

菏泽医学专科学校实验系列教材

生物化学实验指导

主编 刘观昌 张凤英

北京大学医学出版社

菏泽医学专科学校实验系列教材

生物化学实验指导

主 编 刘观昌 张凤英

副主编 赵家坤 韦 岩 韩 冰 李 阁

编 委 (以姓氏拼音为序)

付丹丹 (菏泽医学专科学校)

韩 冰 (菏泽医学专科学校)

孔令银 (菏泽市立医院)

李 阁 (菏泽医学专科学校)

刘观昌 (菏泽医学专科学校)

刘瑞芳 (菏泽医学专科学校)

刘艳艳 (菏泽医学专科学校)

刘粤梅 (菏泽医学专科学校)

韦 岩 (菏泽医学专科学校)

张凤英 (菏泽医学专科学校)

赵家坤 (菏泽医学专科学校)

朱怀荣 (菏泽医学专科学校)

北京大学医学出版社

SHENGWU HUAXUE SHIYAN ZHIDAO

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导/刘观昌, 张凤英主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2011. 8

ISBN 978-7-5659-0236-9

I. ①生… II. ①刘…②张… III. ①生物化学-
实验-医学院校-教学参考资料 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 165898 号

生物化学实验指导

主 编: 刘观昌 张凤英

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 陈 奋 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 6.25 字数: 153 千字

版 次: 2011 年 8 月第 1 版 2011 年 8 月第 1 次印刷 印数: 1-9000 册

书 号: ISBN 978-7-5659-0236-9

定 价: 13.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

菏泽医学专科学校实验系列教材 建设编写指导委员会

主任委员 付章丽

副主任委员 于信民 孔晓霞

委员 (按姓氏拼音排序)

冯 瑜 高尚举 高曰超 李 琳 刘观昌

刘心臣 邵 军 田 健 王海祥 王克志

尹祥敏 袁志勇

前 言

生物化学是医药院校一门重要的基础学科。近年来，随着实验技术的突飞猛进，生物化学得到了迅速发展。生物化学实验是生物化学课程中十分重要的组成部分，不断加强和改进实验教学是提高生物化学教学质量的重要环节。掌握生物化学常用实验方法和技术，不仅是学习生物化学这门课本身的要求，也是学好其他课程及进行科学研究的需要。为进一步提高生物化学实验课的教学质量，我们根据多年的教学经验，经过反复筛选实验内容，编写了这本实验指导。

本教材是在我们多年使用的生物化学实验讲义的基础上，紧扣教学大纲的内容和要求，经修订和改编而成；不仅补充更新了原有的理论和实验内容，还增加了一些反映最新进展的实验技术。内容分为前后呼应的两大部分，前半部分扼要介绍常用的生物化学基本理论和实验方法，包括生物化学实验中的基本操作、分光光度法、离心、电泳、层析、蛋白质及核酸的分离纯化技术、PCR 等，以供学生实验时查找及教师讲解；后半部分是实验部分，根据理论教学大纲，每一部分的理论内容均安排了相应的实验，同时还有若干个综合性实验。学习生物化学实验的目的是培养学生的动手能力和良好的科研素养，为学生将来的工作和学习奠定基础。

本实验指导既有现代生物化学的重要技术和方法，如各种电泳、层析、分光光度法、微量气体分析等，又保留了经实践证明效果好而又实用的经典方法。

本书实验项目较多，各院校可根据自己的实际情况进行选择。

由于水平所限，加之时间仓促，本教材难免存在缺点、错误，望使用本书的各位教师 and 同学们提出宝贵的修改意见，以求进一步完善。

编者

2011 年 5 月

目 录

实验须知	1
实验一 基本操作与练习	3
一、吸量管	3
二、移液器	3
三、容量瓶及量筒	4
四、滴定管	5
五、其他基本操作	5
实验二 生物化学实验常用操作技术	7
一、分光光度技术	7
二、电泳技术	11
三、层析技术	12
四、聚合酶链反应技术	13
五、离心技术	14
实验三 蛋白质的沉淀反应	16
一、中性盐沉淀蛋白质	16
二、乙醇沉淀蛋白质	16
三、重金属盐沉淀蛋白质	17
四、生物碱沉淀蛋白质	18
五、加热沉淀蛋白质	18
实验四 蛋白质等电点的测定	20
实验五 紫外吸收法测定蛋白质含量	21
实验六 双缩脲法测定蛋白质含量	22
实验七 血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	23
实验八 氨基酸薄层层析	26
实验九 氨基酸的纸上层析	27
一、氨基酸水平型纸层析	27
二、氨基酸垂直型纸层析	28
实验十 动物组织中核酸的提取和含量测定	29
一、核酸的提取	29
二、核酸含量的测定(测糖法)	30
实验十一 核酸化学成分的鉴定	32
实验十二 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA	34
实验十三 胡萝卜素的柱层析分离法	36
实验十四 维生素 C 的定量测定(2,4-二硝基苯肼法)	37
实验十五 血清淀粉酶活性测定(碘-淀粉比色法)	39

实验十六 温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活性的影响	41
一、温度对酶活性的影响	41
二、pH 对酶活性的影响	42
三、激活剂和抑制剂对酶活性的影响	43
实验十七 乳酸脱氢酶同工酶的分离（醋酸纤维素薄膜电泳法）	44
实验十八 线粒体的制备与 P/O 比值的测定	46
实验十九 细胞色素氧化酶的作用及其抑制与解毒	48
实验二十 血糖的测定	50
一、邻甲苯胺法	50
二、葡萄糖氧化酶法	50
实验二十一 激素对血糖浓度的影响	53
实验二十二 剧烈运动对尿中乳酸含量的影响	54
实验二十三 血清乳酸脱氢酶活性测定（比色法）	55
实验二十四 酮体的生成及其定性	58
实验二十五 血清总胆固醇测定	60
一、胆固醇氧化酶法	60
二、硫磷铁法	61
实验二十六 血清高密度脂蛋白-胆固醇的测定（磷钨酸-镁沉淀法）	63
实验二十七 血清甘油三酯测定	65
一、分溶抽提-乙酰丙酮显色法	65
二、磷酸甘油氧化酶（GPO - PAP）法	66
实验二十八 血清尿素氮的测定	69
实验二十九 血清谷丙转氨酶活性的测定	71
一、赖氏比色法	71
二、速率法	73
实验三十 血清钾的测定	75
一、四苯硼钠比色法	75
二、四苯硼钠直接测定法	76
实验三十一 血清总钙测定	78
一、邻甲酚酞络合酮比色法	78
二、乙二胺四乙酸二钠（EDTA - Na ₂ ）滴定法	79
实验三十二 家兔低钙实验	81
实验三十三 血清无机磷测定	82
一、硫酸亚铁磷钼蓝比色法	82
二、紫外分光光度法	83
附录 I 常用缓冲液的配制方法	85
附录 II 各种洗涤液的配方及使用	89

实验须知

【实验目的】

生物化学实验是生物化学教学的重要组成部分，加强和改进实验课教学是提高教学质量的重要环节，通过生化实验课教学要达到以下三个方面的目的：

1. 培养学生严谨的科学态度，提高分析问题和解决问题的能力。
2. 掌握生物化学的基本实验方法和实验技术。
3. 通过实验，进一步加深对生物化学理论知识的理解和掌握。

【实验前准备】

1. 复习好课堂讲授的有关理论知识。
2. 根据实验计划，认真预习实验指导。
3. 明确每次实验的目的，掌握实验设计的原理。
4. 了解操作步骤和初步判断实验的预期结果。

【实验时的注意事项】

1. 严格遵守实验规则，注意保持实验台面及仪器整洁，公用仪器及试剂不得随意搬动。
2. 必须严肃、认真，一丝不苟地按照《实验指导》进行操作，仔细观察，综合分析实验所出现的现象与结果，并及时记录下来。
3. 如果实验结果与理论不相符时，必须进行科学分析，找出原因并重做，直到结果正确为止。
4. 试剂用后放回原处，瓶盖切勿盖错。标准试剂不能用潮湿吸管或滴管与之直接接触，任何试剂取出后不得再放入原瓶。
5. 使用玻璃仪器时，要稳拿轻放，尽量避免损坏。使用分光光度计、离心机、电泳仪等贵重仪器，必须熟悉其使用方法，在不熟悉其用法时严禁随意开动。
6. 实验用过的滤纸、火柴梗以及沉淀物不得倒入水槽，以防阻塞下水道。舍去的浓酸、浓碱均须倒入废液缸中，不得倒入水池，以免损坏排水设施。

【实验后注意事项】

1. 及时清洗试管等试验器材，整理实验台面，打扫室内卫生。
2. 实验过程中如有仪器损坏，应填写“仪器损坏单”交给老师，说明损坏原因，以便吸取教训。
3. 离开实验室前要将门、窗、水、电、煤气关闭好。

【实验报告】

每次做完实验，须及时整理实验记录，按照规定的格式及内容写出实验报告，交指导老师评阅。实验报告内容包括：

1. 实验名称及实验日期。
2. 实验原理 用自己的语言表达，不要抄袭《实验指导》的内容。
3. 操作 简述实验过程，但不要抄袭实验讲义。
4. 结果 如实记录观察到的实验现象和数据，对实验数据进行必要的运算和处理。

5. 讨论 分析实验结果并加以讨论。

【安全注意事项】

1. 低沸点有机溶剂，如乙醚、石油醚、酒精、丙酮等均属易燃物品，应远离火源，若要加热时，须用水浴加热。

2. 万一出现火情，首先将一些易燃物品移至远处，然后将火扑灭。灭火方法：可用湿布或工作服盖上扑灭，也可取沙扑灭。若乙醚、油类等比水轻而易燃之物品着火时，切勿用水，火势大者速取灭火器灭之。

3. 万一发生酸、碱灼伤皮肤、眼睛等事故，不要惊慌，先用大量自来水冲洗，酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和，碱烧伤者用饱和 H_3BO_3 溶液冲洗，氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。较严重者应及时去医院救治。

(刘瑞芳)

实验一 基本操作与练习

生物化学实验中需要多种基本操作技术，如各种玻璃仪器和测量仪器的正确使用；技术操作中的样品混匀、保温、加热、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，熟悉和掌握生化实验的一些基本操作是非常重要的。

生物化学的实验方法基本上是化学的方法，也就是用定性及定量的分析方法来观察物质代谢的规律，必须做到定性的洁净及定量的准确。因此，首先介绍一些常用仪器的使用和操作过程中的几项基本技术，并要求同学们反复练习，以达到熟练的程度。

一、吸量管

吸量管是精密的定量容器，在生物化学实验中最为常用。

使用时操作者左手持橡皮球，右手持吸量管上端，将吸量管浸入液体内大约 1cm 处，不得过深或过浅。用橡皮球吸取液体至所需刻度上方时，立即用右手示指按住管口。将吸量管下端提出液面，慢慢放开示指，使液面下降至所需刻度处。以吸量管尖端接触瓶壁，去除多余液体。然后将吸量管插入另一容器中，再松开示指，使液体流出。观察刻度时，应保持吸量管于垂直状态，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水平面上。弧形液面应与刻度成切线。

常用的吸量管有以下三种：

1. 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，要将吸量管内的全部液体放出，特别注意的是要将最后留在管尖端中的液体吹出，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出到达下端指定的刻度，即达到指定的体积。

2. 移液吸量管 也称容量吸量管或胖肚吸量管，是单一刻度的吸量管，中间呈圆柱状膨大，为定量移出整量液体之用。有 5ml、10ml、15ml、20ml、25ml、50ml 及 100ml 等规格。其溶液是根据液体自内流出量来计算的。卸放液体时，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 15~30 秒即可，管尖残余液体不要放出。如管壁刻有“吹”字，则应吹出。

3. 奥氏吸管 也称欧氏吸管，亦为一种单一刻度的吸量管，中下部呈球形膨大，所以液体与吸管表面接触面积较小，用于吸取血液等黏度较大的液体。流放标本时，应让其自然地缓慢流出，以减少内壁黏附。若为吹出式，管尖最后 1 滴应吹出。在学生实验中常用的有 1.0ml、2.0ml、5.0ml 等规格。

二、移液器

移液器是生物化学与分子生物学实验室常用的小件精密设备，移液器能否正确使用，直接关系到实验的准确性与重复性，同时关系到移液器的使用寿命，下面以连续可调的移液器为例，说明移液器的使用方法。

移液器由连续可调的机械装置和可替换的吸头组成，不同型号的移液器吸头有所不同，

实验室常用的移液器根据最大吸取量有 5 μ l、10 μ l、20 μ l、50 μ l、100 μ l、200 μ l、1ml、5ml、10ml 等规格。移液器的正确使用包括以下几个方面：

1. 根据实验精度选用正确量程的移液器（使用者可根据移液器生产厂家提供的吸量误差表确定）。当取用体积与量程不一致时，可通过稀释液体，增加吸取体积来减少误差。

2. 移液器的吸量体积调节 移液器调至所需刻度，调整过程中动作要轻缓，切勿超过最大或最小量程。

3. 吸量 将吸头套在移液器的头上并轻轻转动，有必要时可用手辅助套紧，以保证密封，但要防止由此带来的污染。使用前应先将移液器空吸和空排几次，以保证腔内外气压相一致。然后将吸量按钮按至第一档，将吸头垂直插入待取液体中，深度以刚浸没吸头尖端为宜（2~3mm），然后慢慢放松按钮，使之复位，以吸取液体，等待 1~2 秒钟后从液体中取出，并避免碰撞任何东西；释放所吸液体时，先将吸头头部移至加样容器壁上，缓慢按压吸量按钮至第一档，等待 1~2 秒钟后，再把按钮全部按下（第二档）以排出所有液体。排尽全部液体后，吸头应沿容器壁向上滑动取出，再放松按钮，使之复位，即完成一次操作过程。

4. 吸头的更换 性能优良的移液器具有卸载吸头的机械装置，轻按卸载按钮，吸头会自动脱落。

【注意事项】

1. 连续可调移液器的取用体积调节要轻缓，严禁超过最大或最小量程；
2. 在移液器吸头中含有液体时禁止将移液器水平放置，平时不用时置移液器架上；
3. 吸取液体时，动作应轻缓，防止液体随气流进入移液器的头部；
4. 在吸取不同的液体时，要更换移液器吸头；
5. 移液器属精密量器，不允许直接接触液体，不使用时应调至最大刻度，保持弹簧松弛，同时应接上吸头，以保持管内清洁；
6. 移液器要进行定期校准，一般由专业人员来进行。

三、容量瓶及量筒

容量瓶是一种长颈梨形的平底瓶，具有磨口塞，颈部有画线，表示在所示温度下（一般为 20℃）当液体充满到标线时，液体体积恰好与瓶上所注明的体积相等。容量瓶有 10ml、25ml、50ml、100ml、200ml、250ml、500ml、1000ml、2000ml 等规格。

使用容量瓶配制溶液时，一般是先将固体物质在烧杯用少量溶剂溶解，然后将溶液沿玻璃棒定量地转移到量瓶中。烧杯用少量水冲洗 2~3 次，并注入容量瓶中，再加入溶剂混匀稀释。当稀释至溶液面接近标线时，应等待 1~2min，使附在瓶颈内壁的水流下，并待液面之小气泡消失后，再用滴管逐滴加入溶剂，使之恰至刻度处，即溶液凹面最低点和标线相切。然后将容量瓶塞塞好，将它反复倒置，摇动数次混匀之。

容量瓶不能直接用火加热，水浴加热时也不要骤热和骤冷，也不能用烘箱烘烤，以免变形而引起容量误差。

量筒为粗计量器，当所量取的液体要求不十分准确时，可使用之。常用的有 25ml、50ml、100ml、250ml、500ml、1000ml。量取时视线与量筒内液体凹面的最低点在同一水平上，偏高或偏低都会造成较大的误差。量筒之底座及筒身是焊接在一起的，因而不能量取过热液体，更不能直接加热，以防炸裂。

四、滴定管

滴定管是供容量分析滴定之用，按其容量大小可分为常量滴定管和微量滴定管两种。

1. 常量滴定管 常用的有 25ml 和 50ml 两种规格，按其用途分为酸式滴定管和碱式滴定管两种：①酸式滴定管装有玻璃活塞，可盛酸性、中性以及氧化性（ KMnO_4 、 I_2 和 AgNO_3 ）等溶液，不宜盛碱性溶液，因为碱常使活塞与活塞套黏合，难以转动；②碱式滴定管下端套有一段约 10cm 长的橡皮管（内装玻璃珠）接尖嘴玻璃管。可盛碱性溶液，不宜盛氧化性溶液，因为氧化性溶液易与橡皮起作用。

2. 微量滴定管 总容积有 1ml、2ml 和 5ml，最小刻度为 0.05ml 或 0.01ml，有的附有自动加液装置。微量滴定管尖的口径小，故流出的液滴细小。

使用滴定管应注意以下事项：

1. 检查是否清洁干燥、是否漏水、玻塞是否滑润，如有漏水转动不灵，应拆下活塞重新涂抹凡士林。涂抹前要将玻塞擦干，用手指沾少量凡士林在活塞两头各擦一薄层，将活塞插入槽内，然后向同一方向转动活塞，直到从外面看时全部透明为止。油涂好后，在活塞的小头的槽上套一橡皮圈，以防活塞滑脱。

2. 使用时必须认出每一格表示多少毫升，先用少量滴定液清洗滴定管 2~3 次，然后方可装液。装液体后，管内如有气泡必须排出。

3. 滴定之前应先读取起始点。滴定时，左手控制玻塞，右手持瓶，边滴边摇，密切注意被滴定溶液的颜色变化。

4. 装置滴定管时、管身必须与地面垂直。读取时眼睛与溶液凹面下缘处在同一水平线上，不要仰头或低头读数。

五、其他基本操作

1. 溶液的混匀 欲使化学反应充分进行，必须使反应体系内各种物质迅速地相互接触。溶液的混匀方式有下列几种，可随使用器皿、液体容量不同而选用。

(1) 旋转混匀法：手持容器作离心旋转，适用于未盛满液体的试管或小口器皿，如三角烧瓶等。

(2) 弹指混匀法：左手持试管使之直立，以右手示指轻击试管之下部，使管内溶液作旋转流动。

(3) 倒转混匀法：适用于有玻璃塞的瓶子，如容量瓶等。

(4) 弹动混匀法：以右手大拇指、示指、中指握住试管上部，将试管底部于左手掌中弹动。

(5) 吸管混匀法：用吸管将溶液反复吸放数次，适用于量少而无沉淀的液体。

(6) 搅拌混匀法：适用于烧杯等大口容器所盛之溶液的混匀。一般在配制混合剂时用，用玻棒搅拌以助溶，或混匀大量的溶液。

2. 保温与加热

(1) 保温：为使某一化学反应在恒定温度下进行，常需要保温，如酶促化学反应。保温需要用恒温箱或恒温水浴箱，使用恒

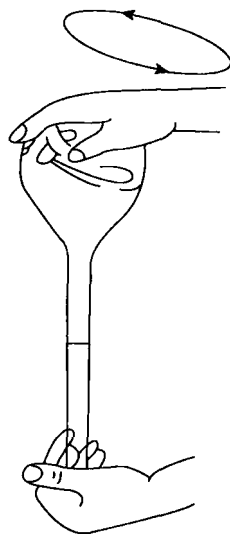


图 1-1 容量瓶的倒置混匀

温箱或恒温水浴时应注意：①箱中温度调好后，切勿再转动调节钮；②随手关好温箱门或水浴盖，防止热的散失；③小心操作，防止药品撒于仪器内。如有药品撒于其中，须立即设法清除。

(2) 加热：常用的加热方法有两种：一是直接把试管或其他器皿在酒精灯或电炉、煤气灯上加热；二是在水浴中加热或煮沸。要按实验要求去做。

3. 过滤 过滤的目的是使沉淀物与液体分离。可用滤纸、纱布、棉花、抽滤等方法过滤，根据实验要求选择。过滤时应注意以下几点：

(1) 当定量地收集滤液时，不要预先用水浸湿滤纸，以免影响滤液的浓度。

(2) 漏斗边缘要比滤纸边高出 0.5~1.0cm，滤纸锥体的三层一边应放在漏斗出口短的一边，漏斗出口长的一边应紧靠容器壁。

(3) 漏斗颈的出口不应与溶液接触，更不应将漏斗颈浸在滤液中。

4. 玻璃仪器的冲洗 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，再以毛刷洗刷数遍，以自来水彻底冲刷，最后以少量蒸馏水冲洗，倒置试管架上。

(2) 吸管等量器一般只用自来水冲洗，再以蒸馏水冲洗即可，必要时应用铬酸溶液浸泡过夜，再以自来水彻底冲刷，最后用蒸馏水冲洗，倒置吸管架上，使其自行干燥。

(3) 吸取含血液或蛋白质等物质的吸管或其他量器，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，器皿应透明光亮，没有水滴。洗净的仪器不能再布擦拭内壁。

各种洗涤液的配制方法及使用参见附录 II。

(刘观昌)

实验二 生物化学实验常用操作技术

一、分光光度技术

分光光度分析是目前生物化学实验室及临床生化检验中最常用的定量方法之一。

(一) 原理

光线的本质是电磁波，有不同的波长，肉眼可见的彩色光称可见光。波长在 400～750nm，小于 400nm 的光线称为紫外光，大于 750nm 的光线称为红外线。分光光度分析的基本原理是根据溶液在光线照射下，对光线有选择的吸收，不同的物质由于其分子结构不同，对光线的吸收能力也不同，不同的物质具有其各自的吸收光谱，其理论依据是 Lambert - Beer 定律，是指一束单色光通过有色透明液时，特定波长的光会被吸收，被吸收光波的量与溶液厚度成一定的比例关系。

设入射光的强度为 I_0 ，透射光的强度为 I ，则 I 和 I_0 之百分比值称为透光度，用 T 表示，即

$$T = I / I_0 \times 100\%$$

T 值是随溶液厚度的增加而减小的，通过计算推导， T 与溶液厚度间并不存在简单的定量关系，只有 T 的负对数 ($\lg T$) 才随溶液厚度的增加而成正比的增加。

$$-\lg T = -\lg I / I_0 = \lg I_0 / I = a_1 b$$

式中， a_1 为常数， b 为溶液的厚度。式中 $\lg I_0 / I$ 即透光度的负对数称为吸光度 A ，又称消光度 (E) 或称光密度 (OD 或 D)。所以： $A = a_1 b$ 。

Beer 定律：当一束单色光通过溶液后，溶液的厚度不变，而浓度不同时，溶液浓度越大，则透射光的强度越弱。其他关系的推导同 Lambert - Beer 定律推导。

$$\lg I_0 / I = a_2 c$$

式中， c 为溶液的浓度， a_2 为常数。

如果同时考虑到溶液的厚度和溶液的浓度对光吸收的影响时，上式合并起来即得：

$$\lg I_0 / I = abc, \text{ 即: } A = abc$$

在此， a 为吸光率（也称吸光系数）。

上式即为 Lambert - Beer 定律的表达式，是分光光度分析的基本计算公式。

采用适当的光源、棱镜和适当的光源接收器，可使介质浓度测定范围不仅局限于可见光，亦可扩大到紫外光区和红外光区。经单色器（棱镜）得到的光源虽然不是纯的单色光，但波长范围狭窄，也更符合 Lambert - Beer 定律，使分光光度分析灵敏度大为提高。

以不同波长的单色光作为入射光，测定某一溶液的吸光度，然后以入射光的不同波长为横轴，各相应的吸光度为纵轴作图，可得到溶液的吸收光谱曲线。不同的物质，分子结构不

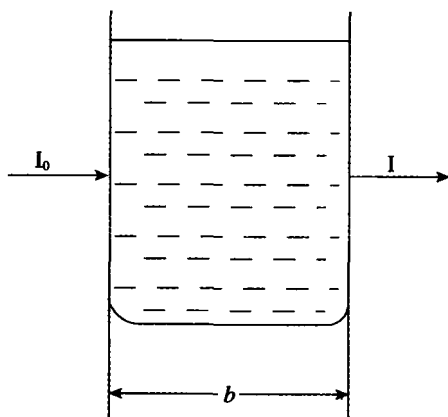


图 2-1 比色原理示意图

同，其吸收光谱曲线也有其特殊形状。许多动、植物组织中所含的组分用化学方法不易分离，此组分可借助于分光光度法测定出不同的吸收光谱曲线，用以确定各组分的性质和含量。由于分光光度计波长范围较大，既可用于可见光，也可用于紫外线和红外线吸收测定。又由于分光光度法可利用物质持有的吸收光谱曲线进行定性定量，因此，待测物质既可以是有色物质，也可以是无色物质，只要对特定波长的光线吸收即可。

（二）分光光度法在生物化学中的应用

利用分光光度法对物质进行定量测定，其计算方法主要有两种：

1. 利用标准管计算被测物含量（直接比较法） 用已知浓度的标准物与测定管同样处理，读取各管光密度。再根据 Lambert - Beer 定律的表达式计算：

$$A_1 = a_1 b_1 c_1, A_2 = a_2 b_2 c_2$$

式中， A_1 、 A_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管光密度。

c_1 、 c_2 分别为已知浓度标准管和未知浓度测定管测定物浓度。

因盛标准液和测定液的比色皿内径相同（ $b_1 = b_2$ ）。故以上二式可写成：

$$A_1 / a_1 \cdot c_1 = A_2 / a_2 \cdot c_2$$

因标准液和测定液的介质为同一物，故 a 相同。即 $a_1 = a_2$ ，上式可以换算成下式：

$$c_1 = A_2 / A_1 \cdot c_2$$

上式为实验操作中常用的计算式。

2. 利用标准曲线进行换算 先配制一系列已知不同浓度的测定物溶液，按测定管同样方法处理显色，分别读取各管光密度，以各管光密度为纵坐标，各管浓度为横坐标，在方格坐标纸上作图得标准曲线。以后进行测定时，就不需再做标准管，只以测定管光密度即可从标准曲线上查得测定物的浓度。

一般认为，标准曲线范围在测定物浓度的 0.5~2 倍之间，光密度在 0.05~1.0 范围内为宜，所作标准曲线仅供短期使用。标准曲线制作与测定管测定应在同一台仪器上进行，操作条件完全一样，否则其测定结果会有一定误差。

（三）分光光度计的结构与使用

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来并测量其强度的仪器称为分光光度计。分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用（全波段）分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五个部分组成，即光源、单色器、狭缝、吸收池和检测器系统（图 2-2）。

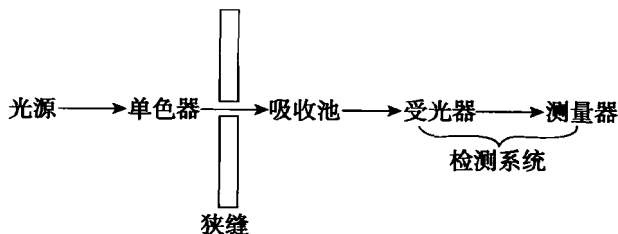


图 2-2 分光光度计结构示意图

1. 光源 一个好的光源要求具备发光强度高、亮度稳定、光谱范围宽和使用寿命长等特点。分光光度计上常用的有白炽灯（钨灯、卤钨灯等）、气体放电灯（氢灯、氘灯及氙灯等）、金属弧灯（各种汞灯）等多种。有钨灯和氢灯（或氘灯）的分光光度计，光源的供电需要由稳压电源供给。钨灯在出现灯管发黑时应及时更换，如换用灯的型号不同，还需要调节灯座的位置和焦距，接触灯管时应戴手套，以防留下污迹。

2. 单色器 单色器是将混合光波分解为单一波长光的装置，多用棱镜或光栅作为色散元件，它们能在较宽光谱范围内分解出相对单一波长的光线，通过此色散系统根据需要可选择一定波长范围的单色光，单色光的波长范围愈窄，仪器的敏感性越高，测量的结果越可靠。

3. 狭缝 狭缝是由一对隔板在光通路上形成的缝隙，通过调节缝隙的大小调节入射光的强度，并使入射光形成平行光线，以适应检测器的要求，分光光度计的狭缝可在 0~2mm 宽度内调节。

4. 吸收池 吸收池也叫比色杯、比色皿或比色池，一般由玻璃或石英制成。在可见光范围内测定时选用光学玻璃吸收池，在紫外线范围内测定时必须用石英池。

注意保护比色杯的质量是取得良好分析结果的重要条件之一，吸收池上的指纹、油渍或壁上的一些沉积物，都会显著地影响其透光性，因此务必注意仔细操作和及时清洗并保持清洁。

5. 检测系统 主要是由受光器和测量器两部分组成，常用的受光器有光电池、真空光电管或光电倍增管等。它们可将接受到的光能转变为电能，并应用高灵敏度放大装置，将弱电放大，提高灵敏度。通过测量所产生的电能，由电流计显示出电流的大小，在仪表上可直接读取 A 值、T 值。较高级的现代仪器，还常附有电子计算机及自动记录器，可自动报出吸收曲线。

（四）操作方法

不论何种分光光度计，其基本操作方法大同小异。现以 7-22 型分光光度计为例，简要说明其使用要点。

1. 接上电源，打开比色室暗箱盖（光门挡板自动遮住光道），打开电源开关，将仪器预热约 20min，旋转波长旋钮选择所需波长。

2. 将灵敏度选择开关放置于“1”档，将旋钮“5”置于“T”档，然后旋转“0”调节旋钮，使读数窗口显示值为零。

3. 将空白、标准及测定溶液分别到至干净的比色杯中，依次放于比色杯架上。

4. 将暗箱门盖上，并将空白管置于光路上，调节“100%”旋钮使读数窗口显示值为“100.00”。再将旋钮置于“A”档，看显示的吸光度是否为零。若为零则继续下面的步骤；若不为零则可用消光零调节钮，使之为零，同时需将旋钮置于“T”档，重复本步开始调节操作，以确保在“T”档时，暗箱盖打开时为零，合上时为 100；调至“A”档后，吸光度为零。

注：若空白液对光线吸收能力过强，仪器灵敏度不够，导致调不到 100% 时，可将灵敏度选择开关拨到较高（2~3 档），至足以调到 100% 为度，但改变灵敏度选择开关以后，需要重新校正“0”旋钮及 100% 旋钮。

5. 将标准液及待测液的比色杯依次推入光路，即可从自动电流计直接读出吸光度值。

6. 使用完毕后，关上仪器开关，切断电源，将比色杯取出，用蒸馏水充分洗涤干净，

放回原处。

附 VIS-722N 可见分光光度计使用说明

VIS-722N 可见分光光度计是在原有 7-22 型分光光度计的基础上经过改进而成，操作增加了智能化系统，显示屏以液晶显示代替了原来的仪表盘。其使用方法如下：

1. 打开仪器开关，仪器自动进入标准测量模式，将仪器预热 15min 后即可进入测量。
2. 旋转波长旋钮，使波长窗数为测量波长。
3. 将空白液、标准液、测定液分别放入样品池，并关好样品室门。
4. 将空白液拉入光路，按 100% 键进入调百，待液晶显示 T 值为 100% 时表示调整完毕。
5. 将样品池挡光位拉入光路，观察 T 值是否为 100%；如不是，按 0% 键调零。
6. 将空白溶液再次拉入光路，观察 T 值是否为 100%；如不是，再次进入调百调零直至参比的透光度 (T) 测量值为 0% 时完成仪器的调整。
7. 在完成仪器的调整后，将标准液和测定液拉入光路中，此时所显示的 T 值与 A 值便是此样品的透光率与吸光度值。

(五) 注意事项

1. 该仪器应放在干燥的房间内，使用时放置在坚固平稳的工作台上，室内照明不宜太强。天热时不能用电扇直接向仪器吹风，以免仪器光源不稳定。
2. 使用本仪器前，使用者应该首先了解本仪器的结构和工作原理，了解各个操作旋钮或各按键的功能。在未接通电源之前，应该对仪器的安全性能进行检查，电源接线应牢固，通电也要良好，各个调节旋钮的起始位置应该正确，然后再接通电源开关。
3. 要注意保护比色皿的透光面，避免产生斑痕，否则影响透光度。比色皿放入比色皿架前应先用吸水纸吸干外壁的水珠，拿取比色皿时只能用手捏住毛玻璃的两侧面，比色皿使用完毕后应洗净（不可用碱溶液和强氧化剂洗涤，以免腐蚀玻璃或使比色皿黏结处脱胶），用擦镜纸吸干后放回比色皿盒内。
4. 若比色不连续进行，暂停使用时应使暗箱盖打开，以免光路长时间处于导通状态，致使光电管疲劳，影响测定准确性。为了避免仪器积灰和沾污，在工作结束后要用布套或塑料套子罩住整个仪器。

附 751G 型分光光度计使用

1. 选择适用波长的光源灯，钨灯适用波长为 320~1000nm，氢弧灯适用波长为 200~320nm。把主机背面的光源选择杆拨到选定的光源方向，氢弧灯向右，钨灯向左拨。打开放大器电源开关和灯源开关，将选择开关拨至“校正”位，旋转波长旋钮到所需刻度，仪器预热 20min。氢灯稳压电源的工作电流达 300mA 时，可正常工作。
2. 根据波长选择比色杯，350nm 以上用玻璃比色杯，350nm 以下用石英比色杯。将待测溶液（1 个杯中为空白液，3 个杯中为待测溶液）注入比色杯（注入的液体约为杯子体积的 3/4，若太满，拉动时易溢出杯外，损坏仪器）。沾在杯外的液体用擦镜纸轻轻拭去。然后将盛有液体的比色杯放入托架内，盖上盖板。移动样品槽手柄，把装有空白液的比色杯移入光路中，移动时注意滑板是否处在定位槽内。
3. 调节暗电流使电表指针到零。为了使测定正确，每测量一次，暗电流要校正一次。
4. 旋转灵敏度旋钮，一般从停止位置顺时针方向转动 3~5 圈。