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教程

主　编　何凤田　连继勤

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教程

主　编　何凤田　连继勤

编　委　（按姓氏笔画排序）

甘立霞　申晓冬　付晓红　闫小晶

江　渝　苏　畅　李　彦　杨朝辉

连继勤　何凤田　张　立　张　艳

陈岑曦　陈　姗　陈　彬　周　鹏

赵　力　娄桂予　高　敏　黄　刚

龚　薇　彭家和　曾益军　樊继山

戴双双

科学出版社

北　京

·版权所有　侵权必究·
举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本教材是为了适应医学教育改革、培养高素质创新型医学人才的需要而编写的一本生物化学与分子生物学实验教材。本书分为三部分:第一部分介绍了生物化学与分子生物学实验基本知识与理论,包括生物化学与分子生物学实验基本知识、生物化学实验基本技术理论、分子生物学实验基本技术理论、生物化学与分子生物学专业常用数据库及其应用;第二部分为生物化学与分子生物学实验操作,共精选了30个生物化学与分子生物学具体实验;第三部分为附录,列出了常用生物化学与分子生物学试剂的配制方法。

本教材既可作为医学院校各专业学生(包括研究生)的教学用书,也可作为相关专业教师和科技工作者的科研参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程 / 何凤田,连继勤主编. —北京:科学出版社,2012.1

ISBN 978-7-03-033314-8

Ⅰ.生… Ⅱ.①何… ②连… Ⅲ.①生物化学-实验-高等学校-教材 ②分子生物学-实验-高等学校-教材 Ⅳ.①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 004745 号

责任编辑:秦致中 / 责任校对:纪振红
责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

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
铭浩彩色印装有限公司印刷
科学出版社发行　各地新华书店经销
*
2012年1月第 一 版　开本:787×1092 1/16
2012年1月第一次印刷　印张:15
字数:345 000

定价:34.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前　言

“加强实验教学，注重培养学生的实践能力和创新精神”是医学教育改革的一个重要趋势。生物化学与分子生物学实验技术是生物医学诸多学科的重要研究手段，已成为高等医学院校各专业学生必修的一门重要实验课程。该实验课程的目标旨在拓宽学生视野，激发学生的学习热情和猎奇心，将学生培养成高素质的创新型人才。正是为了适应医学教育改革和发展的趋势，实现生物化学与分子生物学实验课程的目标，我们编写了本实验教程。

本书内容分为三大部分。第一部分为生物化学与分子生物学实验基本知识与理论，包括生物化学与分子生物学实验基本知识、生物化学实验基本技术理论、分子生物学实验基本技术理论、生物化学与分子生物学专业常用数据库及其应用；第二部分为生物化学与分子生物学实验操作，共精选了30个生物化学与分子生物学具体实验；第三部分为附录部分，汇集了常用生物化学与分子生物学试剂的配制方法。

本书各部分内容的编写均由多年从事生物化学与分子生物学教学及科研的老师执笔，是大家相互学习、精诚合作的结果。在内容的选取上，既考虑了经典的生物化学与分子生物学实验技术，又引入了部分目前科学研究中经常使用的实验技术，如基因表达调控研究中常用的启动子活性分析实验、EMSA和ChIP实验，检测基因表达水平常用的实时定量PCR技术，研究基因功能常用的RNAi技术，检测蛋白表达模式常用的双向凝胶电泳，检测蛋白质相互作用常用的酵母双杂交技术等。

本书既可作为医学院校各专业学生（包括研究生）的教学用书，也可作为相关专业教师和科技工作者的科研参考书。

由于编者水平有限，书中如有疏漏和不足之处，殷切希望广大师生给予批评指正，我们将不胜感激。

何凤田　连继勤

2011年11月于重庆

目　　录

第一篇　生物化学与分子生物学实验基本知识与理论

第一部分　生物化学与分子生物学实验基本知识 …… (1)
一、实验室基本规则 …… (1)
二、实验室基本操作 …… (2)
三、实验样品的制备 …… (6)
四、实验误差与数据处理 …… (8)
五、实验记录与实验报告 …… (12)
第二部分　生物化学实验基本技术理论 …… (14)
一、分光光度技术 …… (14)
二、层析技术 …… (20)
三、电泳技术 …… (37)
四、离心技术 …… (43)
第三部分　分子生物学实验基本技术理论 …… (48)
一、重组 DNA 技术 …… (48)
二、核酸分子杂交技术 …… (52)
三、聚合酶链反应技术 …… (59)
四、蛋白质印迹技术 …… (65)
第四部分　生物化学与分子生物学专业常用数据库及其应用 …… (67)
一、常用数据库 …… (67)
二、常用分析工具 …… (74)
三、真核基因启动子区生物信息学分析 …… (85)
四、MicroRNA 靶标的预测 …… (90)

第二篇　生物化学与分子生物学实验操作

第五部分　生物化学实验操作 …… (95)
实验一　蛋白质的性质 …… (95)
实验二　蛋白质含量测定 …… (101)
实验三　醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白 …… (111)
实验四　SDS-PAGE 蛋白电泳 …… (113)
实验五　蛋白质双向电泳 …… (116)
实验六　氨基酸与蛋白质层析 …… (119)
实验七　肽或蛋白质 N-端氨基酸残基序列测定 …… (126)
实验八　核酸的分离提取、鉴定及含量测定 …… (134)
实验九　双脱氧链末端合成终止法测定 DNA 序列 …… (137)

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

实验十 酶反应条件的选择 …… (143)
实验十一 酶活性测定 …… (148)
实验十二 酶反应速度与米氏常数测定 …… (149)
实验十三 血糖(葡萄糖)测定 …… (153)
实验十四 脂类测定 …… (154)
实验十五 代谢产物测定 …… (162)
第六部分 分子生物学实验操作 …… (166)
实验十六 质粒 DNA 的提取、酶切及电泳 …… (166)
实验十七 DNA 片段的回收、连接与转化 …… (169)
实验十八 重组子的转化与筛选 …… (172)
实验十九 重组 DNA 在原核细胞中的表达 …… (175)
实验二十 常规 PCR 及 RT-PCR …… (177)
实验二十一 实时定量 PCR(real-time PCR) …… (181)
实验二十二 DNA 的分子杂交——Southern 印迹 …… (183)
实验二十三 RNA 的分子杂交——Northern 印迹 …… (187)
实验二十四 蛋白质的免疫印迹——Western 印迹 …… (190)
实验二十五 cDNA 文库的构建 …… (191)
实验二十六 荧光素酶报告基因检测启动子活性 …… (197)
实验二十七 电泳迁移阻滞实验 …… (199)
实验二十八 染色质免疫沉淀实验 …… (205)
实验二十九 酵母双杂交实验 …… (210)
实验三十 RNA 干扰实验 …… (214)
附录 …… (220)
附录 1 化学试剂分级与注意事项 …… (220)
附录 2 常用缓冲液的配制 …… (221)
附录 3 硫酸铵饱和度计算表 …… (228)
附录 4 常用培养基及抗生素的配制 …… (230)
附录 5 离心机转速(r/min)与相对离心力(RCF)的换算 …… (233)

第一篇　生物化学与分子生物学实验基本知识与理论

第一部分　生物化学与分子生物学实验基本知识

一、实验室基本规则

为了保证生物化学与分子生物学实验的顺利进行，培养同学们掌握良好、规范的生物化学与分子生物学基本实验技能，特制定以下实验细则，请同学们严格遵守。

(1) 课前认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，了解每一操作的意义，了解所用仪器的使用方法，做好实验设计。

(2) 严格按照生物化学与分子生物学实验分组，分批进入实验室，不得迟到。学生提前10分钟到岗，任课教师提前15分钟到岗。

(3) 学生须穿工作服，按规定分组进入实验室，保持安静，不得大声喧哗和嬉戏，不得随意走动，关闭手机或置于振动状态。绝对禁止用实验仪器或试剂开玩笑。

(4) 应保持实验台的整洁，仪器、试剂摆放整齐，用过的滤纸放入垃圾桶中，废液倒入废液缸中，禁止直接倒入水槽中或随地乱丢。

(5) 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。使用贵重精密仪器前应了解使用方法，使用时要严格遵守操作规程，发现故障立即报告教师，不得擅自移动或动手检修实验仪器。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，应如实向教师报告，并填写仪器损坏登记表，然后补领。

(6) 注意节约试剂，公用试剂用完后，应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台和地上。

(7) 在实验过程中，听从老师指导，严格按操作规程进行，完成实验后按要求及时书写实验报告，并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上，实验报告要真实，文字要简练、准确。若实验失败，应及时分析原因。

(8) 实验教学区内严禁吸烟，禁用明火；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。

(9) 注意节约用水用电，离开实验室前要关好水源、电源，关好门窗，严防事故发生。

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

(11) 做完实验要清洗仪器、器皿，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。

（曾益军）

二、实验室基本操作

(一) 器皿仪器的清洗

1. 玻璃器皿的清洗 在生物化学与分子生物学实验中，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。生物化学与分子生物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生物化学与分子生物学实验中蛋白质、酶、核酸等往往都是以“毫克”和“微克”计，稍有杂质，影响就很大。②生物化学与分子生物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）、去污剂等，因此玻璃仪器（包括离心管等塑料器皿）洁净与否，是获得准确结果的重要前提。洁净的玻璃仪器内壁应十分明亮光洁，无水珠附着在玻璃上。

(1) 初用玻璃仪器的清洗：新购买的玻璃仪器表面常附着有碱性物质，同时常有许多灰尘涸在上面，使用前必须彻底清洗。先用洗涤灵稀释液、肥皂水或去污粉等洗刷，用自来水洗净，然后浸泡在 1% ～ 2%盐酸溶液中过夜（不少于 4 h），以中和其碱性物质，再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 3 次，80℃烘箱烤干备用。

(2) 使用过的玻璃仪器的清洗

1) 一般玻璃仪器，如试管、烧杯、锥形瓶等，先用自来水洗刷去净污物，再用大小合适的毛刷蘸取洗衣粉、合成洗涤剂或去污粉仔细刷洗器皿内外壁，自来水多次反复冲洗至容器内壁不挂水珠，最后用少量蒸馏水洗 2～3 次，倒置在器皿架上晾干或置于烘箱烤干备用。

2) 容量分析仪器，如吸量管、容量瓶、滴定管等，不能用毛刷刷洗。用后应及时用自来水多次冲洗，细心检查洁净程度，根据挂不挂水珠采取不同处理方法：①如不挂水珠，用蒸馏水冲洗 3 次，风干备用；②若冲洗后的器皿仍挂水珠，则将其晾干后，用重铬酸钾洗液浸泡 4～6 小时，再用自来水冲洗，最后用蒸馏水洗 3 次控干。

3) 石英和玻璃比色皿的清洗：决不可用强碱清洗，因为强碱会侵蚀抛光的比色皿，需用洗液或 1%～2%的去污剂浸泡后用水冲洗，然后使用绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗，效果会更好。洁净的比色皿应内外壁均不挂水珠。

2. 塑料器皿的清洗 聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿已在生物化学与分子生物学实验中广泛使用。初次使用塑料器皿时，可先用 8 mol/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 10^{-3} 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. 黏附有血浆的刻度吸量管常用的三种洗涤方法

(1) 先用 45%尿素溶液浸泡，使血浆蛋白溶解，然后用自来水冲洗。

(2) 用 1%氨水浸泡，使血浆溶解，然后再依次用 1%稀盐酸溶液、自来水冲洗。

(3) 以上二法如达不到清洁要求，可浸泡于重铬酸钾洗液 4～6 小时，再用大量自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2～3 次。

4. 其他　盛过传染性样品的容器，应进行高压或其他方法消毒。盛过有毒药品、放射性同位素试剂的容器，必须经过专门处理，确知没有残余物存在方可进行清洗。凡用过的玻璃仪器，均应立即洗涤，久置干涸后洗涤十分困难。如不能及时洗涤，先用流水初步冲洗后浸泡在清水中，待实验后按常规处理。

5. 洗涤液的种类和配制方法

(1) 重铬酸钾洗液(以下简称洗液)的配制及注意事项

1) 洗液的配制：铬酸洗液可配制成三种不同的强度，其成分用量见表 1-2-1。

表 1-2-1　铬酸洗液的配制

	弱液	次强液	强液
重铬酸钾(g)	100	120	63
浓硫酸(ml)	100	200	1000
蒸馏水(ml)	1000	1000	200

配制洗液时先将重铬酸钾溶于蒸馏水中，必要时可加热帮助溶解，待冷却后再将浓硫酸缓慢加入，边加边搅拌。注意此时可产生高热。为防止容器破裂，应选用耐酸搪瓷缸或耐高温的玻璃器皿，切忌用量筒及试剂瓶等配制。为防止洗液吸收空气中的水分而被稀释变质，洗液应储存于带盖的容器中。一般最常用的为次强液。

2) 使用时应注意以下几点：①需用洗液浸泡的容器，在浸泡前应尽量沥干，否则会因洗液被稀释而降低洗液氧化力。②Hg^{2+}、Ba^{2+}、Pb^{2+}等离子可与洗液发生化学反应，生成不溶性化合物沉积在容器壁上。因此，凡接触过上述离子的容器，应先除去上述离子(可用稀硝酸或 5%～10% EDTA 清除)。③油类、有机溶剂等有机化合物可使洗液还原失效。因此，容器壁上附有大量油类、有机溶剂时应先去除。④洗液的酸性和氧化性很强，使用时应格外注意，千万不要滴落在皮肤或衣物上，以免灼伤或烧坏。⑤洗液颜色由深棕色变为绿色时，说明洗液已经失效，应停止使用，更换新液，因重铬酸变成硫酸铬后不再具有氧化能力。

(2) 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($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$)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(EDTA-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。

6. 玻璃和塑料器皿的干燥　通常使用烘箱或烘干机进行干燥，而不要用丙酮荡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，从而干扰实验结果。

(二) 吸量管和微量移液器的使用

1. 吸量管的种类及使用方法

(1) 刻度吸量管

1) 刻度吸量管的种类：①按容量规格来分，有 0.1、0.2、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10ml 等数种。其精密度按不同的容积可达移取量的 0.1%～1%。通常将管身标明的总容量分刻为 100 等分。因此，10ml 的吸量管一格代表 0.1ml；1ml 的吸量管一格代表 0.01ml，其余类推。②按"零"点位置来分，有"0"点在吸量管上端的(即读数从上而下逐渐增大)，也有"0"点在吸量管下端的(读数从下而上逐渐增大)。两种标示方法，在使用时各有方便之处。③按刻度方法来分，刻度吸量管也有两种，一种是刻度刻到尖端的，将液体放出时，应吹出残留在吸量管尖端的少量液体，另一种是刻度不刻到尖端的。

2) 刻度吸量管的正确使用方法：在吸取液体时，首先认清试剂标签，选择容量大小合适的吸量管，用右手拇指和中指拿住吸量管上端，将吸量管的尖端伸入待取液体的液面下约 1cm处，左手持洗耳球对准吸量管上口，轻轻吸取，使液体从吸管下端徐徐上升，当液面升到刻度以上时，移去洗耳球，迅速用右手食指按紧吸量管的上口，以控制试剂的泄放。将吸管下端提离液面并接触瓶颈内壁，吸液后应尽量使吸量管保持垂直，此时视线平视吸管刻度标线，稍松抬右手食指或轻轻转动吸量管，液面即缓缓下降。待液体弯月面的最低点与吸量管的刻度相切时，立即按紧食指，使液体不再流出，将吸量管移入准备接收试剂的容器中，其尖端接触容器内壁，松开右手食指使液体自然流出，待液体流完后再等 15 秒钟，捻动一下吸量管后移去(如需吹的吸量管，则吹出尖端的液体后再捻转一下吸量管移去)。

3) 使用刻度吸量管的注意事项：①选择适当规格的吸量管，吸量管的最大容积应等于或略大于所需容积(ml 数)。②仔细看清吸量管的刻度情况，弄清刻度是否包括吸量管尖端的液体，读数方向是自上而下，还是自下而上。③拿吸量管时，刻度一定要面向自己，以便读数。④吸取试剂时应注意三点：一是先吹去吸量管内可能存在的残留液体，二是将吸量管插入试剂液面深部(以免吸液过程中因液面降低而吸入空气产生气泡或管内试剂进入洗耳球)，三是使用洗耳球(不可直接用口吸)。⑤按吸量管上口时通常用示指。⑥吸取黏滞性大的液体(如血液、血浆、血清等)时，除选用合适的吸管外，应注意拭净管尖附着的液体，尽量减慢放液速度，待液体流尽后吹出管尖残留的最后一滴液体。⑦使用的吸量管应干净、干燥无水。如急用而又有水时，可用少量欲取试剂冲洗 3 次，以免试剂被稀释。

(2) 移液吸量管：常用量取 50、25、10、5、2、1ml 的液体，常见的一种是吸量管的上端只有一个刻度，另一种是除了在吸量管上端有刻度外，在吸量管下端狭窄处也有一刻度线。无论哪一种，在使用时将量取的液体自然流出后，只需将吸量管的尖端触及受器壁约半分钟即可，不得吹出尖端残留的液体。

(3) 奥氏吸量管：供准确量取 0.5、1.0、2.0、3.0ml 液体所用。这种吸量管只有一个刻度，当放出所量取的液体时，管尖余留的液体必须吹入容器内。

(4) 使用原则：量取整数量液体，并且取量要求准确时，应该选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液吸量管。同一定量实验中，如欲加同种试剂于不同的管中，并且取量不多时，应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。

2. 定量吸(移)液器(微量加样器)

(1) 定量吸液器的优点：使用方便，取、加样迅速，计量准确，不易破损，能吸取多种样品

(只换吸头即可)。

(2) 定量吸液器的类型:有两种类型。

1) 固定式:只能取加一定容量的试剂,不能随意调节取加样量。其规格有 10、20、25、30、50、100、200、250、300、400、500 和 1000μl 等。

2) 可调式:在一定容量范围内可根据需要进行调节取加样量。例如规格为 50～200μl 的可调式定量吸液器,可以在 50～200μl 的范围内根据需要调节成设计容许的各种取加样容量。

(3) 定量吸液器的使用方法

1) 选择适当的吸液器。吸液前先把吸头套在吸引管上,套上后要轻轻旋紧一下,以保证结合严密。

2) 持法:右手四指(除大拇指外)并拢握住吸液器外壳(使外壳突起部分搭在食指近端),大拇指轻轻放在吸液器的按钮上。

3) 取样(吸液):用大拇指按下按钮到第一停止点,以排出一定容量的空气,随后把吸嘴尖浸入取样液内,徐徐松开大拇指,让按钮慢慢自行复原,取样即告完成。

4) 排液:将吸液器的吸嘴尖置于加样容器壁上,用大拇指慢慢地将按钮按下到第一停止点,停留 1 秒钟(黏性较高的溶液停留时间应适当延长)。然后再把按钮按到第二停止点上,让吸头沿管壁向上滑动。当吸头尖与容器壁或溶液离开时,方可释放按钮,使其恢复到初始位置。

5) 吸液器用后应及时取下吸嘴。

3. 练习(吸量管的使用)　取 50ml 锥形瓶加入 0.1mmol/L 的 HCl 5ml,酚酞指示剂 1 滴,用 0.1mmol/L 的 NaOH 滴定,记录结果。

(三) 溶液的混匀

1. 混匀的目的

(1) 使反应体系内的各种物质分子很好地互相接触,充分进行反应。

(2) 使欲稀释的溶液成为浓度均一的溶液。

2. 混匀的方法

(1) 使容器作离心运动。

(2) 左手持试管上端,用右手指轻击试管下半部,使管内溶液作旋转运动。

(3) 利用旋涡混合(振荡)器混匀。

(4) 不得已时可用干燥清洁的玻璃棒搅匀。

3. 混匀的注意事项

(1) 防止盛器内的液体溅出或被污染。

(2) 严禁用手指堵塞管口或瓶口振荡混匀。

(四) 离心机的使用方法

根据最高离心转速的不同可将离心机分为三种类型:普通离心机,其最高转速一般在 4000～6000r/min;高速离心机,转速可达 10 000～25 000r/min;超速离心机,转速可超过 50 000r/min 以上。以下简要介绍普通离心机的使用方法:

(1) 使用前先检查变速旋钮是否在"0"位,外套管是否完整无损和垫有橡皮垫。

(2) 离心时先将待离心的物质转移到大小合适的离心管内或小试管内,检查离心管或

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

小试管的大小是否与离心机的套管相匹配。盛量不宜过多，占管的 2/3 体积为宜，以免溢出。将此离心管放入外套管，再在离心管与外套管间加入缓冲用水。

(3) 将一对装有离心管的外套管在粗天平上平衡。如不平衡可调整缓冲用水或离心物质的量。

(4) 将平衡好的套管，按对称方位放到离心机插孔中。把不用的离心套管取出，盖严离心机盖。

(5) 接通电源，开启开关，逐档扭动旋钮，缓慢增加离心机转速，至所需数值。

(6) 当达到离心所需时间后，将调速旋钮逐步回零，关闭电源。待离心机自动停止转动后(不可人为制动)，再打开离心机盖取出样品。

(7) 用完后，取出套管中橡皮垫洗净，冲洗外套管，倒置干燥。

(曾益军)

三、实验样品的制备

在生物化学与分子生物学实验中，无论是分析组织中各种物质的含量，还是探索组织中的物质代谢过程，均需利用特定的生物样品，这些样品在进行实验前，往往需要预先加以适当的处理。下面扼要介绍血液、尿液及组织样品的主要处理方法。

(一) 血液样品

1. 血清的制备 血清是全血不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄清亮液体。其所含成分接近于组织间液。代表着机体内环境的物理化学性状，比全血更能反映机体的状态，所以血清是常用的血液样品。

操作：将刚采集的血液直接注入试管，将试管倾斜放置，使血液形成一斜面。夏季于室温下放置，待血液凝固后，即有血清析出；冬季，因室温较低，室温下放置时血液凝聚缓慢，不易析出血清，故需要将血液置于 37℃水浴或温箱中以促进血清析出。血清析出后，用吸管吸取上层血清置于另一支试管中，若不清亮或带有血细胞，应离心，将上清液移至另一试管中，加盖冷藏备用。

制备血清要防止溶血，一方面使用的容器要干燥清洁；另一方面，血块收缩后应及早分离出血清。放置过久，血块中血球也可能发生溶血，引起血清成分的变化。

2. 全血的制备 无论收集动物或人体血液，一方面要注意容器的清洁与干燥，另一方面要及时加入适当的抗凝剂以防止血液凝固。

操作：在新鲜血液取出后，迅速放入含有抗凝剂的器皿中，同时轻轻摇动，使血液与抗凝剂充分混匀，以免形成凝块。全血样品如不立即进行试验，应冷藏于 4℃冰箱中。

常用的抗凝剂有草酸钾、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸二钠、氟化钠及肝素等，可视具体实验要求而定。

草酸钾可迅速与血中钙离子结合，形成不溶性草酸钙，使血液不凝固。每毫升血液用 1～2mg 即可。此抗凝剂常用于非蛋白氮等多种测定项目，但不适用于钾、钙的测定。对乳酸脱氢酶、酸性磷酸酶和淀粉酶具有抑制作用，使用时应注意。

氟化钠是一种弱抗凝剂。2mg/ml 的氟化钠能够抑制血液内葡萄糖的分解，因此在测

定血糖时常与草酸钾混合使用。但氟化钠可抑制脲酶活性，所以不能用于脲酶法的尿素氮测定，也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

乙二胺四乙酸二钠盐（简称 $EDTANa_2$）易与钙离子络合而使血液不凝，有效浓度为每毫升血液用 0.8mg。此抗凝血适用于多种生化分析，但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

抗凝剂的用量要适当，不宜过多以免影响实验结果。通常每毫升血液需要草酸钾 1～2 mg，或柠檬酸钠 5 mg，或氟化钠 5～10 mg，或肝素 0.05～0.1mg（市售肝素大多数为钠盐溶液，每毫升含肝素 12 500 国际单位，125 国际单位＝1mg 肝素，使用时可按此计算）。使用时可先配成浓溶液，按需要量加到盛血的容器中使用。

3. 血浆的制备　血浆比血清分离得快而且量多。两者的差别，主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原，其他成分基本相同。

操作：将全血样品于 2000r/min 离心 10min，沉降血细胞，取上层清液即为血浆。

制备血浆必须严格防止溶血，要求采取血液时的一切用具（注射器、针头、容器等）均需清洁干燥。操作过程中避免剧烈振荡。

4. 无蛋白血滤液　测定血液中的非蛋白质成分时（如 NPN、尿酸、肌酸等），为了防止蛋白质产生干扰，通常先将样品中的蛋白质除去。常用的方法是利用三氯醋酸、钨酸或氢氧化锌等沉淀蛋白质，然后用过滤或离心法制成“无蛋白血滤液”。

（二）尿液样品

一般的定性试验可以用新鲜收集的尿液，如不能立即试验，则宜在阴凉处存放，或加入适当的防腐剂如甲苯、盐酸等。

进行定量分析时，通常要收集 24 小时的混合液作为测试样。因一次排出的尿液成分受许多因素如食物、饮水、昼夜生理变化等的影响，不能准确反映物质代谢的真实情况。弃去清晨第一次尿液，将以后每次排出的尿液收集在一起，包括第二天早晨同一时间排出的尿液。把收集的 24 小时尿液充分混和后测量其总体积，然后取样分析。收集的尿液应放在阴凉处保存，最好立即进行实验。也可在收集尿液的容器中预先放入防腐剂，通常每升尿中约加入 5 毫升甲苯或麝香草酚少许。

（三）组织样品

离体不久的组织，在适宜的温度及 pH 等条件下，可以进行一定程度的物质代谢。因此，在生物化学与分子生物学实验中，常利用离体组织研究各种物质代谢途径与酶系的作用，也可以从组织中分离纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质进行研究。

应用动物组织进行实验，要求在动物死亡后迅速取出组织，并尽快地进行提取或测定。一般采用注射过量麻醉药品来处死动物，然后立即取出实验所需器官或组织，去除外层脂肪组织及结缔组织后，用冷冻的生理盐水洗去血液，必要时也可用冰冷的生理盐水灌注脏器以洗去血液，再用滤纸吸干，迅速称重后进行实验。取出的脏器或组织，可根据不同的目的，用下列方法制成不同的组织样品。

（1）组织糜：将组织用剪刀迅速剪碎，或用绞肉机绞成糜状即可。

（2）组织匀浆：新鲜组织称取重量后剪碎，加入适当的匀浆制备液，可用乳钵加少量海砂（经洗涤处理）研磨成浆，或用高速电动匀浆器或玻璃匀浆器制成组织匀浆。因匀浆时有

大量热产生，为了避免酶类丧失活性，故应在冰浴中进行。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液、Krebs-Ringer 溶液或 0.25mol/L 蔗糖溶液等，可根据实验要求加以选择。

(3) 组织浸出液(组织提取液)：将上法制成的组织匀浆加以离心，取上清液即为组织浸出液。

(4) 组织切片：部分实验(如组织呼吸实验)要求应用组织的薄片来进行，可用刀片或特殊的装置来切片，制成薄薄的组织片。

(连继勤)

四、实验误差与数据处理

在任何测量中，无论所用仪器多么精密，方法多么完善，实验者多么细心，均难以达到几次实验结果完全相同，而存在一定误差。因此，实验者不仅要能熟练地进行各种分析操作，而且还应该善于判断分析结果的正确性，检查产生误差的原因，以提高分析结果的可靠程度。

(一) 误差及其产生的原因

1. 误差的概念 真实值与测量值之间的偏差叫做误差。

2. 误差的来源 产生误差的原因很多，一般根据误差来源的性质，将误差分为：

(1) 过失误差：由于观测者粗心大意、操作失误造成的明显与实验结果不符的误差。这种误差又称为粗差。比如，观测者读错仪器表示的数字，对于要求清零的仪器测试前忘记清零，以及记录和计算错误造成的误差。这种误差的特点是误差没有规律，没有系统误差所表现出的方向性和重现性。加强责任心，仔细操作可以避免此类误差。

(2) 系统误差：指测定中某种未发现或未确认的因素引起的误差。这种误差的特点是具有方向性和重现性，即测定结果中偏大或偏小，其大小和偏向在同一实验中完全相同。这种误差是可以避免或修正的，产生的原因主要有以下几种：

1) 仪器误差：因仪器本身不够精密或使用不当所造成的。如天平、砝码、量器等不够准确等。

2) 方法误差：由于分析方法本身造成的。如质量分析中沉淀物少量溶解或吸附杂质；比色分析中标准液与测定液显色不一致等。

3) 试剂误差：来源于试剂、蒸馏水不纯，标准溶液浓度配制不准确或放置过久已变质等。

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的。如不同的操作者对滴定终点颜色变化的判断会有差别等。

(3) 偶然误差：由多方面原因所造成。如取样不均匀，砝码的偶然缺损，测定过程中某些不易控制的外界因素(如温度和气压)的影响，被检物污染，检验者几次观察终点不一致等。偶然误差是由于各种可变因素引起的，是较难控制和预料的，也不能用数据来校正。偶然误差的特点是无规律性，有时大，有时小，其误差的正负可同时出现，完全由概率决定，服从统计定律，符合正态分布，可以运用概率理论进行处理。

(二) 准确度和精密度

每个测定方法不仅应具备较高的准确度，而且需有较高的精密度才能使用。

1. 准确度　指测量值与真实值相符合的程度。通常用误差来表示，误差越小则测定的结果越准确，即准确度越高。误差可分为绝对误差和相对误差：

$$绝对误差=测量值-真实值$$

$$相对误差=\frac{绝对误差}{真实实值}\times 100\%$$

例如，用分析天平称得两种蛋白质的重量各为 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：

$$2.1750-2.1751=-0.0001(g)$$

$$0.2175-0.2176=-0.0001(g)$$

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，两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，就可以看出第一份称重的准确度比第二份的准确度大 10 倍。显然，当被称量物的质量较大时，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。但由于真实值是并不知道的，因此在实际工作中无法算出分析的准确度，只能用精密度来评价分析的结果。

回收率测定在一定程度上可以说明测定结果的准确度。取一标准物质与待测的未知样品同时做平等测定，测得的量与所取得的量之比的百分率就称回收率。例如，测得某病人血清钠为 320 mg%，向该样品 100ml 中加入钠 310 mg，测得结果为 620 mg%，可用下式计算回收率：

$$X=\frac{a-b}{Y}\times 100\%$$

设 X=回收率；

a=测定总量；

b=待测物质含量；

Y=已知加入量；

代入公式：

$$回收率=\frac{620-320}{310}\times 100\%=96.78\%$$

回收率低说明准确度差。但只要恒定在一定范围内，即使回收率低，其测定方法也可使用。

2. 精密度（又称重复性）　是指用某一方法反复多次测定同一物质的结果相符合的程度。一般用偏差表示，偏差越大则精密度低，偏差越小则精密度越高。偏差也可分为绝对偏差和相对偏差：

$$绝对偏差=个别测量值-算术平均值$$

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

例如：测定样品中氯化钠含量时，同一样品分析 4 次，所得百分含量如下：

各次测定结果	算术平均值	偏差
50.12%		−0.02%
50.14%		0
	50.14%	
50.20%		+0.06%
50.08%		−0.06%

上面所表示的偏差，即为绝对偏差，而各次测定的相对偏差分别为−0.04%、0、+0.12%、−0.12%。通常规定每次测定结果与算术平均值之间的相对偏差不能超过0.1%，因此，上例4次测定都很精密。今假定第五次测定为49.94%，与四次算术平均值之间的相对偏差为−0.4%，则此次测定不精密，应删去不要。用相对偏差来表示实验精密度比用绝对偏差更有意义。除了用相对偏差来表示精密度外，还常用下列三种方式来表示：

(1) 平均偏差

$$平均偏差=\frac{\sum[偏差]}{测定次数}$$

式中：$\sum$ 代表总和。

偏差有正负，而在实际工作中用绝对值来计算平均偏差是比较合理的。因为如果分析工作做得不好，各次测定数值相差很大，若不用绝对值计算，会抵消一部分，甚至全部抵消，结果算出来的平均偏差很小，甚至等于零。显然，这样计算出来的偏差不能表示测定方法的真实精密度。上例测定结果的平均偏差为：

$$\frac{0.02\%+0.00\%+0.06\%+0.06\%}{4}=0.035\%\approx0.04\%$$

测定结果可用数字50.14±0.04%表示。偏差越小，精密度越高。

(2) 标准差：由于大小不同的偏差出现的几率不同，求平均偏差时把它们一视同仁地加在一起亦是不合理的，它常给出过度的精密度，因此在定量分析中用的不多。在定量分析中，常用的是均方偏差，又叫标准差(SD)。即：

$$SD=\pm\sqrt{\frac{\sum(X-\overline{X})^2}{n-1}}$$

式中：X 代表测定值，$\overline{X}$为平均值，n 为测定次数。

计算标准差，首先求算术平均值，然后求平均值的绝对偏差，代入公式即可求出标准差。例如，上例的算术平均值为50.14%，平均值的绝对偏差分别为−0.02%、0、+0.06%、−0.06%。代入公式：

$$SD=\pm\sqrt{\frac{0.02^2+0^2+0.06^2+0.06^2}{3}}=\pm0.05$$

结果表示用“平均值±标准差”即50.14±0.05%。标准差小则精密度高。

标准差用来表示各个数值对于均数的离差程度。将单次测量的偏差平方之后，较大的偏差更能反映出来，这样能更好的说明数据的精密度。

(3) 变异系数：当偏差随平均值变化而改变时，用变异系数(CV)表示偏差更为确切，同时它还可用于比较不同样本或不同测定方法的偏差大小。变异系数是标准差与平均值的百分比。即：

$$CV=\frac{SD}{\overline{X}}\times100\%$$

例如上例的变异系数为：

$$CV=\frac{0.05}{50.14}\times 100\%=0.1\%$$

变异系数的高低反映了实验的偶然误差，它取决于方法本身的稳定性、实验条件的控制和恒定情况，以及个人操作误差等。变异系数的要求是根据工作性质的要求和具体情况来确定的。一般应小于5%，在精密的分析中，则应该要求更小，一般要求小于2%。

3. 准确度与精密度的关系　准确度与精密度是两种不同的概念和表示法。准确度是由于系统误差和偶然误差两者决定的，而精密度仅是偶然误差决定的。一个分析结果虽然有很高的精密度，但并不一定说明结果的准确度很高，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量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偏离真实值，也就是分析的准确度并不一定很高，因此用精密度来评价分析的结果有一定的局限性。精密度高不一定准确度高，精密度是保证准确度的先决条件，只有消除了系统误差后，精密度高的测定结果，才能既准确，又精密。

4. 提高结果准确度的方法　通常采用两种方法：

(1) 增加平行测定次数，取其算术平均值，可以减少偶然误差。平行测定的次数越多，其平均偶然误差就越小。

(2) 消除系统误差。常用方法有：①空白试验——为了消除由试剂等因素引起的误差，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方法，在完全相同的条件下进行分析，得到的结果为空白值，将样品分析得到的结果扣除空白值，可以得到比较准确的结果；②校正仪器；③严格遵守操作规程等方法。

(三) 有效数字

在生化定量分析中，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、计算应当无误外，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，包括所有“可靠数字”和最后一位“欠准数字”。应选取几位有效数字，取决于实验方法与所用仪器的精确度。

例如，用1/10 000分析天平称得某物质重1.1415 g，是五位有效数字，而用1/100台秤称得该物质为1.14 g，则只有三位有效数字。

又如，读取某滴定管液面刻度为10.25ml，是四位有效数字。

上面各数字的最后一位数字是不可靠的，称为“欠准数字”或可疑数，也叫估计值，其他的数字均是准确的“可靠数字”。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。“0”有双重意义，它可以用作有效数字，也可以用来定位。它在数字中间或数字后面时，是有效数字，但在数字前面时，它只是定位数字，用来表示小数点的位置，而不是有效数字。例如：

1.26014	六位有效数字
12.001	五位有效数字
21.00	四位有效数字
0.0212	三位有效数字
0.0010	二位有效数字
200	有效数字不明确

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com