

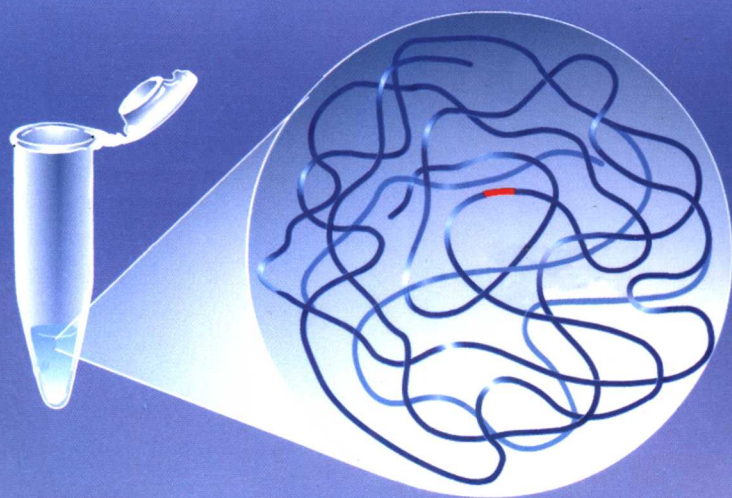
21世纪高等医药院校教材

生物化学实验

第二版

韩跃武 主编

BIOCHEMISTRY EXPERIMENTS



兰州大学出版社

21 世纪高等医药院校教材

生物化学实验

第二版

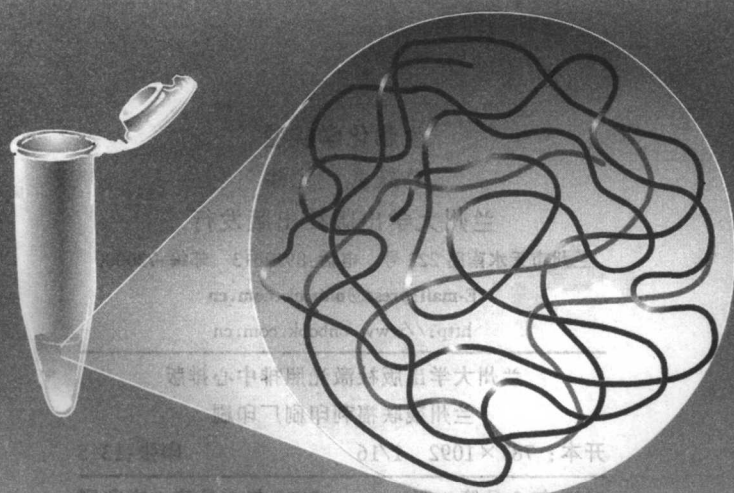
主 编 韩跃武

副主编 杨林西 陈 卫

编 者 姚海燕 张雪燕 王玉平

耿 哲 谢俊秋 郝春燕

高丽萍 肖尚英



兰州大学出版社

生物化学实验

韩跃武 主编

兰州大学出版社出版发行

兰州市天水南路 222 号 电话:8912613 邮编:730000

E-mail:press@onbook.com.cn

<http://www.onbook.com.cn>

兰州大学出版社激光照排中心排版

兰州残联福利印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16

印张:13.5

2006 年 8 月第 1 版

2006 年 8 月第 1 次印刷

字数:287 千字

印数:1~2000 册

ISBN7-311-02250-9

定价:21.00 元

前 言

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一。人类基因组计划的启动和进展,更显示出生物化学实验技术是生命科学研究领域和临床诊疗应用领域中一项非常重要的基本技术。近几年来,我国高等教育的步伐也在不断的加快,不少院校组建了生命科学学院或生物学院,相继建立了生物技术、生物工程、生物科学等新专业。因此,作为医药院校的学生必须掌握基本的生物化学实验技能,了解生物体内基本物质成分的分离、分析和鉴定常用方法以及物质代谢的研究方法,并通过实验技术加深对理论知识的理解,增强分析问题和解决问题的能力。

为此,我们积累多年教学实践之经验,参考国内外的生化实验教材,编写了这本《生物化学实验》。本书比较系统、全面地介绍了生物化学常用实验技术与方法。共分 14 章,包括了生物化学实验的基本要求、常见的实验方法及基本原理、普通实验、综合实验、设计实验、选择实验、开拓性实验、实验室安全知识及防护知识、常用生化仪器的使用方法、缓冲溶液、电泳染色方法、核酸实验方法及相关参数、常用数据等内容。常见的实验方法及基本原理中包含了电泳、层析、分光光度、离心等四大生物化学基本技术,把现代生物化学技术的精华系统扼要地介绍给学生。普通实验这一章是一些经典的生物化学实验内容,综合性实验则是对生物化学四项基本实验技术和原理的综合应用。而设计实验是在尽可能利用研究所现有的试剂和设备的前提下,最大限度地将学生的动手和动脑能力结合起来,以便培养学生独立思考勇于探索创新的能力。在选择性实验这一章中我们安排了难易程度不一的实验内容,加大了实验的选择余地。《生物化学实验》二版教材在第一版的基础上,做了进一步的补充和完善,其中加入了第八章方法学评价内容,以引导学生树立严谨的实验态度,明确科学的实验设计。此外针对目前生物化学与分子生物学实验技术的迅速发展,为了培养创新人才,与世界接轨,我们引进了一些现代的实验方法,在实验教材中新增了开拓性实验这一章,包括基因多态性研究、小鼠肾脏双向电泳、人体毛头发基因组 DNA 的提取等要求较高的实验内容。通过这些创新开拓性实验,使学生接触一些前沿的实验课题,从而极大地调动学习兴趣,挖掘学生的求知欲。

本书的实验方法严谨可靠,可操作性强,实用性强,具有部分工具书的属性。适用于高等医药院校基础生物化学实验教学,可供临床医学、药学、医学检验、口腔、预防、护理等专业根据各专业特点选择使用。

尽管我们用最大努力来编写本教材,由于能力有限总不免有许多不足与疏漏之处,谨望广大师生在使用当中多提宝贵中肯的意见,以便更好地完善教材。

编者

2006 年 6 月

目 录

第一章 生物化学实验的基本要求	(1)
第一节 实验的准确性.....	(1)
一、有效数字	(1)
二、误差	(2)
三、误差的表示方法和计算	(3)
四、与质量控制有关的几个基本概念	(4)
五、统计学的一些基本概念和计算公式	(4)
第二节 实验记录及报告	(10)
一、实验记录.....	(10)
二、实验报告.....	(10)
第三节 实验样品的制备	(11)
一、动物的脏器.....	(11)
二、微生物.....	(11)
三、细胞.....	(12)
第四节 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法	(12)
一、初用玻璃仪器的清洗.....	(12)
二、使用过的玻璃仪器的清洗.....	(12)
三、洗涤液的种类和配制方法.....	(13)
第五节 试剂的配制及一些常用数据表	(14)
第二章 常见的实验方法及基本原理	(16)
第一节 离心技术	(16)
一、离心沉降速率影响因素.....	(16)
二、沉降系数.....	(17)
三、离心设备.....	(19)
四、制备超离心法.....	(19)
第二节 层析技术	(22)
一、薄层层析.....	(22)
二、聚酰胺薄膜层析.....	(23)
三、凝胶层析.....	(23)
四、离子交换层析.....	(23)
五、亲和层析.....	(25)

生物化学实验

六、气相色谱·····	(26)
七、高效液相色谱·····	(27)
第三节 电泳技术·····	(28)
一、影响电泳的主要因素·····	(28)
二、常用电泳支持介质·····	(29)
三、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳·····	(30)
四、连续密度梯度电泳·····	(32)
五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(32)
六、等电聚焦电泳·····	(32)
七、双向电泳·····	(33)
八、毛细管电泳·····	(34)
九、电泳新技术·····	(35)
第四节 分光光度法·····	(36)
一、基本原理·····	(36)
二、比色法·····	(37)
三、分光光度法·····	(38)
四、浊度法·····	(39)
第五节 基因多态性及其检测方法·····	(39)
一、基因多态性·····	(39)
二、基因多态性的检测方法·····	(40)
第三章 普通实验·····	(42)
实验一 Folin-酚法测定蛋白质含量·····	(42)
实验二 肌糖原的酵解作用·····	(43)
实验三 影响酶活性的因素·····	(46)
实验四 碱性磷酸酶 K_m 值测定·····	(49)
实验五 乳酸脱氢酶及辅酶 I 琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制·····	(52)
实验六 酮体的生成与利用·····	(55)
实验七 血清丙氨酸氨基转移酶测定·····	(56)
实验八 分光光度法测定血红蛋白含量及血糖·····	(59)
实验九 蛋白质的变性与沉淀·····	(67)
实验十 血清蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳·····	(69)
第四章 综合实验·····	(72)
实验一 质粒 DNA 的提取及电泳鉴定·····	(72)
实验二 鸡卵类粘蛋白的制备及活力的测定·····	(75)
实验三 动物肝脏 DNA 的提取与二苯胺测定·····	(82)
实验四 酵母 RNA 的提取及醋酸纤维薄膜电泳分离核苷酸·····	(85)

第五章 设计实验	(90)
第六章 选择实验	(91)
实验一 蛋白质的两性性质及等电点的测定	(91)
实验二 枯草杆菌碱性磷酸酶的制备及酶活性的测定	(93)
实验三 单核苷酸的离子交换柱层析分离	(96)
实验四 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹	(99)
第七章 开拓性实验	(106)
实验一 从动物毛发中提取 DNA 进行 RAPD 扩增	(106)
实验二 DNA 指纹图谱分析	(108)
实验三 小鼠肾脏组织的双向电泳	(112)
实验四 随机扩增多态 DNA	(118)
第八章 方法学评价实验	(122)
实验一 线性范围试验	(122)
实验二 批内重复性试验	(124)
实验三 回收试验	(127)
实验四 干扰试验	(129)
实验五 方法比较试验	(130)
实验六 检测能力测定	(133)
第九章 实验室安全知识及防护知识	(136)
第十章 常用生化仪器的使用方法	(139)
第一节 称量仪器	(139)
第二节 分光光度计	(142)
第三节 离心机	(145)
第四节 干燥箱和恒温箱	(146)
第五节 电热恒温水浴	(147)
第六节 自动部分收集器	(148)
第七节 核酸蛋白检测仪	(149)
第八节 酸度计	(149)
第九节 移液器	(151)
第十一章 缓冲溶液	(152)
第一节 缓冲理论	(152)
第二节 常用缓冲液配制方法	(152)
第十二章 电泳染色方法	(156)
第一节 核酸染色	(156)
第二节 蛋白质染色	(157)
第三节 糖蛋白染色	(158)

生物化学实验

第四节	脂蛋白染色	(158)
第五节	同工酶染色	(159)
第十三章	核酸实验方法及相关数据	(164)
第一节	核酸含量的测定	(164)
第二节	常用的核酸换算公式及某些核酸的性质	(165)
第三节	核酸的纯化与浓缩	(167)
第十四章	常用数据	(170)
第一节	常用层析介质数据	(170)
	一、离子交换层析数据及参数	(170)
	二、聚丙烯酰胺凝胶的技术数据	(172)
	三、琼脂糖凝胶的技术参数	(172)
	四、凝胶过滤层析介质的技术参数	(172)
	五、Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶的数据	(177)
	六、Sephadex G 型交联葡聚糖凝胶溶胀所需时间	(178)
	七、琼脂糖凝胶的数据	(178)
	八、Superose 的数据	(179)
	九、琼脂糖凝胶 Bio-Gel A 型的数据	(179)
	十、Bio-Gel P 型凝胶的数据	(180)
	十一、交联聚苯乙烯凝胶 Bio-Beads S-X 型的数据	(181)
	十二、制备级 Superdex 凝胶过滤介质的数据	(181)
	十三、聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的数据	(182)
	十四、各种凝胶所允许的最大操作压	(182)
第二节	凝胶过滤用标准蛋白	(183)
	一、凝胶过滤用低相对分子质量标准的组成	(183)
	二、凝胶过滤用高相对分子质量标准的组成	(184)
	三、凝胶过滤用相对分子质量标准品	(184)
第三节	干燥剂、致冷剂、浓缩剂及硅化剂	(185)
	一、干燥剂	(185)
	二、致冷剂	(186)
	三、浓缩剂	(189)
	四、硅烷化剂	(190)
第四节	生物化学中某些重要化合物的 Mr 及 pK 值	(192)
第五节	一些常用单位	(194)
	一、长度单位	(194)
	二、体积单位	(195)
	三、质量单位	(195)

四、摩尔与摩尔浓度表示法	(195)
五、十进位数量词头及符号	(196)
附录 实验课教学大纲	(197)
一、本课程的目的意义	(197)
二、本课程的基本要求	(197)
三、实验教学大纲	(199)
主要参考书目	(204)

第一章 生物化学实验的基本要求

第一节 实验的准确性

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、酶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。

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源可把误差分为两类,即系统误差和偶然误差。

一、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(0.0708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六位有效数字,也是无用的。这时可改用准确数为四位的天平即可。

二、误差

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。

1. 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;在配置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。

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、容量皿或其它仪器进行校正,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。

2. 偶然误差

与系统误差不同,误差的大小、正负是偶然发生的。这种误差时大时小,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,而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。

3. 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。这种误差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、在配置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。

此外,在实际工作中要根据实验目的,设计好切实可行的实验方案,并根据实际需要的准确度来选择测试手段(仪器及方法),如在做定性实验时,称量及配制试剂时可相对粗些,可选择台秤及量筒来称重、量取,而在做定量实验时,则必须使用分析天平及容量瓶来称量、定容,以确保实验数据真实可靠。

三、误差的表示方法和计算

实验误差为一统称,严格地说应包括误差和偏差。所谓误差是指测定值与真值之差;而偏差是指测定值与测定均值之差;但通常将这两者混用,统称为误差。

1. 平均误差

平均误差是指一组测定值中,测定值与测定均值的算术平均偏差。

$$dm = \frac{\sum |di|}{n}, di = (X - \bar{X}),$$

dm 为平均误差, X 为测定值, $\bar{X}$ 为均值, di 为离均差, n 为次数。其缺点是取绝对值,无法表示出各次测量间彼此的符合情况。

2. 标准误差(标准差)

标准误差是指一组测定值中,每一个测定值与测定平均值间的偏离程度(详见统计方法)。

3. 绝对误差

绝对误差是测定值与真值间的差数,表示准确度的一种方法。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{真值}(U)$$

绝对误差有正值与负值,正值说明结果偏高,负值说明结果偏低。测定值与测定均值间的差异为绝对误差。所谓真值是未知的,实际上需用多次精确测定的结果(平均值),代替真值来使用,但一定要在消除系统误差之后,所以

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{测定均值}(\bar{X})$$

生物化学实验

4. 相对误差

绝对误差表示误差绝对值的大小,在应用上受到一定的限制,无法比较测定中误差相互之间的大小。为了便于误差间的相互比较,常用相对误差。实践中常用的是

$$\text{相对误差} = \frac{\text{测定值} - \text{真值}}{\text{真值}} \times 100\%$$

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{测定值} - \text{测定均值}}{\text{测定均值}} \times 100\%$$

四、与质量控制有关的几个基本概念

1. 准确度

准确度是指测定值与真值之间相符合的程度,测定值愈接近真值,测定结果的误差愈小,准确性愈高,说明方法愈好。衡量准确度通常用回收实验,也即是在样品中加入一定量的已知浓度的标准液,测定回收量,计算回收率,以百分数表示。

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{加标准液后的测定值}}{\text{测定样品量} + \text{标准量}} \times 100\%$$

2. 精密度

精密度是指在相同条件下,用同一仪器,同一方法,对同一标本进行多次重复测定时,测定值与测定均值之间或各测定值间的符合程度。它是衡量在规定条件下实验方法测定结果的稳定性、重复性的一个指标,它只代表各测定值的分散和密集的程度。各测定值之间彼此愈接近,表示重复性愈好,测定值的偏差愈小,精密度愈高,方法愈稳定。

精密度与准确度有一定的关系,但两者不是统一的,精密度高不等于准确度高,反之亦然。准确度的高低是表示测定结果的好坏、系统误差的大小。而精密度的高低是说明方法稳定性、重复性的好坏。只有在消除了系统误差之后,使用精密度高的方法,才能做到既精密又准确,可称之为精确的方法。

3. 灵敏度

灵敏度的高低有几种表示方法:一种是指被测物质单位浓度变化所引起的指示物量的变化,如吸光度,相同的单位浓度,引起吸光度变化大的,称之为灵敏度高,反之称灵敏度低。灵敏度与取样体积、分析方法以及最后比色或检测需要量都有密切关系。要使方法的灵敏度保持稳定,必须结合灵敏度及准确度作全面考虑。特别是在微量分析中,空白值的大小及稳定性对灵敏度影响很大,不可忽视。

五、统计学的一些基本概念和计算公式

人们在工作、学习、日常生活中常常遇到各种各样的问题,也就需要解决各种问题,可以说,解题是人类最经常、最重要的活动之一。科学研究亦可说是解题的过程。例如提出某种生理现象与疾病的发生有何关系。为了解决这个大问题,必须提出一系列的小问题,进行观察和实验,然后对所得数据进行分析,从而得出问题的解等。整个过程可分以下几个步骤:提出问题、实验设计、实验、数据分析、得出结论。概括起来,前面的三项说的是取得数据,后两项是分析数据。为了解决科研提出的问题,往往需要做许多观察,得到大量的数据,这时即需要进行统计。

统计学有两个重要的职能:一个是压缩数据,另一个是由样本(指一组数据)推断总体。压缩数据,即是将千千万万的数据经处理,成为简单的数,如平均值、百分率等。但这还不够,这只反应一组数据(即一个样本)。一个样本不能作为对整体的推断,从样本到整体,从部分到全体,必须作归纳推理,所以要作统计学处理。

1. 标准差

一个样本的平均值只说明资料量数的水平,不能说明资料中个体的分散情况和程度。同一平均数的资料,可有不同的离散度。例如 12,13,14,15,16,17,18 的均数为 15;1,4,10,20,26,29 的均数也是 15,但后者的离散度较前者大得多,因此需要有方法来说明资料变异情况。标准差就是用来表示资料变异程度的方法之一。

小样本的标准差算法:公式如下

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}}{N - 1}}$$

S = 标准差

X = 量数或变异数

$\bar{X}$ = 平均数

N = 例数或观察的次数

$N - 1$ = 自由度

如样本很大,用此公式不太合适,需用另一个公式。一般大样本即用计算机计算,在此不多介绍。

2. 标准误

从一个整体中,抽出许多个样本,便会得到许多均数;这些均数的标准差,就称标准误。标准误是表示一批均数的分散情况,正如标准差表示每一个数量的分散情况一样。实验的标准误,可用来表示同样实验重复若干次,每次结果的离散程度。精密的实验,应该每次结果相差很少,如果相差很大,说明实验中存在问题。所以计算实验标准误,可以知道实验的精密度如何,亦可知道实验的重复性如何。如果求得的标准误小,则重复实验得到同样结果的可能性就大,也就是实验的精密度大,或重复性好。事实上我们不可能重复许多次实验,汇集许多均数,我们通常只有一个样本,所以就得从这个样本(即一次实验)的结果来估算标准误,如标准误很小,表示这次实验有一定的代表性,结果比较可靠,反之则否。

标准误($S_{\bar{X}}$)的计算公式如下:

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N(N - 1)}}$$

标准误除了可表示实验的精确度外,还可以用来计算两组实验之间相比有无显著差异(称显著性)。

3. 显著性的测定(t 值的计算)

显著性是说明这次实验是由于机遇,是由于必然规律,换句话说,这次结果是偶然的,

生物化学实验

还是有意义的。

如对一批测试者前后做两次观察,第一次和第二次实验是同一批测试者,观察两次实验是否有显著性差异,可用显著性来计算。例如:观察豚鼠注射肾上腺素,对支气管灌流液经过支气管流速的变化,以每分钟的滴数计算。实验结果如下:

豚鼠号	用药前	用药后	增加数 (X)	X ²
1	30	46	16	256
2	38	50	12	144
3	48	52	4	16
4	48	52	4	16
5	60	58	-2	4
6	46	64	18	324
7	26	56	30	900
8	58	54	-4	16
9	46	54	8	64
10	48	58	10	100
11	44	36	-8	64
12	46	54	8	64
			96	1968

求 t 值得公式为

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{X}}}$$

$\bar{X}$: 实验后增加均数

m : 实验前均数

$S_{\bar{X}}$: 标准误

按上表算出实验后增加的

$$\bar{X} = 96/12 = 8 \text{ 滴}$$

按公式求出标准差

$$S = \sqrt{\frac{1968 - (96)^2/12}{12 - 1}} = \sqrt{\frac{1968 - 768}{11}} = \sqrt{\frac{1200}{11}} = \sqrt{109.09} = \pm 10.44 \text{ 滴}$$

再求标准误:

第一章 生物化学实验的基本要求

$$S_{\bar{X}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \frac{10.44}{\sqrt{12}} = \frac{10.44}{3.46} = 3.02$$

求 t 值

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{X}}} = \frac{8 - 0}{3.02} = 2.649$$

自由度 = $12 - 1 = 11$

查 t 值表 $5\% = 2.201$

$1\% = 3.106$

所以 $0.01 < P < 0.05$ 有显著性

从此结果可以得出,加肾上腺素,流速有显著的增加。

以上计算可用于实验动物个体差异较大时,可以作自身对照的比较,这些实验设计,可以消除个体差异的因素,但不是所有的实验都可以作自身比较的,因此必须进行组与组间的比较。

组间比较计算公式如下:

计算二组的均值为 $\bar{X}_1$ 及 $\bar{X}_2$

计算二组离均数平方和 $\sum (X_1 - \bar{X}_1)^2$ 及 $\sum (X_2 - \bar{X}_2)^2$

求出综合估计标准差

$$S = \sqrt{\frac{(X_1 - \bar{X}_1)^2 + (X_2 - \bar{X}_2)^2}{(N_1 - 1) + (N_2 - 1)}}$$

估计差数标准误

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = S \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}$$

$N_1 = N_2$ 时

$$S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = S \sqrt{2/N} = \sqrt{2S^2/N}$$

计算 t 值:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

最后根据自由度 ($N_1 + N_2 - 2$) 及 t 值查表 1-1 得到 P 值。 P 值 < 0.05 即有显著性, < 0.01 , < 0.001 即非常显著。

表 1-1 相当于机率 5%、1% 及 0.1% 的 t 值 (t 值表)

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
1	12.706	63.657	636.619	31	2.040	2.745	
2	4.303	9.925	31.596	32	2.037	2.740	

生物化学实验

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
3	3.182	5.841	12.924	33	2.035	2.734	
4	2.776	4.604	8.610	34	2.032	2.729	
5	2.571	4.032	6.869	35	2.030	2.724	
6	2.447	3.707	5.959	36	2.028	2.720	
7	2.365	3.499	5.408	37	2.026	2.716	
8	2.306	3.355	5.041	38	2.025	2.712	
9	2.262	3.250	4.781	39	2.023	2.708	
10	2.228	3.169	4.587	40	2.021	2.704	3.551
11	2.201	3.106	4.437	41	2.020	2.701	
12	2.179	3.055	4.318	42	2.018	2.698	
13	2.160	3.012	4.221	43	2.017	2.696	
14	2.145	2.977	4.140	44	2.015	2.693	
15	2.131	2.947	4.073	45	2.014	2.690	
16	2.120	2.921	4.015	46	2.013	2.688	
17	2.110	2.898	3.965	47	2.012	2.685	
18	2.101	2.878	3.922	48	2.010	2.683	
19	2.093	2.861	3.883	49	2.009	2.680	
20	2.086	2.845	3.850	50	2.008	2.678	
21	2.080	2.831	3.819	51	2.007	2.676	
22	2.074	2.819	3.792	52	2.006	2.674	
23	2.069	2.807	3.767	53	2.006	2.673	
24	2.064	2.797	3.745	54	2.005	2.671	
25	2.060	2.787	3.725	55	2.004	2.669	
26	2.056	2.779	3.707	56	2.003	2.667	
27	2.052	2.771	3.690	57	2.003	2.665	
28	2.048	2.763	3.674	58	2.002	2.664	
29	2.045	2.756	3.659	59	2.004	2.662	
30	2.042	2.750	3.646	60	2.000	2.660	3.460