

家畜内科丛书

吴维芬 史德浩



兽医血清酶学 检验技术

7-51
农业出版社

家畜内科丛书

兽医血清酶学检验技术

吴维芬 史德浩

前 言

家畜内科疾病种类多，发病率高，直接影响畜牧业生产的发展，并造成经济上损失，因此，家畜内科疾病及其防治，一向受到兽医工作者的注意与重视。

随着畜牧业生产的发展与科学的进步，为满足基层兽医工作者的需要，中国畜牧兽医学学会家畜内科研究会与农业出版社协作配合，组织和出版一套《家畜内科丛书》。本丛书的读者对象以县、区、乡级兽医工作者为主，同时兼顾大、中专院校兽医专业师生以及职业中学、养畜专业户。

这套丛书由四十多个分册组成，内容包括家畜消化器官疾病、泌尿器官疾病、呼吸系统疾病、血液循环系统疾病、神经系统疾病、代谢性疾病以及中毒性疾病等。编写采用一书一题的形式，每个分册独立成篇，各分册间又互有联系。内容着重介绍国内外兽医内科及诊断方面的先进理论和技术，以求提高基层兽医人员的理论水平和实际操作能力，读者可以根据自己的需要选购。

本套丛书从一九八五年起陆续出版，真诚地欢迎读者提出宝贵意见，以改进我们的工作。

中国畜牧兽医学学会家畜内科研究会

目 录

前言

第一章 血清酶学概述	1
一、血清(浆)中的特异酶类	3
二、血清中的非特异酶类	3
第二章 酶学检验基础	5
一、酶学检验的基本原理	5
二、酶的单位	6
三、影响酶检验的基本因素	7
四、样品	8
五、酶学检验的质量控制	10
第三章 兽医临床上常用血清酶的检验	13
一、谷-丙转氨酶的测定	13
二、谷-草转氨酶的测定	21
三、乳酸脱氢酶及其同功酶的测定	28
四、血清碱性磷酸酶及其同功酶的测定	43
五、精氨酸酶的测定	55
六、肌酸磷酸激酶的测定	59
七、 α -淀粉酶的测定	64
八、醛缩酶的测定	67
九、 γ -谷氨酰转肽酶的测定	71
十、胆碱酯酶的测定	75
十一、5'-核苷酸酶的测定	79

十二、山梨醇脱氢酶的测定	83
第四章 几种主要器官疾病的血清酶变化	87
一、肌病	87
二、肝病	88
三、骨病	90
四、中枢神经系统疾病	91
五、胰腺疾病	91
六、肾脏疾病	91

第一章 血清酶学概述

关于酶学的研究,至今已有70—80年的历史,但是酶的很多生化反应中的关键问题还是在40年前才得到阐明,特别在近20年来,随着试剂和测试手段的发展,临床酶学在医学上所占地位日益重要。临床酶学在现代兽医临床生化领域中也是一门发展很快的学科,把酶学应用于临床较医学上还早。1934年,Armstrong等发现,19头犬实验性胆管阻塞6天后,血清碱性磷酸酶活性增加了30—100倍;阻塞排除,酶活性恢复到原有水平。Freeman等(1938)发现,犬患钩端螺旋体病时,血清碱性磷酸酶的活力提高4倍。Drill等(1944)发现,犬肝脏坏死时,这种酶检测的灵敏度和碘溴酞钠试验一样。Brauer和Root等(1947)发现,反复用四氯化碳使犬肝脏坏死后,谷-丙转氨酶和胆碱酯酶的活力增加数倍。Cornelius等(1959)发现,马、牛、羊等实验性肝坏死时,精氨酸酶、山梨醇脱氢酶、 γ -谷氨酰转肽酶、谷-草转氨酶等升高。1941年,Alleroft等发现,在生理情况下,血清碱性磷酸酶的活力有变动,绵羊和牛,血清中这种酶的活力随年龄增长而降低,直到成年时中止,并在妊娠期有轻度升高。为了确定酶学在临床医学上应用的价值,在50年代以后对血清酶进行了一系列的研究,发现有的酶具有器官或组织的特异性,如草食兽肝脏中的山梨醇脱氢酶。但参与

糖酵解、戊糖循环、柠檬酸循环反应的有关酶类，可分布在全身细胞中，有的酶可来自很多器官，如碱性磷酸酶多来自胆管、骨骼、肝脏、肠道、肾小管和胎盘。肌酸磷酸激酶可来自脑、肌肉。所有组织中都含有乳酸脱氢酶。胆碱酯酶存在于神经肌接头、脑白质、肝脏、胰和肠等器官中。谷-草转氨酶除存在于肝、肌肉等组织以外，其它组织中也含有这种酶。并且还发现，同一种酶在不同种类动物中，其特异性也不相同。如谷-丙转氨酶对肝细胞损害的诊断，在犬是有意义的，但对牛的敏感性就比较差。在家畜不同生理状态下，很多酶在血清中的活力也不一致。但是，随着研究的深入和检验技术的进步，发现几种酶来自一种细胞时，则这些酶在血清中所占比例也接近于它们在这一组织内所存在的比例。于是，一些学者开始采用同时检测血清中的多种酶，然后根据这些酶的活力变化（即酶谱）来提高诊断的特异性。据Gerbes（1968）和Hoffman（1967）报道，各种类型心肌功能障碍的马，谷-丙转氨酶、谷-草转氨酶和肌酸磷酸激酶的活力都增高。牛肝病时， γ -谷氨酰转肽酶、碱性磷酸酶、精氨酸酶、山梨醇脱氢酶同时升高；骨骼病时仅碱性磷酸酶活力升高。据Gerber（1968）报道，马肝病时，谷-草转氨酶、乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、山梨醇脱氢酶、精氨酸酶、谷-丙转氨酶等活力增高。

随着酶学研究的不断深入，人们发现，有些酶虽然催化同一反应，但其蛋白质分子在结构上略有不同，从而在物理、化学、特别是免疫性质上也是不同的。一般认为，具有同一活力的酶，它们的“活性中心”的结构是相同的，但它们的肽链中氨基酸排列可以大不一样，这类酶称为同功酶。采

用电泳可以将同功酶分离出若干区带，由于各种组织所含同功酶的百分率各不相同，因此可根据各区带的含量（电泳图谱）来确定器官的特异性，从而提高诊断价值。目前，医学上用于诊断的血清酶有30种以上，在兽医上也已超过20种，而且酶的检验已从血清向尿液、脑脊髓液、滑液等生理体液发展。

国内兽医界应用血清酶检验诊断疾病，近几年来有较大进展，但由于受到各种条件的限制，如技术人员的培养、仪器设备和试剂的供应等还不能满足要求，发展还是不平衡的，尚需作出极大努力。

血清（浆）中的酶主要来源有两类：

一、血清（浆）中的特异酶类

这些酶类具有特异功能，血清是其正常活动场所。这类酶在血清中的含量高于大多数细胞，如参与血液凝固的各种酶、铜蓝蛋白（铜氧化酶）、拟胆碱酯酶和脂蛋白脂酶等。这些酶在肝脏中合成后不断释入血液，以保持在血液中的有效浓度。

二、血清中的非特异酶类

这类酶在血清中没有生理功能，其在血清中的浓度大大低于组织，并且血清中还缺少这类酶产生活性所需的辅酶。这类酶又可分成两组：（1）分泌酶：包括淀粉酶、脂肪酶、磷酸酶等。这类酶分泌速度很快，能通过正常排泄途径很快排出，如胆道、肠道、尿路等，故正常血清中含量很低，一旦排泄经路被阻，或释入细胞外液的量突然增加，或生成率增加，则酶在血清中的含量就可显著增加。（2）细胞酶：这类酶为细胞代谢所必需，被包含在组织细胞内，液

度很高，其中有的是以游离状态存在于细胞内液；有的包含在细胞结构内部（如线粒体和溶酶体），只要细胞膜保持完整、细胞代谢正常，酶在细胞外液或血清中的浓度很低，甚至没有。当细胞膜破坏或通透性增强时，细胞内的酶便被释入或逸出细胞进入血清或其它体液中。当大量细胞受到损害，这类酶在血清中的浓度便突然升高，甚至高出很多倍。据此，临床上便可依照血清中某种酶活力升高的情况来确定相应器官的完整性，这就是引人注目的临床酶学。

一种酶能否适用于临床诊断，必须符合于下列条件：

（一）检验方法比较简单、快速，准确性和重复性都较好。

（二）所获资料应具有诊断意义。首先应建立各种动物酶的正常值，其正常值和异常值之间重叠小，其异常值应有理由反映某个器官或器官某一部分的病理变化。

（三）这种酶必须存在于体液（血液、尿液等）中，并有着较长的生物半衰期，比较稳定，以利于检测。

在实践中，并非所有的酶都能符合上述三个要求，如精氨酸酶、山梨醇脱氢酶和谷-丙转氨酶在很多动物中都是肝脏的特异酶，是肝细胞损害的特异指标，但精氨酸酶测定的操作烦琐，山梨醇脱氢酶又不太稳定，因而临床上目前还多采用谷-丙转氨酶，但对牛、羊而言，这种酶的敏感性较差，而精氨酸酶对牛羊的特异性又较高。因此在选择一种酶作诊断用时，要求既能检测快速、简便，又具有很高的特异性，目前尚有一定困难。

第二章 酶学检验基础

一、酶学检验的基本原理

临床酶学检验主要是测定酶的活力。在保证提供酶产生活性的最佳条件下（如底物、温度、pH、离子强度和激活剂等），以催化某种化学反应的速率和催化基质形成反应产物的量来确定其活力，这就是两种常用的酶学检验法的基础。

（一）酶的动力学检测法 当酶和基质接触时，其反应速率只是在初速度时与酶的活力呈线性关系。为了保证测试时所得速率为初速度，通常都把基质浓度变化在5%以内时定为初速度。当基质浓度过低时实验不易测准，所以在测定酶的活力时，基质应有足够的浓度，这样，就整个酶反应来说，对基质是零级反应，而对酶却是一级反应，从而测得的速率就可以比较可靠地反映酶的活力。由于各种动物体内各种酶的活力不尽相同，在病理情况下，某种酶的活力又可高出正常若干倍，从而基质的浓度仅根据正常状态的活力确定显然是不足的，一般需提高2—3倍。但当遇到某种酶的活力特别高时，可将被检血清作一定倍数稀释后重新测试。这种方法因能清楚地反映出反应速率，故较敏感、精确，也容易控制，并且在基质被耗尽前就能确定反应速率。假如血清中存在酶的激活剂或抑制剂，也可以在反应速率的图谱上

反映出来。这种检验方法当采用一种稳定的记录仪记录读数时，就能连续确定酶的活力变化。

(二) 酶的终点检测法 当酶和基质接触时，基质不断消耗，反应产物不断形成，在酶作用到一定时间时加入一种抑制或破坏反应的化学制剂，使反应中止，然后根据基质的消耗量或反应产物的形成量来确定酶的活力。这种方法的优点是，对使用仪器的要求不太严格，方法比较简单，特别是现在已有自动分析仪，能把定时取样、中止反应、加入反应试剂、保温、比色等检测过程编成程序，自动化地依次完成并记录结果。但是，这种终点检测法的缺点是当酶的活力超过所需基质浓度的限量时，或形成的反应产物能抑制反应时便可出现各种误差。

二、酶的单位

由于酶的含量不能以重量作为计算单位，故只能依据在一定条件下，酶作用于基质后按照基质的消耗量或反应产物量来表示酶的多少，这种表示方式就是酶的活力单位数。反应基质的量可选用任何一种适宜的单位，如微克、毫克、微克分子(微摩尔)等。作用时间通常用分或小时。由于反应速率与实验条件密切相关，因而对反应时的pH、温度、缓冲液的性质、离子强度、基质的性质、激活剂的浓度以及其它因素(如作用时间等)，都必须在确定单位时规定下来。如谷-丙转氨酶采用金氏法测定时，其单位定义为每100毫升血清在37℃水浴下与基质作用60分钟生成1微克分子丙酮酸者为一个金氏单位。又如，碱性磷酸酶采用金氏法测定时是以磷酸苯二钠为基质与100毫升血清在pH9.6、37℃下水浴，作用7.5分钟时释放出1毫克苯酚定为1个金氏单位；

而采用贝-劳氏 (Bessey-Lowery-Brock) 法时, 基质改用硝基磷酸酚等, 则以 1 升血清在 37℃ 下作用 60 分钟产生 1 毫克分子硝基酚者定为 1 个贝-劳氏单位。其它尚有种种改良法。鉴于各种方法都有其特定条件, 结果自然不尽相同, 因此酶的单位也就不一, 结果常不能相互比较, 这就要求各实验室按照自己的条件建立各种动物酶的正常值。为免此弊, 目前医学上已有统一规定, 并逐渐趋向应用国际单位。但在兽医上, 酶学应用于临床进展缓慢, 解决这些问题尚需作大量的工作。

三、影响酶检验的基本因素

(一) 温度 在温度的一定范围内, 酶的活力随温度的升高而增加, 反应速度加快, 通常在 0—50℃ 之间时, 温度每升高 10℃, 其活力可提高 2—3 倍, 但超过 60℃ 时酶被破坏。一般动物体内最适宜温度在 40℃ 左右, 因而测定时大多采用 37℃ 水浴或干浴。

(二) pH 值 pH 对酶的活力有直接影响。一般动物体内各种酶的最适宜 pH, 除碱性磷酸酶为 pH 9.6—9.8、胃蛋白酶为 pH 1.5—2 以外, 大多数酶的适宜 pH 值在 6.5—8 之间。因此, 在测定过程中都需在一定的 pH 缓冲液内进行。

(三) 酶的浓度和基质浓度 在酶的检测中, 基质的浓度往往超过酶的浓度, 这使反应速率与酶的浓度成正比, 但当酶的浓度很高而基质的浓度不增加时, 则反应速率就不再随酶的浓度增加而加快。反之, 当基质浓度很高而酶的浓度不高, 可引起严重干扰作用。例如, 谷-丙转氨酶测定时, 基质中的 α -酮戊二酸与 DL-丙氨酸在一定条件下由谷-丙转氨

酶催化成丙酮酸和L-谷氨酸，丙酮酸与2,4-二硝基苯肼作用后生成红棕色的丙酮酸二硝基苯腙，当基质浓度过高时， α -酮戊二酸过多，它也可与2,4-二硝基苯肼作用生成红棕色的 α -酮戊二酸2,4-二硝基苯腙，从而影响测定的精度。为此，在谷-丙转氨酶的测定中应尽量降低基质中的 α -酮戊二酸的用量，通常把 α -酮戊二酸与DL-丙氨酸的比例控制在1:100来防止干扰作用。当血清中酶的浓度很高，基质浓度相对过低时，为保证酶反应能充分进行，常把血清作一定倍数稀释后测定。

(四) 作用时间 酶的催化反应通常都是可逆反应，初始，正向反应占优势，随后反应陆续进行，基质浓度不断减小，反应产物不断增加，当到达一定程度时，过量的反应产物可以抑制正反应的进行。况且酶的终点检测法是根据催化作用后所生成的反应产物和基质减少的量来确定酶的活力，故作用时间是测定中的一个关键因素。

(五) 激活剂和抑制剂 酶的活力可受某些物质的作用而增强或降低，这就是酶的激活剂与抑制剂。如氯离子能使淀粉酶的活力增强；镁离子能使磷酸酶的活力提高。反之，氰化物、叠氮钠等可抑制某些酶的活力。因而在测定过程中必须十分注意激活剂和抑制剂的影响。

四、样品

(一) 样品采集 采集供酶检测的血清样品有较高的要求，一般按如下方式进行。

1. 所用器具必须用肥皂水洗净，常水漂洗，最后用蒸馏水漂洗后烘干备用。

2. 采血时，动物皮肤以碘酊消毒后再用酒精脱碘，稍

待片刻，让酒精挥发后再进行。

3. 针头插入血管后，徐徐抽动活塞，让血液缓缓流入注射器内。抽毕，拔去针头，把注射器接头贴着试管壁缓慢注入。

4. 盛有血液的试管斜放静置，待血凝块收缩、析出血清后作检验用。

如采用血浆作检验时，抗凝剂一般都用肝素，采血后立即离心，分离出血浆待用。

一个合格的样品应新鲜，不发生溶血。有些酶在红细胞内含量很高，如腺苷脱氢酶在红细胞内的含量为血清中含量的40倍，其它如谷-丙转氨酶、谷-草转氨酶、乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶、 α -羟丁酸脱氢酶等在红细胞内都有较高的含量。因而溶血样品是酶检测中的一大禁忌。

(二) 样品的运送与保存 在实践中并非所有样品都能于分离出血清后随即检测，因而需要运送和保存。在现场采血后应立即分离出血清（浆），然后把血清（浆）吸入小试管内，管口塞紧并用石蜡封口，置冷藏瓶内立即送往实验室检验。当不能立即检测时就需保存一定的时间。由于酶的种类较多，其特性各异，如有的酶在室温下很不稳定，有的酶在冻结情况下很易丧失活性，因而贮藏条件也不尽相同。据Kaneko报告的材料，现将不同贮藏条件下一些酶的稳定性列于表1、2。

表1 不同贮藏条件下某些血清酶的稳定性。

酶的种 类	室 温 (25℃)	冷 藏 (0—4℃)	冻 结 (-25℃)
酸性磷酸酶	4 小时 ^b	3 天 ^c	3 天
碱性磷酸酶	2—3 天 ^d	2—3 天	1 月
醛缩酶	2 天	2 天	不稳定
α -淀粉酶	1 月	7 月	2 月
胆碱酯酶	1 周	1 周	1 周
肌酸磷酸激酶 (未活化)	2 小时	6 小时	不稳定 ^e
(激 活)	2 天	1 周	1 周
谷-草转氨酶	2 天	1 周	不稳定
异柠檬酸脱氢酶	5 小时	3 天	3 周
乳酸脱氢酶	1 周	1—3 天 ^f	1—3 天 ^f
山梨醇脱氢酶	不稳定	1 天	2 天
谷-丙转氨酶	2 天	1 周	不稳定
α -羟丁酸脱氢酶	不稳定	3 天	不稳定

注：a. 在这特定时间内，酶的活力不低于原有活力的90%。

b. 在pH 5—6 时。

c. 加入枸橼酸盐或乙酸盐。

d. 活力可以增加。

e. 酶不能很好耐受融冻。

f. 取决于血清同功酶谱。

(摘自 Jiro J. Kaneko 等著《家畜临床生化》)

五、酶学检验的质量控制

酶的检测是诊断和研究疾病的重要方法之一，酶检验的项目日益增多，检验人员的一项重要工作就是既能展开检验项目，又能保证检验质量。

以往常发现这样的情况，即在同一实验室，采用相同的方法检测同种酶，其结果会有差异；或同一样品在不同实验

表2 不同贮存条件血清酶的活力变化

酶的种 类	贮存方式	时 间 (天)	活 力 (%)
α -淀粉酶	室 温	8	100
胆碱酯酶	室 温	8	90
	0—4℃	8	90
	冻 结	8	94
肌酸磷酸激酶	室 温	1	25
	0—4℃	1	32—65
	冻 结	8	25
谷氨酸脱氢酶	室 温	2	60
	0—4℃	2	60—100
	冻 结	2	60
谷-草转氨酶	室 温	4	97
	0—4℃	8	87
	冻 结	2	90
谷-丙转氨酶	室 温	4	75
	0—4℃	8	78
	冻 结	8	31
乳酸脱氢酶	室 温	8	74—88
	0—4℃	8	81
	冻 结	8	81
碱性磷酸酶	室 温	8	71
	0—4℃	8	71
	冻 结	8	68
山梨醇脱氢酶	室 温	8	54
	0—4℃	8	71
	冻 结	8	52

室检测，其结果有极大的差异。这就给临床诊断工作造成困难。为此必须建立酶学检验的质量控制制度。

造成上述差异的原因，常见有如下几种：

(一) 过失误差 由于工作不认真，使用的容器不清洁，导致比色时读数不正确。

(二) 系统误差 这类误差原因比较复杂，涉及面较广，常见的有下述情况。

1. 仪器不正确或使用不当，如天平、比色计失灵。光电池因使用时间过长而疲劳或衰老，灵敏度降低；比色皿不清洁，皿上粘附污物影响透光度。

2. 试剂的影响。试剂的浓度和用量引起溶液色泽的变化，透光度出现误差。如转氨酶测定中，2,4-二硝基苯肼的用量和浓度不同都使溶液的色泽发生变化。

3. 温度与时间。反应时的温度和时间同显色反应速度有密切关系。温度过高或过低都影响酶的活力。显色后放置过久，也可发生色泽变化。如碱性磷酸酶、淀粉酶可发生褪色，这样，开始比色与最后比色在光密度上便有很大改变，为此比色要快速，一批样品数不宜过多。

4. 标准曲线。标准曲线又称工作曲线。谷-丙转氨酶的测定都事先作一标准曲线，这样，可省略每作一个样品时都需制备标准液和比色后的计算等烦琐手续。制作时需严格操作，制成的标准曲线必须准确，不应弯曲或偏离过大。由于显色后其光密度并非始终和酶的活力呈线性关系，故标准曲线不能任意延长。当血清中酶的活力过高，光密度超过标准曲线的范围时，可把血清用量减半或作一定倍数的稀释后再行测定。