

生物化学实验

中國醫科大學

一九八六年十月

生物化学实验

中国医药大学

— 1954—1955 —

前 言

本实验手册是根据教学发展的需要，学习兄弟院校的经验并结合我校的实际编写的。虽然参与编写的同志做了很大的努力，但由于我们经验不足，所以错误之处在所难免，请大家在使用中多提意见。

中国医科大学 生化教研室

一九八六年九月

目 录

第一部分 常用生物化学实验技术及原理

一、常用生物材料的处理	(1)
二、比色分析法和分光光度法	(4)
(一) 比色分析法的基本原理	(5)
(二) 比色分析的测定方法	(8)
(三) 比色分析条件的选择	(10)
(四) 常用的分光光度计	(11)
三、电泳技术	(17)
(一) 基本原理	(17)
(二) 醋酸纤维膜电泳	(20)
(三) 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(21)
(四) 等电聚焦电泳	(29)
四、层析法	(32)
(一) 层析法中一些术语	(32)
(二) 层析法分类	(33)
(三) 层析法的理论概述	(33)
(四) 凝胶过滤层析	(35)
(五) 离子交换层析	(39)
(六) 亲和层析	(43)
(七) 薄层层析	(47)
五、放射性同位素示踪技术	(49)
(一) 基本知识	(50)
(二) 放射性核素衰变的规律和性质	(50)
(三) 放射性测量的有关知识	(51)
(四) 放射免疫测定技术	(53)
(五) 放射自显影技术	(53)

第二部分 实验

六、蛋白质的测定	(54)
实验(一) 凯氏微量定氮法	(54)
实验(二) 酚试剂法	(56)
实验(三) 双缩脲法	(57)
实验(四) 比色法	(59)
七、酶促反应动力学实验	(60)
实验(五) 酚标准曲线的绘制	(61)

实验 (六) pH 对 酶促反应速度的影响.....	(62)
实验 (七) 温度对酶促反应速度的影响.....	(63)
实验 (八) 底物浓度对酶促反应速度的影响.....	(64)
实验 (九) 抑制剂对酶促反应速度的影响.....	(65)
八、生物氧化.....	(66)
实验 (十) 乳酸脱氢酶及辅酶 I	(66)
实验 (十一) 琥珀酸脱氢酶实验.....	(68)
实验 (十二) 细胞色素氧化酶实验.....	(69)
九、糖代谢	
实验 (十三) 运动对尿中乳酸含量的影响.....	(70)
实验 (十四) 血糖定量.....	(71)
实验 (十五) 胰岛素及肾上腺素对血糖浓度的影响.....	(73)
实验 (十六) 肝糖元实验.....	(74)
十、脂类.....	(75)
实验 (十七) 肝脂质的提取及薄层层析.....	(75)
实验 (十八) 血清总胆固醇定量.....	(77)
十一、蛋白质代谢.....	(78)
实验 (十九) 转氨基作用.....	(78)
实验 (二十) 血清蛋白的醋酸纤维膜电泳分离及测定.....	(80)
十二、核酸.....	(82)
实验 (二十一) 酵母 RNA 的提取.....	(82)
实验 (二十二) 从肝脏中 提取 DNA.....	(83)
实验 (二十三) 核酸的定量测定.....	(84)
实验 (二十四) DNA 定 量 测定.....	(86)
实验 (二十五) 组织中核酸的分离及定量.....	(87)
实验 (二十六) 紫外吸收测定核酸含量.....	(90)
十三、人血清抗胰蛋白酶的分离及鉴定.....	(91)
实验 (二十七) 盐析法.....	(92)
实验 (二十八) 凝胶过滤法.....	(92)
实验 (二十九) DEAE 纤维素离子交换层析.....	(93)
实验 (三十) 伴刀豆球蛋白琼脂糖亲和层析.....	(95)
实验 (三十一) SDS 聚丙烯酰胺凝胶平板电泳.....	(96)
实验 (三十二) 等电聚焦圆盘电泳.....	(98)
十四、血清 γ -球蛋白.....	(99)
实验 (三十三) 血清球蛋白的分离纯化.....	(99)
实验 (三十四) 凝胶过滤法分离球蛋白的重链与轻链.....	(101)
十五、同位素实验.....	(101)
实验 (三十五) 尿中激肽含量的放射免疫测定法.....	(101)

实验(三十六) 胰岛素放射免疫测定.....	(103)
------------------------	-------

附录

一、缓冲液.....	(105)
(一) 一些常用作缓冲剂的化合物的酸解常数.....	(105)
(二) 常用缓冲液的配制方法.....	(106)
1. 磷酸盐缓冲液.....	(106)
2. 巴比妥钠—盐酸缓冲液 (18℃)	(107)
3. Tris—盐酸缓冲液 (0.05 M, 25℃)	(107)
二、层析法常用数据表.....	(108)
(一) 葡聚糖凝胶的某些技术数据.....	(108)
(二) 琼脂糖凝胶的技术数据.....	(109)
(三) 各种凝胶所允许的最大操作压.....	(109)
三、硫酸铵饱和度的常用表.....	(110)
1. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	(110)
2. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	(111)
四、离心机转数与相对离心力的换算.....	(112)
五、 ^{125}I 衰变表.....	(113)
六、FT—613 自动计算放免测量仪使用方法.....	(113)

第一部分

常用生物化学实验技术及原理

一、常用生物材料的处理

Treatment of Common Biological materials

1. 血液 (Blood)

(1) 采血

因饮食及其他生理情况影响血液成分常发生变动, 所以一般应在早饭前安静条件下采血。

需用血量较少时, 可由耳垂采毛细血管血。采血前先用手揉搓局部, 使血液循环旺盛, 再用70%酒精进行局部消毒, 用刺血针或注射针头穿刺 (深约2mm), 擦去第一滴血, 在不加压力下任血液自然流出 (如血不流出时, 可在其周围轻轻加压, 但不要过重), 然后使血滴入小试管, 或迅速用微量吸管直接吸取。

静脉采血通常选用肘窝的静脉, 局部用碘酒及70%酒精消毒, 扎止血带, 用严密消毒的注射器穿刺采血, 然后注入适当的容器中。此过程中要注意防止溶血, 否则影响分析。①所用注射器、针头及盛血容器都必须是十分清洁干燥的。②针头与针管需要连接严密, 在采血过程中不应进入小气泡, 否则易发生凝血和溶血。③由注射器注出血液时, 必须拔掉针头, 沿器壁轻轻地注到容器中, 不要有气泡, 避免强力的冲击。

(2) 分离血清

把新采的血于试管或离心管中, 倾斜放置, 任其自然凝固, 然后移放冰箱或室温放置等待析出血清。如急用时, 可在已经完全凝固 (约需30~45分钟) 后, 用细的钝尖玻璃棒紧贴管壁把凝块表面周边粘附管壁处轻轻剥开, 然后离心 2000~3000rpm 约10分钟, 移取血清放另外小试管中。

(3) 抗凝全血及血浆的制备

采血后立即注入盛有适当的抗凝剂的试管中, 轻振使抗凝剂溶解并混匀, 即可得到不凝的全血。

将抗凝血液离心 (2000~3000 rpm 5~10分钟), 使有形成分下沉, 上部即为血浆。用乳头吸管注意吸取血浆, 移放另试管中备用。

生化实验中最常用的抗凝剂为草酸盐 (钾、钠、铵、锂盐), 用量为每ml血液2mg。另外, 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA) 每ml血用1mg。氟化钠则需量较大, 每ml血用10mg, 它还有抑制糖酵解作用。再有肝素 (Heparin) 是较好的抗凝剂, 每ml血只需约0.05mg即可。

这些抗凝剂使用固体粉末, 也可以先配成一定浓度的溶液, 按计算量 (例如10%草

酸钾0.1 ml可使5 ml血液抗凝)加入试管中,然后放烘箱中于80°C以下烘干,更便于使用。

血液加入抗凝剂后,要及时轻轻摇动使抗凝剂溶解并混匀,不可过强振荡,避免溶血。抗凝剂的药量要适当,过少不足以抗凝,过多则影响实验,如草酸钾过多可影响硫酸加钨酸钠法除蛋白效果。又根据实验目的不同要对抗凝剂加以选择,如用草酸铵则不适于氮定量。如血糖定量可用氟化钠以防止糖的分解,最好与草酸盐并用(每ml血用草酸盐2mg加氟化钠3~4mg)。肝素抗凝效果好,适用于各种分析,但价格较贵,一般实验中不必使用。

(4) 血液样品的保存

血液成分容易发生变动,原则上应尽快进行分析。如必须暂时保存时,应放入冰箱。全血最不安定,可做成除蛋白滤液保存。血浆应及时与血细胞分开,血清也应与凝块分开,单独保存。

2. 尿液(Urine)

(1) 采尿

尿液成分及浓度生理变动较大。按实验目的不同,可用不同的尿液。许多定性实验可用随时采取的一次尿样。清晨第一次尿样,比较稳定,便于比较,也常采用。为定量实验常需采用全日尿样。

全日尿亦即由第一天某时开始到第二天同一时间的24小时尿,具体采法如下:在第一天晨6时排尿一次弃去,以后的尿液全部收集到加有适当防腐剂的容器中,到翌晨6时,不论有无尿意,再主动排尿一次于容器中。注意切实掌握始末时间,当中不可稍有损失。容器一般约需有2L容积,估计尿量多者应另有准备。采尿中间不可有异物混入。采尿完了后,把全部尿液充分混匀,量记总体积及其他必要项目,然后留取其一部分供实验用。

(2) 防腐

为防止采尿过程中及暂时保存中尿液成分发生变化,需要加适当的防腐剂。选用不影响实验目的的防腐剂。常用的有甲苯,全日尿中加2~5ml,它成一薄层盖在尿液表面上,适用于一般测定。另外,也常用冰醋酸(约10ml)、浓盐酸约(10ml)等。

3. 组织

根据实验目的不同则选用组织和处理方法亦不同。许多实验中常用肝脏或肌肉,主要因为其量多且含酶类较全,尤其肝脏代谢机能广泛,且其组织易于处理,最常使用。组织材料的处理过程中最重要原则是切实注意,勿使待分析物质发生变化或损失。

(1) 动物的处理

一般常用兔、鼠、蛙等,可用打击头部使急速死亡。鼠亦常用脱颈椎方法致死,必要时立即断头放血。然后迅速采出所需组织,放到冰冷条件下,除去其他组织,洗去血液,用滤纸吸干,称重供用。

(2) 匀浆的制备

进行组织或细胞内酶活性的测定或某些成分的定量时,多使用组织匀浆。制备匀浆一般常用乳钵。把组织剪碎,放乳钵中,必要时加少量玻璃砂研磨,加入一定量液体以

做成一定稀释倍数的匀浆（如10%匀浆，即指匀浆中含组织湿重10%）。但研磨中一次加入较多液体，不便于细研，可先加少量，研细后，最后加入全量研匀。

为制备匀浆并提取组织成分，常用的溶液有生理盐水、缓冲液等。又分析某些细胞成分时使用0.15M的KCl或0.25 M蔗糖液等。有时为使蛋白沉淀并提取某些成分，用5~10%三氯醋酸等。

在分析酶活性或某些易变物质（如ATP等）或分离细胞内各组分进行研究时，特别要注意保持冰冷条件，迅速处理。制备匀浆中，一方面采取冷却手段，防止变化。另外也可改进方法加速操作。为此，可采用匀浆器（Homogenizer），使用电动匀浆器不仅加快了研磨速度，也提高了匀浆的均匀程度。

常用的装置是通过小电动机转动的玻璃匀浆器。匀浆管内放组织及提取液，其杵上接电动机，杵壁与管壁间有一定间隙，杵底有磨齿，杵转动时把组织撕开并在杵壁与管壁间磨碎，使管迅速上下移动，可使组织相继通过与管壁摩擦磨碎。研磨效果与间隙及转速有关。匀浆管外面可放冰等，在冷却条件下研磨。

4. 沉淀的分离

（1）过滤

一般生化定量实验中，常用优质滤纸和小漏斗进行过滤。例如滤除血清蛋白质的沉淀，用其清液进行各种分析。先把适当大小的圆形滤纸进行对折两次，使所成圆锥体与漏斗内壁全面相接，如与漏斗角度不适合要调节滤纸圆锥角度，使之与漏斗相适应。角度合适，滤纸全面紧贴漏斗壁，中间无气泡，使过滤速度较快。向滤纸上倾注液体，要沿玻璃棒加于中央，加液不可过多，液面应距滤纸上缘2mm以上。

（2）离心及离心机

离心法是利用离心力将不同质量的物质进行分离。离心力与转速（每分钟转数）的平方、物质质量及旋转半径成正比。电动离心机转速快，分离效果高，可以迅速地使溶液中悬浮物沉集下来，得出上清液及沉淀，供进一步分析。液体粘稠或过少，难以过滤或不适于需时较长的过滤者，皆可离心。再有，需要反复沉淀和洗涤以及需要收集量少的沉淀进行分析者，更需要离心。此外，离心法也用于某些液体的分离。

离心使用离心机（Centrifuge）。使用离心机时特别注意对称位置上离心力的平衡。其次，注意防止离心过程中离心管的破裂及保证离心效果。虽然转速愈快时间愈长，则离心作用愈大，但这也增加仪器负担和打坏离心管的危险。一般实验，常用转速为每分钟5000转（每分钟转数 round per minute, 常用符号 rpm 表示）以下，大多数情况下，约2000 rpm 5~15分即可达到目的。某些实验，按规定的转速及时间使用，转速不可过高，时间不可拖长。

一般电动离心机的使用方法及注意事项如下：

使用方法：

1）检查离心管套管：如有玻璃碎片等异物，必须彻底清除。管底放好适当的棉花或胶垫。

2）平衡对称位置的重量：用称离心管用的天平，平衡对称位置上的套管、离心管与内容物的总重。一侧放检品管，向另侧离心管内加水，达到平衡为止。

3) 套管等放入离心机的对称位置后, 离心管不得过高, 否则必须重新处理。最后盖上离心机盖。

4) 先将调速旋钮转到零位, 然后再正确连接电源(注意电压、严防接错)。逐步转动旋钮, 渐渐加快转速, 待机钮指示或转速指示器的标示达到所需转速时为止, 并记时间。

5) 到定时间时, 逐渐地转回旋钮到零位, 拔下电源插销, 等待转动自然停止, 决不可用手强制地使之突然停转。然后开盖, 取出离心管。

注意事项:

1) 离心机需放在牢固平稳的台面上, 保持水平位置。

2) 使用离心机, 关键问题是对称位置上的离心力相等, 不仅对称的要总重相等, 而且重心所在位置也应该对称。只有这样才能保证仪器高速正常运行和得到好的离心效果; 否则在高度旋转中会产生离心力的很大差别, 发生震动, 影响沉降效能, 并且容易使离心管破碎, 甚至会损伤仪器。所以保持对称位的平衡是必须严格遵守的操作规程。

所用离心管应当是重量和形状相同的。管壁厚薄不规整, 质量不好的玻璃离心管, 在 3000 rpm 以上时很容易发生打管现象。

一般使用较低转速时可两侧都放待离心液体, 为对称位平衡向较轻侧离心管与套管之间加水。但使用转速较高时, 应当取前述向另侧离心管中加水的方法。向离心管与套管间加水虽然两侧可以等重, 但旋转后两者重心所在位置不同, 即旋转半径不同, 高速旋转时仍会产生离心力的不同。等重并不一定离心力相等, 平衡的原则是要求对称位离心力相等。

3) 起动及停车过程都必须逐渐地, 起动过快时可有多余电流变为热能, 有烧线包危险, 震动也大, 易洒出液体或打破离心管。强制突然停转, 不仅会有沉淀振起, 也会损害仪器。

4) 起动时或离心过程中出现异常声响时, 要及时停车进行检查处理。

5) 注意, 切勿使液体流溅于离心机内侵蚀机体, 机腔内应干燥清洁, 离心管内装液体不可过满, 避免溅出。使用后对离心管套管也要进行检查处理, 套管内应保持清洁干燥, 不得留有液体或碎玻片等。

二、比色分析法和分光光度法

Colorimetric methods and spectrophotometric methods

许多物质本身具有一定的颜色, 也有许多物质本身是无颜色的, 在加入适当的显色剂后可生成有色物质。溶液的浓度愈大, 其颜色愈深。因此, 可利用比较溶液颜色的深浅的方法来测定有色溶液的浓度, 这种方法叫做比色分析法。此法可用光电比色计进行测定, 由滤光板来获得近似的单色光, 滤光板的波长范围宽达 30~50 nm。

分光光度法和比色分析法都是光吸收的方法, 两者的主要区别是所用仪器的构造和分析的灵敏度、准确度以及应用范围有所不同。分光光度法所用的仪器叫做分光光度

计,它是利用棱镜(或光栅)来获得单色光的,其波长范围较窄,可达 $3\sim 5\text{ nm}$,是比较纯的单色光。因此,分光光度法比一般比色法的灵敏度、准确度和选择性都要高。

(一) 比色分析法的基本原理

1. 物质的颜色与波长

物质呈现的颜色与光有着密切关系。红、橙、黄、绿、青、兰、紫等色光按一定的比例混合而形成白光,每一种颜色的光都具有一定的波长范围如表1。可见光的波长范围是 $400\sim 760\text{ nm}$,中间各种色光的波长由紫到红递增。波长小于 400 nm ,即靠近紫光外侧的光,叫做紫外线;波长大于 760 nm ,即靠近红光外侧的光,叫做红外线。紫外线和红外线都是眼睛看不见的光。

表1 各种光的波长

远 红 外	$20\sim 400$	μm
近 红 外	$0.76\sim 20$	μm
红	$620\sim 760$	nm
橙	$592\sim 620$	nm
黄	$578\sim 592$	nm
绿	$500\sim 578$	nm
青	$464\sim 500$	nm
兰	$446\sim 464$	nm
紫	$400\sim 446$	nm
近 紫 外	$200\sim 400$	nm
远 紫 外	$50\sim 200$	nm

把两种适当颜色的光按一定的强度比例混合,可以成为白光,这两种色光就叫互补色。图1中处于直线关系的两种色光为互补色。如红光与青光、绿光与紫光、黄光与兰光为互补色等等。白光通过棱镜后可以分解成波长的各种不同色光。把具有一种波长,不能再进行分解的光叫做单色光。混合光分解成单色光的现象叫做光的色散。由色散作用形成的色光按照一定次序排列的光叫做光谱。

2. 溶液的颜色和光吸收的关系

有色物质对光的吸收具有选择性。溶液所呈现的不同颜色,是由于溶液中的有色质点(分子或离子)选择性地吸收某种颜色的光所引起的。溶液对各种波长的光具有不同的吸收能力,溶液呈现的颜色就是与它的主要吸收的光相当的互补色。例如,一束白光通过核黄素溶液,我们看见黄色,是

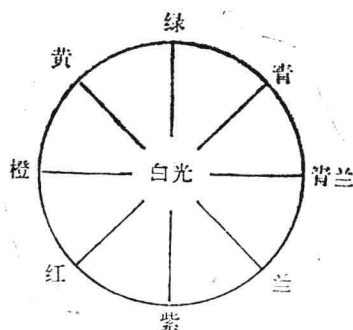


图1 互补色光示意图

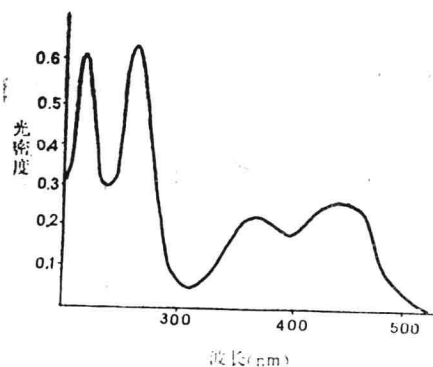


图2 核黄素的吸收光谱

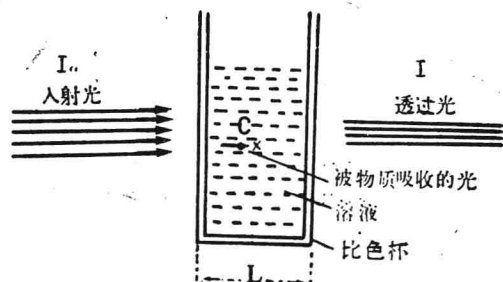
因为蓝色光被吸收，而其它颜色的光都是两两互补（见图1），透过光中只剩下黄色光，所以核黄素溶液显黄色。

通常，测定同一物质对不同波长光线的吸收绘出曲线，以波长为横坐标，光密度为纵坐标作图，所得曲线称为光吸收曲线或吸收光谱。核黄素的吸收光谱如图2所示。由图可见，核黄素对不同波长光线吸收程度不同，在可见光中选择性地对450 nm吸收最多，称为最大吸收。另外在紫外线部分还有两个吸收高峰，在260 nm和370 nm处。

各种物质的结构性质不同，吸收特性也各不相同，对不同波长的光吸收程度也不同，各有其特异的吸收曲线。

3. 物质浓度、液层厚度与光吸收的关系

当一束单色光通过溶液后，光被溶液吸收的程度与溶液的浓度、液层的厚度以及入射光的程度有关。浓度越大、液层厚度越厚，则吸收光越多，这就是物质（均匀而透明的固体、液体或气体）对光吸收的规律，即朗伯—比尔（Lambert—Beer）定律，其关系如下式：



$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-KCL} \dots\dots\dots ①$$

式中T为透光率，常用百分透光率表示。I₀为入射光强度，C为溶液的浓度，L为液层的厚度，I为透过光的强度（如图3）。

①式中两边取对数则得，

$$\lg \frac{I}{I_0} = -KCL \dots\dots\dots ②$$

图3 一束光通过溶液时的情况示意图

$$\lg \frac{I_0}{I} = KCL \dots\dots\dots ③$$

此公式为朗伯—比尔定律的数学形式。下面讨论这一公式的物理意义。

③ 式中的 $\lg \frac{I_0}{I}$ 表示什么？

当 $I = I_0$ 时， $\lg \frac{I_0}{I} = 0$ ，表示溶液完全不吸收光线。

当 $I \ll I_0$ 时， $\lg \frac{I_0}{I}$ 值很大，表示溶液对光线吸收较多。

当 $I \rightarrow 0$ 时， $\lg \frac{I_0}{I}$ 值无穷大，表示光线几乎被溶液完全吸收，即溶液不透过光。

由此可见， $\lg \frac{I_0}{I}$ 表示了溶液对光的吸收程度，习惯上用光密度 (Optical density)

O、D或D表示；一般又称吸光度(Absorbance)用A表示；或用消光度(Extinction)用E表示，三者意义相同。于是③式可写成：

$$D = KCL \dots \dots \dots ④$$

公式中K为吸光系数(或消光系数)。将④式移项得： $K = \frac{D}{CL}$ ，它表示有色溶液在单位浓度和单位厚度时的吸光度。

消光系数的表示方法有百分消光系数和克分子消光系数等。百分消光系数(符号 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$)，即浓度以百分浓度来表示消光系数，实际上它就是当溶液浓度为1%及厚度为1cm时的光密度值。克分子消光系数(符号 $E_{1\text{cm}}^M$ 或 ϵ)，即浓度以克分子浓度来表示消光系数。实际上它就是当溶液浓度为1克分子浓度及厚度为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。

在光电比色计和分光光度计的读数盘上附有两种数字：一种是等距离标尺，为透光率用T表示，单位%，从左到右逐渐增加0→100；另一种是不等距离的标尺，为光密度用D表示从左到右逐渐减少 $\infty \rightarrow 0$ ，其对应关系如图4所示。

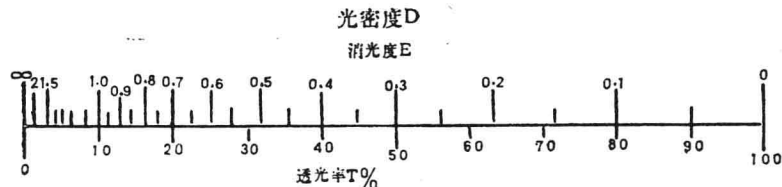


图4 消光度和透光率的关系

4. 待测溶液浓度的计算

通常，测定时直接读出光密度值，便于进一步按下列方式处理计算出待测溶液的浓度：

(1) 利用标准管法计算出待测溶液的浓度

在同样实验条件下同时测得标准液和待测液的光密度值，然后进行计算。

根据朗伯—比尔定律④式得：

$$\text{标准溶液：} D_s = K_s C_s L_s$$

$$\text{待测溶液：} D_u = K_u C_u L_u$$

两种溶液的液层厚度相等， $L_u = L_s$ ，温度相同，而且是同一物质的两种不同浓度，在测定时所用单色光也相同，则 $K_u = K_s$ 。

$$\text{两式相比得：} \frac{D_u}{D_s} = \frac{C_u}{C_s} \text{ 即 } C_u = \frac{D_u}{D_s} \cdot C_s$$

公式中 D_u 、 D_s 可由光电比色计或分光光度计测出， C_s 为已知，则待测溶液的浓度 C_u 即可求出。

(2) 利用标准曲线求出待测溶液的浓度

分析大批待测溶液时，采用此法比较方便。先配制一系列浓度由小到大的标准溶液，测出它们光密度。在标准溶液的一定浓度范围内，溶液的浓度与其光密度之间呈直线关系。以各管的光密度为纵坐标，各管浓度为横坐标，在方格坐标纸上作图得出标准曲线。在制作标准曲线时，起码用五种浓度递增的标准溶液，测出的数据至少要有三个落在直线上，这样的标准曲线方可使用。

测定待测溶液时，操作条件应与制作标准曲线时相同。测出光密度后，从标准曲线上可以直接查出其浓度。如图5中可由 D_u 直接查出其浓度 C_u 。

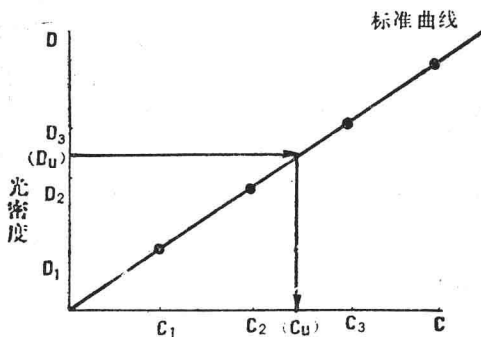


图5 标准曲线（浓度光密度曲线）

(3) 利用标准系数法求出待测溶液的浓度

此法比上述两法简便，将多次测定标准溶液的光密度算出平均值后，按下式求出标准系数。

$$\text{标准系数} = \frac{\text{标准液浓度}}{\text{标准液平均光密度}}$$

将用同样方法测出待测溶液的光密度代入下式即可。

待测溶液光密度 × 标准系数 = 待测溶液浓度

(4) 利用消光系数法求出待测溶液的浓度

消光系数计算浓度的公式：

$$C = \frac{D}{E_{1\%}^{1\text{cm}}} \quad \text{或} \quad C = \frac{D}{\epsilon}$$

在同样条件下测得待测溶液的光密度，可用上式计算出其浓度。

此公式常用于紫外吸收法，如对蛋白质溶液含量的测定，因蛋白质在波长280 nm处有最大吸收峰，利用已知蛋白质在波长280 nm的克分子消光系数，再读取待测液蛋白质的光密度，即可算出待测液蛋白质的浓度，不需显色，操作简便。

(二) 比色分析的测定方法

1. 光电比色法

根据光电效应原理利用光电池和检流计连接起来，通过测定有色溶液透过光的强度，求得被测物质含量的方法叫做光电比色法。

光电比色法的基本原理简述如下：白光经过滤光板后可得到近似单色光，让单色光通过有色溶液，然后射到光电池上，光电池受光而放出电子，所产生的电流与光的强度成正比关系，在检流计上可读出相应的光密度或透光率。

光电比色计基本结构原理如图 6。

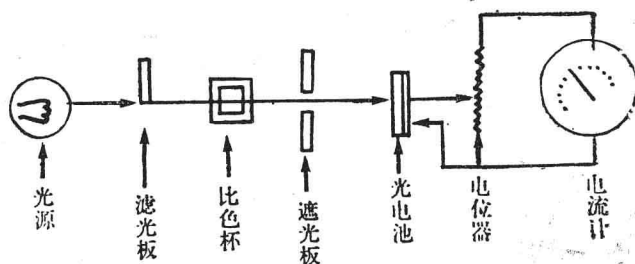


图 6 光电比色计（单电池式）基本结构示意图

用光电比色计进行比色分析时，需要一套滤光板，选用其中合适的滤光板。通常，滤光板最易透过的光是有色溶液最易吸收的光。一般说来，滤光板的颜色应与被测溶液的颜色为互补色。选择滤光板可参考表 2。

表 2 互补色与滤光板的选择

被测溶液的颜色	滤光板的颜色
绿色带黄	青 紫
黄	兰
橙 红	兰 绿
红	绿 兰
青 紫	黄 绿
兰	黄
兰色带绿	橙 红
绿	紫

分光光度法和比色法的基本原理是相同的，其理论基础也是朗伯—比尔定律。

2. 分光光度法

分光光度法所使用的仪器是分光光度计。一般所说分光光度计是指可见光范围的。

有的也包括近紫外或红外光的称为紫外或红外分光光度计，以及万用（全波段）分光光度计。

分光光度计的基本构造原理如图 7。

分光光度法在定量应用上优越性很大，如果溶液中同时含有两种或更多的物质，这些物质都符合朗伯—比尔定律时，可以不用分离直接测定计算除去杂质的干扰，而测定出待测物质的含量。例如，组织的核酸

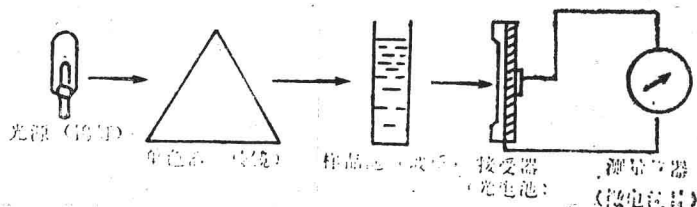


图 7 各类分光光度计各组分示意图

提取物中混有蛋白质，干扰核酸的测定，图 8 中 I 是核酸的吸收曲线，II 是蛋白质的吸收曲线。可用标准物测出 230 nm 和 260 nm 处核酸和蛋白质各自消光系数。假设核酸在

230 nm处消光系数为 R_1 ，在260 nm处为 R_2 ，蛋白质的消光系数在230 nm处为 P_1 在260 nm处为 P_2 。而测得提取物溶液的光密度在230 nm处为 D_{230} ，在260 nm处为 D_{260} ，可利用下列方法分别求出核酸的浓度 C_r 和蛋白质的浓度 C_p 。

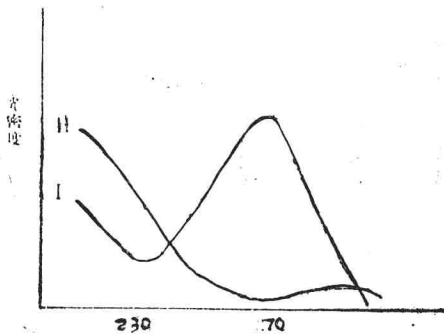


图8 核酸(I)、蛋白(II)的吸收曲线

根据比尔定律： $D = KCL$

$$D_{230} = R_1 C_r + P_1 C_p \dots\dots\dots ①$$

$$D_{260} = R_2 C_r + P_2 C_p \dots\dots\dots ②$$

解二元一次联立方程式，可得出：

$$C_r = \frac{D_{230} P_2 - D_{260} P_1}{R_1 P_2 - R_2 P_1}$$

$$C_p = \frac{D_{260} P_1 - D_{230} R_2}{R_1 P_2 - R_2 P_1}$$

上二式中右侧皆为已知数，由此可求出核酸的浓度 C_r 和蛋白质的浓度 C_p 。

分光光度法除应用于定量外，还可用于定性鉴定。可以测出物质的吸收光谱用于定性定量。特定条件下某物质的吸收光谱是一定的，可测定两处波长的光密度值，用其比值来鉴定确认是否是某物质。例如5'AMP在pH 3时， $\frac{D_{280}}{D_{260}}$ 的比值为0.23。分光光度法还用于研究物质的变化，物质发生变化时，其吸收光谱也发生变化。例如，NADH氧化时其340 nm的吸收高峰消失。又如当DNA变性时，在260 nm处吸收可增加30~40%等等。

(三) 比色分析条件的选择

1. 波长的选择

测定波长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：要求“吸收最大，干扰最小”。因为光密度愈大，测定灵敏度愈高，准确度也容易提高；干扰愈小，选择性愈好，测定准确度愈高。如图9所示，有A、B两种物质存在，A物质最大吸收波长在a处，但在同样波长下B物质也有吸收，对测定有干扰。因此，选用b处波长比较合适，此时灵敏度虽有所降低，但清除了B物质的干扰，提高了准确度。

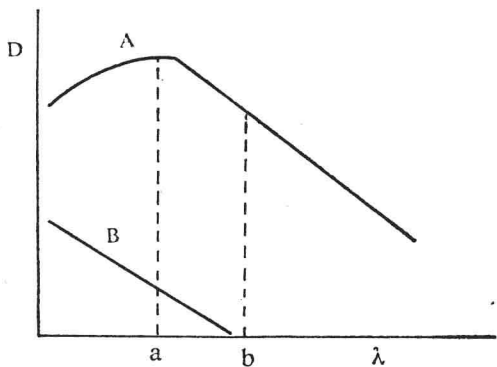


图9 A、B物质的吸收曲线

2. 光密度的选择

溶液的光密度太大或太小，都会影响测量的准确度。从检流计的标尺可以看出，在光密度较小的一端(如 $D = 0.03, 0.04$ 时)读数只能准确至1~2位有效数字；在光密度较大的一端(如 $D = 1, 2, 1.3$ 时)刻度

很密，读数也只能准确至1~2位有效数字。而在标尺中部（如 $D = 0.1 \sim 0.7$ 时），读数可准确至2~3位有效数字。因此，光密度读数在检流计标尺中部时，测定的准确度较高，相对误差最小。一般使用时要求 $D = 0.05 \sim 1.0$ 。

为了控制光密度，根据 $D = KCL$ 关系式可以看出，调节溶液的浓度或改变比色杯的厚度，都可控制溶液的光密度在适当的范围内。一般采用改变溶液浓度控制光密度在适当的范围内。

3. 显色条件的选择

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。

必须控制显色条件，因为显色剂的用量、溶液的pH、温度和反应时间都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度的变化，从而影响比色测定的准确度。有些杂质也能与显色剂生成有色溶液而干扰测定，因此在比色测定前必须设法除掉干扰物质。

此外，在比色分析中，常需要利用空白溶液调节仪器的透光率为100%，此时光密度为零。空白溶液仅仅不含有被测物质，而其他溶剂、试剂和处理条件与被测溶液完全相同。利用空白溶液可消除显色溶液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）常用的分光光度计

1. 72型分光光度计

这是一种简易型的初级分光光度计，波长范围为420—720 nm。由单色光器、稳压电源和检流计三部分构成(图10)。单色光是由白炽钨丝灯供给光源，通过一个玻璃棱镜及二个透镜产生的。由单色光器获得光谱较窄，单色光透过有色溶液的光线通过光电池将光能变为电能，在高灵敏度的检流计上指出相应的光密度或透光率。

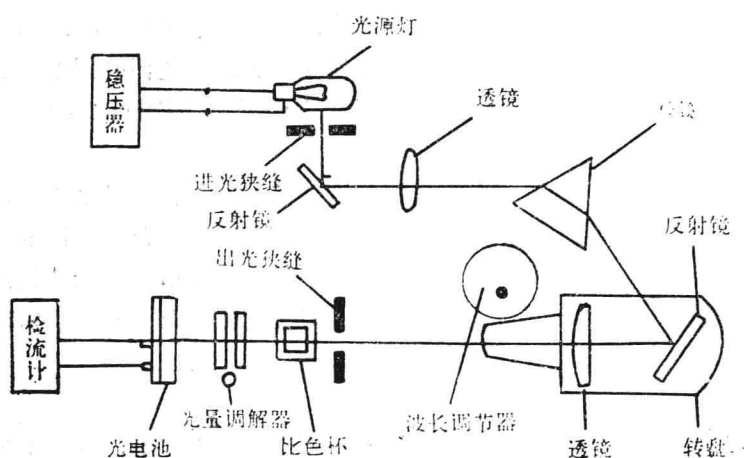


图10 72型分光光度计光学系统简图

2. 721型分光光度计