

SPT 21世纪高等院校教材

生命科学类

生物化学技术原理及应用



www.sciencep.com

Q5
126

21 世纪高等院校教材(生命科学类)

生物化学技术原理及应用

(第三版)

赵永芳 主编

科学出版社

2002

内 容 简 介

本书由二十章组成,共分三编:第一编概述蛋白质、核酸等生命大分子物质的制备程序及基本要点;第二编讲解从动、植物和微生物材料中分离上述物质的常见方法,如离子交换层析、疏水层析、亲和层析、聚焦层析、凝胶过滤、高效反相液相色谱等;第三编介绍鉴定生命大分子物质所涉及到的相关方法,如同位素标记(包括 DNA、RNA 和蛋白质的标记)、基因重组、DNA 测序、生物芯片、细胞凋亡、生物传感器、各种电泳(包括凝胶电泳、聚焦电泳、琼脂电泳、转移电泳、毛细管电泳、以及多种大分子物质电泳后所用染色液的配制等)、免疫分析(包括单克隆抗体的制备、免疫扩散、各种免疫电泳、微球测定、固相免疫测定等)、薄层与薄膜层析和气相色谱等。书中在阐明各类方法之基本原理的同时,还讲述了主要操作和应用实例,在每章末尾附有思考题和参考文献,全书共有插图、表 370 余幅。

本书适合综合性大学及医、农、师范院校等相关专业本科生和研究生学习之用,还可供从事生物科学工作的有关人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学技术原理及应用/赵永芳主编.—3 版.—北京:科学出版社, 2002.7

(21 世纪高等院校教材(生命科学类))

ISBN 7-03-010026-3

I. 生… II. 赵… III. 生物化学—高等学校—教材 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 004655 号

科学出版社 出版

京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1988 年 7 月 第 一 版 1994 年 6 月 第 二 版

武汉大学出版社

2002 年 7 月 第 三 版 开本: B5(720 × 1000)

2002 年 7 月 第一次印刷 印张: 32 1/2

印数: 1—4 000 字数: 634 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(北燕))

序 言

20世纪后期,生命科学的一系列突破——基因工程、人类基因组计划、克隆羊的成功,不仅加速了生命科学的发展进程,而且把生命科学推进到一个完整的技术体系。它的进展具有直接的实践意义,使以往生命科学仅用于认识生物和利用生物的状况,很快转变到人工改造生物乃至创造新生物的局面。生命科学的这一变化,导致生化技术理论的研究越来越深入,生化技术的应用也越来越广泛,从而使其逐步形成一门独立的重要分支学科。

面对新世纪不同学科将进一步相互渗透、彼此交叉的发展趋势,面对生化技术可在诸多学科领域广泛应用的特点,面对探讨蛋白质和核酸等物质的结构与功能在认识生命活动本质方面起着关键作用,《生物化学技术及其应用》的编著者邀约了几位赞同该书观点的同行,在1988年和1994年武汉大学出版社先行出版之教材(两个版本)的基础上,结合各自多年从事教学、科研的经验体会,并参考国内外文献资料,重新撰写了一本以讲解如何从生物材料中提取制备蛋白质和核酸等物质为主线,以介绍当前生化技术领域的新成果和精华知识为重点,以阐述分离、鉴定生命大分子物质所涉及到的方法基理和操作技巧为核心的《生物化学技术原理及应用》教科书。此书从一个侧面提示了科学发展和前沿领域的研究方向,较好地满足了一些综合性大学、医、农、师范院校,以及部分生物研究所等单位教学与科研的需要。

众所周知,分离鉴定生命物质试验的成败,与所选用的最佳方法关系密切。因此本书阐述的诸多实验方法,多半是经过检验确认的,有的是在原始方法基础上修改或优化的,有的是编者或所在实验室建立的。另外,在讲述相关方法的基理和程序时,还扼要介绍了操作要点和注意事项,力求使读者在按书中所述内容开展试验时,能得到满意的结果;力求让不同层次的读者能从书中找到自己需要的东西。但限于每个实验方法的建立、发展乃至完善都有其不同的背景,所介绍的方法可能是专为特定对象设计的。因此,读者可以在基理范围内按照实际需要进行适当改动。

本书由二十章组成,共分三编,第一编概述生命大分子物质的制备程序;第二编讲解分离蛋白质和核酸等物质的常见方法;第三编介绍鉴定上述物质所涉及到的相关方法。每章一般都按基本原理、操作步骤和应用实例等格式编排。其中应用实例仅用来说明有关方法的某些参数,辅助读者理解书中的内容,而不是对每一问题的详细讲解和全面评论。在每章末尾附有思考题和参考文献,以便读者学习。

本书各章分别由何其敏(第十一章,第十九章中固相免疫吸附法)、黄健(第十二、

十五章)、肖华胜(第十三章)、刘建平(第十四章)、吴超群与余应年(第十六章)、王银善(第四、十八章)、陈洪和夏伏建(第十八章中第六节)、舒邦良(第十九章中免疫微球测定)和赵永芳(第一~三、五~十、十七、十九、二十章)撰写。另外,何其敏先生还提供了相关参考资料及毛细管电泳的部分图谱。全书由赵永芳审查、统编、定稿。

俗话说,“一本好书半个师”。这充分肯定了优秀出版物在传播知识过程中的作用和重要性,但姑且勿言编撰好书,就是编写一本让读者认可的书籍也绝非易事。本书的编写人员在撰稿过程中都付出了辛勤的劳动,也很想把工作做漂亮,但限于水平、时间和生化技术涉及的知识面较广等原因,故书中难免有欠妥和错漏之处,编者诚恳希望读者指正。

编者衷心感谢科学出版社及钟谊同志的大力支持。

赵永芳

二〇〇一年六月于武昌珞珈山

目 录

序 言

第一编 概述

| | |
|------------------------|------|
| 第一章 生命大分子物质的制备 | (3) |
| 第一节 材料的选择与处理 | (3) |
| 一、材料的选择 | (3) |
| 二、材料的处理 | (4) |
| 第二节 确立测定方法 | (5) |
| 一、目的与要求 | (5) |
| 二、常用的测定方法 | (5) |
| 第三节 细胞的破碎 | (8) |
| 一、机械破碎 | (9) |
| 二、溶胀和自溶 | (9) |
| 三、化学处理 | (10) |
| 四、生物酶降解 | (10) |
| 第四节 抽提 | (10) |
| 一、抽提的含义 | (10) |
| 二、抽提有效成分的影响因子 | (10) |
| 第五节 浓缩 | (13) |
| 一、沉淀法 | (14) |
| 二、吸附法 | (14) |
| 三、超过滤法 | (14) |
| 四、透析法 | (14) |
| 五、减压蒸馏法 | (15) |
| 六、冰冻干燥法 | (15) |
| 第六节 纯化方案的设计与评价 | (15) |
| 一、纯化方案的设计 | (15) |
| 二、纯化方案的评价 | (17) |
| 第七节 有效成分纯度和性质的分析 | (18) |
| 第八节 应用实例 | (18) |

| | |
|----------------|------|
| 思考题与参考文献 | (19) |
|----------------|------|

第二编 纯化方法

| | |
|-----------------------|------|
| 第二章 沉淀法 | (23) |
| 第一节 基本原理与沉淀类型 | (23) |
| 一、基本原理 | (23) |
| 二、制备蛋白质 | (23) |
| 三、制备核酸 | (33) |
| 第二节 应用实例 | (36) |
| 一、脾磷酸二酯酶的纯化 | (36) |
| 二、细菌染色体 DNA 的制备 | (36) |
| 思考题与参考文献 | (37) |
| 第三章 吸附层析 | (39) |
| 第一节 吸附柱层析 | (40) |
| 一、常用术语 | (40) |
| 二、基本原理 | (41) |
| 三、吸附剂 | (42) |
| 四、洗脱剂 | (45) |
| 五、层析柱的制备与层析操作 | (45) |
| 六、应用与实例 | (48) |
| 第二节 薄层层析 | (51) |
| 一、操作及注意事项 | (52) |
| 二、应用实例 | (58) |
| 第三节 聚酰胺薄膜层析 | (59) |
| 一、基本原理 | (59) |
| 二、应用实例 | (59) |
| 思考题与参考文献 | (63) |
| 第四章 疏水层析 | (64) |
| 第一节 基本原理 | (64) |
| 第二节 操作与应用 | (65) |
| 一、层析柱的制备 | (65) |
| 二、加样与洗脱 | (66) |
| 三、应用实例 | (66) |
| 思考题与参考文献 | (69) |

| | |
|-------------------------------|-------|
| 第五章 离子交换层析 | (70) |
| 第一节 基本原理 | (70) |
| 第二节 离子交换剂的分类及性质 | (72) |
| 一、分类 | (72) |
| 二、性质 | (80) |
| 第三节 离子交换剂与缓冲液的选择 | (88) |
| 一、离子交换剂的选择 | (88) |
| 二、缓冲液的选择 | (89) |
| 三、加样量的确定 | (92) |
| 第四节 操作 | (92) |
| 一、离子交换剂的处理、再生和转型 | (92) |
| 二、分离物质的交换 | (93) |
| 三、物质的洗脱与收集 | (94) |
| 第五节 应用 | (96) |
| 一、制备、纯化生命物质 | (96) |
| 二、测定蛋白质的等电点 | (99) |
| 思考题与参考文献 | (100) |
| 第六章 凝胶过滤 | (101) |
| 第一节 凝胶的分类及性质 | (101) |
| 一、葡聚糖凝胶 | (102) |
| 二、琼脂糖凝胶 | (104) |
| 三、聚丙烯酰胺凝胶 | (106) |
| 四、Sephacryl | (106) |
| 五、Superdex | (108) |
| 第二节 基本原理 | (109) |
| 第三节 操作 | (111) |
| 一、凝胶的选择和处理 | (111) |
| 二、凝胶柱的制备 | (112) |
| 三、加样与洗脱 | (113) |
| 四、凝胶柱的再生及保存 | (117) |
| 第四节 应用 | (118) |
| 一、脱盐和浓缩 | (118) |
| 二、分离生命物质 | (118) |
| 三、去热源物质 | (120) |
| 四、测定分子质量 | (120) |

| | |
|-----------------------------|--------------|
| 五、其他 | (123) |
| 思考题与参考文献 | (123) |
| 第七章 亲和层析 | (124) |
| 第一节 基本原理 | (124) |
| 第二节 操作 | (126) |
| 一、基质的选择 | (126) |
| 二、配体的选择 | (127) |
| 三、亲和吸附剂的制备 | (129) |
| 四、特异性吸附 | (131) |
| 五、分离大分子物质 | (132) |
| 六、亲和层析柱的再生 | (134) |
| 第三节 提高吸附剂的操作容量 | (134) |
| 一、在配体和基质之间引入“手臂” | (134) |
| 二、增加配体取代的程度 | (135) |
| 三、配体与基质以最少的键连接 | (137) |
| 四、基质多孔性的影响 | (137) |
| 五、其他 | (137) |
| 第四节 应用实例 | (138) |
| 一、纯化大分子物质 | (138) |
| 二、研究酶的结构与功能 | (141) |
| 三、实例 | (142) |
| 思考题与参考文献 | (145) |
| 第八章 聚焦层析 | (146) |
| 第一节 基本原理 | (146) |
| 一、多缓冲剂和多缓冲交换剂 | (146) |
| 二、聚焦层析原理 | (147) |
| 第二节 操作 | (150) |
| 一、多缓冲剂的选择 | (150) |
| 二、多缓冲交换剂用量的确定 | (150) |
| 三、多缓冲交换剂的处理 | (151) |
| 四、样品的准备 | (152) |
| 五、上样和洗脱 | (152) |
| 六、样品中多缓冲剂的去除 | (153) |
| 第三节 应用 | (153) |

| | |
|----------------------------|--------------|
| 一、分离模型蛋白质 | (153) |
| 二、分离复杂的物质 | (154) |
| 三、鉴定某些酶的性质 | (154) |
| 思考题与参考文献 | (156) |
| 第九章 高效液相色谱 | (157) |
| 第一节 基本原理 | (158) |
| 第二节 反相高效液相色谱 | (161) |
| 一、固定相、流动相和色谱柱 | (162) |
| 二、分离纯化糖基化白蛋白肽片段 | (164) |
| 第三节 应用 | (166) |
| 一、定性和定量分析 | (166) |
| 二、测定酶活性 | (167) |
| 三、测定蛋白质分子质量 | (167) |
| 四、分离核酸和蛋白质 | (168) |
| 思考题与参考文献 | (174) |
| 第十章 固定化的酶与微生物 | (175) |
| 第一节 制备方法 | (176) |
| 一、固定化酶 | (176) |
| 二、固定化微生物 | (179) |
| 第二节 制品的性质 | (180) |
| 一、酶的相对活力 | (180) |
| 二、活力曲线与最适 pH 值 | (181) |
| 三、稳定性 | (182) |
| 四、米氏常数 | (183) |
| 五、其他 | (184) |
| 第三节 应用 | (184) |
| 一、工业方面 | (184) |
| 二、医学方面 | (185) |
| 三、生化分析方面 | (186) |
| 四、应用实例 | (188) |
| 思考题与参考文献 | (190) |

第三编 鉴定方法

| | |
|-----------------------|--------------|
| 第十一章 标记 | (193) |
| 第一节 核酸标记 | (193) |

| | |
|------------------------------|-------|
| 一、标记物的制备及类型 | (193) |
| 二、非核素标记 | (194) |
| 三、核素标记 | (208) |
| 四、标记物纯化 | (211) |
| 五、探针的鉴定 | (213) |
| 六、应用实例 | (216) |
| 第二节 蛋白质(酶、抗体)标记 | (220) |
| 一、标记方法 | (220) |
| 二、核素和非核素标记 | (226) |
| 思考题与参考文献 | (234) |
| 第十二章 重组 DNA | (235) |
| 第一节 重组 DNA 的部件 | (236) |
| 一、工具酶 | (236) |
| 二、载体 | (238) |
| 三、目的基因 | (241) |
| 第二节 重组 | (247) |
| 一、黏性末端连接法 | (247) |
| 二、平端连接法 | (249) |
| 三、平黏连接法 | (249) |
| 四、T-A 连接法 | (249) |
| 五、同聚物加尾连接法 | (249) |
| 六、人工接头连接法 | (250) |
| 第三节 DNA 扩增 | (252) |
| 一、重组 DNA 导入宿主细胞 | (252) |
| 二、重组体的筛选与鉴定 | (254) |
| 三、表达产物的纯化 | (256) |
| 第四节 应用实例 | (257) |
| 一、分离总 RNA 和 mRNA | (257) |
| 二、反转录合成第一链 cDNA | (257) |
| 三、PCR 扩增及其产物纯化 | (257) |
| 四、PCR 产物的克隆 | (258) |
| 五、重组质粒的提取及限制性内切核酸酶分析 | (258) |
| 思考题与参考文献 | (260) |
| 第十三章 DNA 序列测定 | (260) |
| 第一节 双脱氧链终止法 | (260) |

| | |
|--------------------------|-------|
| 一、基本原理 | (260) |
| 二、载体系统 | (262) |
| 三、测序试剂 | (265) |
| 四、测序操作 | (268) |
| 五、变性电泳 | (271) |
| 六、序列读取 | (271) |
| 第二节 PCR 法 | (273) |
| 一、直接测序 | (273) |
| 二、循环测序 | (274) |
| 第三节 化学降解法 | (275) |
| 一、测序原理 | (276) |
| 二、一般程序 | (277) |
| 三、具体操作 | (277) |
| 四、应用实例 | (280) |
| 思考题与参考文献 | (281) |
| 第十四章 生物芯片 | (282) |
| 第一节 基因芯片 | (282) |
| 一、基本原理和 workflow | (282) |
| 二、制备及操作 | (285) |
| 三、应用实例 | (291) |
| 第二节 蛋白质芯片 | (296) |
| 一、原理及特点 | (297) |
| 二、制备与操作 | (297) |
| 三、应用实例 | (299) |
| 第三节 芯片实验室 | (303) |
| 一、芯片实验室的特点 | (303) |
| 二、应用实例 | (304) |
| 思考题与参考文献 | (307) |
| 第十五章 聚合酶链反应 | (308) |
| 第一节 基本原理 | (308) |
| 一、反应系统 | (308) |
| 二、反应过程及条件 | (313) |
| 第二节 PCR 的类型 | (315) |
| 一、普通 PCR | (315) |
| 二、原位 PCR | (316) |

| | |
|----------------------------|-------|
| 三、反转录 PCR | (316) |
| 四、反向 PCR | (317) |
| 五、不对称 PCR | (318) |
| 六、巢式 PCR | (318) |
| 七、彩色 PCR | (319) |
| 第三节 应用 | (320) |
| 一、构建 cDNA 文库 | (320) |
| 二、直接测序 | (320) |
| 三、标记 DNA 探针 | (320) |
| 四、寻找新基因 | (320) |
| 五、检测环境中的致病菌与指示菌 | (321) |
| 思考题与参考文献 | (321) |
| 第十六章 细胞凋亡 | (322) |
| 第一节 基本原理与主要特性 | (322) |
| 一、基本原理 | (322) |
| 二、主要特性 | (334) |
| 第二节 检测细胞凋亡的方法 | (337) |
| 一、形态学 | (337) |
| 二、DNA 片段 | (339) |
| 三、酶活性与组蛋白 | (340) |
| 四、流式细胞仪 | (342) |
| 第三节 应用 | (344) |
| 一、抗肿瘤药物的研究和开发 | (344) |
| 二、疾病的诊断和治疗 | (344) |
| 思考题与参考文献 | (346) |
| 第十七章 生物传感器 | (347) |
| 第一节 基本原理 | (347) |
| 一、离子选择电极 | (348) |
| 二、生物活性材料 | (349) |
| 第二节 类型与制备 | (350) |
| 一、类型 | (350) |
| 二、制备 | (350) |
| 第三节 应用 | (351) |
| 一、工业方面 | (351) |
| 二、医学方面 | (352) |

| | |
|------------------------------|--------------|
| 三、环境监测方面 | (353) |
| 思考题与参考文献 | (353) |
| 第十八章 电泳 | (355) |
| 第一节 基本原理 | (356) |
| 第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (358) |
| 一、基本原理 | (359) |
| 二、一般操作 | (364) |
| 第三节 琼脂糖凝胶和半干式聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (383) |
| 一、琼脂糖凝胶电泳 | (384) |
| 二、半干式聚丙烯酰胺凝胶电泳(分离 DNA) | (387) |
| 第四节 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (388) |
| 一、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (389) |
| 二、尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (390) |
| 三、SDS-尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳 | (391) |
| 第五节 聚丙烯酰胺凝胶电聚焦 | (392) |
| 一、基本原理 | (393) |
| 二、载体两性电解质的理化性质 | (393) |
| 三、载体两性电解质的 pH 范围与用量选择 | (394) |
| 四、测定蛋白质等电点的操作 | (395) |
| 第六节 毛细管电泳 | (399) |
| 一、基本原理与类型 | (399) |
| 二、电泳装置 | (402) |
| 三、应用实例 | (405) |
| 第七节 印迹法(转移电泳) | (407) |
| 一、基本原理 | (408) |
| 二、操作及注意事项 | (409) |
| 三、应用 | (411) |
| 思考题与参考文献 | (413) |
| 第十九章 免疫分析 | (414) |
| 第一节 抗体的性质、制备及纯化 | (414) |
| 一、抗体的性质 | (414) |
| 二、多克隆抗体的制备 | (415) |
| 三、单克隆抗体的制备 | (421) |
| 四、抗体的检测 | (425) |
| 五、抗体的纯化 | (428) |

| | | |
|-------------|-----------------|-------|
| 第二节 | 抗原抗体反应 | (430) |
| 一、 | 凝集反应 | (430) |
| 二、 | 免疫扩散 | (434) |
| 三、 | 免疫电泳 | (436) |
| 四、 | 固相免疫吸附(含 ELISA) | (441) |
| 五、 | 免疫微球测定 | (449) |
| | 思考题与参考文献 | (454) |
| 第二十章 | 气相色谱 | (456) |
| 第一节 | 基本原理 | (457) |
| 一、 | 常用术语 | (457) |
| 二、 | 原理 | (458) |
| 第二节 | 气相色谱仪的构造 | (460) |
| 一、 | 载气流速的控制和测量 | (460) |
| 二、 | 进样系统 | (461) |
| 三、 | 恒温室 | (461) |
| 四、 | 色谱柱 | (461) |
| 五、 | 检定器 | (465) |
| 第三节 | 操作 | (466) |
| 一、 | 操作要点 | (466) |
| 二、 | 条件的选择 | (467) |
| 第四节 | 定性和定量检测 | (467) |
| 一、 | 定性检测 | (467) |
| 二、 | 定量检测 | (468) |
| 第五节 | 应用 | (472) |
| 一、 | 分析蛋白质和氨基酸 | (472) |
| 二、 | 分析核酸 | (472) |
| 三、 | 分析糖类物质 | (472) |
| 四、 | 分析脂肪酸 | (473) |
| 五、 | 分析农药 | (474) |
| | 思考题与参考文献 | (474) |
| | 参考文献 | (475) |
| | 附录 | (484) |
| 一、 | 常用数据 | (484) |
| 二、 | 常用缓冲液的配制 | (494) |
| | 缩写词索引 | (499) |

第一编 概 述

