

• 检验技术与方法 •

血清唾液酸丙酮酸氧化酶测定新法的研究及应用

唐先平¹, 秦媛媛¹, 唐吉宏²

(1. 中国人民解放军第二七三医院, 新疆库尔勒 841000; 2. 重庆医科大学第二临床学院 400042)

摘要:目的 探讨建立一种血清唾液酸测定的新方法以及临床应用。方法 应用 N-乙酰神经氨酸酶、丙酮酸氧化酶、抗坏血酸氧化酶、N-乙酰神经氨酸醛缩酶、过氧化物酶与色原系统 3-甲基-N-乙基(β-羟乙基)苯胺、4-氨基安替比林进行血清唾液酸浓度的酶法测定。结果 磷酸盐缓冲液最适浓度为 50 mmol/L、pH 7.2, 最大吸收峰值为 510 nm, 线性范围为 0~4 500 mg/L, 显色稳定。精密度的批内($n=30$)变异系数(CV)=1.90%~3.3%, 批间($n=30$)CV=1.98%~3.5%, 回收率为 95.2%~105.1%, 平均回收率为 99.6%。与酶偶联速率法比较, 相关系数(r)=0.996, 回归方程 $Y=1.028X+0.40$, 两法高度相关, 正常参考值范围 50~90 mg/L。结论 该方法具有高度的特异性和准确性, 操作简便、灵敏快速、标本用量少、结果稳定, 适用于全自动、半自动生化分析仪, 更适用于中小型医院, 有较高的推广使用价值。

关键词:丙酮酸氧化酶; 血清唾液酸; N-乙酰神经氨酸酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)19-2237-02

血清唾液酸(serum sialic acid)是碳糖神经氨酸家族复合物的总称, 是广泛分布在糖蛋白中的一种糖类物质, 在人体组织中以各种衍生物的形式存在, 是细胞膜的重要组成部分, 具有十分重要的生理功能。其浓度与癌细胞的增殖、转移、浸润及逃避宿主细胞的免疫监视等密切相关^[1]。近年来, 血清唾液酸的检测广泛应用于肿瘤患者的诊断及普查上。其测定方法分为酶法和化学法两种。化学法是一种直接测定法, 酶法是一种间接测定法, 国内常规检测为酶偶联速率法。目前国内尚少见丙酮酸氧化酶法测定血清唾液酸的报道, 本组应用神经氨酸酶(neuraminidase)、N-乙酰神经氨酸醛缩酶(N-acetyl neuraminic acid aldolase)、丙酮酸氧化酶(hydrogen peroxide)、抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase)和过氧化物酶(peroxidase), 建立了一种新的血清唾液酸丙酮酸氧化酶测定法。现将实验研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 BT-224 半自动生化分析仪, 37℃ 恒温水浴箱。试剂: (1) 50 mmol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液; (2) 反应液, 用 50 mmol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液配制, 每升反应液中含有抗坏血酸氧化酶 5 000 U、神经氨酸酶 250 U、丙酮酸氧化酶 3 000 U、过氧化物酶 2 000 U、4-氨基安替比林 2 mmol 混匀, 放 4℃ 冰箱保存, 可稳定 1 年; (3) 显色液用 50 mmol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液配制, 每升显色液中含有 N-乙酰神经氨酸醛缩酶 15 000 U、3-甲基-N-乙基(β-羟乙基)苯胺 0.5 mmol、Triton X-100 0.05 mL, 混匀, 放 4℃ 冰箱保存, 可稳定 1 年。

1.2 测定原理 血清唾液酸在神经氨酸酶的作用下, 水解生成 N-乙酰神经氨酸; N-乙酰神经氨酸在 N-乙酰神经氨酸醛缩酶的作用下, 生成丙酮酸和 N-乙酰甘露糖胺; 丙酮酸在丙酮酸氧化酶的作用下生成过氧化氢(H₂O₂); H₂O₂ 与 3-甲基-N-乙基(β-羟乙基)苯胺[3-methyl-N-ethyl(β-hydroxy ethyl) benzene amine, MEHA]、4-氨基安替比林(4-amino-antipyrine, 4-AAP)在过氧化物酶的作用下生成红色醌类物质, 其颜色的深浅与血清唾液酸的浓度成正比, 在标准曲线上查出相应的结果。

1.3 唾液酸标准液 精确称取 N-乙酰神经氨酸 10 mg, 加蒸馏水溶解至 10 mL, 即为 1 000 mg/L 的 N-乙酰神经氨酸标准液。

1.4 测定方法 (1) 操作步骤: 10 μL 血清样品或 10 μL 唾液酸标准液, 分别加入测定管和标准管中, 再分别加入反应液 1.0 mL, 放 37℃ 水浴箱保温 5 min, 最后分别加入显色液 1.0

mL, 放 37℃ 水浴箱保温 5 min, 取出后在 BT-224 半自动生化分析仪上, 用 560 nm 波长、1.0 cm 光径杯, 以空白管调零, 测定其吸光度, 空白管用蒸馏水代替血清样品进行操作。(2) 计算: 血清唾液酸浓度(mg/L)=A 测定×10/A 标准。

2 结果

2.1 缓冲液最适浓度、pH 值及种类的选择 经试验测定选用 50 mmol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液。

2.2 最大吸收峰值测定 选择 400~600 nm 波长范围测定, 本方法显色液的最大吸收峰值为 560 nm。

2.3 显色液稳定性观察 显色后将显色液室温放置, 其吸光度在 45 min 内几乎无变化, 60 min 后吸光度呈缓慢下降的趋势。

2.4 精密度测定 本方法批内($n=20$)测定变异系数(CV)=1.90%~3.3%, 批间($n=20$)CV=1.98%~3.5%, 说明精密度良好。

2.5 回收试验 取 1 份已知唾液酸浓度的血清标本, 加入已知不同浓度的唾液酸标准液, 测定其唾液酸的实际浓度, 其回收率为 95.2%~105.1%, 平均回收率为 99.6%。

2.6 线性范围测定 取唾液酸标准液配制成 0~5 000 mg/L 不同浓度进行唾液酸测定, 在 560 nm 时其唾液酸浓度在 0~4 500 mg/L 范围内呈良好的线性关系。

2.7 方法学比较 用本方法与酶偶联速率法同时对 100 例血清标本进行唾液酸浓度测定, 其相关系数(r)=0.996, 回归方程 $Y=1.028X+0.40$, 两法呈高度相关。与酶偶联速率法特异性比较, 用高浓度维生素 C 的已知唾液酸浓度为 76 mg/L 的血清标本采用两种方法进行唾液酸浓度检测, 本方法检测结果为 74 mg/L, 酶偶联速率法为 65 mg/L, 本方法偏低 2.7%, 而酶偶联速率法偏低 14.5%, 说明本方法的特异性高于酶偶联速率法。

2.8 干扰试验

2.8.1 胆红素 当血清胆红素浓度在 10~100 μmol/L 时, 对测定结果无影响, 其浓度在 120 μmol/L 时, 测定结果偏高 4%。

2.8.2 血红蛋白 当血红蛋白浓度在 400 mg/L 以下时对测定结果无影响, 在 420~500 mg/L 时, 对结果有轻微影响, 因此, 应尽量避免溶血。

2.8.3 三酰甘油 当血清三酰甘油在 10.0 mmol/L 以下时

对结果无影响,在 15 mmol/L 可使结果偏高 8%~10%,如更高,应做适当稀释后再测定。

2.8.4 常用 5 种抗凝剂 肝素、EDTA-Na₂、EDTA-K₂、枸橼酸钠和草酸钠在常用浓度下对血清唾液酸结果几乎无影响。

2.9 正常参考值测定 用本方法测定 200 例 30~70 岁经体检无肾脏、肝脏、肺部、心脑血管疾病,血清肝、肾功能正常的健康人群。空腹采血,置于不含添加剂的洁净玻璃管内,待血液凝固后分离血清,2 h 内完成测定,血清唾液酸正常参考值为 450~850 mg/L。

3 临床应用

3.1 急性白血病 3 例,血清唾液酸浓度在 1 540~4 268 mg/L;肝癌患者 5 例,血清唾液酸浓度在 965~3 842 mg/L;肺癌患者 4 例,血清唾液酸浓度在 897~33 678 mg/L;乳腺癌患者 9 例,血清唾液酸浓度在 1 023~2 152 mg/L;胃癌患者 6 例,血清唾液酸浓度在 912~2 830 mg/L;大肠癌患者 5 例,血清唾液酸浓度在 874~1 925 mg/L;其他癌症患者 4 例,血清唾液酸浓度在 941~1 506 mg/L。

3.2 其他疾病 29 例,尿路结石患者 15 例,血清唾液酸浓度稍有增高,在 764~1 045 mg/L;前列腺肥大患者 6 例,血清唾液酸浓度在 715~982 mg/L;急性肾炎患者 8 例,血清唾液酸浓度在 653~925 mg/L。

4 讨论

4.1 本方法选择灵敏度较高的色原系统,是提高其检测灵敏度的有效途径,MEHA、4-AAP 色原无毒性,显色稳定性好,结果不受一般浓度的黄疸、溶血的物理性干扰。为了扩大线性范围,必须适当降低灵敏度,将比色波长移至 560 nm。

4.2 血清唾液酸是细胞膜糖蛋白的重要组成部分,与生物体的许多生物学功能有关,且与细胞恶变、癌转移、浸润、失去接触性抑制、细胞黏附性降低以及肿瘤抗原性密切相关。细胞在代谢异常时,唾液酸脱落进入体液,使血清中唾液酸升高,主要见于急性炎症反应和结核病妊娠等^[2]。本方法测定血清唾液酸浓度,可作为癌症、肿瘤诊断的辅助性指标和疗效观察指标,在肿瘤广泛扩散时血清唾液酸升高,也可作为肿瘤复发的一个指标,与文献报道一致^[3]。当炎症消除后或病情好转,血清唾液酸浓度基本正常^[4]。血清唾液酸浓度与肿瘤特异性生长因

子有一定的相关性^[5]。

4.3 丙酮酸是本方法反应中重要的中间产物,因此,若在样品中含有过多的丙酮酸会对测定造成干扰,但在健康者血清中的丙酮酸浓度一般小于 0.1 mmol/L,这只对测定造成较小的误差。由于正常血清中含有乳酸脱氢酶,它会把丙酮酸变为乳酸,这就更减小了误差,所以在常规测定时不需要做样品空白。

4.4 本方法选择的最佳试剂条件,特别是缓冲液的浓度、种类及 pH 值,对本法起着非常重要的作用。在反应液中加入抗坏血酸氧化酶,破坏维生素 C,避免还原性物质对结果的影响,加入 TritonX-100 非离子性表面活性剂是防止显色液发生浑浊,保证反应液的透明度^[6]。底物和酶的浓度都达到饱和,所用的 pH 值在各种酶的最适范围,这样可使反应时间缩至最短。

4.5 本方法主要用于血清中的唾液酸测定,尿中的唾液酸不能测定,因为尿中有丙酮酸氧化酶的抑制物。

总之,应用丙酮酸氧化酶建立的一种新的酶法测定血清唾液酸的方法,具有快速准确、操作简便、微量、灵敏、线性范围宽和结果稳定等优点,适用于全自动、半自动生化分析仪,更适应于中小型医院,有较大的推广使用价值。

参考文献

[1] 王秀钦,刘晓兰.血清唾液酸测定对恶性肿瘤的诊断价值[J].肿瘤防治研究,1994,24(5):337.

[2] Brenne AT, Baade RT, Waage A, et al. Interleukin-21 is a growth and survival factor for human myeloma cells[J]. Blood, 2002, 99(10):3756

[3] 徐新波,杜江东,寇新明.血清唾液酸作为肿瘤标志物的检测及临床应用[J].国际检验医学杂志,2010,31(2):182-183.

[4] 陈建仙,王能智,欧平.唾液酸测定在恶性肿瘤与良性疾病诊疗上的应用[J].福建医药杂志,1995,17(3):146.

[5] 毛志福,金化民.血清唾液酸的诊断作用与临床意义[J].国外医学:外科学分册,1995,22(4):222.

[6] 唐先平,秦媛媛,宋蓉,等.血清尿素丙酮酸氧化酶测定新方法的研究及应用[J].国际检验医学杂志,2008,29(9):792-793.

(收稿日期:2011-05-11)

• 检验技术与方法 •

固相免疫吸附法在 ABO 正反定型/RhD 血型检测中的应用

史立英¹,杨文冲²,于红¹,苏式敏¹,王超²,童军³,李勇³

(1. 吉林省肿瘤医院,长春 130012;2. 长春博德生物技术有限责任公司 130012;

3. 长春生物制品研究所 130062)

摘要:目的 探讨固相免疫吸附法在 ABO 正反定型/RhD 血型检测中的应用。方法 通过应用新鲜红细胞试管法、微柱凝胶法及固相免疫吸附法同时测定 557 例临床样本的 ABO 正反定型/RhD 血型,对检测结果进行分析,对固相免疫吸附法进行临床评价。**结果** 固相免疫吸附法与试管法的符合率达 100%,与微柱凝胶法的符合率也达 100%。**结论** 固相免疫吸附法可以用于 ABO 正反定型/RhD 血型的测定。

关键词:血型抗原; 固相免疫吸附法; 试管法; 微柱凝胶法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)19-2238-03

为了保障输血安全,《输血技术规范》中明确规定要检查受血者和供血者 ABO 血型正反定型及患者 Rh D 血型^[1]。为此,本组开发出可以用于 ABO/RhD 血型检测的新方法——固相免疫吸附法,应用的抗原为分子化抗原及处理的红细胞进行

正反定型检测^[2]。现将该新型方法与新鲜红细胞试管法、微柱凝胶法的比较结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机抽取 557 例患者抗凝全血,其中男 207