

医学生化

全自动生化分析仪测定血清乳酸
脱氢酶同工酶 I

李国君 田亚平 董振南

(解放军总医院生化科, 北京 100853)

摘要 应用 α -糜蛋白酶和盐酸胍作为抑制剂选择性测定待测样品中乳酸脱氢酶同工酶 I (LD-1)。采用蛋白水解酶和抑制剂来破坏乳酸脱氢酶同工酶 2~5 (LD 2~5) 的活性, 因此不需预处理待测样品, 可直接用于自动生化分析仪。使用日立 7150 分析仪建立了 LD-1 测定参数, 方法变异系数 (CV) 2.7%~4.4%; 测得结果 (y) 与 LD-1 电泳方法 (x) 相关良好, $y = 0.967x - 1.957$, $r = 0.992$ ($n = 37$); 检测了 197 名健康男女血清样品, 确定 LD-1 参考值范围为 29.78~59.26 U/L, $\bar{x} \pm s = (44.58 \pm 7.39)$ U/L。

关键词 乳酸脱氢酶同工酶 I (LD-1), α -糜蛋白酶, 盐酸胍抑制剂, 全自动生化分析仪

乳酸脱氢酶 (LD) 广泛分布于多种组织器官内, 是细胞正常代谢的重要酶类。正常生理条件下, 血清中 LD 的活性较低; 在病理情况下, 由于受损组织细胞内 LD 释放入血液, 使其浓度明显增高。血清中有 5 种 LD 同工酶, 分别来自不同组织器官, LD-1、LD-2 主要来源于心肌细胞, 特别是 LD-1 在血清中的浓度变化可特异性地反应患者心肌总损伤程度。因此 LD 被广泛用于心梗的临床诊断。特别在急性心梗时 LD-1 增加比总 LD 更敏感、特异, 而 LD-1 与 LD 的比值在临床上有重要的鉴别诊断价值^[1,2]。测定 LD-1 一般使用同工酶电泳方法, 因操作不够简便, 应用上受一定影响; 近年来发展的免疫化学方法特异性强, 比电泳方法简便, 但还需要分离抗原抗体复合物。我们依据有关报道^[1~3], 建立了一种可直接用于全自动生化分析仪的蛋白水解酶测定 LD-1 同工酶的分析方法。操作简便, 具有较好特异性, 适于日常生化检验。

1 材料和方法

1.1 试剂

LD-L 试剂盒与 LD 同工酶电泳试剂盒 (北京中生公司); α -糜蛋白酶 38.5 kU/L (ICN 公司); 盐酸胍, 纯度 98% (Sigma 公司); 定值血清和混合血清。

1.2 仪器

六一牌电泳仪 (北京中生公司); 贝克曼电泳仪和光密度计; 日立 7150 全自动生化分析仪; 意大利 BT-224 半自动分析仪。

1.3 方法

1.3.1 LD-1 电泳方法: 样品 5 μ l, 加 α -糜蛋白酶或同时加入盐酸胍混合液 30 μ l, 37℃ 水浴 5 min, 按 LD 同工酶电泳试剂盒说明操作, 电流控制在 30 mA, 电泳 15 min。经活性染色后在贝克曼光密度计上扫描。

1.3.2 全自动生化分析仪 LD-1 方法: 参照日立 7150 分析仪测定 LD 的参数, 样品 $10\ \mu\text{l}$, R1 为 $80\ \mu\text{l}$ (含 $7\ \text{g/L}$ α -糜蛋白酶, $0.7\ \text{mol/L}$ 盐酸胍, pH 8.5 Tris 缓冲液), R2 为 $230\ \mu\text{l}$ (使用 LD-L 试剂), 延迟时间 120 s, 试验温度 37°C , 波长 405/340 nm.

2 结果和讨论

2.1 α -糜蛋白酶浓度

配制浓度为 0、2、4、6、8 和 $10\ \text{g/L}$ 的 α -糜蛋白酶 (pH 8.5 Tris 缓冲液), 取混合血清分别加入不同浓度的 α -糜蛋白酶液, 按 LD-1 电泳方法及全自动生化分析仪方法操作, 结果见图 1 和图 2. 图 1 表明 LD-3、LD-4 和 LD-5

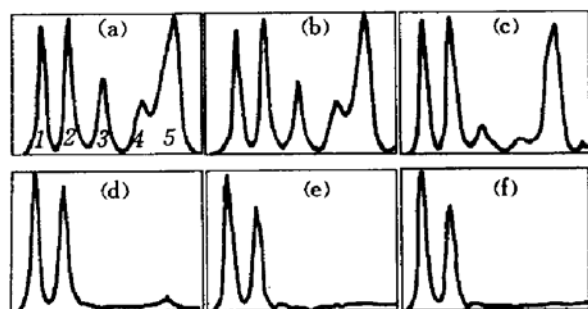


图 1 用同工酶电泳方法测定的 LD-1 活性
1: LD-1; 2: LD-2; 3: LD-3; 4: LD-4; 5: LD-5. (a) ~ (f): α -糜蛋白酶浓度依次为 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 $10.0\ \text{g/L}$.

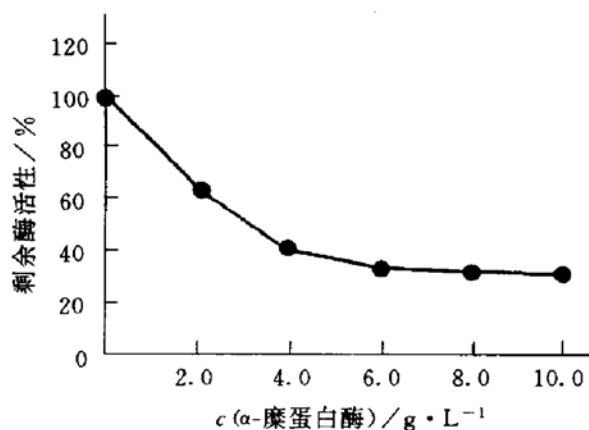


图 2 用日立 7150 分析仪测定的 LD 活性
●—●: LD-1.

随着 α -糜蛋白酶浓度的增加而逐步被抑制失去活性, 至其浓度达 $7\ \text{g/L}$ 以上时, 上述 3 种同

工酶被完全抑制, LD-2 被部分抑制, 而 LD-1 几乎不受影响; 图 2 是日立 7150 分析结果, 当 α -糜蛋白酶 $6\ \text{g/L}$ 以上时, 其结果趋于稳定, 可表示 LD-3、LD-4 和 LD-5 已被完全抑制, 这与电泳结果相符合, 结果还有轻微下降, 则表示 LD-2 仍在受影响.

2.2 盐酸胍与 α -糜蛋白酶联合影响

配制浓度 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 $1.0\ \text{mol/L}$ 的盐酸胍 (含 α -糜蛋白酶 $7.0\ \text{g/L}$, pH 8.5 Tris 缓冲液), 取混合血清分别加入不同浓度的抑制剂, 并分别按 LD 电泳方法及全自动生化分析仪方法操作, 结果见图 3 ~ 图 5.

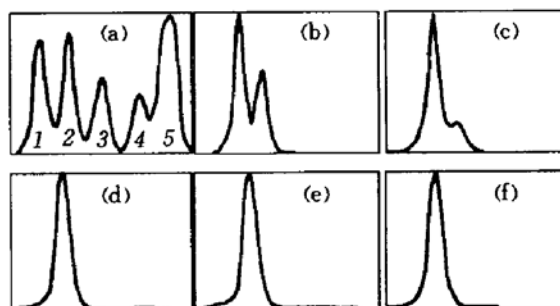


图 3 用同工酶电泳方法测定的 LD-1 活性
1: LD-1; 2: LD-2; 3: LD-3; 4: LD-4; 5: LD-5. α -糜蛋白酶浓度 $7.0\ \text{g/L}$. (a) ~ (f): 盐酸胍浓度依次为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 $1.0\ \text{mol/L}$.

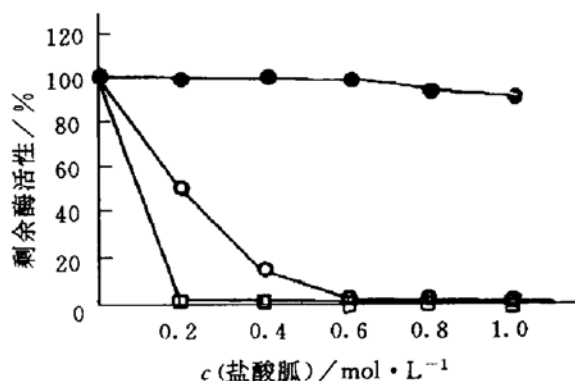


图 4 不同浓度的盐酸胍对 LD-1 活性的影响
●—●: LD-1; ○—○: LD-2; □—□: LD-3, LD-4, LD-5. α -糜蛋白酶浓度为 $7.0\ \text{g/L}$.

由图 3 和图 4 可见盐酸胍浓度在 $0.6\ \text{mol/L}$ 以上时, LD-2 ~ LD-5 被完全抑制而失去活性. 图 5 是日立 7150 仪分析结果, 同样可见盐酸

胍浓度 0.6 mol/L 时, 其结果趋于稳定, 结合图 3 和图 4 分析, LD-1 只受轻微影响^[4].

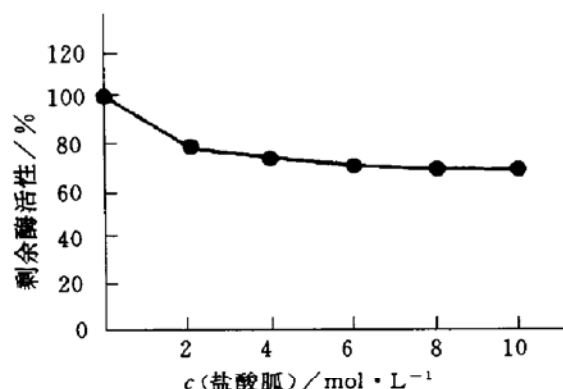


图 5 用日立 7150 分析仪测定的 LD-1 活性

●—●: LD-1.

2.3 LD-1 同工酶抑制线性

取 LD 样品总活性为 3310 U/L, 通过电泳及自动分析仪方法测定, 可计算出抑制 LD-2~LD-5 总酶活性 2638 U/L, 结果见图 4.

2.4 抑制剂反应时间观察

混合血清与抑制剂分别使其在 37℃ 水浴 2.5、5.0、7.5 和 10 min 反应, 参照上述分析方法, 分别在 BT-224 半自动分析仪上测定 LD-1, 结果表明 37℃ 水浴 5 min 即可达到完全抑制目的, 延长时间对结果无影响.

2.5 试剂稳定性观察

将抑制剂 R1 置 2~8℃ 保存, 连续测定 5 d, 图 6 结果表明 R1 在 2~8℃ 时可稳定 48 h, 其测定结果无变化.

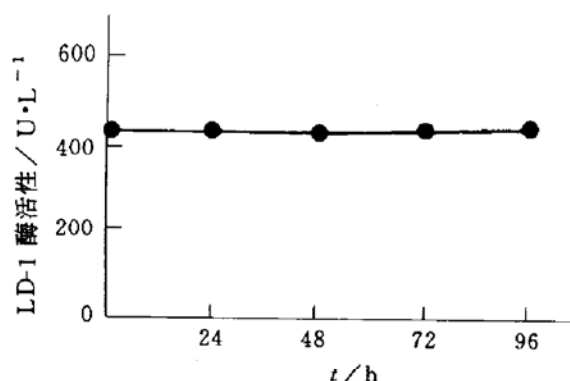


图 6 LD-1 同工酶抑制剂稳定性观察

●—●: LD-1.

2.6 精密度分析

取 LD-1 高中低值样品在日立 7150 分析仪上做重复实验, 计算出变异系数, $CV = 2.7\% \sim 4.4\%$. ($n = 20$, $\bar{x} = 193$).

2.7 方法间比较

取正常及心梗病人样品 45 份, 分别进行 LD 电泳及全自动分析仪测定, 本文方法 (y) 与 LD-1 电泳方法 (x) 相关良好, $y = 0.967x - 1.957$, $r = 0.992$; 另外选择 92 份健康人样品, 在自动分析仪上同时测定 LD 及 LD-1, 经统计 LD-1 占总 LD 的 19.44% ~ 31.00%, $\bar{x} \pm s = (25.22 \pm 2.89)\%$, 此数据与有关文献报道相符^[2,5].

2.8 正常参考值

选自健康男, 女 197 人血清样品 (年龄 20~77 岁), 经 LD-1 测定确定其参考值范围 29.78 ~ 59.36 U/L, $\bar{x} \pm s = (44.58 \pm 7.39)$ U/L.

2.9 临床应用

留取临床确诊的心梗病人样品 58 例, 分别测定 LD-1、LD、CK 和 AST, 结果表明 CK 部分结果增高 (急性心梗患者增高明显), m-AST 结果增高也较明显. 总 LD 测定的平均值为 157.0 U/L, 稍高于正常参考值. 而 LD-1 结果则明显升高 (LD-1 测定平均值为 127.0 U/L), 有 3 例心肌梗塞患者血清 LD-1 比总 LD 的结果增高幅度明显.

实验结果表明, 用 α -糜蛋白酶的作用是破坏 LD-3、LD-4 和 LD-5 的 A 与 B 亚基相连接的苯基丙氨酸键, 使之很快失去活性. 如单独使用盐酸胍不能完全破坏 LD-2, 而若与 α -糜蛋白酶联合使用, 则很快使 LD-2 失活^[3,6], 若盐酸胍浓度很高, 对 LD-1 活性有轻微影响, 因此其浓度应控制在 0.7 mol/L 以下. 本方法由于采用了全自动分析仪测定, 操作简便, 且重复性好, 亦可用于手工及半自动分析仪, 因此可广泛应用于临床医学实验.

参 考 文 献

- 2 Adan J, Bernstein L H, Babb J. Clin Chem, 1986; 32: 624
- 3 Sirahase Y, Watazu Y, Kaneda N *et al.* Clin Chem, 1992; 38 (11): 2193
- 4 Wassarman P M, Burger J W. J Mol Biol, 1972; 67: 537
- 5 Leung F Y, Henderson A R. Clin Chem, 1979; 25: 209
- 6 Onigbinde T A, Wu A H B, Jonson M *et al.* Clin Chem, 1990; 36: 1134

Studies on the Measurement of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme I Activities by Using Automatic Analyzer. Li Guojun, Tian Yaping, Dong Zhennan (*Department of Clinical Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China*).

Abstract A very simple method to determine the activity of LD isoenzyme I by using α -chymotrypsin and guanidine has been developed. LD-3 ~ LD-5 can be completely inactivated and

LD-2 can be partially inactivated by α -chymotrypsin. Guanidine can further completely inactivate LD-2. This method has been used in automatic analyzer. The coefficient of variation of the proteolytic method is among 2.7% ~ 4.4%. Results obtained by the present method correlates with those by the electrophoresis method ($r = 0.992$, $y = 0.967x - 1.957$). In the present assay system, the reference value for LD-1 activity in healthy people ranges from 29.78 ~ 59.26 U/L. The study showed that the selective measurement of LD-1 isoenzyme method is rapid and accurate. It has great clinical significance.

Key words lactate dehydrogenase isoenzyme I, guanidine inhibitor, α -chymotrypsin, automatic analyzer

(上接第 182 页, Continued from page 182)

Abstract A sensitive and precise method for simultaneous determination of some major cholesterol autooxidation products (COPs) was described. The method was based on high performance liquid chromatography (HPLC) with 6-chlorostigmasterol as internal standard. After saponification and extraction, the COPs were derivatized into benzoates for measurement by HPLC with ultraviolet detection. Each product

gave a linear response ($r > 0.9990$) over a concentration range of 0.312 ~ 10.000 mg/L. The intra- and inter- assay co-efficients of variation was 2.15% ~ 5.40% and 1.23% ~ 3.70%, respectively. This method was successfully applied to the determination of COPs in cholesterol standard reference material and in human serum.

Key words cholesterol, cholesterol autooxidation products, HPLC