

生物化学

仪器分析

及技术

张承圭 王传怀 合编  
袁玉荪 王新昌

● 高等教育出版社

● SHENGWU HUAXUE YIQI FENXI JI JISHU

# 生物化学仪器分析 及技术

张承圭 王传怀 合编  
袁玉荪 王新昌

高等教育出版社

**生物化学仪器分析及技术**

张承圭 王传怀 合编  
袁玉荪 王新昌

\*

高等教育出版社 出版

新华书店北京发行所发行  
商务印书馆上海印刷厂印装

\*

开本 787×1092 1/16 印张 32.75 字数 746.000  
1990年4月 第1版 1990年4月第1次印刷  
印数 0001—1,140

ISBN 7-04-000896-3/O·346

定价 6.90 元

# 前 言

《生物化学仪器分析及技术》一书是在作者长期从事的教学——《生物化学分析》课讲义的基础上，根据教学实践和生化方法学的发展，逐步积累、取舍、修改、补充而成。在内容上特别是在介绍各方法的技术特点和常规操作中，融合了作者自己的科研实践经验，叙述的一些实验条件是国内目前基本具备的，同时也是作者自己实验室的条件。

全书共分四篇二十八章，分别由袁玉荪，张承圭(光学分析篇)，王传怀(层析篇)、张承圭(区带电泳篇)和王新昌(放射免疫测定篇)等编写。对每章的内容，力求较详细地介绍每种方法的技术特点和基本操作要求，而对基本理论和方法原理部分，则只叙述到为熟悉、掌握和灵活应用该方法所必须了解的程度为止，不作过多的理论或原理的阐述与探讨。全书以目前常用的分离、纯化生物大分子的层析和区带电泳两大类方法为主，同时也用适当篇幅介绍一些更为近代的，需要更多、更精密的仪器设备的生化分析方法，以使读者了解生化方法学是在不断发展的。

全书所用专业名词，主要以《化学化工词汇》(科学出版社)为依据，有关的专业名词或代号基本上均附英文原名。

本书初稿曾召开审稿会(1982年)进行审稿。参加审稿的有：北京大学张庭芳；华东师范大学范培昌；北京师范大学王秀奇；南开大学杨大卫；中山大学苏拔贤；武汉大学刘殿功；四川大学华士锦；东北师范大学张翼伸等同志，对全书进行了认真地审阅，并提出了宝贵的修改意见。其他有关同志也曾给予我们支持和帮助，在此一并致谢。

由于作者水平有限，内容的选择或取舍，较多地考虑到我们教学上的需要，不尽合适，缺点以至错误也在所难免，敬请读者批评指正。

张承圭

1987.8.

DAG 7/08

# 目 录

## 第一篇 光学分析法

第一章 比色分析法	1	1.5.2 实验条件不一致	23
1.1 基本原理	1	1.5.3 入射光强度不稳定或单色性太差	23
1.1.1 光是电磁波	1	1.5.4 读数误差	24
1.1.2 色光的互补	2	第二章 分光光度法	27
1.1.3 基本定律	2	2.1 基本理论	27
1.1.3.1 朗伯定律	3	2.1.1 光谱的类型	27
1.1.3.2 比耳定律	4	2.1.1.1 发射光谱	27
1.1.3.3 朗伯-比耳定律	4	2.1.1.2 吸收光谱	27
1.1.4 比色分析法常用符号及其意义	4	2.1.2 吸收光谱曲线	28
1.1.5 运算公式	6	2.1.3 产生吸收光谱的机理	29
1.2 比色分析的条件	7	2.1.4 发色团和助色团	31
1.2.1 显色	7	2.2 影响吸收光谱的几种因素	32
1.2.1.1 显色反应的类型	7	2.2.1 温度	33
1.2.1.2 显色剂的选择	8	2.2.2 溶剂	34
1.2.1.3 影响显色的因素	9	2.2.2.1 对曲线细微结构的影响	34
1.2.2 入射光	10	2.2.2.2 对 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁的影响	35
1.2.3 干扰物质与干扰的排除	11	2.2.2.3 对 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁的影响	35
1.2.4 溶液的浓度	11	2.2.3 pH值	37
1.3 比色分析定量方法	12	2.2.4 溶液浓度	38
1.3.1 标准系列法	12	2.2.5 狭缝宽度	38
1.3.2 等色法(平衡法)	12	2.2.6 背景吸收	39
1.3.3 消光-浓度工作曲线法	12	2.3 定性分析	39
1.3.4 差示法	13	2.3.1 定性鉴定	39
1.3.5 催化比色法	14	2.3.2 纯度鉴定	41
1.3.6 比色滴定法	14	2.3.3 结构分析	41
1.4 光电比色计	15	2.4 定量分析	42
1.4.1 光电比色计的工作原理	15	2.4.1 单一物质的定量分析	42
1.4.2 光电比色计的主要部件	16	2.4.2 混合样品的定量分析	42
1.4.2.1 光源	16	2.4.2.1 吸收光谱不重叠的混合物定量方法	42
1.4.2.2 滤光片	16	2.4.2.2 吸收光谱重叠的混合物定量方法	42
1.4.2.3 比色槽	17	2.4.3 差光谱分析	43
1.4.2.4 光电池	18	2.4.4 消化系数算法	44
1.4.2.5 检流计	19	2.4.5 络合物组成的测定	45
1.4.3 国产581-G型光电比色计	21	2.5 分光光度计	45
1.5 比色分析的误差	22	2.5.1 分光光度计的一般构造	46
1.5.1 不符合朗伯-比耳定律	22		

2.5.2 分光光度计的主要部件	47	3.6.5.2 双光电池补偿式光电荧光计	80
2.5.2.1 光源	47	3.6.5.3 日本 Shimadzu Kotaki UM 型微量 荧光计	81
2.5.2.2 单色器	47	3.6.5.4 国产 930 型荧光光度计	81
2.5.2.3 比色杯	51	3.6.5.5 国产 DF-01 型数字显示式荧光测定仪	82
2.5.2.4 光电变换元件	52	3.6.6 荧光分光光度计	83
2.5.2.5 检测单元	53	3.7 荧光分析的常用方法	84
2.5.3 分光光度计的主要性能指标	55	3.8 荧光分析的应用——具体方 法举例	85
2.5.4 紫外分光光度计的进展	55	3.8.1 糖类的测定	85
2.5.4.1 双光束分光光度计	55	3.8.2 乙醛酸(二羟醋酸)的测定—— 血, (尿和细菌抽提液中乙醛酸的 测定	87
2.5.4.2 双波长分光光度计	56	3.8.3 维生素 A 的测定	88
2.5.4.3 紫外检测器	56	3.8.4 硫胺素和抗硫胺素的测定	89
<b>第三章 荧光分析法</b>	<b>58</b>	3.8.5 维生素 D 的测定	91
3.1 前言	58	3.8.6 胆碱和乙酰胆碱的测定	91
3.2 荧光的产生	61	3.8.7 胆固醇和胆固醇酯的测定	92
3.3 荧光分析的根据——荧光强度	63	3.8.8 氢化可的松(皮质醇)及其他皮 质类固醇的测定	92
3.4 荧光效率	65	3.8.9 肾上腺素和去甲肾上腺素的测定	93
3.5 影响荧光强度的因素	67	3.8.10 谷氨酰胺和天冬酰胺的测定	94
3.5.1 pH 值对荧光的影响	68	3.8.11 基于赖氨酸的含量对组蛋白的 测定	96
3.5.2 温度对荧光的影响	69	3.8.12 谷胱甘肽的测定	96
3.5.3 溶剂对荧光的影响	69	3.8.13 组胺的测定	97
3.5.4 激发光对荧光的影响	71	3.8.14 组织中蛋白酶的测定	97
3.5.5 荧光污染的影响	71	3.8.15 组织蛋白酶 B 的测定	98
3.5.6 自吸收和内滤效应的影响	71	3.8.16 $\beta$ -葡糖苷酸酶的测定	98
3.5.7 稀样品溶液的影响	73	3.8.17 5'-核苷酸磷酸二酯酶的测定	98
3.5.7.1 氧化作用	73	3.8.18 半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 的测定	99
3.5.7.2 光分解	73	3.8.19 核糖核酸酶的测定	99
3.5.7.3 表面吸附	73	3.8.20 DNA 和 RNA 的测定	100
3.5.8 荧光熄灭的影响	74	3.8.21 腺嘌呤及其衍生物的测定	103
3.6 荧光分析的仪器	75		
3.6.1 光源	75		
3.6.2 滤光片和单色器	77		
3.6.3 样品池(盛液杯)	79		
3.6.4 检测器	79		
3.6.5 光电荧光计	80		
3.6.5.1 单光电池光电荧光计	80		

## 第二篇 层析法

<b>第一章 层析概论</b>	<b>104</b>	1.3.2 根据流动相的不同分类	106
1.1 发展简史	104	1.3.3 根据支持物的装填方式分类	107
1.2 层析法中的一些术语	105	1.4 层析法理论概述	107
1.3 层析法的分类	106	1.4.1 分配定律	107
1.3.1 根据分离的原理不同进行分类	106	1.4.2 分配层析的机理	108

1.4.3 塔板理论	110	2.6.1 氨基酸单向纸层析标准曲线测定	134
1.5 层析法的发展趋势	113	2.6.2 氨基酸的双向纸层析	135
<b>第二章 纸层析</b>	<b>115</b>	2.6.3 核苷酸的纸层析	135
2.1 纸层析的基本原理	115	2.6.4 糖的纸层析	136
2.1.1 纸层析的机理	115	2.6.5 用环形纸层析分离茶叶中的咖啡因	136
2.1.2 $R_f$ 值	115	2.6.6 用反相纸层析分离高级脂肪酸	136
2.1.3 物质的化学结构与 $R_f$ 值之间的关系	116	附录一 纸层析常用的溶剂系统	137
2.1.3.1 物质极性对 $R_f$ 值的影响	116	附录二 纸层析的重要显色剂的配制	138
2.1.3.2 $R_m$ 值及其与物质化学结构的关系	117	<b>第三章 离子交换柱层析</b>	<b>141</b>
2.1.3.3 二肽的结构与 $R_f$ 值的关系	117	3.1 引言	141
2.1.4 实验条件与 $R_f$ 值的关系	118	3.2 离子交换树脂	142
2.1.4.1 溶剂系统对 $R_f$ 值的影响	118	3.2.1 离子交换树脂的分类	142
2.1.4.2 温度对 $R_f$ 值的影响	118	3.2.2 离子交换树脂的合成	142
2.1.4.3 展层方式对 $R_f$ 值的影响	119	3.2.3 离子交换树脂合成举例	144
2.1.4.4 共存物质对 $R_f$ 值的影响	119	3.2.3.1 阳离子交换树脂	144
2.1.4.5 展层剂所走距离和纸的种类对 $R_f$ 值的影响	119	3.2.3.2 阴离子交换树脂	145
2.2 溶剂系统	119	3.2.4 离子交换树脂的性质	145
2.2.1 选择溶剂系统的原则	119	3.2.4.1 离子交换树脂的物理性质	145
2.2.2 多元溶剂系统	120	3.2.4.2 离子交换树脂的化学性质	146
2.2.3 一些有机溶剂系统的精制方法	120	3.3 离子交换平衡和选择性	149
2.3 滤纸	121	3.4 离子交换动力学	151
2.3.1 滤纸的选择	121	3.5 离子交换柱层析的基本原理	152
2.3.2 常用的层析滤纸	121	3.6 离子交换柱层析的实验技术	154
2.3.3 滤纸的净化	122	3.6.1 离子交换树脂的选择	154
2.4 纸层析的实验技术	122	3.6.2 树脂颗粒大小的选择和处理	154
2.4.1 纸层析的展层方法及装置	122	3.6.2.1 树脂的筛选和浮选	154
2.4.2 滤纸的裁剪	126	3.6.2.2 树脂的处理	155
2.4.3 加样方法	127	3.6.3 仪器设备	156
2.4.4 饱和与展层	128	3.6.3.1 层析柱	156
2.4.5 图谱的显示	128	3.6.3.2 恒流装置	156
2.4.6 $R_f$ 值的测定	129	3.6.3.3 分部收集装置	157
2.4.7 定量方法	130	3.6.4 离子交换层析的操作步骤	157
2.5 特殊类型的纸层析	132	3.6.4.1 柱的装填	157
2.5.1 纸堆层析	132	3.6.4.2 加样和洗脱	158
2.5.2 反相层析	132	3.6.4.3 洗脱液的分析	158
2.5.3 盐析纸层析	132	3.6.4.4 树脂的再生	159
2.5.4 用被吸附剂处理过的滤纸进行层析分离	133	3.7 离子交换柱层析在生物化学上的应用	159
2.5.5 高温纸层析	133	3.7.1 氨基酸的层析分离	159
2.6 实验举例	134	3.7.1.1 树脂	159
		3.7.1.2 仪器设备	159
		3.7.1.3 样品的处理	159

3.7.1.4 加样、洗脱和收集	150	4.5.5 洗脱液的收集与分析	187
3.7.1.5 定量测定	150	4.5.6 洗脱液的鉴定	187
3.7.2 肽的分离	161	4.5.7 再层析分离	187
3.7.2.1 层析的样品	161	4.5.8 浓缩	187
3.7.2.2 操作步骤	161	4.5.8.1 离子交换法	188
3.7.2.3 结果分析	161	4.5.8.2 超滤法	188
3.7.3 核酸衍生物的分离	161	4.5.8.3 用吸水剂处理	188
附录	162	4.6 离子交换纤维素柱层析在生	
<b>第四章 离子交换纤维素层析</b>	<b>172</b>	物化学中的应用举例	188
4.1 引言	172	4.6.1 小牛胸腺组蛋白的分离	188
4.2 离子交换纤维素	172	4.6.1.1 样品的制备	188
4.2.1 离子交换纤维素的分类	172	4.6.1.2 层析分离	188
4.2.2 离子交换纤维素的性质	173	4.6.2 肽的分离	189
4.2.2.1 DEAE-纤维素	173	4.6.3 人血清白蛋白的分离与提纯	189
4.2.2.2 TEAE-纤维素	174	4.6.3.1 试剂配制	189
4.2.2.3 ECTEOA-纤维素	175	4.6.3.2 样品处理	190
4.2.2.4 CM-纤维素	175	4.6.3.3 分离	190
4.2.2.5 P-纤维素	175	<b>第五章 凝胶层析</b>	<b>191</b>
4.2.3 离子交换纤维素的合成	175	5.1 引言	191
4.2.3.1 CM-纤维素的合成	175	5.2 凝胶层析的原理	191
4.2.3.2 DEAE-纤维素的合成	176	5.2.1 凝胶层析的简单模型	191
4.3 吸附与解吸	177	5.2.2 分配系数 $K_d$	192
4.3.1 牢固吸附和有限吸附平衡	177	5.2.3 $V_e$ 、 $V_{av}$ 与分子量的关系	194
4.3.2 梯度洗脱	179	5.3 层析凝胶	195
4.3.3 阶段洗脱	181	5.3.1 层析凝胶的必备条件	195
4.3.4 pH 变化对吸附与解吸的影响	181	5.3.2 葡聚糖凝胶	196
4.4 层析条件的选择	182	5.3.3 聚丙烯酰胺凝胶	198
4.4.1 样品性质的鉴定和处理	182	5.3.4 交联丙烯基葡聚糖凝胶	198
4.4.2 离子交换纤维素的选择	182	5.3.5 琼脂糖凝胶	199
4.4.3 交换剂颗粒大小的选择	183	5.3.6 凝胶离子交换剂	203
4.4.4 缓冲溶液的选择	183	5.4 凝胶层析的实验技术	203
4.5 实验步骤	184	5.4.1 凝胶型号的选择	203
4.5.1 离子交换纤维素的处理	184	5.4.2 凝胶颗粒大小的选择	204
4.5.1.1 细颗粒的除去	184	5.4.3 洗脱剂的选择	205
4.5.1.2 离子交换纤维素的洗涤	184	5.4.4 凝胶的溶胀	205
4.5.1.3 离子交换纤维素 pH 的调节	184	5.4.5 凝胶柱的装填	206
4.5.2 装柱	185	5.4.6 调节流速	207
4.5.2.1 重力沉降法	185	5.4.7 加样	207
4.5.2.2 加压法	185	5.4.8 洗脱	209
4.5.3 加样	186	5.4.9 重新装填	209
4.5.3.1 加样量	186	5.5 影响凝胶层析的主要因素	209
4.5.3.2 样品的准备	186	5.5.1 样品	209
4.5.3.3 加样的方法	187		
4.5.4 洗脱	187		



5.5.2 柱	210	6.6.2 配体与聚丙烯酰胺凝胶载体的 偶联	234
5.5.3 凝胶颗粒大小	211	6.6.2.1 聚丙烯酰胺凝胶直接活化法	234
5.6 实验举例	212	6.6.2.2 共聚法	235
5.7 凝胶的防霉与保存方法	213	6.6.3 配体与多孔玻璃载体的偶联	235
5.7.1 防霉方法	213	6.6.4 蛋白质配体与载体偶联的问题	236
5.7.2 保存方法	214	6.7 接“手臂”	236
<b>第六章 亲和层析</b>	<b>215</b>	6.8 亲和层析技术	238
6.1 引言	215	6.8.1 亲和层析的操作方式和步骤	238
6.2 亲和层析的基本原理	215	6.8.2 非专一性洗脱	239
6.2.1 亲和层析的简单模型	215	6.8.3 专一性洗脱	241
6.2.2 生物大分子对配体的亲和力	217	6.8.4 亲和吸附剂的再生方法	242
6.3 配体	218	6.8.5 影响亲和层析的因素	242
6.3.1 配体的必要条件	218	6.8.5.1 样品体积和流速的影响	242
6.3.2 纯化酶所需的配体	218	6.8.5.2 温度对亲和层析的影响	243
6.3.3 纯化酶抑制剂所需的配体	219	6.9 实验举例	243
6.3.4 纯化结合维生素的蛋白质的配体	219	6.9.1 尿激酶的纯化	243
6.3.5 纯化激素受体的配体	220	6.9.2 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶的提纯	243
6.3.6 纯化抗原和抗体的配体	220	<b>第七章 气相层析</b>	<b>245</b>
6.3.7 提纯小分子化合物所需要的配体	220	7.1 概况	245
6.3.8 纯化核酸的配体	221	7.1.1 气相层析的进展	245
6.4 “手臂”	222	7.1.2 气相层析的分类	245
6.4.1 载体的空间位阻和“手臂”的作用	222	7.1.3 气相层析仪流程	246
6.4.2 “手臂”的长度	223	7.1.4 气相层析的特点	246
6.4.3 “手臂”的性质	224	7.2 基本概念和基本理论	247
6.5 载体	225	7.2.1 层析图	247
6.5.1 载体的必要条件	225	7.2.2 基线	247
6.5.2 琼脂糖凝胶	226	7.2.3 峰高	247
6.5.3 交联琼脂糖凝胶	227	7.2.4 峰面积	247
6.5.4 聚丙烯酰胺凝胶	228	7.2.5 峰宽与半峰宽	247
6.5.5 聚丙烯酰胺—琼脂糖凝胶 (AcA)	228	7.2.6 死时间 $t_0$ 和死体积 $V_0$	247
6.5.6 葡聚糖凝胶	229	7.2.7 保留时间 $t_R$ 和保留体积 $V_R$	248
6.5.7 纤维素	229	7.2.8 实际保留时间 $t'_R$	248
6.5.8 多孔玻璃	230	7.2.9 校正保留时间 $t'_R$ 和校正保留 体积 $V'_R$	248
6.6 配体和载体的偶联	231	7.2.10 保留温度 $T_R(K)$	248
6.6.1 配体与多糖载体的偶联	231	7.2.11 比保留体积 $V_g$	248
6.6.1.1 溴化氰活化法	231	7.2.12 相对保留值	248
6.6.1.2 三嗪活化法	232	7.3 气相层析仪	249
6.6.1.3 高碘酸盐氧化法	232	7.3.1 气路系统	249
6.6.1.4 环氧乙烷法	233	7.3.2 进样系统	250
6.6.1.5 配体与多糖载体的其他偶联方法	234		

7.3.3 温度控制系统	251	7.6.1 担体的分类	265
7.3.4 层析柱	252	7.6.2 硅藻土型担体	266
7.4 检测器	252	7.6.2.1 红色担体	266
7.4.1 检测器的应答值	252	7.6.2.2 白色担体	266
7.4.1.1 检测器应答值的定义	252	7.6.2.3 硅藻土型担体的处理方法	266
7.4.1.2 检测器应答值的测定	253	7.6.3 非硅藻土型担体	268
7.4.1.3 相对应答值	254	7.6.3.1 玻璃微球	268
7.4.2 检测器的敏感度	254	7.6.3.2 氟担体	268
7.4.3 热导池检测器	254	7.6.4 担体的选择	269
7.4.4 氢焰离子化检测器(氢焰检测器)	255	7.7 定量分析	269
7.4.4.1 氢焰检测器的工作原理	255	7.7.1 峰面积的测量方法	270
7.4.4.2 氢焰检测器离子室的结构	256	7.7.1.1 几何图解法	270
7.4.4.3 氢焰检测器的操作条件	256	7.7.1.2 峰高乘保留时间法	270
7.4.5 电子捕获检测器	257	7.7.1.3 自动积分法	270
7.4.5.1 电子捕获检测器的结构和工作原理	257	7.7.1.4 求积仪法	271
7.4.5.2 工作条件的选择	257	7.7.1.5 剪纸称重法	271
7.5 固定相	258	7.7.1.6 未完全分离峰面积的测量	271
7.5.1 固体固定相	258	7.7.2 定量方法	271
7.5.2 固定液	262	7.7.2.1 归一化法	271
7.5.2.1 固定液必须具备的条件	262	7.7.2.2 外标法	272
7.5.2.2 影响组分在固定液中溶解度的因素	262	7.7.2.3 内标法	272
7.5.2.3 固定液的选择	263	7.7.2.4 内加法	273
7.5.2.4 固定液的涂渍和老化	263	7.8 气相层析在氨基酸分析上的应用	274
7.5.3 层析柱的填充方法	264	7.8.1 氨基酸用三氟乙酸酐(TFAA)酰化	274
7.5.3.1 填充性的装填方法	264	7.8.2 氨基酸的PTH化	275
7.5.3.2 毛细管柱的涂渍方法	265		
7.6 担体	265		

### 第三篇 区带电泳法

第一章 绪论	277	2.1.1 直流电源	294
1.1 电泳法发展简史	277	2.1.2 电极	294
1.2 何谓区带电泳	279	2.1.3 分析的样品	295
1.3 理论概要	281	2.1.4 支持滤纸的方法	295
1.3.1 迁移率	281	2.1.4.1 平卧法	295
1.3.2 pH变化对带电物质离子化的影响	283	2.1.4.2 悬挂法	295
1.3.3 胶体颗粒的电动电位	286	2.1.5 滤纸的选择	297
1.3.4 电渗与电渗的校正	289	2.1.6 缓冲液溶的选择	297
1.3.5 带电质点的支持介质上的迁移率	291	2.1.7 点样	298
第二章 纸电泳	294	2.1.8 电泳条件	299
2.1 纸电泳的一般方法	294	2.1.9 分离样品的定位——定性检定	299
		2.1.10 定量测定	301
		2.2 双向纸电泳	301

2.2.1 双向均为电泳	301	4.2 电泳装置	319
2.2.2 一向电泳, 一向层析	301	4.2.1 通用型电泳槽	319
2.2.2.1 先电泳后层析或先层析后电泳	302	4.2.2 小型电泳槽	320
2.2.2.2 同时进行电泳和层析	302	4.3 缓冲溶液	320
2.3 连续纸电泳	302	4.4 电泳分离前膜的准备	321
2.4 高压纸电泳	303	4.5 加样	321
2.4.1 一般介绍	303	4.6 电泳	322
2.4.2 生物液体中氨基酸的分离	305	4.7 分离区带的检测	323
2.4.3 肽段的分离	306	4.7.1 染色	323
2.4.3.1 制备混合肽	306	4.7.1.1 一般蛋白质染色	323
2.4.3.2 电泳和层析双向分离	307	4.7.1.2 糖蛋白染色	324
2.4.3.3 作指纹图谱	308	4.7.1.3 脂蛋白染色	324
<b>第三章 薄层电泳</b>	<b>311</b>	4.7.2 洗涤脱色	324
3.1 引言	311	4.7.3 染色膜的干燥和透明	324
3.2 一般方法要点	311	4.7.4 膜的检定	325
3.2.1 电泳装置	311	4.8 应用举例	325
3.2.2 薄层材料	312	4.8.1 血红蛋白的分离	325
3.2.3 缓冲溶液	312	4.8.1.1 血红蛋白溶液的制备	325
3.2.4 薄层板的制备	312	4.8.1.2 加样	326
3.2.5 加样及电泳	313	4.8.1.3 电泳	326
3.2.6 薄层板的冷冻干燥处理	313	4.8.1.4 检定	326
3.3 层析电泳双向分离法	313	4.8.2 血清中结合珠蛋白的测定	326
3.3.1 制作肽图的一般过程	313	4.8.2.1 原理	326
3.3.2 制作肽图的步骤	314	4.8.2.2 电泳	327
3.3.2.1 蛋白质的水解	314	4.8.2.3 检定	327
3.3.2.2 先层析后电泳双向分离制成肽图	314	4.8.3 同工酶的分离检定	327
3.4 凝胶过滤-电泳双向薄层方法	314	4.8.3.1 所需试剂	327
3.4.1 Sephadex 薄层板的制备	315	4.8.3.2 操作步骤中的注意点	327
3.4.2 凝胶过滤	315	4.8.4 核苷酸的分离	328
3.4.3 电泳	316	4.8.5 氨基酸分析	328
3.4.4 检出分离的蛋白质分部	316	4.9 实验结果不满意或实验失败的可能原因	329
3.5 应用举例	316	4.9.1 醋酸纤维膜	329
3.5.1 检测用荧光胺标记的伯胺类物质	316	4.9.2 缓冲溶液	329
3.5.1.1 荧光胺的制备	316	4.9.3 样品和加样	329
3.5.1.2 薄层层析	316	4.9.4 电泳	329
3.5.1.3 电泳	317	4.9.5 染色和透明	330
3.5.2 用荧光胺作为喷雾试剂在肽图上检测分离的肽	317	<b>第五章 凝胶免疫电泳</b>	<b>331</b>
3.5.3 氨基酸的双向分离	317	5.1 引言	331
<b>第四章 醋酸纤维膜电泳</b>	<b>319</b>	5.2 琼脂凝胶免疫电泳方法	333
4.1 醋酸纤维膜电泳的特点	319	5.2.1 琼脂凝胶的制备	333

5.2.2	电泳	333	6.5.4	单体的纯度问题和纯化方法	362
5.2.3	免疫沉淀	333	6.5.5	凝胶系统及其组成	363
5.3	高压琼脂免疫电泳	333	6.5.6	圆柱形凝胶的制备	363
5.4	定量免疫电泳	334	6.5.6.1	分离胶的制备	363
5.4.1	定量免疫电泳的依据和要求	334	6.5.6.2	堆积胶的制备	367
5.4.2	定量免疫电泳所需的试剂	335	6.5.6.3	样品胶的制备	367
5.4.2.1	电泳支持介质——琼脂糖	335	6.5.6.4	影响凝胶聚合的因素	367
5.4.2.2	缓冲溶液	335	6.5.7	电泳	368
5.4.2.3	染色溶液和脱色溶液	335	6.5.7.1	安装电泳管	368
5.4.2.4	抗体(抗血清)	335	6.5.7.2	加样	368
5.4.3	火箭免疫电泳	336	6.5.7.3	加电极缓冲液	368
5.4.3.1	电泳板的制备	336	6.5.7.4	加指示染料	369
5.4.3.2	电泳	337	6.5.7.5	电泳	369
5.4.3.3	检定	337	6.5.8	凝胶的取出	370
5.4.4	双向免疫电泳	338	6.5.9	凝胶的固定和染色——分离区带的检定	370
5.4.4.1	手工双向免疫电泳法	338	6.5.9.1	蛋白质的一般染色方法	370
5.4.4.2	半自动双向免疫电泳法	338	6.5.9.2	含金属蛋白质的染色	371
5.4.4.3	双向免疫电泳图谱的检定	339	6.5.9.3	脂蛋白的染色	371
5.4.4.4	双向免疫电泳的应用	340	6.5.9.4	糖蛋白的染色	371
5.4.5	定量免疫电泳存在的问题	340	6.5.9.5	核酸的染色	371
5.4.6	免疫电泳方法中应注意的一些问题	341	6.5.10	脱色	371
5.5	其他形式的免疫电泳简介	343	6.5.11	定量分析	372
5.5.1	交叉免疫电泳	343	6.5.11.1	切片抽提法	372
5.5.2	薄层凝胶过滤免疫电泳	345	6.5.11.2	微量光密度计法	372
5.5.3	放射对流免疫电泳	346	6.5.11.3	计数法	373
5.5.4	线形免疫电泳	347	6.5.11.4	放射自显影法	373
第六章	聚丙烯酰胺凝胶电泳	351	6.6	蛋白质分子量的测量	373
6.1	引言	351	6.6.1	聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量的根据和要求	373
6.2	聚丙烯酰胺凝胶	352	6.6.2	求商法测定分子量	374
6.2.1	凝胶的结构及用量计算	352	6.7	分析 RNA 时应注意的一些问题	375
6.2.2	凝胶的催化聚合过程	354	6.7.1	制胶	375
6.2.3	凝胶的分子筛效应	355	6.7.2	RNA 样品问题	375
6.2.4	凝胶的浓度, 交联度和不同颗粒电泳迁移率之间的关系	355	6.7.3	缓冲溶液的离子强度	376
6.3	不连续 盘电泳原理概要	356	6.7.4	电泳时的温度	376
6.4	缓冲溶液的选择原则	358	6.7.5	其他的注意事项	376
6.5	分析圆盘电泳方法	360	6.8	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	376
6.5.1	必要的设备	360	6.8.1	概况	376
6.5.2	凝胶组成成分的化学、物理性质	360	6.8.2	测定分子量的 SDS 凝胶电泳方法	378
6.5.3	丙烯酰胺和亚甲基双丙烯酰胺浓度的测定方法	362	6.8.2.1	试剂的配制	378
			6.8.2.2	凝胶的制备	378

6.8.2.3 样品液的制备	380	7.5.1 电泳装置	396
6.8.2.4 电泳步骤	380	7.5.2 电泳步骤	396
6.8.2.5 检定	382	7.5.2.1 支持介质 Pevikon 的处理	396
6.8.3 凝胶的保存方法	383	7.5.2.2 制 Pevikon 电泳板	396
6.8.3.1 湿法保存凝胶	383	7.5.2.3 加样	397
6.8.3.2 干法保存凝胶	383	7.5.2.4 分离区带的分段回收	397
6.8.4 影响蛋白质电泳迁移率造成成分		7.5.3 高压制备板电泳	397
子量测定误差的因素	383	7.5.3.1 高压制备板电泳装置	398
6.8.4.1 SDS 的结合程度	384	7.5.3.2 电泳前应注意的几个问题	398
6.8.4.2 样品本身的荷电性质	384	7.5.4 应用举例	399
6.8.4.3 蛋白质分子量和分子大小	384	7.5.4.1 糖肽和糖蛋白的分离	399
6.8.4.4 其他影响因素	384	7.5.4.2 蛋白类的分离	399
6.8.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量的局限性	384	7.5.4.3 尿中肽类的分离	399
		7.5.4.4 血清中球蛋白的分离	399
6.9 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳	385	<b>第八章 等电聚焦</b>	401
<b>第七章 制备电泳</b>	387	8.1 等电聚焦的基本原理	401
7.1 引言	387	8.2 pH 梯度的组成	401
7.2 制备性圆盘电泳装置 A 型	387	8.3 人工合成的载体两性电解质	402
7.2.1 电极缓冲液室	388	8.4 稳定介质	403
7.2.2 电泳柱	388	8.5 密度梯度柱等电聚焦	403
7.2.3 环形洗脱室	388	8.5.1 U 型管等电聚焦方法	403
7.2.4 法兰锤体	388	8.5.2 Vesterberg 和 Svensson 的等电聚焦方法	404
7.2.5 夹环	388	8.5.3 Grant 和 Leback 的等电聚焦方法	407
7.2.6 电泳步骤	389	8.5.3.1 Isco 密度梯度电泳柱的特点	407
7.2.6.1 凝胶溶液、电极缓冲液和冲洗缓冲液的配制	389	8.5.3.2 进行等电聚焦所需的必要部件以及所用的几种溶液	407
7.2.6.2 电泳装置各部件的组装和电泳	389	8.5.3.3 不在中心管内进行分析的等电聚焦操作步骤	409
7.2.7 几点讨论	390	8.5.3.4 在中心管内进行分析的等电聚焦操作步骤	410
7.3 制备性圆盘电泳装置 B 型	391	8.5.4 对密度梯度等电聚焦方法的几点讨论	410
7.3.1 电泳装置的几个主要部件	391	8.5.4.1 二性载体的选择	410
7.3.1.1 凝胶支持管	391	8.5.4.2 样品	411
7.3.1.2 绝热套	392	8.5.4.3 对聚焦带的检测	412
7.3.1.3 透析滤膜和膜的固定环	392	8.5.4.4 二性载体的去除	412
7.3.1.4 缓冲液槽	392	8.6 凝胶介质中的等电聚焦	412
7.3.1.5 电极	392	8.6.1 凝胶等电聚焦的特点	412
7.3.2 具体操作	392	8.6.2 柱状凝胶等电聚焦	413
7.3.2.1 选择缓冲液	392	8.6.2.1 装置	413
7.3.2.2 凝胶柱的制备	393	8.6.2.2 凝胶的制备	413
7.3.2.3 电泳体系的性能试验	393	8.6.2.2 加样	414
7.3.2.4 加样	394		
7.3.3 应注意的几个问题	394		
7.4 若干种蛋白质的分离制备条件	395		
7.5 Pevikon 制备板电泳	396		

8.6.2.4 等电聚焦操作步骤	114
8.6.3 薄层凝胶等电聚焦	116
8.6.3.1 装置	116
8.6.3.2 薄层凝胶的制备	17

8.6.3.3 加样	119
8.6.3.4 等电聚焦步骤中需要注意的问题	119

8.7 对方法的几点讨论	420
--------------	-----

## 第四篇 放射免疫法

<b>第一章 放射免疫测定的基本知识</b>	422	3.6 标记物的制备	446
1.1 引言	422	3.7 碘化标记物	447
1.2 术语	422	3.7.1 碘化法	447
1.3 放射免疫测定的早期发展史	423	3.7.2 碘化作用的损伤	449
1.4 结合测定的基本原理	424	3.7.3 碘化标记物的纯化	451
1.5 结合体稀释曲线和标准曲线	426	3.7.4 标记物的化学分析	452
1.6 标准曲线的不同制作方法	429	<b>第四章 放射免疫测定对抗体的要求</b>	455
1.7 K 值的重要性	431	4.1 抗体的化学性质	455
1.8 K 值的测定	431	4.2 抗原的化学性质	456
1.9 放射免疫测定的缓冲液和常用添加剂	432	4.3 免疫应答的细胞学基础	456
<b>第二章 放射免疫测定需要一个纯化的抗原</b>	434	4.4 免疫反应的生理学	457
2.1 结合测定的要求	434	4.5 放射免疫测定所需抗体的性质	457
2.2 需要一个纯化的抗原(配体)	434	4.6 抗体的产生	458
2.3 纯配体的优越性	435	4.7 免疫原的性质和剂量	459
2.3.1 大分子蛋白激素	436	4.8 作为免疫原的半抗原的制备	459
2.3.2 癌胚抗原	436	4.9 佐剂	461
2.3.3 类固醇激素和药物	436	4.10 动物的品种	461
2.3.4 小肽激素	437	4.11 免疫的途径	461
2.4 纯化的配体与内源性配体的不一致性	437	4.12 注射时间和采抗血清的时间	462
2.5 标准品	438	4.13 对于放射免疫抗血清的选择	463
2.6 材料的贮藏	440	4.14 抗体的贮存	464
<b>第三章 放射免疫测定需求一个标记的抗原</b>	442	<b>第五章 放射免疫测定时游离相与结合相的分离</b>	465
3.1 放射性同位素	442	5.1 分离方法的有效性	465
3.2 放射性同位素的计数	443	5.2 分离方法的实用性	466
3.3 计数仪的选择	444	5.3 分离游离相和结合相的方法	467
3.4 同位素计数方面的某些问题	445	5.3.1 电泳	467
3.5 标记物的基本特性	446	5.3.2 凝胶过滤	467
		5.3.3 吸附方法	468
		5.3.3.1 活性炭吸附	468
		5.3.3.2 硅胶和硅藻土的吸附	468
		5.3.3.3 羟基磷灰石	469
		5.3.4 分部沉淀	469

5.3.5 双抗体法	470	7.3.4 未标记配体的破坏或掩蔽	488
5.3.5.1 “双抗体”或“第二”抗体	470	7.3.5 非专一的非特异性作用的判别	
5.3.5.2 固相化的第二抗体	471	和去除	488
5.3.6 固相体系	472	<b>第八章 放射免疫测定的精确性</b>	490
5.3.6.1 结合体附着到圆盘和试管壁表面	472	8.1 精确性(precision)的定义	490
5.3.6.2 结合体连接到特殊的固相上	472	8.2 影响精确性的因素	490
5.3.7 结论: 分离步骤的选择	473	8.2.1 试剂和分析设计中的问题	490
<b>第六章 放射免疫测定的灵敏度</b>	474	8.2.2 分析过程中操作的差错	493
6.1 灵敏度(sensitivity)的定义	474	8.3 监测结合分析精确性的方法	494
6.2 增加放射免疫测定灵敏度的方法	475	8.3.1 对于监测精确性的质量控制物质的制备	494
6.2.1 减少标记物的用量	475	8.3.2 用质量控制物质来检查精确性的方法	495
6.2.2 减少结合体的用量	476	8.3.3 监测精确性的其他方法	497
6.2.3 增加保温时间	476	8.4 结合测定最适精确性方法的建立	498
6.2.4 减少保温时间——非平衡分析法	477	8.5 在放射免疫测定中对精确性评价方面国内的一些建议	498
6.2.5 试剂加入的顺序	477	<b>第九章 放射免疫测定与其他分析类型的关系</b>	500
6.2.6 采用亲和力高的抗体	478	9.1 对测定方法的要求	500
6.2.7 增加样品的体积	478	9.2 受体分析(Receptor Assay)	500
6.2.8 提高保温的温度	478	9.3 血液结合蛋白分析(circulating binding protein assays)	501
6.2.9 增加样品重复测定的次数	479	9.4 免疫分析(immunoassays)	501
6.2.10 抽提和浓缩配体	479	9.5 结论	503
6.3 降低放射免疫测定灵敏度的方法	479	<b>第十章 放射免疫测定操作的安全预防措施</b>	504
6.4 放射免疫测定的靶区——范围的重要性	480	10.1 放射免疫实验室中的放射性危险	504
6.5 结论	481	10.2 管理总则	504
<b>第七章 放射免疫测定的特异性</b>	482	10.3 标记规则	505
7.1 特异性(specificity)的定义	482	10.4 实验室监测	505
7.2 专一的非特异性(specific non-specificity)	482	10.5 放射性废物处理	505
7.2.1 专一的非特异性的基础	482	10.6 放射免疫实验室的设计	506
7.2.2 专一的非特异性的估计	483		
7.2.3 改进特异性的方法	485		
7.3 非专一的非特异性(non-specific non-specificity)	486		
7.3.1 样品中存在干扰抗原-抗体反应的物质	487		
7.3.2 样品中空白值的变化	487		
7.3.3 抗体或标记物的破坏或掩蔽	487		

# 第一篇 光学分析法

## 第一章 比色分析法

在一定浓度范围内，溶液中有色物质的浓度与溶液颜色的深度成正比。根据溶液颜色深度，测定溶液中有色物质含量的方法，称为比色分析法。

许多物质是无色的。但在适当条件下与适当试剂作用，可产生有色物质，因而亦可用比色分析法测定其含量。

比色分析法操作较简便，并具有较高的灵敏度和精确度(可测范围为  $10^{-3}$ — $10^{-6}$  mol/L，催化比色法可达  $10^{-10}$  mol/L，相对误差为 5% 左右)，所用仪器也较简单，是一广泛应用的微量分析法。

### 1.1 基本原理

#### 1.1.1 光是电磁波

电磁波有不同的波长( $\lambda$ )和频率( $\nu$ )。波长是指振幅相同而相位相差一个周期的最近两点间的距离(图 1-1)。频率是单位时间内的全振动次数，它和波长的关系如下式所示：

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

式中  $c$  是光速，在真空中  $c = 2.998 \times 10^{10}$  cm/s。

电磁波亦可用波数( $\sigma$ )表示，波数是指在 1cm 长度内所含波的数目(红外光谱常用此法表示)。

$$\sigma = \frac{1}{\lambda}$$

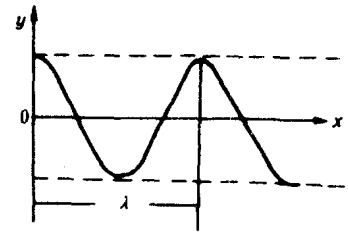


图 1-1 振动曲线

将电磁波按波长(或频率)顺序排列起来，即得电磁波谱(图 1-2)。比色分析所用的是波长在 400—760 nm 范围内的电磁波。是人眼所能感觉到的，称为可见光。

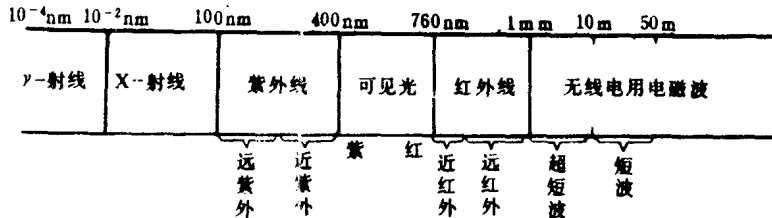


图 1-2 电磁波谱



可见光区的电磁波因波长不同而呈现不同的颜色，这些不同的电磁波称为单色光。单色光并非单一波长的光，而是一定波长范围内的光，欲得到单一波长的单色光是很困难的。

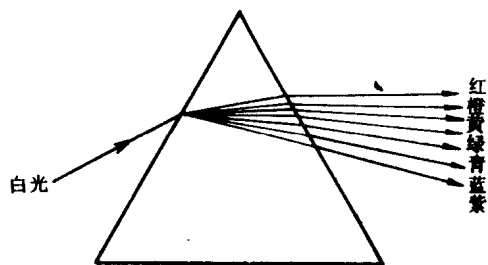


图 1-3 白光的分解

太阳及钨丝灯发出的白光是含有各种单色光的混合光(复合光)，利用棱镜(或光栅)可将白光分解成按波长顺序排列的各种单色光(图 1-3)，这就是光谱。将混合光分解成单色光的现象称为光的色散或分光。

投射于物体的光可被物体反射和吸收，如该物体是透明的，则还有部分光可透过物质。

### 1.1.2 色光的互补

在白光照射下，物体所以呈现特定的颜色，是因为物体对不同波长的色光有选择吸收的缘故。有色溶液之所以呈现不同颜色，也由于这种对光的选择性吸收所致。例如，硫酸铜溶液对黄光的吸收最强，对蓝光的吸收很弱，故在白光照射下，溶液呈蓝色，又如高锰酸钾溶液对绿光的吸收能力很强，对红紫色光的吸收能力极弱，所以溶液呈红紫色。由此可知：

(1)任何有色溶液(或物体)都对一定的单色光有强烈的吸收能力,对其他色光则不吸收或吸收能力极弱(如对各种色光的吸收能力都很强,则该物体呈黑色)。反之,对任何色光都不吸收,则该物体为白色或无色。(2)若物体从白光(混合光)中去除(如被溶液吸收)某单色光,则该物体必然呈现特定的颜色,而被去除(吸收)的单色光颜色和该物体所呈现的颜色互为补色,如上述硫酸铜溶液的蓝色和被它强烈吸收的黄色即互为补色。

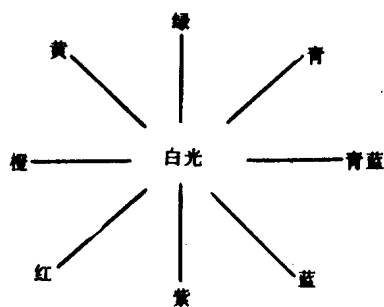


图 1-4 色光的互补关系

只有利用被测溶液吸收最强的单色光进行比色分析,才能得到最满意的结果,而被测溶液吸收最强的单色光,就是与溶液的颜色互补的色光,图 1-4 中相应的两色光互补,如将互补的色光相混(相加),即产生白光。反之,如从白光中去除一种色光,即得与其互补的色光。

互补原则是进行比色分析选择单色光的依据。

### 1.1.3 基本定律

如果将两种不同浓度的硫酸铜溶液,分别盛于形状及大小都相同的玻璃器皿中,并置于同样强度的白光照射下,二者虽然都呈现蓝色。但蓝色深浅不同(图 1-5)。浓度大的( $C_1$ )色深,浓度小的( $C_2$ )色浅,这是由于前者吸收的光能较后者多的缘故,如果测量它们的透过光强度,浓度大的透过光( $I_1$ )较浓度小的透过光( $I_2$ )弱。

事实上,除了溶液吸收光能,容器亦可吸收一部分光能( $I_A$ ),而溶液及容器表面还可反射部分光能( $I_R$ )。若入射光强度为 $I_0$ ,溶液吸收的光能为 $I_A$ ,透过光强度为 $I$ ,则

$$I_0 = I_R + I_A + I_{A'} + I$$