



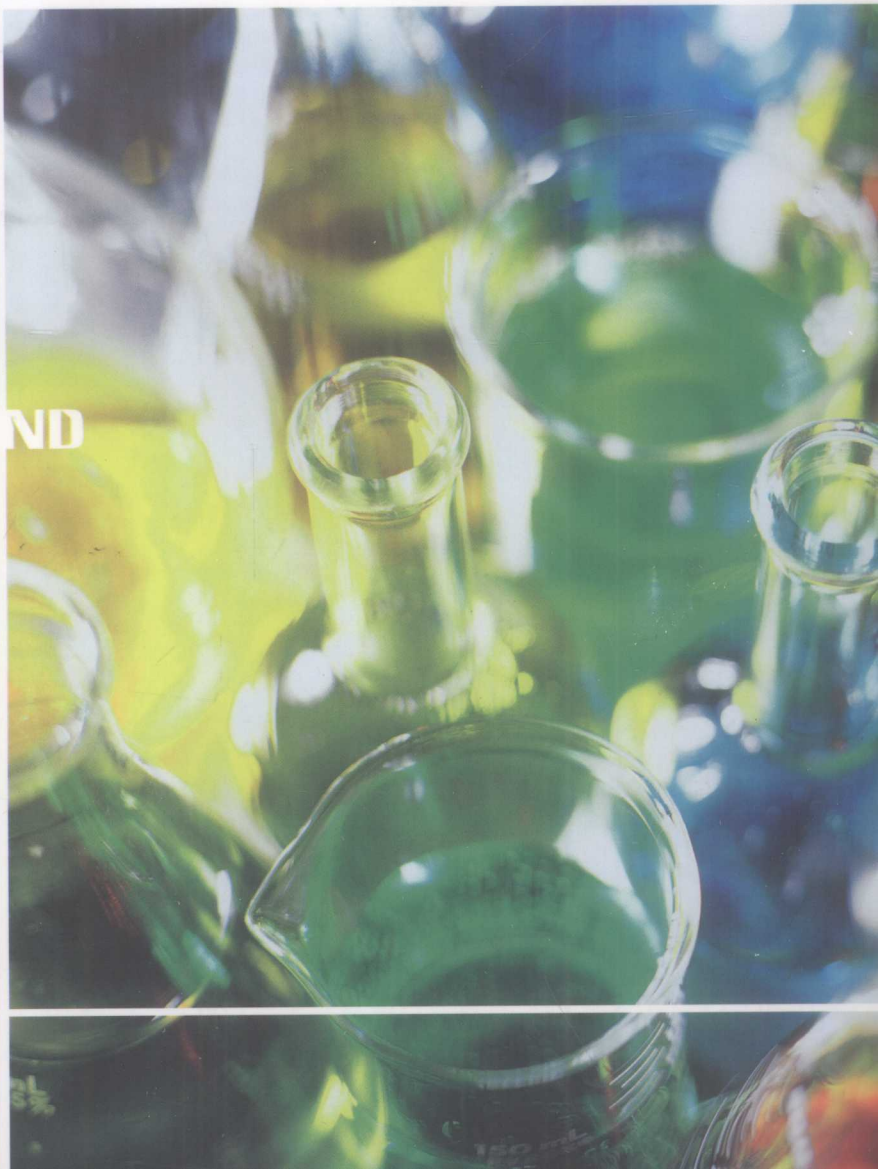
高等院校生命科学类“十二五”规划教材

汪晓峰 刘雪萍 编

生物化学实验技术



BIOCHEMISTRY
EXPERIMENTS AND
TECHNIQUES



中国林业出版社

Q5
269
高等院校生命科学类“十二五”规划教材

生物化学实验技术

汪晓峰 刘雪萍 编



GD 01582843

中国林业出版社

内 容 简 介

《生物化学实验技术》共收编 26 个实验,广泛选取了生化实验中较为成熟的糖类、脂类、氨基酸和蛋白质类、核酸类、酶类、维生素类等实验,包括层析法、分光光度法、电泳法、离心分离法等。因此,本书可以作为一本实用的生化实验手册使用。此外,在附录中列出了我们觉得必须提供的实验室常识和常用数据。

本书的实验方法严谨可靠,可操作性强,可适用于农、林、渔、牧、医等学科的本、专科生,还可作为生命科学研究生及研究人员的实验参考资料。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验技术/江晓峰,刘雪萍编. —北京:中国林业出版社,2011.7

高等院校生命科学类“十二五”规划教材

ISBN 978-7-5038-6246-5

I. ①生… II. ①江… ②刘… III. ①生物化学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 131760 号

中国林业出版社·教材出版中心

责任编辑:丰帆 高红岩

电话:83220109 83221489

传真:83220109

出版发行 中国林业出版社 (100009 北京市西城区德内大街刘海胡同 7 号)

E-mail: jiaocaipublic@163.com 电话: (010) 83224477

http: //lycb. forestry. gov. cn

经 销	新华书店
印 刷	北京市昌平百善印刷厂
版 次	2011 年 7 月第 1 版
印 次	2011 年 7 月第 1 次印刷
开 本	850mm × 1168mm 1/16
印 张	8.25
字 数	175 千字
定 价	15 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有 侵权必究

前言

生物化学是生物学科重要的基础理论课程之一，主要研究生物体的化学组成、生命过程中化学变化以及生物大分子信息传递等内容，是生物学与化学交叉学科。生物化学实验技术主要用于测定生物体内各种物质的化学本质和含量、分离和提纯这些物质，研究其特性以及它们在体内发生的种种变化。近年来，由于此技术的广泛应用而得以迅速发展。为了适应当今科学技术发展的新形式，更好地培养掌握现代技术的专业人才，紧密联系理论教学大纲的内容，在多年本科生物化学实验讲义的基础上，我们重新整理编写了《生物化学实验技术》教材。

本教材较为全面地介绍了基础生物化学实验的基本理论及其技术。全书共分生物化学实验室基本知识、实验和附录三部分，共选编了 26 个实验，既有锻炼学生基本技能训练的传统实验，又增加了综合性实验等内容。

本教材内容丰富，讲解深入浅出，具有很强的实用性，可供生物科学、生物技术及其他相关专业的本科生或研究生使用。

编 者

2010 年 9 月

前 言

第一部分 实验室基本知识

一、实验室规则	(1)
二、实验室基本操作	(2)
三、实验记录与实验报告	(3)
四、实验误差与数据处理	(5)
五、植物样品的采取、处理与保存	(10)
六、缓冲溶液	(12)

第二部分 实 验

第一章 糖	(16)
实验一 植物组织中糖含量的测定	(16)
实验二 还原糖含量的测定 (3, 5-二硝基水杨酸比色法)	(19)
实验三 糖的定量测定 (蒽酮法)	(21)
第二章 氨基酸和蛋白质	(23)
实验四 氨基酸的纸层析	(23)
实验五 脯氨酸含量的测定	(25)
实验六 蛋白质及氨基酸的呈色反应	(27)
实验七 蛋白质的沉淀反应	(29)
实验八 蛋白质的两性反应和等电点的测定	(32)
实验九 蛋白质含量的测定	(34)
I 双缩脲法测定蛋白质含量	(34)
II 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	(35)

III	紫外分光光度法测定蛋白质含量	(37)
IV	Folin - 酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质含量	(39)
实验十	细胞色素 C 的制备和测定	(41)
实验十一	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS - PAGE) 测定蛋白质 相对分子质量	(45)
实验十二	凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	(50)
第三章	酶和维生素	(56)
实验十三	酶的特异性	(56)
实验十四	温度、pH 值对淀粉酶活性的影响	(58)
I	温度对淀粉酶活性的影响	(58)
II	pH 值对淀粉酶活性的影响	(59)
实验十五	过氧化氢酶活性的测定	(61)
实验十六	过氧化物酶活性的测定	(63)
实验十七	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳测定过氧化物同工酶	(65)
实验十八	植物组织中硝酸还原酶活性的测定	(70)
实验十九	淀粉酶活性的测定	(72)
实验二十	酶浓度对酶促反应速度的影响——碱性磷酸酶活性的测定	(75)
实验二十一	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	(77)
实验二十二	溶菌酶的提取和系列性质测定	(79)
I	溶菌酶的提取	(79)
II	蛋白质浓度、酶活力测定	(81)
III	酶促动力学 (K_m 测定、脲的抑制)	(82)
IV	酶的最适 pH 值	(84)
V	酶的最适温度	(85)
VI	分子筛层析测酶相对分子质量	(86)
VII	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定酶相对分子质量及其纯度鉴定	(87)
实验二十三	维生素 C 含量的测定	(90)
第四章	核酸	(92)
实验二十四	DNA 的制备	(92)
I	DNA 的制备及其含量测定 (浓盐分离法)	(92)
II	植物组织中核酸的提取及定量测定	(94)

实验二十五 DNA 的含量测定	(97)
I 紫外吸收法测定 DNA 含量	(97)
II 定磷法测定 DNA 含量	(99)
III 二苯胺显色法测定 DNA 含量	(101)
实验二十六 离子交换柱层析分离核苷酸	(103)

第三部分 附 录

一、离心技术	(107)
二、分光光度计说明与原理	(111)
三、常用蛋白质相对分子质量 (M_r) 标准参照物	(115)
四、常用缓冲溶液的配制方法	(115)
五、实验室中常用酸碱的密度和浓度	(120)
六、硫酸铵饱和度的常用表	(121)

第一部分 实验室基本知识

一、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。否则，不能进行实验。
2. 实验时自觉遵守实验室纪律，保持室内安静，不大声说笑和喧哗。
3. 实验过程中要听从教师指导，认真按照实验步骤和操作规程进行实验。若想改进和设计新的实验方法，必须取得教师的同意。实验时认真进行实验记录，实验完毕及时整理数据，按时上交实验报告。
4. 实验台面、称量台、药品架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐，药品用完后立即盖好瓶盖并放回药品架，严禁瓶盖及药勺混杂，切勿使药品(尤其是 NaOH)洒落在天平和实验台面上，毛刷用后必须立即挂好，各种器皿不得丢弃在水池内。
5. 配制试剂和用无离子水要注意节省，按实验实际使用量配制，多余的重要试剂和各种有机试剂要按教师要求进行回收，昂贵的 Sephadex、Sephadex 凝胶和 DEAE 纤维素等，用后必须及时回收，不得丢弃。
6. 配制的试剂和实验过程中的样品，尤其是保存在冰箱和冷室中的样品，必须贴上标签、写上品名、浓度、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。
7. 配制和使用洗液必须极为小心，强酸强碱必须倒入废液缸或冲稀后排放。电泳后的凝胶和各种废物倒入废物桶，不得倒入水池。
8. 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。使用高速冷冻离心机和 HPLC 等大型仪器必须经过考核。仪器发生故障应立即报告教师，未经许可不得自己随意检修。
9. 实验室内严禁吸烟、饮水和进食，严禁用嘴吸移液管和虹吸管。易燃液体不得接近明火和电炉，凡产生烟雾、有害气体和不良气味的实验，均应在通风条件下进行。
10. 实验完毕必须及时洗净并放好各种玻璃仪器，插好自动部分收集器上的试管，保持实验台面和实验柜内的整洁。
11. 每组的仪器和玻璃器皿要用油漆编号，严禁抄拿其他组仪器，不得将器

皿遗弃在分光光度计内和其他实验台面上。打破了玻璃仪器要及时向教师报告,并自觉登记,学期结束时按规定进行处理。

12. 每位学生要熟悉实验室内电闸的位置,烘箱和电炉用毕必须立即断电,不得过夜使用,要严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。

13. 每日实验完毕,值日生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。

二、实验室基本操作

1. 玻璃仪器的清洗

实验中所用的玻璃仪器清洁与否,直接影响实验的结果,往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差,有时甚至会导致实验的失败。做生物化学实验对玻璃仪器清洁程度的要求,比一般化学实验的要求更高。这是因为:①生物化学实验中蛋白质、酶、核酸等往往都是以“毫克”和“微克”计算的,稍有杂质,影响就很大。②生物化学实验对许多常见的污染杂质十分敏感,如金属离子(钙、镁离子等)、去污剂和有机物残基等,因此,玻璃仪器(包括离心管等塑料器皿)彻底清洗干净是非常重要的。

(1) 初用玻璃仪器的清洗 新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用 0.5% 的去污剂洗刷,再用自来水洗净,然后浸泡在 1% ~ 2% 盐酸溶液中过夜(不可少于 4h),再用自来水冲洗,最后用无离子水冲洗 2 次,在 100 ~ 120℃ 烘箱内烘干备用。

(2) 使用过的玻璃仪器的清洗 使用过的玻璃仪器先用自来水洗刷至无污物,再用合适的毛刷沾去污剂(粉)洗刷,或浸泡在 0.5% 的清洗剂中超声清洗(比色皿决不可超声),然后用自来水彻底洗净去污剂,用无离子水洗 2 次,烘干备用(计量仪器不可烘干)。清洗后器皿内外不可挂有水珠,否则重洗,若重洗后仍挂有水珠,则需用洗液浸泡数小时后(或用去污粉擦洗),重新清洗。

(3) 石英和玻璃比色皿的清洗 石英和玻璃比色皿决不可用强碱清洗,因为强碱会侵蚀抛光的比色皿。只能用洗液或 1% ~ 2% 的去污剂浸泡,然后用自来水冲洗,这时若用一支绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗,效果会更好,清洗干净的比色皿也应内外壁不挂水珠。

2. 塑料器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿,在生物化学实验中已用的越来越多。第一次使用塑料器皿时,可先用 8mol/L 尿素(用浓盐酸调 pH = 1)清洗,接着依次用无离子水、1 mol/L KOH 和无离子水清洗,然后用 0.001 mol/L EDTA 除去金属离子的污染,最后用无离子水彻底清洗。以后每次使用时,可只用 0.5% 的去污剂清洗,然后用自来水和无离子水洗净即可。

3. 洗液的配制

因已确定铬有致癌作用,因此,配制和使用洗液时要极为小心。常用的配制

方法有以下 2 种:

(1) 取 100mL 工业浓硫酸置于烧杯内, 小心加热, 然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉末, 边加边搅拌, 待全部溶解并缓慢冷却后, 贮存在磨口玻璃塞的细口瓶内。

(2) 称取 5g 重铬酸钾粉末, 置于 250mL 烧杯中, 加 5mL 水使其溶解, 然后慢慢加入 100mL 浓硫酸, 溶液温度将达 80°C , 待其冷却后贮存于磨口玻璃瓶内。

4. 其他洗涤液

(1) 工业浓盐酸 可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

(2) 5% 草酸溶液 用数滴硫酸酸化, 可洗去高锰酸钾的痕迹。

(3) 5% ~ 10% 磷酸三钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)溶液 可洗涤油污物。

(4) 30% 硝酸溶液 洗涤二氧化碳测定仪及微量滴管。

(5) 5% ~ 10% 乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA} - \text{Na}_2$)溶液 加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

(6) 尿素洗涤液 为蛋白质的良好溶剂, 适用于洗涤盛过蛋白质制剂及血样的容器。

(7) 有机溶剂 如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性染料污痕等, 二甲苯可洗脱油漆的污垢。

(8) 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液 这是两种强碱性的洗涤液, 对玻璃仪器的侵蚀性很强, 可清除容器内壁污垢。洗涤时间不宜过长, 使用时应小心慎重。

5. 玻璃和塑料器皿的干燥

生化实验中用到的玻璃和塑料器皿经常需要干燥, 通常都是用烘箱或烘干机在 $110 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 进行干燥, 而不要用丙酮荡漂洗再吹干的方法来干燥, 因为那样会有残留的有机物覆盖在器皿的内表面, 从而干扰生物化学反应。硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸, 所以决不能放在烘箱中干燥, 只能用冷风吹干。

三、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极为重要的, 记录如果有误, 会使整个实验失败, 这也是培养学生实验能力和严谨的科学作风的一个重要方面。因此, 提出以下要求:

(1) 每位同学必须准备一个实验记录本。实验前认真预习实验, 看懂实验原理和操作方法, 在记录本上写好实验预习报告, 包括详细的实验操作步骤(可以用流程图表示)和数据记录表格等。

(2) 记录本上要编好页数, 不得撕缺和涂改, 写错时可以划去重写。不得用铅笔记录, 只能用钢笔和圆珠笔。记录本的左页作为计算和草稿用, 右页用于预习报告和实验记录。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, 切不可潦草以至日后无法辨认。实验记录必须公正客观, 不可夹杂主观因素。

(4) 实验中要记录的各种数据, 都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格, 以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录, 造成不可挽回的损失。

(5) 实验记录要注意有效数字, 如吸光光度值应为“0.050”, 而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测两次以上, 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。

(6) 实验中要详细记录实验条件, 如使用的仪器型号、编号、生产厂等; 生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等; 试剂的规格、化学式、分子量、试剂的浓度等, 都应记录清楚。两人一组的实验, 必须每人都作记录。

2. 实验报告

实验报告是实验的总结和汇报, 通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和问题, 学会处理各种实验数据的方法, 加深对有关生物化学与分子生物学原理及实验技术的理解与掌握, 同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式和内容包括:

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; ⑥结果讨论。

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。写实验报告要用实验报告专用纸, 以便教师批阅, 不要用练习本和其他片页纸。

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。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、淡黄色或是其他颜色? 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? 热时生成还是冷却时生成? 在科学研究中, 仔细观察, 特别注意那些未曾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, 对学生将是非常重要的科学研究训练。

实验报告使用的语言要简明清楚, 抓住关键, 各种实验数据都要尽可能整理成表格并作图表示之, 以便比较, 一目了然。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, 要注明合适的单位, 坐标轴的分度数字要与有效数字相符, 并尽可能简明, 若数字太大, 可以化简, 并在坐标轴的单位上乘以 10 的方次。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“.”。有时也可用两端有小横线的垂直线段来表示实验点, 其线段的长度与实验误差相符。通常横轴是自变量, 往往知道的很准确; 纵轴是因变量, 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

布在曲线上和曲线两边，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。

实验结果的讨论要充分，尽可能多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，并欢迎对实验提出改进意见。

四、实验误差与数据处理

生化分析是对组成生物机体的几类主要化学物质，如糖、脂肪、蛋白质、核酸、维生素、酶等进行的分析和测定。定性分析只能确定存在哪些物质，粗略知道这些物质所占的比例。要精确地知道这些物质的含量必须进行定量分析。

1. 误差

在进行定量分析实验测定的过程中，很难使测量出来的数值与客观存在的真实值完全相同。真实值与测量值之间的差别叫做误差。通常用准确度和精密度来评价测量误差的大小。

准确度是实验分析结果与真实值相接近的程度，通常用误差的大小来表示。误差愈小，准确度愈高。误差又分为绝对误差和相对误差。其表示式分别如下：

$$\Delta N = N - N'$$

$$\text{相对误差} = \frac{\Delta N}{N'} \times 100\%$$

式中： ΔN ——绝对误差；

N ——测定值；

N' ——真实值。

例如，用分析天平称得 2 种蛋白质物质的质量各为 2.1750g 和 0.2175g。假定两者的真实值各为 2.1751g 和 0.2176g，则称量的绝对误差应分别为：

$$2.1750 - 2.1751 = -0.0001(\text{g})$$

$$0.2175 - 0.2176 = -0.0001(\text{g})$$

它们的相对误差应分别为：

$$\frac{0.0001}{2.1751} \times 100\% = 0.005\%$$

$$\frac{0.0001}{0.2176} \times 100\% = 0.05\%$$

由此可见，2 种蛋白质称量的绝对误差虽然相等，但当用相对误差表示时，就可看出第一份称量的准确度比第二份的准确度大 10 倍。显然，当被称量物体的质量较大时，称量的准确度就较高。

所以，应该用相对误差来表示分析结果的准确度。但因真实值并不知道，因此，在实际工作中无法求出分析的准确度，只得用精密度评价分析的结果。

精密度是指在相同条件下，进行多次测定后所得数据的程度。精密度一般用

偏差来表示。偏差也分绝对偏差和相对偏差：

绝对偏差 = 个别测定值 - 算术平均值(不计正负号)

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

和误差的表示方法一样，用相对偏差来表示实验的精密度，比用绝对偏差更有意义。

在实验中，通常对某一样品进行多次平行测定，求得其算术平均值，作为该样品的分析结果。该结果的精密度常用平均绝对偏差和平均相对偏差来表示。平均绝对偏差是个别测定值的绝对偏差的算术平均值。

例如，分析某一蛋白质制剂含氮量的百分数，共测 5 次，其结果分别为 16.1%，15.8%，16.3%，16.2%，15.6%。用来表示精密度的偏差可计算如下：

分析结果	算术平均值	个别测定值的绝对偏差(不计正负)
16.1%	16.0%	0.1%
15.8%		0.2%
16.3%		0.3%
16.2%		0.2%
15.6%		0.4%

$$\text{平均绝对误差} = 0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\% / 5 = 0.2\%$$

$$\text{平均相对误差} = \frac{0.2}{16.0} \times 100\% = 1.25\%$$

在分析实验中，有时只做 2 次平行测定，这时就应用下式表达结果的精密度：

$$\frac{\text{2 次分析结果的差值}}{\text{平均值}} \times 100\%$$

应该指出，误差和偏差具有不同的含义，误差以真实值为标准，而偏差以平均值为标准。由于物质的真实值一般是无法知道的，我们平时所说的真实值其实只是采用各种方法进行多次平行分析所得到相对正确的平均值。用这一平均值代替真实值来计算误差，得到的结果仍然只是偏差。例如，上述蛋白质制剂含氮量的测定结果可用数字 16.0% ± 0.2% 表示。

还应指出，用精密度来评价分析的结果是有一定的局限性的。分析结果的精密度很高(即平均相对偏差很小)，并不一定说明实验的准确度也很高。因为如果分析过程中存在有系统误差，可能并不影响每次测得数值之间的重合程度，即不影响精密度，但此分析结果却必然隔离真实值，也就是分析的准确度并不一定很高。当然，如果精密度也不高，则无准确度可言。

2. 产生误差的原因和校正

(1) 产生误差的原因 产生误差的原因很多，一般根据误差的性质和来源，将误差分为系统误差和偶然误差两类。系统误差与分析结果的准确度有关，它是由分析过程中某些经常发生的原因所造成的。它对分析结果的影响比较稳定。在重复测定时，常常重复出现。这种误差的大小与正负往往可以估计出来，因而可

以设法减少或校正。系统误差的来源主要有：

① 方法误差：由于分析方法本身所造成的，如重量分析中沉淀物少量溶解或吸附杂质，容量分析中等当点和滴定终点不完全符合等。

② 仪器误差：因仪器本身不够精密所造成的，如天平、砝码、量器并不够准确。

③ 试剂误差：来源于试剂或蒸馏水的不纯。

④ 操作误差：由于每个人掌握操作规程与控制条件常有出入而造成，如不同的操作者对滴定终点颜色变化的判断会有差别等。

(2) 误差的校正 为了减少系统误差常采取下列措施：

① 空白试验：为了消除由试剂等因素引起的分析误差，可在测定时不加样品的情况下，按照与样品测定完全相同的操作顺序，在完全相同的条件下进行分析，所得的结果为空白值。将样品分析的结果扣除空白值，可以得到比较准确的结果。

② 回收率测定：作这种测定时，取一标准物质(其中的组分含量是已经精确知道的)与待测的未知样品同时做平行测定。测得的量与所取的量之比的百分率称为回收率。

这种由标准样品测得的回收率可以用来检验、表达某些分析的系统误差，因为系统误差愈大，回收率愈低。还可以通过下式对样品测量值进行校正，如：

被测样品的实际含量 = 样品的分析结果(含量) / 回收率

③ 仪器校正：对测量仪器(如砝码、容量仪器等)进行校正，以减少误差。工作中，应当合理安排实验系统，以使系统误差在测定中不起主要作用。偶然误差与分析结果的精密度有关，它来源于难以预料的因素，或是由于取样不均匀，或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素的影响。在生物测定法中，由于影响生物的因素是多方面的，往往造成较大的误差。例如，用微生物法测定维生素含量时，由于培养基的条件和菌种的差异，每次测定的结果相差都比较大，维生素对分析结果的影响也不固定。似乎没有规律性，但如果进行多次测定，便可发现有如下两条规律：一是正误差和负误差出现的几率相等，二是小误差出现的次数多，大误差出现的次数少。

为了减少偶然误差，一般采取的措施是：

① 平均取样：动、植物新鲜组织可制成匀浆后取样；细菌通常制成悬液，经玻璃珠打散摇匀后，再量取一定体积的菌体样品进行分析；固体样品极不均匀，应于取样前先进行粉碎、混匀。

② 多次取样：根据偶然误差出现的规律，如果进行多次平行测定，然后取其算术平均值，就可减少偶然误差。平行测定的次数愈多，其平均偶然误差就愈小。

除了以上两类误差之外，还有因操作事故引起的“过失误差”，如读错刻度、溶液溅出、加错试剂等。这时可能出现一个很大的“误差值”，在计算平均值时，此种数值应弃去不用。

实际工作中,应根据需要的准备程度选择测量手段(仪器及方法)。例如,分样品时,要求准确到 0.1g,只需使用台秤,不必使用分析天平;如果需要较高的准确度,又无适宜的仪器设备,则可用提高样品用量的方法来达到。

3. 有效数字

在生物化学定量分析中除了要选择准确度和精密度符合要求的实验方法、测定数值力求准确、计算无误之外,还应在记录数据和进行计算时注意有效数字的取舍。

有效数字应是实际可能测量到的数字,应该选取几位有效数字,取决于实验方法与可用仪器的精确程度。

例如,用分析天平称得某物质量为 1.1415g,是 5 位有效数字;而用台秤称得该物质量为 1.14g,则只有 3 位有效数字。

又如,读取某滴定管液面刻度为 16.25mL,是 4 位有效数字。上面各数字的最后一位数字是不可靠的,称为可疑数,也叫估计值,其他的数字均是准确的。因此,所谓有效数字,即在一个数值中,除最后一位是可疑数外,其他各数都是确定的。

数字 1, 2, 3, …, 9 都可作为有效数字,只有“0”特殊,它在数字中间或数字后面时,一般地说是有效数字,但在数字前面时,它只是定位数字,用来表明小数点的位置,而不是有效数字。例如:

1.26011	6 位有效数字
12.001	5 位有效数字
21.00	4 位有效数字
0.0212	3 位有效数字
0.0010	2 位有效数字
200	有效数字不明确

在 200 中,后面的 0 可能是有效数字,也可能是定位数字。为避免混乱,一般写成标准式:如 $65\ 000 \pm 1\ 000$ 可写成 $(6.5 \pm 0.1) \times 10^4$ 或 $(6.50 \pm 0.10) \times 10^4$ 或 $(6.500 \pm 0.100) \times 10^4$,它们的有效数字依次为 2、3、4 位。在加减乘除等的运算过程中,要特别注意有效数字的取舍。

(1) 加减法 将 38.2060g, 1.32g, 161.2g 三数相加,则它们的和为(可以在数下划一横线以示区别):

$$38.206\bar{0} + 1.3\bar{2} + 161.2 = 200.7260$$

因 200.7260(g) 后面 4 位均是可疑数,但只要保留一位:200.7(g)。因此,相加或相减时,有效数字的保留应以小数点后位数最少的数字为准,上式可简化为:

$$38.2 + 1.3 + 161.2 = 200.7$$

(2) 乘除法 几个数值相乘或相除时,其乘积或商的相对误差接近于所有数值中相对误差最大的。因此,其积或商所保留有效数字位数与各运算数字中有效数字位数最少的相同。例如:

$$0.153 \times 3.1 / 0.112 = 4.2$$

也可简化成:

$$0.15 \times 3.1 / 0.11 = 4.2$$

只保留 2 位有效数字: 4.3, 4.3 的相对误差和 3 个运算数字中 3.1 的相对误差最为接近。因为 0.1545、3.1 和 0.112 这 3 个数的相对误差各为:

$$\frac{\pm 0.0001}{0.1545} \times 100\% = \pm 0.06\%$$

$$\frac{\pm 0.1}{3.1} \times 100\% = \pm 3\%$$

$$\frac{\pm 0.001}{0.112} \times 100\% = \pm 0.9\%$$

4.3 的相对误差为:

$$\frac{\pm 0.1}{4.3} \times 100\% = \pm 2\%$$

还应指出, 有效数字最后一位数为“可疑数”, 若一个数值没有可疑数, 便可视作无限。例如, 将 7.12g 样品二等分, 每份重是:

$$\frac{7.12}{2} \times 100\% = 3.56(\text{g})$$

式中除数 2 不是测量所得, 不是可疑数, 可把它视为无限多位有效数字, 如 π 、e 等常数有效数字的位数也可以认为是无限的。

4. 数据处理

对实验中所得的一系列数据, 采取适当的处理方法进行整理、分析, 才能准确反映出被研究对象的数量关系。在生物化学实验中通常采用列表法或作图法表示实验结果, 可使结果表达得清楚、明了, 而且还可以减少和弥补某些测定的误差。根据对标准样品的一系列测定, 也可以列出表格或绘制标准曲线, 可由测定数据直接查出结果。

(1) 列表法 将实验所得各数值用适当的表格列出, 并表示出它们之间的关系。通常数据的名称和单位写在标题栏中, 表内只填写数字。数据应正确反映测定有效数字, 必要时应计算出误差值。例如, 测定某发酵液中菌体生长繁殖与糖、氮、磷含量的关系, 结果列于表 1-1。

表 1-1 菌体的生长与糖、氮、磷含量的关系

培养时间 (h)	菌体变化	总糖 (%)	氨基酸 (mg/mL)	可溶性磷 (mg/mL)	pH 值	培养结果 (孢子数/mL)	备 注
接种前		5.60	2.77	0.276	—		用 4t 发酵 缸培养, 每 4h 取 样 一次
4	孢子萌发	3.60	2.02	0.102	6.00	0.725	
12	菌丝大量生长	3.08	1.85	0.020	5.60	2.10	
20	孢子成熟	0.880	0.868	0	4.92	5.35	
24	菌体开始自溶	—	—	—	—	7.55	

(2) 作图法 实验所得到的一系列数据之间关系及其变化情况, 可以用图线直观地表现出来。作图时通常先在坐标纸上确定坐标轴, 标明轴的名称和单位, 然后将各数值点用“+”字或“×”字标注在图纸上, 再用直线或曲线把各点连接起来。图形必须是平滑的, 可以不通过所有的点, 而要求线两旁偏离的点分布较均匀。在画线时, 个别偏离过大的点应当舍去, 或重复实验校正之。采用作图法时至少要有 5 个以上的点, 否则没有意义。

五、植物样品的采取、处理与保存

生物化学分析的准确性, 除取决于分析方法的选择是否合适以及全部分析工作是否严格按照要求进行外, 在很大程度上还取决于样品的采取是否有最大的代表性。如果不遵循科学方法采样, 样品缺乏代表性, 即使分析工作严谨无误, 也得不到正确的结论。因此, 必须对样品的采取、处理和保存给予足够的重视。从大田或实验田采回的样品, 一般数量较大, 称为“原始样品”。再按原始样品的种类(如根、茎、叶、花、果实等)分别选出“分析样品”。再根据分析任务的要求和样品的特征, 从平均样品中选出供分析所用的“分析样品”。由此可见, 分析样品的获得需经一系列复杂而仔细的步骤, 在实际工作中一定要以高度认真负责的态度对待。

(一) 原始样品和平均样品的采取、处理与保存

原始样品和平均样品的采取, 按分析目的可有两种方法: 一种是为了鉴定品质而进行的混合取样; 另一种是植物生育期取样。

1. 混合取样法

一般种子样品可用混合取样法。把代表一定面积的收获物先经脱粒, 然后在木板或牛皮纸上铺成均匀的一层, 再按对角线把样品分成 4 个三角形, 取 2 个相对的三角形的样品, 而将另外 2 个三角形的样品淘汰。如此操作, 一直淘汰到所要求的数量为止。这个取样法叫做“四分法”, 这样取得的平均样品在实验室经适当处理即可制成分析样品。

豆类及油料种子选取平均样品的方法与谷类种子取样法相同。注意: 样品中不要有未成熟的种子或混杂物, 不要将簸出去的种子加到平均样品中。

如果直接从田里采取植株样品, 在生长均一的情况下, 可按对角线或沿平行的直线等距离采样。如果植株长势不均匀, 则应根据生长的强弱, 按比例采取大约 5 个点的样品后混合。每个样点随植株数随植物的种类和采样的时间有所不同。如小麦等密植型作物或其他作物幼苗, 可按面积采取或采取样品束(一束样品的植株数视需要而定), 像玉米、甘蔗等作物, 每个样点采取一株就够了。

选取块根、块茎的平均样品时, 必须注意到大、中、小三类样品的比例。然后纵切取其一部分($1/2 \sim 1/4$)组成平均样品, 否则就失去其应有的代表性。一般蔬菜样品也按对角线法采取。番茄样品应选择簇位相同、成熟度一致的果实,