

循环酶法测定同型半胱氨酸的临床研究

袁平宗(四川省内江市第二人民医院 641100)

【摘要】 目的 对循环酶法测定同型半胱氨酸方法进行临床评价。**方法** 依据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)评价方案对循环酶法同型半胱氨酸测定方法进行了精密度、线性和抗干扰试验评价。**结果** 批内精密度 CV 小于 3.45%,总精密度小于 3.78%。线性范围:在 0~50.0 mol/L 范围内呈线性。胆红素在 700 $\mu\text{mol/L}$ 、TG 在 8.0 mmol/L、抗坏血酸在 30 mg/dL 以内,对试验无明显的干扰,干扰相对偏差小于 4%。血红蛋白在 150 g/L 内,干扰偏差小于 5.2%。**结论** 循环酶法同型半胱氨酸检测试剂盒在测定精密度、线性范围、抗干扰等方面的性能可以满足临床检测的需要。

【关键词】 循环酶法; 同型半胱氨酸; 精密度; 线性; 准确度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)04-0424-02

Clinical research of enzymatic cycling assay for detecting homocysteine YUAN Ping-zong (Neijiang Second People's Hospital, Neijiang, Sichuan 641100, China)

【Abstract】 Objective To perform the clinical evaluation on the enzymatic cycling assay for detecting homocysteine (Hcy). **Methods** The performance characteristics such as precision, linearity, interference testing of the kit were evaluated respectively according to the evaluating scheme issued by the National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Results** CV of within-run was less than 3.45% and the total CV was less than 3.78%. The linear range was 0—50.0 $\mu\text{mol/L}$. When the concentration of conjugated bilirubin was within 700 $\mu\text{mol/L}$, TG within 8.0 mmol/L and ascorbic acid within 30 mg/dL, there was no obvious interference to test. The relative deviation of interference was less than 4%. And the hemoglobin concentration of 150 g/L produced less than 5.2% interference deviation. **Conclusion** The performance of precision, linearity and interference testing of the homocysteine enzymatic cycling assay kit can fulfill the requirements of clinical laboratory.

【Key words】 enzymatic cycle; homocysteine; precision; linear; accuracy

同型半胱氨酸测定的参考方法是高效液相色谱法(HPLC),但是其操作复杂,耗时且费用较高;用于实验研究的方法是离子色谱法与毛细管电泳法,临床上较少使用;常用方法是酶联免疫分析法(EIA),特点是操作方便、快捷、重复性好,但是大部分操作仍需要手工操作,不适合临床大批量标本同时测定。目前运用较多的是循环酶法测定同型半胱氨酸(Hcy),此方法很容易自动化,且测定的时间缩短至 10 min 左右,且可在自动生化分析仪上进行,使 Hcy 测定的常规应用成为可能^[1]。根据实验条件,在 7600-020 分析仪上对该项目进行测定,其测定时间短、灵敏度高,为进一步了解该方法的特点,本研究参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的评价方案对该方法进行了评价,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂主要成分^[2]

1.1.1 试剂 1 s-腺苷甲硫氨酸(SAM)0.1 mmol/L, NADH 0.2 mmol/L, TCEP 0.5 mmol/L, α -酮戊二酸 5.0 mmol/L; Hcy 甲基转移酶(HMTase)5.0 U/L,谷氨酸脱氢酶(GLDH)10 U/L。

1.1.2 试剂 2 s-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶(SAHase)3.0 U/L,腺苷脱氨酶(ADA)5.0 U/L。

1.1.3 标准品 6.5、28.5 $\mu\text{mol/L}$ (批号 09-0326)。

1.2 标本 健康组 50 例,其中男 25 例,女 25 例,年龄 10~65 岁。

1.3 仪器 日立 7600-020 自动生化分析仪。

1.4 测定参数 反应类型:两点终点法;温度 37 $^{\circ}\text{C}$;主波长

340 nm,次波长 700 nm;4 点定标;体积 6 μL , A 试剂 120 μL , B 试剂 60 μL 。

1.5 实验原理 基于小分子捕获技术 SMT 的 S 腺苷同型半胱氨酸水解酶在 TCEP 作用下,氧化型同型半胱氨酸转化为游离型 Hcy,游离型 Hcy 与共价底物 S 腺苷甲硫氨酸 SAM(s adenosylmethionine)催化反应形成蛋氨酸和 S 腺苷同型半胱氨酸(SAH)。SAH 被 SAH 水解酶水解成腺苷和 Hcy,形成的 Hcy 可以循环加入反应,从而放大了检测信号,生成物腺苷(Ado)立即水解为次黄嘌呤和氨,氨在谷氨酸脱氢酶的作用下,使 NADH 转化为 NAD^{+} ,样本中的 Hcy 的浓度与 NADH 的变化成正比。

2 结果

2.1 线性试验 按 NCCLS 的评价方案^[3],选择 0 $\mu\text{mol/L}$ 和 50.0 mmol/L 的高低混合血清各 3 份,然后把其中 1 份等量混合产生中间值 25.0 $\mu\text{mol/L}$,中间值再与高低值等量混合,产生 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 37.5 $\mu\text{mol/L}$ 等 5 个不同的梯度值,在仪器上以低值到高值和高值到低值分别测定求得两次算术平均值,结果显示, Hcy 含量超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 出现偏差,含量在 50 $\mu\text{mol/L}$ 以内具有良好的线性,以 X 作为理论值, Y 作为测定值进行回归分析,其方程 $Y=1.019X-1.081, r^2=0.9942$ 。

2.2 干扰物试验 取 1 份血清(Hcy 含量为 25.2 $\mu\text{mol/L}$)分成 5 份,分别加入三酰甘油(TG)8.0 mmol/L;血红蛋白(Hb)150 g/L;胆红素(BIL)700 $\mu\text{mol/L}$,抗坏血酸 30 mg/L 用本法测定。结果表明当加入 $\text{TG} \leq 8.0 \text{ mmol/L}$ 、 $\text{Hb} \leq 150 \text{ g/L}$ 、 $\text{BIL} \leq 700 \mu\text{mol/L}$ 、抗坏血酸小于或等于 30 mg/dL 时经配对

比较,均无显著干扰($P>0.05$),结果见表 1。

2.3 精密度评价 分别选择 Hcy 含量为 25.2、12.5、5.6 $\mu\text{mol/L}$ 的血清,分成 3 份,1 份一次性测定 20 次,另 2 份平行测定,每日上下午各测 1 次,连续 20 d,测定结果见表 2。

表 1 干扰物试验测定

干扰物	干扰物浓度	测定结果($\mu\text{mol/L}$)	干扰偏差
TG	8.0 mmol/L	24.8	-1.59%
Hb	150 g/L	23.9	-5.16%
BIL	700 $\mu\text{mol/L}$	24.5	-2.78%
抗坏血酸	30 mg/dL	25.8	2.38%

表 2 精密度实验测定

浓度($\mu\text{mol/L}$)	批内 CV%	批间 CV%
25.2	2.24	2.56
12.5	3.25	3.69
5.6	3.45	3.78

其 CV 平均值批内小于 3.45%,批间小于 3.78%。

2.4 回收试验 把 Hcy 含量为 14.8 $\mu\text{mol/L}$ 血清分成 3 份,分别加入含量为 9.2、11.1、25.2 $\mu\text{mol/L}$ 的血清(按原血清 10 份,加入血清 1 份混合)用本法双份平行测定,其结果见表 3。回收率分别为 96.6%、104.0%、102.3%,平均为 101.0%,见表 3。

表 3 回收试验测定(原血清 10 份加入血清 1 份)

加入血清浓度($\mu\text{mol/L}$)	加入浓度($\mu\text{mol/L}$)	回收浓度($\mu\text{mol/L}$)	回收率(%)
9.2	14.3	14.3	96.6
16.1	14.9	15.4	104.0
25.2	15.7	15.2	102.3

2.5 血清 Hcy 参考值 循环酶法测定 50 例健康人群 Hcy 结果为,男 25 例,女 25 例,其 Hcy 值分别为 (10.21 ± 2.14) 和 $(9.82\pm2.32)\mu\text{mol/L}$,男性和女性的 Hcy 值差异无统计学意义($P<0.05$)。血清 HCY 实验室参考范围:5.2~14.5 $\mu\text{mol/L}$ (95% 的可信区间),与试剂盒标明的小于 15 $\mu\text{mol/L}$ 以及戴婉如等^[3],王清涛和秦晓光^[4]调查结果相符合。其医学决定水平,临床医生应根据实验结果、临床资料及其他检查综合分析为准。

3 讨 论

3.1 线性分析,结果显示其反应在 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 以内具有良好的线性($Y=1.019X-1.081, r^2=0.9942$)。当结果超过 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,应将标本用生理盐水 5 倍稀释,其结果乘 5

即可(可在 7600-020 仪器上设置,自动稀释重做标本,结果自动计算乘以稀释位数)。

3.2 样品体积分数 SVF^[5](样品体积 SV 与反应总体积 TV 的比值)的选择,如果过高,血清内源性干扰以及边反应(即 side reaction;标本收集中的添加物如抗凝剂、稳定剂、防腐剂、反应容器和加样器的污染影响实验本身的反应)会使其特异性下降,过低又会使反应中产生的乳浊物过低,导致结果重复性下降,选择 A 试剂 120 μL ,B 试剂 60 μL ,样品 6 μL ,体积分数 SVF 为 0.032 $[6/(120+60+6)]$,其测定也表明结果重复性好,总 CV<4.0%。

3.3 在实验室中,分析方法的选择应包括如下考虑:(1)准确性,标本中几乎都存在多种潜在性干扰如抗坏血酸、胆红素、溶血、高脂、抗凝剂、稳定剂、防腐剂、反应容器和加样器的污染等,本法测定采用双吸光度,能有效的消除这些干扰,其回收率为 101.2%。(2)微量,在 7600-020 分析仪上血清用量只需 6 μL ,外周血有 1 mL 左右即可。(3)分析迅速、精密度高,本法完成一次测试只需 10 min 左右。(4)抗干扰性,由于客观原因,本研究仅选取了临床常见的 4 种干扰物质,实验结果表明:胆红素在 700 $\mu\text{mol/L}$ 、TG 在 8.0 mmol/L、抗坏血酸在 30 mg/dL 以内,对试验无明显的干扰,相对偏差小于 4%。血红蛋白在 150 g/L 内,相对偏差不大于 5.2%,说明该试剂盒具有较强的抗干扰能力。另外,使用氨甲蝶呤、卡马西平、苯妥英钠、NO、6-氮尿嘧啶苷等药物治疗的患者,会引起 Hcy 检测水平偏高^[6]。在今后的研究中,作者将进一步评价这类药物对该试剂盒测定结果的影响,以对该试剂盒性能进行更加全面的了解。

参考文献

[1] 张传,宝赵海,舰谢结,等.对循环酶法同型半胱氨酸测定试剂盒的评价[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):270-272.

[2] 高静,董振南,田亚平.循环酶法测定血清同型半胱氨酸的临床应用研究[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):199-202.

[3] 戴婉如,陈捧,蓝兰,等.应用循环酶法对血液同型半胱氨酸的测定及临床应用分析[J].福建医药杂志,2007,29,(5):125-126.

[4] 王清涛,秦晓光.同型半胱氨酸的检测和临床应用[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):193-195.

[5] 李立,常玉芝.酶测定中的样品体积分数[J].临床检验杂志,2000,18(4):229-231.

[6] 刘士彬,张勤,邵冰.同型半胱氨酸样本的稳定性检测观察[J].淮海医药,2009,27(5):444.

(收稿日期:2010-09-16)

《检验医学与临床》编辑部成员及联系方式

编辑部主任:辜明铭 (023)63878252 E-mail:cqwsxx@163.com
编辑:石 芸 周晓凤 陈秋莲 张卡琳 吴小莹 曾 玲(实习编辑)
编 务:李 敏(兼编辑) (023)63613484
投稿查询网站: <http://www.labmc.com.cn> <http://jyyx.cqshic.com>