

分光光度计有效测量范围的生化实验验证

何正平, 陆红, 吴忠良, 江培

(复旦大学 生物科学教学实验中心 生物化学实验室, 上海 200433)

摘要:为了在生物化学实验讲解中更直观地说明使用分光光度计时的有效测量范围,分别测定了不同浓度的苯丙氨酸和 pSK 质粒的光吸收值,与相应的标准浓度对照,计算出不同光吸收值的偏差,得到光吸收值与测量偏差的曲线。实验结果表明,当光吸收值小于 0.1 和大于 1.0 时,测量偏差超过 10%,而当光吸收值在 0.1~1.0 之间时,测量偏差小于 10%(当光吸收值在 0.3~0.7 之间时,测量偏差小于 4%),测量值有效可信。本实验以氨基酸和核酸两种物质为例,验证了分光光度计的有效测量范围为 0.1~1.0。

关键词:有效测量范围;光吸收值;偏差

中图分类号:Q 5-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7167(2007)02-0033-02

Biochemical Experimental Definition in Reliable Measurement of Spectrophotometer

HE Zheng-ping, LU Hong, WU Zhong-liang, JIANG Pei-hong

(Lab. of Biochemistry, Teaching Center of Biology, Fudan Univ., Shanghai 200433, China)

Abstract: To show the reliability of spectrophotometric measurements in the experimental teaching, A280 for serial dilution of phenylalanine and A260 for serial dilution of plasmid pSK were taken. For each sample, the percentage standard deviation was plotted. The results show that the standard deviation is up 10% for low and high spectrophotometric values, and the standard deviation is below 10% for spectrophotometric values between 0.1 and 1.0 (as little as 4% for readings between 0.3 and 0.7). The spectrophotometric values between 0.1 and 1.0 are very reproducible.

Key words: reliable measurements; spectrophotometric values; deviation

CLC number: Q 5-3

Document code: A

Article ID: 1006-7167(2007)02-0033-02

使用分光光度计测量溶液的透光率,测量值和实际值之间具有一定的偏差,因而只有在一定的测量范围内,测量值才是有效可信的^[1,2]。为了在教学中更直观地说明使用分光光度计时的有效测量范围,我们设计了两个生物化学实验,以实验数据来验证分光光度计的有效测量范围为 0.1~1.0。

分别精确称取一定量的苯丙氨酸和 pSK 质粒,进行系列稀释,对每个稀释度的溶液进行比色测定,计算测定值和标准浓度之间的偏差,得到光吸收值与测量偏差的曲线。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

(1) 仪器:精密分析天平,容量瓶,移液管,真空冷冻干燥机,UV240 紫外光栅分光光度计。

(2) 试剂:磷酸缓冲液(pH 7.5, 0.1 mol/L),苯丙氨酸, pSK 质粒(复旦大学生物化学与分子生物学实验室提供), QIAGEN Plasmid Maxi Kit (购自 QIAGEN)。

1.2 实验原理

酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的 R 基含有苯环共轭双键,因此酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸在近紫外光区域(220~300 nm)具有光吸收。酪氨酸的最大光吸收(ϵ_{\max}) 在 275 nm,在该波长下的摩尔消光系数(molar extinction coefficient) $\epsilon_{275} = 1.4 \times 10^3$;苯丙氨酸的 ϵ_{\max} 在 257 nm, $\epsilon_{257} = 2.0 \times 10^2$;色氨酸的 ϵ_{\max} 在 280 nm,

收稿日期:2006-03-16

作者简介:何正平(1965-),男,浙江义乌人,学士,实验师, Tel: 021-65642811; E-mail: luhong@fudan.edu.cn

$280 = 5.6 \times 10^3$ 。因此可以利用分光光度法测定这3种氨基酸的含量。分光光度法定量分析所依据的是 Lambert-beer 定律:

$$A \text{ 或 } D = \lg I_0 / I = \lg 1 / T = CL$$

式中:A或D为光吸收或光密度;C为摩尔消光系数;L为吸收杯的内径长度(cm); I_0 为入射光强度;I为透射光强度;T为透光率。

核酸在260 nm处有特征的光吸收,其浓度和光吸收值见表1。

表1 浓度和光吸收值

1个 A_{260} 单位(1 cm 测量光径)	浓度/($\mu\text{g mL}^{-1}$)
dsDNA	50
ssDNA	33
RNA	40
寡核苷酸	20~30

分别精确称取一定量的苯丙氨酸和 pSK 质粒,进行系列稀释,对每个稀释度的溶液进行比色测定,每个稀释度重复测定4次,计算测定值和标准浓度之间的偏差,可以绘制了光吸收值与测量偏差的曲线,得出分光光度法测定溶液浓度的有效测量范围。

1.3 实验方法

(1) pSK 质粒的抽提和纯化^[4,7]。质粒的抽提按“分子克隆”相关方法操作;质粒的纯化按《QIAGEN Plasmid Purification Handbook》相关方法操作。纯化后质粒真空冷冻抽干。

(2) 光吸收值与测量偏差曲线^[5]。分别精确称取41.3 mg的苯丙氨酸和2.5 mg的pSK质粒,溶解到10 mL,然后进行系列稀释,对每个稀释度的溶液进行比色测定,每个稀释度重复测定4次,计算测定值和标准浓度之间的偏差,得到光吸收值与测量偏差的曲线。

2 结果与讨论

2.1 苯丙氨酸光吸收值与测量偏差曲线

按照实验方法1.3(2),测定了不同稀释度的苯丙氨酸溶液的光吸收值,计算测定值和标准浓度之间的偏差,得到光吸收值与测量偏差的曲线如图1。

(上接第32页)

度。通过对以上实验的微量化尝试,说明此微型滴定符合分析实验、绿色化学的要求。所以应将此方法进一步探索并推广到其它分析实验中。

参考文献(References):

- [1] 周怀宁,王德林.微型有机化学实验[M].北京:科学出版社,1999.
- [2] 贤景春,刘宗瑞.微型化学实验[M].呼和浩特:内蒙古教育出版社,2000.

2.2 pSK 质粒光吸收值与测量偏差曲线

按照实验方法1.3(2),测定了不同稀释度的pSK质粒溶液的光吸收值,计算测定值和标准浓度之间的偏差,得到光吸收值与测量偏差的曲线如图2。

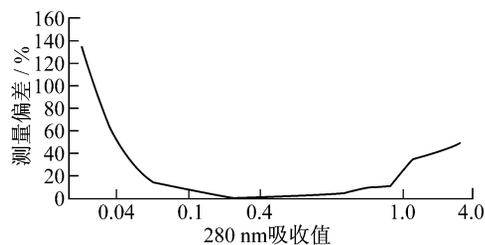


图1 苯丙氨酸光吸收值与测量偏差的关系

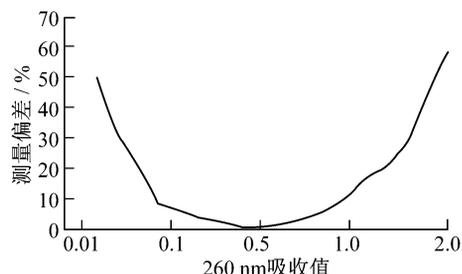


图2 pSK 质粒光吸收值与测量偏差的关系

从图1和图2所得到的两条光吸收值与测量偏差的曲线可以看出:当光吸收值小于0.1和大于1.0时,测量偏差超过10%而当光吸收值在0.1~1.0之间时,测量偏差小于10%(当光吸收值在0.3~0.7之间时,测量偏差小于4%),测量值有效可信。本实验以氨基酸和核酸两种物质为例,验证了分光光度计的有效测量范围为0.1~1.0,可以在教学中更直观地讲解使用分光光度计时的有效测量范围。

参考文献(References):

- [1] 殷海青.光度分析中工作曲线偏离朗伯-比尔定律的原因[J].青海师专学报,2004(5):63-66.
- [2] 沈同,王镜岩.生物化学[M].北京:高等教育出版社,1990.
- [3] 周建林.紫外分光光度法测定17种结晶氨基酸注射液中色氨酸的含量[J].中国生化药物,1994(2):125-126.
- [4] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1994.
- [5] 陈钧辉.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2003.
- [6] Philippe Sauer, Markus Müller, and Jie Kang. Quantitation of DNA[J]. QIAGEN News, 1998, Issue 2:23-25.
- [7] QIAGEN Plasmid Purification Handbook[Z]. QIAGEN, 2000.
- [3] 解庆范,黄汉杰.酸碱滴定分析微型实验研究[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2004,19(1):44-45.
- [4] 解庆范,郑志福.甲醛法测定硫酸铵中氮含量的微型化研究[J].泉州师范学院学报(自然科学版),2004,22(2):75-77.
- [5] 梁玉珍,刘磊.微型滴定装置及滴定分析微型化初探[J].高师理工学报,2003,23(1):75-77.
- [6] 华中师范大学.分析化学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [7] 赫春香,张淑敏.小型滴定分析化学实验的改革与实践[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2000,23(4):445-448.