

生物化学检验 实验实训指导

SHENGWUHUAXUE JIANYAN

SHIYAN SHIXUN ZHIDAO

主编 徐惠萍



生物化学检验 实验实训指导

主 编: 徐惠萍

副主编: 周红辉

编 者: (按姓氏笔画排序)

王 晔 (江西省儿童医院)

张才成 (江西昌大一附院)

周红辉 (江西护理职业技术学院)

徐惠萍 (江西护理职业技术学院)



江西科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学检验实验实训指导/徐惠萍主编. —南昌:江西科学技术出版社, 2012. 9

ISBN 978—7—5390—4613—6

I. ①生… II. ①徐… III. ①生物化学—医学检验—实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①R446.1—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 253838 号

国际互联网(Internet)地址:

<http://www.jxkjcb.com>

选题序号:ZK2012087

图书代码:X12010—101

生物化学检验实验实训指导

徐惠萍主编

出版	江西科学技术出版社
发行	
社址	南昌市蓼洲街 2 号附 1 号 邮编:330009 电话:(0791)86623341 86610326(传真)
印刷	江西千叶彩印有限公司
经销	各地新华书店
开本	787mm×1092mm 1/16
字数	120 千字
印张	6
版次	2012 年 11 月第 1 版 2012 年 11 月第 1 次印刷
书号	ISBN 978—7—5390—4613—6
定价	12.00 元

赣版权登字—03—2012—115

版权所有,侵权必究

(赣科版图书凡属印装错误,可向承印厂调换)

前 言

生物化学检验是一门实践性、应用性极强的医学检验专业的核心课程,为了实践“校企合作、工学结合”,培养优秀高端医学检验技能型人才,我们综合近年来社会对我省检验专业人员的实际需求,各级医院检验科工作现状以及我省检验专业实践教学条件,配合相应教材,编写了《生物化学检验实验实训指导》。为更好地实现岗位技能需求与临床实践无缝对接,我们增加了部分医学检验人才必备的基本知识;项目所用试剂不再详述配制,只列出试剂盒中各试剂的主要成分及标准液浓度;对实训项目及其检测方法作了相应的选择,加强了全自动生化分析仪及生化项目检测新方法的学习,同时仍十分注重适用于基层医院的经典的手工生化项目检测的培训。

本教材由两大模块构成:第一篇主要介绍医学检验人才必须具备和掌握的基本知识和基本实训项目,每个项目包括目的、原理、试剂、器材、操作步骤、参考区间及临床意义;第二篇为项目达标测试,为单项选择题并附有参考答案,便于学生强化对应项目的基本知识和基本技能,同时注意与临床检验技术职业资格证书考试的衔接。

为了让学生学习技能更加贴近实践、贴近临床,我们特邀请了江西儿童医院检验科生化室王晔、江西南昌大学医学院第一附属医院检验科生化室张才成参编,在此深表感谢!

由于编者水平有限,时间急促,不妥之处在所难免,恳请使用本教材的老师和学生批评指正。

徐惠萍

2012年6月

目 录

第一篇

1

实训部分

学习情境一 生物化学检验基础知识/1

项目一 刻度吸管、微量可调式移液器的使用/6

项目二 分光光度计的使用/7

项目三 分光光度计波长的校正与吸收曲线的制作/8

学习情境二 蛋白质检验/10

项目四 总蛋白测定标准曲线的制作/10

项目五 总蛋白测定(双缩脲法)/11

项目六 白蛋白测定(溴甲酚绿法)/12

项目七 血清蛋白电泳(醋酸纤维薄膜法)/14

学习情境三 糖代谢紊乱检验/18

项目八 血糖测定(葡萄糖氧化酶法)/18

项目九 口服葡萄糖耐量试验/19

项目十 糖化血红蛋白测定(离子交换层析法)/21

学习情境四 脂代谢及脂代谢紊乱检验/23

项目十一 血清(浆)总胆固醇测定(氧化酶法)/23

项目十二 血清(浆)甘油三酯测定(GPO-PAP酶法)/24

项目十三 高密度脂蛋白胆固醇测定(磷钨酸-镁沉淀法)/25

项目十四 血清载脂蛋白 AI(ApoAI)测定(比浊法)/27

项目十五 血清(浆)脂蛋白电泳(预染琼脂糖凝胶法)/28

学习情境五 钠、钾、氯和酸碱平衡检验/31

项目十六 血清钾、钠测定(ISE分析法)/31

项目十七 血清氯化物的测定(硫氰酸汞比色法)/32

项目十八 血清(浆)碳酸氢根浓度测定/33

学习情境六 钙、磷检验/37

项目十九 血清总钙测定(邻甲酚酞络合酮法 O-CPC)/37

项目二十 血清无机磷测定(紫外终点法)/38

学习情境七 肝胆疾病的检验/40

- 项目二十一 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)标准曲线制备/40
- 项目二十二 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定/41
- 项目二十三 血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定/45
- 项目二十四 血清碱性磷酸酶(ALP)测定(速率法)/48
- 项目二十五 血清胆红素测定(改良 J-G 法)/49

学习情境八 肾功能检验/52

- 项目二十六 血清尿素测定(酶偶联法)/52
- 项目二十七 血清肌酐测定(苦味酸速率法)/53
- 项目二十八 血清尿酸测定(尿酸酶-过氧化物酶法)/55

学习情境九 心肌损伤标志物检验/57

- 项目二十九 血清乳酸脱氢酶测定(LD-L 法)/57
- 项目三十 血清肌酸激酶(CK)测定(速率法)/58

学习情境十 胰腺疾病检验/61

- 项目三十一 血清(尿)淀粉酶测定(碘-淀粉比色法)/61

学习情境十一 实验室管理/63

- 项目三十二 室内质量控制图的绘制/63
- 项目三十三 葡萄糖测定回收实验/66

第二篇

项目达标测试

68

- 学习情境一 生物化学检验基础知识/68
- 学习情境二 蛋白质检验/72
- 学习情境三 糖代谢紊乱检验/73
- 学习情境四 脂代谢及脂代谢紊乱检验/76
- 学习情境五 钠、钾、氯和酸碱平衡检验/77
- 学习情境六 钙、磷检验/78
- 学习情境七 肝胆疾病的检验/78
- 学习情境八 肾功能检验/81
- 学习情境九 心肌损伤标志物检验/82
- 学习情境十 胰腺疾病检验/83
- 学习情境十一 实验室管理/83
- 附表 临床生化项目及临床意义/86

主要参考文献

90

第一篇 实训部分



▶▶▶ 学习情境一

生物化学检验基础知识

一、生化检验实训室一般规则

实验实训课的目的是为了提高学生逐步掌握基本技能的能力,培养学生树立理论联系实际,实事求是,严肃认真的科学态度。为此,学生必须遵守下列实验实训室规则。

1. 实训前要认真预习,明确实训的目的和要求,了解实训的原理、操作步骤及注意事项。
2. 进入实训室必须穿工作服,保持安静。实训操作时,应遵从老师的指导,严格按照操作规程和步骤进行实验,不得大声喧哗、来回走动,如有问题,应请示老师解决。实训操作过程应有条不紊,实训器具、试剂应摆放整齐有序。
3. 认真对待实训过程中的每一项基本技能训练。标本的制备及取样,试剂的定量移取及加注,溶液的混匀、保温、加热及各种仪器的正确操作等,均应反复训练,体会和掌握操作要点,力求做到熟练、准确、规范。
4. 爱护公物,不管是易损的试管、吸管,还是精密分析仪器,均要按操作规程细心、认真操作。如有损坏,要及时报告老师,并照章酌情赔偿。
5. 注意安全,杜绝安全事故的发生。
6. 实验完毕后,整理并清洗实验用具,实验器材、试剂归位。认真完成实验报告,并安排值日生打扫实验室,做到仪器、桌面、地面、水池四干净。离开实验室前要检查水、电、门、窗是否关好,经老师同意后方能离开。

(徐惠萍)

二、常用器具及仪器的使用

生物化学检验实验中使用的各种玻璃计量容器都是以毫升为计量单位,在量器上用 ml 标出;标定条件都是以 20℃ 为标准,故量器上都标有 20℃ 字样。

(一) 刻度吸管的使用

刻度吸管是生物化学检验实验中使用最广泛的吸量管,常用的容量规格有 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml 和 10.0ml 等。

使用刻度吸管应根据需要正确选用不同容量规格的吸管,一般应选用取液量最接近的吸量管,如吸取 1ml 的液体用 10ml 的吸管会使误差增大,需要 2ml 的溶液而用 1ml 的吸管吸取两次也会使误差增大。

刻度吸管分完全流出式(量入式)和不完全流出式(量出式)两种。完全流出式包括吸管管尖不能自然流出的液体,使用时要把最后不能流出的液体吹出,通常在管壁上标有“吹”、TC 或 E 的字样。不完全流出式不包括管尖最后不能自然流出的液体,使用时不能吹,而是将管尖靠在容器壁上并停留数秒,通常在管壁上标有 TD 或 A 的字样。

使用刻度吸管时,右手拿吸管,刻度面对自己,将管尖插入液面下 1~2cm。左手拿吸耳球,左手大拇指按压吸耳球把球内的空气压出,再把吸耳球的尖端紧盖吸管的管口,左手掌协助吸耳球颈部固定在管口上,慢慢松开左手大拇指,当液体吸至所需量的刻度线以上 1~2cm 处,用右手手指迅速按住吸管上口,将管尖移离液面,垂直将多余的液体放出至液面的弯月面与标线相切时为止,再将吸管垂直移至准备好的容器内,使管尖与容器内壁接触,让液体自然流出。

(二) 微量可调式移液器的使用

微量可调式移液器常用于吸取 1ml 以下的微量液体。微量可调式移液器一般有 5 挡调节,其规格可根据需要进行选择。

微量可调式移液器使用前,应先连续按动多次;旋转按钮,选定取量值;选取合适的吸液嘴安放在微量可调式移液器下端吸液杆上,轻轻转动,以保持密封。垂直地握住移液器,将按钮压至第一挡,并将吸液嘴插入液面下 2~3mm,缓慢、平稳地松开控制按钮,使之复位,停留 1~2s 后从液体中取出。再将移液器移至准备好的容器内,缓慢地将按钮按到第一挡,等待 1~2s 后再将按钮完全按下,排出液体。使用不同的试剂应更换塑料吸液嘴。

(三) 分光光度计的使用

分光光度计种类较多,其结构基本相似,以 722-S 型分光光度计为例说明。

1. 操作方法:

(1) 打开电源开关,接通电源。

(2) 用模式键选择透光率“T”,调节所需要的波长。仪器预热 20min。

(3) 打开比色盖,按“0”按钮,使数字显示为“0.00”。将空白液、标准液和待测液分别装入比色皿中,使空白液对准光路。盖上比色盖,按透光率“100%”按钮,使数字显示为“100.0”。

(4) 吸光度 A 的测量:用模式键选择吸光度“A”,数字显示“0.00”,然后将标准液和待测液分别推入光路,读取其吸光度。

(5) 比色完毕后,各个调节旋钮应回零。关闭电源开关,套上仪器罩。将比色皿冲洗干净,倒置于盛放比色皿的瓶皿中。

2. 注意事项及维护:

(1) 每台仪器所配套用比色杯不能与其他仪器上的比色杯单个调换。

- (2) 仪器停止工作时,应切断电源。
- (3) 保持仪器的清洁和干燥。
- (4) 仪器工作数月或搬动后,要检查或校正波长。

(四) 电热恒温水浴箱的使用

电热恒温水浴箱简称水浴箱,主要用于恒定水温,保持生化反应所需恒温条件。温度控制灵敏度一般为 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

1. 关闭水浴箱底部放水开关,注入水至适当深度,水位不能低于电热管,以免电热管被烧坏。绝不允许先通电后加水。

2. 接通电源,打开开关,此时若红灯亮,表示电热管开始加热。调节温控旋钮至适当位置。

3. 观察温度计,当温度升至距所需温度约 2°C 时,逆时针方向旋转调温旋钮至红灯刚好熄灭,绿灯亮。此后红灯不断熄灭,绿灯不断亮,表示恒温控制器发挥作用,再继续观察一段时间温度升降变化情况,直到绿灯稳定。若与所需温度不符,只需略微调节温控旋钮直到所需恒定温度。

4. 调温旋钮刻度盘上的温度标示值不表示箱内水的实际温度。实际操作中,应先记录水箱内温度计所指示的温度与刻度盘上的指示位置,做好相应记号,在多次使用的基础上,可比较迅速、准确地在刻度盘指示位置上得到需要恒定的水温。

5. 水浴箱若较长时间不用,应将温控旋钮退回零位,放尽水浴箱内的水,以免生锈。

三、试剂的配制与使用

(一) 试剂

临床化学检验实验需使用大量的化学试剂,合理选用化学试剂和正确进行试剂配制是保证实验结果准确的关键。临床化学实验中,使用目的不同对化学试剂的质量要求也不同。因此,检验工作者必须熟悉化学试剂的品级规格及其用途,以便根据不同的使用目的,作出正确的选用。

1. 化学试剂的等级标准: 国产试剂一般分四级,各级的名称、符号及主要适用范围见表 1-1。

表 1-1 国产化学试剂的品级规格

级别	名称	符号	色标	说明
一级	优级纯 (保证试剂)	GR	绿色标签	纯度高、杂质含量低,适用于研究和配制标准液
二级	分析纯 (分析试剂)	AR	红色标签	纯度较高、杂质含量较低,适用于定性和定量分析
三级	化学纯	CP	蓝色标签	纯度低于二级,用途近似二级
四级	实验试剂	LR	黄色标签	纯度较低,用于一般定性分析

2. 化学试剂的保管: 妥善保管试剂具有两个方面的含义: 一是保证安全,二是保证质量。

- (1) 储存化学试剂的库房应通风、干燥、冷暗。
- (2) 试剂需按液体、固体分开并按顺序存放,做好标记。

- (3) 易燃、易挥发试剂需要密塞。
- (4) 剧毒药品应专人专柜保管存放,每次用后要登记用量。
- (5) 强酸、强碱试剂应分开存放。
- (6) 生物制品、酶类制剂均应避光冰箱低温保存。

(二) 试剂的配制

1. 称重法: 首先选取合格的溶质,必要时先进行恒重,然后在分析天平上精确称取所需重量。再放在洁净的烧杯中,加入适量的溶剂溶解。如溶质较难溶解,可适当加热助溶;如试剂为有机溶剂,欲加热,需隔水加热,待完全溶解,冷至室温,倒入容量瓶中,以溶剂补充体积至刻度,混匀,倒入试剂瓶密塞保存备用。

2. 容量法: 取适量溶剂于烧杯中,量取所需量的溶质,缓缓加入溶剂内,必要时边加边搅拌,然后转入适当的容器中,再以溶剂补足至刻度。混匀,倒入试剂瓶密塞保存备用。

3. 对于一些含量不够准确的试剂,一般先配制成大约含量的浓溶液,再用基准液标定出它的精确含量,最后以稀释法稀释至精确浓度。

4. 注意事项:

(1) 配制试剂时,应根据试验要求选用不同规格的试剂。配制标准溶液的试剂应符合 GR 或 AR 级,一般溶液无特殊要求者可选用 CP 级试剂。

(2) 试剂配制中的溶剂一般为蒸馏水,特殊试剂或非水为溶剂的试剂应注明清楚。

(3) 配制标准溶液、缓冲液,称量时应选用 1/10000 的分析天平,量器选用一等容量瓶和吸管,一般溶液可选用粗天平和量筒。

(4) 试剂开瓶后,如不能一次用完,应及时封闭保存,特别是易吸潮的试剂。对见光易变质的试剂,外面要用黑纸包裹。

(5) 称量或量取试剂用的器皿、取试剂用的药勺均应洁净干燥。试剂一经取出(特别是液体试剂),不得放回原瓶。

(6) 配好的试剂,应贴标签,注明试剂名称、浓度、用途和配制日期。

(7) 见光易分解的试剂配制好后应装入棕色瓶中,需滴加的试剂装入滴瓶中。标准溶液、酶试剂、酶底物液一般都要置冰箱保存。

(三) 溶液浓度的表示方法及其运算

1. 百分浓度(%):

(1) 质量 - 质量百分浓度% (g/g): 指 100g 溶液中所含溶质的克数。

(2) 体积 - 体积百分浓度% (ml/ml): 指 100ml 溶液中所含溶质的毫升数。

2. 质量 - 体积浓度(g/L): 指 1L 溶液中所含溶质的克数。

3. 物质的量浓度: 简称浓度 C , 是指 1L 溶液中所含溶质的量。溶质的量可用 mol、mmol、 μmol 等表示。

4. 百分浓度与物质量浓度的换算: 市售的浓酸都采用% (g/g) 表示物质的含量。如将其换成物质量浓度,可按下列式计算: $C = 1000 \times P \times (g/g) / M$ (P 表示密度, M 为摩尔质量)。

5. 溶液的稀释: 根据稀释前后溶质量不变,可得下式:

$$C_{\text{浓}} \times V_{\text{浓}} = C_{\text{稀}} \times V_{\text{稀}}$$

应用此公式时要注意稀释前后其浓度单位与体积单位要一致。

6. 溶液的混合: 当两种不同浓度的溶液混合时, 混合后溶质的量应等于混合前两溶液的溶质量之和。计算式为:

$$C \times (V_1 + V_2) = C_1 V_1 + C_2 V_2$$

(四) 试剂的使用规则

1. 使用试剂时, 除要看清楚试剂的名称、浓度及配制日期外, 还应注意观察试剂的颜色、透明度及有无沉淀。
2. 瓶塞开启后, 瓶塞心朝上, 不可与任何物品接触, 更不允许瓶塞张冠李戴。
3. 吸取试剂时, 只能用刻度吸管或用移液器移取。用试剂瓶直接倾倒试剂时, 应注意掌心紧握瓶签, 避免溶液腐蚀瓶签。
4. 吸取完试剂后, 应立即盖好瓶盖放回原处。
5. 要求低温存放的试剂, 用毕后应立即放回冰箱。

四、临床常用生化检验项目组合及临床意义

(一) 临床生化检验技师的岗位职责与作用

随着检验医学的迅猛发展, 新的生化检测项目及检测技术层出不穷, 为了使实验室数据更好地被利用, 更及时地转化为有价值的诊断信息, 临床生化检验岗位急需有相应高素质的优秀高端医学检验技能型人才。现代临床生化检验技师的岗位职责与作用主要有以下各项:

1. 能熟练地运用本院检验科生化室各种现代化仪器设备, 并能进行参数设置、仪器的常规和特殊保养。
2. 能独自胜任本科室各项日常工作, 正确分析质控结果, 对失控结果能迅速查找原因并进行相应处理。
3. 能够熟练使用计算机, 正确组合配套实验, 为临床提供及时可靠的检验结果及结果分析的咨询服务。
4. 能为临床提供检验结果的解释、分析以及需要进一步检查的建议。
5. 对个别病人进行连续监测, 为控制调整其治疗方案提供实验依据。
6. 协助医院对职工的培训与继续教育。
7. 参加医院和社会的科研项目。
8. 重视研究开发工作, 不断开发新试验, 推出新项目, 主动对临床医师进行专题介绍。

(二) 常用生化检验项目组合

合理地选择、评价和组合生化检验项目, 可杜绝不必要的医疗资源浪费, 为临床疾病的诊断、治疗和预后提供最佳的理论依据。

一般医院各类组合常见的有: 生化全套、肝功能、血脂全套、肾功能、糖类、电解质、特定蛋白、心肌酶谱、胰腺酶等。常用具体组合内容见表 1-2。

表 1-2 常用生化检验项目的名称、缩写及组合情况

项目名称	编写	组合内容
肝功能 1	GGN1	TBiL DBiL ALT AST ALP GGT ALB TP
肝功能 2	GGN2	TBiL DBiL ALT AST ALP GGT ALB TPADA CHE LDH PA
肾功能 1	SGN1	BUN Cr UA
肾功能 2	SGN2	BUN Cr UA Ca ²⁺ P
血脂 1	XZ1	TC TG
血脂 2	XZ2	TC TG HDL - C LDL - C Apo - A1 Apo - B LP(a)
心肌酶谱	XIMP	AST CK CK - MB LDH HBDH Mb CnTI
电解质	DJZ	K ⁺ Na ⁺ Ca ²⁺ Cl ⁻ P Mg ²⁺
糖类	TL	Glu FRA
胰腺酶	YXM	AMY LPS P - AMY
特定蛋白	TDDDB	CRP ASO RF IgG IgA IgM C ₃ C ₄
胸腹水	XFS	Glu TP LDH AMY Cl ⁻ TC TG ADA
脑脊液	NJY	Glu TP LDH Cl ⁻ CK ADA ALT AST

注: ADA,腺苷脱氢酶; PA,前白蛋白; Mb,肌红蛋白; FRA,果糖胺; LPS,脂肪酶; CHE,胆碱酯酶; P - AMY,胰腺淀粉酶。

(三) 临床生化项目及临床意义

见书后附表。

(张才成)

项目一 刻度吸管、微量可调式移液器的使用

【目的】

熟练掌握刻度吸管、微量可调式移液器的正确使用。

【器材】

烧杯、试管、刻度吸管、微量可调式移液器。

【操作】

1. 刻度吸管、微量可调式移液器的选择:

- (1) 在一次完成转移的前提下,应选用容量小的刻度吸管、微量可调式移液器。
- (2) 对于同一次实训中同一种试剂的移取,应选用同一支刻度吸管、微量可调式移液器。

2. 刻度吸管、微量可调式移液器的使用:

(1) 刻度吸管:

- ①左手拿吸耳球,右手拿吸管,刻度面对自己。
- ②将管尖垂直插入试剂液面下 1~2cm 处。
- ③液体吸至零刻度线以上 1~2cm 处,吸液一次完成,无气泡。
- ④将管尖移离液面,垂直将多余的液体放出至液面弯月面,刻度与视线三者平齐,调零。

⑤滤纸擦拭刻度吸管外壁。

⑥将吸管垂直移至准备好的试管内上部放液,读数正确。

(2) 微量可调式移液器:

①将微量可调式移液器调整至所需挡位。

②安装吸液嘴,轻轻转动以保持密封。

③将按钮压至第一挡,垂直插入液面下 2 ~ 3mm 处,缓慢、平稳地松开控制按钮,停留 1 ~ 2s 后从液体中取出。

④用滤纸擦拭吸液嘴外壁。

⑤左手持试管,右手持可调式移液器。

⑥将移液器移至准备好的试管底部,缓慢地将按钮按到第一挡,1 ~ 2s 后再将按钮完全按下,完全吹出嘴尖残余液体。

3. 按表 1-3、表 1-4 规范操作,反复练习,直至熟练掌握刻度吸管、微量可调式移液器的正确使用。

表 1-3 刻度吸管的使用

加入物(ml)	0	1	2	3	4	5
蒸馏水	3.0	2.7	2.5	1.8	1.0	0.5

表 1-4 微量可调式移液器的使用

加入物(μ l)	0	1	2	3	4	5
蒸馏水	5	20	50	100	150	250

(周红辉)

项目二 分光光度计的使用

【目的】

1. 掌握比色分析的基本原理。
2. 规范使用 721 型、722 型分光光度计。

【原理】

利用被测物的有色溶液对某一特定波长的光谱具有选择性吸收的特性,将吸收的光谱按不同强度转变成相应的电能,再将电量的变化用检流计显示出来,将显示的电量以光量强度(A) 计算,根据朗伯 - 比尔定理,即 $A = K \cdot C \cdot L$,即吸光度与溶液的浓度(C) 与液层的厚度(L) 的乘积成正比关系。

【器材】

721 型、722 型分光光度计、镨钕滤光片、纱布、比色杯。

【操作】

1. 721 型分光光度计的操作步骤:

- (1) 接通电源。
- (2) 选择波长。

- (3) 开盖粗调透光度 T “0.00”,关盖粗调透光度 T “100%”。
- (4) 预热 20min。
- (5) 放入镨钕滤光片(测定管)。
- (6) 开盖精确调透光度 T “0.00”,关盖精确调透光度 T “100%”。
- (7) 将镨钕滤光片推入光径,读取吸光度(A)值。
- (8) 收场(关电源、罩仪器罩、登记、清洗比色杯和纱布等)。

2. 722P 型分光光度计的操作步骤:

- (1) 接通电源。
- (2) 选择波长。
- (3) 将挡黑挡置于光径,关盖粗调透光度 T “0.00”;将空气(空白管)对着光径,关盖粗调透光度 T “100%”。
- (4) 预热 20min。
- (5) 放入镨钕滤光片(测定管),空气对着光径。
- (6) 同步骤(3)操作,精确调透光度 T “0.00”与透光度 T “100%”。
- (7) 将镨钕滤光片推入光径,读取吸光度(A)值。
- (8) 收场(关电源、罩仪器罩、登记、清洗比色杯和纱布等)。

【注意事项】

1. 仪器需防震、防潮、避光。
2. 比色时,手拿比色杯的毛面,液体倒杯高的 $2/3$ 或 $4/5$,比色杯不能用硬毛刷刷洗,也不能用高温烘烤。

(周红辉)

项目三 分光光度计波长的校正与吸收曲线的制作

【目的】

1. 掌握 721 型、722 型分光光度计波长的检测与校正。
2. 熟悉吸收曲线的制作。

【原理】

光源通过棱镜色散成连续光谱,转动准直镜使色散光谱中某一部分由光狭缝射出而成一束单色光,该光束的主波长由随同准直镜转动的刻度盘指示。刻度盘读数与射出光束实际波长是否相符,可通过测绘的已知吸收峰波长的标准镨钕滤光片吸收曲线而确定。

【器材】

721 型、722 型分光光度计,镨钕滤光片,坐标纸。

【操作】

1. 初步检查:
 - (1) 打开电源,仪器预热 20min。
 - (2) 调节波长至 580nm,将一张白纸放置在比色槽的光路上。

(3) 将光量 T “100%”的旋钮调至最大,在小白纸上可看到橘黄色的光斑。

(4) 若光斑不是橘黄色,左右旋转波长调节旋钮使之出现橘黄色的光斑,粗略判断波长偏离的程度,选择检测的起始波长。

2. 精确检查(吸收曲线制作):

(1) 测定最大吸收峰波长:

①调节波长至起始波长,用空气调 T “0”和 T “100%”。将镨钕滤光片推入光路中,记录 A 值,退出镨钕滤光片。

②按表 1-5 调节波长至另一值,用空气调 T “0”和 T “100%”。再将镨钕滤光片推入光路中,记录 A 值,退出镨钕滤光片。

③如此反复测定直至 A 值为最大,记录此点的指示波长,即为最大吸收峰波长。

表 1-5 镨钕滤光片吸收曲线制备操作

波长	吸光度	波长	吸光度	波长	吸光度
510		527		533	
515		528		534	
520		529		535	
524		530		540	
525		531		545	
526		532		550	

(2) 计算波长误差:将 A 值最大时的波长减去镨钕滤光片最大的吸收波长 529nm,即得被校分光光度计的波长误差。

3. 波长校正:

如波长精度超出允许误差(360 ~ 600nm: ± 3 nm; 600 ~ 700nm: ± 5 nm; 700 ~ 800nm: ± 8 nm),打开分光光度计左侧调节窗口盖板,用螺丝刀试调波长的调节杆。试调波长的调节杆后,再按精确检查步骤操作,直至分光光度计的波长精度误差在其允许范围内即可。

(周红辉)



项目四 总蛋白测定标准曲线的制作

【目的】

学会制备标准曲线,进一步熟练分光光度计的使用。

【原理】

配制一系列浓度不同的蛋白质标准液,按一定操作方法显色后,用选定的波长分别测定它们的吸光度,以吸光度为纵坐标,标准液浓度为横坐标,在坐标纸上标出各坐标点,通过连接各点,使其成—通过“0”点的直线,即为标准曲线。由此计算出因数 $K = A/C$ 。在实际测定中,用待测管吸光度除以因数 K 即可算出待测物浓度或直接用待测管吸光度在标准曲线上查找出其相应的浓度。

【器材】

恒温水浴箱、分光光度计、刻度吸管、微量移液器、试管、试管架。

【试剂】

1. 双缩脲试剂。
2. 20g/L 蛋白标准液: 取浓度为 70g/L 的总蛋白标准液 1ml, 加入蒸馏水 2.5ml, 混匀即可。

【操作】

取试管六支,标明管号,按表 2-1 操作。

表 2-1 标准曲线的制备操作步骤

加入物(ml)	0	1	2	3	4	5
20g/L 蛋白标准液	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蒸馏水	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	-
双缩脲试剂	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
相当于血清蛋白质(g/L)	0	20	40	60	80	100

充分混匀,置 37℃ 水浴中 10min(或 25℃ 水浴中 30min), 在 540nm 波长处进行比色,以“0”管调零,读取各管吸光度。

上述操作平行测定 3 次。各管取 3 次吸光度均值作为纵坐标,相应的浓度作为横坐标,绘制成标准曲线。

【注意事项】

1. 应配制 5~6 个浓度不同的标准系列管。
2. 浓度范围应足够大(包括正常参考及两端常用病理范围), 直至观察到“拐点”(即不呈直线的浓度值), 以便能准确地画出线性范围。

3. 每一种浓度最好是做三个平行测定,且平行管间吸光度的最大值与最小值之差应小于0.05,然后求平均值。
4. 要定期校正标准曲线(更换试剂、仪器检修)。
5. 当待测液吸光度超出线性范围时,应将标本稀释后再测定,结果乘以稀释倍数。
6. 标本测定的条件(用量、总体积、方法、仪器等)应和标准曲线制作的条件一致。
7. 标准曲线上应注明方法、仪器、波长、日期、制作者等。

(徐惠萍)

项目五 总蛋白测定(双缩脲法)

【目的】

1. 掌握双缩脲法测定血清总蛋白的原理及注意事项。
2. 熟练进行实训操作。
3. 熟悉血清总蛋白测定的主要临床意义。

【原理】

蛋白质分子中的肽键(-CONH -)在碱性条件下与双缩脲试剂中的 Cu^{2+} 作用生成紫红色络合物。此呈色反应与双缩脲($\text{H}_2\text{N} - \text{OC} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$)在碱性溶液中与 Cu^{2+} 作用产生紫红色的反应相似,故称为双缩脲反应。溶液颜色的深浅与蛋白质的含量成正比,通过与同样处理的校准血清比较,即可计算出样品中总蛋白的含量。

【器材】

恒温水浴箱、分光光度计、刻度吸管、微量移液器、试管、试管架。

【试剂】

总蛋白试剂盒:

1. 双缩脲试剂(主要成分: CuSO_4 、酒石酸钾钠、KI、NaOH)。
2. 70g/L 总蛋白标准液。

【操作】

取3支试管,按表2-2操作。

表2-2 血清总蛋白双缩脲测定操作步骤

加入物(ml)	空白管(B)	标准管(S)	测定管(R)
血清	-	-	0.1
蛋白标准液	-	0.1	-
蒸馏水	0.5	0.4	0.4
双缩脲试剂	3.0	3.0	3.0

充分混匀,置37℃水浴中10min(或25℃水浴中30min),在540nm波长处进行比色,以空白管调零,读取各管吸光度。

【计算】

$$\text{血清总蛋白(g/L)} = \frac{A_R}{A_S} \times C_S$$