



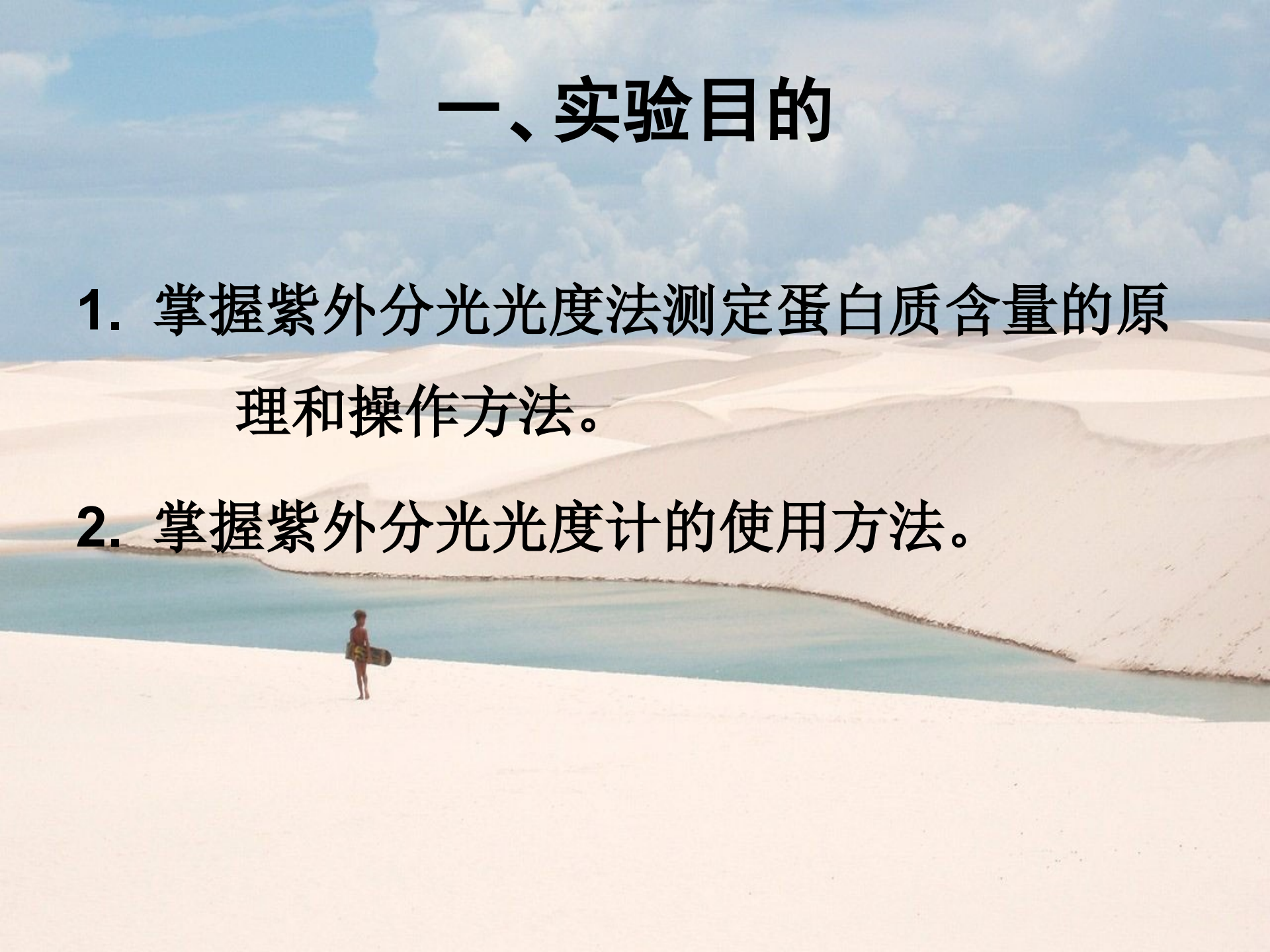
实验一

紫外分光光度法测定蛋白质浓度

陈聪

一、实验目的

1. 掌握紫外分光光度法测定蛋白质含量的原理和操作方法。
2. 掌握紫外分光光度计的使用方法。



二、实验原理

蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸残基。它们具有吸收紫外光的性质，其吸收高峰在 280nm 波长处，且在此波长内吸收峰的吸光度与其浓度成正比关系，故可作为蛋白质定量测定的依据。但由于各种蛋白质的酪氨酸和色氨酸的含量不同，故测定那些与标准蛋白质的酪氨酸和色氨酸含量差异大的蛋白质，有一定的误差。故该法适于用测定与标准蛋白质的氨基酸组成相似的蛋白质。

二、实验原理

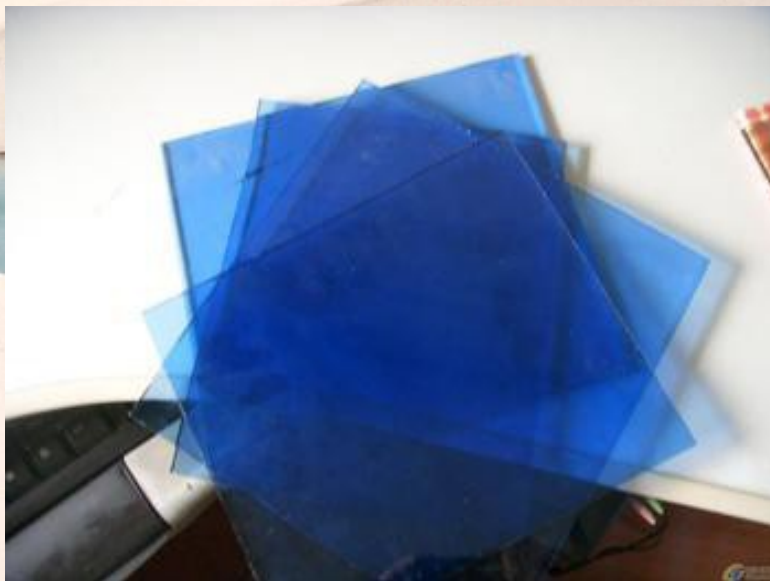
另外，不少杂质在 280nm 波长下也有一定吸收能力，可能发生干扰。其中以核酸（嘌呤和嘧啶碱）的影响更为严重。然而核酸的最大吸收峰是在 260nm，因此溶液中同时存在核酸时，必须同时测定 $A_{260\text{nm}}$ 与 $A_{280\text{nm}}$ ，然后根据两种波长的吸收度的比值，通过经验公式校正，以消除核酸的影响而推算出蛋白质的真实含量。

二、实验原理

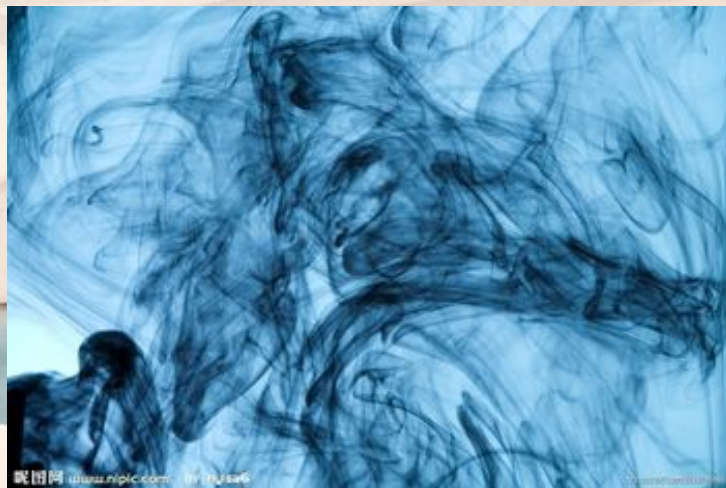
朗伯-比耳定律

- 布格 (Bouguer) 和朗伯 (Lambert) 先后于 1729 年和 1760 年阐明了光的吸收程度和吸收层厚度的关系。 $A \propto b$

■



- 1852 年比耳 (Beer) 又提出了光的吸收程度和吸收物浓度之间也具有类似的关系。 $A \propto c$



- 二者的结合称为朗伯—比耳定律。

二、实验原理

朗伯-比耳定律

吸光度 A：表征物质对光吸收程度的量。

$$A = \lg I_i / I_t = -\lg T = \epsilon bc$$

- A-- 吸光度
- ϵ -- 摩尔吸光系数
- C-- 被测物浓度
- I_i -- 入射光强
- T-- 透过率
- b-- 液层厚度（光程长度）
- I_t -- 透射光强



三、实验试剂与器材

1. 试剂

- (1) 标准蛋白质: 1mg/mL 牛血清蛋白
- (2) 待测样本蛋白质

2. 器材

- (1) UV-9100 紫外分光光度计 & 比色皿
- (2) 试管 (10只)
- (3) 试管架
- (4) 刻度吸管 0.5 ml (×2)、 2 ml (×1)、 5ml (×1)

四、实验步骤

1. 标准曲线法

(1) 取试管 10 支，编号后按下表操作。

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	测定管 1	测定管 2
标准蛋白 (ml)	0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0		
样本蛋白 (ml)									8	8
水 (ml)	8.0	4.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0		
蛋白质浓度 (mg/ml)	0	0.125	0.25	0.375	0.5	0.625	0.75	0.875		

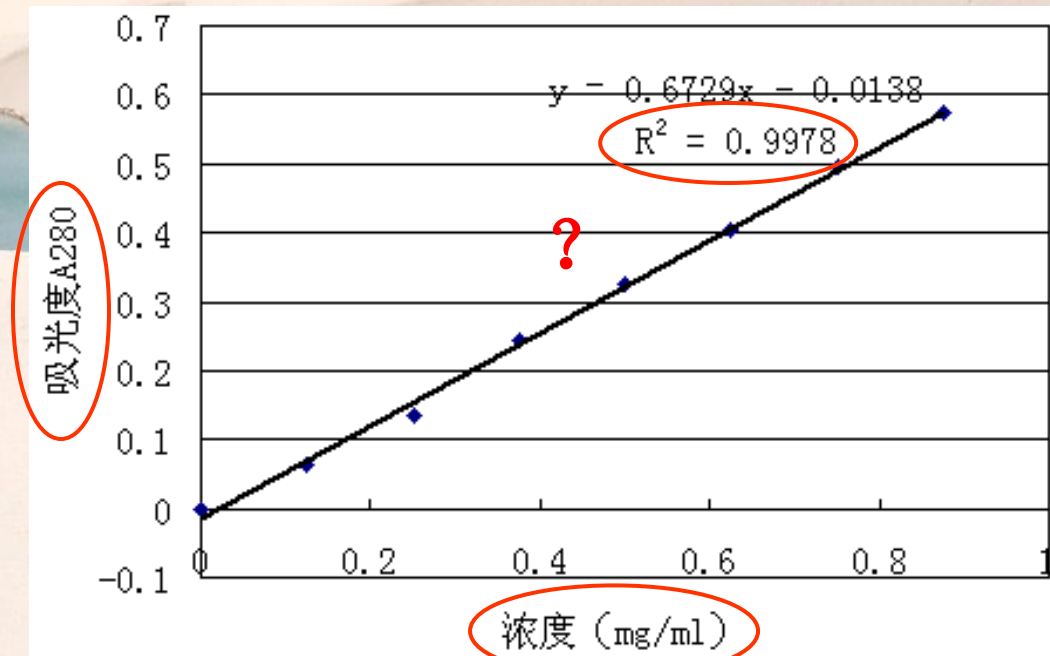
各管混匀，盛于石英杯中，用紫外分光光度计，以空白管 1 调零，分别于 280nm 波长下测定各管吸光度。

此外，测定管需同时测定 260nm 波长的吸光度，用于经验公式直接计算。

四、实验步骤

(2) 标准曲线的绘制

以标准管各管吸光度 (A_{280nm}) 为纵坐标, 以蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。然后根据测定管吸光度值, 直接查标准曲线求得样本中蛋白质的浓度。



四、实验步骤

2. 经验公式法

用紫外分光光度计测定样本蛋白质分别在 **280nm** 和 **260nm** 波长下的吸光度。按以下公式计算样本蛋白质浓度 (mg/ml) :

$$\text{样本蛋白质浓度} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

★ 比较**标准曲线法**和**经验公式法**的结果

五、注意事项

1. 移液管的操作
2. 紫外分光光度计的使用
3. 标准蛋白质和样本蛋白质的区别
4. 测定管中样本蛋白质在 **260nm** 波长的测定
5. 实验结束后仪器的清洗和归还
6. 实验报告中要有标准曲线图，并要根据测定管中样本蛋白质的吸光度求出其浓度。

Thanks



姓名

1. 温敬双, 李玉祥

2. 刘美芬 黎筱琳

3 何翠丹 李影梅

4 陈燕玲 颜斯敏

5 陈文娟 朱佩云

6 郑丽萍 李绮芬

7 袁静苑 李莎

8 陈芝宝 黄美婷 黄文标

9 黄宗伟 赵家杰

10 黄志豪 陈俊杨