

提高分光光度计在实验海洋生物学研究中测量准确度的几种方法*

METHODS TO IMPROVE MEASURING ACCURACY OF SPECTROPHOTOMETER IN THE STUDY OF EXPERIMENTAL MARINE BIOLOGY

王 勇¹ 郎刚华² 徐永立¹ 张培军¹

(¹ 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(² 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

* 分光光度计是生物化学与分子生物学实验中的常用仪器,常用来测定核酸、蛋白质等生物大分子的纯度、浓度以及吸收光谱的变化特征等。其中纯度与浓度的测定对分光光度计的准确度要求较高,测量数值的细微差异都有可能影响实验结果。因此,提高分光光度计的测量准确度就显得极为重要。本文就作者在这方面的实践经验作一简单介绍。

1 确认样品的检测范围

在许多情况下,用分光光度计定量的结果不准,往往是因为超出了检测范围。在这里,检测范围包括两方面含义:一是指该样品是否可用分光光度法测定,二是指所测样品的浓度范围。例如,用 280 nm 和 260 nm 紫外光测蛋白质浓度,如果溶液中有一定量的 DNA, RNA, 芳香族氨基酸等物质,则必然干扰测定结果^[2]。而用 260 nm 和 280 nm 紫外光测核酸含量时,蛋白质、酚、琼脂糖或其他核酸也会干扰测定结果^[1]。遇此情况,或者想办法除去干扰物质,或者换用其他方法测定。另外,每种测定方法都有一个线性关系的范围,即使样品可以用某方法测定,如果所测的浓度不在该方法的线性关系范围内,也不会得出正确的结果。例如,紫外(280 nm)法测定蛋白质浓度的测量范围是 100~1 000 $\mu\text{g}/\text{m l}$,紫外(215~225 nm)法的测量范围是 20~100 $\mu\text{g}/\text{m l}$,而紫外(224~233.3 nm)法的测量范围是 5~180 $\mu\text{g}/\text{m l}$ ^[2]。

因此,要根据不同的样品浓度来选择适当的测定方法,如一经测定发现浓度不合适,那就应当采取措施,或者换用别的方法,或者稀释样品,或者浓缩样品。

2 经常校准波长

在美国 Beckman 公司生产的 DU-600 系列的紫

外/可见分光光度计中,都有一个波长校准程序。每隔一定时间(如半年或 1 a),应该用该程序校准一次,以确保仪器系统自身的准确性。简易型仪器,如国产 722 型可见光分光光度计和 751G 型紫外/可见分光光度计,则应经常检查波长调节旋钮是否松动,并定期用标准溶液检查波长指示是否正确。

3 加样体积要准

在用移液器具向比色皿中加样时,要保证加样体积的准确性,很重要的一点就是,将加样器具的尖嘴贴在比色皿的侧壁底部,然后缓慢加入样品。如果仔细观察就会发现,在加样时,由于加样器内壁对样品溶液的吸附作用,液体流出时不同部位流速不同,在中央处液体流速最快,在四周则最慢。如在加样时速度过快,由于加样器内壁与样品溶液相接触的地方对溶液产生了一定的吸附力,导致少量样品以液滴形式吸附于移液器具的内壁,造成加样不准。对于使用较大容量比色皿(>0.5 ml)的 722 型与 751G 型分光光度计而言,这点误差影响并不太大。但对于使用微量比色皿(<100 μl)的分光光度计而言,因加样体积本来就非常小,稍微吸附一点液体就足以造成测定结果的较大差异。因此,应当引起实验人员的高度重视。

4 测定比色皿之间的吸光差异

许多人在使用分光光度计时,往往忽略了比色皿之间的差异性,直接用一个比色皿测空白,用另一个比色皿测实验样品,记录的数据又不进行校正。应当说,在教学实验中可以这样做,但如从事科研工作,这样做显然不合适。正确的做法是,在测定时,分别向几

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3163 号。
实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 163 号。
收稿日期:1997-03-17

个比色皿中加入空白液,以其中一个作为空白,测定其他几个比色皿的吸光度值,记录下来。在测定样品时,仍以原来的空白比色皿作为空白比色皿,以其他几个比色皿盛待测样品,测得的吸光度值应加上或减去该比色皿的差异值,这样得出的结果才是最终结果。

5 比色皿的清洗方法与次数

首先,比色皿应定期清洗。可使用浓盐酸:甲醇(1:1)浸泡比色皿1 h,随后用蒸馏水彻底冲洗。如果一次测量的待测样品数量比较多,每个比色皿往往需反复使用多次,如清洗不当就容易造成污染,导致结果不准。因此,每用完一个比色皿都应当将比色皿中样品尽量全部弃去,加入蒸馏水,再将蒸馏水全部弃去,如此清洗即可。当然,清洗次数越多比色皿越干净,但次数太多是没必要的。本文作者曾用DNA样品做过实验,在完全弃去样品液之后,再加入等体积的蒸馏水测吸光度,发现比色皿中的样品残留率为5%左右。根据这一比率,如不加清洗,则残留物含量为原来的5%;清洗一次则为5%以下;清洗两次,则基本上测不到残余物。因此,对于一般的实验,清洗一次即可;而对于要求极为严格的实验,清洗两次足矣。另

外,测定不同浓度的样品,还应注意必须先测低浓度样品,后测高浓度样品。根据作者测定的残留率,如果浓度相差在5倍以上,那么测定低浓度样品后完全弃去样品,直接加入高浓度样品进行测定,不会影响实验结果。

6 对测定数据进行统计学处理

在通常情况下,只要将分光光度计按要求预热一定时间,所配溶液充分溶解且充分混匀,那么即使分多次取样测定,其吸光度值也不会有多大差异。因此,对一个样品,通常取样一次,测吸光度一次即可。如果对实验要求较高,可以对每个样品分多次取样测定,或对每次取样间隔一定时间多读几次数据,然后求其平均值。

参考文献

- 1 J. 萨姆布鲁克等著,金冬雁、黎孟枫等译。分子克隆。北京:科学出版社,1992。956
- 2 菅原 洁、副岛正美。蛋白质的定量法。学会出版・シタ -,1977。21~22