



全国高等农林院校“十三五”规划教材



生物化学 研究技术

马艳琴
杨致芬
◎ 主编

SHENGWU HUAXUE
YANJIU JISHU

 中国农业出版社

全国高等农林院校“十三五”规划教材

前 言

单 各 员 人 官 编

生物化学研究技术

马艳琴 杨致芬 主编

中国农业出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学研究技术 / 马艳琴, 杨致芬主编. —北京:
中国农业出版社, 2019. 8
全国高等农林院校“十三五”规划教材
ISBN 978-7-109-25725-2

I. ①生… II. ①马… ②杨… III. ①生物化学-高
等学校-教材 IV. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 153515 号

中国农业出版社

地址: 北京市朝阳区麦子店街 18 号楼

邮编: 100125

责任编辑: 宋美仙 文字编辑: 徐志平

版式设计: 杜 然 责任校对: 刘丽香

印刷: 北京万友印刷有限公司

版次: 2019 年 8 月第 1 版

印次: 2019 年 8 月北京第 1 次印刷

发行: 新华书店北京发行所

开本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 10.75

字数: 252 千字

定价: 24.80 元

版权所有·侵权必究

凡购买本社图书, 如有印装质量问题, 我社负责调换。

服务电话: 010-59195115 010-59194918

编写人员名单

主 编 马艳琴 杨致芬

副主编 李 丽 陈水红

编 者 (按姓氏笔画排序)

马 镒 (沈阳农业大学)

马艳琴 (山西农业大学)

王 彬 (宁夏大学)

李 丽 (山西农业大学)

杨致芬 (山西农业大学)

杨致荣 (山西农业大学)

陈水红 (塔里木大学)

赵成萍 (山西农业大学)

高建华 (山西农业大学)

前 言

生物化学研究技术是生命科学领域各学科必不可少的研究手段，渗透到农业、医药、食品等各个领域。因此，掌握生物化学研究技术的基本原理和方法，不仅可以加强学生对生物化学基本理论的进一步理解，而且可以为学生以后的学习以及生产、科研工作打下牢固的基础。

本教材以生物化学中常用的研究技术为框架，主要包括一般知识、离心技术、沉淀与浓缩技术、电泳技术、层析技术、分光光度技术和滴定技术等内容。在阐明各类技术基本原理的同时，还列举了数个应用该技术解决实际农业研究问题的基础实验，各院校可根据专业需要进行选做。另外，本教材在第八章还列举了酶的提取、纯化与活性测定，DNA 提取、扩增与分子杂交等综合性实验，涵盖了多种生物化学实验技术，有利于培养学生对所学知识的综合运用能力和创新实践能力。

本教材由长期工作在生物化学教学与科研一线的教师共同编写，所阐述的诸多应用实例和实验方法经过多年教学实践检验，并逐步得到完善，具有简明、精炼、实用的特点。教材中各章分别由杨致芬（第一章）、陈水红（第二章）、马镛（第三章）、王彬（第四章）、高建华（第五章）、杨致荣（第六章）、李丽（第七章）、马艳琴（第八章）、赵成萍（附录）编写，由马艳琴、杨致芬统稿、定稿。

本教材不仅适用于综合性院校及农林、师范院校等相关专业的本科生和研究生使用，还可供从事生物化学教学与研究工作的有关人员参考。由于经验和水平有限，在编写过程中仍有不足之处，真诚希望广大读者在参考使用过程中反馈意见和建议，使其日臻完善。

编 者

2019年5月

目 录

前言	1
第一章 概论	1
第一节 一般知识	1
一、玻璃仪器的洗涤	1
二、试剂、试剂的浓度及配制	2
三、实验记录、实验数据的整理和实验报告	3
四、实验的准确度和精密度的	4
第二节 材料的选择与处理	6
一、材料的选择	6
二、材料的预处理	6
三、细胞破碎	7
第三节 悬浮介质的选择原则	8
一、维持渗透压	8
二、维持 pH	8
三、消除有害因素	10
四、保持溶液一定的极性和离子强度	10
五、温度	10
第四节 实验方案的确定	11
第二章 离心技术	12
第一节 离心的基本原理	12
第二节 离心机	14
一、制备离心机	14
二、分析离心机	15
三、转头	15
四、离心机的操作和注意事项	16
第三节 常用离心技术	17
一、沉淀离心	17
二、差速离心	17
三、密度梯度离心	18

第四节 应用实例	20
一、叶绿体的分离与制备	20
二、线粒体的分离与制备	21
第三章 沉淀与浓缩技术	24
第一节 沉淀技术	24
一、沉淀技术的基本原理	24
二、盐析法	25
三、有机溶剂沉淀法	28
第二节 浓缩技术	30
一、沉淀浓缩法	30
二、吸附法	30
三、超过滤法	30
四、减压蒸馏浓缩法	31
五、冷冻干燥法	31
第三节 应用实例	31
一、酵母 RNA 的分离提取	31
二、动物组织中核酸的提取与鉴定	33
三、质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定	35
四、蛋白质的两性性质及等电点的测定	37
第四章 电泳技术	39
第一节 概述	39
一、泳动度	39
二、影响泳动度的外界因素	39
三、电泳技术的分类	40
四、电泳技术相关仪器	41
第二节 常用电泳技术	42
一、纸电泳和醋酸纤维素薄膜电泳	42
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	42
三、SDS-PAGE	45
四、琼脂糖凝胶电泳	46
五、等电聚焦电泳	46
六、双向电泳	47
第三节 染色方法	47
一、蛋白质染色方法	47
二、核酸染色方法	49

三、糖蛋白染色方法	50
第四节 应用实例	52
一、醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	52
二、醋酸纤维素薄膜电泳分离腺苷酸	54
三、聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离过氧化物酶同工酶	55
四、SDS-PAGE 测定超氧化物歧化酶的相对分子质量	57
第五章 层析技术	59
第一节 概述	59
一、层析技术的原理和分类	59
二、层析的常用术语	59
三、柱层析的设备与操作	60
四、薄层层析的设备与操作	62
第二节 凝胶过滤	63
一、凝胶过滤的基本原理	63
二、常用凝胶过滤材料	65
三、凝胶过滤的操作	67
四、凝胶过滤法的应用	69
五、应用实例	69
第三节 分配层析	71
一、分配层析的基本原理	71
二、影响迁移率的因素	72
三、应用实例	72
第四节 吸附层析	75
一、吸附层析的基本原理	75
二、吸附剂	75
三、洗脱液	76
四、应用实例——植物组织中可溶性糖的硅胶 G 薄层层析	77
第五节 离子交换层析	78
一、离子交换层析的基本原理	78
二、离子交换剂	79
三、离子交换层析的操作	81
四、应用实例——血清免疫球蛋白 G 的分离纯化及鉴定	83
第六节 亲和层析	85
一、亲和层析的基本原理	85
二、亲和层析的操作	86
第七节 气相色谱	87

一、气相色谱仪的基本装置和分析流程	87
二、气相色谱的基本原理	88
第八节 高效液相色谱	88
第六章 分光光度技术	90
第一节 概述	90
第二节 分光光度计的构造及使用	90
一、分光光度计的一般构造	90
二、721 型分光光度计	92
三、紫外-可见分光光度计	92
第三节 应用实例	93
一、糖的定量测定	93
二、血液中葡萄糖的测定(福林-吴宪氏法)	99
三、蛋白质含量的测定	101
四、花椰菜 DNA 的提取与二苯胺显色法测定 DNA 的含量	107
五、淀粉酶活性的测定	109
六、转氨酶活性的测定(金氏法)	111
七、过氧化氢酶活性的测定	114
八、乳酸脱氢酶活性的测定	115
九、酵母发酵过程中无机磷的利用	118
十、植物组织中丙二醛含量的测定	119
十一、脯氨酸含量的测定	120
十二、血清总脂的测定(香草醛法)	122
十三、生物组织中固醇含量的测定(磷硫铁法)	123
第七章 滴定技术	126
第一节 概述	126
一、滴定分析法的概念	126
二、滴定技术的分类	126
第二节 应用实例	127
一、维生素 C 含量的测定	127
二、植物呼吸酶活性的测定	131
三、过氧化氢酶活性的测定	134
第八章 生物化学技术的综合应用	136
第一节 酶活性的测定	136
一、酶的专一性及影响酶促反应速度的因素	136

二、琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制作用的观察	138
三、大蒜中 SOD 的提取、纯化及活性测定	139
第二节 植物基因组 DNA 的提取	144
第三节 PCR 技术扩增 DNA 片段	145
第四节 DNA 琼脂糖凝胶电泳	146
第五节 Southern 杂交	146
附录	149
一、常用的基本单位	149
二、常用化合物的性质	151
三、常用缓冲液的配制	152
参考文献	161

第一节 一般知识

一、化学仪器的洗涤

玻璃仪器是生物化学实验操作的主要工具，其清洁与否直接影响实验的结果。在操作过程中，每个人都应养成保持仪器清洁、放置整齐的习惯。

(一) 一般玻璃仪器

一般玻璃仪器如试管、烧杯和锥形瓶等，可用自来水冲洗去污物，将其浸于洗衣粉或肥皂水中，用毛刷蘸自来水由外至里、由内向外刷洗(也可用毛刷蘸洗衣粉刷洗)。然后用自来水冲净刷壁上不洁水珠为止。检查时，无水珠表示洗涤干净。应重复洗涤，最后用少量蒸馏水冲洗2~3次。对待测样品瓶应十分小心地晾干或用烘箱烘干。

(二) 量筒和滴定管

量筒和滴定管如使用、测定管、锥形瓶和锥形瓶等，使用后应立即用自来水冲洗以除去残留物。冲洗时，应小心冲洗，防止玻璃仪器上干燥。晾干后，将其浸泡于碳酸钠溶液中4~6h以除去油污。取出后用自来水冲洗干净，检查时，无水珠表示洗涤干净。如已洗净，再用蒸馏水冲洗2~3次。对待测样品瓶应十分小心地晾干或用烘箱烘干。

(三) 洗液液

实验室中除用水、洗衣粉和肥皂外，还可使用一些化合物的溶液洗涤玻璃仪器。这类溶液称为洗液。其种类很多，常用的有铬酸洗液和重铬酸钾洗液。

1. 铬酸洗液 铬酸洗液是一种强氧化剂，能溶解有机物。它是实验室中使用最广泛的一种洗液。常用的铬酸洗液配方如下：

配方(1)：称取重铬酸钾10g，溶于100ml水中，再缓慢加入300ml浓硫酸，边加边搅拌。若中速搅拌过高，则先加一半浓硫酸，冷却后再加另一半。

配方(2)：称取重铬酸钾5g，溶于50ml水中，可缓慢加入浓硫酸100ml，冷却后即可使用。

铬酸洗液具有强氧化作用，对皮肤、衣服等要避生为之接触。铬酸洗液应保存在密封容器中。使用时，可将玻璃仪器浸泡其中。不洁物从玻璃仪器上脱落，玻璃仪器洗成无色。

第一章 概 论

生物化学技术是随着现代生物、物理和化学的发展而逐步形成的适用于生物化学研究的方法。在生物化学研究过程中,需要制备、纯化物质,也需要定性、定量地测定有机体中的各种成分,这些工作的完成依赖于生物化学技术。各种生物化学技术有各自的原理和操作方法,但每种技术的实施都包括取样、预处理和样品制备等步骤。各种技术的应用都要求有温和的条件、接近体内的环境;要消除各种有害因素,尽可能保持研究对象原有的生物活性。本章就是讨论进行生物化学研究时涉及的普遍性内容。

第一节 一般知识

一、玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器是生物化学技术操作时的主要工具,其清洁与否直接影响实验的结果。在操作过程中,每个人都应养成保持仪器清洁、放置整齐的习惯。

(一) 一般玻璃仪器

一般玻璃仪器如试管、烧杯和锥形瓶等,洗涤时先用自来水冲去污物,将其浸于洗衣粉或肥皂水中,用毛刷细心地刷洗内外壁(也可用毛刷抹肥皂或洗衣粉刷洗)。然后用自来水冲洗至器壁上不沾水珠为止。若器壁上沾有水珠表示未洗干净,应重复洗涤。最后用少量蒸馏水冲洗2~3次。将洗净的器皿倒置于干净处晾干或用烘箱烤干。

(二) 量度玻璃仪器

量度玻璃仪器如吸管、滴定管、量筒和容量瓶等,使用后应立即用清水冲洗以除去残留物质,千万勿使残留物质在玻璃仪器上干燥。晾干后,将其浸泡于铬酸洗涤液中4~6h或过夜。然后用水充分冲洗,并查看是否洗净(方法同前)。如已洗净,再用蒸馏水冲洗2~3次。除吸管可烘干外,其他量度玻璃仪器只能倒置晾干。

(三) 洗涤液

实验室中除用水、洗衣粉和肥皂外,还可使用一些化合物的溶液洗涤玻璃仪器,这类溶液称为洗涤液,其种类很多,现就常用的几种洗涤液做简要介绍。

1. 铬酸洗液 铬酸洗液又称为重铬酸钾-硫酸洗液。这是实验室中使用最广泛的一种洗涤液。常用的铬酸洗液配方如下:

① 配方1:称取重铬酸钾50g,溶于100mL水中,再慢慢加入400mL浓硫酸,边加边搅拌。若中途温度过高,则先暂停待稍冷后再加。冷却后即可使用。

② 配方2:称取重铬酸钾5g,溶于5mL水中,再慢慢加入浓硫酸100mL。冷却后即可使用。

铬酸洗液具有强烈的腐蚀性,皮肤、衣物等要避免与之接触。铬酸洗液应保存在密封容器中,以防吸水。良好的铬酸洗液呈褐红色。若铬酸洗液颜色变成黑绿色,则表示洗液已失

效，无氧化能力，应更换。

2. 10%~20%尿素溶液 此洗涤液是蛋白质的良好溶剂，用以洗涤盛过蛋白质样品或溶液的器皿。

3. 硝酸洗涤液 水和浓硝酸按 1 : 1 比例配成硝酸洗涤液，用以洗涤二氧化碳测定仪等。

二、试剂、试剂的浓度及配制

试剂是进行实验必不可少的，因此有必要掌握有关试剂的等级、配制等知识。

(一) 试剂纯度的等级标准

我国的化学试剂（通用试剂）共分为四级，即优级纯、分析纯、化学纯和实验试剂。另外还有专门用途的专用试剂，如高纯试剂、色谱纯试剂、生化试剂、指示剂等，这些试剂只有一个级别。常见试剂的级别、英文代号及适用范围见表 1-1。

表 1-1 常见试剂的级别、英文代号及适用范围

纯度等级	英文代号	瓶签颜色	级别	适用范围
优级纯	GR	绿色	一级	纯度较高，主要用于精密的科学实验和分析实验
分析纯	AR	红色	二级	纯度稍差，用于一般科学实验和分析实验
化学纯	CP	蓝色	三级	用于要求不高的分析检验及制备
实验试剂	LR	黄色	四级	用于一般的实验和要求不高的科学实验

(二) 试剂的浓度及其配制

实验室中常用的试剂，通常以水为溶剂，有时也以有机溶剂为溶剂。表示溶液浓度的方式有多种，如物质的量浓度、质量浓度等。常见溶液浓度的表示方式及其配制方法如下。

1. 物质的量浓度 物质的量浓度表示在 1 L (1 000 mL) 溶液中含有溶质的物质的量 (mol)，用 mol/L 表示。配制方法：称取一定质量的试剂溶于溶剂中，最后定容到 1 000 mL。若溶质有结晶水，计算质量时应考虑在内。例如要配制 0.1 mol/L Na_2HPO_4 溶液，应称取 17.805 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （其相对分子质量为 178.05），先用少量水溶解，最后定容到 1 000 mL。

2. 质量浓度 质量浓度表示在单位体积溶液中含有溶质的质量，一般用 g/L 表示。配制方法：称取一定质量的溶质，用溶剂溶解后稀释到一定的体积。例如要配制 10 g/L NaOH 溶液，即称取 10 g NaOH 先溶入少量蒸馏水中，再稀释至 1 L，或称取 1 g NaOH，将其溶入少量蒸馏水中再稀释至 100 mL。

3. 质量分数浓度 质量分数浓度表示一定质量的溶液中含有溶质的质量，用百分数表示。例如要配制 10% NaCl 溶液，则称取 10 g NaCl，将其加到 90 g 蒸馏水中溶解即可。

4. 体积分数浓度 体积分数浓度表示在一定体积溶液中含有溶质的体积，用百分数表示。例如要配制 50% 乙醇，则量取 50 mL 无水乙醇，用蒸馏水稀释至 100 mL。

5. 以体积比表示的浓度 以体积比表示的浓度是指溶液中溶质与溶剂的相对量，在色谱溶剂系统中常用。用 (V+V) 表示。例如配制乙醇 (2+1)，即取 2 份体积的无水乙醇，加入 1 份体积的水；配制乙醇-乙酸-水 (1+2+1)，即取 1 份体积的无水乙醇、2 份体积的

乙酸和 1 份体积的水相混合。

三、实验记录、实验数据的整理和实验报告

(一) 实验记录

实验前必须认真预习,弄清实验目的、原理和操作步骤,准备好便于保存的记录本,将实验中观察到的现象、结果和数据及时地记在记录本上。原始记录必须准确、详尽、清楚。记录时,应正确记录实验结果,切忌夹杂主观因素,这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象,应如实、仔细地记录下来。在定量分析实验中观测的数据,如称量物的质量、滴定管的读数、分光光度计的读数等,都应设计一定的表格记下正确的读数,并根据仪器的精确度准确地记录有效数据。例如吸光度值为 0.050,不应写成 0.05。实验中所用仪器的型号及试剂的规格、化学式、相对分子质量、溶液浓度等,都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找失败原因的参考依据。如对记录结果有怀疑,或记录结果遗漏、丢失,必须重做实验。

(二) 实验数据的整理

对实验得到的数值应根据实验的目的,采取科学合理的方法进行整理分析,求出数值间量的关系,确切而明显地表达出实验的结果。在生物化学实验中常用的数据整理方法有列表法、作图法等。

1. 列表法 列表法是测得值的初步整理方法,即将实验所得各数据用适当的表格列出。通常数据的名称和单位写在标题栏内,表中只填写数据。数据应正确反映测定的有效数字,必要时应计算出误差值。通过列表法能初步反映出量间的关系。

2. 作图法 实验所得的一系列数值,为了求出它们之间的关系和变化情况,可以用图直观地表现出来。作图时可以用坐标纸手绘图,也可以通过 Excel、GraphPad Prism 等软件制作。

(三) 实验报告

实验结束后,要及时整理实验数据,总结实验结果,并对结果进行分析,写出实验报告。实验报告书写可参照下列格式。

实验编号及实验名称

实验者姓名:

班级:

实验日期:

(1) 实验目的和要求

(2) 实验原理

(3) 仪器、试剂和材料

(4) 实验操作步骤

(5) 实验结果(包括数据处理)

(6) 结果分析与讨论

(7) 思考题

在实验报告中,实验目的和要求、实验原理及操作步骤部分可简单扼要叙述,但对于实验条件和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分,应根据实验的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比,并尽量总结成各种图表。另外,还应针对实验结果进行必要的分析。实验讨论部分可以包括关于实验方法(或操作技术)和

有关实验的一些问题的探讨,对实验的异常结果、异常现象以及思考题的探讨,对实验设计的认识、体会和建议,对实验项目的改进意见等。

四、实验的准确度和精密度

在生物化学分析工作中,无论怎样谨慎操作,测定结果总会产生误差,那么怎样评价实验的精确性呢?实验的精确性通常用准确度和精密度来衡量。掌握实验的准确度和精密度,是进行分析工作的基础。

(一) 实验误差及准确度

在实际的分析工作中,由于仪器的性能、实验的技巧以及化学反应是否完全等原因,测得的结果往往不是客观的真实值,只是与真实值接近,所以测得的结果称为近似值。近似值与真实值之间的差别称为误差。近似值比真实值大时误差为正,近似值比真实值小时误差为负。表示误差的方法有绝对误差和相对误差。

1. 绝对误差 近似值与真实值之间的差值称为绝对误差。以 A 表示真实值, a 表示近似值, r 表示绝对误差, 则

$$r = a - A$$

2. 相对误差 绝对误差占真实值的百分数为相对误差。相对误差用 R 表示, 即

$$R = \frac{a - A}{A} \times 100\% = \frac{r}{A} \times 100\%$$

显然,绝对误差与被测量有关,绝对误差不能全面反映问题,应该用相对误差表示分析结果的准确度。

(二) 系统误差

根据误差产生的原因和性质,误差可分为系统误差和偶然误差。系统误差是由分析过程中经常性的因素造成的,在每次测定中都比较稳定地重复出现,它与分析结果的准确度有关。偶然误差是指在某项测定中由于偶然因素引起的误差。

1. 系统误差产生的原因

(1) 方法误差 方法误差是由于分析方法本身造成的误差。如容量分析中等电点和滴定终点不完全符合等。

(2) 仪器误差 仪器误差是由于仪器不够精密,或未进行校正所造成的误差。

(3) 试剂误差 试剂误差是由于试剂或蒸馏水不纯造成的误差。

(4) 操作误差 操作误差是由不同操作者对实验条件控制不同造成的。如不同操作者对滴定终点的颜色判断不同等。同时在操作中,不可避免地要有损耗和污染,如吸管,用得再精心也免不了有少量样品粘壁而损耗,用滤纸过滤也是如此。

由于上述种种原因引起的系统误差,其特点是无论重复做多少次实验,都是经常反复出现,同真实值之间的差距是比较一定的。

由于系统误差对分析结果的影响比较稳定,重复测定可以重复出现,因此可以设法减少误差。

2. 系统误差的减少 系统误差的减少常采用下列措施:

(1) 校正仪器 对所用的测量仪器(如砝码、容量仪器)进行校正,以减少系统误差。

(2) 做空白试验 由于试剂中含有影响测定结果的杂质或试剂侵蚀器皿等可导致误差,

可用做空白试验来校正。其方法是用空白样品（即不含被测物的试剂溶液）与被测样品在完全相同的条件下进行测定，最后用被测样品所得的测定值减去空白试验的测定值，可以得到比较准确的结果。

应该指出，由于真实值是无法知道的，因此在实际工作中无法求出真正的准确度，只能用精密度来评价分析的结果。

（三）偶然误差与精密度

1. 偶然误差 如前所述，偶然误差是由偶然因素引起的，这些因素时隐时现，如仪器的临时故障、天平两侧温度不一、电压不稳定、取样不均匀等。另外，操作不细心也是出现偶然误差的原因之一，如量取溶液后吸管外侧擦得不干净，或放出液体的速度不均匀等。偶然误差的大小通常用精密度来衡量。

2. 精密度 精密度是指对同一样品在同一条件下多次测定结果之间接近的程度。同一样品的一系列测定值越接近，精密度越高，表明偶然误差越小。若同一样品的一系列测定值相差较大，则说明其精密度低，偶然误差较大。

精密度一般用偏差来表示。偏差分为绝对偏差和相对偏差。

绝对偏差 = |个别测定值 - 测定值的算术平均值|

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

精密度的表示法同误差的表示法一样，用相对偏差比绝对偏差更有意义。

在实验中，对某一样品通常须进行多次平行测定，求得其算术平均值，作为该样品的测定结果。对于该结果的精密度则有多种表示方法，可用平均绝对偏差和平均相对偏差表示。

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{\sum \text{个别测定值的绝对偏差}}{\text{测定次数}}$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{\text{平均绝对偏差}}{\text{测定值的算术平均值}}$$

在实验中，有时只做两次测定，精密度可用下式计算：

$$\text{精密度} = \frac{\text{两次测定结果的差值}}{\text{平均值}} \times 100\%$$

不同的实验方法允许误差的要求不同。如用滴定法对同一样品进行平行测定时，各测定之间的允许误差不应超过 0.2%。

利用绝对偏差 (d) 和测定次数 (n) 可计算标准偏差 (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

标准偏差表示所测定的这些样品中待测物的含量变化范围，这是生物统计学中一种精密度的表示方法。标准偏差越小，表示样品中各个测定值的变异度（集中或分散的程度）越小，数据越精确，其结果可以用平均值 (\bar{X}) \pm 标准偏差 (SD) 来表示。

3. 偶然误差的减少 偶然误差与分析结果的精密度有关，它来源于难以预料和不固定的因素。为了减少偶然误差，一般采取如下措施。

(1) 均匀取样 动植物新鲜组织可制成匀浆后取样；细菌通常制成悬液，经玻璃球打散摇匀后，再量取一定的菌体样品进行分析；固体样品极不均匀，应于取样前进行粉碎、

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。平均测定的次数越多,其平均误差就越小。

因错误操作导致的误差称为过失误差。过失误差的数值应弃去不用。

在实际分析工作中,应根据准确度的要求选择测量手段。例如,要求准确到 0.1 g,则只需使用台秤,不必使用分析天平。若需要较高的准确度,又无合适的仪器设备,则可用提高样品用量的方法来达到目的。

第二节 材料的选择与处理

一、材料的选择

实验是否能达到预期的目的,材料的选择是关键因素之一。实验的目的不同,材料选择的原则就不同,取样的方法也不同。生物化学实验的具体目的有多种,但概括起来有两种:一种是通过制备而获得一定纯化的物质,这种实验称为制备性实验;另一种是通过定性定量分析,了解生物体的代谢状况、样品品质等,这种实验称为分析性实验。

对于制备性实验来讲,应选欲提取成分含量高、来源丰富易得、新鲜、目标成分易分离提取的材料。在实践过程中,要抓主要矛盾,全面分析,综合考虑。

对于分析性实验来讲,材料的选择应根据研究目的来确定。比如研究光合作用,要取植物的叶片;研究品质变化,要取生物体的可食部分。

采集的样品,必须经处理后才能用于分析,处理分为材料的预处理和细胞破碎两个步骤。

二、材料的预处理

不同的材料,预处理方法不同。

(一) 动物材料的预处理

对于动物组织,必须选择欲提取成分含量丰富的脏器、组织为原料,然后进行去皮、去筋、绞碎、匀浆、脱脂等处理。预处理好的材料,若不立即用于实验,应放入液氮或用超低温冷冻保存。对于一些小组织,可置于丙酮液中脱水,待其干燥后磨粉贮存备用。

(二) 植物样品的预处理

1. 种子样品的处理 一般种子样品去除杂质后,再进行研磨、粉碎,通过孔径为 150~180 μm 的试验筛,混合均匀保存,贴上标签,注明样品的采集地点、处理、采样日期和采样人姓名。若长期保存还要蜡封,并在容器内放入一点樟脑或对位二氯甲苯,防止虫、菌的破坏作用。而对于像芝麻、蓖麻、亚麻等油料作物的种子,为了测定其含油量,不能用粉碎机,只能用研钵、匀浆器或其切成薄片作为原料备用。

2. 根、茎、叶、果实等新鲜样品的处理 采回的新鲜样品,要经过净化、杀青、烘干(或风干)等一系列预处理才能存放。

(1) 净化 采回的新鲜样品,如果混有泥土等杂质,应用柔软湿布擦净,不要用水冲洗。但是对大批量的样品,可用水冲洗干净。

(2) 杀青 为了保持样品的化学成分不发生转变或损耗,需将样品在 105 $^{\circ}\text{C}$ 杀青 15~20 min,终止样品中酶的活动。

(3) 烘干 样品经杀青后,立即降低烘箱温度,维持在 $70\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至样品烘干为止(含水量 $<10\%$)。干燥样品的根、茎、叶、果实均要进行粉碎、过筛。

(三) 微生物样品的预处理

微生物由于其本身的优点,常作为制备大分子物质的主要材料。当选用的微生物菌种培养一段时间后,用离心方法收集其上清液。经浓缩后可用于制备细胞外有效成分。收集的菌体经破细胞处理后,即可以从中提取有效成分。若培养液和菌体不立即使用,前者可置于低温下短时间贮存,后者可制成冻干粉,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存数月不会变质。

三、细胞破碎

细胞破碎的方法有很多,包括机械破碎法、物理破碎法、化学及生物化学破碎法等。不同的实验规模、不同的实验材料和实验要求,使用的破碎方法和条件也不同。一些坚韧组织,如动物的肌肉、植物的根茎等,常常需要强烈的搅拌或研磨作用,才能将其组织细胞破碎;比较柔软的组织,如肝、脑等组织,用普通的玻璃匀浆器即可达到完全破坏细胞的目的。

(一) 机械破碎法

通过机械运动所产生的剪切力作用,使细胞破碎的方法称为机械破碎法。常用的机械破碎法有组织捣碎法、研磨破碎法和匀浆器破碎法。

1. 组织捣碎法 此法利用捣碎机的高速旋转叶片所产生的剪切力将组织细胞破碎,一般用于动物内脏组织、植物肉质种子、柔嫩的叶芽等比较脆嫩的组织细胞的破碎,旋转叶片的转速可高达 $10\ 000\text{ r/min}$ 以上。此法也可用于微生物细胞的破碎,但破碎时须加石英砂才有效。此法主要用于工业上和实验室,但捣碎期间要注意降温。

2. 研磨破碎法 此法利用研钵、石磨、球磨、珠磨机等研磨器械的剪切力将组织细胞破碎,多用于细菌或其他坚硬的植物材料的破碎。为了提高研磨效果,研磨时常加入少量石英砂、玻璃粉或其他研磨剂。此法温和、简单,适用于实验室内少量样品的处理。

3. 匀浆器破碎法 此法利用匀浆器所产生的剪切力将组织细胞破碎。匀浆器一般由硬质磨砂玻璃制成。匀浆器的细胞破碎程度比组织捣碎机高,而其剪切力对生物大分子的破坏较小,且匀浆过程中蛋白质或酶降解的可能性很小,所以是实验室细胞破碎首选的方法之一。

(二) 物理破碎法

通过温度、压力、超声波等物理因素的作用使细胞破碎的方法,称为物理破碎法。物理破碎法多用于微生物细胞的破碎。常用的物理破碎法有反复冻融破碎法、温度差破碎法、压力差破碎法和超声波破碎法。

1. 反复冻融破碎法 把样品置于低温($-20\sim -15\text{ }^{\circ}\text{C}$)下冰冻一段时间,然后取出,在室温(或 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$)下迅速融化。如此反复冻融多次,细胞可在形成冰粒和增高剩余细胞液浓度的同时,发生溶胀、破碎。

2. 温度差破碎法 利用温度的骤然变化使细胞因热胀冷缩的作用而破碎的方法称为温度差破碎法。样品为病毒或细菌时可用此法。操作时,将在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻的材料投入沸水中,或将较高温度的热细胞突然冷冻,都可使细胞破碎。

3. 压力差破碎法 通过压力的变化使细胞破碎的方法称为压力差破碎法。常用的压力