

临床酶学的若干问题

杨 振 华

中华医学会南通市分会
南 通 医 学 院
南通医学院附属医院

一九八三年七月

临床酶学的若干问题

杨振华

临床测定同工酶的方法

同工酶的发现至今只有廿余年历史，但研究工作的进展速度十分迅速，已知在物质代谢的调控、机体的发育、生物种族的进化中都起着积极的作用。同工酶是遗传基因的一类很易检测到的表型，是一种很有效且方便的研究遗传变异的工具。同工酶测定技术目前已有效地应用于遗传育种工作中。50年代末期，临床医学家企图通过测定患者血液或其他体液中的酶活力来诊断疾病或者病变组织，实践发现酶测定的特异性并不很高。因为机体的各种细胞的主要代谢过程如糖酵解，糖元生成，三羧酸循环，脂肪酸合成等基本上都是一致的，目前还很难说存在着所谓器官特异的酶。测定同工酶诊断疾病可以弥补上述不足，为诊断疾病开辟新的领域，在短短十余年中同工酶已取得长足进步。Roe氏统计了328例心肌梗塞患者各项检查结果见下表：

检 查 项 目	假阴性 %	灵敏度 %	假阳性 %	特异性 %
心 电 图	34	66	0	100
总 CPK 活 性	2	98	15	85
LDH ₁ /LDH ₂ 比值	10	90	5	95
CPK—MB	0	100	1	99

又如诊断肿瘤，目前也找不出一个特异性和灵敏度都很高的酶试验，因为尚未发现一种只存在于肿瘤组织并能进入血液而正常组织又不存在的酶。但是人们已经知道，胚胎型或胎盘型同工酶正常只存在于胚胎或胎盘组织中，在正常成年组织中没有或仅有痕量。这些同工酶在成年人中出现，可能指示有恶性肿瘤的生长。胎盘—ALP，绒毛膜—ALP，羊水—ALP和胎盘型组织胺酶看来是真正的癌胚酶。这些同工酶的检测已初步应用于诊断肝癌。可以断言在今后将会有更多的同工酶应用于临床医学。

近年来，我国一些省市医疗和研究机构的临床实验室已进行了一些同工酶检测工作，但方法比较单一，不能适应临床诊断的需要。本文就适用于临床测定同工酶方法作一较全面阐述，根据方法和原理从下列三个方面加以讨论。

一、根据酶的理化性质分离同工酶

（一）电泳法

电泳方法的种类是众多的，滤纸电泳仅在早期使用过。醋酸纤维素薄膜和琼脂糖电泳操作简单，所以一般实验室用它来分离和测定同工酶就能满足临床上绝大部分的要求。特别是醋酸纤维素薄膜电泳方法简单，适用于大批标本，不少临床实验室都着重发展这类方法。

我们提出了一种新的不连续缓冲体系，能清晰分出至少七种区带的血清蛋白，用于分离 γ GT 同工酶也较巴比妥缓冲液更为清晰，区带也多。

淀粉胶和聚丙烯酰胺凝胶(PAG)电泳,不仅根据分子电荷而且可以根据分子大小区分各种酶蛋白,所以分辨力比醋酸纤维素和琼脂糖电泳更高。遗传学家们企图用淀粉胶电泳,从人群同工酶谱的分析中探讨遗传基因位点的分布和变异,因此要求同工酶分离得精确、清楚,并要求有良好的重现性,而定量的问题就不怎样重要。由于一开始就是用淀粉胶进行此项研究工作,目前已积累了很多资料,尽管它在分辨力方面不如PAG,重复性也差,但习惯上遗传基因方面的研究仍以淀粉胶为主。

PAG电泳重复性好,技术要求也不太高,因此实验室使用已愈来愈广。它比醋酸纤维素或琼脂糖电泳提供更多临床信息,例如用PAG分离ALP可以在肝ALP区带前方查到肝癌特有的Kosala同工酶和胎儿小肠型ALP,而用醋酸纤维素或琼脂糖电泳是查不到的。

如将单一浓度的PAG电泳改为几个浓度的阶段梯度凝胶,或者为连续梯度凝胶,则分辨力还可进一步改善。例如单用7%PAG电泳分离血清 γ -GT,除在原位有一深染区带外,往往只在 α 球蛋白区有一模糊区带。若改用连续梯度凝胶时,可以分出高达13区带的 γ GT。但本法电泳达到平衡时间往往需24小时。而我们改为四层浓度胶(15%, 11.5%, 7%, 4%)则分离时间短,效果不差于连续梯度电泳。

电泳法分离同工酶,不仅要严格遵守一般电泳注意事项,还应注意分离同工酶时特有的要求。在电泳分离过程中会产生热,这不仅影响了蛋白质的分离,对于酶来说还有一个热灭活的问题,因此在电泳过程中必须时刻注意温度不能升得太高,选用的电压要低一些,缓冲液离子浓度也要小一

点,电泳时间也尽可能缩短。不少作者还为此设计了不少附有冷却装置的电泳槽。有文献报导,用电泳测定LD同工酶的LD₄和LD₅百分比,与其他方法如层析法相比,往往偏低。有人认为就是因为LD₄和LD₅不耐热,在电泳过程中有部分酶灭活的缘故,为此可以在电泳时加入些保护剂,如加入1%白蛋白可防止LDH₄和LDH₅灭活,加入二巯基苏糖醇,则有助于CPK—BB的回收。

选择电泳缓冲液时,要考虑使同工酶区带分离清楚。电泳缓冲液不一定限于使用PH8.6巴比妥缓冲液,应选用一些分辨力高的缓冲液,为此常在缓冲液中加入Ca⁺⁺和Li⁺。我们应用2氨基2甲基1.3丙二醇缓冲液,可将正常人的 γ GT分为三个区带,而普通巴比妥缓冲液只能分为二带。在选用缓冲液时,还必须考虑到电泳后酶反应条件,首先PH应尽可能和酶反应最适pH相接近,例如 γ GT最适pH在8.0左右,我们则选用pH8.1的缓冲液作为电泳缓冲液。又如测定碱性磷酸酶同工酶时,所用的电泳缓冲液就可以偏碱一些,高于pH9.0。其次,电泳缓冲液不应含有酶反应的抑制物和干扰呈色的物质等等。在建立LAP同工酶电泳分离法时,发现电泳缓冲液中EDTA有抑止酶呈色作用,电泳缓冲液中除去EDTA后,正常标本才显示出LAP区带。PAG电泳时,一般都以过硫酸铵为催化剂聚胶。但过硫酸铵为强氧化剂,一些酶在其作用下易失活。所以PAG的成层胶常常用光聚合或者进行一定时间予电泳后再加入标本。

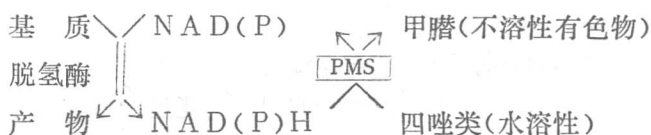
(二)酶区带的呈色法:电泳分离后显示同工酶的方法很多,历史上曾用过洗脱法,就是将电泳图谱按分离间隔剪下,洗脱后分别用一般酶测定方法测定其活力,然后可以以

每部分酶活力为纵轴，电泳图谱的各个部分为横轴 绘制 成图。然而用此法表示同工酶活力的分布情况，相当麻烦而且分辨力不高，一些较小的变化往往查不出来，目前已抛弃不用。1957年Hunter和Markert氏首先用组织化学方法测定淀粉胶电泳后酶的活力，将此种淀粉胶上酶区带的分布称为酶谱（Zymogram）。此法效率高，分辨力强，呈色后可用光密度计进行定量测定，目前已成为临床研究同工酶中应用最广泛的方法。这类方法主要优点是可以直接用肉眼观察到分离后的酶呈色区带，这点在检查一些由于酶的等位基因变异而引起同工酶的变化时更为有用，它能显示出酶区带的微小变异。在同工酶研究中显示酶活力的呈色法，大都来源于组织化学家检查组织中酶定位的方法，不大使用临床化学家测定酶活力的呈色法。因为后者呈色要求最后呈色物溶于水中，以利于比色。如用于电泳时则酶区带很易出现弥散；组织化学方法正相反，呈色物沉淀于酶作用原位不弥散，这对我们提高同工酶检测的分辨力很为有用。所以作同工酶方面的人员应对“组织化学”这门学科有所了解和熟悉。但是组织和细胞中酶含量成千倍高于血清中含量，很易查出。一般组织化学方法往往比较简单，例如酶反应 往往不是在 最适pH时进行，基质浓度往往也较低，因此将组织化学方法应用于同工酶测定时，不应简单地搬用，而应加以适当的修改。

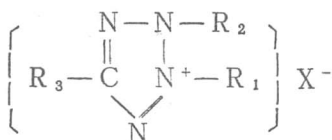
显示酶区带试剂溶液可以直接加在电泳支持物上，例如在淀粉胶或PAG电泳后就是这样，注意由于PAG有限制 大分子扩散的特性，往往仅是凝胶表面酶呈色，内部酶不易呈色，尤其是使用酶偶联试剂时，试剂中的酶不易扩散进胶内，所以用PAG分离同工酶时胶不宜厚。目前不太用盘状

电泳分离同工酶,可能这也是原因之一。此法不适用于醋纤和琼脂糖电泳,因呈色后酶带极易模糊不清,常将呈色试剂配在琼脂胶中或用滤纸、醋纤沾湿后复盖于电泳后的介质上。

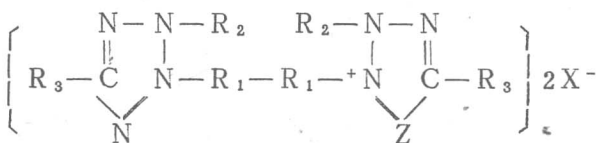
在众多显示酶呈色试剂中有二类试药特别引人注目。一类是电子传递染料,适用于涉及一切形成辅酶 I 和 II 的酶反应。Markert 和 Moller 首先用于测定 LDH 同工酶。其作用模式图如下:



在脱氢酶作用下,氧化型辅酶转变为还原型辅酶,通过中间递氢体吩嗪甲酯硫酸盐(PMS),将还原辅酶上的氢传递给四唑盐类,生成难溶性的有色化合物沉积在酶作用部位上。四唑盐类是1, 2, 3, 4四唑杂环的衍生物,2、3、5位分别被各种环状化合物取代,又可分为单四唑盐和双四唑盐二类,通式如下:



单四唑盐化合物



双四唑盐化合物

适用于同工酶测定的四唑盐必须符合如下要求：氧化还原电位应接近于零；还原产物不再被分子氧所氧化；呈色物质具有较高的克分子吸光系数；生成的甲臍溶解度要小，要稳定，对光应不敏感。

历史上第一个应用于临床实验室的四唑盐是氯化三苯四唑盐（TTC），用于检定细菌和尿路感染，由于其氧化还原电位很低，还原产物很易被氧氧化，加上对光敏感，因此无法用于同工酶测定上。以后有新四唑盐（NT）、四唑蓝盐（BT）等，也存在各种缺点，目前应用不多。目前国内使用最多的是硝基四唑蓝盐（NBT）和碘化硝基四唑盐（INT）。国外不少文献则认为四唑盐类中以甲基噻唑四唑盐（MTT）最好，呈色深，对光不敏感。

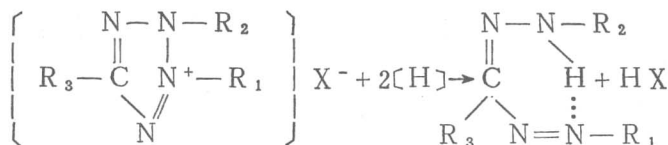
以下是一些四唑盐的氧化还原电位

基质辅酶和各种四唑盐的氧化还原电位

	氧化还原电位(E.)
乳酸/丙酮酸	-0.180
NAD	-0.320
NBT	-0.050
INT	-0.090
MTT	-0.110
BT	-0.160
NT	-1.170
TTC	-0.490

四唑盐类一般是白色或淡黄色水溶性化合物，在中性条件下加入氢很快不可逆地被还原形成甲臍（Formazan），

反应通式如下：



甲臆是一类深色难溶于水但溶于有机溶剂的化合物，单四唑盐形成的甲臆常为黄到红色，双四唑盐形成的甲臆常为蓝至黑色。不同甲臆呈色强度并不一样，下表是各种四唑盐甲臆的克分子消光系数。

	吸 收 高 峰 $\lambda_{\max}$ (nm)	克分子消光系数 $\epsilon_{\max}$
NBT	530	36,400
MTT-CO	660	20,000
INT	490	15,000
NT	505	14,000
BT	606	10,400

由于和四唑盐类氧化还原电位较接近，一般还原辅酶只能还原少量NBT、INT和MTT，因此反应中间还需另一递氢体。目前应用最多的是吩嗪甲酯硫酸盐（PMS），此试剂对光敏感，溶液颜色由黄变绿就不宜使用。最近有文献提出用Meldola Blue（8—二甲氨基—2，3—苯吩氧嗪），此试药对光不敏感，早期文献也有人使用过2·6二氯酚靛基酚亚甲基和黄递酶。

应用四唑盐法测定还原酶同工酶时，应注意所谓“非脱氢酶”的效应（“nothing” Dehydrogenase）。这是 Racker 氏在1955年首先提出来的，作者发现在一些非酶部分，四唑盐类也可以非特异地被还原生成不溶性甲嗪化合物，出现有色区带，同时作一对照试验就不难发现；只要在呈色液中不加入基质，如仍出现有色区带就是“非脱氢酶”的效应。例如测定LD同工酶时除通常的五个区带外，常可在白蛋白区出现外加色带，一般出现在标本用量大、酶反应孵育时间长、碱性条件、PMS过量时，对其原因还没完全清楚，一般都认为是由于巯基的非特异还原作用。因为加用阻断巯基试剂如碘乙酰胺、对氯汞苯甲酸常可阻止此现象产生。此作用和pH关系较大，一般在pH8.0以上才出现此现象。在实际工作中应用四唑盐反应都尽量控制在pH8.0以下进行，有人在反应液中加入 CN^- ，据说也有助于消除此副作用。

目前几乎所有脱氢酶同工酶的测定都使用这一类四唑盐法。如使用酶偶联试剂还可应用其他酶类同工酶的测定，如临床上电泳法测CPK同工酶就是此原理。其他如测GOT、乃至二肽酶和三肽酶，此时肽酶水解产物氨基酸在L-氨基酸氧化酶作用下伴有黄素腺苷二核苷酸（FAD）的还原，后者又还原PMS，最终和四唑盐作用呈色。

另一类试剂是稳定性重氮盐试剂，它们可以和萘酚、萘胺形成不溶性沉淀物，呈色灵敏度很高，广泛应用于组织化学方法中。萘酚和萘胺很容易生成各种衍生物。萘酚的乙酸，丁酸酯可用于测定非特异酯酶，磷酸酯用于测定磷酸酶，亮氨酸萘胺和谷氨酸萘胺则是LAP、 γ GT合适的基质。

一般说来 α -萘酚往往比 β -萘酚呈色反应更为鲜明，萘酚衍生物如萘酚AS，萘酚AS—MX，萘酚AS—TR和萘酚AS—BI，据说呈色效果比萘酚更好。稳定重氮盐种类和型号很多，选用时可参阅Pearse的“组织化学”。

根据我们的经验，在实际工作中应注意下列几点：

重氮盐不太稳定，不同厂家的质量并不完全一样，放置较长的试剂本身常变深，最好能多购置一些各种类型和不同厂家的重氮盐，自己进行试验，找出最合适的重氮盐以及最良好的条件，而不必拘束于文献介绍的条件。例如有文献介绍固蓝B溶于5%醋酸中作为显色剂，我们按此操作却不显色，改用pH4.7缓冲液溶解呈色鲜艳。又如我们曾试用过一并固酱GBC，配成的溶液本身就呈紫色，和萘酚不起反应，换用另一厂家的固酱GBC染色很好。

其次重氮盐反应受pH影响，如 α -萘酚和固蓝B在pH9.2作用生成黑色沉淀，pH7.4则开始为红色，随产量增多呈黑色，而在pH5.0时则呈紫色。此外重氮盐在pH高情况下常不稳定易分解呈色，我们一般都选用pH4.7缓冲液溶解重氮试剂，呈色虽然浅一些，但几乎没有底色，适宜于光密度计定量测定。

重氮试剂对酶反应都有一定抑制作用，假如将重氮试剂配在基质缓冲液中称为同时捕获法，则呈色往往较浅。如分为二个步骤，电泳后先与基质作用一段时间，以后再与重氮试剂作用呈色则染色效果较好。这种方法我们称之为培养后偶联法。

前述的四唑盐对酶反应一般无抑制作用，所以呈色剂和基质缓冲液混在一起，很少用培养后偶联法。

近年来临床上要求愈来愈高，如诊断胎儿先天性疾病往往要求在少量羊水细胞中检出酶的异常，这只有用极其灵敏方法才能作到，用通常呈色方法很难达到此要求。因而推动了荧光染色法的发展，其灵敏度可比通常呈色法提高10—100倍。还原型辅酶Ⅰ和Ⅱ在340nm紫外线激发下产生荧光，吸收峰在448nm，样品电泳后和基质作用，如果基质中含还原辅酶，在紫外线照射下就可出现均匀荧光。在酶作用区域由于还原型辅酶转换为氧化型（不产生荧光），荧光减弱乃至出现暗带。假如基质中含氧化型辅酶，在酶作用下转变为还原型辅酶，也可产生荧光谱带。

电泳法测CPK同工酶用四唑盐呈色时只有当CPK-MB大于10U/L时，酶区带才能显示。这显示不太灵敏，因为正常时CPK-MB含量太少不超过5U/L，用四唑盐时也会有一部分阳性病例被漏诊，若改用荧光法，则正常标本也能清楚显示CPK-MB区带。

游离的萘酚和萘胺也可产生荧光，其激发波长为335～345nm，可在415～455nm范围测其荧光，此法可用于检测LAP和ALP同工酶。目前应用最广泛的是4-甲基伞形酮（4-methylumbelliferone）的衍生物，它除了和萘酚一样可以形成各种酯类衍生物、作为酯酶和磷酸酶的基质外，还可与半乳糖、葡萄糖、甘露糖等形成各种糖苷化合物，用于测定相应的水解酶。一般先在酸性或中性条件下进行水解反应，以后用氨气熏蒸，或用碱性缓冲液使其成碱性。此时水解下来的4-甲基伞形酮出现强烈的荧光，因此这一方法非常敏感，它的克分子消光系数都大于上述各种荧光物质，但容易弥散，在呈色后应尽快记录。此外还有用荧光素的衍

生物测定碳酸酐酶的方法。

呈色法绝不只限于上述几类试剂，其他各种酶的化学反应都可试用于同工酶测定，如一些“色素元”呈色法。人们合成一些酶的基质，其本身是无色或颜色很淡，在酶作用下将基质中的呈色基团分解下来而显色。例如测定红血球中酸性磷酸酶时用磷酸酚酞为基质，在酶作用下释放出酚酞，在碱性条件中呈红色。又如可用蓝色淀粉（Blue Starch）测定淀粉酶同工酶等。这类方法其优点很多，在酶作用同时就显色，既方便又准确，较适合用于测定水解酶类。但是要合成合适的基质很不容易，其他酶类用这类方法也比较困难。其中吡啶类的磷酸和脂肪族羧酸的衍生物作为基质是测定ALP和非特异酯酶同工酶较好方法，比通用的萘酚磷酸酯重氮盐呈色法更为灵敏，它的水解产物吡啶被铁氰化钾氧化为鲜艳的靛兰，方法简单可以观察其呈色的动态过程。

其他电泳方法：

等电点聚焦：在目前是分辨力最高的一种电泳方法。用正常电泳只能将血清中NAG分为A、B二种，而用等电点聚焦还可将A B进一步分为多条。已有文献报导用此法分解LD、ALP和L-氨基酸氧化酶同工酶。但本法作为测定同工酶方法也存在着一些严重缺点：主要易引起酶变性，在等电点时，酶蛋白电荷为中性易沉淀变性，电泳时所用电压梯度较大，产热明显，同时往往以强酸强碱为起始缓冲液易引起标本中同工酶变性，这些问题在目前尚未能很好解决。此外应注意所用两性电解质ampholine可能和同工酶作用，引起人为变化并不是真正的同工酶。

二相电泳：这是最近推荐的一种高分辨力分离方法。一

般先进行等电点聚焦，以后第二相进行 S D S 聚丙烯酰胺凝胶电泳。已分离出不少有临床意义的异常蛋白，由于 S D S 有使酶蛋白解聚作用酶活力下降。因此直接用于同工酶测定有困难，但原则上是可以应用的。

（二）层析法：电泳法虽操作简单，但标本用量不可能太大，所以在提纯时多用层析法。特别是离子交换层析法，具有试剂操作简单，分离效果好，标本用量大等优点，用于测定同工酶也可以弥补电泳法定量不太准的不足。例如有一些酶由于测定方法灵敏度差，用电泳由于加标本量有限往往测不出来，而层析法就可以用较大量标本，同时测定层析后洗脱液中酶活力也比较简单，完全可以利用一般测定酶的方法进行。不象电泳法那样常需设计一些比较复杂的方法才能呈色出现酶谱。从定量角度来看，层析法结果显然优于电泳呈色法。但层析法操作比较麻烦，要正确测定各个酶峰和区带，一个标本往往要作数次乃至十余次的测定，通过绘图才能看出，远没有电泳法简单明确。在显示异常区带或出现微小变化时，层析法也往往不易查出。

离子交换层析法：这是使用最多的一种层析法，常用的有阴离子交换剂 DEAE-Sephadex 和阳离子交换剂 CM-Sephadex 等，其中以阴离子交换剂最常用。提纯时常用盐类梯度将酶洗脱分离，一般说来其分离情况类似电泳，但分辨力较差，用于分析测定同工酶时，标本用量小往往使用小柱层析。其基本理论和操作技术同经典层析法，只是层析柱很小，有的内径只有 3 毫米。也可用 5 毫升吸管或者 2 毫升注射器外筒代替，适用于临床测定。有的方法用同一洗脱液可以同时测定乳酸脱氢酶、谷草转氨酶等几种同工酶。此

法已成功用于测定CPK—MB并已制成试剂盒供应临床使用。前几年,有的作者试图用DEAE-Sephadex分离LDH同工酶,但LDH₄和LDH₅不易分离。最近改QAE-Sephadex已成功分离五种LDH同工酶。此外有人用分批操作法(Batch法)。即在标本中直接加入各种吸附剂(最常用的为DEAE-Sephadex A—50),此时一部分同工酶被吸附,一部分未被吸附,可分别测定此二部分同工酶活力。此法虽然比较粗糙,但简单易行,如果应用得当可以符合临床需要。近年来,我们还引用了玻璃珠或树脂型的离子交换剂分离同工酶。

凝胶过滤层析:是分离和测定高分子同工酶的一种可靠方法。高分子ALP是一种在正常人血中查不到而多见于肝胆系统患者异常的酶,对黄疸诊断有一定价值。也用于检测巨淀粉酶,一般文献多用柱层法,操作麻烦标本用量大。我们用Sephadex G-200薄层层析测定血清中高分子ALP,证明比醋纤和PAGE电泳更为可靠。

亲和层析:

本法具有特异性高、操作简便等优点,广泛应用于提纯酶,但用来直接测定尚不多见。近年来,科学家们对用植物凝集素(lectin)分离酶蛋白给予较多注意。一些酶特别是和膜结构结合的酶,如ALP、 γ GT和LAP往往是糖蛋白。不同同工酶所结合的多糖不一定一样,如用ConA-Sepharose 4B进行分离,可以观察到成年和胚胎期肝中NGT和多糖结合有明显差异。其他亲和试剂如Cibacon Blue F 36—A或Blue Sepharose CL—6B也广泛用于酶的分离。它含有能和核苷酸辅酶结合的配基,LDH₁很易用NAD或

AMP洗下;相反LDH₅仅当使用NADH时才能洗下。ADH₁, ADH₂和ADH₃在此柱上吸附能力也顺序相减,又用AMP-Sepharose分离LDH_x,在1.6mmoles/L以NAD为洗脱液时很易从此柱上洗下。

近年来有人将亲和作用和电泳方法结合起来。将ConA-Sepharose放在淀粉胶中,含糖化合物由于和凝集素作用,电泳速度变慢。NAG-C和NAG-A、B用此法也容易分开。

(三) 其他分离方法:

七十年代末期,有人成功地用高效液相色谱法分解LDH和CPK同工酶,具有时间短分辨力高等优点。在目前还存在试剂用量大需要一定仪器和技术等缺点,但有一定发展前途。

超速离心机也可用于分离同工酶。文献报导用超速离心机可将高分子ALP进一步分为二类。一类在超速离心后上浮证实是ALP和脂蛋白复合物。另一类则下沉和膜结构相结合。看来用此法特别适合于研究各种同工酶和细胞亚显微结构间的关系。

利用同工酶催化性质的不同来测定同工酶

现已知道同工酶并不具有相同的生理功能,它们只是催化同一化学反应,但催化性质可有差别,临床化学家们可以利用这些差异测定各种同工酶和基质反应的差异。一些特异性低的酶,特别是族或键特异性酶、如ALP和羧基酯酶对不同的基质亲和力常有明显差异。早在1934年就发现从红血球