



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



iCourse · 教材



植物生理生化实验 原理与技术 (第3版)

主编 王学奎 黄见良

高等教育出版社



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材



iCourse · 教材



Principles and Techniques of
Plant Physiological Biochemical Experiment

植物生理生化实验 原理与技术

(第3版)

ZHIWU SHENGLI SHENGHUA SHIYAN YUANLI YU JISHU

主编 王学奎 黄见良

高等教育出版社

内容简介

本书是“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材,是对第2版(2007年度普通高等教育精品教材)的一次全面修订。全书分为两篇和一个附录。第一篇为植物生理生化实验原理,较全面地介绍了植物生理生化实验技术的基本原理、离心技术、层析技术、电泳技术、红外 CO₂ 气体分析技术、光学分析技术、气体测压技术、电化学分析技术、免疫化学技术、Southern blotting 和 PCR 反应原理与技术等实验理论及其相关仪器设备的设计、工作原理和操作;第二篇为实验技术,精选了包括生理生化在内的 80 多个实验技术和 5 类综合性实验技术方案,涉及植物生长发育各个阶段和逆境条件下植物的生理生化代谢过程;附录部分包括各种常用参数表、常用缓冲液、培养液和培养基的配制方法以及植物生长调节剂的性质、应用范围和使用方法等。

本教材主要面向农林院校植物生产类各专业的植物生理学和基础生物化学的本科教学,也适用于综合性大学、师范院校以及从事植物生理生化相关工作的师生、科研人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

植物生理生化实验原理和技术 / 王学奎, 黄见良主编.
--3 版 -- 北京: 高等教育出版社, 2015.1
ISBN 978-7-04-039646-1

I. ①植… II. ①王… ②黄… III. ①植物生理学-实验-高等学校-教材 ②植物生物化学-实验-高等学校-教材
IV. Q94-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 111447 号

策划编辑 孟 丽 责任编辑 孟 丽 封面设计 张 楠 责任印制 尤 静

出版发行	高等教育出版社	网 址	http://www.hep.edu.cn
社 址	北京市西城区德外大街4号		http://www.hep.com.cn
邮政编码	100120	网上订购	http://www.landaco.com
印 刷	化学工业出版社印刷厂		http://www.landaco.com.cn
开 本	787mm×1092mm 1/16	版 次	2000 年 7 月第 1 版
印 张	20.25		2015 年 1 月第 3 版
字 数	490千字	印 次	2015 年 1 月第 1 次印刷
购书热线	010-58581118	定 价	32.00元
咨询电话	400-810-0598		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物 料 号 39646-00

iCourse·数字课程(基础版)

植物生理生化实验 原理和技术(第3版)

主编 王学奎 黄见良

<http://abook.hep.com.cn/39646>

登录方法:

1. 访问<http://abook.hep.com.cn/39646>
2. 输入数字课程用户名(见封底明码)、密码
3. 点击“进入课程”

账号自登录之日起一年内有效,过期作废
使用本账号如有任何问题

请发邮件至: lifescience@pub.hep.cn



“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

植物生理生化实验原理和技术(第3版)

主编 王学奎 黄见良

用户名

密码

验证码

7 0 3 2

进入课程

使用说明

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

以原国家精品课程和精品资源共享课建设为资源基础,围绕实验课程的教学目标,“植物生理生化实验原理和技术(第3版)”数字课程设计收集了13个主要实验示范操作视频和21个实验的教学课件,是纸质教材的有力补充。优良的数字资源便于教师组织教学,有效协助学生课前预习,提升实验课程教学效果。



数字课程网站

网址: <http://abook.hep.com.cn/39646>
<http://abook.hep.com.cn/39646>

用户名: 输入教材封底的16位明码; 密码: 刮开“增值服务”涂层, 输入16位暗码; 输入正确的验证码后, 点击“进入课程”开始学习。

相关教材



现代植物生理学(第3版)
李合生主编

实验示范视频

-  视频 1 植物组织自由水束缚水含量测定
-  视频 2 小液流法测水势
-  视频 3 光合速率的测定(CIRAS-1)
-  视频 4 瓦布格微量测压法测定呼吸速率
-  视频 5 凯氏定氮法测定总氮含量
-  视频 6 斐林试剂比色法测定还原糖
-  视频 7 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量
-  视频 8 淀粉酶活性的测定
-  视频 9 圆盘式凝胶电泳法测定 SOD 同工酶
-  视频 10 植物组织中 DNA 的提取与测定
-  视频 11 反相纸层析法分离不饱和脂肪酸
-  视频 12 葡萄糖试纸法测定硫代葡萄糖苷含量
-  视频 13 抗坏血酸含量的测定

第3版编委会

主 编 王学奎 黄见良
副主编 杨特武 厉秀茹 郝再彬
张玉琼 王双明 井 文
刘 明 刘延吉 柯玉琴

编 委(按姓氏拼音排序)

包金花(内蒙古民族大学)
陈翠莲(华中农业大学)
丰胜求(华中农业大学)
郝再彬(桂林工学院)
洪玉枝(华中农业大学)
黄见良(华中农业大学)
井 文(南京农业大学)
柯玉琴(福建农林大学)
李海霞(华中农业大学)
厉秀茹(北京农学院)
刘 明(塔里木大学)
刘延吉(沈阳农业大学)
时翠平(河北农业大学)
王双明(西南科技大学)
王学奎(华中农业大学)
杨特武(华中农业大学)
于虹漫(云南农业大学)
张 达(东北农业大学)
张方东(华中农业大学)
张玉琼(安徽农业大学)

第 3 版前言

本教材第 2 版于 2006 年由高等教育出版社出版以来,被国内众多高校选定为本科植物生理学实验、基础生物化学实验的教科书,受到广大师生广泛认可,被评为“2007 年度普通高等教育精品教材”。2012 年,本教材与配套理论教材《现代植物生理学(第 2 版)》(李合生主编)共同入选“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材。

十二五期间,教育部启动了国家精品开放课程建设项目,华中农业大学“植物生理学”原国家精品课程在 2013 年成功转型升级,获得国家级精品资源共享课立项,并于 2014 年在爱课程网(www.icourses.cn)上线。高等教育出版社承担国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务,在校社的紧密协作过程中,我们共同意识到了当前教与学发生的深刻变化,建设满足学生个性化自主学习和校际共建共享的新型教材已经成为现实课题。在此背景下,高等教育出版社启动了“高等农林院校基础课程精品资源共享课及系列教材”建设项目,“iCourse·教材”为项目成果之一。本教材第 3 版有幸列入其中,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,纸质教材更加精炼适用,数字课程对纸质教材内容加以巩固、补充和拓展,这种方式为学生自主学习和教师创新教学方法提供了很好的支撑。

本次对纸质教材主要修订了如下内容:

第一篇的实验理论部分重点对“红外 CO_2 气体分析技术”、“光学分析技术”等章节进行了较大修订,增加了新仪器的理论基础、实际应用和操作、维护等方面的知识。

第二篇的实验技术部分删除了相对陈旧的实验方法,对原有 50% 以上的实验技术进行了完善、内容补充与更新。新增的实验技术包括露点法测定植物组织的水势、植物的溶液培养及缺素观察、植物谷氨酰胺合成酶活性测定、高效液相色谱法测定植物的内源激素含量、信号转导相关实验如植物细胞 G 蛋白活性测定、酶联免疫法(ELISA)测定 CaM 总量、钙依赖蛋白激酶活性测定以及与抗寒、抗旱、作物和果蔬品质分析相关的综合性实验等。

本教材的数字课程有 13 个主要实验的教学录像和 21 个实验的教学课件,建议教师利用这些视频、课件资源,引导学生课前预习,以获得更好的教学效果。爱课程网站上华中农业大学“植物生理学”资源共享课程第十二章还有 12 个实验的教学录像,可供教师参考使用。年轻教师可以观摩教学录像,积累教学经验。

本版编委会由包金花、陈翠莲、丰胜求、郝再彬、洪玉枝、黄见良、井文、柯玉琴、李海霞、厉秀茹、刘明、刘延吉、时翠平、王双明、王学奎、杨特武、于虹漫、张达、张方东、张玉琼(按姓氏拼音排序)等来自全国 13 所院校的 20 位教学第一线的骨干教师组

成。修订初稿完成后由编委互审,副主编审校,主编王学奎、黄见良负责全书统稿。华中农业大学李合生教授、曾汉来教授和南京农业大学夏凯教授对本书进行了最终审阅。华中农业大学2010张之洞班(农科)的王喆、凌寒和阮丹娜免费为该书绘制了部分插图。此外,本书的出版、发行一直得到高等教育出版社的吴雪梅、孟丽、李光跃等以及华中农业大学教务处的的大力支持。本书编写过程中参考了国内、外有关资料、论文和实验指导等。在此一并表示衷心的感谢!

努力建设高质量的本科教材一直是编委们追求的目标,但限于编者的水平,错误、疏漏之处在所难免,欢迎广大读者及时提出批评和建议。

王学奎 黄见良

2014.10 于武汉

目 录

第一篇 植物生理生化实验原理

第一章 植物生理生化实验技术的 基本原理	3	4.4 电泳的应用	46
1.1 植物材料的种类	3	第五章 红外线 CO ₂ 气体分析技术	48
1.2 植物材料的采取	3	5.1 红外线 CO ₂ 气体分析仪的 工作原理	48
1.3 分析样品的前处理和保存	4	5.2 红外线 CO ₂ 气体分析仪的 类型	51
1.4 待测组分的提取、分离和 纯化技术	5	5.3 红外线 CO ₂ 气体分析技术的 运用	56
1.5 样品中待测组分的测定	7	第六章 光学分析技术	58
1.6 实验结果的数据处理与分析	8	6.1 紫外光-可见光分光光度法	58
第二章 离心技术	11	6.2 原子吸收分光光度法	66
2.1 基本原理	11	6.3 火焰分光光度法	70
2.2 离心机的类型及主要构造	13	6.4 荧光分光光度法	72
2.3 常用的离心技术	14	6.5 旋光分析法	75
2.4 分析性超速离心技术的应用	16	6.6 近红外分析法	78
第三章 层析技术	18	第七章 气体测压技术	81
3.1 层析原理	18	7.1 气体测压技术的类型及其 基本原理	81
3.2 分配层析	20	7.2 气体测压技术的应用	83
3.3 吸附层析	21	第八章 电化学分析技术	87
3.4 凝胶层析	23	8.1 电化学分析技术的类型及其 基本原理	87
3.5 离子交换层析	24	8.2 电化学分析技术的应用	89
3.6 亲和层析	25	8.3 DDS-12A 型数字式电导率仪的 基本原理及使用方法	89
3.7 气相色谱	26	第九章 免疫化学技术——酶联免疫吸附 测定法(ELISA)	91
3.8 高压液相色谱	28	9.1 ELISA 的原理	91
3.9 毛细管电泳色谱	29	9.2 设计和合成特定的免疫原	92
3.10 层析技术的应用	29		
第四章 电泳技术	32		
4.1 电泳基本原理	32		
4.2 影响迁移率的主要因素	33		
4.3 凝胶电泳	35		

9.3 抗体的制备	92	原理与技术	95
9.4 标记抗原的制备	93	10.1 Southern 杂交	95
9.5 ELISA 测定程序的设计	93	10.2 PCR 反应	98
第十章 Southern blotting 和 PCR 反应			

第二篇 植物生理生化实验技术

实验 1 植物组织中自由水和束缚水含量的测定	103	光合作用的影响	146
实验 2 植物组织水势的测定	108	实验 17 红外线 CO ₂ 气体分析仪法测定植物光合速率与呼吸速率	148
I 小液流法	108	I CB-1101 光合测定仪测定光合速率	148
II 折光仪法	109	II TPS-1 便携式光合作用系统测定光合速率、呼吸速率和蒸腾速率	151
III 露点法	109	实验 18 氧电极法测定光合速率和呼吸速率	154
实验 3 钾离子对气孔开度的影响	114	实验 19 微量定容测压法测定种子的呼吸速率	158
实验 4 植物的溶液培养和缺素观察	115	实验 20 小篮子法(广口瓶法)测定植物呼吸速率	161
实验 5 植物体内硝态氮含量的测定	118	实验 21 植物组织中总氮含量的测定——微量凯氏定氮法	163
实验 6 植物伤流液中糖和氨基酸的测定	120	实验 22 植物组织中游离氨基酸总量的测定——茚三酮溶液显色法	168
实验 7 根系活力的测定——TTC 法	123	实验 23 植物组织中可溶性糖含量的测定	171
实验 8 植物体内硝酸还原酶活力的测定	125	I 蒽酮比色法测定可溶性糖	171
I 离体法	125	II 3,5-二硝基水杨酸测定还原糖	173
II 活体法	127	III 苯酚法测定可溶性糖	174
实验 9 植物谷氨酰胺合成酶活性的测定	129	IV 斐林试剂比色法测定还原糖	176
实验 10 叶绿体色素含量的测定	131	实验 24 植物组织中蛋白质含量的测定	178
实验 11 希尔反应的观察	134	I 双缩脲法	178
实验 12 离体叶绿体光诱导荧光强度的测定	135	II Folin-酚试剂法	180
实验 13 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶活性的测定	137	III 考马斯亮蓝 G-250 法 (Bradford 法)	182
I 分光光度法	137	IV 紫外吸收法	184
II 同位素法	139		
实验 14 叶绿体中 3-磷酸甘油醛脱氢酶活性的测定	141		
实验 15 乙醇酸氧化酶活性的测定	144		
实验 16 真空渗入法测定环境因子对植物			

实验 25 植物组织中有有机酸含量测定	187	观察	242
实验 26 淀粉酶活性的测定	189	I 植物春化现象的观察	242
实验 27 叶绿体 ATP 酶活性测定	192	II 植物光周期现象的观察	243
实验 28 脲酶 K_m 值的测定	195	实验 46 花粉活力的测定	244
实验 29 蛋白质相对分子质量的测定—— SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	198	I 碘-碘化钾(I_2 -KI)染色法	244
实验 30 植物过氧化物酶同工酶测定—— 圆盘式凝胶电泳法	201	II 过氧化物酶测定法	244
实验 31 植物组织中 DNA 的提取与 测定	204	III 氯化三苯基四氮唑(TTC)法	245
实验 32 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	207	实验 47 植物种子生命力的快速测定	247
实验 33 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶 电泳	209	I TTC 法	247
实验 34 PCR 反应	211	II 染料染色法	248
实验 35 Southern blotting	213	III 碘化钾反应法	249
实验 36 植物细胞 G 蛋白活性的 测定	216	IV 荧光法	249
I 荧光法	216	实验 48 谷物淀粉含量的测定 (旋光法)	251
II 同位素放射强度法	218	方法 I	251
实验 37 酶联免疫法(ELISA)测定 CaM 总量	220	方法 II	253
实验 38 蛋白质磷酸化酶——钙依赖 蛋白激酶活性的测定	223	实验 49 谷物种子蛋白质组分的分析	255
I 液闪法	223	实验 50 谷类作物种子中赖氨酸含量 的测定——茚三酮比色法	257
II 放射自显影法	225	实验 51 种子粗脂肪含量的测定	259
实验 39 生长素类调节剂对种子萌发的 影响	227	实验 52 植物组织中纤维素含量的 测定	261
实验 40 赤霉素对 α -淀粉酶的 诱导形成	229	实验 53 植物种子中主要不饱和脂肪酸 的分离——反相纸层析法	263
实验 41 植物激素对愈伤组织的形成 和分化的影响	231	实验 54 油菜籽中硫代葡萄糖苷总量的 测定	265
实验 42 高效液相色谱法测定植物的 内源激素含量	234	I 内源酶法	265
实验 43 气相色谱法测定乙烯含量	237	II 葡萄糖试纸法	266
实验 44 酶联免疫吸附检测法(ELISA) 测定植物激素含量	239	实验 55 抗坏血酸(维生素 C)含量的测定	268
实验 45 植物春化和光周期现象的		I 滴定法	268
		II 比色法	270
		实验 56 果蔬可溶性固形物含量的 测定	272
		实验 57 游离脯氨酸含量的测定	274
		实验 58 植物组织中丙二醛含量的 测定	276
		实验 59 气相色谱法测定植物样品膜脂	

中脂肪酸的含量	278	实验 65 综合实验 1——以大豆为材料	290
实验 60 植物抗逆生理指标的测定—— 电导仪法	280	实验 66 综合实验 2——以甜叶菊叶片为 材料	291
实验 61 愈创木酚法测定过氧化物 酶活性	282	实验 67 综合性实验 3——低温胁迫对植物 幼苗的影响	292
实验 62 高锰酸钾滴定法测定过氧化氢 酶活性	284	实验 68 综合性实验 4—— CaCl_2 在增强植物 抗旱性中的作用	293
实验 63 氮蓝四唑(NBT)法测定超氧化物 歧化酶活力	286	实验 69 综合性实验 5——果蔬的品质 分析	294
实验 64 苯丙氨酸解氨酶活性的测定 ..	288		

附 录

附录 1 硫酸铵饱和度常用表	295	附录 6 Hoagland 营养液及改良 Hoagland 营养液配方	302
附录 2 实验中常用酸碱的相对密度和 浓度的关系	297	附录 7 植物组织培养常用培养基	303
附录 3 常用固态酸、碱、盐的配制 参考表	297	附录 8 常见的植物生长调节物质及其 主要性质	304
附录 4 常用酸碱指示剂	298	附录 9 植物激素与生长调节剂在农业 生产中的应用	305
附录 5 常用缓冲溶液的配制	298		
参考文献	307		

第一篇

植物生理生化实验原理

第一章 植物生理生化实验技术的基本原理

1.1 植物材料的种类

植物生理生化实验(plant physiological biochemical experiment)使用的材料非常广泛,根据来源可划分为天然的植物材料(如植物的幼苗、根、茎、叶、花等器官或组织等)和人工培养、选育的植物材料(如杂交种、诱导突变种、植物组织培养突变型细胞、愈伤组织、大肠杆菌、酵母等)两大类;按其水分状况、生理状态可划分为新鲜植物材料(如苹果、梨、桃的果肉,蔬菜叶片,绿豆、豌豆芽下胚轴,麦芽,谷芽,鳞茎,花椰菜等)和干材料(小麦面粉、玉米粉、大豆粉,根、茎、叶干粉,干酵母等)两大类,因实验目的和条件不同而加以选择。

1.2 植物材料的采取

植物材料生理生化分析的准确性,在很大程度上取决于植物材料的采取是否具有良好的代表性。为了保证植物材料的代表性,必须采用科学方法采取。从大田或实验地、实验器皿中采取的植物材料称为“原始样品”。再按“原始样品”的种类(如植物的根、茎、叶、花、果实、种子等)分别选出“平均样品”。再根据分析的目的、要求和样品种类的特征,采用适当的方法,从“平均样品”中选出供分析用的“分析样品”。

1.2.1 原始样品的取样法

(1) 随机取样 在试验区(或大田)中选择有代表性的取样点,取样点的数目视田块的大小而定。选好点后,随机采取一定数量的样株,或在每一个取样点上按规定的面积从中采取样株。

(2) 对角线取样 在试验区(或大田)可按对角线选定五个取样点,然后在每个点上随机取一定数量的样株,或在每个取样点上按规定的面积从中采取样株。

1.2.2 平均样品的采取法

(1) 混合取样法 一般颗粒状(如种子等)或已碾磨成粉末状的样品可以采取混合取样法进行。具体的做法为:将供采取样品的材料铺在木板(或玻璃板、牛皮纸)上成为均匀的一层,按照对角线划分为四等份。取对角的两份为进一步取样的材料,而将其余的对角两份淘汰。再将已取中的两份样品充分混合后重复上述方法取样。反复操作,每次均淘汰 50% 的样品,直至所取样品达到所要求的数量为止。这种取样的方法叫做“四分法”。

一般禾谷类、豆类及油料作物的种子均可采用这个方法采取平均样品。但应注意样品中不要混有未成熟的种子及其他混杂物。

(2) 按比例取样法 有些作物、果品等材料,在生长不均等的情况下,应将原始样品按不同

类型的比例选取平均样品。例如对甘薯、甜菜、马铃薯等块根、块茎材料选取平均样品时,应按大、中、小不同类型的样品的比例取样,然后再将每一单个样品纵切剖开,每个切取 $1/4$ 、 $1/8$ 或 $1/16$,混在一起组成平均样品。

在采取果实的平均样品时,如桃、梨、苹果、柑橘等果实,即使是从同一株果树上取样,也应考虑到果枝在树冠上的各个不同方位和部位以及果实体积的大、中、小和成熟度上的差异,按各相关的比例取样混合成平均样品。

1.2.3 取样注意事项

(1) 关于取样的地点,一般在距田埂或地边一定距离的株行取样,或在特定的取样区内取样。取样点的四周不应有缺株的现象。

(2) 取样后,按分析的目的分成各部分(如根、茎、叶、果等),然后捆齐,并附上标签,装入纸袋。有些多汁果实取样时,应用锋利不锈钢刀子,并注意勿使果汁流失。

(3) 对于多汁的瓜、果、蔬菜及幼嫩器官等样品,因含水分较多,容易变质或霉烂,可以在冰箱中冷藏,或进行灭菌处理或烘干以供分析之用。

(4) 选取平均样品的数量应当不少于供分析用样品的 2 倍。

(5) 为了动态地了解试验用植物在不同生育期的生理状况,常按植物不同的生育期采取样品进行分析。取样方法系在植物的不同生育时期先调查植株的生育状况并区分为若干类型,计算出各种类型株所占的百分比,再按此比例采取相应数目的样株作为平均样品。

1.3 分析样品的前处理和保存

1.3.1 种子样品的前处理和保存

一般种子(如禾谷类种子)的平均样品清除杂质后要进行磨碎,如条件许可最好用电动磨粉机,在磨碎样品前后都应当使磨粉机(或其他碾磨用具)的内部十分清洁,最初磨出的少量样品可以弃去不要,然后正式磨碎,使样品全部无损地通过 $80\sim 100$ 目筛孔的筛子,混合均匀作为分析样品贮存于具有磨口玻塞的广口瓶中,并随即贴上标签,注明样品的采取地点、试验处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存的样品,在其贮存瓶上的标签还需要涂蜡。为了防止样品在贮存期间生虫,可在瓶中放置一点樟脑或对位二氯甲苯。

油料作物种子(如芝麻、亚麻、花生、蓖麻等)如需要测定其含油量时,不应当用磨粉机磨碎,否则样品中所含的油分吸附在磨粉机上将明显地影响分析的准确性。所以,应将少量油料种子样品放在研钵中磨碎或用切片机切成薄片作为分析样品。

1.3.2 茎叶样品的前处理和保存

采回新鲜样品(平均样品)后,先要经过净化、杀青、烘干(或风干)等一系列前处理(pretreatment)。

(1) 净化 新鲜样品从田间或试验地取回时,常沾有泥土等杂质,应用柔软湿布擦净,不应用水冲洗。

(2) 杀青 为了保持样品化学成分不发生转变和损耗,务必及时终止样品中酶的活动,通常将新鲜样品置于 105 °C 的烘箱中杀青 15~20 min。

(3) 烘干 样品经过杀青之后,应立即降低烘箱的温度,维持在 70~80 °C,直到样品烘干至恒重为止,一般的样品所需烘干的时间大约为 1 天。烘干时应注意温度不能过高,否则会把样品烤焦。

烘干(或风干)的茎叶样品,均要进行磨碎,磨茎叶用的粉碎机与磨种子的磨粉机的结构不同,不宜用磨种子的电磨来代替。待粉碎或磨碎的样品一定要充分干燥。磨碎后样品的保存方法均与上相同。

此外,在测定植物材料中酶的活性或某些成分(如维生素 C、DNA、RNA 等)的含量时,需要用新鲜样品。取样时注意保鲜,取样后应立即进行待测组分提取;也可采用液氮冷冻后保存于一704 °C 冰箱中,或经冰冻真空干燥将得到的干燥制品存放在 0~4 °C 冰箱中。在鲜样已进行了匀浆,尚未完成提取、纯化,不能进行分析测定等特殊情况下,也可加入防腐剂(甲苯、苯甲酸),以液态保存在缓冲液中,置于 0~4 °C 冰箱即可,但保存时间不宜过长。

1.4 待测组分的提取、分离和纯化技术

1.4.1 待测组分的提取

将上述烘干(风干)粉碎的、冰冻的或是新鲜的样品置于一定的溶剂(提取液)中,用电动捣碎机或研钵破碎,样品混合液内含有各种待测组分。由于待测组分的结构、性质不同,与其他细胞组分的结合强度及在提取液中的溶解程度有差异,因而不同待测组分的提取液的性质、成分和操作条件都有很大差别。

对于像色素、植物激素、氨基酸、可溶性糖、有机酸等小分子物质的提取,首要的是选择适当性质的溶剂。一般而言,极性的(亲水的)待测组分易溶于极性溶剂中,非极性的(亲脂的)待测组分易溶于非极性的有机溶剂中。提取液的 pH 影响待测组分的解离状态及其活性、稳定性,不可忽视。例如叶绿素可以用 95%乙醇或丙酮溶液提取,脱落酸、赤霉素可用丙酮、甲醇溶液提取,还原性糖可用蒸馏水提取,维生素 C 可用 2%草酸溶液提取。两性物质氨基酸在等电点以外的任何 pH 溶液中都是呈解离态,一般可用 10%乙酸提取。为了使待测组分能更快、更充分地从其他细胞组分中分离出来,可以采用电炉加热及煮沸、恒温水浴保温、剧烈搅拌或振荡等。这样就可以使待测组分最大限度地存在于提取液中,再经过离心或过滤除去残渣,即可得到较理想的粗提液。

对于像核酸、蛋白质及酶等生物大分子的提取,则要相对复杂一些。一般情况下,碱性生物大分子物质易溶于酸性溶剂,酸性生物大分子物质易溶于碱性溶剂。由于不同蛋白质分子中含有不同比例的极性基团与非极性基团,氨基酸排列顺序有很大差别,因此提取蛋白质时,要根据蛋白质的结构及溶解性质、等电点等因素配制不同的蛋白质提取液。一般而言,蛋白质提取液以水为主,再加少量酸、碱或盐组成。这样可以通过少量离子的作用,减少蛋白质分子极性基团之间的静电引力,加强蛋白质与提取液之间的相互作用,从而提高其溶解性。缓冲液的 pH 应选择在偏离等电点的两侧,使蛋白质分子带上净电荷,以提高其溶解度。对于某些与脂质结合得比较