

酶转换法测定同型半胱氨酸的方法学评价

沈国平 邢建明 毛水莹 费月平 沈玲珑

摘要 **目的** 对酶转换法测定同型半胱氨酸(Hcy)进行方法学评价,以确定其分析性能是否符合临床实验室使用的要求。**方法** 根据 NCCLS 文件和已建立的方法对酶转换法测定 Hcy 的精密度、线性、方法学比较、干扰试验、回收率、试剂稳定性等进行评价和比较。**结果** 酶转换法测定 Hcy 的精密度(批内、批间、日间、总 CV 均 $< 5.0\%$)较高;Hcy 浓度在 $0 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ 内,呈线性关系;酶转换法和循环酶法测定 Hcy 结果两者相关性良好($r^2 = 0.924, n = 60$),测定结果的可靠性是相同的($t = 0.08, P > 0.05$);血红蛋白(Hb) $< 2\text{g/L}$ 、甘油三酯(TG) $< 72\text{mmol/L}$ 、总胆红素(Tbil) $< 340 \mu\text{mol/L}$ 、维生素 C(VitC) $< 10.0\text{g/L}$ 时,酶转换法测定 Hcy 干扰相对偏差 $< 10.0\%$;回收率为 101.25% ;试剂稳定性较好。**结论** 酶转换法测定 Hcy 具有较高的精密度、较宽的线性、较强的抗干扰能力,结果准确可靠,适合在临床实验室使用。

关键词 同型半胱氨酸 酶转换法 方法学评价

Evaluation of the Enzyme Conversion Method to Detect Hcy Shen Guoping, Xing Jianming, Mao Shuiying, et. al, The Maternity and Child Health Care Hospital of Huzhou, Zhejiang 313000, China

Abstract **Objective** To evaluate the enzyme conversion detection method in Hcy in order to determines that the analysis performance can meet the clinical lab requirement or not. **Methods** It evaluated the enzyme conversion method to detect Hcy's precision, linearity, method comparison, interference, recovery and stability by the NCCLS and the established method. **Results** Precision of enzyme conversion method is higher, the CV of intra - batch, inter - batch and between - run individual was less than 5% , the consistencies of Hcy were within $0 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ and shows a linearity relation. The Hcy were detected by the enzymatic cycling assay or the enzyme conversion were better correlation($r^2 = 0.924, n = 60$) and consistency ($t = 0.08, P > 0.05$). Enzyme conversion detection, The interference relative bias was $< 10.0\%$ and the recovery was 101.25% by the enzyme conversion method to detect Hcy when Hb was less than 2g/L , TG was less than 72 mmol/L , Tbil was less than $340 \mu\text{mol/L}$ and VitC was less than 10.0g/L . However, it showed excellent stability. **Conclusion** The enzyme conversion detection of Hcy with better precision, wider working range, better anti - Interference and reliable results is a suitable method to be used in lab.

Key words Hcy; Enzyme conversion; Method Evaluation

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢过程中的中间产物。近年来它的检测技术不断发展,临床应用范围更加广泛,已经成为许多疾病的相关诊断指标。目前,同型半胱氨酸(Hcy)的测定方法有很多种,有高效液相色谱法(HPLC)、离子色谱法、毛细管电泳法、酶联免疫分析法(EIA)、荧光偏振免疫法和循环酶法^[1]。由于以上方法有的操作复杂,有的仪器或试剂昂贵,影响了在国内常规检验及进一步推广普及。现上海复星长征医学科学有限公司生产了一种适用于自动生化分析仪的酶转换法测定 Hcy 试剂盒,本实验对酶转换法测定血清 Hcy 试剂盒进行了方法学评价,同时与循环酶法测定血清 Hcy 试剂盒进行了相关性比较,以

确定其分析性能是否符合临床实验室应用的要求,现总结报告如下。

材料与方法

1. 材料:(1)仪器:美国雅培公司 Abbott Aeroset 全自动生化仪。(2)Hcy 试剂盒:评价试剂由上海复星长征医学科学有限公司提供,含定标液和质控品(低值和高值)。试剂主要成分:Tris 缓冲液 50mmol/L , FeCl_3 50mmol/L , 同型半胱氨酸酶 500U/L , 5 - 磷酸吡哆醛 5mmol/L , 二硫苏糖醇 5mmol/L , 二乙基对苯二胺硫酸盐 2mmol/L 。对照试剂由北京九强生物技术有限公司提供,含定标液和质控品(低值和高值)。试剂主要成分:S - 腺苷甲硫氨酸 0.1mmol/L , 还原型辅酶 0.2mmol/L , 3 (2 - 羧乙基) 膦氯化氢 0.5mmol/L , α - 酮戊二酸 5mmol/L , Hcy 甲基转移酶 5.0kU/L , 谷氨酸脱氢酶 10kU/L , S - 腺苷同型半胱氨酸水解酶 3.0kU/L , 腺苷脱氨酶 5.0kU/L 。(3)测定样本:①定值质控血清,低值质控血清 Hcy = $10.0 \mu\text{mol/L}$, 高值质控血清 Hcy = $20.0 \mu\text{mol/L}$;由上海复星长征医学科学有限公司提供;②临床标本,为来笔者医院健康查体者 60 例,标

作者单位:313000 浙江省湖州市妇幼保健院检验科

通讯作者:沈国平,电子邮箱:sgp2030382@126.com

本均无黄疸、溶血及脂血,年龄 22 ~ 55 岁,男、女性各 30 例,所有标本均采取空腹静脉血 4ml,在 1h 内以 3000r/min 离心 10min 后分离血清待检,健康查体者均无心、肝、肾及血液系统等疾病。

2. 干扰物质:由于实验条件限制,我们选了 4 种临床常见的干扰物质,制备如下:①血红蛋白干扰物:取新鲜乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血用生理盐水反复洗涤数次后,离心弃去生理盐水,加蒸馏水使红细胞完全溶解(镜下瑞氏染色检查),使用 Sysmex - XE - 2100D 血球仪进行血红蛋白检测,加生理盐水配制,血红蛋白(Hb)浓度分别为 32、16、8、4、2g/L;②甘油三酯(TG)干扰物:取高血脂患者样本,使用 Abbott Aeroset 自动生化分析仪进行甘油三酯检测,加生理盐水配制,TG 浓度分别为 72、36、18、9、4.5、2.25mmol/L;③胆红素干扰物:取黄疸患者样本,使用 Abbott Aeroset 自动生化分析仪进行胆红素检测,加生理盐水配制,总胆红素(TBil)浓度分别为 340、170、85、42.5、21.25 μ mol/L;④维生素 C 干扰液:临床用 100g/

L 的维生素 C 注射液加生理盐水配制,维生素 C 浓度分别为 10、7.5、5.0、2.5、1.0g/L。

3. 方法:(1)操作方法:试剂盒测定参数设置和操作严格按照试剂盒厂家规定进行。(2)评价方法:按照 NCCLS 评价方案和已建立的方法对试剂的精密度、线性、抗干扰性、回收率等进行评价,并与北京九强生物技术有限公司生产的 Hey 试剂盒进行相关性比较^[2];通过间隔时间测定评价新配工作试剂的贮存稳定性。

4. 统计学方法:采用 Microsoft Excel 2003 及 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。

结 果

1. 精密度评估:依据 NCCLS 文件,取低值、高值质控血清,每天测定 2 次,两次测定间隔不少于 2h,每次测定对样本均做双份检测,共测定 20 天,计算低值、高值质控血清样本的精密度,结果见表 1。

表 1 Abbott Aeroset 测定 HCY 的精密度评价结果

样本	$\bar{x}$	批内		批间		日间		总	
		S	CV(%)	S	CV(%)	S	CV(%)	S	CV(%)
低值	10.32	0.17	1.65	0.24	2.33	0.44	4.26	0.49	4.75
高值	20.43	0.28	1.37	0.40	1.96	0.58	2.84	0.67	3.28

2. 线性试验:依据 NCCLS 文件,采用试剂盒中浓度为 40.0 μ mol/L 标准液,配制其浓度水平分别为 2、5、10、20、30、40 μ mol/L 的标本进行测定,每个标本测定 4 次,将所得数据平均值作散点图并进行多项式回归统计分析,结果(图 1)表明在测定范围内呈线性,回归方程为: $y = 1.005x + 0.388, r^2 = 1.000$ ^[3]。

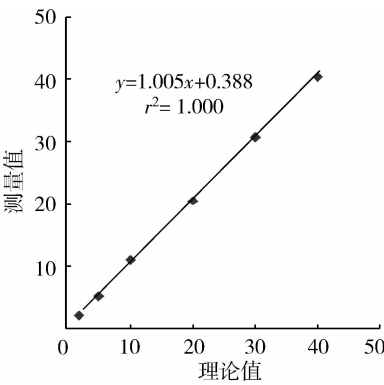


图 1 HCY 试剂的线性实验

进行回归统计分析;结果表明两者测定结果具有良好的相关性($y = 0.901x + 1.170, r^2 = 0.924, n = 60$,图 2);酶转换法测定结果均值:12.77 $\pm$ 6.37 μ mol/L,循环酶法测定结果均值:12.87 $\pm$ 6.80 μ mol/L,两者测定结果均值比较,差异无统计学意义($t = 0.08, P > 0.05$),由此可见两者测定结果基本一致。

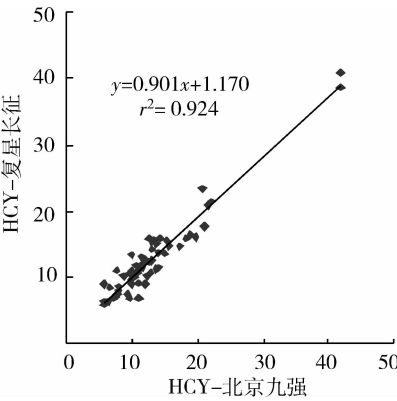


图 2 两种方法测定 HCY 相关性比较

3. 对比试验:依据 NCCLS 文件,我们以复星长征试剂为实验方法,北京九强试剂为比较方法,每天测定 10 个样本,测定时第 1 次按 1 $\rightarrow$ 10 顺序,第 2 次按 10 $\rightarrow$ 1 顺序,用 Abbott Aeroset 生化仪对每个样本进行测定,在 6 个工作日内完成,将所得数据作散点图并

4. 干扰试验:依据 NCCLS 文件,在混合血清标本分别加入临床上常见的干扰物质,生理盐水做平行管对照,每个测试标本分析 2 次,与对照样本结果比较,Hb 干扰比较严重,Hb 浓度在 2g/L 时偏差 < 10%,其余几项偏差均 < 10.0%,干扰试验结果

见表 2。

表 2 HCY 抗干扰试验测定结果

干扰物	血红蛋白 (g/L)	总胆红素 (μmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	维生素 C(g/L)
浓度	2	340	72	10.0
偏差(%)	10.2	4.1	7.8	-7.7

5. 回收试验:采用混合血清标本 2.7ml,平均分成 3 份,分别加入浓度为 20、40μmol/L 的标准溶液和生

理盐水 0.1ml,以生理盐水管做对照,每个测试样本分析 4 次,测的回收样本结果均值为 11.95、14.20μmol/L,对照样本结果均值为 10.0μmol/L,回收率为 97.5% 和 105.0%,平均回收率为 101.25%。

6. 试剂稳定性:新配工作试剂当天在 Abbott Aeroset 自动生化分析仪上定标并测定高、低值质控血清中 Hcy 含量,然后贮存在仪器试剂仓(2~8℃),分别在第 2、3、4 天测定,每个标本上下午各测定 2 次,取当天数据均值记录。结果显示新配工作试剂在说明书注明的 4 天内测定结果无影响(表 3)。

表 3 HCY 新配工作试剂稳定性测定结果

样本	预测值	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天	
		$\bar{x}$	偏差(%)	$\bar{x}$	偏差(%)	$\bar{x}$	偏差(%)	$\bar{x}$	偏差(%)
低值	10.0	10.1	1.0	9.9	-1.0	9.6	-4.0	9.8	-2.0
高值	20.0	20.3	1.5	19.8	-1.0	19.6	-2.0	20.3	1.5

讨 论

Hcy 是一种含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢过程中的中间产物。许多临床研究及大规模流行病学调查表明,Hcy 水平升高是动脉粥样硬化性血管病,动、静脉血栓栓塞、糖尿病、肝脏疾病以及周围血管性疾病等的一个重要的独立危险因素,在临床上测定 Hcy 对于疾病的诊断有很重要的意义^[4,5]。上海复星长征医学科学有限公司生产的 Hcy 试剂,其原理是:以酶转换法为基础,样本中的氧化型同型半胱氨酸首先被还原剂二硫苏糖醇还原为还原型同型半胱氨酸;还原型同型半胱氨酸其后被特异性极高的基因重组同型半胱氨酸酶分解产生 NH₃、α-氧代丁酸、硫化氢;分解产物硫化氢在氧化剂 FeCl₃ 存在下与呈色剂二乙基对苯二胺硫酸盐反应形成甲基蓝色化物;上述反应中形成的甲基蓝色化物与样本中同型半胱氨酸的浓度成正比,通过在波长 660nm 处测定吸光度的变化值,即可测得样本中同型半胱氨酸的总浓度。

我们按照 NCCLS 评价方案和已建立的方法对复星长征公司提供的 Hcy 试剂进行了线性、精密度、抗干扰能力、回收试验等方面的评价试验,结果表明该方法具有较好的精密度,批内、批间、日间、总 CV 均 <5.0%,见表 1;在 0~40μmol/L 内检测线性良好,标准曲线至少可稳定 3 周;平均回收率为 101.25%;我们选用了临床常见的干扰物质,结果表明血红蛋白

干扰比较严重,Hb 浓度在 2g/L 时偏差大于 10%,其余几项偏差均 <10.0%,见表 2;由于实验条件限制,我们与北京九强公司的 Hcy 试剂进行了比较,相关性良好($r^2=0.924, n=60$),两者测定结果基本一致($t=0.08, P>0.05$)。由于试剂 1 需新配制,我们对其进行了稳定性测试,结果表明其在说明书规定的时间内稳定性良好,见表 3。

综上所述,酶转换法测定 Hcy 试剂盒具有操作简便、快速、适合自动生化仪使用操作、具有较高的精密度和准确度、较宽的线性、较强的抗干扰能力和试剂稳定性,符合临床检验使用的要求,适合在临床实验室使用。但是血红蛋白会使测定结果偏高,应注意避免样本溶血。

参考文献

1 韩志钧,黄志峰,卢业成,等. 临床化学常用项目自动分析法[M]. 3 版. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2005:1043-1049
2 王金良,李晓军,涂植光,等. 实用检验医学·下册[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:7-33
3 李萍,刘小娟,黄亨建. 多项式评价线性在实验医学中的应用[J]. 检验医学,2006,21(6):582-587
4 McCully KS. Homocysteine and vascular disease[J]. Nature Medicine, 1996,2(4):386-389
5 贾琰,穆红. 同型半胱氨酸的检测技术与临床应用新进展[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(11):1023-1025

(收稿:2011-03-25)
(修回:2011-04-13)