

健康体检中心建设与 规范化运行管理实用手册

JIANKANGTIJIANZHONGXINJIANSEHEYUGUIFANHUAYUNXINGGUANLISHIYONGSHOUCE



银声音像出版社

健康体检中心建设 与规范化运行管理实用手册

主编：余绍卫

本书是《健康体检中心建设与规范化运行管理实用手册》光盘的使用说明和对照阅读手册

(第四卷)

银声音像出版社

单位:

$$\text{样品的酶单位/升} = \frac{\text{产物的生成量}}{\text{每一酶单位规定的产物生成量}} \times \frac{\text{每一酶单位所规定的温育时间}}{\text{酶反应温育时间}}$$

$$\text{样品的酶单位/升} = \frac{\frac{1\,000\text{ (ml)}}{\text{酶反应时样品实际用量 (ml)}} \times \frac{\text{测定管吸光度} - \text{对照管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \text{标准液含量} \times \frac{1}{\text{酶反应温育时间}}}{\frac{1\,000\text{ (ml)}}{\text{酶反应时样品实际用量 (ml)}}}$$

2) 吸光系数法: 根据吸光系数的定义, 测得的吸光度除以吸光系数即得其浓度。

①定时法: 样品的酶活力单位按下式计算:

$$\text{IU/L} = (\text{测定管吸光度} - \text{对照管吸光度}) \times \frac{\text{每一酶单位所规定的时间}}{\text{酶反应温育时间}} \times \frac{10^6}{\epsilon} \times \frac{\text{TV}}{\text{L} \times \text{SV}}$$

式中 TV: 反应系统总体积 (ml); SV: 反应系统中样品体积 (ml);

L: 光径 (cm); 10^6 : 将 mol 换算成 μmol ;

ϵ : 被测物 (产物或底物) 在特定波长下的摩尔吸光系数

②连续监测法: 测出在线性反应期 (线性范围) 内的每分钟吸光度变化值 ($\Delta A/\text{min}$), 则可按下式计算出样品的酶活力单位:

$$\text{IU/L} = \Delta A/\text{min} \times \frac{10^6}{\epsilon} \times \frac{\text{TV}}{\text{L} \times \text{SV}}$$

通常情况下, 线性反应期内吸光度的增加速率以 $\Delta A/\text{min}$ 表示, 吸光度的下降速率以 $(-\Delta A/\text{min})$ 表示。以连续监测法测定血清乳酸脱氢酶为例, 计算期活力。

操作: 血清 0.05ml, 加 37℃ 预温度物应用液 1.0ml, 混匀。立限吸入自动分析仪中进行测定 (血清稀释倍数为 21)。或放入具有恒温装置的紫外分光光度计中 (波长为 340nm, 光径为 1.0cm, 37℃), 孵育 30 秒后, 读取初始吸光度 (A_0), 同时开始计时, 在精确 1, 2, 3 分钟时, 分别读取吸光度 A_1 、 A_2 、 A_3 , 确定每分钟平均吸光度变化值 ($\Delta A/\text{min}$)。

计算:

$$\Delta A/\text{min} = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3}$$

$$\text{LD (IU/L)} = \Delta A/\text{min} \times \frac{10^6}{6\,220} \times \frac{1.05}{1.0 \times 0.05} = \Delta A/\text{min} \times 3\,376$$

式中 6 220 为被测物 NADH (产物) 在 340nm 的摩尔吸光系数。

②平衡法: 样品的酶活力单位计算同定时法, 但要去除时间一项。

(二) 酶活力测定影响因素

1. 样品

(1) 溶血 红细胞中某些酶的活性比血浆高, 如 LD 约高 100 倍, ALT 和 AST 分别高 7 倍和 15 倍。因此, 溶血标本对这些测定有影响。

(2) 抗凝剂 某些酶可被抗凝剂抑制, 如 EDTA 可抑制需钙离子的 AMY 和需镁离

子的 CK、磷酸酶等；草酸盐也可抑制 LD。因此，一般都采用血清标本，确实需要使用血浆标本时，则应使用肝素抗凝剂。

(3) 样品存放时间 各种血清酶的稳定性不同，表 9-3-30 列出了 5 种血清酶的稳定性。

表 9-3-30

5 种血清酶的稳定性 (天数)

血清酶	室温	4℃	-20℃
丙氨酸氨基转移酶	2	14	30
门冬氨酸氨基转移酶	2	14	30
淀粉酶	2	60	60
碱性磷酸酶	0.5	6	600
乳酸脱氢酶	3	7	30

2. 设定条件

酶活力易受测定条件，如温度、pH、底物浓度等影响。因此，在酶活力测定时，要控制在最佳条件（如最适温度、最适 pH 等）下进行。在最佳条件下，不仅酶的活力最高，相对误差最小，而且酶活力受测定条件变化的影响也最小。由于生物化学已介绍过酶浓度、温度、pH、底物浓度、激活剂和抑制剂等因素对酶促反应速度的影响，在此重点介绍底物浓度对酶活力影响的米氏方程式。

1913 年，Michaelis 和 Menten 根据酶作用的中间产物学说，提出了酶反应速度与底物浓度关系的数学公式，即米-曼公式（或米氏方程式）：

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

式中 v 为反应速度， V_m 为最大反应速度， $[S]$ 为底物浓度， K_m 为米氏常数。米氏常数是酶学研究中一个极其重要的数据， K_m 在数量上等于酶促反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度，其单位是 mol/L 或 mmol/L。

K_m 是酶的重要特征性常数，它只与酶的性质有关，而与酶的浓度无关。当 pH、温度和离子强度等因素不变时， K_m 值是比较恒定的。纯度不同的同种酶，其 K_m 也相差不大。不同的酶有不同的 K_m 值。同一种酶有几种底物时，则对每一种底物各有一个特定的 K_m 值，其中 K_m 值最小的底物一般称为该酶的最适底物或天然底物。 K_m 值可近似地表示酶对底物的亲和力， K_m 值越小，表示亲和力越大； K_m 值越大，表示亲和力越小。显然天然底物与酶的亲和力最大，实验中不需要很高的底物浓度就可以达到最大反应速度（ V_m ），也可以满足实验所需要的底物浓度。通常测定酶活力的底物浓度应为 K_m 值的 10 倍以上，即 $[S] \geq 10K_m$ ，此时酶促反应速度（ v ）可以达到最大反应速度（ V_m ）的 90% 以上。

综合分析酶的特性和酶活力测定的方法、原理，测定酶活力时必须注意以下几点：

(1) 要规定一定的反应条件，如温度、pH、反应时间等，并在酶活力测定过程中保持这些反应条件的恒定，如温度不得超过规定温度的 $\pm 1^\circ\text{C}$ ，pH 值应恒定在该酶的最适 pH 值范围内，反应时间必须十分准确等。

(2) 标本更新鲜，由于绝大多数酶可因久置而使其活力降低，降低程度与各种酶的

稳定性有关。因此,标本若无法及时测定,应保存在冰箱中。用血浆时还应考虑到抗凝剂对酶反应的影响。有些酶在血细胞、血小板中的浓度比血清高,为此在采血、分离血清时应注意防止溶血和白细胞的破裂。

(3) 配制的底物浓度应准确且足够大,底物液中应加入不抑制该酶活力的防腐剂,并保存在冰箱中,以防止底物被分解或变质。

(4) 在测定过程中,所用器材应绝对清洁,不应含有酶的抑制物,如酸、碱、蛋白沉淀剂等。

(5) 无论是采用定时法,还是采用平衡法和连续监测法,首先都要测定酶反应的时间曲线,避开延滞期和非线性期,使酶活力测定在线性反应期内进行;同时还要确定该方法能够测定酶活力的最高限度,对超过这一限度的样品,或是减少样品用量,或是缩短反应时间,或是将样品稀释后重测,以确保测定在线性反应期内进行。由于只有酶促反应过程中最初一段时间内的反应速度与酶浓度成正比(随着反应时间的延长,由于底物浓度的减少和产物浓度的增加,反应速度将逐渐降低)。因此,测定酶活力时,酶作用的时间通常在 30 分钟以内,不宜超过 60 分钟。

(6) 测定酶活力时,应正确设计适当的对照管,以消除所测得结果中非酶促反应生成的那一部分。测定管中的产物量必须减去对照管中的产物量才是由酶催化生成的产物量。常用的对照有样品对照、底物对照和时间对照,应用时可根据具体情况予以选择。

1) 样品对照:临床上测定酶活力的样品大多数量体液,其中含有多种酶的成分,也可能含有一些待测定的产物,还可能在反应体系中通过旁路反应生成相同的产物,这些都可以设计不加底物、只加样品的样品对照管予以抵消。

2) 底物对照:某些酶的底物能自发地部分分解为统一的待测产物,这可通过不加样品、单加底物的底物对照管予以抵消。

3) 时间对照:待测样品中既有其它酶的存在,又有统一的待测产物,且有底物自发分解的情况并存,则必须做一个含有酶和底物但反应时间为零的对照管。也可以先用蛋白沉淀剂或其它试剂停止反应后,再加底物予以抵消。

(三) 血清酶活力测定的标准化和质量控制

1. 血清酶活力测定的标准化

血清酶活力测定的标准化可从两方面考虑。一方面是为各实验室提供一种活性稳定的酶作为标准品来鉴定和校正各实验室的测定条件,以达到规定的要求。这种作为标准品的酶应该来源于人体或经实验证明与人体酶的动力学行为极其相似,并达到一定纯度,酶的介质必须是动物血清,最好是人血清,其中 ALT、AST、GGT、ALP、LD 和 CK 等国外已有商品化的参考品;另一方面是由国家或地区推荐统一的测定方法。被推荐的这种测定方法通常要有较高的准确性和实用性,并能为大多数实验室所接受,一般以 IFCC 推荐的方法为准,也可结合我国实际提出相近的方法。1990 年我国卫生部医政司颁布了《全国临床检验操作规程》(第一版),1997 年又颁布了第二版,其中对临床生化检验常用的 16 种酶提出了 30 种方法,可以认为我国在酶活力测定的标准化方面又向前迈进了一步,也为今后酶活力测定的质量控制奠定了基础。

2. 血清酶活力测定的质量控制

临床生化检验中的血清酶活力测定的质量控制越来越被得到重视,但由于血清酶活力测定越来越多,酶的测定方法多种多样,且有各自的单位定义和正常参考值,加上对这些测定方法及其测定条件(如温度、pH、缓冲体系、底物浓度及辅酶浓度等)未作明确的规定,以及大多数酶又无标准品和参考品等原因,使得酶活力测定的质量控制难以进行。由于酶活性的降低可以是酶本身变性失活的结果,也可以是测定条件变化的结果,因此,在酶活力测定的质量控制中最重要的的是要提供一种可靠的质控酶(对质控酶的要求是:在规定的期限内酶活性是稳定不变的,并能对测定条件的变化作出敏感的反应)。除此也可在每次测定样品时同时插入1~2个上次已经测定过的标本,通过比较两次测定结果来进行质量控制。一般情况下,第二次结果要低于第一次,但两次结果差异应 $<10\%$ 。如果酶的活力比较高,则天与天之间的变异系数应 $<5\%$ 。

(四) 酶活力测定的应用

酶活力测定已广泛应用于消化系统、心血管、骨骼、肌肉、肾脏等器官和组织的疾病与恶性肿瘤的诊断。

1. 在诊断肝胆疾病中的应用

肝是机体新陈代谢最活跃的器官,这是由于肝细胞中含有最丰富的酶类。当肝细胞损伤时,由于细胞内酶的释放或合成减少,可导致相关血清酶含量的变化。因此,临床上已应用肝组织专一性酶或相对专一性酶来作为判断肝细胞损伤的指标,如ALT和AST,其中ALT被认为是肝细胞损伤最敏感的指标之一。已知肝细胞损伤时ALT与AST均释出较多,使其在血清中的含量增多。

另有一些酶类在肝细胞损伤时往往表现出活性降低,如胆碱酯酶(ChE)、卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(LCAT),在急性肝炎和失代偿性肝硬化时可分别降至正常的30%~50%及50%~80%。

上述酶类的测定主要用于反映肝细胞的结构和功能,而血清ALP、GGT、5'-核苷酸酶(5'-NT)主要用于胆道疾病特别是胆道阻塞时的临床诊断。单胺氧化酶(MAO)是结缔组织中的酶类,其活性测定可用于肝纤维化程度的判断。

2. 在诊断心肌梗死中的应用

用于诊断心肌梗死的血清酶主要有AST、乳酸脱氢酶同工酶1(LD₁)、肌酸激酶同工酶2(CK-2或CK-MB)。这主要基于它们的器官特异性。AST广泛分布于机体各组织中,但在心肌中的含量最多。LD是低度特异性酶类,但LD₁在心肌中的百分含量最高。当心肌梗死时,正常血清的LD₂>LD₁的情况会转变成LD₁>>LD₂。CK-MB在机体中除腓肠肌外,在心肌中含量第二,心肌梗死时,血清CK-MB可增高10~25倍,阳性率为100%。而肝肾疾病、肺梗塞或溶血等情况CK-MB均不升高。因此,在上述3种常用酶测定中,CK-MB是诊断心肌梗死最佳的血清酶指标。

线粒体型门冬氨酸氨基转移酶(m-AST)与心肌梗死并发心力衰竭的发病率和死亡率有正比关系,尤其在预测死亡率方面较测定血清CK-MB更有价值。

3. 在诊断胰腺疾病中的应用

用于诊断胰腺疾病的血清酶主要有AMY和脂肪酶(LPS)。这两种酶均来自胰腺泡的分泌。在急性胰腺炎时,血清(尿)AMY显著增高。伴有高血脂的急性胰腺炎和静

止性慢性胰腺炎，血清与尿液中的 AMY 活性正常。

LPS 的改变在胰腺炎时与 AMY 相平行。由于其它急腹症时该酶活性并不增高，因此，诊断胰腺炎的特异性较高。LPS 分子量较大不易通过肾小球进入尿液，因此，尿中检测不出 LPS。

4. 在诊断骨骼疾病中的应用

ALP 属于低度特异性酶，在各种骨骼疾病中血清 ALP 均表现上升，特别是成骨肉瘤及畸形骨炎，可分别增至正常的 45 倍与 30 倍。严性肿瘤骨转移、骨质软化症、佝偻病患者血清 ALP 都有不同程度的增加。因此，ALP 是各种骨骼疾病最重要的酶学诊断指标。

5. 在诊断前列腺疾病中的应用

酸性磷酸酶 (ACP) 主要分布于前列腺、红细胞、血小板等。成年男性血清中 1/3 ~ 1/2 的 ACP 来自于前列腺。因此，ACP 是诊断前列腺疾病，特别是诊断前列腺癌的最重要指标。

6. 在诊断肿瘤中的应用

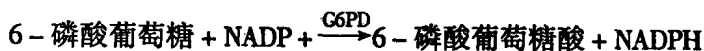
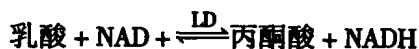
在肿瘤发生、发展及组织癌变过程中，与细胞正常分化、增殖功能有关的酶或同工酶活性下降或消失，并出现肿瘤组织中的同工酶（胚胎型同工酶、胎盘型同工酶和异位型同工酶）升高。恶性肿瘤患者血清某些酶活性的改变机制比较复杂。因此，至今没有十分特异的酶用于某种恶性肿瘤的诊断。随着酶学检测技术的发展，同工酶的检测可望成为某种恶性肿瘤的特异性诊断指标。

(五) 工具酶

在许多酶反应中，底物或产物的变化量往往很难直接测定，常需要在反应体系中加入一些能与产物作用但又不干扰酶反应的试剂。这些试剂通常是酶及其底物，使第一个酶反应的产物转变为易于检测的第二个酶或第三个酶的产物。通过这种偶联反应来间接测定第一个酶的待测物浓度或待测酶活性。这种作为试剂用于测定待测物浓度或待测酶活性的酶称为工具酶。常用的工具酶主要是氧化还原酶类，因为这些酶的产物最易直接检测。此外，部分转移酶类和水解酶类也可用作工具酶。下面介绍几种常用的工具酶及其指示反应。

1. NAD (P)⁺ 或 NAD (P) H 偶联的脱氢酶及其指示反应

最常用的作为工具酶的脱氢酶是乳酸脱氢酶 (LD)、苹果酸脱氢酶 (MDH)、谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PD)，这些酶都以 NAD (P)⁺ 或 NAD (P) H 为辅酶。其催化的反应式如下：



NADH 和 NADPH 在 340nm 有较强的紫外光吸收特性，而 NAD⁺ 和 NADP⁺ 在此波长

吸收较弱。因此,可用紫外分光光度法直接测定 NADH 和 NADPH 的变化量。由于 NADH 和 NADPH 在 340nm 紫外线激发下还可产生强烈的蓝色荧光,其荧光波长为 460nm,而 NAD^+ 和 NADP^+ 不被激发,故还可通过荧光法来测定 NADH 和 NADPH 的变化量。荧光法的灵敏度较分光光度法高出 2~3 个数量级,分光光度法只能测出 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{mol/L}$,而荧光法可测出 $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

2. 偶联 H_2O_2 的工具酶及其指标反应

葡萄糖氧化酶、尿酸酶、甘油氧化酶和胆固醇氧化酶等分别作用于葡萄糖、尿酸、甘油和胆固醇,使其氧化产生 H_2O_2 , H_2O_2 在过氧化物酶 (POD) 的作用下使色素原 (如 4-氨基安替比林 + 酚) 氧化显色。这一反应是 Trinder 提出的,故称为 Trinder 反应。上述提到的各种酶均为工具酶,其中 POD 的作用可产生呈色物质,又称为指示酶。Trinder 反应式如下:



上述 Trinder 反应中的酚还可使用 2, 4-二氯苯酚、2, 6-二氯苯酚、2-羟基-3, 5-二氯苯磺酸等代替,且反应的灵敏度可得到提高。

二、血清氨基转移酶测定

氨基转移酶又称转氨酶,在机体内多达 60 余种,广泛分布于人体各组织。其中以丙氨酸氨基转移酶 (ALT 或 GPT) 和门冬氨酸氨基转移酶 (AST 或 GOT) 两种最为重要,它们催化机体内氨基酸的转氨基反应:



AST 有两种受不同基因控制的同工酶,分别存在于细胞质 (c-AST) 和线粒体 (m-AST) 中。而一般认为,ALT 不存在同工酶,我国学者证实,在人组织和血清中也存在类似 AST 的两种同工酶,即细胞质 ALT (c-ALT) 和线粒体 ALT (m-ALT)。

氨基转移酶的测定方法可分为两类。一类是比色法,此法利用氨基转移酶作用后生成的 α -酮酸可与 2, 4-二硝基苯肼作用生成苯腙,苯腙在碱性条件下呈红棕色,显色的深浅可反映所生成的 α -酮酸量的多少,经比色测定可间接求得氨基转移酶的活力。另一类是速率法,此法利用氨基转移酶作用后生成的 α -酮酸 (如丙酮酸、草酰乙酸) 经工具酶乳酸脱氢酶 (LD) 或苹果酸脱氢酶 (MDH) 催化与 NADH 发生还原反应时,伴有 NAD^+ 的生成,由于 NADH 的氧化速率与标本中酶活力呈正比,因此,监测 340nm 波长下 NADH 的氧化速率,即可计算出氨基转移酶的活力。

(一) 血清丙氨酸氨基转移酶测定

1. 比色法 (赖氏法)

【原理】

ALT 催化丙氨酸与 α -酮戊二酸间的氨基移换反应,生成丙酮酸和谷氨酸:



经 30 分钟反应后,加入 2,4-二硝基苯肼终止反应,并与反应液中产生的丙酮酸及底物缓冲液中剩余的 α -酮戊二酸作用生成相应的 2,4-二硝基苯腙,两种苯腙在碱性条件下呈红棕色,其吸收光谱曲线有差别,在 500~520nm 处差异最大,以等摩尔浓度计算,丙酮酸苯腙的呈色强度约为 α -酮戊二酸苯腙的 3 倍。根据此特点可计算出丙酮酸的生成量,从而推算出 ALT 的活力。

【试剂】

1.0.1mol/L 磷酸氢二钠溶液 磷酸氢二钠(含两个结晶水)17.8g 溶解于水中,并加水至 1 000ml,冰箱内保存。

2.0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液 磷酸二氢钾 13.6g 溶解于水中,加水至 1 000ml,冰箱内保存。

3.0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4) 将 420ml 0.1mol/L 磷酸氢二钠溶液和 80ml 0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液混匀,加氯仿数滴,置冰箱内保存。

4.底物缓冲液(DL-丙氨酸 200mmol/L, α -酮戊二酸 2mmol/L) 精确称取 1.79g DL-丙氨酸和 29.2mg α -酮戊二酸,先溶于约 50ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液中,用 1mol/L 氢氧化钠(约 0.5ml)调节到 pH7.4,再加磷酸盐缓冲液至 100ml,置冰箱保存,可稳定 2 周。

每升底物缓冲液中可加入麝香草粉 0.9g 或加氯仿数滴防腐。置冰箱中至少可保存 1 个月。分装安瓿灭菌后,室温至少可用 3 个月。

5.1.0mmol/L 2,4-二硝基苯肼溶液 称取 19.8mg 2,4-二硝基苯肼,溶于 10ml 10mol/L 盐酸中,完全溶解后,加蒸馏水至 100ml,置棕色玻璃瓶,室温中保存。若有结晶析出,应重新配制。

6.0.4mol/L 氢氧化钠溶液 将 16.0g 氢氧化钠溶解于水中,并加水至 1 000ml,置具塞塑料试剂瓶内,室温中可长期稳定。

7.2mmol/L 丙酮酸标准液 准确称取 22.0mg 丙酮酸钠(AR),置于 100ml 容量瓶中,加 0.05mol/L 硫酸至刻度。

丙酮酸不稳定,开封后易变质,相互聚合为多聚丙酮酸,建议使用质量可靠的市售标准液。

【操作】

在测定前取适量的底物溶液,在 37℃ 水浴箱内预温 5 分钟后使用。具体操作按表 9-3-31 进行。

表 9-3-31

ALT 测定操作步骤

加入物(ml)	测定管	对照管
血清	0.1	0.1
底物溶液	0.5	-
混匀,在 37℃ 水浴箱中保温 30 分钟		
2,4-二硝基苯肼溶液	0.5	0.5
底物溶液	-	0.5

各管混匀后，置 37℃ 水浴保温 20 分钟，然后，每管加入 0.4mol/L 氢氧化钠 5.0ml，混匀，室温放置 5 分钟后，用分光光度计在波长 505nm 处，以蒸馏水调零点，读取各管吸光度。测定管吸光度减去样品对照管吸光度后，从标准曲线中查得 ALT 活力单位。

【标准曲线绘制】

1. 按表 9-3-32 操作。

表 9-3-32

ALT 各标准管的配制

加入物 (ml)	0	1	2	3	4
0.1mol/L 磷酸盐缓冲液	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
2mmol/L 丙酮酸标准液	—	0.05	0.10	0.15	0.20
底物缓冲液	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30
相当于酶活力 (卡门氏单位)	0	28	57	97	150

2. 各管加入 2, 4-二硝基苯肼溶液 0.5ml，混匀，37℃ 20 分钟后加入 0.4mol/L 氢氧化钠溶液 5.0ml。

3. 混匀，室温放置 5 分钟后，用分光光度计在波长 505nm 处，以蒸馏水调零点，读取各管吸光度。将各管吸光度均减去“0”管吸光度后，以所得吸光度差值为纵坐标，各管对应的酶活力卡门单位为横坐标，绘制成标准曲线。

【单位定义】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 为一个卡门单位（相当于 0.1608 μ molNADH 被氧化）。

【正常参考值】

5~25 卡门单位

【注意事项】

1. 血清中 ALT 在室温 (25℃) 可以保存 2 天，在 4℃ 冰箱可保存 2 周，在 -20℃ 可保存 1 个月。

2. 配制底物液时，根据酶的立体异构特异性，应选用 L-丙氨酸。如只有 DL-丙氨酸试剂，可加倍用量。

3. 由于一般血清标本中内源性酮酸含量很少，血清对照管吸光度接近于试剂空白管（以蒸馏水代替血清，其它和对照管同样操作），故成批标本测定时一般不需要每份标本都作自身血清对照管，以试剂空白管代替即可，但对超过正常值的血清标本应进行复查。复查时，每份标本都应作自身血清对照管。

严重脂血、黄疸及溶血血清可增加测定的吸光度；糖尿病酮症酸中毒病人血中因含有大量酮体，能和 2, 4-二硝基苯肼作用呈色，也会引起测定管吸光度增加，因此，检测此类标本时，应作血清标本对照管（即样品对照）。

4. 底物中的 α -酮戊二酸也能与 2, 4-二硝基苯肼反应，生成苯腙而显色。为了减少其对产物丙酮酸显色的干扰作用，降低了底物液中 α -酮戊二酸的浓度，但在酶活力很高的标本中，酶反应不能充分进行，因此标准曲线不呈直线，随着酶活力的增大，曲

线的斜率趋于平坦,测定结果的准确性也相应下降。故当血清标本 ALT 活力超过 150 卡门单位时,往往超出了标准曲线的直线段范围,此时应将血清用生理盐水稀释 5 倍或 10 倍后重测,其结果乘以稀释倍数。

5. 底物中的 α -酮戊二酸和显色剂 2, 4-二硝基苯肼均为呈色物质,称量必须很准确,每批试剂的空白管吸光度上下波动不应超过 0.015A,如超出此范围,应检查试剂及仪器等方面问题。

6. 呈色的深浅与 NaOH 的浓度有关,NaOH 浓度越大呈色越深,NaOH 浓度 < 0.25mol/L 时,吸光度下降变陡,因此 NaOH 浓度要准确。

7. 加入 2, 4-二硝基苯肼溶液后,应充分混匀,使反应完全。加入 NaOH 溶液的方法和速度要一致,如液体混合不完全或 NaOH 溶液的加入速度不同均会导致吸光度读数的差异。

8. 成批测定 ALT 时,各管加入血清后,试管架应置 37℃ 水浴中操作。以一定时间间隔向各管加入底物缓冲液,每管即时混匀。

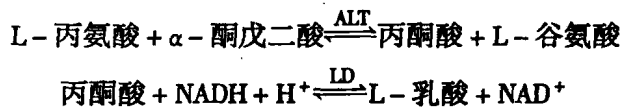
【附注】

本法无自身的酶活力单位,是根据本法中酮酸量及其吸光度值 (A) 与卡门单位的关系,而套用卡氏单位。

2. 速率法

【原理】

在 ALT 速率法测定中酶偶联反应式为:



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

本实验可采用单试剂法和双试剂法进行操作测定。

1. 单试剂法 单试剂法的原理是:血清与试剂成分完整的底物溶液混合,ALT 催化反应立即开始,在波长 340nm、比色杯光径 1.0cm、37℃ 经 90 秒延滞期后连续监测吸光度下降速率。根据线性反应期内吸光度下降速率 ($-\Delta A/\text{min}$),计算出 ALT 活力单位。

【试剂】

试剂成分和在反应液中的参考浓度:

pH	7.5
Tris 缓冲液	100mmol/L
L-丙氨酸	500mmol/L
α -酮戊二酸	15mmol/L
NADH	0.18mmol/L
磷酸吡哆醛 (P-5'-P)	0.1mmol/L (国内 ALT 试剂盒中没有这一成分)

LD 1 200U/L

市售 ALT 底物的复溶及保存：按试剂盒说明书规定。但起始吸光度必须大于 1.2A，试剂空白测定值必须小于 5U/L。达不到要求者，示为此试剂已不合格，不能使用。

【操作】

血清 0.1ml，加 37℃预温 ALT 底物溶液 1.0ml，混匀。立即吸入自动分析仪中进行测定（血清稀释倍数为 11），或放入具有恒温装置的紫外分光光度计中（波长为 340nm，光径为 1.0cm，37℃），孵育 90 秒后，读取初始吸光度（ A_0 ），同时开始计时，在精确 1、2、3 分钟时，分别读取吸光度 A_1 、 A_2 、 A_3 ，确定每分钟平均吸光度变化值（ $-\Delta A/\text{min}$ ）。

以半自动分析仪为例，主要参数为：

系数	1 768
孵育时间	90 秒
连续监测时间	60 秒
比色杯光径	1.0cm
波长	340nm
吸样量	500 μ l
温度	37℃

【计算】

$$\begin{aligned}\text{ALT (U/L)} &= (-\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{6\,220} \times \frac{1.1}{0.1} \\ &= (-\Delta A/\text{min}) \times 1\,768\end{aligned}$$

式中 6 220 为 NADH 在 340nm 的摩尔吸光系数。

2. 双试剂法 双试剂法和原理是：血清与缺少 α -酮戊二酸的底物溶液混合，37℃保温 5 分钟，使样品中所含的 α -酮酸（如丙酮酸）引起的副反应进行完毕。然后，加入 α -酮戊二酸启动 ALT 的催化反应，在波长 340nm 处连续监测吸光度下降速率。根据线性反应期吸光度下降速率（ $-\Delta A/\text{min}$ ），计算出 ALT 活力单位。

【试剂】

试剂成分	在反应液中的参考浓度
试剂（I）	
Tris 缓冲液	100mmol/L
L-丙氨酸	500mmol/L
NADH	0.18mmol/L
LD	1 200U/L
pH	7.3
试剂（II）	
α -酮戊二酸	15mmol/L

【操作】

血清 0.1ml，加试剂（I）1.0ml，混匀，37℃孵育 5 分钟。然后，加入试剂（II）

0.1ml, 混匀, 启动 ALT 催化反应。立即吸入自动分析仪中进行测定 (血清稀释倍数为 12)。或放入具有恒温装置的紫外分光光度计中 (波长为 340nm, 光径为 1.0cm, 37℃), 孵育 30 秒后, 读取初始吸光度 (A_0), 同时开始计时, 在精确 1、2、3 分钟时, 分别读取吸光度 A_1 、 A_2 、 A_3 , 确定每分钟平均吸光度变化值 ($-\Delta A/\text{min}$)。

以半自动分析仪为例, 主要参数为:

系数	1 929
孵育时间	30 秒
连续监测时间	60 秒
比色杯光径	1.0cm
波长	340nm
吸样量	500 μ l
温度	37℃

【计算】

$$\begin{aligned}\text{ALT (U/L)} &= (-\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{6\,220} \times \frac{1.2}{0.1} \\ &= (-\Delta A/\text{min}) \times 1\,929\end{aligned}$$

【正常参考值】

5 ~ 40 U/L。

【临床意义】

ALT 广泛分布于全身各组织器官, 尤以肝脏含量最为丰富, 如以血清 ALT 的比活性为 1 计, 其它组织的比活性依次为: 肝 (2 850)、肾 (1 200)、心 (450)、骨骼肌 (300)、胰 (130)、脾 (80)、肺 (14) 和红细胞 (7)。肝组织的 ALT 主要存在于肝细胞的可溶性部分 (溶胶), 当肝脏受损时, 此酶可释放入血, 导致血中该酶活力显著增高, 故测定 ALT 常作为判断肝细胞损伤的灵敏指标, 临床上常用 ALT 来作为诊断肝疾病, 特别是急性传染性肝炎的灵敏性和特异性指标。但其它疾病或因素亦会引起 ALT 不同程度的增高。

1. ALT 活性在下列疾病可见增高:

(1) 肝胆疾病: 急性病毒性肝炎、慢性活动型肝炎、脂肪肝、肝癌、肝硬变活动期、中毒性肝炎、胆结石、胆管炎和胆囊炎等。

(2) 心血管疾病: 急性心肌梗死、急性心肌炎、急性心力衰竭、脑出血等。

(3) 骨骼肌疾病: 多发性肌炎、进行性肌营养不良等。

2. 一些药物和毒物可引起 ALT 活性升高, 如氯丙嗪、异菸肼、苯巴比妥、奎宁、水杨酸制剂及酒精、铅、汞、四氯化碳或有机磷等。

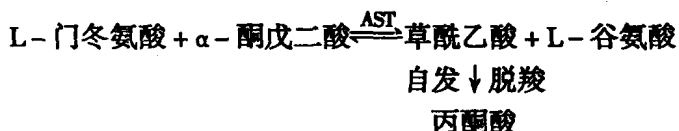
3. 血清 ALT 与 AST 联合测定并计算其比值有助于对某些疾病的鉴别。正常情况下 ALT/AST 比值小于 1, 但在传染性肝炎及其它原因引起的肝脏炎症时, ALT/AST 比值升高。肝硬化、肝癌、进行性肌营养不良、皮炎时, AST 升高的幅度高于 ALT。

(二) 血清门冬氨酸氨基转移酶测定

1. 比色法 (赖氏法)

【原理】

AST 催化门冬氨酸与 α -酮戊二酸间的氨基移换反应,生成草酰乙酸和谷氨酸;草酰乙酸经非酶促反应自发脱羧生成丙酮酸。反应式如下:



经 60 分钟反应后,加入 2,4-二硝基苯肼终止反应,并与反应液中的两种 α -酮酸(丙酮酸、 α -酮戊二酸)生成相应的 2,4-二硝基苯腙。在碱性条件下,两种苯腙的吸收光谱曲线有差别,在 500~520nm 处差异最大,丙酮酸所生成的苯腙的呈色强度显著大于 α -酮戊二酸苯腙。据此可用比色法测定 AST 活力。

【试剂】

1. 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)。

2. AST 底物溶液 (DL-门冬氨酸 200mmol/L, α -酮戊二酸 2mmol/L) 精确称取 2.66g DL-门冬氨酸和 29.2mg α -酮戊二酸,置于一小烧杯中,加入 1mol/L 氢氧化钠约 1.5ml,溶解后加 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液约 80ml,用 1mol/L 氢氧化钠调节至 pH7.4,然后将溶液移入 100ml 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液稀至刻度,放置冰箱保存。

3. 1.0mmol/L 2,4-二硝基苯肼溶液。

4. 0.4mol/L 氢氧化钠溶液。

5. 2mmol/L 丙酮酸标准液。

【操作】

同 ALT 比色测定法,但酶促反应作用时间改为 60 分钟,查 AST 标准曲线求得 AST 活力单位。

【标准曲线绘制】

按表 9-3-33 向各管加入相应试剂。其余步骤同 ALT 标准曲线的绘制。

表 9-3-33

AST 各标准管的配制

加入物 (ml)	0	1	2	3	4
0.1mol/L 磷酸盐缓冲液	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
2mmol/L 丙酮酸标准液	0	0.05	0.10	0.15	0.20
底物缓冲液	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30
相当于酶活力 (卡门单位)	0	24	61	114	190

【正常参考值】

8~28 卡门单位

【注意事项】

1. 配制 AST 底物溶液时,若用 L-门冬氨酸,称量为 1.33g。

2. 本法的缺点是当标本 AST 活性增高时,草酰乙酸会对 AST 显示反馈抑制,使测定结果偏低;酮血症血清标本应做对照管,以防测定结果假性增高。

3. 其它注意事项同赖氏法测定 ALT 实验中的注意事项。

2. 速率法

【原理】

采用酶偶联反应测定血清 AST 活力。L- 门冬氨酸和 α - 酮戊二酸在 AST 作用下, 生成草酰乙酸和 L- 谷氨酸。草酰乙酸在苹果酸脱氢酶 (MDH) 作用下生成 L- 苹果酸, 同时伴有 NADH 转化为 NAD^+ 。在 340nm 波长下, 监测 NADH 的氧化速率, 从而可计算出 AST 的活力大小。

本实验采用双试剂法, 其原理是: 血清与缺少 α - 酮戊二酸的底物溶液混合, 37℃ 保温 5 分钟, 使样品中所含的 α - 酮酸引起的副反应进行完毕。然后, 加入 α - 酮戊二酸启动 AST 的催化反应, 在波长 340nm 处连续监测吸光度下降速率, 根据线性反应期内吸光度下降速率 ($-\Delta A/\text{min}$), 来计算出 AST 活力单位。

【试剂】

试剂成分	在反应液中的参考浓度
试剂 (I)	
Tris 缓冲液	80mmol/L
L- 门冬氨酸	240mmol/L
NADH	0.18mmol/L
MDH	> 600U/L
LD	> 600U/L
pH	7.8
试剂 (II)	
α - 酮戊二酸	12mmol/L

【操作】

1. 血清 0.1ml, 加试剂 (I) 1.0ml, 混匀, 37℃ 孵育 5 分钟。然后, 加入试剂 (II) 0.1ml, 混匀, 启动 AST 催化反应。立即吸入自动分析仪中进行测定 (血清稀释倍数为 12)。或放入具有恒温装置的紫外分光光度计中 (波长为 340nm, 光径为 1.0cm, 37℃), 孵育 30 秒后, 读取初始吸光度 (A_0), 同时开始计时, 在精确 1、2、3 分钟时, 分别读取吸光度 A_1 、 A_2 、 A_3 , 确定每分钟平均吸光度变化值 ($-\Delta A/\text{min}$)。

2. 以半自动分析仪为例, 主要参数为:

系数	1 929
孵育时间	30 秒
连续监测时间	60 秒
比色杯光径	1.0cm
波长	340nm
吸样量	500 μl
温度	37℃

【计算】

$$\text{AST (U/L)} = (-\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{6\ 220} \times \frac{1.2}{0.1}$$

$$= (-\Delta A/\text{min}) \times 1929$$

【正常参考值】

8~40U/L。

【注意事项】

见 ALT 测定

【临床意义】

AST 广泛分布于全身各组织器官，在心肌细胞内含量最多，如以血清 AST 的比活性为 1 计，其它组织的比活性依次为：心 (7 800)、肝 (7 100)、骨骼肌 (5 000)、肾 (4 500)、胰 (1 400)、脾 (700)、肺 (500) 和红细胞 (15)。AST 主要定位于线粒体和胞浆中，即线粒体型 AST (m-AST) 和胞浆型 AST (c-AST)。当心肌梗死时，血清中 AST 活力增高，在发病后 6~12 小时之内显著增高、在 16~48 小时达到高峰，约在 3~5 天恢复正常。血清中的 AST 也可来源于肝细胞，各种肝病可引起血清 AST 的升高，有时可达 1 200 卡门单位，中毒性肝炎还可更高。肌炎、胞膜炎、肾炎及肺炎等也可引起血清 AST 的轻度增高。

AST 与 ALT 联合测定有助于急性心肌梗死和肝病的鉴别，急性心肌梗死患者 AST 活力升高幅度较大，而 ALT 正常或轻度升高；AST 与 CK-MB、LD 等联合测定有助于对急性心肌梗死的病程判断。

三、血清 γ -谷氨酰基移换酶测定

γ -谷氨酰基移换酶 (GGT 或 γ -GT)，亦称 γ -谷氨酰转肽酶。它主要催化末端含有谷氨酸，并由其 γ -羧基形成肽键的多肽类或含有此肽键的其它化合物 (统称为供体)，使其分子上的 γ -谷氨酰基转移至另一些氨基酸、多肽或其它化合物、甚至是底物本身或水 (统称为受体) 分子上，从而合成体内所需的一些生化物质。GGT 是参与 γ -谷氨酰循环的第一个酶，其天然底物是谷胱甘肽。其催化反应 (举例) 如下：

γ -谷氨酰-3-羧基-对硝基苯胺 + 双甘肽 $\xrightarrow{\text{GGT}}$ γ -谷氨酰-双甘肽 + 3-羧基-对硝基苯胺

测定 GGT 活力的方法主要有两种，即比色法和速率法。

(一) 比色法**【原理】**

本法以 L- γ -谷氨酰- α -萘胺为底物，在 GGT 的催化下， γ -谷氨酰基转移到双甘肽分子上，同时释放出游离的 α -萘胺，后者与重氮试剂反应，产生红色化合物，其色泽深浅与酶活力浓度成正比。测出 α -萘胺的含量，即可求出 GGT 活力。

【试剂】

1.150mmol/L Tris, 60mmol/L 双甘肽溶液 称取 Tris 9.1g, 双甘肽 3.96g, 溶于 400ml 蒸馏水中，再加蒸馏水至 500ml，加少许氯仿防腐，置冰箱保存，此液 pH 约 8.0 (25℃)。

2.1mol/L HCl。

3. 底物缓冲液 称取 L- γ -谷氨酰- α -萘胺(无结晶水, MW272.3) 217mg, 置于小烧杯中, 加入 1mol/L 盐酸约 4ml, 使其完全溶解, 再加入上述 Tris 双甘肽溶液 90ml, 于 25℃ 用 1mol/L HCl 调节至 pH8.0 $\pm$ 0.1, 然后加蒸馏水至 100ml (此液在 37℃, pH 为 7.8~7.9), 置 4℃ 冰箱保存。

4. 2g/L 对氨基苯磺酸醋酸溶液 称取对氨基苯磺酸 2.0g 溶解于蒸馏水 400ml 中(需加热助溶), 冷却后加冰醋酸 200ml, 再加蒸馏水稀释到 1 000ml, 置 4℃ 冰箱保存。

5. 1.0g/L 亚硝酸钠溶液 称取亚硝酸钠 0.1g 溶于少量蒸馏水中, 然后用蒸馏水定容到 100ml。置 4℃ 冰箱保存, 约可使用 1 周。

6. 显色剂 临用时取 1.0g/L 亚硝酸钠溶液 4ml, 加 2g/L 对氨基苯磺酸醋酸溶液 100ml, 充分混匀即可。

7. 1.5mmol/L α -萘胺标准贮存液 精确称取 α -萘胺 214.8mg, 置 1 000ml 烧杯中, 加无水乙醇 50ml 溶解, 然后加蒸馏水约 600ml, 立即充分混匀, 定量移入 1 000ml 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 混匀。置棕色瓶中, 4℃ 冰箱保存。

8. 0.15mmol/L α -萘胺标准应用液 吸取 1.5mmol/L α -萘胺标准贮存液 10ml, 用底物缓冲液定容至 100ml。

【操作】

按表 9-3-34 操作。

表 9-3-34

GGT 比色法操作步骤

加入物 (ml)	测定管	对照管
血清	0.05	-
底物缓冲液 (37℃ 预热)	0.5	0.5
37℃ 水浴, 准确 15 分钟		
显色剂	5.0	5.0
血清	-	0.05

以上各管混匀后, 放置 10 分钟, 在波长 530nm, 比色杯光径 1.0cm, 用对照管调零, 读取测定管吸光度, 查标准曲线。

【标准曲线绘制】

按表 9-3-35 操作。

表 9-3-35

GGT 标准曲线绘制操作步骤

加入物 (ml)	对照管	1	2	3	4	5
α -萘胺标准应用液	-	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
底物缓冲液	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	-
蒸馏水	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
显色剂	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
相当于 GGT (U/L)	0	20	40	60	80	100