



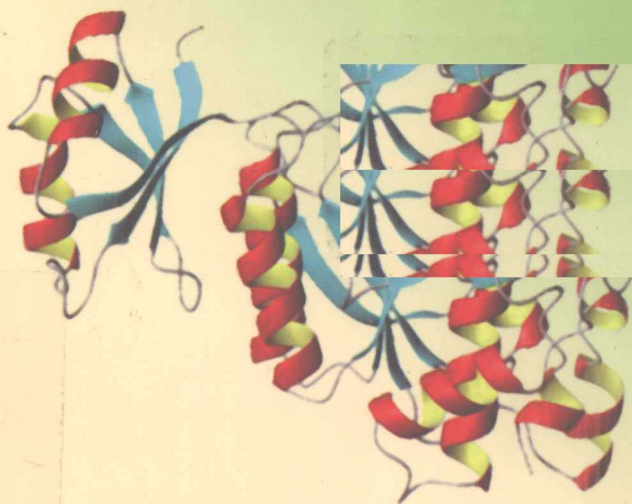
面向21世纪精品课程教材  
全国高素质应用型人才培  
养规划教材

全国高等医药教育规划教材

# 生物化学与分子生物学实验技术 ——实验指导分册

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JISHU

主 编 陈秀芳 毛孙忠  
副主编 张 伟 张雄飞  
叶 辉 沈年汉



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社



教育部普通高等教育“十一五”  
国家级规划教材 全国高等学校生物化学实验教材

全国高等学校生物化学实验教材

# 生物化学与分子生物学实验技术

——实验指导分册

主 编 陈 颖 副主编 王 颖  
编 者 王 颖 王 颖 王 颖  
王 颖 王 颖 王 颖



科学出版社

面向 21 世纪精品课程教材  
全国高素质应用型人才  
培养规划教材  
全国高等医药教育规划教材

# 生物化学与分子生物学 实验技术

——实验指导分册



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术. 实验报告分册/陈秀芳, 毛孙忠主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2010.3

ISBN 978-7-308-07368-4

I. ①生… II. ①陈…②毛… III. ①生物化学—高等学校—实验报告②分子生物学—高等学校—实验报告

IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 017810 号

## 生物化学与分子生物学实验技术(实验指导分册、实验报告分册)

主 编 陈秀芳 毛孙忠

---

丛书策划 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)

责任编辑 阮海潮

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 富阳市育才印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 15.75

字 数 394 千

版 印 次 2010 年 3 月第 1 版 2010 年 3 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-07368-4

定 价 30.00 元(共 2 册)

---

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88925591

# 前 言

随着生命科学的迅猛发展,生物化学与分子生物学的方法与理论已经渗透到生命科学的各个研究领域。生物化学与分子生物学是一门实验性学科,其理论的形成和发展几乎都以实验技术为基础。实验教学不仅是生物化学与分子生物学教学工作的重要组成部分,而且在培养学生协作共事的团队精神、严谨务实的科研作风、创新意识和创新能力、分析和解决实际问题的能力等方面均有不可替代的作用。鉴于近几十年来生物化学与分子生物学新的实验方法和实验技术的不断出现,我们以往采用的自编实验讲义已不能满足学生学习的需要,为了跟上学科的发展,适应实验教学的需要,特编写此实验教材。

本教材以生物化学和分子生物学常用实验技术为导向,以方法学为主,对当今生命科学领域常用技术的原理、实验操作步骤、注意事项、应用等作了系统的介绍,围绕分光光度技术、层析技术、电泳技术、离心技术、核酸的分离制备、PCR 技术、核酸分子杂交技术等安排了 30 多个实验,内容涵盖了蛋白质化学、核酸化学、酶学、维生素、糖代谢、脂类代谢、分子生物学等不同方面,与《生物化学》教材内容衔接紧密。本书汇集了编者多年来从事实验教学与科学研究积累的经验,同时参考了大量相关的文献和书籍,是一本系统的、实用性强的实验教材。

本书适用于医学、生物学等相关专业学生,使用时可根据不同专业的教学要求加以选择。

本教材为《生物化学与分子生物学实验技术——实验指导分册》(其配套教材为实验报告分册)。本教材的出版得到了温州医学院有关领导的大力支持,在整个编写过程中始终得到金丽琴教授的关心和精心指导,金教授对本书的编写大纲、初稿和终稿都进行了认真的审阅,并提出了宝贵的修改意见;同时,陈秀芳老师、毛孙忠老师、叶辉老师、张伟老师、张雄飞老师、沈年汉老师、王建光老师、唐敬兰老师、雷康福老师、李春洋老师为本教材的策划、编写大纲的制订、审稿和编写工作做出了卓有成效的贡献;在出版过程中,浙江大学出版社给予了大力支持,特别是阮海潮副编审在本教材编辑审稿等方面付出了辛勤的劳动,在此一并表示衷心的感谢。

由于编者水平有限、时间仓促,难免存在不妥和疏漏之处,敬请同行专家和使用本书的师生批评指正。

陈秀芳

2010 年 2 月于温州医学院

# 目 录

第一章 概 论.....	1
第一节 实验室基本常识 / 1	
第二节 实验报告书写要求 / 2	
第三节 生化实验基本操作 / 2	
第二章 生物化学实验常用技术.....	7
第一节 分光光度技术(比色法) / 7	
第二节 层析技术 / 13	
第三节 电泳技术 / 23	
第四节 离心技术 / 30	
第三章 分子生物学实验常用技术 .....	36
第一节 核酸的分离提取和纯化 / 36	
第二节 聚合酶链反应 / 40	
第三节 核酸分子杂交技术 / 47	
第四章 生物化学实验部分 .....	53
实验一 血清 $\gamma$ -球蛋白的分离纯化与鉴定 / 53	
实验二 蛋白质含量测定 / 56	
I. 双缩脲法 / 56	
II. Folin-酚试剂法(Lowry 法) / 57	
III. 考马斯亮蓝 G-250 法 / 59	
IV. BCA 法 / 60	
V. 紫外分光光度法 / 62	
实验三 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳 / 64	
实验四 血清蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳 / 66	
实验五 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量 / 69	
实验六 等电聚焦电泳测定蛋白质等电点 / 72	

实验七	氨基酸的薄层层析	/ 74
实验八	蛋白质的脱盐(凝胶层析法)	/ 76
实验九	氨基酸的双向纸层析	/ 78
实验十	血清总胆固醇的测定(硫磷铁法)	/ 80
实验十一	血清尿素的测定(二乙酰一肟法)	/ 82
实验十二	血清高密度脂蛋白-胆固醇含量的测定(酶法)	/ 84
实验十三	血清甘油三酯的测定(乙酰丙酮显色法)	/ 86
实验十四	酮体的生成与作用的定性测定	/ 88
实验十五	维生素 C 的提取及定量测定(磷钼酸法)	/ 90
实验十六	血清乳酸脱氢酶总活性的测定(比色法)	/ 93
实验十七	血清葡萄糖含量测定	96
	I. 葡萄糖氧化酶法	/ 96
	II. 邻甲苯胺法	/ 98
实验十八	丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	/ 100
实验十九	碱性磷酸酶的 $K_m$ 测定及抑制剂类型的判定(双倒数作图法)	/ 102
	I. 碱性磷酸酶的 $K_m$ 测定	/ 102
	II. 抑制剂类型的判定	/ 104
实验二十	酶浓度、pH、温度及抑制剂对酶促反应的影响	/ 106
	I. 酶浓度对酶促反应的影响	/ 106
	II. pH 对酶促反应的影响	/ 108
	III. 温度对酶促反应的影响	/ 110
<b>第五章</b>	<b>分子生物学实验部分</b>	112
实验一	组织细胞中基因组 DNA 的提取	/ 112
实验二	琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段(水平潜水式)	/ 114
实验三	质粒 DNA 的提取(碱裂解法)	/ 117
实验四	动物组织细胞总 RNA 的提取和变性凝胶电泳鉴定	/ 120
实验五	紫外分光光度法测定核酸的浓度及纯度	/ 123
实验六	聚合酶链反应(PCR)	/ 125
实验七	逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)	/ 127
实验八	Southern 印迹杂交	/ 130
实验九	Western 印迹杂交	/ 133
<b>附 录</b>		136
<b>参考文献</b>		148

# 第一章 概 论

实验技能的培养与训练是生物化学教学的重要内容,其作用是使学生掌握生物化学实验的基本原理和技术以及操作方法,熟练掌握生化实验相关仪器的使用,提高分析和解决问题的能力。生化实验内容的安排力求与理论教学内容相协调,并紧密结合临床应用实际,在实验过程中充分发挥学生的主动性和创造性,通过教师积极引导,促进学生在创新能力和综合素质方面全面提高。一般按每两人一组进行分组,在规定的时间内,由学生独立完成实验操作。在实验过程中,教师监督学生的操作,注重引导学生独立发现问题、分析和解决问题。

## 第一节 实验室基本常识

### 一、实验室守则

(1) 每位同学都应自觉遵守实验课堂纪律,不迟到、不早退,上课不大声谈笑,有事请假。

(2) 实验前必须认真预习,熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤等,了解所用仪器的构造及使用方法。实验过程中要听从带教老师的指导,认真地按操作规程进行实验,并将实验数据和结果及时、真实地记录在实验报告纸上。完成实验后经教师检查同意,方可离开。

(3) 实验台面应保持整洁,仪器、药品应摆放整齐。洗涤和使用仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。贵重精密仪器的使用,应严格遵守操作规程,发现故障须立即报告教师,不得擅自动手检修。一旦损坏仪器,应如实向教师报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。实验室内一切物品,未经实验指导教师批准严禁带出。借物必须携带有效证件办理登记手续。实验完毕,要及时清点和洗净自己的仪器并放置好,将实验台面擦拭干净。

(4) 使用药品、试剂必须遵循节约原则。公用试剂用完后,应立即盖严放回原处。

(5) 实验室内严禁吸烟!丙酮、乙醇、乙醚等易燃药品要远离火源操作和放置,不能直接加热;废液可倒入水槽内,放水冲走;强酸、强碱溶液则必须先用水稀释后再倒入水槽;废纸、渣滓等固体废物不要倒入水槽,应倒入垃圾袋内,以免堵塞下水道。

(6) 当班值日生要认真负责实验室卫生清扫、安全和其他服务性的工作。实验结束,注意关闭灯、水、电、火、窗。

### 二、实验基本要求

(1) 积极预习:实验前,每位同学都应应对当次实验内容进行预习,明确实验的目的、原理、操作步骤等,以达到巩固理论知识,熟悉实验内容及要求的目的。

(2) 统筹实验安排,认真操作:实验操作前应计划如何进行实验统筹,以节省时间。要切



实注意操作要点,每一步操作都必须明确其意义,不可盲目动手,否则易导致实验失败。

(3) 端正实验态度:实验时要认真、实事求是,决不允许敷衍潦草。实验记录要真实可信,不可伪造实验数据或结果。实验结论、分析与讨论要独立思考和完成,不可抄袭或拷贝。遇有疑难问题时,首先要尽量自己寻求解答,锻炼思维能力,然后再请教其他同学或老师。

(4) 密切配合,团结协作:实验是两个同学一组进行的,所以在实验过程中两位同学要密切配合,充分发挥团队协作精神,优质、高效地完成。

## 第二节 实验报告书写要求

### 一、实验记录

实验中观察到的实验现象、测量得到的数据和结果,应及时地记录。原始记录必须准确、简练、完整、清楚。从第一次实验课开始就应养成这种良好的习惯。

实验中使用到的仪器的类型、规格、编号以及试剂的分子式、相对分子质量等,都应记录清楚,以便在总结实验时进行核对,并作为查找实验成败原因的参考依据。如果对记录的结果有怀疑、遗漏或丢失等,都必须重做实验。应用不可靠的结果或伪造数据,在实际工作中可能造成难以估计的损失和影响。因此,在平时就应培养一丝不苟、严谨诚实的科研态度。

### 二、实验报告

实验报告是学生对实验内容掌握情况的主要反映,真实、完整、及时地完成实验报告是对每个学生的基本要求。为了使实验报告内容条理清晰,有利于带教教师的批改与核对,对实验报告内容与格式统一作如下要求:

- (1) 实验目的;
- (2) 实验原理(简述实验的基本原理);
- (3) 实验步骤(简要书写实验步骤,可以采用流程图表示);
- (4) 实验结果(是对实验现象的描述及对实验数据的记录和处理);
- (5) 实验结论(是对实验结果的概括与综合);
- (6) 讨论(对实验中遇到的问题、异常现象进行探讨,分析原因,提出解决的办法,或谈谈实验成功的经验);
- (7) 你对本实验的建议(阐述你对本实验方法、设计及步骤等方面的改进建议);
- (8) 教师评价。

## 第三节 生化实验基本操作

### 一、玻璃仪器的洗涤

#### 1. 洗涤液

洗洁精、肥皂水、洗衣粉、强酸氧化剂洗液(如铬酸洗液)、碱性洗液(如碳酸钠溶液、碳酸氢钠溶液、磷酸钠溶液等)、碱性高锰酸钾洗液、尿素洗涤液等。根据玻璃器皿所携带的污渍性质

不同选择合适的洗液。

## 2. 洗涤要求与步骤

(1) 要求：洁净的玻璃器皿表面不应挂任何水滴。

(2) 步骤：如图 1-1 所示。

**注意：**对使用过的仪器应养成及时清洗的习惯，特别是血液分析时用以吸取血液样本的吸管，用过后应当立即用水将所沾的血渍冲去，因为放置过久血液干硬后将很难清除。

### (3) 玻璃仪器的干燥

一般的玻璃仪器洗净后可倒置架上，让水分蒸发自然干燥晾干；如需迅速干燥，则应按仪器的不同类型按不同方法处理：

① 试管、离心管、烧杯、烧瓶等普通玻璃器皿可置烤箱中 100~105℃ 烘烤；

② 少量仪器如需急用也可在电炉或酒精灯上烘烤，烘烤时应不时转动器皿，使其受热缓慢且均匀，并将管口(或杯口)倾斜向下，以便水蒸气冷凝成水滴，顺口流出，不致使水滴接触烘热的器壁而使仪器爆裂；

③ 有些玻璃仪器应避免烘烤，如烘烤吸管、容量瓶、量筒等容易造成器壁变形而使容量不准；比色杯在烘烤时易发生破裂。

## 二、液体体积的度量仪器及使用方法

量筒、移液管、容量瓶和滴定管等是度量液体体积的常用仪器。对量筒、移液管、滴定管的体积读数时，应将量筒、移液管、滴定管保持竖直，视线与管内液面保持水平，读取与弯月面相切的刻度，视线偏高和偏低都会造成误差(图 1-2)；此外，微量溶液的吸取也可使用微量枪式移液器。

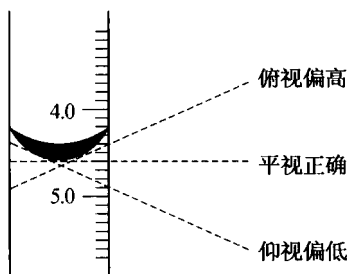


图 1-2 移液管和吸量管的读数

### (一) 移液管和吸量管(图 1-3)

要求准确移取一定体积溶液时，可用移液管。常用的移液管有 5、10、25mL 等。移液管一般是中部有近球形的玻璃管，管的上部有一刻度线表明体积，流出溶液的体积与管上所标明的体积相同。

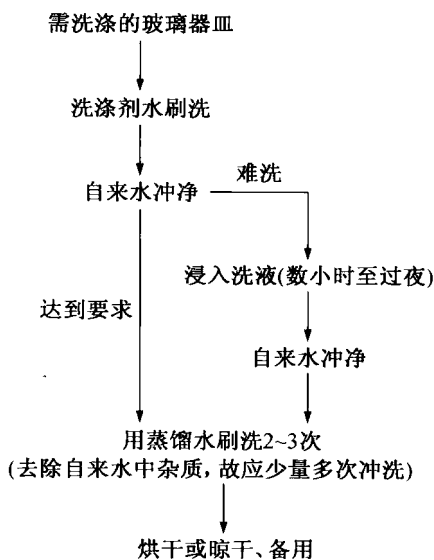


图 1-1 玻璃仪器洗涤的一般步骤

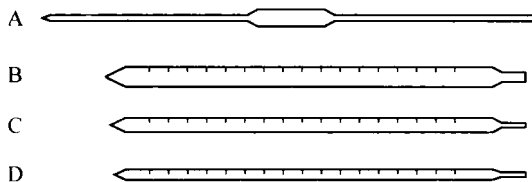


图 1-3 移液管(A)和吸量管(B、C、D)

吸量管一般只用于取小体积的溶液。管上带有分度,可以用来吸取不同体积的溶液。但用吸量管取溶液的准确度,不如移液管。上面所指的溶液均以水为溶剂,若为非水溶剂,则体积稍有不同。

移液管和吸量管的使用方法简单介绍如下:

### 1. 洗涤

使用前用少量洗液润洗后,依次用自来水润洗三次、蒸馏水润洗三次,洗净的移液管和吸量管整个内壁和下部的内壁不挂水珠。

移取溶液前再用少量移取液润洗三次。润洗移液管时,为避免溶液稀释或沾污,可将溶液转移至小烧杯中吸取。首先吸入少量溶液至移液管中,将移液管慢慢放平并旋转,使移液管内壁全部洗过。然后将管直立,将管中液体沿烧杯内壁放出,然后再将小烧杯的液体沿管的外壁下部倒出。这样一次即可将移液管内壁、小烧杯内壁和移液管下端的外壁同时润洗一遍。如此操作三次后,可直接将移液管插入容量瓶中或将溶液倒入小烧杯中吸取所需溶液。

### 2. 吸取溶液

用移液管移取溶液时,右手拇指和中指拿住管颈标线的上部(图 1-4),将移液管垂直插入液面以下 1~2cm 深度,不要插入太深,以免外壁沾带溶液过多;也不要插入太浅,以免液面下降时吸空。随着液面的下降,移液管逐渐下移。左手拿洗耳球将溶液吸入管内至标线以上,拿去洗耳球,随即用右手食指按住管口。将移液管离开液面,靠在器壁上,稍微放松食指,同时轻轻转动移液管,使液面缓慢下降,当液面与标线相切时,立即按紧食指使溶液不再流出。

### 3. 放出溶液

把移液管的尖嘴靠在接收容器内壁上,让接收容器倾斜而移液管直立。放开食指使溶液自由流出。待溶液不再流出时,等 15s 后再取出移液管。最后尖嘴内余下的少量溶液,不必用力吹入接收器中(如移液管上有一个“吹”字,则一定要将尖嘴内余下的少量溶液吹出),这样从管中流出的溶液正好是管上标明的体积。

**注意:** 使用移液管时,在一次完成转移的前提下,应选用容量较小的移液管;对于同一实验中同一种试剂的移取,应尽可能选用同一支移液管。

## (二) 枪式移液器

枪式移液器,又称微量加样器(移液器),最早出现于 1956 年,由德国生理化学研究所的科学家 Schnitger 发明,其后,1958 年德国 Eppendorf 公司开始生产按钮式微量加样器,成为世界上第一家生产微量加样器的公司。这些微量加样器的吸液范围在 0.1~5mL 之间,适用于临床常规化学实验室使用。微量加样器发展到今天,不但加样更为精确,而且品种也多种多样,如微量分配器、多通道微量加样器等,其加样的物理学原理有两种:① 空气垫(又称活塞冲程)加样;② 无空气垫的活塞正移动加样。

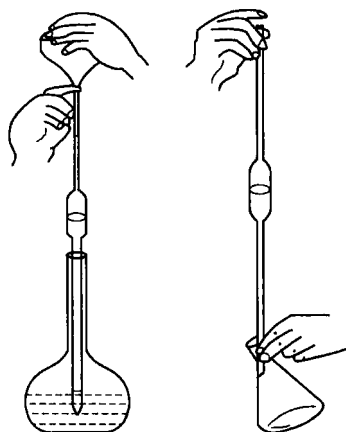


图 1-4 移液管的使用操作

## 1. 枪式移液器的结构(图 1-5)

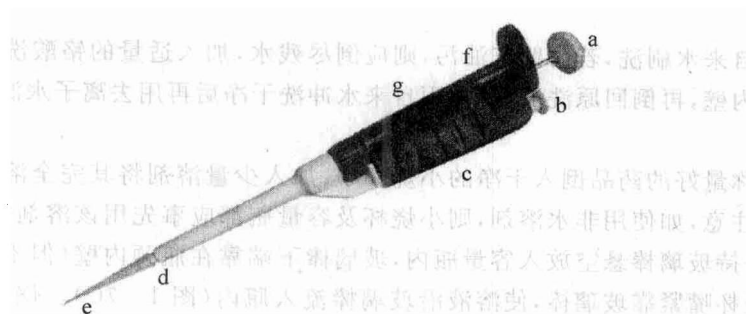


图 1-5 枪式移动器的结构示意图

- a. 液体吸放按钮; b. 枪头排放按钮; c. 枪头排放器; d. 枪头接嘴;  
e. 枪头; f. 体积选取旋钮; g. 体积显示刻度盘

移液器内部柱塞分 2 段行程,第 1 档为吸液,第 2 档为放液,手感十分清楚。

## 2. 操作(图 1-6)

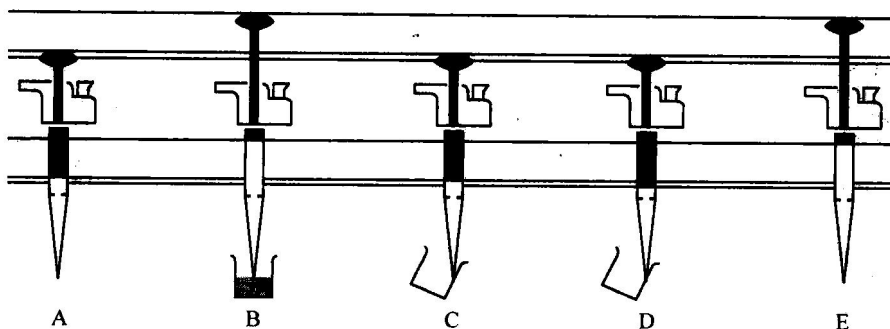


图 1-6 枪式移液器的操作简图

A. 调体积选取钮至所需值,套上枪头、旋紧,保持微量移液器竖直,将按钮压至第一段;B. 微量移液器头尖端浸入溶液,缓慢释放按钮,使其复原;C. 保持微量移液器竖直,将微量移液器头与容器壁接触,慢慢压下按钮至第一段;D. 压至第二段把溶液完全释放出;E. 释放按钮回原状

**注意:** 移取过程中应控制速度和力度;移取另外样品时,需按枪头排放钮,更换枪头;勿将微量移液器本体浸入溶液中;微量移液器的任何部分切勿用火烧烤,亦不可吸取温度高于 70℃ 的溶液,避免蒸汽侵入腐蚀活塞;套有枪头的微量移液器,无论枪头中是否有溶液,均不可平放,需直立架好。

## (三) 容量瓶

容量瓶是用来精确地配制一定体积和浓度溶液的量器。容量瓶的外型是平底、颈细的梨形瓶,瓶口带有磨口玻璃塞。颈上有环形标线,瓶体标有体积,一般表示为 20℃ 时液体充满至刻度时的容积。常见的有 10、25、50、100、250、500 和 1000mL 等各种规格。容量瓶的使用,主要包括以下几个方面:

## 1. 检查

使用容量瓶前应先检查瓶塞是否漏水,检查时加自来水近刻度,盖好瓶塞用左手食指按住,同时用右手五指托住瓶底边缘(图 1-7A 和 B),将瓶倒立 2min,如不漏水,将瓶直立,把瓶

塞转动  $180^\circ$  再倒立 2min, 若仍不渗水即可使用。

## 2. 洗涤

可先用自来水刷洗, 若内壁有油污, 则应倒尽残水, 加入适量的铬酸洗液, 倾斜转动, 使洗液充分润洗内壁, 再倒回原洗液瓶中, 用自来水冲洗干净后再用去离子水润洗 2~3 次备用。

## 3. 配制

将准确称量好的药品倒入干净的小烧杯中, 加入少量溶剂将其完全溶解后再定量转移至容量瓶中。注意, 如使用非水溶剂, 则小烧杯及容量瓶都应事先用该溶剂润洗 2~3 次。定量转移时, 右手持玻璃棒悬空放入容量瓶内, 玻璃棒下端靠在瓶颈内壁(但不能与瓶口接触), 左手拿烧杯, 烧杯嘴紧靠玻璃棒, 使溶液沿玻璃棒流入瓶内(图 1-7C)。烧杯中溶液流完后, 将烧杯嘴沿玻璃棒上提, 同时使烧杯直立, 将玻璃棒取出放入烧杯内, 用少量溶剂冲洗玻璃棒和烧杯内壁, 将冲洗液也同样转移到容量瓶中, 如此重复操作三次以上。然后补充溶剂, 当容量瓶内溶液体积至  $3/4$  左右时, 可初步摇荡混匀, 再继续加溶剂至近标线, 最后改用滴管逐滴加入, 直到溶液的弯月面恰好与标线相切。若为热溶液, 则应将溶液冷至室温后, 再加溶剂至标线。盖上瓶塞, 将容量瓶倒置, 待气泡上升至底部; 再倒转过来, 使气泡上升到顶部, 如此反复 10 次以上, 使溶液混匀。

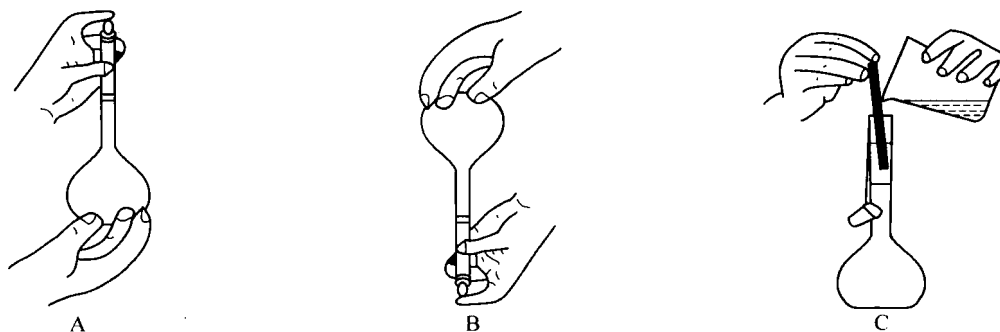


图 1-7 容量瓶的使用

## 4. 稀释

用移液管移取一定体积的浓溶液于容量瓶中, 加水至标线。同上法混匀即可。

**注意:** 容量瓶不宜长期贮存试剂, 配好的溶液如需长期保存应转入试剂瓶中。转移前须用该溶液将洗净的试剂瓶润洗 3 遍。用过的容量瓶, 应立即用双蒸水洗净备用, 如长期不用, 应将磨口和瓶塞擦干, 用纸片将其隔开。此外, 容量瓶不能在电炉、烘箱中加热烘烤, 如确需干燥, 可将洗净的容量瓶用乙醇等有机溶剂润洗后晾干, 也可用电吹风或烘干机的冷风吹干。

## 第二章 生物化学实验常用技术

### 第一节 分光光度技术(比色法)

#### 一、物质对光的选择性吸收

光的本质是一种电磁波。光线有不同的波长,肉眼可见的彩色光称为可见光,波长范围在400~750nm,小于400nm的光称为紫外线,大于750nm的光称为红外线。当光通过透明介质溶液时,其辐射能量部分可被溶液吸收,所以光射出溶液介质之后光能被减少。而溶液呈现不同的颜色,正是由于溶液中的粒子(分子或离子)选择性地吸收某种颜色的光所引起的。如果各种颜色光的透过程度相同,这种物质就是无色透明的,若只有一部分波长的光透过,其他波长的光被吸收,则溶液就呈现出透过光的颜色,并与被吸收的光的颜色相互补(图2-1)。

任何一种溶液,对不同波长光的吸收程度往往不同,一些有色物质可以选择性地吸收部分可见光而呈现不同颜色,一些物质却能特征性地选择吸收紫外线。物质吸收由光源发出的某些波长的光可形成特定的吸收光谱,由于物质的吸收光谱与物质的分子结构相关,而且在一定条件下其吸收程度与该物质的浓度有关,所以可利用物质的特定吸收光谱对其进行定性和定量分析。分光光度法正是利用各物质所具有的这种吸收特征所建立起来的分析方法。

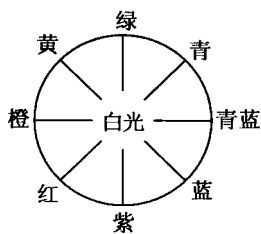


图 2-1 光的互补色示意图

#### 二、分光光度法的基本定律——Lambert-Beer 定律

##### (一) 吸光度

将不同波长( $\lambda$ )的单色光依次通过有色溶液,测量溶液对光的吸收情况,被吸收光的值称为吸光度(absorbance,  $A$ )。以波长( $\lambda$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标作图,得到光吸收曲线或称吸收光谱(图2-2)。在吸收光谱中,吸光度最大处对应的波长为最大吸收波长,用 $\lambda_{\max}$ 表示。 $\lambda_{\max}$ 是定性鉴别物质的基础;不同浓度的溶液, $\lambda_{\max}$ 不变,浓度与峰值成正比,这是进行物质浓度定量分析的依据。

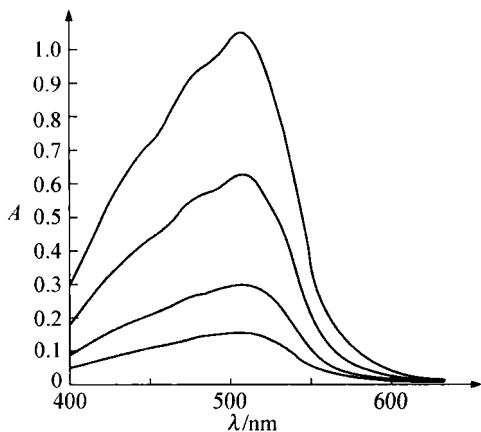


图 2-2 吸收光谱示意图

(其中 $\lambda_{\max} = 510\text{nm}$ ,浓度与峰值成正比)

##### (二) 透光率和吸光度

当一束单色光(入射光,强度表示为 $I_0$ )通过

透明溶液介质时,光的去路有三种情况(图 2-3),部分光被溶液吸收(吸收光,强度为  $I_a$ ),部分光穿透过溶液(透射光,强度为  $I_t$ ),还有一小部分光被反射(反射光,强度为  $I_r$ ),显然  $I_0 = I_a + I_t + I_r$ 。由于在利用分光光度法时,被测溶液和参比溶液的吸收池材料和厚度相同,反射光强度影响相互抵消,因此  $I_0 = I_a + I_t + I_r$  可简化为  $I_0 = I_a + I_t$ 。透射光的强度  $I_t$  与入射光强度  $I_0$  之比称为透光率(transmittance,  $T$ ),即  $T = \frac{I_t}{I_0}$ 。透光率的负对数称为吸光度,用符号  $A$  表示,即  $A = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I_t}$ 。  $A$  愈大,溶液对光的吸收愈多。

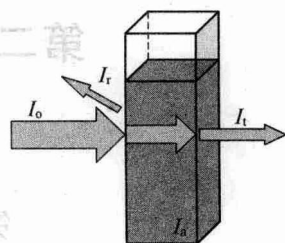


图 2-3 光透过溶液示意图

### (三) Lambert-Beer 定律

一束单色光通过溶液介质后,光能被吸收一部分,吸收多少与溶液的浓度和厚度成正比,即 Lambert-Beer 定律,其表达式为:

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = -kcL \tag{2-1}$$

式中:  $I_0$ ——入射光强度;

$I_t$ ——通过溶液介质后的透射光强度;

$c$ ——溶液介质的浓度(concentration),  $g \cdot L^{-1}$ ;

$L$ ——溶液介质的直径(path length);

$k$ ——吸光系数(absorption coefficient),  $g \cdot cm^{-1}$ 。

由于  $A = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I_t}$ , 所以得到:

$$-A = \lg \frac{I_t}{I_0} = -kcL \tag{2-2}$$

则推导出:

$$A = kcL \tag{2-3}$$

其中  $k$  为常数,又称为消光系数( $\epsilon$ ),表示物质对光吸收的本领,由物质种类和光波长决定。Lambert-Beer 定律是分光光度法的理论基础。

## 三、定性和定量分光光度分析

### (一) 定性分析

吸收光谱曲线是物质的特征性曲线,它与分子结构有严格的对应关系,故可作为定性分析的依据。不同物质的分子结构不同,它们的最大光吸收波长( $\lambda_{max}$ )也往往不同,因此其吸收光谱图具有特殊形状。图 2-4 为维生素  $B_{12}$  溶液的吸收光谱曲线。

### (二) 定量分析

分光光度法最大的用途就是能对物质进行定量分析。许多对光有吸收的物质可直接用分光光度法

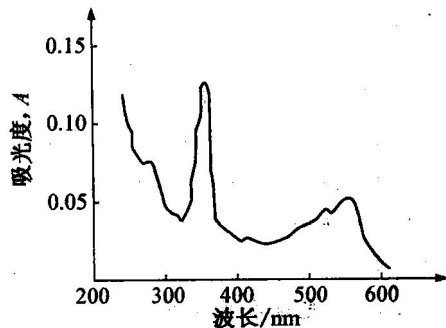


图 2-4 维生素  $B_{12}$  溶液的吸收光谱图

进行定量测定,而一些对光,包括紫外光、可见光或近红外光都无吸收的物质也可通过与某些化学试剂反应而生成呈色物质,在一定的反应条件下和浓度范围内,溶液颜色的深浅(对光吸收的程度)与该溶液中呈色物质的浓度成正比,以此间接对样品进行定量。

### 1. 波长的选择

使用分光光度法测定溶液中物质的含量,首先要选择最适单色波长,因为只有以能被溶液吸收的光束作为入射光才能符合 Lambert-Beer 定律。测定有色物质时,不同颜色的待测溶液,则应选择不同波长的单色光束。在分光光度计上,单色光波长的选择原则一般是使被测溶液的单位浓度的吸光度变化最大,同时还要具有最小的空白及干扰读数,借以获得最高的灵敏度和准确性。最理想的办法是对每种物质先作出它的光谱吸收曲线及有关干扰物质的吸收曲线,根据这些光谱吸收曲线来选择最佳测定波长。表 2-1 列出了可供选择的波长范围。

表 2-1 测定波长的选择范围

待测液颜色	所选波长范围(nm)	待测液颜色	所选波长范围(nm)
绿	490~420	紫青	540~560
绿黄	430~440	蓝	570~600
黄	440~450	蓝带绿	600~630
橙红	450~480	绿带蓝	630~760
红	49~530		

### 2. 利用标准管计算测定物含量

最适波长选定以后就可进行溶液物质含量的测定。通常都采用对比测定法,即以已知精确含量的待测物质溶液作为参考标准物(浓度为  $c_s$ )和未知待测样品(浓度为  $c_x$ )用同一方法,在同一条件下、同时进行测定,读取标准物质的吸光度( $A_s$ )和未知含量的样品吸光度( $A_x$ ),由于标准物质和未知物质是同一物质,其摩尔吸光系数( $\epsilon$ )相同和进行测定用的比色皿内径长( $L$ )相同,即  $L_s = L_x$ ,根据公式  $A = \epsilon cL$ ,可得到:

$$A_s = \epsilon c_s L_s \text{ 和 } A_x = \epsilon c_x L_x$$

由此推导出:

$$c_x = \frac{A_x}{A_s} \times c_s$$

根据标准管中物质的实际浓度,由上式计算出测定管中物质的浓度。

### 3. 利用标准曲线法定量待测物浓度

配制一系列不同浓度的标准溶液(至少五个),按测定管同样方法处理呈色,在选定的波长处分别测定各管的吸光度( $A$ ),以吸光度为纵坐标,标准溶液的浓度( $c$ )为横坐标,在坐标纸上作图,制作标准曲线(图 2-5)。在同样条件下测定待测液的吸光度,从标准曲线上可找出相应的浓度值。

根据 Lambert-Beer 定律,标准液的浓度在一定范

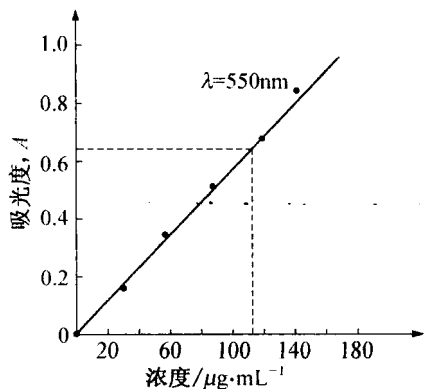


图 2-5 标准曲线法测量待测样品含量



围内与吸光度成直线关系,标准曲线是这种直线关系的描述,一般认为,标准曲线范围在测定物浓度的一半到 2 倍之间,并使吸光度在 0.05~1.0 范围内为宜。

注意:曲线制作与测定管的测定应在同一仪器上进行,由于曲线的建立与实验室当时的条件(如温度、湿度、大气压及电压稳定性等)有关,因此标准曲线常因各种变化而需校正或重做。

4. 根据摩尔消光系数(ε)求待测物质浓度

当浓度为 1mol/L 时,溶液厚度为 1cm,可求出消光系数(ε),然后根据公式  $c = \frac{A}{\epsilon}$  求出待测定物质的浓度。

此法常用于紫外吸收测定法,如核苷酸溶液含量测定,如 UTP 在 262nm 具有最大吸收峰,利用已知 UTP 在 262nm 时的摩尔消光系数(ε),读取待测 UTP 溶液吸光度 A,即可求出该 UTP 的浓度。

两种以上被测物的混合液,也可利用不同 ε 进行定量测定。例如,a,b 两种物质在波长 λ<sub>1</sub> 时的摩尔消光系数分别为 ε<sub>a1</sub> 和 ε<sub>b1</sub>,在波长 λ<sub>2</sub> 时的摩尔消光系数分别为 ε<sub>a2</sub> 和 ε<sub>b2</sub>,a 和 b 混合的溶液在 λ<sub>1</sub> 时的吸光度为 A<sub>1</sub>,在 λ<sub>2</sub> 时的吸光度为 A<sub>2</sub>,则可从下式求出 a、b 两种物质的浓度 c<sub>a</sub> 和 c<sub>b</sub>。

$$\left. \begin{aligned} A_1 &= \epsilon_{a1} c_a + \epsilon_{b1} c_b \\ A_2 &= \epsilon_{a2} c_a + \epsilon_{b2} c_b \end{aligned} \right\} \longrightarrow \begin{aligned} c_a &= \frac{\epsilon_{b1} A_2 - \epsilon_{b2} A_1}{\epsilon_{a2} \epsilon_{b1} - \epsilon_{a1} \epsilon_{b2}} \\ c_b &= \frac{\epsilon_{a1} A_2 - \epsilon_{a2} A_1}{\epsilon_{a1} \epsilon_{b2} - \epsilon_{a2} \epsilon_{b1}} \end{aligned}$$

四、常用分光光度计及使用介绍

各种型号的紫外/可见分光光度计,不论是何种型号,基本上都由五部分组成:①光源;②单色器(包括产生平行光和把光引向检测器的光学系统);③样品室;④接收检测放大系统;⑤显示或记录器。

下面对常见的几种类型的分光光度计的使用做简要介绍。

(一) 722 型可见分光光度计

1. 简介与构造

722 型可见分光光度计是一种结构简单、使用方便的单光束分光光度计,能在 340~1000nm 范围内执行透射比、吸光度和浓度的直读测定,广泛应用于医药卫生、临床检测、石油化工、环保监测、食品生产和质量控制等部门作定性、定量分析,还可作为高等院校和中学相关课程的实验教学仪器。现以 722S 型可见分光光度计为例介绍其构造和使用方法(图 2-6 和图 2-7)。

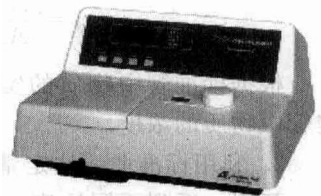


图 2-6 722S 型可见分光光度计外观图

2. 使用方法

(1) 开启电源,指示灯亮,选择开关置于“T”,选择测试所用的波长。仪器预热 20min。

(2) 打开试样室盖(光门自动关闭)。调节“0”旋钮,使数字显示为“00.0”,盖上试样室盖,将比色皿架处于空白对照校正位置,使光电管受光,调节透光率“100%”旋钮,使数字显示为“100.0”。