 Plg 活性的标准曲线 经 96 孔板透射比浊法分析显示:随着牛血 Plg 标准品活性增加,反应孔的酪蛋白被水解,透光率逐渐增大,两者呈正相关,相关系数 R2 为 0.995 8;且具有较好的线性关系,线性方程为:y=0.089 9x-0.5103(其中 y 为 Plg 活性水平;x 为透光率×100),见图 1。

2.2 重复试验评价 对随机健康体检人群的血浆 Plg 活性进行分析,第一天重复测定 20 次,批内变异系数为 4.5%;第二天再重复测定 20 次,批内变异系数为 3.5%。两天测定的平均值、标准差无显著差别(P=0.001 8)。

2.3 干扰试验评价 分别补加正常血浆水平大约 1 倍、2 倍、3 倍浓度的葡萄糖、尿素,测定高浓度葡萄糖、尿素对 Plg 测定的影响。结果显示葡萄糖有正干扰,尿素有负干扰(表 1),且随浓度的增大干扰程度也增强。

糖尿病患者(n=25)、冠心病患者(n=23) 血浆 Plg 水平分别为(3.64±0.22)U/mL、(2.86±0.35)U/mL、(2.34±0.31)U/mL,经 SPSS 分析 3 组之间有显著差别(F=132.26,P=0.000)。

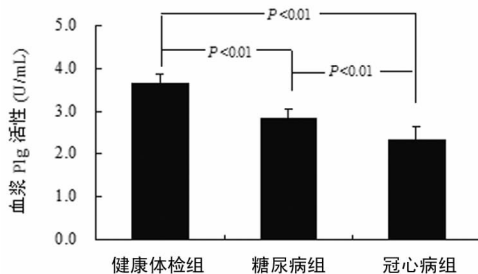


图 2 健康体检人群、糖尿病患者、冠心病患者血浆 Plg 活性比较

3 讨论

目前显色法采用的底物为三肽化合物如 S2251(分子式: H-D-Val-Leu-Lys- pNA)、S2403(分子式: H-D-Pyr-Phe-Lys-pNA)、S2390(分子式: H-D-Val-Phe-Lys- pNA)等^[1,4,7],纤溶酶作用于底物的 Lys-pNA 酰胺键,释放出对硝基苯胺(pNA)而显黄色。由于底物易见光分解发生自发反应,有较高的本底色,使得反应前后吸光度变化较小,线性范围窄;且三肽化合物来源受限目前价格较高。酪蛋白是纤溶酶的良好底物,但中性环境下难溶于水,其钠盐虽具有较好的水溶性,由于它本身及水解后产物均无明显颜色,需特殊设备进行检测^[8]。脱

脂奶粉含 α 、 β 、 γ 和 κ 酪蛋白,纤溶酶主要降解 α 、 β 酪蛋白。因脱脂奶粉中仍含少量的脂质,这些脂质与酪蛋白形成微球,增强了酪蛋白的水溶性,加上酪蛋白本身的颜色从而使脱脂奶呈现出乳白色^[9]。纤溶酶降解酪蛋白的同时破坏了微球结构使产物透光率增加,本实验研究表明纤溶酶活性高低与透光率增加呈现良好的线性关系。但制备的底物反应液稳定性稍差,实验中通过增加低溶点的琼脂糖后,提高了反应体系的稳定性,经检测批内、批间重复性均较好。

有研究表明新鲜乳汁本身含有少量的纤溶酶原,主要用于降解酪蛋白,有利于婴儿对酪蛋白的消化和吸收^[10],因此新鲜牛奶不宜用于本方法。而脱脂奶粉经过持续加热处理后所剩纤溶酶活性很低^[11],实验中通过 80℃ 加热 30 分钟并加入琼脂糖后放置数小时透光率无明显改变,回收率达到 90%,证实纤溶酶原已基本去除。当然,由于不同批次脱脂奶粉的脂质含量有差异,因此试剂制备因尽可能采用同批次的产品,同时测定时必须作好空白对照以减少系统误差。

总之,本实验尝试了一种简便可行的人血纤溶活性的测定方法,并进行了性能评价和临床样本分析。人血纤溶酶活性的测定对于疾病的诊断和溶栓治疗的药物监测都具有重要意义^[12]。

参考文献

[1] 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,2006:227-228.
 [2] Syrovets T,Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2004, 61:873-885.
 [3] Laumonier Y, Syrovets T, Burysek L, et al. Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced

signaling in human peripheral monocytes[J]. Blood, 2006, 107 (20):3342-3349.
 [4] 孙东风,徐光,蔡旭,等.血浆纤维蛋白原活性发色底物测定法[J].上海医科大学学报,1997,24(1):52-53.
 [5] Astrup T, Müllertz S. Fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Bioph,1952,40(2):346-351.
 [6] 金灿煌,范征,杜平中,等.人纤溶酶原活力的快速测定[J].中国医药工业杂志,1999,30(1):25-27.
 [7] Shi GY,Wu HL. Isolation and characterization of microplasminogen; A low molecular weight form of plasminogen[J]. J Bio Chem, 1988,263(32):17071-17075.
 [8] Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen; purification from human plasma by affinity chromatography[J]. Science,1970,170(3962): 1095-1096.
 [9] Ismail B,Nielsen SS. Invited review; Plasmin protease in milk; current knowledge and relevance to dairy industry[J]. J Dairy Sci, 2010,93(11):4999-5009.
 [10] Eigel, WN, Hofmann, CJ, Chibber, BA, et al. Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979,76(5):2244-2248.
 [11] Crudden A,Oliveira JC,Kelly AL. Kinetics of changes in plasmin activity and proteolysis on heating milk[J]. J Dairy Sci,2005,72 (4):493-504.
 [12] Stief TW,Richter A,Bünder R, et al. Monitoring of Plasmin and Plasminogen Activator Activity in Blood of Patients under Fibrinolytic Treatment by Reteplase[J]. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis,2006,12(2):213-218.

(收稿日期:2012-10-05)

• 检验技术与方法 •

胶体金单克隆抗体法与匹拉米洞法检测粪便隐血的对比分析

黄丽¹,时爱玲²,罗刚惠¹

(1. 解放军第三〇三医院检验科 广西南宁 530021;2. 湖北省随州市军分区卫生所 441300)

摘要:目的 对胶体金单克隆抗体法与匹拉米洞法检测粪便隐血的分析性能进行评价。方法 分别采用两种方法对 100 例住院患者随机粪便标本和加入动物血、蔬菜汁等物质的粪便标本进行检测,同时测定稀释成系列浓度的红细胞悬液,以评价两种方法的灵敏度、抗干扰能力等。结果 胶体金单克隆抗体法的阳性率为 34.0%,匹拉米洞法为 57.0%, $P < 0.005$,差异具有统计学意义;对加入动物血和蔬菜汁的标本,胶体金法检测结果均为阴性,匹拉米洞法均为阳性;胶体金单克隆抗体法可检测到的最低 Hb 浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$,匹拉米洞法可检测到的 Hb 浓度不小于 10 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 胶体金单克隆抗体法的灵敏度、抗干扰能力均优于匹拉米洞法,为粪便隐血试验的首选方法。

关键词:粪便隐血试验; 胶体金单克隆抗体法; 匹拉米洞法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.039

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0348-02

粪便隐血试验(FOBT)是临床用于诊断和监测消化道出血性疾病的一项重要指标,对于早期发现和诊断消化道恶性肿瘤也具有重要意义。目前用于检测粪便隐血的方法主要有化学法和免疫法两大类,化学法干扰因素多,易受饮食(肉类、蔬菜、药物、铁剂等)、药物等的影响,而免疫法不受饮食的限制,而且快速、简单、准确,灵敏度和特异性较高。胶体金免疫法已被世界卫生组织和世界胃肠镜检查协会推荐作为粪便隐血试验的一种较为确认的方法^[1]。本文选择化学法中的匹拉米洞法和胶体金单克隆抗体法的两种试剂进行性能比较,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料 (1)本院 100 例住院患者随机粪便标本;(2)已知

Hb 浓度的抗凝全血 1 mL;(3)5 种动物血(猪、鸡、鸭、鱼、牛血)和新鲜绿色蔬菜汁。

1.2 试剂 胶体金单克隆抗体法采用英科新创(厦门)科技有限公司的检测试剂盒;匹拉米洞法采用珠海贝索生物技术有限公司的检测试剂盒。

1.3 方法 两种检测方法均严格按照各自的试剂盒说明书进行操作。

1.3.1 分别用两种方法对本院 100 例住院患者的粪便标本进行隐血对照实验。

1.3.2 抗干扰能力检测 取胶体金单克隆抗体法和匹拉米洞法检测结果均阴性的粪便标本用蒸馏水制成悬液,离心取上清