

• 论 著 •

微板速率法检测丙氨酸氨基转移酶的研究

高朝贤¹, 朱玉兰², 陈钰婷¹, 李丽梅¹, 张 文¹, 刘征宇¹, 杨学琴¹, 惠长野^{1△}

(1. 广东省深圳市职业病防治院病理毒理科 518020;

2. 广东省深圳国际旅行卫生保健中心医学实验室 518033)

摘要:目的 探讨全自动酶联免疫分析系统微板速率法检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)的方法评价和临床应用。方法 参照国际临床化学联合会(IFCC)的推荐方法,结合分析系统建立微板速率法,通过方法学试验,评价其线性、批内和批间重复性;比较 823 例体检者血清标本采用微板速率法与常规生化分析仪法检测 ALT 的结果,并评价方法的临床应用。结果 微板速率法检测 ALT,在活性 303 U/L 以下具有良好的线性;批内和批间变异系数均小于 1/5TEa,其检测结果与常规生化分析仪的相关性良好。结论 全自动酶联免疫分析系统微板速率法检测 ALT,为大批量标本同时检测 ALT 和 ELISA 项目提供了很好的选择,值得临床推广使用。

关键词:丙氨酸氨基转移酶; 微板速率法; 酶联免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)20-2841-03

Study on microtiter plate kinetic method to detection ALT

GAO Chaoxian¹, ZHU Yulan², CHEN Yuting¹, LI Limei¹, ZHANG Wen¹,LIU Zhengyu¹, YANG Xueqin¹, HUI Changye^{1△}

(1. Department of Pathology and Toxicology, Shenzhen Prevention and Treatment Center for Occupational Diseases, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen International Travel Healthcare Center, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application of ALT detection based on microtiter plate kinetic method in the automatic enzyme immunoassay system. **Methods** By reference to the IFCC recommended kinetic method, microtiter plate kinetic method was established in the automatic enzyme immunoassay system of ALT detection. The linear, intra-batch and inter-batch duplicability of the method were evaluated. ALT test results of 823 samples with microtiter plate kinetic method and automatic biochemistry analyzer method were compared. **Results** Microtiter plate kinetic method had good linearity where ALT activity < 303 U/L, the intra batch and inter batch variation coefficients < 1/5TEa. The detection results of the clinical samples were correlated with the biochemical analyzer. **Conclusion** Microtiter plate kinetic method to detection ALT in the automatic enzyme immunoassay system is an ideal method for simultaneous detection of ALT and ELISA in large batch samples, which is worth popularizing.

Key words: ALT; microtiter plate kinetic method; enzyme linked immunosorbent assay

丙氨酸氨基转移酶(ALT)检测是采供血机构献血者和出入境检验检疫机构法定的体检者必查项目之一^[1-4]。ALT 检测方法较多^[5-6]。国际临床化学联合会(IFCC)和国家卫计委推荐速率法^[7-8]。本研究基于速率法原理,结合全自动酶联免疫分析系统的特点建立一种快速检测方法(微板速率法),并对该方法的线性、精密度、准确度等进行评价。为采供血机构和检验检疫机构筛查 ALT 提供一种更高效的检测方法。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 由深圳国际旅行卫生保健中心提供的 823 例出入境者血清标本,标准品由美国贝克曼公司提供,质控品购自 RANDOX 公司。

1.2 仪器与试剂 Genesis RSP 150/8 全自动加样仪(瑞士 Tecan 公司), FAME 24/20 全自动酶联免疫分析系统(瑞士 Hamilton 公司), AU2700 全自动生化分析仪(美国贝克曼公司); 96 孔微量反应板(北京万泰药业有限公司), ALT 速率法试剂(上海科华生物科技股份有限公司), 标准血清(美国贝克

曼公司,批号:66300/0117,定值:85.6 U/L),质控血清[英国 RANDOX,批号:HN1530/740UN、HN1532/539UE,参考值:(38±9)、(133±27)U/L]。

1.3 方法 微板速率法检测 ALT:96 孔平底酶标板,设标准孔 3 孔,质控孔 2 孔(低值和高值各 1 孔),留 1 孔空白,其他为待检标本孔,采用 Genesis RSP 150/8 全自动加样仪分别加标准血清、质控血清,标本血清各 40 μL,试剂 1 加入 200 μL。试剂 2 装入 FAME 24/20 全自动酶联免疫分析系统,设定第 1 次读板程序。试剂 2 加样量 50 μL,加样速度为最快,试剂加完后立即读板,测定主波长 340 nm,参考波长 620 nm。设定第 2 次读板的主波长和参考波长同第 1 次读板程序,不需加试剂。第 1 次读板完成后,取出酶标板,37℃ 孵育 600 s 后,进行第 2 次读板。导出检测数据,Excel 处理算出标本检测结果。

1.3.1 线性试验 抽取 ALT 活性 683 U/L(AU2700 全自动生化分析仪)的血清标本,使用生理盐水做 2/3 比例稀释成活性梯度 683、455、303、202、135、90、60、40、27、18、12 U/L 的 11 例标本,应用微板速率法检测 ALT 结果。

1.3.2 重复性试验 RANDOX 质控血清 2 例,正常值和高值血清各 1 例,应用微板速率法连续重复检测 20 次,评价该方法的批内重复性;每天检测 1 次,重复 20 d,评价该方法的批间重复性。

1.3.3 对比试验 823 例血清标本分别采用微板速率法和 AU2700 全自动生化分析仪的传统检测方法进行检测,分析 2 种方法的相关性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。绘制吸光度变化与 ALT 活性散点图,拟合 $ALT \leq 303$ U/L 的直线方程;描述批内、批间重复性试验的均值、标准差及变异系数;比较 2 种方法检测结果的相关性。

2 结 果

2.1 线性试验 ALT 活性在 303 U/L 以下具有良好的线性,ALT 与测得吸光度变化的拟合曲线为 $Y=0.003X+0.0057$,相关系数 $R^2=0.9983$ 。超过 303 U/L,吸光度变化偏离曲线,随 ALT 活性升高但吸光度升高不明显。见图 1。

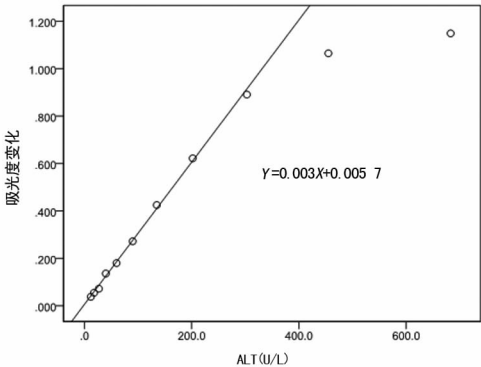


图 1 微板速率法检测 ALT 线性试验

2.2 重复性试验 美国临床实验室改进法案修正案 (CLIA'88)规定 ALT 允许总误差 (TEa)为靶值的 $\pm 20\%$,微板速率法检测 ALT 批内、批间变异系数均小于 4% ,小于 $1/5 TEa$ 。见表 1。

表 1 微板速率法检测 ALT 重复性试验

项目	均值	标准差	变异系数 (%)
批内低值	38.02	0.83	2.18
批间低值	38.06	1.24	3.26
批内高值	133.08	3.39	2.56
批间高值	133.24	5.05	3.79

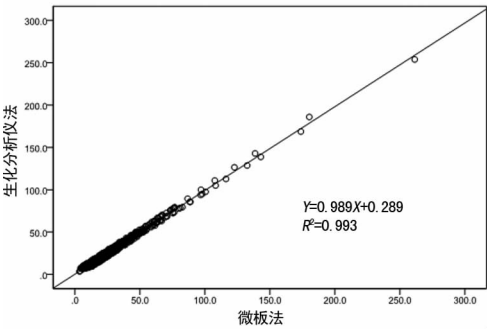


图 2 微板速率法与生化分析仪法的对比试验

2.3 对比试验 2 种方法检测 823 例血清标本的结果具有良

好的相关性,拟合线性回归方程为 $Y=0.989X+0.289$, $R^2=0.993$ 。2 种方法检测 823 例阳性结果显示,大于 40 U/L 阳性结果的符合率为 99.88%。见图 2 和表 2。

表 2 2 种方法检测 ALT 的结果比较 [n (%)]

检测方法	ALT 检测结果样品数			合计
	<40 U/L	40~80 U/L	>80 U/L	
生化分析法	695(84.4)	109(13.2)	19(2.4)	823
微板速率法	696(84.6)	109(13.2)	18(2.2)	823

3 讨 论

IFCC 推荐的 ALT 检测方法是速率法,其原理是 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸在 ALT 的作用下生成丙酮酸和 L-谷氨酸,丙酮酸在乳酸脱氢酶 (LDH) 的作用下生成 L-乳酸,同时还还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 被氧化成为 NAD^+ , NADH 吸光度的下降速率和 ALT 的活力呈正比, NADH 在 340 nm 处有特异吸收峰,测定其下降速率,即可测出 ALT 活性。该方法具有准确度高、重复性好的特点,在临床检测中应用广泛,但必须在生化分析仪上完成。与 ALT 一样, HBsAg 和 HIV 等 ELISA 项目也是献血者和法定体检者的必检项目,采供血机构和出入境检验检疫机构通常需先用酶标仪完成 ELISA 检测再用生化分析仪完成 ALT 检测。本研究建立的微板速率法可使 ALT 与 ELISA 检测项目同时加样,并可同时利用全自动酶联免疫分析系统检测,1 次可检测 90 例标本,10 min 内完成,免除繁琐步骤,减少差错发生,同时也可避免不同仪器间多次检测的携带污染问题。

本研究微板速率法在 ALT 活性 303 U/L 以下时具有良好的线性,检测上限约 300 U/L,检测 ALT 具有良好的批内和批间重复性,与传统生化分析仪法的结果比较,两者相关性很好,阳性结果符合率达 99.88%。相关研究报道,微板 ALT 检测方法多数以赖氏法和丙酮酸氧化酶法为主,这 2 种方法由于检测的重复性差,特别是对高值标本的检测存在严重的偏离现象,目前已基本淘汰^[9-11]。与其他改良的微板速率法比较,本研究只需检测 2 个点吸光度,操作更加简便^[12]。

本研究微板速率法不同于连续监测的速率法,是加入试剂后吸光度与反应 10 min 后吸光度变化的 2 点速率,对该方法的深入研究结果表明,反应时间影响检测的重复性和线性范围。在实际操作中,很难做到每批标本的反应时间完全一致,因此需在每块微孔板上都设置标准品,计算 K 值。本研究在仪器、试剂等条件下,10 min 反应时间的线性上限约 300 U/L,超过 300 U/L 的结果检测会偏低,应当稀释后重新复查,不同实验室由于检测体系不同,检测的线性范围可能存在差异。微板在大批量标本检测中具有一定的优势,对单个或少量标本的检测并不是理想的选择。

综上所述,本研究建立的微板速率法具有操作性强、结果稳定可靠的优点,与传统生化分析仪法有较好的可比性。该方法可采用全自动酶联免疫分析系统使 ALT 与 ELISA 其他项目同时检测,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 刘颖,周磊,臧亮.大连市献血前 ALT 筛查的开展意义[J].中国输血杂志,2015,28(8):910-911. (下转第 2846 页)

期、有淋巴结转移、肿块较大、出现胸膜浸润的患者其表达较高。

肺癌的治疗现已进入分子化、个体化阶段,这就要求尽可能多地了解在其发生、发展过程中所涉及到的相关分子,希望通过本研究能够为今后肺癌的分子靶向治疗、预后评估提供一些理论依据。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Hammock L, Lewis M, Phillips C, et al. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often dose not predict Oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization[J]. Hum Pathol, 2003, 34(8): 1043-1405.
- [3] Stella GM, Scabini R, Inghilleri S, et al. EGFR and KRAS mutational profiling in fresh non-small cell lung cancer (NSCLC) cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(8): 1327-1335.
- [4] Zhang L, Zhang J, Chen Z, et al. Epidermal growth factor (EGF) triggers the malignancy of hemangioma cells via activation of NF- κ B signals[J]. Bio Pha, 2016, 82(82): 133-140.
- [5] Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, et al. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects[J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1459-1470.
- [6] Villalva C, Duranton-Tanneur V, Guilloteau K, et al. EGFR, KRAS, BRAF, and HER-2 molecular status in brain metastases from 77 NSCLC patients[J]. Cancer Med, 2013, 2(3): 296-304.
- [7] Yang L, Lu JG, Tan QH, et al. Value of COX-2 and HER-

2 in judging condition and prognosis in non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Oncol Cancer Res, 2010, 7(3): 200-205.

- [8] Nechaev IN, Knyazev EN, Krainova NA, et al. Express analysis of HER-2/neu status in breast cancer biopsy specimens[J]. Bull Exp Biol Med, 2013, 155(4): 522-526.
- [9] Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer[J]. Adv Anat Pathol, 2011, 18(1): 53-59.
- [10] Maeda A, Nakata M, Yasuda K, et al. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis[J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 39-44.
- [11] 陈秋兰, 周绍荣, 焦兰农, 等. 乳腺癌组织中 HER-2、VEGF 和 Ki67 的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(15): 38-40.
- [12] Ilhan N, Gungor H, Gul HF, et al. Expression of endoglin and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in experimental colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2016, 36(8): 3953-3959.
- [13] Siregar GA, Halim S, Sitepu VR. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in Helicobacter pylori infection and their association with degree of gastritis[J]. Acta Med Indones, 2015, 47(2): 120-126.
- [14] 翟乃亮, 刘金苹, 高福泉. 非小细胞肺癌患者血清中 VEGF、Ang-2 和 survivin 的表达及相关性研究[J]. 滨州医学院学报, 2016, 39(1): 23-25.
- [15] Brussino L, Culla B, Bucca C, et al. Inflammatory cytokines and VEGF measured in exhaled breath condensate are correlated with tumor mass in non-small cell lung cancer[J]. J Breath Res, 2014, 8(2): 271-275.

(收稿日期: 2016-04-22 修回日期: 2016-06-17)

(上接第 2842 页)

- [2] 伍俊, 赵宏祥. 献血者丙氨酸氨基转移酶初筛的效果评价与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 1877-1878.
- [3] 金齐, 王宏权, 牛文博, 等. 2010~2012 年锦州口岸出入境人员疾病监测结果分析[J]. 中国国际卫生检疫杂志, 2013, 11(6): 867-868.
- [4] 唐明慧, 汪海波, 史咏梅, 等. 珠海口岸出入境人员 HBsAg、HBeAg 和转氨酶检测结果分析[J]. 热带医学杂志, 2016, 21(3): 533-534.
- [5] 尤榕, 韩玲, 王健, 等. 街头无偿献血干式化学试纸条筛查 ALT 的效果评价[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(3): 346-347.
- [6] 石延社. 丙酮酸氧化酶法与赖氏法检测血清 ALT 的比较[J]. 临床输血与检验, 2003, 5(2): 139-140.
- [7] Ceriotti F, Henny J, Queralto J, et al. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase

(GGT) in serum; results from an IFCC multicenter study[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(11): 1593-1601.

- [8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 279-280.
- [9] 宋丽娟, 宋立晶. 赖氏法和速率法检测血清 ALT 方法学比较[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(12): 870-871.
- [10] 孙金莲, 张丽. 丙酮酸氧化酶速率法在大批量献血员 ALT 检测中的应用[J]. 包头医学院学报, 2010, 18(3): 289-290.
- [11] 李天君, 赵锋, 张文学, 等. 采供血机构不同检测系统对 ALT 检测结果比对研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(9): 849-851.
- [12] 韩金玉, 张成松, 王爱香, 等. 改良速率法检测 ALT 的探讨[J]. 临床输血与检验, 2000, 2(4): 30-31.

(收稿日期: 2016-05-11 修回日期: 2016-08-11)