

生物科学
生物技术
系 列

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与分子生物学 实验技术

第三版

胡琼英 秦春 陈敏 主编



化学工业出版社

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

普通高等教育“十二五”规划教材

生物化学与分子生物学 实验技术

第三版

胡琼英 秦春 陈敏 主编



化学工业出版社

本书由实验和附录两部分组成。实验部分着重介绍了37个综合性、实用性强的生物类实验，分为生物化学实验和分子生物学实验两大部分。本教材凝聚了资深教师数十年实验教学的经验和体会，实验的设计和操作更为科学、严谨，更易于学生学习掌握。本版教材在前两版内容的基础上，对每一实验都增加了详细的实验操作技术指导，在实验教学中获得了良好效果。

在附录中整理和翻译了有关“常用仪器性能指标及使用说明”、“常用缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理与保存”等内容。此外，还补充了一些生化实验方面的习题。

本教材可供理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程及农林院校农学、林学、植保、资源环境、园艺、食品、理学等各专业的学生及相关领域的科技人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术 / 胡琼英, 秦春, 陈敏主编. —3版.
北京: 化学工业出版社, 2014.7
普通高等教育“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-20686-2

I. ①生… II. ①胡…②秦…③陈… 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. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第099728号

责任编辑: 赵玉清
责任校对: 吴静

文字编辑: 张春娥
装帧设计: 尹琳琳

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)
印装: 三河市延风印装厂
787mm×1092mm 1/16 印张12¹/₄ 字数293千字 2014年9月北京第3版第1次印刷

购书咨询: 010-64518888(传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899
网 址: <http://www.cip.com.cn>
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 22.00元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主编 胡琼英 秦 春 陈 敏

编者 (按姓名笔画排序)

卢亚萍 刘琳莉 芮 琪

李少琼 杨志敏 汪 瑾

狄 冽 沈文飏 张益民

陈 敏 茅冬梅 胡琼英

秦 春 聂 理

制图 张益民 刘琳莉 茅冬梅

主审 徐朗莱 聂 理

前言

生物化学实验是生命科学研究的重要手段。学生通过生物化学实验课程的学习，可加深对实验原理的理解、巩固理论知识、掌握生物化学实验的技术、熟悉实验室常用仪器和一些大型精密仪器的使用，从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下一个良好的基础。

《生物化学与分子生物学实验技术》(第三版)是在前两版教材的基础上，进一步结合我校生物学教学实验中心资深教师的实践教学经验，对原教材做了大量修正编写而成的。本版教材更加注重培养学生在定量、定性实验操作中的科学性、严谨性。通过本课程的学习，可以培养学生分析问题、解决问题的能力，激发学生对科学实验的兴趣。

为了使学生通过有限的实验课程学到更多的实验技能，在将来的工作或科研中少走弯路，编者将几十年实验教学的经验和体会融入了本教材。本书会让学生对实验过程中的每一步骤怎样操作、为什么这样操作，有一个较为清晰的理解。本书对学生以及科研工作者都是一本有益的工具书。

本教材内容包括蛋白质、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的提取、分离、电泳、色谱、光谱法检测及分子杂交等定性定量技术。本教材的每个实验后面都附有思考题及答案，便于学生和研究人员在学习和科研中参考。本书可供理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资源环境、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用，可以作为“生物化学实验”、“分子生物学实验”等课程的教材和参考书。

本教材的出版得到了南京农业大学的苏业瑜、叶茂炳、徐朗莱等教授以及生命科学院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助；生物基地51班的张亮、齐继艳、陈舟舟和生命基地62班的张艳红同学以及生物基地91班的牟尚婕、牛静、龙若吟、朱非凡等同学对部分实验内容进行了探究、改进与验证，谨此深表谢意！

鉴于作者水平有限，书中不足之处，欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者

南京农业大学

第一版前言

生物化学实验技术不仅是生物化学的重要内容和理论基础,也是生物科学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学实验,不仅可以进一步巩固生物化学的基本理论,了解实验原理,还能熟悉生物化学实验的基本方法和技术以及许多大型精密仪器的使用,从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下良好基础。

《生物化学实验》供理工科高等院校的生命科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资环、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用,要求学生学会蛋白类、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的分离提取、定量测定或定性鉴定等方法;掌握电泳、层析、离心和光谱法检测等技术;培养学生综合性、设计性实验创新能力。

本书在南京农业大学生命科学院编写的《生物化学实验指导》讲义基础上,又吸取了该校多年的教学、科研、开发工作中的经验和广大学生的建议,对原教材内容进行了必要的修改,重新编写了这本《生物化学实验》教材,并补充了许多新的实验内容,便于学生自学。我们还增设了“自行设计实验”、“综合性选做实验”和“综合性开放实验”,鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神。在附录中,我们还整理和翻译了有关“常用仪器性能指标及使用说明”、“缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理及保存”等内容,为从事综合性生物化学实验的师生们提供方便。

本教材多年来得到了苏业瑜、叶茂炳、周培根、徐朗莱、戚晓玉各位教授和欧瑜等老师以及生命科学院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助;还有生物基地51班的张亮、齐继艳、陈舟舟和王潇同学的积极参与,谨此深表谢意!鉴于作者水平有限,欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者

2007年3月

第二版前言

生物化学与分子生物学实验技术是生物化学的重要内容，也是生物科学研究的重要方法和手段。学生通过生物化学与分子生物学实验，理解实验原理，进一步巩固生物化学与分子生物学的理论知识，并且掌握生物化学与分子生物学实验的基本方法和技术，熟悉实验室常用仪器和一些大型精密仪器的使用，从而为以后的专业课学习以及生产、科研工作打下一个良好的基础。

《生物化学与分子生物学实验》一书是在第一版《生物化学实验》的基础上，结合本校多年的实验教学经验和广大师生的建议，对原教材做了必要的修改。增添了一些新的实验内容、习题及答案。在附录中整理和翻译了“常用仪器性能指标及使用说明”、“缓冲溶液的配制”、“植物样品的采集、处理及保存”等资料。本教材包括蛋白类、糖类、脂类、核酸、氨基酸、酶和维生素的提取、分离、电泳、层析、光谱法检测及分子杂交等定性定量技术，以锻炼学生的基本实验技能，同时培养学生综合实验、设计实验的创新能力。

本书可供理工科高等院校的生物科学、生物技术、生物工程及农林院校的农学、林学、植保、资环、园艺、食品、理学等各专业的本科生使用。可以作为《生物化学实验》、《生物化学分析》、《分子生物学实验》等课程的教材和参考书。

本教材多年来得到了南京农业大学的苏业瑜、叶茂炳、徐朗莱等教授以及生命科学院院领导、实验教学中心领导的大力支持和帮助；还有生物基地51班的张亮、齐继艳、陈舟舟和生命基地62班的张艳红同学的积极参与，谨此深表谢意！欢迎广大师生提出宝贵意见。

编者

2010年5月

南京农业大学

目录

Contents

实验室规则	1
实验记录及实验报告	2
生物化学实验	4
实验一 缓冲液配制和pH值测定	4
实验二 分光光度计线性分辨范围测定	6
实验三 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量	8
实验四 RNA的提取与核酸的颜色反应	14
实验五 影响淀粉酶活性的一些因素	18
实验六 硫酸铵沉降法纯化工业淀粉酶	22
实验七 葡聚糖凝胶色谱法脱盐	24
实验八 淀粉酶活力的测定	28
实验九 Folin-酚比色法测定蛋白质含量	31
实验十 间隔法测定过氧化物酶的活力	35
实验十一 连续记录法测定过氧化氢酶的活力	37
实验十二 2,6-二氯酚靛酚滴定法测定L-抗坏血酸的含量	39
实验十三 荧光光度法测定核黄素的含量	42
实验十四 茚三酮比色法测定赖氨酸含量	45
实验十五 考马斯亮蓝G-250比色法测定蛋白质含量	48
实验十六 纸电泳分离鉴定三种腺苷酸	52
实验十七 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白	53
实验十八 NBT光化还原法测定超氧化物歧化酶活性	56
实验十九 Eadie-Hofstee法测定辣根过氧化物酶的 K_m	58
实验二十 硫酸铵分级沉淀纯化苯丙氨酸解氨酶	60
实验二十一 凝胶色谱法脱去PAL溶液中的硫酸铵	66
实验二十二 DEAE纤维素柱色谱法纯化PAL	70
实验二十三 超氧化物歧化酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	72
实验二十四 过氧化物酶同工酶的分析——等电聚焦电泳	76
实验二十五 过氧化氢酶和辣根过氧化物酶的色谱分离与电泳	80
实验二十六 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶加氧酶提取及其Western杂交检测	84
分子生物学实验	88
实验二十七 用16S rDNA方法鉴定细菌种属	88

实验二十八	植物基因组 DNA 的提取、纯化与定量	90
实验二十九	DNA 琼脂糖凝胶电泳	93
实验三十	基因组 DNA 的酶切与检测	95
实验三十一	质粒 DNA 的提取、纯化与鉴定	96
实验三十二	目的基因 PCR 扩增	99
实验三十三	感受态细胞的制备及转化	101
实验三十四	DNA 测序	103
实验三十五	重组子的构建、筛选与鉴定	105
实验三十六	植物总 RNA 的提取、纯化与检测	109
自行设计实验		111
实验三十七	工业淀粉酶的纯化与分析	111
综合性开放实验		112
附录		113
附录一	植物样品的采取、处理与保存	113
附录二	常用缓冲溶液的配制	115
附录三	硫酸铵溶液饱和度计算表 (0°C)	122
附录四	色谱显色剂	123
附录五	常用凝胶及色谱用滤纸的规格和性能	127
附录六	玻璃仪器的洗涤及一些常用洗涤剂	129
附录七	移液器的使用	131
附录八	分光光度计	132
附录九	离心机	140
附录十	电泳设备	144
附录十一	pH 计	148
附录十二	电子天平	150
附录十三	EDC-810 型 PCR 仪	150
附录十四	实验室安全及防护知识	152
生物化学实验习题		155
生物化学实验习题参考答案		170

实验室规则

1. 每个同学要自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，保持室内安静，不大声谈笑。
2. 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上，然后交给老师审阅。课后写出实验报告，由课代表收交给教师。
3. 环境和仪器的清洁整齐是做好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架必须保持整洁，仪器药品要井然有序，公用试剂用完后应立即盖严，放回原处，勿使试剂药品洒在实验台面和地上。实验完毕，需将药品试剂排列整齐，仪器要洗净倒置放好，将实验台面抹拭干净。完成实验后，经老师检查验收后方可离开实验室。
4. 使用药品、试剂和各种物品必须注意节约，不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂，不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤玻璃仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障立即报告教员，不要自己动手检修。要爱护国家财产，厉行节约。
5. 注意安全。实验室内严禁吸烟！煤气灯应随用随关，必须严格做到：火着人在，人走火灭。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置，实验完毕，应立即关好煤气阀门和水龙头、拉下电闸，各种玻璃器皿放置稳妥，离开实验室以前应认真负责地进行检查，严防不安全事故。
6. 废弃液体（强酸、强碱、溶液必须先用水稀释）可倒入水槽内，同时放水冲走；废纸、火柴头及其他固体废物和带有渣滓沉淀的废物均应倒入废品缸内，不能倒入水槽或到处乱扔。
7. 仪器损坏时，应如实向教员报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补领。
8. 实验室内一切物品，未经本室负责教员批准严禁携出室外，借物必须办理登记手续。
9. 每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生主要负责当天实验室的卫生、安全和一些服务性的工作。
10. 对实验的内容和安排不合理的可提出改进意见，对实验中出现的一些反常现象应进行讨论，并大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习，将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单扼要地写在记录本中。实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，更不要擦抹及涂改，写错时可以准确地划去重写，记录必须使用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据，应该及时地直接记在记录本上，绝对不可以用单片纸做记录或作草稿。原始记录必须准确、简练、详尽、清楚。从实验课开始就应该养成这种良好的习惯。

记录时，应做到正确记录结果，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，在定量实验中观测的数据，如称量物的重量、滴定管的读数、光电比色计或分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为0.050，不应写成0.05，每一个结果最少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录上的每一个数字都是反映每一次的测量结果，所以，重复观测时，即使数据完全相同也应如实记录下来，数据的计算也应该写在记录本的另一页，一般写在正式记录左边的一页。总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、浓度等，都应记录清楚，以便总结实验时进行核对，并作为查找成败原因的参考数据。

如果发现记录的结果有遗漏、丢失或对此有怀疑等，都必须重做实验。将不可靠的结果当作正确的记录，在实际工作中可能造成难于估计的损失，更主要的是这不是实事求是的态度。因此，在学习期间就应养成一丝不苟、严谨求实的科学作风。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量实验两大类，下面分别列举两大类实验报告的格式，仅供参考。

1. 关于定性实验报告

实验编号及实验名称

- (1) 目的
- (2) 原理
- (3) 实验材料及设备
- (4) 试剂的配制
- (5) 操作方法
- (6) 结果分析
- (7) 讨论

一般每次实验课做一个定性实验。实验报告中的实验目的要写出针对这次实验课的内容

而达到的实验目的和要求。在写实验报告时，可以按照实验内容分别写出原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分简述基本原理。操作方法（或步骤）可以采用工艺流程图的方式或自行设计表格来表示。某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分合并。结果与讨论应包括观察到的现象和实验结果，对实验中遇到的问题和布置的思考题进行探讨，并对实验过程或方法提出改进意见等。

2. 关于定量实验报告

实验编号及实验名称

(1) 目的

(2) 原理

(3) 实验材料及设备

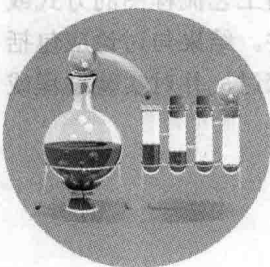
(4) 试剂配制

(5) 操作方法

(6) 结果计算

(7) 讨论

通常每次实验课只做一个定量实验。在实验报告中，目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要地叙述，但是对于实验条件（试剂配制及仪器）和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分，应根据实验课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，如原始数据及其处理的表格、标准曲线以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外，还应针对实验进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括：实验方法或操作技术等有关问题，实验结果是否异常，本实验注意事项以及思考题的探讨。更重要的是与本实验有关的一些知识拓展，查阅几种与本实验类似的另外几种测定方法，比较其优缺点等。说出通过本实验，你的收获，总结经验，吸取教训，提出个人见解。



生物化学实验

吉林师范大学学报 (C)
 吉林师范大学学报 (D)
 吉林师范大学学报 (E)
 吉林师范大学学报 (F)
 吉林师范大学学报 (G)



实验一 缓冲液配制和pH值测定

吉林师范大学学报 (G)



一、目的

1. 了解配制缓冲液和pH计的基本原理。
2. 掌握配制缓冲液和使用pH计的基本方法。

二、原理

在一定的酸或碱的作用下，能够自动调整和保持溶液pH值基本不变的溶液称为缓冲液。以HAc和NaAc组成的缓冲液为例，它的pH符合下面关系： $pH = pK_a - \lg \frac{[HAc]}{[Ac^-]}$ ，因此，改变[HAc]/[Ac⁻]的比值，可以在一定范围内配制不同pH值的缓冲液。缓冲液的缓冲容量大小不仅与其总浓度有关，而且与其组分子比也有关。总浓度越大，缓冲容量越大；总浓度一定，其组分子比越接近1，缓冲容量越大。缓冲液适当稀释或浓缩，其pH值基本保持不变。

测定pH值的pH计（或称酸度计），一般是由一支对H⁺敏感的玻璃电极和一支不随溶液中被测离子活度变化而改变其本身电位的甘汞电极以及一个测量电位的电位计所组成，两支电极和测试溶液构成一个伏特电池，电极在不同的pH值溶液中产生不同的电位，它符合电化学理论中的Nernst方程，即 $E = E^{\ominus} - (2.303RT/F)pH$ 。测定中，首先测得已知pH的标准缓冲液中产生的电位 E_s ，然后，由测得未知pH缓冲液中产生的电位 E_x 通过 $pH_x = pH_s + \frac{(E_s - E_x)F}{2.303RT}$

可直接计算出该缓冲液的pH_x。为了方便，pH计上装有一个定位调节器，当测量标准缓冲液pH时，利用它可把读数直接指示在标准的pH值上，这样在以后测未知pH的缓冲液时，该电位读数也就直接表示相应的pH值。在本实验使用的Beckman Φ61 pH计中，以上过程均由仪器自动完成。

三、实验试剂及设备

1. 试剂

磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O)、磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄ · 2H₂O)、冰醋酸、醋酸钠

($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸、盐酸、标准pH缓冲液 (pH4.01、7.00、10.01)。

2. 仪器

电子天平 (感量0.001g)、pH计。

3. 器材

容量瓶: 100mL×2; 量筒: 50mL×1; 移液管: 10mL×1; 烧杯: 100mL×1, 200mL×2; 漏斗、洗瓶、洗耳球、移液管架、玻璃棒: 各1。

四、操作步骤

1. 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液配制 (0.1mol/L, pH7.0)

(1) 由附录“常用缓冲溶液的配制”表中通过计算, 分别称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ _____g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____g, 用蒸馏水溶解后, 定容至100mL。

经验提示

这种方法称之为“重量法”, 其优点是操作简单、节省试剂。但其试剂必须是在空气中化学性质稳定, 能够准确称量。

(2) 将配好的缓冲液倒入相应的试剂瓶, 贴上标签, 保存备用。

2. 醋酸-醋酸钠缓冲液配制 (0.1mol/L, pH5.4)

(1) 0.1mol/L醋酸钠母液的配制: 称取 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ _____g, 用蒸馏水溶解后, 定容至50mL。

(2) 0.1mol/L醋酸母液的配制: 吸取冰醋酸 _____mL, 用蒸馏水定容至1000mL。

(3) 取0.1mol/L醋酸钠母液43mL、0.1mol/L醋酸7mL, 于烧杯中混匀, 用pH计测定pH值, 使混合液的pH值最终达到5.4。

经验提示

这种方法是“母液法”-“调制法”的结合。“母液法”是先配制一定体积的共轭酸溶液和一定体积的共轭碱溶液, 如果两种共轭酸碱的试剂化学性质稳定, 按附录表格中pH值对应的体积比配制就可得到所需的缓冲溶液。但是, 因为醋酸是挥发性的液体酸, 用母液法配制的0.1mol/L醋酸溶液浓度是不准确的。严格讲, 应该是小于这个浓度的。所以按附录表格中pH值对应的体积比配制得到的缓冲液的pH值是不准确的, 还需要用pH计来调制。

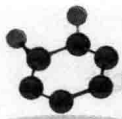
(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶, 贴上标签, 保存备用。

3. Tris-Gly-HCl缓冲液配制 (0.025mol/L, pH8.3)

(1) 称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 0.300g、甘氨酸1.44g, 加入约80mL蒸馏水, 加热溶解。

(2) 冷却后, 用pH计测定pH值, 并不断滴加2.5mol/L盐酸, 使pH值最终达到8.3。

(3) 用蒸馏水定容至100mL。



经验提示

这种方法是“重量法”-“调制法”的结合。因为对某些实验，Tris和Gly浓度是限定的，所以一定是先根据所需要浓度称取一定量的Tris和Gly，但这两种共轭酸碱对按此量混合，pH值又不可能达到所需要缓冲液的pH值。因此在实验反应体系允许的条件下，先用某种酸或碱来把pH值通过pH计调到所需值。

(4) 将配制好的缓冲液倒入试剂瓶，贴上标签，保存备用。

五、思考题

1. 配制缓冲液时，选取合适的缓冲试剂，主要根据什么原则？
2. 配制缓冲液，常用的方法有哪几种？
3. 在我们用调制法配制缓冲液时，当pH计测出你的溶液比你所需要的pH值高，应该向缓冲液中加什么来把pH值降下来？当pH计测出你的溶液比你所需要的pH值低，应该向缓冲液中加什么来把pH值升上去？



实验二 分光光度计线性分辨范围测定



一、目的

1. 学习分光光度计的工作原理，掌握比色测定的基本操作方法。
2. 掌握标准曲线的制作及分光光度计最佳测试浓度范围的确定。

二、原理

比色法是常用的生化分析方法，利用分光光度计可以很方便地完成多种生物物质的定量分析。比色法的理论基础是朗伯-比尔定律，其测定浓度范围要求在分光光度计线性分辨范围内。

光线的本质是电磁波的一种，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的光线称为紫外光；大于750nm的光线称为红外光。

当光线通过透明溶液介质时，其辐射的波长有一部分被吸收、一部分透过，因此光线射出溶液之后，部分光波减少，这种光波的吸收和透过可用于某些物质的定性定量分析。

分光光度法依据 Lambert-Beer 定律： $\lg \frac{I_0}{I} = KcL$

令 $A = \lg \frac{I_0}{I}$ ， $T = \frac{I}{I_0}$ ，则 $A = KcL$ ， $A = -\lg T$

式中 T ——透光率；

A ——吸光度（有时用光密度OD表示）；

- I ——透射光强度；
- I_0 ——入射光强度；
- K ——吸收系数；
- L ——溶液的光径长度；
- c ——溶液的浓度。

从上式可以看出，一束单色光通过溶液后，光波被吸收一部分，其吸收多少与溶液的浓度和溶液厚度成正比，当入射光、吸收系数 K 和溶液的光径长度 L 不变时，吸光度 A 与溶液的浓度 c 成正比（图2-1）。用标准曲线法，即可对未知样品做定量分析。

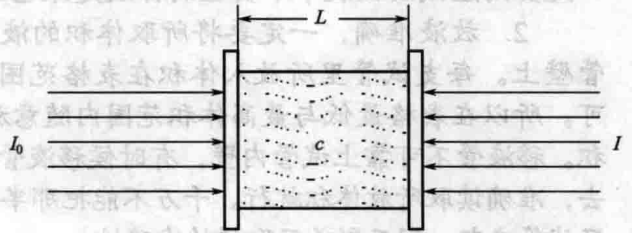


图2-1 Lambert-Beer 定律示意图

三、实验材料及设备

1. 仪器

UV5200型分光光度计。

2. 器材

刻度试管：25mL×21；移液器：1mL×1；吸头几只；烧杯：250mL×2，50mL×1；洗耳球：2；滴管：2；移液管（白线）：1mL×1, 2mL×1, 5mL×1；洗瓶、试管架、移液管架：各1。

四、试剂的配制

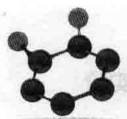
0.01mol/L 硫氰化铁 $[Fe(SCN)_3]$ 溶液：称取30.000g（过量）KSCN和27.05g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ，加入2.5mol/L HCl 100mL，用蒸馏水溶解后定容至1000mL（经验提示：保质期一个星期）。

五、操作步骤

取15支试管，按表2-1所示顺序操作。

表2-1 分光光度计线性分辨范围测定

操 作		管 号														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
硫氰化铁 标准液	$Fe(SCN)_3$ /mL	0	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.6	1.8
	蒸馏水/mL	定容至10mL，各管混匀														
选择波长		用8号管的溶液寻找较大吸收峰的波长 $\lambda =$ _____ nm														
比色		以0号管为空白参比，测定该波长的吸光度														
吸光度 (A)																



经验提示

1. 取液准确，本实验可以用移液管取标液，也可以用移液器取标液，但移液器的准确性不是很可靠，所以一般建议用移液管取标液；但用移液管取液时，一定要用差减法放液；本实验的标液是深色的，所以要用白线条的移液管。

2. 放液准确，一定要将所取体积的液体全部放入试管的底部，不能挂在试管壁上。每支试管里所放入体积在表格范围内是任意的，不必非要按表格数据不可。所以在表格最低与最高体积范围内随意放，但要准确记录该管所放入的液体体积。移液管不可靠上试管内壁，有时候移液管下端管口会挂半滴，那就再多放1滴下去，准确读取所放体积就行。千万不能把那半滴在试管上方内壁靠一下，因为它到不了试管底部，因而影响了取样的准确性。

3. 准确定容后一定要充分摇匀。

4. 正确操作分光光度计，做好比色皿的润洗工作。比色皿的外壁不能挂有液体，如挂有液体，一方面污染仪器，另一方面造成待测液的光径变厚，使吸光值的数据变大而失真。

本实验如果做得好，应该在工作曲线中找到一段 $R^2 = 0.999$ 以上的直线。该直线对应的样品浓度范围就是分光光度计对硫氰化铁溶液的线性分辨范围。

六、结果处理

1. 由0~14号管的数据，以硫氰化铁溶液的体积为横坐标、吸光值为纵坐标，在计算机中绘制标准曲线；要求显示线性方程($y = ax + b$)与线性关系。要求 $R^2 = 0.999$ 以上。

2. 根据曲线分析分光光度计对硫氰化铁溶液的线性分辨浓度范围。

七、思考题

1. 做比色测定时，标准溶液的浓度范围应怎样选定？待测样品溶液的浓度应稀释在什么范围？

2. 比色时，设一个“0”号管的意义是什么？



实验三 3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的含量



一、目的

1. 了解3,5-二硝基水杨酸比色法测定糖的原理。
2. 掌握还原糖和总糖定量测定的一种方法。

二、原理

还原糖是指含自由醛基或酮基的单糖（如葡萄糖）和某些具有还原性的双糖（如麦芽