

生物化学与分子生物学 实验指导

Guide to Experiments of
Biochemistry and Molecular Biology

■ 主 编 / 马文丽 李 凌



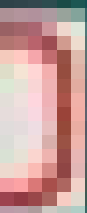
人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

生物化学与分子生物学 实验指导

Guide to Experiments of
Biochemistry and Molecular Biology

主编 王凤翥 李 洁



人民卫生出版社
People's Health Press

生物化学与分子生物学实验指导

Guide to Experiments of Biochemistry and Molecular Biology

主 编 马文丽 李 凌

副主编 张 宝 刘安玲 何肖娟

编 者 (以姓氏汉语拼音为序)

蔡翠霞	冯春琼	何肖娟	李 凌
刘安玲	马文丽	欧阳鸿	彭翼飞
危 敏	吴捷莉	肖维威	殷志新
余海浪	张 宝	周 烨	周珏宇
朱利娜			



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/马文丽,李 凌主编. —北京:人民军医出版社,2011.8
ISBN 978-7-5091-5124-2

I. ①生… II. ①马… ②李… III. ①生物化学—实验—医学院校—教学参考资料②分子生物学—实验—医学院校—教学参考资料 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 180434 号

策划编辑:吴 磊 文字编辑:冯海凉 吴 磊 责任审读:周晓洲

出版人:石 虹

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300—8751

网址:www.pmmp.com.cn

印、装:北京国马印刷厂

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:25.75 字数:640 千字

版、印次:2011 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001—4500

定价:49.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内 容 提 要

本书系统讲解了生物化学与分子生物学实验技术的基本原理(第1—5章)、实验概论(第6—8章)、实验各论(第9—16章)、实验常用数据(第17—18章)。其中,实验各论部分的编写参照了国家级实验教学示范中心建设要求,分为基本型实验、综合设计型实验、研究创新型实验3个模块。本书内容编排系统,逐层深入;内容丰富、翔实,共涵盖了35个实验项目,反映了实验教学改革的成果;写作风格有明显创新,在简要介绍实验原理、材料的基础上,以新颖、独创的表格流程格式,清晰地描述了每个操作步骤的内容、要点(含注意事项、技巧分析);在结果部分不仅介绍了预期结果,还分析了可能出现的常见问题及处理方法。为方便读者进行国际交流,书末附有重点实验的英文实验指导(附录A),供读者参考。本书既可作为高等学校生物化学与分子生物学实验教材,又可作为相关专业人员了解、掌握生物化学与分子生物学实验技术的重要参考书。

前言

生物化学与分子生物学是生命科学的领头学科,其理论和实验技术已广泛渗透到生命科学的各个领域。因此,生物化学与分子生物学的实验技术已经成为揭示生命奥秘的重要工具。

南方医科大学生物化学与分子生物学实验教学中心近几年来在实验教学上进行了一系列改革,构建了以人才培养为核心、创新能力培养为主线的实验教学体系及教学模式,在培养学生的实验设计思维与动手操作能力等方面取得了明显成效,现已成为广东省生物化学与分子生物学实验教学示范中心。在总结实验教学改革经验的基础上,我们编写了这本实验指导。

本书共分6篇(18章),分别是:①生物化学与分子生物学实验技术的基本原理篇(第1—5章),介绍了生物化学四大技术及分子生物学三大核心技术之一的核酸分子杂交技术(另两项核心技术已融入到第12章PCR技术、第15章分子克隆技术);②实验概论篇(第6—8章),包括实验的基本要求、基本技能训练及实验样品的制备;③基本型实验篇(第9—12章),按蛋白质、氨基酸实验,酶学实验,糖类、脂类实验,核酸实验分类编排;④综合设计型实验(第13—14章);⑤研究创新型实验(第15—16章,分别以分子克隆及基因芯片实验为代表);⑥实验常用数据(第17—18章)。另附有英文版实验指导(附录A)。

本书的编写特色鲜明。①内容编排系统,逐层深入:由理论到实验;实验内容由概论到各论;各论中各实验项目的编排参照国家级实验教学示范中心建设要求,分为基本型实验、综合设计型实验、研究创新型实验三个模块;最后附有英文版实验指导(可供双语教学与留学生教学使用)。②内容丰富、翔实:共涵盖了35个实验项目,其中既有大量经典、临床与科研实践实用的实验,又引入了反映多年实验教学改革成果的自主设计性实验、基因芯片实验等。③创新的写作风格:在简要介绍实验原理、材料的基础上,以新颖、独创的表格流程格式,清晰地描述了每个操作步骤的内容、要点(含注意事项、技巧分析);结果部分不仅介绍了预期结果,还分析了可能出现的常见问题及处理方法。这在目前的实验教材中未见先例。因此,本书既是一本高等学校生物化学与分子生物学实验教材,又可作为相关专业人员了解、掌握生物化学与分子生物学实验技术的重要参考书。

本书在编写过程中得到了国家精品课程、国家双语教学示范课程、国家教学团队、广东省实验教学示范中心项目的支持,在此一并表示感谢。

对于书中不足之处,敬请广大师生批评指正,以使本书日趋完善。

马文丽 李 凌

2011年8月于广州

目 录

第一篇 生物化学与分子生物学实验技术的基本原理

第1章 分光光度技术	(2)
第一节 基本原理	(2)
一、光的基本知识	(2)
二、朗伯—比尔定律	(3)
第二节 分光光度技术的应用	(4)
一、定量分析	(4)
二、定性分析	(5)
三、纯度检测	(6)
四、分光光度法的误差	(6)
第三节 分光光度计的基本结构及使用	(6)
一、分光光度计的基本构造	(6)
二、常见分光光度计的使用	(7)
三、分光光度计使用的注意事项	(9)
第2章 电泳技术	(10)
第一节 基本原理	(10)
一、电泳的原理	(10)
二、影响电泳速度的外界因素	(11)
第二节 电泳分类	(11)
一、按工作原理分类	(11)
二、按分离目的分类	(12)
三、按用法分类	(12)
第三节 常用电泳技术	(12)
一、纸电泳	(12)
二、醋酸纤维素薄膜电泳	(13)
三、琼脂糖凝胶电泳	(14)
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳	(14)
五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(16)
六、等电聚焦电泳	(16)
七、双向凝胶电泳	(17)
八、免疫电泳	(19)
九、毛细管电泳	(20)
第四节 电泳装置的结构及使用	(21)
一、电泳装置	(21)

二、使用方法	(24)
第3章 层析技术	(26)
第一节 基本原理	(26)
一、层析的基本概念	(26)
二、层析的基本原理	(27)
三、层析技术的分类	(28)
第二节 吸附层析	(29)
一、吸附层析的原理	(29)
二、吸附层析的分类	(30)
三、吸附剂和洗脱剂的选择	(31)
第三节 分配层析	(31)
一、分配层析的原理	(31)
二、纸层析	(32)
第四节 离子交换层析	(33)
一、离子交换层析的原理	(33)
二、离子交换剂的类型	(34)
三、离子交换层析的应用	(34)
四、离子交换树脂的处理	(34)
第五节 凝胶层析	(35)
一、凝胶层析的原理	(35)
二、凝胶层析的实验技术	(36)
三、凝胶层析的应用	(38)
第六节 亲和层析	(38)
一、亲和层析的原理	(39)
二、亲和层析的基本过程	(39)
三、亲和层析载体、配体的选择与偶联	(39)
第4章 离心技术	(41)
第一节 离心技术的基本原理	(41)
一、离心力	(41)
二、相对离心力	(42)
三、沉降系数	(42)
第二节 离心分离的常用方法	(42)
一、沉淀离心法	(42)
二、差速离心法	(43)
三、密度梯度离心法	(44)
第三节 离心机的分类及使用	(45)
一、制备型离心机	(46)
二、分析型离心机	(47)
三、离心操作注意事项及其维护保养	(47)
第5章 核酸分子杂交技术	(49)

第一节 基本原理	(49)
一、DNA 的变性	(49)
二、DNA 的复性	(50)
三、核酸分子杂交	(50)
第二节 核酸探针及其标记	(50)
一、核酸探针	(51)
二、探针的标记	(52)
第三节 常用核酸分子杂交技术	(55)
一、固相杂交技术	(55)
二、液相杂交技术	(57)
三、核酸分子杂交实验条件的优化	(58)
 第二篇 生物化学与分子生物学实验概论	
第 6 章 生物化学与分子生物学实验的基本要求	(64)
第一节 实验室的基本要求	(64)
一、实验室规则	(64)
二、实验室安全	(64)
第二节 实验记录与实验报告的基本要求	(66)
一、实验记录	(66)
二、实验数据的处理	(70)
三、实验误差分析与处理	(71)
四、实验报告的要求	(76)
第 7 章 生物化学与分子生物学实验基本技能训练	(78)
第一节 基本操作技能	(78)
一、玻璃仪器的洗涤与干燥	(78)
二、溶液的混匀	(79)
三、过滤、加热与冷却	(80)
第二节 基本器材与仪器的使用	(82)
一、刻度吸管的使用	(82)
二、可调微量移液器的使用	(83)
三、容量瓶的使用	(83)
四、电子天平的使用	(84)
五、pH 计的使用	(85)
第 8 章 生物化学与分子生物学实验样品的制备	(88)
第一节 样品制备的基本原则与策略	(88)
一、生物样品制备的基本原则	(88)
二、生物样品制备的基本策略	(89)
第二节 常用实验样品的制备	(89)
一、血液样品	(89)
二、尿液样品	(90)

三、组织样品	(90)
四、微生物样品	(91)
五、植物样品	(92)
第三节 生物大分子的制备	(92)
一、核酸的分离纯化	(92)
二、蛋白质的分离纯化	(93)

第三篇 基本型实验

第9章 蛋白质、氨基酸实验	(98)
第一节 蛋白质的定量测定	(98)
实验1 蛋白质的定量测定(微量凯氏定氮法)	(98)
实验2 蛋白质的定量测定(双缩脲法)	(103)
实验3 蛋白质的定量测定(Folin-酚试剂法)	(105)
实验4 蛋白质的定量测定(BCA法)	(107)
实验5 蛋白质的定量测定(考马斯亮蓝染色法)	(109)
实验6 蛋白质的定量测定(紫外吸收法)	(111)
第二节 蛋白质相对分子量测定(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)	(113)
第三节 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳及其定量	(120)
第四节 氨基酸的薄层层析	(124)
第五节 氨基酸的纸层析	(128)
第10章 酶学实验	(132)
第一节 过氧化氢酶米氏常数的测定	(132)
第二节 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定	(135)
第三节 琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制	(138)
第四节 乳酸脱氢酶同工酶琼脂糖电泳法测定	(140)
第11章 糖类、脂类实验	(143)
第一节 血糖的定量测定	(143)
实验1 血糖的定量测定(Folin-吴宪法)	(143)
实验2 血糖的定量测定(葡萄糖氧化酶法)	(147)
实验3 血糖的定量测定(己糖激酶法)	(149)
第二节 乳酸的定性分析与定量测定	(151)
实验1 尿中乳酸含量的定性分析	(152)
实验2 血液中乳酸含量的定量测定	(153)
第三节 血清甘油三酯的测定(乙酰丙酮显色法)	(155)
第四节 血清总胆固醇的测定(胆固醇氧化酶法)	(158)
第12章 核酸实验	(161)
第一节 核酸的定量测定	(161)
实验1 核酸的定量测定(定磷法)	(161)
实验2 核酸的定量测定(紫外吸收法)	(164)
实验3 DNA的定量测定(二苯胺法)	(165)

实验 4 RNA 的定量测定(地衣酚法)	(167)
第二节 核酸的琼脂糖凝胶电泳	(169)
实验 1 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(169)
实验 2 RNA 的甲醛变性凝胶电泳	(172)
第三节 核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(174)
第四节 DNA 的聚合酶链式反应	(177)

第四篇 综合设计型实验

第 13 章 综合性实验	(186)
第一节 血清清蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化与定量	(186)
第二节 碱性磷酸酶的分离纯化、比活性测定与动力学分析	(196)
实验 1 碱性磷酸酶的分离纯化和比活性测定	(196)
实验 2 底物浓度对碱性磷酸酶活性的影响	(199)
实验 3 pH 对碱性磷酸酶活性的影响	(203)
实验 4 温度对碱性磷酸酶活性的影响	(205)
第三节 肝糖原的提取、鉴定与定量	(207)
实验 1 肝糖原的提取与鉴定	(207)
实验 2 肝糖原定量测定	(209)
第四节 血清脂蛋白的电泳分离与定量测定	(211)
实验 1 血清脂蛋白的琼脂糖凝胶电泳	(213)
实验 2 血清高密度脂蛋白-胆固醇的分离与定量测定(磷钨酸-镁沉淀法)	(216)
第五节 质粒 DNA 的提取、定量与酶切鉴定	(218)
实验 1 质粒 DNA 的小量提取(碱裂解法)	(219)
实验 2 高纯质粒小量制备(试剂盒法,离心柱型)	(224)
实验 3 质粒 DNA 的定量(紫外分光光度法)	(226)
实验 4 质粒 DNA 的酶切鉴定	(228)
第六节 基因组 DNA 的提取、定量与鉴定	(232)
实验 1 细菌基因组 DNA 的提取、定量与鉴定	(232)
实验 2 动物组织基因组 DNA 的提取、定量与鉴定	(235)
第七节 总 RNA 的提取、定量与逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)	(239)
实验 1 总 RNA 的提取与定量	(239)
实验 2 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)	(243)
第八节 Southern 杂交	(248)
实验 1 基因组 DNA 样品的限制性酶切	(248)
实验 2 酶切样品的琼脂糖凝胶电泳	(250)
实验 3 DNA 的变性、转膜与固定	(252)
实验 4 杂交与杂交后清洗	(255)
实验 5 杂交结果的检测	(257)
第九节 斑点或狭缝杂交	(258)
第 14 章 设计性实验	(265)

第一节 设计性实验的基本程序	(265)
一、选题定题	(265)
二、实验设计	(266)
三、实验实施	(269)
四、实验总结	(269)
第二节 生物化学与分子生物学实验设计的基本思路	(270)
一、蛋白质研究的实验设计	(270)
二、酶学研究的实验设计	(275)
三、核酸研究的实验设计	(277)
四、糖类化合物的实验设计	(280)
五、脂类及维生素的实验设计	(282)
附:实验设计书范例	(284)

第五篇 研究创新型实验

第 15 章 分子克隆实验	(294)
第一节 目的基因的分离与载体的选择	(294)
实验 1 目的基因的分离	(294)
实验 2 载体的选择	(297)
第二节 目的基因与载体的限制性酶切及酶切产物的回收	(301)
实验 1 目的基因与载体的限制性酶切	(301)
实验 2 酶切产物的回收	(304)
第三节 目的基因与载体的连接	(307)
实验 1 酶切产物的克隆(T4 DNA 连接酶法)	(308)
实验 2 PCR 产物的 TA 克隆	(311)
第四节 重组 DNA 的导入	(314)
第五节 阳性重组体的筛选与鉴定	(317)
实验 1 阳性重组体的筛选(α -互补法)	(317)
实验 2 阳性重组体的鉴定(菌落 PCR 法)	(320)
第六节 目的基因的表达及鉴定	(321)
第 16 章 基因芯片实验	(325)
第一节 限制性基因芯片探针的制备	(325)
第二节 基因芯片实验样品的限制性荧光标记	(330)
第三节 基因芯片的表面处理与质控	(335)

第六篇 生物化学与分子生物学实验常用数据

第 17 章 试剂的配制与保存	(340)
第一节 化学试剂分级及注意事项	(340)
一、化学试剂纯度分级表	(340)
二、试剂配制的一般注意事项	(340)
三、易变质及需要特殊方法保存的试剂	(341)

第二节 常用试剂及溶液的配制	(341)
一、常用清洗液的配制	(341)
二、常用试剂的配制	(342)
三、常用缓冲液的配制	(344)
四、电泳常用缓冲液的配制	(349)
五、常用储存液的配制	(350)
第三节 细菌实验试剂的配制与保存	(351)
一、细菌培养基的配制	(351)
二、抗生素的配制	(353)
三、细菌的保存	(354)
第 18 章 常用数据表	(355)
一、常用蛋白质相对分子质量标准数据	(355)
二、氨基酸的主要参数	(355)
三、核酸、蛋白质换算数据	(356)
四、常用核酸相对分子质量标准数据	(356)
五、琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 的最佳分辨范围	(357)
六、PAGE 凝胶配表(核酸电泳用)	(357)
七、SDS-PAGE 的浓缩胶(5% Acrylamide)配方表	(358)
八、SDS-PAGE 分离胶配方表	(358)
九、SDS-PAGE 分离胶的浓度与最佳分离范围	(359)

附录 A 英文版实验指导

(Guide to Biochemistry Experiment)

Introduction to Biochemistry Experiments	(360)
Experiment 1 Determination of protein content by Lowry's method	(363)
Experiment 2 Protein identification by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	(365)
Experiment 3 Electrophoresis on cellulose acetate membrane of serum proteins	(371)
Experiment 4 Amino Acid Identification by Thin Layer Chromatography	(374)
Experiment 5 Extraction, Identification and Quantification of liver glycogen	(377)
Experiment 6 Plasmid DNA Miniprep, Quantification and Restriction Digestion Analysis	(381)
Experiment 7 Total RNA isolation and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	(389)

第一篇

生物化学与分子生物学实验技术的基本原理

第 1 章 分光光度技术

分光光度法(spectrophotometry)是根据物质对不同波长的光线具有选择性吸收,每种物质都具有其特异的吸收光谱,而建立起来的一种定量、定性分析技术,也称为吸收光谱法(absorption spectrometry),其理论依据是物质特有的 Lambert 和 Beer 定律。在生化实验中,分光光度法主要用于氨基酸含量的测定、蛋白质含量的测定、核酸的测定、酶活性测定、生物大分子的鉴定和酶催化反应动力学的研究等。

分光光度法是比较法的发展。比较法只限于在可见光区,分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比较法用的单色光是来自滤光片,谱带宽度 40~120nm,精度不高,分光光度法则要求近于真正单色光,其光谱带宽最大不超过 3~5nm,在紫外区可到 1nm 以下,来自棱镜或光栅,具有较高的精度。本章重点讨论紫外光及可见分光光度技术。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光量子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。

光的波动性体现为波长和频率,可用式 1-1 表示:

$$\lambda = \frac{C}{V} \quad (1-1)$$

式中: λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长; V 为频率,即每秒钟振动次数; C 为光速等于 299 770km/s。

上式表明,光的波长与频率成反比,波长越长,频率越低;波长越短,频率越高。

光的微粒性是以光子的能量值为特征的。光子的能量与光的波长成反比,而与频率成正比,即不同波长与频率的光具有不同的能量。

光属于电磁波。自然界中存在各种不同波长的电磁波,见表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围为 200nm~10 μ m。其中 200~400nm 为紫外光区,400~760nm 为可见光区,760~10 000nm 为红外光区。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长	来 源
γ 射线	$10^{-3} \sim 10^{-1} \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-1} \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外线	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外线	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见光	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外线	$0.76 \sim 50 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
远红外线	$50 \sim 1000 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
微波	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子振动
无线电波	$1 \sim 1000 \text{ cm}$	磁共振

二、朗伯-比尔定律

利用分光光度技术来进行定量分析,测定物质含量的基本原理是朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律,这个定律讨论了有色溶液对单色光的吸收程度与溶液及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得的。

当光线通过均匀、透明的溶液时可出现3种情况:一部分光被反射,一部分光被吸收,另有一部分光透过溶液(图1-1)。它们之间的关系见式1-2:

$$I_0 = I_a + I_r + I_t \quad (1-2)$$

式中: I_0 为入射光强度; I_a 为吸收光强度; I_r 为反射光强度; I_t 为透射光强度。

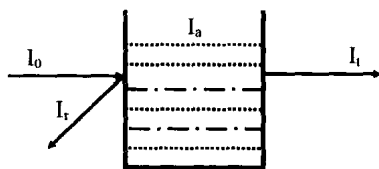


图1-1 单色光通过介质

I_t 和 I_0 之比称为透光度(transmittance, T),表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,见式1-3:

$$T = I_t / I_0 \quad (1-3)$$

$T \times 100\%$ 称为百分透光度($T\%$)。

显然, T 越大,说明对光的吸收越弱;相反, T 越小,对光的吸收越强。

透光度的负对数称为吸光度(absorbance, A),又称为消光度(degree of extinction, E)或光密度(optical density, OD),即式1-4:

$$A = -\lg T = -\lg I_t / I_0 = \lg I_0 / I_t \quad (1-4)$$

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就要减弱;若溶液浓度不变,则溶液的厚度愈大(即光在溶液中所经过的途径愈长),光的强度减低也愈显著,见式1-5:

$$A = \lg I_0 / I_t = K_1 \times L \quad (1-5)$$

式中: K_1 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和浓度以及溶液的温度等; L 为液层厚度。

2. 比尔定律 当一束单色光通过液层厚度一定的均匀溶液时,溶液中的吸光物质的浓度增大,则透射光强度将减弱。这是吸光度与浓度的定量关系,是紫外/可见分光光度分析的定量依据,称 Beer 定律,见式1-6:

$$A = \lg I_0 / I_t = K_2 \times C \quad (1-6)$$

式中: K_2 为比例系数,其值取决于入射光的波长、溶液的性质和液层的厚度以及溶液的温度等; C 为溶液浓度。

3. 朗伯-比尔定律 若同时考虑液层厚度和溶液浓度对吸光度的影响,即把朗伯定律和比尔定律合并起来得:当一束波长为 λ 的单色光通过均匀溶液时,其吸光度与溶液浓度和光线通过的液层厚度的乘积成正比,即为朗伯-比尔定律,如图1-2所示。用公式表示为式1-7:

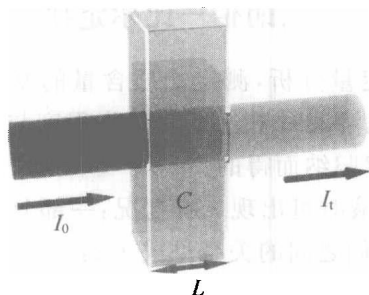


图 1-2 光的吸收

$$A = \lg I_0 / I_t = K \times L \times C \quad (1-7)$$

式中: L 为液层厚度; C 为溶液浓度; K 为比例系数。

若 L 用 cm 表示, C 用 g/L 表示, 比例常数 K 称为吸光系数; 若 L 用 cm 表示, C 用 mol/L 表示, 比例常数 K 称为摩尔吸光系数。

吸收系数的物理意义是吸光物质在单位浓度及单位液层厚度时的吸光度。在给定的条件(入射光波长、溶液种类、温度和 pH)下, 吸光系数为定值, 是物质的重要特征量。不同的物质对同一波长的单色光, 可有不同的吸光系数, 因此, 可以根据吸光系数作定性分析。另外, 同一物质在不同波长下测得的吸光系数不同, 吸光系数值越大, 表示该物质对该波长的光吸收能力越强, 测定分析的灵敏度也越高。因此, 在定量分析中, 应尽量采用吸光系数最大的单色光。

第二节 分光光度技术的应用

分光光度技术以其使用方便、迅速、样品用量少等优点而广泛应用于生物化学分析, 成为实验室常规的实验手段。虽然分析方法多种多样, 但归根结底可分为两类: 一是在固定波长下测定物质溶液的吸光度, 进行定量分析; 二是在一定的波长范围内, 绘制样品的吸收光谱曲线, 进行定性分析。

一、定量分析

分光光度技术最主要的应用是在定量分析方面。根据 Lambert-Beer 定律, 溶液的浓度在一定范围内与吸光度成正比关系。因此, 在特定波长单色光下测出溶液的吸光度, 即可计算出溶液的浓度。

应用分光光度技术进行物质的定量分析时, 所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长, 这样做不仅可避免其他物质的干扰, 而且灵敏度大, 因为物质在含量上的稍许变化就将引起吸光度的较大差异。

含量测定时一般采用以下 4 种方法进行样品的定量分析。

1. 标准管法(即标准比较法) 对已知浓度的标准液和待测液作同样处理, 使用相同的空白, 同时测定它们的吸光值, 根据测定的吸光值及标准品浓度, 可直接计算出待测样品的浓度, 见式 1-8, 式 1-9:

$$A_x / A_s = (K \times C_x \times L / K \times C_s \times L) \quad (1-8)$$