

北京大学医学实验系列教材

生物化学与 分子生物学实验教程

主 编 倪菊华

副主编 梁 静 贾竹青



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

生物化学与分子生物学实验教程

主 编 倪菊华

副主编 梁 静 贾竹青

编 者 (按姓氏笔画排序)

马利伟 王卫平 王海英 朱 滨

杨 洋 杨笑菡 李淑艳 吴 歌

张晓伟 陈 颢 易 霞 俞文华

贾竹青 倪菊华 梁 静

秘 书 朱 滨

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/倪菊华主编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-557-9

I. 生… II. 倪… III. ①生物化学—实验—医学院校—教材②分子生物学—实验—医学院校—教材 IV. Q5-33
Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040142 号

生物化学与分子生物学实验教程

主 编: 倪菊华

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 朱文玉 韩忠刚

责任校对: 金彤文

责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 8.5

字数: 208 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷

印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-557-9

定 价: 15.60 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

北京大学医学实验系列教材编委会

主任委员 李学军

副主任委员 管又飞 宫恩聪

秘书长 张燕

委员 (按姓氏笔画排序)

卫 兰	王 宪	王月丹	白 云	李 彤	刘永寿
吴 伟	吴 丹	吴立玲	肖军军	宋德懋	张卫光
张 涛	范少光	祝世功	钟延丰	贾弘禔	贾竹青
徐 海	倪菊华	梁 静	谭焕然		

序

现代医学是一门实验科学。医学院校在培养学生时一般都很重视实验教学，北京大学医学部也是如此。但在我的印象中，以前都是各学科单独设立实验课程，彼此多有重复。从内容上看，有相当部分只是理论课上某些结论的印证，学生们往往对着实验指导一步一步往下操作，实验结束、报告写完，脑子里并没有留下多少印象。近些年来，北京大学医学部基础医学院围绕培养创新人才的目标，在教学内容、教学方法、课程模式、考核体系等方面进行了新的探索和实践，其中也包括实验教学的改革。他们在1998年创建了生物医学实验教学中心，十年来对12门基础医学课程的实验教学进行了重组、整合和改革，打破了“单一课程”、“单一实验室”的原有模式，形成了以机能、形态、生物化学与分子生物学、病原与免疫、细胞生物与遗传五个模块和基础性实验、综合性实验、研究性实验三个层次所构成的基础医学实验教学体系，并且在实验内容方面注重培养学生科学思维，激发学生创新活力，提高学生解决实际问题的能力。我认为北京大学医学部在基础医学实验课程教学方面进行的改革是扎实的，是成功的。《北京大学医学实验系列教材》是他们十年改革成果的总结，值得各医学院校参考。我也衷心希望我国从事医学教育的同道们再接再厉，在实践中不断摸索新的经验，思想再解放一些，改革的步伐再迈得大一些，为建立具有中国特色的先进医学教育体系做出新的贡献。

是为序。

韩启德

二零零八年四月二十九日

前 言

生物化学与分子生物学是生命科学的重要组成部分，其发展日新月异。生物化学与分子生物学理论的形成和发展几乎都以实验技术为基础。为适应实验教学的需要、提高学生的动手能力、加深学生对生物化学及分子生物学理论的理解，编写《生物化学及分子生物学实验教程》作为高等医药院校生物化学及分子生物学实验教材，已是当务之急。

本书是在我们多年使用的本科生及研究生生物化学与分子生物学实验讲义的基础上，经修订和改编而成。根据学科发展，在原有实验讲义的基础上，删去了部分验证性实验，增加了一些反映最新进展的实验技术。全书包括总则、基本实验和高级实验三部分。总则介绍生物化学与分子生物学实验操作基本要求以及常用仪器的使用与维护。基本实验包括蛋白质分离与纯化、酶学实验和核酸提取与分析。除了常规经典的生化分析技术，新增了 SDS-PAGE、等电聚焦电泳、DNA 重组与鉴定、PCR 等分子生物学热门技术，可作为本科生的普通生物化学与分子生物学实验教材。高级实验收集了 RT-PCR、GST pull-down、Northern Blot 等分子生物学最新研究技术，有一定难度，可作为生物化学与分子生物学专业研究生的实验教材。

本书编写者均为北京大学医学部生物化学与分子生物学系的青年骨干教师，多数具有博士学位。他们承担生物化学与分子生物学教学与科研工作多年，既有丰富的教学经验，又有扎实的实验室工作基础，他们编写的实验教材有较强的针对性和实用性。

本书在编写和出版过程中，得到了北京大学医学出版社领导和编辑的大力支持与协助，在此表示感谢。由于编写时间仓促、编者水平有限，本书难免存在疏漏与错误，恳请同行与使用者予以指正赐教。

倪菊华

2008 年 3 月

目 录

总 则

实验室规则	(1)
基本操作	(2)
常用仪器简介	(6)

基本实验

蛋白质分离与纯化	(15)
实验一 血清的盐析及含量测定	(16)
实验二 凝胶过滤层析	(20)
实验三 醋酸纤维素膜电泳	(26)
实验四 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	(30)
实验五 等电聚焦电泳	(35)
酶学实验	(39)
实验一 底物浓度对酶促反应速度的影响	(40)
实验二 酶浓度对酶促反应速度的影响	(43)
实验三 pH 对酶促反应速度的影响	(45)
实验四 温度对酶促反应速度的影响	(47)
实验五 抑制剂对酶促反应速度的影响	(49)
实验六 乳酸脱氢酶粗提液的制备及活力测定	(52)
核酸提取与分析	(56)
实验一 质粒 DNA 的微量快速提取	(57)
实验二 质粒 DNA 的酶切与鉴定	(62)
实验三 DNA 重组与鉴定	(65)
实验四 聚合酶链反应技术 (PCR)	(71)

高级实验

实验一 生肌蛋白的诱导表达和提取	(77)
实验二 蛋白质免疫印迹分析 (Western Blot)	(80)
实验三 免疫共沉淀	(84)
实验四 GST pull-down 分析	(90)
实验五 肝细胞总 RNA 提取及鉴定	(94)
实验六 RT-PCR 技术	(98)
实验七 探针标记	(102)
实验八 Southern Blot	(105)

实验九 Northern Blot	(111)
实验十 电泳迁移率变动分析 (EMSA)	(117)
附录 化学试剂的规格与保管	(120)
主要参考文献	(122)

总 则

生物化学与分子生物学实验有其独特的实验操作技能，多数实验需要用到特殊的仪器设备。在进入正式实验课程之前，有必要让学生系统了解实验室的基本规则、实验操作的基本要求以及常用仪器、设备的使用方法与维护，便于培养学生良好的实验室工作习惯。

本部分主要介绍实验室基本规则、玻璃仪器的清洗方法、移液器的使用方法以及混匀、保温、离心等常用实验操作基本技能。对分光光度计、离心机、PCR 仪、洁净工作台等常用仪器设备的工作原理、使用方法及维护也逐一介绍。

实验室规则

1. 生物化学与分子生物学实验不同于化学和生物学实验，而有其独特的实验技能和操作规程。课前必须认真预习，明确实验目的、熟悉实验原理、了解操作关键步骤及注意事项。

2. 不迟到早退，自觉遵守课堂纪律，认真听老师讲解，保持室内安静，不高声谈笑。

3. 常用仪器在首次实验时，按仪器清单进行清点，并负责保管，如有破损，到实验教学准备室换领。使用过程中如有破损必须到准备室登记，按规定进行赔偿。期末如数归还。

4. 应本着积极、认真的态度，在老师的指导下完成每次实验。注意观察实验过程中出现的现象和结果，结果不良时，必须重做。

5. 应及时将实验结果和原始数据如实记录在实验报告上，并请老师当场审核，根据实验结果进行分析，按时将实验报告交老师评阅。

6. 实验后，必须把仪器洗净，有序放入仪器柜，并防止碰撞造成玻璃制品破损。

7. 爱护实验器材，特别是贵重仪器。非本次实验使用的仪器设备未经允许不得乱动。本次实验必须使用的仪器设备，在充分了解仪器性能和操作规程之后，严格按照规程操作。不可擅自拆卸仪器或将部件带出室外。实验过程中，如发现设备损坏或运转异常，应立即报告。

8. 对实验室内公用仪器，如分光光度计、电动振荡器、离心机等，每组同学使用时间不宜过长，以免影响全班实验进度。

9. 使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度，确定其是否为本次实验所需要。

10. 取出试剂后应立即将瓶塞盖好，放回原处，切勿盖错，以免造成试剂交叉污染，取出而未用完的试剂不得倒回原试剂瓶内。

11. 实验室内严禁吸烟！对腐蚀性或易燃性试剂，操作时要格外小心。如酒精、乙醚等低沸点有机溶剂，使用时应禁明火，远离火源，若需加热要用水浴加热，不可直接在火上加热。

12. 凡属发烟或可产生有毒气体的化学实验，均应在通风柜内进行，避免对人体造成危害。配制挥发性有机试剂时也应通风柜内进行。

13. 若发生酸碱灼伤事故，应立即用大量自来水冲洗，酸灼伤者再用饱和 NaHCO_3 溶液

中和，碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和。氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理，严重者应立即送医院救治。

14. 若发生起火事件，马上用灭火器扑灭。

15. 实验后要清洁实验台面、地面；试剂瓶要摆放整齐。经常保持实验室内清洁，不得随地吐痰，不乱丢纸屑。

16. 所有固体废弃物应丢弃在垃圾桶内。浓酸及对环境有害的废弃物应放在指定的容器中，由实验教学准备室交有关部门统一处理。

17. 课后由值日生负责打扫实验室的卫生，关好窗户，切断电源、水源及关好天然气阀门，经老师检查后，值日生方能离开实验室。

基本操作

【实验目的】

1. 掌握清洗玻璃仪器的正确方法。
2. 学会铬酸洗液的配制方法。
3. 学会正确使用移液管和可调式取液器。
4. 了解混匀法、保温法、沉淀法的适用范围。

【实验内容】

1. 玻璃仪器的清洗

生物化学与分子生物学实验常需使用各种玻璃仪器，玻璃仪器的清洁程度直接影响测量体积的可靠性和实验结果的准确性。因此，玻璃仪器的洗涤是生物化学与分子生物学实验一项重要的基本技术。

清洗过的玻璃仪器要求清洁透明，玻璃表面不含可溶解的物质，倒置时水沿器壁自然下流，器壁不挂水珠。

(1) 新购玻璃仪器的清洗

新出厂的玻璃制品表面往往黏附有可游离的金属离子、油污和灰尘，首次使用前需要用洗涤剂刷洗，流水冲净后，浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸，取出后用流水冲净，再浸泡于 1% HCl 溶液中过夜。用流水冲净酸液后，用纯水少量多次冲洗后，晾干备用。

新购砂芯玻璃滤器使用前应以热的盐酸或铬酸洗液边抽滤边清洗，再用纯水洗净。

(2) 使用过的玻璃仪器的洗涤

应根据污物性质和玷污程度选用合适的清洁方法。

1) 非计量敞口玻璃仪器，如试管、离心管、烧杯、量筒等，均可直接用毛刷蘸洗涤剂或洗衣粉刷洗，然后用自来水反复冲洗干净，最后用蒸馏水少量多次冲洗后，晾干备用。

注意：洗前检查毛刷顶端铁丝是否裸露，洗刷时不可用力过猛，以免损坏仪器。

2) 容量分析仪器，如滴定管、吸量管、容量瓶等。先用自来水冲洗晾干，然后于铬酸洗液中浸泡数小时，取出待沥净铬酸洗液后，用流水充分冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 遍，晾干备用。

3) 比色杯用毕立即用流水反复冲洗，再用蒸馏水或纯水冲洗干净。避免用碱液或强氧化剂清洗，切不可用试管刷刷洗或粗糙布、滤纸等擦拭。洗净后，倒置在比色杯架上晾干备用。

2. 常用铬酸洗液的配制（浓度为5%）

铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤，由重铬酸钾（ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ）和浓硫酸配制而成，其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。硫酸越浓，产生的铬酐越多，其清洁效力越强。新配制的铬酸洗液一般呈棕红色，为黏稠状液体，变为绿色时不宜再用。

其配制方法如下：

称取	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	5 g	置于 300 ml 烧杯中
加	dH_2O	5 ml	使其尽量溶解（可加热使其加速溶解）
缓缓加入	浓硫酸	100 ml	边加边搅拌，待冷却后使用。

因硫酸加入后即放出大量的热，所以要缓慢注入，并随加随搅拌，注意不要溅出来灼伤操作者。配好的洗液待冷却后，装瓶备用，盖严以防吸水失去去污效力。

3. 移液操作

（1）吸量管的使用

1) 常用吸量管的种类

a. 奥氏吸量管：此类吸管中下部有一橄榄形的膨大。每根奥氏吸量管只有一个刻度，适用于量取黏度较大的溶液。规格为 0.5 ml, 1 ml, 2 ml。此类吸量管不常使用。

b. 刻度吸量管：供量取 10 ml 以下体积的溶液。每根吸量管上有许多等分的刻度，刻度标记有自上而下和自下而上两种，规格为 0.1 ml, 0.2 ml, 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml 等。此类吸量管常用。

刻度吸量管上方印有各种彩环，以示容积区别。红色单环：0.1 ml, 5 ml；绿色或红色双环：0.5 ml；黑色单环：0.2 ml, 2 ml；黄色单环：1 ml；桔色单环：10 ml。

2) 吸量管的使用

a. 选用原则

在一次完成移液的前提下，应选用容量最接近的吸量管；

对于同一次实验中同一种试剂的移取，应选用同一支吸量管。

b. 刻度吸量管取液的操作方法

执管：拇指和中指执吸量管上部，使吸量管保持垂直，食指按管上口调节流速，刻度朝向操作者。

取液：把吸量管插入液体，用洗耳球吸取液体至所需量（取刻度上方）；移开洗耳球，迅速用食指压紧管口，然后抽离液面。（必要时用小滤纸片将管尖端外围拭净）。

调准刻度：用食指控制液体至所需刻度（此时液体凹面、视线和刻度应在同一水平线上）。

放液：移开食指，让液体自然流入容器内。此时，管尖应接触容器内壁，但不应插入容器的原有液体中（否则管尖会沾上容器内试剂，再移液时致使试剂交叉污染）。待液体流尽，将最后液滴吹出或转动吸量管使其沿容器内壁流出。

洗涤：吸取血浆、尿及黏稠试剂的吸量管，用后应及时用自来水冲洗干净。如果吸取一般试剂的吸量管，可待实验完毕后再洗。

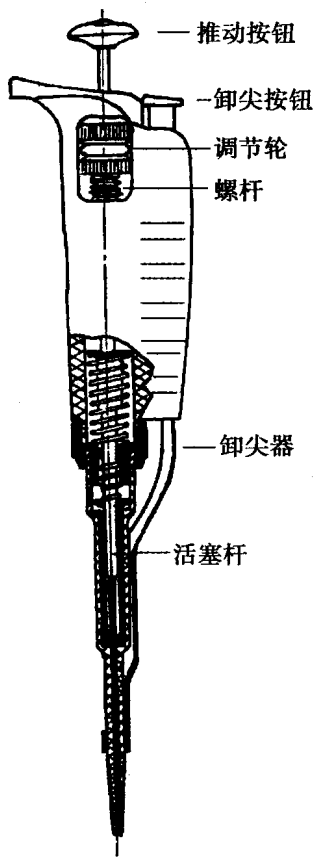
注意：①对于刻度由上至下的吸量管应尽量使用上端刻度。②管尖残液是否需吹，视具体情况而定。一般来说，移取 1 ml 及 1 ml 以下液体时均需吹出；移取大于 1 ml 的液体时可不吹，使管尖贴壁尽量排净残液。

（2）可调式取液器的使用

随着科学技术的不断进步，实验中样品加样量也越来越精确，从半微量到微量甚至痕

量，从毫升到微升。可调式取液器因其使用方便，取液精确，已逐步取代刻度吸量管成为生化实验室中的必备工具。

1) 可调式取液器的结构



注：推动按钮内部的活塞分 2 段行程，第一档为吸液，第二档为放液，手感十分清楚。

2) 规格及有效量程

规格	2.5 μl	10 μl	20 μl	100 μl	200 μl	1000 μl
有效量程	0.1~2.5 μl	1~10 μl	2~20 μl	10~100 μl	20~200 μl	100~1000 μl

3) 操作规程

旋转调节轮至所需体积值；

套上吸头，旋紧；

垂直持握可调式取液器用大拇指按至第一档；

将吸头插入溶液，徐徐松开大拇指，使其复原；

将吸头移出液面，必要时可用纱布或滤纸拭去附于吸头表面的液体（注意：不要接触吸头孔口）；

排放时，重新将大拇指按下，至第一档后，继续按至第二档以排空液体。

注意：移取另一样品时，按卸尖按钮弃掉吸头并更换新吸头。

4. 溶液的混匀

样品和试剂的混匀是保证化学反应充分进行的一种有效措施。为使反应体系内各物质迅速地接触，必须借助于外力的机械作用。常用的混匀方法有以下几种：

(1) 旋转混匀法：手持容器上端，利用手腕的旋转，使溶液作离心旋转。适用于未盛满液体的试管或小口器皿如锥形瓶。

(2) 指弹混匀法：一手执试管上端，试管与地面垂直。另一只手手指呈切线方向轻拨试管下部，使管内溶液作旋涡运动。

(3) 移液器混匀法：用移液器将溶液反复吹吸数次，可达到混匀的目的。

(4) 搅动混匀法：使用干玻璃棒搅匀，适用于烧杯中固体试剂的混匀。

(5) 振荡器混匀法：将试管置于振荡器的振动盘上，逐渐用力下压，使管内液体旋转。混匀操作时，应防止管内液体溅出而造成液体损失，严禁用手指堵住试管口进行混匀，防止污染和样本的损失。

5. 保温

样品和试剂混匀后常常要在一定温度下保持一段时间使其充分进行反应。先将恒温水浴箱温度设定钮调节至所需温度，待温度达到实验所要求后将容器放入恒温水浴箱并开始计时。水浴箱中水量要充足，实验过程中要随时监测并及时调节温度。

6. 过滤

在生化实验中常采用过滤法。过滤应使用干滤纸，湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸一般采用平折法，即对折后，再对折。滤纸上缘与漏斗壁应完全吻合，不留缝隙。向漏斗内倾倒液体时，要用玻棒引导而且不应倒入过快，勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。

当沉淀黏稠，或颗粒小的可以通过滤纸时，特别是溶液容积小又需精确定量时，应使用离心沉淀法。

【分析与思考】

1. 若量取 2 μl 液体，应选取哪种规格的可调式取液器？

2. 铬酸洗液的成分是什么？配铬酸洗液时，应将何溶液倾入何溶液中？

【注意事项】

1. 铬酸洗液是强氧化剂，有很强的腐蚀性，使用时注意不要滴溅到皮肤、衣物及实验台等处。拿取洗液中的玻璃仪器时，需戴耐酸手套，切忌用手直接拿，如不小心溅到皮肤上，应立即用大量清水冲洗。

2. 混匀时谨防容器内液体溅出或被污染；严禁用手堵塞管口或瓶口振摇。

3. 使用可调式取液器取液时推动按钮至第一档，放液时推动按钮至第二档。

(朱 滨)

常用仪器简介

一、离心机

(一) 基本原理

悬液静置不动时,由于重力作用,悬粒逐渐自动沉降,粒子越重下沉越快,而密度比液体小的粒子则向上浮。直径为数微米的微粒如红细胞可以利用重力来观察其沉降速度,但小于几个微米的微粒如病毒和蛋白质分子就不能用重力来使其沉降,因为微粒小,沉降慢,扩散现象严重,所以需要利用离心的方法,产生强大的离心力场,以加速沉降。

离心技术是利用旋转运动的离心力以及物质的沉降系数或浮力密度的差别进行分离、浓缩和提纯的一种方法。离心机是利用离心力把溶液中的粒子进行分离的一种仪器。

(二) 常用类型

离心机的种类很多,根据离心机转速的不同将离心机分为低速离心机(最高转速 4000r/min),高速离心机(最高转速 20000r/min)和超速离心机(最高转速 60000r/min 以上)。超速离心机又可分为分析超速离心机和制备超速离心机两类。按使用温度不同分为常温或冷冻离心机。

生物化学与分子生物学实验室常用的离心机为高速离心机,如果离心转速在 10000 r/min 以上,离心时间超过 5 分钟时,应使用冷冻离心机。冷冻离心机根据液体容量的大小又分为台式和落地式两大类。下面简要介绍一般高速离心机的使用方法(特殊用途的离心机使用时请参阅相关的使用说明书)。

(三) 使用方法

1. 打开电源(如需低温离心,要事先将离心机制冷至 4℃),设置离心转速和离心时间。
2. 离心时先将待离心的物质转移到大小合适的离心管内,量不宜超过 2/3 管容积。
3. 将盛有离心液的两只离心管置台秤上,调节两边重量使之平衡。如不平衡,可调整离心管内容物的量。每次离心操作都必须严格遵守平衡的要求,否则将会损坏离心机部件,甚至造成严重事故。2ml 以下的离心管可不用配平,但离心管内液量要相似。
4. 将平衡好的离心管盖好,按对称方位放入离心机转头插孔中,盖好转子盖及离心机盖,然后按下开始键开始离心。
5. 达到离心时间后,离心机自动减速。待其自然停止后,打开离心机上盖,再打开转子盖,取出离心管。

(四) 注意事项

1. 使用前必须认真阅读使用说明书,了解仪器使用注意事项与使用方法。
2. 离心机应放置在牢固的水平平面上。
3. 在离心时,若振动大,应检查仪器是否摆放平稳,离心管内液量是否相似,离心管是否对称摆放在转头内。
4. 离心过程中,若听到特殊响声,应立即停止离心,检查离心管。若离心管已碎,应清除并更换新管并应重新配平;若管未碎,也应重新配平。
5. 使用完毕后,切断电源,冷冻离心机要打开机盖晾干,以保持腔体内和机组干燥。

二、分光光度计

(一) 基本原理

分光光度法是利用物质特有的吸收光谱,对物质作定性或定量检测的一项常用技术。有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质因其分子结构各异,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都有其特异的吸收光谱。光线是一种电磁波,其中可见光的波长范围大约为 760nm (红色) 至 400nm (紫色); 波长小于 400nm 的光线称为紫外线,波长大于 760nm 的光线称为红外线。

当光线通过某种真溶液时,其中一部分光线可以透过,而另一部分光线则被溶液所吸收。该现象可用于某些物质的定性或定量分析。

分光光度计的工作原理及分光光度法的计算都是依据 Lambert-Beer 定律推导而得。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液的液层厚度和浓度之间的定量关系。

在利用比色法测定溶液中某种化学成分的含量时,通常需加入某种显色剂,以产生有色化合物,其颜色深浅与待测化学成分的含量成正比,据此对待测物浓度进行测定。与重量分析法、容量分析法相比,比色法具有操作简便、灵敏度高等优点。

Lambert 定律:

一束平行单色光在通过某一真溶液时,由于溶液吸收一部分光能,使入射光强度减弱。若该溶液的浓度不变,则溶液的厚度愈大,光线强度的减弱也愈显著。

设: I_0 为入射光的强度, I 为出射光的强度, L 为溶液的厚度

$$\log \frac{I}{I_0} \propto -L \quad (1)$$

Beer 定律:

一束单色光通过一溶液时,光线的强度会因被吸收而减弱。若溶液的厚度不变,则溶液浓度愈高,光线强度减弱也愈明显。

设: C 为溶液的浓度

$$\log \frac{I}{I_0} \propto -C \quad (2)$$

将 (1)、(2) 两式合并,即得到:

$$\log \frac{I}{I_0} = -K \cdot C \cdot L$$

$$\text{设: } T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Abs} = -\log \frac{I}{I_0} \quad \text{则} \quad \text{Abs} = -\log T = K \cdot C \cdot L$$

此即 Lambert-Beer 定律。其中 Abs 表示吸光度,也称光密度 (O. D.); T 表示透光率; K 为常数,又称消光系数。

在使用分光光度计时,通常将溶液厚度固定。故可直接通过光密度值表示溶液的浓度:光密度值大者,溶液的浓度高;光密度值小者,溶液的浓度低。根据光密度值计算溶液具体浓度的方法有两种:

(1) **标准曲线法:** 实际工作中,常用待测物的纯品,配置一系列浓度递增的标准液,用分光光度计测量得一组吸光度值,然后分别以浓度、吸光度为横、纵坐标,作图。根据

Lambert-Beer 定律, $Abs = KCL = KC$ (L 为定值), 应得到一条通过原点的直线, 此直线称为标准曲线或工作曲线。按照同样方法测得待测液的 Abs 值后, 可直接从图上查得待测液的浓度。

一条理想的标准曲线应是斜率接近于 1 且过原点的直线, 其范围应在被测物浓度的一半到两倍之间, 吸光度在 0.05~1 之间。但在实际工作中, 常发生标准曲线不成直线的情况, 特别是标准液浓度较高时, 明显见曲线向浓度轴弯曲 (个别情况向吸光度轴弯曲), 此情况称为偏离 Lambert-Beer 定律。导致标准曲线发生偏离的原因有: ①溶液中介质的不均一性 (胶体溶液、乳浊液或悬浮物质), 导致光线因散射而损失, 使实测吸光度值增加; ②若溶液中的物质发生化学反应缔合成新的化合物或发生结构互变, 则影响吸光度值, 也会导致标准曲线的偏离。所以, 得到一条好的标准曲线是非常重要的, 它既可指示测定是否偏离 Lambert-Beer 定律, 又可指示待测物符合 Lambert-beer 定律的浓度范围, 以保证得到准确、可靠的结果。

(2) 比色法: 样品 Abs / 标准 Abs = 样品浓度 / 标准浓度

样品浓度 = 样品 Abs ÷ 标准 Abs × 标准浓度

(二) 常用类型

分光光度计是应用分光光度法 (即比色法) 测定物质含量 (即浓度) 的装置。分光光度计的种类很多, 根据仪器的光源灯所能发射出的波长来区分, 使用的波长范围在 400~760nm 之间的为可见分光光度计; 使用的波长范围为 200~400nm 为紫外分光光度计, 只适用于紫外光区测定; 使用的波长范围为 200~1100nm 的为可见-紫外两用分光光度计; 还有近红外分光光度计、荧光分光光度计等。从记录方式上看, 有仪表直读手记式的; 有自动记录式的。从光学系统设计上看, 有单光束及双光束及单波长及双波长之区别。分光光度计一般由光源、单色光器 (包括分光系统、光路狭缝)、样品池、检测器 (包括光电原件、读数放大系统) 以及各部分的电源等部分组成, 见图 1。

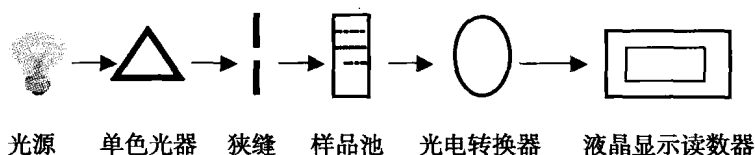


图 1 分光光度计的基本结构

光源: 提供比色照明。

单色器: 将光源提供的混合光进行色散为一连续光谱。

狭缝: 截取连续光谱上某段光谱, 狭缝越小, 单色光越纯, 即单色性越好。

样品池 (比色杯): 一般由玻璃或石英制成, 用来盛待测溶液。

光电转换器: 将光的信号转换成可读电信号。

液晶显示读数器: 可显示测量数据、参数、状态及人机对话信息, 而且能显示测量图谱。

(三) 使用方法

这里主要介绍本实验室常用的 TU-1800 紫外-可见分光光度计。其他型号分光光度计使用前请认真阅读使用说明书。

1. 接通电源, 打开仪器开关, 仪器进行自检并初始化, 整个过程约需 3 分钟, 初始化正常结束后系统进入仪器操作主画面, 《选择工作方式》画面。仪器预热 15~30 分钟。

2. 按数字【1】进入《光度测量》主画面。
3. 设置测光方式：按【F1】选择设置参数，按数字【1】设置测光方式为 Abs，按【RETURN】键退出参数设置。
4. 设置样品池数：按【F3】转入试样设置画面，按数字【1】选择多联池，按数字【2】选择样品池数，按【ENTER】确定。然后按【RETURN】键退出试样设置。
5. 设置工作波长：按【GOTO-λ】键输入所需工作波长数值。
6. 调零点：打开舱门，在池架的第 1 位（近身端）放置空白参比液杯，再依次放置待测液杯。关闭舱门，按【AUTOZERO】键，校正空白参比液 Abs 值为 0.000。
7. 按 F2 进入测量画面，按【STRAT/STOP】键进行自动测量，记录数据。
8. 仪器使用完毕，取出比色杯，盖好比色舱盖，按【RETURN】键退出测量操作，返回到《选择工作方式》主画面。关闭电源。

（四）注意事项

1. 用分光光度计检测物质浓度时，为了除去待测液中其他成分对待测物吸光度的影响，需配制一种空白液（空白液中含有除待测物外的其他成分），用以调节透光率，使其达 100%，以校正待测物的吸光度值。
2. 为了得到一条好的标准曲线，除规范、认真地操作外，作图时应注意：使所画的直线尽量和每个点都较接近。若有个别点距离其他点特别远，视具体情况取舍。
3. 分光光度计属精密仪器，应精心爱护使用，防震、防潮、防腐蚀。不能在仪器表面放置装有液体的比色杯及试管。
4. 比色杯中的液体应适量，避免检测过程中液体溅到仪器里。如待测液为强酸、强碱液体，应尽快比色，以防止破坏比色杯。比色杯不能用毛刷清洗。

附：比色杯的使用方法

比色杯根据材质的不同分为玻璃比色杯和石英比色杯两种，前者适用于可见分光光度计，后者适用于紫外分光光度计。石英比色杯价格昂贵。为了保证两只比色杯光径完全一致，通常是成对包装。

比色杯有两个透光面和两个非透光面，光线从其透光面穿过到达检测系统。其透光面不应用手触摸或接触粗糙物体，用手持非透光面，加 2/3 体积的液体即可，用镜头纸或柔软的绒布擦净透光面的污物或液滴。比色操作的时间应尽量短，比色完毕应立即用蒸馏水冲净比色杯。比色杯只能置于比色杯架上，决不允许散乱地放在操作台上，更不允许放在仪器上。比色杯中若有水，不能直接用于比色，可用少量待测液润洗内壁。

三、电泳装置

（一）基本原理

电泳技术是分子生物学研究不可缺少的重要分析手段。电泳仪电源和电泳槽组成一套电泳装置，电泳仪电源具有正、负极，可以给连接的电泳槽加上具有正、负极的电场，驱动带电粒子在电场中泳动进而分离。它还有电压/电流转换作用，可以按照实验需要恒流、恒压或恒功率输出。

（二）常用类型

电泳仪电源电压分为高压 1500~5000V、中压 500~1500V、低压 500V 以下三种；电