

“七〇二”含量测定法

广东、上海“七〇二”协作组 编

上海科学技术情报研究所

毛主席语录

抓革命，促生产，促工作，促战备。

备战、备荒、为人民。

要认真总结经验。

在生产斗争和科学实验范围内，人类总是不断发展的，自然界也总是不断发展的，永远不会停止在一个水平上。因此，人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

前 言

在伟大领袖毛主席**“备战、备荒、为人民”**的伟大战略方针指引下，广东地区和全国各地一样，广大工人、贫下中农、革命干部和革命科技人员，破除迷信，解放思想，自力更生，艰苦奋斗，土法上马，掀起了一个规模空前的**“七〇二”**科学实验群众运动，并取得了一定的成绩。

在生产和使用**“七〇二”**的过程中，广大群众迫切需要解决准确、快速、简便的分析含量的方法。群众的要求就是我们研究的课题。我们**“七〇二”**协作组的同志，遵循伟大领袖毛主席关于**“我们应该走到群众中间去，向群众学习，把他们的经验综合起来，成为更好的有条理的道理和办法”**的教导，根据广东地区广大群众生产和使用**“七〇二”**的经验，经过反复试验，初步解决了**“七〇二”**的简易测定方法。现把情况介绍如下。

由于我们水平低，缺乏经验，实验时间又短，在这份资料里一定会存在很多不足甚至错误的地方，请广大群众予以批评指正。并热切的期望在新的跃进形势下，在一浪高一浪的蓬勃发展的群众性科学实验运动中，有更好、更完善的测定方法涌现出来。

广东、上海**“七〇二”**协作组

1971 9.

目 录

- 一、核酸的几种测定方法……………(1)
- 二、定磷法的原理和简易测定法……………(2)
- 三、分析样品的预处理……………(8)
- 四、各种“七〇二”原料及产品中的核酸含量测定……………(10)

一、核酸的几种测定方法

核酸是由核苷酸组成的，核苷酸又由碱基、核糖和磷酸三部分组成。根据核酸的组成确定了几种相应的测定方法。

1. 紫外吸收法:

核酸中的碱基包括嘌呤和嘧啶杂环，它们有吸收紫外光的性能，并在波长 260 毫微米处有最大吸收值，称为吸收高峰。对于一个较纯的核酸样品，可以用紫外分光光度计测定它在不同波长处的光吸收值，并根据 260 毫微米的吸收高峰值计算出含量。这个方法不仅灵敏度高，可鉴定到 4 微克/毫升的核酸，而且可以准确、简便、迅速地得到样品中是否含有核酸的证据。但在测定粗制品时，色素及其它紫外吸收的杂质对测定有干扰作用，且仪器昂贵，难以普及。

2. 定糖法:

核糖核酸的核糖和脱氧核糖核酸的脱氧核糖部分，它们分别能与地衣酚和二苯胺试剂呈显色反应。地衣酚测定核糖核酸中的戊糖方法灵敏度低(可鉴定到每毫升 40 微克核糖核酸)，它不经过消化就与显色剂反应，蛋白质、杂糖对测定都有干扰，不易测准。

二苯胺测定脱氧核糖核酸含量法，灵敏度更低(鉴定最低量每毫升 90 微克)，但由于紫外法和定磷法对核糖核酸和脱氧核糖核酸没有直接鉴别能力，所以它还是测定核酸中脱氧核糖核酸含量的常用方法之一。此法在测定白地霉中的脱氧核糖核酸时，再详细叙述。

3. 定磷法:

核酸中含有磷酸, 可以用定磷法测定出磷的含量。已知磷占酵母核酸重量的 9.5%, 即核酸为磷重量的 $10.5 \approx 11$ 倍。每测得 1 毫克核酸的磷, 就代表含有 11 毫克的核酸。定磷法灵敏度比较高, 最低可以测到每毫升含 20 微克核酸的水平。用 72 型、71 型分光光度计及比色计都可测定, 没有这些仪器的单位, 用眼睛将测定样品与标准色阶管相比较, 也可以衡量出核酸的含量, 即所谓目测法。使用定磷法测定核酸含量, 方法简便、试剂容易得到, 这是一个值得推广普及的切实可行的方法。

二、定磷法的原理和简易测定法

1. 样品的消化:

称取一定量待消化的样品放在消化瓶中, 加入适量的 10N 硫酸, 如果消化样品是少量液体, 加入 2.5 毫升左右硫酸就够了, 如果消化样品是固体, 硫酸就要适当多加些。但是如果一开始就加入很多硫酸, 而消化过程中又消耗不大, 会引起大量过剩, 干扰下步显色, 因为显色时, 反应系统中硫酸浓度约 1N 左右较合适, 否则就会有干扰。样品加入硫酸后, 放在电炉上加热, 待产生白烟, 样品变黑后, 取下小心地滴加数滴过氧化氢(如果没有过氧化氢也可小心滴加数滴高氯酸, 但决不要过量), 促进氧化, 然后再放回电炉上加热。这样反复数次, 直到消化瓶中的溶液透明, 不再呈黑色或棕色为止。如果不加过氧化氢或高氯酸, 消化时间约需 7~8 小时, 加上上述氧化剂一般 30~60 分钟即可完成。待消化液冷至室温加蒸馏水

到 100 毫升，摇匀，准备定磷比色。消化过程中，碳水化合物氧化成二氧化碳和水；硫化物氧化成二氧化硫放出；含氮化合物氧化成氨，和溶液中的硫酸形成硫酸铵；含磷化合物则变成无机磷酸。

有马福炉的单位，也可以将样品放在坩埚内，加上盖子，放入炉中进行灼烧，使之灰化，灰化完全应该是白色粉末，这时有机磷化合物转变成可以比色的无机磷。灰化完毕后取出，待冷至室温，用 0.1N 的盐酸将灰份洗出，稀释至一定体积，进行比色。

2. 试剂的配制：

(1) 6N 硫酸溶液：用量筒量取 50 毫升浓硫酸(36N)小心地倒入约 200 毫升蒸馏水中，然后再加水到 300 毫升。

(2) 2.5% 钼酸铵溶液：称取 7.5 克钼酸铵(含四分子结晶水)，加热溶解在 300 毫升蒸馏水中。

(3) 10% 抗坏血酸溶液：称取 15 克抗坏血酸，加蒸馏水 150 毫升搅拌使其全部溶解，如不全溶，可在 40°C 以下的水浴中加热溶解，置于棕色瓶中，放冰箱中保存。一般可用 1~2 个月。如果没有冰箱，则计算一下需要多少毫升，使用时临时配制。当抗坏血酸溶液变成黄色则不能使用。

(4) 定磷试剂：在使用前取上述试剂按体积比例临时混合，蒸馏水：6N 硫酸：2.5% 钼酸铵：10% 抗坏血酸 = 2：1：1：1。摇匀，混合液应为淡黄色，混合后不能放置时间太长，如呈棕黄色则不能使用。

(5) 标准无机磷储备液：将分析纯的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)，先在 110°C 烘箱中烘至恒重，然后放在干燥器中，待温度平衡后，用天平精确称取 1.0967 克(或准确称取 1 克左右加以换算)，放在 250 毫升容量瓶中，用蒸馏水溶解，稀

释到刻度(含磷量 1 毫克/毫升),作为贮备溶液,放冰箱保存。

3. 显色反应:

精确地吸取 1 毫升贮备液,置于 100 毫升容量瓶中,用蒸馏水稀释到刻度(含磷量 10 微克/毫升)。取 6 支试管,按表 1 中的编号,分别按表内要求加入标准磷液、蒸馏水及定磷试剂。摇匀之后,在 45°C 水浴中保温 25 分钟(没有恒温水浴设备,也可用热水不断调节,维持在 45°C 左右),试管中分别显出深浅不同的蓝色称为标准色阶管。其反应原理如下:在硫酸存在下,试剂中的钼酸铵以钼酸形式和样品中的磷酸反应,形成磷钼酸,再经还原剂作用,还原成钼蓝呈蓝色。磷酸含量在一定浓度范围内,溶液蓝色的深浅和磷酸含量成正比。

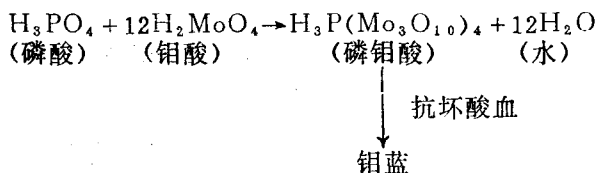


表 1

试 管 号 码	空白	1	2	3	4	5
标准磷液(毫升)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
无机磷含量(微克)	0	2	4	6	8	10
蒸 馏 水(毫升)	3.0	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0
定磷试剂(毫升)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
显色体积(毫升)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

4. 无机磷标准线的制备:

保温 25 分钟后取出, 冷至室温, 用 72 型分光光度计 660 毫微米比色(或比色计选择 650 毫微米滤光片比色)分别将各管显色液倒入比色杯, 以空白管作对照(不可用水作对照), 读 660 毫微米光密度值, 结果举例如表 2。以各管含磷量(微克)作横座标, 以光密度值为纵座标作图(图 1)。标准线在光密度从零到 0.7 左右的范围内应该是一条通过原点的直线。直线上任一点的横座标与纵座标的比值是一个常数, 我们称它为标准线常数, 它等于 1 单位光吸收值所相当的磷的微克数。在这个例子中, 标准线常数等于 $\frac{2}{0.1} = \frac{10}{0.5} = 20$, 求出了标准线常数, 当读出被测样品的 660 毫微米光密度值后, 不必查标准线, 即可乘上这一常数, 直接进行计算。

表 2

试 管 号 码	空 白	1	2	3	4	5
无机磷含量(微克)	0	2	4	6	8	10
660 毫 微 米 光 密 度 值	—	0.10	0.195	0.295	0.390	0.50

标准线应该经常校准。每当仪器经过维修, 调换灯泡, 或重新配标准磷试剂, 标准线都要重新作过。严格来说, 应该每次测定样品时同时做一次标准线。

5. 测定样品的核酸含量:

以广州饮料三厂酒糟为例, 取 1 克经过预处理的酒糟, 消化后稀释到 100 毫升, 取双样, 各 3.0 毫升, 空白管加蒸馏水 3.0 毫升(供比色时作对照用), 然后各加入定磷试剂 3.0 毫升, 摇匀, 于 45°C 保温 25 分钟。取出, 冷至室温, 用分光

光度计 660 毫微米波长比色。结果如表 3。

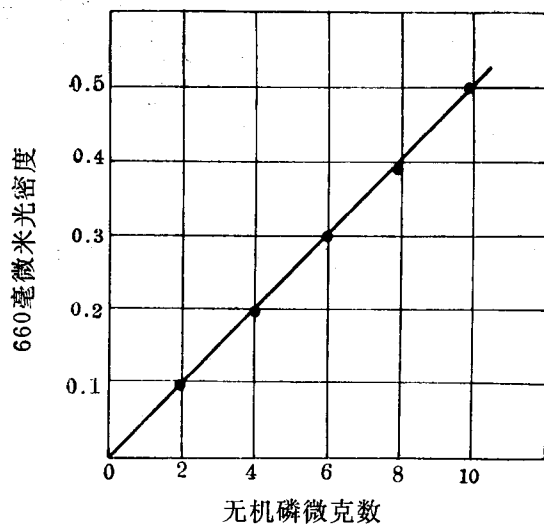


图 1

表 3

试 管 号 码	空 白	1	2
样 品(毫升)	0	3.0	3.0
蒸馏水(毫升)	3.0	0	0
定磷试剂(毫升)	3.0	3.0	3.0
显色体积(毫升)	6.0	6.0	6.0
660 毫微米光密度 值	—	0.395	0.40

读数在 0.1 到 0.7 之间为有效数，可以计算含量，读数小

于 0.1 或大于 0.7 要重新取样显色测定。两个同一样品读数接近时表明测定可靠，可以用来计算核酸的含量。核酸中的含磷量是一定的，核糖核酸的含磷量为 9.5%，因此，可以根据磷含量计算出核酸量，即 1 微克磷等于 11 微克的核糖核酸，也就是测得的磷含量乘 11 倍就是核酸的量。

计算：
$$\frac{\text{光密度值} \times \text{标准线常数} \times \text{稀释体积} \times 11}{\text{测定时取样毫升数} \times \text{样品重量(微克)}} \times 100\%$$

$$\text{即} \quad \frac{0.40 \times 20 \times 100 \times 11}{3 \times 1000,000} \times 100\% = 0.29\%$$

结果每克湿酒糟中含核酸量为 0.29%。若测定时颜色比较深，只取 1 毫升另外加 2 毫升水测定时，式中不需要除以 3 而是除以 1。(同样，取 0.2 毫升消化液加 2.8 毫升水时，式中则不除以 3 而除以 0.2) 另外如消化后稀释成 50 毫升，式中则将 100 换成 50。消化瓶可预先加 50 毫升或 100 毫升水于颈部水平面处刻一条线，消化完毕，冷却，加水到刻度线即可，不必转移到容量瓶中。这样可减少麻烦。如按干重计算含量，除取 1 克分析样品消化外，另取 5 克湿样品放烘箱中烘干后称其重量，干重为 1 克，就是 5 克湿重等于 1 克干重，上述 0.29% 折合成干重核酸含量为：

$$\frac{5 \text{ 克湿重}}{1 \text{ 克干重}} \times \text{湿重含量}\% = \text{干重含量}\%$$

$$\text{按上式计算：} \frac{5}{1} \times 0.29\% = 1.45\% (\text{按干重计算含量})$$

6. 简易测定法(目测法)：

没有分光光度计和比色计的单位，同样可以用定磷法测定

样品的核酸含量。

在完成本节中(1)样品的消化,(2)试剂的配制,(3)显色反应步骤后,将已消化的样品稀释到一定体积,然后取二份1~3毫升放到两支与标准色阶管直径相同的试管中,用水补充到3毫升,再分别加入3毫升定磷试剂,与前述显色反应同样条件显色后,将这两支测定管在白色背景下,用眼睛反复和标准色阶管相比较,看它们相当于标准色阶管的哪一管,再根据该标准管的磷含量计算测定液的核酸含量。

由于钼蓝的颜色不稳定,随时间变化较快,因此每测一次样品要同时作一次标准色阶管。为了简化起见,可配制1%硼砂($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)溶液,加入适量的广范pH试纸(我们采用上海试剂三分厂生产的pH1~14试纸)即呈现出类似钼蓝的颜色,取5支试管,调节pH试纸的用量,使这五支试管中溶液的颜色分别与上述钼蓝标准色阶管一一对应。试管的粗细相同,用白纸作背景进行比较。最后,用酒精喷灯封管,即可代替上述钼蓝标准色阶管,用于测定样品的核酸含量。硼砂溶液加入pH试纸产生的颜色比钼蓝稳定。但是如果将其暴晒于强烈日光下,也会逐日退色。若在每次使用完毕后,避光保存,至少可以连续使用三个月左右,其颜色基本不变。这种标准色阶管可以比较方便地一次生产成百套供需要单位使用。

三、分析样品的预处理

根据核酸的组成中含有碱基、核糖、磷酸的特点,可以分别用测定紫外吸收的方法及测定磷酸或核糖含量的方法来计算核酸含量。对于纯度比较高的样品,如从酵母或白地霉中提取

的核酸，上述三种方法都可以准确地测定其含量。

这里要说明的是我们在农业上使用的“七〇二”不可能培养了酵母或白地霉先抽提纯核酸再进行降解去使用，这样做无论在生产工序和经济上考虑都是不必要的。农业上实际使用的“七〇二”产品，一般来讲它们的共同特点是颜色深、杂质多，干扰因素大，核苷酸含量低，给准确测定带来一些困难。为了建立一个可靠的测定方法，我们进行了一些实验分析工作，现介绍如下：

用紫外分光光度计测定核酸含量，虽然是一个比较灵敏方便的方法，但由于酒糟等水解液颜色很深，干扰了测定。紫外光吸收结果如图2曲线，波长越短，光吸收越高，图中曲线在260毫微米处没有核苷酸的特征性吸收高峰，因此不能肯定其中含有核苷酸，更不能用来计算产品中的核苷酸含量。

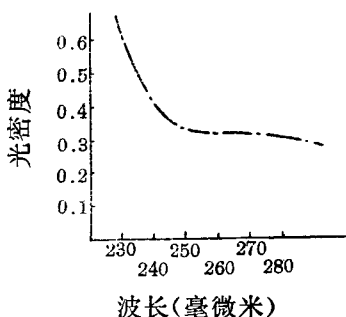


图 2

用定磷的方法测定含量，即全消化后测定总磷量减去无机磷含量，对于核苷酸含量较高的白地霉碱解液可以使用，但对于酒糟碱解液等含量极低的水剂，由于颜色深，杂质多，常会出现无机磷几乎和总磷相等，有时在测定无机磷时反应系统中产生沉淀，干扰了测定，不易测准。我们早期的测定工作(收集在中科院微生物所编《核酸降解物在农业上的应用》一书中)已经不能适应客观的需要，其中用醋酸氧铀-高氯酸试剂沉淀法来测定无机磷，这种处理方法是不必要的，如果需要可适当加

高氯酸沉淀蛋白等干扰物质。

为了用定磷的方法达到准确测定核酸含量的目的，关键在于排除干扰。我们知道一般动物、植物组织中含磷化合物可分为四类：

(1)无机磷酸盐及其他小分子有机磷化合物，它们可以用水洗或酸洗的方法从样品中除去；(2)磷脂类，可用酒精洗涤或用酒精乙醚混合物抽提的方法除去；(3)核酸，以核蛋白的形式存在，于室温条件下用水或稀酸短时间离心洗涤和酒精洗涤过程中都不溶解；(4)磷蛋白，在神经组织、蛋黄、牛奶中含量多，白地霉、酒糟中含量极少，可不予考虑。

在分析样品的核酸含量之前，先用上述方法对样品进行处理，排除对测定的干扰，我们称它为“预处理”。这一预处理的原则适用于一般样品，但不同的样品，洗涤时应有不同侧重。

通过对样品进行预处理，可以测到样品中核酸的紫外吸收特征峰形。核酸的含量，用定磷法测定的结果与紫外分光光度计测得的结果基本上一致，达到了准确测定的目的。象酒糟、豆腐渣酵母培养液，干重98%以上是杂质，通过预处理，我们也能将其中含量仅为1%左右的核酸准确测定出来。更重要的是，在生产“七〇二”之前，首先测定原料中的“七〇二”含量，可以达到普查资源的目的，有利于指导生产，降低成本，提高产品质量。

四、各种“七〇二”原料及产品中的 核酸含量测定

例1.白地霉粉剂中核酸含量测定

利用废糖蜜、淘米水、豆腐水以及葡萄糖废液等培养的白地

霉菌丝体，经过水洗，压干，烘干，粉碎成粉末。

称取 1 克粉末

↓ 95% 酒精浸泡洗涤，
↓ 离心，弃去上清液

沉淀部分

↓ 1% 高氯酸洗涤四次，
↓ 充分洗去无机磷酸盐，
↓ 每次离心后弃去上清液

沉淀部分

↓ 消化后稀释到 110 毫升

取 0.1 毫升定磷

↓ 加 2.9 毫升蒸馏水，3 毫升定磷试剂，
↓ 45°C 保温 25 分钟

比色，660 毫微米光密度值 0.395

计算：

$$\frac{\text{光密度值} \times \text{标准线常数} \times \text{稀释体积} \times 11}{\text{测定时取样毫升数} \times \text{样品重量(微克)}} = \times 100\%$$

$$\text{即 } \frac{0.395 \times 20 \times 110 \times 11}{0.1 \times 1000 \times 1000} \times 100\% = 9.55\%$$

重复上述实验结果为 9.2%

如果不经酒精和高氯酸洗涤，直接消化定磷计算，含量为 14.5%。另外，采用紫外分光光度计测定法：称取白地霉粉剂 1 克，用 10% 食盐溶液，每次 20 毫升，沸水浴抽提三次，抽提液适当稀释进行紫外分光光度计测定，具有核酸的特征性吸收峰(图 3)，260 毫微米有吸收高峰，低峰在 235 毫微米处。从抽提效果看来(图 4)，经三次抽提核酸已接近完全。根据三次抽提计算核酸含量为 9.3%，与上述预处理后定磷结果符合，说明不经过预处理，直接消化定磷的结果是一个假象，是白地霉

细胞中磷酸盐和小分子磷化合物干扰测定的结果。说明预处理是必要的。

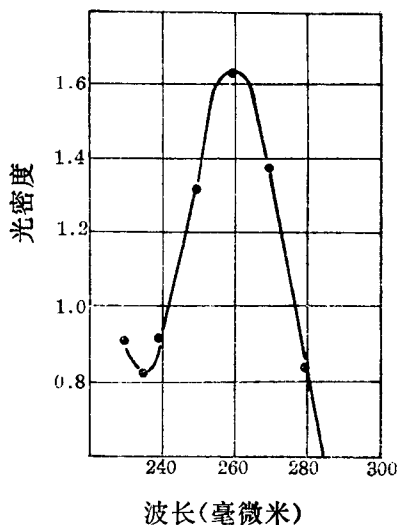


图 3

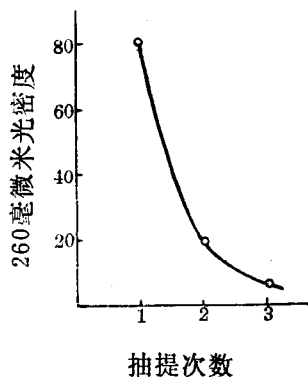


图 4

表 4 白地霉核酸含量测定结果(%干重)

实验次数	未经预处理定磷	预处理后定磷	食盐抽提三次合并紫外分光光度计测定
1	14.5	9.55	9.3
2	14.5	9.2	8.2

白地霉碱降解液(即七〇二水剂)的含量测定

将白地霉水剂用滤纸过滤,从清液中取二份,每份 5 毫升,其中一份加 2 毫升浓硫酸于电炉上消化,冷后稀释到 100 毫升,从中取 0.5 毫升加 2.5 毫升水及 3 毫升定磷试剂 45°C 保温显色。另一份不消化,直接稀释到 100 毫升,取 1 毫升加水 2 毫

升及定磷试剂 3 毫升，同样显色测定无机磷。按目测法同标准色阶管比较，总磷相当于 8 微克，无机磷相当于 6 微克，计算如下：

$$\frac{(\text{总磷} - \text{无机磷}) \times \text{稀释倍数} \times \frac{340}{31}}{1,000,000} \times 100\%$$

$$\text{即 } \frac{(16 - 6) \times 20 \times \frac{340}{31}}{1,000,000} \times 100\% = 0.22\%$$

即该水剂浓度为 2200 单位 (p.p.m.)。

目测结果与比色计测定基本上一致。对于白地霉粉剂，我们测定过不少生产单位的产品，含量一般在 8~9% 左右。譬如称 25 克白地霉粉剂，经过酸解或碱解后加水到 100 市斤，就是 40 度 (或 40 单位)，喷施一亩农作物。特别是用酸降解后由于核酸分子中嘌呤碱基断裂，游离磷增加，定磷方法此时已不适用，因此可以按白地霉粉剂中核酸含量计算，不必进行分析。

例 2. 白地霉粉剂中脱氧核糖核酸含量测定

前面曾提到用二苯胺法可以测定脱氧核糖核酸的含量。

二苯胺试剂的配制：

称取 1 克二苯胺，溶于 100 毫升冰醋酸中，再加入 2.75 毫升浓硫酸即成。

脱氧核糖核酸标准线的制备：

称取一定量鱼精脱氧核糖核酸，溶于蒸馏水中，稀释至浓度为 250 微克/毫升。取 6 支试管，按表 5 编号，分别按表内要求加入脱氧核糖核酸，蒸馏水和二苯胺试剂。摇匀之后于沸水浴中煮沸 10 分钟，各试管内即显示出深浅不同的蓝色，待冷至