高等医药院校《生物化学与分子生物学》配套教材

供临床、预防、麻醉、检验、药学、精神卫生、护理等医学类专业及生物学专业使用

生物化学与分子生物学实验指导

主　编　骆亚萍

副主编　刘灿华　李文凯

编　者　(以姓氏笔划为序)

龙　苏　李文凯　刘灿华

刘美莲　向新颖　陈汉春

陈淑华　骆亚萍　唐建华

黄建军　曾卫民

中南大学出版社

需要全本请访问 www.ertongbook.com

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验指导/骆亚萍主编. —长沙:
中南大学出版社, 2006. 2

ISBN 7-81105-268-7

Ⅰ. 生... Ⅱ. 骆... Ⅲ. ①生物化学 - 实验 - 高等学校 - 教学参考资料②分子生物学 - 实验 - 高等学校 - 教学参考资料
Ⅳ. ①Q5 - 33②Q7 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 009410 号

生物化学与分子生物学实验指导

主编 骆亚萍

□责任编辑 谢新元
□责任印制 汤庶平
□出版发行 中南大学出版社
社址: 长沙市麓山南路 邮编: 410083
发行科电话: 0731-8876770 传真: 0731-8710482
□印 装 中南大学湘雅印刷厂

□开 本 730× 960 1/16 □印张 12.75 □字数 229 千字
□版 次 2006 年 2 月第 1 版 □2006 年 2 月第 1 次印刷
□书 号 ISBN 7-81105-268-7/R・024
□定 价 18.00 元

图书出现印装问题, 请与经销商调换

前　　言

生物化学与分子生物学是生命科学的重要组成部分，其发展日新月异。生物化学与分子生物学理论的形成和发展几乎都以实验技术为基础，为了顺应生物化学与分子生物学学科的发展，贯彻落实教育部关于“ 教材建设精品化 ”的精神，我们以使用多年的《生物化学、分子生物学实验》讲义为蓝本，重新组织了修订与编写，并以《生物化学与分子生物学实验指导》教材正式出版。

本教材以大学本科医学类专业及生物学专业学生为主要读者群，结合《生物化学与分子生物学》课程学时，按教学大纲必须掌握的实验项目进行编写，对学习和加深理解生物化学与分子生物学知识有指导意义。本教材亦可作为相关领域研究生以及从事相关领域科学研究和检验人员的参考用书。参加本教材编写的人员是中南大学湘雅医学院一批多年来一直从事生物化学与分子生物学教学和科研的骨干教师，书中精选了湘雅医学院生物化学教研室认为学生必须掌握的教学实验项目，或任教老师认为今后科研过程中会经常遇到的实验操作。在章节编排方面，本教材将四大生物化学技术和分子生物学基本原理以及一些常用生化仪器合为实验基础理论部分；实验操作部分紧贴教学大纲与统编理论教材密切配合，并增加了适用于生物学专业学生的 10 余项实验，对原用于医学专业的实验也进行了修订，但见于编者的知识浅短、局限，仍可能存在不足之处，敬请批评指正。

编　者

2006 年 1 月

目 录

实验须知 …… (1)
生物化学实验基本操作训练 …… (3)

第一部分 常用生物化学与分子生物学技术及原理

第 1 章 分光光度法 …… (6)
1.1 基本原理 …… (6)
1.2 分光光度法的定性和定量分析 …… (7)
1.3 分光光度计的结构 …… (9)
第 2 章 层析技术 …… (12)
2.1 离子交换色谱法 …… (12)
2.2 凝胶过滤色谱法 …… (16)
2.3 吸附层析法 …… (25)
2.4 分配色谱法 …… (27)
2.5 亲和层析法 …… (29)
第 3 章 电泳技术 …… (32)
3.1 基本原理 …… (32)
3.2 一般技术 …… (38)
3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 …… (41)
3.4 蛋白质的凝胶聚焦电泳法 …… (51)
第 4 章 离心技术 …… (59)
4.1 基本原理 …… (59)
4.2 离心机和转子的种类 …… (63)
4.3 离心分离的种类 …… (66)
第 5 章 分子生物学基本原理 …… (69)
5.1 基本概念 …… (69)
5.2 重组 DNA 技术 …… (71)
第 6 章 生化实验常用仪器 …… (85)
6.1 722 型分光光度计 …… (85)

6.2 精密 pH 计 …… (86)
6.3 高速离心机 …… (87)
6.4 PCR 基因扩增仪 …… (87)

第二部分 生物化学与分子生物学实验

第 7 章 蛋白质定性定量分析 …… (90)
实验一 蛋白质的沉淀反应 …… (90)
1. 蛋白质的盐析 …… (90)
2. 用重金属盐沉淀蛋白质 …… (92)
3. 用沉淀生物碱的试剂沉淀蛋白质 …… (92)
4. 用无机酸沉淀蛋白质 …… (93)
5. 用有机酸沉淀蛋白质 …… (93)
6. 加热沉淀蛋白质 …… (93)
实验二 蛋白质的两性反应及等电点测定 …… (94)
1. 蛋白质的两性反应 …… (94)
2. 酪蛋白的等电点的测定 …… (96)
实验三 Bradford 法测定蛋白浓度 …… (96)
实验四 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定 …… (97)
实验五 微量凯氏定氮法测定血清总蛋白 …… (99)
实验六 蛋白质定量的紫外分光光度法 …… (103)
实验七 福林 - 酚试剂法测定血清总蛋白 …… (103)
实验八 用离子交换层析法分离混合氨基酸 …… (105)
实验九 凝胶过滤分离高铁血红蛋白与高铁氰化钾 …… (109)
实验十 凝胶过滤分离纯化脲酶及其活性测定 …… (111)
实验十一 血清 γ球蛋白的分离与纯化 …… (115)
实验十二 醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质 …… (118)
实验十三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清蛋白质 …… (121)
实验十四 凝胶等电聚焦分离血清蛋白质 …… (125)
第 8 章 核酸定性定量分析 …… (127)
实验十五 酵母 RNA 的提取(浓盐法) 及成分鉴定 …… (127)
实验十六 核酸的定量测定——定磷法 …… (129)
第 9 章 酶学实验 …… (132)

需要全本请访问 www.ertongbook.com

1. 酶活力 …… (132)
2. 初速度 …… (132)
实验十七 底物浓度及抑制剂对酶促反应速度的影响 …… (133)
实验十八 温度、pH 对酶促反应速度的影响 …… (137)
实验十九 蔗糖酶与淀粉酶的专一性实验 …… (139)
实验二十 乳酸脱氢酶及其辅酶的作用实验 …… (140)
实验二十一 乳酸脱氢酶同工酶活性测定 …… (143)
实验二十二 丙酮酸脱氢酶活性测定 …… (144)
实验二十三 糖原合成酶活性测定 …… (145)
第 10 章 代谢实验 …… (147)
实验二十四 还原糖的定量测定 …… (147)
1. Somogyl - shaffer - Hartmann 法定糖 …… (147)
2. 比色法定糖 …… (150)
实验二十五 肝糖原的提取和鉴定 …… (151)
1. 肝糖原提取 …… (151)
2. 鉴定 …… (152)
实验二十六 粗脂肪的定量测定——索氏提取法 …… (152)
实验二十七 脂肪皂化值及碘值的测定 …… (154)
1. 脂肪皂化值的测定 …… (154)
2. 脂肪碘值的测定 …… (156)
实验二十八 脂肪酸的 β- 氧化 …… (158)
实验二十九 肝组织的生酮作用 …… (160)
实验三十 转氨基作用及其鉴定 …… (161)
第 11 章 分子生物学实验 …… (164)
实验三十一 外周血白细胞 DNA 提取(微量法) …… (164)
实验三十二 琼脂糖凝胶电泳 …… (165)
实验三十三 大肠埃希菌质粒转化实验 …… (167)
实验三十四 微量快速质粒 DNA 的提取与纯化(碱裂解法) …… (168)
实验三十五 限制性核酸内切酶消化 DNA …… (170)
实验三十六 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段(低熔点胶法) …… (172)
实验三十七 质粒的柱层析纯化 …… (174)
实验三十八 聚合酶链反应 …… (175)
实验三十九 单链构象多态性分析 …… (178)
1. 10% 聚丙烯酸胺凝胶的制备 …… (179)

2. 电泳 …… (179)
3. 银染 …… (180)
4. 凝胶干燥 …… (180)
第 12 章 临床生化实验 …… (181)
实验四十 酶法(GOD - PAP 法) 测血清葡萄糖 …… (181)
实验四十一 血清尿素氮的测定 …… (182)
实验四十二 血清甘油三酯测定 …… (184)
实验四十三 红细胞膜的制备 …… (186)
实验四十四 红细胞膜蛋白质含量测定(改良福林 - 酚试剂法) …… (188)
实验四十五 红细胞膜总胆固醇含量的测定 …… (189)
实验四十六 维生素 C 含量的测定(碘滴定法) …… (191)

实验须知

【实验目的】

(1) 学习和掌握生物化学基本技术和研究方法，为临床医学和实验医学打下基础。

(2) 培养学生实事求是的工作作风，树立对科学研究的正确态度和科学的思维方法。

【实验要求】 进行科学实验不仅要求质量(结果良好)而且要求高效率，为此应注意以下各点:

(1) 实验前做好预习，只有在充分做好预习的基础上，实验才能获得较好的结果，这是培养学生在实验中独立工作的必要过程，每次实验前必须通过预习着重了解实验目的和要求、实验原理及主要操作步骤，特别要弄清实验设计的原理。并根据这些，计划好整个实验应使用的仪器、操作程序及大致的时间分配，做到心中有数，避免盲目机械地按实习指导操作。

(2) 实验室必须保持整洁安静，实验者必须严肃认真并专心地进行操作，细致地观察实验现象，并从实验结果中得出正确的结论，写好实验报告。

【实验原始记录及报告】 每人必须准备一个原始记录本，一切观察的现象与实验数据必须记录在记录本上，做实验不能无记录或仅仅凭印象来描述结果。也不准用碎纸记录，更严禁将原始记录涂写在手心上。这关系到良好的科学习惯的培养。

实验报告内容包括实验日期、名称、原理、主要操作步骤及观察结果、解释与结论。报告要用自己的话来书写，字迹端正整洁，内容简明扼要。报告应于 2 天内送交指导教师，教师批阅报告并登记入册，作为本课程实验考核成绩，不能无故缺交报告，如违反规定，将酌情扣减实验成绩。

【实验室规则】

(1) 保持实验室肃静。

(2) 爱护仪器，尽量避免破损，节约使用试剂、蒸馏水、自来水和电。若不慎损坏了仪器，须填写仪器破损单，注明破损原因，并经指导教师同意后，方可到生物化学供应室换领，并按学院规定赔偿和处理。

(3) 保护实验台，不要将高温物品直接放在台面上，切勿将强酸、强碱等

物洒在台面上。

(4) 取完试剂应及时将瓶盖盖好，放回原处。千万不要乱扔乱放，以免影响别人做实验。

(5) 废弃液体可倒入水池，并放水冲走，固体废物应倒入废物缸内。

(6) 每个实验室选出室长1名，负责实验室的有关工作。于开学时排出保安卫生值日。每次实验完毕后，值日生应负责打扫实验室，并检查门窗水电保安工作。

(7) 实验用仪器包括公用仪器与自己保管仪器。公用仪器不得放入自己的仪器柜内，用毕放回原处；自己保管的仪器，每组一套，各种小仪器名称规格及数量见表1。

表1 各种小仪器的名称数量

名称	数量	名称	数量
大烧杯	1个	滴管	2支
小烧杯	1个	玻棒	1支
大试管	18支	试管夹	1个
小试管	4支	试管架	1个

生物化学实验基本操作训练

【实验目的】

(1) 了解实验室的一般规则，点收仪器。

(2) 掌握一般玻璃仪器的洗涤法和刻度吸量管的使用。

【器材及药品】 ① 试管；② 量筒；③ 吸量管(0.1mL、0.5mL、1mL、2mL、5mL 及 10mL 各 1 支)；④ 红色墨水。

【点收仪器】 逐项清点仪器是否完整无缺，若有破损或减少，应向指导教师报告并请求更换或补发。

【玻璃仪器的洗涤】

(1) 一般容器：如试管、量筒及烧杯等，可直接用肥皂水或去污粉刷洗，再用自来水多次冲洗，去尽肥皂水或去污粉，最后用少量蒸馏水冲洗 2～3 次，倒置沥干备用。洗净的容器内壁应是光洁不沾挂水珠。

(2) 容量分析仪器：如吸量管、量筒及滴定管等，先用自来水冲洗多次，待沥干后，再用铬酸洗液浸泡数小时，然后用自来水充分冲洗，直到将洗液全部洗净为止，最后用少量蒸馏水冲洗 2～3 次备用。

【吸量管的种类】 吸量管分有三种类型(图 1)，分述如下：

(1) 奥氏吸量管：奥氏吸量管供准确量取 0.5mL、1mL、2mL、5mL 及 10mL 液体之用。每根吸量管上只有一个刻度，放液时最后须吹出残留在管尖的液体。这类吸量管的特点是在同一容量的吸量管中以它的内表面积为最小。故准确度最高，常作为量取黏度较大的液体之用。

(2) 移液管或移液吸量管：移液管供准确量取 1mL、5mL、10mL、20mL、25mL、50mL 及 100mL 液体之用。每根吸量管上只有一个刻度，放液时待管内液体流出后，吸量管管尖在容器内壁上继续停留 15～30 秒钟，管尖残留液体不得吹出。这类吸量管常作为化学容量分析定量稀释之用。

(3) 刻度吸量管：刻度吸量管供量取 10mL 以下的任意体积的液体之用。有 0.lmL、0.2mL、0.25mL、0.5mL、1mL、2mL、5mL 及 10mL 几种。这类吸量管刻度有到尖端者和不到尖端者两种。因生产单位不同，有自上而下或自下而上的两种刻度法。因此，使用时应仔细分清，千万不要弄错。若使用刻度到尖端者，则在所量取的液体全部放出后，须将残留在管尖的液体吹出；若使用刻

度不到尖端者，则以刻度为准。例如使用 lmL 吸量管吸取 lmL 液体时，则将液体恰巧放出至下端刻度即可，决不可放液达到最低的刻度以下。

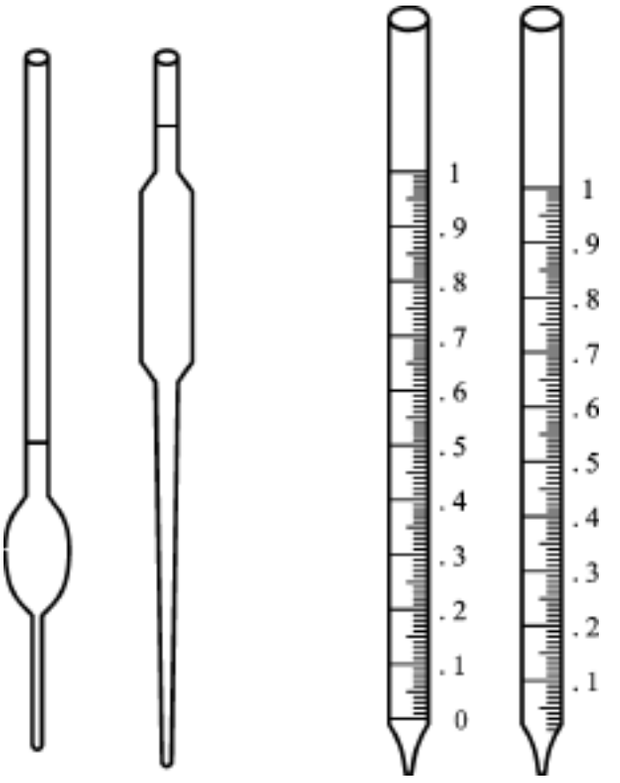


图 1　三种类型吸量管

【吸量管的使用方法】　三种类型的吸量管除上述几点不同外，其他操作相同，并简介如下：

(1) 拿管法：中指和拇指拿住吸量管上端，示指(也称食指)顶住吸量管顶端。

(2) 取液：将吸量管插入液体内，用胶皮球吸取液体至最高刻度以上，然后迅速用示指按紧吸量管顶端，使液体不致从管内流出。

(3) 调刻度：将已充满液体的吸量管提出液面，用碎滤纸片抹干吸量管外面的液体，然后持吸量管与地面保持垂直，放松示指控制液体缓慢地下降刚好至最上刻度(液体凹面、刻度和视线应在一水平面上)，立即按紧吸量管顶端。

(4) 放液：放松示指，让液体缓慢地放入容器内(图 2)。

【吸量管的选用原则】

(1) 量取整数量液体时，应选用奥氏吸量管，若量取体积较大时可用移液管。

(2) 选用与取液量最近的吸量管。如欲取 0.15mL 液体，应选用 0.2mL 刻度吸量管。而不能用 0.5mL 刻度吸量管。

(3) 做生化定量实验，如几个试管需加入不同量的同一种液体时，要根据加入液体的量酌情选用吸量管。如各管所加入的液体量分别为 0.2mL、0.4mL、0.6mL 及 0.8mL 时，应选用 1 支与最大的取液量接近的刻度吸量管，即 1mL 刻度吸量管。但另一种情况却不能这样做，如各管加入液体的量为 1mL、2mL、5mL 及 8mL 时，则不能选用同 1 支 10mL 刻度吸量管吸取不同的量加入各管中，而应该分别用 1mL、2mL、5mL 及 10mL 刻度吸量管吸取。因为用 10mL 刻度吸量管量取 1mL、2mL 甚至 5mL 溶液时，管内径太大，其刻度是很难控制准确的。

(4) 当取液量不足吸量管的满刻度时，如用 1mL 刻度吸量管量取 0.6mL 液

需要全本请访问 www.ertongbook.com

体时，应选用刻度吸量管中上段刻度(指刻度到尖端者)。若用1mL刻度不到尖端的吸量管，上中下段刻度都可以使用。

【试管内液体的混匀方法】 如何使试管或离心管中先后加入的数种试剂充分混匀是生化实验中的最常用的基本操作，通常试管内液体的混匀方法有以下几种:

(1) 旋转法(使试管做周围运动)：液体较多时常采用此法。右手拿试管上端，利用手腕力量使试管做周围运动。顺时针或逆时方向转动都可以，但必须朝一个方向(图3)。



图2 使用吸量管放液的姿式

(2) 指弹法：液体较少时可采用此法。左手持试管上端，使试管大致垂直于地面，再用右手手指轻轻弹动试管(即手指与试管壁成切线运动)，使管内液体呈漩涡状转动。

(3) 甩动法：此法只适用于少量液体的混匀。右手握住试管上端，将试管倾斜在桌面上来回迅速甩动，使管内液体呈旋涡状转动。



图3 旋转法

(4) 倒转法与玻棒搅拌法：生化实验不常采用这两种方法。

【实验内容】

(1) 识别吸量管的容量、类型、刻度的有效位数，并练习正确使用。

(2) 用1mL、2mL、5mL及10mL刻度吸量管准确量取1mL、2mL、3mL、5mL及10mL自来水分别加入5支试管中。然后用0.5mL吸量管量取0.5mL红墨水分别加入上面的试管中，按上述各种混匀法把各管混匀。

【思考题】

(1) 1支试管用3mL蒸馏水洗1次与用1mL蒸馏水洗3次，哪种方法能清洁试管？为什么？

(2) 何谓有效数字？123.0、12.3、0.123、0.01230各有几位有效数字？

(3) 1mL刻度吸量管的最细刻度为0.01mL，有效数字应读至小数点后第几位？

(骆亚萍)

第一部分 常用生物化学与分子生物学技术及原理

第1章 分光光度法

物质对不同波长的光波具有选择吸收的特性，分光光度法就是基于物质的这种特性而建立起来的分析方法。它利用单色器获得单色光来测定物质对光的吸收能力。分光光度法极为灵敏、精确、快速和简便，在复杂组分的系统中，不需要分离，即能检测出其中所含的极少量物质，所以利用物质对不同波长的电磁辐射能量的吸收，进行各种分光光谱分析，已经成为近代化学和许多其他现代科学研究领域中对物质的定量分析和结构研究的重要实验手段，这些方法包括紫外线可见分光光度法、红外线吸收光谱、微波吸收光谱和磁共振及其他光谱等等。

1.1 基本原理

1.1.1 光的基本性质

光是由光量子组成的，具有二重性，即不连续的微粒和连续的波动性。波长和频率是光的波动性特征，可用下式表示：$\lambda = C/V$

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。V 为频率，即每秒钟振动次数。C 为光速等于 299 770km/s。光属于电磁波。自然界中存在各种不同波长的电磁波，电磁波按照频率大小，从频率最小的无线电波到频率最大的 γ- 射线排成一列，即组成电磁波的波谱，分光光度法所使用的光谱范围为 200nm ～10 μ(1 μ = 1000nm) 。其中 200 ～400nm 为紫外光区，400 ～760nm 为可见光区，760 ～10000nm 为红外光区。

1.1.2 光吸收的基本定律(Lanbert-Beer 定律)

朗伯-比尔(Lanbert-Beer) 定律是比色分析的基本原理，这个定律是有色溶液对单色光的吸收程度与溶液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。

Lanbert 指出，当一定强度的光线(I_0) 通过溶液时，如果溶液的浓度一定，则透过光线的强度(I) 随所通过溶液厚度(b) 的增加成指数函数的减少，即:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon b} \quad (1)$$

Beer 指出，当溶液厚度一定时，透过光线的强度随吸收物质的浓度(C) 的增加成指数函数的减少，即:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon C} \quad (2)$$

在(1) 和(2) 式中，ε为常数，它与照射光线的波长和吸收光线物质的性质有关，将两式合并得:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon bC} \quad (3)$$

将③式的指数式改写成对数式，即

$$\lg I/I_0 = -\varepsilon bC \quad (4)$$

式中 I/I_0 称透光度(transmittancy) 以 T 表示，通常以百分率来表示，称为透光率(T%) 。透光度或透光率是表示光线透过情况的量度，其数值 < 1，若用透光度的负对数来表示，得到:

$$A = -\lg 1/T = \varepsilon bC \quad (5)$$

式中 A 为吸光度(消光度或光密度) 是表示光线被吸收情况的量度，吸光度与被测溶液的浓度(C) 、溶液的厚度或光程(b) 的乘积成正比。此关系即为 Lanbert-Beer 定律，简称 Beer 定律。

式中的 ε称为摩尔吸收系数(即溶液浓度为 1mol/L 时，光程为 1cm 时，某一波长下的吸光度) ，为一常数，ε值是任何物质在特定波长下吸收光线能力的指标，

吸收定律是紫外和可见吸收光度分析法进行定量分析的理论基础，必须对它的意义和使用条件有充分的认识和正确的理解。为此，应该着重指出:

第一，必须是在使用适当波长的单色光为入射光的条件下，吸收定律才成立。单色光越纯，吸收定律越准确。

第二、并非任何浓度的溶液都遵守吸收定律，稀溶液(10^{-4} ～10^{-5} mol/L) 都遵守吸收定律，浓度过大时，将产生偏离。

第三、吸收定律能够用于那些彼此不相互作用的多组分的溶液，它们的吸光度具有加合性。

1.2 分光光度法的定性和定量分析

1.2.1 用紫外光谱法鉴定化合物

用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线(图 1 - 1) 。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度的溶液，测定此溶液对每一种单色光的吸光度，然

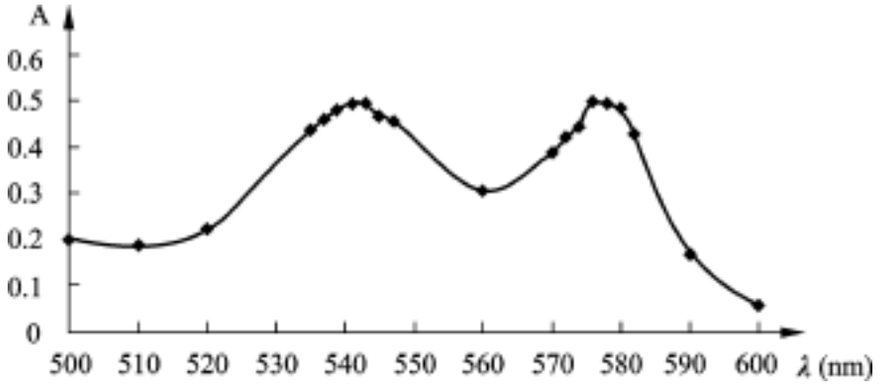


图 1 - 1 吸收光谱曲线

后以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制吸光度(A) ——波长曲线，此曲线即吸收光谱曲线。各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线，因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线一样时，则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时，其吸收光谱曲线中，峰值的大小不同，但形状相似，即吸收高峰和低峰的波长是一定不变的。紫外线吸收是由不饱和的结构造成的，含有双键的化合物表现出吸收峰。紫外吸收光谱比较简单，同一种物质的紫外吸收光谱应完全一致，但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外，单独依靠紫外吸收光谱决定一个未知物结构，必须与其他方法配合。紫外吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

1.2.2 测定溶液中物质的含量

可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。具体来说有两种方法:

(1) 标准管法: 设同一物质的两种不同浓度的溶液，其浓度分别为 C_1、C_2，盛在相同厚度的比色杯中，透光厚度 b 相同。用同一个单色光源，测得其吸光度分别为 A_1 和 A_2，则有: $A_1 = \varepsilon bC_1$; $A_2 = \varepsilon bC_2$，两式相除得:

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{\varepsilon bC_1}{\varepsilon bC_2} \qquad \frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2}$$

或 $C_1 = A_1 / A_2 \times C_2$。此式为计算吸光度的计算公式，其意义为: 同一物质的两种不同浓度的溶液，盛于相同厚度的比色杯中，用同一单色光源照射时，两溶液的吸光度之比与两溶液的浓度之比相等。式中 A_1 和 A_2 都为实验数据，是已知的，设 C_2 为标准溶液也是已知的，则待测溶液的浓度 C_1 即可求出。

(2) 标准曲线法(查表法) : 根据 Beer 定律，在分光光度计的测定范围内，可配制一系列已知不同浓度的标准溶液，在特定波长条件下由光度计分别测出

它们的吸光度值。以 A 为纵坐标，相应的溶液浓度(C) 为横坐标，在坐标纸上可作出一条吸光度与浓度成正比通过原点的直线，称作标准曲线(图 1 - 2) ，也称为工作曲线、C - A 曲线。按相同条件处理的未知溶液(与标准溶液同质) ，只要测得其吸光度值，即可由标准曲线上查出相应的浓度值。

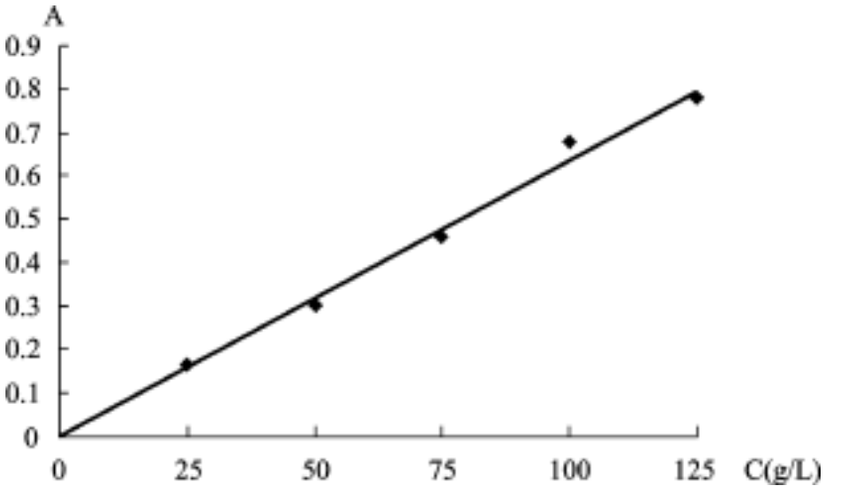


图 1 - 2　标准曲线

标准曲线法比标准管法精确，它可以消除由于种种原因所引起的偏离吸收定律而造成的误差，并可判别待测溶液使用的测定浓度范围。虽然制作标准曲线比较费时，但对于成批样品的测定却有简便省时的优点。所以，在一般实际工作中，广泛应用这种方法。

在分光光度分析中，吸光度的测量通常都在对应于吸收峰的波长处(λ_{max}) 进行，因为在此处每单位浓度所改变的吸光度值最大，因此，可得到最大的测量灵敏度。同时，吸收曲线在这个区域常常是平坦的，吸光度随波长的变化最小，可以得到最佳的测量精度。

为了避免来自其他吸收物质的干扰，对于某种特殊的分析也可选用非峰值的波长。在这种情况下，如果可能的话，应选择一个其吸收系数随波长的改变不太大的区域。

1.3　分光光度计的结构

分光光度计一般可根据使用的波长范围分成:

紫外 - 可见分光光度计: 如国产的 751 型。

可见分光光度计: 如国产的 721G 型、722 型。

无论哪一种分光光度计都包括 5 个基本部件: 光源、单色光器、吸收池、检测器和测量仪表。

1.3.1 光源

必须具有稳定的、有足够强度的连续光谱，并经聚光镜使成平行光。分光光度计常用的光源有两种：钨灯和氢灯。钨灯(普通白炽灯)可用以提供可见光光源，其可应用的光谱范围为320～2500nm，为保证光源稳定，常常装配稳压电源。氢灯，常用的为低压氢灯，具石英窗，提供紫外光的光源，光谱为180～375nm，实际上只用于360nm以下。氢灯灯丝需预热，点燃后灯丝停止加热，故需配有以热开关控制的专用稳压器。

1.3.2 单色光器

单色器是把混合光波分解为单一波长光的装置。在分光光度计中多用棱镜或者光栅作为色散元件。

棱镜：光波通过棱镜时，不同波长的光折射不同。波长愈短，传播速度愈慢，折射率也愈大；反之，波长愈长，传播速度愈快，折射率愈小。因而能将不同波长的光分开。棱镜有玻璃或石英制成，形状和用法在不同仪器上可有不同

光栅：在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线，由于刻线处不透光，通过光的干涉和衍射使较长的光波偏折角度大，较短的光波偏折角度小，因而形成光谱。

1.3.3 吸收池(比色杯)

装测定溶液的容器称吸收池，一般由透明玻璃制成，吸收紫外光的用石英制成。比色杯的形状多为方形，其大小决定光线通过液层的厚度(L)，有各种不同容量和光程规格，常用的为10mm比色杯。

要求高准确度的分析，需用配对的比色杯(配对标准以读数相对偏差<2%)，一般可固定使用，以消除误差。比色杯上的指纹、油污或壁上的沉积物都会显著地影响其透光性。比色杯的维护主要应注意下列几点：不要使比色杯的光学面接触硬物，以免产生划痕，任何抓痕将导致严重的误差；测定毕，不要残留溶液于池内，特别是蛋白质和核酸溶液，将会牢固地粘于池壁；擦拭比色杯必须用软绸缎布或擦镜纸，以免发生光学面永久性擦伤。

1.3.4 检测器

主要作用是接受透射光信号，以转换成电能，其电流大小与入射光强度成正比，产生的电流经放大后由测量仪表以吸光度或透光度读出。有下列3种类型：

(1) 光电池：通常用硒光电池或阻挡层光电池。因光电流大，无须放大，但有疲劳现象，使用中应注意。

(2) 光电管：在阴极涂有不同光敏金属，故有不同规格，光电流小，需放

需要全本请访问 www.ertongbook.com