



# 生物化学实验

## 生物大分子定量测定技术

### 3.8 双光束紫外-可见分光光度计的使用

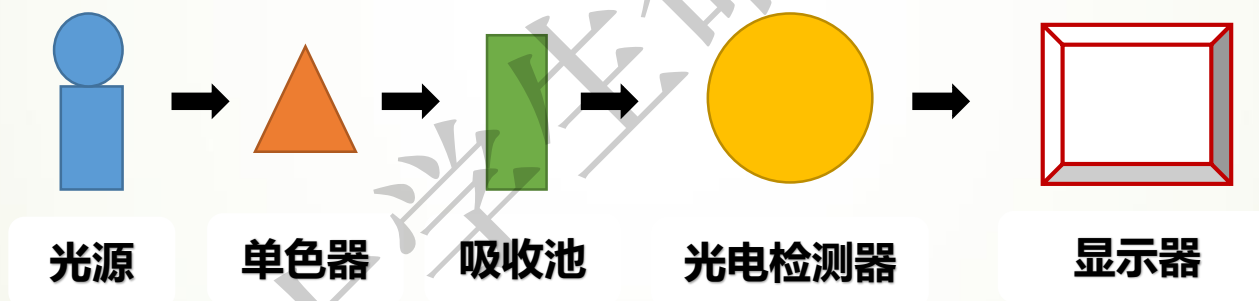
北京大学 王青松 胡晓倩

# 紫外-可见分光光度计

- 紫外-可见分光光度计 (ultra-violet and visible spectrophotometry, UV-Vis) : 是最早出现, 目前仍然是最重要、使用最广泛的光谱仪器, 是生物化学和分子生物学研究中不可缺少的分析手段。

# 紫外-可见分光光度计的基本构造

紫外-可见分光光度计主要由5个部分组成：



紫外-可见分光光度计的基本构造

# 各部分的功能

- 光源：发出所需波长范围内的连续光谱，主要采用**氘灯（紫外区）**和**卤素灯（可见光区）**。
- 单色器：将光源发出的连续光谱分解为单色光的装置。主要有**棱镜**和**光栅**2种。
- 吸收池：用于盛待测及参比溶液的比色皿。
- 光电检测器：利用光电效应，将光能转换成电流信号。**通常用光电倍增管**，少数为二极管阵列。
- 显示器：液晶数字显示窗口和计算机控制显示。

# 紫外-可见分光光度计的分类

## 按照仪器使用的波长分类



☐ 真空紫外分光光度计 (0.1~200 nm)

☐ 可见分光光度计 (350~700 nm)

☐ 紫外-可见分光光度计  
(190~1100nm)

☐ 紫外-可见-红外分光光度计  
(190~2500nm)

## 按照仪器使用的光学系统分类



☐ 单光束分光光度计

☐ 双光束分光光度计

☐ 双波长分光光度计

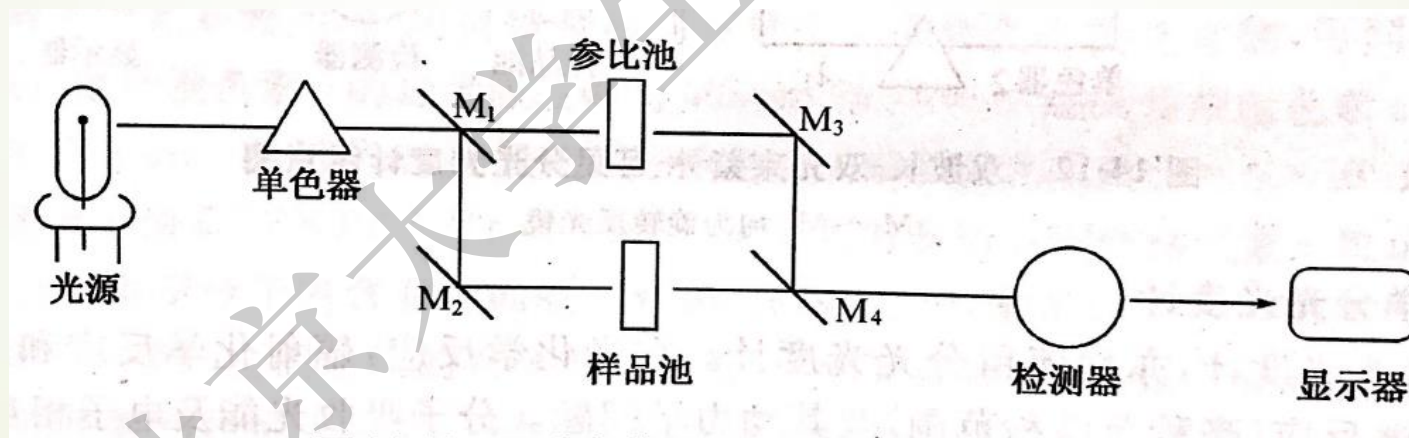
☐ 双波长-双光束分光光度计

☐ 动力学分光光度计

**生物化学实验用：双光束紫外-可见分光光度计**

# 双光束紫外-可见分光光度计

- 双光束紫外-可见分光光度计的光源发射光经单色器分光后经反射镜分解为强度相等的两束光，一束通过参比池，一束通过样品池。光度计能自动比较两束光的强度，此比值即为样品的透射比，经对数变换将它转换成吸光度并作为波长的函数记录下来。



# 双光束紫外-可见分光光度计的优点

- 双光束是目前使用广泛的分光光度计，具有以下优点：
  - 能自动记录吸收光谱曲线（自动扫描），可快速全波段扫描。
  - 由于两束光同时分别通过参比池和样品池，能自动消除光源不稳定、检测器灵敏度变化等因素影响所引起的误差。

生物化学实验课中主要用于测定GST酶的酶活力、米氏常数 $K_m$ 、最大反应速度 $V_{max}$



# 仪器构造



样品室外盖

样品室：放置比色皿

液晶显示屏

操作控制按钮

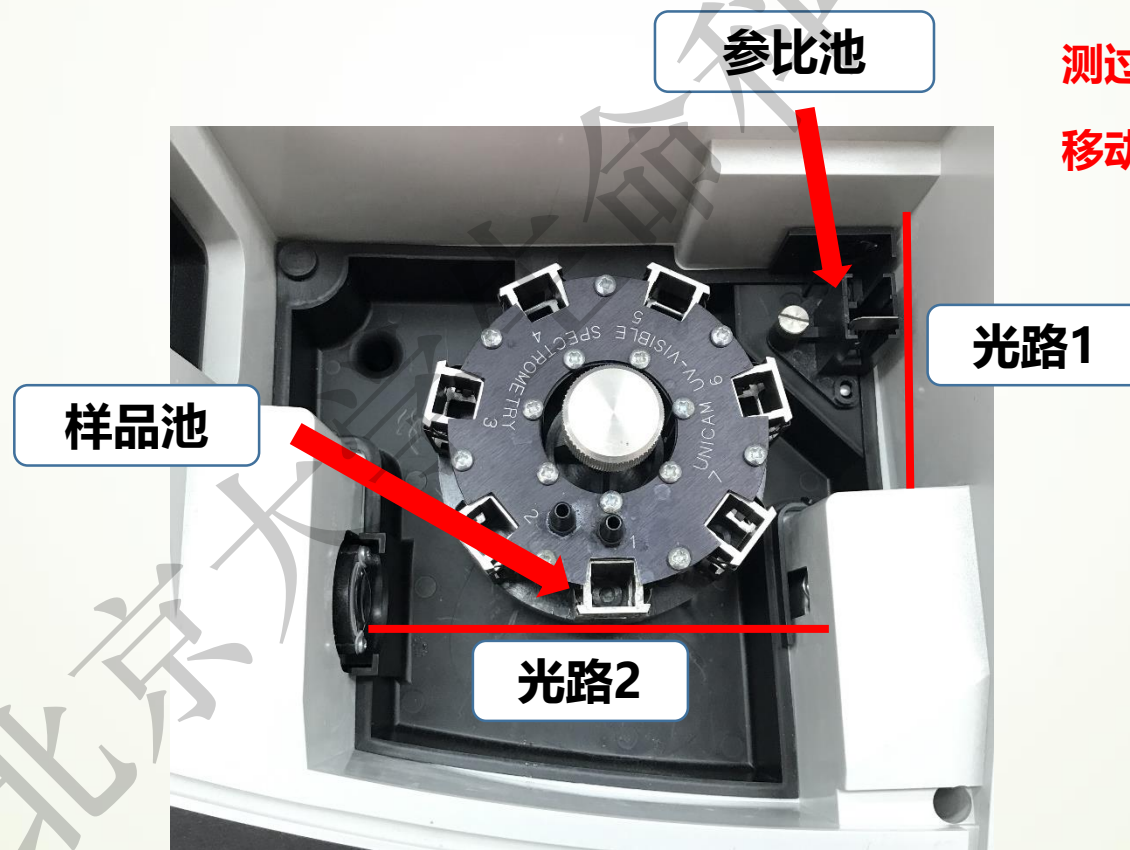
Helios双光束紫外-可见分光光度计  
(Thermo公司)



# 样品室结构

- 样品池在校零时放入装有参比溶液的比色皿，在检测时放入装有待测样品的比色皿。

- 用于放装有参比溶液的比色皿，在校零及后面的检测过程中，此比色皿不需移动。



# 吸收池/比色皿

- 吸收池 (Cuvette): 又称比色皿, 是用于装入待测样品及参比溶液的容器。一般配有**硅酸盐玻璃比色皿 (可见光波长的测定)** 和 **石英玻璃比色皿 (紫外波长的测定)** 。
- 比色皿结构: 大多为长方体。比色皿两面为**光学面**, 须保持洁净, 不可用手触摸。另外两面为**接触面**, 为雾面, 是手指可接触的表面。
- 比色皿的杯径: 有0.5 cm、**1 cm**、2 cm和3 cm等。 **生化实验常用1 cm光程的比色皿。**



# 仪器的基本操作步骤

1. 开机，仪器自检通过后，仪器预热20分钟

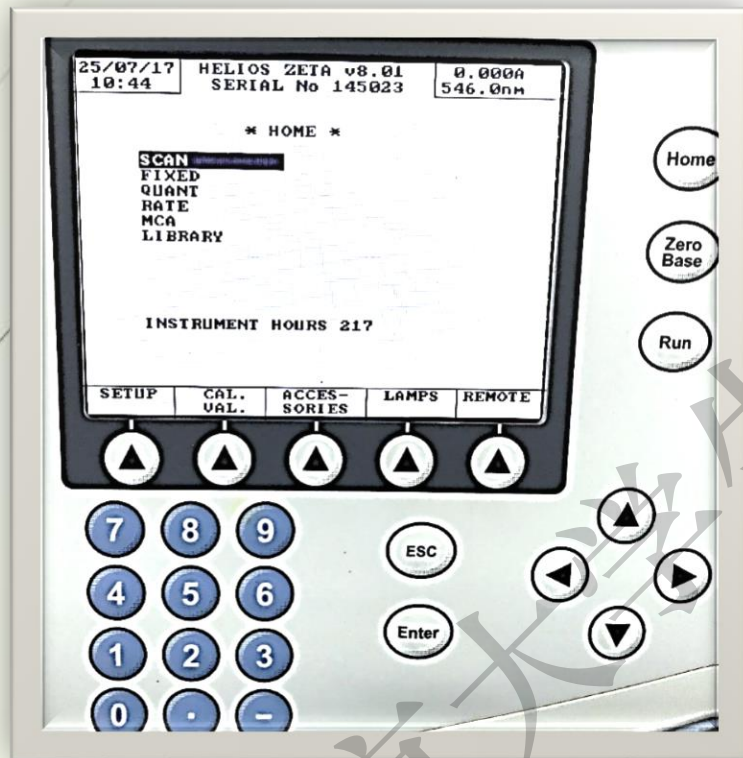
2. 设置检测参数：所需波长，cycle数、delay time等

3. 调零：将2个装有空白溶液的比色皿放入分别放入参比池和样品池，按ZeroBase键调零

4. 检测：将待测样品比色皿放入样品池，按RUN键测定样品的吸光值

5. 测量完毕，记录实验数据，洗净比色皿，关机

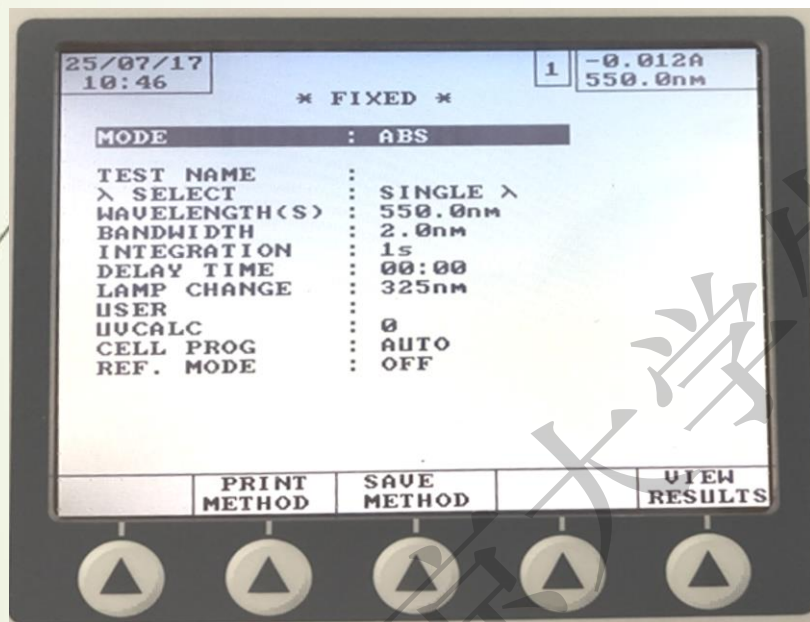
# 1. 开机自检后的主界面



- Home键：按此键直接回到主界面
- ZeroBase键：调零键
- Run键：运行，检测吸光值
- 数字键盘区：输入检测的波长等参数。
- 方向键：上/下/左/右移动
- ESC键：取消
- Enter键：确认参数，或进入下一界面
- FIXED：设置所需的检测参数

## 2. 设置检测参数

- 进入FIXED页面：主界面下按方向键将光标调到FIXED位置，按Enter键即可。



- WAVELENGTH (s): 设置检测波长
- delay time: 设置检测的延迟时间
- cell cycles: 设置检测次数。

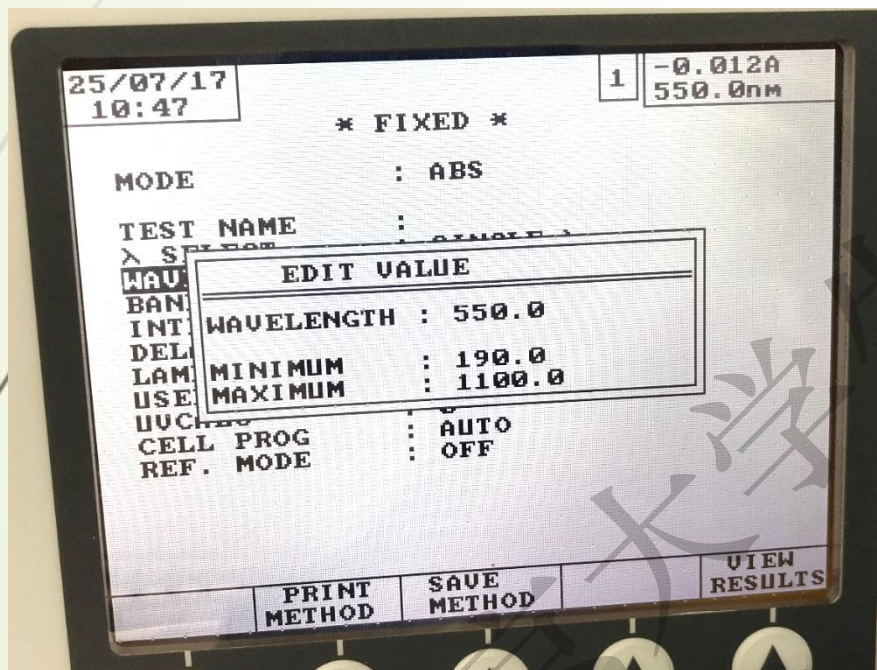
- 例：参数按如下设置：

- WAVELENGTH (s): 500 nm
- delay time: 30 s
- cell cycles: 8

- 表示待测样品在波长500 nm，自按RUN键开始，每隔30 s仪器检测1次，总共得到8个吸光值。

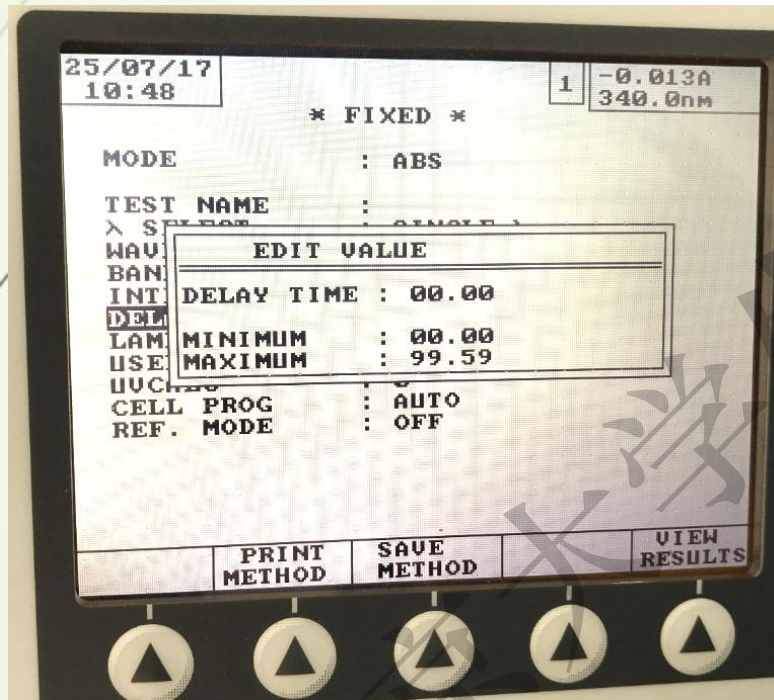


# 波长设置



- FIXED界面，光标移至“WAVELENGTH (s)” ，按Enter键进入右侧界面。
- 输入所需波长，如320 nm。
- 按Enter键确认参数即可。
- **注意：**按Enter键后，需要等待仪器调整参数。液晶屏下面显示的“**Instrument Busy-Please Wait**”消失后，方可继续操作。

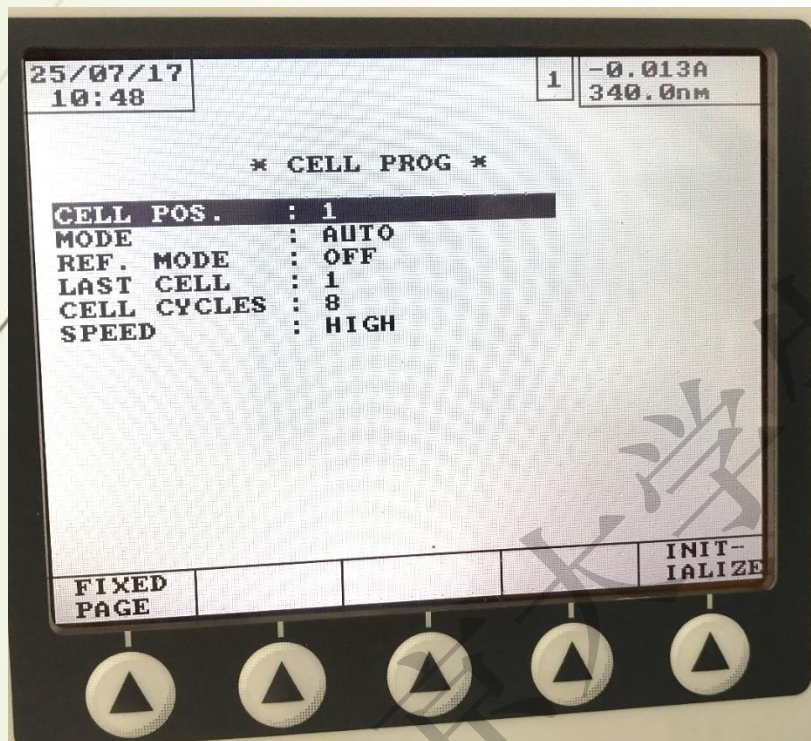
# Delay time设置



- Fixed页面，光标调到DELAY TIME位置，按Enter键进入调节页面；
- 数字键盘区域输入所需delay time，如30 s，数字键盘输入0.30，按Enter键即可；
- 按Enter键确认参数。

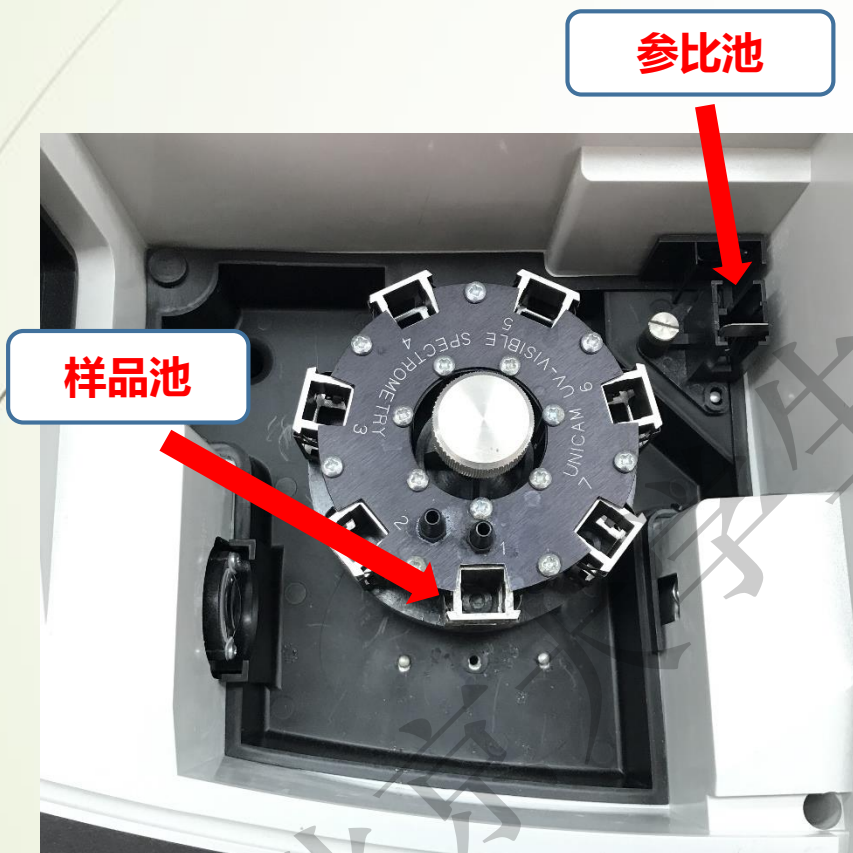


# CELL CYCLES设置



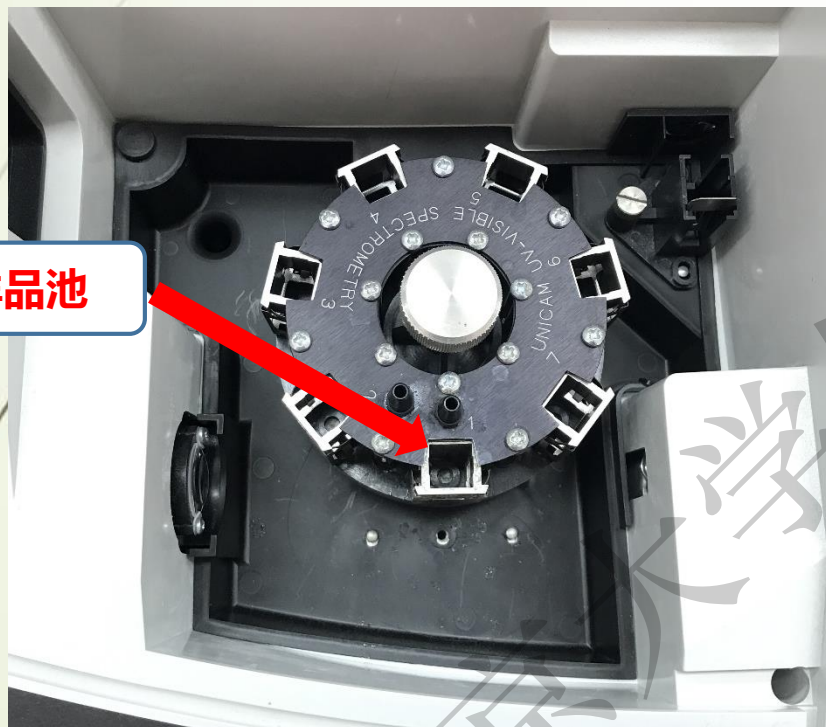
- Fixed页面，将光标调到CELL PROG位置，按Enter键进入CELL PROG调节页面；
- CELL CYCLES调节：将光标调到CELL CYCLES位置，按Enter键进入调节页面；
- 数字键盘区域输入所需的CELL CYCLES数，如8，按Enter键即可；
- 按Enter键，确定所调的参数。

### 3. 调零



- 在2个比色皿中，分别加入3 mL的参比溶液；
- 将比色皿放入如图所示的参比池和样品池中，  
**注意比色皿的光学面对准光路；**
- 盖好样品室外盖；
- 按ZeroBase键调零。

## 4. 检测



样品池

- 调零后，打开样品室外盖，取出样品室中央转盘里样品池中的比色皿；
- 倒掉比色皿里的参比溶液，在比色皿里加入待测样品溶液；
- 将比色皿放入样品室中央转盘的样品池中（**注意比色皿的光学面对准光路**）；
- 盖好样品室外盖；
- 按RUN键开始检测。

## 5. 测量完毕

记录实验数据



洗净比色皿



关机