

实用蛋白质化学技术

华家桢 奚国良 易庆成等编译

编译者

华家桢	奚国良
易庆成	吕植桢
凌义和	张仁斌
陈志豪	乐俊民

编辑

吴德才

实用蛋白质化学技术

华家桢等 编译

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 无锡县人民印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 15.625 插页 1 字数 338,000

1982年9月第1版 1982年8月第1次印刷

印数 1—7,200

统一书号: 13119·956 定价: (科五)1.60元

内 容 提 要

本书根据 T. Devenyi 及 J. Gergely «氨基酸、肽和蛋白质——蛋白质化学的生化和免疫技术» 一书编译, 内容包括低压、中压及高压电泳, 免疫化学测定, 蛋白质和肽的水解, 氨基酸的定量测定, 纸层析, 薄层层析, 离子交换, 凝胶过滤, 蛋白质和肽的末端分析和逐步降解及气相层析等, 增编部份内容包括等电聚焦, 荧光技术, 质谱, 高效液相层析, 放射免疫及亲和层析等。内容比较全面, 叙述比较详细具体, 特别注重实用。

本书可供分子生物学、生化、生理以及医学、农学等研究工作者参考。

编 译 者 序

蛋白质是生命活动的主要体现者，构成生命现象的各种活动主要是通过蛋白质来实现的。近年来，蛋白质化学的研究进展十分迅速，尤其由于分子生物学这一新学科的形成和发展，使蛋白质研究达到了前所未有的新水平。

从化学角度来说，蛋白质是氨基酸以酰胺键相连结的大分子化合物，类似结构的较小分子称为多肽，近年发现机体在脑内、垂体、外周各部位分泌有许多微量的多肽物质，产生各种不同重要生理作用，控制着机体的生长发育、生殖、代谢、血压调节、胃液分泌，甚至记忆、睡眠等。前几年从脑内分出的脑啡肽与内啡肽不但具有吗啡样作用，并且许多神经学家认为，它们很可能是一组神经递质或神经调节物质，而这些是脑功能活动的重要物质基础。因此，有关这些肽的研究逐渐成为神经科学中最令人瞩目的领域之一。

随着学者们对于蛋白质、活性多肽结构与功能研究的日益重视，蛋白质化学研究技术也相应地有了飞跃发展，国外已有许多专书问世。国内从事蛋白质及多肽化学研究的人员也越来越多，但与此不相适应的是，有关蛋白质研究技术的书籍，无论译著却都十分缺少，不能满足有关人员的需要。有鉴于此，我们编译了这一本介绍蛋白质化学研究技术的专书，以供有关工作者参考。我们所译的原著是 Devenyi 和 Gergely 的“氨基酸、肽和蛋白质”（1974 年英文版）。此书的特点是内

容比较全面,叙述简明,而且特别注重于实用。对从事具体实验的人员来说有拿来即能应用的优点。更为可贵的是作者所写的章节都有个人经验,对各个具体方法的优缺点及可能出现的一些问题附有确切而实事求是的评注,可供实验时参考。但此书的不足之处是有些重要的专题由于篇幅或其它原因未能列入。近年来又有一些新技术刚趋于成熟,因而我们除翻译原书外,另编写了六章,与原书章节合成一专书,以弥补原书的不足之处。所编写的几章是:等电点聚焦(第14章);荧光技术(第15章);蛋白质和肽顺序的质谱测定(第16章);高效液相色谱及其在氨基酸和肽分离中的应用(第17章);蛋白质和多肽的放射免疫分析(第18章)以及亲和层析(第19章)。以上新编章节所叙述的大多是蛋白质化学研究技术的近年新进展,有重要的应用价值。如放射免疫分析与荧光技术的应用已使蛋白质与多肽的检测达到了微微克分子水平,成为现代蛋白质化学研究中不可缺少的技术;由于高效液相分析的应用,使一些含量十分低,分离特别困难的组份的分离取得了成功;质谱配合其它方法的应用已成为氨基酸顺序分析的又一重要手段;再如亲和层析的发展也已达到了能应用于蛋白质化学研究的阶段。相信这些技术在今后蛋白质及多肽的化学研究中会起越来越重大的作用。编写这几章时我们也力求简明、实用,尽量使之与原书宗旨相符。而且,各编写者对其所编内容亦或多或少有些实践经验。虽如此,本书仍远非完全,实际上以一本书包括蛋白质研究的所有技术也是不可能的。编译者的目的只是为具体从事蛋白质化学研究者提供一些集中而主要的技术,侧重于实践应用,以期对他们的研究工作能有所裨益。

限于编译者水平,本书错误或不当之处一定甚多,敬希读

者不吝指正,以便改正。

本书编译时承蒙中国科学院药物研究所高怡生教授指导,并由嵇汝运教授审校,谨致谢意。

一九七九年六月

目 录

第 一 章 蛋白质分析的一些方法学问题	1
一、天然蛋白质的研究	1
1. 天然蛋白质的电泳	2
2. 区带电泳法	4
1) 纸电泳	6
2) 淀粉凝胶电泳	6
3) 琼脂凝胶电泳	7
4) 醋酸纤维膜电泳	8
5) 丙烯酰胺凝胶电泳	8
3. 通过免疫化学方法研究天然蛋白质	9
1) 术语	9
2) 沉淀反应概况	10
3) 免疫扩散法	11
4) 免疫扩散法的应用	13
4. 蛋白质的离子交换层析	15
5. 蛋白质的凝胶过滤分级分离	18
参考文献	22
综合文献	23
二、顺序分析的方法学问题	24
参考文献	37
综合文献	41
第 二 章 蛋白质低压电泳分析法	42
一、低压纸电泳	42
1. 电泳技术	42

2. 染色方法	50
1) 蛋白质的染色法	50
2) 脂蛋白的染色法	52
3) 糖蛋白的染色法	54
3. 蛋白质低压纸电泳结果的测定	57
1) 用洗脱法进行定量测定	57
2) 用光电比色法进行定量测定	59
4. 低压纸电泳方法中一些误差的来源	62
5. 蛋白质的测定方法	63
二、醋酸纤维薄膜电泳	68
三、琼脂凝胶电泳	71
四、淀粉凝胶电泳	74
1. 垂直淀粉凝胶电泳	74
2. 水平淀粉凝胶电泳	76
五、丙烯酰胺凝胶电泳	81
1. 丙烯酰胺凝胶区带电泳	81
2. 盘状电泳 (Disc electrophoresis)	84
参考文献	91
综合文献	92
第 三 章 中压及高压电泳方法	93
一、水平中压电泳仪及其应用	94
二、对角线电泳法	103
1. 对角线电泳制备胱氨酸肽	103
2. 对角线电泳制备甲硫氨酸肽	105
3. 对角线电泳制备组氨酸肽	107
4. 对角线电泳分离赖氨酸肽	108
5. 从蛋白质的胰酶解产物中分离胰酶解的C-末端肽 段	110
三、高压电泳技术	110

参考文献	112
综合文献	112
第 四 章 免疫化学的测定方法	113
一、免疫血清的产生	113
1. 不加佐剂的免疫方法	113
2. 加用佐剂的免疫方法	115
二、用沉淀反应分析蛋白质	116
1. 定性沉淀试验	116
2. 用稀释方法测定抗体的滴度	118
3. 抗原-抗体等价区的测定	119
4. 界面(环状)沉淀试验	120
5. 定量沉淀试验	121
三、用凝胶扩散方法分析蛋白质	123
1. 简便、线性凝胶扩散法	123
2. 线性单向凝胶扩散法(又称试管双向扩散法)	125
3. 平面双向凝胶扩散法(又称平板双向凝胶扩散法)	126
4. 免疫电泳	133
1) Grabar 和 William 的常量免疫电泳法	133
2) Scheidegger 的微量免疫电泳法	136
5. Ossermann 的蛋白质比较分析法	145
6. 吸附免疫电泳	147
7. 免疫凝胶过滤	148
8. 电协同扩散对流免疫电泳	149
9. 用含抗体的琼脂糖凝胶电泳作蛋白质的定性和定量 分析	150
10. 定量凝胶扩散法	152
1) Feinberg 的抗体梯度方法	152
2) 用含有特异性抗体的琼脂平板作蛋白质定量测 定	154

3) Backhausz 的定量免疫电泳法	155
11. 醋酸纤维膜的蛋白质免疫扩散分析	156
1) 平面双向扩散	156
2) 免疫电泳	156
参考文献	157
综合文献	158
第五章 蛋白质和肽的水解	159
一、水解物质的准备	159
1. 蛋白质和肽的过甲酸氧化	159
2. 蛋白质和肽的还原及羧甲基化	159
二、蛋白质和肽的 6N HCl 水解	160
三、蛋白质和肽的部分酸水解	161
四、蛋白质和肽的胰蛋白酶水解	161
五、蛋白质和肽的糜蛋白酶水解	163
六、蛋白质和肽的胃蛋白酶水解	163
七、蛋白质和肽的木瓜蛋白酶水解	164
八、蛋白质的溴化氰裂解	164
综合文献	166
第六章 用氨基酸自动分析仪定量测定氨基酸	167
参考文献	179
第七章 氨基酸与肽的纸层析	180
综合文献	187
第八章 肽的离子交换层析	188
一、强酸性肽在 Amberlite IR-4B 柱上的分级分离	188
二、碱性肽的 Amberlite IRC-50 柱层析	189
三、肽在 Dowex 50×2 柱上用不挥发缓冲液分级分离	190
四、肽在 Dowex 50×2 柱上用挥发性缓冲液分级分离	192
五、肽的 CM 纤维素柱层析	193
六、肽的 DEAE 纤维素柱层析	195

综合文献	197
第九章 蛋白质的层析	198
一、蛋白质的 DEAE 纤维素柱层析	198
1. OH ⁻ 型 DEAE 纤维素柱	198
2. Cl ⁻ 型 DEAE 纤维素柱	200
3. 在脲存在下的 DEAE 纤维素层析	201
综合文献	202
4. 血清蛋白的 DEAE 纤维素柱层析	203
二、蛋白质的阳离子交换纤维素柱层析	206
1. CM 纤维素	206
2. 血清蛋白在磷酸纤维素(phospho-cellulose)柱上的分 级分离	208
3. 血清蛋白在 CM 纤维素柱上的分级分离	209
三、血清蛋白在 DEAE 葡聚糖凝胶柱上的分级分离	210
四、在 DEAE 葡聚糖凝胶上通过“分批”技术制备 γ 球蛋白	213
综合文献	214
第十章 蛋白质和肽的凝胶过滤	215
一、蛋白质溶液在葡聚糖凝胶柱上的脱盐	215
二、用葡聚糖凝胶浓缩蛋白质溶液	216
三、血清蛋白通过凝胶过滤进行分级分离	216
四、 γ G 球蛋白的大分子量片段在葡聚糖凝胶柱上的分离	218
五、酶解产物在葡聚糖凝胶 G-50 柱上的预分级分离	221
六、通过循环凝胶过滤分离蛋白质	223
综合文献	225
第十一章 薄层层析	226
一、氨基酸及其衍生物的薄层层析	229
1. DNP-氨基酸	230
2. PTH-氨基酸	231
3. Dansyl-氨基酸	231

4. 肽	232
二、薄层凝胶过滤	233
参考文献	236
综合文献	237

第十二章 蛋白质与肽的末端分析和逐步降解238

一、N-末端 2,4-二硝基氟苯测定法	238
1. 蛋白质二硝基苯化	239
2. DNP-蛋白质或肽的水解与 DNP-衍生物的提取	240
3. DNP-氨基酸的纸层析	241
4. 以薄层层析鉴定 DNP-氨基酸	245
5. DNP-氨基酸的间接鉴定	245
6. DNP-衍生物的定量测定	247
7. DNP-氨基酸的制备	248
8. ϵ -DNP-Lys 的制备	249
二、N-末端氨基酸丹磺酰化测定法	249
1. 丹磺酰化技术 (Hartley, 1970)	250
2. DNS-氨基酸的鉴定	251
1) 纸上电泳鉴定 DNS-氨基酸	251
2) 薄层电泳鉴定 DNS-氨基酸	253
3) 聚酰胺薄层层析鉴定 DNS-氨基酸	255
3. DNS-氨基酸的制备	257
三、以异硫氰酸苯酯降解法测定 N-末端顺序	258
四、蛋白质的 PTC 降解	260
五、肽的 Dansyl-Edman 顺序分析法	261
六、肽的 Edman 降解与定量氨基酸分析顺序分析法	262
1. PTH-衍生物的检测	263
2. PTH-氨基酸制备	263
七、用亮氨酸氨肽酶测定 N-末端顺序	264
八、胍解法测定 C-末端	267

九、羧肽酶消化法测定C-末端顺序	269
参考文献	271
综合文献	271
第十三章 氨基酸衍生物的气相色谱分析	272
一、前言	272
二、原理	273
1. 方法步骤	274
1) 进样	274
2) 分离	275
3) 检测、记录、计算、鉴定	277
2. 方法原理	277
三、气相色谱分析氨基酸衍生物及肽的特殊仪器要求和实验条件	279
1. 工作温度	279
2. 进样器	280
3. 柱填料	281
4. 氨基酸分析用的气相色谱仪的要求	283
5. 气相色谱图的定量计算	283
四、衍生物的分析性质	284
1. 氨基酸衍生物的制备	284
2. 保护功能团法制备衍生物	292
3. 氨基酸的化学转化法制备衍生物	300
4. 氨基酸降解法制备衍生物	301
五、氨基酸的热解反应	302
六、氨基酸衍生物的气相色谱法	302
七、氨基酸定量分析问题	308
八、肽的气相色谱法	311
1. Biemann 法	312
2. Weygand 法	314

参考文献	325
第十四章 等电点聚焦	326
一、引言	326
二、基本原理	327
三、两性载体	328
1. 必需具备的条件	328
2. 制备方法	329
3. 两性载体的性质	329
四、等电点聚焦	330
1. 以液体为介质	330
2. 以凝胶为介质	336
1) 颗粒凝胶为介质	336
2) 聚丙烯酰胺凝胶为介质	337
3. 等电点聚焦后 Ampholine 的除去方法	338
参考文献	340
第十五章 荧光技术	341
一、序言	341
二、原理	341
三、试剂	342
1. 荧光胺的制备及其特性	342
2. 对装置及其它化学试剂的要求	343
四、应用范围	344
五、荧光技术在柱层析及非柱层析法中的应用	345
1. 非柱层析	345
2. 柱层析	347
六、应用实例	351
1. 肽的纯化	351
2. 肽与糖肽的分子量测定	351
3. 用荧光氨基酸分析仪测定蛋白质或肽的氨基酸	

组成	355
4. 肽的氨基酸顺序测定	357
5. 肽的合成	358
6. 肽的定量分析	359
7. 生理研究	360
参考文献	361
第十六章 蛋白质和肽顺序的质谱测定	362
一、前言	362
二、寡肽顺序的质谱测定法	365
原理	365
应用范围	365
操作	365
1. N-乙酰全甲基衍生物的制备	365
2. 质谱分析	367
评注	369
参考文献	374
第十七章 高效液相色谱及其在氨基酸、肽和蛋白质分 离中的应用	376
一、引言	376
二、原理	377
三、仪器装置	380
1. 高压输液泵	380
2. 梯度淋洗装置	381
3. 层析柱	381
4. 进样器	382
5. 检测器	384
四、实验条件选择	384
1. 层析填料——固定相	384
2. 洗脱液——移动相	386

五、应用举例	387
1. PTH-氨基酸	387
2. 小肽分离	388
3. 小鼠垂体中 β -内啡肽的分离	390
参考文献	392
第十八章 蛋白质和多肽的放射免疫分析	393
一、基本原理	393
二、测定的主要条件和步骤	395
三、抗原的制备和标记	396
1. 抗原的制备	400
2. 抗原的标记	401
3. *Ag 的分离纯化	408
4. *Ag 的质量鉴定和比放射性测定	411
四、抗血清的制备	419
1. 抗血清的产生	419
2. 抗血清的质量鉴别	421
五、*AgAb 复合物的分离	425
1. 双抗体法	425
2. 中性盐和溶剂沉淀法	427
3. 非特异性吸附法	427
4. 免疫特异吸附法	428
六、标准曲线及其制作过程	431
1. 标准曲线的制作过程	431
2. 标准曲线的其它作图方法	432
七、生物样品测定	434
八、灵敏度及提高灵敏度常用的手段	435
1. 降低*Ag 用量	436
2. 提高抗血清的稀释倍数	436
3. 改变加样次序	437

九、精确度及影响精确度的因素	438
1. 影响精确度的因素	439
2. 监视和检验实验精确度的方法	441
十、附录	441
参考文献	443
第十九章 亲和层析	446
一、载体要求	447
二、载体简介	447
1. 多孔玻璃载体	447
2. 聚丙烯酰胺凝胶载体	447
3. 纤维素载体	448
4. 葡聚糖凝胶载体	448
5. 琼脂糖凝胶和交联琼脂糖凝胶载体	448
三、载体活化及偶联	451
1. 多糖类载体活化	451
2. 分子臂的引入及双功能结合剂	455
3. 多孔玻璃载体的活化	456
四、亲和吸附和洗脱	459
五、亲和层析应用	461
1. 干扰素的提纯	461
2. 微管蛋白 (Tubulin) 的纯化	462
3. DNP 标记肽的纯化	466
参考文献	468
英汉名词对照	469