

全国高等学校教材

# 生物化学与分子生物学 实验指导

主 审 吕士杰

主 编 张 巍

副主编 李 妍 徐俊杰



人民卫生出版社

全国高等学校教材

# 生物化学与分子生物学 实验指导

主 审 吕士杰

主 编 张 巍

副主编 李 妍 徐俊杰

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 程 (吉林医药学院)

刘玉莲 (吉林医药学院)

芦晓晶 (吉林医药学院)

李庆华 (吉林医药学院)

张 巍 (吉林医药学院)

罗 军 (吉林医药学院)

柳明珠 (延边大学)

徐世明 (首都医科大学)

朱文赫 (吉林医药学院)

纪朋艳 (吉林医药学院)

李 妍 (吉林医药学院)

杨宇丹 (吉林大学)

张向阳 (济宁医学院)

罗洪斌 (湖北民族学院)

姜艳霞 (吉林医药学院)

徐俊杰 (吉林医药学院)

人民卫生出版社



## 图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验指导/张巍主编. —北京: 人民卫生出版社, 2014

ISBN 978-7-117-18549-3

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学-实验-医学院校-教学参考资料②分子生物学-实验-医学院校-教学参考资料  
IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 317356 号

|       |                                                  |                                 |
|-------|--------------------------------------------------|---------------------------------|
| 人卫社官网 | <a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>   | 出版物查询, 在线购书                     |
| 人卫医学网 | <a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a> | 医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯 |

版权所有, 侵权必究!

## 生物化学与分子生物学实验指导

主 编: 张 巍

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京市卫顺印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 10

字 数: 250 千字

版 次: 2014 年 2 月第 1 版 2014 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-18549-3/R · 18550

定 价: 20.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

# 前言



生物化学与分子生物学是医学院校的重要基础学科,其理论和技术已渗透至基础医学和临床医学的各个领域,并衍生出许多新兴的交叉学科。为适应实验教学的需要、提高学生的动手能力和独立思考能力、加深学生对生物化学与分子生物学理论的理解,本书对生物化学与分子生物学实验进行重新整合,减少验证性实验,增加综合性实验,同时结合临床和药学各专业的需要,加入创新性和学生设计性实验。

本书分3篇:第一篇为生物化学与分子生物学实验基本知识,其中包括生物化学与分子生物学实验室规则与基本要求和生物化学与分子生物学实验基本操作两个章节;第二篇是生物化学与分子生物学基本实验技术及原理,这部分涵盖了分光光度技术、电泳技术、层析技术、离心分离技术、生物大分子制备技术、核酸分子杂交、重组DNA技术、聚合酶链反应(PCR)和细胞培养技术9个章节;第三篇为生物化学与分子生物学实验,这部分又分为理论验证实验、综合分析实验、创新性实验和设计性实验4个章节。各学校可根据不同教学层次和对象,酌情选用以进行实验教学。为培养学生独立思考、分析问题和解决问题的能力,本书增加了一些创新性实验和设计性实验,旨在增加学生的动手能力和独立解决问题的能力,为培养学生的科研能力打下良好的基础,适应医学院校培养目标的需要。

由于本教材的编写时间仓促,编者水平有限,书中难免有疏漏和不足之处,恳请同行和使用者予以批评和建议。

张巍  
2013年10月

# 目 录



## 第一篇 生物化学与分子生物学实验基本知识

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 第一章 生物化学与分子生物学实验室规则与基本要求 | 2  |
| 一、实验室规则                  | 2  |
| 二、实验记录及实验报告的书写           | 3  |
| 三、实验误差的产生及提高实验准确度的方法     | 4  |
| 第二章 生物化学与分子生物学实验基本操作     | 8  |
| 一、玻璃器皿的洗涤与清洁             | 8  |
| 二、常用玻璃仪器的使用              | 9  |
| 三、移液器的选择与使用              | 11 |
| 四、安全注意事项及意外事故的处理         | 12 |

## 第二篇 生物化学与分子生物学基本实验技术及原理

|                  |    |
|------------------|----|
| 第三章 分光光度技术       | 14 |
| 一、基本原理           | 14 |
| 二、技术分类           | 16 |
| 三、仪器基本构造         | 16 |
| 四、常用分光光度计及使用方法   | 17 |
| 第四章 电泳技术         | 20 |
| 一、基本原理           | 20 |
| 二、常用电泳技术         | 21 |
| 三、电泳的影响因素        | 23 |
| 四、电泳可能遇到的问题及解决办法 | 24 |
| 第五章 层析技术         | 26 |
| 一、基本原理           | 26 |
| 二、层析分类           | 27 |
| 三、柱层析的基本过程       | 31 |
| 第六章 离心分离技术       | 32 |
| 一、基本原理           | 32 |
| 二、离心机的主要构造和类型    | 33 |
| 三、离心方法           | 35 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 四、离心操作的注意事项 .....            | 37 |
| <b>第七章 生物大分子制备技术</b> .....   | 38 |
| 一、生物材料的选择 .....              | 39 |
| 二、组织细胞破碎与细胞器分离 .....         | 40 |
| 三、生物大分子的提取 .....             | 41 |
| 四、生物大分子的分离纯化 .....           | 42 |
| 五、提纯后的处理 .....               | 49 |
| <b>第八章 核酸分子杂交</b> .....      | 51 |
| 一、基本原理 .....                 | 51 |
| 二、探针 .....                   | 51 |
| 三、杂交滤膜 .....                 | 52 |
| 四、杂交条件 .....                 | 52 |
| 五、常见分子杂交的种类 .....            | 53 |
| <b>第九章 重组 DNA 技术</b> .....   | 54 |
| 一、目的 DNA 片段的取得 .....         | 54 |
| 二、DNA 片段和载体的连接 .....         | 54 |
| 三、导入宿主细胞 .....               | 55 |
| 四、筛选 .....                   | 55 |
| 五、基因表达 .....                 | 55 |
| <b>第十章 聚合酶链反应(PCR)</b> ..... | 57 |
| 一、基本原理 .....                 | 57 |
| 二、基本步骤 .....                 | 57 |
| 三、几种重要的 PCR 衍生技术 .....       | 57 |
| 四、影响因素 .....                 | 58 |
| <b>第十一章 细胞培养技术</b> .....     | 61 |
| 一、细胞培养的基本设备及准备工作 .....       | 61 |
| 二、细胞培养用液及培养基(液) .....        | 65 |
| 三、细胞培养的基本技术 .....            | 68 |

### 第三篇 生物化学与分子生物学实验

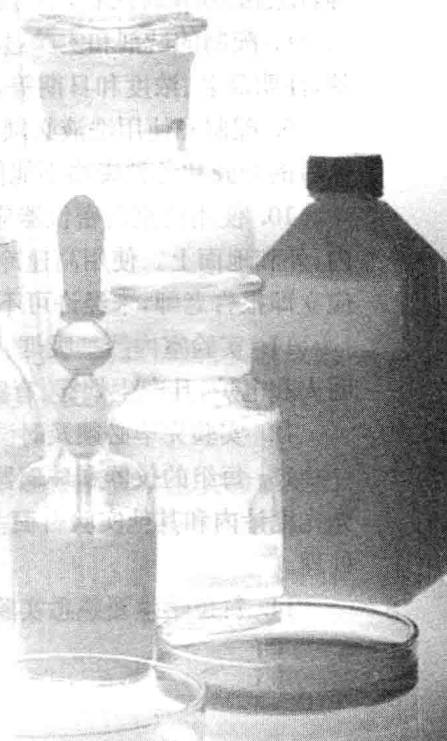
|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| <b>第十二章 理论验证实验</b> .....           | 72 |
| 实验一 蛋白质含量测定 .....                  | 72 |
| 一、双缩脲法测定蛋白质浓度 .....                | 72 |
| 二、Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质浓度 ..... | 73 |
| 三、紫外分光光度法测定蛋白质浓度 .....             | 74 |
| 四、考马斯(Comessie)亮蓝结合法测定蛋白质浓度 .....  | 75 |
| 五、BCA 法测定蛋白质浓度 .....               | 76 |
| 实验二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳 .....            | 77 |
| 实验三 维生素 C 含量测定 .....               | 79 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| 一、总维生素 C 含量测定——2,4-二硝基苯肼法 .....   | 79  |
| 二、还原型维生素 C 含量测定 .....             | 81  |
| 实验四 脲酶 $K_m$ 值简易测定 .....          | 82  |
| 实验五 激素对血糖浓度的影响 .....              | 84  |
| 实验六 血清谷丙转氨酶(ALT)活性测定(赖氏法) .....   | 87  |
| 实验七 血清总胆固醇的测定 .....               | 88  |
| 一、硫磷铁法 .....                      | 88  |
| 二、血清总胆固醇的测定(邻苯二甲醛法) .....         | 90  |
| 三、血清胆固醇的定量测定(醋酸酐法) .....          | 91  |
| 实验八 血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳 .....            | 92  |
| 实验九 SDS-PAGE 测定蛋白质的分子量 .....      | 93  |
| 实验十 DNA 琼脂糖凝胶电泳 .....             | 96  |
| 实验十一 聚合酶链反应(PCR)体外扩增 DNA .....    | 98  |
| 实验十二 质粒 DNA 的提取、制备与检测 .....       | 101 |
| <b>第十三章 综合分析实验</b> .....          | 104 |
| 实验一 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化 .....         | 104 |
| 实验二 血清清蛋白的分离、提纯和定量 .....          | 106 |
| 实验三 组织 DNA 与 RNA 的分离、提纯和定量 .....  | 109 |
| 实验四 血清高密度脂蛋白中胆固醇的测定 .....         | 112 |
| 实验五 细胞基因组 DNA 的提取与检测 .....        | 114 |
| 一、细胞基因组 DNA 的提取 .....             | 114 |
| 二、提取 DNA 鉴定 .....                 | 115 |
| 三、DNA 分子量大小鉴定 .....               | 116 |
| 实验六 反转录聚合酶链反应(RT-PCR) .....       | 116 |
| 实验七 DNA 的限制性酶切与琼脂糖凝胶电泳 .....      | 119 |
| 实验八 DNA 重组实验 .....                | 121 |
| 实验九 重组克隆的筛选 .....                 | 124 |
| 实验十 蛋白质免疫印迹分析(Western blot) ..... | 126 |
| 实验十一 Southern 印迹杂交 .....          | 130 |
| 实验十二 Northern 印迹杂交 .....          | 133 |
| <b>第十四章 创新性实验</b> .....           | 137 |
| 实验一 蛋白质或酶的分离纯化 .....              | 137 |
| 实验二 饥饿和饱食对肝糖原含量的影响 .....          | 137 |
| 实验三 乙型肝炎病毒 DNA 的检测 .....          | 138 |
| 实验四 血清(浆)过氧化脂质测定 .....            | 138 |
| 实验五 血友病的分子诊断 .....                | 139 |
| 实验六 RNA 干扰技术靶向沉默目的基因 .....        | 140 |
| <b>第十五章 设计性实验</b> .....           | 141 |
| 实验一 组织蛋白的提取及含量测定 .....            | 141 |
| 实验二 天然产物中多糖的提取、纯化与鉴定 .....        | 142 |

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 实验三 蛋白质的表达、分离、纯化和鉴定.....           | 143 |
| 设计方案 I 蛋白质的表达、分离、纯化.....           | 144 |
| 设计方案 II 蛋白质的鉴定.....                | 145 |
| 实验四 比较不同组织中 DNA 的含量和纯度 .....       | 147 |
| 实验五 蛋白质的两性反应和等电点测定.....            | 147 |
| 实验六 血清中胆固醇及甘油三酯的测定.....            | 148 |
| 设计方案 I 血清甘油三酯简易测定法.....            | 148 |
| 设计方案 II 血清甘油三酯的测定(GPO-PAP 法) ..... | 149 |
| 参考文献.....                          | 152 |

## 第一篇

# 生物化学与分子生物学实验基本知识



# 第一章

## 生物化学与分子生物学实验室规则与基本要求



### 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。

2. 课前预先分好实验小组,每组推选组长一人。上课时,组别和座位应相对稳定,保持良好的课堂秩序。

3. 上实验课时,不得迟到早退,也不得提前进入实验室自行摆弄仪器装置。

4. 实验时自觉遵守实验室纪律,不虐待实验动物,保持室内安静,禁止大声说笑和喧哗。

5. 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。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。

6. 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,药品称完后立即盖好瓶盖放回药品架,严禁瓶盖及药勺混杂,切勿使药品(尤其是氢氧化钠)洒落在天平或实验台面上,毛刷用后必须立即挂好,各种器皿不得丢弃在水池内。

7. 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老师要求进行回收,价格昂贵的 Sephadex、Sephadex 凝胶和 DEAE 纤维素等,用后必须及时回收,不得丢弃。

8. 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,注明品名、浓度和日期等,放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液,必须严密封口。

9. 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按比例稀释后排放。电泳后的凝胶和各种废物不能倒入水池,只能倒入废物桶。

10. 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老师,未经许可不得自己随意检修。

11. 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,均应在通风橱内进行。

12. 实验完毕必须及时洗净并放好各种玻璃仪器,保持实验台面和实验柜内的清洁。

13. 每组的仪器和玻璃器皿要用油漆编号,严禁使用其他组仪器,不得将器皿遗弃在分光光度计内和其他实验台面上,损坏玻璃仪器要及时向教师报告,并自觉登记,按规定进行处理。

14. 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。

15. 实验完毕,实验组长应组织同学协助老师清理仪器装置,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、实验记录及实验报告的书写

### (一) 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科学作风的一个重要方面。

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,熟悉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,不得撕毁和涂改,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。记录本的左侧页作计算和草稿用,右侧页作预习报告和实验记录用。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,切勿潦草以致日后无法辨认。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数据的记录,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、生产厂家等;生物材料的来源、形态特征、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,必须每人都做记录。

### (二) 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和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。实验报告的格式应为:

1. 实验名称。

2. 实验目的。

3. 实验原理(简述实验的基本原理)。

4. 实验步骤(可以采用流程图的方式或以表格方式表示)。

5. 数据处理。

6. 结果与讨论 描述实验出现的现象和结果,分析它们所说明的问题,探讨实验成败的关键因素,阐述对实验设计的改进意见等。对于定量实验列出算式进行计算,并对实验结果进行必要的说明和分析。

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纸张。

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,仔细地观察,特别注意那些未想到的实验现象是十分重要的,这些观察常常会得到意外的发现,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,一目了然,以便比较。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的几次方。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,充分运用自己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,特别是对实验提出改进意见。

### 三、实验误差的产生及提高实验准确度的方法

#### (一) 实验误差

生化分析常需要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、酶等进行定量测定。在进行定量分析测定的过程中,由于受分析方法、测量仪器、所用试剂和分析工作者等方面的限制,很难使测量值与客观存在的真实值完全一致,即分析过程的误差是客观存在的。作为分析工作者不仅要测定试样中待测组成的含量,还应对测定结果作出评价,判断它的准确度和可靠性程度,找出产生误差的原因,并采取有效措施减少误差,使所得的结果尽可能准确地反映试样中待测组分的真实含量。

1. 准确度和误差 准确度表示实验分析测定值与真实值相接近的程度,因测定值与真实值之间的差值为误差,所以误差愈小,测定值愈准确,即准确度愈高,误差可用绝对误差和相对误差表示。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值} - \text{真实值}$$

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

例如:用分析天平称得两种蛋白物质的重量各为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

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

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

它们的相对误差应分别为-0.005%和-0.05%

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

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

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,当被称量物体的重量较大时,称量的准确度就高,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。

2. 精确度与偏差 在分析测定中,测试者常在相同条件下,对同一试样进行多次重复

测定(称平行测定),所得结果不完全一致,每一测定值与真实值都有差别,但若取它们的平均值,就有可能更接近真实值,如果多次重复的测定值比较接近,表示测定结果的精确度较高。

精确度表示在相同条件下,进行多次实验的测定值相近的程度,一般用偏差来衡量分析结果的精确度,偏差也有绝对偏差和相对偏差两种表示方法。

绝对偏差=个别测定值-算术平均值(不计正负号)

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

当然和误差的表示方法一样,用相对偏差来表示精密度比用绝对偏差更有意义。

在实验中,对某一样品通常进行多次平行测定,求得其算术平均值,作为该样品分析结果。对于该结果的精密度则有多种表示方法,这里介绍常用的两种方法。

(1)平均绝对偏差和平均相对偏差表示法

例: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%             |

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\%}{5} = 0.2\%$$

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

测定结果可用 16.0±0.2%表示。

(2)标准差法

例:测定血清钙含量,重复六次,结果分别为 9.90mg%、9.96mg%、9.94mg%、9.96mg%、9.90mg%、9.90mg%,精密度计算如下:

- 1)首先求其算术平均值。
- 2)然后求平均值的绝对偏差:绝对偏差=每次测定值-平均值。
- 3)求出标准偏差:结果表示“用平均值±标准差”,即 9.93±0.03mg%。

应该指出,准确度和精确度、误差和偏差具有不同的含义,不能混为一谈,准确度是表示测定值与真实值相符合程度,用误差来衡量,误差越小,测定准确度愈高。精确度则表示在相同条件下多次重复测定值相符合程度,用偏差来衡量,偏差愈小,测定的精确度愈好。

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,用精确度来评价分析的结果是有一定的局限性的。分析结果的精确度很高(即平均相对误差很小),并不一定说明实验

的准确度也很高。因为如果分析过程存在系统误差,可能并不影响每次测得数值之间的重合程度,即不影响精确度,但此分析结果却必然偏高真实值,也就是分析的准确度并不一定很高。当然,如果精确度也不高,则无准确度而言,所以精确度是保证准确度的先决条件。在实际分析中,首先要求良好的精确度,测定的精确度越好,得到准确度结果的可能性就越大,通常进行分析时,对同一试样,必须用同样方法,在同一条件下,由同一个人操作,做几个平行测定,取平均值,测定次数越多,平均值越接近真实值。

## (二) 误差来源

由于所有的测量都可能产生误差,故应了解这些误差的可能来源。一般根据误差的性质和来源,将误差分为系统误差(可测误差)和偶然误差(随机误差)两类。

1. 系统误差 与分析结果的准确度有关,是由分析过程中某些经常发生的原因所造成的。对分析结果的影响比较稳定。在重复测定时,常常重复出现。系统误差的来源主要有:

(1)方法误差:由分析方法本身所造成的,如容量分析中等当点和滴定终点不完全符合。

(2)仪器误差:因仪器本身不够精密所造成的,如天平、砝码、量器等不够准确。

(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。

2. 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,这些因素是时隐时现的。

## (三) 提高实验准确度的方法

提高分析结果的准确度就必须减少测定中的系统误差和偶然误差。

1. 减少系统误差常采取下列措施

(1)标准物对照:在任何测试中,甚至在使用标定仪器和基准试剂时,都应使用待测物质的标准溶液。这种做法能对方法的准确度提供一种有用的检查,因为测量所得的数据必须落在真实值范围之内。标准溶液应与待测溶液用完全相同的方法处理,此时可以画出一条能够指示用浓度测量物质质量变的标准曲线,从待测溶液得到的测定值应落在标准曲线范围之内,然后读出测定数值;或者取标准物某一确定浓度的溶液与待测液以同样的方法,在相同条件下平行测定(标准物的组成最好与待测液相似,含量也相近),得平均值  $\bar{X}_{\text{标}}$ 。

标准物的已知浓度常视为真实值  $\mu$ ,用  $t$ -检验法检验  $\bar{X}_{\text{标}}$  与  $\mu$  之间是否有显著性差异,即检验所采用的测定方法是否有系统误差。如果有系统误差,需对待测液的测定值加以校正。计算方法如下:

$$\bar{X}_{\text{标}}/\mu = \bar{X}_{\text{未}}/X_{\text{未}}, \text{ 则 } X_{\text{未}} = \bar{X}_{\text{未}}/\bar{X}_{\text{标}} \times \mu$$

其中,  $\bar{X}_{\text{未}}$  为待测液测定值的平均值,  $\mu$  作为校正系数。测定值经校正后,即可消除测定中的系统误差。

(2)设置空白试验:在任何测量实验中,都应设置空白溶液作为对照,以消除由于试剂中含有干扰杂质或溶液对器皿的侵蚀等所产生的系统误差。用等体积的蒸馏水代替待测液,并严格按照待测液和标准液相同的方法及条件同时进行平行测定,所得结果称为空白值,它是由所用的试剂而不是待测物质所造成的。将待测物的分析结果扣除空白值,就可以得到比较准确的结果。

空白值一般不应过大,特别在微量分析测定时,如果空白值太大,应将试剂加以纯化和改用其他适当的器皿。

(3)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),添加到待测的未知样品中,与待测的未知样品同时作平行测定。测得的添加标准物量与实际所取的标准物量之比的百分率就称为回收率。这种由标准样品测得的回收率可以用来检验、表达某些分析过程的系统误差,因为系统误差愈大,回收率愈低。

(4)仪器校正:仪器不准确引起的系统误差可以通过仪器校正来减少。为此,应该经常对测量仪器(如砝码、天平、容量器等)进行预先校正,以减少误差,并在计算实验结果时用校正值。

总之,在分析测定工作中,应该注意合理安排实验系统,以尽量减少系统误差或使系统误差在测定中不起主要作用。

## 2. 为减少偶然误差,一般采取以下措施

(1)平均取样:根据实验要求并考虑生物材料的特殊性如动物的种属、年龄、性别、生长状态及饲养条件,选取动、植物某一新鲜组织制成匀浆后取样,细菌通常制成悬浮液,经玻璃珠打散摇匀后,再量取一定体积的菌体样品。固体样品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,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。

除以上两类误差外,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”,在计算算术平均值时,此种数值应弃去不用。

## (四) 数据处理

对实验中所得到的一系列数值,采取适当的方法进行整理、分析,才能准确地反映出被研究对象的数量关系。在生化实验中,通常采用列表法或作图法来表示实验结果,以使结果表达得清楚、明了,而且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的有效数字,必要时应计算出误差值。

2. 作图法 实验所得到的一系列数据之间的关系及其变化情况,可以用图像直观的表现出来。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,可能不通过所有的点,而要求线两旁偏离的点分布均匀。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五个以上的点,否则便没有意义。

(姜艳霞)

## 第二章

# 生物化学与分子生物学实验基本操作



### 一、玻璃器皿的洗涤与清洁

#### (一) 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”或“微克”计的,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)是否彻底清洗干净是非常重要的。

1. 新购玻璃仪器的清洗 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 4 小时),再用自来水冲洗,最后用无离子水冲洗两次,在 100~120℃ 烘箱内烘干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器:如试管、烧杯、量筒等普通玻璃仪器,可直接用毛刷蘸清洁剂刷洗,然后用自来水冲洗,直至容器壁不挂水珠即可。最后用少量蒸馏水冲洗内壁 2~3 次,倒置晾干即可。

容量分析仪器:容量瓶、滴定管及吸量管等容量仪器,用后用自来水多次冲洗,如能清洁(内壁不挂水珠),再用蒸馏水少量冲洗 2~3 次,晾干即可。若仍不干净(如附有油污等),则必须于干后放入铬酸洗液内浸泡数小时,然后倒净洗液(或捞出),用自来水充分冲洗至水不显黄色后再冲几次,最后用少量蒸馏水冲洗 2~3 次,晾干备用。

3. 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。只能用洗液或 1%~2% 的去污剂浸泡,然后用自来水冲洗,这时使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。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

#### (二) 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、1mol/L KOH 和无离子水清洗,然后用 3~10mol/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,可用 0.5% 的去污剂清洗,然后依次用自来水和无离子水洗净即可。

#### (三) 洗液的配制

因铬有致癌作用,因此配制和使用洗液时要极为小心,常用的两种配制方法如下:

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,储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  $80^{\circ}\text{C}$ ,待其冷却后储存于磨口玻璃瓶内。

#### (四) 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。

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( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )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 是蛋白质的良好溶剂,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。

#### (五) 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,一般来说洗净后的玻璃仪器,如不急用应倒放在晾架上令其自然干燥。若有急用可放在烘烤箱中  $110\sim 120^{\circ}\text{C}$  烤干,但容量玻璃仪器,如容量瓶、吸量管、滴定管以及烧结、结构复杂的玻璃仪器等,严禁烘烤。此类仪器,如急用可采用水泵抽气法干燥。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。

## 二、常用玻璃仪器的使用

### (一) 吸量管

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,测定的准确度和吸量管的正确选择和使用有密切关系。常用的吸量管可以分为三类:

1. 刻度吸量管 刻度吸量管是多刻度吸量管,供量取 10ml 以下任意体积的溶液,有 0.1ml、0.2ml、0.5ml、1.0ml、2.0ml、5.0ml、10.0ml 等规格。吸量管刻度所标的数字有自上而下和自下而上两种,使用之前应仔细分辨。有“快”字则为快流式,有“吹”字则为吹出式,无“吹”的吸管不可将管尖的残留液吹出。吸、放溶液前要用吸水纸擦拭管尖外壁。

2. 移液管 常用来量取 50ml、25ml、10ml、5ml、2ml、1ml 的液体,这种吸量管只有一个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15 秒,注意管尖残留液体不要吹出。

3. 奥氏吸量管 在量取黏度较大的液体如血液、血清等时,应当使用奥氏吸管。这种吸管也是单标的,并且在其下端有一个膨大部分。所以液体与吸管表面接触面积较小,当量取血液时,较其他种吸管准确。奥氏吸管的容量包括遗留在尖端的液体,故在缓缓使液体流出后,再停留数秒钟,吹出最后一滴。在学生实验中常用的有 0.5ml、1.0ml、2.0ml、3.0ml 等规格。