

高等医学院校教材

医用生物化学

实验技术与方法

YIYONGSHENGWUHUAXUE

SHI YAN JI SHU YU FANG FA

主编：谷兆侠 李平法



人民中国出版社

医用生物化学 实验技术与方法

主 编 谷兆侠 李平法

副主编 咎玉玺 石如玲 谷俊侠 毛清芝

张玲叶 李西兴

编 委 王小引 王 凯 毛清芝 石如玲

田少华 李平法 李西兴 李 辰

张 文 张玲叶 张明珠 谷兆侠

谷俊侠 周延升 赵长安 赵春澎

咎玉玺

人民中国出版社

医用生物化学实验技术与方法

主 编 谷兆侠 李平法

责任编辑 董思博

人民中国出版社

(北京车公庄大街3号)

华北石油局印刷厂

787×1092 16开 16.5印张 400千字

2000年7月第一版 2000年7月第一次印刷

ISBN 7-80065-436-2/R·243

定 价:18.50元

前 言

近几十年，生命科学出现了突飞猛进的发展，生物化学是其中进展最快的学科之一。随着生命研究不断向分子水平的深入，生物化学理论和技术也日益成为基础医学和临床学科揭示生理和病理现象本质，进行疾病的诊断和防治不可缺少的理论依据和手段。作为一个医学生，掌握基本的生物化学实验技术和方法是非常必要的。为满足医学实验教学发展的需要，适应生物化学发展水平，我们在原有实验教材的基础上，总结了多年来实验教学工作的经验，参考国内外的一些最新资料，组织编写了这本《医用生物化学实验技术和方法》。

本书主要作为医学院校本科学生实验教材，也可作为专科、中专及成人教育各层次使用，并可供教师及其他医务工作者作参考。为适应目前高等教育改革发展的需要，加强学生能力培养，全面推行素质教育，本书在内容取舍和编排方式上作了较大的调整，期望使之既能够加强学生对实验基本技术与技能的掌握，又有利于学生分析问题，解决问题和创造性思维等能力的培养，能从中学习科研的思路与方法。同时，本书也注意了新技术、新方法的引进和介绍。

全书内容分上、下两篇。上篇对生物化学实验技术的有关知识及理论进行了较系统的介绍，主要包括：生物化学实验基本知识；光谱分析、电泳、层析、离心和自动生化分析等生化基本技术；分子生物学有关技术；实验设计及思路等。下篇围绕各种生化技术精选了49个实验，包括部分综合型大实验和常用的临床生化检验实验。使用者基本上可以从中找到适宜于各层次开设的相应实验内容。书中附有参考文献，可供读者查阅。本书内容详实，既可作为实验教材，又是一本便于自学的内容丰富的参考书。

诚挚地欢迎读者对书中存在的错误和不当之处提出批评和指正。

谷兆侠 李平法

1999年8月

目 录

上 篇

第一章 生物化学实验基本知识	(1)
第一节 生物化学实验室一般规则.....	(1)
第二节 实验误差.....	(4)
第三节 实验基础知识与操作.....	(8)
第二章 光谱光度分析技术	(22)
第一节 比色法与分光光度法	(22)
第二节 火焰光度法	(32)
第三节 荧光分析法	(34)
第三章 电泳技术	(39)
第一节 电泳技术的原理	(39)
第二节 电泳的分类	(42)
第三节 纸电泳及薄膜电泳	(44)
第四节 凝胶电泳	(47)
第五节 其它电泳技术	(52)
第四章 层析技术	(55)
第一节 吸附层析	(55)
第二节 分配层析	(61)
第三节 凝胶过滤	(64)
第四节 离子交换层析	(69)
第五节 亲和层析	(73)
第五章 离心技术	(77)
第一节 离心技术的原理	(77)
第二节 离心机的类型及结构	(79)
第三节 离心的分类及应用	(80)
第六章 电位分析技术与自动分析技术	(83)
第一节 电位分析技术	(83)
第二节 自动分析技术	(92)
第七章 常用分子生物学技术	(96)

第一节	DNA 凝胶电泳	(96)
第二节	聚合酶链反应	(102)
第三节	DNA 序列测定	(105)
第四节	Southern 杂交法	(109)
第八章	实验设计	(113)
第一节	实验设计的意义	(113)
第二节	实验设计的基本原则	(114)
第三节	实验设计的内容	(117)
第四节	实验设计的类型	(119)

下 篇

实验一	凯氏定氮法测定血清蛋白质	(121)
实验二	双缩脲法测定血清蛋白质	(123)
实验三	酚试剂法测定血清蛋白质	(125)
实验四	紫外分光光度法测定血清蛋白质	(127)
实验五	蛋白质的等电点测定	(128)
实验六	蛋白质的沉淀反应	(129)
实验七	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	(133)
实验八	血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	(137)
实验九	血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳	(143)
实验十	血红蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	(146)
实验十一	氨基酸薄层层析分离	(149)
实验十二	氨基酸纸层析分离	(151)
实验十三	凝胶柱层析法分离血红蛋白及 DNP-鱼精蛋白	(154)
实验十四	血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离与提纯	(156)
实验十五	紫外吸收法测定核酸含量	(159)
实验十六	酵母核糖核酸的提取与组分鉴定	(161)
实验十七	细胞核的分离纯化及 DNA、RNA 的测定	(163)
实验十八	温度、pH 对酶促反应速度的影响	(169)
实验十九	底物浓度对酶促反应速度的影响	(173)
实验二十	抑制剂对酶促反应速度的影响	(175)
实验二十一	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	(176)
实验二十二	碱性磷酸酶的提取及比活测定	(178)
实验二十三	乳酸脱氢酶同工酶电泳分离	(183)
实验二十四	肌酸激酶同工酶的分离及测定	(186)

实验二十五	脲酶的凝胶过滤分离·····	(189)
实验二十六	胰蛋白酶亲和层析法提纯·····	(193)
实验二十七	邻甲苯胺法测定血糖及糖标准曲线制作和回收实验·····	(197)
实验二十八	葡萄糖氧化酶法测定血糖·····	(201)
实验二十九	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响·····	(203)
实验三十	饱食、饥饿及激素对肝糖原含量的影响·····	(205)
实验三十一	尿糖的定性测定·····	(207)
实验三十二	血清甘油三酯测定·····	(208)
实验三十三	血清胆固醇测定·····	(213)
实验三十四	血清高密度脂蛋白胆固醇测定·····	(216)
实验三十五	血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳·····	(218)
实验三十六	尿酮体定性测定·····	(220)
实验三十七	血清丙氨酸氨基转移酶测定·····	(222)
实验三十八	血清尿素测定·····	(225)
实验三十九	血清胆红素测定·····	(228)
实验四十	尿 17-酮类固醇测定 ·····	(231)
实验四十一	血清钾、钠测定·····	(233)
实验四十二	血清氯化物测定·····	(237)
实验四十三	血钙测定·····	(239)
实验四十四	维生素 B ₁ 的荧光测定 ·····	(242)
实验四十五	维生素 B ₂ 的荧光测定 ·····	(245)
实验四十六	维生素 C 的定量测定 ·····	(247)
实验四十七	对流免疫电泳法检测乙型肝炎抗原·····	(249)
实验四十八	质粒 DNA 的提取 ·····	(251)
实验四十九	人和哺乳动物细胞基因组 DNA 制备 ·····	(253)
参考文献	·····	(257)

上 篇

第一章 生物化学实验基本知识

第一节 生物化学实验室一般规则

一、实验室规则

1. 学生进入实验室必须穿工作服，自觉遵守纪律，听从教师安排，不准高声喧哗，保持实验室内安静，以提供良好的学习环境。

2. 实验课开始操作之前，要认真听取老师讲解。实验操作必须严格按照操作规程和教师的指导进行，合理安排时间，做到科学有序，有条不紊。需要改变实验操作程序或试剂用量时，必须征求教师同意后方可进行。

3. 在整个实验操作过程中要注意节约，不得浪费或随意增加试剂和样品的用量。试剂瓶的排列要整齐有序，用完后要立即放回原处，以防污染或打翻造成浪费。

4. 要爱护仪器、设备，严格按照操作规程进行操作。精密、大型仪器按照规定放在固定的位置，未经许可，不得随意搬动。发现问题或出现故障，要立即停止使用，并及时报告指导教师。使用结束后要擦净盖好，进行登记。损坏仪器要及时报告，填写损物登记后补领，并按学院规定的赔偿制度酌情赔偿。

5. 生化实验中经常用到易燃、易爆、有毒、强腐蚀等易造成人身伤害的化学试剂，并经常要使用水、电、燃气等，稍有不慎，就可能造成事故。因此必须小心谨慎，加强安全防范意识，杜绝事故的发生。

6. 每个实验室选一名室长，协助教师负责实验室的有关工作，并负责安排卫生值日。实验结束后，每个学生要把自己所用过的器皿清洗干净放回原处，值日人员要认真整理，清点器材，打扫室内卫生、擦净实验台、试剂架，倒净垃圾，检查水、电、燃气的开关，关好门窗，经老师同意后方可离开实验室。

二、实验要求

1. 要积极主动参与每次实验，自觉地进行基本技术与技能训练，有意识地培养自己的动手能力、分析综合能力，培养严谨的实事求是的工作作风。

2. 课前要预习 在上课前必须进行充分的预习，通过预习达到对本次实验的目的明确，原理清楚，操作时心中有数。

3. 认真观察，作好记录 实验中认真观察实验现象和结果，完整、准确、实事求是地作好实验记录。要求每人必须有实验记录本，不准用碎纸作实验记录，更不准将实验的原始数据写在手上，这样容易把数据丢失，也不利于良好的科学习惯的培养。在实验中发现问题要深入思考，认真查找原因，找出妥善解决的办法。

4. 认真书写实验报告 实验报告是每次实验情况的真实记录和总结，是对学生独立工作能力和素质培养的重要环节，每个学生都要独立完成。报告要用自己的语言，实事求是地写，要求字迹端正，书面整洁，内容简明扼要。主要包括实验日期，实验名称，实验原理，主要操作步骤，结果与讨论。写好后，由实验室长统一收齐，于当天下午或第二天送交教师。教师将认真批改，并登记入册，作为本学期实验成绩的一部分。

三、实验室的安全防护

在生物化学实验中，经常用到一些毒性很强、腐蚀性很高、易燃、易爆的化学药品，使用玻璃、瓷质等易碎的器皿，在有水、电、燃气等设备的环境中操作，因此必须十分重视安全防护。

1. 开始实验之前，必须了解室内的水闸、电闸的总开关及室内的安全防护设施，离开实验室务必要将水、电闸门关闭。

2. 使用电器设备（如电热干燥箱，恒温水浴，离心机，电炉等）时要小心操作严防触电，绝不可用湿手或者在眼睛旁视的情况下，开启电闸或电器开关。如要检查是否漏电，需用验电笔，或用手背轻轻触及仪器表面，凡是发现漏电的仪器未经检修一律不准使用。使用加热的电器（电炉、电热套、电热板）或燃气时要作到人着火人在，人走火灭。

3. 易燃试剂（如乙醚、乙醇、甲醇、丙酮、氯仿等）极易燃烧，它们与空气的混合物都有不同程度的爆炸性，因此在使用时要特别注意远离火源，加强空气流通。严禁在有火源的地方倾倒试剂，严禁把这些试剂放在烧杯等广口器皿内直接在火上加热，只能在水浴上利用回流、冷凝或蒸馏。在水浴上加热时切勿使容器密闭，以防引起爆炸。

4. 生化实验中所用的化学试剂有许多剧毒、致癌、强腐蚀性，它们可通过皮肤、消化道、呼吸道侵入人体，对人体造成伤害。因此在操作过程中，必须特别注意：①实验操作过程中凡能产生烟雾或腐蚀性气体试剂应放在通风橱内，如实验室无此设备，则必须开窗通风；②若需要用吸量管量取试剂时，必须使用橡皮球或定量加液器吸取，严禁用嘴直接吸取；③使用剧毒药品应严格按照实验室规定的审批手续领取，使用时要严格操作，用后要妥善处理。

5. 实验的废液中有的含有强酸、碱等腐蚀性试剂，有的含有毒物质，有的含易燃易爆物质。若处理不当，都将导致严重伤害。因此，实验废液的处理也是实验安全防护中不可缺少的重要环节。强酸、强碱性废液不能直接倒入下水槽中，而应先将废液稀释，然后再倒入水槽，并用大量自来水冲洗，以防废液滞留而损坏下水道。含有氰化物的废液应先加入氢氧化钠调 $\text{pH} > 7$ 后再加入次氯酸过夜，使 CN^- 被氧化分解后方可倒入下水道流水冲走。

四、实验室意外事故的处理。

1. 实验中一旦发生火灾，切不可惊慌失措，应保持冷静。首先应切断室内的一切火

源和电源，然后根据具体情况，采用合适方法灭火。

(1) 当可燃液体燃着时，应立即拿开着火区域内的一切可燃物品，关闭通风器以防火势扩大。若着火面积较小可用石棉布、湿布、砂土等覆盖，隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻，以免碰翻盛装易燃液体的器皿，使更多的易燃液体流出而使火势扩大。

(2) 酒精及其它可溶于水的易燃液体着火时，可用水稀释灭火。

(3) 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应该用石棉布或砂土灭火，而绝对不能用水灭火，否则反而会扩大燃烧面积。

(4) 电线着火时，不能用水及一氧化碳灭火器灭火，而应首先切断电源，然后用四氯化碳灭火。

(5) 衣服被燃着时，切忌带火奔走，可用大衣等蘸上水包裹身体，或躺在地上滚动以灭火。

(6) 发生火灾时，应注意保护现场，较大的着火事故要及时报警。

2. 触电的处理 如果在实验中不慎触电，首先应立即切断电源。如果一时找不到电源，在没有切断电源的情况下，绝不可直接用手去拉触电者。应迅速用木棒等绝缘物把电线与触电者分开，然后进行人工呼吸。待有了呼吸，即可移至空气流通、温度适中的房间里继续抢救。如果只是失去知觉而呼吸正常则应使其平卧呼吸新鲜空气，或用棉球蘸氨水少许放在患者鼻前，使吸入少量氨以促其苏醒。

3. 药品灼伤的处理 如果不慎被强酸、溴、氯等药品灼伤，应立即用自来水冲洗，然后再用 0.5mol/L 碳酸氢钠洗涤后涂上少许油膏；如灼伤眼睛，应立即用蒸馏水或洗眼液冲洗，再用 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液冲洗后滴入 1~2 滴橄榄油或蓖麻油以滋润之。如不慎被强碱灼伤皮肤，应立即用自来水冲洗后再用饱和硼酸或 0.3mol/L 醋酸洗涤，再涂上少许油膏，若伤及眼睛，应先用蒸馏水冲洗后再用 1% 硼酸溶液冲洗，并滴入 1~2 滴橄榄油滋润之。

4. 不慎将有害试剂吸入口中的临时处理 吸入强酸液体，应立即用清水或 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液漱口，再服用氧化镁、镁乳等和牛奶的混合剂数次，每次约 200ml 或服用万用解毒剂（木炭粉 2 份，氧化镁 1 份，鞣酸 1 份混合而成）1 汤匙，切忌服用碳酸氢钠液，以免使其和酸作用产生大量的气体而造成对胃的刺激。吸入强碱溶液可立即用清水或 5% 硼酸溶液漱口，再服用 0.8mol/L 醋酸溶液适量。吸入石炭酸类药品，应立即用 30~40% 酒精漱口，再服用 30~40% 酒精适量。吸入氰化物，应立即用大量清水漱口，服用 3% 过氧化氢溶液适量，静脉注射 1% 美兰 20ml，再吸入亚硝酸异戊酯，并注意呼吸情况，必要时做人工呼吸。吸入汞或汞类化合物，应立即服用牛奶或生鸡蛋，再服用催吐剂，尽量把吸入胃内的内容物吐出来。

5. 如被玻璃物品、瓷质物品或其它机械物品割伤，首先应查看伤口内有无玻璃，瓷质或金属碎片，待清除干净后用硼酸溶液冲洗干净，再涂以碘酒等进行消毒。必要时进行包扎，若伤口过大或过深而造成大量出血时，应作止血处理。

以上仅是对一般伤害的应急处理，重症患者应视其情况迅速送医院急诊处理。

(李西兴 周延升)

第二节 实验误差

在实验中,由于样品的局限性,仪器的性能,实验方法本身的缺陷,操作者的技术以及人们对客观事物认识的局限性等诸多因素的影响,造成实验结果偏离客观实际值的现象称为误差。简单地说误差就是测定值与真值之差。在生物化学实验中,实验方法正确,仪器精密,操作熟练,也不可能使实验结果与真值绝对相符。即使是同一样本,在相同的条件下多次测定,其结果也不可能完全相同。因此实验中的误差是绝对的,是不可能完全避免的。但是如果我们能把误差控制在一定限度内,则所获得结果仍可基本上反映客观事实。如果误差超过了一定的限度,将不同程度地歪曲真实情况,造成假象,导致错误的结论。随着人们认识能力的提高,科学技术的发展及高精仪器的使用,会使误差减小。因此应了解有关误差的产生原因及基本知识,以便在实验中设法避免或消除,从而提高实验的精密度与准确度,保证实验质量。

一、误差的分类

误差又称变异或差异,是指测定结果与真值的不符合性。所谓真值是指采用一种最可靠的参考方法测得的近似真实的值。按误差的性质和产生的原因,可将其分为过失误差、系统误差和随机误差。

1. 过失误差 人为因素引起的误差。主要是由于工作不认真、操作不正确所引起,如器皿不清洁、加错试剂、采样无代表性、读数错误、取错标本、编号错误、计算错误、填错结果等。过失误差的发生是偶然的,无规律可循,造成虚假的数据。即使是统计学的质量控制也很难查出这种误差。完善的工作制度、严格的管理是防止过失误差最有效的方法。

2. 系统误差 系统误差又称可测误差、定向误差或恒定误差,它是在实验过程中,由某些恒定因素造成的,可致实验结果呈定向偏离(即误差的正、负常常是一定的,其值大小也有一定的规律可循)。系统误差决定了实验的准确度,应力求避免,如已发现要尽快查明原因。常见的系统误差主要有方法误差、仪器误差,试剂误差、操作误差、条件误差、估计误差、顺序误差,重复误差、非均匀误差等。

3. 随机误差 随机误差也称抽样误差或偶然误差,是医学实验研究中比较重要的误差之一。随机误差不是由于单一因素,而是多种可变的随机因素造成的,是不易测定的偏差。在每次观测的结果中,误差的大小和正负都不一定。环境温度的突然波动,电源电压的突然变化,仪器噪声忽大忽小,试剂变质或过期使用,标准曲线的范围不够宽,标本处理不当,仪器使用不当和出现故障,分析判断能力和操作技术的微小差别等,都可看作是大量随机因素造成的误差迭加。因此随机误差不可预测,也不易控制。

二、误差的表示方法和计算

1. 绝对误差 实验所测得的单一测量值或多次测量的均值与真值之间的差称绝对误

差。它表示同样性质数值的误差大小，但不能表示不同性质数值的误差大小。

$$\text{绝对误差} = \text{测量值} (\chi) - \text{真值} (\mu)$$

绝对误差有正负之分，当测量结果大于真值（结果偏高），误差为正；低于真值（结果偏低）为负。例如，测定血浆中总蛋白含量，测得结果为 60.5g/L，而真实值为 60.1g/L，而绝对误差为 +0.4g/L。

2. 相对误差 仅根据绝对误差尚不能全面评价测量中的误差到底有多大，而通过自身比较即可以看出。绝对误差与真值之比称相对误差。亦有正负之分，常用“ δ ”表示。

$$\text{相对误差} (\delta) = \frac{\chi - \mu}{\mu} \times 100\%$$

相对误差与统计学上的变异系数很类似，是实验准确度的一种表示方法。例如：正常人的血钾平均值为 4.5mmol/L，测得的平均值为 4.44mmol/L，绝对误差为 -0.06mmol/L，相对误差为 1.3%。

3. 偏差 实验中真值往往是不知道的，常以多次测量的平均值代表，据此计算出的误差称偏差。

(1) 绝对偏差(d) 一次测量值(x)与平均值($\bar{x}$)的差为 d,有正负之分。即 $d = x - \bar{x}$ 。

(2) 相对偏差(dn) 一次测量值的绝对偏差与平均值之比,用%表示。 $dn = \frac{d}{\bar{x}} \times 100$

(3) 平均偏差 ($\bar{d}$) 绝对偏差的绝对值之和的平均值，就是平均偏差，以 $\bar{d}$ 表示：

$$\bar{d} = \frac{\sum |d|}{n}$$

n 为变量值的个数。

(4) 相对平均偏差 为平均偏差与平均值之比（常用百分数表示）。

$$\text{相对平均偏差} = \frac{\bar{d}}{\bar{x}} \times 100\%$$

4. 极差 为一组观察值中最大值与最小值之差，表示误差范围，以 R 表示。

$$R = X_{\max} - X_{\min}$$

式中：X_{max}为测量值 X₁, X₂, ……X_n 中最大值，X_{min}为测量值 X₁, X₂, ……X_n 中最小值。

除此之外，误差的表示方法还有离均差平方和、方差、标准偏差、相对偏差等。

三、误差控制

误差控制的目的在于消除非实验因素的影响，针对误差的来源以便采取相应的措施。

1. 仪器和试剂误差控制 要选用合乎实验要求的试剂和仪器，在同一监测分析中应使用同一仪器、同一批号试剂，根据具体情况选择不同等级的试剂。测量前应对仪器进行校准，并将校正值应用到测量结果的修正中去；用空白实验结果修正测量结果，以消除试剂不纯等原因所产生的误差。

2. 方法误差控制 扩大实验范围，采取不同的方法来选择、对比。尽量采用准确、精密的方法，这与误差的大小有直接关系。方法的灵敏度有两重性，越灵敏的方法，要求

实验条件越苛刻，否则被试因素的轻微影响很容易表现出来，测定值的波动范围可能较大，然而条件控制得当，误差还是可以减少的。

实验方法要尽量标准化和统一化，就是要有具体的规定、明确的标准和操作规程以及质量控制。国家已制定了许多实验方法的国家标准。

3. 操作误差控制 遵守操作规程，严格要求，养成细心和正规的操作习惯。实验者应充分了解方法的原理及各种影响因素。在实验方法未确定之前，不要进行正式实验。

4. 分配误差控制 必须遵守随机原则对个体及样本进行分配，以避免主观选择。所谓随机化，就是全部受试者有同等的机率被分配至实验组或对照组，各组之间在纵横方面都应保持一致。

5. 估计误差控制 为了消除心理影响所致的误差，在实验设计中可采用“双盲法”，使实验者与设计者分开，科研人员与统计人员分开。动物实验中应采用“单盲法”（实验判定者单盲）。

6. 条件误差的控制 实验应自始至终保持条件齐同一致的原则，这样组间不仅有可比性，而且可消除许多未知误差。实验中设置对照组，就是用以消除条件误差。对仪器进行校正，作试剂空白的措施其目的均在于消除条件误差，此外，最适条件的确定，用药方法的标准化、实验步骤和操作的正规化，实验条件的固定化都有利于消除实验条件所致的误差。

7. 顺序误差的控制 实验顺序以不影响以后实验的效应为前提可先进行某个或某些实验，但要注意消除因时间因素引起的误差。一般来说，对实验的任何顺序均应采取随机化原则，在无法采用随机顺序时，则可采用交叉进行。

8. 抽样误差控制 要想控制抽样所造成的误差，首先必须精选样本，进行随机化抽样，使样本具有代表性，符合实验的要求，即保证样本的质。同时样本的数量也要适当，包括取样的份数及每份样本的数量。如样本份数太少，不具代表性。需增加抽样量，进行多次重复实验。样本量增大，能缩小抽样所致的误差。也不是说样本量越大越好，要根据情况适当控制。

9. 非均匀性误差控制 实验组和对照组之间应该在基础参数、实验条件等方面均衡一致，具体项目及其标准随实验的要求而定。提高样本在主要基础参数上的一致性，则分组时发生不均匀性误差的可能相应减少。

10. 过失误差控制 过失误差的发生是偶然的，在平行特别是重复的实验中，再度同样发生的机率很小，因此可通过重复实验去发现和排除。真实的实验结果在重复实验时仍应出现。实验中要养成随时记录的良好习惯，对重要称量、计算和结果数据都应完整记录，加以核对。平时要自觉遵守各操作规程，高标准严要求，养成实事求是、一丝不苟的科学作风和精益求精的工作态度，不断提高理论和操作技术水平。含有过失误差的测量数据经常表现为离群数据，可以用离群数据的统计检验方法将其剔除。对于确知操作过程中存在错误的的数据，无论结果好坏都必须舍去。

四、实验方法的评价

实验方法的评价主要是通过检验误差大小，确定方法的可接受性。不论开展哪种实验，都要了解测定结果是否能达到必要的精确度和准确度，对实验方法做出评价。评价主

要通过重复性实验、回收实验、干扰实验等方法进行。

1. 重复性实验 重复性实验是对同一样品（或同一批样品）按照规定的方法，在相对恒定的条件下进行多次实验，观察测定结果的变异。因此，它可以反映实验方法的精密度，根据精密度大小，对实验方法作出评价。

2. 回收实验 回收实验是在已知浓度的样品中加入一定量被测物质，然后用同样方法测定，比较测得浓度与实际加入浓度的差异，判定实验误差大小。因此，它反映实验方法的准确度，据此对实验方法作出评价。

回收实验的结果可以用回收率来表示：

$$\text{回收率} = \frac{\text{回收浓度}}{\text{加入浓度}} \times 100\%$$

回收浓度 = 测定浓度 - 已知样品浓度

加入浓度 = 标准浓度 $\times \frac{\text{标准液毫升数}}{\text{样品毫升数} \times \text{标准液毫升数}}$ 一般实验方法要求回收率在 $100 \pm 5\%$ 之间。

在回收实验评价实验方法时，每例样品要重复测定 3 次以上，以减少随机误差。反过来，在实验方法确定的情况下，回收率还可以反映实验误差的大小。回收率越偏离 100% 表明实验误差越大。

3. 干扰实验 干扰实验是测定某些物质对实验方法的影响而造成的误差，可衡量实验方法的准确度。干扰实验的基本方法同回收实验，但不对加入物进行分析，只是测定它对分析方法的干扰。干扰方式一般是由于加入物与分析试剂起作用，影响测定结果而发生误差。如在生物化学测定中，必须考虑胆素、肌酐、血红蛋白、溶血标本等对实验的影响。

此外，还可以通过与参考方法比较，统计两者结果有无显著性差异，来判定该方法是否可采用。

五、实验数据的处理

为了获得实验的准确结果，不仅要进行正确的测定，还要对各种数据进行正确地处理。原始记录或结果均需用数字表示，确定用几位数字来代表测量或计算结果是很重要的。数字过少不能表示其精密度，过多则令人感到烦琐。

（一）有效数字

有效数字也叫有效位数，包括所有的准确数字和第一位可疑数字。例如分析天平称量样品为 10.746g，这 5 位数是确定的，小数点后的第四位数则需要用指针的偏移来加以估计，如为 10.7464g，这里的最后一位数是不确定的，这六位数字都为有效数字。滴定管的最小刻度是 0.1ml，因小数点后的第二位数字只能是估计的，如果出现小数点后的第三位或第四位数将是错误的，不是有效数字，结果必然引起别人的怀疑。如果把滴定管内 1.23ml 读记成 1.2ml，也是不符合实际的，因为小数点后第一位“2”这个数字是确定的。所以测量结果的记录、运算和报告，必须注意有效数字。由有效数字构成的数值（如测定值）与通常数字上的数值概念上是不同的。例如 34.5、34.50、34.500 这三个数，在数字上都看作同一数值，如用于表示测定值，则这三个数值所反映的测量结果的准确程度是不同的。记录和报告的测量结果只应包含有效数字，对有效数字的位数不能任意增删。

(二) 数字的取舍

记录测量化验数据时，一般只保留一位“不定数字”，即可疑数字。当有效数字确定后，其余数字应一律弃去。各种测量、计算的数值需要修约时，主要根据拟取舍的数字中左边第一数字而定。若小于5，则舍去；若大于5则进一；若为5，且其后数字不全为零，则进一，若为5，且其后数字全为零，拟保留的末位数字为奇数则进一，若为偶数则不进。所有的修约应一次修出结果，不能还值修约。

(三) 数字运算规则

1. 许多数相加或相减时，和或差的最大误差等于各个直观测量的误差之和，所以它们的和或差的有效数字的保留，应以小数点的后位数最小的数字为准。

例如：求 0.0121、25.64、1.05782 之和。

正确算法	错误算法
0.01	0.0121
25.64	25.64
+ 1.06	+ 1.00782
26.71	26.70992

2. 乘法和除法 保留有效数字的位数取决于相对误差最大那个数。即最后结果的有效数要与各近似值中有效数字位数最小者相同。在计算过程中，还可以暂时多保留一位数字，待最后计算结果时，再弃去多余数字。

例如： $0.0121 \times 25.64 \times 1.05782$ (0.0121 位数最少)

应写为 $0.0121 \times 25.64 \times 1.06 = 0.328$

3. 在计算平均值时，求四个或四个以上准确度接近的近似值的平均值时，则平均值的有效位数，可较原数据的有效位数多一位。

(四) 可疑数据（异常数据）的鉴别和取舍

在一组观察值中有时出现少数过大或过小的极端值，使人怀疑发生了错误，这种数值称为可疑值。能从所控制的实验条件中，直接找到某些确定因素，确实纯属外来影响造成的，如试剂加错，样品溅出等，就可以把这些数据舍弃掉。对于没有根据说明某些过高过低数据有什么差错时，不能凭经验随便舍去。在科学实验史上，许多预料之外的异常结果，后来被证明是非常有意义的。因此对某些极端值与均值相差较大时，应仔细分析，推敲能否找出一定规律，并按一定的原则和检验方法决定取舍。

(周延升 毛清芝)

第三节 实验基础知识与操作

一、常用玻璃仪器

玻璃仪器是生化实验中必不可少的器材，它质量好坏，清洁与否，容量是否准确等直

接影响着实验结果的准确性。目前的生物化学实验，多采用微量甚至超微量的方法，在检测中尽管有精密的仪器和熟练的操作技术，但是，如果使用的玻璃仪器质量差、不清洁或容量不准，也会对实验结果造成很大的误差。因此，要求每个同学都必须掌握玻璃仪器基本知识和用法。

（一）常用玻璃仪器的种类及使用

实验室所用的玻璃仪器按其性质和用途分为容器、量器和专用玻璃器皿三大类。

1. 量器类 常用量器有量杯、量筒、容量瓶、吸量管、移液管等。

（1）量杯、量筒 量杯和量筒常用于要求不太精确的溶液体积的度量，也可用于液体的稀释和混合。在配制要求不十分精确的溶液浓度时，如百分浓度、体积比浓度等，使用量筒比较方便。

量杯呈圆锥形，具嘴，由于其准确性较差，只能配制一般溶液，实验室一般很少使用。量杯的规格有 5~2 000ml 不等。

量筒呈圆柱形，精确度略高于量杯。其规格从 5~2 000ml 不等，可根据需要选用不同规格的量筒。大规格量筒不应配小体积液体，而小体积的量筒也不能多次量取大体积的溶液，这样容易造成误差。

量杯和量筒均不能加热也不能用作反应容器。若在液体混合或稀释时放热很多，则不能使用量筒，这是因为制造量器的玻璃是低硼钙玻璃，这种玻璃耐碱性能较好，但耐热性能较差，不能在热源上加热否则会引起炸裂。

量筒上有许多刻度，由于量筒的大小不一样，每刻度所表示的 ml 数也不同。读取量筒刻度时，视线和量筒内液面的弯月形最低处应在同一水平面上。偏高或偏低都会造成较大的误差。

（2）容量瓶 容量瓶是一种细颈梨形平底的能力器，带有磨口瓶塞，颈上有环形标线，表示在所指温度下（一般为 20℃）液体充满到标线时，液体体积恰好与瓶上所注明的容积相等。

容量瓶是一种较准确的容量仪器，常用于配制标准溶液、试样溶液或用于准确稀释溶液。

容量瓶在洗涤前应检查其是否漏水。检查的方法为：将水放入至标线，盖好瓶塞，左手按住塞子，右手指尖握住底边缘，把瓶倒立 2min，观察瓶周围是否有水渗出，如果不漏，将瓶直立，把瓶转动约 180°后，再倒过来试一次。检查两次很有必要，因为有的瓶塞与瓶口不是在任何位置都密合的，不漏水的容量瓶才能使用。按常规操作把容量瓶洗净，晾干或低温（50℃以下）干燥备用。注意不能直接在火焰上加热，也不能在 80℃以上的烤箱中烘烤，否则玻璃受热，使容积发生改变。

配制溶液时，如用固体物质配制溶液，须先将固体物质在烧杯中用溶剂溶解，如果溶解过程放热，应待溶液降至室温时再转移至容量瓶中。注意容量瓶先用溶剂洗涤三次后才能转入，再加溶剂洗涤烧杯至少三次，洗液一并转入容量瓶中，以保证溶质全部转移，然后缓慢加入溶剂，当加到接近标线 1cm 时，应停顿 30~60 秒，待瓶颈上部内壁沾附的液体流下后，再用洗瓶或滴管小心逐滴加入，直至液面底部的弧形与标线相切为止。观察标线时，量瓶应平放在试验台上。勿用手掌握住瓶体部分，以免影响体积。眼睛位置必须与液面和标线在同一水平面上。水充满标线后盖好盖塞，将容量瓶倒转振荡，使瓶内气泡上

升,反复数次,使溶液充分混匀。配好的溶液如果需要保存,应转移到细口试剂瓶中。

浓溶液的稀释,可用移液管吸取一定体积的浓溶液放入容量瓶中,然后按上述方法稀释至标线。

容量瓶不宜久存溶液,因为任何溶液长时间存入在容量瓶中,都对量瓶壁有腐蚀作用,甚至长时间存放水也会腐蚀。尤其是碱性溶液侵蚀瓶壁,并使瓶塞粘住无法打开,所以配好溶液后,应将溶液转入清洁干燥的试剂瓶中贮存。并应将容量瓶及时洗净。

(3) 吸量管 吸量管分为三种:移液管、刻度吸量管和固定式微量吸量管,它们的用途有所不同。

① 刻度吸管 刻度吸管是一种广泛使用的吸量管,其准确度较高,使用灵活,管上有刻度,可以根据刻度吸取所需体积的溶液,常用的有 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10ml 等数种。

刻度吸管有完全流出式和不完全流出式两种。完全流出式包括吸管尖端不能自然流出的液体。使用这种吸管时,要把最后不能自然流出的液体吹出,这种吸管壁上通常有“吹”字,也可以根据管上的刻度来确定。不完全流出式刻度吸管的容量,不包括管尖最后不能自然流出的液体,使用这种吸管时,不必将残留在管尖端的溶液吹入容器内。

吸量管使用前要用铬酸洗液浸泡数小时以去掉油污。再用自来水和蒸馏水冲洗干净。吸取溶液时还要先用少量该溶液润洗管内壁。最好是用橡皮球吸取液体,特别是吸取有毒、强酸、强碱和挥发性液体时应绝对避免用嘴去吸。吸取溶液时,一般用左手拿橡皮球,右手把吸管插入溶液中吸取,管尖插入的深度要适当。插得太深,吸管外壁沾附的液体多、误差大,而且易污染溶液。插入太浅,容易吸入空气,还容易把液体吸到球中去。一般是把吸管插入溶液面下 1cm 左右为宜。然后以中指、拇指拿住刻度线以上地方,刻度面对自己,慢慢吸溶液到刻度线以上,立即用食指压住上口,使吸管下端离开液面,用滤纸将吸管外壁擦净,垂直缓慢地将多余的液体放出至液面的弯月面与标线相切时为止。此时眼睛必须与液体凹面相平行,立即按紧食指,拿出吸管,垂直的移入准备接受溶液的器皿中,使管尖与容器内壁接触,让液体自然流出,不可用吹气的办法加快流速。0.1ml 以下的吸管通常是量入式的,所以当液体放出后,应吸取容器中的稀释液吹洗 2~3 次,使管壁沾附的液体全部洗去。

吸量管的规格很多,正确选用是很重要的。先用时应遵循“靠近原则”,即尽量选用与待取液体体积相等或略小的吸量管。例如用 10ml 吸管取用 0.1ml 溶液显然会使误差增大;同样如果需要 1ml 溶液而用 0.5ml 吸管吸取两次也使误差增大。

② 移液管 移液管是一种准确度较高的吸量管。这种吸量管中间膨大呈球形或长圆柱型,所以也称为胖肚吸管。它具有单刻度,即只有一条总量标线。多用于吸取样品溶液、标准溶液或要求非常准确的溶液。一般移液管的体积以自动流出为准,管尖剩余液体不能吹。

③ 微量吸管亦称自动吸管或定量加液器,它是一种精密的取液仪器。其原理是利用柱塞的定程运动形成负压吸入定量液体到塑料尖头内。取样量准确、迅速,操作简单。适合实验室连续取样和液体分装。其规格有 10、20、50、100、200、500、1 000 μ l 和可调式等数种。使用前最好检查一下其准确度和精密度。根据吸液量的多少选择合适的微量吸管。