

生物科学中的数学

方法手册

George Keleti

William H. Laderer

毛景平 译

大连理工大学出版社

生物科学中的微量方法手册

SHENGWUKEXUEDE WEILIANG FANGFASHOUCE

Georg Keleti

William H. Lederer 著

毛德寿 译

大连理工大学出版社出版
(大连市甘井子区凌水河)

辽宁省地矿局测绘大队
印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 4 字数: 83千字
1990年7月第1版 1990年7月第1次印刷
印数: 001~500册

责任编辑: 崔久满 王君仁

封面设计: 崔久满

责任校对: 彭学勤

ISBN 7-5611-0282-8/Q·11

定价: 1.53元

内 容 简 介

本手册为Georg Keleti和William H. Lederer所著，共介绍106个从生物材料中提取、分离、分析和测定的微量方法。内容包括三部分：供化学分析和生物学性质鉴定用的材料的制备；化学微量分析法；免疫化学试验法。本书是实验室工作的指南性手册。可供微生物学、生物化学、免疫化学工作者以及临床检验人员参考。

作者序言

本书介绍的实验都是来源于文献中的方法，而且是经过实际应用后修订写成的。

本手册有106个实验，每个只叙述生物化学或微生物学的一项制备或分析技术。写法简明扼要，按操作程序一步步列出，包括实验目的和评价。因此，研究工作者、实验技术人员或学生不必借助其它参考资料，便可分析某一生化制品。各实验所用试剂均有详细的配制方法，不必另行计算。为使实验方法更清楚，必要处还作了解释，这对方法的了解是必要的、有益的。虽然本书涉及的是微量分析法，不过，这些微量分析法很容易改为常量分析。

本书分三章：第一章 化学分析或生物学性质鉴定用材料的制备；第二章 化学微量分析法；第三章 免疫化学试验法。

本书中的许多实验以脂多糖为材料，但它只不过是作为一种模式化合物。

本手册是为微生物学家、生物化学家和免疫化学家编写的。不过，我们舍去了分子生物学方面的内容，只涉及与大学、研究院、工业和公共卫生实验室有关的生物材料，其目的是为研究工作者、教师和学生提供一本实验室工作的指南。

本书中的注释引自文献，由Ilene Winn Lederer改写。

Georg Keleti
William H. Lederer

目 录

序 言

第一章 化学分析或生物学性质鉴定用材料的制备

实验一	糖衍生物的Dowex50酸水解	(1)
实验二	Amberlite IRA-410树脂的活化	(1)
实验三	Dowex50树脂的活化	(2)
实验四	革兰氏阴性细菌脂多糖制备(改良Westphal法)	(2)
实验五	荚膜多糖抗原制备	(3)
实验六	共同抗原的制备	(4)
实验七	脂多糖、糖苷类脂或类脂A 与牛血清 白蛋白的络合	(5)
实验八	生物材料去蛋白	(6)
实验九	内毒素去蛋白	(7)
实验十	RNA和DNA的测定	(7)
实验十一	DNA制备	(8)
实验十二	样品真空干燥器干燥	(10)
实验十三	内毒素(Foster-Ribi法)制备	(11)
实验十四	内毒素(改良Boivin法)制备	(12)
实验十五	生物材料的酶处理	(13)
实验十六	革兰氏阴性细菌粗糙型菌株的糖苷类脂制备	(14)
实验十七	脂多糖(HCl)水解	(15)

实验十八	脂多糖(H_2SO_4)水解	(16)
实验十九	单糖、寡糖和氨基糖纸层析分离	(16)
实验二十	胞囊层的分离	(17)
实验二十一	由脂多糖或糖苷类脂制备类脂A	(19)
实验二十二	分子筛层析	(19)
实验二十三	脂多糖及其它物质的局部酸水解	(21)
实验二十四	脂多糖及有关物质的碱水解	(22)
实验二十五	分离细胞化学成份用细菌的制备	(23)
实验二十六	蛋白质分离	(23)
实验二十七	脂多糖纯化(改良Westphal法)	(24)
实验二十八	RNA制备	(24)
实验二十九	RNA制备(Cetavlon法)	(25)
实验三十	组织RNA、DNA和蛋白质的分离	(26)
实验三十一	蔗糖密度梯度离心	(27)

第二章 化学微量分析法

实验三十二	乙醛测定	(28)
实验三十三	3-乙酰氨基糖或自由3-氨基糖	(29)
实验三十四	N-乙酰基和O-乙酰基测定	(30)
实验三十五	游离3-氨基糖的乙酰化	(32)
实验三十六	N-乙酰氨基己糖	(32)
实验三十七	4-氨基-L-阿拉伯糖	(33)
实验三十八	氨基糖、氨基酸等等(茚三酮)	(34)
实验三十九	硼氢化钠还原	(35)
实验四十	糖(铁氰化物法)测定	(36)

实验四十一	糖(苯磺酸)测定	(37)
实验四十二	6-脱氧己糖	(37)
实验四十三	2-脱氧糖(二苯胺)测定	(38)
实验四十四	2-脱氧糖(Webb)测定	(39)
实验四十五	气-液层析测定羧脂肪酸	(40)
实验四十六	气-液层析测定糖	(40)
实验四十七	3,6-二脱氧己糖测定	(41)
实验四十八	脂链脂肪酸(羟胺)测定	(42)
实验四十九	DNA测定	(43)
实验五十	糖的下行纸层析测定	(44)
实验五十一	甲醛测定	(45)
实验五十二	甲酸测定	(46)
实验五十三	游离脂肪酸(长链)测定	(47)
实验五十四	果糖测定	(48)
实验五十五	D-乳糖(半乳糖氧化酶法)测定	(48)
实验五十六	脂多糖脂肪酸气相层析	(49)
实验五十七	D-葡萄糖(葡萄糖氧化酶法)测定	(51)
实验五十八	庚糖测定	(51)
实验五十九	氨基己糖测定	(52)
实验六十	己糖测定	(53)
实验六十一	己糖(蒽酮)测定	(54)
实验六十二	游离脂肪酸的分离	(54)
实验六十三	2-酮-3-脱氧辛酯测定	(55)
实验六十四	类脂(总)测定	(56)
实验六十五	神经氨酸测定	(57)

实验六十六	核酸测定	(57)
实验六十七	戊糖(苔黑酚)测定	(58)
实验六十八	过碘酸氧化	(59)
实验六十九	磷(无机)测定	(60)
实验七十	磷(总磷)测定	(61)
实验七十一	气-液层析用糖的制备	(62)
实验七十二	蛋白质(双缩脲)测定	(63)
实验七十三	蛋白质(Lowry)测定	(63)
实验七十四	纤维薄膜层析快速测定糖	(64)
实验七十五	氨基糖和氨基酸层析的茚三酮显色	(65)
实验七十六	糖层析后的邻苯二甲胺显色	(65)
实验七十七	糖薄层或纸层的 Ag^+/OH^- 显色	(66)
实验七十八	微量分析法的标准曲线	(66)
实验七十九	糖(DISCHE光谱)测定法	(68)
实验八十	糖醛酸(定性)检定	(68)
实验八十一	糖醛酸(定量)(Dische)测定	(69)

第三章 免疫化学实验法

实验八十二	补体结合试验	(70)
八十二A	补体滴定	(71)
八十二B	补体结合试验用的血红蛋白标准曲线	(72)
八十二C	补体结合试验用羊红血球细胞的制备	(73)
八十二D	溶血素(解体)滴定	(74)

八十二E	补体结合试验用抗原滴定·····	(75)
八十二F	补体结合试验·····	(78)
实验八十三	补体结合(Bordet—Wassermann) ···	(81)
八十三A	补体滴定·····	(81)
八十三B	抗原滴定·····	(82)
八十三C	补体结合试验用羊红血球细胞的敏化 (Bordet—Wassermann) ·····	(83)
八十三D	溶血素(解体) 滴定·····	(84)
八十三E	诊断补体结合(Bordet—Wassermann) ·····	(85)
实验八十四	抗脂多糖(O 抗原) 抗体形成细胞的检定 ·····	(86)
实验八十五	用红血球细胞凝集反应测定共同抗原··	(87)
实验八十六	单向双扩散(OAKLEY) ·····	(88)
实验八十七	免疫电泳或欧托隆(Ouchterlong) 凝胶扩散图谱的固定和显色·····	(89)
实验八十八	免疫电泳·····	(90)
实验八十九	被动红血球细胞凝集反应的抑制·····	(91)
实验九十	LD ₅₀ (半致死量) 测定 ·····	(93)
实验九十一	用环己亚胺预处理的LD ₅₀ 测定 ·····	(94)
实验九十二	溶血素凝胶定位测定抗体生成细胞·····	(94)
实验九十三	微量沉淀反应的抑制·····	(97)
实验九十四	欧托隆凝胶扩散·····	(98)
实验九十五	脂多糖或其它材料的被动红血球细胞 凝集反应·····	(100)

实验九十六	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	(102)
实验九十七	SDS—聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	(104)
实验九十八	抗血清的制备	(107)
实验九十九	制备抗血清用H抗原的制备	(108)
实验一〇〇	制备抗血清用O抗原的制备	(108)
实验一〇一	热源反应	(109)
实验一〇二	定量微量沉淀反应	(110)
实验一〇三	单向扩散(Oudin)	(111)
实验一〇四	玻片凝集反应	(113)
实验一〇五	玻管凝集反应	(114)
实验一〇六	红血球细胞凝集反应应用Vi抗原的提取	(115)

第一章

化学分析或生物学性质 鉴定用材料的制备

实验一 糖衍生物的Dowex50酸水解

目的 由糖衍生物释放单糖，供进一步分析游离糖。

方法 (1) 于安瓶中装入 5 毫克寡糖样品，加 500 微升水；
(2) 加入活化的 Dowex50 树脂 (实验三)，达 25% 体积浓度，摇匀。(3) 火焰封口；(4) 沸水浴 3 小时；(5) 冷至室温；(6) 4℃、3000rpm 离心 10 分钟；(7) 上清液于真空干燥器中干燥 (CaCl_2 , NaOH) (见实验十二)；
(8) 加 500 微升水；(9) 重复步骤 (7) 和 (8)；(10) 重复步骤 (7)。

参 考 文 献

1. Keleti, J., H. Mayer, I. Fromme and O. Lüderitz, Eur. J. Biochem. (16) 284, 1970.

实验二 Amberlite IRA-410 树脂活化

目的 试剂 Amberlite IRA-410 (HCO_3^- 型) 树脂，使用前必须经洗涤和活化。它是一种很有用的和合适的中和剂，例如用于脂多糖酸水解 (实验十八)。

方法 (1) 于一垫有Whatman 1号滤纸的布氏漏斗中, 加约100克树脂, 蒸馏水洗至流出液pH与水相同; (2) 用2 N HCl浸泡10—15分钟, 不时搅拌; (3) 水洗至树脂pH与水相同; (4) 2 N NaOH浸泡10—15分钟, 不时搅拌; (5) 水洗至树脂pH与水同; (6) 加入饱和 NaHCO_3 , 浸泡20分钟, 不时搅拌, 这步重复3次; (7) 处理好后铺在铝板上, 用称量纸盖好, 室温晾干2—3天; (8) 在深色瓶中可存放数日。

参 考 文 献

1. Personal Communication and experience.

实验三 Dowex50树脂活化

目的 活化Dowex50树脂, 用于寡糖或糖苷的酸水解(实验一); 气—液层析用的糖制备上, 用它降低pH, 从碱区至pH 4—5之间(实验七十一)。

方法 (1) Dowex50, 200—400目, 氢型; (2) 将树脂置于布氏漏斗(垫Whatman 1号滤纸)里, 加入10倍以上的1 N HCl; (3) 静置15分钟左右; (4) 水抽洗至树脂pH与水同; (5) 活化一次最长只能用1—2周。

参 考 文 献

1. Personal Communication and experience.

实验四 革兰氏阴性细菌脂多糖的制备

(改良 Westphal 法)

目的 本法原理是，细菌混悬于热苯酚—水混合液，冷却后分三层：水层含脂多糖和核酸；苯酚层为蛋白质（也含少量糖）；离心沉淀物为细胞碎片。

方法 (1) 68℃水浴中，将20克细菌干粉（制备 见实验二十五）混悬于350毫升水中；(2) 加入预热68℃的90%苯酚350毫升，用力搅拌30分钟；(3) 冰浴冷却至10℃；(4) 7000rpm离心45分钟；(5) 吸出水层，内含脂多糖、核酸；(6) 苯酚层和不溶性残留物再加350毫升水，用力搅拌，68℃水浴加热30分钟，重复(3)、(4)、(5)步操作；(7) 苯酚层用于分离蛋白质（实验二十六），液层合并；(8) 合并的水层流水透析3天，除尽苯酚；(9) 40℃减压浓缩至100毫升左右；(10) 5000rpm离心15分钟，弃去沉淀；(11) 上清液真空冷冻干燥，得粗品脂多糖，按实验二十七纯化。

参 考 文 献

1. Westphal, O. and K. Jann, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, edited by R. L. Whistler, J. N. BeMiller and M. L. Wolfrom, Vol. 5, p. 83. Academic Press, New York, 1965.

实验五 荚膜多糖抗原制备

目的 酸性多糖是某些细菌株荚膜主要构成成份。它能被不同离子强度的盐与季胺盐（如溴化十六烷基三甲胺，Cetavlon）所释放，之后分离。Cetavlon盐提取液中，RNA首先被沉

淀，之后用水降低上清液的离子强度，离心，沉淀物中含酸性多糖Cetavlon盐，当将之转变为钠盐时便可分离。

方法 (1) 由脂多糖纯化(实验二十七)的第(2)步所得500毫克干品；(2) 溶于50毫升NaCl试剂A中；(3) 加入25毫升试剂B；(4) 室温搅拌15分钟；(5) 10,000 rpm离心30分钟，沉淀物中含粗RNA Cetavlon盐；(6) 上清加225毫升水混合；(7) 4℃过夜；(8) 4℃、10,000rpm离心30分钟，上清液含低分子量脂多糖；(9) 沉淀溶于NaCl试剂C中；(10) 加10体积95%乙醇；(11) 10,000rpm离心30分钟；(12) 沉淀物中含荚膜多糖抗原钠盐；(13) 重复步骤(9)、(10)、(11)，使之沉淀完全；(14) 沉淀溶于水；(15) 4℃对水透析2天；(16) 真空冷冻干燥。

试剂 A 17.6克NaCl用水溶至1000毫升(0.3M)；

B 4克溴化十六烷基三甲铵用A稀释至100毫升；

C 58.5克NaCl用水定容至1000毫升(1M)。

参 考 文 献

1. Westphal, O. and K. Jann, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, edited by R. L. Whistler, J. N. Bemiller and M. L. Wolfrom, Vol. 5, p. 83. Academic Press, New York, 1965.

实验六 共同抗原的制备

目的 由大肠杆菌(如E. Coli, Enterobacter aerogenes, Salmonella, 和Shigella)制备部分纯化的共同抗原。这些菌株含O抗原和共同抗原。两种抗原可用乙醇分离。共

同抗原溶于85%乙醇，O抗原不溶。共同抗原的抗血清可用E. Coli044热杀悬液直接免疫兔制得。

方法 (1) 上述菌株用Difco琼脂在37℃克氏瓶培养18小时；(2) 将收集细胞混悬于凝集用磷酸盐缓冲液(pH7.3)

(3) 沸水浴1小时；(4) 4℃、23,500g离心20分钟；(5) 上清液加乙醇至85%浓度。混合液置室温18小时；(6) 4℃、23,500g离心20分钟；(7) 上清液于真空(减压)蒸发至小体积；(8) 残留液盛于培养皿，37℃培养箱中干燥成粉末；(9) 粉末溶于体积同步骤(2)的pH7.3的凝集用缓冲液。

参 考 文 献

1. Suzuki, T., E. A. Gorzynski and E. Neter, J. Bacteriol. (88) 1240, 1964.

实验七 脂多糖、糖苷类脂

或类脂A与牛血清白蛋白的络合

目的 这是内毒素物质与蛋白质结合的一种方法，可提高内毒素制品的生物学活性，产生新抗原和评价载体对生物学活性的影响。

方法 (1) 类脂A 20毫克，混悬于10毫升水中；(2) 加入10微升三羟乙基胺；(3) 20毫克牛血清白蛋白，用20毫升水配成溶液；(4) 两液合并，40℃减压干燥；(5) 加15毫升水，40℃再干燥；(6) 加20毫升水，于50℃的振荡水浴中温育30分钟；(7) 超声处理15分钟；(8) 真空冷

冻干燥（实验十二）。

参 考 文 献

1. Westphal, O., J. Gmeiner, O. Lüderitz and A. Tanaka, Int. Convoc. On Immunol. Buffalo, N. Y. 1968, p. 33, Karger, Basel, New York, 1969.

实验八 生物材料去蛋白

目的 此种从生物材料（如血或组织提取液）中除去蛋白质的方法，在微量分析方法中应用颇多。操作必须注意勿使盐类（如氟化物、草酸盐）带进溶液。否则，即使滤液浓缩至很小体积，沉淀亦不凝聚。

方法 （1）1600毫升样品，如血、血清、血浆等；（2）加1.9毫升水，摇匀；（3）加1毫升 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 试剂A，摇匀；（4）加1毫升 ZnSO_4 试剂B，摇匀；（5）用垫滤纸的布氏漏斗过滤或在2,000rpm离心30分钟。

试剂 A 3.6克 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 用水溶至200毫升（1.8%）；B 4.6克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 用水溶至200毫升（2%）这两种试剂必须互为中和。试验：10毫升B用50毫升水稀释加2滴酚酞，用A滴定至粉红色。应耗A 10 ± 0.05 毫升。

参 考 文 献

1. Somogyi, M., J. Biol. Chem. (160) 69, 1945.

实验九 内毒素去蛋白

目的 按Foste—Ribi法制备的内毒素（实验十三）用Somogyi法去蛋白效果很好。

方法 （1）10毫克内毒素粗品（实验十三，步骤20）；（2）混悬于5毫升水；（3）加入10毫升0.3N Ba(OH)₂，摇匀；（4）加入10毫升试剂A，摇匀；（5）用垫Whatman 1号滤纸的布氏漏斗过滤；（6）4℃透析至饱和BaCl₂显阴性；（7）35℃减压浓缩至小体积；（8）真空冷冻干燥。

试剂 A 50克ZnSO₄ · 7 H₂O用水溶至100毫升（5%）。

参 考 文 献

1. Somogyi, M., J. Biol. Chem. 160, 69, 1945;
2. Badakhsh, F. F. and J. W. Foster, Amer. J. Vet. Res. (31) 359, 1970.

实验十 RNA和DNA测定

目的 本法是分离和定量组织RNA和DNA的一种十分简单又准确的实验方法。

方法 （1）100毫克组织加5毫升冰冷却的水，匀浆4分钟；（2）加2.5毫升冷的HClO₄试剂A，冰水浴中放10分钟；（3）4℃、10,000rpm离心15分钟，弃去上清液；（4）沉淀用5毫升冷HClO₄洗2次；（5）小心倾去