

现代常用医学 检验技术及临床应用

(下)

王富伟等◎主编

现代常用医学 检验技术及临床应用

(下)

王富伟等◎主编

第十八章 生物质谱技术

质谱仪是一种定性鉴定用仪器,但不能对混合物进行分离。而色谱仪是一种对混合物进行分离的仪器,但定性能力差。如二者结合起来,则使分离和鉴定同时进行。因此,在有机质谱仪中,除激光解吸电离-飞行时间质谱仪和傅立叶变换质谱仪之外,所有质谱仪都是和气相色谱或液相色谱组成联用仪器。这样,使质谱仪无论在定性分析还是在定量分析方面都十分方便。同时,为了增加未知物分析的结构信息和增加分析的选择性,采用串联质谱法(质谱-质谱联用),也是目前质谱仪发展的一个方向。

一、气相色谱-质谱联用仪

气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)主要由3部分组成:色谱部分、质谱部分和数据处理系统。在色谱部分,混合样品在合适的色谱条件下被分离成单个组分,然后进入质谱仪进行鉴定。

色谱仪是在常压下工作,而质谱仪需要高真空,因此,如果色谱仪使用填充柱,必须经过一种接口装置-分子分离器,将色谱载气去除,使样品气进入质谱仪。如果色谱仪使用毛细管柱,则可以将毛细管直接插入质谱仪离子源,因为毛细管载气流量比填充柱小得多,不会破坏质谱仪真空。

GC-MS的质谱仪部分可以是磁式质谱仪、四极质谱仪,也可以是飞行时间质谱仪和离子阱。目前使用最多的是四极质谱仪。离子源主要是EI源和CI源。

GC-MS的另外一个组成部分是计算机系统。由于计算机技术的提高,GC-MS的主要操作都由计算机控制进行,这些操作包括利用标准样品(一般用FC-43)校准质谱仪,设置色谱和质谱的工作条件,数据的收集和处理以及库检索等。这样,1个混合物样品进入色谱仪后,在合适的色谱条件下,被分离成单一组分并逐一进入质谱仪,经离子源电离得到具有样品信息的离子,再经分析器、检测器即得每个化合物的质谱。这些信息都由计算机储存,根据需要,可以得到混合物的色谱图、单一组分的质谱图和质谱的检索结果等。根据色谱图还可以进行定量分析。因此,GC-MS是有机物定性、定量分析的有力工具。

作为GC-MS联用仪的附件,还可以有直接进样杆和FAB源等。但是FAB源只能用于磁式双聚焦质谱仪。直接进样杆主要是分析高沸点的纯样品,不经过GC进样,而是直接送到离子源,加热汽化后,由EI电离。另外,GC-MS的数据系统可以有几套数据库、主要有NIST库、Willey库、农药库、毒品库等。

二、液相色谱-质谱联用仪

液相色谱-质谱联用仪(liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS)联用仪主要由高效液相色谱、接口装置(同时也是电离源)、质谱仪组成。高效液相色谱与一般的液相色谱相同,其作用是将混合物样品分离后进入质谱仪。LC-MS接口装置是LC-MS联

用的关键。接口装置的主要作用是去除溶剂并使样品离子化。目前,几乎所有的 LC-1VIS 联用仪都使用大气压电离源作为接口装置和离子源。由于接口装置同时就是离子源,因此质谱仪部分主要是质量分析器。作为 LC-1S 联用仪的质量分析器种类很多,最常用的是四极杆分析器(简称为 Q),其次是离子阱分析器(Trap)和飞行时间分析器(TOF)。因为 LC-MS 主要提供分子量信息,为了增加结构信息,LC-MS 大多采用具有串联质谱功能的质量分析器,串联方式很多,如 Q-Q-Q、Q-TOF 等。

三、串联质谱法

为了得到更多的有关分子离子和碎片离子的结构信息,早期的质谱工作者把亚稳离子作为一种研究对象。所谓亚稳离子(metastable ion)是指离子源出来的离子,由于自身不稳定,前进过程中发生了分解,丢掉 1 个中性碎片后生成的新离子,这个新的离子称为亚稳离子。这个过程可以表示为 $m_1^+ \rightarrow m_2^+ N$, 新生成的离子在质量上和动能上都不同于 m_1^+ , 由于是在行进中途形成的,因此,它也不处在质谱中 m_2 的质量位置。研究亚稳离子对了解离子的母子关系,对进一步研究结构十分有用。于是,在双聚焦质谱仪中设计了各种各样的磁场和电场联动扫描方式,以求得到子离子,母离子和中性碎片丢失。尽管亚稳离子能提供一些结构信息但是由于亚稳离子形成的概率小,亚稳峰太弱,检测不容易,而且仪器操作也困难,因此,后来发展成在磁场和电场间加碰撞活化室,人为地使离子碎裂,设法检测子离子、母离子,进而得到结构信息。这是早期的质谱-质谱串联方式。随着仪器的发展,串联的方式越来越多。尤其是 20 世纪 80 年代以后出现了很多软电离技术,如 ESI、APCI、FAB、MALDI 等,基本上都只有准分子离子,没有结构信息,更需要串联质谱法得到结构信息。因此,近每来,串联质谱法发展十分迅速。

串联质谱法(tandem mass spectrometry)可以分为 2 类:空间串联和时间串联。空间串联是 2 个以上的质量分析器联合使用,2 个分析器间有 1 个碰撞活化室,目的是将前级质谱仪选定的离子打碎,由后一级质谱仪分析。而时间串联质谱仪只有 1 个分析器,前一时刻选定离子,在分析器内打碎后,后一时刻再进行分析。

(陈鑫 李彦娜)

第十九章 即时检测技术

一、即时检验的含义与特点

(一) 即时检验的含义

即时检验 (point - of - care testing, POCT) 是指在患者身边进行的临床检测。point - of - care testing 具有复杂的含义, 其他许多词也从不同方面表达了它的内容, 如 bedside testing (床旁检验)、near - patient testing (患者身边检验)、physician's office testing (医师诊所检验)、extralaboratory testing (检验科外的检验)、decentralized testing (分散检验)、off site testing (现场检验)、ancillar testing (辅助检验)、alternative sitetesting (替代现场检验)、home use testing (家用检验) 等。POCT 通常不一定是临床检验师来进行, 是在采样现场即刻进行分析, 省去标本在实验室检验时的复杂处理程序, 快速得到检验结果的一类新方法。实际上“即时检验”的中文翻译也没有表达出 POCT 的完整含义。

(二) 即时检验的特点

POCT 具有以下几个特点: ①快速, POCT 的主要目的就是减少 TAT, 更快地得到实验结果; ②提高了诊治效率, 例如对于急性心肌梗死的诊断, 心肌损伤标志物 cTnl 即时检验的应用可使此类急性患者的诊断和治疗方案的确定变得更容易和更准确, 整个过程只需要 15 分钟; ③减少了诊治不及时的风险。

二、即时检验仪器分类

POCT 之所以得到迅速应用, 很重要的是 POCT 仪器得到迅速发展。POCT 仪器具有小型化、操作方法简单化、结果报告即时化等特点。

(一) 根据即时检验仪器的大小和重量分

可分为桌面 (benchtop) 型、便携型、手提式及手提式一次性使用型。

(二) 根据所用的一次性装置来分

可分为单一或多垫试剂条、卡片式装置、生物传感器装置、微制造装置以及其他多孔材料等多种装置。

(三) 按照仪器用途来分

可分为血液分析仪、快速血糖检测仪、电解质分析仪、血气分析仪、药物应用监测仪、抗凝测定仪、心肌损伤标志物检测仪、甲状腺激素检测仪、酶联免疫检验仪、放射免疫分析仪等。

(四) 根据仪器检测项目的用途分类

(1) 用于疾病的一级预防的检测项目: 葡萄糖、HbA_{1C}、微量白蛋白尿、电解质、胆固

醇、C 反应蛋白、尿分析、凝血标志物、沙眼衣原体、HIV、链球菌等。

(2) 用于急诊室的检验项目：电解质、血气分析、葡萄糖、肌酐、淀粉酶、心脏标志物、脑损伤标志物、凝血标志物等。

(3) 用于重症监护的检验项目：电解质、离子钙、离子镁、血气分析、葡萄糖、乳酸、渗透压、肌酐、血红蛋白、凝血酶原时间等。

三、即时检验原理

(一) 干化学法

干化学法 (dry chemical assay) 是以被检测样品中的液体作为反应媒介，待测物直接与固化于载体上的干粉试剂反应的一种方式。所谓“干化学”是与传统的“湿化学”（即溶液化学）相对比较而言的。它与传统湿化学的最大区别就在于参与化学反应的媒介不同。它可以与光度计、传感器和电极技术等检测技术联用进行临床样本分析。包括双层膜法、多层膜法。此技术目前已被广泛应用于血糖、血尿素氮、血脂、血氨及心脏、肝脏等酶学血生化指标的 POCT 检测。图 19-1 代表用干化学技术对 cTnT 进行检测原理示意图。

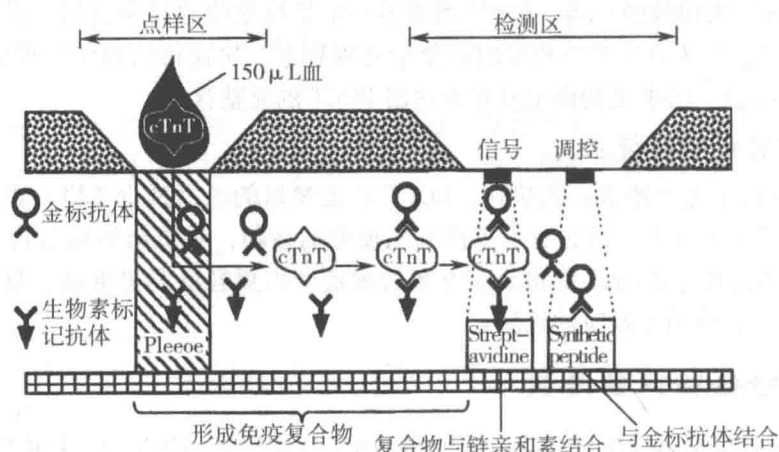


图 19-1 干化学技术对 cTnT 进行检测原理示意图

(二) 免疫胶体金技术

免疫胶体金技术 (immunocolloidal gold technique) 是以胶体金标记结合抗原-抗体反应的免疫标记技术。胶体金颗粒具有高电子密度的特性，金标蛋白结合处，在显微镜下可见黑褐色颗粒，当这些标记物在相应的标记处大量聚集时，肉眼可见红色或粉红色斑点，这一反应可以通过银颗粒的沉积被放大。该类技术主要有斑点免疫金渗滤法 (dot-immunogold filtration assay, DIGFA) 和免疫层析法 (immuno-chromatography assay, ICA)，被广泛应用于快速检测蛋白质类和多肽类抗原。

(三) 化学生物传感器技术

利用离子选择电极、底物特异性电极、电导传感器等特定的生物检测器进行分析检测。该类技术是酶化学、免疫化学、电化学与计算机技术结合的产物。

(四) 免疫荧光技术

通过检测板条上激光激发的荧光，定量检测以 pg/ml 为单位的检测板条上单个或多个标志物。检测系统通常由荧光读数仪和检测板组成（图 19-2）。检测板采用层析技术，分析物在移动的过程中形成了免疫复合物。如检测 HbA1c 使用的是免疫竞争法。当检测缓冲液与加入了溶血缓冲液后的全血混匀时，荧光标记的抗 HbA1c 抗体与血样中的 HbA1c 结合，然后当该样品混合液加入到检测板的加样孔后，样品中的 HbA1c 和固定在检测板上的糖化血红蛋白则会与检测抗体（荧光标记抗体）竞争性地结合，反应平衡后，样品中的 HbA1c 越多，固定在检测板上的糖化血红蛋白与荧光标记抗体结合的机会就越少，最后读出检测板所示荧光强度。荧光信号强弱与 HbA1c 的量成反比。仪器内部有两个光学系统。荧光检测系统监测 HbA1c 浓度；另一个光学系统检测总血红蛋白浓度。仪器将这两个参数转换为比值（%）显示在屏幕上，就是 HbA1c 的相对浓度（占总 Hb 的比率）。测定 HbA1c 的检测板含有一个固定了 HbA1c 的检测线和一个固定了抗生物素蛋白的质控线。

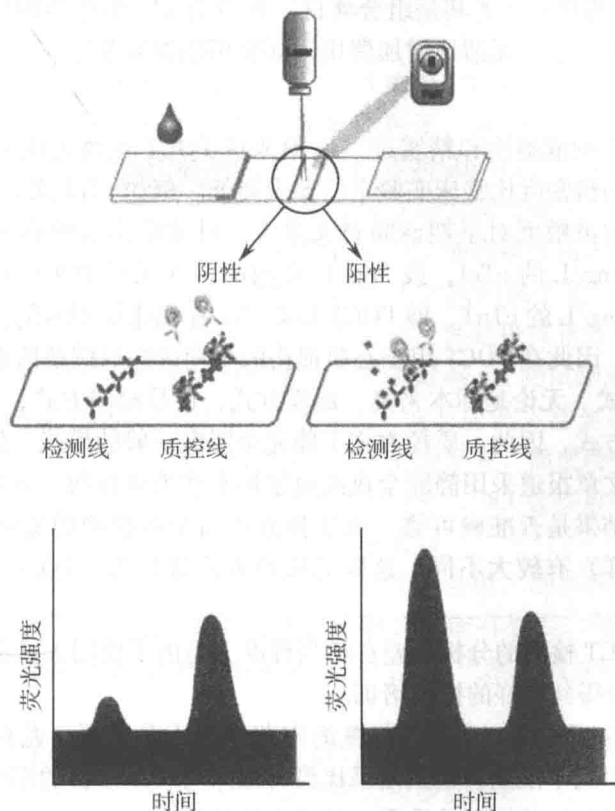


图 19-2 免疫荧光技术快速检测血液 HbA1c

(五) 红外和远红外分光光度技术

此类技术常用于无创性检测 POCT 仪器。如用于儿科经皮检测新生儿胆红素，不用采血，可直接观测，减少了新生儿采血的麻烦，患儿家长易于接受。

(六) 生物芯片技术

生物芯片技术是最新发展起来的技术，特点芯片面积小，制作方便，多个项目可在一个

芯片上同时检测。

未来的 POCT 技术将向图形分析、纳米技术、微流体技术、表面等离子共振技术方向发展。

四、即时检验的质量控制

临床检测的质量控制包括分析前、分析中和分析后 3 个阶段共十多个步骤。POCT 的优点是减少或去除了检测过程中的部分问题（如样品转运、结果传输等），但产生一些新的问题和潜在的误差（如检测结果的质量）。

（一）分析前

1. 选择合适的 POCT 检测装置 采用或接受 POCT 方式应重视与提高患者的医疗护理水平、医疗结果的改进、医疗费用水平的关系。选择时不仅应考虑速度快，更应考虑所在医疗机构的实际需求，适合临床实践应用。

2. POCT 设置的检测项目（尤其是组合项目）是否合适 不适当的组合项目有可能给临床一些没有更多价值的信息，无谓地增加费用，甚至可能误导临床。

（二）分析中

1. 正确评价 POCT 的准确性和精密度 一般来说 POCT 主要关注的是简单、快速和价廉，其检测的准确性和精密度比临床实验室的要求要低。例如 cTnI 或 cTnT 是诊断心肌损伤的重要标志物，检测的灵敏度对早期诊断意义重大。目前临床实验室采用免疫分析仪检测 cTn 时最低可检测到 1ng/L 的 cTnI，或 3ng/L 的 cTnT，而采用 POCT 方法最低只能检测到 50ng/L 的 cTnI，或 30ng/L 的 cTnT，即 POCT 检测 cTn 在临床应用时的检测灵敏度明显不能满足早期诊断的需求。因此在 POCT 用于心肌损伤的早期诊断时应该慎重。

2. 质量控制的方式 无论是标本采集、加样方式，还是检测方式，POCT 均不等同于传统的临床实验室检测方式，因此，质控方式不能完全照搬一般的模式。例如，对便携式血糖仪的质控管理，有些文章报道采用静脉全血或血浆标本作为质控物，通过定量加样的方式检测，以观察判定检测结果是否准确可靠，而这种方式与患者检测的实际方式（采用外周毛细血管血、非定量加样）有较大不同。这样的质控方式难以真正达到了解进而控制检测质量的目的。

3. 使用人员 POCT 检测的分析误差在相当程度上是由于使用人员引起的。因此，使用者在操作 POCT 之前应得到良好的操作培训。

4. POCT 装置的校准和维护 POCT 装置的定期校准十分重要，尤其是操作者为非检验专业人员时。应该认识到不准确的检测结果比没有结果对临床诊治的影响更坏。而校准和定期维护对保证检测结果的准确性至关重要。校准和维护要有一定的专业化知识，要严格按照生产厂商规定的要求和操作程序进行，有疑问时应请相关检验专业人员协助解决。

（三）分析后

在很多情况下，POCT 是非专业人员进行操作和使用，检测得到的结果如何应用也是应该关注的问题。

（陈 鑫 李彦娜）

第二十章 血气分析仪及临床应用

一、血气分析仪的基本结构及原理

不同类型的血气分析仪有不同的特点和性能，但也有共同的要求。为使测定结果准确可靠，除应严格按照各仪器的操作规程进行操作、校正和测定外，还应了解仪器的基本结构及工作原理。

(一) 基本结构

自动血气分析仪的基本结构大致包括以下几个主要部分：电极和测量室、恒温装置、管路系统、电子控制系统、显示屏和打印装置等。

1. 电极和测量室 血气分析仪的电极分为 pH 电极、 PCO_2 电极、 PO_2 电极和参比电极。

(1) pH 电极系统：pH 电极实际是一套测量系统，由 pH 测量电极和参比电极组成。pH 测量电极现多采用平面型 pH 玻璃电极，电极芯为 Ag/AgCl 电极，其中灌注内缓冲液，留有一小气泡。此气泡不宜过大，使用过程中如气泡增大说明密封不好，有渗漏现象，不能使用。参比电极又叫甘汞电极，其内液通过微孔或离子渗透膜所构成的盐桥与血液样品相连接，因此，盐桥实际上是参比电极的内液和血液样品之间的离子通道。pH 测量系统的故障大多数为参比电极影响所致，因此参比电极的安装和更换是极其重要的。饱和 KCl 溶液易渗出产生结晶，参比电极膜及电极套要定期更换，否则影响 pH 测试结果。

pH 电极有一定的使用期限，用久后可能老化，使反应低下甚至不能正常工作，此时需要更换新电极。由于血液蛋白对电极污染容易出现反应异常，而玻璃电极不可随便拆换，可用 0.1g/dl 胃蛋白酶盐酸溶液浸泡 30 分钟，然后用 pH 7.383 缓冲液冲洗。若经酶处理仍无改善，可检查参比电极，更换氯化钾溶液和参比电极膜。

(2) PCO_2 电极： PCO_2 电极技术性能基本同于 pH 电极，所不同的只是 PCO_2 电极需装尼龙网及渗透膜以注入外缓冲液。其渗透膜应平整，不能有皱纹、裂缝和针眼并保持清洁。渗透膜及尼龙网与敏感玻璃膜紧贴，不能夹有空气。有气泡可致反应速度变慢，显示不稳定，引起测定误差。

要定期更换电极缓冲溶液，电极缓冲液 pH 发生改变时可影响 PCO_2 定标准确性。外缓冲液不宜装得过满，应留有小气泡，使温度升高时有膨胀余地，以免电极膜变形，影响测定结果。电极要经常清洗，清洗时应用随机所带清洁剂。如换缓冲液后电极反应低下则要更换渗透膜。

(3) PO_2 电极：由前端的选择性 O_2 通透性膜、铂阴极和 Ag/AgCl 阳极组成， PO_2 电极用久后，其阴极端的磨砂玻璃上会有 Ag 或 AgCl 沉积，使电极灵敏度改变，此时应在细砂纸上滴上数滴 PO_2 电极外缓冲液，摩擦去掉沉积，用 PO_2 外缓冲液洗净，即可得到好的效果。渗透膜及电极外缓冲液要定期更换，与 PCO_2 电极方法相同。

测量室是一固定铝块，测量毛细管通道位于测量室内，是一根透明的细塑料管，管壁上

有四个孔,分别用于漏出参比电极、 PCO_2 电极、 PO_2 电极、pH 电极的端部。测量室内还有加热器和温度传感器,即为一热敏电阻,以便测量室内保持 37°C ,一旦温度超出 $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ 的规定范围,传感器立即反馈信号到温控电路,使停止或开始加热。

2. 恒温装置 由加热元件、风扇及温度控制装置组成。

3. 管路系统 血气分析仪的管路系统比较复杂,是血气分析仪很重要的组成部分。管路系统的功能有完成自动定标、自动测量、自动冲洗及抽取标本血样。

管路系统结构,通常由气瓶、溶液瓶、连接管道、电磁阀、正压泵、负压泵、测量毛细管和转换装置等部分组成。

(1) 气路系统:气路系统用来提供 PCO_2 和 PO_2 两种电极定标时所用的两种气体。每种气体中含有不同比例的氧和二氧化碳。气路系统根据供气方式又分为两种,由压缩气瓶供气,叫外配气方式;由气体混合器供气,叫内配气方式。

1) 压缩气瓶供气方式:由两个压缩气瓶供气,一个含有 5% 的二氧化碳和 20% 的氧;另一个含 10% 的二氧化碳,不含氧。经过减压后输出的气体,首先经过湿化器饱和湿化后,再经阀或转换装置送到测量室中,对 PCO_2 和 PO_2 电极进行定标。湿化器是用水蒸气将定标气体饱和湿化的装置。经饱和湿化后的水蒸气产生的压力为恒定值。

2) 气体混合器供气方式:这种供气系统用仪器本身的气体混合器产生定标气。加到气体混合器上来的空气压缩机产生的压缩空气和气瓶送来的纯二氧化碳气体,二氧化碳的纯度要求大于 99.5%,气体混合器将上述两种气体进行配比、混合,最后产生类似于上述气瓶内气体比例的两种不同浓度的气体。同气瓶预混的供气方式一样,这两种气体也要经湿化器后,才送给测量毛细管。

(2) 液路系统:液路系统具有两种功能,一是提供 pH 电极系统定标用的两种缓冲液,二是自动将定标和测量时停留在测量毛细管中的缓冲液或血液冲洗干净。液路系统需要四个盛放液体的瓶子,其中两个盛放缓冲液 1 和缓冲液 2,第三个盛装冲洗液,第四个盛放废液。

(3) 阀门和泵:血气分析仪内部具有两个泵,一为真空泵,另一为蠕动泵。利用这两个泵来完成仪器的定标、测量和冲洗。真空泵用来产生负压,使废液瓶内维持负压,靠此负压去吸引冲洗液和干燥空气,用于冲洗和干燥测量毛细管。真空泵还用于湿化器的快速充液。蠕动泵用于抽吸样品和定标品。在定标时用来抽取缓冲液到测量室。在测血样时用来抽样品。

4. 电子控制系统 将仪器测量信号进行放大和模数转换、对仪器实行有效控制、显示和打印出结果,并通过键盘输入指令。

5. 显示屏和打印装置 是显示和打印数据的部分。

(二) 基本原理

被测血液在管路系统的抽吸下。被抽进样品室内的测量毛细管中测量。毛细管管壁上开有 4 个孔, pH、pH 参比、 PO_2 和 PCO_2 4 支电极感测头紧紧将这 4 个孔堵严,其中, pH 和 pH 参比电极共同组成 pH 测量系统,被测量的血液吸入测量毛细管后,管路系统停止抽吸;这样,血液中 pH、 PCO_2 和 PO_2 同时被 4 支电极所感测,电极将它们转换成各自的电信号,这电信号经过放大模数转换后被送至计算机系统,计算机处理后将测量值和计算值显示出来并打印出测量结果。

(三) 性能特点

血气分析仪的检测速度快,可以满足临床抢救所需;血气分析仪的检测准确性和重复性好,各型号的血气分析仪一般 pH 的偏差在 0.01 ~ 0.015, PCO₂ 和 PO₂ 在 3% ~ 6% 左右,精密度则更高,这一结果完全能满足临床的要求。血气分析仪属于 24 小时连续开机处于待测状态的精密机器,操作比较简单,关键是日常保养,其易受血液中蛋白质的影响,需要去蛋白质和换膜,因此对血气分析仪需要加强日常保养。

二、血气及酸碱分析常用参数含义及参考区间

转换因素: 1mmHg = 0.133kPa; 1kPa = 7.5mmHg。

(一) 血氧分析

血氧分析一般包括以下测定参数: 氧分压 (partial pressure of oxygen, PO₂)、氧饱和度 (oxygen saturation, SatO₂) 和血红蛋白 50% 氧饱和度时氧分压 (partial pressure of oxygen of 50% hemoglobin oxygen saturation, P50)、脱氧血红蛋白或还原血红蛋白 (deoxy-hemoglobin, HHb)、氧合血红蛋白 (oxyhemoglobin, O₂Hb)、高铁血红蛋白 (methemoglobin, MetHb) 和碳氧血红蛋白 (carboxyhemoglobin, COHb)。

1. 氧分压 指血浆中物理溶解 O₂ 的压力, O₂ 在血液中溶解量的多少与 PO₂ 成正比, PO₂ 是机体缺氧的敏感指标。

参考区间: 动脉血为 10.64 ~ 13.30kPa (80 ~ 100mmHg)。

PO₂ 低于 7.31kPa (55mmHg) 即表示有呼吸衰竭, 低于 4.0kPa (30mmHg) 可有生命危险。

2. 氧饱和度和血红蛋白 50% 氧饱和度时氧分压 SatO₂ 是指血液在一定的 PO₂ 下, HbO₂ 占全部 Hb 的百分比值, 是了解血红蛋白氧含量程度和血红蛋白系统缓冲能力的指标。主要取决于动脉氧分压, 可用下式表示:

$$\text{SatO}_2 (\%) = [(\text{血氧含量} - \text{物理溶解氧}) / \text{血氧容量}] \times 100\%$$

当 PO₂ 降低时, SatO₂ 也随之降低; 当 PO₂ 增加时, SatO₂ 也相应增加。氧解离曲线为 S 形, 这条 S 形曲线可受各种因素的影响而发生左移或右移的改变, 观察曲线左移或右移的指标为 P50。P50 是指血红蛋白 50% 氧饱和度时的氧分压。P50 可反映血液运输氧的能力以及血红蛋白对氧的亲合力。P50 增加, 提示氧解离曲线右移, 氧与 Hb 亲合力降低, Hb 易释放氧。P50 降低, 提示氧解离曲线左移, 氧与 Hb 亲合力增加, Hb 易结合氧, 但不易释放氧。因此 P50 降低时, 尽管 SatO₂ 较高, 实际上组织同样缺氧。影响 P50 的因素很多, 凡能影响氧与 Hb 结合的因素均可影响 P50, 主要有以下几种: ①温度: 体温高时右移, 低时左移; ②PCO₂: PCO₂ 增高右移, 降低左移; ③pH: 增高左移, 降低右移; ④红细胞内 2, 3 - 二磷酸甘油酸 (2, 3 - DPG): 增高右移, 降低左移。

参考区间: 动脉血 SatO₂ 参考区间为 91.9% ~ 99%, P50 参考区间为 3.5 kPa (26mmHg)。

3. 脱氧血红蛋白或还原血红蛋白 指的是没有携带氧的血红蛋白, 还原血红蛋白呈紫蓝色。当毛细血管中还原血红蛋白达到 5g/dl 以上时, 皮肤、黏膜呈现青紫色, 称为发绀 (cyanosis), 常见于乏氧性缺氧。静脉血因含还原血红蛋白多, 所以呈现暗红色, 透过皮肤,

就呈现青紫色。

参考区间：动脉血 HHb 参考区间为 0 ~ 5%。

4. 氧合血红蛋白 临床意义同氧饱和度。

参考区间：动脉血 O₂Hb 参考区间为 92% ~ 98%。

5. 高铁血红蛋白 正常人血红蛋白分子含二价铁 (Fe²⁺)，与氧结合为氧合血红蛋白。当血红蛋白中铁丧失一个电子，被氧化为三价铁 (Fe³⁺) 时，即称为高铁血红蛋白 (MetHb)。当血中 MetHb 量超过参考区间时，称为高铁血红蛋白血症，可分为获得性高铁血红蛋白血症：主要由于药物或化学物接触引起；先天性高铁血红蛋白血症：由于 NADH - 高铁血红蛋白还原酶缺乏引起；此外，还可见先天性高铁血红蛋白血症伴有异常血红蛋白 M (HbM)。

参考区间：动脉血 MetHb 参考区间为 0 ~ 6%。

6. 碳氧血红蛋白 碳氧血红蛋白是由一氧化碳与血红蛋白结合而形成。一氧化碳与血红蛋白的结合力比氧与血红蛋白的结合力大 200 ~ 300 倍，碳氧血红蛋白的解离速度只有氧合血红蛋白的 1/3 600。因此一氧化碳与血红蛋白结合生成碳氧血红蛋白，不仅减少了红细胞的携氧能力，而且抑制、减慢氧合血红蛋白的解离和氧的释放。血中碳氧血红蛋白的浓度与空气中一氧化碳的浓度成正比。中毒症状取决于血中碳氧血红蛋白的浓度，血液中碳氧血红蛋白浓度大于 2% 时即可引起神经系统反应，达 5% 时，冠状动脉血流量显著增加，达 10% 时，冠状动脉血流量可增加 25%，这是一种代偿功能。但冠状动脉硬化患者则没有这种代偿能力，因而导致心肌缺氧、损伤。当血中碳氧血红蛋白为 2.5% 时就可缩短心绞痛患者的发作时间。同时血中碳氧血红蛋白浓度也是大气污染或室内空气污染生物材料监测的重要指标。

参考区间：动脉血 COHb 参考区间为 0 ~ 2%。

(二) 酸碱度

血液酸碱度 (potential of hydrogen, pH) 是 $[H^+]$ 的负对数值， $[HCO_3^-] / [H_2CO_3]$ 是决定血液 pH 的主要因素。

1. 参考区间 动脉血参考区间为 7.35 ~ 7.45。

2. 临床意义 <7.35 为酸血症，>7.45 为碱血症。但 pH 正常并不能完全排除无酸碱失衡，可能为代偿性酸碱平衡紊乱。

(三) 二氧化碳分压

二氧化碳分压 (partial pressure of carbon dioxide, PCO₂) 指血浆中物理溶解 CO₂ 的压力。PCO₂ 代表酸碱失调中的呼吸因素，它的改变可直接影响血液 pH 的改变。

1. 参考区间 动脉血参考区间为 4.65 ~ 5.98kPa (35 ~ 45mmHg)。

2. 临床意义 超出或低于参考区间称高、低碳酸血症。大于 7.33kPa (55mmHg) 有抑制呼吸中枢的危险，是判断各型酸碱中毒的主要指标。

(四) 二氧化碳总量

二氧化碳总量 (total carbon dioxide, TCO₂) 指存在于血浆中各种形式的 CO₂ 的总和。TCO₂ 在体内受呼吸及代谢两方面因素的影响，但主要受代谢因素的影响。

1. 参考区间 动脉血参考区间为 3.2 ~ 4.27kPa (24 ~ 32mmHg)。
2. 临床意义 代谢性酸中毒时明显下降, 碱中毒时明显上升。

(五) 实际碳酸氢盐和标准碳酸氢盐

实际碳酸氢盐 (actual bicarbonate, AB) 是指人体血浆中实际的 HCO_3^- 含量, 是体内代谢性酸碱失衡的重要指标, 也受呼吸因素改变的影响。标准碳酸氢盐 (standard bicarbonate, SB) 指在体温 37℃、 PCO_2 为 5.32kPa (40mmHg)、 SatO_2 为 100% 时的 HCO_3^- 含量, 排除了呼吸因素的影响。

1. 参考区间 动脉血参考区间: AB 为 21 ~ 28mmol/L; SB 为 21 ~ 25mmol/L。

2. 临床意义 AB 与 SB 两个指标联合分析, 更有参考价值。两者正常为酸碱平衡正常, 两者皆低为代谢性酸中毒失代偿, 两者皆高为代谢性碱中毒失代偿, $\text{AB} > \text{SB}$ 为呼吸性酸中毒, $\text{AB} < \text{SB}$ 为呼吸性碱中毒。

(六) 碱剩余

碱剩余 (base excess, BE) 指在标准条件下, 即温度 37℃、一个标准大气压、 PCO_2 为 5.32kPa (40mmHg)、 SatO_2 为 100%, 用酸或碱将 1L 血液 pH 调整至 7.40 所需要加入的酸碱量。正常人 BE 值在 0 附近波动。

1. 参考区间 动脉血参考区间: -3 ~ +3mmol/L。

2. 临床意义 BE 正值增加时, 常提示代谢性碱中毒; BE 负值增加时, 常提示代谢性酸中毒。

(七) 阴离子间隙

阴离子间隙 (anion gap, AG) 指血浆中未测定的阴离子 (UA) 与未测定的阳离子 (UC) 浓度间的差值, 即 $\text{AG} = \text{UA} - \text{UC}$ 。该值可根据血浆中常规可测定的阳离子 (Na^+) 与常规测定的阴离子 (Cl^- 和 HCO_3^-) 的差算出, 即 $\text{AG} = [\text{Na}^+] - \{[\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-]\}$ 。

1. 参考区间 10 ~ 14mmol/L。

2. 临床意义 目前多以 $\text{AG} > 16\text{mmol/L}$ 作为判断是否有 AG 增高型代谢性酸中毒的界限。它可鉴别不同类型的代谢性酸中毒。增高: 见于代谢性酸中毒、糖尿病酮症酸中毒、尿毒症等。阴离子间隙正常的代谢性酸中毒如高血氯性代谢性酸中毒。降低: 临床表现为低蛋白血症等。

(八) 缓冲碱

缓冲碱 (buffer base, BB) 是血液中具有缓冲作用的碱之总和, 包括 HCO_3^- 、 HPO_4^{2-} 、血红蛋白、血浆蛋白。BB 能反映机体对酸碱平衡紊乱时总的缓冲能力, 它不受呼吸因素和二氧化碳改变的影响。

1. 参考区间 45 ~ 55mmol/L。

2. 临床意义 缓冲碱增高常见于代谢性碱中毒; 减低常见于代谢性酸中毒, 若此时实际碳酸氢盐 (AB) 正常, 有可能为贫血或血浆蛋白低下。

(陈鑫 李彦娜)

第二十一章 蛋白质及多肽类检验

一、总蛋白 (TP) 测定

(一) 生化及生理

血清总蛋白是血浆中全部蛋白质的总称,可利用不同的方法将其分离,其含量变化对临床疾病诊断和治疗监测具有重要临床意义。血清中的白蛋白, α_1 、 α_2 、 β -球蛋白,纤维蛋白原,凝血酶原和其他凝血因子等均由肝细胞合成。 γ -球蛋白主要来自浆细胞。当肝脏发生病变时,肝细胞合成蛋白质的功能减退,血浆中蛋白质即会发生质和量的变化。临床上用各种方法检测血清蛋白的含量来协助诊断肝脏疾患,并作为疗效观察、预后判断的指标。

(二) 检测方法

凯氏定氮法:经典的蛋白质测定方法。测得样品中氮含量后,根据蛋白质平均含氮量16%计算蛋白浓度。该法结果准确性好,精密度高,灵敏度高,是公认的参考方法,目前用于标准蛋白质的定值和校正其他方法等,并适用于一切形态(固体和液体)的样品。但该法操作复杂、费时,不适合体液总蛋白常规测定,而且样品中各种蛋白质含氮量有一定的差异,尤其在疾病状态时差异可能更大,故本法不适于临床应用。

双缩脲法:两个尿素分子缩合后生成的双缩脲,可在碱性溶液中与铜离子作用形成紫红色的反应物;蛋白质中的连续肽键在碱性溶液中也能与铜离子作用产生紫红色络合物,因此将蛋白质与碱性铜反应的方法称为双缩脲法。该法对各种蛋白质呈色基本相同,特异性和准确度好,且显色稳定性好,试剂单一,方法简便。该法灵敏度虽不高,但对血清总蛋白定量很适宜,胸腹腔积液中蛋白质含量多数大于10g/L,基本上也能用该法测定,而对蛋白质浓度很低的其他体液尤其是脑脊液和尿液,不是合适的定量方法。

染料结合法:在酸性环境下,蛋白质带正电荷,可与染料阴离子反应而产生颜色改变,常用染料有氨基黑、丽春红、考马斯亮蓝、邻苯三酚红钼等。前两种常用作为血清蛋白电泳的染料。考马斯亮蓝常用于需更高呈色灵敏度的蛋白电泳中,也可用于尿液、脑脊液等样品的蛋白质定量测定,优点是鉴别、快速、灵敏,但比色杯对染料有吸附作用,在自动生化分析仪中无法很好地清洗(手工清洗常采用乙醇)。染料结合法均存在不同蛋白质与染料结合力不一致的问题。目前临床上最常用的是邻苯三酚红钼法。

比浊法:某些酸如三氯乙酸、磺基水杨酸等能与蛋白质结合而产生微细沉淀,由此产生的悬浮液浊度大小与蛋白质的浓度成正比。该法的优点是操作简便、灵敏度高,可用于测定尿液、脑脊液等蛋白质浓度较低的样品;缺点是影响浊度大小的因素较多,包括加入试剂的手法、混匀技术、反应温度等,且各种蛋白质形成的浊度亦有较大的差别。目前临床上较多应用的是茚三酮法。

酚试剂法:原理是运用蛋白质中酪氨酸和色氨酸使磷钨酸和磷钼酸还原为钨蓝和钼蓝。

该法灵敏度较高。Lowry 将酚试剂法进行了改良,先用碱性铜溶液与蛋白质反应,再将铜一肽键络合物中的酪氨酸和色氨酸与酚试剂反应,产生最大吸收在 745 ~ 750nm 的颜色,使呈色灵敏度更为提高,达到双缩脲法的 100 倍左右,有利于检出较微量的蛋白质。各种蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量不同,如白蛋白含色氨酸 0.2%,而球蛋白含色氨酸 2% ~ 3%,因此本法不适合测定混合蛋白质,只适合测定单一蛋白质,如测定组织中某一蛋白质抽提物。该法易受还原性化合物的干扰,如带 -SH 的化合物、糖类、酚类等。

直接紫外吸收法:根据蛋白质分子在 280nm 处的紫外吸光度值计算蛋白质含量。其原理是:芳香族氨基酸在 280nm 处有一吸收峰,可用于蛋白质的测定。因生物样品常混有核酸,核酸最大吸收峰为 260nm,在 280nm 也有较强的吸收,因而测得的蛋白质浓度可采用两个波长的吸光度予以校正,即蛋白质浓度 (g/L) = $1.45A_{280nm} - 0.74A_{260nm}$ 。该法准确性受蛋白质分子中芳香族氨基酸的含量影响甚大,而且尿酸和胆红素在 280nm 附近有干扰,所以不适合血清、尿液等组成复杂的体液蛋白质测定,常用于较纯的酶、免疫球蛋白等测定。本法不加任何试剂且不需要任何处理,可保留制剂的生物活性,可回收全部蛋白质。

(三) 标本要求与保存

采用血清或血浆,血清首选,血浆用肝素或 EDTA 抗凝。标本量 1ml,至少 0.5ml。最好在 4 小时内分离血清/血浆。分离后标本在室温 (25℃)、冷藏 (4℃) 或冷冻 (-20℃) 稳定保存 14 天。可反复冻融 3 次。

(四) 参考区间

血清:脐带血:48 ~ 80g/L。

早产儿:36 ~ 60g/L。

新生儿:46 ~ 70g/L。

1 周:44 ~ 76g/L。

7 个月 ~ 1 岁:51 ~ 73g/L。

1 ~ 2 岁:56 ~ 75g/L。

>2 岁:60 ~ 80g/L。

成人 (活动):64 ~ 83g/L。

成人 (休息):60 ~ 78g/L。

>60 岁:比成人低 0 ~ 2g/L。

(五) 临床意义

(1) 升高:脱水、水分摄取不足、腹泻、呕吐、静脉淤血、糖尿病酸中毒、发热、肠梗阻和穿孔、外伤、急性感染等;单核-巨噬细胞系统疾患 (球蛋白增多);多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、白血病等;慢性感染性疾病 (球蛋白增多);细菌、病毒、寄生虫感染,关节炎等。

(2) 降低:血浆蛋白漏出:出血、溃疡、蛋白质尿、胃肠炎的蛋白漏出;营养不良 (清蛋白减少):营养失调症、低清蛋白血症、维生素缺乏症、恶病质、恶性贫血、糖尿病、妊娠中毒等;肝功能障碍 (清蛋白合成减少):肝硬化、肝癌、磷中毒等。

血清总蛋白存在生理变动:脐带血、新生儿等与成人比较约低 15g/L., 血浆总蛋白随年龄增长而增加,13 ~ 14 岁则达到成人水平,呈稳定的平衡状态,但随年龄老化有降低趋

势。成人女性比男性低 $1.0 \sim 2.0 \text{g/L}$ ，妊娠中期会下降。

血清总蛋白含量正常者，并不表明其组分也正常，例如肝硬化患者往往呈现血浆清蛋白减少，而 γ -球蛋白增加，两因素相互抵消则血浆总蛋白仍处于正常范围。为了使其结果有临床意义，除测定总蛋白外，还需加测 Hb 和血细胞比容 (Hct) 或者循环血液量，进行综合判断。

(六) 影响因素

严重溶血、明显的脂血、高胆红素会引起蛋白质浓度的假性上升。检测前应离心去除样品中的沉淀。

二、白蛋白 (Alb) 测定

(一) 生化及生理

白蛋白是 580 个氨基酸残基的单链多肽，分子量为 66 300，分子结构中含 17 个二硫键，不含糖。在体液 pH 7.4 的环境中，白蛋白为负离子，每分子可以带有 200 个以上负电荷。白蛋白 (albumin, Alb) 由肝实质细胞合成，在血浆中其半衰期 15 ~ 19 天，是血浆中含量最多的蛋白质，占血浆总蛋白的 57% ~ 68%。各种细胞外液中均含微量的白蛋白；正常情况下白蛋白在肾小球中滤过量甚微，约为血浆中白蛋白量的 0.04%，即使如此，每天从肾小球滤过液中排出的白蛋白即可达 3.6g，为终尿中蛋白质排出量的 30 ~ 40 倍，由此可见滤过液中多数清蛋白可被肾小管重新吸收。

其主要生理功能包括：①血浆的主要载体蛋白：许多水溶性差的物质可以通过与白蛋白的结合而被运输，具有活性的激素或药物等一旦与白蛋白结合时，则不呈现活性；这种结合是可逆性的，当白蛋白含量改变或血液 pH 等因素变化时，与白蛋白结合的激素和药物结合量发生改变使其游离型含量也随之变化，从而导致生理活性增强或减弱。②维持血浆胶体渗透压：病理状态下，因为血浆白蛋白丢失或浓度过低时，可引起水肿、腹水等症状。③具有缓冲酸碱的能力：蛋白质是两性电解质，含有许多 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ 基团；当血液偏酸时，以 $-\text{NH}_3^+$ 和 $-\text{COOH}$ 形式存在，当血液碱性过强时，则以 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COO}^-$ 形式存在。④重要的营养蛋白：白蛋白可以在不同组织中被细胞内吞而摄取，其氨基酸用于组织修补。因疾病等食物摄入不足或手术后患者常给予静脉白蛋白注射液。

(二) 检测方法

体液白蛋白浓度的测定方法包括电泳法、免疫化学法和染料结合法。电泳法只能测定其百分含量，乘以总蛋白浓度可得其浓度，用于白蛋白定量操作不方便，且精密度不如直接定量。免疫化学法包括免疫比浊法和放射免疫法等，这类方法特异性好、灵敏度高，且白蛋白易纯化，因而其抗血清容易制备，较适合于尿液和脑脊液等低浓度白蛋白的测定。血清中白蛋白浓度很高，以染料结合法最多用，其原理是：阴离子染料溴甲酚绿 (bromocresol green, BCG) 或溴甲酚紫 (bromocresol purple, BCP) 能与白蛋白结合，其最大吸收峰发生转移，BCG 与白蛋白反应形成的蓝绿色复合物在 630nm 处有吸收峰，BCP 与白蛋白反应形成的绿色复合物在 603nm 处有吸收峰。而球蛋白基本不结合这些染料。

(三) 标本要求与保存

血清或血浆，血清首选，血浆用肝素或 EDTA 抗凝。标本量 1.0ml，至少 0.5ml。最好

在 45 分钟内分离血清/血浆。分离后标本在室温 (25℃)、冷藏 (4℃) 或冷冻 (-20℃) 稳定保存 14 天。可反复冻融 3 次。

(四) 参考区间

血清白蛋白随年龄有所变化, 0~4 天为 28~44g/L, 4 天~14 岁为 38~54g/L, 此后下降; 14~18 岁为 32~45g/L, 成年人为 35~52g/L, 60~90 岁为 32~46g/L, >90 岁为 29~45g/L。走动者比卧床者平均高 3g/L。

医学决定水平: >35g/L 时正常, 28~34g/L 为轻度缺乏, 21~27g/L 为中度缺乏, <21g/L 则严重缺乏。低于 28g/L 时, 会出现组织水肿。

(五) 临床意义

血浆白蛋白增高仅见于严重脱水时, 无重要的临床意义。低白蛋白血症见于下列疾病。

(1) 白蛋白合成不足: 严重的肝脏合成功能下降如肝硬化、重症肝炎; 蛋白质营养不良或吸收不良, 血浆白蛋白受饮食中蛋白质摄入量影响, 可作为个体营养状态的评价指标, 但体内总量多、生物半衰期长, 早期缺乏时不易检出。

(2) 白蛋白丢失: 白蛋白在尿中丢失, 如肾病综合征、慢性肾小球肾炎、糖尿病性肾病、系统性红斑狼疮性肾病等; 胃肠道蛋白质丢失, 如肠道炎症性疾病时因黏膜炎症坏死等丢失; 皮肤丢失, 如烧伤及渗出性皮炎等。

(3) 白蛋白分解代谢增加: 组织损伤, 如外科手术和创伤; 组织分解增加, 如感染性炎症疾病等。

(4) 白蛋白的分布异常: 如门静脉高压时大量蛋白质尤其是白蛋白从血管内漏入腹腔; 肝硬化导致门脉高压时, 由于白蛋白合成减少和大量漏入腹水的双重原因, 使血浆白蛋白显著下降。

(5) 无白蛋白血症: 是极少见的遗传性缺陷, 血浆白蛋白含量常低于 1g/L。但没有水肿等症状, 部分原因可能是血管中球蛋白含量代偿性升高。

(六) 影响因素

不能使用氟化物血浆; 实验前需离心含沉淀物的标本。

三、前白蛋白 (PA) 测定

(一) 生化及生理

前白蛋白分子量 55 000, 由肝细胞合成, 在电泳中显示在白蛋白前方, 其半衰期很短, 仅约 12 小时。前白蛋白 (prealbumin, PA) 的生理功能是作为组织修补材料和运载蛋白, 可结合大约 10% 的 T_4 和 T_3 , 对 T_3 的亲合力更大, 还有运载维生素 A 的作用。

(二) 检测方法

免疫透射比浊法或免疫散射比浊法。散射比浊法是在光源光路垂直方向上测定浊度的散射光强度, 计算被测物质含量, 灵敏度较高, 但需要专门的免疫分析仪和配套的试剂盒。透射比浊法是在光源的光路方向上测量浊度的投射光强度, 计算被测物质的含量, 灵敏度可满足常规工作的要求, 且可在具有 340nm 波长的任何生化分析仪上进行, 实用性较广。测定原理为: 血清中的 PA 与抗 PA 抗体在液相中反应生成抗原抗体复合物, 使反应液呈现浊度。