

医学生化

改良红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性直接测定法

关广雄* 曹予明

(广州医学院第二附属医院, 广州 510260)

沈雁

(广州市红十字会医院, 广州 510220)

摘要 建立一个在全自动生化分析仪上, 去除 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGD) 对结果的影响且能准确、快速检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 活性的定量方法. 采用自动扣减样本空白的速率法对 107 例正常人, 31 例 G6PD 明显缺陷病人 (经高铁血红蛋白还原率法筛选) 血样本进行测定. 表明灵敏度达 0.27 U/gHb, 批内 CV = 5.6%; 批间 CV = 9.4%. 线性范围在 0~15 U/gHb. 与常规的高铁血红蛋白还原率法结果比较, 两法相关系数 (r) = 0.863. 速率法特异性较好, 有结果稳定、准确、操作简便、检测快速等优点, 是一种值得推广使用的方法.

关键词 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶, 速率法, 高铁血红蛋白还原率法

学科分类号 R446, R112

目前, 在一些技术较先进的国家广泛使用 G6PD 活性的定量检测方法. 为探索一种操作简便、快速、结果可靠, 更适合临床要求的检测方法, 我们参考文献 [1~5], 建立一个在日立 7170 全自动生化分析仪上自动扣减样本空白的速率法, 并对 168 例临床标本进行测定和评价.

1 材料与方法

1.1 仪器

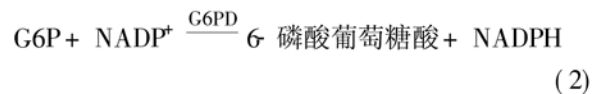
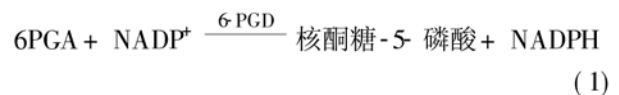
日立 7170 全自动生化分析仪 (日立公司产, 日本)

1.2 试剂组成

G6PD 试剂盒由 Randox 公司提供 (英国); 6-PGAN₃ 购自 Sigma 公司; R₁: 60 mmol/L Triethanolamine 缓冲液 (pH 7.0), 0.37 mmol/L NADP⁺. 另按 6 mmol/L 的 6-PGAN₃ 加入至 R₁ 试剂中; R₂: 0.58 mmol/L G6P; 溶血素: 0.5% 毛地黄皂苷; 氰化血红蛋白试剂, 带纯化 Hb 标准 (150 g/L, 上海生物制品所产).

1.3 方法

1.3.1 原理: 在红细胞戊糖代谢旁路中, G6PD 及 6PGD 两步酶促反应都可产生 NADPH, 如果在反应系统中同时添加底物葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖酸-6-磷酸, 所测得的活性是反映 G6PD 与 6PGD 之和, 再减去单纯加底物葡萄糖酸-6-磷酸所测得的 6PGD 活性, 则反映 G6PD 的真实活性. 反应式如下:



1.3.2 溶血液制备: 取枸橼酸盐抗凝全血 750 g 离心 5 min 后吸取红细胞层 0.2 ml, 每次以 3 ml 0.9% NaCl, 750 g 离心 5 min, 重复清洗 3 次, 吸尽上清, 加入 0.5% 溶血素 0.5 ml, 混匀, 让红细胞溶解充分. 放 4℃ 静置 10 min, 再于 750 g 离心 5 min, 取上清 0.2 ml 测定.

1.3.3 检测过程: 扣减样本空白的速率法 (Rate), 波长为 340 nm, 温度为 37℃, 4 μl 样品体积, 反应开始时, 加入 250 μl R₁, 当反应至第 8 点~第 15 点为 ΔA₁ (6PGD), 反应至第 5 分钟加 25 μl R₂, 反应至第 18 点~第 25 点为 ΔA₂ (G6PD+6PGD); ΔA = ΔA₂ - ΔA₁. 在 7170 全自动生化分析仪上全反应过程监测, 10 min 共读取 34 点吸光度 (A), 每点间隔为 18 s.

另设一通道用于氰化血红蛋白试剂测定溶血液 Hb 浓度.

1.3.4 计算公式:

$$\text{G6PD(U/L)} = K \times \Delta A \quad (1)$$

$$\Delta A = \Delta A_2 - \Delta A_1$$

* 通讯联系人.

Tel: 020-84411511-251, E-mail: Ana8cn2001@yahoo.com.cn

收稿日期: 2000-09-11, 接受日期: 2000-09-28

$$\Delta K = \frac{TV}{SV} \times \frac{1000}{\epsilon \times L} = \frac{279}{4} \times \frac{1000}{6.3 \times 1} = 11071$$

$$G6PD(U/g) = \frac{G6PD(U/g)}{Hb(g/L)} \quad (2)$$

TV : 总反应体积 μ l; SV : 样本体积 μ l; ϵ : NADPH 在 340 nm 波长摩尔消光系数, L : 光径为 1 cm.

1.3.5 单位定义: 每克血红蛋白的 G6PD 在 37℃ 每分钟水解 1 μ mol G6P 为 1 个单位.

2 结 果

2.1 批内, 批间重复试验

取两份标本, 分别做批内、批间重复性试验, 结果见表 1.

表 1 批内批间重复性结果

	批内	批间
\bar{x} (μg^{-1})	2.58	2.46
s	0.148	0.229
CV (%)	5.6	9.4

$n=10$.

2.2 6PGAN₃ 浓度的选择

配制 R₁ 试剂, 加入 6PGAN₃ 底物, 浓度由 1 ~ 6 mmol/L 共 6 个浓度, 按单试剂测定 6-PGD 方法, 在 2~ 8 mmol/L 底物浓度其酶单位均无明显变化, 观察 10 min 反应, 其线性良好. 为保证 6-PGD 反应完全, 本文采用 6 mmol/L 6-PGAN₃.

2.3 灵敏度

取一标本置 56℃ 24 h, 灭活 G6PD 活性后重复测定 10 次, 结果 $x=0.0$, $s=0.091$. 本法最低检测限为 0.273 U/gHb.

2.4 线性范围

取一份 G6PD 高活性标本 (15 U/g) 同时用生理盐水稀释为: 5 U/g、10 U/g, 用本法测定, 结果在 0~ 15 U/g 范围内, 线性良好.

2.5 G6PD 检测结果

应用本法检测 107 例正常人, 30 例中间值, 31 例 G6PD 缺陷病人标本 (经高铁血红蛋白还原率法筛选), 结果见表 2.

表 2 G6PD 检测结果

	例数	均值	s	范围 $x \pm 2s$
正常值	120	5.6	1.4	2.8~ 8.2
中间值	25	1.86	0.48	0.9~ 2.8
明显缺陷	23	0.5	1.16	< 0.8

2.6 对比试验

采用 168 例临床标本进行测定, 分别用两种方法对三组病例进行检测, 比较两者的符合率 (表 3).

表 3 两种方法比较

	正常	中间值	缺乏
速率法 (例)	120	25	23
高铁血红蛋白还原试验 (例)	107	17	21
符合率/%	89.2	68.0	91.3
相关系数 (r)	0.863		

3 讨 论

红细胞 G6PD 缺乏是溶血性疾病的重要病因之一, 尤其在南方各省 G6PD 缺乏引起的溶血性疾病更为常见. 对人群进行 G6PD 活性的优生普查及对临床上有溶血的病人进行检测, 均需要选择一种准确、快速、简便易行的方法. 在国内, 检测 G6PD 活性的方法较多, 如改良的四氮唑蓝法, 荧光斑点法, 美蓝吸收法, 高铁血红蛋白还原率法及酶活性直接测定法等. 其中多采用后两种检测方法. 现在我们采用建立在 7170 全自动生化分析仪上的自动扣减样本空白的速率法, 对 168 例临床标本 (经高铁血红蛋白还原试验测定后) 进行检测, 其结果作统计分析, 结合临床资料, 正常人均值为 5.6 U/g, 范围: 2.8~ 8.2 U/g, 中间值: 均值 1.86 U/g, 范围: 0.9~ 2.8 U/g; G6PD 明显缺陷均值为 0.5, 范围 < 0.82 U/g. 与文献 [4] 结果相一致; 方法灵敏度为 0.275 U/g, 批内 $x=2.58$ U/g, $s=0.148$, CV 为 5.6%; 批间 $x=2.46$ U/g, $s=0.229$, CV 为 9.4%. 线性范围: 0~ 15 U/g 内线性良好. 与高铁血红蛋白还原试验结果对比分析, 两种方法相关系数 (r) 为 0.863. 高铁血红蛋白还原试验对于血红蛋白病、贫血等病人的标本会产生假阳性; 速率法能准确、快速检测出正常人与 G6PD 明显缺陷病人, 且特异性较好, 因此可应用于临床检验工作中.

商品 G6PD 试剂盒定量方法都以测定 NADPH 为基础, 而 NADPH 的产量同时受到 G6PD 和 6PGD 的影响, 即 G6PD 酶促反应所产生的 6-PGA 可作为底物供 6-PGD 继续反应产生 NADPH, 而我们采用 7170 全自动生化分析仪特有扣减空白的速率法, 在 R₁ 中添加 6PGAN₃, 用 G6PD 活性+ 6-PGD 活性减去 6-PGD 活性, 能够准确地反映

G6PD 的活性.

本文以 U/gHb 作单位, 校正吸样粘附和洗涤血球所引起的误差, 较之原试剂盒及其他测定方法更准确表达 G6PD 的活性.

为满足临床工作中操作方法简便快速的要求, 我们还进行了检测样本预处理工作中, 减少洗涤步骤的对比分析, 结果红细胞洗涤 1 次与 3 次之间结果无显著性差异. 因此, 在标本预处理工作步骤中, 洗涤 2 次即可.

在检测过程中, 我们采用 109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝, 并要求当天完成检测. 如果不能当天完成检测, 应采用全血保养液保存. 溶血液的制备, 要求 Hb 浓度在 30 g/L 左右检测 G6PD 活性最佳^[3]. 经本法实验证实, 标本中 Hb 浓度太低时, 酶总量偏低, 测定的反应线性不好, 而 Hb 浓度太高, 起始吸光度太高, 造成光度计测定不准确.

参 考 文 献

- 1 杜传书. 红细胞 G-6-PD 活性的测定及其临床应用. 输血及血液学, 1979, 3 (2): 31~ 34
Du C S. SHU XUE JI XUE YE XUE, 1979, 3 (2): 31~ 34
- 2 许延康, 吴秋玲, 芮琳, 等. 对红细胞 G-6-PD 活性测定的几种筛选方法的评价. 中华医学检验杂志, 1980, 3 (4): 217~ 219
Xu Y K, Wu Q L, Rai L, et al. Chin J Lab Med, 1980, 3 (4): 217~ 219
- 3 陈顺存, 王效思, 冯泰宝, 等. 红细胞 G-6-PD 活性快速分光光度法测定及临床应用. 中华医学检验杂志, 1981, 4 (2): 105~ 107
Chen S C, Wang X S, Feng T B, et al. Chin J Lab Med, 1981, 4 (2): 105~ 107
- 4 顾荣泉, 王文冠, 贺根兴. 红细胞 G-6-PD 和 PK 测定法及其临床应用. 上海医学检验杂志, 1993, 8 (2): 95~ 97
Gu R Q, Wang W G, He G X. Shanghai J Lab Med, 1993, 8 (2): 95~ 97
- 5 Katsinelos P, Eugenidis N, Vasiliadis T, et al. Aemolysis due to G6PD deficiency, induced by endoscopic sphincterotomy. Endoscopy, 1998, 30 (6): 581

A Modified Assay of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase in Red Blood Cell

GUAN Guang-Xiong*, CAO Yu-Ming

(Department of Laboratory, The Guangzhou Second Medical College Hospital, Guangzhou 510260, China)

SHEN Yan

(Guangzhou Red Cross Hospital, Guangzhou 510220, China)

Abstract To develop a precise and rapid method for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) assay on the auto-analysis eliminating the interruption of 6-glucose-phosphate dehydrogenase (6GPD). Human blood samples from 107 normal people and 31 patients with obvious G6PD deficiency (Methemoglobin MHb) were analyzed by Rate A with sample blank correction is desired. Results showed that the measured sensitivity was 0.27 U/gHb, the within-run precision was 0.145. the coefficient of variation (CV) was 5.6% and the between-run precision was 0.229. the CV was 9.4%. The linear was between 0~ 15 U/gHb. Compared to the results measure by Rate A with sample blank correction is desired. The correlation coefficient (r) to two methods was 0.863. These results indicate that it is a specificity, stable, simple and rapid method and this method is deserved to be popularized.

Key words G6PD, 6PGD, rate, MHb

* Corresponding author. Tel: 86-20-84411511-251, E-mail: Ana8cn2001@yahoo.com.cn

Received: September 11, 2000 Accepted: September 28, 2000