

使用BECKMAN CX-5自動分析儀 測定尿中NAG活性的評估

江蕙玲 劉嘉斌

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (E.C. 3.2.1.30) 簡稱 NAG。在臨床上應用於早期腎傷害的指標，例如使用某些腎毒性藥物造成之腎傷害並可發現腎臟移植早期排斥現象。我們使用塩野義的尿液NAG試藥，以單頻道自動分析儀 (Beckman CX5) 分析尿液NAG的濃度。以本法測四種不同濃度之尿中NAG同時再現性 (n=21) CV值分別為8.05%、3.73%、1.79%、5.84%。相同檢體之日差再現性 (n=20) CV值分別為10.91%、3.9%、3.25%及2.17%。並用已知濃度10 U/L及101 U/L之品管尿液，分析儀器的精密度及準確度，CV值 (n=10) 分別為3.68%及0.37%；SD值分別為0.40及0.37。線性範圍0 U/L至101 U/L均佳。另評估Thymol及HCl兩種防腐劑，結果Thymol之相關係數為0.95 ($y=0.95x+0.74, r=0.95$)；HCl之相關係數為0.47 ($y=0.52x-0.75, r=0.47$) Thymol可接受，而HCl不可使用。另外測22歲到59歲187名男女健康國人NAG之活性以建立國人的參考值，結果男性為 <7.74 U/L；女性為 <7.13 U/L。綜合以上各項評估結果，修改後的方法在臨床檢驗上的精密度及準確度均可令人接受，另外在操作上增加了作業的方便性，減少人為誤差並降低試藥之成本。

Key Words: N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, Autoanalyzer

(中山醫學 2: 9~18, 1991)

傳統的腎功能檢查例如：尿蛋白 (urine protein)；尿素氮 (BUN)；肌酸酐 (creatinine) 等，這些物質的濃度只能反應腎功能之腎絲球的通透性，或腎小管的再吸收能力，無法反應出早期腎實質受損的情形，而尿中NAG是從腎小管上皮細胞釋放出來的，因此能反應出腎實質受損的情形。

NAG分子量約150,000 daltons⁽¹⁾，存在於許多不同器官及組織，具有不同的異構酶 (Isoenzyme)，例如在腎臟、肝臟及脾臟為

酸性的A-form及鹼性的B-form組成。血清中的NAG為A^{*}-form是介於A-form及B-form間的中間型；另外在懷孕婦女血清中亦有P-form發現。尿中NAG主要為A-form及少部分之B-form組成^(2,3) (如表一)。在腎臟，NAG係存於腎小管上皮細胞內的一種分解微粒酶 (Lysosome)，其與黏多醣類 (mucopolysaccharide) 及醣蛋白之分解有關⁽⁴⁻⁶⁾，因為NAG的分子量大，不會被腎小管再吸收，當腎臟實質受損時，即會排入尿中，而其它器

Table 1. NAG ISOENZYMES

TISSUE:

A-FORM (ACID form)
 B-FORM (BASIC form)
 eg. Kidney; Liver; Spleen

SERUM:

A-FORM (Major)
 I1; I2 INTERMEDIATE FORM
 P-FORM (Pregnancy women)

URINE:

A-FORM (Major)
 B-FORM (Small)

官的NAG很容易經肝臟代謝，且半衰期短，因此不會排入尿中。所以尿中NAG活性是一種非常敏感的腎實質受損之指標，亦可以當作追蹤腎臟疾病預後情形的試驗，而且腎臟移植早期發生排斥現象或因使用某些腎毒性藥物造成腎傷害的病人，尿中NAG之活性會有明顯的增高^(1, 7-10)。NAG的活性不受細菌及蛋白尿的影響，在室溫3天；4°C7天；-20°C時一個月的環境下依然安定^(11, 12)。

目前尿中NAG活性的測定可分為螢光法及呈色法兩種，螢光法所使用的試劑為4-methylumbelliferone。呈色法所用的試劑有兩種：1. 2-methyl-4-(2'-nitrovinyl)-phenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (簡稱MNP-Glc NAc)^(11, 13)。2. Sodio-m-cresol-Sulfonphthaleinyl-N-acetyl- β -D-glucosaminidase (簡稱MCP-NAG)^(6, 14)。螢光法的敏感度非常高，但須特殊的儀器設備，而且試劑的價格比一般呈色法的試劑昂貴，因此要作為篩檢用，以呈色法較為合適。

尿中NAG之測定目前尚不普遍，1987年起本院以測定尿中NAG的活性來協助診斷及追蹤腎功能，目前已將此項檢驗當成腎功能之常規檢查項目之一，以手工操作 (manul) 檢查，但手工操作對於反應時間的控制必須非常準確，因此人為誤差較大，且又耗時費力，為了提高準確性，節省人力，增加作業效率，我們乃擬以自動分析儀測試尿液NAG的活性。1983年Powell氏等人⁽⁷⁾曾以離心式自動分析儀器 (Centrifugal Analyzer) 測NAG之活性，但本院之離心式自動分析儀器已使用十

年，已接近淘汰邊緣，本院於1989年4月引入Beckman公司出品最新型的單頻道多項式自動分析儀器CX-5 (Single channel, Multi-test)，我們乃試圖設計一套程式並找出最佳測試條件，使NAG之測定能以本院之自動分析儀器操作，並評估各種指標，以確知其可行性。

材料與方法

一、原理：使用Sodio-m-cresolsulfonphthaleinyl-N-acetyl- β -D-glucosaminidase (MCP-NAG) 當基質，在752秒反應時間內經NAG加水分離而游離出m-cresol purple (圖一)，於波長560nm及670nm測定尿中NAG之活性。

二、試劑：日本塩野義試藥 (Shionogi) Urine N-acetyl- β -D-glucosaminidase 活性測定試藥。包括：

1. 人工基質試藥：1瓶含MCP-NAG 92 mg, PH4.90。(冷凍乾燥)
2. 緩衝劑試藥：Citrate Buffer 50 mmol/L, PH4.75。
3. 反應停止試劑：0.3 mol/L Sodium Carbonate。
4. Standard 107U/L。
5. Control 10U/L及101U/L。

三、配製：

1. 緩衝液之調製：將緩衝劑試藥以精製水55ml溶解之。
2. 人工基質溶液之調製：將全部的緩衝液加入人工基質試藥中，溶解之。
3. 反應停止液之調製：反應停止試劑以精製水110ml溶解之。但因無法上機，因此以上比例改以1/4 (27.5ml) 溶解先行評估。

四、儀器：自動分析儀器CX-5 (Beckman) 、雙波長、光源為Xenon lamp，本法所用之各項分析條件如表2。

五、步驟：

1. 將人工基質試藥40ml放至Beckman CX-5 Cartridge Compartment A之位置。(最大容量為110ml)
 2. 將反應停止液15ml放至Cartridge Compartment B之位置。(最大容量為18ml)
- (以上兩種試藥須依每次使用試藥量之

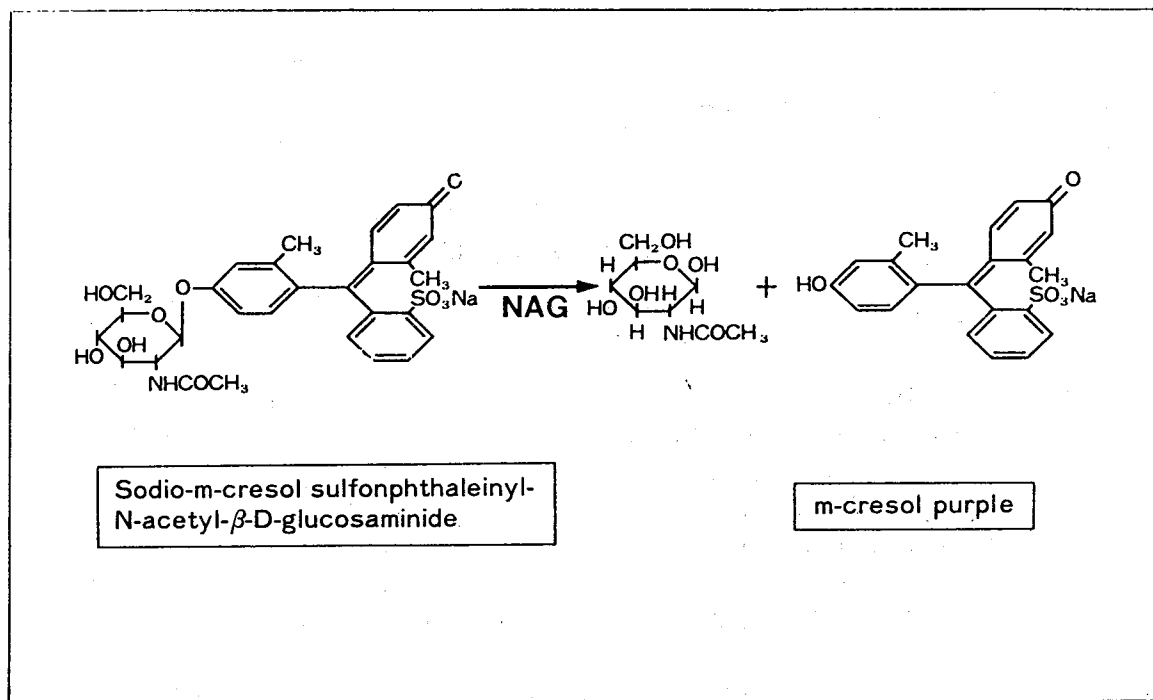


Fig 1. Urinary NAG之測定原理

比例放置，以避免儀器在執行Reagent Loading時發生dispenser Sensor error之現象)

3. 將分析條件設定完全後，執行Reagent Load之功能。
4. 以0 U/L及107 U/L之Calibrator執行校正程序。
5. 將待測檢體資料輸入電腦，啟動儀器進行分析。

結果

我們做了如下幾項評估：

- 一、反應停止液配方之改變：市售之urinary NAG活性試劑其Primary reagent (MCP-NAG)及Secondary reagent(反應停止液)比例為1：2，無法符合儀器Cartridge的容量限制，因此將反應停止液由原先須以110ml精製水溶解的步驟修改為27.5ml精製水溶解，如圖2所示可得知兩者之r值為1，相關性良好。
- 二、分析條件之評估：本法評估過程中在校正

液濃度、反應的方式、反應的時間上做了六次修正之後，如表2以Endpoint Reaction之反應方式，反應時間為752秒，並執行0 U/L及107 U/L兩點校正，波長560nm為最佳之分析條件。

三、精密度(Precision)及準確度(Accuracy)的評估：

已知濃度10 U/L及101 U/L的NAG Control，以Beckman CX-5測試10次其CV值分別為3.68%及0.370%；SD分別為0.40及0.373如表3。

四、反應線性(linearity)的測試：

已知濃度10 U/L及101 U/L的NAG Control，分別以精製水稀釋成2.5 U/L、5.0 U/L、10 U/L、25.25 U/L、50.5 U/L及101 U/L等連續濃度如縱軸所標示，而BeckmanCX-5測試之結果如橫軸所示(圖3)可知反應線性良好。

五、同時再現性的評估(Precision-Within Run)：

收集高、中、低四種不同濃度之pool urine，同時測21次以瞭解其同時再現性

Table 2. Beckmen CX-5之分析條件

SYNCHRON CX5
USER DEFINED CHEMISTRIES

USER ID #: 5

Test Name: NAG	Calculation Factor: 0
Reaction Type: [ENDPOINT 2]	Math Model: [LINEAR]
Reaction Direction: [POSITIVE]	Cal Time Limit: 168 hr
Units: [U/L]	No. of Calibrators: 2
Decimal Precision: [X.X]	

Primary Wavelength: [560] nm

Secondary Wavelength: [670] nm

Sample Volume: 8 uL

CALIBRATORS

MULTIPOINT SPAN

Primary Inject Rgt:

A: 200 uL

1 : 0.00

1-2: 0.000

Secondary Inject Rgt:

B: 75 uL

2 : 107.00

Add Time: 752 sec

REAGENT BLANK

REACTION

Start Read: 240 sec

Start Read: 656 sec

End Read: 288 sec

End Read: 688 sec

Low ABS Limit: -1.500

Low ABS Limit: -1.500

High ABS Limit: 1.500

High ABS Limit: 1.500

USABLE RANGE

SUBSTRATE DEPLETION

Lower Limit: 0.0

Initial Rate: 99.999

Upper Limit: 200.0

Delta ABS: 1.500

RECOVERY/SENSITIVITY

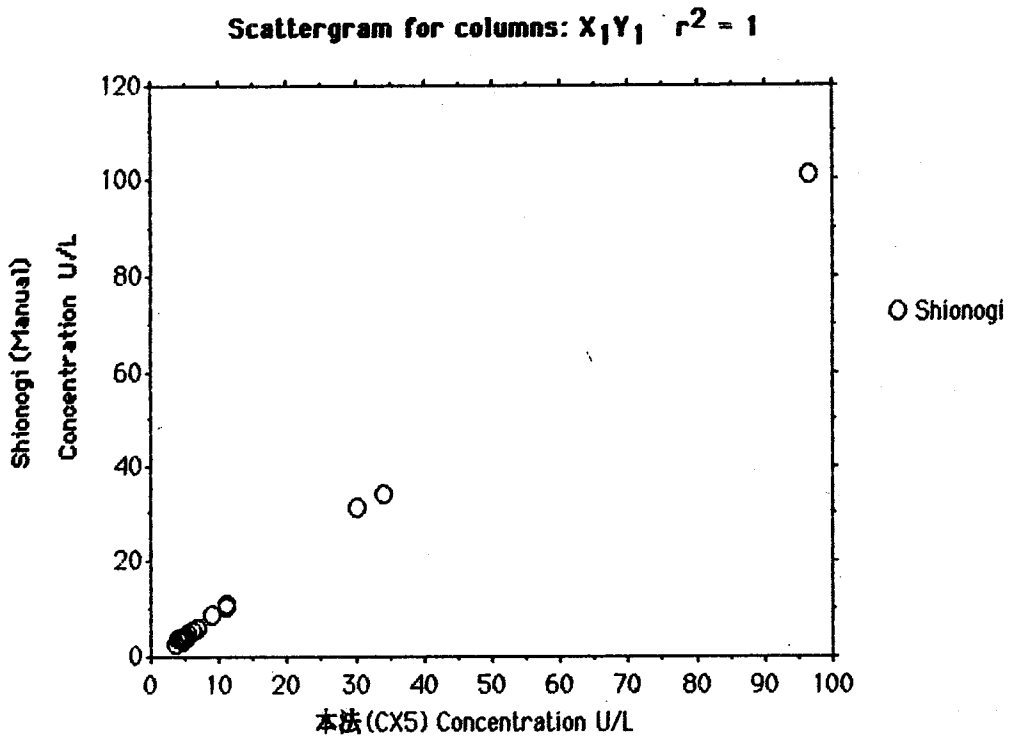


Fig 2. 本法與Shionogi尿中NAG活性測定試藥手工操作方法之比較

Table 3. Urinary NAG精密度及準確度之評估

	NAG CONTROL I (10 U/L)	MAG CONTROL II (101 U/L)
N	10	10
MEAN	10.91	100.71
SD	0.402	0.373
CV	3.683	0.370

其SD值分別為0.23、0.45、0.46、2.31，CV值為8.05%、3.73%、1.79%及5.84% (表4)。

六、日差再現性的評估(Precision-Day to Day Run)：

收集高、中、低四種不同濃度之pool urine，測20天之日差再現性，SD值分別為0.31、0.47、0.83及0.88，CV值為10.91

%、3.9%、3.25%、2.17% (表5)。

七、防腐劑之干擾：

以Thymol及HCl兩種當作收集24小時尿液之防腐劑，與不加任何防腐劑置於4°C保存的尿液比較，使用Thymol之結果如圖4，迴歸方程式為 $y=0.95x+0.74$ ，相關係數r值為0.95，使用HCl之結果如圖5，迴歸方程式為 $y=0.52x-0.75$ ，相關係數

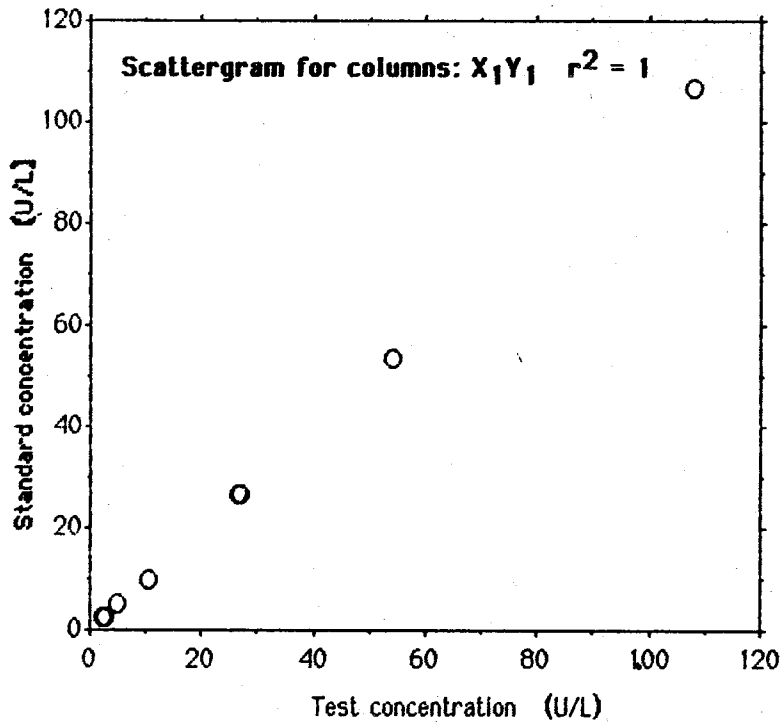


Fig 3 Urinary NAG之反應線性

Table 4. Urinary NAG之同時再現性

Conc. (U/L)	N	MEAN	SD	CV%
L	21	2.91	0.23	8.05
M1	21	12.06	0.45	3.73
M2	21	25.59	0.46	1.79
H	21	39.52	2.31	5.84

Table 5. Urinary NAG之日差再現性

Conc. (U/L)	N	MEAN	SD	CV%
L	20	2.86	0.31	10.91
M1	20	12.07	0.47	3.9
M2	20	25.64	0.83	3.25
H	20	40.44	0.88	2.17

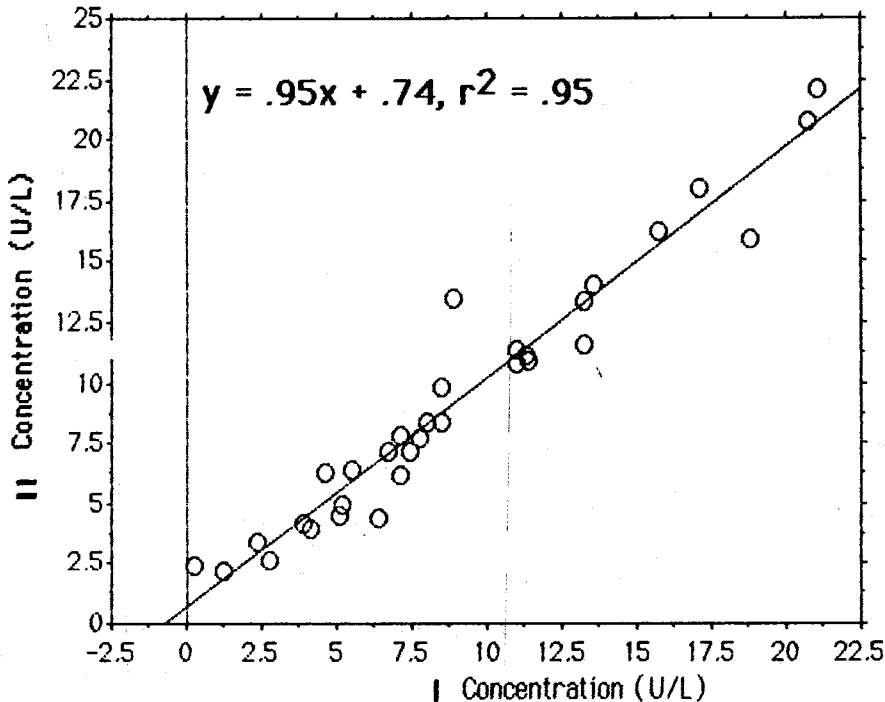


Fig 4. 4°C保存之尿液 (I) 與添加Thymol (II) 之尿液NAG活性比較之相關性

r值為0.47。

八、參考值之建立：

我們調查187名22歲到59歲健康國人，測其尿中NAG之活性，結果如表6，正常參考值男性為<7.74 U/L；女性為<7.13 U/L。

討論

Beckman CX-5為一部全自動電腦化工具選擇性單頻道多測定項目的生化分析儀，可分析不同的檢體，例如：血清、尿液及腦脊髓液等，一次最多可同時分析28個項目，每一項目檢體量為3-25ul，試藥量為200-327ul。儀器本身利用雙波長、光源為Xenon lamp進行測試，反應型式可分為Endpoint Reaction及Rate Method二種 [15]。本法進行評估過程中，我們修改反應停止液的濃度並作六次不同的反應時間、線性及校正液濃度之評估，得到了一個最佳的條件 (表2)，並用此條件進行測試可得知其高、低值之Control CV值分別為0.37%及3.68%，(SD值分別為0.373及0.40) 其精密度及準確度都令人滿意；而且反應線性

為0 U/L至107 U/L，相當良好，且其分析速度每小時可完成50個檢體，亦令人滿意。

1983年Powell et al曾以4-methylumbelliferone使用離心式自動分析儀器 (Centrifugal Analyzer) 測定NAG之活性，其Between Run Precision (n=20) 分別為6.7%及10.8% [7]。1984年CT YUEN et al 以MNP-Glc NAc Reagent分析NAG活性，其Within Run Precision (n=10) 分別為2.8%、2.1%及2.1%；Day to Day Run Precision (n=20) 分別為9.5%、8.2%、8.5% [11]。而日本塩野義原廠以手工操作分析高、中、低三種不同濃度之檢體其同時再現性CV值 (n=10) 為2.6%、2.3%、2.9%，日差再現性CV值 (n=9) 分別為4.1%、5.0%及11.2% [16]。利用本法將urinary NAG以Beckman CX-5自動分析儀測定，四種不同濃度的urinary NAG活性其同時再現性CV值 (n=21) 分別為8.05%、3.73%、1.79%、5.84%。日差再現性CV值 (n=20) 分別為10.91%、3.9%、3.25%、2.17%。以此數據與文獻及原廠評估出的數值比較，其結果相當接近並均甚優異。

另外我們進行了一項防腐劑對Urinary

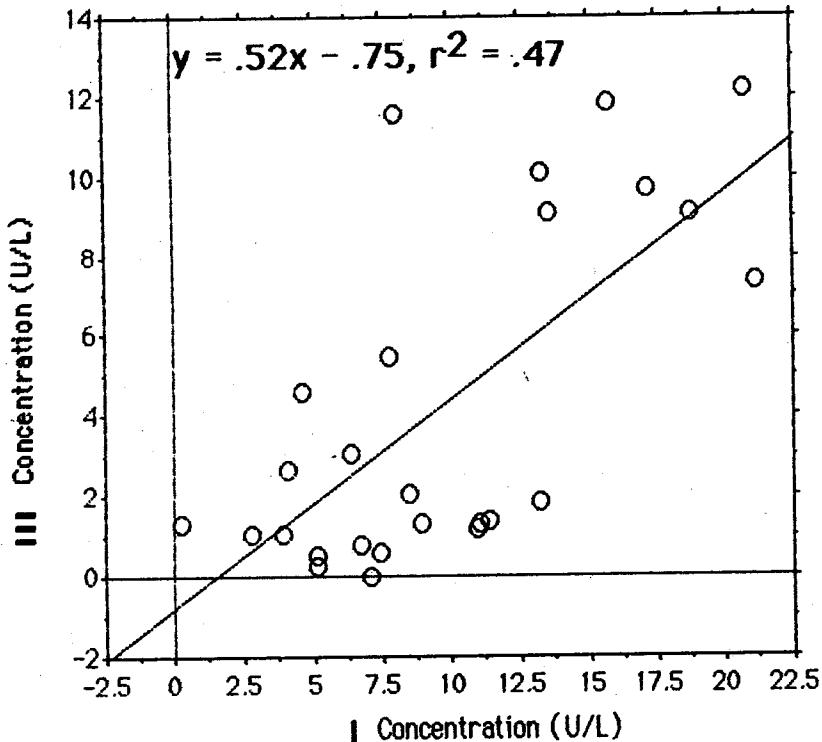


Fig 5. 4°C保存之尿液 (I) 與添加HCl (III) 之尿液NAG活性比較之相關性

Table 6. Urinary NAG之參考值

性 別	人 數	Reference Range
男 性	78	<7.74 U/L
女 性	109	<7.13 U/L
總 數	187	

NAG干擾的評估，我們選用了Thymol及HCl二種常用的防腐劑與保存於4°C之尿液比較，發現使用Thymol之尿液r值為0.95；使用HCl之r值為0.45，因此Urinary NAG之防腐劑應當用Thymol，不可使用HCl。

另有鑑於目前國內所使用之Urinary NAG參考值一直都沿用外國的數據，並不一定適用於國人，因此我們收集了187名沒有腎臟病病史及尿液例行檢查結果正常的本院同仁及其家屬進行調查，統計出的參考值，男性<7.74 U/L；女性<7.13 U/L，較日本統計之<5.0 U/L為高。

由以上結果我們提出以市售之NAG活性

試藥將其反應停止液修改配製成27.5ml，檢體於4°C冷藏保存或添加Thymol當成防腐劑，由Beckman CX-5 Autoanalyzer定量分析尿中NAG活性，可減少人為誤差及提高作業的方便性並簡化作業程序，為一般常規檢驗簡易可行之方法。

誌謝

本文承蒙生化室同仁、潘美珠學姐及市立復健醫院蔡健星組長協助得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

1. Kunin CM, Chesney RW, Craig WA et al: Enzymuria as a Marker of Renal Injury and Disease: Studies of NAG in the General Population and in Patients with Renal Disease. *Pediatrics* 1978; 62: 751-60.
2. Paraire M, Bourbouze R, Francois Ch et

- al: Differential Assay of A and B Isoenzyme in Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Clin Chim Acta* 1983; 129: 233-238.
3. Turker SM, Pierce RJ, Price RG: Characterisation of Human N-acetyl- β -D-glucosaminidase Isoenzyme as an Indicator of Tissue Damage in Disease. *Clin Chim Acta* 1980; 102: 29-40.
 4. Hir ML, Ulrich C: Distribution of Acid Hydrolases in the Nephron of Normal and Diabetic Rats. *Int J Biochem.* 1980; 12: 41-45.
 5. Iwona stolarek, Jacqueline E. A. Howey, and Callum G. Fraser: Biological Variation of Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase: Practical and Clinical Implications. *Clin Chem* 1989; 35: 560-563.
 6. Noto A, Ogawa Y, Moris, et al: Simple, Rapid Spectrophotometry of Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase, with use of a New Chromogenic Substrate. *Clin Chem* 1983; 29/10: 1713-1716.
 7. Powell SC, Scaro J, Wilson E et al: Assay of Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase in a centrifugal Analyzer. *Clin Chem* 1983; 29/10: 1717-1719.
 8. Bourbonze R., Baumanin FC, Bouralet JP et al: Distribution of N-acetyl- β -D-glucosaminidase Isoenzyme along the rabbit nephron. *Kidney Int.* 1984; 25: 636-42.
 9. 劉秋松：測定尿中NAG以篩檢腎臟病變 基層醫訊第四卷第七期，1989；7；10。
 10. TUCKER SM, BOYD PJR, THOMPSON AE et al: Automated Assay of N-acetyl- β -D-Glucosaminidase in Normal and Pathological Human urine. *Clin Chim Acta* 1975; 62: 333-339.
 11. Yuen CT, Kind PRN, Price RG et al: Colorimetric Assay for N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) in Pathological Urine using the ω -nitrostyryl substrate: the development of a kit and the comparison of manual procedure with the automated fluorimetric method. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 295-300.
 12. Mueller PW, MacNeil ML, Steinberg KK: Stabilization of Alanine Aminopeptidase, Gamma Glutamyltranspeptidase, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity in Normal Urines. *Arch Environ Contam Toxicol* 1986; 15: 343-347.
 13. Horak E, Hopfer SM, Sunderman W et al: Spectrophotometric Assay of Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity. *Clin Chem* 1981; 27: 1180-1185.
 14. Noto A, Moris, Kitakaze T, et al: *Jap. J. Clin. Path. Suppl* 1983; 56: 65-72.
 15. SYNCHRON Clinical System CX4/CX5 Operating Instructions 1988 Beckman Instruments Inc.
 16. 日本鹽野義尿液NAG活性試藥操作手冊 Page 7。

The Measurement of Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase with BECKMAN CX-5 Autoanalyzer

Whei-Ling Chiang Chia-Bin Liu

N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) (EC 3.2.1.30) was clinically used as the marker for early diagnosis of renal damage, such as damaging caused by renal intoxication drugs; and also able to discover early renal rejection after kidney transplantation. We employed the urine NAG reagent of shionogi to analyse the concentration of NAG in the urine, using single channel multi-test autoanalyzer (Beckman CX-5). The within run precision (n=21) CV of testing 4 different urine NAG concentration by this method are 8.05%; 3.73%; 1.79%; 5.84% respectively. Whereas the between run precision (n=20) CV of testing the same sample are 10.91%; 3.9%; 3.25% and 2.17%. When using two known concentration of 10 U/L and 101 U/L quality control urine to analyse the accuracy and precision of the

equipment the CV are 3.68% and 0.37%; the SD are 0.40 and 0.37 respectively. The linearity from 0 U/L to 101 U/L is good. We also evaluated 2 types of preservatives thymol and HCl, the coefficient of correlation of thymol is 0.95 ($y=0.95X+0.74$, $r=0.95$); and that of HCl is 0.47 ($y=0.52X-0.75$, $r=0.47$). So thymol is acceptable but not HCl. In order to build up the reference range of Taiwenses, we tested the NAG activity of 181 healthy males and Females, aged from 22 to 59. The result for male is < 7.74 U/L and for females is 7.13 U/L. From the above results, the modified method is acceptable by clinical laboratory for its precision and accuracy. It is not only simple in procedure; reduce personal error but also has lower reagent cost. (CSMJ 2: 9-18, 1991)