

赵永芳 编著

生物化学技术原理及其应用

SHENGWUHUAXUEJISHU
YUANLIJIQIYINGYONG

(第二版)



武汉大学出版社

WUHANDAXUECHUBANSHE

生物化学技术原理及其应用

(第 二 版)

赵永芳 编著



A0280528

武汉大学出版社

(鄂)新登字 09 号

图书在版编目(CIP)数据

生物化学技术原理及其应用/赵永芳编·——2 版
·——武汉:武汉大学出版社
ISBN 7-307-01766-0

I. 生…

II. 赵…

III. ①生物化学—技术—理论

②生物化学—技术—应用

IV. Q503

武汉大学出版社出版

(430072 武昌 珞珈山)

新华书店湖北发行所发行

荆沙市印刷一厂印刷

1994 年 6 月第 1 版 1995 年 7 月第 2 次印刷

开本:850×1168 1/32 印张:14.125 插表 1

字数:353 千字 印数:3001—6000

ISBN 7-307-01766-0/Q·51 定价:12.80 元

内 容 简 介

本书由十四章组成,共分三编:第一编概述生命大分子物质的制备程序及原理;第二编介绍分离方法如离子交换层析、亲和层析、聚焦层析、凝胶过滤、气相色谱和高效液相色谱等;第三编介绍鉴定方法如电泳(包括凝胶电泳、聚焦电泳、琼脂电泳和转移电泳等)、薄层层析、免疫分析(包括单克隆抗体的制备、抗体或抗原的标记)、生物传感器和聚合酶链反应(PCR)等。书中在阐述有关方法的基本原理时,还讲述了主要操作及应用。

本书可供综合性大学及医、农院校等有关学生学习之用;还可供从事生物化学的有关人员参考。

序

近 10 年来生命科学发生了“科学的革命”(Thomas Kuhn 的“Paradiqm”),出现了革命性的技术,使最优秀的实验生物学家过去难于进行的实验成了实验室的常规工作。分子生物学的惊人发展建立了生物工程工业,这不仅对研究生命的复杂机理提供了可能,并且改变了人们对从病毒到人的生物体的认识。

这场革命发生的原因可追溯到 1953 年 DNA 双螺旋结构的发现,以及 1970 年以来革命性的技术的出现:DNA 重组、基因克隆化、限制性内切酶、DNA 序列分析等。其中克隆化比任何其他技术更重要,它改变了生物学的面貌。

生物学的发展需要涉及许多其他学科的知识和技术。因而许多学科很自然地结合起来了,传统的学科与学科之间,科学与技术之间的界限也逐渐消失。有些知识和技术很可能使两个完全不相关的领域互通信息,互相了解。科学和技术紧密地联系了。技术的发展推动学科的前进,学科的前进又促使技术的发展。技术是发展科学的动力。两者是相辅相成的。

武汉大学生生化专业赵永芳同志从 1976 年起讲授《生物化学技术原理及其应用》。经过十余年的教学实践和对最初教研室集体撰写的讲义不断的修改和补充,演化产生的这本以生化技术为主的教科书,因而是一本成熟的教科书。这本书具有下列的优点:(一)文字简洁明了,易于阅读;(二)内容丰富,努力跟上生化技术的最新发展;(三)理论联系实际,基本原理、操作方法和具体应用结合得较好;(四)每章附有思考题和参考文献。这本教科书是适合生化

专业和其它有关专业如病毒学、细胞生物学、分子生物学、遗传学等本科生的教材和研究生的参考书,是一本优秀的教科书。它的出版值得欢迎,特此介绍和推荐。

高尚荫

1987. 2.

第二版编者的话

本书出版后,只准备作为武汉大学生生化专业本科生和生物系研究生使用的教材。但未料到,校外的不少读者也赞同书中的内容与观点。编者对此不胜感激,并随之萌生了将第二版献给读者的勇气和信心。

第二版的编排与第一版相同。书中的大部分章节仅将不妥之处或陈旧的例证与图表作了修改、补充和撤换;而少部分章节如聚合酶链式反应(PCR)和生物传感器等则是新增写或是原有段落扩写而成的。第二版仍然注重在普及生化技术知识的基础上提高,在理论联系实际方面下功夫。

几年来,陆续收到一些热心人提出的宝贵意见和提供的珍贵资料,编者对此深表谢意,同时欢迎读者对不正确或有错误的地方指正。

编者再次深切感谢武汉大学出版社的大力支持,并对绘制插图的王莉娟和陈宝联同志表示感谢。

1994年2月
于武昌珞珈山

目 录

第一编 概 论

第一章 生命大分子物质的制备	1
第一节 材料的选择与处理	2
一、材料的选择	2
二、材料的处理	2
第二节 确立测定方法	4
一、目的与要求	4
二、常用的测定方法	5
第三节 细胞的破碎	6
一、机械破碎	6
二、溶胀和自溶	7
三、化学处理	8
四、生物酶降解	8
第四节 抽提	9
一、抽提的含义	9
二、抽提有效成分的影响因子	9
第五节 浓缩	14
一、沉淀法	14
二、吸附法	14
三、超过滤法	14
四、透析浓缩法	14
五、减压蒸馏浓缩法	15

六、冰冻干燥法	15
第六节 纯化方案的设计与评价	16
一、纯化方案的设计	17
二、纯化方案的评价	17
第七节 有效成分纯度和性质的分析	20
第八节 实例	21
一、制备高纯度人转铁蛋白的快速方法	21
二、叶绿体的提取与 4.5SRNA 的制备	21
三、细菌质粒 DNA 的提取	22
思考题	22

第二编 纯化方法

第二章 沉淀法	24
第一节 基本原理	24
第二节 沉淀的类型与操作	25
一、盐析法	25
二、有机溶剂沉淀法	33
三、蛋白质沉淀剂	35
四、聚乙二醇沉淀作用	36
五、选择性沉淀法	36
六、结晶	37
第三节 实例	38
思考题	39
第三章 吸附层析	40
第一节 吸附柱层析	42
一、常用术语	42
二、基本原理	44

三、吸附剂	44
四、洗脱剂	48
五、层析柱的制备与层析操作	49
六、应用与实例	52
第二节 薄层层析	55
一、操作及注意事项	57
二、实例	63
第三节 聚酰胺薄膜层析	68
一、基本原理	69
二、应用	70
思考题	76
 第四章 离子交换层析	 78
第一节 基本原理	78
第二节 离子交换剂的分类及性质	81
一、分类	82
二、性质	86
第三节 离子交换剂与缓冲液的选择	96
一、离子交换剂的选择	96
二、缓冲液的选择	99
第四节 操作	99
一、离子交换剂的处理、再生和转型	99
二、分离物质的交换	101
三、物质的洗脱与收集	102
第五节 应用	105
一、制备、纯化生命物质	105
二、测定蛋白质的等电点	110
思考题	111

第五章 凝胶过滤..... 113

第一节 凝胶的分类及性质..... 113

一、葡聚糖凝胶 113

二、琼脂糖凝胶 117

三、聚丙烯酰胺凝胶 121

四、Sephacryl 122

第二节 基本原理..... 123

第三节 操作..... 127

一、凝胶的选择和处理 127

二、凝胶柱的制备 129

三、加样与洗脱 130

四、凝胶柱的再生及保存 135

第四节 应用..... 138

一、脱盐和浓缩 138

二、分离生命物质 138

三、去热源物质 139

四、测定分子量 140

五、其它 145

思考题..... 146

第六章 亲和层析..... 147

第一节 基本原理..... 148

第二节 操作..... 151

一、基质的选择 151

二、配体的选择 152

三、亲和吸附剂的制备 153

四、特异吸附 158

五、分离大分子物质 160

六、亲和层析柱的再生 162

第三节 提高吸附剂的操作容量.....	162
一、在配体和基质之间引入“手臂”(arms)	162
二、增加配体取代的程度	164
三、配体与基质以最少的键连接	164
四、基质多孔性的影响	166
五、其它	167
第四节 应用.....	167
一、纯化大分子物质	167
二、研究酶的结构与功能	172
思考题.....	173
 第七章 聚焦层析.....	 174
第一节 基本原理.....	174
一、多缓冲剂和多缓冲交换剂	174
二、聚焦层析原理	176
第二节 操作.....	179
一、多缓冲剂的选择	181
二、多缓冲交换剂用量的确定	181
三、多缓冲交换剂的处理	181
四、样品的准备	183
五、上样和洗脱	183
六、样品中多缓冲剂的去除	184
第三节 应用.....	184
一、分离模型蛋白质	185
二、分离复杂的物质	186
三、鉴定某些酶的性质	188
思考题.....	189
 第八章 气相色谱.....	 190

第一节 基本原理.....	191
一、常用术语	191
二、原理	193
第二节 气相色谱仪的构造	195
一、气源、载气流速的控制和测量	196
二、进样系统	197
三、恒温室	198
四、色谱柱	198
五、检定器	204
第三节 操作.....	206
一、操作要点	206
二、条件的选择	207
第四节 定性和定量分析.....	207
一、定性分析	207
二、定量分析	209
第五节 应用.....	214
一、分析蛋白质和氨基酸	215
二、分析核酸	215
三、分析糖类物质	217
四、分析脂肪酸	217
五、分析农药	218
思考题.....	218
 第九章 高效液相色谱.....	 219
第一节 基本原理.....	219
第二节 应用.....	223
一、定性和定量分析	224
二、测定酶活性	225
三、测定蛋白质分子量	226

四、分离核酸和蛋白质	228
五、附表：部分色谱柱的性能及有关参数	230
思考题	235
第十章 固定化酶与微生物	236
第一节 制备方法	237
一、固定化酶	237
二、固定化微生物	241
第二节 制品的性质	242
一、酶的相对活力	242
二、活力曲线与最适 pH	245
三、稳定性	249
四、米氏常数	251
五、其它	252
第三节 应用	253
一、工业方面	253
二、医学方面	255
三、生化分析方面	256
四、应用实例	259
思考题	262

第三编 鉴定方法

第十一章 生物传感器	264
第一节 基本原理	265
一、离子选择电极	265
二、生物活性材料	267
第二节 类型与制备	268
一、类型	268

二、制备	269
第三节 应用	270
一、工业方面	270
二、医学方面	271
三、环境监测方面	272
思考题	274
 第十二章 电泳	275
第一节 基本原理	276
第二节 纸电泳	279
一、材料准备	280
二、点样	282
三、电泳	284
四、烘干	284
五、显色	284
六、定量测定	284
第三节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	287
一、基本原理	288
二、操作	295
第四节 琼脂电泳	321
一、基本原理	321
二、操作	322
三、应用实例	324
第五节 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	324
一、基本原理	325
二、操作	326
第六节 聚丙烯酰胺凝胶电聚焦	327
一、基本原理	328
二、两性电解质的理化性质	329

三、两性电解质的 pH 范围与用量的选择	330
四、测定蛋白质等电点的操作	331
第七节 印迹法(转移电泳)	335
一、基本原理	336
二、操作及注意事项	337
三、应用	340
思考题	342
 第十三章 免疫分析	344
第一节 抗体的性质、制备及纯化	344
一、抗体的性质	344
二、多克隆抗体的制备	345
三、单克隆抗体的制备	353
四、抗体的检测	358
五、抗体的纯化	362
第二节 抗原抗体反应	366
一、标记	366
二、分析方法	373
思考题	385
 第十四章 聚合酶链式反应	388
第一节 原理	388
一、反应物与最适条件	389
二、PCR 原理	391
第二节 操作	393
一、试剂的配制	393
二、步骤	394
第三节 应用	396
一、检测基因的分离和表达	396

二、检测癌症 397

思考题..... 397

附录..... 399

 一、常用数据 399

 二、常用缓冲液的配制 414

参考文献..... 423