

第一部分 概述

一、生物化学实验的特点、目的及重要性

(一)生物化学实验特点

生物化学实验技术是生命科学等诸多学科的重要研究手段，也是医学院校学生必修的基础实验课程。它不仅是生物化学课程教学的重要组成部分，而且具有完整的独立理论体系和独特的实验技巧，是生物化学理论课所不能代替的。生物化学实验与形态学以及其他医学基础实验不尽相同，它还具有严密的科学性和微量、定量等特点，因此生物化学实验课的要求高而且严格，仪器要求精密、先进，所需电子化的大型设备多，所以教师对实验仪器要按教学大纲要求严格管理、认真负责施教。

(二)生物化学实验目的

- (1)进行生物化学实验基本技能的训练，培养学生独立工作能力。
- (2)培养学生科学思维方法、严谨的科学作风和实事求是的科学态度。
- (3)验证某些生物化学基本理论，帮助学生对生物化学理论知识的进一步理解和掌握。
- (4)进行一定的实验理论学习和一定的科研基本功训练。

(三)生物化学实验的重要性

医学本身就是一门实验科学。近年来，由于生物化学分离技术与分析技术的迅速发展，特别是蛋白质与核酸等生物大分子实验技术迅速发展，为生物学、分子生物学的研究提供了有利条件，促进了近代生物学科相关各领域的发展。没有生物化学实验技术的发展，就不可能有近代生物学特别是分子生物学的发展。近代生物学和分子生物学及生物化学实验技术对临床医学、药学、医学检验、预防医学、环境、卫生、工农业生产等都已产生了巨大的影响。

二、生物化学实验室规则

- (1)学生进入实验室必须穿白大衣、戴白帽，衣帽要求整洁，不准迟到、早退，不准大声喧哗。
- (2)课前学生要认真预习，做好实验设计。在实验过程中，听从老师指导，严格地按操作规程进行。完成实验后按要求书写实验报告，实验报告要真实，若实验失败，要分析原因。
- (3)环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品必须保持整洁，仪器、药品要井然有序。试剂用完后立即盖严，放回原处。不要将试剂药品洒在实验台面和地上，严禁向水池内丢碎纸片、棉花等物。实验完毕，将用具刷洗干净，放回原处，实验台面擦拭干净，经老师验收后方可离去。
- (4)对实验器材应倍加爱护，精密仪器必须按操作规程使用，服从老师指导，试剂、水、电、肥皂等消耗品要厉行节约，应特别注意药品和试剂的纯净，严防混杂。
- (5)注意安全。实验室内严禁吸烟！乙醚、乙醇、丙酮等易燃物品，使用时必须远离火源，蒸馏时用水浴或蒸气浴，不可直接加热。剧毒物品要严格管理、小心使用，切勿触及伤口或误入口内。操作结束后，必须仔细洗手，严格清点。
- (6)器材损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏器材登记表，然后方可补领。
- (7)实验室内的一切物品不得私自带出实验室。不得存放与实验无关的物品。
- (8)每次实验课由学生轮流值日。值日生要负责当天实验室的卫生、安全及一些服务性工作。

三、实验误差与数据处理

(一)误差

在进行定量分析实验测定的过程中，很难使测量出来的数值与客观存在的真值完全相同。测定值与真值之差称为误差（error）。通常用准确度和精密度来评价测量误差的大小。

1. 准确度

准确度是指测定值与真值相接近的程度，通常用误差的大小来表示，误差愈小，准确度越高。误差又分为绝对误差和相对误差。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值} - \text{真值}$$

$$\text{相对误差} (\%) = \frac{\text{绝对误差}}{\text{真值}} \times 100\%$$

例如：用分析天平称得两种蛋白质的重量各为 2.0750g 和 0.2075g，假定两者的真值各为 2.0751g 和 0.2076g，则称量的绝对误差分别为：

$$2.0750 - 2.0751 = -0.0001(\text{g})$$

$$0.2075 - 0.2076 = -0.0001(\text{g})$$

它们的相对误差应分别为：

$$\frac{-0.0001}{2.0751} \times 100\% = -0.005\%$$

$$\frac{-0.0001}{0.2076} \times 100\% = -0.05\%$$

由此可见，两种蛋白质称量的绝对误差虽然相等，但当用相对误差表示时，就可以看出第一份称量的准确度比第二份称量的准确度高 10 倍。显然，当被称量物体的重量较大时，称量的准确度就较高。所以应该用相对误差来表示分析结果的准确度。但由于真值是并不知道，因此在实际工作中无法算出分析的准确度，只能用精密度来评价分析的结果。

2. 精密度

精密度是指在相同条件下，进行多次测定后所得数据相近的程度，精密度一般用偏差来表示。偏差也分为绝对偏差和相对偏差。

$$\text{绝对偏差} = \text{个别测定值} - \text{算术平均值 (不计正负号)}$$

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

当然，和误差的表示方法一样，用相对偏差来表示实验的精密度比用绝对偏差更有意义。

在实验中，对某一样品通常进行多次平行测定，求得其算术平均值，作为该样品的分析结果。对于该结果的精密度则有多种表示方法，这里介绍常用的两种方法。

(1) 平均绝对偏差和平均相对偏差表示法：

例如：分析某一蛋白质制剂含氮量的百分数，共测五次，其结果分别为 16.1%、15.8%、16.3%、16.2%、15.6%，用来表示精密度的偏差可计算如下：

分析结果算术平均值		个别测定值的绝对偏差 (不计正负号)
16.1%	16.0%	0.1%
15.8%		0.2%
16.3%		0.3%
16.2%		0.2%
15.6%		0.4%

$$\text{平均绝对偏差} = \frac{0.1\% + 0.2\% + 0.3\% + 0.2\% + 0.4\%}{5} \times 100\% = 0.2\%$$

$$\text{平均相对偏差} = \frac{0.2}{16.0} \times 100\% = 1.25\%$$

测定结果可用 $(16.0 \pm 0.2)\%$ 来表示。

(2) 标准差法:

例如:测定血清铜含量,重复 6 次,结果分别为 9.90mmol/L、9.96mmol/L、9.94mmol/L、9.96mmol/L、9.90mmol/L、9.90mmol/L,精确度计算如下:

① 首先求其算术平均值 ($\bar{X}$)

$$\bar{X} = \frac{9.90 + 9.96 + 9.94 + 9.96 + 9.90 + 9.90}{6} = 9.93 \text{ mmol/L}$$

② 然后求平均值的绝对偏差

∴ 绝对偏差(d) = 每次测定值(x) - 平均值($\bar{X}$)

$$\therefore d_1 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

$$d_2 = 9.96 - 9.93 = +0.03$$

$$d_3 = 9.94 - 9.93 = +0.01$$

$$d_4 = 9.96 - 9.93 = +0.03$$

$$d_5 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

$$d_6 = 9.90 - 9.93 = -0.03$$

③ 求出标准差 (S)

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = 0.03 \quad \text{其中, } n \text{ 为测定次数}$$

结果表示用“平均值 ± 标准差”,即 $9.93 \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ 。可见标准差(standard deviation)是描述数据分布的离散程度。一般检验仅做一次分析的允许误差定为 $3S$ 。

标准差还可以用来计算变异系数。

变异系数(coefficient of variation, CV)是标准差与算术均数之比,用百分数表示,计算公式为:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

它描述了相对于算术平均值 $\bar{X}$ 而言标准差的大小,即描述数据的变异相对于其平均水平来说是大还是小。

标准差与变量值单位相同,而变异系数是相对比,没有单位,它描述的不是数据分布的绝对离散程度,而是相对离散程度,因此变异系数更便于资料间的分析比较。

变异系数常用于:

- 比较算术平均数相差悬殊的几组资料的变异度,如相同度量衡单位指标不同时间的纵向比较。
- 比较度量衡单位不同的多组资料的变异度,即做相同时间不同指标的横向比较。
- 变异系数还常用于比较多个样品重复测定的误差。

应该指出,误差和偏差具有不同的含义。误差是以真值为标准,而偏差是以平均值为标准。由于物质的真值一般是无法知道的,所以我们平时所说的真值其实只是采用各种方法进行多次平行分析所得的相对正确平均值。用这一平均值代替真值来计算误差,所得到的结果仍然是偏差。

还应指出,用精密度评价分析的结果也有一定的局限性。分析结果的精密度很高不一定说明实验准确度也很高。因为如果分析过程中存有系统误差,可能并不影响每次测得数值之间的重合

程度，即不影响精密度，但此分析结果则必然偏离真值，也就是说分析的准确度并不一定很高。当然，若是精密度不高，则更无准确度可言。

(二)产生误差的原因和校正

产生误差的原因很多，一般根据误差的性质和来源，将其分为系统误差和偶然误差两大类。

1. 系统误差

在一定的测量条件下，由某些恒定因素按确定的方向起作用，引起多次测量平均值对真值的偏差，即为系统误差。

系统误差与分析结果的准确度有关，它是由于分析过程中某些经常发生的原因所造成的，对分析结果的影响比较稳定。在重复测定时，经常重复出现，其大小与正负在同一实验中完全相同。系统误差的来源主要有：

(1)方法误差：由方法本身不够完善所造成的，如化学反应特异性不高，容量分析中等当点和滴定终点不完全符合等。

(2)仪器误差：因仪器本身不够精密所造成的，如仪器的刻度不准确，量器、比色杯、砝码等不符合要求。

(3)试剂误差：来源于试剂或蒸馏水不纯。

(4)操作误差：由于每个人掌握操作规程与控制条件常有出入而造成的，如不同的操作者对滴定终点颜色变化的判断会有差别等。

为减少系统误差常采取下列措施：

(1)空白试验：为了清除由试剂等因素引起的分析误差，可在不加样品的情况下，按照与样品测定完全相同的操作手续，在完全相同的条件下进行测定分析，所得的结果为空白值。将样品分析的结果扣除空白值，可以提高结果的准确度。

(2)回收率测定：做这种测定时，取一标准物质（其中的组分含量是已经精确知道的），添加到待测的未知样品中，与待测的未知样品同时做平行测定，测定的添加标准物量与实际所取得的标准物量之比的百分率就称回收率。回收率在 $100 \pm 5\%$ 为合格，这种由标准样品测得的回收率可以用于检验或表达某些分析过程的系统误差，因为系统误差愈大，回收率愈低。

(3)仪器校正：仪器出厂时一般都是经过校正的，但在使用中还应定期进行校正，以保证仪器的精度，减少因仪器而引起的系统误差。

2. 偶然误差

在一组测量中，由于各种因素的偶然变化，而引起单次测量值对多次测量平均值的偏差，即为偶然误差。

偶然误差与分析结果的精密度有关，它来源于难以预料的因素，或是由于取样不均匀，或是因为测定过程中某些不易控制的外界因素的影响。这些因素是时隐时现的，为了减少偶然误差，一般采取的措施是：

(1)平均取样：动、植物新鲜组织可制成匀浆后取样；全血标本取样时要摇匀等。

(2)多次取样：平行测定次数愈多，其偶然误差就会愈小。

提高测量值的精密度是考察实验结果可靠性的重要指标之一。偶然误差服从统计规律，经过多次测量，其测量值是正态分布的。测量数据的平均值说明了数据的集中趋势。当只有偶然误差时，平均值即为出现频率最大值，可认为是真值。正态分布曲线的波峰宽度反映了测量数据的离散性。离散性愈小，测量的数据愈精密。

除以上两类误差外，还有因操作事故引起的“过失误差”，如读错刻度、溶液溅出、加错试剂等，

这时可能出现一个很大的“误差值”，在计算算术平均值时，此种数值应弃去不用。

引起系统误差及偶然误差的因素是相对的，有时引起系统误差的因素可以引起偶然误差，引起偶然误差的因素也可以引起系统误差。例如试剂变质可引起偶然误差，如果不更换而继续使用则可引起系统误差。

(三)有效数字

在生物化学定量分析中除了要选择准确度和精密度符合要求的实验方法、测定数值力求准确、计算正确外，还应在记录数据和进行计算时注意有效数字的取舍。

有效数字应是实际可能测量到的数字。包括所有“可靠数字”和最后一位“欠准数字”。应选取几位有效数字取决于实验方法与所用仪器的精确程度。

例如：用分析天平称量物质重为 1.7415g，是五位有效数字，而用台秤称得该物质为 1.74g，则只有三位有效数字。

又如，读取某滴定管液面刻度 16.25ml，是四位有效数字。

上面各数字的最后一位数字是不可靠的，称为“欠准数字”或“可疑数”，也叫估计值，其他的数字均是准确的“可靠数字”。因此，所谓有效数字，即在一个数值中除最后一位是可疑数外，其他各数都是确定的。

数字 1, 2, 3, …, 9，都可作为有效数字，只有“0”特殊，它在数字中间或数字后面时，是有效数字，但在数字前面时，它只是定位数字，用来表示小数点的位置，而不是有效数字。

例如：1.26014	六位有效数字
72.001	五位有效数字
24.00	四位有效数字
0.0212	三位有效数字
0.0010	二位有效数字
200	有效数字不明确

在 200 中，后面的 0 可能是有效数字，也可能是定位数字。为了避免混乱，一般写成标准式，如 65000 写成 6.5×10^4 或 6.50×10^4 或 6.500×10^4 ，它们的有效数字依次为二位、三位、四位。

在加减乘除等的运算过程中，要特别注意有效数字的取舍，应采用四舍六入五留双的原则；否则会使结果计算不准确。有效数字运算规则大致可归纳如下：

1. 加减法

几个数相加或相减时，有效数字的保留应以小数点后位数最少的数字为准。

例：

$$\begin{array}{r} 38.2 \\ 1.3 \\ + 1.12 \\ \hline 40.6 \times \end{array}$$

结果应为 40.6

2. 乘除法

几个数值相乘或相除时，其积或商所保留的有效数字位数与各运算数字中有效数字位数最少的相同。

例：

$$\frac{0.1545 \times 3.1}{0.112} = 4.3$$

还应指出，有效数字位数最少的那个数，首位是 8 或 9 时，而其结果的首位数不是 8 或 9 时，应

多保留一位。

例： $9.12 \times 2.011 = 18.34$

有效数字的最后一位为“可疑数”，若一个数值没有可疑数，便可视为无限有效。例如将 7.12 克样品分成二等份，每份重量为：

$$\frac{7.12}{2} = 3.56(\text{g})$$

式中除数 2 不是测量所得，不是可疑数，可把它视为无限多位有效数字。其他如常数 π 、 e 及 $\sqrt{3}$ 等有效数字的位数也可认为是无限的。

(四)数据处理

在实验中得到的一系列数值，采取适当的方法进行整理、分析，才能准确地反映出被研究对象的数量关系。在生化实验中，通常采用列表法或作图法来表示实验结果，以使结果表达得清楚、明了，而且可以减少和弥补某些测定的误差。根据对标准样品的一系列测定，也可以列出表格或绘制标准曲线，可由测定数据直接查出结果。

1. 列表法

将实验所得的各数值用适当的表格列出，并表示出它们之间的关系。通常数据的名称和单位写在标题栏中，表内只填写数字。数据应正确反应测定的有效数字。必要时应计算出误差值。见表 1-1

表 1-1 血清总蛋白测定时各管所加试剂及测定结果

试剂	空白管	标准管	测定管
血清 (ml)	—	—	0.100
蛋白标准液 (ml)	—	1.00	—
0.154mol/L NaCl(ml)	2.00	1.00	1.90
双缩脲试剂 (ml)	3.00	3.00	3.00
吸光度	—	0.400	0.450
血清总蛋白 (g/L)	—	—	67.5

2. 作图法

实验所得的一系列数据之间的关系及其变化情况，可以用图线直观地表现出来。作图时通常在坐标纸上确定坐标轴，标明轴的名称和单位，然后将各数值点用“+”或“×”字标注在图纸上，再用直线或曲线把各点连接起来。图形必须是很平滑的，可以不通过所有的点，而要求线两旁偏离的点分布较均匀。在画线时，个别偏离过大的点应当舍去或重复实验校正之。采用作图法时至少有五个以上的点，否则便没有意义。

四、实验记录及实验报告的书写

(一)实验记录

实验记录是指实验过程中对实验名称、目的、原理、操作过程、结果和数据等的原始记录。实验记录的书写要求是：

- (1)必须使用钢笔或圆珠笔，不准使用铅笔。
- (2)实验中观察到的现象和得出的数据应及时地直接写在记录本上，切忌夹杂主观因素，更不

准伪造数据。努力培养严谨的科学作风,实事求是地把实验结果全面记录下来。

(3)原始记录要准确、简练、详尽、清楚。在定量实验中所测得的数据最好设计一定的表格,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。

(4)实验中使用仪器的类型、编号,以及试剂的规格、化学式、分子量、浓度等,都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。

(5)实验原始记录不准用草纸或书本先记,然后再抄誊。原始数据不准修改,若需修改必须请示教师,并在原始记录上注明更改原因,方可进行。

(二)实验报告的书写

实验报告的书写是一项重要的基本技能训练,是论文写作的基础。一份满意的实验报告应具备准确、客观、详尽、简洁等特点。写好实验报告除了正确的操作步骤外,还要依赖于仔细的观察和客观的记录,依赖于运用所掌握的理论知识对实验现象和结果进行综合的分析。实验报告的优劣也能判断实验者科研能力水平。

1. 实验报告的书写具体要求

(1)书写实验报告应简要通顺、字体清楚、无错别字及使用正确标点。

(2)对实验过程中一切现象的记录要详细,一切原始数据和运算过程均应写在报告上,不准用草纸打稿重写誊写。

(3)对原始数据不准修改,若需修改必须请示任课老师同意后方可进行,并写明原因。

(4)定量实验要求准确记录有效数字。

2. 书写实验报告的基本内容

(1)姓名、年级、班次、组别、实验日期(年、月、日)、室温 _____。

(2)实验名称 _____。

(3)实验目的 _____。

(4)实验原理 _____。

(5)实验试剂与器材 _____。

(6)实验操作步骤 _____。

(7)实验结果及讨论 _____。

在写实验报告时,无论是定性实验,还是定量试验,实验名称和目的都应针对本次实验课的全部内容所必须达到的目的和要求。原理部分要简明扼要。实验操作步骤可以采用流程图的方式或自行设计的表格来表达,要简单明了,避免长篇抄录。要仔细观察实验过程中出现的各种现象,准确记录数据,并列出公式加以计算,得出结果。注意正确使用各种单位,结果与讨论是实验报告中最重要的一部分,对于实验结果的表达,可用简练的文字描述,也可用表格,还可用各种曲线图。在优秀的实验报告与论文中,三者常常并用,得到最佳的效果。探讨实验中遇见的问题和思考题,提出自己的见解,并对自己的实验质量做出评价。

(赵锐)

第二部分 常用生物化学实验基本理论

第一章 比色分析法及分光光度法

光是由光子所组成的，光线也就是高速向前运动的光子流。它和其他电磁波一样，传播过程也呈波动性质，并且有波长和频率的特征。光子的能量有大有小，光子的能量越大，振动的频率也越高，而波长则越短。换言之，光子的能量与频率呈正比，而与波长呈反比。肉眼可见的光线称为可见光，它的波长范围是 400~760nm，不同波长的光线的颜色不同，随着波长的增大，光线也可呈紫、蓝、绿、黄、橙到红等不同的颜色。波长小于 400nm 的光线称为紫外线，大于 760nm 的则称为红外线(见表 2-1-1)。对于生物化学来说最重要的波长区域是可见光和紫外光。

如把两种适当颜色的单色光按一定的强度比例混合，可以成为白光，我们就把这样的两种光互称为互补色光。如图 2-1-1 所示：红光与青光能混合成白色，因此红光与青光互为互补色光。

表 2-1-1 各种光的波长

光	波长
远红外	20~400 μ m
近红外	0.76~20 μ m
红	620~760nm
橙	592~620nm
黄	578~592nm
绿	500~578nm
青	464~500nm
蓝	446~464nm
紫	400~446nm
近紫外	200~400nm
远紫外	50~200nm



图 2-1-1 互补色光示意图

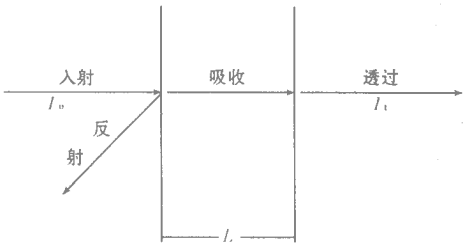


图 2-1-2 光与介质的相互作用

第一节 比色分析法和分光光度法的原理

组成物质的分子均处于一定能态并不停地运动着，通常分子处于能态的基态，当它吸收一定光辐射能量之后跃迁到激发态，则产生吸收光谱。不同物质由于分子结构不同，对不同波长的光线的吸收能力也不同，因此每种物质都有它特异的吸收光谱，并且溶液的颜色也不相同。比色分析法是指用比较溶液颜色深浅的方法来测定有色溶液的浓度，可用各种光电比色计及可见光的分光光度计来完成比色分析；紫外光、可见光、红外光和激光等测定物质的吸收光谱，利用此吸收光谱对物质进行定性定量分析和物质结构分析的方法称为分光光度法或分光光度技术，所使用的仪器是各种类型的分光光度计。分光光度法比一般比色分析法的灵敏度、准确度和选择性都要高。

一、溶液的吸收光谱和溶液的颜色与光吸收的关系

把同一种物质溶液，用分光光度计以各种波长测定其吸光度，之后以波长为横坐标，对应的吸光度为纵坐标，绘成曲线图，此图即为该物质溶液的吸收曲线（吸收光谱）。

例如，把核黄素溶液用紫外—可见光分光光度计在各种入射波长下测定其吸光度，其吸收光谱表明核黄素对各种不同波长的光吸收程度不同（吸光度最高点下指向的波长为最大吸收波长），它在紫外区有两个吸收峰，在可见光区对 450nm 的光吸收最多，即该溶液最大吸收波长为 450nm（蓝色光的波长）。各种物质都有其特征性的吸收曲线。

另外，用同一物质的不同浓度的溶液，分别测定其对光的吸收曲线，把在同一波长下测定的吸光度绘制在一幅吸收光谱图上，图中可见随着溶液浓度增高，吸光度也相应地增高，但该物质溶液的最大吸收波长不变。

溶液的分子或离子能选择地吸收某段波长的光，这是物质溶液的特性。有色溶液对其互补色光吸收最强，溶液所呈现的颜色就是它吸收最强的光的互补色。例如，核黄素溶液对蓝色光吸收最强，蓝色光的互补色光为黄色光，因此核黄素溶液的颜色为黄色，透过光中只剩下黄色光，所以核黄素溶液显黄色。

比色分析时，一般应选择溶液吸收最强的光（溶液颜色的互补色光）照射，这时透过光的光强明显减弱，可提高分析的灵敏度。

二、比色分析法和分光光度法的基本原理

比色分析法和分光光度法的基本原理是相同的，其理论基础都符合 Lambert—Beer 定律。

（一）Lambert—Beer 定律

如图 2-1-2 所示，当一束单色光通过有色溶液时，一部分被反射和折射；一部分被溶液吸收；一部分透过溶液。透过光的强度和有色溶液的厚度及浓度有如下关系：有色溶液的液层愈厚，浓度愈大，则透过光强愈小，它们之间呈一种递减指数函数关系，这就是物质对光的吸收定律，称为 Lambert—Beer 定律。其关系可表达如下：

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-KLC} \quad (2-1-1)$$

式中： I_t 为透过光强度， I_0 为入射光强度， L 为溶液的厚度， C 为溶液的浓度， K 为消光系数。

变动式 2-1-1 得：

$$\frac{I_t}{I_0} = 10^{-KLC} \quad (2-1-2)$$

将式 2-1-2 两边取常用对数得：

$$\lg \frac{I_t}{I_0} = -KLC \quad (2-1-3)$$

将式 2-1-3 中的负号移到等号左侧得：

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC \quad (2-1-4)$$

式 2-1-4 即为 Lambert—Beer 定律的对数式。

(二) 透光率、吸光度及消光系数

1. 透光率

如式 2-1-2 所示, I_t/I_0 表示透过光占入射光强度的比例, 我们就把 I_t/I_0 称为透光率, 通常用‘ T ’表示。

2. 吸光度

如式 2-1-4 所示, I_0/I_t 为透光率倒数的对数, 我们就把 $\lg I_0/I_t$ 称为吸光度, 通常用‘ A ’表示, 因此式 2-1-4 可写成：

$$A = KLC \quad (2-1-5)$$

式 2-1-5 表示：吸光度与消光系数、溶液厚度及溶液浓度的乘积成正比。

从吸光度的概念 $A = \lg \frac{I_0}{I_t}$ 表达式我们可以看出下列物理意义：

(1) 当 $I_t = I_0$ 时, $\lg \frac{I_0}{I_t} = 0$, 表示溶液完全不吸收光线；

(2) 当 $I_t \ll I_0$ 时, $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 之值很大, 表示溶液对光线吸收较多；

(3) 当 $I_t \rightarrow 0$ 时, $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 之值无穷大, 表示光线几乎完全被溶液吸收, 即溶液不透过光。

由此可见, A 表达了溶液对光的吸收程度。

3. 消光系数

变动式 2-1-5 得：

$$K = \frac{A}{LC} \quad (2-1-6)$$

式 2-1-6 中 K 即为消光系数, 指的是溶液在单位浓度和单位厚度时的吸光度。

消光系数是物质的重要特性, 它与入射光的波长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, 消光系数是一定值。通过实验可测得：消光系数愈大, 该物质吸收光的能力愈强, 测定的灵敏度愈高。

三、比色分析法和分光光度法的结果计算

(一) 公式计算法

从式 $A = KLC$ 可知：吸光度 A 与 KCL 成正比。比色时将标准液与待测液做比较, 我们用 A_s

表示标准液的吸光度, A_u 表示待测液的吸光度, 则:

$$A_s = K_s \cdot C_s \cdot L_s$$

$$A_u = K_u \cdot C_u \cdot L_u$$

比色时使用同一厚度的比色杯, 即标准液与待测液厚度相同, 温度相同, 而且是同一性质的溶液, 因此消光系数也相同, 则两式相比得:

$$\frac{A_u}{A_s} = \frac{C_u}{C_s}$$

$$C_u = \frac{A_u}{A_s} \cdot C_s$$

上式 C_u 为待测液浓度, C_s 为标准液浓度 (已知), 通过比色, 待测液浓度便可以计算出来。

在生物化学实验中, 有一些实验采用了公式计算法, 如: 血糖含量测定。

(二) 利用标准曲线求出待测溶液的浓度

分析大批待测溶液时, 采用此方法比较方便。此种方法首先要制作一条标准曲线, 标准曲线的制作方法如下:

先配制一系列浓度由小到大的标准溶液, 测出它们的吸光度, 在标准溶液的一定浓度范围内, 溶液的浓度与其吸光度之间呈直线关系。以各管的吸光度为纵坐标, 相应的各管浓度为横坐标, 在方格坐标纸上作图得出标准曲线。在制作标准曲线时, 至少用五种浓度递增的标准溶液, 测出的数据至少要有三个点落在直线上。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, 测出吸光度后, 在标准曲线上即可直接查出其浓度。

该方法的优点是操作时只测定待测液吸光度便可迅速从标准曲线上查得结果, 勿需每次做标准管, 节省时间, 节省试剂, 且从曲线上可观测到脱离光吸收定律的浓度段, 可以掌握测定的最适浓度。缺点是如果比色计更换或大修, 试剂批号不同时, 曲线应重新制作, 以防测定结果出现差错。

在生物化学实验中, 有一些实验采用了此方法, 如: 血红蛋白含量测定。

(三) 利用标准系数求出待测溶液的浓度

此种方法比上述两种方法简便, 具体计算方法如下: 将多次测定标准溶液的吸光度算出算术平均值后, 按下式求出标准系数:

$$\text{标准系数} = \frac{\text{标准液浓度}}{\text{标准液平均吸光度}}$$

用同样方法测出待测溶液的吸光度, 代入下式即可。

$$\text{待测溶液浓度} = \text{待测溶液吸光度} \times \text{标准系数}$$

(四) 利用消光系数求出待测溶液的浓度

我们知道: $K = \frac{A}{L \cdot C}$, 一般在比色分析法与分光光度法中, 所使用的比色杯的厚度通常为

1cm, 所以上式可简化为: $K = \frac{A}{C}$, 那么 $C = \frac{A}{K}$ 。

此公式常用于紫外吸收法, 如对蛋白质含量的测定。因蛋白质在 280nm 处有最大吸收峰, 利用已知浓度的蛋白质溶液测出其在 280nm 处的吸光度, 之后利用上述公式求出其消光系数, 再读取待测蛋白质在 280nm 处的吸光度, 利用上述公式即可求出待测蛋白质溶液的浓度。

此种方法不需显色, 操作简便。

四、分光光度计的基本结构

各种型号的分光光度计基本上都由五部分组成,依次是光源、单色器、样品室、接收检测放大系统及显示装置或记录器。

(一)光源

用于可见光和近红外光区的光源是钨灯,现在最常用的是卤钨灯,即石英钨灯泡中充以卤素,以提高钨灯的寿命。适用波长范围是 $320\sim 1100\text{nm}$ 。由于能量输出的波动为电压波动的四次方倍,因此电源电压必须稳定。

用于紫外光区的是氘灯,适用波长范围是 $195\sim 400\text{nm}$,由于氘灯寿命有限,要注意节约灯时。

(二)单色器

单色器是分光光度计的心脏部分,它的作用是把来自光源的混合光分解为单色光并能随意改变波长。其核心部件是色散元件即棱镜或光栅,转动棱镜或光栅的波长盘,可以改变单色器出射光束的波长;调节出入射狭缝隙的宽度,可以改变出射光束的带宽和单色光的纯度。纯粹的单色光只是一种理想情况,分光光度计所能得到的“单色光”实际上只是具有一定波长范围的谱带,狭缝越宽,所包括的波长范围也愈宽。对单色光纯度来说,狭缝是愈窄愈好,但光的强度也就越弱,因此狭缝不能无限地小,狭缝的最小宽度取决于检测器能准确地进行测量的最小光能量。目前达到的最小宽度为 0.1nm 。

(三)样品室

包括有池架(比色杯架)、吸收池(比色杯)以及各种可更换的附件。

池架有普通池架和恒温池架,恒温池架有水恒温池架和电恒温池架。吸收池有光学玻璃杯和石英玻璃杯两种。光学玻璃杯因为普通玻璃吸收紫外光,因此只能用于可见光,适用波长范围是 $400\sim 2000\text{nm}$ 。石英玻璃杯可透过紫外光、可见光和红外光,是最常使用的吸收池,使用波长范围是 $180\sim 3000\text{nm}$ 。高档分光光度计的样品室还可以更换各种重要附件,用于各种特殊测量。如换上“积分球”,可用来检测微弱透光和不透光的样品。换上“凝胶扫描装置”,可用于电泳凝胶胶条上样品带的扫描测量。

(四)检测器

检测器是一种光电转换设备,即把光强度以电讯号显示出来,常用的检测器有光电管,光电倍增管和光电二极管三种。检测器接受光线后产生的电流极小,要采用高灵敏度放大线路将弱电流放大,才能用适当仪器检出。由于采用放大装置,使仪器对光线的检测灵敏度大大提高,所以允许采用高分辨率的单色光器,以便获得光谱范围极窄的“纯”单色光。虽然,光谱范围狭窄的单色光要比范围宽的弱得多,但这种有放大线路的灵敏检测装置仍然可以准确地将它测量出来,为提高分光光度计的精密密度提供了可靠的保证。

(五)显示装置

低档分光光度计现在已都使用数字显示,有的还连有打印机。现在高性能分光光度计均可连接微机,而且有的主机还使用带液晶或 CRT 荧屏显示的微处理机和打印绘图机,有的还连有标准软驱,存取数据更加方便。

五、分光光度法的应用

(一)用于定量分析

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 Lambert—Beer 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，组织核酸提取物中混有蛋白质，干扰核酸的测定，可用标准物测出 230nm 和 260nm 处核酸和蛋白质各自的消光系数，假设核酸在 230nm 处消光系数为 R_1 ，在 260nm 处为 R_2 ，蛋白质的消光系数在 230nm 处为 P_1 ，在 260nm 处为 P_2 。而测定得到提取物溶液的吸光度在 230nm 处为 A_{230} ，在 260nm 处为 A_{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 。

根据 Lambert-Beer 定律：

$$A = KLC$$

$$A_{230} = R_1 C_r + P_1 C_p$$

$$A_{260} = R_2 C_r + P_2 C_p$$

解二元一次方程式，可得出

$$C_r = \frac{A_{230} P_2 + A_{260} P_1}{R_1 P_2 + R_2 P_1}$$

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

由此可求出核酸的浓度 C_r 和蛋白质的浓度 C_p 。

(二)用于定性鉴定

分光光度法除应用定量分析外，还应用于定性鉴定。

在特定条件下，某物质的吸收光谱是一定的，可测定两处波长的吸光度值，用其比值来鉴定确

认是否是某物质。例如：5'-AMP 在 pH=5 时 $\frac{A_{230}}{A_{260}}$ 的比值为 0.23。

(三)用于研究某物质的变化

分光光度法还用于研究某物质的变化。物质发生变化时，其吸收光谱也发生变化。例如，NADH 氧化时，其 340nm 处的吸收高峰消失。

六、比色分析法与分光光度法条件的选择

(一)波长的选择及利用波长除干扰

测定波长对比色分析的灵敏度、准确度和选择性都有很大影响。选择波长的原则是：吸收最大，干扰最小。因为吸光度愈大，测定的灵敏度愈高，准确度也容易提高；干扰愈小，选择性愈好，测定的准确度愈高。

(二)吸光度读数误差

透光率读数的准确度是仪器精度的主要指标之一。精度高的仪器透光率读数误差 (ΔT) 可小于 0.5%，一般约在 1% 左右。由于透光率与浓度之间是对数函数关系，透光率精度不能代表测定结果的精度。测定结果的精确度常用相对误差表示，因浓度 C 与吸光度 A 是正比关系。

因为

$$A = KC$$

$$\Delta A = K \cdot \Delta C$$

所以

$$\frac{\Delta C}{C} = \frac{\Delta A}{A}$$

所以测定结果的相对误差就是吸光度的相对误差。

另外，吸光度或透光率误差也可由仪器或操作原因引起。如，比色杯或比色杯架的位置不当，比色杯进入光路的位置不同，比色杯的透光性与厚度有差别而未校正；仪器上所刻印的吸光度值不准，与所换算的透光度值有出入等等，都可以引起误差。

(三)显色条件的选择

合适的显色剂可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度为 100%,此时吸光度为零。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,抵消比色杯和试剂带来的影响。

第二节 荧光光谱分析法

一、荧光的概念

所谓荧光即是分子吸收辐射以后发射出较长波长辐射的现象。所以一种化合物可以在紫外区吸收辐射并发射出可见光。这种在波长上的增加叫做 Stokes 位移。

荧光主要分为共振荧光、直接线荧光及分步线荧光三种,其中以共振荧光用于分析最多见。

二、荧光产生的原理

大多数有机分子在室温下处于基态。光子的吸收使这些分子中的电子在不到 10^{-15} 秒的时间内跃迁到较高能态($S_0 \rightarrow S_1$ 或 $S_0 \rightarrow S_2$ 等),吸收以后,由于碰撞退降,能量极快丧失(作为热)。结果激发分子的能量迅速下落到最低激发态的最小振动($S_1 V_0$),从这些分子在不到 10^{-8} 秒时间内恢复到基态时,发射的能量产生荧光峰,表现 Stokes 位移。虽然许多有机分子在紫外和可见光区吸收辐射,但只有少数发荧光。

三、荧光光谱分析法

荧光光谱属于发射光谱,因为发射的辐射能有许多相靠近的数值,视所达到的最后振动和转动能级而定,所以荧光光谱是带光谱。

原子荧光光谱分析技术是一项比较新的痕量元素分析技术,原子荧光现象早在 19 世纪末已被人们发现,但是直到 1962 年才有人建议用原子荧光进行元素分析。1964 年万伏德娜(Winefordner)发表了原子荧光光谱分析理论,并提出了铟、镉、汞的分析结果,自此原子荧光光谱分析才开始被人们所重视。近数十年来发展比较快,现在已经能用这种技术测定多种元素。

四、荧光光谱分析法与分光光度法相比的优缺点

在极低的浓度下,当分光光度计不够精确时,荧光光谱分析法最为精确。例如,可以检测 100pg 的儿茶酚胺或 NADH,通过放大光电管线路所产生的电流,荧光计的灵敏度易于在大范围内调节,荧光光谱计具备大的光谱选择性,因为 Stokes 位移,可以用两个单色器,一个选择激发波长,另一个选择荧光波长,不需要参考比色杯,但是必须制作校准曲线。

使用荧光法的主要问题是能量的淬灭,能量本来会作为荧光发射,但却被转移到其他分子之中。

五、荧光光谱分析法的应用

荧光光谱分析技术就是利用物质的荧光光谱进行定性(有、无)、定量(多、少)分析的一种方法。要得到某物质的荧光光谱,首先要通过热能或电能将物质激发,接收它的光谱,然后通过各种方法达到定性或定量分析的目的。

(一)定性分析

1.“最后线”鉴别法

只寻找某元素发射光谱中的几条谱线，就可以肯定该元素是否存在，各种元素的最后谱线在专著中有列表。

2. 比较鉴别法

把被测样品与标准样品的发射光谱拍摄在同一张照相纸上，通过光谱图的比较进行鉴定。

3. 元素光谱图对照鉴别法

有预先制好的元素光谱图与样品光谱图进行比较鉴别之。

4. 元素谱线波长比较法

用波长仪测量光谱片谱线的波长，然后利用元素谱线波长表，确定某元素是否存在。

(二)定量分析

原子荧光定量分析的理论依据是：单位时间内样品以荧光辐射出来的能量与单位时间内被样品吸收的共振辐射的能量成正比。

由于荧光光谱分析技术的精确性、重复性及灵敏性，当被测物浓度太低不适宜用吸收光谱分析法时，主要利用荧光光谱分析法进行测定。例如，食物中维生素 B_1 的测定。

(三)其他方面的应用

荧光光谱分析法除有上述应用外，还有其他许多方面的应用。例如，酶的测定和动力学分析、蛋白质结构的研究等等。

六、原子荧光光谱仪

原子荧光光谱仪，它的结构大体与发射光谱类仪器相似，但光源光轴与单色器光轴必须呈 90° 角以保证光电管接收荧光的纯度，再者是光源和原子化器有它的特殊要求。

(一)光源

荧光的强度依赖于光源的辐射功率，因此光源辐射功率的高低是选择光源的主要依据，其次要求光源要稳定、寿命长、易于调整。光源有无极放电灯、氙灯、金属蒸气放电灯、空心阴极灯等，常用的是无极放电灯和氙灯。

无极放电灯是由惰性气体、金属封入石英管中制成，将其置入无线电或微波频率场中使灯内原子蒸气激发而辐射出光——较窄的共振荧光谱线。无极放电灯是线性光源，优点是易得，寿命较长，缺点是光学位置不易调整。

氙灯是连续光源，常见的是 150W 和 450W 氙灯。优点是可供多种元素分析，而不像线性光源那样每测一种元素要有一对应光源。

(二)原子化器

不利用火焰而把样品转化成原子的装置称为原子化器。无火焰原子化器具有灵敏度高、用样少、噪音低的优点。原子化器多采用石墨或金属圈，经供电加热后变样品为原子蒸气，进而被激发而发射出荧光。

(初秋)

第二章 几种常用的生物大分子实验技术

第一节 沉淀法

一、盐析技术

盐析法是蛋白质（包括酶类）分离纯化的常用技术，其原理是蛋白质、酶在低盐浓度下的溶解度，随着盐浓度升高而增加（此时称为盐溶）。当盐浓度不断上升时，蛋白质和酶的溶解度又以不同程度下降并先后析出，称为蛋白质的盐析。这一现象是由于蛋白质分子内及分子间电荷的极性基团有着静电吸引，当水中加入少量盐类时，盐类离子与水分子对蛋白质分子上的极性基团的影响，使蛋白质在水中溶解度增大。但盐浓度增加到一定程度时，水的活度被降低，蛋白质表面电荷大量被中和，水化膜被破坏，于是蛋白质分子相互聚集而沉淀析出。盐析法就是根据不同蛋白质和酶在一定浓度的盐溶液中溶解度降低的不同而达到彼此分离的方法。在盐析时，蛋白质的溶解度与溶液中离子强度有如下关系：

$$\lg(S/S_0) := -K_S \times I$$

式中 I 为离子强度， S_0 为蛋白质在纯水中的溶解度， S 为蛋白质在离子强度为 I 的溶液的溶解度， K_S 称为盐析常数(Salting-out constant)。

离子强度(Ionic strength) 是溶液中各种离子的摩尔浓度 (C_i) 与该离子的化合价数 (Z_i) 平方的乘积的总和的 $1/2$ 值：

$$\begin{aligned} I &= 1/2(C_1 Z_1^2 + C_2 Z_2^2 + C_3 Z_3^2 + \dots + C_n Z_n^2) \\ &= 1/2 \sum C_i Z_i^2 \end{aligned}$$

盐析常数 K_S 的值主要与盐的性质（包括该盐类的离子价数和离子平均半径）有关，也和蛋白质的性质有关。一般来说，蛋白质在某一盐溶液中 K_S 越大，盐析效果越好。例如用硫酸铵做盐析时，下面几种蛋白质的 K_S 值分别是：人血红蛋白 0.71，马肌红蛋白 0.94，卵清蛋白 1.22，纤维蛋白原 1.46。所以纤维蛋白原最易被盐析出来，即只要较低离子强度就足以使它从溶液中沉淀析出。反之，血红蛋白盐析所要求的硫酸铵浓度要高得多。在一定的 pH 值和温度条件下，通过改变盐类的浓度（离子强度）来分离蛋白质的方法，称为 K_S 分段盐析法”。

$\lg S_0$ (常用 β 值) 是个常数，它主要取决于蛋白质的性质，也与溶液的 pH 值及温度有密切关系，而与 K_S 值不同 (K_S 与溶液的 pH 值及温度的关系不大)。根据前面公式可改写为：

$$\lg S = \beta - K_S \times I$$

当离子强度不变时，通过改变溶液 pH 值或温度来改变 β 值，也可以达到分离蛋白质的目的，这种方法称为“ β 分段盐析法”。通常在蛋白质的初步提纯阶段多用 K_S 分段盐析法，而在最后精细提纯的步骤则可采用 β 分段盐析法。

二、盐析提纯蛋白质时要选择的条件

(一) 盐的选择

蛋白质盐析常用的盐类是硫酸铵，也可采用硫酸钠、氯化钠、硫酸镁等，通常把这些盐称为“中性盐”，硫酸铵的优点是溶解度大，25℃时其摩尔浓度可达到 4.1mol/L，大约每 1000ml 水可溶解 767g 之多，这样高的浓度足以把多种蛋白质盐析出来。另一个优点是它的温度系数小，即溶解度

受温度的影响不大,例如,在 0°C 时它的溶解度还可达到 3.9mol/L , 这对于蛋白质纯化工作要求在低温条件下进行来说,应用硫酸铵来进行盐析非常有利。此外它的价格低,容易获得,而且不易引起蛋白质变性,所以应用最广。不过它也存在一定缺点,例如,它所含的铵离子可干扰双缩脲反应,使应用 Lowry 氏法,这种常用的蛋白质定量分析方法时发生困难,使用上受到一定限制。

再有,这种方法缓冲能力比较差,故有时也应用硫酸钠,如盐析免疫球蛋白,用硫酸钠的效果也不错,硫酸钠的缺点是 30°C 以下溶解度太低。

(二)盐的饱和度

分段盐析法通过改变盐浓度来达到分离目的,因此要求准确将溶液中盐浓度分步提高到各种蛋白质盐析所需的浓度。在盐析法中常用饱和度来表示所需的盐浓度,而以饱和溶液的饱和度定为 100% 。当实验中需要将蛋白质溶液的硫酸铵饱和度 S_1 提高到另一新的饱和度 S_2 时,可以方便地直接从表 2-2-1 中查出需要添加的固体硫酸铵的克数。

表 2-2-1 室温下由饱和度 S_1 提高到 S_2 时每升溶液应添加固体硫酸铵的克数

$S_1 \backslash S_2$	0.10	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
0	55	113	144	175	209	242	278	312	350	390	430	474	519	560	608	657	708	760
0.10		57	67	118	149	182	215	250	287	325	365	405	448	494	530	585	634	685
0.20			29	59	90	121	123	188	225	260	298	337	379	420	465	512	559	610
0.25				29	60	91	93	157	192	228	265	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	62	125	160	195	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	31	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40								63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45								31	64	98	133	169	206	245	286	330	373	420
0.50									32	63	100	135	172	211	250	292	335	380
0.55										33	66	101	138	176	214	255	298	344
0.60											33	67	103	140	179	219	262	305
0.65												34	69	105	143	182	224	267
0.70													34	70	108	146	187	228
0.75														35	72	110	149	170
0.80															36	73	112	152
0.85																37	75	114
0.90																	37	76
0.95																		38

此外,也可以先配制盐的饱和溶液,然后根据需要逐步加入蛋白质溶液中,以提高盐的饱和度达到分段盐析的目的。每次提高盐的饱和度所需的饱和溶液量可用下式求出:

$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

式中 V 为所需添加的饱和溶液的体积(毫升), V_0 为需要提高饱和度的蛋白质溶液的体积, S_2 为所需达到的饱和度, S_1 为原来蛋白质溶液的盐饱和度。

(三) pH

前面已经指出, β 值和溶液的 pH 有密切关系。当溶液的 pH 达到蛋白质的等电点时, β 值最小,蛋白质的溶解度最低,最容易从溶液中析出。因此进行盐析时,应注意溶液的 pH,通常溶液的 pH 要控制在接近于待分离的蛋白质的等电点。例如,配制饱和硫酸铵溶液时,往往还需要向溶液中添加适量硫酸或浓氨水,来调节溶液的 pH,使之接近于待分离蛋白质的等电点。若要分离血清