


# 现代临床检验 诊断与新技术应用

(下)

赵俊暎等◎主编

 吉林科学技术出版社

# 现代临床检验 诊断与新技术应用

(下)

赵俊暎等◎主编

# 第十八章 肝脏功能检验

## 第一节 血清酶学检验

### 一、丙氨酸氨基转移酶

#### (一) 连续监测法测定丙氨酸氨基转移酶活性

1. 原理 在丙氨酸氨基转移酶 (Alanine transferase, ALT) 速率法测定中酶偶联反应式为:



在上述偶联反应中, NADH 的氧化速率与标本中酶活性呈正比, 在 340nm 波长处, NADH 呈现特征性吸收峰, 而 NAD 则没有。因此, 在 340nm 监测吸光度的下降速率 ( $-\Delta A/\text{min}$ ), 可计算出 ALT 的活性单位。

#### 2. 试剂组成

(1) 试剂 I: Tris 缓冲液 100mmol/L, L-丙氨酸 500mmol/L, NADH 0.18mmol/L, LDH I 200U/L。

(2) 试剂 II: pH 7.3 100mmol/L Tris 缓冲液,  $\alpha$ -酮戊二酸 15mmol/L。

#### 3. 操作步骤

(1) 手工法实验步骤: 取试剂 I 1ml, 加入血清 100 $\mu$ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟后, 加入试剂 II 100 $\mu$ l, 混匀。延迟 30 秒后, 在 340nm 波长下连续监测吸光度变化 60 秒, 根据吸光度下降速率 ( $-\Delta A/\text{min}$ ), 计算出 ALT 活性单位。

(2) 自动生化分析仪主要反应参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②波长: 主波长 340nm (副波长 410nm); ③延迟时间: 30 秒; ④测定时间: >60 秒; ⑤样品、试剂用量: 按试剂说明书设置或等比例修改。

#### 4. 计算

$$\text{ALT (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times T_v \times 1000) / (6.22 \times S_v \times P)$$

式中:  $T_v$  为总反应体积 (ml),  $S_v$  为样本体积 (ml), 6.22 为 NADH 在 340nm 处摩尔吸光度,  $P$  为比色杯光径 (cm)。

#### 5. 评价

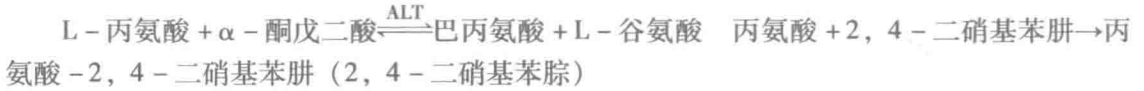
(1) 样本收集和贮存: 宜用空腹新鲜血清或肝素抗凝血浆并避免溶血。因为红细胞中 ALT 浓度约为血浆中 3~5 倍。分离血清室温保存 ALT 可稳定 3 天, 在 2~4 $^{\circ}$ C 可稳定 3 周 (10%~15% 降低)。避免冰冻, 冰冻可导致明显降低。

(2) 血清中存在的  $\alpha$ -酮酸 (如丙酮酸) 对实验有正向干扰:  $\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+$ , 采用双试剂法可去除此干扰。

(3) 血清中谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 增高时, 在有氨存在的条件下, 有如下反应, 导致 ALT 升高:  $\alpha\text{-酮戊二酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{NH}_4^+ \xrightleftharpoons{\text{GLDH}} \text{L-谷氨酸} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$ 。一般来说, 血清中氨含量甚微影响不大, 但对于个别重型肝炎患者此影响较大。

(二) 赖氏比色法测定丙氨酸氨基转移酶活性

1. 原理 本实验基于下述反应:



在碱性条件下 2, 4-二硝基苯胍呈棕色, 测定 510nm 处吸光度, 与标准曲线对照, 计算 ALT 活性。

2. 试剂 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4); 底物缓冲液 (DL-丙氨酸 200mmol/L,  $\alpha$ -酮戊二酸 2mmol/L); 1.0mmol/L 2, 4-二硝基苯胍溶液; 0.4mmol/L 氢氧化钠溶液; 2mmol/L 丙酮酸标准液。

3. 操作步骤

(1) 标本测定: 具体操作步骤如表 18-1。

室温放置 5 分钟, 在 505nm 波长下比色。

(2) 标准曲线绘制: 如表 18-2 加入各种试剂。

表 18-1 赖氏比色法测定丙氨酸氨基转移酶活性操作步骤

加入物	测定管	对照管
血清 (ml)	0.1	0.1
底物溶液 (ml)	0.5	-
混匀后, 37°C 水浴 30 分钟		
2, 4-二硝基苯胍溶液 (ml)	0.5	0.5
底物溶液 (ml)	-	0.5
混匀后 37°C 水浴 20 分钟		
氢氧化钠溶液 (ml)	0.4	0.4

表 18-2 标准曲线绘制操作步骤

标准管号	0	1	2	3	4
pH7.40, 1mol/L 磷酸盐缓冲液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2mmol/L 丙酮酸标准液	0	0.05	0.1	0.15	0.2
底物缓冲液	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3
酶活力单位 (卡门单位)	0	28	57	97	150

各管加入 2, 4-二硝基苯胍溶液 0.5ml 混匀, 37°C 水浴 20 分钟后加入氢氧化钠溶液 5ml, 放置 5 分钟后以蒸馏水调零, 505nm 比色。各管吸光度均减去 0 号管吸光度, 所得差

值为纵坐标, 相应酶活力单位为横坐标作标准曲线图。

#### 4. 评价

(1) 卡门单位是分光光度单位, 定义为: 血清 1ml, 反应液总体积 3ml, 反应温度 25℃, 波长 340nm, 比色杯光径 1.0cm, 每分钟吸光度下降 0.001A 为一个单位 (约相当于 0.160 μmol NADH 被氧化)。

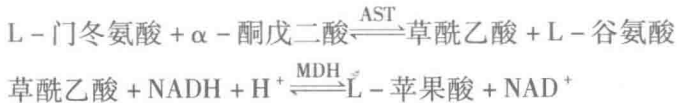
(2) 血清酶活力超过 150 卡门单位时, 应用生理盐水稀释标本后再测定。

(3) 加入 2, 4-二硝基苯肼溶液后应充分混匀, 使反应完全。加入氢氧化钠的速度要一致, 否则会导致吸光度读数差异。成批测定时尤其重要。

## 二、天冬氨酸氨基转移酶及其同工酶

### (一) 连续监测法测定天冬氨酸氨基转移酶活性

1. 原理 本法测定天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate transferase, AST) 的酶偶联反应式为:



在 340nm 波长下, 监测 NADH 的氧化速率, 即吸光度的下降速率, 该速率与 AST 的活性成正比。

#### 2. 试剂

(1) 试剂 I: pH7.65 80mmol/L 的 Tris 缓冲液, 含 L-门冬氨酸 240mmol/L、NADH 0.18mmol/L、苹果酸脱氢酶 420U/L 和 LDH 600U/L。

(2) 试剂 II: α-酮戊二酸 12mmol/L。

#### 3. 操作步骤

(1) 手工法操作步骤: 取试剂 I 1ml, 加入血清 100μl, 混匀, 37℃ 温育 5 分钟后, 加入试剂 II 100μl, 混匀。延迟 30 秒后, 反应进入线性平稳期, 在 340nm 波长下连续监测吸光度变化 60 秒, 根据吸光度下降速率 (-ΔA/min), 计算出 AST 活性单位。

(2) 自动生化分析仪主要参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②主波长 340nm, 副波长 410nm; ③延迟时间 60 秒, 测定时间 >60 秒。样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例修改。

#### 4. 计算

$$\text{AST (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times T_v \times 1000) / (6.22 \times S_v \times P)$$

式中:  $T_v$  为总反应体积 (ml),  $S_v$  为样本体积 (ml), 6.22 为 NADH 在 340nm 处摩尔吸光度,  $P$  为比色杯光径 (cm)。

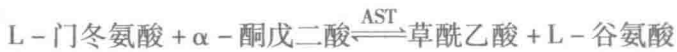
#### 5. 评价

(1) 样本收集和贮存: 宜用空腹新鲜血清或肝素抗凝血浆。样品溶血可导致 AST 显著升高。

(2) 分离血清在室温保存 AST 可稳定 3 天, 在 2~4℃ 可稳定 3 周 (降低小于 10%), 冰冻保存 1 年 (降低 10%~15%)。

## (二) 赖氏比色法测定天冬氨酸氨基转移酶活性

1. 原理 本实验基于下述反应:



经 60 分钟反应后, 加入 2, 4-二硝基苯肼溶液终止反应, 并分别与草酰乙酸和  $\alpha$ -酮戊二酸这两种  $\alpha$ -酮酸生成 2, 4-二硝基苯腙。在碱性条件下, 两种苯腙的吸光度曲线在 500~520nm 处差异最大, 草酰乙酸生成的苯腙吸光度显著大于  $\alpha$ -酮戊二酸生成的苯腙, 据此测定 AST 活力。

2. 试剂 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4); 底物缓冲液 (DL-门冬氨酸 200mmol/L,  $\alpha$ -酮戊二酸 2mmol/L); 1.0mmol/L 2, 4-二硝基苯肼溶液; 0.4mmol/L 氢氧化钠溶液; 2mmol/L 丙酮酸标准液。

3. 操作步骤

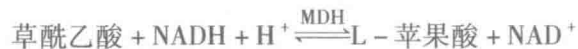
(1) 标本测定与 ALT 比色法相同, 只有酶反应时间改为 60 分钟。

(2) 标准曲线绘制与 ALT 比色法也基本相同, 只是各管对应酶活性分别为 0、24、61、114 和 190 卡门单位。

4. 评价 本方法的缺点为标本 AST 活性高时, 草酰乙酸对 AST 显示反馈抑制, 使测定结果偏低。但酮血症中草酰乙酸和  $\beta$ -羟丁酸, 因同时设有对照管, 不会引起测定结果假性增高。

## (三) 免疫抑制法测定线粒体天冬氨酸氨基转移酶 (m-AST) 活性

1. 原理 天冬氨酸氨基转移酶有两种同工酶, 即存在于细胞质中的胞质天冬氨酸氨基转移酶和存在于线粒体中的线粒体天冬氨酸氨基转移酶 (mitochondrial AST, m-AST)。试剂中的抗胞质天冬氨酸氨基转移酶抗体与胞质天冬氨酸氨基转移酶结合, 抑制胞质天冬氨酸氨基转移酶的活性。样本中未被抑制的 m-AST 检测采用改良的 IFCC 推荐 AST 测定方法, 反应方程式如下:



2. 试剂

(1) 试剂 1: 乳酸脱氢酶, 抗胞质天冬氨酸氨基转移酶抗体, L-门冬氨酸, 苹果酸脱氢酶, Tris 缓冲液 (pH7.8), EDTA。

(2) 试剂 2: 2-氧代戊二酸, NADH。

3. 操作步骤

(1) 手工法测定步骤 (表 18-3)。

表 18-3 手工法测定步骤

	标本管	质控管
试剂 1 ( $\mu\text{l}$ )	200	200
样本 ( $\mu\text{l}$ )	15	15
37℃ 孵育 5 分钟		
试剂 2 ( $\mu\text{l}$ )	50	50

混匀孵育 180 秒后, 连续监测吸光度 A, 计算  $\Delta A/\text{min}$ 。

(2) 自动生化分析仪测定主要反应参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②主波长 340nm, 副波长 410nm; ③延迟时间 60 秒, 测定时间 >60 秒。样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例修改。

#### 4. 计算

$$m\text{-AST (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times Tv \times 1\ 000) / (6.22 \times Sv \times P)$$

式中: Tv 为总反应体积 (ml), Sv 为样本体积 (ml), 6.22 为 NADH 在 340nm 处摩尔吸光度, P 为比色杯光径 (cm)。

5. 评价 试剂中的抗胞质天冬氨酸氨基转移酶抗体的特异性和抗体含量均可影响测定结果, 是试剂盒质量的关键。

### 三、 $\gamma$ -谷氨酰基转移酶

连续监测法测定  $\gamma$ -谷氨酰基转移酶活性:

1. 原理 本法以溶解性较高的 L- $\gamma$ -谷氨酰-3-羧基-4-硝基苯胺为底物, 测定  $\gamma$ -谷氨酰基转移酶 ( $\gamma$ -glutamyl transferase, GGT) 活性。反应式为:



5-氨基-2-硝基苯甲酸盐的生成速率与样本中 GGT 的活性成正比, 在 405nm 波长监测吸光度的增加可测得 GGT 活性。

2. 试剂 底物缓冲液: Tris-HCl 缓冲液 110mmol/L (pH 8.1), 含 L- $\gamma$ -谷氨酰-3-羧基-4-硝基苯胺 6mmol/L、甘氨酸甘氨酸 110mmol/L。

#### 3. 操作步骤

(1) 手工法操作步骤: 血清 0.1ml 和 37℃ 预温的底物缓冲液 1.0ml 充分混匀, 在 37℃ 温育, 410nm 波长下连续监测 60 秒吸光度变化。

(2) 自动生化分析仪主要反应参数: 测定模式: 速率法 (RATE), 主波长 410nm, 副波长 540nm, 延迟时间 30 秒, 测定时间 >60 秒, 样品、试剂用量按试剂说明书设置。

#### 4. 计算

$$\text{GGT (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times Tv \times 1\ 000) / (9.49 \times Sv \times P)$$

式中: Tv 为总反应体积 (ml), Sv 为样本体积 (ml), P 为比色杯光径 (cm), 9.49 为 5-氨基-2-硝基苯甲酸盐在 405nm 处摩尔吸光度。

#### 5. 评价

(1) 样本收集和保存: 新鲜血清或 EDTA-2Na 抗凝血浆。肝素抗凝血浆会引起反应液混浊。柠檬酸盐、草酸盐和氟化物抗凝剂会抑制酶活性约 10%~15%。分离血清在 2~8℃ 保存可以稳定 1 周, 冰冻可以稳定数月。进食后 GGT 活性降低, 然后逐渐升高, 所以推荐早晨空腹采血。

(2) 与底物为 L- $\gamma$ -谷氨酰-4-硝基苯胺的 Szasz 法相比, 本法底物 L- $\gamma$ -谷氨酰-3-羧基-4-硝基苯胺中含亲水羧基, 溶解度大, 容易配制高底物浓度溶液。并且底物自发水解慢, 试剂空白吸光度值低。

#### 四、碱性磷酸酶

##### (一) 连续监测法

1. 原理 本法测定血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性, 是以磷酸对硝基苯酚 (4-NPP) 为底物, 2-氨基-2-甲基-1-丙醇 (AMP) 或二乙醇胺 (DEA) 为磷酸酰基的受体物。4-NPP 在碱性溶液中为无色, 在 ALP 催化下, 4-NPP 分裂出磷酸基团, 生成游离的对硝基苯酚 (4-NP), 后者在碱性溶液中转变为较深黄色的醌式结构。在波长 405nm 处监测吸光度增高速率, 计算出 ALP 活性。

2. 试剂 底物缓冲液由 pH 10.3 的 2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液 1.8mmol/L、10.5mmol/L 氯化镁液和 31.5mmol/L 磷酸对硝基苯酚液, 按体积 10 : 10 : 1 混合而成。

3. 操作步骤 自动生化分析仪主要反应参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②波长: 主波长 405nm (副波长 800nm); ③延迟时间 60 秒, 测定时间 > 60 秒; ④样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例改变。

##### 4. 计算

$$ALP (U/L) = (\Delta A / \text{min} \times Tv \times 1000) / (18.5 \times Sv \times P)$$

式中: Tv 为总反应体积 (ml), Sv 为样本体积 (ml), P 为比色杯光径 (cm), 18.5 为 5-对硝基苯酚在 405nm 处摩尔吸光度。

##### 5. 评价

(1) 样本收集和保存: 使用新鲜血清或肝素抗凝血浆。EDTA、柠檬酸盐、草酸盐抗凝剂会抑制酶活性。分离血清在室温稳定 8 小时, 2~8℃ 稳定 4~5 天。冰冻血清需复温至室温后再行测定, 否则结果偏低。

(2) 常用于 ALP 测定的缓冲液体系可归类为三种: 惰性型, 如碳酸盐缓冲液和巴比妥缓冲液; 抑制型, 如甘氨酸缓冲液; 激活型, 如 AMP、Tris 和 DEA 等缓冲液。不同缓冲体系所测 ALP 活性由高到低依次为: 激活型 > 抑制型 > 惰性型。

##### (二) 比色法

1. 原理 碱性磷酸酶催化磷酸苯二钠水解, 生成磷酸和游离酚, 酚在碱性环境中与 4-氨基安替比林结合, 被铁氰化钾氧化生成红色的醌衍生物, 通过比色计算碱性磷酸酶的活性。

2. 试剂 0.1mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH10), 2.20mmol/L 磷酸苯二钠溶液, 铁氰化钾溶液, 酚标准贮存液 (1mg/ml), 酚标准应用液 (0.05mg/ml)。

##### 3. 操作步骤

(1) 测定步骤如表 18-4

表 18-4 比色法测定碱性磷酸酶操作步骤

加入物	测定管	对照管
血清 (ml)	0.1	-
碳酸盐缓冲液 (ml)	1.0	1.0
	37℃ 水浴 5 分钟	
磷酸苯二钠溶液 (ml)	1.0	1.0



续表

加入物	测定管	对照管
	混匀, 37℃水浴 15 分钟	
铁氰化钾溶液 (ml)	3.0	3.0
血清 (ml)	-	0.1

立即混匀, 在 510nm 波长下, 以蒸馏水调零, 读取各管吸光度。测定管吸光度值减去对照管吸光度值, 按标准曲线确定酶活力单位。

(2) 标准曲线绘制: 按表 18-5 操作。

表 18-5 标准曲线绘制操作步骤

加入物	0	1	2	3	4	5
酚标准应用液 (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (ml)	1.1	0.9	0.7	0.5	0.3	0.1
碳酸盐缓冲液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
铁氰化钾溶液 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
相当金氏单位	0	10	20	30	40	50

在波长 510nm, 以 0 号管调零, 读取各管吸光度为纵坐标, 相应活力单位为横坐标, 绘制标准曲线。

#### 4. 评价

- (1) 铁氰化钾溶液中加入硼酸有稳定显色作用。
- (2) 底物中不应含有游离酚, 如空白管显红色, 说明磷酸苯二钠已开始分解, 应弃去不用。
- (3) 加入铁氰化钾后必须迅速混合, 否则显色不充分。

### 五、乳酸脱氢酶及其同工酶

#### (一) 连续监测法 (L-法)

1. 原理 此法测定乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LD) 的反应式为:



反应过程中, 乳酸被氧化成丙酮酸, 同时 NAD 还原成 NADH, 在 340nm 波长监测 NADH 吸光度增高速率, 计算 LD 活力。

2. 试剂 Tris - HCl 缓冲液 50mmol/L (pH8.9 ± 0.1), L - 乳酸钾 50mmol/L, NAD6mmol/L。

3. 操作步骤 主要反应参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②波长: 主波长 340nm (副波长 800nm); ③延迟时间 60 秒, 测定时间 60 ~ 120 秒; ④样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例改变。

在基本参数大体不变的基础上, 可根据实验室所用生化分析仪和试剂的不同, 确定针对性更强的详细参数。

4. 计算

$$LD (U/L) = (\Delta A / \text{min} \times Tv \times 1\ 000) / (6.22 \times Sv \times P)$$

式中：Tv 为总反应体积 (ml)，Sv 为样本体积 (ml)，6.22 为 NADH 在 340nm 处摩尔吸光度，P 为比色杯光径 (cm)。

5. 评价

(1) 样本收集和保存：新鲜血清或肝素抗凝血浆，草酸盐抗凝剂会抑制 LD 活性。分离血清在室温稳定 7 天。由于 LD 同工酶 LD-4 和 LD-5 对冷敏感，故血清应室温下保存。红细胞内 LD 浓度为血浆中的 360 倍，溶血可引起 LD 增高。

(2) 关于顺反应、逆反应问题：顺反应即 L 法，反应方向为正方向，测定吸光度上升；逆反应即为 P 法，为负反应，检测 NAD 吸光度下降。逆反应方法比顺反应快，监测时间短；但由于 NADH 是不稳定试剂，易产生 LD 活性抑制的物质，因此两种方法各有利弊。目前国内试剂厂家采用 L 法居多，国外采用 P 法的较多。

(二) 连续监测法 (P-法)

1. 原理 本法测定 LD 的反应方程式为：



反应过程中，丙酮酸被还原成乳酸，同时 NADH 被氧化成 NAD，在 340nm 波长下监测 NADH 吸光度降低速率，计算 LD 活力。

2. 试剂 Tris 缓冲液 50mmol/L (pH7.4)，EDTA-2Na 5mmol/L，丙酮酸 1.2mmol/L，NADH 缓冲液 0.2mmol/L。

3. 操作步骤

(1) 手工法操作步骤：取血清 0.05ml 和 2.0ml NADH-Tris-EDTA 缓冲液混匀，37℃ 水浴 5 分钟 (消除血清标本中内源性 α-酮酸对 NADH 的消耗)，再加入 0.2ml 丙酮酸溶液混匀，立即测定 340nm 吸光度下降速率。

(2) 自动分析仪主要反应参数：①测定模式：速率法 (RATE)；②波长：主波长 340nm (副波长 800nm)；③延迟时间：20 秒；④测定时间：60~120 秒；⑤样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例改变。

4. 计算

$$LD (U/L) = (\Delta A / \text{min} \times Tv \times 1\ 000) / (6.22 \times Sv \times P)$$

式中：Tv 为总反应体积 (ml)，Sv 为样本体积 (ml)，6.22 为 NADH 在 340nm 处摩尔吸光度，P 为比色杯光径 (cm)。

5. 评价 参见连续监测法 (L-法) 测定 LD。

(三) 比色法

1. 原理 乳酸脱氢酶催化 L-乳酸脱氢，生成丙酮酸。丙酮酸和 2,4-二硝基苯肼反应，生成丙酮酸二硝基苯腙，在碱性溶液中呈棕红色，颜色深浅与丙酮酸浓度呈正比，由此计算酶活力。

2. 试剂 底物 0.3mol/L 乳酸锂 (pH 8.8 二乙醇胺缓冲液)，11.3mmol/L NAD 溶液，1mmol/L 2,4-二硝基苯肼溶液，0.4mol/L NaOH，0.5mmol/L 丙酮酸标准液。

### 3. 操作步骤

(1) 标本测定：按表 18-6 操作。

室温放置 5 分钟后，以蒸馏水调零，在波长 440nm 下读取各管吸光度，测定管减去对照管作为标本吸光度对照标准曲线，获得该标本酶活力浓度。

表 18-6 比色法测定乳酸脱氢酶操作步骤

加入物	测定管	对照管
血清 (ml)	0.01	0.01
底物缓冲液 (ml)	0.5	0.5
	37℃ 水浴 5 分钟	
NAD 溶液 (ml)	0.1	-
	37℃ 水浴 5 分钟	
2, 4-二硝基苯胂溶液 (ml)	0.5	0.5
NAD 溶液 (ml)	-	0.1
	37℃ 水浴 15 分钟	
氢氧化钠溶液 (ml)	5.0	5.0

(2) 标准曲线绘制：按表 18-7 操作。

室温放置 5 分钟后，以空白管调零，在波长 440nm 下读取各管吸光度，作为纵坐标，相应活力单位作为横坐标，绘制标准曲线。

表 18-7 标准曲线绘制操作步骤

加入物	B	1	2	3	4	5
丙酮酸标准液 (ml)	0	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2
底物缓冲液 (ml)	0.5	0.475	0.45	0.4	0.35	0.3
蒸馏水 (ml)	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
2, 4-二硝基苯胂溶液 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	37℃ 水浴 5 分钟					
氢氧化钠溶液 (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
相当金氏单位	0	125	250	500	750	1 000

4. 评价 乳酸锂比乳酸钾和乳酸钠更稳定，容易称量，更适合作为乳酸脱氢酶底物。

## 六、胆碱酯酶

### (一) 连续监测法测定胆碱酯酶

1. 原理 拟胆碱酯酶 (pseudocholinesterase, PChE) 催化丙 (丁) 酰硫代胆碱水解，产生丙 (丁) 酸与硫代胆碱；后者与无色的 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸 (DTNB) 反应，形成黄色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸 (5-MNBA)。在 410nm 处测定吸光度增加速率，所测  $\Delta A_{410nm}/min$  与 PChE 活力成正比。

2. 试剂 磷酸盐缓冲液 6.42mmol/L (pH7.6), 碘化丙酰硫代胆碱 10mmol/L, 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸 0.42mmol/L。

### 3. 操作步骤

(1) 手工法操作步骤: 测定前, 将碘化丙酰硫代胆碱溶液和 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸溶液按 1 : 3 混合, 取 3ml 预温 3 分钟, 加入血清 5 $\mu$ l 混匀, 延滞 10 秒后, 在 410nm 波长下每隔 30 秒监测 3 分钟。

(2) 自动分析仪主要反应参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②主波长: 410nm (副波长: 800nm); ③温度: 37 $^{\circ}$ C; ④延迟时间: 10 秒; ⑤测定时间: 60 ~ 120 秒; ⑥样品、试剂用量按试剂说明书设置或等比例稀释。

### 4. 计算

$$PChE \text{ U/L} = (\Delta A / \text{min} \times Tv \times 1000) / (13.6 \times Sv \times P)$$

式中: Tv 为总反应体积 (ml), Sv 为样本体积 (ml), 13.6 为 5 - MNBA 在 410nm 处摩尔吸光度, P 为比色杯光径 (cm)。

### 5. 评价

(1) 样本收集和保存: 新鲜血清或肝素抗凝血浆。PChE 在血清中非常稳定, 室温保存稳定数 10 天, -20 $^{\circ}$ C 保存可稳定 3 年。

(2) 人和动物的胆碱酯酶 (CHE) 有两类, 一类是真胆碱酯酶 (AChE), 分布在红细胞及脑灰质等中; 一类是拟胆碱酯酶 (PChE), 分布在肝、脑白质和血清等中。两类胆碱酯酶均可催化酰基胆碱水解, 但对各种底物的特异性及亲和力有差异。

(3) 血清经稀释后, PChE 易失活, 如需稀释必须尽快完成检测。

## (二) 比色法

1. 原理 血清中胆碱酯酶催化乙酰胆碱水解为胆碱和乙酸。未被水解的乙酰胆碱与碱性羟胺作用, 生成乙酰羟胺。乙酰羟胺在酸性溶液中与高铁离子作用, 生成棕色复合物, 比色测定剩余乙酰胆碱含量, 间接推算血清中胆碱酯酶的活力。

### 2. 试剂

(1) 缓冲乙酰胆碱溶液: 由 A 液 16ml、B 液 2ml 和 C 液 2ml 混合而成。

1) A 液: 称巴比妥钠 10.3g, 溶于 300ml 蒸馏水中, 慢慢加入 1mol/L 盐酸 60ml, 再加入无水碳酸钠 5.3g, 加热至结晶消失, 加蒸馏水至 500ml。

2) B 液: 溴化乙酰胆碱 1.13g 或氯乙酰胆碱 0.91g, 加蒸馏水溶解至 10ml。

3) C 液: 氯化镁 4.2g, 氯化钾 0.2g, 加蒸馏水溶解稀释至 100ml。

(2) 其他溶液: 碱性羟胺溶液, 10g/L 三氯化铁溶液, 4mol/L 盐酸。

3. 操作步骤 取缓冲乙酰胆碱溶液 0.5ml 和血清 0.05ml, 混匀 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟, 加入碱性羟胺溶液 0.5ml 混匀, 静待 1 分钟后, 加入 4mol/L 盐酸 1.5ml 混匀。另用试管取上述混匀液 0.5ml 和氯化高铁溶液混匀后离心, 取上清液 540nm 比色。

单位定义: 1ml 血清中 CHE 在 37 $^{\circ}$ C 水浴与底物作用 1 小时, 每水解 1 $\mu$ mol 的乙酰胆碱为 1 个酶活力单位。

4. 评价 加入碱性羟胺后, 须待 1 分钟以上再加酸, 以保证与乙酰胆碱充分作用。

(赵俊暎)

## 第二节 胆红素与胆汁酸检验

### 一、总胆红素

#### (一) 改良 J-G 法测定总胆红素

1. 原理 血清中胆红素同重氮试剂反应, 产生重氮胆红素化合物, 在 550nm 波长下, 吸光度与胆红素浓度呈正比。其中结合胆红素可直接与重氮试剂反应, 产生偶氮胆红素; 在同样条件下, 游离胆红素须有加速剂 (咖啡因 - 苯甲酸钠) 使胆红素氢键破坏后再与重氮试剂反应, 测得的才是血清总胆红素 (total bilirubin, TBIL)。

2. 试剂 咖啡因 - 苯甲酸钠试剂含 5.6% 无水乙酸钠、5.6% 苯甲酸钠、0.1% EDTA - 2Na 和 3.75% 咖啡因; 263g/L 碱性酒石酸钠; 重氮试剂 [0.5ml 亚硝酸钠 (5g/L) 与 20ml 对氨基苯磺酸 (5g/L) 混合]; 5g/L 叠氮钠。

#### 3. 操作步骤

(1) 主要反应参数: ①测定模式: 终点法 (END); ②波长: 600nm; ③温度: 37℃; ④测定时间: 10 分钟; ⑤样品、试剂用量按试剂说明书设置。

(2) 在基本参数大体不变的基础上, 可根据实验室所用生化分析仪和试剂的不同, 确定针对性更强的详细参数。

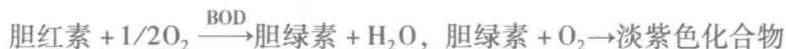
#### 4. 评价

(1) 样本收集和保存: 新鲜未溶血的血清或血浆。胆红素对光敏感, 应避光保存, 室温稳定 2 小时, 2~8℃ 稳定 12 小时, -20℃ 冷冻稳定 3 周。

(2) 轻度溶血对本法无影响, 但严重溶血可使测定结果偏低。

#### (二) 胆红素氧化酶法测定

1. 原理 在 pH 8.0 条件下, 胆红素氧化酶 (bilirubinoxidase, BOD) 催化结合胆红素和未结合胆红素氧化, 反应如下:



胆红素的最高吸收峰在 450nm 附近, 随着胆红素被氧化成胆绿素, 吸光度下降, 下降程度与胆红素浓度成正比。

2. 试剂 0.1mol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH8.2) 含 4mmol/L 胆酸钠和 15mmol/L 十二烷基硫酸钠 (SDS), BOD 溶液 2 000U/L, 胆红素标准液。

3. 操作步骤 按表 18-8 进行。

表 18-8 胆红素氧化酶法测定总胆红素操作步骤

加人物	测定 (U)	空白 (UB)	标准 (S)	标准空白 (SB)
血清 (ml)	0.05	0.05	-	-
胆红素标准 (ml)	-	-	0.05	0.05
Tris - HCl 缓冲液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水 (ml)	0.05	0.05	-	-
BOD 溶液 (ml)	-	-	0.05	0.05

加入 BOD 溶液后立即混匀, 37℃ 水浴 5 分钟, 以蒸馏水调零, 在 450nm 波长处比色。

4. 计算 总胆红素 =  $(AUB - AU) / (ASB - AS) \times C$  标准

5. 评价

(1) BOD 法特异性高, 既适合手工, 又适合自动分析仪。

(2) 本方法的灵敏度和线性范围均比 J - G 法高, 但由于 BOD 来源困难, 试剂成本较高。

### (三) 钒酸盐法测定

1. 原理 血清胆红素在 pH3.0 附近, 在有机复合氧化剂和表面活性剂的作用下, 被氧化成胆绿素, 胆红素特有的黄色消失, 测定吸光度的变化, 计算样品浓度。

2. 试剂

(1) 试剂 1: pH3.0 枸橼酸盐缓冲盐 100mmol/L, 表面活性剂。

(2) 试剂 2: pH7.5 磷酸盐缓冲液, 偏磷酸盐 3.5mmol/L。

3. 操作步骤 按表 18 - 9 操作:

表 18 - 9 钒酸盐法测定总胆红素操作步骤

加入物	空白 (B)	标准 (S)	测定管 (T)
试剂 1 (ml)	1.4	1.4	1.4
蒸馏水 (ml)	0.05	-	-
标准液 (ml)	-	0.05	-
血清 (ml)	-	-	0.05
混匀, 37℃ 水浴 5 分钟, 450nm 处读取各管吸光度 $A_1$			
试剂 2 (ml)	0.35	0.35	0.35
混匀, 37℃ 水浴 5 分钟, 450nm 处读取吸光度 $A_2$ , 并计算 $\Delta A = A_1 - A_2$			

4. 计算 总胆红素 =  $(\Delta A \text{ 测定} / \Delta A \text{ 标准}) \times C$  标准

5. 评价 钒酸盐法试剂稳定性比重氮法更好。

## 二、结合胆红素

### (一) 改良 J - G 法测定结合胆红素

1. 原理 血清中结合胆红素 (conjugated bilirubin) 可直接与重氮试剂反应, 产生偶氮胆红素化合物, 在 550nm 波长下, 吸光度变化与胆红素浓度成正比。

2. 试剂组成 碱性酒石酸钠 263g/L, 重氮试剂由 0.5ml 亚硝酸钠 (5g/L) 和 20ml 对氨基苯磺酸 (5g/L) 混合而成, 叠氮钠 5g/L。

3. 操作步骤

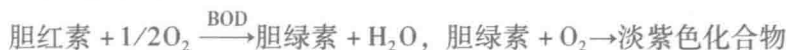
(1) 主要反应参数: ①测定模式: 终点法 (END); ②波长: 600nm; ③温度: 37℃; ④测定时间: 1 分钟; ⑤样品、试剂用量: 按试剂说明书设置。

(2) 在基本参数大体不变的基础上, 可根据实验室所用生化分析仪和试剂的不同, 确定针对性更强的详细参数。

4. 评价 样本收集和保存同 TBIL。

## (二) 氧化酶法测定结合胆红素

1. 原理 反应原理同总胆红素测定,但在 pH3.7~4.5 条件下,胆红素氧化酶 (BOD) 只能催化结合胆红素和大部分  $\delta$ -胆红素转化为胆绿素,而不能催化未结合胆红素发生此氧化反应。反应如下:



胆红素的<sup>最大吸收峰</sup>在 450nm 附近,随着结合胆红素被氧化成胆绿素,吸光度下降,下降程度与结合胆红素浓度成正比。

2. 试剂 pH4.5 磷酸盐缓冲液 200mmol/L;胆红素氧化酶 (BOD) 溶液 2 000U/L;结合胆红素标准液 (二牛磺酸胆红素,DTB)。

3. 操作步骤 按表 18-10 操作:

表 18-10 氧化酶法测定结合胆红素操作步骤

加入物	测定 (U)	测定空白 (UB)	标准 (S)	标准空白 (SB)
血清 (ml)	0.05	0.05	-	-
DTB 溶液 (ml)	-	-	0.05	0.05
磷酸盐缓冲液 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
蒸馏水 (ml)	0.05	0.05	-	-
BOD 溶液 (ml)	-	-	0.05	0.05

加入 BOD 溶液后立即混匀,37℃ 水浴 5 分钟,蒸馏水调零,450nm 比色。

4. 计算 结合胆红素 = (AUB - AU) / (ASB - AS) × C 标准

5. 评价 光对 BOD 法测定结合胆红素有较大的影响,新生儿黄疸患者经过蓝光照射治疗后,会产生光胆红素,易被 BOD 氧化,导致 BOD 法测定结果假性增高。而高效液相色谱法和 J-G 法测定时没有这种假性增高。

## (三) 钒酸盐法测定结合胆红素

1. 原理 在 pH3.0 溶液中,血清结合胆红素在有机复合氧化剂和表面活性剂的作用下,被氧化成胆绿素,胆红素特有的黄色消失,测定吸光度的变化,计算其浓度。

2. 试剂

(1) 试剂 1: pH3.0 枸橼酸盐缓冲盐 100mmol/L,表面活性剂。

(2) 试剂 2: pH7.5 磷酸盐缓冲液,偏磷酸盐 3.5mmol/L。

3. 操作步骤

(1) 按表 18-11 操作:

表 18-11 钒酸盐法测定结合胆红素操作步骤

加入物	空白 (B)	标准 (S)	测定管 (T)
试剂 1 (ml)	1.4	1.4	1.4
蒸馏水 (ml)	0.05	-	-
标准液 (ml)	-	0.05	-

加入物	空白 (B)	标准 (S)	测定管 (T)
血清 (ml)	-	-	0.05
混匀, 37°C 水浴 5 分钟, 450nm 处读取各管吸光度 $A_1$			
试剂 2 (ml)	0.35	0.35	0.35
混匀, 37°C 水浴 5 分钟, 450nm 处读取吸光度 $A_2$ , 并计算 $\Delta A = A_1 - A_2$			

(2) 计算

直接胆红素 = ( $\Delta A$  测定/ $\Delta A$  标准)  $\times$  C 标准

4. 评价

(1) 钒酸盐法试剂稳定性好, 易于保存, 临床应用更方便。

(2) 钒酸盐法测定结合胆红素结果比重氮法偏高, 直接胆红素/总胆红素比值亦因此偏高。

三、胆汁酸

(一) 酶比色法测定胆汁酸

1. 原理 在  $3\alpha$ -羟类固醇脱氢酶 ( $3\alpha$ -HSD) 作用下, 各种胆汁酸 (bile acid) C3 位上的羟基 ( $3\alpha$ -OH) 脱氧形成羰基 ( $3\alpha$ -O), 同时氧化型 NAD 还原为 NADH。随后 NADH 上的氢由黄递酶催化转移给硝基四氮唑蓝 (NTB), 产生甲臆。用磷酸终止反应, 甲臆的产量与胆汁酸成正比。

2. 试剂

(1) 0.2mol/L Tris-HCl 的缓冲液 (pH7.5)。

(2) 测定试剂:  $3\alpha$ -羟类固醇脱氢酶 ( $3\alpha$ -HSD) 5U/L; 黄递酶 500U/L; NAD<sup>+</sup> 1mmol/L; NTB 0.5g/L。

(3) 空白试剂: 同测定试剂, 但不含  $3\alpha$ -HSD。

(4) 200mmol/L 丙酮酸钠溶液。

(5) 1.33mol/L 磷酸溶液。

(6) 混合血清: 取无溶血、无黄疸、肝功试验正常的血清混合。

(7) 标准液: 50 $\mu$ mol/L 甘氨酸胆酸钠。

3. 操作步骤

(1) 按表 18-12 操作

表 18-12 酶比色法测定胆汁酸操作步骤

加入物	待测血清 (U)		试剂 (R)		混合血清 (P)		标准 (S)	
	U	UB	R	RB	P	PB	P	SB
待测血清 (ml)	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-
蒸馏水 (ml)	-	-	0.2	0.2	-	-	-	-
混合血清 (ml)	-	-	-	-	0.2	0.2	-	-



续表

加入物	待测血清 (U)		试剂 (R)		混合血清 (P)		标准 (S)	
	U	UB	R	RB	P	PB	P	SB
标准 (ml)	-	-	-	-	-	-	0.2	0.2
丙酮酸钠溶液 (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
测定试剂 (ml)	0.5	-	0.5	-	0.5	-	0.5	-
空白试剂 (ml)	-	0.5	-	0.5	-	0.5	-	0.5
混匀, 37℃水浴 10 分钟								
磷酸溶液 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

加入磷酸溶液终止反应后, 540nm 波长分别以各组对应的试剂空白管调零, 测定吸光度。

(2) 计算

$$\text{总胆汁酸 } (\mu\text{mol/L}) = [ (AU - AR) / (AS - AP) ] \times 50$$

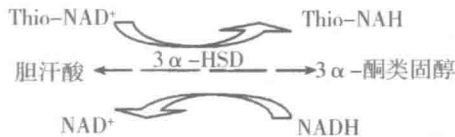
4. 评价

(1) 胆汁酸测定有四类方法: 气-液色谱法、高效液相色谱法、放射免疫法和酶法, 酶法不需特殊仪器, 操作简单, 易于推广使用。

(2) 样本收集和保存: 血清、肝素或 EDTA 抗凝血浆。血清胆汁酸浓度在餐后升高, 因此应早晨空腹采血。血清胆汁酸 4℃ 稳定 1 周, -20℃ 保存稳定 3 个月。

(二) 循环酶速率法测定胆汁酸

1. 原理 胆汁酸被 3α-羟类固醇脱氢酶 (3α-HSD) 以及 β-硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型 (Thio-NAD<sup>+</sup>) 特异性氧化, 生成 3α-酮类固醇以及 β-硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型 (Thio-NADH)。此外在 3α-羟类固醇脱氢酶以及 NADH 的存在下, 3α-酮类固醇又被转变为胆汁酸和 NAD<sup>+</sup>, 如此反复循环, Thio-NADH 生成越来越多, 405nm 处检测吸光度增加速率, 可得标本胆汁酸浓度。反应如下:



2. 试剂

- (1) 试剂 1: 950mg/L Thio-NAD<sup>+</sup>。
- (2) 试剂 2: NADH 6 000mg/L, 3α-HSD 12U/L。

3. 操作步骤

(1) 自动生化分析仪主要参数: ①测定模式: 速率法 (RATE); ②温度: 37℃; ③波长: 405nm; ④延迟时间: 1 分钟; ⑤测定时间: 2 分钟; ⑥样品、试剂用量按试剂说明书设置。

(2) 计算

$$\text{总胆汁酸 } (\mu\text{mol/L}) = (\Delta A \text{ 样本} / \text{min} \div \Delta A \text{ 标准} / \text{min}) \times C \text{ 标准}$$