

全国高等医药教材建设研究会规划教材·全国高等医药院校配套教材



供医学检验专业用

临床生物化学和生物 化学检验实验指导

第2版

WBC		WBC	
LY%	50.0	LY%	50.0
MO%	13.5	MO%	13.5
GR%	36.6 L	GR%	36.6 L
LY#	H	LY#	H
MO#	H	MO#	H
GR#	H	GR#	H
RBC	4.45	WBC	
HGB	14.2	LY%	50.0
HCT	42.6	MO%	13.5
MCV	95.8	GR%	36.6 L
MCH	31.9	LY#	H
MCHC	33.3	MO#	H
RDW	12.0	GR#	H
MPV			
PDW			

主编 钱士匀

 人民卫生出版社

全国高等医药院校配套教材

供医学检验专业用

临床生物化学和生物化学 检验实验指导

第 2 版

主 编 钱士匀

编者（以姓氏笔画为序）

王 琰（北华大学医学院）

刘 芳（武汉大学医学院）

刘忠民（广州医学院）

刘新光（广东医学院）

李 萍（四川大学华西临床医学院）

陈筱菲（温州医学院）

张 彦（重庆医科大学）

邹光楣（湖北药检专科学校）

郑铁生（江苏大学医学技术学院）

钱士匀（海南医学院）

章 尧（蚌埠医学院）

彭剑雄（中南大学湘雅医学院）

图书在版编目 (CIP) 数据

临床生物化学和生物化学检验实验指导/钱士匀主编.
第2版. —北京: 人民卫生出版社, 2003. 3

ISBN 7-117-05370-4

I. 临… II. 钱… III. ①临床医学—生物化学—
医学院校—教学参考资料②生物化学—医学检验—医
学院校—教学参考资料 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 005612 号

临床生物化学和生物化学检验实验指导 (第2版)

主 编: 钱士匀

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

印 刷: 三河市尚艺印装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 21

字 数: 482 千字

版 次: 1999 年 11 月第 1 版 2003 年 7 月第 2 版第 6 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05370-4/R·5371

定 价: 23.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

《临床生物化学和生物化学检验实验指导》系周新教授、涂植光教授主编的《临床生物化学和生物化学检验》和李萍教授主编的《临床生物化学检验》的配套实验教材。教材中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得到广泛的应用，这使得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，我们在陈正炎教授主编的第一版《临床生物化学和生物化学检验实验指导》实验教材的基础上，结合现代医学检验的发展和实验教学的需要，编写了第二版《临床生物化学和生物化学检验实验指导》。

本教材分十七章及附录一、二、三，共计 126 个实验，分为生物化学技术与临床生物化学检验两大部分。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。书末附临床化学实验室基础、常用生化检验英文缩写术语，另有中英文索引以方便查找。本教材的编写遵循医学检验专业培养目标，力求适应新世纪医学教育的要求，注重学生的基本知识、基本临床实践技能和初步科研能力的培养。《临床生物化学和生物化学检验实验指导》第二版保持了第一版的风格和特点，更新了部分内容，增加了新的实验方法，如化学发光法；同时增加了部分实验，如血清肌钙蛋白、血清乙醇含量测定、试剂盒质量评价试验等。我们对第一版教材中的第四章“免疫化学技术”进行了删减，该章节内容由《临床免疫学和免疫检验》编写；对于一些方法比较陈旧、临床上不太常用的实验也进行了删减。本教材内容与理论教材衔接，有利于培养学生的创新思维和实践能力。为配合医学检验专业三年制大专学生的实验教学需要，编写了分子生物学实验技术和方法学评价实验这两章内容。对于个别不便于作为单独实验列出又比较实用的内容，作为附录安排在相关实验的后面，作为教学参考之用。

本教材可供高等医学院校医学检验专业本、专科学生及成人教育本、专科学生使用，也可供从事临床检验工作的技术人员参考使用。

本教材在编写过程中得到检验医学界许多老教授的指点和帮助，同时得到海南医学院医学检验系、广东医学院医学检验系和北华大学医学院检验系的大力支持，在此表示衷心的感谢。由于检验医学发展迅速，内容涉及广泛，加之本人水平有限，难免存在不足之处或错误，敬请各位专家和读者批评。

钱士匀

2002 年 11 月

目 录

第一章 光谱技术	1
实验 1 紫外分光光度法测定血清蛋白质	1
附：紫外分光光度法测定核酸的浓度	3
实验 2 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱分析	3
实验 3 荧光光度法测定 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶含量	5
实验 4 原子吸收分光光度法测定血浆锌的含量	7
第二章 层析技术	10
实验 5 离子交换柱层析法分离混合氨基酸	10
实验 6 凝胶过滤法分离蛋白质	11
实验 7 亲和层析法提取特异性 IgG	13
实验 8 固相层析免疫分析法快速检测肌钙蛋白 I	15
附：全自动化学发光法测定血浆肌钙蛋白 I 含量	16
第三章 电泳技术	17
实验 9 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	17
附：聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质	21
实验 10 琼脂糖电泳分离血清脂蛋白	24
实验 11 等电聚焦电泳测定血清蛋白质等电点	25
实验 12 毛细管电泳分离血清蛋白质	27
实验 13 脉冲场凝胶电泳技术分离 DNA	28
附：自动电泳分析系统简介	30
第四章 酶学基本知识实验	31
实验 14 分离纯化小麦胚芽中酸性磷酸酶	31
实验 15 酶蛋白含量测定及比活性分析	34
实验 16 酸性磷酸酶时间进程曲线	37
实验 17 酸性磷酸酶酶浓度-速度曲线	38
实验 18 pH-酸性磷酸酶活性曲线	39
实验 19 酸性磷酸酶米氏常数的测定	40
实验 20 磷酸盐对酸性磷酸酶活性的抑制作用	41
第五章 分子生物学实验技术	43
实验 21 大鼠肝组织 DNA 的提取及其含量测定	43
附：外周血细胞 DNA 的快速提取	44

实验 22	碱裂解法从大肠杆菌中制备质粒 DNA	45
	附：一步法提取质粒 DNA	48
实验 23	PCR 扩增目的 DNA	48
实验 24	DNA 限制性图谱的绘制——DNA 的限制性内切酶酶切分析	50
	附：聚丙烯酰胺凝胶电泳银染分析 DNA	51
实验 25	Southern 印迹	54
实验 26	DNA 自动测序实验	56
第六章	方法学评价与试剂盒评价实验	60
第一节	方法学评价试验	60
实验 27	线性范围试验	60
实验 28	批内重复性试验	62
实验 29	回收试验	65
实验 30	干扰试验	66
实验 31	方法比较试验	68
实验 32	检测能力测定	70
	附 1：血糖测定评价方法 (GOD-POD 法)	72
	附 2：血糖测定比较方法 (HK 法)	73
第二节	试剂盒质量评价试验	75
实验 33	化学反应速度时间曲线试验	75
	附：稳定性试验	76
第七章	血清 (浆) 蛋白质测定	78
实验 34	双缩脲法测定血清蛋白	78
实验 35	溴甲酚绿法测定血清白蛋白	80
	附：溴甲酚紫法测定血清白蛋白	82
实验 36	免疫透射比浊法测定前白蛋白	83
实验 37	凝固法定量测定纤维蛋白原	86
	附：热沉淀比浊法测血浆纤维蛋白原	88
实验 38	酚试剂法测定血清粘蛋白	89
第八章	糖及其代谢物的测定	92
第一节	血清 (浆) 葡萄糖测定	92
实验 39	葡萄糖氧化酶法测定血清 (浆) 葡萄糖	92
实验 40	邻甲苯胺法测定血清 (浆) 葡萄糖	94
实验 41	己糖激酶法测定血清 (浆) 葡萄糖	96
第二节	血清 (浆) 糖化蛋白的测定	98
实验 42	微柱法分离糖化血红蛋白	98
实验 43	果糖胺法测定糖化血清蛋白	100
第三节	血液其他糖类及糖代谢产物的测定	101
实验 44	半乳糖氧化酶法测定半乳糖	101
实验 45	比色法测定全血乳酸	103

实验 46	乳酸脱氢酶法测定全血乳酸	105
实验 47	分光光度法测定全血丙酮酸	106
第九章	血清(浆)脂类及脂蛋白测定	109
第一节	血清甘油三酯的测定	109
实验 48	乙酰丙酮显色法测定血清甘油三酯	109
实验 49	磷酸甘油氧化酶法测定血清甘油三酯	111
第二节	血清胆固醇的测定	113
实验 50	胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	113
第三节	血清(浆)脂蛋白的测定	114
实验 51	磷钨酸-镁沉淀法测定高密度脂蛋白-胆固醇	114
	附: 过氧化物酶清除法测定高密度脂蛋白-胆固醇	116
实验 52	聚乙烯硫酸盐沉淀法测定血清(浆)低密度脂蛋白-胆固醇	118
	附: 表面活性剂清除法测定血清(浆)低密度脂蛋白-胆固醇	120
实验 53	免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)	122
	附: 酶联免疫吸附法测定脂蛋白(a)	123
第四节	血清载脂蛋白的测定	125
实验 54	免疫透射比浊法测定血清载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B	125
第十章	血清无机离子及微量元素测定	127
第一节	钾、钠离子测定	127
实验 55	火焰发射光谱法测定血清钾、钠离子	127
实验 56	离子选择性电极电位法测定血清钾、钠离子	130
第二节	血清钙测定	133
实验 57	偶氮胂 III 比色法测定血清总钙	133
实验 58	甲基百里香酚蓝法测定血清总钙	134
实验 59	离子选择性电极电位法测定钙离子	135
第三节	血清磷测定	137
实验 60	还原钼蓝法测定血清磷	138
实验 61	黄嘌呤氧化酶法测定血清磷	138
第四节	血清镁测定	140
实验 62	甲基麝香草酚蓝法测定血清镁	140
实验 63	钙镁试剂比色法测定血清镁	142
第五节	氯化物的测定	143
实验 64	硫氰酸汞比色法测定血清氯	143
实验 65	离子选择性电极法测定血清氯	146
第六节	微量元素的测定	146
实验 66	双环己酮草酰二胺比色法测定血清铜	147
	附: 原子吸收分光光度法测定血清铜	149
实验 67	吡啶偶氮酚比色法测定血清锌	150
实验 68	亚铁啉比色法测定血清铁和总铁结合力	151

第十一章 血气分析	155
实验 69 血气分析	155
实验 70 酶法测定血浆二氧化碳	161
第十二章 激素及激素代谢产物的测定	164
实验 71 酶联免疫吸附法测定人绒毛膜促性腺激素	164
实验 72 酶标免疫荧光法测定血清皮质醇	165
实验 73 时间分辨免疫法测定血浆雌二醇	168
实验 74 尿 17-酮类固醇测定	169
实验 75 尿 17-羟皮质类固醇测定	172
实验 76 柱层析荧光法测定尿液儿茶酚胺	173
实验 77 尿香草扁桃酸测定	176
实验 78 放射免疫法测定血浆醛固酮	178
第十三章 非蛋白含氮化合物及总胆汁酸测定	181
第一节 血清尿素的测定	181
实验 79 二乙酰-脲法测定血清尿素	181
实验 80 脲酶-波氏比色法测定血清尿素	183
实验 81 酶偶联速率法测定血清尿素	184
第二节 血清肌酐测定	185
实验 82 去蛋白碱性苦味酸法测定血清肌酐	186
实验 83 不去蛋白速率法测定血清肌酐	187
实验 84 内生肌酐清除率测定	188
第三节 血清尿酸测定	190
实验 85 磷钨酸还原法测定血清尿酸	190
实验 86 尿酸酶-过氧化物酶偶联法测定血清尿酸	192
第四节 血氨测定	193
实验 87 酶法测定血浆氨	193
实验 88 干化学法测定血浆氨	195
第五节 血清总胆红素和结合胆红素测定	196
实验 89 改良 J-G 法测定血清总胆红素和结合胆红素	196
实验 90 胆红素氧化酶法测定总胆红素和结合胆红素	199
附 1: 二甲亚砷法测定总胆红素	201
附 2: 钒酸氧化法测定总胆红素和结合胆红素	202
第六节 总胆汁酸测定	203
实验 91 酶比色法测定总胆汁酸	203
附: 酶循环法测定血清总胆汁酸	206
第十四章 常用酶类测定	208
第一节 氧化还原酶类	208
实验 92 连续监测法测定乳酸脱氢酶总活性 (L-P 反应法)	208

实验 93	比色法测定乳酸脱氢酶总活性	210
实验 94	琼脂糖电泳法测定乳酸脱氢酶同工酶	211
实验 95	连续监测法测定葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	214
实验 96	邻联大茴香胺比色法测定血清铜蓝蛋白	216
实验 97	茚醛偶氮奈酚法测定血清单胺氧化酶	218
实验 98	邻苯三酚自氧化抑制法测定超氧化物歧化酶	219
第二节	转移酶类测定	222
实验 99	赖氏法测定血清丙氨酸氨基转移酶	222
	附：赖氏法测定血清门冬氨酸氨基转移酶	225
实验 100	连续监测法测定血清丙氨酸氨基转移酶	227
	附：连续监测法测定血清门冬氨酸氨基转移酶	229
实验 101	连续监测法测定血清 γ -谷氨酰基转移酶	230
实验 102	肌酸显色法测定血清肌酸激酶	232
实验 103	连续监测法测定血清肌酸激酶	234
实验 104	琼脂糖凝胶电泳法测定血清肌酸激酶同工酶	236
第三节	水解酶类的测定	239
实验 105	磷酸苯二钠比色法测定血清碱性磷酸酶	239
实验 106	磷酸麝香草酚酞比色法测定酸性磷酸酶	241
实验 107	羟胺三氯化铁比色法测定血清胆碱酯酶	243
实验 108	碘-淀粉比色法测定血清淀粉酶	245
实验 109	连续监测法测定淀粉酶	247
实验 110	血清脂肪酶的测定	248
第十五章	常用治疗性药物监测	250
实验 111	双波长紫外分光光度法测定血清茶碱及药代动力学参数计算	250
实验 112	化学发光酶免疫法测定地高辛	253
实验 113	高效液相色谱法测定血清苯妥英	255
实验 114	高效液相色谱法测定全血环孢素 A	257
实验 115	荧光偏振免疫法测定全血环孢素 A	259
实验 116	改良扩散法测定血液乙醇的含量	261
	附：REA 法测定乙醇含量	263
第十六章	肿瘤标志物的测定	266
实验 117	放射免疫（双抗体）法测定甲胎蛋白	266
	附：免疫电泳自显影法测定甲胎蛋白异质体	268
实验 118	ELISA 法测定癌胚抗原（CEA）	269
	附：放射免疫法测定癌胚抗原	271
实验 119	放射免疫分析法测定 CA ₁₉₋₉	273
实验 120	化学发光法测定抗前列腺特异性抗原（抗 PAS）	275
	附：时间分辨荧光免疫分析法检测 PSA- α 1 抗胰凝乳蛋白酶	277
实验 121	放射免疫分析法测定血清铁蛋白	278
实验 122	β_2 -微球蛋白的测定	280

第十七章 神经递质与其他生物活性物质的测定	282
实验 123 放射免疫法测定 β -内啡肽	282
实验 124 放射免疫法测定血浆 P 物质	285
实验 125 反相高效液相色谱法测定血清 γ -氨基丁酸	288
实验 126 重氮化反应法测定血清一氧化氮测定	290
 参考文献	 294
 附录一 临床化学实验室基础	 296
第一节 常用玻璃器皿及量器的使用	296
第二节 试剂及试剂的配制	300
第三节 pH 和缓冲液	304
 附录二 常用生化检验英文缩写术语	 311
 中英文索引	 318

第一章 光谱技术

光是一种电磁波，具有波动性和粒子性。波动性的特征是波长和频率。从理论上说，光称为光子，是由光微粒子（光子）所组成的，而光微粒子是一种具有能量的物质，不同波长的光具有不同的能量，光子的能量与光的波长成反比，与频率成正比。

光的波长可用纳米（nm）为单位来表示。人的眼睛所能感觉到的波长为 400nm 的紫色到 760nm 的红色，该段波长以外的光就不能看见，故 400~760nm 之间的光波称为可见光。短于 400nm 的为紫外线，短于 200nm 为远紫外线。长于 760nm 的为红外线。

利用物质的发射光谱、吸收光谱或散射光谱特征对物质进行定性、定量分析的技术称光谱分析技术。光谱分析的种类很多，可按光谱产生的方式加以分类。基于发射光谱特征的主要有火焰光度法、原子发射光谱法和荧光光谱法等；基于吸收光谱特征的主要有紫外及可见分光光度法、原子吸收分光光度法和红外光谱法等；基于散射光谱特征的有比浊法等。发射光谱法是根据物质受到热能或电能等的激发后所发射出的特征光谱线来进行定性及定量分析的一种方法；吸收光谱分析法是根据溶液能吸收由光源发出的某些波长的光所形成的光谱，利用这种光谱可鉴定物质的性质和含量的一种方法；散射光谱分析法是测定光线通过溶液混悬颗粒后的光吸收或光散射程度的一种定性或定量分析法。

本章介绍应用吸收光谱原理进行分析的可见及紫外分光光度法、原子吸收分光光度法，以及应用发射光谱原理进行分析的荧光光度法。

实验 1 紫外分光光度法测定血清蛋白质

【原理】

蛋白质分子中存在着含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸，使蛋白质在 270~290nm 波长范围内具有吸收紫外光的性质，其中酪氨酸的 λ_{\max} 为 275nm，色氨酸的 λ_{\max} 为 280nm，苯丙氨酸的 λ_{\max} 为 257nm，在此波长范围内，蛋白质溶液的吸收值与其浓度成正比，可作定量测定。由于生物样品中常混有核酸，核酸对紫外光也有吸收，但其峰值在 260nm 附近，因此可用下列经验公式计算蛋白质浓度。

Lowry - Kalckar 公式：

$$\text{蛋白质浓度(g/L)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

Warburg - Christian 公式：

$$\text{蛋白质浓度(g/L)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

将 280nm 的吸光度与 260nm 的吸光度各乘以系数相减后即为接近的蛋白质浓度。 A_{280} 与 A_{260} 分别代表光径为 1cm 时对 280nm 和 260nm 的吸光度。

由于蛋白质中肽键的存在，使其在 200~225nm 远紫外区波长也有光吸收，因此，

蛋白质浓度在一定范围内，可用 A_{215} 、 A_{225} 值按下述公式测定。

Waddell 经验公式：

$$\text{蛋白质浓度(g/L)} = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

由于血清中不同类型蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量不同，所以测定 270~290nm 波段紫外吸收也会因每个样品中蛋白质氨基酸组成的差异而有较大的变异，因而这个方法不能直接用于血清总蛋白的准确定量。而在远紫外区（200~225nm）的光吸收主要由肽键所致，各种蛋白质具有相同的吸收系数，蛋白质浓度在 120g/L 仍符合 Beer 定律，因而 Ressler 等人建立起 210nm 波长下测定血清总蛋白的实用方法，其准确性与双缩脲法和 Kjeldahl 法间有较好的可比性。

【试剂】

1. 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1 000ml 容量瓶中，用蒸馏水定容。

2. 蛋白质标准溶液（1mg/ml）准确称取经校正后的牛血清白蛋白用 0.15mol/L NaCl 溶液配制成 1mg/ml。

【操作步骤】

1. 标准曲线法 取 8 支试管，分别按表 1-1 加入试剂。

表 1-1 蛋白质标准曲线的制作

试 剂	管 号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
蛋白质标准溶液(mg/ml)	—	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
0.15mol/L NaCl 溶液	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	—
蛋白质浓度(mg/ml)	—	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750	1.00

混匀后，选用 1cm 的石英比色杯，在 280nm 处以第一管调节零点，分别测定各管吸光度值。以光密度值为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标，绘制出 280nm 处血清蛋白质标准曲线。取 1ml 血清蛋白生理盐水稀释液（应使其浓度在蛋白质标准曲线范围内），加 0.15mol/L NaCl 溶液 3ml，混匀后，按上述方法测定吸光度值，根据标准曲线查出蛋白质浓度。

2. Lowry - Kalckar 公式法及 Warburg - Christian 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将在血清作 100 倍稀释，选用光径为 1cm 的石英比色杯，分别在 280nm 和 260nm 波长两处测定溶液的吸光度（A），根据 Lowry - Kalckar 公式或 Warburg - Christian 公式计算此溶液的蛋白质浓度，再乘以稀释倍数 100 得到血清蛋白质的真实浓度。

3. Waddell 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将血清作 1 000 倍稀释，选用光径为 1cm 石英比色杯，分别在 215nm 和 225nm 波长两处测定溶液的吸光度（A），根据 Waddell 公式计算此溶液的蛋白质浓度，再乘以稀释倍数 1 000 得到血清蛋白质的真实浓度。

【注意事项】

1. 270~290nm 紫外法对测定蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质溶

液，有一定的误差。

2. 本法需用高质量石英比色杯。
3. 紫外分光光度计使用前需对其波长进行校正。
4. 待测样品的蛋白质浓度应控制在 15~25g/L 范围内。
5. 注意溶液 pH，这是由于蛋白质的紫外吸收峰会随 pH 的改变而变化。
6. 受非蛋白质因素的干扰较重，除核酸外，游离的色氨酸、酪氨酸、尿酸、核苷酸、嘌呤、嘧啶和胆红素等均有干扰。

附：紫外分光光度法测定核酸的浓度

嘌呤碱或嘧啶碱具有共轭双键，使核苷酸和核酸在紫外光区具有特征性的吸收光谱，最大吸收峰在 260nm。比色杯光径 1cm，波长 260nm，1 个吸光度值 (1A) 相当于 50 μ g/ml 双螺旋 DNA；401 μ g/ml 单螺旋 DNA 或 RNA；20 μ g/ml 寡核苷酸。

(一) DNA 的浓度测定

1. 取 DNA 溶液 10 μ l，加双蒸馏水 600 μ l (即稀释 61 倍)。
2. 用双蒸馏水调零，测定 260nm 和 280nm 的吸光度值 (A_{260} , A_{280})。
3. DNA 浓度 (μ g/ μ l) = $\frac{A_{260} \times 50 \times 61}{1000}$
4. DNA 的纯度 A_{260}/A_{280} 的比值应大于 1.7 以上。若样品中含有蛋白质 (吸收峰在 280nm) 等杂质时，比值下降，应重新纯化。有时需要测定 A_{230} ， A_{260}/A_{230} 的比值应大于 2.0，如比值太小，说明样品中残存酚等有机杂质。
5. DNA 溶液需经一定比例稀释，不可太浓。否则，因溶液粘稠，加样器不易吸准。

(二) RNA 的浓度测定

1. 取 RNA (溶于 5g/L SDS 溶液中) 溶液 10 μ l，加入三蒸馏水 500 μ l 中 (稀释 51 倍)。
2. 将 5g/L SDS 用三蒸馏水作 51 倍稀释，用此液调零，测定 RNA 稀释液在 260nm 和 280nm 的吸光度 (A_{260} , A_{280})。
3. RNA 浓度 (μ g/ μ l) = $\frac{A_{260} \times 50 \times 61}{1000}$
4. RNA 的纯度 纯的 RNA， $A_{260}/A_{280} = 2.0$ 。由于所用的标本不同，比值在 1.7~2.0 之间可以接受。如低于此范围，往往是由于蛋白质的污染。有时，RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 的比值可大于 2.0。低于此值则表示有异硫氰酸胍的污染。应再经异戊醇沉淀，以除去小分子胍类的污染。

实验 2 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱分析

【原理】

血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 在不同条件下可以形成不同形式的衍生物。血红蛋白溶液在空气中充分接触氧气可生成氧合血红蛋白 (oxyhemoglobin, HbO₂)。Hb 溶液中通入一氧化碳 (CO)，Hb 与 CO 结合而成碳氧血红蛋白 (carboxyhemoglobin,

COHb), CO 结合在 Hb 中的亚铁原子上, COHb 呈樱桃红色, 它的吸收光谱同 HbO₂ 非常接近。高铁氰化钾 [K₃Fe(CN)₆] 在酸性或中性环境中, 可使 Hb 中的亚铁离子失去一个电子, 氧化成高铁离子而成为棕色的高铁血红蛋白 (methemoglobin, MHb)。由于这些物质的组成成分不同, 其分子结构也不同, 故具有各自的吸收光谱可资鉴别, 其吸收光谱特征归纳于表 1-2。

利用分光光度计测定不同波长的光线通过溶液时的吸光度, 以波长为横坐标, 相应的吸光度为纵坐标, 绘制吸收光谱曲线。

表 1-2 血红蛋白及衍生物吸收光谱波长

	吸收峰数	吸收峰波长(nm)
HbO ₂	2	578,540
COHb	2	572,535
MHb(pH6.4)	4	630,578,540,500

【试剂】

- 100g/L 高铁氰化钾溶液 称取高铁氰化钾 1g 置 10ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 临用前配制。
- 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1 000ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容。

【操作步骤】

1. Hb 溶液的制备 静脉采血 4~5ml, 置于抗凝管中, 各种抗凝剂均可使用, 离心分离血浆, 吸去血浆, 将压积红细胞用生理盐水约作 10 倍稀释洗涤, 混和, 离心, 吸出上清液, 如此洗涤 3~4 次, 除去血浆蛋白质。将洗过的压积红细胞一份, 加蒸馏水一份和氯仿半份, 加塞, 猛力振摇约 5min, 离心沉淀, 除去细胞膜等残渣, 分离 Hb 溶液。Hb 溶液分离后, 测定其含量并调节至 100g/L。

2. 样品的制备

(1) HbO₂ 溶液: 取 Hb 溶液 4 滴, 加蒸馏水 5ml。

(2) COHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 再加辛醇 1 滴, 摇匀, 用滴管通入 CO 2~3min 呈樱桃红色。

(3) MHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 加新鲜配制的 100g/L 高铁氰化钾 3 滴, 混匀, 呈棕色, 尽可能快比色。

3. 测定 分别取上述溶液 3ml 盛于比色杯内, 以蒸馏水作空白, 在波长 470~650nm 范围内, 每隔 20nm 测吸光度一次, 在接近吸收高峰时, 每隔 2nm 测吸光度一次。每测一次波长, 必须重新校正零点, 再测吸光度。以入射光波长为横坐标, 各相应的吸光度为纵坐标, 分别绘出各物质的吸收光谱曲线。

【注意事项】

- 必须对所用的分光光度计进行波长校正。
- 高铁氰化钾临用前配制, 贮存于棕色瓶中。
- 如果没有 CO 发生器, 可用煤气替代。

实验3 荧光光度法测定 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶含量

荧光分析 (fluorimetry) 是一种分子发光分析技术, 是利用某些物质受紫外光照射后发出特有的荧光, 据此对物质进行定性和定量分析。用于荧光分析的仪器叫荧光计或荧光分光光度计。

【原理】

物质中的分子吸收光能可由基态跃迁至激发态, 当从激发态返回基态时, 发出比原激发光频率较低的荧光。激发光一般为紫外光, 而发出的荧光多为可见光。对于一种浓度较小的荧光物质, 在一定浓度范围内, 其荧光强度与溶液浓度呈线性关系, 据此可测定荧光物质的含量。

在定量测定时, 应选择荧光物质的最大激发波长 (λ_{ex}) 和最大荧光波长 (λ_{em}), 这就需要先获知激发光谱和荧光光谱。测定不同波长激发光时的荧光强度, 以激发光波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 所得曲线即表示激发光谱。荧光强度最大时激发光波长称为最大激发波长; 与此类似, 在最大激发波长时测定不同波长的荧光强度, 以荧光波长为横坐标, 荧光强度为纵坐标作图, 所得曲线便是荧光光谱。

荧光底物 4-甲基伞形酮 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷, 在 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 作用下水解, 释放出游离的 4-甲基伞形酮 (4-MU)。后者在碱性条件下变构, 受激发产生荧光。根据荧光强度在标准曲线上查得 4-MU 含量, 通过计算得出酶活力单位。

【试剂】

1. 枸橼酸-磷酸盐缓冲液 (枸橼酸 30mmol/L, 磷酸盐 47.5mmol/L, pH4.5, 在 1.0g/L 牛血清白蛋白中):

(1) 枸橼酸溶液: 称取 12.6g 枸橼酸 \cdot H₂O, 以蒸馏水溶解并稀释至 1L (60mmol/L);

(2) 磷酸氢二钠溶液: 称取无水 Na₂HPO₄ 13.5g, 以蒸馏水溶解并稀释至 1L (95mmol/L);

(3) 取 (1) 液 50ml 及 (2) 液 50ml 混合, 测 pH 应为 4.5。

(4) 取 (3) 液 50ml, 加入叠氮钠 10mg 及牛血清白蛋白 50mg, 溶解。4℃ 保存可稳定数周, 如长菌应弃去。此为含牛血清白蛋白缓冲液。

2. 2mmol/L 底物缓冲液 称取 4-甲基伞形酮-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷 (Mw=379.4) 7.6mg, 溶于 10ml 含牛血清白蛋白缓冲液中。小量分装于具塞试管中, 置 -20℃ 保存可用数月, 但不得反复冻融。

3. 酶反应中止液 (pH10.42) 称取甘氨酸 37.5g, 溶于 1L 蒸馏水中, 加入 920ml 0.5mol/L 氢氧化钠, 用 0.5mol/L 氢氧化钠调校 pH 至 10.4。

4. 300 μ mol/L 4-甲基伞形酮标准液 称取 4-甲基伞形酮 11mg, 用中止液溶解并定容至 250ml。此为贮存液, 置棕色瓶 4℃ 保存至多稳定 10d。

【操作】

1. 先将血清用不含牛血清白蛋白 (BSA) 的缓冲液作 20 倍稀释, 尿用蒸馏水作 20 倍稀释, 后按表 1-3 操作。

表 1-3 NAG 荧光测定法操作步骤

加 入 物	测定管(U)	空白管(B)
已稀释样品(ml)	0.1	
不含 BSA 缓冲液(ml)		0.1
底物缓冲液(ml)	0.2	0.2
	混匀, 37°C 水浴 15min	
中止缓冲液(ml)	3.0	3.0

混匀各管, 激发波长 364nm, 发射波长 448nm, 以中止液调零, 6 μ mol/L 4-MU 管调荧光强度至 100 后, 分别测空白管及测定管的荧光强度。根据需要, 也可用 3 μ mol/L 4-MU 管调荧光强度至 100。

2. 标准曲线的制作 取 300 μ mol/L 4-MU 0.5ml, 以中止液稀释至 25ml, 得 6 μ mol/L 应用液。再按表 1-4 操作。

表 1-4 NAG 荧光测定法标准曲线制作表

加 入 物	管 号					
	1	2	3	4	5	6
6 μ mol/L 4-MU(ml)	1	2	3	4	5	6
中止液(ml)	5	4	3	2	1	0
相当于 4-MU 浓度(μ mol/L)	1	2	3	4	5	6

按上述波长, 用中止液调零, 6 号管调 100, 读取各管荧光强度, 在坐标纸上作标准曲线, 应为直线。

单位定义: 1L 样品中的被测酶, 37°C 1min 催化水解 1 μ mol 底物, 产生 1 μ mol 4-MU 为 1 个单位浓度 (U/L)。为避免尿液浓缩或稀释的影响, 以同一份尿中的肌酐值校正酶活性 (NAG, U/gCre)。

【计算】

$$\text{NAG U/L} = \frac{F_U - F_B}{15} \times \frac{3.3}{0.1} \times 20 \times \frac{6}{100} = (F_U - F_B) \times 2.64$$

式中 F_U 代表测定管荧光强度, F_B 代表空白管荧光强度, 15 为酶促反应时间 (min), 3.3 为反应液总体积 (ml), 0.1 为所用稀释样品体积 (ml), 20 为样品稀释倍数, 6 及 100 为 6 μ mol/L 4-MU 之荧光强度 100。

尿中 NAG 的 U/L 被尿中肌酐的 g/L 除, 所得商为 U/gCre。

【参考范围】

9.94U/L \pm 2.07U/L

【注意事项】

1. 本法酶促反应液中各成分浓度为 底物 1.33mmol/L, 枸橼酸 20mmol/L, Na_2HPO_4 32mmol/L。

2. 配试剂所用蒸馏水应是重蒸馏水。底物应无游离的 4-MU, 如有, 可用丙酮提去。BSA 中应无该酶, 如有应 50°C 加热 2h 灭活。

3. 血清中 NAG 于 4°C 稳定数小时到数天, -20°C 可稳定数月。尿标本 4°C 稳定 1 周。

4. 除服用能产生荧光的药物外, 一般标本不作标本空白 (对照管)。

【临床意义】

1. 尿 NAG 活性增高是肾小管损害的较敏感指标, 增高见于急性肾炎、休克引起的肾功能衰竭 (特高)、肾病综合征、流行性出血热、中毒性肾病。肾病恢复期或肾实质病变不重时, 增加不明显。下泌尿系统感染和尿路结石, 尿酶可正常。肾移植患者, 尿 NAG 测定可早期发现排斥反应, 一般在临床出现各种指征前 1~3d 即有尿 NAG 增高。

2. 肝硬变和慢性活动性肝炎晚期, 肝组织有纤维化倾向者, 血清 NAG 升高; 中晚期妊娠, 血清中 NAG 活性亦增高。

实验 4 原子吸收分光光度法测定血浆锌的含量

原子吸收分光光度分析是基于元素所产生的原子蒸气中, 待测元素的基态原子, 对所发射的特征谱线具有吸收作用, 其吸收规律遵循 Beer 定律, 即在一定条件下, 原子吸收值与该物质的含量成正比。原子吸收分光光度分析是一种吸收光谱的技术, 使用的仪器为原子吸收分光光度计。

【原理】

锌的空心阴极灯发射 213.8nm 谱线, 通过火焰进入分光系统照射到检测器上。血清用去离子水稀释, 吸入原子化器 (火焰), 锌在高温下离解成锌原子蒸气。部分发射光被蒸气中基态锌原子吸收, 光吸收的量与火焰中锌离子的浓度成正比。

在使用锐线光源和稀溶液的情况下, 基态原子蒸气对共振线的吸收符合 Beer 定律:

$$A = \lg(I_0/I) = K L N_0$$

式中 A 为吸光度, I_0 为入射光强度, I 为经原子蒸气吸收后的投射光强度, K 为吸收系数, L 为辐射光所穿过的原子蒸气的长度, N_0 为基态原子密度。

在锌原子蒸气中, 待测锌元素的基态原子数与它对 213.8nm 波长的能量吸收成正比。在血浆锌被原子化、火焰的绝对温度低于 3000K 时, 可以认为锌原子蒸气中锌基态原子的数目实际上接近或等于锌原子总数, 在固定的实验条件下, 锌原子总数与血浆锌浓度 (C) 的比例是一定的。因此, 上式可写成:

$$A = KC$$

这是原子吸收分光光度法进行血浆锌定量分析的基本公式。实验中使用火焰法, 将血浆锌原子化, 采用校正曲线定量。

【试剂】

1. 甘油液稀释液 50ml/L (V/V) 甘油。

2. 锌标准贮存液 (15.3mmol/L) 取浓硝酸 10ml, 加入至去离子水 50ml 中。准确称取纯锌粉 1.0g, 溶于此溶液中, 待溶解后, 用去离子水定容至 1000ml。室温可稳定保存一年。

3. 锌标准中间液 (153 μ mol/L) 准确吸取锌标准贮存液 1.0ml 加入 100ml 容量瓶内, 用去离子水定容, 临用前配制。