

医学基础实验讲义

(药学系用)

上海第一医学院

國學基礎實驗講義

（供中學用）

上海中華書局

医学基础实验讲义

编写：上海第一医学院药学系

责任校对：竺心影

印刷：上海第一医学院印刷厂

1977年4月第一版 1977年4月第一次印刷
(书号：2113—7668—3)

印数：1—2500 定价：0.96元

说 明

遵照伟大领袖毛主席“**教育要革命**”、“**教材要彻底改革**”的教导，按照药学教育的需要，我们已将《解剖生理学》、《微生物学》、《病理学》、《生物化学》、《药理学》等五门课程的内容合编成《医学基础》一门新教材。为了贯彻理论与实践相结合的方针，便于掌握最基本的医学基础实验方法，以便对研制的药物进行必要的实验观察，作为过渡到临床试用的参考，所以，实验内容也作了适当的穿插、安排。

本实验讲义，疗效试验和安全试验方面所选择的方法较多，其中部分供药学、药化专业同学实验之用，另外部分可供药理训练班选用，参考。

上 海 第 一 医 学 院

《医学基础》教材编写组

一九七六年九月

目 录

第一部分 有关生化实验

实验1 氨基酸的纸上层析法	1
实验2 蛋白质的性质	1
一、蛋白质的胶体性质——蛋白质的透折	1
二、蛋白质的沉淀、变性、凝固	2
实验3 血清蛋白纸上电泳	4
实验4 胆碱酯酶的活力测定	6
实验5 酶的特性	9
实验6 酶的提取、分离及纯化	10
实验7 血清中总胆固醇和甘油三酯的测定	12
一、血清中总胆固醇的测定	13
二、血清中甘油三酯的测定	14
实验8 无蛋白血滤液的制备及非蛋白氮的测定	16
一、无蛋白血滤液的制备	16
二、血液中非蛋白氮(NPN)的测定	16
实验9 血液中肌酐的测定	19
实验10 血清谷丙转氨酶(GPT)的测定	20

第二部分 药理总论实验

实验11 实验动物的给药方法	23
实验12 尿中磺胺的测定	26
实验13 药物在体内的分布——小白鼠血和肝中磺胺噻唑钠浓度的测定	27
实验14 药物半衰期的测定	29
实验15 影响药物作用的各种因素	29
一、药物的剂量与剂型对药物作用的影响	29
二、给药途径对药物作用的影响	30
三、药物的理化性质与作用的关系	30
四、药物的相互作用	31
五、机体的机能状态对药物作用的影响	31

第三部分 微生物及化疗实验

实验16 显微镜油镜的使用与细菌形态结构的观察	33
实验17 细菌的染色法	34
实验18 培养基的制备	34
实验19 细菌接种法及生长状况的认识	35
实验20 消毒灭菌	38

实验21	药物的无菌检查和杂菌总数的测定	38
实验22	药物的体外抗菌试验	40
实验23	药物的体内抗菌试验	41
实验24	病毒的特性与抗病毒药的筛选法	42
实验25	真菌及其它微生物	44
实验26	破伤风毒素的致病作用及破伤风抗毒素的免疫作用	44
实验27	抗疟药的筛选方法	44
实验28	抗血吸虫药对小白鼠的实验治疗	45
实验29	驱蛔虫药的作用	46
第四部分	抗肿瘤药物的筛选方法	48
实验30	美蓝试管筛选法	48
实验31	诱导噬菌体筛选法	49
实验32	抗噬菌体筛选法	50
实验33	精原细胞筛选法	50
实验34	抗肿瘤药体内筛选法	52
第五部分	血液循环系统的生理与药理实验	55
实验35	血液常规检查	55
一、	血红蛋白测定	55
二、	红、白血球计数方法	55
三、	白细胞分类	57
实验36	促进纤维蛋白溶解药物的快速筛选法	58
实验37	蟾蜍心搏过程的观察	59
实验38	蟾蜍心室的过早搏动和代偿间歇	59
实验39	影响兔动脉血压的因素	60
实验40	药物对蟾蜍血管的作用	61
实验41	药物对离体兔耳血管的作用	63
实验42	药物对离体兔主动脉条的作用	64
实验43	β -型肾上腺素能受体阻断药对蟾蜍心脏的作用	65
实验44	抗心律失常药的作用	66
实验45	小白鼠的耐缺氧试验	66
实验46	离体兔心灌流	66
实验47	药物对离体蟾蜍心脏的作用	68
实验48	强心甙对在位蟾蜍心脏的作用	69
实验49	强心甙对在位猫心的作用	70
第六部分	泌尿、呼吸和消化系统的生理与药理实验	70
实验50	尿液常规检验	70
实验51	影响兔尿生成的因素	72
实验52	药物对不麻醉兔的利尿与抗利尿作用	72
实验53	兔呼吸运动的调节	73

实验54	药物的镇咳作用	74
实验55	药物的祛痰作用	75
实验56	药物的平喘作用	76
实验57	药物的抗组织胺作用	77
实验58	药物对气管链的作用	77
实验59	药物对胃肠道蠕动的影晌	78
第七部分	避孕药物的筛选方法	79
实验60	抗生育实验	79
实验61	抗着床实验	80
实验62	抗早孕实验	80
实验63	抗排卵实验	81
实验64	药物对离体子宫的作用	82
第八部分	神经系统的药理实验	83
实验65	的卡因和普鲁卡因的表面麻醉作用	83
实验66	盐酸普鲁卡因对神经干的局麻作用	83
实验67	椎管麻醉	84
实验68	麻醉前给药	85
实验69	药物对蟾蜍腹直肌的作用	85
实验70	琥珀酰胆硷作用部位的分析	86
实验71	大白鼠胫前肌胫神经在体动物实验	87
实验72	毒扁豆硷增强琥珀酰胆硷对横纹肌的松弛作用	88
实验73	水合氯醛的催眠作用	88
实验74	安定药的筛选方法	89
实验75	抗惊厥药的筛选方法	91
一、	用药物产生惊厥的方法及抗惊厥药的作用	91
二、	电惊厥及药物的抗电惊厥作用	91
实验76	氯丙嗪的镇吐作用	92
实验77	氯丙嗪的安定作用	92
实验78	药物对小白鼠的镇痛作用	93
实验79	药物的解热作用	94
实验80	药物的抗炎作用	95
一、	考的松对炎症的影响	95
二、	棉球肉芽肿法	95
三、	急性关节肿法	95
实验81	中枢兴奋药对呼吸抑制的解救作用	96
实验82	毛果芸香硷及阿托品对瞳孔的作用	97
实验83	药物对离体肠的作用	98
实验84	α -受体兴奋剂和阻断剂对豚鼠离体输精管的作用	99
实验85	药物对麻醉动物心血管系统的作用	100

第九部分 药物的安全试验	102
实验86 药物的刺激性试验	102
一、兔臀部肌肉法	102
二、兔眼结膜法	102
三、小白鼠刺激试验	102
实验87 药物的过敏性试验	103
实验88 被动皮肤变态反应 (PCA)	104
实验89 药物的溶血试验	105
实验90 热原检查	106
实验91 药物的急性毒性试验	109
一、半数致死量 (LD_{50}) 的测定	109
二、最大耐受量的测定	110
实验92 半数有效量的测定	110
实验93 新药过渡临床时一些问题的讨论	111
一、关于评定药物疗效的方法问题	111
(一) 动物实验的意义	111
(二) 动物的选择	111
(三) 药理学研究方法	112
二、关于评定药物安全性的一些问题	113
(一) 急性毒性试验	113
(二) 亚急性毒性试验	114
三、新药临床试用的设计	115
第十部分 生物检定与基本统计知识	117
一、生物检定的应用范围	117
二、生物检定中存在的问题	117
三、减少生物差异的方法	119
四、生物反应的类型	119
五、剂量与反应的关系	120
1. 量反应和剂量的关系	120
2. 质反应和剂量的关系	120
六、实验误差的估计	121
1. 标准差 (S)	122
2. 均数标准误 ($S_{\bar{x}}$)	123
3. 可信限	124
4. 百分率的标准误 (S_p)	125
七、显著性测验—— t 测验和 X^2 测验	126
1. 样本均数与总体均数差异的显著性测验	126
2. 同一批对象处理 (或实验) 前后差异的显著性测验	126
3. 两个样本均数差异的显著性测验	127

4. 样本率与总体率差异的显著性测验	128
5. 质反应百分率之差的显著性测验	129
6. X^2 测验(卡方测验)	129
八、效价计算的基本公式	131
九、常用的实验设计和相应的计算方法	131
1. 量反应的检定	131
(1) 比较平均法	131
(2) 四点法	132
2. 质反应的检定	133
(1) 最小效量法	133
(2) 半数效量法	134
① 简化机率单位法	134
② 寇氏法	140
③ 机率 — 对数绘图法	141
十、生物统计复习题	143
附录:	146
一、各种生理溶液的成分及配制	146
二、其它溶液及材料的配制	146
三、常用非挥发性麻醉药的用法和用量	148
四、药物浓度和剂量的计算	149
五、实验动物的饲养与管理	152
六、实验动物的某些正常生理值	157

第一部分 有关生化实验

实验 1 氨基酸的纸上色层分析法

测定氨基酸在研究蛋白质和各种氨基酸在机体内的代谢是非常重要的。纸上色层分析法是常用的方法，因为这种方法所需的样品量很少（只要几微克），操作简便，分离效果好。

纸上层析法是分配层析法的一种。此方法的原理是利用混合物在两种互不相混合的溶剂内的分配系数不同而达到分离的目的。正如物质的抽取一样，溶于一种溶剂中的物质，当加入第二种溶剂震荡后，可恒定的分布于两种溶剂中。在此两溶剂中，该物质浓度的比为一常数，即所谓的分配系数。在纸上层析法中，就是利用滤纸片上所附着的水（一般滤纸保留着20—22%的水）做第一种溶剂。滴上氨基酸后，用第二种与水不能混和或部分混和的溶剂在紧闭的容器中不断地流洗。氨基酸随着第二种溶剂在纸上移动，产生了在两种液相间的分配现象，逐渐趋向于集中，由于它们的分配系数不同，在纸上移行的速度也不同，因此可以被分开。被纸保留的溶剂叫做固定相，另一种溶剂叫做流动相。一般在固定相中溶解度大的成分移行距离较小，而在流动相中溶解度较大的氨基酸可带得较远。在做氨基酸分离中，水是常用的固定相，各种易挥发的醇类，如正丁醇等都可作为流动相。

在氨基酸被分离后，可用适当的显色剂喷在纸上使之显色，然后再测定它所移动的距离，与已知的对比，可以测出为何种氨基酸。通常以 R_F 值来表示位置。

$$R_F = \frac{\text{分离物质移行的距离}}{\text{溶剂移行的距离}}$$

方法：

(1) 取滤纸一条（宽与长度视所需的成分多寡而定），在距纸一端1—2厘米处，用铅笔轻轻划一横线。

(2) 用微量滴管滴氨基酸溶液于横线中央，滴的直径越小越好，因此可以等第一滴干后，再重复滴一二次（约2—3微克）增加样品浓度而不使范围扩大（氨基酸溶液同时滴）。

(3) 垂直悬滤纸条于盛有正丁醇混合液（正丁醇：醋酸：水 = 40:10:50）的层析缸中，紧闭缸口，开始层析。

(4) 当溶剂上升至离滤纸上端2—3厘米处，取出纸条，用风扇吹干。

(5) 干后，浸于0.1%茚三酮之丙酮溶液中，然后再用风扇吹去纸上的丙酮。置于65℃之烘箱中，半小时后取出，即可见到纸上的氨基酸色斑。

(6) 同时进行两个已知氨基酸（谷氨酸、酪氨酸）及他们的混合液的色层分析。对比它们 R_F 是否一致。

实验 2 蛋白质的性质

一、蛋白质的胶体性质——蛋白质的透析

目的：了解蛋白质的胶体性质，并熟悉透析的原理及操作。

蛋白质是由许多氨基酸组成的高分子化合物，其分子量非常巨大，小的也在6000以上，大的可达数千万，其分子颗粒的大小已达胶体颗粒尺度范围之内（直径1—100 μ ），所以蛋白质具有胶体性质。蛋白质分子颗粒周围有许多亲水基团（氨基、羧基及肽链等），在水溶液中，它们皆能与水起水合作用，以致使颗粒周围形成了较厚的水合膜，将颗粒与颗粒分散开。加之蛋白质是两性离子，在一定pH溶液中其颗粒表面带有相同电荷，互相排斥，使颗粒不致互相凝集，故溶解的蛋白质通常为一稳定的亲水胶体，具有一系列的胶体性质，如丁道尔现象、布朗运动以及分子颗粒不能透过半透膜等。

透析就是利用小分子晶体物质能透过半透膜，而胶体颗粒不能透过半透膜的原理，以分离胶体和小分子夹杂物，故利用透析法可使蛋白质纯化。

方法：

1. 火棉胶囊的制作 取小烧杯一只，于烧杯内壁薄薄地涂一层火棉胶，待乙醚挥发掉后，火棉胶膜即脱开，轻轻取出，置蒸馏水中待用。

2. 注入2.5ml蛋白溶液及2ml饱和氯化钠溶液于火棉胶囊中，并将火棉胶囊的开口用线扎住，吊在玻璃棒上。放入盛有蒸馏水的烧杯中，使其开口端位于水面之上。

3. 约经过一小时后，自烧杯中取出1~2ml水溶液，置于试管中，加入硝酸银溶液1滴，检查有无氯离子存在？

4. 另取烧杯中水溶液及火棉胶囊中溶液分别作双缩脲反应，检查有无蛋白质存在：取试管两只，分别加入烧杯中溶液及火棉胶囊中溶液各10滴。然后于两管中均加入20%NaOH溶液15滴及1%CuSO₄溶液2滴，摇匀，观察试管中颜色变化，若出现紫玫瑰色，则证明溶液中有蛋白质存在。

二、蛋白质的沉淀、变性、凝固

目的：观察蛋白质的沉淀，变性，凝固反应，进一步了解蛋白质的亲水胶体，两性电离，变性凝固等物理化学性质。

蛋白质沉淀反应虽然极多，但可划分两类，第一类是可逆的沉淀反应。此类反应中沉淀的蛋白质的结构未遭到重大的改变，因此这种蛋白质沉淀仍能再溶解于原来的溶媒中，此时蛋白质分子基本上保持原来的天然性质，并未遭受显著的变性。第二类是不可逆的沉淀反应。亦即在此类反应中，蛋白质分子结构已受到重大改变，不能再溶解于原来的溶媒中，此时蛋白质发生变性。变性后蛋白质便丧失了其天然的生物学和物理学特性，其中包括生物活性丧失，溶解度变小，粘度增加，失去结晶性，易于被酶分解等。

属于可逆沉淀反应者有：蛋白质的盐析，在低温下用乙醇或丙酮短时间作用于蛋白质而使其沉淀的反应等。

属于不可逆沉淀反应者有：重金属盐类，生物碱沉淀剂以及加热凝固等沉淀反应。

蛋白质沉淀的原因常不外乎其胶体稳定因素被破坏，或加入试剂与蛋白质生成了不溶性化合物，或其他因素使蛋白质分子结构根本改变，下列各实验将分别讨论之。

（一）蛋白质的盐析 如果向蛋白质溶液中添加硷金属盐类或硷土金属盐类（通常用(NH₄)₂SO₄、Na₂SO₄、NaCl、MgSO₄），这些盐能破坏胶体稳定因素，从而减小了蛋白质胶体溶液的稳定性，当盐类浓度足够大时，则蛋白质粒子呈沉淀析出。用大量盐类使蛋白质从其溶液中沉淀的方法叫做盐析。由盐析而获得的蛋白质沉淀经透析或用水稀释以减少盐类

浓度时,又能再溶解,因此蛋白质盐析是可逆的过程。

盐析不同种类的蛋白质需要不同浓度的同一盐类,这就是混合蛋白质之所以能用盐析法分段分离的原理,例如饱和硫酸铵溶液几乎能从中性溶液中析出所有的蛋白质,其中某些蛋白质(例如球蛋白)仅在半饱和硫酸铵溶液中可析出,而另一些蛋白质(例如清蛋白)则在饱和的硫酸铵溶液中才能析出沉淀。

本实验将用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离血浆清蛋白、球蛋白。

方法:

1. 取3 ml血浆加入等体积之饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混和后,观察是否有蛋白质沉淀。
2. 用滤纸过滤取沉淀少许,加入蒸馏水,观察沉淀能否重行溶解。
3. 向滤液中加入过量的固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,不断搅拌,直到溶液完全饱和为止。有何变化?

4. 再取沉淀少许,加入蒸馏水,观察沉淀能否溶解。

(二)有机溶剂沉淀蛋白质 许多有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)。能使蛋白质从中性或弱酸性溶液中沉淀出来。例如,向蛋白质水溶液中添加乙醇,到一定浓度,则蛋白质便产生沉淀;各种蛋白质所需的浓度不同,故用此法亦可分离蛋白质。

与水亲和力强的有机溶剂加入蛋白质水溶液时,能使蛋白质胶体粒子表面失去水膜而降低其在溶液中的稳定性,故能使蛋白质产生沉淀。

用有机溶剂沉淀蛋白质时,若在溶液中有少量盐类(如 NaCl)存在,则沉淀的形成更加迅速而完全。因为这些盐类可“中和”蛋白质颗粒表面的电荷。

如乙醇沉淀蛋白质是在低温下进行的,将所得的沉淀从乙醇中迅速分离,则蛋白质还能重新溶解于水中,亦即在这种情况下蛋白质的性质并未改变,其变性尚未完成,因而其沉淀是可逆的,但若长期在乙醇中放置,则蛋白质变性而不能再溶于原来的溶剂中。

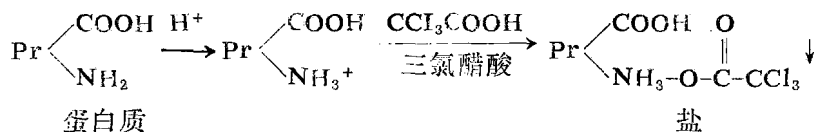
方法:

- (1) 取二小试管,各加蛋白质溶液20滴,再于其中一管内,加入固体 NaCl 少许,震荡。
- (2) 各加入2 ml 95%乙醇并强烈震荡,比较二管蛋白质沉淀产生情况。

(三)生物碱沉淀剂沉淀蛋白质 蛋白质溶液能因加入生物碱沉淀剂而沉淀。三氯醋酸、磷钨酸、磷钼酸、鞣酸、苦味酸、偏磷酸等常用于沉淀植物碱的检定,因此称之为生物碱沉淀剂。蛋白质分子内也有与生物碱分子内含氮基团相似的氨基,故也可用生物碱沉淀剂沉淀之。

生物碱沉淀剂沉淀蛋白质的原理是其与蛋白质的 $-\text{NH}_2$ 基结合形成不溶性盐。此盐是由蛋白质阳离子与生物碱沉淀剂的阴离子相结合而成的。因此用生物碱沉淀剂沉淀蛋白质,须在酸性溶液中进行,以使蛋白质呈阳离子,在碱性溶液时,减少了氨基游离,可使沉淀复溶。

例:三氯醋酸沉淀蛋白质



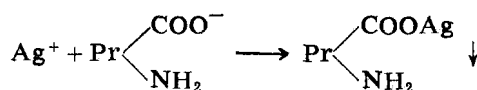
方法:

取小试管一只,加蛋白质溶液10滴,加入10%三氯醋酸5滴,观察沉淀之生成。

(四)用重金属盐类沉淀蛋白质 重金属盐类(如铅、铜、银、汞等盐)可与蛋白质的自由羧基结合,生成不溶性的蛋白盐而沉淀,因重金属盐可以使蛋白质变性,故用稀释或透析法皆不能使其重新溶解。

银盐、汞盐(升汞)、铅盐、铜盐可使机体中毒,而蛋白质与重金属盐类有着结合的特性,故借此,在重金盐类尚未吸收前,常用蛋白质(如牛乳、生鸡蛋蛋白等)作为解毒剂。

例如:银盐和蛋白质结合:



方法:

取小试管2只,各加蛋白质溶液10滴,分别滴入0.5%升汞溶液,3%硝酸银溶液各2滴,观察沉淀生成。

(五)加热沉淀蛋白质 蛋白质溶液加热,增加分子碰撞,当达到一定温度时,其撞击力可以折断蛋白质结构中的氢键等副键(主键为肽键),破坏分子内一定的排列而失去天然蛋白质的性质(即发生变性),造成不可逆的沉淀(即凝固)。几乎一切蛋白质皆能因加热而凝固,凝固的温度按蛋白质的不同而有区别,如有些蛋白质在50°--55℃,即能凝固,而有些蛋白质却能经受暂时的高温而不凝固。

变性、凝固与时间有关,且随温度升高而加速,因此极短时间的加热也可能不引起凝固。

盐类的存在及氢离子浓度,对蛋白质加热凝固有重要的影响,在强酸或强碱中,蛋白质均可因加热而变性,但因此时胶粒带电荷而不沉淀,也不凝固。只有在等电点时(大多数蛋白质等电点在PH5左右,即微酸性),蛋白质胶粒最不稳定,凝固作用最为迅速完全。盐类存在的影响,在于“中和”电荷,从而降低胶粒的稳定性。

方法:

(1)取三支小试管,记上号码,各加入蛋白质溶液约20滴。

(2)于第一试管中加入一滴1%醋酸,然后加热,此时蛋白质处于接近等电点的环境中,所以蛋白质的沉淀较快而完全。

(3)于第二试管中加入10%醋酸约5滴,并加热即使煮沸亦不生成蛋白质沉淀。

(4)于第三试管中,加入10%NaOH约5滴,并加热,即使煮沸,亦不生成沉淀。

实验3 血清蛋白纸上电泳

原理:各种蛋白质都有它特有的等电点,血清(或血浆)中的各种蛋白质也不例外。蛋白质在等电点时是电中性状态,它的分子既不带阳电,也不带阴电。它在电场中不向任何一极移动。血浆蛋白质的等电点均低于pH7(见下表)

蛋白质名称	等电点(pH)	分子量
白蛋白	4.88	69000
α-球蛋白	5.06	α ₁ 200,000 α ₂ 3000,000

β -球蛋白	5.12	90,000—150,000
γ -球蛋白	6.85—7.5	156,000—300,000
纤维蛋白原	5.4	400,000

在pH 8.6的缓冲溶液中，例如在8.6时，它们都游离成负离子，在电场中均向阳极移动，此种现象称为电泳。等电点离pH 8.6愈远，移动速度愈快。各种血浆蛋白质因游离程度不同，带电数量不同，所以在电场中移动的速度也不同。蛋白质分子小而带电多者移动速度较快，分子大而带电少者移动较慢。如此则血浆中所含各种蛋白质在电场中按其移动快慢可分为白蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白、纤维蛋白原及 γ -球蛋白等6条区带。血清中没有纤维蛋白原，故分为5条。

试剂

1. 巴比妥缓冲液 (pH 8.6) 离子强度0.075 离子强度0.05

巴比妥钠 15.45g 10.3g

巴比妥 2.76g 1.84g

蒸馏水溶解后加至1000ml

2. 溴酚蓝染色液 50%乙醇300ml加5g磺柳酸及2g溴酚蓝。

3. 0.5%醋酸漂洗液 取冰醋酸5ml，加蒸馏水至1000ml。

4. 用0.01N NaOH溶液 (可用0.01N—0.02N)。

称取0.4g NaOH溶解于1000ml蒸馏水中 (用容量瓶配制)。

方法：

1. 将滤纸裁成2—3cm宽，长20—30cm (视电泳槽大小而定)，在滤纸中部，略偏阴极一边，用铅笔划一起点。

2. 将滤纸放在缓冲溶液中浸湿，再用普通吸水纸吸干，随即将血清标本约0.01—0.02ml用微量吸管滴加在滤纸的起点线处，成一条细的垂直于滤纸长边的横线。

3. 滤纸条上滴加血清后，即平放在电泳槽的支架上。中部悬空平直，两端贴附在支架上浸入缓冲溶液中，然后在电泳槽上加盖，等待半小时。

4. 关闭电泳室间的活塞道管，开放电源，调节电压至约8—10伏特/cm长，及电流约为0.4毫安/cm阔。电泳通电时约为4—5小时。电泳终了时，将滤纸条取出，放在100℃烘箱中10分钟烘干。

5. 将滤纸条浸入溴酚蓝染色液中染色5分钟，取出，用0.5%醋酸漂洗液浸洗4次，每次5分钟，或直到漂洗液不带颜色为止。

6. 取出，平放在100℃烘箱中烘干。

7. 把滤纸上的蛋白色带分段剪下，白蛋白部分浸入0.01N (或0.015N, 0.02N) NaOH溶液8ml中，其余部分分别浸入4ml NaOH中，不时摇动，使蓝色浸出。

8. 在滤纸的无蛋白部分剪下与 α_1 -球蛋白同样大小的一片，浸入NaOH溶液作为空白管。

9. 37℃水浴中放置半小时后，用520—595m μ 或绿色滤光板光电比色，以空白管校正光密度到零点，测得各部分的光密度为OD_A，OD _{α_1} ，OD _{α_2} ，OD _{β} ，OD _{γ} 。

计算：光密度总和 $T = 2 \times OD_A + OD_{\alpha_1} + OD_{\alpha_2} + OD_{\beta} + OD_{\gamma}$ 。各部分蛋白质的百分数各为：

$$\text{白蛋白}\% = \frac{2 \times OD_A}{T} \times 100$$

$$\alpha_1\text{-球蛋白}\% = \frac{OD\alpha_1}{T} \times 100$$

$$\alpha_2\text{-球蛋白}\% = \frac{OD\alpha_2}{T} \times 100$$

$$\beta\text{-球蛋白}\% = \frac{OD\beta}{T} \times 100$$

$$\gamma\text{-球蛋白}\% = \frac{OD\gamma}{T} \times 100$$

临床意义

1. 肾病综合症,慢性肾小球肾炎: 白蛋白下降, α_2 -球蛋白升高, β -球蛋白也升高。
2. 多发性骨髓瘤 γ -球蛋白形成高峰, β -球蛋白增加, 有时在 β 与 γ 球蛋白之间出现一种新的蛋白质, 名为M-型蛋白或巨球蛋白 (Macroglobulin)。
3. 肝硬变 白蛋白显著降低, γ -球蛋白升高2—3倍。
4. 黑热病 白蛋白减少, γ -球蛋白增加很多。

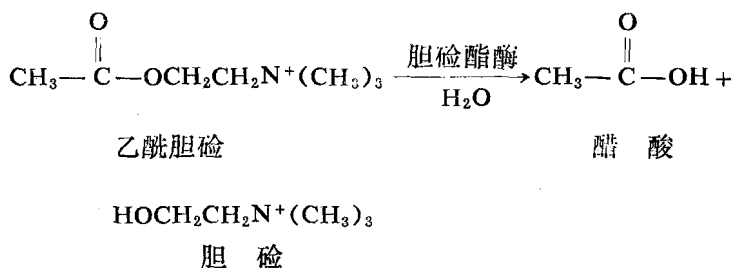
实验4 胆碱酯酶的活力测定

目的:

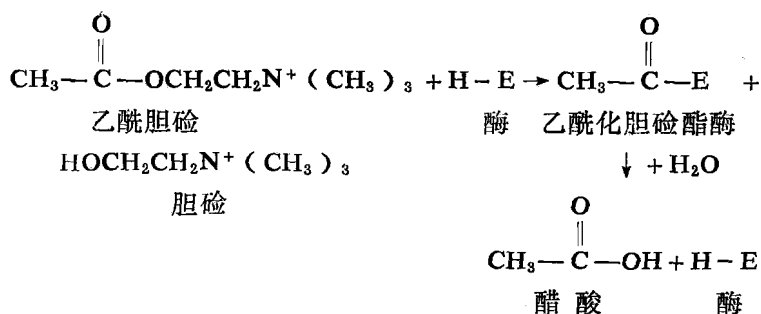
- (1) 了解胆碱酯酶的活力测定方法。
- (2) 测定敌百虫对胆碱酯酶的抑制作用。

原理:

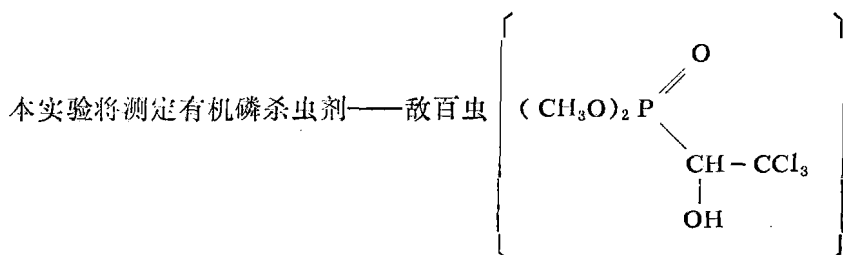
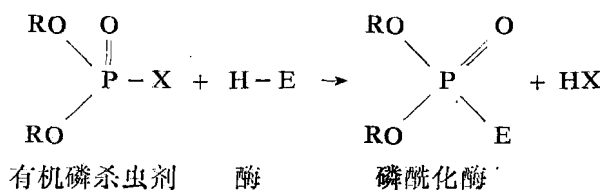
胆碱酯酶能使乙酰胆碱水解:



在作用过程中,胆碱酯酶先与乙酰胆碱作用,生成胆碱和乙酰化胆碱酯酶,后者又很快地在几千分之一秒的时间内,水解为醋酸和酶。酶又可继续作用于另一分子乙酰胆碱。过程如下:



有机磷杀虫剂 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (\text{RO})_2\text{P} - \text{X} \end{array}$ ，X多为酸性基，如卤素，CN，硝基酚等能与胆碱酯酶作用，形成类似乙酰化胆碱酯酶的磷酰化胆碱酯酶，但是它水解很慢或几乎不水解，因而抑制胆碱酯酶，使其丧失水解乙酰胆碱的作用。抑制反应如下：

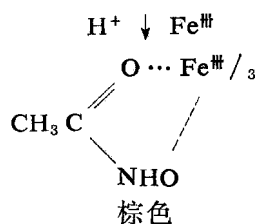
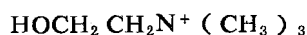
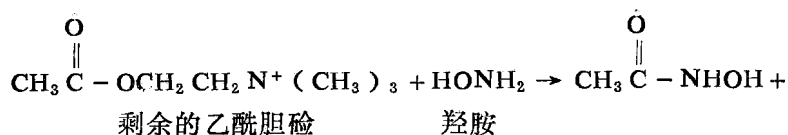


在一定剂量下，对一定量红血球胆碱酯酶的抑制百分率。

$$\text{抑制百分率} = \frac{\text{正常酶的活力} - \text{抑制处理后的酶活力}}{\text{正常酶活力}} \times 100\%$$

本实验的胆碱酯酶活力测定方法，是以4微克分子的乙酰胆碱被胆碱酯酶作用后，剩余的乙酰胆碱与硷性羟胺作用，生成乙羟肟酸，后者在酸性溶液（HCl）中再与FeCl₃作用，生成棕色化合物，以比色法测定光密度（D）（滤光片波长为540mμ），然后计算出酶促水解了的乙酰胆碱微克分子数，并规定催化一微克分子乙酰胆碱水解的酶活力为一个酶活力单位。

上述显色反应：



实验操作:

1. 取试管四只, 编号
2. 按下表次序加入试剂。

加入量 试剂	管别 1	2	3	4
(1) 全血	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
(2) H ₂ O	1 ml	—	1 ml	2 ml
(3) 0.005 M 敌百虫	—	1 ml	—	—
37℃准确保温 30 分钟				
(4) 0.004 M 乙酰胆碱	1 ml	1 ml	—	—
37℃准确保温 10 分钟				
(5) 硷性羟胺	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
(6) 0.004 M 乙酰胆碱	—	—	1 ml	—
(7) HCl 试剂	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
(8) FeCl ₃ 试剂	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
摇匀后过滤, 并以“空白管”液调节光密度至 0, 比色测定各管的光密度(D)。				

(3) 据公式 “酶活力 = $4 \times (1 - \frac{D_{\text{测定}}}{D_{\text{标准}}})$ ” 求出各管红血球胆碱酯酶的活力及

0.005 M 敌百虫的抑制百分率

试剂配制:

(1) 0.134 M, pH 7.2 磷酸缓冲液 由每升含 NaH₂PO₄ 18.626 g 溶液 28 份和每升含 Na₂HPO₄ 48.39 g 溶液 72 份混合配成 (必要时调节 pH 至 7.2)。

(2) 0.04M 乙酰胆碱 取 0.9047g 溴化乙酰胆碱 (或氯化乙酰胆碱 0.7265g) 用 0.001M pH 4.5 醋酸缓冲液配成 100ml 溶液 (冷藏待用)。

(3) 0.004M 乙酰胆碱 用磷酸缓冲液将上述 0.04M 乙酰胆碱溶液稀释 10 倍 (临用时配