

[美] J. H. 彻里 著

植物分子生物学 实验指导



科学出版社

33

内 容 简 介

本书是植物生理学中分子生物学的最新实验技术。书中分为：酶学、酶的纯化、线粒体、光合作用、核苷酸、核酸的性质、脱氧核糖核酸、核糖核酸、蛋白质合成、植物激素、生物测定技术、用气相色谱法分析植物的成分等十一部分，具体介绍了35个实验。

本书可供各大、专院校生物系、农学系师生及从事植物生理学科研究的科研人员参考。

J. H. Cherry

MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS

A TEXT-MANUAL

Columbia University Press, New York and London

1973

植物分子生物学实验指导

〔美〕J. H. 彻里 著

崔 激 徐杏阳 马 诚 译
林忠平 吴石君 赵玉锦
倪晋山 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

*

1979年9月第一版 开本：787×1092 1/32

1979年9月第一次印刷 印张：7 3/8

印数：0001—12,120 字数：165,000

统一书号：13031·1084

本社书号：1518·13—10

定价：0.77元

前 言

十年以前,我还是一个年青的教授,在普渡大学教有关植物生物化学和生理技术的新课程。这个课程是需要的,因为许多研究生在实验技术方面没有受到足够的训练。特别是农业学校,学生们没有在生物学、生物化学的正式课程中得到足够的能力和信心能去使用现代实验设备和从事生物化学过程。这个课程的目的是为学生们提供广阔范围的实验,而不必要包括植物生理的一切领域。

植物分子生物学实验指导是这些年教学的产物。这本书对于概括植物生物化学和生理所有领域来说是不完全的。这些实验主要是涉及在我的经历中我所感兴趣的科学研究领域(例如核苷酸、蛋白质和核酸)。我希望这个实验指导可以做到两个目的——它可以对在植物生物化学、生理学的一个高级实验课中提供选择合适的实验过程。同时也为刻苦钻研的学生提供与实验指导中这些特别领域有关的参考书。

对那些学习我的课程并对实验做出贡献的许多学生表示热烈的感谢。

J. H. 彻里

目 录

第一部分	酶学	1
实验 1	葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶活性的测定	8
实验 2	异柠檬酸酶活性的测定	11
实验 3	琥珀酸脱氢酶的测定	13
实验 4	甜菜根圆切片中转化酶活性的测定	15
实验 5	核糖核酸酶 (RNase) 活性的测定	19
第二部分	酶的纯化	23
实验 6	异柠檬酸酶的提纯	29
实验 7	白氨酸 -tRNA 合成酶的纯化	33
第三部分	线粒体	39
实验 8	分离的线粒体的氧化和磷酸化活性的测定	42
第四部分	光合作用	50
实验 9	光合作用抑制剂	53
第五部分	核苷酸	58
实验 10	核苷酸的提取、色谱分离及鉴定	67
第六部分	核酸的性质	73
实验 11	植物中核酸的测定	78
实验 12	RNA 的碱水解及核苷酸的分离	82
实验 13	RNA 核苷酸的简单分离法	85
第七部分	脱氧核糖核酸	87
实验 14	DNA 的分离	92
实验 15	提纯 DNA 的一个新方法	95
实验 16	DNA 密度梯度分离	98
实验 17	哺乳动物 DNA 聚合酶的提取和鉴定	102

实验 18	大豆下胚轴染色质 DNA 合成	105
第八部分 核糖核酸		108
实验 19	总 RNA 的提取及色层分离	113
实验 20	核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳	119
实验 21	蔗糖梯度离心分离核酸	124
实验 22	染色质—RNA 聚合酶测定	126
第九部分 蛋白质合成		129
实验 23	tRNA 的分离	136
实验 24	氨酰基-tRNA 合成酶的分离	139
实验 25	蔗糖梯度分离植物核糖体	143
实验 26	聚尿苷酸指导的苯基丙氨酸掺入	147
第十部分 植物激素: 生物测定技术		152
实验 27	类生长素物质的提取和生物测定	160
实验 28	类赤霉素物质的提取和生物测定	164
实验 29	细胞分裂素的生物测定	168
实验 30	根据豌豆茎胀大作乙烯的生物测定	171
第十一部分 用气相色谱法分析植物的成分		173
实验 31	叶子类脂化合物的脂肪酸组分测定	177
实验 32	植物细胞壁的单糖	180
实验 33	植物蛋白质的氨基酸组分	184
实验 34	植物组织中游离氨基酸库 (pool) 的组分	189
实验 35	植物组织果胶甲酯酶, 游离甲醇和甲氧基的测定	192
附录		196
1	调节硫酸铵浓度的表	196
2	蛋白质紫外光吸收测定	198
3	X 天数以后 ^{32}P 残余放射性的比例	199
4	圆盘电泳用的特殊方法	200
5	蛋白质的圆盘电泳方法	201
6	将Dowex-1 从氯型转换成甲酸型的方法	204
7	标准皂土 (Bentonite) 悬浮液的制备	204

8	用于离子交换层析的纤维素吸附剂的制备·····	205
9	放射性同位素·····	210
10	生物学常用的缓冲液 ·····	216

第一部分 酶 学

前 言

生活细胞独有的特性是它有能力在周围环境的温度下很快地进行复杂的生物化学反应。在细胞内参与这些显著化学转换的主要物质叫酶。酶是在细胞内合成的蛋白质，它能催化或加速从热力学上是可能的反应，所以反应的速度和细胞的需要是一致的。酶不能改变一个反应的自由能 (ΔF)。酶能在极低的浓度下发生作用。它们一般对每一反应是专一的；就是说一个酶不能加速所有的反应，而是每一不同反应需要一个专一的酶。由于酶是一个蛋白质，如果被热，强酸或碱，或有机溶剂改变性质，就失去了它的催化特性。

一个酶催化反应的性质

A $\longrightarrow$ B 的反应可以用热力学表示如下：

$$\Delta F = F_B - F_A$$

如果 ΔF 是负的(-)，反应是放能的。

$$\Delta F = F + RT/n \frac{[B]}{[A]}$$

如果 ΔF 是正的(+)，反应是需能的。

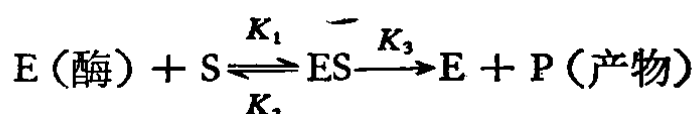
很多有正 ΔF 的反应应当与一个能源如 ATP 相偶联时进行的速度很快。这在自由能的一切变化中发生的反应是负的。

酶的动力学应该(如果可能的话)在反应速度与浓度成正

比例的条件下进行研究。这种情况用图 1 表示,这是用转化酶催化的反应。

一个酶催化反应的速度随着基质浓度的加大而增加到最高的水平(图2)。在与基质饱和时,酶的一切催化部分都被占用了,并达到最高的速度(V_m)。这样的反应动力学指明形成了一个酶-基质(ES)复合物。

表示一个 ES 复合物和各种反应的速度常数的方程式如下:



(反应速度依赖于 K_3 , 即 K_3 是速度限制阶段)。产物形成的速度依赖于 K_3 。这是假定 $E + P \xrightarrow{K_4} ES$ 是很小。按照定义,在最高速度的一半时($V_m/2$)。 K_m 等于基质的浓度(每升的克分子)。这个常数, K_m , 在某些条件下约接近于一个 ES 复合物的解离常数,参阅前面的方程式。

如果我们假定 $E + S \rightleftharpoons ES$ 反应是可逆的,则 ES 的解离常数可用 K_m 表示为

$$K_m = \frac{[(E) - (ES)](S)}{[ES]}$$

因此,当公式重新排列来解 ES, 结果是

$$ES = \frac{(E)(S)}{K_m + S}$$

(注: 这里假定 K_2 是极小) 现在, 如果 ES 的速度常数是 K_3 , 则可以测出的速度 v 是

$$v = (ES)K_3$$

用下式取代 ES

$$\frac{(E)(S)}{K_m + (S)}$$

这样 v 的方程式则为

$$v = K_3 \left(\frac{(E)(S)}{K_m + (S)} \right)$$

在最大的速度(当所有的酶是 ES 形式), $V_m = K_3(E)$ 。用 V_m 取代上面方程式的 K_3 就产生了 Michaelis-Menten 方程式:

$$v = \frac{V_m(S)}{K_m + (S)}$$

这个方程式也可照下式写

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + S}{V_m(S)} \quad \text{和} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}$$

在图 3 中用 Lineweaver-Burk 图象说明了 Michaelis-Menten 方程式。

给学生有益的启发

1. 一个“正确的”酶浓度对一个已知基质浓度的重要性用图 4 表示。

2. 在曲线的线形范围内用速度值来计算酶活性。

3. 一个酶单位可以认为是在每单位时间内起作用的基质的数量(例如: 微克分子/分)。

4. 比活性 = $\frac{\text{开始速度的单位}}{\text{毫克蛋白质}}$

这就是

$$\text{比活性} = \frac{\text{微克分子/分}}{\text{毫克蛋白质}}$$

5. (比活性) $\times$ (总毫克蛋白质) = 总酶活性

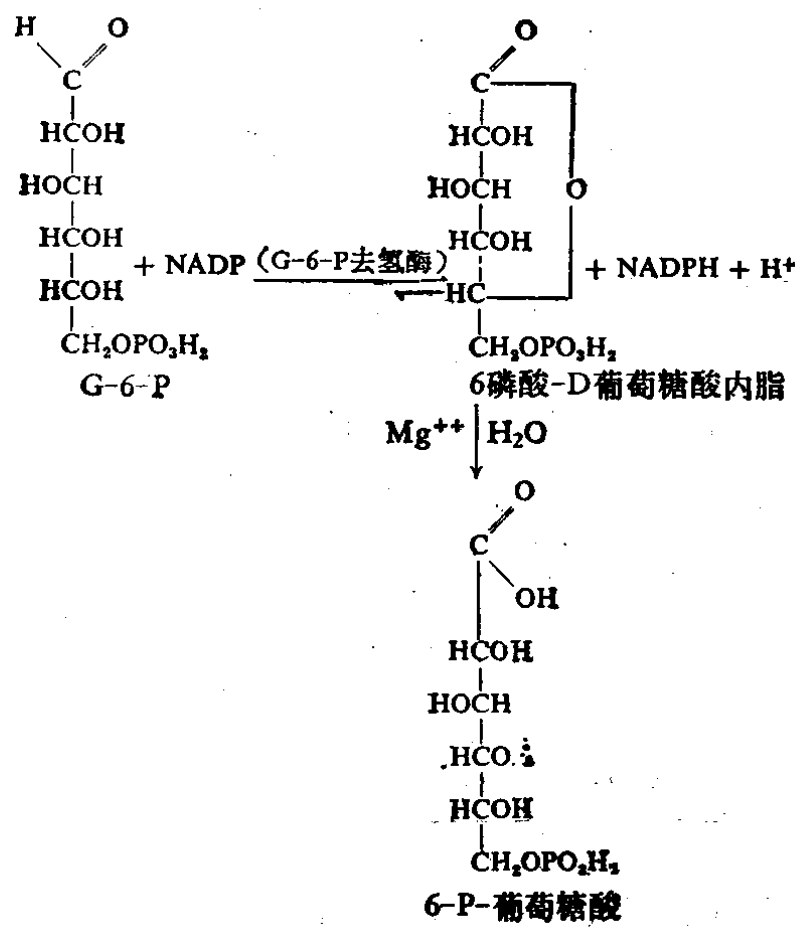
6. 对每一样品,记着测定开始的速度,体积和蛋白质浓度。

7. 在低温保存酶制品,但是当测定酶时保持温度近 30°C 或要求的温度。

对要研究的每一酶反应的考虑

一、葡萄糖 6-P 脱氢酶

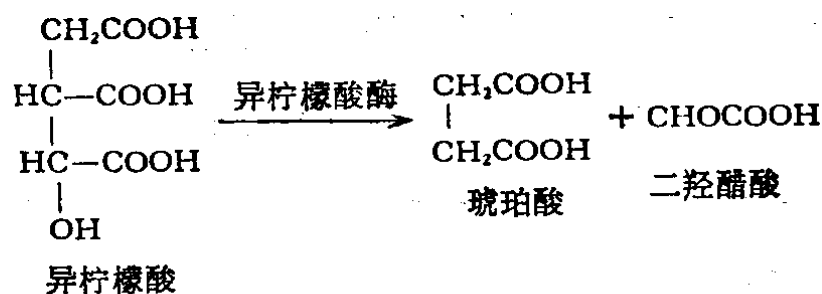
G-6-P 的氧化导致产生还原的 NADP(NADPH)。辅酶 NADP 和 NAD 的特性是在还原状态靠近 340 毫微米处吸收紫外光 (U.V), 而在氧化状态不是这样(图 5)。(注: 为简化 NADP 的结构, 删去了许多不涉及基本构造的 H 和 OH。NAD 具有与 NADP 相同的构造, 但在核糖的 Z' 位置没有磷酸; 参阅图 6)



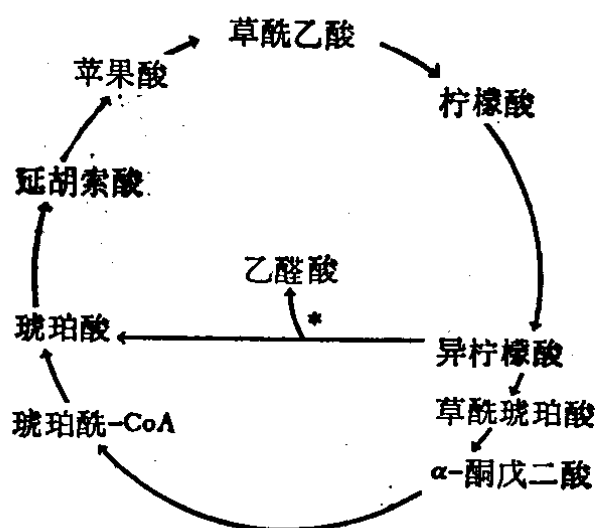
二、异柠檬酸酶

这个酶参与二羟醋酸盐支路, 用下面的图解表示。要研

究的反应是将异柠檬酸转化为琥珀酸和二羟醋酸，如下面的方程式所示

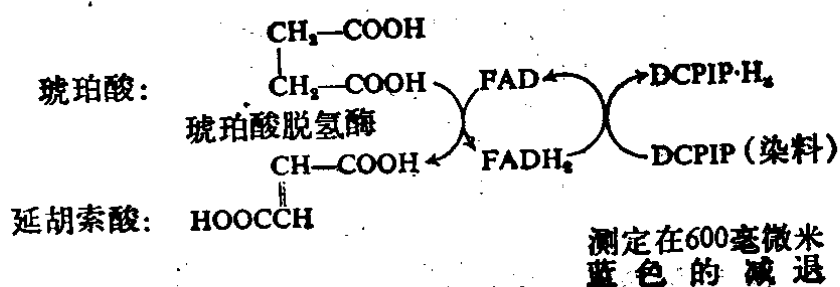


在产生二羟醋酸过程中，反应产生一个另外的羰基，羰基的形成可以按苯肼试法用分光光度计测定(图 7)。在二羟醋酸苯肼产生以后，反应的混合物必须用高温高压锅去破坏产生的任何 schiff 碱。如果不这样做，空白或参考数值就要高些。



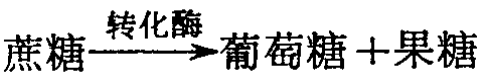
三、琥珀酸脱氢酶

这种酶位于线粒体内，所以线粒体制剂可以用作它的来源。



四、转化酶活性

用测量甜菜根圆片中蔗糖的水解测定这种活性。



用测量还原糖(葡萄糖)的增加测定酶活性。

五、核糖核酸酶活性

分析酵母 RNA 的酶水解时得出核糖核酸酶活性。

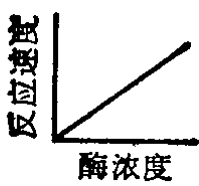
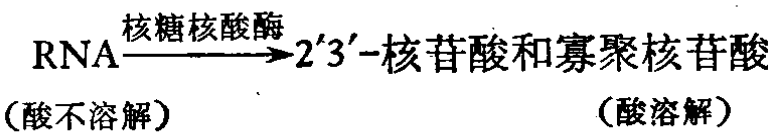


图 1 说明增加的反应速度是酶浓度的函数的图解

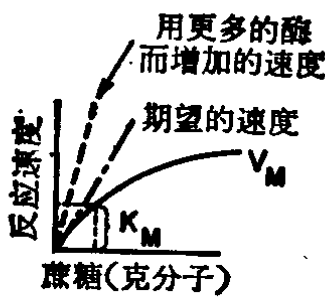


图 2 作为基质浓度的函数的转化酶活性速度

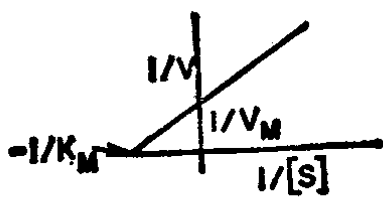


图 3 典型的 Lineweaver-Bnrk 图象 (斜率= K_M/V_M)

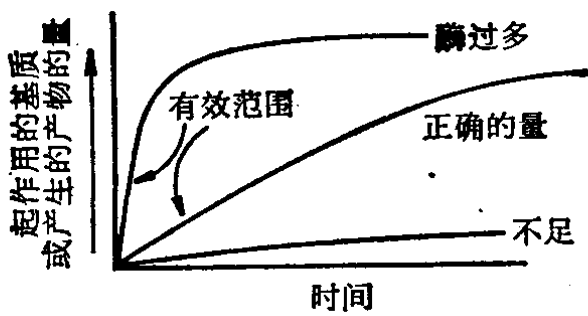


图 4 酶催化反应的时间过程,描述各种水平的酶浓度

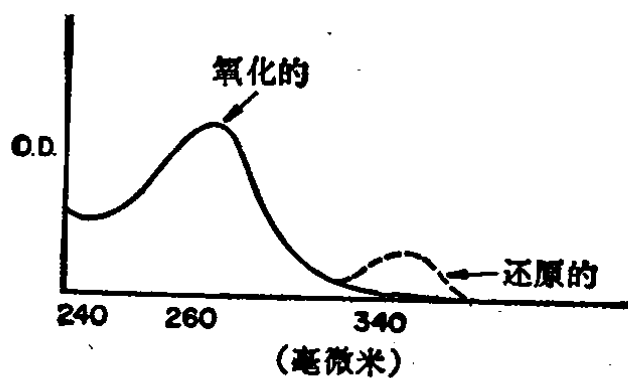


图 5 氧化和还原形式的 NAD 和 NADP 的紫外吸收光谱

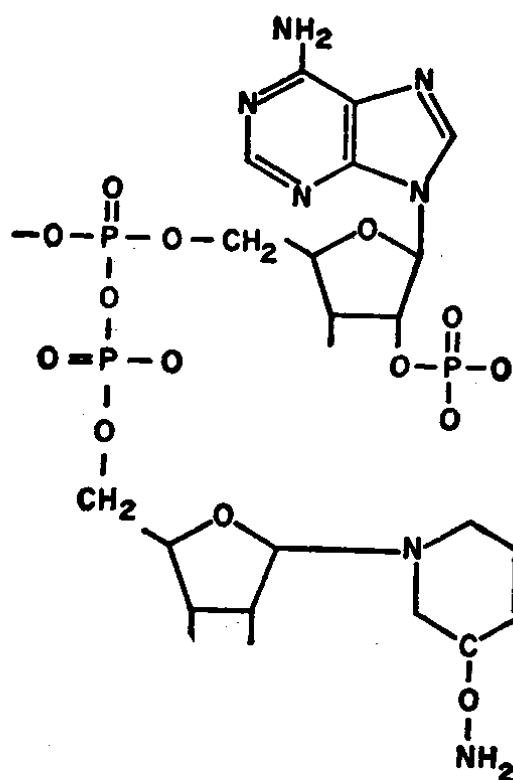


图 6 NADP 的结构式

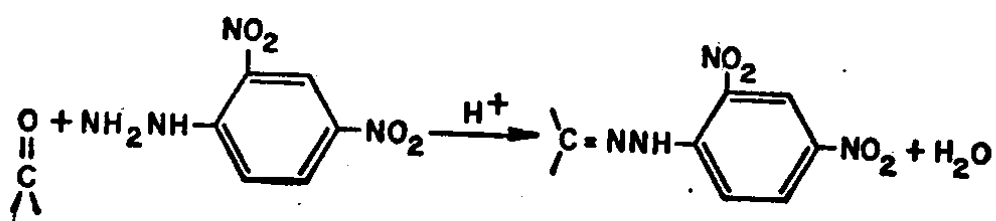


图 7 羰基与苯肼的反应

(崔激译)

实验1 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的测定

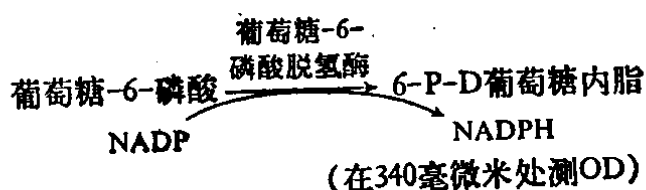
A. 目的

葡萄糖-6-磷酸氧化成6-磷酸-D-葡萄糖内酯需要NADP作辅酶。内酯的水解是放能反应,产生6-磷酸葡萄糖酸。由于(NADPH)在340毫微米吸收紫外光而NADP则否,这个系统可用于酶催化反应的分光光度法测定。

B. 材料和设备

玉米幼苗	纱布
匀浆器	分光光度计
研磨介质(0.42M 甘露醇, 0.005M KCl, 0.005M MgSO ₄ 及 0.02M Tris, pH7.5)	反应混合液(葡萄糖 -6-磷酸, NADP 及 KCN),
冰冻离心机	

C. 酶的反应过程



D. 实验步骤

从3—7天的黄化玉米幼苗(在29℃的黑暗条件下萌发)上取2—3克根和芽的样品。用冷水洗净。将每份样品放在含0.42M甘露醇, 0.005M KCl, 0.005M MgSO₄及0.02M Tris pH7.5的研磨溶液中用匀浆器研磨1分钟。匀浆液用四层纱布过滤并以500×g离心8分钟。用冷匀浆缓冲液将清洁的匀

浆物稀释到 10 毫升,直接用作酶的来源。

酶液已制好待用时,按表 1 所列的母液体积配制反应混合液。

表 1

	浓度 克分子	体积 毫升
NADP	3×10^{-3}	1
葡萄糖-6-磷酸	9×10^{-2}	1
KCN ¹⁾	4.5×10^{-2}	1
研磨介质	--	26

1) 注意: 不能用口吸 KCN 移液管

将反应混合液放在 30℃ 的水浴中。待反应混合液的温度达到 30℃ 时,分别吸取 2.0 毫升到两个石英比色杯中。在第一个比色杯中加 0.1 毫升缓冲液,作为空白对照。在第二个比色杯中加 0.1 毫升植物匀浆,立即将分光光度计调整到零,并开始记录在 340 毫微米处吸光度的增加。如果此反应进行得过快或过慢(看指导),可多加一点或少加一点植物匀浆,再重复此过程。NADH 在 340 毫微米的克分子消光系数是 6.22×10^3 。所以当所有的 NADP 都被还原时反应混合液的吸光度应是接近 0.6。根据已知的克分子消光系数可计算出所还原的 NADP 的量。

E. 蛋白质的测定

从每一种组织匀浆中吸取 0.5 毫升样品并加 1 毫升冷 10% 三氯乙酸 (TCA) 沉淀蛋白质。在 $10000 \times g$ 离心 10 分钟,弃去上清液。将沉淀溶于 5 毫升 0.1N NaOH 中,按 0.1 毫升的等份取样,用 Lowry 等人的方法^[1]分析蛋白质。

1. 试剂

(1) 2.0% Na_2CO_3 溶于 0.1N NaOH 中。

- (2) 0.3% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 溶于 1% 酒石酸钠中。
- (3) 酚试剂 (Folin-Ciocalteu) 1.0N
- (4) 标准蛋白质溶液: 牛血清白蛋白 (B、S、A) 0.2 毫克/毫升, 溶于 0.1N NaOH 中。
- (5) 在分析前不久将试剂(1)与(2)按(50:1)混合。

2. 步骤

将用 NaOH 悬浮的样品 (一般为 0.1 毫升) 放入试管后, 加 5 毫升试剂(5), 置放 10 分钟, 然后加 0.5 毫升试剂(3)并立即混合。在室温下放 30 分钟后, 在 750 毫微米处读吸光度。(注: 如果用不同的体积, 应在加试剂(5)以前进行调整)

3. 标准曲线

将从 0.1 毫升到 0.5 毫升(20—100 微克)范围内的 B.S.A. 溶液加于试管中并测定其显色的程度。

F. 数据处理

计算所有被测定的样品的总单位 (1 酶单位 = 每分钟光密度变化 0.01) 及比活性, 以你的数据写一简单报告。

参 考 文 献

- [1] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Fair and R. J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.

一 般 参 考 文 献

- Cherry, J. H. *Plant Physiol.* 38: 440, 1963.
Cooperstein, S. J. and A. Lazarow. *J. Biol. Chem.* 189: 665, 1951.
Hiatt, A. J. *Plant Physiol.* 36: 552, 1961.
Kagland, T. E. and D. P. Hackett. *Biochim. Biophys. Acta* 54: 577, 1961.

(徐杏阳译)

