

生物化学及生态学实验技术

主 编 吕春梅

副主编 邱 冬 王 琨 孙丽欣

参 编 (以姓氏笔画为序)

刘彦丽 陈志强 张振宇

主 审 杨基先 王爱杰

哈尔滨工业大学出版社

哈 尔 滨

内 容 提 要

本书为高等学校实验课程配套教材,主要是为配合环境科学类、环境工程类专业的本科生同步教学而编写的。本书主要由生物化学实验和生态学实验两部分组成。在生物化学实验方面,把生物化学理论与实验技术相结合,加强实验课教学,主要内容为生物化学实验方法和技术原理。在生态学实验方面,着重突出环境因子与环境科学的密切关系。本书多数实验以教学大纲为版本制定,配合理论教学,培养学生独立思考和操作能力,达到提高实验技能、巩固理论知识的目的。

本书可作为高等学校环境科学、环境工程、生物科学专业的本科生教材,也可供相关领域的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学及生态学实验技术/吕春梅主编. —哈
尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004.10

(市政与环境工程系列丛书)

ISBN 7-5603-2033-3

I.生… II.吕… III.①生物化学—实验—高
等学校—教材 ②生态学—实验—高等学校—教材
IV.①Q5-33 ②Q14-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 048921 号

出版发行 哈尔滨工业大学出版社

社 址 哈尔滨市南岗区教化街 21 号 邮编 150006

传 真 0451-86414749

印 刷 哈尔滨工业大学印刷厂

开 本 787×960 1/16 印张 12.25 字数 250 千字

版 次 2004 年 10 月第 1 版 2004 年 10 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 7-5603-2033-3/X·16

印 数 1~3 000

定 价 16.00 元

前 言

随着生物科学技术的发展,生物化学和生态学已成为高等学校环境科学类、环境工程类等相关专业的重要基础课。

本书为教学实验主导教材。在实验内容上,基本覆盖了目前生物化学领域和生态范畴内常用的实验方法与实验应用技术。从实验材料准备到实验结果分析,使学生经过一个完整的实验操作过程,从而达到增加理性认识和感性认识,加强选择分析能力和实验操作能力。

本书共分六章,第一、二章主要阐述生物化学实验基础方法及技术理论,有生物分离法、生化分析及生化制备等。第三章为生物化学实验,从基础实验到重点实验及综合实验共设 23 个实验项目。内容明确,由浅入深,立足于学生的动手能力及理论素质的培养。第四章主要以室内生态环境为主,介绍了对人类有害物质(细菌、化学物质)的检测技术。第五章为城市生态环境实验,主要内容是城市环境因素对人类危害的测定。第六章为自然环境条件下的生态检测实验。

全书内容广泛,实用性强,系统地介绍了较前沿的生化实验及生态学应用技术,对学生将来从事生物科学研究奠定了基础。

本书由哈尔滨工业大学吕春梅、王琨、孙丽欣、张振宇、陈志强、刘彦丽,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所邱冬编写,具体分工为:第一、三章由吕春梅、孙丽欣编写;第二章由孙丽欣、邱冬编写;第四章由王琨、陈志强、邱冬编写;第五章由张振宇、吕春梅、王琨编写;第六章由吕春梅、刘彦丽编写,全书由吕春梅主编,杨基先、王爱杰主审。

由于编写人员水平有限,难免存在疏漏及不妥之处,希望使用本书的教师、学生和广大读者批评指正。

编 者

2004 年 3 月

目 录

第一章 生物化学分析方法与实验技术	(1)
第一节 生物化学分析方法	(1)
一、重量法	(1)
二、化学法	(2)
三、分光光度法	(6)
四、色谱法	(6)
五、酶分析法	(7)
六、生物物质分析法	(7)
第二节 生物化学实验制备方法	(11)
一、生物化学制备的特点	(11)
二、溶剂提取	(11)
三、生物制备中的沉淀法	(12)
四、生物制备中的萃取法	(13)
五、生物制备中的结晶	(14)
六、生物制备中的代谢研究方法	(15)
第三节 生物化学实验技术	(16)
一、离心技术	(16)
二、层析技术	(18)
三、电泳技术	(22)
第二章 生物化学实验常用仪器的使用方法	(28)
第一节 TOC 测定仪的使用	(28)
一、用途	(28)
二、测定方法	(28)
三、仪器构造	(29)
四、样品的配制及保存	(29)

五、标样及样品测定	(29)
六、使用 TOC - V 的要点	(30)
第二节 COD 快速测定仪的使用	(30)
一、测定原理	(30)
二、主要技术性能	(30)
三、准备工作	(31)
四、实验操作	(31)
五、注意事项	(32)
第三节 752 型紫外光栅分光光度计的使用	(32)
一、仪器的主要用途及特点	(32)
二、仪器的主要技术指标及规格	(32)
三、仪器的工作原理	(33)
四、仪器的基本结构	(34)
五、仪器的安装要求	(35)
六、仪器的操作方法及注意事项	(36)
七、仪器的维护	(37)
八、故障检修	(38)
第四节 常用恒温箱的使用方法	(39)
一、恒温箱的分类与结构	(39)
二、恒温箱的正确使用方法	(40)
第三章 生物化学常用实验	(41)
第一节 糖化实验	(41)
实验一 鉴定糖的呈色反应	(41)
实验二 糖的还原作用及总糖含量的测定	(45)
实验三 蒽酮比色法测定糖原含量	(49)
实验四 碘测法的多糖实验	(51)
实验五 用糖的旋光性测定糖的浓度	(53)
实验六 二硝基水杨酸比色法测定总糖含量	(55)
第二节 蛋白质生化实验	(58)
实验一 蛋白质的呈色反应	(58)
实验二 蛋白质的沉淀反应	(62)

实验三 测定蛋白质浓度的方法	(64)
实验四 蛋白质的变性实验	(70)
实验五 蛋白质相对分子质量的测定——葡聚糖凝胶薄层层析法	(72)
实验六 纸层析法分离鉴定氨基酸	(75)
第三节 遗传物质生化实验	(79)
实验一 定磷法测定核酸含量	(79)
实验二 紫外吸收法测定核酸	(82)
实验三 稀碱法分离提取 RNA - A	(83)
实验四 稀碱法分离提取 RNA - B	(85)
实验五 碱变性法对 DNA 的提取	(87)
实验六 植物细胞中 DNA 的提取	(90)
实验七 琼脂糖凝胶电泳法测 DNA 含量	(92)
第四节 酶的生化基础实验	(94)
实验一 酶的基本性质实验	(94)
实验二 辅酶 I 的测定	(100)
实验三 乳酸脱氢酶 - 辅酶的测定	(101)
实验四 酵母醇脱氢酶的测定	(103)
第四章 室内环境生态实验	(107)
第一节 室内空气微生物检测	(107)
实验一 撞击法检测室内空气微生物	(107)
实验二 沉降法检测室内空气微生物	(110)
实验三 室内灰尘中螨虫的检测	(111)
第二节 室内空气中化学物质检测实验	(113)
实验一 空气中甲醛的测定	(114)
实验二 空气中二氧化硫的测定	(117)
实验三 室内换气率的测定	(124)
第五章 城市生态环境实验	(127)
第一节 城市空气中有毒物质检测	(127)
实验一 重量法测定大气中的飘浮颗粒	(127)
实验二 空气中一氧化碳的测定	(129)
实验三 空气中二氧化碳的测定	(135)

实验四 空气中二氧化氮的测定	(138)
实验五 城市大气中铅的测定	(145)
第二节 城市生态其他类型实验	(152)
实验一 城市噪声的监测	(152)
实验二 城市生活垃圾特性的测定	(156)
第六章 自然环境生态实验	(167)
第一节 自然环境中生态因子对微生物的作用	(167)
实验一 温度因子对微生物的生态作用	(167)
实验二 酸碱性对微生物的生态作用	(170)
实验三 地表水中微生物数量的测定	(172)
第二节 其他类生态实验	(174)
实验一 微生物法检测土壤污染	(174)
实验二 利用指示性植物监测大气二氧化硫污染	(177)
实验三 紫外线鉴别分离黄曲霉菌群毒性的实验	(180)
实验四 太阳辐射量及光照强度的测定	(182)
参考文献	(185)

第一章 生物化学分析方法与实验技术

对于任何一种生物,要从细胞中提取某种特定成分,或测定某种生化物质的含量或活性,必须采用各种有效的生物化学方法。即使是同一种生化物质,同时有多种分析方法可供选择,但任何一种方法,都有其各自的优缺点和一定的适用条件。选用哪种方法会对实验有利,取决于实验基质。生物化学以生物高分子为主要研究对象,本章结合测定问题,介绍几种实验分析方法及实验技术。

第一节 生物化学分析方法

一、重量法

重量法又称重量分析法,是通过一定的方法和程序,从参试样本中,提取或纯化某一种成分,并求出其在样本中所占比例。现以粗脂肪的定量测定为例,说明重量法的应用。

根据类脂及其水解产物都不溶于水,且溶于脂溶性溶剂的原理,可用脂溶性溶剂从试样中把脂类物质提出来,蒸去溶剂,根据其质量可计算出试样中的含油量。

1. 实验仪器及实验样品

- (1) 恒温干燥烘箱;
- (2) 分析天平;
- (3) 粉碎机;
- (4) 研钵;
- (5) 磨口瓶;
- (6) 40 目筛;
- (7) 大豆、花生或蓖麻籽等。

2. 实验操作

备用样的制备:大豆、花生各取 30 g, 105 °C 烘干 1 h, 粉碎, 装入磨口瓶中为备用试样。

称取备用试样 2 ~ 4 g 两份(含油 0.7 ~ 1 g), 精确至 0.001 g, 置于 (105 ± 2) °C 烘箱中干燥 1 h 取出, 放入干燥器内冷却至室温。此时要测冷却至室温的备用试样的水分, 将备用试样放入研钵内研细, 必要时可加石英砂助研。用角勺将研细的试样移入干燥的滤纸筒内, 取少量脱脂棉蘸乙醚抹净研钵、研锤和角勺上的试样、油迹, 一并投入滤纸筒内, 在试样上层覆以脱脂棉, 然后将滤纸筒放入索氏抽提器的抽提管内。

在装有 2~3 粒浮石并已烘至恒重的洁净的抽提瓶内,加入瓶体约 1/2 的无水乙醚,把抽提器各部分连接起来,通入冷却水,在水浴上进行抽提。调节水浴温度,使冷凝下滴的乙醚为 180 滴/min 即每秒 3 滴。抽提时间一般需 8~10 h,含油量高的作物种子应延长抽提时间,至抽提管内的乙醚用滤纸试验无油迹时停止。

抽提完毕后,从抽提管中取出滤纸筒,将承接烧瓶与蒸馏装置连接好,在水浴上蒸馏回收抽提瓶中的乙醚。取下抽提瓶,在沸水浴上蒸去残余的乙醚,然后将盛有粗脂肪的抽提瓶放入 $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 烘箱中,烘 1 h,取出存放于干燥器中冷却至室温(约 1 h)后称重,精确至 0.001 g,再烘干 30 min,冷却后称重,直至恒重。抽提瓶增加的质量即为粗脂肪质量。抽出的油应是清亮的,否则应重做,结果计算式为

$$w(\text{粗脂肪,干基}) = \frac{\text{粗脂肪质量}}{\text{试样质量}(1 - w_{\text{水}})} \times \%$$

$$w(\text{带壳油料种子粗脂肪}) = w(\text{种仁粗脂肪}) \times \text{出仁率}$$

平行测定的结果用算术平均值表示,保留小数后 2 位。平行测定结果的相对误差,大豆不得大于 2%,油料作物种子不得大于 1%。

除了脂类可用重量法测定外,棉花、麻类、饲料、食品中的纤维素也可用重量法测定。现在有了半自动的纤维分析仪,同时可处理 6 个样品,分析效率可以大幅度提高。

二、化学法

化学分析方法是建立在一种物质和另一种物质发生的化学反应之上的。任何物质的化学分析方法都必须遵守物质的量规则,物质的量规则是指在化学反应中,消耗了的两反应物的物质的量相等,用公式表示为

$$nB = nT$$

以下为凯氏定氮法测定蛋白质的方法,以此来说明化学分析在生化分析中的应用。

1. 实验仪器

- (1) 凯氏烧瓶: 50 mL, 4 个;
- (2) 锥形瓶: 50 mL, 5 个;
- (3) 微量滴定管: 5.00 mL, 1 支;
- (4) 吸量管: 1 mL、2 mL, 各 1 支;
- (5) 量筒: 10 mL, 2 支;
- (6) 表面皿: 数个;
- (7) 远红外消煮锅: 1 台;
- (8) 改良式凯氏蒸馏仪: 1 台;
- (9) 煤气灯: 1 个。

2. 实验试剂

- (1) 混合指示剂储备液: 取 50 mL 体积分数为 0.1% 的甲烯蓝 - 无水乙醇溶液于

200 mL 体积分数为 0.1% 的甲基红 - 无水乙醇溶液混合, 贮于棕色瓶中备用。本质记载的 pH 值为 5.2 时为紫红色; pH 值为 5.4 时是暗蓝色 (或灰色); pH 值为 5.6 时是绿色, 变色点 pH 值是 5.4, 所以指示剂的变色范围很窄, 极其灵敏。

(2) 硼酸指示剂混合液: 取 100 mL 质量分数为 2% 的硼酸溶液, 滴加混合指示剂贮备液, 摇匀后, 溶液呈紫色即可 (约加 1 mL 混合指示剂贮备液)。

(3) 浓硫酸: H_2SO_4 ;

(4) 氢氧化钠溶液: $w(\text{NaOH}) = 3\%$;

(5) 硼酸溶液: $w(\text{H}_3\text{BO}_3) = 2\%$;

(6) 盐酸标准溶液: 浓度为 0.010 0 mol/L;

(7) 硫酸钾 - 硫酸铜混合物粉末: $\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 5 : 1$;

(8) 硫酸铵标准溶液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 氮的质量浓度为 0.3 mg/mL;

(9) 牛血清蛋白。

3. 实验操作

(1) 样品的准备: 称取牛血清清蛋白 50 mg 2 份, 加入两凯氏烧瓶中, 标记为 1 号、2 号, 注意将样品加到烧瓶底部, 勿沾于瓶颈。3、4 号凯氏烧瓶中为空白对照, 不加样品。在以上 4 个凯氏烧瓶中加入约 500 mg 硫酸钾 - 硫酸铜混合物粉末, 再加 5 mL 浓硫酸。

(2) 消化: 将以上 4 个烧瓶放到远红外消煮锅上进行消化。先调到低功率挡进行加热煮沸, 首先看到烧瓶内物质碳化变黑, 并产生大量泡沫, 此时要特别注意, 不能让黑色物质上升到烧瓶颈部, 否则将严重影响样品的测定结果。当混合物停止冒泡, 蒸汽与二氧化硫也均匀地放出时, 将功率挡调到使瓶内流体微微沸腾之处。假如在瓶颈上发现有黑色颗粒, 应小心地将烧瓶倾斜振摇, 用消化液将它冲洗下来。在消化时要常转动烧瓶, 使全部样品都浸泡在硫酸内, 以便在微沸的硫酸中不断消化, 消化液在轻度回流的情况下大约维持 2~3 h。待消化液变成褐色后, 为了加速完成消化, 略微冷却后将质量分数为 30% 的氢氧化钠 1~2 滴加到瓶底消化液中, 再继续消化, 直到消化液由淡黄色变成清晰的淡蓝绿色, 消化即告完成。为了保证反应的彻底完成, 继续消化 1 h。消化完毕, 把烧瓶冷却至室温。

(3) 蒸馏:

① 凯氏蒸馏仪的洗涤 (图 1.1): 取 5 个 50 mL 的锥形瓶, 各加 5 mL 质量分数为 2% 的硼酸指示剂混合液 (应呈紫红色), 用表面皿覆盖备用。

打开夹子 7, 使冷水流入蒸汽发生器内球体 2/3 量后关闭夹子 7。将电炉子放到蒸汽发生器 2 下面加热, 此时夹子 3 和 8 处于关闭状态, 蒸汽通过反应室 1 到冷凝器 4 外腔, 凝成水滴洒落于盛混合液的三角瓶 9 中。当蒸汽洗涤反应约 10 min 后, 移去三角瓶, 放上另一个盛混合液的三角瓶, 保证冷凝管末端连接的小玻璃管完全浸于液体中。继续蒸馏 1~2 min, 观察三角瓶内的溶液是否变色, 如不变成鲜绿色而是变成灰色或暗色, 则表明

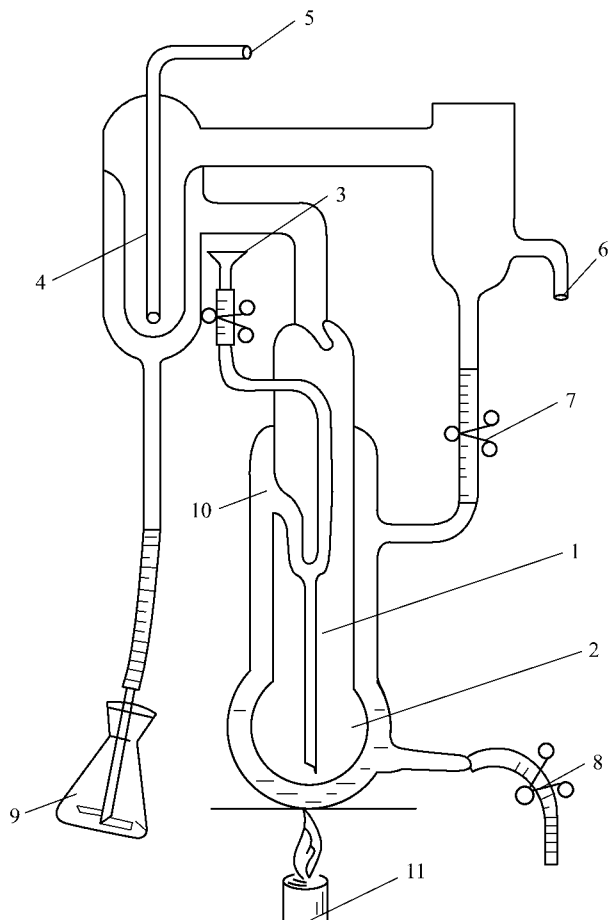


图 1.1 改良式凯氏蒸馏仪

1—反应室；2—蒸汽发生器；3—加样口（小漏斗）并附夹子；4—冷凝器；5—冷凝水入口；6—冷凝水出口；7—夹子；8—夹子（废液排出口）；9—锥形瓶；10—出样口；11—电炉子

反应室内部已干净。移动三角瓶使混合液离开管口约 1 cm，继续蒸馏 1 min，最后用水冲洗管外口，移开电炉子，准备下一步把消化液加入反应室内。

②消化样品及空白的蒸馏：将冷却后的消化液加水稀释到刻度 50.0 mL 摇匀备用。

打开夹子 8，放掉蒸汽发生器中的热水，然后关闭夹子 8，打开夹子 7，使冷水流入蒸汽发生器内球体 2/3 量后关闭夹子 7。这一步操作对加样时避免样品经出样口 10 抽出反应室是很关键的。打开夹子 3，取 2 mL 稀释消化液自加样口 3 加入反应室 1，关闭夹子 3。另取一个盛混合液的三角瓶斜接在冷凝管的下端。取质量分数为 30% 的氢氧化钠溶液约 10 mL，放入加样口的小漏斗中，微开夹子 3，使氢氧化钠慢慢流入反应室，当未完全流

尽时,关闭夹子 3,向小漏斗加入 3 mL 蒸馏水,再微开夹子 3,使一半的蒸馏水流入反应室,关闭夹子 3,一半的蒸馏水留在小漏斗中作水封。将电炉子放回蒸汽发生器下面,继续加热蒸馏,三角烧瓶中溶液有紫红色变成鲜绿色,自变色起开始记时,蒸馏 5 min,然后使液面离开冷凝管口约 1 cm,并用少量蒸馏水洗涤冷凝管口外周,继续蒸馏 1 min。用表面皿覆盖三角瓶,待其余样品蒸馏完毕后,一同滴定。

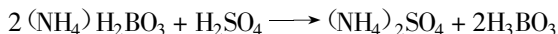
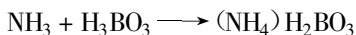
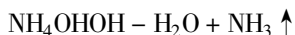
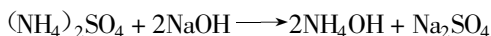
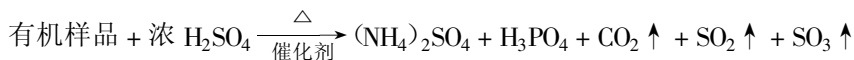
③标准样品的练习:在蒸馏样品及空白前,为了练习蒸馏和滴定操作,可用标准硫酸铵溶液试做实验 2~3 次。标准硫酸铵的含氮量是 0.3 mg/mL,每次试验取 0.2 mL。

④蒸馏后蒸馏仪的洗涤:样品蒸馏完毕后,挪开锥形瓶及电炉子,随即自加样口较快地倒入一些冷蒸馏水,反应室外的空气骤然冷缩,反应室内的废液被迅速从出样口 10 抽出,打开夹子 7,排除蒸汽发生器内废液,并关闭夹子 8。在自加样口加一些冷蒸馏水,打开夹子 6,冷水在流入,关闭夹子 6,打开夹子 7,使冷水尽量多的流入蒸汽发生器内,但不要超过出样口 10,关闭夹子 7,打开夹子 8,使冷水排除。此时,由于蒸汽发生器内的空气压力降低较多,反应室中冷水又自动抽出。如此反复几次,即可排尽反应废液及洗涤废液。在操作过程中,将冷凝水自入口 5 接入,冷凝水出口 6 始终敞开,冷凝水自排。

(4)样品的滴定:全部蒸馏完毕后,用 0.010 0 mol/L 标准盐酸溶液滴定各锥形瓶中收集的氮量,直至硼酸指示剂混合液由绿色变回淡紫色,即为滴定终点。

(5)实验结果处理:每一种蛋白质都有其恒定的含氮量。各种蛋白质含量变幅在 14%~18% 之间,平均为 16%。当样品在浓硫酸中加热时,样品中蛋白质的氮变成铵盐状态。在强碱条件下将氨蒸出,用加有混合指示剂的硼酸吸收蒸出的氨,以标准硫酸滴定硼酸吸收的氨,恢复硼酸吸收氨之前原有的氢离子浓度。根据标准酸消耗量,即可求出蛋白质的含氮量,再乘以 16% 的倒数 6.25,即可求出样品中蛋白质的含量。

凯氏法中有关反应为



结果计算

$$w(\text{样品的蛋白质})/\% = \frac{(V_S - V_{\text{CK}}) \times C_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 14 \times 6.25}{W \times 2 \times 1000} \times 100$$

式中 V_S ——滴定样品用去标准硫酸的体积 (mL);

V_{CK} ——滴定空白用去标准硫酸的体积 (mL);

$C_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ —— H_2SO_4 的浓度 (mol/L);

W ——样品的质量(g)。

三、分光光度法

分光光度法是利用物质所特有的吸收光谱的特性,来测定其物质含量的一种方法。

由于分光光度法具有灵敏度高,操作简便、精确、快速,对于复杂的组分系统,无需分离即可检测出其中所含的微量组分的特点,因此分光光度法早已成为生物化学研究中广泛使用的分析方法。

还原糖的测定是生化分析中经常做的项目,最方便的方法就是分光光度法。在碱性条件下,显色剂 3,5-二硝基水杨酸与还原糖共热后被还原成棕红色氨基化合物,在一定范围(50~100 μg)内还原糖的量与显色后溶液的颜色强度成比例关系,因此利用分光光度法可测定样品中还原糖的含量。

为了获得吸光度与浓度之间的线性关系,在利用分光光度法进行测定时应该注意:

(1)分光光度计应有很好的分光或滤光性能,这是因为朗伯-比尔定律只适用单色光。

(2)吸光度值应控制在 0.05~1.0 范围之内,否则应适当稀释溶液或换用光径更小的比色杯。

(3)正确选用参比溶液。当显色剂及其他试剂均无色,而被测溶液中又无其他离子时,可用蒸馏水作参比溶液。如显色剂本身具有颜色,则用显色剂作对照。如显色剂本身无色,而被测溶液中有其他有色离子时,则用不加显色剂的被测溶液作对照。

四、色谱法

色谱法是用来分离混和物中各组分的方法,是由固定相和流动相两部分组成。

流动相原理,是以流动相流过加有样品的固定相时,由于各组分在两相之间的浓度比例不同,就会以不同速度移动而互相分离开来。流动相是气体时为气相色谱,为液体时称液相色谱。

固定相可以只是固体,也可以是被固体或凝胶体所支持的液体,固定相在装入柱中被展成薄层或涂成薄膜,称为色谱床。

色谱法的基本作用是实现混合物中各组分的有效分离,完成定性分析。纸色谱法、薄层色谱法、薄膜色谱法都能胜任定性分析,但要实现高分辨率的分离或准确进行各组分的定量分析,它们就不能满足需要了。尽管可以采用洗脱比色或用薄层扫描仪处理显色后的图谱,但最多能做到半定量。随着离子交换色谱仪(如氨基酸自动分析仪)、高效液相色谱仪、气相色谱仪和毛细管电泳仪的出现及逐渐完善,生物物质的分离和定量分析可以在很短时间内准确完成。

离子交换色谱法主要用来分离极性较强、电离度大的混合物。氨基酸分析仪是用离子交换色谱法分析氨基酸组分及含量的专用液相色谱仪。在酸性条件下,氨基酸多元混

合物首先与离子交换树脂上的钠离子发生交换而被结合。然后用不同酸碱洗脱液分段洗脱,酸性、中性和碱性氨基酸顺次流出,而且每种氨基酸在固定条件下洗脱时间是固定的。流出的氨基酸在混合室内与茚三酮混合,流经加热的反应螺旋管时充分反应显色,再流经专用分光光度计比色,在记录仪上绘出各种氨基酸出峰图谱,积分仪打印出分析结果,可以同时做出定性、定量分析。

五、酶分析法

酶法分析最主要的优点在于选择性强,不受体系中共存物质干扰,灵敏度高,可测定到 $0.01 \sim 10 \mu\text{g}$ 这样微量的物质。随着多种酶试剂的商品化和固相酶的出现,以及快速而准确的酶法分析自动化技术的出现,酶法分析日益得到广泛应用。

酶只是一种生物细胞产生的,以蛋白质为主要成分的生物催化剂。酶促反应具有高度的专一性,包括底物专一性和反应专一性。这种选择性会使酶在很低的浓度下,都能实现较高的催化能力。酶分析法用途很广,对反应底物、激活剂、抑制剂及酶本身都可进行测定。

酶种类和酶的反应类型很多,不同的反应过程各不相同。酶分析法测定主要有两类:化学方法和仪器方法。

1. 化学方法

为了跟踪一个酶反应的进程,必须检测其中某一反应物或反应产物的浓度随时间而变化的程度。在化学方法中,反应的跟踪是定时地从反应混合物中取出一定样品,测定其中某一反应物或产物的变化值。取样后可用下列的其中一个方法来终止酶反应。

- (1) 加入一种能与底物结合的化合物或酶的抑制剂。
- (2) 使样品突然冷却,钝化酶的活性。
- (3) 将样品迅速置入沸水浴中使酶失活。
- (4) 凡对酸碱敏感酶,可利用突然加入酸或碱来改变 pH,终止酶活性。

2. 仪器分析方法

如果不取样就能连续地检测化学反应,那当然是更理想的。应运而生的各种仪器方法,就具有这种特点。仪器方法大致有两类:一类是跟踪某些反应物的消失或反应产物的出现,直接利用它的理化性质加以检测;另一类是使用耦联反应体系,进行间接检测。常用的仪器方法有测压法、分光光度法、旋光测定法、电化学法、荧光法和放射化学法。

六、生物物质分析法

在参加实验的生物材料中,有机化合物的种类很多,因此涉及的生物物质分析方法也很多,但主要有两种。

1. 碳水化合物分析方法

碳水化合物的测定有物理方法和化学方法,但以化学分析法更为常用。在化学分析

法中,还原糖的测定是最基本的,因为非还原糖及多糖等的分析,是经过水解将其转化为还原糖来测定并以还原糖来表示其含量的,即

$$w(\text{总碳水化合物}) = 100 - [w(\text{水分}) + w(\text{粗蛋白}) + w(\text{粗脂肪}) + w(\text{粗灰分})]$$

(1)可溶性糖的测定:可溶性糖易溶于水和乙醇溶液。水果、蔬菜等样品可用水直接提取,含淀粉和葡萄糖较多的样品需用体积分数为 80% 的乙醇溶液提取。

用水提取可溶性糖时,先将样品研成糊状或粉状,加一定量蒸馏水,在 70~80℃ 水浴上加热 1 h。为防止多糖被酶解,可加入少量氯化汞(HgCl_2)。样品含有机酸较多时,应先调节 pH 值至中性,再加热提取,可避免低聚糖被有机酸部分水解。最后用水定容至一定体积,过滤,取滤液测糖。

当用体积分数为 80% 的乙醇溶液提取可溶性糖时,回流提取 3 次,每次 30 min。合并提取液,蒸去乙醇,以水定容至一定体积,测糖。

为了除去蛋白质等干扰物质,可用质量分数为 10% 的醋酸铅中性溶液处理可溶性糖提取液,冷却后过滤。用饱和硫酸钠沉淀滤液中多余的铅,过滤后定容至一定体积,再进行糖的测定。

具体方法有:3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法;蒽酮比色法;地衣酚-硫酸比色法。

(2)淀粉的测定:很多生物物质都含有一定量的淀粉,淀粉的主要成分为葡萄糖聚合成的高分子化合物,由于结构不同,决定了不同的淀粉,其性质也不同,但多数都溶于水,遇碘呈蓝色或深紫色。

淀粉可直接被酸水解生成葡萄糖或酶水解生成麦芽糖和糊精,再经酸水解生成葡萄糖,这是淀粉经酶或酸水解后测定还原糖计算淀粉含量的理论基础。另外,淀粉经分散和酸解后具有一定的旋光性,是旋光法测定淀粉含量的基础。由于半纤维素也容易被酸水解产生还原糖,所以用直接水解法测定淀粉,会使测定结果偏高。

① $\text{CaCl}_2 - \text{HAcO}$ 浸提-旋光法:其原理为淀粉可用 $\text{CaCl}_2 - \text{HAcO}$ (相对密度为 1.3, pH 值为 2.3) 为分散和液化剂,在一定的酸度和加热条件下,使淀粉溶解和部分酸解,生成具有一定旋光性的水解产物,用旋光计测定之。用此法时,各种淀粉的水解产物的比旋指定为 203,计算式为

$$w(\text{淀粉})/\% = \frac{\alpha \times 100}{m \times l \times 203} \times 100$$

式中 α ——旋光角度的读数;

l ——旋光管长(dm);

m ——样品质量(g);

203——淀粉的比旋。

②淀粉糖化酶-酸水解法:其原理为样品经脱脂、脱(可溶性)糖后,加入淀粉酶糖化,冷却后用中性醋酸铅除蛋白,糖化液(含糊精和麦芽糖)再用盐酸水解,淀粉最终转化为葡

葡萄糖,测定还原糖的量,结果有两种表示方法,即

$$w(\text{还原糖})/\% = \frac{\text{还原糖}(\text{mg}) \times \text{样液总体积}}{\text{样品质量}(\text{mg}) \times \text{测定取用体积}} \times 100$$

或

$$w(\text{淀粉}) = w(\text{还原糖}) \times 0.9$$

以上两种方法测得的是样品中淀粉的总量。如果要了解样品中直链淀粉和支链淀粉各自的含量,可用双波长比色法测定。

(3) 果胶物质的测定:果胶物质是一些复杂的胶态的碳水化合物衍生物,是一种植物胶,主要成分是半乳糖醛酸及其甲酸。

根据结构和某些性质,果胶质分为水不溶解的原果胶和能溶于水的果胶酸及果胶酯酸。将这两类果胶质从样品中分别提取出来,加入氯化钙生成不溶于水的果胶酸钙,测其质量后换算成果胶质的质量。所以果胶物质的测定一般都选用重量法。

新鲜样品:称取磨碎的样品 50 g,置于 1 000 mL 烧杯中,加入 0.05 mol/L 的 HCl 溶液 400 mL,在 80~90 °C 加热 2 h,加热时随时补充蒸发损失的水分。冷却后,移入 500 mL 容量瓶,加水定容。过滤,收集滤液并记录滤液容积。

干燥的样品:称 60 目的干样 5 g,置于 250 mL 三角瓶中,加入加热至沸腾的 0.05 mol/L 的 HCl 溶液 150 mL,连接冷凝器,加热回流 1 h,冷却至室温,用水定容至 250 mL,摇匀,过滤,收集滤液并记录滤液容积。

水溶性果胶物质:将样品研碎,若新鲜样品,则应准确称取 30~50 g;若是干燥样品,则应准确称取 5~10 g。以 150 mL 水将样品移入 250 mL 烧杯中,加热至沸腾,保持 1 h。加热时随时补足蒸发所损失的水分,最后把杯内物质全部移入 250 mL 容量瓶内,加水定容。过滤,收集滤液并记录滤液容积。

测定过程:

①吸取一定量滤液(其量相当于能生成果胶酸钙约 25 mg),放入 1 000 mL 烧杯中。中和后,加水至 300 mL,再加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 100 mL,充分搅拌,放置过夜以皂化(脱去甲氧基,使生成果胶酸钠)。

②加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 50 mL,5 min 后,加入 0.1 mol/L 的 CaCl_2 溶液 25 mL,然后,一边滴加 2 mol/L 的 CaCl_2 溶液 25 mL,一边充分搅拌,放置 1 h。

③把放置 1 h 后的样品加热 5 min,趁热以直径为 11 cm 的折叠滤纸过滤,用热水洗涤至不含有氯化物。

④用热水把滤纸上的沉淀无损地洗入原先的烧杯中,加热煮沸数分钟,用已知质量的玻璃砂心漏斗(1 G₂)过滤,在 105 °C 烘 1.5 h 后称重。再放入烘箱继续干燥至恒重为止。

结果处理:

结果有两种表示方式,即

$$w(\text{果胶酸钙})/\% = \frac{(m_1 - m_2) \times V}{V_1 \times m} \times 100$$

$$w(\text{果胶酸})/\% = \frac{0.9233 \times (m_1 - m_2) \times V}{V_1 \times m} \times 100$$

式中 m_1 ——果胶酸钙质量和玻璃砂心漏斗质量(g);

m_2 ——玻璃砂心漏斗质量(g);

m ——样品质量(g);

V_1 ——用去提取液的体积(mL);

V ——提取液总容积(mL);

0.9233——由果胶酸钙换算成果胶酸的系数,果胶酸钙的实验式定为 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_{16}\text{Ca}$, 其中钙的质量分数约为 7.67%, 果胶酸的质量分数约为 92.33%。

2. 核酸分析法

核酸可分为 DNA、RNA, 由于结构不同所以性质也不同。对于核酸的定量分析法有两种。一种是测定一定量生物材料中的 DNA、RNA 的含量; 另一种是对 DNA、RNA 纯度的测定。

(1) 紫外吸收法: 最常用的核酸定量法为紫外吸收法。天然核酸分子中, 由于各种碱基中存在共轭双键, 在 240 ~ 280 nm 段有极大吸收。纯核酸的紫外吸收高峰为 260 nm, 吸收低谷为 230 nm。在一定限度内 (10 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), A_{260} 值与核酸浓度成正比, 但 RNA 和 DNA 的比消光系数不同: RNA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 $A_{260} = 0.022$; DNA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 $A_{260} = 0.020$ 。

因此, 根据样品的 A_{260} , 可以定量测定核酸 (天然大分子)。

上述核酸分离程序中, 实际上制得的是单核苷酸溶液, 对于 RNA 来说, A_{260} 增加 1.1 ~ 1.5 倍, DNA 的 A_{260} 增加 1.3 ~ 1.4 倍。所以, 在分析计算时不能简单地利用高分子核酸的比消光系数, 应该在做样品的同时, 做 RNA 和 DNA 标样的水解, 分别测出各自的比消光系数, 再行计算。

(2) 对 - 硝基苯肼法: 在核酸酸解液中, 加入体积分数为 5% 的三氯乙酸及对 - 硝基苯肼, 煮沸 20 min, 冷却后加乙酸乙酯, 振荡, 离心, 弃去上层有机相, 取水层溶液 3.0 mL, 加 2 mol/L 氢氧化钠 1.0 mL 显色, 定容至 5.0 mL, 测 A_{560} 。此法专一性强, 核糖、RNA 水解物及蛋白质 (各 1 mg 以下) 共存时均无干扰, 并且不经脱脂程序, 对 DNA 定量也无影响。

对于纯的核酸制备物, 存在如下数量关系, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双链 DNA、37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单链 DNA、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单链 RNA、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单链寡聚核苷酸其 $A_{260} = 1$, 据此用紫外吸收法来计算核酸样品的浓度 (大于 0.25 g/mL)。

分光光度法不但能测定核酸的浓度, 还可以通过测定 A_{260}/A_{280} 比值, 估计其核酸的纯度。DNA 的比值为 1.8, RNA 的比值为 2.0。酶、蛋白质的存在会导致 A_{260}/A_{280} 比值降低。若 DNA 的 $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 说明制剂中存在 RNA, 需要考虑用 RNA 酶处理样品, 提高 DNA