

卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

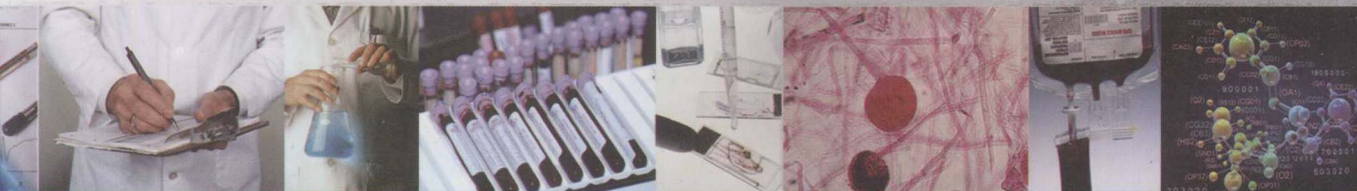
全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

临床生物化学检验 实验指导

第4版

主编 钱士匀

 人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



“十二五”国家重点图书出版规划项目
“十二五”国家重点音像出版规划项目

全国高等医药院校教材
第五版

临床生物化学检验 实验指导

主编 王承甫

副主编 王承甫 王承恩



卫生部“十二五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校配套教材
供医学检验专业用

临床生物化学检验

实验指导

主 编 钱士匀

副主编 左云飞

编 者 (以姓氏笔画为序)

左云飞 (大连医科大学)

刘忠民 (广州医学院)

李 艳 (吉林医药学院)

李贵星 (四川大学华西临床医学院)

张 彦 (重庆医科大学)

郑 芳 (武汉大学医学部)

赵云冬 (北华大学医学检验学院)

胡云良 (温州医学院)

侯 敢 (广东医学院)

钱士匀 (海南医学院)

梅传忠 (蚌埠医学院)

图书在版编目(CIP)数据

临床生物化学检验实验指导 / 钱士匀主编. —4 版.
—北京: 人民卫生出版社, 2011.12

ISBN 978-7-117-15176-4

I. ①临… II. ①钱… III. ①生物化学—医学检验—
医学院校—教学参考资料 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 238945 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中 医、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

临床生物化学检验实验指导

第 4 版

主 编: 钱士匀

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京市后沙峪印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 16

字 数: 382 千字

版 次: 1999 年 11 月第 1 版 2011 年 12 月第 4 版第 20 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-15176-4/R·15177

定 价: 27.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)

前 言

《临床生物化学检验实验指导》(第4版)是府伟灵、徐克前教授主编的《临床生物化学检验》(第5版)的配套实验教材,是在钱士匀教授主编的《临床生物化学与检验实验指导》(第3版)的基础上进行更名、修订和编写的。本教材适用于医学检验专业五年制本科、四年制本科和三年制专科学生及成人教育本、专科学生的实验教学使用,教材中实验内容各院校可根据本校的实际情况选择开设。

本教材编写遵循医学检验专业培养目标,适应新世纪医学教育模式的要求,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,同时体现简洁、实用的指导思想。教材内容符合面向社会需求的医学检验专业复合型人才基本要求,教材共分16章,共计99个实验,每个实验包括实验原理、试剂与器材、操作步骤、结果计算、参考区间、临床意义、注意事项,每个实验后附有实验方法的评价及思考题。

为强调学生综合能力和创新能力的培养提高,增加了临床检验综合性/设计性实验内容和部分临床上新的、成熟实用的实验内容,同时改变了实验章节编排模式,编写顺序按物质代谢和疾病种类进行编排,并整合了部分章节,删减了教学实验室单独难于完成的实验内容,缩减了编写篇幅。考虑到教材的实用性,附录中增加了常用临床生化检验参考区间,保留了常用临床生化检验英文缩写术语。

本教材在编写过程中得到大连医科大学和海南医学院检验专业广大教师的大力支持和帮助,同时得到检验医学界许多老教授的指点和帮助,在此表示衷心的感谢。由于检验医学发展迅速,内容涉及广泛,加之本人水平有限,难免存在疏漏和不当之处,敬请各位专家和读者指出,以备再版时修正。

钱士匀
2011年10月

目 录

第一章 临床生化检验基本技术	1
第一节 光谱分析技术	1
实验 1 血红蛋白及其衍生物吸收光谱分析	1
实验 2 紫外分光光度法测定血清蛋白质	3
附:紫外分光光度法测定核酸浓度	5
第二节 电泳技术	6
实验 3 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	6
实验 4 琼脂糖电泳分离血清脂蛋白	10
实验 5 等电聚焦电泳测定血清蛋白质等电点	12
第三节 层析技术	14
实验 6 离子交换柱层析法分离混合氨基酸	14
实验 7 凝胶过滤法分离蛋白质	16
实验 8 亲和层析法提取特异性 IgG	18
第四节 离心技术	20
实验 9 红细胞膜的制备	21
第二章 方法学评价实验	23
第一节 准确度的评价	23
实验 10 回收试验	23
实验 11 干扰试验	25
实验 12 方法比较试验	26
第二节 精密度的评价	30
实验 13 批内重复性试验	30
第三节 线性范围评价	32
实验 14 线性范围评价试验	32
第三章 酶的分离纯化与酶动力学分析综合实验	35
实验 15 分离纯化小麦胚芽中酸性磷酸酶	35

目 录

实验 16	酶蛋白含量测定及比活性分析	38
实验 17	酸性磷酸酶时间进程曲线	41
实验 18	酸性磷酸酶酶浓度-速度曲线	42
实验 19	pH-酸性磷酸酶活性曲线	43
实验 20	酸性磷酸酶米氏常数的测定	45
实验 21	磷酸盐对酸性磷酸酶活性的抑制作用	46
第四章	体液蛋白质测定	48
实验 22	双缩脲法测定血清总蛋白	49
实验 23	溴甲酚绿法测定血清白蛋白	51
实验 24	免疫透射比浊法测定前白蛋白	53
实验 25	邻苯三酚红钼络合法测定尿液及脑脊液微量蛋白	55
第五章	糖及其代谢物的测定	58
第一节	血清(浆)葡萄糖测定	58
实验 26	葡萄糖氧化酶法测定血清(浆)葡萄糖	58
实验 27	己糖激酶法测定血清(浆)葡萄糖	60
实验 28	口服葡萄糖耐量试验	62
第二节	血清(浆)糖化蛋白的测定	63
实验 29	果糖胺法测定糖化血清蛋白	63
实验 30	微柱法分离糖化血红蛋白	64
第三节	与糖代谢紊乱相关的实验室检测	66
实验 31	放射免疫法测定血清胰岛素	66
实验 32	电化学发光免疫法测定 C 肽	68
实验 33	乳酸脱氢酶法测定全血乳酸	69
实验 34	酶动力学法测定血清 β -羟丁酸	71
第六章	血清(浆)脂类及脂蛋白测定	73
第一节	血清(浆)胆固醇的测定	73
实验 35	胆固醇氧化酶法测定血清(浆)总胆固醇	73
附:	ALKB 法测定血清(浆)总胆固醇	75
第二节	血清(浆)三酰甘油的测定	76
实验 36	GPO-PAP 法测定血清(浆)三酰甘油	77
实验 37	变色酸显色法测定血清(浆)三酰甘油	79

第三节 血清(浆)脂蛋白胆固醇的测定	81
实验 38 过氧化物酶清除法测定高密度脂蛋白-胆固醇	81
附: 磷钨酸-镁沉淀法测定血清(浆)高密度脂蛋白-胆固醇	83
实验 39 表面活性剂清除法测定血清(浆)低密度脂蛋白-胆固醇	84
第四节 血清(浆)载脂蛋白测定	86
实验 40 免疫透射比浊法测定脂蛋白(a)	86
附: 酶联免疫吸附法测定脂蛋白(a)	88
实验 41 免疫透射比浊法测定血清载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B	89
第七章 微量元素与维生素代谢紊乱的生物化学检验	92
第一节 微量元素的测定	92
实验 42 双环己酮草酰二脲比色法测定血清铜	92
实验 43 吡啶偶氮酚比色法测定血清锌	94
第二节 维生素的测定	95
实验 44 三氯化锑比色法测定维生素 A	95
实验 45 荧光法测定维生素 E	97
实验 46 2,4-二硝基苯肼比色法测定维生素 C	99
第八章 电解质和酸碱平衡紊乱的生物化学检验	101
实验 47 离子选择性电极电位法测定血清钾、钠、氯、钙离子	101
实验 48 血气分析	104
第九章 肝胆疾病的生物化学检验	110
第一节 肝脏分泌与排泄功能的生物化学检验	110
实验 49 改良 J-G 法测定总胆红素和结合胆红素	110
附: 胆红素氧化酶法测定总胆红素和结合胆红素	113
实验 50 酶比色法测定总胆汁酸	115
第二节 肝脏蛋白质合成功能的生物化学检验	117
实验 51 连续监测法测定血清胆碱酯酶	117
第三节 肝脏疾病的相关酶的生物化学检验	119
实验 52 连续监测法测定血清丙氨酸氨基转移酶	119
实验 53 连续监测法测定血清 γ -谷氨酰基转移酶	121
实验 54 茚醛偶氮萘酚法测定血清单胺氧化酶	122
实验 55 磷酸苯二钠比色法测定血清碱性磷酸酶	124

目 录

第四节 酒精性肝病和肝性脑病生物化学检验	126
实验 56 乙醇脱氢酶法测定血液乙醇的含量	126
实验 57 谷氨酸脱氢酶法测定血浆氨	127
第十章 肾脏疾病的生物化学检验	130
第一节 反映肾小球功能的生物化学检验	130
实验 58 碱性苦味酸法测定肌酐	131
实验 59 肌氨酸氧化酶法测定血清肌酐	133
实验 60 内生肌酐清除值的测定	134
实验 61 脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联速率法测定血清尿素	136
实验 62 尿酸酶-过氧化物酶偶联法测定血清尿酸	138
实验 63 免疫透射比浊法测定血清胱抑素 C	140
第二节 反映肾小管功能的生物化学检验	141
实验 64 荧光光度法测定 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶	141
实验 65 放射免疫分析法测定血(尿) α_1 微球蛋白	144
第十一章 心血管系统疾病的生物化学检验	147
第一节 心肌损伤及再灌注的生物化学检验	147
实验 66 肌酸显色法测定血清肌酸激酶	147
实验 67 免疫抑制法测定肌酸激酶同工酶 CK-MB	150
实验 68 化学发光免疫法测定心肌肌钙蛋白 T	151
第二节 高血压相关的生物化学检验	153
实验 69 荧光比色法测定尿儿茶酚胺	153
实验 70 放射免疫法测定血浆肾素	155
第三节 心功能不全的生物化学检验	157
实验 71 ELISA 法测定脑钠肽(BNP)	158
第十二章 消化系统疾病的生物化学检验	161
第一节 胃疾病的生物化学检验	161
实验 72 滴定法测定胃酸分泌	161
实验 73 连续监测法测定胃蛋白酶	162
第二节 胰腺疾病的生物化学检验	163
实验 74 碘-淀粉比色法测定血清淀粉酶	164
实验 75 连续监测法测定血清淀粉酶	165
实验 76 比浊法测定血清脂肪酶	167

第十三章 内分泌疾病的生物化学检验	169
第一节 下丘脑-垂体内分泌功能紊乱的生物化学检验	170
实验 77 电化学发光法测定泌乳素	170
实验 78 酶联免疫吸附法测定促甲状腺激素	172
第二节 甲状腺功能紊乱的生物化学检验	173
实验 79 放射免疫法测定三碘甲状腺原氨酸	173
实验 80 时间分辨荧光免疫分析法测定甲状腺素	175
第三节 肾上腺功能紊乱的生物化学检验	176
实验 81 尿 17- 酮类固醇测定	177
实验 82 尿 17- 羟皮质类固醇测定	179
实验 83 尿香草扁桃酸测定	181
第四节 性激素紊乱的生物化学检验	183
实验 84 时间分辨荧光免疫分析法测定睾酮	183
实验 85 化学发光法测定雌二醇	185
第十四章 神经系统疾病及妊娠相关的生物化学检验	189
第一节 神经系统代谢紊乱的生物化学检验	189
实验 86 邻联大茴香胺比色法测定血清铜蓝蛋白	189
实验 87 ELISA 法测定 S100 β 蛋白	191
第二节 妊娠与相关疾病的生物化学检验	193
实验 88 酶联免疫吸附法测定人绒毛膜促性腺激素	193
实验 89 竞争性化学发光酶免疫法测定孕酮	195
第十五章 常用治疗药物监测	198
实验 90 化学发光酶免疫法测定地高辛	198
实验 91 高效液相色谱法同时测定血浆苯巴比妥、苯妥英及卡马西平	200
实验 92 荧光偏振免疫法测定全血环孢素	201
实验 93 酶放大免疫测定技术测定血浆(清)利多卡因	203
实验 94 双波长比色法测定茶碱	205
第十六章 临床检验综合性/设计性实验	209
实验 95 急性心肌梗死的实验诊断与鉴别诊断	210
实验 96 糖尿病的实验诊断与鉴别诊断	213
实验 97 肾脏疾病诊断与鉴别诊断	218

目 录

实验 98 肝胆疾病的实验诊断与鉴别诊断	222
实验 99 急性胰腺炎诊断与鉴别诊断	227
主要参考资料	232
附录 1 常用临床生化检验参考区间	234
附录 2 常用生化检验英文缩写术语	238

临床生物化学检验的主要任务是利用物理学、化学、生物学、遗传学、病理学、免疫学、生物化学和分子生物学的理论与技术,探讨疾病的发病机制,研究其病理过程中出现的特异性化学标志物或体内特定成分的改变,为疾病的预防、诊断、治疗和预后提供生物化学信息和决策依据。而成熟的检验技术和建立可靠实用的检测方法是临床生物化学检验工作的重要基础。常用的生化检验技术有生物大分子的制备技术、光谱分析技术、电泳技术、层析技术、离心技术、电化学分析技术、酶学分析技术、生物传感技术、自动生化分析技术等。本章仅介绍光谱分析技术、电泳技术、层析技术、离心技术。

第一节 光谱分析技术

光是一种电磁波,具有波动性和粒子性。波动性的特征是波长和频率。从理论上说,光称为光子,是由光微粒子(光量子)所组成的,而光微粒子是一种具有能量的物质,不同波长的光具有不同的能量,光子的能量与光的波长成反比,与频率成正比。

光的波长可用纳米(nm)为单位来表示。人的眼睛所能感觉到的波长为400nm的紫色到760nm的红色,该段波长以外的光就不能看见,故400~760nm之间的光波称为可见光。短于400nm的为紫外线,短于200nm的为远紫外线。长于760nm的为红外线。

利用物质的发射光谱、吸收光谱或散射光谱特征对物质进行定性、定量分析的技术称光谱分析技术。光谱分析的种类很多,可按光谱产生的方式加以分类。基于发射光谱特征的主要有火焰光度法、原子发射光谱法和荧光光谱法等;基于吸收光谱特征的主要有紫外及可见分光光度法、原子吸收分光光度法和红外光谱法等;基于散射光谱特征的有比浊法等。

光谱分析技术在生化检验和临床生化科研中,是一种最基本、应用最广泛的分析技术,它具有灵敏、准确、快速、选择性好和不破坏样品诸多优点,目前在医学实验室应用极为广泛。本章仅介绍常用吸收光谱技术,其他光谱分析技术在《临床检验仪器学》一书中会有详细介绍。

实验1 血红蛋白及其衍生物吸收光谱分析

【实验原理】

血红蛋白(hemoglobin, Hb)在不同条件下可以形成不同形式的衍生物。血红蛋白溶液在空气中充分接触氧气可生成氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, HbO₂)。Hb溶液中通入一氧化

碳(CO), Hb 与 CO 结合而成碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHb), CO 结合在 Hb 中的亚铁原子上, COHb 呈樱桃红色, 它的吸收光谱同 HbO₂ 非常接近。高铁氰化钾[K₃Fe(CN)₆]在酸性或中性环境中, 可使 Hb 中的亚铁离子失去一个电子, 氧化成高铁离子而成为棕色的高铁血红蛋白(methemoglobin, MHb)。由于这些物质的组成成分不同, 其分子结构也不同, 故具有各自的吸收光谱可资鉴别, 其吸收光谱特征归纳于表 1-1。

利用分光光度计测定不同波长的光线通过溶液时的吸光度, 以波长为横坐标, 相应的吸光度为纵坐标, 绘制吸收光谱曲线。

【试剂与器材】

1. 100g/L 高铁氰化钾溶液 称取高铁氰化钾 1g 置 10ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 临用前配制。
2. 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1000ml 容量瓶中, 用蒸馏水定容。
3. 氯仿、辛醇。
4. 坐标纸及分光光度计。

【操作步骤】

1. Hb 溶液的制备 静脉采血 4~5ml, 置于抗凝管中, 各种抗凝剂均可使用, 离心分离血浆, 吸去血浆, 将压积红细胞用生理盐水约做 10 倍稀释洗涤, 混和, 离心, 吸出上清液, 如此洗涤 3~4 次, 除去血浆蛋白质。将洗过的压积红细胞一份, 加蒸馏水一份和氯仿半份, 加塞, 猛力振摇约 5 分钟, 离心沉淀, 除去细胞膜等残渣, 分离 Hb 溶液。Hb 溶液分离后, 测定其含量并调节至 100g/L。

2. 样品的制备

- (1) HbO₂ 溶液: 取 Hb 溶液 4 滴, 加蒸馏水 5ml。
- (2) COHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 再加辛醇 1 滴, 摇匀, 用滴管通入 CO 2~3 分钟呈樱桃红色。
- (3) MHb 溶液: 取 Hb 溶液 3 滴, 加蒸馏水 5ml, 加新鲜配制的 100g/L 高铁氰化钾 3 滴, 混匀, 呈棕色, 尽可能快比色。

3. 测定 分别取上述溶液 3ml 盛于比色杯内, 以蒸馏水作空白, 在波长 470~650nm 范围内, 每隔 20nm 测吸光度一次, 在接近吸收高峰时, 每隔 2nm 测吸光度一次。每测一次波长, 必须重新校正零点, 再测吸光度。

【结果计算】

以入射光波长为横坐标, 各相应的吸光度为纵坐标, 分别绘出各物质的吸收光谱曲线。吸光度最高所对应的波长为吸收峰。

【参考区间】

各种血红蛋白及衍生物吸收峰波长见表 1-1 所示:

表 1-1 血红蛋白及衍生物吸收光谱波长

样品	吸收峰数	吸收峰波长(nm)
HbO ₂	2	578、540
COHb	2	572、535
MHb (pH 6.4)	4	630、578、540、500

【临床意义】

运用血红蛋白及衍生物吸收光谱和吸收峰检查,可以判断樱桃红色的碳氧血红蛋白、棕色的高铁血红蛋白的存在,用于临床 CO、CN⁻ 中毒诊断的快速定性实验。

CO 中毒是工业、居民生活中的常见疾病,除了因 CO 中毒产生的不同临床症状与体征外,血中 COHb 的定性定量测定具有诊断意义。

【评价与思考】

1. 吸收光谱分析技术是临床生化检验中最为常用的分析技术,熟悉该实验原理和操作是生化检验工作的重要基础。注意实验所用分光光度计需进行波长校正。高铁氰化钾临用前配制,贮存于棕色瓶中。

2. 血红蛋白及衍生物吸收光谱测定为何要求对波长 470~650nm 范围内,每隔 20nm 测吸光度一次,在接近吸收高峰时,为何每隔 2nm 测吸光度一次?

3. 两个相邻波长的吸光度相等,且比其余波长的吸光度高,此时如何选定吸收峰?

实验2 紫外分光光度法测定血清蛋白质**【实验原理】**

蛋白质分子中存在着含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸,使蛋白质在 270~290nm 波长范围内具有吸收紫外光的性质,其中酪氨酸的 λ_{\max} 为 275nm,色氨酸的 λ_{\max} 为 280nm,苯丙氨酸的 λ_{\max} 为 257nm,在此波长范围内,蛋白质溶液的吸收值与其浓度成正比,可作定量测定。由于生物样品中常混有核酸,核酸对紫外光也有吸收,但其峰值在 260nm 附近,因此可用下列经验公式计算蛋白质浓度。

Lowry-Kalckar 公式:

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

Warburg-Christian 公式:

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260}$$

将 280nm 的吸光度与 260nm 的吸光度各乘以系数相减后即即为接近的蛋白质浓度。 A_{280} 与 A_{260} 分别代表光径为 1cm 时对 280nm 和 260nm 的吸光度。

由于蛋白质中肽键的存在,使其在 200~225nm 远紫外区波长也有光吸收,因此,蛋白质浓度在一定范围内,可用 A_{215} 、 A_{225} 值按下述公式测定。

Waddell 经验公式:

$$\text{蛋白质浓度 (g/L)} = 144 \times (A_{215} - A_{225})$$

由于血清中不同类型蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量不同,所以测定 270~290nm 波段紫外吸收也会因每个样品中蛋白质氨基酸组成的差异而有较大的变异,因而这个方法不能直接用于血清总蛋白的准确定量。而在远紫外区(200~225nm)的光吸收主要由肽键所致,各种蛋白质具有相同的吸收系数,蛋白质浓度在 120g/L 仍符合 Beer 定律,因而 Ressler 等人建立起 210nm 波长下测定血清总蛋白的实用方法,其准确性与双缩脲法和 Kjeldahl 法间有较好的可比性。

【试剂与器材】

1. 0.15mol/L NaCl 溶液 精确称取 NaCl 8.766g 溶于 1000ml 容量瓶中,用蒸馏水定容。

2. 蛋白质标准溶液(1mg/ml) 准确称取经校正后的牛血清白蛋白用 0.15mol/L NaCl 溶液配制成 1mg/ml。

3. 坐标纸、紫外分光光度计及石英比色杯。

【操作步骤】

1. 标准曲线法 取 8 支试管, 按表 2-1 操作进行。

表 2-1 蛋白质标准曲线的制作

试剂	管号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
蛋白质标准溶液 (mg/ml)	—	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
0.15mol/L NaCl 溶液	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	—
蛋白质浓度 (mg/ml)	—	0.125	0.250	0.375	0.500	0.625	0.750	1.00

混匀后, 选用 1cm 的石英比色杯, 在 280nm 处以第一管调节零点, 分别测定各管吸光度值。以光密度值为纵坐标, 蛋白质浓度为横坐标, 绘制出 280nm 处血清蛋白质标准曲线。取 1ml 血清蛋白生理盐水稀释液(应使其浓度在蛋白质标准曲线范围内), 加 0.15mol/L NaCl 溶液 3ml, 混匀后, 按上述方法测定吸光度值, 根据标准曲线查出蛋白质浓度。

2. Lowry-Kalckar 公式法及 Warburg-Christian 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将血清做 100 倍稀释, 选用光径为 1cm 的石英比色杯, 分别在 280nm 和 260nm 波长两处测定溶液的吸光度(A)。

3. Waddell 公式法 用 0.15mol/L NaCl 溶液将血清做 1000 倍稀释, 选用光径为 1cm 石英比色杯, 分别在 215nm 和 225nm 波长两处测定溶液的吸光度(A)。

【结果计算】

1. 标准曲线法计算 取 1ml 血清蛋白生理盐水稀释液(应使其浓度在蛋白质标准曲线范围内), 加 0.15mol/L NaCl 溶液 3ml, 混匀后, 按上述方法测定吸光度值, 根据标准曲线查出蛋白质浓度。

2. 根据 Lowry-Kalckar 公式或 Warburg-Christian 公式计算 此溶液的蛋白质浓度, 再乘以稀释倍数 100 得到血清蛋白质的真实浓度。

3. 根据 Waddell 公式计算 此溶液的蛋白质浓度, 再乘以稀释倍数 1000 得到血清蛋白质的真实浓度。

【参考区间】

成人运动后: 64~83g/L; 成人静卧时: 60~78g/L。

【临床意义】

1. 由于该法不加任何试剂, 保留样本蛋白质生物活性, 常用于医疗用品中酶制剂、各种免疫球蛋白制剂中蛋白质含量测定, 以表明有关医疗制剂含量、质量标准。

2. 血浆总蛋白上升 常见脱水导致血浆浓缩, 凡急性失水(如呕吐、腹泻、高热); 休克, 由于毛细血管通透性增加血管内水分流向血管外, 导致血浆浓缩; 肾上腺皮质功能不全(艾迪生病)由于钠的丧失而发生继发性脱水。血浆总蛋白可高达 100~150g/L。

3. 血浆总蛋白下降 血浆水分增加, 如注射过量低渗盐水、盐潴留; 营养不良及慢性肠

道疾病使体内缺乏合成蛋白质的原料；长期消耗性疾病，如肺结核、甲亢、肿瘤性疾病；肝功能损伤造成白蛋白降低所致血浆总蛋白下降；肾功能损伤导致尿中、溃疡性结肠炎从粪便中丢失蛋白质均可导致血浆总蛋白下降。

【注意事项】

1. 270~290nm 紫外法对测定蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质溶液，有一定的误差。
2. 本法需用高质量石英比色杯。紫外分光光度计使用前需对其波长进行校正。
3. 待测样品的蛋白质浓度应控制在 15~25g/L 范围内。
4. 注意溶液 pH 值，这是由于蛋白质的紫外吸收峰会随 pH 的改变而变化。受非蛋白质因素的干扰较重，除核酸外，游离的色氨酸、酪氨酸、尿酸、核苷酸、嘌呤、嘧啶和胆红素等均有干扰。

【评价与思考】

1. 标准曲线法 标准品与待测样本同质性，否则易产生较大的误差。
2. 运用 270~290nm 波长范围进行紫外分光光度法测定血清蛋白质 操作简便，溶液可以回收。但受样本中核酸影响，而且影响大小和核酸的含量多少有关。所以使用该法最好同时测定核酸量，以消除误差。当核酸含量大于 20% 或溶液混浊时，会产生非常大的误差。Warburg 计算出消除核酸的校正参数 F 值，校正后的计算公式要乘以稀释倍数和校正参数 (F)。见表 2-2 所示。

表 2-2 计算蛋白质含量的校正参数 F

A_{280}/A_{260}	核酸含量 (%)	F
1.75	0.00	1.116
1.52	0.50	1.054
1.36	1.00	0.994
0.874	5.00	0.682
0.705	10.00	0.478
0.644	14.00	0.377
0.595	20.00	0.278

3. Waddell 法 Waddell 公式中应用 A_{215} 、 A_{225} 不仅可以避免核酸的干扰 (在远紫外区 (200~225nm) 的光吸收主要由肽键所致)，而且各种蛋白质的 $E_{215}^{1\text{mg/ml}}$ 平均值间差异较小，增加测定结果的可比性。但实验要求条件比较高，需要较高档的比色分析仪。

4. 紫外分光法测定血清蛋白质的原理与优缺点。

附：紫外分光光度法测定核酸浓度

嘌呤碱或嘧啶碱具有共轭双键，使核苷酸和核酸在紫外光区具有特征性的吸收光谱，最大吸收峰在 260nm。比色杯光径 1cm，波长 260nm，1 个吸光度值 (A) 相当于 50 $\mu\text{g/ml}$ 双螺旋 DNA；40 $\mu\text{g/ml}$ 单螺旋 DNA 或 RNA；20 $\mu\text{g/ml}$ 寡核苷酸。

(一) DNA 的浓度测定

1. 取 DNA 溶液 10 μ l, 加双蒸馏水 600 μ l (即稀释 61 倍)。
2. 用双蒸馏水调零, 测定 260nm 和 280nm 的吸光度值 (A_{260} , A_{280})。

$$3. \text{DNA 浓度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 50 \times 61}{1000}$$

4. DNA 的纯度 A_{260}/A_{280} 的比值应大于 1.7。若样品中含有蛋白质 (吸收峰在 280nm) 等杂质时, 比值下降, 应重新纯化。有时测定 A_{230} , A_{260}/A_{230} 的比值应大于 2.0, 如比值太小, 说明样品中残存酚等有机杂质。

5. DNA 溶液需经一定比例稀释, 不可太浓。否则, 因溶液黏稠, 加样器不易吸准。

(二) RNA 的浓度测定

1. 取 RNA (溶于 5g/L SDS 溶液中) 溶液 10 μ l, 加入三蒸馏水 500 μ l 中 (稀释 51 倍)。
2. 将 5g/L SDS 用三蒸馏水做 51 倍稀释, 用此液调零, 测定 RNA 稀释液在 260nm 和 280nm 的吸光度 (A_{260} , A_{280})。

$$3. \text{RNA 浓度 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{A_{260} \times 40 \times 51}{1000}$$

4. RNA 的纯度 纯的 RNA, $A_{260}/A_{280} = 2.0$ 。由于所用的标本不同, 比值在 1.7~2.0 之间可以接受。如低于此范围, 往往是由于蛋白质的污染。有时, RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 可大于 2.0。低于此值则表示有异硫氰酸胍的污染。应再经异戊醇沉淀, 以除去小分子胍类的污染。

第二节 电泳技术

电泳 (electrophoresis) 是指带电粒子在电场作用下向其所带电荷相反电极方向泳动的现象。利用带电粒子的这种特性来分离、纯化、鉴定氨基酸、多肽、蛋白质、核酸、酶甚至病毒与细胞等的技术, 称为电泳技术。电泳技术可分为自由电泳 (无支持物) 和区带电泳 (有支持物) 两大类, 其中自由电泳因结构复杂、操作要求高等原因应用并不广泛。而区带电泳可用各种类型的物质做支持体, 故应用较广泛, 其中包括滤纸电泳、薄层电泳 (薄膜及薄板)、凝胶电泳 (琼脂、琼脂糖、淀粉胶、聚丙烯酰胺)、转移电泳和毛细管高压电泳等。电泳技术所需设备简单、操作方便和具有较高的分辨率, 已成为生物学、医学检验中常用的分析技术。

实验 3 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质

【实验原理】

血清中各种蛋白质的等电点 (pI) 大都低于 8.6, 在 pH 8.6 的缓冲液中, 电离成负离子, 在电场中向正极移动。因各种蛋白质 pI 不同, 在同一 pH 下带电荷量有差异, 同时各蛋白质的分子大小与分子形状也不相同, 因此在同一电场中泳动速度也不同。带电荷多, 分子量小者, 泳动较快; 反之则较慢。

醋酸纤维素薄膜电泳可将血清蛋白分离为 5 条区带, 从正极端起依次为白蛋白、 α_1 -球