

固相放射免疫分析法在 ABO 血型 微量测定中的应用^①

吴奋强^② 郭景元

(中山医科大学法医系物证学教研室,广州,510089)

提 要 本文报道一个经过改良的简单、快速、灵敏和准确的固相放射免疫分析法(Solid Phase Radioimmunoassay,SPRIA),对其方法学、灵敏度和准确度进行了测定,并对其在检测法医物证几种生物检材血型物质应用方面进行了研究探讨。本方法批内变异系数为 5.6%,批间变异系数为 10.15%。新鲜血的稀释度达 1:2 560 时,仍可用此法有效测出其中所含 ABO 血型抗原。用该法分别检测人体微量血痕、毛囊组织和唾液斑的 ABO 血型,获得满意结果。然后盲测 50 例样本血型,以样本计数值大于 800 次/min 判为阳性孔,小于 800 次/min 判为阴性孔进行判型,结果全部正确。由于本法适用于各种微量生物材料血型物质的测定,因此在法医学领域内将会有较好的应用前景。

主题词 法医学; ABO 血型系统/免疫学; 放射免疫测定/方法

中图分类号 D919.4

自从 50 年代 Pressmen 首次应用放射性碘标记技术进行抗原抗体结合反应的研究以来,同位素标记测定技术得到很大的发展,目前已成为生物学测定灵敏度最高的方法之一。在法医血清学领域内已用于种属^[1]、性别^[2]和血型^[3]的测定。本实验先建立起一种经过改良的同位素标记技术的方法——固相放射免疫分析法(SPRIA),再用来尝试检测微量人血斑、组织和体液斑的 ABO 血型,获得较满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂 包被液:pH 9.6 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液;洗涤液:pH7.4 0.02mol/L Tween-20 磷酸盐缓冲液;1% BSA(bovine serum albumin)和 3%鸡蛋清液;单克隆抗-A(McAb-A)和抗-B(McAb-B)(由卫生部长春生物制品研究所提供,效价由 512 调至

128);¹²⁵I-羊抗鼠 IgG 血清(¹²⁵I-SAM,羊抗鼠 IgG 冻干血清购自卫生部上海生物制品所,标碘由广东科学院测试所完成,放化浓度为 254 μ Ci/ml,放化纯度为 97.4%)。

1.1.2 仪 器 FT-613 自动计数¹²⁵I 放免测定仪(核工业部北京核仪器厂生产);40 孔软质微量反应板。

1.2.3 检 材 将新鲜全血滴于干净棉纱上制成血痕;取新鲜毛发根部作毛囊组织的血型测定;新鲜唾液斑用滤纸制成。

1.2 方 法

1.2.1 检材的处理 ①新鲜血 用包被液将其作适量稀释(或不稀释),然后加于软质微量反应板的 2 个孔中,每孔加 30 μ l,置 56 $^{\circ}$ C 干燥箱中干燥。②血痕 剪取血痕纤维 2mm 长,用大头针将其撕松,然后放于微量反应板的 2 个孔中。用吸管吸取少许 3%鸡蛋清液加于孔的低部,浸湿血痕纤维,迅速吸去多余蛋清,然后将板置 56 $^{\circ}$ C 干燥箱 10min。③毛囊组织 取 2~3 根毛发用 10 μ l 包被液

① 本研究获校青年基金资助;

② 第一作者,1961 年出生,男,硕士,讲师

浸泡根部 5min 后,用针刮下毛囊,将其研磨成糊状,然后再加 50 μ l 包被液,混匀,再加于软质微量板的 2 个孔中,每孔约 30 μ l。将板置 56 $^{\circ}$ C 干燥箱中 10min。④唾液斑 剪取唾液斑约 2mm²,加 60 μ l 包被液浸泡 2h,之后吸取浸泡液加于微量板的 2 个孔中,每孔 30 μ l,再将板置于 56 $^{\circ}$ C 干燥箱中 10min。

1.2.2 加样 ①各孔加 1%BSA 液 100 μ l,室温放置 10min 后弃去。②各孔加洗涤液 0.2ml,轻摇 1min,弃去内容物,然后再洗 2 次。③一孔加 McAb-A,另一孔加 McAb-B,各为 30 μ l,室温静置 20min 后弃去。④依步骤 1.2.2②用洗涤液洗 3 次。⑤各孔加¹²⁵I-SAM IgG 30 μ l(放化浓度 254 μ Ci/ml,按 1:50 稀释),室温放置 20min,之后弃去。⑥依步骤 1.2.2②用洗涤液洗 3 次。

1.2.3 样本测定 用剪刀将各孔背面突出

部分剪下,分别放于小试管中,用放免仪进行测定计数。

2 结果

2.1 SPRIA 方法学测定

2.1.1 批内变异系数的测定 同一种样本分成 10 份,分别放入小试管中,同一次用放免仪进行测定,得 10 个数据,计算均数,标准差得 CV_{批内}=5.6%。

2.1.2 批间变异系数的测定 同一种样本分成 10 份,分 10 次在放免仪进行测定、计数,得 CV_{批间}=10.15%。

2.2 140 例新鲜血样的测定

将新鲜全血用包被液稀释后按 1.2.2 所述方法加样和测定,结果见表 1。

表 1 SPRIA 法测定 140 例血样结果*(均值)

血型	A 型血(40 例)		B 型血(40 例)		O 型血(40 例)		AB 型血(20 例)	
	McAb-A	McAb-B	McAb-A	McAb-B	McAb-A	McAb-B	McAb-A	McAb-B
计数	1200.4 (816-1843)	593.8 (509-697)	570.6 (385-694)	1105.5 (806-1897)	546.8 (448-674)	509.9 (397-637)	906.9 (813-997)	914.5 (861-1061)

* (1)每份血样用包被液按 1:500 稀释;(2)阳性孔计数大于 800 次/min,阴性孔计数小于 700 次/min;(3)A 型和 B 型血样的阳性孔与阴性孔计数的差别明显($P < 0.001$);(4)O 型血样的抗 A 与抗 B 孔以及 AB 型血样的抗 A 与抗 B 孔计数值无统计学上的差别($P > 0.5$);(5)AB 型血的抗 A 和抗 B 孔与 O 型血的抗 A 和抗 B 孔计数值差别明显($P < 0.001$)。 (6)计数单位:次/min

2.3 灵敏度的测定

新鲜血的稀释度高达 1:2 560 时,仍可有效的测出其中所含血型物质(计数大于 800 次/min)。结果见表 2。

2.4 血痕血型的测定

将各型血痕纤维按 1.2.1②及 1.2.2 所

述方法进行处理和测定,结果见表 3。

2.5 毛囊组织和唾液斑血型测定

将 10 人的毛发和唾液斑样本按 1.2.1③④及 1.2.2 所述方法进行处理和测定,结果见表 4。

表 2 SPRIA 法灵敏度的测定(次/min)

血样	稀释度						
	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	
A 型	1 979	1 284	1 150	910	805	720	
B 型	1 897	1 220	1 143	905	800	730	
AB 型<	抗 A 孔	1 430	1 053	930	802	710	610
	抗 B 孔	1 512	1 112	941	813	711	640

表3 SPRIA法测定血痕血型(次/min)¹⁾

血型	A型	B型	O型	AB型
样本数	28	26	27	15
抗A孔计数	1 198 (816~1 843)	576 (386~784)	554 (418~794)	906 (813~997)
抗B孔计数	603 (520~790)	1099 (806~1 898)	536 (397~794)	914 (862~1 061)

1)阳性孔与阴性孔计数值及统计学比较基本同表1,只是表3中阴性孔计数值可大于700次/min,但小于800次/min

表4 SPRIA法测定毛囊组织和唾液斑血型(计数均值,单位次/min)¹⁾

检材	A型		B型		O型		AB型	
	抗A孔	抗B孔	抗A孔	抗B孔	抗A孔	抗B孔	抗A孔	抗B孔
毛囊组织	904	603	610	950	602	600	860	820
唾液斑	1 004	520	490	1 100	510	500	930	960

1)测定结果,阳性孔(A型的抗A孔,B型的抗B孔,AB型的抗A孔,抗B孔)均值大于800,阴性孔(A型的抗B孔,B型的抗A孔,O型的抗A孔、抗B孔)小于700,两者均值差别明显($P < 0.05$)

2.6 准确性测定

将50个已知血型血样(包括新鲜血和血痕)编号后盲测,以计数大于800次/min为阳性孔,计数小于800次/min为阴性孔进行判型,结果无一错误。

3 讨论

SPRIA法的应用在法医学方面未见报道,在临床医学方面有些学者用来测定血中肾素^[4]和与风湿病有关的胶原蛋白^[5]。SPRIA法与常规放射免疫分析法(RIA)相比具有较简单、快速但准确性稍差的特点。有的学者在做此法时要先用一些吸附物(如聚乙烯珠粒或磁性颗粒等)吸附抗体并在试管中进行反应,这样的操作比较麻烦。本试验采用软质微量反应板,未用吸附物,操作比较简便,一批可以作数10个样本的测定,而且测定方法也比较独特和简便(测定结果时只需剪下反应板背面孔的突出部分,这样就可以利用微量反应板同时作许多样本的测定,而且比较简单),与国外报道此法的方法学比较,本法批内变异系数5.6%与所报道的相近,只是批间变异系数10.15%稍高些(国外报道 $CV_{批内}=5.5\sim 6.9\%$, $CV_{批间}=3.7\sim 8.2\%$)。

为了使非特异性计数不致于过高,检材用量不要太多(如每孔血痕用量不要超过0.4cm),另外用1%BSA液进行封闭和在洗涤液中加入适量的Tween-20有一定的减低效果。由于本法是用计数值来判断结果,而不是用法医物证学大部分试验所采用的定量的方法,所以判断结果比较客观和容易,不需要特别的经验。

目前测定血痕血型比较灵敏的方法有解离试验和混合凝集试验等^[6],在灵敏度方面与本试验大致相同,但本试验不需指示红细胞,结果稳定,判断也比较客观。使用传统的方法在测定血痕、体液斑、组织等的血型时往往采用不同的方法,如测定血痕的血型用解离试验、混合凝集试验等,测定体液斑用中和试验等^[7],而本法则适合测定各种检材的血型抗原,比较方便。

关于判断结果标准,在抗体的标记情况(放化纯度、放化浓度等)不一样和各种抗体的效价不一样时,判断结果的标准(阳性孔和阴性孔的计数值)应有差别,本试验各阳性孔计数值均大于800次/min,阴性孔计数值均小于800次/min,以此值为标准做盲测试验,判断结果全部正确。

由于本试验比较稳定,并且灵敏、简便和判断结果较客观,适合各种法医物证微量检

材的血型抗原的检测,因此为法医学微量检验技术提供了一个新的类型,将具有较好的应用前景。

(本项研究曾得到核医学教研室桂治宁教授和曾熙兰教授的支持和帮助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Quarino L, Kobilinsky L. Development of a RIA technique for the detecting of human hemoglobin in dried bloodstains. *J Forensic Sci*, 1988, 33(6) : 1369
- 2 Yamamoto Y, Tsutsumi A, Ishizu H. Sex identification of bloodstains by RIA of sex hormones. *Forensic Sci Int* 1984, 24 : 19
- 3 Fukushima H, Segawa M, Ota M, et al. Determination of ABO blood groups by RIA using I^{125} -protein A. *J Forensic Sci*, 1987, 32(2) : 531
- 4 Hiroshi S, Takasaki I, Ishikawa Y, et al. Measurement of plasma active renin by solid phase radioimmunoassay using monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metal*, 1982, 54(2) : 423
- 5 Rowley MJ, Gershwin ME, Mackay IR, et al. Collagen antibodies in juvenile arthritis and adult rheumatoid arthritis; differences in levels and type-specificity. *J Rheumatol*, 1988, 15 : 289
- 6 Outteridge RA. Absorption-elution grouping of bloodstains and development. *Nature*, 1962, 194 : 385
- 7 郭景元主编. 实用法医学. 上海:上海科技出版社, 1980, 598

(1994-10-18 收稿 1995-03-26 修回)

APPLICATIONS OF A SOLID PHASE RADIOIMMUNOASSAY (SPRIA) TO THE MICRODETERMINATION OF ABO BLOOD GROUP

Wu Fenqiang Guo Jingyuan

(Department of Forensic Serology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

This paper reports a simple, rapid, sensitive and accurate solid phase radioimmunoassay (SPRIA) which has been improved. The research included the tests of its methodological parameters, sensitivity, accuracy, and the studies on its applications to the detection of blood group substances in varied forensic biological materials. The coefficient variation of intra-assay was 5.6%, and that of inter-assay was 10.15%. As to its applications to the forensic serology, the ABO blood groups of human bloodstains, hair follicular tissues and salivary stains had been tested and the results were satisfying. Later, 50 unknown type blood samples had been blind tested. The judging level used to identify the positive and negative wells was 800 cpm, that meant, if the radioactive count of a well were over 800 cpm, it was determined as a positive well, if that of a well were below 800 cpm, it was negative well. As SPRIA is a method of microdetermination which can microtest the blood group antigens contained in varied forensic biological materials, it should have a good future of its applications to the forensic medicine fields.

Subject headings forensic medicine; ABO blood-groups system/immunology; radioimmunoassay/methods