

现代实用医学实验技术丛书

SHIYONGSHENGWUHUAXUE
YUFENZISHENGWUXUE
SHIYANJISHU

实用生物化学与 分子生物学实验技术

●
王淳本 主编
湖北科学技术出版社



现代实用医学实验技术丛书

实用生物化学与 分子生物学实验技术

主 编：王淳本

副主编：孙 军 戴五星

编 者(按姓氏笔画顺序)：

王淳本 冯作化 孙 军 李 东

杨业金 杨渝珍 陈蓓蓓 宗义强

屈 伸 张桂梅 张建民 袁 萍

章 洁 戴五星

湖北科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

实用生物化学与分子生物学实验技术/王淳本主编.
武汉: 湖北科学技术出版社, 2003.2
ISBN 7-5352-2884-4

I. 实… II. 王… III. ①生物化学-实验技术
②分子生物学-实验技术 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 078619 号

现代实用医学实验技术丛书

实用生物化学与分子生物学实验技术

© 王淳本 主编

责任编辑: 冯友仁

封面设计: 王梅

出版发行: 湖北科学技术出版社
地 址: 武汉市武昌黄鹄路 75 号

电话: 86782508
邮编: 430077

印 刷: 武汉第二印刷厂

邮编: 430100

787mm × 1092mm 16 开 19.25 印张
2003 年 2 月第 1 版

480 千字
2003 年 2 月第 1 次印刷

印数: 0 001—2 000

ISBN 7-5352-2884-4/R·644

定价: 35.00 元

本书如有印装质量问题 可找承印厂更换

《现代实用医学实验技术丛书》

编辑委员会

屈 伸	沈关心	王西明
王淳本	刘能保	姜昌富
吴雄文	余从年	梁智辉

丛书策划

冯友仁

内 容 提 要

全书内容分为生物化学技术基本理论、分子生物学技术基本理论、生物化学与分子生物学教学实验以及附录等四个部分。第一部分和第二部分共 14 章,分别系统地介绍了现代生物化学与分子生物学的主要技术理论,并介绍了毛细管电泳、双向电泳、蛋白质组技术、生物芯片等最新技术的原理及应用。教学实验部分共选编了 24 个实验:6 个生物化学综合性实验主要是培养学生对蛋白质进行分离分析的综合实验技能,让研究生掌握科研中迫切需要的生物大分子如蛋白质的分离、提取、浓缩、纯化、定量等实验技术。这些实验技术实际上包括了生物工程下游技术的大部分。18 个分子生物学实验以 DNA 重组的基本过程为主线,介绍重组 DNA 技术的各个基本实验,同时还介绍了 DNA 探针制备和标记、分子杂交、序列分析、PCR、以及 SSCP 等技术。这些实验都在教学中采用过,并取得了较好的教学效果。第四部分附录汇集了生物化学与分子生物学常用的资料和数据,对独立进行科学研究更为需要。

本书以综合性大学、医药、师范和农林院校有关专业的研究生及本科生为对象,也可供其他生物化学与分子生物学实验技术工作者参考。它是一本高等学校生物化学与分子生物学实验教材,也是一本小型生物化学与分子生物学实验技术工具书。

前 言

现代生物化学与分子生物学是在生物化学、遗传学、微生物学、生物物理学、免疫学以及信息科学相互渗透融汇的基础上发展起来的,已经成为生命科学和医学中的前沿学科。其突飞猛进的发展,离不开生物化学与分子生物学技术的进步,从某种意义上说,技术与方法的创新和进步是推动生物化学与分子生物学理论飞速发展的直接动力。

近年来,生物化学与分子生物学新的实验技术和方法进展迅猛。毛细管电泳、双向电泳、高效液相色谱-质谱联用、分子克隆、分子杂交、聚合酶链反应(PCR)、生物芯片等技术不仅推动着生物化学与分子生物学的理论飞速发展,而且已广泛地应用于基础医学研究和临床诊断及治疗的各个领域,并不断得到新的充实与发展。

华中科技大学同济医学院(原同济医科大学)生物化学与分子生物学系在最近10年,先后编写了4个版本的《生物化学实验指导》和3个版本的《分子生物学实验技术》,在教学中发挥了重要的作用,取得了良好的效果。为了跟上学科的发展,编者本着继承与创新相结合的精神,吸取了以上几版教材的精华,在我们近几年使用的实验教材基础上,总结经验,增加了一些最新的实验方法和技术,整理编写成这本新的实验教材。

本书以综合性大学、医药、师范和农林院校有关专业的研究生及本科生为对象,也可供生物化学与分子生物学实验技术工作者参考。全书内容分为生物化学技术基本理论(1~8章)、分子生物学技术基本理论(9~14章)、生物化学与分子生物学实验(共24个实验)以及附录等4个部分。分别系统地介绍了现代生物化学与分子生物学的主要技术理论,并特别介绍了毛细管电泳、双向电泳、蛋白质组技术、生物芯片等最新技术的原理及应用。教学实验部分共选编了24个实验。6个生物化学综合性实验主要是培养学生对蛋白质进行分离、分析的综合实验技能,让研究生掌握科研中迫切需要的生物大分子如蛋白质的分离、提取、浓缩、纯化、定量等实验技术。这些实验技术实际上也是生物工程下游技术的主要部分。18个分子生物学实验以DNA重组的基本过程为主线,介绍重组DNA技术的各个基本实验,同时还介绍了DNA探针制备和标记、分子杂交、序列分析、PCR、以及SSCP等技术。这些实验都在教学中采用过,并取得了较好的教学效果。附录汇集了生物化学与分子生物学常用的资料和数据,为独立进行科学研究提供必要的参考。

由于本书编写过程中增加的内容比较多,也比较新,难免有不妥之处,希望广大读者提出宝贵意见。

编者

2002年8月

第一章 分光光度技术

<p>第一节 基本原理 (1)</p> <p> 一、光的基本知识 (1)</p> <p> 二、朗伯—比尔定律 (2)</p> <p> 三、吸光系数 (3)</p> <p>第二节 分光光度计的 基本类型和组件 (3)</p> <p> 一、分光光度计的基本类型 (3)</p> <p> 二、分光光度计的基本组件 (5)</p> <p>第三节 分光光度技术的应用 (6)</p> <p> 一、定量分析 (6)</p> <p> 二、定性分析 (7)</p> <p>第四节 测试条件的选择 (8)</p> <p> 一、测试波长的选择 (8)</p> <p> 二、测量狭缝的选择 (8)</p>	<p> 三、吸光度测量范围的控制 (9)</p> <p> 四、参比溶液的选择 (9)</p> <p>第五节 分光光度法的误差 (9)</p> <p> 一、物理性原因产生的误差 (9)</p> <p> 二、化学性原因引起的误差 (10)</p> <p>第六节 常见国产分光光度计 的使用 (10)</p> <p> 一、721 型分光光度计 (10)</p> <p> 二、722S 型分光光度计 (11)</p> <p> 三、日本岛津 1240 紫外/可见分光光度计 (带 Sipper 160 型自动流动池) (11)</p> <p> 四、使用分光光度计的注意事项 (12)</p>
--	--

第二章 色谱技术

<p>第一节 色谱技术的概念和特点 (13)</p> <p> 一、色谱技术的概念 (13)</p> <p> 二、色谱技术的特点和优点 (13)</p> <p> 三、色谱技术的不足 (14)</p> <p>第二节 色谱法的分类 (14)</p> <p> 一、按两相所处的状态分类 (14)</p> <p> 二、按色谱的分离机制分类 (14)</p> <p> 三、按操作形式不同分类 (15)</p> <p>第三节 色谱的基本理论 (16)</p> <p> 一、色谱法中常用的术语 (16)</p> <p> 二、塔板理论 (18)</p>	<p> 三、速率理论 (19)</p> <p> 四、分离度(resolution) ——色谱分离效能的总指标 ... (22)</p> <p>第四节 常用的色谱方法 (22)</p> <p> 一、吸附色谱 (22)</p> <p> 二、分配色谱 (24)</p> <p> 三、凝胶色谱 (25)</p> <p> 四、离子交换色谱 (30)</p> <p> 五、亲和色谱 (33)</p> <p> 六、高效液相色谱 (34)</p> <p> 七、毛细管电泳 (37)</p>
---	---

第三章 电泳技术

第一节 基本原理..... (42)	分子量的原理..... (55)
一、蛋白质电荷的来源..... (42)	二、分子量的测定和计算..... (56)
二、电泳的基本原理..... (43)	三、操作方法..... (56)
三、影响电泳的因素..... (43)	第六节 聚丙烯酰胺梯度
第二节 醋酸纤维薄膜电泳..... (45)	凝胶电泳..... (57)
第三节 琼脂糖凝胶电泳..... (45)	第七节 聚丙烯酰胺凝胶
一、核酸分子大小与琼脂糖	等电聚焦电泳..... (58)
浓度的关系..... (46)	一、等电聚焦的原理..... (58)
二、核酸构型与琼脂糖凝胶电泳	二、pH梯度的形成..... (59)
分离的关系..... (47)	三、操作方法..... (60)
三、琼脂糖凝胶电泳	四、IEF - PAGE 中常见的问题
基本方法简介..... (47)	及解决方法..... (62)
第四节 常规聚丙烯酰胺	第八节 双向电泳..... (64)
凝胶电泳..... (48)	一、样品制备..... (65)
一、聚丙烯酰胺凝胶聚合原理	二、第一向等电聚焦..... (65)
及相关特性..... (48)	三、平衡及二向间的转移..... (66)
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳原理..... (50)	四、第二向 SDS - PAGE..... (66)
三、操作方法..... (52)	五、蛋白质的检测
四、聚丙烯酰胺凝胶电泳中常见的问题	及图谱数字化分析..... (66)
及解决方法..... (54)	第九节 染色方法..... (66)
第五节 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶	一、蛋白质染色..... (66)
电泳原理..... (55)	二、脂蛋白染色..... (68)
一、SDS - PAGE 测定蛋白质	三、核酸的染色..... (69)

第四章 离心技术

第一节 离心理论..... (70)	第二节 离心分离的种类..... (74)
一、离心分离的原理..... (70)	一、差速离心法..... (74)
二、沉降系数..... (72)	二、密度梯度离心法..... (75)
三、相对离心力和离心时间..... (72)	第三节 离心操作注意事项..... (77)
四、离心机的分类..... (73)	

第五章 荧光分光分析技术

- | | | | |
|----------------------|------|-------------------------|------|
| 一、荧光的产生 | (78) | 五、荧光定量测定的方法 | (83) |
| 二、荧光检测的类型 | (78) | 六、荧光分析仪器的基本结构 | (83) |
| 三、荧光分析的基本参数 | (80) | 七、几种不同类型的荧光分析测定装置 | (84) |
| 四、环境因素对荧光分析的影响 | (82) | | |

第六章 蛋白质组技术

- | | | | |
|------------------|------|--------------------|------|
| 一、蛋白质组学 | (87) | 四、蛋白质组数据库的建立 | (90) |
| 二、蛋白质组分离技术 | (87) | 五、蛋白质组研究的前景 | (91) |
| 三、蛋白质组分析技术 | (89) | | |

第七章 细胞培养技术

- | | | | |
|--------------------|------|---------------------|------|
| 第一节 细胞培养基本知识 | (92) | 第二节 细胞培养的基本技术 | (97) |
| 一、体外培养细胞的分型 | (92) | 一、培养细胞的取材 | (97) |
| 二、培养细胞的生长特点 | (92) | 二、组织材料的分离 | (98) |
| 三、培养细胞的生长过程 | (93) | 三、原代培养 | (98) |
| 四、培养细胞生长的条件 | (95) | 四、传代培养和细胞系的维持 | (98) |
| 五、培养用液 | (96) | 五、细胞的冻存与复苏 | (99) |
| 六、培养基 | (96) | 六、培养细胞的污染及检测 | (99) |

第八章 生物大分子制备技术

- | | | | |
|--------------------------------|-------|---------------------|-------|
| 第一节 预处理和细胞的分离 | (100) | 二、蛋白质的分离纯化 | (105) |
| 一、选择材料及预处理 | (100) | 三、核酸的分离纯化 | (107) |
| 二、细胞的分离 | (101) | 四、蛋白质的定量 | (108) |
| 第二节 细胞的破碎及细胞器
的分离 | (101) | 五、DNA、RNA 的定量 | (110) |
| 一、细胞的破碎 | (101) | 第四节 浓缩、干燥及保存 | (111) |
| 二、细胞器的分离 | (104) | 一、蛋白质的浓缩 | (111) |
| 第三节 生物大分子的提取、
分离纯化和定量 | (104) | 二、核酸的浓缩 | (113) |
| 一、蛋白质(包括酶)的提取 | (104) | 三、干燥 | (115) |
| | | 四、保存 | (115) |

第九章 重组 DNA 技术

第一节 目的基因的获取 (117)	七、碱性磷酸酶 (128)
一、直接从染色体中分离 (118)	第四节 DNA 限制性内切酶酶切
二、化学合成法 (118)	及片断回收 (128)
三、用逆转录酶录制 cDNA (118)	一、限制性内切酶运用的设计 (128)
四、构建基因组文库	二、限制性内切酶的酶切 (129)
及 cDNA 文库 (118)	三、琼脂糖凝胶电泳分离
五、聚合酶链反应 (119)	和 DNA 片断的回收 (130)
第二节 分子克隆载体与	四、琼脂糖凝胶中回收
宿主的选择 (119)	DNA 片段的纯化 (133)
一、质粒载体 (120)	第五节 外源基因与载体的连接 (134)
二、噬菌体 (121)	一、粘性末端连接 (135)
三、噬菌粒 (122)	二、平末端的连接 (135)
四、粘粒 (122)	三、DNA 的胶内连接 (136)
五、DNA 病毒载体 SV ₄₀ (122)	第六节 重组 DNA 导入宿主细胞 (136)
六、反转录病毒载体 (123)	一、大肠杆菌的转化 (137)
七、宿主细胞 (123)	二、电脉冲穿孔法转化
第三节 分子克隆常用的工具酶 (124)	大肠杆菌 (138)
一、限制性核酸内切酶 (124)	第七节 含重组质粒的宿主菌落
二、DNA 聚合酶 (127)	的筛选与鉴定 (138)
三、DNA 连接酶 (128)	一、利用宿主细胞遗传表型
四、末端脱氧核苷酰转移酶 (128)	的改变进行筛选 (139)
五、核酸酶 (128)	二、分析重组子分子结构特性
六、脱氧核糖核酸酶 (128)	进行鉴定 (140)

第十章 外源基因表达技术

第一节 大肠杆菌表达系统 (141)	一、真核表达载体 (147)
一、大肠杆菌表达载体	二、目的基因 (148)
的表达元件 (141)	三、外源基因导入哺乳动物
二、大肠杆菌的表达载体 (142)	细胞的方法 (148)
三、外源基因在大肠	四、哺乳动物基因转移
杆菌中表达 (144)	的筛选标记 (149)
四、提高外源基因表达	五、外源基因在哺乳细胞的表达
水平的措施 (145)	和基因表达产物的检测 (150)
第二节 哺乳动物细胞表达系统 (146)	

第十一章 分子杂交技术

第一节 核酸杂交的基本理论	二、探针标记物····· (153)
——DNA 变性与复性····· (151)	三、标记方法····· (154)
一、DNA 变性····· (151)	第三节 核酸分子杂交····· (155)
二、DNA 复性····· (151)	一、影响杂交的因素····· (156)
三、核酸分子杂交····· (152)	二、固相杂交法····· (157)
第二节 核酸探针及其标记····· (152)	三、液相杂交法····· (160)
一、核酸探针····· (152)	

第十二章 聚合酶链反应(PCR)技术

第一节 PCR 基本原理	二、不对称 PCR····· (174)
和影响因素····· (163)	三、差异 PCR····· (174)
一、基本原理····· (163)	四、复合 PCR····· (174)
二、PCR 反应步骤简介····· (164)	五、着色互补 PCR····· (175)
三、影响因素····· (164)	六、锚定 PCR····· (175)
四、PCR 条件优化····· (167)	七、竞争性 PCR····· (175)
五、注意事项····· (168)	八、定量 PCR····· (175)
第二节 逆转录 PCR 技术····· (169)	九、原位 PCR····· (176)
一、原理····· (169)	十、重组 PCR····· (176)
二、RNA 的提取····· (169)	十一、RNA 扩增与一步法扩增
三、逆转录 PCR 反应····· (170)	(RT-PCR)····· (177)
第三节 PCR—SSCP 银染技术····· (171)	第五节 PCR 技术应用····· (177)
一、原理····· (171)	一、DNA 克隆····· (177)
二、实验方法····· (172)	二、重组 PCR····· (177)
第四节 PCR 技术扩展····· (174)	三、DNA 序列的测定····· (178)
一、反向 PCR····· (174)	四、用于基因定量····· (178)

第十三章 DNA 序列测定

第一节 序列测定的技术和策略····· (179)	第三节 全自动激光荧光
第二节 Sanger 双脱氧末端	DNA 测序····· (182)
终止法测序····· (179)	

第十四章 生物芯片技术

第一节 生物芯片的概念和特点	(183)	的应用	(193)
第二节 生物芯片的分类	(183)	一、微缩实验室芯片	(193)
第三节 生物芯片的制备和检测	(184)	二、基因突变分析	(193)
一、芯片载体的表面修饰	(184)	三、克隆选择及文库筛选	(194)
二、芯片阵列制作方式	(185)	四、测序芯片	(194)
三、杂交探针的种类与制备	(186)	五、基因多态性分析	(195)
四、样品制备和标记	(189)	六、基因表达谱分析	(195)
五、分子杂交和杂交微环境	(189)	七、微生物菌种鉴定、致病机理	
六、杂交信号采集和处理	(190)	及抗药性分析	(195)
七、生物信息的分析和提取	(190)	八、药物筛选芯片	(196)
第四节 生物芯片在医学中			

第十五章 生物化学与分子生物学实验

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应	(197)	实验十三 含重组质粒的细菌菌落的鉴定	(238)
实验二 蛋白质的定量测定	(199)	实验十四 哺乳类高分子量DNA的提取	(241)
实验三 血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定	(208)	实验十五 哺乳类细胞总RNA的提取	(244)
实验四 双向电泳	(212)	实验十六 DNA探针的标记	(246)
实验五 碱性磷酸酶的分离纯化	(215)	实验十七 Southern印迹法	(249)
实验六 鸡卵类粘蛋白的制备	(219)	实验十八 Northern印迹法	(253)
实验七 质粒DNA的制备与纯化	(223)	实验十九 斑点杂交和狭线杂交	(256)
实验八 DNA纯度、浓度与分子量的测定	(226)	实验二十 原位杂交	(258)
实验九 DNA的限制性内切酶消化	(229)	实验二十一 聚合酶链式反应(PCR)	(262)
实验十 从琼脂糖凝胶中分离回收DNA片段	(231)	实验二十二 DNA序列分析	(267)
实验十一 DNA片段的连接反应	(234)	实验二十三 免疫印迹法——Western Blot	(271)
实验十二 重组质粒DNA转化大肠杆菌	(236)	实验二十四 SSCP技术检测基因突变	(275)

附 录

附录一 实验须知	(278)	附录二 常用试剂的配制	(285)
----------	-------	-------------	-------

第一章 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、定性分析的技术。也称为吸收光谱法(absorption spectrometry)。其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

分光光度法是比较法的发展。比色法只限于在可见光区,分光光度法则由可见光区扩展到紫外光区和红外光区。比色法用滤光片产生单色光,谱带宽度为 40~120 nm,精度不高,而分光光度法则采用棱镜或光栅产生单色光,其光谱带宽最大不超过 3~5 nm,且具有较高的波长精度。本章仅讨论紫外及可见分光光度技术。

紫外及可见分光光度技术是一种分析技术。它不需要我们把欲分析的样品从混合物中分离开来,即可利用样品特殊的吸收峰或特殊的显色反应,直接进行定性、定量的分析。具有操作简单、灵敏度高、选择性强、定量分析的精密度和准确度都很高的优点。但是直接利用紫外光谱进行定性的能力相对较弱,通常还需与红外、色谱、质谱等技术结合才能作出可靠的定性鉴定。

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。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c/\nu$$

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。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $(299\ 770 \pm 4)\text{km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波,列表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200 nm~10 μm (1 μm = 1 000 nm) 之间。其中 200~400 nm 为紫外光区,400~760 nm 为可见光区,760~10 000 nm 为红外光区。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长		来 源
	M	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-18}$	0.1~10 nm	内层电子
远紫外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	10~200 nm	中层电子
紫外	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	200~400 nm	外层价电子
可见	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	400~760 nm	外层价电子
红外	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	0.76~50 μm	分子振动与分子转动
远红外	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	50~1 000 μm	分子振动与分子转动
微波	$10^{-3} \sim 1$	0.1~100 cm	分子转动
无线电波	$1 \sim 10^3$	1~1 000 m	核磁共振

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根据的是朗伯—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的浓度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。

(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,见图 1-1。

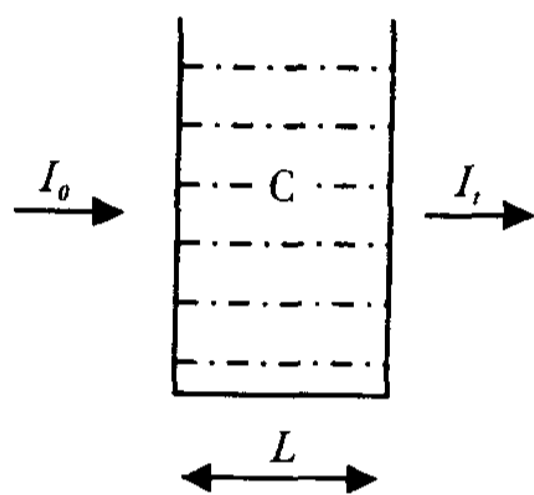


图 1-1 光吸收示意图

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度),通过液层厚为 L 溶液后,光的强度为 I_t (透过光的强度),则 $\frac{I_t}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,称为透光度(transmittance),用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少,但实践证明,透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系,只有透光度的负对数($-\lg T$)才随着溶液厚度的增加而成正比例增加,即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例写成等式,得到 $\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度(absorbance, A),又称为消光度(degree of extinction, E)或光密度(optical density, D), 所以

$$A = K_1 L$$

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。

上式表明,当溶液的浓度不变时,吸光度与溶液液层的厚度成正比,这就是朗伯定律。

(2)比尔定律:当一束单色光通过有色溶液后,溶液液层的厚度不变而浓度不同时,溶液度愈大,则透射光的强度愈弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度; 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。

上式表明,当溶液液层的厚度不变时,吸光度与溶液的浓度成正比,这就是比尔定律。

(3)朗伯—比尔定律:如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,将朗伯定律和比尔定律合并起来,得到:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC$$

$$A = KLC$$

这就是朗伯—比尔定律,它表示溶液的吸光度与溶液浓度和液层厚度的乘积成正比。式中 K 是比例常数,式中若 L 用厘米表示, C 用 W/V 浓度或摩尔浓度表示,则比例常数 K 称为吸光系数或消光系数。

三、吸光系数

吸光系数的物理意义是吸光物质在单位浓度及单位厚度时的吸光度。在给定条件(单色光波长、溶剂、温度、pH 值)下,吸光系数是物质的特征量,它和该物质分子在基态和激发态之间的跃迁几率有关。不同物质对同一波长的单色光,可有不同的吸光系数,吸光系数通常有两种表示方式:

(1)摩尔吸光系数:指 1 摩尔浓度的溶液在厚度为 1 cm 时,在某一特定波长下的吸光度,用 ϵ 或 E_M 表示。

(2)百分吸光系数:其意义指某物质的 1% (W/V) 浓度的溶液,在厚度为 1 cm 时,在某一特定波长下的吸光度,用 $E^{1\%}$ 来表示。

两种吸光系数表示方式之间关系是:

$$\epsilon = \frac{M}{10} \times E^{1\%}$$

式中 M 是吸光物质的分子量。摩尔吸光系数一般不超过 10^5 数量级,通常把 ϵ 值达到 10^4 的划分为强吸收,小于 10^2 的划为弱吸收,介于二者之间的为中强吸收。

吸光系数 ϵ 和 $E^{1\%}$ 一般都不能直接测得,需用已知准确浓度的稀溶液测得吸光度后经换算而得到。例如浓度为 28.9 mg/L 的尿苷三磷酸钠盐二水合物 ($MW = 586$) 的水溶液,在波长 262 nm,用 1 cm 光径吸收池测得吸光度 A 为 0.507。则

$$E^{1\%} = \frac{A}{C \times L} = \frac{0.507}{28.9 \times 10^{-3} \times 10} = 175.4$$

$$\epsilon = \frac{M}{10} \times E^{1\%} = \frac{586}{10} \times 175.4 = 1.028 \times 10^4$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其吸光系数不一定相同,可以作为定性分析的依据之一。 ϵ 或 $E^{1\%}$ 值愈大,说明该物质溶液对光吸收愈强烈,则分光分析测定的灵敏度愈高。

第二节 分光光度计的基本类型和组件

一、分光光度计的基本类型

光电比色计是利用滤光片获得接近于单色光的光线,用光电池和电流计测量通过溶液的

透射光强度,并直接表示出透光率或吸光度。但由于一般比色滤光片的单色性能并不很高,带通高达 50 nm,且只能提供几种固定波长的光线,无法满足对各种样品测定时所需要的不同波长,比色计很难满足当前实验检测的要求。

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来,并测量其强度的仪器称为分光光度计。分光光度计是靠光栅或棱镜提供单色光的高级的光电比色计。它的单色器可提供波长连续可调的测定光线,其带通一般为 2~5 nm,高档的可达 0.1 nm,因此是较纯的单色光。

分光光度计有几种基本类型(见图 1-2),一类是单波长分光光度计,另一类是双波长分光光度计。

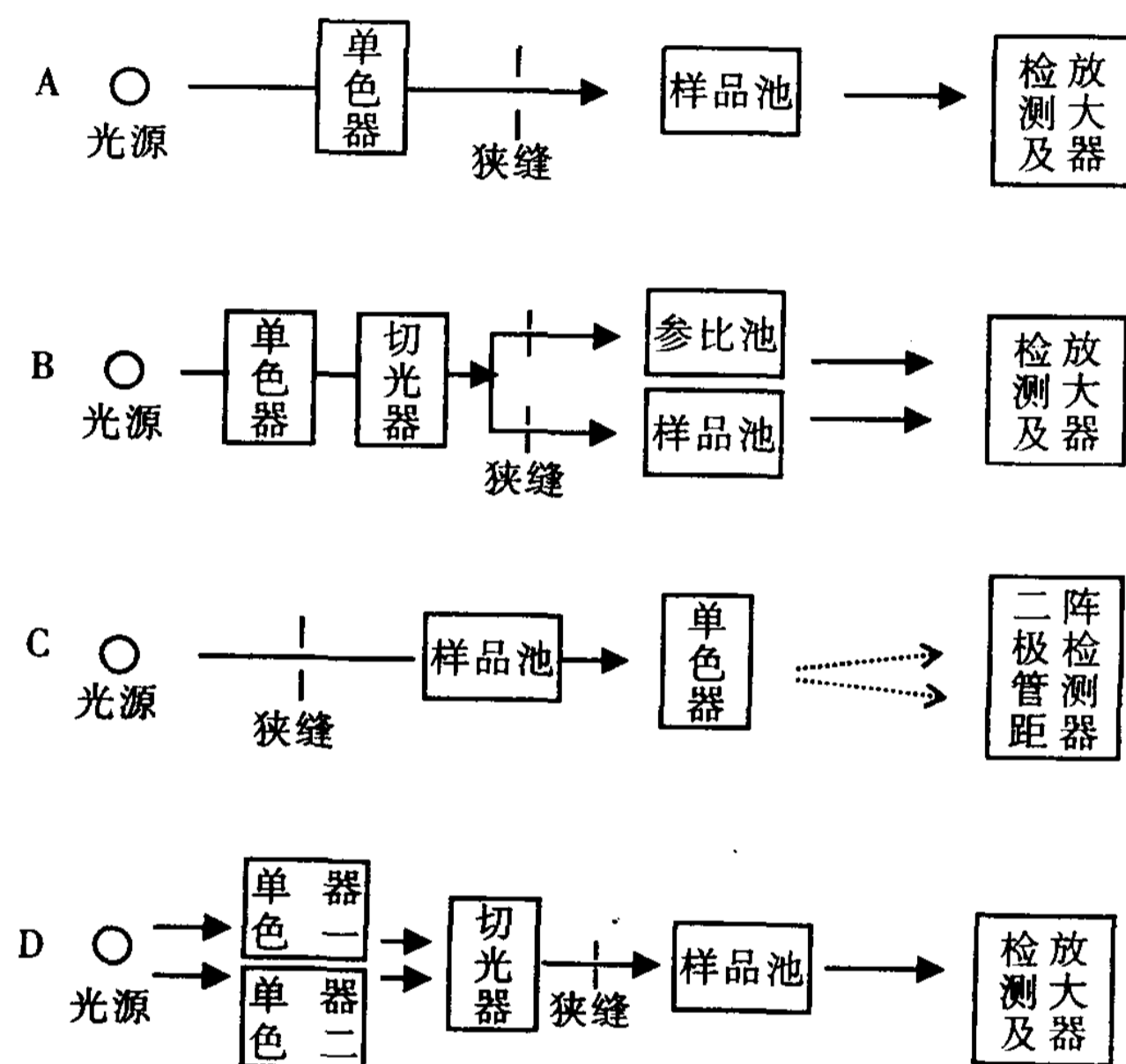


图 1-2 各种类型分光光度计的结构示意图

A: 单光束分光光度计 B: 双光束分光光度计 C: 二极管矩阵分光光度计 D: 双波长分光光度计

单波长分光光度计又可分为单光束和双光束两类。分光光度计的基本类型是单光束分光光度计,它的光路中只有一束光线,根据使用的波长范围不同,分为可见光分光光度计和紫外/可见分光光度计,紫外/可见分光光度计的整个光路系统全部是由光学石英玻璃制成。

双光束分光光度计是由切光器把入射单色光分裂为两束,一束通过样品吸收池,另一束通过参比吸收池,这样它可以自动地扣除参比空白的影响,直接得到样品的吸光度 ΔA 或吸收光谱。双光束分光光度计是一种应用最为便捷的分光光度计,采用计算机自动控制及处理。

此外,分光光度计还有另一种类型,即二极管阵列快速扫描分光光度计,它的检测器由数百个光电二极管组成阵列,同时检测不同波长上的吸光度。所以它的扫描速度极快,从紫外到近红外(190~1 000 nm)的全波长扫描,仅需时 0.15 s。

当样品中含有两种吸收光谱互相重叠的成分时,采用单波长分光光度计单独测量待测成分的吸光度将遇到很大的困难。双波长分光光度计是让两束不同波长的单色光经切光器分别交替通过同一样品吸收池,而直接读出在这两个波长的吸光度差 ΔA 的仪器,它可以方便地由

ΔA 值求出样品中被测组分的含量。选择适当的波长,可以在有干扰组分的存在下,不经分离而测出被测组分的含量。

二、分光光度计的基本组件

虽然分光光度计的类型很多,但无论哪一类型的分光光度计,都有下列 5 个基本部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池,检测及显示系统。

(一)光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320 ~ 2 000 nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360 ~ 1 000 nm,稳定性好,用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150 ~ 400 nm 的紫外线,可用作紫外光区分光光度计的光源。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处,一般作波长校正用。

钨灯和卤钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,更换后需要仔细调节灯座的位置和焦距,氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴上手套以防留下污迹。

(二)分光系统(单色器)

单色器是指能从混合光波中分解出所需波长光线的装置,有棱镜及光栅两种类型。

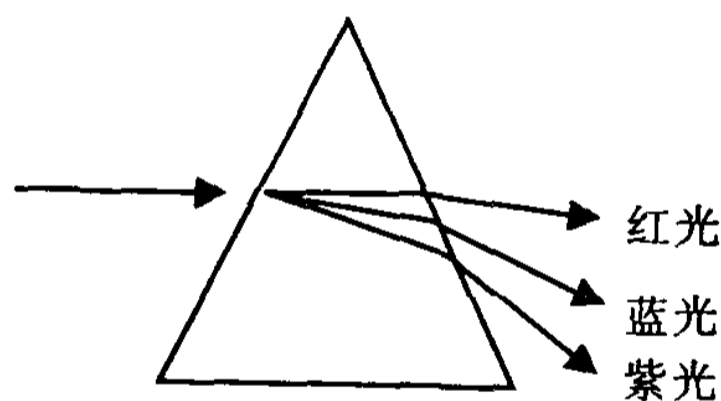


图 1-3 棱镜分光器

用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185 ~ 4 000 nm,在紫外光区有较好的分辨率,而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度是不均匀的,在紫外区可达到 0.2 nm,而在长波段只能达到 5 nm。

另一类分光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线(1 000 ~ 2 400 线/mm),刻线处不透光,通过光的干涉和衍射现象,较长的光波偏折的角度大,较短的光波偏折的角度小而形成光谱。光栅与棱镜不同,它的色散能力在不同的波长区域都是一致的。所以采用光栅的分光光度计,其波长刻度是均匀的,适宜用微机控制,自动设置分析波长或进行波长扫描。

(三)狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨率。狭缝宽时,允许通过光线的带宽大,则光能强但纯度较差,反之则单色性好而强