



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学与分子生物学实验技术

主编 杨安钢 刘新平 药立波



高等教育出版社
Higher Education Press

要點容內



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物化学与分子生物学实验技术

主 编 杨安钢 刘新平 药立波

副主编 张 斌 孔 英 段秋红

编 者(以姓氏笔画为序)

于晓光(哈尔滨医科大学)

孔 英(大连医科大学)

王天云(新乡医学院)

王梁华(第二军医大学)

方定志(四川大学)

刘新平(第四军医大学)

杨安钢(第四军医大学)

张 斌(第四军医大学)

药立波(第四军医大学)

林建银(福建医科大学)

周俊宜(中山大学)

段秋红(华中科技大学)

曾麒燕(广西医科大学)



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

本教材分为三个部分;第一部分为生物化学与分子生物学常用的基本技术理论,包括分光光度技术、液相色谱技术、电泳技术、离心技术、荧光分析技术、蛋白质分离与制备技术、DNA 重组技术、重组 DNA 的表达技术、核酸杂交技术、聚合酶链反应技术、蛋白质结构与功能研究的手段以及生物信息学分析等。第二部分为生物化学与分子生物学实验,其中包括蛋白质、酶的基本定性定量实验、代谢实验以及 DNA 重组实验,具有简单、实用的特点。第一部分的大多数技术在这些实验中得到了应用和体现。第三部分是附录,汇集了生物化学与分子生物学常用的数据和资料,便于查阅。

本教材可作为高等学校医学类专业五、八年制本科生生化实验课程教材,也可供相关专业的青年教师和研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术/杨安钢,刘新平,药立波主编. —北京:高等教育出版社,2008. 6

ISBN 978-7-04-024274-4

I. 生… II. ①杨… ②刘… ③药… 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. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第067701号

策划编辑	冯娟	责任编辑	薛玥	封面设计	张楠	责任绘图	尹莉
版式设计	史新薇	责任校对	朱惠芳	责任印制	尤静		

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100120
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京京科印刷有限公司

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landracom.com>
<http://www.landracom.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16
印 张 18
字 数 430 000

版 次 2008年6月第 1 版
印 次 2008年6月第 1 次印刷
定 价 28.10 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 24274-00

前 言

20 世纪 70 年代以来,以重组 DNA 技术为代表的现代生物化学与分子生物学研究技术飞速发展,为生物化学与分子生物学理论的发展注入了新的生机与活力,没有这些重要技术革命性的进步就不会有重要理论的突破。因此生物化学与分子生物学技术理论已成为高等医学院校基础医学教学的重要课程。现代生物化学与分子生物学技术理论的教学目的已经不再单纯是为理论课或后续课程打基础,而是通过这门课的教学拓展学生视野,激发学生学习热情与好奇心,将学生培养成基础知识扎实、知识面宽、适应性强、有创新意识和团结协作能力的高素质人才。

本书分为三个部分;第一部分为生物化学与分子生物学常用的基本技术理论,包括分光光度技术、液相色谱技术、电泳技术、离心技术、荧光分析技术、蛋白质分离与制备技术、DNA 重组技术、重组 DNA 的表达技术、核酸杂交技术、聚合酶链反应技术、蛋白质结构与功能研究的手段以及生物信息学分析的基本方法等 12 章,作为各个院校安排集体讲座和学生自修的基本教材。第二部分为生物化学与分子生物学实验,其中包括蛋白质、酶的基本定性定量实验、代谢实验以及 DNA 重组实验,这些实验内容大多是目前许多院校正在应用的,具有简单、实用效果好的特点。第一部分中的大多数技术在这些实验中得到了应用和体现;这些实验可供各院校实验教学时选用。第三部分是附录,汇集了生物化学与分子生物学常用的数据和资料,便于同学们在实际应用中查阅。

本书由第四军医大学、第二军医大学、大连医科大学、华中科技大学同济医学院、四川大学基础医学与法医学院、福建医科大学、广西医科大学、哈尔滨医科大学、中山大学、新乡医学院的多位老师共同完成,是大家互相学习、愉快合作的结果。

在本书的编写过程中,第四军医大学训练部的领导给予了积极的经济支持。在本书的校改过程中,第四军医大学生物化学与分子生物学教研室陈南春高级实验师和李霞副教授对全部内容做了大量认真细致的校对工作,王景媛秘书在绘制全书的插图及全文格式编排方面付出了大量的劳动,在此一并向他们表示衷心感谢。

杨安钢 刘新平 张 斌

2007 年 12 月 1 日

目 录

第1章 分光光度技术	1	五、离子交换色谱的应用	27
第一节 基本原理	1	第四节 亲和色谱	27
一、光的基本知识	1	一、亲和色谱的基本原理	27
二、朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律	2	二、亲和吸附剂	28
第二节 分光光度计结构简介	3	三、亲和色谱的基本操作	29
一、光源	3	四、亲和色谱的应用	30
二、分光系统(单色器)	4	第五节 高效液相色谱	31
三、狭缝	4	一、高效液相色谱基本原理及特点	31
四、比色杯	4	二、高效液相色谱流程及设备	32
五、检测器系统	4	三、高效液相色谱技术的分类与应用	33
第三节 分光光度技术的应用	5	四、快速蛋白液相色谱(FPLC)	34
一、测定溶液中物质的含量	5	思考题	35
二、用紫外光谱鉴定化合物	5	参考文献	35
第四节 分光光度法的误差	6	第3章 电泳技术	36
第五节 常见国产分光光度计的使用	6	第一节 基本原理	37
一、721型分光光度计	6	第二节 影响电泳的因素	38
二、751型分光光度计	7	一、溶液的pH	38
三、使用分光光度计的注意事项	8	二、溶液的离子强度	38
思考题	9	三、电场强度	38
参考文献	9	四、电渗现象	39
第2章 液相色谱技术	10	五、支持介质的筛孔	39
第一节 色谱原理及基本装置	11	第三节 电泳的种类和应用	39
一、色谱的基本理论	11	一、醋酸纤维薄膜电泳	39
二、柱色谱的基本装置及基本操作	13	二、琼脂糖凝胶电泳	40
第二节 凝胶色谱	14	三、聚丙烯酰胺凝胶电泳	41
一、凝胶过滤的原理	14	四、等电聚焦	45
二、相关概念和基本参数	15	五、毛细管电泳	45
三、凝胶的分类	16	六、双向电泳	46
四、凝胶色谱的操作	19	七、变性梯度凝胶电泳	48
五、凝胶色谱的应用	21	第四节 电泳后大分子的检测	49
第三节 离子交换色谱	22	一、染色显示法	49
一、基本原理	22	二、微量光密度计测定法	51
二、离子交换剂的类型及性质	23	思考题	51
三、离子交换剂的选择	25	参考文献	51
四、离子交换色谱的操作要点	25	第4章 离心技术	52

第一节 离心作用的基本原理	52	第二节 选择材料及预处理	75
一、离心力	52	第三节 细胞的破碎及细胞器的分离	75
二、相对离心力	52	一、细胞的破碎	75
三、沉降速度	53	二、细胞器的分离	76
四、沉降系数	53	第四节 蛋白质的提取、分离与纯化	77
五、沉降时间	54	一、蛋白质(包括酶)的提取	77
六、K 系数	54	二、蛋白质的分离与纯化	78
第二节 离心机的类型	54	第五节 蛋白质定量及纯度分析	84
一、制备型离心机	54	一、蛋白质定量	84
二、分析型离心机	55	二、蛋白质纯度鉴定	86
第三节 制备型超速离心的分离方法	56	第六节 蛋白质相对分子质量测定	87
一、差速沉降离心法	56	一、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定	
二、密度梯度区带离心法	56	蛋白质的相对分子质量	87
第四节 离心机使用原则及注意事项	58	二、凝胶过滤法测定蛋白质的相对分	
思考题	59	子质量	87
参考文献	59	三、沉降法(超速离心法)	87
第 5 章 荧光分析技术	60	第七节 蛋白质的浓缩、干燥及贮存	88
第一节 荧光的基本知识	60	一、样品的浓缩	88
一、荧光的发光原理	60	二、干燥	89
二、荧光色素的性质	60	三、贮存	89
三、荧光的淬灭及抗淬灭	62	思考题	90
四、常用的荧光染料(探针)	62	参考文献	90
第二节 免疫荧光细胞化学和荧光原位		第 7 章 DNA 重组技术	91
杂交技术	64	第一节 核酸的提取	92
一、免疫荧光细胞化学技术	64	一、DNA 的提取	92
二、荧光原位杂交	65	二、RNA 的提取	92
三、荧光显微镜	66	三、核酸的纯化	92
第三节 流式细胞术	67	四、核酸的浓缩	93
一、流式细胞仪的基本结构和工作		五、核酸定量及纯度分析	93
原理	67	第二节 目的基因的获取	93
二、流式细胞术的应用	68	一、直接从染色体中分离	93
第四节 实时荧光定量 PCR 技术	69	二、化学合成法	93
一、荧光定量化学原理	69	三、RT-PCR	93
二、荧光定量 PCR 仪的光学原理	70	四、构建基因组文库及 cDNA 文库	94
三、荧光定量原理	70	五、聚合酶链反应	94
四、样品制备及操作	71	第三节 分子克隆载体与宿主细胞的选择	94
五、主要用途	72	一、质粒	95
思考题	72	二、噬菌体	95
参考文献	73	三、噬菌粒	96
第 6 章 蛋白质分离与制备技术	74	四、黏粒	97
第一节 概述	74	五、DNA 病毒载体 SV40	97
		六、反转录病毒载体	97

七、宿主细胞	98
第四节 分子克隆常用的工具酶	98
一、限制性核酸内切酶	99
二、DNA 聚合酶	99
三、DNA 连接酶	100
四、末端脱氧核苷酸转移酶	100
五、核酸酶	100
六、脱氧核糖核酸酶	100
七、碱性磷酸酶	100
第五节 限制性内切酶对 DNA 的酶切及片段回收	100
一、限制性内切酶的选择	101
二、限制性内切酶的酶切	101
三、琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 片段的回收	102
四、琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的纯化	103
第六节 外源基因与载体的连接	103
第七节 重组 DNA 导入宿主细胞	104
一、大肠杆菌的转化	104
二、电脉冲穿孔法转化大肠杆菌	105
第八节 含重组质粒的宿主菌落的筛选与鉴定	105
一、利用宿主细胞遗传表型的改变进行筛选	105
二、根据重组子分子结构特性进行鉴定	106
思考题	107
参考文献	107
第 8 章 重组 DNA 的表达技术	108
第一节 大肠杆菌表达系统	108
一、大肠杆菌表达载体的构成	108
二、常用的大肠杆菌表达载体	110
三、在大肠杆菌中高效表达外源蛋白的策略	115
四、表达产物的检测	116
五、原核表达系统的优缺点	116
第二节 真核细胞表达系统	118
一、哺乳动物细胞表达载体	118
二、哺乳动物细胞的基因导入	123
三、表达产物的鉴定	124
四、其他真核表达系统	124

思考题	124
参考文献	125
第 9 章 核酸杂交技术	126
第一节 核酸杂交的基本理论	126
一、DNA 变性	126
二、DNA 复性	127
三、核酸分子杂交	127
第二节 核酸探针及其标记	128
一、核酸探针的种类及应用	128
二、标记物的应用及选择	129
第三节 核酸探针的标记方法	131
一、缺口平移法	131
二、随机引物法	131
三、用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5' 末端	131
四、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段快速标记 DNA 探针末端	132
五、非放射性物质标记核酸	132
第四节 核酸分子杂交方法	134
一、核酸分子杂交的类型	134
二、核酸分子杂交实验因素的优化	138
第五节 DNA 芯片技术	141
思考题	142
参考文献	143
第 10 章 聚合酶链反应技术	144
第一节 PCR 技术基本原理、特点及影响因素	144
一、PCR 技术的基本原理	144
二、PCR 技术的基本特点	144
三、影响 PCR 反应的因素	146
第二节 PCR 的基本步骤	147
第三节 PCR 反应条件的优化	148
一、PCR 反应条件的常规优化方法	148
二、降落 PCR	149
第四节 PCR 引物设计	149
一、PCR 引物设计的基本原则	149
二、引物设计软件	150
第五节 反转录 PCR 技术	150
一、反转录 PCR 技术的基本原理	150
二、反转录 PCR 的基本步骤	150
三、反转录 PCR 的影响因素	151

第六节 PCR 技术的应用	151	实验二 血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离	
一、PCR 技术在分子生物学领域的		纯化及鉴定	183
应用	151	一、分离纯化	183
二、PCR 技术在临床医学领域的		二、醋酸纤维素薄膜电泳	187
应用	153	实验三 蛋白质的定量实验	190
思考题	154	一、紫外吸收法	190
参考文献	154	二、劳里法(Lowry 法)	191
第 11 章 蛋白质结构与功能研究的		三、染料法	192
手段	155	实验四 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测	
第一节 蛋白质结构分析	155	定蛋白质相对分子质量	193
一、蛋白质一级结构——氨基酸组成与		实验五 蛋白质印迹分析	198
序列测定	156	实验六 碱性磷酸酶的分离纯化及比活	
二、蛋白质的高级结构分析	159	性的测定	200
第二节 蛋白质功能研究	160	实验七 酶的特异性及温度、pH 对酶活	
一、蛋白质-蛋白质相互作用的研究		性的影响	204
方法	161	一、酶的特异性	204
二、蛋白质-DNA 相互作用的研究		二、温度对酶活性的影响	205
方法	164	三、pH 对酶活性的影响	205
第三节 蛋白质功能研究的其他策略	165	实验八 碱性磷酸酶的 K_m 值测定及磷酸	
一、蛋白质芯片技术	165	盐对碱性磷酸酶的抑制作用	207
二、质谱在大规模蛋白质相互作用		一、碱性磷酸酶的 K_m 值测定	207
分析中的应用	165	二、磷酸盐对碱性磷酸酶的抑制	
三、串联亲和纯化	166	作用	208
四、纳米技术	167	实验九 脲酶 K_m 值简易测定	210
五、RNA 干扰	167	实验十 乳酸脱氢酶同工酶分析	212
六、miRNA	169	实验十一 乳酸脱氢酶及辅酶的作用	214
思考题	170	实验十二 激素对血糖的调节	216
参考文献	170	激素对血糖浓度的影响(葡萄糖氧化	
第 12 章 生物信息学分析的基本方法	171	酶法)	216
第一节 核酸和蛋白质数据库	171	实验十三 血清转氨酶活性的测定	217
一、核酸序列数据库	171	实验十四 血清总胆固醇测定(硫磷	
二、蛋白质序列数据库	174	铁法)	220
第二节 综合信息检索系统	174	实验十五 尿素氮测定及回收率	221
第三节 序列比对分析	176	实验第二部分 分子生物学实验	224
第四节 生物信息学数据库的数据挖掘	178	实验十六 载体的选择和制备	224
思考题	179	质粒 DNA 的制备与纯化	224
参考文献	179	实验十七 DNA 的纯度、浓度和构象	
实验第一部分 生物化学实验	180	分析	226
实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	180	实验十八 目的基因的获取	229
一、蛋白质的加热变性凝固	180	一、DNA 为模板的 PCR 扩增实验	229
二、蛋白质沉淀反应	180	二、RT-PCR——mRNA 反转录生成	
		cDNA	231

实验十九 DNA 的限制性内切酶消化	233	附录二 生物化学常用试剂的配制及	
实验二十 DNA 片段回收	235	参数	250
实验二十一 DNA 片段的连接反应	237	一、常用缓冲溶液的配制	250
实验二十二 用重组质粒 DNA 转化大肠		二、百分浓度酸、碱溶液的配制	253
杆菌	238	三、易变质及需要特殊方法保存的	
实验二十三 含重组质粒的细菌菌落的		试剂	253
鉴定	240	四、常用酸碱相对密度和浓度的	
实验二十四 地高辛精标记核酸探针的		关系	254
斑点杂交及免疫检测	242	五、冷却剂和干燥剂	254
实验二十五 生物信息学分析基本方法		六、色谱法常用资料	256
实验	244	七、常用放射性核素及测量单位	259
附录一 实验须知	245	八、离心机转数	260
一、实验室规则	245	九、基本单位的词头	260
二、实验室常识	245	十、常用药品中英文对照及其分子式和	
三、实验室安全	246	相对分子质量	261
四、实验室急救	246	附录三 分子生物学实验中常用的数据	
五、移液器的使用及注意事项	247	资料	267
六、玻璃仪器的清洗及各种洗涤液的		一、常用的数据资料	267
配制	248	二、常用贮存液的配制	270

第 1 章 分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度技术(分光光度法)主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。分光光度法是比色法的发展。比色法只限于在可见光区,分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比色法用的单色光通过滤光片产生,谱带宽度从 40~120 nm,精度不高,而分光光度法则要求近于真正单色光,其光谱带宽最大不超过 3~5 nm,在紫外光区可到 1 nm 以下。单色光通过棱镜或光栅产生,具有较高的精度。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光量子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c/\nu$$

式中 λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $(299\,770 \pm 4) \text{ km/s}$ 。光属于电磁波(表 1-1)。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长	来 源
γ 射线	$10^{-3} \sim 10^{-1} \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-1} \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外线	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外线	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见光	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外线	$0.76 \sim 50 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动与分子转动
远红外线	$50 \sim 1\,000 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动与分子转动
微波	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子转动
无线电波	$1 \sim 1\,000 \text{ m}$	核磁共振

二、朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律

自然界中存在各种不同波长的电磁波,列表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200 nm 至 10 μm (1 μm =1 000 nm)。其中 200~400 nm 为紫外光区,400~760 nm 为可见光区,760~10 000 nm 为红外光区。

朗伯-比尔定律是比色分析的基本原理,这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

1. 朗伯定律

一束单色光通过溶液后,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就要减弱;若溶液浓度不变,则溶液的厚度愈大(即光在溶液中所经过的途径愈长),光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度),通过液层厚为 L 的溶液后,光的强度为 I_t (透过光的强度),则 I_t/I_0 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,称为透射比(transmittance),用 T 表示,又称透光率。透射比随溶液厚度的增加而减少,但实践证明,透射比和溶液厚度间并不存在简单的定量关系,只有透射比的负对数($-\lg T$)才随着溶液厚度的增加而成正比地增加,即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L \quad (1.1)$$

将上述比例式写成等式,得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L \quad (1.2)$$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度(A)(absorbance),又称为消光度(E)(degree of extinction)或光密度(D)(optical density)。所以

$$A = K_1 L \quad (1.3)$$

式中 K_1 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

式(1.3)表明,当溶液的浓度不变时,吸光度与溶液液层的厚度成正比,这就是朗伯定律。

2. 比尔定律

当一束单色光通过有色溶液后,溶液液层的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则透射光的强度愈弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 c \quad (1.4)$$

$$A = K_2 c$$

式中 c 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和液层的厚度,以及溶液的温度等。

式(1.4)表明,当溶液液层的厚度不变时,吸光度与溶液的浓度成正比,这就是比尔定律。

3. 朗伯-比尔定律

如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来,得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K L c \quad (1.5)$$

$$A = K L c$$

即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比,这就是朗伯-比尔定律。

式(1.5)中,若 L 用厘米表示, c 用摩/升表示,比例常数 K 称为吸光系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和温度等,而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用 cm 表示, c 用 mol/L 表示,则上式中的比例常数用 K 表示,得到

$$A = K L c \quad (1.6)$$

式中 K 称为物质的摩尔吸收系数(molar absorption coefficient),其值相当于 $L = 1 \text{ cm}$, $c = 1 \text{ mol/L}$ 时,在一定波长下的吸光度,它是物质的特性常数。

$$A = K L c = K \times 1 \times 1 = K \quad (1.7)$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其摩尔吸收系数不一定相同。 K 值愈大,说明该物质溶液对光吸收愈强烈,则比色测定的灵敏度愈高。

第二节 分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来,并测量其强度的仪器称为分光光度计。

分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用(全波段)分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池、检测器系统。如图 1-1 所示。

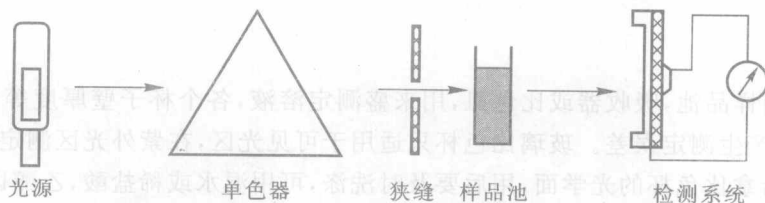


图 1-1 分光光度计组成部分

一、光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤

钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320~2 000 nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360~1 000 nm,稳定性好,用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400 nm 的紫外线,可用作紫外光区分光光度计的光源。红外线光源则由纳恩斯特(Nernst)棒产生,此棒由 $ZrO_2:Y_2O_3=17:3$ (Zr 为锆,Y 为钇)或 Y_2O_3,GeO_2 (Ge 为锗)及 ThO_2 (Th 为钍)之混合物制成。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处,一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,如换用的灯型不同,还需要调节灯座的位置和焦距,氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

二、分光系统(单色器)

单色器是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置,由棱镜或光栅构成。

用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185~4 000 nm,在紫外光区有较好的分辨力,而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧越差(图 1-2)。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度在紫外光区可达到 0.2 nm,而在长波段只能达到 5 nm。

有的分光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻画许多平行线,刻线处不透光,于是通过光的干涉和衍射现象,波长较长的光波偏折的角度大,较短的光波偏折的角度小,因而形成光谱。

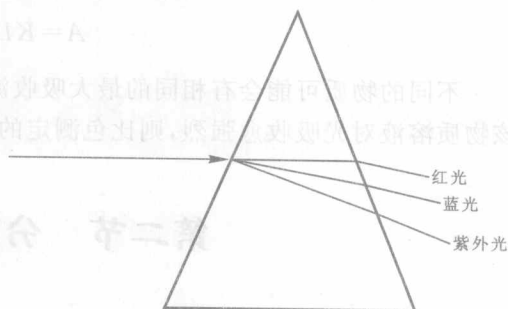


图 1-2 棱镜分光器

三、狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨力。狭缝可在 0~2 nm 宽度内调节,由于棱镜色散力随波长不同而变化,较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

四、比色杯

比色杯也叫样品池,吸收器或比色皿,用来盛测定溶液,各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等,否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要用石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面,用后要及时洗涤,可用温水或稀盐酸,乙醇以至铬酸洗液(在浓酸中浸泡时不要超过 15 min),表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

五、检测器系统

有许多金属能在光的照射下产生电流,光愈强电流愈大,此即光电效应。因光照射而产生的电流叫做光电流。受光器有两种,一是光电池,二是光电管。光电池的组成种类繁多,最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流较强,可直接用微电流计量出。但是,当连续照射一段

时间后会产生疲劳现象而使光电流下降,要在暗中放置一段时间才能恢复。因此使用时不宜长期照射,随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属(多为碱土金属的氧化物)作成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中的电子发射出来。光愈强,光波的振幅愈大,电子放出愈多。电子是带负电的,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,所以需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管,在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多,这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机联用等,数字输出则通过模拟/数字转换装置,如数字式电压表等进行。

第三节 分光光度技术的应用

一、测定溶液中物质的含量

可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液(浓度已知的溶液)和未知液(浓度待测定的溶液)的吸光度,将两者进行比较。由于所用吸收池的厚度是一样的,可用下式进行计算。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{Kc_xL}{Kc_sL} = \frac{c_x}{c_s}, \quad \text{即 } c_x = \frac{A_x}{A_s} \times c_s \quad (1.8)$$

式中 c_x 代表未知液的浓度, c_s 代表标准液的浓度, A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值,式中只有 c_x 是未知的,可由上式计算得之。

也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度,绘制标准曲线,在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线,然后测定出未知液的吸光度,即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长,这样做有两个好处:① 灵敏度高,物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异;② 可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸收系数(K)求得测定物质的浓度,由于物质的 K 是已知的,读取光径(液层厚度)为 1 cm 时溶液的吸光率(A),则可以用下式计算溶液中物质的浓度(c):

$$c = \frac{A}{K} \quad (1.9)$$

式(1.9)常在紫外光吸收法时应用,无需显色反应,操作方便。

二、用紫外光谱鉴定化合物

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液,测定此溶液对每一种单色光的吸光度,然后以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制吸光度—波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线,因此,用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外吸收光谱比较简单,同一种物质的紫外吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外,单独依靠紫外吸收光谱不能决定一个未知物的结构,必须与其他方法配合。紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

第四节 分光光度法的误差

在分光光度法中,即使将各种因素都控制好,对于浓度过大或过小的样品,误差仍然很大。因为浓度过大的样品,其吸光度过高,影响检测器的灵敏度,且读数标尺刻度的精度差,误差亦大,故难以准确。浓度过低的样品,其吸光度小,因与仪器本身因素有关,也容易引起检测器标尺上的读数误差。例如,光源波动的影响:当光源强度改变1%、吸光度为1.0时,只有0.4%的误差,但在吸光度为0.045时,则可产生9.6%的误差。实际上,在整个透射比(或吸光率)范围的不同部分均有不同的误差。从理论上推算,相对误差的最小的部分在透射比为36.8%处(或吸光率为0.4343处),故通常认为测定值在吸光率0.20~0.80范围内(透射比为20%~65%)误差较小,超出此范围,相对误差均会增大。

影响分光光度法精确度的主要原因还有光谱纯度。分光光度计应能正确选出光源光谱中所需部分波长作为入射光,一般应保持光谱带宽度在10 nm以下,如果测定样品有很狭窄的吸收峰,就必须有更小的光谱宽度,所以分光光度计大多均有可调的狭缝。在实际使用中,用较大狭缝虽可提高重现性,但由于加大了光谱宽度,反而降低了准确度。

散射光也是引起误差的重要因素。这里所说的散射光是指一切未经测定溶液吸收,而又落到检测器上引起干扰的光,如室内自然光,经过某些漏洞进入仪器而明显增大了透光度,故高灵敏度的分光光度计宜安装在光线较暗的室内。散射光也包括能透过比色皿的非测定需要的其他波长的光,实际上是光谱不纯,但因效果与散射光一样,故也称为散射光干扰。散射光干扰对高浓度测定特别有害,能使吸光度降低,标准曲线的高浓度部分向下弯曲。

第五节 常见国产分光光度计的使用

一、721型分光光度计

721型分光光度计是一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计,其波长范围为360~800 nm,在410~710 nm的灵敏度较好(图1-3)。

使用方法如下:

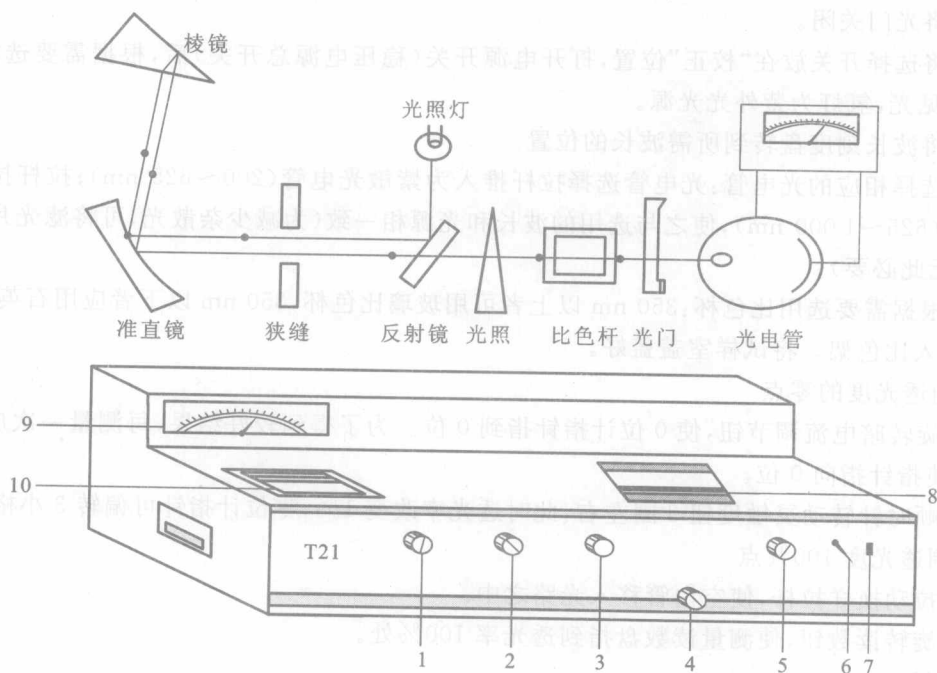


图 1-3 721 型分光光度计原理图和仪器图

1. 波长选择钮；2. “0”电位钮；3. “100”电位钮；4. 比色杯拉杆；5. 灵敏选择钮；
6. 电源开关；7. 光源指示灯；8. 暗箱盖；9. 读数表；10. 波长读数窗

1. 灵敏度选择钮放在“1”挡(如调不到“0”时选用较高的挡)。
2. 转动波长选择钮,选用所需的波长。
3. 接通电源(指示灯亮)。
4. 揭开比色杯暗箱盖,转动“0”电位钮,使电表指针对准 $T=0$ 处。
5. 将比色杯放入比色杯架,使空白管对向光路,盖好比色杯暗箱盖。转动“100”电位钮,调准电表指针,使之指向 $A=0$ ($T=100$) 处。
6. 拉动比色杯架的拉杆,使测定杯进入光路,迅速从电表上读取吸光度值,记录。测读过程中,随时推回拉杆到原位,使空白杯进入光路,并转动“100”电位钮,使指针回到 $A=0$ 处。
7. 比色完毕后,关上电源开关,取出比色杯,将比色杯暗箱盖好,清洗比色杯并晾干。

二、751 型分光光度计

751 型分光光度计是一种可供在紫外光到红外光区 ($200 \sim 1\,000\text{ nm}$) 测量吸收光谱的较高级分光光度计。在波长 $320 \sim 1\,000\text{ nm}$ 范围内,用钨丝白炽灯泡作光源,在波长 $200 \sim 320\text{ nm}$ 范围内,用氢灯作光源。此型分光光度计操作较复杂,操作时务必要按操作规程进行,以防损坏仪器。

使用方法如下:

1. 准备

(1) 将光门关闭。

(2) 将选择开关放在“校正”位置,打开电源开关(稳压电源总开关)后,根据需要选择灯源,钨灯为可见光,氢灯为紫外光光源。

(3) 将波长刻度盘转到所需波长的位置。

(4) 选择相应的光电管:光电管选择拉杆推入为紫敏光电管(200~625 nm);拉杆拉出为红敏光电管(625~1 000 nm),使之与选用的波长和光源相一致(为减少杂散光,可将滤光片推入光路,一般无此必要)。

(5) 根据需要选用比色杯:350 nm 以上者可用玻璃比色杯,350 nm 以下者应用石英杯,并将比色杯放入比色架。将试样室盖盖好。

2. 调透光度的零点

(1) 旋转暗电流调节钮,使 0 位计指针指到 0 位。为了得到较好结果,每测量一次应随时进行调整,使指针指向 0 位。

(2) 顺时针转动灵敏度钮 3 圈左右,此时透光率改变 1%,零位计指针可偏转 3 小格。

3. 调透光度 100%点

(1) 拉动换样拉杆,使空白管移入光路之中。

(2) 旋转读数钮,使测量读数盘指到透光率 100%处。

4. 测量

(1) 扳动选择开关到“ $\times 1$ ”处。

(2) 拉开光门,使单色光通过样品后射到光电管上。

(3) 旋转狭缝选择钮,使零位计指针指向 0 位,用灵敏度钮细调,使指针准确指到 0 位上。

(4) 拉动换样拉杆,将待测溶液移入光路之中。此时零位指针偏离 0 位。

(5) 旋转读数钮,使零位计的指针重新指向 0 位。此时,从读数盘上便可读出透光度和吸光度数值。

(6) 如果样品过浓,透光率 $<10\%$,吸光率 >1 时,可将选择开关放到“ $\times 0.1$ ”位置。此时,当零位计指针重新移到零位时,读取盘上的透光率值必须乘 0.1,吸光率值则应加 1,才是真实的数据。

(7) 在测定中,如需反复校准仪器的透光率的 100%时,仪器选择开关的校正档便相当于读数盘上 100%的位置。所以需调 100%时,可以将选择开关扳回“校正”档,用灵敏度钮调零位计的“0”位即可,不必要旋转刻度盘到 100%位置上。

三、使用分光光度计的注意事项

(1) 分光光度计必须放置在固定而且不受震动的仪器台上,不能随意搬动,严防震动、潮湿和强光直射。

(2) 比色杯盛液量以达到杯容积 2/3 左右为宜。若不慎将溶液流到比色杯的外表面,则必须先用滤纸吸干,再用擦镜纸或绸布擦净,然后才能把比色杯放入比色杯槽内。移动比色杯槽要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

(3) 不可用手拿比色杯的光学面,禁止用毛刷等物摩擦比色杯的光滑面。

(4) 用完比色杯后应立即用水冲洗,再用蒸馏水洗净。若用上法洗不净时,可用 5%中性皂