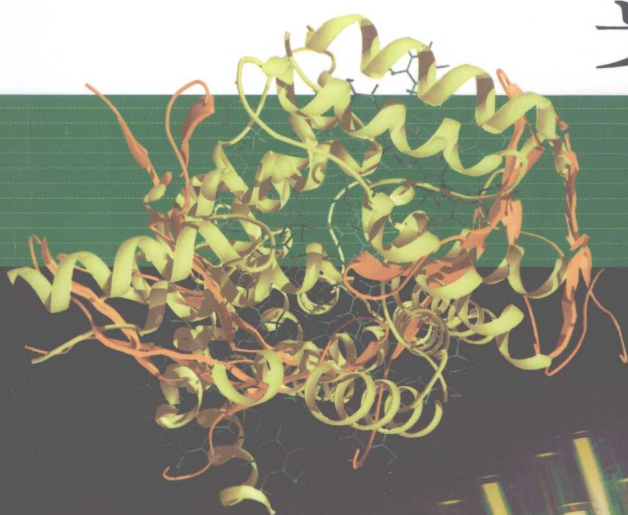


普通高等教育“十一五”规划教材

生物科学 生物技术系列

生物化学与 分子生物学 实验技术

王晓华 朱文渊 主 编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学与分子生物学 实验技术

王晓华 朱文渊 主 编
陈新美 赵 青 副主编

编 审：陈新美、朱文渊
校 对：陈新美、朱文渊

责任编辑：陈新美
封面设计：陈新美



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验技术/王晓华, 朱文渊主
编. —北京: 化学工业出版社, 2008. 1

普通高等教育“十一五”规划教材——“普

ISBN 978-7-122-01939-4

I. 生… II. ①王…②朱… III. ①生物化学-实验-
高等学校-教材②分子生物学-实验-高等学校-教材

IV. Q5-33 Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 005918 号

主 编 朱文渊 王晓华
副主编 曹 洁 姜海洲

责任编辑: 赵玉清

文字编辑: 刘 畅

责任校对: 郑 捷

装帧设计: 张 辉

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 11½ 字数 221 千字

2008 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 17.00 元

版权所有 违者必究

编写人员

主 编 王晓华 朱文渊

副主编 陈新美 赵 青

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王晓华 王燕菲 朱文渊

刘 桦 余利红 陈新美

赵 青 章喜明 廖兆全

主 审 王燕菲

前 言

生物化学与分子生物学是生命科学中发展迅速的基础学科，它的理论和技术已渗透至基础医学和临床医学的各个领域，并衍生出了许多新兴的交叉学科，如分子免疫学、分子微生物学、分子遗传学、分子药理学等。目前，这门学科已展示出极大的发展潜力和极其广阔的应用前景。实验教学是高校教学中一个重要的组成部分，它是培养学生实践能力和创新能力的重要环节，也是提高学生专业素养和就业竞争力的重要途径。

本教材是以培养学生学习生物化学与分子生物学实验技能为主要目的的实验指导书。遵循先理论后实践的原则，编写的宗旨为简明、实用。我们以实验教学改革为指导，加强了生物化学基本技能训练和综合性实验。全书分为三大部分：第一部分简要介绍生物化学实验的基本知识；第二部分为生物化学与分子生物学基本实验原理和技术，其中包括分光光度技术、离心技术、层析技术、电泳技术和其他分子生物学基本技术；第三部分为生物化学与分子生物学实验。各学校可根据不同教学层次和对象、实验教学课时酌情选用。附录列出常用生物化学试剂的配制方法，可供有关人员查阅参考。本实验指导主要是为配合基础生物化学教材而编写，所涉及的技术面比较广泛，可供临床医学、医学检验、影像学、预防医学、生物科学、生物技术等相关学科本科学生使用。

参加本教材编写的人员主要是广州医学院生物化学与分子生物学教研室教学一线的教师，他们具有多年的教学工作经验，为本书编写投入了大量的精力。另外，化学工业出版社在编辑加工中做了大量细致的工作，在此对他们表示衷心感谢！

由于编写本教材的时间仓促，编者水平有限，书中难免出现疏漏和不足之处，恳请广大读者不断向我们提供宝贵的批评和建议，不胜感激。

编 者

2008 年 1 月

目 录

第一部分	生物化学与分子生物学实验基本知识	1
第一节	生物化学与分子生物学实验室规则	1
第二节	生物化学实验的基本操作	3
第二部分	生物化学与分子生物学实验原理与技术	7
第一节	分光光度法	7
第二节	离心技术	15
第三节	层析技术	27
第四节	电泳	41
第五节	分子克隆	49
第六节	聚合酶链式反应 (PCR)	54
第七节	核酸分子杂交技术	62
第三部分	生物化学与分子生物学实验	71
第一节	生物化学基本实验	71
实验 1	双缩脲法测定蛋白质浓度	71
实验 2	Folin-酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质浓度	74
实验 3	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	76
实验 4	紫外分光光度法测定蛋白质	79
实验 5	血清蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳	81
实验 6	预染血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	86
实验 7	聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	88
实验 8	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	92
实验 9	等电聚焦电泳法测定蛋白质的等电点	97
实验 10	影响酶活性的因素	100
实验 11	蔗糖酶的专一性	103
实验 12	底物浓度对酶促反应速度的影响——过氧化氢酶 K_m 的测定	105
实验 13	抑制剂对酶促反应速度的影响	109
实验 14	血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性测定 (赖氏法)	111

实验 15	血清甘油三酯含量的测定——乙酰丙酮法	114
实验 16	血浆高密度脂蛋白(HDL)-胆固醇含量的测定	116
实验 17	酮体的生成	118
实验 18	运动对全血乳酸含量的影响	120
第二节	生物化学综合实验	122
实验 19	激素对血糖浓度的影响	122
实验 20	血清 γ -球蛋白的分离与纯度鉴定	126
实验 21	血清清蛋白的分离及电泳鉴定	130
实验 22	核酸的分离提取、成分鉴定及含量测定	133
第三节	分子生物学实验	148
实验 23	大肠杆菌感受态细胞制备及外源 DNA 的转化	148
实验 24	质粒 DNA 的提取	152
实验 25	质粒 DNA 的限制性内切酶酶切	154
实验 26	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	157
实验 27	PCR 基因扩增	159
实验 28	Southern 杂交分析	162
实验 29	Northern 杂交分析	166
附录		169
附录 I	化学试剂分级及注意事项	169
附录 II	常用缓冲液配制方法	170
附录 III	重铬酸洗液的配制与再生	173
参考文献		175

第一部分 生物化学与分子生物学 实验基本知识

第一节 生物化学与分子生物学实验室规则

1. 实验前必须认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，熟悉每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法。进入实验室要穿好工作服，否则不能开始实验。

2. 自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，不大声谈笑，不随便打电话。

3. 实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并把实验结果和数据及时、如实记录在实验报告上，文字力求简练、准确。完成实验后，按要求写出实验报告，课后由班长收齐交给教师。

4. 实验台面应随时保持整洁，仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后，应立即盖严放回原处，试剂瓶塞不得混用。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕，仪器洗净放好，将实验台面擦拭干净。做动物实验时，认真按照操作要求，实验结束时，要清理干净动物实验的污物，如不慎被动物抓伤，立即报告教师进行妥善处理。

5. 使用仪器、药品、试剂和各物品必须注意节约，昂贵的试剂按要求回收，不得丢弃。洗涤和使用仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教师，不得擅自动手检修。

6. 实验室内严禁吸烟，加热用的电炉应随用随关。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，操作和放置都要远离火源。实验完毕，应立即拨去电源开关和关好水龙头，拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查水电，严防发生安全事故。

7. 废液体可倒入水槽内，同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。废纸屑及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品桶内；不能倒入水槽或到处乱扔。

8. 要精心使用和爱护仪器，如使用分光光度计时，不能将比色杯直接置于

分光光度计上,并注意拿放比色杯时,不要打碎。仪器损坏时,应如实向教师报告,并填写损坏仪器登记表,然后补领。

9. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

10. 每次实验课由班长负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

实验室安全守则

1. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

2. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

3. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

4. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

5. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

6. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

7. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

8. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

9. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

10. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

11. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

12. 实验室内一切物品,未经本室负责教师批准,严禁带出室外,借物必须办理登记手续。

第二节 生物化学实验的基本操作

一、玻璃仪器的洗涤与清洁

生化实验所用的各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响实验的可靠性和准确性。因此,玻璃仪器的清洗不仅是实验前后的常规操作,而且是一项最基本的技术。

洗涤过的玻璃仪器要求清洁透明,表面不含可溶解的物质,水沿器皿壁自然下流时不挂水珠。

玻璃仪器的清洗方法很多,要根据实验的需求,以及污物性质选用不同的清洗方法。

1. 新购置的玻璃仪器清洗

新购置的玻璃仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有游离的金属离子,清洗方法如下。

- (1) 先用肥皂水刷洗,用流水冲净。
- (2) 浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸,用流水冲净。
- (3) 于 1%~2% HCl 溶液中浸泡过夜。流水洗净酸液,用少量蒸馏水多次冲洗后,干燥备用。

2. 用过的玻璃仪器清洗

- (1) 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器,如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 2~3 次后,倒置于清洁处晾干。
- (2) 容量分析仪器,如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,晾干后,于铬酸洗液浸泡数小时,然后用自来水和蒸馏水冲洗干净,干燥备用。
- (3) 玻璃比色皿用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物黏附于皿壁,宜用稀盐酸或适当浓度的清洗液浸泡数小时后清洗,然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后倒置晾干备用。

二、清洗液的种类与配制方法

1. 铬酸洗液 铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性和强酸性。由重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 和浓硫酸配制而成。硫酸越浓,铬酐越多,其清洁效力越强。因洗液具有强腐蚀性,所以使用时必须注意安全。当洗液由棕红色变为绿色时,不宜再用。常用的配制方法有以下两种。

- (1) 取重铬酸钾 5g 置于 250mL 烧杯之中,加 5mL 水使其尽量溶解,然后慢慢加入 100mL 工业用硫酸,边加边搅拌,冷却后备用。
- (2) 取 100mL 工业用浓硫酸置于烧杯中内小心加热,然后慢慢加入重铬酸钾 5g,边加边搅拌,待全部溶解后冷却,储于具塞瓶中。

2. 肥皂水和洗衣粉溶液 是最常用的洗涤剂, 主要是利用其乳化作用以除去污垢, 一般玻璃仪器均可用其刷洗。

3. 5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 主要用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

4. EDTA- Na_2 洗液 5%~10%的 EDTA- Na_2 洗液, 加热煮沸, 可去除玻璃器皿内部钙、镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

5. 尿素洗液 45%的尿素溶液是血污和蛋白质的良好洗液。

6. 草酸洗液 于10%草酸溶液中加入少量浓硫酸或浓盐酸, 可清洗高锰酸钾的痕迹。

7. 盐酸乙醇洗液 3%的盐酸乙醇可以除去玻璃器皿上的染料附着物。

8. 乙醇硝酸混合液 用于清洗难以去除的有机物, 最适合于洗净滴定管。

三、吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的玻璃仪器之一, 测定的准确性和吸量管的正确选择与使用密切相关。

1. 吸量管的分类

(1) 奥氏吸量管 供准确量取 0.5mL、1.0mL、2.0mL、3.0mL 液体所用。此种吸量管只有一个刻度, 具有一球形空间, 当放出所量取的液体时, 管尖残留的液体必须吹入容器内。准确度大于多刻度吸量管。

(2) 移液管 常用来量取 50.0mL、25.0mL、10.0mL、5.0mL、2.0mL、1.0mL 的液体, 这种吸量管只有一个刻度, 管中间有膨大部分。放液时, 量取的液体自然流出后, 管尖需在容器内壁停留 15s, 注意管壁残留液体不要吹出。准确度大于多刻度吸量管。

(3) 多刻度吸量管 供量取 10mL 以下体积的溶液。一般刻度包括尖端部分, 将所量液体全部放出后, 还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸量管为“吹出式”, 吸量管上端标有“吹”字。未标“吹”字的吸量管, 则不必吹出管尖的残留液体。通常 1.0mL 以下多刻度吸量管为“吹出式”。

2. 吸量管的选择

(1) 量取整数体积液体, 并且量取要求准确时, 应选用奥氏吸量管。

(2) 量取大体积液体时要用移液管。

(3) 量取任意体积的液体时, 应选用取液量最接近的吸量管, 如欲取 0.15mL 应选用 0.2mL 的刻度吸量管。

(4) 在同一试验中, 如欲加同种试剂于不同管中, 并且取量不同时, 应选择一支与最大取液量最接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30mL、0.50mL、0.70mL、0.90mL 时, 应选用一支 1mL 刻度吸量管。

3. 吸量管的使用

(1) 拿法 中指和拇指拿住吸量管的上端, 食指置于吸量管顶端。

(2) 取液 用吸耳球吸液体至刻度上, 注意液面上升, 吸完后用食指堵住吸量管上端, 标准液或黏性大的液体都必须先用滤纸擦拭其外壁, 然后缓慢放液。

(3) 调刻度 吸量管与地面保持垂直, 下口与试剂瓶接触并成一角度, 用食指控制液体下降至最上一刻度液体凹面处。读数时要求三点一线, 即视线、液体凹面和吸量管刻度线在同一水平面上。

(4) 放液 吸量管移入准备接受溶液的容器中, 吸量管保持垂直, 容器稍倾斜, 吸量管与容器成一角度, 放开食指, 使液体自动流出。

四、微量加样器的分类和使用

1. 分类

(1) 固定容量 常用的有 $25\mu\text{L}$ 、 $50\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $500\mu\text{L}$ 、 $1000\mu\text{L}$ 。

(2) 可调容量 常用的有 $0.5\sim 10\mu\text{L}$ 、 $10\sim 50\mu\text{L}$ 、 $20\sim 200\mu\text{L}$ 、 $200\sim 1000\mu\text{L}$ 、 $1\sim 5\text{mL}$ 等不同规格。

每种微量加样器都有专用的聚丙烯塑料吸头, 吸头通常是一次性使用。

2. 使用

加样器是一种在一定容量范围内可随意调节的精密取液装置, 其取液量取决于装置内活塞上下的移动距离, 该距离调节可通过调节轮控制螺杆实现。

(1) 将相应的聚丙烯塑料吸头装在吸液杆顶端, 并轻轻旋转一下以确保密封, 然后用四指并拢握住加样器上部, 用拇指按住塞杆顶端的按钮, 向下按到第一停点。

(2) 将加样器的吸头插入待取的溶液中, 缓慢松开按钮, 吸入液体, 并停留 $1\sim 2\text{s}$ 。

(3) 将吸头沿器皿壁取出, 用吸水纸擦去吸头表面附着的液体。

(4) 排液时吸头接触倾斜的器皿壁, 先将按钮按到第一停点, 停留 1s , 再按压到第二停点。

(5) 吹出吸头尖部的剩余溶液, 然后按下吸头推杆, 将吸头推入装废物的容器内。

3. 注意事项

(1) 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指, 绝不允许突然松开, 以防液体吸入过快而进入微量加样器内, 造成加样器柱塞的腐蚀而漏气。

(2) 为获得较高的精度, 吸头需预先吸取一次样品溶液, 然后再正式移液, 因为吸取血清蛋白溶液或有机溶剂时, 吸头内壁会残留一层“液膜”, 造成排液量偏小而产生误差。

(3) 浓度和黏度大的液体会产生误差, 为消除其误差, 可由实验确定补偿量, 补偿量可用调节旋钮改变读数窗的读数来进行设定。

(4) 可用分析天平称量纯水的重量并用计算的方法, 来校正微量加样器, 20°C 时每 1mL 蒸馏水重 0.9982g 。

【思考题】

1. 某实验需量取 0.1~0.9mL 之间的五组液体，应选何种量器，为什么？
2. 常用的清洁液有哪几种，如何制备？
3. 如何正确使用吸量管？
4. 如何正确使用微量加样器？

(刘 桦)

量器种类

量器种类

- (1) 容量瓶 常用规格有 25mL、50mL、100mL、200mL、500mL、1000mL。
- (2) 可滴容量瓶 常用规格有 0.5~10mL、10~50mL、50~200mL、200~500mL。

容量瓶与可滴容量瓶的区别在于前者用于精确配制一定体积的溶液，而后者用于精确移取一定体积的溶液。

容量瓶与可滴容量瓶的使用注意事项：(1) 使用前应检查容量瓶是否漏水。(2) 容量瓶只能用于配制溶液，不能用于贮存溶液。(3) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(4) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

容量瓶与可滴容量瓶的清洗方法：(1) 容量瓶应先用自来水冲洗，再用蒸馏水冲洗。(2) 容量瓶应定期用铬酸洗液清洗，以去除油污。

容量瓶与可滴容量瓶的校准方法：(1) 容量瓶应定期校准，以确保体积准确。(2) 容量瓶的校准应在 20℃ 下进行。

容量瓶与可滴容量瓶的存放方法：(1) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(2) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

容量瓶与可滴容量瓶的使用注意事项：(1) 使用前应检查容量瓶是否漏水。(2) 容量瓶只能用于配制溶液，不能用于贮存溶液。(3) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(4) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

容量瓶与可滴容量瓶的清洗方法：(1) 容量瓶应先用自来水冲洗，再用蒸馏水冲洗。(2) 容量瓶应定期用铬酸洗液清洗，以去除油污。

容量瓶与可滴容量瓶的校准方法：(1) 容量瓶应定期校准，以确保体积准确。(2) 容量瓶的校准应在 20℃ 下进行。

容量瓶与可滴容量瓶的存放方法：(1) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(2) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

容量瓶与可滴容量瓶的使用注意事项：(1) 使用前应检查容量瓶是否漏水。(2) 容量瓶只能用于配制溶液，不能用于贮存溶液。(3) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(4) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

容量瓶与可滴容量瓶的清洗方法：(1) 容量瓶应先用自来水冲洗，再用蒸馏水冲洗。(2) 容量瓶应定期用铬酸洗液清洗，以去除油污。

容量瓶与可滴容量瓶的校准方法：(1) 容量瓶应定期校准，以确保体积准确。(2) 容量瓶的校准应在 20℃ 下进行。

容量瓶与可滴容量瓶的存放方法：(1) 容量瓶应存放在干燥、阴凉处，避免阳光直射。(2) 容量瓶应定期清洗，保持洁净。

第二部分 生物化学与分子生物学 实验原理与技术

第一节 分光光度法

分光光度法 (spectrophotometry) 是利用物质特有的吸收光谱, 对物质进行鉴定和测定其含量的技术。光是由光子所组成的, 光线就是高速向前运动的光子流, 光的本质是一种电磁波, 传播过程呈波动性, 具有一定的波长和频率。

人肉眼可见的光线称为可见光, 波长范围为 $400 \sim 760\text{nm}$ 。波长介于 $10 \sim 400\text{nm}$ 的光线叫紫外线, 波长大于 760nm 的叫红外线。可见光区的电磁波因波长不同而呈现不同的颜色, 这些不同颜色的电磁波称为单色光。太阳及钨灯发出的白光, 是各种单色光的混合光 (复合光), 利用棱镜可将白光按波长顺序排列分成各种单色光, 即红、橙、黄、绿、青、蓝、紫等, 这就是光谱。一切物质都会对某些波长的光进行选择性的吸收, 有色溶液之所以呈现不同颜色, 就是由于这种对光的选择性吸收所致。某些无色物质虽对可见光无吸收作用, 但能选择性吸收特定波长的紫外线或红外线。物质的吸收光谱与它们本身的分子结构有关, 不同物质由于其分子结构不同, 对不同波长光线的吸收能力也不同。每种物质都具有特异的吸收光谱, 在一定条件下, 其吸收程度与该物质浓度成正比, 因此可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度, 对不同物质进行定性和定量的分析。

两种适当颜色的光按一定的强度比例混合, 可以成为白光, 这两种光称为互补光。当白色光通过溶液时, 如果溶液对各种波长的光都不吸收, 则溶液透明无色。如果溶液对某些波长的光吸收较少而对其他波长的光吸收较多, 则溶液呈现这种吸收较少而透过较多的光的颜色, 即溶液呈现的是它所吸收光的互补色。吸收越多, 颜色越深。如果溶液对光的吸收没有明显的选择性, 即较均匀地吸收时, 溶液呈现灰色。

大多数物质本身具有一定的颜色, 也有一些物质本身虽是无色的, 但加入适当的试剂后可生成有色的物质, 溶液的浓度愈大, 其颜色越深, 且对光的吸收越大。所以, 可通过测定比较溶液在某一波长下的吸光度值来确定溶液的浓度, 这种方法叫做比色分析法。比色分析法又分为光电比色法和分光光度法, 我们着重

讨论分光光度法。

因为分光光度法具有灵敏度强、精确度高、操作简便快速,对于复杂的组分系统,无需分离即可检测出其中所含的微量组分的特点,因此分光光度法目前已成为生物化学研究中广泛使用的技术之一。

分光光度法依据的原理是 Lambert-Beer 定律。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

一、分光光度法的基本原理

1. Lambert 定律

当一束单色光垂直通过一均匀的溶液时,一部分光会被溶液吸收,因此光线的强度会减弱。设:入射光强度为 I_0 ,溶液的厚度为 L ,出射光即透过光强度为 I ,则 I/I_0 表示光线透过溶液的程度,称为透光度 (T)。若溶液的浓度不变,则透过溶液的厚度愈大,光线强度的减弱愈显著,即光吸收的量与溶液的厚度成比例关系, Lambert 定律证明:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_1 L \quad (1)$$

式中, K_1 是常数; L 为溶液的厚度 (光径)。

2. Beer 定律

当一束单色光通过溶液介质时,若溶液的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则光吸收愈大,透过光的强度愈弱,即溶液对光的吸收与溶液的浓度成比例关系, Beer 定律可用下式表示:

$$\lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad (2)$$

式中, K_2 是常数; C 为溶液的浓度。

3. Lambert-Beer 定律

如果同时考虑液层厚度和溶液浓度对光吸收的影响,将式(1)与式(2)合并,则:

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \quad (3)$$

此公式为 Lambert-Beer 定律的数学形式。

已知 $T = \frac{I}{I_0}$ 即 $-\lg T = \lg \frac{I_0}{I}$

令 $A = \lg \frac{I_0}{I}$ 则 $A = -\lg T = KCL$ 即 $A = KCL$ (4)

式中 T 为透光度; A 为吸光度 (光密度、消光度); K 为常数 (消光系数),表示物质对光线吸收的能力,常用表示方法有百分浓度消光系数和物质的量浓度消光系数两种。

百分浓度消光系数:即以百分浓度来表示的消光系数,它等于溶液浓度为

1%、液层厚度为 1cm 时的光密度值。

物质的量浓度消光系数：即以物质的量浓度来表示的消光系数，它等于溶液浓度为 1mol/L、液层厚度为 1cm 时的光密度值。

消光系数是物质的重要特性，它与入射光的波长以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，消光系数是一个定值，通过实验可以测得。消光系数值愈大，该物质吸收光的能力愈强，测定的灵敏度愈高。

二、分光光度法的应用

1. 用标准管法计算待测液浓度

实际测量过程中，用一已知浓度的标准液和一未知浓度的待测液经同样处理显色，读取吸光度，就可以得出下列算式：

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}}L, A_{\text{测}} = KC_{\text{测}}L$$

由于两种溶液的液层厚度相等，即 L 值相等。另外温度相同，而且是同一物质的两种不同浓度，在测定时所用波长也相同，所以 K 值相等，故

$$C_{\text{测}} = \frac{A_{\text{测}} C_{\text{标}}}{A_{\text{标}}}$$

式中， $C_{\text{标}}$ 为标准液浓度； $A_{\text{标}}$ 为标准液吸光度； $C_{\text{测}}$ 为待测液浓度； $A_{\text{测}}$ 为待测液吸光度。

根据上式可知，对于相同物质和相同波长的单色光来说，溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。用已知标准液的浓度及吸光度就可按公式算出待测液的浓度。

2. 用标准曲线法求出待测溶液的浓度

当分析大批待测溶液时，采用标准曲线法则比较方便。先配制一系列浓度由低到高的标准溶液，按测定管同样方法处理显色，在最大吸收波长 (λ_{max}) 处读取各管吸光度。以各管吸光度 A 为纵轴，各管溶液浓度为横轴，在方格坐标纸上作图得标准曲线。在标准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。以后进行测定时，只要待测液以相同条件在 λ_{max} 处读取吸光度 A ，就可从标准曲线上查得该待测液的相应浓度，操作条件应与制作标准曲线时相同。需要特别指出的是，在制作标准曲线时，至少需配制 5 种浓度递增的标准溶液，测出的数据至少要有 3 个点落在直线上，这样的标准曲线方可用来求待测溶液的浓度。

标准曲线范围选择在待测物浓度 0.5~2 倍之间较好，并使吸光度在 0.05~1.00 范围为宜，所作标准曲线仅供短期使用。当待测液吸光度超过线形范围时，应将标本稀释后再测定。标准曲线制作与待测液应在同一台仪器上进行。有时尽管型号相同，操作条件完全一样，因不是同一台仪器，其结果会有一定误差。当测定条件发生变化时，应重新制作标准曲线。

3. 利用摩尔消光系数 ϵ 求待测液浓度

当溶液浓度为 1mol/L、溶液厚度为 1cm 时的吸光度值称为摩尔消光系数，

以 ϵ 表示, 此时 ϵ 与 A 相等。

在已知 ϵ 的情况下, 读取待测液的吸光度 A , 可直接推算出溶液的浓度:

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此计算式常用于紫外吸收法, 如蛋白质溶液含量测定, 因蛋白质在波长 280nm 下具有最大吸收峰, 利用已知蛋白质在波长 280nm 时的摩尔消光系数, 再读取待测蛋白质溶液的吸光度, 即可算出待测蛋白质的浓度, 无需显色, 操作简便。

三、比色分析条件的选择

1. 波长的选择

测定时波长的选择对比色分析的灵敏度、准确度和选择性有很大的影响。选择波长的原则是: 吸收最大、干扰最小。因为吸光度越大, 测定灵敏度越高, 准确度也容易提高; 干扰越小, 则选择性越好, 测定准确度也越高。因此, 选用的测定波长应尽可能获得较高灵敏度及较高准确度。

2. 吸光度的选择 (溶液浓度选择)

溶液的吸光度太大或太小都会影响测定的准确度。从检流计的标尺可以看出, 在吸光度较小和较大的两端, 读数只能准确至 1~2 位有效数字; 而在标尺中部, 读数可准确到 2~3 位有效数字。因此, 吸光度读在检流计标尺中部时, 测定的准确度较高, 相对误差较小。

为了控制吸光度, 根据 $A = KCL$ 关系可以看出, 调节溶液的浓度或改变比色杯的厚度, 都可控制溶液的吸光度在适当的范围内。一般采用改变溶液浓度的方法控制吸光度在适当的范围内。

3. 显色条件的选择

显色剂的用量、溶液的 pH 值、温度和反应时间都会直接影响到生成的有色物质的解离平衡, 这些因素的变化能引起颜色深浅的变化, 从而影响比色测定的准确度。因此, 必须控制显色条件, 选择合适的显色剂, 使显色反应灵敏度高, 选择性好, 化学性质稳定。另外, 有些杂质也能与显色剂生成有色溶液而干扰测定, 所以在比色测定前还应设法除掉干扰物质, 选用试剂也尽量用高纯度制品。

此外, 在比色分析中, 利用空白溶液调零也是至关重要的操作, 具有重要意义。空白溶液除不含有被测物质外, 其他溶剂、试剂和处理条件等与被测溶液完全相同, 故利用空白溶液可消除显色剂中其他有色物质的干扰, 抵消比色杯和试剂对入射光的影响。

四、仪器的结构

分光光度计的种类和型号很多, 但各种类型的分光光度计的结构和原理基本相似。最常用的是可见分光光度计和紫外-可见光分光光度计。一般都包括光源、单色器、狭缝、吸收池、检测系统 (检测器和显示器) 等部件。如下图 (图2-1) 所示。

(1) 光源 有钨灯和氘灯, 前者适用于 360~900nm 波长范围, 后者适用于