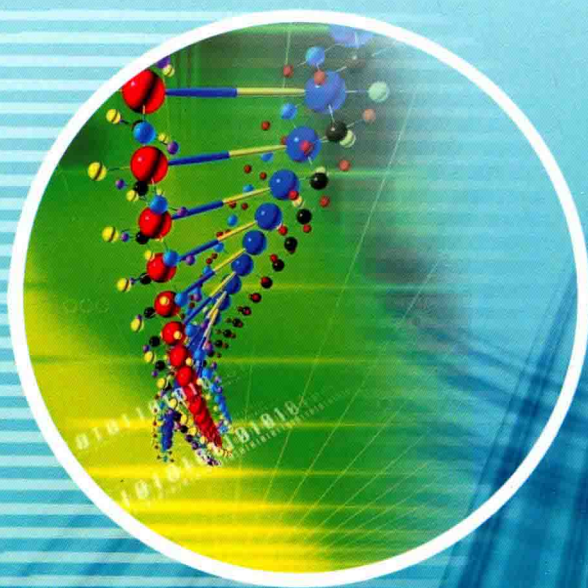


全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学 实验指导

◎ 主编 肖永红 李倩



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学实验指导

主 编 肖永红 李 倩

副主编 王贞香 安 琼

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

安 琼 李 倩 王贞香 肖永红

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材精选部分常用生物化学实验,涵盖生物化学实验技术的各个方面,以定量实验为主,特别注重医学生物化学技术的基本原理、临床应用,另外还增加了一些分子生物学的实验方法。本书内容分为三部分:生物化学实验室的基本要求、常用的基本生物化学技术和学生实验项目。通过这些实验的全过程训练,学生能够从多方面对这些生化技术有比较全面的认识,理解这些技术的意义及用途。

本书适用于应用型高等医学院校的医学各专业及相关专业,也可作为实验室人员的培训教材。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导 / 肖永红, 李倩主编. —北京: 科学出版社, 2017.1

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-051545-2

I. ①生… II. ①肖… ②李… III. ①生物化学-实验-高等学校-教学参考资料②分子生物学-实验-高等学校-教学参考资料 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 002532 号

责任编辑: 朱 华 / 责任校对: 张怡君

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

湖北画印中画印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 1 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 1 月第一次印刷 印张: 9 1/4

字数: 214 000

定价: 35.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

生物化学的飞速发展，在很大程度上有赖于生物化学实验技术的快速进步。生物化学实验技术主要应用化学、物理学及生物学的原理及方法而建立起来的，后来又融入了生理学、微生物学、遗传学及免疫学等学科的理论和技术，具有较强的理论性和实践性。生物化学实验是医学院校大多数专业的专业基础课/必修课。因此，学生在学习生物化学理论的同时，应该对生物化学实验技术有所了解与掌握。

生物化学实验技术发展很快，种类很多，要在短时间内全面掌握是不现实的。但是学生能对一些常用的基本生物化学实验方法和相关理论，通过亲手操作、观察实验现象、记录实验数据及对实验结果的讨论分析等手段，既有助于学生对生物化学理论知识的进一步巩固、理解和初步应用，又有利于锻炼学生的动手能力和知识的综合应用能力。为将来进一步学习临床课程乃至临床工作，或开展一些医学研究工作奠定一定基础。

本教材选择了一些常用生物化学实验方法，供学生操作，其中包括了生物化学实验技术的各个方面，以定量实验为主，特别注重了医学生物化学技术的基本原理、临床应用，希望学生通过这些实验的全过程训练后，能够从多方面理解这些技术的意义及用途，能对这些生化技术有比较全面的认识。随着生物化学的发展，分子生物学实验技术也越来越多地应用到生化的研究领域。在本教材编写的实验指导中增加了一些分子生物学的实验方法，目的是让学生对分子生物学实验有所了解，同时，对生物化学研究发展方向也有所知晓。因此，本讲义共选择三部分内容：第一部分：生物化学实验室的基本要求；第二部分：常用的基本生物化学技术；第三部分：学生实验项目。

由于受学时数的限制，本教材未能把生物化学所有的实验技术都编入其中，只局限于一部分对医学生学习生物化学可能会有帮助的实验。另外，限于我们业务技术水平等原因，本实验指导可能存在一些缺点和不够完善之处，敬请批评、指正。

编 者

2016 年 12 月

目 录

第一篇 生物化学与分子生物学实验基本要求

第一章 实验室安全规则	1
第一节 实验规则	1
第二节 实验室安全和注意事项	2
第三节 应急处理	2
第二章 实验设计与实验报告	4
第一节 实验设计	4
第二节 实验记录及实验报告	5
第三节 实验误差	6
第四节 有效数字	8
第三章 实验化学试剂	9
第四章 实验室的基本操作	13
第一节 玻璃器皿的洗涤	13
第二节 溶液的常规操作	16
第三节 实验常用标本的制备	17
第四节 常用实验器材的使用	20

第二篇 实验室常用基本技术

第五章 离心技术	24
第六章 分光光度技术	27
第七章 层析技术	30
第一节 吸附层析	30
第二节 分配层析	30
第三节 离子交换层析	31
第四节 凝胶层析	32
第五节 亲和层析	33
第八章 电泳技术	36
第一节 概述	36
第二节 醋酸纤维薄膜电泳	38
第三节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	39
第四节 琼脂糖凝胶电泳	42
第五节 其他电泳	44
第六节 电泳后大分子的检测	44
第九章 聚合酶链式反应(PCR 技术)	46
第一节 聚合酶链式反应	46
第二节 反转录 PCR(RT-PCR)	48
第三节 实时荧光定量 PCR	49
第四节 原位 RCR	52
第五节 PCR 扩增产物分析	53
第十章 生物大分子的制备	54
第一节 生物大分子制备的前处理	54
第二节 生物大分子的提取	55

第三节	生物大分子的分离和纯化	57
第四节	冰冻干燥	59
第十一章	AC9000 型电解质分析仪使用	62
第十二章	DS-3C 微量元素检测仪的使用	65
第三篇 生物化学与分子生物学实验项目		
第十三章	蛋白定量测定	72
第一节	酚试剂法 (改良 Lowry)	72
第二节	紫外分光光度法	74
第三节	改良微量凯氏定氮法	75
第十四章	蛋白醋酸纤维薄膜电泳	77
第十五章	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	80
第十六章	乳酸脱氢酶同工酶测定	85
第十七章	影响酶促反应速率的因素	87
第一节	pH 和温度对酶促反应的影响	87
第二节	激活剂和抑制剂对酶促反应的影响	88
第十八章	碱性磷酸酶米氏常数的测定	90
第十九章	血清/尿淀粉酶测定	93
第一节	改良 Winslow 氏法	93
第二节	碘-淀粉比色法	94
第二十章	血糖测定	96
第一节	邻甲苯胺法	96
第二节	葡萄糖氧化酶法	97
第三节	尿糖的定性测定 (班氏试剂法)	99
第二十一章	血脂测定	100
第一节	总胆固醇测定	100
第二节	甘油三酯测定	102
第三节	高密度脂蛋白测定 (磷钨酸-镁沉淀法)	106
第四节	血清载脂蛋白的测定	107
第二十二章	超速离心法分离血浆脂蛋白	110
第二十三章	肝/尿中酮体的测定	112
第一节	肝中酮体的测定	112
第二节	尿中酮体的定性测定 (Lange 法)	113
第二十四章	血清转氨酶测定	115
第一节	血清丙氨酸氨基转移酶测定	115
第二节	血清 AST 测定 (赖氏法)	120
第二十五章	血清尿素氮测定 (二乙酰-脲法)	122
第二十六章	血清胆红素测定	124
第一节	改良 J-G 法	124
第二节	胆红素氧化酶法	125
第二十七章	提取基因组 DNA (蛋白酶 K 消化法)	129
第二十八章	提取人外周血基因组 DNA (改良碘化钾法)	131
第二十九章	PCR 扩增血液胆固醇酯转运蛋白 D442G	133
第三十章	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	135
第三十一章	快速质粒抽提及酶切鉴定	138
参考文献		141

第一篇 生物化学与分子生物学

实验基本要求

第一章 实验室安全规则

第一节 实验规则

(1) 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律,维护课堂秩序,进入实验室前必须穿戴好实验服,实验室内保持安静,严禁大声喧哗;无故不得迟到、早退,不得在实验室内吸烟。

(2) 实验前必须认真预习,了解本次实验的目的、原理、操作步骤,懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法,否则不能开始实验。

(3) 实验过程中按照教材和指导教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,实验过程中若有疑问或遇见问题,请及时询问教师,切勿自己盲目处理。并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上,文字要简练、准确。完成实验后经指导教师检查同意,方可离开实验室。

(4) 实验台面应随时保持整洁,仪器、药品摆放整齐。使用药品、试剂和各物品必须注意节约。实验试剂取用完毕后应及时归放原位,及时盖好试剂瓶盖,避免实验试剂被污染。公用试剂用完后,应立即盖严放回原处,不得私自占用。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕,仪器洗净放好,将实验台面抹拭干净,才能离开实验室。

(5) 不得在实验室内用餐,不准用实验室的容器盛放食物,不能在实验室的冰箱内存放食物,不准在实验室的微波炉中热饭,严禁实验室的任何试剂入口。

(6) 实验室内注意用水、用电的安全,加热用的电炉应随用随关,严格做到:人在炉火在,人走炉火关。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热,并要远离火源操作和放置。强酸、强碱、有毒及腐蚀性试剂的使用要特别注意,要戴手套进行操作。不得将高温、强酸、强碱、有毒及腐蚀性试剂抛洒在实验台上,避免伤害性事故的发生。实验完毕,应立即拔去电炉开关和关好水龙头,拉下电闸。离开实验室以前认真、负责地进行检查水电,严防发生安全事故。

(7) 实验废弃物应分类处理,一般性液体废弃物可倒入水池,并放水冲走;强酸、强碱可在稀释后倒入水槽并放水冲走,有毒或腐蚀性试剂应倒入指定的废液瓶中集中处理;动物尸体、血液标本等应放入指定的容器中集中处理。废纸屑及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内;不能倒入水槽或到处乱扔。

(8) 要精心使用和爱护仪器,洗涤和使用仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,文明使用,发现故障立即报告指导教师,不得擅自动手检修。如使用分光光度计时,不能将比色杯直接置于分光光度计上,并注意拿放比

色杯时, 不要打碎。仪器损坏时, 应如实向指导教师报告, 并填写损坏仪器登记表, 然后补领。如人为因素引起的实验仪器设备损坏将按照规定进行赔偿。

(9) 实验室内一切物品, 未经本室负责指导教师批准, 严禁带出室外, 借物必须办理登记手续。

(10) 每次实验课由班长或课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

第二节 实验室安全和注意事项

实验的参与人员必须时刻把实验室安全放在首位, 严格遵守实验室的规章制度和实验操作规范。

(1) 实验操作过程中凡遇有能产生烟雾或有毒性腐蚀性气体时, 应放在通风橱内进行, 并戴口罩和手套。如果实验室内无此种设施, 则必须注意及时打开窗户通气。

(2) 以吸量管取用试剂应使用吸耳球。对于剧毒或有腐蚀性的试剂的取用更要注意安全, 应使吸量管的尖端固定在液面下适当的位置, 以防试剂进入吸耳球。如果不慎已吸入球内, 则应随时洗净晾干。

(3) 乙醚、乙醇、丙酮、氯仿等易燃试剂不可直接放在火源上蒸煮, 以防容器破裂而引起火灾。遇有火险绝不要慌乱, 应根据火情妥善处理。如系少量试剂引起的小火, 可用湿抹布轻轻盖住即可熄灭; 如已酿成大火, 则应首先关闭电源(如实验室建筑有自动灭火装置, 则不可关闭电源!), 用二氧化碳灭火器或粉末灭火器扑灭(千万不可用水或酸碱泡沫灭火器灭火!); 如果衣服着火, 切勿惊慌, 可以跑到室外就地打滚即可将身上的火扑灭。

(4) 含有强腐蚀性试剂、毒害试剂的实验废液、生物标本等不能随意倒入下水道, 须妥善处理。

第三节 应急处理

实验室应急处理, 即实验室意外事故的急救。

1. 皮肤灼伤处理 皮肤不慎被强酸、溴、氯等物质灼伤时, 应用大量自来水冲洗, 然后再用 5% 碳酸氢钠溶液洗涤。

2. 强酸溶液进入口内的处理 应立即用清水或 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液漱口, 再服用氯化镁、镁乳等和牛奶混合剂数次, 每次约 200ml; 或服用万应解毒剂(配法: 木炭末 2 份、氧化镁 1 份及鞣酸 1 份混合而成) 1 茶匙。但不宜服用碳酸钠溶液, 以免因和酸作用而产生过量气体反而加剧对胃的刺激。

3. 强碱溶液进入口内的处理 立即用大量清水或 5% 的硼酸溶液漱口, 再服用 5% 乙酸溶液适量, 或服用上述万应解毒剂 1 茶匙。

4. 石炭酸类物质进入口内的处理 立即用 30%~40% 乙醇漱口, 然后再服用 30%~40% 乙醇适量, 并设法尽可能将胃内容物呕吐出。

5. 氰化物进入口内的处理 应立即用大量清水漱口, 再服用 3% 过氧化氢溶液适量; 静脉注入 1% 亚甲蓝(美蓝) 20ml, 再吸入亚硝酸异戊酯, 并注意呼吸情况, 必要时可进行人工呼吸。

6. 汞及汞类化合物进入口内的处理 应立即服用生鸡蛋或牛奶若干,再设法使胃内容物尽量呕吐出来。

7. 碘酒或碘化合物进入口内的处理 应立即服用米汤或淀粉若干,再设法使胃内容物尽量呕吐出来。

8. 酸、碱等化学试剂溅入眼内的处理 先用自来水或蒸馏水冲洗眼部,如溅入酸类物质则可再用 5%碳酸氢钠溶液仔细冲洗;如系碱类物质,可以用 2%硼酸溶液冲洗,然后滴 1~2 滴油性物质起滋润保护作用。

9. 被电击的处理 生化实验室内电器设备众多,如某项设备漏电,使用中则有触电危险。如有人不慎触电,首先应立即切断电源。在没有断开电源时绝不可赤手去拉触电者,宜迅速用干木棒、塑料棒等绝缘物把导电物与触电者分开,然后对触电者进行抢救。若发现触电者已失去知觉或已停止呼吸,则应立即施行人工呼吸;待有了呼吸即可移至空气新鲜、温度适中的房间里继续进行抢救。

10. 酸、碱等化学试剂溅洒在衣服鞋袜上的处理 强酸或强碱类物质洒在衣服鞋袜上,应立即脱下用自来水浸泡冲洗;溅洒物如系苯酚类物质,而衣服又是化纤织物,则可先用 60%~70%酒精擦洗被溅处,然后再将衣物放清水中浸泡冲洗。

以上仅是一般应急处理方法,重症者应送医院急诊室处理。

第二章 实验设计与实验报告

第一节 实验设计

一、实验设计的基本要素

1. 实验对象 实验对象选择的合适与否直接关系到实验实施的难度,以及对实验新颖性和创新性的评价。医学实验的对象通常包括实验动物、人、细胞、细菌和病毒等,一个完整的实验设计中所需实验材料的总数称为样本含量。要根据特定的设计类型估计出较合适的样本含量。

2. 实验对象的分组 实验对象的设组一般有实验组和对照组,分组时遵循随机原则。每个组内的样品数目必须符合基本的统计分析的要求。实验动物分组也需符合基本的实验动物饲养原则,避免分组后实验对象的数量对实验结果产生影响。

3. 实验因素 实验因素是指作用于实验对象及对实验结果产生影响的因素,影响的主要因素有:

(1) 处理因素:外部施加给实验对象的因素,如处理试剂或药品等的剂量、浓度、作用时间等。

(2) 干扰因素:实验对象自身的因素如年龄、性别、体重,又如动物的窝别或批次等。

4. 实验效应 实验因素作用于实验对象后出现的效应即实验效应。实验效应是反映实验因素作用强弱的标志,必须通过具体的指标来体现。指标的选择要尽可能多地选择客观性强的指标。同时也要考虑指标的灵敏度与特异性、精确性等。只有这样才能对实验结果进行准确分析,从而大大提高实验结果的可信度。

二、实验设计的原则

实验设计的主要原则包括:对照、随机、重复及均衡。此外,实验设计时也要综合考虑弹性原则、最经济原则以及专业上需要考虑的一些原则。

1. 对照原则 通常一个实验分为实验组和对照组。实验组是接受实验因素处理的对象组;对照组是不接受实验因素处理的对象组。至于哪个作为实验组,哪个作为对照组,一般是随机决定的。从理论上说,由于实验组与对照组所受到的无关因素的影响是相等的、被平衡了的(即可减少或消除实验误差),故实验组与对照组两者的差异则可认定为是来自实验因素的效果。这样的实验结果是可信的。

对照组的设计包括多种形式,可根据实验目的和内容加以选择。对照主要包括以下几种:

(1) 空白对照:又称为正常对照(或阴性对照)。空白对照组不加任何处理因素。

(2) 自身对照:对照与实验在同一实验对象上进行。如同一实验对象用药前后的对比、先用甲药再用乙药的对比。

(3) 组间对照: 也称为相互对照, 是指几个实验组之间相互对照, 而不单独设对照组。如用几种药物治疗某疾病, 比较这几种药物的治疗效果。

(4) 标准对照: 通常指将实验组结果与标准值或正常值对比。实验设计时通常可采用公认(或效果确切, 能得出阳性结果)的方法作为参照。在方法学评价时, 标准对照(或阳性对照)有重要意义。

实验对照原则是设计和实施实验的准则之一。通过设置实验对照对比, 即可排除无关变量的影响, 又可增加实验结果的可信度和说服力。

2. 随机原则 随机原则是指实验样本的抽取是在实验对象的总体中随机抽取的。如果在同一实验中存在多个处理因素, 则各因素作用顺序的机会也是均等的。简单地说, 随机原则的概念包括随机抽样、随机分组、随机实验顺序。

3. 重复原则 重复原则即控制某种因素的变化幅度, 在相同实验条件下做多次独立重复实验, 观察其对实验结果影响的程度。任何实验都必须能够重复, 这是具有科学性的标志。一般认为重复 5 次以上的实验才具有较高的可信度。

4. 均衡原则 均衡是指在相互比较的各组间, 除了要考虑施加的处理因素条件一致外, 其余因素特别是可能影响实验结果的干扰因素要尽量相同。如动物实验要求各组间动物的数量、种系、性别、年龄、体重、毛色等要尽量一致, 实验仪器、药品、时间等方面也应一致, 这样才能有效减少实验误差。

第二节 实验记录及实验报告

每次实验要做到课前认真预习, 实验操作中仔细观察并如实记录实验现象与数据, 课后及时完成实验报告。

一、课 前 预 习

实验课前要将实验名称、目的和要求、实验内容与原理、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中, 做到心中有数。

二、实 验 记 录

从实验课开始就要培养严谨科学作风, 养成良好习惯。实验条件下观察到的现象应仔细地记录下来, 实验中观测的每个结果和数据都应及时如实地直接记在记录本上, 记录时必须做到原始记录准确、简练、详尽、清楚。如称量试材样品的重量、滴定管的读数、分光光度计的读数等, 都应设计一定的表格准确记下正确的读数, 并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如, 光密度值为 0.050, 不应写成 0.05。每一个结果至少要重复观测两次以上, 当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。另外, 实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等, 都应记录清楚, 以便总结实验完成报告时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等, 都必须重做实验。

三、实验报告

(一) 整理和总结实验结果

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。实验报告的一般格式为:

1. 实验名称 包括实验题目、实验者的详细信息(姓名、学号、班级、同组人员等)及实验日期。
2. 实验目的
3. 实验原理
4. 主要仪器及试剂配制
5. 操作方法与实验步骤、注意事项
6. 实验结果及分析讨论

(二) 按照实验内容可分为定性和定量两大类

1. 定性实验 在定性实验报告中,实验名称和目的要求是针对该次实验课的全部内容而必须达到的目的和要求。在完成实验报告时,可以按照实验内容分别填写主要器材与试剂、实验原理、实验步骤及注意事项、实验结果及分析与讨论等。原理部分应简述基本原理;实验操作(或步骤)可以流程简图的方式或自行设计的表格来表示;记录实验数据,得出实验结果;对实验结果进行分析讨论;包括实验结果及观察现象的小结、对实验课遇到的问题 and 思考题进行探讨以及对实验的改进意见等。

2. 定量实验 在定量实验报告中,实验目的、原理以及操作方法部分应简单扼要的叙述,但是对于实验条件(试剂配制及仪器)和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分,应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表,如原始数据及其处理的表格、标准曲线图以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外,还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括:关于实验方法(或操作技术)和有关实验的一些问题,如实验的正常结果和异常现象以及思考题进行探讨,对于实验设计的认识、体会和建议,对实验课的改进意见等。

第三节 实验误差

生物化学实验是以活的生命体为对象,对生物体内存在的主要大分子物质,如糖、脂肪、蛋白质、核酸等进行定性或定量的分析测定。定性分析是确定存在物质的种类,或粗略计算物质所占的比例;而定量分析则需要确定物质的精确含量。因此分析工作者要根据实验要求对实验结果进行分析和总结,要善于分析和判断结果的准确性,认真查找可能出现误差的原因,并进一步研究减少误差的办法,以不断提高所得结果的准确度。

一般在实验测量过程中都会有误差产生,但在懂得这些误差的可能来源的前提下,多数的误差是可以通过适当的处理来校正的。误差即指一种被测物的测定结果与其真值的不符合性,真值往往是不能确切知道的,通常以多次测定结果的平均数来近似地代表真值。尽管实验的分析方法相当准确,仪器亦很精密,试剂纯度很高,操作者技术很熟练,然而

这些都不能使某种物质的测定结果与其真值绝对相符。同一个样本多次重复测定,其结果亦不能完全相同。因此实验中的误差是绝对的。根据误差的来源和性质,通常可分下述三大类。

一、系统误差

系统误差是指一系列测定值存在有相同倾向的偏差,或大于真值,或小于真值,一般是恒定的。多是由于某种确定的原因引起的,在一定条件下可以重复出现,误差的大小一般可以测出。经分析找出原因,可采取一定措施,减少或纠正。

1. 系统误差的来源

(1) 方法误差:如用滤纸称量易潮解的药品;做生物实验特别是酶的实验时没有考虑温度的影响等。

(2) 仪器误差:如量取液体时,按烧杯的指示线量取液体往往准确度降低,需要用量筒量取;在配制标准溶液时量筒同样不够精确,要选用等体积的容量瓶定容到刻度线;不同的天平其精度差别很大,如果需要称量 100g 以上的物体,使用托盘天平即可,但如称量 1g 的样品,选用扭力天平比较方便,称量 10mg 以内的样品则必须使用感量为万分之一克的分析天平或电子天平称取。

(3) 试剂误差:如试剂不纯或蒸馏水不合格,引入微量元素或对测定有干扰的杂质,就会造成一定的误差。

(4) 操作误差:如在使用移液管量取液体时,由于每人的操作手法不同,可能会存在一定的操作误差。特别是在读数据时,目光是否平视,视线与液体弯月面是否相切,都可能成为生化实验中造成较大误差的主要原因。

2. 系统误差的校正

(1) 仪器校正:在实验前对使用的砝码、容量皿或其他仪器进行校正,对 pH 计、电接点温度计等测量仪器进行标定,以减少误差。

(2) 空白实验:在任何测量实验中都应包括有对照的空白实验。用同体积的蒸馏水或样品中的缓冲液代替待测溶液,并严格按照待测液和标准液同法处理,即得到所谓的空白溶液。在最后计算时,应从实验测得的结果中扣除从空白溶液中得到的数值,即可得到比较准确的结果。

二、偶然误差

与系统误差不同,误差的大小,正负是偶然发生的。误差时大时小,时正时负,不固定,一般不可预测。分析的步骤愈多,出现这种误差的机会愈多,所以也不易控制。如遇到这种情况时,应对仪器、试剂、方法作全面的检查。一般生物类实验的影响因素是多方面的。常常由于某些条件,如温度、光照、气流、反应时间、反应体系的微小变化都会引起较大的误差。特别是某些因素的作用机理目前仍不十分清楚,所以有些实验结果重现性较差。偶然误差初看起来似乎没有规律性,但经过多次实验,便可发现偶然误差分布有以下规律。一是正误差和负误差出现的几率相等;二是小误差出现的频率高,二大误差出现的频率较低。因此解决偶然误差主要可通过进行多次平行实验,然后取其平均值来弥补。测试的次数越多,偶然误差的几率就越小。

三、责任误差

这种误差是由于工作人员工作态度不严肃,责任心不强,思想不集中,操作粗枝大叶所引起的,这种误差是可以避免的。对于初做生物化学实验的工作者来说是经常发生的。如加错试剂、在配制标准溶液时固体溶质未被溶解就用容量瓶定容、在称量样品时未关升降扭就加砝码、在做电泳时点样端位置放错、在做抽滤实验时应留滤液却误留滤渣、在作图时坐标轴取反以及记录和计算上的错误等。这些失误会对分析结果产生极大的影响,致使整个实验失败。所以在实验中一定要避免操作错误,培养严谨和一丝不苟的科学实验作风,养成良好的实验习惯,减少失误的发生。

第四节 有效数字

做实验每天接触千千万万的数字,什么是有效数字?是否小数点后数字愈多愈准确?数字1、2、3、4、5、6、7、8、9是有效数字。数字0可以是有效数,也可能不是,如果零只用来表示小数点的位置时,它即不是有效数。例如,0.070080kg,这个数字的前两个零都不是有效数字,它们只是用来表示小数点的位置。如改用另一个单位,即可把它们取消,如采用克为单位,就可写成70.080g。7和8之间的两个零,是有效数字,如去除其中的两个零,数值就完全变了(0.0708kg或0.0780kg)。最后一位零也是有效数字,它指出在该项称重中,可以测定到0.000010kg,只不过数字正好是零。如果将最后的零去除,则意味着重量只能称到0.00001kg。有效数字的位数说明一个测定的准确度,应当符合这个测定(包括这个测定的每一个步骤)总的准确度。在作一项测定(长度、重量、容积、光密度、时间、电流、电压等),进行一项计算或报告一项实验结果,在数值上都可包括一位估计的数字。例如用一刻度最小到毫米的尺来量一个长度时,可以估算到刻度的1/10,就是估计到0.1mm,如623.3mm,0.3这个数是估计的,真实的数可能是623.1或623.5mm,最后一个数字是有误差的。如计算一个乘数,如将3.625mg/ml,乘以1.26时,在乘积中的值只能保留三位数字,因为乘积不可能比它原来的数字更为准确。又如将几个数值相加(0.410+0.1263+9.00,其和应是9.58,而不是9.5763,因为数的和不会比它准确度最差的一项为好。据以上的原因,在一个测定的各个环节中在可能范围内要注意应选择准确度相类似的仪器,否则在某一环节中使用了一次准确度很低的仪器,则整个测定结果的准确度便降低了。同样,在某一个实验环节使用了一次准确度很高的仪器,这种测量也是徒劳无功的,毫无意义。例如在滴定管的校正中,由于滴定管只能读到四位数字如32.18时,水及称量瓶的重量也只需称到四位有效数字(如49.19g),虽然分析天平可称至有效数六位。也是无用的。这时可改用准确数四位的天平即可。

【思考题】

- (1) 在记录实验数据时,1、1.0、1.00、1.000、1.0000各有什么意义?
- (2) 请设计一个实验报告的格式。
- (3) 在实验中如何减少实验误差?

第三章 实验化学试剂

一、一般化学试剂纯度、等级及适用范围

通用的化学试剂，分为四个纯度。市售的化学试剂在试剂瓶的标签上用不同的符号和颜色标明其纯度等级（表 3-1）。

表 3-1 化学试剂的纯度、等级及适用范围

纯度	等级	符号	颜色	适用范围
优级纯	一级	G.R	绿色	用于分析实验和科研
分析纯	二级	A.R	红色	用于分析实验和科研
化学纯	三级	C.P	蓝色	用于要求较高的化学实验
实验试剂	四级	L.P	黄色	用于一般要求的化学实验
生物试剂		B.R 或 C.R		根据说明使用

另外，还有一些规格，如纯度很高的光谱纯，层析纯；纯度很低的工业级，药典纯（相当于四级）等。

二、缓冲溶液

（一）缓冲原理

缓冲溶液是由弱酸及其盐、弱碱及其盐组成的混合溶液，能在一定程度上抵消、减轻外加强酸或强碱对溶液酸度的影响，从而保持溶液的 pH 相对稳定。缓冲系统对维持生物的正常 pH，正常生理环境起重要作用。多数细胞仅能在很窄的 pH 范围内进行活动，而且需要有缓冲体系来抵抗在代谢过程中出现的 pH 变化。

在生化实验和研究工作中，经常用到缓冲溶液来维持实验体系。如在提取蛋白质、酶等实验体系中的 pH 变化或变化过大，会使蛋白质、酶等的活性下降甚至完全失活。所以学会配制缓冲溶液是生化实验的重要内容。

生化实验常用的缓冲系主要有磷酸、柠檬酸、碳酸、醋酸、巴比妥酸、Tris（三羟甲基氨基甲烷）等及其盐组成的缓冲系统。在生化实验或研究工作中要慎重地选择缓冲体系，因为有时影响实验结果的因素并不是缓冲液的 pH，而是缓冲液中的某种离子。如硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐和三羟甲基甲烷等缓冲剂都可能与反应体系中的某些物质产生不需要的反应。可能产生的反应有：

- （1）硼酸盐：硼酸盐与许多化合物形成复盐、如蔗糖。
- （2）柠檬酸盐：柠檬酸盐离子容易与钙结合，所以存在有钙离子的情况下不能使用。
- （3）磷酸盐：在有些实验，它是酶的抑制剂或甚至是一个代谢物，重金属易以磷酸盐的形式从溶液中沉淀出来。而且它在 pH 7.5 以上时缓冲能力很小。
- （4）三羟甲基氨基甲烷：它可以和重金属一起作用，但在有些系统中也起抑制的作用。其主要缺点时温度效应。这点往往被忽视，在室温 pH 是 7.8 的 Tris-缓冲液，在 4℃时是

8.4, 在 37℃ 时是 7.4, 因此, 4℃ 配制的缓冲液拿到 37℃ 测量时, 其氢离子浓度就增加了 10 倍。而且它在 pH 7.5 以下, 缓冲能力很差。

缓冲溶液的 $\text{pH} = \text{p}K_{\text{a}} + \lg \left(\frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{共轭酸}]} \right)$

(二) 缓冲液的配制

1. 常见缓冲溶液的配制

(1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (0.2mol/L), 见表 3-2。

表 3-2 0.2mol/L Na_2HPO_4 x ml + 0.2mol/L NaH_2PO_4 y ml

pH	x (ml)	y (ml)	pH	x (ml)	y (ml)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.5	50.5	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

(2) 巴比妥钠-盐酸缓冲液 (表 3-3)。

表 3-3 0.04mol/L 巴比妥钠 100ml + 0.2mol/L 盐酸 x ml

pH (18℃)	x (ml)	pH (18℃)	x (ml)
6.8	18.4	8.4	5.21
7.0	17.8	8.6	3.82
7.2	16.7	8.8	2.52
7.4	15.3	9.0	1.65
7.6	13.4	9.2	1.13
7.8	11.47	9.4	0.70
8.0	9.39	9.6	0.35
8.2	11.21		

(3) Tris-HCl 缓冲液 (0.05mol/L) (表 3-4)。

表 3-4 0.1mol/L Tris 50ml+0.1mol/L 盐酸 x ml 混匀后, 蒸馏水稀释至 100ml

pH (25℃)	x (ml)	pH (25℃)	x (ml)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2

续表

pH (25℃)	x (ml)	pH (25℃)	x (ml)
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

(4) 甘氨酸-NaOH 缓冲液 (0.05mol/L) (表 3-5)。

表 3-5 0.2mol/L 甘氨酸 50ml+0.2mol/L NaOH x ml 混匀后, 蒸馏水稀释至 100ml

pH	x (ml)	pH	x (ml)
8.6	4.0	9.6	22.4
8.8	6.0	9.8	27.8
9.0	8.8	10.0	32.0
9.2	12.0	10.4	38.6
9.4	16.8	10.6	45.5

2. 常用电泳缓冲液的配制 见表 3-6。

表 3-6 常用电泳缓冲液的配制

缓冲液类型	应用液	贮存液
Tris-甘氨酸	1×	5×: 15.1g Tris 碱; 94g 甘氨酸; 50ml 10% SDS
Tris-硼酸 (TBE)	0.5×	5×: 54g Tris 碱; 27.5g 硼酸; 20ml 0.5mol/L EDTA
Tris-磷酸 (TPE)	1×	10×: 108g Tris 碱; 15.5ml 85%磷酸; 40ml 0.5mol/L EDTA
Tris-乙酸 (TAE)	1×	5×: 242g Tris 碱; 57.1ml 冰乙酸; 20ml 0.5mol/L EDTA

注: Tris 溶液可从空气中吸收 CO₂, 使用时注意将瓶盖严。TBE 贮存液长时间存放会形成沉淀, 出现沉淀后应废弃

3. 常用凝胶上样缓冲液的成分 见表 3-7。

表 3-7 常用凝胶上样缓冲液的成分

缓冲液类型	6×缓冲液	贮存温度 (℃)
1	6mol/L EDTA	4
	18%聚蔗糖水溶液	
	0.15%溴甲酚绿	
	0.25%二甲苯青 FF	
2	0.25% 溴酚蓝	4
	0.25%二甲苯青 FF	
	40%蔗糖水溶液	
	0.25% 溴酚蓝	
3	0.25%二甲苯青 FF	室温
	15%聚蔗糖水溶液	
	0.25% 溴酚蓝	
	0.25%二甲苯青 FF	
4	30%甘油水溶液	4
	0.25% 溴酚蓝	
	0.25%二甲苯青 FF	
	30%蔗糖水溶液	