**实验二** **分光光度法线性分辨范围测定---考马斯亮蓝法及BCA法**

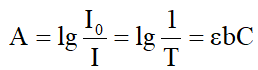
一、实验目的

掌握分光光度法的用途、原理、测定分光光度计线性范围的方法及重要性。

二、实验原理

分光光度法是常用的生化分析方法。仪器简单，价格便宜，操作方便。有分光光度计的实验室，可以很方便地完成多种生物物质的**定量分析**。分光光度法的理论基础是朗伯—比尔定律，它的使用要求在分光光度计线性分辨范围之内，否则将使结果出现较大的误差，这一点恰恰是容易被忽视的。通过对一台分光光度计线性分辨范围的测定，加深对比色法的理解，对今后的科学研究也将是十分有益的。

在用紫外—可见分光光度计进行某种物质溶液的吸收光谱测定之前，先将光源灯发射的连续光谱**分光**获得一定波长的单色光，然后测定单色光透过溶液的**吸光值**，所以分光光度法也称为比色法。各种不同的物质具有其各自的吸收光谱，因此当某种光通过溶液时，其能量就会被吸收而减弱，光能减弱的程度和光经过的物质的厚度及物质的浓度有一定的比例关系。



式中I0为入射光强度，I为透射光强度，b为溶液厚度，C为溶液浓度，T为透光度，A为吸光度，ε为摩尔吸收系数。如果溶液浓度以mol／L表示，溶液厚度以cm表示，ε单位为L／(mol·cm)。ε愈大，表示溶液对单色光的吸收能力愈强，分光光度测定的**灵敏度**就愈高。

这就是在分光光度测定中常用的**朗伯—比尔定律**。该定律表示入射光通过溶液时，吸光度与该溶液的浓度和厚度的关系。

根据朗伯—比尔定律，吸光度与溶液浓度应是通过原点的线性关系(溶液厚度一定)，但在实际工作中吸光度与溶液浓度之间常常**偏离线性关系**，产生偏离的主要因素有：

1．样品溶液因素。朗伯—比尔定律通常只在稀溶液时才能成立，这是由于随着溶液浓度增大，吸光质点间距缩小，彼此间相互影响和相互作用加强，破坏了吸光度与浓度之间的线性关系。

2．仪器因素。朗伯—比尔定律只适用于单色光，但经仪器狭缝投射到被测溶液的光，并不能保证理论要求的单色光，这也是造成偏离朗伯—比尔定律的一个重要因素。

在仪器确定的情况下，着重考察溶液浓度变化对吸光度线性的影响。

三、试剂和器材

1. 牛血清白蛋白溶液(10mg/mL)：称取牛血清白蛋白(BSA)1.000g，用适当蒸馏水溶解后定容至100 mL，每组分装5ml。

2. 考马斯亮蓝试剂配制：称取100mg考马斯亮蓝G-250溶于50mL95%乙醇，加入100mL85%（W／v）磷酸，将溶液用水稀释到1000mL。试剂的终浓度为0.01%考马斯亮蓝G-250，4.7%（W／V）乙醇，和8.5%（w／V）磷酸。

3. BCA试剂：溶液A，溶液B，按照50:1配置成工作液。

4. 紫外-可见分光光度计，试管，试管架，容量瓶， 烧杯，吸管，玻璃棒，恒温水浴箱。

四、实验方法

考马斯亮蓝法测定蛋白含量：595nm

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | **0** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** |
| 蛋白浓度mg/ml | **0** | **0.005** | **0.010** | **0.020** | **0.040** | **0.060** | **0.080** | **0.10** | **0.20** | **0.40** |
| 蛋白体积ml | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| 考马斯亮蓝试剂ml | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |
| A620 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 管号 | **10** | **11** | **12** | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** |  |  |
| 蛋白浓度mg/ml | **0. 60** | **0.80** | **1.0** | **2.0** | **4.0** | **6.0** | **8.0** | **10.0** |  |  |
| 蛋白体积ml | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |  |  |
| 考马斯亮蓝试剂ml | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** | **4** |  |  |
| A620 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

BCA法测定蛋白含量：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | **0** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** |
| 蛋白浓度mg/ml | **0** | **0.005** | **0.010** | **0.020** | **0.040** | **0.060** | **0.080** | **0.10** | **0.20** | **0.40** |
| 蛋白体积ml | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** |
| BCA试剂ml | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** |
| A620 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 管号 | **10** | **11** | **12** | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** |  |  |
| 蛋白浓度mg/ml | **0. 60** | **0.80** | **1.0** | **2.0** | **4.0** | **6.0** | **8.0** | **10.0** |  |  |
| 蛋白体积ml | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** |  |  |
| BCA试剂ml | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** | **4.0** |  |  |
| A620 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

五、实验结果

以蛋白含量为横座标，以相应吸光度为纵座标，利用EXCEL绘制趋势曲线。

六、实验分析

对结果进行分析，找出考马斯亮蓝法、BCA法测定蛋白含量的线性范围，并加以比较。

七、思考题

1．蛋白质含量测定的方法有哪些?

2．为什么要寻找分光光度法线性分辨范围?