

生物化学实验教程

赵 锐 李旭生 主 编



中国科学技术出版社

生物化学实验教程

赵 锐 李旭甦 主 编

江苏工业学院图书馆
藏书章

中国科学技术出版社

• 北 京 •

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/赵锐等主编. —北京:中国科学技术出版社,2004.6

ISBN 7-5046-3811-0

I. 生… II. 赵… III. 生物化学—实验—教材

IV. Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 048669 号

中国科学技术出版社

北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码:100081

电话:010-62103210 传真:010-62183872

科学普及出版社发行部发行 各地新华书店经售

北京长宁印刷有限公司印刷

开本:787 毫米×1092 毫米 1/16 印张:9.75 字数:250 千字

2004 年 6 月第 1 版 2004 年 6 月第 1 次印刷

印数:1~2200 册 定价:26.00 元

(凡购买本社的图书,如有缺页、倒页、
脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

生物化学的飞跃发展,是建立在实验基础上的。由周爱儒主编的《生物化学》第六版加强了分子生物学的有关内容。近些年来,生物化学和分子生物学的实验技术和内容的发展很快,为了适应其发展和教学改革及教学内容的更新,在总结多年来的教学基础上,我们编写了这本《生物化学实验教程》。

首先,本书比较系统、扼要地介绍了医学生物化学实验相关的基本理论和方法。同时,又对新技术的内容,特别是涉及分子生物学实验的内容也做了必要的介绍。选择实验 30 个,其中保留了部分传统的实验方法和实验内容,同时部分为反映新技术、新方法,特别增加了不少分子生物学实验内容。在编写过程中,本着科学性、适用性的原则,对每个具体实验基本原理、试剂具体配制方法、操作过程和注意事项也做了较为详细的叙述。我们还把一些仪器的使用、样品制备、数据记录、参考资料等作为附录内容,以增加使用本书的方便性。

尚需说明的是,本书涉及的内容主要可供医学五年制、七年制和研究生的教学使用,也可作为医学院校师生的参考书。

由于编写时间仓促,书中若有错漏和不妥之处,希望使用者给予批评指正。对选用的参考文献及有关资料的作者在此表示感谢。

赵 锐 李旭甦

2004. 4. 20

目 录

第一部分 概述	(1)
第二部分 常用生物化学实验基本理论	(8)
第一章 比色分析法及分光光度法	(8)
第一节 比色分析法和分光光度法的原理	(9)
第二节 荧光光谱分析法	(14)
第二章 几种常用的生物大分子实验技术	(16)
第一节 沉淀法	(16)
第二节 透析和超滤	(19)
第三节 浓缩和干燥	(20)
第四节 离心技术	(22)
第三章 电泳技术	(25)
第一节 电泳基本原理	(25)
第二节 影响电泳迁移率的因素	(26)
第三节 电泳时电流维持机理	(28)
第四节 常用电泳简介	(28)
第四章 层析技术	(37)
第一节 基础知识	(37)
第二节 分配层析	(38)
第三节 离子交换层析	(40)
第四节 凝胶层析	(41)
第五节 亲和层析	(44)
第六节 吸附层析	(45)
第五章 酶联免疫吸附测定技术	(46)
第一节 基本原理及方法类型	(46)
第二节 操作条件	(48)
第三节 制备酶标记物的方法	(49)
第六章 PCR 技术	(51)
第一节 PCR 技术简介	(51)
第二节 PCR 基本原理	(52)
第三节 PCR 技术特点及问题解决	(54)
第四节 PCR 技术在医学上的应用	(55)
第五节 PCR 技术的发展	(57)
第三部分 实验	(61)
实验一 血红蛋白的吸收光谱及其含量测定	(61)
实验二 蛋白质的比色分析法(双缩脲法、酚试剂法)	(63)

实验三	紫外分光光度法测定蛋白质	(66)
实验四	单底物酶促反应 K_m 测定	(68)
实验五	血清谷丙转氨酶活性测定(赖氏比色法)	(70)
实验六	血糖的含量测定	(72)
实验七	紫外分光光度法对核酸定量和质量检测	(76)
实验八	RNase 抑制法抽提分离总 RNA	(77)
实验九	酵母 RNA 的提取	(79)
实验十	核酸的定量测定(定磷法)	(80)
实验十一	肝脏中 DNA 的提取	(82)
实验十二	DNA 含量测定(改良二苯胺法)	(84)
实验十三	RNA 的测定(苔黑酚法 Orcinol)	(86)
实验十四	质粒 DNA 的提取	(88)
实验十五	质粒的酶切与鉴定	(92)
实验十六	醋酸纤维素薄膜电泳	(95)
实验十七	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离血清蛋白质	(98)
实验十八	SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子量	(100)
实验十九	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(103)
实验二十	IEF/SDS—PAGE 双向电泳分离血清蛋白质	(105)
实验二十一	乳酸脱氢酶同工酶的分离	(109)
实验二十二	胡萝卜素的吸附层析	(111)
实验二十三	DEAE—纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(112)
实验二十四	亲和层析法纯化尿激酶	(114)
实验二十五	细胞色素 C 的制备与纯化	(116)
实验二十六	酶联免疫吸附测定法测定血清 γ -球蛋白	(119)
实验二十七	PCR 法检测淋球菌	(121)
实验二十八	组织过氧化脂质定量测定	(123)
实验二十九	牛血铜锌超氧化物歧化酶(CuZn—SOD)分离提纯与活性测定	(125)
实验三十	超氧化物歧化酶蛋白含量和活性测定	(127)
第四部分 附录		(129)
附录一	实验室安全及防护知识	(129)
附录二	玻璃仪器的洗涤及洗涤液的配制	(131)
附录三	生物化学实验样品的制备	(133)
附录四	生物化学实验中常用仪器的使用	(135)
附录五	化学试剂的规格与保管	(143)
附录六	常用缓冲溶液的配制方法	(144)
附录七	标准缓冲溶液的配制方法	(148)
附录八	离心机转数 ω (r/min)与相对离心力 RCF 的换算	(149)

第一部分 概述

一、生物化学实验的特点、目的及重要性

(一)生物化学实验特点

生物化学实验技术是生命科学等诸多学科的重要研究手段,也是医学院校学生必修的基础实验课程。它不仅是生物化学课程教学的重要组成部分,而且具有完整的独立理论体系和独特的实验技巧,是生物化学理论课所不能代替的。生物化学实验与形态学以及其他医学基础实验不尽相同,它还具有严密的科学性和微量、定量等特点,因此生物化学实验课的要求高而且严格,仪器要求精密、先进,所需电子化的大型设备多,所以教师对实验仪器要按教学大纲要求严格管理、认真负责施教。

(二)生物化学实验目的

- (1)进行生物化学实验基本技能的训练,培养学生独立工作能力。
- (2)培养学生科学思维方法、严谨的科学作风和实事求是的科学态度。
- (3)验证某些生物化学基本理论,帮助学生对生物化学理论知识的进一步理解和掌握。
- (4)进行一定的实验理论学习和一定的科研基本功训练。

(三)生物化学实验的重要性

医学本身就是一门实验科学。近年来,由于生物化学分离技术与分析技术的迅速发展,特别是蛋白质与核酸等生物大分子实验技术迅速发展,为生物学、分子生物学的研究提供了有利条件,促进了近代生物学科相关各领域的发展。没有生物化学实验技术的发展,就不可能有近代生物学特别是分子生物学的发展。近代生物学和分子生物学及生物化学实验技术对临床医学、药学、医学检验、预防医学、环境、卫生、工农业生产等都已产生了巨大的影响。

二、生物化学实验室规则

- (1)学生进入实验室必须穿白大衣、戴白帽,衣帽要求整洁,不准迟到、早退,不准大声喧哗。
- (2)课前学生要认真预习,做好实验设计。在实验过程中,听从老师指导,严格按操作规程进行。完成实验后按要求书写实验报告,实验报告要真实,若实验失败,要分析原因。
- (3)环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品必须保持整洁,仪器、药品要井然有序。试剂用完后立即盖严,放回原处。不要将试剂药品洒在实验台面和地上,严禁向水池内丢碎纸片、棉花等物。实验完毕,将用具刷洗干净,放回原处,实验台面擦拭干净,经老师验收后方可离去。
- (4)对实验器材应倍加爱护,精密仪器必须按操作规程使用,服从老师指导,试剂、水、电、肥皂等消耗品要厉行节约,应特别注意药品和试剂的纯净,严防混杂。
- (5)注意安全。实验室内严禁吸烟!乙醚、乙醇、丙酮等易燃物品,使用时必须远离火源,蒸馏时用水浴或蒸气浴,不可直接加热。剧毒物品要严格管理、小心使用,切勿触及伤口或误入口内。操作结束后,必须仔细洗手,严格清点。
- (6)器材损坏时,应如实向教师报告,并填写损坏器材登记表,然后方可补领。
- (7)实验室内的一切物品不得私自带出实验室。不得存放与实验无关的物品。
- (8)每次实验课由学生轮流值日。值日生要负责当天实验室的卫生、安全及一些服务性工作。

三、实验误差与数据处理

(一) 误差

在进行定量分析实验测定的过程中,很难使测量出来的数值与客观存在的真值完全相同。测定值与真值之差称为误差(error)。通常用准确度和精密度来评价测量误差的大小。

1. 准确度

准确度是指测定值与真值相接近的程度,通常用误差的大小来表示,误差愈小,准确度越高。误差又分为绝对误差和相对误差。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值} - \text{真值}$$

$$\text{相对误差}(\%) = \frac{\text{绝对误差}}{\text{真值}} \times 100\%$$

例如:用分析天平称得两种蛋白质的重量各为 2.0750g 和 0.2075g,假定两者的真值各为 2.0751g 和 0.2076g,则称量的绝对误差分别为:

$$2.0750 - 2.0751 = -0.0001(\text{g})$$

$$0.2075 - 0.2076 = -0.0001(\text{g})$$

它们的相对误差应分别为:

$$\frac{-0.0001}{2.0751} \times 100\% = -0.005\%$$

$$\frac{-0.0001}{0.2076} \times 100\% = -0.05\%$$

由此可见,两种蛋白质称量的绝对误差虽然相等,但当用相对误差表示时,就可以看出第一份称量的准确度比第二份称量的准确度高 10 倍。显然,当被称量物体的重量较大时,称量的准确度就较高。所以应该用相对误差来表示分析结果的准确度。但由于真值是并不知道的,因此在实际工作中无法算出分析的准确度,只能用精密度来评价分析的结果。

2. 精密度

精密度是指在相同条件下,进行多次测定后所得数据相近的程度;精密度一般用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差。

$$\text{绝对偏差} = \text{个别测定值} - \text{算术平均值} (\text{不计正负号})$$

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

当然,和误差的表示方法一样,用相对偏差来表示实验的精密度比用绝对偏差更有意义。

在实验中,对某一样品通常进行多次平行测定,求得其算术平均值,作为该样品的分析结果。对于该结果的精密度则有多种表示方法,这里介绍常用的两种方法。

(1) 平均绝对偏差和平均相对偏差表示法:

例如:分析某一蛋白质制剂含氮量的百分数,共测五次,其结果分别为 16.1%、15.8%、16.3%、16.2%、15.6%,用来表示精密度的偏差可计算如下:

分析结果	算术平均值	个别测定值的绝对偏差(不计正负号)
16.1%	16.0%	0.1%
15.8%		0.2%
16.3%		0.3%
16.2%		0.2%
15.6%		0.4%

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\%}{5} \times 100\% = 0.2\%$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{0.2}{16.0} \times 100\% = 1.25\%$$

测定结果可用 $(16.0 \pm 0.2)\%$ 来表示。

(2) 标准差法:

例如:测定血清铜含量,重复 6 次,结果分别为 9.90mmol/L、9.96mmol/L、9.94mmol/L、9.96mmol/L、9.90mmol/L、9.90mmol/L,精确度计算如下:

① 首先求其算术平均值($\bar{X}$)

$$\bar{X} = \frac{9.90 + 9.96 + 9.94 + 9.96 + 9.90 + 9.90}{6} = 9.93 \text{ mmol/L}$$

② 然后求平均值的绝对偏差

∵ 绝对偏差(d) = 每次测定值(X) - 平均值($\bar{X}$)

$$\therefore d_1 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

$$d_2 = 9.96 - 9.93 = +0.03$$

$$d_3 = 9.94 - 9.93 = +0.01$$

$$d_4 = 9.96 - 9.93 = +0.03$$

$$d_5 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

$$d_6 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

③ 求出标准差(S)

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = 0.03 \quad \text{其中, } n \text{ 为测定次数}$$

结果表示用“平均值 ± 标准差”,即 $9.93 \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ 。可见标准差(standard deviation)是描述数据分布的离散程度。一般检验仅做一次分析的允许误差定为 $3S$ 。

标准差还可以用来计算变异系数。

变异系数(coefficient of variation, CV)是标准差与算术均数之比,用百分数表示,计算公式为:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

它描述了相对于算术平均值 $\bar{X}$ 而言标准差的大小,即描述数据的变异相对于其平均水平来说是大还是小。

标准差与变量值单位相同,而变异系数是相对比,没有单位,它描述的不是数据分布的绝对离散程度,而是相对离散程度,因此变异系数更便于资料间的分析比较。

变异系数常用于:

- 比较算术平均数相差悬殊的几组资料的变异度,如相同度量衡单位指标不同时间的纵向比较。
- 比较度量衡单位不同的多组资料的变异度,即做相同时间不同指标的横向比较。
- 变异系数还常用于比较多个样品重复测定的误差。

应该指出,误差和偏差具有不同的含义。误差是以真值为标准,而偏差是以平均值为标准。由于物质的真值一般是无法知道的,所以我们平时所说的真值其实只是采用各种方法进行多次平行分析所得的相对正确平均值。用这一平均值代替真值来计算误差,所得到的结果仍然是偏差。

还应指出,用精密度评价分析的结果也有一定的局限性。分析结果的精密度很高不一定说明实验准确度也很高。因为如果分析过程中存有系统误差,可能并不影响每次测得数值之间的重合

程度,即不影响精密度,但此分析结果则必然偏离真值,也就是说分析的准确度并不一定很高。当然,若是精密度不高,则更无准确度可言。

(二)产生误差的原因和校正

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源,将其分为系统误差和偶然误差两大类。

1. 系统误差

在一定的测量条件下,由某些恒定因素按确定的方向起作用,引起多次测量平均值对真值的偏差,即为系统误差。

系统误差与分析结果的准确度有关,它是由于分析过程中某些经常发生的原因所造成的,对分析结果的影响比较稳定。在重复测定时,经常重复出现,其大小与正负在同一实验中完全相同。系统误差的来源主要有:

(1)方法误差:由方法本身不够完善所造成的,如化学法反应特异性不高,容量分析中等当点和滴定终点不完全符合等。

(2)仪器误差:因仪器本身不够精密所造成的,如仪器的刻度不准确,量器、比色杯、砝码等不符合要求。

(3)试剂误差:来源于试剂或蒸馏水不纯。

(4)操作误差:由于每个人掌握操作规程与控制条件常有出入而造成的,如不同的操作者对滴定终点颜色变化的判断会有差别等。

为减少系统误差常采取下列措施:

(1)空白试验:为了清除由试剂等因素引起的分析误差,可在不加样品的情况下,按照与样品测定完全相同的操作手续,在完全相同的条件下进行测定分析,所得的结果为空白值。将样品分析的结果扣除空白值,可以提高结果的准确度。

(2)回收率测定:做这种测定时,取一标准物质(其中的组分含量是已经精确知道的),添加到待测的未知样品中,与待测的未知样品同时做平行测定,测定的添加标准物量与实际所取得的标准物量之比的百分率就称回收率。回收率在 $100\pm 5\%$ 为合格,这种由标准样品测得的回收率可以用于检验或表达某些分析过程的系统误差,因为系统误差愈大,回收率愈低。

(3)仪器校正:仪器出厂时一般都是经过校正的,但在使用中还应定期进行校正,以保证仪器的精度,减少因仪器而引起的系统误差。

2. 偶然误差

在一组测量中,由于各种因素的偶然变化,而引起单次测量值对多次测量平均值的偏差,即为偶然误差。

偶然误差与分析结果的精密度有关,它来源于难以预料的因素,或是由于取样不均匀,或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素的影响。这些因素是时隐时现的,为了减少偶然误差,一般采取的措施是:

(1)平均取样:动、植物新鲜组织可制成匀浆后取样;全血标本取样时要摇匀等。

(2)多次取样:平行测定次数愈多,其偶然误差就会愈小。

提高测量值的精密度是考察实验结果可靠性的重要指标之一。偶然误差服从统计规律,经过多次测量,其测量值是正态分布的。测量数据的平均值说明了数据的集中趋势。当只有偶然误差时,平均值即为出现频率最大值,可认为是真值。正态分布曲线的波峰宽度反映了测量数据的离散性。离散性愈小,测量的数据愈精密。

除以上两类误差外,还有因操作事故引起的“过失误差”,如读错刻度、溶液溅出、加错试剂等,

这时可能出现一个很大的“误差值”，在计算算术平均值时，此种数值应弃去不用。

引起系统误差及偶然误差的因素是相对的，有时引起系统误差的因素可以引起偶然误差，引起偶然误差的因素也可以引起系统误差。例如试剂变质可引起偶然误差，如果不更换而继续使用则可引起系统误差。

(三)有效数字

在生物化学定量分析中除了要选择准确度和精密度符合要求的实验方法、测定数值力求准确、计算正确外，还应在记录数据和进行计算时注意有效数字的取舍。

有效数字应是实际可能测量到的数字。包括所有“可靠数字”和最后一位“欠准数字”。应选取几位有效数字取决于实验方法与所用仪器的精确程度。

例如：用分析天平称量物质重为 1.7415g，是五位有效数字，而用台秤称得该物质为 1.74g，则只有三位有效数字。

又如，读取某滴定管液面刻度 16.25ml，是四位有效数字。

上面各数字的最后一位数字是不可靠的，称为“欠准数字”或“可疑数”，也叫估计值，其他的数字均是准确的“可靠数字”。因此，所谓有效数字，即在一个数值中除最后一位是可疑数外，其他各数都是确定的。

数字 1, 2, 3, …, 9, 都可作为有效数字，只有“0”特殊，它在数字中间或数字后面时，是有效数字，但在数字前面时，它只是定位数字，用来表示小数点的位置，而不是有效数字。

例如：1.26014	六位有效数字
72.001	五位有效数字
24.00	四位有效数字
0.0212	三位有效数字
0.0010	二位有效数字
200	有效数字不明确

在 200 中，后面的 0 可能是有效数字，也可能是定位数字。为了避免混乱，一般写成标准式，如 65000 写成 6.5×10^4 或 6.50×10^4 或 6.500×10^4 ，它们的有效数字依次为二位、三位、四位。

在加减乘除等的运算过程中，要特别注意有效数字的取舍，应采用四舍六入五留双的原则；否则会使结果计算不准确。有效数字运算规则大致可归纳如下：

1. 加减法

几个数相加或相减时，有效数字的保留应以小数点后位数最少的数字为准。

$$\begin{array}{r} \text{例：} \quad \quad \quad 38.2 \\ \quad \quad \quad \quad 1.3 \\ + \quad \quad \quad 1.12 \\ \hline \quad \quad \quad 40.6 \times \end{array}$$

结果应为 40.6

2. 乘除法

几个数值相乘或相除时，其积或商所保留的有效数字位数与各运算数字中有效数字位数最少的相同。

$$\text{例：} \quad \quad \quad \frac{0.1545 \times 3.1}{0.112} = 4.3$$

还应指出，有效数字位数最少的那个数，首位是 8 或 9 时，而其结果的首位数不是 8 或 9 时，应

多保留一位。

例：

$$9.12 \times 2.011 = 18.34$$

有效数字的最后一位为“可疑数”，若一个数值没有可疑数，便可视为无限有效。例如将 7.12 克样品分成二等份，每份重量为：

$$\frac{7.12}{2} = 3.56(\text{g})$$

式中除数 2 不是测量所得，不是可疑数，可把它视为无限多位有效数字。其他如常数 π 、 e 及 $\sqrt{3}$ 等有效数字的位数也可认为是无限的。

(四) 数据处理

在实验所得的一系列数值，采取适当的方法进行整理、分析，才能准确地反映出被研究对象的数量关系。在生化实验中，通常采用列表法或作图法来表示实验结果，以使结果表达得清楚、明了，而且可以减少和弥补某些测定的误差。根据对标准样品的一系列测定，也可以列出表格或绘制标准曲线，可由测定数据直接查出结果。

1. 列表法

将实验所得的各数值用适当的表格列出，并表示出它们之间的关系。通常数据的名称和单位写在标题栏中，表内只填写数字。数据应正确反应测定的有效数字。必要时应计算出误差值。见表 1-1

表 1-1 血清总蛋白测定时各管所加试剂及测定结果

试剂	空白管	标准管	测定管
血清(ml)	—	—	0.100
蛋白标准液(ml)	—	1.00	—
0.154mol/L NaCl(ml)	2.00	1.00	1.90
双缩脲试剂(ml)	3.00	3.00	3.00
吸光度	—	0.400	0.450
血清总蛋白(g/L)	—	—	67.5

2. 作图法

实验所得的一系列数据之间的关系及其变化情况，可以用图线直观地表现出来。作图时通常在坐标纸上确定坐标轴，标明轴的名称和单位，然后将各数值点用“+”或“×”字标注在图纸上，再用直线或曲线把各点连接起来。图形必须是很平滑的，可以不通过所有的点，而要求线两旁偏离的点分布较均匀。在画线时，个别偏离过大的点应当舍去或重复实验校正之。采用作图法时至少有五个以上的点，否则便没有意义。

四、实验记录及实验报告的书写

(一) 实验记录

实验记录是指实验过程中对实验名称、目的、原理、操作过程、结果和数据等的原始记录。实验记录的书写要求是：

(1) 必须使用钢笔或圆珠笔，不准使用铅笔。

(2) 实验中观察到的现象和得出的数据应及时地直接写在记录本上，切忌夹杂主观因素，更不

准假造数据。努力培养严谨的科学作风,实事求是地把实验结果全面记录下来。

(3)原始记录要准确、简练、详尽、清楚。在定量实验中所测得的数据最好设计一定的表格,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。

(4)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和作为查找成败原因的参考依据。

(5)实验原始记录不准用草纸或书本先记,然后再抄誊。原始数据不准修改,若需修改必须请示教师,并在原始记录上注明更改原因,方可进行。

(二)实验报告的书写

实验报告的书写是一项重要的基本技能训练,是论文写作的基础。一份满意的实验报告应具备准确、客观、详尽、简洁等特点。写好实验报告除了正确的操作步骤外,还要依赖于仔细的观察和客观的记录,依赖于运用所掌握的理论知识对实验现象和结果进行综合的分析。实验报告的优劣也能判断实验者科研能力水平。

1. 实验报告的书写具体要求

(1)书写实验报告应简要通顺、字体清楚、无错别字及使用正确标点。

(2)对实验过程中一切现象的记录要详细,一切原始数据和运算过程均应写在报告上,不准用草纸打稿重写誊写。

(3)对原始数据不准修改,若需修改必须请示任课老师同意后方可进行,并写明原因。

(4)定量实验要求准确记录有效数字。

2. 书写实验报告的基本内容

(1)姓名、年级、班次、组别、实验日期(年、月、日)、室温_____。

(2)实验名称_____。

(3)实验目的_____。

(4)实验原理_____。

(5)实验试剂与器材_____。

(6)实验操作步骤_____。

(7)实验结果及讨论_____。

在写实验报告时,无论是定性实验,还是定量试验,实验名称和目的都应针对本次实验课的全部内容所必须达到的目的和要求。原理部分要简明扼要。实验操作步骤可以采用流程图的方式或自行设计的表格来表达,要简单明了,避免长篇抄录。要仔细观察实验过程中出现的各种现象,准确记录数据,并列公式加以计算,得出结果。注意正确使用各种单位,结果与讨论是实验报告中最重要的一部分,对于实验结果的表达,可用简练的文字描述,也可用表格,还可用各种曲线图。在优秀的实验报告与论文中,三者常常并用,得到最佳的效果。探讨实验中遇见的问题和思考题,提出自己的见解,并对自己的实验质量做出评价。

(赵 锐)

第二部分 常用生物化学实验基本理论

第一章 比色分析法及分光光度法

光是由光子所组成的,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,光子的能量与频率呈正比,而与波长呈反比。肉眼可见的光线称为可见光,它的波长范围是 400~760nm,不同波长的光线的颜色不同,随着波长的增大,光线也可呈紫、蓝、绿、黄、橙到红等不同的颜色。波长小于 400nm 的光线称为紫外线,大于 760nm 的则称为红外线(见表 2-1-1)。对于生物化学来说最重要的波长区域是可见光和紫外线。

如把两种适当颜色的单色光按一定的强度比例混合,可以成为白光,我们就把这样的两种光互称为互补色光。如图 2-1-1 所示:红光与青光能混合成白色,因此红光与青光互为互补色光。

表 2-1-1 各种光的波长

光	波长
远红外	20~400 μ m
近红外	0.76~20 μ m
红	620~760nm
橙	592~620nm
黄	578~592nm
绿	500~578nm
青	464~500nm
蓝	446~464nm
紫	400~446nm
近紫外	200~400nm
远紫外	50~200nm

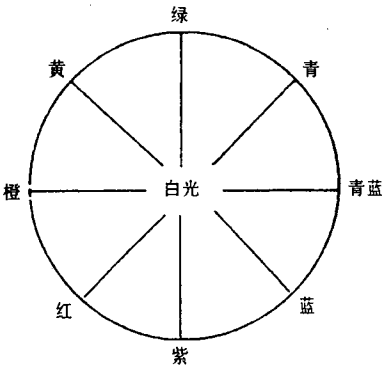


图 2-1-1 互补色光示意图

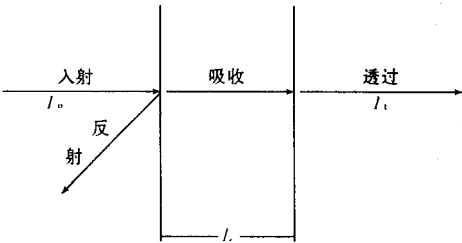


图 2-1-2 光与介质的相互作用

第一节 比色分析法和分光光度法的原理

组成物质的分子均处于一定能态并不停地运动着,通常分子处于能态的基态,当它吸收一定光辐射能量之后跃迁到激发态,则产生吸收光谱。不同物质由于分子结构不同,对不同波长的光线的吸收能力也不同,因此每种物质都有它特异的吸收光谱,并且溶液的颜色也不相同。比色分析法是指用比较溶液颜色深浅的方法来测定有色溶液的浓度,可用各种光电比色计及可见光的分光光度计来完成比色分析;紫外光、可见光、红外光和激光等测定物质的吸收光谱,利用此吸收光谱对物质进行定性定量分析和物质结构分析的方法称为分光光度法或分光光度技术,所使用的仪器是各种类型的分光光度计。分光光度法比一般比色分析法的灵敏度、准确度和选择性都要高。

一、溶液的吸收光谱和溶液的颜色与光吸收的关系

把同一种物质溶液,用分光光度计以各种波长测定其吸光度,之后以波长为横坐标,对应的吸光度为纵坐标,绘成曲线图,此图即为该物质溶液的吸收曲线(吸收光谱)。

例如,把核黄素溶液用紫外—可见光分光光度计在各种入射波长下测定其吸光度,其吸收光谱表明核黄素对各种不同波长的光吸收程度不同(吸光度最高点下指向的波长为最大吸收波长),它在紫外区有两个吸收峰,在可见光区对 450nm 的光吸收最多,即该溶液最大吸收波长为 450nm(蓝色光的波长)。各种物质都有其特征性的吸收曲线。

另外,用同一物质的不同浓度的溶液,分别测定其对光的吸收曲线,把在同一波长下测定的吸光度绘制在一幅吸收光谱图上,图中可见随着溶液浓度增高,吸光度也相应地增高,但该物质溶液的最大吸收波长不变。

溶液的分子或离子能选择地吸收某段波长的光,这是物质溶液的特性。有色溶液对其互补色光吸收最强,溶液所呈现的颜色就是它吸收最强的光的互补色。例如,核黄素溶液对蓝色光吸收最强,蓝色光的互补色光为黄色光,因此核黄素溶液的颜色为黄色,透过光中只剩下黄色光,所以核黄素溶液显黄色。

比色分析时,一般应选择溶液吸收最强的光(溶液颜色的互补色光)照射,这时透过光的光强明显减弱,可提高分析的灵敏度。

二、比色分析法和分光光度法的基本原理

比色分析法和分光光度法的基本原理是相同的,其理论基础都符合 Lambert—Beer 定律。

(一) Lambert—Beer 定律

如图 2-1-2 所示,当一束单色光通过有色溶液时,一部分被反射和折射;一部分被溶液吸收;一部分透过溶液。透过光的强度和有色溶液的厚度及浓度有如下关系:有色溶液的液层愈厚,浓度愈大,则透过光强愈小,它们之间呈一种递减指数函数关系,这就是物质对光的吸收定律,称为 Lambert—Beer 定律。其关系可表达如下:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-KLC} \quad (2-1-1)$$

式中: I_t 为透过光强度, I_0 为入射光强度, L 为溶液的厚度, C 为溶液的浓度, K 为消光系数。

变动式 2-1-1 得:

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-KLC} \quad (2-1-2)$$

将式 2-1-2 两边取常用对数得：

$$\lg \frac{I_i}{I_o} = -KLC \quad (2-1-3)$$

将式 2-1-3 中的负号移到等号左侧得：

$$\lg \frac{I_o}{I_i} = KLC \quad (2-1-4)$$

式 2-1-4 即为 Lambert-Beer 定律的对数式。

(二)透光率、吸光度及消光系数

1. 透光率

如式 2-1-2 所示, I_i/I_o 表示透过光占入射光强度的比例,我们就把 I_i/I_o 称为透光率,通常用“T”表示。

2. 吸光度

如式 2-1-4 所示, I_o/I_i 为透光率倒数的对数,我们就把 $\lg I_o/I_i$ 称为吸光度,通常用“A”表示,因此式 2-1-4 可写成:

$$A = KLC \quad (2-1-5)$$

式 2-1-5 表示:吸光度与消光系数、溶液厚度及溶液浓度的乘积成正比。

从吸光度的概念 $A = \lg \frac{I_o}{I_i}$ 表达式我们可以看出下列物理意义:

(1) 当 $I_i = I_o$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_i} = 0$, 表示溶液完全不吸收光线;

(2) 当 $I_i \ll I_o$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_i}$ 之值很大, 表示溶液对光线吸收较多;

(3) 当 $I_i \rightarrow 0$ 时, $\lg \frac{I_o}{I_i}$ 之值无穷大, 表示光线几乎完全被溶液吸收, 即溶液不透过光。

由此可见, A 表达了溶液对光的吸收程度。

3. 消光系数

变动式 2-1-5 得:

$$K = \frac{A}{LC} \quad (2-1-6)$$

式 2-1-6 中 K 即为消光系数,指的是溶液在单位浓度和单位厚度时的吸光度。

消光系数是物质的重要特性,它与入射光的波长及溶液的性质和温度有关,也与仪器的质量有关,在入射光波长、溶液种类和温度一定的条件下,消光系数是一定值。通过实验可测得:消光系数愈大,该物质吸收光的能力愈强,测定的灵敏度愈高。

三、比色分析法和分光光度法的结果计算

(一)公式计算法

从式 $A = KLC$ 可知:吸光度 A 与 KCL 成正比。比色时将标准液与待测液做比较,我们用 A,

表示标准液的吸光度, A_u 表示待测液的吸光度, 则:

$$A_s = K_s \cdot C_s \cdot L_s$$

$$A_u = K_u \cdot C_u \cdot L_u$$

比色时使用同一厚度的比色杯, 即标准液与待测液厚度相同, 温度相同, 而且是同一性质的溶液, 因此消光系数也相同, 则两式相比得:

$$\frac{A_u}{A_s} = \frac{C_u}{C_s}$$

$$C_u = \frac{A_u}{A_s} \cdot C_s$$

上式 C_u 为待测液浓度, C_s 为标准液浓度(已知), 通过比色, 待测液浓度便可以计算出来。

在生物化学实验中, 有一些实验采用了公式计算法, 如: 血糖含量测定。

(二) 利用标准曲线求出待测溶液的浓度

分析大批待测溶液时, 采用此方法比较方便。此种方法首先要制作一条标准曲线, 标准曲线的制作方法如下:

先配制一系列浓度由小到大的标准溶液, 测出它们的吸光度, 在标准溶液的一定浓度范围内, 溶液的浓度与其吸光度之间呈直线关系。以各管的吸光度为纵坐标, 相应的各管浓度为横坐标, 在方格坐标纸上作图得出标准曲线。在制作标准曲线时, 至少用五种浓度递增的标准溶液, 测出的数据至少要有三个点落在直线上。这样的标准曲线方可使用。

测定待测溶液时, 操作条件应与制作标准曲线时相同, 测出吸光度后, 在标准曲线上即可直接查出其浓度。

该方法的优点是操作时只测定待测液吸光度便可迅速从标准曲线上查得结果, 无需每次做标准管, 节省时间, 节省试剂, 且从曲线上可观测到脱离光吸收定律的浓度段, 可以掌握测定的最适浓度。缺点是如果比色计更换或大修, 试剂批号不同时, 曲线应重新制作, 以防测定结果出现差错。

在生物化学实验中, 有一些实验采用了此方法, 如: 血红蛋白含量测定。

(三) 利用标准系数求出待测溶液的浓度

此种方法比上述两种方法简便, 具体计算方法如下: 将多次测定标准溶液的吸光度算出算术平均值后, 按下式求出标准系数:

$$\text{标准系数} = \frac{\text{标准液浓度}}{\text{标准液平均吸光度}}$$

用同样方法测出待测溶液的吸光度, 代入下式即可。

$$\text{待测溶液浓度} = \text{待测溶液吸光度} \times \text{标准系数}$$

(四) 利用消光系数求出待测溶液的浓度

我们知道: $K = \frac{A}{L \cdot C}$, 一般在比色分析法与分光光度法中, 所使用的比色杯的厚度通常为

1cm, 所以上式可简化为: $K = \frac{A}{C}$, 那么 $C = \frac{A}{K}$ 。

此公式常用于紫外吸收法, 如对蛋白质含量的测定。因蛋白质在 280nm 处有最大吸收峰, 利用已知浓度的蛋白质溶液测出其在 280nm 处的吸光度, 之后利用上述公式求出其消光系数, 再读取待测蛋白质在 280nm 处的吸光度, 利用上述公式即可求出待测蛋白质溶液的浓度。

此种方法不需显色, 操作简便。