



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

· 高等学校专业教材 ·

[高校教材]

果蔬采后 生理生化实验指导

曹建康 姜微波 赵玉梅 编著

EXPERIMENT GUIDANCE OF
POSTHARVEST PHYSIOLOGY AND
BIOCHEMISTRY OF FRUITS AND VEGETABLES




中国轻工业出版社

高等学校专业教材

果蔬采后生理生化 实验指导

曹建康 姜微波 赵玉梅 编著

 中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

果蔬采后生理生化实验指导/曹建康,姜微波,赵玉梅编著. —北京:
中国轻工业出版社,2007.9
高等学校专业教材

ISBN 978-7-5019-6003-3

I. 果… II. ①曹…②姜…③赵…=III. ①水果-生理生
化特性-实验-高等学校-教材②蔬菜-生理生化特性-
实验-高等学校-教材 IV. TS255.3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第086043号

责任编辑:伊双双

策划编辑:伊双双

责任终审:滕炎福

封面设计:刘鹏

版式设计:马金路

责任校对:郎静瀛

责任监印:胡兵 张可

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印刷:三河市世纪兴源印刷有限公司印刷

经销:各地新华书店

版次:2007年9月第1版第1次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:11.5

字数:259千字

书号:ISBN 978-7-5019-6003-3/TS·3500

定价:22.00元

读者服务部邮购热线电话:010-65241695 85111729 传真:85111730

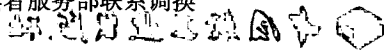
发行电话:010-85119845 65128898 传真:85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

61043J4X101ZBW



内 容 简 介

本书是编著者结合在长期的教学、科研过程中积累的经验,借鉴了植物科学研究中同类实验的优点,参考了近年来国内外相关专业实验新技术和新方法,主要从果蔬品质营养分析,果蔬中可溶性糖、淀粉、果胶、纤维素、蛋白质(酶)的生化测定,果蔬采后呼吸生理、乙烯生物合成代谢、活性氧代谢、抗氧化代谢、乙醇发酵代谢,以及果蔬抗逆代谢等方面介绍了许多相关过程的测定方法。

本书可作为高等农林院校食品、园艺等相关专业研究生、本科生的教材,还可作为相关教学和研究人员的参考书。

前 言

作为特殊的生命个体,果蔬产品一旦脱离母体植株后,生命活动所需的各种养分(水、矿质元素)再也不能得到供给和补充。果蔬只有通过消耗其体内储存的营养成分(主要为糖、蛋白质等有机物)来维持其采后生命活动。然而,到目前为止,对于果蔬采后生理生化代谢的研究,主要是通过借鉴植物生理学和生物化学研究中的一些相关方法进行的,还没有专门的针对果蔬采后生理学和果蔬生物化学的实验指导,严重影响了果蔬采后生命活动的科学研究工作。随着果蔬采后生理生化研究的日趋深入,实验技术不断提高,我们深切地感到,编写一本适应新时期教学和科研要求的果蔬采后生理生化实验指导教材十分必要。为此,我们编写了本书,以便为相关科研和实验教学工作提供具体而系统的指导。

本教材是编著者通过多年的科研和教学实践,在不断积累、总结经验的基础上,借鉴了植物科学研究中同类实验的优点,参考了近年来国内外相关专业实验新技术和新方法,经过反复增删才编写而成的。同时,编著者充分利用中国农业大学在果蔬采后生理和贮藏保鲜技术研究方面的优势,借鉴各个相关研究室的实验经验,对本书中各项实验内容、实验过程和数据都进行了认真的验证,对可能导致实验出现误差或失败的因素进行了深入探讨,对实验中需要注意的细节、关键步骤都进行了详细的整理和说明。

本教材第一部分介绍了一些基本实验操作。在这部分内容中,编著者根据在实验教学和科研中存在的问题,着重对基本实验操作应注意的事项进行了整理和说明。第二部分详细介绍了果蔬采后生理生化的各种具体实验过程,内容包括果蔬品质营养分析,果蔬中可溶性糖、淀粉、果胶、纤维素、蛋白质(酶)的生化测定,果蔬采后呼吸生理、乙烯生物合成代谢、活性氧代谢、抗氧化代谢、乙醇发酵代谢,以及果蔬抗逆代谢等方面。本教材在实验内容的编写上进行了新的尝试,特别是酶活性的测定和活性单位的定义上,紧扣酶生物学特点,启迪和鼓励实验者进行探索性研究。因此,本教材有利于培养实验者的综合分析能力和创新能力。

在本教材的编著过程中,得到了中国农业大学果蔬采后生理与贮藏保鲜技术实验室部分研究生的支持和帮助,硕士研究生曹冬冬同学对本书进行了认真校稿。中国轻工业出版社伊双双编辑为本书的编写提供了极好的建议,付出了很大的努力。在此谨向他们表示真诚的感谢。此外,本书参考了大量国内外研究文献和实验指导书,特在此说明,并向这些资料的作者表示衷心感谢。

由于编者水平所限,书中错误和欠妥之处在所难免,恳请有关专家、老师和同学批评指正。

编 者

2007年7月于中国农业大学

目 录

第一篇 基本实验操作原理	1
一、仪器的清洗、干燥和保管	1
二、称量	3
三、取液与移液	5
四、溶液组成的表示方法	6
五、缓冲溶液的配制	7
六、溶液 pH 的测定	10
七、离心技术	11
八、分光光度技术	13
九、样品的提取、分离、纯化和保存	14
十、蒸馏水的要求	17
十一、误差分析与数据处理	17
第二篇 果蔬采后生理生化实验技术	21
实验 1 果蔬一般物理性状的测定	21
实验 2 果实硬度的测定	22
实验 3 果蔬中可溶性固形物含量的测定	24
实验 4 果蔬中可滴定酸含量的测定	28
实验 5 果蔬汁液冰点的测定	30
实验 6 果蔬组织含水量的测定	31
实验 7 果蔬中叶绿素含量的测定	32
实验 8 果蔬中抗坏血酸含量的测定	34
实验 9 果蔬中游离氨基酸总量的测定	41
实验 10 果蔬中总酚物质、类黄酮与花青素含量的测定	44
实验 11 果蔬呼吸强度的测定	46
实验 12 贮藏环境中 O ₂ 和 CO ₂ 浓度的测定	51
实验 13 果蔬中可溶性糖含量的测定	54
实验 14 果蔬中还原糖含量的测定	59
实验 15 果蔬中可溶性蛋白质含量的测定	68
实验 16 果蔬中淀粉含量及淀粉酶活性的测定	76
实验 17 果蔬中果胶物质含量及果胶酶活性的测定	84

实验 18	果蔬中粗纤维含量及纤维素酶活性的测定	93
实验 19	果蔬中过氧化物酶活性的测定	101
实验 20	果蔬中多酚氧化酶活性的测定	103
实验 21	果蔬中脂氧合酶活性的测定	105
实验 22	果蔬组织乙烯生物合成代谢的测定	108
实验 23	果蔬组织活性氧代谢的测定	115
实验 24	果蔬组织抗氧化代谢的测定	125
实验 25	果蔬组织乙醇发酵代谢的测定	133
实验 26	果蔬中苯丙氨酸解氨酶活性的测定	142
实验 27	果蔬中几丁质酶活性的测定	144
实验 28	果蔬中 β -1,3-葡聚糖酶活性的测定	147
实验 29	果蔬中游离脯氨酸含量的测定	150
实验 30	果蔬细胞膜渗透率的测定	152
实验 31	果蔬中丙二醛含量的测定	154
实验 32	果蔬蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	156
实验 33	果蔬同工酶和可溶性蛋白质凝胶电泳	161
附录		166
附录 1	常用缓冲溶液的配制方法	166
附录 2	实验室中常用酸碱的相对密度和浓度	172
附录 3	常用有机溶剂及其主要性质	173
参考文献		175

第一篇 基本实验操作原理

一、仪器的清洗、干燥和保管

仪器的清洗是一项细致的实验准备工作,实验中所用的仪器清洁与否,洗涤是否符合要求,对实验结果的准确性和精确程度均具有直接的影响。在果蔬采后生理生化实验中,经常涉及到蛋白质、酶甚至核酸等多种具有生物活性的物质的测定和制备工作。这些物质对许多常见的污染杂质如金属离子(钙、镁离子等)、去污剂和有机物残基等十分敏感。由于实验仪器不洁净或被污染,往往会造成生化实验出现较大的误差,有时甚至导致实验的失败。因此,实验仪器、用具是否洁净就显得非常重要了。

(一) 仪器的清洗

1. 初用玻璃仪器的清洗

新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用去污剂溶液洗刷,再用自来水洗净后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜(不可少于4h),再用自来水冲洗。清洗后的器皿内外不可挂有水珠,否则需重新洗净。最后,用去离子水冲洗两次,在100~120℃烘箱内烘干备用(注意,计量仪器不可烘干)。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

先用自来水将仪器中的污染物洗刷干净,再用合适的毛刷沾去污剂(粉)洗刷,或浸泡在含清洗剂的水中超声清洗(注意,比色皿绝不可超声清洗),然后用自来水彻底洗净去污剂,用去离子水洗涤两次,烘干备用。

3. 石英和玻璃比色皿的清洗

强碱会浸蚀抛光的比色皿,因此在清洗时绝不可用强碱清洗。可用洗液或去污剂溶液浸泡后,再用自来水和去离子水冲洗。用绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗,效果会更好。

4. 塑料器皿的清洗

塑料器皿一般由聚乙烯、聚丙烯等材料制成,在实验中的应用越来越多。第一次使用塑料器皿时,可先用8mol/L尿素(用浓盐酸调pH=1)清洗,接着依次用去离子水、1mol/L KOH和去离子水清洗,然后用 10^{-3} mol/L乙二胺四乙酸(EDTA)除去金属离子的污染,最后用去离子水彻底清洗。以后每次使用时,可只用去污剂溶液清洗,然后用自来水和去离子水洗净即可。

(二) 洗液的配制

洗液的种类较多,根据需要,可以配置不同的洗液。

1. 铬酸洗液

常用铬酸洗液清洗新购买的玻璃仪器,以除去玻璃表面附着的碱性物质。但是铬有致癌作用,毒性较大,配制和使用洗液时要极为小心,常用的两种配制方法如下:

方法一:取 100mL 工业浓硫酸置于烧杯内,小心加热,然后慢慢加入 5g 重铬酸钾粉末,边加边搅拌,待全部溶解并缓慢冷却后,贮存在磨口玻璃塞的细口瓶内。

方法二:称取 5g 重铬酸钾粉末,置于 250mL 烧杯中,加 5mL 水使其溶解,然后慢慢加入 100mL 浓硫酸,溶液温度将达 80℃,待其冷却后贮存于磨口玻璃瓶内。

2. 工业浓盐酸

可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

3. 50g/L 草酸溶液

用数滴硫酸酸化,可洗去高锰酸钾的痕迹。

4. 30% 硝酸溶液

洗涤二氧化碳测定仪及微量滴管。

5. 50 ~ 100g/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na₂)溶液

加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

6. 尿素洗涤液

为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛过蛋白质制剂及血样的容器。

7. 有机溶剂

如丙酮、乙醚、乙醇等可用于洗脱油脂、脂溶性染料污痕等;二甲苯可洗脱油漆的污垢。

8. 市售洗涤剂

可洗涤油污物。

(三) 器皿的干燥

用于不同实验的仪器对干燥有不同的要求,一般定量分析中的烧杯、锥形瓶等仪器洗净即可使用,而用于有机化学实验或有机分析的仪器很多是要求干燥的,有的要求无水迹,有的要求无水。应根据不同要求来干燥仪器。

一般先将器皿洗涤干净,再用蒸馏水或去离子水冲洗后,在无尘处倒置除去水分,自然干燥。可用安有斜木钉的架子和带有透气孔的玻璃柜放置仪器。实验中还常常将洗净的玻璃和塑料器皿控去水分,放在烘箱中烘干,烘箱温度为 60℃ 左右,干燥 1 ~ 2h。带实心玻璃塞的以及厚壁仪器烘干时要注意慢慢升温并且温度不可过高,以免烘裂。量器不可放于烘箱中干燥。需要注意的是,硝酸纤维素的塑料离心管加热时会发生爆炸,所以绝不能放在烘箱中干燥,只能用冷风吹干。对于急于干燥的仪器或不适合放入烘箱的较大的仪器,都可用气流烘干机烘干或用电吹风机吹干。

(四) 仪器的保管

实验仪器要分门别类地存放,以便取用。经常使用的玻璃仪器放在实验柜内,要放置稳妥,高的、大的放在柜内靠里面。移液管洗净后应置于防尘的盒中。滴定管使用后,要倒去内装的溶液,洗净后倒置夹于滴定管架上。长期不用的滴定管要除掉凡士林后垫纸,用皮筋拴好活塞保存。比色皿用毕洗净后,在瓷盘或塑料盘中垫滤纸,倒置晾干后装入比

色皿盒或清洁的器皿中。带磨口塞的仪器如容量瓶,最好在洗净前就用橡皮筋或小线绳把塞和管口拴好,以免打破塞子或互相弄混。需长期保存的磨口仪器要在塞间垫一张纸片,以免日久粘住。成套的仪器如索氏萃取器、气体分析器等用完要立即洗净,放在专门的纸盒里保存,防止配件的丢失。

总之,要本着对工作负责的精神,对所用的一切玻璃仪器用完后要清洗干净,按要求保管。要养成良好的工作习惯,不要在仪器里遗留油脂、酸液、腐蚀性物质(包括浓碱液)或有毒药品,以免造成后患。

二、称 量

(一) 称量的一般过程

称量工作是生化实验中经常要进行的基本操作。称量器具主要有各种天平,如托盘天平、分析天平等。现在,各种电子天平在实验室中的应用越来越广泛。

电子天平要放置于稳定的工作台上,避免振动、气流及阳光照射。调节支撑角高度,使水平仪气泡位于中间位置。电子天平在初次接通电源或者在长时间断电之后,至少需要30min的预热时间,只有这样,天平才能达到所需要的工作温度。在接通以后,电子称量系统自动实现自检功能。当显示器显示“零”时,自检过程即告结束,此时,天平工作准备就绪。

称量前,选用合适的天平,在天平托盘上放上称量纸,并进行调零。调零后才能进行称量。如果称量的是潮湿的或是具有腐蚀性的试剂,必须放在玻璃器皿(如表面皿、烧杯、称量瓶)里称量。在称取量很少时,可以左手拿药匙,右手轻拍左手手腕,小心抖动药匙,使药品都落在称量纸上,达到所需质量。

进行一般的简单称量(确定质量)时,可将物品放到秤盘上。当显示器上出现作为稳定标记的质量单位“g”或其它选定的单位时,读出质量数值。但是在进行精密称重时,为避免测量误差,必须将空气流动引起的质量变化考虑在内。一般要合上天平的挡风罩,防止台面的振动等。

(二) 电子天平的正确使用与维护

1. 电子天平及其分类

人们把利用电磁力平衡被称物体重力的天平称为电子天平。其特点是称量准确可靠、显示快速清晰,并且具有自动检测系统、简便的自动校准装置以及超载保护等装置。电子天平称量精确度(感量)往往不同,常见的有各种电子顶载天平(0.1g)、电子精密天平(0.001~0.1g)和电子分析天平(0.1mg)等。

2. 电子天平的校准

在使用前一定要仔细阅读电子天平使用说明书,按照说明书进行校准和测定。如果使用前不仔细阅读说明书,则很容易忽略“校准”操作,从而造成较大称量误差。在较长的时间间隔内未进行校准,而且仅仅以天平显示零位便认为可直接称量,可能会导致出现较大称量误差。存放时间较长、位置移动、环境变化都会引起天平准确度和精确度的变化,因此,电子天平在使用前一般都应进行校准操作。需要指出的是,电子天平开机显示

零点,并不能说明天平称量的数据准确度符合测试标准,只能说明天平零位稳定性合格。

这里以上海天平仪器厂 JAI203 型电子天平为例说明如何对天平进行外校准。方法:轻按 CAL 键,当显示器出现 CAL - 时即松手,显示器就出现 CAL - 100,其中“100”为闪烁码,表示校准砝码需用 100g 的标准砝码。此时就把准备好的“100g”校准砝码放上秤盘,显示器即出现“---”等待状态,经较长时间后显示器出现 100.000g,拿去校准砝码,显示器应出现 0.000g,若出现不是为零,则再清零,再重复以上校准操作(注意:为了得到准确的校准结果最好重复以上校准)。

3. 电子天平量程范围

一般电子天平最大安全载荷是它能够承受的、不致使其计量性能发生永久性改变的最大静载荷。由于电子天平采用了电磁力自动补偿电路原理,当秤盘加载时(注意不要超过称量范围),电磁力会将秤盘推回到原来的平衡位置,使电磁力与被称物体的重力相平衡。只要在允许范围内,称量大小对天平的影响是很小的,不会因长期称重而影响电子天平的准确度。

4. 电子天平的维护与保养

- (1) 将天平置于稳定的工作台上避免振动、气流及阳光照射。
- (2) 在使用前调整水平仪气泡至中间位置。
- (3) 电子天平应按说明书的要求进行预热。
- (4) 称量易挥发和具有腐蚀性的物品时,要盛放在密闭的容器中,以免腐蚀和损坏电子天平。
- (5) 经常对电子天平进行自校或定期外校,保证其处于最佳状态。
- (6) 如果电子天平出现故障应及时检修,不可带“病”工作。
- (7) 天平不可过载使用以免损坏。
- (8) 若长期不用电子天平时应暂时收藏为好。

(三) 使用托盘天平的注意事项

实验室还经常用到托盘天平,为了取得较好的称量效果,在使用托盘天平时要注意一些事项。

(1) 调零 称量前要将天平放置平稳,并将游码左移至标尺的零处,检查天平的摆动是否达到平衡。如果已达到平衡,指针摆动时先后指示的分度盘上左、右两边的格数接近相等。指针静止时则应指在分度盘的中央。如果天平的摆动未达到平衡,可以调节左、右平衡螺母使摆动平衡。

(2) 称量物的放置 称量物不能直接放置在托盘上,应该垫两张大小一样的纸。如果称量的是潮湿的或是具有腐蚀性的试剂必须放在玻璃器皿(如表面皿、烧杯、称量瓶)里称量。

(3) 砝码的放置 将砝码放在右盘(因为游码的刻度盘的零点在左边),用镊子夹取。加砝码的顺序是“先大后小再游码”。称量时,若被称量物和砝码位置错放,则被称量物的质量 = 砝码的质量 - 游码的质量。称量完毕后,应将砝码依次放回砝码盒中,并把游码移回零处。

称量未知物时,先将未知物置于左盘,后加砝码(先大后小);称取一定质量的物质

时,则可以先加砝码到需要的质量,然后加被称物(若所称物为粉末或小颗粒固体、且称取量只缺很少时,左手拿药匙,右手轻拍左手手腕,小心抖动药匙加足药品量)。

三、取液与移液

在实验分析过程中,需要熟练掌握准确的取液和移液技术。为此要常用到各种形式的移液器具,如滴管、移液管(吸管)、滴定管、自动移液器和量筒等。取液度量仪器都不能加热,否则会影响其精确度。

1. 滴管

滴管使用方便,主要用于半定量移液,如滴加指示剂等。

2. 移液管

移液管分为两种。一种是无刻度线的胖肚移液管或称球形移液管,精确度较高,液体自标线流至口端(留有残液)。球形移液管一般为 25mL、50mL,在球部以上细管刻有一标线,当所吸液体弯月面与标线相切时,液体自然流完,则液体体积在一定温度下即等于管上所标体积。另一种移液管为刻度吸管,管身为粗细均匀的玻璃管,上面均匀刻有表示容积的刻度线,其准确度低于胖肚吸管。吸管的管身上有“快”字样为快流式,有“吹”字则为吹出式,无“吹”字的吸管不可将管尖的残留液吹出。吸、放溶液前要用吸水纸擦拭管尖。一般用洗耳球从吸管的上端吸取溶液。

3. 滴定管

滴定管有酸式和碱式两种,其最小刻度线在上方。为保持滴定管中溶液浓度与原溶液的相同,应先用 5~10mL 溶液冲洗滴定管 2~3 次。向滴定管倒溶液,应直接加入,不宜借用别的仪器。使用前要赶走滴定管下端的气泡。当滴定接近终点时,应滴加半滴溶液,如果溶液悬在滴定管出口嘴上不落下,用锥形瓶内壁或玻璃棒将液滴沾下,然后用蒸馏水冲洗内壁或玻璃棒。读数要读至小数点后两位。滴定管内的溶液不能放至刻度线以下。

4. 自动移液器

自动移液器已经在实验室中得到广泛的使用。它们主要用于多次重复的快速定量移液,可以只用一只手操作,十分方便。移液的准确度(即容量误差)为 $\pm(0.5\% \sim 1.5\%)$,移液的精密度(即重复性误差)更小些,为 $\leq 0.5\%$ 。自动移液器有 10~5000 μL 等多种规格。每种取液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头,此种吸头还可以进行 120 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌。吸头通常是一次性使用,也可以经超声清洗后重复使用。

在使用自动移液器时,先用拇指和食指旋转取液器上部的旋钮,使数字窗口出现所需容量体积的数字,在取液器下端插上一个塑料吸头,并旋紧以保证气密,然后四指并拢握住移液器上部,用拇指按住柱塞杆顶端的按钮,向下按到第一停点,将移液器的吸头插入待取的溶液中,缓慢松开按钮,吸上液体;并停留 1~2s(黏性大的溶液可加长停留时间),再将吸头沿器壁滑出容器,用吸水纸擦去吸头表面可能附着的液体;排液时吸头接触倾斜的器壁,先将按钮按到第一停点,停留 1s(黏性大的液体要加长停留时间),再按压到第二停点,吹出吸头尖部的剩余溶液。移液完毕,可按下除吸头的推杆,

将吸头推入废物缸。

使用自动移液器的注意事项:

(1) 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指,绝不允许突然松开,以防将溶液吸入过快而冲入取液器内腐蚀柱塞而造成漏气。

(2) 为获得较高的精度,吸头需预先吸取一次样品溶液,然后再正式移液,因为吸取血清蛋白质溶液或有机溶剂时,吸头内壁会残留一层“液膜”,造成排液量偏小而产生误差。

(3) 浓度和黏度大的液体,会产生误差。消除误差的补偿量,可由试验确定,补偿量可通过调节旋钮改变读数窗的读数来进行设定。

(4) 可用分析天平称量所取纯水的质量并进行计算的方法来校正取液器,1mL 蒸馏水 20℃ 时重 0.9982g。

5. 量筒

量筒不能用作反应器,不能装热的液体,也不能加热。根据不同的需要选择不同量程的量筒。如要量取 8mL 的液体,就要选择 10mL 的量筒以减少测量误差。读数时,视线与量筒内凹液面的最低点处在同一水平线上。若仰视,读数将偏小,所量液体体积偏大;俯视则反之。用量筒量取液体,其精确度不够高。

四、溶液组成的表示方法

实验中,经常需要配制不同组成的溶液。溶液的组成是指溶质在一定温度下其溶解度的范围内,溶液各成分在量方面的关系。用一定量溶液中所含溶质的量来表示的方法,就称做溶液组成的表示方法。这里主要介绍溶质的质量分数、体积分数以及物质的量浓度等几种溶液组成的表示方法。

(一) 质量分数

溶液中溶质的质量分数是表示溶液组成的诸多方法中的一种,指溶质质量与溶液质量之比,以 ω 表示。

$$\begin{aligned} \text{溶质的质量分数} &= \frac{\text{溶质的质量}}{\text{溶液的质量}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{溶质的质量}}{\text{溶质的质量} + \text{溶剂的质量}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{溶质的质量}}{\text{溶液的密度} \times \text{溶液的体积}} \times 100\% \end{aligned}$$

质量分数是质量比,是用 100 份质量的溶液中所含溶质质量的份数来表示的一种比值。质量分数无单位,应有百分符号。只要分子、分母单位一致,任何质量单位都适用。此外,质量分数是质量比不是体积比。例如,5% 的食盐水表示 100g 食盐水中含食盐 5g,含水 95g。溶质均指无水物,不含结晶水。一般不作特殊说明的百分浓度,就是指质量分数,试剂厂生产的液体酸碱,常用此法表示。

(二) 体积分数

使用两种液体配制溶液时,可通过一种液体的体积与混合物的体积之比来表示溶液的组成,即溶液中溶质或溶剂的体积与溶液体积之比,称为体积分数,以 φ 表示。

$$\text{体积分数} = \frac{\text{一种液体的体积}}{\text{混合后液体体积}} \times 100\%$$

如用 70 体积酒精和 30 体积的水配成酒精溶液,该溶液中酒精的体积分数为 70%。此外,在相同温度和相同压强下,混合气体中某纯净物气体体积与混合气体体积之比也可用体积分数表示。

(三) 物质的量浓度

按照国标规定,浓度并不是泛指一定量的溶液里所含溶质的量,而只是物质的量浓度的同义词,即物质的量浓度简称浓度。因此,用“溶液的浓度”来泛指溶液的组成或含量的说法是不准确的,故将“溶液的浓度”改为“溶液组成的表示方法”。

物质的量浓度是以 1L 溶液里含有溶质的量来表示溶液组成的物理量,单位为 mol/L。

$$\text{物质的量浓度 (mol/L)} = \frac{\text{溶质的物质的量 (mol)}}{\text{溶液的体积 (L)}}$$

溶质的质量分数与物质的量浓度可按下式换算。

$$\text{物质的量浓度} = \frac{1000 \times \rho \times w}{\text{摩尔质量} \times 1}$$

式中 ρ ——溶液密度, g/cm³;

w ——溶质的质量分数。

(四) 质量浓度

质量浓度是以溶液中某溶质的质量除以混合物的体积来计算的,单位为 kg/m³、g/mL、g/L 等。

五、缓冲溶液的配制

生物体内生化代谢活动是在一定的 pH 条件下进行的。体内 pH 环境的任何改变都将引起与代谢有关的酸碱电离平衡移动,从而影响生物体代谢的活性。各种生化样品的分离纯化和分析鉴定,也必须选用合适的 pH。生化实验中,常用缓冲溶液来维持实验体系稳定的 pH。

缓冲溶液通常是由一种或两种化合物溶于溶剂(即纯水)所得的溶液。溶液内所溶解的溶质(化合物)称之为缓冲剂,调节缓冲剂的配比即可得到不同 pH 的缓冲液。缓冲溶液的正确配制和 pH 的准确测定,是非常重要的基础工作,在实验研究中有着极为重要的意义。

根据 Brönsted - Lowry 酸碱理论(又称酸碱质子理论),凡能释放质子的分子或离子(如: H₂O, HCl, NH₄⁺, HSO₄⁻ 等)称为酸,凡能接受质子的分子或离子(如: H₂O, NH₃, Cl⁻ 等)称为碱。强电解质溶于水几乎全部解离为正负离子,而弱电解质溶于水时,则不完全解离,只有部分的分子解离出正负离子,其余以分子形式存在于溶液中。例如,弱酸(HA)及其盐溶于水时,只有部分 HA 解离为 H⁺ 和 A⁻。以 K_a 表示该弱酸解离达平衡时 HA 的解离平衡常数,将 HA 的 pK_a 定义为 -lgK_a,将 HA 溶液的 pH 定义为 -lg[H⁺],则可得 Henderson - Hassel - Balch 方程:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

该方程表示了溶液 pH 与溶质中可解离基团 $\text{p}K_a$ 之间的关系。当 $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ 时： $\text{pH} = \text{p}K_a$ ，这就意味着当 $[\text{HA}]$ 有一半解离时，溶液的 pH 等于 $\text{p}K_a$ ，此时，弱酸 - 碱缓冲体系的 $\text{p}K_a$ 即代表缓冲范围的中点。一个缓冲体系的有效缓冲范围，通常是在 $\text{p}K_a$ 值为中点的两个 pH 单位范围内，即：缓冲剂的有效 $\text{pH} = \text{p}K_a \pm 1$ 。所以，当缓冲溶液的 pH 等于该缓冲剂的 $\text{p}K_a$ 值时，缓冲能力最大。在配制缓冲溶液时，要考虑到这一点。

常用缓冲液配制方法见附录 1。一般按比例将两种缓冲剂溶液混合，并加入所有的成分（如 EDTA、DTT、 Mg^{2+} 等）后，再用 HCl 或 NaOH、KOH 调节混合液 pH，最后将混合液稀释至需要的浓度（某些混合液在稀释后需要测定 pH）。

常用缓冲液如下。

1. 磷酸盐缓冲液

磷酸盐 (NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4) 是生化试验研究中使用最广泛的缓冲剂，由于它们是二级解离，有 2 个 $\text{p}K_a$ 值，所以用它们配制的缓冲液，pH 缓冲范围最宽。

由于低温时钠盐较难溶，而钾盐易溶，因此用钾盐比钠盐好。但是因为 SDS（十二烷基磺酸钠）会与钾盐生成难溶的十二烷基磺酸钾，所以在配制 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳的缓冲液时，只能用磷酸钠而不能用磷酸钾。

磷酸盐缓冲液的优点：①容易配制成各种浓度的缓冲液；②适用的 pH 范围宽；③pH 受温度的影响小；④缓冲液稀释后 pH 变化小，如稀释 10 倍后 pH 的变化小于 0.1。

其缺点：①易与常见的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以及重金属离子缔合生成沉淀；②会抑制某些生物化学过程，如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。

2. 三羟甲基氨基甲烷 N - Tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris 缓冲液

Tris 缓冲液在生化实验研究中使用得越来越多，尤其在 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中都已使用 Tris 缓冲液。Tris 缓冲液的常用有效 pH 范围是在“中性”范围，例如：Tris - HCl 缓冲液 $\text{pH} = 7.5 \sim 8.5$ ；Tris - 磷酸盐缓冲液 $\text{pH} = 5.0 \sim 9.0$ 。

按书后附录 1 中所列该缓冲液的配制方法，分别配制 0.05mol/L Tris 和 0.05mol/L HCl 溶液，然后按表中所列体积混合，即得 Tris 缓冲液。

由于标准浓度的稀盐酸不易配制，所以常用另一种方法。若配 1L 0.1mol/L 的 Tris - HCl 缓冲液，可先称取 12.11g Tris 碱溶于 950 ~ 970mL 无离子水中，边搅拌边滴加 4mol/L HCl，用 pH 计测定溶液 pH 至所需的 pH，然后再加水补足到 1000mL。

Tris - HCl 缓冲液的优点：①Tris 碱的碱性较强，可以只用这一种缓冲体系配制 pH 范围由酸性到碱性的大范围 pH 的缓冲液；②对生物化学过程干扰很小，不与 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及重金属离子发生沉淀。

其缺点：①缓冲液的 pH 受溶液浓度影响较大，缓冲液稀释 10 倍，pH 的变化大于 0.1；②温度效应大，温度变化对缓冲液 pH 的影响很大。例如：4℃ 时缓冲液的 $\text{pH} = 8.4$ ，37℃ 时则为 $\text{pH} = 7.4$ 。所以，一定要在使用温度下进行配制，室温下配制的 Tris - HCl 缓冲液不能用于 0 ~ 4℃；③易吸收空气中的 CO_2 ，故配制的缓冲液要盖严密封；④此缓冲液对某些 pH 电极发生一定的干扰作用，所以要使用与 Tris 溶液具有兼容性的电极。

3. 有机酸缓冲液

这一类缓冲液多数是用羧酸与它们的盐配制而成, pH 范围为酸性, 即 $\text{pH} = 3.0 \sim 6.0$, 最常用的是乙酸 - 乙酸钠、柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲体系。

有机酸缓冲液的缺点: ①所有这些羧酸都是天然的代谢产物, 因而对生化反应过程可能发生干扰作用; ②柠檬酸盐可以和一些金属离子如 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 等结合而使缓冲液受到干扰。

4. 硼酸盐缓冲液

硼酸盐缓冲液是碱性范围内最常用的缓冲液, 其有效 pH 范围是 $8.5 \sim 10.0$ 。但是硼酸盐缓冲液能与很多代谢产物形成络合物, 尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲液受到干扰。

5. 氨基酸缓冲液

此类缓冲液的使用范围宽, 一般为 $\text{pH} = 2.0 \sim 11.0$ 。常用的有:

甘氨酸 - Tris 缓冲液: $\text{pH} = 8.0 \sim 11.0$ (此缓冲液用于广泛使用的 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极缓冲液);

甘氨酸 - HCl 缓冲液: $\text{pH} = 2.0 \sim 5.0$;

甘氨酸 - NaOH 缓冲液: $\text{pH} = 8.0 \sim 11.0$;

此类缓冲体系能为细胞组分和各种提取液提供更接近天然的环境。但是, 此类缓冲体系与羧酸盐和磷酸盐缓冲体系相似, 也会干扰某些生化代谢过程。

根据具体试验需要, 缓冲液中往往加入以下成分:

(1) 盐 通常用 $0.1 \sim 0.2 \text{mol/L}$ KCl 或 NaCl 来模拟生理状况下的离子强度。

(2) 螯合剂 为了避免金属离子的干扰, 应在溶液中加入特异金属离子的螯合剂, 但应注意金属离子螯合剂同时能使蛋白酶失活。为了除去缓冲液中存在的痕量金属离子, 可在其中加入 $0.1 \sim 5 \text{mmol/L}$ 的乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)。EDTA 对大多数金属离子有非特异的亲和性。

(3) 还原剂 在细胞中有许多种还原成分, 如谷氨酰胺可防止蛋白质氧化。但是一旦细胞破碎, 由于和氧的接触以及稀释作用而引起抗氧化成分的减少, 使许多蛋白质因巯基被氧化形成二硫键而失去活性。因此, 常常通过加入 β -巯基乙醇来保护蛋白质的巯基不被氧化。 β -巯基乙醇一般以溶液形式贮存在 4°C , 其使用浓度为 $5 \sim 20 \text{mmol/L}$ 。在加入缓冲液中 24h 内, β -巯基乙醇被氧化, 其后可加速蛋白质的失活。二硫苏糖醇 (DTT, 一般保存在 -20°C) 也被广泛用来保护蛋白质的巯基。DTT 的使用浓度为 $0.5 \sim 1.0 \text{mmol/L}$, 氧化后可形成稳定的分子内二硫键, 并不危及蛋白质的巯基。在实际使用时, 在蛋白质或酶液制备过程中, 可用大约 12mmol/L 的 β -巯基乙醇, 而在长期储存时可加入 $1 \sim 5 \text{mmol/L}$ DTT。

(4) 去污剂 在膜蛋白质的提取和纯化过程中, 常利用去污剂使膜蛋白溶解。去污剂分子通常是由非极性的尾部和亲水性的头部组成的双极性分子, 可在水中溶解。去污剂的一个重要特性是可以形成分子团结构, 成簇的去污剂分子将亲水性的头部向外。溶解的膜蛋白与去污剂分子结合成团, 某蛋白质的疏水区或穿膜区被去污剂分子覆盖, 使其能与水性缓冲液相溶。然后在一定条件下, 可通过透析除去去污剂。常用的去污剂主要

有离子型和非离子型。

离子型去污剂包括一个带电荷的头部,带阳离子电荷的为阳离子去污剂,带阴离子的为阴离子去污剂。十二烷基磺酸钠(SDS)是常用的阴离子型去污剂。SDS可使蛋白质高度变性,解聚成亚基单体的形式被分离,并和SDS结合后带有很强的负电荷,对于测定蛋白质的相对分子质量较为方便。

非离子型去污剂带有非极性的亲水头部,对蛋白质之间的相互作用干扰较弱,对于分离功能性的蛋白质复合物较为有利。与离子型去污剂相比,这种去污剂对蛋白质的变性作用较弱,然而在非离子型去污剂中蛋白质易发生聚集。Triton X-100 是重要的非离子型去污剂。在1%~3%(体积分数)Triton X-100中,许多蛋白质活性保持不变。对于膜脂蛋白质需用10倍甚至更高浓度的Triton X-100来溶解。Triton X-100在280nm处有强的吸收值。非离子型去污剂Tween-20通常在固相免疫细胞化学反应(ELISA,RIA,免疫印迹)中用来阻断非特异性蛋白质的相互作用。

(5) 蛋白酶抑制剂 在破碎组织提取蛋白质的同时,还能使细胞中的蛋白酶释放出来。这些蛋白酶能使蛋白质降解。因此,在蛋白质提取过程中,需要加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白质水解。常用的蛋白酶抑制剂有苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、EDTA、胃蛋白酶抑制剂(pepstatin)、亮抑蛋白酶肽(leupeptin)和胰蛋白酶抑制剂(aprotinin)等。

PMSF和亮抑蛋白酶肽都能够抑制丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶活性,一般使用浓度分别为0.1~1.0mmol/L和0.5mg/mL;EDTA能抑制金属蛋白酶活性,使用浓度为0.5~1.5mmol/L;胃蛋白酶可抑制酸性蛋白酶活性,使用浓度为1.0 μ mol/L;胰蛋白酶抑制剂也能抑制丝氨酸蛋白酶活性,使用浓度为0.01~0.3 μ mol/L。

各种蛋白酶抑制剂对不同蛋白质的敏感性各不相同,因此,在实际应用时需要调整各种蛋白酶抑制剂的浓度。由于蛋白酶抑制剂在液体中的溶解度极低,尤其应注意在缓冲液中加入蛋白酶抑制剂时应充分混匀以减少蛋白酶抑制剂的沉淀。

(6) 防止微生物污染剂 缓冲液很容易受到微生物污染。将缓冲液放在冰箱里保存可有效地减少污染。另外,可加入0.2g/L(或3mmol/L)的叠氮化钠以防止贮存缓冲液的污染,在这一浓度下通常不会影响蛋白质的活性或功能。

六、溶液 pH 的测定

最简便但较粗略的测定溶液 pH 的方法是用 pH 试纸。测定时,先将试纸条剪成小块,用镊子夹一小块试纸(不可用手拿,以免污染试纸),用玻璃棒蘸少许溶液与试纸接触,试纸变色后与色阶板对照,估读出所测 pH。切不可将试纸直接放入溶液中,以免污染样品溶液。试纸要存放在有盖的容器中,以免受到实验室内各种气体的污染。

利用 pH 计可以精确测定溶液 pH,测定的关键是要正确选用和校对 pH 电极。现在使用的一般都是复合电极,使用时应注意:

- (1) 经常检查电极内的 4mol/L KCl 溶液的液面,如果液面过低则应补充。
- (2) 电极玻璃泡极易破碎,使用时必须极为小心。取下电极套后,应避免电极的敏