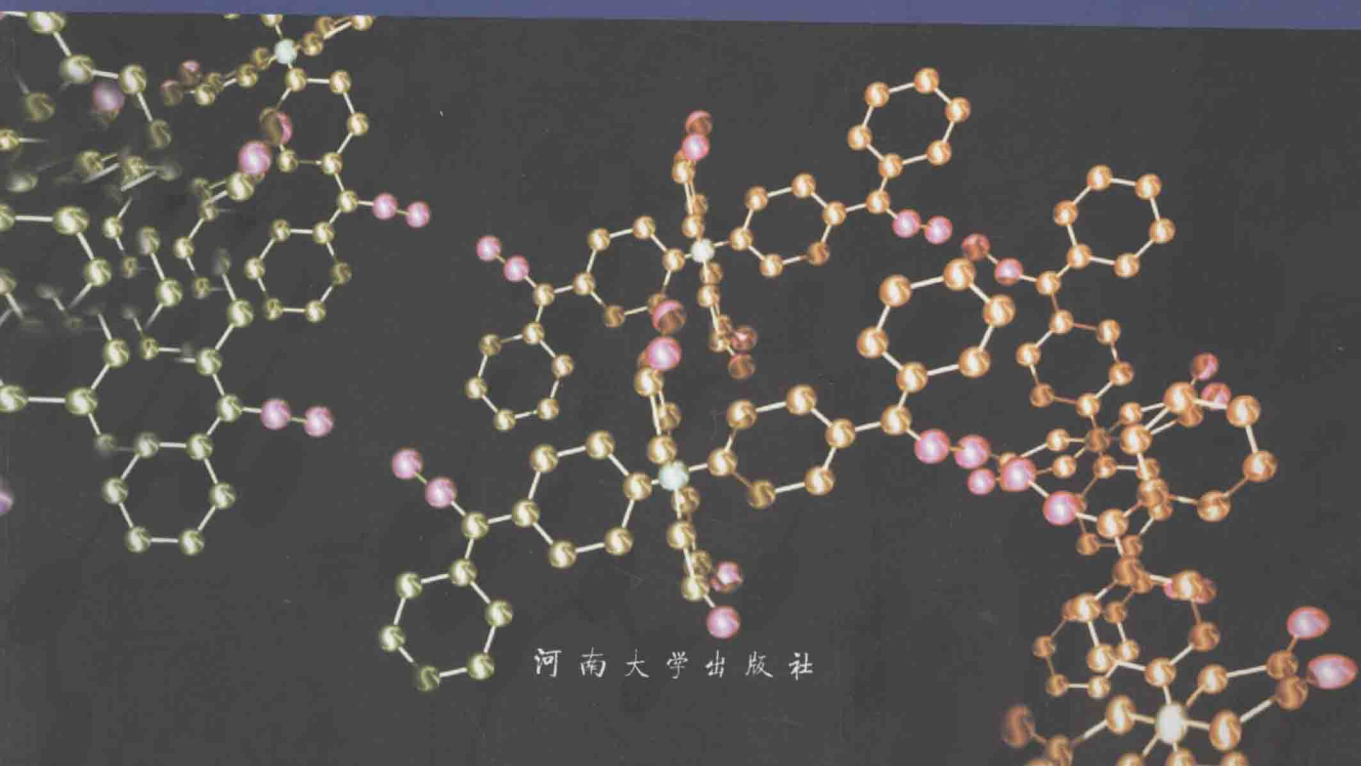


新世纪普通高校医学专业系列教材

生物化学与分子生物学 实验教程

SHENGWU HUAXUE
YU FENZI SHENGWUXUE
SHIYAN JIAOCHENG

张维娟 王玉兰 主编



河南大学出版社

新世纪普通高校医学专业系列教材

生物化学与分子生物学 实验教程

主 编：张维娟 王玉兰
副主编：谷敬丽
编 者：张维娟 王玉兰
谷敬丽 葛振英
房 娜

河南大学出版社
· 郑州 ·

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/张维娟,王玉兰主编. —郑州:河南大学出版社,2014.1
ISBN 978-7-5649-1456-1

I. ①生… II. ①张… ②王… 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. ①Q5—33 ②Q7—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 020227 号

责任编辑 李亚涛

责任校对 付会娟

封面设计 王四朋

出版发行 河南大学出版社

地址:郑州市郑东新区商务外环中华大厦 2401 号 邮编:450046

电话:0371-86059712(高等教育出版分社)

0371-86059713(营销部)

网址:www.hupress.com

排 版 郑州市今日文教印制有限公司

印 刷 郑州市今日文教印制有限公司

版 次 2014 年 2 月第 1 版

印 次 2014 年 2 月第 1 次印刷

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 13

字 数 285 千字

印 数 1 ~ 2000 册

定 价 26.00 元

(本书如有印装质量问题,请与河南大学出版社营销部联系调换)

前言

生物化学与分子生物学是从分子水平了解生命现象、揭示生命奥秘的重要课程,也是医学院校各专业学生必修的主干课程。20 世纪 50 年代,以生物大分子为主要研究对象的新兴学科——分子生物学出现,它的建立和迅猛发展,带动了整个生命学科的发展,成为 21 世纪科技发展的领头学科。目前,生物化学与分子生物学已形成完整的理论体系,先进的实验技术和实验方法,不但有力的推动了本学科理论不断进步,也为生物医学相关学科的发展提供了研究工具。

生物化学与分子生物学是一门实验学科,实验教学是整个教学体系的重要组成部分。掌握生物化学与分子生物学实验的基本技术、实验设计和实验方法,不仅能够培养学生科学严谨的工作态度和思维方式,而且通过实验过程和实验结果,学生能更加直观的观察分子水平的生命现象,提高学生对相关理论的认识水平和分析解决问题的能力。这些实验课程的完成也为学生将来从事科研工作奠定了基础。

本教材适合医、药、护、临床心理学等各专业学生使用,兼顾基本生物化学技术的训练和生物化学与分子生物学实验的设计和的操作。在编排上力求新意,以实验技术为线索进行编排,每一节介绍一项技术,并配有相应的实验项目及图解,使学生在系统了解有关技术的同时,通过动手实验强化相应的知识和能力。教材共分四编:第一编是生物化学基本技能及操作,包括生物化学四项基本技术的原理、应用及使用方法,通过学习使学生逐步掌握生物化学基本实验方法和技术;第二编是生物化学的基础实验,所选实验项目与各专业生物化学教材相匹配,为从专业基础实验课向专业课过渡奠定基础;第三编是生物化学的综合实验,所选实验内容均是在前两编训练的基础上,完成相对完整的生物化学实验内容,使学生在较高层次认识生物化学知识和技术的实际应用,培养学生的逻辑思维和动手操作能力,有些综合实验还可以作为毕业论文的参考;第四编是分子生物学实验,主要帮助学生了解并掌握分子生物学的基本研究方法和技术,也有效提高学生对分子遗传学和基因工程等理论知识的认识水平。

本教材可作为高等院校生物类各专业本科生和研究生生物化学与分子生物学实验教材,也可供相关教学和科研工作者参考。

参加本教材编写的人员长期在教学一线工作,教材的诸多内容凝聚着编者多年的教学经验和心得体会,尽管如此,本教材仍难免有遗漏和不妥之处,恳请读者批评指正。

编者

2013 年 7 月

打造学术精品 服务教育事业
河南大学出版社
读者信息反馈表

尊敬的读者：

感谢您购买、阅读和使用河南大学出版社的_____一书,我们希望通过这张小小的反馈表来获得您更多的建议和意见,以改进我们的工作,加强我们双方的沟通和联系。我们期待着能为您和更多的读者提供更多的好书。

请您填妥下表后,寄回或发 E-mail 给我们,对我们的支持我们不胜感激!

1. 您是从何种途径得知本书的?

☐书店 ☐网上 ☐报刊 ☐图书馆 ☐朋友推荐

2. 您为什么决定购买本书?

☐工作需要 ☐学习参考 ☐对本书感兴趣 ☐随便翻翻

3. 您对本书内容的评价是:

☐很好 ☐好 ☐一般 ☐差 ☐很差

4. 您在阅读本书的过程中有没有发现明显的专业及编校错误? 如果有,它们是:

5. 您对哪一类的图书信息比较感兴趣:_____

6. 如果方便,请提供您的个人信息,以便于我们和您联系(您的个人资料我们将严格保密):

您供职的单位:_____

您教授的课程(老师填写):_____

您的通信地址:_____

您的电子邮箱:_____

请联系我们:

电话:0371-86059712 0371-86059713 0371-86059715

传真:0371-86059713

E-mail:hdgdjyfs@163.com

通信地址:河南省郑州市郑东新区 CBD 商务外环路商务西七街中华大厦 2304 室

河南大学出版社高等教育出版分社

目 录

第一编 生物化学基本技能及操作	(1)
实验 1 基本操作和实验室常识	(1)
实验 2 光谱光度法	(6)
实验 3 层析技术	(11)
实验 4 离心技术	(21)
实验 5 电泳技术	(26)
第二编 生物化学的基础实验	(44)
实验 1 蛋白质的颜色反应	(44)
实验 2 蛋白质的盐析	(46)
实验 3 蛋白质含量测定——紫外分光光度法	(47)
实验 4 蛋白质含量测定——改良 Lowry 法	(49)
实验 5 血清总蛋白测定——双缩脲法	(53)
实验 6 蛋白质等电点的测定	(55)
实验 7 核酸组分的鉴定	(57)
实验 8 维生素 C 的测定——2,4-二硝基苯肼法	(59)
实验 9 温度、pH 对酶活性的影响	(61)
实验 10 K_m 值测定——脲酶 K_m 值的简易测定法	(64)
实验 11 激动剂和抑制剂对酶活性的影响及酶的特异性	(66)
实验 12 汞盐对脲素酶的抑制作用及其解除	(69)
实验 13 乳酸脱氢酶及其辅酶	(71)
实验 14 血清淀粉酶(AMS)碘-淀粉比色法	(73)
实验 15 细胞色素体系的作用及其抑制与解除	(75)
附 细胞色素体系的作用及其抑制	(77)
实验 16 血清葡萄糖的测定	(78)

附 尿糖的定性测定	(82)
实验 17 糖耐量试验	(83)
实验 18 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(84)
实验 19 血清中胆固醇的测定	(85)
实验 20 血浆中磷脂的测定	(88)
实验 21 酮体的生成及定性实验	(90)
实验 22 血清中谷丙转氨酶的测定	(91)
实验 23 血清中谷草转氨酶的测定	(94)
实验 24 血清中无机磷的测定	(95)
实验 25 血清中尿素氮的测定	(98)
实验 26 血浆(清)中碳酸氢根的测定	(101)
实验 27 血清中钙离子的测定	(102)
实验 28 血清中锌离子的测定	(104)
实验 29 羟基磷灰石柱层析法分离鼠肝中 RNA 和 DNA	(107)
实验 30 氯化物的测定	(109)
第三编 生物化学的综合实验	(111)
实验 1 血清 γ -球蛋白的分离、纯化及鉴定	(111)
实验 2 核酸的提取、分离及鉴定	(116)
实验 3 亚麻子脂肪酸的制备及定量测定	(120)
实验 4 离子交换层析法——乳汁过氧化物酶的纯化	(125)
第四编 分子生物学实验	(136)
实验 1 SDS 碱裂解法制备质粒 DNA	(136)
附 1 质粒提取试剂盒纯化质粒 DNA	(139)
附 2 细菌的冻存和复苏	(142)
附 3 聚乙二醇沉淀纯化质粒 DNA	(142)
实验 2 质粒 DNA 的酶切与琼脂糖电泳鉴定	(144)
实验 3 从琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	(148)
附 胶回收试剂盒回收 DNA 片段	(152)
实验 4 DNA 片段的连接反应	(154)
实验 5 用重组质粒 DNA 转化大肠杆菌	(156)
实验 6 聚合酶链反应技术(PCR)	(159)

实验 7 蛋白质免疫印迹分析	(163)
实验 8 Southern 印迹法	(168)
实验 9 Northern 印迹法	(173)
附 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染分析 DNA	(178)
实验 10 GST 融合蛋白的表达与纯化	(181)
附录 I 常用缓冲液及酸碱指示剂的配制方法	(186)
附录 II 几种动物生化常数表	(192)
附录 III 离心机的转速与相对离心力间的换算	(194)
附录 IV SDS 聚丙烯酰胺凝胶配方表	(196)

第一编 生物化学基本技能及操作

实验1 基本操作和实验室常识

生物化学实验中有多种基本操作,如各种玻璃仪器和测量仪的使用,技术操作中样品的混匀、搅拌、振荡、加热、保温、沉淀、过滤、离心等。如果这些操作不规范,将影响实验结果的准确性。因此,应对生物化学实验的一些基本操作深入理解和熟练掌握,这对完成实验来说是非常重要的。

生物化学的实验方法基本上是化学实验方法,也就是用定性和定量的分析方法来观察物质代谢的规律,必须做到定性的清楚及定量的准确。为了做好实验,应先对一些常用仪器的使用方法和实验过程中的基本操作技术反复练习,熟练掌握。

一、基本操作

1. 吸量管的使用

常用的吸量管有以下三种。

(1) 刻度吸量管

刻度吸量管有 0.1mL, 0.2mL, 0.5mL, 1.0mL, 2.0mL, 5.0mL, 10.0mL 等规格。刻度吸量管又分刻度到尖端和刻度不到尖端两种。使用前者时,要将吸量管中的全部液体放出,才能达到指定体积。使用刻度不到尖端的吸量管时,仅需将吸量管内的液体放到下端指定的刻度时,即达到指定体积。

(2) 移液吸量管

也称容量吸量管或胖肚吸量管,是一种单一刻度的吸量管,中间呈圆柱状膨大,为定量移出整量液体之用。移液吸量管有 5mL, 10mL, 15mL, 20mL, 25mL, 50mL, 100mL 等规格,其容量是根据液体自内流出量来计算。流放溶液时,将管尖紧靠容器内壁,使液体自行流出,流完后管尖在容器内壁上停留 15s ~ 30s 即可,管尖残余液体不要吹出。如管壁刻有“吹”字,则应吹出。

(3) 奥氏吸量管

也称欧氏吸量管,也是一种单一刻度的吸量管,中下部呈环形膨大,所以液体与吸量

管表面接触面积较小,用于吸取血液及胶粘液体。流放标本时,应让其自然缓慢地流出,以减少内壁粘附。若为吹出式,管尖最后一小滴应吹出。在实验室常用的有 1.0mL, 2.0mL, 5.0mL 等规格。

吸量管的使用方法:使用吸量管时,操作者左手持吸耳球,右手持吸量管上端,将吸量管浸入液体内大约 0.1cm 深处,不得过深以免管的外壁粘附的溶液太多,也不可太浅,防止空气突然进入管中,将溶液吸入吸耳球内。当吸取液体至刻度上方时,立即用右手食指按住管口。将吸量管下端提出液面,慢慢放开食指使液面下降至所需刻度处,以管尖端接触瓶壁,去除多余液体。然后将吸量管插入另一容器中,再放开食指,使液体流出。观察刻度时,应保持吸量管呈垂直状态,吸量管的刻度面要面对操作者,操作者的视线应与液面处于同一平面上,使弧形液面与刻度线成切线。见图 1-1 所示。

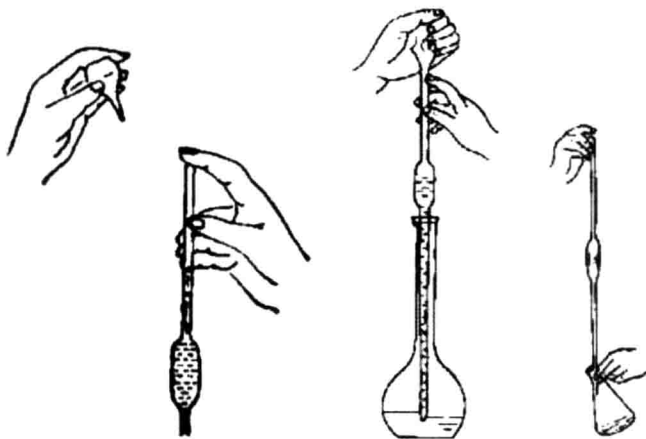


图 1-1 吸量管使用方法

2. 微量移液器的使用

微量移液器又称为微量移液枪或微量加样枪,是移液器的一种,常用于实验室少量或微量液体的移取,规格有很多种,不同规格的移液枪需配套使用不同大小的枪头。移液枪属精密仪器,使用及存放时均要小心谨慎,防止损坏,避免影响其量程。操作方法如下:微量移液器拧到需要的量程,装上枪头,然后手握住枪柄,大拇指按住上面的取液按钮至第一档位,枪头插入试剂液面下,轻轻松开拇指按钮,待试剂吸入后移出移液器,把枪头插入要加入试剂的容器,拇指按下取液按钮,为了把枪头里面的残留试剂都打出去,拇指要用力按至第二档位。用过的枪头如果不用了,可以用拇指按住枪顶端的另一个按钮,把枪头打到废液缸里。见图 1-2、1-3、1-4 所示。



图 1-2 微量移液器握持方法

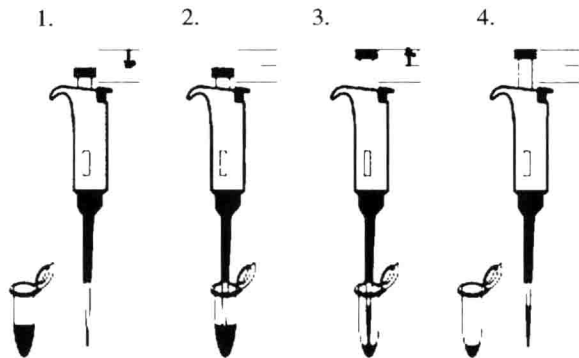


图 1-3 吸取溶液:1. 将取液按钮压至第一档; 2. 尽可能保持微量移液器垂直, 将吸嘴尖端浸入溶液; 3. 缓慢释放按钮, 吸取溶液; 4. 将微量移液器移出。

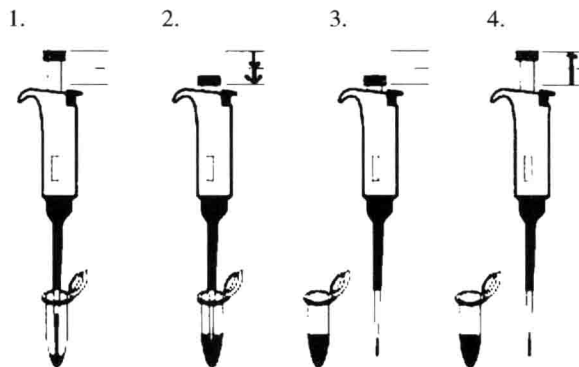


图 1-4 释放溶液:1. 将已吸取溶液的加样枪移至指定容器中; 2. 慢慢压下取液按钮至第二档, 把溶液完全释放; 3. 从容器中撤出加样枪; 4. 吸嘴离开液面后, 放开按钮。

注意事项

- ① 如果是酶等比较贵的试剂, 只需轻轻接触液面即可, 以防止枪头潜入过深粘上多余液体, 造成浪费。
- ② 使用完毕, 把枪调到最大量程, 有利于枪的保养。

③ 吸取具有腐蚀性的溶液时,不可过快吸取,以防止溶液涌进枪内腐蚀枪。

④ 不可超量程使用,过大过小都不行,影响枪的准确性。

3. 玻璃仪器的洗涤

玻璃仪器用完后,应按下列要求清洗:

① 普通玻璃仪器,如烧杯、烧瓶、锥形瓶、试管等,先用自来水冲洗,再以毛刷蘸肥皂液洗刷数遍,以自来水彻底冲刷,最后以少量蒸馏水冲洗,倒置于试管架上。

② 吸量管等量器一般先用自来水冲洗,再以蒸馏水冲洗即可。必要时应该用铬酸洗液浸泡过夜,再以自来水彻底冲刷,最后用蒸馏水冲洗,倒置于吸量管架上,使其自行干燥。

③ 吸取含血液或蛋白质等物质的吸量管或其他容器,必须立即用水冲洗。否则,因凝结不易洗净,如欲浸泡洗液中,也必须先用水冲净、晾干,再浸入其中。

④ 滴定管玻璃塞上如有凡士林,清洗前应将凡士林擦去。

⑤ 一切玻璃仪器洗净后,器皿壁应透明光亮,没有水滴。洗净的仪器不能再布擦其内壁。

铬酸洗液配制法:取重铬酸钾 5g 置于 250mL 烧杯中,加水 5mL,摇动使其充分溶解,慢慢加入浓硫酸 100mL,随加随摇;冷却后,贮存于广口容器内,加盖防止吸水。

4. 搅拌和振荡

① 配制溶液时,必须随时搅拌或振荡混合。配制完时,必须充分搅拌或振荡混合。

② 搅拌使用的玻璃搅棒,必须两头都烧圆滑。

③ 搅棒的粗细长短,必须与容器的大小和所配制的溶液的多少呈适当比例关系。不能用长而粗的搅棒去搅拌小离心管中的少量溶液。

④ 搅拌时,尽量使搅棒沿着管壁运动,不搅入空气,不使溶液飞溅。

⑤ 倾入液体时,必须沿器壁慢慢倾入,以免有大量空气混入。倾倒表面张力低的溶液(如蛋白质溶液)时,更需缓慢仔细。

⑥ 振荡溶液时,应按圆圈转动容器,不应上下振荡。

⑦ 振荡混合小离心管中液体时,可将离心管握在手中,以手腕、肘或肩作轴来旋转离心管;也可由一手持离心管上端,用另一手弹动离心管;也可用一手大拇指和食指持管的上端,用其余三个手指弹动离心管。手指持管的松紧要随着振动的幅度变化。还可以把双手掌心相对合拢,夹住离心管,来回搓动。

⑧ 在容量瓶中混合液体时,应倒持容量瓶摇动,用食指或手心顶住瓶塞,并不时翻转容量瓶。

⑨ 在分液漏斗中振荡溶液时,应用一手在适当角度下倒持漏斗用食指或手心顶住瓶塞,并用另一手控制漏斗的活塞。一边振荡,一边开动活塞,使气体可以随时由漏斗排出。

⑩ 研磨配制胶体溶液时,要使杵棒沿着研钵的单方向进行,不要来回研磨。

5. 沉淀的过滤和洗涤

(1) 沉淀的过滤

① 过滤沉淀一般使用滤纸。

② 应根据沉淀的性质选择不同的滤纸。胶体沉淀,应使用质疏松孔大的滤纸。一般大小颗粒的结晶形沉淀,应使用孔径较小的致密滤纸。而极细的沉淀,则应使用孔径最小的致密滤纸。滤纸越致密,过滤就越慢。

③ 滤纸的大小要由沉淀量来决定,并不是由溶液的体积来决定。沉淀量应装到滤纸高度的 $1/3$ 左右,最多不超过 $1/2$ 。通常使用直径为 $7\text{cm} \sim 9\text{cm}$ 的圆形滤纸。

④ 折叠滤纸应先整齐的对折,错开一点再对折,打开后形成一边一层、一边三层的圆锥体。折叠尖端时不可过于用力,以免容易出洞。放入漏斗中时,滤纸边缘应与漏斗壁完全吻合。撕去三层一边的外面两层部分的尖端,使滤纸上缘能更好的贴在漏斗的壁上,不留缝隙。而下面部分要有空隙,以利于提高过滤速度。

⑤ 滤纸上缘一般应低于漏斗口上缘 $0.5\text{cm} \sim 1\text{cm}$ 。润湿滤纸时,应用指尖轻压滤纸,赶净滤纸和漏斗间的气泡,使滤纸紧贴漏斗壁。同时漏斗颈内必须充满液体,这样,才可借液柱的重量而对滤液产生吸滤作用。

⑥ 过滤时,为了防止沉淀堵塞滤纸的孔洞,通常采用倾泻法,即先小心地把溶液倾入漏斗而不使沉淀流入,只在过滤的最后一步才把沉淀转移到漏斗中。

⑦ 过滤时,将玻璃棒直立在三层滤纸的中间部分,其下端接近但不能触及滤纸,并使盛器紧贴玻璃棒,使液体顺玻璃棒缓缓流入漏斗。液体最多加到距滤纸上缘 $3\text{mm} \sim 4\text{mm}$ 处,过多则沉淀会因滤纸的毛细管作用而爬到漏斗壁上。

(2) 沉淀的洗涤

① 在容器中洗涤沉淀一般采用倾注法,洗涤时,采用少量多次的方法最为有效。通常,容易洗涤的粗粒晶体洗 $2 \sim 3$ 次,难洗涤的黏稠无定形沉淀则需洗 $5 \sim 6$ 次。注意,每次都应尽量倾干以增加洗涤效率,并防止沉淀流失。

② 转移沉淀时,先向沉淀中加入滤纸一次所能容纳量的洗涤液,搅拌成混悬液,不要等待沉淀下沉,立即按倾注清液的同样方式倾入漏斗。容器内剩余的沉淀可以用少量洗涤液按上述方法重复数次,直到全部转移到漏斗内。

③ 在漏斗内洗涤沉淀时,先将沉淀轻轻摊开在漏斗下部,再用滴管(或洗瓶)将洗涤液加入到漏斗上缘稍下的地方,同时转动漏斗,并使洗涤液沿着漏斗不断向下移动,直到洗涤液充满滤纸一半时立即停止。待漏斗中洗涤液完全漏出后,再进行第二次洗涤。通常,完全洗去沉淀所吸附的不挥发物质,需 $8 \sim 10$ 次左右。确定沉淀已经洗净,需要进行必要的检验。必须注意,沉淀的过滤和洗涤工作一定要一次完成,不可间断。

二、实验室常识

① 挪动干净玻璃仪器时,勿使手指接触仪器内部。

② 量瓶是量器,不准用量瓶作盛器。量瓶等带有磨口玻璃塞的塞子,不要盖错。带有玻璃塞的仪器和玻璃瓶等,如果暂时不使用,要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

③ 洗净的仪器要放在架上或干净纱布上晾干,不能用抹布擦拭,更不能用抹布擦拭仪器内壁。

④ 不要用棉花代替橡皮塞或木塞堵瓶口或试管口。

⑤ 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。

⑥ 不要用滤纸称量药品,更不能用滤纸做记录。

⑦ 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口,以免掺进杂质。

⑧ 标签纸的大小应与容器相称,或用大小相当的白纸,绝对不能用滤纸。标签上要写明物质的名称、规格(或浓度)、配制的日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的2/3处,试管等细长形容器则贴在上部。

⑨ 使用铅笔写标记时,要写在玻璃仪器的磨砂玻璃处。如用玻璃蜡笔,则写在玻璃容器的光滑面上。

⑩ 取用试剂和标准溶液后,需立即将瓶口塞严,放回原处。取出的试剂和标准溶液,如未用完,切勿倒回原瓶内,以免掺混。

⑪ 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味气体的实验,均应在通风橱内进行。橱门应紧闭,非必要时不要打开。

⑫ 进行动物实验时,不许戏弄动物。进行杀死或解剖等操作,必须按规定方法进行。绝对不能拿动物、手术器械或药品开玩笑。

⑬ 使用贵重仪器,如天平、比色计、离心机等,应十分重视,加倍爱护。使用前,应熟知使用方法,若有问题,随时请指导实验人员解答。使用时,要严格遵守操作规程。发生故障时,应立即关闭仪器,请示报告,不得擅自拆修。

实验2 光谱光度法

利用各种化学物质(包括原子、基团、分子)所具有的发射、吸收或散射光谱谱系(带状或线状)的特征来确定其性质、结构及含量的技术,称为光谱光度分析技术。可见光、紫外线及红外线照射某些物质后,引起物质内部分子、电子或原子核间运动状态的变化,消耗一部分能量,然后透射出来,再通过棱镜,可得到一组不连续的光谱,此光谱称为吸收光谱。由物质产生吸收光谱的原理建立的分析方法,有比色法和分光光度法。

应用发射光谱而设计的分析仪器主要有火焰光度计、原子荧光光谱仪和荧光比色计等。根据物质的吸收光谱设计的定量分析仪器有:光电比色计、可见光区分光光度计、紫外光区分光光度计、红外光区分光光度计以及原子吸收分光光度计等。

一、原理

光是电磁波的一种,具有不同的波长。波长的范围在400nm~750nm,肉眼可以观察

到的光叫可见光;波长范围在 200nm ~400nm,肉眼观察不到的光叫紫外光。当一束单色光通过溶液时,溶液吸收了一部分光能,其余部分透过溶液。不同物质的分子结构不同,对光的吸收能力也不同。在特定的波长条件下,可通过测定溶液的吸光度,对溶液中的物质进行定量测定。

Lambert – Beer 定律阐明了吸光物质对单色光吸收的强弱与该物质溶液的浓度、光径长度之间的定量关系如下

$$A = -\lg T = -\lg(I_t/I_0) = Ecl$$

式中:E 为吸光系数;

c 为溶液的浓度;

l 为溶液的厚度;

I_0 为入射光强度;

I_t 为出射光强度;

I_t/I_0 称为透光率,用 T 表示。

在实际应用中,为了方便用 A 代表 $-\lg T$,并称为吸光度。Lambert – Beer 定律不仅适用于可见光,也适用于紫外光和红外光。

从 Lambert – Beer 定律可知,吸光度与吸光物质溶液的浓度和溶液的厚度的乘积成正比关系。当待测物质与标准物质溶液的成分相同时,吸光系数 E 相等,而待测物质与标准物质溶液的厚度也相等时,吸光度则与溶液的浓度呈正比。在实际工作中,常用已知浓度求算法和标准曲线法测定物质溶液的浓度。

1. 已知浓度求算法

在相同的条件下测定已知浓度(c_1)标准溶液的吸光度(A_1),同时测定未知浓度(c_2)样品溶液(待测溶液)的吸光度(A_2),如一种物质的两种不同浓度的溶液,与吸光度的关系则为

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{c_1}{c_2}$$

在测得待测溶液和标准溶液的吸光度后,即可算出待测溶液的浓度为

$$c_2 = \frac{A_2}{A_1} c_1$$

2. 标准曲线法

配制已知浓度的标准物质的梯度溶液(呈梯度递增的浓度),用与被测溶液相同的方法处理显色,分别读取特定波长下各已知浓度的标准溶液的吸光度。以各已知浓度为横坐标,以其相应的吸光度为纵坐标,在坐标纸上作图即得标准曲线。依据待测溶液的吸光度在标准曲线上便可查找到其对应浓度。

已知浓度求算法比标准曲线法的误差小。标准曲线法适合于大批量样品的测定,可节约人力和试剂。但应注意,制作标准曲线时,标准溶液的测定必须与待测溶液的测定在

同一台仪器上进行,而且要求操作步骤和其他条件完全一致,否则,会引起很大误差。另外,所作标准曲线只能供短期使用,且应定期进行校验。

二、可见光分光光度计

1. 722 型光栅分光光度计

722 型光栅分光光度计由光源、单色器、试样室、光电管、线性运算放大器、对数运算放大器及数字显示器等部件组成。见图 1-5 所示。

操作方法

- ① 预热:开启电源,开亮指示灯,使仪器预热 20min;
- ② 调节波长:旋转波长旋钮,调节所需波长;
- ③ 调节灵敏度:将灵敏度旋钮置于放大倍数最小的“1”档;
- ④ 调节选择开关:将选择开关置于“T”位;

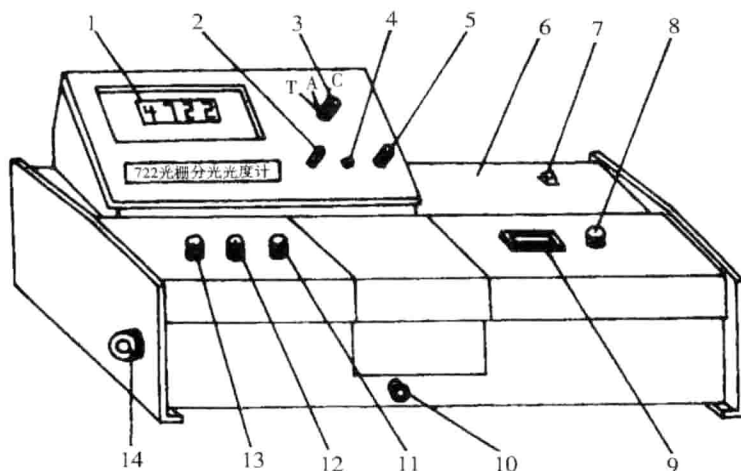


图 1-5 722 型光栅分光光度计

1. 数字显示器 2. 吸光度调节旋钮(消光零) 3. 选择开关 4. 吸光度调斜率电位器
5. 浓度旋钮 6. 光源室 7. 电源开关 8. 波长旋钮 9. 波长刻度窗 10. 试样架拉手
11. 100% T 旋钮 12. 0T 旋钮(0 旋钮) 13. 灵敏度调节旋钮 14. 干燥器

⑤ 调透光率“0”:打开试样室盖(光门自动关闭),将盛有溶液的比色皿置于比色皿架中,依次为空白溶液或对照溶液、标准溶液、样品液 1 和样品液 2。使空白溶液或对照溶液比色皿置于光路位置,调节“0”旋钮,使数字显示为“00.0”;

⑥ 调节透光率“100”:合上试样室盖,调节“100”旋钮,使数字显示为“100.0”,若显示不到,适当增大灵敏度档位。再重复步骤⑤和步骤⑥,保证“00.0”和“100.0”分别到位;

⑦ 调节吸光度“0”:将选择开关置于“A”,仍保持空白或对照溶液置于光路,旋动“消