

SHENG WU HUA XUE GONG JU

〔美〕 T. G. 库 珀 著

生物化学工具

人 民 卫 生 出 版 社

9242/23

生物化学工具

T. G. Cooper 著

徐 晓 利 主译

王震熙 朱正美 朱寿民

李茂深 何开玲 杨康成

宋后燕 周爱如 徐晓利

崔秀云 崔肇春 黄宝珊

章云津

译

人 民 卫 生 出 版 社

The Tools
of Biochemistry

T. G. Cooper

A Wiley-Interscience Publication

1977

生物化学工具

徐晓利 主译

人民卫生出版社出版

北京顺义寺上印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168毫米32开本 12 $\frac{3}{4}$ 印张 4插页 314千字

1980年8月第1版第1次印刷

1983年4月第1版第2次印刷

印数：8,601—12,800

统一书号：14048·3810 定价：1.40元

前 言

为进行富有成效的研究，一个基本条件是要具备符合实验者意图的满意的技术。生物科学的进步，很大程度上有赖于观测仪器工艺的平行发展。不幸的是，许多研究工作的通病是对所用的工具缺乏了解。无论对于实验数据还是取得这些数据所用的方法，都同样需要仔细地估价。

本书目的在于为读者提供更多更好的合用的生物化学技术。通常，大学生和研究生从事研究课题时所熟悉的只是他们所处环境中用过的一些技术。而当要用全新的方法、技术处理某项课题时，他们会感到困难，因为他们既缺乏有关某种特定方法使用的可能性和局限性的一般资料，也缺乏在明确规定的条件下应用这种方法的机会。编写此书正是为了解决这一困难。本书虽是大学高年级课程的基础内容，但是也可作为现成的有用的资料，为研究生和有经验的研究人员所用。本书旨在扩大读者的知识面，成功与否将以此点实现多少来衡量。

本书采取的格式是首先介绍每种技术的理论基础和使用范围，目的是使读者懂得随后要做的操作的道理，并不打算写成无所不包的论文。然后是实验部分，对用该方法做的一些实验予以详细描述。选列了一些简便易行的实验，这些实验只要方法使用得当，可以提供明确的数据样本。为了便于将材料应用于最广泛的教学和科研需要方面，各章都是一个独立的单元。这样读者便可根据自己的需要和能力选择方法。

(下略)

T. G. Cooper

1977年1月于匹兹堡，宾夕法尼亚

目 录

第一章 电位测量技术	1
pH 的计算	1
应用有机指示剂测量 pH	7
pH 的电位测量法	10
参比电极	10
玻璃电极	12
电流计	15
缓冲剂	18
离子特异性电极	23
实验部分	26
新的或长期不用的联合电极的制备	26
氨基酸的滴定	27
甲醛存在下氨基酸的滴定	29
Clark 电极的校正	30
酿酒酵母对氧的摄取	32
蓖麻子线粒体对氧的摄取	32
第二章 分光光度法	36
分光光度计	41
光源	41
单色光器	43
样品室	47
检测器	49
实验部分	50
双缩脲蛋白质测定法	50
Lowry 蛋白质测定法	51
无机磷的测定	53
用苔黑酚(Orcinol)反应测定核酸	54
用 Park 与 Johnson 方法测定还原糖	55
溴酚蓝 pKa 的测定	57

生物重要分子的光谱特性	60
第三章 放射化学	63
β 放射的测量	66
闪烁计数测量法	67
闪烁计数器的使用	78
计数效率	82
同时测定多种同位素	91
闪烁计数样品的制备	93
放射性二氧化碳的测定	97
气流法或盖氏计数法	98
计数统计	102
标记步骤	106
实验部分	114
含水及有机闪烁液的制备	114
闪烁计数器平衡点的测定	114
β 谱的测定	115
增益对 β 谱的影响	115
测量同位素平衡点的另一种方法	115
淬灭剂对 β 谱的影响	117
用道比法测量淬灭样品的计数	118
用外标准道比法测量多标记样品的放射性	119
测定多标记样品中 ^{14}C 和 ^3H 的 cpm 的另一种方法	120
^{32}P 半衰期的测定	122
气流计数器坪值的测定	123
仪器死时间的测定	124
^3H 亮氨酸掺入 E. Coli 蛋白质的作用	125
第四章 离子交换技术	129
交换剂	131
交换剂的制备	136
层析法	142
层析柱	142
洗脱的梯度	143
层析柱的洗脱	146

样品分部的大小·····	147
离子交换技术用于酶的测定·····	147
实验部分·····	148
用 Dowex 树脂分离有机酸·····	148
用 Dowex 树脂从有机酸中分离氨基酸·····	153
用 Dowex 甲酸层析柱分离核苷酸·····	155
用微型离子交换柱测定酸性磷酸酶·····	157
第五章 凝胶渗透层析 ·····	160
作用方式·····	160
凝胶过滤介质·····	163
凝胶介质的制备·····	167
装柱·····	169
空隙体积的测定·····	175
加样和层析·····	176
实验部分·····	178
柱的硅烷化·····	178
用 Sephadex G-25 分离蓝葡聚糖 2000 和溴酚蓝·····	179
第六章 电泳 ·····	183
离子在电场中的移动·····	183
丙烯酰胺凝胶电泳·····	184
电泳过程·····	189
圆盘凝胶电泳·····	192
十二烷基硫酸钠 (SDS) 丙烯酰胺凝胶电泳·····	194
丙烯酰胺凝胶电泳的类型·····	196
板凝胶电泳·····	196
琼脂糖-丙烯酰胺凝胶·····	197
双向凝胶电泳·····	198
电泳分离后大分子的检测·····	200
考马斯亮蓝染色·····	200
荧光染色技术·····	200
特异性酶的显色·····	201
其他染色法·····	203

放射活性大分子的检测	203
实验部分	206
区带电泳	206
荧光卡明标记蛋白质的区带电泳	213
用硝基蓝四氮唑显色的乳酸脱氢酶圆盘凝胶电泳	215
第七章 亲和层析法	222
层析用的载体	225
配基的选择	227
配基和载体的联结	227
吸附剂的衍生物	231
层析	233
第八章 免疫化学技术	242
抗体的构造	242
抗体的生成	244
抗体生成的实用知识	250
抗原	250
佐剂	250
动物, 剂量及接种的途径	251
对接种的应答	252
血清的收集和制备	255
溶液中大分子抗原与抗体的反应	259
凝胶中抗原-抗体的反应	262
免疫电泳	268
利用抗体对蛋白质作特异性高分辨力的测定	269
安全	270
标记抗原时放射性同位素的选择	271
抗原的直接免疫沉淀法	272
蛋白质重新合成的证明	273
酶的失活型的证明	274
^{35}S -蛋氨酸的合成	277
放射免疫测定法	278
^{125}I 的标记方法	280

放射免疫测定法的标准化·····	283
实验部分·····	288
抗生物素蛋白免疫血清的制备·····	288
抗原的定量沉淀·····	289
在扩散板上抗生物素蛋白和抗生物素-免疫血清的双向扩散·····	290
第九章 离心 ·····	293
相对离心力·····	293
台式医用离心机·····	295
高速离心机·····	295
超速离心机·····	299
驱动和速度控制·····	301
温度控制·····	303
真空系统·····	303
转头·····	304
沉降系数·····	306
密度梯度·····	308
沉降速度或区带离心·····	309
沉降平衡或等密度离心·····	310
梯度分部·····	314
浓度的折射测定法·····	316
在制备超离心机中的沉降分析·····	319
密度梯度的特殊设计·····	321
区带转头中大规模离心·····	327
实验部分·····	331
用线性的及阶梯式蔗糖密度梯度分离线粒体、原质体 和乙醛酸循环体·····	331
第十章 蛋白质的纯化 ·····	336
测定方法的建立·····	336
分离材料的选择·····	338
增溶溶解的方法·····	338
渗透溶胞作用·····	339
研磨·····	339

绞切器	341
超声波	342
挤压	343
从亚细胞组分中取出蛋白质	343
稳定作用	345
pH	345
氧化程度	346
重金属污染	347
介质的极性和离子强度	347
蛋白酶或核酸酶的污染	348
温度	348
分离和浓缩	349
差别溶解法	349
透析与浓缩	358
离子交换层析	366
离子强度的电导测量	369
电泳与分子筛层析	369
纯化的标准	369
实验部分	370
小麦胚芽酸性磷酸酶的纯化	370
酸性磷酸酶适宜的测定条件的建立	377
测定酸性磷酸酶作用于对-硝基苯酚磷酸盐的米氏常数	381
纯化表的制作	382
附录 I 市售常用酸、碱的浓度	384
附录 II 蔗糖溶液的折射率(在 20℃)的国际标度(1936)	385
附录 III CsCl溶液的密度与折射率的关系(在 25℃)	386

第一章 电位测量技术

生物体内进行的化学反应，大多数深受氢离子浓度的影响。由于这个特性这样重要，多细胞生物演化种种奥妙的方法，以保持细胞周围溶液的氢离子浓度在非常严格的范围内。如果要对生物体及其组成成分的功能获得深入的有意义的了解，我们必须在实验室复制出生物体为要保持其可接受的氢离子浓度而作出的精细措施。本章下面的讨论是采用 Brønsted-Lowry 的酸、硷定义：酸是指供给质子的物质，硷是指接受质子的物质。可以把这个定义列成公式，酸就是解离出硷和质子的物质：



因此，HCl 应视为酸，而 Cl^- 应视为与其结合的硷。

酸	结 合 硷
HCl	Cl^-
CH_3COOH	CH_3COO^-
H_2CO_3	HCO_3^-
HCO_3^-	CO_3^{2-}
NH_4^+	NH_3

根据酸和硷的解离程度，可以把它们分为强弱两类。强酸是指按反应(1)极度向右进行的酸，换言之，强酸基本上是完全解离的。例如，0.01M 的 HCl 溶液中氢离子的浓度是 0.01M，因为 HCl 是强酸，全部解离。另一方面，弱酸是指按反应(1)不是明显地向右方进行解离的酸，仅有一小部分解离（如醋酸、硼酸或碳酸等）。

pH 的计算

丹麦化学家 S. P. L. Sorensen 为溶液的氢离子浓度提出一

1105109

- 1 -

个简便的符号。他把氢离子浓度的负对数称为 pH。

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] \quad (2)$$

因此, 0.01M HCl 溶液的 pH 便是,

$$\begin{aligned} \text{pH} &= -\log[10^{-2}] \\ &= 2.0 \end{aligned}$$

生物化学中最常遇到的 pH 值是在 4 到 11 范围内。图 1-1 说明 pH 与酸度和硷度的关系。

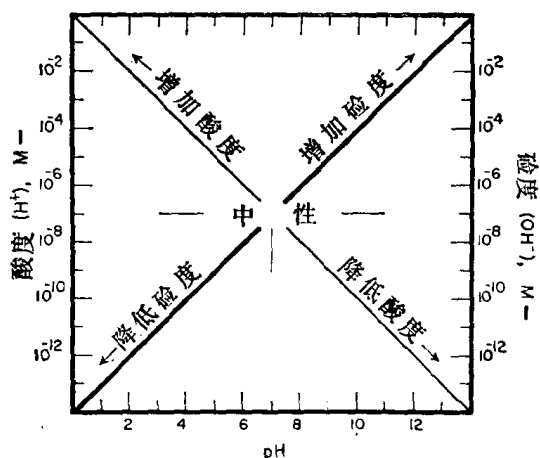
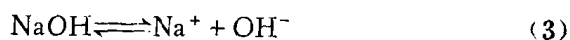


图 1-1 溶液的酸度和硷度与其氢离子浓度和氢氧离子浓度的关系

显然, 浓度为 10^{-2}M 的强酸溶液的 pH 是 2.0, 但 0.01M 的强硷溶液的 pH 却不是一眼就看得清楚的[见反应(3)]。



从水的解离而言, 氢氧离子的浓度可与氢离子 (H^+) 的浓度有关联, 或更确切地说, 与水合氢离子 (H_3O^+) 的浓度有关联:



这个反应的平衡常数方程式是

$$K_{\text{平衡}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} \quad (5)$$

于是,
$$K_{\text{平衡}}[\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \quad (6)$$

由于水的浓度 $[\text{H}_2\text{O}]$ 在整个解离过程中大致保持不变, 故可以将这一项与平衡常数合并, 得出一个新的常数, $K_{\text{水}}$:

$$K_{\text{水}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \quad (7)$$

纯水在 25°C 时, 水合氢离子和氢氧离子的浓度都是等于 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 。所以,

$$\begin{aligned} K_{\text{水}} &= (1 \times 10^{-7})(1 \times 10^{-7}) \\ &= 1 \times 10^{-14} \end{aligned}$$

由于在水溶液中水合氢离子与氢氧离子的浓度积必须保持恒值 $1 \times 10^{-14}\text{M}$, 如果式(7)中有一项的值增加, 则另一项必须相应降低。因此, 0.01M NaOH 的水溶液它的氢离子浓度是

$$\begin{aligned} [\text{H}^+] &= \frac{K_{\text{水}}}{[\text{OH}^-]} \\ &= \frac{10^{-14}}{10^{-2}} \\ &= 10^{-12} \end{aligned} \quad (8)$$

于是,
$$\text{pH} = 12$$

按照酸硷定义, 弱酸在水溶液中仅是部分地解离的。



在平衡时, H^+ 、 A^- 及未解离的 HA 的浓度可按下式自该酸的解离常数计算:

$$K_{\text{酸}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (10)$$

将式(10)移项, 得:

$$[\text{H}^+] = \frac{[\text{HA}]K_{\text{酸}}}{[\text{A}^-]} \quad (11)$$

若对方程式(11)两侧各取负对数, 则:

$$-\log[H^+] = -\log K_{\text{酸}} + (-\log \frac{[HA]}{[A^-]}) \quad (12)$$

或

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{酸}} + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (13)$$

化为通式，

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{酸}} + \log \frac{[\text{结合硷}]}{[\text{未解离的酸}]} \quad (14)$$

这个方程式被称为 Henderson-Hasselbach 方程式。

如果

$$[A^-] = [HA] \quad (15)$$

则

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{酸}}$$

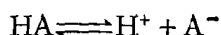
许多手册以 $\text{pK}_{\text{酸}}$ 表示各种酸的解离常数（即是酸解离出一个质子和它的结合硷的平衡常数）。

任何一种离子的克分子浓度从来都是认为就是它的有效浓度或活度，其实这只有在离子浓度极低时才是真实的。因为在一定的体积中离子的数目增多，则离子相互作用的机率也就增大。这些相互作用妨碍离子的移动，从而降低离子的有效浓度或活度。活度为克分子浓度乘以活度系数，

$$a_i = f_i [i] \quad (16)$$

此处， a_i 是某种离子 i 的活度， f_i 为活度系数。当离子处于互相远隔的情况下（在低浓度时） f_i 接近于 1； f_i 随 i 的浓度增大而减小。把离子的活度和离子的克分子浓度这两个概念加以区别是重要的，因为电位测量氢离子浓度得到的所有结果，都是氢离子的活度而不是浓度。

有时将一种已知浓度的弱酸或弱碱加入水中而要计算所得溶液的 pH。其 pH 值可根据酸的解离求出。



它的解离方程式是

$$K_{\text{酸}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

在仅含有一种弱酸的系统中，不妨假定 $[\text{H}^+] = [\text{A}^-]$ ，因此

$$K_{\text{酸}} = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{HA}]} \quad (17)$$

可将方程式 (17) 改写为

$$[\text{H}^+]^2 = K_{\text{酸}} [\text{HA}] \quad (18)$$

$$\text{或} \quad [\text{H}^+] = \sqrt{K_{\text{酸}} \cdot [\text{HA}]} \quad (19)$$

取对数，则

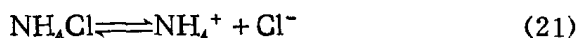
$$\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{p}K_{\text{酸}} - \log[\text{HA}])$$

或

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{\text{酸}} - \log[\text{HA}]}{2} \quad (20)$$

至于将一种弱硷溶于水所得溶液的 pH，则以相似的方式演算，不同的地方在于用 $K_{\text{硷}}$ 代替 $K_{\text{酸}}$ ，并且必须按方程式 (8) 把 OH^- 浓度化为 H^+ 浓度。

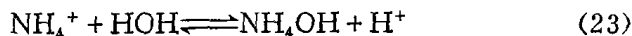
弱酸或弱硷盐类水溶液的 pH 也可用上述关系式算出。不过必须考虑盐的水解作用。例如 NH_4Cl ，它是强酸 HCl 和弱硷 NH_4OH 生成的盐，在水中解离如下：



由于 NH_4OH 是一种弱硷，自由 NH_4^+ 与水反应如下：



HCl 是一种强酸，在水中全部解离。反应式 (22) 也可视之为：



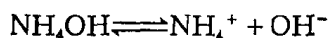
并以如下方程式表示：

$$K_{\text{水解}} = \frac{[\text{NH}_4\text{OH}][\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+][\text{H}_2\text{O}]} \quad (24)$$

因为水的浓度（约为 55M）比其中任何成分大得多，故可假定它为常数。于是

$$K_{\text{水解}} = \frac{[\text{NH}_4\text{OH}][\text{H}^+]}{[\text{NH}_4^+]} \quad (25)$$

然而， NH_4OH 的解离，



且

$$K_{\text{硷}} = \frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_4\text{OH}]} \quad (26)$$

如果我们假设 NH_4Cl 全部解离，则 $[\text{NH}_4\text{Cl}] = [\text{NH}_4^+]$ 。并且我们也知道 $[\text{NH}_4\text{OH}] = [\text{H}^+]$ 。从这两事实可将方程式(26)改写为：

$$K_{\text{硷}} = \frac{[\text{NH}_4\text{Cl}][\text{OH}^-]}{[\text{H}^+]} \quad (27)$$

前面曾经指出，

$$K_{\text{水}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

以及

$$[\text{OH}^-] = \frac{K_{\text{水}}}{[\text{H}^+]}$$

因此

$$K_{\text{硷}} = \frac{[\text{NH}_4\text{Cl}]K_{\text{水}}}{[\text{H}^+][\text{H}^+]} \quad (28)$$

或

$$[\text{H}^+]^2 = \frac{[\text{NH}_4\text{Cl}]K_{\text{水}}}{K_{\text{硷}}} \quad (29)$$

据此，就可以容易地说明

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{\text{水}} - \text{p}K_{\text{硷}} - \log[\text{NH}_4\text{Cl}]}{2} \quad (30)$$

用这样的推演方法可以写出弱酸和强硷所成的盐溶于水制得溶液的 pH 为：

$$\text{pH} = \frac{\text{p}K_{\text{水}} + \text{p}K_{\text{酸}} + \log[\text{盐}]}{2} \quad (31)$$

以及弱酸和弱硷所成的盐溶于水中制得的溶液的 pH 是,

$$\text{pH} = \frac{\text{pK}_{\text{水}} + \text{pK}_{\text{酸}} - \text{pK}_{\text{硷}}}{2} \quad (32)$$

还请注意, 一种硷的 $\text{pK}_{\text{硷}}$ 可借下列等式自其所结合的酸的 $\text{pK}_{\text{酸}}$ 算出, 反之亦然。

$$\text{pK}_{\text{水}} = \text{pK}_{\text{酸}} + \text{pK}_{\text{硷}} \quad (33)$$

请读者自己来证明这个等式。

应用有机指示剂测量 pH

在上一段讨论了一些简单溶液的 pH 的计算法。不过, 实际上由于要求测出其 pH 值的溶液的复杂性, 以及溶液的本质亦往往不明, 因此这样的计算法常常是不可能的。通过测量来确定 pH

表 1-1 常用的酸-硷指示剂

指 示 剂	pH 范 围	酸 色	硷 色
甲基紫	0.5~1.5	黄	蓝
麝酚蓝	1.2~2.8	红	黄
甲基黄	2.9~4.0	红	黄
甲基橙	3.1~4.4	红	黄
溴酚蓝	3.0~4.6	黄	蓝-紫
溴甲酚绿	3.8~5.4	黄	蓝
甲基红	4.2~6.3	红	黄
氯酚红	4.8~6.4	黄	红
溴麝酚蓝	6.0~7.6	黄	蓝
对-硝基苯酚	6.2~7.5	无色	黄
酚红	6.4~8.0	黄	红
甲酚红	7.2~8.8	黄	红
麝酚蓝	8.0~9.6	黄	蓝
酚酞	8.0~9.8	无色	红
麝酚酞	9.3~10.5	无色	蓝
茜素黄 R	10.1~12.0	黄	紫