

微柱凝胶抗球蛋白试验中液体和凝胶两相介质的作用

胡永红 李 勇 刘庆海 王玉华 (广州市第一人民医院, 广州 510180)

中国图书分类号 R392-33 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2005)05-0369-03

[摘要] 目的:探讨微柱凝胶抗球蛋白试验中液体和凝胶两相介质的作用,分析该试验不需洗涤步骤的原因。方法:将甲基兰溶液加入微柱凝胶管的上部宽腔中,观察其扩散至微管下部窄腔的凝胶介质中的时间。将甲基兰溶液加入传统Coombs试验的试管腔反应液中,观察其在反应液中扩散的时间。结果:MG Coombs试剂卡反应腔中加入的甲基兰长时间不扩散到凝胶中,能够保持两相状况长达6小时,远远长于常规的红细胞血清血型学的抗原抗体反应所需时间。甲基兰溶液完全扩散到凝胶中,两相混合需30小时。传统的试管Coombs试验加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,再加入甲基兰溶液后即刻全部呈蓝色。结论:证明在微柱凝胶抗球蛋白试验中不需洗涤而简化了程序,有两个原因。原因之一是试剂卡中的反应液存在两相状况,即抗球蛋白试剂存在于微管下部窄腔的凝胶介质中;红细胞,被检人血清位于微柱凝胶管上部宽腔中。原因之二是凝胶介质不仅仅是分离凝集红细胞和散在的红细胞的介质,还是促进抗球蛋白与IgG致敏红细胞反应的介质。两个原因之关键是其反应液中存在两相状况。

[关键词] Coombs试验;微柱凝胶Coombs试验;甲基兰

An analytical study of the functions of two phase media of liquid and gel with the microcolumn gel Coombs' test

HU Yong-Hong, LI Yong, LIU Qing-Hai, WANG Yu-Hua. 1st Hospital of Guangzhou City, Guangzhou 510180, China

[Abstract] **Objective:** To analyse the functions of two phase media of Liquid and Gel with the Microcolumn Gel Coombs' Test and study the reasons for obviating the need of washing RBC in the Gel Coombs' T. **Methods:** Add tryplan blue solution into the wider upper portion of the microcolumn gel tube, observe the time of the tryplan blue solution diffusion into the Gel medium at the narrow bottom portion of the tube. Add tryplan blue solution into the liquid reactant in test tube, observe the time of the tryplan blue solution diffusion into the liquid medium. **Results:** In the Microcolumn of Gel Coombs' Test there is no visual mixing of the two phases for 6 h at least which is much longer than the incubation time needed for antibody-antigen reaction in routine red cell serology. It takes more than 30 h for the 2 phases to mix. In the test tube of Coombs' Test the tryplan blue solution diffusion into the liquid reactant of serum, red cells and anti globin reagents and turned to blue colour immediately. **Conclusion:** Two reasons for non-requirement of washing in Gel-Coombs' T have been found. Firstly, there are two phases of reactants in the tubes of cards, the AHG is present in the gel at the narrow bottom portion of the tube, and the RBC, the serum to be detected in the wider upper portion of the tube. Secondly, the gel serves as not only a medium for separating agglutinated RBC from the dispersed RBC, but as a medium for boosting the reactions of AHG with IgG sensitized RBCs. The crux of the two reasons is of the two phases of reactants.

[Key words] Coomb's test; Gel Coomb's Test; Tryplan blue solution

近些年,一项新的免疫学技术——微柱凝胶抗球蛋白,也称微柱凝胶Coombs试验(Microcolumn Gel Coombs Test, MG Coombs' T),极大地简化了不完全抗体的检测程序。传统的试管Coombs试验(Test Tube Coomb Test, TF Coombs' T)自1945年发明以来,虽然早已无异议地被认定为检测不完全抗体的最准确试验,但其检测程序繁琐和技术要求高,且不能够同时检测多份标本,所以始终只能应用在对临床少数标本的确定性试验中。对临床大量需要检测不完全抗体的标本,如血型相容性检测,以及对临床有意义抗体的常规检测,首先应用盐水凝集试验检测完全抗

体,然后应用酶试验或聚凝胺试验筛检不完全抗体,最后才应用TF Coombs' T对少数标本进行确定性试验。TF Coombs' T操作程序繁琐的最主要原因是需要多次洗涤,加入红细胞抗原和血清标本后,孵育,至少三遍洗涤,再加入抗球蛋白试剂,以避免其被血清中非特异性球蛋白中和,抗球蛋白试剂才能真正连结红细胞膜上的不完全抗体,使之出现凝集。MG Coombs' T不需要洗涤,在含有抗球蛋白试剂的微柱凝胶反应腔中加入红细胞和血清,孵育后可直接离心读取结果,极大地简化了实验程序。自1999年Lapierre Y发表第一篇文章至今^[1],MG Coombs' T已成为检测不完全抗体的血型血清学临床常规检测技术^[2-4]。在毫无异议,充分肯定MG Coombs' T试验的前提下,也始终存在着疑问:MG Coombs' T为什么不需要洗涤?从常识上讲,在MG Coombs' T微柱

长春生物制品研究所,长春 130062

作者简介:胡永红(1955年-),女,主任,副主任技师;

通讯作者:李 勇(1952年-),男,研究员,博士,主要从事血液免疫学和生物制品学研究。

凝胶中,血清中的球蛋白也应该能够中和及消耗抗球蛋白试剂,从而影响抗球蛋白试剂和红细胞上不完全抗体的连结。文献未见有关实验对此问题的解释报道。笔者通过实验对此原因进行探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 MG Coombs 试剂卡;ABO/RhD 血型检测卡 批号:20040306,长春博讯生物技术有限责任公司生产。
- 1.1.2 人血清 IgG 抗-D 试剂 批号:20040101,长春博德生物技术有限责任公司生产。
- 1.1.3 抗人球蛋白试剂(兔免疫血清) 批号:20031206,长春博德生物技术有限责任公司生产。
- 1.1.4 人红细胞 一周内采集新鲜的 A 型、B 型和 D 阳性红细胞,同型的血两人份混合。吉林省血液中心血型参比实验室提供。
- 1.1.5 1% 甲基兰水溶液 Tryplan blue solution (0.4%), Sigma, Lot 19H 2388。
- 1.1.6 微柱凝胶免疫分析技术专用离心机和孵育器 长春博研医学生物仪器公司生产。

1.2 方法

- 1.2.1 取 MG Coombs 试剂卡和 ABO/RhD 血型检测卡各九个。各取六个卡,在反应腔中各加入甲基兰 50 μl。离心观察后分 3 组,每组 2 个卡,分别放入 4℃ 冰箱、室温(20℃)和 37℃ 孵育器中。另三个卡在反应腔中各加入无菌生理盐水 50 μl,也分三组,同时放入上述温度环境中。
- 1.2.2 定时观察甲基兰溶液在微柱凝胶腔中的扩散情况。并分记录:甲基兰溶液加入后即刻观察;之后每 30 分钟观察一次,共 2 小时;再每 2 小时观察一次,共 6 小时;过夜后(16 小时)再继续观察,每 2 小时一次,共 6 个小时。总计 30 小时。
- 1.2.3 分别取出孵育了 6 小时的卡各 1 个,将微柱凝胶反应腔中蓝色液体吸出,加入 25 μl 生理盐水,再吸出所有凝胶于试管中,2 000 r/min 离心 5 分钟,取上清。将 MG Coombs 试剂卡中取出的上清加入以不完全抗-D 致敏的红细胞中(已充分洗涤)。将 ABO/RhD 血型检测卡中取出的上清分别加入 A、B 和 D 阳性红细胞,1 000 r/min 离心 1 分钟。
- 1.2.4 将未加入甲基兰的 3 个卡在放置 30 小时后取出,各孔中加入相应 0.5% 红细胞各 50 μl。孵育 15 分钟,离心观察结果。
- 1.2.5 取试管 3 支进行传统的试管 Coombs 试验比较,第 1 支连续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试

剂,孵育 15 分钟后离心;第 2 支连续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,再加入甲基兰溶液;第 3 支试管常规进行试管抗球蛋白试验。即不完全抗-D 试剂与 D 阳性红细胞反应后,洗涤 3 遍,加入抗球蛋白试剂,离心观察结果。

2 结果

- 2.1 在加入甲基兰的 MG Coombs 试剂卡的反应腔中:(1)液体部分即刻呈蓝色,与凝胶层呈明显分界,凝胶层仍呈原来颜色。离心后观察仍呈两相,见图 1。(2)4℃ 和室温放置 30 个小时仍未见蓝色液体扩散至凝胶层,两相界面稳定,见图 1。(3)37℃ 放置 22 小时的卡,可见蓝色液体扩散至凝胶层上 1/3 处,界面略模糊不清,见图 2。
- 2.2 将微柱凝胶腔中蓝色液体吸出后,于试管中离心凝胶,取出上清。在取出的上清中加入不完全抗-D 致敏的红细胞(已充分洗涤)。将 ABO/RhD 血型检测卡中取出的上清分别加入 A、B 和 D 阳性红细胞,离心后都出现凝集。
- 2.3 将未加入甲基兰的 3 个卡在放置 30 小时后取出,各孔中加入相应 0.5% 红细胞各 50 μl。孵育 15 分钟,离心后都出现凝集现象。
- 2.4 加入甲基兰的微柱卡中的凝胶在 48 小时已干燥,不能继续观察甲基兰扩散。
- 2.5 传统的试管 Coombs 试验比较:(1)第 1 支试管连

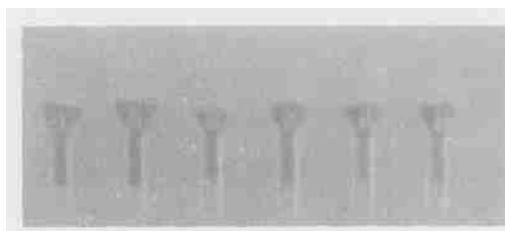


图 1 加入甲基兰,离心后即刻观察
Fig. 1 Observe instantly after putting Tryplan blue solution into micro-tubes



图 2 37℃ 放置 22 小时观察
Fig. 2 Observe at 22 h after putting Tryplan blue solution into micro-tubes keeping in 37℃

续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,孵育 15 分钟后离心,未见凝集现象。(2)第 2 支试管连续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,再加入甲基兰溶液,即刻呈蓝色。孵育 15 分钟后离心,未见凝集现象。(3)第 3 支试管常规进行试管抗球蛋白试验。不完全抗-D 试剂与 D 阳性红细胞反应后,洗涤 3 遍,加入抗球蛋白试剂,离心后出现凝集。

3 讨论

3.1 以上实验结果可以清楚表明: MG Coombs 试剂卡中加入的甲基兰在反应腔中很快扩散,但是能够长时间不扩散到凝胶中。4 和室温放置的卡经 30 个小时,37 放置的卡近 20 小时,上层蓝色液体和白色凝胶两相界面稳定。可以说明在 MG Coombs 试剂卡中加入人血清后,人血清中的球蛋白长时间不扩散到凝胶中,也就避免了凝胶中的抗球蛋白试剂被中和消耗。反应腔中甲基兰扩散在 37 要快于 4。在甲基兰被吸出后,离心凝胶分离的上清仍能够出现阳性反应,说明凝胶中的抗体成分经 6 小时也未扩散到甲基兰液体中。该 6 小时已经是远长于孵育所需的 15 分钟。未加入甲基兰的 3 个卡在放置后取出,各孔中加入相应红细胞。孵育 15 分钟后离心,都出现凝集现象,说明阳性对照成立。3 支试管:第 1 支连续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,孵育后离心,未见凝集现象,说明抗球蛋白试剂被人血清中和消耗。第 2 支连续加入人血清、红细胞和抗球蛋白试剂,再加入甲基兰溶液,即刻呈蓝色,说明各种成分很快扩散混合。第 3 支试管常规进行试管抗球蛋白试验,出现凝集。第 1 支阴性结果说明血清不完全抗体试剂与相应阳性红细胞结合后,必需洗涤除净血清,避免抗球蛋白试剂被中和消耗。

此试验清楚地证明了在 MG Coombs T 中,由于加入的人血清和含抗球蛋白试剂的凝胶长时间处于两相状况,相互不扩散,即凝胶中抗球蛋白试剂并不被人血清中的球蛋白中和及消耗,这就明确了 MG Coombs T 简化洗涤步骤的根本原因,由此也可以进一步分析 MG Coombs T 的反应机理。

3.2 MG Coombs T 的反应机理: 在 MG Coombs 试剂卡的微柱上部反应腔中,人血清标本中特异性不完全抗体 (Fab) 与相应红细胞结合后,在一定的离心力作用下通过微柱下部凝胶时,相邻的单体红细胞免疫复合物被抗人球蛋白桥连而出现凝集。应强

调,在 MG Coombs 试剂卡的反应腔中含有抗人球蛋白试剂。人血清特异性抗体和非特异性抗体(包括其他免疫球蛋白)都能和反应腔中的抗球蛋白试剂结合。反应腔中存在着:(1)抗人球蛋白 (Fab) 与人血清中特异性抗体 (Fc) 结合,特异性不完全抗体 (Fab) 再结合红细胞抗原,表现为颗粒性红细胞免疫复合物。(2)抗人球蛋白 (Fab) 结合非特异性抗体 (Fc) (包括其他免疫球蛋白),但非特异性抗体并不能结合红细胞,呈可溶性免疫复合物。这两种反应是随机反应,必然是同时存在。该抗人球蛋白和非特异性抗体形成的可溶性复合物对颗粒性免疫复合物(抗人球蛋白-特异性抗体-红细胞)之间的连接形成位阻,因而影响微柱反应腔中形成凝集反应。使红细胞沉降需要的离心力一般是小于 100 g,而抗体等蛋白质复合物分子沉降分离需要的离心力至少是 3 000 g。因此微柱凝胶免疫分析技术中的离心力只能使红细胞下降分离,而不能使血清蛋白、抗人球蛋白以及可溶性抗原抗体复合物下降分离。抗人球蛋白-特异性抗体-红细胞颗粒性免疫复合物在离心下降分离过程中,在通过液体和胶体两相界面时,各个颗粒性免疫复合物之间距离缩小,排除其间可溶性复合物的位阻现象。在 MG Coombs 试剂卡的反应腔中,与可溶性抗原抗体复合物比较,如果红细胞颗粒性免疫复合物(红细胞-特异性抗体-抗人球蛋白)中分子间,或红细胞颗粒性免疫复合物之间亲和力强,或者是红细胞颗粒性免疫复合物数量多,出现的凝集反应强,反之就弱。强阳性反应时红细胞凝集团块出现在凝胶表面,即液相和凝胶两相之间,而弱阳性反应时,红细胞凝集团块出现在凝胶中间。阴性反应时,红细胞则被沉淀在微柱凝胶管尖底部。

4 参考文献

- 1 Lapierre Y, Rigal D, Adam J *et al*. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reaction [J]. *Transfusion*, 1990;30:109-113.
- 2 Brecher E Mark. AABB technical manual [M]. 14th ed. American Association of Blood Bank Bethesda USA, 2002:688-689.
- 3 李 勇,朱建春,刘 莹.微柱凝胶 Coombs 试验对人 RhD 血型检测的实验研究 [J]. *中国输血杂志*, 1998;11(1):24.
- 4 李 勇,杨贵贞.人类红细胞血型学实用理论与实验技术 [M]. 北京:中国科学技术出版社,1999:276-278.

[收稿 2005-02-18]

(编辑 许四平)