

分光光度计

分光光度定义

分光光度法则是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内光的吸收度,对该物质进行定性和定量分析。常用的波长范围为:(1)200~400nm 的紫外光区(2)400~760nm 的可见光区,(3)2.5~25 μ m (按波数计为 4000cm^{-1} ~ 400cm^{-1}) 的红外光区。所用仪器为紫外分光光度计、可见光分光光度计(或比色计)、红外分光光度计或原子吸收分光光度计。为保证测量的精密度和准确度,所有仪器应按照国家计量检定规程或本附录规定,定期进行校正检定。

仪器组成

分光光度计已经成为现代分子生物实验室常规仪器。常用于核酸,蛋白 分光光度计基本组成

定量以及细菌生长浓度的定量。

仪器主要由光源、单色器、样品室、检测器、信号处理器和显示与存储系统组成。

光谱范围

包括波长范围为 400~760 nm 的可见光区和波长范围为 200~400 nm 的紫外光区.不同的光源都有其特有的发射光谱,因此可采用不同的发光体作为仪器的光源.

钨灯的发射光谱:钨灯光源所发出的 400~760nm 波长的光谱光通过三棱镜折射后,可得到由红橙,黄绿,蓝靛,紫组成的连续色谱;该色谱可作为可见光分光光度计的光源.

氢灯(或氘灯)的发射光谱:氢灯能发出 185~400 nm 波长的光谱可作为紫外光光度计的光源.

物质的吸收光谱(1)

如果在光源和棱镜之间放上某种物质的溶液,此时在屏上所显示的光谱已不再是光源的光谱它出现了几条暗线,即光源发射光谱中某些波长的光因溶液吸收而消失这种被溶液吸收后的光谱称为该溶液的吸收光谱.

不同物质的吸收光谱是不同的.因此根据吸收光谱,可以鉴别溶液中所含的物质.

物质的吸收光谱(2)

当光线通过某种物质的溶液时透过的光的强度减弱.因为有一部分光在溶液的表面反射或分散,一部分光被组成此溶液的物质所吸收只有一部分光可透过溶液.

入射光= 反射光 + 分散光 + 吸收光 + 透过光

如果我们用蒸馏水(或组成此溶液的溶剂)作为"空白"去校正反射,分散等因素造成的入射光的损失则:

入射光 = 吸收光 + 透过光

原理

分光光度计采用一个可以产生多个波长的光源,通过系列分光装置,从而产生特定波长的光源,光源透过测试的样品后,部分光源被吸收,计算样品的吸光值,从而转化成样品的浓度。样品的吸光值与样品的浓度成正比。

单色光辐射穿过被测物质溶液时,被该物质吸收的量与该物质的浓度和液层的厚度(光路长度)成正比,其关系如下式:

$$A = -\log(I/I_0) = -\lg T = kLc$$

式中 :A 为吸光度; 基本原理

I₀ 为入射的单色光强度;

I 为透射的单色光强度;

T 为物质的透射率;

k 为摩尔吸收系数;

L 为被分析物质的光程, 即比色皿的边长

c 为物质的浓度

物质对光的选择性吸收波长, 以及相应的吸收系数是该物质的物理常数。当已知某纯物质在一定条件下的吸收系数后可用同样条件将该供试品配成溶液, 测定其吸收度, 即可由上式计算出供试品中该物质的含量。在可见光区, 除某些物质对光有吸收外, 很多物质本身并没有吸收但可在一定条件下加入显色试剂或经过处理使其显色后再测定, 故又称比色分析。由于显色时影响呈色深浅的因素较多, 且常使用单色光纯度较差的仪器, 故测定时应用标准品或对照品同时操作。

仪器特点

- 1、采用高性能优质光栅, 波长精度更高;
- 2、采用进口钨灯, 发光效率高, 使用寿命长, 功耗降低;
- 3、超大规模集成, T/A 转换精度高, 稳定性高;
- 4、微机系统的应用, 使操作使用简单可靠。

技术参数

波长范围: 320~1000nm 分光光度计

光谱带宽: 4nm

杂散光: $\leq 0.5\%$ (在 360nm 处)

波长准确度: 优于 $\pm 2\text{nm}$

透射比准确度: $\leq \pm 1\text{nmT}$

常见的用途

核酸的定量

核酸的定量是分光光度计使用频率最高的功能。可以定量溶于缓冲液的寡核苷酸, 单链、双链 DNA, 以及 RNA。核酸的最高吸收峰的吸收波长 260 nm。每种核酸的分子构成不一, 因此其换算系数不同。定量不同类型的核酸, 事先要选择对应的系数。如: 1OD 的吸光值分别相当于 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 dsDNA, 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 ssDNA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Olig。测试后的吸光值经过上述系数的换算, 从而得出相应的样品浓度。测试前, 选择正确的程序, 输入原液和稀释液的体积, 尔后测试空白液和样品液。然而, 实验并非一帆风顺。读数不稳定可能是实验者最头痛的问题。灵敏度越高的仪器, 表现出的吸光值漂移越大。事实上, 分光光度计的设计原理和工作原理, 允许吸光值在一定范围内变化, 即仪器有一定的准确度和精确度。如 Eppendorf Biophotometer 的准确度 $\leq 1.0\%$ (1A)。这样多次测试的结果在均值 1.0% 左右之间变动, 都是正常的。另外, 还需考虑核酸本身物化性质和溶解核酸的缓冲液的 pH 值, 离子浓度等: 在测试时, 离子浓度太高, 也会导致读数漂移, 因此建议使用 pH 值一定、离子浓度较低的缓冲液, 如 TE, 可大大稳定读数。样品的稀释浓度同样是不可忽视的因素: 由于样品中不可避免存在一些细小的颗粒, 尤其是核酸样品。这些小颗粒的存在干扰测试效果。为了最大程度减少颗粒对测试结果的影响, 要求核酸吸光值至少大于 0.1A, 吸光值最好在 0.1-1.5A。在此范围内, 颗粒的干扰相对较小, 结果稳定。从而意味着样品的浓度不能过低, 或者过高 (超过光度计的测试范围)。最后是操作因素, 如混合要充分, 否则吸光值太低, 甚至出现负值; 混合液不能存在气泡, 空白液无悬浮物, 否则读数漂移剧烈; 必须使用相同的比色杯测试空白液和样品, 否则浓度差异太大; 换算系数和样品浓度单位选择一致; 不能采用窗口磨损的比色杯; 样品的体积必须达到比色杯要求的最小体积等多个操作事项。

除了核酸浓度, 分光光度计同时显示几个非常重要的比值表示样品的纯度, 如

A260/A280 的比值，用于评估样品的纯度，因为蛋白的吸收峰是 280nm。纯净的样品，比值大于 1.8（DNA）或者 2.0（RNA）。如果比值低于 1.8 或者 2.0，表示存在蛋白质或者酚类物质的影响。A230 表示样品中存在一些污染物，如碳水化合物，多肽，苯酚等，较纯净的核酸 A260/A230 的比值大于 2.0。A320 检测溶液的混浊度和其他干扰因子。纯样品，A320 一般是 0。

蛋白质的直接定量（UV 法）

这种方法是在 280nm 波长，直接测试蛋白。选择 Warburg 公式，光度计可以直接显示出样品的浓度，或者是选择相应的换算方法，将吸光值转换为样品浓度。蛋白质测定过程非常简单，先测试空白液，然后直接测试蛋白质。由于缓冲液中存在一些杂质，一般要消除 320nm 的“背景”信息，设定此功能“开”。与测试核酸类似，要求 A280 的吸光值至少大于 0.1A，最佳的线性范围在 1.0-1.5 之间。实验中选择 Warburg 公式显示样品浓度时，发现读数“漂移”。这是一个正常的现象。事实上，只要观察 A280 的吸光值的变化范围不超过 1%，表明结果非常稳定。漂移的原因是因为 Warburg 公式吸光值换算成浓度，乘以一定的系数，只要吸光值有少许改变，浓度就会被放大，从而显得结果很不稳定。蛋白质直接定量方法，适合测试较纯净、成分相对单一的蛋白质。紫外直接定量法相对于比色法来说，速度快，操作简单；但是容易受到平行物质的干扰，如 DNA 的干扰；另外敏感度低，要求蛋白的浓度较高。

比色法蛋白质定量

蛋白质通常是多种蛋白质的化合物，比色法测定的基础是蛋白质构成成分：氨基酸（如酪氨酸，丝氨酸）与外加的显色基团或者染料反应，产生有色物质。有色物质的浓度与蛋白质反应的氨基酸数目直接相关，从而反应蛋白质浓度。

比色方法

一般有 BCA，Bradford，Lowry 等几种方法。

Lowry 法：以最早期的 Biuret 反应为基础，并有所改进。蛋白质与 Cu^{2+} 反应，产生蓝色的反应物。但是与 Biuret 相比，Lowry 法敏感性更高。缺点是需要顺序加入几种不同的反应试剂；反应需要的时间较长；容易受到非蛋白物质的影响；含 EDTA，Triton x-100，ammonia sulfate 等物质的蛋白不适合此种方法。

BCA (Bicinchoninine acid assay) 法：这是一种较新的、更敏感的蛋白测试法。要分析的蛋白在碱性溶液里与 Cu^{2+} 反应产生 Cu^+ ，后者与 BCA 形成螯合物，形成紫色化合物，吸收峰在 562nm 波长。此化合物与蛋白浓度的线性关系极强，反应后形成的化合物非常稳定。相对于 Lowry 法，操作简单，敏感度高。但是与 Lowry 法相似的是容易受到蛋白质之间以及去污剂的干扰。

Bradford 法：这种方法的原理是蛋白质与考马斯亮兰结合反应，产生的有色化合物吸收峰 595nm。其最大的特点是，敏感度高，是 Lowry 和 BCA 两种测试方法的 2 倍；操作更简单，速度更快；只需要一种反应试剂；化合物可以稳定 1 小时，方便结果；而且与一系列干扰 Lowry，BCA 反应的还原剂（如 DTT，巯基乙醇）相容。但是对于去污剂依然是敏感的。最主要的缺点是不同的标准品会导致同一样品的结果差异较大，无可比性。

某些初次接触比色法测定的研究者可能为各种比色法测出的结果并不一致，感到迷惑，究竟该相信哪种方法？由于各种方法反应的基团以及显色基团不一，所以同时使用几种方法对同一样品得出的样品浓度无可比性。例如：Keller 等测试人奶中的蛋白，结果 Lowry，BCA 测出的浓度明显高于 Bradford，差异显著。即使是测定同一样品，同一种比色法选择的标准样品不一致，测试后的浓度也不一致。如用 Lowry 测试细胞匀浆中的蛋白质，以 BSA 作标准品，浓度 1.34mg/ml，以 α 球蛋白作标准品，浓度 2.64mg/ml。因此，在选择比色法之前，最好是参照要测试的样本的化学构成，寻找化学构成类似的标准蛋白作标准品。另外，比色

法定量蛋白质，经常出现的问题是样品的吸光值太低，导致测出的样品浓度与实际的浓度差距较大。关键问题是，反应后 1011 分光光度计的重要配件——比色杯的颜色是有一定的半衰期，所以每种比色法都列出了反应测试时间，所有的样品（包括标准样品），都必须在此时间内测试。时间过长，得到的吸光值变小，换算的浓度值降低。除此，反应温度、溶液 PH 值等都是影响实验的重要原因。此外，非常重要的是，最好是用塑料的比色法。避免使用石英或者玻璃材质的比色杯，因为反应后的颜色会让石英或者玻璃着色，导致样品吸光值不准确。

细菌细胞密度（OD 600）

实验室确定细菌生长密度和生长期，多根据经验和目测推断细菌的生长密度。在遇到要求较高的实验，需要采用分光光度计准确测定细菌细胞密度。OD600 是追踪液体培养物中微生物生长的标准方法。以未加菌液的培养液作为空白液，之后定量培养后的含菌培养液。为了保证正确操作，必须针对每种微生物和每台仪器用显微镜进行细胞计数，做出校正曲线。实验中偶尔会出现菌液的 OD 值出现负值，原因是采用了显色的培养基，即细菌培养一段时间后，与培养基反应，发生变色反应。另外，需要注意的是，测试的样品不能离心，保持细菌悬浮状态。

分光光度计的重要配件——比色杯

比色杯按照材质大致分为石英杯、玻璃杯以及塑料杯。根据不同的测量体积，有比色杯和毛细比色杯等。一般测试核酸和紫外定量蛋白，均采用石英杯或者玻璃杯，但是不适合比色法测定。因为反应中的染料（如考马斯亮兰）能让石英和玻璃着色，所以必须采用一次性的塑料杯。而塑料杯一般不适合用于在紫外范围内测试样品。

由于另外测试的样品量不同，所以一般分光光度计厂家提供不同容积的比色杯以满足用户不同的需求。目前市场已经存在一种既可用于核酸、紫外蛋白质定量，亦可用于蛋白比色法测定的塑料杯，样品用量仅需 50 μ l，比色杯单个无菌包装，可以回收样品。如 Eppendorf UVette[®]塑料比色杯，是目前比色杯市场上一个革新。随着生命科学以及相关学科发展，对此类科学的实验研究提出更高的要求，分光光度计将是分子生物学实验室不可缺少的仪器，也成为微生物、食品、制药等相关实验室的必备设备之一。

随着科技的发展，现在比色杯已经不是使用分光光度计时的必备物品。目前国外 Nanodrop 公司（现已被 Thermo Fisher 公司收购）生产的 ND1000 分光光度计与旧式分光光度计相比，已经可以做到无需稀释样品，无需使用比色杯，每次测量仅需 1-2 μ l 样品即可完成测量。

操作方法

1. 接通电源，打开仪器开关，掀开样品室暗箱盖，预热 10 分钟。
2. 将灵敏度开关调至“1”档（若零点调节器调不到“0”时，需选用较高档。）
3. 根据所需波长转动波长选择钮。
4. 将空白液及测定液分别倒入比色杯 3/4 处，用擦镜纸擦清外壁，放入样品室内，使空白管对准光路。
5. 在暗箱盖开启状态下调节零点调节器，使读数盘指针指向 $t=0$ 处。
6. 盖上暗箱盖，调节“100”调节器，使空白管的 $t=100$ ，指针稳定后逐步拉出样品滑竿，分别读出测定管的光密度值，并记录。
7. 比色完毕，关上电源，取出比色皿洗净，样品室用软布或软纸擦净。

注意事项

1. 该仪器应放在干燥的房间内，使用时放置在坚固平稳的工作台上，室内照明不宜太强。热天时不能用电扇直接向仪器吹风，防止灯泡灯丝发亮不稳定。
2. 使用本仪器前，使用者应该首先了解本仪器的结构和工作原理，以及各个操纵旋钮

之功能。在未接通电源之前，应该对仪器的安全性能进行检查，电源接线应牢固，通电也要良好，各个调节旋钮的起始位置应该正确，然后再接通电源开关。

3. 在仪器尚未接通电源时，电表指针必须于“0”刻线上，若不是这种情况，则可以用电表上的校正螺丝进行调节。