

前 言

本标准是在参考国际临床化学联合会(IFCC)和中华医学会检验学会酶活性浓度测定的推荐方法总则的基础上制定的。

本标准从2002年7月1日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位:中国医学科学院北京协和医院检验科。

本标准主要起草人:林其燧、宋耀虹、鄢盛恺。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

1 范围

本标准规定了临床酶活性浓度测定方法总则。

本标准适用于临床与基础医学实验室进行酶活性浓度的测定,也可作为与酶活性浓度检验有关的仪器和试剂生产企业、有关评价单位及质量管理部门的标准。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 最适条件 optimum conditions

在所选择温度下能使酶反应的催化活性达到最大所需的条件。主要与下述一些因素有关:(1)如底物、辅因子、活化剂、缓冲液和变构剂种类和浓度;(2)指示酶和辅助酶的种类和浓度;(3)反应混合液的pH和离子强度;(4)其他可变因素,如已知抑制剂的去除。在某些情况下,为了使最终测定系统达到最大的测定重复性,可考虑对最适条件进行适当修改。

2.2 血清(血浆)中酶 enzyme in serum or plasma

存在于血清(血浆)中的酶。应避免使用“血清酶”这种术语,因为易误解为血清(血浆)特定产生的酶。如血清(血浆)中丙氨酸氨基转移酶不能称为血清(血浆)丙氨酸氨基转移酶。

2.3 连续监测法 continuous monitoring method

根据连续测定酶促反应过程中某一反应物或底物的浓度随时间变化的多点数据来求出酶活性浓度的方法。以“连续监测法”代替“动态法”,避免使用“动态法”这一术语。

2.4 始发反应 primary reaction

指示反应 indicator reaction

辅助反应 auxiliary reaction

使用酶偶联系统测定一些酶活性浓度时,被测定酶催化的反应称为始发反应;产生被检测物质如NADH的反应称为指示反应,相应的酶称指示酶;有些测定体系中,在始发反应和指示反应之间往往还需要添加一定的酶反应将其偶联起来,此反应称为辅助反应,催化此反应的酶称辅助酶。催化始发反应的酶来源于血清或其他生物物质,指示酶和辅助酶作为反应系统中的试剂。

2.5 酶催化活性单位 unit of catalytic activity

2.5.1 国际单位 international unit

国际生化协会酶学委员会推荐使用国际单位,即在规定的条件下,每分钟催化一微摩尔(μmol)底物的酶量为一个国际单位(IU)。1 IU = $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ 。目前常将IU简写为U。

2.5.2 卡特单位 katal unit

在规定的条件下,每秒钟催化转化一摩尔底物的酶量。1 katal = $1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 。酶催化活性单位常用

katal 表示,其对血清中酶量而言显然过大,故常用单位为 μkatal 或 nkatal 。1 katal = 60×10^6 U, 1 U = $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} = 16.67 \text{ nmol} \cdot \text{s}^{-1} = 16.67 \text{ nkatal}$ 。

2.6 酶催化活性浓度 catalytic activity concentration

利用酶有加速化学反应(催化)的特性,通过测定被加速化学反应的反应速率,据此来推算出酶含量的高低。常用单位($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)来表示酶量的多少,并计算出浓度即一定体积标本中的酶活性。这种浓度的确切名称是“酶的催化活性浓度”或简称为“酶活性浓度”。本标准中酶活性浓度所指的体积不是测定系统,而是指血清(血浆)标本的体积,如常用的血清中酶催化浓度单位 U/L,式中 L(升)是指 1 L 血清(血浆)的单位。体积单位推荐用 L(升),而不是 mL(毫升)。考虑我国目前情况,建议报告血清中酶活性浓度同时以两种单位值(U/L, katal/L)并列或仍暂以 U/L 表示之。

2.7 摩尔吸光系数 molar absorption coefficient

光径为 1.00 cm 时,一定波长的光,通过含吸光物质浓度为 1.00 mol/L 时的溶液的吸光度。通常以符号 ϵ 表示。

2.8 米氏常数 Michaelis constant

酶促反应的速度达到最高反应速度的一半时的底物浓度。通常以符号 K_m 表示。

3 反应温度

酶催化的反应速度明显受到测定时温度的影响,在推荐酶的测定方法时首先要指定某一温度为反应温度,并应在酶反应期间保持温度在较小范围内波动。

本标准推荐测定酶活性浓度方法的反应温度为 37℃,温度上下波动应控制在 $37 \text{ C} \pm 0.1 \text{ C}$,并以此温度所测结果报告,不推荐使用温度校正系数。

4 方法选择

4.1 应尽可能全部采用连续监测法,少用或不用固定时间法。不论用什么方法,重要的是必须弄清随时间迁移,酶反应进程曲线的实际情况。

4.2 酶反应进程曲线的一般情况常为:反应一开始速度比较慢,经过一段时间(延滞期)后反应速度加快并达到一个反应速度稳定的阶段,即线性反应期。而后由于种种因素,如底物因酶反应消耗而浓度下降,产物浓度上升出现逆反应,反应产物可能有抑制酶反应作用或酶的热失活等,促使酶反应变慢,偏离线性。必须根据酶反应线性期的吸光度变化计算出酶活性浓度。否则将导致误差。

4.3 尽量减少操作步骤,以避免过多的吸量和接触太多的容器表面而引起的误差。应注意到测定标本是含有各种成分的血清(血浆),有些成分可能对某些酶的测定产生干扰或出现副反应,此时使用双试剂可能更为有利。

5 仪器和设备

5.1 应明确规定仪器和设备各种性能规范,以减少实验室之间的测定误差。本标准推荐使用半自动或全自动生化分析仪及其他相应的配套设备。

5.2 所用仪器应有全面的光学系统性能规范,包括:波长的准确度、带宽、分光方式、吸光度范围、线性及所选波长的偏离辐射能。光度误差常被忽视,但是吸光度在 0.01~0.05 之间变化时,很容易引起系统相对误差。对于仪器的其他方面的性能也应有相应的规范。

5.3 比色杯的表面应平行,以保证光通过时不会因吸收、反射或其他散射效应使吸光度降低。光通过时不应受杯壁或杯表面附着物的干扰。比色杯内径应为 $10.0 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$ 。如采用其他规格的比色杯,性能应同上。

- 5.4 pH 计应按规定定期进行校准。
- 5.5 所用玻璃容器应符合规定并定期进行校准。如果校正玻璃容器的温度与反应温度不同时,应对因液体膨胀而产生的体积误差进行校正。
- 5.6 任何接触标本、试剂或反应混合物的表面都必须经化学清洗,去除干扰酶活性测定的物质,如极少量的酸、金属、去垢剂或其他复合物等。

6 试剂

- 6.1 按照各种酶检测的要求,选用符合规定纯度的合适的化学试剂。
- 6.2 所有用水应使用纯水或双蒸水,符合酶检测的要求。如果水中存在酶的抑制剂,其浓度应低于最小抑制浓度(应标出)。如所配制试剂需保存较长时间,则应使用无菌水(不含任何添加剂)。
- 6.3 试剂用酶(指示酶和辅助酶)必须标明质量性能并符合检测需要。试剂用酶应避免其他酶、代谢产物及杂质的污染,因其可能改变初级或次级反应的速度。如果不能避免这些干扰,应加以注明。
- 6.4 所用对照物(通常是底物、产物或辅酶,而不是酶物质)的组成和纯度应说明性能要求,其摩尔吸光系数必须在终反应混合物中,根据浓度的增加进行测定。
- 6.5 采用说明明确而可靠的程序配制缓冲溶液。应保证反应混合物的 pH 在预设限内。在测定过程中, pH 在预设限内的变化所引起的测定酶催化活性浓度的相对变化小于 1%。根据在储存过程中, pH 的变化和降解产物的增加所引起的测定酶催化活性浓度的相对变化小于 0.5%,确定缓冲溶液的储存期和条件。

7 反应条件的选定

- 7.1 应明确选定条件,如底物种类和浓度,最适 pH 和缓冲液种类、浓度、工具酶浓度、辅因子、活化剂等,并列出生作实验的必要资料。
- 7.2 选择酶反应条件时,首先是选择以什么材料作为标本。如所测定的酶含有多种同工酶时,不同同工酶最适反应条件可能有差异。实验材料不同,所含各种同工酶比例不一样,最后所选择的条件不一定和实测血清标本一致。可采取下述两种折衷方案:(1)选择一个已知特性的来自人体组织的单一同工酶的酶制剂,以此作为选择和确定最适条件的标本。其优点是他人易重复和证实所确定条件的合理性。但如选择的酶和血清中的酶性质不太接近,则用此法所选择的条件有可能不适合血清标本。(2)以混合血清作为酶的来源,因血清是推荐方法的检测对象。由于个体差异,正常和病理血清中同工酶的组成和性质差异给重复和证实工作带来困难。
- 7.3 当所测酶专一性不强可使用多种底物时,所选用的底物必须有足够的特异性和较高的诊断意义。例如临床上测定酸性磷酸酶(ACP)主要为诊断前列腺癌,所选用的底物应对前列腺酸性磷酸酶(PACP)有较高的特异性,不易被其他组织如红细胞、血小板中酸性磷酸酶所作用。
- 7.4 使用多种图表或统计学方法来说明所选条件的合理,如应列出求得米氏常数(K_m)的方法以及相应的图表、最适 pH、缓冲液浓度对酶催化活性影响的图表等。
- 7.5 固定标本体积在总反应混合液中的比例,不能随意更改。血清中除测定的酶外,还可能含有酶的抑制剂、活化剂,各种代谢物和其他酶。使用不同比例的标本,这些标本内含物的量就不同,可能影响所选定的条件。必须指出的是血清本身就是一种缓冲剂,有一定缓冲能力,如标本体积所占比例太大,不易保持反应混合液 pH 的稳定性。除少数特殊者外,标本在总体积中的比例应在 10% 以下。如大于此比例,一定要注意所测血清对反应混合物 pH 可能带来的影响。
- 7.6 应确定在所选定条件下酶测定的可报告范围。理论上当底物浓度饱和时,反应初速度随酶浓度增加而加快,不存在限制。但初速度只是一个理论概念,实际测定时必须让酶反应进行一定时间,确定反应

曲线的线性反应期,据此确定酶活性浓度,因此测定范围是有限的。在不影响测定精密度前提下,应尽可能增加酶催化活性浓度的测定可报告范围。当测定结果超过其上限时,测定结果不可靠。稀释后测定结果虽在规定范围内也不认为是十分准确的。所用酶的控制品,不论是室内还是室间的,其靶值都应在可报告范围内。

7.7 应用血清标本来检测方法的分析误差。酶催化活性浓度最好选择在能区分健康和疾病的临界值或参考值上限附近,不宜偏高或偏低。

8 标本的采集、运输与保存

8.1 采样前的准备与采样:许多因素可引起人血清(或其他生物物质)中某些酶催化浓度的生理性变化,如年龄、性别、个人习惯、体重、食物或饮料摄入、节食、饮食习惯、锻炼或日周期节律等有关。不同人种、职业、地理、气候及其他环境因素也对酶活性浓度有影响。因此,即使很好的控制了受试者的条件,并采用国际公认的 IFCC 方法,将来仍有必要对每一群体进行详细研究。

8.2 血清(血浆)标本:如需要使用血浆而不是血清,则必须说明在不影响酶催化活性下所用抗凝剂的类型和浓度。溶血、脂血或黄疸血清(血浆)可能会干扰酶催化活性,应在所用方法中作出提示。

8.3 应说明方法中新鲜全血和所分离血清在不同保存温度下酶的稳定性,冰冻血清或冻干酶质控物和校准品的稳定性。

8.4 对于其他体液或组织标本,应说明病人采样前准备的特殊要求、标本收集或活检过程,以及标本处理与保存方法。

9 测定步骤

9.1 方法中应详细列出测定酶催化浓度的全部操作过程。

9.2 对于仪器而言,可采用或参考仪器给出的方法和设置的参数。详细说明波长、带宽的耐受限、空白校正、延迟时间,读数时间、非酶促变化的控制,以及温度控制、比色杯的处理和溶液的转运等。

9.3 分析系统可用表格形式列出反应条件。包括缓冲液/试剂混合物量(mL 或 μL)及其在反应混合物中的终浓度(mmol/L 或 μmol/L);血清标本量(mL 或 μL)及其在 37℃ 孵育时间(min 或 s);启动试剂量(mL 或 μL)及其终浓度(mmol/L 或 μmol/L)等。记录吸光度值变化的时间,校正空白反应。

9.4 酶活性浓度计算:用式(1)计算。

$$b = \frac{V}{\epsilon \times v \times \ell} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \dots\dots\dots (1)$$

式中: *b*——酶催化活性浓度, katal · L⁻¹(可转换成常用单位 U/L);
V——反应体积, L;
 ϵ ——摩尔消光系数, L · mol⁻¹ · m⁻¹ 或 m² · mol⁻¹;
v——血清量, L;
 ℓ ——比色杯光径, m;
 ΔA ——吸光度变化;
 Δt ——时间间隔, s。

10 解释

10.1 每个酶活性浓度测定方法须由几个实验室共同进行性能及可靠性评价,予以确认。评价方案须认真合理设计,全面考虑。

10.2 从健康人或病人体液或组织中所得出的某种酶催化浓度是应用方法的测定结果,不是方法学的组成部分。

10.3 应在报告的附录中列出已知药物及其他干扰物在体内的药理学效应及在体外测定过程中的影响。
