

TBHBA 为色原的丙氨酸氨基转移酶分析方法的建立及评价

张志伦, 蒲晓允[△], 吴杰红, 傅灵媛

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 建立一种高灵敏度、可见光比色的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定新方法, 评价其临床应用价值。方法 以 2,4,6-三溴-3-羟基苯甲酸(TBHBA)为色原, 在 500 nm 处测定红色醌类化合物的吸光度, 与血清中的 ALT 活性成正比, 并与 IFCC 推荐的速率法测定 ALT 的结果进行比较。结果 该方法线性范围为 3.0~1 000.0 U/L, 其高值、临界值和低值的不精密度分别为 3.82%, 4.17%, 0.32%。结论 该方法灵敏度高、可用可见光检测, 为研制结构更为简单的检测仪器奠定了基础。

关键词:谷氨酸转氨酶; TBHBA; 速率法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0376-02

丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)被认为是诊断肝脏损伤最灵敏的指标之一^[1]。本组根据丙酮酸氧化酶反应即 Trinder^[2-3]显色原理, 建立了以 2,4,6-三溴-3-羟基苯甲酸(TBHBA)为色原测定 ALT 的新方法, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 仪器及试剂 日本奥林巴斯 AU-2700 型全自动生化分析仪, 北京捷伦酸度计, 德国 Thermo 微量核酸蛋白检测仪 ND20, 杭州惠邦设备有限公司反渗透纯水机; 丙酮酸氧化酶、过氧化物酶(Sigma 公司), L-丙氨酸(上海康达氨基酸厂), α -酮戊二酸(国药集团化学试剂有限公司), 黄素腺嘌呤二核苷酸、焦磷酸硫酸素(BIO BASIC INC), 4-氨基安替吡啉(4-AAP, 苏州工业区亚科化学试剂有限公司), TBHBA 为自行配制, 磷酸氢二钠(重庆博艺化学试剂有限公司), 磷酸二氢钾(重庆北碚化学试剂厂), 校准血清(英国朗道校准品), 质控血清(英国朗道质控品)。

1.2 反应液的配制 0.1 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液内含 L-丙氨酸 500.0 mmol/L, α -酮戊二酸 10.0 mmol/L, 丙酮酸氧化酶 4 000.0 U/L, 过氧化物酶 4 000.0 U/L, 4-AAP 0.5 mmol/L, 焦磷酸硫酸素 15.0 mmol/L, 黄素腺嘌呤二核苷酸 30 μ mol/L, TBHBA 0.5 g/100 mL。

1.3 方法

1.3.1 以 TBHBA 为色原检测 ALT 反应管中加入 200 μ L 反应液和 2 μ L 血清, 对照管中加入 2 μ L 蒸馏水, 混匀后水浴 10 min, 用蒸馏水调零, 用对照管调试剂空白, 取 2 μ L 反应管中的液体于 Thermo 微量核酸蛋白检测仪 ND20 中扫描最大吸收峰。

1.3.2 紫外酶偶联速率法测定 ALT 对 Olympus AU-2700 全自动生化分析仪进行定标, 计算各结果的均值、标准差和变异系数(CV)。

1.3.3 线性 取 ALT 活性为 1 000 U/L 的血清, 用生理盐水梯度稀释后, 分别取 2 μ L, 按本法操作。

1.3.4 精密度测定 取高值和低值血清标本, 批内重复测定 10 次。批间重复, 将标本存 4 $^{\circ}$ C, 每 2 天重复 1 次, 连续测定 3 周, 共测 10 次。

1.3.5 定值质控血清测定 取卫生部临床检验中心定值质控血清, 其定值分别为 77、132、50、153、41 U/L, 允许范围分别为 62~92、106~158、40~60、122~184、33~49 U/L, 采用本法

测定。

1.3.6 酶反应试剂稳定性试验 将酶反应液保存于 4 $^{\circ}$ C, 每天用于检测质控血清 4 次。

1.3.7 干扰试验 维生素 C 干扰, 在血清中加入 5~50 mg/L 维生素 C; 溶血干扰, 血清中加血红蛋白 2~5 g/L。

1.4 统计学处理 数据用百分率(%)及 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较用样本均数 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 2 种方法的相关性采用直线相关分析。所有数据统计分析均运用 SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 最大吸收峰 以 TBHBA 为色原检测 ALT, 于 Thermo 微量核酸蛋白检测仪 ND20 中扫描得到红色醌类化合物在 500 nm 处有最大吸收, 空白试剂不影响测定。

2.2 线性范围 酶活性在 3.0~1 000.0 U/L 内呈线性($Y = 0.9747X + 2.1697, r^2 = 0.9996$)。

2.3 方法相关性 取 ALT 活性在 6.0~1 002.0 U/L 的标本 30 份, 分别用本法和紫外酶偶联速率法测定血清 ALT, 2 种方法进行比较, 相关系数 $r = 0.998, Y = 0.941X - 4.448$ 。

2.4 批内精密度测定结果 测得低值、临界值、高值标本中 ALT 活性分别为 (32.5 ± 1.24) U/L、 (39.6 ± 1.65) U/L、 $(1 034.5 \pm 3.27)$ U/L; CV 分别为 3.82%、4.17%、0.32%。

2.5 批间精密度测定结果 测得低值、临界值、高值标本中 ALT 活性分别为 (30.8 ± 1.40) 、 (40.6 ± 1.62) 、 $(1 006.5 \pm 4.69)$ U/L; CV 分别为 4.55%、3.04%、0.47%。

2.6 定值质控血清测定 结果分别为 80、129、54、150、45 U/L, 均在质控范围内。

2.7 反应试剂稳定性 反应试剂于 4 $^{\circ}$ C 保存, 可使用 2 周。

2.8 干扰试验结果 在血清中加入 5~50 mg/L 维生素 C 后, 测定结果与未加者结果差异无统计学意义($P > 0.05$)。血清中加入血红蛋白 2~5 g/L 后, 用本法测定差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

目前测量 ALT 的手段包括紫外连续监测速率法、酮体粉法、赖氏法, 但这些方法的影响因素较多。紫外连续监测速率法在标本出现脂血、溶血时得出的结果不准确, 而且仪器造价较高, 提高了检测成本; 酮体粉法因没有严格的测定条件, 干扰因素多, 判定结果的反应是定性反应, 且误差较大, 卫生部

[△] 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。

1991 年已经明令淘汰;赖氏法中酶反应的丙酮酸量和酶活性之间不能呈现良好的线性关系,而且显色反应的工作曲线弯曲,不能满足酶活性测定要求。而丙酮酸氧化酶法中,ALT 催化 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸生成丙酮酸和 L-谷氨酸,丙酮酸氧化酶催化丙酮酸氧化生成丙酸和 H_2O_2 ,过氧化物酶再催化 H_2O_2 、4-AAP 和 TBHBA 生成醌亚胺和水,此即为著名的 Trinder 反应。醌亚胺的最大吸收峰在 500 nm 左右,通过监测 500 nm 处吸光度可间接反映丙酮酸的生成量、反映 ALT 的活性。本方法具有较高的精密度,测定结果准确可靠,亦有很好的重复性,ALT 活性在 3~1 000 U/L 内有很好的线性,且标本用量少,可相对减少溶血、脂血的干扰,5 g/L 以内的血红蛋白对标本测定几乎不干扰,与速率法相比,主要性能指标相差无几。速率法采用酚试剂作为色原剂,在 H_2O_2 及过氧化物酶存在的情况下与 4-AAP 反应生成红色醌亚胺类化合物,此反应中的摩尔吸光系数为 6 000,由于 1 个 TBHBA 分子比酚多 1 个羧基和 3 个溴,用 TBHBA 代替酚反应,其摩尔吸光系数可达到 29 400^[4],因此大大提高了检测的准确性及精密度。丙酮酸氧化酶法是目前较为理想的 ALT 检测方法,其结果比较准确,线性范围宽,重复性好,而且反应生成肉眼可见的红色产物,用半自动光谱仪检测吸光度时可以避免漏检,采用检测效率高的可见光检测,大大降低了对仪器的要求,为便携式仪器的发展奠定了基础^[5-6]。但本法也存在影响因素,如血液中的还原性物质如胆红素、50 mg/L 以上的维生素 C、尿酸可与色原物质竞争 H_2O_2 ,从而消耗反应过程中产生的 H_2O_2 ,使测定

• 检验技术与方法 •

结果偏低^[7-8]。但综合分析,以 TBHBA 为色原测定 ALT 活性的方法操作简便、结果准确、影响因素少,对仪器设备的要求低,适合用于临床标本的测量,并可以提高检测的灵敏度。

参考文献

- [1] Moreno JM, Fágain CO. Activity and stability of native and modified alanine aminotransferase in cosolvent systems and denaturants[J]. J Mole Cata B; Enzy, 1997, 2(6): 271-279.
- [2] Trinder P, Webster D. Determination of HDL-cholesterol using 2, 4, 6-tribromo -3-hydroxybenzoic acid with a commercial CHOD-PAP reagent[J]. Ann Clin biochem, 1984, 21: 430-433.
- [3] 倪星忠. 临床生化酶试剂方法[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1997: 127-128.
- [4] 王则宇, 姜斌, 班成超. 3 种丙酮酸氧化酶法试剂盒测定 ALT 比较[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(10): 96-97.
- [5] 信红霞, 杨光, 王成英, 等. 氧化酶法筛查献血者 ALT 的应用评价[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(1): 50.
- [6] 李学仁. 丙酮酸氧化酶比色法测定血清 ALT[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(3): 148.
- [7] 范加诚, 刘绪华, 陈秀丽. 丙酮酸氧化酶法在血清 ALT 活性测定中的应用评价[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(1): 50-51.
- [8] 李平, 李耀峰. 生化检验目前存在问题及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 748, 750.

(收稿日期: 2010-03-31)

干化学法检测钠离子的实验研究

吴杰红, 蒲晓允[△], 傅灵媛, 张志伦

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究基于干化学试剂和微型光谱仪技术快速检测钠离子的方法。方法 将所配制的电解质钠离子液体试剂采用干化学法制备,运用速率法的反应原理,测定 405 nm 处吸光度的变化,并对试剂的性能进行评价。结果 电解质钠离子液体试剂冻干后 90 d 内反应稳定性良好,其批内 CV<4%,批间 CV<5%,回收率为 95%~105%;当血清内胆红素(TB)含量小于或等于 290.40 μ mol/L、血红蛋白含量小于或等于 10 g/L,三酰甘油含量小于或等于 11.20 mmol/L 时,测定结果未见明显干扰;测定结果与全自动生化分析仪具有良好的相关性($r^2=0.9543$)。结论 以微型光谱仪干试剂法测定电解质钠离子结果准确可靠,检测过程简便,仪器试剂携带方便,符合战地救治、基层医疗的需要。

关键词:光谱分析; 电解质; 钠离子; 干试剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0377-02

电解质钠离子的测定是临床诊治和抢救的常规及急诊检测项目,也是军事医学中战地救治研究的重要内容之一。由于目前适用于野战环境的便携式急救生化仪器非常少,而且与全自动生化仪配套的电极价格昂贵^[1],因此本组研究了基于干化学试剂和微型光谱仪技术快速检测钠离子的方法,旨在研制适合野战、基层等小型医疗机构的便携式检测设备。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 微型光谱分析仪(重庆大学研制),波长 405 nm,吸光度线性范围 0.000~3.000; AU-2700 型全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司); ModulyoD-230 冷冻干燥机

(美国 Thermo 公司)。试剂 I: β -半乳糖苷酶 1.0 U/mL、Tris 缓冲液 400 mmol/L, pH9.0; 试剂 II: 硝基酚半乳糖苷 5.8 mmol/L、Tris 缓冲液 10.0 mmol/L, pH6.0。

1.2 方法

1.2.1 试剂的干燥及密封 取 1 套用于微型光谱仪的自制检测杯(光径 5 mm),底部预置搅拌子,按比例加入试剂 I,置于一 70 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,第 2 天加入试剂 II,继续预冻,待 2 种试剂结晶后,放入冷冻干燥机真空抽干 6 h,经过升华、解吸附,于 8.3 kPa 时取出,将干燥好的检测杯用塑胶加热密封,置于已放入硅胶的密封袋内保存。

[△] 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。