技术与方法 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.007

终点平衡尿酸酶法与动力学尿酸酶法联用测定尿酸

龙高波[1],杨宪峰[1],刘红博[1],蒲 军[2],杨晓兰[1],廖 飞[1]
（1. 重庆医科大学检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室;2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016）

【摘 要】目的:考察终点平衡尿酸酶法和动力学尿酸酶法联用测定尿酸的可行性和线性范围。方法:在25℃下 1.2 ml 硼酸钠缓冲液(0.20 mol/L,pH 9.2)中用 293 nm 吸收跟踪尿酸酶反应;测定加入 5 μl 尿酸酶液前反应体系吸收,加入 5 μl 苛求芽孢杆菌尿酸酶液后记录 5.0 min 内吸收变化。终点平衡法以尿酸酶反应前吸收为起点而尿酸完全氧化后吸收为本底,二者之差为尿酸净吸收且同尿酸浓度成正比;动力学法分析尿酸酶反应过程预测本底。分析模拟尿酸酶反应曲线,探索从终点平衡法转换为动力学法的尿酸浓度界限值;实验测定联用法的可行性和线性范围。结果:分析 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶模拟反应曲线,发现两种方法转换的尿酸浓度界限值可为 5.0 μmol/L;分析实验反应曲线证实此界限值可行。在 40 U/L 尿酸酶时终点平衡法测量范围 1.0~6.0 μmol/L;联用法测量范围 1.5~60 μmol/L 且对 30 μmol/L 黄嘌呤有抗性;在 5.0 μmol/L 以下变异系数小于 10%而 5.0 μmol/L 以上可小于 5%。结论:这种联用法测定尿酸成本更低、线性范围更宽且效率高。

【关键词】尿酸;动力学尿酸酶法;终点平衡尿酸酶法;线性范围;联用法
【中国图书分类法分类号】Q55 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-09-14

作者介绍:龙高波(1985-),男,硕士,
研究方向:体外诊断与药物筛选生物技术。
通信作者:廖 飞,男,教授,Email:liaofeish@sina.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672009);重庆市科委重点资助项目(编号:CSTC2011BA5039)。

轻,而 NF-κB 的表达显著降低,这可能是 IL-18BP 能抑制内膜增殖的机制。当然 AS 中内膜的增殖是一个复杂的炎症反应过程,抑制内膜的增殖,其具体作用机理往往是多靶点、多环节,还需更深层次的研究为其临床防治 AS 提供有力的依据。

参 考 文 献

[1] Libby P,Ridker P M,Hansson G K,et al.Inflammation in atherosclerosis:from pathophysiology to practice[J].J Am Coll Cardiol,2009,54(23):2129-2138.

[2] Tenger C,Sundborger A,Jawien J,et al.IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005,25(4):791-796.

[3] Whitman S C,Ravisankar P,Daugherty A.Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma[J].Circ Res,2002,90(2):E34-38.

[4] Novick D,Kim S H,Fantuzzi G,et al.Interleukin-18 binding protein:a novel modulator of the Th1 cytokine response[J].Immunity,1999,10(1):127-136.

[5] Li J M,Eslami M H,Rohrer M J,et al.Interleukin 18 binding protein(IL18-BP)inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury in an atherosclerotic rabbit model[J].J Vasc Surg,2008,47(5):1048-1057.

[6] Ushio S,Namba M,Okura T,et al.Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor,expression in Escherichia coli,and studies on the biologic activities of the protein[J].J Immunol,1996,156(11):4274-4279.

[7] Chandrasekar B,Mummidi S,Mahimainathan L,et al.Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappa B-and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin[J].J Biol Chem,2006,281(22):15099-15109.

[8] Sahar S,Dwarakanath R S,Reddy M A,et al.Angiotensin Ⅱ enhances IL-18 mediated inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells:a novel cross-talk in the pathogenesis of atherosclerosis[J].Circ Res,2005,96(10):1064-1071.

[9] 吕 翠,高 波,谭 兰,等.颈动脉内中膜厚度与血清白介素-18 关系的初步研究[J].脑与神经疾病杂志,2009,17(4):277-279.

[10] Novick D,Kim S H,Fantuzzi G,et al.Interleukin-18 binding protein:a novel modulator of the Th1 cytokine response[J].Immunity,1999,10(1):127-136.

[11] Mallat Z,Corbaz A,Scoazec A,et al.Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability[J].Circ Res,2001,89(7):E41-E45.

[12] Bacuerle P A,Baltimore D.NF-κB:ten years after[J].Cell,1996,87:13-20.

（责任编辑:冉明会）

Integration of the kinetic uricase method with the equilibrium uricase method for uric acid assay

LONG Gao-bo[1], YANG Xian-feng[1], LIU Hong-bo[1], PU Jun[2], YANG Xiao-lan[1], LIAO Fei[1]

(1. Key Laboratory of Medical Laboratory Diagnostics of the Education Ministry, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To examine the feasibility and the linear range for serum uric acid assay by integrating a kinetic uricase method with the equilibrium uricase method. *Methods*: Uricase reaction curves were monitored within 5.0 min by absorbance at 293 nm in 1.2 ml borate buffer (0.20 mol/L, pH 9.2) at 25℃; the absorbance at 293 nm of a reaction solution minus 5 μl uricase solution was measured as the initial absorbance, the absorbance after the addition of 5 μl solution of recombinant Bacillus fastidiosus uricase to complete the reaction was measured as the background absorbance. The difference between the initial absorbance and the background absorbance should be proportional to final levels of uric acid. By the kinetic uricase method, the background absorbance was predicted by kinetic analysis of uricase reaction curve rather than being determined by experimentation. The threshold of a uric acid level for changing from the equilibrium uricase method to the kinetic uricase method was estimated by simulation analysis. The threshold and the linear range of the integration strategy were examined by experimentation. *Results*: The threshold was 5.0 μmol/L uric acid in reaction solutions by simulation at 40 U/L uricase, and was supported by experimentation. The equilibrium uricase method determined 1.0 to 6.0 μmol/L uric acid. The integration strategy determined uric acid from 1.5 to 60 μmol/L with resistance to final 30 μmol/L xanthine; CV was below 10% for uric acid below 5.0 μmol/L and was lower than 5% for uric acid over 5.0 μmol/L. *Conclusion*: The integration strategy for uric acid assay had wider linear range, lower cost and practical analysis efficiency.

【Key words】uric acid; the kinetic uricase method; the equilibrium uricase method; linear range; the integration method

血清尿酸水平是实验诊断高尿酸血症相关疾病的重要指标[1-3]。尿酸酶对尿酸专一性高，并生成易测定的过氧化氢，故尿酸酶法常用于临床检验测定血清尿酸[3]。在 pH 9.2 的硼酸盐缓冲液中测定 293 nm 吸收变化可监测尿酸酶反应过程[4]。测定酶反应达到终点后产物增量或所消耗底物量称终点平衡法，分析酶反应过程数据测定初始底物浓度称动力学法；测定尿酸时，测定 293 nm 吸收变化称直接尿酸酶法，测定尿酸酶生成的过氧化氢称间接尿酸酶法[3]。因此，有多种尿酸酶法可测血清尿酸且大多已用于临床检验[3]。

高尿酸血症常伴随血清高黄嘌呤[5]。目前测定尿酸常用真菌尿酸酶，这些尿酸酶都对黄嘌呤敏感[4]。用以反应时间为自变量的积分速度方程分析尿酸酶反应过程可预测本底吸收测定尿酸，此方法称为动力学尿酸酶法[3,6-9]。用对尿酸亲和力较低尿酸酶，此动力学尿酸酶法对反应体系接近 30 μmol/L 黄嘌呤有明显抗性，可测上限很高而所需尿酸酶量小于 40 U/L[8,9]。如反应体系样品量为 3%，此直接动力学尿酸酶法对样品中接近 0.90 mmol/L 黄嘌呤有抗性，而生理条件下黄嘌呤溶解度约 0.30 mmol/L[8]。因此，这种直接动力学尿酸酶法有明显优势。

动力学尿酸酶法需拟合反应曲线，其要求：(1)被分析数据中吸收变化大于 0.003 数据（以下称有效数据）多于 5 个，(2)被分析数据中底物消耗比例高于 40%[4,6,10]。所以，当反应体系尿酸很少时就难获得所需有效数据，这造成动力学尿酸酶法的线性下限不理想。事实上，测定低浓度尿酸时终点平衡尿酸酶法更有优势。如将动力学尿酸酶法和终点平衡尿酸酶法联用，将有望用低活性尿酸酶获得很低的线性下限和理想的线性上限。通过测定 293 nm 吸收监测尿酸酶反应过程，终点平衡尿酸酶法和动力学尿酸酶法测定尿酸的定量指标完全相同。只要两种方法可测尿酸浓度有交叉区域，并确定两种数据处理方法进行转换的界限值，就有望用联用法测量尿酸。本文考察基于终点平衡尿酸酶法和动力学尿酸酶法的联用法测定尿酸的可行性和线性范围。

1 材料和方法

1.1 主要化学试剂和材料

尿酸、二乙基三氨基五乙酸（Diethylene triamine pentacetate acid, DETAPA）、黄嘌呤均购于 Alfa Aesar 公司，其余试剂均为国产分析纯。用 0.020 mol/L 硼酸钠（pH 8.0）缓冲液配制 0.75 mmol/L 尿酸储备溶液。常规检验分析后剩余临床血清标本收集于秦皇岛市第一人民医院检验科。固定尿酸在 293 nm 消光系数（ε）为 11.5 mmol/(L·cm)，在临用前以 293 nm 吸收校正储备尿酸溶液的浓度。

1.2 苛求芽孢杆菌尿酸酶的重组表达和纯化

所用表达载体参照文献[11]。在 18℃用 0.40 mmol/L 异丙基-β-D-半乳糖苷诱导 16 h，收集菌体超声处理破碎，离心去沉淀。用经 0.10 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）缓冲液平衡的 DEAE-纤维素离子交换柱层析，线性升高 NaCl 到 0.50 mol/L 梯度洗脱，收集活性成分用聚乙二醇 6 000 浓缩后对相同 Tris-HCl 缓冲液透析；加 3.0 mmol/L 叠氮钠在 4℃保存。标定尿酸

酶活性时用 0.20 mol/L 硼酸钠(pH 9.2)缓冲液，尿酸浓度为 75 μmol/L，用设定尿酸消光系数计算，每分钟氧化 1 μmol 尿酸成产物的酶量为 1 个活性单位。

1.3 尿酸酶反应曲线监测和酶活性标定

缓冲液为 0.20 mol/L 硼酸钠(pH 9.2，含有 0.10 mmol/L 的铁离子螯合剂 DETAPA)并恒温在 25℃。用兼容机和配套软件操作欣茂 UV7504 分光光度计。将含 1.10 ml 缓冲液但无尿酸酶和适量样品的溶液 1.195 ml 尽可能完全地转移到石英比色杯中，测定该溶液的吸收并扣除其后加入 5 μl 尿酸酶液启动反应造成的稀释效应(0.4%)后为起点吸收(A_0)。在比色杯中加入 5 μl 恰当稀释的尿酸酶液并尽量混匀，滞后 20 s 以设定间隔(未作说明即为 5 s)记录 293 nm 吸收变化[6,11,12]。每个反应体系共记录 5.0 min。将仪器记录吸收数据导出，按下述软件要求的格式转换成文本文件保存。在此文本文件中用关键字标识起点吸收 A_0、记录间隔及样品编号等信息，读入后在下述软件的主窗口中显示供查询。

1.4 尿酸酶反应曲线的模拟分析

此前已报道尿酸酶稳态反应积分速度方程 Eq.(1)[4,11]。设定初始尿酸浓度、尿酸酶米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_m)，以逐步逼近法计算用 5 s 间隔记录时尿酸酶无误差反应曲线。按设定尿酸在 293 nm 消光系数，换算成反应过程中尿酸吸收变化曲线；叠加正态分布且方差为 0.001 的随机吸收误差再叠加设定的恒定本底吸收(A_b)，获得模拟的尿酸酶反应曲线。模拟反应曲线也记录成对应文本文件。通过模拟分析确定动力学尿酸酶法和终点平衡尿酸酶法之间转换的尿酸浓度界限值，并用实验数据分析予以验证。

$$\ln(\frac{S_0}{S_i})+\frac{S_0-S_i}{K_m}=\frac{V_m}{K_m}\times t \qquad (1)$$

1.5 动力学尿酸酶法测定血清尿酸

参照此前方法，在软件中将尿酸酶 K_m 设定成模拟所用参数或实验测定参数(如未说明则为 0.22 mmol/L[9])。用软件读入文本文件记录的反应曲线和相关信息(包括 A_0)，在运行窗口中选择被分析数据范围以保障分析尿酸酶稳态反应过程预测本底(A_b)，以 A_0 和 A_b 之差为反应体系尿酸的净吸收。利用设定消光系数换算成反应体系尿酸浓度，再按加样量换算成反应体系的尿酸浓度。

1.6 终点平衡尿酸酶法和联用法测定尿酸

在终点平衡法中，测定未加尿酸酶 1.195 ml 体系起点吸收并校正，以加入尿酸酶反应 5.0 min 后吸收为本底 A_b，以 A_0 和 A_b 之差为尿酸净吸收，并换算成反应体系尿酸浓度。

在联用法中，先计算起点吸收 A_0 和反应 5.0 min 吸收之差值；如此差值小于设定界限值，就以最后 0.5 min 记录吸收均值为本底，用终点平衡法计算反应体系尿酸的净吸收；如此差值大于设定界限值，则用动力学尿酸酶法预测本底计算反应体系尿酸的净吸收，再换算成反应体系的尿酸浓度。

1.7 程序设计

用此前酶反应动力学过程分析软件 PCFenzyme(可在 http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.11.016 下载)[12]。用软件读入文本文件中储存 A_0，将文本文件中固定间隔记录的吸收数据读入并在当前主窗口绘制反应曲线(图 1)。从列表框中选择被分析的起点和终点。从主窗口文本框中输入预设 K_m。设任意时刻尿酸吸收为 A_i，按 Eq.(2)对酶反应曲线进行数据转换，并按 Eq.(3)对固定间隔记录反应曲线进行回归分析，计算决定系数并换算成 F 统计量判断拟合优度，对应最好拟合的参数组合中包含 A_b[3,4,13]。从比被分析终点附近 3 个吸收均值小 0.000 3 开始以 0.001 步长下调 A_b，用每个预设本底进行数据转换后对反应时间进行回归分析。

$$y=\ln(\frac{A_0-A_i}{A_i-A_b})+\frac{A_0-A_i}{\varepsilon\times K_m} \qquad (2)$$

$$y=a+\frac{V_m}{K_m}\times t \qquad (3)$$

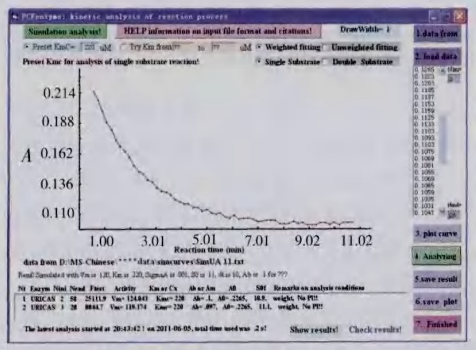


图 1 所用程序运行的主窗口

1.8 数据统计分析

为保障测量精度，以变异系数(Coefficient of variation，CV)小于 10%、偏离用线性响应预测值小于回归估计标准差 2 倍的最小可测尿酸浓度为线性下限；以变异系数不大于 5%、偏离线性响应预测值不大于回归估计标准差 2 倍的最大可测尿酸浓度为线性上限。用 Excel 的统计函数进行回归和 t 检验分析。

2 结 果

2.1 分析模拟尿酸酶反应曲线考察联用法的可行性

模拟 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶反应曲线可知(图 2)。尿酸低于 2.0 μmol/L 时无法获得 5 个以上有效数据，尿酸大于 3.0 μmol/L 时刚好可获得 5 个有效数据。对 6.0 μmol/L 及以下尿酸，反应 5.0 min 后吸收与再反应 25 min 时相差仅 0.001。对 7.0 μmol/L 及以上尿酸，40 U/L 尿酸酶反应 5.0 min 后吸收比再反应 25.0 min 后吸收高 0.002 以上。因此，终点平衡尿酸酶法用 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶反应 5.0 min，其线性上限接近 6.0 μmol/L 而线性下限约 1.0 μmol/L。

要在低浓度尿酸时获得足够有效数据需对数据过滤筛选吸收降低大于 0.003 的数据，故记录间隔可为 10 s 以便在自动生化分析仪上多通道同步检测。用动力学尿酸酶法分析模拟反应 5.0 min 内数据，测定 5.0 μmol/L 尿酸 CV 可小于 5%且偏差也小于 5%；测定 3.0 μmol/L 时，其有效数据量仅 5 个且所得尿酸浓度 CV 只能控制在 10%左右。动力学尿酸酶

法分析高浓度尿酸反应曲线所得尿酸浓度 CV 可低于 2%。用 40 U/L 尿酸酶反应 5.0 min，动力学尿酸酶法的线性下限约 4.0 μmol/L 而线性上限超过 90 μmol/L。

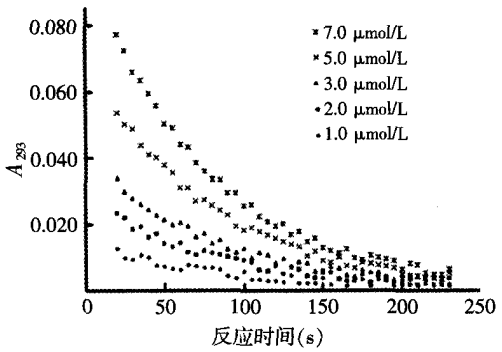


图 2　模拟的 40 U/L 尿酸酶 5 s 间隔记录的反应曲线

可见，用 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶时，从 4.0 μmol/L 到 6.0 μmol/L 尿酸为 2 种方法都可测量尿酸含量的交叉区域；对应含 5.0 μmol/L 尿酸反应 5.0 min 内的起点和终点间的吸收变化，可作为两种尿酸酶法之间转换的尿酸浓度界限值，即起点吸收同反应 5.0 min 时吸收相差大于 0.056 用动力学尿酸酶法，小于 0.056 则用终点平衡尿酸酶法。

据此界限值选择所用数据分析方法，用 40 U/L 重组表达苛求芽孢杆菌尿酸酶时，联用法测定尿酸线性范围从 1.0~90 μmol/L（数据未给）。此下限基本为终点平衡法的下限而上限为动力学法的上限，对应反应体系可测尿酸范围比动力学尿酸酶法拓宽 4 倍，比终点平衡尿酸酶法拓宽接近 18 倍。这些模拟分析结果表明联用法有明显优势。

进一步分析模拟反应曲线发现，在 5.0 μmol/L 尿酸时如所用尿酸酶活性降低为 5 U/L，则反应 5.0 min 后的吸收变化小于 0.040 但终点平衡尿酸酶法的偏差大于 20%。这种数据用动力学尿酸酶法分析所得尿酸含量偏差更大，对应所得尿酸酶 V_m 易出现负偏差但大多小于 40%。用 60 U/L 尿酸酶时，所得结果没有显著差异。所以，分析反应 5.0 min 的数据时，前述两种尿酸酶法转换的界限值需保障尿酸酶活性不能低于所设定的数值；用动力学法尝试分析所得 V_m 可作为辅助检验所用尿酸酶活性是否符合要求。

2.2　分析实验数据实现联用法的可行性

滞后 20 s 记录终点平衡法线性上限附近的低浓度尿酸实验反应曲线如图 3。所用苛求芽孢杆菌尿酸酶 K_m 接近 0.20 mmol/L，故测定条件下应是一级反应，吸收应指数衰减。实验反应曲线与模拟反应曲线的显著差异在于反应开始阶段明显处于非稳态，这在稍高浓度的尿酸时更明显。启动反应 30 s 后吸收基本上指数衰减，表明启动反应 30 s 后尿酸酶反应才能达到稳态。另外，从反应曲线的光滑程度可见，实验反应曲线中的随机吸收误差可能小于 0.001。尿酸酶反应中间产物 5-羟基异尿酸在 302 nm 有吸收峰[14,15]，此中间产物在硼酸盐中很易分解，但其在反应起始阶段会积累，这也可能是其稳态反应延迟时间较长的原因之一。所以，为可靠预测 A_b 适宜分析启动反应 35 s 后的数据。

从含 3.0 μmol/L 尿酸反应 5.0 min 的数据中基本可筛选到 5 个有效数据，而其反应 5.0 min 时吸收比动力学法预测 A_b 高 0.001。分析 5.0 μmol/L 尿酸反应曲线所得 A_b 也仅比反应 5.0 min 的吸收低 0.001。分析 7.0 μmol/L 尿酸反应曲线所得 A_b 比反应 5.0 min 吸收低 0.003 以上。用终点平衡尿酸酶法和动力学尿酸酶法重复测量 5.0 μmol/L 尿酸的净吸收，其 SD 都为 0.001（n=5）。终点平衡尿酸酶法的线性范围从 1.5~6.0 μmol/L。相应地，用 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶时，终点平衡法可测线性上限约 6.0 μmol/L 尿酸，而 5.0 μmol/L 尿酸可作为两种尿酸酶法转换的尿酸浓度界限值。分析 5.0 μmol/L 尿酸反应曲线所得 V_m 与用 20.0 μmol/L 尿酸分析反应过程所测定的 V_m 相差小于 15%。可见，在此两种方法转换的尿酸浓度界限值时，动力学尿酸酶法所得 V_m 可用于辅助判断反应体系的尿酸酶活性是否满足要求。

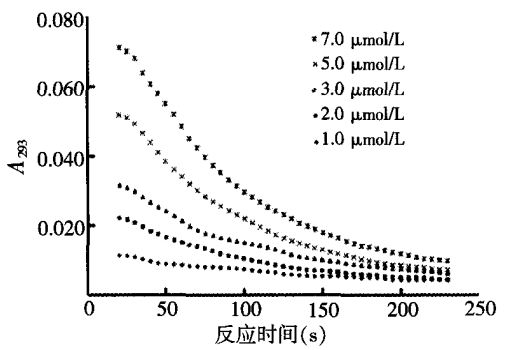


图 3　用 40 U/L 尿酸酶 5 s 间隔记录低浓度尿酸的反应曲线

2.3　联用法测量尿酸的线性范围和抗黄嘌呤能力

用 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶，联用法测定尿酸线性范围从 1.5~60.0 μmol/L。其线性下限高于终点平衡法但低于动力学尿酸酶法的 50%，线性上限达到终点平衡尿酸酶法上限近 10 倍（图 4），线性响应斜率>0.98。在反应体系尿酸浓度较高时，终点平衡法出现明显偏差且浓度越高则偏差越大，这可能是终点平衡法需高活性尿酸酶才能保障线性上限的主要原因。用 20 U/L 尿酸酶时，动力学法线性上限约 35.0 μmol/L；与用相同活性的另一种苛求芽孢杆菌尿酸酶相当[9]。联用法在5.0 μmol/L以下变异系数小于10%而5.0 μmol/L以上可小于 5%。

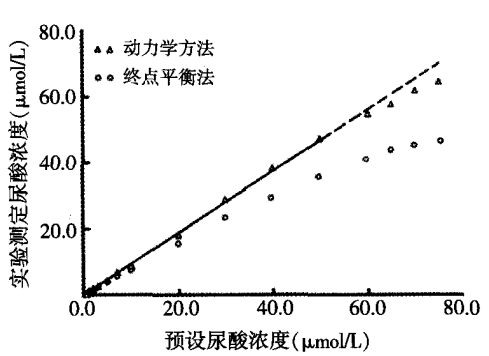


图 4　以 40 U/L 苛求芽孢杆菌尿酸酶基于联用方法测定尿酸响应曲线

用 30 μl 血清样品使反应体系尿酸终浓度为 4.0、18.0 μmol/L 和 41.0 μmol/L 时，外加黄嘌呤到终浓度 10.0 μmol/L 或 30.0 μmol/L 对测定尿酸的影响小于 3%，而各浓度下测定尿酸含量 CVs 接近 3%（n=3）。用配对 t 检验分析，发现黄嘌呤对联用法测量尿酸没有明显干扰（P≈0.262）。如按黄嘌呤抑制常数校正所设定 K_m[9]，所得 V_m 变化小于 15%；如不校正所设 K_m 则加黄嘌呤后 V_m 下降大于 60%。因此，联用法需所用尿酸酶活性不低于设定值才能抗黄嘌呤干扰；需选两种方法都可测的尽可能高浓度底物在设定时间内的对应检测信号变化为界限值，实现两种方法的转换。

3 讨 论

以监测 293 nm 吸收变化为基础，终点平衡法和动力学法都能可靠测定尿酸[3]。所以，联用法的关键是：(1)获得 2 种方法都可测尿酸浓度的交叉区域；(2)确定交叉区域内从终点平衡法转换成动力学法处理酶反应数据的尿酸浓度界限值，一般可为终点平衡法的线性上限或动力学法的下限。

给定尿酸浓度下有效数据量取决于酶活性、记录滞后时间、记录间隔、稳态反应所需延迟时间等。记录滞后时间可为 20 s。用低活性尿酸酶时高浓度尿酸需长时间反应才能达到底物消耗比例要求，这会降低分析效率。所以，用 40 U/L 尿酸酶滞后 20 s，以 10 s 间隔记录 5.0 min 尿酸酶反应过程。

此联用法以终点平衡尿酸酶法和动力学尿酸酶法的数据处理方法为基础，需确定 2 种方法都能可靠测定的尿酸浓度交叉区域及数据分析方法转换的尿酸浓度界限值。优化所用尿酸酶量及反应时间可获得 2 种方法都可测定的尿酸浓度交叉区域。动力学尿酸酶法需尽可能高的底物消耗比例，故终点平衡法上限可为 2 种方法转换的尿酸浓度界限值。此联用法所用尿酸酶活性仅为 40 U/L 而用终点平衡法所用尿酸酶活性需大于 400 U/L，此联用法线性范围更宽且分析时间仅需 5.0 min，无疑成本和效率都优于终点平衡法。此联用法对 30.0 μmol/L 黄嘌呤有抗性，这是此前所有其它商业化尿酸酶法试剂盒不具备的优势。本文所用尿酸酶稳定性好（数据未发表），本身对黄嘌呤抗性很强[9,11]。因此，联用法用低活性尿酸酶可获得更宽可测范围且保障分析效率。

从化学计量学的角度，本文所述不同尿酸酶法的差异在于数据分析方法不同。此联用法测量尿酸是一种全新数据处理方法，其用一种反应条件而据反应体系尿酸浓度范围（起点和终点的吸收之差）选择最适合的数据分析方法。此前曾报道将分析酶反应过程和初速度法联用测定酶活性[10]，但至今未报道终点平衡法和酶反应过程分析法联用测定底物量。Dade Behring 的 Dimension RXL 系列自动生化分析仪等可提供 293 nm 光源测定尿酸，故此联用法有望用于常规实践。另外，酶法分析广泛用于临床检验，此联用法有可能发展成一类全新酶法测定底物量的数据处理方法，从而能用较低活性工具酶获得很宽的线性范围且保障分析效率。

参 考 文 献

[1] Ramazzina I, Folli C, Secchi A, et al. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes [J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(3): 144-148.

[2] Kutzing M K, Firestein B L. Altered uric acid levels and disease states[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(1): 1-7.

[3] Zhao Y S, Yang X Y, Lu W, et al. Uricase based method for determination of uric acid in serum[J]. Microchim Acta, 2009, 164(1): 1-6.

[4] Liao F, Zhu X Y, Wang Y M, et al. The comparison on the estimation of kinetic parameters by fitting enzyme reaction curve to the integrated rate equation of different predictor variables[J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, 62(1): 13-24.

[5] Hande K R, Perini F, Putterman G, et al. Hyperxanthinemia interferes with serum uric acid determinations by the uricase method[J]. Clin Chem, 1979, 25(8): 1492-1494.

[6] Liao F, Tian K C, Yang X, et al. Kinetic substrate quantification by fitting to the integrated Michaelis-Menten equation[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375(6): 756-762.

[7] Liao F, Zhao Y S, Zhao L N, et al. Kinetic method for enzymatic analysis by predicting background with uricase reaction as model [J]. J Med Coll PLA, 2005, 20(6): 338-344.

[8] Liao F, Zhao Y S, Zhao L N, et al. The evaluation of a direct kinetic method for serum uric acid assay by predicting the background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(6): 497-502.

[9] Zhao Y S, Zhao L N, Yang G Q, et al. Characterization of an intracellular uricase from Bacillus fastidious ATCC 26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic method[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2006, 45(2): 75-80.

[10] Liu B Z, Zhao Y S, Zhao L N, et al. An integration strategy to estimate the initial rates of enzyme reactions with much expanded linear ranges using uricases as models[J]. Anal Chim Acta, 2009, 631: 22-28.

[11] Zhang C, Yang X L, Feng J, et al. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from Bacillus fastidiosus[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(6): 1298-1301.

[12] Liao F, Yang D Y, Tang J Q, et al. The measurement of serum cholinesterase activities by an integration strategy with expanded linear ranges and negligible substrate-activation[J]. Clin Biochem, 2009, 42(6): 926-928.

[13] 陆 旋. 应用统计学[M]. 北京：清华大学出版社. 1999. 71-75.

[14] Priest D G, Pitts O M. Reaction intermediate effects on the spectrophotometric uricase assay[J]. Anal Biochem, 1972, 50(1): 195-205.

[15] Kahn K, Tipton P A. Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction[J]. Biochemistry, 1998, 37(33): 11651-11659.

（责任编辑：关蕴良）