

生物化学实验教程

黄如彬 丁昌玉 林厚怡 主编

世界图书出版公司

-33

RB

高等医药院校教材

供医学、儿科、口腔、卫生、药学、检验专业用

生物化学实验教程

主 编

黄如彬 苏善玉 林厚恒

(首都医科大学) (蚌埠医学院) (南京医科大学)

编 委

李学礼 (上海铁道医学院)

陈 瑞 (首都医科大学)

赵鼎吕 (扬州大学医学院)

黄钦田 (南京医科大学)

黄诒森 (镇江医学院)

蒋 滢 (苏州医学院)

蒋秉坤 (蚌埠医学院)

世界图书出版公司

1995

内 容 简 介

本书是魏勇主编的《医学生物化学》一书的配套教材，是按卫生部有关医学生物化学基本技能训练精神编写的。内容以训练学生熟悉和掌握基本实验技术和方法为主，同时也介绍一些临床上较为重要、有代表性的检测方法。

全书共8章46个实验，包括生化实际基本操作、样品制备、分光光度法、层析法、电泳法、离心分离、酶学实验及临床生化实验等。可供五六年制医学、儿科、口腔、卫生、药学及检验等专业学生使用，也可供培训生化师资使用。

生物化学实验教程

黄如彬 丁昌玉 林厚怡 编

责任编辑 西世良

世界图书出版公司北京公司出版

北京朝阳门内大街137号

邮政编码：100010

北京昌平百善印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1995年5月第一版 开本：787×1092 1/16

1995年5月第一次印刷 印张：9

印数：0001-1000 字数：20.8万字

ISBN 7-5062-2122-5/O · 169

定价：13.80元

前 言

本实验教程是魏勇主编的《医学生物化学》一书的配套教材，是按卫生部有关医学生生物化学基本技能训练精神编写的。可供医学、儿科、口腔、卫生、药学和检验等专业学生使用，也可供研究生作基本技术训练用。

生物化学是一门重要的实验性基础医学课程。生物化学实验技术和方法的迅速发展，为生命科学，特别是分子生物学的研究创造了必要条件。显然，生化实验是生物化学教学的重要组成部分。它与理论教学既有联系，又是一个相对独立的组成部分，有其自身的规律和系统。使学生对生化实验有一个比较系统和完整的概念，有利于基本技能的训练和科学思维的形成，并提高学生的动手能力。

本书内容包括：基本操作、分光光度法、电泳法、层析法、酶学实验及临床生化等8章。首先对各项技术的基本理论作简明扼要的介绍，然后再安排有关实验，包括有代表性的临床检测方法，以使学生对临床应用的生化实验有个初步了解。

由于我们的水平有限，在编写本教程时，疏漏或错误之处在所难免，希望通过师生的实践，提出修改意见，以使这本生化实验教程进一步完善和提高。

本书在编写过程中得到江苏省生化协会和各院校领导的大力支持和指导。首都医科大学的潘颖、史小玲、张小东和韩淑杰等同志在校稿绘图方面作了大量工作，在此一并致谢。

编者 1994. 6. 30

目 录

实验室规则	(1)
第1章 生化实验基本操作	(3)
1.1 玻璃仪器的洗涤与清洁	(3)
1.2 清洗液的原理与配制	(3)
1.3 吸量管的种类和使用	(4)
1.4 溶液的混匀	(6)
1.5 过滤	(6)
1.6 离心机的使用方法	(6)
第2章 实验样品的制备	(7)
2.1 血液样品	(7)
2.2 尿液样品	(7)
2.3 组织样品	(8)
第3章 分光光度法	(8)
3.1 分光光度法	(9)
3.2 分光光度法在生物化学中的应用	(10)
3.3 分光光度计的结构	(11)
实验1 紫外光度法测定蛋白质含量	(12)
实验2 改良 Lowry 氏法测定蛋白质含量	(13)
实验3 双缩脲 (Biuret) 法测定蛋白质含量	(14)
实验4 动物组织中基因 DNA 的提取	(15)
实验5 肝组织核酸的提取和鉴定	(18)
实验6 酵母细胞核酸的提取和组分鉴定	(21)
实验7 5'-腺苷酸酶活性测定	(24)
实验8 改良 Mohum 法测定血清谷-丙转氨酶活性	(27)
实验9 血清无机磷的定量测定	(28)
实验10 过氧化脂质测定	(30)
实验11 酵母利用无机磷的测定	(31)
第4章 层析法	(32)
4.1 分类	(33)
4.2 层析中的常用术语	(33)
4.3 纸层析	(35)
4.4 薄层层析	(36)
4.5 离子交换层析	(37)
4.6 凝胶层析	(38)
4.7 亲和层析	(40)

实验 12	血清脂类硅胶 G 薄层层析	(42)
实验 13	氨基酸的薄层层析	(44)
实验 14	氨基酸单向纸层析	(46)
实验 15	聚酰胺薄膜层析鉴定成人型血红蛋白 N-末端氨基酸	(47)
实验 16	葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱层析分离脲酶-胰岛素混合液	(50)
实验 17	葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱层析分离血红蛋白和 DNP-胰糜蛋白酶混合液	(52)
实验 18	血清 γ -球蛋白的分离纯化	(53)
实验 19	凝胶层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	(56)
实验 20	离子交换层析分离混合氨基酸	(58)
第 5 章	电泳法	(60)
5.1	电泳的基本原理	(60)
5.2	影响电泳的主要因素	(61)
5.3	区带电泳的分类	(62)
5.4	几种常见的电泳方法	(63)
实验 21	血清蛋白质乙酸纤维素薄膜电泳定量测定	(66)
实验 22	血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳——盘状电泳	(69)
实验 23	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(72)
实验 24	碱性磷酸酶 (AKP) 同工酶的分离与测定	(73)
实验 25	乳酸脱氢酶同工酶的分离与测定	(75)
实验 26	等电聚焦电泳分离血红蛋白	(77)
第 6 章	离心分离技术	(80)
6.1	原理	(80)
6.2	分类	(80)
实验 27	细胞核分离和核酸、蛋白质含量测定	(82)
第 7 章	蛋白质、酶、核酸	(87)
实验 28	蛋白质的沉淀反应	(87)
实验 29	酪蛋白等电点的测定	(89)
实验 30	凯氏微量定氮法	(90)
实验 31	酪氨酸酶的催化作用	(92)
实验 32	影响酶促反应的因素	(93)
实验 33	琥珀酸脱氢酶的作用及其竞争性抑制	(96)
实验 34	蔗糖酶的专一性	(97)
实验 35	碱性磷酸酶的提取和比活性测定	(99)
实验 36	碱性磷酸酶米氏常数的测定	(102)
实验 37	过氧化氢酶 K_m 的测定	(106)
第 8 章	临床生化实验	(108)
实验 38	邻甲苯胺法测定血糖	(108)
实验 39	饥饿和饱食对肝糖原含量的影响	(109)

实验 40	胰岛素和肾上腺素对家兔血糖浓度的影响	(111)
实验 41	血清甘油三酯含量测定	(112)
实验 42	血清总胆固醇含量测定	(115)
实验 43	高密度脂蛋白中胆固醇含量的测定	(118)
实验 44	草酸盐-高锰酸钾滴定法测定血清钙	(120)
实验 45	二乙酰-脲显色法测定尿素氮	(121)
实验 46	食物中维生素 C 的提取和定量	(123)
附录		(125)
一、	待测溶液和选用滤光片的对应关系	(125)
二、	化学试剂纯度分级表	(125)
三、	实验室常用酸碱的比重和浓度	(126)
四、	不同温度时标准缓冲溶液的 pH 值	(126)
五、	缓冲溶液的配制	(126)
六、	离心机转速与离心力的换算	(131)
七、	元素原子量表	(132)
八、	硫酸铵饱和度常用表	(133)
九、	紫外吸收法测定蛋白质含量的校正因子	(135)

实 验 室 规 则

〔实验要求〕

1. 实验前必须预习实验指导和有关理论，明确实验目的、原理、预期的结果，操作关键步骤及注意事项。
2. 实验时要严肃认真专心进行操作，注意观察实验过程中出现的现象和结果，结果不良时，必须重做。
3. 实验中，应及时将实验结果如实记录下来，并请老师当场审核。根据实验结果进行科学分析，按时将实验报告交教师评阅。

〔仪器保管及清洁〕

1. 常用仪器在首次实验时，按仪器清单进行清点，并负责保管，若有缺损到实验准备室换领，实验中如有仪器破损必须登记，期末如数归还。
2. 实验后，必须把仪器洗净放入柜内，按次序放置好，以提高工作效率并防止破损。
3. 贵重仪器尤其要尽力爱护，非本次实验使用的仪器未经老师允许不得乱动。本次实验必须使用的仪器，在使用前要了解使用方法，严格遵守操作规程。
4. 公用仪器，如分光光度计、电动离心机等，每组同学使用时间不宜过长，以免妨碍工作。
5. 玻璃仪器清洗：一般玻璃仪器都应用洗衣粉或去污粉洗涤，铬酸洗液勿用于普通玻璃仪器之洗涤，用过的铬酸洗液须加以保存，直至变为绿色方可弃之，其舍弃法与浓硫酸液相同。蒸馏水使用应遵循少量多次原则。

〔试剂使用规则〕

1. 使用试剂前应仔细辨认标签，看清名称及浓度，是否为本实验所需要。
2. 取出试剂后，立即将瓶塞盖好，切勿盖错；放回原处；未用完的试剂不得倒回瓶内。
3. 取标准溶液时，应先将标准液倒入干净试管中，再用清洁吸管吸取标准液，以免污染瓶中的标准溶液。
4. 使用滴管时，滴管夹端朝下，切勿倒置勿使试剂流入橡皮帽内。
5. 使用有毒试剂及强酸强碱时，尽可能用量筒量取，若用吸管时只能用吸耳球吸取，切勿用嘴吸取，以免造成意外。

〔安全注意事项〕

1. 低沸点有机溶剂，如乙醚、石油醚、酒精等均系易燃物品，使用时应禁明火，远离火源，若须加热要用水浴加热，不可直接在火上加热。
2. 凡属发烟或产生有毒气体的化学实验，均应在通风柜内进行，以免对人体造成危害。
3. 若发生酸碱灼烧事故，先用大量自来水冲洗，酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和，碱灼烧者用饱和 H_3BO_3 溶液中和，氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。
4. 若发生起火事件，根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。
5. 离开实验室必须关好窗户，切断电源、水源，以确保安全。

〔废弃物处理〕

1. 所有固体废弃物如：用过的滤纸、碎屑沉淀物等必须倾弃于垃圾筒中。

2. 浓酸必须弃于小钵中，用水冲淡，然后倒入水槽中。
3. 实验完成后之沉淀或混合物含有可提取之贵重药品者不可随意舍弃，应交教师保存。

〔实验室清洁〕

1. 实验室必须经常保持清洁，不得随地吐痰，乱丢纸屑。
2. 实验后要清扫实验台面、地面。试剂瓶要码放整齐。
3. 下课时轮流由值日生打扫卫生，经老师检查，方能离开实验室。

首都医科大学 于培兰

第 1 章 生化实验基本操作

1.1 玻璃仪器的洗涤与清洁

生化实验常用各种玻璃仪器,其清洁程度将直接影响测量体积的可靠性和反应的准确性。因此,玻璃仪器的清洁不仅是实验前后的常规工作,而且是一项重要的基本技术。

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

玻璃仪器的清洗方法很多,需要根据实验的要求,以及污物性质选用不同的清洁方法。

1.1.1 新购仪器的清洗 新购仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有可游离的金属离子。因此,新购仪器需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸。用流水冲净后,再浸泡于 1%—2% HCl 溶液中过夜。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次冲洗后,干燥备用。

1.1.2 使用过的玻璃仪器的清洗

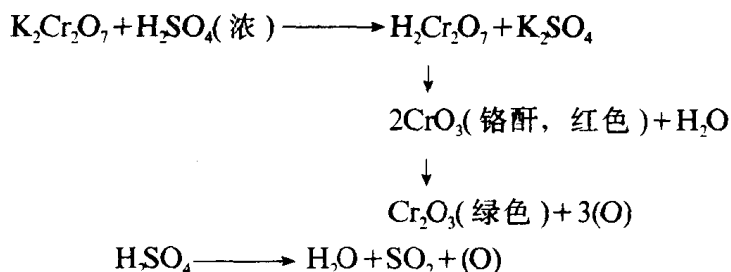
1.1.2.1 一般非计量玻璃仪器或粗容量仪器,如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 2—3 次后,倒置于清洁处晾干。

1.1.2.2 容量分析仪器,如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,沥干后,浸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。

1.1.2.3 比色杯,用毕立即用自来水反复冲洗,如有污物粘附于杯壁,宜用盐酸或适当溶剂清洗。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。

1.2 清洗液的原理与配制

1.2.1 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。

配制时有下列三种方法:

(1) 常用铬酸洗液,浓度为 3%—5%。配制方法如下:称取重铬酸钾 5g 置 250ml 烧杯

之中,加入热水 5ml 搅拌,为使其尽量溶解,在烧杯下放一石棉网,向烧杯中缓慢注入工业用浓硫酸 100ml,随加随搅拌,注意不要溅出来。因为放热较多, H_2SO_4 不宜加入过快。此时溶液由红黄色变为黑褐色。冷却后,装瓶备用。盖严以防吸水。

(2) 取 100ml 工业用浓硫酸置烧杯中,小心加热,然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉,边加边搅,待全部溶解后冷却,贮于具塞的细口瓶中。

(3) 取 80g 重铬酸钾溶于 1000ml 水中,慢慢加入工业用硫酸,边加边搅,冷却后,备用。

1.2.2 肥皂水和洗衣粉溶液 这是最常用的洗涤剂,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。

1.2.3 5% $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 碱性,可用于洗涤油污。所洗仪器不可用于磷的测定。

1.2.4 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA 二钠) 洗液 浓度为 5%—10% 的 EDTA 二钠洗液,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。

1.2.5 尿素洗液 45% 的尿素溶液是清洗血污和蛋白质的良好溶剂。

1.2.6 草酸洗液 称取 5—10g 草酸,溶于 100ml 水中,加入少量硫酸或浓盐酸,可洗脱高锰酸钾的痕迹。

1.2.7 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。

1.2.8 乙醇-硝酸混合液 用于清洗一般方法难于洗净的有机物。最适合于洗净滴定管。

1.3 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一,测定的准确度和吸量管的正确选择和使用有密切关系。

1.3.1 吸量管的分类 常用的吸量管可以分为三类:

(1) 奥氏吸量管 供准确量取 0.50、1.0、2.0、3.0ml 液体所用。此种吸量管只有一个刻度,当放出所量取的液体时,管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管 常用来量取 50.0、25.0、10.0、5.0、2.0、1.0ml 的液体,这种吸量管只有一个刻度,放液时,量取的液体自然流出后,管尖需在盛器内壁停留 15 秒钟。注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管 供量取 10ml 以下任意体积的溶液。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。

刻度吸量管的上方有一彩色标志环,此标志表示如下:

标准容量 (ml)	0.1	0.2	0.25	0.5	1	2	5	10	25	50
色 标	红	黑	白	红	黄	黑	红	桔红	白	黑
环 数	单	单	双	双	单	单	单	单	单	单

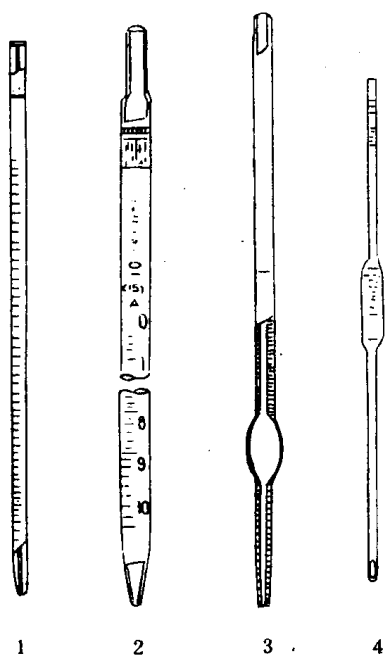
1.3.2 吸量管的使用

1.3.2.1 选用原则 量取整数量液体,并且取量要求准确时,应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液管。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 液

体，应选用 0.2ml 的刻度吸量管。

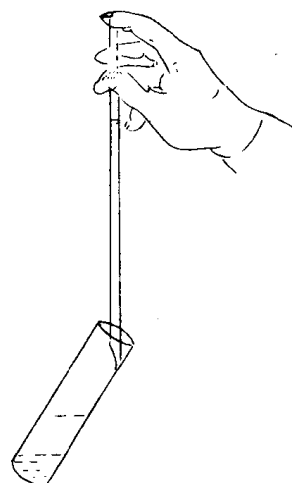
同一定量试验中，如欲加同种试剂于不同管中，并且取量不同时，应选择一支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30、0.50、0.70、0.90ml 时，应选用一支 1.0ml 刻度吸量管。

1.3.2.2 吸量管的使用



三类吸量管简图

1、2 刻度吸量管 3 奥氏吸量管 4 移液管



使用吸量管的姿势

正误 步骤	正确	错误
拿法	中指和姆指拿住吸管上端，食指顶住吸量管顶端	用姆指顶住吸量管顶端，其余四指拿住吸量管
取液	用橡皮球吸液体至刻度上，眼睛看着液面上升 吸完后用食指顶住吸量管上端，并用滤纸擦干其外壁	眼睛不看液面上升 不用滤纸擦或调刻度后再擦
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处 液体凹面、刻度和视线应在一水平面上	吸量管倾斜，悬空调刻度 液体凹面、刻度、视线不在一水平面上
放液	吸量管移入准备接受溶液的容器中，仍使其出口尖端接触器壁，并成一角度。吸量管仍保持垂直（见图2） 放开食指，使液体自动流出。奥氏吸量管和刻度到底的吸量管应吹出尖端残留的液体。移液管应最后靠壁15秒。不要吹	吸量管倾斜，其尖端不与容器壁接触并成一角度 过早吹，奥氏吸量管和刻度到底吸量管未吹出尖端液体

1.4 溶液的混匀

生化实验中，为保证化学反应的充分进行，加入试剂后，充分混匀，是保证试验成功的又一重要步骤。混匀方式大致有如下几种：

1.4.1 使试管作圆周运动 右手持试管上端，利用手腕的旋转，使试管作圆周运动。

1.4.2 指弹混匀 左手持试管上端，试管与地面垂直。右手手指呈切线方向轻拨试管下部，使管内液体呈旋涡状转动。

1.4.3 吸量管混匀 用吸量管将溶液反复吹吸数次，使溶液混匀。

1.4.4 玻棒搅动 本法适于烧杯内容物（如固体试剂）的混匀，在生化实验中很少应用。

1.4.5 电磁搅拌混匀

1.4.6 振荡器混匀

混匀操作时，应防止管内液体溅出，以免造成液体损失。同时严禁用手指堵住试管口混匀液体，防止污染和标样的损失。

1.5 过滤

用于收集滤液，收集沉淀或洗涤沉淀。在生化实验中如用于收集滤液应选用干滤纸，不应将滤纸先弄湿，湿滤纸将影响滤液的稀释比例。滤纸过滤一般采用平折法（即对折后，再对折）并且使滤纸上缘与漏斗壁完全吻合，不留缝隙。向漏斗内加液时，要用玻棒引导而且不应倒入过快，勿使液面超过滤纸上缘。较粗的过滤可用脱脂棉或纱布代替滤纸。有时以离心沉淀法代替过滤法可达到省时、快捷的目的。

1.6 离心机的使用方法

欲使沉淀与母液分开，过滤和离心都可以达到目的，但是当沉淀粘稠，或颗粒小得可以通过滤纸时，则需选用离心法。特别是溶液量小又需定量测定时，离心分离法更具优越性。

离心机种类很多。一般实验室具备的离心机是最大转速约为 4000 r/min 左右的台式或落地式离心机。本节将简要叙述一般离心机的使用方法（特殊用途的离心机请参阅相关的说明书）。

(1) 将待离心的液体置于玻璃离心管中。

(2) 两只装有待离心液的离心管分别装入两个完整地并且配备了橡皮软垫的离心套管之中。置天平两侧配平，向较轻一侧离心套管内用滴管加水，直至平衡。

(3) 检查离心机内无异物和无用的套管，并且运转平稳。将已配平的两个套管对称地放置于离心机的离心平台上。盖好上盖，开启电源。

(4) 慢慢推动转速调节杆，增加离心机转速。当离心机转速达到要求时，记录离心时间。

(5) 达到离心时间后，逐渐减速，断开电源，当离心机自然停止后，取出离心管和离心套管。

(6) 倒去离心套管内的平衡用水，倒置于干燥处晾干。

首都医科大学 潘 颖 黄如彬

第 2 章 实验样品的制备

分析组织中某种物质的含量，探索物质代谢的过程和规律，经常使用人或动物的肝、肾、脑、粘膜和肌肉等组织，也选用全血、血浆、血清或者无蛋白血滤液等血液样品，有时也采用尿液、胃液等完成各种生化实验。掌握以上各种实验样品的正确处理和制备方法是保证生化实验顺利进行的关键。

2.1 血液样品

2.1.1 全血 取清洁干燥的试管或其它容器，收集人或动物的新鲜血液，立即与适量的抗凝剂充分混合，所得到的抗凝血为全血。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择，但是用量不宜过大，否则将影响实验的结果。常用剂量如下：草酸钾或草酸钠 1—2mg; 柠檬酸钠 5mg; 氟化钠 5—10mg; 肝素 0.1—0.2mg。

抗凝剂宜先配成水溶液，按取血量的需要加于试管或适当容器内，横放，再蒸干水分（肝素不宜超过 30℃），使抗凝剂在容器内形成薄层，利于血液与抗凝剂的均匀接触。

取得的全血如不立即使用应贮于 4℃ 冰箱之中。

2.1.2 血浆 抗凝之全血在离心机中离心，使血球下沉，如此得到的上清液即为血浆。质量上乘的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血，必须采用干燥清洁的采血器具和容器，并尽可能地少振摇。

2.1.3 血清 收集不加抗凝剂的血液，室温下自然凝固，所析出的草黄色液体，即为血清。制备血清时，血凝块收缩析出血清，大约需要 3 小时。为促进血清尽快析出。必要时可以采用离心的方法缩短分离时间，并且可得到较多的血清。

制备血清同样要防止溶血，所以，应用的器具应当干燥清洁。而且血清析出后宜用干净的玻棒轻轻分离血凝块与容器壁的粘连，及时吸出析出的血清。

2.1.4 无蛋白血滤液 血液中含有丰富的蛋白质，在许多生化实验中如血糖测定等，蛋白质的存在会干扰测定的结果，所以通常需要将其中的蛋白质除去，制成无蛋白血滤液，再进行分析测定。常用的蛋白沉淀剂有钨酸、三氯乙酸或氢氧化锌。血液加入蛋白质沉淀剂之后离心或过滤所得的上清液或滤液，就是无蛋白血滤液，以钨酸为蛋白沉淀剂的无蛋白血滤液，常用于血糖、肌酐、NPN 等成分的测定。用三氯乙酸沉淀蛋白质，所得的血滤液呈酸性，利于钙磷的溶解。因此在测定血清离子含量时多宜采用。

2.2 尿液样品

尿液中含有多种代谢产物。但是昼夜之中尿液中的化学物质含量，往往随着进食、饮水、运动及其它情况有所变动。一般定性实验，收集一次尿液即可。若作定量测定，则需收集 24 小时尿液。收集方法是，排除体内残余尿液，记录时间，收集到次日同一时间的全部尿液，盛入有盖的清洁容器内，混合后，量出尿液总量，并作记录。尔后取适量尿液测定。

为防止尿液变质，应适当加入防腐剂。如测定含氮物质时加入甲苯，用量为 5ml/L 尿

液。测定激素时，每升尿液加入 5ml 浓盐酸。

如果作某种试验性测定时（如维生素排出测定），宜在服药后数小时采集尿液。

动物尿液的采集，可将动物饲养于代谢笼中，其排出尿液经笼下漏斗收集。

2.3 组织样品

在生化实验中，经常利用离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用。或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及某些有意义的代谢物质进行研究。

但是，在生物组织中，因含有大量的催化活性物质，离体组织的采集必需在冰冷条件下进行，并且尽快完成测定。否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头法处死动物，放出血液，立即取出所需脏器或组织，除去脂肪和结缔组织之后，用冰冷生理盐水洗去血液，再用滤纸吸干，称重后，按试验要求制成匀浆或者组织糜。

组织糜：迅速将组织剪碎，用捣碎机绞成糜状，或者加入少量黄砂于乳钵中，研磨至糊状。

组织匀浆：取一定量新鲜组织剪碎，加入适量匀浆制备液，用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器的杵头在高速运转中会产生热量，因此在制备匀浆时，需将匀浆器置于冰水中。

常用的匀浆制备液有生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖液等，可根据实验的要求，加以选择。

组织浸出液：上述组织匀浆液再经过离心分离出的上清液就是组织浸出液。

首都医科大学 潘 颖 黄如彬

第 3 章 分光光度法

光是由光子所组成，光线就是高速向前运动的光子流，光的本质是一种电磁波，传播过程呈波动性质，具有波长和频率的特征。

将电磁波按波长（或频率）顺序排列起来，即得

γ 射线	X 射线	紫外线	可见光	红外线	无线电用电磁波
------	------	-----	-----	-----	---------

人肉眼可见的光线称可见光，波长范围在 400—760nm

200—400nm 为紫外光区（波长 < 400nm 的光线）

760—500000nm 为红外区（波长 > 760nm ……） $\text{nm} = \text{m}\mu = 10\text{\AA}$ （埃）， $\text{\AA} = 10^{-8}\text{cm}$

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，单色光并非单一波长的光，而是一定波长范围内的光，太阳及钨丝灯发出的白光，是各种单色光的混合光（复合光），利用棱镜可将白光分成按波长顺序排列的各种单色光，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吸收，而物质对不同波长的射线，表现为不同的吸收现象，这一性质称为选择性吸收。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，但也能选择性地吸收在可见光范围外的部分光能，即可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，因此每种物质都具有其特异的吸收光谱，在一定条件下，其吸收程度与该物质浓度成正比，故可利用各种物质的不同的吸收光谱特征及其强度对不同物质进行定性和定量的分析。吸收光谱的测定可用来检测各种不同的物质。

3.1 分光光度法

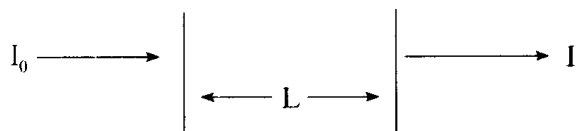
分光光度法，常被用来测定溶液中存在的光吸收物质的浓度，其基本原理是根据 Lambert 和 Beer 定律。

3.1.1 Lambert 定律

一束平行单色光垂直照射于一均匀物质（溶液）时，由于溶液吸收一部分光能，使光的强度减弱，若溶液的浓度不变，则溶液的厚度愈大，光线强度的减弱也愈显著。

设：入射光强度为 I_0 L 表示溶液的厚度（即光程）

出射光（透过光）强度为 I



根据辐射能理论推导， I_0 与 I 之间关系为

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

K_1 是常数，受光线波长、溶液性质、溶液浓度的影响。

3.1.2 Beer 定律

当一束单色光通过一溶液时，光能被溶液介质吸收一部分，若溶液的厚度不变，则溶液浓度 C 愈大，光吸收愈大，透射光线强度的减弱也愈显著，光强度减弱的量与溶液浓度增加量成正比

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

K_2 为吸收系数，是常数，溶液对光吸收的大小与溶液浓度 C 成正比。

3.1.3 Lambert-Beer 定律（又称吸收定律）

此二式合并（即（1）与（2）合并）

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

$$\text{令 } A = \lg \frac{I_0}{I} \quad T = \frac{I}{I_0}$$

$$\text{则 } A = KCL \quad A = -\lg T$$

T 为透光度, A 为吸光度 (光密度、消光度)。

其中 K 为常数, 又称消光系数 (extinction coefficient), 表示物质对光线吸收的本领, 其值因物质种类和光线波长而异。对于相同物质和相同波长的单色光则消光系数不变。

3.1.4 根据 Lambert-Beer 定律, 如果单色光的波长、溶液的性质和溶液的厚度一定时, 用一个已知浓度的标准液和一个未知浓度的待测液进行比色分析就可以得出下列运算公式:

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}}L \quad A_{\text{样}} = KC_{\text{样}}L$$

$$\text{由于是同一类物质及相同光径, 故 } \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}}L}{KC_{\text{标}}L} = \frac{C_{\text{样}}}{C_{\text{标}}}$$

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

式中 $C_{\text{样}}$ = 待测样品浓度, $A_{\text{样}}$ = 待测样品吸光度。

$C_{\text{标}}$ = 标准溶液浓度, $A_{\text{标}}$ = 标准溶液吸光度。

根据上式可知, 对于相同物质和相同波长的单色光 (消光系数不变) 来说, 溶液的吸光度和溶液的浓度呈正比。故已知标准溶液的浓度及吸光度按公式可算出测试样品溶液的浓度。

3.2 分光光度法在生物化学中的应用

利用分光光度法对物质进行定量测定的方法, 主要有如下几种:

3.2.1 标准曲线法

用已知浓度的标准溶液, 配制成一系列不同浓度的标准溶液, 在最大吸收波长 (λ_{max}) 处测得各个吸光度 (A 值), 以 A 为纵坐标, 浓度为横坐标, 作标准曲线, (绘制 A-C 曲线) 取其直线部分作定量依据。

在测定被测样品时, 以相同条件在 λ_{max} 处测定 A 值, 再从标准曲线上查得该样品的相应浓度。

标准曲线制作与测定管的测定, 应在同一仪器上进行, 在配制样品时, 一般选择其浓度相当于标准曲线中部的浓度较好。

3.2.2 直接比较法 (标准管法)

将样品溶液与已知浓度的标准溶液在相同条件下在 λ_{max} 处分别测定 A 值 (因为在此条件下, 两者 K 值相等), 然后可根据下列公式, 求得样品溶液的浓度含量

$$\frac{A_{\text{标}}}{C_{\text{标}}} = \frac{A_{\text{样}}}{C_{\text{样}}} \quad C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$$

3.2.3 吸收系数法

1. 克分子消光系数 (ϵ)

即溶液浓度为 1M (1 克分子), 溶液厚度为 1 厘米时的吸光度值 (光密度值)。 ϵ 值在 λ_{max} 时, 可在一定实验条件下测得或由手册药典中查出。