

生物化学 技术原理及其应用

赵永芳 编

15

武汉大学出版社



生物化学技术 原理及其应用

赵永芳 编

—
武汉大学出版社

内 容 简 介

本书由十五章组成，共分四部分：第一部分概述纯化生命分子物质的原理和程序；第二部分介绍分离方法如离子交换层析、亲和层析、凝胶过滤和高效液相色谱等；第三部分介绍鉴定方法如电泳（包括凝胶电泳、聚焦电泳、琼脂电泳和转移电泳等）、薄层层析法和免疫学法（包括单克隆抗体的制备以及抗体或抗原的标记）等；第四部分是介绍常用的几种生化仪器。书中在讲述有关方法的基本原理时，也讲述了操作和应用。

本书可供综合大学、医学院校等有关学生学习之用；还可供从事生物化学工作的有关人员参考。

生物化学技术原理及其应用

赵永芳 编

武汉大学出版社出版

（武昌 珞珈山）

新华书店湖北发行所发行

武汉大学出版社印刷总厂印刷

*

850×1168毫米 1/32 16.25印张 406千字

1988年9月第1版 1988年9月第1次印刷

印数：1—3 200

ISBN 7-307-00282-5/Q·7

定价：3.20元

序

近10年来生命科学发生了“科学的革命”(Thomas Kuhn的“Paradigm”),出现了革命性的技术,使最优秀的实验生物学家过去难于进行的实验成了实验室的常规工作。分子生物学的惊人发展建立了生物工程工业,这不仅对研究生命的复杂机理提供了可能,并且改变了人们对从病毒到人的生物体的认识。

这场革命发生的原因可追溯到1953年DNA双螺旋结构的发现,以及1970年以来革命性的技术的出现:DNA重组、基因克隆化、限制性内切酶、DNA序列分析等。其中克隆化比任何其他技术更重要,它改变了生物学的面貌。

生物学的发展需要涉及许多其他学科的知识和技术。因而许多学科很自然地结合起来了,传统的学科与学科之间,科学与技术之间的界限也逐渐消失。有些知识和技术很可能使两个完全不相关的领域互通信息,互相了解。科学和技术紧密地联系了。技术的发展推动学科的前进,学科的前进又促使技术的发展。技术是发展科学的动力。两者是相辅相成的。

武汉大学生物专业赵永芳同志从一九七六年起讲授《生物化学技术原理及其应用》。经过十余年的教学实践和对最初教研室集体撰写的讲义不断的修改和补充,演化产生的这本以生化技术为主的教科书,因而是一本成熟的教科书。这本书具有下列的优点:(一)文字简洁明瞭,易于阅读;(二)内容丰富,努力跟上生化技术的最新发展;(三)理论联系实际,基本原理、操作方法和具体应用结合得较好;(四)每章附有思考题和参考文献。这

教科书是适合生化专业和其它有关专业如病毒学、细胞生物学、分子生物学、遗传学等本科生的教材和研究生的参考书，是一本优秀的教科书。它的出版值得欢迎，特此介绍和推荐。

高尚荫

1987.2.

编者的话

随着生物学、特别是分子生物学的迅速发展，生物化学技术的应用越来越广泛；生物化学技术理论的研究也越来越深入，从而使其逐渐形成了一门独立的分支学科。我校从一九七六年起在生化专业开设了生物化学技术理论及实验课程。当时所用教材为集体撰写。近年在此教材经多次修改的基础上，参考国内外的一些文献资料，根据部分学生和教师的建议，并结合编者从事教学及科研的体会，重新编写了这本从技术到理论更臻完善的、适合生化专业本科生和生物系研究生使用的生物化学技术教科书。

本书主要论述生物大分子物质的制备程序；纯化方法；鉴定方法和生化仪器等内容，共分十五章。每章一般都按基本原理、操作步骤和具体应用等格式阐述。其中应用方面介绍的实例仅用来说明有关方法所涉及的某些参数，而不是对每一问题的全面评论。在每章的后面附有思考题和主要参考文献，以便读者学习。

本书在编写和脱稿过程中，承中国科学院学部委员、著名病毒学专家高尚荫教授的指导和审阅，并为其撰写序；承刘正雄副教授的支持和关心。又本书初稿各章分别承严家骥教授、朱汝璿教授、卢文筠教授、方慈祺副研究员、王鄂生副教授和方世国副教授的审阅并提出宝贵意见。编者向他们致以深切的谢意。此外，编者对生化技术组的同志以及绘制插图的刘启融同志表示感谢。

生物化学技术涉及学科很多。限于编者水平，书中难免错漏和欠妥之处，希望读者指正，以便修改。

最后，编者深切感谢武汉大学出版社的大力协助。

一九八七年二月

目 录

第一编 概 论

第一章 生物大分子物质的制备	(1)
第一节 材料的选择与处理	(1)
一、有效成分的特性.....	(1)
二、材料选择的一般原则.....	(2)
三、材料的处理.....	(2)
1.动物脏器 (2) 2.植物组织 (3) 3.微生物 (3)	
第二节 建立测定方法	(3)
一、目的与要求.....	(3)
二、测定方法.....	(4)
1.光谱法 (4) 2.电化学法 (4)	
第三节 细胞的破碎	(5)
一、机械破碎.....	(5)
1.研磨法 (5) 2.组织捣碎器法 (5) 3.超声波法 (5)	
4.压榨法 (6) 5.冻融法 (6)	
二、溶胀和自溶.....	(6)
1.溶胀 (6) 2.自溶 (6)	
三、化学处理法.....	(6)
四、酶法.....	(7)
第四节 抽提	(7)
一、抽提方法.....	(7)
二、影响抽提有效成分的因子.....	(7)

1. pH值 (7) 2. 溶剂的极性和离子强度 (8) 3. 蛋白酶
- 或核酸酶 (8) 4. 温度 (9) 5. 搅拌 (9) 6. 氧化 (9) 7. 金属离子 (10)
8. 抽提液与抽提物的比例 (10)

第五节 浓缩 (10)

- 一、沉淀法 (10)
- 二、吸附法 (10)
- 三、超过滤法 (11)
- 四、透析浓缩法 (11)
- 五、减压蒸馏浓缩法 (12)
- 六、冰冻干燥法 (12)

第六节 纯化方案的设计原则 (13)

- 一、纯化方案的选择 (13)
- 二、纯化方案的评价 (13)

第七节 有效成分的纯度和性质的分析 (16)

第八节 实例 (17)

- 一、制备高纯度的人转铁蛋白的快速方法 (17)
- 二、叶绿体的提取与4.5SRNA的制备 (17)
- 三、细菌质粒DNA的提取 (18)

第二编 纯化方法

第二章 沉淀法 (19)

第一节 基本原理 (19)

第二节 沉淀的类型及操作 (19)

- 一、盐析法 (19)

1. 盐的分级沉淀 (20) 2. 盐析曲线的制作 (21) 3. 影响盐析的因子 (23) 4. 脱盐 (26)

- 二、有机溶剂沉淀法 (27)

- 三、蛋白质沉淀剂 (28)

1. 碱性蛋白质 (29) 2. 凝集素 (29) 3. 重金属 (29)

- 四、聚乙二醇沉淀作用 (29)

- 五、选择性沉淀法 (30)

六、结晶	(30)
第三节 实例	(31)
一、脾磷酸二酯酶的纯化	(31)
1. 丙酮粉的制备 (31) 2. 第一次硫酸铵分级分离 (32) 3. 第二次硫酸铵分级分离 (32) 4. 丙酮分级分离 (32)	
第三章 吸附层析法	(34)
第一节 吸附柱层析	(36)
一、常用术语 (对所有层析都适用)	(36)
1. 固定相 (36) 2. 流动相 (37) 3. 操作容量 (37) 4. 床体积 (37) 5. 洗脱体积 (37) 6. 外水体积 (37) 7. 内水体积 (37) 8. 基质体积 (37) 9. 膨胀度 (38) 10. 分配系数和迁移率 (38)	
二、基本原理	(38)
三、吸附剂	(39)
1. 吸附剂的选择 (39) 2. 吸附剂的性质 (39)	
四、洗脱剂	(42)
五、层析柱的制备及层析操作	(43)
1. 层析柱 (44) 2. 吸附剂的用量 (44) 3. 装柱 (44) 4. 上样和洗脱 (45) 5. 吸附剂的再生 (46)	
六、应用与实例	(46)
1. 应用 (46) 2. 实例 (47)	
第二节 薄层层析法	(49)
一、具体操作及注意事项	(51)
1. 薄层板的制备 (51) 2. 点样 (54) 3. 展层 (54) 4. 显色 (57)	
二、实例	(62)
第三节 聚酰胺薄膜层析法	(63)
一、基本原理	(64)
二、DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	(65)
1. 试剂及样品的制备 (66) 2. 展层剂与展层 (67) 3. 注意事项 (67)	
三、DABTH-氨基酸的薄层法在蛋白质顺序分析中的应用	(69)
1. DABTH-氨基酸的制备 (71) 2. DABITC在手工液相测定顺序法中的应用 (71) 3. 利用薄层法测定DABTH-氨基酸 (71)	

第四章 分配层析法—纸层析法 (75)

第一节 基本原理 (75)

第二节 影响 R_f 值的主要因素 (76)

一、分离物的结构 (76)

二、流动相 (展层剂) (77)

1. 性质 (77) 2. 组成 (77) 3. pH值 (77)

三、温度 (78)

四、滤纸的性质 (78)

1. 滤纸的选择 (79) 2. 滤纸的处理 (79)

第三节 应用 (79)

一、氨基酸的定性分析 (79)

1. 样品制备和点样 (79) 2. 双向层析 (80) 3. 显色 (81) 4. 测 R_f 值

二、氨基酸的定量分析 (81)

1. 比色法 (81) 2. 光密度法 (81)

第五章 离子交换层析 (84)

第一节 基本原理 (84)

第二节 离子交换剂的分类及其性质 (87)

一、分类 (88)

1. 疏水性离子交换剂 (88) 2. 亲水性离子交换剂 (90)

二、性质 (95)

1. 颜色与形状 (95) 2. 交联度 (96) 3. 吸水量或膨胀度 (96) 4. 交换容量 (99) 5. 稳定性 (102) 6. 比重 (102) 7. 流速 (103)

第三节 离子交换剂与缓冲液的选择 (106)

一、离子交换剂的选择 (106)

1. 对阴、阳离子交换剂的选择 (106) 2. 对强、弱离子交换剂的选择 (107) 3. 对不同离子型交换剂的选择 (107) 4. 对不同基质离子交换剂的选择 (107)

二、缓冲溶液的选择 (108)

1. 缓冲液组分的选择 (108) 2. 缓冲液离子强度和pH值的选择 (108)

第四节 操作 (110)

一、离子交换剂的处理、再生和转型 (110)

二、分离物质的交换 (111)

三、物质的洗脱与收集	(112)
------------	---------

第五节 应用	(115)
--------	---------

一、制备、纯化生物物质	(116)
-------------	---------

- 1.用强阳离子交换剂树脂732分离四种核苷酸 (116)
- 2.用离子交换法从胰酶水解的肠粘膜液中提取肝素钠 (117)
- 3.用DEAE-纤维素22层析法纯化解酚假单胞菌邻苯二酚-2、3-双加氧酶 (118)

二、测定蛋白质的等电点	(119)
-------------	---------

△ 第六章 凝胶过滤	(122)
------------	---------

第一节 凝胶的分类及性质	(122)
--------------	---------

一、葡聚糖凝胶	(122)
---------	---------

- 1.理化性质 (124)
- 2.稳定性 (125)
- 3.吸附性 (125)

二、琼脂糖凝胶	(128)
---------	---------

三、聚丙烯酰胺凝胶	(131)
-----------	---------

四、Sephacryl	(132)
-------------	---------

第二节 基本原理	(134)
----------	---------

第三节 操作	(137)
--------	---------

一、凝胶的选择和处理	(137)
------------	---------

- 1.凝胶的选择 (137)
- 2.凝胶用量的计算 (138)
- 3.凝胶的处理 (138)

二、凝胶柱的制备	(139)
----------	---------

- 1.柱的选择 (139)
- 2.装柱 (141)
- 3.凝胶柱的鉴定 (141)

三、加样、洗脱和测定	(141)
------------	---------

- 1.加样 (141)
- 2.洗脱 (144)

四、凝胶柱的再生和处理	(146)
-------------	---------

- 1.再生 (146)
- 2.脱水处理 (147)

第四节 应用	(149)
--------	---------

△ 一、脱盐和浓缩	(149)
-----------	---------

二、分离提纯	(149)
--------	---------

三、去热源物质	(150)
---------	---------

四、测定分子量	(150)
---------	---------

- 1.用凝胶柱层析制作测定蛋白质分子量的标准曲线的方法 (152)
- 2.用葡聚糖凝胶薄板测定蛋白质分子量 (154)

五、其它	(156)
------	---------

第七章 亲和层析..... (159)

第一节 基本原理..... (160)

第二节 操作..... (163)

一、基质的选择..... (163)

二、配体的选择..... (164)

1. 对欲纯化的大分子物质具有较强的亲和力 (164) 2. 具有一个与
基质共价结合的基团 (166)

三、亲和吸附剂的制备..... (166)

1. 活化 (166) 2. 偶联 (169) 3. 配体结合量的测定 (170)

四、特异性的吸附..... (171)

五、大分子物质的分离..... (174)

六、亲和层析柱的再生..... (176)

第三节 提高吸附剂与大分子物质亲和力的途径..... (177)

一、在配体和基质之间引入“手臂”(arms)..... (177)

1. 原理 (177) 2. 吸附剂衍生物的制备 (178)

二、增加配体取代的程度..... (179)

三、配体与基质以最少的键连接..... (179)

四、基质多孔性的影响..... (180)

五、其它..... (183)

第四节 应用..... (183)

一、分离纯化大分子物质..... (183)

1. 纯化抗体、抗原及其复合物 (183) 2. 分离纯化糖蛋白 (185)

3. 分离巯基蛋白 (185) 4. 分离核酸 (185) 5. 其它 (185)

二、研究酶的结构与功能..... (188)

第八章 聚焦层析..... (190)

第一节 基本原理..... (190)

一、多缓冲剂和多缓冲交换剂..... (190)

1. 多缓冲剂 (190) 2. 多缓冲交换剂 (191)

二、聚焦层析的原理..... (192)

1. pH梯度溶液的形成 (193) 2. 蛋白质的行为 (193) 3. 聚焦效应 (194)

第二节 操作..... (196)

一、选择多缓冲交换剂及相应的缓冲液	(196)
二、多缓冲交换剂用量的选择	(197)
三、多缓冲交换剂的处理	(200)
四、样品的准备	(200)
五、上样和洗脱	(201)
六、分离后的样品中多缓冲剂的去除	(201)

第三节 应用 (201)

一、分离模型蛋白质	(202)
二、分离复杂的物质	(203)
1. 分离鸡蛋白组分 (203)	
2. 分离麋鹿肌肉匀浆液中的蛋白质 (204)	
3. 鉴定铁氧(化)一还(原)蛋白—NADP ⁺ 氧化还原酶的某些特性 (205)	

第九章 气相色谱 (208)

第一节 基本原理 (210)

一、常用术语	(210)
1. 载气 (210)	
2. 担体 (210)	
3. 固定液 (211)	
4. 死时间、保留时间和校正保留时间 (211)	
5. 死体积 (211)	
6. 滞留因子 (212)	
7. 基线 (212)	
8. 分离度 (212)	

二、原理	(212)
------	---------

第二节 气相色谱仪的构造 (213)

一、气源、载气流速的控制和测量	(214)
二、进样系统	(214)
三、恒温室	(215)
四、色谱柱	(215)
1. 柱的形状及分类 (215)	
2. 担体 (216)	
3. 固定液的分类及选择 (217)	
4. 色谱柱的制备 (221)	
五、检定器	(221)
1. 热导池检定器 (221)	
2. 氢火焰离子化检定器 (223)	

第三节 操作 (224)

一、操作要点	(224)
二、操作条件的选择	(224)
1. 载气流速 (224)	
2. 柱温 (225)	
3. 进样量和进样速度 (225)	
三、故障的分析与排除	(225)

1. 分离不完全 (225)	2. 几个峰重叠在一起 (225)	3. 分析时间过长 (225)
4. 色谱峰不规则 (225)		
第四节 定性和定量分析方法		(226)
一、定性分析方法		(226)
1. 利用校正保留值定性 (226)	2. 利用“加入法”定性 (227)	
3. 利用保留值与化合物结构之间的关系定性 (227)		
二、定量分析方法		(228)
1. 校正因子的概念 (228)	2. 定量方法 (229)	
第五节 应用		(233)
一、蛋白质和氨基酸的分析		(233)
二、核酸的分析		(234)
三、糖类的分析		(234)
四、脂肪酸的分析		(234)
五、农药的分析		(237)
第十章 高效液相色谱		(239)
第一节 基本原理		(239)
第二节 应用		(242)
一、定性和定量分析		(242)
二、酶活性的测定		(244)
三、蛋白质分子量的测定		(247)
四、分离纯化核酸和蛋白质		(248)
1. 用反相HPLC分离核苷酸 (248)	2. 用高效液相离子交换色谱分离核糖核蛋白复合物 (248)	3. 用高效聚焦色谱分离几种碱性谷胱甘肽转移酶的同功酶 (249)
五、附表		(251)
第十一章 固定化的酶和微生物		(257)
第一节 制备方法		(258)
一、固定化酶		(258)
1. 载体结合法 (258)	2. 交联法 (264)	3. 包埋法 (264)
二、固定化微生物		(265)
第二节 制品的性质		(265)
一、酶的相对活力		(265)

二、活力曲线与最适pH	(268)
三、稳定性	(272)
四、米氏常数	(273)
五、其它	(276)
第三节 应用	(277)
一、工业方面	(277)
二、医学方面	(279)
三、生化分析方面	(281)
1. 自动分析 (281) 2. 酶电极 (282) 3. 分析生物大分子物质的结构 (283) 4. 研究酶的功能和反应机理 (284) 5. 亲和层析 (284)	
四、应用实例	(285)
1. 固定化5'-磷酸二酯酶的制备方法 (重氮法) (285) 2. 固定化具有葡萄糖异构酶活性菌体的制备方法 (交联法) (288) 3. 固定化抗坏血酸氧化酶的制备方法 (肽法) (288)	

第三编 鉴定方法

第十二章 电泳法	(290)
第一节 基本原理	(292)
第二节 纸电泳	(295)
一、材料准备	(295)
1. 电泳槽 (295) 2. 缓冲液的选择 (296) 3. 滤纸的选择和剪裁 (296)	
二、点样	(298)
1. 点样位置和形状 (298) 2. 点样量 (298) 3. 点样方法 (299)	
三、电泳	(299)
四、烘干	(300)
五、显色	(300)
六、定量测定法	(300)
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(303)
一、基本原理	(304)
1. 聚丙烯酰胺的合成 (306) 2. 分离效应 (310)	
二、操作	(313)
1. 不连续垂直柱状凝胶电泳 (313) 2. 不连续垂直板凝胶电泳 (326)	

3. 连续的盘状凝胶电泳和垂直板凝胶电泳 (328) 4. 线性或阶梯式梯度的柱状及板状凝胶电泳 (332) 5. 双向电泳 (337)

第四节 琼脂电泳 (340)

- 一、基本原理 (340)
- 二、操作 (340)
1. 缓冲液的配制 (340) 2. 琼脂糖凝胶板的制备 (340) 3. 加样 (341) 4. 电泳 (341) 5. 观察 (342)

- 三、应用实例 (342)

第五节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (343)

- 一、基本原理 (343)
- 二、操作 (344)
1. 凝胶浓度的选择 (344) 2. 样品的制备 (345) 3. 电泳条件 (345)
4. 固定 (345) 5. 染色 (345) 6. 计算迁移率 (R_f 值) (346)

第六节 聚丙烯酰胺凝胶电泳聚焦 (346)

- 一、基本原理 (347)
- 二、两性电解质的理化性质 (348)
1. 缓冲性能强 (349) 2. 导电性能好 (349) 3. 分子量小 (349)
4. 紫外吸收值低 (349) 5. 一般与分离样品不起化学反应 (349)
- 三、两性电解质的PH范围及用量的选择 (350)
- 四、测定蛋白质等电点的操作 (351)
1. 凝胶配制 (351) 2. 加样 (353) 3. 聚焦 (353) 4. 固定与染色 (353)
5. 样品PH的测定 (353) 6. 蛋白质的洗脱 (355) 7. 等电点的测定 (356)

第七节 印迹法 (或转移电泳) (356)

- 一、基本原理 (357)
- 二、操作及注意事项 (以蛋白质为例) (358)
1. 蛋白质的分离 (358) 2. 印迹 (358) 3. 鉴定 (359)
- 三、应用 (361)
1. 分析和制备特异成分 (361) 2. 检测生物大分子物质之间的相互作用 (361) 3. 实例 (362)

第十三章 免疫化学法 (365)

第一节 抗体的性质、制备及纯化 (365)

- 一、抗体的性质 (365)
- 二、多克隆抗体的制备 (367)