

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学 实验教程

第2版

主 编 徐跃飞 孔 英



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学与分子生物学 实验教程

第2版

主 编 徐跃飞 孔 英

副主编 田余祥 任 凤

编 委 (以姓氏笔画为序)

丁文勇	王 艳	孔 英	田余祥
任 凤	刘 帅	刘丽红	宋嘉哲
张文利	李 胜	杨 帆	杨雪松
汪淑晶	沙珊珊	林 琳	柳林华
徐跃飞	康 健	隋琳琳	董伟杰
樊建慧	燕 秋	薛 恺	

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书针对生物化学教学及研究中涉及的三个主要的生物大分子——蛋白质、酶和核酸,根据生物大分子的理化性质,结合实用的电泳技术、层析技术、离心技术、分析测定技术、分子克隆技术等,综合系统地介绍生物大分子的分离、纯化、含量测定、分析鉴定和应用,并结合教学中物质代谢、酶促反应动力学的系统分析,设计实验并融入相关实验技术和新近的研究进展,使学生在实验教学中掌握知识、技能的同时,体会对科研方法的选择与评价。

本书可供高等医学院校本科生和研究生教材使用,也可供有关的教學及科技人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/徐跃飞,孔英主编.—2版.—北京:科学出版社,2017.1

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-047269-4

I. ①生… II. ①徐… ②孔… III. ①生物化学实验-医学院校-教材 ②分子生物学实验-医学院校-教材 IV. ①Q5-53②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 025443 号

责任编辑:王 颖 / 责任校对:何艳萍

责任印制:赵 博 / 封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

大厂书文印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017 年 1 月第 二 版 印张:9 1/2

2017 年 1 月第七次印刷 字数:222 000

定价:29.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

生物化学与分子生物学是近代自然科学中发展非常迅速的学科。它的发展得益于物理学、化学、数学、计算机技术等各学科间的广泛渗透而引发的研究方法和技术的不断革命和创新。了解和掌握生物化学与分子生物学实验技术和方法,是从事该领域乃至其他相关学科研究工作的十分重要的前提和手段。

实验教学是生物化学与分子生物学基本的教学形式之一,鉴于本科生及研究生教学的需要,根据教学实际情况,我们编写了《生物化学与分子生物学实验教程(第2版)》一书。本书的特点是:

(1)较系统地介绍了生物化学与分子生物学的基本研究技术和方法,如分光光度法、层析法、电泳法、离心法、分子克隆技术等。

(2)既注重基础训练,又强调课程的综合性、实用性。

(3)以综合性思路设计实验加强学生创新思维、科研能力的培养,其中所涉及各个实验项目又可以单独安排教学,以适合多层次的教学需要。

本书共分六章。第一章介绍生物化学实验基本技术;第二章和第三章主要介绍高分子化合物——蛋白质及核酸的分离和提取及结构和性质的鉴定;第四章介绍酶的催化作用及酶反应动力学分析;第五章介绍物质代谢的分析方法;第六章介绍分子生物学基本实验技术。全书共设实验项目37个。本书可供医学类高等院校本科生及研究生使用,也可供其他相关学科的研究工作者参考。热切欢迎使用本书的教师和同学给予批评指正,以利我们进一步修改。

作 者

2015年12月

目 录

第一章 生物化学常用分析技术	1
第一节 生物大分子的基本制备技术	1
第二节 分光光度法	6
第三节 层析技术	15
第四节 电泳技术	24
第二章 蛋白质分子组成与理化性质分析	37
第一节 蛋白质的分子组成与结构	37
第二节 蛋白质的分离和纯化	38
第三节 蛋白质的定量	38
第四节 蛋白质相对分子量测定	41
第五节 实验项目	42
实验一 蛋白质的定量测定	42
实验二 血清蛋白质的层析分离	45
实验三 血清蛋白质的电泳分离	48
实验四 蛋白质理化性质分析	52
实验五 固定化蛋白质的免疫生化鉴定 (Western Blot)	56
第三章 核酸的分子组成及理化性质分析	58
第一节 核酸的分子组成与结构	58
第二节 核酸的理化性质	59
第三节 核酸的制备和含量测定	60
第四节 实验项目	61
实验六 真核生物基因组 DNA 的制备 (苯酚法)	61
实验七 人外周血白细胞 DNA 的制备	62
实验八 DNA 与 RNA 含量测定	63
实验九 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA	63
第四章 酶作用及酶促反应动力学	65
第一节 酶的分子结构和功能	65
第二节 酶促反应动力学	65
第三节 酶活性测定	69
第四节 实验项目	70
实验十 淀粉酶的特异性及温度、pH 对淀粉酶活性的影响	70
实验十一 碱性磷酸酶的提纯及比活性的测定	73
实验十二 碱性磷酸酶的 K_m 测定	77
实验十三 磷酸盐对碱性磷酸酶的抑制作用	78
实验十四 温度和 pH 对碱性磷酸酶活性的影响	79

实验十五 乳酸脱氢酶同工酶分析	81
第五章 物质代谢及其激素调节	83
第一节 物质代谢定义	83
第二节 物质代谢的研究方法	83
第三节 实验项目	85
实验十六 血清葡萄糖的测定	85
实验十七 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	87
实验十八 肝糖原的提取和鉴定	89
实验十九 生物氧化中酶的催化作用	90
实验二十 血浆高密度脂蛋白-胆固醇含量的测定	92
实验二十一 磷脂的提取及其薄板层析	94
实验二十二 酮体的生成与作用	95
实验二十三 血清丙氨酸转氨酶活性的测定(改良赖氏法)	97
实验二十四 纸层析法鉴定转氨酶的转氨基作用	99
第六章 分子生物学基本实验技术	102
第一节 基因工程基本技术	102
第二节 聚合酶链反应	108
第三节 核酸分子杂交	111
第四节 DNA 测序技术	113
第五节 实验项目	115
实验二十五 动物组织总 RNA 的提取	115
实验二十六 聚合酶链反应(PCR)技术体外扩增 DNA	116
实验二十七 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)	117
实验二十八 质粒 DNA 的制备	118
实验二十九 限制性内切酶酶切	122
实验三十 目的 DNA 片段的分离和纯化	123
实验三十一 DNA 片段与载体的连接	124
实验三十二 感受态细菌的制备(化学法)	126
实验三十三 质粒 DNA 的转化	127
实验三十四 重组质粒的筛选	128
实验三十五 Southern blot(印迹)	129
实验三十六 外源基因的原核表达	131
实验三十七 外源基因在真核生物中的表达	132
附录	134
附录一 常用缓冲溶液的配制	134
附录二 常用蛋白质相对分子质量及等电点	137
附录三 色谱法常用数据	139
附录四 离心转数和离心力的换算	141
附录五 实验数据和数据处理	142

第一章 生物化学常用分析技术

第一节 生物大分子的基本制备技术

生物大分子的制备过程包括选材、细胞的破碎和细胞器的分离、生物大分子的提取和分离、样品的纯化，以及样品的浓缩干燥和储存等方面。生物大分子的制备工作是一件十分细致的工作，既要设法得到它们的纯品，又要努力保持其生物活性。有时制备一个较高纯度的蛋白质、酶或核酸，需要付出较长时间的艰苦劳动。生物大分子制备方法的选择是以生物大分子的性质（如分子大小、形状、溶解度、带电性质等）为依据的（表 1-1）。对于结构和理化性质不同的生物大分子，所选用的分离提纯方法也不相同。

表 1-1 生物大分子的理化性质与分离纯化方法的比较

理化性质	相应的分离、纯化方法
分子大小和形态	差速离心、超滤、分子筛、透析
溶解度	盐析、萃取、分配层析、结晶
电荷差异	电泳、等电聚焦电泳、离子交换层析
生物功能专一性	亲和层析

在制备生物大分子的过程中，为了随时了解所用方法的优劣、选择条件的效果如何、追踪提纯物质含有何种组分以及纯度和得率如何，必须对所提纯的生物大分子随时进行分析鉴定。因此在提纯以前，必须首先建立对生物大分子的相应分析鉴定方法。在分离、纯化过程中每一步都对生物大分子的比活性（总活性除以总蛋白量的值）、得率（每一步骤所得总活性与第一步所得总活性的百分比，设开始时的总活性为 100%）和提纯倍数（每一步骤所得比活性与第一步所得的比活性的比值，设开始时为 1）进行测定。现以猪肝异柠檬酸脱氢酶提纯过程为例，将提纯过程的各步追踪数字列于表 1-2。

表 1-2 猪肝异柠檬酸脱氢酶的提纯

步骤	总体积 (ml)	酶浓度 (单位/ml)	酶总活性 (单位)	蛋白质浓 度(mg/ml)	总蛋白质 量(mg)	比活性 (单位/mg)	得率 (%)	提纯 倍数
匀浆	7.00	2.85	19.95	35.50	248.50	0.080	100	1.0
氯仿抽提	5.00	3.60	20.88	19.20	111.40	0.187	105	2.3
37.5% ~ 55% 硫酸铵盐析的 上清液(透析)	1.50	11.25	16.87	21.40	32.10	0.525	84.5	6.5
DEAE 纤维素	2.39	3.32	9.09	1.00	2.38	3.82	45.5	477
磷酸钙层析	0.45	15.05	6.77	0.90	0.41	16.70	34	209
凝胶过滤	0.52	9.80	5.09	0.22	0.11	45.60	25.5	570

从表 1-2 可知猪肝异柠檬酸脱氢酶被提纯 570 倍。得率是 25.5%。

下面仅将生物大分子的分离、纯化过程的一些基本技术做一介绍。

一、盐析技术

盐析 (salting-out) 方法是蛋白质和酶提纯工作中应用最早, 至今仍广泛应用的方法。其原理是蛋白质在高浓度盐的溶液中, 随着盐浓度的逐渐增加, 由于蛋白质水化膜被破坏、溶解度下降而从溶液中沉淀出来。各种蛋白质的溶解度不同, 因而可利用不同浓度的盐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 (见本章第四节电泳) 关系可用下式表示:

$$\log \frac{S}{S_0} = -K_s \times I \quad (1-1)$$

式 1-1 中, S_0 是蛋白质在纯水 (离子强度 $I=0$) 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 为盐析常数。

上述公式中当温度和 pH 一定时, S_0 仅取决于蛋白质的性质。因此对于同一蛋白质, 在一定温度和 pH 时, S_0 是一常数。

设 $\log S_0 = \beta$

则 $\log S = \beta - K_s \times I \quad (1-2)$

盐析常数 K_s 主要取决于盐的性质 (盐的离子价数和离子平均半径), 也和蛋白质的性质有关。不同的蛋白质在同一种盐溶液中的 K_s 值不同, K_s 值越大, 盐析效果越好。从上述公式可知在温度和 pH 一定的同一种盐溶液中, 不同蛋白质有各自一定的 β 和 K_s 值。可以通过改变盐的离子强度来分离不同的蛋白质。这种方法称分段盐析法。对于同一种盐溶液, 如果保持离子强度不变, 通过改变温度和 pH 来改变 β 值, 也可达到盐析分离的目的。这种方法称为 “ β 分段盐析法”。

盐析法提纯蛋白质时应考虑以下几个条件的选择。

1. 盐的种类 蛋白质盐析常用中性盐, 主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。应用最广泛的是硫酸铵, 硫酸铵的优点是:

(1) 溶解度大。25℃时硫酸铵的溶解度可达 4.1mol/L (541g/L) 以上。大约每升水可溶解 767g 之多。在这一高溶解度范围内, 许多蛋白质和酶都可以被盐析沉淀出来。

(2) 温度系数小, 硫酸铵的溶解度受温度影响不大。例如 0℃时, 硫酸铵的溶解度仍可达到 3.9mol/L (515g/L)。大约每升水可溶解 676g。对于需要在低温条件下进行酶的纯化来说, 应用硫酸铵是有利的。

(3) 硫酸铵不易引起蛋白质变性, 对于很多种酶还有保护作用, 且价格低廉, 容易获得。

硫酸铵的缺点是铵离子干扰双缩脲反应, 为蛋白质的定性分析造成一定困难。

2. 盐的浓度 分段盐析法是通过改变盐的浓度达到分离目的, 应该将盐的浓度准确地分步提高到各种蛋白质所需的浓度。盐的浓度常用饱和度表示, 饱和溶液定为 100%。调整硫酸铵溶液饱和度的方法有计算、查表两种:

(1) 添加饱和溶液的计算法: 如 S_2 为所需达到的饱和度, S_1 为原来的饱和度。V 为达

到所需饱和度的溶液体积， V_0 为原来的体积。则

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

(1-3)

体积的改变造成的误差小于 2%，可以忽略不计。

(2) 查表法：可以从表 1-3 中直接查到将 1L 饱和度为 S_1 的浓度提高到饱和度为 S_2 的浓度时所需添加固体硫酸铵的重量 (g)。

表 1-3 室温下由 S_1 提高到 S_2 时每升加固体硫酸铵的克数

$S_1 \backslash S_2$	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	154	188	225	260	298	337	379	420	465	512	559	610
0.25				29	60	91	123	157	192	228	265	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	93	125	160	195	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	62	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40							31	63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45								31	64	98	133	169	206	245	286	330	373	420
0.50									32	63	100	135	172	211	250	292	335	380
0.55										33	66	101	138	176	214	255	298	344
0.60											33	67	103	140	179	219	261	305
0.65												34	69	105	143	182	224	267
0.70													34	70	108	146	187	228
0.75														35	72	110	149	170
0.80															36	73	112	152
0.85																37	75	114
0.90																	37	76
0.95																		38

3. pH 如前所述， β 值与溶液的 pH 有密切关系。当溶液的 pH 达到蛋白质等电点时， β 值最小，蛋白质的溶解度最低，最易从溶液中析出，因此在盐析时，应控制溶液的 pH 使之接近蛋白质的等电点。

4. 温度 温度对 β 值的影响不如对 pH 的影响显著。因此，对温度的要求不严格，低温主要是防止蛋白质变性和水解。

5. 蛋白质浓度 溶液中蛋白质浓度愈高，盐析所需的盐饱和度愈低。所以，盐析的蛋白质浓度不宜过低。但过高的蛋白质浓度也不适合，因会和其他蛋白产生共沉淀作用，影响纯度。

二、透析和超滤

(一) 透析

透析 (dialysis) 是利用生物大分子不能透过半透膜而将大分子的蛋白质与小分子化合

物分开，在生物大分子的制备过程中，除盐、少量有机溶剂、生物小分子杂质以及浓缩样品时都要用到透析技术。透析时将待纯化的蛋白质

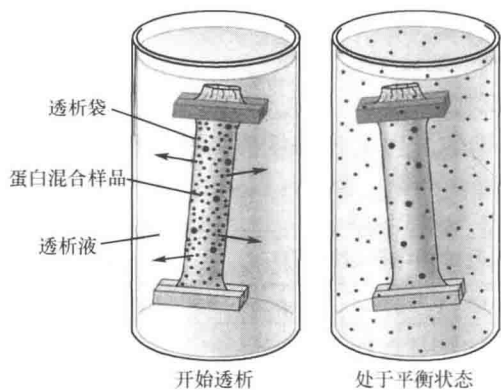


图 1-1 透析示意图

质装在半透膜制成的透析袋中，浸入水或缓冲液中进行透析，透析袋中的盐或小分子物质可通过半透膜扩散到水或缓冲液中，直至透析袋内外的小分子物质浓度达到平衡为止（图 1-1），而大分子的蛋白质留在袋内。多次更换水或缓冲液可以使盐或小分子物质扩散更彻底。透析速度与半透膜厚度、膜内外小分子物质浓度梯度以及温度（常选 4℃）有关。透析所用的膜可为动物膜、玻璃纸、棉胶、纤维素等。

商品透析袋使用前常以甘油处理以防干裂；为防止影响蛋白质活性，也可在使用前用乙醇、碳酸氢钠、EDTA、蒸馏水依次洗涤或直接以水煮沸 5~10 分钟。透析袋可反复使用，若长时间不用，可洗净后存于含 0.5% NaN_3 蒸馏水中以防长菌。

如将透析袋放入高浓度吸水性强的多聚物溶液中，透析袋内的水便迅速被袋外多聚物所吸收，从而可达到袋内液体浓缩的目的，这种方法称为“反透析”。可用作反透析的多聚物有聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）、聚乙烯吡咯烷酮（polyvinyl pyrrolidone, PVP）、右旋糖、蔗糖等。

（二）超滤

超滤（ultrafiltration）是利用超滤膜分离大、小分子物质，在一定压力下，蛋白质溶液通过一定孔径的超滤膜时，小分子量物质及水被滤出，大分子蛋白质截留在膜上，从而达到脱盐、浓缩、分离和纯化的目的（图 1-2）。如果欲截留不同分子量的蛋白质，可选择不同孔径的超滤膜，常用的微孔滤膜孔径为 0.05~1.0 μm 。超滤技术操作简便，实验条件温和，不增加任何化学试剂，不引起温度、pH 的变化，因而可以防止生物大分子的变性、失活和自溶。

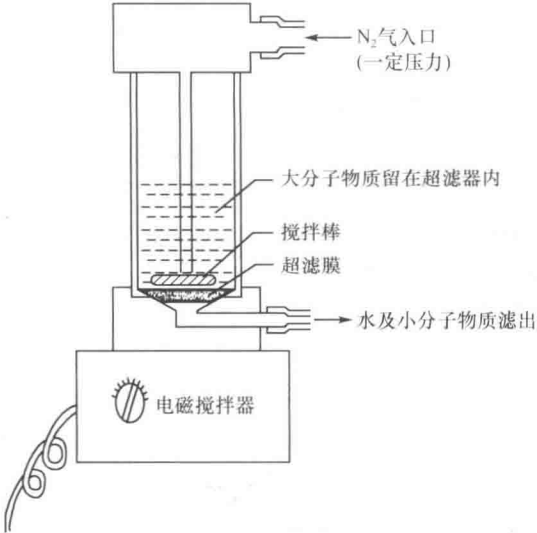


图 1-2 超滤原理示意图

三、浓缩、干燥及储存

（一）样品的浓缩

生物大分子在制备过程中由于过柱纯化而样品变得很稀，为保存和鉴定，往往需要进行浓缩。常用的浓缩方法：

- 1. 减压加温蒸发浓缩 通过降低液面压力使液体沸点降低，减压的真空度越高，液体

沸点降得越低，蒸发越快，适用于不耐热的生物大分子的浓缩。

2. 空气流动蒸发浓缩 空气流动使液体加速蒸发，铺成薄层的溶液，表面不断通过空气流，或将生物大分子溶液装入透析袋内置于冷室，用电风扇吹风，使透过膜外的溶剂不断蒸发而达到浓缩目的，此法速度慢不适于大量溶液浓缩。

3. 冰冻法 生物大分子在低温下结成冰，盐类及生物大分子不进入冰内而留在液相中。先将待浓缩的溶液冷却使之变成固体，然后缓慢融解，利用溶剂与溶质溶解点的差别而达到除去大部分溶剂的目的。如用浓缩蛋白质和酶的盐溶液时，不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面，蛋白质和酶则集中于下层溶液中，移去冰块可得蛋白质和酶的浓缩液。

4. 吸收法 通过吸收剂直接吸收除去蛋白溶液中溶液分子使之浓缩。所用吸收剂需与溶液不起化学反应，对生物大分子不吸附，易与溶液分开。常用的吸收剂有聚乙二醇，聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。使用聚乙二醇时，先将生物大分子溶液装入半透膜，外加聚乙二醇覆盖置于 4℃下，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被水饱和后要更换新的，直至达到所需体积。

5. 超滤法 超滤法是使用一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性的过滤，适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐，能较好地保持生物大分子的活性及回收率。不同类型和规格的滤膜，水的流速、分子量截止值等参数均不同，须根据需要来选用，Diaflo 超滤膜的分子量截留值见表 1-4，另外，超滤装置形式、溶质成分及性质、溶液浓度等对超滤效果都有一定影响。

表 1-4 Diaflo 超滤膜的分子量截留值

滤膜名称	相对分子量截留值	滤孔的平均直径/0.1nm
XM-300	300 000	140
XM-200	100 000	55
XM-50	50 000	30
PM-30	30 000	22
UM-20	20 000	18
PM-10	10 000	15
UM-2	1000	12
UM-05	500	10

纤维过滤透析是用上面的超滤膜制成空心纤维管，将多根这样的管拢成一束，管两端与低离子强度缓冲液相连，使缓冲液不断在管中流动，然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液流过纤维管时，小分子很易透过膜而扩散，大分子则不能，由于纤维过滤透析法面积增大，可使透析时间缩短 10 倍。

(二) 干燥

干燥是将潮湿的固体、半固体或浓缩液中的水分（或溶剂）蒸发除去的过程。生物大分子制备得到所需的产品，为防止变质、易于保存和运输，常需要干燥处理，干燥后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点。最常用的方法是真空干燥和冷冻真空干燥。

真空干燥适用于不耐高温，易于氧化物质的干燥和保存，整个装置包括干燥器、冷凝

器及真空泵三部分。干燥器内常放一些干燥剂如五氧化二磷、无水氯化钙等,以便干燥保存样品。真空干燥是在相同温度下,被干燥物质所含水分或溶剂由于周围空气压力的降低蒸发速度增加,真空度愈高,溶剂沸点愈低,蒸发愈快。

冷冻真空干燥是在真空干燥原理之上,同时增加了温度因素,在相同压力下,水蒸汽压随温度下降而下降,故在低温低压下,冰很易升华为气体。操作时一般先将待干燥的液体冷冻到冰点以下使之变成固体,然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。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。

(三) 储存

生物大分子的稳定性与保存方法密切相关。生物大分子的储藏保存可分为干态和液态储藏两种,注意储藏时应避免长期暴露于空气中以防止微生物的污染。

1. 干态储藏 温度对生物大分子的稳定性影响很大,在低温情况下其活性可在数日甚至数年无明显变化。储藏方法也很简单,只要将干燥后的样品置于干燥容器内(内装有干燥剂)密封,保存于 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中即可。有时为了取样方便和避免取样时样品吸水和污染,可先将样品分装于小瓶中,每次用时只取出1瓶。

2. 液态储藏 液态储藏的优点是使样品免去干燥这一步骤,生物大分子的生理活性和结构破坏较少;缺点是需要较严格的防腐措施,储藏时间不能太长,液态储藏注意事项如下:

(1) 样品太稀易使生物大分子变性,必须浓缩到一定浓度才能封装储藏。

(2) 一般需加入防腐剂和稳定剂,常用的防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿等。蛋白质和酶常用的稳定剂有蔗糖、甘油等,如酶也可加入底物和辅酶以提高其稳定性。此外,钙、锌、硼酸等溶液对某些酶也有一定保护作用。

(3) 储藏对温度要求较低,大多数在 0°C 左右冰箱保存,另有文献报道某些蛋白质和酶在低温中反而引起变性,故应分情况对待,不能一概而论。

总之,生物大分子的储藏和保存,温度和水分是影响稳定性的两个主要因素。其次,各种稳定剂的应用是否适当关系也很大,实际应用时应全面加以考虑。

(孔 英)

第二节 分光光度法

物质的分子或离子对光波有选择性的吸收作用。不同的物质由于其分子(或离子)结构不同,对光波的吸收能力也各不相同。利用物质对不同波长光波的吸收特性,对物质进行定性、定量及结构分析的方法,称为分光光度法。

分光光度法是在比色法的基础上发展起来的,两者所依据的原理基本相同。比色法仅限于在可见光区进行测定,而且谱带宽度范围偏大(通常是 $40\sim 120\text{nm}$),灵敏度、精确度不高,使其应用受到一定限制。而分光光度法由于采用了更为先进的单色系统和光检测系统,不仅光谱带宽大大缩窄(可见区最大不超过 $3\sim 5\text{nm}$,紫外区更是在 1nm 以下)而且可在可见光区和紫外区(合称紫外可见分光光度法)、红外区(红外分光光度法)进行

测定，因此其在灵敏度、准确度、精密度及应用范围上都大大优于比色法，在医药、化工、冶金、环境保护、地质等诸多领域有着广泛的应用。本节重点介绍紫外可见分光光度法。

一、基本原理

(一) 光波的基本知识

光线是高速运动的光子流，也是具有波长和频率特征的电磁波。光子的能量与频率成正比，与波长成反比。肉眼可见的光线称为可见光，只占电磁波谱的很窄一部分，不同波长的可见光具有不同的颜色。波长大于 760nm 的光线称为红外线。波长小于 400nm 的光线称为紫外线（表 1-5）。

表 1-5 各种光波的波长范围

光波	波长 λ	光波	波长 λ
紫外线	200~400nm	可见光	400~760nm
远紫外线	200~280nm	红光	760~640nm
中紫外线	280~320nm	橙光	640~610nm
近紫外线	320~400nm	黄光	610~530nm
红外线	0.7~100 μ m	绿光	530~505nm
近红外线	0.7~2 μ m	蓝靛光	505~470nm
中红外线	3~5 μ m	紫光	470~380nm
远红外线	8~100 μ m		

(二) 物质对光波的选择性吸收

1. 吸收光谱 光在与物质作用时，物质可对光产生不同程度的吸收。物质的分子或离子结构决定了物质在吸收光波时只能吸收某些特定波长的光，也就是说，物质对光的吸收有选择性。例如，当一束白光（复合光）通过硫酸铜溶液时，水合铜离子中的电子选择性的吸收复合光中的黄光而发生跃迁，其他颜色的光不被吸收而透过溶液，故溶液呈现出黄色的互补色——蓝色。我们通常见到的有色物质，都是由于他们吸收了可见光中的部分光，而呈现出被吸收光颜色的互补色。不同分子中的电子跃迁需要的能量不一样，因此不同物质对光的吸收特性也各不相同。

将不同波长的光连续地照射到一定浓度的样品溶液，便可得到与不同波长相对应的不同的吸收强度（吸光度）。如以波长（ λ ）为横坐标，吸光度（ A ）为纵坐标，就可绘出该样品的特异性吸收曲线，这种曲线体现了物质对不同波长的光的吸收能力，称为吸收光谱。每种物质都具有其特异的吸收光谱，据此可以用来鉴定各种不同的物质。例如核黄素之所以呈现黄色，是由于它仅吸收可见光中的蓝光范围，并测得其吸收峰在 450nm（图 1-3）。在紫外光范围它还有两个吸收峰，分别是 260nm 和 370nm。

2. 影响紫外-可见吸收光谱的因素 物质的吸收光谱与测定条件有密切的关系。测定条件（温度、溶剂极性、pH 等）不同，吸收光谱的形状、吸收峰的位置、吸收强度等都

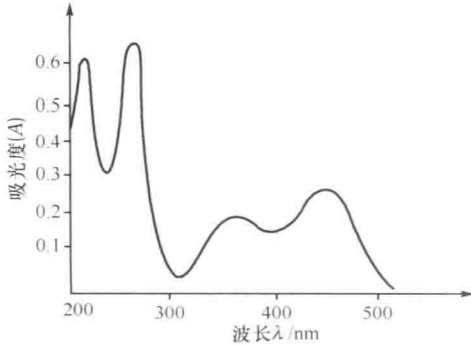


图 1-3 核黄素 200~500nm 波长的吸收光谱

注：核黄素 22μmol/L 溶于 0.1mol/L 磷酸钠中，pH 7.06，吸收杯厚 1cm

可能发生变化。

(1) 温度：在室温范围内，温度对吸收光谱的影响不大。

(2) 溶剂：在选择使用溶剂时，要注意以下几点：

1) 同一种物质由于使用的溶剂不同，得到的紫外-可见吸收光谱的峰形和最大吸收位置可能不一样，所以在测定物质的吸收光谱时，一定要注明所使用的溶剂。

2) 尽量选用低极性溶剂。

3) 能很好地溶解待测样品，并且形成的溶液具有良好的化学和光化学稳定性。

4) 溶剂本身在样品的吸收光谱区无明显吸收。

3. pH 溶液的酸碱度对待测样品、显色剂、二者形成的有色化合物及溶液体系中的其他试剂的解离均可产生显著的影响。解离程度不同，溶液的颜色也不尽相同，即可能会造成吸收光谱发生一定程度的位移。为尽可能减少这种影响，应该在实验前确定合适的 pH 范围，并选择适宜的缓冲体系。

(三) 郎伯-比尔定律

在实际应用中，分光光度法常被用来测定溶液中存在的某个光吸收物质的浓度。其理论依据是郎伯-比尔 (Lambert-Beer) 定律。

1. 郎伯定律 一束单色光在通过一溶液时，由于溶液吸收一部分光能，使光的强度减弱。若溶液的浓度不变，则溶液的厚度愈大，光强度的减弱也愈显著 (图 1-4)。

若以 I_0 表示入射光强度， I 表示光线通过溶液后的透过光强度， L 表示溶液的厚度，

则 $\frac{-dI}{dL} \propto I$, $-\frac{dI}{dL} = \alpha I$ 或 $\frac{dI}{I} = -\alpha dL$

积分: $\int \frac{dI}{I} = -\int \alpha dL$

得: $\ln I = -\alpha L + C$

当 $L=0$ 时, $I=I_0$, 所以 $C=\ln I_0$

即 $\ln I = -\alpha L + \ln I_0$

所以 $\ln \frac{I_0}{I} = \alpha L$ 或 $\frac{I}{I_0} = e^{-\alpha L}$

或 $\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L$ ($K_1 = \frac{\alpha}{2.303}$) $\frac{I}{I_0} = 10^{-K_1 L}$ (1-4)

K_1 是一常数，受光线波长、溶液性质和溶液浓度影响。从上述公式可知，透过溶液后，

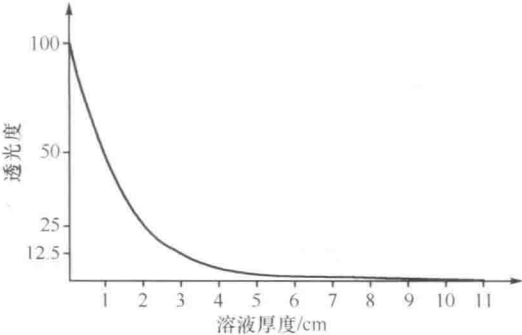


图 1-4 光吸收与溶液厚度的关系

光线强度的减弱 (I/I_0) 与溶液厚度 (L) 呈指数函数关系。可见光强度的改变与溶液厚度并不呈简单的正比关系。这一关系就是郎伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过一溶液时, 若溶液的厚度不变, 则溶液浓度愈高, 光线强度减弱也愈显著。与上定律相似, 两者的关系可以表示如下:

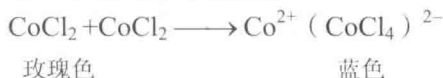
$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-K_2 L} \quad (1-5)$$

式 1-5 中, C 表示溶液的浓度, K_2 是一常数, 受光线波长、溶液性质和溶液厚度的影响。式 1-5 所表示的光线强度与溶液浓度的关系称为比尔定律。

虽然所有的溶液均符合郎伯定律, 但并非所有的溶液都符合比尔定律。这是由于有些物质在不同浓度条件下其颜色可能发生改变, 即在不同浓度条件下其吸收光的波长发生改变。常见的原因如下:

(1) 有些有色物质在溶液中可能解离成相应的离子, 离子的颜色与分子的颜色不同, 造成对比尔定律的误差。

(2) 有些物质在较高浓度状态下可形成络合物, 络合物使吸收光谱发生改变。例如: 氯化钴在稀溶液中呈玫瑰色, 而在浓溶液中呈蓝色。



(3) 氢离子浓度和电解质也可引起一些有色物质颜色的改变, 这些改变也可能造成比尔定律的误差。

3. 郎伯-比尔定律 将 Lambert 定律和 Beer 定律合并, 即式 1-4 和式 1-5 合并为:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \quad \text{或} \quad \frac{I}{I_0} = 10^{-KCL}$$

一般将通过溶液后的光线强度 (I) 和入射光强度 (I_0) 的比值称为透光度 (transmittance, T), 将 $-\lg I/I_0$ 用光密度 (optical density, OD 或 D) 表示, 以反映该溶液对光吸收的情况。有时也用吸光度 (absorbance, A) 表示。则它们之间的关系如下

$$A(D) = -\lg \frac{I}{I_0} = -\lg T = KCL \quad (1-6)$$

其中, K 为常数, 称为消光系数 (extinction coefficient, 符号 E) 表示物质对光线吸收的本领, 其值因物质种类和光线波长而异。

二、分光光度法的应用

分光光度法以物质特异性的吸收光谱为检测基础, 因此具有灵敏度高、选择性好、准确度高等优点, 而且由于其分析成本低, 操作简便、快速, 现在已被广泛地应用于化工、冶金、地质、医学、食品、制药及环境监测等领域, 是研究物质的成分、含量、结构、纯度及物质间相互作用的非常有效而便捷的手段之一。此外, 紫外分光光度法还可作为红外 (IR)、核磁共振 (NMR)、质谱 (MS) 等方法的辅助手段, 对有机物进行定量、定性及结构等方面的分析。现将分光光度法的应用做一简要介绍。

1. 定量分析测定物质的浓度 这是分光光度法最早期的应用之一, 其基本原理是郎伯-比尔定律。

根据郎伯-比尔定律,对于相同物质和相同波长的单色光来说,式 1-6 中的消光系数不变,是个定值。而在实际工作中利用分光光度计测量吸光度时,所用比色杯的大小是一样的,因此式 1-6 就变成了:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2} \quad \text{或} \quad C_1 = \frac{A_1}{A_2} \times C_2 \quad (1-7)$$

如果 C_2 为标准溶液的浓度,则可根据测得的吸光度值,按式 1-7 求得待测溶液的浓度。

为简便起见,实际工作中常常不是每测一个待测样品都做一个标准管,而是事先测定一系列不同浓度的标准管,然后以吸光度对标准浓度作图,得到标准曲线,测得待测物质的吸光度后,便可从标准曲线上查到相应的浓度数值。

从式 1-6 可知,若知道某待测物质的消光系数和溶液的厚度,也可以从吸光度推算出待测溶液的浓度。消光系数的常用表示方法有两种:

(1) 百分消光系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$): 浓度以百分浓度来表示的消光系数。百分消光系数等于浓度为 1%, 液层厚度为 1cm 的吸光度值。

(2) 克分子消光系数 (ϵ): 浓度以摩尔浓度来表示的消光系数。克分子消光系数等于溶液浓度为 1 个摩尔浓度, 液层厚度为 1cm 的吸光度值。

用消光系数计算浓度的公式是:

$$C = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad (\text{浓度单位为 g/100ml}) \quad \text{或} \quad C = \frac{A}{\epsilon} \quad (\text{浓度单位为摩尔浓度})$$

例: 一蛋白质溶液在其吸收峰 $\lambda = 278\text{nm}$ 处的吸光度 $A = 0.520$, 吸收杯厚度为 1.00cm, 已知 $E_{1\text{cm}}^{1\%} 278 = 5.10$, 则此蛋白质溶液的浓度为

$$C = \frac{A}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} = \frac{0.520}{5.10} = 0.102\%$$

2. 定性分析鉴定物质的属性 每一种化合物都有自己的特征光谱。测出未知物的吸收光谱, 可以对该未知物作出定性鉴定, 即当某一未知物质的吸收光谱与某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时, 则很可能二者即为同一物质。如前文所述, 核黄素吸收峰在 450nm, 在紫外光范围它还有两个吸收峰, 分别是 260nm 和 370nm。如果某一样品具有这样的吸收光谱, 则可初步判定该物质为核黄素。分光光度法对复杂化合物的定性分析有一定的困难。

3. 纯度的鉴定 用紫外吸收光谱确定试样的纯度是比较方便的。如核酸的纯度分析中, 可用 A_{260}/A_{280} 的比值, 鉴定其纯度。

4. 结构分析 紫外-可见吸收光谱一般不用于化合物的结构分析, 但利用紫外吸收光谱鉴定化合物中的共轭结构和芳香环结构还是有一定价值。如果某化合物在近紫外区内无吸收, 说明该物质无共轭结构和芳香环结构。

5. 显色剂的选择及使用 对于紫外分光光度法而言, 一般无须特殊的试剂即可直接进行测定。但这种方法只适用于含共轭或芳香环结构的有机物和少数无机阴离子 (如 NO_2^- 、 NO_3^-), 对于其他大多数物质来说此法则不适用。为此, 需要对待测样品进行显色。

显色反应所需要的试剂通常包括各种显色剂和增敏剂。常用的无机显色剂有硫氰酸盐、钼酸铵、过氧化氢等几种。有机显色剂则种类繁多, 有杂环偶氮类、三氮烯类、荧光酮、安替比林类、胍类、三苯甲烷碱性染料、环芳烃等几大类, 这些显色剂的显色反应已经涉及元素周期表中的绝大部分元素, 可用于许多阴阳离子及有机组分的直接或间接测

定。增敏剂中应用得比较多的是各种表面活性剂、高分子聚合物、环糊精等试剂，它们在改善光度分析性能、提高灵敏度方面起重要作用。

有机物的显色反应涉及离子缔合反应、重氮-偶合反应、荷移配位反应、氧化还原反应、金属离子作显色剂的显色反应等几大类。在这些反应中，只有针对性高、灵敏度好、反应速度快、生成物稳定、显色剂在测定波长处无明显吸收、反应条件易于控制且两种有色物最大吸收波长之差大于 60nm 的化学反应才能满足实验的要求。

三、分光光度计的结构原理

不论比色计 (colorimeters)、光度计 (photometers) 还是分光光度计 (spectrophotometers)，其基本结构原理都是相似的，都由光源、单色光器、狭缝、吸收杯和检测器系统部分组成 (图 1-5)。

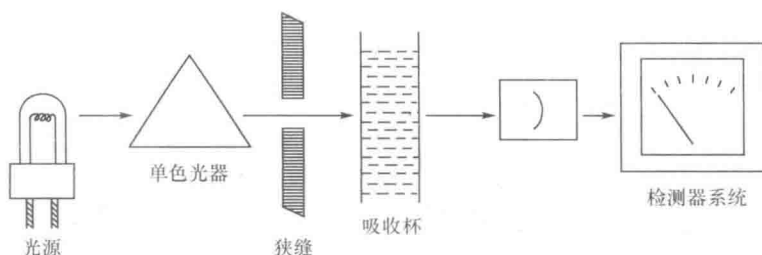


图 1-5 分光光度计结构原理

(一) 光源

一个好的光源要求具备发光强度高、光亮稳定、光谱范围广、有连续性和使用寿命长等特点。利用固体灯丝材料高温放热产生的辐射作为光源的是热辐射光源，如钨灯 (tungsten lamp)、卤钨灯，它们适用于做 340~1000nm 范围的光源，在可见区使用。卤钨灯的使用寿命及发光效率高于钨灯。气体放电光源是指在低压直流电条件下，氢或氖气放电所产生的连续辐射，一般为氢灯或氖灯，适用于做 200~360nm 的紫外分析的光源。此外，金属弧灯 (各种汞灯) 有时也用作分光光度计的光源。

(二) 单色光器

分光光度法测定某一物质的吸光度需要在某一特定波长下进行。单色光器的作用在于根据需求选择一定波长范围的单色光。在实际工作中欲选择出单个某波长的光线是困难的。所谓单色光是指在此波长有最大发射，而在相邻较长和较短波长范围内的发射能量较少而言。单色光的波长范围愈窄，仪器的敏感度愈高，测量的结果愈可靠。

最简单的单色光器是光电比色计上所采用的滤光片 (一定颜色的玻璃片)。由于通过光线的光谱范围较宽，所以光电比色计的分辨效果较差，现在已被棱镜 (prism) 和衍射光栅 (diffraction grating) 所取代。后二者是较好的单色光器，它们能在较宽光谱范围内分离出相对单一波长的光线 (图 1-6)。

1. 棱镜 光波通过棱镜时，不同波长的光折射率不同，因而能将不同波长的光分开。