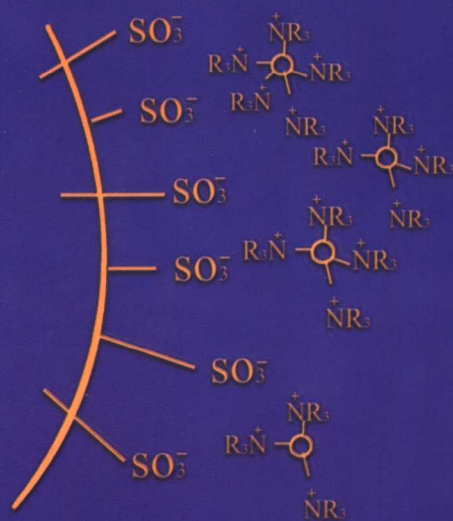
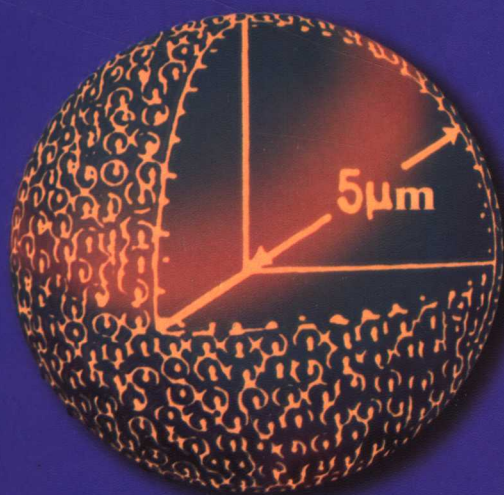


糖复合物生化研究技术

主 编 张惟杰

第二版



浙江大学出版社

糖复合物生化研究技术

(第二版)

主编 张惟杰

浙江大学出版社

糖复合物生化研究技术

(第二版)

主编 张惟杰

责任编辑 李玲如

* * *

浙江大学出版社出版

(杭州浙大路 38 号 邮政编码 310027)

(E-mail: zupress@mail.hz.zj.cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

浙江大学出版社电脑排版中心排版

浙江省良渚印刷厂印刷

浙江省新华书店经销

* * *

787mm×1092mm 16 开 35.25 印张 902 千字

1994 年 10 月第 1 版 1999 年 8 月第 2 版 2006 年 4 月第 5 次印刷

印数: 4001 5000

ISBN 7-308-02125-4/Q · 014 定价: 39.00 元

编者的话

在全国第一次糖的生化学术会议(1982,青岛)后,我受命集合大家的力量编一本糖生化研究方法的书。经过几年努力,《复合多糖生化研究技术》于1987年由上海科学技术出版社出版。第一次印刷印2400册。1990年前后,各位作者收到索书的函件逐渐多起来,作者们手头的一两本也被要去,有的地方甚至不得不复印一批,以满足本单位教学与科研的需要。这些情况反映出,在世界范围内对糖生物学(Glycobiology)的研究热度不断上升的影响下,我国对糖的研究也在不断发展。以糖为研究重点的实验室和课题在不断增加,参与或涉及糖研究的研究人员和研究生人数大为扩展,高等院校中也增设了糖方面的讲授与实验课程。因此,有必要把编写糖生化研究方法的书的工作继续下去。

于是,在内容和作者队伍都有较大扩充的基础上,由浙江大学出版社于1994年出版了《糖复合物生化研究技术》,该书与其说是一本新书,不如说是前一本书的修订版。但是,很快发现,书中错处较多,作为主编我深感不安。经过作者们的再次努力,再加上相当一部分内容的扩充,《糖复合物生化研究技术》(第二版)问世了。

从《复合多糖生化研究技术》到《糖复合物生化研究技术》的第二版,编辑方针里有一个共同点,即所收集的实验方法,不求合而力求其可靠性和可行性。请国内从事某一技术方法较多的作者或实验室,把自己亲手做过的,可以得到相应结果的方法写出来,构成本书的主体内容。适当扩充的一些方法内容,其作者也许并未亲自做过,但肯定对这个方面比较熟悉,有一定的权威或把握。作为一本方法书,正确无误是理所当然的,但仍可能出错,对此我很有临渊履冰之忧,只有恳请同行和读者不吝指出,以便在以后可能的机会中改正。

一本书和一个人或一事物一样,都应有自身的历史。因此,在本版中保留了张龙翔教授写的序言和沈昭文教授写的后记以及惠永正教授为第一版写的前言。几位年青人,郭虹、郭秋鹏、于昕、许正平、何志勇、王东宁等同志先后为本书做了许多工作,中国生化学会袁士龙同志也曾给予大力支持。谨向他们致诚挚的谢意。

张惟杰

于1997年5月1日

中国人民解放军军事医学科学院(邮政编码 100850)

马立人 刘耀清 孙仲诏 陈轶兰 骆传环

耿俊贤 王秉伋 董俊兴 马百平 刘镇国

中国人民解放军第二军医大学(邮政编码 200433)

张世民

中国人民解放军第二六一医院(邮政编码 100094)

冯方波

上海医科大学(邮政编码 200032)

查锡良 徐大顺 顾天爵

大连医学院(邮政编码 116023)

朱正美 刘建军

东北师范大学(邮政编码 130024)

李润秋 张翼仲

安徽大学(邮政编码 230039)

王 靖 张郢昌 张林维 吴东儒

武汉大学(邮政编码 430072)

赵永芳

山东大学(邮政编码 250100)

张玉臻 陈冠军 曲音波 高培基

中国科学院图书馆(邮政编码 100080)

张树庸

西安医科大学生物化学研究所(邮政编码 710061)

田梦玉

浙江大学(邮政编码 310027)

陈仙海 吕志良

上海交通大学(邮政编码 200030)

张惟杰

序 言

糖类的研究经过一个相对寂静时期以后,近二十多年来又活跃起来了。过去认为糖类在生物体内的作用主要是作为能量资源,例如动物体内储存的糖元和植物体内储存的淀粉;或者是作为结构材料,例如植物细胞的纤维素等。近来由于多糖以及糖结合物的分离、纯化、组分测定和结构分析有了长足的进步,同时由于对糖类的生物学功能有了新的认识,例如糖结合物在细胞识别、细胞间物质运输和对免疫功能的调节等方面的作用,因此关于糖类的研究又引起人们的重视。

糖类的研究工作和蛋白质、核酸的研究工作相比,在我国还是一个薄弱的环节。1982年中国生物化学会在青岛召开了第一次糖的生化学术会议。在会议上,五十多篇论文的报告和讨论反映了我国目前糖的生化研究方面的成就,也说明我国这方面的研究工作已经有了一个较好的开端。这次学术会议对于糖类研究工作的开展,无疑将会起推动作用。本书是这次学术会议建议编写的一本关于糖化学和生化研究的工具书。生物化学研究工作的开展,在很大程度上取决于实验方法 and 研究技术的掌握。参加本书编写工作的作者都是在糖类领域里从事研究的生化工作者,具有第一手的经验。列入本书的实验研究方法,大多数是作者在自己实验室做过的。这本工具书的出版,将会起到交流各自经验和心得的作用;对于准备参加糖类生化研究的新手来说,也可以收到事半功倍的效果。

本书在总论中介绍糖类的分离、测定、结构分析的常用方法,也包括近年发展起来的气相色谱、高效液相色谱、质谱、红外光谱,核磁共振等新方法。一些糖苷酶类和结构分析用的工具酶的分离纯化方法也在总论中作了介绍。在各论中,介绍真菌、酵母等微生物多糖,植物多糖,褐藻、红藻、海带等海藻多糖,以及蛋白聚糖、神经鞘糖脂、凝集素等的分离、纯化、鉴定等研究方法。各论中列举的材料,大都是我国产的多糖和糖结合物。为了读者方便,本书最后还对糖类生化的文献作了简单介绍。

我国地大物博,糖类资源也很丰富,而且有些真菌多糖还对生物体具有独特的生理作用,可以作为药用资源。随着社会主义现代化建设事业的进行,各个地区和海洋资源的开发,糖类研究必将越来越受到人们的重视。希望这本工具书的问世,能加速我国糖类基础和应用研究的发展,为社会主义现代化建设服务。

张龙翔
于1987年

前 言(第一版)

蛋白质、核酸和多(寡)糖是最重要的三种生物大分子。蛋白质和核酸在生命现象中的重要性为世人所知,以基因重组为代表的生物工程已经并将大大地造福于人类社会。在迎接生命科学作为领头科学的新世纪来临之际,我们不能不再次重申:正是由于蛋白质和核酸化学,包括分析、测序、合成和结构诸方面研究的成熟才带动了在分子水平上研究生命现象的时代的出现。在这些领域中涌现出多个诺贝尔化学奖获得者即是一个强有力的佐证。

碳水化合物在结构上不同寻常的复杂性再次引起了人们对它的兴趣。与只能以一种途径相互联结的核苷酸和氨基酸不同,单糖可在多个羟基上以两种可能的构型相连成寡糖和多糖,这样,四种不同的核苷酸或氨基酸连结只能构成 24 种不同的四核苷酸或四肽,但四种不同的单糖,理论上即能形成 35 560 种四糖。结构多样性引起的复杂性虽然给糖化学家的工作带来了巨大困难,但也使寡糖成为最有魅力的信息载体。生物进化的无数事实使我们感觉到自然界似乎不会浪费如此巨大的信息资源,问题是迄今我们还未对其功能认识清楚而已。可肯定的是在生命体系中,糖不会仅仅作作为一种结构材料或能量贮源,一定会具有可与核酸或蛋白质比拟的信息功能。确实,近 10 年来涉及糖的生物学研究已使这一重大前景初露端倪。例如,不断积累的证据表明糖及其缀合物是细胞识别的主要标记物,对特定的糖类参与细胞识别的基础研究,在预防和治疗包括癌症在内的多种疾病将有巨大的应用潜力。无可置疑,如同蛋白质和核酸一样,糖的重要生物功能的全貌必将随着糖化学的成熟而逐步明朗,从而带动分子生物学的另一场突破。

目前,在糖化学中包括顺序测定的分析技术、合成方法学和空间结构技术等研究方法,从总体上讲还只相当于 60~70 年代核酸和蛋白质研究的水平。在核酸和蛋白质研究中起重要作用的高效的序列分析、固相自动合成和依靠 X 衍射方法的空间结构分析等,对糖化学来讲,还是一个在远处呼唤的期待。蛋白质和核酸的科学史证明了理论上的突破(如双螺旋概念)离不开方法和手段上的创新(如固相合成法),两者汇合在一起才能造成一个新的时代。

“工欲善其事,必先利其器”。建立系统完善的糖化学研究方法已成为有志于攀登糖研究高峰的科学家,特别是青年科学家追求的目标。本书从几个方面介绍糖的生化分析的目前进展和各种已建立的方法和技术,不失为一本有价值的参考书。我衷心希望在我国有更多的同行,特别是青年人勇敢进入这个具有高度挑战性的领域,为科学的发展和人类进步作出贡献。

国家科委副主任 惠永正 教授

1993 年 8 月 12 日于北京

目 录

第一章 绪论.....	1
-------------	---

总 论

第二章 糖的分离和分析.....	7
------------------	---

2.1 糖的定量测定	7
2.1.1 中性糖的测定	9
1. 还原糖的次亚碘酸盐定量法	9
2. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法	10
3. Somogyi-Nelson 法	11
4. 苯酚-硫酸法	11
5. 蒽酮-硫酸法	12
6. 地衣酚-硫酸法	13
7. 戊糖的测定(地衣酚法)	14
8. 己糖和 6-脱氧己糖的比色测定	14
9. 葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖	15
2.1.2 氨基己糖的测定	16
1. 氨基己糖的比色测定	16
2. N-乙酰氨基己糖的比色测定	18
3. 用 Ehrlich 试剂测定氨基糖	18
2.1.3 己糖醛酸的测定	20
2.2 糖的色谱法	21
2.2.1 糖的纸色谱	21
1. 单糖和双糖的纸色谱	21
2. 寡糖和多糖的纸色谱	28
3. 多羟基醇的纸色谱	28
4. 糖酸的纸色谱	29
5. 氨基糖的纸色谱	29

2.2.2 糖的柱色谱	30
1. 糖的活性炭柱分离	30
2. 蜂蜜中寡糖的炭柱分级法	31
3. 糖的离子色谱法分析	32
2.2.3 糖的气相色谱	36
1. 糖的三甲基硅醚衍生物	37
2. 糖腈乙酸酯衍生物	38
3. 糖醇乙酸酯衍生物	40
4. 糖的三氟乙酸酯衍生物	41
5. 果糖和葡萄糖或甘露糖共存时的气相色谱定量法	42
6. 气相色谱同时测定醛糖和糖醛酸	44
7. 气相色谱用于微量多糖与寡糖的单糖组成分析	45
2.2.4 糖的高效液相色谱	47
1. 单糖和双糖的分析	48
2. 寡糖的分离和测定	54
3. 糖腈全苯甲酸酯紫外标记法分离和测定微量单糖和双糖	57
4. 脉冲安培检测法(HPAEC-PAD)用于单糖和寡糖的分析	59
5. 茚甲氧羧基胍衍生物	65
6. 神经节苷脂的高效液相色谱分析(HPLC)	72
2.2.5 糖的薄层色谱	73
2.3 糖的电泳法	75
1. 红细胞膜上唾液酸的等速电泳	76
2. 多糖的滤纸电泳	78
3. 多糖的玻璃纤维纸电泳	79
4. 多糖的醋酸纤维薄膜电泳	79
5. 多糖的凝胶电泳	80
6. 单糖的高效毛细管电泳	81
7. 寡糖的毛细管电泳	82
8. 糖蛋白的高效毛细管电泳	87
9. 酸性多糖与寡糖的等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳	89
2.4 糖复合物中其他成分的测定	90
1. 糖复合物中乙酰基的测定	90
2. 糖复合物中硫酸基的测定	91
第三章 复合糖化物的物化性质	93
3.1 多糖的纯度鉴定	94
1. 比旋度法	94
2. 超离心法	95
3. 高压电泳法	95
4. 凝胶过滤法	96

3.2 复合糖化物分子量的测定	97
1. 测定多糖分子量的方法和原则	97
2. 渗透压法测定多糖分子量	100
3. 蒸汽压法测定多糖分子量	102
4. 端基法测定多糖分子量	103
5. 光散射法测定多糖分子量	106
6. 粘度法测定多糖分子量	110
7. 高效液相色谱法测定多糖分子量(1)	112
8. 高效液相色谱法测定多糖分子量(2)	117
9. 超过滤法及其在多糖化学研究中的应用	120
10. 凝胶过滤法测定糖蛋白和糖肽的分子量	126
第四章 糖链结构分析方法	128
4.1 从糖蛋白分离糖链或糖肽	129
1. O-糖苷键的稀碱水解(β -消除反应)	129
2. N-糖苷键的胍解法	130
3. N-糖苷键的三氟乙酸水解法	132
4. 多糖的部分酸水解	133
5. 糖蛋白和糖肽的部分酸水解	134
6. 从卵清蛋白制备糖肽	136
7. 酶解法从糖蛋白释放糖肽	138
4.2 用于结构研究的化学方法	140
1. 高碘酸氧化	140
2. Smith 降解	141
3. 甲基化反应(改良 Hakomori 法)	142
4. 甲基化反应(硫酸二甲酯法)	144
5. 微量寡糖的甲基化分析方法	145
6. 多糖中乙酰基的定位	148
4.3 糖苷酶及其在结构分析中的应用	149
1. 胍解法释放牛凝血酶原寡糖的顺序测定	156
2. β -N-乙酰氨基葡萄糖苷内切酶-H(Endo-H)的分离纯化	156
3. β -甘露糖苷酶的分离纯化	159
4. 一种能分解琥珀酸型聚糖的内切酶的分离纯化	160
5. 从土壤细菌中初步分离 α -甘露糖苷酶和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 甘露聚糖内切酶	161
6. 枯草杆菌 α -淀粉酶的分离纯化	163
7. 红色红曲霉 α -葡萄糖苷酶的分离纯化	165
8. 茁霉多糖酶的分离纯化	168
9. 多聚半乳糖醛酸内切酶的分离纯化	170
10. 从分枝犁头霉制剂分离纯化 α -半乳糖苷酶	171
11. 从产碱菌中分离纯化麦芽四糖淀粉酶	173

12. 从黑曲霉突变株制剂分离纯化分解生淀粉的葡萄糖淀粉酶	174
13. 从滴曲霉分离纯化 β -N-乙酰氨基己糖苷酶	177
14. 几丁质酶的分离纯化	179
15. 菊糖酶的分离纯化	181
16. 真菌纤维素酶系的分离纯化	183
17. 木聚糖酶系的分离纯化	185
18. 糖苷酶的固定化	186
19. 硝基苯酚糖苷化合物的有机合成	187
4.4 用于糖链结构分析的光谱法	193
1. 糖的红外光谱法	193
2. 糖的拉曼光谱法	198
4.5 质谱在糖类分析中的应用	201
1. 过碘酸盐氧化-FAB-MB 法	209
2. 乙基标记法	214
3. 直接 FAB-MS 法测定糖基的顺序	214
4. 全乙酰化低聚木糖的质谱研究	217
5. 全苯基化缩水内醚糖的质谱研究	222
6. 色质联用进行低聚糖的结构序列分析	230
7. 质谱法测定痕量的完整寡糖	232
8. 神经节苷脂的快原子质谱结构分析	239
4.6 核磁共振法在多糖上的应用	242
4.7 糖链结构研究中的免疫学方法	253
1. 抗原的制备	254
2. 抗血清的制备	257
3. 抗血清的处理和纯化	258
4. 效价的测定和糖结构分析	259
第五章 糖复合物的其他研究方法	263
5.1 同位素标记在糖复合物微量分析中的应用	263
5.2 拟糖蛋白的合成和应用	265
5.2.1 糖与蛋白质形成共价联接的方法	267
1. 重氮盐偶合法	267
2. 重氮偶联法	268
3. 异硫脲酸酯法	269
4. 异硫脲酸苯基- α -L-岩藻糖苷和 BSA 的偶联	270
5. 还原胺化法合成拟糖蛋白	271
6. 寡糖天冬酰胺经茚三酮激活后用还原胺化法和蛋白质偶联	273
7. 还原胺化法偶联糖蛋白和蛋白质	274
8. 还原氨基化方法	275
9. 活化酰基化方法	276

10. 糖肽与蛋白质的偶联	277
11. 双功能试剂交联法合成拟糖蛋白(1)	279
12. 双功能试剂交联法合成拟糖蛋白(2)	279
13. 双功能试剂交联法合成拟糖蛋白(3)	281
14. 脎化法合成拟糖蛋白	282
5.2.2 水不溶性糖类载体和蛋白质的偶联	284
1. 溴化氰活化法	284
2. 重氮法	285
3. 用双环氧试剂的交联法	286
5.2.3 拟糖蛋白的应用	287
1. 用于糖结合蛋白的分离和鉴定	287
2. 作为组织化学的标记物	288
5.3 多糖的化学修饰	289
5.3.1 非选择性化学修饰	290
1. 酯化	290
2. 甲基化	293
3. O-羧甲基化、O-羧甲基纤维素钠的制备	294
4. 高取代度多糖磷酸单酯的制备	295
5. 多糖硫酸酯的制备	296
6. 多糖硬脂酸酯的制备	296
7. 羟乙基化多糖的制备	297
5.3.2 选择性化学修饰	298
1. 伯羟基的酯化	298
2. 伯羟基的醚化	299
3. 伯羟基的氧化	300
4. 仲羟基的氧化	301
5. 羧基的还原	302
6. 羧基的酰化	303
7. N-酰化	304
5.3.3 末端基团的修饰	305

各 论

第六章 多 糖	309
6.1 植物多糖	309
6.1.1 细胞内贮存多糖的提取和分离	310
1. 当归水溶性多糖的提取和分离	310
2. 亲和层析法分离直链淀粉和支链淀粉	311

6.1.2 果胶类物质的提取和分离	312
1. 单子叶植物细胞壁中鼠李-半乳糖醛酸聚糖的分离	312
2. 双子叶植物细胞壁中鼠李-半乳糖醛酸聚糖的分离	313
6.1.3 半纤维素的提取和分离	314
1. 悬浮培养细胞半纤维素的分离	314
2. 新鲜植物组织半纤维素的分离	317
6.1.4 树胶和粘胶多糖	321
1. 根部多糖的分离	321
2. 茎部多糖的分离	322
3. 叶中多糖的分离	322
4. 皮部多糖的分离	323
5. 花中多糖的分离	324
6. 种荚多糖的分离	325
7. 培养组织材料中多糖的分离	325
8. 大蒜球根部多糖的提取	326
6.1.5 寡糖素	327
寡糖素(寡聚半乳糖醛酸)的酶法制备、纯化和活性测定	327
6.2 微生物多糖	328
1. 粪产碱杆菌产粘变株胞外酸性多糖的纯化	328
2. 斜顶菌(<i>Clicopius caespitosus</i> PK)水溶性多糖的分离提纯	329
3. 香菇(<i>Lentinus edodes</i>)碱溶性多糖的分离提纯	330
4. 酵母甘露聚糖的分离提取	331
5. 酵母甘露聚糖的选择性乙酰解反应	333
6. 免疫学方法在酵母甘露聚糖结构研究中的应用	334
7. 树舌(<i>Ganoderma applanatum</i>)中色素多糖的分离制备	336
6.3 海藻多糖	337
6.3.1 褐藻多糖	338
1. 褐藻多糖的分析法	338
2. 褐藻多糖物理性质的测定	345
3. 褐藻胶的分离和提纯	346
4. 褐藻糖胶的分离和提纯	347
5. 褐藻淀粉(海带淀粉)的分离和提纯	348
6.3.2 红藻多糖	348
1. 红藻多糖的分析方法	350
2. 红藻多糖物理性质的测定	355
3. 琼胶的分离和提纯	357
4. 琼脂糖的分离和制备	358
5. 珠状琼脂糖的制备和提纯	360
6. 卡拉胶的分离和提纯	360

第七章 糖蛋白	362
7.1 动物来源糖蛋白	362
1. 粘液糖蛋白的分离	362
2. 膜糖蛋白的分离	364
3. 纤维粘连蛋白的测定方法	366
7.2 植物来源糖蛋白	368
1. 中药知母 (<i>Anemarrhena asphodeloides</i>) 糖蛋白的提取和分离	369
2. 胡萝卜 (<i>Daucus carota</i> L.) 根细胞壁伸展蛋白的提取和分离	369
3. 萝卜 (<i>Raphanus sativus</i> L. Var. hortensis backer) 叶糖蛋白的提取和分离	370
4. 葡萄 (<i>Carignan noir</i> CV) 渣中糖蛋白的提取和分离	370
第八章 蛋白聚糖	372
8.1 糖胺聚糖(GAG)的分离提取	382
1. 糖胺聚糖的一般提取方法	382
2. 组织中糖胺聚糖的提取	383
3. 透明质酸的分离提取	384
4. 4-硫酸软骨素的分离提取	385
5. 6-硫酸软骨素的分离提取	386
6. 软骨素的制备	387
7. 硫酸皮肤素的分离提取	388
8. 肝素的分离提取	389
9. 低分子肝素的制备	390
10. 硫酸乙酰肝素(硫酸类肝类)的分离提纯	391
11. 硫酸角质素的分离提取	393
12. 海参糖胺聚糖的分离提取	394
8.2 糖胺聚糖(GAG)的分析和测定	396
8.2.1 糖胺聚糖的电泳法鉴定	397
1. 糖胺聚糖乙酸纤维素膜双向电泳	397
2. 糖胺聚糖乙酸纤维素膜单向电泳(1)	398
3. 糖胺聚糖乙酸纤维素膜单向电泳(2)	399
4. 糖胺聚糖的琼脂糖凝胶电泳	401
5. 糖胺聚糖不连续琼脂糖凝胶电泳	402
6. 糖胺聚糖聚丙烯酰胺凝胶电泳	403
8.2.2 糖胺聚糖的酶学和化学法组成鉴定	404
1. 糖胺聚糖的酶降解	404
2. 糖胺聚糖中氨基己糖的鉴别测定	406
3. 糖胺聚糖中己糖醛酸的鉴别测定	407
4. 糖胺聚糖中硫酸基/羧酸基比值测定	409
5. 糖胺聚糖中 N-乙酰氨基己糖/己糖醛酸的比值测定	410

6. 糖胺聚糖中 N-硫酸基/总硫酸基的比值测定	411
8.2.3 糖胺聚糖的定量分析	413
1. 凝胶过滤法测定糖胺聚糖的分子量	413
2. 总糖胺聚糖的含量测定	413
3. 混合糖胺聚糖中各聚糖相对含量测定	414
4. 糖胺聚糖的比色定量法	414
8.2.4 尿中糖胺聚糖的测定方法	415
1. 原子吸收法	416
2. 单向电泳法	417
8.2.5 糖胺聚糖的酶解	418
8.3 人主动脉蛋白聚糖(PG)的研究方法	419
8.3.1 蛋白聚糖的提取、分离和鉴定	419
1. 蛋白聚糖的解聚提取	419
2. 蛋白聚糖的分离	420
3. 蛋白聚糖(或糖胺聚糖)的鉴定	423
4. 蛋白聚糖中硫酸根位置的分析	425
8.3.2 蛋白聚糖的生物学性质的研究	426
1. 蛋白聚糖与外源性透明质酸(HA)的再聚集作用	426
2. 蛋白聚糖与脂蛋白(LP)的相互作用	427
8.4 培养的动物细胞中蛋白聚糖(PG)的研究方法	429
1. 细胞培养和标记蛋白聚糖的提取	430
2. 离子交换柱层析分离蛋白聚糖	432
3. 凝胶过滤柱层析分离蛋白聚糖	432
4. 氯化铯等密度超速离心法分离蛋白聚糖	433
5. 糖胺聚糖和寡糖的分离鉴定及蛋白聚糖的结构分析	434
8.5 各种来源蛋白聚糖的提取和分离	437
1. 软骨蛋白聚糖的提取和分离	437
2. 脑组织硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的提取和分离	438
3. 角膜硫酸角质素蛋白聚糖的提取和分离	441
4. 蛋白聚糖的部分酸水解	442
5. 蛋白聚糖的非特异性蛋白酶消化	443
6. 蛋白聚糖的特异性蛋白酶消化	443
第九章 神经鞘糖脂	445
9.1 神经节苷脂的分离和纯化	450
9.1.1 分配分离法	450
1. Suzuki 改良 Folch 分配法	450
2. Ladisch 分配法	451
9.1.2 离子交换法	453
9.2 神经节苷脂的鉴定	455

9.2.1 神经节苷脂的定量——唾液酸含量的测定	455
1. 间苯二酚-盐酸法	455
2. 过碘酸-间苯二酚法	456
3. 硫代巴比妥酸法	456
9.2.2 薄板层析(TLC)法	457
9.2.3 高效薄板层析(HPTLC)板放射免疫分析法	458
9.2.4 毛细管气相色谱法	459
9.2.5 神经节苷脂的高压液相色谱(HPLC)分析	461
1. 未衍生神经节苷脂的高压液相色谱	461
2. 神经节苷脂衍生物的高压液相色谱	462
9.2.6 神经节苷脂的高效毛细管电泳分析	464
9.3 中性糖脂的分离和纯化	466
9.4 鞘糖脂抗体的制备和鉴定	467
第十章 凝集素	470
10.1 凝集素的分离、纯化和鉴定	474
10.1.1 天然的或修饰的聚糖作亲和吸附剂	475
1. 伴刀豆凝集素(ConA)的纯化	477
2. 蓖麻凝集(RCA ₁)的纯化	478
3. 麦胚凝集素(WGA)的纯化	479
4. 花生凝集素(PNA)的纯化	480
10.1.2 结合载体的糖蛋白或糖肽作亲和吸附剂	481
1. 植物血凝素(PHA)的纯化	483
2. 麦胚凝集素(WGA)的纯化	484
10.1.3 结合载体的单糖或双糖作亲和吸附剂	484
1. 大豆凝集素(SBA)的纯化	488
2. 蓖麻蚕血淋巴凝集素(PLL ₁)的纯化	489
3. 花生凝集素(PNA)的纯化	490
10.1.4 细胞膜凝集素的纯化	490
10.1.5 凝集素的疏水层析	492
10.1.6 鉴定凝集素的一般方法	493
1. 血凝活力的鉴定	493
2. 凝集素糖结合活性的定量测定方法	494
3. 纯度鉴定	495
4. 糖蛋白鉴定	495
10.1.7 凝集素分离鉴定的技术准备	497
1. Sepharose 的酸处理	497
2. 甲状腺球蛋白-Sepharose 的制备	497
3. 卵粘蛋白-Sephsrose 的制备	498
4. 半乳糖胺-CH-Sepharose 的制备	498

5. GalNAc-Epoxy-Sepharose 的制备	499
6. Rha-Sepharose 4B 的制备	499
7. 乳糖-淀粉凝胶亲和吸附剂的制备	499
8. 固定化红血球	500
9. 麦芽糖-淀粉凝胶的制备	500
10.2 凝集素衍生物的制备	500
10.2.1 标记凝集素的制备	500
1. 放射性标记凝集素	501
2. 酶标记凝集素	504
3. 荧光标记凝集素	506
4. 生物素(biotin)标记凝集素	508
5. 铁蛋白标记凝集素	509
6. 胶体金-凝集素复合物的制备	510
10.2.2 固定化凝集素的制备	510
1. Con A-Sepharose 4B 的制备	510
2. RCA-Sepharose 4B 的制备(带己二胺“臂”)	511
3. Con A-Sepharose 6B 的制备(氰基硼氢化钠法)	511
4. 溴化氰活化法制备固相化凝集素	512
10.3 凝集素在生物科学和医学研究中的应用	513
10.3.1 用固定化凝集素分离纯化糖蛋白	514
1. 白扁豆 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的分离纯化	514
2. 猪大网膜脂肪细胞膜糖蛋白的分离纯化	515
3. 血型物质 MN 抗原的纯化	517
4. 用 Con A-Sepharose 4B 分离 ConA 亲和蛋白	517
5. 固相化凝集素的强化	518
10.3.2 用凝集素检测糖复合物并推测其寡糖结构	520
1. 测定溶液中的糖复合物	520
2. 测定细胞膜和亚细胞结构上的糖复合物	526
10.3.3 固定化凝集素亲和层析分离分析寡糖和糖肽	530
1. 序列凝集素柱结合糖苷水解酶分析 N-糖肽	531
2. GS-I-Con A-Sepharose 柱分离带 α Gal-末端的寡糖	535
10.4 内源凝集素	537
10.4.1 内源凝集素的检测	537
1. 蛋白质制造技术测定水溶性内源凝集素	537
2. 免疫组织化学方法测定细胞中的内源凝集素	538
10.4.2 内源凝集素的与分离纯化	539
1. 水溶性内源凝集素的分离纯化	539
2. 细胞膜内源凝集素的分离纯化	540
后记	541