

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

# 临床生物化学检验 实验指导

主 编 杨国珍 李 兴



科学出版社

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

# 临床生物化学检验实验指导

**主 编** 杨国珍 李 兴  
**副主编** 潘 卫 黄 海 许 健 王良宏  
**编 委** (按姓氏汉语拼音排序)  
毕 莹(贵阳医学院)  
陈孝红(昆明医学院)  
黄 海(贵阳医学院)  
黄韵祝(贵阳医学院附属医院)  
李海霞(北京大学医学部)  
李洪春(徐州医学院)  
李 兴(贵阳医学院)  
刘丽荣(贵阳医学院)  
刘 宓(贵州省肿瘤医院)  
潘 卫(贵阳医学院)  
任婷婷(贵阳医学院附属医院)  
唐筑灵(贵阳医学院附属医院)  
汪 峰(江苏省泰兴市人民医院)  
王良宏(贵阳医学院)  
王树辉(贵州省人民医院)  
王 伟(贵州省肿瘤医院)  
许 健(贵州省临床检验中心)  
杨国珍(贵阳医学院)  
**秘 书** 王良宏(贵阳医学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

## 内 容 简 介

本书是全国高等院校医学实验教学规划教材之一,全书共4章53个实验。第一章是基本技能实验,重点介绍实验室的一些基本知识和临床生物化学检验基本技术。第二章是常规应用实验,重点介绍体液蛋白质、脂类及脂蛋白、糖及其代谢物、非蛋白含氮化合物、酶类、血气分析、无机离子及微量元素和心肌标志物的检测。第三章是综合应用实验,包括方法学评价实验、试剂盒性能评价实验、仪器性能评价实验和质量控制。第四章是设计创新实验,包括动物模型的建立、临床常见疾病的实验诊断方案的设计等。本书以临床生物化学检验基本技能实验和常规应用实验为主,强调临床生物化学检验的基础知识与基本操作技能,在此基础上增加了综合应用实验和设计创新实验内容,具有较强的临床实用性。

本书可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用,并可用作临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学以及药学专业实验教学的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

临床生物化学检验实验指导 / 杨国珍,李兴主编. —北京:科学出版社, 2012.6

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-034977-4

I. ①临… II. ①杨… ②李… III. 生物化学-医学检验-医学院校-教材  
IV. R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第134123号

责任编辑:李国红 李 植 / 责任校对:林青梅

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年6月第一次印刷 印张:9 1/2

字数:219 000

定价:26.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》 编写指导委员会

顾 问	郑铁生			
主 任	杨国珍			
副主任	李永念			
委 员	(按姓氏笔画排序)			
	王正荣	王良宏	王豫萍	李 兴
	肖 芸	谷俊莹	张亚莉	罗昭逊
	费 樱	莫 非	夏曙华	黄 海
	黄韵祝	蒋红梅	曾小菁	潘 卫
秘 书	潘 卫	谷俊莹		

# 序

医学检验是临床医学与实验医学的有机结合,是运用物理学、化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、生物信息学、细胞学等技术,为疾病预防保健、疾病诊断、治疗及科研等提供客观依据的一门学科。医学检验专业的培养目标是,培养既具有基础医学、临床医学和检验医学理论知识,又具有实验室基本技能和一定创新能力的高级医学检验人才。

按照《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见》(教高[2011]5号)“充分发挥高等学校在教材建设中的主体作用……高等学校要根据学校特色,促进教材建设与人才培养相结合,与专业建设、课程建设、科研工作、教学方式方法改革和教学辅助资源建设相结合,形成良性互动,建设高质量教材”的精神,这套《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》由贵阳医学院牵头,联合第三军医大学、湖北医药学院、北京大学医学部、湖南师范大学、宁夏医科大学、遵义医学院、昆明医学院、海南医学院、徐州医学院、贵阳中医学院、贵阳护理职业学院、贵州省临床检验中心、贵州省人口计生科研究所、贵州省人民医院、贵州省血液中心、贵阳市妇幼保健院儿童医院、广州军区总医院以及贵州省肿瘤医院共同编写。这套教材包括医学检验专业课程的七本实验教材,分别是《临床基础检验学实验指导》、《临床生物化学检验实验指导》、《临床微生物学检验实验指导》、《临床免疫学检验实验指导》、《临床血液学检验实验指导》、《分子诊断学实验指导》及《临床输血学检验实验指导》。这套教材可供高等院校医学检验、卫生检验等专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

这套教材的顺利出版,是各位编者辛勤劳动的结晶,是各参编单位的大力支持的结果。尤其是得到了教育部国家级教学团队、高等学校特色专业建设点、贵州省高等学校教学内容和课程体系改革重点项目、贵州省教育厅省级实验教学示范中心和贵州省卫生厅、贵阳医学院及贵阳医学院附属医院等专项资金的资助,在此一并致谢。

敬请各位读者在使用中多提宝贵意见,以利修改再版。

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》编写指导委员会

2012年元月

# 前 言

《临床生物化学检验》是医学检验专业的核心课程,是一门以临床病理诊断为主要目标的实践性强、应用性强的专业课程。临床生物化学检验的实验教学在整个教学过程中占有十分重要的地位,对教学质量有至关重要的影响。通过实验教学使学生掌握临床检验技能,培养学生动手能力、观察能力、分析问题和解决问题的能力,巩固和深化所学的基础知识和临床知识,将是医学检验毕业生立足于社会的基本条件。

经过多年的实验教学,听取了学生和就业单位的反馈意见,对实验教学模式进行了改革,改变传统的以物质检测为主要目的验证性实验教学模式,提出了以技术和能力培养为主线,构建了基本技能实验、常规应用实验、综合应用实验和设计创新实验四大实验模块,进行了相应的教材编写。这套教材的内容配合理论教学,注重学生对临床生物化学检验基础理论、基本知识、基本技能的学习,在此基础上培养学生综合应用能力和创新思维能力,适用于医学检验专业本科、专科及成人教育学生,也可供给从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

这套教材在编写思路、内容选择及编写过程中,得到了江苏大学医学技术学院郑铁生教授以及许多专家学者的指点和帮助,得到了科学出版社的大力支持,得到了多所高等医学院校的关心和支持,在此表示衷心的感谢。

由于检验医学发展迅速,新的检验技术层出不穷,编撰时间及编者水平有限,难免有许多不足之处,请各位专家和读者批评指正。

杨国珍  
2012年5月1日

# 目 录

第一章 临床生物化学检验基本技能实验 .....	(1)
第一节 实验室基本知识 .....	(1)
一、实验用玻璃器皿的清洗、使用和校正 .....	(1)
二、移液器的使用和校正 .....	(4)
三、临床生物化学检验实验用水 .....	(5)
第二节 临床生化检验基本技术 .....	(7)
一、光谱技术 .....	(7)
实验 1 721 分光光度计性能检查及校正 .....	(8)
二、电泳技术 .....	(10)
实验 2 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 .....	(10)
实验 3 乳酸脱氢酶同工酶乙酸纤维素薄膜电泳 .....	(12)
三、层析技术 .....	(14)
实验 4 氨基酸双向纸层析 .....	(14)
实验 5 离子交换层析分离血清蛋白质 .....	(16)
四、制备纯化技术 .....	(18)
实验 6 动物肝脏 RNA 的制备 .....	(18)
实验 7 核酸样品含量测定 .....	(19)
第三节 临床生物化学检验实验报告的书写 .....	(23)
一、实验报告的书写要求 .....	(23)
二、实验报告的书写内容 .....	(24)
三、实验报告书写的必要性和重要性 .....	(24)
第二章 临床生物化学检验常规应用实验 .....	(26)
第一节 化学法测定实验 .....	(26)
实验 8 双缩脲法测定血清总蛋白 .....	(26)
实验 9 溴甲酚绿法测定血清清蛋白 .....	(29)
实验 10 果糖胺法测定糖化血清蛋白 .....	(31)
实验 11 重氮法测定血清总胆红素和结合胆红素 .....	(32)
实验 12 苦味酸固定时间法测定血清肌酐 .....	(35)
第二节 酶促反应法测定实验 .....	(37)
实验 13 氧化酶法测定血清(浆)葡萄糖 .....	(37)
实验 14 氧化酶法测定血清甘油三酯 .....	(40)
实验 15 氧化酶法测定血清总胆固醇(TC) .....	(42)
实验 16 匀相法测定血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) .....	(45)
实验 17 匀相法测定血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) .....	(48)
实验 18 过氧化物酶指示系统法测定血清尿酸 .....	(51)
实验 19 脱氢酶指示系统法测定血清尿素 .....	(53)
实验 20 脱氢酶指示系统法测定血清肌酐 .....	(55)
实验 21 酶激活法测定血清钙、磷、镁离子 .....	(57)



实验 22 酶循环法测定血清总胆汁酸	(62)
实验 23 连续监测法测定血清丙氨酸氨基转移酶	(64)
实验 24 色素原底物法检测碱性磷酸酶	(66)
第三节 电化学法测定实验	(68)
实验 25 离子选择性电极法(ISE)测定血清钠、钾、氯离子	(68)
实验 26 血气分析	(72)
第四节 免疫化学法测定实验	(76)
实验 27 酶联免疫吸附法(ELISA 法)测定肌酸激酶及其同工酶	(76)
实验 28 心肌肌钙蛋白 T 测定(电化学发光法)	(78)
实验 29 心肌肌红蛋白检测(免疫比浊法)	(80)
实验 30 透射比浊法测定尿微量清蛋白	(82)
实验 31 免疫比浊法测定血清胱抑素 C	(84)
实验 32 免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)	(86)
第五节 层析法测定实验	(89)
实验 33 柱层析法测定糖化血红蛋白	(89)
第三章 临床生物化学检验综合应用实验	(92)
第一节 方法学评价实验	(92)
实验 34 方法比较试验	(92)
实验 35 回收试验	(94)
实验 36 干扰试验	(96)
实验 37 批内重复性实验	(97)
实验 38 检测限实验	(100)
实验 39 线性范围试验	(101)
实验 40 方法性能判断实验	(102)
第二节 临床生化检验试剂盒性能评价实验	(103)
实验 41 线性范围实验	(104)
实验 42 时间反应曲线实验	(105)
实验 43 稳定性实验	(107)
实验 44 准确度和精密度实验	(108)
第三节 临床生化检验仪器性能评价实验	(110)
实验 45 自动生化分析仪的性能评估实验	(110)
第四节 临床生物化学检验质量控制	(121)
实验 46 临床化学检验室内质量控制	(121)
实验 47 临床化学检验室间质量评价(EQA)	(126)
第四章 临床生物化学检验设计创新实验	(131)
实验 48 家兔乙醇代谢速率模型的建立与测定	(131)
实验 49 血清肌酐测定的干扰评价	(132)
实验 50 1 型糖尿病动物模型的建立	(133)
实验 51 小鼠急性肝损伤的模型建立与检测	(133)
实验 52 急性肾小球肾炎实验室诊断方案的设计	(134)
实验 53 糖尿病酮症酸中毒实验室诊断方案的设计	(135)
附录	(137)
附录一 临床生物化学检验常用缓冲溶液的配制	(137)
附录二 常用生化检验英文缩写术语	(141)
参考资料	(144)



# 第一章 临床生物化学检验基本技能实验

临床生物化学检验是生物化学、病理学、生物医学技术和临床医学等学科互相渗透、不断发展,逐步形成的一门理论性和实践性的独立学科,是检验医学专业的主干课程之一。临床生物化学检验与临床实践紧密结合,通过对人体生物样本进行检测,为临床疾病的预防、诊断、病情监测、疗效观察和预后判断等提供重要信息。临床生物化学检验的教学内容包括理论教学和实验教学两部分,实验教学重在训练学生的实践操作能力,这种能力对临床检验测定结果的准确性和可靠性至关重要。为了达到实践教学目的,提高实验教学效果,使学生能够更好地掌握本课程的基础理论、基本知识和基本技能,本章重点介绍实验室的一些基本知识和临床生化检验基本技术。

## 第一节 实验室基本知识

实验室基本知识包括实验室的安全知识、纯水的制备与检测、试剂的等级标准及试剂的配制、常用实验器材的使用和维护等。实验室安全知识已在《临床微生物学与检验》教学中介绍,本节主要介绍实验用玻璃器皿的清洗、使用和校正,移液器的使用及校正和临床生物化学检验实验用水。

### 一、实验用玻璃器皿的清洗、使用和校正

实验用玻璃器皿分为容器类和量器类。容器类玻璃器皿为常温或加热条件下物质的反应容器以及储存容器,如试管、烧杯、锥形瓶、试剂瓶等。量器类玻璃仪器用于计量溶液体积,如量筒、容量瓶、吸量管、移液管、滴定管等。

#### (一) 玻璃器皿的清洗与干燥

玻璃器皿的清洁程度直接影响测定结果的准确性。根据不同的实验目的,使用不同的玻璃器皿,选用不同的清洗剂进行清洗,达到玻璃器皿清洁透明,冲洗水沿器壁自然下流时无挂水珠现象。

1. 新购买玻璃器皿的清洗 新购买玻璃器皿的表面常附有游离的碱性物质,在包装、运输过程中可能有污物,可先用自来水洗刷至无污物,0.5%的去污剂洗刷,再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%的盐酸溶液中过夜(至少4小时),再用自来水洗净,最后用去离子水冲洗两到三次,倒放在架子上备用。

#### 2. 使用过玻璃器皿的清洗

(1) 容器类玻璃器皿:该类玻璃器皿使用后应及时倒掉内容物,然后用自来水清洗以免黏污物干涸。清洗时先用自来水刷洗至无污物,后用合适的洗涤液洗刷器皿内外壁,自来水流水冲洗,蒸馏水冲洗2~3次,烤干或倒置在清洁处。

(2) 量器类玻璃器皿: 该类玻璃器皿使用后应立即浸泡于自来水中以免黏污物干涸。清洗时用流水冲洗附着的试剂、蛋白质等物质, 晾干, 铬酸洗液中浸泡 4~6 小时或过夜, 自来水冲洗干净, 蒸馏水冲洗 2~4 次, 晾干备用。

(3) 比色皿: 使用完毕立即用清水反复冲洗干净, 若附着有污物冲洗不净, 可用盐酸或适当溶剂清洗, 再用自来水反复冲洗干净, 最后用蒸馏水冲洗干净, 倒置于干净滤纸上晾干备用。注意为防止损坏比色皿的透光度, 勿用试管刷或粗糙的纸或布擦拭; 勿用强碱或强氧化剂清洗。

(4) 特殊玻璃器皿: 污染过血、尿等标本的试管清洗时, 应在消毒液(如重铬酸钾或煤酚皂溶液)中浸泡过夜进行消毒, 再按常规方法清洗。被石蜡、凡士林或其他油脂类污染的玻璃量器要单独洗涤, 洗涤前先除去油脂再按常规方法清洗。染料污染的玻璃器皿, 先用清水清洗, 再置于重铬酸钾清洁液或稀盐酸中浸泡以彻底去除附着的染料, 然后按常规方法清洗。用于微量元素测量的玻璃器材应单独清洗, 先用稀硝酸浸泡再用去离子水冲洗, 然后按照一般方法清洗。

### 3. 几种清洗液的配制和应用

(1) 清洁液(重铬酸钾清洁液): 重铬酸钾 1000g, 加热水 2L 并搅拌使之溶解, 冷却后缓慢加入浓硫酸 10L, 混匀即可。注意加入硫酸时, 速度不能过快, 以免产生高热而使容器破裂。由于硫酸吸湿性强, 可吸收空气中水分而变稀, 用后应及时加盖。清洁液的颜色由棕黄色变为绿色, 其清洁效力降低, 再加入适量的重铬酸钾和浓硫酸可继续使用, 若变成黑色则不能再用, 应重新配制。

(2) 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2$ )洗液: 50~100g/L 的 EDTA- $\text{Na}_2$  溶液, 加热煮沸可清洗玻璃器皿内壁的白色沉淀物如钙、镁盐类和不易溶解的重金属盐类。

(3) 其他特殊洗液: 草酸洗液可洗脱高锰酸钾的痕迹, 硫代硫酸钠洗液可去除碘液污染, 7.5mol/L 尿素洗液可除去黏附在器皿上的血液或血清蛋白。

## (二) 玻璃器皿的使用

1. 量筒 量筒一般用于不太精密的液体计量, 使用时根据需要进行选择不同量程的量筒。如取用 8ml 时, 应选用 10ml 量筒(误差  $\pm 0.1\text{ml}$ )。读取量筒刻度值时, 一定要使视线与量筒内液面处于同一水平线上, 以免增加量取误差。量筒不能做反应容器, 不能装热的液体。

2. 容量瓶 容量瓶为细颈梨形的平底瓶, 一般用于将精密称量的固体试剂或一定浓度的浓溶液配制成准确浓度的溶液。瓶颈上有环形标线, 标示指定温度时液体的容积。容量瓶与瓶塞配套使用, 使用前检查是否漏水。注意容量瓶不能长期存放溶液, 不能在烤箱中烘烤, 不许以任何形式对其加热。

3. 吸量管 吸量管一般用于准确量取一定体积的液体, 可分三类: 奥氏吸量管、移液管和刻度吸量管。

(1) 奥氏吸量管: 准确性最好, 尤其适用于黏稠液体的量取, 常用规格有 0.5ml、1.0ml、2.0ml 和 3.0ml 等。此种吸量管只有一个刻度, 当放出所量取的液体时, 管尖残留的液体须吹入容器内。

(2) 刻度吸量管: 主要用于量取 10ml 以下任意体积的溶液, 分全流出式和不完全流出式两种。完全流出式的上端常标有吹字, 刻度包括尖端部分, 欲将所取液体全部放出时, 应将管尖的液体吹出。另一种吸量管的刻度不包括管尖部分, 放液时至相应刻度线处即可。

吸量管使用应规范。移取液体时, 用右手的大拇指和中指拿住管上方, 食指向上配合

左手操作。吸量管插入液体中1~2cm,左手用洗耳球慢慢将液体吸入管内。当液面升高到刻度以上时,立即用右手食指按住管口,将吸量管下口提出液面,略微放松食指使液面平稳下降,直到溶液的弯月面与标线相切时,食指立即压紧管口使液体不再流出。放出液体时,将吸量管末端外壁的溶液用干净滤纸擦去,然后使管末端靠在器皿内壁上,松开食指,让管内液体自然沿器壁流下,待15秒左右拿出吸量管。

(3) 移液管:一般用来准确量取较大体积液体,常用规格有50ml、25ml、10ml、5ml、2ml和1ml等。用移液管量取液体时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留15秒左右。管尖残留的液体不要吹出。

(4) 烧杯:常用于盛放液体、加热和溶解试剂,常与容量瓶配合使用。使用时切勿用手接触其内壁,溶解或混匀试剂时可用玻璃棒轻轻搅拌混匀。烧杯内溶液倒入容量瓶时,注意用溶液多次冲洗烧杯,一并倾入容量瓶内。

(5) 漏斗:多用于过滤和收集沉淀物。在定量分析时,选用大小合适的滤纸,对角折叠两次后1:3分开放入漏斗内,纸的边缘不能超出漏斗上缘。滤纸大小与过滤液体量应相配,过大使滤液回收减少,所含成分浓缩而影响其效果。

### (三) 常用玻璃器皿的校正

在校正量器之前,须先熟悉它们的正确使用方法,校正方法与实际工作中的使用方法一致。校正时,所用蒸馏水至少在室内放置1小时以上,校正仪器应仔细洗涤至内壁完全不挂水珠,如室温变化须记录水的温度,在开始放水前,滴定管或移液管尖端与外面的水必须除去。

1. 校正量器的方法 校正方法一般通过量器在某温度时所容纳水或水银的重量来推算其体积。因此,校正时必须考虑三个因素,即温度对量器的影响,温度对水或水银密度的影响,空气浮力对水重量的影响,其中温度对水密度的影响最大。校正时的温度应尽量接近实验室全年平均温度(一般为20℃)。

校正的基本程序:称出量器容纳的水重,根据以下公式换算为体积。 $W_{20} = W_t / r$ ,  $W_t$  为某一温度下所称得的水重,  $r$  为某温度时充满容量为1L的玻璃量器的水的重量(表1-1)。

表 1-1 水在 10~40℃ 的  $r$  值

$t(^{\circ}\text{C})$	$r(\text{g})$	$t(^{\circ}\text{C})$	$r(\text{g})$	$t(^{\circ}\text{C})$	$r(\text{g})$
10	998.41	21	996.99	32	994.31
11	998.34	22	996.79	33	994.01
12	998.26	23	996.59	34	993.71
13	998.17	24	996.37	35	993.40
14	998.06	25	996.14	36	993.07
15	997.94	26	995.91	37	992.74
16	997.81	27	995.66	38	992.41
17	997.67	28	995.41	39	992.06
18	997.51	29	995.15	40	991.71
19	997.35	30	994.88		
20	997.17	31	994.60		

例如:容器为1L的量瓶在20℃校正时,称得水重为998.06g,从表1-1查得20℃时 $r$ 值

为 997.15, 则该量瓶在 20℃ 时的真实容量为:  $V_{20} = 1000 \times (W_1/r) = 1000 \times (998.06/997.15) = 1000.91(\text{ml})$ , 校正值为  $1000.91 - 1000 = +0.91\text{ml}$

2. 校正吸量管的方法 一般 0.2ml 以上吸量管均可用水称量法校正。将吸量管洗净, 干燥, 吸取蒸馏水至标线以上, 缓缓调节液面弧形至标线, 将水放入已称量的具塞锥形瓶中, 再称量, 两次重量之差为水的重量, 以实验温度时每毫升水的重量来除水重, 即得吸量管的真实体积。若在允许误差范围内即为合格, 超过允许误差则弃之或重新刻度。

3. 校正容量瓶的方法 将洗净的容量瓶在室温晾干, 称空瓶重, 注入蒸馏水至标线再称重, 两次重量之差即为瓶中水重, 以实验温度时每毫升水的重量来除水重, 即得吸量管的真实体积。

## 二、移液器的使用和校正

移液器又称移液枪、微量加样器, 加样精确, 按原理主要有空气垫式加样器和活塞正移液式加样器两种。移液器是量出式量器, 分为定量移液器和可调移液器两大类。移液器主要由显示窗、容量调节部件、活塞、活塞套、吸引管和吸液嘴等部分组成。

### 1. 移液器的使用方法

(1) 量程选择: 移液器能在特定量程范围内准确移取液体, 使用时如果超出最小或最大量程, 会损坏加样器并导致计量不准。

(2) 设定体积: 刻度调节系统一般由 3 个数字组成。正常调节方法是从大量程调节至小量程。从小量程调节至大量程时, 应先调至超过设定体积刻度, 再回调至设定体积, 这样可以保证移液器的准确性。

(3) 吸头安装: 选择合适吸头, 将移液枪垂直插入吸头, 左右旋转半圈上紧。

(4) 预洗吸头: 吸样前应预洗吸头, 先轻轻吸打几次液样, 可消除吸液误差。

(5) 吸液: 将按钮按至第一档, 吸头垂直浸入液面 2~3mm, 慢慢吸入液体, 停留 1s 将吸头脱离液面, 用吸纸抹去吸嘴外面可能黏附的液滴。勿触及吸头口。

(6) 放液: 将吸头口贴到容器内壁并保持 10°~40° 倾斜, 将按钮按至第一档, 停 1~2s 后, 继续按压至第二档, 排除残余液体。松开按钮, 同时提起移液器。

(7) 按吸头弹射器弃去吸头。

2. 移液器的校正 为保证加样的准确性, 需要定期对移液器进行校准。校准可按以下程序进行。

(1) 校正前准备: 室温应控制在 20~25℃, 波动范围不大于 ±0.5℃。电子天平放置于无尘和震动影响的台面上, 天平内放置一盛蒸馏水的小烧杯以保持湿度。另外需要 5~10ml 体积的小烧杯一只, 温度 20~25℃ 的双蒸水。

(2) 校准步骤: 将移液器调至拟校准体积, 选择合适吸头, 调节好天平, 来回吸吹蒸馏水 3 次以使吸头湿润, 移液器吸取蒸馏水, 将蒸馏水完全打入称量烧杯中, 记录称量值, 并按以上步骤称量 10 次, 取 10 次测量值的均值, 按蒸馏水 Z 因子计算体积, 最后按校准结果调节移液器。

### 三、临床生物化学检验实验用水

水是实验室最常用的溶剂,天然水中含有许多杂质,须经过蒸馏、电渗析等处理,除去杂质才可作为实验用水。实验用水的质量高低直接影响试剂质量和实验结果的准确性和精密性。2008年中国制定了实验室用水国家标准(表 1-2),1985年美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)提出了实验用水的标准(表 1-3)。

表 1-2 中国实验室用水国家标准 GB6682-2008

名称	一级	二级	三级
pH 范围(25℃)	—	—	5.0~7.5
电导率(25℃),ms/m	≤0.01	≤0.10	≤0.50
电阻率(MΩ/cm,25℃)	≥10	≥1.0	≥0.2
可溶性硅[以(SiO <sub>2</sub> )计],mg/L	<0.01	<0.02	—

表 1-3 美国 NCCLS 等级纯水标准

级别	I 级	II 级	III 级
pH	—	—	5.0~8.0
电阻率(MΩ/cm,25℃)	≥10	≥2.0	≥1.0
硅(SiO <sub>2</sub> ,mg/L)	0.05	0.1	1.0
微粒	0.2μm 微孔膜过滤	未定	未定
有机物质	活性炭过滤	未定	未定

一般性实验选用 II 级水,特殊实验如酶活性测定、电解质分析等应选用 I 级水,III 级水用作仪器、器皿的自来水清洁后冲洗。

#### (一) 纯水的制备方法和储存方法

##### 1. 纯水的制备方法

(1) 蒸馏法:蒸馏水是利用水与杂质的沸点不同,经蒸馏器蒸馏制得。将自来水或天然水在蒸馏器中加热气化,然后冷凝水蒸气得蒸馏水。蒸馏法制纯水的优点是操作简单、成本低、效果好,适用于用水量较少的中、小厂矿和实验室使用。用于纯水制备的蒸馏器有多种。实验室用纯水可用玻璃或金属蒸馏器进行蒸馏制得。特殊用途的高纯水可用硬质玻璃、石英、银、铂或聚四氟乙烯等材质的蒸馏器进行蒸馏制得,一般化学分析用的蒸馏水通常是通过一次蒸馏的方法制得,称为一次水。精密分析或测定高纯物质时所用的纯度较高的水,可用普通蒸馏器增加蒸馏次数或减慢蒸馏速度的方法制得。

(2) 离子交换法:通过离子交换树脂精制的纯水称为离子交换水或去离子水。由于离子交换树脂去离子能力强,水质良好,出水量大,成本低,操作技术易掌握等优点,适合于各种规模的实验室采用。在用水量大的场合有替代蒸馏法制备纯水的趋势。

离子交换法是通过离子交换树脂过滤,水中的离子与树脂上的离子发生交换使水得到净化的方法。实验室用纯水的制备程序一般分为两步:硬水软化和去离子。硬水软化是指在用树脂交换离子之前,先将水质硬度降低到一定程度的一种前处理工艺。去离子是利用

离子交换树脂中的氢离子交换水中的阳离子,以氢氧根离子交换水中的阴离子。目前,国内外相关去离子水的制备技术和设备已经很成熟,去离子水设备有现成的商品可以买到。

(3) 电渗析法制取纯水:电渗析纯化水是除去水中的电解质,又叫电渗析脱盐。电渗析纯化水的原理是利用离子交换膜的选择性透过,即阳离子交换膜(简称阳膜)仅允许阳离子通过,阴离子交换膜(简称阴膜)仅允许阴离子通过,在外加直流电场作用下,使一部分水中的离子通过离子交换膜迁移到另一部分水中,造成一部分水淡化,另一部分水浓缩,收集淡化水即为纯化水。

电渗析法对弱电解质去除效率较低,常用于海水淡化,不适用于单独制取分析用纯水。电渗析法与离子交换法联用,可制得较好的分析用纯水。电渗析法的优点是设备可自动化,节省人力,仅消耗电能,不消耗酸碱,不产生废酸等。

(4) 活性炭吸附法:活性炭吸附法是采用活性炭柱处理自来水以除去有机物的方法。原理是利用活性炭过滤器的空隙大小,即有机物通过孔隙时的渗透率来达到去除有机物的目的。

(5) 超滤膜法:超滤膜法是采用超滤的方法除去水中悬浮物的方法,所得水仍需进一步纯化。

(6) 纯水器:目前多采用该法制备纯水。它把纯化水技术的工作原理有效地集中在一台纯水机上,基本工艺是水经过滤膜预处理后,结合碳吸附和离子交换处理,最后以孔径  $0.45\mu\text{m}$  的滤膜除去微生物。

2. 纯水的储存方法 在实际工作中应重视纯水的储存、运输和使用过程,以免纯水等级下降。一般选用聚乙烯或聚丙烯桶或瓶储存,储存时间不宜太长。使用时应避免仪器可能的污染,切勿用手接触纯水或容器内壁。

## (二) 水的纯度检测

1. 标准检测方法 标准检测方法要求严格精确,一般用于精密分析实验和科学研究用水。

(1) pH 范围:纯水质量标准中对一、二级水的 pH 未作具体规定,原因是纯水几乎不导电,在一、二级水的纯度下,很难准确测定其 pH。

(2) 电导率:测一、二级水时,电导仪的电极常数应在  $0.01\sim 0.1\text{cm}^{-1}$ 。测三级水时,电导仪的电极常数应在  $0.1\sim 1\text{cm}^{-1}$ 。应使用具有温度补偿功能的电导仪,“在线”测定一级和二级水的电导率。如果使用的电导仪不具有温度补偿功能,则应装有“在线”热交换器,使实验时水温能控制在  $(25\pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。

(3) 可氧化物质:用高锰酸钾滴定法来测定纯水中可氧化物的含量。高锰酸钾滴定液呈紫红色或粉红色,具有强氧化性,若水中有可氧化物时,其被还原成为近无色的溶液。据此可用于纯水可氧化物含量测定。

(4) 吸光度:用分光光度计来测定纯水的吸光度值。将水样分别注入  $1\text{cm}$  和  $2\text{cm}$  吸收池中,于  $254\text{nm}$  处以  $1\text{cm}$  吸收池中的水样为参比,测定  $2\text{cm}$  吸收池中水样的吸光度。若仪器灵敏度不够,可适当增加测量吸收池的厚度。

(5) 蒸发残渣:蒸发残渣测定使用的主要仪器是旋转蒸发器。量取  $1000\text{ml}$  二级水,分几次加入到旋转蒸发器的  $500\text{ml}$  蒸馏瓶中,于水浴上减压蒸发至  $50\text{ml}$  时转移至玻璃蒸发皿中,用  $5\sim 10\text{ml}$  水样分  $2\sim 3$  次冲洗蒸馏瓶,洗液合并入蒸发皿,水浴上蒸干,在  $(105\pm$

2)°C的电烘箱中干燥至质量恒定。残渣质量不得大于1.0mg。

(6) 可溶性硅:试剂包括50g/L 钼酸铵溶液、2g/L 对甲氨基酚硫酸盐(米吐尔)溶液、50g/L 草酸溶液。量取520ml 一级水,注入铂皿中。在防尘条件下,蒸发至约20ml时停止加热。冷至室温,加入1.0ml 50g/L 钼酸铵溶液,摇匀。放置5分钟后,加1.0ml 50g/L 草酸溶液,摇匀。放置1分钟,加1.0ml 2g/L 米吐尔溶液,摇匀。转至25ml 比色管中,稀释至刻度,摇匀,于60°C水浴中保温10分钟。目视比色,试液的蓝色不得深于标准。标准溶液处理过程为0.50ml 二氧化硅标准溶液(0.01mg/ml)加入20ml 水样后,从加1.0ml 钼酸铵溶液起与样品试液同时同样处理。

2. 一般检测方法 标准检验方法严格、准确,费时较多。对于一般化验用的纯水可用测定电导率法和化学方法检验。

(1) 电导率:纯水的电导率可以用电导率仪检测。离子交换法制纯水时可根据电导率确定何时需再生交换柱。取水样后要立即测定,注意避免空气中的二氧化碳溶于水使水的电导率增大。目前市场上有一种使用方便的手持式微型电导率仪(测水笔)。

(2) 阳离子和阴离子的检测:分别用试管取自来水和制备的纯水,进行下列离子检验:  
① 镁试剂检验  $Mg^{2+}$ :在3ml 水样中加入2滴6mol/L NaOH,再加镁试剂2滴,观察是否有浑浊,无浑浊则判断无  $Mg^{2+}$ 。  
② 钙指示剂检验  $Ca^{2+}$ :在1ml 水样中加入2滴2mol/L NaOH,再加入少许钙指示剂,观察是否有浑浊,无浑浊则判断无  $Ca^{2+}$ 。  
③  $AgNO_3$  溶液检验  $Cl^-$ :在1ml 水样中加入2滴2mol/L  $HNO_3$  酸化,再加入2滴0.1mol/L  $AgNO_3$  溶液,观察是否有浑浊,无浑浊则判断无  $Ag^+$ 。  
④  $BaCl_2$  溶液检验  $SO_4^{2-}$ :在1ml 水样中加入2滴2mol/L HCl,再加入2滴1mol/L  $BaCl_2$  溶液,观察是否有浑浊,无浑浊则判断无  $SO_4^{2-}$ 。

(3) 指示剂法检测 pH:酸度检查时,取水样10ml,加甲基红 pH 指示剂(甲基红指示剂的变色范围  $pH=4.2\sim 6.3$ ,红→黄)2滴不显红色。碱度检查时,另取水样10ml,加溴麝香草酚蓝 pH 指示剂(溴麝香草酚蓝指示剂变色范围  $pH=6.0\sim 7.6$ ,黄→蓝)5滴不显蓝色即符合要求。用于测定微量硅、磷等的纯水,应该先对水进行空白试验,才可应用于配制试剂。

(李 兴)

## 第二节 临床生化检验基本技术

临床生化检验包含对健康人体和患者化学状态的研究以及用于诊断、治疗和预防的化学实验方法的应用。临床生化检验技术是保证临床生化检验工作顺利进行的技术基础,目前多采用近代生物技术并逐步运用现代生物技术。常用的检验技术较多,包括光谱分析技术、电泳技术、层析技术、离心技术、电化学分析技术、质谱技术及生物大分子制备技术等。本节主要介绍光谱分析技术、电泳技术、层析技术和生物大分子制备技术。

### 一、光谱技术

利用物质具有吸收、发射或散射光谱的特征,来确定物质的性质、结构或含量的分析方法称为光谱技术。光谱技术具有灵敏、快速、准确、简便和不破坏样品等优点,是一种最常



用的临床生化检验技术。

## 实验 1 721 分光光度计性能检查及校正

### 【实验目的】

1. 掌握 721 分光光度计的基本结构及工作原理。
2. 熟悉 721 分光光度计性能检查的基本程序和方法。
3. 了解标准曲线的制作方法。

### 【实验原理】

1. 波长校正 波长校正是对 721 分光光度计进行一些机械调整,改变光源与单色器的相对位置,使它们处于一条直线上,使波长指示盘上标明的波长与射入样品比色杯的辐射波长一致。以保证波长读数与通过样品的波长相符合,达到仪器的最大灵敏度。否则,分析结果会表现出明显的差异,这一差异在紫外区尤为明显。

2. 线性检查 线性检查包括仪器线性和测定方法线性两个方面的检查。线性误差表现为溶液的浓度与吸光度不成线性关系,出现偏离的现象。出现偏离现象有两种情况,一是溶液本身不符合比尔定律,如溶液的吸光度系数可随温度或 pH 的改变而改变等,这种现象叫化学偏离;二是仪器本身各种因素的影响,使吸光度测定值与浓度之间不成线性关系,这种现象叫仪器偏离。本实验研究仪器偏离,其影响因素很多,如杂光、有限带宽、检测器噪声、波长的波动和比色杯误差等。

仪器的线性误差对测定结果的影响与实际采用的分析方法有关。通常采用相对比较法,即用已知浓度的标准液与样品进行比较,当标准液的成分和浓度与样品接近时,仪器的线性误差对分析结果影响较小。所以,比色法中的标准液应选用与样品基质相同或相似者,才能使分析结果准确。

进行仪器线性检查时,在一定浓度范围内将符合比尔定律的有色物质配成不同浓度的溶液,在一定波长下用来检查仪器本身能否如实反映有色物质的浓度变化。这种检查方法与被测物质呈色反应无关,它不受分析方法本身误差的影响,用测得的吸光度对溶液浓度作图,在理想情况下应是一条直线。

3. 杂光(杂散光)检查 在吸光度测定中,凡检测器感受到的不需要的辐射都称为杂光。杂光对吸光度测定的准确性有严重影响,往往易被忽视。杂光的来源有:①室内光线过强漏入仪器;②仪器自身原因,如单色器设计缺陷、光学元件老化以及仪器内部反射及散射等;③样品本身的原因,如样品有荧光、样品散射等。

设杂光产生的电信号造成  $0\sim 100\%T$  的偏移为  $X\%$ ,若测定结果为  $t\%$ ,其中包括了杂光的影响,称表观透光率。被测物质的真实透光率应为  $(t-X)/(100-X)$ ,转换为吸光度时应为  $\lg[(100-X)/(t-X)]$ 。当真实吸光度值增大时,由杂光引起的误差随之增大。这是影响高浓度测定的一个重要因素,常表现为制备标准曲线时高浓度管的吸光度偏低。杂光所造成的误差为系统误差,完全消除杂光较困难,但可监测杂光水平并设法控制在一定的允许范围内。

4. 比色皿的质量检查 比色皿一般由玻璃、石英或萤石制成,光径 1.0 cm 或 0.5cm,光线通过时有一部分光为空气于玻璃接触面的反射而损失(4%),另一部分为玻璃吸收。比色皿的质量除受原材料影响外,还受到杯壁的厚度是否均匀、上下光径是否一致、各杯彼

此是否相配等影响。不能配对的比色皿将影响样品的测试精度。

5. 重复性检查 在波长、工作状态、电源电压、比色皿配套等合格的前提下,可进行重复性检查。重复性是指对同一标本进行多次测量时,测量结果的一致程度。重复性的改变可对分光光度计的检测结果造成误差。为确保分析结果的准确性,应在仪器安装完或使用一段时间后进行重复性检查并校正。

### 【实验器材】

1. 试剂 500mg/L 重铬酸钾溶液、蒸馏水。
2. 器材 721 分光光度计、镨钕滤光片。

### 【实验步骤】

1. 波长校正 采用镨钕滤光片法。镨钕滤光片是含有稀有金属镨和钕的玻璃制品,有片形或长方柱形(1cm×1cm×3cm),在波长 585nm 或 529nm 处有特异的吸收峰,可用来判断出射光波长与通过比色杯的波长是否一致。本法适用于 721 分光光度计可见光区的波长校正,由于 573nm 和 585nm 两峰不易分开,校正时易产生误差,故推荐用 529nm 峰或谷为标准来进行波长校正。

(1) 粗调:仪器按要求预热,波长度盘置于 580nm 处, $T\%$ 调至最大,在比色杯处放一白纸条,观察是否有光强均匀、边缘无光晕或杂光的光斑,如不符合要求,可调节光源灯泡位置使其符合要求。

(2) 细调:将灵敏度拧置于“1”(最低档);波长度盘置于 529nm,调节指示器表盘读数  $T\%$ 为零,在光路空白时调  $T\%$ 为 100% $T$ ,并反复检查零点和 100% $T$  稳定情况。然后将镨钕滤光片插入光路,慢慢旋转波长度盘,找到透光率值最低点(向左或右微旋波长度盘时透光率均增加),即为波长 529nm。

如果透光率最低点的波长指示值为 531nm,此时波长误差为:531-529=2nm,超出规定( $\pm 1$ nm),必须调整。

(3) 调整方法:将波长度盘对准 529nm,从光路取出镨钕滤光片,光路空白时调电表指针至 100% $T$ ,再将镨钕滤光片插入光路。打开仪器左侧小盖板,找到波长校正螺丝(三个中左侧柄长的一个),反时针方向微微调节(负误差时则顺时针方向),使电表指针指示  $T\%$ 为最低。反复检查波长误差情况,直到符合仪器技术指标要求为止。

由于 721 型分光光度计光学系统的机械工艺较差,使用中易发生出射光波长与通过比色杯的波长不一致,须定期进行波长检查和校正。

2. 线性检查 通常采用重铬酸钾法。

(1) 将重铬酸钾储存液配制成系列浓度:100、200、300、400、500mg/L 的溶液,在 440nm 波长处,用蒸馏水调零后测该 5 种不同浓度重铬酸钾溶液的吸光度(必要时测每管前均用蒸馏水调零),记录读数。

(2) 以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标作图,制作标准曲线。

3. 杂光(杂散光)检查

(1) 紫外光区:可用 10g/L 的碘化钠溶液,在 240nm 处测定的吸光度应大于 2.00。此外,也可用 12g/L 的氯化钾溶液,在 220nm 处测其透光率,即为杂光量,一般应小于 1% $T$ 。以上测定均用石英杯,蒸馏水调零。

(2) 可见光区:可使用镨钕滤光片法检查。先校正波长,后用黑纸片挡住比色杯光路,