

• 全国高等医药院校配套教材 •

生物化学和临床生物化学检验

王 琰 钱士匀 / 主编

实 验 教 程

Experiment Course
In Biochemistry And
Clinical Biochemistry Test



清华大学出版社

● 全国高等医药院校配套教材 ●

生物化学和临床生物化学检验 实验教程

Experiment Course In
Biochemistry And Clinical Biochemistry Test

王 琰 钱士匀 / 主编

清华大学出版社

北 京

内 容 简 介

《生物化学和临床生物化学检验实验教程》是与高等医药院校医学检验专业理论教材相配套的实验教材。本书是根据参编的11所院校所开设的实验内容编写的。全书分上、下篇,共16章。上篇为生物化学和临床生物化学检验基本理论,包括实验室基本知识、光谱分析技术、电泳技术、层析技术和分子生物学技术;下篇为生物化学和临床生物化学检验实验,包括血清蛋白质测定、血清葡萄糖测定、血清脂类及脂蛋白测定等多种物质检测,共计65个实验,每个实验包括目的、原理、试剂、操作、计算、参考值范围、临床意义、注意事项、评价及思考题等。书末附有常用生化参考值、缓冲液配制以及生化检验术语英汉和汉英索引等。各校在使用时,可根据本校的设备、条件等进行取舍和顺序调整。

本教材可供高等医学院校医学检验学、临床医学、基础医学、预防医学等专业使用,也可供从事医学研究的相关人员参考使用。

版权所有,翻印必究。举报电话:010-62782989 13501256678 13801310933

本书封面贴有清华大学出版社防伪标签,无标签者不得销售。

本书防伪标签采用特殊防伪技术,用户可通过在图案表面涂抹清水,图案消失,水干后图案复现;或将表面膜揭下,放在白纸上用彩笔涂抹,图案在白纸上再现的方法识别真伪。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学和临床生物化学检验实验教程/王琰,钱士匀主编. —北京:清华大学出版社,2005.9

ISBN 7-302-11664-4

I. 生… II. ①王… ②钱… III. ①生物化学—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(2005)第 095914 号

出 版 者: 清华大学出版社 地 址: 北京清华大学学研大厦

<http://www.tup.com.cn> 邮 编: 100084

社 总 机: 010-62770175 客 户 服 务: 010-62776969

责任编辑: 张建平

封面设计: 京鲁创业

版式设计: 肖 米

印 装 者: 北京嘉实印刷有限公司

发 行 者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 185×230 印 张: 20.75 字 数: 472 千字

版 次: 2005年9月第1版 2005年9月第1次印刷

书 号: ISBN 7-302-11664-4/R·91

印 数: 1~4000

定 价: 35.00 元

前 言

FOREWORD

《生物化学和临床生物化学检验实验教程》是与高等医学检验专业理论教材相配套的实验教程。本教程遵循医学检验专业培养目标,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,重在强调以创造能力培养为核心,以利于复合型人才的培养,形成医学检验教育新的培养模式,强调综合素质的培养和综合能力的提高,增强学生综合分析问题和解决问题的能力。为了便于学生深入了解各章的内容和检索有关术语,书末附有常用生化参考值、缓冲液配制、生化检验术语英汉和汉英索引等,具有可读性和实用性。

本书是根据参编的 11 所院校所开设的实验内容编写的。全书共 16 章,分上、下篇,上篇为生物化学和临床生物化学检验基本理论,包括实验室基本知识、光谱分析技术、电泳技术、层析技术和分子生物学技术;下篇为生物化学和临床生物化学检验实验,包括血清蛋白质测定、血清葡萄糖测定、血清脂类及脂蛋白测定等多种物质检测,共计 65 个实验,每个实验包括目的、原理、试剂、操作、计算、参考值范围、临床意义、注意事项、评价及思考题等。各校在使用时,可根据本校的设备、条件等进行取舍和顺序调整。

本教材可供高等医学院校医学检验学、临床医学、基础医学、预防医学等专业使用,也可供从事医学研究的相关人员参考使用。

本教程在编写过程中,得到了同行的热情鼓励和支持,也得到了参编院校和清华大学出版社的大力支持。另外,北华大学母润红老师在整理工作中给予了全力帮助,在此一并表示衷心的感谢。同时对选用参考文献及有关资料的作者表示感谢。

由于编写时间较仓促,本教材难免有错误和遗漏之处,恳请各位专家和读者批评指正。

王 琰 钱士匀

2005 年 8 月

目 录

CONTENTS

绪论	1
上篇 生物化学和临床生物化学检验基本理论	
第一章 实验室基本知识	7
第一节 常用玻璃器皿	7
第二节 化学试剂	10
第三节 生化样品的制备	16
第四节 实验记录与实验报告	19
第五节 实验用纯水的制备	21
第六节 实验室安全及防护知识	23
第七节 实验误差与数据处理	25
第二章 光谱分析技术	32
第三章 电泳技术	37
第一节 概论	37
第二节 醋酸纤维薄膜电泳	41
第三节 琼脂糖凝胶电泳	41
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	43
第五节 等电聚焦电泳	45
第四章 层析技术	47
第五章 分子生物学技术	53
第一节 核酸的分离与纯化技术	53
第二节 DNA 分析技术	55
第三节 诊断分子生物学技术的临床应用	64

下篇 生物化学和临床生物化学检验实验

第六章 血清(浆)蛋白质测定	71
实验一 血清总蛋白测定双缩脲法	73
实验二 血清总蛋白测定凯氏定氮法	76
实验三 血清总蛋白测定凯氏定氮比色法	80
实验四 血清总蛋白测定紫外分光光度法	82
实验五 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	84
实验六 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(圆盘电泳)	89
实验七 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量(垂直板电泳)	93
实验八 蛋白质的两性解离和等电点测定	98
实验九 血清 γ -球蛋白的分离与纯化	101
实验十 蛋白质的水解	103
实验十一 蛋白质的盐析与透析	106
实验十二 血清白蛋白测定溴甲酚绿法	107
实验十三 血清白蛋白测定溴甲酚紫法	110
第七章 血清葡萄糖测定	113
实验一 血清葡萄糖测定邻甲苯胺法	116
实验二 血清葡萄糖测定葡萄糖氧化酶法	119
实验三 血清葡萄糖测定己糖激酶法	122
第八章 血清脂类及脂蛋白测定	126
实验一 血清总胆固醇测定胆固醇氧化酶法	126
实验二 血清甘油三酯测定乙酰丙酮显色法	129
实验三 血清甘油三酯测定磷酸甘油氧化酶法	131
实验四 血清脂蛋白电泳琼脂糖凝胶电泳法	134
实验五 血清高密度脂蛋白-胆固醇测定磷钨酸-镁沉淀法	137
实验六 血清高密度脂蛋白-胆固醇测定过氧化物酶清除法	139
实验七 血清低密度脂蛋白-胆固醇测定聚乙烯硫酸盐沉淀法	141
实验八 血清低密度脂蛋白-胆固醇测定表面活性剂清除法	143
实验九 血清载脂蛋白 A I 和载脂蛋白 B 测定免疫透射比浊法	144
实验十 血清脂蛋白(a)测定免疫透射比浊法	147
第九章 血清酶类测定	150

实验一	小麦胚芽中酸性磷酸酶分离纯化与活性测定	150
实验二	过氧化氢酶米氏常数的测定	155
实验三	影响酶活性的因素	159
实验四	血清乳酸脱氢酶总活性的测定比色法	161
实验五	血清乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖凝胶电泳	163
实验六	血清丙氨酸氨基转移酶测定赖氏法	167
实验七	血清肌酸激酶测定肌酸显色法	171
实验八	血清 γ -谷氨酰基转移酶测定连续监测法	174
实验九	自动化分析仪实际 K 值测定	176
第十章	血清电解质测定	180
实验一	血清钠、钾测定火焰光度法	182
实验二	血清钠、钾测定离子选择电极法	186
实验三	血清氯测定硫氰酸汞比色法	189
实验四	血清总钙测定甲基麝香草酚蓝比色法	191
实验五	血清钙测定邻-甲酚酞络合酮比色法	193
实验六	血清磷测定还原钼蓝法	196
实验七	血清镁测定甲基麝香草酚蓝比色法	198
第十一章	血清微量元素测定	201
实验一	血清铜测定双环己酮草酰二脲比色法	202
实验二	血清锌测定吡啶偶氮酚比色法	205
实验三	血清铁和总铁结合力测定亚铁嗉比色法	207
第十二章	肝功能试验	211
实验一	血清总胆红素和结合胆红素测定改良 J-G 法	211
实验二	血清总胆红素和结合胆红素测定胆红素氧化酶法	215
实验三	血清总胆汁酸测定酶比色法	218
第十三章	肾功能试验	222
实验一	血清尿素测定二乙酰一肟法	223
实验二	血清尿素测定脲酶-波氏比色法	225
实验三	血清尿素测定酶偶联速率法	227
实验四	血清肌酐测定除蛋白碱性苦味酸法	229
实验五	血清尿酸测定磷钨酸还原法	231

第十四章 层析检测技术	235
实验一 凝胶层析法分离血清蛋白质	236
实验二 DEAE-纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	237
实验三 胡萝卜素柱层析	239
第十五章 分子生物学检测技术	242
实验一 盐析法提取动物组织基因组 DNA 及其含量测定	242
实验二 异硫氰酸胍-酚/氯仿一步法提取动物组织总 RNA 及含量测定	245
实验三 碱裂解法从大肠杆菌中制备质粒 DNA	248
实验四 PCR 扩增目的 DNA	251
实验五 TA 克隆技术	254
第十六章 方法学评价实验	257
实验一 线性范围试验	258
实验二 重复性试验	261
实验三 回收试验	264
实验四 方法比较试验	266
附录一 常用生化参考值	270
附录二 缓冲溶液的配制	286
附录三 常见蛋白质相对分子质量参考值	300
附录四 常见蛋白质等电点参考值	302
附录五 常用单位换算法	304
附录六 元素的原子量表	306
附录七 酸碱指示剂	308
附录八 常用生化检验英文缩写术语	310
索引	314
参考文献	318



绪 论



生物化学(biochemistry)是研究生物体内化学分子与化学反应、生物体分子结构与功能、物质代谢与调节,以及遗传信息传递的分子基础与调控规律的科学。临床生物化学(clinical biochemistry)是在人体正常的生物化学代谢基础上,研究疾病状态下生物化学病理性变化的基础理论和相关代谢物的质和量的改变,从而为疾病的临床实验诊断、治疗监测、药物疗效和预后判断、疾病预防等方面提供信息和决策依据的一门学科。它是在生物化学基础上迅速发展起来的一门独立学科,二者相互渗透,密切相关。

早在 20 世纪初,科学家就开始对人体的化学组成进行系列研究。20 世纪 50 年代, Watson JP 和 Crick FH 提出了 DNA 双股螺旋结构模型,随后,分光技术、层析技术、电泳技术和免疫学技术等分析技术的陆续应用,推动了临床生物化学检验技术的发展。20 世纪 80 年代发明的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术,展现出广阔的应用前景,将生物化学、临床生物化学和分子生物学不断向前推进。

生物化学和临床生物化学检验实验教学是理论教学的重要环节。通过实验教学,观察某些生物化学和临床生物化学检验反应现象,联系并加深对理论内容的理解,验证和巩固理论知识;掌握生物化学和临床生物化学检验实验的基本知识、实验原理和一般仪器的使用;培养科学实验技能和严谨的科学态度,准确记录,科学分析并做出实事求是的实验报告,逐步提高观察问题、分析问题和解决问题的能力,为今后从事科学实验打下必要的基础。

生物化学和临床生物化学检验实验室规则

(1) 学生进入实验室必须穿好白大衣,戴好白帽子,衣帽整洁。自觉遵守实验室纪律,不准迟到、早退,不准大声喧哗和随意走动。

(2) 实验前必须预习,明确实验目的,掌握基本原理,熟悉主要操作、注意事项,做好实验设计。在实验过程中,听从老师指导,严格地按操作规程进行。仔细辨认试剂标签,

看清名称及浓度,切勿用错。实验后及时整理,根据实验结果进行科学分析,如实记录实验过程中出现的现象、数据与结果,按要求书写实验报告。实验报告要真实,若实验失败,要分析原因。

(3) 实验台面、试剂药品必须保持整洁,仪器、药品要井然有序。取出试剂后,立即盖好瓶塞并将试剂瓶放回原处,瓶塞不要盖错。不要将试剂药品洒在实验台面和地上,严禁向水池内丢碎纸片、棉花等物。实验完毕,将用具刷洗干净,放回原处,实验台面擦拭干净,经老师验收后方可离去。

(4) 使用滴管时,滴管尖端朝下,不可倒置,以免试剂流入橡皮帽。用吸量管取液体时,应该用吸耳球吸,不能用嘴吸。

(5) 所有固体废弃物(棉花、纱布、滤纸等)须丢入垃圾筒中,不可弃于桌上及水池里。

(6) 吸标准溶液时,应先将标准液倒入干净试管中,再用吸量管吸,以防污染瓶中标准溶液。有毒及有害物不能随意乱扔,应专门收集并做无害化处理。易燃易爆试剂应远离火源,低沸点有机溶剂如需加热要用水浴。

(7) 实验室内严禁饮水和进食。凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验,均应在通风条件下进行。

(8) 爱护仪器,尽量避免破损及超负荷使用,用完及时关机。配制试剂和用无离子水要注意节省,按实验实际使用量配制,重要和昂贵的试剂,用后必须及时回收,不得丢弃。

(9) 器材损坏时,应如实向教师报告,并填写损坏器材登记表,后方可补领。

(10) 注意安全。实验室内严禁吸烟! 乙醚、乙醇、丙酮等易燃物品,使用时必须远离火源,蒸馏时用水浴或蒸气浴,不可直接加热。剧毒物品要严格管理,小心使用,切勿触及伤口或误入口内。操作结束后,必须认真洗手,严格清点。

(11) 实验室内的一切物品不得私自带出实验室,不得在实验室内存放与实验无关的物品。

(12) 实验内容和安排如有不合理的地方,可提出改进意见。对实验中的一些反常现象应积极分析、讨论,大胆提出自己的看法,做到主动学习。

(13) 实验完毕,所有公用物品应摆放整齐,各自清理自己的实验桌面,清洗所用器材。每次实验课由学生轮流值日。值日生要负责打扫实验室的卫生、检查门窗水电安全及一些服务性工作。

本书纲要

生物化学和临床生物化学检验实验是生命实验科学的重要组成部分,由于科学发展的横向性以及学科间的相互渗透,生物化学和临床生物化学检验实验在渗入其他学科的同时,也渗入了一些相关学科的理论知识和实验方法。再加上实验器材和仪器的现代化,推动了生物化学和临床生物化学检验的发展,从而为疾病的临床实验诊断、药物疗效、治疗监测、预后判断及疾病预防等提供了可靠信息。

本书主要是供高等医学检验专业本科学生使用的教材,也可供临床医学、基础医学、

预防医学和从事医学研究的人员使用。全书分上、下篇,上篇为生物化学和临床生物化学检验基本理论,包括实验室基本知识、光谱分析技术、电泳技术、层析技术和分子生物学技术;下篇为生物化学和临床生物化学检验实验,包括血清蛋白质测定、血清葡萄糖测定、血清脂类及脂蛋白测定等多种物质的检验,共计 65 个实验,每个实验包括目的、原理、试剂、操作、计算、参考值范围、临床意义、注意事项、评价及思考题等。各校在使用时,可根据本校的设备、条件等进行取舍和顺序调整。

(王 琰 钱士匀)

上
篇

.....生物化学和临床生物化学检验基本理论.....▶

S
H
A
N
G
P
I
A
N

实验室基本知识

第一节 常用玻璃器皿

玻璃器皿是生物化学和临床生物化学检验学实验常用的基本器具,其清洁程度直接影响测量样品的可靠性和实验结果的准确性,因此玻璃器皿的清洁非常重要。根据玻璃器皿用过与否、实验的特殊要求以及污物的性质应该选择不同的清洗液和不同的清洗方法。洗涤效果的基本要求:玻璃器皿清洁透明,表面不含可溶解的物质,水能够沿器壁自然下流而不挂水珠。

一、玻璃仪器的一般洗涤

(一) 新器皿的清洗

新器皿的特点是表面附着油污和灰尘,含有可游离的金属离子。一般情况下,新器皿首先需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于 0.93mol/L 的 Na_2CO_3 溶液中煮沸。再次用流水冲净后,再浸泡于 $0.3\sim 0.6\text{mol/L}$ 的 HCl 溶液中过夜。用流水洗净酸液,再用蒸馏水少量多次冲洗 $2\sim 3$ 次,在 $100\sim 130^\circ\text{C}$ 烘箱内烤干备用。

(二) 用过玻璃器皿的清洗

1. 非计量的一般玻璃器皿和粗容量器皿 如试管、量筒、烧杯等,首先用肥皂水刷洗,将器皿内外(特别是内壁)细心刷洗,然后用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 $2\sim 3$ 次后,烤干或倒置在清洁处晾干备用。

2. 容量分析器皿 如吸量管、滴定管、容量瓶等,首先用自来水冲洗晾干,然后于铬酸洗液中浸泡数小时,最后用自来水和蒸馏水冲洗干净,干燥备用。

3. 比色杯 首先用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物粘附于杯壁时,应该用盐酸

或适当溶剂清洗。然后用自来水、蒸馏水冲洗干净,倒置晾干备用。一定不要用试管刷、粗糙的布或滤纸等擦拭,也应避免用较强的碱或强氧化剂清洗。

二、各种清洗液的配方及使用

1. 肥皂水和洗衣粉溶液 这是最常用的清洗液,利用其乳化作用可以很好地除去污垢,一般玻璃器皿均可用其刷洗。

2. 铬酸洗液 广泛应用于玻璃器皿洗涤的清洗液,由于它的强氧化性和强酸性而产生很强的清洁效力。铬酸洗液由重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)和浓硫酸配制而成,硫酸越浓,产生铬酸越多,其清洁效力也越强。常用铬酸洗液的浓度为3%~5%。铬酸洗液具有很强的腐蚀性,使用时必须注意安全,防止烧伤。铬有致癌作用,操作时须做好防护。当洗液由棕红色变为绿色时表明变质,不宜再用。主要配制方法如下。

(1) 在250ml烧杯中置重铬酸钾5g,加入热水5ml搅拌,使其尽量溶解。先在烧杯下放一石棉网,再向烧杯中缓慢加入工业用浓硫酸100ml,边加边搅拌。注意不要加入过快,勿使硫酸溅出来。此时溶液由红黄色逐渐变为黑褐色。冷却后贮于有塞的细口瓶中,以防吸水。

(2) 在250ml烧杯中置100ml工业用浓硫酸,小心加热,然后慢慢加入5g重铬酸钾粉,边加边搅拌,待全部溶解后冷却,装瓶并盖严备用。

(3) 取80g重铬酸钾溶于1000ml水中,慢慢加入工业用硫酸,边加边搅拌,冷却后装瓶备用。

3. 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)洗液 常用的EDTA- Na_2 洗液浓度为5%~10%,加热煮沸后可去除玻璃器皿表面钙镁盐类和不易溶解的重金属盐类产生的白色沉淀。

4. 草酸洗液 草酸5~10g,溶于100ml水中,制成草酸洗液。加入少量硫酸或浓盐酸后可洗去高锰酸钾的痕迹。

5. 尿毒洗液 尿毒洗液的常用浓度为45%,是清洗血污和蛋白质的良好洗剂。

6. 盐酸-乙醇洗液 盐酸-乙醇洗液的常用浓度为3%,用于除去玻璃器皿上附着的染料。

7. 乙酸-硝酸混合液 一般用于难以洗净的有机物,常用乙酸-硝酸混合液清洗,最适于清洗滴定管。

8. $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ 水溶液 常用浓度为5%~10%,此碱性液体可用于洗涤油污。

三、吸量管和微量移液器

吸量管和微量移液器是用于准确量取一定体积液体的最常用的实验仪器,测定的准确度与吸量管及微量移液器的正确选择和使用密切相关。而微量移液器可以单手操作,用于多次重复定量移液,使用非常方便。

(一) 吸量管的种类

常用的吸量管有以下3种:

1. 移液管 常用于量取 50.0ml、25.0ml、10.0ml、5.0ml、2.0ml、1.0ml 的液体。这种吸量管为单一刻度管,放液时,量取的液体自然流入盛器,管尖须靠在盛器内壁上停留 15s。注意管尖残留液体不可吹出。

2. 奥氏吸管 常用于准确量取 0.5ml、1.0ml、2.0ml、3.0ml 液体。此种吸量管亦为单一刻度管,当放出所量取的液体后,必须将管尖余留的液体吹入盛器内。

3. 刻度吸管 常用于量取 10ml 以下任意体积的液体,一般刻度包括尖端部分的体积。一类吸管为“吹出式”,吸管上端标有“吹”或“快”字样,将所量取的液体全部放出后,必须将残留于管尖的溶液吹入盛器。另一类未标“吹”或“快”字的吸管,则不应该吹出管尖的残留液体。

(二) 吸量管的使用

1. 选用原则 要求量取液体体积较大时,要用移液管;要求准确量取整数量体积液体时,应选用奥氏吸管;要求量取任意体积(10ml 以下)的液体时,应选用与所取液体量最接近的刻度吸管。例如,取 0.08ml 液体,应选用 0.1ml 的刻度吸管。在同一定量实验中,要于不同试管中加入同种试剂并且取量不同时,应该选择与最大取液量接近的 1 支刻度吸管。如各试管要求加液体量为 0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml 时,应选用 1 支 2.0ml 的刻度吸管。

2. 使用方法 以中指和拇指拿住吸管上端,食指置于吸管上端一旁;将橡皮球置于吸管上端吸取液体,眼睛看着液面上升,使液面至刻度上;吸完后迅速用食指顶住吸管顶端,用滤纸擦干吸管外壁;吸管要保持垂直,尖端与试剂瓶保持接触,用食指控制液体下降至所需体积的刻度处(液体凹面、刻度和视线应在同一水平面上);吸管移入准备接受溶液的实验盛器中,吸管尖端接触器壁形成角度,吸管仍要保持垂直;放开食指,使液体自动流出;根据吸管种类吹或不吹尖端余留液体。

(三) 微量移液器的使用

1. 操作 首先用拇指和食指旋转移液器上的旋钮,使数字窗口出现所需体积的数字;将吸嘴牢固地装在吸引杆上,装上后轻轻地旋转以保证气密性;用拇指按住塞杆顶端按钮到第一停止点,把吸嘴头尖浸入待取溶液内 2~5mm,缓慢释放按钮,使之慢慢返回到初始位置,停留 1~2s;把吸嘴沿取样容器壁滑动从容器内取出,用滤纸擦去吸嘴表面附着的液体,注意不要接触到吸嘴头的尖孔;把移液器的吸嘴头尖置于加样盛器壁上,用拇指慢慢地将按钮按到第一停止点,停留 1s(黏性较高的溶液增加停留时间);然后按到第二停止点,吹出吸嘴尖端的残余液体,再让吸嘴沿着容器壁向上滑动,当吸嘴头尖离开容器壁,与溶液不接触后释放按钮,使其返回到初始位置。

2. 注意事项

(1) 取样之前预先吸取一次样品溶液,然后再正式取液,可以减少吸嘴内壁残留“液膜”造成的误差,尤其是吸取血清、蛋白质和有机溶液时。

(2) 吸液和排液的速度尽可能一致,可以提高移液精确度,同时因为“啷”地一下释放