

酶

试

临床生化 酶试剂 方法

倪星忠 编著

华东师范大学出版社

剂

酶

6.55
487

V+112/21

临床生化酶试剂方法

倪星忠 编著

华东师范大学出版社

(沪)新登字第201号

临床生化酶试剂方法

倪星忠 编著

华东师范大学出版社出版发行

(上海中山北路 3663 号)

新华书店上海发行所经销 上海译文印刷厂印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 15.25 字数: 400千字

1993年3月第一版

1993年3月第一次印刷

印数: 001—5,000 本

ISBN 7-5617-0821-1/N: 072 定价: 9.00元

内 容 简 介

本书全面地介绍了临床生化酶试剂方法的新进展。在第一篇中从理论上对与酶试剂有关的酶学原理,包括动力学理论作了系统的、深入的介绍,对酶试剂的设计原则作了精辟的归纳。在第二篇中,共介绍了 147 个测定方法,可供测定 118 个项目,其中包括对体液酶、糖、醇、脂、氨基酸、维生素、激素、核苷酸、无机离子、药物及毒物等具有重要诊断意义的项目的测定方法。它们大多是 80 年代新发展起来的,其中很多可在普通分光光度计上测定,在各级医院均可使用。

对医学检验工作者、大学、中专医学检验专业的师生有实用价值。对临床医生、酶试剂研制、生产人员及工程技术人员有一定的参考价值。

序

近年来,自动分析仪及酶试剂在国内的应用日益扩大,临床生化检验技术发生了深刻的变化。

酶试剂具有专一性高、反应条件温和、无毒害等优点,因此,新的酶试剂测定法不断出现,至今已建立了二百多种方法,可测定一百多种临床生化项目,商品试剂盒亦有四、五十种之多。这些方法包括了绝大多数常用的临床生化项目。为此,临床检验工作者应对酶试剂的有关基础知识、现状和发展趋势有较全面的了解。《临床生化酶试剂方法》一书的问世,符合了这一需要,填补了这一领域的空白。

在理论上,本书将酶学基本原理与酶试剂的应用相结合,进行了系统的、深入浅出的阐述,在具体测定方法上,本书介绍了可测定118个项目的147个测定方法。这些方法绝大部分为80年代以来提出的比较可靠和较有实用价值的新方法。它们几乎覆盖了临床生化的整个领域,并且代表了酶试剂发展的新趋势。本书作者长期从事酶试剂的工作,具有一定的经验和心得,因此所编著的内容对临床生化工作者及酶试剂的研制人员具有较大的参考价值和实用价值。

本书有一显著的特点,即主要倾向于介绍手工测定方法;在偶联酶系统上着重介绍氧化酶体系,在动力学方面更强调平衡法。这不仅反映了酶试剂发展的一个新趋势,而且更符合我国国情。因为这类方法在一般的分光光度计上都能使用,这可使酶试剂法走出具备自动分析仪的大医院,而推向一般设备的基层医院。

相信,本书一定会受到广大医学检验工作者和酶试剂研制人员的欢迎,也会对我国酶试剂事业起到推动作用。

陶义训 1991.8.

前 言

70年代以来,临床生化检验技术正经历着一场技术革命,液相酶试剂(本书简称为酶试剂)、固相酶、酶电极及自动分析仪的广泛应用是这一革命的主要内容,酶试剂是这一革命的技术基础,它的应用面也最为广泛。

19世纪末期,人们就探索用酶代替化学试剂作分析测定。本世纪30年代,Warburg发明了脱氢酶偶联法,使酶试剂开始受到重视,获得发展,为自动分析仪的发明和发展创造了试剂基础。

近20年来,由于发明了可见光比色的酶试剂系统,使酶试剂可应用于任何一个只具一般设备的医院实验室,又由于各国科学家的努力研究,不仅使酶试剂在理论上日趋完善,而且已设计出几百种方法,可用于测试约200个临床生化检验项目,目前常用的临床生化检验项目,大多数可用酶试剂来检测。与现用的化学测定法相比,酶试剂具有专一性高,反应条件温和,无毒害,操作简便等优点,可预见,在不远的将来,现有的临床生化检验方法将基本上被酶试剂的方法所取代,整个临床生化检验领域将面目一新。因此,作为临床检验工作者,有必要对酶试剂的理论、现状和发展趋势作一全面的了解。本书的目的就在于对这方面作一个系统的介绍。

在理论上,本书对酶试剂的基本原理作了系统的总结,对酶试剂的设计原则作了归纳。在介绍动力学原理时,为方便有兴趣的读者查考和探索,对有关公式的推导也作了较详细的介绍(一般的读者则可在动力学公式小结中直接找到其结论)。至于具体测定方法,本书介绍了147个方法,可测定118个项目,其中包括对酶、糖、醇、有机酸、脂、氨基酸、维生素、激素、核苷酸、无机离

子、药物及毒物等具有重要诊断意义的项目的测定法。这些方法均选自最新的、权威的文献或著名公司的产品配方，比较实用，除了一部分需要自动分析仪或紫外比色外，许多方法只需一般的分光光度计即可。对需要与同位素、高效液相层析、薄层层析、荧光法、发光法等较复杂的技术相结合的酶试剂方法，本书不予介绍。因此，这些方法大多可在县级以上医院作常规使用。

作者以此书为引玉之砖，希望国内临床检验工作者和生物工程师对酶试剂予以足够重视，协同奋进。

由于作者的水平及资料来源有限，难免有错漏之处，望广大读者及有关专家不吝指正。

本书承上海市检验中心主任冯仁丰、江苏省检验学会秘书长徐亚民诚意指正，中国科学院生物化学研究所袁中一研究员、上海第二医科大学李立群教授精心审校，陶义训教授为之作序，特此致谢。

作者 1991.8.于上海

目 录

第一篇 酶试剂的基本原理

第一章 酶的基本概念	2
第一节 酶作用的特点	2
第二节 酶的分类和命名	7
第三节 酶活力的测定	8
第四节 影响酶活性的各种因素	11
第五节 酶的稳定性	14
第六节 酶的标准化	16
第二章 酶反应动力学	18
第一节 Michaelis-Menten 方程	18
第二节 Michaelis-Menten 方程的意义	21
第三节 米氏常数(K_m)的求法	24
第四节 多步骤反应的米氏方程	27
第三章 酶试剂的动力学原理	29
第一节 单酶试剂的动力学	29
第二节 酶偶联测定法的动力学	32
第四章 多底物反应的动力学	47
第一节 多底物反应的类型和命名	47
第二节 多底物反应的动力学方程	50
第三节 二底物反应作图法	56
第四节 多底物反应动力学方程的实际应用	62
第五节 两底物浓度的选择	64
第六节 动力学公式小结	67
第五章 酶的抑制作用	72
第一节 可逆抑制与不可逆抑制	72
第二节 可逆抑制的动力学	75
第六章 酶试剂的设计	81

第一节	速率法和平衡法	81
第二节	酶偶联系统	84
第三节	反应条件的选择	92
第四节	测定结果的计算	95

第二篇 生化检验中酶试剂方法

第七章	体液酶的测定	100
第一节	乳酸脱氢酶的测定	100
第二节	红细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的测定	102
第三节	3-磷酸甘油醛脱氢酶的测定	105
第四节	黄嘌呤氧化酶的测定	107
第五节	单胺氧化酶的测定	109
第六节	红细胞中过氧化氢酶的测定	111
第七节	超氧化物歧化酶的测定	113
第八节	γ -谷氨酰转移酶的测定	115
	方法 I:胆红素氧化酶法	115
	方法 II:单酚氧合酶法	117
第九节	嘌呤核苷磷酸化酶的测定	119
	方法 I:过氧化物酶法	119
	方法 II:乙醛脱氢酶法	121
第十节	谷草转氨酶的测定	123
	方法 I:丙酮酸氧化酶法	123
	方法 II:苹果酸脱氢酶法	124
第十一节	谷丙转氨酶的测定	127
	方法 I:丙酮酸氧化酶法	127
	方法 II:乳酸脱氢酶法	129
第十二节	丙酮酸激酶的测定	130
	方法 I:丙酮酸氧化酶法	130
	方法 II:乳酸脱氢酶法	132
第十三节	肌酸激酶的测定	135
	方法 I:甘油-3-磷酸氧化酶法	135

	方法 II:己糖激酶法	138
第十四节	腺苷酸激酶(肌激酶)的测定	141
第十五节	半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的测定	143
第十六节	羧酸酯酶的测定	148
第十七节	脂肪酶的测定	150
第十八节	红细胞中乙酰胆碱酯酶的测定	151
第十九节	胆碱酯酶的测定	153
第二十节	碱性磷酸酶的测定	155
第二十一节	5'-核苷酸酶的测定	157
第二十二节	淀粉酶的测定	159
	方法 I:麦芽四糖法	159
	方法 II:改良麦芽五糖法	161
	方法 III: β -2-氯-4-硝基苯酚麦芽五糖法	164
	方法 IV:对硝基苯 α -麦芽五糖苷基衍生物 法	165
	方法 V:麦芽七糖法	167
第二十三节	亮氨酸氨肽酶的测定	169
第二十四节	鳥嘌呤脱氨酶的测定	171
第二十五节	腺苷脱氨酶的测定	173
第二十六节	腺苷脱氨酶同工酶的测定	175
第二十七节	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的测定	177
第二十八节	精氨酰琥珀酸裂解酶的测定	179
第八章	糖、醇及其有关化合物的测定	182
第一节	葡萄糖的测定	182
	方法 I:葡萄糖氧化酶法	182
	方法 II:己糖激酶法	184
	方法 III:葡萄糖脱氢酶法	186
第二节	半乳糖的测定	188
第三节	半乳糖-1-磷酸的测定	190
第四节	甘露糖的测定	192
第五节	果糖的测定	194

第 六 节	木酮糖的测定	196
第 七 节	岩藻糖的测定	198
第 八 节	莠苣二糖及乳糖的测定	200
第 九 节	甘露糖醇的测定	202
第 十 节	D-阿拉伯糖醇的测定	204
第 十 一 节	山梨醇的测定	205
第 十 二 节	红细胞中糖原的测定	208
第 十 三 节	二羟丙酮的测定	210
第九章	有机酸测定	212
第 一 节	乳酸的测定	212
	方法 I: 乳酸氧化酶法	212
	方法 II: 乳酸脱氢酶法	213
第 二 节	丙酮酸的测定	215
	方法 I: 丙酮酸氧化酶法	215
	方法 II: 乳酸脱氢酶法	216
第 三 节	α -酮戊二酸的测定	218
第 四 节	苹果酸的测定	219
第 五 节	柠檬酸的测定	221
第 六 节	异柠檬酸的测定	224
第 七 节	草酸的测定	225
第 八 节	尿中羟乙酸的测定	228
第 九 节	乳清酸的测定	230
第 十 节	唾液酸的测定	232
	方法 I: 丙酮酸氧化酶法	232
	方法 II: N-乙酰己糖胺氧化酶法	233
	方法 III: N-酰基甘露糖胺脱氢酶法	235
第 十 一 节	乙酸盐的测定	237
第十章	氨基酸及其有关化合物的测定	239
第 一 节	苯丙氨酸的测定	239
	方法 I: 苯丙氨酸氧化酶法	239
	方法 II: 苯丙氨酸脱氢酶法	240

第 二 节	苯丙氨酸和苯丙酮酸的测定	242
第 三 节	酪氨酸的测定	243
	方法 I: 酪胺氧化酶法	243
	方法 II: 苯丙氨酸裂解酶法	245
第 四 节	琥珀酰酮的测定	246
第 五 节	谷氨酰胺的测定	249
第 六 节	精氨酸和磷酸精氨酸的测定	251
第 七 节	羟脯氨酸的测定	253
第 八 节	鸟氨酸的测定	254
第 九 节	瓜氨酸的测定	257
第 十 节	亚胺甲基谷氨酸的测定	259
第 十 一 节	肌酐的测定	262
	方法 I: 肌氨酸氧化酶法	262
	方法 II: 谷氨酸脱氢酶法	264
第 十 二 节	肌酸的测定	265
第 十 三 节	尿中肌乙酸的测定	268
第 十 四 节	氨的测定	269
第 十 五 节	尿素氮的测定	272
	方法 I: 丙酮酸氧化酶法	272
	方法 II: 脲酶-Berthelot 法	274
	方法 III: 脲酶-谷氨酸脱氢酶法	277
第 十 六 节	支链氨基酸的测定	279
第 十 七 节	支链 α -羧基酸的测定	281
第 十 八 节	4-甲基-2-羧基戊酸的测定	284
第 十 九 节	血中多胺的测定	285
第 二 十 节	尿中除尸胺外多胺的测定	287
第 二 十 一 节	血清总胆红素的测定	290
第 二 十 二 节	直接胆红素的测定	292
第 二 十 三 节	总胆红素和直接胆红素的测定	293
第十一章	脂类的测定	296
第 一 节	甘油三酯的测定	296

	方法 I:甘油磷酸氧化酶法	296
	方法 II:乳酸脱氢酶偶联法	297
	方法 III:甘油氧化酶法	299
	方法 IV:二碘硝基四唑显色法	301
第 二 节	胆固醇的测定	303
第 三 节	血清甘油三酯和胆固醇的连续比色测定	307
第 四 节	游离脂肪酸的测定	308
第 五 节	甘油的测定	310
第 六 节	磷脂的测定	312
第 七 节	卵磷脂和鞘磷脂的测定	314
第 八 节	3 α -羟基胆汁酸的测定	318
第 九 节	7 α -羟基胆汁酸的测定	321
第 十 节	12 α -羟基胆汁酸的测定	323
第 十 一 节	熊去氧胆酸的测定	325
第 十 二 节	乙酰乙酸和 β -羟基丁酸总浓度的测定	327
第 十 三 节	β -羟基丁酸盐的测定	329
第 十 四 节	过氧化脂质的测定	330
第十二章	激素、维生素及核苷酸的测定	333
第 一 节	雌二醇和雌酮的测定	333
第 二 节	雄激素的测定	336
第 三 节	焦磷酸硫胺素(维生素 B ₁)的测定	339
第 四 节	吡哆醛 5'-磷酸 (维生素 B ₆)的测定	342
第 五 节	抗坏血酸(维生素 C)的测定	345
第 六 节	尿酸的测定	347
	方法 I:过氧化物酶法	347
	方法 II:紫外测定法	350
	方法 III:过氧化氢酶法	352
第 七 节	腺三磷和脱氧腺三磷的测定	353
第 八 节	腺二磷和腺一磷的测定	355
第 九 节	黄嘌呤和次黄嘌呤的测定	358
第十三章	无机离子的测定	360

第 一 节	尿中焦磷酸的测定	360
第 二 节	无机磷的测定	362
	方法 I: 黄嘌呤氧化酶法	362
	方法 II: 磷酸化酶法	364
第 三 节	血清氯的测定	366
第 四 节	碳酸氢盐的测定	367
第 五 节	锌的测定	369
第 六 节	钠的测定	371
第 七 节	镁的测定	372
	方法 I: 己糖激酶法	372
	方法 II: 甘油-3-磷酸氧化酶法	375
第 八 节	钾的测定	379
第十四章	药物和毒物的测定	381
第 一 节	血清茶碱的测定	381
第 二 节	氨甲蝶呤的测定	383
第 三 节	水杨酸的测定	385
	方法 I: 可见光比色法	385
	方法 II: 紫外比色法	387
第 四 节	4-氨基苯甲酸的测定	389
第 五 节	扑热息痛(对乙酰氨基苯酚)的测定	391
第 六 节	2-脱氧葡萄糖的测定	392
第 七 节	5-氟胞嘧啶的测定	394
第 八 节	甲酸的测定	396
第 九 节	甲醇的测定	397
第 十 节	乙醇的测定	399
	方法 I: 乙醇氧化酶法	399
	方法 II: 乙醇脱氢酶法	400
第 十 一 节	乙醛的测定	402
第 十 二 节	乙二醇的测定	404
参考文献		406
附 表		456

第一篇 酶试剂的基本原理

第一章 酶的基本概念

生物体在其整个生命过程中，每时每刻都进行着大量的化学反应，所有这些反应都在生物催化剂催化下进行的，生物催化剂中主要的是酶，其化学本质是蛋白质。

酶作用有许多特点，以下予以介绍。

第一节 酶作用的特点

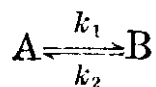
一、具有一般催化剂的特点

酶作为一类催化剂，具有一般催化剂共同的特点，这些特点共有三个方面。

第一，催化剂本身在反应过程中是不消耗的，即在反应结束后酶的量及活性都仍与反应前一样，这一点在作为液相酶试剂中并不显现其优点，因为反应结束后酶将与其他反应产物一起被弃去。但当用作固定化酶(如酶电极)时，这一特点就充分显示了它的优越性：反应结束后酶活性不变，能十分容易地与反应液分开而可反复作用，大大降低了成本。

第二，催化剂的作用是加快化学反应达到平衡的速度，但不能改变反应的平衡常数，因为它以同样的倍数同时加快正反应和逆反应。

从理论上说，一般的化学反应几乎都是可逆的，因此，对于从物质A生成物质B的反应可写成以下形式：

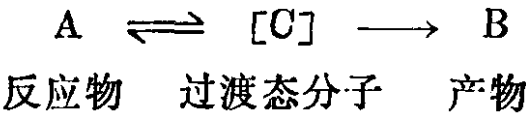


其中 k_1 为由A生成B的反应速度常数， k_2 为由B生成A的反

应速度常数,当反应达到平衡时,则有一平衡常数 K , $K = \frac{k_1}{k_2}$, 即它等于正反应及逆反应的速度常数之比,催化剂在作用时,它既使 k_1 提高了 n 倍,同时也使 k_2 提高了 n 倍,因此平衡常数 K 值仍保持不变,只是使反应达到平衡的时间缩短了。

第三,催化剂作用的基本原理是降低反应的活化能,从而大大增加了“活化分子”,使反应加速进行。

当反应物 A 变成产物 B 时,一般要经过一个生成过渡态分子 C 的阶段,即反应的历程可表达为



过渡态分子是能量超过一定值(阈值)的活化分子,这种分子会放出能量转变为产物 B,因此,反应速度与过渡状态分子 C 的生成量成比例。使反应物分子变为过渡状态分子的能量称活化能。对不同的反应,过渡态分子的阈值不同,因而活化能也不同。对同一反应,如果经过的反应途径不同,活化能也会不同。而催化剂的作用就是使反应循着活化能较低的途径进行,这样能量超过阈值

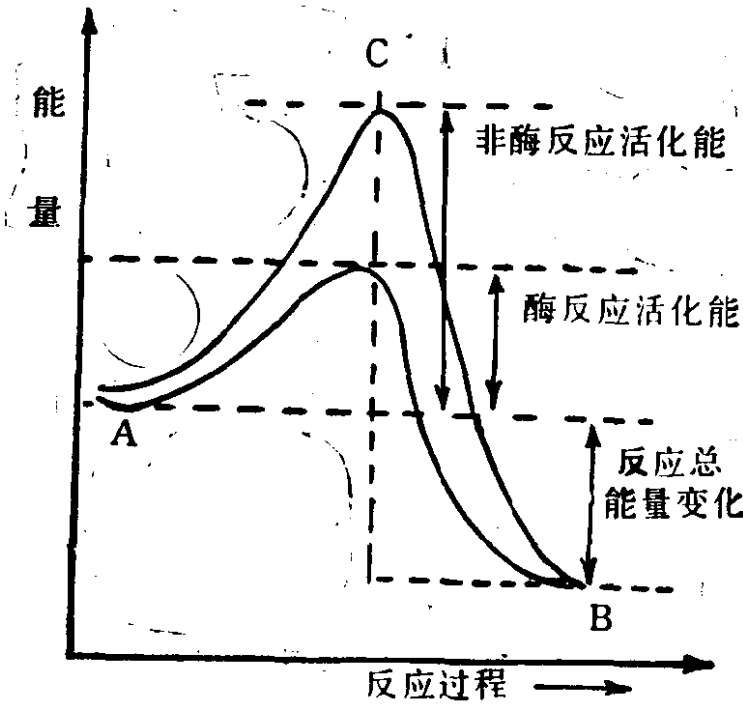


图 1-1 酶反应与非酶反应活化能关系