

医学生物化学

与分子生物学实验

教程

主编 刘吉民 张家颖



33



吉林大学出版社
JILIN UNIVERSITY PRESS

医学生物化学与分子生物学 实验教程

主 编 刘吉民 张家颖
副主编 孙国光 万 敏

吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学实验教程/刘吉民,张家颖编著. —长春:吉林大学出版社, 2002.12

ISBN 7 - 5601 - 2782 - 7

I. 医... II. ①刘...②张... III. ①医用化学:生物化学—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. ①R313—33②Q7—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 100543 号

主 编 刘吉民 张家颖
副主编 孙国光 万 敏
参编者 李小林 李晓梅 李健伟
 陆艳娟 杨成君

医学生物化学与分子生物学 实验教程

主编 刘吉民 张家颖

责任编辑、责任校对:郑贤花

封面设计:孙 群

吉林大学出版社出版
(长春市明德路3号)

吉林大学出版社发行
长春市永昌福利印刷厂印刷

开本:787×1092毫米 1/16

2002年12月第1版

印张:8.75

2002年12月第1次印刷

字数:179千字

印数:1—2 500册

ISBN 7—5601—2782—7/R·23

定价:14.00元

前 言

生物化学与分子生物学是生命科学中发展最为迅速的学科领域之一，作为实验科学，该学科的发展与进步离不开新的实验技术和实验手段的开发与应用，况且生物化学与分子生物学的实验方法、手段基本也是基础及临床医学研究中广泛、普遍应用的实验技术，与其他许多学科的实验课大部分是验证性实验不同，生物化学与分子生物学实验理论及实验是相对独立的一门重要医学基础课。就本专业来讲，医学本科生在校期间除理论课之外应能较系统而又简明扼要地学习和掌握生物化学与分子生物学的实验理论和实验技能，以适应不断发展的医学实践的需要及为将来进一步从事的研究工作打下基础。正是基于此需要，我们在原实验教材的基础上经整理、增删、修改，尝试编写了这本教材。编写中注意到了使其能尽量反映出该领域较成熟的进展与进步。为避免重复，在理论课教科书中已出现的有关实验理论内容在本教材中未列入，这可能在一定程度上影响某些内容的系统性、完整性。教材最后部分加进了“附录”，介绍生物化学与分子生物学常用资料及数据，以期提高该实验教材的实用性。

本教材上篇第一、二、三章及附录由孙国光编写，第四章由杨成君编写，第五、六章由刘吉民编写，第七章~第十章由张家颖、万敏编写；下篇由张家颖、孙国光、万敏、李小林、李晓梅、李健伟、陆艳娟等编写。教材中所列实验较多，且繁、简、深、浅不一，这是适应七年制医学班、五年制本科、大专及成人教育等不同学制和办学方式需要而选择编入的。授课教师可根据不同要求、学时及具体情况加以选择组合使用。编写过程中承蒙洪敏教授、杨翰仪教授审阅，均提出了宝贵意见，教材中的插图均为我教研室杨成君老师绘制，在此一并表示感谢。

由于编写经验不足且时间仓促，疏漏甚至错误之处难免，请使用的同志及诸位同仁不吝批评指正，我们将不胜感激。

编 者

2002年8月

实验室规则

- (一) 自觉地遵守课堂纪律，维护秩序，保持安静，不迟到，不早退，不大声说笑。
- (二) 课前要认真预习，做好实验设计。在实验过程中，听从教师指导，严格按操作规程进行。实验结果和数据要真实准确、简要地记录在实验记录本上。完成实验后，当堂写出实验报告，经教师检查同意，方可离开。
- (三) 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。不要将试剂药品洒在实验台面和地上，严禁向水槽内丢火柴杆、碎纸片等物。实验完毕，将用具刷洗干净，放回原处，把实验台面抹拭干净，经教师验收仪器后，方可离开。
- (四) 使用实验器材应倍加爱护。要节约使用试剂、水电、煤气、火柴、肥皂等消耗品。应特别注意药品和试剂的纯净，严防混杂。
- (五) 注意安全。实验室内严禁吸烟！乙醇、乙醚、丙酮等易燃物品，使用时必须远离火源。实验完毕，应立即关好煤气阀和水龙头，离开实验室前要认真地进行检查，以防发生事故。
- (六) 仪器损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏仪器登记表，然后方可补领。
- (七) 每次实验课由同学轮流值日。值日生要负责当天实验室的卫生、安全及服务性工作。
- (八) 实验的内容和安排如有不合理的地方，可提出改进意见。对实验中出现的一切异常现象应积极讨论，大胆提出自己的看法，做到生动、活泼、主动地学习。

目 录

上篇 实验基本技术及原理

第一章 实验样品的制备	(1)
一、血液	(1)
二、尿液	(1)
三、组织	(2)
第二章 几种常用的生物大分子实验技术	(3)
一、盐析技术	(3)
二、透析和超滤	(5)
三、减压浓缩和冷冻干燥	(6)
第三章 分光光度法及比色分析法	(7)
一、原理	(7)
二、仪器的基本结构	(8)
三、两种常用的国产仪器使用方法	(9)
第四章 层析技术	(12)
一、吸附层析	(12)
二、分配层析	(13)
三、离子交换层析	(15)
四、凝胶过滤	(19)
五、亲和层析	(22)
第五章 电泳技术	(24)
一、原理	(24)
二、纸上电泳和醋酸纤维素薄膜电泳	(26)
三、琼脂及琼脂糖凝胶电泳	(28)
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(28)
第六章 酶联免疫吸附测定法	(33)
一、原理	(33)
二、类型	(35)
三、试剂与器材	(37)
四、操作方法	(38)
五、注意事项	(38)
第七章 离心分离技术	(39)
一、沉降理论	(39)

二、沉降系数	(40)
三、加速度的比	(41)
四、几种离心分离法	(42)
第八章 分子克隆	(44)
一、真核细胞基因组 DNA 的制备	(44)
二、细胞总 RNA 的提取	(44)
三、质粒 DNA 的制备	(45)
四、DNA 插入片段的制备	(45)
五、连接反应	(46)
六、重组质粒的转化	(47)
第九章 外源基因的表达	(49)
一、外源基因在原核细胞中的表达	(49)
二、外源基因在真核细胞中的表达	(50)
三、Western 印迹	(51)
第十章 核酸分子杂交技术	(53)
一、核酸探针	(53)
二、Southern 印迹	(58)
三、Northern 印迹杂交	(59)

下篇 实验部分

实验一 蛋白质的颜色反应	(60)
实验二 微量凯氏定氮法	(61)
实验三 测定蛋白质的比色分析法	(64)
实验四 紫外分光光度法测定蛋白质	(66)
实验五 血清葡萄糖含量的测定	(68)
实验六 食物中维生素 C 含量测定	(70)
实验七 酶促反应动力学实验	(72)
实验八 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白质	(77)
实验九 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(78)
实验十 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)	(83)
实验十一 乳酸脱氢酶同工酶的测定(电泳法)	(86)
实验十二 血清脂蛋白的琼脂糖凝胶电泳	(88)
实验十三 胡萝卜素的吸附层析法	(90)
实验十四 氨基移换作用与氨基酸的纸上层析	(91)
实验十五 氨基酸的薄层层析	(93)
实验十六 DEAE 纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(94)
实验十七 血清 γ -球蛋白的提纯	(96)

实验十八 真核细胞 DNA 与 RNA 的分离提取	(99)
实验十九 重组质粒 DNA 的提取酶切鉴定	(101)
实验二十 DNA 与 RNA 的定量测定	(103)
实验二十一 DNA 聚合酶链式反应(PCR)	(103)
实验二十二 DNA 重组	(104)
实验二十三 核酸杂交	(109)
实验二十四 Western 印迹	(117)

附录

一、实验室安全及防护知识	(119)
二、实验误差与数据处理	(121)
三、试剂分级及注意事项	(126)
四、常用缓冲溶液的配制	(126)

上篇 实验基本技术及原理

第一章 实验样品的制备 (Preparation of experimental samples)

生物化学实验的材料通常是血、尿或组织等，有时还要用粪便、胆汁、胃液及其他生物材料。在进行实验前，往往都需要预先加以适当的处理。下面仅介绍血液、尿液及组织的主要处理方法。

一、血液

采血的仪器必须保持清洁与干燥。采集血清，无需使用抗凝剂，让血液自行凝固，当血块收缩后，即有血清分离出来。在生物化学实验中，多数情况下要求尽快将血清分离，以免引起血清成分的变化。若血块粘着容器壁过紧，血清不易分离出来，可用细玻璃棒轻轻剥离，将血液离心，可使血清分离得较快、较多。这种方法在生物化学实验中经常采用。

若要采用全血或血浆，就要应用抗凝剂来防止血液凝固。常用的抗凝剂是草酸钾，也有采用柠檬酸钠或氟化钠，有些情况下也可应用价格较贵的肝素作为抗凝剂。抗凝剂的用量要适当，不宜过多，以免影响实验结果，通常每毫升血液需要草酸钾 1~2 mg 或肝素 0.01~0.2 mg(相当于 1~20 国际单位)。使用时可先配成浓溶液，按需要量加到盛血的容器中蒸发干后备用。

应用血清或血浆时要避免溶血。除仪器干燥外，还应注意不要将血液剧烈振荡，而且不要采血后放置过久(数小时以上)，以免产生溶血，污染血清或血浆。

要测定血液中的非蛋白质成分时(如血糖、NPN 等)，为了防止蛋白质产生干扰，往往要首先将样品中的蛋白质除去。常用的方法是利用三氯醋酸、钨酸及氢氧化锌等沉淀剂与蛋白质作用，然后用过滤或离心技术制成无蛋白滤液。

二、尿液

进行定性试验可以用新收集的尿液，如不能立即试验，则宜放阴凉处存放，或加入适当的防腐剂(甲苯、盐酸等)。

要进行定量分析时，通常要采用收集 24 h 的混合尿液作测样，因为一次排出尿液的成分受许多因素(如食物、饮水等)的影响，变化很大，不能准确反映物质代谢的真实情况。

三、组织

应用动物组织进行实验，要求在动物杀死后迅速取出组织处理，用冷冻生理盐水冲洗或灌流干净后，尽快制成组织切片或组织匀浆，供进一步实验应用。

有些生化实验(例如组织呼吸的实验)要求应用组织的薄片来进行实验，可用刀片或特制的装置来切片，制成薄薄的组织片。但是，生化实验中更常用的是组织匀浆，即以适量盐类溶液或缓冲溶液和组织共同研磨，制成匀浆。当组织数量较大时，可先用高速组织捣碎机将组织捣碎(样品量少时可用剪刀尽量剪碎)备用。若组织数量较少，则可用乳钵加少量海砂(经洗涤处理过的)研磨成浆。制备组织匀浆常用的是组织匀浆器，它是由一个厚壁玻璃试管状容器和一个研杵所组成。有些组织匀浆器的研杵是用手转动，适用于极少量匀浆的制备。制备组织匀浆量较大时则组织匀浆器的研杵由可调速的马达(电动搅拌机)带动，效率较高。应用时将适量剪碎的组织与盐溶液(或缓冲溶液)放入匀浆器中，用马达带动的研杵插入管中，以约 1000 r/min 的速度带动研杵转动，并小心将旋转的研杵做上下移动若干次，即可将组织研磨成匀浆。不过要注意，在研磨时有大量热产生，为了避免酶类丧失活性，故应在冰浴中进行。

第二章 几种常用的生物大分子实验技术 (Several convenient laboratory techniques for macromolecules)

一、盐析技术(Salting out technique)

盐析法是蛋白质(包括酶类)分离纯化的常用技术,它的原理是蛋白质在高浓度盐类溶液中,其溶解度随浓度的增加而降低。各种蛋白质的溶解度不同,因而可利用不同浓度的高浓度盐类溶液来沉淀分离各种蛋白质。在盐析时,蛋白质的溶解度与溶液中离子强度有如下关系:

$$\lg \frac{S}{S_0} = -K_s I$$

式中 I 为离子强度, S_0 为蛋白质在纯水中的溶解度, S 为蛋白质在离子强度为 I 的溶液中的溶解度, K_s 称为盐析常数(Salting-out constant)。

离子强度(Ionic strength)是溶液中各种离子的摩尔浓度(C_i)与该离子的化合价数(Z_i)平方的乘积的总和的 $1/2$ 值:

$$I = \frac{1}{2} (C_1 Z_1^2 + C_2 Z_2^2 + C_3 Z_3^2 + \cdots + C_n Z_n^2) \\ = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

盐析常数 K_s 的值主要和盐的性质(包括该盐类的离子价数和离子平均半径)有关,也和蛋白质的性质有关,不同蛋白质对于同一盐类的 K_s 值也不同。例如用硫酸铵作盐析时,下面几种蛋白质的 K_s 值分别是:人血红蛋白 0.71, 马肌红蛋白 0.94, 卵清蛋白 1.22, 纤维蛋白原 1.46。所以纤维蛋白原最易被盐析出来,即只要较低离子强度就足以使它从溶液中沉淀析出;反之,血红蛋白盐析所要求的硫酸铵浓度要高得多。在一定的 pH 和温度条件下,通过改变盐类的浓度(离子强度)来分离蛋白质的方法,称为 K_s 分段盐析法。

$\lg S_0$ 值(常为 β 值)是个常数,它主要取决于蛋白质的性质,也和溶液的 pH 值及温度有密切关系,而与 K_s 值不同(K_s 与溶液的 pH 值及温度的关系不大)。根据前面公式可改写为:

$$\lg S = \beta - K_s I$$

当离子强度不变时,通过改变溶液 pH 或温度来改变 β 值,也可以达到分离蛋白质的目的,这种方法称为 β 分段盐析法。通常在蛋白质的初步提纯阶段多用 K_s 分段盐析法,而在最后精细提纯的步骤则可采用 β 分段盐析法。

盐析提纯蛋白质时要选择的几个条件:

(一) 盐的种类

蛋白质盐析常用的盐类是硫酸铵,也可采用硫酸钠、氯化钠、硫酸镁等,通常把这

些盐类称为中性盐，硫酸铵的优点是溶解度大，25℃下可达到541 g/L (4.1 mol)，这样高的浓度足以把许多蛋白质盐析出来。另一个优点是它的温度系数小，即溶解度受温度的影响不大，例如在0℃时它的溶解度还可达到515 g/L (3.9 mol)，这对于蛋白质纯化工作要求在低温条件下进行来说，应用硫酸铵来进行盐析非常有利。此外它的价格低，容易获得，而且不易引起蛋白质变性，所以应用最广。不过它还存在一定缺点，例如它所含有的铵离子可干扰双缩脲反应，使应用Lowry氏法(常用的蛋白质定量分析方法)发生困难，使用上受到一定限制。

(二) 盐的浓度

分段盐析法通过改变盐类浓度来达到分离目的，因此要求准确将溶液中盐类浓度逐步提高到各种蛋白质盐析所需的浓度。

在盐析法中常用饱和度来表示所需的盐类浓度，而以饱和溶液的饱和度定为100%。当实验中需要将蛋白质溶液的硫酸铵饱和度从 S_1 提高到另一新的饱和度 S_2 时，可以方便地直接从表1-1中查出需要添加的固体硫酸铵量。

表 1-1 室温下由饱和度 S_1 提高到 S_2 时每升溶液应添加固体硫酸铵的量/g

S_1 S_2	0.10	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
0	55	113	144	175	209	242	278	312	350	390	430	474	519	560	608	657	708	760
0.10		57	67	118	149	182	215	250	287	325	365	405	448	494	530	585	634	685
0.20			29	59	90	121	123	188	225	260	298	337	379	420	465	512	559	610
0.25				29	60	91	93	157	192	228	265	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	62	125	160	195	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	31	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40								63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45									31	64	98	133	169	206	245	286	330	373
0.50										32	63	100	135	172	211	250	292	335
0.55											33	66	101	138	176	214	255	298
0.60												33	67	103	140	179	219	261
0.65													34	69	105	143	182	224
0.70														34	70	108	146	187
0.75															35	72	110	149
0.80																36	73	112
0.85																	37	75
0.90																		37
0.95																		

此外，也可以先配制盐的饱和溶液，然后根据需要逐步加入蛋白质溶液中以提高盐的饱和度来达到分段盐析的目的。每次提高盐的饱和度所需的饱和溶液量可用下式求出：

$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

式中 V 为所需添加的饱和溶液的体积(mL)， V_0 为需要提高饱和度的蛋白质溶液的体积， S_2 为所需达到的饱和度， S_1 为原来蛋白质溶液的盐饱和度。

(三) pH 值

前面已经指出, β 值和溶液的 pH 值有密切关系。当溶液的 pH 值达到蛋白质的等电点时, β 值最小, 蛋白质的溶解度最低, 最容易从溶液中析出。因此进行盐析时, 应注意溶液的 pH 值, 通常溶液的 pH 值要控制在接近于待分离的蛋白质的等电点。例如, 配置饱和硫酸铵溶液时, 往往还需要向溶液中添加适量 1:1 硫酸或浓氨水, 调节溶液的 pH 值, 使接近于待分离蛋白质的等电点。若要分离血清清蛋白, 可调节到 pH 为 5 左右; 要分离 γ -球蛋白, 则要调节到 pH 为 7 左右。

(四) 温度

温度对 β 值的影响通常不如 pH 值的影响大, 故盐析时控制温度的要求不很严格。但为了避免蛋白质的变性或水解, 通常都选择较低温度的条件来进行盐析。

(五) 蛋白质浓度

需要进行盐析的溶液的蛋白质浓度, 对盐析所要求的盐类饱和度有相当明显的影响, 蛋白质浓度越高, 盐析所需的盐类饱和度越低。所以要盐析的蛋白质溶液浓度不宜过低, 以免使所需的盐饱和度太高, 不易沉淀析出。但是, 蛋白质的浓度也不宜过高, 浓度过高的蛋白质会和其他杂蛋白产生共沉作用, 即和一些不需要的蛋白质夹杂在一起沉淀下来, 影响被提纯的蛋白质的纯度。

二、透析和超滤 (Dialysis and ultrafiltration)

透析是利用蛋白质等生物大分子不能透过半透膜的性质的一类纯化方法。用半透膜将含生物大分子的盐类溶液与蒸馏水(或其他不含该生物大分子的溶液)分隔开, 放置一段时间后, 大分子溶液的成分就会发生改变, 除不能透过膜的生物大分子外, 其他低分子物质(如盐类、单糖或二糖等)则可透过膜而使两边的成分达到平衡, 膜两侧这些物质的浓度都会发生明显的变化。

去盐透析是应用最广泛的一种透析方法。在盐析后, 将含大量盐类的蛋白质溶液放在半透膜的袋内, 再将袋浸入蒸馏水或生理盐水中, 经过一段时间, 袋内的盐类除净, 从而达到除盐的目的。

平衡透析是另一类常用的透析方法。将盛有大分子溶液的透析袋浸入一定浓度盐类溶液或缓冲溶液中, 经过一段时间后, 袋内外的盐类浓度或 pH 值即可达到平衡。通过这种方法有控制地改变被透析溶液的盐类浓度与 pH 值, 是许多生化制备与分析方法中常用的样品预处理技术。

利用半透膜还可以进行大分子溶液的浓缩。将盛有待浓缩的大分子溶液的透析袋放入高浓度的吸水性强的多聚物溶液中, 袋内溶液中的水即可迅速被袋外的多聚物所吸收而有效地浓缩。这种浓缩方法亦称为反渗透析技术。

可供反渗透析用的多聚物种类很多, 如聚乙二醇(polyethylene glycol 简称 PEG), 商品名亦称碳脂, 聚乙烯咯酮(Polyvinylpyrrolidone, 简称 PVP), 右旋糖苷等。有时也可用蔗糖代替, 浓缩效果也很好, 不过蔗糖分子量较小, 可以缓慢透过半透膜, 污染被浓缩的大分子溶液, 使用上受到一定限制。有时这些吸水剂可直接洒在盛待浓缩的透析袋外面, 不必配成浓溶液应用, 效果也很好。此外, 葡聚糖凝胶的吸水性很强, 也可用做脱水剂。特别

是孔径小的型号(如 G-25), 还可以直接放入大分子溶液中吸收水分, 而不用透析袋, 因为这些凝胶的网孔很小, 大分子物质不能进入网孔内, 所以可方便地用来浓缩大分子物质。透析法所用的半透膜种类很多, 最简单的就是玻璃纸, 也有的制成管状出售, 使用时只要剪下适当长短, 用蒸馏水浸泡清洗干净, 将一端用细绳扎成袋状即可应用。使用后洗净, 用 0.02% 叠氯酸钠作防腐剂, 可放在冰箱中保存, 留供以后再用。

除透析袋外, 市面上还有些不同型号的微孔滤膜出售, 常见的是醋酸纤维素微孔滤膜。选择孔径大小适当的微孔滤膜, 使小分子物质能通过而大分子物质不能通过, 就可以用来过滤大分子溶液(常压、加压或减压过滤均可), 使小分子物质和水分一齐被滤除而达到除盐或浓缩的目的。这种利用微孔滤膜过滤分离大分子和小分子物质溶液的方法, 就称为超滤法, 在生物大分子物质的提纯工作应用得很普遍。此外, 超滤法还可以用来测定大分子物质的分子量, 当选用几种已知孔径大小的微孔滤膜进行超滤时, 根据物质能通过何种孔径的滤膜, 或与已知分子量的大分子物质进行比较, 即可估测出该大分子物质的分子大小和分子量。

三、减压浓缩和冷冻干燥

(Concentration under reduced pressure and freeze drying or lyophilization)

减压浓缩和冷冻干燥是生物大分子制备工作中常用的浓缩干燥技术, 它们都是利用降低被浓缩干燥的物质周围空气的压力, 使水分蒸发或升华加速的原理而设计的。

因为生物大分子(如蛋白质和酶等)通常遇热不稳定, 极易变性, 所以减压浓缩通常要在常温或低温下进行, 不给被浓缩液体加热。当盛液体的容器(通常是球形厚壁的耐压玻璃瓶)与真空泵相连而减压时, 溶液表面的蒸发速度将随真空度的增高而增大, 从而达到加速液体蒸发浓缩的目的。蒸发出来的水分可通过冷凝器(例如达到零下 20℃ 甚至更低温度)捕集。不过应当注意, 在减压情况下, 水分子运动的平均自由路程由于空气稀薄而显著延长, 使每个水分子碰撞器壁机会增大, 比较难于通过容器的出口逸出, 因此要求真空系统的管径要粗, 活塞孔径要大, 这样才能保证减压蒸发有足够大的速度。为了加速液面的蒸发, 还可以通过转动容器或其他方法将溶液铺成薄膜, 以增加液体的蒸发表面。

冷冻干燥除利用真空度增大以加速蒸发外, 还利用水的蒸汽压随温度的下降而降低的特性, 使待干燥的溶液冷冻到冰点以下, 在冻结状态下冰迅速升华为气体而使样品干燥的方法。操作时, 一般先将待干燥液体冷冻到冰点以下, 使水分变成固态冰, 然后在低温(-30~ -10℃), 高真空度 13.3~40 Pa 时, 将溶剂变成气体直接用真空泵抽走。此法干燥后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点, 适用于各类生物大分子的干燥保存。

目前, 国内外有各种型号的冰冻干燥机, 可结合实验或生产的特点加以选择。最好选择带有预冷冻室的冰冻干燥机。

第三章 分光光度法及比色分析法 (Spectrophotometric method and colorimetric method)

一、原理

(一) 基本原理

光是由光子所组成, 光线也就是高速向前运动的光子流。它和其他电磁波一样, 传播过程也呈波动性质, 并且有波长和频率的特征。光子的能量有大有小。光子的能量越大, 振动的频率也越高, 而波长则越短。换言之, 光子的能量与频率成正比, 而与波长呈反比。肉眼可见的光线的颜色不同, 随着波长的增大, 光线可呈紫、蓝、绿、黄、橙到红等不同的颜色, 波长小于 400 nm 的光线称为紫外线, 大于 750 nm 的则称为红外线。

当光线照射到物体上, 便会有部分光线的能量被物质所吸收。不同物质由于分子结构不同, 对不同波长的光线吸收能力也不同, 因此每种物质都有它特异的吸收光谱, 吸收光谱的测定可以用来鉴别各种不同的物质。

根据 Lambert-Beer 二氏定律, 当一束单色光通过溶液时由于部分能量被溶液吸收, 通过溶液后射出的光线强度 I 就要比入射光线强度 I_0 小, 它们的比值(透光度 $T = \frac{I}{I_0}$)和溶液的厚度(L)及溶液的浓度(C)有如下的关系:

$$D = -\lg \frac{I}{I_0} = KCL \quad (1)$$

K 为常数, 称为消光系数(Extinction coefficient, 也有用符号 E), 表示物质对光线吸收的本领, 其数值因物质的种类及光线的波长而异。 D 值称为光密度(Optical density, O.D.), 表示该溶液对光线吸收的量, 亦称之为吸收度(Absorbance, A)。

基于以上原理, 在工作中应用分光光度计测定溶液的吸收光谱及其对某一波长光线的吸收能力可以作为物质定性或定量检查方法, 称为分光光度法。常用的有紫外分光光度法及比色分析法。前者应用紫外光区波长的光, 其优点是不需显色、简便迅速, 有时标本还可回收, 减少消耗; 后者是指应用波长为可见光范围内的分光光度计比较测定溶液和标准溶液的光吸收能力来测定未知浓度的方法。

(二) 待测溶液浓度计算

1. 利用标准管浓度的计算

从公式(1)可以看到, 当溶液的厚度(L)不变, 对于同一物质和同样波长的单色光(即消光系数不变), 溶液的光密度和溶液的浓度成正比, 即:

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad \text{或写作} \quad C_1 = \frac{D_1}{D_2} C_2 \quad (2)$$

根据公式(2), 若 C_2 为已知浓度的标准溶液的浓度, 则根据光密度的比值即可求出

待测溶液的浓度 C_1 。这就是比色分析法的依据。

2. 利用消光系数的计算

从公式(1)还可以看到若已知物质的消光系数和溶液的厚度(即吸收杯的内径,常用的吸收杯内径为 1 cm),也可以直接从光密度推算出溶液的浓度。

消光系数的常用表示方法有二。

(1) 百分消光系数($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) 即浓度以百分浓度 g/100 mL 来表示的消光系数,实际上它就是当溶液浓度为 1% 及厚度为 1 cm 时的光密度值。

(2) 摩尔消光系数(ϵ) 即浓度以摩尔浓度来表示的消光系数,实际上它就是当溶液浓度为 1 mol/L 及厚度为 1 cm 时的光密度值。

用消光系数计算浓度的公式是:

$$C = \frac{D}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{浓度单位为 g\%})$$

或

$$C = \frac{D}{\epsilon} \quad (\text{mol/L})$$

3. 利用标准曲线求得

分析大批样品时,采用此法比较方便,但需要事先制作一条标准曲线(或称工作曲线),以供一段时间使用。

配制一系列浓度由小到大的标准溶液,测出它们的光吸收。在标准溶液的一定浓度范围内,溶液的浓度与其光吸收之间呈直线关系。以各标准溶液的浓度为横坐标,相应的光吸收为纵坐标,在方格坐标纸上绘出标准曲线。制作标准曲线时,起码要选 5 种浓度递增的标准溶液,测出的数据至少要 3 个落在直线上,这样的标准曲线方可使用。

比色测定待测样品时,操作条件应与制作标准曲线时相同。测出光吸收后,从标准曲线上可以直接查出它的浓度,并计算出待测物质的含量。

二、仪器的基本结构

分光光度计及光电比色计的基本结构是由光源、单色光器(monochromator)、吸收杯(absorption cell)以及应用光电效应测量光线强度的测光机构四个部分所组成,如图 1-1。

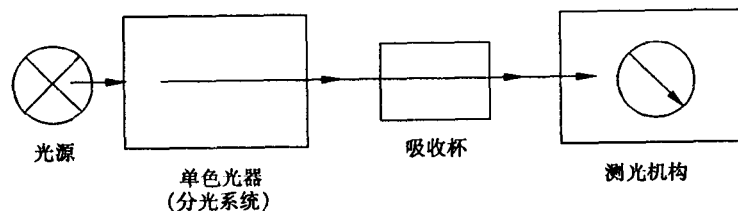


图 1-1 分光光度计及光电比色计的基本结构

(一) 光源

钨丝灯是适用于可见光范围的光源,而对紫外线则通常用充氢气或氙气的放电灯泡(氢弧灯或氙弧灯)。为了使发出的光线稳定,光源的供电需要由稳压电源或稳流电源供

给。

(二) 单色光器

分光光度计的单色光器(分光系统)有棱镜及衍射光栅两种,通过这分光系统可根据需要选择一定波长范围的单色光,单色光的波长范围愈狭,测量的结果愈可靠。

光电比色计所用的单色光器仅能较好地透过一定波长范围的光线的滤光片(有颜色的玻璃片),因为它透过的光线光谱范围要比棱镜或光栅单色光器宽得多,所以光电比色计实际上就是比较粗糙的简易分光光度计,但对比色分析来说一般还是可以得到相当满意的结果的。

(三) 吸收杯(比色杯)

可见光范围内选用玻璃吸收杯,而紫外线范围内则要采用石英吸收杯。

(四) 测光机构

测量通过吸收杯后的光线强度的机构都是利用硒光电池、光电管或光电倍增管等光电元件作为受光器。它们都要将投射来的光线能量转变为电能,进一步用适当的方法测量产生的电流,即可了解光线的强度。

最简单的光电测量装置就是利用硒光电池的系统,接受光线后产生的微弱电流可直接用灵敏的电流计检出。光电比色计及简单的分光光度计通常就是采用这种类型的检测装置。

较精密的分光光度计都是采用光电管或光电倍增管作为受光器,它们接受光线后产生的电流极小,要采用高灵敏度放大线路将弱电流放大,才能用适当仪器检出。

由于采用放大装置,使仪器对光线的检测灵敏度大大提高,所以允许采用高分辨率的单色光器,以便获得光谱范围极窄的“纯”单色光。虽然光谱范围狭窄的单色光要比范围宽的弱得多,但这种有放大线路的灵敏检测装置仍然可以准确地将它测量出来,为提高分光光度计的精度提供了可靠的保证。

三、两种常用的国产仪器使用方法

(一) 722S 分光光度计

722S 分光光度计是一种简洁易用的新型分光光度计,在设计上采用了微电脑控制和光栅单色器技术,简化操作,提高灵敏度,是一种分光光度法的通用仪器。可广泛适用于医学卫生、临床检验、生物化学等方面的分析工作。

1. 预热

仪器开机后灯及电子部分需热平衡,故开机预热 30 min 后才能进行测定工作,如紧急应用时请注意随时调零,调 100% T。

2. 调零

目的:校正基本读数标尺二端(配合 100% T 调节),进入正确测试状态;

调整时机:开机预热 30 min 后,改变测试波长时或测试一段时间,以及作高精度测试前;

操作:打开试样盖(关闭光门)或用不透光材料在样品室中遮断光路,然后按“0%”键,即能自动调整零位。