**酶标仪常用光谱分析原理简介**

分子生物学技术平台 郭蕴郦

ylguo@sibcb.ac.cn Tel:021-54921136

在生物学研究中，经常会遇到通过检测各种光谱来对样品进行分析。在具体实验中，实验人员经常遇到待测样品和检测光谱之间不匹配的情况，无法选定合适的检测光谱，检测仪器和相应的耗材。即便是确定了仪器，但如果选择错误的光谱和耗材，也会得到不对的实验结果，影响对待测样品的判断。在这里我对常用的一些光谱做一个简单的介绍，便于实验人员进行相应的选择。

1. 吸收光

在生物学研究中最常用的就是紫外分光光度法来对待测样品进行含量浓度的检测。这里就是利用了生物大分子在紫外可见光区域有光吸收的特性，样品浓度越高，光吸收越强，测得的数据就越大。这里我们检测的就是待测样品的吸收光（absorption spectrum）。最常用来对核酸分子，蛋白分子，菌液等进行浓度定量。

在这个过程中利用的是分子的吸收光谱的变化来对待测样品进行分析，在实验过程中会影响到结果的因素除了待测样品的本身特性和含量多少以外，客观上只有光照对结果起到决定性作用。为了达到饱和的吸收光数值，需要足够多的光能照射在样品上，同时周围环境对光的吸收最小，才能得到稳定可靠的数值。因此在选择检测器皿时优先选用透光率高的器皿，比如玻璃或石英材质的比色皿。由于玻璃本身对波长小于340nm以下的紫外线有吸收，所以在大部分生物学样品的紫外吸收光检测中严格要求使用石英比色皿。在多功能酶标仪等一起上则需要选择无光吸收的全透明微孔板。

1. 荧光

 物质的分子吸收一定的能量后，其电子从基态跃迁到激发态，如果在返回基态的过程中伴随有光辐射，这种现象称为分子发光（molecular luminescence），以此建立起来的分析方法，称为分子发光分析法。根据分子受激发光的类型、机理和性质的不同，分子发光分析法通常分为荧光分析法，磷光分析法和化学发光分析法。在生物学研究中，经常用到的就是荧光分析法和化学发光分析法。这里我仅对这两种方法进行一个简单的介绍。

 荧光是物质吸收光照（通常为紫外-可见光）或者其他电磁辐射后发出的光。由于不同的物质其组成与结构不同，所吸收的光和发射出的光的波长也不相同。同一种物质具有相通的激发光谱和发射光谱，通过这一特性即可对待测样品进行定性分析。如果待测样品浓度不同，受到固定波长的激发光照射后，所发射的荧光强度也会有所不同，通过测量发射光的光强变化即可对样品进行定量分析。[荧光分析法](https://baike.baidu.com/item/%E8%8D%A7%E5%85%89%E5%88%86%E6%9E%90%E6%B3%95/7903392)的特点是灵敏度高、选择性好、样品用量少和操作简便。在荧光分光光度计上进行这类检测时需选用石英比色皿，而在多功能酶标仪上进行荧光检测时，因为荧光检测时光强较强，一般选用黑色的酶标板。同时黑色酶标板还可以削弱非特异性反应的影响。一般在荧光检测中发射光是各向同性，如果使用透明板，会导致光从各个方向发散，影响光检测值，同时相邻孔间也会互相影响，导致结果的不准确。因此在荧光检测中严禁使用透明微孔板。

化学发光（Chemiluminescence）又称为冷光（Cold Light），它是在没有任何光、热或电场等激发的情况下，由化学反应而产生的光辐射。生命系统中也有化学发光，称生物发光（Bioluminescence），如萤火虫、某些细菌或真菌、原生动物、蠕虫以及甲壳动物等所发射的光。化学发光分析（Chemiluminescence Analysis）就是利用化学反应所产生的发光现象进行分析的方法。它是近30多年来发展起来的一种新型、高灵敏度的痕量分析方法。在痕量分析、环境科学、生命科学及临床医学上得到愈来愈广泛的应用。

化学发光具有以下几个特点：

（1）极高的灵敏度

（2）由于可以利用的化学发光反应较少，而且化学发光的光谱是由受激分子或原子决定的，一般来说也是由化学反应决定的。很少有不同的化学反应产生出同一种发光物质的情况，因此化学发光分析具有较好的选择性。

（3）分析速度快，一次分析在1 min之内就可完成，适宜自动连续测定。

（4）定量线性范围宽，化学发光反应的发光强度和反应物的浓度在几个数量级的范围内成良好的线性关系。

与荧光的强光强不同，化学反应产生的光辐射一般强度偏弱，为了得到准确的检测结果，需要将四散的光辐射集中在一起，通过检测器进行检测。所以在多功能酶标仪上需要选择白色的微孔板，将四散的光辐射全部反射进入检测器，达到更高的检测灵敏度。在单孔的检测仪器中由于检测器的位置和没有多样品之间的影响，普通的EP管即可进行相关检测，不需要额外的检测器皿。