

环境生化分析

Environmental Biochemical Analysis

主 编 梁爱惠 副主编 温桂清

环境生化分析

HUANJING SHENGHUA FENXI

主 编 梁爱惠

副主编 温桂清

成 员 (按姓氏笔画排序)

李纪顺 张 静 周莲平 范燕燕 梁爱惠

温桂清 蒋治良 覃惠敏 魏 超

GUANGXI NORMAL UNIVERSITY PRESS
广西师范大学出版社

· 桂林 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

环境生化分析 / 梁爱惠主编. —桂林: 广西师范大学出版社, 2013.2

ISBN 978-7-5495-3445-6

I. 环… II. 梁… III. 生物样品分析 IV. X132

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 022700 号

广西师范大学出版社出版发行

(广西桂林市中华路 22 号 邮政编码: 541001)
(网址: <http://www.bbtpress.com>)

出版人: 何林夏

全国新华书店经销

衡阳顺地印务有限公司印刷

(湖南省衡阳市雁峰区园艺村 9 号 邮政编码: 421008)

开本: 787 mm × 1 092 mm 1/16

印张: 30.25 字数: 627 千字

2013 年 2 月第 1 版 2013 年 2 月第 1 次印刷

定价: 50.00 元

如发现印装质量问题, 影响阅读, 请与印刷厂联系调换。

前言

环境分析化学是研究如何运用现代科学理论和先进实验技术来鉴别和测定环境中化学物质的种类、成分、含量以及化学形态的科学,是环境化学和分析化学的一个重要分支学科。生化分析技术在环境分析化学中的应用,为环境污染物的分析和检测提供了一种简便、快速、价廉的方法。本书共由十一章组成,环境分析化学基础知识对环境生化分析的学习是最基本的也是非常重要的,这些内容常被忽视,故把它列在第1章。蛋白质和核酸均为非常重要的两类生物大分子,也是两类非常重要的分析试剂。以蛋白质为主线,第2章至第8章对氨基酸和蛋白质的结构、性质,蛋白质和氨基酸分析,酶分析、免疫分析和生物传感器原理及其在环境分析中的应用进行了介绍。核酸是另一种非常重要的生物大分子分析试剂,结合我们的科研成果,参考有关文献,第9章至第11章介绍了核酸结构及其分析方法,PCR技术原理和适配体分析原理及其在环境分析中的应用。

酶分析、免疫分析、适配体分析、纳米分析是当今相关领域的研究热点,以此为基础的环境生化分析发展迅速,我们在参考有关生化分析教材的基础上,结合本课题组的研究成果,编著了《环境生化分析》教材,不妥之处,恳请同仁批评指正。本书可作为化学、环境类本科高年级学生教材使用,也可作为研究生教材,还可供广大相关科技工作者和工程技术人员参考使用。在编著该书的过程中,得到了环境与资源学院领导及环境科学系老师和同学们的大力支持,在此一并致谢!

编者

目 录

| | |
|--------------------------------|----|
| 第 1 章 环境分析化学简介 | 1 |
| 1.1 环境分析化学的任务、特点及要求 | 1 |
| 1.1.1 环境分析化学的任务 | 1 |
| 1.1.2 环境分析化学的特点 | 2 |
| 1.1.3 环境分析化学的要求 | 2 |
| 1.2 环境分析化学的发展趋势 | 3 |
| 1.2.1 高效预富集、分离方法的研究 | 3 |
| 1.2.2 环境分析监测技术的连续自动化 | 4 |
| 1.2.3 开发新的用于环境分析化学的计算机软件 | 4 |
| 1.2.4 各种方法和仪器的联用 | 5 |
| 1.2.5 提出新原理,发展新方法 | 5 |
| 1.2.6 环境生化分析 | 5 |
| 1.3 环境检验的生化指示器系统 | 5 |
| 1.3.1 活体生物 | 6 |
| 1.3.2 组织和器官 | 7 |
| 1.3.3 细胞培养 | 11 |
| 1.3.4 细胞制备物 | 11 |
| 1.4 污染物在生物体内的积累和分布 | 14 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 1.4.1 污染物在生物体内的积累 | 14 |
| 1.4.2 污染物在生物体内的分布 | 14 |
| 1.5 生物样品的采集、制备和保存 | 15 |
| 1.5.1 人类血、尿、头发和其他组织样品的采集、制备和保存 | 16 |
| 1.5.2 动物样品的采集、制备和保存 | 19 |
| 1.5.3 人和动物待检样品的取样 | 24 |
| 1.5.4 植物样品的采集、制备和保存 | 24 |
| 1.6 生物样品的预处理 | 28 |
| 1.6.1 消解和灰化 | 28 |
| 1.6.2 提取、分离和浓缩 | 29 |
| 1.6.3 适用于酶法检验的生物样品的处理 | 30 |
| 1.7 环境样品有机污染物分析的预处理技术 | 33 |
| 1.7.1 优先污染物与优先监测 | 33 |
| 1.7.2 环境有机污染物分析的必要性 with 特点 | 34 |
| 1.7.3 环境有机污染物分析的一般步骤与amp;方法 | 35 |
| 1.7.4 环境有机污染物衍生化 | 38 |
| 1.7.5 固相萃取 | 41 |
| 1.7.6 固相微萃取 | 48 |
| 1.7.7 超临界流体萃取 | 51 |
| 思考题 | 55 |
| 参考文献 | 55 |
| 第2章 蛋白质结构与性质 | 57 |
| 2.1 蛋白质的功能和分类 | 57 |
| 2.1.1 蛋白质研究概况 | 57 |
| 2.1.2 蛋白质的功能 | 59 |
| 2.1.3 蛋白质的分类 | 60 |
| 2.2 氨基酸的功能、结构、性质 | 61 |
| 2.2.1 氨基酸的功能与制备 | 61 |
| 2.2.2 天然氨基酸的主体结构 | 62 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 2.2.3 氨基酸的性质 | 64 |
| 2.3 蛋白质的性质 | 68 |
| 2.3.1 蛋白质的两性解离和等电点 | 69 |
| 2.3.2 蛋白质分子的大小 | 70 |
| 2.3.3 蛋白质的胶体性质 | 71 |
| 2.3.4 蛋白质的变性 | 71 |
| 2.3.5 蛋白质的沉淀反应 | 73 |
| 2.3.6 蛋白质的颜色反应 | 74 |
| 2.4 蛋白质的结构分析 | 74 |
| 2.4.1 蛋白质的一级结构 | 75 |
| 2.4.2 蛋白质的二级结构 | 75 |
| 2.4.3 蛋白质的三级结构 | 76 |
| 2.4.4 蛋白质的四级结构 | 77 |
| 2.5 蛋白质组学简介 | 78 |
| 2.5.1 常用的蛋白质组学研究技术 | 79 |
| 2.5.2 蛋白质组学研究展望 | 83 |
| 思考题 | 84 |
| 参考文献 | 85 |
| | |
| 第3章 氨基酸分析 | 86 |
| 3.1 氨基酸的定量斑点分析 | 87 |
| 3.1.1 斑点显色分析法 | 87 |
| 3.1.2 斑点荧光分析法 | 88 |
| 3.2 色谱方法 | 88 |
| 3.2.1 离子交换色谱法 | 88 |
| 3.2.2 反相色谱分析法 | 92 |
| 3.2.3 气相色谱法(GC) | 94 |
| 3.2.4 氨基酸的电泳分析法 | 95 |
| 3.3 基于氨基酸选择性反应的分析方法 | 96 |
| 3.3.1 显色分析法 | 96 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 3.3.2 荧光方法 | 97 |
| 3.3.3 微生物方法 | 97 |
| 3.3.4 酶分析法 | 98 |
| 3.4 氨基酸分析中存在的问题及发展趋势 | 99 |
| 思考题 | 100 |
| 参考文献 | 100 |
| | |
| 第4章 蛋白质分析方法 | 102 |
| 4.1 蛋白质分析方法概论 | 103 |
| 4.2 化学分析法 | 104 |
| 4.3 紫外吸收光谱法 | 105 |
| 4.3.1 双缩脲(Biuret Assay)法 | 107 |
| 4.3.2 劳里(Lowry)法 | 107 |
| 4.3.3 染料结合法 | 108 |
| 4.4 荧光分光光度法 | 113 |
| 4.4.1 内源荧光法 | 114 |
| 4.4.2 外源荧光法 | 114 |
| 4.5 共振瑞利散射光谱法 | 116 |
| 4.6 极谱法 | 118 |
| 4.6.1 蛋白质自身的极谱波 | 119 |
| 4.6.2 蛋白质的催化氢波 | 119 |
| 4.6.3 蛋白质—金属配合物吸附波 | 120 |
| 4.7 高效液相色谱法 | 121 |
| 4.7.1 高效液相色谱简介 | 121 |
| 4.7.2 蛋白质的高效液相色谱分析 | 131 |
| 4.8 高效毛细管电泳法 | 131 |
| 4.8.1 HPCE 简介 | 132 |
| 4.8.2 毛细管电泳法的应用 | 140 |
| 思考题 | 142 |

| | |
|------------------|------------|
| 参考文献 | 142 |
| 第5章 酶分析法 | 143 |
| 5.1 酶分析基础 | 144 |
| 5.1.1 酶的定义和性质 | 144 |
| 5.1.2 酶分析测定的原则 | 144 |
| 5.1.3 酶反应动力学 | 145 |
| 5.1.4 影响酶催化反应的因素 | 148 |
| 5.2 酶动力学分析方法 | 151 |
| 5.2.1 初速度法 | 152 |
| 5.2.2 固定时间分析法 | 153 |
| 5.3 酶分析的检测技术 | 153 |
| 5.3.1 紫外—可见分光光度法 | 153 |
| 5.3.2 荧光光度法 | 154 |
| 5.3.3 电化学法 | 154 |
| 5.3.4 其他方法 | 155 |
| 5.4 酶分析应用 | 156 |
| 5.4.1 活化剂的测定 | 156 |
| 5.4.2 抑制剂的测定 | 158 |
| 5.4.3 酶活性的测定 | 159 |
| 思考题 | 164 |
| 参考文献 | 164 |
| 第6章 免疫分析 | 166 |
| 6.1 抗原抗体及其制备 | 168 |
| 6.1.1 抗原及其制备 | 168 |
| 6.1.2 抗体及其制备 | 173 |
| 6.2 免疫反应 | 187 |
| 6.2.1 免疫反应基本原理 | 187 |

| | |
|--|------------|
| 6.2.2 经典的免疫反应 | 190 |
| 6.3 免疫分析法 | 202 |
| 6.3.1 放射免疫测定 | 203 |
| 6.3.2 免疫荧光技术(immunofluorescence technique) | 223 |
| 6.3.3 胶体金标记技术 | 235 |
| 思考题 | 244 |
| 参考文献 | 245 |
| 第7章 酶联免疫法及其在残留农药分析中的应用 | 246 |
| 7.1 ELISA 原理 | 247 |
| 7.1.1 酶标抗原直接竞争抑制法 | 247 |
| 7.1.2 酶标抗体直接竞争抑制法 | 247 |
| 7.1.3 酶标抗体间接竞争抑制法 | 248 |
| 7.2 ELISA 检测残留农药的一般程序 | 250 |
| 7.2.1 半抗原的准备 | 250 |
| 7.2.2 人工免疫抗原的合成 | 251 |
| 7.2.3 农药抗体的制备 | 252 |
| 7.2.4 抗原或抗体的包被 | 252 |
| 7.2.5 结果的判定 | 253 |
| 7.2.6 应用实例 | 256 |
| 7.3 采用分子诊断技术对环境中毒素的检测分析 | 259 |
| 7.3.1 采用免疫分析对真菌毒素的分子诊断 | 259 |
| 7.3.2 采用免疫分析技术对细菌毒素的分子诊断 | 266 |
| 7.3.3 采用免疫分析技术对其他生物毒素的检测 | 267 |
| 思考题 | 269 |
| 参考文献 | 269 |
| 第8章 生物传感器及其在环境污染物分析中的应用 | 270 |
| 8.1 概述 | 270 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| 8.2 酶传感器 | 272 |
| 8.2.1 酶传感器的结构 | 272 |
| 8.2.2 酶的固定化 | 273 |
| 8.2.3 酶传感器的分类 | 275 |
| 8.3 酶传感器的应用 | 279 |
| 8.4 利用生物传感器对环境中的污染物进行监测 | 280 |
| 8.4.1 利用生物传感器对环境参数的监测 | 280 |
| 8.4.2 利用生物传感器对毒物质的检测 | 284 |
| 8.4.3 利用生物传感器对残留农药的检测 | 284 |
| 8.4.4 利用传感器对重要污染物的检测 | 290 |
| 8.4.5 利用生物传感器对有机大分子的检测 | 296 |
| 8.4.6 利用生物传感器对环境金属离子的检测 | 299 |
| 8.5 环境中农药的免疫传感技术进展 | 301 |
| 8.5.1 农药分析免疫传感器 | 301 |
| 8.5.2 免疫传感器的生物分子部分 | 302 |
| 8.5.3 免疫传感器的传感器部分 | 304 |
| 8.5.4 免疫传感器方法 | 310 |
| 思考题 | 312 |
| 参考文献 | 313 |
| 第9章 核酸分析 | 315 |
| 9.1 核酸的结构 | 315 |
| 9.1.1 碱基、戊糖、核苷和核苷酸 | 316 |
| 9.1.2 核酸的结构 | 319 |
| 9.2 核酸及核苷酸的性质 | 325 |
| 9.2.1 溶解性 | 325 |
| 9.2.2 核酸及其组分的两性性质 | 326 |
| 9.2.3 紫外吸收特性 | 330 |
| 9.2.4 核酸的变性与复性 | 331 |
| 9.3 核酸的分离纯化 | 332 |

| | |
|--|------------|
| 9.3.1 核酸分离的一般原则 | 332 |
| 9.3.2 DNA 的分离纯化 | 333 |
| 9.3.3 RNA 的分离纯化 | 334 |
| 9.3.4 核酸组分的分离纯化 | 334 |
| 9.4 核酸分析方法 | 336 |
| 9.4.1 化学发光法 | 336 |
| 9.4.2 光度分析法 | 336 |
| 9.4.3 荧光分析法 | 337 |
| 9.4.4 共振散射光谱分析法 | 338 |
| 9.4.5 电化学方法 | 338 |
| 9.4.6 其他方法 | 339 |
| 思考题 | 339 |
| 参考文献 | 339 |
| | |
| 第 10 章 基于分子诊断技术的环境致病微生物检测 | 341 |
| 10.1 利用 PCR 技术检测环境中的致病微生物 | 342 |
| 10.1.1 聚合酶链式反应 | 342 |
| 10.1.2 利用 PCR 技术检测病原菌 | 351 |
| 10.1.3 利用 PCR 技术检测环境中的病毒 | 356 |
| 10.1.4 利用 PCR 技术检测环境中的寄生虫 | 360 |
| 10.2 利用寡核苷酸杂交技术检测致病微生物 | 361 |
| 10.2.1 核酸探针杂交技术 | 361 |
| 10.2.2 采用 DNA 探针检测病原微生物 | 382 |
| 10.3 利用免疫分析技术检测致病微生物 | 393 |
| 10.3.1 ELISA 法检测病原细菌 | 394 |
| 10.3.2 ELISA 法检测病原真菌 | 395 |
| 10.3.3 ELISA 法检测病毒 | 396 |
| 10.3.4 ELISA 法检测病原虫 | 399 |
| 10.4 检测环境中病原微生物的其他快速方法 | 399 |
| 10.4.1 检查某些细菌的专有酶进行快速鉴定 | 399 |

| | |
|--|------------|
| 10.4.2 快速检测细菌生化反应的色原或荧光底物及成套鉴定系统 | 400 |
| 10.4.3 应用不同载体的快速凝集试剂检查与鉴定微生物 | 401 |
| 10.4.4 快速检出细菌的毒素 | 401 |
| 10.4.5 快速的细菌对抗菌药物的敏感性试验 | 402 |
| 10.4.6 化学传感器对病毒的快速监测 | 402 |
| 思考题 | 403 |
| 参考文献 | 403 |
| 第 11 章 核酸适体及其在环境分析中的应用 | 404 |
| 11.1 修饰核苷酸 SELEX 技术 | 404 |
| 11.1.1 基于 Mod-SELEX 的聚合酶 | 405 |
| 11.1.2 修饰核苷酸库 SELEX 技术应用实例 (Mod-SELEX) ... | 408 |
| 11.2 基于核酸适体的生物传感器和生物测定的最新进展 | 412 |
| 11.2.1 核酸的性能 | 413 |
| 11.2.2 核酸功能概述 | 415 |
| 11.2.3 从随机单链寡核苷酸库中筛选适配体 | 416 |
| 11.2.4 适配体传感器 | 419 |
| 11.2.5 光学传感器 | 420 |
| 11.2.6 固定光学传感器 | 424 |
| 11.2.7 固定声信号传感器——受约束的和谐信号 | 427 |
| 11.2.8 微传感器 | 428 |
| 11.2.9 电学传感器 | 429 |
| 11.2.10 传递 FNAs 信号促进适体生物感应 | 433 |
| 11.2.11 适体生物的测定——应用于适体研究 | 435 |
| 11.2.12 适体在诊断学、治疗学和药物发现中的应用 | 436 |
| 11.3 核酸适配体电化学传感器 | 440 |
| 11.3.1 电化学核酸适配体传感器 | 442 |
| 11.3.2 场效应晶体管核酸适配体传感器 | 451 |

| | |
|--|-----|
| 11.3.3 基于压电晶体的微重量核酸适配体传感器 | 452 |
| 11.3.4 结论和展望 | 454 |
| 11.4 用于环境污染监测的核酸生物传感器 | 455 |
| 11.4.1 生物传感器在环境分析中的应用 | 455 |
| 11.4.2 基于核酸的生物传感器 | 456 |
| 11.4.3 基于核酸的吸引力生物传感器 | 457 |
| 11.4.4 基于核酸催化反应的生物传感器 | 462 |
| 11.4.5 基于核酸的生物传感器用于检测由化学作用导致的 DNA 损伤 | 464 |
| 11.4.6 发展趋势 | 466 |
| 思考题 | 467 |
| 参考文献 | 468 |

第 1 章 环境分析化学简介

★ 1.1 环境分析化学的任务、特点及要求

1.1.1 环境分析化学的任务

环境分析化学是研究如何运用现代科学理论和先进实验技术来鉴别和测定环境中化学物质的种类、成分、含量以及化学形态的科学,是环境化学的一个重要分支学科。

随着人口的增加、工业生产的迅速发展、人类生活水平的提高,人类活动导致的环境污染急剧增加,环境问题越来越引起社会的关注。由于大量的局部和全球性环境问题都直接或间接与化学物质有关,因此认识与解决环境问题必须弄清环境中的化学问题,必须对化学物质的性质、来源、含量及其形态进行细致的分析和监测。为此,应用现代分析化学中的各项新理论、新方法、新技术,且引进了近代化学、物理学、数学、生物学、地学、计算机和其他技术科学的最新成就,定性、定量地研究环境问题,从而建立了环境分析化学。

环境分析化学所提供的环境中化学物质种类、含量、形态等信息为评价环境质量、污染控制和治理,制订环境保护政策以及解决环境问题等提供了科学依据。如世界重大污染事件——痛痛病、水俣病事件的解决,环境分析化学起了关键作用。由此可见,环境分析化学在环境科学中起着极为重要的作用,它的发展必将有力地推动环境科学的发展。

1.1.2 环境分析化学的特点

环境分析化学研究的对象是环境中的化学物质,它们具有以下特点:

1. 种类繁多

这是由于污染物质化学物种的多样化,仅美国环保局规定水体中优先监测污染物就有一百多种,其中含有铜、铅、锌、镉等重金属,氰化物、氮氧化物等无机污染物,烷烃、多环芳烃等有机污染物;样品来源广泛,有来自空气、水(包括地表水、地下水、海水、排放废水)、沉淀物、土壤、固体废渣、生物体及其代谢物等。

2. 含量低

环境分析化学所研究的对象含量低,原因是大气、水、土壤及生物体中化学物质的本底水平(背景值)含量极小,一般都属于痕量($10^{-6} \sim 10^{-9}$ g)和超痕量($10^{-9} \sim 10^{-12}$ g)分析,而研究化学物质对环境的污染程度必须对其本底值有所了解;某些污染元素或化合物产生毒性效应的浓度范围低。如汞、镉的毒性效应分别为 0.001 mg/L、0.01 mg/L 左右;地面水中砷的最高容许浓度为 0.04 mg/L;挥发性酚类化合物的最高容许浓度为 0.01 mg/L。此外,化学污染物的形态不同,其毒理特性和化学行为则不同。因此,环境分析化学不仅要测定化学污染物的总量,还要测定其不同的形态。显然,化学物质形态的含量比其总量更低。

3. 样品组成复杂

人类生产与社会活动和自然界的生物体代谢过程不断向周围环境排放各种有害的化合物,环境样品中往往含有数十至数百种不同的化合物。样品的复杂性使得环境分析干扰因素多。

4. 具有流动性和不稳定性

环境是一个多组分和多变的开放体系。形形色色的污染物进入环境后可能因相互作用或外界影响而经历溶解、吸附、沉淀、氧化、还原、光解、水解、生物降解等变化。因此,环境样品变化大,不稳定,所采集的样品是环境中的一部分,是动态平衡的一部分,它随气温、风向、气压、温度的变化而变化。

1.1.3 环境分析化学的要求

根据环境分析化学研究对象的上述特点,要求分析方法除了满足一般分析所要求的准确度高,精密度好之外,还需具备以下三个方面:

(1)灵敏度高,检出限低。能满足痕量和超痕量分析的要求。一些环境分析方

法及其检出限归纳如下(见表1-1)。

(2)选择性好。可用于复杂样品的测量,可在大量共存物的存在下测量痕量待测物。

(3)适用范围广。能用于不同来源的环境样品,不同种类化学物质的测量。

表1-1 环境分析方法及检出限

| 分析方法 | 检出限/g | 分析方法 | 检出限/g |
|------------------|------------|------------|------------|
| 分光光度法(VIS、UV、IR) | 10^{-9} | 火焰原子吸收光谱法 | 10^{-10} |
| 化学发光法 | 10^{-12} | 石墨炉原子吸收光谱法 | 10^{-14} |
| 催化分析法 | 10^{-13} | 火焰光度分析 | 10^{-10} |
| 流动注射分析法 | 10^{-9} | 极谱法 | 10^{-9} |
| 荧光法 | 10^{-12} | 电子能谱 | 10^{-18} |
| X射线荧光光谱法 | 10^{-9} | 电子探针 | 10^{-15} |
| 发射光谱法 | 10^{-10} | 中子活化分析法 | 10^{-14} |
| 激光光谱法 | 10^{-14} | 放射性同位素分析法 | 10^{-16} |
| 库仑分析法 | 10^{-9} | 液相色谱法 | 10^{-10} |
| 阳极溶出伏安法 | 10^{-12} | 气相色谱法 | 10^{-12} |
| 离子选择电子法 | 10^{-9} | 螯合物气相色谱法 | 10^{-14} |
| 质谱法 | 10^{-15} | 离子色谱法 | 10^{-9} |
| 火花源质谱法 | 10^{-14} | 薄层色谱法 | 10^{-9} |

1.2 环境分析化学的发展趋势

1.2.1 高效预富集、分离方法的研究

当待测物浓度低于分析方法的检出限以及干扰很大时,由于环境样品组成的复杂性,待测物含量极低,因此不能直接测定,需将样品进行处理。传统的离子交换、共沉淀、溶剂萃取等预富集、分离方法,操作过程冗长,分离效率不高,手续繁琐。因此,改进、建立高效的预富集、分离方法仍是环境分析化学活跃的研究领域。例如,在溶剂萃取基础上发展起来的超临界萃取法分离、富集城市灰尘中多环芳烃,速度比传统