

核酸的化学

〔澳大利亚〕D. O. 佐登著 施嘉鍾等译

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本书介绍有关核酸的各种提取方法、结构和性质。叙述嘌呤碱和嘧啶碱、核苷和核苷酸的酸碱性、结构及其合成。尤其在核酸的结构和复制机制方面,以物理化学观点作了研究和讨论,使读者对核酸在生物学过程中所产生的独特作用有一较清楚的概念。

本书可供化学、生物化学、生物学、医学、农学工作者以及有关高等院校师生的参考。

THE CHEMISTRY OF NUCLEIC ACIDS

D. O. Jordan

Butterworths, 1960

核 酸 的 化 学

施嘉鍾 郑景略 汪迺經 潘筱平 陶鴻根 譯

施嘉鍾 李 亮 审閱

上海科学技术出版社出版 (上海瑞金二路 450 号)

上海市书刊出版业营业許可証出 093 号

大东集成联合印刷厂印刷 新华书店上海发行所发行

开本 850×1156 1/32 印张 11 4/32 排版字数 294,000

1965 年 1 月第 1 版 1965 年 1 月第 1 次印刷

印数 1—3,700

統一書号 13119·621 定价(科六) 1.70 元

序

目前关于核酸结构及其功能的知識是从累积多种不同学科的研究而来，其中涉及从物理到化学以及从生物化学到生物学和遺傳学的研究。一个包括核酸结构及功能的各方面的广泛著述将需要几卷的篇幅加以記載，而且亦在任何著者能力范围以外。因此，我在本书中只集中討論核酸的化学及其结构。这里所用的“结构”一詞包含最广泛的意义。因此除了叙述核酸分子的詳細构造，諸如分子内部原子的相对位置、鍵的本性以及核酸大分子的大小和形状外，还討論及由于不同核苷酸的排列次序，不同核苷酸的組成和不同核苷酸的分子大小所引起的核酸制备的不均一性。这样的叙述显然是需要的，因为如果象現在所相信的，核酸傳遞遺傳密碼以及含有其他生物学的功能，則核酸的结构对于决定这些功能具有非常重要的意义。

D. O. 佐登

物理化学和无机化学部
Johnson 实验室
Adelaide 大学
南澳大利亚

目 录

序

第一章 引 言	1
第二章 核酸的提取	8
引 言	8
脱氧戊糖核蛋白的提取	10
脱氧戊糖核酸鈉的提取	13
各种脱氧戊糖核酸鈉制备方法的比較	20
戊糖核蛋白的提取	21
戊糖核酸鈉的提取	25
第三章 核酸的不均一性和分級分离	36
引 言	36
脱氧戊糖核酸的物理不均一性	37
脱氧戊糖核酸的化学不均一性和分級分离	39
戊糖核酸的不均一性和分級分离	56
第四章 核酸組分的提取和核酸的組成	62
嘌呤碱、嘧啶碱、核苷和核苷酸的提取	62
核酸的組成	85
第五章 核苷的結構及其合成	97
引 言	97
嘌呤碱和嘧啶碱的本性与結構	99
碳水化合物組分的本性与結構	104
苷鍵的位置	105
苷鍵的构型	107
核苷的合成	112
第六章 核苷酸的結構及其合成	123
引 言	123
核糖核苷酸的异构現象	124
脱氧戊糖核苷酸	130

核糖核苷酸的合成	130
脱氧核糖核苷酸的合成	132
第七章 核酸组分的酸碱性质	135
嘌呤碱和嘧啶碱	135
核苷和核苷酸	137
第八章 核酸的结构(一) 核苷酸间键的性质	141
引 言	141
戊糖核酸中核苷酸间的键	141
脱氧戊糖核酸中核苷酸间的键	150
第九章 核酸的结构(二) 脱氧核糖核酸的 Watson 和 Crick 的结构	157
引 言	157
X-射线衍射的研究	157
电位滴定的研究	171
Watson 和 Crick 模型的分析化学证明	176
Watson 和 Crick 结构的可能的修改	177
第十章 核酸的结构(三) 溶液中脱氧戊糖核酸盐离子的大小、形状和另外几种性质	180
引 言	180
脱氧戊糖核酸钠的分子量	182
溶液中脱氧戊糖核酸钠的分子构型	196
从电子显微镜研究所得的脱氧戊糖核酸分子的大小、形状和不均一性	205
脱氧戊糖核酸的酸碱性质	209
脱氧戊糖核酸盐离子上的电荷	219
脱氧戊糖核酸与金属离子和有机阳离子的相互作用	224
在非水溶剂中脱氧戊糖核酸性质的研究	237
第十一章 核酸的结构(四) 脱氧戊糖核酸的变性和降解	245
引 言	245
脱氧戊糖核酸的变性	245
脱氧戊糖核酸的降解	269
第十二章 核酸的结构(五) 戊糖核酸的结构	280
引 言	280

戊糖核酸的分子构型	286
溶液中戊糖核酸盐离子的大小和形状	291
第十三章 核酸的结构(六) 多核苷酸链中核苷酸的排列次序	296
引 言	296
脱氧戊糖核酸中核苷酸的排列次序	296
戊糖核酸中核苷酸的排列次序	305
末端磷酸基团	311
第十四章 合成的多核苷酸	315
合成的核糖多核苷酸	315
合成的脱氧核糖多核苷酸	338
第十五章 核酸的螺旋结构和复制	345

第一章 引言

化学、細胞学和遺傳学的綜合研究使人們相信核酸在控制生物的新陳代謝、生殖以及生长方面具有非常重要的意义。差不多所有新陳代謝的进行都要通过酶的作用，而这些酶的合成是受遺傳单位——基因所控制的。当細胞分裂时，基因必須可以复制，而且亦必須能对特殊的蛋白质分子的合成加以控制。在过去有一个时期，人們曾經认为与基因相結合的、作为細胞結構的染色体包含核酸和蛋白质。但近来具有可以信服的証据証明基因所具的重要遺傳部分只包含核酸，而不包含蛋白质。

核酸傳遞遺傳信息的概念来自 Avery、Macleod 和 McCarty^[1] 的发现。这个发现指出首先由 Griffith^[2] 所描述的‘遺傳轉移物质’就是高聚脫氧戊糖核酸^[3]，这个物质在适当条件下能够誘致不包含在囊中的肺炎球菌 II 型的 R 变形体完全轉变为包含在囊中的肺炎球菌 III 型的 S 細胞。这种工作未曾立即得到应有的广泛承认，主要因为在当时关于核酸的結構仍趋向于錯誤的偏見，认为核酸是一个四核苷酸分子。但是，当洞察到核酸具有大分子的特征后，特别是 Hershey 和 Chase^[4] 的工作指出噬菌体的本性与作用后，Avery 及其同工者的工作的重要性遂得到普遍的承认。Hershey 和 Chase^[4] 能够証明当大腸噬菌体在适当的环境下加入到大腸杆菌細胞中时，組成噬菌体的核蛋白即开始解离，脫氧戊糖核酸和一小部分可溶性蛋白质遂进入細胞中，而大部分的蛋白质則遺留在細胞外面。在宿主細胞中后期所发生的噬菌体生殖过程中，特殊的蛋白质和脫氧戊糖核酸均曾合成，这些蛋白质和脫氧戊糖核酸与在未感染的宿主細胞中的任何組分均不相同。这种如一般所假定的种属特异物质是在特殊的遺傳决定因素影响下所产生的。在生成这种物质时，不是脫氧戊糖核酸就是可溶性蛋白

质进入細胞中, 而且两者均进入。Hershey^[5]曾指出, 进入細胞的物质, 即彼所謂的“发芽物质”为 97% 脫氧戊糖核酸和 3% 蛋白质所組成, 但要肯定某一成分較另一成分更具有噬菌体的遺傳功能, 在目前尚不可能。但是, Herriott^[6]认为从細菌的轉移因素的本质来看, 并且从結構方面考虑, 脫氧戊糖核酸似乎是一个較为吸引人們注意的进入細胞的选择性物质。这种見解为 Doermann、Chase 和 Stahl^[7] 从受紫外光作用失去活力的噬菌体去找寻其中未被发现的遺傳信息載体的研究結果以及 Stent^[8] 用同位素示踪作同样研究所得的結果所証实。核酸在生物作用过程中所产生的独特作用的进一步証明来自 Fraenkel-Conrat^[9] 与 Gierer 和 Schramm^[10] 的各自独立的观察, 即从烟草花叶病毒分离出来的戊糖核酸具有病毒的活性, 而这些活性可以认为差不多完全为天然病毒或从解离出来的核酸与蛋白质再結合而成的再生病毒所具有的活性。

从这些研究結果曾經明显地証明, 一度所认为的遺傳信息的主要密碼存在于染色体中的蛋白质部分的概念必須予以摺弃, 而現在一般均承认这种具有遺傳性质的主要物质为脫氧戊糖核酸; 只有在植物病毒中戊糖核酸才代替了脫氧戊糖核酸^[11]。

要使核酸能够傳遞遺傳信息, 必須有一个模板或密碼与核酸的化学結構相結合。核酸为一互聚合体, 其单体核苷酸为一个嘌呤碱或嘧啶碱与一个磷酸糖酯相結合的化合物。在任何一个核酸中只有一种糖, 但一般均含有四个不同的嘌呤碱或嘧啶碱。虽然关于嘌呤碱和嘧啶碱的排列次序尚未有直接的知識, 但是这些碱基为核酸中的唯一可以变换的成分的事实指出它們具有一定次序的排列, 而这种排列就构成了遺傳的密碼。核酸分子的长度各不相同, 它不特决定于用作提取的特种組織。但从某一組織中提取出来的制备物亦一定不相同, 象沉降系数的广大分布所表示的^[12,13]。这种不均一性可以部分地在提取时人为地产生。但是, 由于观察到用阴离子交換剂^[14,15] 进行的核酸分級分离表示出洗脱液的成分与沉降系数間存在着相互的关系, 并且在級分內的沉降系数分布

特別狹窄，所以出現了不同基因的核酸分子具有不同長度的可能性。因此遺傳密碼除與嘌呤鹼或嘧啶鹼的排列次序有聯系外，它還可以從核酸分子的長度來加以判定。

研究核酸，特別研究其生物學功能，近年來已因 1953 年 Watson 和 Crick^[16] 所建議的脫氧戊糖核酸的結構模型而大大地受到鼓舞。這個結構模型除小部分被修改外，現已被廣泛承認為脫氧戊糖核酸的基本結構。這個將在後面几章中詳細討論的核酸結構包括兩條多核苷酸鏈，以相反的方向相互纏繞成雙螺旋體，彼此通過嘌呤鹼和嘧啶鹼所成的特殊氫鍵連結在一起。這樣由嘌呤鹼和嘧啶鹼互補排列所成的兩條多核苷酸鏈使 Watson 和 Crick 認為核酸分子可以用一條多核苷酸鏈作為另一條多核苷酸鏈的模板而直接自行複製。這個令人興奮的建議卻引起了很多問題，其中包括這兩條纏繞在一起的多核苷酸鏈的分開以及 Delbrück 和 Stent^[18] 所詳細討論過的幾個複製方法的修改。雖然 Watson 和 Crick 所建議的原來核酸結構及其複製機制均曾經修改，但他們根據幾個不同實驗室所累積的化學的與物理的證據所作出的貢獻，在核酸知識的發展方面可算是一個劃時代的事件。

核酸的發現為 Miescher 研究工作的結果。他在 1868~69 年在 Tübingen 城 Hoppe-Seyler 的實驗室工作時從膿細胞的細胞核中提取出一種物質，他稱之為‘核素’(Nuclein)。這個具有酸性的物質特別使人感到興趣，因為它含有相當高的磷成分，而在當時所知道的生物組織中所含的有機化合物只有卵磷脂含磷。Miescher 把他的工作告知 Hoppe-Seyler，他感到非常有興趣而驚奇，因此他親自重複了 Miescher 的膿細胞的實驗，並且請他的兩個學生 Plósz 和 Lübbavin 用除膿外的物質（如蛋黃、酵母、乳酪和鳥類及爬蟲類動物的紅血球）來檢查 Miescher 的方法。當‘核素’的發現被確定後，Miescher 和 Hoppe-Seyler 及其學生的工作即於 1871 年^[19]發表於 Hoppe-Seyler 的 *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 雜誌中。繼後 Altmann^[20]，即‘核酸’一詞的創始者，發表了‘核素’的簡便的一般制法。

不幸得很, Miescher 充分証明核酸为高聚物的工作被后来的研究工作者們所忽視, 他們利用有机化学中的降解方法将用酸和碱并用加热处理的方法从組織中提取出来的物质作为研究。用这样提取方法所得的产物, 虽然只适宜于作为核酸水解产物的檢查和核酸降解产物的研究, 但与天然核酸很少相似之处。

許多根据利用降解物质进行研究而作出的假定常导致錯誤的結論, 其中有些还严重地阻碍着关于核酸結構与功能的知識的进一步发展。例如, 过去将近 10~15 年間认为核酸分子是一个四核苷酸的概念是由于发现酵母核酸的水解物中含有 4 个几乎等分子比例的核苷酸分子以及以后被証明是錯誤的^[22]分子量的測定^[21]而来的。这个錯誤的測定表示核酸粒子的大小相当于 4 个核苷酸分子。但是不管这样的批判, 利用古典有机化学的方法以进行降解的研究对于确定組成核酸的基本分子仍具非常重要的意义。

从这个工作的結果产生了核酸存在着两种显然不同类型的概念。一种是从酵母而来的核酸, 当水解时产生腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、磷酸和一种被 Hammarsten 认为是一种戊糖, 而 Levene 和 Jacobs^[23] 則确定为核糖的糖。另一种是从胸腺而来的核酸, 水解后产生腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶 (5-甲基尿嘧啶)、磷酸和一种被 Levene 和 London^[24] 认为是脫氧戊糖, 而 Levene、Mikeska 和 Morri^[25] 則确定为脫氧核糖的糖。这两种核酸因而分別叫做核糖核酸和脫氧核糖核酸。因为大部分动物来源的核酸类似从胸腺所得的核酸而植物来源的核酸类似从酵母而来的核酸, 因此一般均认为戊糖核酸具有植物的特征, 而脫氧戊糖核酸則具有动物組織的特征。

但是这样的区分永远不能避免人們的反对, 而且当这样的区分开始时, 即不断有例外的发现。它的不准确性的有力証明来自 Brachet^[26] 的組織化学的研究, Caspersson^[27] 所介紹的組織的紫外分光的測定以及 Davidson 和 Waymouth^[28] 的細胞化学成分的分析等。細胞和組織的化学成分的更准确的分析已因紙层析^[29~31]和离子交换技术^[31]的使用而变为可能。根据这些研究的結果, 一

般均断定細胞质中的組分包含有戊糖核酸，而細胞核中的組分則包含有脫氧戊糖核酸和一小部分戊糖核酸。因此人們証明这两种核酸均存在于所有类型的細胞中，不論其为植物来源的或动物来源的，并且也指出戊糖核酸和脫氧戊糖核酸在生物学方面的主要区别在于戊糖核酸主要存在于細胞质中，而脫氧戊糖核酸則完全或几乎完全存在于細胞核中。

核酸中糖的鉴定仅严格地进行过几次。到目前为止，从核酸中分离出来的糖仅为 D-核糖和 2-脫氧-D-核糖两种。在酵母^[23]和肝中^[33]的戊糖核酸所含的戊糖曾被确定为 D-核糖，但从层析的結果証明此种核糖与大部分其他来源^[31]所得到的戊糖核酸中的 D-核糖相同。从胸腺中所得到的脫氧戊糖核酸中的脫氧戊糖已被确定为 2-脫氧-D-核糖^[25]，但是用层析方法^[30]証明从其他来源所得到的脫氧戊糖核酸中的糖亦与 2-脫氧-D-核糖相同。在本书中‘戊糖核酸’与‘脫氧戊糖核酸’将作为属名在书中各处使用，除非在个别的地方涉及某些特殊的、成分已知的核酸时則不采用此属名。

(施嘉鍾 譯)

参考文献

- [1] Avery, O. T., Macleod, O. M. and McCarty, M. *J. exp. Med.* 1944, **79**, p. 137
- [2] Griffith, F. *J. Hyg., Camb.* 1928, **27**, p. 113
- [3] See Zamenhof, S. *Progr. Biophys.* 1956, **6**, p. 86; *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 351
- [4] Hershey, A. D. and Chase, M. *J. gen. Physiol.* 1952, **36**, p. 39
- [5] Hershey, A. D. *Virology* 1955, **1**, p. 108
- [6] Herriott, R. M. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 399
- [7] Doermann, A. H., Chase, M. and Stahl, F. W. *J. cell. comp. Physiol.*

- 1955, **45**, Supplement 2, p. 51
- [8] Stent, G. S. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1953, **39**, p. 1234
Stent, G. S. and Fuerst, O. R. *J. gen. Physiol.* 1955, **38**, p. 441
- [9] Fraenkel-Conrat, H. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 882
See also Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. A. and Williams, R. O. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 501
- [10] Gierer, A. and Schramm, G. *Nature, Lond.* 1956, **177**, p. 702
- [11] Glass, B. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 757
- [12] Shooter, K. V. and Butler, J. A. V. *Trans. Faraday Soc.* 1956, **52**, p. 734;
J. Polym. Sci. 1957, **23**, p. 705
- [13] Schumaker, V. N. and Schachman, H. K. *Biochim. biophys. Acta* 1957, **23**, p. 628
- [14] Bradley, D. F. and Rich, A. *J. Amer. chem. Soc.* 1956, **78**, p. 5898
- [15] Bendich, A., Pahl, H. B., Rosenkranz, H. S. and Rosoff, M. *Symp. Soc. exp. Biol.* 1958, **12**, p. 31
- [16] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Nature, Lond.* 1953, **171**, pp. 737, 964
- [17] Watson, J. D. and Crick, F. H. C. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 1953, **18**, p. 123
- [18] Delbrück, M. and Stent, G. S. *A Symposium on the Chemical Basis of Heredity* (Ed. W. D. McElroy and B. Glass): Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 699
- [19] Miescher, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 441
Plósz, P. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 461
Lübavín, N. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 463
Hoppe-Seyler, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 486
Miescher, F. *Med.-chem. Unters.* 1871, **4**, p. 502
- [20] Altmann, R. *Arch. Anat. Physiol., Lpz.* 1889, p. 524
- [21] Myrbäck, K. and Jorpes, E. *Hoppe-Seyl. Z.* 1935, **237**, p. 159
- [22] Fletcher, W. E. *Thesis*, University of London, 1948
- [23] Levene, P. A. and Jacobs, W. A. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 1909, **42**, pp. 2102, 2469, 2474, 2703
- [24] Levene, P. A. and London, E. S. *J. biol. Chem.* 1929, **81**, p. 711 and **83**, p. 793
- [25] Levene, P. A., Mikeska, L. A. and Mori, T. *J. biol. Chem.* 1930, **85**, p. 785
- [26] Brachet, J. *Arch. Biol., Liège* 1933, **44**, p. 519; 1937, **48**, p. 529; 1940, **51**, pp. 151, 167; *C. R. Soc. Biol., Paris* 1940, **133**, pp. 88, 90

- [27] Caspersson, T. *Skand. Arch. Physiol.* 1936, **74**, Supplement 8
Caspersson, T. and Schultz, J. *Nature, Lond.* 1939, **143**, p. 602
Caspersson, T. *J. R. micr. Soc.* 1940, **60**, p. 8
Caspersson, T. and Schultz, J. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 1940, **26**, p. 507
Caspersson, T. *Naturwissenschaften* 1941, **29**, p. 33
Caspersson, T. and Thorell, B. *Chromosoma* 1941, **2**, p. 132
Caspersson, T., Nyström, C. and Santesson, L. *Naturwissenschaften* 1941, **29**, p. 29; *Acta radiol., Stockh.* 1942, p. 46
- [28] Davidson, J. N. and Waymouth, C. *Nature, Lond.* 1943, **152**, p. 47; *Biochem. J.* 1944, **38**, pp. 39, 375, 379
- [29] Wyatt, G. R. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 243
- [30] Chargaff, E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 307
- [31] Magasanik, B. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 373
- [32] Cohn, W. E. *The Nucleic Acids* Vol. 1 (Ed. E. Chargaff and J. N. Davidson): Academic Press, New York, 1955, p. 211
- [33] Davidson, J. N. and Waymouth, C. *Biochem. J.* 1944, **38**, p. 379

第二章 核酸的提取

引 言

研究核酸的目的和許多生物化学研究的目的相同，是将提取出来的核酸的化学結構和反应性能与它在生物机体中的功能联系起来。高分子量和結構复杂的細胞成分的提取必然要涉及这样的問題：提取出来的制备物是否在各方面都和細胞中的原物质相同。合乎理想的提取方法必須能使所得到的制备物在每一点上都能保持它在原来細胞中的結構。但是，細胞中的核酸总是和蛋白质結合在一起的。現在还不能說，究竟細胞中所有的核酸是否都以核蛋白的形式存在。但是毫无疑問，即使不是所有的核酸，至少是大部分的核酸是以具有生物活性的核蛋白形式存在。核蛋白可以在一定程度上以不发生变化的状态被提取出来，但是很难区别天然的核蛋白与从細胞中同时提取出来的蛋白质和核酸所形成的类似蛋白质核酸盐那样的矯作物。曾經采用过許多方法从蛋白质中分离出核酸。但是，不論这些方法是温和的或是激烈的，一个事实总是存在，即細胞中的核酸若使是和蛋白质結合在一起，則原来和蛋白质結合的基团将被釋放出来，并且很可能有引起副反应的危險。

核酸的提取还因缺乏对它在細胞中的真正功能的了解而更加复杂起来。核酸和多种蛋白质（例如酶和抗体等）不同，它并不具有容易衡量的生物活性，所以拟定一种能令人满意的核酸提取方法的标准要比在相似的情况下拟定蛋白质的提取方法的标准困难得多，因此經常采用很多随意制定的标准，其中包括化学分析、分子量測定、紫外吸收光譜、粘度以及酸、碱滴定等。严格地說，这些标准只能用于制备方法之間的相互比較，并且在比較时还要利用

一些并不一定正确的假设,例如分子量愈高则制备方法愈好等。所以应当强调指出,不能象对某些蛋白质和病毒那样,现在对一个满意的核酸制备方法还没有绝对的标准。

Miescher^[1]、Altmann^[2]与 Kossel 和 Neumann^[3]最初所叙述的核酸制备方法是根据这样的假定来设计的,即核酸是不稳定的物质,在活性试剂和加热处理下会发生根本的变化。这个假定至今被公认为是正确的,因此所有近代的制备方法都尽可能地采用最温和的条件。可是在 1899 年 Neumann^[4]描述了一个改进 Altmann 法的方法,这个方法包括将切碎的生物器官在 3% 氢氧化钠溶液中进行加热,这在以后 30 年的时间中一直是制备核酸的典型方法^[5]。因此 Levene 和 Bass^[6]说:‘已经消除了对用激烈的方法从蛋白质中分离核酸的传统顾虑’。

这个发展可能加速了运用有机化学中的古典方法以研究核酸的水解产物,然而这也是采纳一个极端错误的核酸分子量数值的原因。因此,虽然当时 Miescher 和 Kossel 可能都已经意识到核酸的复杂性质及其巨大分子结构,而后来的工作者却认为核酸的分子还是比较小的。这个见解一直都没有被怀疑过,直到重新采用温和方法制取核酸时,核酸的大分子性质才又重新被人们认识。

细胞中的核酸是和蛋白质紧密地联结在一起的。在核酸的制备过程中最困难的步骤是将核酸从蛋白质中分离出来。现在的分离方法通常分为两个步骤。首先是核蛋白的提取,它可以以固体的状态,或不以固体的状态被提取出来。其次是使核酸与蛋白质分离。在这个方法中,当脱氧戊糖核酸和戊糖核酸都是和蛋白质结合在一起时,戊糖核酸与脱氧戊糖核酸的分离是根据 Mirsky 和 Pollister^[7]所描述的方法,即利用这两种核蛋白在电解质溶液中溶解度的显著差别来进行分离。过去在核酸与蛋白质分离后用以分离戊糖核酸和脱氧戊糖核酸^[8]以及采用强烈试剂的方法,都不能令人满意。

脫氧戊糖核蛋白的提取

除用酸或碱的方法外，提取核精蛋白和核組蛋白有两种主要方法。这两种方法的差别在于从細胞組織中提取核蛋白时所用溶液的离子强度不同。第一种方法是用水或低离子强度的溶液^[9~28]；第二种方法是用高离子强度的溶液^[7,29~30]。提取脫氧戊糖核酸这两种方法均可应用；但是制取核蛋白則以第一种方法为佳，因为有相当多的証据証明，在氯化鈉的濃溶液中(1M)将发生核酸和蛋白质的解离^[7,12,26,30,37,40~42]，并且在沉淀时形成一种在某些細節方面和原来核蛋白不相同的蛋白质核酸盐。

利用脫氧戊糖核蛋白在不同电解质^[7]溶液中溶解度的显著不同，可以使这种核蛋白和戊糖核蛋白完全分离。Frick^[30]曾詳尽地探討过脫氧戊糖核蛋白在不同濃度的氯化鈉溶液中的溶解度問題，他指出在0.14M氯化鈉溶液(生理盐水)中，脫氧戊糖核蛋白的溶解度只及它在純水中的溶解度的1%，而在1M氯化鈉的溶液中，它的溶解度至少是在水中的两倍。因此脫氧戊糖核蛋白在0.14M氯化鈉溶液中的溶解度最低。相反的，戊糖核蛋白通常比較容易溶解，尤其是能够在0.14M氯化鈉溶液中溶解。因此用0.14M氯化鈉溶液洗滌切碎的組織可以使脫氧戊糖核蛋白与戊糖核蛋白分离。

在从細胞中提取核蛋白时，必須防止酶降解；若是不可能防止，至少也要使酶降解减少到可以忽視的程度。大多数細胞中似乎都含有对核酸为特异的解聚酶。在提取时，在同一溶液中这种酶和核蛋白都以游离状态存在，因此有可能相互起反应。为了减少或阻止酶的作用，曾經提出过許多預防的方法。例如，所有的制备过程均应在0°C或更低温度下进行以降低酶反应的速度；通常还要加入酶的毒物如砷酸盐^[18]、檸檬酸盐^[34]、氟化物^[33]或螯合剂如乙二醇四乙酸鈉等以进一步抑制酶的作用。

已經強調过，在核酸和核蛋白的提取过程中必須避免加热以

及使用能使 pH 显著偏离中性的强烈化学试剂。此外，如 Chargaff^[43] 所首先指出的，也要避免使用高速絞碎器。現在已經肯定，在制备过程中过多地使用高速絞碎器(拌和器或匀浆器)会使大分子发生降解。这可能是由于局部受热或超声波空穴化作用所造成的后果。但是，为了打碎細胞，似乎仍有使用这种絞碎器的必要，但使用的時間应尽可能地縮短。

以下列举两种典型的制备方法，一种用低离子强度的溶液，另一种用高离子强度的溶液。

用低离子强度溶液制备小牛胸腺核組蛋白^[26]

將剛宰杀的小牛的胸腺除去油脂后，立即冰冻并迅速加以处理。往后的全部操作均須在 4~6°C 的冷室中进行。將每份 50 g 的胸腺在一裝有切削刀片的高速混和器中与 50 ml 預先調整到 pH 7 的、含有 0.1M 氯化鈉和 0.05M 檸檬酸鈉的、冰冷的混和液共同搗碎 30 秒钟。然后用离心机在 2600 g 下轉离 30 分钟，弃去上层清液。將所得沉降物重新悬浮在 100 ml 同样的氯化鈉-檸檬酸鈉溶液中，再进行轉离。这样的洗滌可以重复进行。

为了除去电解质，將沉降物重新充分悬浮在水中，并加以轉离。用这样的方法洗滌三次，每次用預先經碳酸氫鈉調整到 pH 7 的蒸餾水 50 ml。在最后一次的洗滌中沉降物应当发生膨脹，但不大溶解在上层清液中。將此胶状沉降物在高速混和器中与 250 ml 蒸餾水(調整到 pH 7)共同拌和 15 秒钟，并搖震过夜。此时应成极粘稠的溶液，这个溶液在高速混和器中攪拌一些時間后，在离心机中在 2000 g 下轉离 30 分钟。然后加入計算量的氯化鈉溶液(約 0.2M)使水溶液的濃度相当于 0.15M 氯化鈉以沉淀核蛋白。經轉离 30 分钟后，將沉淀出的核蛋白在离心机中用 0.15M 氯化鈉溶液洗滌，最后迅速用少量蒸餾水洗滌一次。

用高离子强度的溶液制备小牛胸腺核組蛋白^[7,37]

用上述方法制取小牛胸腺。往后的全部操作均須在 4~6°C 的冷室中进行。將每份 50 g 的小牛胸腺在一裝有切削刀片的高速混和器中与 50 ml 預先調整到 pH 7 的含有 0.1M 氯化鈉和 0.05M 檸檬酸鈉的冰冷的混合液共同拌和 30 秒钟。用离心机在 2000 g 下轉离 30 分钟，弃去上层清液。將沉降物重新悬浮在 100 ml 氯化鈉-檸檬酸鈉溶液中，再加以轉离，这样的洗滌可以重复进行。