

高等医药院校精品教材

# 医学生物化学 与分子生物学实验

Yixueshengwuhuaxue  
Yu Fenzishengwuxue Shiyan

主 编 肖方祥 李志红



清华大学出版社

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

高等医药院校精品教材

# 医学生物化学与分子生物学实验

主 编 肖方祥 李志红  
编 者 (按姓氏笔画排列)  
王艳林 李自成 李志红 肖方祥  
肖 莉 盛德乔 彭 帆

华中科技大学出版社  
中国·武汉

## 内 容 提 要

本书较全面、系统地介绍了生物化学与分子生物学常用的实验理论与技术,主要包括:量器的使用、校正与实验数据的处理,分光光度技术,层析技术,电泳技术,离心技术,酶活力测定与酶法分析,临床常用生物化学检测方法以及基因工程技术等。在每种实验技术理论介绍之后都附有与之对应的基本技能训练实验。在基本技能训练实验的基础上,本书还编写了血清白蛋白的纯化与鉴定、重组 DNA 的构建及其在大肠杆菌中的诱导表达等综合性实验,并介绍了一些常用的生物化学仪器的使用方法。本书以问题为中心,书中每种实验技术理论和相关实验都以问题的方式展开,可引导读者带着问题去学习,通过探寻解决问题的方法,加深读者对相关实验的理论和技术的认识。

本书可作为医学院校各专业本科生和硕士研究生的实验指导教材,也可供相关教师和科研技术人员参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验/肖方祥 李志红 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2011.8  
ISBN 978-7-5609-7312-8

I. 医… II. ①肖… ②李… III. ①医用化学:生物化学-实验-医学院校-教材 ②医药学:分子生物学-实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 167218 号

### 医学生物化学与分子生物学实验

肖方祥 李志红 主编

策划编辑:胡章成

责任编辑:尚利娜

封面设计:范翠璇

责任校对:朱霞

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:荆州市今印集团有限责任公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:8.75

字 数:240千字

版 次:2011年8月第1版第1次印刷

定 价:16.00元

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换  
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务  
版权所有 侵权必究

# 前 言

实验是一切研究的基础。实验对培养学生敏锐的观察能力、科学的思维习惯、良好的动手能力以及全面提升学生的素质起着不可替代的作用。近年来,生物化学与分子生物学实验技术得到突飞猛进的发展,了解与掌握生物化学与分子生物学实验技术的核心理论与方法,是生命科学领域教学与科研的共同需求。

2005年以来,三峡大学医学院生物化学与分子生物学教研室开展了“以问题为中心”的生物化学与分子生物学实验教学改革,受到学生的普遍欢迎。本书是在2008年编写的《生物化学与分子生物学实验指导》(第四版)的基础上,结合近年来指导医学本科生与硕士研究生的实验教学与科研经验修订与改编而成的。本书可作为高等医学院校各专业本科生与医学硕士研究生的生物化学与分子生物学实验指导用书。

本书的编写思想:以问题为中心,将实验技术理论与方法相结合,将基本技能训练实验与综合实验相结合,每章及基本技能训练实验都以问题的方式展开,引导读者带着问题去学习,通过探寻解决问题的方法,加深读者对相关实验的理论和技术的认识。

本实验指导主要包括五个部分。第一部分为生物化学实验的基本理论与基本技能,包括绪论,量器的使用、校正与实验数据的处理,分光光度技术,层析技术,电泳技术,离心技术,酶活力测定与酶法分析等,每章后面都附有与之对应的基本技能实验;第二部分为临床常用生物化学检验,包括血清蛋白质、葡萄糖、脂类物质含量的测定,肝功能与肾功能的相关检测等;第三部分为分子生物学基本技术;第四部分为综合性实验,包括血清白蛋白的纯化与鉴定、重组DNA的构建及其在大肠杆菌中的诱导表达;第五部分为附录,介绍了常用的生物化学仪器的使用方法。

本书是在前几版的基础上修订、编写而成的,首任主编是李如义教授等,他们深厚的学术造诣和严谨的治学态度为本书的编写奠定了良好的基础。本书在编写过程中得到了三峡大学医学院领导的关心与帮助,华中科技大学出版社的高效工作使本书得以顺利出版,在此表示衷心的感谢。另外,本书在编写过程中参考了已经出版的国内外生物化学与分子生物学实验技术方面的书籍,谨向这些编写者致以诚挚的谢意。

由于编者水平有限,敬请读者在使用过程中提出宝贵的意见与建议,以利于再版时进一步改进与修正。

编 者

2011年5月

# 目 录

绪论	1
一、学习目标	1
二、生物化学实验技术发展简史	1
三、实验室规则	3
四、实验记录与实验报告	3
第一章 量器的使用、校正与实验数据的处理	5
一、常用量器的使用规则	5
二、常用量器容量的校正	6
三、实验误差与数据处理	7
实验一 吸量管和微量可调式移液器的使用、校正与数据处理	10
第二章 分光光度技术	11
一、光吸收的基本知识	11
二、光吸收的基本定律	12
三、吸光度的测量	13
四、定量分析方法	16
实验二 分光光度法测定未知溶液的浓度	16
第三章 层析技术	18
一、层析技术的基本概念和特点	18
二、层析法的分类	19
三、常用的层析方法	19
四、柱层析的基本装置和基本操作	25
实验三 Sephadex G-25 凝胶层析	27
第四章 电泳技术	29
一、电泳的基本原理	29
二、电泳的分类	31
三、常用的电泳技术	32
四、染色方法	37
实验四 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	38
实验五 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	41
实验六 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	44
第五章 离心技术	46
一、离心技术的基本理论	46
二、离心机的分类	48
三、常用的离心分离方法	49
四、离心操作注意事项	51
第六章 酶活力的测定与酶法分析	52
一、酶活力的测定	52

## 2 医学生物化学与分子生物学实验

二、酶法分析	55
实验七 血清中碱性磷酸酶活力的测定(磷酸苯二钠法)	57
实验八 血清中葡萄糖浓度的测定(GOD-POD法)	59
实验九 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	61
<b>第七章 临床常用生物化学检验</b>	<b>64</b>
一、血清蛋白质含量的测定	64
实验十 血清总蛋白的测定(双缩脲法)	64
实验十一 血清白蛋白的测定(溴甲酚绿法)	66
二、血清葡萄糖含量的测定	68
实验十二 血清葡萄糖的测定(邻甲苯胺法)	68
实验十三 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)	70
三、血清脂类物质的测定	71
实验十四 血清甘油三酯的测定(GPO-PAP法)	72
实验十五 血清总胆固醇的测定(胆固醇氧化酶法)	74
实验十六 血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-Ch)的测定(磷钨酸-Mg <sup>2+</sup> 沉淀法)	75
四、肝功能的相关检测	77
实验十七 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活力的测定(改良赖氏法)	77
实验十八 血清总胆红素和直接胆红素的测定(改良J-G法)	79
五、肾功能的相关检测	82
实验十九 血清尿素的测定(脲酶比色法)	82
实验二十 血清尿酸的测定(酶偶联法)	84
<b>第八章 基因工程技术</b>	<b>87</b>
一、获取目的基因	88
二、选择适当的载体	88
三、限制性内切酶切割DNA	89
四、DNA片段的回收	90
五、目的基因与载体片段的连接	90
六、重组DNA导入宿主细胞	91
七、重组DNA的筛选与鉴定	91
八、外源基因的表达与目的蛋白的纯化	92
实验二十一 质粒DNA的小量快速提取(碱裂解法)	92
实验二十二 人外周血白细胞DNA的制备(NaI法)	94
<b>第九章 血清白蛋白的纯化与鉴定</b>	<b>96</b>
实验二十三 盐析与葡聚糖凝胶G-25凝胶层析脱盐	97
实验二十四 DEAE-纤维素离子交换层析	99
实验二十五 考马斯亮蓝G <sub>250</sub> 染色法测定蛋白质的浓度	101
实验二十六 蛋白质垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)	102
实验二十七 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)	105
<b>第十章 重组DNA的构建及其在大肠杆菌中的诱导表达</b>	<b>107</b>
实验二十八 目的基因的PCR扩增	108

实验二十九 目的基因与载体的限制性双酶切·····	111
实验三十 从琼脂糖凝胶中回收 DNA(玻璃粉末洗脱法) ·····	112
实验三十一 目的基因片段与载体的连接·····	114
实验三十二 大肠杆菌感受态细胞的制备、转化与筛选 ·····	115
实验三十三 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达和 SDS-PAGE 检测 ·····	117
实验三十四 Western 印迹法检测表达蛋白 ·····	118
<b>附录 常用生物化学仪器的使用方法</b> ·····	<b>121</b>
附录 A 721E 型分光光度计 ·····	121
附录 B HD-3 型紫外检测仪 ·····	122
附录 C BSZ-100 型自动部分收集器 ·····	124
附录 D LM17 型记录仪 ·····	125
附录 E DYY-6C 型电泳仪 ·····	126
附录 F Adventurer 系列电子天平 ·····	126
附录 G H-1650 型离心机 ·····	127
附录 H PTC-150 型 PCR 仪 ·····	128
<b>参考文献</b> ·····	<b>130</b>

# 绪 论

欢迎同学们来到生物化学与分子生物学实验室学习生物化学相关实验的理论与技术!

对于同学们来说,这虽然不是第一次进行化学实验,但是我们相信,生物化学实验将会是同学们最感兴趣、最激动人心、受益颇多的实验课程,当然也会是花费精力颇多、需倾心投入的实验课程。同学们过去在物理、化学、生物等学科学到的很多理论知识、实验技术和操作技能,将在生物化学实验中得到广泛运用。当然更重要的是,同学们将学到许多新的、在生物化学与分子生物学的科学研究中最常用的实验技术,这些技术不仅与生命科学领域的重大理论的飞速发展有关,也是目前深入了解疾病分子机理的重要手段。希望对这些技术的学习带给同学们的不仅是新奇,而且能引领大家走入生命科学研究殿堂,学会如何通过科学的思维与技术手段来研究生命现象,使同学们的创新意识、创新能力和批判性思维能力得到提高。

当同学们进行生物化学实验时,无疑会与以前所做的各种实验进行比较,大家会发现:第一,在生物化学实验中用微量可调式移液器取代了量筒与滴管,用小指管取代了试管与烧瓶,计量单位由“毫升”转变为“微升”,由“克”转变为“微克”与“纳克”,同学们将进行的是“微升”、“微克”甚至是分子水平的研究,这正是生物化学实验的主要特点之一,即是微量甚至痕量分析,往往达到纳克(ng)或皮克(pg)水平;第二,生物化学实验操作条件温和,往往在室温与缓冲介质中进行,以尽可能减少对所研究组分的天然结构和功能的损害;第三,采用的技术方法分辨率高,可明确区分结构或性质极其相似的物质。另外,在多数情况下,生物分子溶解在溶液中,看不到所要研究的物质与变化,但是生物化学实验中所采用的各种技术方法将起到“眼睛”的作用,用以对所研究的对象以及进行的生物化学过程进行监测。

## 一、学习目标

同学们在生物化学与分子生物学实验的学习中应该做到以下几方面。

(1) 学习实验设计的基本思路,掌握各个实验的基本原理,学会严密地组织实验,合理地安排实验步骤和时间。

(2) 训练动手能力,学会熟练地使用各种生物化学实验仪器,包括各种天平、分光光度计、离心机、自动部分收集器、核酸蛋白检测仪、酸度计、各种电泳装置和摇床等,能够整齐清洁地进行所有的实验,培养严谨细致的科学作风。

(3) 学习准确翔实地记录实验现象和实验数据的技能,提高实验报告的写作能力。

(4) 掌握生物化学的各种基本实验方法和实验技术,尤其是各种电泳技术和层析技术,为今后进一步学习打下坚实的基础。

(5) 有些实验需要大家的共同合作,这就需要团队精神。社会发展与个人价值的实现都离不开团队精神,同学们在团队中需分工合作,密切配合。

希望同学们通过生物化学与分子生物学实验技能的训练,学会科学研究的基本方法,并加深对生物化学与分子生物学基本知识的理解,为后续课程的学习和今后进一步深造打下坚实的基础。

## 二、生物化学实验技术发展简史

在过去的一个世纪中,生物化学与分子生物学的发展尤为迅速,在新的世纪它仍将是生命



## 2 医学生物化学与分子生物学实验

科学的带头学科。这一切主要有赖于生物化学与分子生物学实验技术的不断发展与完善。这里简单介绍与生物化学和分子生物学发展密切相关的重大实验技术的历史(表 0-1),从中可以窥视出生物化学实验技术在生命科学与临床医学中的重要地位。

表 0-1 与生物化学和分子生物学发展密切相关的重大实验技术的历史

时 间	实验技术	主要奠基者	相关理论发展与成就
1924 年	超离心技术	T. Svedberg	用于测定血红蛋白的相对分子质量,获 1926 年诺贝尔化学奖
1935 年	放射性同位素示踪技术	Schoenheimer 等	对各种物质代谢过程的阐明起了决定性的作用
20 世纪 40 年代	分配层析技术	Martin 和 Synge	用于生化物质的分离,获 1952 年诺贝尔化学奖
20 世纪 40 年代	电泳技术	Tiselius	获 1948 年诺贝尔化学奖
1958 年	氨基酸自动分析仪	Stem, Moore、 Spackman	用于蛋白质的氨基酸组成分析
20 世纪 50 年代	蛋白质 X-射线衍射	Perutz 和 Kendrew	用于蛋白质三维结构分析,获 1962 年诺贝尔化学奖
	核酸 X-射线衍射	Crick, Watson, Wilkins	用于核酸三维结构分析,获 1962 年诺贝尔生理学或医学奖
1962— 1972 年	亲和层析技术	Anfinsen	为层析技术的重大发展,因研究酶化学的基本理论获 1972 年诺贝尔化学奖
1969 年	SDS-PAGE	Weber	标志着电泳技术的飞速发展,用于蛋白质分子质量的测定
1972— 1973 年	DNA 分子重组技术	Berg, Cohen	标志着基因工程技术的诞生, Berg 获 1980 年诺贝尔化学奖
1980 年	DNA 序列分析技术	Sanger, Gilbert	获 1980 年诺贝尔化学奖
1981 年	高效毛细管电泳技术	Jorgenson, Lukacs	标志着高通量 DNA 序列分析技术的快速发展
1984 年	单克隆技术	Kohler, Milstein 等	标志着极微量蛋白质检测技术的发展,获 1984 年诺贝尔生理学或医学奖
1985 年	PCR 技术	Mullis	标志着 DNA 体外扩增技术的诞生,获 1993 年诺贝尔化学奖
1991 年	二维核磁共振技术	R. Ernst	用于蛋白质结构方面的研究,获 1991 年诺贝尔化学奖
1993 年	寡聚核苷酸定点突变	M. Smith	获 1993 年诺贝尔化学奖
2002 年	生物大分子质谱分析 3D 核磁共振技术	田中耕一 Kurt Wiithrich	利用质谱分析技术与核磁共振技术测定溶液中生物大分子的三维结构,获 2002 年诺贝尔化学奖
2008 年	绿色荧光蛋白(GFP)	下村修、钱永健 Martin Chalfie	GFP 为一种广泛应用的活体报告蛋白, GFP 的发现获 2008 年诺贝尔化学奖

### 三、实验室规则

(1) 实验前必须认真预习实验内容,明确本次实验的目的和要求,掌握实验原理,写好实验预习报告,穿好实验服,否则,不能进行实验。

(2) 实验时自觉遵守实验室纪律,不迟到,不早退,保持室内安静,不大声说笑和喧哗。严禁用器械及动物开玩笑。

(3) 严格按操作规程使用仪器,凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用。仪器发生故障、损坏和丢失时,应立即报告老师,凡违反操作规程而损坏仪器者要追究责任。

(4) 实验过程中要大胆、细心,认真观察实验现象并记录好原始数据;节约试剂,节约水电。

(5) 实验过程中的样品,尤其是保存在冰箱和冷藏室中的样品,必须贴上标签,写上品名、浓度、配制者的姓名和日期等;放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液必须严密封口。

(6) 实验完毕,洗净所用器材,固体舍弃物(如用过的滤纸、电泳用凝胶条等)切勿倒入水槽内,以免堵塞。昂贵的 Sephadex 凝胶和 DEAE 纤维素等,用后必须及时回收,不得丢弃。学生须经指导教师同意,方能离开实验室。

(7) 每位学生要熟悉实验室内电闸的位置,严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。

(8) 每日实验完毕,值日主要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员,必须检查并关好水、电、门、窗,经老师检查后方可离开。

### 四、实验记录与实验报告

#### 1. 实验记录

详细、准确、如实地做好实验记录是实验科学研究过程中极为重要的一个环节,也是培养同学实验能力和养成严谨的科学作风的一个重要方面。

(1) 每位同学必须准备一个实验报告本,实验前认真预习实验,看懂实验原理和操作方法,写好实验预习报告。预习报告应包括实验目的、原理、详细的实验操作步骤(可以用流程图表示)、实验的注意事项以及拟制好的实验数据记录表格等。

(2) 报告上要编好页数,不得撕缺和涂改,写错时可以划去重写。不得用铅笔记录,只能用钢笔或圆珠笔。同组的两位同学合做同一实验时,两人必须都有相同、完整的记录。

(3) 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据,条理清楚,字迹端正。实验记录必须公正、客观,不可夹杂主观因素,即使观测的数据相同或偏差很大,也都应如实记录,不得涂改。实验记录要注意有效数字。

#### 2. 实验报告

实验报告是实验的总结和汇报,写实验报告可以分析、总结实验的经验和问题,学会处理各种实验数据,加深对有关生物化学与分子生物学实验原理和实验技术的理解和掌握,同时写实验报告也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式应为:①实验目的;②实验原理;③仪器和试剂;④实验步骤;⑤数据处理与结果;⑥问题与讨论;⑦临床意义。

每个实验报告都要按照上述要求来写,实验报告的写作水平也是衡量学生实验成绩的一个重要方面。实验报告必须独立完成,严禁抄袭。

(1) 实验现象的记录。为了使实验结果能够重复,必须详细记录实验现象的所有细节。

#### 4 医学生物化学与分子生物学实验

例如,若实验中生成沉淀,那么沉淀的真实颜色是什么?是白色、淡黄色或是其他?沉淀的量是多还是少?是胶状还是颗粒状?什么时候形成沉淀?立即生成还是缓慢生成?加热时生成还是冷却时生成?

在科学研究中,仔细地观察,特别注意那些未预想到的实验现象是十分重要的,这些观察常常引起意外的发现,报告并注意分析实验中的真实发现,这对同学们将是非常重要的科学研究训练。

(2) 实验结果的整理。对于实验结果,应根据实验目的将原始记录系统化、条理化,其表达方式一般有以下三种。①叙述式:用文字将观察到的、与实验目的有关的现象客观地加以描述,描述时需要有时间概念与顺序。②表格式:能够较为清楚地反映观察的内容,有利于相互对比。每一图表应说明一定的中心问题,表内的项目及计量单位应填明。③简图式:可用曲线图表示实验数据或结果。实验作图尤其要严格要求,必须使用坐标纸,每个图都要有明显的标题,坐标轴的名称要清楚完整,并注明合适的单位。实验点要使用专门设计的符号,如○、●、□、■、△、▲等,符号的大小要与实验数据的误差相符,不要用×、+和·(小圆点)。通常横轴是自变量,往往知道得很准确;纵轴是应变变量,是测量的数据。曲线要用曲线板或曲线尺画成光滑连续的曲线,各实验点均匀分布在曲线上或曲线两边,且曲线不可超越最后一个实验点。两条以上的曲线和符号应有说明。

(3) 实验讨论的书写。实验结果的讨论是根据已知的理论知识对结果进行解释和分析,讨论内容应包括:①以实验结果为论据,论证实验目的,即判断实验结果是否为预期的结果;②实验结果揭示了哪些新问题,是否出现了非预期结果,即“异常现象”,对此应分析可能的原因;③实验结果有哪些生理或病理意义等。实验结果的讨论要充分,尽可能多地查阅一些有关的文献和教科书,充分运用已学过的知识和生物化学原理,进行深入的探讨,勇于提出自己独到的分析和见解,并对实验提出改进意见。

由于同学们对实验操作的认真程度、技术熟练情况和实验动物个体的差异性等都可对实验结果产生直接的影响,有时实验可能部分成功或完全失败。对于有时间限制的教学性实验,不可能反复多次进行同一实验。因此,需进一步强调的是:①实验前同学们必须熟悉每一个实验的相关理论、每种试剂的作用、每个实验步骤的意图;②实验过程中同学们必须认真进行实验操作,及时、正确地做好实验记录;③实验结束后同学们对实验结果做认真、客观的分析和总结,如果实验失败,也不要气馁,而需认真总结实验失败的可能原因和教训。

最后,预祝同学们生物化学与分子生物学实验的学习取得圆满成功!

(肖方祥、李志红)

# 第一章 量器的使用、校正与实验数据的处理

## 问题

◆ 在有些定量分析的生物化学实验中,往往需要准确地转移液体,如何选择量器的种类与规格是初学者遇到的首要问题。不同量器的技术标准与使用方法有何差异?

◆ 有些量器在出厂前或者在使用过程中出现容量与标示值不相符的情况,对实验结果有较大影响,因此必须对量器进行校正。如何校正?

◆ 获得的实验结果是否准确?可靠性如何?如何正确记录与处理实验数据?

## 一、常用量器的使用规则

实验中所用的量器都有固定的规格和技术标准,出厂时都印有经国家计量机关检定认可的检定标记,“A”、“B”等字样表示量器的等级,A级量器的允许误差范围较B级量器的小。“mL”表示量器以毫升为计量单位,“20℃”表示计量检定温度为20℃。

玻璃量器分为量入式玻璃量器和量出式玻璃量器两种,量入式玻璃量器用于测定注入量器中液体的体积,用“In”标记;量出式玻璃量器用于测定从量器中倾出的液体的体积,用“Ex”标记。

量器的规格均以量器的容量来区分。

### (一) 量杯、量筒

量杯、量筒常用于要求不甚精确的大量液体的测量。量杯呈圆锥形,量筒为圆柱形。量杯是量出式的,而量筒则有量出式量筒和量入式量筒两种。量筒的精度略高于量杯的精度。它们的规格有10 mL、25 mL、50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1 000 mL等多种。

### (二) 吸量管

吸量管广泛用于生物化学实验,其准确度较高,使用灵活方便,有多种规格(0.1~10 mL)可供选用。吸量管有完全流出式吸量管和不完全流出式吸量管两种,完全流出式吸量管的容量包括了吸量管尖端不能自然流出的液体的体积,通常在管壁上标明有“吹”字,使用时要把最后不能自然流出的液体吹出;不完全流出式吸量管的容量,不包括管尖最后不能自然流出的液体的体积,使用这种吸量管时不能吹,应将管尖靠在容器壁上并稍停留片刻,直到液体不流出为止。

吸量管分A、B等级别,可根据实验精度的要求选用。其常用规格有0.1 mL、0.2 mL、0.25 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL、5 mL、10 mL数种。

使用吸量管时,用洗耳球吸取液体,其刻度面向自己,以管尖插入液面下1 cm为宜。插得太深,吸量管外壁黏附的液体多,误差大;插得太浅,易吸入空气,或将液体吸入洗耳球内。液体吸至稍过所需量标线,然后将管尖移离液面,垂直将多余的液体放出,至液体弯月面的最底部恰与所需量标线相切,再将液体移至容器内,放出液体。规格为0.1 mL以下的吸量管通常是完全流出式的,应吹出吸量管尖端不能自然流出的液体。此外,还应根据所需量取体积正确地选用不同容量规格的吸量管,否则会人为地扩大误差范围,影响实验结果。如果用1 mL吸

## 6 医学生物化学与分子生物学实验

量管吸取 0.1 mL 溶液显然会使误差增大,同样,如果需要 1 mL 溶液而用 0.5 mL 吸量管吸取两次也会使误差增大。

### (三) 微量可调式移液器

微量可调式移液器常用于吸取 1 mL 以下的微量液体。它由塑料杆状外壳、刻度旋钮和顶部按钮装置构成(图 1-1)。每种移液器都有一种与之配套的一次性塑料吸头。移液器准确度高,使用方便。简单地说,移液器就是一个精密的活塞,改变活塞的行程就可连续调整取液量,吸液容量等于活塞移动的距离与活塞截面积的乘积。

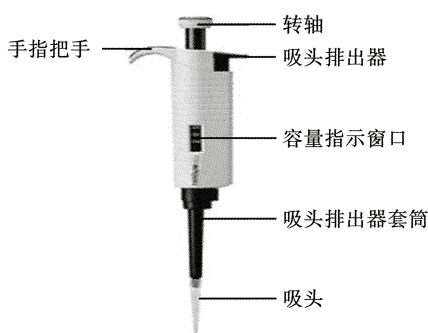


图 1-1 微量可调式移液器的基本构造

取样时,推动按钮带动按钮推杆使活塞向下移动至第一停点位置,排出活塞腔内气体,松手后活塞在变位弹簧的作用下恢复到原位,从而完成一次吸液过程;再次按压操作按钮至第二停点位置,排出液体。微量可调式移液器活塞移动的距离由调节轮控制螺杆机构实现。

微量可调式移液器的规格一般分为 2  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ,最大到 1 000  $\mu\text{L}$ 。应根据需要选择合适的规格,否则会人为地扩大误差范围,影响实验结果。

一个完整的移液循环,包括容量设定→吸头安装→预洗吸头→吸液→放液→卸去吸头等六个步骤。每一个步骤都有需要遵循的操作规范。

(1) 设定容量。旋转转轴(或调节轮)使移液量达到所需容量,移液量由容量指示窗口示出。逆时针方向旋转转轴,增大移液量;顺时针方向旋转转轴,减少移液量。移液量的设定不能超过额定范围。

(2) 安装吸头。将吸头套在移液管头上,轻轻转动,以保证密封。

(3) 预洗吸头。使用前应先将移液管吸液和排液几次,以保证腔内、外气压一致。

(4) 吸液。垂直地握住移液器,将按钮按至第一停点位置,并把吸头浸入到液面下 2~3 mm 处,再缓慢地放松按钮,使之复位,等待 1~2 s 后从液体中取出,并避免碰撞任何东西。

(5) 放液。将吸头移至加样容器壁上,缓慢地把按钮按至第一停点位置,等待 1~2 s,再把按钮完全按下(即按至第二停点位置),排尽全部液体后,吸头应沿容器壁向上滑动取出,再放松按钮,使之复位,即完成一次操作过程。

(6) 卸去吸头。按吸头排出器按钮,吸头与移液器自动分开。

微量可调式移液器属精密量器,使用过程中应注意下列事项。①不允许直接接触液体。使用过程中或不使用时应插上吸头,垂直放置,以防止液体进入活塞内,保持管内清洁。②必须在移液器的额定范围设定移液量,不能超过额定范围,否则会损坏仪器。③按下或松开按钮的操作必须循序渐进,不可急速弹回。

## 二、常用量器容量的校正

量器容量准确与否,对生物化学实验结果有较大影响,有些量器在出厂前或者在使用过程中出现容量与标示值不相符的情况,存在一定的误差,因此,有时需要对量器进行成批或个别校正,以提高其准确度。

量器容量校正的原理建立在两个基本概念之上:一是物质的质量单位(克)与长度单位的

原始定义:1 L 水在密度最大(温度 3.98 °C)时的质量是 1 000 g;二是纯液体物质的质量、体积与密度的物理关系:质量=体积×密度。水在 3.98 °C 时的密度为 1 g/cm<sup>3</sup>,其他温度下的密度可以测定出来,见表 1-1。物质的质量可以用精密电子天平进行准确称量。知道物质的质量与密度,体积就可以计算出来。

表 1-1 不同温度下水的密度

温度/°C	密度/(g/cm <sup>3</sup> )	温度/°C	密度/(g/cm <sup>3</sup> )	温度/°C	密度/(g/cm <sup>3</sup> )
0	0.999 868	12	0.999 525	24	0.997 326
1	0.999 927	13	0.999 404	25	0.997 074
2	0.999 968	14	0.999 271	26	0.996 813
3	0.999 992	15	0.999 126	27	0.996 542
4	1.000 000	16	0.998 970	28	0.996 262
5	0.999 992	17	0.998 802	29	0.995 973
6	0.999 968	18	0.998 623	30	0.995 676
7	0.999 929	19	0.998 433	31	0.995 369
8	0.999 876	20	0.998 232	32	0.995 054
9	0.999 869	21	0.998 021	33	0.994 731
10	0.999 728	22	0.997 799	34	0.994 399
11	0.999 632	23	0.997 567	35	0.994 059

量器的容积随温度的变化而变化,所以必须确定温度,量器才有其意义。温度的选择采用实验室全年的平均温度,一般以 20 °C 为测量温度。常用量器容量校正时必须考虑以下三个因素:①温度对水(或水银)密度的影响;②温度对容量仪器(玻璃的热胀冷缩)的影响;③称重时空气浮力对重量的影响。其中影响最大的是温度对水密度的影响,故校正时的温度应尽可能选择靠近 20 °C。对于容量在 0.2 mL 以下的量器用水称重法进行校正时,误差较大,故以水银称重法为佳。

### 三、实验误差与数据处理

实验是一门科学。由于仪器和感觉器官的限制,实验研究中测得的数据只能达到一定程度的准确度,因此,实验者必须在实验之前了解测量所能达到的准确度,拟定可行的实验方案,选择合理的实验方法和合适的实验进程,寻找有利的测量条件,精细实验;在实验后对所测得的数据进行处理、归纳、整理,科学地分析各物理量之间的关系和规律,正确表达实验结果,并评价、分析测量结果的可靠程度。所有这些都要求树立正确的误差概念,并通过对误差大小及产生误差原因的分析,采取减小误差的有效措施,以实现上述要求。以下简要介绍有关误差分析与数据处理的一些基本概念。

#### (一) 误差及其产生的原因

除实验过程中因粗心大意或不按规范程序操作所造成的过失误差外,实验误差分为系统误差与偶然误差。

系统误差,又称可测误差,是由一定原因引起的,它对测定结果的影响比较固定,在同一条

## 8 医学生物化学与分子生物学实验

件下,重复测定,它将重复出现,因此其大小可以测出。产生的原因有方法误差、仪器误差、试剂误差、操作误差等。常用对照试验、空白试验或校准仪器等办法减小系统误差。

偶然误差,又称随机误差,是由于某些难以预料的偶然因素引起的(如环境温度、湿度和气压的微小波动,仪器性能的微小变化等),它对测定结果的影响不固定。虽然偶然误差难以察觉,但它具有一定的规律性:小误差出现的概率大;大误差出现的概率小;大小相等的正、负误差出现的概率相等。偶然误差随测定次数的增加而迅速减小,所以,多次测量取平均值是减少偶然误差的最好方法。通常情况至少要做三组平行实验。

### (二) 误差的表示方法

#### 1. 准确度与误差

准确度(accuracy)是指测定值与真实值之间的偏离程度,大小用误差来量度。误差越小,测定结果的准确度越高。

绝对误差(absolute error,  $E$ )

$$E = X - X_T$$

式中: $X$  为测量值; $X_T$  为真实值。

相对误差(relative error,  $E_r$ )

$$E_r = \frac{E}{X_T} \times 100\%$$

相对误差是绝对误差在真实值中所占的百分比。 $E$  是有单位的,而  $E_r$  是无单位的,因此,不同物理量的  $E_r$  可以相互比较; $E$  的大小与被测值  $X$  的大小无关,而  $E_r$  与被测值  $X$  和  $E$  都有关。因此,无论是比较各种测量的精度或是评定测量结果的准确度,采用  $E_r$  都更为合理。

#### 2. 精密度与偏差

精密度(precision)是指多次测量结果之间的吻合程度,其大小用偏差来量度。偏差越小,精密度越高。

绝对偏差(absolute deviation,  $d_i$ )

$$d_i = X_i - \bar{X}$$

式中: $X_i$  为单个测量值; $\bar{X}$  为平均值。

相对偏差(relative deviation,  $d_r$ )

$$d_r = \frac{d_i}{\bar{X}} \times 100\%$$

相对偏差的计算多用于一般的测量工作中。常量分析的测量结果一般要求  $d_r \leq 0.2\%$ 。

标准偏差(或标准差, standard deviation,  $S$ )

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

标准偏差反映一组数据的离散程度(其中  $n$  为测量次数),是表示精密度的最重要指标。标准偏差越大,表示实验数据越离散,即越不精确;反之,标准偏差越小,表示实验数据越精确。

变异系数(coefficient of variation, CV)

当进行两个或多个资料变异程度的比较时,如果几组数据单位相同,平均值相差不大,可以直接利用标准偏差来比较。但如果几组数据的单位不同或平均值相差较大,标准偏差就缺

乏可比性了,因此又引入了变异系数。变异系数又称相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

由于变异系数可以消除单位和(或)平均值的不同对两个或多个资料变异程度比较的影响,因此在数据统计中应用广泛。

精密度与准确度是两个相互联系但又有区别的概念。相对偏差小,只能说明测量精密度高,但不能说准确度就一定很好。高精密度不能保证高准确度,而高准确度必须有高精密度来保障。只有在无系统误差时,精密度和准确度才是一致的。

### (三) 实验数据的处理

实验中任何测量的准确度都是有限的,只能以一定近似值来表示测量结果。因此,测量数据的准确度就不能超过测量方法(仪器)的最小允许范围。如果任意地将近似值保留过多的位数,反而会歪曲测量结果的真实性。正确记录和计算实验数据,就涉及有效数字的概念和运算规则的问题。

#### 1. 记录测量数值,必须写出它的有效数字

有效数字是指实际测量得到的数字,它包括所有的准确数字和最后一位估计数字。如 50 mL 量筒上的最小刻度为 1 mL,在两刻度间可再估计一位,所以可读至 0.1 mL,如 35.5 mL。若为 50 mL 滴定管,最小刻度为 0.1 mL,再估计一位,可读至 0.01 mL,如 25.41 mL,若记录成 25.4 mL 或 25.410 mL 都是错误的。

注意“0”的双重作用:第 1 个数字前面的“0”,如 0.0001564 中“0”,只作定位用,不是有效数字;数字中间和小数末端的“0”,如 2500.38 和 6.9700 中的“0”都是有效数字。整数如 500 中的“0”,有效数字位数不能确定。如写成  $5.0 \times 10^2$  是两位有效数字,写成  $5.00 \times 10^2$  是三位有效数字。对于 pH、pK、lgc 等对数值,其有效数字的位数,取决于小数点后面的位数,而小数点前面的整数部分只表明该真数中 10 的指数。如  $\text{pH}=10.68$ ,即  $[\text{H}^+]=2.1 \times 10^{-11}$ ,其有效数字为两位,而不是四位。自然数和在计算中出现的倍数或分数,都不是测量所得到的,所以其有效数字的位数不受限制。

#### 2. “四舍六入五留双”修约法

修约时要合理取舍。凡有效数字右边第 1 位数等于或大于 6 则进位;小于 4 则舍去;等于 5,如前一位是奇数则进位,是偶数则舍去。先修约后运算。

#### 3. 有效数字运算规则

(1) 加减运算中,几个数相加减所得和或差的有效数字的位数,应以小数点后位数最少的那个数为准。如:求  $80.1+3.46+0.7872$  的和,应以 80.1 为准,多余数字应按修约规则取舍,因此应为  $80.1+3.5+0.8=84.4$ 。

(2) 乘除运算中,几个数相乘(或除)所得的积(或商)的有效数字的位数,应以有效数字位数最少的那个数为准。如求  $0.0431 \times 27.84 \times 1.0578$  的积,0.0431 的有效位数为 3,是最少的,因此应为  $0.0431 \times 27.8 \times 1.06=1.27$ 。乘方和开方相当于乘法与除法。

(3) 对数运算中,对数尾数的位数应与真数的有效数字相同。如:  $[\text{H}^+]=6.4 \times 10^{-5}$ ,  $\text{pH}=4.19$ 。

$\text{pH}=4.19$  不能看成三位有效数字,而是两位有效数字,  $\text{pH}$  的整数部分仅与真数中 10 的



指数对应。

### 实验一 吸量管和微量可调式移液器的使用、校正与数据处理

#### 问题

◆ 当你需要从试剂瓶中转移 100  $\mu\text{L}$  的液体到试管中时,应选择什么规格的吸量管或者微量可调式移液器? 吸量管上刻有的一些标记如“天波 0.1 mL 20  $^{\circ}\text{C}$  Ex B 吹”等分别代表什么含义? 如何选择合适的量器来转移指定体积的溶液?

◆ 当你把微量可调式移液器容量设定在 100  $\mu\text{L}$  并把液体从试剂瓶中转移到了试管中时,你是否确定所转移的液体体积就是 100  $\mu\text{L}$ ? 导致误差的可能原因有哪些?

#### 【实验目的】

- (1) 熟练掌握吸量管与微量可调式移液器的使用方法。
- (2) 掌握有效数字的概念及如何正确记录、处理与分析实验数据。
- (3) 掌握量器的校正原理与方法。
- (4) 掌握电子天平的使用方法。

#### 【实验器材与试剂】

50 mL 烧杯、不同规格的吸量管、不同规格的微量可调式移液器、电子天平(精度 0.000 1 g)、温度计(精度 0.1  $^{\circ}\text{C}$ )、蒸馏水。

#### 【实验操作】

- (1) 吸量管的操作练习。
- (2) 微量可调式移液器的操作练习。
- (3) 给定量器,转移定量液体,在电子天平上称量转移液体的质量,记录实验数据(注意:每组数据均需是测定 3 次以上的平行数据)。电子天平的使用方法参见附录 F。
- (4) 对测量数据进行准确度和精密度评估,计算量器容量的校正值。

(肖方祥、李志红)