

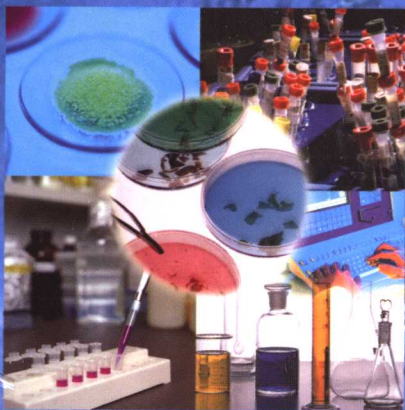
21世纪 高等院校教材
国家理科基地教材

生物科学系列

现代生化技术

第二版

郭 勇 编著



科学出版社

www.sciencep.com

内 容 简 介

本书是在1996年编著的《现代生化技术》的基础上,根据国内外生化技术的最新进展和发展趋势,结合笔者的教学、科研实践,修改、补充而成。本书主要介绍重要而又常用的各种现代生化技术的技术原理和操作要点。内容包括三篇14章,第一篇为生化分离技术,包括提取与沉淀分离技术、过滤与膜分离技术、萃取分离技术、层析分离技术、电泳技术、离心分离技术等6章;第二篇为生化检测技术,包括化学检测技术、光学检测技术、气体检测技术、生物检测技术、放射性同位素检测技术等5章;第三篇为酶、基因和细胞操作技术,包括酶技术、基因克隆技术、细胞融合技术等3章。每一章都有一节列出若干个实验,可供选择使用。

本书可供高等院校生物技术、生物工程、生物科学、生物化工、发酵工程、酶工程、生物制药以及其他有关学科的本科生和研究生作为教材使用,也可供有关专业的教学工作者、科研工作者和工程技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

现代生化技术/郭勇编著. —2版. —北京:科学出版社, 2005. 2

21世纪高等院校教材. 生物科学系列

ISBN 7-03-014619-0

I. 现… II. 郭… III. 生物化学-技术-高等学校-教材 IV. Q503

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第120103号

责任编辑:周 辉 甄文全/责任校对:钟 洋

责任印制:安春生/封面设计:陈敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

西源印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1996年8月第 一 版 华南理工大学出版社

2005年2月第 二 版 开本:B5(720×1000)

2005年2月第一次印刷 印张:21 1/4

印数:1—4 000 字数:393 000

定价:32.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

第二版前言

为了适应学科发展的要求,作者在1986年编写了《生化技术》讲义,在华南理工大学微生物工程、生物化工、发酵工程专业作为本科生和硕士研究生的教材使用,1992年经过第一次补充修改,1996年经过再次补充修改后,改名为《现代生化技术》,由华南理工大学出版社正式出版发行。本书第二版是在上述第一版的基础上,查阅国内外大量文献资料,结合笔者的教学、科研成果重新补充修改而成。

自本书第一版出版以来,已经经过8年多的时间,在这期间,本书在华南理工大学等几十所高等院校作为教材使用,教学效果良好,受到广泛的好评。

近30年来,生物科学和生物工程飞速发展,在理论研究和应用研究方面均取得了举世瞩目的巨大成就。这些成就的取得,与生化技术的发展密不可分。一方面,生物科学与生物工程的发展要求,推动生化技术的高速发展,另一方面生化技术的发展又极大地加速了生物科学和生物工程的发展步伐。例如,1990年启动的人类基因组计划,要求有一套快速、准确的基因测序技术,这一迫切要求极大地推动了基因测序技术的发展,新发展的基因测序技术又对人类基因组计划的提前完成起到了至关重要的作用。

在本次编写过程中,根据生化技术的发展情况,对本书内容进行了较大的修改和补充。由原来的三篇13章扩展到现在的三篇14章。其中新增加了过滤与膜分离技术、萃取分离技术两章,由于核磁共振检测技术主要是由专业人员操作的仪器分析技术,一般生物科学与生物工程工作者很少直接操作,所以在本书第二版中予以删除,有兴趣者可以查阅有关专著。同时对提取与沉淀分离技术、层析分离技术、离心分离技术、分光光度检测技术、生物检测技术、酶分子修饰技术、基因克隆技术和细胞融合技术等章节的内容也作了较大的修改和补充。

在本书的编写过程中,得到余若黔教授、谢秀祯教授、韩双艳博士等许多专家学者的指导和支持,在此表示衷心的感谢。

希望本书第二版的出版能全面反映现代生化技术的全貌,通过对现代生化技术的基本原理和基本技术的介绍,为读者更快、更好地掌握现代生物科学和生物

工程的研究手段和实验方法，为 21 世纪生物科学和生物技术的腾飞和普及做出应有的贡献。

虽然本书第二版的内容有了较多更新，但是由于生化技术的发展日新月异，加上作者水平所限，错漏之处，诚请读者批评指正。

作者

2004 年 9 月于广州

第一版前言

在生物化学及其相关学科应用的各种技术统称为生化技术，主要是指生物体内物质及其代谢产物，特别是生物大分子的分离、检测、制备与改造技术。

近 20 多年来，生物科学在理论与应用方面都取得了惊人的进展，重要的原因之一是生化技术的重大发展。

生化技术的发展过程可以追溯到半个多世纪以前。1925 年，Svedberg 设计的超速离心机以及同时代的 Wrburg 发明的微量检压计等，推动生物化学进入到现代生物化学阶段。1935 年，放射性同位素技术在生物化学过程中的应用，以及随后建立并逐步发展起来的层析技术、电泳技术及其他分离、检测技术，都迅速地促进了生物化学的进展，从而使生物化学的研究工作从整体水平、细胞水平提高到分子水平。20 世纪 60 年代以来生物工程迅速发展，已成为世界新技术革命的主要内容之一。生物工程的发展要求现代生化技术迅速发展，同样，现代生化技术的迅速发展也大大地推动了生物工程的发展。

现代生化技术不仅是生物化学工作者进行研究工作必不可少的手段，也是其他相关学科，如微生物学、酶学、分子生物学、分子物理学、分子遗传学、食品科学、营养学、医学、药理学等进行基础研究的重要工具。同时与生物工程、生物化工、生物制药、微生物工程、发酵工程、酶工程、食品工程、生化工程等息息相关。

本书是作者在 1986 年编写的、1992 年第一次修改补充的《生化技术》讲义的基础上再次修改补充而成的。主要阐述了现代生物科学领域中重要而又常用的生化技术的基本原理及操作要点。实验内容在有关章集中一节列出。这些实验内容都是从国内外公开发表的论文著作中选择而来，其中有一部分是作者在华南理工大学、日本东京大学、美国爱达荷大学（University of Idaho）进行科学研究时亲自做过的，另一部分是作者指导博士研究生和硕士研究生进行学位论文研究时成功使用的，可供研究生或本科生选择部分内容进行实验。

现代生化技术正在飞速发展，原有的技术经常有新的突破，新的技术不断涌

现，往往是书未印出，又有了新的发展，加上作者水平所限，不当之处，诚请读者批评指正。

作者

1995年6月

目 录

第二版前言

第一版前言

第一篇 生化分离技术

第一章 提取与沉淀分离技术	3
第一节 细胞破碎	3
一、机械破碎法	3
二、物理破碎法	4
三、化学破碎法	5
四、酶促破碎法	6
第二节 提取	6
一、提取的方法	7
二、影响提取的因素	8
第三节 沉淀分离	9
一、盐析沉淀法	9
二、等电点沉淀法	14
三、有机溶剂沉淀法	14
四、复合沉淀法	15
五、金属盐沉淀法	15
六、选择性变性沉淀法	16
第四节 实验	16
实验 1-1 大肠杆菌细胞的超声波破碎	16
实验 1-2 枯草杆菌碱性磷酸酶的提取与盐析	17
实验 1-3 枯草杆菌 DNA 的提取与分离	20
实验 1-4 酵母 RNA 的提取与分离	21
实验 1-5 大蒜细胞 SOD 的提取与分离	22
实验 1-6 大鼠肝 rRNA 的提取与分离	24
第二章 过滤与膜分离技术	26
第一节 非膜过滤	26
一、非膜过滤的分类	26
二、非膜过滤的操作过程	27

第二节 膜分离技术	28
一、膜分离的分类	28
二、膜分离的操作过程及其控制	30
第三节 实验	32
实验 2-1 胰凝乳蛋白酶的透析脱盐	32
实验 2-2 糖化酶的超滤分离	33
第三章 萃取分离技术	36
第一节 有机溶剂萃取	36
一、有机溶剂的选择	36
二、有机溶剂萃取的操作过程	36
第二节 双水相萃取	37
一、双水相萃取的原理	37
二、双水相萃取的操作过程	38
第三节 超临界萃取	40
一、超临界萃取的原理	40
二、超临界萃取的操作过程	41
第四节 反胶束萃取	43
一、反胶束萃取的原理	43
二、反胶束萃取的操作过程	43
第五节 实验	45
实验 3-1 青蒿素的超临界萃取分离	45
实验 3-2 人生长激素的双水相萃取分离	46
实验 3-3 穿心莲内酯的有机溶剂萃取	47
第四章 层析分离技术	49
第一节 吸附层析	49
一、吸附层析原理	49
二、吸附柱层析	50
三、聚酰胺薄膜层析	54
四、其他吸附层析	54
第二节 分配层析	55
一、纸层析	55
二、薄层层析	60
三、气相层析	63
第三节 离子交换层析	72
一、离子交换剂的选择与处理	72
二、离子交换层析的操作过程	75
第四节 凝胶层析	76
一、凝胶层析的基本原理	76

二、凝胶的选择与处理	78
三、凝胶层析操作过程	80
第五节 亲和层析	82
一、亲和层析母体和配基	83
二、亲和层析方法	83
第六节 层析聚焦	86
一、交换剂和缓冲液体系	86
二、pH 梯度的形成	86
三、层析聚焦的操作过程	87
第七节 实验	88
实验 4-1 蛋白质溶液的凝胶层析脱盐	88
实验 4-2 氨基酸的纸层析	89
实验 4-3 核苷酸的离子交换层析	91
实验 4-4 胰蛋白酶的亲和层析	93
实验 4-5 凝胶层析测定蛋白质的相对分子质量	95
实验 4-6 DNS-氨基酸的聚酰胺薄膜层析	97
实验 4-7 醇酯成分的气相层析	98
实验 4-8 胆酸混合液的薄层层析	101
第五章 电泳技术	103
第一节 电泳的基本原理	103
第二节 纸电泳	105
一、缓冲液的选择	105
二、滤纸的选择与剪裁	105
三、电泳操作要点	105
第三节 薄层电泳	107
第四节 薄膜电泳	108
第五节 凝胶电泳	109
一、聚丙烯酰胺凝胶的制备原理	109
二、不连续电泳中样品压缩成层的原理	111
三、SDS 凝胶电泳原理	112
四、凝胶电泳的操作要点	112
第六节 等电点聚焦电泳	114
一、稳定 pH 梯度的形成	114
二、两性电解质载体	115
三、支持 pH 梯度的介质	115
四、等电点聚焦电泳的操作要点	116
第七节 实验	117
实验 5-1 核苷酸的纸电泳	117

实验 5-2 蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳	119
实验 5-3 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	120
实验 5-4 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	122
实验 5-5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	124
实验 5-6 蛋白质的二元凝胶电泳	127
第六章 离心分离技术	129
第一节 离心机的选择	129
一、常速离心机	129
二、高速离心机	129
三、超速离心机	129
第二节 离心方法的选择	131
一、差速离心	131
二、密度梯度离心	131
三、等密度梯度离心	133
第三节 离心条件的确定	134
一、离心力	134
二、离心时间	134
三、温度	135
四、pH 值	135
第四节 实验	136
实验 6-1 细菌核糖体的分离	136
实验 6-2 大肠杆菌细胞膜的分离	137
实验 6-3 RNA 的蔗糖密度梯度离心分离	138
实验 6-4 大鼠肝细胞核的分离	139

第二篇 生化检测技术

第七章 化学检测技术	143
第一节 糖类的化学检测	143
一、兰-爱农 (Lane-Eynon) 法	143
二、斐林试剂快速法	144
三、次碘酸钠法	145
四、铜试剂法	147
第二节 蛋白质和氨基酸的化学检测	148
一、定氮法测定蛋白质的含量	148
二、双缩脲试剂法测定蛋白质含量	150
三、福林-酚试剂法测定蛋白质含量	150
四、蛋白质 N-末端氨基酸 DNS 测定法	152
五、蛋白质的氨基酸排列顺序测定——Edman 法	152
六、蛋白质 N-末端氨基酸 FDNB 测定法	156

七、茚三酮显色法测定氨基酸含量	157
八、甲醛滴定法测定氨基酸	159
第三节 蛋白质的免疫化学检测	159
一、基本概念与原理	159
二、蛋白质的免疫化学检测方法	160
第四节 核酸的化学检测	162
一、定磷法测定核酸含量	162
二、二苯胺法测定 DNA 含量	163
三、地衣酚法测定 RNA 含量	164
第五节 实验	164
实验 7-1 斐林试剂置换法测定还原糖	164
实验 7-2 葡萄糖淀粉酶的活力测定	166
实验 7-3 微量凯氏定氮法测定总氮量	167
实验 7-4 福林-酚试剂法测定蛋白质含量	169
实验 7-5 丹磺酰化法分析蛋白质 N-末端氨基酸	170
实验 7-6 异硫氰酸苯酯分析法测定肽链的氨基酸排列次序	172
实验 7-7 茚三酮显色法测定氨基酸含量	174
实验 7-8 双向免疫扩散法测定抗血清效价	175
实验 7-9 定磷法测定核酸含量	176
实验 7-10 地衣酚显色法测定 RNA 含量	178
实验 7-11 二苯胺显色法测定 DNA 含量	179
第八章 光学检测技术	181
第一节 旋光检测技术	181
一、原理	181
二、操作要点	182
第二节 荧光检测技术	182
一、邻苯二甲醛荧光分析法测定氨基酸	183
二、荧光胺荧光分析法测定肽含量	184
第三节 分光光度检测技术	185
一、原理	185
二、操作要点	186
第四节 实验	188
实验 8-1 旋光法测定味精的纯度	188
实验 8-2 荧光法测定核黄素含量	189
实验 8-3 荧光法测定氨基酸含量	190
实验 8-4 紫外吸收法测定核酸含量	191
实验 8-5 紫外吸收法测定蛋白质含量	192
第九章 气体检测技术	194
第一节 华勃氏呼吸仪检压法	195

第二节 范·斯莱克检测仪测定 α -氨基酸含量	198
第三节 实验	198
1 实验 9-1 酵母细胞耗氧量的测定	198
实验 9-2 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸脱羧酶活力	199
实验 9-3 华勃氏呼吸仪测定 L-谷氨酸含量	201
第十章 生物检测技术	203
第一节 安全性试验	203
一、毒性试验	203
二、局部刺激性试验	205
三、溶血试验	205
四、热原试验	205
五、过敏试验	206
第二节 生长抑制物质的生物效价测定	206
一、稀释法	207
二、扩散法	207
第三节 生长促进物质的生物效价检测	209
一、稀释法	210
二、扩散法	210
三、比浊法	210
四、滴定法	210
第四节 实验	210
实验 10-1 卡那霉素的效价测定	210
实验 10-2 二环素的杀菌能力测定	212
实验 10-3 细胞病变抑制法测定干扰素的效价	213
实验 10-4 热原试验	215
第十一章 放射性同位素检测技术	217
第一节 基本知识	217
一、放射性同位素	217
二、放射性同位素的衰变与射线	217
三、衰变规律	218
四、放射线的防护	219
第二节 放射性同位素的检测	219
一、放射自显影技术	220
二、盖革计数管探测	220
三、闪烁计数器探测	221
第三节 放射性同位素的掺入	223
第四节 实验	224
实验 11-1 γ - 32 P-ATP 的酶促合成	224

实验 11-2 ^3H -蛋白质的生物合成	225
实验 11-3 ^3H -蛋白质凝胶的放射荧光显影	225

第三篇 酶、基因和细胞操作技术

第十二章 酶技术	229
第一节 酶生物合成的调节技术	229
一、酶的诱导合成	229
二、酶生物合成的阻遏	231
第二节 酶反应动力学的研究	233
一、酶反应初速度的测定	233
二、底物浓度对反应速度的影响—— K_m 和 $v_{\max}$ 的测定	233
三、最适温度、热稳定性和活化能的测定	235
四、最适 pH 值的测定	237
五、酶的激活与抑制	237
第三节 酶、细胞和原生质体固定化技术	238
一、吸附法固定化技术	238
二、包埋法固定化技术	239
三、结合法固定化技术	240
四、交联固定化技术	242
第四节 酶分子修饰技术	242
一、金属离子置换修饰	243
二、大分子结合修饰	243
三、酶的侧链基团修饰	245
四、肽链有限水解修饰	248
五、核苷酸链剪切修饰	249
六、氨基酸置换修饰	249
七、核苷酸置换修饰	250
八、酶分子的物理修饰	251
第五节 实验	251
实验 12-1 β -半乳糖苷酶的诱导合成	251
实验 12-2 无机磷酸对枯草杆菌碱性磷酸酶生物合成的阻遏作用	253
实验 12-3 碱性磷酸酶的反应动力学性质	254
实验 12-4 L-谷氨酸脱羧酶的固定化	256
实验 12-5 枯草杆菌细胞固定化	257
实验 12-6 谷氨酸棒杆菌原生质体固定化	258
实验 12-7 固定化原生质体生产谷氨酸脱氢酶	259
第十三章 基因克隆技术	261
第一节 基因的获取技术	261
一、分离法	261

二、反转录法	262
三、化学合成法	264
四、聚合酶链反应 (PCR) 技术	265
第二节 载体的制备技术	267
一、载体的分类	268
二、载体的制备	269
第三节 DNA 体外重组技术	271
一、黏性末端连接	271
二、平头末端连接	272
三、修饰末端连接	273
第四节 重组 DNA 引入受体细胞技术	274
一、受体细胞的筛选与处理	274
二、外源 DNA 引入受体细胞	274
第五节 重组 DNA 的鉴定技术	276
一、DNA 印迹技术	276
二、RNA 印迹技术	278
三、蛋白质印迹技术	279
四、DNA 序列测定技术	279
第六节 实验	283
实验 13-1 大肠杆菌 <i>Col E1</i> 质粒的分离	283
实验 13-2 重组 DNA 的细胞转化	285
实验 13-3 Sanger 法测定基因的序列	286
实验 13-4 DNA 印迹杂交	287
实验 13-5 PCR 扩增目的基因	289
实验 13-6 碱裂解法提取质粒 DNA	290
第十四章 细胞融合技术	292
第一节 动物细胞融合技术	292
一、细胞的制备	293
二、细胞融合	293
三、融合子的筛选	294
第二节 原生质体融合技术	295
一、原生质体制备	295
二、原生质体融合	299
三、细胞壁的再生	300
四、融合子的筛选	300
第三节 细胞拆合技术	301
一、细胞器的分离	302
二、细胞器重组	303
第四节 实验	305

实验 14-1 枯草杆菌原生质体的制备 305

实验 14-2 酵母原生质体的分离与再生 305

实验 14-3 从胡萝卜细胞分离原生质体 307

实验 14-4 动物细胞微核体和胞质体的制备 308

附录 310

主要参考文献 321

第一篇 生化分离技术

生化分离技术是指从含有多种组分的混合物中将某种生化物质与其他物质分离的技术。

生化分离技术在生物科学与生物工程的基础研究、应用研究和实际生产中是广泛使用、不可缺少的手段。

生化分离技术有多种，本书主要介绍提取与沉淀分离技术、过滤与膜分离技术、萃取分离技术、层析分离技术、电泳分离技术、离心分离技术等。

