

生物大分子实验手册

张德安 林永齐 刘兰英 定 澄
陈维多 李希凯 姜言辅 李正强

吉林大学出版社

生物大分子实验手册

张德安 林永齐 刘兰英 定 澄

陈维多 李希凯 姜言辅 李正强

责任编辑：杨济魁

封面设计：张沐沉

吉林大学出版社出版
(长春市东中华路29号)

吉林省新华书店发行
吉林大学印刷厂印刷

开本：787×1092毫米 1/32

1991年12月第1版

印张：15.25

1991年12月第1次印刷

字数：340千字

印数：1—1000册

ISBN 7-5601-1089-4/Q·4

定价：4.10

前 言

就在这块土地上，70年代初曾被视为科学弃儿的生物化学，而今竟成了祖国建设事业中的佼佼者。其理论研究的重大突破，实践应用的丰硕成果，乃至生物工程的崛起为人类未来生存所展现的美好前景，无不吸引着各行各业的工作者积极了解它、认识它、通晓它、动用它，以期在各自的领域做出崭新的成果。由此，生物化学不仅广泛地播种于工、农、医、林、牧、副、渔、国防等各个领地，而且确确实实在发酵、食品、轻工、环保、能源、制药、临床诊断、生物资源开发利用上散发出了奇光异彩。纵观生物化学的建立和发展，无不以生物化学的实验方法及研究技术为前提，而这些方法和技术又都以物理学、化学及生物学的基础理论和实验方法为基础，诸如电子显微镜揭开了生物界微观世界的奥秘，使我们得以看到细胞内的亚显微结构及病毒等超分子的内部结构，层析和电泳技术极大地推进了蛋白质、酶、核酸等生物大分子的分离、分析与结构测定，同位素示踪技术在阐明生物体内的代谢过程中起了决定性的作用，各种光谱技术，核磁共振、顺磁共振、激光拉曼及电子计算技术，不仅使生物化学实验分析提高到一个崭新的水平，而且大量实验数据的积累使之迅速地发展成为一门具有独立的基本概念和原理的学科。可见，掌握生物化学实验方法和研究技术对于生物化学工作者是十分重要的，而这些方法和技术的创新、乃至促进生物化学更大的发展，尚需各个学科工作者的共同

努力。随着生物化学新方法不断涌现,新技术的层出不穷,乃至其内容的日益浩瀚,要想全面系统地掌握它,不只是生物化学工作者的难点,更使非生化工作者感到困惑。因此,为了适应我国生物化学的教学、科研和生产发展的需要,根据我校生物化学教研室历年来的教学、科研、实验和生产的经验,结合国内外的发展情况,汇编了这本《生物大分子实验手册》,旨在使各个学科的工作者能从不同的角度开阔视野,共同为发展祖国的建设事业作出力所能及的贡献。

本手册分仪器方法分析和生物大分子分析两大部分。主要内容是生物化学领域中重要而常用的实验分析方法和技术,并介绍一些新近发展的重要生物化学研究技术,包括吸附层析、分配层析、离子交换层析、排阻层析、亲和层析、气相层析、高压液相层析、逆流分溶、膜及空心纤维分离、一般电泳、高压电泳、连续电泳、不连续电泳、免疫电泳、等电聚焦、等速电泳、可见和紫外光谱、荧光光谱、红外光谱、激光拉曼谱、火焰分光、自旋共振、核磁共振、质谱、旋光谱、圆二色谱、光散射、极谱、X-射线衍射、超速离心、检压、放射性同位素、电子显微镜等技术的原理、操作程序及应用,以及运用这些技术对蛋白质、酶与核酸等重要生物大分子进行分离纯化、定性定量分析、结构分析、活性测定等方法的原理和具体操作实例。为便于读者使用,附有常用数据数表、单位换算表、生化名词略语及缩写表。

参加本手册编写工作的有林永齐、刘兰英、定澄、陈维多、李希凯、姜言辅、李正强等。由于本书的编写时间比较匆促,所以不妥及错误之处肯定不少,恳请读者不吝指正。

张 德 安

1985年12月15日于长春

目 录

第一章 仪器方法分析	(1)
一、层析	(1)
(一) 吸附层析	(1)
1. 根据	(1)
2. 柱层析	(2)
3. 薄层层析	(5)
(二) 分配层析	(12)
1. 根据	(12)
2. 纸层析	(13)
(三) 离子交换层析	(16)
1. 根据	(16)
2. 操作程序	(17)
3. 离子交换剂及其选择	(17)
4. 交换剂的处理与转型	(25)
5. 离子交换柱层析的操作	(26)
(四) 排阻层析	(30)
1. 根据	(30)
2. 材料	(3)
3. 凝胶层析	(35)
(五) 亲和层析	(42)
1. 根据	(42)
2. 载体的选择	(43)
3. 配基的选择及其与载体的联接	(43)
4. 亲和柱层析	(44)

(六) 气相层析	(47)
1. 根据	(47)
2. 气相层析仪器装置	(47)
3. 载气	(48)
4. 层析柱	(48)
5. 担体	(49)
6. 固定液	(50)
7. 样品	(50)
8. 检测系统	(51)
9. 定性分析	(51)
10. 定量分析	(52)
11. 制备性气液层析	(54)
(七) 高压液体层析	(54)
1. 根据	(54)
2. 类型	(54)
3. 高压液体层析仪	(55)
4. 检测器	(55)
5. 常用的担体	(55)
6. 流动相的选择	(56)
(八) 逆流分溶	(56)
1. 根据	(56)
2. 仪器	(56)
3. 溶剂的选择	(56)
4. 溶剂的处理	(57)
(九) 膜及空心纤维分离	(57)
1. 根据	(57)
2. 加速小分子透过膜的方法	(57)
3. 常用的材料	(58)
4. 膜分离	(58)
5. 空心纤维分离	(59)

二、电 泳	(60)
(一) 基本根据	(61)
(二) 迁移率及其影响因素	(61)
1. 迁移率	(61)
2. 影响迁移率的因素	(61)
3. 缓冲液	(62)
4. 支持物	(62)
(三) 一般技术	(62)
1. 装置	(62)
2. 支持物的制备和特性	(62)
3. 操作程序	(66)
(四) 特殊技术	(67)
1. 高压电泳	(67)
2. 连续电泳	(68)
3. 不连续电泳	(69)
4. 免疫电泳	(70)
5. 等电聚焦	(70)
6. 等速电泳	(71)
(五) 电泳的应用	(71)
三、光 谱	(72)
(一) 光谱类型及其应用	(73)
1. 原子光谱	(73)
2. 分子光谱	(74)
3. 光谱法的用途	(75)
(二) 可见和紫外分光光度法	(75)
1. 根据	(75)
2. 仪器装置	(75)
3. 应用	(79)
(三) 荧光光谱分析法	(83)
1. 根据	(83)

2. 仪器.....	(83)
3. 应用.....	(84)
(四) 红外分光光度法.....	(86)
1. 根据.....	(86)
2. 仪器种类.....	(86)
3. 应用.....	(88)
(五) 激光拉曼分光光度法.....	(88)
1. 根据.....	(88)
2. 应用.....	(88)
(六) 火焰分光光度法.....	(88)
1. 根据.....	(88)
2. 仪器装置.....	(88)
3. 应用.....	(99)
(七) 电子自旋共振波谱法.....	(91)
1. 基本概念.....	(91)
2. 检测依据.....	(91)
3. ESR波谱仪的基本结构.....	(92)
4. 应用.....	(94)
(八) 核磁共振波谱仪.....	(95)
1. 基本概念.....	(95)
2. 检测依据.....	(95)
3. NMR波谱仪的基本结构.....	(97)
4. NMR 波谱法的应用.....	(98)
(九) 质谱法.....	(99)
1. 基本概念.....	(99)
2. 检测根据.....	(100)
3. 质谱仪的基本结构.....	(100)
4. 质谱法的应用.....	(101)
(十) 旋光谱和圆二色谱法.....	(101)
1. 基本概念.....	(102)

2. 检测的根据	(102)
3. 仪器的基本结构	(103)
4. 应用	(104)
(十一) 光散射法	(105)
1. 基本概念	(105)
2. 检测的根据	(105)
3. 仪器的基本结构	(105)
4. 应用	(106)
(十二) 极谱分析法	(106)
1. 基本概念	(106)
2. 检测的根据	(106)
3. 仪器的基本结构	(108)
4. 应用	(109)
(十三) X-射线衍射结构分析	(110)
1. 分析的依据	(110)
2. 分析的方法和理论	(110)
四、超速离心	(115)
(一) 基本依据	(115)
1. 离心力	(115)
2. 沉降系数	(117)
3. 沉降速度	(118)
4. 沉降时间	(118)
5. 沉降系数与物质分子量	(119)
(二) 仪器的基本结构及操作技术	(119)
1. 离心管	(119)
2. 转头	(120)
3. 制备性超速离心机	(120)
4. 分析性超速离心机	(122)
5. 超离心法	(122)
6. 密度梯度制备	(123)

7. 分步收集装置.....	(124)
(三) 应用.....	(125)
1. 分子量的测定.....	(126)
2. 大分子的纯度鉴定.....	(128)
3. 大分子构象变化的检测.....	(128)
五、检压法.....	(128)
(一) 根据.....	(128)
(二) 仪器的基本结构与操作.....	(128)
1. 附属部件.....	(128)
2. 主要装置.....	(129)
3. 测定方法.....	(130)
(三) 应用.....	(133)
六、放射性同位素法.....	(133)
(一) 根据.....	(133)
(二) 放射性的单位.....	(134)
1. 居里.....	(134)
2. 比放射性.....	(134)
(三) 射线与物质的相互作用.....	(134)
1. α 粒子.....	(134)
2. 负电子.....	(134)
3. γ 射线.....	(135)
(四) 放射性探测.....	(135)
1. 射线探测器及其种类.....	(135)
2. 照相乳胶曝光法.....	(135)
3. G-M计数管.....	(136)
4. 闪烁计数器.....	(137)
5. 荧光熄灭的校正.....	(141)
(四) 应用.....	(143)
七、电子显微镜法.....	(143)
(一) 根据.....	(143)

(二) 电镜的结构及其类型·····	(145)
1. 电镜的结构·····	(145)
2. 电镜的类型·····	(145)
(三) 生物样品的制备·····	(146)
1. 应考虑的因素·····	(146)
2. 支持膜的制备·····	(147)
3. 超薄切片法的操作环节·····	(148)
4. 异丁烯酸酯包埋法·····	(149)
5. 冰冻刻蚀法·····	(150)
6. 琼脂过滤法·····	(150)
7. 负反差法·····	(151)
8. 同位素自显影等方法·····	(152)
(四) 固定液的制备及使用·····	(152)
1. 四氧化锇固定·····	(152)
2. 戊二醛固定·····	(152)
3. 双重固定·····	(152)
(五) 投影·····	(153)
(六) 应用·····	(153)
1. DNA 的电镜研究·····	(153)
2. 核糖体的电镜研究·····	(155)
第二章 生物大分子的分析·····	(157)
一、生物大分子的制备·····	(157)
(一) 制备概述·····	(157)
1. 制备的意义·····	(157)
2. 制备的根据·····	(157)
3. 制备方法的分类·····	(157)
4. 制备方法的选择·····	(158)
5. 制备程序·····	(158)
6. 制备过程中的注意事项·····	(159)
(二) 选材与预处理·····	(159)

1. 选材的根据	(159)
2. 选材时的注意事项	(160)
3. 预处理工作	(160)
(三) 细胞器分离	(160)
1. 细胞的破碎	(160)
2. 细胞器的分离	(162)
(四) 生物大分子的制备	(165)
1. 提取	(165)
2. 分离纯化	(171)
3. 浓缩	(180)
4. 结晶	(181)
5. 干燥	(184)
6. 储藏保存	(185)
7. 细菌(枯草杆菌) DNA的分离纯化	(185)
8. 植物(豆胚芽) DNA的分离纯化	(188)
9. 动物(大鼠肝) DNA的分离纯化	(190)
10. 大鼠肝rRNA的分离纯化	(193)
11. 大肠杆菌tRNA的分离纯化	(195)
12. 动物(大鼠肝) rRNA的分离纯化	(197)
13. 哺乳动物细胞中mRNA的分离纯化	(198)
二、核酸及核苷酸的分析	(202)
(一) 概述	(202)
(二) 核酸含量的分析	(203)
1. 生物材料中核酸含量的测定	(203)
2. 紫外吸收法测定核苷及核苷酸含量	(206)
3. 改良苔黑酚法测定RNA的含量	(219)
4. 改良二苯胺法测定DNA的含量	(221)
5. 定磷法测定核酸含量	(223)
(三) 核酸的水解及其组成分析	(225)
1. 核酸的水解	(225)

2. 酵母RNA的组成成分鉴定·····	(226)
3. 核酸碱基组成的纸层析分析·····	(227)
4. 核苷酸的薄层层析分析·····	(229)
5. 核苷酸的醋酸纤维素薄膜电泳分析·····	(231)
6. 核苷酸的高压纸上电泳分析·····	(233)
7. 核苷酸的过碘酸氧化法定量分析·····	(235)
8. 核苷酸的离子交换柱层析分离分析·····	(237)
(四) 核酸大分子的分离分析·····	(241)
1. RNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳·····	(241)
2. DNA的琼脂糖凝胶电泳·····	(243)
3. 噬菌体 λ DNA的酶解片段分离分析·····	(246)
4. 质粒DNA的分离纯化及分析·····	(268)
5. 细胞核及染色质的分离分析·····	(260)
6. 细胞核DNA生物活性分析·····	(264)
7. RNA的蔗糖密度梯度离心·····	(266)
8. DNA氯化铯密度梯度离心·····	(268)
三、蛋白质及氨基酸的分析·····	(271)
(一) 氨基酸的定性分析·····	(271)
1. 氨基酸共有的显色分析法·····	(271)
2. 特殊氨基酸的分析法·····	(272)
(二) 氨基酸的定量分析·····	(288)
1. 氨基酸通用的定量分析法·····	(288)
2. 特殊氨基酸的定量分析·····	(298)
(三) 蛋白质的定性分析·····	(321)
1. 蛋白质共有的显色分析法·····	(321)
2. 复合蛋白质的显色反应·····	(322)
(四) 蛋白质的定量分析·····	(323)
1. 蛋白质总氮量的测定——凯氏定氮法·····	(323)
2. 蛋白质溶液浓度测定法·····	(325)
(五) 蛋白质纯度分析·····	(328)

1. 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳法·····	(328)
2. 醋酸纤维素薄膜电泳法·····	(351)
3. 等电聚焦电泳法·····	(333)
(六) 蛋白质分子量测定法·····	(335)
1. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法·····	(335)
2. 凝胶柱层析法·····	(339)
3. 凝胶薄层层析法·····	(341)
4. 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳法·····	(347)
(七) 蛋白质末端分析·····	(351)
1. 蛋白质NH ₂ 末端氨基酸分析·····	(351)
2. 蛋白质 COOH-末端氨基酸分析·····	(373)
(八) 血清蛋白质的测定·····	(376)
1. 血清总蛋白 白蛋白及球蛋白的测定·····	(376)
2. 血清丙种球蛋白测定·····	(379)
3. 血清粘蛋白测定·····	(380)
4. 血清蛋白质的纸电泳分析·····	(382)
四、酶的活性测定·····	(384)
(一) 概述·····	(384)
1. 酶活性测定的重要意义·····	(385)
2. 酶活性的定义·····	(386)
3. 酶的分类·····	(386)
4. 酶活力测定的常用仪器·····	(388)
(二) 几种重要酶的活力测定·····	(388)
1. 胰蛋白酶活力测定·····	(388)
2. 限制性内切酶EcoRI的活力测定·····	(389)
3. 酰化酶的活力测定·····	(391)
4. 辣根过氧化物酶活力测定·····	(392)
5. 过氧化氢酶活力测定·····	(395)
6. 超氧化物歧化酶的活性测定·····	(396)
7. 双磷酸核酮糖羧化酶活力测定·····	(398)

(三) 临床诊断用酶测定技术·····	(400)
1. 临床诊断常用酶·····	(400)
2. 谷丙转氨酶活力测定·····	(400)
3. 乳酸脱氢酶活力测定·····	(402)
4. 血清精氨酸酶测定·····	(403)
5. 血清肌酸磷酸激酶测定·····	(406)
6. 血清淀粉酶活力测定·····	(409)
7. 血清胆碱酯酶活力测定·····	(411)
8. 血清醛缩酶活力测定·····	(415)
9. 碱性磷酸脂酶活力测定·····	(419)
10. 临床诊断用酶试剂·····	(423)
(四) 工业酶活性测定·····	(428)
1. 工业上常用酶·····	(428)
2. 蛋白酶活力测定·····	(428)
3. 胰蛋白酶活力测定 (药用) ·····	(430)
4. 胃蛋白酶活力测定 (药用) ·····	(430)
5. 糖化型淀粉酶活力测定·····	(431)
6. 液化型淀粉酶活力测定·····	(433)
7. 葡萄糖异构酶活力测定·····	(434)
8. 纤维素酶活力测定·····	(437)
9. 果胶酶活力测定·····	(439)
10. 黄嘌呤氧化酶活力测定·····	(440)
11. 磷酸二酯酶活力测定·····	(441)
12. 尿素酶 (尿酶) 活力测定·····	(442)
13. 木瓜蛋白酶活力测定·····	(444)
(五) 同工酶的测定·····	(445)
1. 同工酶及测定同工酶的意义·····	(445)
2. 39种不同酶的同工酶检测技术·····	(445)
3. 几种重要酶的同工酶测定·····	(464)

第一章 仪器方法分析

一、层析

层析分离法又称色谱分离法，是一种分离多组分混合物的有效物理方法。层析法的种类很多，根据其作用机理的不同，可分为吸附层析、分配层析、离子交换层析、排阻层析等；根据所使用的固定相和流动相的不同，可分为气-固色谱、气-液色谱、液-固色谱、液-液色谱；根据操作条件的不同，又可分为柱层析、纸层析、薄层层析、高压液相层析等。由于层析法操作简便、设备不复杂、样品量可大可小、易与光学仪器组成自动化系统，所以早已成为生化分析中常用的分离分析方法。层析法的一般分类见表 1-1。

表1-1 层析法的一般分类

固 定 相	流动相	装置	作用机理	名 称
固体 {	吸附剂	柱	吸附	吸附层析
	离子交换剂	柱	酸碱度, 极性	离子交换层析
固体	液体	薄层	分配 吸附	呼附薄层层析
液体	液体	柱	分配	分配层析
液体	液体	薄层	分配	分配薄层层析
液体	液体	纸	分配	纸层析
固体	液体	柱	分子大小	凝胶层析
固相配基	液体	柱	分子亲和力	亲和层析
固体	气体	柱	吸附	气体吸附层析
固体	气体	柱	分配	气体分配层析

(一) 吸附层析

1. 根据：利用各种成分被吸附剂（表面具有吸附分子的

特性的固体)的吸附程度及其在分离溶剂中的溶解度差异进行分离,取决于化合物的分子结构。

2.柱层析:混合物的分离是在装有适当吸附剂的玻璃管柱中进行的。

(1) **操作程序:**一般包括吸附剂处理、玻璃层析柱的选择(如氧化铝层析柱的内径与柱长的比例约在1:10—1:20之间)、吸附剂装柱(一般将吸附剂以适当溶剂浸泡、经搅拌或减压抽出气泡后,缓慢倒入柱中,使其自然沉降,装至所需体积)、样品上柱(勿使吸附剂面受搅动)、洗脱、洗脱液部分收集(详见蛋白质及氨基酸分析部分)。

(2) 吸附剂的选择与选理

1)类别:常用的吸附剂可分为两大类:

①无机类:碱金属的碳酸盐、碱土金属的氧化物、碳酸盐、硅酸盐、磷酸盐及其他盐类、氧化铝、活性碳、硅胶及许多天然硅铝土物质(如滑石、陶土、粘土、酸性白土等)、一些人工合成的硅铝酸盐(如人造沸石,即“分子筛”,有特异的孔隙大小)。

②有机类:纤维素、淀粉、蔗糖、乳糖、菊根粉、聚酰胺等。

根据吸附力的强弱可分为三类(表1-2)

表1-2 吸附剂按吸附力分类

弱	中	强
蔗糖、淀粉	碳酸钙	活化硅胶
菊根粉	磷酸钙	活化硅酸镁
柠檬酸镁	碳酸镁	活化氧化铝
滑石粉	磷酸镁	活性炭
碳酸钠	氧化镁	活化氧化镁
碳酸钾	氢氧化钙	漂白土