

谷 - 丙转氨酶活性测定方法的改进

邓文溢¹, 荣欣茹¹, 文江平^{2*}

¹首都医科大学第四临床医学院, 北京

²首都医科大学附属北京同仁医院检验科, 北京

Email: wenjiangping1224@126.com

收稿日期: 2021年6月4日; 录用日期: 2021年6月18日; 发布日期: 2021年7月5日

摘要

背景: 目前, 谷 - 丙转氨酶活性采用比色法测定。但在经典测定方案中, 加入显色剂后, 对照管中须加入与测量组等体积的谷丙转氨酶底物液, 而对照管中先前加入的血清未灭活, 可能具有酶活性, 并与底物液发生额外的转氨基反应, 造成阴性对照失真。目的: 探究和了解经典谷 - 丙转氨酶活性测定实验方案的原理和流程, 优化原有实验方案。方法: 按经典方案进行操作, 发现其由于对照管转氨酶不及时灭活可能对对照失真的问题; 改进方案验证, 将测定管和对照管分别细分为灭活管与非灭活管, 按经典方案进行操作, 并对实验结果进行比较分析。结果: 灭活与否显著影响对照管的光密度值, 但不影响测定管光密度值。即灭活后的对照管光密度值明显小于未灭活的对照管, 而灭活的测定管光密度值则几乎与未灭活的测定管相等。结论: 经典实验在颜色反应前未对已有的转氨酶灭活, 导致转氨基反应持续进行, 对照管无法形成阴性对照。应该将原实验所有试管在颜色反应之前统一进行高温处理, 以此将血清中的转氨酶及时灭活。

关键词

血清谷丙转氨酶, 酶活性测定, 改进

The Improvement of the Existing Experimental Scheme for the Determination of Serum ALT Activity

Wenyi Deng¹, Xinru Rong¹, Jiangping Wen^{2*}

¹The Forth Clinical College, Capital medical University, Beijing

²Department of Laboratory Medicine, Beijing Tongren Hospital, Capital medical University, Beijing

Email: wenjiangping1224@126.com

*通讯作者。

文章引用: 邓文溢, 荣欣茹, 文江平. 谷 - 丙转氨酶活性测定方法的改进[J]. 生物医学, 2021, 11(3): 142-148.
DOI: [10.12677/hjbm.2021.113019](https://doi.org/10.12677/hjbm.2021.113019)

Abstract

Background: At present, colorimetry was used to determine the activity of serum ALT. However, in this classical measurement scheme, we should add the same volume of ALT substrate solution to the control group as the experimental group after we add chromogenic agent. The serum ALT added before has not been inactivated, which means it may still have enzyme activity and catalyze additional transamination with substrate solution at the same time, resulting in the distortion of the negative control. **Objective:** To explore and understand the principle and process of the classical experiment for the determination of ALT activity and optimize the original experimental scheme. **Methods:** We operated the classical scheme, and found that the inactivation of transaminase in the control tubes in time might cause the distortion of negative control. The improved scheme was set up to verify this conjecture, where the test tubes in the experimental group and the control group were both divided into inactivated tubes and non-inactivated tubes respectively. We operated the improved scheme in accordance with steps of the classical scheme and compared the results between the two schemes. **Results:** The inactivation has a significant effect on the optical density of the control tubes, but not on that of the experiment tubes. That is, the optical density of the inactivated control tubes was significantly lower than that of the uninactivated control tubes in the original scheme, and the optical density of the inactivated experimental tubes was almost the same as that of the uninactivated experimental tubes in the original scheme. **Conclusion:** The classical experiment did not inactivate the existing ALT before the color reaction, which led to the continuous transamination so that the negative control could not be formed between the control group and experimental group. All test tubes in the original experiment should be uniformly processed at high temperature before the color reaction so as to inactivate the serum ALT in time.

Keywords

Serum ALT, Determination of ALT Activity, Improvement

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人体各组织中转氨酶的含量差别很大。转氨酶只分布于细胞内，正常血清中含量甚微。谷 - 丙转氨酶(glu-tamic pyruvic acid transaminase, GPT)又称丙氨酸转氨酶(alanin transaminase, ALT)在肝脏细胞内含量较高，当发生肝脏疾病时，将导致肝细胞受损，转氨酶便会释放入血，引起血清转氨酶(如 ALT)的升高。临床上血清谷丙转氨酶水平是肝脏病变的重要指标之一，能较为敏感地监测肝脏是否受到损害。因此定量测定血清 ALT 的活性可以作为肝脏相关疾病诊断和预后监测的指标之一[1]。脂肪肝、肝炎、肝癌、肝硬化、大量或长期饮酒、熬夜、感冒、甚至剧烈运动等均有可能致使 ALT 升高[2]-[7]。ALT 越高，表明肝损伤越严重，治疗越困难[8] [9]。且 ALT 的动态变化对肝脏损害的诊断也具有重要的指导意义[10]。在健康管理过程中，筛检主要是为了早期发现患者和高危人群[11] [12] [13] [14] [15]；而血站、采供血系统对献血者的血液检测 ALT 则主要是为了保障受血者及血液制品的安全，备受关注[16] [17] [18] [19]。

目前, 为了了解测定血清中谷 - 丙转氨酶的活性在临床诊断中的意义, 掌握血清谷 - 丙转氨酶活性测定的原理和方法, 经典测定方法为: 以丙氨酸和 α -酮戊二酸为底物, 在 37°C , $\text{pH}7.4$ 条件下, 谷 - 丙转氨酶催化底物生成丙酮酸和谷氨酸, 再利用显色剂 2,4-二硝基苯肼与丙酮酸反应, 生成丙酮酸二硝基苯腙。其在碱性溶液中呈棕红色, 在 520 nm 处有最大特征光吸收, 颜色深浅与丙酮酸生成量成正比。用比色法测定其光密度, 与经同样处理的标准丙酮酸溶液比较, 即可计算谷 - 丙转氨酶活性。本方法中血清谷 - 丙转氨酶活性单位定义如下: 每毫升血清在 $\text{pH}7.4$, 37°C 保温条件下与底物作用 30 分钟后, 每生成 $2.5\ \mu\text{g}$ 的丙酮酸为一个谷 - 丙转氨酶活性单位, 得出的酶活性单位正常值为 $2\sim 40\ \text{U/ml}$ 。本实验所用理论公式为: 酶活性单位/ $\text{ml} = [(\text{测定管 O.D} - \text{对照管 O.D})/\text{标准管 O.D}] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1$ [1]。但经观察和讨论, 猜想在原实验测量过程中实验步骤和条件可能存在不合理之处, 即为了保证测量组和对照组的变量唯一, 在所有管均加入显色剂之后, 须向对照管中再加入与测量组等量的谷丙转氨酶底物液。而先前加入的血清没有进行灭活处理, 此时可能依旧具有酶活性, 并与底物液发生额外的转氨基反应。由此可能导致对照管无法与测定管形成阴性对照, 所得数据无实际意义, 不能直接代入公式运算, 最终影响实验结果的准确性。因此, 本文对原来经典实验进行改进, 设计成一新的改进方案, 以验证原实验是否存在问题以及改良是否合理, 以提高最终实验测定结果的准确性。

2. 原实验及改进方案

2.1. 材料与试剂

- (1) $50\ \mu\text{g/ml}$ 标准丙酮酸液: 准确称取丙酮酸钠 $6.25\ \text{mg}$, 溶于 $0.05\ \text{mol/L}$ 硫酸 $100\ \text{ml}$ 中, 用前配制。
- (2) $0.1\ \text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液: 称取磷酸氢二钾 $13.97\ \text{g}$ 和磷酸二氢钾 $2.69\ \text{g}$ 加蒸馏水溶解, 定容至 $1000\ \text{ml}$ 。
- (3) 谷 - 丙转氨酶底物液: 称取 α -酮戊二酸 $29.2\ \text{mg}$, 丙氨酸 $1.78\ \text{g}$, 用 $0.1\ \text{mol/L}$ NaOH 调整至 $\text{pH}7.4$ 。最后用磷酸盐缓冲液稀释至 $100\ \text{ml}$ 。冰箱保存。
- (4) 0.02% 2,4-二硝基苯肼: 用 $1\ \text{mol/L}$ HCl 配制。
- (5) $0.4\ \text{mol/L}$ NaOH 。
- (6) 血清样品。

2.2. 器材

- (1) 恒温水浴箱。
- (2) 分光光度计、比色杯。
- (3) 吸量管、试管。
- (4) 微量加样器。

2.3. 实验方案

- (1) 原实验方案:

取干燥洁净试管 7 支, 编号 1~7 号。其中 1、2 号管作标准管; 3 号管作空白管; 4、5 号管作测定管 (2 次重复); 6、7 号管作对照管。按表 1 中步骤进行操作。

- (2) 改进方案:

在原实验方案的基础上, 增加干燥洁净的试管 4 支, 编号 8、9 号管作灭活对照管, 10、11 号管作灭活测定管 (2 次重复)。在原实验步骤的基础上, 37°C 保温 $10\ \text{min}$, 然后 8~11 管 100°C 保温 $15\ \text{min}$, 杀灭对照管和测定管中的酶活性。按表 1 中步骤进行操作。

Table 1. The volume of each solution added to each test tube and the sequence of steps**表 1.** 各试管中加入各溶液的体积值和步骤顺序

试剂(ml)	管号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
蒸馏水	0.5	0.5	1.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
谷丙转氨酶底物液	—	—	—	0.5	0.5	—	—	—	—	0.5	0.5
血清	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
各测量管和对照管分别混匀, 37℃准确保温 30 min											
100℃灭活, 15 min											
2,4-二硝基苯肼	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
丙酮酸标准液	0.5	0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
谷丙转氨酶底物液	—	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—
0.4mol/L NaOH	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
室温静置 10 min											
吸光度检测	520 nm 波长检测吸光度										

注: 底色为蓝色部分为新增的实验, 8~9 为灭活的对照管, 10~11 为灭活的测定管。谷 - 丙转氨酶活性单位/ml = [(测定管 O.D - 对照管 O.D) / 标准管 O.D] × 50 × 0.5 × 1/2.5 × 1/0.1 [1]。

3. 结果与分析

3.1. 原实验方案结果

按照实验方案, 测得标准管、空白管、测定管和对照管的 OD 值见表 2, 由公式计算的 ALT 的酶活性单位/ml = $[(0.323 + 0.324) \div 2 - (0.198 + 0.205) \div 2] / [(0.393 + 0.427) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 29.8$ U/ml。

Table 2. The optical density**表 2.** 光密度数值

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
数值(O.D)	0.415	0.437	0.000	0.323	0.324	0.204	0.206	0.045	0.066	0.343	0.380

3.2. 改进方案结果

按照实验方案, 测得标准管、空白管、测定管(灭活与非灭活)和对照管(灭活与非灭活)的 OD 值见表 2, 对 ALT 酶活性进行计算:

测定管和对照管同时进行高温(100℃)灭活: ALT 的酶活性单位/ml = $[(0.343 + 0.38) \div 2 - (0.045 + 0.066) \div 2] / [(0.415 + 0.437) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 71.8$ U/ml。

只对照管进行高温(100℃)灭活: ALT 的酶活性单位/ml = $[(0.324 + 0.323) \div 2 - (0.045 + 0.066) \div 2] / [(0.415 + 0.437) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 63.3$ U/ml。

3.3. 对比分析

(1) 37℃准确保温 30 min 后高温(100℃)灭活酶活性对对照管 OD 值的影响。

在改进的实验中, 6、7、8和9号管为对照管, 6号和7号管的测定参照原实验方案, 8号和9号管在37℃准确保温30 min后, 经100℃高温处理, 灭活血清中ALT的酶活性。添加2,4-二硝基苯肼和谷丙转氨酶底物液后, 分别测定6、7、8和9号管的OD值, 结果见表2。实验结果表明, 6和7号管的OD值平均为0.205, 8和9号管的OD值平均为0.055, 相当于6和7号管的OD值平均值的26.8%, 显著小于6和7号管的OD值平均值。说明经过37℃准确保温30 min后, 是否进行100℃高温处理对测定的OD值影响极大, 也说明添加2,4-二硝基苯肼和谷丙转氨酶底物液后, 6和7号管的酶促反应一直在进行之中。

(2) 37℃准确保温30 min后高温(100℃)灭活酶活性对测定管OD值的影响。

在改进的实验中, 4、5、10和11号管为测定管, 4号和5号管的测定参照原实验方案, 10号和11号管在37℃准确保温30 min后, 经100℃高温处理, 灭活血清中ALT的酶活性。添加2,4-二硝基苯肼后, 分别测定4、5、10和11号管的OD值, 结果见表2。实验结果表明, 4和5号管的OD值平均为0.324, 10和11号管的测定值平均为0.36, 基本持平。说明经过37℃准确保温30 min后, 是否进行100℃高温处理对测定的OD值影响不大。

(3) 37℃准确保温30 min后高温(100℃)灭活酶活性对ALT酶活性测定值的影响

按照原实验的测定数据, 由公式计算的ALT的酶活性单位/ml = $[(0.323 + 0.324) \div 2 - (0.198 + 0.205) \div 2] / [(0.393 + 0.427) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 29.8 \text{ U/ml}$ 。

按照改进后的测定数据, 对ALT酶活性进行计算。

测定管和对照管同时进行高温(100℃)灭活: ALT的酶活性单位/ml = $[(0.343 + 0.38) \div 2 - (0.045 + 0.066) \div 2] / [(0.415 + 0.437) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 71.8 \text{ U/ml}$ 。

只对对照管进行高温(100℃)灭活: ALT的酶活性单位/ml = $[(0.324 + 0.323) \div 2 - (0.045 + 0.066) \div 2] / [(0.415 + 0.437) \div 2] \times 50 \times 0.5 \times 1/2.5 \times 1/0.1 = 63.3 \text{ U/ml}$ 。

分别为原实验求得酶活性数值的240.9%和212.4%, 均显著增高。

4. 讨论

(1) 37℃准确保温30 min后高温(100℃)灭活酶活性对对照管OD值得影响。

在改进方案中, 两支非灭活对照管与两支灭活对照管最终光密度数值相差较大, 表明了两支非灭活对照管明显生成了较多的显色物质, 即丙酮酸二硝基苯腙, 又由于每管所提供的2,4-二硝基苯肼的量是相等的, 因此表明非灭活对照管产生了较多的丙酮酸。而非灭活对照管与灭活对照管在实验条件上的不同之处在于: 灭活对照管在加入底物液前对试管液体进行了100℃加热处理, 这就使得之前加入的血清中的酶被灭活, 进而导致后续的转氨基反应生成丙酮酸几乎无法进行。相反, 非灭活对照组中由于没有进行100℃的高温处理, 血清中的酶没有被灭活, 转氨基反应依然有发生的可能性。结合实验数据可得出, 由于非灭活对照管中的酶没有被灭活, 导致在加入底物液之后的保温条件下, 明显生成了较多的丙酮酸, 导致最终的测出了较大的光密度。

(2) 37℃准确保温30 min后高温(100℃)灭活酶活性对测定管OD值得影响。

对比两支非灭活测定管和两支灭活测定管的数据结果, 发现灭活管的数值稍大于非灭活管的数值。非灭活测定管与灭活测定管在实验条件上的不同之处在于: 非灭活测定管在保温30 min后对试管液体进行了100℃加热处理, 这就使得之前加入的血清中的酶被灭活, 进而导致后续反应中几乎将不再生成新的丙酮酸。相反, 非灭活测定管中由于没有进行100℃的高温处理, 血清中的酶没有被灭活, 转氨基反应依然有发生的可能性。假设非灭活测定管在后续的第二次保温时间内或其他时间内以较大反应速率生成了较大量的新的丙酮酸, 则非灭活测定管最终的光密度数值应该明显大于灭活测定管, 但是数据显示灭

活测定管光密度反而稍大于非灭活测定管光密度,这显然与假设不成立,因此说明非灭活测定管在之前的 30 min 保温时间内,转氨基反应已经接近反应平衡,后续时间段内即使酶没有被灭活,转氨基反应速率也很小或为零,导致没有生成新的丙酮酸。至于导致灭活测定管光密度反而大于非灭活测定管的原因可能是分光光度计本身存在一定故障与质量问题,或者实验人员自身操作问题。

(3) 37℃准确保温 30 min 后高温(100℃)灭活酶活性对 ALT 酶活性测定值的影响

由此可以得出,在原实验中,对照管在加入底物液之后的保温时间内以及其他时间内,底物在酶的作用下,通过较大速率的转氨基反应,生成了较多的丙酮酸。而在测定管中,在第一次保温时间结束后的操作过程中,由于转氨基反应已基本达平衡,所以几乎不再生成新的丙酮酸,即使在 10 min 的保温操作下,也只是发生了第二步反应,即丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼的反应。因此两管丙酮酸生成量不仅在 30 min 保温操作下有较大差值,在 30 min 保温后也有较大差值,根据公式酶活性单位/ml = [(测定管 O.D - 对照管 O.D)/标准管 O.D] × 50 × 0.5 × 1/2.5 × 1/0.1,公式成立的前提是测定管和对照管的丙酮酸生成量差值存在且仅存在于 30 min 的保温时间内,原实验不满足这一条件,故数据无意义。在改进方案中,灭活对照管和灭活测定管由于在保温后均进行了灭活处理,在后续操作中,几乎都不再生成新的丙酮酸,因此满足公式成立条件,数据有意义。

5. 结论

将原方案的所有试管 37℃准确保温 30 min 后再高温(100℃)处理 15 min,可确保实验准确。

基金项目

本文受国家自然科学基金(31160394, 1560556),首都医科大学科研培育基金(PYZ2018116)资助。

参考文献

- [1] 侯燕芝, 张海燕. 肝脏疾病与血清酶活性的分析测定:血清谷-丙转氨酶活性测定[M]. 医学生物学实验教程. 北京: 北京大学医学出版社.
- [2] 赵崇贵, 罗菊香. 血清总胆汁酸及谷丙转氨酶测定在肝胆疾病中的意义[J]. 吉林医学, 2010, 31(24): 4042.
- [3] 陈洁, 吴建锋. 血清酶与总胆汁酸联合检测在常见肝脏疾病中的诊断价值[J]. 实用医技杂志, 2011, 13(1): 35-36.
- [4] 刘素霞. 肝功能检查对诊断慢性乙型肝炎的临床意义[J]. 中国校医, 2015, 29(12): 938, 941.
- [5] 吕晓. 6 项肝功能指标检测在诊断肝病方面的临床价值分析[J]. 当代医药论丛, 2014, 12(8): 42-43.
- [6] 胡司淦, 邵杉, 吴士礼, 刘进军, 宣玲, 李妙男, 等. 肝功能异常水平对慢性心力衰竭患者的预测价值[J]. 岭南心血管病杂志, 2013, 19(2): 178-181.
- [7] 袁艳伟. 肝炎肝硬化患者的肝功能检验结果的临床意义分析[J]. 大家健康(下旬版), 2015(5): 79.
- [8] 黄斌伦, 叶均, 严春霞, 金耀建, 高素华, 金苑青, 朱莞玲. 某高校新生谷丙转氨酶升高原因的调查分析[J]. 金华职业技术学院学报, 2016, 16(6): 79-82.
- [9] 刘瑜. 慢性乙肝合并肝硬化患者血清谷丙转氨酶、乙肝表面抗原水平与肝功能的相关性分析[J]. 中外女性健康研究, 2018(11): 138, 155.
- [10] 董入奈. 肝损伤与谷丙转氨酶的动态关系(附 44 例临床分析) [J]. 综合临床医学, 1995(4): 39-40.
- [11] Kim, H.C., Nam, C.M., Jee, S.H., Han, K.H., Oh, D.K. and Suh, I. (2004) Normal Serum Aminotransferase Concentration and Risk of Mortality from Liver Diseases: Prospective Cohort Study. *BMJ*, **328**, Article No. 983. <https://doi.org/10.1136/bmj.38050.593634.63>
- [12] Kariv, R., Leshno, M., Beth-Or, A., Strul, H., Blendis, L., Kokia, E., Noff, D., Zelber-Sagie, S., Sheinberg, B., Oren, R. and Halpern, Z. (2006) Reevaluation of Serum Alanine Aminotransferase Upper Normal Limit and Its Modulating Factors in a Large-Scale Population Study. *Liver International*, **26**, 445-450. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01197.x>
- [13] Van der Poorten, D., Kenny, D.T., Butler, T. and George, J. (2007) Liver Disease in Adolescents: A Cohort Study of

- High-Risk Individuals. *Hepatology*, **46**, 1750-1758. <https://doi.org/10.1002/hep.21918>
- [14] Lee, J.K., Shim, J.H., Lee, H.C., Lee, S.H., Kim, K.M., Lim, Y.S., Chung, Y.H., Lee, Y.S. and Suh, D.J. (2010) Estimation of the Healthy Upper Limits for Serum Alanine Aminotransferase in Asian Populations with Normal Liver Histology. *Hepatology*, **51**, 1577-1583. <https://doi.org/10.1002/hep.23505>
- [15] 董忠生, 杨少龙, 傅宜方. 从单项筛检 ALT 结果看常见肝病的“过度诊断”与“过度治疗” [J]. 医学争鸣, 2014, 5(2): 20-24.
- [16] 黄佰里, 朱立春, 王拥军, 徐霄勤, 严力行. 献血者筛查 ALT 作用的探讨[J]. 中国输血杂志, 2002, 15(2): 123-124.
- [17] 何博, 黄晓斌, 戚艳萍, 苏玮, 陈小光. 广州血液中心无偿献血者初筛 ALT 活性效果评价[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(7): 796-798.
- [18] 杨茹, 李刚, 姚立. 武汉地区献血人群转氨酶异常升高原因探讨[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(6): 635-637.
- [19] 陈善华, 王志红. 献血员筛查丙氨酸氨基转移酶的重要性分析及评价[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2012, 25(5): 674, 684.