

[英] Keith Wilson & John Walker 编著
屈 伸 主译

实用生物化学 原理和技术 (第五版)

Principles and Techniques of
Practical Biochemistry



中国医药科技出版社

实用生物化学原理和技术

Principles and Techniques of Practical Biochemistry

第 五 版

[英] Keith Wilson & John Walker 编著

屈伸 主译

中国医药科技出版社

图字：01 - 2004 - 3749 号

原书《Principles and Techniques of Practical Biochemistry》之版权为 Cambridge University Press 所拥有，经 Cambridge University Press 同意并授权，由中国医药科技出版社出版该书之简体中文版。此书之中文简体版权归中国医药科技出版社所有。

图书在版编目 (CIP) 数据

实用生物化学原理和技术 / (英) 威尔逊 (Wilson, K.),
(英) 沃克尔 (Walker, J.) 编著；屈伸等译.

北京：中国医药科技出版社，2005. 1

书名原文：Principles and Techniques of Practical Biochemistry
ISBN 7 - 5067 - 3152 - 5

I. 实... II. ①威... ②沃... ③屈... 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 142070 号

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100088

电话 010 - 62244206

网址 www.mpsky.com.cn

规格 787 × 1092mm $\frac{1}{16}$

印张 39 $\frac{3}{4}$

字数 875 千字

版次 2006 年 1 月第 1 版

印次 2006 年 1 月第 1 次印刷

印刷 北京市昌平区百善印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 7 - 5067 - 3152 - 5/R · 2626

定价 138.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

译者名单

主译 屈 伸

译者 (按姓氏笔画排序)

王 玉	尹燕华	田 俊
毕 昊	刘志国	刘 敏
孙雅亮	杨仕林	李清芬
宗义强	赵云斌	姚妍怡
胡国志	章 洁	彭冬君
廖国宁		

第五版序言

遗传学、细胞生物学、生物化学和生理学的老师们真切地感受到在近几年内，他们各自专业领域的知识在迅速扩增。每周大批期刊都在提供新的发现，这为原本内容繁多的课程增加了更多新的内容。这些知识的增加源于分子遗传学，特别是基因克隆和表达方法的发展，使得代谢酶类、结构蛋白、膜受体蛋白和调控蛋白等功能蛋白的基因鉴定、克隆、测序和表达技术等均成为常规技术。这些常规技术的出现使我们在分子水平上对生物过程的认识发生了革命性变化，同时也使得以前独立的学科相互交叉融合。这些新知识在医疗和商业方面的应用也已显示出其优势。即使是非专业人员也已经知道，分子生物学已被应用于诸如考古学、植物及动物繁殖、大范围的遗传诊断检查、慢性疾病特别是肿瘤的诊断和治疗等方面。许多单细胞生物基因组密码的破译和在新千年伊始将完成的人类基因组计划的快速进展等已显示出它们在未来将有更多令人瞩目的应用。

分子生物学伴随着免疫学、细胞培养技术、蛋白分析技术（如层析、电泳、质谱分析和各种形式的分光技术）的进展而同步发展。在计划该书本次新版时，我们融入了这些进展的细节，同时又继承了上一版的内容，即重点放在生物学科学生实验的相关技术和原理上。对于一些复杂实验技术的内容本书涉及较少，因为这些内容及其进展在有关的讲座和读物中可以了解。因此，本版与早先的版本相比，对分子生物学技术的介绍更为详细。本书中有两个章节用来介绍分子生物学技术：第二章具体介绍基础理论和实用技术，第三章重点放在分子生物学技术的应用。这两章由 Ralph Rapley 博士编写，他是本书的新编委。第四章的免疫学技术由国家生化标准和控制机构的 Susan 和 Robin Thorpe 重新编写，他们也是本书的新编委。同时增加了一个新的章节来介绍蛋白质纯化及其在现代实验生物学中的重要性（第六章）。而早先几版关于酶技术的章节中，一直没有强调酶-底物（或抑制物）结合以及配体与膜受体和膜转运体结合的相似性。本版我们增加了一个新的章节（第八章）来介绍细胞间的相互作用和相关信号传导、放大过程的知识。

本版对光谱技术和质谱技术的两个章节作了修订，将其分成了三个章节。第九章、第十章是关于以量子理论为基础的一些重要技术，如可见-紫外分光光谱、荧光光谱、发光光谱、圆二色光谱技术、比浊法、浊度法和原子吸

收技术（第九章）以及红外光谱技术、电子自旋共振光谱技术和核磁共振波谱技术（包括核磁共振显像）（第十章）；第十一章主要介绍各种类型的质谱分析，包括近几年刚刚开始用于蛋白结构测定的应用及讨论。在这三个章节中，通过介绍利用多种技术对非那西汀分子的研究，来阐明光谱和质谱分析的数据的互补性。

本版已全面更新了离心技术（第五章）、电泳技术（第十二章）、层析技术（第十三章）、放射性同位素技术（第十四章）、电化学技术（第十五章）的内容。整本书强调实用生物化学的定量特点，所以几乎所有的章节现在都包含一系列计算题，并附有答案，学生们可以用来评估自己对理论的理解程度。为了进一步帮助学生抓住重点，每一个章节都附有需要理解的“关键词”，同时还提供了可进一步阅读的参考书籍。在许多章节中出现的共同的内容，尽量做到与其他章节相互参考，减少不必要的重复，但仍有小部分保留了下来，主要是为了全面地理解和阐述作者所采用的方法的细微区别。为了强调热力学对生物化学的重要性，许多章节对热力学的原理和方程进行了注释，同时在第一章中增加了有关热力学的内容。该章节中介绍了一些非常重要和实用的例子，它们是最基本的，但同时也是许多学生在实验操作中比较难以处理的，包括浓度和含量的区别、pH 值和各种热力学参数的计算。我们希望本书对读者有更多的帮助。在新版本的编辑中，我们采纳了读者们对第四版所提出的许多建设性建议。我们继续欢迎使用此书作为学习工具的所有读者给我们提出建议，同时对所有授权我们使用他们的图形的作者们致以深深的谢意。

KEITH WILSON
JOHN WALKER

缩 写

下列缩写将出现在整本书内，不再给予定义。

5'-AMP	5'-单磷酸腺苷
5'-ADP	5'-二磷酸腺苷
5'-ATP	5'-三磷酸腺苷
bp	碱基对
CHAPS	3-(3-胆胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸
c. p. m	每分钟计数
DDT	二氯二苯三氯乙烷
DNA	脱氧核糖核酸
d. p. m	每分钟分解程度
e ⁻	电子
EDTA	乙二胺四乙酸盐
EGTA	乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸
e. m. f	电动势
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸
FMN	黄素单核苷酸
HAT	次黄嘌呤、氨蝶呤与胸苷的组织培养基
Hepes	羟乙基哌嗪乙磺酸
kb	千碱基对
log	以10为底的对数
M _r	相对分子量
min	分钟
NAD ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(氧化型)
NADH	烟酰胺二核苷酸(还原型)
NADP ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(氧化型)
NADPH	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原型)
Pipes	派嗪-N, N'-双(2-乙磺酸)
P _i	无机磷酸盐
PP _i	无机焦磷酸盐
RNA	核糖核酸
s. t. p	标准温度和压力
Tris	三(羟甲基)氨基甲烷

作者

Professor D. B. Gordon
Department of Biological Sciences
Metropolitan University of Manchester
Chester Street
All Saints
Manchester M15 6BH, UK

Dr A. Griffiths
Department of Biological Sciences
Oxford Brookes University
Headington
Oxford OX3 0BP, UK

Dr R. Rapley
Department of Biosciences
University of Hertfordshire
Hatfield Campus
College Lane
Hatfield
Herts AL10 9AB, UK

Dr P. K. Robinson
Department of Applied Biology
University of Central Lancashire
Preston
Lancs PR1 2HE, UK

Dr I. Simpkins
Department of Biosciences
University of Hertfordshire
Hatfield Campus
College Lane
Hatfield
Herts AL10 9AB, UK

Professor R. J. Slater
Department of Biosciences
University of Hertfordshire
Hatfield Campus
College Lane
Hatfield
Herts AL10 9AB, UK

Professor R. Thorpe
National Institute for Biological Standards and Control
Blanche Lane
South Mimms
Potters Bar
Herts EN6 3QG, UK

Dr S. Thorpe
National Institute for Biological Standards and Control
Blanche Lane
South Mimms
Potters Bar
Herts EN6 3QG, UK

Professor J. M. Walker
Department of Biosciences
University of Hertfordshire
Hatfield Campus
College Lane
Hatfield
Herts AL10 9AB, UK

Professor K. Wilson
Department of Biosciences
University of Hertfordshire
Hatfield Campus
College Lane
Hatfield
Herts AL10 9AB, UK

目 录

第一章 生物化学研究的基本原则	(1)
1.1 生物化学的本质属性	(1)
1.2 生物能学	(3)
1.3 新陈代谢的研究方法	(17)
1.4 实验室实际应用	(21)
1.5 体内模型	(33)
1.6 体外模型	(35)
1.7 显微技术	(51)
1.8 关键术语	(58)
1.9 计算	(63)
1.10 参考资料	(64)
第二章 分子生物学与基本技术	(66)
2.1 引言	(66)
2.2 核酸的组成及基本结构	(66)
2.3 基因和基因组的复杂性	(73)
2.4 遗传密码的特性	(74)
2.5 核酸的细胞定位	(75)
2.6 DNA 的功能	(77)
2.7 核酸操作：基本工具与技术	(85)
2.8 核酸的分离	(87)
2.9 DNA 片段的限制酶切图谱	(91)
2.10 核酸印迹技术	(92)
2.11 基因探针的来源	(93)
2.12 DNA 探针的标记	(94)
2.13 聚合酶链式反应	(97)
2.14 DNA 的核苷酸序列	(103)
2.15 生物信息学和互联网	(109)
2.16 关键术语	(111)
2.17 计算	(115)
2.18 参考资料	(116)

第三章 分子克隆和基因分析	(117)
3.1 引言	(117)
3.2 构建基因文库	(117)
3.3 克隆载体	(125)
3.4 杂交与基因探针	(141)
3.5 筛选基因文库	(142)
3.6 基因克隆的应用	(147)
3.7 外源基因的表达	(151)
3.8 基因分析和基因表达	(156)
3.9 分析全基因组	(166)
3.10 分子生物学技术与应用	(170)
3.11 关键术语	(172)
3.12 参考资料	(176)
第四章 免疫化学技术	(177)
4.1 概述	(177)
4.2 抗体的制备	(181)
4.3 免疫球蛋白的纯化与裂解	(188)
4.4 免疫沉淀	(194)
4.5 抗体标记	(197)
4.6 免疫印迹	(204)
4.7 免疫测定	(205)
4.8 免疫组织、细胞化学	(213)
4.9 亲和力和亲合力	(218)
4.10 表面胞质共振技术在免疫化学中的应用	(218)
4.11 关键术语	(218)
4.12 计算	(220)
4.13 参考资料	(220)
第五章 离心技术	(222)
5.1 概述	(222)
5.2 沉降的基本原理	(222)
5.3 离心机及其应用	(228)
5.4 制备型转头的设计及保养	(232)
5.5 样品容器	(237)
5.6 制备型超速离心机的分离方法	(237)

5.7 密度梯度分离的实施	(242)
5.8 制备转头的选择, 性能和应用	(246)
5.9 亚细胞部分的分析	(248)
5.10 分析型超速离心机的应用	(250)
5.11 离心机使用安全	(252)
5.12 关键术语	(253)
5.13 计算	(254)
5.14 参考资料	(259)
第六章 蛋白质的性质、结构和纯化	(260)
6.1 氨基酸和蛋白质的性质	(260)
6.2 蛋白质的结构	(263)
6.3 蛋白质的纯化	(265)
6.4 蛋白质结构分析	(279)
6.5 关键术语	(290)
6.6 计算	(292)
6.7 参考资料	(294)
第七章 生物分子的相互作用: I 酶	(295)
7.1 受体 - 配体的结合	(295)
7.2 酶: 性质与命名	(295)
7.3 酶恒态动力学	(296)
7.4 酶的测定	(311)
7.5 底物检测	(316)
7.6 酶的前恒态动力学	(317)
7.7 酶的活性中心和催化机制	(319)
7.8 固定化酶	(323)
7.9 代谢活动的细胞调控	(325)
7.10 关键术语	(327)
7.11 计算	(330)
7.12 参考资料	(332)
第八章 生物分子的相互作用: II 细胞表面受体和传递体	(333)
8.1 细胞表面受体的分类	(333)
8.2 受体 - 配体结合的定量	(334)
8.3 受体结构	(343)

8.4	信号转导机制	(346)
8.5	信号放大	(352)
8.6	关键术语	(354)
8.7	膜转运过程	(356)
8.8	物理扩散	(356)
8.9	易化扩散	(358)
8.10	主动转运和离子通道	(360)
8.11	受体介导的细胞内吞作用	(366)
8.12	关键术语	(368)
8.13	计算	(369)
8.14	参考资料	(371)
第九章 光谱技术: I 原子和分子的电子光谱		(372)
9.1	简介	(372)
9.2	γ -射线光谱和 ν -射线共振光谱	(374)
9.3	X-射线光谱	(375)
9.4	紫外光与可见光光谱	(376)
9.5	荧光分光分析	(385)
9.6	圆二色光谱	(391)
9.7	比浊法和散射比浊法	(393)
9.8	发光分析法	(394)
9.9	原子光谱	(396)
9.10	激光	(399)
9.11	关键术语	(399)
9.12	计算	(402)
9.13	参考资料	(406)
第十章 光谱技术: II 振动光谱以及磁场中电子和核的自旋取向		(407)
10.1	简介	(407)
10.2	红外和拉曼光谱	(407)
10.3	电子自旋共振波谱	(409)
10.4	核磁共振波谱	(414)
10.5	关键术语	(428)
10.6	参考资料	(429)

第十一章 质谱技术 (430)

- 11.1 概述 (430)
- 11.2 质谱仪 (430)
- 11.3 电轰击离子化 (432)
- 11.4 化学电离 (438)
- 11.5 场电离 (438)
- 11.6 离子解吸法 (438)
- 11.7 离子挥发法 (447)
- 11.8 分析器 (452)
- 11.9 检测器 (458)
- 11.10 串联质谱仪 (459)
- 11.11 关键术语 (464)
- 11.12 计算 (465)
- 11.13 参考资料 (470)

第十二章 电泳技术 (471)

- 12.1 基本原理 (471)
- 12.2 支持介质 (473)
- 12.3 蛋白质电泳 (476)
- 12.4 核酸电泳 (491)
- 12.5 毛细管电泳 (495)
- 12.6 关键术语 (499)
- 12.7 计算 (500)
- 12.8 参考资料 (501)

第十三章 色谱技术 (502)

- 13.1 概述 (502)
- 13.2 色谱理论和应用 (504)
- 13.3 低压柱色谱 (511)
- 13.4 高压液相色谱 (514)
- 13.5 吸附色谱 (522)
- 13.6 分配色谱 (523)
- 13.7 离子交换色谱 (527)
- 13.8 分子排阻色谱 (531)
- 13.9 亲和色谱 (534)
- 13.10 气液色谱 (539)

13.11	薄层色谱	(543)
13.12	色谱体系的选择	(546)
13.13	关键术语	(546)
13.14	计算	(550)
13.15	参考资料	(552)
第十四章 放射性同位素技术		(553)
14.1	放射性的特性	(553)
14.2	放射性的检测和测量	(558)
14.3	放射性计数和数据分析的其他用途	(573)
14.4	放射性示踪实验的优势及限制因素	(576)
14.5	安全性	(577)
14.6	放射性同位素在生物学中的应用	(579)
14.7	关键术语	(582)
14.8	计算	(584)
14.9	参考资料	(586)
第十五章 电化学技术		(587)
15.1	概述	(587)
15.2	电化学技术的原理	(591)
15.3	氧化还原反应	(596)
15.4	pH 电极	(599)
15.5	离子选择电极和气敏电极	(601)
15.6	Clark 氧电极	(602)
15.7	HPLC 的电化学检测器	(607)
15.8	生物传感器	(609)
15.9	关键术语	(614)
15.10	计算	(616)
15.11	参考资料	(618)

第一章 生物化学研究的基本原则

1.1 生物化学的本质属性

生物化学是一门跨学科的科学，它将数学、物理学和化学的原理系统地结合起来，根据结构和功能间的相互联系，解释生命进展中的独特的特征。生物化学方面的进展大大地扩展了自然科学中运用的主要原理和技术。生物化学不再仅仅是一种理论上的概念，而是一门应用科学，其科学发现将会带来物质利益。近些年来，生物化学、细胞生物学和微生物学结合而形成的分子生物学，使人们对医学、农业、制药、饮食工业的生物过程的理解和控制已经带来了引人注目的进步。这证实了被广泛持有的生物技术将成为新千年卓越产业的观点。

生物化学在分子水平上利用不同生理复杂性的生物系统模型去解释因果关系，在这一点上它是典型的分析和定量结合。从字面上看分析是指“对某事物追本溯源”，例如将某物分解成细小的碎片。然而，只有当通过与合成（将组分组合）结合，对分解的个体部分的观察进行解释和推断，形成一个完整的功能体系时，分析才能发挥其作用。因此分解和合成的结合表明系统和外部环境之间的界限，也就是说什么组分是系统的一部分，可直接影响系统，哪些是与其相对应的间接影响系统的外部因素。在许多实例中，反复研究可引导出系统的定义。

例如在分析生物化学领域，实验模型首先要通过质量分析，其中主要的不同生物材料要通过裂解技术处理使其组成成分分离、浓缩和鉴别。定性分析生物化学主要在分子水平进行鉴别，但有时也会在电子水平进行。定量分析则主要是测量由定性分析确认的组分的量和（或）浓度（每单位体积）。该技术主要依赖分析方法和仪器设备。在合理的准确性和精确性条件下，生物样品的测定值代表了某物质分子在样品的全部生物分子中所占比例的准确平均值。因此定量测定须通过恰当的统计学分析来确立，从客观上来说明测定数值是否有意义，数据资料是否偶然获得，抑或是否有能够得到结果的可行模式。准确度和精确度是两个统计学的术语。

显微分析技术（见 1.7）和离心技术的联合运用（见第五章），不仅确认细胞为生命的基本单元，也在亚细胞水平上对细胞质和细胞膜进行生物化学分区。在缺乏真正的核并仅有一层单质膜的原核生物细胞生物化学分区是不清晰的，而在真核细胞中生物化学分区最清晰；真核生物细胞不仅有细胞核还有核膜在细胞质内延伸，内质网、高尔基体和其他与膜结合的细胞器以及核糖体、线粒体、过氧化物酶体、色素体（存在于植物中），均由微管和微丝构成的网将它们联结在一起。

对细胞膜结构和功能的深入研究提出了经典的 Singer - Nicholson 液态镶嵌模型学说，该学说认为，疏水性的脂质双分子层主要通过微弱的范德华力与膜表面的蛋白（非固有

蛋白)和位于深层的(固有的)蛋白质较松散地结合、蛋白质流动在脂质双层里。对膜蛋白和其转运功能之间关系的研究,揭示了蛋白质 α -螺旋(见6.2)的重要性,它广泛分布于膜内,形成亲水性通道,允许极性大分子(见8.4)通过细胞膜。例如,大肠杆菌的乳糖透性酶,红细胞膜中血型糖蛋白、嗜盐菌的菌视紫质、线粒体的细胞色素氧化酶,叶绿体和线粒体中的 H^+ -ATP酶,神经细胞膜上的钠、钾离子泵以及存在于分泌型上皮组织细胞膜上的钙通道。当然通道的开放是有选择性的,它直接由与受体的结合(见8.3)或间接地通过激素调控的蛋白质构象的改变控制通道的开放(见8.4.1)。

非极性脂质(糖脂、脑苷脂)聚集成为脂质双分子层和球形微粒是生物化学进化中的关键,它使得膜性物质能将生物化学过程分为独立的亚系统,同时它促进了离子梯度的建立。离子梯度最开始形成于原始细胞和其周围环境间,后来随着多细胞体系的建立而形成于细胞间。这些离子梯度代表最基本的能量储备,并被用于生命活动(转运、移动、生物合成等)。生物有机体的独特性在于能够捕获周围环境的能量并且通过同化的过程而储存于化学键,如C—C键、C—N键、C—O键、N—H键、O—H键、O—P键。这些储存于键间的能量可以释放并做功。与真核生物相比,原核生物在利用不同的生态环境和利用不同的能量来源方面显示出更强的能力。原核生物适应基于能量转移的生物化学途径及高分子生物合成的自然选择。

原核生物建立了通过底物及氧化和光合作用而产生能量的机制。随着原核生物内共生现象的出现,使得真核细胞内的自然选择成为可能,细胞分化形成不同的器官执行特定的生理功能。在多细胞的有机体中的每一种不同的细胞类型中,进行着不同的生物化学和生理反应活动,并诱导生理活动中细胞间的相互协作。结果是,发育生物化学在很大篇幅上从分子水平描述引起分化的选择性基因表达的机制。

从基因方面来说,物种间的基因是显著不同的,这可以阻止异体受精和因DNA杂交(系统发生的差异性)而引起的基因融合。虽然这些差异存在,但仍保留着许多相同的化学成分和生物过程,使得在一种物种获得的生物化学模式的推论被运用于另一物种。通常来自微生物、动物组织培养物或实验动物对外来化合物(非生命物质)所发生的生物化学的、生理的、药理学及毒理学上的反应的推论应用于人类,以发掘其商业和医药应用价值。这种应用必须慎重从事,因为细胞种类之间、物种之间生物存在差异,同时大体生理上亦不同,尤其是在单个细胞和多细胞物种之间。任何形式的化学分析或显微样品的制备由于生物化学完整性被破坏,不可避免地产生人工假象,这意味着体内的外推结论可能不正确。虽然这方面受质疑,但由表及里的分析法和从整体水平上的探根求源的分析推理,极大地促进了对生物形式的整体性和多样性的认识,对其他研究生物系统的学科,如生态学、生理学、药理学、微生物学、植物学、动物学和环境科学提供了理论支持。

近些年来,对DNA和RNA的认识,确定了遗传物质DNA与碱基序列的关系,以及特殊蛋白质的形成,因此使人们对发育过程中细胞的分化有着更精确的解释。采用PCR技术人工合成DNA以及基因工程中将DNA扩增和转移到非自然受体中,已经使得“由内到外”的研究方法解决用传统的生物化学方法难以解决的问题。