

酵素在臨床實驗室的應用

鍾楚紅

中國醫藥學院醫技系主任

化學實驗室用鑑定和測定酵素來達到診斷疾病與疾病的預後的目的是已超過三十年了。最近由於技術的快速進步，使得每個臨床實驗室均用到酵素於分析系統上。以酵素為試劑具有敏感性、專一性與穩定性高的優點。因此酵素在臨床實驗室的用途逐日增加，尤其是酵素免疫分析法的發展與運用更是可觀。

今日酵素在臨床實驗室的應用，涵蓋的範圍包括尿液分析、化學、毒物學與治療用藥物監測、內分泌學、微生物學、病毒學、血液學、凝固作用、血清學、組織學、遺傳學等，將個別簡單討論如下：

1. 尿液分析 (Urinalysis)

以化學方法分析尿液時常用尿液試紙。試

紙以酵素溶液浸透再乾燥之，再與尿液中之欲測受酶質作用呈色。例如欲測尿糖，試紙以 glucose oxidase 與 peroxidase 溶液浸透再乾燥之，以此試紙浸入尿液中生成有色產物，即可測知有無尿糖存在。另外，最近尿液試紙常規檢驗增加了一項可測知白血球存在與否的檢查。其原理主要是利用 leukocyte esterase test。顆粒性白血球含有酵素 esterase，可以催化 indoxyl carbonic acid ester 水解為 indoxyl 的反應。反應所產生的 indoxyl 可再與 diazonium 反應產生紫色物質。由於試紙中含有過量的受酶質與反應物，因此產生的紫色強度與病人尿液中所含顆粒性白血球濃度成正比。

2. 化學 (Chemistry)

各類的臨床生化分析儀已應用酵素於測定以往手工操作不易測定的檢驗項目。例如利用 phosphoenol pyruvate carboxylase 來測定 CO₂，比以前用老式氣體分析法測定 CO₂ 既精確又快速。此外，如 amylose 等牽涉多步驟酵素反應的檢驗項目，也因以酵素為工具，利用自動生化分析儀而簡化了檢驗步驟，縮短了檢驗時間。Table I 表列了一些以酵素為工具的檢驗項目。

3. 毒物學與治療用藥物監測 (Toxicology / Therapeutic drug monitoring)

最早利用 E I A 技術於毒物學的為美國 Syva 公司。應用 E M I T (Enzyme - multiplicated immunoassay technique) 可針對治療某些疾病的藥物加以定量與監測。這些藥物諸如：抗癲藥物、治心臟病藥物、抗氣喘藥物、抗微生物藥物和抗腫瘤藥物。這些技術亦可用於甲狀腺功能的測定、multiple protein. 分析與尿中濫用藥物的篩檢。

就如在尿液分析所提，酵素試劑固定於試紙上。利用此種試紙於病人檢體，可以迅速地測定定量所含藥物。美國 Ames 公司生產的 seralyzer 亦是運用試紙測定常規生化檢驗，而被廣泛用於醫生診所。以試紙應用免疫分析技術可以測定 theophylline 濃度。這種被稱為 A R I S (Apoenzyme Reactivation Immunoassay System) 的為一主要的技術突破。加病人血清於浸透有抗 theophylline 抗體的試紙上。此試紙上同時含有 peroxidase 與其他用來產生藍色反應的必需試劑。利用放射比測定法，顏色強度與檢體中之藥物濃度成正比。

更有甚之，最近 Syva 公司所屬之 Synt-

ex Medical Diagnostics 發展出所謂

Acculevel 為運用免疫分析法來定量 theophylline。此方法的特點為不需分離步驟，可用全血直接操作，並且不需要用到儀器設備。其主要利用浸潤有 theophylline 專一抗體與含有 glucose oxidase 及與 theophylline 結合之 horseradish peroxidase 液態試劑之試紙。直接把 12 μ l 之檢體 (全血) 加於酵素試劑瓶，在此紅血球被吸附而與血漿分離。剩餘的血漿因毛細管作用爬昇上此試紙上，此過程大約需時十分鐘。然後此試紙置於含有 glucose oxidase 與 horseradish peroxidase 此二種酵素的展開液中。在五分鐘內，試劑反應在試紙上形成色帶。色帶的高度與檢體中所含 theophylline 濃度成比例。

顯然地，由於被使用於治療用之藥物種類愈來愈多。用於毒物學與治療用藥物監測的方法將愈來愈重要。

4. 內分泌學 (Endocrinology)

檢驗甲狀腺荷爾蒙和其他諸如 LH, T S H 等荷爾蒙常用 R I A 方法。但近年來已漸漸用 E I A 方法測定這些荷爾蒙。E I A 方法較不能普遍的原因是因測定時牽涉到較多反應步驟，且需較多人工操作。但我們相信，只要這一個困難能突破，加上應用自動化，E I A 方法將可取代有曝露在放射性物質危險性的 R I A 方法。

5. 微生物學 (Microbiology)

微生物學將是未來快速發展，廣泛地應用酵素與相關免疫技術的領域。在諸多因素中，最明顯的因素是許多微生物能產生特異性酵素，或產生能與酵素媒介反應有關之產物。快速鑑定臨床上重要的微生物，是每位微生物學家努力的方向。傳統鑑定法，微生物必須生長複

TABLE I Enzymes as reagents in tests for other analytes

Analyte	Reagent enzyme
Adenosine triphosphate	Phosphoglyceric phosphokinase/glycerinaldehyde phosphate dehydrogenase
Alanine amino transferase	Lactate dehydrogenase
Ammonia	Glutamate dehydrogenase
Amylase	Maltophosphatase/Phosphoglucomutase/Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Aspartate amino transferase	Malate dehydrogenase
Carbon dioxide	Phosphoenolpyruvate carboxylase/Malate dehydrogenase
Cholesterol	Cholesterol oxidase/Cholesterol esterase
Creatine	Creatine kinase
Creatine kinase	Pyruvate kinase/Lactate dehydrogenase
Ethanol	Alcohol dehydrogenase
Galactose	Galactose oxidase
Glucose	Hexokinase/Glucose-6-phosphate dehydrogenase/Glucose oxidase/Peroxidase
Glycerol	Glycerol dehydrogenase
17-ketosteroids	Glucuronidase/Sulfatase
Lactic acid	Lactate dehydrogenase
Maltose	Glucosidase
Pyruvic acid	Lactate dehydrogenase
Triglycerides	Glycerokinase/Pyruvate kinase/Lactate dehydrogenase/Glucose phosphate dehydrogenase
Urea	Urease/Glutamate dehydrogenase
Uric acid	Amylase Glucose oxidase Hexokinase Trypsin Uricase

雜、有時不穩定的培養基中一段長時間。基於所接種細菌本身含有早已存在的酵素，利用這些酵素可鑑定，評估致病性，亦可鑑定微生物之特性。Table II 表列了目前運用酵素所鑑定的微生物。以往微生物實驗室，血清中抗生藥測定是用生物分析法。此種分析法目前均被 E I A 方法取代了。

TABLE II Microorganisms associated with particular enzymes
Enzyme and associated microorganisms

Nitrate reductase—E,G,H,I,J
Phenylalanine deaminase—H
Ominine decarboxylase—G,H,I
Lysine decarboxylase—G,H,I
Urease—H
β -galactosidase—C,E,G,H,I
Tryptophanase—G
β -glucuronidase—G
Leucine Arylamidase—B
Coagulase—A
Cytochrome Oxidase—C,E,F,G,H,I,J
β -lactamase—C,D
Catalase—A,B

Microorganisms

A—Staphylococcus
B—Streptococcus
C—Neisseria
D—Haemophilus
E—Pseudomonas
F—Branhamella
G—Escherichia
H—Proteus
I—Klebsiella
J—Alcaligenes

6. 病毒學 (Virology)

基於某些致病性病毒需要快速鑑定的理由，刺激了病毒學免疫分析法的發展。目前上市試劑中，能被廣泛接受的只有美國 Abbott 公司所發展出來的 RotazymeTM 輪狀病毒分析。此 E I A 方法是測定病人糞便檢體中之輪狀病毒抗原。

過去欲鑑定病毒，是把病毒以組織培養來培養，非常費錢耗時。現在由於組織培養技術的改良，以及免疫診斷試劑的進步，病毒可以在一天內被診斷出來。美國 Difco 公司最近利用組織培養與免疫診斷試劑系統，發展出 Cell-MaticsTM，可測知 Herpes simplex

病毒。此外，用於診斷 cytomegalovims、Epstein-Barr Virus、rubeola 與 rubella Virus 的免疫分析試劑目前已上市。與其相關的酵素免疫分析試劑亦將於不久後上市。

Chlamydia 雖非病毒，一般列在病毒實驗室以組織培養的方法來培養。目前用以診斷 chlamydia 抗原的酵素免疫分析試劑已上市。為最快速的診斷方法。

7. 血液學 (Hematology)

多年來白血球的分類常根據其所含特殊酵素。例如 leukocyte alkaline phosphatase 活性可用於偵測顆粒性白血病。

美國 Technicon 公司生產的儀器 Hemalog D 是發展自動化細胞化學技術。此儀器可偵測 eosinophils, neutrophils, and monocytes 的 peroxidase 活性。Monocytes 亦含有特殊的 fluoride-Sensitive esterase。當 PH 為 6.1 時，此酵素可與受酶質 α -naphthyl butyrate 作用。此酵素雖亦存在於其他種白血球，但在此特殊 PH 值 (PH 6.1) 之下，其活性最低。當 Brij-35 (為陰離子表面活性劑) 存在時，neutrophils 之 esterase 活性將降低，只有 monocyte esterase 活性可以被測得。

以細胞化學方法研究 T-淋巴球成熟階段，是利用細胞以受酶質染色淋巴球之酵素 acid α -naphthyl butyrate esterase 與 acid phosphatase。這些酵素的在顯示 T-淋巴球已成熟，此時細胞可被染色。

某些血小板有關係疾病，可能含有血小板抗體。目前可用 E L I S A 方法快速診斷。這些疾病包括原發性血小板減少性紫斑症、自體免疫疾病、癌症病人的異體免疫作用、以及因藥物治療引起的小板減少症。

最新上市的試劑是利用 E I A 定量測定與白血病有關的酵素 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)。報告指出白血病人 TdT 活性隨病情的復發與減輕而上升與下降。雖需進一步證明其用途，很顯然地此為一種新的酵素工具。

8. 凝固作用 (Coagulation)

美國 Du Pont 公司生產之 aca analyzer 發展出一種 plasminogen 分析法。乃利用細菌酵素 streptokinase 會與 plasminogen 形成一種有酵素活性的複合物。此複合物能水解某合成之受酶質，且水解速度與檢體所含 plasminogen 量成比例。此外，許多其他凝固試驗均於其反應系統中用到酵素，以用來測定與治療有關之因子。其他的 E I A 方法亦在發展中，例如 Fibrinopeptide A。

9. 血清學 (Serology)

酵素免疫分析法已可用來定量某些抗原與抗體。臨床上最常用於肝炎的診斷。這些包括測定 HBsAg、Anti-HBs、Anti-HBc、Anti-HBc IgM、Anti-HBc Ag、Anti-HBe 等。由這些檢驗項目測定的結果可以知道肝炎的分型及其病程。

新的 E I A 方法用於測定 HTLV-III 抗體、反錄病毒抗體 (retrovirus antibody)。雖然這些抗體臨床上對於後天免疫不全症候群 (AIDS) 的重要性尚待評估，其用途目前主要在於輸血與血液製品的初步篩檢，用以預防因輸血而感染 AIDS。

10. 組織學 (Histology)

利用 avidin 與 biotin 之間有很強的親和力的特性，可以發展出許多染色技術。再結合酵素可以用來分析測定組織細胞中的某些物質 (參看 Table III)。

TABLE III Enzyme histologic stain systems

Analyte of interest	Enzyme stain system
S-100 Protein	PAP or IP
Prostatic specific antigen	PAP
Epithelial membrane antigen	PAP or IP
Beta-endorphin	IP
Keratin and cyokeratins	PAP
Islet cell tumor detection	PAP
Neuron specific enolase	PAP
Carcino embryonic antigen	PAP or IP
Plutary hormones (rGH, ACTH, LH, FSH, TSH, Prolactin)	PAP
Thyroglobulin	PAP or IP
Blood group antigens A,B,H	PAP or IP
Neurotensin	PAP or IP
Substance P	PAP or IP
Beta-1-glycoprotein	PAP or IP
Bombesin antibody	PAP or IP
Estradiol	IP
Hepatitis B surface antigen	PAP or IP
PAP = peroxidase-antiperoxidase	
IP = immunoperoxidase	

II. 遺傳學 (Genetics)

科學家預測總有一天分子遺傳學方法將成為很普遍的一種應用。新的實驗室技術，包括分子融合分析法與酵素試劑，將使得臨床學家不再單純的只把基因的本質當成能遺傳表型於子代而已。他們將開始把基因本質當成能在實驗室中以生化本質表達出來的特質。

目前最有名的新酵素試劑為 restriction endonucleases 此酵素能認知和分離出一小段容易處理的特殊順序 DNA。超過 400 種的這類酵素已被應用於認知特殊順序 DNA。即便只有單一塩基的改變，亦會破壞了 DNA 斷裂的位置。可以預測的是將來分子遺傳學家可以利用 restriction enzymes 來斷裂 DNA 成許多小段，產生指紋 (Finger print)，再加以繪製基因。這種技術雖面臨一些特殊困難，但優點是不限於任何系統均可適用。

總而言之，臨床實驗室裡以酵素為工具是必然的趨向。尤其單株抗體與酵素的配合將大大地擴展臨床實驗室方法學的領域，造福更多的人類。