

分光光度计的应用常识

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，蛋白定量以及细菌生长浓度的定量。

分光光度计的简单原理

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。

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 μg/ml 的 dsDNA，37 μg/ml 的 ssDNA，40 μg/ml 的 RNA，30 μg/ml 的 Oligo。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 0.1–1.5 A。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 280 nm。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 280 nm 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 320 nm 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 Cu²⁺ 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 (Bicinchoninic 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 Cu²⁺ 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 562 nm 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 595 nm。其最大的特点是，敏感度好，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 1.34 mg/ml，以 a 球蛋白作标准品，浓度 2.64 mg/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

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）

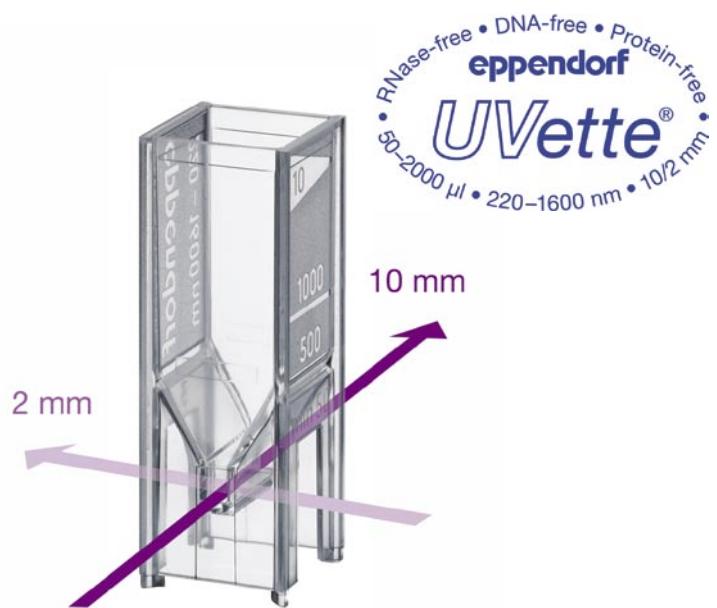
实验室确定细菌生长密度和生长期，多根据经验和目测推断细菌的生长密度。在遇到要求较高的实验，需要采用分光光度计准确测定细菌细胞密度。OD 600 是追踪液体培养物中微生物生长的标准方法。

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 µl，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。

作者 蒋东萍 技术支持
德国艾本德股份公司上海代表处

