

## 生物化学实验室规则

1. 每个同学都应该自觉遵守课堂纪律，维护课堂秩序，不迟到，不早退，不大声谈笑。
2. 实验前必须认真预习，熟悉本次实验的目的、原理、操作步骤，懂得每一操作步骤的意义和了解所用仪器的使用方法，否则不能开始实验。
3. 实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并把实验结果和数据及时、如实记录在实验记录本上，文字要简练、准确。完成实验后经教师检查同意，方可离开实验室。
4. 实验台面应随时保持整洁，仪器、药品摆放整齐。公用试剂用完后，应立即盖严放回原处。勿使试剂、药品洒在实验台面和地上。实验完毕，仪器洗净放好，将实验台面抹拭干净，才能离开实验室。
5. 使用仪器、药品、试剂和各物品必须注意节约。洗涤和使用仪器时，应小心仔细，防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时，应严格遵守操作规程，发现故障须立即报告教师，不得擅自动手检修。
6. 实验室内严禁吸烟！加热用的电炉应随用随关，严格做到：人在炉火在，人走炉火关。乙醇、丙酮、乙醚等易燃品不能直接加热，并要远离火源操作和放置。实验完毕，应立即拨去电炉开关和关好水笼头，拉下电闸。离开实验室以前应认真、负责地进行检查水电，严防发生安全事故。
7. 废液体可倒入水槽内，同时放水冲走。强酸、强碱溶液必须先用水稀释。废纸屑及其他固体废物和带渣滓的废物倒入废品缸内；不能倒入水槽或到处乱扔。
8. 要精心使用和爱护仪器，如使用分光光度计时，不能将比色杯直接置于分光光度计上，并注意拿放比色杯时，不要打碎。仪器损坏时，应如实向教师报告，并填写损坏仪器登记表，然后补领。
9. 实验室内一切物品，未经本室负责教师批准，严禁带出室外，借物必须办理登记手续。
10. 每次实验课由班长或课代表负责安排值日生。值日生的职责是负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性的工作。

## 实验记录及实验报告

每次实验要做到课前认真预习，实验操作中仔细观察并如实记录实验现象与数据，课后及时完成实验报告。

### 一、课前预习

实验课前要将实验名称、目的和要求、实验内容与原理、操作方法和步骤等简单地写在记录本中，做到心中有数。

### 二、实验记录

从实验课开始就要培养严谨科学作风，养成良好习惯。实验条件下观察到的现象应仔细地记录下来，实验中观测的每个结果和数据都应及时如实地直接记在记录本上，记录时必须使用钢笔或圆珠笔，并做到原始记录准确、简练、详尽、清楚。如称量试材样品的重量、滴定管的读数、分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为 0.050，不应写成 0.05。每一个结果至少要重复观测两次以上，当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。另外，实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量、准确的浓度等，都应记录清楚，以便总结实验完成报告时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等，都必须重做实验。

### 三、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量两大类，实验报告的格式：实验序号，实验名称；

- (1) 目的和要求
- (2) 内容与原理
- (3) 主要仪器及试剂配制
- (4) 操作方法与实验步骤
- (5) 结果与讨论

定性实验报告中的实验名称和目的要求是针对该次实验课的全部内容而必须达到的目的和要求。在完成实验报告时，可以按照实验内容分别写原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法（或步骤）可以流程简图的方式或自行设计的表格来表示。结果与讨论包括实验结果及观察现象的小结、对实验课遇到的问题和思考题进行探讨以及对实验的改进意见等。

定量实验报告中，目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要的叙述，但是对于实验条件（试剂配制及仪器）和操作的关键环节必须写清楚。对于实验结果部分，应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表，如原始数据及其处理的表格、标准曲线图以及比较实验组与对照组实验结果的图表等。另外，还应针对实验结果进行必要的说明和分析。讨论部分可以包括：关于实验方法（或操作技术）和有关实验的一些问题，如实验的正常结果和异常现象以及思考题进行探讨，对于实验设计的认识、体会和建议，对实验课的改进意见等。

# 碳水化合物

## 实验一 还原糖和总糖的测定 3,5-二硝基水杨酸比色法

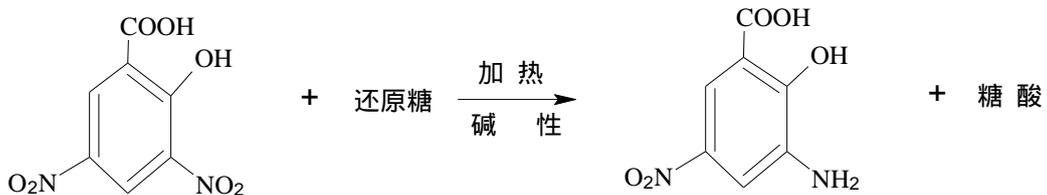
### 一、目的

掌握还原糖和总糖测定的基本原理，学习比色法测定还原糖的操作方法和分光光度计的使用。

### 二、原理

还原糖的测定是糖定量测定的基本方法。还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类，单糖都是还原糖，双糖和多糖不一定是还原糖，其中乳糖和麦芽糖是还原糖，蔗糖和淀粉是非还原糖。利用糖的溶解度不同，可将植物样品中的单糖、双糖和多糖分别提取出来，对没有还原性的双糖和多糖，可用酸水解法使其降解成有还原性的单糖进行测定，再分别求出样品中还原糖和总糖的含量（还原糖以葡萄糖含量计）。

还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其它产物，3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内，还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成正比关系，利用分光光度计，在540nm波长下测定光密度值，查对标准曲线并计算，便可求出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时，每断裂一个糖苷键需加入一分子水，所以在计算多糖含量时应乘以0.9。



3,5-二硝基水杨酸（黄色）

3-氨基-5-硝基水杨酸（棕红色）

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

小麦面粉；精密 pH 试纸。

#### 2. 主要仪器

- (1) 具塞玻璃刻度试管：20mL 11
- (2) 大离心管：50mL 2
- (3) 烧杯：100mL 1
- (4) 三角瓶：100mL 1

- (5) 容量瓶：100mL 3
- (6) 刻度吸管：1mL 1；2mL 2；10mL 1
- (7) 恒温水浴锅
- (8) 沸水浴
- (9) 离心机
- (10) 扭力天平
- (11) 分光光度计

### 3. 试剂

#### (1) 1mg/mL 葡萄糖标准液

准确称取 80 烘至恒重的分析纯葡萄糖 100mg，置于小烧杯中，加少量蒸馏水溶解后，转移到 100mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至 100mL，混匀，4 冰箱中保存备用。

#### (2) 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂

将 6.3g DNS 和 262mL 2M NaOH 溶液，加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠的热水溶液中，再加 5g 结晶酚和 5g 亚硫酸钠，搅拌溶解，冷却后加蒸馏水定容至 1000mL，贮于棕色瓶中备用。

(3) 碘-碘化钾溶液：称取 5g 碘和 10g 碘化钾，溶于 100mL 蒸馏水中。

(4) 酚酞指示剂：称取 0.1g 酚酞，溶于 250mL 70% 乙醇中。

(5) 6M HCl 和 6M NaOH 各 100mL。

## 四、操作步骤

### 1. 制作葡萄糖标准曲线

取 7 支 20mL 具塞刻度试管编号，按表 1 分别加入浓度为 1mg/mL 的葡萄糖标准液、蒸馏水和 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 试剂，配成不同葡萄糖含量的反应液。

表 1 葡萄糖标准曲线制作

管 号	1mg/mL 葡萄糖标准液 (mL)	蒸馏水 (mL)	DNS (mL)	葡萄糖含量 (mg)	光密度值 (OD <sub>540nm</sub> )
0	0	2	1.5	0	
1	0.2	1.8	1.5	0.2	
2	0.4	1.6	1.5	0.4	
3	0.6	1.4	1.5	0.6	
4	0.8	1.2	1.5	0.8	
5	1.0	1.0	1.5	1.0	
6	1.2	0.8	1.5	1.2	

将各管摇匀，在沸水浴中准确加热 5min，取出，冷却至室温，用蒸馏水定容至 20mL，加塞后颠倒混匀，在分光光度计上进行比色。调波长 540nm，用 0 号管调零点，测出 1~6

号管的光密度值。以光密度值为纵坐标，葡萄糖含量（mg）为横坐标，在坐标纸上绘出标准曲线。

## 2. 样品中还原糖和总糖的测定

### (1) 还原糖的提取

准确称取 3.00g 食用面粉，放入 100mL 烧杯中，先用少量蒸馏水调成糊状，然后加入 50mL 蒸馏水，搅匀，置于 50℃ 恒温水浴中保温 20min，使还原糖浸出。将浸出液（含沉淀）转移到 50mL 离心管中，于 4000r/min 下离心 5min，沉淀可用 20mL 蒸馏水洗一次，再离心，将二次离心的上清液收集在 100mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，混匀，作为还原糖待测液。

### (2) 总糖的水解和提取

准确称取 1.00g 食用面粉，放入 100mL 三角瓶中，加 15mL 蒸馏水及 10mL 6M HCl，置沸水浴中加热水解 30min（水解是否完全可用碘-碘化钾溶液检查）。待三角瓶中的水解液冷却后，加入 1 滴酚酞指示剂，用 6mol/L NaOH 中和至微红色，用蒸馏水定容在 100mL 容量瓶中，混匀。将定容后的水解液过滤，取滤液 10mL，移入另一 100mL 容量瓶中定容，混匀，作为总糖待测液。

### (3) 显色和比色

取 4 支 20mL 具塞刻度试管，编号，按表 2 所示分别加入待测液和显色剂，空白调零可使用制作标准曲线的 0 号管。加热、定容和比色等其余操作与制作标准曲线相同。

表 2 样品还原糖测定

管号	还原糖待测液 (mL)	总糖待测液 (mL)	蒸馏水 (mL)	DNS (mL)	光密度值 (OD <sub>540nm</sub> )	查曲线葡萄糖量 (mg)
7	0.5		1.5	1.5		
8	0.5		1.5	1.5		
9		1	1	1.5		
10		1	1	1.5		

## 五、结果与计算：

计算出 7、8 号管光密度值的平均值和 9、10 管光密度值的平均值，在标准曲线上分别查出相应的还原糖毫克数，按下式计算出样品中还原糖和总糖的百分含量。

$$\text{还原糖}(\%) = \frac{\text{查曲线所得葡萄糖毫克数} \times \frac{\text{提取液总体积}}{\text{测定时取用体积}}}{\text{样品毫克数}} \times 100$$

$$\text{总糖}(\%) = \frac{\text{查曲线所得水解后还原糖毫克数} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品毫克数}} \times 0.9 \times 100$$

## 六、附 注

1. 离心时对称位置的离心管必须配平。
2. 标准曲线制作与样品测定应同时进行显色，并使用同一空白调零点和比色。
3. 面粉中还原糖含量较少，计算总糖时可将其合并入多糖一起考虑。

## 七、思考题

1. 3,5-二硝基水杨酸比色法是如何对总糖进行测定的？
2. 如何正确绘制和使用标准曲线？

## 参考答案

1. 植物中的总糖包括单糖、寡糖和多糖，单糖是还原糖，可直接测定。而没有还原性的寡糖和多糖，需用高浓度的酸在加热的条件下水解成有还原性的单糖，还原糖在碱性条件下加热被氧化成糖酸及其它产物，3,5-二硝基水杨酸则被还原为棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸。在一定范围内，还原糖的量与棕红色物质颜色的深浅成一定比例关系，利用分光光度计，在 540nm 波长下测定光密度值，查对标准曲线并计算，可求出样品中还原糖和总糖的含量。由于多糖水解为单糖时，每断裂一个糖苷键需要加入一分子水，所以在计算多糖含量时应乘以 0.9。

2. 标准曲线应在坐标纸上绘制，横坐标轴距坐标纸底边 1.5~2cm，标示出刻度和葡萄糖的毫克数；纵坐标轴距坐标纸左边 1.5~2cm，标示刻度和光密度值；曲线为过原点的直线，测定点均匀分布在直线的两侧；标准曲线只能在测试条件完全相同的情况下，用于确定样品中的物质含量。对于重复的测定，应取吸光度的平均值查标准曲线；测定数据不应记在标准曲线上。

(任大明)

## 实验二 还原糖含量测定 砷钼酸比色法

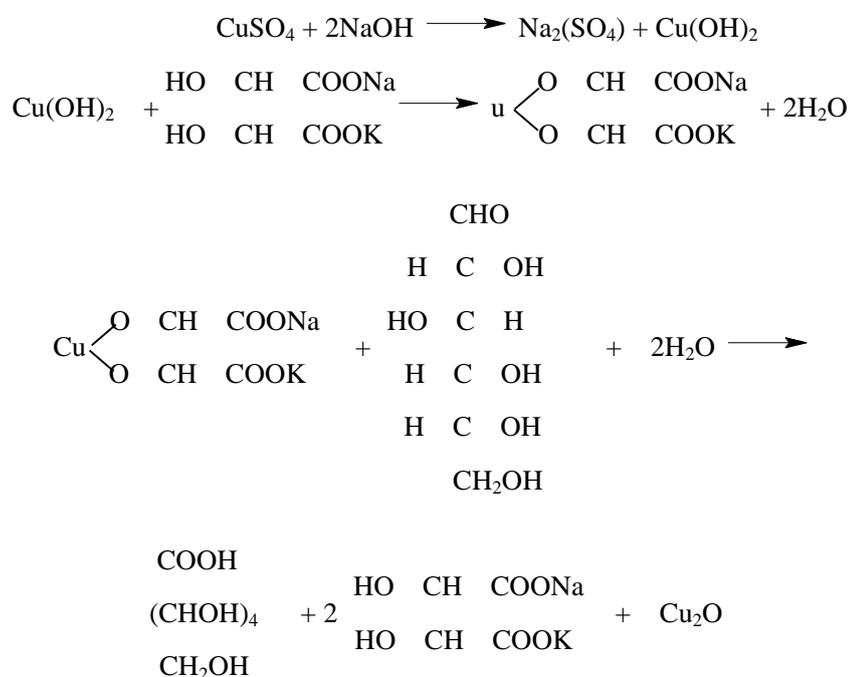
### 一、目的

植物体内的还原糖主要是葡萄糖、果糖和麦芽糖。它们在植物体内的分布，不仅反映植物体内碳水化合物的运转情况，而且也是合成其它成分碳架来源和呼吸作用的基质。此外，水果、蔬菜中含糖量的多少，也是鉴定其品质的重要指标。其它碳水化合物，如淀粉、蔗糖等，经水解也生成还原糖。因此，测定还原糖的方法在研究植物体内生理生化变化和测定植物体内碳水化合物方面都是很重要的。

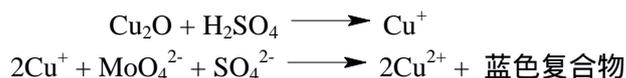
### 二、原理；

还原糖是具有羰基 (>C=O) 的糖，能将其它物质还原而其本身被氧化。

(1) 还原糖在碱性条件及有酒石酸钾钠存在下加热，可以定量地还原二价铜离子为一价铜离子，产生砖红色的氧化亚铜沉淀，其本身被氧化。具体反应如下：



(2) 氧化亚铜在酸性条件下，可将钼酸铵还原，还原型的钼酸铵再与砷酸氢二钠起作用，生成一种蓝色复合物——砷钼蓝，其颜色深浅在一定范围内与还原糖的含量（即被还原的  $\text{Cu}_2\text{O}$  量）成正比，用标准葡萄糖与砷钼酸作用，比色后做标准，就可测得样品还原糖含量。



### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

苹果、面粉等

#### 2. 主要仪器

(1) 分光光度计

(2) 水浴锅

(3) 具塞刻度试管：20mL 10

(4) 刻度吸管：1 mL 1, 2 mL 4, 5 mL 3

(5) 容量瓶：100 mL 2

(6) 漏斗

(7) 研钵

#### 3. 试剂

(1) 铜试剂：

A、4%CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

B、称取 24g 无水碳酸钠，用 850mL 水溶于大烧杯中，加入 2g 含 4 分子结晶水的酒石酸钾钠，待全溶（应加热）后加入碳酸氢钠 16g，再加入 120g 无水硫酸钠（加热），全溶及冷却后加水至 900mL，沉淀 1~2d，取上清液（要求严格时过滤）备用。

使用前将 A 与 B 按 1 : 9 混匀即可使用。

(2) 砷钼酸试剂：25g 钼酸铵 (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 溶于 450mL 蒸馏水中（加热溶解，但温度接近 150℃ 时易分解），待冷却后再加入 21mL 浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 混匀。另将 3g 磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 溶解于 25mL 蒸馏水中，然后加到钼酸铵溶液中，室温下放置于棕色瓶中可长期使用。

(3) 200 μg / mL 标准葡萄糖原液：准确称取分析纯葡萄糖 200mg，溶解定容到 1000mL。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线的制作：

在一系列刻度试管中，分别加入 200 μg / mL 标准葡萄糖 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 及 0.6 mL，再顺序加入蒸馏水 2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5 及 1.4 mL，配成浓度分别为 0、10、20、30、40、50 及 60 μg/mL 的系列葡萄糖溶液。每试管加入铜试剂 2mL，混匀后沸水浴中加热 10min，立即冷却，再加入 2mL 砷钼酸试剂，振荡两分钟后稀释到 20mL，用分光光度计在 620nm 波长下比色，测其光密度 OD<sub>620nm</sub>（做一式两份）。

以糖浓度微克数为横坐标，光密度 OD<sub>620nm</sub> 为纵坐标，绘制标准曲线。

#### 2. 植物样品中还原糖的提取：

将样品洗净，吸干其表面水分，切碎混匀，称取 1g 放入研钵中，加入约 0.5g 石英砂，磨成匀浆，加水将样品由玻璃漏斗冲入 100mL 容量瓶中，加水达 70~80mL，摇匀后置于 80℃ 恒温水浴上浸提 0.5h。

待上述样品冷却后,沉淀蛋白质,加入5%硫酸锌5mL,再慢慢滴入0.3mol/L Ba(OH)<sub>2</sub> 5mL,以沉淀蛋白质。振荡后静置,至上层出现清液后再加一滴Ba(OH)<sub>2</sub>,直至无白色沉淀时,向容量瓶加水至刻度。

### 3. 还原糖含量的测定:

过滤上述已定容的样品液,取5mL滤液,再定容到100mL(此步视样品的含糖量而定)。取已稀释的溶液2mL,与标准葡萄糖显色法相同:加铜试剂2mL,煮沸10min,加砷钼酸试剂2mL,振荡2mL,定容到15ml,620nm波长下比色,记下光密度OD<sub>620nm</sub>(至少重复两次)。

## 五, 结果计算

$$\text{还原糖含量(\%)} = \frac{G \text{ 稀释液倍数}}{W \cdot 10^6}$$

式中: G 从标准曲线上查得含糖量(μg)  
W 样品重(g)

## 六、思考题

举例说明哪些是还原糖?

参考答案:

还原糖是指含有自由醛基或酮基的糖类,单糖都是还原糖,双糖和多糖不一定是还原糖,其中果糖、乳糖和麦芽糖是还原糖,蔗糖、淀粉和纤维素等是非还原糖。

(任大明)

# 脂 类

## 实验三 脂肪碘值的测定

### 一、目的

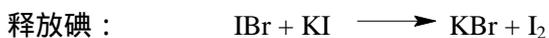
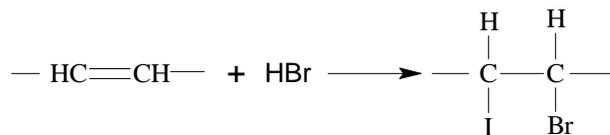
掌握测定脂肪碘值的原理和操作方法,了解测定脂肪碘值的意义。

### 二、原理

不饱和脂肪酸碳链上含有不饱和键，可与卤素（Cl<sub>2</sub>，Br<sub>2</sub>，I<sub>2</sub>）进行加成反应。不饱和键数目越多，加成的卤素量也越多，通常以“碘值”表示。在一定条件下，每 100g 脂肪所吸收碘的克数称为该脂肪的碘值。碘值越高，表明不饱和脂肪酸的含量越高，它是鉴定和鉴别油脂的一个重要常数。

碘与脂肪的加成反应很慢，而氯及溴与脂肪的加成反应快，但常有取代和氧化等副反应。本实验使用 IBr 进行碘值的测定，这种试剂稳定，测定的结果接近理论值。溴化碘（IBr）的一部分与油脂的不饱和脂肪酸起加成作用，剩余部分与碘化钾作用放出碘，放出的碘用硫代硫酸钠滴定。

加成反应：



实验时取样多少决定于油脂样品的碘值。可参考表 1 与表 2：

表 1 样品最适量和碘值的关系

碘 值 (g)	30 以下	30~60	60~100	100~140	140~160	160~210
样品数 (g)	约 1.1	0.5~0.6	0.3~0.4	0.2~0.3	0.15~0.26	0.13~0.15
作用时间 (h)	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0

表 2 几种油脂的碘值

名 称	亚麻子油	鱼肝油	棉子油	花生油	猪 油	牛 油
碘 值 (g)	175~210	154~170	104~110	85~100	48~64	25~41

### 三、试剂和器材

#### 1. 试剂

##### (1) 溴化碘溶液

取 12.2g 碘，放入 1 500mL 锥形瓶内，缓慢加入 1 000mL 冰乙酸（99.5%），边加边摇，同时略温热，使碘溶解。冷却后，加溴约 3mL。

注意：所用冰乙酸不应含有还原性物质。检查方法：取 2mL 冰乙酸，加少许重铬酸钾及硫酸，若呈绿色，则证明有还原性物质存在。

##### (2) 0.1mol/L 标准硫代硫酸钠溶液

取结晶硫代硫酸钠 50g，溶在经煮沸后冷却的蒸馏水（无 CO<sub>2</sub> 存在）中。添加硼砂

7.6g 或氢氧化钠 1.6g ( 硫代硫酸钠溶液在 pH 9 ~ 10 时最稳定 )。稀释到 2 000mL 后 , 用标准 0.1mol/L 碘酸钾溶液按下法标定 :

准确量取 0.1mol/L 碘酸钾溶液 20mL、10%碘化钾溶液 10mL 和 1mol/L 硫酸 20mL , 混合均匀。以 1%淀粉溶液作指示剂 , 用硫代硫酸钠溶液进行标定。按下面所列反应式计算硫代硫酸钠溶液浓度后 , 用水稀释至 0.1mol/L。



- (3) 纯四氯化碳
- (4) 1%淀粉溶液 ( 溶于饱和氯化钠溶液中 )
- (5) 10%碘化钾溶液
- (6) 花生油或猪油

## 2. 器材

- (1) 碘瓶 ( 或带玻璃塞的锥形瓶 )
- (2) 棕色、无色滴定管各 1 支
- (3) 吸量管
- (4) 量筒
- (5) 分析天平

## 四、操作步骤

1. 准确称取 0.3 ~ 0.4g 花生油 2 份 , 置于两个干燥的碘瓶内 , 切勿使油粘在瓶颈或壁上。加入 10mL 四氯化碳 , 轻轻摇动 , 使油全部溶解。用滴定管仔细地加入 25mL 溴化碘溶液 , 勿使溶液接触瓶颈 , 塞好瓶塞 , 在玻璃塞与瓶口之间加数滴 10%碘化钾溶液封闭缝隙 , 以免碘的挥发损失。在 20 ~ 30 °C 暗处放置 30min , 并不时轻轻摇动。油吸收的碘量不应超过溴化碘溶液所含之碘量的一半 , 若瓶内混合物的颜色很浅 , 表示花生油用量过多 , 改称少量花生油 , 重作。

2. 放置 30min 后 , 立刻小心地打开玻璃塞 , 使塞旁碘化钾溶液流入瓶内 , 切勿丢失。用新配制的 10%碘化钾 10 mL 和蒸馏水 50mL 把玻璃塞和瓶颈上的液体冲洗入瓶内 , 混匀。用 0.1mol / L 硫代硫酸钠溶液迅速滴定至浅黄色。加入 1%淀粉溶液约 1mL , 继续滴定 , 将近终点时 , 用力振荡 , 使碘由四氯化碳全部进入水溶液内。再滴定至蓝色消失为止 , 即达滴定终点。

另作 2 份空白对照 , 除不加油样品外 , 其余操作同上。滴定后 , 将废液倒入废液缸内 , 以便回收四氯化碳。计算碘值。

## 五、结果计算

碘值表示 100 g 脂肪所能吸收碘的克数 , 因此样品碘值的计算如下 :

$$\text{碘值} = \frac{(A - B) T}{C} \times 100$$

式中，A：滴定空白用去的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液的平均毫升数

B：滴定碘化后样品用去的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  溶液的平均毫升数

C：样品的重量 (g)

T：1mL 0.1mol / L 硫代硫酸钠溶液相当的碘的克数

## 六、附 注

(1) 碘瓶必须洁净、干燥，否则油中含有水分，引起反应不完全。

(2) 加碘试剂后，如发现碘瓶中颜色变浅褐色时，表明试剂不够，必须再添加 10 ~ 15 mL 试剂。

(3) 如加入碘试剂后，液体变浊，这表明油脂在  $\text{CCl}_4$  中溶解不完全，可再加些  $\text{CCl}_4$ 。

(4) 将近滴定终点时，用力振荡是本滴定成败的关键之一，否则容易滴加过头或不足。如震荡不够， $\text{CCl}_4$  层会出现紫或红色，此时应用力振荡，使碘进入水层。

(5) 淀粉溶液不宜加得过早，否则滴定值偏高。

## 七、思考题

1. 测定碘值有何意义？液体油和固体脂碘值间有何区别？

2. 滴定过程中，淀粉溶液为何不能过早加入？

3. 滴定完毕放置一些时间后，溶液应返回蓝色，否则表示滴定过量，为什么？

## 参考答案

1. 不饱和脂肪酸碳链上含有不饱和键，可与卤素 ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{I}_2$ ) 进行加成反应。不饱和键数目越多，加成的卤素量也越多，通常以“碘值<sub>i</sub>”表示。在一定条件下，每 100g 脂肪所吸收碘的克数称为该脂肪的<sub>i</sub>碘值<sub>i</sub>。碘值越高，表明不饱和脂肪酸的含量越高，它是鉴定和鉴别油脂的一个重要常数。因此，液体油的碘值应高于固体脂的碘值。

2. 淀粉溶液不宜加得过早，否则大量的  $\text{I}_2$  与淀粉结合成蓝色物质，这一部分碘就不容易与  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  反应，由碘值计算公式可知，B 值减小，因而使滴定值偏高。

3. 这是由于空气氧化 I 所引起的。如果溶液未变蓝，说明 I 被空气氧化成  $\text{I}_2$  后，继续与  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  发生反应，而不与淀粉反应生成蓝色，即  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  过量。

(孟 玲)

## 实验四 粗脂肪含量的测定 索氏抽提法

### 一、目的

脂肪广泛存在于许多植物的种子和果实中，测定脂肪的含量，可以作为鉴别其品质优劣的一个指标。脂肪含量的测定有很多方法，如抽提法、酸水解法、比重法、折射法、电测和核磁共振法等。目前国内外普遍采用抽提法，其中索氏抽提法（Soxhlet extractor method）是公认的经典方法，也是我国粮油分析首选的标准方法。通过本实验的学习，掌握索氏抽提法测定粗脂肪含量的原理和操作方法。

### 二、原理

本实验采用索氏抽提法中的残余法，即用低沸点有机溶剂（乙醚或石油醚）回流抽提，除去样品中的粗脂肪，以样品与残渣重量之差，计算粗脂肪含量。由于有机溶剂的抽提物中除脂肪外，还或多或少含有游离脂肪酸、甾醇、磷脂、蜡及色素等类脂物质，因而抽提法测定的结果只能是粗脂肪。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

油料作物种子、中速滤纸

#### 2. 仪器：

- (1) 索氏脂肪抽提器（图 1）或 YG- 型油分测定器
- (2) 干燥器（直径 15~18cm，盛变色硅胶）
- (3) 不锈钢镊子（长 20cm）
- (4) 培养皿
- (5) 分析天平（感量 0.001g）
- (6) 称量瓶
- (7) 恒温水浴
- (8) 烘箱
- (9) 样品筛（60 目）

#### 3. 试剂

无水乙醚或低沸点石油醚（A.R.）

### 四、操作步骤

1. 将滤纸切成 8cm 8cm，叠成一边不封口的纸包，用硬铅笔编写顺序号，按顺序排列在培养皿中。将盛有滤纸包的培养皿移入 105 2 烘箱中干燥 2h，取出放入干燥器

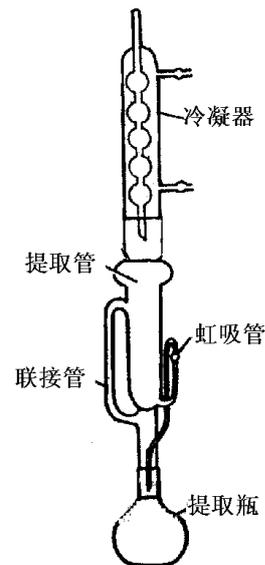


图1 索氏抽提器

中，冷却至室温。按顺序将各滤纸包放入同一称量瓶中称重（记作 a）称量时室内相对湿度必须低于 70%。

#### 2. 包装和干燥

在上述已称重的滤纸包中装入 3g 左右研细的样品，封好包口，放入 105 ℃ 的烘箱中干燥 3h，移至干燥器中冷却至室温。按顺序号依次放入称量瓶中称重（记作 b）。

#### 3. 抽提

将装有样品的滤纸包用长镊子放入抽提筒中，注入一次虹吸量的 1.67 倍的无水乙醚，使样品包完全浸没在乙醚中。连接好抽提器各部分，接通冷凝水水流，在恒温水浴中进行抽提，调节水温在 70~80 ℃ 之间，使冷凝下滴的乙醚成连珠状（120~150 滴/min 或回流 7 次/h 以上），抽提至抽取筒内的乙醚用滤纸点滴检查无油迹为止（约需 6~12h）。抽提完毕后，用长镊子取出滤纸包，在通风处使乙醚挥发（抽提室温以 12~25 ℃ 为宜）。提取瓶中的乙醚另行回收。

#### 4. 称重

待乙醚挥发之后，将滤纸包置于 105 ℃ 烘箱中干燥 2h，放入干燥器冷却至恒重为止（记作 c）。

### 五、结果与计算

$$\text{粗脂肪含量}(\%) = \frac{b - c}{b - a} \times 100$$

式中：a：称量瓶加滤纸包重（g）

b：称量瓶加滤纸包和烘干样重（g）

c：称量瓶加滤纸包和抽提后烘干残渣重（g）

### 六、附 注

（1）测定用样品、抽提器、抽提用有机溶剂都需要进行脱水处理。这是因为：第一，抽提体系中有水，会使样品中的水溶性物质溶出，导致测定结果偏高；第二，抽提体系中有水，则抽提溶剂易被水饱和（尤其是乙醚，可饱和约 2% 的水），从而影响抽提效率；第三，样品中有水，抽提溶剂不易渗入细胞组织内部，结果不易将脂肪抽提干净。

（2）试样粗细度要适宜。试样粉末过粗，脂肪不易抽提干净；试样粉末过细，则有可能透过滤纸孔隙随回流溶剂流失，影响测定结果。

（3）索氏抽提法测定脂肪最大的不足是耗时过长，如能将样品先回流 1~2 次，然后浸泡在溶剂中过夜，次日再继续抽提，则可明显缩短抽提时间。

（4）YG- 型油分测定器容量大，适合于样品较多的选种鉴定工作使用，温度控制在 70 ℃ 左右，8h 可提取完毕。

(5) 必须十分注意乙醚的安全使用。抽提室内严禁有明火存在或用明火加热。乙醚中不得含有过氧化物,保持抽提室内良好通风,以防燃爆。乙醚中过氧化物的检查方法是:取适量乙醚,加入碘化钾溶液,用力摇动,放置 1min,若出现黄色则表明存在过氧化物,应进行处理后方可使用。处理的方法是:将乙醚放入分液漏斗,先以 1/5 乙醚量的稀 KOH 溶液洗涤 2~3 次,以除去乙醇;然后用盐酸酸化,加入 1/5 乙醚量的  $\text{FeSO}_4$  或  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶液,振摇,静置,分层后弃去下层水溶液,以除去过氧化物;最后用水洗至中性,用无水  $\text{CaCl}_2$  或无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水,并进行重蒸馏。

## 七、思考题

1. 如何利用残余法测定油料作物种子中的粗脂肪含量?
2. 测定过程中为什么需要对样品、抽提器、抽提用有机溶剂都要进行脱水处理?
3. 在实验过程中安全使用乙醚应注意哪些问题?
4. 测定样品粒子粗细有什么要求?

## 参考答案

1. 残余法测定油料作物种子中的粗脂肪含量,是用低沸点有机溶剂(乙醚或石油醚)回流抽提,除去样品中的粗脂肪,以样品与残渣重量之差,来计算粗脂肪含量。

2. 进行脱水处理的原因有三:第一,抽提体系中有水,会使样品中的水溶性物质溶出,导致测定结果偏高;第二,抽提体系中有水,则抽提溶剂易被水饱和(尤其是乙醚,可饱和约 2%的水),从而影响抽提效率;第三,样品中有水,抽提溶剂不易渗入细胞组织内部,结果不易将脂肪抽提干净。

3. 抽提室内严禁有明火存在或用明火加热。乙醚中不得含有过氧化物,保持抽提室内良好通风,以防燃爆。

4. 试样粗细度要适宜。试样粉末过粗,脂肪不易抽提干净;试样粉末过细,则有可能透过滤纸孔隙随回流溶剂流失,影响测定结果。

(孟玲)

# 核 酸

## 实验五 酵母 RNA的提制

### 一、目的：

学习和掌握从酵母中提制 RNA 的原理和方法，从而加深对核酸性质的认识。

### 二、原理：

提取和制备 RNA 的首要问题是选 RNA 含量高的材料。微生物是工业上大量生产核酸的原料，其中 RNA 的提制以酵母最为理想，因为酵母核酸中主要是 RNA ( 2.67 ~ 10.0% )，DNA 很少 ( 0.03 ~ 0.516% )，而且菌体容易收集，RNA 也易于分离。此外，抽提后的菌体蛋白质 ( 占干菌体的 50% ) 仍具有很高的应用价值。

RNA 提制过程首先要使 RNA 从细胞中释放，并使它和蛋白质分离，然后将菌体除去。再根据核酸在等电点时溶解度最小的性质，将 pH 调至 2.0 ~ 2.5，使 RNA 沉淀，进行离心收集。然后运用 RNA 不溶于有机溶剂乙醇的特性，以乙醇洗涤 RNA 沉淀。

提取 RNA 的方法很多，在工业生产上常用的是稀碱法和浓盐法。稀碱法利用细胞壁在稀碱条件下溶解，使 RNA 释放出来，这种方法提取时间短，但 RNA 在稀碱条件下不稳定，容易被碱分解；浓盐法是在加热的条件下，利用高浓度的盐改变细胞膜的透性，使 RNA 释放出来，此法易掌握，产品颜色较好。使用浓盐法提出 RNA 时应注意掌握温度，避免在 20 ~ 70 之间停留时间过长，因为这是磷酸二酯酶和磷酸单酯酶作用的温度范围，会使 RNA 因降解而降低提取率。在 90 ~ 100 条件下加热可使蛋白质变性，破坏磷酸二酯酶和磷酸单酯酶，有利于 RNA 的提取。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

活性干酵母；pH0.5 ~ 5.0 的精密试纸；冰块。

#### 2. 仪器

- (1) 药物天平
- (2) 三角瓶 ( 100mL )
- (3) 量筒 ( 50mL )
- (4) 水浴锅
- (5) 电炉
- (6) 试管木夹

- (7) 离心管
- (8) 离心机 (4 000r/min)
- (9) 烧杯 (250mL, 50mL, 10mL)
- (10) 滴管及玻棒
- (11) 吸滤瓶 (500mL)
- (12) 布氏漏斗 (60mm)
- (13) 表面皿 (8cm)
- (14) 烘箱
- (15) 干燥器
- (16) 紫外可见分光光度计

### 3. 试剂

- (1) NaCl (化学纯)
- (2) 6mol/L HCl
- (3) 95%乙醇 (化学纯)

## 四、操作步骤

### 1. 提取

活性干酵母粉 5g, 倒入 100mL 三角瓶中, 加 NaCl 5g, 水 50mL, 搅拌均匀, 置于沸水浴中提取 1h。

### 2. 分离

将上述提取液取出, 立即用自来水冷却, 装入大离心管内, 以 3 500r/min 离心 10min, 使提取液与菌体残渣等分离。

### 3. 沉淀 RNA

将离心得到的上清液倾于 50mL 烧杯中, 并置于放有冰块的 250mL 烧杯中冷却, 待冷至 10℃ 以下时, 用 6mol/L HCl 小心地调节 pH 至 2.0~2.5。随着 pH 下降, 溶液中白色沉淀逐渐增加, 到等电点时沉淀量最多(注意严格控制 pH)。调好后继续于冰水中静置 10min, 使沉淀充分, 颗粒变大。

### 4. 抽滤和洗涤

上述悬浮液以 3 000r/min 离心 10min, 得到 RNA 沉淀。将沉淀物放在 10mL 小烧杯内, 用 95%的乙醇 5~10mL 充分搅拌洗涤, 然后在铺有已称重滤纸的布氏漏斗上用真空泵抽气过滤, 再用 95%乙醇 5~10mL 淋洗 3 次。由于 RNA 不溶于乙醇, 洗涤不仅可脱水, 使沉淀物疏松, 便于过滤、干燥, 而且可除去可溶性的脂类及色素等杂质, 提高了制品的纯度。

### 5. 干燥

从布氏漏斗上取下有沉淀物的滤纸, 放在 8cm 表面皿上, 置于 80℃ 烘箱内干燥。将

干燥后的 RNA 制品称重。

#### 6. 含量测定

称取一定量干燥后的 RNA 产品配制成浓度为 10~50  $\mu\text{g/mL}$  的溶液,在 751 型分光光度计上测定其 260nm 处的光密度值,按下式计算 RNA 含量:

$$\text{RNA 含量}(\%) = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}}}{0.024 \text{ L}} \times \frac{\text{RNA 溶液总体积}(\text{mL})}{\text{RNA 称取量}(\mu\text{g})} \times 100$$

式中:  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  为 260nm 处的光密度值; L 为比色杯的光径 (cm); 0.024 为 1mL 溶液含有 1  $\mu\text{g}$  RNA 的光密度值。

### 五、结果计算

根据含量测定的结果按下式计算提取率:

$$\text{RNA 提取率}(\%) = \frac{\text{RNA 含量}(\%) \times \text{RNA 制品量}}{\text{酵母重}(\text{g})} \times 100$$

### 六、思考题

1. RNA 提制中注意事项是什么?

#### 参考答案

1. 主要注意事项为: 避开核酸酶作用的温度范围 20~70 ,防止 RNA 降解。同时在调 pH 值时,一定要缓慢小心,且要在低温下进行。此外,在抽滤洗涤时,要用乙醇洗涤,且不可用水洗,否则将导致 RNA 部分溶解而造成损失,降低 RNA 提取率。

附注: 苯酚法提取酵母 RNA

#### (一) 原理

细胞内大部分 RNA 均与蛋白质结合在一起,以核蛋白的形式存在。因此,提取 RNA 时要把 RNA 与蛋白质分离并除去。将细胞置于含有十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)的缓冲液中,加等体积水饱和酚,通过剧烈振荡,然后离心形成上层水相和下层酚相。核酸溶于水相,被苯酚变性的蛋白质或者溶于酚相,或者在两相界面处形成凝胶层。本实验采用的 0.15mol/L 缓冲液系统可使大部分 RNA-蛋白复合物解离,而 DNA-蛋白复合物只有极少部分解离;用酚处理时 DNA-蛋白复合物变性,在低温条件下从水相中除去,这样得到的 RNA 制品中混杂的 DNA 极少。用氯仿-异戊醇继续处理 RNA 制品,可进一步除去其中少量的蛋白质。最后用乙醇使 RNA 从水溶液中沉淀出来。本法得到的 RNA 不仅纯度高,而且多呈自然状态,可供继续研究之用。

#### (二) 主要仪器和试剂

## 1. 仪器

- (1) 台式高速离心机 (10 000r/min)
- (2) 水浴
- (3) Eppendorf 管 (1.5mL)
- (4) 紫外可见分光光度计
- (5) 冰箱或冷柜 (0~4 )
- (6) 振荡器
- (7) 分析天平 (精确至 0.1mg)
- (8) 真空干燥器

## 2. 试剂 (均为分析纯)

- (1) SDS-缓冲液 :0.3% SDS ,0.1mol/L NaCl ,0.05mol/L 乙酸钠 ,用乙酸调到 pH5.0。
- (2) 饱和酚液 :重蒸苯酚用 (1) 溶液饱和。
- (3) 氯仿-异戊醇液 :24 : 1 (V/V)。
- (4) 含 2%乙酸钾的 95%乙醇溶液。
- (5) 无水乙醇
- (6) 乙醚
- (7) 溶菌酶 (B.R.)(1mg/mL)

### (三) 操作步骤

1. 取 1g 活性干酵母在研钵中研碎,加 10mL SDS-缓冲液使成匀浆,洗入各 Eppendorf 管 (略少于管容积的一半),加溶菌酶 0.1mL,混匀,室温静置 10min,再加等体积饱和酚液,室温下剧烈振荡 5min。置冰浴中分层,在 0~4 低温环境下,10 000r/min 离心 10min。吸出上层清液,转入新的 Eppendorf 管,加等体积氯仿-异戊醇,室温下剧烈振荡 2.5min,然后 10 000r/min 离心 5min。吸出上层清液,转入另一新 Eppendorf 管,加 2 倍体积 95% 乙醇 (含 2%乙酸钾),在冰浴中放置 30min,使 RNA 沉淀。再以 10 000r/min 离心 5min,弃上清液,沉淀用少许无水乙醇和乙醚各洗一次,即加乙醇或乙醚,迅速离心各 1min,保留沉淀。倾去乙醚后,减压真空干燥,准确称重,记录。

RNA 制品纯度的测定及 RNA 提取率的计算与浓盐法相同。

(吕淑霞)

## 实验六 地衣酚显色法测定 RNA 含量

### 一、目的

学习 RNA 含量的定量测定方法以及 RNA 快速定性检测方法,熟悉分光光度计使用原理及其操作。

### 二、原理

在三氯化铁及盐酸存在下, RNA 与 3,5-二羟基甲苯(地衣酚)反应,生成绿色物质,其最大光吸收值在 670nm 处。要说明的是:地衣酚反应特异性较差,凡戊糖均可与地衣酚反应, DNA 及其他杂质也能给出类似的颜色。因此测定 RNA 时,要考虑 DNA 等杂质影响,可先测定 DNA 含量,再计算出 RNA 含量。

### 三、实验材料、主要仪器与试剂

#### 1. 实验材料

(1) RNA 标准溶液:取标准 RNA(预先经定磷法确定其纯度)配成  $100\mu\text{g/mL}$  的溶液。

(2) 样品待测液:适当稀释,使 RNA 含量为  $50\sim 100\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2. 地衣酚试剂

先称取 100mg 三氯化铁溶于 100mL 浓盐酸中(配制 0.1%浓度的溶剂)备用。在使用前加入 100mg 地衣酚配制成 0.1%浓度的地衣酚试剂。

#### 3. 主要仪器

(1) 分光光度计。

### 四、操作方法

#### 1. 标准 RNA 曲线的制作

取 12 支洁净干燥试管按下表取样并加入试剂:

管号	RNA 标准溶液 (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	地衣酚试剂 (mL)	RNA 含量 ( $\mu\text{g}$ )
1, 2	0	2.5	2.5	0
3, 4	0.5	2.0	2.5	50
5, 6	1.0	1.5	2.5	100
7, 8	1.5	1.0	2.5	150
9, 10	2.0	0.5	2.5	200
11, 12	2.5	0	2.5	250

充分混匀后，于沸水浴中加热 20min。自来水冷却后，测定  $OD_{670nm}$ 。以 RNA 含量为横坐标， $OD_{670nm}$  为纵坐标，绘制标准曲线。

## 2. 样品的测定

取样品溶液 2.5mL，加入地衣酚试剂 2.5mL，如前述方法测定  $OD_{670nm}$ ，从标准曲线查出 RNA 含量。

## 五、计算

$$\text{样品中 RNA 浓度} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{样品测得的 RNA} (\mu\text{g})}{2.5 (\text{mL})}$$

(吕淑霞)

# 实验七 三种腺苷酸分离鉴定——醋酸纤维素薄膜电泳法

## 一、目的

掌握醋酸纤维素薄膜电泳法分离带电颗粒原理；观察核苷酸类物质的紫外吸收现象。

## 二、原理

带电粒子在电场中向着与其自身带相反电荷的电极移动的现象，称为电泳。控制电泳条件（如 pH 等），使混合试样中的不同组分带有不同的净电荷，各组分在电场中移动的速度或方向各不相同，从而达到分离各组分的目的，这就是电泳分析法。以醋酸纤维素薄膜作支持物进行电泳分析的方法称为醋酸纤维素薄膜电泳法。

在 pH4.8 电泳缓冲液条件下，带有不同量磷酸基团的 AMP、ADP、ATP 解离之后，带有负电荷量的顺序为：ATP > ADP > AMP，它们在电场中移动速度不同，从而得到分离。又利用核苷酸类物质的碱基具有紫外吸收性质，将分离后的电泳醋酸薄膜放在紫外灯下，可见暗红色斑点，参照标准样品在同样条件下的电泳情况，对混合试样分离后的各组分进行鉴定。

### 三、仪器与试剂

#### 1. 仪器

- (1) 电泳仪、电泳槽（平板式）
- (2) 紫外灯
- (3) 电吹风、医用镊子
- (4) 醋酸纤维素薄膜（8 cm × 12cm）
- (5) 微量进样器（10  $\mu$ L 或 50  $\mu$ L）

#### 2. 试剂

(1) 柠檬酸缓冲液（pH4.8）：称取柠檬酸 8.4g，柠檬酸钠 17.6g，溶于蒸馏水，稀释到 2000mL。

(2) 标准腺苷酸溶液：用蒸馏水将纯 AMP、ADP、ATP 分别配成 100mg/10mL 溶液。其中 AMP 需略加热助溶。置冰箱备用。

(3) 混合腺苷酸溶液：分别取上述标准液 AMP、ADP、ATP 各 1 份等量混匀。置冰箱备用。

### 四、操作步骤

1. 点样：将醋酸纤维素薄膜放入 pH4.8 柠檬酸缓冲液中，待膜完全浸透（约 0.5h）后用镊子取出，夹在清洁的滤纸中间，轻轻吸去多余的缓冲液，仔细辨认薄膜无光泽面，用微量进样器在无光泽面上点样。点样点距薄膜一端 1.5cm，样点之间距离 1.5cm。点样量为 2~3  $\mu$ L，按少量多次原则分 2~3 次点完。

2. 电泳：向两个电泳槽内注入 pH4.8 的柠檬酸缓冲液，缓冲液的高度约为电泳槽深度的 3/4。（注意：两槽中电泳液面一致）。用宽度与薄膜相同的滤纸作“滤纸桥”连接醋酸纤维素薄膜和两极缓冲液。待滤纸全部被缓冲液浸湿后，将已点样薄膜的无光泽面向下贴在电泳槽支架的“滤纸桥”上。

点样端置于负极方向，盖上电泳槽盖，接通电源，在电压降为 10V/cm 的条件下进行电泳，一小时后关闭电源，取出醋酸纤维素薄膜，用电吹风吹干。

3. 鉴定：用镊子小心地将吹干的薄膜放在紫外灯下观察，用铅笔划出各腺苷酸电泳斑点，并标明各斑点的腺苷酸代号。

绘出三种标准核苷酸及样品的电泳图谱，以标准单核苷酸的迁移率作标准，鉴别试样中各组分。

### 五、附 注

1. 电泳前，一定要检查电极正负极与薄膜方向，确定负极接在薄膜的点样一端，因为样品是带负电荷，接通电源后，样品要在薄膜上向正极泳动；确定薄膜的无光泽面朝下。

2. 点样时，要控制点样点的大小在直径为 2~3mm，样点不可太大，否则电泳后观察

结果不理想。

## 六、思考题

1. 说明电泳分离腺苷酸的原理。

### 参考答案

1. 电泳法分离的目标物质一定是带电的。腺苷酸是两性物质，其含氮碱基嘌呤与嘧啶使其具有碱性，而其磷酸基团赋予腺苷酸的酸性。在柠檬酸缓冲液 pH4.8 条件下，腺苷酸磷酸基团解离，使腺苷酸带负电，在电场中向正极泳动。AMP、ADP、ATP 三种腺苷酸因磷酸基团的解离而分别带有 2、3、4 个负电荷，它们在电场中移动速度不同，因此经过一段时间电泳后，即可达到分离。

(吕淑霞)

## 实验八 植物 DNA 的提取与测定

### 一、目的

随着基因工程等分子生物学技术的迅速发展及广泛应用，人们经常需要提取高分子量的植物 DNA，用于构建基因文库、基因组 southern 分析、酶切及克隆等，这是研究基因结构和功能的重要步骤。本实验目的是学习从植物材料中提取和测定 DNA 的原理并掌握 CTAB 提取 DNA 的方法，进一步了解 DNA 的性质。

### 二、原理

细胞中的 DNA 绝大多数以 DNA-蛋白复合物 (DNP) 的形式存在于细胞核内。提取 DNA 时，一般先破碎细胞释放出 DNP，再用含少量异戊醇的氯仿除去蛋白质，最后用乙醇把 DNA 从抽提液中沉淀出来。DNP 与核糖核蛋白 (RNP) 在不同浓度的电解质溶液中溶解度差别很大，利用这一特性可将二者分离。以 NaCl 溶液为例：RNP 在 0.14mol/L NaCl 中溶解度很大，而 DNP 在其中的溶解度仅为纯水中的 1%。当 NaCl 浓度逐渐增大时，RNP 的溶解度变化不大，而 DNP 的溶解则随之不断增加。当 NaCl 浓度大于 1mol/L 时，DNP 的溶解度最大，为纯水中溶解度的 2 倍，因此通常可用 1.4mol/L NaCl 提取 DNA。为了得

到纯的 DNA 制品，可用适量的 RNase 处理提取液，以降解 DNA 中掺杂的 RNA。

关于植物总 DNA 的提取主要有两种方法：

#### 1. CTAB 法：

CTAB (十六烷基三甲基溴化铵, hexadecyltrimethylammonium bromide, 简称 CTAB): 是一种阳离子去污剂, 可溶解细胞膜, 它能与核酸形成复合物, 在高盐溶液中 (0.7mol/L NaCl) 是可溶的, 当降低溶液盐的浓度到一定程度 (0.3 mol/L NaCl) 时从溶液中沉淀, 通过离心就可将 CTAB 与核酸的复合物同蛋白、多糖类物质分开, 然后将 CTAB 与核酸的复合物沉淀溶解于高盐溶液中, 再加入乙醇使核酸沉淀, CTAB 能溶解于乙醇中。

#### 2. SDS 法：

利用高浓度的阴离子去垢剂 SDS (十二烷基磺酸钠, Sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS) 使 DNA 与蛋白质分离, 在高温 (55 ~ 65 ) 条件下裂解细胞, 使染色体离析, 蛋白变性, 释放出核酸, 然后采用提高盐浓度及降低温度的方法使蛋白质及多糖杂质沉淀, 离心后除去沉淀, 上清液中的 DNA 用酚/氯仿抽提, 反复抽提后用乙醇沉淀水相中的 DNA

一般生物体的基因组 DNA 为  $10^7 \sim 10^9$ bp, 在基因克隆工作中, 通常要求制备的大分子 DNA 的分子量为克隆片段长度的 4 倍以上, 否则会由于制备过程中随机断裂的末端多为平末端, 导致酶切后有效末端太少, 可用于克隆的比例太低, 严重影响克隆工作。因此有效制备大分子 DNA 的方法必须考虑两个原则: (1) 尽量去除蛋白质、RNA、次生代谢物质 (如多酚、类黄酮等)、多糖等杂质, 并防止和抑制内源 DNase 对 DNA 的降解。(2) 尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏。

几乎所有的 DNase 都需要  $Mg^{2+}$  或  $Mn^{2+}$  为辅因子, 故实现 (1) 尽量去除蛋白质的要求, 需加入一定浓度的螯合剂, 如 EDTA、柠檬酸, 而且整个提取过程应在较低温度下进行 (一般利用液氮或冰浴)。为实现 (2) 需要在 DNA 处于溶解状态时, 尽量减弱溶液的涡旋, 而且动作要轻柔, 在进行 DNA 溶液转移时用大口 (或剪口) 吸管。

提取的 DNA 是否为纯净、双链、高分子的化合物, 一般要通过紫外吸收、化学测定、“熔点” (melting temperature,  $T_m$ ) 测定、电镜观察及电泳分离等方法鉴定。本实验采用 CTAB 法提取 DNA 并通过紫外吸收法鉴定。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

新鲜菠菜幼嫩组织、花椰菜花冠或小麦黄化苗等

#### 2. 主要仪器

- (1) 高速冷冻离心机
- (2) 751 型分光光度计
- (3) 恒温水浴
- (3) 液氮或冰浴设备

(4) 磨口锥形瓶

(5) 核酸电泳设备

### 3. 试剂 (CTAB 法)

(1) CTAB 提取缓冲液 :100 mmol/L Tris-HCl ( pH8.0 ), 20 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub> ,1.4mol/L NaCl ( 如表 1 ), 2% CTAB , 使用前加入 0.1% ( V/V ) 的 β-巯基乙醇。

表 1 CTAB提取缓冲液配制

试剂*名称	M.W.	配制 1 000mL	配制 500mL
Tris	121.14	12.114g	6.057g
EDTA-Na <sub>2</sub>	372.24	7.4448g	3.7224g
NaCl	58.44	81.816g	40.908g

\* 用 HCl 调 pH 值。

(2) TE 缓冲液 : 10mmol/L Tris-HCl, 1mM EDTA ( pH8.0 )

(3) DNase-free RNase A: 溶解 RNase A 于 TE 缓冲液中, 浓度为 10mg/mL, 煮沸 10 ~ 30min, 除去 DNase 活性, - 20 °C 贮存 ( DNase 为 DNA 酶, Rnase 为 RNA 酶 )

(4) 氯仿-异戊醇混合液 ( 24:1, V/V ): 240mL 氯仿 ( A.R. ) 加 10mL 异戊醇 ( A.R. ) 混匀。

(5) 3mol/L 乙酸钠 ( NaAc, pH6.8 ): 称取 NaAc · 3H<sub>2</sub>O 81.62g, 用蒸馏水溶解, 配制成 200mL, 用 HAc 调 pH 至 6.5。

(6) 95%乙醇

TE 缓冲液, Tris-HCl ( pH8.0 ) 液, NaAc 溶液均需要高压灭菌。

## 四、操作步骤

1. 称取 2 ~ 5g 新鲜菠菜幼嫩组织或小麦黄花苗等植物材料, 用自来水、蒸馏水先后冲洗叶面, 用滤纸吸干水分备用。叶片称重后剪成 1cm 长, 置研钵中, 经液氮冷冻后研磨成粉末。待液氮蒸发完后, 加入 15mL 预热 ( 60 ~ 65 °C ) 的 CTAB 提取缓冲液, 转入一磨口锥形瓶中, 置于 65 °C 水浴保温, 0.5~1h, 不时地轻轻摇动混匀。

2. 加等体积的氯仿/异戊醇(24:1), 盖上瓶塞, 温和摇动, 使成乳状液。

3. 将锥形瓶中的液体倒入离心管中, 在室温下 4 000r/min 离心 5min, 静置, 离心管中出现 3 层, 小心地吸取含有核酸的上层清液于量筒中, 弃去中间层的细胞碎片和变性蛋白以及下层的氯仿。

4. 根据需要, 上清液可用氯仿/异戊醇反复提取多次。

5. 收集上层清液, 并将其倒入小烧杯。沿烧杯壁慢慢加入 1 ~ 2 倍体积预冷的 95%乙醇, 边加边用细玻棒沿同一方向搅动, 可看到纤维状的沉淀 ( 主要为 DNA ) 迅速缠绕在玻棒上。小心取下这些纤维状沉淀, 加 1 ~ 2 mL 70%乙醇冲洗沉淀, 轻摇几分钟, 除去乙

醇，即为 DNA 粗制品。

6. 上述 DNA 粗制品含有一定量的 RNA 和其它杂质。若要制取较纯的 DNA，可将粗制品溶于 TE 缓冲液中，加入 10mg/mL 的 RNase 溶液，使其终浓度达 50  $\mu$ g/mL，混合物于 37  $^{\circ}$ C 水浴中保温 30min 除去 RNA。重复步骤 2~5 的操作，可制得较纯的 DNA 制品。

7. 将 DNA 制品溶于 250  $\mu$ L 的 TE 缓冲液中，完全溶解 DNA 样品。

8. 加入 1/10 倍体积的 3mol/L NaAc (pH6.8) 和 2 倍体积的 95% 乙醇，沉淀 DNA，重复步骤 5。最后，将 DNA 溶于 250  $\mu$ L 的 TE 缓冲液中。

9. 在 751 型分光光度计上测定该溶液在 260nm 紫外光波长下的光密度值。代入下式计算 DNA 的含量。

#### 四、结果计算

$$\text{DNA 浓度 (}\mu\text{g/mL)} = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}}}{0.020 \text{ L}} \times \text{稀释倍数}$$

式中  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  为 260nm 处的光密度；L 为比色杯光径 (cm)；0.020 为 1  $\mu$ g/mL DNA 钠盐的光密度。

DNA 的紫外吸收高峰为 260nm，吸收低峰为 230nm，而蛋白质的紫外吸收高峰为 280nm。上述 DNA 溶液适当稀释后，在 751 分光光度计上测定其  $\text{OD}_{260\text{nm}}$ 、 $\text{OD}_{230\text{nm}}$  和  $\text{OD}_{280\text{nm}}$ 。如  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{230\text{nm}} \geq 2$ ， $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}} \geq 1.8$ ，表示 RNA 已经除净，蛋白含量不超过 0.3%。

#### 五、附注

如果植物样品不经液氮处理，提取液中的 CTAB 浓度需要提高到 4% (W/V)。在许多情况下，使用 0.1% (V/V) 巯基乙醇，并不能完全抑制叶片中的氧化作用，但是，这种氧化作用不会影响限制性内切酶的活性。如果使用的巯基乙醇浓度高于 0.1% (V/V)，则会大大降低 DNA 的得率。

#### 六、思考题

1. 制备的 DNA 在什么溶液中较稳定？
2. 为了保证植物 DNA 的完整性，在吸取样品、抽提过程中应注意什么？

#### 参考答案

1. 制备的 DNA 在：(1) 含有螯和剂如 EDTA 中较稳定，因为 EDTA 能螯和  $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Mn}^{2+}$  离子，抑制 DNase；(2) 在 pH5~9 之间较稳定，否则过酸过碱会破坏 DNA 的结构；(3) 有一定离子强度 (强度越高, DNA 越稳定) 的溶液中较稳定。

(TE 满足以上要求, 但如需对所得 DNA 进行酶切, EDTA 浓度不可过高, 一般用 0.1 TE 或 0.2 TE)。

2. 为了保证植物 DNA 的完整性:(1) 整个提取过程应在较低温度下进行(一般利用液氮或冰浴);这样可防止和抑制内源 DNase 对 DNA 的降解;(2) 当 DNA 处于溶解状态时, 要尽量减弱溶液的涡旋, 动作要轻柔;在进行 DNA 溶液转移时用大口(或剪口)吸管, 尽量减少对溶液中 DNA 的机械剪切破坏。

(钟鸣)

## 实验九 质粒 DNA 的提取、酶切与鉴定

### 一、目的

掌握质粒的小量快速提取法;了解质粒酶切鉴定原理。

### 二、原理

质粒(plasmid)是一种染色体外的稳定遗传因子。大小在 1~200kb 之间,具有双链闭合环状结构的 DNA 分子。主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中。质粒具有自主复制和转录能力,能使子代细胞保持它们恒定的拷贝数,可表达它携带的遗传信息。他可独立游离在细胞质内,也可整合到细菌染色体中,它离开宿主的细胞就不能存活,而它控制的许多生物学功能却赋予宿主细胞的某些表型。

所有分离质粒 DNA 的方法都包括 3 个基本步骤:培养细菌使质粒扩增;收集和裂解细菌;分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可破坏菌体细胞壁,十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)可使细胞壁裂解,经溶菌酶和阴离子去污剂(SDS)处理后,细菌 DNA 缠绕附着在细胞壁碎片上,离心时易被沉淀出来,而质粒 DNA 则留在上清液中。用酒精沉淀洗涤,可得到质粒 DNA。

质粒 DNA 分子量一般在  $10^6$ ~ $10^7$  道尔顿范围内。在细胞内,共价闭环 DNA(covalently closed circular DNA, 简称 cccDNA)常以超螺旋形式存在。若两条链中有一条链发生一处或多处断裂,分子就能旋转而消除链的张力,这种松弛型的分子叫作开环 DNA(open circular DNA, 简称 ocDNA)。在电泳时,同一质粒如以 cccDNA 形式存在,它比其开环和

线状 DNA 的泳动速度都快，因此在本实验中，质粒 DNA 在电泳凝胶中呈现 3 条区带。

限制性内切酶是一种工具酶，这类酶的特点是具有能够识别双链 DNA 分子上的特异核苷酸顺序的能力，能在这个特异性核苷酸序列内，切断 DNA 的双链，形成一定长度和顺序 DNA 片段。如：EcoR 和 Hind 的识别序列和切口是：

EcoR : G AATTC

Hind : A AGCTT

G, A 等核苷酸表示酶的识别序列，箭头表示酶切口。限制性内切酶对环状质粒 DNA 有多少切口，就能产生多少酶切片段，因此鉴定酶切后的片段在电泳凝胶的区带数，就可以推断酶切口的数目，从片段的迁移率可以大致判断酶切片段大小的差别。用已知分子量的线状 DNA 为对照，通过电泳迁移率的比较，就可以粗略推测分子形状相同的未知 DNA 的分子量。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 主要仪器

- (1) 塑料离心管 1.5mL 30
- (2) 塑料离心管架 1
- (3) 微量加样器 10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L 各一支
- (4) 常用玻璃仪器及滴管等
- (5) 台式高速离心机 (20 000r/min)
- (6) 电泳仪
- (7) 电泳槽
- (8) 样品槽模板

#### 2. 材料

大肠杆菌 DH5

#### 3. 试剂

(1) pH8.0 G.E.T 缓冲液( 50mmol/L 葡萄糖 ,10 mmol/L EDTA ,25mmol/L Tris-HCl ); 用前加溶菌酶 4mg/mL。

(2) pH 4.8 乙酸钾溶液 ( 60mL 5mol/L KAc , 11.5mL 冰乙酸 , 28.5mL H<sub>2</sub>O )

(3) 酚/氯仿 ( 1 : 1 , V/V ): 酚需在 160 °C 重蒸，加入抗氧化剂 8-羟基喹啉，使其浓度为 0.1% ，并用 Tris-HCl 缓冲液平衡两次。氯仿中加入异戊醇，氯仿 / 异戊醇 ( 24 : 1 , V / V ) 。

(4) pH 8.0 TE 缓冲液：10mmol/L Tris , 1mmol/L EDTA ，其中含有 RNA 酶 ( RNase ) 20  $\mu$ g/mL。

(5) TBE 缓冲液：称取 Tris10.88g、硼酸 5.52g 和 EDTA 0.72g ，用蒸馏水溶解后，定容至 200mL ，用前稀释 10 倍。

(6) EB 染色液：称取 5g 溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB), 溶于蒸馏水中并定容到 10mL, 避光保存。临用前, 用电泳缓冲液稀释 1 000 倍, 使其最终浓度达到 0.5  $\mu$ g/mL。

#### 四、操作步骤

##### 1. 培养细菌

将带有质粒的大肠杆菌 DH5 接种在 LB 琼脂培养基上, 37 培养 24~48h。

##### 2. 从细菌中快速提取制备质粒 DNA

(1) 用 3~5 根牙签挑取平板培养基上的菌落, 放入 1.5mL 小离心管中, 或取液体培养菌液 1.5 mL 置小离心管中, 10 000r/min 离心 1min 去掉上清液。加入 150  $\mu$ L 的 G.E.T. 缓冲液, 充分混匀, 在室温下放置 10min。

(2) 加入 200  $\mu$ L 新配置的 0.2mol/L NaOH, 1% SDS。加盖, 颠倒 2~3 次使之混匀。冰上放置 5 min。

(3) 加 150  $\mu$ L 冷却的乙酸钾溶液 加盖后颠倒数次混匀 冰上放置 15 min。10 000r/min 离心 5 min, 上清液倒入另一离心管中。

(4) 向上清液中加入等体积酚/氯仿, 震荡混匀, 10 000r/min 离心 2 min, 将上清液转移至新的离心管中。

(5) 向上清液中加入等体积无水乙醇, 混匀, 室温放置 2 min。离心 5 min, 倒去上清乙醇溶液, 将离心管倒扣在吸水纸上, 吸干液体。

(6) 加 1mL 70%乙醇, 震荡并离心, 倒去上清液, 真空抽干, 待用。

##### 3. 质粒 DNA 的酶解

将自提质粒加入 20  $\mu$ L 的 TE 缓冲液, 使 DNA 完全溶解。取清洁、干燥、灭菌的具塞离心管编号用微量加样器按表 1 所示将各种试剂分别加入每个小离心管内。

表 1 DNA酶切加样表

管号	标准样品 DNA( $\mu$ g)	标准样品 PBR322( $\mu$ g)	自提样品 质粒( $\mu$ L)	内切酶 EcoRI ( $\mu$ )	EcoRI 酶切缓冲 液 10 ( $\mu$ L)	水( $\mu$ L)
1			10		2	8
2			10	4	2	
3		0.5			2	
4	1			4	2	
5		0.5		4	2	
6			10	4	2	8
7			10		2	8

补无菌双蒸水至 20 $\mu$ L, 依实际情况做相应调整

加样后,小心混匀,置于 37℃ 水浴中,酶解 2~3 h,反应终止后,各酶切样品于冰箱中贮存备用。

#### 4. DNA 琼脂糖凝胶电泳

(1) 琼脂糖凝胶的制备:称取 0.6g 琼脂糖,置于三角瓶中,加入 50 mL TBE 缓冲液,经沸水浴加热全部融化后,取出摇匀,此为 1.2%的琼脂糖凝胶。

(2) 胶板的制备:取橡皮膏(宽约 1cm)将有机玻璃板的边缘封好,水平放置,将样品槽板垂直立在玻璃板表面。将冷却至 65℃ 左右的琼脂糖凝胶液,小心倒入凝胶液,使胶液缓慢展开,直到在整个玻璃板表面形成均匀的胶层,室温下静置 30 min,待凝固完全后,轻轻拔出样品槽模板,在胶板上即形成相互隔开的样品槽。用滴管将样品槽内注满 TBE 缓冲液以防止干裂,制备好胶板后立即取下橡皮膏,将胶板放在电泳槽中使用。

(3) 加样:用微量加样器将上述样品分别加入胶板的样品小槽内。每次加完一个样品,要用蒸馏水反复洗净微量加样器,以防止相互污染。

#### 5. 电泳

加完样品后的凝胶板,立即通电。样品进胶前,应使电流控制在 20mA,样品进胶后电压控制在 60~80V,电流为 40~50 mA。当指示前沿移动至距离胶板 1~2cm 处,停止电泳。

#### 6. 染色

将电泳后的胶板在 EB 染色液中进行染色以观察在琼脂糖凝胶中的 DNA 条带。

### 五、结果与观察

在波长为 254nm 的紫外灯下,观察染色后的电泳胶板。DNA 存在处显示出红色的荧光条带。

### 六、思考题

1. 染色体 DNA 与质粒 DNA 分离的主要依据是什么?
2. EB 染料有哪些特点?在使用时应注意些什么?

#### 参考答案

1. 纯化 DNA 的方法主要依据染色体 DNA 比质粒 DNA 分子大得多,而且染色体 DNA 被断裂成线状分子,但质粒 DNA 为共价闭环结构,当加热或用酸、碱处理 DNA 溶液时,线状染色体 DNA 容易发生变性,共价闭环的质粒 DNA 在冷却和回到中性 pH 时即恢复其天然构象。

2. EB 染料的全名是 3,8-二氨基-5-乙基-6 苯基菲啶溴盐。EB 能插入 DNA 分子中碱基对之间,导致 EB 与 DNA 结合,DNA 所吸收的 260nm 的紫外光传递给 EB,或者结合的 EB 本身在 300nm 和 360nm 吸收的射线均在可见光谱的红橙区,以 560 nm 波长发射出来。EB 染料有许多优点,如染色操作简便、快速,室温下染色 15~20min;不会使核酸断裂;

灵敏度高，10ng 或更少的 DNA 即可检出。

但应特别注意的是，EB 是诱变剂，配制和使用 EB 染色液时，应带乳胶手套或一次性手套，并且不要将该染色液洒在桌面或地面上，凡是沾污 EB 的器皿或物品，必须经专门处理后，才能进行清洗或弃去。

(陈红漫)

## 实验十 紫外吸收法测定核酸的含量

### 一、目的

学习紫外分光光度法测定核酸含量的原理和操作方法，熟悉紫外分光光度计的基本原理和使用方法。

### 二、原理

核酸、核苷酸及其衍生物的分子结构中的嘌呤、嘧啶碱基具有共轭双键系统(  $-C=C-C=C-$  )，能够强烈吸收 250~280nm 波长的紫外光。核酸 (DNA, RNA) 的最大紫外吸收值在 260nm 处。遵照 Lambert-Beer 定律，可以从紫外光吸收值的变化来测定核酸物质的含量。

在不同 pH 溶液中嘌呤、嘧啶碱基互变异构的情况不同，紫外吸收光也随之表现出明显的差异，它们的摩尔消光系数也随之不同。所以，在测定核酸物质时均应在固定的 pH 溶液中进行。

核酸的摩尔消光系数 (或吸收系数)，通常以 ( ) 来表示，即每升含有一摩尔核酸磷的溶液在 260nm 波长处的消光值 (即光密度，或称为光吸收)。核酸的摩尔消光系数不是一个常数，而是依赖于材料的前处理、溶液的 pH 和离子强度发生变化。它们的经典数值 (pH = 7.0) 如下：

DNA 的 ( ) = 6 000 ~ 8 000

RNA 的 ( ) = 7 000 ~ 10 000

小牛胸腺 DNA 钠盐溶液 (pH = 7.0) 的 ( ) = 6 600，DNA 的含磷量为 9.2%，含 1  $\mu$ g/mL DNA 钠盐的溶液光密度为 0.020。RNA 溶液 (pH = 7.0) 的 ( ) = 7 700~7 800，RNA 的含磷量为 9.5%，含 1  $\mu$ g /mL RNA 溶液的光密度为 0.022~0.024。采用紫外分光光

度法测定核酸含量时,通常规定:在 260nm 波长下,浓度为  $1\mu\text{g/mL}$  的 DNA 溶液其光密度为 0.020,而浓度为  $1\mu\text{g/mL}$  的 RNA 溶液其光密度为 0.024。因此,测定未知浓度的 DNA (RNA) 溶液的光密度  $\text{OD}_{260\text{nm}}$ ,即可计算测出其中核酸的含量。

该法简单、快速、灵敏度高,如核酸  $3\mu\text{g/mL}$  的含量即可测出。对于含有微量蛋白质和核苷酸等吸收紫外光物质的核酸样品,测定误差较小,若样品内混杂有大量的上述吸收紫外光物质,测定误差较大,应设法事先除去。

由于降解或水解作用,核酸的光密度可以增高约 40%,这就是众所周知的增色效应 (hyperchromic effect)。在大分子的核酸中,氢键和  $\pi$ -键相互作用改变了碱基的共振行为。因此,核酸的光密度低于构成它的核苷酸的光密度,该现象称为减色效应 (hypochromic effect)。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

1. 试材:核酸样品 DNA 或 RNA。

2. 主要仪器

- (1) 分析天平
- (2) 紫外分光光度计
- (3) 冰浴或冰箱
- (4) 离心机
- (5) 离心管 (10mL)
- (6) 烧杯 (10mL)
- (7) 容量瓶 (50mL、100mL)
- (8) 移液管 (0.5mL、2mL 和 5mL)
- (9) 药品勺和玻璃棒
- (10) 试管和试管架。

3. 试剂

- (1) 5%~6%氨水:用 25%~30%氨水稀释 5 倍。
- (2) 钼酸铵-过氯酸试剂:取 3.6mL70%过氯酸和 0.25g 钼酸铵溶于 96.4mL 蒸馏水中。

### 四、操作步骤

1. 核酸样品纯度的测定

(1) 准确称取待测的核酸样品 0.5g,加少量蒸馏水(或无离子水)调成糊状,再加适量的水,用 5%~6%氨水调至 pH7,定容至 50mL。

(2) 取两支离心管,甲管内加入 2mL 样品溶液和 2mL 蒸馏水;乙管内加入 2mL 样品溶液和 2mL 沉淀剂(沉淀除去大分子核酸,作为对照)。混匀,在冰浴(或冰箱)中放置 30min,3 000r/min 离心 10min。从甲、乙两管中分别取 0.5mL 上清液,用蒸馏水定容

至 50mL。选用光程为 1cm 的石英比色杯，在 260nm 波长下测其光密度。

(3) 计算

$$\text{DNA(或RNA)} = \frac{\text{甲}OD_{260\text{nm}} - \text{乙}OD_{260\text{nm}} (\text{g/mL})}{0.020(0.024)} \times 100$$
$$\text{样品浓度}(\text{g/mL})$$

$$\text{上式中样品浓度} = \frac{0.5(\text{g})}{50 \times \frac{4}{2} \times \frac{50}{0.5} (\text{mL})} = \frac{0.5 \times 10^6 (\text{g})}{10^4 (\text{mL})} = 50(\text{g/mL})$$

如果待测的核酸样品不含酸溶性核苷酸或可透析的低聚多核苷酸，则可将样品配制成一定浓度的溶液（20~50 μg/mL）在紫外分光光度计上直接测定。

2. 核酸溶液含量的测定

当待测的核酸样品中含有酸溶性核苷酸或可透析的低聚多核苷酸，在测定时需要加钼酸铵-过氯酸沉淀剂，沉淀除去大分子核酸，测定上清液 260 nm 处光密度作为对照。

(1) 取 2 支离心管，每管各加入 2mL 待测的核酸溶液，再向甲管内加 2mL 蒸馏水，向乙管内加 2mL 沉淀剂。混匀，在冰浴（或冰箱）中放置 10min，3 000r/min 离心 10min。将甲、乙两管清液分别稀释至光密度在 0.1~1.0 之间。选用光程为 1cm 的石英比色杯，在 260nm 波长下测其光密度  $OD_{260\text{nm}}$ 。

(2) 计算

$$\text{DNA(或RNA)含量}(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{\text{甲}OD_{260\text{nm}} - \text{乙}OD_{260\text{nm}}}{0.020(\text{或}0.024)} \times \text{稀释倍数}$$

五、思考题

1. 采用紫外光吸收法测定样品的核酸含量，有何优点及缺点？
2. 若样品中含有核苷酸类杂质，应如何校正？

参考答案

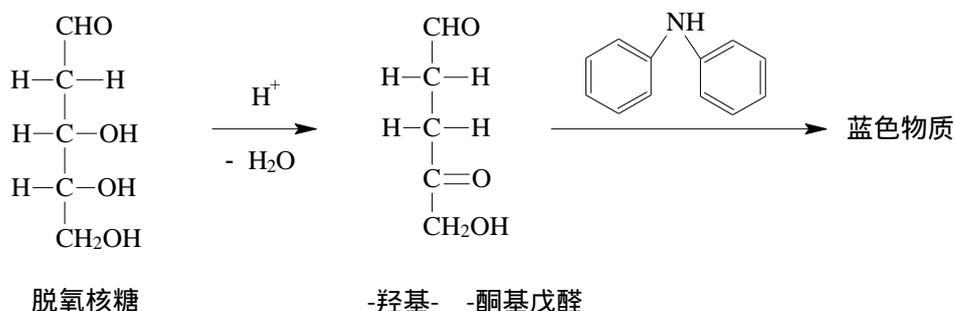
1. 用紫外光吸收法测定样品的核酸含量，具有简单、快速、灵敏度高的优点，并且待测核酸样品中含有的微量蛋白质和核苷酸等吸收紫外光物质，产生较小测定误差。但该方法在测定样品内混杂有大量的上述吸收紫外光物质时，则会产生较大测定误差，需要设法事先除去。

2. 当样品中含有核苷酸类杂质时，需要加钼酸铵-过氯酸沉淀剂处理，沉淀除去大分子核酸，测定上清液 260 nm 处光密度，以此作为对照，再从未加沉淀剂测得的样品液 260nm 光密度中扣除。

## 六、附注：化学法测定 DNA 的含量 二苯胺显色法

### (一) 原理

DNA 在酸性条件下加热，其嘌呤碱与脱氧核糖间的糖苷键断裂，生成嘌呤碱、脱氧核糖和脱氧嘧啶核苷酸，而 2-脱氧核糖在酸性环境中加热脱水生成 -羟基- 酮基戊糖，与二苯胺试剂反应生成蓝色物质，在 595nm 波长处有最大吸收。DNA 在 40~400  $\mu\text{g}$  范围内，光吸收与 DNA 的浓度成正比。在反应液中加入少量乙醛，可以提高反应灵敏度。



### (二) 试剂及器材

#### 1. DNA 标准溶液

准确称取小牛胸腺的 DNA 钠盐，以 0.01mol / L NaOH 溶液配成 200  $\mu\text{g}$  / mL 的溶液。

#### 2. 测定样品溶液

准确称取干燥的 DNA 制品，以 0.01mol / L NaOH 溶液配成 100~150  $\mu\text{g}$  / mL 的溶液。若要测定 RNA 制品中的 DNA 含量，样品中至少要含有 DNA 20  $\mu\text{g}$  / mL 才能进行测定。

#### 3. 二苯胺试剂

称取 1g 二苯胺，溶于 100mL 的分析纯的冰乙酸中，再加入 60% 以上的过氯酸 10mL，混匀待用。临用前加入 1mL 的 1.6% 乙醛，配好的试剂应为无色。

#### 4. 分光光度计

### (三) 操作方法

#### 1. 制作 DNA 标准曲线：取 12 支洁净干燥试管按表 1 加入试剂：

表 1 DNA 标准曲线制作

管号	DNA 标准溶液 (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)	二苯胺试剂 (mL)	DNA 含量 ( $\mu\text{g}$ )
1, 2	0	2.0	4	0
3, 4	0.4	1.6	4	80
5, 6	0.8	1.2	4	160
7, 8	1.2	0.8	4	240
9, 10	1.6	0.4	4	320
11, 12	2.0	0	4	400

按上表加完各试剂后，充分混匀。于 60℃ 水浴中保温 1h，冷却后于 595nm 波长处以 1, 2 管为空白调零，测定各管光密度 (OD<sub>595nm</sub>)。取两管的平均值，以 DNA 的含量为横坐标，光密度为纵坐标，绘制标准曲线。

2. 样品 DNA 含量测定：取 2 支干净试管按表 2 加入试剂，其它操作同上。

表 2 样品 DNA 含量测定

管号	DNA 待测溶液* (mL)	二苯胺试剂 (mL)	OD <sub>595nm</sub>	DNA 含量 (μg)
1'	2	4		
2'	2	4		

\*待测溶液中的 DNA 含量应调整至标准曲线的可读范围内。

3. DNA 含量计算：以样品的光密度，从标准曲线上查出相对应 DNA 含量，按下式计算出样品中 DNA 的百分含量。

$$\text{DNA}(\%) = \frac{\text{待测液中测得的 DNA 量}(\mu\text{g})}{\text{待测液中样品的量}(\mu\text{g})} \times 100$$

附注：二苯胺试剂具有腐蚀性，且二苯胺反应产生的蓝色不易褪色，操作中应防止洒出，比色时，比色杯外面一定要擦干净。

(吕淑霞)

## 蛋白质及氨基酸

### 实验十一 氨基酸纤维素薄层层析

#### 一、目的

学习纤维素薄层层析的操作方法，掌握分配层析的原理。

#### 二、原理

以纤维素作为支持物，把它均匀地涂布在玻璃板上成一薄层，然后在此薄层上进行层析即为纤维素薄层层析。纤维素是一种惰性支持物，它与水有较强的亲和力而与有机溶剂亲和力较弱。层析时吸着在纤维素上的水是固定相，而展层溶剂是流动相。当欲被分离的

各种物质在固定相和流动相中的分配系数不同时，它们就能被分离开。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

绿豆芽或萌发小麦种子

#### 2. 仪器

烧杯 50mL 1；玻璃板 5 cm 20cm 1；层析缸；毛细管；喷雾器；研钵。

#### 3. 试剂

标准氨基酸溶液：丝氨酸、色氨酸、亮氨酸，分别以 0.01mol/L 盐酸配成 4mg/mL 的溶液。

纤维素粉（层析用）或微晶型纤维素（层析用）；羧甲基纤维素钠（CMC）。

层析溶剂系统：正丁醇（分析纯）：冰醋酸（分析纯）：水 = 4 : 1 : 1 (V/V)。

显色剂：0.1% 茚三酮-丙酮溶液。

### 四、操作步骤

#### 1. 氨基酸的提取

取已萌发好的小麦种子 2g（或绿豆芽下胚轴 2g），放入研钵中，加 95%乙醇 4mL 及少量的石英砂，研成匀浆后，倒入离心管中离心 3 000r/min、15min，上清液即为氨基酸提取液，用滴管小心吸入点样瓶中备用。

#### 2. 制板

取少量羧甲基纤维素钠（约 12mg），置研钵中充分研磨，再称取纤维素粉 3g 于研钵中研磨，再加入 14mL 水研磨匀浆，把纤维素匀浆倒在洗净烘干的玻璃板上，轻轻震动，使纤维素均匀分布在玻璃板上，水平放置风干，用前放入 100 ~ 110 °C 烘箱中活化 30min。

此处羧甲基纤维素钠是起粘合剂作用，它使纤维素粉能较牢固地粘附于玻璃板上，加入量过多会破坏纤维素薄层的毛细作用而使层析速度延缓，加的量过少则粘合不牢固，因此需要注意加量控制。

#### 3. 点样

用刀片将薄层板上薄层的左右各边刮削掉 0.5cm，以防止“边缘效应”。在纤维素薄板上距一端 15mm 处，用铅笔轻轻划出点样记号。样点之间距离 1.3cm。用毛细管吸取样品，在记号处点样，样品斑点直径控制在 2mm 左右。

#### 4. 展层

将薄板有样品的一端浸入已存放展层溶剂的层析缸中，层析溶剂液面不能高于样品线。待展层溶剂走到距薄板顶端 0.5 ~ 1cm 时取出此薄板（约 1 ~ 2h），用铅笔在前沿处作一记号后用电吹风吹干。

#### 5. 显色

将茚三酮显色剂喷雾在板上，用热风吹数分钟，(或置于 70~80 烘箱中烘干)即可观察到紫红色的氨基酸斑点，脯氨酸例外，为黄色斑点。用铅笔圈出氨基酸斑点，量出溶剂前沿的距离及各斑点中心与起点之间的距离，并计算各氨基酸的 Rf 值。Rf 值为迁移率 (rate of flow, Rf)，在恒定条件下，每种氨基酸有其一定的 Rf 值。Rf 值表示为：

$$Rf = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

根据已知标准氨基酸和 Rf 值，与小麦 (或绿豆芽) 提取液中氨基酸的 Rf 值比较，确定提取液中含有哪些种氨基酸。

## 五、附 注

1. 在操作过程中，手必须洗净，只能接触薄板上层边角；不能对着薄板说话，以防唾液掉在板上。
2. 配制展层剂时，要用纯溶剂，应现用现配，以免放置过久其成分发生变化 (酯化)。

## 六、思考题

1. 什么是分配系数？
2. 薄层层析中极性氨基酸与非极性氨基酸展层的速度哪个快一些？
3. 何为“边缘效应”？如何减轻或消除？

## 参考答案

1. 分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂中溶解达到平衡时，该溶质在两相溶剂中的浓度比值。在层析条件确定后分配系数是一常数，以 K 表示。

$$K = \frac{\text{固定相中溶质的浓度}}{\text{流动相中溶质的浓度}}$$

分配系数与溶剂和溶质的性质有关，同时受温度、压力的影响。所以不同物质的分配系数不同。而在恒温恒压条件下，某物质在确定的层析系统中的分配系数为一常数。

2. 层析的分离是基于氨基酸的非极性性质。物质的极性越小 (即非极性越大)，在有机溶剂中分配就越多，迁移率就越大；反之物质的极性越大，迁移率越小。所以非极性氨基酸在有机溶剂中展层的速度快于极性氨基酸。

3. 在用多元系统进行展层时，其中极性较弱的和沸点较低的溶剂 (例如氯仿-甲醇系统中的氯仿) 在薄层板的两边易挥发，因此，它们在薄层两边的浓度比在中部的浓度小，也就是说在薄层的两边比中部含有更多的极性较大或沸点较高的溶剂，于是位于薄层两边

的 Rf 值要比中间的高，即所谓“边缘效应”。

为减轻或消除边缘效应，可在层析缸的内壁贴上浸湿了展开剂的滤纸，使层析缸内溶剂蒸汽的饱和程度增加。

(马镛)

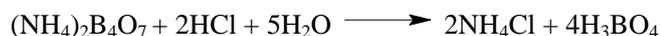
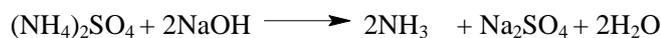
## 实验十二 总氮含量的测定

### 一、目的

加深理解蛋白质是生命物质基础；掌握半微量凯氏定氮法测定总氮含量原理和方法。

### 二、原理

蛋白质是生命的物质基础，是构成生物体细胞组织的重要成分，蛋白质是含氮的有机化合物，是有机态氮的表现形式。样品与硫酸和催化剂一同加热消化，使蛋白质分解，分解的氨与硫酸结合生成硫酸铵，然后碱化蒸馏使氨游离，用硼酸吸收后再用盐酸标准溶液滴定，根据酸的消耗量乘以换算系数，即得蛋白质含量。用反应式表示如下：



### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

植物、动物组织及食品

#### 2. 主要仪器

(1) 自动回流消化仪

(2) 凯氏定氮仪

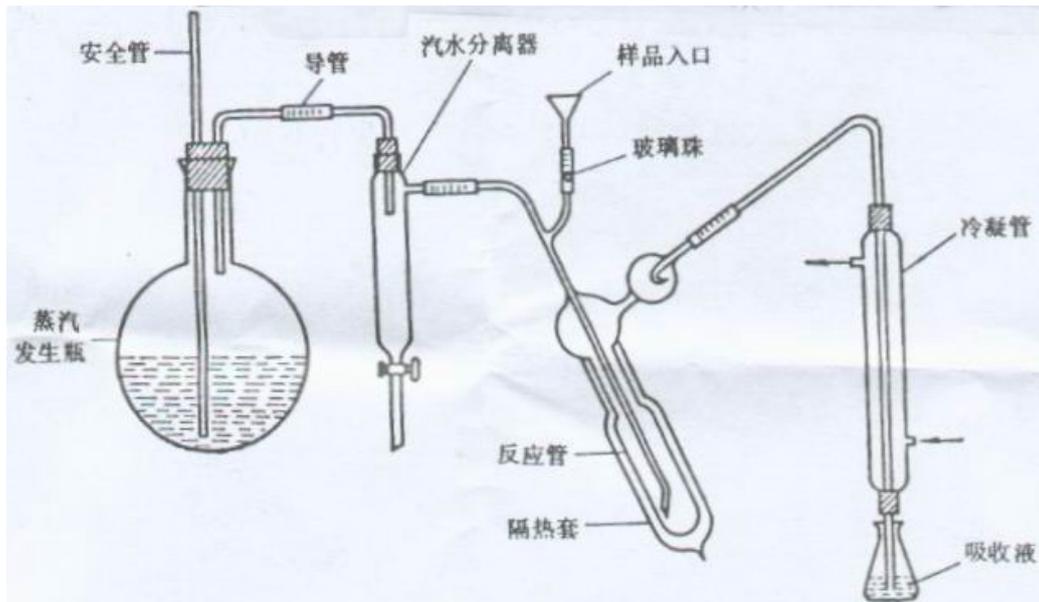


图2 微量凯氏定氮蒸馏装置

### 3. 试剂

- (1) 0.1% 甲基红乙醇液：称取 0.1g 甲基红溶于 100mL 60% 乙醇中。
- (2) 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液：称取 0.1g 溴甲酚绿溶于 100mL 20% 乙醇中。
- (3) 0.2% 溴甲酚绿乙醇溶液：称取 0.2g 溴甲酚绿溶于 100mL 20% 乙醇中。
- (4) 40% 氢氧化钠：称取 40g NaOH 溶于水中，定容至 100mL。
- (5) 2% 硼酸：称取 2g 硼酸用水溶解并定容至 100mL。
- (6) 0.05mol/L 盐酸标准溶液配制：量取 4.5mL 盐酸，加水稀释至 1 000mL。
- (7) 溴甲酚绿-甲基红混合指示剂制备：量取 30mL 0.2% 溴甲酚绿乙醇溶液加入 20mL 0.1% 甲基红乙醇溶液，混匀。
- (8) 甲基红-溴甲酚绿混合指示剂：1 份 (5mL) 0.1% 甲基红乙醇溶液与 5 份 (25mL) 0.1% 溴甲酚绿乙醇溶液临用时混合。
- (9) 其他试剂：无水碳酸钠、硫酸、硫酸铜，硫酸钾均为分析纯

## 四、操作步骤

### 1. 样品消化

称取适量样品 0.1~2g (固体)，移入干燥的消化管中，加入 0.2g 硫酸铜，3g 硫酸钾及 20mL 硫酸，轻轻摇匀后进行消化。待消化液呈蓝绿色澄清透明后，再继续加热 0.5h。熄火冷却后，将消化液移入 100mL 容量瓶中，用水定容至 100mL。取与处理样品相同量的硫酸铜，硫酸钾，硫酸按同一方法作试剂空白试验。

## 2. 碱化蒸馏

向接收瓶内加入 10mL 2% 硼酸及 2 滴混合指示剂并使冷凝管下端插入液面下，吸取 10.0mL 样品消化稀释液注入凯氏定氮仪的反应室中，用 10mL 蒸馏水冲洗进样入口，再加 10mL 50% 氢氧化钠溶液，打开水蒸汽发生器与反应室之间的夹子，蒸汽通入反应室使氨气被蒸发出来，并通过冷凝管而进入接收瓶内，以第一滴馏液滴下开始计时，蒸馏 5min，取下接收瓶。松开水蒸汽发生器瓶上的夹子，迅速夹紧水蒸汽发生器和反应室之间的夹子，将废液排出。

## 3. 滴定

用微量酸式滴定管，以 0.05mol/L 盐酸标准溶液进行滴定，溶液由蓝绿色变为灰红色为终点。

## 4. 空白试验

同时取 10.0mL 空白消化稀释液同上操作。

## 5. 盐酸标定

精密称取约 0.08g 在 270~300 干燥（或在 500~600 干燥 40~50min）至恒重的无水碳酸钠，加入 50mL 水使之溶解，加 10 滴溴甲酚绿—甲基红混合指示剂，用配制的盐酸标准液滴定至溶液由绿色变为紫红色，煮沸 2min，冷却至室温，继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色。

盐酸标准溶液的摩尔浓度计算： $C = m / (V_1 - V_2) \times 0.0530$

式中：

C 盐酸标准溶液的摩尔浓度 (mol/L)；

m 无水碳酸钠的质量 (g)；

$V_1$  样品滴定消耗盐酸标准溶液的体积 (mL)；

$V_2$  空白滴定消耗盐酸标准溶液的体积 (mL)；

0.0530 每毫摩尔无水碳酸钠的克数。

## 五、结果计算

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot C \cdot 0.014}{m} \cdot F \cdot 100$$

式中：

X 样品中蛋白质的含量 (%)；

$V_1$  样品消耗盐酸标准液的体积 (mL)；

$V_2$  空白实验消耗盐酸标准液的体积 (mL)；

C 盐酸标准溶液通过标定后的摩尔浓度 (mol/L)；

0.014 每毫升盐酸标准液相当于氮的克数；

m 样品质量 (g)；

F 氮换算为蛋白质的系数为 6.25.

## 六、附注

1. 蒸馏时，蒸汽发生要均匀充足，蒸馏中途不得停火断汽，否则发生倒吸。加碱要足量（反应室液体呈深蓝色或褐色）并且碱液不能污染冷凝管及接收瓶。

2. 蒸馏是否完全，可用精密 pH 试纸测试冷凝管出口的冷凝液是否呈碱性来确定。

## 七、思考题

1. 总氮测定时，消化至关重要，样品消化时注意事项有哪些？

2. 样品脂肪较多时，应如何处理？

## 参考答案

1. 样品开始炭化时易产生暴沸现象，这时要减小火力，勿使炭化物质上升到消化管上部。待消化液均匀沸腾后，再加大火力。如果消化液不易澄清透明时，可将消化烧瓶冷却，加入 30%过氧化氢 2~3mL，再加热，直至消化液黄色消失呈淡蓝色透明为止。

2. 如果样品脂肪较多时，可适当增加硫酸量，促使硫酸与氨作用形成硫酸铵。否则因硫酸过少，过多的硫酸钾将与硫酸作用形成硫酸氢钾，而阻止硫酸与氨作用，导致氨损失而使测定结果偏低。

(迟乃玉)

## 实验十三 脯氨酸含量的测定

### 一、目的

了解脯氨酸与植物逆境、衰老的关系；掌握脯氨酸测定原理和常规测定方法。

### 二、原理

在正常环境条件下，植物体内游离脯氨酸含量较低，但在逆境（干旱、低温、高温、盐渍等）及植物衰老时，植物体内游离脯氨酸含量可增加 10~100 倍，并且游离脯氨酸积

累量与逆境程度、植物的抗逆性有关。因此，测定植物体内游离脯氨酸的含量，在一定程度上可以判断逆境对植物的危害程度和植物对逆境的抵抗力。

在酸性条件下，脯氨酸与茚三酮反应生成稳定的红色缩合物，此缩合物在 515nm 处有最大吸收峰，可以用分光光度法测定。

### 三、实验材料，主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

植物组织。

#### 2. 主要仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 水浴锅
- (3) 大试管 (18mm × 200mm)
- (4) 具塞刻度试管 (20mL)

#### 3. 试剂

(1) 酸性茚三酮溶液：称取 1.25g 茚三酮溶于 30mL 冰乙酸和 20mL 6M 磷酸溶液中，搅拌加热（低于 70℃）溶解，冷却后置棕色瓶中，4℃ 保存可使用 2~3 天。

(2) 80%乙醇（分析纯）。

(3) 脯氨酸标准溶液：称取 10mg 脯氨酸，用少量 80%乙醇溶解，蒸馏水定容至 100mL（100 μg/mL）。再用蒸馏水稀释成 1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/mL 的系列溶液。

### 四、操作步骤

#### 1. 脯氨酸标准曲线制作

取 7 支具塞试管，分别加入各浓度的标准脯氨酸系列溶液 2mL，冰乙酸 2mL，茚三酮溶液 2mL，混匀后沸水浴中加热 20min，冷却后，以 0 号管为对照在 515nm 光波长下比色测定光密度。以光密度  $OD_{515nm}$  为纵坐标，脯氨酸含量为横坐标，绘制标准曲线。

管号	标准脯氨酸 (μg)	冰乙酸 (mL)	茚三酮溶液(mL)	$OD_{515nm}$
1	0	2	2	
2	1	2	2	
3	2.5	2	2	
4	5.0	2	2	
5	10	2	2	
6	15	2	2	
7	20	2	2	

## 2. 样品制定

(1) 称取 0.2~0.5g 植物样品放入研钵中，用总量为 10mL 80% 的乙醇（少许）研磨成匀浆，将匀浆移入大试管并用剩余 80% 乙醇洗研钵，试管加盖，黑暗下浸提 1h（样品为绿色叶片时，应加入少许活性炭）。

(2) 过滤上述提取液，并加 1g 人造沸石振荡 15min，室温下离心 3 000r/min、5min。

(3) 取上清液 2mL，加入 2mL 冰乙酸，2mL 茚三酮溶液于大试管中，充分混匀，沸水浴加热 20min，冷却后 515nm 波长下测定光密度。从标准曲线上查出待测样品中脯氨酸含量（ $\mu\text{g}$ ）。

## 五、结果计算

$$\text{脯氨酸含量} (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{C \cdot 5}{W}$$

式中：

C 由标准曲线查得的待测样品脯氨酸含量（ $\mu\text{g}$ ）

W 植物样品重量（g）

5 提取脯氨酸时 80% 乙醇体积（10mL）与测定时所取样品液体积（2mL）比。

## 六、思考题

1. 植物组织内游离脯氨酸测定有何意义？

2. 脯氨酸提取除本实验方法外，还有何方法？测定时应作哪些改变？

## 参考答案

1. 在正常环境条件下，植物体内游离脯氨酸含量较低，但在逆境（干旱、低温、高温、盐渍等）及植物衰老时，植物体内游离脯氨酸含量明显增加。测定植物体内游离脯氨酸的含量，可以判断逆境对植物的危害程度和植物对逆境的抵抗力。

2. 脯氨酸提取除本实验方法外，还可以用茚基水杨酸处理样品，待酸性茚三酮反应之后，再用甲苯萃取，520nm 比色。当脯氨酸提取试剂或萃取剂改变时，测定光密度的波长应当改变，具体采用多少波长，还应根据实验而定。

（迟乃玉）

## 实验十四 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量

### 一、目的

学习和掌握考马斯亮蓝 G-250 测定蛋白质含量的原理和方法。

### 二、原理

考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。考马斯亮蓝 G-250 在游离状态下呈红色,最大光吸收在 488nm;当它与蛋白质结合后变为青色,蛋白质-色素结合物在 595nm 波长下有最大光吸收。其光吸收值与蛋白质含量成正比,因此可用于蛋白质的定量测定。蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 结合在 2min 左右的时间内达到平衡,完成反应十分迅速;其结合物在室温下 1h 内保持稳定。该法是 1976 年 Bradford 建立,试剂配制简单,操作简便快捷,反应非常灵敏,灵敏度比 Lowry 法还高 4 倍,可测定微克级蛋白质含量,测定蛋白质浓度范围为 0~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,是一种常用的微量蛋白质快速测定方法。

### 二、材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

新鲜绿豆芽

#### 2. 主要仪器

- (1) 分析天平、台式天平
- (2) 刻度吸管
- (3) 具塞试管、试管架
- (4) 研钵
- (5) 离心机、离心管
- (6) 烧杯、量筒
- (7) 微量取样器
- (8) 分光光度计

#### 3. 试剂

(1) 牛血清白蛋白标准溶液的配制:准确称取 100mg 牛血清白蛋白,溶于 100mL 蒸馏水中,即为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的原液。

(2) 蛋白试剂考马斯亮蓝 G-250 的配制:称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250,溶于 50mL 90%乙醇中,加入 85% (W/V) 的磷酸 100mL,最后用蒸馏水定容到 1 000mL。此溶液在常温下可放置一个月。

#### (3) 乙醇

(4) 磷酸 (85%)

#### 四、操作步骤

##### 1. 标准曲线制作

(1) 0~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准曲线的制作：取 6 支 10mL 干净的具塞试管，按表 1 取样。盖塞后，将各试管中溶液纵向倒转混合，放置 2min 后用 1cm 光径的比色杯在 595nm 波长下比色，记录各管测定的光密度  $\text{OD}_{595\text{nm}}$ ，并做标准曲线。

表 1 低浓度标准曲线制作

管 号	1	2	3	4	5	6
1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准蛋白液 (mL)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
蒸馏水 (mL)	1.00	0.98	0.96	0.94	0.92	0.90
考马斯亮蓝 G-250 试剂 (mL)	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80	100
$\text{OD}_{595\text{nm}}$						

(2) 0~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准曲线的制作：另取 6 支 10mL 具塞试管，按表 2 取样。其余步骤同 (1) 操作，做出蛋白质浓度为 0~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准曲线。

表 2 高浓度标准曲线制作

管 号	7	8	9	10	11	12
1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准蛋白液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL)	1.00	0.8	0.6	0.4	0.2	0
考马斯亮蓝 G-250 试剂 (mL)	5	5	5	5	5	5
蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	200	400	600	800	1 000
$\text{OD}_{595\text{nm}}$						

##### 2. 样品提取液中蛋白质浓度的测定

(1) 待测样品制备：称取新鲜绿豆芽下胚轴 2g 放入研钵中，加 2mL 蒸馏水研磨成匀浆，转移到离心管中，再用 6mL 蒸馏水分次洗涤研钵，洗涤液收集于同一离心管中，放置 0.5~1h 以充分提取，然后在 4 000r/min 离心 20min，弃去沉淀，上清液转入 10mL 容量瓶，并以蒸馏水定容至刻度，即得待测样品提取液。

(2) 测定：另取 2 支 10mL 具塞试管，按下表取样。吸取提取液 0.1mL (做一重复)，放入具塞刻度试管中，加入 5mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂，充分混合，放置 2min 后用 1cm 光径比色杯在 595nm 下比色，记录光密度  $\text{OD}_{595\text{nm}}$ ，并通过标准曲线查得待测样品提

取液中蛋白质的含量 X (  $\mu\text{g}$  )。以标准曲线 1 号试管做空白。

表 3 待测液蛋白质浓度测定

管 号	13	14
蛋白质待测样品提取液 ( mL )	0.1	0.1
蒸馏水 ( mL )	0.9	0.9
考马斯亮蓝 G-250 试剂 ( mL )	5	5
OD <sub>595nm</sub>		
蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )		

## 五、结果计算

$$\text{样品蛋白质含量 ( } \mu\text{g/g 鲜重)} = \frac{X \times \frac{\text{提取液总体积 ( mL )}}{\text{测定时取样体积 ( mL )}}}{\text{样品鲜重 ( g )}}$$

式中：X 为在标准曲线上查得的蛋白质含量 (  $\mu\text{g}$  )

## 六、附 注

1. Bradford 法由于染色方法简单迅速，干扰物质少，灵敏度高，现已广泛应用于蛋白质含量的测定。

2. 有些阳离子，如  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、乙醇等物质不干扰测定，但大量的去污剂如 TritonX-100、SDS 等严重干扰测定。

3. 蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 结合的反应十分迅速，在 2min 左右反应达到平衡；其结合物在室温下 1h 内保持稳定。因此测定时，不可放置太长时间，否则将使测定结果偏低。

## 七、思考题

1. 制作标准曲线及测定样品时，为什么要将各试管中溶液纵向倒转混合？

### 参考答案

1. 将各试管中溶液纵向倒转混合目的是使反应充分，并且使整个反应液均一，否则在比色测定时，结果会有较大偏差，使标准曲线的制作不标准，后续的测定结果就不可靠。

( 吕淑霞 )

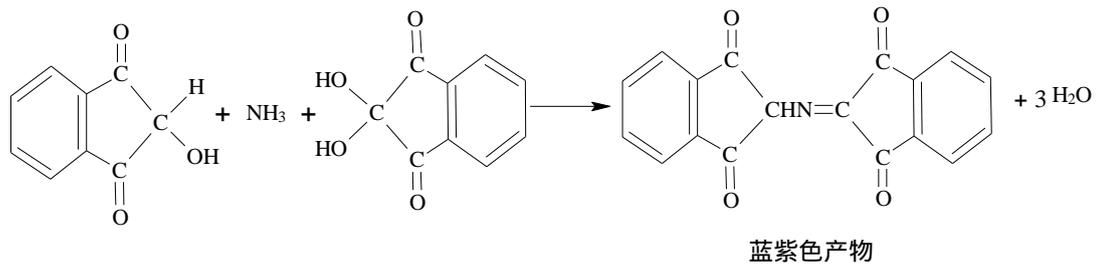
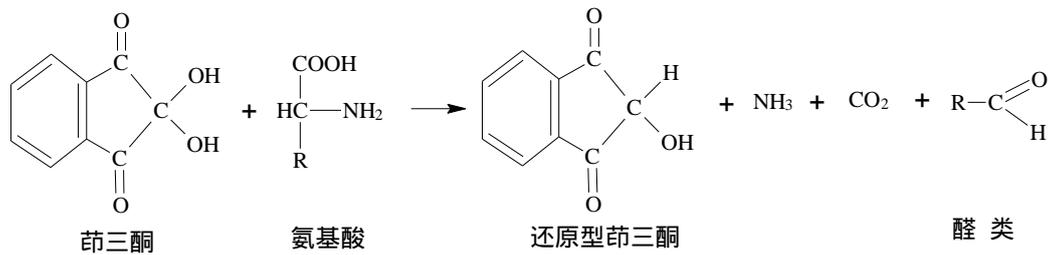
## 实验十五 茛三酮显色法测定氨基酸含量

### 一、目的

学习茛三酮显色法测定氨基酸含量的方法

### 二、原理

茛三酮溶液与氨基酸共热，生成氨。氨与茛三酮和还原性茛三酮反应，生成紫色化合物。该化合物颜色的深浅与氨基酸的含量成正比，可通过测定 570nm 处的光密度，测定氨基酸的含量。



### 三、试剂与材料

(1) 标准氨基酸溶液：配制成 0.3mmol/L 溶液。

(2) pH5.4, 2mol/L 醋酸缓冲液：量取 86mL 2mol/L 醋酸钠溶液，加入 14mL 2mol/L 乙酸混合而成。用 pH 检查校正。

(3) 茛三酮显色液：称取 85mg 茛三酮和 15mg 还原茛三酮，用 10mL 乙二醇甲醚溶解。

茛三酮若变为微红色，则需按下法重结晶：称取 5g 茛三酮溶于 15~25mL 热蒸馏水中，加入 0.25g 活性炭，轻轻搅拌。加热 30min 后趁热过滤，滤液放入冰箱过夜。次日析出黄白色结晶，抽滤，用 1mL 冷水洗涤结晶，置干燥器干燥后，装入棕色玻璃瓶保存。

还原型茚三酮按下法制备：称取 5g 茚三酮，用 125mL 沸蒸馏水溶解，得黄色溶液。将 5g 维生素 C 用 250mL 温蒸馏水溶解，一边搅拌一边将维生素 C 溶液滴加到茚三酮溶液中，不断出现沉淀。滴定后继续搅拌 15min，然后在冰箱内冷却到 4℃，过滤、沉淀用冷水洗涤 3 次，置五氧化二磷真空干燥器中干燥保存，备用。

乙二醇甲醚若放置太久，需用下法除去过氧化物：在 500mL 乙二醇甲醚中加入 5g 硫酸亚铁，振荡 1~2h，过滤除去硫酸亚铁，再经蒸馏，收集沸点为 121~125℃ 的馏分，为无色透明的乙二醇甲醚。

- (4) 60%乙醇。
- (5) 样品液：每毫升含 0.5~50 μg 氨基酸。
- (6) 分光光度计。
- (7) 水浴锅。

#### 四、操作步骤

##### 1. 标准曲线的制作

分别取 0.3mmol/L 的标准氨基酸溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mL 于试管中，用水补足至 1mL。各加入 1mL pH5.4, 2mol/L 醋酸缓冲液；再加入 1mL 茚三酮显色液，充分混匀后，盖住试管口，在 100℃ 水浴中加热 15min，用自来水冷却。放置 5min 后，加入 3mL 60%乙醇稀释，充分摇匀，用分光光度计测定 OD<sub>570nm</sub>（脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应呈黄色，应测定 OD<sub>440nm</sub>）。

以 OD<sub>570nm</sub> 为纵坐标，氨基酸含量为横坐标，绘制标准曲线。

##### 2. 氨基酸样品的测定

取样品液 1mL，加入 pH5.4, 2mol/L 醋酸缓冲液 1mL 和茚三酮显色液 1mL，混匀后于 100℃ 沸水浴中加热 15min，自来水冷却。放置 5min 后，加 3mL 60%乙醇稀释，摇匀后测定 OD<sub>570nm</sub>（生成的颜色在 60min 内稳定）。

将样品测定的 OD<sub>570nm</sub> 与标准曲线对照，可确定样品中氨基酸含量。

#### 五、结果计算

$$\text{氨基酸含量 (mmol/L)} = \frac{\text{OD}_{570\text{nm}} \text{ 对应标准曲线查得值}}{1000}$$

#### 六、思考题

- 1. 茚三酮是否可用于氨基酸和蛋白质的定性鉴定？

#### 参考答案

- 1. 可以。蛋白质、多肽和各种氨基酸具有茚三酮反应。除 α-氨基酸中的脯氨酸和羟

脯氨酸呈黄色外，其它氨基酸生成紫红色，最终为蓝色化合物。因此在层析法可以用茚三酮对氨基酸进行定性鉴定。

(陈红漫)

## 实验十六 Folin-酚法测定蛋白质含量

### 一、目的

掌握 Folin-酚法测定蛋白质含量的原理和方法，熟悉分光光度计的操作。

### 二、原理

Folin-酚试剂法包括两步反应：第一步是在碱性条件下，蛋白质与铜作用生成蛋白质-铜络合物；第二步是此络合物将磷钼酸-磷钨酸试剂 (Folin 试剂) 还原，产生深蓝色 (磷钼蓝和磷钨蓝混合物)，颜色深浅与蛋白质含量成正比。此法操作简便，灵敏度比双缩脲法高 100 倍，定量范围为 5 ~ 100  $\mu\text{g}$  蛋白质。Folin 试剂显色反应由酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸引起，因此样品中若含有酚类、柠檬酸和巯基化合物均有干扰作用。此外，不同蛋白质因酪氨酸、色氨酸含量不同而使显色强度稍有不同。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

绿豆芽下胚轴 (也可用其它材料如面粉)

#### 2. 仪器

- (1) 722 型 (或 721 型) 分光光度计
- (2) 4 000r/min 的离心机
- (3) 分析天平
- (4) 容量瓶 (50mL)
- (5) 量筒
- (6) 移液管 (0.5mL、1mL、5mL)

#### 3. 试剂 (纯度均为分析纯)

- (1) 0.5mol/L NaOH
- (2) 试剂甲：

(A) 称取 10g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、2g  $\text{NaOH}$  和 0.25g 酒石酸钾钠，溶解后用蒸馏水定容至 500mL。

(B) 称取 0.5g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，溶解后用蒸馏水定容至 100mL。

每次使用前将 (A) 液 50 份与 (B) 液 1 份，即为试剂甲，其有效期为 1d，过期失效。

(3) 试剂乙：

在 1.5L 容积的磨口回流器中加入 100g 钨酸钠 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 和 700mL 蒸馏水，再加 50mL 85% 磷酸和 100mL 浓盐酸充分混匀，接上回流冷凝管，以小火回流 10h。回流结束后，加入 150g 硫酸锂和 50mL 蒸馏水及数滴液体溴，开口继续沸腾 15min，驱除过量的溴，冷却后溶液呈黄色（倘若仍呈绿色，再滴加数滴液体溴，继续沸腾 15min）。然后稀释至 1L，过滤，滤液置于棕色试剂瓶中保存，使用前大约加水 1 倍，使最终浓度相当于 1mol/L。

#### 四、操作步骤

##### 1. 标准曲线的制作

(1) 配制标准牛血清白蛋白溶液：在分析天平上精确称取 0.0250g 结晶牛血清白蛋白，倒入小烧杯内，用少量蒸馏水溶解后转入 100mL 容量瓶中，烧杯内的残液用少量蒸馏水冲洗数次，冲洗液一并倒入容量瓶中，用蒸馏水定容至 100mL，则配成 250  $\mu\text{g/mL}$  的牛血清白蛋白溶液。

(2) 系列标准牛血清白蛋白溶液的配制：取 6 支普通试管，按表 1 加入标准浓度的牛血清白蛋白溶液和蒸馏水，配成一系列不同浓度的牛血清白蛋白溶液。然后各加试剂甲 5mL，混合后在室温下放置 10min，再各加 0.5 试剂乙，立即混合均匀（这一步速度要快，否则会使显色程度减弱）。30min 后，以不含蛋白质的 1 号试管为对照，用 722 型分光光度计于 650nm 波长下测定各试管中溶液的光密度并记录结果。

表 1 牛血清白蛋白标准曲线制作

试 剂	管 号					
	1	2	3	4	5	6
250 $\mu\text{g/mL}$ 牛血清白蛋白 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蛋白质含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	50	100	150	200	250

(1) 标准曲线的绘制：以牛血清白蛋白含量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标，以光密度为纵坐标绘制标准曲线。

##### 2. 样品的提取及测定

(1) 准确称取绿豆芽下胚轴 1g，放入研钵中，加蒸馏水 2mL，研磨匀浆。将匀浆转

入离心管，并用 6mL 蒸馏水分次将研钵中的残渣洗入离心管，离心 4 000r/min、20min。将上清液转入 50mL 容量瓶中，用蒸馏水定容到刻度，作为待测液备用。

(2) 取普通试管 2 支，各加入待测溶液 1mL，分别加入试剂甲 5mL，混匀后放置 10min，再各加试剂乙 0.5mL，迅速混匀，室温放置 30min，于 650nm 波长下测定光密度，并记录结果。

## 五、结果计算

计算出两重复样品光密度的平均值，从标准曲线中查出相对应的蛋白质含量  $X(\mu\text{g})$ ，再按下列公式计算样品中蛋白质的百分含量。

$$\text{样品中蛋白质含量}(\%) = \frac{X(\mu\text{g}) \times \text{稀释倍数}}{\text{样品重}(\text{g}) \times 10^6} \times 100$$

## 六、附注

(1) 进行测定时，加 Folin 试剂要特别小心，因为 Folin 试剂仅在酸性 pH 条件下稳定，但此实验的反应只是在 pH10 的情况下发生，所以当加试剂乙（Folin 试剂）时，必须立即混匀，以便在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前即能发生还原反应，否则会使显色程度减弱。

(2) 本法也可用于游离酪氨酸和色氨酸含量测定。

## 七、思考题

1. 含有什么氨基酸的蛋白质能与 Folin-酚试剂呈蓝色反应？
2. 测定蛋白质含量除 Folin-酚试剂显色法以外，还可以用什么方法？

## 参考答案

1. 含有酚基的氨基酸（酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸）能与 Folin-酚试剂反应呈蓝色，因为 Folin-酚试剂在碱性溶液中极不稳定，易被酚类化合物还原为蓝色化合物（钼兰和钨兰混合物）。

2. 除 Folin-酚试剂显色法以外，紫外吸收法也可以进行蛋白质含量的测定。蛋白质在 280nm 下具有最大的吸收值，这是由于含有酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸所引起的。若将已知不同浓度的蛋白质在 280nm 处测定，并作标准曲线，即可求得未知溶液的蛋白质浓度。

（马镛）

## 实验十七 紫外吸收法测定蛋白质含量

### 一、目的

学习紫外分光光度法测定蛋白质含量的原理；熟练掌握紫外分光光度计测定原理及使用方法。

### 二、原理

由于蛋白质中存在着含有共轭双键的酪氨酸和色氨酸，因此蛋白质具有吸收紫外光的性质，最大吸收峰在 280nm 波长处。在此波长范围内，蛋白质溶液的光密度  $OD_{280nm}$  与其浓度呈正比关系，可作定量测定。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

1. 试验材料：待测的蛋白质溶液。

2. 主要仪器

(1) 紫外分光光度计，(2) 试管与试管架，(3) 刻度吸量管

3. 试剂

(1) 标准牛血清蛋白溶液：准确称取经凯氏定氮法校正的结晶牛血清蛋白，配制成浓度为 1mg/mL 的溶液。

(2) 待测蛋白质溶液：浓度为 1mg/mL 左右的溶液。

### 四、操作步骤

1. 标准曲线制作

按表 1 分别向每支试管内加入各种试剂，混匀。以光程为 1cm 的石英比色杯，在 280nm 波长处测定各管溶液的光密度值  $OD_{280nm}$ 。以蛋白质浓度为横坐标，光密度值为纵坐标，绘出标准曲线。

表 1 蛋白质标准曲线制作

管号	标准蛋白质溶液 (mL)	蒸馏水 (mL)	蛋白质浓度 (mg/mL)	$OD_{280nm}$
1	0	4	0	
2	0.5	3.5	0.125	
3	1.0	3.0	0.25	
4	1.5	2.5	0.375	
5	2.0	2.0	0.50	
6	2.5	1.5	0.625	
7	3.0	1.0	0.75	
8	4.0	0	1.0	

## 2. 样品测定

取待测蛋白质溶液 1mL，加入蒸馏水 3mL，混匀，按上述方法测定 280nm 的光密度，并从标准工作曲线上查出待测蛋白质溶液的浓度。

## 五、附注

1. 在测定工作中，可以利用 280nm 及 260 nm 的光密度值求出蛋白质的浓度：

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 1.45\text{OD}_{280\text{nm}} - 0.74\text{OD}_{260\text{nm}}$$

式中的  $\text{OD}_{280\text{nm}}$  是蛋白质溶液在 280nm 下测得的光密度， $\text{OD}_{260\text{nm}}$  是蛋白质溶液在 260nm 下测得的光密度。

2. 对于有核酸存在时所造成的误差，可将待测的蛋白质溶液稀释至光密度在 0.2~2.0 之间，选用光程为 1cm 的石英比色杯，在 280nm 及 260nm 处分别测出光密度  $\text{OD}_{280\text{nm}}/\text{OD}_{260\text{nm}}$  的比值，从表 2 中查出校正因子“F”值，同时可查出该样品内混杂的核酸的百分含量，将 F 值代入下述公式，即可计算出该溶液的蛋白质浓度。

$$\text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = F \cdot \text{OD}_{280\text{nm}} \cdot D$$

式中： $\text{OD}_{280\text{nm}}$  为被测溶液在 280nm 紫外波长下的光密度，D 为溶液的稀释倍数。

表 2 紫外吸收法测定蛋白质含量的校正因子

$\text{OD}_{280\text{nm}}/\text{OD}_{260\text{nm}}$	校正因子	核酸%	$\text{OD}_{280\text{nm}}/\text{OD}_{260\text{nm}}$	校正因子	核酸%
1.75	1.116	0.00	0.846	0.656	5.50
1.63	1.081	0.25	0.822	0.632	6.00
1.52	1.054	0.50	0.804	0.607	6.50
1.40	1.023	0.75	0.784	0.585	7.00
1.36	0.994	1.00	0.767	0.565	7.5
1.30	0.970	1.25	0.753	0.545	8.00
1.25	0.944	1.50	0.730	0.508	9.00
1.16	0.899	2.00	0.705	0.478	10.00
1.09	0.852	2.50	0.671	0.422	12.00
1.03	0.814	3.00	0.644	0.377	14.00
0.979	0.776	3.50	0.615	0.322	17.00
0.939	0.743	4.00	0.595	0.278	20.00
0.874	0.682	5.00			

注：通常纯蛋白质的  $\text{OD}_{280\text{nm}}/\text{OD}_{260\text{nm}}$  约为 1.8，而纯核酸的比值约为 0.5。

## 六、思考题

1. 紫外吸收法与 Folin-酚比色法测定蛋白质含量相比,有何缺点及优点?
2. 若样品中含有核酸类杂质,应如何校正?

### 参考答案

1. 蛋白质测定的 Folin-酚比色法(即 Lowry 法)的定量范围为 5~100  $\mu\text{g}$  蛋白质,灵敏度高;但操作要费较长时间,且 Folin 试剂显色反应由酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸引起,因此样品中若含有酚类、柠檬酸和巯基化合物均有干扰作用;不同蛋白质因酪氨酸、色氨酸含量不同而使显色强度也稍有不同。

紫外吸收法测蛋白质含量迅速、简便、不消耗样品,低浓度盐类不干扰测定。因此,已在蛋白质和酶的生化制备中广泛采用,尤其在柱层析分离纯化中,常用 280nm 进行紫外检测,来判断蛋白质吸附或洗脱情况。但该法的缺点是:(1)对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质,有一定的误差。故该法适于测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。(2)若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外光的物质,会出现较大干扰。例如,在制备酶的过程中,层析柱的流出液中有时混杂有核酸,应予以校正。

2. 当样品中含有核酸类杂质,可以根据核酸在 260nm 波长处有最强的紫外光吸收,而蛋白质在 280nm 处有最大的紫外光吸收的性质,通过计算可以适当校正核酸对于测定蛋白质浓度的干扰作用。详细内容见附注。但是,因为不同的蛋白质和核酸的紫外吸收是不相同的,虽然经过校正,测定结果还存在着一定的误差。

(吕淑霞)

# 酶

## 实验十八 淀粉酶活力的测定

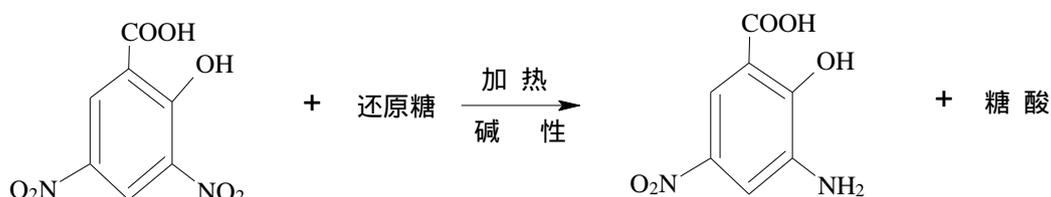
### 一、目的

学习和掌握测定淀粉酶(包括  $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶)活力的原理和方法。

### 二、原理

淀粉是植物最主要的贮藏多糖,也是人和动物的重要食物和发酵工业的基本原料。淀粉经淀粉酶作用后生成葡萄糖、麦芽糖等小分子物质而被机体利用。淀粉酶主要包括  $\alpha$ -

淀粉酶和  $\alpha$ -淀粉酶两种。 $\alpha$ -淀粉酶可随机地作用于淀粉中的  $\alpha$ -1,4-糖苷键，生成葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、糊精等还原糖，同时使淀粉的粘度降低，因此又称为液化酶。 $\beta$ -淀粉酶可从淀粉的非还原性末端进行水解，每次水解下一分子麦芽糖，又被称为糖化酶。淀粉酶催化产生的这些还原糖能使 3,5-二硝基水杨酸还原，生成棕红色的 3-氨基-5-硝基水杨酸，其反应如下：



3,5-二硝基水杨酸（黄色）

3-氨基-5-硝基水杨酸（棕红色）

淀粉酶活力的大小与产生的还原糖的量成正比。用标准浓度的麦芽糖溶液制作标准曲线，用比色法测定淀粉酶作用于淀粉后生成的还原糖的量，以单位重量样品在一定时间内生成的麦芽糖的量表示酶活力。

淀粉酶存在于几乎所有植物中，特别是萌发后的禾谷类种子，淀粉酶活力最强，其中主要是  $\alpha$ -淀粉酶和  $\beta$ -淀粉酶。两种淀粉酶特性不同， $\alpha$ -淀粉酶不耐酸，在 pH3.6 以下迅速钝化。 $\beta$ -淀粉酶不耐热，在 70℃ 15min 钝化。根据它们的这种特性，在测定活力时钝化其中之一，就可测出另一种淀粉酶的活力。本实验采用加热的方法钝化  $\alpha$ -淀粉酶，测出  $\beta$ -淀粉酶的活力。在非钝化条件下测定淀粉酶总活力（ $\alpha$ -淀粉酶活力+  $\beta$ -淀粉酶活力），再减去  $\alpha$ -淀粉酶的活力，就可求出  $\beta$ -淀粉酶的活力。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

萌发的小麦种子（芽长约 1cm）

#### 2. 仪器

- (1) 离心机
- (2) 离心管
- (3) 研钵
- (4) 电炉
- (5) 容量瓶：50mL 1, 100mL 1
- (6) 恒温水浴
- (7) 20mL 具塞刻度试管 13

- (8) 试管架  
 (9) 刻度吸管：2mL 3, 1mL 2, 10mL 1  
 (10) 分光光度计

### 3. 试剂 (均为分析纯)

(1) 标准麦芽糖溶液 (1mg/mL): 精确称取 100mg 麦芽糖, 用蒸馏水溶解并定容至 100mL。

(2) 3,5-二硝基水杨酸试剂: 精确称取 3,5-二硝基水杨酸 1g, 溶于 20mL 2mol/L NaOH 溶液中, 加入 50mL 蒸馏水, 再加入 30g 酒石酸钾钠, 待溶解后用蒸馏水定容至 100mL。盖紧瓶塞, 勿使 CO<sub>2</sub> 进入。若溶液混浊可过滤后使用。

(3) 0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液

A 液:(0.1mol/L 柠檬酸): 称取 C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 21.01g, 用蒸馏水溶解并定容至 1L。

B 液:(0.1mol/L 柠檬酸钠): 称取 Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O 29.41g, 用蒸馏水溶解并定容至 1L。

取 A 液 55mL 与 B 液 145mL 混匀, 即为 0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液。

(4) 1% 淀粉溶液: 称取 1g 淀粉溶于 100mL 0.1mol/L pH5.6 的柠檬酸缓冲液中。

## 四、操作步骤

### 1. 麦芽糖标准曲线的制作

取 7 支干净的具塞刻度试管, 编号, 按表 1 加入试剂:

表 1 麦芽糖标准曲线制作

试 剂	管 号						
	1	2	3	4	5	6	7
麦芽糖标准液 (mL)	0	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8	2.0
蒸馏水 (mL)	2.0	1.8	1.4	1.0	0.6	0.2	0
麦芽糖含量 (mg)	0	0.2	0.6	1.0	1.4	1.8	2.0
3,5-二硝基水杨酸 (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

摇匀, 置沸水浴中煮沸 5min。取出后流水冷却, 加蒸馏水定容至 20mL。以 1 号管作为空白调零点, 在 540nm 波长下比色测定光密度。以麦芽糖含量为横坐标, 光密度为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 2. 淀粉酶液的制备

称取 1g 萌发 3 天的小麦种子 (芽长约 1cm), 置于研钵中, 加入少量石英砂和 2mL 蒸馏水, 研磨匀浆。将匀浆倒入离心管中, 用 6mL 蒸馏水分次将残渣洗入离心管。提取

液在室温下放置提取 15~20min，每隔数分钟搅动 1 次，使其充分提取。然后在 3 000r/min 转速下离心 10min，将上清液倒入 100mL 容量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，摇匀，即为淀粉酶原液，用于  $\alpha$ -淀粉酶活力测定。

吸取上述淀粉酶原液 10mL，放入 50mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，摇匀，即为淀粉酶稀释液，用于淀粉酶总活力的测定。

3. 酶活力的测定：取 6 支干净的试管，编号，按表 2 进行操作。

表 2 酶活力测定取样表

操作项目	$\alpha$ -淀粉酶活力测定			$\beta$ -淀粉酶活力测定		
	- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6
淀粉酶原液 (mL)	1.0	1.0	1.0	0	0	0
钝化 $\alpha$ -淀粉酶	置 70℃ 水浴 15min，冷却					
淀粉酶稀释液 (mL)	0	0	0	1.0	1.0	1.0
3,5-二硝基水杨酸 (mL)	2.0	0	0	2.0	0	0
预保温	将各试管和淀粉溶液置于 40℃ 恒温水浴中保温 10min					
1% 淀粉溶液 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
保温	在 40℃ 恒温水浴中准确保温 5min					
3,5-二硝基水杨酸 (mL)	0	2.0	2.0	0	2.0	2.0

将各试管摇匀，显色后进行比色测定光密度，记录测定结果，操作同标准曲线。

### 五、结果计算

计算 - 2、- 3 光密度平均值与 - 1 光密度之差，在标准曲线上查出相应的麦芽糖含量 (mg)，按下列公式计算  $\alpha$ -淀粉酶的活力。

$$\alpha\text{-淀粉酶活力}[\text{麦芽糖毫克数} / \text{样品鲜重}(g) \cdot 5\text{分钟}] = \frac{\text{麦芽糖含量}(mg) \times \text{淀粉酶原液总体积}(mL)}{\text{样品重}(g)}$$

计算 - 2、- 3 光密度平均值与 - 1 光密度之差，在标准曲线上查出相应的麦芽糖含量 (mg)，按下式计算 ( + ) 淀粉酶总活力。

$$\begin{aligned} & \text{淀粉酶总活力}[\text{麦芽糖毫克数} / \text{样品鲜重}(\text{g}) \cdot 5\text{分钟}] \\ &= \frac{\text{麦芽糖含量}(\text{mg}) \times \text{淀粉原液总体积}(\text{mL}) \times \text{稀释倍数}}{\text{样品重}(\text{g})} \end{aligned}$$

$$\text{淀粉酶活力} = ( \quad + \quad ) \text{淀粉酶总活力} - \quad \text{淀粉酶活力}$$

## 六、附 注

(1) 样品提取液的定容体积和酶液稀释倍数可根据不同材料酶活性的大小而定。

(2) 为了确保酶促反应时间的准确性，在进行保温这一步骤时，可以将各试管每隔一定时间依次放入恒温水浴，准确记录时间，到达 5min 时取出试管，立即加入 3,5-二硝基水杨酸以终止酶反应，以便尽量减小因各试管保温时间不同而引起的误差。同时恒温水浴温度变化应不超过 0.5 。

(3) 如果条件允许，各实验小组可采用不同材料，例如萌发 1d、2d、3d、4d 的小麦种子，比较测定结果，以了解萌发过程中这两种淀粉酶活性的变化。

## 七、思考题

1. 为什么要将 -1、 -2、 -3 号试管中的淀粉酶原液置 70 水浴中保温 15min?
2. 为什么要将各试管中的淀粉酶原液和 1% 淀粉溶液分别置于 40 水浴中保温?

## 参考答案

1. 由于 淀粉酶不耐热，70 15min 被钝化，所以将此 3 个试管中的溶液在 70 保温 15min 使其钝化，从而测得的淀粉酶活性即为 淀粉酶活性。

2. 酶反应需要适当的温度，只有在一定的温度条件下才表现出最大活性，40 是淀粉酶的最适温度，所以应将酶液和底物（淀粉液）先分别保温至最适温度，然后再进行酶反应，这样才能使测得的数据更加准确。

(唐 咏)

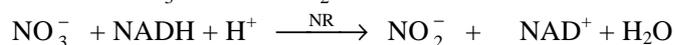
## 实验十九 硝酸还原酶活性的测定

### 一、目的

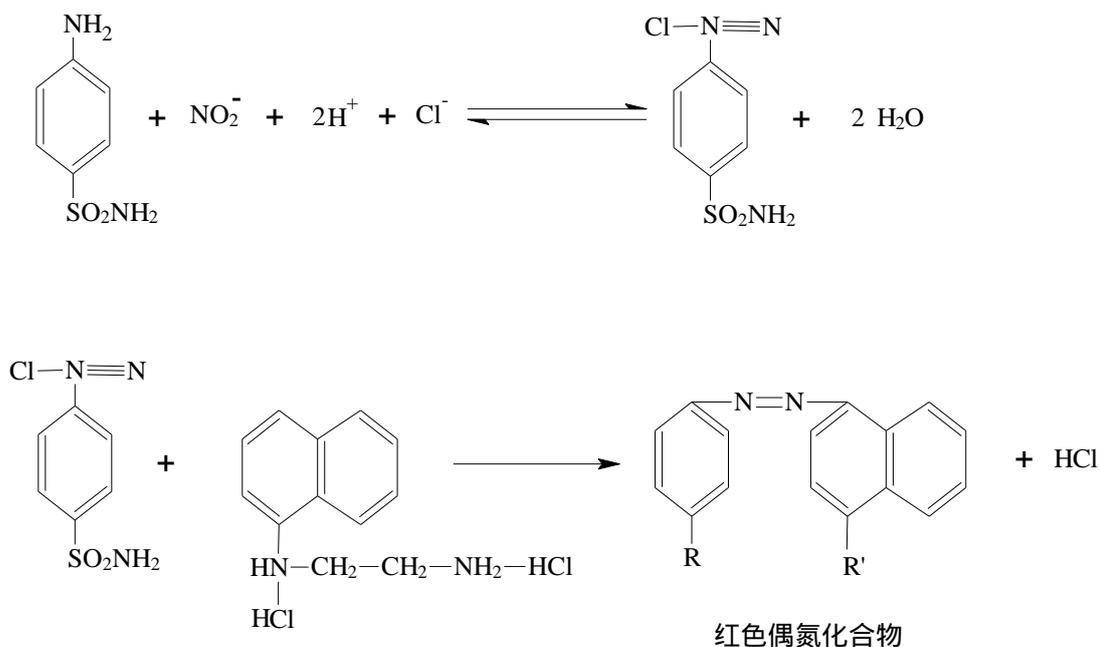
硝酸还原酶 (EC.1.6.6.1, 缩写 NR) 是硝酸盐同化中第一个酶, 也是限速酶, 处于植物氮代谢的关键位置。它与植物吸收利用氮肥有关, 对农作物产量和品质有重要影响, 因而硝酸还原酶活性被当作植物营养或农田施肥的指标之一, 也可作为品种选育的指标之一。通过本实验可以初步掌握测定硝酸还原酶活性的原理和方法。

### 二、原理

硝酸还原酶可将  $\text{NO}_3^-$  还原成  $\text{NO}_2^-$ , 其反应为:



在一定条件下,  $\text{NO}_2^-$  的生成量与硝酸还原酶活性呈正相关。 $\text{NO}_2^-$  含量可用磺胺显色法测定, 即在酸性条件下与对-氨基苯磺酰胺发生重氮反应, 生成的重氮化合物又与 N-萘基乙二胺盐酸盐 (或 -萘胺) 生成红色偶氮化合物, 可在 540nm 下比色测定。反应如下:



硝酸还原酶活性一般采用活体法或离体法测定。离体法需将材料磨成匀浆, 经过滤或离心除去残渣, 以上清液为硝酸还原酶粗酶液进行测定。由于研磨中  $\text{NADH}$  受损失, 必需外加  $\text{NADH}$  方可测定。活体法直接用鲜活组织进行测定。环境中的  $\text{NO}_3^-$  进入细胞后,

被硝酸还原酶还原成  $\text{NO}_2^-$  并扩散到细胞外在溶液中积累，测定溶液中  $\text{NO}_2^-$  的含量即可得知硝酸还原酶活性的大小。活体法不破坏细胞原有的酶反应系统，NADH 可由代谢反应不断生成，无需外加。活体法简便、快速，不需要贵重仪器设备及低温条件，但重复性欠佳，应作一定量的重复。本实验采用活体法测定硝酸还原酶活性。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 材料

材料可选用小麦、玉米、白菜、油菜、烟叶等作物的叶片

#### 2. 仪器

- (1) 天平
- (2) 真空泵和真空干燥器
- (3) 离心机
- (4) 20mL 刻度试管 7
- (5) 50mL 三角瓶 3
- (6) 恒温水浴
- (7) 恒温箱
- (8) 分光光度计
- (9) 移液管：5mL × 2；2mL × 5；1mL × 1

#### 3. 试剂

(1) 亚硝酸钠标准液：精确称取亚硝酸钠 0.1000g，用水溶解后定容至 100mL，吸取此液 5mL，用水稀释定容至 1 000mL，即为  $5 \mu\text{g/mL}$  的亚硝酸钠标准液。

(2) 0.1mol/L pH7.5 磷酸缓冲液：

A 液 (0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )：称取 35.61g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (A.R)，用蒸馏水溶解并定容至 1 000mL。

B 液 (0.2mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )：称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (A.R) 27.6g，用蒸馏水溶解并定容至 1 000mL。

取 A 液 84.0mL 和 B 液 16.0mL，混匀，加蒸馏水 100mL。必要时用酸度计测定其 pH，并用 HCl 或 NaOH 溶液校正至 pH7.5。

(3) 0.04mol/L  $\text{KNO}_3$ ：称取 10.11g  $\text{KNO}_3$  (A.R) 溶于磷酸缓冲液并定容至 500mL。

(4) 1% 对氨基苯磺酸：称 1g 对氨基苯磺酸，加 25mL 浓盐酸，用水定容至 100mL。

(5) 0.2% 1-萘胺：称 0.2g 1-萘胺，加 25mL 冰乙酸，用水定容至 100mL。

(6) 30% 三氯乙酸：75.0g 三氯乙酸用水定容至 250mL。

### 四、操作步骤

#### 1. 标准曲线的制作

取 6 支干净试管，编号，按表 1 加入试剂：

表 1 标准曲线制作取样表

试 剂	试 管 号					
	1	2	3	4	5	6
亚硝酸钠标准液 (mL)	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水 (mL)	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4	0
1%对氨基苯磺酸 (mL)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
0.2% 1-萘胺 (mL)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
亚硝酸钠含量 (μg)	0	2	4	6	8	10

摇匀后在室温下放置 20min，然后在 540nm 波长下测定光密度，以亚硝酸含量为横坐标，光密度为纵坐标绘制标准曲线。

## 2. 酶反应和酶活性的测定

将实验材料（如白菜叶片）用水洗净，再用蒸馏水冲洗，然后用纱布或滤纸吸干。将材料剪成 0.5cm × 0.5cm 左右的小块，混合均匀后分别称取三份，每份 1g，然后分别放入 3 只 50mL 的三角瓶中，编号后按表 2 加入各种试剂：

表 2 酶活性测定取样表

三 角 瓶 号	1	2	3
0.1mol/L pH7.5 磷酸缓冲液 (mL)	4.0	4.0	4.0
0.04mol/L KNO <sub>3</sub> 溶液 (mL)	5.0	5.0	5.0
30%三氯乙酸 (mL)	1.0	0	0

摇匀后将三角瓶置于真空干燥器中，接上真空泵抽气 10min。放气后叶片变软并沉入溶液。将三角瓶取出放入恒温箱，在 30℃、暗条件下保温 30min。取出后立即向 2、3 号瓶分别加入 1mL 30%三氯乙酸以终止酶反应。将各瓶中的反应液离心(2000r/min, 10min)，然后分别吸取上清液 2mL 于另一试管中，各加入 4mL 1%对氨基苯磺酸和 4mL 0.2% 1-萘胺，室温显色 20min 后测定 540nm 波长下的光密度。用 2、3 号管溶液光密度平均值减去 1 号管溶液的光密度，得到的值在标准曲线上查出相应的 NaNO<sub>2</sub> 含量 (μg)。

## 五、结果与计算

把在标准曲线上查得的 NaNO<sub>2</sub> 含量代入下式，计算硝酸还原酶活性：

$$\text{NR活性}[\text{NaNO}_2(\mu\text{g})/\text{鲜重}(\text{g})\cdot\text{h}] = \frac{\text{NaNO}_2\text{含量}(\mu\text{g})\times\text{稀释倍数}}{\text{样品重}(\text{g})\times\text{时间}(\text{h})}$$

## 六、附 注

1. 真空抽气可在真空恒温箱中进行(抽气至 700mmHg 柱, 10min), 也可以在真空干燥器中接真空泵抽气。

2. 酶反应要在暗条件下进行的原因是叶绿体在光合作用时可产生亚硝酸还原酶的辅酶铁氧还蛋白, 与亚硝酸还原酶同时存在时可还原  $\text{NO}_2^-$ , 所以在暗条件下进行反应可阻止  $\text{NO}_2^-$  的继续反应, 以保证测定结果的准确。

3. 硝酸还原酶是诱导酶, 光照是其诱导条件之一, 所以应在光合作用进行了一段时间以后(3h) 采样, 田间采样应在早晨 9 点钟以后。

4. 无机磷对硝酸还原酶活力有促进作用, 所以常用磷酸缓冲液。

5. 在配制标准溶液时, 加入亚硝酸钠标准液和蒸馏水后要摇匀。显色时, 加入 1% 对氨基苯磺酸后应充分摇匀。

## 七、思考题

1. 为什么要将加有样品和试剂的三角瓶放入真空干燥器抽气?

2. 为什么 1 号三角瓶在加入样品之前就要先加入 1.0ml 30% 三氯乙酸?

## 参考答案

1. 将加有样品和试剂的三角瓶放入真空干燥器中进行抽气、放气, 重复数次, 可以排出植物组织间隙的气体, 使底物溶液进入叶片组织并进行酶反应。

2. 由于 1 号瓶事先加入三氯乙酸, 造成酸性条件, 使得加入样品中的蛋白质(包括硝酸还原酶) 变性失活, 因此不会产生酶反应, 可以此溶液作为对照。

(唐 咏)

## 实验二十 纤维素酶活力的测定

### 一、目的

学习和掌握 3,5-二硝基水杨酸(DNS) 法测定纤维素酶活力的原理和方法, 了解纤维素酶的作用特性。

## 二、原理

纤维素酶是一种多组分酶，包括  $C_1$  酶、 $C_x$  酶和  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶三种主要组分。其中  $C_1$  酶的作用是将天然纤维素水解成无定形纤维素， $C_x$  酶的作用是将无定形纤维素继续水解成纤维寡糖， $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的作用是将纤维寡糖水解释成葡萄糖。纤维素酶水解纤维素产生的纤维二糖、葡萄糖等还原糖能将碱性条件下的 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 还原，生成棕红色的氨基化合物，在 540nm 波长处有最大光吸收，在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色强度呈比例关系，利用比色法测定其还原糖生成的量就可测定纤维素酶的活力。

## 三、实验材料、主要仪器和试剂

### 1. 实验材料

- (1) 纤维素酶制剂 500mg
- (2) 新华定量滤纸 50mg / 份 4
- (3) 脱脂棉花 50mg / 份 4
- (4) 羧甲基纤维素钠 (CMC) 510mg
- (5) 水杨酸苷 500mg

### 2. 主要仪器

- (1) 722 型或其他型号的可见分光光度计
- (2) 恒温水浴 2 台
- (3) 沸水浴锅
- (4) 电炉子
- (5) 剪刀
- (6) 万分之一分析天平
- (7) 恒温干燥箱
- (8) 冰箱
- (9) 试管架
- (10) 胶头滴管
- (11) 具塞刻度试管 20mL 24
- (12) 移液管或加液器 0.5 mL 3 ; 2mL 7
- (13) 容量瓶 100 mL 6 ; 1000 mL 3
- (14) 量筒 50 mL 2 ; 100 mL 1 ; 500 mL 1
- (15) 烧杯 100 mL 6 ; 500mL 3 ; 1 000 mL 1

### 3. 试剂 (均为分析纯)

- (1) 浓度为 1mg/mL 的葡萄糖标准液

将葡萄糖在恒温干燥箱中 105 °C 下干燥至恒重，准确称取 100mg 于 100mL 小烧杯中，

用少量蒸馏水溶解后，移入 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 100mL，充分混匀。4 冰箱中保存（可用 12~15 天）。

#### （2）3,5-二硝基水杨酸（DNS）溶液

准确称取 DNS 6.3g 于 500mL 大烧杯中，用少量蒸馏水溶解后，加入 2mol/L NaOH 溶液 262mL，再加到 500mL 含有 185g 酒石酸钾钠（ $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$ ，MW=282.22）的热水中，再加 5g 结晶酚（ $C_6H_5OH$ ，MW=94.11）和 5g 无水亚硫酸钠（ $Na_2SO_3$ ，MW=126.04），搅拌溶解，冷却后移入 1000mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 1000mL，充分混匀。贮于棕色瓶中，室温放置一周后使用。

#### （3）0.05 mol/L pH4.5 的柠檬酸缓冲液

A 液（0.1 mol/L 柠檬酸溶液）：准确称取  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ （MW=210.14）21.014g 于 500mL 大烧杯中，用少量蒸馏水溶解后，移入 1000mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 1000mL，充分混匀。4 冰箱中保存备用。

B 液（0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液）：准确称取  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ （MW=294.12）29.412g 于 500mL 大烧杯中，用少量蒸馏水溶解后，移入 1000mL 容量瓶中，然后用蒸馏水定容至 1000mL，充分混匀。4 冰箱中保存备用。

取上述 A 液 27.12mL，B 液 22.88mL，充分混匀后移入 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 100mL，充分混匀，即为 0.05 mol/L pH4.5 的柠檬酸缓冲液。4 冰箱中保存备用，用于测定滤纸酶活力。

#### （4）0.05 mol/L pH5.0 的柠檬酸缓冲液

取上述 A 液 20.5mL，B 液 29.5mL，充分混匀后移入 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容至 100mL，充分混匀。即为 0.05M pH5.0 的柠檬酸缓冲液。4 冰箱中保存备用。用于测定  $C_1$  酶活力。

#### （5）0.51%羧甲基纤维素钠（CMC）溶液

精确称取 0.51g CMC 于 100mL 小烧杯中，加入适量 0.05 mol/L pH5.0 的柠檬酸缓冲液，加热溶解后移入 100mL 容量瓶中并用 0.05 mol/L pH5.0 的柠檬酸缓冲液定容至 100mL，用前充分摇匀。4 冰箱中保存备用，用于测定  $C_x$  酶活力。

#### （6）0.5%水杨酸苷溶液

准确称取 0.5g 水杨酸苷于 100mL 小烧杯中，用少量 0.05 mol/L pH4.5 的柠檬酸缓冲液溶解后，移入 100mL 容量瓶中并用 0.05 mol/L pH4.5 的柠檬酸缓冲液定容至 100mL，充分混匀。4 冰箱中保存备用，用于测定  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活力。

#### （7）纤维素酶液的配制

准确称取纤维素酶制剂 500mg 于 100mL 小烧杯中，用少量蒸馏水溶解后，移入 100mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至 100mL，此酶液的浓度为 5mg/mL，4 冰箱中保存备用。

### 四、操作方法和步骤

### 1. 葡萄糖 (G) 标准曲线的制作

取 8 支洗净烘干的 20mL 具塞刻度试管, 编号后按表 1 加入标准葡萄糖 (G) 溶液和蒸馏水, 配制成一系列不同浓度的葡萄糖溶液。充分摇匀后, 向各试管中加入 1.5mL DNS 溶液, 摇匀后沸水浴 5min, 取出冷却后用蒸馏水定容至 20mL, 充分混匀。在 540nm 波长下, 以 1 号试管溶液作为空白对照, 调零点, 测定其它各管溶液的光密度值并记录结果。以葡萄糖含量 (mg) 为横坐标, 以对应的光密度值为纵坐标, 在坐标纸上绘制出葡萄糖标准曲线。

表 1 葡萄糖标准曲线制作

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖标液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
蒸馏水 (mL)	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
葡萄糖含量 (mg)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4

### 2. 滤纸酶活力的测定

取 4 支洗净烘干的 20mL 具塞刻度试管 编号后各加入 0.5mL 酶液和 1.5mL 0.05 mol/L pH4.5 的柠檬酸缓冲液, 向 1 号试管中加入 1.5mL DNS 溶液以钝化酶活性, 作为空白对照, 比色时调零用。将 4 支试管同时在 50℃ 水浴中预热 5~10min, 再各加入滤纸条 50mg (新华定量滤纸, 约 1cm × 6 cm), 50℃ 水浴中保温 1h 后取出立即向 2、3、4 号试管中各加入 1.5mL DNS 溶液以终止酶反应, 充分摇匀后沸水浴 5min, 取出冷却后用蒸馏水定容至 20mL, 充分混匀。以 1 号试管溶液为空白对照调零点, 在 540nm 波长下测定 2、3、4 号试管液的光密度值并记录结果。

根据 3 个重复光密度的平均值, 在标准曲线上查出对应的葡萄糖含量, 按下式计算出滤纸酶活力 (U/g)。在上述条件下, 每小时由底物生成 1 $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\text{滤纸酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{酶液定容总体积 (mL)} \times 5.56}{\text{反应液中酶液加入量 (mL)} \times \text{样品重 (g)} \times \text{时间 (h)}}$$

式中: 5.56 为 1mg 葡萄糖的  $\mu$ mol 数。(1000/180=5.56)

### 3. C<sub>1</sub> 酶活力的测定

将 5mg/mL 的原酶液稀释 10~15 倍后用于测定 C<sub>1</sub> 酶活力, 以脱脂棉为底物。

取 4 支洗净烘干的 20mL 具塞刻度试管 编号后各加入 50mg 脱脂棉 加入 1.5mL 0.05M pH5.0 的柠檬酸缓冲液, 并向 1 号试管中加入 1.5mL DNS 溶液以钝化酶活性, 作为空白对照, 比色时调零用。将 4 支试管同时在 45℃ 水浴中预热 5~10min, 再各加入适当稀释后

的酶液 0.5mL，45℃ 水浴中保温 24h。取出后立即向 2、3、4 号试管中各加入 1.5mL DNS 溶液以终止酶反应，充分摇匀后沸水浴 5min，取出冷却后用蒸馏水定容至 20mL，充分混匀。以 1 号试管溶液为空白对照调零点，在 540nm 波长下测定 2、3、4 号试管液的光密度值并记录结果。

根据 3 个重复光密度的平均值，在标准曲线上查出对应的葡萄糖含量，按下式计算出  $C_1$  酶活力 (U/g)。在上述条件下反应 24h，由底物生成 1mmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$C_1 \text{ 酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{酶液定容总体积 (mL)} \times \text{稀释倍数} \times 5.56 \times 24}{\text{反应液中酶液加入量 (mL)} \times \text{样品重 (g)} \times \text{时间 (h)}}$$

式中：24 为酶活力定义中的 24h。

#### 4. $C_x$ 酶活力的测定

将 5mg/mL 的原酶液稀释 5 倍后用于测定  $C_x$  酶活力，以 CMC 为底物。

取 4 支洗净烘干的 20mL 具塞刻度试管，编号后各加入 1.5mL 0.51% CMC 柠檬酸缓冲液，并向 1 号试管中加入 1.5mL DNS 溶液以钝化酶活性，作为空白对照，比色时调零用。将 4 支试管同时在 50℃ 水浴中预热 5~10min，再各加入稀释 5 倍后的酶液 0.5mL，50℃ 水浴中保温 30min 后取出，立即向 2、3、4 号试管中各加入 1.5mL DNS 溶液以终止酶反应，充分摇匀后沸水浴 5min，取出冷却后用蒸馏水定容至 20mL，充分混匀。以 1 号试管溶液为空白对照调零点，在 540nm 波长下测定 2、3、4 号试管液的光密度值并记录结果。

根据 3 个重复光密度的平均值，在标准曲线上查出对应的葡萄糖含量，按下式计算出  $C_x$  酶活力 (U/g)。在上述条件下，每小时由底物生成 1mmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$C_x \text{ 酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{酶液定容总体积 (mL)} \times \text{稀释倍数} \times 5.56}{\text{反应液中酶液加入量 (mL)} \times \text{样品重 (g)} \times \text{时间 (h)}}$$

#### 5. $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活力的测定

取 4 支洗净烘干的 20mL 具塞刻度试管，编号后各加入 1.5mL 0.5% 水杨酸苷柠檬酸缓冲液，并向 1 号试管中加入 1.5mL DNS 溶液以钝化酶活性，作为空白对照，比色时调零用。将 4 支试管同时在 50℃ 水浴中预热 5~10min，再各加入酶液 0.5mL，50℃ 水浴中保温 30min，取出后立即向 2、3、4 号试管中各加入 1.5mL DNS 溶液以终止酶反应，充分摇匀后沸水浴 5min，取出冷却后用蒸馏水定容至 20mL，充分混匀。以 1 号试管溶液为空白对照调零点，在 540nm 波长下测定 2、3、4 号试管液的光密度值并记录结果。

根据 3 个重复光密度的平均值，在标准曲线上查出对应的葡萄糖含量，按下式计算出  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶活力 (U/g)。在上述条件下，每小时由底物生成 1mmol 葡萄糖所需的酶量定义为一个酶活力单位 (U)。

$$\hat{A} \text{ 葡萄糖苷酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times \text{酶液定容总体积 (mL)} \times 5.56}{\text{反应液中酶液加入量 (mL)} \times \text{样品重 (g)} \times \text{时间 (h)}}$$

## 五、结果计算

### 1. 葡萄糖 (G) 标准曲线的制作 (表 2)

表 2 标准曲线测定数据列表

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖含量(mg)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
光密度(OD <sub>540nm</sub> )	0							

根据表中数值,以葡萄糖(G)含量(mg)为横坐标,以对应的光密度值为纵坐标,在坐标纸上绘制出葡萄糖标准曲线。并在坐标纸的右上角写上实验题目、时间、实验人。

### 2. 滤纸酶活力的测定结果计算 (表 3)

表 3 滤纸酶活力的测定数据列表

管 号	1	2	3	4	三管平均值
光密度(OD <sub>540nm</sub> )	0				
葡萄糖含量(mg)	0				

根据滤纸酶活力公式,计算出滤纸酶活力(U/g):

$$\text{滤纸酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times 100 \text{ (mL)} \times 5.56}{0.5 \text{ (mL)} \times 0.5 \text{ (g)} \times 1 \text{ (h)}}$$

### 3. C<sub>1</sub> 酶活力的测定结果计算 (表 4)

表 4 C<sub>1</sub>酶活力的测定数据列表

管 号	1	2	3	4	三管平均值
光密度值	0				
葡萄糖含量(mg)	0				

根据 C<sub>1</sub> 酶活力公式,计算出 C<sub>1</sub> 酶活力(U/g):

$$C_1 \text{ 酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times 100 \text{ (mL)} \times \text{稀释倍数} \times 5.56 \times 24}{0.5 \text{ (mL)} \times 0.5 \text{ (g)} \times 24 \text{ (h)}}$$

#### 4. C<sub>x</sub> 酶活力的测定结果计算

管 号	1	2	3	4	三管平均值
光密度值	0				
葡萄糖含量 (mg)	0				

根据 C<sub>x</sub> 酶活力公式, 计算出 C<sub>x</sub> 酶活力 (U/g):

$$C_x \text{ 酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times 100 \text{ (mL)} \times 5 \text{ (倍)} \times 5.56}{0.5 \text{ (mL)} \times 0.5 \text{ (g)} \times 0.5 \text{ (h)}}$$

#### 5. Î葡萄糖苷酶活力的测定结果计算

管 号	1	2	3	4	三管平均值
光密度值	0				
葡萄糖含量 (mg)	0				

根据 Î葡萄糖苷酶活力公式, 计算出 Î葡萄糖苷酶活力 (U/g):

$$\text{Î葡萄糖苷酶活力 (U/g)} = \frac{\text{葡萄糖含量 (mg)} \times 100 \text{ (mL)} \times 5.56}{0.5 \text{ (mL)} \times 0.5 \text{ (g)} \times 0.5 \text{ (h)}}$$

### 六、附 注

1. DNS 溶液配制时, 将含 DNS 的 NaOH 溶液加到含酒石酸钾钠的热水溶液中时, 一定要慢倒, 边倒边搅拌, 以防被烫。

2. 纤维素酶液的浓度可根据不同酶制剂的活力而相应调整。如果酶活力高, 酶浓度可小些; 反之, 酶活力低时, 酶浓度则大些。

3. 在测定时, 调零用 1 号管液一定在相应的各管液测定完成后, 方可从比色杯中弃掉。

4. 测定酶活时, 滤纸条和脱脂棉等底物一定要充分浸入在反应液中。

5. 用移液管或加液器加各试剂时, 不能将移液管或取液枪头混用。

### 七、思考题

1. 为什么用产物的生成量来定义酶活单位而不用底物减少量来定义?

2. DNS 为什么能钝化纤维素酶活性?

3. 为什么在测定 C<sub>1</sub> 酶活力和 C<sub>x</sub> 酶活力时, 酶液要稀释?

## 参考答案

1. 因为产物的生成是从无到有的过程,用适当的方法可以很容易、很准确的测出产物产生的多少;而底物的加入量比较大,它的减少量不容易被测出。所以常用产物的生成量来定义酶活单位。

2. 因为在配制 3,5-二硝基水杨酸(DNS)时,加入了氢氧化钠,而使得 3,5-二硝基水杨酸(DNS)试剂的碱性非常强,强碱抑制了纤维素酶的活性,所以 3,5-二硝基水杨酸(DNS)能钝化纤维素酶的活性。

3. 为了确保适当的底物反应浓度,在反应初速度时测出的结果更为精确,所以要找出最适的酶液浓度,而将酶液稀释来测定  $C_1$  酶活力和  $C_x$  酶活力。

( 阚国仕 )

## 实验二十一 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定

植物叶片在衰老过程中发生一系列生理生化变化,如核酸和蛋白质含量下降、叶绿素降解、光合作用降低及内源激素平衡失调等。这些指标在一定程度上反映衰老过程的变化。近来大量研究表明,植物在逆境胁迫或衰老过程中,细胞内自由基代谢平衡被破坏而有利于自由基的产生。过剩自由基的毒害之一是引发或加剧膜脂过氧化作用,造成细胞膜系统的损伤,严重时会导致植物细胞死亡。自由基是具有未配对价电子的原子或原子团。生物体内产生的自由基主要有超氧自由基( $O_2^{\cdot-}$ )、羟自由基( $OH^{\cdot}$ )、过氧自由基(ROD)、烷氧自由基(RO)等。植物细胞膜有酶促和非酶促两类过氧化物防御系统,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和抗坏血酸过氧化物酶(ASA-POD)等是酶促防御系统的重要保护酶。抗坏血酸( $V_C$ )、 $V_E$ 和还原型谷胱甘肽(GSH)等是非酶促防御系统中的重要抗氧化剂。SOD、CAT等活性氧清除剂的含量水平和 $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、 $OH^{\cdot}$ 和 $O_2$ 等活性氧的含量水平可作为植物衰老的生理生化指标。

自 1968 年发现 SOD 后,立刻引起科学界的高度重视,近 40 年来这方面的研究进展非常迅速,它的应用领域日益拓宽,SOD 也有了产品。二十世纪 80 年代后期,我国关于

SOD 的研究及应用也形成了热点,如今已在化妆品添加剂、饮料及医药方面显示了特殊效果。

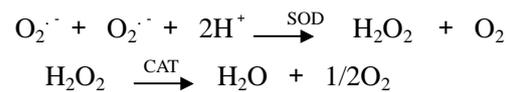
超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 是生物细胞某些生理生化反应常见的中间产物。自由基是本身带有不成对价电子的分子、原子、原子团或离子,化学性质非常活泼,是活性氧的一种。如果细胞中缺乏清除自由基的酶时,机体就会受到各种损伤。超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase),简称 SOD,能通过歧化反应清除生物细胞中的超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ),生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ 。 $H_2O_2$  由过氧化氢酶 (CAT) 催化生成  $H_2O$  和  $O_2$ ,从而减少自由基对有机体的毒害。

### 一、目的

学习和掌握氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 光化还原法测定 SOD 活力的方法和原理,并了解 SOD 的作用特性。

### 二、原理

SOD 是含金属辅基的酶。高等植物含有两种类型的 SOD :Mn - SOD 和 Cu.Zn - SOD ,它们都催化下列反应 :



由于超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 为不稳定自由基,寿命极短,测定 SOD 活性一般为间接方法。并利用各种呈色反应来测定 SOD 的活力。核黄素在有氧条件下能产生超氧自由基负离子  $O_2^{\cdot-}$ ,当加入 NBT 后,在光照条件下,与超氧自由基反应生成单甲脒 (黄色),继而还原生成二甲脒,它是一种蓝色物质,在 560nm 波长下有最大吸收。当加入 SOD 时,可以使超氧自由基与  $H^+$  结合生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,从而抑制了 NBT 光还原的进行,使蓝色二甲脒生成速度减慢。通过在反应液中加入不同量的 SOD 酶液,光照一定时间后测定 560nm 波长下各液光密度值,抑制 NBT 光还原相对百分率与酶活性在一定范围内呈正比,以酶液加入量为横坐标,以抑制 NBT 光还原相对百分率为纵坐标,在坐标纸上绘制出二者相关曲线,根据 SOD 抑制 NBT 光还原相对百分率计算酶活性。找出 SOD 抑制 NBT 光还原相对百分率为 50% 时的酶量作为一个酶活力单位 (U)。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

小麦、玉米、水稻、棉花等新鲜叶片

#### 2. 主要仪器

- (1) 722 型或其他型号的可见分光光度计
- (2) 万分之一分析天平
- (3) 高速冷冻离心机
- (4) 冰箱
- (5) 光照箱：4 500Lux
- (6) 带盖瓷盘 1 个/处理
- (7) 移液管架
- (8) 研钵
- (9) 离心管 5mL 数个
- (10) 微烧杯 10~15mL 8 个/处理
- (11) 移液管或加样器 0.5mL 4；1mL 2；2mL 2；5mL 1
- (12) 微量进样器 50 $\mu$ L 2；100 $\mu$ L 2
- (13) 烧杯 50mL 3；100mL 5；500mL 1；1 000mL 2
- (14) 量筒 50mL 1；100mL 2
- (15) 容量瓶 50mL 1；100mL 5；250mL 1；1 000mL 2
- (16) 细口瓶 125mL 5

### 3. 试剂

- (1) 0.1 mol/L pH7.8 磷酸钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 缓冲液

A 液 (0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液): 准确称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (MW=358.14) 3.5814g 于 100mL 小烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 移入 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容至刻度, 充分混匀。4 冰箱中保存备用。

B 液 (0.1 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液): 准确称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (MW=156.01) 0.780g 于 50mL 小烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 移入 50mL 容量瓶中用蒸馏水定容至刻度, 充分混匀。4 冰箱中保存备用。

取上述 A 液 183mL 与 B 液 17mL 充分混匀后即为 0.1 mol/L pH7.8 的磷酸钠缓冲液。4 冰箱中保存备用。

- (2) 0.026 mol/L 蛋氨酸 (Met) 磷酸钠缓冲液

准确称取 L-蛋氨酸 ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ , MW=149.21) 0.3879g 于 100mL 小烧杯中, 用少量 0.1 mol/L pH7.8 的磷酸钠缓冲液溶解后, 移入 100mL 容量瓶中并用 0.1 mol/L pH7.8 的磷酸钠缓冲液定容至刻度, 充分混匀 (现用现配)。4 冰箱中保存可用 1~2d。

- (3)  $7.5 \times 10^{-4}$  mol/L NBT 溶液

准确称取 NBT ( $\text{C}_4\text{OH}_3\text{OCl}_2\text{N}_1\text{O}_6$ , MW=817.7) 0.1533g 于 100mL 小烧杯中, 用少量蒸馏水溶解后, 移入 250mL 容量瓶中用蒸馏水定容至刻度, 充分混匀 (现配现用)。4

冰箱中保存可用 2~3d。

(4) 含  $1.0 \mu\text{mol/L}$  EDTA 的  $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  核黄素溶液

A 液：准确称取 EDTA (MW=292) 0.00292g 于 50mL 小烧杯中，用少量蒸馏水溶解。

B 液：准确称取核黄素 (MW=376.36) 0.0753g 于 50mL 小烧杯中，用少量蒸馏水溶解。

C 液：合并 A 液和 B 液，移入 100mL 容量瓶中，用蒸馏水定容至刻度，此溶液为含  $0.1 \text{ mmol/L}$  EDTA 的  $2 \text{ mmol/L}$  核黄素溶液。4 冰箱中保存可用 8~10d。该溶液应避光保存，即用黑纸将装有该液的棕色瓶包好，置于 4 冰箱中保存。

当测定 SOD 酶活时，将 C 液稀释 100 倍，即为含  $1.0 \mu\text{mol/L}$  EDTA 的  $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  核黄素溶液。

(5)  $0.05 \text{ mol/L}$  pH7.8 磷酸钠缓冲液

取  $0.1 \text{ mol/L}$  pH7.8 的磷酸钠缓冲液 50mL 移入 100mL 容量瓶中用蒸馏水定容至刻度，充分混匀。4 冰箱中保存备用。

(6) 石英砂。

#### 四、操作方法和步骤

##### 1. 酶液的制备

按每克鲜叶加入 3mL  $0.05 \text{ mol/L}$  pH7.8 磷酸钠缓冲液，加入少量石英砂，于冰浴中的研钵内研磨成匀浆，定容到 5mL 刻度离心管中，于  $8500 \text{ r/min}$  ( $10000g$ ) 冷冻离心 30min，上清液即为 SOD 酶粗提液。

##### 2. 酶活力的测定

每个处理取 8 个洗净干燥好的微烧杯编号，按表 1 加入各试剂及酶液，反应系统总体积为 3mL。其中 4~8 号杯中磷酸钠缓冲液量和酶液量可根据试验材料中酶液浓度及酶活力进行调整（如酶液浓度大、活性强时，酶用量适当减少）。

各试剂全部加入后，充分混匀，取 1 号微烧杯置于暗处，作为空白对照，比色时调零。其余 7 个微烧杯均放在温度为  $25^\circ\text{C}$ ，光强为  $4500 \text{ Lux}$  的光照箱内（安装有 3 根 20W 的日光灯管）照光 15min，然后立即遮光终止反应。在  $560 \text{ nm}$  波长下以 1 号杯液调零，测定各杯液光密度并记录结果。以 2、3 号杯液光密度的平均值作为抑制 NBT 光还原率 100%，根据其他各杯液的光密度分别计算出不同酶液量的各反应系统中抑制 NBT 光还原的相对百分率。以酶液用量为横坐标，以抑制 NBT 光还原相对百分率为纵坐标，作出二者相关曲线。找出 50% 抑制率的酶液量 ( $\mu\text{L}$ ) 作为一个酶活力单位 (U)。

表 1 反应系统中各试剂及酶液的加入量 (mL)

试剂 杯号	试剂 (5)	试剂 (2)	试剂 (3)	酶液	试剂 (4)
1	0.9	1.5	0.3	0	0.3
2	0.9	1.5	0.3	0	0.3
3	0.9	1.5	0.3	0	0.3
4	0.85	1.5	0.3	0.05	0.3
5	0.80	1.5	0.3	0.10	0.3
6	0.75	1.5	0.3	0.15	0.3
7	0.70	1.5	0.3	0.20	0.3
8	0.65	1.5	0.3	0.25	0.3

## 五、结果计算

### 1. 560nm 波长下各杯液的光密度 (表 2)

表 2 测定数据列表

杯号	1	2	3	4	5	6	7	8	2、3号平均值
酶液量 (mL)	0	0	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	
光密度(OD <sub>560nm</sub> )	0								
抑制率 (%)		100	100						100

以酶液加入量为横坐标，以抑制 NBT 光还原相对百分率为纵坐标，在坐标纸上绘制出二者相关曲线。找出 50%抑制率的酶液量 (μL) 作为一个酶活力单位 (U)。

### 2. SOD 酶活力按下式计算

$$A = \frac{V \times 1000 \times 60}{B \times W \times T}$$

式中各因子代表内容如下：

A：为酶活力 (酶活力单位：U/g (FW) · h)；

V：为酶提取液总体积 (mL)；

B：为一个酶活力单位的酶液量 (μL)；

- W：为样品鲜重 (g)；  
 T：为反应时间 (min)；  
 1 000：为 1mL = 1 000 $\mu$ L；  
 60：为 1h = 60min。  
 3. 抑制率按下式计算

$$\text{抑制率} = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100\%$$

式中各因子代表内容如下：

- D<sub>1</sub>：为 2、3 号杯液的光密度平均值；  
 D<sub>2</sub>：为加入不同酶液量的各杯液的光密度值。

注：有时因测定样品的数量多，每个样品均按此法测定酶活力工作量将会很大，也可每个样品只测定 1 个或 2 个酶液用量的光密度值，按下式计算酶活力。

$$A = \frac{(D_1 - D_2) \times V \times 1000 \times 60}{D_1 \times B \times W \times T \times 50\%}$$

式中各因子代表如下：

- D<sub>1</sub>：为 2、3 号杯液的光密度平均值；  
 D<sub>2</sub>：为测定样品酶液的光密度；  
 50%：为抑制率 50%；

其它各因子代表的内容与上述 SOD 酶活力计算公式的各因子代表的内容相同。

## 六、注意事项

1. 富含酚类物质的植物（如茶叶）在匀浆时产生大量的多酚类物质，会引起酶蛋白不可逆沉淀，使酶失去活性，因此在提取此类植物 SOD 酶时，必须添加多酚类物质的吸附剂，将多酚类物质除去，避免酶蛋白变性失活，一般在提取液中加 1~4% 的聚乙烯吡咯烷酮（PVP）。

2. 测定时的温度和光化反应时间必须严格控制一致。为保证各微烧杯所受光强一致，所有微烧杯应排列在与日光灯管平行的直线上。

## 七、思考题

1. 为什么 SOD 酶活力不能直接测得？
2. 超氧自由基为什么能对机体活细胞产生危害，SOD 酶如何减少超氧自由基的毒害？

## 参考答案

1. 由于超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 为不稳定自由基, 寿命极短, 反应过程不易控制, 测定的结果也不精确, 所以测定 SOD 活性一般采用间接方法。

2. 自由基是具有未配对价电子的原子或原子团, 化学性质非常活泼, 是活性氧的一种。植物在逆境胁迫或衰老过程中, 细胞内自由基代谢平衡被破坏而有利于自由基的产生。过剩自由基的毒害之一是引发或加剧膜脂过氧化作用, 造成细胞膜系统的损伤, 严重时会导致植物细胞死亡。超氧自由基是生物细胞某些生理生化反应常见的中间产物, 如果细胞中缺乏清除自由基的酶, 机体就会受到各种损伤。SOD 则能通过歧化反应清除生物细胞中的超氧自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ), 生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,  $H_2O_2$  由过氧化氢酶 (CAT) 催化生成  $H_2O$  和  $O_2$ , 从而减少自由基对有机体的毒害。

( 阚国仕 )

## 实验二十二 过氧化物酶活性的测定

### 一、目的

过氧化物酶广泛存在于植物体中, 是活性较高的一种酶。它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系。在植物生长发育过程中它的活性不断发生变化。一般老化组织中活性较高, 幼嫩组织中活性较弱。这是因为过氧化物酶能使组织中所含的某些碳水化合物转化成木质素, 增加木质化程度, 而且发现早衰减产的水稻根系中过氧化物酶的活性增加, 所以过氧化物酶可作为组织老化的一种生理指标。此外, 过氧化物同工酶在遗传育种中的重要作用也正在受到重视。

通过本实验学习并掌握过氧化物酶活性测定的原理及方法。

### 二、原理

过氧化物酶催化过氧化氢氧化酚类的反应, 产物为醌类化合物, 此化合物进一步缩合或与其他分子缩合, 产生颜色较深的化合物。本实验以邻甲氧基苯酚 (即愈创木酚) 为过氧化物酶的底物, 在此酶存在下,  $H_2O_2$  可将邻甲氧基苯酚氧化成红棕色的 4-邻甲氧基苯酚,

其反应为：



红棕色的物质可用分光光度计在 470nm 处测定其消光值，即可求出该酶的活性。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 材料

水稻根系，马铃薯块茎等。

#### 2. 仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 移液管
- (3) 离心机 (4 000r/min)
- (4) 秒表
- (5) 研钵
- (6) 天平

#### 3. 药品

- (1) 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.5)

取 12.114g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，加水稀释，用 HCl 调 pH8.5 后定容 1 000mL。

- (2) 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0)

贮备液 A：0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液 (27.8g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 配成 1 000mL)。

贮备液 B：0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液 (53.65g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 或 71.7g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 配成 1 000mL)。

分别取贮备液 A 87.7mL 与贮备液 B 12.3mL 充分混匀并稀释至 200mL。

- (3) 反应混合液

取 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.0) 50mL，过氧化氢 0.028mL，愈创木酚 0.019mL 混合。

#### 四、操作步骤

1. 酶液提取：取不同水稻根系（根系表面水分吸干）1g，剪碎置于研钵中，加 5mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH8.5），研磨成匀浆，以 4 000r/min 离心 5min，倾出上清液，必要时残渣再用 5mL 缓冲液提取一次，合并两次上清液，保存在冰箱（或冷处）备用。

2. 取光径 1cm 比色杯 2 个，向其中之一加入上述酶液 1mL（如酶活性过高可稀释之），再加入反应混合液 3mL，立即开启秒表记录时间；而向另一比色杯中加入 0.2 mol/L 磷酸缓冲液（pH6.0），作为零对照。用分光光度计在 470nm 波长下测定反应 5min 时的光密度值。

#### 五、结果计算

以每分钟光密度变化（以每分钟  $OD_{470nm}$  变化 0.01 为 1 个活力单位）表示酶活性大小，即

$$\text{过氧化物酶活力} = \frac{OD_{470nm}}{\text{min} \quad \text{mg (FW)}}$$

#### 六、附注

1. 酶的提取纯化需在低温下进行。

#### 七、思考题

1. 试述酶活力的定义？
2. 测定酶的活力要注意控制哪些条件？

#### 参考答案

1. 过氧化物酶活力是以每分钟光密度变化（ $OD_{470nm}$  变化）0.01 为 1 个活力单位来表示酶活性大小的。

2. 酶的活力测定时：（1）保持待测材料的酶活；（2）测定时注意控制反应时间；

（钟鸣）

## 实验二十三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离过氧化物同工酶

### 一、目的

同工酶是指能催化同一种化学反应，但其酶蛋白本身的分子结构组成却有所不同的一组酶。研究表明，植物在发育过程中，所合同工酶的种类和比例都不相同，它们与植物的遗传、生长发育、代谢调节及抗性等都有一定关系，因此作为基因表达的产物，测定同工酶谱是认识基因存在和表达的一种工具，在植物的种群、发育及杂交遗传的研究中有重要的意义。

过氧化物酶是植物体内普遍存在的、活性较高的一种酶。它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系。在植物生长发育过程中它的活性不断发生变化，测定这种酶的活性或其同工酶，可以反映某一时期植物体内代谢的变化。

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定同工酶，方法简便，灵敏度高，重现性强，测定结果便于观察、记录和保存。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术，分离小麦幼苗过氧化物酶同工酶，根据酶的生物化学反应，通过染色方法显示出酶的不同区带，以鉴定小麦幼苗过氧化物酶同工酶。

通过本实验要掌握电泳技术的原理、方法、装置、凝胶配制等知识，熟悉主要的操作过程，同时对同工酶有一个感性的认识。

### 二、原理

#### 1. 电泳

带电粒子在电场中向与其自身带相反电荷的电极移动，这种现象称为电泳。近几十年来，电泳作为一项有效的分析、分离和制备技术发展很快，在生产、科研和医疗工作中得到了广泛应用。用电泳技术分离、分析蛋白质、酶、核酸等生物大分子，有较高的分辨率，目前已成为生物科学研究中必不可少的手段之一。

#### 2. 影响电泳的主要因素

若将带净电荷  $q$  的粒子放入电场，则该粒子所受到的引力  $F_{引}$  可用数学式表示如下：

$$F_{引} = E \cdot q \quad (1)$$

式中  $E$  为电场强度，单位为“ $v/cm$ ”，表示电场中单位距离上的电位差。

如果这种情况发生在真空中，则带电粒子会朝着电极加速前进并且最后与电极相撞。但在溶液中，由于电场的牵引力  $F_{引}$  与加速运动的粒子和溶液之间产生的阻力（即摩擦力） $F_{阻}$  相对抗。故上述现象不会发生。根据 Stokes 公式，阻力的大小取决于粒子的大小和形状以及所在介质的粘度：

$$F_{阻} = 6 \pi \eta r v \quad (2)$$

式中  $F_{阻}$  是球形粒子所受的阻力， $r$  是球形粒子的半径， $\eta$  是溶液的粘度， $v$  是粒子移

动的速度。在溶液中，由电场而产生的加速力被阻力所对抗，因此，

$$E q = 6 \pi \eta r v \quad (3)$$

将(3)式整理得：

$$v = \frac{E q}{6 \pi \eta r} \quad (4)$$

由此可以看出，粒子移动的速度（ $v$ ）与电场强度（ $E$ ）和粒子所带电荷量（ $q$ ）成正比，而与粒子的大小（ $r$ ）和溶液的粘度（ $\eta$ ）成反比。非球形粒子（如 DNA）在电泳过程中会受到更大的阻力，即粒子的移动速度还与粒子形状有关。

既然在一定 pH 条件下，每一分子都具有特殊的电荷（种类与数量）、大小和形状，在一定的时间内它在相同的电场中便应集中到特定的位置上而形成紧密的泳动带。这就是带电粒子可以用电泳技术进行分离、分析、鉴定的基本原理。

由于带电粒子的泳动速度受电场强度影响，使得同一带电粒子在不同电场里泳动速度不同。为了便于比较，常用迁移率（或称泳动度）代替泳动速度表示粒子的泳动情况。迁移率（泳动度）的定义为“带电粒子在单位电场强度下的泳动速度”，若以  $m$  表示迁移率，则

$$m = \frac{v}{E} \quad (5)$$

将(4)式代入(5)式，得

$$m = \frac{\frac{E q}{6 \pi \eta r}}{E} = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (6)$$

由(6)式可以看出，迁移率（泳动度）仅与球形粒子所带电荷的数量，粒子大小及溶液粘度有关，而与电场强度无关。由于氨基酸、蛋白质、酶等的电离度  $\alpha$  随溶液 pH 变化而不同，所以实际上常使用有效迁移率。有效迁移率  $u$  为迁移率  $m$  和当时条件下电离度  $\alpha$  的乘积。即：

$$u = m \alpha \quad (7)$$

将(6)式代入(7)式，得：

$$u = \frac{q \alpha}{6 \pi \eta r} \quad (8)$$

由(8)式可以看出，凡能影响溶液粘度的因素如温度，影响分子带电量  $q$  及解离度  $\alpha$  的因素如 pH 的改变，都会对有效迁移率产生影响。因此，电泳应尽可能在恒温条件下进行。并选用一定 pH 的缓冲液。同时，所选用的 pH 以能扩大各种被分离物质所带电荷量的差异为好，以利于分离各种成分。

以上讨论的基本上是在溶液中进行的自由电泳的情况。在支持介质中进行的各种电泳，除以上因素影响外，有效迁移率还受电渗现象的影响。所谓电渗是指在电场中，液体

对于固体支持物的相对移动。例如在纸电泳中，由于滤纸（纤维素）上带有负电荷，因感应相吸而使与滤纸相接触的水溶液带正电荷，从而使液体向负极移动，带着本来是向正极泳动的物质以更快的速度移动。因此，电泳时应避免用高电渗物质作支持介质。

最后要考虑选用离子强度适宜的溶液。一般最适的离子强度在 0.02 ~ 0.2 之间。在稀溶液中，离子强度 可用下式计算：

$$= \frac{1}{2} \sum m_i Z_i^2 \quad (9)$$

(9)式中， $m_i$  为离子的克分子浓度， $Z_i$  为离子的价数。

### 3. 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶电泳是以聚丙烯酰胺凝胶作为载体的一种区带电泳。这种凝胶是以丙烯酰胺单体 (Acrylamide, 简称为 Acr) 和交联剂 N, N'-甲叉双丙烯酰胺 (N, N'-Methylene Bisacrylamide, 简称为 Bis) 在催化剂的作用下聚合而成的。

Acr 和 Bis 在它们单独存在或混合在一起时是稳定的，且具有神经毒性，操作时应避免接触皮肤。但在具有自由基团体系时，它们聚合。引发产生自由基的方法有两种，即化学法和光化学法。

化学聚合的引发剂是过硫酸铵  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Ammonium persulfate, 简称为 Ap), 催化剂是 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine, 简称为 TEMED)。在催化剂 TEMED 的作用下，由过硫酸铵 (Ap) 形成的自由基又使单体形成自由基，从而引起聚合作用。TEMED 在低 pH 时失效，会使聚合作用延迟；冷却也可使聚合速度变慢；一些金属抑制聚合；分子氧阻止链的延长，妨碍聚合作用。这些因素在实际操作时都应予以控制。

光聚合以光敏感物核黄素 (即  $V_{B2}$ ) 作为催化剂，在痕量氧存在下，核黄素经光解形成无色基，无色基被氧再氧化成自由基，从而引起聚合作用。过量的氧会阻止链长的增加，应避免过量氧的存在。

光聚合形成的凝胶孔径较大，而且随着时间的延长而逐渐变小，不太稳定，所以用它制备大孔径的浓缩胶较为合适。采用化学聚合形成的凝胶孔径较小，而且重复性好，常用来制备分离胶。

聚丙烯酰胺的基本结构，为丙烯酰胺单位构成的长链，链与链之间通过甲叉桥联结在一起。链的纵横交错，形成三维网状结构，使凝胶具有分子筛性质。网状结构还能限制蛋白质等样品的扩散运动，使凝胶具有良好的抗对流作用。此外，长链上富含酰胺基团，使其成为稳定的亲水凝胶。该结构中不带电荷，在电场中电渗现象极为微小。这些特点，使得聚丙烯酰胺适合作区带电泳的支持介质。

聚丙烯酰胺凝胶的质量主要由凝胶浓度和交联度决定。每 100ml 凝胶溶液中含有的单体 (Acr) 和交联剂 (Bis) 总克数称为凝胶浓度，用 T% 表示。凝胶溶液中，交联剂 (Bis) 占单体 (Acr) 和交联剂 (Bis) 总量的百分数称为交联度，用 C% 表示。改变凝胶浓度以

便适应各种样品的分离。一般常用 7.5% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质，而用 2.4% 的分离核酸。但根据蛋白质与核酸分子量不同，适用的浓度也不同（见表 1）。

表 1 凝胶浓度选用表

物 质	分 子 量 范 围	适用的凝胶浓度(%)
蛋 白 质	$< 10^4$	20 ~ 30
	1 $10^4 \sim 4 \times 10^4$	15 ~ 20
	4 $10^4 \sim 1 \times 10^5$	10 ~ 15
	1 $10^5 \sim 5 \times 10^5$	5 ~ 10
	$> 5 \times 10^5$	2 ~ 5
核 酸	$< 10^4$	15 ~ 20
	$10^4 \sim 10^5$	5 ~ 10
	$10^5 \sim 2 \times 10^6$	2 ~ 2.6

#### 4. 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳的原理

系统的不连续性表现在以下几个方面：

(1) 凝胶板由上、下两层胶组成，两层凝胶的孔径不同。上层为大孔径的浓缩胶，下层为小孔径的分离胶。

(2) 缓冲液离子组成及各层凝胶的 pH 不同。本实验采用碱性系统。电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液，浓缩胶为 pH6.7 的 Tris-HCl 缓冲液。而分离胶为 pH8.9 的 Tris-HCl 缓冲液。

(3) 在电场中形成不连续的电位梯度。在这样一个不连续的系统里，存在三种物理效应，即电荷效应、分子筛效应和浓缩效应。在这三种效应的共同作用下，待测物质被很好地分离开来。下面以本实验要分离的小麦苗过氧化物酶同工酶为例，分别说明三种效应的作用：

(1) 电荷效应：各种酶蛋白按其所带电荷的种类及数量，在电场作用下向一定电极，以一定速度泳动。

(2) 分子筛效应：分子量小，形状为球形的分子在电泳过程中受到阻力较小，移动较快；反之，分子量大、形状不规则的分子，电泳过程中受到的阻力较大，移动较慢。这种效应与凝胶过滤过程中的情况不同。

(3) 浓缩效应：待分离样品中的各组分在浓缩胶中会被压缩成层，而使原来很稀的样品得到高度浓缩。其原因如下：

由于两层凝胶孔径不同，酶蛋白向下移动到两层凝胶界面时，阻力突然加大，速度变慢。使得在该界面处的待分离酶蛋白区带变窄，浓度升高。

在聚丙烯酰胺凝胶中，虽然浓缩胶和分离胶用的都是 Tris-HCl 缓冲液，但上层浓缩胶为 pH 6.7，下层分离胶为 pH 8.9。HCl 是强电解质，不管在哪层胶中，HCl 几乎都全

部电离，Cl<sup>-</sup>布满整个胶板。待分离的酶蛋白样品加在样品槽中，浸在 pH8.3 和 Tris-甘氨酸缓冲液中。电泳一开始，有效泳动率最大的 Cl<sup>-</sup> 迅速跑到最前边，成为快离子（前导离子）。在 pH6.7 条件下解离度仅有 0.1 ~ 1% 的甘氨酸（pI = 6.0）有效泳动率最低，跑在最后边，成为慢离子（尾随离子）。这样，快离子和慢离子之间就形成了一个不断移动的界面。在 pH6.7 条件下带有负电荷的酶蛋白，其有效泳动率介于快慢离子之间，被夹持分布于界面附近，逐渐形成一个区带。

由于快离子快速向前移动，在其原来停留的那部分地区成了低离子浓度区，即低电导区。因为电位梯度 V、电流强度 I 和电导率 S 之间有如下关系：

$$V = \frac{I}{S}$$

所以在电流恒定条件下低电导区两侧就产生了较高的电位梯度。这种在电泳开始后产生的高电位梯度作用于酶蛋白和甘氨酸慢离子加速前进，追赶快离子。本来夹在快慢离子之间的酶蛋白区带，在这个追赶中被逐渐地压缩聚集成一条更为狭窄的区带。这就是所谓的浓缩效应。在此区带中，各种酶蛋白又按其电荷而分成不同层次，在进入分离胶前被初步分离，形成若干条离得很近但又不同的“起跑线”。

当酶蛋白和慢离子都进入分离胶后，pH 从 6.7 变为 8.9，甘氨酸解离度剧增，有效迁移率迅速加大，从而赶上并超过所有酶蛋白分子。此时，快慢离子的界面跑到被分离的酶蛋白之前，不连续的高电位梯度不再存在。于是，此后的电泳过程中，酶蛋白在一个均一的电位梯度和 pH 条件下，仅按电荷效应和分子筛效应而被分离。与连续系统相比，不连续系统的分辨率大大提高，因此已成为目前广泛使用的分离分析手段。

### 三、实验材料、仪器和试剂

#### 1. 实验材料

小麦幼苗

#### 2. 仪器

- (1) 垂直板电泳槽及附件（玻璃板、硅胶条、梳子、导线等）
- (2) 稳压稳流直流电泳仪
- (3) 高速离心机（10 000r/min）
- (4) 量筒：500mL 1，10mL 1，5mL 1
- (5) 烧杯：250mL 4
- (6) 微量注射器（50 $\mu$ L）
- (7) 其他：玻棒、大培养皿等

#### 2. 试剂

贮液配制方法见表 2。

表 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳贮液配制方法

序号	试剂名称	配制方法
1	1.5% 琼脂	1.5g 琼脂, 100mL pH8.9 分离胶缓冲液浸泡, 用前加热溶化。
2	分离胶缓冲液, pH8.9 (pH8.9 Tris-HCl 缓冲液)	取 48 mL 1mol/L HCl, Tris36.8g, 用无离子水溶解后定容至 100 mL。
3	浓缩胶缓冲液, pH6.7 (pH6.7 Tris-HCl 缓冲液)	取 48 mL 1 mol/L HCl, Tris 5.98g, 用无离子水溶解后定容至 100 mL。
4	分离胶丙胶贮液 (Acr-Bis 贮液)	Acr 28.0g, Bis 0.735g, 用无离子水溶解后定容至 100 mL, 过滤除去不溶物, 装入棕色试剂瓶, 4℃ 保存。
5	浓缩胶丙胶贮液 (Acr-Bis 贮液)	Acr 10g, Bis 2.5g, 用无离子水溶解后定容至 100 mL, 过滤除去不溶物, 装入棕色试剂瓶, 4℃ 保存。
6	10% 过硫酸铵溶液 (Ap)	10g 过硫酸铵溶于 100 mL 无离子水中(当天配制)。
7	四甲基乙二胺 (TEMED)	原液。
8	核黄素溶液	核黄素 4.0mg, 无离子水溶解后定容至 100mL。
9	电极缓冲液, pH8.3 (pH8.3 Tris-甘氨酸缓冲液)	Tris 6 g, 甘氨酸 28.8 g, 溶于无离子水后定容至 1 000 mL, 用时稀释 10 倍。
10	40% 蔗糖溶液	蔗糖 40 g, 溶于 100 mL 无离子水中。
11	pH4.7 乙酸缓冲液	乙酸钠 70.52 g, 溶于 500 mL 蒸馏水中再加 36 mL 冰乙酸, 蒸馏水定容至 1 000 mL。
12	7% 乙酸溶液	19.4 mL 36% 乙酸稀释至 100 mL。
13	样品提取液, pH8.0 (pH8.0 Tris-HCl 缓冲液)	Tris 12.1 g, 加无离子水 1 000 mL, 以 HCl 调节 pH 至 8.0
14	0.5% 溴酚蓝溶液	0.5 g 溴酚蓝溶于 100 mL 无离子水中。
15	联大茴香胺染色液	联大茴香胺 250 mg 溶于 140 mL 95% 乙醇中, 加 20 mL 蒸馏水, 使用前加 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4 ~ 5 mL (当天配制)

#### 四、操作步骤

##### 1. 贮液配制

按上表配制贮液, 但应注意

- (1) 配好的贮液用棕色瓶盛装置冰箱内保存, 可放 1~2 个月。
- (2) 过硫酸铵应当天配制。
- (3) 如有不溶物要过滤。
- (4) 显色液用前再混和。
- (5) 电极缓冲液用时稀释 10 倍。

##### 2. 电泳槽的安装

垂直板电泳槽的式样很多, 目前流行的是用有机玻璃做的两个“半槽”组成的方形电

泳槽,中间夹着凝胶模子,是由成套的两块玻璃板装入一个用硅酮橡胶做成的模套而构成,由硅酮橡胶套决定两玻璃板之间距离约为 1.5mm,形成一个“胶室”,胶就在这两板之间的胶室内聚合成平板胶。当凝胶模子与两半槽固定在一起后,凝胶槽子两侧形成前后两个槽,供装电极缓冲液和冷凝管用。

将两块玻璃板用去污剂洗净,再用蒸馏水冲洗,直立干燥(勿用手指接触玻璃板面,可用手夹住玻璃板的两旁操作),然后正确放入硅胶条中,夹在电泳槽里,按对角线顺序旋紧螺丝,注意用力均衡以免夹碎玻璃板。安装好电泳槽用 pH8.9 缓冲液配制的 1.5% 琼脂溶液封底,待琼脂凝固后即可灌制凝胶。

### 3. 凝胶的制备

将贮液由冰箱取出,待与室温平衡后再配制工作液。

#### (1) 按表 3 比例配制分离胶

表 3 分离胶取样表

贮液号	2	4	6	7	
名称	分离胶缓冲液	分离丙胶	过硫酸铵	TEMED	无离子水
取用量 (mL)	3	6	0.30	0.06	15

注: TEMED 在灌胶前加。

将分离胶沿长玻璃板加入胶室内,小心不要产生气泡,加至距短玻璃板顶端 3cm 处,立即覆盖 2~3mm 的水层(或水饱和正丁醇),静置待聚合(约 40min),当胶与水层的界面重新出现时表明胶已聚合。

#### (2) 按表 4 比例配制浓缩胶

表 4 浓缩胶取样表

贮液号	3	5	7	8	
名称	浓缩胶缓冲液	浓缩丙胶	TEMED	核黄素溶液	蔗糖
取用量 (mL)	1	2	0.03	1	4

注: TEMED 在灌胶前加。

先倒掉分离胶上的水层,立即加入浓缩胶,插入梳子(即样品槽模板),待胶凝后,小心取出梳子。将稀释 10 倍的电极缓冲液倒入两槽中,前槽(短板侧)缓冲液要求没过样品槽,后槽(长板侧)缓冲液要求没过电极,备用。

### 4. 样品的制备

称取小麦幼苗茎部 0.5 g,放入研钵内,加 pH 8.0 提取液 1 mL,于冰水浴中研成匀浆,然后以 2 mL 提取液分几次洗入离心管,在高速离心机上以 8 000r/min 离心 10min,倒出上清液,以等量 40% 蔗糖及 1/5 体积溴酚蓝指示剂混和,留作点样用。

### 5. 点样

用微量注射器（50 $\mu$ L）吸取少量样液，在浓缩胶上层点样，每个点样槽 15~50 $\mu$ L。点样时须小心，防止样品液的扩散。

#### 6. 电泳

将电泳槽放入冰箱，接好电源线（前槽为负极）。打开电源开关，调节电流到 20mA 左右，样品进入到分离胶后加大到 30mA，维持恒流。待指示染料下行到距胶板末端 1cm 处，即可停止电泳。把调节旋钮调至零，关闭电源，电泳约 3h。

#### 7. 剥胶

取出电泳胶板，去掉胶套，掀开玻璃，去掉浓缩胶，用玻棒协助将分离胶放到盛有 pH4.7 的乙酸缓冲液的大培养皿中浸泡 10min。

#### 8. 染色、记录结果

倒去乙酸缓冲液，加联大茴香胺染色液，使淹没整个胶板，于室温下显色 20min，即得到过氧化物酶同工酶的红褐色酶谱。该酶活性染色过程如下：过氧化物酶分解  $H_2O_2$  产生羟基，后者使联大茴香胺发生反应生成褐色化合物。所以用染色液浸泡凝胶时，有过氧化物酶同工酶蛋白质条带的部位便出现褐色的谱带。

倒掉染色液，重新加入 7% 的乙酸溶液，于日光灯下观察记录酶谱，绘图或照相。

### 五、附注

1. 如果室温较高，可适当减少电流，延长电泳时间，或采取降温措施，以免温度过高造成酶活损失。

#### 2. 工业纯丙烯酰胺（Acr）和甲叉双丙烯酰胺（Bis）的纯化方法

##### （1）Acr 的纯化

称取 70g 的 Acr，于 50 溶于 1 000L 三氯甲烷（A.R.）中，趁热过滤，冷至 -20，使结晶，于冷处用布氏漏斗抽滤，用冷的三氯甲烷短时间冲洗，继续抽滤，收集结晶，在真空干燥器中彻底干燥。将白色纯结晶保存于棕色瓶中，熔点为 84.5 $\pm$ 0.3。

##### （2）Bis 的纯化

称取 12g 的 Bis 溶于 40~50 的 1 000L 丙酮（A.R.）中，趁热过滤，慢慢冷至 -20，于冷处过滤或离心收集结晶。用冷丙酮洗涤后，真空干燥。白色结晶保存于棕色瓶中。

### 六、思考题

1. 电泳要求的基本条件有哪些？
2. 丙烯酰胺凝胶电泳的制胶过程中，哪些因素影响胶的凝聚？
3. 电泳系统的不连续性表现在哪几个方面？存在哪几种物理效应？
4. 简述酶活性染色的过程？

#### 参考答案

1. 电泳的基本条件为：(1) 电泳应尽可能在恒温条件下进行。(2) 选用一定 pH 的缓冲液。同时，所选用的 pH 以能扩大各种被分离物质所带电荷量的差异为好，以利于分离各种成分。(3) 有效迁移率还受电渗现象的影响，电泳时应避免用高电渗物质作支持介质。(4) 选用离子强度适宜的溶液。一般最适的离子强度在 0.02 ~ 0.2 之间。

2. TEMED 在低 pH 时失效，会使聚合作用延迟；冷却也可使聚合速度变慢；一些金属抑制聚合；分子氧阻止链的延长，妨碍聚合作用。这些因素在实际操作时都应予以控制。以光敏感物核黄素 ( $V_{B2}$ ) 作为催化剂进行光聚合时，应避免过量氧的存在。

3. 系统的不连续性表现在以下几个方面：(1) 凝胶板的上、下两层凝胶的孔径不同，上层为大孔径的浓缩胶，下层为小孔径的分离胶。(2) 缓冲液离子组成及各层凝胶的 pH 不同。本实验采用碱性系统。电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液，浓缩胶为 pH6.7 的 Tris-HCl 缓冲液。而分离胶为 pH8.9 的 Tris-HCl 缓冲液。(3) 在电场中形成不连续的电位梯度。在这样一个不连续的系统里，存在三种物理效应，即电荷效应、分子筛效应和浓缩效应。在这三种效应的共同作用下，待测物质被很好地分离开来。

4. 该酶活性染色过程如下：过氧化物酶分解  $H_2O_2$  产生氧基，后者使联大茴香胺发生反应生成褐色化合物。所以用染色液浸泡凝胶时，有过氧化物酶同工酶蛋白质条带的部位便出现褐色的谱带。

(钟鸣)

## 实验二十四 植物组织中蔗糖酶活力的测定

### 一、目的

了解植物组织中提取蔗糖酶的方法，掌握蔗糖酶活力测定的原理。

### 二、原理

本实验以 Nelson 方法测定酶活力，其原理是：蔗糖酶可将非还原性的蔗糖水解为葡萄糖和果糖，而葡萄糖作为还原糖含有的自由醛基，在碱性溶液中将  $Cu^{2+}$  还原，还原糖本身被氧化成羟酸；砷钼酸试剂与氧化亚铜生成蓝色复合物（砷钼蓝），在 510nm 波长下有正比于还原糖浓度的光密度，从而确定蔗糖酶的活力，该法测定的范围为 25~200  $\mu g$ 。

### 三、主要仪器及试剂

## 1. 仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 刻度具塞试管 (20 mL)
- (3) 恒温水浴
- (4) 移液管

## 2. 试剂

- (1) 4mmol/L 葡萄糖 20mL
- (2) 4mmol/L 蔗糖 20mL
- (3) 0.5 mmol/L 蔗糖 200mL
- (4) 0.2 mol/L 乙酸缓冲液 pH 4.5 , 200mL

### (5) Nelson 试剂：

A 试剂 :100mL 溶剂中含  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.5g , $\text{NaHCO}_3$  2.0g , $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20g ,酒石酸钾钠 20g。

B 试剂：100 mL 溶剂中  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  15g , 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 滴。

以 A :B=50 :2 的比例混合即可使用，使用前需在 37℃ 以上溶解，防止溶质析出。

砷钼酸试剂：100 mL 中含钼酸铵 5 g , 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4.2 mL , 砷酸钠 0.6g。

## 四、操作步骤

### 1. 标准曲线制作

- (1) 取 9 个具塞试管，按表 1 加样：

表 1 标准曲线制作取样

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖 (4mmol/L) / ( mL )	0	0.02	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
水 (mL)	1.0	0.98	0.95	0.9	0.85	0.8	0.75	0.7
$\text{OD}_{510\text{nm}}$								

(2) 向每管中加 1mL Nelson 试剂，盖上塞子，置沸水浴中 20 min。冷至室温，向每管中加 1 mL 砷钼酸试剂。

(3) 5 min 后，向每管中加 7mL 蒸馏水，混匀。

(4) 在 510 nm 下测定光密度，以还原糖葡萄糖为横坐标，以  $\text{OD}_{510\text{nm}}$  值为纵坐标，制作标准曲线。

### 2. 酶活力测定

取 2g 小麦苗，加入 2mL 乙酸缓冲液，在冰浴中用研钵研磨成糊状，12 000r/min 离心 10min，留取上清液用于酶活测定。取 2 支具塞刻度试管，向每个试管中加入乙酸缓冲液 0.8ml，0.5 mmol/L 蔗糖溶液 0.2mL，适当稀释的酶液 1mL，以同样处理但不加酶液者为空白对照，室温下放置 10min。然后向每管中加 1mL Nelson 试剂，置沸水浴中 20min。冷却

至室温,向每管中加 1mL 砷钼酸试剂,5min 后,向每管中加 7mL 蒸馏水,510 nm 下比色,测定光密度 OD<sub>510nm</sub>。

## 五、实验结果

活力计算:在室温、pH4.5 条件下,每分钟水解产生 1 μmol 葡萄糖所需的酶量,定义为酶的 1 个活力单位 (U)。

$$\text{酶活力 (U/g)} = \frac{\text{测得还原糖含量} \times n \times V \times 1000}{W \times t}$$

n: 稀释倍数;

V: 酶液的总体积 (mL);

W: 样品重(g);

t: 时间 (10min);

1000: 毫摩尔转化为微摩尔的倍数。

## 六、思考题

1. 为什么蔗糖酶也称为转化酶,它所催化的反应是否可逆?

### 参考答案

1. 蔗糖酶可将蔗糖水解,其产物为葡萄糖和果糖。蔗糖是右旋的,葡萄糖和果糖的混合物是左旋的,即旋光度发生了转变,转化酶因此而得名。该酶所催化的反应是不可逆的,转化酶将蔗糖水解为葡萄糖和果糖,同时释放出大量的热能。

(陈红漫)

# 维生素

## 实验二十五 维生素 A 的含量测定

### 一、目的

学习和掌握维生素 A 的提取和定量测定方法。

### 二、原理

维生素 A 是脂溶性维生素，在氯仿溶液中可与三氯化锑生成不稳定的蓝色，称为 Carr-Price 反应。蓝色溶液在 620nm 处有一吸收高峰。蓝色的深浅与维生素 A 的含量成正比。利用比色法可测知样品维生素 A 含量。由于所生成的蓝色物质不稳定，因而必须在 6 秒内比色完毕。

三氯化锑遇微量水份即可形成氯化锑 ( $\text{SbOCl}$ )，不再与维生素 A 起反应，因此本实验中所使用的仪器及试剂必须绝对干燥。为了吸收可能混入反应液中的微量水份，可向反应液中加 1~2 滴醋酸酐。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

动物肝脏 5~10g (或饲料添加剂 2~5g)

#### 2. 仪器

- (1) 分光光度计
- (2) 索氏抽提器
- (3) 恒温水浴
- (4) 匀浆器
- (5) 刻度吸管 (1mL, 2mL, 5mL, 10mL)
- (6) 球型冷凝器 (磨口, 300mm)
- (7) 分液漏斗 (250mm)

#### 3. 试剂

(1) 无水乙醇 (A.R.): 需经脱醛处理。方法是: 2g  $\text{AgNO}_3$  溶于少量蒸馏水中, 4g NaOH 溶于温乙醇中, 将二者倾入 1000mL 乙醇中, 摇匀, 静置 1~2 天, 取上层乙醇蒸馏。最初 50mL 馏分弃去。收集的馏分应做含醛检查: 取 2mL 氧化银氨溶液 (加浓氨水于 50%  $\text{AgNO}_3$  中, 直至沉淀全部溶解; 加数滴 10% NaOH, 如又有沉淀, 应再加氨水使其溶解), 加几滴蒸出的乙醇, 摇匀, 加少量 10% NaOH, 加热, 如没有银沉淀表示没有醛, 否则将

发生银镜反应。

(2) 乙醚 (A.R.): 不得含有过氧化物, 以免维生素 A 被破坏。过氧化物检验方法: 取 5mL 乙醚, 加 1mL 50% KI, 振荡 1min, 如水层呈黄色或加 1 滴淀粉后显蓝色, 则证明乙醚中含过氧化物, 必须重新蒸馏, 直至无过氧化物。具体方法见本书实验四附注 (5)。

(3) 氯仿 (A.R.): 氯仿分解产物可破坏维生素 A, 检查的方法是: 在试管中加少量氯仿和水, 振荡, 加几滴  $\text{AgNO}_3$  溶液, 如水层出现白色沉淀, 说明氯仿中有分解产物。这时, 可在分液漏斗中加水洗涤氯仿数次, 再加无水硫酸钠脱水蒸馏。

(4) 20% ~ 25% 三氯化锑: 用减量法称取 20 ~ 25g 干燥的三氯化锑, 溶于 100mL 氯仿中, 加少许无水硫酸钠, 贮存于棕色瓶中, 盖严, 尽量避免吸收水分的机会。

(5) 标准维生素 A: 取维生素 A 乙酸酯 0.115g, 溶于 100mL 氯仿中。此液为 1mg/mL 维生素 A 贮备液, 使用时将其稀释为  $1 \mu\text{g/mL}$  维生素 A 的操作液。

(6) 酚酞: 1g 酚酞溶于 100mL 95% 乙醇中。

(7) 80% KOH

(8) 浓氨水 (25% ~ 28%, A.R.)

(9) 无水硫酸 (A.R.)

(10) 焦性没食子酸 (A.R.)

#### 四、操作步骤

##### 1. 样品处理

取匀浆器捣碎的动物肝脏 5 ~ 10g 加水 40mL, 搅匀, 移入分液漏斗中, 加浓氨水 5mL, 乙醇 30mL 摇匀。然后用乙醚抽提, 每次用量为 40mL 共抽提 3 次。收集乙醚层, 醚层用水 (每次 100mL) 洗涤, 共 3 次。将 3 次水层合并, 用 30mL 乙醚抽提一次。合并所有的醚层, 于索氏抽器中除去乙醚。

##### 2. 皂化

向除尽乙醚的瓶中加入 30mL 80% 的氢氧化钾及 40mL 无水乙醇, 0.8g 焦性没食子酸, 83 1 水浴上皂化约 30min。皂化时间因样品而异。检查是否皂化完全, 可向皂化瓶内加少量水, 振摇, 如有混浊现象, 表示皂化不完全, 应继续加热回流, 反之, 则表示皂化已完全。

##### 3. 提取

将皂化液转入分液漏斗中, 加 50mL 水, 以 40mL 乙醚共 3 次提取皂化液。合并乙醚提取液, 并用蒸馏水 (每次 100mL) 洗涤醚层至水呈中性, 弃去水层。醚层定容到一定体积, 并用无水硫酸钠除去水分后进行测定。

##### 4. 挥发除去溶剂

取一定量 (2 ~ 5mL) 醚提取液, 在真空下除去乙醚, 残渣立即加入 5mL 氯仿, 并在刻度具塞试管定容至 10mL。此液供比色测定用。

##### 5. 样品的测定

取 1mL 样品的氯仿液放入光径为 1cm 比色杯中，加 1 滴醋酸酐，另取 1mL 氯仿放入光径为 1cm 比色杯中，加 1 滴醋酸酐作空白对照液。先在空白液比色杯中加 3mL 三氯化铈氯仿液，用细玻璃棒迅速搅拌均匀，立即放入分光光度计中读取光密度。按样品的光密度从标准曲线上查出维生素 A 的含量。

#### 6. 标准曲线的绘制

按表 1 取样，用与样品测定相同的操作，测出各管光密度，以维生素 A 含量为横坐标，光密度为纵坐标，绘制出标准曲线。

表 1 维生素 A 标准曲线制作

管 号	1 μg/ml 维生素 A 标准液 (mL)	氯仿 (ml)	维生素 A 的浓度 (μg/ml)	光密度(OD <sub>620nm</sub> )
1	0	10	0	
2	1.0	9.0	0.1	
3	2.0	8.0	0.2	
4	3.0	7.0	0.3	
5	4.0	6.0	0.4	
6	5.0	5.0	0.5	

### 五、结果与计算

100g 样品中维生素 A 的含量按下式计算：

$$V_A \text{ 含量(mg/100g 样品)} = \frac{C \ D}{W \ 1000} \ 100$$

式中：C 为从标准曲线上查得的 V<sub>A</sub> 浓度 (μg/mL)；

D 为样品稀释倍数；

W 为样品重量 (g)

### 六、附 注

(1) V<sub>A</sub> 极易被阳光破坏，实验中应避免强光照射。

(2) 三氯化铈腐蚀性强，不得用手直接接触。三氯化铈遇水分解，生成白色沉淀，因而全部仪器必须充分干燥。用过的器皿先用稀盐酸浸泡后再清洗。

(3) 为了除去乙醚残留液中的水分而加入无醛乙醇。

(4) 全部操作过程要尽可能迅速，特别是皂化后，维生素 A 在空气中容易氧化，残渣应立即溶于溶剂中。

(5) 最好使用在呈色后能立即测定其吸光度最大值的直读式分光光度计。

(6) 可以用抗坏血酸代替邻苯三酚，用二氯甲烷代替氯仿。

(7) 用三氯醋酸代替三氯化铈作显色剂也可测定维生素 A。

## 七、思考题

1. 样品皂化的目的是什么？
2. 此方法的优缺点是什么？
3. 还有什么方法可以测定维生素 A 的含量？

### 参考答案

1. 皂化的目的是为了去除其它对定量测定有干扰作用的物质。
2. 三氯化锑法很早以前就被广泛用来定量测定维生素 A。对维生素 A 是较灵敏的特异反应，在波长 620nm 处有最大吸收峰。但三氯化锑法显色不稳定，而且样品必须经皂化和萃取以除掉样品中的干扰物质，操作比较麻烦。
3. 可用高压液相色谱法，此法比三氯化锑法快速，简便，准确。此法还能测定维生素 A 棕榈酸酯，维生素 A 乙酸酯和维生素 A 醇，也能分离无水维生素 A。

(杨雪莲)

## 实验二十六 维生素 C 的含量测定

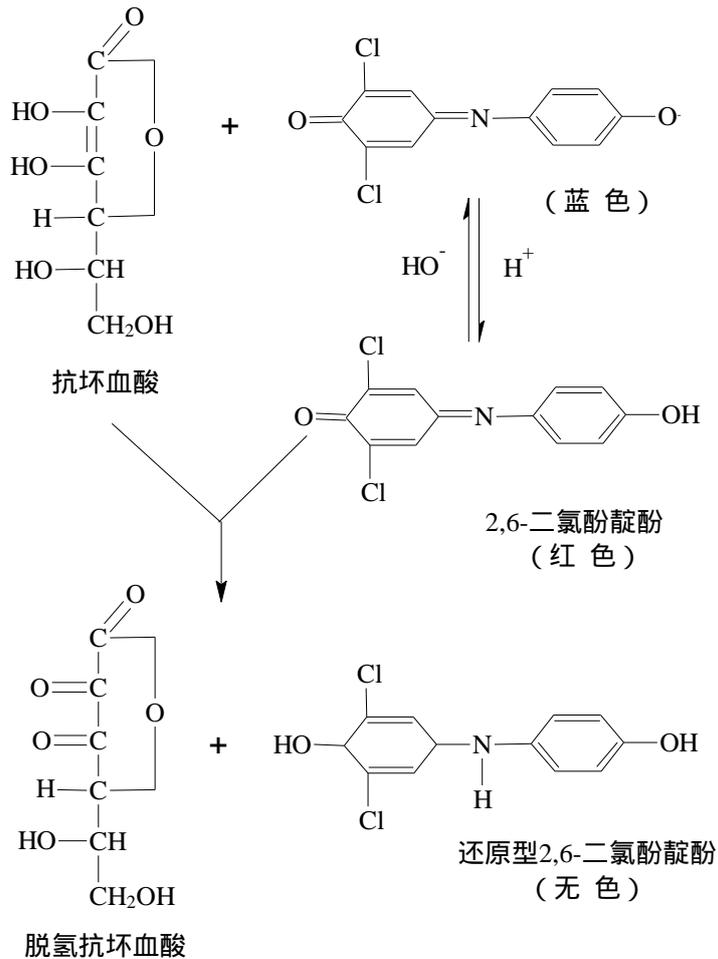
### 一、目的

学习和掌握用 2,6-二氯酚靛酚滴定法测定植物材料中抗坏血酸含量的原理与方法。

### 二、原理

维生素 C 是人类营养中最重要的维生素之一，它与体内其它还原剂共同维持细胞正常的氧化还原电势和有关酶系统的活性。维生素 C 能促进细胞间质的合成，如果人体缺乏维生素 C 时则会出现坏血病，因而维生素 C 又称为抗坏血酸。水果和蔬菜是人体抗坏血酸的主要来源。不同栽培条件、不同成熟度和不同的加工贮藏方法，都可以影响水果、蔬菜的抗坏血酸含量。测定抗坏血酸含量是了解果蔬品质高低及其加工工艺成效的重要指标。

2,6-二氯酚靛酚是一种染料，在碱性溶液中呈蓝色，在酸性溶液中呈红色。抗坏血酸具有强还原性，能使 2,6-二氯酚靛酚还原褪色，其反应如下：



当用 2,6-二氯酚靛酚滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时，滴下的 2,6-二氯酚靛酚被还原成无色；当溶液中的抗坏血酸全部被氧化成脱氢抗坏血酸时，滴入的 2,6-二氯酚靛酚立即使溶液呈现红色。因此用这种染料滴定抗坏血酸至溶液呈淡红色即为滴定终点，根据染料消耗量即可计算出样品中还原型抗坏血酸的含量。

### 三、实验材料、主要仪器和试剂

#### 1. 实验材料

取新鲜水果（蔬菜）样品 50g，加 100g 2%草酸溶液，用组织捣碎机打成匀浆。称取 10g 匀浆，移入 50mL 容量瓶，用 2%草酸定容至刻度，摇匀后静置备用。

#### 2. 仪器

- (1) 天平
- (2) 组织捣碎机

- (3) 容量瓶 (50mL)
- (4) 刻度吸管 (5mL, 10mL)
- (5) 锥形瓶 (100mL)
- (6) 碱式滴定管 (10mL)

### 3. 试剂

- (1) 2% 草酸
- (2) 1% 草酸

(3) 标准抗坏血酸溶液 (0.1mg/mL): 精确称取 50.0mg 抗坏血酸, 用 1% 草酸溶液溶解并定容至 500mL。临用现配。

(4) 0.05% 的 2,6-二氯酚靛酚溶液: 500mg 2,6-二氯酚靛酚溶于 300mL 含 104mg 碳酸氢钠 (A.R) 的热水中, 冷却后再用蒸馏水稀释至 1000mL, 滤去不溶物, 贮棕色瓶内, 4 保存一周有效。滴定样品前用标准抗坏血酸标定。

## 四、操作步骤

1. 2,6-二氯酚靛酚溶液的标定: 准确吸取 4.0mL 抗坏血酸标准液 (含 0.4mg 抗坏血酸) 于 100mL 锥形瓶中, 加 16mL 1% 草酸溶液, 用 2,6-二氯酚靛酚滴至淡红色 (15S 内不褪色即为终点)。记录所用染料溶液的体积 (mL), 计算出 1mL 染料溶液所能氧化抗坏血酸的量 (mg) (记作 T)。

2. 样品滴定: 准确吸取样品提取液 (上清液或滤液) 两份, 每份 20.0mL, 分别放入两个 100mL 锥形瓶中, 按上面的操作进行滴定并记录所用染料溶液体积 (mL)。

## 五、结果计算

取两份样品滴定所用染料体积平均值, 代入下式计算 100g 样品中还原型抗坏血酸的含量:

$$\text{抗坏血酸含量 (mg/100 g 样品)} = \frac{V \quad T \quad G \quad A}{W \quad G_1 \quad A_1} \quad 100$$

式中: V —— 滴定样品提取液消耗染料平均值 (mL)

T —— 每 mL 染料所能氧化抗坏血酸 mg 数

G —— 匀浆总重量 (g)

G<sub>1</sub> —— 制备提取液取用匀浆重量 (g)

A —— 样品提取液定容体积 (mL)

A<sub>1</sub> —— 滴定时吸取样品提取液体积 (mL)

W —— 样品重量 (g)

## 六、附 注

(1) 样品提取液定容时若泡沫过多，可加几滴辛醇或丁醇消泡。

(2) 市售 2,6-二氯酚靛酚质量不一，以标定 0.4mg 抗坏血酸消耗 2mL 左右的染料为宜，可根据标定结果调整染料溶液浓度。

(3) 样品的提取液制备和滴定过程，要避免阳光照射和与铜、铁器具接触，以免抗坏血酸被破坏。

(4) 滴定过程宜迅速，一般不超过 2min。样品滴定消耗染料 1~4mL 为宜，如果超出此范围，应增加或减少样品提取液用量。像番茄、柑桔等维生素 C 含量高的试材，可称取 5g 样品，加少许 2% 草酸研磨，定容到 50mL，再离心或过滤；吸取 20mL 两份，分别滴定，记录消耗的染料量。按下式计算维生素 C 含量。

$$\text{维生素 C 含量 (mg/100 g 样品)} = \frac{V \quad T \quad A}{W \quad A_1} \quad 100$$

式中：V        滴定样品提取液消耗染料平均值 (mL)  
T        每 mL 染料所能氧化抗坏血酸 mg 数  
A        样品提取液定容体积 (50mL)  
A<sub>1</sub>       滴定时吸取样品提取液体积 (20mL)  
W        样品重量 (5g)

## 七、思考题

1. 该法测定抗坏血酸有何不足？
2. 用 2% 草酸提取样品的目的是什么？

### 参考答案

1. 用本法测定抗坏血酸含量虽简便易行，可以一次测定大量的样品。但有下列缺点：第一，本法只能测定还原型抗坏血酸，不能测出具有同样生理功能的氧化型抗坏血酸和结合型抗坏血酸。第二，样品中的色素经常干扰对终点的判断，可预先用白陶土脱色，或加入 2~3ml 二氯乙烷，以二氯乙烷层变红为终点。

2. 用 2% 草酸制备样品提取液，可有效地抑制抗坏血酸氧化酶，以免抗坏血酸为氧化型而无法滴定。如果样品中有较多亚铁离子 (Fe<sup>2+</sup>) 时，亦会使染料还原而影响测定，这时应改为 8% 乙酸制备样品提取液。

( 杨雪莲 )

# 附录

## 附录一 植物样品的采取、处理与保存

生物化学分析的准确性，除取决于分析方法的选择是否合适以及全部分析工作是否严格按照要求进行外，在很大程度上还取决于样品的采取是否有最佳的代表性。如果不遵循科学方法采样，样品缺乏代表性，即使分析工作严谨无误，也得不到正确的结论。因此，必须对样品的采取、处理和保存给予足够的重视。

从大田或实验田采回的样品，一般数量较大，称为“原始样品”。再按原始样品的种类（如根、茎、叶、花、果实等）分别选出“平均样品”。再根据分析任务的要求和样品的特征，从平均样品中选出供分析用的“分析样品”。由此可见，分析样品的获得须经一系列复杂而仔细的步骤，在实际工作中一定要以高度认真负责的态度对待。

### （一）原始样品及平均样品的采取、处理与保存

原始样品及平均样品的采取，按分析目的可有两种方法：一种是为了鉴定品质而进行的混合取样；另一种是按植物生育期取样。

1. 混合取样法：一般种子样品可用混合取样法。把代表一定面积的收获物先经脱粒，然后在木板或牛皮纸上铺成均匀的一层，再按对角线把样品分成4个三角形，取两个相对的三角形的样品，而将另外两个三角形的样品淘汰。如此操作，一直淘汰至所要求的数量为止。这个取样法叫做“四分法”，这样取得的平均样品在实验室经适当处理即可制成分析样品。

豆类及油料种子选取平均样品的方法与谷类种子取样法相同。注意，样品中不要有未成熟的种子或混杂物质，不要将簸出去的种子加到平均样品中。

如果直接从田里采取植株样品，在生长均一的情况下，可按对角线或沿平行的直线等距离采样。如果植株长势不均匀，则应根据生长的强弱，按比例采取大约5个点的样品后混合。每个样点取的植株数随植物的种类和采样的时间有所不同。如小麦等密植型作物或其它作物幼苗，可按面积采取或采取样品束（一束样品的植株数视需要而定），象玉米、甘蔗等作物，每个样点采取一株就够了。

选取甘薯、马铃薯、甜菜、萝卜等块根、块茎的平均样品时，必须注意到大、中、小三类样品的比例。然后纵切取其一部分（二分之一至四分之一）组织作为平均样品，否则就不具有代表性。

一般蔬菜样品也按对角线法采取。番茄样品应选择簇位相同、成熟程度一致的果实，取果实的1/4组成平均样品。

采取苹果、梨、桃、柑橘等水果的平均样品时，一般选1~3株果树为代表，从植株

的全部收获物中选取大、中、小果实以及向阳、背阳部分的果实混合成平均样品。葡萄等浆果，采样时可在不同地点的5~10株植物上的各个部位包括向阳、背阳以及上、下各部位采样。

2. 按生育期取样法：在幼苗期取样，因植株较小，采取的株数就比较多，尽管各种作物有所不同，总的原则是所取样品的干重应当是分析用的2倍。

植株逐渐长大，每次采取的株数也相应减少，但绝不能采单株作样品。在各个生育期取样时，都应作观察记录。

取样地点一般在边行区，取样点的四周不应有缺株现象。

取样后，按分析目的分成各个部分，如根、茎、叶、穗等，然后捆好，附上标签，分别装入样品袋。

瓜果、蔬菜取回后因水分较多，容易霉烂，可在冰箱中冷藏，或用于干燥灭菌，或用酒精处理或烘干，以供分析之用。

## （二）分析样品的处理与保存

采回的新鲜植株样品如果混有泥土，不应用水冲洗，可用湿布擦净，然后置空气流通处风干或烘干。烘干样品时，可把植株放入80℃烘箱中，以停止酶活动并驱除水分。烘干样品时，注意温度不能过高，以免把植株烤焦。最好不要晒，以免灰尘沾染或被风刮走。全植株样品应按照根、茎、叶、种子等分开。果实必须剖出时，要用锋利的不锈钢刀子，不允许将其中汁液流失。

为了避免糖、蛋白质、维生素等成分的损失，可采用真空干燥或冷冻真空干燥法。

风干或烘干的样品，根据其特点分别进行以下处理：

1. 种子样品的处理：一般谷物种子的平均样品可用电动样品粉碎机粉碎。事先要把机器内收拾干净，最初粉碎出的少量样品可弃去不用，然后正式粉碎，使全部样品通过一定筛孔的筛子，混合均匀，按四分法取出一定数量的样品细粉作为分析样品，贮存于干燥的磨口广口瓶中，同时贴上标签，注明样品的名称、编号、采取地点、处理、采样日期和采样人姓名等。长期保存时，标签应涂石蜡，并在样品中加适当的防腐剂。

蓖麻、芝麻等油料种子应取少量样品在研钵内研碎，以免脂类损失。

2. 茎秆样品的处理：干燥后的茎秆样品也要磨碎。粉碎茎秆的粉碎机不同于种子粉碎机，其切割部分由几付排列方向相反的刀片组成。粉碎后的样品按上法保存。

3. 多汁样品的处理：一般多汁样品，如瓜果蔬菜等，其化学成分（糖、蛋白质、维生素等）在保存中易发生变化，往往多用新鲜样品进行各项测定。将它们的平均样品切成小块，放入电动组织捣碎机中打成匀浆，如果样品含水量较少，可按样品重量加入适量水，然后捣碎。样品量少时可用手持匀浆器或在研钵内研磨，必要时可在研钵内加少量石英砂。如果所测物质不稳定（如某些维生素和酶等），则上述操作均应在低温下进行。样品匀浆如来不及测定，可暂存冰箱内，或灭菌后密封保存。

4. 丙酮干粉的制备：在分离、提纯或测定某种酶的活力时，丙酮干粉法是常用的有

效方法之一。该方法是将新鲜材料打成匀浆，放入布氏漏斗，按匀浆重量缓慢加入 10 倍的低温冰箱内冷却到 -15 ~ -20 的丙酮，迅速抽气过滤，再用 5 倍冷丙酮洗 3 次，在室温下放置 1 小时左右至无丙酮气味，然后移到盛有五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备在低温下完成，所提丙酮干粉可长期保存于低温冰箱。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质，还能除掉脂类物质，免除脂类干扰，而且使得某些原先难溶的酶变得溶解于水。

## 附录二 实验室安全及防护知识及其常识

### （一）实验室安全知识

在生物化学实验室中，经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触，常常使用易碎的玻璃和瓷器器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行着紧张而细致的工作，因此，必须十分重视安全工作。

1. 进入实验室开始工作前应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水、电、煤气的开关关好，门窗锁好。

2. 使用煤气灯时，应先将火柴点燃，一手执火柴紧靠近灯口，一手慢开煤气门。不能先开煤气门，后燃火柴。灯焰大小和火力强弱，应根据实验的需要来调节。用火时，应做到火着人在，人走火灭。

3. 使用电器设备（如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等）时，严防触电；绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。应该用试电笔检查电器设备是否漏电，凡是漏电的仪器，一律不能使用。

4. 使用浓酸、浓碱，必须极为小心地操作，防止溅出。用移液管量取这些试剂时，必须使用橡皮球，绝对不能用口吸取。若不慎溅在实验台上或地面，必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤应立即治疗。

5. 使用可燃物，特别是易燃物（如乙醚、丙酮、乙醇、苯、金属钠等）时，应特别小心。不要大量放在桌上，更不要在靠近火焰处。只有在远离火源时，或将火焰熄灭后，才可大量倾倒易燃液体。低沸点的有机溶剂不准在火上直接加热，只能在水浴上利用回流冷凝管加热或蒸馏。

6. 如果不慎倾出了相当量的易燃液体，则应按如下法处理：

（1）立即关闭室内所有的火源和电加热器。

（2）关门，开启小窗及窗户。

（3）用毛巾或抹布擦拭洒出的液体，并将液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

7. 用油浴操作时，应小心加热，不断用温度计测量，不要使温度超过油的燃烧温度。

8. 易燃和易爆物质的残渣（如金属钠、白磷、火柴头）不得倒入污物桶或水槽中，应收集在指定的容器内。

9. 废液，特别是强酸和强碱不能直接倒在水槽中，应先稀释，然后倒入水槽，再用

大量自来水冲洗水槽及下水道。

10. 毒物应按实验室的规定办理审批手续后领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

## (二) 实验室灭火法

实验中一旦发生了火灾切不可惊慌失措，应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电源。然后根据具体情况正确地进行抢救和灭火。常用的方法有：

1. 在可燃液体燃着时，应立即拿开着火区域内的一切可燃物质，关闭通风器，防止扩大燃烧。若着火面积较小，可用抹布、湿布、铁片或沙土覆盖，隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻，避免碰坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃器皿，导致更多的溶剂流出而再着火。

2. 酒精及他可溶于水的液体着火时，可用水灭火。

3. 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应用石棉布或砂土扑灭。绝对不能用水，否则反而会扩大燃烧面积。

4. 金属钠着火时，可把砂子倒在它的上面。

5. 导线着火时不能用水及二氧化碳灭火器，应切断电源或用四氯化碳灭火器。

6. 衣服烧着时切忌奔走，可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动，以灭火。

7. 发生火灾时应注意保护现场。较大的着火事故应立即报警。

附表 1 某些物质燃烧时应选用的灭火剂

燃烧物质	应选用灭火剂	燃烧物质	应选用灭火剂
苯 胺	泡沫, 二氧化碳水	松节油	喷射水, 泡沫
乙 炔	水蒸汽, 二氧化碳	火 漆	水
丙 酮	泡沫, 二氧化碳, 四氯化碳	磷	砂, 二氧化碳, 泡沫, 水
硝基化合物	泡沫	赛路珞	水
氯乙烷	泡沫, 二氧化碳	纤维素	水
钾, 钠, 钙, 镁	砂	橡 胶	水
松 香	水, 泡沫	煤 油	泡沫, 二氧化碳, 四氯化碳
苯	泡沫, 二氧化碳, 四氯化碳	漆	泡沫
重 油	喷射水, 泡沫	蜡	泡沫
润滑油	同上	石 蜡	喷射水, 二氧化碳
植物油	同上	二硫化碳	泡沫, 二氧化碳
石 油	同上	醇 类	水
醚 类	水	(高沸点 175 以上)	
(高沸点 175 以上)		醇 类	泡沫, 二氧化碳
醚 类	泡沫, 二氧化碳	(低沸点 175 以下)	
(低沸点 175 以下)			

### (三) 实验室急救

在实验过程中不慎发生受伤事故，应立即采取适当的急救措施。

1. 受玻璃割伤及其他机械损伤：首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物碎片，然后用硼酸水洗净，再擦碘酒或紫药水，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血，立即到医院诊治。

2. 烫伤：一般用浓的（90%~95%）酒精消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿（一级灼伤），可用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处；若皮肤起泡（二级灼伤），不要弄破水泡，防止感染；铬伤处皮肤呈棕色或黑色（三级灼伤），应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好，急送医院治疗。

3. 强碱（如氢氧化钠，氢氧化钾）钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时，要先用大量自来水冲洗，再用5%乙酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。

4. 强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时，应立即用大量自来水冲洗，再以5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。

5. 如酚触及皮肤引起灼伤，应该用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇。

6. 若煤气中毒时，应到室外呼吸新鲜空气，若严重时应立即到医院诊治。

7. 水银容易由呼吸道进入人体，也可以经皮肤直接吸收而引起积累性中毒。严重中毒的征象是口中有金属气味，呼出气体也有气味；流唾液，牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色；淋巴腺及唾液腺肿大。若不慎中毒时，应送医院急救。急性中毒时，通常用碳粉或呕吐剂彻底洗胃，或者食入蛋白（如1升牛奶加3个鸡蛋清）或蓖麻油解毒并使之呕吐。

8. 触电：触电时可按下述方法之一切断电路：

(1) 关闭电源；

(2) 用干木棍使导线与被害者分开；

(3) 使被害者和土地分离，急救时急救者必须做好防止触电的安全措施，手或脚必须绝缘。

### (四) 实验室常识

1. 挪动干净玻璃仪器时，勿使手指接触仪器内部。

2. 量瓶是量器，不要用量瓶作盛器。带有磨口玻璃塞的量瓶等仪器的塞子，不要盖错。带玻璃塞的仪器和玻璃瓶等，如果暂时不使用，要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

3. 洗净的仪器要放在架上或干净纱布上晾干，不能用抹布擦拭；更不能用抹布擦拭仪器内壁。

4. 除微生物实验操作要求外，不要用棉花代替橡皮塞或木塞堵瓶口或试管口。

5. 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。

6. 不要用滤纸称量药品，更不能用滤纸作记录。

7. 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口，以免掺混。

8. 标签纸的大小应与容器相称，或用大小相当的白纸，绝对不能用滤纸。标签上要写明物质的名称、规格和浓度、配制的日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的2/3处，试管等细长形容器则贴在上部。

9. 使用铅笔写标记时，要在玻璃仪器的磨砂玻璃处。如用玻璃蜡笔或水不溶性油漆

笔，则写在玻璃容器的光滑面上。

10. 取用试剂和标准溶液后，需立即将瓶塞严，放回原处。取出的试剂和标准溶液，如未用尽，切勿倒回瓶内，以免带入杂质。

11. 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味气体的实验，均应在通风橱内进行。橱门应紧闭，非必要不能打开。

12. 用实验动物进行实验时，不许戏弄动物。进行杀死或解剖等操作，必须按照规定方法进行。绝对不能用动物、手术器械或药物开玩笑。

13. 使用贵重仪器如分析天平、比色计、分光光度计、酸度计、冰冻离心机、层析设备等，应十分重视，加倍爱护。使用前，应熟知使用方法。若有问题，随时请指导实验的教师解答。使用时，要严格遵守操作规程。发生故障时，应立即关闭仪器，请告知管理人员，不得擅自拆修。

14. 一般容量仪器的容积都是在 20℃ 下校准的。使用时如温度差异在 5℃ 以内，容积改变不大，可以忽略不计。

#### (五) 玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制法

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否，直接影响实验结果，往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差，甚至会出现相反的实验结果。因此，玻璃仪器的洗涤清洁工作是非常重要的。

##### 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，可先用洗涤剂稀释液、肥皂水或去污粉等洗刷再用自来水洗净，然后浸泡在 1% ~ 2% 盐酸溶液中过夜（不少于 4 小时），再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次，在 80 ~ 100℃ 烘箱内烤干备用。

##### 2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器：如试管、烧杯、锥形瓶等（包括量筒），先用自来水洗刷至无污物；再选用大小合适的毛刷沾取洗涤剂稀释液或浸入洗涤剂稀释液内，将器皿内外（特别是内壁）细心刷洗，用自来水冲洗干净后，蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次，烤干或倒置在清洁处，干后备用。凡洗净的玻璃器皿，不应在器壁上带有水珠，否则表示尚未洗干净，应再按上述方法重新洗涤。若发现内壁有难以去掉的污迹，应分别试用下述各种洗涤剂予以清除，再重新冲洗。

(2) 量器：如移液管、滴定管、量瓶等。使用后应立即浸泡于凉水中，勿使物质干涸。工作完毕后用流水冲洗，去附着的试剂、蛋白质等物质，晾干后浸泡在铬酸洗液中 4 ~ 6 小时（或过夜），再用自来水充分冲洗、最后用水冲洗 2 ~ 4 次，风干备用。

(3) 其他：具有传染性样品的容器，如病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器，应先进行高压（或其他方法）消毒后再进行清洗。盛过各种有毒药品，特别是剧毒药品和放射性同位素等物质的容器，必须经过专门处理，确知没有残余毒物存在方可进行清洗。

##### 3. 洗涤液的种类和配制方法

(1) 铬酸洗液（重铬酸钾-硫酸洗液，简称为洗液）广泛用于玻璃仪器的洗涤。常用的配制方法有下述四种：

取 100mL 工业浓硫酸置于烧杯内，小心加热，然后小心慢慢加入 5g 重铬酸钾

粉末，边加边搅拌，待全部溶解后冷却，贮于具玻璃塞的细口瓶内。

称取 5g 重铬酸钾粉末置于 250mL 烧杯中，加水 5mL，尽量使其溶解。慢慢加入浓硫酸 100mL，随加随搅拌。冷却后贮存备用。

称取 80g 重铬酸钾，溶于 1000mL 自来水中，慢慢加入工业硫酸 100mL（边加边用玻璃棒搅动）。

称取 200g 重铬酸钾，溶于 500mL 自来水中，慢慢加入工业硫酸 500mL（边加边搅拌）。

(2) 浓盐酸（工业用）：可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

(3) 5% 草酸溶液：用数滴硫酸酸化，可洗去高锰酸钾的痕迹。

(4) 5% ~ 10% 磷酸三钠 ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 溶液：可洗涤油污。

(5) 30% 硝酸溶液：洗涤  $\text{CO}_2$  测定仪器及微量滴管。

(6) 5% ~ 10% 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA -  $\text{Na}_2$ ) 溶液：加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

(7) 尿素洗涤液：为蛋白质的良好溶剂，适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

(8) 酒精与浓硝酸混合液：最适合于洗净滴定管，在滴定管中加入 3mL 酒精，然后沿管壁慢慢加入 4mL 浓硝酸（比重 1.4），盖住滴定管管口，利用所产生的氧化氮洗净滴定管。

9. 有机溶剂：如丙酮、乙醇、乙醚等可用于洗去油脂、脂溶性染料等污痕。二甲苯可洗脱油漆的污垢。

10. 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液：是两种强碱性的洗涤液，对玻璃仪器的侵蚀性很强，清除容器内壁污垢，洗涤时间不宜过长。使用时应小心慎重。上述洗涤液可多次使用，但是使用前必须将待洗涤的玻璃仪器先用水冲洗多次，除去肥皂、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂时，应先用纸擦去，然后用乙醇或乙醚擦净后才能使用洗液，否则会使洗涤液迅速失效。例如：肥皂水，有机溶剂（乙醇、甲等）及少量油污都会使重铬酸钾-硫酸洗液变成绿色，减低洗涤能力。

## 附录三 基础生物化学实验室常用仪器简介

### （一）722S 分光光度计

#### 1. 用途及特点

722S 分光光度计是一种简洁易用的分光光度法通用仪器，能在 340~1000nm 波长范围内执行透光率、吸光度和浓度直读测定，可广泛适用于医学卫生、临床检验、生物化学、石油化工、环保监测、质量控制等部门作定性定量分析用。仪器特点：

(1) 4 位 LED 显示

(2) 非球面光源光路，CT 光栅单色器

- (3) 大样品室, 4 位置比色槽架, 可选 1~5cm 光程矩形比色皿
- (4) 自动调零, 自动调 100%T
- (5) 有浓度因子设定或浓度直读功能
- (6) 附有 RS-232C 串行接口
- (7) 光学系统: 衍色光栅 C-T 单色器

## 2. 仪器规格

- (1) 波长范围: 340~1 000nm
- (2) 光源: 卤素灯 20w/12v
- (3) 光谱带宽: 6nm
- (4) 电源: 220v 50/60Hz

## 3. 仪器操作键

- (1) 100%T 键:

在 TRANS 灯亮时用作自动调节 100%T (一次未到位可加按一次);

在 ABS 灯亮时用作自动调节吸光度 0 (一次未到位可加按一次);

在 FACT 灯亮时用作增加浓度因子设定, 点按点动, 持续按 1s 后, 进入快速增加, 再按 MODE 键后自动确认值;

在 CONC 灯亮时, 用作增加浓度直读设定, 点按点动, 持续 1s 后进入快速增加设定。

- (2) %T 键:

在 TRANS 灯亮时用作自动调整 0%T;

在 ABS 灯亮时不用, 否则出现超载;

在 FACT 灯亮时用作减少浓度因子设定, 操作同 100%T 键;

在 CONC 灯亮时用作减少浓度直读设定, 操作同 100%T 键。

- (3) FUNCTION 键: 预定功能扩展键用。

- (4) MODE 键: 用作选择显示标尺。

- (5) TRANS 指示灯: 指示显示窗显示透光率。

- (6) ABS 指示灯: 指示显示窗显示吸光度。

- (7) FACT 指示灯: 指示显示窗显示浓度因子。

- (8) CONC 指示灯: 指示显示窗显示浓度直读数据。

## 4. 操作使用

### 4.1 基本操作

4.1.1 预热: 开机后灯及电子部分需热平衡, 故开机 30min 后可开始测定。

4.1.2 调零:

目的: 校正读数标尺二端, 进入测试状态。

调整时机: 预热后, 改变测试波长或测试一段时间后, 以及作高精度测试前。

操作: 打开样品槽盖, 按 0% 键, 即可自动调整到零位。

4.1.3 调 100%T

目的: 校正读数标尺二端, 进入测试状态。

调整时机: 同 4.1.2

操作：将空白样品液放入光路中，盖好盖按下“100%T”即可自动调100%T。

注：调100%T可能影响0%，调整后请检查0%，如有变化可重调0%一次。

4.1.4 调波长：用旋钮调节，波长显示窗读数时目光垂直观察。

4.1.5 改变样品槽位置让不同样品进入光路

槽有四位置，用拉杆改变，离测试者最近为“0”，依次为“1”、“2”、“3”位置，对应拉杆推向最内为“0”，依次向外拉为“1”、“2”、“3”位置。

4.1.6 确定滤光片位置

当测试波长在340~380nm内作高精度测试可将拨杆推向前，通常不用此滤光片，可将其置于400~1000nm处。

4.1.7 改变标尺（本仪器有四种标尺）

TRANS 透色率：用于透明液体和固体测量透射特点。

ABS 吸光度：用于标准曲线法或绝对吸收法定量分析，在作动力学测试时可利用。

FACT 浓度因子：用于在浓度因子法浓度直读时设定浓度因子。

CONC 浓度直读：用于标样法浓度直读时，作设定和读出。

注：各标尺的转换用MODE键并由各自指示灯指示。

## 4.2应用操作

4.2.1 测定透明材料的透光率

- (1) 预热（即4.1.1步）
- (2) 设定波长（4.1.4）
- (3) 置入空白（4.1.5）
- (4) 置透过标尺（4.1.7）
- (5) 确定滤光片位置（4.1.6）
- (6) 粗调100%（4.1.3）
- (7) 调零（4.1.2）
- (8) 调100%（4.1.3）
- (9) 置入样品（4.1.5）
- (10) 读出数据

4.2.2 测定透明溶液的吸光度

- (1) 预热
- (2) 设定波长
- (3) 置入空白
- (4) 调100%T、0%T [即4.2.1中(3)~(6)步]
- (5) 置吸光度标尺（用MODE键转换到ABS）
- (6) 样品置入光路
- (7) 读出数据

4.2.3 用标准曲线法对物质定量

- (1) 取已知含量的标准样品
- (2) 按样品各自的分析规程制备样品溶液及背景溶液

- (3) 设波长，置入空白，调零，置“ABS”，读出样品吸光度
- (4) 重复上步读出各标准溶液吸光度
- (5) 以各样品中已知含量及读得吸光度绘制坐标图，并画出相关最佳的曲线
- (6) 读出未知样品的吸光度，在曲线表上找出对应浓度

#### 4.2.4 直接使用浓度直读功能

- (1) 测出标准样品吸光度
- (2) 置标尺为浓度直读
- (3) 按 100%T 或 0%T 键使已知含量值或含量值的 10n 倍
- (4) 置入未知样品溶液
- (5) 读出显示值（或含量值的 10n 倍）

#### (五) 注意事项

- (1) 操作应轻缓
- (2) 不要将样品溶液弄到仪器上
- (3) 不要用手拿比色皿的光面
- (4) 比色皿用毕应及时清洗干净

## (二) LD4-2型 低速离心机

### 1. 用途及特点

低速离心机是对混合溶液进行快速分离而沉淀的专用设备，可广泛用于医院、食品、工业、科研等方面进行化验、生化试验，分离悬浮液等工作。本仪器特点如下：

- (1) 最大转速 4 000r/min
- (2) 逆时针旋转
- (3) 容量 50mL 4 和 10mL 3 4

### 2. 使用方法

- (1) 将离心机置于平稳地面或平稳台面上
  - (2) 负荷配重，各对称放置的被分离物之间的重量误差不大于 1g
  - (1) 检查手柄是否置于慢速位置，开关应拨向“关”的位置，盖与容器室锁紧
  - (2) 接通电源，开关拨向“开”位置
  - (3) 平稳移动手柄，视转速表指示到达所需转速，一、二分钟后转速稳定开始记时。
- 分离完毕将受柄调回原位，开关拨向“关”。第二次分离重复(2)~(5)项。

- (4) 关闭电源。

### 3. 注意事项

- (1) 被分离样必须配平
- (2) 被配平样品的离心管在离心机中时必对称放置
- (3) 离心机启动后如有不正常噪音及振动时，应立即切断电源，排除故障。
- (4) 塑料离心管用后清洗干净

### (三) TD型 电子天平

#### 1. 用途及特点

本天平是采用单片微机的智能化电子天平，具有去皮重称重自动校准零点自动跟踪和故障显示等多种功能，天平掉线后，其校准数据等能自动保护。称量范围：0~210g；最小读数：0.01g；开机预热时间不少于 30min。

#### 2. 使用方法

- (1) 置于稳定的工作台上。
- (2) 调整水平，插好电源，打开开关，预热 30min。
- (3) 待天平稳定后，显示“0.00”称量模式。
- (4) 将被称物置秤盘上，即显示该物的质量，待显示器左边“.”熄灭后，即表示称量已稳定。

注：去皮重操作即先将容器于秤盘上，天平显示容器质量，按“TARE”键后，显示“0.00g±”，即已去重。置物于容器中，即显示物的重量。

- (5) 关闭电源。

#### 3. 注意事项

- (1) 称重前必预热
- (2) 皮和物之和不超过称量范围，否则显示“ ”，表示超重。
- (3) 不要将药品洒到秤盘上，会腐蚀天平。
- (4) 操作时不要用力过大，会影响平衡。

### (四) DYY- 6B型 稳压稳流电泳仪

#### 1. 用途及特点

电泳技术是分子生物学不可缺少的重要分析手段。它在基础理论农业、工业、医药卫生、法医学、商检、教育以及国防科研等实践中有着广泛的用途。可以用电泳方法进行定量分析，或者将一定的混合物分离成各种组分以及作少量制备。本电泳仪可以作纸电泳和凝胶电泳。其特点为：负载能力强，精度高。具稳压稳流双显示双调节功能。输出电压：0~600V 连续可调；输出电流：0~400mA 连续可调。

#### 2. 使用方法

- (1) 首先确定仪器电源开关是在关位。
- (2) 连接电源线，电极线对应插在仪器输出插口，并与电泳槽相应插口连接好。
- (3) 确定电泳槽中已放置好试剂。
- (4) 恒压恒流调整：

恒压：先将电压旋钮调到所需电压，将电流钮调到希望的最大处，然后打开电源开关，输出电压将指示在所需值。

恒流：应将电流调至所需电流处，将电压调至希望的最大处。

- (5) 本机可在工作时随时调整。如不熟悉预置电压电流，需恒流输出，则将电流调

为 0，电压为最大，然后开机，缓缓调节电流钮到所需值。需恒压输出，则将电压调为 0，电流为最大，然后开机，将电压调到位。

### 3. 注意事项

- (1) 请勿让电解质溶液进入仪器内部。
- (2) 电极线按要求连接。
- (3) 使用中发现异常应立即关机。
- (3) 输出电压高时请远离，以防触电。

## (五) 电热干燥培养箱

### 1. 用途及特点

本仪器采用自然对流通风式结构，冷空气经电热器加热后，自左右二侧对流空间上升，并从内胆左右侧小孔内进入内室，再自箱顶风顶逸出。内室温度均匀，适合培养细菌等用。

### 2. 使用方法

- (1) 开启箱门放好试样，关好箱门。
- (2) 打开电源，掀下“设定选择”开关，调节“设定调节”旋钮，待数显值到所需工作温度值，复置“设定选择”开关。
- (3) 升温时，绿灯亮，恒温时，红灯亮。当温度升到所需温度时，红绿灯交替跳跃，进入恒温状态，此时箱温度应以箱顶温度计指示为准。

### 3. 注意事项

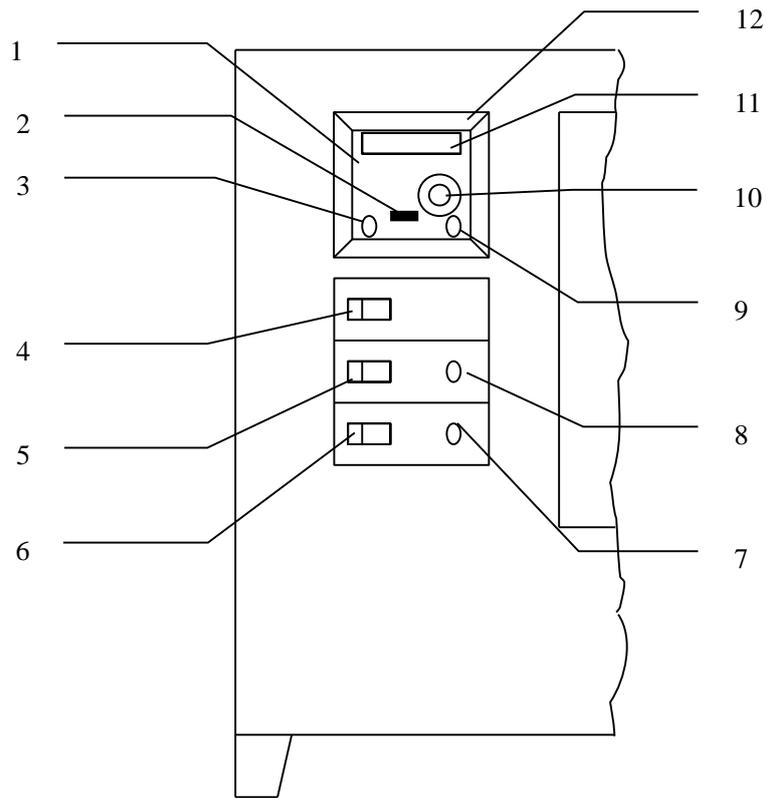
- (1) 试验物放置不宜过挤，使空气畅通，平均受热。
- (2) 用毕，将电源全部切断。
- (3) 保持箱内清洁，使用时不得擅自离开，以防意外。

## (六) 电热鼓风干燥箱

### 1. 用途及特点

本仪器广泛适用于工厂或实验室的一般性干燥、热处理及其它加热之用。最高使用温度为 200 。

### 2. 仪器结构



1. 温度控制仪
2. 测量/设定转换开关
3. 加热工作指示灯 (ON)
4. 鼓风机开关 (FAN)
5. 仪器工作电源开关 (POWER)
6. 加热功率选择开关 (HEAT SELECT)
7. 保险器 (FUZE)
8. 电源指示灯
9. 加热停止指示灯 (OFF)
10. 温度值设定旋钮
11. 温度值显示屏
12. 保护罩

### 3. 使用方法

- (1) 合上电源。
- (2) 打开仪器电源开关到“ON”。
- (3) 取下保护罩,将测量/设定拨向“设定”,旋至所需温度(顺时针增大,反之减小),后拨向“测量”,盖上罩。

- (4) 如需鼓风请将其打至“ON”。
- (5) 选择加热功率“LOW”或“HIGH”(“HIGH”全功率加热，升温快)。
- (6) 当温度到预定值，红绿灯交替工作，温度值以箱顶温度计为准。
- (7) 调好温度后打开箱门，放入试样，关好门，记好时间。
- (8) 用后将各开关关闭，最后断开电源。

#### 4. 注意事项

同电热干燥培养箱

### (七) 组织捣碎匀浆机

#### 1. 用途及特点

本仪器用来处理样品，广泛应用于生物、遗传、病毒、医学、环保、水产等领域。本仪器主要特点是容量大、功率大、转速高，操作简单，特别适用于各种内脏组织的捣碎。

#### 2. 使用方法

- (1) 正确安装捣碎匀浆棒，放置捣碎匀浆杯
- (2) 将样品放入捣碎匀浆杯
- (3) 接通外电源，合上电源开关，指示灯亮
- (4) 设定定时，将钮调至“定时”或“常开”
- (5) 缓慢调节调速钮，升至所需转速
- (6) 工作完毕，将调速钮置于最小位置，定时器置“零”，关电源开关，切断电源
- (7) 擦洗匀浆杯和匀浆棒，其上不允许有水滴污物残留

#### 3. 注意事项

- (1) 安装要紧。
- (2) 缓慢加速。
- (3) 保持仪器清洁，无污物。

(林英)

## 附录四 常用缓冲溶液的配制

### (一) 甘氨酸 盐酸缓冲液 ( 0.05 mol/L)

X 毫升 0.2 mol/L 甘氨酸 + Y 毫升 0.2 mol/L HCl, 再加水稀释至 200 毫升。

pH	X	Y	pH	X	Y
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸分子量 = 75.07。

0.2 mol/L 甘氨酸溶液含 15.01 g/L。

### (二) 邻苯二甲酸 盐酸缓冲液 ( 0.05 mol/L)

X 毫升 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾 + Y 毫升 0.2 mol/L HCl, 再加水稀释至 20 毫升。

pH(20 )	X	Y	pH (20 )	X	Y
2.2	5	4.670	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	2.6	5	0.597
2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.032			

邻苯二甲酸氢钾分子量 = 204.23。

0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾溶液含 40.85 g/L。

### (三) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)	0.1 mol/L 柠檬酸 (mL)	pH	0.2 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)	0.1 mol/L 柠檬酸 (mL)
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 分子量 = 141.98 ; 0.2 mol/L 溶液为 28.40 g/L。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 分子量 = 178.05 ; 0.2 mol/L 溶液为 35.61 g/L。

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 分子量 = 358.22 ; 0.2 mol/L 溶液为 71.64 g/L。

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 分子量 = 210.14 ; 0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L。

### (四) 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸缓冲液

pH	钠离子浓度	柠檬酸 (g)	氢氧化钠 (g)	盐酸 (mL)	最终体积 (L)
	(mol/L)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> H <sub>2</sub> O	NaOH 97%	HCl (浓)	
2.2	0.20	210	84	160	10
3.1	0.20	210	83	116	10
3.3	0.20	210	83	106	10
4.3	0.20	210	83	45	10
5.3	0.35	245	144	68	10
5.8	0.45	285	186	105	10
6.5	0.38	266	156	126	10

使用时可以每升中加入 1 克酚，若最后 pH 值有变化，再用少量 50% 氢氧化钠溶液或浓盐酸调节，冰箱保存。

(五) 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (0.1 mol/L)

pH	0.1 mol/L 柠檬酸 (mL)	0.1 mol/L 柠檬酸钠 (mL)	pH	0.1 mol/L 柠檬酸 (mL)	0.1 mol/L 柠檬酸钠 (mL)
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸： $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  分子量 = 210.14；0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L。

柠檬酸钠： $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$  分子量 = 294.12；0.1 mol/L 溶液为 29.41 g/L。

(六) 醋酸-醋酸钠缓冲液 (0.2 mol/L)

pH (18 )	0.2 mol/L NaAc (mL)	0.2 mol/L HAc (mL)	pH (18 )	0.2 mol/L NaAc (mL)	0.2 mol/L HAc (mL)
3.6	0.75	9.35	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	6.40	0.60

NaAc  $\cdot 3H_2O$  分子量 = 136.09；0.2 mol/L 溶液为 27.22 g/L。

冰乙酸 11.8 mL 稀释至 1 L (需标定)。

(七) 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 (0.05 mol/L)

X 毫升 0.2 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + Y 毫升 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 20 毫升。

pH (20 )	X (mL)	Y (mL)	pH (20 )	X (mL)	Y (mL)
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

(八) 磷酸盐缓冲液

磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液 (0.2 mol/L)

pH	0.2 mol/L		pH	0.2 mol/L	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (mL)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (mL)		$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (mL)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (mL)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 178.05 ; 0.2 mol/L 溶液为 35.61 g/L。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 358.22 ; 0.2 mol/L 溶液为 71.64 g/L。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  分子量 = 138.01 ; 0.2 mol/L 溶液为 27.6 g/L。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 156.03 ; 0.2 mol/L 溶液为 31.21 g/L。

(九) 巴比妥钠 盐酸缓冲液

pH ( 18 )	0.04 mol/L 巴比妥钠 (mL)	0.2 mol/L HCl (mL)	PH ( 18 )	0.04 mol/L 巴比妥钠 (mL)	0.2 mol/L HCl (mL)
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

巴比妥钠分子量 = 206.18 ; 0.04 mol/L 溶液为 8.25 g/L。

(十) Tris-HCl缓冲液 ( 0.05 mol/L)

50 毫升 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 ( Tris ) 溶液与 X 毫升 0.1mol/L 盐酸混匀并稀释至 100 毫升。

pH (25 )	X (mL)	pH (25 )	X (mL)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

Tris 分子量 = 121.14 ; 0.1 mol/L 溶液为 12.114 g/L。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳，使用时注意将瓶盖严。

(十一) 硼酸-硼砂缓冲液 (0.2 mol/L 硼酸根)

pH	0.05 mol/L 硼砂 (mL)	0.2 mol/L 硼酸 (mL)	pH	0.05 mol/L 硼砂 (mL)	0.2 mol/L 硼酸 (mL)
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂： $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 381.43；0.05 mol/L 溶液（等于 0.2 mol/L 硼酸根）含 19.07 g/L。

硼酸： $\text{H}_3\text{BO}_3$  分子量 = 61.84；0.2 mol/L 的溶液为 12.37 g/L。

硼砂易失去结晶水，必须在带塞的瓶中保存。

(十二) 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (0.05 mol/L)

X 毫升 0.2 mol/L 甘氨酸 + Y 毫升 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 200 毫升。

pH	X (mL)	Y (mL)	pH	X (mL)	Y (mL)
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸分子量 = 75.07；0.2 mol/L 溶液含 15.01 g/L

(十三) 硼砂-氢氧化钠缓冲液 (0.05 mol/L 硼酸根)

X 毫升 0.05 mol/L 硼砂 + Y 毫升 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 200 毫升。

pH	X (mL)	Y (mL)	pH	X (mL)	Y (mL)
9.3	50	6.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

硼砂  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 381.43；0.05 mol/L 硼砂溶液（等于 0.2 mol/L 硼酸根）为 19.07 g/L。

(十四) 碳酸钠 碳酸氢钠缓冲液 ( 0.1 mol/L ) (此缓冲液在  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  存在时不得使用 ) .

pH		0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.1 mol/L $\text{NaHCO}_3$
20	37	(mL)	(mL)
9.16	8.77	1	9
9.40	9.22	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  分子量 = 286.2 ; 0.1 mol/L 溶液为 28.62 g/L。

$\text{NaHCO}_3$  分子量 = 84.0 ; 0.1 mol/L 溶液为 8.40 g/L。

## 附录五 硫酸铵饱和度的常用表

1.调整硫酸铵溶液饱和度计算表 ( 25 )

		硫酸铵终浓度, % 饱和度																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
硫酸铵初浓度, % 饱和度		每 1 升溶液加固体硫酸铵的克数																
	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

1 在 25 下硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每升溶液所加固体硫酸铵的克数。

## 2. 硫酸铵溶液饱和度计算表 ( 0 ) ;

		硫酸铵终浓度, % 饱和度																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
硫酸铵初浓度, % 饱和度	每 100 毫升溶液加固体硫酸铵的克数																		
	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7	
	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2	
	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7	
	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2	
	20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7	
	25	0		2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2	
	30	0			2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8	
	35	0				2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3	
	40	0					2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8	
	45	0						2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3	
	50	0							3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.3	30.8	34.8	
	55	0								3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3	
	60	0									3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.1	27.9	
	65	0										3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4	
	70	0											3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9	
	75	0												3.2	6.6	10.1	13.7	17.4	
	80	0													3.3	6.7	10.3	13.9	
	85	0														3.4	6.8	10.5	
	90	0															3.4	7.0	
95	0																3.5		
100	0																		

1 在 0 下硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每 100 毫升溶液所加固体硫酸铵的克数。

## 3. 不同温度下的饱和硫酸铵溶液

温 度 ( )	0	10	20	25	30
每 1000 毫升水中含硫酸铵摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
重量百分数	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
1000 毫升水用硫酸铵饱和所需克数	706.8	730.5	755.8	766.8	777.5
每升饱和溶液含硫酸铵克数	514.8	525.2	536.5	541.2	545.9

## 附录六 氨基酸的一些理化常数

氨基酸名称	相对分子质量	熔点** ( )	等电点 PI	溶解度 (%, 25 )	[a] <sup>24-26°</sup>
甘氨酸 (Glycine) (Gly)	75.07	292d	5.97	24.99	
L-丙氨酸 (L-Alanine) (Ala)	89.07	295d	6.00	16.6	A +14.6 B +1.8
L-丝氨酸 (L-Serine) (Ser)	105.09	223d	5.68	25	A +15.1 B -7.5
L-苏氨酸 (L-Threonine) (Thr)	119.12	253d	6.16	易溶	A -15.0 B -28.5
L-缬氨酸 (L-Valine) (Val)	117.15	315d	5.96	8.85	A +28.3 B +5.63
L-亮氨酸 (L-Leucine) (Leu)	131.17	337d	5.98	2.19	A +16.0 B -11.0
L-异亮氨酸 (L-Isoleucine) (Ileu)	131.17	285d	6.02	4.12	A +39.5 B +12.4
L-半胱氨酸 (L-Cysteine) (Cys)	121.15		5.07	易溶	A +6.5
L-胱氨酸 (L-Cystine) (Cyss)	240.29	258	5.05	0.011	A -23.2
L-蛋氨酸 (L-Methionine) (Met)	149.21	283d	5.74	易溶	A +23.2 B -10.0
L-天门冬氨酸 (L-Aspartic acid) (Asp)	133.10	-269 -271	2.77	0.5	A +25.4 B +5.05
L-天门冬酰胺 (L-Asparagin) (Asn)	132.12	236d (水合物)		2.98	A +28.6 B +5.4
L-谷氨酸 (L-Glutamic acid) (Glu)	147.13	247 (208d)	3.22	0.864	A +31.8 B +12.0
L-谷氨酰胺 (L-Glutamine) (Gln)	146.15	184		3.6	A +31.8 B +6.3
L-精氨酸 (L-Arginine) (Arg)	174.20	244	10.76	15.0	A +27.6 B +12.5
L-赖氨酸 (L-Lysine) (Lys)	146.19	224d	9.74	易溶	A +25.9 B +13.5
L-苯丙氨酸 (L-Phenylalanin) (Phe)	165.19	283d	5.48	2.96	A -4.47 B -34.5
L-酪氨酸 (L-Tyrosine) (Tyr)	181.19	342(295d)	5.66	0.045	A -10.0
L-组氨酸 (L-Histidine) (His)	155.16	277d		4.16	A +11.8 B -38.5
L-色氨酸 (L-Tryptopnane) (Try)	204.22	281 (289)	5.89	1.14	A +2.8 B -33.7
L-脯氨酸 (L-Proline) (Pro)	115.13	220d	6.30	162.3	A -60.4 B -86.2
L-羟脯氨酸 (L-Hydroxy-proline) (Pro-OH)	131.13	270d	5.83	36.11	A -50.5 B -76.0
L-瓜氨酸 (L-Citruline) (Cit)	175.19	234 -237d		易溶	A +24.2 B +4.0
L-鸟氨酸 (L-Ornithine) (Orn)	132.16			易溶	A +28.4 B +12.1

\*A 于 5mol/L HCl 中；B 于水中；C 于 10% HCl 中；\*\*d 代表到达熔点后分解。

## 附录七 常用酸碱和固态化合物的一些数据

### (一) 实验室中常用酸碱的比重和浓度的关系

名 称	分子式	分子量	比 重	百分浓度 % ( W/W )	摩尔浓度 ( 粗 略 ) mol/L	配 1 L 1 mol/L 溶 液 所 需 ( mL ) 数
盐 酸	HCl	36.47	1.19	37.2	12.0	8.4
			1.18	35.4	11.8	
			1.10	20.0	6.0	
硫 酸	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98.09	1.84	95.6	18.0	28
			1.18	24.8	3.0	
硝 酸	HNO <sub>3</sub>	63.02	1.42	70.98	16.0	63
			1.40	65.3	14.5	
			1.20	32.36	6.1	
冰 乙 酸	CH <sub>3</sub> COOH	60.05	1.05	99.5	17.4	59
乙 酸	CH <sub>3</sub> COOH		1.075	80.0	14.3	
磷 酸	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98.06	1.71	85.0	15	67
氨 水	NH <sub>4</sub> OH	35.05	0.90		15	67
			0.904	27.0	14.3	70
			0.91	25.0	13.4	
			0.96	10.0	5.6	
氢氧化钠 溶 液	NaOH	40.0	1.54	50.0	19.3	53
氢氧化钾 溶 液	KOH	56.10	1.538	50.0	13.7	

(二) 常用固态化合物的摩尔浓度配制参考表

名 称		分子量	浓 度	
			mol/L	g/L
草 酸	$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	126.08	1	63.04
柠 檬 酸	$\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	210.14	0.1	7.00
氢氧化钾	KOH	56.10	5	280.50
氢氧化钠	NaOH	40.00	1	40.00
碳 酸 钠	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	106.00	0.5	53.00
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.20	1	358.20
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.10	1/15	9.08
重铬酸钾	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	294.20	1/60	4.9035
碘 化 钾	KI	166.00	0.5	83.00
高锰酸钾	$\text{KMnO}_4$	158.00	0.05	3.16
乙 酸 钠	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	82.04	1	82.04
硫代硫酸钠	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	248.20	0.1	24.82

(李贺民)

## 凡 例

NR：硝酸还原酶  
NADH：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸  
A.R.：分析纯  
CMC：羧甲基纤维素钠  
R<sub>f</sub>：移动速率（迁移率）  
Tris：三羟甲基氨基甲烷  
FW：鲜重  
Acr：丙烯酰胺单体  
Bis：甲叉双丙烯酰胺  
Ap：过硫酸铵  
TEMED：四甲基乙二胺  
CTAB：十六烷基三甲基溴化铵  
SDS：十二烷基磺酸钠  
EDTA：乙二胺四乙酸  
DNP：脱氧核糖核蛋白  
RNP：核糖核蛋白  
TE：Tris-EDTA 缓冲液  
EB：菲啶溴红（溴乙啶）  
LB：蛋白胨，酵母浸汁培养基  
DNS：3,5-二硝基水杨酸  
G：葡萄糖  
SOD：超氧化物歧化酶  
ROD：过氧自由基  
RO：烷氧自由基  
CAT：过氧化氢酶  
POD：过氧化物酶  
ASA-POD：抗坏血酸过氧化物酶  
GSH：还原型谷胱甘肽  
NBT：氯化硝基四氮唑蓝  
Lux：光照强度  
PVP：聚乙烯吡咯烷酮

## 主要参考书目

- [1] 文树基等.《基础生物化学实验指导》(农学类专业用).西安:陕西科学技术出版社,1994
- [2] 郭勇.《现代生化技术》(食品工程系列教材).华南理工大学出版社,1995
- [3] 刘国诠,余兆楼.《色谱柱技术》.北京:化学工业出版社,2001
- [4] 汤章城等 编著.《现代植物生理学实验指南》.北京:科学出版社出版,1999
- [5] 周顺伍.《生物化学实验技术》.北京:北京农业大学出版社,1989
- [6] 林稚兰,黄秀梨.《现代微生物学与实验技术》.北京:科学出版社,2000
- [7] 郝建军,刘延吉.《植物生理学实验技术》.沈阳:辽宁科学技术出版社,2001
- [8] 陈毓荃.《生物化学研究技术》(植物生理生化及农科各专业用).北京:中国农业出版社,1993
- [9] 李建武等.《生物化学实验原理和方法》.北京:北京大学出版社,1994
- [10] 汪沛洪.《基础生物化学实验指导》(农业类专业用).西安:陕西科学技术出版社,1985