

紫外分光光度法测定 DNA 蛋白质含量

美析仪器有限公司

一、实验目的

学习紫外分光光度法测定蛋白质含量的原理；
掌握紫外分光光度法测定蛋白质含量的实验技术；
掌握 UV-1700 紫外可见分光光度计的使用方法并了解此仪器的主要构造。

二、实验原理

紫外可见吸收光谱法又称紫外可见分光光度法,它是研究分子吸收 190nm~750nm 波长范围内的吸收光谱,是以溶液中物质分子对光的选择性吸收为基础而建立起来的一类分析方法。紫外可见吸收光谱的产生是由于分子的外层价电子跃迁的结果,其吸收光谱为分子光谱。

定性分析:利用紫外可见吸收光谱法进行定性分析一般采用光谱比较法。即将未知纯化合物的吸收光谱特征,如吸收峰的数目、位置、相对强度以及吸收峰的形状与已知纯化合物的吸收光谱进行比较。

定量分析:紫外可见吸收光谱法进行定量分析的依据是朗伯-比尔定律: $A = \lg I_0/I = \epsilon bc$,当入射光波长 λ 及光程 b 一定时,在一定浓度范围内,有色物质的吸光度 A 与该物质的浓度 c 成正比,即物质在一定波长处的吸光度与它的浓度成线性关系。因此,通过测定溶液对一定波长入射光的吸光度,就可求出溶液中物质浓度和含量。由于最大吸收波长 λ_{\max} 处的摩尔吸收系数最大,通常都是测量 λ_{\max} 的吸光度,以获得最大灵敏度。

光度分析时,分别将空白溶液和待测溶液装入厚度为 b 的两个吸收池中,让一束一定波长的平行单色光非别照射空白和待测溶液,以通过空白溶液的透光强度为 I_0 ,通过待测溶液的透光强度为 I ,根据上式,由仪器直接给出 I_0 与 I 之比的对数值即吸光度。

紫外可见分光光度计:紫外可见吸收光谱法所采用的仪器称为分光光度计,它的主要部件有五个部分组成,即光源、单色器、吸收池、检测器、信号显示器;

由光源发出的复合光经过单色器分光后即可获得任一所需波长的平行单色光,该单色光通过样品池静样品溶液吸收后,通过光照到光电管或光电倍增管等检测器上产生光电流,产生的光电流由信号显示器直接读出吸光度 A 。可见光区采用钨灯光源、玻璃吸收池;紫外光区采用氘灯光源、石英吸收池。

本实验采用紫外分光光度法测定蛋白质含量。蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,因此,蛋白质具有吸收紫外光的性质,其最大吸收峰位于 280 nm 附近(不同的蛋白质吸收波长略有差别)。在最大吸收波长处,吸光度与蛋白质溶液的浓度的关系服从朗伯-比耳定律。该测定法具有简单灵敏快速高选择性,且稳定性好,干扰易消除不消耗样品,低浓度的盐类不干扰测定等优点。

三、仪器与试剂

UV-1700 美析仪器-紫外可见分光光度计,比色管,吸量管 标准蛋白质溶液: 5.00 mg. mL⁻¹ 溶液 0.9% NaCl 溶液,待测蛋白质溶液

四、实验步骤

〈一〉准备工作

1. 启动计算机，打开主机电源开关，启动工作站并初始化仪器。
2. 在工作界面上选择测量项目（光谱扫描，光度测量），本实验选择光度测量，设置测量条件（测量波长等）。
3. 将空白放入测量池中，点击 START 扫描空白，点击 ZERO 校零。
4. 标准曲线的制作。

〈二〉测量工作

1. 吸收曲线的绘制：

用吸量管吸取 2mL 5.00mg/mL 标准蛋白质溶液于 10mL 比色管中，用 0.9% NaCl 溶液稀释至刻度，摇匀。用 1cm 石英比色皿，以 0.9% NaCl 溶液为参比，在 190 nm~400nm 区间，测量吸光度。

2. 标准曲线的制作：

用吸量管分别吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 5.00 mg·mL⁻¹ 标准蛋白质溶液于 5 只 10 mL 比色管中，用 0.9% NaCl 溶液稀释至刻度，摇匀。用 1 cm 石英比色皿，以 0.9%NaCl 溶液为参比，在 280 nm 处分别测定各标准溶液的吸光度 A₂₇₈ 记录所得读数。

3. 样品测定：

取适量浓度的待测蛋白质溶液 3 mL，按上述方法测定 278 nm 处的吸光度。平行测定三份。

五、数据处理：

1. 以波长为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制吸收曲线，找出最大吸收波长。

由吸收曲线可得最大吸收波长 $\lambda_{\max}=278\text{nm}$ (图略)

2. 以标准蛋白质溶液浓度为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

标准溶液浓度 C(mg/mL)

吸光度 A 0.25 0.171 0.50 0.335 0.75 0.482 1.00 0.637 1.25

标准溶液浓度 C(mg/mL)

$y=0.6208x+0.0186R^2$

$=0.9998$

浓度 C-吸光度 A 标准曲线方程是： $A=0.6208*C+0.0186$

3. 根据样品蛋白质溶液的吸光度，从标准曲线上查出待测蛋白质的浓度。

平行测定次数 样品液吸光度 A 样品溶液浓度 C(mg/mL)

1 0.676 1.059 2 0.672 1.053 3 0.674 1.056

所测溶液平均浓度： $C=(C_1+C_2+C_3)/3=1.056 \text{ mg/mL}$

测量的标准偏差： $S=\sqrt{\sum(X_i-\bar{X})^2/(n-1)}=0.003$

待测蛋白质溶液浓度为： $1.056 \text{ mg/mL} * 10\text{mL} / 3\text{mL} = 3.520 \text{ mg/mL}$ 。