

临床生化实验目录

实验一、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白测定(双缩脲法)---	1
实验二、非蛋白氮测定(次亚溴酸钠法)-----	7
实验三、尿素氮测定(脲酶法)-----	12
实验四、肌酐测定(苦味酸法)-----	15
实验五、尿酸测定(磷钨酸钠显色法)-----	19
实验六、血清总胆固醇测定-----	24
实验七、血清甘油三酯测定(正庚烷-异丙醇-乙酰丙酮法)---	27
实验八、血清钾测定(四苯硼钠比浊法)-----	30
实验九、血清钠测定(醋酸双氧铀镁-亚铁氰化钾间接比色法)---	37
实验十、氯化物测定(硝酸汞滴定法)-----	43
实验十一、血清钙的定量(EDTA)滴定法-----	49
实验十二、血清(浆)总铁结合力测定-----	53
实验十三、血清谷丙转氨酶(SGPT)活性测定-----	57
实验十四、血清胆硷酯酶测定(羟胺比色法)-----	61
实验十五、5'-核苷酸酶测定-----	66
实验十六、 γ -谷氨酰转氨酶测定(重氮试剂比色法)-----	71
实验十七、乳酸脱氢酶测定(2,4-二硝基苯肼比色法)---	76

实验十八、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶测定	81
实验十九、血清胆红素定性，定量试验（凡登白试验）	83
实验二十、血浆纤维蛋白原测定（亚硫酸钠沉淀法）	89
实验二十一、血浆二氧化碳结合力（ CO_2CP ）测定酸硷滴定法	91
实验二十二、血清淀粉酶测定（改良Winslow法）	94

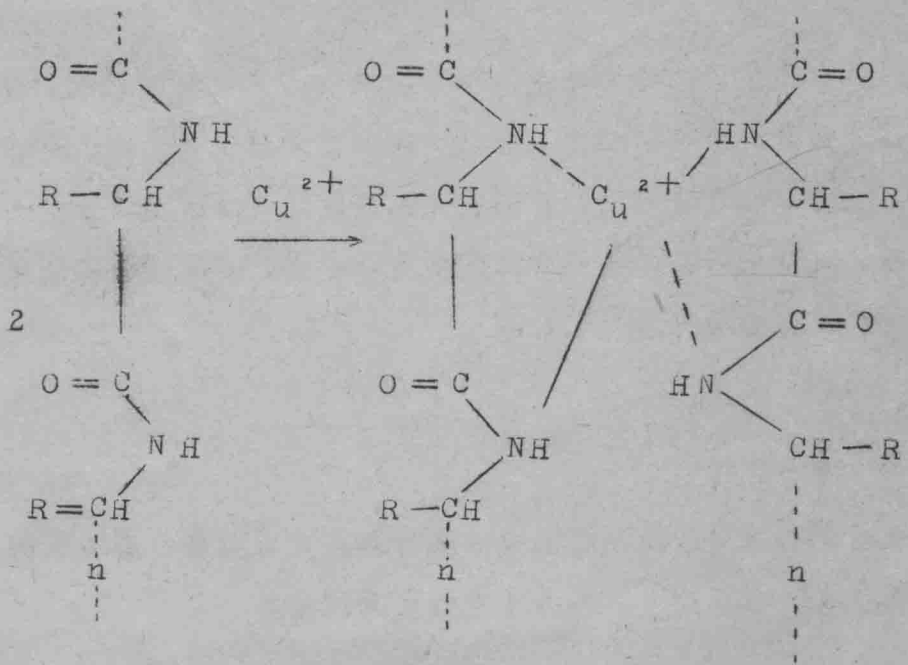
实验一、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白测定
(双缩脲法)

原 理

两分子尿素加热脱氨缩合成为缩二脲，与碱性铜溶液中的铜离子形成紫红色此反应称缩二脲反应。而蛋白质中的肽键

($\begin{matrix} \text{O} & \text{H} \\ \parallel & | \\ -\text{C}- & \text{N}- \end{matrix}$) 与缩二脲的氨基甲酰基 ($\begin{matrix} \text{O} & \text{H} \\ \parallel & | \\ -\text{C}- & \text{N}-\text{H} \end{matrix}$) 很相似，所

以也有此反应，其反应式如下、



紫红色化合物

用 Na_2SO_4 为球蛋白沉淀剂，取混悬液作为总蛋白测定，加乙醚使蛋白浮起，底部的清晰部分即为白蛋白液，为此即可确定各种蛋白的浓度。

试 剂

1. 2.6% 无水硫酸钠 7% Na_2SO_4 (无水亚硫酸钠) 溶液 (平时保存于 37°C 水浴箱内备用)。

2. 双缩脲试剂，硫酸铜 ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 2.5 克加水 100 毫升，加微热助溶；另取酒石酸钾钠 ($\text{KN}_a\text{C}_2\text{H}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 10 克，碘化钾 5 克溶于 500 毫升水中，再加 20% NaOH 300 毫升，溶解混合后，慢慢加入硫酸铜液中，最后加水至 1000 毫升。

3. 乙醚

4. 1 克% 蛋白标准液。取含量准确的 10% 内种球蛋白或 2.5% 白蛋白溶液，用生理盐水稀释成含蛋白 1 克% 的浓度即可。若无上述二种蛋白溶液，可取经定氮法测定蛋白质准确含量的标准血清。设定氮后的血清总蛋白浓度为 a 克%，若配制 1% 浓度 100 毫升所需血清毫升数为 X ，则

$$X = \frac{100 \times 1}{a}$$

准确吸取已知蛋白浓度之血清 X 毫升加入 100 毫升容量瓶内，用生理盐水稀释至刻度，即为 1 克% 之蛋白溶液。

标准曲线绘制：（先做）

管号 试剂 (ml)	1	2	3	4	5	B
1% 蛋白溶液	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	—
生理盐水	0.9	0.7	0.5	0.3	0.1	4.0
双缩脲试剂	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
相当于蛋白质 量 (克%)	1	3	5	7	9	0

混合后放 37°C 水浴中 20 分钟，用 540 nm 滤光片光电比色，以水调零，读取各管光密度读数。从测定管读数减去空白管读数后，以光密度为纵座标，蛋白质克数% 为横座标，绘成标准曲线。

操 作

1. 取被测血清 0.4 毫升，加于一离心管中，加 2.6% 无水硫酸钠溶液 3.6 毫升，充分混匀。用塑料盖住颠倒 10 次。

2. 吸取混悬液 1 ml 加至总蛋白管，作为总蛋白测定液，其余部分过滤，滤液保温在 37°C 水浴中。

3. 吸取清蛋白滤液 1 ml，加入清蛋白测定管中。

按下表操作

管别 试剂 (ml)	总 蛋 白 (T)	清 蛋 白 (A)
总 蛋 白 液	1	—
清 蛋 白 液	—	1
生 理 盐 水	—	—
双 缩 脲 试 剂	4	4

混匀后放 37℃ 水浴中 20 分钟，用 540 nm 波长或绿色滤光片以水调零点进行光电比色。测定管光密度减去空白管光密度读数，分别查标准曲线，求得总蛋白和清蛋白的克%。求 A/G 比值。

$$\text{总蛋白}\% - \text{清蛋白}\% = \text{球蛋白}\%$$

也可作一标准管用计算法求得蛋白质之含量。做法一般选含蛋白 4% 左右的浓度，与测定管同时按同样方法测定，计算式如下：

$$\frac{\text{测定管光密度} - \text{空白光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{空白光密度}}$$

$$\times \text{标准液浓度} = \text{总蛋白或清蛋白}\%$$

$$\text{标准管光密度} - \text{空白光密度}$$

正 常 值

总蛋白为 6—8 克%

球蛋白 1.5~3 克%

清蛋白为 3.5—5 克%

清蛋白：球蛋白 (A/G) 为 1.1~1.8:1

附 注

1. 硫酸钠的溶解度与温度有关，温度低于 30℃ 易出结晶。

故室温较低时应在 37℃ 水浴中进行测定。

2. 血清标本应新鲜，且不可溶血。

3. 加乙醚后不可用力振荡，以免使清蛋白变性沉淀，有人主张颠倒混合多次即可。

4. 体液中除蛋白质外，不含有与双缩脲试剂显色的物质，胆红素虽在 540 nm 处有微弱的吸光性，但对蛋白质测定影响较小。

5. 各种血清蛋白与双缩脲试剂呈色程度基本相同，其中酪蛋白、明胶等的呈色程度与血清蛋白质有很大差别。因此不能任选未知性能的蛋白作为血清蛋白质标准液。

6. 含脂类较多的血清，可用乙醚 3 毫升抽提一次后再行比色。

7. 本法虽显色较稳定，仍需时常同时加入标准血清显色，对标准曲线进行核对。

8. 铵离子能和氢氧化铜生成 $(\text{Cu}(\text{NH}_2)_3)^{+2}$ 络离子，所以应用器材不可含铵盐。

临床意义

总蛋白：

1. 血清总蛋白浓度增高：

常见有血清中水分减少。凡体内水分的排出大于水分的摄入时，均可引起血浆的浓缩，尤其在急性失水（如呕吐、腹泻、高热等）变化更显著。由于大量水分丢失，引起血浆成份的浓缩，血清总蛋白浓度有时可达 10—15 克/100 ml。又如休克时，由

于毛细血管通透性的变化，血浆也可发生浓缩。慢性肾上腺皮质机能减退（阿狄森氏病）时，由于钠的丢失而致继发性水分丢失，血浆也出现浓缩现象。另一种增加现象是血清蛋白质合成增加。多发生在多发性骨髓瘤患者，此时为球蛋白增加，其量可超过5克/100ml，总蛋白则有时可超过10克/100ml。

2. 血清总蛋白浓度降低：

血浆中水分增加，血浆被稀释。如注射过多低渗溶液或因各种原因引起水、盐潴留。食物中蛋白质含量不足或慢性肠道疾病所引起的吸收不良，使体内缺乏合成蛋白质的原料，或因长期患消耗性疾病，如严重结核病，甲状腺机能亢进和恶性肿瘤等，均可造成血清总蛋白浓度降低。肝功能严重损害时，蛋白质的合成减少，以白蛋白降低最为显著。严重灼伤时大量血浆渗出，或大出血引起的大量血液的丢失。肾病综合症时尿液中长期丢失蛋白质，或溃疡性结肠炎粪便中长期丢失一定量的蛋白质，都将反应总蛋白浓度的低下。

白蛋白：

除严重失水引起血浆浓缩而致白蛋白浓度增加外，临床上的白蛋白浓度降低最为常见。白蛋白降低其表现形式为白蛋白合成障碍，见于长期禁食、蛋白质营养缺乏，吸收不良，肝脏病变（特别是肝硬化及乙醇，四氯化碳引起之中毒性病变）。晚期肿瘤及创伤，感染等应激状态，甲状腺机能减退，免疫球蛋白增多等。白蛋白丢失过多也是白蛋白降低的一个原因。见于肾脏病变引起大量蛋白尿等疾患。白蛋白降低的另一个因素是白蛋白分解过盛，见于甲状腺机能亢进和发烧创伤等应激状态。必须指出，某些疾病时血浆

蛋白浓度降低的原因是多方面的，其详细情况可详阅有关蛋白质代谢章。

球蛋白：

在大多数疾病（如肝病和肾病综合症等）的过程中，除血浆白蛋白的浓度降低外，都伴有多种血浆球蛋白的异常。临床上的球蛋白浓度增高最为常见。其增高原因主要是细菌和寄生虫感染所引起的机体免疫反应增强，如结核病、黑热病、血吸虫病、疟疾、麻风等；自身免疫性疾病时机体的免疫机能亢进，如播散性红斑狼疮，硬皮病、风湿热、类风湿性关节炎、肝硬化等；骨髓瘤和淋巴瘤，此时 γ 球蛋白增加和部分球蛋白增加。

清球蛋白比值

随着测定方法不同其比值也有所不同，这是允许的，而观察其变化的意义在于两者浓度的关系是否正常。凡因血清水分变化引起的蛋白质浓度变化时，A/G比值变化不大。临床上常见的变化是白蛋白浓度降低和球蛋白浓度增高，所以A/G的比值小于正常值，严重时则小于1，习惯称为倒置，此类情形见于多发性骨髓瘤等疾病。

实验二、非蛋白氮测定（次亚溴酸钠法）

临床意义

血液中NPN包括尿素、尿酸等物质中所含之氮，其中尿素氮约占 $\frac{1}{2}$ 。它们皆为蛋白质代谢产物，大部分由肾脏排出体外。若蛋白

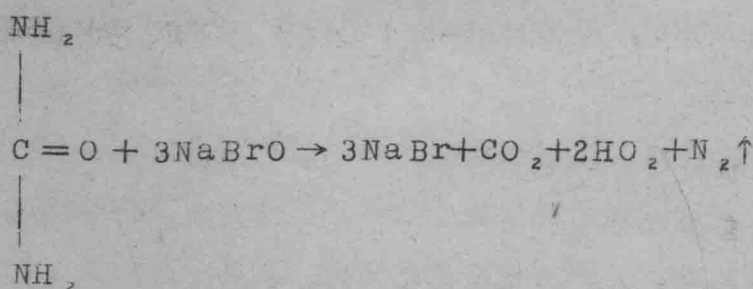
质分解代谢增加或肾脏排泄有障碍时，血液中 NPN 均可增加。

增高：肾脏和泌尿道疾患，如急性肾小球肾炎、慢性肾炎、肾功能衰竭、尿毒症、尿闭，肾盂积水（和积脓），泌尿道结石（或梗塞），非肾脏方面疾患，如大量呕吐、腹泻、高热、脱水，严重烧伤及大量内出血等。

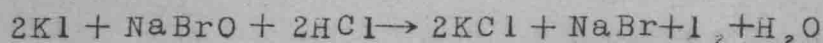
减少：偶见于急性黄色肝萎缩，肝硬化等。

原 理

在弱硷性溶液中，次亚溴酸钠使无蛋白滤液中的非蛋白氮氧化，其反应如下（以尿素为例）：



从上式可以看出，次亚溴酸钠在反应中有所消耗，其消耗量与氮化物之含量成正比关系。因此在测定过程中加入一定量过量之次亚溴酸钠与氮化物作用后，剩余的量又可与碘化钾作用，使碘化钾中之碘游离。反应式如下：



因此过量之碘化钾与剩余的次亚溴酸钠作用时，剩余的次亚溴酸钠愈多，使碘游离的量也愈大，游离的碘在酸性条件下显黄色。碘游离的量多少与生成的颜色的深浅成正比，与同样处理的标准管比较，可推算出非蛋白氮的含量。

试 剂

1. 蛋白沉淀剂:

于1000毫升量杯中加入钨酸钠4.48克, 柠檬酸钠2.0克, 结晶硫酸钠6.4克, 蒸馏水约500毫升, 搅拌使其溶解, 再加入1N硫酸4.48毫升和硫酸铜2.0克, 混合使溶, 再用蒸馏水稀释至1000毫升, 置棕色瓶中于室温保存。

2. 次亚溴酸钠试剂

(1) 硼酸氟化钠溶液。

① 硼酸溶液, 硼酸84.5克, 氢氧化钠15.6克, 溶于约800毫升蒸馏水中, 煮沸30分钟(驱氨), 冷却, 用蒸馏水稀释至1000毫升。

(2) 饱和氟化钠溶液(约3%)

(3) 27%氢氧化钠溶液

取①液5份, ②液3份, ③液1份混合即成。

(2) 溴溶液

配法I: 于100毫升量杯中加入溴化钾2.0克加蒸馏水50毫升溶解, 加入纯溴0.8克(约0.25毫升), 搅拌使完全溶解, 再用蒸馏水稀释至100毫升, 置棕色玻璃瓶中, 塞紧, 于冰箱内保存以免溴逸出。

配法II:

贮存液: 取溴化钾3.2克, 溴酸钾2.8克, 溶于500毫升蒸馏水中。此液可永久保存。

应用液: 临用前取上述贮存液5毫升加浓硫酸1毫升, 静置30分钟后溶液由无色变成红棕色。置棕色瓶中密闭。

取上述(1)液 9 份, (2)液 1 份混匀即得次亚溴酸钠试剂。临用前配制。

3. 10% 碘化钾溶液:

取洁净的中号试管, 每管加入碘化钾 (A·R) 0.5 克, 用塞塞好。临用前取 1 管, 加入 5 毫升蒸馏水溶解即可。

4. 6 N 盐酸:

于 500 毫升量杯中加入蒸馏水约 200 毫升, 徐徐加入浓盐酸 250 毫升, 边加边用玻璃棒搅匀, 然后加蒸馏水至 500 毫升刻度, 混匀即成 (如用标准曲线作计算基础, 就必须校正)。

5. 尿素标准贮存液 (1ml=1mgN)

精确称取干燥 (在 65~70°C) 恒重之尿素 (A·R) 0.2143 克 (含氮量 100 毫克), 置于 100 毫升容量瓶内, 用蒸馏水稀释至刻度, 混匀于冰箱保存。

6. 尿素标准应用液 (1ml=0.3mgN)

精确吸取上述贮存液 30 毫升于 100 毫升容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度。混匀, 置冰箱保存。

操 作

1. 血清液之制备: 取蛋白沉淀剂 3.0 毫升, 准确加入混匀全血 0.1 毫升, 混匀, 放置 5 分钟, 离心沉淀 3000 rpm x 5'。

2. 尿素标准应用液之处理: 取蛋白沉淀剂 3.0 毫升, 准确加入尿素标准应用液 (1ml=0.3mgN) 0.1 毫升, 混匀。

3. 显色

(表见下页)

试剂(毫升)	管别	测定(U)	标准(S)	空白(B)
	血 滤 液		2.0	—
处理尿素标准应用液		—	2.0	—
蛋白沉淀剂		—	—	2.0
次亚溴酸钠试剂		3.0	3.0	3.0

490nm 0.46 0.44 0.25
0.25

混匀、静置2分钟

5%碘化钾	0.2	0.2	0.2
(6N硫酸)	2.0	2.0	2.0

混匀用 490 nm 波长或紫色滤光片比色，蒸馏水调零。立即比色，否则会变浊。

计 算

$$\text{全血非蛋白氮(毫克\%)} = \frac{\text{空白管光密度} - \text{测定管光密度}}{\text{空白管光密度} - \text{标准管光密度}}$$

$$\times \frac{0.1}{3.1} \times 2.0 \times 0.3$$

$$\times \frac{100}{\frac{0.1}{3.1} \times 2.0} = \frac{\text{空白管光密度} - \text{测定管光密度}}{\text{空白管光密度} - \text{标准管光密度}} \times 30$$

正 常 值:

20—40毫克%

附 注

1. 蛋白沉淀剂中加入硼酸、硫酸铜是为了防止血滤液中葡萄

糖及硫化物对次亚溴酸钠的作用

2. 样品应新鲜，放置过久会吸收空气中的氨而影响结果。
3. 溴液配制好的应静置一星期后再用更好。
4. 加入盐酸后应立即摇匀比色，如放置过久会引起碘的损失而影响结果。
5. 6 N 盐酸可用 6 N 硫酸代替，且不易混浊。
6. 本法不适用于尿中 NPN 之测定，因尿中含有过多还原性物质。
7. 本法亦可用滴定法进行，即用 1 / 200 N 硫代硫酸钠滴定析出游离之碘。
8. 尿毒症患者，血中 NPN 可高达 200 毫克%，操作时可发现加盐酸后不显色或显色甚浅，此时可将血清液用量减半再行测定，结果乘以 2。
9. 溴溶液中之溴，易从溶液中溢出，若用放置过久的溴溶液配制次亚溴酸钠试剂，则标准管与试剂空白管光密度较低，用这样的试剂测定含量较高的非蛋白氮时，很难得到准确的结果。
在试验过程中，如发现标准管、试剂空白管的光密度，较初配时降低 20% 以上者，则此溶液不能再用，应重新配制。
10. 零点空白管可用蒸馏水代替。

实验三、尿素氮测定（脲酶法）

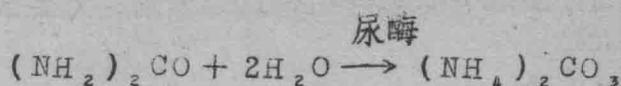
临床意义

正常人尿素氮约占非蛋白氮的一半，非蛋白氮增高时尿素氮也相应增高。但两者并非全成正比例，特别是某些病情较严重的慢性肾炎、尿毒症等病人，有时尿素氮含量可达非蛋白氮 80% 以上。

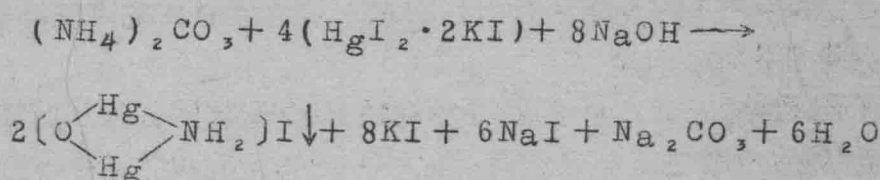
尿素氮增加的临床意义与非蛋白氮同，因此一般情况下两者不必同时做。

原 理

无蛋白血滤液中之尿素，经尿素酶作用后产生碳酸铵。其反应如下：



碳酸铵在硷性环境中可与纳氏试剂作用，显棕黄色，其反应如下：



试 剂

1. 纳氏试剂

配制方法同NPN测定

2. 硫酸铵标准应液 (1ml 0.15mgN)

配制方法同NPN测定。

3. 10% 钨酸钠溶液。

4. 2/3N 硫酸溶液。

5. 尿素酶溶液：

巨豆粉或西瓜子仁粉5克，加70%甘油少许研磨，再以70%甘油稀释至100毫升，混匀，待沉淀后，取其上层液应用。此溶液贮存于水箱内约可用3个月。

操作 (要求做平行管)

1. 蒸馏水5.0毫升加全血0.3毫升和尿素酶溶液4滴，混匀。(用塑料膜盖住后摇)

2. 置37°C水浴中准确放置20分钟，取出后加2/3 N硫酸0.3毫升和10%钨酸钠0.3毫升，混匀，离心沉淀(3000 rpm × 10³)，取上清液按下表操作：

管别 试剂 (ml)	标准 (S)	测定 (U)	空白 (B)
经脲酶作用的无蛋白滤液	—	2.0	—
硫酸铵标准应用液	1.0	—	—
蒸馏水	4.0	3.0	5.0
格替树脂胶 (滴)	1	1	1
纳氏试剂	2.0	2.0	2.0

混匀后以440 nm滤光板光电比色，以空白调“0”读取光密度。

计算

$$\frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times 15 = \text{尿素氮毫克} / 100 \text{ ml}$$

正常值

9—17毫克%

附注

1. 脲酶粉亦可用大豆粉代替，直接取粉少许加入血标本中以代替脲酶溶液，但平时应妥善保管，如潮湿有细菌繁殖，可使酶活力降低甚至破坏。同时细菌分解蛋白质产生氨，使空白光密度增加，

造成很大误差。脲酶液如含氨时，可用泡沸石吸附除去，或另作空白管后减去空白光密度。如用纯脲酶粉效果较好，但价格贵，一般没有必要。

2. 本法是一种酶促反应，脲酶是一种蛋白质，因此酸、碱和重金属（特别是残留的纳氏试剂中的汞）都会影响或破坏其活性，故所用试剂和器皿必须清洁。同时对于作用温度和时间亦应严格掌握。脲酶液的加入量亦不宜过多，否则会显混浊。

实验四、肌酐测定

肌酐是肌酸的代谢产物。在体内是一种废物，由肾脏排出。血液液中也含有少量的肌酐，约2毫克%。一般与尿素氮同时测定，正常情况下尿素氮与肌酐之比为15~24:1，在肾脏疾病时其比值有明显改变。

测定肌酐的方法：有酶化法，根据肌酐酶可使肌酐分解原理，用硷性苦味酸盐法测定酶作用前及作用后所显色泽，二值之差即为肌酐含量。此法优点是特异性高，可用血清直接测定，不必除蛋白，操作又简便。其缺点是肌酐酶不易得到。而一般化学法：有苦味酸法，硝基甲苯反应，二硝基苯甲酸反应，纳氏试剂反应等方法。此类方法虽特异性比直接法差，但不需酶制剂，操作较简便，而得到广泛采用。化学法多采用苦味酸法W·H·C也推荐了此法。

本节介绍一种化学法。