

分子生物学方法

[西德] P. 康德拉 著
W. 阿培尔

科学出版社

分子生物学方法

〔西德〕P. 康德拉 W. 阿培尔 著

中国医学科学院肿瘤防治研究所细胞学室

李申德 译 吴 旻 校

科 学 出 版 社

1 9 7 7

内 容 简 介

本书介绍了分子生物学中比较常用的新技术,叙述较详细、具体,便于实际操作。各种方法均经专人检定,比较可靠。各章末均附有参考文献,以便查阅。内容包括:细胞组分的分离与纯化;分子生物学中的电子显微镜方法和放射自显影方法;生物大分子的分离与纯化;生物大分子的物理化学鉴定法和化学鉴定法;生物大分子的酶促合成;特殊方法;附录和生物化学及分子生物学数据等。

可供分子生物学、生物化学、生物物理、动物学、植物学、细胞学、遗传学、微生物学、免疫学、医学、药理学及化学等方面的实验室工作者和大专院校师生参考。

P. Chandra W. Appel

METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE

Gustav Fischer Verlag · Stuttgart 1973.

分 子 生 物 学 方 法

〔西德〕P. 康德拉 W. 阿培尔 著

中国医学科学院肿瘤防治研究所细胞学室

李申德 译 吴 旻 校

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中 国 科 学 院 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1977年7月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1977年7月第一次印刷 印张: 11 3/8

印数: 0001—11,050 字数: 255,000

统一书号: 13031·464

本社书号: 692·13—10

定 价: 1.15 元

译 者 的 话

近二十年来, 生物科学在细胞学、免疫学、遗传学、生理学、生物化学和生物物理学等领域中取得了迅速的进展, 现代数学、物理学和化学等方面的新概念和新技术大量渗入到生物科学中, 使研究重点逐渐由细胞水平转向分子水平, 从而形成了一门新的学科——分子生物学。这一切进展是同方法上的进展分不开的。

本书是一本叙述分子生物学中常用方法的工具书, 内容简明、扼要, 较有条理, 各章后均附主要参考资料, 篇末还附有各种数据, 便于查阅。

本书虽是偏重实际操作的工具书, 但对其内容, 仍应遵循毛主席的教导: **“如同我们对于食物一样, 必须经过自己的口腔咀嚼和胃肠运动, 送进唾液胃液肠液, 把它分解为精华和糟粕两部分, 然后排泄其糟粕, 吸收其精华, 才能对我们的身体有益, 决不能生吞活剥地毫无批判地吸收。”**

本书在翻译过程中由中国科学院生物物理研究所有关同志审阅“附录”一章, 中国医学科学院庞其方同志审阅“分子生物学中的电子显微镜方法”一章, 谨致谢意。

由于我们不是这方面的专业工作者, 在翻译过程中虽向有关同志请教, 译文中不妥之处在所难免, 希望广大读者批评指正。

李申德

1974年10月

引 言

最近二十年来,生物化学所取得的卓越进展(如同在所有的自然科学的学科一样),如果没有方法上的发展,是不能想像的. 假如要追溯一下现代生物化学的诞生时刻,很自然会找到1925年 Svedberg 设计的超速离心机,或同时代的“Warburg 压力计”. 对于那些同化学更加密切相关的方法来说,也可追溯到1935年,那时, Schoenheimer 及 Rittenberg 首次应用同位素来追踪生物化学过程. 大约40年前,也可说生物化学进入了方法的时代. 此后,不仅建立了上述一些方法,还有许多其他的方法(从其中仅举出层离法、电泳及电子显微镜检查),从而使生物化学达到了当前的水平. 现在,不仅生物化学家及生物学家,还包括医学家、生物物理学家和药物学家,以及任何愿为阐明生命过程作出贡献的人们,都可以卓有成效地为探讨生物学反应的分子基础作出贡献. 在许多实验室中建立了相应的仪器设备,并发表了无数的论文. 本书的目的在于,经过严格的并经作者亲自检定的选择,提供分子生物学的所有重要方法以及重要生物大分子的物理与化学特性,以便任何一个热心的工作者,不需要费力地查找文献,而能找到从事现代化学-生物学实验的途径. 我希望本书的付印,能成功地为此服务,并能为分子生物学输送更多的人材.

Th. 威兰德

1973年3月

前 言

现在,一种流行的观念是,生物科学在近二十年来取得了以往任何时期都不能比拟的更大进展。的确,与多数人的意见相反,还存在另外一种看法,其中主要部份是真实的。这种进展是由很多因素组成的,其中最重要的是提供了现在能为我们支配的技术的重大发展,这一发展开辟了前所未有的通向知识领域的途径。借助于这些技术,开辟了几乎无限的可能性。可以期望,我们探索细胞的生物学奥秘的知识,将会提高到迄今未观察过的水平——分子水平。

如果不利用超速离心技术的现代方法,要从事核酸组成的探讨,几乎是不可想像的。再加上顺序分析方法及同位素标记,人们就能够设计前一时代所不能想像的研究计划。现在已经有可能拟定克服以前所不能战胜的困难的计划了。光学、电子学及放射化学为保证其实现提供了工具。对现代化研究者来说,主要问题在于,何时及如何使用这些方法。

于是,就碰上了一个相当复杂的问题。现代的技术相互之间差别悬殊,因此对于个别人来说,在应用这些现代技术时,首先需要进行程度很高的专业训练。某一个研究者在实际掌握一组仪器或技术方面,可以是一个很好的专家;但是,现在要对一个研究计划作出良好的设计,最好,或者甚至是必需对一切现有的方法加以严肃的考虑。因此,一个科学家至少应当知道当时可以利用的所有技术的基本原理,专家则必须掌握它。当涉及的问题范围彼此相交时,就要组织一组不同学科的专家队伍,他们彼此之间应相互信赖;一个生物学家

在今天不能再孤立地进行工作了。提得尖锐些的话，他的任务在于懂得许多技术的基本原则以外，还要十分精通其中的几种。至于他以何种比例把他的全部可能性分摊在这两种目标上，则是他自己的事。这个问题的解决总是因人而异的，这取决于这个生物学家的个人能力，他的兴趣以及他对不同学科的知识深度。此时，仪器和器械尽管是必不可少的，但终究不过是达到目的的手段而已。它仅仅是使理想实现的一种辅助手段，而不是别的。

本书的意图是，把一些现代生物学使用的技术，介绍给较大范围的有兴趣的人们。作者希望，读者利用本书叙述的方法，作为工作入门，来为其目的服务。作者试图使本书具备实验手册的特点。因此，方法的叙述是以操作顺序的形式出现，而不涉及理论。此外，本书还以附录的形式对这些方法作一概述。其余的请读者查阅相应的文献。

方法的选择基于下述几个观点：首先是除常用的标准方法外，还要加上实践中有所变更的；其次，除了简单的技术性方法外，还应考虑到适用于特殊问题研究的方法；最后，读者除了实用的方法外，还须有更好的解决更进一步任务的方法。在任何一种情况下，采用的方法限于在分子生物学研究中已经得到应用和正在应用的方法。

所有采用的方法均经过检定者或作者实验检定，所以，检定者或作者以自己的名义，为所检定方法的可重复性及正确性负责。

当正文、特殊文献或附录必须引用文献时，无例外地只择要选用，选择文献的原则是较老的，经证实的或普遍承认的论文。

器械及试剂的命名，通常按国际准则，个别的按制造者的写法。

作者希望,从事不同生物学科实验工作的科学家,如植物学家、动物学家、微生物学家、生物化学家、分子生物学家及医学与化学的某些特殊学科能使用本书提供的方法.

他们还希望,本书还能对不同科学部门的研究生及一切愿意学习现代生物学新方法的人们,有所裨益.

P. 康德拉 W. 阿培尔

1972 年 12 月

目 录

译者的话	v
引言	vi
前言	vii
第一章 细胞组分的分离与纯化	1
1.1. 植物材料——菠菜叶叶绿体的分离	1
1.2. 动物材料——小牛胸腺细胞核的分离和纯化	2
1.3. 动物材料——大鼠肝细胞核的分离	4
1.4. 细菌——大肠杆菌核糖体的分离	6
1.5. 动物材料——大鼠肝核糖体的提纯	9
1.6. 大鼠郎格罕胰岛细胞的分离	11
第二章 分子生物学中的电子显微镜方法	17
引言	17
2.1. 载膜	18
2.2. 生物材料的制备	22
2.3. DNA 的电子显微镜检查	31
2.4. 核糖体的电子显微镜检查	35
第三章 分子生物学中的放射自显影方法	37
3.1. 引言	37
3.2. 放射自显影实验的设计	38
3.3. 光学显微镜技术	39
3.4. 电子显微镜技术	43
3.5. 定量放射自显影	46
第四章 生物大分子的分离与纯化	48

4.1. 细菌(枯草杆菌)脱氧核糖核酸的分离与纯化 ...	48
4.2. 植物材料——豆胚芽脱氧核糖核酸的分离	55
4.3. 动物材料——大鼠肝脱氧核糖核酸的分离	57
4.4. 大鼠肝的核内核糖核酸的分离与纯化	63
4.5. 面包酵母菌可溶性核糖核酸的提纯	65
4.6. 大肠杆菌转移核糖核酸的分离与纯化	69
4.7. 动物组织——大鼠肝核糖体核糖核酸的分离 ...	72
4.8. 植物材料——豌豆胚芽染色质的提纯	75
4.9. 动物材料——大鼠肝染色质的提纯	77
第五章 生物大分子的物理化学鉴定	80
5.1. 蛋白质的微量乙酸叶片电泳	80
5.2. 蛋白质的盘状电泳	83
5.3. 平衡透析: 一些物质同生物大分子的结合亲和力	88
第六章 生物大分子的化学鉴定	92
6.1. 脱氧核糖核酸的定量测定	92
6.2. 核糖核酸的定量测定	94
6.3. 蛋白质的定量测定	96
6.4. 核酸中含磷量的定量测定	99
6.5. 核酸的定量碱基分析	102
6.6. 蛋白质总水解物的定向微量分析	106
6.7. 肽(三肽)的顺序分析	111
第七章 生物大分子的酶促合成	120
7.1. 细菌(大肠杆菌)的无细胞系统中的蛋白质合成	120
7.2. 动物组织(大鼠肝)的无细胞系统中的蛋白质合成	128
7.3. 动物组织(大鼠脑)的无细胞系统(简化系统)中	

的蛋白质合成	135
7.4. 用一种小球菌 (<i>Micrococcus lysodeikticus</i>) 的多核苷酸磷酸化酶合成多核苷酸	139
7.5. 用细菌(大肠杆菌)的 RNA 聚合酶进行依赖 DNA 的 RNA 生物合成	145
7.6. 用动物组织(大鼠肾)中结合于细胞核的 RNA 聚合酶进行依赖 DNA 的 RNA 生物合成	152
7.7 用 RNA 肿瘤病毒——小鼠的 Friend 白血病病毒(逆转录酶)进行 DNA 生物合成	157
7.8. 在大鼠肝的脱氧核糖核酸上胸腺嘧啶核苷的参入	162
7.9. 在大鼠肝的核糖核酸上尿嘧啶核苷的参入	165
7.10. 在大鼠肝及大鼠脑的多聚体核糖核酸上尿嘧啶核苷的参入	168
第八章 特殊方法	175
8.1. 干扰素的生产及测定	175
8.2. 通过完整细胞(胰脏的郎格罕胰岛细胞)生物合成前胰岛素	180
8.3. 胰岛素的免疫测定	185
第九章 附录	190
9.1. 超速离心	190
9.1.1. 引言	190
9.1.2. 蔗糖密度梯度离心(分离 RNA 混合物)	191
9.1.3. 等密梯度离心	195
9.2. 放射性同位素	210
9.2.1. 放射性衰变	211
9.2.2. 同位素稀释法	214
9.2.3. 放射活性的测定	217

9.2.4. 应用放射性同位素时的防护措施·····	231
9.2.5. 最大放射负荷·····	235
9.3. 鉴定蛋白质和核酸的物理化学方法 ·····	241
9.3.1. 引言·····	241
9.3.2. 光学方法·····	243
9.3.3. 流体动力学方法·····	252
第十章 生物化学及分子生物学数据 ·····	259
10.1. 嘌呤碱及嘧啶碱的特性·····	262
10.2. 嘌呤及嘧啶核苷的特性·····	270
10.3. 脱氧核糖核酸的特性·····	286
10.4. 核糖核酸的特性·····	310
10.5. 氨基酸的特性·····	324
10.6. 蛋白质的特性·····	332
参考文献 ·····	338
索引 ·····	342

第一章 细胞组分的分离与纯化

1.1. 植物材料——菠菜叶叶绿体的分离

根据 R. B. Park 及 N. G. Poh (1961).

原则

菠菜叶以蔗糖溶液匀浆化，自 $200 \times g$ 离心的上清液以 $600 \times g$ 离心分离叶绿体。

材料

1. 器械:

冷冻离心机, $4000 \times g$;

刀匀浆器;

尼龙织物(例如尼龙袜)或棉织物。

2. 试剂:

生物化学用 D(+) 蔗糖;

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4), 分析纯;

乙二胺四乙酸, 二钠盐 ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$).

3. 溶液的制备:

(1) 蔗糖溶液: $0.5M$ 水溶液。

(2) 磷酸钾缓冲液: KH_2PO_4 溶于溶液 (1) 中, $0.1M$, 调至 $\text{pH}7.4$.

(3) 完全的介质: EDTA 溶于溶液 (2) 中, $10mM$, 调至 $\text{pH}7.4$.

(4) 原料: 新鲜、洗净的菠菜 (*Spinacia oleracea*) 叶, 在加工前再次用冷自来水冲洗, 并尽可能使之干燥。

操作规程

所有操作步骤均应在 0°C 或接近 0°C 条件下进行。将 125 克菠菜叶加入 250 毫升溶液(3)中, 用匀浆器的最高转速匀浆化 30 秒钟。绿色的匀浆用双层尼龙织物或棉织物过滤, 并用 $200 \times g$ 5 分钟低速离心。上清液随即以 $600 \times g$ 离心 12 分钟, 将其沉淀悬浮于 40 毫升溶液(1)中, 再以 $600 \times g$ 离心 12 分钟。这样得到的沉淀即为纯化的叶绿体。

参 考 文 献

R. B. Park und N. G. Poh. J. Mol. Biol. **3**, 1 (1961)

1.2. 动物材料——小牛脑胸细胞核的分离和纯化

根据 V. G. Allfrey 及 A. E. Mirsky (1964), 经 P. Chandra 检定。

原则

小牛胸腺以含 Ca^{++} 的等渗蔗糖溶液匀浆化。匀浆经离心分离出细胞核部分, 并在 Ficoll® (一种蔗糖多聚物) 梯度 (Gradient) 中纯化。加入 Ca^{++} 的作用是在分离过程中减小细胞核的脆性、防止集聚及抑制线粒体的氧化磷酸化去偶联作用 (Entkoppelung)。

材料

1. 器械:

冷冻离心机, $4000 \times g$;

刀匀浆器；

尼龙织物(例如：尼龙袜)；

Potter-Elvehjem 氏带玻璃杵的匀浆器；

电磁搅拌器；

亚麻布。

2. 试剂：

生物化学用 D(+) 蔗糖；

氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，分析纯；

氯化钠 (NaCl)，分析纯；

Ficoll® (药典 AB，乌布萨拉或德国的药典 GmbH，法兰克福)。

3. 溶液的制备：

(1) 蔗糖溶液：0.5M 水溶液。

(2) 蔗糖溶液：0.25M 水溶液。

(3) 匀浆介质： CaCl_2 溶于溶液 (2)，3.3mM。

(4) 悬浮介质： CaCl_2 溶于溶液 (2)，3mM。

(5) Ficoll® 溶液：100 克 Ficoll® 用蒸馏水小心地进行透析，并溶于 100 毫升溶液 (4) 中。

(6) 氯化钠溶液：0.9% (g/v) 水溶液，冰冷的。

4. 原料：

新鲜的、未经冰冻的小牛胸腺。

操作规程

所有操作程序均在 2—4℃ 条件下进行。先把腺体上的脂肪和结缔组织除去，随即用溶液 (6) 稍加冲洗并用布拭干。用刀子或剪刀把组织充分切碎。于 50 克组织中加入 50 毫升溶液 (1) 及 400 毫升溶液 (3) 制成混合物，并用刀匀浆器匀浆化 5 分钟。匀浆用四层亚麻布和二层尼龙织物依次过滤。滤

液用 $1000 \times g$ 离心 7 分钟,分离到的沉淀物即为粗制的细胞核。将粗制细胞核悬浮于 100 毫升溶液 (4) 中,这样制成的悬液在人工匀浆器中用玻璃杵上下捣动约 10—15 次,小心地使之分散,随即用电磁搅拌器缓慢搅动约 10 分钟,以双层尼龙织物过滤,并再次以 $1000 \times g$ 离心 7 分钟。上述全部洗涤过程须多次反复,直至洗涤液高度透明为止。最后的沉淀物即为分离到的细胞核。

细胞核如上述悬浮于 100 毫升溶液 (4) 中,置于 250 毫升离心杯中,小心地覆盖一层 20 毫升溶液 (5) 与 55 毫升溶液 (4) 的混合物。上述梯度以 $700 \times g$ 离心 10 分钟,获得的沉淀即为纯化的细胞核。

参 考 文 献

- V. G. Allfrey und A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 43, 589 (1957).
V. G. Allfrey, V. C. Littau und A. E. Mirsky, J. Cell Biol. 21, 213 (1964).

1.3. 动物材料——大鼠肝细胞核的分离

根据 C. C. Widnell 及 J. R. Tata (1964), 经 W. Appel 检定。

原则

操作方法原则上类似自小牛胸腺分离细胞核。区别点在于不用 Ficoll[®] 梯度法而采用蔗糖梯度法。肝脏在含 Ca^{++} 的蔗糖溶液中匀浆化。匀浆经离心分离出细胞核部份。加入 Ca^{++} 的作用是在在分离过程中减小细胞核的脆性,防止集聚及抑制线粒体的氧化磷酸化去偶联作用。

材料

1. 器械:

制备式超速离心机;

钢压榨机或绞肉机;

Potter-Elvehjem 氏带特氟纶(聚四氟乙烯纤维)杵的匀浆器;

Potter-Elvehjem 氏人工匀浆器;

尼龙织物(例如: 尼龙袜).

2. 试剂:

密度梯度离心用 D(+) 蔗糖;

氯化钙 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 分析纯;

氯化钠 (NaCl), 分析纯.

3. 溶液的制备:

(1) 氯化钠溶液: 0.9%(g/v) 水溶液.

(2) 蔗糖溶液 A: 0.33M 水溶液, 含 0.40mM CaCl_2 .

(3) 蔗糖溶液 B: 0.25M 水溶液, 含 0.30mM CaCl_2 .

(4) 蔗糖溶液 C: 0.34M 水溶液, 含 0.30mM CaCl_2 .

(5) 蔗糖溶液 D: 2.40M 水溶液, 含 0.30mM CaCl_2 .

4. 原料:

大鼠, 性别、年龄及饲养情况不拘.

操作规程

实验前 24 小时内动物须保持空腹, 然后将其断头处死. 肝脏在原位用溶液 (1) 充分冲洗后取出. 以后所有操作均应在 2—4℃ 条件下进行. 肝脏用钢压榨机压碎或用绞肉机较碎. 每 10 克组织浆加入 30 毫升溶液 (2), 置于电动匀浆器中, 使杵上下捣动约 30 次制成匀浆. 匀浆随后用双层尼龙织