

Chemical Biology : A Practical Course

化学生物学 实验教程

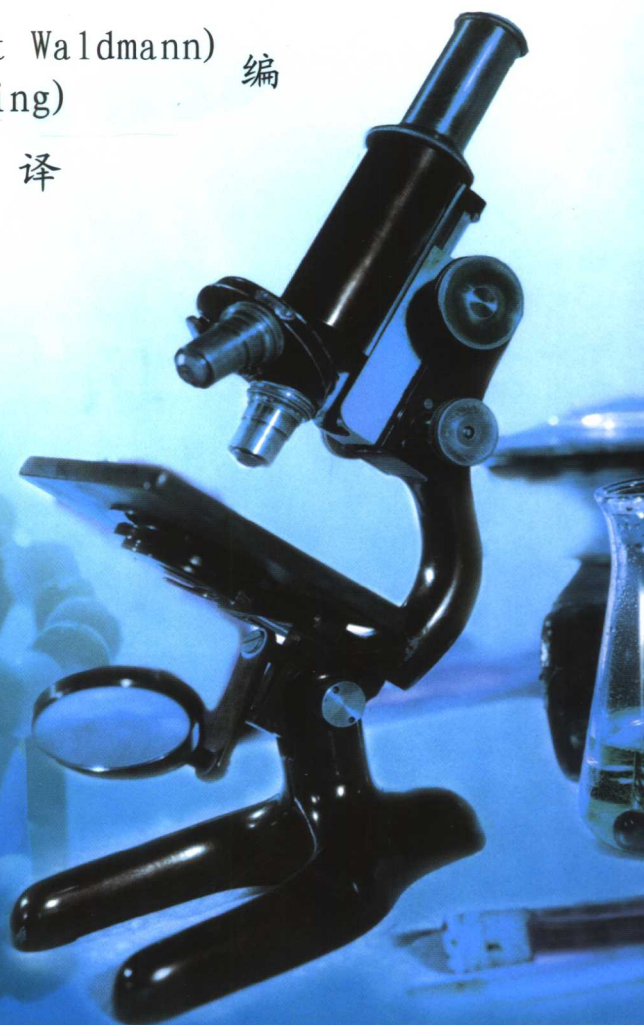
[德] H. 沃尔德曼 (Herbert Waldmann) 编
P. 詹宁 (Petra Janning)

方唯硕 赵颖 肖志艳 译



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心



Chemical Biology : A Practical Course

化学生物学 实验教程

[德] H. 沃尔德曼 (Herbert Waldmann) 编
P. 詹宁 (Petra Janning)

方唯硕 赵颖 肖志艳 译



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

化学生物学实验教程/[德] 沃尔德曼 (Waldmann, H.), 詹宁 (Janning, P.) 编; 方唯硕, 赵颖, 肖志艳译. 北京: 化学工业出版社, 2006.7

书名原文: Chemical Biology: A Practical Course

ISBN 7-5025-8800-0

I. 化… II. ①沃…②詹…③方…④赵…⑤肖… III. 化学生物学实验-教材 IV. 06-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 054488 号

Chemical Biology: A Practical Course/by Herbert Waldmann, Petra Janning

ISBN 3-527-30778-8

Copyright©2004 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

本书中文简体字版由 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 出版公司授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2006-0376

化学生物学实验教程

[德] H. 沃尔德曼 P. 詹宁 编

方唯硕 赵颖 肖志艳 译

责任编辑: 杨燕玲

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 胡艳玮

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 15¼ 字数 254 千字

2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8800-0

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

中文版序

化学生物学是一门正在成长并大有前途的学科。它要在化学和生物学交叉层面上揭示生物现象的化学基础。该学科基于对有关的生物现象的分析及结构基础,综合运用化学和生物学的手段揭示和探索亟待解决的问题。这一学科特别注重发展新的合成方法和策略,并运用于合成可用做研究生物现象的探针的化合物。

近年来化学生物学领域已经取得了长足的发展,在中国也是如此。中国已有数个机构开始教授化学生物学课程,设立研究专业,并组织了多次会议,也开始重视国际合作。例如2004年在北京中德中心举办,由清华大学李艳梅教授组织的中德青年化学生物学会议,而且已经计划将这一会议发展成一个系列会议,下一届将于2006年在德国由 Oliver Seitz 教授组织举办。

非常高兴我们的《化学生物学实验教程》一书被译成中文,使本书能被更多的人了解。为了成功地在化学和生物学交叉领域进行多学科研究,有必要更新学术训练的内容。应该在学生的大学学习过程中把两个领域的理论知识和实验技术都教授给他们。这本书就是进行这样多学科实验培训的基础,该书作为多特蒙德大学的学士和硕士培养计划和马普所国际研究课程的一部分已有多年。本书的目的是进行一种尝试,为建立化学生物学实验课程提供一份蓝图。某些实验如酶的分离、固相肽合成和钙的测定可以很容易地在其实验室进行操作,其他一些实验如 Ras 蛋白的法尼基化或蛋白质组分析尽管无法在任一实验设施条件下实施,但这些实验提供了一个例子,说明此类课程中可以包括这类实验。在多特蒙德大学,该实验课自2000年建立以来,选课学生的数量一直在持续上升。课程开始时仅有7名学生,但到2005/2006学年冬季已有76人。很自然在此期间我们要对课程的组织进行优化。在

最多 20 人组成的群体中，每个实验由 2~3 名学生在 1~2 名有经验的研究生指导下进行。对于更多人组成的群体我们要改变组织方式。我们增加了一次讲座，教授每个实验及其理论背景，并随之进行一次短的笔试，考察每个实验的基本情况。未能通过笔试的学生在上实验课之前必须通过一个口试。学生实验在一个实验课教室中进行，由 2 名有经验的研究生指导。此外，还配备 1~2 名了解实验细节的有经验的研究生，学生可以与之讨论问题并改正操作。我们还进一步优化了某些实验的流程。例如，蛋白质组学实验改进为用已知的蛋白质混合物代替酵母提取物，这样就可以进行一维电泳而不必非要用二维电泳。这样实验可在一周内完成，而不是原来的两周。我们每年都对课程进行改进，而且也邀请所有的同仁将他们认为有趣的实验推荐给我们，便于我们在新版中将这些内容包括进去。

最后，我们希望感谢中国医学科学院药物研究所的方唯硕教授及其合作者翻译此书以及化学工业出版社给予的帮助。

P. Janning
H. Waldmann
2005 年 8 月

译者的话

化学生物学是一门新兴的学科，其特点是多学科尤其是生命科学与化学在理论和研究方法上的交叉渗透。如张礼和院士与王梅祥教授在《化学生物学进展》（化学工业出版社，2005）一书前言中所述，“作为一门新型交叉学科，化学生物学的萌生缘于化学的长期发展和成熟以及生物科学和生物技术研究的积累，特别是世纪之交基因组学、蛋白质组学的兴起和迅猛发展”。化学生物学与另一门由化学与生物学交叉学科的生物化学的主要不同之处，可能在于生物化学“发展成了生物学的一个分支，而非化学的分支”。

化学生物学的理论和技术仍在发展之中，因此它究竟涵盖了多大范围的技术方法在目前阶段恐怕仍然是见仁见智的问题。在“Current Opinion in Chemical Biology”这一化学生物学标志性的综述类期刊中，组合化学、化学遗传学/化学基因组学、生物大分子结构与功能的关系、生物合成、生物体系与功能的模拟、生物检测分析新方法乃至新一代治疗方法等都被包括进化学生物学的庞大体系中。美国 Cornell 大学化学与化学生物学系的 T. P. Begley 教授在 Nature Chemical Biology 杂志中讨论化学生物学教育时指出的“Chemical biology, broadly defined as the application of chemistry to the study of molecular events in biological systems”和“Chemical biology represents a new integration of the subdisciplines of biological chemistry”，则给出了化学生物学最宽泛的概念，并强调了化学生物学研究人员掌握生物学研究方法与技术的重要性。

对于化学生物学的这一学科的发展而言，培养具有多学科知识背景、开阔的研究思路和广泛的生物学和化学技术训练的青年研究人员是十分重要的。国内外已有数本教科书和理论书籍出版，

其中国内有供研究生教学用的《化学生物学与生物技术》(科学出版社, 2005)和供本科生教学用的《化学生物学导论》(化学工业出版社, 2006); 国外类似的书籍也有数本。本书是德国马普研究所和多特蒙德大学研究生实验课使用的教学手册, 是第一本可能也是至今唯一一本化学生物学的实验教程。因此, 本书鲜明的特色应该使它能够为我国的化学生物学青年研究人员的培养起到借鉴和参考作用。

对于化学生物学这样的交叉学科而言, 即使是这样一本不算厚的实验教程, 其所涉及的学科和术语也非常广泛, 靠一人之力很难保质而迅速地完成。因此, 方唯硕和赵颖分别承担了侧重化学和生物学的章节, 对于计算机分子设计的内容则由肖志艳承担。我们还尽力统一了一些反复出现的名词的译法, 希望这本译作看起来风格比较统一。

最后, 我们还要感谢化学工业出版社的编辑在成书前后给与的帮助和支持。化学工业出版社近年出版了许多涉及生物医药领域研究前沿的图书, 希望我们的译作能为他们的图书系列添彩。

译者
2006年7月

英文版序

化学与生物学（当然还包括物理学）虽然都是自然科学的核心，但在过去几十年间的发展历程却大不相同。化学从19世纪崛起，其成就包括新材料的发展（这在当时是人言必称的）和对疾病的治疗，这种盛况一直持续到20世纪。然而，人们渐渐发现主流化学研究所关注的大多数分子（即便说不是全部的分子）都可用已知的方法学制备。人名反应的发现也在20世纪90年代出现停滞。不过认为现在的化学已是一门成熟科学的说法则是错误和缺乏远见的。化学方法学还有待大力完善使之成为一门真正有效和可靠的科学，而且人们应认识到只有少数处于研究领域前沿和经验丰富的研究小组才能掌握那种具有挑战性的合成工作。不过日渐明朗的是人们的智力探险和挑战已从化学自身所固有的领域向其相邻学科——生物学迁移。20世纪下半叶之前，生物学还基本上是以现象描述为主的科学。不过自20世纪60年代以来，研究重点逐渐地但却是不可抗拒地转向生物学中与分子有关的内容。今天许多老的生物学家抱怨年轻一代只想操纵基因但却不再知道怎样给树进行分类。过去几十年里生物学已毫无争议地取得无数成功。最近的成就则是对人和其他基因组成功的破译，从而使生物学发展成为“大时代”（big time）的科学。在20世纪与21世纪之交，生物学正处于化学在一个世纪之前所处的类似的成功状态。特别要指出的是，如同19世纪与20世纪之交的物理和化学，这些相邻学科的研究目标、题目、方法以及最重要的研究方向都在趋同。今日的化学研究目标已不再是20世纪50年代和60年代时具有张力的小分子。对共价键的强度和有关理论的证实与证伪以及反应机理的揭示都失去了吸引力。大型的天然物分子、超分子结构、（生物）聚合物的化学与性质的结合则走进人们的视线。简言

之，人们感兴趣的对象在逐渐变大。

生物学已从描述性地观察现象的层次进入到分子科学的层次。最热门的研究题目包括（生物）大分子的结构及彼此间的相互作用，它们与低分子质量化合物及超分子结构如细胞膜和细胞骨架的作用以及这些作用对生物学现象的影响。两个相邻学科的界限逐渐模糊，新的交叉领域应运而生。如同 19 至 20 世纪出现了物理化学和化学物理学。当 Fritz Haber 在卡尔斯鲁厄担任“气相反应化学”（Chemie der Gasphasenreaktionen）讲席，并发展了使他获得诺贝尔奖的氮气和氢气合成氨的方法之前，还没有物理化学这一学科。

在 20 世纪与 21 世纪之交，化学与生物学的关系也是如此，“化学生物学”（Chemical Biology）就是正在形成的新领域。现在物理化学已经成为全世界化学系讲授和研究化学的三大支柱之一。可以预见在不远的将来，以关注化学和生物学边缘的一个分支学科将会成为第四大支柱。出人意料的是“生物化学”并未担任这一角色。这可能主要是因为它发展成了生物学的一个分支，而非化学的分支。

如果化学与生物学出现了交叉（我们对此毫不怀疑），化学和生物学的学术训练必须变化以适应新一代学生进行学术探索的要求和期望。也需要有新的并且相对容易建立的课程。如果不增加实际操作的训练，此后的跨学科研究所必需的多学科培训便无法实现。

据我们所知，本书中涉及的课程是首次引入大学教学。如有类似情况我们不了解的话，我们愿意修正这一说法。多特蒙德大学化学专业的学生已成功地学习了这一课程。那些参加国际马普化学生物学研究计划的化学和生物学的学生，也在由该计划提供的研究生教育中学习了这门课程。这一研究计划是由多特蒙德大学和 Bochum 大学的化学和生物学系以及位于多特蒙德的马普分子生理学研究所共同举办的。

本课程既包括了基础性实验如酶的分离、肽和寡核苷酸的固相合成和与蛋白质组学有关的实验，也包括取材于过去 10 年来马普所内从事化学与生物学的研究组共同研究课题的专业性更强的实验。一般来说，我们会设计两个或更多的针对不同学科的实验，

以清楚地表明化学生物学研究的跨学科性质。例如脂质化多肽和蛋白质的合成及其生物物理性质的测定及在细胞生物学实验中的应用就是这样的一个例子。不过迄今为止,实际训练课程中仅包含了极少数这样成功的例子。

我们意识到书中对与我们自己的研究计划有关的实验的偏爱,以及有些实验所需要的仪器并不是在任何化学和生物系中都能得到常规的应用。不过为了建立第一个实验课程,从可行性上说这样做是有必要的。

每章以相同的格式组成:首先是一个短小的摘要和有关实验的学习目标,然后是理论背景,着重讲述理解实验所需的知识。针对一个特定题目并未给出有关背景的全部内容,而是给出了必要的参考文献供进一步阅读。理论背景之后是实验流程,分为两部分。在“准备”部分中列出了学生开始实验前老师需要进行的准备工作。第二部分中描述了实验课中具体操作步骤。当然,根据个别情况(比如学生的时间安排)可能需要修改这种常规做法,而且在不同的环境中要优化时间配置,包括实验课中哪些部分要在学生实验前准备好,哪些由学生完成。

一般而言,实验课由2到3个学生组成的一个小组每周进行一次实验(约每天5小时)。全部实验课在一个学期内完成,学生总数在20人以下。第10章涉及到的蛋白质组实验分两周做完。第一周为二维电泳,第二周进行胰蛋白酶消化和蛋白质的质谱鉴定。每组学生由1到2名研究生指导。这种训练非常深入,并且要大量的投入和人力。不过我们认为这种努力非常值得,因为成绩合格的学生反馈非常好,且退课率为0。我们认识到这本书中描述的实验课只是第一次尝试,今后有余地大量改进并加以超越。我们愿意邀请所有同仁向我们推荐能满足上述目的且有代表性和教育价值的实验,以便再版时能加入这些实验。

最后我们要感谢我们的同事,是他们的努力使这些实验能在一门学生培训课程中常规化而且可靠地操作。在相应的实验中提及了他们的名字。我们还要感谢 Wiley-VCH 的 Gudrun Walter 和 Frank Weinreich 协助编辑和对我们的鼓励。

缩略语

2-D	二维
A	腺苷
AA	氨基酸
abbrev.	缩略语
Ac	乙酸盐 / 乙酰
ACE	血管紧张素转化酶
AdoMet	S-腺苷甲硫氨酸
ADP	腺苷二磷酸
AIDS	获得性免疫缺损综合征
approx.	大约
APT1	酰化蛋白硫酯酶 1
aq.	水 (的)
ATP	腺苷三磷酸
B	碱基
bAP	生物素化碱性磷酸酶
BG	生物素-半乳糖
Bhoc	二苯甲羰基
Boc	叔丁氧羰基
BOP	(苯并三唑-1-氧代) 三 (二甲氨基) 磷鎓六氟磷酸盐
bp	碱基对
BPB	溴酚蓝
BSA	小牛血清白蛋白
Bu	丁基
iBu	异丁基
Bz	苯甲酰基
C	胞苷
ca.	大约

cf.	参见
CHAPS	3-[(3-胆酰胺基丙基)-二甲氨基]-1-丙磺酸盐
cmc	临界微团浓度
CNE	氰乙酯
CoA	辅酶 A
CPG	可控孔度玻璃
DABCYL	4-(4-二甲氨基偶氮)-苯甲酰基
DAG	二酰基甘油
DCC	二环己基碳二亚胺
DCM	二氯甲烷
ddH ₂ O	双蒸水
DDI	DNA-定向固定化
DEAE	二乙基氨基乙基 (偶联到琼脂糖颗粒上)
DHB	2,5-二羟基苯甲酸
DIC	N,N-二异丙基碳二亚胺
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
DMAP	4-二甲氨基-吡啶
DMF	二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
Dmt	二甲氧三苯甲基
DNA	脱氧核糖核酸
ds	双链
DTE	二硫赤藓糖醇
DTT	二硫苏糖醇
e. g.	例如
EDTA	乙二胺四乙酸
ELISA	酶联免疫吸附测定法
eq.	当量
ER	内质网
ESI	电喷雾离子化
et al.	等人
etc.	等事 (物)
Far	法尼基
FITC	荧光素-5-异硫氰酸酯

FKBP	FK506 结合蛋白
fl.	全长
Fmoc	9-芴甲氧羰基
FPLC	快速蛋白质液相层析
FPP	法尼基焦磷酸酯
FRET	荧光共振能量转移
FTase	法尼基转移酶
G	鸟苷
Gal	半乳糖
GalNAc	<i>N</i> -乙酰半乳糖胺
GalNAz	<i>N</i> -叠氮乙酰半乳糖胺
GAP	GTP 酶活化蛋白
GC	气相色谱
GDP	鸟苷二磷酸
GEF	鸟嘌呤核苷酸交换因子
Ger	牻牛儿基
GFP	绿色荧光蛋白
Grb2	生长因子受体结合蛋白 2
GTP	鸟苷三磷酸
HATU	<i>N</i> -[(二甲基)-1 <i>H</i> -1,2,3-三唑[4,5- <i>b</i>]吡啶-1-基亚甲基]- <i>N</i> -甲基甲铵六氟磷酸盐 <i>N</i> -氧化物 (即 2-(7-偶氮苯并三氮唑)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸酯)
HBSS	Hanks 平衡盐溶液
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -苯并三唑-1-基)(二甲基)亚甲基]- <i>N</i> -甲基甲铵六氟磷酸盐- <i>N</i> -氧化物 (即苯并三氮唑- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲六氟磷酸酯)
HEPES	<i>N</i> -(2-羟乙基)哌嗪- <i>N'</i> -(2-乙磺酸)
HIV	人免疫缺陷病毒
HOBT	<i>N</i> -羟基苯并三唑
HPLC	高效液相色谱
HRP	辣根过氧化物酶
i. e.	即
IC ₅₀	半数抑制浓度
Ig	免疫球蛋白

IP ₃	肌醇-1,4,5-三磷酸酯
IPG	固相 pH 梯度
IR	红外
LAH	氢化锂铝
m/z	质荷比
MALDI	基质辅助激光解吸附离子化
MALDI-TOF	基质辅助激光解吸附离子化-飞行时间 (质谱)
MAP	促分裂原活化蛋白
Me	甲基
MeCN	乙腈
mod.	修饰的
MPI	(德国) 马普研究所
mRNA	信使核糖核酸
MS	质谱
MTases	甲基转移酶
NBD	7-硝基-1,2,3-苯并氧杂噁二唑
NF-AT	坏死因子-AT
NMR	核磁共振
no.	编号
Nu	亲核剂
OD	光密度
Pi	无机磷酸根
P. PH.	土豆磷酸化酶
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
Pal	棕榈酰
PalCoA	棕榈酰辅酶 A
PalTase	棕榈酰转移酶
Pbf	2,2,4,6,7-五甲基-苯并二氢呋喃-5-磺酰基
PBS	磷酸缓冲盐
PC12 细胞	嗜铬细胞瘤细胞
pcCMT	异戊二烯基半胱氨酸羧甲基转移酶
PCR	聚合酶链反应
PenStreb	青霉素 /链霉素
PEP	多肽工程研究计划

PG	保护基
Pip	哌啶
PIP ₂	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸
PNA	肽核酸
POPC	1-棕榈酰-2-月桂磷脂酰胆碱或 1-十六酰-2-[顺-9-十八烯酰]- <i>sn</i> -甘油-3-磷酸胆碱
PP	焦磷酸酯
PP1	以吡唑并 [3,5-d] 嘧啶为母体的抑制剂
PSD	源后衰变
PyBOP	(苯并三唑-1-基氧代)三(四氢吡咯) 磷鎓六氟磷酸盐
Pyr	吡啶
quant.	定量的
QSAR	定量构效关系
Rab	来自大鼠脑的类 Ras 蛋白
R	比率
Ras	大鼠腺瘤
R _{max}	最大比率
R _{min}	最小比率
Rib	核糖
RNA	核糖核酸
RP-HPLC	反相高效液相色谱
RP-LC-MS	反相液相色谱-质谱
rpm	每分钟转数
rt	室温
S. Ph	蔗糖磷酸化酶
s/n	信噪比
SAM	S-腺苷-L-甲硫氨酸
SAR	构效关系
SDS	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SLBA	糖-凝集素结合实验
SNP	单核苷酸多态性
Sos	<i>Son of Sevenless</i> 基因的 1596 个残基的产物
SPE	固相萃取

SPPS	固相肽合成
ss	单链
sSMCC	磺酸琥珀酰-4-(<i>N</i> -马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸盐
STV	链霉菌亲和素
STV-HRP	链霉菌亲和素-辣根过氧化物酶
T	胸苷
TAMRA	6-羧四甲基罗丹明
TCA	三氯乙酸
TEA	三乙胺
TEMED	四甲基乙二胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TIS	三异丙基硅烷
TOF	飞行时间
Tris	三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIZMA)
Tris-HCl	三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐
UV	紫外
v/v	每份体积中的体积数 (体积分数) ^①
vol	体积
w/v	每份体积中的质量 (质量浓度, 1% = 10g/L) ^①
wt	野生型

① v/v 和 w/v 按国内标准已废止使用, v/v 改为体积分数, w/v 按 1% (w/v) = 10g/L 的关系换算——译者注。

目 录

1 引言：化学生物学——一门化学与生物学交叉的新学科	1
1.1 研究实例 1: Ras 超家族脂质化蛋白的化学生物学	5
1.2 研究实例 2: Rab 蛋白的化学生物学	10
1.3 研究实例 3: FK506 天然生物靶点的鉴定和作为 化学生物学研究工具的蛋白质二聚体的设计	13
1.4 研究实例 4: 蛋白质-DNA 复合体的共价捕获	16
1.5 研究实例 5: 细胞成像和荧光探针标记体内蛋白质	19
1.6 研究实例 6: 利用化学工具调节细胞表面结构	20
1.7 研究实例 7: 激酶等位基因的特异性抑制	21
1.8 结论	23
1.9 参考文献	23
2 DNA 合成与 DNA 杂交	25
2.1 摘要	27
2.2 学习目的	27
2.3 理论背景	27
2.3.1 基础知识	27
2.3.2 寡聚核苷酸的化学合成	29
2.3.3 与合成的寡聚核苷酸杂交	33
2.4 实验操作	36
2.4.1 准备	36
2.4.2 寡聚核苷酸 (16 个碱基) 的合成、纯化和 产率测定	36
2.4.3 完全匹配 (6-8, 7-9) 和单一碱基错配 (6-9, 7-8) 双链 T_M 值的确定	36