

生物化学技术指南

SHENG WU HUA XUE JI SHU ZHI NAN

● 朱启忠 等编著

● 新疆科技卫生出版社 (K)

生物化学技术指南

朱启忠等 编著

新疆科技卫生出版社(K)

责任编辑: 李 欢

封面设计: 车小虎

生物化学技术指南

朱启忠等 编著

新疆科技卫生出版社 (K) 出版

(乌鲁木齐市延安路4号 邮政编码830001)

新疆新华书店发行 山东蓝盾印刷厂印刷

787×1092 毫米 32 开本 10印张 216千字

1995年6月第1版 1995年6月第1次印刷

印数: 1—3000

ISBN7-5372-0824-7/Q·23 定价: 8.50元

主 编 朱启忠 何士敏

副主编 翁德宝 王丙云 周晓钢

编写人员

第一、二章 朱启忠

第二、四章 王丙云

第五、六章 周晓钢 何士敏

第七章 翁德宝

第八章 何士敏

第九章 翁德宝

第十章 翁德宝 朱启忠

第十一章 黎绍辉

前 言

随着科技的发展，生物化学技术已渗透到工农业生产、医学等各个领域，其在实际应用方面越来越显示出它的重要性。要进行有成效的研究，一个最基本的条件就是具备符合实验者意图的满意的技术，而本书的编写目的就在于为读者提供更多更好的且实用的生物化学技术方法，以适应生物化学技术在教学、科研和生产发展中的需要。

本书的选材侧重于生物化学中的基本实验技术方法，注意新发展的较为实用的重要生化技术。在写稿时尽量做到对各种生化技术的基本原理和操作方法进行详细论述，并例举了大量的实验实例。编写中考虑了各校及有关生产单位的实验设备条件，使实例能在教学、科研、生产实践、临床检验上广泛应用。

本书主要介绍的是生物化学应用领域中重要而又常用的基本技术和方法，包括生物大分子的基本制备技术；分光光度法，分配层析，离子交换层析，凝胶层析，亲和层析，电泳，酶的固定化及离心技术；较为实用的生化产品的制备工艺和常规，临床检验实验。全书由朱启忠统稿、定稿。

本书可供高等院校生物系、医学各专业，轻工和食品专业作为生物化学技术及实验课的教材，并可供生化制品厂家研究人员、生物化学教师、科研工作者参考。

本书的编写工作得到各校领导及同仁们的大力支持和帮

助，在此表示衷心的感谢。

限于编者的水平和实践经验，书中漏误及不当之处在所难免，敬盼读者批评指正。

编者 1995年

目 录

第一章 生物大分子的基本制备技术	(1)
一、材料选择及预处理	(1)
二、细胞的破碎及细胞器的分离	(2)
三、提取	(5)
(一) 蛋白质和酶的提取	(5)
(二) 核酸的提取	(7)
四、分离纯化	(8)
(一) 蛋白质和酶的分离纯化	(9)
(二) 核酸的分离纯化	(12)
五、浓缩、干燥、保存	(13)
六、实验实例	(13)
(一) 人胎盘丙种球蛋白的制备	(13)
(二) 胰岛素的制备	(15)
(三) 碱性磷酸酶的提取分离及比活性的测定	(17)
(四) 具有生物活性 DNA 的制备	(22)
(五) 酵母 RNA 的提取和定性	(24)
第二章 分光光度法	(27)
一、基本原理	(27)
二、分光光度计的结构原理	(31)
(一) 光源	(31)
(二) 单色器	(33)

(三) 狭缝·····	(34)
(四) 比色杯·····	(34)
(五) 检测系统·····	(35)
三、实验实例·····	(36)
(一) 考马斯亮兰法测定蛋白质含量·····	(36)
(二) 紫外吸收法测定核酸的含量·····	(38)
(三) 血糖定量 (邻甲苯胺比色法)·····	(41)
(四) 谷丙转氨酶活性的测定 (赖氏法)·····	(43)
第三章 纸上分配层析技术·····	(48)
一、基本原理·····	(49)
二、影响 R_f 值的主要因素·····	(50)
(一) 物质结构与极性的影响·····	(51)
(二) 层析溶剂的影响·····	(52)
(三) pH 的影响·····	(53)
(四) 展开方式与 R_f 值的关系·····	(54)
(五) 温度的影响·····	(54)
(六) 滤纸的影响·····	(54)
三、具体操作·····	(56)
(一) 样品的处理·····	(56)
(二) 点样·····	(56)
(三) 展开·····	(57)
(四) 显色·····	(62)
(五) R_f 值测量·····	(64)
(六) 定量分析·····	(64)
四、实验实例: 圆形滤纸层析法分离氨基酸·····	(65)
第四章 离子交换层析技术·····	(68)
一、基本原理·····	(68)
二、交换剂·····	(71)

(一) 交换剂的基本类型	(71)
(二) 交换剂的选择	(74)
(三) 交换剂的处理、再生与转型	(78)
三、离子交换层析的方法	(81)
(一) 层析柱	(81)
(二) 装柱与加样	(82)
(三) 洗脱与收集	(83)
四、实验实例	(89)
(一) 离子交换树脂法分离核苷酸	(89)
(二) 离子交换层析分离氨基酸	(92)
第五章 凝胶层析技术	(95)
一、基本原理	(95)
二、常用于凝胶层析的凝胶种类	(98)
三、凝胶层析操作	(101)
(一) 凝胶的选择和用量	(101)
(二) 凝胶的制备	(103)
(三) 凝胶柱的制备	(104)
(四) 装柱	(105)
(五) 凝胶柱平衡	(106)
(六) 上样	(107)
(七) 洗脱	(109)
(八) 样品的检测	(110)
四、凝胶柱的保存、干燥和再生	(110)
五、实验实例: 凝胶层析法测蛋白质分子量	(112)
第六章 亲和层析技术	(116)
一、基本原理	(116)
二、载体及载体选择	(118)
(一) 载体	(118)

(二) 常用凝胶·····	(118)
三、配基及配基的选择条件·····	(121)
(一) 常用配基·····	(122)
(二) 配基的选择·····	(123)
(三) 配基浓度·····	(125)
(四) 配基大小的选择·····	(126)
四、载体活化与配基的偶联·····	(126)
(一) 载体对配基固相化的影响·····	(126)
(二) 载体的活化及配基偶联·····	(128)
五、吸附和洗脱·····	(133)
(一) 影响吸附的因素·····	(133)
(二) 常用洗脱方法·····	(134)
(三) 亲和柱的再生·····	(135)
六、实验实例: 亲和层析法提纯胰蛋白酶·····	(135)
第七章 电泳技术 ·····	(140)
一、基本原理·····	(140)
二、影响电泳的几项因素·····	(143)
(一) 溶液的离子强度·····	(143)
(二) 电场强度·····	(144)
(三) 溶液的 pH 值·····	(145)
(四) 电渗现象·····	(145)
三、电泳技术的分类及应用·····	(146)
(一) 滤纸电泳·····	(146)
(二) 琼脂和琼脂糖凝胶电泳·····	(148)
(三) 醋酸纤维素薄膜电泳·····	(148)
(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(149)
四、实验实例·····	(158)
(一) 血清蛋白的醋酸纤维素薄膜电泳·····	(158)

	(二) 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离血清蛋白·····	(164)
第八章	酶的固定化技术 ·····	(172)
一、	固定化酶的主要制备方法·····	(172)
	(一) 吸附法·····	(172)
	(二) 包埋法·····	(175)
	(三) 共价化学偶联法·····	(176)
	(四) 直接交联固相法·····	(178)
	(五) 固定化细胞法·····	(179)
二、	固定化酶的性质及应用·····	(180)
	(一) 固定化酶的性质·····	(180)
	(二) 固定化方法的选择及应用·····	(181)
三、	实验实例: 糖化酶的固定化·····	(185)
第九章	离心技术 ·····	(191)
一、	离心分离的基本原理·····	(191)
	(一) 沉降和离心·····	(191)
	(二) 离心力和沉降速度·····	(192)
二、	离心技术的应用·····	(194)
	(一) 离心机的类型和用途·····	(194)
	(二) 制备超速离心技术·····	(197)
三、	实验实例: 蔗糖密度梯度离心分离 RNA 混合物·····	(203)
第十章	几种生化产品的制备工艺 ·····	(209)
一、	胰岛素-胰酶联产工艺·····	(209)
二、	工业胰酶的制备工艺·····	(215)
三、	脑氨肽的制备工艺·····	(217)
四、	胆固醇的制备工艺·····	(219)
五、	胃膜素-胃蛋白酶联产工艺·····	(221)
六、	胸腺素的制备工艺·····	(224)

七、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 的制备工艺	(227)
八、溶菌酶的制备工艺	(231)
九、肝素钠的制备工艺	(234)
十、血红素的制备工艺	(241)
十一、尿激酶的制备工艺	(243)
十二、SOD 的制备工艺	(249)
十三、胱氨酸的制备工艺	(252)
十四、植酸的生产工艺	(257)
十五、植酸钙的生产工艺	(258)
第十一章 常规与临床检验实验	(260)
一、蛋白质的颜色反应	(260)
二、蛋白质的变性、沉淀、凝固反应	(268)
三、酪蛋白的提取	(272)
四、酪蛋白的等电点测定	(274)
五、微量凯氏定氮法	(275)
六、维生素 C 含量的测定	(282)
七、酶的性质实验	(284)
八、脂肪酸的 β -氧化	(289)
九、血尿素氮测定	(291)
十、血乳酸测定	(294)
十一、血尿酸测定	(297)
十二、血清胆固醇测定	(299)
十三、血红蛋白的定量测定	(301)
十四、尿糖定性实验	(302)
十五、尿肌酐测定	(303)
十六、尿中酮体定性实验	(306)

第一章 生物大分子的基本制备技术

生物大分子主要指蛋白质、酶和核酸这三大类物质，它们是一切生命活动的物质基础，是一切生命现象的基本体现者。因此，对这三类物质的研究就成为探索生命奥秘的焦点。研究生物大分子，首先需要解决制备问题，没有高纯度的生物大分子，研究就无法进行。制备工作涉及物理学、化学及生物学等多方面的知识和技术，但基本原理有两个，一是利用混合物中几个组分分配率的差异，把它们分别分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中，如盐析、有机溶剂提取、层析和结晶等；二是将混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域，从而达到分离的目的，如电泳、超速离心和超滤等。不论使用哪种方法，都应随时注意保持生物大分子的结构和生物活性的完整性。因为，过酸、过碱、高温、剧烈机械作用和强烈辐射等多种因素均可导致生物大分子结构和功能的破坏。所以，整个制备过程宜选择较为温和的工作条件。

生物大分子的制备，一般包括材料选择与预处理、细胞破碎与细胞器分离、提取和纯化、浓缩与干燥四个阶段。

一、材料选择及预处理

制备生物大分子的材料有动物、植物和微生物，需根据

实验目的选择材料。选材时要注意植物的季节性、动物的生理状态及微生物的生长期。动物饥饿时，脂肪和糖类含量较少，有利于蛋白质、酶和核酸的分离；微生物生长的对数期，酶和核酸的含量较高，可得到较高产量。

选定材料后，一般需作预处理。动物组织需先剔除结缔组织、脂肪组织等非活性部分；植物种子需先去壳和除脂；微生物需先将菌体与发酵液分离。

二、细胞的破碎及细胞器的分离

欲获得细胞内生物大分子，需先破碎细胞，欲制备某一细胞器的生物大分子，应先分离该细胞器。

（一）细胞的破碎

破碎细胞的方法较多，有机械法、物理法、化学法及生化法，现将常用的方法简介如下：

1. 高速组织捣碎机

将材料配成稀糊状，置于筒内，约占筒容积的 $1/3$ ，固定筒盖，先将调速器拨至最慢处，开动马达后，逐步加速至所需速度。本法适用于动物内脏组织、植物肉质种子、柔嫩的叶和芽等材料的破碎。

2. 玻璃匀浆器

由研管和研杆组成，研管的内壁及研杆的表面均经磨砂处理。先把剪碎的组织置于管中，再套入研杆用手来回研磨，上下移动，即可使细胞研碎。研杆也可由电动搅拌器驱动，与高速组织捣碎机比较，此法细胞破碎程度较高，机械切力对生物大分子破坏较少。

3. 研钵

需先将组织剪碎，加入少量玻璃砂效果更好。

4. 超声破碎

此法多用于微生物和细胞培养材料的破碎。破碎效果与样品浓度以及所用频率有关，可根据样品体积大小及所用频率选用合适的探头。以从大肠杆菌制备各种酶为例，用 50 ~ 100 毫克菌体/毫升的浓度，在 1KG 至 10KG 频率下处理 10 ~ 15 分钟，加入玻璃珠可缩短时间。因超声处理时产热较多，故应用此法时，需要采取降温措施。另外，某些核酸及酶对超声敏感，慎用此法。

5. 反复冻融法

多用于动物细胞。先将细胞在低温下(一般在 -20°C 以下)冷冻，然后溶解，如此反复操作，可使细胞破碎。

6. 表面活性剂处理法

常用十二烷基磺酸钠(SDS)及去氧胆酸钠等。它们可破坏生物膜。

除以上方法外，还有冷热交替法，加压破碎法、自溶法及溶菌酶处理等方法，不管用哪种方法，均应在一定的缓冲液中进行，有时还需加入保护剂，以防止生物大分子的变性和降解。

(二) 细胞器的分离

由于生物大分子在细胞内分布不同(表 1-1)，因此，要制备某种生物大分子，往往需要以细胞中某一部分作材料，或是为制备某一细胞组分的生物大分子，排除其它组分的干扰，在细胞破碎后，也需将细胞各组分加以分离。

常用差速离心法分离细胞器。方法是将破碎的细胞置于

表1-1 蛋白质、酶及核酸在肝细胞内的分布情况

细胞器名称	主要蛋白质及酶类	核酸类
细胞核	精蛋白、组蛋白 核酸合成酶系	RNA 占总量 10% 左右, DNA 几乎 全部
线粒体	电子传递、氧化磷酸化、三 羧酸循环、脂肪酸氧化、氨 基酸氧化、尿素合成等酶系	RNA 占总量 5% 左 右, DNA 微量
内质网 (微粒体)	蛋白质合成酶系、羟化酶 类	RNA 占总量 50% 左 右
溶酶体	水解酶系(包括核酸酶、磷 脂酶、组织蛋白酶及糖苷 酶等)	
高尔基复合体	糖苷转移酶、粘多糖及类固 醇合成酶系	
细胞膜	载体与受体蛋白, 特异抗体, ATP 酶, 环化腺苷酶, 5'-核 苷酸酶、葡萄糖-6-磷酸酶等	
细胞汁	嘌呤和嘧啶代谢酶类、氨基 酸合成酶系, 可溶性蛋白类	RNA (主要为 tRNA) 占总量 30%

适当的介质中进行差速离心, 各组分因质量大小不同, 分别沉降于离心管的不同区域, 将它们分离后即得所需组分, 常用的离心介质有蔗糖, Ficoll(一种蔗糖聚合物)和葡萄糖-聚

乙二醇等高分子溶液。所选介质是否合适，对分离效果影响甚大。

三、提取

提取也称抽提或萃取，其作用是将经过处理或破碎的细胞置于一定的溶剂中，在一定的条件下，使被提取的生物大分子充分释放出来。影响提取效果的主要因素有：被提取物质在溶剂中的溶解度大小以及被提取物质由固相扩散到液相的难易程度，而溶解度的大小又取决于溶质(生物大分子)的分子结构和溶剂的理化性质。一般来讲，极性物质易溶于极性溶剂，非极性物质易溶于非极性溶剂；碱性物质易溶于酸性溶剂，酸性物质易溶于碱性溶剂；温度升高，溶解度增大；溶液 pH 值远离溶质(生物大分子)的等电点，溶解度增大；应用两个互不相容的液相抽提时，也遵循分配定律，但在制备生物大分子时，影响因素颇多，故需根据经验和实验条件，灵活掌握。

(一) 蛋白质和酶的提取

大多数蛋白质溶于水、稀盐、稀酸或稀碱中(表 1-2)，所以，一般采用水溶液提取蛋白质，其中稀盐溶液和缓冲液因能较好地维持蛋白质的正常结构和生物活性，成为提取蛋白质最常用的溶剂。一些和脂质结合牢固或分子表面含大量非极性侧链的蛋白质可用一种或几种有机溶剂提取。这里仅简要介绍影响盐溶液和缓冲溶液提取蛋白质效果的几个主要因素。

1. 盐浓度