

生物化学& 临床生物化学检验 实验教程



主编 刘云春 来明名



云南大学出版社
YUNNAN UNIVERSITY PRESS

生物化学& 临床生物化学检验 实验教程



主编 刘云春 来明名



云南大学出版社
YUNNAN UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生物化学&临床生物化学检验实验教程 / 刘云春, 来明名主编. — 昆明: 云南大学出版社, 2018
ISBN 978-7-5482-3362-6

I. ①生… II. ①刘… ②来… III. ①生物化学—化学实验—医学院校—教材②生物化学—医学检验—医学院校—教材 IV. ①Q5-33 ②R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第117758号

生物化学&临床生物化学检验实验教程

刘云春 来明名 主编

策划编辑: 邓立木

责任编辑: 李 红

装帧设计: 贺 涛

出版发行: 云南大学出版社

印 装: 昆明市五华区理焯教育印务有限公司

开 本: 787 mm × 1092 mm 1/16

印 张: 9.5

字 数: 171 千

版 次: 2018年7月第1版

印 次: 2018年7月第1次印刷

书 号: ISBN 978-7-5482-3362-6

定 价: 25.00 元

地址: 昆明市一二一大街182号(云南大学东陆校区英华园内)

邮编: 650091

发行电话: 0871-65033244 65031071

网址: <http://www.ynup.com>

E-mail: market@ynup.com

若发现本书有印装质量问题, 请与印厂联系调换, 联系电话: 0871-64167045。

前 言

《生物化学 & 临床生物化学检验实验教程》是由大理大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室刘云春教授（博士）和来明名副教授（博士）主编完成的，遴选的实验项目是根据“生物化学与分子生物学”和“临床生物化学检验”的理论教学内容选择的。本实验教程适用于临床医学、医学检验等医学类本科学生和医学类研究生的实验教学。

《生物化学 & 临床生物化学检验实验教程》的编写遵循医学类专业的培养目标，注重学生的基本知识、基本实践技能和科研能力的培养，将《生物化学 & 临床生物化学检验实验教程》分为生物化学与临床生物化学检验基本技术、生物化学与分子生物学实验项目、临床生物化学及分子检验实验项目三篇进行编写，共遴选了30个实验项目，每个实验包括实验目的、原理、试剂与器材、操作步骤、结果、参考范围、临床意义、注意事项及评价，并附有思考题。

参与本实验教程编写的还有大理大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室的左绍远教授、周静华教授、熊伟教授、陈贵元副教授和张钰哲讲师。实验的准备和实施由本实验室的高级实验师罗永会，实验师徐春萍、李莹莹和助理实验师普元倩协助完成。在此，对为参与本实验教程编写付出努力的人员表示由衷的感谢！

由于生物化学与分子生物学及检验医学的发展日新月异，内容涉及广泛，而编者的能力、水平有限，本教程难免存在不足之处，敬请读者批评指正，以使本实验指导教材得到进一步完善和提高。

大理大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

刘云春 来明名

2018年4月

目 录

第一篇 生物化学与临床生物化学检验基本技术

第一章 实验基本操作	(3)
一、玻璃仪器的洗涤	(3)
二、溶液混匀法	(4)
三、微量移液器的使用	(5)
第二章 离心机的原理及使用	(6)
一、离心原理	(6)
二、离心方法	(6)
三、离心机使用注意事项	(7)
第三章 分光光度技术	(8)
一、分光光度技术的基本原理	(8)
二、分光光度计的组成与结构	(11)
三、分光光度技术的应用	(12)
第四章 常用分子生物学实验技术	(16)
一 层析技术	(16)
二 电泳技术	(19)
三 PCR 技术	(26)
四 印迹杂交技术	(29)

第二篇 生物化学与分子生物学实验项目

第一章 生物化学实验项目	(33)
实验 1 双缩脲法测定血清蛋白质含量	(33)
实验 2 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白	(36)
实验 3 血红蛋白醋酸纤维素薄膜电泳分离及定量测定	(41)
实验 4 酶促反应动力学实验	(45)
实验 5 GOD - PAP 法测定血清葡萄糖	(51)
实验 6 胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	(54)
实验 7 乙酰丙酮显色法测定血清甘油三酯	(56)
实验 8 GPO - PAP 法测定血清甘油三酯	(60)
实验 9 二乙酰一肟法测定血清尿素	(63)
实验 10 双纸片法测定红细胞葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢 酶活性	(66)
实验 11 人血浆同型半胱氨酸的测定	(68)
第二章 分子生物学实验项目	(72)
实验 1 外周血细胞 DNA 的快速提取	(72)
实验 2 λ DNA 的限制性内切酶消化及琼脂糖凝胶电泳 分析	(74)
实验 3 聚合酶链式反应 (PCR) 体外扩增 DNA	(76)

第三篇 临床生物化学与分子检验实验项目

第一章 临床生物化学检验实验项目	(83)
实验1 BCA法测定血清蛋白质含量	(83)
实验2 果糖胺法测定糖化血清蛋白	(85)
实验3 口服葡萄糖耐量试验	(88)
实验4 胆固醇氧化酶法测定血清总胆固醇	(91)
实验5 磷钨酸还原法测定血清尿酸	(94)
实验6 胆红素氧化酶法测定血清总胆红素和结合胆 红素	(97)
实验7 重氮法测定血清总胆红素和结合胆红素	(101)
实验8 酶比色法测定总胆汁酸	(103)
实验9 磷酸苯二钠比色法测定血清碱性磷酸酶	(107)
实验10 赖氏法测定血清丙氨酸氨基转移酶	(110)
实验11 肌氨酸氧化酶法测定血清肌酐	(116)
实验12 肌酸显色法测定血清肌酸激酶	(119)
实验13 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清乳酸脱氢 酶同工酶	(123)
第二章 临床分子检验实验项目	(130)
实验1 乙醛脱氢酶突变基因型的检测	(130)
实验2 肥胖因子解偶联蛋白1突变基因型的检测	(134)
实验3 蛋白质免疫印迹——Western Blot	(137)

**第一篇 生物化学与临床
生物化学检验基本技术**

第一章 实验基本操作

一、玻璃仪器的洗涤

在分析工作中，洗涤玻璃仪器不仅是一项必须做的实验前的准备工作，也是一项技术性的工作。仪器洗涤是否符合要求，对检验结果的准确和精密度均有影响。不同的分析工作有不同的仪器洗净要求，我们以一般定量化学分析为主介绍仪器的洗涤方法。

1. 洗涤剂及使用范围

最常用的洁净剂是肥皂、肥皂液（特制商品）、洗衣粉、去污粉、洗液、有机溶剂等。肥皂、肥皂液、洗衣粉、去污粉，用于可以用刷子直接刷洗的仪器，如烧杯、三角瓶、试剂瓶等；洗液多用于不便于用刷子洗刷的仪器，如滴定管、移液管、容量瓶、蒸馏器等特殊形状的仪器，也用于洗涤长久不用的杯皿器具和刷子刷不下的结垢。

2. 洗涤液的制备及使用注意事项

洗涤液简称洗液，根据不同的要求有各种不同的洗液。将较常用的几种介绍如下：

(1) 强酸氧化剂洗液。强酸氧化剂洗液用重铬酸甲 ($K_2Cr_2O_7$) 和浓硫酸 (H_2SO_4) 配成。 $K_2Cr_2O_7$ 在酸性溶液中有很强的氧化能力，但对玻璃仪器少有侵蚀作用，在实验室内使用广泛。其配制浓度各有不同，5% ~ 12% 的各种浓度都有，使用时要注意不能溅到身上，以防“烧”破衣服和损伤皮肤。洗液倒入要洗的仪器中，应使仪器内壁全浸洗后稍停一会再倒回洗液瓶；第一次用少量水冲洗刚浸洗过的仪器后，废水不要倒在水池里和下水道里，长久会腐蚀水池和下水道，应倒在废液缸中，缸满后倒在垃圾里，若无废液缸，倒入水池时，要边倒边用大量的水冲洗。

(2) 碱性洗液。碱性洗液用于洗涤有油污物的仪器，用此洗液时，采用长时间（24 小时以上）浸泡法，或者浸煮法。从碱洗液中捞取仪器时，要戴乳胶

手套，以免烧伤皮肤。常用的碱洗液有：碳酸钠液（ Na_2CO_3 ，纯碱）、碳酸氢钠（ Na_2HCO_3 ，小苏打）、磷酸钠液（ Na_3PO_4 ，磷酸三钠）、磷酸氢二钠液（ Na_2HPO_4 ）等。

(3) 纯酸纯碱洗液。根据器皿污垢的性质，直接用浓盐酸（ HCl ）或浓硫酸（ H_2SO_4 ）、浓硝酸（ HNO_3 ）浸泡。纯碱洗液多采用 10% 以上的浓烧碱（ NaOH ）、氢氧化钾（ KOH ）或碳酸钠（ Na_2CO_3 ）液浸泡。

(4) 有机溶剂。带有脂肪性污物的器皿，可以用汽油、甲苯、二甲苯、丙酮、酒精、三氯甲烷、乙醚等有机溶剂擦洗或浸泡。一般多用于无法使用刷子的小件或特殊形状的仪器洗涤，如活塞内孔、移液管尖头、滴定管尖头、滴定管活塞孔、滴管、小瓶等。

3. 洗涤玻璃仪器的步骤与要求

(1) 常用法。洗涤仪器先用自来水洗刷至无污物，再用毛刷蘸取去污剂洗刷，然后用自来水彻底洗净后，用去离子水刷洗 2 次，烘干备用。若是计量仪器，晾干即可。要注意洗净的玻璃仪器内外壁水流线不会成条，否则重洗。

(2) 玻璃仪器的干燥。做实验经常要用到的仪器应在每次实验完毕后洗净干燥备用。常用干燥法有：①晾干：不急用的仪器，可在用蒸馏水冲洗后在无尘处倒置控去水分，然后让其自然干燥。可用安有木钉的架子或带有透气孔的玻璃柜放置仪器；②烘干：洗净的仪器控去水分，放在烘箱内烘干，烘箱温度为 $105^\circ\text{C} \sim 110^\circ\text{C}$ ，烘 1 小时左右；③热（冷）风吹干：对于急于干燥的仪器或不适于放入烘箱的较大的仪器可用热（冷）风吹干的办法吹干。通常用少量乙醇、丙酮（或最后再用乙醚）倒入已控去水分的仪器中摇洗，然后用电吹风机吹，开始用冷风吹 1~2 分钟，当大部分溶剂挥发后，再吹入热风至其完全干燥，再用冷风吹去残余蒸汽，不使其又冷凝在容器内。

二、溶液混匀法

容器中先后加入的几种试剂能否充分混匀往往是实验成败的关键之一，溶液混匀的方法有以下几种：

1. 旋转法

右手掌心顶住试管口，五指拿紧试管，利用腕力使试管向同一个方向做圆周运动，使试管内液体形成旋涡而混匀。该法适用于试管中液体较多或小口器皿。

2. 甩动法

右手持试管上部，将试管轻轻甩动振摇即可混匀，此法适用于液体较少时。

3. 弹敲法

右手持试管上部，将试管的下部在左手掌心弹敲。

4. 吸管混匀法

用清洁吸管将溶液反复吸放数次，使溶液充分混匀。成倍稀释某种液体时往往采取此法。

5. 用震荡器混匀

将需要混合的液体装入试管内，手持试管放在震荡器的工作台上即可混匀。

三、微量移液器的使用

微量移液器的种类根据提取容量的不同有 1000 μ L、500 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、5 μ L、2 μ L、1 μ L 等种类。

1. 使用方法

调到需要的量程，装上枪头，然后手握住枪柄，大拇指按住上面的按钮至第一档位，枪头插入试剂液面下，轻轻松开拇指按钮，移出试剂，把枪头插入要加入试剂的管子，拇指按下枪头。为了把枪头里面的试剂残留都打出去，拇指要用力按至第二档位。用过的枪头如果不用了，可以用拇指按住枪顶端的另一个按钮，把枪头打掉，打到废液缸里。

2. 注意事项

- (1) 吸液时，按到第一个档位即可，不要太用力，以免按到第二档位。
- (2) 如果是酶等比较贵的试剂，只需轻轻接触液面即可，以防止枪头潜入过深，粘上多余液体。
- (3) 使用完毕，把枪调到最大量程，这样有利于枪的保养。
- (4) 吸取具有腐蚀性溶液，不可过快吸取，以防止溶液涌进枪内腐蚀枪。
- (5) 不可超量程使用，量程过大、过小都不行，会影响准确性。

第二章 离心机的原理及使用

离心机是借助离心力分离液相非均一体系的仪器，根据物质的沉降系数、质量、密度等的不同，应用强大的离心力使物质分离、浓缩和提纯。离心机转速在 6000r/min 以下的称为低速离心机，转速在 6000 ~ 20000r/min 以内的称为高速离心机，转速在 20000r/min 以上的称为超速离心机。离心技术，是分离、纯化细胞、病毒、蛋白、核酸和酶的最方便有效的工具。

一、离心原理

离心技术是利用离心机转子高速旋转产生的强大离心力，加快液体中颗粒的沉降速度，把样品中不同沉降系数和浮力密度的物质分离开。离心力 (F) 的大小取决于离心转头的角速度 (ω , r/min) 和物质颗粒距离心轴的距离 (r , cm)。它们的关系是： $F = \omega^2 R$ 。

二、离心方法

1. 差速离心法

这种方法是选择不同转速的离心机，分离各个不同组分的方法。例如，先用低速沉降大颗粒和上清液，再高速离心上清沉降中等颗粒，最后超速离心上清沉降小颗粒。采用逐级提高离心力分离上清液的方法，把不同大小的颗粒分开，这种方法简单、方便。分离的组分沉到管底，可以迅速浓缩所要的组分，减少体积。但回收率和纯度是有矛盾的，要提高回收率，势必提高转速或延长离心时间，这样大小相近的颗粒也会沉到管底。因此，该法多用于粗提纯或初步浓缩样品。

2. 速度区带（或速度梯度）离心法

这种方法是將样品放在一个连续的密度梯度液体上，通过离心，大颗粒沉降快，小颗粒沉降慢。经过一段时间，相同的颗粒就在同一深度形成一条带子，因此可以把各种组分分离开。这种方法适用于分离密度相同而大小不同的物质，如不同的蛋白质组分密度都差不多，但分子量不一样，用本法很容易将其分开；

但对密度不同、大小类似的物质则不易分离。

三、离心机使用注意事项

(1) 离心机在运转时，不得移动。

(2) 安放离心机的地面应坚实平整，用两只调平螺杆调节，使离心机与地面接触和均匀受力，以免产生振动。

(3) 离心管加液应称量平衡，若加液差异过大运转时会产生大的振动，此时应停机检查，使加液符合要求，离心试管必须成偶数对称放入。

(4) 若运行时有离心试管破裂，会引起较大振动，应立即停机处理。

(5) 每次停机后再开机的时间间隔不得少于 5 分钟，以免压缩机堵转而损坏。

(6) 每次离心工作完成后，必须将转子取出，否则长时间放在轴上，可能锈死，因转子取不出而造成离心机整机报废。

(7) 电源必须有接地线。

(8) 本机转子使用寿命为三年，过期应更换转子。

(9) 所有转子不能超过其最高转速使用。

第三章 分光光度技术

利用各种化学物质（原子、基团、分子及高分子化合物）所具有的发射光、吸收光或散射光光谱谱系的特征来确定其性质、结构及含量的技术，称为分光光度技术或分光光度法。此项技术广泛应用于各个学科领域，在生物化学与分子生物学领域内，尤其是对物质的定性及定量测定，更是一项不可少的重要技术手段。本章主要介绍吸收光谱分析技术。

一、分光光度技术的基本原理

1. 光的基本知识

光是由光子组成的，一束光就是大量光子的聚集。光具有二重性，即连续的波动性和不连续的微粒性。

光的波动性体现为波长和频率，其关系可用下式表示：

$$\lambda = c/\nu$$

式中， λ 为波长， c 为光速， ν 为频率。上式表明：光的波长与频率成反比。波长越短，频率越高；波长越长，则频率越低。

光的微粒性是以光子的能量为特征的。光子的能量与光的波长成反比，而与频率成正比，即不同波长与频率的光具有不同的能量。

光属于电磁波。自然界中的电磁波由不同性质的连续波长的光谱所组成。人的眼睛所能感觉到的光的波长是 400nm 的紫色光到 760nm 的红色光，在这段波长以外的光不能为肉眼所见。因此，将 400 ~ 760nm 之间的光波称为可见光；200 ~ 400nm 为紫外线，短于 200nm 为远紫外线，长于 760nm 为红外线。分光光度法所使用的光谱范围一般在 200 ~ 10000nm 之间，但对生物化学和分子生物学来说，使用最多的波长区域是可见光和紫外光。

2. 发射光谱与吸收光谱

(1) 发射光谱。发光体发出的光通过三棱镜后所表现出的光谱称为发射光谱。发光体可以是日光灯、氢灯、钨灯等，也可以是原子与分子燃烧时所发出的光。不同的发光体各有其独特的发射光谱，根据发射光谱可以鉴别发光体的

性质及组分，也可以采用不同发射光谱的发光体作为仪器的光源，例如，使用钨灯作为可见光区分光光度计的光源，氢灯作为紫外光区分光光度计的光源。

(2) 吸收光谱。当一定光源所产生的发射光透过含有某种物质的溶液时，其光谱会发生改变。某些波长的光因被溶液中的物质所吸收而消失了，此时的光谱即为该物质的吸收光谱。

物质的吸收光谱与其结构、性质有关。不同物质由于其分子结构不同，对不同波长的光的吸收能力也不相同，每种物质都有其独特的吸收光谱。溶液对单色光吸收能力的强弱与其物质浓度有关。因此，利用吸收光谱可以对不同物质进行定性和定量分析，其理论依据是朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律。

3. 朗伯 - 比尔定律

朗伯 - 比尔定律是比色分析的基本原理。

Lambert 定律：当一束单色光透过有色溶液之后，由于溶液吸收了一部分光线，透过光的强度就要减弱。当溶液浓度不变时，透过的液层越厚，光线强度的减弱越显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光强度)，通过液层厚度为 L 的溶液后，光线的强度减弱为 I (透射光强度) (见图 1-1)，则： I/I_0 表示光线透过溶液的程度，称为透光度 (Transmittance)，用“ T ”表示。

$$T = \frac{I}{I_0}$$

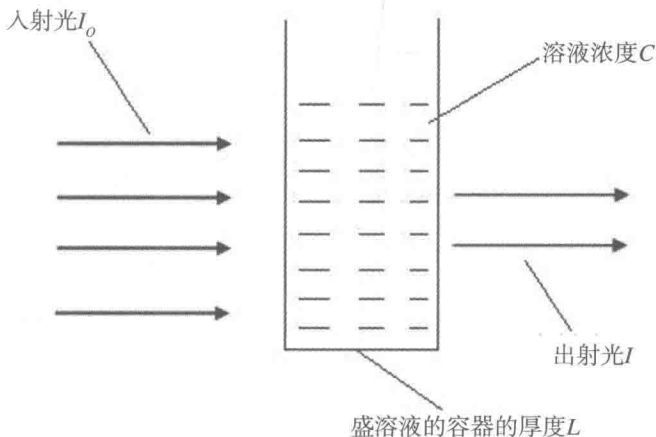


图 1-3-1 溶液对光的吸收

T 的数值一般小于 1, 只有溶液完全不吸收时, T 才等于 1。 T 随溶液厚度的增加而减小。但实践证明, T 与溶液厚度之间并不存在简单的定量关系, 只有 T 的负对数 ($-\lg T$) 才随溶液厚度的增加而成正比例地增加。即:

$$-\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I} \propto L$$

写成等式则为: $\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L$

式中 $\lg \frac{I_0}{I}$ 称为吸光度 (Absorbance), 用字母 “ A ” 表示。吸光度 (A) 也被称为消光度 (E) 或光密度 (OD)。整理上式得式①:

$$A = K_1 L \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

由①式可知, 当溶液的浓度 C 不变时, 吸光度 A 与溶液液层的厚度 L 成正比。 K_1 为比例系数, 表示物质对光的吸收特性, 其值与溶液的性质、浓度、入射光的波长以及溶液的温度有关。这就是 Lambert 定律。

Beer 定律: 当一束单色光透过有色溶液之后, 当溶液液层的厚度不变而浓度不同时, 溶液的浓度越大, 则透过光的强度越弱。其间的定量关系推导同上, 则有:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C$$

$$A = K_2 C \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

在②式中, C 为有色溶液的浓度, K_2 为比例系数, 受入射光的波长、溶液的性质、液层厚度及溶液温度的影响。因此, Beer 定律的意义是: 当溶液液层的厚度 L 不变时, 吸光度 A 与溶液的浓度 C 成正比。

如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 则将上述①、②式合并起来, 就得到 Lamber - Beer 定律, 即吸光度 A 与溶液的浓度 C 和液层的厚度 L 的乘积成正比, 用③式表示。

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL$$

$$A = KCL \dots\dots\dots \textcircled{3}$$

③式中 L 的单位用 cm 表示, C 的单位用 g/L 表示, 则 K 称为吸光系数, 其值大小取决于入射光的波长、溶液的性质和温度, 而与光的强度、溶液浓度及液层厚度无关。