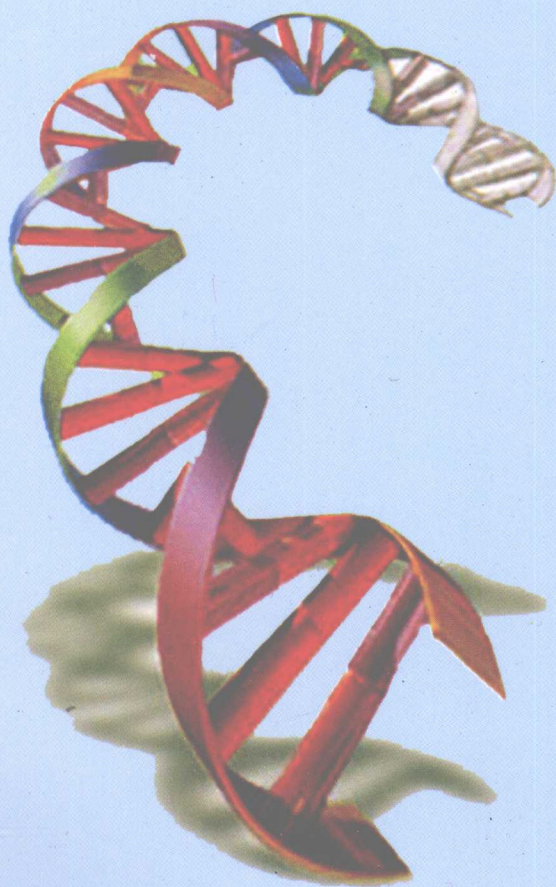


生物化学学习与实验指导

主 编：段亚平

副主编：曲 妮



西藏人民出版社

生物化学学习与实验指导

主 编 沈雁冰

副主编 唐 增



人民卫生出版社

生物化学学习与实验指导

主 编 段亚平

副主编 曲 妮

参 编 李 勇 王瑞云 格桑曲珍

西藏人民出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物化学学习与实验指导 / 段亚平主编. —拉萨: 西藏人民出版社, 2009. 7

ISBN 978-7-223-02665-9

I. 生… II. 段… III. 生物化学-高等学校-教学参考资料 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 084101 号

生物化学学习与实验指导

- | | |
|------|------------------------|
| 主 编 | 段亚平 |
| 责任编辑 | 杨芳萍 姚永奇 |
| 电脑排版 | 周正权 |
| 出版发行 | 西藏人民出版社 (拉萨市林廓北路 20 号) |
| 印 刷 | 西藏军区印刷厂 |
| 开 本 | 787 × 1092 1/32 |
| 印 张 | 10.25 |
| 字 数 | 200 千 |
| 版 次 | 2009 年 7 月第 1 版 |
| 印 次 | 2009 年 7 月第 1 次印刷 |
| 印 数 | 01-2,000 |
| 书 号 | ISBN978-7-223-02665-9 |
| 定 价 | 15.00 元 |

版权所有 翻印必究

(如有印刷质量问题, 请与出版社发行部联系调换)
发行部联系电话 (传真): 0891-6826115

前 言

生物化学(Biochemistry)是研究生物体的化学组成及化学变化规律的科学,是在分子水平上探讨生命的本质,所以也称生命的化学。通过学习要求掌握人体的化学组成、分子结构及结构与功能的关系、物质代谢及调控、信息传递与表达的分子基础、生化技术的基本原理和操作技能。生物化学是一门重要的医学基础课程,同时也是实验操作性很强的一门学科。近年来,由于许多基础医学学科的研究均深入到分子水平,并应用生物化学的理论和解决各个学科的问题,近代医学的发展经常运用生物化学的理论和方法来诊断、治疗和预防疾病,而且许多疾病的机理也需要从分子水平上加以探讨。因此,学习和掌握生物化学的基础知识和基本技能,除理解生命现象的本质与人体正常生理过程的分子机制外,更重要的是为进一步学习基础医学其他各课程和临床医学打下扎实的生物化学基础。有目共睹,迅猛发展的生物化学学科,研究成果累累,促进了相关和交叉学科,特别是医学的发展,已成为生命科学的共同语言。

生物化学对于初学者是比较难理解、难记忆的学科之一,为帮助初学者更好地理解 and 巩固学科的理论知识、增强记忆、培养综合分析问题的能力和方便教学,特编写这本《生物化学学习与实验指导》。该书分两部分,第一部分为实验指导,主要是便于实验课教学,如实验前预习,实验操作,写实验报告;第二部分为学习指导,可供学生课后复习及对本学科理论知识的掌握程度自行测定。编者均是从事多年生物化学教学的专职教师,结合教学实践过程中所发现的难点、疑点,以及各类考试中经常涉及到的内容而编写的。是与人民卫生出版社出版的普通高等教育“十五”国家级规划教材《生物化学》第7版(查锡良主编)相配套的辅助用书。段亚平编写的内容主要是1~3章生物大分子的结构与功能、15~17章专题篇和部分实验指导;曲妮编写的内容主要是10~14章基因信息的传递和部分实验指导;李勇编写的内容主要是4~9章物质代谢及调节和部分实验指导;王瑞云主要编写实验指导;格桑曲珍主要编写学习目标。本书收集了不同层次的20余个实验和不同程度的各类考试中经常涉及到的内容,涵盖面较广。医学类各专业的本、专科可根据教学大纲所要求重点内容,结合教学实践选择使用。

由于编写时间仓促,学识能力有限,不尽如人意之处在所难免。谨请读者提出宝贵意见,我们不胜企盼,并表示衷心感谢。

编 者

2009年2月

目 录

第一部分 实验指导

实验须知	1
实验一 蛋白质的沉淀与变性反应	2
实验二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	4
实验三 分光光度计的使用	7
实验四 血清总蛋白的含量测定——双缩脲法	9
实验五 紫外吸收法测定蛋白质浓度	11
实验六 血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	12
实验七 核酸(DNA)电泳	14
实验八 脱氧核糖核酸 (DNA) 的含量测定	15
实验九 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶状盘状电泳 (PAGE)	17
实验十 酶的专一性及影响酶活性的因素	20
实验十一 综合设计性实验	22
实验十二 肝糖原的提取与鉴定	26
实验十三 尿糖定性实验	27
实验十四 血清总胆固醇的磷钼铁测定法	27
实验十五 血清脂蛋白的琼脂糖凝胶电泳	29
实验十六 肝中酮体生成作用	30
实验十七 氨基酸的纸上层析与氨基酸移换作用	31
实验十八 血清转氨酶活性测定 (改良穆氏法)	33
实验十九 细胞色素 C 的提取	35
实验二十 滴定法测定维生素 C 的含量	37
实验二十一 蛋白质代谢产物测定及有关肾功能试验	39

实验二十二 专题介绍	42
质粒 DNA 的提取	42
质粒 DNA 与目的 DNA 片段的连接	45
重组质粒 DNA 转化原核细胞	47
酵母 RNA 提取与测定	49

第二部分 学习指导

绪 论	54
第一章 蛋白质的结构与功能	54
第二章 核酸的结构与功能	62
第三章 酶	69
第四章 糖代谢	78
第五章 生物氧化	85
第六章 脂类代谢	91
第七章 氨基酸代谢	97
第八章 核苷酸代谢	103
第九章 物质代谢的联系与调节	108
第十章 DNA 的生物合成(复制)	113
第十一章 RNA 的生物合成(转录)	120
第十二章 蛋白质的生物合成(翻译)	127
第十三章 基因表达调控	134
第十四章 基因重组与基因工程	140
第十五章 细胞信息转导	145
第十六章 肝的生物化学	152

第一部分 实验指导

实验须知

【实验目的】

1. 培养学生严谨的科学态度和作风, 提高分析问题和解决问题的能力。
2. 通过实验, 加深对生物化学基本理论的理解, 使学生能够更好地将理论与实践密切结合起来。
3. 使学生熟练地掌握生化实验的基本操作和生化技术。

【实验前的准备】

1. 根据实验指导, 认真预习。
2. 复习相关理论。
3. 明确实验目的。
4. 熟悉实验的主要操作步骤。
5. 初步判断实验的预期结果。

【实验时的注意事项】

1. 必须严肃认真, 一丝不苟地进行操作, 仔细观察和综合分析实验所出现的现象与结果, 并及时记录下来。
2. 如果实验结果与理论结果不相符时, 必须进行科学分析, 找出原因, 可重做。
3. 试剂用后放回原处。瓶盖切勿盖错, 如张冠李戴, 试剂即受污染。标准试剂不应用潮湿之吸管或滴管与之直接接触, 取出后不得再行放入原瓶。
4. 使用玻璃仪器时, 既要大胆, 又要小心, 稳拿轻放, 尽量避免损坏。使用光电比色计、分光光度计、离心机、电泳仪等贵重仪器时, 更应仔细小心。如感到使用生疏或不会时, 应先请教师指导。任何仪器如有损坏, 应立即报告教师, 说明损坏原因, 以便吸取教训。
5. 实验室保持肃静, 注意清洁卫生。共用仪器及试剂等设备, 未经教师允许, 不得随意搬动。
6. 实验用过的滤纸、火柴梗以及沉淀物等不得倒入水槽, 以防阻塞下水道。弃去的浓酸、浓碱, 均须倒入废液缸中, 不得直接倒入水槽, 以免损坏下水道。

【实验后的注意事项】

1. 实验后, 将所用仪器清洗干净, 妥善存放, 以备下次使用。
2. 如有仪器损坏, 应填写“仪器损坏单”, 经教师签字后, 去技术室换取。

3. 离开实验室时，一定要将实验室整理清洁，关好门、窗、水、电，方能离去。

【实验报告】

每次做完实验，须及时整理实验记录，依照规定的格式和内容写出实验报告，交指导教师评阅。报告内容包括：

实验题目

实验目的

原理

操作：简叙实验过程，但不要抄录讲义。

结果：详细地记录实验中的现象，不得伪造、抄录讲义。

讨论：分析实验结果，经过自己思考，得出明确的结论。

【实验室内意外事故的处理】

实验中如遇着火、烫伤、割伤等意外事件发生，必须镇静地紧急处理，并立即报告教师，作如下处理：

1. 着火：如酒精灯推倒或其他原因起火，首先将一切易燃物品移至远处，然后将火扑灭。灭火方法：可用湿布或工作服盖上扑灭，或取沙扑灭。如乙醚、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。

2. 烧伤：皮肤被火灼伤，用烫伤软膏涂之，如伤势较重，即送医院。

3. 药品伤：皮肤为药品所侵蚀，应根据药品之性质加以适当处理后，用单宁油膏或凡士林涂之，如系酸或碱，则先用大量水洗去后，然后用5%的小苏打液或1%醋酸液分别处理之。如眼睛为药品所侵入，用水洗去后，继以5%的小苏打液或1%的硼酸液洗之，视侵入药品之性质而定。必要时，去医院处理。

实验一 蛋白质的沉淀与变性反应

【目的】

1. 认识蛋白质沉淀与变性的作用。
2. 掌握蛋白质沉淀和变性的原理及操作方法。

【原理】

在水溶液中，蛋白质分子的表面由于形成水化层和双电子层而使蛋白质成为稳定的胶体颗粒。在一定的物理、化学因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷，脱水，甚至变性，可以使蛋白质以固态形式从溶液中析出，这个过程称为蛋白质的沉淀反应。蛋白质的沉淀反应可分为以下两种：

(1) 可逆性沉淀反应。蛋白质虽已沉淀析出，但是它的分子内部结构并未发生显著变化，蛋白质仍然保持原有的性质，在沉淀因素除去后，蛋白质能够再溶于原来的溶剂中。例如，盐析作用，以及在低温下，乙醇、丙酮对蛋白质的短时间作用，利用等电点的沉淀等，都属于可逆性沉淀反应。

(2) 不可逆沉淀反应。在发生沉淀反应的同时，蛋白质分子内部结构和空间构型遭到

破坏,使蛋白质失去原来的天然性质,蛋白质发生了变性。变性的蛋白质在沉淀因素去除后不能再溶解于原来溶剂中。重金属盐,生物碱试剂,过酸,过碱,加热,震荡,超声波,有机溶剂等都能使蛋白质发生不可逆沉淀反应。

【试剂】

1. 蛋白质溶液:取5只鸡蛋(或鸭蛋)的蛋清,用蒸馏水稀释至100 ml,拌均匀后用4~8层纱布过滤。此蛋白质溶液需新鲜配制。

2. 蛋白质—NaCl溶液:取20 ml蛋清,蒸馏水200 ml和饱和NaCl溶液100 ml,充分搅匀,用纱布滤去不溶物(加入NaCl的目的是溶解球蛋白)。

3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末,饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,3% AgNO_3 ,0.5%乙酸铅,10%三氯乙酸,5%磺基水杨酸,0.1% CuSO_4 ,浓 H_2SO_4 ,0.1%乙酸,饱和NaCl溶液,10%NaOH溶液,10%乙酸溶液等。

【器材】

试管、试管架、小玻璃漏斗、滤纸、玻璃纸、玻璃棒、线绳、500 ml烧杯、10 ml量筒、纱布等。

【操作】

1. 蛋白质的可逆沉淀反应—盐析

用大量中性盐使蛋白质从溶液中沉淀析出的过程称为蛋白质的盐析作用。蛋白质是亲水性胶体,在高浓度的中性盐影响下,蛋白质分子被盐脱去水化层,同时所带的电荷被中和,胶体稳定性遭受破坏而沉淀析出。析出的蛋白质仍保持其天然蛋白的性质。降低盐的浓度时,蛋白质还能再溶解。

沉淀不同的蛋白质所需中性盐的浓度不同,而使用的盐类不同时,反应也有差异。例如,向含有清蛋白和球蛋白的鸡蛋清溶液中加入 MgSO_4 或NaCl,则球蛋白沉淀析出;加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和,则清蛋白沉淀析出。在等电点时,清蛋白可被饱和 MgSO_4 、NaCl、半饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液沉淀析出,该法被称为蛋白质的分级盐析。

取一支大试管加入3 ml蛋白质—NaCl溶液和3 ml饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,混匀,静置约10 min,球蛋白沉淀析出。将其过滤后,向滤液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末,边加边用玻璃棒搅拌,直至粉末不再溶解,达到饱和为止。析出的沉淀为清蛋白。静置后,倒去上部清液,收集清蛋白沉淀。取出部分沉淀加水稀释,观察它是否溶解。

2. 蛋白质的不可逆沉淀反应

(1) 重金属盐沉淀蛋白质

重金属盐易与蛋白质结合成稳定的沉淀而析出。蛋白质在水溶液中是两性电解质,在碱性溶液中(对蛋白质的等电点而言),蛋白质分子带负电荷,能与带正电荷的金属离子结合成蛋白质盐。在有机体内,蛋白质常以其可溶性的钠盐或钾盐的形式存在,当加入汞、铅、铜、银等重金属盐时,蛋白质形成不溶性的盐类而沉淀。且沉淀不再溶解于水中,这说明蛋白质发生了变性。

重金属盐沉淀蛋白质的反应通常很完全,临床上对重金属盐的食物性中毒的患者一般可采用加入蛋白质的方法来解除中毒。

取3支大试管,各加入约1 ml蛋白质溶液,分别加入3% AgNO_3 3~4滴,0.5%乙酸铅

1~3 滴和 0.1%CuSO₄ 3~4 滴, 观察沉淀的生成。向第 2 支和第 3 支试管内再分别加入过量的乙酸铅溶液和浓 H₂SO₄, 观察沉淀的再溶解。

(2) 有机酸沉淀蛋白质

有机酸能使蛋白质沉淀, 其中以三氯乙酸和磺基水杨酸最有效, 它们能将血清等生物体液中的蛋白质完全除去。

取 2 支大试管, 各加入蛋白质溶液约 0.5 ml, 然后分别滴加 10%三氯乙酸和 5%磺基水杨酸溶液各数滴, 观察蛋白质沉淀。

(3) 无机酸沉淀蛋白质

取 1 支大试管, 加入浓硫酸 0.5ml, 然后沿管壁徐徐加入蛋白质溶液 0.5ml, 观察接触面有何现象发生。摇匀, 又有何现象发生。解释之。

(4) 加热沉淀蛋白质

几乎所有的蛋白质都因加热变性而凝固, 成为不可逆的不溶状态。盐类和 H⁺浓度对蛋白质加热凝固有重要影响。少量盐类促进蛋白质的加热凝固。当蛋白质处于等电点时, 加热凝固最完全且最迅速。在酸性或碱性溶液中, 蛋白质分子带有正电荷或负电荷, 虽然加热, 但蛋白质也不会凝固; 若同时有足量的中性盐存在, 则蛋白质可因加热而凝固。

取 5 支试管, 编号, 按表 1—1 加入有关试剂。

表 1—1 蛋白质沉淀与变性反应加样表

管号 \ 试剂	蛋白质溶液	0.1%乙酸	10%三氯乙酸	饱和 NaCl	10%NaOH
1	2ml	—	—	—	—
2	2ml	0.5ml	—	—	—
3	2ml	—	0.5ml	—	—
4	2ml	—	—	0.5ml	—
5	2ml	—	—	—	0.5ml

将各管混匀, 观察并记录各管现象, 然后将各管放入沸水浴中加热 5 min, 观察并比较各管的沉淀情况。

【结果与分析】

实验二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳

【目的】

1. 了解醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白的基本原理。
2. 掌握醋酸纤维素膜薄电泳法分离血清蛋白的操作方法。

【原理】

血清中含有清蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白、 γ -球蛋白等各种蛋白质。各种不同的蛋白质由于氨基酸组分、立体构象、分子量、等电点及分子形状的不同，在电场中迁移时泳动的速度有所不同。分子量小、等电点低、在相同碱性 pH 缓冲体系中带负电荷多的蛋白质颗粒在电场中迁移速度较快。用醋酸纤维素薄膜为支持物，将正常人血清在 pH 8.6 的缓冲体系中电泳 1 h 左右，可以使血清蛋白得到分离，经染色后，血清蛋白质可显示出 5 条血清蛋白区带。在血清蛋白中，以清蛋白泳动最快，其余依次为 α_1 -、 α_2 -、 β -及 γ -球蛋白。这些区带经洗脱后可用分光光度法定量，也可直接进行光吸收扫描自动绘出区带吸收峰及相对百分比。由于血清蛋白醋酸纤维素膜电泳具有操作简单，快速，分辨率高及重复性好等优点，已成为临床生化检验的常规操作之一，还可用于分离脂蛋白、血红蛋白，以及同工酶的分离、测定。

【试剂】

1. 测试材料：未溶血的人血清

2. 电泳缓冲液(pH 8.6, 0.07 mol/L, 离子强度 0.06): 称取 1.66 g 巴比妥和 12.76 g 巴比妥钠，置三角瓶中，加双蒸水约 600 ml，稍加热溶解，冷却后用双蒸水定容至 1000 ml。4℃保存备用。

3. 血清蛋白染色

(1) 0.5%氨基黑 10B 染色液：称取 0.5 g 氨基黑 10B，加双蒸水 40 ml，甲醇 50 ml，冰乙酸 10 ml，混匀溶解后置试剂瓶内贮存。

(2) 漂洗液：取 95%乙醇 45 ml，冰乙酸 5 ml 和双蒸水 50 ml，混匀后置试剂瓶内贮存。

(3) 透明液：(临用前配制)

甲液：取冰乙酸 15 ml，无水乙醇 85 ml，混匀贮存于试剂瓶内。

乙液：取冰乙酸 25 ml，无水乙醇 75 ml，混匀贮存于试剂瓶内。

(4) 保存液：液体石蜡。

(5) 定量洗脱液 (0.4 mol/L NaOH 溶液)：称取 16 g NaOH，用少量蒸馏水溶解后定容至 1000 ml。

【器材】

醋酸纤维素膜 (2 cm × 8 cm)、培养皿 (直径 9 cm~10 cm)、解剖镊子及竹夹、点样器、直尺、铅笔、电泳仪及电泳槽、玻璃板 (12 cm × 12 cm)、试管及试管架、吸量管 (2 ml、5 ml)、可见光分光光度计、吹风机、单面刀片、普通滤纸及臭氧化缸 (用普通容器亦可)。

【操作】

1. 准备醋酸纤维素薄膜

用竹夹取一片薄膜，平放在盛有缓冲液的平皿中，完全浸泡在缓冲液内，约 30 min 后用于电泳。

2. 准备电泳槽

根据电泳槽膜支架的宽度，剪裁尺寸合适的滤纸条。在两个电极槽中，各倒入电极缓冲液。在电泳槽的两个膜支架上，各放两层滤纸，使滤纸一端的长边与支架前沿对齐，另一端浸入电极缓冲液内。待滤纸条湿润后，用玻璃棒挤压排气，使滤纸紧贴膜支架。

3. 点样

取一张干净滤纸 (10 cm×10 cm), 用竹夹取出浸透的薄膜, 夹在两层滤纸间以吸去多余的缓冲液或晾干, 无光泽面向上平放在点样模板上, 在距薄膜边 1.5 cm 处用铅笔划一平行线, 作为点样区, 用磨光的玻片蘸取血清后, 均匀涂在点样区内, 使血清完全渗透至薄膜内, 形成一定宽度、粗细均匀的直线。此步是实验成功的关键。

4. 电泳

用竹夹将点样端的薄膜平贴在负极电泳槽支架的滤纸上, 注意使点样面朝下, 另一端平贴在阳极端支架上, 薄膜紧贴滤纸桥并绷直, 能下垂, 同时安放几张薄膜, 薄膜之间应相隔几毫米, 使薄膜平衡 10min。在室温下进行电泳, 打开电源开关, 调节电流强度为 0.3mA/cm (膜宽)。通电 10min~15min 后, 将电流强度调节到 0.5mA/cm (膜宽), 电泳时间为 50min~80min。电泳后调节旋钮, 使电流为零, 关闭电泳仪切断电源。

5. 染色与漂洗

血清蛋白质的染色、漂洗和脱色

用解剖镊子取出电泳后的薄膜, 放在加有 0.5% 氨基黑 10B 染色液的培养皿中, 浸染 5min。取出后再用漂洗液浸洗、脱色, 每隔 5min 换漂洗液一次, 连续数次, 直至背景蓝色脱尽。取出薄膜放在滤纸上, 用吹风机吹出的冷风将薄膜吹干。

6. 透明

将脱色并吹干后的薄膜浸入透明甲液中 2min, 立即放入透明乙液中浸泡 1min, 取出后立即紧贴于干净玻璃板上, 不能有气泡。约 2min~3min 薄膜完全透明。若透明太慢, 可用滴管取透明乙液少许在薄膜表面淋洗一次, 垂直放置玻璃板待其自然干燥, 或用吹风机冷风吹干且至无酸味为止。将玻璃板放在流动的自来水下冲洗, 当薄膜完全润湿后, 用单面刀片撬开薄膜的一角, 用手轻轻将透明的薄膜取下, 用滤纸吸干所有的水分, 最后将薄膜在液体石蜡中浸泡 3min, 再用滤纸吸干液体石蜡, 压平。此薄膜透明, 区带着色清晰, 可用于光吸收计扫描。长期保存不褪色。

【结果与分析】

附:

血清蛋白经醋酸纤维素膜电泳和染色后, 一般可显示 5 条区带。从点样点开始依次是: γ - β - α_2 - α_1 -球蛋白和清蛋白。未经透明处理的电泳图谱可直接用于定量测定。定量测定可采用洗脱法或光吸收扫描法, 以测定各蛋白组分相对百分含量。

1. 洗脱法

将显色后的电泳区带依次剪下, 并在负极端剪一块与清蛋白区带面积相同的薄膜作为空白, 分别放在试管中, 在含清蛋白区带及空白膜的试管中, 加入 0.4 mol/L NaOH 4 ml, 其余各管加入 2 ml, 摇匀后, 置 37℃ 水浴中保温 30 min, 每隔 10 min 充分振摇一次, 使各染色区带色泽完全洗脱下来。冷却后, 用 722 型可见光光度计, 用 620 nm 波长比色, 测定各组分的吸光率, 按顺序标以 A 清, A α_1 , A α_2 , A β , A γ 按下列方法计算各组分蛋白质所占的百分率。

(1) 计算吸光率总和 (T)。

$$T = 2 \times A_{\text{清}} + A_{\alpha_1} + A_{\alpha_2} + A_{\beta} + A_{\gamma}$$

(2) 计算血清中各蛋白质组分相对百分含量。

计算公式

正常值

$$\text{清蛋白}(\%) = (2 \times A_{\text{清}} / T) \times 100$$

54% ~ 73%

$$\alpha_1\text{球蛋白}(\%) = (A_{\alpha_1} / T) \times 100$$

2.78% ~ 5.1%

$$\alpha_2\text{球蛋白}(\%) = (A_{\alpha_2} / T) \times 100$$

6.3% ~ 10.6%

$$\beta\text{球蛋白}(\%) = (A_{\beta} / T) \times 100$$

5.2% ~ 11%

$$\gamma\text{球蛋白}(\%) = (A_{\gamma} / T) \times 100$$

12.5% ~ 20%

【临床意义】

1. 慢性肝炎、肝硬化时，清蛋白降低， γ —球蛋白升高 2~3 倍。
2. 肾病综合征时，清蛋白降低， α_2 及 β —球蛋白升高。

实验三 分光光度计的使用

【目的】

了解分光光度计的基本原理，学会使用 722 型光栅分光光度计。

【原理】

分光光度计的基本原理是溶液中的物质在光的照射激发下，产生了对光吸收的效应，物质对光的吸收是具有选择性的，若溶液选择性地吸收了某种颜色的光，则溶液呈吸收光的互补色，例如：硫酸铜溶液吸收的是黄色光显示蓝色。不同的物质都具有其各自的吸收光谱。有色溶液颜色的深浅，与其中呈色物质的含量成正比，在定量分析中，*比较有色物质溶液的颜色深浅来测定物质含量的分析方法称为比色法（目测、光电比色、分光光度法）。因此当某单色光通过溶液时，其能量就会被吸收而减弱，光能量减弱的程度和物质的浓度有一定的比例关系，也符合于比色原理——朗伯—比耳定律。

$$T = I / I_0$$

$$A = -\lg T$$

$$A = KCL$$

其中：T：透光度

I：透射光强度

I_0 ：入射光强度

A：吸光度

K：吸光系数

L：溶液的光径长度

C：溶液的浓度

从以上公式可以看出，当入射光、吸收系数和溶液的光径长度不变时，透过光是根据溶液的浓度而变化的。722 型光栅分光光度计的基本原理是根据上述之物理光学现象而设计的。

在实际比色时，使用完全相同的比色杯，即液层厚度 (L) 相同，K 为常数。所以可简化为溶液对光吸收度 (A) 与其浓度 (C) 之间的关系。即溶液的浓度越大，吸收度越大。

可以通过测定吸光度求知某一溶液的浓度。

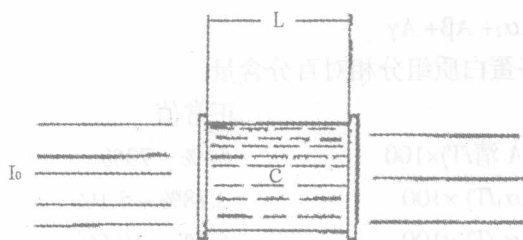


图 3-1

设：测定管的吸管度和浓度分别为 A 测和 C 测，标准管吸光度和浓度分别为 A 标和 C 标，根据 $A=KCL$ 得知

$$A \text{ 测} : A \text{ 标} = C \text{ 测} : C \text{ 标}$$

$$\text{则 } C \text{ 测} = \frac{A \text{ 测}}{A \text{ 标}} \times C \text{ 标}$$

上式中 C 标为已知，A 测与 A 标可测出，把这些数值代入公式，就可求出测定管浓度。

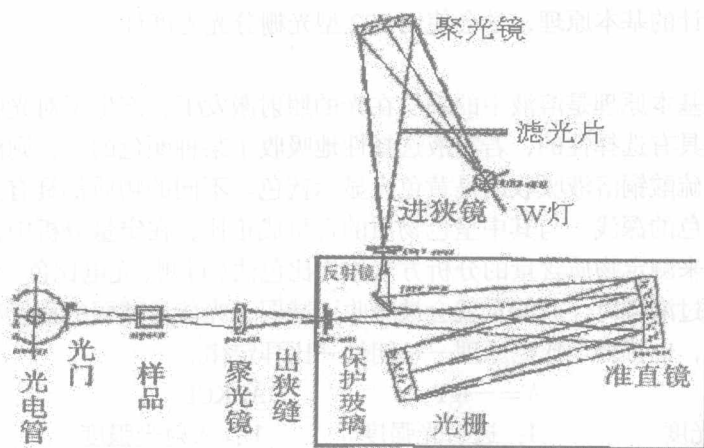


图3-2 光栅分光光度计光学系统图

722 型光栅分光光度计采用光栅自准式色散系统和单光束结构光路如图 3-2 所示。

钨灯发出的连续辐射光经滤光片聚光镜聚光后投向单色器进狭缝，此狭缝正好处于聚光镜及单色器内准直镜的焦平面上，因此进入单色器的复合光通过平面反射镜反射及准直镜准直变成平行光射向散元件光栅，光栅将入射的复合光通过衍射作用形成按照一定顺序均匀排列的连续单色光谱，此单色光谱重新回到准直镜上，由于仪器出射狭缝设置在准直镜的焦平面上，这样，从光栅色散出来的光谱经准直镜后利用聚光原理成像在出射狭缝上，出射狭缝选出指定带宽的单色光通过聚光镜落在试样室被测样品中心，样品吸收后透射的光经光门射向光电管阴极面。

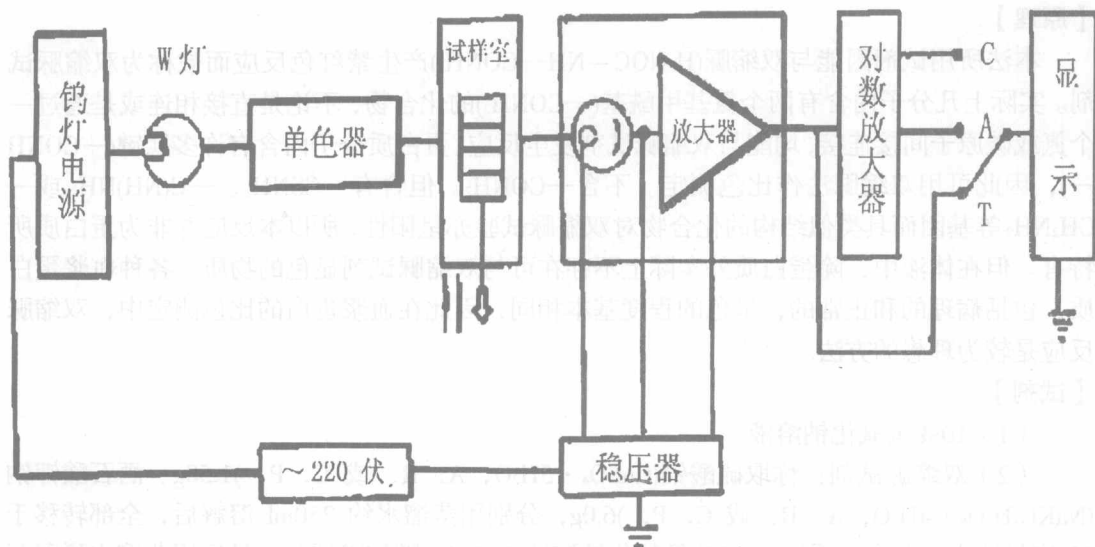


图 3-3 仪器结构方框图

722 型光栅分光光度计由光源室、单色器、试样室、光电管暗盒、电子系统及数字显示器等部件组成。

【操作】

1. 仪器摆放在坚固的平台上，各个调节旋钮的起始位置正确。
2. 接通电源，打开开关，选择适当波长。将选择开关置于“T”。预热 20 分钟。
3. 打开试样室盖，调节“0”旋钮，使数字显示“00.0”。
4. 将空白液、标准液、测定液分别倒入 3 个比色皿中。将比色皿放入试样室，空白管对准光路，合上试样室盖。
5. 调节透光率“100%”旋钮，使数字显示为“100.0”。
6. 将选择开关置于“A”，调节吸光度旋钮，使数字显示为“.000”。
7. 分别将标准液和测定液对准光路，读取相应数据。
8. 回位，取出比色皿，倒掉液体，放回原处。

操作练习：

配制不同浓度的重铬酸钾，各取 4ml，其中有标准液和测定液，蒸馏水为空白液，选用波长为 440nm，并计算出测定液浓度。

实验四 血清总蛋白的含量测定——双缩脲法

【目的】

了解双缩脲法测定蛋白质含量的原理和方法。

【原理】

本法所用试剂因能与双缩脲($\text{H}_2\text{NOC}-\text{NH}-\text{CONH}_2$)产生紫红色反应而被称为双缩脲试剂。实际上凡分子内含有两个氨基甲酰基($-\text{CONH}_2$)的化合物,不论是直接相连或是通过一个氮或碳原子间接连接,均能与双缩脲试剂发生反应。蛋白质分子内含有许多肽键($-\text{CONH}-$),因此可用双缩脲法作比色测定。不含 $-\text{CONH}_2$ 。但含有一 CSNH_2 、 $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 等基团而具类似结构的化合物对双缩脲试验亦呈阳性,所以本反应并非为蛋白质所特有。但在体液中,除蛋白质外实际上不存在可与双缩脲试剂显色的物质。各种血浆蛋白质,包括病理的和正常的,呈色的程度基本相同,因此在血浆蛋白的比色测定中,双缩脲反应是较为理想的方法。

【试剂】

(1) 10%氢氧化钠溶液。

(2) 双缩脲试剂:称取硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, A. R. 或 C. P.)1.50g、酒石酸钾钠($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, A. R. 或 C. P.)6.0g,分别用蒸馏水约250ml溶解后,全部转移于1L容量瓶中,混合,再加入10%氢氧化钠溶液300ml,随加随摇匀。最后用蒸馏水稀释至1L。保存于塑料试剂瓶或内壁涂一层纯净石蜡的普通试剂瓶中。如无红色或黑色沉淀出现,此试剂可长期使用。

(3) 标准血清:收集足量的新鲜血清(单份的或混合的),每100ml加入叠氮钠50mg,将比血清置于冰箱内分装后冰冻保存。

(4) 生理盐水:0.9%的氯化钠溶液。

【器材】

试管及试管架、刻度吸量管、721型分光光度计。

【操作】

将血清标本及标准血清用生理盐水作1/20稀释(例如血清0.20ml加生理盐水3.80ml),然后按表4-1进行操作。

表 4-1

	空白管(ml)	标准管(ml)	测定管(ml)
血清标本(1/20)	—	—	1.0
标准血清(1/20)	—	1.0	—
生理盐水	1.0	—	—
双缩脲试剂	4.0	4.0	4.0

充分混合。室温放置30分钟。用540nm进行比色,以空白管校正光密度到零点,读取各管光密度值。

【结果与分析】

计算

$$\frac{\text{测定管光密度}}{\text{标准管光密度}} \times \text{标准血清蛋白浓度 } 10(\text{g/L}) = \text{血清总蛋白}(\text{g/L})$$