

R250 显色液或酚试剂的某些基团发生反应,从而导致使标本底偏高,影响实验结果,但确切原因仍有待于进一步的实验研究。对于改良 Bio-Rad DC 法,若选用含有 Biolyte 的细胞裂解液为空白,则蛋白质含量的测定结果明显比不含有 Biolyte 的细胞裂解液为空白的测定结果较高,约提高 20%左右,故在测定过程中最好以不含 Biolyte 的细胞裂解液为对照,蛋白质样品在样品测定后再加入 Biolyte。实验结果显示对于神经细胞蛋白质含量测定可选用 Bradford 法、BCA 法和改良 Bio-Rad DC 法。其中改良 Bio-Rad DC 法更佳。Lowry 法不适于神经细胞蛋白质含量测定,这可能与神经细胞中脂质含量比较高,细胞裂解液中的一些还原剂和去污剂影响测定结果有关。

参考文献

[1] 甘淋,李娟,何涛.几种蛋白质含量测定方法的比较研究

[J]. 泸州医学院学报,2004,27(6)500-502.

[2] 郑志斌,杨玲.神经细胞培养-理论与实践[M].北京:科学出版社,2002:236-237.
 [3] 朱厚勋.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,1999:158-159.
 [4] 中国生物制品标准化委员会.中国生物制品规程[M].北京:化学工业出版社,2000,672.
 [5] Chattaraj SC, Das SK. Interference of thimerosal in the bicinchoninic acid protein microassay [J]. Boll Chim Farm, 2000,139(1):30-33.
 [6] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999:123-146.

(收稿日期:2012-02-15)

• 临床研究 •

快速自动微板血源筛查法在疑难配血中的应用

钟展华,严凤好,李雪群,万小春(广东省惠州市中心血站 516000)

【摘要】 目的 建立一种为需要进行疑难配血的患者自动化、快速、准确的血源筛查方法。**方法** 从医院送检的疑难配血标本中选取 2 个具有代表性的标本,一个标本同时含有 IgG 类抗-C 和抗-e,另一个标本含有 IgG 类抗-D,使用 U 型板、凝聚胺溶液和自动加样器联合应用的方法在 528 个供血者全血标本中为上述两个标本筛查相合血源,同时使用手工试管法进行平行实验,记录并对比上述两种方法筛查总过程使用的时间,筛查出的供者标本数。**结果** 快速微板自动血源筛查法、试管法均能筛查出相合血源,微孔板筛查所需要的总时间较短,试剂用量也较少。**结论** 快速微板自动血源筛查法在疑难配血中筛查相合血源,具有快速、准确的效果。

【关键词】 快速自动微板血源筛查法; 凝聚胺溶液; 疑难配血

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.14.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)14-1740-02

输血前试验的 3 个步骤:ABO、RhD 血型检定、抗体筛查和交叉配血是保证临床输血的安全和有效手段,通常情况下,只要 ABO、RhD 血型检定正确,供(受)者 ABO、RhD 同型配血都是相容的;如果同型配血不相容,则被称疑难配血,在疑难配血中,医务人员有时遇到的情况是受血者血清中含有临床意义的同种抗体,需要筛选相应抗原阴性的供血者。如果相应抗原阴性的供血者(特别是多种抗原同时为阴性的)在人群中的频率较低的时候,就需要对大量的供血者标本进行筛查,才能筛选出相应抗原阴性的供血者。作者建立一种使用 U 型板、凝聚胺溶液、全自动加样器联合应用的自动化、快速、准确的供血者标本快速筛查方法,可以为需要进行疑难配血的受血者从血站的血库中快速筛查出相合血液,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 本市医院 2010 年至 2011 年送检到本实验室的疑难配血标本 118 例,本课题选取有代表性的标本 2 例,分别标号 NO.1、NO.2。NO.1 为已经确认血清中同时含有 IgG 类型抗-e、抗-C、“O”型受血者标本,NO.2 为已经确认含 IgG 类型的抗-D“O”型受血者标本。2011 年 5 月 16~19 日在本站献血的献血者全血标本 528 例,血型均为 O 型,标本均按《献血者健康检查标准》化验完毕且均合格。

1.2 主要试剂 BASO 凝聚胺三步法试剂,由珠海贝索公司

生产;抗球蛋白、谱细胞、IgM 的抗-D、抗-E、抗-e、抗-C、抗-c 试剂均由上海血液生物医药有限公司生产;抗 M、N、_ka、Jkb、S、s 试剂由加拿大 Dominion 公司生产、已经本实验室确认的 1 人份无意外抗体及自身抗体的献血者红细胞和血浆、生理盐水。以上试剂均在有效期内使用。

1.3 主要器材 STAR 全自动加样器,瑞士 Hamilton 公司生产,配套英文控制软件版本为 3.2.0.3289;恒温振荡器(上海微百科技);CT6D 平板离心机(日本日立);DK-600S 三用水浴箱(广东环凯);KA-2200 离心机(日本久保田);anthos ht3 酶标仪(奥地利 anthos);10~100 μL、20~200 μL 可调量程微量移液器(美国 Thermo);96 孔 U 型板和 96 孔平底板。

1.4 疑难配血标本的处理 用常规方法对医院送检的疑难标本进行检测,包括血型鉴定和抗体筛查,使用手工试管法和 BASO 凝聚胺试剂,判定疑难配血的标本所含的抗体类型及是否含有自身抗体。

1.5 STAR 全自动加样仪过程

1.5.1 将 118 个献血者全血标本分 5 次排列在 STAR 加样器上,将献血者的全血标本进行稀释到 5%后进行加样,用平底板做稀释板,将献血者稀释后的血样分别加 30 μL 到 2 块 U 型板上。

1.5.2 将标本 NO.1 和 NO.2 的标本分别加 30 μL 到 2 块 U

型板的每个孔内,用单针加样,加样模式为空中喷射。

1.5.3 在每块 U 型板的每个孔加如入 15 μ L 两步法凝聚胺的凝聚胺溶液(黑色瓶子),加样时前,将凝聚胺溶液根据用量滴入干净的试管中,STAR 加样器吸液时,根据计算用量多吸 30 μ L,在加样前,先分配 15 μ L 到原试管中,加样完成后,最后的 15 μ L 也吐回原试管中,加样模式为空中喷射。

1.6 将加好样的 U 型板用振荡器以 1 000 r/min 的振频,level 振幅,振荡 U 型板 2 min,加盖后放进 37 $^{\circ}$ C 的水浴箱内,水浴 15 min。将 U 型板用平板离心机以 800 r/min 离心 1 min;用振荡器以 1 000 r/min 的振频,振荡 U 型板 2 min。目测结果。

1.7 设置阴阳性对照每板试验设阴性、阳性对照各 1 孔,加入 U 型板最前 2 孔。阴性对照使用无意外抗体及自身抗体的献血者红细胞和血浆,阳性对照使用 IgG 抗-D 试剂和 O 型 RhD 阳性红细胞,加入量与受检标本相同。

1.8 平行实验用手工试管法使用 BASO 两步法凝聚胺试剂、抗球试剂记录全过程所需时间。

2 结 果

快速微板筛查法(U 型板)筛查 528 个献血者寻找相合血液与手工试管法效果对比结果见表 1。

表 1 快速微板筛查法(U 型板)筛查 528 个献血者寻找相合血液与手工试管法效果对比

组别	受血者标本		总耗时 (h)
	NO. 1	NO. 2	
快速微板筛查法(U 型板)法	13	6	2.5
手工试管凝聚胺法	13	6	35.0
手工试管抗球蛋白法	13	6	46.0

注:表中均为筛查出相合血液的标本数。

3 讨 论

医院输血科(血库)在对受血者进行的输血前交叉配血实验时,有时会遇到受血者血浆中含有针对血型抗原的有临床意义的意外抗体,导致交叉配血不合。此时,输血科可对库存的血液进行筛查,如遇到的是针对高频率血型抗原的抗体,以本文的 No. 1 受血者的抗体为例,抗-C、抗-e 抗原阴性的供血者在人群中的频率约为 2%,即筛查 100 个供血者,大约可以筛选 2 名抗-C、抗-e 抗原阴性的供血者,一般输血科将很难筛选出相合的血液。在此种情况下,输血科一般会请求当地采供血机构(血站)协助寻找血源。此时,血站相关实验室如果使用传统试管法进行血源筛选,将需要耗费大量人力和物力成本,也需要耗费大量的时间来进行试验,还可能会耽搁患者宝贵的治疗或者抢救时机。

在临床上常用的抗原抗体检测方法有:盐水法、酶法、抗球蛋白法、微柱凝胶法、凝聚胺法等。盐水法,简单、易操作,对检测 IgM 类抗体敏感,但难于检测 IgG 类的抗体;酶法敏感性高,但需要孵育,实验时间较长且对部分血型系统检测不敏感^[1];抗球蛋白法为经典交叉配血方法,是检测不完全抗体最

可靠的方法,结果稳定可靠,但操作繁琐、耗时,且难于实现自动化操作;微柱凝胶法减少了抗球蛋白法的洗涤步骤,但不能用全自动加样器加样,也难于实现自动化操作,且成本高,用来进行筛查从经济角度来讲不划算;凝聚胺法操作简便,灵敏度高,实验时间短,易于实现自动化操作,缺点是检测 Kell 血型系统不理想和易受肝素的干扰。但是对于中国人来说,几乎 100%是 kk 型,至今未发现 Kell 血型系统的抗体,只要不使用含肝素的标本,选择使用凝聚胺法进行抗原抗体的检测就较为理想。常规的凝聚胺三步法,需要加试剂 2 次和弃去凝聚胺混合液,因为是用微孔板做实验,凝聚胺混合液这一步骤非常难做好,往往在弃去混合液的同时也将红细胞带出来,导致实验失败。国内有余晋林等^[2]选用一步法凝聚胺试剂进行配血筛查实验的报道,作者起初也计划采用这一方式,但一步法凝聚胺试剂目前在国内难于购买到,经过作者的反复测试,直接用凝聚胺三步法的凝聚胺溶液也可以达到将 IgG 类的抗体检测出来的效果,但要严格控制凝聚胺溶液的用量,按红细胞:血清:凝聚胺溶液比例为 2:2:1 比例,混匀后放入水浴箱 12 min,然后用平板离心机离心,最后用手轻敲 U 型板,目测每个孔的凝聚程度,实验结果证明取得非常好的效果。

本文介绍的血源筛查出来的相合献血者标本,还需要用经典的方法进行确认,如微柱凝胶法和试管抗球蛋白法,本试验室使用的确认方法是微柱凝胶法,是一种安全、结果准确、灵敏度高和简便的交叉配血方法,它可以检测出红细胞或者血清中附着的 IgG 或者 IgM 等抗体所导致的配型不合^[3]。对于存在温自身抗体的患者,也可以利用本文介绍的方法从大量的供血者中选取“最小不相容性”的供血者血液输^[4]。

利用本文的筛查方法为需要进行疑难配血的患者筛选血源最突出的优点是快速和简便,可以充分利用血站的已经拥有的试验室资源,全国的血站几乎都拥有全自动的加样设备,凝聚胺三步法的试剂也是常备试剂,因而本文介绍的血源筛查方法适用于全国的绝大部分血站,对于及时挽救患者生命,具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:260,263-264.
- [2] 余晋林,伍伟健,马春会,等. 凝聚胺微板法自动化配血系统在交叉配血中的应用[J]. 中国输血杂志,2011,24(10):886-887.
- [3] 周益强,肖倩,辛荣传,等. 微柱凝胶技术在交叉配血中的应用研究[J]. 检验医学与临床,2009,6(17):1459-1460.
- [4] 梁金凤. 自身抗体的分析处理及输血策略[J]. 检验医学与临床,2011,8(19):2425-2427.

(收稿日期:2012-02-27)