

准确滴定溶血素的方法研究

刘 畅, 王 彬, 赵景辉, 邵逸文, 曹大伟*

(山东泰邦生物制品有限公司, 泰安 271000)

摘 要: 目的 本文旨在探究一种准确滴定溶血素的方法, 以规避经典方法中难以客观判断滴定终点的问题。

方法 利用溶血素影响补体对绵羊红细胞的溶血反应, 以非线性模型-自由型四参数拟合曲线代替经典的线性回归模型, 以IC50对应稀释度为溶血素最适稀释度。**结果** 对同一批溶血素进行6次滴定实验, 使用自由型四参数拟合曲线模型滴定结果分别为1:1139, 1:1128, 1:1090, 1:1086, 1:1207, 1:1190, 相关系数 r^2 分别为0.9991、0.9987、0.9978、0.9979、0.9965、0.9974, 滴定结果相对偏差(RSD)为5%, 残差平方和分别为 6.8873×10^{-5} 、 9.9401×10^{-5} 、 17.5828×10^{-5} 、 16.4352×10^{-5} 、 27.8222×10^{-5} 、 20.3063×10^{-5} , 残差绝对值均小于0.03; 使用经典直线回归模型溶血素滴定结果为1:1200, 残差绝对值小于10, 残差平方和为7.4802。**结论** 该方法滴定结果稳定, 能够准确定位溶血素对绵羊红细胞的最适敏化稀释度。

关键词: 溶血素滴定; 补体; 绵羊红细胞; 四参数拟合曲线

0 引 言

补体在人体内的免疫系统中起到了重要的作用, 过度的补体激活会导致人体自身正常组织的炎症和损伤, 如急性肺损伤、类风湿关节炎等^[1], 所以抗补体活性检测是食品药品质量的一项重要安全指标^[2-4], 而溶血素的滴定则是准确检测抗补体活性的必要条件。

待测样品溶血素含量和活性的不确定性决定了在进行溶血反应时, 相同稀释度的不同血清样品其溶血反应率可能在较大的范围内波动。虽然根据测定结果可调整样品血清的稀释度后重新测定, 其结果是大幅增加了实验工作量, 同时降低了不同批次试验结果之间的可比性。

在经典溶血素滴定过程中, 存在溶血素滴定终点难以判断的问题, 试验过程中并不存在完全不影响吸光度的稀释度, 故导致每个实验室对滴定终点的判断并不一致, 从而在进行抗补体活性测定试验时结果有所差异^[5-7]。其滴定方法中所建立的线性回归模型是直线回归模型, 而溶血素稀释度与溶血率直接的响应关系并非呈直线线性, 故直线回归模型并非最合适该滴定实验的数学模型。

如上所述, 溶血素稀释不当会导致绵羊红细胞的功能发生紊乱, 溶血素效价过高则加剧溶血现象, 溶血素效价过低则难以出现溶血, 两种情况均可对测定结果造成很大影响, 使试验结果不能真实反映抗补体活性, 严重地影响了试验的准

确性^[8-10]。

本文旨在建立一种准确测定溶血素效价的检测统计方法, 为抗补体活性试验提供更好的血球敏化环境, 使抗补体活性检测试验结果客观准确。

1 材料与方法

1.1 仪器

XSE204 万分之一电子分析天平(METTLER TOLEDO); HZS-HA 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); TU-1950 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); L535R 台式低速离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

氯化钙(批号 20190124, 天津百世化工有限公司, 分析级); 氯化镁(批号 20190526, 天津百世化工有限公司, 分析级); 氯化钠(批号 20190724, 天津凯通试剂, 分析级), 巴比妥钠(批号 20200802, 徐州试剂二厂); 明胶(批号 WXBC9513V, SIGMA, 生物级); 豚鼠血清(补体); 溶血素; 绵羊红细胞(批号 29220121, 郑州百基生物科技有限公司)。

1.3 溶液制备

(1) 镁-钙贮备液制备: 称取氯化钙 1.10 g、氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 5.08 g, 加纯化水溶解并稀释至 25 mL。

(2) 巴比妥缓冲液贮备液制备 称取氯化钠 41.51 g, 巴比

第一作者: 刘畅, 硕士, 药品技术工程师, 研究方法为细胞增殖分化、II 型糖尿病、炎症反应。

* **通信作者:** 曹大伟, 硕士, 高级工程师, 控制中心主任, 研究方向为血液制品质量检测。E-mail: caodawei@chinabiologic.com

妥钠 5.13 g, 加纯化水 800 mL 溶解。用 1 mol/L 盐酸溶液调 pH 值至 7.3, 加镁-钙储备液 2.5 mL, 再加纯化水稀释至 1000 mL, 用 0.22 μm 膜滤过, 4℃ 保存备用。

(3)明胶巴比妥缓冲液(GVB)制备 称取明胶 0.625 g, 加纯化水 30 mL 煮沸使溶解, 加巴比妥缓冲液贮备液 100 mL, 再加纯化水稀释至 500 mL, 混匀即得。

(4)豚鼠血清(补体)制备从 12 只 400~500 g 豚鼠, 进行心脏采血, 于 4℃, 500 g 离心 10 min, 除去血细胞提取血清, 制备的混合血清, 小量分装, 于 -70℃ 冰箱中保存。使用时稀释 300 倍进行补体滴定。

(5)制备 5% 羊红细胞悬液。取绵羊红细胞适量, 用 GVB 至少洗 3 次后, 悬浮于适量 GVB 中。取 0.2 mL 红细胞悬液, 加至 2.8 mL 纯化水中, 待红细胞完全溶血后, 于 541 nm 处测定吸光度, 根据下列公式, 将该溶液的吸光度调节至 0.62±0.01。

$$V_f=V_i\times A/0.62$$

公式中: V_i 为稀释前红细胞悬液体积, mL; A 为稀释前红细胞溶解液吸光度; V_f 为稀释后红细胞悬液体积, mL。

1.4 新式溶血素滴定方法

取冻干溶血素 1 支, 用 0.5 mL 纯化水溶解后, 精密量取 0.1 mL, 加入 9.9 mL GVB, 混匀成 1 : 100 稀释液。

取试管 8 支, 各加入 1mL GVB, #1、#2 管各加入 1 mL 溶血素(1 : 100)稀释液, 从 #2 管开始进行 2 倍稀释至 #8 管, 最后一管弃去 1 mL。则 #1 至 #8 管溶血素梯度为 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1600、1 : 3200、1 : 6400、1 : 12800, 置于冰浴中备用。

将各梯度溶血素分别与 0.2 mL 5% 绵羊红细胞悬液混合, 37℃ 水浴放置 30 min 后, 取上述各梯度混合物各 0.2 mL, 分别加 GVB 1.1 mL 以及稀释的补体溶液 0.2 mL。阴性对照为 1.4 mL GVB 中加入 0.1 mL 5% 绵羊红细胞悬液; 阳性对照为 1.4 mL 纯化水中加入 0.1 mL 5% 绵羊红细胞悬液。

将各管混匀, 置 37℃ 振荡水浴 60 min, 然后将各管取出放置冰浴 3 min 后离心(4℃, 702 g, 5 min)。吸取上清液, 于 541 nm 测各管吸光度。

以溶血素稀释倍数的对数为横轴(以 10 为底数), 吸光度为纵轴, 建立四参数拟合曲线。记录曲线的 Top、Bottom、LogIC50、HillSlope 和 r^2 值。IC50 即绵羊红细胞灵敏度最高点, 即溶血素最适稀释倍数。

1.5 经典溶血素滴定方法

稀释溶血素: 取冻干溶血素 1 支, 用标示量纯化水溶解后, 量取 1 mL 溶血素, 加入 6.5 mL GVB, 混匀成 1 : 7.5 稀释液; 另取 1 mL 溶血素, 加入 9 mL GVB, 混匀成 1 : 10 稀释液。

使用 1 : 10 稀释液将溶血素依次稀释为 1 : 75、1 : 100、1 : 150、1 : 200、1 : 300、1 : 400、1 : 600、1 : 800、1 : 1600、1 : 2400、1 : 3200、1 : 4800, 放冰浴中备用。

取 1.0 mL 不同稀释度的溶血素分别与 5% 绵羊红细胞悬液 1.0 mL 混合, 37℃ 水浴 30 min, 取 0.2 mL 加入明胶巴比妥缓冲液 1.10 mL, 豚鼠补体溶液 0.2 mL, 37℃ 放置 60 min 后离心(4℃, 702 g, 5 min)取上清液, 在 541 nm 波长下测吸光度。每个稀释度做 2 管, 另做 3 管未溶血对照管(GVB 1.4 mL 加 5% 绵羊红细胞悬液 0.1 mL), 3 管全溶血对照管(纯化水 1.4 mL 加 5% 绵羊红细胞悬液 0.1 mL), 同法操作。

按下式计算各管溶血率以 Y 值为纵坐标, 以不同溶血素稀释梯度为横坐标作直接回归, 选择增加溶血素的量也不影响(即两梯度溶血率相对偏差不大于 2%)。 Y 值的溶血素稀释度为每 1 mL 含 1 个最小溶血单位。最小溶血率应在 50%~70%, 否则实验不成立。

$$Y=\frac{\text{各管吸光度}-\text{未溶血对照管吸光度}}{\text{全溶血管吸光度}-\text{未溶血对照管吸光度}}\times 100\%$$

2 结果与分析

同一批溶血素取 6 份, 根据溶血素滴定方法进行滴定(溶血素稀释方法、梯度范围、四参数拟合曲线方程的建立见溶血素滴定方法部分), 记录吸光度, 溶血素滴定结果分别为 1 : 1139, 1 : 1128, 1 : 1090, 1 : 1086, 1 : 1207, 1 : 1190, RSD 为 5% (见表 1); 相关系数 r^2 分别为 0.9991、0.9987、0.9978、0.9979、0.9965、0.9974, 残差平方和分别为 6.8873×10^{-5} 、 9.9401×10^{-5} 、 17.5828×10^{-5} 、 16.4352×10^{-5} 、 27.8222×10^{-5} 、 20.3063×10^{-5} (见表 2)。根据拟合曲线的相关系数和残差平方和可知, 四参数拟合曲线模型适用于溶血素滴定试验, 线性良好。使用经典溶血素滴定方法进行实验时, 未溶血管吸光度为 0, 全溶血管吸光度平均值为 0.621, 溶血素滴定结果为 1 : 1200, 相关系数 r^2 为 0.96, 残差平方和为 7.4802(见表 3)。经典溶血素滴定结果的残差平方和显著高于使用四参数拟合曲线模型拟合的结果, 故本实验中选择的溶血素稀释梯度与建立的数学模型优于经典溶血素滴定方法(见图 1~3)。

表 1 溶血素滴定实验吸光度统计

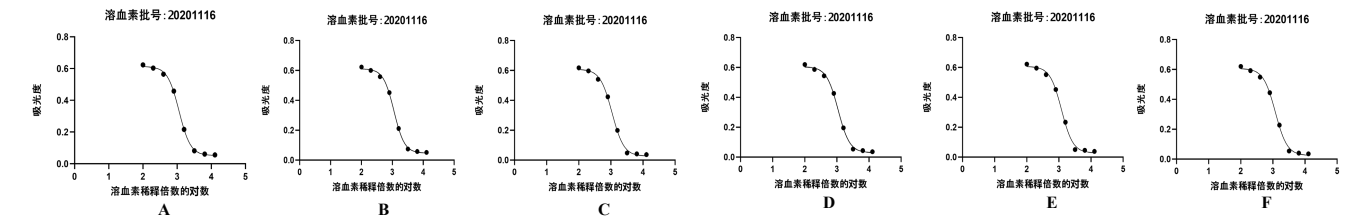
溶血素稀释梯度	稀释倍数的对数	第一次溶血素滴定实验吸光度		第二次溶血素滴定实验吸光度		第三次溶血素滴定实验吸光度	
1 : 100	2	0.622	0.624	0.625	0.621	0.615	0.620
1 : 200	2.30103	0.604	0.602	0.599	0.602	0.599	0.595
1 : 400	2.60206	0.567	0.562	0.557	0.560	0.539	0.543
1 : 800	2.90309	0.457	0.458	0.450	0.453	0.423	0.425
1 : 1600	3.20412	0.218	0.215	0.212	0.211	0.201	0.197
1 : 3200	3.50515	0.082	0.081	0.077	0.072	0.046	0.050

续表

溶血素稀释梯度	稀释倍数的对数	第一次溶血素滴定实验吸光度		第二次溶血素滴定实验吸光度		第三次溶血素滴定实验吸光度	
1 : 6400	3.80618	0.061	0.061	0.055	0.060	0.042	0.041
1 : 12800	4.10721	0.057	0.055	0.051	0.053	0.038	0.036
溶血素稀释梯度	稀释倍数的对数	第四次溶血素滴定实验吸光度		第五次溶血素滴定实验吸光度		第六次溶血素滴定实验吸光度	
1 : 100	2	0.619	0.621	0.623	0.622	0.621	0.620
1 : 200	2.30103	0.584	0.590	0.594	0.598	0.591	0.594
1 : 400	2.60206	0.542	0.546	0.555	0.549	0.550	0.548
1 : 800	2.90309	0.430	0.423	0.450	0.455	0.444	0.445
1 : 1600	3.20412	0.200	0.191	0.231	0.237	0.226	0.230
1 : 3200	3.50515	0.056	0.051	0.051	0.050	0.053	0.056
1 : 6400	3.80618	0.042	0.046	0.044	0.048	0.040	0.041
1 : 12800	4.10721	0.039	0.033	0.039	0.038	0.036	0.035

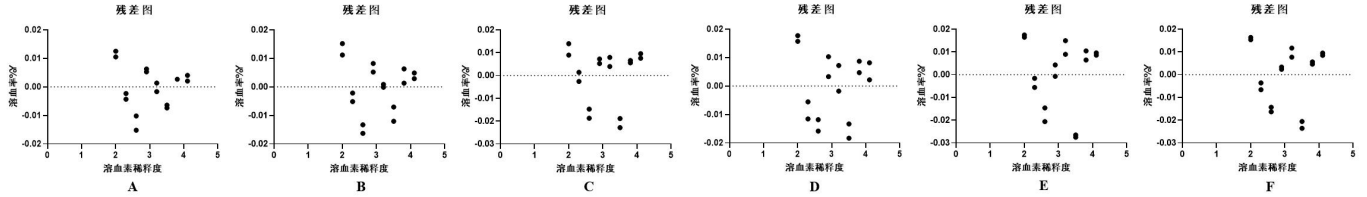
表 2 四参数拟合曲线参数统计

曲线参数	第一次溶血素滴定实验	第二次溶血素滴定实验	第三次溶血素滴定实验	第四次溶血素滴定实验	第五次溶血素滴定实验	第六次溶血素滴定实验
Top	0.6126	0.6110	0.6082	0.6051	0.6070	0.6064
Bottom	0.05184	0.04693	0.02671	0.02930	0.02753	0.02427
LogIC50	3.057	3.052	3.036	3.037	3.082	3.076
HillSlope	-2.578	-2.543	-2.358	-2.409	-2.422	-2.341
IC50	1139	1128	1086	1090	1207	1190



注：A. 第一次溶血素滴定实验；B. 第二次溶血素滴定实验；C. 第三次溶血素滴定实验；D. 第四次溶血素滴定实验；E. 第五次溶血素滴定实验；F. 第六次溶血素滴定实验。

图 1 溶血素滴定实验四参数拟合曲线



注：A. 第一次溶血素滴定实验；B. 第二次溶血素滴定实验；C. 第三次溶血素滴定实验；D. 第四次溶血素滴定实验；E. 第五次溶血素滴定实验；F. 第六次溶血素滴定实验。

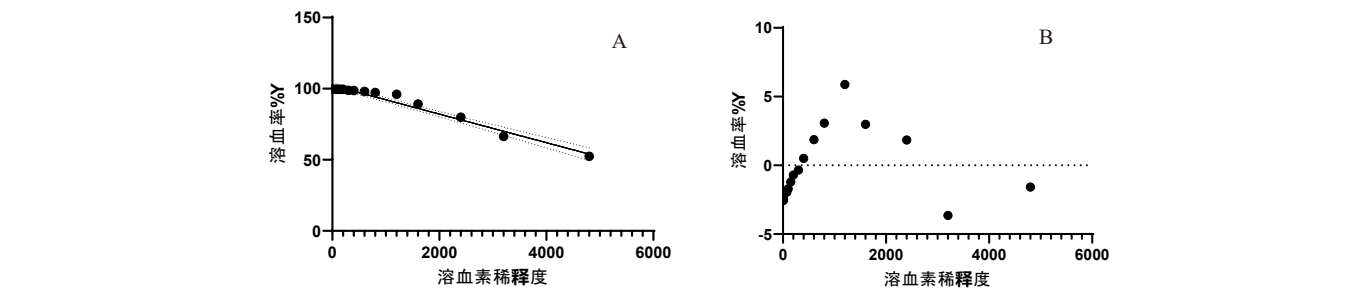
图 2 溶血素滴定实验残差图

表 3 经典溶血素滴定实验吸光度统计

溶血素稀释梯度	吸光度 1	吸光度 2
1 : 7.5	0.618	0.619
1 : 10	0.619	0.619
1 : 75	0.619	0.617
1 : 100	0.618	0.618
1 : 150	0.618	0.618
1 : 200	0.619	0.617
1 : 300	0.615	0.613
1 : 400	0.613	0.613
1 : 600	0.610	0.608

续表

溶血素稀释梯度	吸光度 1	吸光度 2
1 : 800	0.604	0.604
1 : 1200	0.596	0.597
1 : 1600	0.553	0.554
1 : 2400	0.498	0.495
1 : 3200	0.414	0.411
1 : 4800	0.326	0.325



注：图 A 为溶血素滴定回归直线；图 B 为溶血素滴定残差图

图 3 经典溶血素滴定实验

3 讨论与结论

本实验中溶血素滴定的方法是利用溶血素影响补体对绵羊红细胞的溶血反应，以非线性模型－四参数拟合曲线代替经典的线性回归模型，准确找到了溶血素对绵羊红细胞敏化最适稀释倍数(即四参数拟合曲线中 IC50 对应的稀释度，在该溶血素稀释度下，红细胞破裂程度与补体剩余量之间的灵敏度可达到最高)，以溶血素最适稀释比例替代了经典方法中最适溶血素效价，避免了溶血素滴定终点难以判断的问题。同时，使用该方法进行溶血素滴定实验时，可获得的检测结果是连续的，而经典滴定方法仅能获得固定梯度的检测结果(见图 2、图 3)。

在溶血素滴定试验的数剂量－响应关系中，四参数模型能够更好地呈现溶血率与稀释度的量效关系，同时，在溶血素滴定中存在一个溶血率的饱和点，即溶血素的浓度增加到一定程度后，溶血效果不再增加。四参数拟合模型能够很好地描述这一效应，进而可以更精确地确定半最大效应浓度和最大效应，这对于评估溶血素的生物活性非常重要，也是本实验方法比经典溶血素滴定方法更准确的主要原因。

本实验在数据统计与建立四参数拟合曲线时，采用自由型拟合曲线模型，上止线并非以阳性对照组的吸光度，下止线亦非零点；约束型拟合曲线以阳性对照组的吸光度为上止线，以零点为下止线，更为符合理想状态下(即实验过程中仅存在补体结合这一项单一因素导致红细胞破裂)的滴定实验，而自由型拟合曲线更符合当次实验的红细胞状态，两种拟合曲线模型下的滴定结果存在差异，故以何种模型进行拟合更为准确是后续实验中需要研究的问题。

参考文献

[1] 赵永杰,樊黎,董宝卫.新型溶血素在临床血常规检查中的应用价值分析[J].当代医药论丛,2021,19(13):149-150.

[2] 郭江红,王文晔,姜红,等.静注人免疫球蛋白质量评价与研究[J].中国药学杂志,2021,56(21):1749-1754.

[3] 褚秀清.联合检测溶血三项和血清中总胆红素水平对由ABO-新生儿溶血病引起高胆红素血症的早期诊断价值[J].中国妇幼保健,2020,35(04):677-679.

[4] 尹明伟,陈学军,曾智,等.母婴ABO血型不相合的高胆红素血症患儿新生儿溶血病确诊率的影响因素分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(06):663-666

[5] 范伟利,桑秀华.新型溶血素和传统溶血素在血常规检验中的临床价值对照探述[J].临床医药文献电子杂志,2019,6(46):14-15.

[6] 陈卓瑶,邓秋连,黄映红,等.溶血三项检测血清总胆红素及IgG抗体效价与新生儿ABO溶血病的关系探讨[J].新疆医科大学学报,2020,43(08):1069-1072.

[7] 邹晓霞.新型溶血素与传统溶血素在临床血常规检验中的应用效果评价[J].世界最新医学信息文摘,2020,(12):158-158.

[8] 王宗刚,卢元志,张慧兰.静注人免疫球蛋白抗补体活性测定影响因素的探讨[J].中国医药生物技术,2010,(03):224-225.

[9] 李冠军,张学成,张剑涛,等.静注人免疫球蛋白层析纯化条件的优化[J].国际生物制品学杂志,2019,42(03):125-128.

[10] 张世哲,江鸿标,卢玥晴,等.抗补体活性物质临床应用及开发研究进展[J].微生物学通报,2022,49(06):2347-2361.