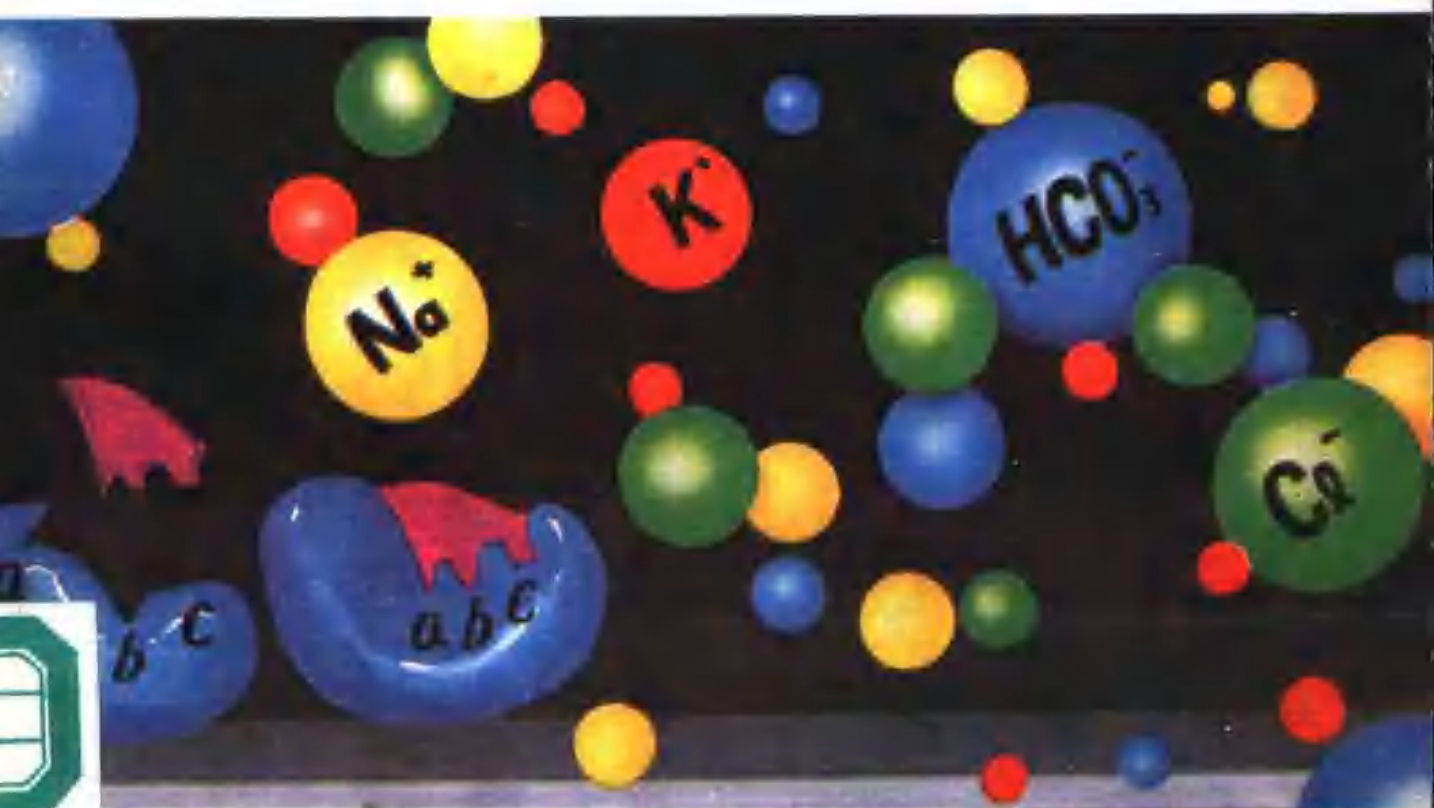


医学资料

美国临床化学协会 推荐临床化学选择法

(小型实验室用)

张 甦 韩志钧 于家录 译



沈阳军区后勤部卫生部

检 验 学 术 资 料

美国临床化学协会
推荐临床化学选择法

(小型实验室用)

张甦 韩志钧 于家录译

沈阳军区后勤部卫生部
沈阳军区质控中心
二〇二医院
空军沈阳医院
二〇八医院

序

本书是为小型临床化学实验室而编写的。所谓“小型实验室”是指不具有高级实验设备及专业人材的实验室而言，诸如商业性化验室、中小型医疗单位及第三世界国家的医院实验室等。

此书集结了美国临床化学协会专家们的心血，他们提供了最适用的优秀检验方法，文字力求简明扼要、通俗易懂。书中方法均经作者多年试用、经过筛选、细心评价而选出的。其目的是节省耗资巨大的筛选费用；为小型实验室提供可靠实验方法。相信本书定会受到大家欢迎。与此同时让我们感谢各位专家为人类的未来所做的不朽贡献。

美国临床化学总部编辑

J. S. King

译 者 的 话

该专辑是美国临床化学协会(AACC)编辑部出版的《临床化学选择法》丛书第九卷,于1982年在华盛顿出版。书中内容适合我国实验室条件,又鉴于部分内容适用性不大,故选择其大部适用部分以供我国检验同道参考选用。

原书编排是按检验项目英文名称A B C顺序排列,为使用方便改为分类排列。

由于译者外文水平所限,错漏之处定所难免,希检验同道斧正、指教。

本书承蒙沈阳军区后勤部卫生部首长大力资助、指导与鼓励;同志们大力协助才得以问世,借此致以由衷地感谢

译 者

1984年12月于沈阳

目 录

第一章 蛋白质测定

一、血清总蛋白及白蛋白测定.....	(1)
(一) 血清总蛋白折射法.....	(1)
(二) 血清总蛋白双缩脲法.....	(2)
(三) 血清白蛋白 B C G 比色法.....	(5)
二、尿液蛋白总量比浊法.....	(7)
三、脑脊液总蛋白比浊法.....	(9)

第二章 糖 测 定

一、葡萄糖直接己糖激酶测定法.....	(11)
二、葡萄糖邻甲苯胺法.....	(15)

第三章 脂 类 测 定

一、总胆固醇酶测定法.....	(20)
二、总胆固醇 L—B 反应法.....	(25)
三、甘油三酯乙酰丙酮比色法.....	(27)

第四章 氨基酸及其代谢产物测定

一、苯丙氨酸荧光测定法.....	(30)
二、血清尿素(氮)尿素酶脲酶比色法.....	(36)
三、血清尿素(氮)二乙酰单肟直接比色法.....	(43)
四、血清、尿液肌酐比色法(苦味酸法).....	(54)
五、血清、尿液肌酐柱层析法.....	(57)
六、尿酸磷钨酸比色法.....	(60)
七、血氨酶测定法.....	(65)

第五章 酶 活 力 测 定

一、谷草转氨酶活力动力学测定法(暂定法).....	(69)
---------------------------	--------

二、谷丙转氨酶活力动力学测定法（暂定法）	（ 75 ）
三、乳酸脱氢酶活力动力学测定法	（ 78 ）
四、碱性磷酸酶活力测定法（P—NPP基质法）	（ 84 ）
五、酸性磷酸酶活力 TPP 基质法	（ 87 ）
六、酸性磷酸酶活力P—NPP基质法	（ 90 ）
七、淀粉酶活力碘淀粉比色法	（ 93 ）
八、淀粉酶活力染料淀粉法	（ 96 ）
九、磷酸肌酸激酶活力测定法	（ 100 ）
十、红细胞葡萄糖—6—磷酸脱氢活力测定法	（ 104 ）
十一、凝血酶元时间和部分激活凝血活酶时间测定法	（ 107 ）

第六章 无机元素测定

一、钾和钠测定法（火焰光度法）	（ 115 ）
二、氯化物硫氰酸汞比色法	（ 120 ）
三、氯化物直接汞滴定法	（ 123 ）
四、发汗试验及汗液分析	（ 124 ）
五、钙 OCPC 比色法	（ 129 ）
六、无机磷比色法	（ 133 ）
七、镁。Magon 比色法	（ 137 ）
八、镁。钛黄比色法	（ 141 ）
九、铁及总铁结合力测定法	（ 144 ）

第七章 胆红质测定

一、总胆红质及直胆红质测定法（改良 J—G 法）	（ 148 ）
二、总胆红质及直胆红质测定法（改良 M—E 法）	（ 153 ）

第八章 血气分析及渗透压测定

一、PH 和血气分析	（ 158 ）
二、渗透压测定（同渗容摩）	（ 172 ）

第九章 其 他

一、巴比妥类药物测定法（紫外分光光度法）	（ 180 ）
二、血液一氧化碳测定法	（ 182 ）
三、水杨酸盐测定法	（ 186 ）

四、血清中酒精量测定法（乙醇脱氢酶法）	（ 189 ）
五、尿雌激素总量测定法	（ 193 ）
六、尿液分析	（ 198 ）

附录：

1. 转换因数及浓度单位折算	（ 211 ）
2. 正常人参比值	（ 213 ）

第一章 蛋白质测定

一、血清总蛋白及白蛋白测定

蛋白是血清或血浆里重要成份，它供给免疫防御物，运送代谢产物和激素，及维持胶体渗透压。“总血清蛋白”至少由几种蛋白组成，某些蛋白含量甚微，而如白蛋白和免疫球蛋白G是以10—50g/L浓度存在。总蛋白浓度通常是作为一个粗略的营养及胃肠功能指示物，作为血浆粘滞度指示物。临床中常测血清白蛋白含量，用它评价营养状态及胃肠道功能的指标。12种其他蛋白常常用免疫技术测定，这包括免疫球蛋白， α_1 -抗胰蛋白酶，转铁蛋白，触珠蛋白和纤维蛋白元等。本文只讲血清总、白蛋白及尿、脑脊液蛋白测定方法。

病人不一定空腹采血，但应减少脂血(脂血的影响将在以后讨论)。尽管血浆可被用来做为测定总蛋白，但血清是首选样品。基本上，血清和血浆之蛋白成分上唯一差别是纤维蛋白元(正常仅2—4g/L，但在很多疾病情况下比较高)。标本如果保存在紧紧塞住容器里，在-20℃，2—4℃或者在室温保持时，至少一周。清亮的血清样品的总蛋白和白蛋白是没有变化。在取样前应化冻混合均匀再用。

注：亦有人证实，清亮血清，紧紧地塞住，在室温稳定一周或更长，在2—4℃稳定一个月，在-20℃稳定直到2个月。

(一) 血清总蛋白折射法

原理：

溶解的固体增加溶液的光折射，通过读折射指数能得到一个总固体的可靠的量变(考察总的血清总蛋白折射术，见参考文献2—4)。因为血清每升正常含有大约16g非蛋白固体，大量的盐，他们对折射指数的影响必须校正。在实施中是采用已知蛋白含量血清校准折光计。折射的指数因温度而不同，但在通常试验温度范围内，这个影响已被用适当的折光计结构克服。高浓度非蛋白固体，如尿毒症时尿素，糖尿病葡萄糖，在疾病情况下，是误差的来源。如血浆中含有6000mg/L葡萄糖或2800mg/L尿素氮，其折射率和6g/L蛋白是相同的，可见其误差之大。

仪器：

最通用的折射仪是美国光学公司的产品。

用一个内部光源按装在升降口(罩)台上，使用它是最方便的。仪器有温度一补偿，且有校准尿比重和血清蛋白定标器。能用蒸馏水调零点。

操作:

1. 把一滴血清注入塑料盖和玻璃板之间,或在玻璃板上放一滴,然后放下塑料盖。

2. 和缓和压盖,并且移动折光器在明亮和暗淡场之间观测划分线。从刻度上读蛋白浓度。

3. 用水清洗表面和用透镜纸擦拭干净。

4. 以g/dL计算, 刻度 $\times 10$ = 血浆总蛋白(g/L)。

如果蛋白浓度小于35g/L, 结果很可能不准确, 并且应该使用双缩脲方法(见下面)。如果浓度超过110g/L, 应稀释样品, 并重复测定。

注: 有人测定了该法的分析误差 $<5\%$, (批内变异 $<1.5\%$; 批间变异为 $<2\%$ 。)

本法测得总蛋白浓度为72.7g/L的血清, 再用DuPontaca生化自动仪测其结果是71.5g/L

(二) 血清总蛋白测定(双缩脲法)

原理:

双缩脲反应是测定蛋白的最古老的方法之一, 早在1914年就被用来测定血清总蛋白。目前, 它仍然是最简单和准确的方法之一。蛋白分子中的多肽脲($-\text{NHCO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2-$) 在碱性条件下与 Cu^{++} 作用生成紫色络合物, 因而得名为双缩脲反应。此反应对不同种类蛋白的呈色力是相似的。目前常用白蛋白做标准物。

双缩脲试剂有很多种配方, Reinhold氏配方是第一个加酒石酸盐, 以防止氢氧化铜沉淀。为了这个目的, Kingsley 提供一个含磷酸盐试剂。而我们采用的试剂是Dumas配方, 同广泛使用的Gornall氏试剂相比其线性范围更宽。配方中加入酒石酸盐是 Cu^{++} 的络合剂, 碘化物有抗氧化作用。Dumas氏双缩脲试剂如用1g/L纯牛血清蛋白检测其呈色力, 540处的净光密度值是0.297。

试剂:

此种试剂有许多市售品, 如Sigma公司出品的双缩脲试剂是采用Gornall氏配方, 此外Fisher公司亦有类似试剂盒。本法采用Dumas氏配方,

1. 6mol/L NaOH溶液: 用新鲜或煮沸蒸馏水配制(含 CO_2 量极少)。溶解240g NaOH, 冷却、并稀释到1L。NaOH要从未启封瓶取用, 以保证它是干燥和没有碳酸盐。此溶液应放于室温, 贮存在密封的聚乙烯瓶里。

2. 双缩脲试剂(CuSO_4 , 12mmol/L; 酒石酸钾钠, 32mmol/L; KI, 30mmol/L; NaOH, 0.60mmol/L)。在大约500mL新鲜蒸馏水里溶解3.00g硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)。加9.0g酒石酸钾钠 $[\text{KOOOC}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ 和5.0g碘化钾。溶解后, 加100ml, 6.0mol/L NaOH溶液, 并且用蒸馏水稀释到1L。室温, 贮存在密封的聚乙烯瓶里。试剂大约稳定6个月。

3. 空白试剂：除不加硫酸铜外配方同双缩脲试剂。

4. 蛋白标准液（白蛋白，60—70g/L）：用纯牛血清白蛋白配制。要用精确度好的方法测知其蛋白含量。贮密封瓶里，放2—4℃下保存。配制及标定方法如下：

取结晶牛血清白蛋白粉1.0g 溶于0.1g/L 叠氮钠水溶液12mL里，温和搅拌全溶之后，用下述紫外分光光度法进行定标：

吸取上述蛋白标准液100微升，加水10mL混匀（稀释101倍）。取部分稀释液注入1.0厘米石英比杯内，以水校零点，测280nm（带宽应≤2nm）光吸收值（A_{280nm}）。应做数次平行试验平均值。

$$\text{则蛋白含量 (g/L)} = \frac{A_{280\text{nm}}}{0.661} \times 101$$

如无紫外分光度计时，亦可用Doumas氏双缩脲试剂呈色（蛋白标液0.1mL加双缩试剂5.0mL）测得540nm光吸收值（计出净A_{540nm}）除以0.297（消光系数）再乘以51(5.1/0.1)即得蛋白浓度（g/L）。此法不如紫外分光光度精确。

注：用人血清白蛋白做标准物不如牛血清白蛋白好。美国标准局的蛋白标准参比物——927标准物即是纯牛白蛋白溶液（浓度是70.45g/L），而CAP（美临床病理学院）提供的总蛋白标准液也是62g/L牛血清白蛋白溶液。

操作：

取四支试管，按下表注加：

注加 (mL)	试剂空白	标 准	测 定	测定空白
水	0.1	—	—	—
血清（浆）	—	—	0.1	0.1
蛋白标准液	—	0.1	—	—
空白试剂	—	—	—	5.0
双缩脲试剂	5.0	5.0	5.0	—
比 色	分别混匀，放室温30分钟（或37℃，10分钟），用水校0点，测540nm光吸收值（A）			

$$\text{血清总蛋白浓度 (g/L)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{试剂空白}} - A_{\text{测定空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{试剂空白}}} \times \text{标准蛋白浓度 (g/L)}$$

如果超过120g/L，用等容积0.15mol/L NaCl稀释样品，重新分析，用2乘结果。

制备标准曲线：已经证明反应采用上面描述的试剂，从10—120g/L是直线。为了

核实这个, 制备标准曲线, 使用 100u L 用 0.15mo L/L NaCl 适当稀释 (至到 6 倍) 60—70g/L 标准, 以产生大约 10—60g/L 值, 及增加未稀释标准量 (150 和 200u L) 作为从 60—120g/L 值。这些增加的量将轻微地增加总容积 (分别地从 5.1 到 5.5 和 5.2m L); 在绘曲线前, 用他们 $\times$ (总容积/5.1) 校正得出最后吸光度。

注: 对于脂肪血清, 按照 Chromg 和 Fischer 的方法。

改进建议: 在一个试管里, 使 100u L 血清附加 0.5m L 水同 10m L 丙酮混合。以复制品实行试验。颠倒混合和离心。倾去上层清液, 倒置试管, 把边缘接触到一张有吸收力的纸上, 敏捷地吸移 5.00m L 双缩脲试剂进入一个管和 5.00m L 双缩脲空白进入另一管。旋涡一混合, 沉淀应该迅速溶解。按上面分析进行。

评价者 L. F. H. 用这样处理脂肪样品, 得到 100% 分析回收率。虽然有时甚至这些样品可以是非常脂肪化。但评价者 S. M. D. 和 R. M. C. 建议仅分析紧急实验样品, 以避免必须如此处理。

评价者 S. M. D. 和 R. M. C. 宁可使用 37°C 10 分钟代替室温 30 分钟。他发现, 在这种情况下, 标准曲线的直线可到 140g/L。他又发现, 用小心吸移和标定的吸管, 试剂和样品容积能够减半。

评价者 L. F. H. 发现, 大多数血清空白吸光度是 0.010 或更小, 很少高于 0.030。评价者 G. T. P. 和 K. Y. H. 发现, 只有在样品是明显的着色 (黄疸或溶血) 和混浊时, 血清空白才是必要的。

讨论:

使用折光技术或双缩方法测定总蛋白是容易的。折光计的准确性仅取决于血清的标定。读数的精密度是到 1g/L。观察具有相对正常血清样品表明, 双缩脲法和浊度法相互实验的一致性是 $\pm 3\%$ 。用双缩脲试剂结果是高度地取决于使用标准的准确性; 今后, 要详细地规定双缩脲标准。一个 51g/L 标准, 在 1cm 杯里, 应该产生一个 0.300 左右的最终的双缩脲吸光度。运转期间精密度, 双缩脲法大约是 $\pm 2\%$ (cv)。

注: 评价者观察运转精密度如下: 2.3% (S. M. D. 和 R. M. C.), 小于 1% (L. F. H.), 2.6—4.3% (M. M. K.), 和 3% (G. T. P. 和 K. Y. H.)。日间精密度是 3.0% 和 3.7% (S. M. D. 和 R. M. C.), 3% (L. F. H.), 1.3—2.1% (M. M. K.) 和 1.3% (G. T. P. 和 K. Y. H.)。评价者 S. E. K. 发现一个平均 4.1% 的 CV, 作为 20 个不同样品同一试验的 CV 结果 (g/L) 同其它方法比较是好的: 66.9, 同折光法 67.4 相比较 (S. M. D. 和 R. M. C.); 71.9, 同另一个双缩脲法 73.0 相比较; 64.6, 同 American Monitork. D. A. 64.4 相比较 (G. T. P. 和 K. Y. H.)。

像在程序里讨论过的那样, 在折光方法里, 主要的误差来源是非蛋白固体的存在, 如过量的尿素和葡萄糖。同样, 因为没作标定, 折光计不应该用来测定体液蛋白; 引流液, 唾液, 胃肠液等不可能像血清或血浆那样含有同样量的蛋白, 并且定标对他们将不适用。

双缩脲方法里误差的主要来源是为脂肪化样品设立的空白的易变性。不含铜的空白试剂, 为血清里胆红素和血红蛋白的颜色提供满意的补偿, 但不为过多的由脂类化合物引

入的混浊提供满意的补偿。对脂肪血清推荐一个交替的空白程序。同样，在未必有的过程里，在血液样品里存在葡聚糖（作为容积扩张剂，在联合情况下，稀罕的使用），同双缩脲试剂可以发生沉淀作用；如果是这种的话，离心试剂混合体和测定清亮的浮在上层的液体。

男人和女人的血清总蛋白的参考均值是72g/L（62—82g/L范围）。其他原始资料报告66—82g/L和60—80g/L。男人比女人大约高1g/L。浓度按下面公式随着年令轻微降低：平均蛋白浓度（g/L）=70.9—0.07y（男）或68.6—0.05y（女），这里y=年令。在妊娠时，到足月时浓度降低，从69到61g/L。在新生儿时，蛋白浓度57（SD7）g/L，到6个月时候，增加到60（SD4）g/L，大约到3岁时候，增加到成人值。未成熟婴儿显示还要比较低的价值，36—60g/L。每日变动少于5g/L，并且注意进食前后没有差别。步行的个别人比躺着的有人比较高的总蛋白浓度（大约4—8g/L），这是液体从血管床进入组织间隙体位移动的必然结果。强力的运动引起相似的增加达几个小时。发现在严重的蛋白缺失时（凡是饮食缺乏或有消化吸收内在的困难）时，在慢性消耗性疾病时，或在迁延的蛋白损失如肾脏病时，降低总蛋白浓度。如果血清蛋白浓度少于40g/L，水肿就经常发生。然而，蛋白浓度不是蛋白缺乏的敏感指标，因为在很多疾病时，血清球蛋白的一部分（免疫球蛋白和“急性相”蛋白）有一个伴随性增加，它作为通常白蛋白减少的补偿。这个替换，按一个降低白蛋白/球蛋白比例，（正常1.5—2），是看得出的。总蛋白值增加发生在脱水时和在高度免疫状态或付蛋白血症时，在这时抗体或单克隆免疫球蛋白以高浓度存在，100g/L或更多，往往导致血浆粘滞度方面显著增加，接着减少到未稍循环。

（三）血清白蛋白BCG比色法

样品收集同总蛋白。

原理：

白蛋白结合负电荷有机物如脂肪酸，胆红质，激素，药物和染料，其它蛋白的结合能力很小。此法系采用1971年的Doumas氏法，以PH4条件下用BCG与白蛋白结合，为排除干扰把比色时间改为30秒。

试剂：

1. BCG试剂（BCG，150mmol/L；琥珀酸钠缓冲液，75mmol/L；叠氮钠，1.5mmol/L；Brij—35，1.2g/L；PH 4.20），在大约950mL水中溶解105.0mg溴甲酚绿或108.0mg它的钠盐，8.85g琥珀酸，100mg叠氮钠、300g/L Brij—35溶液4mL混匀之后，用6moL/L NaOH调节到PH4.15—4.25，然后用水稀释到1L。放在室温，塞严的聚乙烯瓶内，试剂可稳定6个月。

注：有许多配方类似的试剂盒出售，但在用前要测一测线性好坏。

2. 人白蛋白标准（大约每升60g白蛋白和7.5mmoL叠氮钠），在100mL水中在一个小瓶里轻轻搅拌溶解6g人血清白蛋白（Cohn Fraction V）和50mg叠氮钠。用双缩脲法测量总蛋白浓度。贮密闭瓶里，放在2—4℃可稳定半年。

3. 空白试剂：除不加BCG外，余同BCG试剂。

注：此空白试剂只用在乳浊血清。

操作：

1. 用水调628nm光吸收值至0点，而后再测BCG试剂628nm光吸收值（ $A \approx 0.150$ ）。最后用BCG试剂调至628nm光吸收值等于0。

2. 吸移10.0mL BCG试剂一系列试管内。一个一个地加40μL人白蛋白标准（60g/L）或未知血清到每一试管，立即混合，并在加入后30秒（±3秒），测628nm吸光度值。

注：使用标定吸移管和小心地吸移技术，可使用半量试剂和样品。有人主张用波长625nm比色。也有人主张用秒表计呈色时间，认为加入BCG试剂10秒比色对结果干扰最小。尤其是对低白蛋白或高球蛋白的样品要尽可能在短时间比色。

3. 计算结果：

$$\frac{A_{\text{测定}}}{\text{净}A_{\text{标准}}} \times \text{标准液蛋白浓度(g/L)} = \text{血清白蛋白浓度(g/L)}$$

（净A值 = 测量A值 - 空白A值）

4. 对高胆红素血和溶血样品不要求空白，但对高脂肪（混浊）样品，往10mL空白试剂加40μL样品，读吸光度，并且从加BCG试剂样品吸光度减去这个读数。

5. 每升白蛋白从10到60克，反应是直线。为得到这个范围里浓度，要用稀释人白蛋白标准液进行核对。

注：本法精密度（CV）是：批内，1.5%和2.8%（S.M.D.和R.M.C.），3.0—6.7%（M.M.K.），和3.4%（G.T.P.和K.Y.H.）。回收率是98—101%（L.F.H.）；线性范围从20到80g/L。此法与自动仪法对比结果相符。

评价者L.F.H.发现本法测值比用纤维膜电泳法低。

讨论：

BCG法和免疫化学或电泳测定之间相关说明，BCG只要遵守短的反应时间的话，BCG方法可得满意的结果。用正常血清室内调查的结果显示大约6%CV；试验室内取决于操作训练，其日间CV变动在2.5—5.9%。胆红质和血红蛋白对本法无大干扰，中度脂血可以用血清空白补偿。在630nm，吸收系数大约是 $3.1\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，大约是双缩脲反应的灵敏度10倍。

血清白蛋白含量还可用电泳法测得，电泳法不受白/球比值对染料结合力的干扰。免疫化学法测白蛋白是比较可靠的方法，但目前尚未普及。

参比值：

通常白蛋白浓度在成人是42g/L（范围35—50g/L）。女人比男人大约少2g/L。这个差别，大约在70岁时消失。因为浓度按下面公式下降： $\text{g/L} = 41.6 - 0.08y$ （男人）和 $39.1 - 0.04y$ （女人），这里 y = 年令。在妊娠晚期时，浓度大约降低10g/L。新生儿

比母亲有更多白蛋白，新生儿平均是38 (SD4) g/L，到6个月时候增加到47g/L (SD4)，大约在3月达到了成人值。姿势、运动、膳食和脱水的影响比总蛋白要小。

血清白蛋白的浓度在一个大的疾病范围里减少，由于通过增加渗透能力和削弱静脉回流，损失了血管外液，像降低白蛋白生成一样。因为白蛋白的合成对门脉血液里氨基酸很敏感，所以白蛋白是一个通用的蛋白营养指标。在蛋白失去情况下如肾病综合症和肠病蛋白丢失能看见最低的白蛋白值，这时，10—20g/L浓度是普通的。＜20g/L值常在水肿时观察到。

(韩志钧译 张魁校)

二、尿液总蛋白测定 (比浊法)

尽管有时使用12小时和18小时样品，但是尿蛋白定量试验普通是24小时样品。在收集期间要求不防腐，但是收集后样品，应该被贮藏在2—4℃或冰冻保存。

原理：

尿蛋白和三氯醋酸或磺柳酸混合时，蛋白形成细微的沉淀。测量它的吸光度或光散射 (散射测浊法) 来表示沉淀量。此反应是蛋白质的共性反应。这是在酸中有正电荷的蛋白质分子与荷有负电荷的三氯醋酸盐结合成盐而形成的沉淀反应。不同蛋白质的成盐能力是有差别的，可把此法看作是一个经验方法。该比浊法与Henry氏法大体相似。

试剂：

1. 三氯醋酸 (TCA), 0.76mol/L; 在大约500mL水中溶解125g TCA, 并且在容量瓶里稀释至1L。这个溶液在室温稳定几个月, 在2—4℃无限期稳定。如果变色或出现沉淀就弃掉。

2. 氯化钠叠氮钠试剂 (NaCl 150mmol/L, NaN_3 7.5mmol/L); 在1L水中溶解8.5g NaCl 和0.5g NaN_3 。像TCA溶液那样贮存。

3. 血清: (代贮存标准液) 收集无黄疸、不溶血、透明的正常人血清, 按每升血清加入叠氮钠比例做防腐剂。用测血清总蛋白量方法测知该血清所含蛋白量, 而后分装、密封、贮存于2—4℃保存, 可用半年左右。每两个月测一次蛋白含量。

注: 作者曾用新鲜血清样品作标准, 按上面测定蛋白含量。他们指出, 做标准用血清的白蛋白/球蛋白比例应是正常。

4. 工作标准: 用 NaCl — NaN_3 试剂, 把3.00mL 贮存血清稀释到200mL, 为减少泡沫, 小心进行。按下式计算蛋白浓度: $0.015 \times \text{血清的蛋白浓度 (g/L)} \times 1000 = \text{mg/L}$ 此应用蛋白标准液应每月配一次, 贮于2—4℃。

操作:

1. 分析前, 使冷藏样品达到室温, 彻底混匀尿液和记录它的总容量。取 100ml 用 Whatman 1号滤纸过滤。

2. 用尿蛋白试纸粗测尿蛋白含量。如蛋白量 1000mg/L 时, 用 0.15mol/L NaCl 稀释尿液, 使蛋白量在 500—1000 mg/L 范围里。

3. 共取 4 支试管分别注明“测定”、“空白”、“标准一”、“标准二”。

4. 向“测定”、“空白”两管各加尿液(或稀释尿) 4 mL。向两支标准一管内加入 100mg/L 蛋白标准液 4mL, 向标准二管内加入 500mg/L 蛋白标准液 4mL。

为了校正尿里色素, 向空白管加 1.00mL NaCl—叠氮钠试剂。

6. 除空白管外, 其余管各加 0.76mol/L 三氯醋酸试剂 1 mL, (时间间隔要合适), 颠倒混匀。

7. 放室温, 10分钟。

注: 作者认为如标本和试剂未升至室温, 即混合呈浊时可招致很大误差(约 35%)。

加三氯醋酸液的时间隔以 2 分钟为宜, 比色时间应在加入三氯醋酸后 9—11 分钟。

8. 再轻轻混合每个试管内容和读取 620nm 吸光度值。用相对应的空白管调零。

9. 使用靠近样品吸光度标准计算:

$$\text{尿蛋白浓度 (mg/L)} = \frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times \text{蛋白标准液浓度 (mg/L)} \times \text{尿稀释倍数}$$

用尿蛋白浓度乘以 24 小时尿量 (L) 即可计出 24 小时尿中排泄蛋白量。

10. 为检查分析线性, 每四个月制备一次准标曲线。使用大约每升含蛋白 100, 200, 400, 800 和 1000mg 的应用标准液, 用上法比浊, 测其线性范围。

注: 作者用含蛋白量为 35mg/L 标本测得本法的批内变异系数 = 2.3~3.8%, 批间变异系数 = 5.4%。但亦有人用 19mg/L 蛋白尿测得批间变异系数高达 27.7%, 可见蛋白含量低时重复性不佳。

作者测知本法线性范围为: 0~1100mg/L。也做了法间结果对比, 用多份尿液同时用本法测平均蛋白含量为 437mg/L, 而用其他比浊法测得平均含量为 406mg/L。作者认为硫柳酸比浊法结果偏低。

讨论:

用纯蛋白测本法回收率的准确度大约是 10%, 但是在不同病理情况下尿里蛋白的不同性质产生极大差异。用同一份含蛋白量在 1200mg/L 以下的尿液标本分送各医院实验室间质控调查, 经美国临床病理学院统计分析, 试验室间 CV 是 59%。建议今后极小心和注意完成这个实验的细节, 要坚持使用尿液质控物、时时对照, 以防分析误差。

在酸性尿中, 常见的干扰物有: 先锋霉素 II 和先锋霉素 I, 氯丙嗪, 普马嗪, 大剂量青霉素, 磺胺甲异恶唑 (SMZ), 甲苯磺脲 (D860) 和很多 X 线照像造影剂等。

注: 作者发现, 用尿蛋白试纸测尿蛋白, 有时含有蛋白, 而试纸结果却是阴性(-),

这是由于试纸中的指示剂（溴酚兰），主要测量血清白蛋白。它能遗漏单克隆免疫球蛋白尿，轻链（Bence—Jones蛋白）蛋白尿，或遗漏下尿道疾病的尿道蛋白。可见尿蛋白试纸的方法不是一项理想筛选试验法。

由Tietz氏得出的蛋白排泄参考范围是25—75mg/日，但100mg/日也被作为上限广泛使用。正常肾小球在很大程度上，拦住白蛋白和高分子量（相对分子量）蛋白从血浆进入肾小球滤液。通常，尿里蛋白增加多于150mg/日，是损伤肾小球的结果。在大多数肾脏病人尿中，白蛋白是占优势的。在少数例子里，球蛋白占优势，在增殖性骨髓瘤和在巨球蛋白血症时格外显著。

注：有人认为尿蛋白参比值定为25~75mg/日是严格些，他认为应是~100mg/日、在妊妇应为~150mg/日。

尽管由发烧、甲状腺的紊乱，和心脏病引起暂时性蛋白尿可以发生在没有肾脏疾病情况下，但是蛋白尿经常是肾脏疾病的主要的表现形式。有3—5%的青年成人，在白天期间产生轻微蛋白尿，这叫做姿势或直立性蛋白尿，并且通常是一个良性情况。

三、脑脊液总蛋白测定（比浊法）

正常脑脊液无色透明。因标本难得，应小心使用与保存。标本贮存于2~4℃，蛋白可稳定数天，因此可以反复检测。如标本内混入血液将影响蛋白分析结果。

原理：

本法呈浊的机理同尿蛋白比浊法。本法简易，且不受氨基酸、肽类等物干扰，只是每次要用1mL标本为其不足。此法是用对白、球蛋白的呈浊力相同的蛋白沉淀试剂。此法是由Pennock氏首先提出，经Tietz氏改进而成。

试剂：

1. 沉淀试剂：含磺柳酸，0.12mol/L，和硫酸钠0.49mol/L，。在水中溶解30.0g磺柳酸（ $C_7H_6O_4S \cdot 2H_2O$ ）和70.0g硫酸钠（ Na_2SO_4 ）并且在容量瓶里稀释至1L。混匀并滤至透明。贮存褐色瓶里。试剂是稳定的，如有任何变色和混浊，就弃掉。

2. 贮存血清及蛋白应用标准液：配制方法同尿比浊法。

操作：

1. 离心沉淀CSF，除去任何细胞及固形成份。

2. 用0.5mL $NaCl-NaNO_3$ 加入2.0mL沉淀试剂内，混匀，以 $NaCl-NaNO_3$ 液校正0点，测620nm光吸收值（A）如 $A > 0.010$ 时表示沉淀剂不能用，应配制新品。

3. 准备四支试管，注明“试剂空白”、“标准”、“测定”、“测定空白”。标准管内加应用蛋白标准液0.5mL。试剂空白管加入 $NaCl-NaNO_3$ 液0.5mL。

4. 向测定管和测定空白管各加0.5mL脑脊液。

5. 向测定空白管加2.00mL NaCl—NaN₃液混合。

6. 保持一定的间隔时间, 向其余三支试管内各加 2.00mL 沉淀试剂, 混合。放在室温, 10分钟。

7. 在10分钟末, 再轻轻颠倒混合每个试验管, 并且在620nm读吸光度。每次用相对应的空白管调吸光度到零。比浊的时间间隔应与加沉淀剂的时间间隔保持相等。

8. 使用靠近样品吸光度的标准计算蛋白浓度。

$$\frac{A_{\text{测定}}}{A_{\text{标准}}} \times \text{标准液蛋白浓度 (mg/L)} = \text{脑脊液蛋白浓度 (mg/L)}。$$

作者已用此法五年, 如能严格检测试剂浊度及在比浊前充分混匀的话, 此法还是可靠的。但有人认为用脑脊液太多, 因为想改用高灵敏度的柯马士兰法。

本法的批内CV=1.3~3.8%, 批间CV=4.7~5.3%。同一份标本法测为681mg/L 而用参比法测为665mg/L。此法与柯马士兰法结果相符。

此法的线性范围可至600mg/L, 另人报告为1400mg/L。

讨论:

脑脊液蛋白的浊度分析得出结果通常比用浊度法分析尿蛋白得出结果更满意, 大概因为在CSF里缺少尿液的许多干扰因素, 和因为在脑脊液里的蛋白种类比较少。精密度大约是5%(CV), 但在150mg/L以下数值时则CV增大, 约为10%。同其他方法一致性是±7~10%

在低值时, 相对误差是比较显著的。没碰见来自大剂量青霉素, 磺胺甲异恶唑, X光造影剂的干扰。

成年人脑脊液蛋白浓度是150—450mg/L。新生儿(0—1个月)浓度是比较高, 600—900或800—1200mg/L。老年人上界可增加到600mg/L。

脑脊液蛋白增高常见于脑外伤或血脑屏障受损。如进一步做脑脊液蛋白电泳分析将有助于多发性脑硬化病的诊断。

注: 有人主张, 蛋白参比值(成人)范围是180~580mg/L。

(韩志钧译 张魁校)