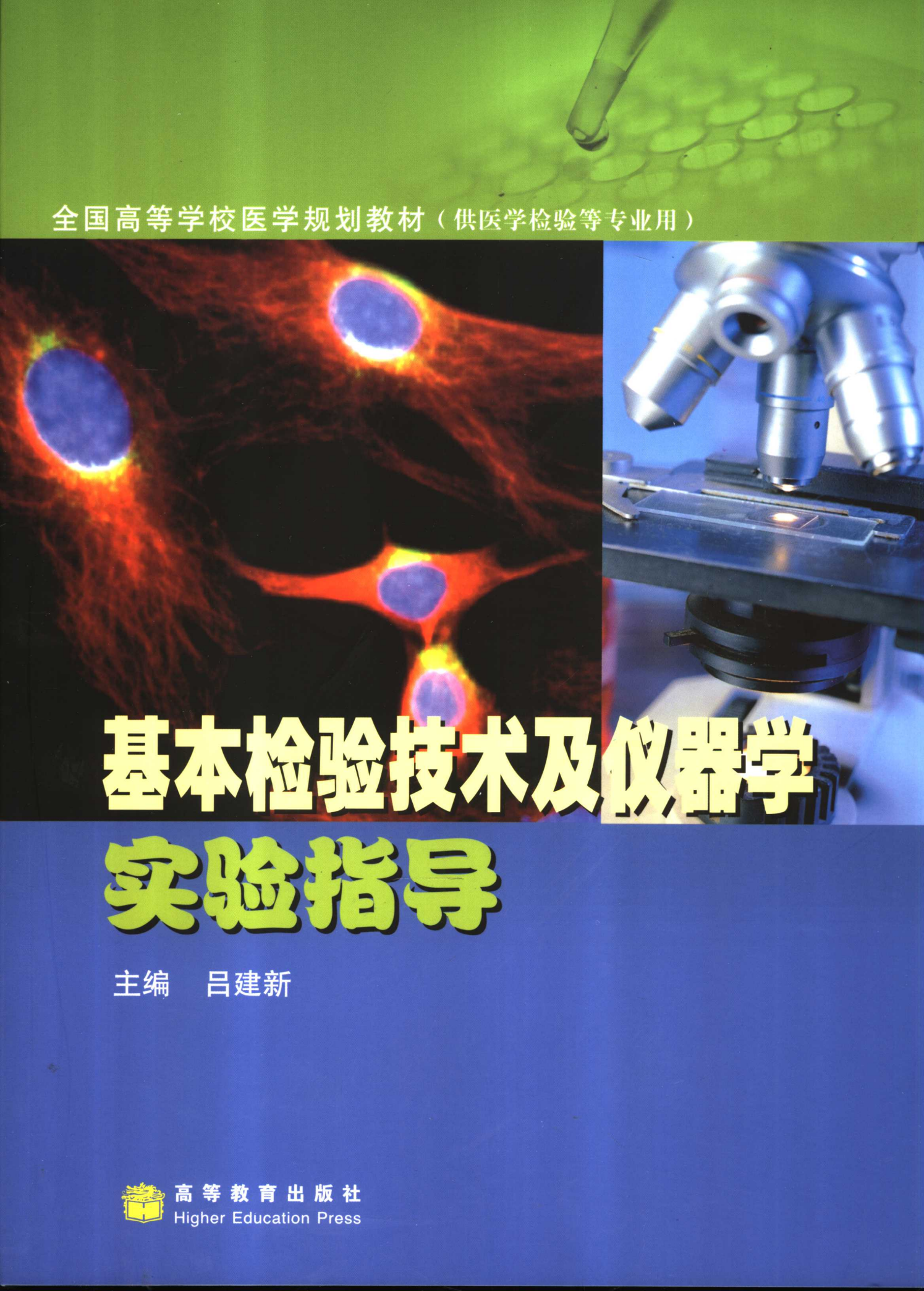




全国高等学校医学规划教材（供医学检验等专业用）

基本检验技术及仪器学 实验指导

主编 吕建新



高等教育出版社
Higher Education Press

全国高等学校医学规划教材

(供医学检验等专业用)

基本检验技术及仪器学 实验指导

主 编 吕建新



高等教育出版社

Higher Education Press

内容简介

《基本检验技术及仪器学实验指导》内容包括医学检验、卫生检验专业学生必须掌握的最常用、最基本的检验技术,同时也包括适应现代检验专业学科发展需要的仪器学理论知识、应用技能及质量控制等内容。

本教材理论联系实际,偏重于应用,强调“实用性”。既有目前在绝大多数院校广泛开展、在卫生单位也普遍应用的基础实验,也有综合性、设计性实验。实验指导突出检验基本技术和仪器学知识的掌握和应用,重视实验操作基本功和专业技能训练,培养学生应用所学知识解决实际问题的能力。为了加强教材的指导性,在实验操作步骤后有注释,说明该步操作的理由、注意事项、经验心得等,使此实验指导更具可操作性,老师上课好教、学生好学,达到更佳的教学效果。

本书可作为高等医药院校医学检验及相关专业学生的教材,同时也可作为临床医学本科生、研究生、临床检验工作者、医学专业研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基本检验技术及仪器学实验指导/吕建新主编. —北京:
高等教育出版社,2006.12
ISBN 7-04-020240-9

I. 基... II. 吕... III. ①医学检验—医学院校—
教学参考资料②医学检验—医疗器械—医学院校—教学
参考资料 IV. ①R446②TH776

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 146074 号

策划编辑	刘晋秦	责任编辑	刘晋秦	封面设计	张楠	责任绘图	朱静
版式设计	张岚	责任校对	殷然	责任印制	宋克学		

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 北京凌奇印刷有限责任公司

开本 850×1168 1/16
印张 10
字数 300 000
插页 1

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 19.00 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 20240-00

《基本检验技术及仪器学实验指导》编写委员会

(以姓氏笔画为序)

兰小鹏	南京军区福州总医院
吕建新	温州医学院
孙桂荣	青岛大学医学院
李 兴	贵阳医学院
李 勇	山东大学医学院
李 霞	武汉大学医学院
何於娟	重庆医科大学
杨晓静	山东大学医学院
邹全明	第三军医大学
邹立林	温州医学院
倪安平	中国协和医科大学
翁亚光	重庆医科大学
黄新祥	江苏大学医学技术学院
曹建明	温州医学院
盖立平	大连医科大学
梁茂植	四川大学华西临床医学院
揭新明	广东医学院

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。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,编写出版了这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(供医学检验等专业用)编写指导小组

2006年9月

前 言

《基本检验技术及仪器学》是一门实践性很强的学科,《基本检验技术及仪器学实验指导》是其配套实验教材,内容包括医学检验、卫生检验专业学生必须掌握的最常用、最基本的检验技术,同时也包括适应现代检验专业学科发展需要的仪器学理论知识、应用技能及质量控制等内容。

该教材有以下特色:

1. 理论联系实际,偏重于应用,强调“实用性”。既有目前在绝大多数院校广泛开展在卫生单位也普遍应用的基础实验,也有综合性、设计性实验。实验指导突出检验基本技术和仪器学知识的掌握和应用,重视实验操作基本功和专业技能训练,培养学生应用所学知识解决实际问题的能力。

2. 指导性强。实验操作步骤后有注释,说明该步骤操作的理由、注意事项、经验心得等,以使此实验指导更具可操作性,老师上课好教、学生好学,达到更佳的教学效果。

3. 树立精品意识,保证质量。实验指导论述严谨、语言流畅简洁、层次分明,医学术语和法定计量单位使用规范。

目前国内检验专业还未开设《检验基本技术及仪器学》这门课程,相关的理论知识和实验技能分布在多门课程之中,较为分散,不够系统。开设这门课程,有助于学生提高学生动手能力,更加全面、系统、扎实地掌握检验基本技能。

参加本书编写的人员多为长期从事教学工作的教授,他们积累了丰富的教学心得和实践经验,建立了规范的实践教学体系,在此向他们深表谢意!本教材是初版,加之编写时间仓促,内容上有疏漏或不当之处,敬请使用该书的教师和学生批评指正。

吕建新

2006年6月

目 录

实验 1	0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液 配制.....	1	实验 20	气相色谱法定量测定血浆 中丙戊酸浓度	42
实验 2	不同纯度水的质量检测	4	实验 21	高效液相色谱 - 紫外法同 时测定血浆苯妥英、苯巴 比妥和卡马西平浓度.....	44
实验 3	尿红细胞形态学检查.....	6	实验 22	高效液相色谱 - 电化学法 测定血浆中内源性儿茶酚 胺浓度	47
实验 4	抗核抗体检查	8	实验 23	高效毛细管电泳法测定血 中环孢素 A 浓度(示教)	50
实验 5	人红白血病 K562 细胞的传 代培养	11	实验 24	高效液相色谱法/质谱联用 法同时测定全血中普乐可 复、雷帕霉素和环孢素 A 浓 度(示教)	52
实验 6	人红白血病 K562 细胞的瑞 氏染色	13	实验 25	生化自动分析	55
实验 7	人红白血病 K562 细胞的血 红蛋白染色.....	15	实验 26	白细胞中线粒体 DNA 的 提取	57
实验 8	染色体制备技术	17	实验 27	超速离心法分离血浆脂 蛋白	59
实验 9	721 型分光光度计主要性能 指标的检查.....	19	实验 28	血清蛋白质的醋酸纤维 薄膜电泳	61
实验 10	邻二氮菲分光光度法测定 微量铁	21	实验 29	等电聚焦电泳测定蛋白 质等电点	64
实验 11	高吸光度差示分析法测定 铁含量	23	实验 30	SDS - PAGE 测定蛋白质 相对分子量	67
实验 12	紫外分光光度法测定血清 蛋白质含量	25	实验 31	Western blot 检测 bcl - 2 蛋白	72
实验 13	紫外分光光度法测定苯酚 共存时苯甲酸含量.....	27	实验 32	阳极溶出伏安法测定铜	76
实验 14	原子吸收分光光度法测定 人发锌含量	29	实验 33	离子选择电极法测定氟 离子	79
实验 15	荧光法测定维生素 B ₂	31	实验 34	动脉血血气分析	82
实验 16	凝胶过滤法分离高铁血红 蛋白	33	实验 35	酶联免疫吸附法测定乙 型肝炎病毒表面抗原.....	85
实验 17	薄层色谱法分离、鉴定氨 基酸	36			
实验 18	薄层色谱法分离、鉴定生 物碱成分	38			
实验 19	气相色谱法分离鉴定苯、 甲苯和环己烷	40			

实验 36	放射免疫法测定胰岛素	87	实验 48	乙型肝炎病毒(HBV)DNA 实时定量检测	120
实验 37	免疫放射法测定新生儿 促甲状腺激素	89	实验 49	PBMC 中分离 RNA	123
实验 38	间接免疫荧光法检测抗双 链 DNA(dsDNA)	91	实验 50	RT-PCR-酶联夹心杂交 法检测人 TNF α mRNA	126
实验 39	间接免疫荧光法检测抗中 性粒细胞胞质抗体(ANCA) ...	93	实验 51	氨基糖苷类抗生素致聋的 基因诊断	129
实验 40	化学发光法测定甲状腺素	95	实验 52	用反向点杂法进行 β -地中 海贫血基因诊断	134
实验 41	化学发光免疫技术测定 甲胎蛋白	98	附录一	《基本检验技术实验指导》 常用试剂的配制	138
实验 42	时间分辨荧光免疫法测 定肽类激素(胰岛素)	101	附录二	常见蛋白质等电点参考值	142
实验 43	荧光偏振法测定环孢素	103	附录三	琼脂糖含量与凝胶分离 DNA 片段范围	143
实验 44	质粒 DNA 的制备	106	附录四	7502pc 型紫外可见分光光度 计的结构及基本操作	144
实验 45	质粒 DNA 的限制性内切 酶酶切与重组	112	附录五	如何撰写实验报告	146
实验 46	重组质粒 DNA 转化	115		彩图	
实验 47	聚合酶链反应扩增目的 DNA	118			

实验 1 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液配制

【目的】

掌握磷酸盐缓冲液的配制方法。

【原理】

能抵抗外加少量酸(或碱)而保持其本身 pH 基本不变的溶液叫缓冲溶液。缓冲溶液的抗酸、抗碱作用叫缓冲作用,组成缓冲溶液的物质叫缓冲体系。缓冲溶液的缓冲作用是由于缓冲体系中含有大量抗碱成分(共轭酸)和抗酸成分(共轭碱),如:HAC - NaAC, $\text{NH}_4\text{Cl} - \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{H}_2\text{CO}_3 - \text{NaHCO}_3$ 。抗酸抗碱能力可用缓冲容量 $\beta = \frac{\Delta n}{V|\Delta \text{pH}|}$ 来衡量,而缓冲溶液的 pH 可用 Henderson - Hasselbalch 方程式计算,即:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \lg \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{共轭酸}]}$$

例如,在 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液中存在着离解平衡:



(足量共轭酸,主要来自 NaH_2PO_4)

(足量共轭碱,主要来自 Na_2HPO_4)

HPO_4^{2-} 是抗酸成分,通过平衡左移能对抗外加酸的影响; H_2PO_4^- 是抗碱成分,通过平衡右移能对抗外加碱的影响。

根据 Henderson - Hasselbalch 方程式, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液的 pH 可由下式计算:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \lg \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

式中 pKa 为 H_3PO_4 的 pKa_2 。

【试剂与器材】

1. 试剂

- (1) 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4 , A. R.)。
- (2) 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, A. R.)。
- (3) 去离子水或双蒸水。

2. 器材

- (1) 天平。
- (2) 烧杯。
- (3) 量筒。
- (4) 容量瓶。
- (5) 玻璃棒。
- (6) 试管。
- (7) 0.5 mL、1 mL、2 mL 奥氏吸量管。
- (8) 5 mL、10 mL、25 mL 移液管。
- (9) 10 mL 刻度吸量管等。

【操作步骤】

配制时,常先配制 0.067(1/15) mol/L 的磷酸氢二钠溶液和 0.067(1/15) mol/L 的磷酸二氢钾溶液,

两者按一定比例混合即成 $0.067(1/15)\text{ mol/L}$ 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PB), 根据需要可配制不同 pH 的 PB。

1. $0.067(1/15)\text{ mol/L}$ 磷酸氢二钠溶液的配制 用天平称取无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 9.47 g (或者 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.87 g 或者 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.87 g) 置烧杯中, 用量筒量取适量蒸馏水充分溶解后, 倾入 $1\,000\text{ mL}$ 容量瓶内, 再加少量蒸馏水清洗烧杯内壁后亦转入容量瓶内, 再加蒸馏水稀释至容量瓶刻度 ($1\,000\text{ mL}$), 盖上塞子, 倒转混匀。磷酸氢二钠固体试剂应呈粉末状, 无结晶块; 配制试剂用水应用新鲜的去离子水或双蒸馏水; 溶液可用旋转混匀法、玻棒搅动法、指弹混匀法、吸量管混匀法、倒转混匀法、甩动混匀法、电磁搅拌混匀法或振荡器混匀法等方法混匀, 可随使用的器皿和液体容量而选用, 如玻棒搅动法适用于烧杯内容物的混匀, 倒转混匀法适用于有塞量筒和容量瓶, 混匀时须防止容器内液体溅出或被污染。

2. $0.067(1/15)\text{ mol/L}$ 磷酸二氢钾溶液的配制 用天平称取磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 9.08 g 置烧杯中, 用量筒量取适量蒸馏水充分溶解混匀后, 倾入 $1\,000\text{ mL}$ 容量瓶内, 再加适量蒸馏水稀释至容量瓶刻度 ($1\,000\text{ mL}$), 盖上塞子, 倒转混匀。注意事项同步步骤 1。

3. 按表 1-1 的比例, 配制成不同 pH 的缓冲溶液。不可盲目地按一些书提供的量配制; 配制缓冲液时应在使用温度下进行; 必要时可应用 pH 计监测缓冲液的 pH; 奥氏吸量管供准确量取 0.5 mL 、 1 mL 、 2 mL 液体时用, 放液时必须吹出最后残留在吸量管尖端的液体; 移液管上只有一个刻度, 放出液体流毕后, 将吸量管尖在容器内壁上继续停留 15 s , 注意不要吹出尖端内的最后部分; 而刻度吸量管上端常标有吹字, 故欲将所量取液体全部放出时, 需将残留管尖的液体吹出。

表 1-1 $18\text{ }^\circ\text{C}$ 0.067 mol/L 磷酸二氢钾/磷酸氢二钠缓冲液的配制

pH	$0.067\text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 的体积 (mL)	$0.067\text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4$ 的体积 (mL)
5.29	2.5	97.5
5.59	5.0	95.0
5.91	10.0	90.0
6.24	20.0	80.0
6.47	30.0	70.0
6.64	40.0	60.0
6.81	50.0	50.0
6.98	60.0	40.0
7.17	70.0	30.0
7.38	80.0	20.0
7.73	90.0	10.0
8.04	95.0	5.0

【注意事项】

1. 试剂药品应有较好的质量, 试剂可分为优级纯 (保证试剂, Guaranteed reagent, G. R.)、分析试剂 (Analytical reagent, A. R.)、化学纯 (Chemical pure, C. P.) 和实验试剂 (Laboratory reagent, L. R.) 等; 试剂药品称量应精确。

2. 配制试剂所用的玻璃器皿应清洁干燥。

3. 配好后的缓冲溶液, 应立即进行除菌处理 (如: 高压灭菌、抽滤或者添加抑菌物质), 以防杂菌生长。

4. 温度的变化对一些缓冲液的 pH 影响很大, 即: $\Delta\text{pK}_a/^\circ\text{C} = -0.031$, 例如: $4\text{ }^\circ\text{C}$ 时缓冲液的 $\text{pH} = 8.4$, 则 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 时的 $\text{pH} = 7.4$, 所以配制缓冲液时一定要在使用温度下进行; 必要时可以应用 pH 计监测缓冲液的 pH, 不应盲目地按一些书提供的量配制。

5. 由于溶液容易吸收空气中的 CO_2 , 所以配制的缓冲液需盖严密封。

【方法学评价】

1. 磷酸盐缓冲液的优点

- (1) 水中高度可溶, 容易配制成各种浓度的缓冲液。
- (2) 有较高的缓冲能力, 适用的 pH 范围较宽。
- (3) pH 受温度的影响较小。
- (4) 缓冲液稀释后 pH 的变化较小, 如稀释十倍后 pH 的变化仅小于 0.1。

2. 磷酸盐缓冲液的应用缺点

- (1) 磷酸盐缓冲液可抑制许多酶促反应及步骤, 而这些酶促反应及步骤正是分子克隆的基础, 其中包括许多限制酶对 DNA 的切割、DNA 的连接和细菌转化等。
- (2) 由于磷酸盐在乙醇中可沉淀, 不能应用于沉淀 DNA 和 RNA。
- (3) 容易与常见的钙离子、镁离子以及重金属离子缔合生成沉淀。

【思考题】

1. 缓冲溶液为何能抵抗外加少量酸或碱及稀释的影响而保持其本身 pH 基本不变?
2. 磷酸盐缓冲液应用的优缺点是什么?

(李 勇)

参考文献

- 1 J. 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥译. 北京: 科学技术出版社, 2002
- 2 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
- 3 中华人民共和国卫生部医政司主编. 全国临床检验操作规程. 南京: 东南大学出版社, 1997

实验2 不同纯度水的质量检测

【目的】

1. 了解电导分析法的原理。
2. 测量不同纯度水体的电导率,分析各种水样是否合乎环境监测的指标。

【原理】

电导法是以测量溶液电导为基础的分析方法。溶液的电导在一定温度下与溶液中所存在的正负离子浓度、所带电荷数量及其迁移速度有关,当溶液中离子浓度发生变化时,其电导也随之变化,用电导来指示溶液中离子浓度就形成了电导分析法。分为直接电导法和电导滴定法。本实验采用直接电导法,是将被测溶液放在由固定面积、固定距离的两个铂电极构成的电导池中,通过测量溶液的电导(或电阻)来确定被测物质含量的方法。

电解质溶液的电导率为:

$$k = G \times \frac{L}{A}$$

式中 A 为电极面积,单位(cm^2); L 为两电极间距离,单位(cm); G 为溶液电导,单位(S); k 为电导率,单位 S/cm , $1 \text{ S}/\text{cm} = 10^6 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

摩尔电导是指 1 mol 的电解质溶液在距离为 1 cm 的两电极间所具有的电导。对于一个浓度为 c 的电解质溶液,它的摩尔电导为:

$$\Lambda_m = \frac{1000}{c} \times k$$

摩尔电导的单位是西门子·厘米²/摩尔($\text{S} \cdot \text{cm}^2/\text{mol}$)

所测溶液的电导为:

$$G = k \times \frac{A}{L} = c \times \frac{\Lambda_m}{1000} \times \frac{1}{\theta}$$

其中 $\theta = L/A$ 为电导池常数。在同一温度下,对于同一电解质, Λ_m 也是一个常数,故此电导 G 和电解质溶液的浓度 c 成正比。

【试剂与器材】

1. 试剂

- (1) 0.01 mol/L 的氯化钾溶液。
- (2) 超离子水。
- (3) 实验室用水。
- (4) 家庭饮用水。
- (5) 海水。

2. 器材

- (1) DDSJ-308A 型电导率仪。
- (2) 其他型号电导仪。

【操作步骤】

1. 配制浓度为 0.01 mol/L 的标准 KCl 溶液。
2. 测定电导池常数

(1) 用 0.01 mol/L 的标准 KCl 溶液冲洗电导池 3 次, 在电导池中注入标准 KCl 溶液, 放入 25 ℃ 的恒温水浴中 15 min, 测定溶液的电导或电阻 κ) { 电导率大小受温度影响, 保证水温度 25 ℃ }。

(2) 更换标准 KCl 溶液, 重复测量 3 次, 取其平均值。已知 25 ℃ 时 0.01 mol/L 的标准 KCl 溶液的电导率为 1 413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ κ) { 注意更换标准溶液进行多次测量, 保证电导池常数测量的准确性 }。

3. 水样的测定

(1) 水样改为超离子水, 按照与电导池常数测定相同的步骤测定水样。

(2) 同上法测定实验室用水。

(3) 同上法测定家庭饮用水。

(4) 同上法测定海水。

(5) 根据测得的电阻或电导求出不同水样的电导率 κ) { 保证上述各步骤具有相同的实验环境 }。

4. 对于现在电导仪, 只需用标准 KCl 溶液校准仪器, 即可直接读出电导率的测量值。

【计算】

1. 求电导池常数 θ

$$\theta = \frac{k}{G}$$

2. 求各水样电导率

$$k_x = \theta G_x$$

【参考范围】

在 25 ℃ 时纯水的理论电导率为 $5.48 \times 10^{-8} \text{ S}/\text{cm}$ 。测定水样的参考值如图 2-1 所示。

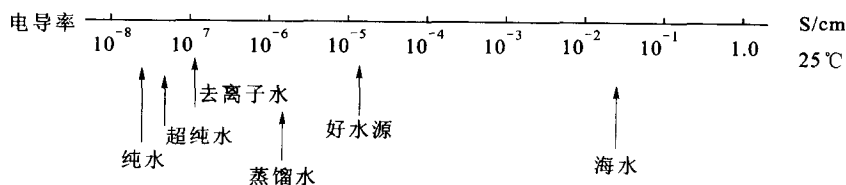


图 2-1 不同纯度水的电导率

【注意事项】

1. 电导率大小与温度有关, 实验所测电导率应为标准 25 ℃ 时测得的。
2. 每次更换水样前应反复冲洗电导池。

【思考题】

1. 电导和电导率是否一样?
2. 实验中为何要保证相同的实验条件?
3. 讨论浓度与电导率的关系?
4. 设计一种求摩尔电导的方法?

(盖立平)

参考文献

- 1 张师愚, 杨惠森主编. 物理化学实验. 北京: 科学出版社, 2002
- 2 徐功骅, 蔡作乾主编. 大学化学实验. 第 2 版. 北京: 清华大学出版社, 2000
- 3 蔡明招主编. 分析化学实验. 北京: 化学工业出版社, 2004
- 4 方惠群等主编. 仪器分析. 北京: 科学出版社, 2002

实验3 尿红细胞形态学检查

【目的】

通过尿红细胞形态学检查,以掌握相差显微镜的使用方法。

【原理】

1. 不染色法进行尿红细胞形态学检查,实际属于尿沉渣(urine sediment)镜检的范畴。尽管常规实验室一般采用普通光学显微镜进行尿沉渣镜检,但本实验力求通过尿红细胞形态学检查掌握相差显微镜的使用方法。

普通光学显微镜与相差显微镜在尿红细胞形态学检查的敏感性方面没有大的差异,但在透明管型及细颗粒管型检测方面,根据顾可梁教授的报道,相差显微镜敏感性更高。

尿红细胞还可进行定量检查,即定量尿沉渣分析板法,如 Fast-Read-10 或 Kova-10 板,其优点是比玻片法误差小,易于规范化,且可进行定量报告,如某种细胞或管型/微升或/升。而不是玻片法的 $\times/\text{HPF}$ 或 LPF (高、低倍镜视野)。

2. 相差显微镜原理 光线通过透明的样本(如活细胞)时,光的波长(颜色)和振幅(亮度)都没有明显的变化,因此,细胞内部结构难以分辨。然而,由于细胞各部分的折射率和厚度的不同,光线通过这种样本时,会产生直射光和衍射光,二者的相位会有所不同,即产生相位差。人眼感觉不到光的相位差,但相差显微镜通过其特殊装置——物镜相板和环状光阑,利用光的干涉现象,将光的相位差转变为人眼可以察觉的振幅差(明暗差),从而使原来透明的细胞呈现明暗差异,这样便可观察活细胞内部的某些细微结构。

【器材】

一次性塑料尿杯、尿离心管(10 mL)、载玻片、盖玻片(22 mm $\times$ 22 mm)、一次性塑料滴管、离心机(水平转头及容纳 10 mL 尿离心管的离心架)、相差显微镜。

【操作步骤】

1. 留取新鲜尿标本,首先使用一次性塑料尿杯留取,然后在倒入 10 mL 尿离心管内■) { 根据中华医学会检验分会的《尿液沉渣检查标准化的建议》,尿标本在留取后应在 2 h 内完成检验,如 2 h 内无法完成分析,可 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏,6 h 内完成检验;或在尿标本中加适量防腐剂}。

2. 尿标本离心,根据《尿液沉渣检查标准化的建议》,离心机采用水平转头离心机。离心时,机内温度应尽可能保持 $<25^{\circ}\text{C}$,离心时间 5 min,离心机相对离心力(RCF)应在 $400 \times g$ 左右。离心机转速与相对离心力的换算公式为:

$$\begin{aligned} r/\text{min} &= 1\,000 \times [G/(11.18 \times \text{半径})]^{1/2} \\ r/\text{min} &= 1\,000 \times [400/(11.18 \times \text{半径})]^{1/2} \end{aligned}$$

■) { 本指南所定义“半径”为离心机轴中央到水平离心机试管底部的距离,或垂直式离心机试管口中央的距离}。

3. 离心后倾去上清尿液,离心管底部残留的液体的量应在 0.2 mL 处,使之浓缩 50 倍。

4. 轻轻混匀尿沉渣,用一次性滴管吸取 1 滴尿沉渣悬液并滴在玻片上,盖上盖玻片,注意避免气泡的产生。

5. 相差显微镜的使用

(1) 使用前需调整聚光器上的环状光阑圆环与相差物镜相板上的圆环完全重叠,方法是先将被检样本调焦至清晰图像,然后取下一侧目镜,插入中心调节望远镜,旋转中心调节望远镜调焦,可看到一明一暗

两个圆环。再转动聚光器上的环状光阑的对中螺钉,使环状光阑的亮环与相板上暗环完全重叠■) } 通过聚光器的升降旋钮调节环状光阑的亮环的大小。如果聚光器已升到最高点或降到最低点而仍不能矫正,说明玻片太厚了,应更换}。调好后取下中心调节望远镜,重新插回目镜即可进行相差观察。其余操作与普通光学显微镜方法相同。

(2) 由于相差显微镜光源要求较强■) } 环状光阑遮掉大部分光,物镜相板上共轭面又吸收大部分光} ,因此,可将视场光阑与聚光器的孔径光阑必须全部开大。转盘(或插板)聚光器上的每个环形光阑均与相应的相差物镜配套使用,不可互换使用。

6. 镜下观察 先在10倍物镜下预览全片,然后换高倍镜计数红细胞。尿液红细胞镜检发现的形态有(彩图1、2):① 均一型:红细胞形态正常,大小及血红蛋白含量一致,颜色微黄,细胞膜正常;② 非均一性型:与均一型相比较,红细胞大小和形态不规则,大红细胞、小红细胞、棘形、皱缩形、伪足形、面包形、花环形等;③ 混合型:均一型和非均一型各占50%。

【注意事项】

需要强调的是镜下未见红细胞并不意味着没有血尿,因为可能红细胞已溶解,此时尿干化学测定即为阳性,因为其检测的是血红蛋白。

【临床意义】

各种泌尿系统疾病,如外伤、炎症、结石、结核、肿瘤等;其他疾病,如各种出血性疾病、高血压及动脉粥样硬化等。

(倪安平)

参考文献

- 1 丛玉隆,马骏龙编著.当代尿液分析技术与临床.北京:中国科学技术出版社,1998
- 2 丛玉隆,王丁编著.当代检验分析技术与临床.北京:中国科学技术出版社,2002
- 3 丛玉隆编著.尿液沉渣检查标准化的建议.中华检验医学杂志,2002,25:249-250

实验4 抗核抗体检查

【目的】

1. 熟悉间接免疫荧光显微技术的原理及其基本操作步骤。
2. 掌握荧光显微镜的使用方法。
3. 了解抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)检测的临床意义。

【原理】

间接免疫荧光显微技术检测抗核抗体的原理是使待测标本中的抗核抗体与基质(HEp-2细胞和灵长类肝冷冻组织切片)发生反应,如果标本阳性,特异性IgA、IgG或IgM抗体就会与基质细胞核中的相应抗原结合,然后再加入荧光标记的抗抗体,经洗涤去除游离的荧光抗体后,在荧光显微镜下可观察到特异性的荧光。

【标本、试剂与器材】

1. 标本 人血清或血浆(EDTA、肝素或柠檬酸盐抗凝均可)。
2. 试剂 HEp-2/猴肝生物薄片马赛克抗核抗体间接免疫荧光法检测试剂盒。试剂盒的组成包括:生物薄片载片,荧光素(FITC)标记的羊抗人IgG,阳性对照血清,阴性对照血清,PBS盐(pH 7.2),吐温20,封片介质和盖玻片。
3. 器材 荧光显微镜、微量移液器、吸头。

【操作步骤】

1. PBS吐温缓冲液配制 1包磷酸盐溶于1升蒸馏水中,并加入2 mL吐温20充分混匀。
2. 标本稀释 将待测标本用PBS吐温缓冲液1:100稀释。例如:取10.1 μL 样品用1000 μL PBS吐温缓冲液稀释并充分混匀。
3. 加样 将加样板放在泡沫板上,按顺序分别滴加25 μL 稀释后血清至加样板的每一反应区(1) {动作一定要轻缓,避免产生气泡}。阴性和阳性对照血清与标本同样处理。加完所有待测标本后再开始温育。
4. 温育 将载片覆有生物薄片的一面朝下,盖在加样板的凹槽里,反应立即开始(1) {确保每一样品均与生物薄片接触且样品间互不接触}。室温(18~25 $^{\circ}\text{C}$)温育30 min。
5. 冲洗 用PBS吐温缓冲液流水冲洗载片1 s,然后立即将其浸入装有PBS吐温缓冲液的洗杯中浸泡至少5 min。有条件的情况下可用旋转摇床进行震荡。
6. 加二抗 滴加20 μL FITC标记的羊抗人IgG(荧光二抗)至洁净加样板的反应区(1) {荧光二抗溶液在使用前应充分混匀,完全加完所有的荧光二抗方可进行下一步温育。为节约时间,可在第一次温育的同时滴加二抗至另一个加样板的反应区}。
7. 温育 从洗杯中取出一张载片,5 s内用吸水纸拭去背面和边缘的水分后,立即盖在加样板的凹槽里(1) {为防止破坏基质,不要擦拭反应区的间隙。确保生物薄片与液滴接触良好,然后继续下一张}。室温(18~25 $^{\circ}\text{C}$)温育30 min(1) {注意避免阳光直射载片}。
8. 冲洗 用烧杯盛PBS吐温缓冲液流水冲洗载片1 s,然后立即将其浸入装有PBS吐温缓冲液的洗杯中浸洗至少5 min。有条件的情况下可用旋转摇床进行震荡。可在每150 mL PBS吐温缓冲液中加入10滴偶氮蓝作为衬染。
9. 封片 将盖玻片直接放在泡沫板的凹槽里。滴加甘油/PBS至盖玻片:每一反应区约10 μL 。从