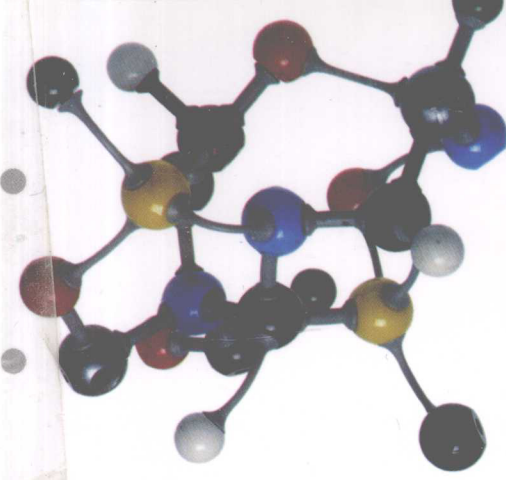
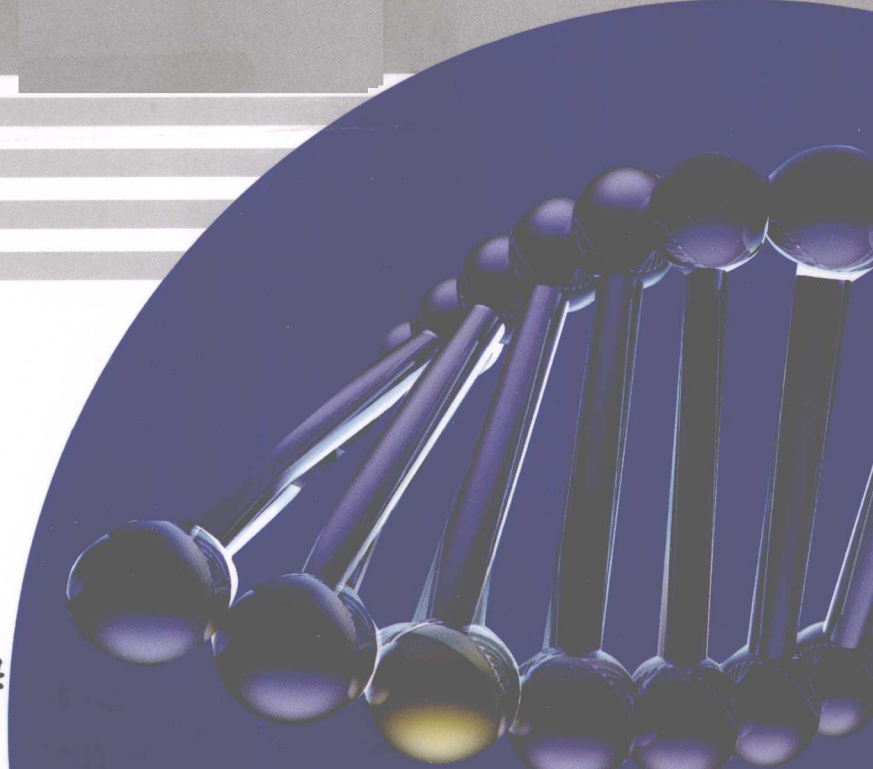




全国高等学校实验教材
供基础、临床、预防、口腔、麻醉医学类专业用

主编◎王小柯 王守训 陈 永

生物化学与分子生物学 实验指导



 军事医学科学出版社



教育部高等学校生物化学与分子生物学教学指导委员会
《生物化学与分子生物学》课程教学指导委员会

主编：王喜军 副主编：王学军 王学军

生物化学与分子生物学 实验指南

清华大学出版社

生物化学与分子生物学实验指导

主 编 王小柯 王守训 陈 永

副 主 编 黄焕生 杨晓云 付新华

参加编写人员 (按姓氏笔画为序)

马 娟 王 平 王小柯

王守训 孔 登 付新华

刘长江 孙凤祥 孙洪亮

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内容提要

本书分生物化学与分子生物学实验基本技术、生物化学与分子生物学实验和附录3个部分。实验基本技术部分着重介绍分光光度分析技术、层析技术、电泳技术、DNA体外重组技术、分子杂交技术和PCR技术等生物化学与分子生物学常用的实验技术。实验部分共选编43个实验,分为蛋白质和分离、纯化与鉴定,酶学,物质代谢,临床生化检验和分子生物学实验5章。其中既保留了一些对加强学生基本实验方法和技能训练行之有效的传统实验,也引入了一些新近发展起来的实验技术。这些实验均经过历年来教学实践和科学研究工作反复验证,比较成熟。

本书以医学院校相关专业的本专科生为对象,可作为其生物化学与分子生物学实验课教材,也可供其他生物化学与分子生物学实验技术工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/王小柯,王守训,陈永主编.

-北京:军事医学科学出版社,2010.8

ISBN 978-7-80245-541-2

I. ①生… II. ①王… ②王… ③陈… 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. ①Q5-33 ②Q7-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第156337号

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路27号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049,63827166

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038

传真:(010)63801284

网址:<http://www.mmsp.cn>

印装:北京市顺义兴华印刷厂

发行:新华书店

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:11.25

字数:273千字

版次:2010年9月第1版

印次:2010年9月第1次

定价:20.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言 Preface

生命科学在 20 世纪有了惊人的发展,生物化学是其中最活跃的分支学科之一,其理论和技术的进步深刻地影响着人类认识生命的进程。今天,生物化学与分子生物学的理论和技术已成为生命科学各学科和生物工程技术的“共同语言”,广泛应用于工业、农业、医药卫生和环境科学领域,因此,本课程也成为高等医学院校学生重要的必修课程之一。开设生物化学与分子生物学实验课的目的,是为了使学生在掌握本学科基本理论的基础上,掌握必要的实验技术技能,更加系统和深入地理解本课程的任务、目的、内涵和学科地位,提高实践能力、创新能力和分析问题、解决问题的能力,为今后进一步学习和工作打好基础。

自 1982 年,潍坊医学院生物化学与分子生物学教研室曾先后 5 次编写和修订《生物化学实验指导》,在总结使用经验的基础上,每次编写都融入新的内容,力图体现学科的发展。鉴于现在使用的第 7 版《生物化学》教材内容调整和大量增加的分子生物学知识这一特点,编者本着继承与创新相结合的精神,吸取了前几版书的精华,并参考其他生物化学实验教科书,在内容上做了较大调整,增加了部分生物化学基本实验和分子生物学实验的原理与方法,以与理论课程衔接;同时,依据“模块化、系统化”的课程改革思路,对书的知识结构进行了较大的修改。全书分为生物化学与分子生物学实验基本技术、生物化学与分子生物学实验和附录 3 个部分,供临床各专业和生物技术专业及其他相关专业的本、专科学生使用。

本书是经过集体讨论后分工负责编写的,潍坊医学院生物化学与分子生物学教研室的全体教师参加了本书的编写。本书的出版是集体劳动的成果。

诚挚地欢迎使用本书的教师、实验技术人员、学生及其他读者提出批评并给予指正。

编者

2010 年 6 月

实验室规则

1. 实验前必须认真预习实验内容,明确本次实验的目的和要求,掌握实验原理,了解实验过程。
2. 实验时应自觉遵守实验室纪律,不迟到早退。保持室内安静,不做与实验无关的事情。
3. 实验中认真按照实验步骤和操作规程进行,听从教师指导,若想改进和设计新的实验方法,应取得教师同意。实验时认真进行实验记录,实验完毕后应及时整理数据,按时上交实验报告。
4. 实验台面、试剂架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐,药品用完后立即盖好瓶盖放回原处,切勿使药品洒落在实验台面上。
5. 所用实验材料要注意节省,多余的重要试剂和各种有机试剂要按教师要求进行回收,昂贵的 Sephadex、Sephadex 凝胶和 DEAE 纤维素等,用后必须及时回收,不得丢弃。
6. 实验完毕必须及时洗净并放好各种仪器设备,保持实验台面和实验柜内的整洁。
7. 使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。使用高速冷冻离心机、培养箱、PCR 仪等贵重仪器必须在教师指导下进行。仪器发生故障应立即报告教师,不得自行检修。
8. 要严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。
9. 每次实验完毕,值日生要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员,必须检查并关好水、电、门、窗、火。

目 录

Contents

第一篇 生物化学与分子生物学实验基本技术

第一章 常用玻璃仪器的清洁与校正	(1)
第一节 常用玻璃仪器的名称和主要用途	(1)
第二节 常用玻璃仪器的清洁与校正	(2)
第二章 分光光度分析技术	(7)
第一节 紫外-可见分光光度分析技术	(7)
第二节 荧光分光光度分析技术	(12)
第三章 层析技术	(15)
第一节 概述	(15)
第二节 几种常用的层析方法	(16)
第四章 电泳技术	(23)
第一节 电泳技术的原理与分类	(23)
第二节 几种常用的电泳技术	(25)
第五章 离心技术	(31)
第一节 离心技术的基本原理	(31)
第二节 常用的离心分离方法	(35)
第六章 DNA 体外重组技术	(38)
第七章 分子杂交基本原理	(47)
第一节 核酸分子探针技术	(47)
第二节 几种常见的杂交	(48)

第八章 基因文库技术	(52)
第一节 基因组文库	(52)
第二节 cDNA 文库	(54)
第九章 聚合酶链式反应(PCR 技术)	(57)
第一节 聚合酶链式反应的原理	(57)
第二节 PCR 反应的成分和作用	(57)
第三节 PCR 反应引物的设计	(59)
第四节 几种特殊的 PCR	(60)
第五节 PCR 技术的应用	(61)
第十章 DNA 序列分析	(63)
第十一章 分子标记技术	(66)

第二篇 生物化学与分子生物学实验

第一章 蛋白质的分离、纯化与鉴定	(70)
实验一 血清 γ -球蛋白的分离与纯化	(70)
实验二 蛋白质的鉴定——电泳法	(73)
实验三 凝胶层析分离蛋白质(血红蛋白与胰蛋白酶的分离)	(78)
实验四 DEAE 纤维素离子交换层析法分离蛋白质	(79)
实验五 血浆脂蛋白的超速离心分离	(81)
实验六 碱性磷酸酶的分离与纯化	(82)
实验七 蛋白质的定量测定	(86)
第二章 酶学	(90)
实验八 温度对酶活性的影响	(90)
实验九 pH 对酶活性的影响	(91)
实验十 激活剂和抑制剂对酶活性的影响	(93)
实验十一 酶的竞争性抑制作用	(94)
实验十二 碱性磷酸酶米氏常数(K_m)测定	(96)
实验十三 磷酸盐对碱性磷酸酶的抑制作用	(100)
实验十四 乳酸脱氢酶活性测定	(102)
实验十五 乳酸脱氢酶同工酶分析	(104)
第三章 物质代谢	(106)
实验十六 血糖测定——Folin-吴宪氏法	(106)

实验十七	胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	(108)
实验十八	运动对尿中乳酸含量的影响	(109)
实验十九	饱食、饥饿对动物肝糖原含量的影响	(110)
实验二十	血清胆固醇测定	(111)
实验二十一	酮体的生成和利用	(115)
实验二十二	肝脏中酮体生成作用	(117)
实验二十三	血浆脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(119)
实验二十四	血清过氧化物(LPO)测定——荧光法	(121)
实验二十五	血清谷丙转氨酶的测定	(122)
实验二十六	纸层析法鉴定转氨酶的转氨基作用	(124)
实验二十七	尿酸含量测定	(126)
第四章	临床生化检验	(128)
实验二十八	血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	(128)
实验二十九	血清甘油三酯测定(乙酰丙酮显色法)	(130)
实验三十	血清游离脂肪酸测定(一次提取比色法)	(132)
实验三十一	血液尿素氮(BUN)的测定——二乙酰-脲显色法	(135)
实验三十二	血清碱性磷酸酶(ALP)测定	(137)
实验三十三	血清单胺氧化酶(MAO)测定	(139)
实验三十四	血清肌酸激酶测定(肌酸显色法)	(141)
实验三十五	尿中酮体定性——Lange 法	(144)
实验三十六	血氨测定(碱性酚次氯酸盐法)	(145)
实验三十七	血清钙测定	(147)
实验三十八	血清无机磷测定	(148)
第五章	分子生物学实验	(151)
实验三十九	RNA 的提取与鉴定	(151)
实验四十	DNA 的提取与鉴定	(154)
实验四十一	质粒 DNA 的提取及酶切	(156)
实验四十二	目的 DNA 片段的回收	(158)
实验四十三	PCR 基因扩增	(159)
附录		(162)

第一篇

生物化学与分子生物学实验基本技术

第一章 常用玻璃仪器的清洁与校正

第一节 常用玻璃仪器的名称和主要用途

实验用玻璃仪器分为容器类和量器类。容器类玻璃仪器为常温或加热条件下物质的反应容器和贮存容器,包括试管、烧杯、锥形瓶、滴瓶、漏斗等。量器类玻璃仪器用于计量溶液体积,不可用作实验容器,包括量筒、移液管、吸量管、容量瓶、滴定管等(表 1-1-1)。

表 1-1-1 常用玻璃仪器名称和主要用途

名 称	主要用途	使用注意事项
烧杯	溶解样品、配制试剂等	加热时应置于石棉网上,使其受热均匀,一般不可烧干
锥形瓶	加热处理试样和容量分析滴定	加热时应置于石棉网上,磨口锥形瓶加热时要打开塞,非标准磨口要保持原配塞
量筒、量杯	粗略地量取一定体积的液体用	不能加热,不能在其中配制溶液,不能在烘箱中烘烤,操作时要沿壁加入或倒出溶液
微量滴定管 (1,2,3,4,5,10 ml)	微量或半微量分析滴定操作	只有活塞式;不能加热,烘烤,不能在其中配制溶液
移液管	准确地移取一定量的液体	不能加热;上端和尖端不可磕破
刻度吸管	准确地移取各种不同量的液体	不能加热;上端和尖端不可磕破

续表

名 称	主要用途	使用注意事项
试剂瓶(细口瓶、广口瓶、棕色瓶)	细口瓶用于存放液体试剂;广口瓶用于装固体试剂;棕色瓶用于存放见光易分解的试剂	不能加热;不能在瓶内配制在操作过程放出大量热量的溶液;磨口塞要保持原配;放碱液的瓶子应使用橡皮塞,以免日久打不开
滴瓶	装需滴加的试剂	不能加热;不能在瓶内配制在操作过程中放出大量热量的溶液;磨口塞要保持原配;放碱液的瓶子应使用橡皮塞,以免日久打不开
漏斗	长颈漏斗用于定量分析,过滤沉淀;短颈漏斗用作一般过滤	
分液漏斗(滴液、球形、梨形、筒形)	分开两种互不相溶的液体;用于萃取分离和富集(多用梨形);制备反应中加液体(多用球形及滴液漏斗)	磨口旋塞必须原配;漏水的漏斗不能使用
试管(普通试管、离心试管)	定性分析检验离子;离心试管可在离心机中借离心作用分离溶液和沉淀	硬质玻璃制的试管可直接在火焰上加热,但不能聚冷;离心管只能水浴加热
(纳氏)比色管	比色、比浊分析	不可直接在火上加热;非标准磨口塞必须原配;注意保持管壁透明,不可用去污粉刷洗
抽滤瓶	抽滤时接受滤液	属于厚壁容器,能耐负压;不可加热
研钵	研磨固体试剂及试样等用;不能研磨与玻璃作用的物质	不能撞击;不能烘烤
干燥器	保持烘干或灼烧过的物质的干燥;也可干燥少量制备的产品	底部放变色硅胶或其他干燥剂,盖磨口处涂适量凡士林;不可将红热的物体放入,放入热的物体后要时开盖以免盖子跳起或冷却后打不开盖子
垂熔玻璃漏斗	过滤	必须抽滤;不能聚冷聚热;不能过滤氢氟酸、碱等;用毕立即洗净

第二节 常用玻璃仪器的清洁与校正

一、常用玻璃仪器的清洁

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否直接影响到实验结果。如果仪器不清洁或被污染将会造成较大的实验误差,甚至会出现相反的实验结果。因此,玻璃仪器的洗涤清洁是一项非常重要的工作。

1. 初用玻璃仪器的清洗:新购玻璃仪器表面常附有油污和灰尘以及金属离子,可用肥皂

2 ...

水(或洗衣粉)刷洗,自来水冲净后,浸泡于1%~2%盐酸溶液中过夜(一般不少于4小时)。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次冲洗后,干燥备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗:一般先用水冲洗,再根据情况选用适当的洗液浸泡数小时后进行洗刷,最后用蒸馏水冲洗干净。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(或洗衣粉)刷洗或浸泡在洗涤剂中超声清洗(比色皿决不可超声),然后再用流水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗3次后干燥备用。清洗标准是玻璃仪器洗净后,以倒置后内壁不挂有水珠为清洁标准。

容量分析仪器如吸量管、滴定管、容量瓶等,使用后应立即浸泡于水中,勿使物质干涸;再用流水冲洗,除去附着的试剂、蛋白质等物质。然后浸泡在铬酸或其他合适洗液中数小时(过夜),再用自来水充分冲洗,最后蒸馏水冲洗3次,干燥备用。

具有传染性标本的容器如病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器,应浸泡在杀菌剂中过夜,进行消毒后再清洗。

3. 凡带油污的玻璃器皿应单独洗涤,可用3%磷酸三钠液浸泡2~4小时,然后再用流水冲洗。如仍见有油斑,可更换新鲜洗液再浸泡一次,最后在流水中冲净。

4. 凡被染色液沾染的玻璃仪器器皿,用清水不能洗脱时,可用3%的盐酸乙醇擦洗,然后再用流水冲净。

清洁标准:洗涤仪器时,应注意按照少量多次的原则,尽量地将仪器洗涤干净;洗涤干净的仪器内外壁上不应附着不溶物、油污,仪器可被水完全湿润,将仪器倒置水即沿器壁流下,器壁上留下一层既薄又均匀的水膜,不挂水珠。

在实验中应根据实际情况和实验内容来决定洗涤程度。如在进行定量实验中,由于杂质的引进会影响实验的准确性,因此对仪器的洁净程度要求较高。对于一般的无机制备实验或者定性实验等,对仪器的洁净程度的要求相对较低,只要洗刷干净,用不着要求不挂水珠,也没有必要用蒸馏水洗涤。

二、常用玻璃仪器的使用与校正

1. 常用玻璃量器的规格 玻璃量器有一定的技术标准,在出厂前需经国家计量机关检验认可,印上鉴定标记。有些容量仪器还印有“一等”或“二等”(或“I”、“II”)等字样。

玻璃计量仪器都以毫升为计量单位,在量器上用“ml”标出。另外,计量鉴定条件以20℃为标准,故在容器上都有“20℃”字样。

此外,实验室常用玻璃器具的计量还分为量入式和量出式两种。量入式是以测量溶液注入容器的数量进行计量,并在容器上“20℃”标记的左侧标以“入”或“TC”、“E”、“B”等字样,其定量标记方式一般是由下往上递增;量出式是以被测量溶液倾出容器的数量进行计量,并在容器上“20℃”标记的右侧标以“出”或“TD”、“A”的字样,其定量标记方式一般是自上而下递增(近年来的产品已不再严格区分,大都是由下向上递增的分度标量)。通常量出式的计量容器(如移液吸管)使用时吸管尖残留液不得吹下;量入式的吸管则必须将管尖残留试液吹出。因而在有些这类的吸管上,还标有“吹”的字样。

2. 玻璃量器的使用

(1) 吸量管的使用:吸量管使用前应洗净,自然沥干。使用时若吸管不干燥应用待量取的溶液少许冲洗3次。吸取溶液时以右手拇指及中指捏住管颈标线以上的地方,将管插入溶液

中。左手用洗耳球慢慢将溶液吸入管内。当液面上升到刻度以上时,迅速用右手的食指按住管口,将吸管末端提出液面,靠在盛溶液器皿的内壁上,略为放松食指,使液面平稳下降,直到溶液的弯月面与标线相切时,立即用食指压紧管口,使液体不再流出。取出移液管(吸量管),以干净滤纸片擦去移液管(吸量管)末端外部的溶液,然后插入接受溶液的器皿中,末端靠在容器内壁上,此时移液管(吸量管)应垂直,与承接的器皿约呈 15 ° 夹角。松开食指,让管内溶液自然流下。遗留在管尖的溶液及停留时间要根据吸管的种类进行不同的处理。注意:在一次完成移液的前提下,应选用容积较小的吸量管,对于同一次实验中同一种试剂的移取,应选用同一支吸量管;量取时,最好选用略大于量取量的刻度吸管,这样溶液可以不放至尖端,而是放到一定的刻度(读数的方法与移液管相同)。

(2) 容量瓶:是一种细颈梨形的平底瓶,瓶颈上有环形标线,表示在所指温度下(一般为 20 ° C)液体充满至标线时的容积。常用的容量瓶有 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 000 ml 等规格。容量瓶是准确度很高的容量仪器,主要用于把精密称量的物质配制成准确浓度的溶液或是将准确容积及浓度的浓溶液稀释成准确浓度及容积的稀溶液。用容量瓶配制溶液时,须先将称量好的固体物质在烧杯中用少量溶剂溶解后再转入容量瓶中,烧杯用溶剂涮洗 3 次一并转入,然后加溶剂至凹面与刻度相切(视线、液面与标线处于同一水平面),加塞后反复摇动,使溶液充分混匀。

(3) 量筒:量筒的精度低于量瓶,用于配制和测量要求不太精确的液体。量筒不能用作反应容器,不能装过热的液体,不能加热,以防破裂。量筒有容量大小不等的各种规格,使用时应选用大小适宜的量筒,以减小误差。例如量取 7 ml 液体时,应选用 10 ml 量筒(测量误差为 ± 0.1 ml);如果选用 100 ml 量筒量取 7 ml 液体体积,则至少有 ± 1 ml 的误差。读取量筒的刻度值,一定要使视线与量筒内液面(半月形弯曲面)的最低点处于同一水平线上,否则会增大体积的测量误差。

3. 常用玻璃量器的校正 有些玻璃容器的标示值不完全符合它的真实容积,往往存在一定的误差,给分析结果带来一定的影响。因此,对容量仪器必须进行校正,以提高分析结果的准确度。校正方法一般采用重量法。

容积的基本单位是升(L)。升是指在真空中以水密度为最大值(温度 3.98 ° C)时 1 000 g 水所占的体积。实际上我们的测量工作不可能在真空中和在 3.98 ° C 时进行,通常以 20 ° C 为测定温度。因此,在校正容器时,将在任一温度下的水重换算成 20 ° C 时的容积。

校正量器的方法通常采用称量法:先称取该容器中容纳蒸馏水的重量,然后将称得的水重换算成容积,其计算公式为:

$$V_{20} = \frac{W_t}{r} \quad (1-1-1)$$

V_{20} :在 20 ° C 时水的体积; W_t :在空气中 T ° C 时称得的水重; r :表示不同温度下容积为 1 ml 的玻璃容器中充满 20 ° C 水在空气中用黄铜砝码称得的重量。

表 1-1-2 列出了水在 10 ~ 40 ° C 时的 r 值。

表 1-1-2 1 ml 水在 10~40℃ 间的 r 值

$T(^{\circ}\text{C})$	$r(\text{mg})$	$T(^{\circ}\text{C})$	$r(\text{mg})$
10	998.41	26	995.91
11	998.34	27	995.66
12	998.26	28	995.41
13	998.17	29	995.15
14	998.06	30	994.88
15	997.94	31	994.60
16	997.81	32	994.31
17	997.67	33	994.01
18	997.51	34	993.71
19	997.35	35	993.40
20	997.15	36	993.07
21	996.99	37	992.74
22	996.79	38	992.41
23	996.59	39	992.06
24	996.37	40	991.71
25	996.14		

例如:容器为 1 L 的量瓶在 21℃ 校正时,称得水重为 998.06 g,从表中查得 21℃ 时 r 值为 996.99,则该量瓶在 21℃ 时的真实容量为 $V = \frac{998.06}{996.99} = 1.001\ 07\ \text{L}$ 。

校正值为 $1\ 001.07 - 1\ 000 = +1.07\ \text{ml}$ 。

鉴于量器本身有一定的允许误差,只有当误差超过它的允许范围时,才用校正值予以修正。

三、加样器的使用与校正

加样器主要用于多次重复的快速定量移液,可单手操作,十分方便。

1. 加样器的分类

取液器可分为两种:一种是固定容量的,常用的有 10 μl , 20 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1 000 μl 等多种规格。另一种是可调容量的取液器,常用的有 0.5~10 μl , 10~40 μl , 20~200 μl , 100~500 μl , 200~1 000 μl 等不同规格。

加样器下段为可装卸、可更换的吸头,用加样器上方的“按钮”定量采取液体(图 1-1-1)。每种取液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头,吸头通常是一次性使用,当然也可以超声清洗后重复使用,而且此种吸头还可以进行 120℃ 高压灭菌。

2. 加样器的使用

(1) 选择一支量程合适的加样器,设定容量值。有些加样器通过旋转按钮设置容量,有些则通过刻度显示。若由低值旋转至高值,则需先超越设定值至少三分之一后再反转至设定值;若由高至低,则直接旋转至设定值即可。

(2) 选择合适的吸头装在加样器套筒上,稍加扭转压紧,使吸头套紧。

(3) 吸液时,四指并拢握住加样器上部,用拇指按住柱塞杆顶端的按钮至第一停点,将加样器垂直浸入液面 2~3 mm,然后缓慢平稳地松开拇指,慢慢吸入液体(图 1-1-2)。停留 1~

2 秒(黏性大的溶液可加长停留时间),然后将吸头提离液面。用吸纸抹去吸嘴外面可能黏附的液滴。小心,勿触及吸头口。

(4)放液时,将吸头口贴到容器内壁并保持 $10^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 倾斜,平稳地把按钮压到第一停点,停 1~2 秒(黏性大的溶液可加长停留时间),继续按压到第二停点,排出残余液体。松开按钮,同时提起加样器。按吸头弹射器除去吸头(改用不同样本液体时必须更换吸头)。

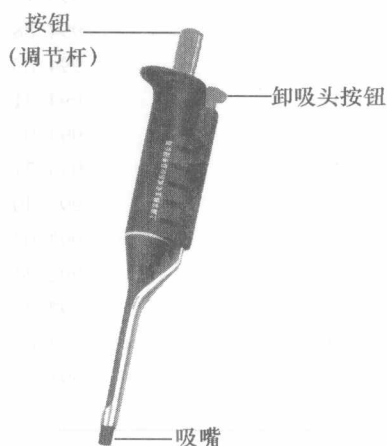


图 1-1-1 可调式移液器的结构



图 1-1-2 持移液器的姿势

3. 加样器的校正 每年至少应检验校正 2~3 次。常用的方法有高铁氰化钾法、双蒸水称重法、水银称重法等。以水称量法为例:校正时要求室温 20°C ,按正规操作吸取蒸馏水,并称其蒸馏水重量,同样记下蒸馏水重量及水温。计算出容积及校正值,如果相对百分误差大于 $\pm 2\%$ 时,应进行调整。调整后,必须再进行检测,直至加样器能正确给出调整的容积。

4. 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,以防将溶液吸入过快而冲入取液器内腐蚀柱塞而造成漏气。

(2)加样时,加样器吸头只能以垂直方式浸入 2~3 mm,因为倾斜的方式将减少液体柱的高度,导致吸取液体过多。

(3)当加样器中有溶液时,不得倒放,必须垂直放置,否则久后失准。

(4)发现吸液时有气泡,将液体排回原容器;检查吸头浸入液体是否太深;换个吸头重新吸取样本。

参考文献

- [1] 李妙葵,贾瑜,高翔,等. 大学有机化学实验[M]. 上海:复旦大学出版社,2006.
- [2] 章正瑛. 生物化学实验指导[M]. 上海:上海第二军医大学出版社,2007.
- [3] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004.

(蔡文娣 马 娟)

第二章 分光光度分析技术

第一节 紫外-可见分光光度分析技术

一、概述

紫外-可见分光光度法是生物化学实验中最常用的定量分析方法,它具有快速、灵敏、准确和选择性强等诸多优点而被广泛应用于科学实验研究和教学实验学习中。

由于蛋白质中的酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸,以及核酸中的嘌呤、嘧啶等杂环结构对紫外线有较强的吸收,因此,紫外吸收法常用于蛋白质和核酸的直接定量分析。可见分光光度法主要用于比色分析。比色分析是指通过比较待测溶液的颜色深浅来计算并确定该种有色液体的物质浓度。有些物质可通过自身的颜色直接进行比色分析,而无色物质则可先通过显色反应,将无色物质转变为有色物质,再进行测定。

二、物质对光的选择性吸收

(一) 光的基本性质

分光光度法的基本依据是物质对光的选择性吸收。因此,分光分析首先要了解光的基本性质。光是一种电磁波,具有波动性和微粒性两种属性。而阐述光的波动性的重要参数是:波长(λ)、频率(γ)和光速(C),其关系式是: $C = \lambda \cdot \gamma$ 。根据波长,光学光谱可分为紫外区(10~400 nm)和可见区(400~780 nm)。具有同一波长的光称为单色光,而有不同的波长组成的光称为复合光。

光的微粒性是指光可被看作是带有能量的微粒流,这种微粒也称为光子或光量子,单个光子的能量(E)决定了光的频率或波长,它的关系式是:

$$E = h \frac{C}{\lambda} \quad (1-2-1)$$

关系式中 h 为普朗克常数。

(二) 物质对光的选择性吸收的原理

当光束照射到某一物质上时,光量子与物质发生相互作用,表现为物质对光的反射、散射、吸收或透射(图 1-2-1)。如果被照射的是均匀的溶液,那么光的散射可以忽略不记。

当一束光照射到某一物质时,组成该物质的分子、原子或离子便与光子发生碰撞,并接受光子的能量,而物质的原子电子便由最低能态(基态)跃迁到较高能态(激发态),这种现象就称为物质对光的吸收。被激发的粒子约在 10^{-8} 秒后又回到基态,在此过程中通过热能或光谱(荧光)的形式释放出能量。只有光子的能量与被照射的粒子的基态和激发态能量之差相当

时,才能发生吸收。由于不同物质的微粒结构不同,其能量差值也不相同,所以物质对不同波长的光的吸收具有选择性。将不同波长的光透过某一固定浓度的溶液去测定每一波长下的吸光度,以吸光度对波长作图,即可得一吸收曲线(吸收光谱)。物质不同,其吸收曲线的形状和最大吸收波长也不相同。据此特性,可对物质进行初步定性分析,以及选择最佳和最适当的波长(图 1-2-2)。

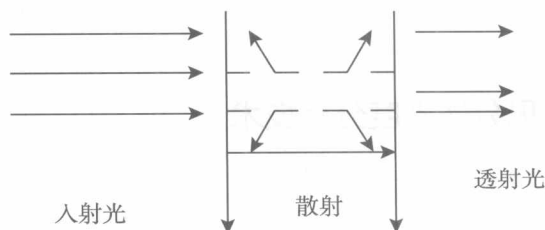


图 1-2-1 溶液对光的作用

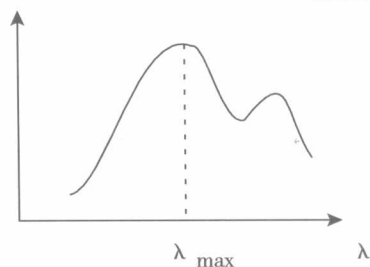


图 1-2-2 吸收曲线

三、分光光度法的原理

分光光度法常被用来测定溶液中存在的光吸收物质的浓度,其基本原理是根据 Lambert 和 Beer 定律。

(一) Lambert 定律

当一束单色光通过透明溶液时,如果溶液的浓度一定,则光的吸收程度与液层厚度成正比。用下式表示:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = K_1 b \quad (1-2-2)$$

式中: A 为吸光度, I_0 为入射光强度, I 为透射光强度, b 为液层厚度, K_1 为比例常数。

在吸光度的测量中,有时也用透光度 T 或百分透光度 $\%T$ 来表述物质对光的吸收程度并进行计算。透光度 T 是透射光强度 I 与入射光强度 I_0 之比,即 $T = I/I_0$ 。因此, $A = \lg I_0/I = -\lg T$ 。

(二) Beer 定律

光的吸收程度和其所遇到的吸光物质的数量有关,即一束单色光通过透明溶液时,如果液层厚度一定,则吸光度与吸光物质的浓度成正比。用下式表示:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = K_2 C \quad (1-2-3)$$

式中: C 为溶液的浓度, K_2 为比例常数。

(三) Lambert-Beer 定律与其适用范围

将上述两式合并后即为朗伯-比耳(Lambert-Beer)定律。其意义是:当一束单色光通过均匀的有色溶液时,溶液的吸光度与溶液浓度和液层厚度的乘积成正比。用下式表示:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = abc \quad D = -\lg \frac{I}{I_0} = KCL \quad (1-2-4)$$

式中: a 为比例常数,也称为吸光系数。