

## 不同基质溶液与渗透压 对 PEG 沉淀血清循环免疫复合物的影响<sup>\*</sup>

徐国萍<sup>1</sup>, 成 军<sup>2</sup>, 孙长贵<sup>2</sup>, 戴玉柱<sup>2</sup>

(1. 杭州江干区人民医院检验科, 杭州 310016; 2. 解放军第一一七医院检验科, 杭州 310013)

**摘要:**目的 探讨聚乙二醇(PEG)沉淀预处理的实验影响因素,建立一种高效的PEG沉淀体系用于血清循环免疫复合物(CIC)前处理。方法 对PEG沉淀预处理的实验条件(溶液基质、离子强度、pH值和渗透压)优化,沉淀血清(制备标准HBsAg-anti-HBs CIC)中的CIC后,采用自主研发的免疫复合物解离剂进行解离,然后再用化学发光法检测游离HBsAg。通过计算解离量来比较最适沉淀体系,最后分别采用传统沉淀和优化后的沉淀条件结合自主研发的解离技术,对335份五种乙肝血清标志物模式(HBV-M)标本进行HBsAg-CIC检测。结果 基质溶液为0.15 mol/L, pH8.2, 500 mOsm/kg的硼酸盐缓冲液的70 g/L PEG 6000沉淀剂,4℃过夜沉淀后选择离心力为18 009×g,离心温度4℃,离心时间为10 min,其沉淀分离效果最佳;五种乙肝血清标志物模式(HBV-M)标本分别采用传统和改良法检测免疫复合物,其中改良法的阳性率高于传统法分别为:0.95.2%,87.2%,80%和8.7%,另外在HBV-M 2,3,4组中改良法的沉淀CIC含量高于传统法且差异存在统计学意义( $P<0.05$ )。结论 PEG沉淀被广泛用于血清CIC检测及前处理,受到多重因素的影响,其中基质溶液及渗透压的选择也十分重要。该文为提高血清中循环免疫复合物(CIC)的检出率及缩短沉淀时间提供了理论基础。

**关键词:**聚乙二醇沉淀;基质溶液;渗透压;循环免疫复合物

中图分类号:R446.62 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)03-079-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.03.020

## Effects of Different Matrix Solutions and Osmotic Pressure on Serum Circulating Immune Complex in PEG Precipitation

XU Guo-ping<sup>1</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup>, SUN Chang-gui<sup>2</sup>, DAI Yu-zhu<sup>2</sup> (1. Department of Clinical Laboratory, Hangzhou Jianggan District People's Hospital, Hangzhou 310016, China;  
2. Department of Clinical Laboratory, 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the influence factors of PEG precipitation pretreatment and establish a highly efficient PEG precipitation system for serum circulating immune complex (CIC) preprocessing. **Methods** The experimental conditions of pretreatment (solution matrix, ionic strength, pH value and osmotic pressure) PEG precipitation was optimized. After precipitation of CIC in serum (preparation of standard HBsAg-anti-HBs CIC), which was dissociated by immune complex dissociation agent developed independently, and then free HBsAg was detected by using the chemiluminescence, comparison of the optimum precipitation system by calculating the amount of dissociation. Optimized techniques of precipitation dissociation, and traditional technology were combined with immune complex dissociation technique independently in the 335 samples of five HBV serological markers (HBV-M) were detected by HBsAg-CIC, respectively. **Results** The best precipitation condition as follow: 0.15 mol/L, pH: 8.2, 500 mOsm/kg borate buffer solution including 70 g/L PEG precipitation 6000 mixed with serum overnight in 4℃. After precipitation centrifugal speed was 18 009×g, centrifugal temperature was 4℃, centrifugal time was 10min, the precipitation separation effect was best. HBsAg-CIC of the five kinds of HBV serological markers (HBV-M) were detected by the traditional method and the improved method, respectively. The positive rate of immune complexes by the improved method was higher than the traditional method, and the positive rates were 0.95.2%, 87.2%, 80% and 8.7% respectively. Additional, the amount of HBsAg-CIC in the HBV-M 2, 3 and 4 were higher by the improved method than by the traditional method, and the difference had statistical significance. **Conclusion** PEG precipitation is widely used for the detection of serum CIC and pretreatment, influenced by multiple factors, including matrix solution and osmotic pressure on the detection of CIC also is very important, in order to improve the circulating immune complex (PEG precipitation) provides a theoretical basis for the detection rate and shortened the settling time.

**Keywords:** PEG precipitation; matrix solution; osmotic pressure; circulating immune complex

<sup>\*</sup> 基金项目:浙江省自然科学基金(LY15H200001),南京军区医药卫生科研基金(12MA117, 15DX025),浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB250, 2018238953),杭州市科技发展计划项目(20160533B75),杭州市卫生科技计划项目(2017B71)。

作者简介:徐国萍(1972-),女,本科,主管技师,主要从事临床免疫学检验诊断研究, E-mail: 573785630@qq.com。

通讯作者:戴玉柱(1985-),男,硕士,副主任技师,主要从事临床免疫学检验诊断研究, E-mail: dyz5895@qq.com。

血清循环免疫复合物(circulating immune complex, CIC)在多种疾病的发生、发展中起到了非常关键的作用,因此临床实验室出现了大批关于CIC检测的方法<sup>[1~3]</sup>。依据检测方法的特异性,将CIC检测方法分为特异性方法和非特异性方法两大类<sup>[4~6]</sup>。而聚乙二醇(PEG)沉淀法既可用于非特异性的方法检测(分光光度计检测吸光度),也可用于特异性方法的前处理(CIC浓缩或CIC与血清基质分离)。PEG为一种不带电荷的直链大分子多糖,主要通过促进CIC聚合成更大的凝聚物而使之被沉淀,PEG沉淀法因方法简便、快速、重复性好,在临床实验室被广泛用于病原体及血清CIC的分离与浓缩。国内外的文献均对PEG沉淀法的温度、离心力、时间等要素进行了优化和明确<sup>[5,7]</sup>,但PEG沉淀法所用溶液基质、离子强度以及渗透压的选择对沉淀效果的影响,则未见相关报道。本文在PEG沉淀法常见的影响因素下,结合我们自主研发的特异性免疫复合物缓冲解离技术,提出了溶液基质、离子强度及渗透压对PEG沉淀法分离血清CIC的影响。具体如下:

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 335份五种乙肝血清标志物模式(HBV-M)标本来自于健康体检者、本院住院传染病科、浙江大学附属第一医院传染病中心住院病人,其中100份HBV-M-1标本(健康体检者,阴性对照组);HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc均阴性;42份HBV-M-2标本:HBsAg, HBeAg和anti-HBc阳性,117份HBV-M-3标本:HBsAg, anti-HBe和anti-HBc阳性;30份HBV-M-4标本:HBsAg, anti-HBc阳性;46份HBV-M-5标本:anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc阳性。

1.2 试剂和仪器 制备HBsAg-anti-HBsAg免疫复合物(HBsAg-CIC),其中HBsAg纯化抗原(3.0 mg/ml)购于以色列Prospec公司;羊-抗HBsAg多克隆抗体(3.0 mg/ml)购于北京博奥森生物技术有限公司;聚乙二醇(PEG 6000)、硼酸( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )、硼砂( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ )、氟化钠( $\text{NaF}$ )购置于成都科龙化工;巴比妥钠( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{NaO}_3$ )购于华中海威基因有限公司;浓盐酸( $\text{HCl}$ )购于兰溪六洞山化工。上海精宏DK-8D型水浴箱,上海精科UV-721型分光光度计,德国原装赛多利PP-50型pH计,德国艾卡C-MAG HS型磁力混匀器,德国艾本德5804 R型高速离心机,德国高能泰克osmomat 030型冰点渗透压仪,美国雅培诊断i2000型化学发光免疫分析

仪及配套HBsAg检测试剂盒。

## 1.3 方法

1.3.1 HBsAg-抗HBsAg免疫复合物制备:在美国雅培公司i2000化学发光免疫分析仪及配套HBsAg试剂检测在线性范围内按照合适的比例配制HBsAg-CIC,用HBV-M均阴性的混合人献血员血清作为稀释剂稀释纯化的人血HBsAg至200 IU/ml(制备的HBsAg量),然后加入羊抗-HBsAg多克隆抗体直至游离HBsAg检测结果 $<1.5$  IU/ml,游离抗体 $<15$  IU/ml为止,37℃水箱放置2 h,然后放4℃冰箱过夜,即形成稳定的HBsAg-CIC,精确计算HBsAg终浓度为193.6 IU/ml,每升复合物制备溶液中加入0.2 ml proclin 300生物防腐剂后分装4℃保存备用。

1.3.2 免疫复合物分离:依据参考文献[5]选择70 g/L PEG 6000沉淀剂,4℃沉淀24 h,离心力为 $18\,009 \times g$ 离心10 min,对不同基质溶液、离子强度及渗透压进行多因素正交设计分组,各基质溶液的配制依据专利及参考文献[5,8,9]。①基质溶液浓度:0.10 mol/L, 0.15 mol/L, 0.20 mol/L;②不同基质溶液:硼酸盐缓冲液(BB)、磷酸盐缓冲液(PBS)、巴比妥钠-HCl缓冲液(Barbital-HCl), Tris-HCl缓冲液;③基质溶液渗透压:400 mOsm/kg, 500 mOsm/kg, 600 mOsm/kg, 700 mOsm/kg;④基质溶液pH值:7.8, 8.0, 8.2, 8.4。

1.3.3 免疫复合物传统法(传统PEG沉淀法)<sup>[10]</sup>与改良法<sup>[5]</sup>(优化后的PEG沉淀分离法)的分离结果比较:传统法和改良法分离待测样本HBsAg-CIC沉淀各两份分别设空白管(未解离HBsAg测定值)和测定管(解离后HBsAg测定值)。分离后沉淀,按照我们自主研发的专利技术<sup>[8,9]</sup>(专利号:ZL201410034039.5, ZL201410033277.4)对分离出的CIC进行解离,解离后使用化学发光定量检测游离HBsAg量,来计算免疫复合物量即解离率。空白对照管未解离的游离HBsAg测定:向空白对照管中同时加入CIC抗原缓冲解离剂和CIC抗原缓冲解离中和剂,混匀后采用Abbott i2000分析仪及配套试剂检测HBsAg,其结果作为空白值;测定管解离后的总游离HBsAg测定:向测定管中加入抗原缓冲解离剂,置42℃水浴振荡30 min(振荡频率60次/min);抗原缓冲解离中和剂,混匀后采用Abbott i2000分析仪及配套试剂2 h内检测HBsAg,其结果作为测定值( $\text{HBsAg-CIC} = \text{测定管HBsAg测定值} - \text{空白管HBsAg空白值}$ )。

1.4 结果判断 HBsAg-CIC结果判断标准见表1。

表 1 解离测定 CIC 中抗原结果判断标准

测定值(IU/ml)	空白值(IU/ml)	结 果
>Cutoff*	<Cutoff	样本中存在 HBsAg-CIC, 具体含量以测定值大小判断
<Cutoff	<Cutoff	样本中不存在 HBsAg-CIC
<Cutoff	>Cutoff	此类型结果模式不存在, 或操作误差所致
>Cutoff	>Cutoff	若测定值>空白值, 则样本中存在 HBsAg-CIC, 具体含量以(测定值-空白值)差值大小判断, 反之则判为不存在 HBsAg-CIC

注: \* Abbott i2000 免疫分析仪的 HBsAg Cutoff=0.05 IU/ml。

1.5 统计学分析 不同沉淀方法的影响因素间, 采用多因素正交设计(四因素四水平), 统计软件为 SPSS 19.0, 传统法与改良法分离检测的 HBsAg-CIC 阳性率用%表示, 检测的 HBsAg-CIC 含量用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 检测的 HBsAg-CIC 含量间比较用配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, 画图使用绘图软件 GraphPad 5.0。

2 结果

2.1 PEG 沉淀法中不同基质、浓度、pH 值、渗透压条件优化 见表 2。通过采用正交设计对 PEG 各影响因素的优化比较发现: 在这已知四个影响因素中, 按照其对沉淀效果的影响大小依次为: 溶液渗透压>基质溶液种类>溶液 pH 值>溶液浓度, 通过四因素四水平的比较, 得到 PEG 优化后改良法的最佳分离溶液体系: 0.15 mol/L, pH 8.2, 500 mOsm/kg 的硼酸盐缓冲液含 70 g/L PEG6000。

表 2 不同基质、浓度、pH 值、渗透压条件优化正交设计结果

试验号	基质溶液	浓度(mol/L)	pH 值	渗透压(mOsm/kg)	实验结果(IU/ml)
1	BB	0.1	7.8	400	160.9
2	BB	0.15	8.0	500	185.6
3	BB	0.20	8.2	600	171.5
4	BB	0.25	8.4	700	168.5
5	PBS	0.1	8.0	600	150.4
6	PBS	0.15	7.8	700	151.5
7	PBS	0.20	8.4	400	166.7
8	PBS	0.25	8.2	500	170.4
9	Barbital-HCl	0.1	8.2	700	164.3
10	Barbital-HCl	0.15	8.4	600	166.6
11	Barbital-HCl	0.20	7.8	500	162.5
12	Barbital-HCl	0.25	8.0	400	151.4
13	Tris-HCl	0.1	8.4	500	168.4
14	Tris-HCl	0.15	8.2	400	164.4
15	Tris-HCl	0.20	8.0	700	144.9
16	Tris-HCl	0.25	7.8	600	158.4
水平 1 均值	171.625	161.000	158.325	160.840	
水平 2 均值	159.750	167.015	158.095	171.725	
水平 3 均值	161.200	161.420	167.640	161.725	
水平 4 均值	159.035	162.175	167.550	157.320	
极差	12.590	6.015	9.545	14.405	

注: 表中加下划线数据为该因素中分离效果最佳的水平。

2.2 传统法与改良法分离结果比较 见图 1。通过将传统法与改良法的前处理结果进行比较可知: 在乙肝感染不同的 HBV-M 中, HBV-M2 模式中的 HBsAg-CIC 阳性率最高, 其次为 HBV-M3 模式, HBV-M1 的 HBsAg-CIC 阳性率最低; 图中乙

肝各模式下经改良法前处理的 HBsAg-CIC 检出率明显高于传统法, 其中 HBV-M1 为不存在 HBsAg-CIC, 所以两者无可比性。

由表 3 可知: 改良法和传统法同时运用在乙肝不同模式下, 改良法沉淀的 HBsAg-CIC 的量高于

传统法,且在 HBV-M 2,3,4 中差异存在统计学意义( $t = -5.66, -12.60$ , 均  $P < 0.05$ ),另外在

HBV-M 1,5 模式中,两者差异无统计学意义( $t = -0.775 \sim -1.77$ , 均  $P > 0.05$ )。

表 3 不同 HBV-M 模式采用传统法与改良法的分离 HBsAg 含量比较( $\bar{x} \pm s$ , IU/ml)

HBV 感染模式(n)	传统法	改良法	t 值	P 值
HBV M-1(100)	0.03±0.01	0.03±0.01	-0.775	0.44
HBV M-2(42)	12.08±11.82	71.73±31.80	-11.40	<0.001
HBV M-3(117)	10.41±10.78	51.95±33.40	-12.60	<0.001
HBV M-4(30)	8.75±9.89	47.13±35.77	-5.66	<0.001
HBV M-5(46)	0.03±0.02	0.03±0.02	-1.77	0.079

注:HBV-M-1:HBsAg,anti-HBs,HBeAg,anti-HBe,anti-HBc 均阴性;HBV-M-2:HBsAg,HBeAg,anti-HBc 阳性;HBV-M-3:HBsAg,anti-HBe,anti-HBc 阳性;HBV-M-4:HBsAg,anti-HBc 阳性;HBV-M-5:anti-HBs,anti-HBe,anti-HBc 阳性。

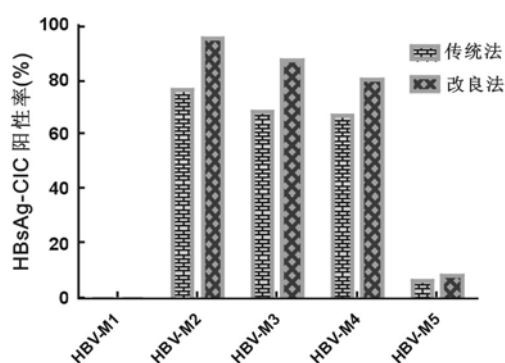


图 1 不同 HBV-M 模式采用传统法与改良法 HBsAg-CIC 阳性率(%)

3 讨论 抗原进入机体或自身抗原刺激(抗原变性、隐蔽性抗原释放),能诱发机体产生细胞及体液免疫应答,产生大量针对相关抗原的抗体,致使抗原与抗体形成免疫复合物<sup>[1~3]</sup>。部分抗原形成免疫复合物被清除,但在某些情况下,当抗原在体内持续存在或者机体清除抗原抗体复合物的功能受损时,免疫复合物可在机体的特定部位引起损害,导致急性炎症、慢性炎症、甚至变性坏死<sup>[11]</sup>。乙型肝炎在我国病毒性肝病中,患病比例最高,而且多数处于慢性化,病毒长期与宿主共存,难以完全清除,其中 HBsAg-CIC 在乙型肝炎引起肝病发生、发展中具有重要的作用<sup>[12,13]</sup>。PEG 沉淀法检测免疫复合物,因其敏感度及特异度问题,在目前实验室逐渐被抗抗体法、补体法等相对特异的方法所取代。而 PEG 沉淀 CIC 法,在临床及基础实验室仍然被广泛用于各类 CIC 的分离及病原体核酸浓缩。本文围绕 PEG 沉淀法分离血清 HBsAg-CIC 这一主题,对该分离方法的实验过程进行优化,以提高分离效果。

由表 2 可知,除了 PEG 的浓度、沉淀时间以及离心力外,本文讨论的沉淀分离所受影响因素,其重要性依次为:渗透压>基质溶液>pH 值>浓度,其中渗透压为主要因素,提示适当的提高渗透

压有助于免疫复合物的有效分离,过高或者过低则影响 CIC 的分离。分析原因:适当的高压减少 CIC 处于悬浮状态,并且可使 CIC 的空间结构发生改变有利于 CIC 分离。当渗透压过低时,悬浮状态 CIC 过多导致最后的沉淀离心,无法将 CIC 沉淀完全。当渗透压过高时,CIC 及其内部的抗体空间结构发生严重的改变,致使用其他特异性方法去检测时,CIC 中的检测位点无法充分暴露,反而降低了检测效果致使检测能力下降。其次是基质溶液,我们在选择不同的基质时存在明显的差异,其中 BB 缓冲液与 PBS 缓冲液差异小,而使用巴比妥缓冲液与 Tris-HCl 作为基质溶液分离效果明显下降,这可能是不同的基质体系,即使是 pH 值一致,可其内部的缓冲离子量不同,导致分离效果存在差异。pH 值单独作为影响因素和不同基质溶液是分不开的,不同的 pH 值在某种程度上也就决定了其缓冲能力的大小。溶液浓度影响最小,本文研究的均为缓冲体系,所以在一定的浓度范围内变化,基质溶液仍然呈现缓冲体系。

由表 3 和图 1 可知在乙肝不同模式下,HBsAg-CIC 的阳性率不同,其中阳性率最高的是 HBV-M2(HBsAg,HBeAg,anti-HBc 阳性),最低的是 HBV-M1(HBsAg,anti-HBs,HBeAg,anti-HBe,anti-HBc 均阴性),改良法的阳性率要高于传统法,另外改良法(HBV-M 2,3,4)分离的 HBsAg-CIC 量要高于传统法,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 HBV-M5 中因为本研究收集的样本例数少,所以差异未能比较出统计学意义( $P > 0.05$ ),由此说明在 HBV 疾病发生发展的不同阶段其 HBsAg-CIC 含量不尽相同,其形成机制和致病机理还不十分明确,有待下一步研究证明。

综上所述,PEG 沉淀免疫复合物法,不仅要考虑到 PEG 浓度、离心力以及放置时间的因素,同时要考虑基质溶液渗透压、基质溶液 (下转 87 页)

(上接 82 页)种类、不同 pH 值和基质溶液浓度等因素。改良法 PEG 沉淀效果明显优于传统方法,为进一步研究 HBsAg-CIC 在 HBV 感染不同阶段的致病机理提供了一个可靠的技术手段,同时对于各类病原体或自身抗原所致疾病中形成的 CIC 研究工作提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's immunobiology[M]. 8th Ed. Garland Publishing Inc, 2012.
- [2] Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system[J]. Nat Immunol, 2015, 16(4): 343-353.
- [3] Rojko JL, Evans MG, Price SA, et al. Formation, clearance, deposition pathogenicity and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies[J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(4): 725-764.
- [4] Takeda K, Maruki M, Yamagaito T, et al. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex transfer chemiluminescence enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2238-2244.
- [5] Dai Y, Hu Z, Chen Y, et al. A novel general and efficient technique for dissociating antigen in circulating immune complexes[J]. Electrophoresis, 2018, 39(2): 406-416.
- [6] Moore TL. Immune complexes in juvenile idiopathic arthritis[J]. Front Immunol, 2016(7): 177.
- [7] Reshetnyak T, Alexandrova EN, Seredavkina NV, et al. AB0434 antibody to dsdna (anti-dsdna), circulating immune complex (cic) in systemic lupus erythematosus (sle) and antiphospholipid syndrome (aps) [J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(suppl 3): A921.
- [8] 成 军, 戴玉柱, 闫 利, 等. 一种免疫复合物缓冲解

离剂及其应用, 中国专利: ZL 2014 10033277. 4[P]. 2016-4-6.

Cheng J, Dai YZ, Yan L, et al. An immune complex dissociation buffer agent and its application, CN: ZL 2014 10033277. 4[P]. 2016-4-6.

- [9] 成 军, 孙长贵, 戴玉柱, 等. 一种用于免疫复合物缓冲解离剂的 CIC 复溶剂, 中国专利: ZL201410034039. 5[P]. 2016-4-6.

Cheng J, Sun CG, Dai YZ, et al. An immune complex dissociation buffer agent CIC complex solvent, CN: ZL201410034039. 5[P]. 2016-4-6.

- [10] 管晓龙, 王海永, 周 莹, 等. 类风湿关节炎血清免疫复合物的质谱鉴定与差异蛋白分析[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(5): 495-501.

Guan XL, Wang HY, Zhou Y, et al. Differentially expressed proteins in serum immune complexes of rheumatoid arthritis: Analysis by mass spectrometry [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2017, 30(5): 495-501.

- [11] Sobenin IA, Salonen JT, Zhelankin AV, et al. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes: Role in atherosclerosis and diagnostic value[J]. Bio Med Res Int, 2014(2014): 205697.

- [12] Yao X, Wang X, Zhao C, et al. Transcriptional analysis of immune-related genes in dendritic cells from hepatitis B surface antigen (HBsAg)-positive transgenic mice and regulation of Fc gamma receptor IIB by HBsAg-anti-HBs complex [J]. J Med Virol, 2011, 83(1): 78-87.

- [13] Takeda K, Maruki M, Yamagaito T, et al. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex-transfer chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2238-2244.

收稿日期: 2018-02-25

修回日期: 2018-04-04