

临床检验操作技术系列丛书

LINCHUANG JIANYAN CAOZUO
JISHU XILIE CONGSHU

梁淑新 施俊英/主编

生物化学

检验分册

SHENGWU HUAXUE
JIANYAN FENCE



军事医学科学出版社

· 临床检验操作技术系列丛书 ·

生物化学检验分册

主 编 梁淑新 施俊英

副主编 王淑仙 陈玉兰

齐村生 胡凤萍

编 委 石杏柳 陈树涛

田敬茹 王建国

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

临床检验操作技术系列丛书——生物化学检验分册/梁淑新,施俊英主编.

-北京:军事医学科学出版社,2006.12

ISBN 978-7-80121-881-0

I. 生… II. ①梁… ②施… III. 生物检验-手册 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 101775 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)63801284

63800294

编辑部:(010)66884418,66884402 转 6210,6213,6216

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmsp.cn>

印 装:廊坊市金盛源印务有限公司

发 行:新华书店

开 本:850mm×1168mm 1/32

印 张:8.5

字 数:216 千字

版 次:2007 年 4 月第 1 版

印 次:2007 年 4 月第 1 次

定 价:17.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

内 容 提 要

本书共分十三章,首先对自动生化分析仪应用基础知识作了详细介绍;对检测项目的方法学进行了介绍,对生物化学检测项目的临床意义做了详细说明,并附加了一些临床小经验,供临床检验工作者及检验系学生参考。

《临床检验操作技术系列丛书》编委会

总 主 编 宋卫青

副总主编 (以姓氏笔画为序)

于修文 于维林 丑广程

朱召明 孙明强 李世荣

李 慧 吴振军 辛苏宁

陈占良 施俊英 赵 超

徐 力 梁 冰 梁淑新

《临床检验操作技术系列丛书》

总前言

临床检验医学目前正以日新月异的速度飞快发展,新技术、新方法、新仪器不断推出。各医疗卫生单位的医学检验部门在疾病的诊疗方面发挥着举足轻重的作用,特别是电子计算机技术及生物医学工程技术的发展与应用,更促进了许多新的医学检验项目的应运而生,而大量的检验数据的复杂处理也带动了医学检验信息管理系统的发展与运用,从而将检验医学推向了一个新的阶段。

为了进一步推进各医疗单位的医学检验技术的发展,规范临床检验操作,提高各医疗单位对临床医学实验室的管理水平,使各级各类临床实验室实现又好又快的发展,我们组织专家编写了《临床检验操作技术系列丛书》,本书包括七个分册,分别为质量管理、体液与脱落细胞检验、微生物学检验、生物化学检验、血液学检验、免疫学检验、分子生物学检验与新技术分册。各分册的内容均以比较成熟并得到公认的临床检验技术为主,同时增加了许多新的方法和技术。本丛书的编写着重于实用性与先进性兼顾,法规性与参考性并存,力求文字简明,表达准确,便于掌握。但由于篇幅较大,编著人员较多,内容与行文风格难免有不协调之处,希望各单位的检验工作者多提宝贵意见,以便再版时修正。

本丛书的编者均为从事临床一线检验工作的中青年专家,他

们基础知识扎实,经验丰富,专业技术熟练,该丛书是他们多年来辛勤劳动的结晶。在本丛书的编著过程中,得到多方面的关心和支持,在此一并表示感谢!

宋卫青

2007 年 1 月 12 日

前 言

随着医学科技的飞速发展,生化常规检测已从传统手工转入半自动或全自动生化仪检测,尤其是全自动生化分析仪,大大提高了临床化学的工作效率。如何使仪器发挥出最大的效能,对检验工作者有着较高的技术素质要求,要对仪器的操作、参数的设置有深入的了解。随着医学检验到检验医学的转变,作为一名检验工作者,要意识到不仅仅是及时地为临床提供准确的结果,还要对检测结果提供咨询服务,在实验选择、结果解释上对临床提出指导性意见。因此,本书首先对自动生化分析仪应用到的理论知识进行了详细地讲解;书中除了对检测项目的方法学进行介绍外,对检测项目的临床意义也作了详细介绍,并附有一些临床小经验。该书适用于检验工作者及检验系学生。由于作者水平有限,难免存在不妥之处,请同仁批评指正。

编者

2006年7月15日

目 录

第一章 基础知识介绍	(1)
一、光谱光度分析基本原理	(1)
二、酶促反应的动力学	(2)
三、酶法分析非酶物质的基本理论	(7)
四、免疫透射比浊法的基本原理	(11)
第二章 全自动生化分析仪参数设置	(13)
一、试剂盒的分类	(13)
二、生化试剂应用中注意的问题	(14)
三、试剂空白(吸光度)的核对	(17)
四、校正核查	(18)
五、样品体积分数	(19)
六、波长的选择	(21)
七、反应时间的设置	(28)
八、底物耗尽	(29)
九、前带分析	(32)
第三章 糖类测定	(35)
一、血清葡萄糖测定	(35)
二、葡萄糖耐量试验	(42)
三、脑脊液葡萄糖测定	(44)
第四章 血脂、脂蛋白、载脂蛋白测定	(45)
一、血清总胆固醇(TC)的测定	(46)
二、血清甘油三酯(TG)的测定	(49)
三、血浆脂蛋白简介	(54)
四、血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定	(55)

五、血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL - C)测定	(57)
六、血清载脂蛋白测定	(60)
七、血清脂蛋白(a)测定	(64)
第五章 血清蛋白质测定	(67)
一、血清总蛋白双缩脲法测定	(67)
二、血清白蛋白溴甲酚绿法测定	(70)
三、血清蛋白电泳	(74)
第六章 肝功能检测	(87)
一、血清总胆红素测定(T - BIL)	(87)
二、血清直接胆红素测定(D - BIL)	(100)
三、血清总胆汁酸的测定	(104)
第七章 血清酶类测定	(108)
一、血清丙氨酸氨基转移酶测定	(108)
二、血清天门冬氨酸氨基转移酶测定	(117)
三、血清乳酸脱氢酶测定	(122)
四、血清碱性磷酸酶测定	(126)
五、血清L - γ - 谷氨酰基转移酶测定	(130)
六、血清肌酸磷酸激酶同工酶测定	(133)
七、血清肌酸磷酸激酶测定	(135)
八、血清 α - 羟丁酸脱氢酶测定	(138)
九、血清胆碱酯酶的测定	(140)
十、淀粉酶测定	(142)
第八章 肾功能检测	(149)
一、血清尿素测定	(149)
二、血清肌酐测定	(152)
三、血清尿酸测定	(158)
第九章 电解质的测定	(162)
一、钾钠测定	(162)
二、氯化物测定	(169)

三、血浆(清)碳酸氢根测定	(175)
四、血清总钙测定	(179)
五、血清无机磷(P)测定	(183)
六、血清镁(Mg)测定	(187)
第十章 免疫比浊法的免疫学检验	(192)
一、免疫球蛋白测定	(192)
二、血清补体 C ₃ 、C ₄ 测定	(197)
三、抗链球菌溶血素 O 测定	(199)
四、类风湿因子测定	(201)
五、C 反应蛋白测定	(202)
第十一章 酸碱平衡与血气分析	(205)
一、气体在血液中的运输	(205)
二、血气分析的测定原理及方法	(212)
三、血气分析常用指标与参数	(220)
四、酸碱平衡紊乱的分类及判断	(226)
第十二章 临床化学检验的质量控制	(234)
一、室内质量控制	(234)
二、室间质量评价基础知识简介	(245)
第十三章 干化学分析仪	(250)
一、基本原理	(250)
二、质量控制	(253)
三、干化学分析仪器的操作及维护保养	(254)
参考文献	(260)

>>>第一章

基础知识介绍

一、光谱光度分析基本原理

具有不同分子结构的物质,对光谱有选择吸收的特性,吸收光谱的范围可在可见光区域,也可在紫外光或红外光区域。如对可见光(400 ~ 760 nm)具有选择性吸收,则呈现一定颜色,有色物质溶液浓度越高,对光吸收越强,颜色也越深。以可见光为光源,通过比较溶液的深浅来测定物质浓度的方法称为比色法;若用波长小于 400 nm 的紫外光源测定无色物质的方法称为紫外分光光度法,其选择性和灵敏度均高于比色法。临床诊断试剂盒基本上都采用这两种方法。

当光线通过某一物质时,物质的原子或分子吸收了入射的辐射能,价电子发生跃迁而产生分子吸收光谱。不同物质分子各有特异的分子吸收光谱。物质的吸光特性符合 Lambert - Beer 定律。

Lambert - Beer 定律可用下式表示: $A = \lg \frac{I_0}{I}$; $A = abc$

式中: A——吸光度;

I_0 ——入射光强度;

I ——出射光强度;

a ——吸光系数(即消光系数);

b ——光径,即光线通过的溶液厚度;

c ——吸光物质在溶液中的浓度。

消光系数 a 对一特定物质在特定波长时为特定值。它的定义

为“当溶液液层厚度为 1 cm, 溶液中某物质的浓度为 1 mol 时, 该物质对某波长光束的吸光度即为该物质的 mol 消光系数”。消光系数愈大, 则可测的物质浓度愈小, 灵敏度愈高。溶液浓度愈大, 所吸收的光的量也愈大, 用吸光度 A 表示 (也称光密度, 用 OD 表示)。

二、酶促反应的动力学

(一) 米氏公式

酶促反应动力学是研究酶促反应的速度以及影响此速度的各种因素。酶促动力学的基本原理可归纳为一数学公式, 称为米氏公式: $V = [V_{\max}(S)] / [K_m + (S)]$

式中 $V_{\max}$ 为最大反应速度, K_m 为米氏常数, $[S]$ 为底物浓度, V 为酶促反应速度。米氏公式表明了底物浓度与酶促反应速度间的定量关系。底物浓度是决定反应速度最重要因素之一, 由图 1-1 可说明酶促反应的速度与底物浓度的关系。

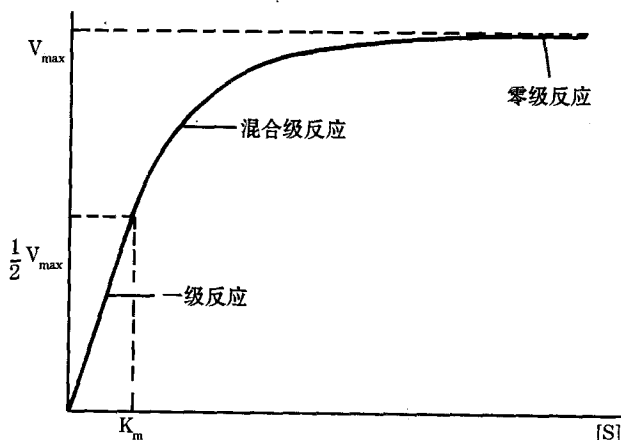


图 1-1 酶促反应速度与底物浓度的关系

当底物浓度较低时(底物浓度从0逐渐增高),反应速度与底物浓度呈正比关系,此为一级反应。随着底物浓度的增加,反应速度不再按正比升高,此为混合级反应。如果再继续加大底物浓度,反应速度不再上升,趋向一个极限,说明酶已被底物饱和。所有的酶都有此饱和现象,只是各自达到饱和所需的底物浓度不一。

(二)米氏常数 K_m

K_m 是当酶促反应速度达最大反应速度一半时的底物浓度,是酶的极重要的特征性物理常数,只与酶的性质有关,而与酶的浓度无关,它代表了酶和底物分子的亲和力大小。 K_m 值大,表示酶和底物分子间亲和力低; K_m 值小,表示两者亲和力高。 K_m 作为常数只是对一定的底物、一定的pH、一定的温度条件而言的。同一个酶有几种底物就有几个 K_m 值,其中 K_m 最小的底物称为该酶的最适底物。

(三)酶活性测定的动力学方法

由于测定酶量十分困难,目前临床上大都采用酶活性间接测定酶量。酶活性即酶促反应速度,指在规定条件下单位时间内底物的减少量或产物的生成量。只有当酶所催化的反应速度与酶浓度成正比而不受其他因素影响时,才能根据酶所催化的反应快慢来表示酶浓度的大小,这就是所谓的酶活性的最适条件,只有在最适条件下测得酶活性的大小才能真实代表酶含量的多少。根据米氏公式,为使酶促反应初速度基本上接近 V_{max} ,底物浓度 $[S]$ 要 $\gg K_m$,此时 $V \propto [E]$; $[E]$ 表示酶浓度。

如果要通过测定底物浓度的下降或产物浓度的上升来反映酶活性的大小则必须是酶浓度与反应产物浓度或底物浓度的变化成正比。图1-2可说明酶促反应中底物浓度 $[S]$,产物浓度 $[P]$ 及酶促反应速度 V 在不同时间的变化曲线。

由图1-2看出,在加入样品开始反应后,有几秒至几分钟的延滞期(延滞期的长短视所测对象及实验条件而定),随后即为底物或产物变化与时间成直线关系的线性期,此期反应速度是恒定

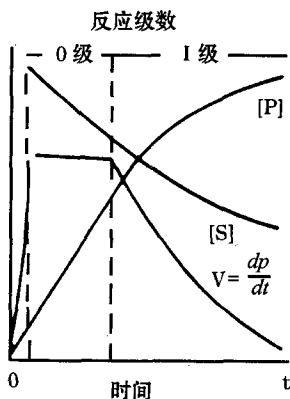


图 1-2 酶促反应中[S][P]和V在不同时间变化的模式图

的,即为酶促反应的初速度,在此期间,因[S]很高,下降量甚微,反应速度不受[S]的影响,故为零级反应(线性时间的长短也与所测对象及实验条件有关)。最后由于多种因素,例如底物浓度下降,产物蓄积,可逆反应增加,或酶本身失活等等,使反应速度下降。最后当底物耗尽时,反应就停止。

综上所述,在测定酶活性时,一定要避开延滞期和非线性期,要在线性期进行测定。测定酶活性有两种方法:固定时间法(二点法)及连续监测法(动力法)。

1. 固定时间法(二点法) 先让酶与底物固定作用一段时间后,再测定底物的消耗量或产物的生成量,这就是固定时间法(或为二点法)。

用二点法时,同样应选用酶反应的线性期进行测定,同时还应确定该法能测定酶活性的最高限度,对于超过此限度的样品,应采用缩短反应时间或减少样品用量的办法进行测定。但是二点法的缺点是无法了解整个反应过程是否在线性期,如用传统赖氏法对丙氨酸氨基转移酶(ALT)的测定。

2. 连续监测法(动力学, kinetic, rate) 酶活性的连续监测法是在酶反应最适条件下,连续监测不同反应时间内底物或产物含量的变化,从而计算出酶促反应的初速度,即酶活性的高低。在自动生化分析中均采用此法。

通过酶偶联体系测定酶活性是目前最为广泛应用的方法,即在反应体系中加入其他酶与被测酶偶联起来,常把外加的最后一个偶联酶称为指示酶,其他外加酶称为辅助酶。使用最多的是需要辅酶 I、II 的氧化还原酶类,因为还原型辅酶 I (NADH) 及还原型辅酶 II (NADPH) 在 340 nm 有强烈的光吸收,而 NAD^+ 及 NADP^+ 都没有这一特性,因而可通过测量 340 nm 处吸光值的变化来监测 NADH 及 NAD^+ 的含量变化,从而获得测定酶的酶活性。如图 1-3 用液体双试剂速率法对 ALT 的测定,监测物质为 NADH,反应方向向下,说明底物中有 NADH。而 LDH 测定,监测物质也为 NADH,但反应方向向上,说明底物中有 NAD^+ 。

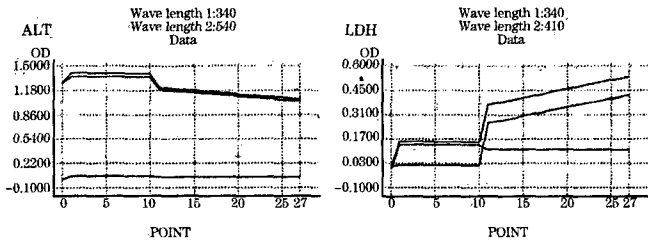


图 1-3 ALT、LDH 反应曲线

另一种连续监测法是利用“色素原”底物,即底物本身无色,经酶作用后成为有色物,从而可通过监测生成物含量的变化间接得到测定酶的酶活性。如图 1-4 用液体双试剂速率法对碱性磷酸酶测定,反应方向向上。其利用碱性磷酸酶催化对硝基苯酚磷酸酯(无色色原)水解生成对硝基苯酚(黄色色原),测定 405 nm 波长光吸收的变化。

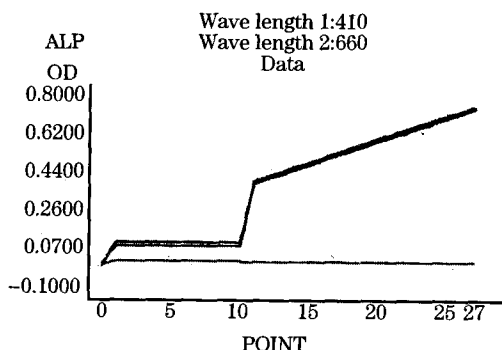


图 1-4 ALP 反应曲线

(四) 酶的活力单位

酶活力高低用酶活力单位表示,酶活力单位是一个人为规定的单位,有惯用单位,国际单位和 Katal 单位,目前在临床常规使用的是国际单位。1976 年国际生化学会酶学委员会规定:1 个酶活力单位 (enzyme - activity unit) 即一个国际单位,用 U 表示,是指在特定条件下,在 1 分钟内能转化 1 μmol 底物所需的酶量,温度选定为 37℃,其他条件如 pH、底物浓度等均采用最适条件。国际单位本身不含有体积的术语,但在临床化学中需要表示出原样品 (如血清、尿液等) 中酶活性的浓度,就必需加用适当的体积术语,常用万单位/L。测定酶活性的大小与测定方法有密切关系。用不同方法测定同一酶的结果不可进行比较,因而对酶活性测定也要标准化和质量控制。

酶活力的计算:

$$\text{酶活力 (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times V_t \times 1\,000}{e \times V_s \times d} = \Delta A/\text{min} \times F$$

式中: $\Delta A/\text{min}$ ——每分钟吸光度变化率;

e ——所监测物质毫摩尔吸光系数;