



全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定



生物化学实验技术

●
●
生理生化专业用

●
周顺伍 主编

北京农业大学出版社

全国高等农业院校教材

全国高等农业院校教材指导委员会审定

生物化学实验技术

周顺伍 主编

生理生化专业用

北京农业大学出版社

(京)第164号

**全国高等农业院校教材
生物化学实验技术**

周顺伍 主编

责任编辑：赵玉琴

*

**北京农业大学出版社出版
(北京市海淀区圆明园西路二号)**

北京外文印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

*

787×1092毫米 32开本 7.25 印张 160 千字

1991年10月第1版 1991年10月第1次印刷

印数：1—2500

ISBN 7-81002-232-6/Q·233

定 价： 1.90 元

主 编 周顺伍 (北京农业大学)
编 者 喻梅辉 (新疆八一农学院)
隋德新 (江苏农学院)
主 审 汪沛洪 (西北农业大学)
齐顺章 (北京农业大学)

前 言

生物化学实验技术主要用于测定生物体内各种物质的化学本质和含量、分离和提纯这些物质，分析它们的化学结构和立体构象以及它们在体内发生的种种变化，探讨它们的结构与生物功能的关系，揭示生命现象的分子机理，进而利用这些技术人为的合成或改造这些物质，为生产实践服务。

像其它实验性学科一样，生物化学的发展是与生物化学实验技术的进步分不开的。在生物化学的发展过程中，每步重大的进展都伴有新技术的应用。例如，层析、电泳技术的出现推动了对生物体各种组成物质成分的认识；同位素示踪法的应用大大加快了生物体内代谢途径的研究；氨基酸顺序分析法和 X-衍射晶体学方法使得人们能够从本世纪 50 年代开始认识到生物大分子——蛋白质的核酸的结构。近年来出现的 DNA 序列分析技术、重组技术及合成技术导致了基因工程、蛋白质工程的出现，使得人们有可能真正从分子水平上来认识生命活动的本质，并能按人们的意志改变生物的遗传性状，达到为人类服务的目的。

当前新的生物化学技术正不断涌现，原有的技术也在不断改进，许多技术如氨基酸顺序分析、DNA 序列分析、DNA 合成等正走向自动化，这不仅提高了对生命物质分析的灵敏度和精确度，使得原来不能研究的问题现在能够得以了解，且大大加快了研究的速度。可以预见，伴随着生化技术的不断改进和创新，人们对生命奥秘的认识将更加深入，运用这些技术必将创造出更多的成果来为人类服务。

生物化学实验技术是以物理学、化学和生物学的理论和

技术为基础的，这些学科的进步不断推动着生物化学实验技术的创新和改革；同时生物化学技术又为各有关学科广泛采用，现在生物化学实验技术已成为生物科学工作者必须掌握的知识与技能。

为适应生物科学技术发展的需要，近年来许多农业院校为各学科的硕士研究生开设了《生物化学实验技术》课，取得了很好的效果。本书即在北京农业大学等院校为动物生理生化专业本科生和动物类学科硕士研究生开设的《生物化学实验技术》课的基础上编写的，可供各有关院校使用。由于生物化学实验技术内容十分广泛，开课的条件有限，也考虑到这门课程主要的目的是训练学生的基本操作技能，所以本书不是全面介绍所有的生物化学技术，只是根据需求和可能选择了一部分内容，通过这些实验使学生能掌握生物化学技术中运用最广泛、最基本的方法，为今后进一步提高打下基础。

本书在介绍各种技术时注意了系统性，也注意了由浅入深的原则。考虑到农业院校基础课的特点特别注意了基本操作。在每个实验中重点介绍一种实验技术，使实验能达到一定的目的，同时也注意实验之间技术的相互衔接。实验中对技术的基本原理作了必要的介绍，教学实践中我们感到结合实验讲解技术原理比较容易达到学以致用目的，但也可采用与实验分开进行系统讲授技术原理的方式。

本书承西北农业大学汪沛洪教授，北京农业大学齐顺章教授，细心审阅，编写过程中得到许多同行的关心和支持，在此表示衷心的感谢！

编者

1989年12月

目 录

实验 1	凝胶层析法	1
实验 2	血浆 IgG 的分离纯化	10
实验 3	细胞色素 C 的制备及测定	20
实验 4	蓖麻毒素的分离纯化及性质测定	28
实验 5	紫外吸收法测定蛋白质含量	38
实验 6	Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定 蛋白质含量	41
实验 7	碱性磷酸酶的分离提纯	44
实验 8	碱性磷酸酶的比活性测定	48
实验 9	碱性磷酸酶米氏常数的测定	55
实验 10	猪胰蛋白酶的制备	60
[附]	氨的等温蒸馏测定法	73
实验 11	红细胞膜的制备及其组成分析	76
实验 12	聚丙烯酰胺凝胶柱状电泳	82
实验 13	植物过氧化物酶同工酶的聚丙烯 酰胺凝胶电泳	92
实验 14	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 测定蛋白质的分子量	96
实验 15	聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法测定 蛋白质的分子量	106
实验 16	凝胶等电聚焦电泳法测定蛋白质 的等电点	114
实验 17	Edman 法分析蛋白质及多肽的 N-末端氨基酸	121

实验 18	DNS - Cl 法分析蛋白质及多肽的 N-末端氨基酸	129
实验 19	抗血清的制备	137
实验 20	抗血清效价及纯度测定	140
实验 21	免疫电泳技术	148
实验 22	酶联免疫吸附测定法(ELISA)	151
实验 23	由动物组织中制备 DNA	159
实验 24	动物肝脏中总 RNA 的制备	162
实验 25	高分子量植物核 DNA 的制备	165
实验 26	紫外吸收光谱法测定核酸类物质	170
实验 27	化学法测定核酸的含量	174
实验 28	核酸的琼脂糖凝胶电泳及其检测	177
实验 29	轮状病毒 RNA 的制备及其基因 结构的电泳分析	184
实验 30	质粒 DNA 的提取与鉴定	190
实验 31	EcoRI 酶解质粒 pBR 322 的反应 及其鉴定	199
实验 32	用质粒 DNA 转化 <i>E. coli</i> 及 转化结果的检测	205
附录		
一、	层析技术常用数据	211
二、	硫酸铵饱和度常用表	217
参考文献		219

实验 1 凝胶层析法

原理：凝胶层析 (gel chromatography) 是本世纪 60 年代发展起来的一种层析技术，有多种名称，如凝胶过滤 (gel filtration)、分子筛过滤 (molecular sieve filtration)、凝胶渗透层析 (gel permeation chromatography) 等。其基本原理是利用动相中被分离物质的分子量大小不同及静相 (凝胶) 具有分子筛的特点，将被分离物质按分子大小分开，达到分离纯化的目的。

凝胶是由具有许多网眼 (每种凝胶网眼的孔径大小是一定的，不同凝胶网眼的孔径不同) 的海绵状基质构成的球状颗粒。网眼分布在颗粒上有如“筛眼”，小于筛眼的物质分子均可透过，大于筛眼的则不能，故又称分子筛。凝胶所以能将不同物质分开是因为当被分离的物质通过凝胶时，小于筛眼的分子将完全渗入到凝胶颗粒内部，沿凝胶孔道移动，即从一个颗粒流出，又进入另一颗粒，如此延续下去，直到流过凝胶柱为止。因而流程漫长，受到较大的阻力，流速慢；大于筛眼的分子则完全不能进入凝胶颗粒内部而只是随着溶剂沿凝胶颗粒的间隙流动，其流程较短、阻力小、流速也快。由此可见，大于筛眼的分子将最先流出层析柱；小于筛眼的分子最后流出；分子大小介于完全不能进入凝胶颗粒和完全渗入之间的物质，则居中流出。这样就将分离物质按分子的大小分开。利用此特点达到分离纯化物质的目的 (见图 1-1)

具有分子筛效应的凝胶，主要有葡聚糖 (商品名为 Sephadex)、琼脂糖 (商品名为 Sepharose)、聚丙烯酰胺凝胶

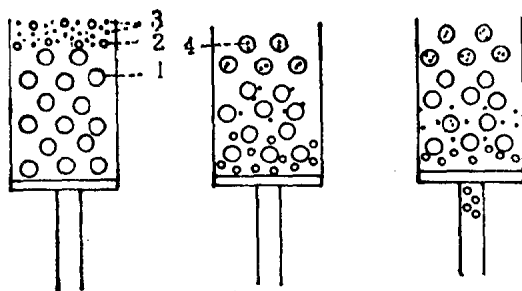


图 1-1 凝胶层析简单原理示意图
1. 凝胶 2. 大分子 3. 中分子 4. 小分子

(商品名为 Bio-gel) 及具有一定网眼的玻璃珠。还有这些凝胶的衍生物。有关各种凝胶的性质见附录一。本实验主要介绍葡聚糖凝胶。葡聚糖凝胶由葡萄糖的多聚物与 1-氯-2, 3-环氧丙烷 ($\text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$) 交联而成(见图 1-2)。环氧



丙烷是引入甘油基将各个多聚葡萄糖单位交联起来, 凝胶网眼的大小由多聚葡萄糖的分子量和制备时环氧丙烷的用量控制。葡聚糖具有较强的亲水性, 在水和电解质溶液中膨胀成为柔软而富于弹性的胶体。其吸水能力与葡聚糖凝胶的交联度有密切关系。交联度大的, 孔径小, 吸水少, 膨胀的程度小; 交联度小的, 孔径大, 吸水多, 膨胀的程度大。因此, 葡聚糖凝胶孔径的大小可以其吸水量的大小来表示, 常以 G-10 至 G-200 号码标记。G 后面的数字是其吸水量 (毫升水/克干胶) 乘以 10 所得的值。如 G-25 即表示吸水量为 2.5 ml/g 干胶。市售有 G-10, G-15, G-25, G-50, G-75, G-100, G-150, G-200 等型号。G-75 以上的凝胶因吸水量

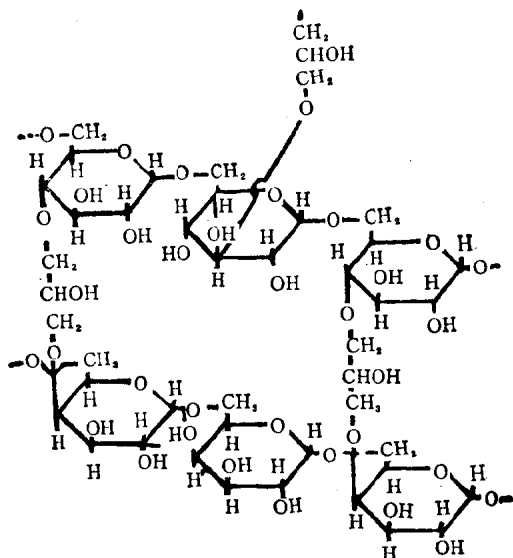


图 1-2 葡聚糖凝胶的基本结构
(引自张龙翔等, 生化实验方法和技术, 1961)

大, 膨胀后形态柔软易变, 统称为软胶。G-75 以下的称为硬胶。

葡聚糖凝胶可分离的分子大小从几百到数十万道尔顿。可根据被分离物质的分子大小及目的选择使用。一般说 Sephadex G 10-50 通常用于分离肽及“脱盐”。Sephadex G 75-200 用以分离各类蛋白质。

凝胶层析是一种物理分离法。葡聚糖凝胶基本上不带电荷、呈惰性, 不与被分离物质发生反应, 所以分离的效果较好。然而由于是葡萄糖的聚合物, 因而仍有少量活性羟基, 能吸附少量蛋白质等被分离的物质。为了克服这个缺点, 一般使用含有离子强度达 0.08 的 NaCl 等中性盐作洗脱液。

本实验通过层析血红蛋白（全排阻）和溴酚蓝（全渗透）的混合物，以掌握凝胶层析的原理及柱层析的装柱、上样、洗脱等基本操作。

试剂及器材：

1) 血红蛋白制备：取新鲜抗凝全血 5 ml，2000 r/min 离心 10 min，弃血浆。用三倍于血球体积的 0.9% NaCl 溶液洗血球（颠倒混匀），离心弃去上清液，重复 1—2 次，至上清液清亮为止。于血球中加入 10 倍体积的蒸馏水，混匀，使血球破碎，以棉花过滤，即得血红蛋白溶液。

2) 用蒸馏水配制 1 mg/ml 的溴酚蓝溶液。

3) Sephadex G-25

4) 1×20 cm 层析柱、洗脱瓶

5) 溶脱液：0.2 mol/L NaCl 溶液

操作：

1) 凝胶溶胀（水化）：商品葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶均为干燥颗粒。使用前必须水化溶胀。商品琼脂糖凝胶呈悬浮胶体可直接使用，玻璃珠不用溶胀。

凝胶溶胀有两种方法：一种是将所需葡聚糖凝胶浸入蒸馏水中于室温下溶胀；另一种是置于沸水浴中溶胀。各种葡聚糖凝胶在两种溶胀方法中所需的时间不同（见附录一）。必须浸泡足够的时间以便凝胶充分溶胀。两种方法中，沸水溶胀不但节省时间，还可以杀灭凝胶中污染的细菌并排出气体。

凝胶溶胀后，需用蒸馏水洗涤几次，每次应将沉降缓慢的细小颗粒随水倾倒出去，以免在装柱后产生阻塞现象，降低流速。洗涤后将凝胶浸泡在洗脱液中待用。

一支层析柱中应该装入的干胶量可以用下法推算：称取

18 所需型号的葡聚糖干胶，放在 5 ml 的量筒中，用上述室温溶胀的方法充分溶胀，观察溶胀后凝胶的体积。然后在层析柱中加水到所需柱床高度，将水倒出，量取体积。根据 18 干胶溶胀后的体积和所需柱床体积，即可推算出干胶的需要量。

2) 装柱：将层析剂装入柱中用以进行层析的方法称柱层析法。作层析用的柱子称层析柱。层析柱有玻璃的和透明塑料的两种。柱子的一端为进口，另一端为出口，出口端底部有烧结玻璃砂板或尼龙布，能阻止层析剂流出，溶剂则可流过。如果没有市售的层析柱，可以选用粗细均匀，长短合适的玻璃管，在两端塞上合适的胶塞，胶塞中插有细玻璃管，在一端放一层尼龙布为出口，即可作为层析柱使用。层析柱的长短粗细根据实验的目的而定，一般说来，柱越长，分离效果越好。但柱过长，层析时间长，样品易稀释造成扩散，反而影响分离效果。柱的内径不宜过细，1 cm 以下易发生“管壁效应”，即柱中央部分的组分移动较快，管壁周围的则移动较慢，造成分离混乱。当然，柱的内径也不宜过粗。

凝胶层析中，在把小分子物质 ($MW < 1500$)，如无机盐或其它物质与大分子物质 ($MW > 20\,000$) 分离时，层析柱的体积一般约为样品的 4—10 倍，高度与直径的比例为 5:1 至 15:1 之间。这类柱也称为“脱盐”柱。常用网孔很小的凝胶如 G-25。用以将生物大分子物质彼此分开的分级层析柱，体积应为样品体积的 25—100 倍。柱长度与直径的比例为 20:1—100:1。本实验中使用“脱盐”柱。

装柱的操作过程如下：将层析柱垂直固定在铁架上，打开柱下口开关。将溶胀好的凝胶放在烧杯中，使凝胶表面的水层与凝胶体积相等。用玻璃棒搅匀凝胶液，顺玻璃棒灌入

柱内。此时柱下口一边排水，上口一边加入搅匀的凝胶，可见凝胶连续均匀地沉降，逐步形成凝胶柱。当到达所需凝胶柱高度时（本实验达 17 cm），立即关闭下口，使凝胶完全沉降。凝胶柱一般离柱顶 3—5 cm，以覆盖一层溶液。

灌注凝胶时要求将均匀的凝胶一直加到所需柱床高度，不能时断时续，否则将出现分层或“纹路”等毛病。若出现这些现象，可以用玻璃棒将已形成的柱床逐步搅起，直至出毛病的部分，再继续加入搅匀的凝胶悬液。若在灌好凝胶后才发现“纹路”、分层等现象时，要重新装柱，以免影响层析效果。在做大型的凝胶柱时，灌注的凝胶是否均匀往往从表面上看不出来。所以使用前应该用一些带色的大分子物质如细胞色素C、血红蛋白或专用的蓝色葡聚糖-2 000（Blue dextran-2 000）通过凝胶柱，以检查形成的带色斑带是否整齐，若斑带歪斜，应该重新装柱，直至达到要求。

刚从冰箱中取出的凝胶液，不能马上用来灌注，应平衡至室温后再用，不然装好的凝胶柱会产生大量的气泡影响层析。

在整个灌注凝胶的过程及使用中，凝胶柱面上一定要覆盖着一层溶液，以免进入空气。若进空气再加入溶液时，凝胶柱中易形成气泡。

装好的凝胶柱，使用时应该用相当于柱床体积两倍或更多的洗脱液（本实验中为 0.2 mol/L NaCl 溶液）流过凝胶柱，以压实凝胶。

3) 上样：将样品加入到凝胶柱中，准备层析的过程称上样。上样时，应该注意上样量的多少，样品的粘稠度及离子强度。这三个因素会影响到以后层析的效果。一般说来“脱盐”层析时，上样体积可为柱体积的 10%—25%；生物大

分子的分级分离，约为柱体积的1%—5%。样品的粘稠度一般不宜大于洗脱液粘稠度的2倍以上，不然洗脱峰会变宽和歪斜。离子强度要达到0.08，以免产生机械性吸附。

上样时先打开层析柱的下口开关，放出凝胶柱面上的溶液，或用皮头吸管吸取，使液面与凝胶表面相平齐，但切忌液面低于凝胶表面。然后将样品加在凝胶表面，打开下口开关，控制流速，使样品慢慢渗入凝胶内。本实验以血红蛋白与溴酚蓝的混合物为样品。在试管中加血红蛋白和溴酚蓝溶液各5滴，混匀，再用皮头吸管加到凝胶柱表面。加样时注意勿将胶柱面冲起形成凹面，也不能沿管壁流下，以免样品沿柱壁与凝胶柱的间隙漏下。当慢慢渗入凝胶的样品液液面与凝胶柱面相平时，关闭下口，完成上样。然后在凝胶柱面上加一层（3—5 cm）洗脱液，接上洗脱瓶准备洗脱。

4) 洗脱：用规定的溶液（本实验用0.2 mol/L NaCl溶液）流过样品，使分子量不同的样品逐步分开并先后由柱床流出的过程为洗脱。所用溶液称洗脱液。洗脱液放在贮液

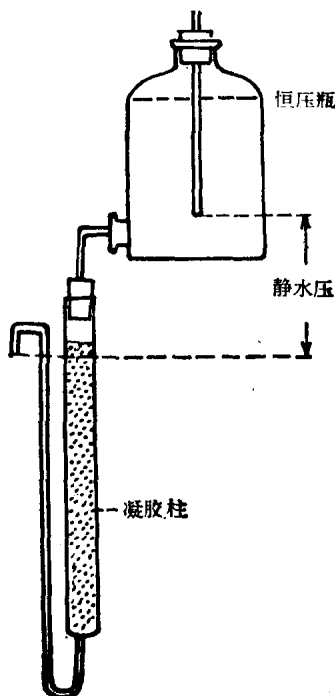


图 1-3 恒压瓶、凝胶柱及静水压

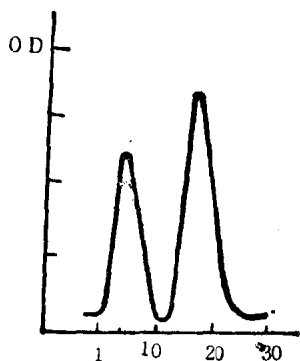
瓶中并与层析柱相通连(见图 1-3)。洗脱时只要打开层析柱下口开关,洗脱液即可流出。

洗脱过程中保持恒定的流速是柱层析获得良好分离效果的重要条件。因为凝胶层析的分离作用主要取决于分子扩散进入凝胶的机会,流速过快有些分子来不及在分子筛中分配而流出;过慢时已分离的分子会因扩散而混合。因而要保持适当的恒定流速。洗脱液的流速取决于它的静水压。静水压是指洗脱液的液面高出于层析柱出口液面高度(或接触空气的两个液面间的高差)产生的液体压力(见图 1-3),这个高度差越大,静水压越大,洗脱液的流速就越快。以前用来装洗脱液的只是一个普通的细口瓶,将它举高或降低固然可以调节洗脱液的流速,但当达到适当流速后将它放到固定的位置时,却不能自动维持流速的恒定,这是由于随着洗脱液流出,液面逐渐降低,因而静水压下降,流速也将逐渐下降。为了解决这个问题,Marriott 首次将洗脱瓶加塞,并插入玻璃管(图 1-3),使玻管下口深入到洗脱液的深部,这样洗脱液的静水压便等于此玻管下口的液面高出层析柱出口液面的高度,只要溶液不低于玻璃管下口,静水压不再受洗脱液逐渐减少的影响,从而自动保持了流速的恒定,此洗脱瓶称为恒压瓶,也叫马氏瓶。当然,当洗脱液减少至液面低于插入玻管的下口时,便会失去作用,但这时可用及时加入洗脱液来解决。

在凝胶层析中,不仅要保持静水压的恒定,还要使静水压不能过大。这是因为 G-75 以上的软胶胶体柔软易变形,对静水压仅有一定的承受能力,不同软胶的承受能力也不相同,静水压超过凝胶的承受能力时,最初流速会很快,其后随着静水压过大将使软胶变形压紧,流速逐渐降低,最后甚

至流不出。所以，保持恒定正确的静水压（见附录一）是凝胶层析时获得满意结果的必要条件。

本实验中使用的 G-25 属于硬胶，硬胶不易变形，受静水压的影响较小。实验过程中的流速可用恒压瓶下口橡皮管上的螺旋夹控制在 2 ml/min 左右，随着洗脱液的流出，样品逐步被分开。本实验中可见分离成红、蓝两部分，并逐步流出。用试管收集洗脱液，按顺序每管收集 10 滴直到无色为止。收集的每管样品液用 0.2 mol/L NaCl 溶液稀释到 1.5 ml ，用分光光度计在 520 nm 波长处测红色溶液光密度，在 680 nm 波长处测蓝色溶液的光密度。以光密度值为纵坐标，以收集管的顺序号为横坐标，在坐标纸上绘图，可获得



具有两条洗脱峰的曲线，称为 图 1-4 洗脱曲线示意图
洗脱曲线，用以表示被分离物质流出的状态（见图 1-4）。

样品如果无色，则需用特异的方法检测，例如无色的蛋白质可用碘基水杨酸检查（见实验 3）。

目前在柱层析蛋白质或核酸时，已采用蛋白-核酸检测仪监测，它在记录仪的记录纸上能自动绘出洗脱曲线。洗脱下来的样品也可以用部分自动收集器收集，使一些需时较长的柱层析操作方便多了。

5) 凝胶的洗涤及保存：由于凝胶对被分离的物质基本无吸附作用，所以无需“再生”，只要用洗脱液冲洗后即可连续使用。但因多次使用后凝胶颗粒将逐渐沉积压紧，流速将