



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

全国高等学校医学规划教材（供医学检验等专业用）



临床检验生物化学 实验指导

主编 刘新光



高等教育出版社
Higher Education Press



普通高等教育“十一五”国家级规划教材
全国高等学校医学规划教材

(供医学检验等专业用)

临床检验生物化学 实验指导

主 编 刘新光



高等教育出版社
Higher Education Press

内容简介

《临床检验生物化学实验指导》分16章共计124个实验。本书主要分两部分：一是临床生物化学检验技术，以综合性实验方式编写。二是以器官疾病为中心的生物化学检验实验，与理论教材章节相配套。本书的主要特色是改变了以往实验教材以各代谢物检测为主线或以各生物化学检验技术为主线的编写格式，进行了按理论教材章节编写相应检验项目的新尝试，从而对疾病的生物化学检验项目有一个完整系统认识。本教材主要适用于医学检验专业本科临床生物化学检验的实验教学，也可作为从事临床生物化学检验专业技术人员以及硕士研究生入学考试的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验生物化学实验指导/刘新光主编. —北京：
高等教育出版社，2006.12
ISBN 7-04-020247-6

I. 临... II. 刘... III. 医用化学：生物化学-医学
检验-化学实验-医学院校-教材 IV. R313-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 131175 号

策划编辑 刘晋秦 冯娟 责任编辑 薛玥 封面设计 张楠
版式设计 张岚 责任校对 王效珍 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总机 010-58581000

经销 蓝色畅想图书发行有限公司
印刷 北京鑫海金澳胶印有限公司

开本 850×1168 1/16
印张 14.5
字数 420 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版次 2006年12月第1版
印次 2006年12月第1次印刷
定价 26.30元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 20247-00

《临床检验生物化学实验指导》编写委员会

(以姓氏拼音为序)

侯 敢	广东医学院
胡云良	温州医学院
贾成瑶	四川大学华西临床医学院
姜旭金	江苏大学医学技术学院
李 伶	重庆医科大学
林孟戈	福建医科大学
刘继英	天津医科大学
刘新光	广东医学院
刘忠民	广州医学院
王 琰	北华大学医学院
徐俊荣	南京医科大学

全国高等学校医学规划教材(供医学检验等专业用)

编写指导小组名单

组 长 涂植光 重庆医科大学

成 员 (排名不分先后)

樊琦诗 上海交通大学医学院
刘新光 广东医学院
刘 辉 大连医科大学
邹 雄 山东大学医学院
徐克前 中南大学湘雅医学院
刘运德 天津医科大学
李 萍 四川大学华西临床医学院
毕胜利 北华大学医学院
许文荣 江苏大学医学技术学院
周 新 武汉大学医学院
张进顺 河北北方学院
刘成玉 青岛大学医学院
张学宁 昆明医学院
童明庆 南京医科大学
杨国珍 贵阳医学院
章 尧 蚌埠医学院
尹一兵 重庆医科大学
钱士匀 海南医学院
蒲晓允 第三军医大学
吕建新 温州医学院
胡建达 福建医科大学
陈芳梅 广西卫生干部管理学院
张纯洁 四川省卫生干部管理学院
宁 勇 湖北中医学院

秘 书 尹一兵

编者的话

医学检验(laboratory medicine)又称检验医学,是细胞病理学、化学病理学、分子病理学与临床医学有机结合,以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、细胞学技术、生物信息学等为技术支撑的交叉学科。其任务是为疾病诊断、病情判断和治疗决策提供信息,为临床和科研提供实验室方法和数据。我国高等医学检验教育始于1983年,到2006年为止,已有70余所高等院校相继建立了医学检验本科专业。23年的探索发展历程中,其培养目标和要求已趋统一。国家教育部本科专业目录中对该专业的培养目标是:“具有基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识和基本能力,能在各级医院、血站及防疫部门从事医学检验及医学类实验室工作的医学高级专门人才。”业务培养要求为:“本专业学生主要学习基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识,受到医学检验操作技能系统训练,具有临床医学检验及卫生检验的基本能力。”

作为特殊的知识载体和教学基本要素的教材,必须体现服务于培养目标,遵循其培养人才的业务要求的基本属性。由国内18所有影响的院(校)医学检验系(学院)参与,进行的国家“十五”重点立项课题——“21世纪中国高等学校人才培养体系的创新与实践”子课题“21世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”中,将教材建设作为主要内容之一。在此教学改革研究的基础上,经过全国高等医学检验教育界同仁的努力,在高等教育出版社的大力支持下,编写出版了此套体现上述教学改革研究成果的高等医学检验专业教材。该套教材有以下特点:

1. 适应现代教育思想和观念,突出调动学生主动学习积极性,培育学生应用所学知识解决问题能力和创新精神。充分体现教学改革研究课题形成的办学模式、课程体系、教学内容和手段的改革成果。

2. 应用现代化教学手段,坚持教材的一体化建设,使教材成为教学全过程的资源库。该套教材除文字教材外,每本均附包括教学大纲、多媒体教案、模拟试题、案例分析、扩展知识和参考材料、典型实验规范化实验操作的视频材料等的教学光盘。既有利于教师组织教学,亦可为学生主动学习,进一步发展提供帮助,是一套真正的立体化教材。

3. 基于医学检验是以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、遗传学、细胞学技术、生物信息学等技术为支撑,而上述技术在各亚专业中均交叉应用。因此,本套教材单独编写了《基本检验技术及仪器学》一书,将医学检验涉及的通用性基本技术集中介绍。这既符合教育部对实验教学改革的要求,有利于学生在掌握基本技术后举一反三,也避免了各亚专业肤浅地重复介绍,更有利于学生能力和技能的培养。

4. 在借鉴国内外同类教材基础上,除坚持基本理论、基本知识、基本技能,思想性、科学性、先进性、启发性、适用性原则外,本套教材注重突出医学检验专业教材的特点。与现有同类教材相比,内容上除根据学科发展,进行了必要的增、减调整外,尤其注意避免片面追求理论系统性而大量、系统重复已学知识的弊病,根据专业特点,重点介绍检验项目的依据、怎样做和做好、项目的临床意义等。力求重点突出、深入浅出、图文并茂。每章前以Key Points概括了该章的知识要点,章末客观介绍了存在问题与发展趋势,并附有主要参考资料及网站,有利于学生主动学习,培养创新能力。这是本套教材的又一鲜明特点。

本文完成之际,欣悉本套教材有10本遴选入“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”,这是对本套教材的充分肯定和认可,也是对广大编写人员的鞭策和鼓励。

全国高等学校医学规划教材(医学检验专业)编写指导小组

2006年9月

前 言

《临床检验生物化学实验指导》是普通高等教育“十一五”国家级规划教材之一,系涂植光教授主编的《临床检验生物化学》的配套实验教材,由来自全国开办医学检验专业本科教育的10所医学院校的11名工作在教学第一线的教授或副教授编写。本教材主要适用于医学检验专业四年制或五年制本科的临床生物化学检验的实验教学,也可作为从事临床生物化学检验专业技术人员和硕士研究生入学考试的参考书。教材中的实验内容各院校可根据本校的实际情况选择开设。

随着现代科学技术的迅速发展,临床生物化学分析技术不断更新,先进的实验仪器及试剂盒广泛的应用,医学检验技术发生了巨大的变化。为适应我国医学检验专业发展的需要,高等教育出版社组织了本套医学检验专业教材的编写,这套教材是国家“十五”重点立项课题“21世纪中国高等学校人才培养体系的创新与实践”课题中的医学子课题“21世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”的内容之一。

根据2005年7月高等教育出版社在海南三亚召开的医学检验专业教材主编会议精神,为了使本教材成为涂植光教授主编的《临床检验生物化学》真正配套的实验教材,并让学生对疾病的生物化学检验有一个完整系统的概念,我们改变了以往实验教材以各代谢物检测为主线或以各生物化学检验技术为主线的编写格式,进行了按理论教材章节编写相应检验项目的新尝试,这是本书的主要特色。为了避免与本套教材中的其他教材重复,本教材还取消了光谱技术、层析技术、电泳技术等章节。个别实验放在器官疾病生物化学检验实验中。

本教材分16章共计124个实验,每个实验包括原理、试剂(试剂与器材)、操作步骤、计算、参考范围、临床意义、注意事项及评价等八项。本书主要分两部分:一是临床生物化学检验技术,以综合性实验方式编写。即酶学基本实验、方法学评价与试剂盒评价两章。将综合性实验编入实验教材,符合目前国家教育部本科教学工作水平评估方案中的机能学课程需要开设综合性实验的要求,有利于培养学生综合解决问题、分析问题以及创新意识的能力。二是以器官疾病为中心的生物化学检验实验,与理论教材章节相配套。在这部分中,为了让学生较全面地理解检测项目的选择目的和方法学的发展历史,每章先概述应检验哪些项目,对于本教材需要介绍的检测项目,先概述方法学评价或历史发展,再具体介绍本书选择的实验。一般一个检测项目介绍两种方法,一种是在教学中较常开展的;另一种则是目前临床上经常使用的或代表目前检测水平的方法。为了介绍更多的方法,类似的检验项目则介绍不同的检验方法。对于多种疾病均要检验的项目,前面的章节先介绍,后面章节需再用此实验项目的则采用参见方式。

由于有的实验无法在教学实验室完成,因此我们补充了全实验室自动化系统、琼脂糖凝胶自动电泳和血气分析标准化操作程序三个真人规范化演示实验录像,特别是全实验室自动化系统是今后临床实验室的发展趋势,作为补充内容制成光盘的赠予教师供教学参考。前两个录像由广州医学院第一附属医院刘忠民主任技师、后一个由四川大学华西医院贾成瑶副主任技师负责组织录像,感谢他们的辛勤劳动!

在编写过程中我们还得到检验医学界许多同行专家的指点和帮助,同时得到广东医学院检验学院和重庆医科大学医学检验系的大力支持,在此一并表示衷心的感谢。由于检验医学发展迅速,内容涉及广泛,加之编者水平有限,书中难免存在不足之处或错误,敬请各位专家和读者在使用过程中给予批评指正,以便再版时修订。

刘新光
2006年6月于湛江

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一章 酶学基本知识实验	1	血红蛋白	33
实验 1 分离纯化小麦胚芽中酸性磷酸酶	1	实验 22 硝基四氮唑蓝还原法测定果糖胺	34
实验 2 酶蛋白含量测定及比活性分析	3	第三节 与糖代谢紊乱相关的实验室检测指标	35
实验 3 酸性磷酸酶时间进程曲线	6	实验 23 放射免疫法测定血清胰岛素	35
实验 4 酸性磷酸酶酶浓度-速率曲线	7	实验 24 电化学发光免疫法测定 C 肽	37
实验 5 pH-酸性磷酸酶活性曲线	8	实验 25 酶动力学法测定血清 β -羟丁酸	38
实验 6 酸性磷酸酶米氏常数的测定	9	实验 26 乳酸氧化酶法测定血浆乳酸	39
实验 7 磷酸盐对酸性磷酸酶活性的抑制作用	10	第四章 血浆脂质及脂蛋白代谢紊乱的生物化学检验	41
第二章 方法学评价与试剂盒评价实验	11	第一节 血浆脂质的测定	41
第一节 方法学评价试验	11	实验 27 乙酰丙酮显色法测定血清三酰甘油	41
实验 8 线性范围测定	11	实验 28 磷酸甘油氧化酶法测定血清三酰甘油	43
实验 9 检测能力测定	14	实验 29 胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	44
实验 10 批内重复性试验	15	第二节 血浆脂蛋白的测定	45
实验 11 回收试验	16	实验 30 磷钨酸-镁沉淀法测定高密度脂蛋白胆固醇	45
实验 12 干扰试验	17	实验 31 均相法测定血浆高密度脂蛋白胆固醇	46
实验 13 方法比较试验	19	实验 32 聚乙烯硫酸盐沉淀法测定血清低密度脂蛋白胆固醇	47
第二节 试剂盒质量评价试验	22	实验 33 酶联免疫吸附法测定脂蛋白(a)	48
实验 14 GOD-POD 法测定葡萄糖的反应时间进程曲线试验	22	实验 34 免疫比浊法测定 C 反应蛋白	49
实验 15 GOD-POD 法测葡萄糖试剂盒的稳定性试验	23	第三节 血清载脂蛋白的测定	50
实验 16 应用 EP10-A 文件对试剂盒的初步评价	23	实验 35 免疫透射比浊法测定血清载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B	51
第三章 糖代谢紊乱的生物化学检验	27	第五章 电解质和酸碱平衡紊乱的生物化学检验	53
第一节 血清(浆)葡萄糖测定	27	第一节 钾、钠离子的测定	53
实验 17 葡糖氧化酶法测定血清(浆)葡萄糖	27	实验 36 离子选择性电极电位法测定血清钾、钠离子	53
实验 18 己糖激酶法测定血清(浆)葡萄糖	29		
实验 19 邻甲苯胺法测定血清(浆)葡萄糖	31		
实验 20 口服葡萄糖耐量试验	32		
第二节 血清(浆)糖化蛋白的测定	33		
实验 21 高效液相色谱法分离糖化			

实验 37 酶法测定钾离子	56	实验 57 放射免疫法测定血清铁蛋白	98
实验 38 酶法测定钠离子	57	实验 58 免疫透射比浊法测定血清 前清蛋白	100
第二节 氯离子的测定	58	第九章 肝胆疾病的生物化学检验	103
实验 39 硫氰酸汞比色法测血清氯离子	58	第一节 肝脏分泌与排泄功能的 生物化学检验	103
实验 40 离子选择性电极法测血清 氯离子	60	实验 59 改良 J-G 法测定血清总胆红素 和结合胆红素	103
第三节 血气分析	61	实验 60 胆红素氧化酶法测定总胆红素和 结合胆红素	105
实验 41 血气分析	61	实验 61 酶比色法测定总胆汁酸	107
实验 42 酶法测定血浆二氧化碳	69	实验 62 四溴酚酞磺酸钠清除试验	109
第六章 骨代谢紊乱的生物 化学检验	71	第二节 肝脏蛋白质合成功能的 生物化学检验	110
第一节 血清钙、磷、镁测定	71	实验 63 双缩脲法测定血清总蛋白	111
实验 43 邻甲酚酞络合酮直接比色法测 血清总钙	72	实验 64 溴甲酚绿法测定血清清蛋白	113
实验 44 离子选择性电极电位 法测定钙离子	73	实验 65 羟胺三氯化铁比色法测定 血清胆碱酯酶	115
实验 45 米吐尔直接显色法测定 血清磷	74	实验 66 乙酸纤维素膜电泳分离血清 蛋白质	116
实验 46 甲基麝香草酚蓝法测定 血清镁	76	第三节 肝脏疾病的相关酶的生物 化学检验	120
第二节 血清碱性磷酸酶测定	77	实验 67 赖氏法测定血清丙氨酸氨 基转移酶	120
实验 47 磷酸苯二钠比色法测定血清 碱性磷酸酶	78	实验 68 连续监测法测定血清丙氨酸 氨基转移酶	123
第三节 钙和磷及骨代谢调节 激素测定	79	实验 69 连续监测法测定血清 γ -谷氨 酰基转移酶	124
实验 48 放射免疫法测定甲状旁腺素	80	实验 70 苯醛偶氮萘酚法测定血清 单胺氧化酶	125
第七章 微量元素与维生素异常的 生物化学检验	82	第四节 酒精性肝病和肝性脑病等的生物 化学检验	127
第一节 微量元素的测定	82	实验 71 微量扩散法测定血液乙醇 的含量	127
实验 49 双环己酮草酰二脲比色法 测定血清铜	83	实验 72 酶法测定血浆氨	128
实验 50 吡啶偶氮酚比色法测定 血清锌	84	第五节 肝肿瘤的生物化学检验	129
实验 51 石墨炉原子吸收光谱法测 微量元素铅	86	实验 73 放射免疫(双抗体)法测定 甲胎蛋白	130
第二节 维生素的测定	88	第十章 肾脏疾病的生物化学检验	132
实验 52 三氯化锑比色法测定 维生素 A	89	第一节 反映肾小球功能的生物 化学检验	132
实验 53 荧光法测定维生素 B ₂	91	实验 74 除蛋白碱性苦味酸法测定 血清肌酐	132
实验 54 直接碘量法测定维生素 C	92		
实验 55 荧光法测定维生素 E	94		
第八章 营养状况的生物化学检验	96		
实验 56 亚铁嗉比色法测定血清铁	96		

实验 75 不去蛋白速率法测定血清肌酐	133	实验 94 放射免疫法测定总 T ₃	161
实验 76 内生肌酐清除率的测定	135	实验 95 放射免疫法测定抗甲状腺微粒体抗 体(或抗甲状腺球蛋白抗体)	163
实验 77 二乙酰-脲法测定血清尿素	135	第三节 肾上腺功能紊乱的生物 化学检验	164
实验 78 脲酶-波氏比色法测定血清尿素	137	实验 96 放射免疫法测定血浆或 24 h 尿醛固酮	164
实验 79 酶偶联速率法测定血清尿素	138	实验 97 尿 17-酮类固醇测定	165
实验 80 尿酸酶-过氧化物酶偶联比色法 测定血清尿酸	139	实验 98 尿 17-羟皮质类固醇测定	167
实验 81 乙酸纤维膜电泳分离尿蛋白	140	实验 99 尿香草扁桃酸测定	169
第二节 反映肾小管功能的生物 化学检验	141	实验 100 化学发光法测定血浆促肾上腺 皮质激素	170
实验 82 酚红排泄试验	141	第四节 性激素紊乱的生物化学检验	172
实验 83 放射免疫分析法测定血(尿) β_2 -微球蛋白	142	实验 101 竞争性放射免疫分析法测定 睾丸酮	172
第十一章 心血管系统疾病的生物 化学检验	144	实验 102 化学发光法测定雌二醇	173
第一节 心肌损伤及再灌注的生物 化学检验	144	第十三章 消化系统疾病的生物 化学检验	177
实验 84 肌酸比色法测定血清肌酸 激酶	145	第一节 胃病的生物化学检验	177
实验 85 免疫抑制法测定肌酸激酶同工酶 CK-MB	146	实验 103 滴定法测定胃酸分泌	177
实验 86 琼脂糖凝胶电泳法测定血清肌酸 激酶同工酶	147	实验 104 连续监测法测定胃蛋白酶	178
实验 87 化学发光免疫法测定心肌肌 钙蛋白 T	149	第二节 胰腺疾病的生物化学检验	179
第二节 高血压的相关生物化学检验	150	实验 105 碘-淀粉比色法测定血清 淀粉酶	180
实验 88 荧光比色法测定尿儿茶酚胺	151	实验 106 连续监测法测定血清淀粉酶	181
实验 89 放射免疫法测定血浆肾素	152	实验 107 比浊法测定血清脂肪酶	182
第三节 心功能不全的生物化学检验	153	第十四章 神经系统疾病的生物 化学检验	184
实验 90 ELISA 法测定脑钠肽	154	实验 108 邻联大茴香胺比色法测定血清 铜蓝蛋白	184
第十二章 内分泌疾病的生物化学 检验	156	实验 109 放射免疫法测定血浆 P 物质	185
第一节 下丘脑-垂体内分泌功能紊乱的 生物化学检验	157	实验 110 生物发光法测定血清 γ -氨 基丁酸	187
实验 91 时间分辨荧光免疫分析法测定 生长激素	157	第十五章 妊娠及其相关的生物 化学检验	189
实验 92 电化学发光法测定催乳素	158	第一节 正常及异常妊娠的生物化 学检验	189
第二节 甲状腺功能紊乱的生物化学 检验	160	实验 111 免疫层析双抗体夹心法测定人 绒毛膜促性腺激素	189
实验 93 酶联免疫吸附法测定促甲状 腺激素	160	实验 112 竞争性化学发光酶免疫法 测定孕酮	190
		第二节 评价孕妇与胎儿的健康生物 化学检验	192

实验 113 肺成熟度组合试验——泡沫试验 或振荡试验	192	实验 119 高效液相色谱法同时测定血浆苯 巴比妥、苯妥英及卡马西平	202
第三节 妊娠与相关疾病的生物 化学检验	193	第三节 免疫抑制药物浓度监测	204
第四节 新生儿代谢特点与新生儿疾病 筛查的生物化学检验	193	实验 120 荧光偏振免疫法测定全血 环孢素 A	205
实验 114 时间分辨荧光免疫分析法测定 妊娠相关血浆蛋白 A	194	第四节 情感性精神障碍药物 浓度监测	206
实验 115 酶联免疫法产前筛查孕中期 唐氏综合征	196	实验 121 干化学法测定血液锂的含量	207
实验 116 金标法产前筛查唐氏综合征和开 放性神经管缺陷	197	第五节 抗心律失常药物浓度监测	208
实验 117 新生儿疾病筛查的基因 诊断实验	198	实验 122 酶放大免疫测定技术测定 血浆(清)利多卡因	209
第十六章 常用治疗药物监测	199	第六节 抗哮喘药物浓度监测	210
第一节 强心苷类药物浓度监测	200	实验 123 双波长紫外分光光度法测定 血清氨茶碱及药代动力学 参数计算	210
实验 118 化学发光酶免疫法测定 地高辛	201	第七节 氨基糖苷类抗生素浓度监测	212
第二节 抗癫痫药物浓度监测	202	实验 124 酶放大免疫技术测定血清 庆大霉素	212
		参考文献	214

第一章 酶学基本知识实验

酶(enzyme)是由活细胞合成的,对其特异底物(substrate)起高效催化作用的蛋白质,是机体催化各种代谢反应最主要的催化剂。所有的酶都具有催化效率高、特异性强等特点。酶加速化学反应的催化能力受酶浓度、底物浓度、pH、温度、抑制剂、激活剂等因素的影响。本章选用新鲜小麦胚芽为分析对象来分离、纯化酸性磷酸酶,通过对其分离、提取、纯化,熟悉酶分离纯化的基本技术和酶活性测定的基本知识;通过对酸性磷酸酶时间进程曲线、酶浓度、最适 pH、米氏常数、抑制剂作用的测定,熟悉酶学的一般实验方法和基本知识,对酶活性及酶促反应动力学进行基本综合测定训练。培养学生综合分析能力、实际动手能力、数据处理以及查阅资料的能力。体液中酶活性的测定是临床生物化学检验的重要组成部分。因此,掌握有关酶活性测定的原理、方法及其影响因素是十分重要的。

实验 1 分离纯化小麦胚芽中酸性磷酸酶

酶的化学本质是蛋白质,一般情况下分离纯化蛋白质的技术均可用于酶蛋白的分离,但分离方法不同于一般有机化合物,因为酶蛋白为生物高分子而且容易变性。酶蛋白分离条件较温和,多利用蛋白质的特殊理化性质,采用盐析、透析、层析、电泳及离心等技术。所有酶蛋白纯化过程都必须考虑浓缩、去除杂质。要了解酶的生物学性质,必须将酶提取、纯化出来,纯化时避免采用高温、过酸、过碱等实验条件。

【原理】

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)广泛分布于自然界中,存在于植物种子、真菌以及前列腺和动物肝脏中。植物种子中的 ACP 在发芽时含量会猛增,随芽胚的生长 ACP 含量会下降。选用新鲜小麦胚芽作为原料来分离和纯化 ACP,具有来源方便、酶含量高等优点。

ACP 能溶解于水和稀缓冲液中;溶于 35% 硫酸铵溶液中,在 57% 的硫酸铵溶液中可沉淀析出;pH 小于 6.5 时稳定性增加,乙酸和枸橼酸可增加 ACP 溶液的稳定性;在中性及高温条件下不稳定,在 70℃ 时相对稳定; Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 为 ACP 激活剂,而 Cu^{2+} 、 P_i 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Pb^{2+} 、NaF、草酸盐、酒石酸盐和甲醛等是 ACP 的抑制剂。从小麦胚芽中提取 ACP 的流程图见图 1-1。

【试剂】

1. 1 mol/L $MnCl_2$ 溶液。
2. 饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 溶液(pH5.5) 称取 $(NH_4)_2SO_4$ 76.7 g,加蒸馏水溶解至 100 mL。
3. 0.25 mol/L EDTA 钠盐溶液(pH5.7)。
4. 甲醇 需在 $-30^\circ C$ 预冷。
5. 新鲜麦芽 100 g。

【操作步骤】

1. 小麦胚芽的制备

选取饱满、新鲜的小麦粒,冷水洗涤,除去干瘪的麦粒及泥沙,再用冷水浸泡 2~4 d(天热时每天要换水)使麦粒发胀。将发胀的麦粒置于沥水的塑料筐中,上面覆盖双层湿的纱布,置于通风处,每天浇水 2~3 次,保持麦粒的湿度。一般情况下,发胀的麦粒在室温 20℃ 情况下,经 3~7 d 就可以发出胚芽。在此过程中应注意通风透气,否则麦粒会发霉。

2. 称取新鲜小麦胚芽 100 g,加冷蒸馏水 200 mL,用捣碎器在高速、间断条件下冰浴捣碎 3~5 min,得到麦芽匀浆,将麦芽匀浆用 2~4 层纱布过滤,尽量将液体挤出,弃去纱布上固体物。

3. 滤液倒入离心管,在 4℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min。

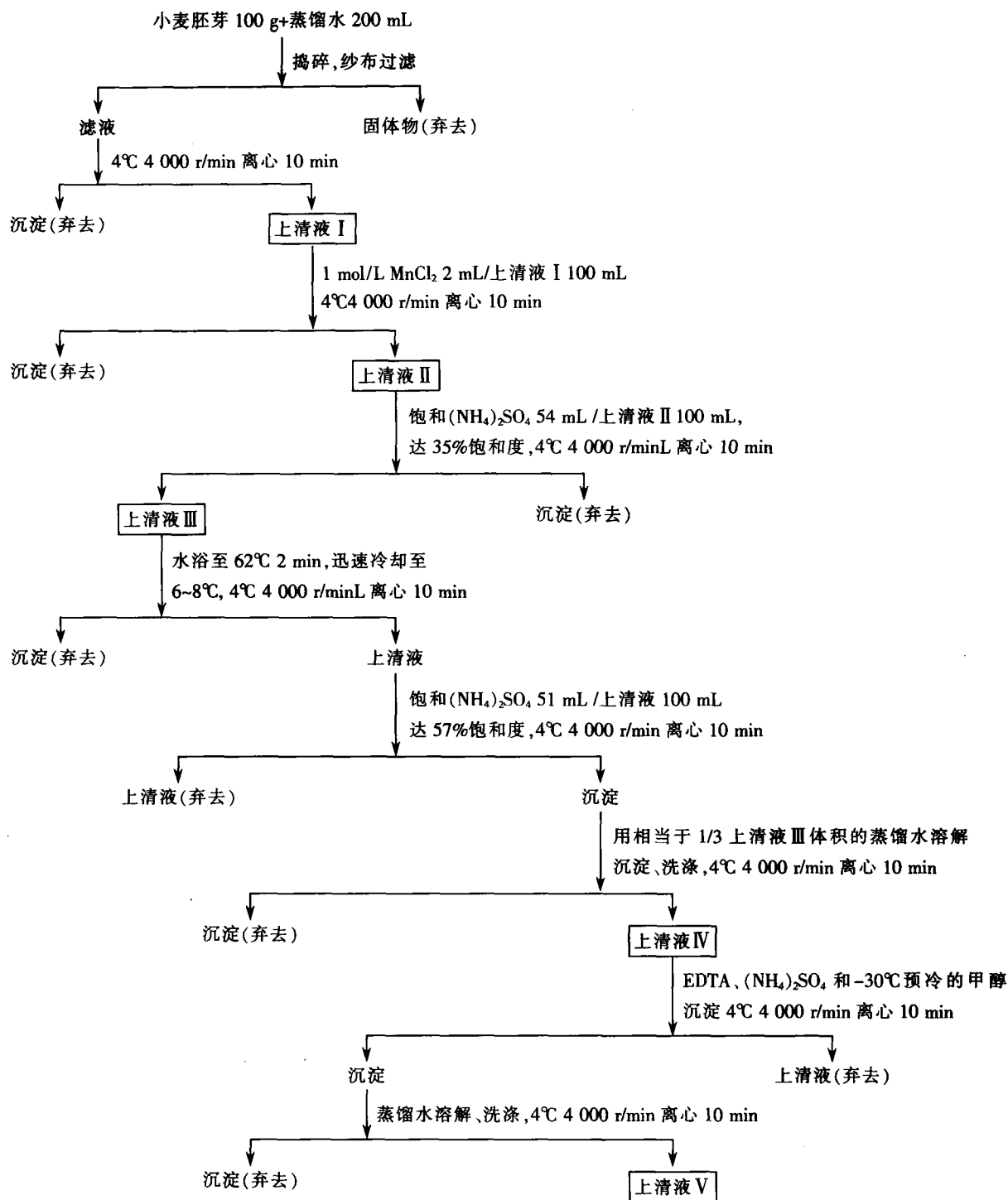


图 1-1 小麦胚芽 ACP 分离纯化流程图

4. 取上清液小心倒入量筒内,记录总体积,此液为上清液 I。留 10 mL 置于 4°C 冰箱保存,待做蛋白质和酶活性测定,剩余液体倒入烧杯中。离心管中的沉淀弃去。
5. 向上清液 I 中按每 100 mL 加入 1 mol/L $MnCl_2$ 溶液 2 mL,加入过程中要在磁力搅拌器上缓慢搅拌。搅拌切勿过快,以免酶蛋白变性和产生大量泡沫。
6. 倒入离心管,在 4°C 以 4 000 r/min 离心 10 min。
7. 将离心管中上清液小心倒入量筒内,记录上清液总体积,此液为上清液 II。留 10 mL 置于 4°C 冰

箱保存,待做蛋白质和酶活性测定,剩余液体倒入烧杯中。离心管中的沉淀弃去。

8. 按上清液Ⅱ 100 mL 加入冰冷的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 54 mL 的比例,缓慢加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,在 5~10 min 内加完,在磁力搅拌器上轻轻搅拌混匀,使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度达到 35%。加完后再搅拌 10 min。

9. 倒入离心管,在 4℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min。

10. 取上清液小心倒入量筒内,记录总体积,此液为上清液Ⅲ。留 10 mL 置于 4℃ 冰箱保存,待做蛋白质和酶活性测定,剩余液体倒入烧杯中。弃去离心管中的沉淀。

11. 将上述液体放在 70℃ 恒温水浴箱中,轻轻搅拌,使液体温度达 62℃ 再持续 2 min,迅速用冰水浴冷却至 6~8℃。利用 ACP 相对耐热的特性,进行加热沉淀,除去不耐热的杂蛋白。

12. 倒入离心管,在 4℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀。

13. 按上清液 100 mL 加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 51 mL 的比例缓慢加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,轻轻搅拌混匀,使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 最终浓度达到 57%。

14. 倒入离心管,以 4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。

15. 沉淀用相当于 1/3 上清液Ⅲ 体积的冰冷蒸馏水溶解、洗涤,以 4 000 r/min 离心 10 min 后,弃去沉淀,成为上清液Ⅳ,记录总体积。留 10 mL 待做蛋白质和酶活性测定,剩余液体倒入烧杯中。

16. 剩余的上清液Ⅳ 按每毫升加入 0.25 mol/L EDTA 0.09 mL 和饱和硫酸铵溶液 0.1 mL,在缓慢搅拌的条件下,按每毫升上清液加 2.0 mL 的比例加入冷甲醇(-30℃ 低温冰箱过夜),使蛋白质析出。在 4℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min 后,弃去上清液。

17. 将沉淀用冷蒸馏水溶解、洗涤,使沉淀尽量溶解。在 4℃ 以 4 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,得到上清液Ⅴ。

【注意事项】

1. 制备小麦胚芽时不宜让麦苗长出,尽量取小麦胚芽部分,因麦粒和麦苗部分 ACP 活性较低。同时要弃去发霉变质的麦胚。

2. 1 mol/L MnCl_2 起稳定酶蛋白和除去杂蛋白的作用。

3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的最终饱和度要严格控制,ACP 溶于 35% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液中,一些杂蛋白沉淀析出。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度增加至 57% 时,ACP 从溶液中析出,某些杂蛋白仍溶于上清液中。

4. 操作中要控制好要求的温度,应尽快加热至 62℃,以保证酶的活性。加热时间过长,会导致酶的活性下降。62℃ 是为了除去一些不耐热的杂蛋白。

5. 甲醇的作用是降低溶液的介电常数,使酶蛋白脱水而从溶液中析出,从而除去杂蛋白。由于有机溶剂沉淀蛋白质常引起蛋白质的变性,因此,低温条件非常重要,甲醇要保持低温。

实验 2 酶蛋白含量测定及比活性分析

酶蛋白的含量严格来说是指酶分子的质量浓度,常用酶蛋白浓度来表示。测定各上清液中蛋白质含量和酶活性及计算各分离步骤的比活性等指标,可以分析和评价分离纯化的效率,熟悉酶分离纯化的基本知识。

(一) 各上清液中蛋白质含量的测定——考马斯亮蓝 G-250(CBBG-250)法

【原理】

CBBG-250 是双色型蛋白质染料,其游离型呈红棕色,在酸性环境下可与蛋白质结合,最大吸收峰为 465 nm。结合型 CBBG-250 呈蓝色,在一定条件下,染料与蛋白质能迅速结合,在波长 595 nm 处的吸光度增加与蛋白质含量成正比。2 min 内达到平衡,1 h 内保持稳定状态。

【试剂】

1. CBBG-250 溶液 称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg,溶于 95% 乙醇 50 mL 中,加入 85% 磷酸 100 mL,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

2. 1 g/L 蛋白质标准溶液。

【操作步骤】

1. 蛋白质校正曲线的制备 除空白管外各管均做平行管,按表 1-1 操作。

表 1-1 蛋白质校正曲线的制备

加入物(mL)	空白管	1×2	2×2	3×2	4×2	5×2
蛋白质标准液	—	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
蒸馏水	0.10	—	—	—	—	—
CBBG-250 溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质浓度(g/L)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10

混匀后,室温放置 2 min 后,以空白管调零,1 h 内在波长 595 nm 下测定各管吸光度。然后以各管蛋白质浓度为横坐标,对应的吸光度值的平均值为纵坐标,绘制蛋白质校正曲线。

2. 各上清液中蛋白质含量的测定 除空白管外各管均做平行管,按表 1-2 操作。

表 1-2 各上清液中蛋白质含量的测定

加入物(mL)	空白管	上清液 I ×2	上清液 II ×2	上清液 III ×2	上清液 IV ×2	上清液 V ×2
蒸馏水	0.1	—	—	—	—	—
上清液 I	—	0.1	—	—	—	—
上清液 II	—	—	0.1	—	—	—
上清液 III	—	—	—	0.1	—	—
上清液 IV	—	—	—	—	0.1	—
上清液 V	—	—	—	—	—	0.1
CBBG-250	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

混匀后,室温放置 2 min 后,以空白管调零,1 h 内在波长 595 nm 下测定各管吸光度。根据各管吸光度值的平均值在校正曲线上查取各管的蛋白质浓度。

【注意事项】

1. 根据各上清液的蛋白质含量不同,需要将上清液稀释后再测定,结果计算乘以稀释倍数。
2. 本实验中所测得的蛋白质含量为总蛋白含量,是包括 ACP 在内的上清液中所有的蛋白质。

【评价】

CBBG-250 染料结合法测定蛋白质含量,具有干扰因素小、灵敏度高的特点。但线性范围 < 1.5 g/L,与不同蛋白质的结合能力不同,并且色素易沉着污染比色杯。

(二) 各上清液中 ACP 活性测定

【原理】

ACP 的作用是能水解磷酸单酯键,释放无机磷酸。ACP 的水解作用特异性不高,有 ATP、ADP 和 G-6-P 等为其天然底物,人工合成的底物有磷酸苯二钠、对硝基磷酸酚等。本实验利用提取液为酶制剂,以磷酸苯二钠作为底物,在 ACP 的作用下,可水解生成酚和磷酸。在酸性溶液中酚能与 4-氨基安替比林作用,经高铁氰化钾氧化生成红色醌类化合物,在波长 510 nm 处测定其吸光度,其颜色深浅与酚的含量成正比,通过比色测定可推算出酶的活性。

【试剂】

1. 1 mol/L 酚标准贮存液 用 0.1 mol/L 的盐酸溶液配制,2~8℃ 冰箱保存。
2. 0.4 mmol/L 酚标准应用液 用酚标准贮存液加蒸馏水稀释而成。

3. 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH10) 称取碳酸氢钠 3.36 g, 无水碳酸钠 6.36 g, 用蒸馏水溶解至 1 000 mL。

4. 4-氨基安替比林(4-AAP)溶液 称取 4-氨基安替比林 6 g, 用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL, 置棕色瓶中 2~8℃ 冰箱保存。

5. 高铁氰化钾溶液 称取硼酸 28 g, 高铁氰化钾 48 g, 各自溶解于 400 mL 蒸馏水中, 两液合并后再加蒸馏水至 1 000 mL, 置棕色瓶中保存。

6. 5 mmol/L 磷酸苯二钠溶液 称取磷酸苯二钠 0.635 g, 加入 500 mL 煮沸的蒸馏水中溶解, 冷却后加氯仿 2 mL 防腐, 2~8℃ 冰箱保存。

7. 0.1 mol/L 枸橼酸溶液(pH5.0) 称取枸橼酸 21.014 g, 加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

8. 0.1 mol/L 枸橼酸三钠溶液(pH5.0) 称取枸橼酸三钠 29.410 g, 加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

9. 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸三钠缓冲液(pH5.0) 每 100 mL 缓冲液按 0.1 mol/L 枸橼酸三钠溶液 59 mL 加 0.1 mol/L 枸橼酸溶液 41 mL 配制而成。

【操作步骤】

1. 校正曲线的制备 除第 1 管以外, 其余各管均做平行管, 按表 1-3 操作。

表 1-3 校正曲线的制备

加入物(mL)	1	2×2	3×2	4×2	5×2	6×2
0.4 mmol/L 酚标准应用液	0	0.20	0.40	0.60	0.80	1.0
蒸馏水	1.0	0.80	0.60	0.40	0.20	0
碳酸盐缓冲液	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
4-AAP 溶液	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
高铁氰化钾溶液	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
相当于酚含量(nmol)	0	80	160	240	320	400

混匀后, 室温放置 10 min, 以“1”管调零, 在波长 510 nm 处比色读取各管吸光度值, 以各管吸光度值的平均值为纵坐标, 相应的酚含量为横坐标绘制校正曲线。

2. 各上清液中 ACP 活性的测定 除空白管外均做平行管, 按表 1-4 操作。

表 1-4 各上清液中 ACP 活性的测定

加入物(mL)	空白管	液				
		上 I×2	上 II×2	清 III×2	清 IV×2	液 V×2
上清液	—	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
蒸馏水	0.10	—	—	—	—	—
枸橼酸缓冲液	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
磷酸苯二钠溶液	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
37℃ 水浴 15 min						
碳酸盐缓冲液	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
蒸馏水	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
4-AAP 溶液	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
高铁氰化钾溶液	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

混匀, 室温放置 10 min, 以空白管调零, 在波长 510 nm 处比色读取各管吸光度值。