



高职高专工学结合教改规划教材系列

生物化学检验实验指导

(供医学检验专业用)

Experiment Guide to Biochemistry Test

主 编 孙 琦
副主编 褚美芬 孙爱华



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

高职高专工学结合教改规划教材系列
浙江省“十一五”重点教材建设项目

生物化学检验实验指导

(供医学检验专业用)

主 编 孙 琦

副主编 褚美芬 孙爱华



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学检验实验指导/孙琦主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2012.2

ISBN 978-7-308-09558-7

I. ①生… II. ①孙… III. ①生物化学—医学检验—
高等职业教育—教材 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 006536 号

生物化学检验实验指导

主编 孙 琦

丛书策划 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)

责任编辑 阮海潮

封面设计 姚燕鸣

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 12.5

字 数 328 千

版 印 次 2012 年 2 月第 1 版 2012 年 2 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-09558-7

定 价 30.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88925591

《生物化学检验实验指导》

编写人员名单

主 编 孙 琦

副 主 编 褚美芬 孙爱华

编 者 张 晖(浙江医学高等专科学校)

周永列(浙江省人民医院)

陈学军(浙江大学医学院附属儿童医院)

褚美芬(浙江医学高等专科学校)

孙 琦(浙江医学高等专科学校)

孙爱华(浙江医学高等专科学校)

张大然(浙江医学高等专科学校)

张学军(浙江省人民医院)

王黎芳(浙江医学高等专科学校)

杜 鹏(浙江医学高等专科学校)

华玉凤(浙江医学高等专科学校)

目 录

第一单元	生化检验室基本知识和技术	1
项目一	生化检验标本的采集与处理	/ 1
	一、血液标本的采集	/ 1
	二、尿液标本的采集	/ 2
	三、标本的处理	/ 2
项目二	光谱分析技术——721 型分光光度计的使用和性能检测	/ 4
项目三	线性范围试验	/ 6
项目四	回收实验	/ 8
项目五	干扰实验	/ 11
项目六	醋酸纤维素薄膜电泳定量测定血清蛋白质	/ 13
项目七	酶学分析技术	/ 15
	一、血清淀粉酶测定(碘-淀粉比色法)	/ 15
	二、血清淀粉酶测定(速率法)	/ 17
第二单元	体液化学成分的测定	20
项目一	血清总蛋白测定(双缩脲法)	/ 20
项目二	血清白蛋白测定	/ 22
	一、溴甲酚绿法测定血清白蛋白	/ 23
	二、溴甲酚紫测定血清白蛋白	/ 25
项目三	血浆纤维蛋白原测定	/ 27
	一、凝固(Clauss)法测定血浆纤维蛋白原	/ 27
	二、复钙双缩脲法测定血浆纤维蛋白原	/ 29
项目四	酚试剂法测定血清粘蛋白	/ 31
项目五	血糖测定	/ 33
	一、邻甲苯胺法测定血糖	/ 34
	二、己糖激酶法测定血糖	/ 36
	三、GOD-POD 法测定血糖	/ 37
项目六	糖化血红蛋白测定	/ 39
	一、微柱法测定糖化血红蛋白	/ 40
	二、亲和层析法测定糖化血红蛋白	/ 42

	三、免疫凝聚法测定糖化血红蛋白 / 43	
项目七	糖耐量曲线的测定 / 45	
	一、口服葡萄糖耐量试验(OGTT) / 45	
	二、静脉注射葡萄糖耐量试验 / 46	
项目八	血脂及血浆脂蛋白的测定 / 47	
	一、血清总胆固醇测定 / 47	
	二、血清甘油三酯测定 / 49	
	三、血清高密度脂蛋白胆固醇测定 / 53	
	四、血清低密度脂蛋白胆固醇测定 / 57	
	五、血清脂蛋白测定(琼脂糖电泳法) / 60	
	六、血清载脂蛋白测定 / 63	
项目九	电解质的测定 / 66	
	一、血清钾、钠离子测定(火焰光度法) / 66	
	二、酶法测定血清钾 / 69	
	三、酶法测定血清钠 / 71	
	四、血清钾、钠、氯、钙离子测定(离子选择电极法) / 72	
	五、血钙测定 / 73	
	六、血清氯离子测定 / 81	
	七、血清无机磷测定 / 85	
	八、血清镁测定 / 90	
	九、血清铁与总铁结合力测定(亚铁嗉法) / 93	
项目十	血气分析与酸碱平衡 / 96	
	一、血气分析仪测定血液 pH、PO ₂ 、PCO ₂ / 96	
	二、酸碱滴定法测定血浆碳酸氢根 / 101	
第三单元	器官功能及分析.....	104
项目一	肝功能的测定 / 104	
	一、血清丙氨酸氨基转移酶测定 / 105	
	二、血清门冬氨酸氨基转移酶测定 / 110	
	三、血清碱性磷酸酶测定 / 114	
	四、血清 γ -L-谷氨酰基转移酶测定 / 118	
	五、血清胆碱酯酶的测定 / 122	
	六、血清胆红素测定 / 125	
	七、血清总胆汁酸测定 / 130	
项目二	肾功能的测定 / 132	
	一、血清肌酐测定 / 133	
	二、血清尿酸测定 / 137	
	三、血清尿素测定 / 141	
项目三	心脏标志物的测定 / 146	

一、血清乳酸脱氢酶测定	/ 146
二、血清肌酸激酶测定	/ 153
三、血清肌红蛋白测定	/ 160
四、心肌肌钙蛋白的测定	/ 162
第四单元 临床专题和综合分析	164
项目一 自动生化分析仪	/ 164
项目二 生物化学检验质量控制	/ 168
一、Levey-Jennings 临时质控图的绘制	/ 168
二、常规质控图的绘制	/ 169
项目三 常用分子诊断学实验技术	/ 171
一、外周血细胞 DNA 的快速提取	/ 172
二、PCR 扩增目的 DNA	/ 173
项目四 双缩脲试剂的配制及应用	/ 175
项目五 临床病例分析	/ 178
临床病例讨论一	/ 178
临床病例讨论二	/ 179
临床病例讨论三	/ 180
临床病例讨论四	/ 180
临床病例讨论五	/ 181
临床病例讨论六	/ 182
临床病例讨论七	/ 183
临床病例讨论八	/ 183
临床病例讨论九	/ 184
临床病例讨论十	/ 184
临床病例讨论十一	/ 185
临床病例讨论十二	/ 186
临床病例讨论十三	/ 187
临床病例讨论十四	/ 188
临床病例讨论十五	/ 189

前 言

《生物化学检验实验指导》是医学检验专业高职高专的学生,在学习《生物化学检验》课程时使用的配套实验教材,也是浙江省的重点教材建设项目之一。

本教材的编写是根据高职高专学生的特点,强调适度够用的原则,遵循培养医学检验专业实用型人才的宗旨,以强化技能为指导,同时将实验技术进行了有机的整合,按照现阶段检验技术的标准和规定,把临床检验的基本理论、操作和评价贯穿于整个实验中,使学生能够在进行各项的实验时,目的明确,事半功倍。

本教材将生化检验实验的内容进行了整合及归纳,把生化检验的诸多实验内容整合成四个单元,即生化检验室基本知识和技术、体液化学成分的分析、器官功能及分析及临床专题和综合分析,然后又在单元下分解成具体的实验项目。这样整合的目的是使各类生化检验实验具有系统性,条理更明晰,有利于学生理解、掌握相关的知识点。同时针对各个项目都制定了明确的知识目标 and 能力目标,其目的是让学生掌握实验的核心技术和理论,理顺对某种疾病检测时,不同的检验项目之间或同一检验项目不同实验方法之间的相互关系。在第四单元的临床案例分析与讨论中,要求学生在相关理论和实验的基础上,结合实际案例进行分析总结,大大提高了学生对生化检验的学习积极性,同时也培养了学生综合分析问题和判断评价的能力。

参加本教材编写的作者都是多年从事医学检验教学或临床检验工作的一线教师和专家,他们经过通力协作完成了全书的编写任务,在此对编写组全体老师和专家的辛勤工作表示敬意和衷心的感谢。

由于时间紧迫,加之我们的水平有限,不妥之处甚至错误在所难免,恳请同行和专家、广大师生和各位读者批评指正。

编 者
2012 年 1 月

第一单元 生化检验室基本知识和技术

生化检验室基本知识包括:生化检验标本的采集与处理,分析仪器的校正、使用和维护,试剂的配制,测定方法的选择与操作。本单元主要介绍生化检验标本的采集与处理,721 型分光光度计的使用与校正,线性范围的检测、回收实验、干扰实验等。

项目一 生化检验标本的采集与处理

【知识目标】

1. 能熟练地进行血液、尿液标本的采集。
2. 了解标本的处理方法。
3. 了解影响实验结果(分析前、中、后)的各种因素。

【能力目标】

1. 正确地进行实验标本的采集与处理。
2. 合理地使用抗凝剂与防腐剂。

生化检验的数据是否可靠,取决于受检者的准备、标本的采集、运送、分析前处理、分析中以及分析后的处理全过程。不适当的标本采集与保存,往往是导致试验结果不可靠的主要原因,且常不易被检测者发现,因而必须予以重视。

一、血液标本的采集

标本的采集:生化检验常用的标本有血液、尿液、脑脊液、胸腹水和羊水等,其中以血液标本最为常用。生化检验常用的血液标本可来自静脉、动脉或毛细血管。静脉血是最常用的血标本,动脉血多用于血气分析,毛细血管采血主要用于儿童。下面介绍静脉采血法。

1. 静脉采血法采血步骤

采血前按照试验项目要求,准备好相应的容器,如试管或抗凝管等。核对患者姓名、编号及检验项目等。采血部位多为肘静脉。肘静脉不明显时,可采用手背静脉、腓静脉或外踝静脉。幼儿可采用颈外静脉,具体操作方法可参见《临床基础检验学》。

采血后取下针头,将血液沿管壁缓慢注入适当的容器,并防止产生泡沫。待血液自行凝固收缩后即可分离出淡黄色透明血清,如果需要全血或血浆,则将血液注入事先准备好的抗凝管中,轻轻混匀,防止凝固,即为抗凝全血;经离心后可分离出淡黄色血浆。

2. 注意事项

(1) 防止溶血:造成溶血的原因有注射器或容器不干燥、不清洁;淤血时间过长;穿刺不顺利,组织损伤过多;抽血速度太快;血液注入容器时未拔下针头;震荡过于剧烈等。

(2) 避免充血或血液凝固:采血时动作应迅速,尽可能缩短止血带使用的时间。用止血带的时间不宜超过半分钟,否则将使生化检验的结果升高或下降。

(3) 不要采用输液患者的同侧手臂采血,女性患者若做了乳腺切除术,应在手术对侧手臂采血。

(4) 采血时只能往外抽,决不能向静脉里推,以免注入空气,造成气栓而导致严重后果。

二、尿液标本的采集

生化检验的尿液标本主要是随机新鲜尿、24h 定时尿,根据检查项目选择标本的采集方法。下面主要介绍 24h 定时尿的采集方法:嘱病人早晨 8 点排尿弃去,以后每次排尿都收集在一大容器内,次日早晨 8 点最后一次尿也收集于容器内,测量并记录其总量,然后混匀尿液,取适量尿液送检。

注意事项:收集尿液的容器必须干燥清洁,最好是一次性使用的容器。尿标本要防止混入月经血、阴道分泌物、精液、前列腺液、粪便等异物。尿标本收集后应在 12h 内送检,以免细菌作用或化学成分的分解。若不能及时送检(如收集 24h 定时尿),应将标本放入冰箱,并加防腐剂保存。

三、标本的处理

标本处理不当可能引起比分析更大的误差,因此,应根据分析目的选择合适的抗凝剂、防腐剂,同时正确地分离、贮存与转运。

1. 抗凝剂

应用物理的或化学的方法,除去或抑制血液中的某些凝血因子,阻止血液凝固,称为抗凝。能够阻止血液凝固的化学试剂,称为抗凝剂(anticoagulant)。抗凝剂种类很多,性质各异,因此必须根据检验项目适当选择,选用不当,会直接影响分析结果。合适的抗凝剂一般要求溶解快、接近中性,不影响其他测定。生化检验常用的抗凝剂如下:

(1) 草酸钾:草酸钾可与血中钙离子生成草酸沉淀,从而阻止血液凝固。草酸钾溶解快,抗凝作用强。草酸钾抗凝剂可改变血液的 pH,所以不能用于酸碱平衡的观察,也不能用于钾、钙的测定。草酸钾对乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶及淀粉酶均有抑制作用,可使其活性降低。

(2) 氟化钠:氟离子能结合钙而抗凝,但抗凝效果较弱,数小时后可出现凝固,因此常与草酸钾混合组成抗凝剂。氟离子能抑制糖酵解中的烯醇化酶,防止糖酵解,因此适用于血糖测定。氟化钠对许多血清酶活性有抑制作用,故不适于酶的测定,如淀粉酶、转氨酶、磷酸酶等,对酶法测定胆固醇和脲酶法测尿素氮也有干扰。

(3) 肝素是一种含有硫酸基团的粘多糖,带强的负电荷,具有多方面抗凝作用,主要是对抗凝血活酶和凝血酶的形成和活性,阻止血小板聚集。肝素具有抗凝能力强、不影响血细胞体

积、不易溶血等优点,是一种较好的抗凝剂,可用于血气分析及其他生化测定,是生化检验中最常用的一种抗凝剂。但肝素久置易失效。肝素钾、锂及铵盐,有人认为最理想的是肝素锂。也有人主张用铵盐,适用于一切电解质及酸碱分析,只对酸性磷酸酶的测定有干扰。

2. 防腐剂

尿液容易生长细菌,从而影响检验结果,在炎热季节尤为明显。因此,尿液排出后应立即送检,如不能及时检验或需留取大量标本时(如24h尿),应置冰箱保存或加入防腐剂。防腐剂应在收集了一次尿液时加入。防腐剂有多种,应根据检验项目选择适当的防腐剂。

(1) 甲苯(或二甲苯): 甲苯可在尿液表面形成薄膜,防止细菌繁殖,但不能消除已经存在于尿液中的细菌,其防腐能力不强。检测时吸取混匀后的下层尿液,甲苯用量为0.5~1ml/100ml尿。此防腐剂对尿液生化检验较适宜,如尿糖、尿蛋白、尿钾和尿钠等的测定。

(2) 浓盐酸: 盐酸使尿液保持高度酸性,防止细菌繁殖,同时防止一些化学物质因尿液碱化而分解。用量为1ml/100ml尿,常用于尿17-羟皮质类固醇、17-酮类固醇、肾上腺素、去甲肾上腺素、儿茶酚胺、3-甲氧基-4-羟基苦杏仁酸及钙等的测定。由于会出现尿酸盐沉淀,因此盐酸不适用于尿酸测定。

(3) 麝香草酚: 可抑制尿内细菌生长,用量为0.1g/100ml尿。由于麝香草酚溶解度低,有人主张用10%的麝香草酚异丙醇溶液,24h尿中加5ml,适用于一般化学成分的测定,如钾、钠、钙、氨基酸、糖、尿胆原、胆红素等,但可引起蛋白假阳性,故不适用于尿蛋白的测定。

3. 标本的分离和贮存

许多物质在红细胞和血清中分布不同,所以血液标本采集后未经分离或放置过久,可发生红细胞和血清之间的相互转移,或红细胞中存在的某些酶分解待测物等,影响实际检验结果。例如,钾在红细胞和血清中之比为20:1,放置过久,红细胞中钾向血清转移,引起结果偏高;血清中葡萄糖可由红细胞内酵解系统分解而降低;血清无机磷可由于红细胞内有机磷酸酯的水解而增加。因此,血液标本应及时分离血清(血浆),最迟不超过2h。血标本分离前应置于室温或37℃水浴箱内,不能直接放入4℃冰箱,以免发生溶血。在分离血浆或血清时,一是要及时,二是要严防溶血;对不是因操作不当引起的溶血或脂血等异常现象,应于检验报告单上注明,供医师参考。尿液、脑脊液和胸腹水等标本常需离心,取上清液进行生化分析。

溶血对分析结果的影响有:①待测物在红细胞内的浓度高于血清(血浆)时,溶血可使测定结果偏高,如钾、镁、乳酸脱氢酶、丙氨酸氨基转移酶、醛缩酶等;②干扰比色测定,特别是在波长300~500nm时;③干扰某些化学反应,如胆红素的重氮反应可被血红蛋白抑制,也会干扰胆固醇的酶法分析。导致溶血的原因很多,有血管内溶血(如用止血带时间太长)、抽血速度太快、与抗凝剂混合时摇动太剧烈、容器带水或清洁剂污染、全血放置时间过久、离心力过大等。血红蛋白浓度超过20mg/dl时肉眼可见溶血。

标本不能及时检测或需保留以备复查时,一般应存放于4~6℃冰箱。存放时限按不同成分的稳定性而定,大多数在各检测项目中有规定,有的则须自己探索。盛放标本的容器要加塞,以免水挥发而致标本浓缩。个别试验标本需存放于-20℃冷柜或更低温度。冰冻标本在室温下解冻后应一次测定,反复冻溶可影响结果。值得注意的是,某些检测指标如LD₅,标本应存放于室温,置4℃冰箱反而不稳定。

所有标本包括质控血清均应视为具传染性的检品,严禁直接用口吸取、接触皮肤或污染器皿的外部、实验台和水浴箱等。标本用后均要作消毒处理,盛标本的器皿要经消毒处理并彻底

清洗后方可使用。

4. 标本的转运

如本院无条件检验需送上级医院或检验中心进行分析,应将标本装入试管密封,再装入聚乙烯塑料袋,置冰箱或冷藏箱内运输。冷却材料可用冰块、冰袋或干冰等,干冰温度可达 -70°C 。如能保证运输途中冰瓶内温度在 -10°C 以下,一般化学成分 2d 内变化不明显。如系短途运输,就不必装入冰瓶,在盛标本的容器上加塞后运送即可,但在运送过程中应避免剧烈震荡。

【分析与讨论】

1. 血浆和血清的区别是什么?
2. 为什么很多生化检验项目要防止溶血? 造成溶血的原因有哪些? 如何避免?
3. 生化检验常用的抗凝剂有哪些? 如何选择使用?
4. 常用的防腐剂各用于哪些生化检测项目?

项目二 光谱分析技术——721 型分光光度计的使用和性能检测

各种化学物质都具有一定的光谱特性,表现为能选择性地吸收或发射某种波长的光。不同的原子或原子团,其发射光谱和吸收光谱各不相同;而相同的物质,在一定的条件下,其发射光谱和吸收光谱的强度与该物质的含量呈正比关系。因此,根据发射光谱或吸收光谱的波长特性及强度,可以对物质进行定性和定量分析,此类分析技术通称为光谱分析技术。它具有灵敏度高、操作简便、快速等优点,是生物化学检验中最常用的技术。本项目主要介绍 721 型分光光度计的使用和性能检测。

【知识目标】

1. 能熟练进行分光光度计的性能检测,包括波长检测、杂光检测。
2. 掌握分光光度计的使用方法。
3. 了解影响分光光度计检测的各种因素。

【能力目标】

1. 熟练运用分光光度计对生化检验结果进行定量分析。
2. 能进行 721 型分光光度计的性能检测。

【实验原理】

分光光度法测量的理论依据是 Lamber-Beer 定律:当溶液中的物质在光的照射和激发下,对光有选择性地吸收。根据 Lamber-Beer 定律,当一束单色光通过一定浓度范围的有色溶液时,溶液的吸光度 A 与溶液的浓度 C 、液层的厚度 $L(\text{cm})$ 成正比,即

$$A = KLC$$

$$A = KLC = -\lg T = -\lg I / \lg I_0 = \lg I_0 / I$$

式中, T 为透光度; I_0 为入射光强度; I 为透射光强度; K 为吸光原数。

测定时, 吸光系数和溶液的光径长度不变时, 透射光强度是根据溶液的浓度来变化的, 只要测出 A 就能算出溶液的浓度。

波长校正原理为: 采用镨钕滤光片, 一般利用其 529nm 的吸收峰, 通过逐点测试法来进行波长检定与校正。通过逐点测试法记录下刻度波长与镨钕滤光片特征吸收, 观察波长值是否超出误差允许范围 ($\leq \pm 2\text{nm}$)。

【试剂与材料】

1. 721 型分光光度计, 比色杯 (1cm)。
2. 镨钕滤光片。
3. 烧杯、蒸馏水。

【操作步骤】

(一) 测量步骤

以 721-A 型分光光度计为例:

1. 打开电源开关, 将比色池的盖子打开, 通电预热仪器 20min。
2. 选定所需波长, 将波长旋钮旋转至测定波长。
3. 将空白液、标准液或待测液放入比色池, 将空白液置于光路中。
4. 将开关置于“T”位, 打开比色池盖子, 用光量粗调和光量细调调节“T%”为“0”, 关上比色池盖子, 调节“T%”为“100”。
5. 将开关置于“A”位, 用消光调零调节“A”为“0”。
6. 重复步骤 4 和 5。
7. 将校准液或待测液推入光路, 测量溶液的吸光度 (A)。重复测量三次, 取三次吸光度值的平均值作为测定值。
8. 仪器使用完毕, 取出比色杯, 将液体倒入废液缸, 以自来水冲洗比色杯两遍, 再用蒸馏水冲洗两遍, 倒置滤纸上备用。拔下电源插头, 复原仪器, 登记使用记录。

(二) 波长校正

1. 粗测 调仪器波长旋钮至 580nm 处, “T%”调至最大, 打开遮光板, 在比色槽中光路经过处放一白纸, 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, 可调节灯泡位置使其符合要求。

2. 细测 调波长至 529nm 处, 再把灵敏度旋钮置于“1”(最低档), 电表机械零点为 0, 在光路空白时调“T%”为 100%, 并反复查零点和“100% T”稳定情况。将镨钕滤光片插入光路, 测出 A 值。再在 529nm 附近每隔 1~2nm, 各测其 A 值。找到透光率值最低的一点, 这一点值为 529nm, 如指示值为 534nm, 此时波长误差为 5nm, 超出规定 ($\pm 1\text{nm}$) 必须进行调整。

3. 调整方法 将波长度盘对准 529nm, 从光路取出镨钕滤光片, 光路空白时调节电表指针到“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 (3 个中左侧柄长的一个) 微微调节 (负误差时顺时针方向), 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为止。盖好左侧小盖板, 校正结束。

(三) 比色杯配套

1. 选取几只大小、材质、色泽相同的比色杯,洗净,装入占比色杯体积 $2/3$ 的蒸馏水(D.W.),擦干,放入比色槽。

2. 在 585nm 处,调第 1 只比色杯透光度为“100% T”,依次测出其他几只比色杯的“T%”,两个吸收池透光率 T 相差应 $<0.5\%$ 。

不合格的需反复剔除极端值,或重新配对,直至有 2 个以上的比色杯合格。

【注意事项】

1. 每次测量前,检查波长是否为所需值。

2. 比色杯在盛装样品前,用所盛装样品冲洗两次,测量结束后比色杯应用蒸馏水清洗干净后放好。若比色杯内有颜色挂壁,可用无水乙醇浸泡清洗。

3. 使用比色杯时,其盛装液体不能超过总体积的 $2/3$,也不宜少于 $1/2$,且在检测前必须用擦镜纸将比色杯外的液体擦拭干净。

4. 每台仪器所配套的比色杯,不能与其他仪器上的比色杯单个调换。

5. 向比色杯中加样时,若样品流到比色杯外壁时,应以滤纸吸干,再用擦镜纸擦净后测量,切忌用滤纸擦拭,以免比色杯出现划痕。

6. 每当改变波长测量时,必须重新校正透光率 100%。

7. 如果大幅度改变测试波长时,在调整“0”和“100%”后稍等片刻(因光能量变化急剧,光电管吸收光后响应缓慢,需一段光响应平衡时间),当稳定后,重新调整“0”和“100%”即可工作。

【方法学评价】

紫外-可见光分光光度计广泛用于医药卫生、临床检测、生物化学、石油化工、环保监测、食品生产和质量控制等定性或定量分析领域。按其光学系统可分为单波长分光光度计和双波长分光光度计,如 721 型分光光度计、751 型分光光度计等,具体使用操作应按仪器说明书进行。

【分析与讨论】

1. 请简述 721 型分光光度计基本使用操作过程。

2. 使用 721 型分光光度计有何注意事项?

3. 可见光的波长范围是多少? 紫外光的波长范围是多少?

4. 生化检验定量分析时,常用的分光光度技术的定量方法是什么? 计算公式是什么?

项目三 线性范围试验

【知识目标】

1. 掌握线性范围试验的原理、用途。

2. 掌握可报告范围、分析测量范围的概念。

3. 熟悉线性范围试验的具体操作过程。

【能力目标】

1. 理解吸收光谱分析的工作原理,能正确规范地进行操作,并准确地绘制出标准曲线。
2. 对实验中出现问题能够用所学知识进行分析和讨论。
3. 对最终的实验结果进行评价。

线性范围试验是考察候选检测方法或检测系统的准确性和实用性。通过该实验可以了解其最高检测值(上限)和最低检测值(下限),是对患者的检测结果可报告范围的一种评价。一个好的检测方法或检测系统应该具有较宽的线性范围,起码应该覆盖本项目的医学决定水平和常见病的检测值。

【实验原理】

线性范围是指系统最终测定值(浓度或活性)与被分析物浓度或活性成比例的范围。本实验使用不同浓度的葡萄糖标准溶液,用 GOD-POD 法测定各自的吸光度,以标准浓度为横坐标,以其对应的吸光度为纵坐标,在方格纸上作图,即可绘制出一条校准曲线。观察被评价方法的葡萄糖的检测范围。

【试剂与器材】

1. 葡萄糖标准液(110mmol/L)。
2. GOD-POD 法酶试剂盒。
3. 分光光度计。

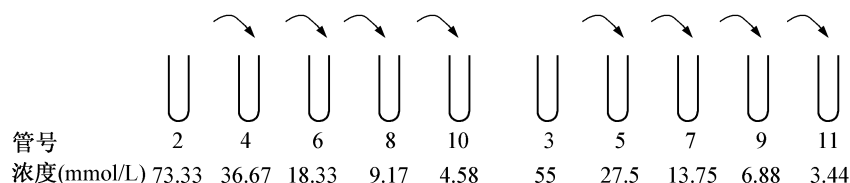
【操作步骤】**(一) 样品的处理与测定**

1. 原始的葡萄糖标准溶液浓度为 110mmol/L,设为第 1 号管,将其稀释后得到 2 种高浓度的葡萄糖标准溶液管:第 2、3 号管。注意稀释后要混匀。

表 1-1 2 号、3 号管的制备

	2 号管	3 号管
110mmol/L 葡萄糖标准溶液(μ l)	100	50
蒸馏水(μ l)	50	50
葡萄糖液浓度(mmol/L)	73.33	55

2. 再分别从第 2、3 号管中取 50 μ l,加蒸馏水 50 μ l 依次作等倍稀释(各 4 管),得到 8 种较低浓度的葡萄糖标准溶液,稀释方法见下图:



3. 取 12 支试管,其中设有空白管(B),按表 1-2 顺序操作。

表 1-2 12 支稀释管的血糖测定

试管编号	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
蒸馏水(μl)	10											
葡萄糖标准液(μl)		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
酶试剂(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
混匀,37℃水浴 10min,取出冷却至室温,500nm 处用 0.5cm 的比色杯,B 管调零,测各管吸光度												
吸光度 A	0											
标准液浓度 C(mmol/L)	0	110	73.33	55	36.67	27.5	18.33	13.75	9.17	6.88	4.58	3.44

(二) 绘制 A-C 曲线

在坐标纸上,以吸光度 A 为纵坐标,葡萄糖浓度 C 为横坐标绘制 A-C 曲线。

【参考范围】

该方法的线性可达 22.24mmol/L。

【注意事项】

1. 葡萄糖标准液的加入量必须十分准确,应用计量准确度很高的微量进样器加样。准确加量是最重要的操作技术。对于后面所有需要微量加样的定量实验均是如此。
2. 标准管系列中每管平行做 3 管取平均值。
3. 造成线性变窄的原因为试剂配制时组分投料不足,试剂配制后组分稳定性差。
4. 有的测定特别是酶法测定,当酶量相对不足时,用标准液所作的线性范围可以达到指定的高限,但在测定同样高值样品时,结果却明显偏低,这往往是样品中的介质效应引起的,值得注意。

【分析与讨论】

1. 实验方法评价试验包括哪些内容? 各项试验检测的目的、原理是什么?
2. 绘制 A-C 曲线时,如果最后两管的吸光度值超出了分光光度计的准确读数范围,应怎样处理? 为什么?
3. 一个规范的标准曲线应是怎样绘制的? 请总结标准曲线的特点并阐述之。

项目四 回收实验

【知识目标】

1. 掌握回收实验的原理。
2. 熟悉回收实验的基本方法。
3. 了解统计方法和评价标准。

【能力目标】

1. 理解回收实验的使用目的。
2. 能够运用回收实验的方法来进行准确度的评价。
3. 熟练地使用回收实验的相关计算公式,并对结果做出正确的评价。

为了确保检验结果的准确可靠,避免各个不同实验室的检测结果相距较大,造成临床医生的诊断和治疗无从评判的情况出现,要求在标本检测以前对标本检测方法以及各实验室的检测结果有一个统一的评价和验证体系,这就提出了精密度评价和准确度评价。临床实验室的准确度评价可用回收实验和干扰实验来体现。回收实验是评价系统比例误差的。

【实验原理】

回收实验是指将被测物标准液加入待测标本中作为回收样品,原待测标本中加入等量的无被测物的溶剂作为基础样品,然后同时用候选方法对两样品进行测定,通过以下公式计算出回收率:

$$\text{加入浓度} = \frac{\text{标准液量(ml)}}{\text{病人样品量(ml)} + \text{标准液量(ml)}} \times \text{标准液浓度}$$

$$\text{回收浓度} = \text{回收样品测得浓度} - \text{基础样品测得浓度}$$

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{回收浓度}}{\text{加入浓度}} \times 100$$

【试剂与器材】

1. 葡萄糖标准液(80mmol/L)。
2. 生理盐水。
3. GOD-POD 试剂盒。
4. 标本:选择血糖浓度在 2.2mmol/L 左右的患者血清标本或者混合血清。
5. 722 型分光光度计,水浴箱。

【操作步骤】**1. 样品的处理**

基础管:血清 0.9ml+0.1ml 生理盐水。

回收管 I:血清 0.9ml+0.01ml 80mmol/L 葡萄糖标准液+0.09ml 生理盐水。

回收管 II:血清 0.9ml+0.06ml 80mmol/L 葡萄糖标准液+0.04ml 生理盐水。

回收管 III:血清 0.9ml+0.09ml 80mmol/L 葡萄糖标准液+0.01ml 生理盐水。

2. 血糖浓度测定 按 GOD-POD 试剂盒上的说明测定各个标本的血糖浓度,每份样品作双份检测,结果取平均值。

【计算】**1. 加入浓度计算**