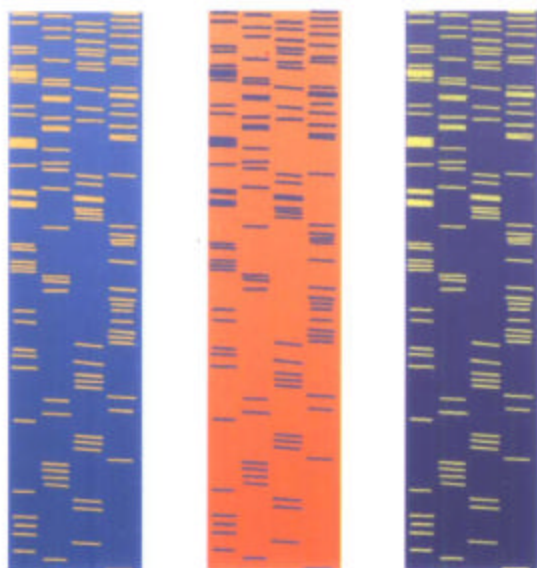




面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

生物化学与分子 生物学实验技术

杨安钢 毛积芳 药立波 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

面向 21 世纪 课程教材
Textbook Series for 21st Century

生物化学与分子 生物学实验技术

杨安钢 毛积芳 药立波 主编



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内容提要

本书是教育部“高等教育面向 21 世纪教学内容和课程体系改革计划”的研究成果,是“面向 21 世纪课程教材”。

本书共分四部分,第一、二部分系统地介绍了生物化学与分子生物学基础理论;第三部分设计了 17 个生物化学及分子生物学实验;第四部分附列了实验须知,生物化学与分子生物学常用试剂的配制及参数。可供医学院校本科生、研究生以及从事生物化学与分子生物学工作的医务人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验技术/杨安钢,毛积芳,
药立波主编. —北京:高等教育出版社,2001
ISBN 7-04-009129-1

I. 生… II. ① 杨… ② 毛… ③ 药… III. ① 生物
化学—实验—技术—高等学校—教材② 分子生物学—实验—技
术—高等学校—教材 IV. ① Q5② Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 70703 号

生物化学与分子生物学实验技术
杨安钢 毛积芳 药立波 主编

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

电 话 010—64054588

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

邮政编码 100009

传 真 010—64014048

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 北京民族印刷厂

开 本 850 × 1168 1/16

印 张 21.75

字 数 540 000

版 次 2001 年 2 月第 1 版

印 次 2001 年 8 月第 2 次印刷

定 价 23.40 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

目 录

第一部分 生物化学技术基本理论

第一章 分光光度技术	(3)	二、配体的选择	(24)
第一节 基本原理	(3)	三、配体与载体之间的偶联	(24)
一、光的基本知识	(3)	四、使用方法	(25)
二、朗伯-比尔(Lambert-Beer)定律	(3)	第五节 高效液相色谱法	(26)
第二节 分光光度计结构简介	(5)	一、高效液相色谱仪	(27)
一、光源	(6)	二、HPLC的应用及进展	(28)
二、分光系统(单色器)	(6)	第三章 电泳技术	(32)
三、狭缝	(6)	第一节 基本原理	(33)
四、比色杯	(6)	第二节 醋酸纤维薄膜电泳	(35)
五、检测系统	(6)	第三节 琼脂糖凝胶电泳	(36)
第三节 分光光度技术的应用	(7)	第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(37)
一、测定溶液中物质的含量	(7)	第五节 等电聚焦	(39)
二、用紫外光谱鉴定化合物	(7)	第六节 电泳后大分子的检测	(40)
第四节 分光光度法的误差	(8)	第四章 离心技术	(43)
第五节 常见国产分光光度计的使用	(8)	第一节 基本原理	(43)
一、721型分光光度计	(8)	一、重力场中的沉降	(43)
二、751型分光光度计	(9)	二、相对离心力	(44)
三、使用分光光度计的注意事项	(10)	三、沉降速度	(45)
第二章 液相色谱技术	(12)	四、沉降系数	(46)
第一节 色谱原理及基本装置	(13)	五、沉降时间	(47)
第二节 凝胶色谱	(14)	第二节 离心机的构造	(47)
一、原理	(14)	一、离心室	(48)
二、凝胶的种类	(15)	二、驱动系统	(48)
三、凝胶色谱使用方法	(18)	三、冷冻系统	(48)
四、应用	(19)	四、真空系统	(48)
第三节 离子交换色谱法	(20)	五、操作系统	(48)
一、基本原理	(20)	第三节 离心转头和离心管	(48)
二、离子交换剂的类型	(20)	一、角度转头	(49)
三、IEC的方法	(22)	二、甩平转头	(49)
第四节 亲和色谱	(23)	三、垂直转头	(49)
一、固相载体的选择	(24)	四、区带转头	(49)

五、连续流动转头	(50)	第六章 发光分析技术	(85)
六、其他转头	(50)	第一节 分子荧光分析技术	(85)
七、离心转头的常用标记及转头参数	(50)	一、荧光的产生	(85)
八、离心管	(50)	二、荧光检测的类型	(86)
第四节 各型离心机的性能及适用范围	(51)	三、荧光分析的基本参数	(87)
范围	(51)	四、环境因素对荧光分析的影响	(89)
一、低速离心机	(51)	五、荧光定量测定的方法	(90)
二、高速离心机	(52)	六、荧光分析仪器的基本结构	(90)
三、超速离心机	(53)	七、几种不同类型的荧光分析测定装置	(91)
第五节 离心方法	(53)	第二节 化学发光分析	(93)
一、差速沉淀离心	(53)	一、化学发光的一般机制	(93)
二、速度区带离心	(54)	二、化学发光定量分析的原理	(94)
三、等密度离心	(57)	三、常用的化学发光物质及反应系统	(96)
四、分析性离心	(58)	四、化学发光的测定	(97)
五、离心操作要领	(59)	五、化学发光的应用	(97)
第五章 放射性同位素技术	(60)	第七章 生物大分子制备技术	(99)
第一节 放射性同位素的性质	(60)	第一节 选择材料及预处理	(99)
一、放射性同位素的特点	(60)	第二节 细胞的破碎及细胞器的分离	(100)
二、放射性强度及其度量单位	(61)	一、细胞的破碎	(100)
第二节 放射性同位素示踪	(61)	二、细胞器的分离	(100)
一、同位素示踪的基本原理	(61)	第三节 提取和纯化	(101)
二、放射性同位素示踪实验具体步骤	(62)	一、蛋白质(包括酶)的提取	(101)
三、几种常用的放射性同位素示踪法	(67)	二、蛋白质的分离纯化	(102)
第三节 放射性测量	(68)	三、核酸的提取	(103)
一、闪烁计数器的工作原理	(68)	四、核酸的纯化	(104)
二、晶体闪烁计数	(69)	五、核酸的浓缩	(104)
三、液体闪烁计数	(70)	六、DNA、RNA 的定量	(105)
四、放射测量的注意事项	(74)	七、核酸的凝胶电泳和相对分子质量参照物	(105)
第四节 放射防护	(75)	第四节 浓缩、干燥及保存	(107)
一、放射性的危害性及防护的必要性	(75)	一、样品的浓缩	(107)
二、放射防护的三原则	(76)	二、干燥	(108)
三、内照射和外照射的防护	(76)	三、保存	(108)
四、放射性污染的消除	(80)		
五、合理处理放射性同位素三废	(82)		
第二部分 分子生物学技术基本理论			
第八章 DNA 重组技术	(113)	四、构建和筛选基因组文库及 cDNA 文库	(114)
第一节 目的基因的获取	(114)	五、聚合酶链反应	(115)
一、直接从染色体中分离	(114)	第二节 分子克隆载体与宿主的选择	(116)
二、化学合成法	(114)		
三、用逆转录酶合成 cDNA	(114)		

一、质粒载体·····	(116)	三、宿主细胞·····	(147)
二、噬菌体·····	(118)	四、重组载体导入哺乳动物细胞·····	(147)
三、噬菌粒·····	(118)	五、基因表达产物的检测·····	(148)
四、粘粒·····	(119)	第十章 分子杂交技术 ·····	(149)
五、宿主细胞·····	(119)	第一节 核酸杂交的基本理论——	
第三节 分子克隆常用的工具酶 ·····	(119)	DNA 的变性与复性·····	(149)
一、限制性核酸内切酶·····	(120)	一、DNA 变性·····	(149)
二、DNA 聚合酶·····	(122)	二、DNA 复性·····	(150)
三、DNA 连接酶·····	(123)	三、核酸分子杂交·····	(151)
四、末端脱氧核苷酸转移酶·····	(123)	第二节 核酸探针及其标记物 ·····	(151)
五、核酸酶·····	(123)	一、核酸探针的种类及应用·····	(151)
六、脱氧核糖核酸酶·····	(123)	二、标记物的应用及选择·····	(153)
七、碱性磷酸酶·····	(123)	第三节 放射性同位素标记核酸	
第四节 DNA 限制性内切酶酶切及		探针·····	(154)
片段回收·····	(124)	一、切口平移法(nick translation)·····	(154)
一、限制性内切酶运用的设计·····	(124)	二、随机引物法(random primer)·····	(155)
二、限制性内切酶的酶切·····	(124)	三、用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5'	
三、琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 和 DNA		末端·····	(155)
片段的回收·····	(125)	四、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段快速	
四、琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的		标记 DNA 探针末端·····	(155)
纯化·····	(128)	第四节 非放射性物质标记核酸	
第五节 外源基因与载体的连接 ·····	(129)	探针·····	(156)
一、粘性末端连接·····	(129)	一、生物素(biotin)标记核酸探针·····	(156)
二、平末端的连接·····	(130)	二、地高辛标记核酸探针·····	(156)
三、DNA 的胶内连接·····	(130)	第五节 核酸分子杂交方法 ·····	(158)
第六节 重组 DNA 导入宿主细胞 ·····	(131)	一、核酸分子杂交的类型·····	(158)
一、大肠杆菌的转化·····	(131)	二、核酸分子杂交实验因素的优化·····	(163)
二、电脉冲穿孔法转化大肠杆菌·····	(132)	第六节 蛋白质分子杂交 ·····	(167)
第七节 含重组质粒的宿主菌落的		一、凝胶滞留法(gel retardation assay)·····	(168)
筛选与鉴定·····	(133)	二、Southern Western 印迹·····	(168)
一、利用宿主细胞遗传表型的改变进行		三、Western Blotting·····	(168)
筛选·····	(133)	四、免疫沉淀·····	(168)
二、分析重组子分子结构特性进行鉴定·····	(134)	第十一章 cDNA 文库的构建与筛选 ·····	(170)
第九章 重组 DNA 表达技术 ·····	(136)	第一节 概述:cDNA 文库概念·····	(170)
第一节 大肠杆菌表达系统·····	(136)	第二节 cDNA 文库构建的策略·····	(171)
一、E. coli 表达载体的结构·····	(136)	一、mRNA 的制备·····	(171)
二、常用的大肠杆菌表达载体·····	(137)	二、cDNA 的制备·····	(173)
三、表达中的其他问题·····	(142)	三、载体的选择·····	(174)
第二节 哺乳动物细胞表达系统 ·····	(143)	四、连接与转化·····	(175)
一、真核表达载体·····	(143)	五、库容量·····	(175)
二、外源 DNA·····	(147)		

第三节 cDNA 文库的筛选..... (176)	四、其他领域..... (192)
第十二章 聚合酶链反应(PCR)技术..... (179)	第十三章 DNA 序列测定技术..... (194)
第一节 PCR 基本原理和影响因素..... (179)	第一节 序列测定的技术和策略..... (194)
一、基本原理..... (179)	一、双脱氧链终止法..... (194)
二、PCR 各步骤简介..... (179)	二、DNA 化学降解法..... (197)
三、材料..... (180)	三、测序策略..... (198)
四、方法..... (181)	第二节 Sanger 双脱氧链终止法测 序..... (199)
五、注意事项..... (181)	一、测序反应..... (199)
六、PCR 条件优化..... (183)	二、变性聚丙烯酰胺凝胶..... (200)
第二节 逆转录 PCR 技术..... (184)	三、应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段进行的双脱氧测序反应..... (205)
一、原理..... (184)	第三节 全自动激光荧光 DNA 测序..... (207)
二、材料..... (184)	第十四章 蛋白质分子结构测定技术..... (209)
三、方法..... (184)	第一节 蛋白质一级结构的测定..... (210)
四、注意事项..... (185)	一、蛋白质或肽的氨基酸组成的定量 测定..... (211)
第三节 PCR-SSCP 银染技术..... (185)	二、蛋白质或肽的末端测定..... (212)
一、原理..... (186)	三、亚基拆离、肽链降解和肽段的分离..... (216)
二、材料..... (186)	四、肽段的氨基酸顺序测定..... (219)
三、方法..... (186)	五、重叠肽法确定肽链的一级结构..... (220)
四、注意事项..... (187)	六、蛋白质分子中二硫键和酰胺基位置的 确定..... (221)
第四节 PCR 衍生技术介绍..... (188)	第二节 蛋白质晶体结构分析..... (222)
一、重组 PCR(recombinant PCR, RPCR)..... (188)	第三节 质谱技术..... (231)
二、原位 PCR(<i>in situ</i> PCR)..... (188)	一、质谱技术简介和原理..... (231)
三、固着 PCR(sanchorde PCR, SA-PCR)..... (188)	二、质谱技术在蛋白质、多肽结构测定 中的应用..... (233)
四、不对称 PCR(asymmetric PCR)..... (189)	第四节 核磁共振技术..... (234)
五、锚定 PCR(anchored PCR)..... (189)	一、核磁共振确定蛋白质三维结构的基本 原理..... (234)
六、反向 PCR(inverse PCR)..... (189)	二、蛋白质溶液三维结构的计算..... (237)
七、着色互补 PCR(color complementation PCR)..... (190)	
八、多重 PCR(multiplex PCR)..... (190)	
第五节 PCR 技术的应用..... (190)	
一、分子生物学科研究领域..... (190)	
二、临床医学领域..... (191)	
三、动植物学的研究..... (192)	

第三部分 生物化学与分子生物学教学实验

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀 反应..... (243)	蛋白质相对分子质量..... (248)
实验二 蛋白质含量测定..... (245)	实验四 等电聚焦法测定蛋白质等 电点..... (252)
实验三 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定	实验五 脲酶 K_m 值简易测定..... (255)

实验六 碱性磷酸酶的分离纯化	(257)	实验十一 核酸的琼脂糖凝胶电泳	(273)
实验七 血清白蛋白、 γ -球蛋白的 分离纯化及鉴定	(261)	实验十二 DNA 与 RNA 的定量测定	(274)
实验八 胰凝乳蛋白酶的制备及活力 测定	(267)	实验十三 RNA 的合成及其抑制	(277)
实验九 蛋清溶菌酶的分离	(269)	实验十四 质粒 DNA 的提取	(280)
实验十 组织 DNA 与 RNA 的分离和 提纯	(271)	实验十五 聚合酶链反应	(283)
		实验十六 分子杂交实验	(284)
		实验十七 DNA 重组实验	(289)

第四部分 附 录

I 实验须知	(297)	常用参数	(317)
前言	(297)	一、一些化学试剂的分级	(317)
一、实验室规则	(297)	二、易变质及需要特殊方法保存的试剂	(317)
二、实验室常识	(297)	三、常用酸碱的相对密度和质量分数、 物质的量浓度的关系	(318)
三、实验室安全	(298)	四、常用酸碱体积分数、相对密度和物质 的量浓度的关系	(318)
四、实验室急救	(299)	五、一些常用化合物的溶解度(20℃)	(320)
五、移液器的使用及注意事项	(299)	六、某些有机溶剂的主要物理常数	(320)
六、玻璃仪器的清洗及各种溶液的配制	(301)	七、冷却剂和干燥剂	(321)
七、实验误差与数据处理	(302)	八、常用蛋白质(酶)的理化特性	(322)
II 生物化学与分子生物学常用试剂 的配制及参数	(305)	九、层析法常用资料	(327)
试剂的配制	(305)	十、同位素衰减表	(330)
一、溶液浓度的表示与计算	(305)	十一、离心机转速与相对离心力的换算	(330)
二、常用缓冲溶液的配制	(308)	十二、数字词头	(331)
三、体积分数酸、碱溶液的配制	(313)	十三、常用药品中英文对照及分子式、 相对分子质量表	(331)
四、闪烁液的配方	(313)		
五、硫酸铵饱和度的常见表	(314)		

《生物化学与分子生物学实验技术》

主 编 杨安钢 毛积芳 药立波

副主编 刘新平

陈南春

方定志

王淳本

编 者 (按编写章节顺序排列)

杨安钢 (第四军医大学)

郭立安 (第四军医大学)

毛积芳 (第二军医大学)

冯伟华 (第二军医大学)

方定志 (华西医科大学)

陈 萍 (第四军医大学)

王淳本 (同济医科大学)

陈南春 (第四军医大学)

刘新平 (第四军医大学)

赵忠良 (第四军医大学)

白 怀 (华西医科大学)

朱 红 (华西医科大学)

韩 骅 (第四军医大学)

胡惠民 (第二军医大学)

邹鲁峰 (第二军医大学)

药立波 (第四军医大学)

王国华 (第四军医大学)

前 言

现代生物化学与分子生物学是在生物化学、遗传学、微生物学、生物物理学、免疫学以及信息科学相互渗透融汇的基础上发展起来的,已经成为生命科学和医学中的前沿学科。其突飞猛进的发展,离不开生物化学与分子生物学技术的进步,从某种意义上说,技术与方法的发展、进步和创新是推动生物化学与分子生物学理论飞速发展的直接动力。

自 20 世纪 50 年代分子生物学创立以来,新的实验技术和方法层出不穷,特别是近 20~30 年来,分子克隆技术日新月异,像分子杂交、聚合酶链反应(PCR)等技术已经越来越广泛并常规地用于基础医学研究和临床诊断治疗的各个领域,并不断得到新的充实与发展。

21 世纪是人类从根本上认识健康与疾病的时代,人类基因组计划的测序工作将在近年内完成,随后的后基因组计划也已开始实施,这意味着人类生命的“全部密码”被解读,严重威胁人类健康的恶性肿瘤、心血管疾病、遗传病等将被攻克,所有这些都建立在现代分子生物学理论与技术创新的基础之上。作为新世纪培养的高等医学院校的大学生,不了解和掌握这些最新的科技成果,就必然会落伍。

为了培养基础扎实、知识面宽、适应性强、有创新意识和能力的高素质人才,1994 年第四军医大学生化教研室在已故苏成芝教授指导和关怀下,编写了“生物化学及分子生物学实验与技术”一书,并在本科生和研究生教学中应用了五年,积累了一些经验和体会。在此基础上,我们本着继承传统实验教学中重视医学基础理论和技能训练的思想,对原书作了修订,精简了纯验证性内容和重复性内容,较多地增加了现代分子生物学技术的基本理论与方法。生物化学与分子生物学实验课不仅要为本专业理论课学习服务,从高素质人才培养的总目标出发,在有限的教学时间内,主要的教学目的还应当使学生掌握作为 21 世纪的医务工作者必须了解和掌握的生物化学与分子生物学实验技术的基本原理和方法,并具有现代化和系统化的知识和技能。

本书分为四部分,第一部分和第二部分共 14 章,分别详细和系统地介绍了现代生物化学与分子生物学的主要技术理论,可针对不同的教学对象选用,有些章节要求学生掌握,有些章节只作一般了解或作为参考资料,为保持内容的完整与连贯,我们将这部分章节用小号字表示。总之,我们希望给学生提供一个更丰富的独立思考与自学的条件,使他们在继续学习中不断提高。第三部分提供的实验项目,都是我们在教学中采用过的,并取得较好的教学效果,可供选用。第四部分附录汇集了生物化学与分子生物学常用的资料和数据,对独立进行科研的研究生更为需要。

本书由第四军医大学、第二军医大学、华西医科大学和同济医科大学的有关人员共同完成,是愉快合作的结果。由于本书编写过程中增加的内容比较多,也比较新,难免有不妥之处,希望广大读者提出宝贵意见。

编 者

2000 年 3 月

责任编辑	田 军	张庆波
封面设计	张 楠	
责任绘图	吴文信	
版式设计	马静如	
责任校对	许月萍	
责任印制	陈伟光	



第一部分

生物化学技术基本理论

第一章

分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用,不同物质由于其分子结构不同,对不同波长光线的吸收能力也不同,因此,每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液,虽对可见光无吸收作用,但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度技术(分光光度法)主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术,其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

分光光度法是比色法的发展。比色法只限于在可见光区,分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比色法用的单色光通过滤光片产生,谱带宽度为 40~120 nm,精度不高,而分光光度法则要求近于真正单色光,其光谱带宽最大不超过 3~5 nm,在紫外光区可到 1 nm 以下。单色光通过棱镜或光栅产生,具有较高的精度。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光子组成的,具有二重性,即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征,可用下式表示:

$$\lambda = c/\nu$$

式中 λ 为波长,具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率,即每秒钟振动次数。 c 为光速,等于 $299\,770 \pm 4\text{ km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波,列成表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200 nm~10 μm (1 μm = 1 000 nm) 之间。其中 200~400 nm 为紫外光区,400~760 nm 为可见光区,760~10 000 nm 为红外光区。

二、朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律

朗伯 - 比尔定律是比色分析的基本原理,这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

表 1-1 电磁波谱

区 域	波 长		来 源
	m	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-8}$	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	$0.76 \sim 50 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
远红外	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	$50 \sim 1\,000 \mu\text{m}$	分子振动与分子转动
微波	$10^{-3} \sim 1$	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子转动
无线电波	$1 \sim 10^3$	$1 \sim 1\,000 \text{ m}$	核磁共振

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后,由于溶液吸收了一部分光能,光的强度就要减弱:若溶液浓度不变,则溶液的厚度愈大(即光在溶液中所经过的途径愈长),光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 (入射光的强度),通过液层厚为 L 溶液后,光的强度为 I_t (透过光的强度),则 $\frac{I_t}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几,称为透光度(transmittance),用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少,但实践证明,透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系,只有透光度的负对数($-\lg T$)才随着溶液层厚度的增加而成正比例地增加,即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例式写成等式,得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度(A)(absorbance),又称为消光度(E)(degree of extinction)或光密度(D)(optical density)。所以

$$A = K_1 L$$

式中 K_1 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液的浓度不变时,吸光度与溶液液层的厚度成正比,这就是朗伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后,溶液液层的厚度不变而浓度不同时,溶液的浓度愈大,则透射光的强度愈弱,其定量关系如下:

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度; K_2 为比例系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和液层的

厚度,以及溶液的温度等。

上式表明,当溶液液层的厚度不变时,吸光度与溶液的浓度成正比,这就是比尔定律。

3. 朗伯-比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响,则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来,得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC$$

$$A = KLC$$

即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比,这就是朗伯-比尔定律。

在上式中,若 L 用厘米表示, C 用克/升表示,则比例常数 K 称为吸光系数,其值取决于入射光的波长,溶液的性质和温度等,而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米表示, C 用摩尔/升表示,则上式中的比例常数用 ϵ 表示,得到

$$A = \epsilon LC$$

式中 ϵ 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient), 其值相当于 $L = 1 \text{ cm}$, $C = 1 \text{ mol/L}$ 时,在一定波长下的吸光度,它是物质的特性常数。

$$A = \epsilon LC = \epsilon \times 1 \times 1 = \epsilon$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长,但其摩尔吸光系数不一定相同。 ϵ 值愈大,说明该物质溶液对光吸收愈强烈,则比色测定的灵敏度愈高。

第二节 分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来,并测量其强度的仪器称为分光光度计。

分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用(全波段)分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成,即光源、单色器、狭缝、样品池、检测系统。如图 1-1 所示。

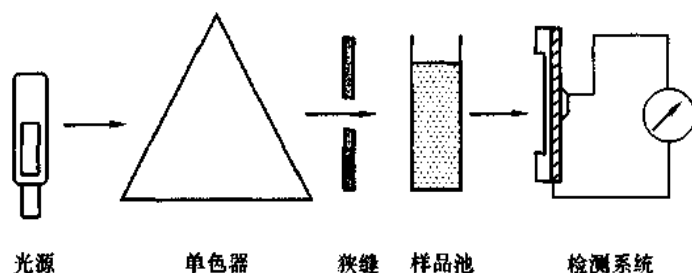


图 1-1 分光光度计各部分示意图

一、光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱,稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯(钨丝灯、卤钨灯等),气体放电灯(氢灯、氘灯及氙灯等),金属弧灯(各种汞灯)等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320~2 000 nm 连续光谱,最适宜工作范围为 360~1 000 nm,稳定性好,可用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400 nm 的紫外线,可用作紫外光区分光光度计的光源。红外线光源则由纳恩斯特(Nernst)棒产生,此棒由 $\text{ZrO}_2:\text{Y}_2\text{O}_3 = 17:3$ (Zr 为锆,Y 为钇)或 $\text{Y}_2\text{O}_3, \text{GeO}_2$ (Ge 为锗)及 ThO_2 (Th 为钍)之混合物制成。汞灯发射的不是连续光谱,能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处,一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换,如换用的灯型不同,还需要调节灯座的位置和焦距,氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的,且有固定的发射方向,安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

二、分光系统(单色器)

单色器是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置,由棱镜或光栅构成。

用玻璃制成的棱镜色散力强,但只能在可见光区工作,石英棱镜工作波长范围为 185~4 000 nm,在紫外光区有较好的分辨率,而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短,色散程度越好,越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计,其波长刻度在紫外区可达到 0.2 nm,而在长波段只能达到 5 nm。

有的分光系统是衍射光栅,即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线,刻线处不透光,于是通过光的干涉和衍射现象,较长的光波偏折的角度大,较短的光波偏折的角度小,因而形成光谱。

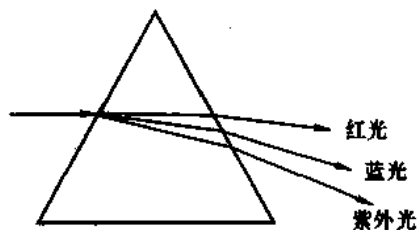


图 1-2 棱镜分光器

三、狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙,用来调节入射单色光的纯度和强度,也直接影响分辨率。狭缝可在 0~2 nm 宽度内调节,由于棱镜色散力随波长不同而变化,较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

四、比色杯

比色杯也叫样品池、吸收器或比色皿,用来盛测定溶液,各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等,否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区,在紫外光区测定时要用石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面,用后要及时洗涤,可用温水或稀盐酸、乙醇以至铬酸洗液(在浓酸中浸泡时不要超过 15 min),表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

五、检测系统

有许多金属能在光的照射下产生电流,光愈强电流愈大,此即光电效应。因光照射而产生的电

流叫做光电流。受光器有两种,一是光电池,二是光电管。光电池的组成种类繁多,最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流较强,可直接用微电流计量出。但是,当连续照射一段时间后会产生产生疲劳现象而使光电流下降,要在暗中放置一段时间才能恢复。因此使用时不宜长期照射,随用随关,以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极,阴极是用对光敏感的金属(多为碱土金属的氧化物)做成,当光射到阴极且达到一定能量时,金属原子中的电子发射出来。光愈强,光波的振幅愈大,电子放出愈多。电子是带负电的,被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小,所以需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管,在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多,这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果,模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机连用等,数字输出则通过模拟/数字转换装置如数字式电压表等进行。

第三节 分光光度技术的应用

一、测定溶液中物质的含量

可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液(浓度已知的溶液)和未知液(浓度待测定的溶液)的吸光度,将两者进行比较。由于所用吸收池的厚度是一样的,可用下式进行计算。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{KC_xL}{KC_sL} = \frac{C_x}{C_s}, \text{即 } C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

式中 C_x 代表未知液的浓度, C_s 代表标准液的浓度, A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值,式中只有 C_x 是未知的,可由上式计算得之。

也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度,绘制标准曲线,在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线,然后测定出未知液的吸光度,即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长,这样做有两个好处:①灵敏度大,物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异;②可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸光率(ϵ)求得测定物质的浓度,由于物质的 ϵ 是已知的,读取光径(液层厚度)为 1 cm 时溶液的吸光度(A),则可以用下式计算溶液中物质的浓度(C):

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此式常在紫外光吸收法时应用,无需显色反应,操作方便。

二、用紫外光谱鉴定化合物

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度

的溶液,测定此溶液对每一种单色光的吸光度,然后以波长为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制吸光度—波长曲线,此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线,因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时,则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时,其吸收光谱曲线中峰值的大小不同,但形状相似,即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的,含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外光吸收光谱比较简单,同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致,但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外,单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构,必须与其他方法配合。紫外光吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

第四节 分光光度法的误差

在分光光度法中,即使将各种因素都控制好,对于浓度过大或过小的样品,误差仍然很大。因为浓度过大的样品,其吸光度过高,影响检测器的灵敏度,且读数标尺刻度的精度差,误差亦大,故难于准确。浓度过低的样品,其吸光度小,则因与仪器本身因素有关,也容易引起检测器标尺上的读数误差。例如光源波动的影响:当光源强度改变1%、吸光度为1.0时,只有0.4%的误差,但在吸光度为0.045时,则可产生9.6%的误差。实际上,在整个透光度(或吸光度)范围的不同部分均有不同的误差。从理论上推算,相对误差的最小的部分在透光度为36.8%处(或吸光度为0.4343处),故通常认为测定值在吸光度0.20~0.80范围内(透光度为20%~65%)误差较小,超出此范围,相对误差均会增大。

影响分光光度法精确度的主要原因还有光谱纯度。分光光度计应能正确选出光源光谱中所需部分波长作为入射光,一般应保持光谱带宽度在10 nm以下,如果测定样品有很狭窄的吸收峰,就必须有更小的光谱宽度,所以分光光度计大多均有可调的狭缝。在实际使用中,用较大狭缝虽可提高重现性,但由于加大光谱宽度反而降低了准确度。

散射光也是引起误差的重要因素。这里所说的散射光是指一切未经测定溶液吸收,而又落到检测器上引起干扰的光,如室内自然光,经过某些漏洞进入仪器而明显增大了透光度,故高灵敏度的分光光度计宜安装的光线较暗的室内。散射光也包括能透过比色皿的非测定需要的其他波长的光,实际上是光谱不纯,但因效果与散射光一样,故也称为散射光干扰。散射光干扰对高浓度测定特别有害,能使吸光度降低,标准曲线的高浓度部分向下弯曲。

第五节 常见国产分光光度计的使用

一、721型分光光度计

这一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计。其波长范围为360~800 nm,在410

~710 nm 之间的灵敏度较好。

使用方法如下：

1. 灵敏度选择钮放在“1”档(如调不到“0”时选用较高的档)。
2. 转动波长选择钮,选用所需的波长。
3. 接通电源(指示灯亮)。
4. 揭开比色杯暗箱盖,转动“0”电位钮使电表指针对准 $T=0$ 处。
5. 将比色杯放入比色杯架,使空白管对向光路,盖好比色杯暗箱盖。转动“100”电位钮,调准电表指针使之指向 $A=0$ ($T=100$) 处。
6. 拉动比色杯架的拉杆,使测定杯进入光路,迅速从电表上读取吸光度值,记录。测读过程中,随时推回拉杆到原位,使空白杯进入光路,并转动“100”电位钮,使指针回到 $A=0$ 处。
7. 比色完毕后,关上电源开关,取出比色杯,将比色杯暗箱盖好,清洗比色杯并晾干。

二、751 型分光光度计

这是一种可供从紫外光到红外光区(200~1 000 nm)测量吸收光谱的较高级分光光度计。在波长 320~1 000 nm 范围内,用钨丝白炽灯泡作光源,在波长 200~320 nm 范围内,用氢灯作光源。此型分光光度计操作较复杂,操作时务必要按操作规程进行,以防损坏仪器。

使用方法如下：

1. 准备
 - (1) 将光门关闭。
 - (2) 将选择开关放在“校正”位置,打开电源开关(稳压电源总开关)后,根据需要选择灯源,钨灯为可见光,氢灯为紫外光光源。
 - (3) 将波长刻度盘转到所需波长的位置。
 - (4) 选择适应的光电管。光电管选择拉杆推入为紫敏光电管(200~625 nm);拉杆拉出为红敏光电管(625~1 000 nm),使之与选用的波长和光源相一致(为减少杂散光,可将滤光片推入光路,一般无此必要)。
 - (5) 根据需要选用比色杯。350 nm 以上者可用玻璃比色杯,350 nm 以下者应用石英杯,并将比色杯放入比色架。将试样室盖盖好。
2. 调透光度的零点
 - (1) 旋转暗电流调节钮,使 0 位计指针指到 0 位。为了得到较好结果,每测量一次应随时进行

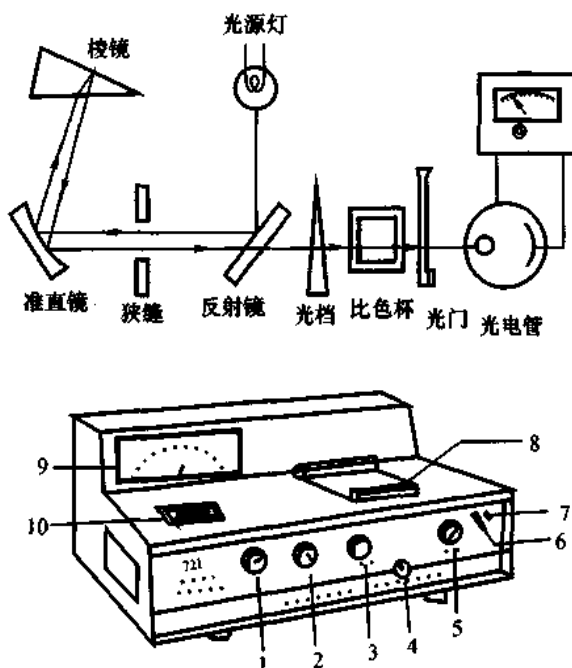


图 1-3 721 型分光光度计原理图和仪器图

1. 波长选择钮 2. “0”电位钮 3. “100”电位钮 4. 比色杯拉杆 5. 灵敏选择钮 6. 电源开关 7. 电源开关 8. 暗箱盖 9. 读数表 10. 波长读数窗

调整,使指针指向0位。

(2) 顺时针转动灵敏度钮三圈左右,此时透光度改变1%,0位计指针可偏转三小格。

3. 调透光度100%点

(1) 拉动换样拉杆,使空白管移入光路之中。

(2) 旋转读数钮,使测量读数盘指到透光度100%处。

4. 测量

(1) 扳动选择开关到“ $\times 1$ ”处。

(2) 拉开光门,使单色光通过样品后射到光电管上。

(3) 旋转狭缝选择钮,使0位计指针指向0位,并用灵敏度钮细调,使指针准确指到0位上。

(4) 拉动换样拉杆,将待测溶液移入光路之中。此时0位指针偏离0位。

(5) 旋转读数钮,使0位计的指针重新指向0位。此时,从读数盘上便可读出透光度和吸光度数值。

(6) 如果样品过浓,透光度 $<10\%$,吸光度 >1 时,可将选择开关放到“ $\times 0.1$ ”位置。此时,当0位计指针重新移到0位时,读取盘上的透光度值必须乘0.1,吸光度值则应加1,才是真实的数据。

(7) 在测定中,如需反复校准仪器的透光度的100%时,仪器选择开关的校正档便相当于读数盘上100%的位置。所以需调100%时,可以将选择开关扳回“校正”档,用灵敏度钮调零位计的“0”位即可,不必要旋转刻度盘到100%位置上。

三、使用分光光度计的注意事项

1. 分光光度计必须放置在固定而且不受振动的仪器台上,不能随意搬动,严防振动,潮湿和强光直射。

2. 比色杯盛液量以达到杯容积 $2/3$ 左右为宜。若不慎将溶液流到比色杯的外表面,则必须先用滤纸吸干,再用擦镜纸或绸布擦净,然后才能把比色杯放入比色杯槽内。移动比色杯槽要轻,以防溶液溅出,腐蚀机件。

3. 不可用手拿比色杯的光学面,禁止用毛刷等物摩擦比色杯的光滑面。

4. 用完比色杯后应立即用自来水冲洗,再用蒸馏水洗净。若用上法洗不净时,可用5%的中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡,也可用新配制的重铬酸钾-硫酸洗液短时间浸泡,之后立即用水冲洗干净。洗涤后应把比色杯倒置晾干或用滤纸条将水吸去,再用擦镜纸轻轻揩干。

5. 一般应把溶液浓度尽量控制在吸光度值0.1~0.7的范围内进行测定。这样所测得的读数误差较小。如吸光度不在此范围内,可调节比色液浓度,适当稀释或加浓,使其在仪器准确度较高的范围内进行测定。

6. 仪器连续使用时间不应超过2 h,每次使用后需要间歇半小时以上才能再用。

7. 每套分光光度计上的比色杯及比色杯槽不得随意更换。

8. 分光光度计内放有硅胶干燥袋,需定期更换。

(第四军医大学 杨安钢)

参考文献

- 1 首都医学院主编. 医用生物化学实验. 天津: 天津科学技术出版社, 1987
- 2 李学骥主编. 医用化学实验技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986
- 3 湖南医学院第二附属医院. 临床生化检验. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1981
- 4 郭尧君编著. 分光光度技术及其在生物化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987
- 5 生物化学编审小组. 生物化学实验指导. 北京: 人民卫生出版社, 1987

第二章

液相色谱技术

色谱技术是生物大分子研究中必不可少的工具,已被普遍认为是当前分离生化样品最有效的手段。不管是哪一种色谱方法,其最基本的特征是具有一个固定相和一个流动相,各种物质得以分离的最基本原因就在于它们在这两个相间具有不同的分配系数。当两相作相对运动时,这些物质在两相间进行反复多次的分配,从而得到分离。

色谱技术有多种分类方法。按两相状态来分类,有气相色谱法和液相色谱法两种。气相色谱以气体作流动相,液相色谱以液体作流动相。在生物大分子分离中,主要以液相色谱为主,故气相色谱在此不做介绍。液相色谱按照作用机制来分类有:离子交换色谱、凝胶排阻色谱、亲和色谱、反相色谱、疏水作用色谱、正相色谱等几种。若按操作方式来分类,又有柱色谱、薄层色谱、纸色谱等数种。按照制备量来分类,有分析色谱和制备色谱。按照填料的强度来分类,有经典的软胶色谱和现代高效液相色谱,等等。尽管分类方法很多,但按照色谱作用机制的分类方法是最重要和最基本的方法,也是大家最常用的方式,表2-1列入了各种分离生物大分子的液相色谱技术。在生物大分子的纯化过程中通常以液相色谱为主,故本章以液相色谱为例,介绍它的原理及在生物大分子分离提纯方面的应用。

表 2-1 蛋白质纯化技术

分离依据	分离方法 (色谱类型)	特 点	用 途
分子大小	凝胶过滤	分级分离,分辨率适中,非常适于脱盐(分级分离时流速较慢(≥ 8 h/循环)的情况,脱盐时流速快(30 min/循环),容易受限于样品体积)	大规模纯化的最后一步。用于去除微量杂质及集合体脱盐可用于任何阶段,特别是步骤衔接时的缓冲液更换
电荷	离子交换	分辨率通常较高,流速较快(合适的填料),容量很大,样品体积不受限	最适于早期纯化,即大体积样品及蛋白纯度较低时使用
等电点	色谱聚焦	分辨率较高,流速快容量很大,样品体积不受限	纯化最后阶段
疏水特性	疏水作用	分辨率较高,流速大容量大,样品体积不受限	适于任何阶段,特别适用于离子强度较高时,如沉淀、离子交换和亲和层析后
	反相	分辨率较高,流速很快,容量大	适于最后阶段,特别适于相对分子质量较小的肽
生物亲和性	亲和	分辨率极高,流速大,容量大,体积不限	适于任何阶段,特别是样品浓度小、杂质含量多时使用

同其他分离技术相比较,液相色谱方法具有以下优点:①分离效率高,选择性好,适用于各种多

元复杂混合物的分离;②应用范围从无机物到有机物,从天然物质到合成产物,从小分子到大分子,从一般化合物到生物活性物质等,可以说几乎包括了所有类型物质;③根据分离对象,按不同分离机制,可广泛选择色谱柱,洗脱体系和操作参数;④既是精细的分离纯化方法,也是快速、灵敏、准确、简便的分析检测手段;⑤它可以处理从痕量以至较大规模制备的样品量,可以实现在线检测和自动化操作。

第一节 色谱原理及基本装置

液相色谱法既可以用比较复杂的装置,也可以用简单的设备。用一根适宜的柱子,一个流量控制装置和一个部分收集器就可以构成最基本的分离装置。

色谱柱是整个过程的中心,在使用时必须满足下述要求:

- (1) 柱底应有一凝胶的支持层,该支持层应保证溶液能从柱中自由流出。
- (2) 支持层下面的死体积要尽可能小。
- (3) 柱子的出口应有一个合适的接头与检测器和部分收集器相连。
- (4) 以玻璃管和塑料管较好。柱子的基本结构如图 2-1。

早期,通过柱子的液体以重力输入为主,这时柱子入口高于出口,以产生静的水压差。但在洗脱期间,贮液容器中洗脱液液面的下降会降低流体压力,从而也降低了洗脱液通过柱子的流速。目前多使用蠕动泵来输送洗脱液。蠕动泵可以产生一个稳定的液体流速而被广泛地使用,它可以用

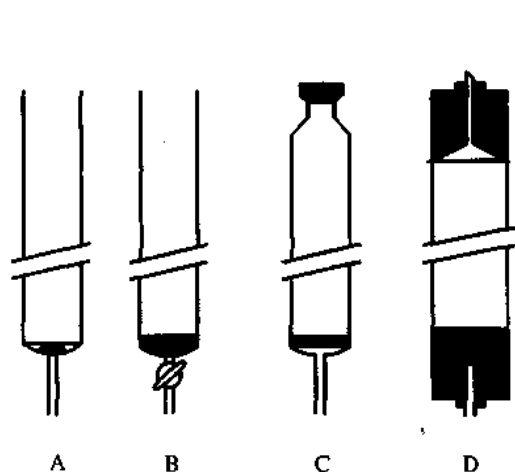


图 2-1 柱子的基本结构

A. 最简单的玻璃柱,其末端拉成毛细管,出口装有脱脂棉塞;B. 带有封闭多孔玻璃滤板的玻璃柱,其出口装有毛细管阀,玻璃滤板下面装有玻璃珠,以减小死体积;C. 顶端装有球面玻璃接头的玻璃柱,出口接上毛细管,多孔玻璃过滤板下面的死体积最小;D. 柱塞式色谱柱,柱底部都装有起支撑作用的多孔层,柱中的柱塞用“O”形圈密封,并用一锥体固定,以防止移动

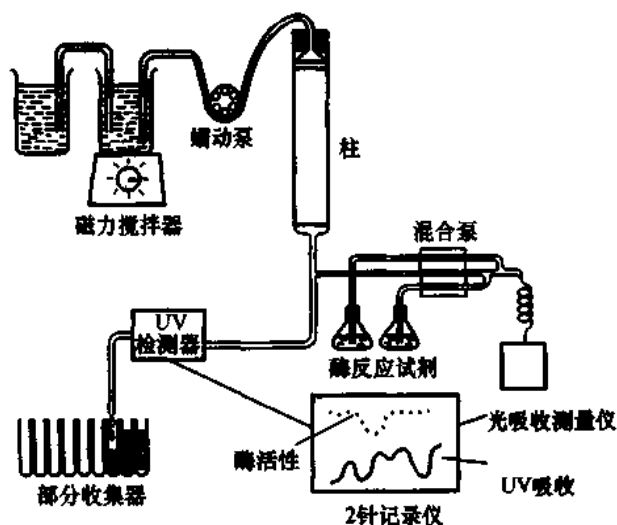


图 2-2 经典柱色谱的基本装置

于上样品,输送缓冲液,产生梯度洗脱方式。

分离生物大分子时,液体流出后要尽快地进行检测,基本装置如图 2-2。生物大分子一般在 280 nm 进行连续的检测(Trp + Tyr)或者在更灵敏的 220→205 nm(肽带)波长进行检测,最后使用收集器收集所需的组分。

第二节 凝胶色谱

凝胶过滤法是利用分子筛效应分离提纯各种具有生物特性的高分子物质的一种方法。

一、原理

凝胶排阻色谱法所用的载体为一定孔径的多孔性亲水性凝胶。当分子大小不同的混合物通过这种凝胶柱时,如图 2-3 所示,直径大于孔径的分子将不能进入凝胶内部,便直接沿凝胶颗粒的间隙流出,称为全排出。较小的分子在容纳它的空隙内,自由出入,造成在柱内保留时间长。这样,较大的分子先被洗脱下来,而较小的分子后被洗脱下来,从而达到相互分离的目的。洗脱时峰的位置和该物质相对分子质量有直接的定量关系。在一根凝胶柱中,颗粒间自由空间所含溶液的体积称为外水体积 V_0 ,不能进入凝胶孔径的那些大分子,当洗脱体积为 V_0 时,出现洗脱峰。

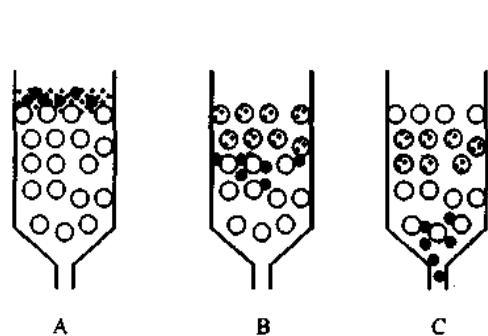


图 2-3 凝胶色谱原理

A. 加样:含有溶质分子的溶液,通过网状结构的凝胶粒子;
B. 洗脱:小分子溶质自由扩散于凝胶粒子的缝隙中而进入凝胶相,大分子溶质被排阻于外;C. 分离:大分子物质由于扩散受阻,在凝胶中行径较短而最先洗脱下来,小分子物质从凝胶相中扩散出来,最后被洗脱下柱

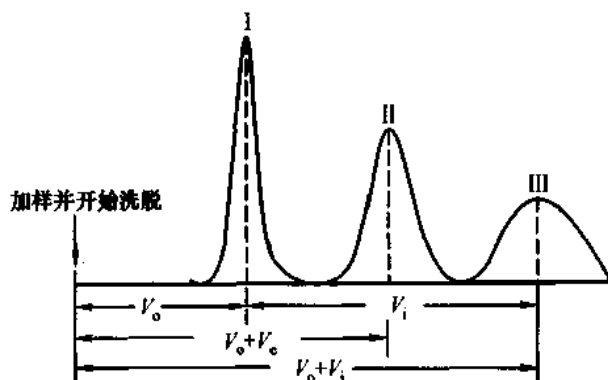


图 2-4 凝胶色谱中洗脱的三种峰

凝胶颗粒内部孔穴的总体积称为内水体积 V_i ,能全部透入凝胶的那些小分子,当洗脱体积为 $V_0 + V_i$ 时出现洗脱峰,介于其间的分子将在洗脱体积为 $V_0 + V_e$ 时,出现洗脱峰(图 2-4)。

我们将分子筛分配系数定义为:

$$K = V_e / V_i \quad (2-1)$$

若生物大分子的分子为球形,其 K 与生物大分子的相对分子质量间存在如下关系:

$$K = -b \lg M_r + c \quad (2-2)$$

其中 b 和 c 为常数

实验已证实这一关系的存在(图 2-5)。图中两条标准曲线分别是使用交联葡聚糖 G-75 和 G-100 取得的,其纵坐标用 V_e 表示,因对一固定的柱来讲, V_e 是常数,所以 V_e 与 K 相当。

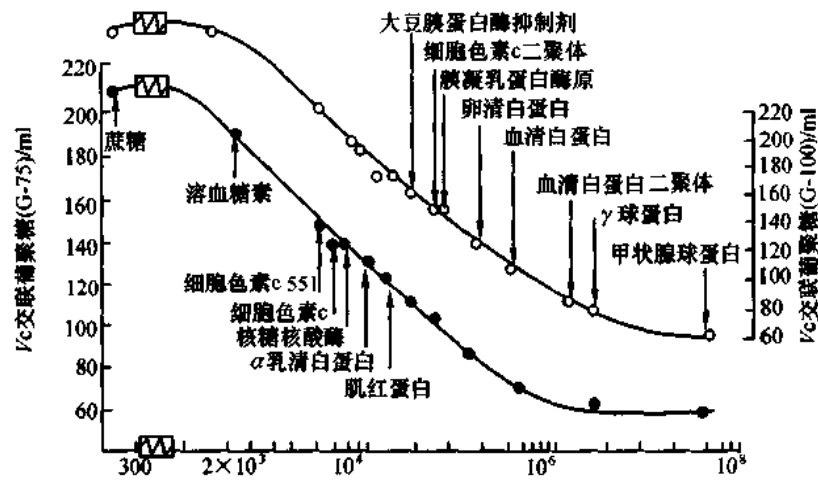


图 2-5 排阻体积与相对分子质量的关系

二、凝胶的种类

用作凝胶的载体物质有交联葡聚糖、聚丙烯酰胺和琼脂糖。

交联葡聚糖商品名为 Sephadex, 它的原料是细菌分泌的链状葡聚糖。通过交联剂 1-氯代-2,3-环氧丙烷交联而成。交联剂添加越多, 孔径越小, 吸水量也就越小; 反之越大。商品 Sephadex 以 G 值表示不同交联度, G 值越大, 空穴也越大, G 后边的数字表示每克干胶膨胀时吸水量的 10 倍, G-25 表示每克干胶可吸附 2.5 g 水。各种型号的交联葡聚糖及其适用范围列于表 2-2。这类凝胶的使用量尤其是 G-75 以上的凝胶正日益减少。

表 2-2 Sephadex G 型主要物理性质

型 别	吸水量 (ml/g)	干粒子直径 / μm	筛 孔	分离范围(相对分子质量)	
				肽类和球蛋白	多 糖
G-10	1.0	40~120	60	<700	<700
G-15	1.5	40~120	60	<1 500	<1 500
G-25 粗	2.5	100~300	40~60	1 000~5 000	100~5 000
中		50~150	60~100		
细		20~80	100~200		
超细		10~40	250~400		
G-50 粗	5.0	同上	同上	1 500~30 000	500~10 000
中					
细					
超细					

续表

型 别	吸水量 (ml/g)	干粒子直径 / μm	筛 孔	分离范围(相对分子质量)	
				肽类和球蛋白	多 糖
G-75 细	7.5	40~120	60	3 000~70 000	1 000~50 000
超细		10~40	250~400		
G-100 细	10.0	40~120	60	4 000~150 000	1 000~100 000
超细		10~40	250~400		
G-150 细	15.0	40~120	60	5 000~400 000	1 000~150 000
超细		10~40	250~400		
G-200 细	20.0	40~120	60	5 000~800 000	1 000~200 000
超细		10~40	250~400		

1. 交联葡聚糖凝胶

2. 聚丙烯酰胺凝胶 聚丙烯酰胺凝胶是丙烯酰胺和 $\text{N,N}'$ -次甲基二丙烯酰胺聚合而成。这种凝胶的商品名为 Bio-gel P。其孔穴大小也是随交联增多而减少,并用 P 值表示不同的交联度, P 值越大,孔径也越大。各种型号的生物胶及其适用范围列于表 2-3。

表 2-3 Bio-gel-P 的各种型号及物理性质

型 号	每克干胶吸水量 /g	每克干胶床体积 /ml	肽和蛋白的 工作范围	全排阻的相对 分子质量	室温最小溶胀 时间/h
P2	1.5	3.8	200~2 000	3 000	2~4
P4	2.4	5.8	500~3 000	3 000	2~4
P6	3.7	8.8	1 000~4 000	5 000	2~4
P10	4.5	12.4	3 000~17 000	25 000	2~4
P30	5.7	14.8	3 000~30 000	40 000	10~12
P60	7.2	19.0	3 000~50 000	60 000	10~12
P100	7.5	19.0	5 000~100 000	200 000	24
P150	9.2	24.0	5 000~150 000	250 000	24
P200	14.7	34.0	5 000~200 000	300 000	48
P300	18.0	40.0	10 000~300 000	$\geq 500 000$	48

3. 琼脂糖凝胶 琼脂糖是从海藻琼脂中分离除去琼脂胶后的中性级分。它是 D-半乳糖和 3,6-脱水 L-半乳糖相间重复结合而成的链状化合物。

这种糖链依靠糖基之间的氢键作用,形成稳定的网状结构,网状结构的疏密依靠改变琼脂糖浓度的方法来控制,因此商品也是以含水状态供应。因为琼脂糖凝胶靠的是氢键相交联,一般型号只能在 $0\sim 40^\circ\text{C}$ 以及 pH 4~9 范围内使用。近年,应用交联剂制备得到的 CL 型和 FF 型琼脂糖则有比较好的稳定性,能用于浓脲、胍、有机溶剂及非离子型去污剂溶液,还能经受 $110\sim 120^\circ\text{C}$ 高压灭菌处理,对生物大分子的吸附能力也特别低。无论是哪种琼脂糖凝胶,其机械强度都比葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶好得多,同时它对生物大分子等高分子的吸附作用也小得多。另外,琼脂糖凝胶适用相对分子质量的范围宽,最大可以到 10^8 ,这一点是另外两种凝胶所无法达到的。正由于以上这些优点,它的应用受到人们的重视。琼脂糖的商品名为 Sepharose 或 Bio-gel A,主要型号的琼脂糖凝胶列于表 2-4。

表 2-4 Sepharose 及 Bio-gel A 的型号

型 号	使用范围(蛋白质)	含琼脂糖/%	
Sephарose	6B	10 000~3 000 000	6
	4B	100 000~20 000 000	4
	2B	1 000 000~100 000 000	2
Sephарose ^R CL	6B	同 上	同 上
	4B		
	2B		
Bio ~ Gel	0.5 m	10 000~500 000	10
	1.5 m	10 000~1 500 000	8
	5 m	10 000~5 000 000	6
	15 m	40 000~15 000 000	4
	50 m	100 000~50 000 000	2
	150 m	1 000 000~150 000 000	1

4. Sephacryl 凝胶 Sephacryl 是由丙烯基葡聚糖和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺共价交联而成的硬凝胶。其类型有 Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400 和 S-500 几种,它们都是超细颗粒。其填料的性质及类型见表 2-5。

Sephacryl 在常用溶剂(除化学去垢剂外)中不溶解,可以使用 pH 的范围是 3~11,在低 pH 时,葡聚糖链可以发生有限的水解,凝胶用 0.2 mol/L NaOH 在室温中处理 100 h,凝胶的多孔性和流速没有可见变化。Sephacryl 可以用含有 SDS 和 6 mol/L 盐酸胍的溶剂进行洗脱。Sephacryl 在 pH 7 环境中,120 ℃ 重复消毒不影响凝胶的色谱性质。以上几种 Sephacryl 有不同的分离范围,在作用时可根据分离范围和选择曲线选用合适的凝胶。

表 2-5 Sephacryl 凝胶系列的性质

凝 胶	近似颗粒体积/ μm	使用相对分子质量范围 (葡聚糖)	使用相对分子质量范围 (球蛋白)
S-100	25~75		$1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$
S-200	25~75	$1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$	$5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$
S-300	25~75	$2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$	$1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$
S-400	25~75	$1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	$2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$
S-500	25~75	$4 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$	

5. Superdex 凝胶 Superdex 是最新的凝胶填料,它是将葡聚糖以共价方式结合到高交联的多孔琼脂糖珠体上形成的复合凝胶。琼脂糖的高交联骨架为珠体提供了较高的物理化学性质,葡聚糖为介质提供了优良的选择性。

这类凝胶物理化学性质稳定,刚度强,适合于高流速,且分辨率高。使用 pH 范围为 3~12,在 pH=7 时可经 120 ℃ 消毒处理,分离中可用 1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 处理,在 1% SDS、6 mol/L 盐酸胍和 8 mol/L 尿素中使用,色谱行为不变。目前有 Superdex G-30、G-75 和 G-200 可供选择,它们的分离范围对于蛋白质来讲,分别为 10 000, 70 000 和 600 000。

6. 聚乙烯醇凝胶 聚乙烯醇系列是以交联聚乙烯醇为骨架的凝胶过滤填料。20 世纪 80 年代初问世,商品名为 Toyopearl。该填料为多孔的三向网状结构,大分子链上含有丰富的羟基,骨架为高亲水性,还可以进行化学改造,而得到多功能的离子交换和亲和色谱填料。

Toyopearl 系列填料的优点为:具有良好的物理化学稳定性,不溶于水及有机溶剂,不受微生物的侵蚀;非特异吸附极少,蛋白质的回收率高;适合于高流速,可用于工业生产,使用寿命长,120℃可反复消毒,色谱性能不受影响。

三、凝胶色谱使用方法

1. 凝胶的选择

(1) 粒子的大小与孔径选择 凝胶粒子必须分散均匀,能够较快的扩散以及有效地分离。高分子物质必须能够扩散到凝胶内才能起到分子筛的效应,不同型号的凝胶皆有各自的排阻极限。

(2) 凝胶必须是惰性的 任何带电荷的凝胶,或对分离物质有亲和力者,都将干扰分离效果。

2. 色谱柱装置 色谱柱的规格要根据分离样品的性质和目的来定。最常用的是内径 2.5 cm (2~4cm)。长度为 100 cm(40~100 cm)的玻璃柱。

3. 凝胶的处理 为了获得合适的流速和良好的分离,凝胶粒子在使用前需经一定处理,主要是将凝胶的保存液更换到分离蛋白质的洗脱液中,对于 Sephadex 系列凝胶在使用前需充分的膨胀与浮选。

4. 装柱 取适当长度的色谱柱(G-200 选用 2.5 cm × 100 cm),底部铺上尼龙筛网或玻璃丝,以不漏粒子为准。用量见表 2-6。

表 2-6 色谱柱大小与凝胶用量

色 谱 柱			凝胶用量/g			
直径/cm	长度/cm	体积/ml	G-25	G-50	G-75	G-100
0.9	15	9.5	2.5	1.0	0.6	0.3
0.9	30	19	5.0	2.0	1.2	0.6
0.9	60	38	10.0	4.0	2.5	1.2
1.6	20	40	10.0	4.0	2.5	1.2
1.6	40	80	20.0	8.0	5.0	2.4
1.6	70	140	35.0	14.0	9.0	4.4
1.6	100	200	50.0	20.0	12.5	6.0
2.6	40	210	50.0	20.0	12.5	7.0
2.6	70	370	90.0	35.0	20.0	12.0
2.6	100	530	130.0	50.0	30.0	17.0
5.0	60	1 000	250.0	110.0	70.0	35.0

用缓冲液(如 PBS)饱和凝胶粒子,置室温 1 h 后上柱。气体在低温时易溶于溶液中,室温时易释放出来,也可用超声脱气将气泡赶走。分离时气泡的溢出将干扰分离效果,破坏柱内填料的结构,应予以避免,故样品不宜从冰箱中取出就立即上柱。

自顶端倾注凝胶悬浮液时,应沿直插到管底的玻璃棒缓缓流入,以免产生气泡与漏出粒子。为了防止分层,最好将凝胶悬液放于贮液瓶中,连续加入。

5. 柱填充的检查和 V_0 的测定 检查柱子填充是否正确的最好方法是用此柱分离某些有色物质。蓝色葡聚糖-2 000 是常用的一种物质,它是一种高分子葡聚糖,含有蓝色发色基团,因此可在一次操作中检查柱子的填充状况和测定出滞留容量 V_0 。方法为把 0.2% 的蓝色葡聚糖-2 000 溶液(1/50~1/100 柱床体积)加到柱子上,洗脱液的离子强度应为 0.02 或更高。在色谱分离过程

中,可能出现的色带形状见表 2-7 和图 2-6。柱子填充良好是获得好的分离结果所必需的。如果用蓝色葡聚糖进行实验后获得了一个不好的色谱带,那么就说明凝胶床没有填好。在这种情况下,柱子必须重新装填。

表 2-7 根据色带形状检查柱子的填充

色 带	原 因	分离效果
狭窄而平整 (图 2-6A)	柱床填充正确	峰窄,分离效果好
狭窄但弯曲 (图 2-6B)	通过柱中心的流速高于柱壁附近流速原因: 1) 填充柱床的悬浮液太稀 2) 在细柱中,流体受到管壁的阻滞(即壁效应)	峰宽,分离效果差
狭窄但不平整 (图 2-6C)	1) 填充过程中,凝胶不均匀的沉降(较大的颗粒沉降在流速较高的一侧) 2) 柱子有横向温度梯度 3) 在填充柱床时,柱子没有处于垂直位置	峰宽,分离效果差
色谱分离期间 开始规则后变成不规则 (图 2-6C,D)	用太浓的悬浮液填充或填充时分步进行,致使柱床不规则	峰宽,分离效果差
不规则色带 (图 2-6D)	1) 最多的情况是柱子的表面不规则 2) 样品粘度过高,样品的粘度比洗脱液的粘度高得多	峰宽,分离效果差

6. 加样 在加样时,为了不扰乱凝胶表面,可在顶部放上一层圆形滤纸或尼龙网,也可覆盖一层 Sephadex G-25(5 mm 厚)的凝胶。

样品要有一定的浓度和体积。通常为床柱体积的 1%~10%,浓度不宜超过 1%~4%。

7. 洗脱

洗脱剂:洗脱剂多采用低离子强度的盐溶液。

流速:各种类型凝胶对流速要求不一。

8. 再生 样品洗脱完毕后,凝胶柱即已再生。一次装柱,可反复使用多次。因此操作简便,重复性高。

9. 保存 各型凝胶悬液加防腐剂或灭菌后,可置冰箱保存数月。防腐剂类型很多,最常用的有叠氮化钠 0.02% 与柳硫汞 0.05% 等,也可用高压蒸汽 0.1 MPa 30 min 灭菌。

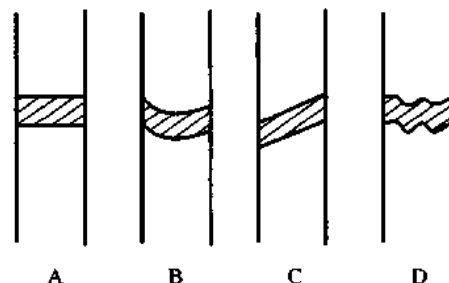


图 2-6 用色带检查柱子的填充情况(说明见表 2-7)

四、应用

1. 脱盐 葡聚糖凝胶 G-25 可排除相对分子质量超过 5 000 的所有分子。因此常用以除去在蛋白质中的盐以及小分子物质。生物大分子脱盐时上样体积可以达到柱体积的 1/5。通常脱盐的凝胶是 Sephadex G25 或 Bio-gel P30。

2. 蛋白质分离 由于凝胶的生物相容性较好,而且具有高的质量和生物学活性回收率,所以凝胶色谱法主要用以分离和纯化分子大小不同的生物大分子物质。

凝胶色谱除了纯化蛋白质外,还同时用于更换缓冲溶液体系。由于凝胶色谱比其他几种色谱的分离蛋白质量少,所以常常放在纯化工艺的最后一步。在使用单克隆抗体亲和色谱纯化的生物制品中,为了防止单克隆抗体从柱上遗漏对产品造成污染,凝胶色谱通常要放于最后一步。

3. 蛋白质相对分子质量的测定 蛋白质和多肽的相对分子质量测定:对不同的样品选用不同的凝胶过滤基质。然后用不同已知相对分子质量(M_r)的样品(或几种样品的混合物)上柱,分别测定它们的洗脱体积(V_e)或时间(t),这些参数间存在着一定的线性关系。再由未知样品的 V_e 或 t 能从上述关系中推测出未知样品的相对分子质量。应该指出的是,在凝胶过滤所用的溶液系统中如不加变性剂等破坏四级结构,所测得的蛋白质样品的相对分子质量应是全蛋白的相对分子质量,一旦实验的条件能破坏四级结构,凝胶过滤所得的蛋白质的相对分子质量则是亚基的相对分子质量,一个蛋白质如有数种相对分子质量不同的亚基组装成的,在解聚条件下进行凝胶过滤就可能得到几个不同的蛋白质峰;再者,如果某些蛋白质是由几条不同的肽链通过二硫键相连而成,则在实验系统中加入还原剂,凝胶过滤所得的图谱中也可能出现几个不同的峰形,每个蛋白峰就是其组成中的一种肽链。

第三节 离子交换色谱法

一、基本原理

离子交换色谱(Ion Exchange Chromatography, IEC)是目前在生物大分子提纯中得到最广泛应用的方法之一。它是利用不同的生物大分子的带电部分与具有相反电荷的离子交换剂吸附强弱不同,因此所需的洗脱剂强度不同。

离子交换剂是借酯化、氧化或醚化等化学反应,在琼脂糖、纤维素或凝胶分子上引入阳离子或阴离子基团的特殊剂型。当离子交换剂带阳离子基团时,可吸附阴离子样品,称为阴离子交换剂,如 DEAE。反之,离子交换剂带阴离子基团时,可吸附阳离子样品,称之为阳离子交换剂,如 CM。

离子交换剂分离样品时,主要依靠增加缓冲溶液的离子强度或改变酸碱度来进行洗脱。

增加缓冲溶液的离子强度:当缓冲溶液的离子强度增加时,即增加了它与生物大分子对交换基团竞争吸附的能力,把生物大分子置换下来。

改变酸碱度:当缓冲溶液的 pH 接近生物大分子的等电点时,其净电荷为零,从而可被洗脱。

由于不同生物大分子的电荷密度分布不同,电荷量不等,等电点的差异以及分子大小的区别,因而与离子交换剂的结合强度不同,利用一定的置换条件,可将其逐一分开。

二、离子交换剂的类型

离子交换剂的类型主要有带离子交换基团的琼脂糖、葡聚糖及纤维素三类。三者各有优缺点。现分述如下:

1. 琼脂糖类 这类离子交换填料是在琼脂糖表面进行化学改造而制备的。由于琼脂糖表面含有大量的羟基,化学改造极为方便。目前在琼脂糖表面可以连接的基团见表 2-8。目前琼脂糖系列的离子交换填料在生物大分子的分离中占据了绝对多数的地位。

2. 纤维素类 离子-纤维素树脂有开放性的支持骨架,大分子能自由地进入和迅速地扩散,因而对大分子的吸附容量较大,有的甚至能可逆地吸附相当于它们本身重量一半的生物大分子。离子-纤维素上的交换基团排列松散,对生物大分子的吸附不太牢固,用温和的洗脱条件就可以将其洗脱下来。因此不至于引起生物大分子的变性。

离子交换纤维素树脂也有阴离子和阳离子两类。常用类型及其特性见表 2-8。

表 2-8 常用的离子交换基团的类型

商 品 名	解 离 基 团	类 别
DEAE	二乙基氨基乙基 $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	弱阴离子
QAE	氨基乙基 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	强阴离子
TEAE	三乙基氨基乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	阴离子
GE	胍乙基 $\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH} \end{array}$	阴离子
PAB	对氨基基 $p-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	
ECTEOA	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})_3$	阴离子
CM	羧甲基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	弱阳离子
SE	磺酸乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	强阳离子
SP	磷酸根 $-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$	强阳离子

同一种离子交换纤维素树脂,往往又分为纤维型和微晶型两种类型。一般的纤维素包含非晶型和微晶型两部分,除去非晶型后制备得到的树脂称为微晶型树脂。由于微晶型树脂的纤维短、粒度细、吸附容量大、分辨率高,更适用于分析工作。而一般较长的纤维型纤维素比较适合于制备工作。

生物大分子的等电点一般在中性附近,因而 DEAE-纤维素和 CM-纤维素应用最广。要求在较强的酸性条件下($\text{pH} < 3$)下分离生物大分子时,可用 P-纤维素或 SE-纤维素;而在较强碱性条件下($\text{pH} > 10$)分离时,可用 GE-纤维素。对于带电荷多而亲和力十分强的生物大分子易选用交换容量小,同时是弱解离的 ECTEOA-纤维素。

进行色谱分离时,加入色谱柱的生物大相对分子质量通常是纤维素量的 1/10。为了得到理想的分辨率,样品体积应该尽可能地小。在洗脱时,可以通过改变洗脱缓冲溶液的 pH 使生物大分子的电荷减少而被洗脱下来,也可通过提高洗脱缓冲液的离子强度减弱生物大分子与载体间的亲和力的办法,将生物大分子逐一洗脱下来。

3. 葡聚糖类 交联葡聚糖作为载体制备的离子交换剂叫做离子交换葡聚糖凝胶。这也是一种应用广泛,分离效果好的离子交换树脂。其操作条件与离子交换纤维素相似。但它在性质上则

有一定的差别。纤维素骨架为柔性长链,而交联葡聚糖的骨架为三维网状结构。因而,它除了具有离子交换能力外,还有分子筛的作用。另外,因其高度的网状结构,使它所带的离子交换基团比纤维素多,交换容量为纤维素类的3~5倍。但是,离子交换葡聚糖具有床体积易受pH和盐浓度的影响而变化的缺点,对分离的结果有一定的影响。

三、IEC 的方法

1. 剂型的选择 离子交换剂的选择主要根据样品分子所带电荷性质和分子大小而定。阴离子交换剂用于洗脱时pH高于样品等电点物质的分离,阳离子交换剂用于洗脱时pH低于样品等电点物质的分离,见图2-7。

弱离子交换剂用于分离对电荷有高度亲合的样品,强离子交换剂用于亲和力低的样品。

对于Sephadex系列的离子交换填料,为了最有效地使用交换容量,分离相对分子质量低于30 000或高于200 000的样品,可采用Sephadex A-25或C-25型。Sephadex A-50与C-50对相对分子质量为30 000~200 000的样品具有较高的交换容量,见表2-9。

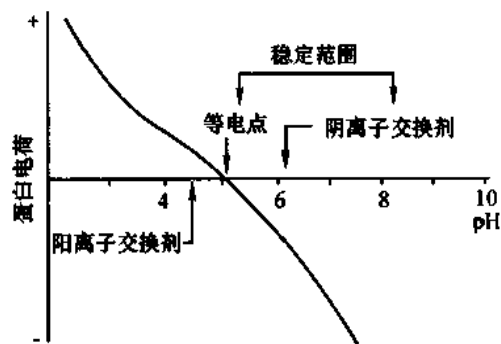


图 2-7 pH 与离子交换剂剂型选择的关系

表 2-9 离子交换剂的选择

蛋白质的相对分子质量		离子交换剂的选择
低相对分子质量	<30 000	Sephadex A-25, C-25
中等相对分子质量	30 000~200 000	Sephadex A-50, C-50
高相对分子质量	>200 000	Sephadex A-25, C-25

2. 离子交换剂的预处理 离子交换纤维素一般含有色素和细小的颗粒,故使用前应当进行洗涤。取适量的粉剂,用 0.5 mol/L 的 NaOH 除去色素和细小的颗粒,用蒸馏水洗至中性,再用 0.5 mol/L 的 HCl 洗涤,用蒸馏水洗至中性后,用缓冲溶液平衡,装柱。也可在柱上平衡,一般需要 2~3 L 缓冲液。

离子交换葡聚糖凝胶的优点是一般不需用酸、碱处理,使用前先需在中性溶液中完全膨胀(室温 1~2 天,沸水浴 2h)。处理过程中不需要除细小的颗粒。避免强烈的搅拌。关键在于用缓冲溶液反复处理后凝胶是否充分荷电,清洗时,最好用布氏漏斗除滤液,代替倾注法以减少损失。

琼脂糖类的填料一般是在 20% 的乙醇溶液中保存,使用前用 5 个柱体积的流动相在柱子上进行洗脱就可以了。

3. 色谱柱的规格 根据分离样品的体积、组分和分离难易而定。当样品量多,组分复杂时,可选用较长的柱子,20~30 cm,内径取决于需要交换的容量(当填料交换容量低时,可选用较大内径的柱子)。当样品量少,组分简单时可采用短的柱子,5~10 cm。

4. 装柱 与一般的凝胶过滤相同。

5. 加样 在色谱柱的顶端尚留有少量的缓冲液时即可开始加样。上样量一半按照其理论上

样负载量的 1/3。

6. 洗脱 洗脱剂是由不同离子强度和不同 pH 的缓冲液组成,用以分离样品的不同组分。改变洗脱剂的原则如表 2-10 所示。

表 2-10 改变洗脱剂的原则

离子交换剂	pH 梯度变化	离子强度变化
阴离子交换剂	减低(或不变)	增加
阳离子交换剂	增加	增加

改变洗脱方式主要有分步洗脱(或称分段洗脱, stepwise elution)和连续梯度洗脱法(continuous gradients)。

(1) 分步洗脱法 预先配制不同离子强度的缓冲溶液,分段换用离子强度由低到高、pH 相同或不同的洗脱液以洗脱生物大分子的各种组分。

(2) 梯度洗脱法 早期采用两个直径相同底部相通的大型容器,将离子强度低的缓冲溶液(如 0.005 mol/L PB, pH 8.0)放入一容器(混合瓶)中,其下端装有一个搅拌器,并连接到色谱柱的顶端,另一个容器存放离子强度较高的缓冲溶液(如 0.2 mol/L Na_2HPO_4 , pH 4.0)。在洗脱过程中,因缓冲液由贮存瓶不断地流入经搅拌器的混合瓶中,使流入色谱柱的洗脱液离子强度呈梯度增加,而 pH 亦逐渐变化。这样可分管自动收集,使结构相近的生物大分子较易分离。

近期,人们已设计出了可以自动梯度洗脱的分离洗脱,具有非常好的重现性。

第四节 亲和色谱

亲和色谱是利用生物大分子与某些相对应的专一分子特异识别和可逆结合的特性而建立起来的一种分离生物大分子的色谱方法,也叫做生物亲和或生物特异性亲和色谱。这种特异可逆结合的物质很多,见表 2-11。如抗原与抗体、底物与酶、激素与受体等,它们间的这种特异亲和能力又叫亲和力。

亲和色谱中,一对互相识别的分子互称对方为配体,如激素可认为是受体的配体,受体也可以认为是激素的配体。

表 2-11 亲和色谱所用体系

常用配体	分离对象
酶	底物、抑制剂、辅酶
抗体	抗原、病毒细胞
外源凝集素	多糖、糖蛋白
核酸	互补碱基序列、组蛋白、核酸聚合酶
激素	受体、载体蛋白
细胞	细胞表面特异蛋白、外源凝集素

亲和色谱法是将配体固定在固相载体上,并且将其装入色谱柱中,当样品通过色谱柱时,由于配体和相对应的生物大分子分子有专一性的亲和作用,将某种生物大分子吸附在柱中,样品中的其

他组分不产生这种专一性的结合,而直接流出色谱柱。然后,便可以利用洗脱剂将吸附在柱中的生物大分子洗脱下来。

亲和色谱法具有高度的专一性,而且色谱过程简单、快速,是一种理想的有效分离纯化生物大分子的手段。

一、固相载体的选择

对于一个成功的亲和色谱分离来说,一个重要的因素就是选择合适的固体载体。一个理想的载体,首先它必须尽可能少地同被分离的物质进行相互作用,以避免非特异的吸附作用。因此,优先选用的是中性聚合物,例如,琼脂糖(Sepharese)或聚丙烯酰胺凝胶(Bio-gel)。其次,载体必须具有良好的通透性,即使在亲和剂键合在它的表面之后也必须保持这种特性。连接亲和剂的先决条件是有足够量的某些化学基团存在,这些基团在不影响载体的结构,也不影响被连接的亲和剂的条件下被活化或衍生。载体在结合亲和剂后,必须在机械性能和化学性质上具有稳定性,而且在改变pH、离子强度、温度以及变性剂的条件下也应该稳定。载体必须有大的孔网结构,允许大分子物质自由出入。再者,载体的组成大小也应均匀。高孔度对于大分子物质的分离是个重要的条件,它的主要作用是提供欲分离的物质与配体间的接触机会。配体大多结合在载体的孔内部,孔太小,生物大分子进不去,即使配体偶联率很高,结合生物大分子的量也不会太大。这不是我们所希望的。一般常用的载体有纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶和多孔玻璃等。

二、配体的选择

正确地选择合适的配体以及合适的结合方式,对获得具有优良分离效果和较大容量的载体同样具有重要作用。能与分离物质牢固、特异和可逆结合的物质都可以作为配体。选择配体有两个条件:第一是生物大分子与配体间具有合适的亲和力,亲和力太强,洗脱条件剧烈,易造成生物大分子失活,亲和力太小,解离容易,结合率不高。第二是配体要具有双重功能,既有可牢固与载体结合的基团,结合后又不影响生物大分子与配体间的亲和力。

亲和色谱要取得成功,配体结合在载体上并不是唯一的因素。具有同等重要的是要完全地从载体上除去非共价结合的配体。因此,应当十分认真地清洗并检查清洗的情况。

与载体共价偶联酶的功能团包括:

- (1) 氨基:赖氨酸的 ϵ -氨基和多肽键N末端的 α -NH₂。
- (2) 羧基:天门冬氨酸的 β -羧基,谷氨酸的 α -羧基和末端的 α -羧基。
- (3) 酚基:酪氨酸的酚环。
- (4) 羟基:丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的羟基。
- (5) 巯基:半胱氨酸的巯基。
- (6) 咪唑基:组氨酸的咪唑基。
- (7) 吡啶基:色氨酸的吡啶基。

三、配体与载体之间的偶联

实践证明,琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶是亲和色谱的优良载体。琼脂糖凝胶结构开放,通过性好,酸碱处理时相当稳定,物理性能也好。琼脂糖凝胶上的羟基在碱性条件下极易被溴化氰活化

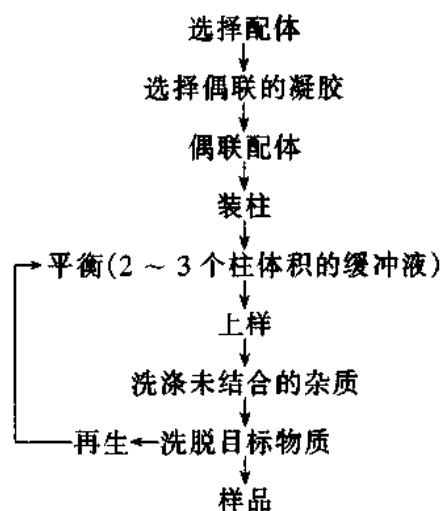
成亚氨基碳酸盐,并能在温和的条件下与氨基等基团作用而引入配体,亲和色谱中最为常用的琼脂糖凝胶的型号是 Sepharose - 4B。

在琼脂糖与溴化氰活化后,再与生物大分子结合形成亲和色谱填料是亲和色谱中最为常用的一种。

四、使用方法

亲和色谱的分离方法随分离的物质不同而不同,一般的程序如下。

1. 吸附 亲和色谱吸附剂制备好后,装入色谱柱中,色谱柱无特殊要求,常用短而粗的柱子。根据纯化物质的量、吸附能力来选择。吸附能力高的常用短柱,吸附能力弱的常用长一些的柱子。



样品为固体时,常用起始缓冲溶液溶解,若为液体,要通过透析等方法将溶液转换为起始缓冲溶液。上样量可根据柱子的吸附容量来推算,通常为吸附容量的 1/3 或更低,对于吸附力弱的物质,上样量按照 1/10 为佳。在样品上柱后,使用 10 倍柱体积的缓冲溶液将不结合的杂质清洗掉。获得最尖锐的洗脱峰和最小洗脱体积的流速为最佳流速。

2. 洗脱 从柱中洗脱目标产物是亲和色谱是否成功的关键。通常采用降低目标产物与配体之间的亲和力的方式进行洗脱。可用一步法或连续改变洗脱剂浓度的方式将目标产品洗脱下来。当蛋白质与配体间的作用力过强时,可用一步法,甚至可先让洗脱剂在柱子中停留半小时的方法。

改变 pH 同样也能改变配体与蛋白质间的作用力,因此通过改变 pH 也是亲和色谱分离目标产物的一种方法。另一种方法是通过改变离子强度来洗脱目标产品。有时也用变性剂来洗脱目标产品。因此,亲和色谱分离目标产品的方法并不是一成不变的,可根据样品的性质和自己的条件进行选择。

对于吸附得十分牢固的生物大分子,必须使用较强的酸或碱作为洗脱剂,或在洗脱液中加入破坏蛋白质的试剂,如脲、盐酸胍。这种洗脱方式往往造成不可逆的变化,使纯化的对象失去生物学活性。因此,对于洗脱得到的蛋白质溶液应立即进行中和、稀释或透析。

第五节 高效液相色谱法

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)又叫高压、高速、近代液相色谱,但常叫做高效液相色谱。它是 20 世纪 60 年代中期才建立的一个高效快速分离化合物的方法,只是到了 70 年代后期才广泛地用在生物大分子的分离和纯化方面。在分离生物大分子时 HPLC 与经典的柱液相色谱比较具有以下几个优点:①分辨率高。一根长 10 cm 的柱子可以分离十几种以上的物质。②速度快。物质的分离与纯化一般在 1 h 内就可以完成,甚至只需要几分钟时间,其流速一般为 1~10 ml/min 或更高。③重复性好。HPLC 在分析生物大分子时结果误差小于 5%。④适用面广,灵活性强。几乎所有的生物大分子根据它们的性质差别(等电点、疏水性、相对分子质量、电荷分布等)都可以使用不同的 HPLC 方法进行分离提纯,在一定的条件下,还可以保持其高的生物学活性,且极易回收。⑤灵敏度高。HPLC 已广泛采用高灵敏的检测器,加上仪器本身集分离和富集于一身,使生物大分子的最小检测下限非常低。紫外一般可达 10^{-7} g, 荧光可达 10^{-9} g。这些 HPLC 特有的优点,使它在近年生物大分子的分离和纯化方面占据了极其重要的地位。如今使用 HPLC 进行生物大分子分离和纯化的文献越来越多。在近几年发表的文章中,约有 80% 以上的生物大分子是由 HPLC 进行纯化的。

尽管经典的柱色谱分离生物大分子的效果比 HPLC 差,但由于投资少、适用面广,在分离生物大分子时仍广泛使用。表 2-12 列出了两者在分离蛋白质时的差别。

表 2-12 经典柱色谱与 HPLC 在分离生物大分子时差别

	经典柱色谱	HPLC
填料粒度	> 100 μm	5~10 μm (小的到 1.5 μm)
柱效	低	高
分离组分数	几个	几十
柱子大小	1~2.5 cm \times 10~100 cm	0.2~1.0 cm \times 5~25 cm
压力	几百千帕	几兆帕到几十兆帕
分离时间	几小时~几十小时	几分钟到几十分钟
自动化程度	低	高
柱子寿命	使用几次或数十次	连续使用几百次以上

HPLC 在分离生物大分子时同经典色谱一样,按照分离机制,可将其分为:高效离子交换色谱(high performance ion-exchange liquid chromatography, HPIEC)、高效反相色谱(high performance reversed-phase liquid chromatography, HPRPC)、高效疏水作用色谱(high performance hydrophobic interaction liquid chromatography, HPHIC)、高效排阻色谱(high performance size exclusive liquid chromatography, HPSEC)和高效亲和色谱(high performance affinity liquid chromatography, HPAC)等几种。它们的主要特性见表 2-13。

表 2-13 生物大分子在不同 HPLC 上的分离机制及其操作条件间的关系

色谱类型	分离机制	操作条件	
		固定相上的基团	流动相
HPIEC	静电作用和电荷分布	带电荷的阴、阳离子	盐水溶液
HPHIC	疏水作用	极性非极性相间	盐水溶液
HPRPC	疏水作用	非极性	有机溶剂-水
HPSEC	分子大小和形状	惰性	盐水或有机溶剂水
HPAC	分子间特异的亲和力	亲和配体	盐水溶液

一、高效液相色谱仪

高效液相色谱仪是 20 世纪 60 年代后期发展起来的一种分析仪器。典型的仪器流程如图 2-8 所示。高效液相色谱设备中的基本部件是输液泵、色谱柱和检测器。但为了能得心应手地工作,仪器应当适应多功能的要求,同时配有梯度装置、部分收集器、恒温系统、数据处理系统以及控制系统等部件,见图 2-8

1. 贮液装置 贮液装置是用来贮存足够数量的洗脱液,供分离物质之用。

2. 输液泵 泵是 HPLC 设备中重要的部件,是驱动溶剂和样品通过色谱分离柱和检测系统的高压源,其性能好坏直接影响整个仪器和分析结果的可靠性。

3. 梯度洗脱装置 梯度洗脱是利用两种或两种以上的溶剂,按照一定时间程序来改变配比浓度,以达到提高洗脱能力、改善分离效率的一种有效方法。梯度洗脱技术在高效液相色谱分离生物大分子中有很重要的实用价值,特别在分离多组分的生物大分子样品时,各组分的

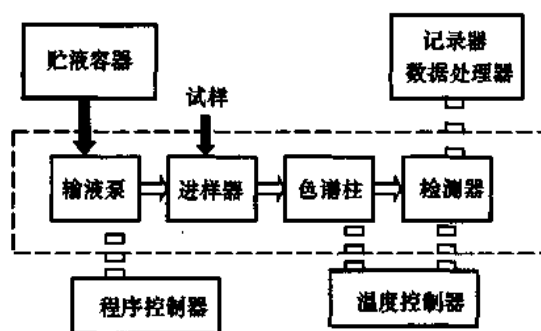


图 2-8 HPLC 的基本组成图

k' 值相差很大,很难用一种固定配比浓度的溶剂获得良好的分离,无法将各组分的 k' 都控制在有效的范围内^[1,2]。采用梯度洗脱可以按一定程序,改变溶剂的极性和洗脱强度,使各组分 k' 值均可控制在最佳条件,不但能提高分离效果和改善峰形,而且可缩短分析时间。梯度洗脱中,后被洗脱的组分比它在相应的等浓度洗脱中的峰形更尖锐,因此检测的灵敏度更高。

4. 色谱柱 色谱柱是 HPLC 的核心部件,要求分离度高,柱容量大,分析速度快,而这些性能不仅与柱填料有关,也和它的结构、装填、使用技术有关。

理论上,色谱柱越长,柱的分离效果越好,但由于固定相的粒度对柱长产生了限制,在目前的条件下,只能保证 10~25 cm 长的柱子可获得好的重现性和结果。色谱柱的内径国外常采用 4.6 mm。国内常采用 5 mm。随着色谱技术的发展,内径 2 mm 的色谱柱已作为常用柱径,因为它可以获得与粗径色谱柱基本相同的分离效果,而其溶剂的消耗量仅为 5 mm 柱子的 1/6。

5. 进样器 待分析样品从柱前的进样器进样,可用注射器进样、阀进样和自动进样器进样三种。其中注射器进样和阀进样最为常用。

6. 检测器 被分析的组分从柱子流出以后该组分在流动相总的浓度的变化可通过检测器转

化为电信号或光信号而被检出。在 HPLC 中,用于生物大分子浓度检测的主要是 UV 检测器。近年来发展的二极管矩阵 UV 检测器允许对柱子流出物进行不停流的瞬间的 UV 波长扫描,是一个比较理想的检测器。荧光检测器有比较高的灵敏度,一般可比 UV 高 10~1 000 倍,但也有更专一的选择性。对于一些电化学活性的物质,电化学检测器是一个比较理想的检测器,它的灵敏度比 UV 高 100~1 000 倍。

7. 部分收集器 如果所进行的色谱分离不是为了纯粹的色谱分析,而是为了收集样品去做其他鉴定或小型制备,部分收集是经常要用的。

8. 数据获取和处理系统 先进的高效液相色谱仪多用微处理机控制,这通常是一台专用的微型计算机,其功能有二:一是作为数据处理机,二是作为控制机。

二、HPLC 的应用及进展

(一) 高效离子交换色谱

HPIEC 是蛋白质纯化中最为常用的色谱法,占各种蛋白质色谱分离技术使用量的 75% 左右。它是依据蛋白质与分离填料间的静电作用力不同而进行分离的一种方法。HPIEC 在分离蛋白质时,由于采用的流动相为低浓度的盐水体系,使得蛋白质在分离后的活性回收率大于 90%。

对于 HPIEC 填料的选择,通常是根据流动相的 pH 和蛋白质的 pI 共同确定的。当溶液的 pH > pI 时,蛋白质带负电荷,在阴离子交换剂保留;当 pH < pI 时,蛋白质带正电荷,在阳离子交换剂上保留;当 pH = pI 时,蛋白质不带电荷,在 HPIEC 上不保留。因此,我们可以根据溶液的 pH 和蛋白质 pI 的情况来选择不同的离子交换填料实现蛋白质的分离。HPIEC 在分离蛋白质时,既可以使用 pH 梯度也可以使用盐浓度梯度或等浓度洗脱的方式进行分离。

离子交换色谱法近年人们主要侧重以下几方面的研究:

1. 应用研究 由于 HPIEC 使用费用低廉,可选择的范围广,而且在纯化后蛋白质保持高的生物学活性和高的质量回收率,使得它无论是在实验室规模还是在大规模蛋白质纯化方面都表现出了良好的应用前景。目前使用 HPIEC 纯化的蛋白质已在千种以上,如抗胰凝乳蛋白酶抗体、基因重组 SR 31747 结合蛋白、基因重组糖原磷酸化酶、抗原和抗体复合物纯化等。

2. 分离速度提高 分离速度的提高是许多分离工作者十分关注的问题。在 HPIEC 方面,非多孔填料(non-porous packing)的出现,使以往几十分钟才能完成的工作在几分钟之内就可以完成。非多孔填料的颗粒只有几个微米,颗粒小,色谱的穿透性能好,流速范围宽,再加上填料表面的非多孔结构,有效地避免了蛋白质在固定相内部的吸附和扩散,提高了蛋白质的质量和活性回收率。

另一种提高 IEC 分离速度的色谱填料是灌注色谱技术(perfusion chromatography)。这种色谱的填料内部具有 80~150 nm 的扩散孔和 600~800 nm 的贯穿孔,流动相可直接从固定相内部穿透而过,从而避免了在传统的色谱分离过程中蛋白质是靠扩散而传递到固定相内部的过程。这种技术比传统的色谱技术快 10~100 倍,分析一个样品只需 30 s 到 3 min。

另一种快速分离蛋白质的技术是连续柱床填料(continuous bed matrix)。这类填料是柱子中直接通过化学合成方法一步制备的。柱子无需进行装填,当使用的填料失效后,直接从柱子中将填料芯取出,换上一个新的填料芯即可,使用极其方便,而且还具有灌注色谱的特点。流动相可直接穿过固定相的内部,避免了蛋白质在分离过程中的扩散作用,分离过程快速,重复性好,可直接对分离的条件进行线性放大。

(二) 高效疏水作用色谱

HPHIC 因其廉价和纯化后保持高的蛋白质生物学活性而成为一个较新的蛋白质分离技术。它的分离是依据蛋白质与固定相间的疏水作用不同而进行的。洗脱体系为高浓度的盐析盐水溶液。当在高盐浓度时,蛋白质被吸附在固定相的表面,随着盐浓度的降低,蛋白质逐渐地被分离开来。

HPHIC 是一个通用的蛋白质分离技术,它使用的流动相为高浓度的盐析盐溶液(最常用的盐体系为硫酸铵-水溶液),对蛋白质的构象具有一定的稳定作用,所以在分离后,蛋白质可保持高的活性回收率。目前,利用 HPHIC 分离的蛋白质有糖蛋白、单抗、酶和基因重组蛋白质等。

HIC 在近年来的研究重点:

1. 新填料的合成 像 HPIEC 一样,HPHIC 的非多孔填料、灌注色谱填料和连续柱床填料相继被合成出来,这些新填料的使用大大提高了蛋白质的分离速度和分离效果。

2. 蛋白质的保留机制 蛋白质在 HPHIC 上是如何进行保留的一直是 HPHIC 的一个主要研究方向。到目前为止,人们已经提出了许多假设,但比较完善的理论是疏溶剂化理论^[12]和计量置换模型。

3. 基因重组蛋白质纯化和复性 目前基因重组技术表达的大部分蛋白质是在 *E. coli* 系统中进行的。表达后的蛋白质常常形成包含体,疏水性较强,这样通过一步 HPHIC 的纯化就可以非常有效地除去杂蛋白而获得高纯度的蛋白质。另一方面,HIC 还可适用于高浓度的盐酸胍和尿素等变性剂溶液,当表达后的蛋白质使用变性剂溶解后,可在 HPHIC 上直接进行分离,在分离蛋白质的同时其生物学活性也得到了恢复,因此,利用 HPHIC 分离基因重组蛋白质的方法倍受青睐。

4. 蛋白质纯化工艺 在制备蛋白质产品时为了有效地减小蛋白质溶液的体积,通常使用盐析法使蛋白质沉淀下来。蛋白质在沉淀后进行分离时,又不得不使用透析方法除盐,方法比较复杂。如果将 HPHIC 放在盐析工艺之后,蛋白质不单可以得到好的分离,而且还可以免去除盐的烦恼。

(三) 高效亲和色谱法

从 1968 年亲和色谱(AC)分离技术被 Cuatrecasas 提出至今已有 30 年的历史。在这 30 年中,亲和色谱技术得到了迅速的发展,并被广泛地用于许多研究领域。

AC 是利用配体与目标产物间进行特异性地生物学识别作用来进行分离的一种方法。这种特异性的识别具有很强的专一性,如抗原与抗体的识别、抗原与细胞或病毒表面受体的识别、酶与底物的识别等。由于这种特异的识别过程具有很强的专一性,因此,AC 对蛋白质分离具有非常好的效果,而且在许多蛋白质的分离中,亲和色谱技术已成了必不可少的分离手段。如基因重组人 α -干扰素、白细胞介素-2 和从尿中提取尿激酶等。

上述的特异吸附某一蛋白质的 HPAC 配体称为特异性的配体。另一类是可以吸附某一类蛋白质的 HPAC 配体称为通用性配体。通用性配体目前共有三类:一是组氨酸配体,它主要是用于对组氨酸有识别作用的一类蛋白质的分离,如从胎盘中提取大量的 IgG;二是三嗪染料配体,它对许多蛋白质有识别作用,如使用 Cibacron blue F3GA 对人血清白蛋白的纯化;三是金属离子亲和配体,它是利用蛋白质与金属离子之间形成螯合物而进行分离的。利用它分离的蛋白质有 IgG、 α_2 -巨球蛋白、血液结合素以及许多基因重组的融合蛋白质。对于通用性的亲和配体最大的优点在于柱子的合成比特异性的配体合成相对容易,适用范围宽,目前有现成的商品化产品出售。

HPAC 分离技术目前已成为高效色谱分离领域中的一个重要分支,它在分离过程中表现出的高选择性和特异性是其他任何技术无法比拟的,但 HPAC 技术在发展中也遇到某些固有的限制,如不易在大规模生产中使用,无法直接从浑浊溶液中分离目标产物等不足。为了克服亲和色谱技术本身的缺陷,近几年人们对其进行了大量的改造使其得到了巨大的发展,相应新的亲和分离技术也不断的产生,如磁性亲和分离技术、径向亲和分离技术、膜亲和分离技术、双水相亲和分离技术、亲和沉淀分离技术、融合蛋白标签技术等。这些新技术的产生不断扩展了 AC 技术的应用范围。

(四) 高效反相色谱法

反相色谱法是一个通用性的蛋白质分离技术。它是利用蛋白质表面的非极性区域同固定相表面的非极性配体相互作用,按照疏水作用力大小进行分离的一种方法。在分离时,HPRPC 由于使用酸性极性有机溶剂作为流动相,使用疏水性极强的非极性烷链作为固定相的配体,使得蛋白质在 HPRPC 上进行分离时常常失去生物学活性,所以使用 HPRPC 进行蛋白质分离时常常受到限制。然而,有些天然的或重组的蛋白质在上述条件下不失活,或在分离后蛋白质的构象可以恢复到天然的状态,PRC 则是一个非常好的分离方法。如天然或重组的胰岛素、重组的人 IL-2 纯化。另外一类在分离后无需保留生物学活性的蛋白质,也常常使用 HPRPC 技术。在对蛋白质进行序

列分析时,常常将 HPPRC 作为纯化的最后一步,既进行除盐又进行分离。

在 HPPRC 分离体系中,固定相的变化对分离效果影响不大。对分离效果影响较大的是流动相的组成和洗脱方式的选择。在 HPPRC 中,蛋白质分离常用的流动相为甲醇-三氟乙酸(TFA)-水体系、异丙醇-TFA-水体系和乙腈-TFA-水体系三种。除此之外还有甲酸-异丙醇-水体系等。蛋白质在 PRC 分离时的洗脱方式有梯度洗脱和等浓度洗脱,其中梯度洗脱最为常用。

(五) 高效排阻色谱

HPSEC 是蛋白质分离的另外一种方式,它是按照蛋白质的大小序列进行分离的一种技术。不涉及太多的作用力问题,操作简单。作为蛋白质分离的一种方法,它具有如下优点:①分离条件温和,蛋白质的活性回收率高,大部分蛋白质在 HPSEC 分离后的活性回收率大于 90%;②蛋白质的分离是按分子的大小顺序进行分离的,不需要使用梯度分离方法,操作简单,对于未知的蛋白质在分离后就可以估算出它的相对分子质量的大小;③HPSEC 是蛋白质除盐最为常用的方法,比透析方法快。但 HPSEC 最大的缺点在于分离容量小,蛋白质在分离时的上样体积通常为柱体积的 1% 左右,最大不能超过柱体积的 5%。因此在分离时,通常将它放在纯化工艺的最后。由于 HPSEC 在分离过程中蛋白质的保留时间不会超过柱子的外水空间,所以,柱效较以上的色谱方法都低。

由于 HPSEC 是最早用于蛋白质分离的色谱技术,所以早期许多蛋白质纯化方法常常选用 HPSEC 技术。目前对 HPSEC 的研究主要是在合成填料方面,分离效果更好,耐压程度更强的填料被不断地合成出来,如 Superdex 系列产品。

(第四军医大学 郭立安)

参考文献

- 1 郭立安. 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术. 西安:陕西科技出版社,1993
- 2 Z Bilkova, J Churacek, Z Kucerovala, *et al.* Purification of anti-chymotrypsin antibodies for the preparation of bioaffinity matrix with oriented chymotrypsin as immobilized ligand. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1997, 689(1): 273~279
- 3 O Jbilo, H Vidal, R Paul, *et al.* Purification and characterization of human SR31747A-binding protein. *J Biol Chem*, 1997, 272(43): 27 107~27 115
- 4 Y J Seok, M Sondel, P Badaw, *et al.* High affinity binding and allosteric regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocayier protein. *HPr. J Biol Chem*, 1997, 272(42): 26 511~26 521
- 5 郭立安, 苏天升. 甲胎球蛋白抗原抗体复合物的阴离子交换 HPLC 分离. *高技术通讯*, 1992, 12: 21~22
- 6 李世贵, 苏天升. 快速高效阴离子交换色谱填料的合成及性能研究. *色谱*, 1991, 9(5): 281~283
- 7 A E Rodrigues. Permeable packing and perfusion chromatography in protein separation. *J Chromatogr Biomed Appl*, 1997, 699: 47~61
- 8 郭立安, 常建华. 蛋白质在疏水作用色谱上的保留模型及其模型参数间关系的研究. *化学学报*, 1996, 54(3): 291~297
- 9 X Geng, L Guo, J Chang. Study on the retention model of proteins in hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr*, 1990, 507: 1~23
- 10 郭立安, 朱宝泉. 疏水作用色谱填料的合成及其在基因重组干扰素纯化中的应用. *高等学校化学学报*, 1997, 18(9): 1462~1464
- 11 郭立安, 朱宝泉. 使用高效疏水作用色谱和凝胶色谱纯化基因重组 γ -干扰素. *高等学校化学学报*, 1997, 18(6): 920~922
- 12 W R Melander, D Corrodini, C Horvath. Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromato-

- graphy, application of solvophobic theory. *J Chromatogr*, 1984, 317: 67~85
- 13 X Geng, Q Chang .High performance hydrophobic interaction chromatography as a tool for refolding. *J Chromatogr.*, 1992, 599: 185~194
 - 14 郭立安, 朱宝泉, 陈代杰. 使用三态模型指导蛋白质复性条件的选择. *中国医药工业杂志*, 1999, 30(3): 141~144
 - 15 刘彤, 耿信笃. 疏水作用色谱法的进展及其在生化研究中的应用. *色谱*, 1998, 16(1): 30~34
 - 16 冯晓黎, 殷剑宁, 丛春水, 等. 高效亲和层析介质的制备和对基因重组 IFN- α 的纯化. *中国生化药物杂志*, 1997, 18(1): 5~8
 - 17 郭立安, 董建中. 使用高效亲和色谱纯化基因重组 IL-2. *分析化学*, 1999, 27(10): 1237
 - 18 孙天霄, 王红梅, 徐长法. 高相对分子质量和低相对分子质量尿激酶的分离纯化及动力学性质研究. *生物化学杂志*, 1997, 13(3): 344~349
 - 19 S Kanoun, L Amourache, S Krishnan, *et al.* New support for the large-scale purification of proteins. *J Chromatogr*, 1986, 376: 259~267.
 - 20 J Travis, J Bowen, D Tewksbury, *et al.* Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem J*, 1976, 157(2): 301~306
 - 21 郭立安. 蛋白质的亲和分离新技术. *第四军医大学学报*, 1999, 20(S): 19~21
 - 22 E P Kroeff, R A Owens, E L Campbell, *et al.* Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1989, 461: 45~61
 - 23 耿信笃, 王立平, 郭藏生. 色谱法分离胰岛素类化合物的新进展. *西北大学学报*, 1987, 17(3): 103~145
 - 24 M P Weir, J Sparks, A M Chaplin. Micropreparative purification of recombinant human IL-2. *J Chromatogr*, 1987, 396: 209~215

第三章

电泳技术

若将两个电极插在电解质溶液中,通上直流电,正离子则向负极移动,而负离子向正极移动,这种现象就是我们熟悉的电泳现象,也称“电泳”(electrophoresis)。概括而言,电泳是指带电粒子在电场中向与自身带相反电荷的电极移动的现象。例如蛋白质具有两性电离性质,当溶液 pH 值大于蛋白质等电点时,蛋白质带负电荷,在电场中向正极移动,反之则带正电荷,向负极移动。当蛋白质溶液 pH 值与蛋白质的等电点相等,静电荷为零时则不移动。

电泳法是一种古老的方法。早在 1808 年俄国物理学家 Ponce 就发现了电泳现象。1907 年有人曾用琼脂糖电泳研究白喉毒素。作为一种方法使用,是在 1937 年由 Tiselius 制成的界面电泳,这对当时蛋白质的研究起了很大作用,并使人们开始认识到电泳技术对于生物科学研究的重要性。然而由于其仪器结构复杂,体积庞大,价格昂贵,且必须在 4℃ 恒温操作,故难以推广。1940 年左右,以纸为电泳支持物的电泳方法问世。1948 年 Wieland 和 Fischer 用纸电泳分析技术分离了混合氨基酸,1950 年 Durrum 分离了多种蛋白质。自此以后,电泳技术引起人们的重视并迅速发展起来。

电泳技术常以有无支持物来分类(表 3-1)。电泳中不用支持物(supporting media)在溶液中进行的电泳称为自由电泳(free electrophoresis),反之,有支持物的电泳称为区带电泳(zone electrophoresis)。在区带电泳中所用支持物不同常有不同的名称。例如:纸电泳(paper electrophoresis),醋酸纤维薄膜电泳(cellulose acetate electrophoresis),琼脂凝胶电泳(agar gel electrophoresis),聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)等。另外,也有以所用电压分为:低电压电泳,高电压电泳;以支持物形状分为:薄层电泳,平板电泳(水平平板电泳,垂直平板电泳),柱电泳,圆盘柱状电泳;以用途分为:分析电泳,制备电泳,定量免疫电泳;以区带形式分为:盘状电泳,火箭电泳等。

各种电泳技术具有以下特点:①凡是带电物质均可应用某一电泳技术进行分离,并可进行定性或定量分析;②样品用量极少;③设备简单;④可在常温进行;⑤操作简便省时;⑥分辨率高。目前电泳技术已经广泛应用于基础理论研究、临床诊断及工业制造等方面。例如用醋酸纤维薄膜电泳分析血清蛋白;用琼脂对流免疫电泳分析病人血清,为原发性肝癌的早期诊断提供依据;用高压电泳研究蛋白质核酸的一级结构;用具有高分辨率的凝胶电泳分离酶、蛋白质、核酸等大分子的研究工作,对生物化学与分子生物学的发展起了重要作用。

表 3-1 电泳技术的种类

类 别	名 称
不用支持物的电泳技术	(1) Tiselius 或微量电泳 (2) 显微电泳 (3) 等电点聚焦电泳技术 (4) 等速电泳技术 (5) 密度梯度电泳
用支持物的电泳技术	(1) 纸上电泳 (2) 醋酸纤维薄膜电泳 (3) 薄层电泳 (4) 非凝胶性支持物区带电泳 (支持物有: 淀粉、纤维素粉、玻璃粉、硅胶等) (5) 凝胶支持物区带电泳 ① 淀粉液 ② 聚丙烯酰胺凝胶 ③ 琼脂(糖)凝胶

第一节 基本原理

在溶液中任何一个带电颗粒在电场作用下的移动大致要受到三方面的影响:

- ① 颗粒的性质, 如: 实际电荷, 大小及形状, 离解强度的难易等。
- ② 所处的环境, 如: 电解质或缓冲液的浓度, 离子强度, pH, 粘度, 温度等。
- ③ 应用电场的性质, 如: 电场强度。

不同带电颗粒在同一电场中泳动的速度不同, 常用泳动度或迁移率来表示, 迁移率是指带电颗粒在单位电场强度下泳动的速度。其数学表达式如下:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{d/t}{U/l} = \frac{dl}{Ut}$$

式中 μ 是迁移率, v 是颗粒迁移速度 (cm/s 或 min), E 是电场强度或电势梯度 (V/cm) d 是颗粒移动距离 (cm), l 是支持物的有效长度 (cm), U 是支持物两端实际电压 (V), t 是通电时间。颗粒的迁移率可通过测量 d 、 l 、 U 、 t 计算出。

影响迁移率的主要因素具体讨论如下:

1. 带电颗粒的性质 即净电荷数量, 颗粒大小及形状。一般来说, 颗粒带净电荷多, 直径小而近于球形, 则泳动速度快, 反之则慢。

物质在电场中所受到的力 (F) 为:

$$F = EQ \quad (1)$$

式中 E 是电场强度, 即单位长度支持物的电位降; Q 是物质颗粒的净电荷。根据史氏定律 (Stoke's law), 球形分子在液体中泳动所受到的阻力 (磨擦力) F' 为:

$$F' = 6\pi r\eta v \quad (2)$$

式中 r 是分子半径, η 是介质粘度, v 是分子泳动速度, 6π 是常数。当颗粒半径较大时, 则常

数为 4π , 即此常数在 $4\pi \sim 6\pi$ 之间, 视颗粒半径大小而定。

当物质在电场中受到的力与物质在液体中受到阻力平衡时, $F = F'$

与(2)合并; $EQ = 6\pi r\eta v$

$$v = \frac{EQ}{6\pi r\eta} \quad (3)$$

已知迁移率(μ)为:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

由于 v 是电泳速度(cm/s) E 是电场强度(V/cm), 所以 μ 的单位是 $\text{cm}^2/(\text{s} \cdot \text{V})$ 。

将(3)代入上式中, 则:

$$\mu = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

这就是迁移率公式。由此可见, 迁移率与分子的形状、介质粘度、颗粒所带电荷有关。其与颗粒表面电荷成正比, 与介质粘度及颗粒半径成反比。然而在实际电泳中, 带电颗粒的迁移率总是比理想的稀溶液中要低些。因为电泳中使用的是具有一定浓度的缓冲溶液。带电荷的生物分子在电解质缓冲溶液中将带有相反电荷的离子吸引到其周围, 形成一离子扩散层。在电场中, 当颗粒向相反电极移动时, 离子扩散层所带有的过剩电荷向颗粒泳动的反方向移动, 结果, 颗粒与离子扩散层之间的静电引力使颗粒的泳动速度减慢。另外, 分子颗粒表面有一层水, 在电场影响下, 它与颗粒一起移动, 可以认为是颗粒的一部分。

2. 电场强度 电场强度也称电位梯度, 是指单位长度(每 1 cm)支持物体上的电位降, 它对泳动度起着十分重要的作用, 例如纸电泳, 测量 25 cm 长纸条两端电压降为 250 V, 则电场强度为 $250 \text{ V}/25 \text{ cm} = 10 \text{ V/cm}$ 。

一般电场强度越高, 带电颗粒移动速度越快。根据电场强度大小, 可将电泳分为常压电泳和高压电泳。前者的电压在 100~500 V, 电场强度一般是 2~10 V/cm, 分离时间需数小时至数天; 后者电压可高达 500~1 000 V, 电场强度在 20~2 000 V/cm, 电泳时间短, 有时仅几分钟即可, 主要用于分离氨基酸、肽、核苷酸。由于电压升高, 电流也随之增大, 故需冷却装置。

3. 溶液的 pH 溶液的 pH 决定了带电颗粒解离的程度, 也决定了物质所带净电荷的多少。对于蛋白质、氨基酸等两性电解质而言, 溶液 pH 离等电点越远, 颗粒所带净电荷越多, 电泳速度越快, 反之则越慢。例如, 血清中几种主要蛋白质的等电点各不相同, 白蛋白 $\text{pI} = 4.0$, α_2 球蛋白 $\text{pI} = 5.06$, β 球蛋白等 $\text{pI} = 5.1$, γ 球蛋白 $\text{pI} = 7.1$ 。当在 pH 8.6 的缓冲液中电泳时, 这些蛋白质都带负电荷, 它们的泳动速度: 白蛋白 $> \alpha_2$ 球蛋白 $> \beta$ 球蛋白 $> \gamma$ 球蛋白。因此, 当要分离一种蛋白质混合物时, 应选择一种能使各种蛋白质所带电荷量差异明显的 pH 值, 以利于各种蛋白质分子的解离。

4. 溶液的离子强度 溶液的离子强度是另一个重要条件。在保持足够缓冲能力前提下, 离子强度要求最小。溶液的离子强度越高, 带电颗粒泳动速度越慢, 反之越快。通常缓冲液离子强度选择在 0.05~0.1 mol/L 之间。在缓冲液中离子强度可用下式计算:

$$I = 0.5 \sum cZ^2$$

I = 溶液的离子强度, c = 离子的浓度, Z = 离子的价数。

例如:求 0.154 mol/L NaCl 溶液的离子强度。

$$I = 0.5 \times (0.154 \times 1^2 + 0.154 \times 1^2) = 0.154$$

浓度大的缓冲液在合适电压下,有较低的电阻和较大的电流,产热较高。离子强度很高时要用低电压,避免过多产热,这样又导致电泳时间会长,增加变性和区带分离困难。

5. 电渗作用 在有支持物的电泳中,影响电泳的另一个重要因素是电渗作用。所谓电渗就是指在电场中,液体对固体支持物的相对移动。例如在 pH 8.6 时,血清蛋白质进行纸电泳时,γ 球蛋白与其他蛋白质一样带负电荷,应该向正极移动,然而它却向负极方向移动,这就是电渗作用的结果。

滤纸的纤维间具有大量孔隙带有负电荷,如一束毛细管,进行电泳时蛋白质通过这些孔隙向前移动。由于纸的孔隙带有负电荷,与带电颗粒一样可以吸引正离子,因此介质沿管壁相对地带有较多的正电荷。在电场中,带负电荷的蛋白质向正极移动,而介质却向负阴极移动,从而对蛋白质颗粒的泳动起阻碍作用。由于 γ 球蛋白分子颗粒大,净电荷较少,移动速度慢,电渗作用大于颗粒向前泳动的力,结果 γ 球蛋白向后退。其他血清蛋白质因分子较小,净电荷较多,电渗作用小于分子向前移动的力,因此,电泳后 γ 球蛋白反而在点样位置之后(图 3-1 电渗示意图)。

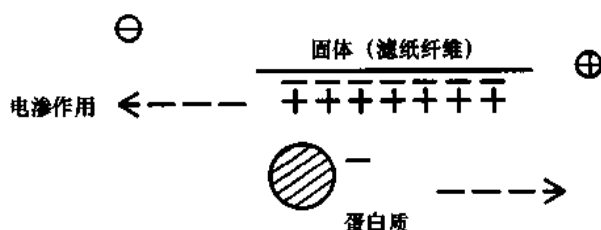


图 3-1 电渗作用示意图

若电渗方向与样品电泳移动方向一致,则样品的表观迁移率就加快,反之则降低。所以电渗作用与电泳速度关系密切。根据支持介质的不同,可产生不同程度、不同方向的电渗流动。

第二节 醋酸纤维薄膜电泳

醋酸纤维薄膜(cellulose acetate membrane, CAM)是一种由醋酸纤维加工制成的一种细密且薄的微孔膜。根据其乙酰化程度、厚度、孔径和网状结构等方面不同而具有不同类型。现已广泛应用于各种生物分子的分离分析中,如血清蛋白、血红蛋白、球蛋白、脂蛋白、糖蛋白、甲胎蛋白、类固醇及同工酶等。它具有简单快速等优点:①电泳区带界限清晰;②通电时间较短(20 min 至 1 h);③对各种蛋白质(包括血清白蛋白、溶菌酶及核糖核酸酶)基本无吸附,因此无拖尾现象;④不吸附染料,因此薄膜上未与蛋白质结合的染料可完全洗掉,显示电泳区带背景干净。电泳须在密闭容器中使用较低电流进行,因薄膜吸水量较低,可避免过分蒸发。其电渗作用虽高但很均一,不影响样品分离效果。不足之处是分辨率比聚丙烯酰胺凝胶电泳低,由于薄膜厚度小(约 10~100 μm),样品用量很少,不适于制备。

电泳的影响因素。①膜的性质;②缓冲溶液的组成, pH 值和浓度;③电流和有效电压;④电泳

时间和温度;⑤电泳槽的密封性能。

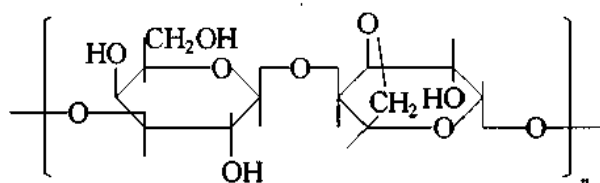
缓冲液的选择。为了提高电泳速度和分辨力,应根据样品的理化性质选择缓冲液的种类、pH值和离子强度。缓冲液浓度应准确,浓度太低,区带泳动速度加快并增加区带宽度,浓度过高则使区带移动速度减慢,造成区带不易分离。因此要特别注意环境温度升高时,因缓冲液蒸发而使浓度增大造成的影响。选择缓冲液最好是挥发性强,对显色或紫外光等观察区带没有影响。若样品含盐量较高时,宜采用挥发性缓冲液。如血清蛋白电泳时可选用 pH 8.6 的巴比妥缓冲液或硼酸缓冲液,氨基酸的分离则可选用 pH 7.2 的磷酸缓冲液等。

操作步骤。点样→电泳→染色→漂洗→透明→测定光密度。选用一定长度和宽度的薄膜条,在其一端处点上样品,在一定电压、电泳条件下,进行电泳。染色可根据不同物质使用不同的显色方法,如核苷酸等物质可在紫外分析灯下观察定位。染色漂洗后,可将电泳区带剪下,溶于一定溶液中进行光密度测定,也可浸于折射率为 1.474 的油中或其他透明液中使之透明,然后直接用光密度计测定。

电泳结果不满意或失败的可能原因。①醋酸纤维素薄膜:a. 过分干燥出现白斑;b. 膜弯曲;c. 表面缓冲液过多。②缓冲溶液:a. 浓度过高;b. 使用次数太多,时间过长而改变浓度;c. 膜与缓冲液接触不良。③样品和加样:a. 样品量太多;b. 加样不整齐;c. 起始位置错误。④电泳:a. 时间过长或过短;b. 电泳槽密闭性不好;c. 电流太大;d. 温度过高。⑤染色和透明:a. 染色液连续使用次数过多,pH 值改变;b. 未完全干燥时进行透明处理。

第三节 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖是从琼脂中提取出来的,是由 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖结合的链状多糖,含硫酸根比琼脂少,因而分离效果明显提高。



琼脂糖电泳具有以下优点:①琼脂糖含液体量大,可达 98%~99%,近似自由电泳,但样品的扩散度比自由电泳小,对蛋白质的吸附极微;②琼脂糖作为支持体有均匀、区带整齐、分辨率高、重复性好等优点;③电泳速度快;④透明而不吸收紫外线,可以直接用紫外检测仪作定量测定;⑤区带可染色,样品易回收,有利于制备。缺点是琼脂糖中有较多硫酸根,电渗作用大。

缓冲液的选用。琼脂糖电泳常用缓冲液的 pH 在 6~9 之间,离子强度为 0.02~0.05。离子强度过高时,会有大量电流通过凝胶而产生热量,使凝胶水分蒸发,析出盐结晶。严重可使凝胶断裂,电流中断。常用缓冲液有硼酸盐缓冲液与巴比妥缓冲液。为防止电泳时两极缓冲液槽内 pH 和离子强度改变,可在每次电泳后合并两极槽内的缓冲液混匀后再使用。

琼脂糖电泳常用于抗原抗体反应的分析,抗体的分离。其种类较多,如高压琼脂糖免疫电泳,定量免疫电泳(火箭免疫电泳,双向免疫电泳)等。

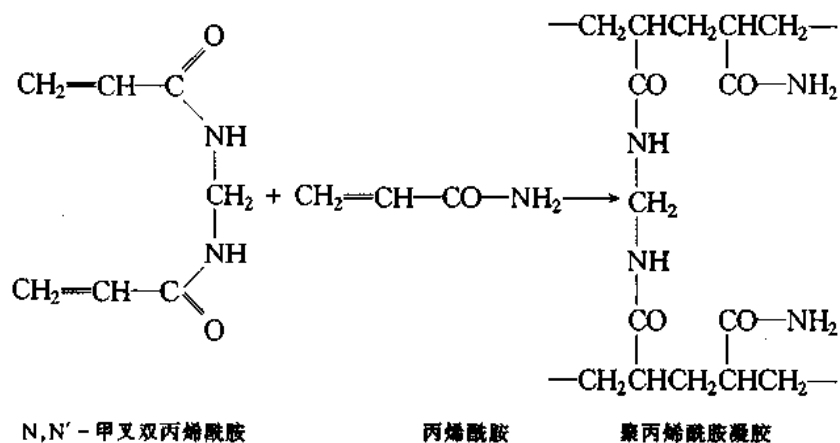
火箭免疫电泳早在 1966 年 Laurell 就介绍了这种方法。它是一种操作简单、省时、可重复的定量免疫电泳方法。由于样品从一定大小的起始孔中朝一个方向移动,形成的抗原-抗体沉淀峰形似火箭而得名。在一定浓度范围内形成的沉淀峰高与所加的样品浓度成正比,一般沉淀峰高在 5~60mm 之间时,定量比较正确,精确度一般超过 95%。

第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)早在 1959 年由 Raymends 和 Weintraub, L 建立。1964 年,此法进一步从理论和实验技术上得到改进并推广应用。由于具有较高的分辨率和灵活性,目前已被广泛应用于蛋白质等生物大分子的分离和分析。

PAGE 以聚丙烯酰胺为支持介质,根据被分离物质的分子大小和分子电荷多少进行分离。

聚丙烯酰胺是由单体丙烯酰胺和交联剂 N,N'-甲叉双丙烯酰胺聚合而成的大分子。此聚合过程需要有催化剂参加,包括引发剂和加速剂两部分。引发剂常为过硫酸铵,在形成中提供自由基,通过自由基传递,使丙烯酰胺成为自由基,发动聚合反应。加速剂为四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)则可加快引发剂释放自由基的速度,具体反应为过硫酸铵在水溶液中形成一个过硫酸自由基。此自由基可激活 TEMED。TEMED 作为一个电子载体提供一个未配对电子将丙烯酰胺单体转化成丙烯酰胺自由基,经反应多聚物聚合成网状结构的凝胶状,其网状孔径大小由聚合条件及单体浓度决定。由过硫酸铵引发的反应称化学聚合反应。核黄素也可作为引发剂,因需强光照反应液,故称为光聚合反应。



聚丙烯酰胺凝胶的制备:凝胶的筛孔、机械强度及透明度等很大程度上由凝胶的浓度和交联度决定。凝胶浓度用 T 表示,即每 100 ml 凝胶溶液中含有单体和交联剂的总克数。交联度用 C 表示,即凝胶溶液中交联剂占单体和交联剂总量的百分数,可用下式计算:

$$T = \frac{a+b}{m} \times 100\%$$

$$C = \frac{b}{a+b} \times 100\%$$

式中 a : 丙烯酰胺克数; b : 甲叉双丙烯酰胺克数; m : 缓冲液体积(ml)

凝胶浓度过高时, 凝胶硬而脆, 容易破碎。反之, 凝胶稀软, 不易操作。交联度过高, 凝胶不透明并缺乏弹性, 反之凝胶呈糊状。

凝胶孔径在凝胶电泳中是一个重要参数。凝胶具有三度空间网状结构, 故凝胶电泳除具有电泳作用外还具有分子筛作用。网孔的大小和形状直接影响到物质的分离效果。凝胶网孔可通过下式计算。

$$\bar{P} = \frac{kd}{\sqrt{C}}$$

式中, P : 网孔平均直径; C : 多聚体浓度; d : 该多聚体分子直径(若不是卷曲分子应为 0.5 nm); k : 常数, k 值取决于凝胶的几何构型, 如果多聚体的链是以近似于直角交联的, 则约为 1.5。据此, 可以通过多聚体浓度 C 近似地计算出网孔直径。例如已知多聚体浓度为 5%, 其网孔平均直径应为:

$$\bar{P} = \frac{1.5 \times 0.5 \text{ nm}}{\sqrt{\frac{5}{100}}}$$

上式计算与实际情况尚有一定距离, 有人测定了总浓度(T)为 6.5%~20% 的丙烯酰胺凝胶液, 在六种不同比例的双丙烯酰胺存在下, 聚合的网孔大小与总浓度有关。总浓度愈大, 孔径相应变小, 机械强度增强。当总浓度不变时, 甲叉双丙烯酰胺(Bis)浓度在 5% 时孔径最小, 高于或低于此值时, 聚合孔径都相对变大。一般情况下, 7.5% 浓度的凝胶(标准凝胶)分离大多数生物体蛋白质的电泳结果比较满意。

凝胶种类: 聚丙烯酰胺凝胶电泳可分为连续的和连续的两类。前者指整个电泳系统中所用缓冲液 pH 和凝胶网孔都是相同的, 后者是指电泳系统中采用了两种或两种以上的缓冲液、pH 和凝胶浓度。

1. 不连续圆盘电泳 不连续电泳除具有连续电泳中的电泳和分子筛作用外, 还具有浓缩效应, 可使稀的样品在电泳过程中浓缩成层, 从而提高分辨率。电泳凝胶为三种不同性能的凝胶。样品胶、浓缩胶(又名成层胶)和分离胶, 前两种胶的缓冲液、pH 和孔径大小完全一样, 不同的是浓缩胶中无样品, 分离胶的孔径较大, pH 也不同。下面以血清蛋白电泳为例表 3-2。浓缩胶和分离胶使用的丙烯酰胺凝胶总浓度 $T=3\%$, 交联剂的百分比 $C=20\%$, Tris-HCl 缓冲液(pH 为 6.7)由核黄素催化聚合成大孔径胶。而分离胶是 $T=7\%$, $C=2.5\%$, Tris-HCl 缓冲液(pH 8.9)由过硫酸铵催化聚合成小孔径胶。将三种凝胶依次灌装进内径为 0.7cm、长 10cm 的小玻璃管内, 置于 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3)的电泳槽内进行电泳。浓缩胶中的样品可被高度浓缩成一薄层。随

表 3-2 血清蛋白凝胶电泳条件

	凝胶总浓度 $T/(\%)$	交联剂百分比 $C/(\%)$	Tris-HCl 缓冲液 pH	凝胶孔径	主要效应
样品胶	3	20	6.7	大	(含有样品)
浓缩胶	3	20	6.7	大	浓缩效应
分离胶	7	2.5	8.9	小	电荷、分子筛效应

注: 电泳缓冲液用 Tris-甘氨酸缓冲液, pH 8.3

着电泳的进行,样品可经电荷效应和分子筛效应而被分离。

这里有几个问题需清楚。

(1) 浓缩效应 血清蛋白质为什么在浓缩胶中被浓缩成薄层?关键在于电泳缓冲液与凝胶缓冲液的组成及 pH 的不同造成的快、慢离子的产生,从而导致一高电势梯度的形成。三种凝胶缓冲液的组成一样,但样品胶和浓缩胶的缓冲液 pH 为 6.7。在此电泳条件下 HCl 离解度大,几乎全部释放出。在电泳中,Cl⁻ 最小,有效泳动率最大,称为快离子(或先行离子);电泳槽中的电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸,甘氨酸 pI 为 6.0,只有 0.1%~1%解离为 NH₂CH₂COO⁻,有效泳动率最小,称慢离子(或随后离子);而样品中血清蛋白带负电荷,其解离度比 HCl 小,比甘氨酸大,介于二者之间,故有效泳动率为:快离子(Cl⁻)>蛋白质->慢离子(甘氨酸离子)。

电泳开始后,快离子(Cl⁻)很快超过蛋白质,使其后面形成一离子浓度较低的低电导区。电导与电势梯度成反比,于是低电导区产生了较高的电势梯度。这种电势梯度使电泳开始后,在电极缓冲液与样品胶之间界面上,Cl⁻很快离开慢离子(甘氨酸离子)并向下迁移。几乎与此同时在这两种离子间造成一个低电导区,于是产生较高的电势梯度,其结果是迫使慢离子加速迁移,并出现高低电压区之间一个稳定的迅速下移的界面。蛋白质样品正好介于两种离子之间,故在高低二个电势梯度的界面上被浓缩成一薄层。随着电泳继续进行,夹有浓缩样品薄层的稳定界面也继续向下移动,这就是浓缩效应。请注意,虽然眼观蛋白质样品已为一薄层,但由于各种蛋白质所带电荷不同,实际也已被分离。

(2) 分子筛效应 样品由浓缩胶一旦进入分离胶,由于 pH 不同,使慢离子(甘氨酸离子)的解离度变大有效泳动率也随之加大,很快超过所有蛋白质,并近似于快离子,导致高电势梯度消失,使蛋白质进入有均一电势梯度的 pH 的分离胶中。由于分离胶孔径小,各种蛋白质除电荷效应被分离外,可根据分子大小和形状不同而被分开,即使是净电荷相同的蛋白质也因分子筛效应而分离。

2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 1967 年 Shapiro 等发现阴离子去污剂十二烷基硫酸钠可消除电泳中蛋白质的电荷因素,这样蛋白质的电泳迁移率完全取决于分子的大小,因而可以用电泳技术测定蛋白质的相对分子质量。电泳时,将足够量的 SDS 和巯基乙醇加入蛋白质样品溶液中。可使蛋白质分子中的二硫键还原。由于十二烷基硫酸根带负电荷,可使所有蛋白质-SDS 复合物带上相同密度的负电荷,其量大大超过蛋白质分子原有的电荷量,因而掩盖了不同种蛋白质原有的电荷差别。另外,SDS 与蛋白质结合后还可引起构象改变。蛋白质-SDS 复合物近似“雪茄烟”形的长圆棒,不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度都一样,约为 1.8 nm。因此在电泳中,蛋白质的迁移率不再受电荷和形状的影响,而取决于相对分子质量的大小。

聚丙烯酰胺凝胶电泳的优点。①样品用量少(1~100 μg),不易扩散;②分辨率高。具有三种效应:浓缩效应,分子筛效应,电荷效应;③电渗作用小;④可根据被分离物质的分子大小控制凝胶浓度制成不同孔径的凝胶。一般含丙烯酰胺 7%~7.5%的凝胶适合分离相对分子质量为 1 万至 100 万的物质,15%~30%的凝胶适合于 1 万以下的分子,4%的凝胶则适合于相对分子质量特别大的分子;⑤丙烯酰胺较稳定,无色透明,机械强度好,易观察,可用检测仪直接测定。

第五节 等电聚焦

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)目前已广泛用于蛋白质分析和制备中,是 20 世纪 60 年代

后才迅速发展起来的重要技术。IEF 的基本原理是,在电泳槽中放入两性电解质,如脂肪族多氨基多羧酸(或磺酸盐、羧酸磺酸盐混合型),pH 范围有 3~10、4~6、5~7、6~8、7~9、和 8~10 等。电泳时,两性电解质形成一个由阳极到阴极逐步增加的 pH 梯度,正极为酸性,负极为碱性。蛋白质分子是在含有载体两性电解质形成的一个连续而稳定的线性 pH 梯度中进行电泳。样品可置于正极或负极任何一端。当置于负极端时,因 $pH > pI$,蛋白质带负电向正极移动。随着 pH 的下降,蛋白质负电荷量渐少,移动速度变慢。当蛋白质移动到与其等电点相应 pH 位置上时即停止,并聚集形成狭窄区带。可见,IEF 中蛋白质的分离取决于电泳 pH 梯度的分布和蛋白质的 pI ,而与蛋白质分子大小和形状无关。

IEF 的优缺点。优点:①分辨率很高,可把 pI 相差 0.01pH 的蛋白质分开;②样品可混入胶中或加在任何位置,在电场中随着电泳的进行区带越来越窄,克服了一般电泳的扩散作用。③电泳结束后,可直接测定蛋白质 pI 。④分离速度快,蛋白质可保持原有生物活性。缺点:①电泳中应使用无盐样品溶液,否则高压中电流太大而发热。但无盐时有些蛋白质溶解性能差易发生沉淀,可在样品中多加些两性电解质。②许多蛋白质在 pI 附近易沉淀而影响分离效果,可加些脲或非离子去垢剂解决。

第六节 电泳后大分子的检测

对于电泳分离后的大分子必须进行检测,常用的定性方法是染色显示法,此外还有光密度计测定法和放射性检测法。

(一) 染色显示法

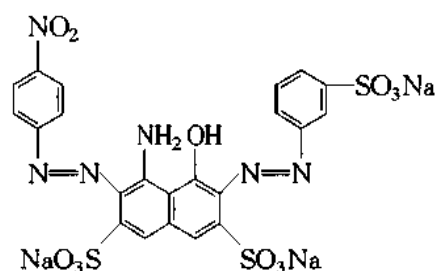
样品经电泳后用染色可将区带显示出来,为了防止电泳后凝胶柱内的分离成分扩散,需要先将分离的区带固定,一般把电泳后凝胶浸泡在 7%醋酸或 12.5%三氯醋酸中十几分钟即可。

1. 蛋白质的染色 常用的蛋白质染色方法见表 3-3

表 3-3 蛋白质的染色法

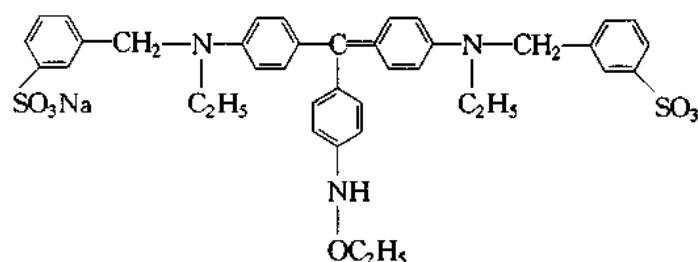
方 法	固 定	染 色 液	染色时间	脱 色
氨基黑 10B	甲醇 7%乙酸	1%氨基黑于 0.1 mol/L NaOH 中, 0.5%~1%氨基黑于 7%乙酸中	5 min(室温) 2 h(室温) 10 min(96℃)	5%乙酸 7%乙酸
考马斯亮蓝 R250	20%磺基水杨酸 10%三氯乙酸	0.25% R250 水溶液 1% R250:10%三氯乙酸 = 19:1 (V/V)	5 min(室温) 0.5 h(室温)	7%乙酸 10%三氯乙酸
考马斯亮蓝 G250	6%乙酸 12.5%三氯乙酸	1% G250 于 6%乙酸中, 0.1% G250 于 12.5%三氯乙酸中	10 min(室温) 30 min(室温)	甲醇:水:浓氨水 = 64:26:1
固绿	7%乙酸	1%固绿于 7%乙酸中	2 h(5℃)	7%乙酸

(1) 氨基黑 10B(amino black 10B) 氨基黑是最常用的蛋白质染料,其分子式为 $C_{22}H_{13}O_{12}N_6S_3Na_3$, 相对分子质量为 716.0, $\lambda_{max} = 620 \sim 630 \text{ nm}$,氨基黑是酸性染料,其磺基与蛋白质反应形成复合盐,此盐可用阴离子交换剂分开,氨基黑留在交换剂上,用水洗下回收蛋白质。



氨基黑钠盐

(2)考马斯亮蓝 R250(coomassie brilliant blue 250) 考马斯亮蓝 R250 染色敏感度比氨基黑 10B 高 5 倍。其分子式为 $C_{45}H_{44}O_7H_3S_2Na$, 相对分子质量为 824, $\lambda_{max} = 560 \sim 590 \text{ nm}$ 。该染料是通过范德瓦引力与蛋白质结合, 尤其适用于微量蛋白质的染色。



考马斯亮蓝 R250

(3)固绿(fast green, FSE) 固绿是一种酸性染料, 分子式为 $C_{32}H_{33}N_2O_{10}S_3Na$, 相对分子质量为 808, $\lambda_{max} = 625 \text{ nm}$, 染色敏感度与氨基黑相似。

2. 核酸的染色 核酸染色常用的固定液有三氯乙酸、甲醇-乙酸液、氯化高汞、乙酸铜、乙酸等, 常用的核酸染色见表 3-4。

表 3-4 核酸的染色法

染料	染色对象	固定与染色方法	脱色
甲基绿	天然 DNA	0.25% 甲基绿溶于 0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液, pH4.1 中, 用氯仿反复抽提至无紫色, 染 1h(室温)	
焦宁 Y	DNA	0.25% 焦宁 Y 溶于乙酸: 甲醇: 水(1:1:8, V/V) 和 1% 乙酸铜的混合液中, 染 16 h(室温)	乙酸: 甲醇: 水 = 0.5:1:8.5
次甲基蓝	RNA	1 mol/L 乙酸中固定 10~15 min, 2% 次甲基蓝溶于 1 mol/L 乙酸中, 染 24 h(室温)	1 mol/L 乙酸
甲苯胺蓝	RNA	0.05% 甲苯胺蓝溶于 15% 乙酸中, 染 1~2h	7.5% 乙酸

焦宁 Y(pyronine Y): 其染色灵敏度高, 效果最好。若凝胶浓度合适, 检出极限可至 $0.01 \mu\text{g}$ 。脱色后 RNA 色带稳定, 抗光不易褪色。焦宁 Y 染色液最适浓度为 0.5%。

次甲基蓝(methylene blue): 染色效果不如焦宁 Y, 检出灵敏度在 $5 \mu\text{g}$ 以上。相对分子质量为 378.88。染色后 RNA 色带较扩散, 时间长易褪色。

3. 糖蛋白的染色 过碘酸-Schiff 试剂显色。

过碘酸液: 2 g 过碘酸溶于 30 ml 蒸馏水中, 加 15 ml 0.2 mol/L 醋酸钠溶液及 100 ml 乙醇, 用前配制或保存于棕色瓶中, 可用数日。

还原液: 5 g 碘化钾、5 g 硫代硫酸钠溶于 100 ml 蒸馏水中, 加 150 ml 95% 乙醇及 2.5 ml

2 mol/L HCl, 现配现用。

亚硫酸品红液: 2g 碱性品红溶于 400 ml 沸水中, 冷却至 50 ℃ 过滤。加入 10 ml 盐酸和 4 g 偏亚硫酸钾, 塞紧瓶塞置于冰箱过夜。加 1 g 活性炭, 过滤。2 mol/L 盐酸缓慢加入, 直至此溶液在玻片上干后不变红色为止。置棕色瓶内冰箱储存。若溶液变红即停止使用。

4. 脂蛋白的染色 染色液: 取 50 g 苏丹黑 B(Sudan black B) 溶于 20 ml 丙酮中, 加入 15 ml 醋酸和 80 ml 水的混合液, 搅拌 30 min 后离心取上清液染色过夜。染料可稳定 2 天。

脱色液: 甲醇: 冰醋酸: 水 = 5:5:1 (V/V) 或 甲醇: 水: 氨水 = 64:36:1 (V/V)

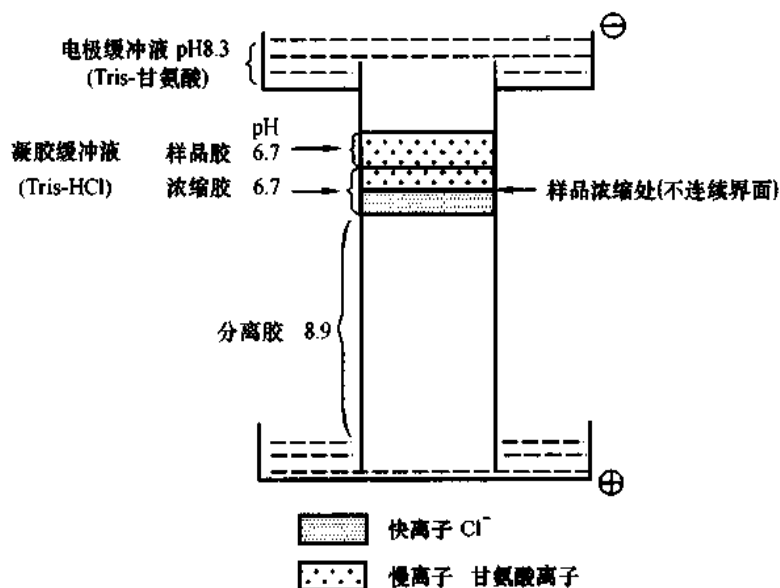


图 3-2 不连续凝胶电泳示意图

(二) 微量光密度计测定法

未染色的样品, 电泳凝胶可用微量光密度计进行紫外扫描。染色后须选用合适的波长, 如用染料氨基黑, 须用 620 nm, 考马斯亮蓝则用 550 nm, 固绿则用 625 nm。根据扫描曲线的峰面积可作相对量比较, 根据峰面积和标准样品浓度制作的标准曲线可求出样品含量(图 3-2)。

(第二军医大学 冯伟华)

第四章

离心技术

离心(centrifugation)技术是将含有微小颗粒的悬浮液置于转头中,利用转头绕轴旋转所产生的离心力,将悬浮的微小颗粒按密度或质量的差异将其分离的方法。随着离心技术的不断发展及离心装置的不断完善,离心机的最大额定转速不断提高,经历了低速、高速、超速等发展阶段。离心机的结构也更加复杂,加入了冷冻系统、真空系统及具有良好自动控制功能的操作系统等,分析用超速离心机(ultracentrifuge)还装有分析光学系统,可用于样品的定量分析。电子计算机自动控制程序的引入使得样品相对分子质量、沉降系数及扩散系数等的测定自动化,为提高测定速度和测定结果的准确性提供了有利的条件。

第一节 基本原理

一、重力场中的沉降

要把生物样品中的微粒从液体中分离出来,最简单的方法是将液体静置一段时间,液体中的微粒受重力的作用,使得较重的微粒下沉,与液体分开,这就是重力沉降。微粒在介质中的沉降受到介质的浮力、介质阻力及扩散现象的影响。根据阿基米德原理,物体在介质中受到浮力 F_b 作用,其大小等于物体所排开同体积介质的质量:

$$F_b = V \cdot \rho_0 \cdot g = \frac{m}{\rho} \cdot \rho_0 \cdot g$$

式中, V 为物体的体积, m 为物体的质量, ρ 为物体的密度, ρ_0 为介质的密度, g 为重力加速度

使微粒下沉的力 $F = W - F_b = V\rho g - V\rho_0 g = Vg(\rho - \rho_0)$, 公式中 W 为重力

若 $\rho > \rho_0$ F 向下,微粒下沉。

若 $\rho < \rho_0$ F 向上,微粒上浮。

若 $\rho = \rho_0$ F 为零,微粒处于平衡悬浮状态。

沉降过程中,当微粒在介质中向下移动的速度增加时,微粒与介质分子摩擦而产生阻力 F_r ,其大小与物体的运动速度成正比,即

$$F_r = f \frac{dx}{dt}$$

式中, f 为阻力系数

$\frac{dx}{dt}$ 为微粒的运动速度

微粒在重力场作用下在介质中开始沉降时,其速度很大,阻力也很大。微粒进行加速运动,当阻力增加到与微粒所受的重力相当时,微粒运动的加速度为零,此时微粒表现为等速运动。通常把微粒等速沉降运动时的速度称为沉降速度,可写为:

$$m \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho} \right) g = f \cdot \frac{dx}{dt}$$

由此式可见粒子的沉降速度与 $m \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho} \right)$ 成正比,与阻力系数 f 成反比。

许多生物样品通常都是在水溶液中进行沉降的,其密度与水的密度相近,因而生物样品的密度变化对沉降速度影响不大。生物样品的质量差别很大,质量越大的微粒在重力场中的沉降速度越大,质量的大小对微粒的沉降速度产生很大的影响。扩散作用是影响微粒沉降的另一个重要因素。微粒的扩散方向与重力沉降方向相反,微粒越小其扩散作用越大。如微粒的质量太小,扩散作用很强,当重力场中的沉降速度与扩散速度相当时,就观察不到明显的重力沉降。如要将这种质量很小的微粒沉降分离出来,只有在离心力场作用下才可能实现。

二、相对离心力

离心技术是根据微小颗粒物质在离心场中的行为建立并发展起来的。离心机的转头能够以稳定的角速度做圆周运动,从而产生一个强大的辐射向外的离心力场,它赋予处于其中的任何物体一个离心加速度,使之受到一个外向的离心力。离心机所产生的离心场(G),通常以如下方程式表示。

$$G = \omega^2 r$$

式中, ω 为转头的角速度,以 rad/s 表示

r 为旋转半径(物质质点所处位置与旋转中心的距离)

离心场通常用相对离心力(Relative Centrifugal Force, RCF, 用符号 F_{RC} 表示),也就是离心力的大小相当于地心引力(即重力加速度 g)的倍数来表示,即

$$F_{RC} = \frac{\omega^2 r}{g} \times g$$

公式进一步推导

$$F_{RC} = \frac{(2\pi n)^2 r}{60^2 g} \times g = 1.119 \times 10^{-5} \times n^2 r \times g$$

式中, n 为转头转速,以转/分(revolutions per minute, 简写成 r/min)表示

g 为重力加速度,等于 980.6 cm/s^2 。

从式中可看出离心机的转头转速和相对离心力 g 或 $\times g$ 之间可以互相换算。一般在低速离心时(转速小于 5 000 r/min),相对离心力的大小常用 r/min 来表示,而超速离心时则用 g 或 $\times g$ 来表示。

由于离心管中从管口到管底各点与旋转中心的距离是不同的,所以在同样转速时,管口和管底所受到的离心力也有差别。例如在某个角度转头中,离心管口到旋转中心的距离为 4.8 cm,而离心管底到旋转中心的距离是 8.0 cm,当转速为 12 000 r/min 时,离心管口和离心管底所受到的相对离心力 F_{RC} 分别是:

$$F_{RC}(\text{管口}) = 1.119 \times 10^{-5} \times (12\,000)^2 \times 4.8 \times g = 7\,734 \times g$$

$$F_{RC}(\text{管底}) = 1.119 \times 10^{-5} \times (12\,000)^2 \times 8.0 \times g = 12\,891 \times g$$

两者相差将近一倍。因此在超速离心时,人们以相对离心力($\times g$)而不是以转速(r/min)来表示离心力的大小,另外也可看出确定旋转半径 r 的数值的重要性,在离心时, r 的准确定义应该是被分离物质颗粒(包括生物大分子)

在离心管中所处的位置与旋转中心之间的距离。

三、沉降速度

沉降速度(sedimentation velocity)是指在强大的离心力作用下,单位时间内物质颗粒沿半径方向运动的距离。

被分离物质颗粒(或大分子)在离心管中与转头一同旋转时承受着沿半径方向的直接离心力作用,用 F_c 来表示,那么

$$F_c = M\omega^2 r$$

由于颗粒处在液体介质中,还必须考虑浮力的作用,因此我们用有效质量来表示被分离颗粒物质在离心场中质量的大小,即

$$M = V(\rho - \rho_m)$$

假定颗粒为球形,则

$$V = 1/6\pi D^3$$

这样我们就得到公式

$$F_c = 1/6\pi D^3(\rho - \rho_m)\omega^2 r$$

式中, M 为颗粒有效质量,用克(g)表示

ω 为转头角速度,用弧度/秒(rad/s)表示

r 为旋转半径,用厘米(cm)表示

ρ 和 ρ_m 分别为颗粒和介质的密度,用克/厘米³(g/cm³)表示

V 为颗粒体积,用立方厘米(cm³)表示

D 为颗粒的直径,用厘米(cm)表示

颗粒受 F_c 作用沿半径方向运动,即沉降,当颗粒以速度 v (cm/s)沉降时,又受到摩擦力(F_l)的作用。

$$F_l = f \cdot v$$

式中, f 为摩擦系数,与介质的粘度(η_m ,单位帕·秒,Pa·s)和颗粒的线性大小有一定关系,对一个球形颗粒来说,按照 Stoke's 定律

$$f = 3\pi\eta_m D$$

颗粒受 F_c 、 F_l 的合力作用向管底沉降。当 $F_c = F_l$ 时,颗粒即达到其最终速度,并保持匀速运动。即

$$1/6\pi D^3(\rho - \rho_m)\omega^2 r = 3\pi\eta_m Dv$$

移项整理得

$$v = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2(\rho - \rho_m)\omega^2 r}{\eta_m}$$

因为

$$\omega = 2\pi n / 60$$

所以

$$v = 6.092 \times 10^{-4} \frac{D^2(\rho - \rho_m)n^2 r}{\eta_m}$$

由此可以看出,颗粒沉降速度与三方面的因素有关:

(1) 颗粒本身的性质 沉降速度与颗粒直径和密度成正比。密度相同时大颗粒比小颗粒沉降快;大小相同时,密度大的颗粒比密度小的沉降快。

(2) 介质的性质 沉降速度与介质的粘度、密度成反比,介质粘度、密度大,则颗粒沉降慢。

(3) 离心条件 颗粒沉降速度与离心时转速和旋转半径成正比。如果其他的条件不变,沉降速度随着 r 的增大而增大,在进行速度区带离心时, r 对沉降速度的这种影响不利于达到满意的分离效果,所以需要在沿半径方向上相应地增加介质的密度和粘度以克服 r 的增加造成的影响。

颗粒的密度一般取决于它的化学组成和空间结构,在溶液中其密度又与它的水合作用相关,而颗粒水合作用的程度取决于介质中的离子浓度与其他水化分子浓度。因此我们引出术语“浮力密度”(buoyant density)来描述在介质中的特定颗粒。浮力密度可以通过测定颗粒在介质中停止沉降(即 $\rho - \rho_m = 0$)时的介质密度来确定。同一种颗粒在不同的介质中浮力密度大小不相同。例如:通过 DNA 本身的化学组成计算出的密度约为 2 g/cm^3 。DNA 在水溶液中的浮力密度约为 1.1 g/cm^3 ,而在 CsCl 浓溶液中的浮力密度约为 1.7 g/cm^3 。

四、沉降系数

(一) 沉降系数

沉降系数(sedimentation coefficient)是指单位离心场作用下颗粒沉降的速度,以 s 来表示, $s = v/(\omega^2 r)$ 。

当我们将某些生物高分子和亚细胞器组分的化学结构、相对分子质量还不了解时,可以用沉降系数对它们的物理特性进行初步描述,将它们区分开来。例如大肠杆菌核蛋白体是 70 S ,它由两个亚基组成,用超离心的方法测得其沉降系数分别为 30 S 和 50 S ,当我们还不清楚它们的结构时就暂以 30 S 和 50 S 命名以示区别。

我们已经提到颗粒的沉降速度(v)与 $\omega^2 r$ 成正比。

$$\text{即 } s = K' \frac{D^2(\rho - \rho_m)}{\eta_m} \quad \text{假定颗粒为球形 } K' = \frac{1}{18}$$

从上式可看出:沉降系数 s 的值与颗粒的大小、形状和密度,以及离心所使用的介质的密度和粘度有关,而与转头的速度和类型无关。

(二) 沉降常数

因为实际测定沉降系数的条件各不相同,必须进行标准化才能准确地描述颗粒特性。公认的标准介质是 20°C 的水,它的密度和粘度($\rho_{20,w}, \eta_{20,w}$)是已知的。在这种标准介质中所确定的颗粒的沉降系数只依赖于颗粒本身的两个参数,即颗粒大小和密度,而这两个参数可以用离心的方法确定。颗粒在 20°C 水中的沉降系数称为其沉降常数 $s_{20,w}$ 。

$$s_{20,w} = K' \frac{D^2(\rho - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}}$$

$s_{20,w}$ 与它的测量状态无关,因而具有通用的特性。

确定沉降常数没有必要一定在水中进行离心。如果已知介质的特征值(ρ_m, η_m),就可利用在该介质中离心的数据确定沉降系数 s ,再将 $s_{20,w}$ 的表达式除以 s 的表达式,即可求出颗粒的沉降常数。

$$\begin{aligned} s_{20,w}/s &= K' \frac{D^2(\rho - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}} \bigg/ K' \frac{D^2(\rho - \rho_m)}{\eta_m} \\ s_{20,w} &= s \cdot \frac{(\rho - \rho_{20,w}) \eta_m}{(\rho - \rho_m) \eta_{20,w}} \\ &= \frac{v}{\omega^2 r} \frac{(\rho - \rho_{20,w}) \eta_m}{(\rho - \rho_m) \eta_{20,w}} \end{aligned}$$

由此看出,如果已知在一定角速度 ω 和旋转半径 r 时的沉降速度 v 以及颗粒的浮力密度 ρ 及其所在介质的密度与粘度(ρ_m, η_m),就可以确定颗粒的沉降常数 $s_{20,w}$ 。 $s_{20,w}$ 的单位命名为 Svedberg, 以 S 表示:

$$1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$$

例如,动物原生质核糖体的沉降常数等于 80 S,它的含义就是: $s_{20,w} = 80 \times 10^{-13} \text{ s}$ 。细胞及细胞的各种组成成分的沉降系数有很大的差异(表 4-1),我们可以利用生物样品沉降系数的差异采用离心技术将它们彼此分离开来。

表 4-1 细胞及细胞内的某些成分的沉降系数范围和它们的离心条件

名 称	沉降系数/S	F_{RC}/g	转速/(r/min)
细胞	$>10^7$	<200	$<1\ 500$
细胞核	$4 \times 10^6 \sim 10^7$	600 ~ 800	3 000
线粒体	$2 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$	7 000	7 000
微粒体	$10^2 \sim 1.5 \times 10^4$	1×10^5	30 000
DNA	10 ~ 120	2×10^5	40 000
RNA	4 ~ 50	4×10^5	60 000
蛋白质	2 ~ 25	$>4 \times 10^5$	$>60\ 000$

(三) 沉降系数与物质相对分子质量

由沉降系数根据 Svedberg 公式可以计算出物质的相对分子质量:

$$M_r = \frac{RTs_{20,w}}{D_{20,w}(1 - \gamma\rho)}$$

式中, M_r 是相对分子质量

$D_{20,w}$ 是以 20 ℃ 的水为介质时颗粒的扩散系数

T 是绝对温度

$S_{20,w}$ 是颗粒的沉降常数

γ 为偏比容,等于溶质粒子密度的倒数

R 是摩尔气体常数,等于 8.315 J/(mol·K)

ρ 是溶剂密度

用此式计算物质的相对分子质量俗称 SD 法。也可用粘度(η)来求相对分子质量(俗称 S[η]法):

$$M = \frac{4\ 698[\eta]^{1/2}}{1 - \gamma\rho}$$

可以看出,无论是 SD 法还是 S[η]法,都必须在已知物质的某些物理常数的前提下才能计算,由于物质结构的复杂性,求得的相对分子质量往往是近似值。

五、沉降时间

分离某物质所需的时间常用反复多次的实验来取得。如果已知该物质的一些物理特性,也能用沉降时间来计算分离该物质所需的分离时间。样品颗粒完全沉降到管底内壁的时间 t_m , 以下列方程式表示:

$$t_m = \frac{1}{s} \cdot \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\omega^2}$$

式中, x_2 表示旋转中心到离心管底内壁的距离

x_1 表示旋转中心到样品溶液弯月面之间的距离

s 为样品沉降系数

第二节 离心机的构造

离心机可按转速的大小(机头的额定最高转速)分为低速离心机($<10 \times 10^3 \text{ r/min}$),高速离心

机($10 \times 10^3 \sim 25 \times 10^3$ r/min)和超速离心机($> 30 \times 10^3$ r/min)三种类型。离心机的转速越高,其构造也越复杂。一般常用的医用台式4 000 r/min的小型离心机,其主要部件是电机和转轴,而高速、超速离心机就必须增加一些致冷、真空等辅助设施。现以超速离心机为例,介绍离心机的主要结构。

一、离心室

离心室是转头在真空、低温下进行高速运转的地方,由二层钢筒组成,其内层为了防止溢出样品液的腐蚀,一般都采用防腐性能强的钢材制作,筒外盘有给离心室致冷的蒸发管。外层是用10 mm左右厚的钢板制作,用以防止转头在发生爆炸事故时碎片对人体的伤害。离心室的上方装有一个钢盖。

二、驱动系统

驱动系统主要是由电动机和转轴组成,旧型号的离心机需提高转头的转速时多采用一变速齿轮箱,利用齿轮传动转轴,具有齿轮箱的离心机还配备一套润滑系统。比较先进的离心机采用变频电机来直接驱动转头,省去了齿轮箱和润滑油循环系统。

三、冷冻系统

该系统是一个比较复杂的系统。主要由制冷压缩机、冷凝器、干燥过滤器、膨胀阀、蒸发管等组成。其工作原理是制冷压缩机将致冷剂压缩成高压液体,流经冷凝器散热冷却,经干燥过滤器除水蒸气;在通过膨胀阀时由于出口管道突然增大,使致冷剂减压而气化;流经蒸发管时对离心室制冷。压缩机的启动与关闭,由置入在离心室内的感温装置来控制。

四、真空系统

由于转头在运转时和空气摩擦能产生大量的热,同时扰动空气所形成的气涡流会直接影响转头的平稳运动和温度的控制,所以转速高的离心机都设有真空系统。该系统由机械泵和扩散泵串接在离心室上,对离心室进行抽真空。

五、操作系统

该系统是全机的中枢。各系统的控制均由操作系统完成,它由开关、旋钮、指示灯、指示仪表等组成。操作者可由操作系统输入工作程序,并观察各部件的运行情况。

第三节 离心转头和离心管

离心转头是超速、高速离心机的主要部件之一。由于超速、高速离心机工作时的转速很高,相应的离心力场则很大,离心转头均用高强度的铝合金、钛合金及超硬铝、锻铝制成。对转头制作过程中的每一步骤都有严格的要求和相应的标准,生产出的转头在使用前均需进行一系列的超速试验、满速爆炸试验及寿命试验,以确保使用的安全可靠。

一、角度转头

角度转头(fixed angle rotor)是各种类型离心机的基本转头和最高速转头。角度转头中离心管的中心线与旋转轴的夹角一般在 $15^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 之间,角度转头常用铝或钛合金制作,呈圆锥形。角度转头具有强度高,重心低,运转平稳,离心时间短,寿命长,使用方便等优点。但角度转头具有壁效应,即靠近离心管外壁部形成强烈对流和涡旋,影响分离纯度。角度转头多用于速度沉淀制备离心及样品的浓缩(在做CsCl等密度离心时,同样具有高的离心效率和分辨率),角度转头的规格较多,常见的有 $32\times 15\text{ml}$, $6\times 50\text{ml}$ 等。

二、甩平转头

甩平转头(swing-out rotor)由铝合金或钛合金制成,转轴上装有吊篮,离心时将离心管放入吊篮中,当离心开始后,离心管中心线在转头加速过程中由与旋转中心线平行而逐渐变为垂直。即离心管方向与离心力方向一致,使得样品在离心过程中具有相对最长的粒子移动路径,同时减少了由于对流和涡旋而引起的壁效应,提高了分离纯度。由于离心管与转头旋转轴呈垂直位置,相应增加了沉降距离,所以离心时间也相应增长。

甩平转头最适合做蔗糖(sucrose)速度区带离心,具有很高的分辨率。甩平转头的吊篮有4吊、6吊等,低速离心机的甩平转头型式较多,在使用中主要要求控制各吊篮中离心管的总质量误差在 0.1g 以内,并成对平衡,对称放置。甩平转头的强度较低,重心偏高,且容量较小,离心所需时间较长,它主要用于速度区带法(长管型)及等密度区带法(短管法),进行高纯度分离。

三、垂直转头

垂直转头(vertical rotor)是一种角度转头,离心管垂直放置。在这种转头中,样品的沉降距离特别短,对流也不明显,离心所需时间短,比较适合作等密度区带离心。通常将离心管(加离心管帽或加可热封的塑料管)密封后垂直插入转头内。离心前,离心管中的样品液受重力的作用液面呈水平分布。离心时,由于离心力作用使液面由水平分布转为垂直分布,被分离颗粒沉降在后半管壁。这种由于离心作用使液面重新转向分布称为再定向。垂直转头适合于氯化铯等密度离心外,也可用于sucrose速度区带离心。

四、区带转头

区带转头(zonal rotor)形状像一个中间空的圆柱体,由上下两半组成,中间由螺纹连接,以便于打开进行内部清洗。转头中央有一轴核及伸向四面的4块隔板,隔板把转头腔划分为四个扇形槽室,梯度液及样品可以通过轴核及隔板内的管道通向转头的中心区及边缘区。在离心分离时,使密度梯度分离和等密度分离可以在转头腔中进行,提高了样品的处理量,也同时提高了离心机效率。区带转头一般用铝合金制造,容量可达 $1\,000\text{ml}$ 以上,转速可达 $10\,000\text{r/min}$ 。超速区带转头用钛合金制造,容量可达 $1\,500\text{ml}$,转速高达 $60\,000\text{r/min}$ 。区带转头离心分离时,由于样品及溶剂直接接触转头,所以对转头的耐腐蚀性要求高,操作人员应进行专门的训练,以正确地使用仪器。

五、连续流动转头

连续流动离心转头(continuous flow rotor)一般装在低速或高速离心机上作大量培养液或原液的浓缩和分离用。转头上有入口和出口,离心时样品液连续由入口流入转头,在离心力的作用下,样品在离心腔内沉降分离,分离后的颗粒沉入转头的边缘,上清液由出口流出。此类转头的优点是样品连续操作,转头体积小,转速较高,分离效率好,克服了大容量转头转速低、高速转头容量小的缺点,操作简单,被广泛地应用于科研和实验室工作。

六、其他转头

除了上面五类转头外,还有分析用超速离心机的分析转头;用于血细胞、肝及其组织细胞、淋巴细胞、酵母及其他单细胞的连续分离的细胞洗脱转头;水平吊桶式转头;水平吊架式转头及土壤脱水转头等。

七、离心转头的常用标记及转头参数

1. 转头标记的意义

(1) 符号:角度转头 FA,垂直转头 V;甩平转头 SW;连续转头 CF;区带转头 Z。

(2) 英文字母后的数字表示该转头的最大额定转速。

(3) Ti 表示由钛或钛合金为材料制成的转头,不标则为铝或铝合金做成的转头。

如:SW65Ti 指该转头为甩平转头,最大额定转速为 65 000 r/min,转头由钛金属制成。

2. 转头参数

R_{\max} :从转轴中心至离心管最外缘或离心管底的距离;

R_{\min} :从转轴中心至离心管最内缘或离心管顶的距离;

RPM_{\max} :转头的最高安全转速;

$F_{RC\max}$:转头以 RPM_{\max} 运转时,在 R_{\max} 处的相对离心力;

$F_{RC\min}$:转头以 RPM_{\max} 运转时,在 R_{\min} 处的相对离心力;

K :衡量转头相对效率的量, K 值愈小,效率愈高,所需离心时间就愈短。

$$K = \frac{\ln \frac{R_{\max}}{R_{\min}}}{3600 \omega^2} \times 10^{12} = \frac{2.53 \times 10^{11} \times \ln \frac{R_{\max}}{R_{\min}}}{RPM_{\max}^2}$$

八、离心管

不同材料的离心管耐酸碱、抗腐蚀、抗温变性能不同,能承受的压力也不一样,在使用前必须依据样品溶剂的化学性质和离心转速选择合适的离心管。常用的塑料离心管有聚乙烯管(PE)、纤维素管(CAB)、聚碳酸酯管(PC)和丙二醇酯管(PP)等。它们的物理特性如表 4-2 所示,尽管塑料离心管的拉力强度较大,但当最大离心力超过 $200\,000 \times g$ 时,如果管内样品液未装满,管内外因受压不均仍会使塑料管显著变形,变形离心管可能破裂造成转头不平衡而发生严重事故,所以显著变形的离心管应严格禁止使用。各种塑料离心管对化学试剂的耐受力不同(表 4-3),在离心前选择离

心管时必须考虑到所用离心管对被分离样品液的稳定性。

表 4-2 各种塑料离心管的物理特性

	PE	CAB	PC	PP
比浓度	0.94~0.97	1.15~1.22	1.2	0.90~0.92
折射指数	1.54	1.46~1.49	1.59	1.49~1.65
负载下的温度偏差 $\lambda/^\circ\text{C}$	60~80	46~102	132~138	99~104
水分吸收率(24h数)	<0.01	0.09~0.2	0.156	<0.02
拉力强度/ $9.8\text{ N}\cdot\text{cm}^{-2}$	218~387	183~485	562~668	232~337
伸长率/%	15~100	40~88	60~100	50~550
透明度	不透明	清晰	清晰	不透明

表 4-3 各种塑料离心管的化学稳定性

	PE	CAB	PC	PP		PE	CAB	PC	PP
弱酸	E	E	E	E	甲苯	G	N	N	G
强酸	E	G	G	E	二甲苯	G	N	N	G
弱碱	E	E	G	E	汽油	G	G	G	G
强碱	E	G	N	E	煤油	E	E	E	E
盐类	E	E	E	E	石油	E	E	E	E
稀铬酸	E	G	E	E	植物油	E	E	E	E
乙醇	E	N	G	E	氯仿	E	N	N	E
酯类	G	N	N	E	四氯化碳	N	E	N	N
醚类	G	N	N	G	苯酚	E	N	N	E
酮类	G	N	N	G	甲酚	E	N	N	E
苯	G	N	N	G	0.1%己基间苯二酚	E	E	E	E

说明: E: 表示很好, 在室温下长时间(乃至1年)暴露无影响;
G: 表示好, 在室温下短时间(短于24h)暴露不致损坏;
N: 表示不推荐使用, 即使短时间暴露, 都可能引起永久性损坏

第四节 各型离心机的性能及适用范围

常见的离心机有超速离心机(分析和制备用)、高速冷冻离心机、大容量冷冻离心机、连续离心机、一般用途低速离心机(无冷冻)以及台式(超速、高速、低速、特殊用途)离心机。在实际应用中, 不同的离心机有不同的应用范围(表 4-4)。

一、低速离心机

低速离心机的最大额定转速一般为 $4\,000\text{ r/min}$, 且连续可调。根据处理样品的容量大小, 低速离心机可分为锥型台式低速离心机和方型台式电动离心机。此类离心机体积小, 重量轻, 容量较大, 能自动控制工作时间, 操作简单, 使用方便。适用于医院化验室、生物化学与分子生物学实验室进行定性分析; 血浆、血清、尿素、疫苗制造等。另外还有水平型桶式低速离心机、大容量立式低速离心机。也有部分厂家生产了带冷冻系统的大容量低速离心机。这类离心机往往用于样品的初级分离制备, 并和高速及超速离心机配合使用而成为最后制备高纯度样品的主要研究和生产手段。

对于生物制品的生产,大容量冷冻离心机可直接用于分离最后产品。由于这类离心设备有大容量的水平及角度转头,装有强大的可调控的制冷系统,使它对于生物样品如病毒、核酸、蛋白、激素及血液组分的分离特别有效和必不可少。大容量冷冻离心机还可直接用于瓶装、袋装样品的离心,为实验室大量样品的分离提供了条件。

表 4-4 离心机的类型和应用范围

性能及应用范围	离心机类型		
	低 速	高 速	超 速
性 能:			
速度范围($\times 10^3 \text{ r/min}$)	2~6	18~35	40~80
最大相对离心力($\times 10^3 g$)	6	60	600
冷却系统	部分有	有	有
真空系统	无	部分有	有
加速/减速控制	部分有	可调	可调
应用范围:			
细胞	可以	可以	可以
细胞核	可以	可以	可以
膜性细胞器	部分可以	可以	可以
膜片段	部分可以	部分可以	可以
核糖体/多核糖体	—	—	可以
大分子	—	—	可以

低速离心机的相对离心力最大可达 $5\,000\,g \sim 6\,000\,g$, 可用于各种细菌、细胞、细胞核等的分离, 是最为广泛使用的一类离心设备。

二、高速离心机

高速离心机的最大额定转速为 $20\,000\, \text{r/min}$ 左右, 最大相对离心力可达 $45\,000\,g$, 由于运转速度高, 一般配备冷冻控温装置。高速离心机适用于各种生物细胞、病毒、血清蛋白等有机物、无机物溶液、悬浮液及胶体溶液等样品的分离、浓缩、提取等制备工作, 是细胞和分子水平研究的基本工具。高速离心机的速度控制系统和温度控制系统都优于低速离心机。如某些全自动高速冷冻离心机的速度控制系统采用 IC 电路, 结构简单, 性能稳定, 且在 IC 速度自动控制电路内, 专门设有超速保护电路, 安全可靠; 而温度控制系统则用 SCR 元件, 通过两个热敏元件, 检测离心室温度及环境温度, 对离心室温度进行自动控制。

高速离心机转头种类很多, 常有角度转头、甩平转头、水平插入式转头、连续离心转头、间歇转头等种类。由于高速离心机转速较高, 离心力较大, 对离心转头的强度要求也较高, 多采用超硬铝、锻铝或不锈钢加工制成, 且要经过满载超速爆炸试验, 安全系数很高。高速离心机的离心管通常以塑料及聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯或硼硅酸玻璃、硼硅酸塑料等制成。实际工作中可按照不同的要求选择使用各种离心管。

小容量台式高速离心机, 机型轻小, 操作方便, 样品量小, 离心力大, 自动平衡, 速度可调, 性能稳定, 安全可靠。可放在一般实验台、冷库、低温水箱中使用, 适用于实验室小量样品液沉淀浓缩, 是分子生物学实验中使用的基本设备。

三、超速离心机

超速离心机可分为分析用超速离心机和制备用超速离心机两种。制备用超速离心机最高额定转速在 55 000~83 000 r/min 之间,最大相对离心力在 $6 \times 10^5 g$ 左右。超速离心机是医学、检验学、生物学、生物化学与分子生物学、化学、农业科学等研究领域的重要仪器之一。利用超速离心转头高速旋转所产生的巨大离心力可对细胞器、病毒、生物大分子进行分离、浓缩、精制,并可用于测定蛋白质、核酸的相对分子质量等。超速离心机的运转速度高,产生的离心力场极强,对离心机的材料及各项质量要求极高。

先进的制备用超速离心机,装有先进的光学系统附属设备,密度梯度形成收集器,用于区带操作的各种加样、聚样器,密度梯度泵,积分仪等。仪器的自动化程度高,功能齐全。典型产品有美国 Beckman L8 系列。英国 MSE 的 PREPSPIN 系列,日本日立 Hitachi Sep-H 系列,国产的有 LXJ-40, CL-60 型等。

与制备用超速离心机相比,分析用超速离心机一般都装备有特殊设计的转头、控制系统和光学系统,可以直接观察了解和分析样品的沉降情况。利用特殊配备的数据处理机自动计算 s (沉降系数)、 M_r (相对分子质量)。分析用超速离心机主要用于生物大分子的相对分子质量测定,估价样品纯度和检测生物大分子构象的变化等。主要产品有美国 Beckman 公司的 Model E 及日本日立公司的 282 型。

第五节 离心方法

随着离心设备的迅速发展,离心方法也有了很大的提高。为分离分析不同要求的样品,建立了不同的离心方法,一般分为制备离心方法和分析离心方法。根据待分离物质理化性能的不同,制备性离心可分别采用差速沉淀离心、速度区带离心和等密度离心等。要获得最佳分离效果,采用这些方法时,还要选择合适的离心转头(表 4-5)。

表 4-5 离心转头的选择

转 头 类 型	分 离 方 法		
	速度沉淀	速度区带	等 密 度
角度转头	极好	差	好
垂直转头	差	好	极好
甩平转头	无效	好	适当
区带转头	差	极好	适当

一、差速沉淀离心

差速沉淀离心(differential centrifugation)系指分步改变离心速度,用不同强度的离心力使具有不同质量的物质分批沉淀分离的方法,它适用于沉降速度差别在一到几个数量级的混合样品的分离,对于差别较小的物质,差速离心难以得到满意的分离效果。

差速沉淀离心一般采用角度转头。在离心开始时,所有颗粒均匀地分布在整个离心管中,离心

期间各种颗粒以不同速度向管底沉降,经一定时间后,最重的颗粒全部沉到管底,并得到不含这种颗粒的上清,将上清以更高速度离心一定时间,又可得到次轻的颗粒,逐渐增加离心速度,就可分批得到不同质量的物质,达到分离的目的。

但是,每次得到的沉淀并不是均一的,这是由于各种大小和密度的颗粒在离心管中均匀分布,经一定时间离心后在全部最重的颗粒到达管底时,一部分较小较轻的颗粒也沉到管底混于该重颗粒之中,所以需要将沉淀再均匀地分散于溶剂中,以原来的沉淀条件再进行离心,获得的沉淀将更“纯”一些,这样反复几次就可得到较均一的沉淀,这个过程称为“洗”沉淀。每次洗出的上清合并起来以更高速度离心可分离下一个较轻的组分。

差速沉淀离心也可以达到分级分离,如果不使各种颗粒的混合物充满离心管,而是在样品与管底之间制作一个所谓“空层”,在离心时这种空层可阻止小颗粒通过。为防止样品与空层相混,空层密度一般都比比较高,实际工作中常以蔗糖溶液来充当空层,这样比空层密度低的颗粒就不能到达管底而停留在界面以上,从而达到分级分离的目的。这种分离只能在甩平转头中进行。

差速沉淀离心时,转头型号的选择应根据离心样品的体积、颗粒大小和离心时间来确定。而离心时间又根据转头的最大允许速度和几何形状而定。为了选择的方便,一般厂家的操作手册都对每个转头给出了将以上多个参数考虑在内的“ k 值”。在最大转速下,水溶性介质中已知沉降常数 $s_{20,w}$ (以 Svedberg 为单位)的颗粒完全沉降所需的时间(以小时表示)可根据以下公式算出。

$$t = k / s_{20,w}$$

例如:50.2Ti 转头的 k 值为 72; 30 转头的 k 值为 290; 它们都带 12 根 38.2 ml 的离心管。在沉降核糖体时($s_{20,w} = 80$ S),前者约需 1 h; 后者约需 2.5 h。

二、速度区带离心

速度区带离心(rate zonal centrifugation)是将样品置于一个平缓的介质梯度中沉降,该梯度的最大密度低于样品混合物的最小密度,样品颗粒按照其不同的沉降速率沉降,从而互相分离。离心一定时间后不同大小的颗粒将沉降在不同的层次,产生所谓区带。由于这种方法是根据颗粒的沉降速率来完成分离,且离心过程中形成区带,所以称作速度区带离心。这种方法适用于分离密度相似而大小有别的样品。

速度区带离心一般采用甩平转头或区带转头。不同大小颗粒的原始混合液加在事先装进甩平转头离心管中或者区带转头腔中的介质梯度上,在离心过程中最重的颗粒就迅速向离心管底或者区带转头的外周移动;形成一定宽度的区带,同时维持这种区带的形状不变,这便是第一层,称之为原始层。紧随第一层后,较轻颗粒形成一分离层;稍后又依次出现更轻颗粒的层次。离心一段时间后,具有不同沉降速率的颗粒就产生了彼此分离的区带。当区带沿离心半径形成最佳分布时停止离心,然后依次收集颗粒区带,所以离心结束时不形成沉淀。与差速沉淀离心法相比,速度区带离心法一次离心就能够同时分离纯化不同大小的颗粒,而不必分开进行。

由此可见,速度区带离心中,使各个区带达到良好分离是至关重要的问题,所以对离心过程中不利于区带形成和分离的因素要加以控制和克服。

沉降过程中液体对流可以引起溶液混合,影响区带形成。防止对流有效的手段就是沿旋转半径从中央到外围增加液体的密度,即形成所谓的“密度梯度(density gradient)”。如:甩平转头离心

管中装蔗糖水溶液时,它们的浓度从液面到管底逐渐增加,就形成了蔗糖密度梯度(简称蔗糖梯度),样品液就加在这种梯度的上面。

沉降过程中旋转半径 r 的改变是另一影响区带形成的因素。 r 的定义是被分离物颗粒与旋转中心的距离。在基本原理中讨论过的颗粒沉降速度公式中,

$$v = 6.092 \times 10^{-4} \frac{D^2(\rho - \rho_m)n^2r}{\eta_m}$$

假如公式中的其他参数保持不变,各区带颗粒的沉降速度将随旋转半径 r 的增加而增加。这就有可能在较轻的颗粒离开液面一定距离并相互分开形成各自的区带之前,较重的颗粒已到达管子底部,使原来已分开的区带又混合起来或形成沉淀,降低分离效果。 r 的这种影响可以通过沿半径方向逐渐增加介质的密度和粘度(ρ_m , η_m)来防止, ρ_m , η_m 的影响能够克服 r 增加的影响,使区带向管子底部接近的速度慢下来。这样,为了获得所有必要区带的完全和快速分离,实验者就要根据自己的需要改变颗粒沿半径方向的沉降速率。

(一) 介质密度梯度的特征和制备

由上面的描述我们知道速度区带离心中,介质的密度梯度主要用来克服对流和 r 增加的影响,介质的密度沿半径方向逐渐增加,梯度的最大密度小于样品混合物的最小密度。梯度液装入离心管后将样品铺在梯度液顶部,即可开始离心。

密度梯度可以手工制备、仪器制备及冷冻法制备。

1. 手工制备 先以不同浓度(密度)的梯度液(加蔗糖),按由浓到稀的次序依次铺入离心,形成不连续阶梯密度。将此液柱的离心管垂直静置在试管架上,在室温 20~25℃ 时,只要 2~3 h 即会因重力作用及扩散作用而形成连续近线性密度梯度。

2. 仪器法制备 直接用密度梯度形成-收集仪制备梯度。

3. 冷冻法制备 用浓度等于高、低平均值的蔗糖或其他梯度液,等量放入各离心管中,然后垂直放置在 -20~-40℃ 低温冰箱内冻结后取出,在室温下静置熔化,如此反复二次即成近直线型梯度分布。

(二) 速度区带离心介质的选择

在速度区带离心中用作密度梯度溶质的物质有多种,如传统使用的蔗糖、甘油等和后来发展起来的 Metrizamide、Ficoll 和 Percoll 等。其主要性能见表 4-6。

1. 蔗糖是目前在速度区带离心中用来形成密度梯度最常用的溶质。不同浓度(以重量百分比表示)的蔗糖溶液具有不同的密度和粘度,随着温度升高,密度和粘度都会降低,表 4-7 列出了 5℃ 和 20℃ 蔗糖和甘油的密度和粘度值,温度从 5℃ 升高到 20℃,二者的密度值降低不大,而粘度有较大降低,尤以高浓度时为甚。蔗糖梯度可用来分离哪些样品,不仅取决于蔗糖的浓度,还要考虑样品的密度。表 4-8 给出了一些主要的生物材料在蔗糖溶液中的平均浮力密度。由于速度区带离心中介质密度梯度的最大密度小于样品的最小密度,所以从表中资料的比较可以看出,适中浓度的蔗糖溶液(<40%)可用于蛋白质和核酸的速度区带分级分离,DNA 半不连续复制的重要证据冈崎片段就是利用这种方法发现的。对细胞膜和细胞器来说,要利用蔗糖梯度做速度区带分离就比较困难。不过,它们可以在分段的蔗糖梯度交界面上分离。

2. 甘油溶液的粘度增加在高浓度时,比蔗糖和 Metrizamide 溶液增加缓慢;甘油溶液的密度也

较低。甘油溶液的浓度必须是蔗糖溶液的两倍时才具有与蔗糖溶液相同的密度。因此,甘油密度梯度离心主要用于一些特殊的条件下,如:利用甘油的稳定性研究酶活力。

表 4-6 梯度材料的种类和主要性能

材料名称	相对分子质量	可制备最大密度	用 途
氯化铯	169.4	1.9~1.98	DNA、RNA、核蛋白体等
硫酸铯	361.9	1.9~2.01	DNA、RNA
溴化钠	102.91	1.53	脂蛋白分离
碘化钠	149.9	1.9	DNA、RNA
酒石酸钾	235.3	1.49	病 毒
蔗 糖	342.3	1.35	极广泛
(+葡萄糖)	—	1.35	染色体
(+重水)	—	1.4左右	核糖核蛋白体
甘 油	92.09	1.26	膜片段、核片段、蛋白
山梨醇	—	—	病毒、酵母等
重 水	20	1.11	肌动蛋白等
Ficoll	400 000	1.23	极广泛
右旋糖酐	~72 000	1.05	微粒体
牛血清白蛋白	~69 000	1.12	整细胞分离
水合氯醛	165.4	1.91	染色体

表 4-7 在 5℃ 和 20℃ 时蔗糖和甘油的浓度、密度和粘度值

质量分数/%	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
温度 5℃										
蔗 ρ	1.020	1.041	1.062	1.084	1.107	1.131	1.156	1.182	1.209	1.236
糖 η	1.753	2.073	2.513	3.135	4.042	5.422	7.636	11.453	18.604	33.16
甘 ρ	1.012	1.025	1.038	1.051	1.065	1.078	1.092	1.105	1.119	1.133
油 η	1.769	2.073	2.429	2.859	3.397	4.105	5.090	6.522	8.904	13.071
温度 20℃										
蔗 ρ	1.018	1.038	1.059	1.081	1.103	1.127	1.151	1.177	1.203	1.230
糖 η	1.148	1.337	1.592	1.946	2.449	3.184	4.323	6.163	9.376	15.42
甘 ρ	1.010	1.022	1.035	1.047	1.060	1.073	1.086	1.099	1.113	1.126
油 η	1.159	1.335	1.539	1.780	2.077	2.460	2.980	3.734	4.910	6.919

表 4-8 常见样品在蔗糖溶液中的平均浮力密度

样 品	密度/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	样 品	密度/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
蛋白质	1.24~1.32	核糖体	1.41
DNA	1.42	细胞膜	1.13~1.18
染色质	1.36	Mitochondria	1.19
RNA	1.49	溶酶体	1.21
		叶绿体	1.21

3. Metrizamide 是一个商品名,它是三碘苯酸的衍生物,相对分子质量为 789。Metrizamide 本身的密度为 2.17 g/cm^3 ,惰性较强,并在很宽的 pH 范围(2.5~12)内保持稳定。Metrizamide 在粘度和密度两方面都比蔗糖理想,在相同浓度情况下它的粘度比蔗糖稍低一些,而密度明显地比蔗糖高。这意味着形成稳定的 Metrizamide 密度梯度所需的浓度比蔗糖所需要的浓度要低得多。然而,

Metrizamide 却几乎不用在速度区带离心中,原因之一就是核酸在其中的浮力密度太低,第二个主要原因则是 Metrizamide 比蔗糖昂贵。此外,它还有紫外吸收和闪烁淬灭的缺点。Metrizamide 主要用在等密度离心中。

4. Ficoll 是蔗糖和环氧氯丙烷的高分子聚合物,相对分子质量为 400 000,它在水中有高的溶解度,在较宽的 pH 范围性质很稳定($\text{pH} < 3$ 可水解)。与蔗糖溶液比较,Ficoll 的密度虽低但粘度较高。Ficoll 一直被用作细胞、细胞器和膜上颗粒离心时所用的密度梯度。Ficoll 也与 Metrizoate 钠盐混合使用。一定比例的这两种物质的混合物具有 1.077 g/cm^3 的密度,而且粘度和渗透压都较低,可用于离心纯化淋巴细胞。

5. Percoll 是一种胶体硅土外裹以聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone),因此有很好的惰性。Percoll 的悬浮液在所给的任何浓度下,密度都比前面的四种物质高,它在水中的粘度也很高,但加入 0.15 mol/L NaCl 时,粘度锐减。Ficoll 和 Percoll 不适用于蛋白质和核酸的速度区带离心。Percoll 在细胞和细胞器的等密度纯化中也常常受到限制。

(三) 区带转头中的离心

区带转头主要用于从大量的样品中对大分子或颗粒进行蔗糖密度梯度的速度区带离心,其主要目的是制备性的分离和纯化。

区带转头中离心的操作过程可以简单地分为四大步骤。

1. 装载梯度溶液(制备梯度) 与通常的方法不同,区带转头在开始离心时是空的。当转速升到 $3\,000 \sim 4\,000 \text{ r/min}$ 时,需要离心的溶液才被“装载”到转头中。这个速度称为装样速度。当转头在装样速度下运转时转头的外部装置将梯度液泵入转头,梯度液通过穿通四个隔板的孔道到达转头内室的周边。首先泵入密度最低的溶液,随后是密度逐渐增加的梯度液,当溶液密度增大时,将原先已在转头内的液体推向中心,最后泵入密度最高的液体,直到充满转头,这种密度最高的液体又称为垫衬层,转头充满后形成随半径而增加的密度梯度。

2. 加入样品和覆盖层 仍在装样速度下,通过到达转头中心的孔道将样品加入梯度的顶部(接近旋转中心);然后再将覆盖层(密度低于样品的液体)加在样品上。这时将有一部分垫衬层溶液通过隔板中的通道倒流出转头。

3. 离心分离 将转头加速至分离速度,离心一段时间使各区带分离并达到最佳分布状态。

4. 取样 将转速减至取样速度(同装样速度),通过隔板中的孔道将与垫衬层密度相同的溶液不断泵至周边,则从中心孔道中流出不同密度的液体,对液体分部收集就能够得到已分离的各个组分,直至转头被垫衬层全部充满(即收集到衬垫层时),取样工作即告结束。

三、等密度离心

等密度离心(isopycnic centrifugation)又叫做平衡离心(equilibrium centrifugation)。样品被置于一个较陡峭的密度梯度中沉降,该梯度的最大密度高于样品混合物的最大密度,梯度的最小密度低于样品混合物的最小密度,当样品颗粒沿梯度运动到与颗粒的浮力密度相等的密度层时,就停止运动,这样经过一段较长时间的离心,样品中所有不同密度的颗粒就都将在各自的等密度区域中停止运动,从而分布在不同的密度梯度区域,即颗粒根据各自的浮力密度进行分级分离。由于这种离心是将样品颗粒沉降到介质中与其浮力密度相等的密度梯度区,故名之等密度离心或平衡离心。这种方法适用于分离大小相近而密度不同的样品。

等密度离心一般使用角度转头或甩平转头。样品液通常和用来形成密度梯度的介质溶液混合在一起装入离心管中,离心时,介质产生沿半径方向增加的密度梯度,样品颗粒则向等密度区运动。当所有颗粒都完全沉降到各

自的等密度区域后,停止离心,分部收集不同密度的溶液,即可得到被分离的样品颗粒,这种分离有五个特点:

(1) 离心过程很长。

(2) 不需粘性介质。

(3) 颗粒的最终分布与其大小和质量无关。无论其初始迁移速率如何,在给定的梯度中颗粒位置只受其浮力密度的影响。

(4) 到达平衡位置的颗粒,一方面来源于比其浮力密度低的低密度区,一方面来源于高密度区。也就是说漂浮与沉降同时发生。所以在等密度离心中样品可以和整个梯度相混合。

(5) 样品的装载容积比速度区带离心大,并且不会形成局部反向梯度。

(一) 介质密度梯度的特征和制备

由以上等密度离心的基本过程可知,采用介质密度梯度的主要目的是形成一系列具有不同密度的区域,以使具有不同浮力密度的颗粒处于其等密度区而彼此分离。介质的密度沿旋转半径增加,接近管底处的密度高于样品的最大密度,液面部分的密度低于样品的最小密度,等密度离心的介质密度梯度一般通过离心的方法来制备,如高浓度盐溶液,在离心力作用下盐离子依次向管底沉降,形成从液面到管底逐渐增加的密度梯度,同时溶质的扩散又会阻碍这种梯度的形成,经过足够时间离心后,两个过程可达到平衡,形成盐溶液密度梯度,并在某一固定转速下保持稳定。

(二) 等密度离心介质的选择

由于核酸的浮力密度比高浓度蔗糖或甘油的最大密度高,甘油和蔗糖都不适合这种密度梯度。等密度离心中用来形成密度梯度的物质有高浓度盐溶液和 Metrizamide。

1. 高浓度盐溶液 广泛应用的盐饱和溶液具有较高的密度, Cs_2SO_4 为 2.01 g/cm^3 , CsCl 为 1.91 g/cm^3 ; KI 为 1.72 g/cm^3 。盐的选择主要取决于高浓度盐溶液的密度与待分离样品的浮力密度之间的关系。 CsCl 密度梯度主要用于 DNA 的分级分离;也可利用沉淀作用对少量 RNA 进行纯化。 Cs_2SO_4 密度梯度主要用于 RNA 的分级分离。三氯乙酸铯密度梯度能够对单、双链 RNA 进行分离;可使核糖核酸酶失活并且能将 DNA 和蛋白质与 RNA 分开,也可以从 DNA 和 RNA 中分离出 DNA-RNA 杂交体。三氯乙酸铯密度梯度用于分离变性 DNA 和天然 DNA。 NaI 密度梯度也广泛应用于各种天然和变性 DNA 的分离。 KI 密度梯度也可用于分离 DNA-RNA 杂交体。 NaBr 或 KBr 密度梯度较多地用于血浆脂蛋白的分离。

2. Metrizamide 密度梯度 Metrizamide 水溶液的基本理化特性前面已进行了讨论, Metrizamide 密度梯度主要用于等密度离心中。与离子密度梯度相比,它有如下优点:化学性质稳定,离解作用低,生物多聚体在其中的浮力密度低,缺点是粘度大,40%~50%的 Metrizamide 溶液,可用来分离蛋白质,特别是核蛋白;加入各种盐和改变 pH 可引起核酸浮力密度的变化而有助于其分级分离。

四、分析性离心

离心除了用于制备外,还可用于样品的定性定量分析。在离心机上装备光学系统,采用特殊的透光离心池,在离心过程中可以直接观察样品颗粒的沉降情况,以对样品进行定性定量分析。分析离心方法也在不断发展,常用的有沉降速度法。沉降平衡法及等密度区带离心法。沉降速度法主要是利用界面沉降来测定沉降系数值,用于样品的定性、定量分析及制备产品的纯度检查。沉降平衡法是常用的测量绝对相对分子质量的方法,它的优点是理论可靠,结果精确,不需测量扩散系数,缺点是操作时间较长。等密度区带离心法用于测定样品的浮力密度值和对混合组分样品的不同密度组分进行定性、定量分析,此法在分析混合样品时其分辨率很高,可达 0.001 g/cm^3 ,在核酸的分析和研究中被广泛地应用。

分析用超速离心主要是为了研究生物大分子的沉降特征和结构,而不是收集一些特殊的部分。因此,它使用了特殊设计的转头和检测系统,以便连续地监视物质在一个离心场中的沉降过程。它是一台装有分析光学系统的离心机,其转速稳定性好($< \pm 0.2\%$),温度测量控制精度高($\pm 0.02^\circ\text{C}$),主要应用于测定样品的沉降系数,测定

物质的绝对相对分子质量,其测定范围小到蔗糖,大到病毒及染色体 DNA 的相对分子质量。测定样品的扩散系数及偏微比容(1 g 样品溶解在大量溶剂中使溶剂体积增加的毫升值),测定生物样品的浮力密度(样品在所在的溶剂中表现的浮力密度)。

五、离心操作要领

1. 精密地平衡离心管和它们的内容物是十分重要的。超速离心机转头是镶置在一根很细的轴上,因此在两支离心管平衡时重量之差不得超过各个离心机说明书上所规定的范围。制备性超速离心机两离心管平衡时重量之差不得超过 0.1g。有的普通离心机带有离心管套筒,平衡时应带上套筒。一台离心机的套筒只能在该离心机上使用,不能在离心机之间(特别是不同型号的离心机之间)混用套筒。

2. 平衡后的一对离心管及其内容物(有时还可能包括离心管套筒)应对称放置,不能错位,不能装载单数的管子,以免因离心所产生的离心力不对称而损坏离心轴。

3. 当平衡的离心管及其内容物(或包括套筒)对称放置好后,盖好离心机盖子,打开电源,转动速度调节旋钮,逐步增加到所需要的离心速度,计算离心时间。

4. 当离心到达所需要的时间后,再转动速度调节旋钮减速。待离心机自然停止转动后取出离心管。关闭离心机电源,拔掉电源插,清洁整理离心机、离心管、套筒、天平等。

5. 超速离心机带自动控制的操作系统,待选定离心速度、时间等参数后,按启动开关,离心机即自动开始转动、记录时间,并可自动停机(取决于输入的控制信号)。在离心室被抽成真空前,离心机只作低速运转。

6. 超速离心时,应注意选择合适的离心管和转头。根据待离心液体性质及体积选择合适的离心管,装载液体时要按各种离心机具体操作说明进行。有的离心管无盖,液体不能装得过多,以防离心时甩出,造成转头生锈或被腐蚀。制备性超速离心机的离心管,常常要求必须将液体装满,以免离心时塑料离心管上部凹陷变形。根据转速选择合适的转头,当转速超过所用转头最大转速的 2.5% 时,转头就会爆炸。转头在使用前应放冰箱内预冷。离心完后,转头应用温水洗涤并干燥,一般水洗就足够了,如必须使用去污剂时应用中性去污剂,不可用碱性去污剂。用中性去污剂擦拭转头,用水除去全部去污剂再用蒸馏水冲净。切勿将转头浸泡在去污剂中。洗净的转头放在室温中干燥,更好的办法是将转头擦干,用理发吹风机吹干,转头长期不用应涂一层上光蜡保护。转头在使用中应防止与其他物品碰撞,避免造成伤痕,如果发现有被腐蚀迹象,转头不应再用,因为它已不安全了。

(华西医科大学 方定志)

参考文献

- 1 Terrance G Cooper. The Tools of Biochemistry. New York: John Wiley & Sons Inc., 1977
- 2 刘培楠,梁植权,宋振玉,等. 仪器分析在分子生物学中的应用(第三册). 北京:科学出版社,1978
- 3 Griffith O. Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation. Beckman Instruments Inc., 1986
- 4 Rickwood D. Centrifugation A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1992
- 5 吉昌华,陈南春,杨安钢,等. 生物化学及分子生物学实验与技术. 西安:陕西科学技术出版社,1994

第五章

放射性同位素技术

第一节 放射性同位素的性质

一、放射性同位素的特点

1. 核衰变 放射性同位素(radio isotope)的原子核不稳定,会不间断地、自发地放射出射线,直至变成另一种稳定性同位素,这就是所谓“核衰变”。放射性同位素在进行核衰变的时候,可同时或单独放射出 α 射线、 β 射线、 γ 射线和电子俘获等。核衰变的速度不受温度、压力、电磁场等外界条件的影响,也不受元素所处状态的影响,只和时间有关。

2. 半衰期 放射性同位素衰变的快慢,通常用“半衰期”来表示。半衰期(half-life),即一定数量放射性同位素原子数目减少为其初始值一半时所需要的时间。如磷-32的半衰期是14.3天,即若有100万个磷-32原子,经过14.3天后,就只剩下50万个了。半衰期越长,说明衰变得越慢,反之亦然。半衰期是放射性同位素的一个特征常数,不同的放射性同位素有不同的半衰期,衰变的时候放射出射线的种类和数量也不同(见表5-1)。

表 5-1 常用同位素的特征

同位素	符号	半衰期	β 射线能量/MeV	γ 射线能量/MeV
氢-3	^3H	12.3 年	0.018	—
碳-14	^{14}C	5 720 年	0.156	—
氮-15	^{15}N	稳定性	—	—
磷-32	^{32}P	14.3 天	1.71	—
硫-35	^{35}S	87.1 天	0.167	—
碘-125	^{125}I	60 天	—	0.027,0.035
碘-131	^{131}I	8.05 天	0.605,0.335,0.250,0.815	0.367,0.637,0.722,0.163

3. 放射性射线与物质的相互作用 射线遇到物质,会产生各种效应。例如,射线能够使照相底片和核子乳胶感光;使一些物质产生荧光;可穿透一定厚度的物质,在穿透物质的过程中,能被物质吸收一部分,或者是散射一部分,还可使一些物质的分子发生电离;另外,当射线辐射到人、动物和植物体时,会使生物体发生生理变化。射线与物质的相互作用,对射线来说,是一种能量传递和

能量损耗的过程,而对受照射物质来说,则是一种对外来能量的物理性反应和吸收的过程。

各种射线由于自身的性质不同,与物质相互作用各有特点(见表 5-2)。这种特点与物质的密度和原子序数相关。 α 射线通过物质时,主要是通过电离和激发,把它的辐射能量转移给物质,其射程很短,一张普通纸就能将 α 射线完全挡住,但 α 射线的能量能被组织和器官全部吸收。 β 射线也能引起物质的电离和激发,与 α 射线能量相同的 β 射线,在同一物质中的射程比 α 射线要长的多。值得注意的是,高能量快速运动的 β 粒子,如磷-32(能量为 1.71 MeV)遇到原子序数高的物质(如铅),运动方向会发生改变,而产生韧致辐射。韧致辐射是一种连续的电磁辐射,它发生的几率与 β 射线的能量和物质的原子序数成正比,在防护上应采用低密度材料,以减少韧致辐射。 β 射线能被不太厚的铝层吸收, γ 射线的穿透力最强,射程最大,它不会被物质完全吸收,只能随着物质厚度的增加而减弱。

表 5-2 能量为 1 MeV 的三种射线与物质相互作用的特点

射线种类	能量传递方式	在空气中射程/m	电离轨迹	电离密度/(离子对/m)
α	电离、激发	0.01	密	6 000
β	电离、激发、韧致辐射	10	前稀后密	6
γ	光电效应、康普顿效应、电子对效应	~600	稀	0.1

二、放射性强度及其度量单位

1. 衰变规律 放射性同位素原子数目的减少服从负指数规律。随着时间的增加,放射性原子的数目按几何级数减少,用公式表示为:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}$$

这里, N 为经过 t 时间衰变后,剩下的放射性原子数目, N_0 为初始的放射性原子数目, λ 为衰变常数,是与该种放射性同位素性质有关的常数, $\lambda = \lambda(t) = e^{-0.693t/\tau}$, 其中 τ 指半衰期。

2. 放射性强度 放射性同位素不断地衰变,它在单位时间内发生衰变的原子数目为放射性强度(radioactivity)。放射性强度的常用单位是贝柯勒尔(Becquerel),简称贝柯(Bq),它表示 1 秒 s 内发生 1 次核衰变。它与放射强度居里的换算关系为 $1\text{Bq} = 2.703 \times 10^{-11}\text{Ci}$; $1\text{Ci} = 3.7 \times 10^{10}\text{Bq}$ 。

第二节 放射性同位素示踪

同位素示踪法是利用放射性和稳定性同位素作为示踪剂,对研究对象进行标记的微量分析方法。Hevesy 于 1923 年首先用天然放射性 ^{212}Pb 研究了铅盐在豆科植物内的分布和转移,1934 年 Joliot 和 Curie 发现了人工放射性,以及其后放射性同位素生产方法的建立(如加速器、反应堆等),为同位素示踪法的发展和广泛应用提供了基本条件和有力保障。

一、同位素示踪的基本原理

用同位素作为一种示踪剂(tracer),可制成含有同位素的标记化合物(如标记食物、药物和代谢物质等)来代替相应的非标记化合物。利用放射性同位素不断地放出特征射线的核物理性质,可用

核探测器随时追踪它在体内或体外的位置、数量及其转变等。

稳定性同位素虽然不释放射线,但可利用它与普通相应同位素之间的质量差异,通过质谱仪、气相层析仪、核磁共振等质量分析仪器来测定。由于稳定性同位素作为示踪剂其灵敏度较低,可获得的种类少,价格也较昂贵,其应用范围受到限制,因而放射性同位素是目前较为适用的示踪剂。

(一) 放射性同位素示踪的基本特点

放射性同位素示踪具有灵敏度高,测量简便,定量、定位准确及符合所研究对象的生理条件等特点。

1. 灵敏度高 放射性示踪法可检测到 $10^{-14} \sim 10^{-18} \text{ g}$ 水平,即可以从 $10^{14} \sim 10^{18}$ 个非放射性原子中检出一个放射性原子,它比目前敏感的重量分析天平要敏感 $10^7 \sim 10^8$ 倍,而迄今最准确的化学分析方法很难测定到 10^{-12} g 水平。

2. 测量简便 放射性测定不受其他非放射性物质的干扰,可以省略许多复杂的物质分离步骤。体内示踪时,可以利用某些放射性同位素释放出穿透力强的 γ 射线,在体外测量而获得结果,这就大大简化了实验过程,做到非破坏性分析。随着液体闪烁计数技术的发展, ^{14}C 和 ^3H 等发射低能 β 射线的放射性同位素在医学及生物学实验中得到越来越广泛的应用。

3. 定位定量准确 放射性同位素示踪法能准确、定量地测定代谢物质的转移和转变,结合形态学技术(如病理组织切片技术,电子显微镜技术等),可以确定放射性示踪剂在组织器官中的定量分布,对组织器官的定位准确度可达细胞、亚细胞乃至分子水平。

4. 符合生理条件 在放射性同位素实验中,所引入标记化合物的化学量是极微量的,相比于体内原有相应物质的重量改变是微不足道的,体内生理过程仍保持正常的平衡状态,因而获得的结果符合生理条件,能反映客观存在的事物本质。

放射性同位素示踪的优点如上所述,但也存在一些遗憾,如从事放射性同位素工作的人员要受一定的专门训练,需具备相应的安全防护措施和条件,目前个别元素(如氧、氮等)还没有合适的放射性同位素等等。示踪实验时,还必须注意到示踪剂的同位素效应和放射效应问题。

所谓同位素效应是指放射性同位素(或稳定性同位素)与相应的普通元素之间存在着化学性质上的微小差异所引起的个别性质上的明显区别。对于轻元素而言,同位素效应比较严重,因为同位素之间的质量差别是倍增的,如 ^3H 质量是 ^1H 的三倍,当用氚水($^3\text{H}_2\text{O}$)作示踪剂时,它在普通 H_2O 中的含量不能过大,否则会使水的物理常数、对细胞膜的渗透及细胞质粘性等都要发生改变。在一般的示踪实验中,由同位素效应引起的误差,常在实验误差内,可忽略不计。放射性同位素释放的射线利于追踪测量,但射线对生物体的作用达到一定剂量时,会改变机体的生理状态,这就是放射性同位素的辐射效应,因此放射性同位素的用量应小于安全剂量,严格控制在生物机体所能允许的范围之内,以免实验对象受辐射损伤,而得出错误的结果。

(二) 示踪实验设计原则

设计一个放射性同位素示踪实验应从实验的目的性,实验所具备的条件和对放射性的防护水平三方面着手考虑。放射性示踪实验设计原则有二:一是必须寻求有效的、可重复的测定放射性强度的条件,二是必须选择具有合适比活度 $\lambda q\delta$ (单位是 Bq/mol) 的放射性同位素(其中, $\lambda = -dN'/dt/N'$, 为该种放射性原子核的衰变常数; $q = N'/n'$, 表示 n' 个该化学形式分子为 N' 个放射性原子所标记; $\delta = n'/n$, 表示放射性标记的分子数 n' 与总分子数(标记的加未标记的) n 之比)。

二、放射性同位素示踪实验具体步骤

放射性同位素示踪实验一般需经过准备、实施和废物处理三个阶段。

(一) 实验准备阶段

在示踪实验的准备阶段,除了准备实验必需的一些试剂和仪器以外,对于放射性同位素种类、掺入途径以及测量方法需要作充分的准备,必要时需进行“冷”实验,几种示踪剂的贮存条件见表 5-3。

1. 示踪剂的选择 一般情形是根据实验目的和实验周期选择具有合适衰变方式、辐射类型和半衰期,且放射毒性低的放射性同位素,该同位素的比活度 $\lambda q\delta$ 值要适中,以保证示踪剂的辐射自分解最低和实验灵敏度最高。至今已确定的放射性同位素包括 58 种天然放射性同位素和 1 300 种左右人工放射性同位素,其中只有少数一部分可用作放射性示踪剂。示踪剂的选择需要考虑:

① 放射性同位素的基本元素及其周围元素的化学性质。因为它们可成为此放射性同位素的杂质;

② 衰变纲图。放射性同位素(经过或不经过中间状态)衰变到处于基态的子体核素,在衰变过程中伴随各种形式的能量辐射,如 α 、 β^- 、 β^+ 、 γ 射线等,这个过程可用衰变纲图来表示。根据衰变纲图并结合实验条件来决定选用何种同位素;

③ 适宜的半衰期 τ 。 τ 与实验目的相关,一般使 τ 足够长,从而使衰变校正有意义或干脆不必作衰变校正,同时又要足够短,能较安全地进行示踪实验,并使得放射性废物容易处理。

在实验工作中,放射性同位素的半衰期应该与实验需要持续的时间 t 相适应,如对于某个实验, $t/\tau = 0.04$ 时,应所选放射性同位素的衰变校正为 3.5%;而 $t/\tau = 0.10$ 时,应选放射性同位素的衰变校正为 6.6%; $t/\tau = 0.15$ 时,应选其衰变校正为 10%。例:示踪铁命运的实验要几个月才能完成,就应避免使用 ^{59}Fe ($\tau = 45.6$ 天, $\beta^- - \gamma$),而应选用 ^{55}Fe ($\tau = 2.60$ 年, EC)作为示踪剂。

④ 放射性同位素标记的位置。有些示踪实验要求特定位置的标记,例如研究氨基酸的脱羧反应, ^{14}C 应标记在羧基上,只有这种定位标记的氨基酸,才能在脱羧后产生 $^{14}\text{CO}_2$ 。

⑤ 同时满足高化学纯度、高放射化学纯度和高放射性核纯度的要求。在示踪剂制备、贮存期间以及试验体系中所使用的化学试剂和酶等可能会产生化学杂质、放射化学杂质以及辐射自分解引起的放射杂质,这些杂质的存在,会影响示踪剂的纯度,从而影响实验结果,甚至会导致错误结论。在示踪实验前,应根据情况对示踪剂的纯度作出鉴定,不符合要求的应作纯化处理。

表 5-3 几种示踪剂的贮存条件

示踪剂	比活度 / $3.7 \times 10^{13} \text{ Bq/mmol}$	贮存条件	贮存温度/ $^{\circ}\text{C}$	贮存时间/星期	分离度/%
[甲基- ^3H]TdR	5.0	$3.7 \times 10^7 \text{ Bq/ml}$ (10% 乙醇)	+2	12	<2
[5- ^3H]UR	5.0	$3.7 \times 10^7 \text{ Bq/ml}$ (10% 乙醇)	+2	12	3
L-[4,5- ^3H]Leu	1.0	$3.7 \times 10^7 \text{ Bq/ml}$ (10% 乙醇)	+2	25	<1
L-[U- ^{14}C]Glu	0.25	2% 乙醇水溶液	+2	60	1
L-[U- ^{14}C]Phe	0.28	3% 乙醇水溶液	+20	16	0.5
5'-[α - ^{32}P]三磷酸腺苷	100	冷冻固态	-140	1	1
5'-[α - ^{32}P]三磷酸腺苷	100	含乙醇(1:1)水溶液	-30	1	2-4
5'-[α - ^{32}P]三磷酸腺苷	2	含乙醇(1:1)水溶液	-30	2	<1
L- ^{35}S -Met	11.9	含 5mmol/L 巯基乙醇水溶液	-80	20	5
3,5-[^{125}I]二碘-L-Tyr	$3.7 \times 10^{11} \text{ Bq/mg}$	20% 丙二醇水溶液	+20	4	未检出

2. 测量仪器的选择 放射性同位素测量仪器及方法的选择取决于射线的种类,对于 α 射线通常可用硫化锌晶体、电离室、核乳胶等方法探测;对能量高的 β 射线可用云母窗计数管、塑料闪烁晶

体及核乳胶测定,对于能量低的 β 射线可用液体闪烁计数器测量; γ 射线则可用盖革计数管和碘化钠(铯)闪烁晶体探测。目前大多数实验室主要采用晶体闪烁计数法和液体闪烁计数法两种测量方式(详见“放射性测量”一章)。

放射性测量仪器的最佳工作条件具有专属性,同一台测量仪器对不同能量的示踪剂有不同的最佳工作条件,同一台仪器的最佳工作条件,随仪器使用期的延长而有所改变,其最佳工作条件不同。

测量仪器最佳工作条件的选择方法有:①测“坪曲线”。“坪”(plateau)指随高压的增加,在一定范围内脉冲数变化较小,形成的一段坡度较小的电压-脉冲曲线,如图5-1所示。应选择“坪”比较平坦曲线相应的甄别阈值和放大器增益,高压值应选择在该“坪”中点偏低处。②选择品质因素。品质因素又称为优值,是指在一定条件下,要达到合适的统计数目所需要的时间是仪器的计数效率 E 和本底计数 N_b 的函数:品质因素 $F = E^2/N_b$ 。

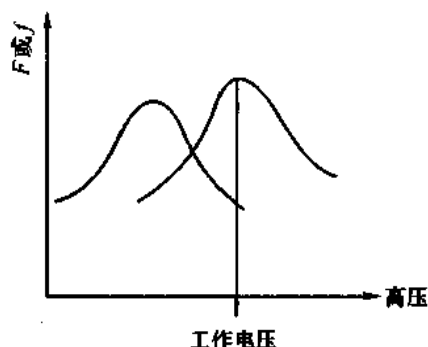


图5-1 $F(f)$ -高压关系曲线

3. 避免测量误差 为了达到准确地计数,可以长时间一次计数,或短时间多次测量,两者达到的标准误差基本相同,在实际工作中,取短时间多次测量较为合理适用。另外,本底高,则标准误差和标准误差都增大,尤其在样品计数率较低时,本底对标准误差和标准误差的影响就愈大,从而影响实验结果的精度。根据核衰变的统计规律,在实验中如果样品数量少,选择 $t_N = 1.4t_b$ 的比例(式中 t_N 为样品放射性测量时间, t_b 为本底测量时间)较为合理;如果样品数量较多,是一大批样品,则延长本底测量时间 t_b ,取 t_b 的时间均值,而 t_N 则可相对短,这样可节省时间,有利于缩短实验周期。对于示踪实验设计来说,样品中所含放射性强度的要求,一般是使其放射性计数率大于或等于本底计数的10~20倍。

4. “冷”实验进行非放射性的模拟实验,把实验全过程预演一遍

同位素示踪实验要求准确、仔细,稍有疏忽或考虑不周就匆忙进行正式实验,既容易导致实验失败,又会造成示踪剂和其他实验用品的浪费,尤其会增加放射性废物,增加实验室本底水平,使实验者接受不必要的辐射剂量,所以模拟实验不仅可以检查正式实验中所用器材、试剂是否合格,又可对操作人员进行训练,以保证正式实验的顺利进行。

(二) 正式实验阶段

1. 放射性生物样品的制备 根据实验目的和示踪剂的性质制备放射性生物样品,其中放射性同位素的性质是生物样品制备形式的主要依据。同位素最大允许剂量及浓度见表5-4。

(1) 合适的放射性强度 同位素必须能经得起稀释,使其最后样品的放射性不能低于本底,即要满足:

$$\frac{ACK}{D} - B > B \quad (1)$$

式中 A 为示踪剂的比放射性, B 为本底计数, C 为示踪剂的用量, K 为计数效率, D 为稀释倍数。在仪器效率一定的情况下,只有示踪剂的比放射性足够高,才能保证被稀释后样品的放射性能够测出来。

一般来说,放射性同位素在生物体内并非被完全均匀地稀释,可能在某些器官、组织、细胞及某

些分子中有选择性地蓄积,蓄积的部分放射性就会很强。在细胞培养、切片保温、酶反应等示踪实验中,应依据实验目的、反应时间及反应体积的不同来考虑示踪剂的用量,通常小于 3.7×10^7 Bq。由于放射性同位素存在辐射效应,还须根据使用的放射性同位素种类,将用量控制在最大允许剂量之内(maximum permissible dose),避免因剂量过大所造成的辐射效应给实验带来不必要的误差。

(2) 合适的示踪剂给人途径 体内示踪实验时,应根据实验目的,选择易吸收、易操作的给人途径,一般要求给予的剂量要准确,体积要小,并防止可能的损失和不必要的污染。体外示踪实验时,应根据实验设计在实验步骤的某个环节加入一定剂量的示踪剂到反应系统中去,力求操作准确、仔细。

(3) 合适的样品收集方式 不论采用何种测量方法,都应该对样品作定量采集,对某些放射性分散的样品应作适当浓集,如测定组织内蛋白质的放射性,应对蛋白质作提取处理,然后制备成相应的测量样品。有些样品需采用灰化法,但灰化法对易挥发的同位素或易挥发的组织样品不合适。

表 5-4 人体内放射性同位素最大允许剂量和空气、水中连续照射的最大允许浓度

同位素	重要器官	体内最大允许剂量 / 3.7×10^4 Bq	最大允许浓度	
			水/ 3.7×10^4 Bq/2500ml	空气/ 3.7×10^4 Bq/ml
^3H	整体	100000	500	1×10^{-5}
^{14}C	脂肪	260	7.5	1×10^{-5}
^{24}Na	整体	15	20	2×10^{-8}
^{32}P	骨	10	0.5	2×10^{-8}
^{35}S	皮肤	300	12.5	1×10^6
^{45}Ca	骨	14	0.25	8×10^{-9}
^{51}Cr	肾	600	1.75	1×10^6
^{55}Fe	血	1000	12.5	7×10^{-7}
^{131}I	甲状腺	0.6	0.15	6×10^{-8}

2. 放射性样品的测量

(1) 绝对测量和相对测量 放射性样品的测量方法分为绝对测量和相对测量。绝对测量是对样品中放射性强度作定量测量,并得到样品中标记同位素的实际衰变率,绝对测量时,要纠正一些因素对测量结果的影响,这些因素包括仪器探头对于放射源的相对立体角、射线被探头接收后的计数几率、反散射、放射源的自吸收影响等。在一般的示踪实验中,大多采用相对测量的方法,比较样品计数率之间的差异,相对测量时,要注意保持样品与测量仪器之间的几何位置固定。

(2) 几何条件的影响 几何条件是放射性相对测量中最重要的影响因素。降低几何条件对放射性测量的影响可以从三方面入手:①选择探测窗大的测量仪器,如光电倍增管作探头的仪器;②在样品制备时,尽量将样品做成点状源,这样当样品的放射性强度较弱时,由于距离探测窗较近而有可能造成的水平位移影响就可以忽略;③无论样品距离探测窗远或近,样品都应置于探测窗的垂直轴线上,以减少样品与探测窗之间的相对立体角。

3. 测量数据的处理 在单位时间内发生衰变的原子核数目并不一定和理论值完全相等,但是围绕着理论值上下涨落,这种现象称为放射性统计涨落,由它造成的测量结果与偶然误差所造成的结果在形式上是一致的(表 5-5)。

表 5-5 放射测量的标准偏差和相对误差公式

	标准偏差		相对误差	
	单次测量	多次测量	单次测量	多次测量
以计数 N 表示	$\delta = \pm \sqrt{N}$	$\delta = \pm \sqrt{N/t}$	$\Sigma = 1/\sqrt{N}$	$\Sigma = 1/\sqrt{AN}$
以计数率 n 表示	$\delta = \pm \sqrt{n/t}$	$\delta = \pm \sqrt{n/At}$	$\Sigma = 1/\sqrt{tn}$	$\Sigma = 1/\sqrt{tnA}$

其中: A 为测量次数; δ 为标准偏差; Σ 为相对误差。

在放射性计数中,如果两个数各有误差,要对它们作加、减、乘、除的数学运算时,其总误差是根据统计学中对同类而互不相关的误差相加的标准方法进行的。

在一组同类样品的计算中,若出现一个与其他数据有明显差别的数据,且从实验过程和仪器设备上都无明显的根据对该数据加以怀疑时,不能轻易舍弃,但是该数据又影响该组数据的平均值,甚至会影响该组数据所作结论的可靠性,这时应用肖勿涅(Chauvenet)判据来舍弃该特殊数据,可以减少误差。

肖勿涅判据认为:如果一组数中任一个数偏离该组数据(包括被怀疑的数值)的平均值很大,以至与这个偏差相等或更大的所有偏差产生的概率小于 $1/2n$ 时,则这个数可以舍去,即对于任何一个数值,根据该组数据个数(或观测次数)的不同,它在 $N \pm k\delta$ 之外,达到了 $p=0.05$ 的显著性,就应该舍去。例:有这样一组数据:30.0, 30.4, 29.2, 32.3, 30.8, 31.0, 29.8, 33.6, 29.2, 36.6, 那些数据可舍去?

首先求出平均值 $N=31.28$

其标准偏差 $\delta = \sqrt{N/A} = \sqrt{31.28/10} = 1.77$

再查肖勿涅判据表,得 $K=1.96$, 求出这组 $n=10$ 数据的平均值波动范围:

$$N \pm K\delta = 31.28 \pm 1.96 \times 1.77 = 31.28 \pm 3.47$$

因此这组数据的平均值波动范围为 $34.75 \sim 27.81$ 。

检验上述 10 个数据,凡在上述范围之外的数据可舍去。36.6 落在平均值波动范围之外,应该舍弃。在可疑数值被舍弃后,该组数据的平均值及标准偏差要重新计算。

在测量次数不太多的情况下,可以简单地比较测量的偏差 $(\bar{N} - N)$ 与 $3\sqrt{N}$ 的大小来决定数据的取舍,若 $(\bar{N} - N) > \pm 3\sqrt{N}$ (99.73%), 则此值已不属于统计误差了,而可能是系统误差或过失误差造成的计数波动,该数值就应舍弃(表 5-6)。

表 5-6 舍弃一个数值的肖勿涅判据

N	K	N	K	N	K
2	1.15	12	2.93	30	2.39
3	1.38	14	2.10	35	2.45
4	1.54	15	2.13	40	2.50
5	1.65	16	2.16	50	2.58
6	1.73	18	2.20	100	2.80
7	1.80	20	2.24	200	3.02
8	1.86	24	2.31	500	3.29
9	1.91	25	2.33		
10	1.96	26	2.35		

(三) 放射性去污染和放射性废物处理

放射性实验,无论是每次实验或阶段性实验结束后,都可能有一定程度的放射性污染和放射性废物出现。因此,在实验结束后,要作除污染和放射性废物的处理。必要时在实验进行过程中,就要作除污染和清理放射性废物的工作。

有关细节请参阅“放射性防护”一节。

三、几种常用的放射性同位素示踪法

(一) 同位素稀释法

同位素稀释法 isotope dilution method 通常可分为正稀释法和反稀释法两种方法。

正稀释法也称直接稀释法,是在非标记化合物中直接加入一定比放射性的该化合物的放射性标记物,混合后经过提纯,通过放射性的降低来计算化合物的含量,它满足

$$W_u = W_o(S_o/S_1 - 1)$$

式中 W_o 为标记化合物的数量, W_u 为非标记化合物的数量, S_o 为标记化合物的比放射性, S_1 为稀释后化合物的比放射性。

反稀释法是将一定数量的非标记化合物加到含有已知比放射性的该种标记化合物中,混合均匀后提纯,由比放射性的降低计算标记化合物的含量,满足:

$$W_o = W_u S_1 / (S_o - S_1)$$

反稀释法不易引起放射性的丢失,有助于提纯和鉴定,也有利于测定比放射性。

(二) 放射免疫分析

放射免疫分析 (radioimmunoassay) 技术是一种超微量的分析方法,定量范围通常为 $10^{-9} \sim 10^{-12}g$,它可测定的物质有 300 多种,其中激素类居多,包括类固醇激素、多肽类激素、非肽类激素、蛋白质类物质、环核苷酸、酶、肿瘤相关抗原、抗体以及病原体、微量药物等物质。

放射性免疫分析是基于被测物质和该物质的同位素标记物,与浓度有限的特异性结合试剂之间进行的竞争性结合。当同位素标记物与特异结合试剂的量在反应系统中保持一定,加入的被测物质(或其标准品)与同位素标记物的总量多于特异结合试剂有效结合的数目时,被测物(或其标准品)与同位素标记物-特异性结合试剂的复合物间呈现函数关系。

以抗原-抗体为例,其测定原理如图 5-2 所示:

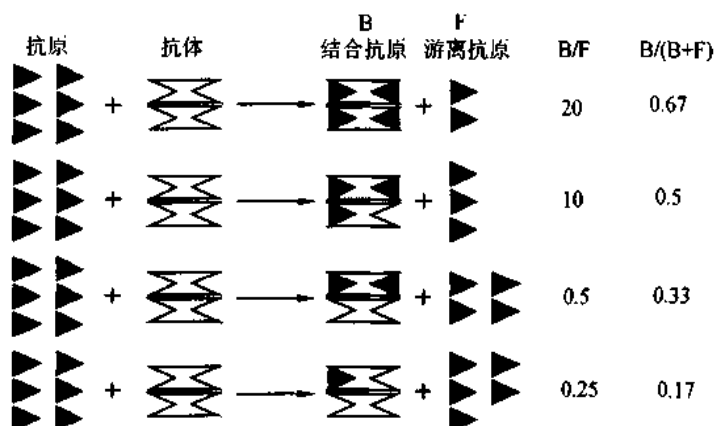


图 5-2 放射免疫分析原理示意图

在该反应系统中,对应于某种含量的被测物,都有相应的 B/F 或 $B/(B+F)$ 值,为了确定对于不同 B/F 或 $B/(B+F)$ 值的被测物量,应以被测物的标准样品作为基准,作出剂量反应曲线(或称标准曲线,校正曲线)等,然后以测得未知样品的 B/F 或 $B/(B+F)$ 值,从反应曲线上读出样品中被测物的具体含量,也可以通过计算求得被测物的含量。

以化学受体为特异试剂的受体放射竞争法,在测定激素的生物活性方面具有重要意义,它也是放射免疫分析技术的深入和补充。

放射性同位素示踪对生物化学与分子生物学领域,乃至对整个生命科学领域都作出了巨大贡献。它对分子生物学领域的贡献还表现在:①对蛋白质合成过程中三个连续阶段,即肽链起始、延伸和终止的研究;②核酸的分离和纯化;③核酸末端核苷酸分析,序列测定;④核酸结构与功能的关系;⑤遗传信息传递的研究等。

第三节 放射性测量

放射性同位素发出的射线与物质相互作用,会直接或间接地产生电离和激发等效应,利用这些效应,可以探测放射性的存在及其性质和强度。用来记录各种射线的数目、强度,分析射线能量的仪器统称为探测器(probe)或测量仪器。测量射线有各种不同的仪器和方法,正如麦凯在 1953 年所说:“每当物理学家观察到一种由原子粒子引起的新效应,他都试图利用这种新效应制成一种探测器”。一般将探测器分为两大类,一是“径迹型”探测器,如照相乳胶、云室、气泡室、火花室、电介质粒子探测器和光色探测器等,它们主要应用于高能粒子物理研究领域。二是“信号型”探测器,包括电离计数器、正比计数器、盖革计数管、闪烁计数器、半导体计数器和契伦科夫计数器等,这些信号型探测器在低能核物理、辐射化学、生物学以及地质学等领域越来越得到广泛地应用,而闪烁计数器则是生物化学和分子生物学研究领域的常备仪器之一。

一、闪烁计数器的工作原理

1. 系统组成 闪烁计数器目前分为晶体和液体闪烁计数器两种。它们主要是由闪烁体、光电倍增管、电源和放大器—分析器—定标器系统组成,测量结果可用计数率,即每分钟的计数次数(简称为 cpm)表示,现代计数装置通常可同时给出衰变率,即射线每分钟的衰变次数(dpm)、计数效率(E)和测量误差等数据,计数效率与计数率之间的关系可用公式表示:

$$E = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}} \times 100\%$$

2. 闪烁体 闪烁体是闪烁计数器的核心结构之一,它是一类能吸收能量,并能在大约 $1\ \mu\text{s}$ 时间内把所吸收的能量以光的形式再发射出来的物质,分为无机和有机闪烁体两大类。闪烁体通常有自吸收,吸收它自己发射一部分光子所占的比例随闪烁材料而变化。无机闪烁体(如 $\text{NaI}(\text{Tl})$, $\text{ZnS}(\text{Ag})$)几乎是 100% 透明的,有机闪烁体(如蒽、塑料闪烁体、液体闪烁体)一般来说透明性较差。

3. 光电倍增管 光电倍增管是闪烁器的重要部件,其组成成分是光阴极和倍增电极。光阴极

的作用是将闪烁体的光信号转换成电信号,倍增电极充当一个放大倍数大于 10^6 的放大器。光阴极上产生的电子经加速作用到达倍增电极,每个倍增电极上发生电子倍增现象,其倍增系数与所加电压成正比关系。光电倍增管的供电电源必须非常稳定,以保证倍增系数的变化最小。在无入射射线时,光电倍增管由于自身热发射而产生的电子倍增称为“暗电流”,暗电流是影响闪烁计数器计数效率的不利因素,保持测量空间环境内较低的温度是减小光电倍增管暗电流的有效方法。

二、晶体闪烁计数

1. 探测原理 晶体闪烁计数(crystal scintillation counting)一般用于探测 γ 射线。 γ 射线不同于 α 和 β 粒子,它类似于光和其他电磁辐射,在与物质作用时不直接产生电离,而是按下述三种机制之一被吸收:光电效应,康普顿效应和电子对生成。

γ 射线由于没有质量,具有很强的穿透性,而且最易被高电子密度的物质所吸收(如:铅)。具有高原子序数 Z 的原子直接与高电子密度有关。就探测器而言,某些无机盐能有效地吸收 γ 光子,发射出强度正比于所吸收 γ 射线能量的光子,例如,铯激活的碘化钠,由于碘原子的原子序数 Z 高,并具有较高的密度(3.67),而且每吸收单位能量的光子产额高,晶体的光透性也好,用于探测 γ 射线,效率较高。

2. 仪器装置 一个供探测 γ 光子用的固体晶体装置包括一个“密闭的”铯激活碘化钠晶体,安放在光电倍增管的表面上,整个装置是不透光的。 γ 射线易于穿透晶体外表的铝层,被晶体所吸收,晶体发射出能量与入射 γ 射线能量成比例的可见光,光电倍增管将可见光能量转换为电脉冲。各种能量转换过程(即从 γ 光子发射到产生一个电脉冲)成比例的性质,以及 γ 光子的吸收性质,保证 γ 放射性同位素可通过晶体闪烁得以计数并定量。

另外,在塑料溶剂(如聚乙烯甲苯)中加入闪烁体(如 POPOP 或 TP)并做成片状,可用以探测能量较高的 β 射线。使用含微量银的硫化锌薄型晶体,可用以探测 α 射线。

3. 晶体闪烁计数的定性、定量分析 一个典型的 γ 发射体 ^{51}Cr 的衰变纲图如图 5-3 所示,放射性同位素 ^{51}Cr 主要按电子俘获方式衰变,其半衰期为 27.8 天,按电子俘获方式衰变至基态钒发生的频率为 91%,并导致随后发射 -5 keV 的弱 X 射线,此 X 射线一般难以探测,因为样品中放射出来的 X 射线在其能穿入碘化钠晶体之前已被吸收。

^{51}Cr 有 9% 的机会通过电子俘获衰变到钒的一种受激核态,并立刻通过发射 -320keV 的 γ 射线衰变至稳定的基态,这种 γ 射线易于探测。

用晶体闪烁计数器来测量 ^{51}Cr ,在 320keV 处可观察到一个尖锐的光电峰,这是 γ 光子能量以光电效应损耗的结果。各种 γ 射线放射性同位素都有其特征的光电峰,利用特征光电峰,可对 γ 射线放射性同位素进行定性鉴别。

将测得的计数率与总放射性强度或标准源的计数率进行比较,可以算出样品放射性占总放射性或标准源的百分比,从而获得样品的相对放射性强度。

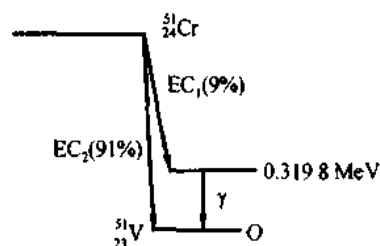


图 5-3 ^{51}Cr 放射性衰变纲图

三、液体闪烁计数

液体闪烁计数(liquid scintillation counting)是将闪烁体溶解在适当的溶液中,配制成为闪烁液,并将待测放射性物质置于闪烁液中进行测量。应用液体闪烁计数可达到 4π 立体角的优越几何测量条件,而且源的自吸收也可以忽略。对于能量低、射程短、易被空气和其他物质吸收的 α 射线以及低能 β 射线(如 ^3H 和 ^{14}C),均有较高的探测效率。

1. 探测机理 从放射源发出的射线能量,首先被闪烁液中的溶剂分子吸收,使溶剂分子激发。该激发能量在溶剂内传播并传递给闪烁体(溶质),引起闪烁体分子的激发,当闪烁体分子回到基态时发射出光子,光子透过透明的闪烁液及样品的瓶壁,被光电倍增管的光阴极接收,继而产生光电子并通过光电倍增管的倍增电极放大,然后被阳极电路接收形成电脉冲,完成放射能 \rightarrow 光能 \rightarrow 电能的转换。

2. 闪烁液 闪烁液是指闪烁瓶中除放射性被测样品之外的其他组分,主要是有机溶剂和闪烁体,有时为了样品制备或提高计数效率的需要,还需加入其他添加剂。如果以一定浓度的闪烁体在甲苯溶液中产生的脉冲高度为 100% 计算,凡能产生 80% 以上脉冲高度的试剂为溶剂,能使脉冲高度随其浓度上升而逐渐降低的称为稀释液,而在浓度很低时就能引起脉冲高度显著下降的称为淬灭剂。

(1) 溶剂 对溶剂的选择,主要视其对闪烁体的溶解度和将放射能转移给闪烁体的效率而定。一个好的溶剂应满足下列条件:①对闪烁体的溶解度高;②对放射源能量的转移效率高;③对闪烁体发射的光子透明度高;④无论有无助溶剂都可以溶解放射性样品;⑤在计数器的工作温度下不结冰;⑥能够形成均相的测量溶液。一般认为,烷基苯类化合物是最好的溶剂,如甲苯和二甲苯,此外苯甲醚也是比较好的溶剂。对于含水量较多的样品,采用 1,4-二氧六环作为溶剂,因为该有机化合物的极性很强,既能很好地溶解闪烁体又可溶解含水量较多的样品,缺点是价格昂贵,冰点高,久放后产生淬灭作用很强的过氧化物,使用时需将 1,4-二氧六环纯化并加入 0.001% 的二乙基二硫化氨基甲酸钠或丁基氢氧基甲苯(BHT)。

(2) 闪烁体 在液体闪烁计数系统中,闪烁体又称荧光体,是闪烁液的溶质,它的种类很多,根据其荧光特性及作用,可分为两类,即初级闪烁体和次级闪烁体(表 5-7)。

① 初级闪烁体(第一闪烁体) 常用的初级闪烁体有:

对联三苯(TP):它是最早使用的闪烁体之一,计数效率高,价格比较便宜,但是,在低温或含水溶液中溶解度不高。

2,5-二苯基噁唑(PPO):它是目前普遍使用的闪烁体,能很好地溶解在常用的溶剂中,在甲苯中的溶解度达 200 g/L 以上。它的化学性质稳定,价格也较便宜,但它的最大缺点是有明显的浓度淬灭(自身淬灭),即随着 PPO 在溶剂中的浓度升高,计数效率下降。

2-苯基-5-(4-二苯基)-1,3,4-噁二唑(PBD):它是已知最有效的初级闪烁体之一。比 PPO 耐受浓度淬灭,但是它的溶解度低,尤其是在低温和含水样品条件下,溶解度下降很快,而且用量比 PPO 多两倍。

2-(4-t-丁基苯基)-5-(4-二苯基)-1,3,4-噁二唑(丁基-PBD):它的溶解度比 PBD 高,其最大优点是对化学和颜色淬灭不敏感,因此可以获得较高的计数效率。

② 次级闪烁体(第二闪烁体) 次级闪烁体的主要功能是吸收初级闪烁体发射的光子并在较长

的光波段上发射出荧光,同时能增加光子的产额。高浓度的次级闪烁体还能与淬灭因子竞争,从而减少了淬灭程度。在下列一种以上的情况下,必须在闪烁液中加入次级闪烁体:

- 样品中含有直接淬灭初级闪烁体的化合物;
- 初级闪烁体浓度高而引起自身淬灭,发射光谱范围与光电倍增管光阴极不匹配;
- 光电倍增管光阴极对于较长波长的光谱响应比较好;
- 测量的样品在近紫外区有明显的吸收。

常用的次级闪烁体有:

1,4,双-2-(5-苯基噁唑)-苯(POPOP),是目前普遍使用的次级闪烁体,它的溶解度小,在甲苯系列中为 1.2 g/L,在二氧六环中为 1.5 g/L。溶解速度慢,通常需加热促溶。

1,4-双-2-(4-甲基-5-苯基噁唑基)-苯(DMPOPOP),它的溶解度比 POPOP 大,在甲苯系列中为 2.3 g/L,在二氧六环中是 8.0 g/L,溶解速度也快,但不如 POPOP 的计数效率高,工作浓度也较高。

此外,还有对-双(O-双基苯乙烯基)-苯(双-MSB)和 2-(4'-二联苯基)-6-苯基苯丙噁唑(PBBO)。

表 5-7 几种常用液体闪烁体的荧光特征

类 别	名 称	最大荧光波长/nm	荧光电子率/%	衰变时间/ns
初 级 闪 烁 体	TP	360	0.93	1.0
	PPO	365	1.00	1.4
	PBD	365	0.83	1.4
	丁基-PBD	365		
次 级 闪 烁 体	POPOP	418	0.93	1.5
	DMPOPOP	430	0.93	1.5

闪烁体的最佳浓度不是一个确定的值,它既受闪烁体种类的影响,又因液闪测量系统的不同而有差异。如初级闪烁体 PPO 在计数系统中淬灭严重,其浓度应增加 2~3 倍才有较高的计数效率。又如,在一个无淬灭的甲苯溶液中,丁基-PBD 的最佳浓度是 7 g/L,而 PPO 则是 4~5 g/L。因此,闪烁体的最佳浓度是指某种闪烁体对特定的闪烁液计数系统而言,通常应通过实验确定其数值。对于次级闪烁体来说,由于其溶解度很小,所以即使有浓度淬灭也不致引起计数效率的明显减少。

(3) 添加剂 闪烁液中除了溶剂、闪烁体之外,有时还添加一些其他成分。为了增加闪烁液对含水样品的溶解能力,需加入助溶剂;为了改善计数效率,则加入抗淬灭剂。

甲苯、二甲苯等有机溶剂极性很小,对水的溶解能力较差。当样品含水较多和体积较大时,要加入一定量的极性有机溶剂,如甲醇、乙醇、乙二醇乙醚等,这些溶剂在非极性溶剂和水分子之间起着桥梁作用,既能和甲苯、二甲苯互溶,又能和水互溶,达到增加含水样品在闪烁液内溶解度的目的,助溶剂的淬灭作用较大,其用量应有所限制。乙二醇乙醚的极性大且淬灭作用小,是常用的助溶剂。

抗淬灭剂蔡通常用在对含水量很大的样品进行测量或采用二氧六环作溶剂时,但是蔡不能和对联三苯合用,尤其是在甲苯或二甲苯溶剂中,否则计数效率会很低。

在液体闪烁计数器中,闪烁液的最佳体积可以在一定范围内有所变化。只要能获得较高的计

数效率,就应该采用较小的体积。较小体积的闪烁液可减少本底计数(大约 0.5cpm/ml 闪烁液),减少样品的自吸收。当样品中含有淬灭成分时,增加闪烁液的体积,可以经稀释作用来减少淬灭。

常用标准闪烁液配方见表 5-8。

表 5-8 标准闪烁液的配方

溶液	成 分				应 用
	第一闪烁体	第二闪烁体	附加试剂	溶剂(至 1L)	
A	PPO(5g)或丁基-PBD(10g)	双-M-SB(0.5g)或DMPOPOP(0.25g)		甲苯	所有溶于甲苯的样品,吸附于支持物上的不溶性样品
B	PPO(3g)或丁基-PBD(10g)	双-MSB(1g)或DMPOPOP(0.5g)	乙醇或2-乙氧基乙醇(300ml)	甲苯	3%以下的水样品
C	PPO(5g)或丁基-PBD(10g)	双-MSB(1g)或DMPOPOP(0.5g)	苯(150g)乙二醇(20ml)2-乙氧基乙醇(100ml)	二氧六环	20%以下的水样品
D	PPO(5g)或丁基-PBD(10g)	双-MSB(0.5g)或DMPOPOP(0.5g)	Triton X-100(333ml)	甲苯	10%以下的水样品以及 20%~40%的水样品,乳状液系统

3. 仪器装置

使用两只性能指标大致相同的光电倍增管,并和符合电路相连接,做成双管符合型液体闪烁计数器(图 5-4)。符合电路只能通过由两只倍增管同时产生的信号,因而只有当两只光电倍增管在符合电路分辨时间内同时观察到的信号才被记录下来,而由热噪声或磷光产生的随机脉冲则被排除掉,有效地降低了仪器本底,提高了探测效率,系统探测效率可在 50% 以上。

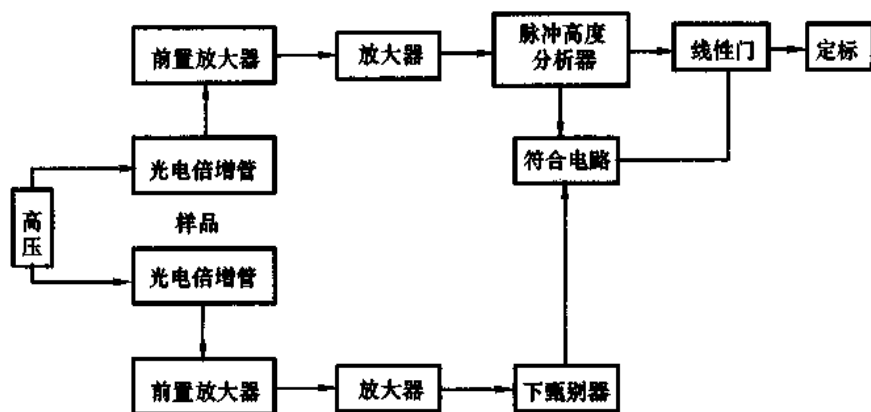


图 5-4 双管符合型液体闪烁计数器方框图

4. 样品制备 样品制备是液体闪烁测量过程中重要的操作步骤,样品制备方法的选择要考虑以下四个因素:①所测样品的物理和化学特性,它决定于所用闪烁液种类和测量方式;②预计的放射性水平,在样品的放射性强度低时,要求的制备方法比较严格;③制备过程的经济和方便,在样品数量多时更为重要。其一般原则是必须使所制备样品的放射性,能在一个短的测量时间达到适当的统计学准确度,最关键的是要求样品制备过程中,尽可能地减少“淬灭”因素。

(1) 均相样品的制备 脂溶性样品可直接加入甲苯或二甲苯系统的闪烁液。含水量少于 3% 的样品,仍应用甲苯或二甲苯系统的闪烁液,但需加入乙二醇乙醚等极性溶剂助溶,助溶剂与甲苯的比例通常为 3:7。含水量大于 20% 的样品,最好采用 100 ml 乙二醇乙醚—20 ml 乙二醇—8g PPO—500 mg POPOP—150 g 萘,二氧六环加至终体积为 1 L 的闪烁液配方。

(2) 非均相样品的制备

① 乳状液计数:表面活性化合物 Triton X-100 是广泛应用的乳化剂,它的亲水端吸引水和其他极性分子,疏水端吸引甲苯等非极性分子。乳状液的物理性能随着水分的增加而改变。溶质在有机相和水相之间的分布是决定乳状液计数效率的关键因素,乳状液有时会比均相测量更高,这是因为淬灭物质主要保留在水相中而不影响在有机相中发生的能量转移过程。

② 悬浮液测量:在甲苯等闪烁液中溶解度极低的无机盐样品,可采用凝胶技术制成悬浮测量液。悬浮液测量的优点是样品不溶解在溶剂中,样品淬灭极小。在悬浮测量液中作为絮凝剂的物质有硬脂酸铝、蓖麻油的衍生物(thixin)及二氧化硅的细颗粒(Cab-o-sil)。含 3.5%~4.0% Cab-o-sil 的悬浮液,可以得到很高的计数效率,Cab-o-sil 还可以减少计数瓶壁对放射性的吸附作用,一般制样时,往往先加 Cab-o-sil,再加入放射性样品,使放射性更多地吸附在悬浮颗粒上而提高计数效率。悬浮液测量除应用于固体无机盐样品的测定外,也可应用于水溶液、组织匀浆和薄层层析样品的测量。

③ 支持物测量:凡不溶于闪烁液的样品,可将它放置在支持物上再浸入闪烁液中进行计数。支持物的种类很多,如普通滤纸、玻璃纤维滤纸及醋酸纤维素薄膜等。支持物测量除淬灭作用小外,还有一个突出的优越性,即一次测量可以容纳较多的样品。在几种支持物中,醋酸纤维素薄膜或玻璃纤维滤纸的测量效率优于普通滤纸,因为普通滤纸对光子传播几乎是不透明的,所以计数效率较低。

5. 双标记同位素 液体闪烁计数器特点之一是能作双同位素分析,配备两个以上独立甄别器的多道装置,并具有脉冲相加和线性门装置,在每种同位素的最佳计数条件下同时测量它们,就能区分发射不同能量的同位素。

假定有一个含有³H和¹⁴C的样品,我们将仪器中甄别器多道装置中的道 1 调成³H的最佳工作条件,道 2 调在¹⁴C的最佳工作条件。³H和¹⁴C标准样品溶解在同样的溶剂中,并采用与实验样品相同的闪烁体。首先测量空白样品,然后对实验样品和标准样品进行计数,由样品测到的计数率,可用下面的联立方程计算出每种同位素的贡献。

$$C = \frac{N_2 - N_1(h_2/h_1)}{C_2 - C_1(h_2/h_1)}$$

$$H = \frac{N_1 - N_2(C_1/C_2)}{h_1 - h_2(C_1/C_2)}$$

公式中:C=样品中¹⁴C的 dpm;C₁=道 1 中¹⁴C的效率(即:100%=1.00);C₂=道 2 中¹⁴C的效率;H=样品中³H的 dpm;h₁=道 1 中³H的效率;h₂=道 2 中³H的效率;N₁=在道 1 中测到的总的净计数;N₂=在道 2 中测到的总的净计数。

为了使双标记测量获得成功,两种放射性同位素的β谱必须要有足够的差异来满足脉冲高度分析所要求的分离。在两种同位素能谱过于接近的情况下,例如¹⁴C和³⁵S,必须首先对它们进行同位素的化学分离,然后分别计数。在双标记测量中,较常用的成对同位素有³H和¹⁴C、³H和³⁵S、³H和³²P及¹⁴C和³²P等。总之,双同位素标记测量须满足下述两个条件:第一,较高能量的同位素尽量

能够在不受较低能量同位素干扰的条件下进行计数;第二,选择一个最佳条件,使双标记样品中较低能量的同位素能被计数。

6. 淬灭作用 放射性能量在测量瓶内的传递和转换过程越顺利,测量效率越高。但事实上,影响能量传递过程的因素很多,它的每一环节都存在着对能量的竞争,甚至发生能量传递的中断,导致测量效率下降,这种现象称为液体闪烁计数的淬灭作用。造成淬灭的因素很多,按淬灭性质归纳,有下列三种类型:

(1) 化学淬灭 化学淬灭的产生是由于放射能激发的少量溶剂分子在分子运动中,与非激发的杂质、溶剂、溶质分子碰撞而将激发能以热能形式消耗。化学淬灭的严重程度取决于淬灭物质的化学结构和浓度。化学淬灭与淬灭物质化学结构的关系见表 5-9。

表 5-9 淬灭程度与淬灭物的化学结构

轻度淬灭	$R-H, R-F, R-O-R, (RO)_3, RO_2, R-CN, R-OH, R-COO-R, R-Cl$
中度淬灭	$R-SH, R-NH_2, R-CH=CH-R, R-Br, R-S-R, R-COOH$
强淬灭	$R-SH, R-OCOCO-R, R-CO-R, R-NH-R, R-CHO, R_2N-R, R-I, R-NO_2, R-COX$

在常温常压下,闪烁液能溶解空气中的氧,当氧的溶解量达到 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,淬灭作用比无氧情况下增加 20%,溶剂中的水分以及其他添加剂应越少越好,另外闪烁液不应放在冰箱中。

(2) 颜色淬灭 由于颜色对光子有吸收作用,会削弱光子的亮度,缩短光量子的自由程,而导致到达光阴极的光子数目减少,造成计数效率下降。颜色不同,淬灭程度也不同,由于闪烁液荧光波长接近于紫外光,所以颜色淬灭程度的顺序为:兰色 > 黄色 > 红色。一些生物样品,如血、尿等在制样过程中须进行脱色处理;在支持物测量过程中,如果滤膜干燥时被烤黄,也会造成计数效率的严重下降。

(3) 光子淬灭 在非均相和均相测量中,样品本身的自吸收会使射线能量在没有传递给溶剂分子之前就被消耗掉了,谓之光子淬灭。

淬灭作用表现在使能谱曲线的峰值下降和位置左移,当能谱峰值因淬灭而降低到一定程度时,计数率就很难与光电倍增管热噪声所产生的电脉冲相区别,其结果是和热噪声信号一起被甄别器甄别掉了。

四、放射测量的注意事项

1. 任何测量放射性的计数方法都存在本底问题 所谓本底指被测样品之外的信号输出。因此,测量到的样品计数率要扣除本底计数率,才是样品的净计数率,仪器本底越低,测量灵敏度越高,准确度也越高,这在 ^3H 标记物的低水平测量中尤为重要。

2. 放射性测量通常存在三种误差 ①系统误差是由于测量仪器本身、测量方法或程序不合理以及周围环境的影响,使测量结果偏离而造成的误差。系统误差产生的原因可以找到并能加以克服;②过失误差是由于实验工作者的主观错误造成,是一种无规律可循的误差;③统计误差是由于放射性衰变本身的随机性而导致的无法控制的误差,它是放射性测量中主要的、固有的误差来源。

在实际工作中,常通过提高计数效率,增加测量次数(以 3~5 次为宜)或每个样品做 1~2 个平行管计数、合理分配测量时间等方法来降低测量统计误差。

3. 在液体闪烁计数中应避免淬灭的因素 如果欲知样品的真正放射性强度,并进行样品间的

相互比较,就需作淬灭校正。常用的淬灭校正方法有稀释法、内标准法、道比法和外标准道比法等。

第四节 放射防护

放射性的来源有天然和人工放射性两类。生活在地球上的人们经常受到这两种放射性的照射,天然放射性即本底照射是不可避免的,而人工放射性的应用产生的放射性危害,使人们对放射防护(radiation protection)的问题越来越重视。

一、放射性的危害性及防护的必要性

1. 放射性的危害性 放射性物质可以从体外或进入体内放出射线,对人体造成损害。就外照射而言,由于各种射线穿透能力不同, γ 射线照射对机体的危害大于 β 射线,而 β 射线的危害性又大于 α 射线。内照射对人体的损害正相反。受照射部位不同,受害程度亦不同。对某种放射性同位素蓄积率高的组织或器官,必然受照严重,如 ^{32}P 对骨骼系统危害较大, ^{125}I 和 ^{131}I 主要危及甲状腺器官。放射性对机体造成的损害随着放射性强度的增加而增大,大剂量的放射性会造成被照射部位的组织损伤,并导致癌变,即使是小剂量的放射性,尤其是长时间的小剂量照射蓄积会诱发器官组织癌变,并会使受照射的生殖细胞发生遗传缺陷。

2. 随机和非随机效应 放射性对人体的影响主要有随机效应和非随机效应。随机效应(stochastic effect)指放射性对机体致癌或遗传效应的发生概率,此发生概率与照射剂量的大小有关,而随机性效应的严重程度与剂量无关,如放射性致癌、放射性诱发各种遗传疾病均属随机性效应。非随机性效应(non-stochastic effect)是机体受照射后在短期内就出现的急性效应,以及经过一定时间后发生的生育功能低下、白内障和造血机能障碍等,其严重程度随受照射剂量不同而变化,它存在着明确的剂量阈值,这种效应是随着受照射剂量的增加,而有越来越多的细胞被杀死而产生的。ICRP第60号出版物把非随机性效应称为确定性效应。

放射防护的目的就在于防止有害的确定性效应,并限制随机性效应的发生率,使放射性达到被认为可以接受的水平。

3. 防护的必要性 毫无疑问,由于利用放射性同位素引起的危害性,与利用它来获得的利益相比是微小的,如治疗宫颈癌而接受射线的妇女,似乎并未发生白血病的特大危险。但是这并不意味着可以掉以轻心,因为放射导致绝经的妇女,即使她们的骨髓仅接受了小剂量的射线照射,却发生了白血病,这说明大剂量的射线照射使细胞易于死亡,而小剂量射线照射只是损伤了细胞,但是这些被损伤了的细胞还能分裂发生癌变,表明低于某阈值的小剂量射线对机体有兴奋效应,称为Hormesis现象。

放射防护的必要性在于保护操作者本人免受辐射损伤,防止不必要的射线照射,保护周围人群的健康和安全,做好放射性污物、污水的收集与处理,避免环境污染,保证实验能够正常进行,取得的结果可靠。在应用放射性同位素时,一定要考虑放射防护问题,“预防为主”,合理的使用放射性同位素,避免不必要的射线照射,减少人群的剂量负担。

二、放射防护的三原则

国际放射防护委员会(ICRP)提出防护的基本原则是放射实践的正当化、放射防护的最优化和个人剂量限制,这三项原则构成完整的剂量限制体系。

1. 放射实践的正当化 在进行任何放射性工作时,都应当进行代价和利益的分析,要求任何放射实践,对人群和环境可能产生的危害比起个人和社会从中获得的利益来,应当是很小的。即效益明显大于付出的全部代价时,所进行的放射性工作就是正当的,是值得进行的。

2. 放射防护的最优化 放射性的照射量应保持在可以合理达到的、尽可能低的水平,避免一切不必要的照射。在放射实践中选择防护水平时,必须在由放射实践带来的利益与所付出的健康损害的代价之间权衡利弊,以期用最小的代价获取最大的净利益。最优化原则又称为 ALARA 原则,用曲线可表示如图 5-5 所示。

由图可知,健康代价(曲线 A)正比于总剂量,当总剂量较小时,放射防护代价(曲线 B)很高,且随剂量的增加而急剧下降,曲线 A 和 B 代价之和有一最小值,这就是最优化健康代价与放射防护代价之和 W_0 。放射防护的最优化在于促进社会公众集体的安全和卫生保健。

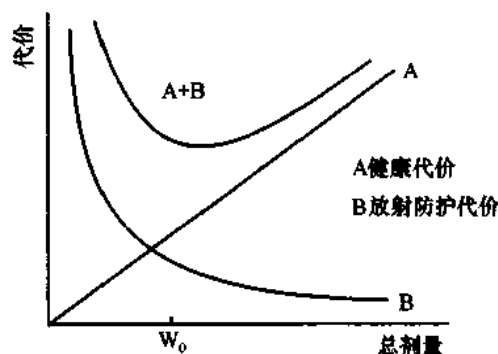


图 5-5 ALARA 原则图

3. 个人剂量限制 在放射实践中,必须保证个人所受的放射性剂量不超过规定的相应限值。ICRP 规定工作人员全身均匀照射的年剂量当量限制为 50 毫希沃特*(mSv),广大居民年剂量当量限值为 1mSv。我国放射卫生防护基本标准中,对工作人员和居民年剂量当量限值,采用了 ICRP 推荐规定的限值。为防止随机效应,规定放射性工作人员受到全身均匀照射时的年剂量当量不应超过 50mSv,公众中个人受照射的年剂量当量应低于 5mSv。当长期持续受放射性照射时,公众中个人在一生中每年全身受照射的年剂量当量限值不应高于 1mSv,且以上这些限制不包括天然本底照射和医疗照射。

个人剂量限制是强制性的,必须严格遵守。各种情况下规定的个人剂量值是不可接受的剂量范围的下限,而不是可以允许接受的剂量上限。即使个人所受剂量没有超过规定的相应剂量当量限值,仍然必须按照最优化原则考虑是否要进一步降低剂量。所规定的个人剂量限值不能作为达到满意防护的标准或设计指标,只能作为以最优化原则控制照射的一种约束条件而已。

三、内照射和外照射的防护

(一) 内照射的防护

放射性物质进入人体对机体产生照射称为内照射(internal radiation)。机体一旦被放射性物质污染,射线对机体的作用就要持续到进入体内的放射性被完全清除为止。

1. 有效半衰期 放射性同位素对机体的内照射毒性与其在体内的存留时间、分布部位、同位素的半衰期及所发出射线的性质密切相关,其中存留时间与同位素的有效半衰期(T_{eff})相关。有效半衰期是放射性同位素的物理半衰期(T_p)和生物半衰期(T_b)共同作用而引起体内放射性物质减

少为摄入量的一半所需要的时间,三者有以下关系公式:

$$\frac{1}{T_{\text{eff}}} = \frac{1}{T_r} + \frac{1}{T_b}$$

由公式可知,如果放射性同位素的物理半衰期远远大于生物半衰期时,其有效半衰期接近或相当于生物半衰期。常用放射性同位素的半衰期见表 5-10。

表 5-10 常用放射性同位素的物理、生物和有效半衰期

	³ H	¹⁴ C	³² P	³⁵ S	⁵¹ Cr	⁵⁹ Co	⁹⁰ Sr	⁹⁰ Y	¹³¹ I
T _r /天	4.5×10 ³	2×10 ⁶	14.3	87.1	27.8	1.9×10 ³	10 ⁴	2.68	8
T _b /天	12	10	257	90	616	9.5	1.3×10 ⁴	1.4×10 ⁴	138
T _{eff} /天	12	10	13.5	44.3	26.6	9.5	5 700	2.68	7.6

少数有效半衰期很长的放射性同位素,如²³⁹Pu(T_{eff}为200年)若沉积于骨骼组织,则终生也难以清除。前已所述,内照射对机体损害主要取决于射线的电离能力,因此对于电离能力较强的α射线和β射线及选择性沉积于紧要器官的放射性同位素应加倍警惕它们可能造成的内照射损害。

2. 内照射防护的三要素

(1) 围封隔离防止扩散 把放射性物质限制在有限空间内,防止其向周围环境扩散。根据放射性同位素对机体的危害性及用量和操作形式不同,采用不同的隔离方法,使用各种类型的通风橱、手套箱等。ICRP 根据毒性将放射性同位素分成四组,如表 5-11 所列。

表 5-11 放射性同位素毒性分组和工作场所分级

放射性同位素毒性组别	举例	日最大操作量/Bq		
		丙级场所	乙级场所	甲级场所
极毒组	²²⁶ Ra	3.7×10 ³ ~1.85×10 ⁵	1.85×10 ⁶ ~3.7×10 ⁸	>3.7×10 ⁸
高毒组	¹³¹ I	3.7×10 ⁴ ~1.85×10 ⁷	1.85×10 ⁷ ~3.7×10 ⁹	>3.7×10 ⁹
中毒组	³² P, ³⁵ S	3.7×10 ⁵ ~1.85×10 ⁸	1.85×10 ⁸ ~3.7×10 ¹⁰	>3.7×10 ¹⁰
低毒组	³ H, ¹⁴ C	3.7×10 ⁴ ~1.85×10 ⁶	1.85×10 ⁹ ~3.7×10 ¹¹	>3.7×10 ¹¹

上表所列为一般化学操作情形下的日最大操作量,如果操作性质和操作条件不同,需要乘以下表中的系数,加以修正。

表 5-12 操作性质的修正因素

操作性质	修正系数
干式发尘操作	0.01
产生少量气体,气溶胶的操作	0.1
一般湿式操作,普通化学操作	1
简单的湿式操作	10
在工作场所贮存	100

级别愈高的场所,对防护的要求愈加严格。低于丙级下限的低毒组放射性,允许在一般实验室操作。

(2) 除污保洁防止污染 操作放射性物质,要随时清理污染,监测污染水平,控制扩散,使污染

程度低于国家规定的限值。

(3) 讲求个人防护 个人使用防护用品,遵守个人防护规则,搞好个人卫生,采取必要的药物预防措施,如操作 ^{131}I 前,口服碘化钾片剂,可减少 ^{131}I 对甲状腺的内照射;工作之后多饮茶水,以利于 ^3H 等放射性物质的排泄等。

内照射防护的具体措施,即要避免放射性物质进入人体内:

① 防止放射性物质从呼吸道侵入:放射性的气体、气溶胶和灰尘是经呼吸道侵入体内的重要形式。大多数放射源是液态的,比活度范围为 $3.7 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^9 \text{Bq/ml}$ 之间,配制液态源的溶剂有水、乙醇、油类等。在使用液态源的过程中,由于蒸发作用,放射性同位素会被带入大气中,例如 ^{131}I 溶液挥发性很强,只要将容器打开,即使在常温常压下也有明显的蒸发作用。如果在实验操作中不慎发生放射性物质的溅、洒、滴、漏而造成环境污染时,会扩大蒸发面使放射性物质附着在微尘和小水滴上而悬浮在空气中污染空气,工作人员通过吸入污染的空气而受到内照射。

在操作放射性物质时,要防止放射性灰尘的形成和播散,建立良好的通风设备,保持工作场所的清洁通风;操作粉尘性或挥发性放射性物质,要在通风橱或手套箱内进行,工作人员要戴口罩保护呼吸道,实验室内的清洁卫生要杜绝干式操作(如扫地和干拖布拖地),采用湿法除尘,放射性溶液要加盖以防挥发。

② 防止放射性物质从消化道侵入:放射性物质经胃肠道的吸收率取决于元素的物理和化学性质及溶解度,如铯和钡的氧化物溶解度较高,很容易经消化道吸收入血,碘为易溶性的化合物,几乎百分之百地被吸收,消化道对各种元素的吸收还存在着选择性,容易吸收机体必需的元素,例如属于门捷列夫周期表第Ⅰ和第Ⅱ族的钠、钾、镁、钙等元素及与这些元素化学性质相近的铯、锶、钡等元素较易被吸收。

在放射性工作场所抽烟、喝水、吃食物等不良习惯将导致放射性物质进入体内,所以从事放射性工作的人员应养成良好的个人习惯,实验时要戴手套,穿着工作服。医用乳胶手套和塑料手套都能满足操作放射性物质的要求。穿戴手套要仔细检查有无破漏,并分清手套的正反面,切不可把污染的外面与裸露的手直接接触,严防两手污染;绝对不在放射性工作场所吸烟、饮食,工作结束后要彻底洗手。

③ 防止放射性物质由皮肤粘膜和伤口侵入:一般完好的皮肤对大部分放射性物质有较好的屏障作用,但同时存在有机溶液时,会增加放射性物质透过皮肤的能力。放射性碘蒸气、碘溶液以及碘化物溶液和氡水的蒸气态及液态也能通过完好的皮肤而被吸收,当皮肤有皲裂或有擦伤、刺伤等创口存在时,放射性物质极易进入伤口,穿透到皮下组织,然后根据化合物的特点或快或慢地被吸收入血,或被吸收到细胞外液中去。

在操作放射性物质时,绝不能对皮肤不加任何防护措施而直接接触放射性物质,体表暴露部位可涂滋润皮肤的油膏来保护皮肤,减少放射性物质的侵入。表皮有创伤和伤口时应暂停操作。使用玻璃器皿须小心谨慎,勿使破碎,一旦发生意外,要仔细检查体表是否受到损伤,有损伤伤口应立即停止工作,检查局部污染情况,并进行去污处理。

(二) 外照射的防护

放射性对机体产生的外照射生物效应与射线的穿透能力密切相关,高能 β 射线和 γ 射线有很强的穿透能力,是外照射(extra-radiation)防护的重点。

外照射防护四要素

(1) 减少用量 从放射性核衰变规律 $N = N_0 e^{-\lambda t}$ 可知,机体所受照射量与放射性物质的原始量成正比,原始使用量越大,受照射剂量越大。在不影响应用效果的前提下,应尽量减少放射性物质的强度,选择能量较低、毒性较小的放射性同位素。凡一时用不着或多余的放射源应及时屏蔽贮存,勿放在工作人员经常活动的室内,对产生气体的放射源要经常检查其密封程度。

(2) 缩短时间 在放射性工作场所内,机体所受的照射剂量与受照射的时间成正比,工作时间越长,所受的照射剂量就越大。在满足工作需要的前提下应尽可能地缩短在放射源附近的停留时

间。

(3) 增加距离 放射源有各种几何形状,只要受照射对象到放射源的距离远远大于放射源本身的线度,如大于或等于 10 倍,就可以把放射源当作点状源。在点状源的情况下,放射性强度与源至受照物质之间距离的平方呈反比,公式:

$$\begin{aligned} \text{由} \quad & \frac{I_1}{I_2} = \frac{d_2^2}{d_1^2} \\ \text{则} \quad & I = 1/d^2 \end{aligned}$$

式中: I 是源的放射性强度, d 是源与受照物质(对象)之间的距离。即距离增加一倍,所受照射量率将减小到原始量的四分之一,若距离增大 10 倍,所受照射量率就可减小到百分之一,所以增大源与受照对象之间的距离是降低照射剂量的有效措施。

(4) 使用屏蔽 时间和距离是简单而有效的外照射防护手段,但在实验中,常受到一定的限制,为达到有效的防护,就必须使用恰当的屏蔽防护。屏蔽防护是根据射线通过物质时被物质吸收而减弱的原理,在放射源与受照对象之间加入一定厚度、适当材料制成的屏蔽物,它可将外照射剂量减少到允许接受的水平。

表 5-13 常用屏蔽材料的密度

材料名称	密度/(g/cm ³)	材料名称	密度/(g/cm ³)	材料名称	密度/(g/cm ³)
有机玻璃	1.18	橡皮	0.91~0.93	铜	8.9
玻璃	2.4~2.6	硬橡皮	1.8	钢	7.1~7.9
石英	2.21	铝	2.7	铅	11.34
塑料	1.4	铁	7.89	铅玻璃	4.77

屏蔽材料的密度决定屏蔽的性能,根据屏蔽材料的密度与屏蔽材料的厚度成正比的关系,在实际工作中可以估算不同屏蔽材料的互相替代。

性质不同的射线与物质作用时,其作用特点不同,所以采用的屏蔽物质也应有所不同,对 γ 射线的防护,铅是良好的屏蔽材料,铅的密度大,较薄的吸收层就能达到屏蔽目的,并能吸收光电效应和电子对效应。常用铅砖和铅玻璃做防护屏,铅橡皮做围裙和手套。用密度较低的材料,如混凝土、铁矿石、土砖等屏蔽低能量的 γ 射线,能避免次级电子的照射。常选用有机玻璃、玻璃及塑料做 β 射线的防护器材,原子序数高的物质不适于 β 射线的屏蔽,高能量的 β 射线(如³²P,1.71 MeV)通过原子序数高的物质时会引起韧致辐射,产生穿透力很强的 X 射线,所以 β 射线极少用铅作屏蔽,否则要有足够的厚度,以防止韧致辐射的穿透。设计屏蔽时,要考虑材料的性质,计算屏蔽层的厚度,还应充分注意散射射线并考虑经济代价,以满足最优化的要求。

外照射防护具体措施:

在实际工作中,要灵活运用上述外照射防护的四项要素。在某些情况下,工作人员不得不在剂量率较高的条件下工作,就要减少操作时间和增加屏蔽; β 射线的穿透能力比 γ 射线要弱的多,易被机体的表层吸收,可以引起不易痊愈的灼伤,所以 β 射线的外照射防护,必须防止体表被污染,除了增加距离外,要设置屏蔽体, β 射线所需屏蔽层的厚度,应等于 β 射线在物质中的最大射程。在操作比放射性高的 β 放射性同位素时,除了要注意设置屏蔽外,还应特别注意没有加盖容器的口部,因为这时没有屏蔽的口部受到容器及其屏蔽体(铅罐等)的散射辐射影响,照射强度更大。

γ 射线在通过物质时,其强度只是逐渐减弱,而不会被物质完全吸收,实际工作中常采用减弱倍数法或半值层

法求得降至某一照射量率时所需屏蔽物质的厚度。

减弱倍数法:根据已知某放射性同位素 γ 射线的能量和要求降低的倍数 K 值,在表5-14中查出所需铅的厚度。

表5-14 不同能量的 γ 射线在不同减弱倍数 K 值时所需铅的屏蔽厚度/cm

减弱倍数	能量(MeV)											
K	0.25	0.50	1.00	1.50	1.75	2.0	2.5	3.0	4.0	6.0	8.0	10.0
5	0.26	1.10	2.74	3.84	4.19	4.38	4.54	4.58	4.42	3.94	3.56	3.28
10	0.37	1.54	3.78	5.29	5.78	6.05	6.32	6.40	6.25	5.63	5.11	4.71
20	0.48	1.97	4.80	6.70	7.32	7.68	8.06	8.19	8.04	7.31	6.67	6.16
40	0.59	2.40	5.79	8.08	8.83	9.22	9.65	9.72	9.58	8.79	7.98	7.41
80	0.69	2.82	6.77	9.43	10.3	10.7	11.1	11.2	11.0	10.1	9.15	8.48
100	0.73	2.96	7.09	9.87	10.8	11.2	11.6	11.7	11.5	10.6	9.61	8.90
500	0.98	3.93	9.33	13.0	14.2	14.9	15.8	16.2	16.1	15.1	14.0	13.1
1 000	1.08	4.34	10.3	14.3	15.6	16.4	17.4	17.8	17.9	16.8	15.6	14.6
5 000	1.33	5.30	12.5	17.3	18.9	19.9	21.1	21.7	21.8	20.6	19.3	18.2
10 000	1.44	5.71	13.4	18.6	20.3	21.4	22.7	23.3	23.5	22.3	20.9	19.7
50 000	1.68	6.66	15.6	21.5	23.6	24.8	26.3	27.1	27.3	26.1	24.7	23.4
100 000	1.79	7.07	16.5	22.8	25.0	26.3	27.9	28.7	29.0	27.7	26.3	25.0
500 000	2.03	8.01	18.7	25.7	28.2	29.7	31.5	32.5	32.8	31.6	30.0	28.6
1 000 000	2.14	8.42	19.6	27.0	29.6	31.2	33.1	34.1	34.5	33.2	31.6	30.2
10 000 000	2.49	9.77	22.6	31.2	34.1	36.0	38.2	39.4	39.9	38.6	37.0	35.6

半值层法:先查表5-15找出某放射性同位素在某一屏蔽材料中减弱一半时所需的厚度(半值层),再利用半值层数目 n 与减弱倍数 K 的关系表5-16,求出半值层数目 n ,将半值层数目与厚度相乘,其乘积就是要达到某照射量率时屏蔽物应有的厚度。使用半值层可以很方便地粗略估计射线的减弱程度,一般的放射源经7个半值层屏蔽后,其强度可减弱到1%,如经10个半值层屏蔽,则其强度可减到1‰,从表5-14至5-16可看出,5 cm厚的铅,可以相当好的屏蔽实验室常用的 γ 射线同位素。

表5-15 不同能量 γ 射线的半值层/cm

γ 射线能量/MeV	半值厚度/cm			
(MeV)	水	混凝土	铁	铅
0.2	5.0	2.0	0.7	0.15
0.5	7.6	2.7	1.1	0.40
1.0	10.4	4.3	1.6	0.90
1.5	12.0	5.0	1.8	1.20
20	14.4	5.8	2.1	1.30

表5-16 半值层数目与减弱倍数 K 的关系

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024

四、放射性污染的清除

放射性物质只能从一处移至另一处,普通方法不能完全清除它。当放射性同位素由于溅出、打翻等情况扩散到它的正常限制范围以外时便产生了污染,如果除污染不及时,就会使实验室和环境

的本底急剧增加,不仅对人员造成伤害,而且影响实验结果的准确性。采用适当手段把放射性物质从被污染的表面上清除掉的过程称为放射性污染的清除,简称除污。除污的目的是使放射性转移到安全场所,使放射性物质残留所引起随机性效应的发生几率减少到可以被接受的水平。清除污染的一般原则有:

- (1) 防止污染面扩大,在除污过程中产生的废液和废物也有放射性,应该按同样方法处理;
- (2) 清除污染要及时,清除越及时,除污的效果越好,污染面扩散的机会就少;
- (3) 选择合适的除污剂,为防止放射性物质与表面的再结合,应选用具有胶体化学性能和耦合性能,并有一定 pH 酸碱度的除污剂,除污剂的要求见表 5-17。

表 5-17 除污剂的要求

在除污染溶液作用下 发生的过程	放射性物质污染表面的情况	
	胶体颗粒污染	由于离子交换和吸附作用污染
(1) 润湿作用	减小除污溶液的表面张力	减小除污溶液的表面张力
(2) 破坏放射性物质与表面的联系	被吸于颗粒上并引起劈分作用	促使解吸作用和离子交换作用
(3) 防止放射性物质再污染表面	使具有胶体化学性能(悬浮、乳化、胶溶、增溶等)	耦合放射性离子

(4) 选择合适的除污方法,清除放射污染的方法有物理除污(如吸、擦、刷、剪、刨、削、超声、电场力等)和化学除污(使用各种除污剂)两种。要根据污染表面的特点及性状、污染源的理化性质、除污设备和其他条件来选择除污方法,实际操作中,常常是化学除污和物理除污两种方法并用;

(5) 注意放射防护,在除污过程中,要遵守操作规则,物体表面清除放射性污染后,要用辐射探测器监测放射性是否已降至安全水平(表 5-18),如果仍高于国家标准规定的表面污染控制水平,应该设法重新除污染。

表 5-18 放射性物质污染表面的导出限值

污染表面	α 放射性物质/Bq/cm ²	β 放射性物质/Bq/cm ²
手、皮肤、内衣、袜	3.7×10^{-2}	3.7×10^{-1}
工作服,手套,工作鞋	3.7×10^{-1}	3.7×10^0
设备,地面,墙壁	3.7×10^0	3.7×10^1
容器表面	3.7×10^{-1}	3.7×10^0

说明:① 能量小于 0.3 MeV 的 β 污染,限值为上表列出值的 5 倍;② 低、中、高剂量放射性核素,控制水平可放宽 10 倍;③ 放射性工作场所相邻房间内,设备与地面的污染水平不应超过上表列出值的十分之一;④ 设备与用品的污染水平不大于上表列出值的五分之一时,经测量许可后,可在一般工作中使用。

清除污染的具体方法:

(1) 人体 人体受到放射性污染的常见部位是手和面部及其他部位的皮肤,如果污染的放射性强度不高,用水冲洗就可以了,温水可提高去污效果,另外普通肥皂是手和皮肤最好的去污剂。除污时,必须先保护好未被污染的皮肤,用棉球浸蘸温和的肥皂水轻拭污染区,由外向里反复擦洗,然后用温清水冲洗,如果未达安全水平,可用 10% EDTA 溶液或 5%~6.5% 高锰酸钾溶液清洗。

放射性碘和磷是两种常用的同位素,污染皮肤的机会也较多,被碘污染时,用 5% 高锰酸钾溶液擦拭,随后用 5% 硫代硫酸钠(或 5% 亚硫酸氢钠)溶液擦拭,再用 10% 碘化钾或 5% 元素碘溶液作为载体帮助去污,最后用大量清水冲洗。放射性磷污染时,先用 10% 磷酸氢钠溶液擦拭,再用 5% 柠檬酸钠和大量清水洗涤,被磷污染时忌用肥皂。不易清洗的某些部位的皮肤,可采用膏剂和粉剂除污,头发污染时最好剪掉。除污后,应在皮肤上涂羊毛脂或其他油脂,预防皮肤龟裂。

总之,放射性物质在体表停留时间越长,被吸收也越多,且由于解剖生理上的差异,吸收能力各不相同。皮肤粘膜组织,只能采用适合于机体的处理方法,不能耐受强酸、强碱或机械性的剧烈处理,否则会导致不良的后果。体表污染不仅导致外照射,而且由于体表可吸收放射性物质进入体内,会造成较为复杂的内照射。

(2) 衣物 被污染的工作服或其他衣物应及时换掉,通过探测仪器了解污染的严重程度。如果是高活性小面积污染或属于长半衰期的放射性同位素污染,一般可以将它剪去作为废物处理。如果是短半衰期的污染,则存放10个半衰期后再洗涤。

手套是最易被污染的用品,在一般性污染时,脱下手套之前,用肥皂清洗和大量水冲洗,并监测其放射性水平,如果还不合乎要求,可再用1%柠檬酸溶液和水冲洗,严重污染时,如果是短半衰期的放射性同位素,可贮存待其自行衰变,如果是长半衰期的,且难除污,就作废物处理。

塑料拖鞋和塑料袖套的除污与手套相似,拖鞋的缝道应该用毛刷仔细洗刷,手套、拖鞋等衣物在超声波清洗机中超声除污是不可取的。

(3) 设备和器械 实验室内操作放射性物质用的设备(诸如器皿、器械和仪器等)要和操作非放射性物质的设备区分开来,其中烧杯、移液管、枪头及搪瓷杯盘的内壁污染更是必然的结果。对这些器皿的去污,应先用同型稳定性化合物溶液糊,然后用肥皂液或洗涤剂刷,再用大量清水冲洗,或者在3%盐酸-10%柠檬酸的溶液里浸泡1h以上,用清水漂洗,干燥后再放入洗液(重铬酸钾在硫酸中的饱和溶液)中浸泡15 min,也可取得较好的除污效果。

金属物品可用柠檬酸-EDTA混合物或氯化胺和稀酸溶液擦拭清洗,对短半衰期同位素严重污染的物品,采取放置法,长半衰期同位素严重污染的物品,就将它们按废物处理。

(4) 工作面和房间 工作面、地面和走廊的污染来源于放射性物质有限的溅泼、空气中气溶胶的沉降、鞋子的传播及由体内示踪实验动物的粪尿、呕吐物等引起。除污染时,应视材料的表面性质、放射性同位素的理化性质和污染的严重程度等因素选择工作面的除污方法。一般是先用锯末、吸水纸等将污染溶液吸掉,再用适当的除污剂浸湿了的布或刷子洗刷污染表面,特别注意切勿使污染范围扩大。对于涂漆面的污染,可采用五步连续除污法:①水冲洗 ②刷子擦拭 ③加热的表面活性剂处理 ④2% EDTA 溶液处理 ⑤ 使用同型稳定性同位素的水溶液作载体清洗。如果污染严重不易去除时,可将油漆层铲除。多孔工作面或墙壁,因为其吸附作用较强,应挖去污染部分。对于纯 β 射线的污染,如果除污效果不好时,可在污染面上覆盖适当厚度的玻璃、有机玻璃或塑料板。

五、合理处理放射性同位素三废

放射性的废水(液)、废气和固体废物统称放射性的三废。其特点是,无论采取任何剧烈的化学和物理方法处理,都不能改变其辐射的性能。任何操作放射性同位素的工作都不可避免地产生三废。如果三废处理不当,会散播出去,污染空气,污染饮用水等周围环境,造成人员的内外照射,危害人身安全。为了降低处理三废的难度,在实际工作中所产生的废物应该按照半衰期的长短分类收集,任何放射性同位素自然存放10个半衰期,其放射性强度都会降低到原有放射性的千分之一,半衰期按长短分类如(表5-19)。

表 5-19 放射性同位素半衰期的分类

类别	分类依据	举例
短半衰期	<15 天	^{32}P , ^{131}I
中等半衰期	15 天 < T < 100 天	^{125}I , ^{35}S , ^{51}Cr
长半衰期	>100 天	^3H , ^{14}C

1. 放射性废气的处理 在放射性同位素示踪实验中,放射性气体废物不多,主要是在固体废物焚烧时产生放射性废气和微尘。工作中产生的少量放射性废气通过设计合理的通风橱被抽入大气中,通过大气的稀释,排入高空就可以了,实验室经常保持良好的通风,空气流向应该从非活性区

→低活性区→高活性区,空气出口和通风橱排气口应安装除尘器和吸附剂。放射性同位素允许浓度见表 5-20。

表 5-20 常用放射性同位素在露天水源和放射性工作场所空气中的最大允许浓度

放射性同位素		最大允许浓度/ 3.7×10^{10} Bq	
名称	符号	水中	空气中
氚	^3H	5×10^{-6}	1×10^{-7}
碳	^{14}C	1×10^{-7}	1×10^{-9}
磷	^{32}P	1×10^{-8}	1×10^{-10}
硫	^{35}S	5×10^{-6}	1×10^{-10}
铬	^{51}Cr	1×10^{-6}	5×10^{-9}
碘	^{131}I	5×10^{-10}	5×10^{-12}

2. 放射性废液的处理

(1) 放置法 对于少量短半衰期的放射性同位素废液,将它们装入适当的容器内,加以密封,注明放射性同位素的名称、类别及存放日期,放入有防护设施的专门贮存室中,放置 10 个半衰期的时间后,经监测符合排放标准时,可排入下水道或按一般废物处理。

(2) 稀释法 对少量的残余示踪剂溶液作放置处理后,或者是清洗污染器皿的废水,在排入到下水系统之前和排放过程中,要用大量的水或加大量的同型稳定性同位素溶液稀释,使生物减少对放射性同位素的吸收。尤其是放射性磷废液的排放,必须采用稳定同位素磷(磷酸盐类)去稀释,因为某些生物(如:鱼)对磷的积聚性较强。用稳定同位素磷稀释,可以使放射性磷的比活度减低到生物积累性不能表现的程度,间接保护了人类。ICRP 规定每 3.7×10^7 Bq 的 ^{32}P ,须用 10 g 磷酸盐稀释为 3.7×10^3 Bq/L 的浓度才可排放到下水道系统,且每周的总排放量不得超过 7.4×10^9 Bq,碘液的排放与磷相似,每 3.7×10^7 Bq 放射性碘,应用 1 g 碘化钾稀释为 1.85×10^4 Bq/L 的浓度,每周的总排放量不得超过 7.4×10^9 Bq。

(3) 浓缩法 对于长半衰期的放射性废液,可以采用化学沉淀、离子交换、蒸发或生物处理等方法进行浓缩,缩小废液体积后再作进一步的固化处理。蒸发浓缩要在通风良好的通风橱内进行,当废液中含有氧化剂和还原剂时,蒸发温度勿超过 125°C ,防止废液爆炸。

应用离子交换剂对废液中放射性离子进行交换,是处理废液的有效办法,但是离子交换柱的再生又会形成新的放射性废液,所以可选用廉价的离子交换剂(如蛭石、硅酸钠凝胶等),在失效后不必再生,可作为固体放射性废物处理。在废液中加入一定 pH 的凝聚剂(如硫酸铝、硫酸亚铁、氢氧化钙等)所形成的絮状体与放射性物质共沉淀,上层清液中的放射性大部分已除去,经过滤,可稀释排入下水道或经离子交换进一步处理,沉淀部分按固体废物处理。有些水生植物和水面浮游生物能将一些放射性同位素积聚到自己体内,把这些生物养在放射性废液中,利用其积聚作用可以有效地降低废液中的放射性浓度。

3. 放射性固体废物的处理

(1) 放置法 其适用范围与放射性废液放置法相同,是处理短半衰期放射性废物较好的办法。如果放置后固体废物的放射性已降低到 3.7×10^4 Bq/kg 以下,就可以作为普通垃圾处理了。

(2) 焚化法 不适于放置法处理的可燃性废物放入专用焚化炉中灰化,以缩小废物体积,焚化所产生的放射性气体经过滤后排入大气稀释,焚化灰渣用固化法处理后深埋。

(3) 固化埋藏法 它是固体放射性废物的最终处理办法,目的是使有害的放射性废物与生物圈尽量隔离,以免造成危害,对体积小的长半衰期放射性废物可与水泥、沥青、玻璃或塑料等混合,

使其固化成为坚硬的团块后深埋到专门的放射性废物场所。这个埋藏的地点必须经公安机关、卫生部门等有关部门批准,并树立永久性标记,使之不能危害人类及其后代。

(第四军医大学 陈萍)

参 考 文 献

- 1 Evans E A, Muramatsu M. Radiotracer Techniques and Applications. Marcel Dekker Inc. 1977
- 2 王玉凯,李学成. 医用放射法规教程. 北京:人民卫生出版社,1992
- 3 P J 奥塞夫. 核辐射探测器入门. 北京:科学出版社,1980
- 4 中科院原子能所. 放射性同位素应用知识. 北京:科学出版社,1958
- 5 朱寿彭,张澜生. 医用同位素示踪技术. 北京:原子能出版社,1989

第六章

发光分析技术

第一章介绍的分光光度技术,是利用物质分子对光选择性吸收的特性而建立的分析技术,又称为分子吸收光谱法。而利用物质分子被激发后具有激发发光特性建立的分析技术,则称为分子发光分析技术。

分子发光可按激发模式的不同进行分类:如果分子因吸收外来辐射光子的能量而被激发,所产生的次级光发射现象称为光致发光,光致发光根据余辉时间的长短又分为磷光和荧光两类;如果分子被激发的能量是由化学反应释放的能量所提供,其发光现象称为化学发光;由生物体内化学反应所引起的发光现象,被称为生物发光;由热活化的离子所引起的发光现象,称为热致发光。由于从分子荧光和化学发光中可解析出被激发分子的大量信息,所以常常利用它们来分析多种样品。

第一节 分子荧光分析技术

有些物质分子吸收了较短波长的光(如紫外光)后,能够被激发,在极短的时间内(延迟几纳秒)发射出较照射波长为长的光,这种光被称为荧光。利用物质分子的荧光特性来进行定性和定量分析,研究其分子的大小形状、结构和运动状态的方法就是分子荧光分析法(molecular fluorescent method)。

由于分子荧光分析具有灵敏度高(可比分子吸收光谱法高2~3个数量级)、线性范围宽达3~4个数量级、选择性强、需要样品量少、方法简便快捷,可提供激发光谱、发射光谱、荧光强度、荧光效率、荧光寿命、荧光偏振等丰富的分析参数,所以荧光分析从建立起就引起人们的重视,并很快在医药卫生和科学研究各个领域的分析研究中推广使用。

荧光分析的主要缺点是应用范围还不够广泛,还有许多物质自己不能产生荧光,也不易和荧光染料结合。另外荧光测定时的实验条件要求严格,干扰因素较多:如光分解、氧淬灭、易污染等,使应用受到一定的限制。

一、荧光的产生

每个分子都具有一系列严格的能级,处于基态的分子吸收了可见紫外区中特征频率波长的光能后,可从基态分子跃迁到激发态。这些激发态分子因振动、相互碰撞等因素把部分能量转移给周围分子,以无辐射跃迁下降到第一激发态的最低振动能级,这一振动能级的分子在返回基态时,分

子将以光的形式释放出它们所吸收的能量,所发出的光称为“荧光”。由于产生荧光时所发出的能量比从激发光吸收的能量略小些,因此,荧光的波长比激发光的波长稍为长些(Stokes 法则)。当激发态的分子转入亚稳的三重线态,停留一段时间再返回基态,这时发出的光称为磷光(图 6-1)。

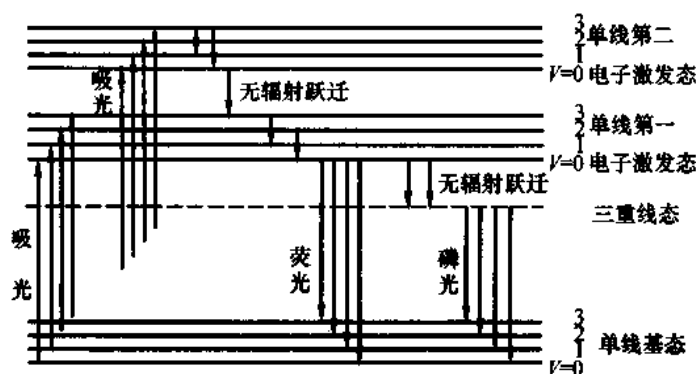


图 6-1 吸收光谱和荧光光谱能级跃迁示意图

二、荧光检测的类型

荧光检测的方式可分为直接荧光检测、间接荧光检测和荧光淬灭检测三大类。

（一）直接荧光检测

有些样品自身可以产生荧光,可以直接进行荧光检测,像少数氨基酸如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和部分蛋白质、核黄素、水杨酸钠等自己可以发出荧光,这就是直接荧光测定方式。在对成分复杂的生物样品进行直接荧光检测前,往往需要利用萃取、沉淀、过滤、色谱等方法对样品加以纯化,以去除或减少杂质的干扰,降低荧光本底,提高检测灵敏度。

（二）间接荧光检测

有些物质本身荧光很弱,或不发荧光,需要使其转化成荧光物质再进行检测,就是间接荧光检测。

1. 化学反应引导的荧光检测 利用化学反应可使一些自身荧光很弱或不能产生荧光的化合物转变成荧光化合物。例如测定血浆或脑组织中的吗啡时,利用氧化还原反应,将含吗啡的提取液 pH 调节至 8.5,加 $K_3Fe(CN)_6$ 使吗啡氧化为二聚物伪吗啡,可产生很强的荧光(350/440 nm),在 $0.1 \sim 8 \mu g/ml$ 血浆浓度范围内成线性。根据测定物的不同化学特性,可利用水解反应、缩合反应、络合反应、光化学反应、 H_2SO_4 引导荧光等不同化学反应,把它转变成相应的荧光化合物。

2. 制备荧光衍生物检测

(1) 与荧光试剂反应生成荧光衍生物 常用的荧光试剂有荧光胺(fluorescamine,又名荧胺),用于含伯胺、仲胺或潜在氨基的样品的测定;丹酰氯(DANS-Cl),常用于含胺基、酚羟基样品的测定;邻苯二甲醛(O-phthaldehyde),常用于伯胺类及 α -氨基酸类化合物的荧光分析;氯化硝基苯脒二氮茂(NBD-Cl),本身无荧光,通过与蛋白质上的支链基团(通常是-SH基)反应生成荧光物质。核酸常用的荧光试剂有溴化乙锭、吖黄素及光神霉素等。

(2) 与荧光染料反应生成荧光离子对 有机碱类样品与水溶性酸性荧光染料络合形成中性离

子对,然后用有机溶剂提取后进行荧光测定。例如利用氯丙酮与四溴荧光素形成离子对,进行氯丙酮含量的测定。

(三) 荧光淬灭检测

荧光淬灭(或称荧光熄灭)指的是荧光物质分子于其他物质分子之间发生的导致荧光强度下降的物理或化学作用过程,这种物质被称为荧光淬灭剂。荧光淬灭作用在荧光分析中降低荧光强度,对荧光分析不利,但是可以被用来建立针对该淬灭剂的荧光测定法,这就是荧光淬灭检测。例如芳伯胺类样品经重氮化后与 Bratton - Marshall 试剂[N - (1 - 萘基) - 乙二胺]偶合,偶合产物可淬灭 Bratton - Marshall 试剂的荧光,与试剂空白对照,荧光强度的减少与样品含量成正比。一般来说,荧光淬灭检测比直接荧光检测更为灵敏,并具有更高的选择性。

三、荧光分析的基本参数

荧光分析能提供比吸收光谱分析更多的参数,这些参数从不同角度反映了分子的特性。通过对这些参数的分析,不但可以进行一般的定性和定量分析,而且还可以推断分子在各种环境中的构象变化,从而了解大分子的结构与功能的关系。下面介绍几种最常用的基本参数。

(一) 荧光激发光谱和发射光谱,荧光激发波长与发射波长的选择

1. 荧光激发光谱和发射光谱 是荧光分析法进行定性和定量分析的最基本的参数。

荧光激发光谱(Excitation spectrum 简称激发光谱)就是测量荧光样品的总荧光量随激发波长变化而获得的光谱,它反映不同波长的激发光产生荧光的相对效率。把样品放入光路后,选择发射波长为一特定波长或为 0 nm(即不对发射光进行分光),然后用激发光单色器扫描,就可得到样品的激发光谱。激发光谱的形状与测量时选择的荧光波长无关,但其相对强度与所选择的荧光发射波长有关。发射波长固定在 0 nm 或它的峰位时,所得的激发光谱的荧光强度最大。激发光谱可用于荧光样品的定性鉴别,也用于荧光测定时选择最佳的激发波长。激发光谱的形状和吸收光谱的形状极为相似,这是因为物质分子吸收能量的过程就是它的激发过程。

荧光发射光谱(fluorescence spectrum 常称为荧光光谱或发射光谱)是分子吸收辐射后在不同波长上再发射的结果。把样品放入荧光分光光度计后,选择合适的波长和强度的激发光固定不变,然后扫描荧光发射波长,即可得到荧光光谱。一般来说,荧光光谱的形状与激发波长的选择无关(个别化合物例外)。但当激发波长远离激发峰时,荧光强度就较小。荧光光谱表示发射的荧光中各种波长的相对强度,荧光光谱可用于荧光样品的定性鉴别,也可作为于荧光测定时选择适当的发射波长和滤光片的依据。硫酸奎宁在稀硫酸溶液中的吸收发射光谱见图 6-2。

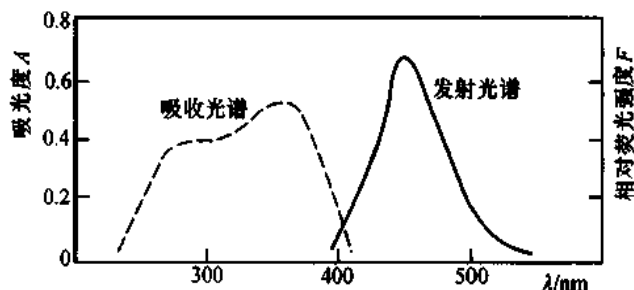


图 6-2 硫酸奎宁在稀硫酸溶液中的吸收光谱和发射光谱

2. 荧光激发波长与发射波长的选择 一般选择激发光谱中的最高峰的波长为激发波长(λ_{ex}), 荧光光谱中的最高峰的波长为发射波长(λ_{em})。 λ_{ex} 与 λ_{em} 之间的距离至少相差 20~30 nm, 最好为 50 nm 左右。若激发光谱中有几个强度适宜的峰, 则应选择较长波长作为 λ_{ex} , 以减小样品可能产生的光分解现象。另外 λ_{ex} 的选择应尽量使它产生的拉曼(Raman)散射光波长与 λ_{em} 相距较远。

(二) 荧光效率、荧光强度与总荧光量

当激发光照射在荧光物质上时, 吸收光的一部分转换成荧光。吸收光的光子数与发射光的光子数之比称为荧光效率(又称量子效率), 通常用 Φ 来表示。

$$\Phi = \frac{\text{发射荧光的光子数}}{\text{吸收激发光的光子数}} \quad (6-1)$$

任何物质的荧光效率不可能大于 1, 而是在 0~1 这个范围。例如罗丹明 B、蒽及萘在乙醇中的 Φ 分别为 0.97、0.3 和 0.12。在稀溶液条件下, 荧光效率 Φ 不随激发波长和溶液的浓度而改变。

荧光强度通常用 F 表示, 表示荧光的相对强弱。物质所发出的荧光强度与物质所吸收的光量成正比, 与物质本身的荧光效率也成正比, 当然与仪器条件也是有关的。可用下列公式表示:

$$F = K\Phi I_0 \epsilon CL \quad (6-2)$$

式中: F : 荧光强度 K : 仪器常数 Φ : 样品的荧光效率 I_0 : 激发光强度 ϵ : 是物质的摩尔吸光系数 C : 物质浓度 L : 样品池的光径

请注意: 只有在测量稀溶液的荧光强度时公式(6-2)才适用。

由公式(6-2)可以得出下面几个结论:

(1) 荧光强度 F 与荧光样品的浓度 C 成正比。这是利用荧光测定进行定量分析的依据。在适宜的条件和范围内, 标准曲线将是一条直线。

(2) 荧光强度 F 与摩尔吸光系数 ϵ 成正比。因此激发光谱将是吸收光谱的复制品, 而且用最大吸收的激发波长激发将得到最高的荧光强度。

(3) 荧光强度 F 与激发光的强度 I_0 成正比。因此荧光分光光度计可比分光光度计具有更高的灵敏度。采用发光能力较强的氙弧灯作为激发光源, 用能探测微弱光能的光电倍增管测量荧光可提高荧光分光光度计的灵敏度。

(4) 测得的荧光强度是与仪器及条件有关的。同一物质用不同的仪器, 或使用相同的仪器, 但测定条件不一样, 得到的荧光值常常是不同的。

用物质的发射光谱的面积来表示荧光的总量称为“总荧光量”。滤片荧光计测得的读数即为样品的总荧光量, 使用荧光分光光度计时, 把发射波长放在 0 nm 或用发射光谱的面积积分可得到总荧光量。使用总荧光量来对物质定量可以提高检测灵敏度。

(三) 荧光偏振

只沿一个固定方向振动的光叫做偏振光, 若用一种偏振的单色光激发荧光样品, 发射的荧光称为偏振荧光, 利用荧光偏振可分析样品的偏振特性。

如果在激发单色器后面和发射单色器后面各放一个偏振片, 就能测出样品退偏振和旋转电矢量的能力。偏振程度决定于物质的分子结构及它所处的环境。荧光偏振可以用如下公式来计算:

$$P = \frac{F_{//} - F_{\perp}}{F_{//} + F_{\perp}} \quad (6-3)$$

这里 P 表示荧光的偏振程度或称退偏度, $F_{//}$ 是起偏器和检偏器的矢量方向互相平行时测出的荧光强度, F_{\perp} 是起偏器和检偏器的矢量方向互相垂直时测出的荧光强度。当 $F_{//} = F_{\perp}$ 时, $P = 0$, 样品分子对光源不产生偏振。当 $F_{//} \rightarrow 0$ 或 $F_{\perp} \rightarrow 0$ 时, $P \rightarrow \pm 1$, 样品分子对光源产生完全偏振。当 $1 > P > -1$ 且 $P \neq 0$ 时, 在样品分子对光源产生部分偏振。许多因素可使荧光偏振消偏, 测定荧光偏振可提供样品在激发态时分子的大小、形状及运动速度等许多信息。

(四) 荧光寿命

当除去激发光源后, 分子的荧光强度降低到最大荧光强度的 $1/e$ 所需的时间称为荧光寿命。荧光寿命都非常短, 仅为 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ s 左右, 它需要使用一种特殊的仪器: 纳秒荧光计来测定。

在分子生物学研究中, 荧光寿命是一个重要参数, 因为它可给出分子结构、大分子的溶液构象、反应速率、蛋白质的弛豫作用、蛋白质结构的纳秒涨落等许多重要信息。时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是现代免疫学中的一项重要技术, 广泛应用于蛋白质、激素、药物、肿瘤标志物、病毒抗原以及 DNA 的测定。

四、环境因素对荧光分析的影响

溶液中的环境对于分子荧光的产生具有强烈的影响, 在进行荧光分析时要特别注意下面几个问题:

1. 溶剂的影响 溶剂对样品荧光特性的影响非常强烈, 同一荧光样品在不同的溶剂中荧光光谱的位置和强度都可能具有显著的差异。例如 2-苯氨基萘溶于环己烷时荧光峰在 372 nm, 溶于乙醇时荧光峰改变到 430 nm。所以进行荧光测定时, 绝对不能随意改变溶剂。

2. 溶液的 pH 对于荧光强度的影响 即使在同一种溶液中, 溶液 pH 的改变对样品的荧光特性也有很大影响。例如苯酚在 pH1 的酸性溶液中荧光强度最强, 而在 pH13 的碱性溶液中不发生荧光; 荧光素在 pH 7 的中性水溶液中的荧光效率为 0.65, 而在 pH 13 的碱性水溶液中上升到 0.92。所以进行荧光测定时, 严格控制溶液的 pH 是非常重要的。

3. 温度对荧光强度的影响 温度对于溶液样品的荧光强度有着显著的影响。一般随着温度的升高, 荧光效率和荧光强度将会降低。有的样品, 温度每上升 1°C , 荧光强度可减少 1%~2%。所以我们在做某些样品的荧光测量时, 需要安装恒温附件以进行恒温测量, 减少温度变化对荧光测量的影响。

4. 光分解的影响 当用强光进行荧光测量时, 可能会引起某些荧光化合物发生光化学反应而受到破坏。这时随着光照时间的延长, 样品的荧光读数越来越低, 甚至荧光峰也产生位移。所以设计仪器时, 常采用高灵敏的检测器而不是用强光源来达到高灵敏度的目的。为克服光分解作用的影响, 可注意降低激发光能和缩短光照时间: 在测量时要设置较窄的激发光狭缝, 较宽的荧光狭缝; 使样品尽量减少光照, 在测定前要随时关闭荧光计的激发光光门, 正式测量时再打开, 并尽可能缩短测定时间。

5. 样品浓度对测量的影响 只有在稀浓度条件下, 荧光强度才与样品浓度成正比。过高浓度的样品使得许多激发光在样品池入口附近就被吸收掉, 而不能抵达样品池的中心部位。这样仅在激发光入口附近有较强的发射荧光, 但这部分荧光不能进入荧光检测器。而且荧光光谱的短波长

端和激发光谱的长波长端若相互重叠,这一重叠部分发生荧光再吸收。在浓度更大时,甚至会产生荧光物质基态分子的多聚体,导致荧光强度更严重地下降。所以,一旦发现样品浓度过高,有导致测量误差的可能时,必须适当稀释试样。

6. 样品池玷污的影响 样品池的一点点污垢也可能给测量结果带来意想不到的影响,因此要注意使用后的及时清洗。

五、荧光定量测定的方法

1. 直接比较法 最简单的荧光定量分析法是直接比较法,即取已知量的荧光物质配成一标准溶液,通过扫描标准样品的激发光谱可选择到最佳的激发波长,扫描发射光谱可选择出发射波长,在这个条件下测定标准的荧光强度,然后在同样条件下测定样品溶液的荧光强度。由这两个荧光强度的比值求得样品中荧光物质的含量。

$$\text{样品浓度} = \frac{\text{样品的荧光值}}{\text{标准的荧光值}} \times \text{标准浓度} \quad (6-4)$$

因为荧光强度和溶液浓度很难在较宽的范围内呈线性关系,所以这种方法只能用于样品和标准的浓度比较接近的情况。

2. 工作曲线法 荧光定量分析一般采用工作曲线法,即以一组已知量的标准物质经过和样品同样的处理后,配制一组标准溶液系列。分别测定这组标准溶液和试剂空白的荧光强度,绘制出减去试剂空白的荧光强度对标准浓度的工作曲线。然后测定样品溶液的荧光强度,减去试剂空白后,在工作曲线中查出样品的浓度。

六、荧光分析仪器的基本结构

荧光仪器的基本结构如图 6-3 所示,主要是由激发光源、激发单色器、发射单色器、样品室、检测系统以及放大显示系统组成。

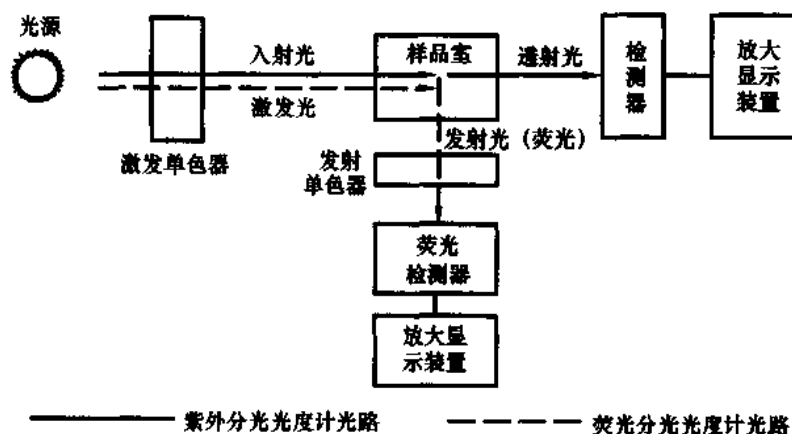


图 6-3 紫外分光光度计和荧光分光光度计典型结构的比较

从图中可见:荧光分光光度计和紫外分光光度计的结构是非常相似的,主要有两点不同:一是

荧光仪器是从入射光的直角方向检测样品的发光信号,而紫外分光光度计是从入射光的方向检测样品的吸收信号。因此,前者是从黑背景下检测发光信号,而后者则是从亮背景下检测光强度改变的情况,所以荧光分析的灵敏度常比吸收分析大2~3个数量级。二是紫外分光光度计在检测器前面的是样品,而荧光分光光度计在这二者之间增加了一个发射单色器,以除去样品发射光以外的辐射,从而为分析的专一性提供有利条件。

1. 激发光源 可供荧光激发用的光源很多。常用的有钨灯、钨卤素灯、氢灯、氘灯、汞灯、氙灯和激光等。对激发光源,主要应考虑它的稳定性和强度。因为光源的稳定性,直接影响测量的重复性和精确度;而光源的强度又直接影响测定的灵敏度。虽然从理论上说,尽可能地增强激发光源可以增大荧光发射的强度,可是在实践中却不愿使用太强的光源。主要因为:

- (1) 强光源照射,容易使一些样品产生光分解等光化学反应。
- (2) 强光源照射,会导致样品加热升温,而温度的不稳定会影响荧光的测定。
- (3) 过强的激发光会导致散射光增多,干扰荧光的测定。

滤片荧光计常用碘钨灯、汞灯作激发光源,荧光分光光度计则常用氙灯作光源,因为高压氙灯能在紫外和可见区给出比较好的连续光谱。但氙灯对电源的稳定性要求较高,才能保证光源的稳定性。

2. 单色器 荧光光度计中通常设置有两套单色器:激发单色器和发射单色器。在滤片式荧光计中,通常使用滤光片作为单色器,常用的滤光片又分玻璃滤光片、胶膜滤光片、干涉滤光片三类。在荧光分光光度计中,常用光栅单色器,它是在一个抛光的玻璃表面上镀铝,然后在铝表面刻上大量的平行线(如2400线/mm)制成的。它分光的谱线分布均匀,有相同的分辨率,而且灵敏度比棱镜高。狭缝是单色器的重要组成部分之一,它的宽窄通常可调,它关系到单色光的强度和频带宽度,狭缝越窄,单色性越好,但光强度也随之减小。

3. 样品室 样品室用以放置荧光池和附件。荧光测量用的荧光池也分玻璃和石英二种,一般用低荧光材料制成。有标准荧光池、微量荧光池和流动池等不同规格。对于溶液样品荧光分析,激发光源、样品池、检测器通常是排成直角。

4. 检测器 与分光光度计一样,检测器主要有硒光电池、光敏二极管、光电管和光电倍增管等。荧光仪器的灵敏度,主要取决于检测器的灵敏度。各类检测器的详细内容第一章中已作介绍。

七、几种不同类型的荧光分析测定装置

荧光分析测定装置从最简单的紫外分析灯到各种常用的荧光分光光度计,以至利用激光作激发光源的流式细胞仪,虽然原理大体相同,但为了不同参数的测定,设计上各有特点,下面简单予以介绍:

1. 荧光分析灯(紫外分析灯) 在各种荧光测定装置中,它的结构最简单,包括一个汞灯和一块滤光片。可分为短波紫外灯(254 nm)和长波紫外灯(365 nm)两种。实际上它是一种用紫外光源作激发,滤光片作激发单色器,眼睛作发射单色器和检测器的荧光光度计。由于它结构简单,使用方便,已成为实验室的标准装备之一。如用手提紫外分析灯观察琼脂糖电泳中DNA分离情况,检查薄层色谱上的荧光斑点和凝胶色谱柱上的荧光带。还可以用它来快速测定黄曲霉素B1的含量。

2. 荧光光度计(滤光片式荧光计) 荧光光度计通常用钨卤素灯或汞灯作激发光源,光电池、

光敏二极管或光电管作检测器,而第一、第二单色器用滤光片来实现。第一滤光片即激发滤光片,仅让所需要的激发光能够通过,由于滤光片靠近光源,不能使用胶膜滤光片,以免受热变质。第二滤光片即发射滤光片,可采用截止滤光片,以截去所有的散射光,即只让样品所发射的荧光通过。

荧光光度计具有结构简单、价廉和灵敏度高的特点,可做微克、毫微克水平的定量工作。如国产 930 荧光光度计,它的荧光检测范围为 330~750 nm,有 12 块滤光片,最低检测限为 10^{-8} g/ml 硫酸奎宁(溶于 0.1 mol/L 硫酸)。

3. 荧光分光光度计 不同物质具有不同的吸收特性和荧光特性,为了弄清它们的性质甚至结构,或在建立荧光分析方法时,寻找适当的激发波长和发射波长,就需要扫描激发光谱和发射光谱,或需要更高的检测灵敏度,这就需要用荧光分光光度计来完成。荧光分光光度计一般都采用微电脑控制、氙灯作光源、光栅作单色器,光电倍增管作检测器,最低检测限可达到 10^{-12} g/ml 硫酸奎宁(溶于 0.1 mol/L 硫酸)。日本岛津公司的 RF-502~540 系列;日立公司的 650、850、MPF-4、F-3000/F-4000、F-4500;美国 Perkin-Elmer 公司的 LS 系列和 MPF-44~66 系列,都是常见的用荧光分光光度计。紫外分光光度计配上荧光附件以后,也可当作荧光分光光度计来使用,如岛津 MPS-5000 紫外分光光度计配上 Model III 荧光附件,日立公司 UV-VIS 紫外分光光度计装上荧光附件后,略加调整就可作为荧光分光光度计使用。

4. 荧光检测器 由于荧光分析有很高的灵敏度,已经成为许多色谱仪器不可缺少的部分。高效液相色谱、氨基酸分析仪常常采用荧光检测器来测定经色谱分离后具有荧光的各个组分,以得到更高的选择性和灵敏度。美国 WATERS 公司、Perkin-Elmer 公司、日本岛津公司等许多公司的 HPLC 都配置有荧光检测器。荧光检测器一般采用汞灯作激发光源,光电管或光电倍增管作检测器,滤光片作单色器。荧光分光光度计一般也都配置有流动池,可作为高压液相色谱的检测器使用。

5. 纳秒荧光计 荧光寿命是荧光测定中的重要参数,它可在分子相互作用的动力学方面能给出许多重要的信息。荧光物质的荧光寿命在纳秒数量级,不能用一般的荧光分光光度计测得,必须使用专门的测量装置:纳秒荧光计。

纳秒荧光测量技术主要分为脉冲法和相位调制法两种。脉冲法是用一个脉冲宽度很窄的光脉冲激发样品,随后测定其荧光的衰减时间。激发脉冲是靠一个以一定频率的纳秒闪光灯或激光器提供,其闪光频率通常为几十千赫兹,样品被闪光灯的一个脉冲激发,然后可利用多种方法来检测荧光衰变的时间。相位法也称为相移法,其动力学信息一般是通过测定激发光波形和相应的荧光响应之间的相移而获得。相位荧光计具有连续可调的频率,通过各个不同频率上得到的相移数据的傅里叶变换就能得到荧光强度衰减的时间信息。

目前荧光寿命的测定主要是利用脉冲纳秒荧光计来进行的,它可以得到一个完整的时间衰减曲线。相位法的特点是仪器比较简单,有较高的亚纳秒灵敏度和精确度,可测出 0.1 ns 的差别。

6. 荧光显微镜 荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本工具。它是由超高压汞灯作光源、滤光片作单色器和显微光学系统等主要部件组成。利用一定波长的光激发标本发射荧光,通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图象,用照相机拍下影像。有的还可用摄像机把影像送给监视器。

7. 流式细胞仪 流式细胞仪又称流动式细胞光度计(FCM)或荧光激活细胞分类计(FACS)。它是一种快速细胞分类和定量分析的新技术。1 s 可测定数千个细胞的多种参数,如 DNA、RNA

及蛋白质含量、细胞体积和核质比等。同时还可按照不同参数对细胞进行分类,把不同类型的细胞分别收集,以供进一步的分析研究。通过对细胞群体进行快速定量分析,识别正常细胞与癌细胞,为肿瘤的早期诊断提供手段。还可用它测定细胞表面抗体、研究细胞周期动力学、细胞核的代谢作用、酶的活性、细胞膜抗原(及其受体部位)、进行染色体分析及血细胞的分类和自动计数等。流式细胞仪的最大特色是不必破碎细胞,而是在细胞整体上进行分子水平的工作。它在细胞生物学、细胞遗传学、免疫学及血液学等研究中是一个十分有用的工具。

细胞的光散射强度反映了细胞的许多结构方面的信息;选用适当的荧光染料与细胞内部的某种成分相结合,检测细胞的荧光信号则可测定出细胞内某种成分的含量;流式细胞仪还可以测定细胞的荧光偏振信号,以此提供细胞的许多结构方面的信息。

流式细胞仪使用激光和弧光灯作为光源,滤光片为单色器,显微物镜收集光线、光电倍增管作检测器。把用荧光或吸收染料染色的细胞制成悬浮液,从流动室喷嘴喷出,形成单个排列的细胞液流,其流动速率约为 $1\,000 \sim 10\,000$ 个/s。细胞依次通过激光的照射产生荧光。荧光强度与细胞内各种组分如 DNA、RNA 和蛋白质等的含量成正比,用显微物镜收集荧光,测定荧光强度即可知道细胞内各种组分的含量。

通过光电检测器测量每个细胞的体积、荧光、光散射和光吸收,这些检测器信号通过处理,用电子计算机显示成细胞的频率分布图。根据检测器测定的各种细胞参数判定细胞的种类和特性,把要分离的细胞分别收集于不同的容器。通过对检测结果进行分析,可深入地研究细胞周期的调控机理

由于使用激光做激发光源,而激光是偏振光,故荧光分子也发射偏振光。但是如果这些分子有明显的转动,则在产生荧光发射之前,它们的方向将随机化,其发射光偏振度将减小。旋转退偏振度取决于荧光分子的大小和形状、荧光寿命以及周围介质的性质(温度、粘度和 pH 值等),因此可以用荧光发射退偏振度来测定重要的生物特性:粘度或流动性。这在生物膜研究中是很重要的,流动性的变化反映了膜的功能。荧光偏振测定也被用于染色体研究中。随着流式细胞仪的广泛应用及周期素(cyclin)的发现,使得对细胞增殖的研究逐步深入,也积极地推动了相关领域的基础研究和临床应用的发展。流式细胞仪是一种用途很广、功能很强的荧光分析仪器。

第二节 化学发光分析

化学发光(Chemiluminescence, CL)是由化学反应释放出来的能量激发了体系中某种物质的分子而产生的次级光发射。当化学发光产生在生命体系中时,就被称为生物发光(Bioluminescence, BL)。化学发光分析法的突出优点是灵敏度高,灵敏度可高达 $10^{-18} \sim 10^{-20}$ mol/L,与酶法反应相结合检测限可达 120 个分子、不需要外来光源,避免了瑞利散射和拉曼散射等噪音干扰,因而比荧光法具有更高的信噪比、线性范围宽,可达六个数量级,而且所需仪器设备简单,分析简便快速。所以化学发光分析作为一种有效的痕量分析方法,在生命科学领域具有广泛的应用前景。

一、化学发光的一般机制

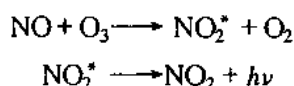
化学发光与荧光的主要区别是激发分子的方式不同。当化学反应释放出大量的化学能(ΔG)

转化成反应产物的电子激发能($*$),并发射出光子($h\nu$)时,就产生了化学发光。我们用这样的顺序来描述化学发光: $\Delta G \rightarrow * \rightarrow h\nu$ 。其中关键的一步是化学激发作用($\Delta G \rightarrow *$),而发光过程($* \rightarrow h\nu$)则是和荧光发射相同的分子由激发态返回基态的发光过程。化学发光反应主要有以下几种类型:

1. 利用反应自身发出的能量激发产物分子的化学发光。可用下面的方程式来表示:



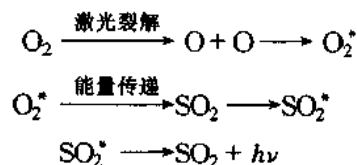
C^* 是 A 和 B 反应产物 C 的激发态, $h\nu$ 为发射的光子,例如:



2. 反应发出的能量激发中间体,经过能量传递的化学发光。可用下面的方程式来表示:



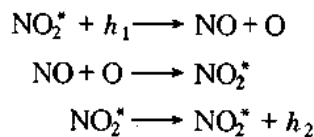
例如:



3. 化学发光反应是光化学反应的逆反应。由光化学反应的产物,引发的化学发光



h_1 为光化学反应的激发光, h_2 为化学发光的发射光,表面上看似乎与荧光发射类似,但本质完全不同。例如:



二、化学发光定量分析的原理

化学发光能够用于对某些物质或酶进行定量分析,是因为发光的强度(I_{CL})与化学反应的速度密切相关,进而可以分析影响反应速度的相关因素。它们的关系可用下面的方程式表示:

$$I_{\text{CL}}(t) = \Phi_{\text{CL}} \times V(t) \quad (6-8)$$

发光强度 $I_{\text{CL}}(t)$ 为在任意时刻 t , 每秒发出的光子数(光子数/秒), 发光量子效率 Φ_{CL} 为发出的光子数与参加

反应的分子数之比(光子数/反应分子数),反应速度 $V(t)$ 为在特定时刻 t , 每秒参加反应的分子数(反应分子数/秒)。对于某个特定的化学发光反应,在恒定的反应条件下 Φ_{CL} 可为一个常数。所以测定化学发光的发光强度 I_{CL} , 实质上反映了化学发光反应的反应速度 V 。

(一) 利用化学发光反应动力学曲线对反应物质的定量分析

对于下面方式的化学发光反应:



V 为化学发光反应进行的速度,根据质量作用定律

$$V = K[R][A] \quad (6-10)$$

式中的 K 是化学发光反应的速率常数,当 R 的浓度很大时,即 R 极大地超过 A 时,式(6-10)可简化为关于 A 的假一级动力学方程式:

$$V = K'[A] \quad (6-11)$$

对(6-11)表示的动力学方程式积分就可得到反应到 t 时刻 A 的浓度是:

$$C_A(t) = C_A^0 e^{-K't}$$

C_A^0 为 A 的起始浓度,根据(6-8)式, t 时刻的化学发光强度 $I_{CL}(t)$ 是:

$$\begin{aligned} I_{CL}(t) &= \Phi_{CL} \times V(t) \\ &= \Phi_{CL} \times K' C_A \\ &= \Phi_{CL} \times K' C_A^0 e^{-K't} \end{aligned} \quad (6-12)$$

化学发光反应大都是瞬时的快速反应,大量化学反应的动力学曲线表明,虽然 A 物质的起始浓度不一样,但化学发光强度达到极大值 I_{max} 式所需时间差别极小,这表示 $e^{-K't}$ 接近一个常数。由(6-12)得出,化学发光的最大发光强度 I_{max} ,与参加反应的 A 物质的起始浓度有线性关系。这就是利用化学发光对物质进行定量分析的依据。

但如果 R 和 A 的起始浓度比较接近,则 $I_{CL}(t)$ 与 R 和 A 的起始浓度之间的关系较为复杂,不能用简单的分立式测定反应动力学曲线峰值来进行 R 或 A 的定量测定

(二) 利用化学发光反应动力学曲线对反应中的酶的定量分析

许多化学发光反应需要不同种类的酶(或催化剂),如 M 是 R 和 A 进行化学发光反应中的酶,对于这种方式的化学发光反应可表示为:



则反应速度为:

$$V = K[R][A][M] \quad (6-14)$$

在化学发光反应中,因为 M 作为催化剂不会被消耗,它的浓度是个常数。如果 R 过量,则(6-14)也可简化为关于 A 的假一级动力学方程式:

$$V = K'[A][M] \quad (6-15)$$

同样可推导出 t 时刻的化学发光强度 $I_{CL}(t)$ 是:

$$I_{CL}(t) = \Phi_{CL} \times K'[M] C_A^0 e^{-K'[M]t} \quad (6-16)$$

酶的浓度一般都是极小的,这样 $e^{-K'[M]t} \approx e^0 = 1$,动力学曲线峰值表示的化学发光的最大发光强度 I_{max} 为:

$$I_{max} = \Phi_{CL} \times K' C_A^0 [M] \quad (6-17)$$

当保持每次反应 R 和 A 的起始浓度不变时,测得的化学发光最大强度 I_{max} 就和酶的浓度成线性关系。这就是利用化学发光对反应中酶的浓度进行定量分析的依据。

三、常用的化学发光物质及反应系统

(一) 常用的化学发光物质

目前常用的化学发光物质主要为下列几类:

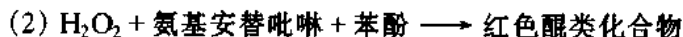
1. 鲁米诺(氨基苯二酰肼)及其衍生物 如鲁米诺、异鲁米诺(isoluminol)及 ABEI、ABEN 等,这是一类最常用的化学发光剂。鲁米诺在过氧化氢及活性氧(过氧化阴离子 O_2^- , 单线态 1O_2 , 羟自由基 $OH\cdot$, 过氧化氢 H_2O_2)存在下,可生成激发态的中间体,当中间体返回基态时会产生化学发光,其发光波长为 425 nm。

2. 吖啶酯衍生物 如吖啶酯 I (简称 AE), 吖啶酯 II (简称 DMAE-NHS), 还有吖啶酯 III。它们的结构中都有吖啶环,通过启动发光试剂($NaOH + H_2O_2$)作用可生成激发态中间体 N-甲基吖啶酮,返回基态时就放出光子。其发光为快速闪烁发光,检测限可达 8×10^{-19} mol/L。

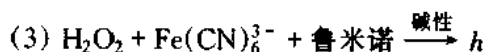
3. 环 1,2-二氧乙烷(1,2-dioxetane)的稳定衍生物 二氧乙烷由于发光半衰期很短($< 1s$),使其应用受到很大限制,目前已有性能优良的二氧乙烷高度稳定性的衍生物 AMPPD 和 AMPGD。具有发光强度高和持续时间长的优点,发光波长为 470 nm,在 15~60 min 时间内发光强度变化很小。AMPPD 为碱性磷酸酶(Apase)的直接化学发光底物,能检测出溶液中 10^{-15} mol/L,固定于膜上 10^{-20} mol/L 的碱性磷酸酶。

(二) 实用的化学发光反应系统

1. 酶联系统 将化学发光与酶促反应结合起来,可使分析系统既具有酶分析的专一性,又具有化学发光分析的高灵敏度。例如酶法测定葡萄糖,原来是进行下面的反应:



然后利用分光光度法进行定量,检测葡萄糖的灵敏度约为 10^{-4} mol/L。如果将第(2)步利用 H_2O_2 进行的生色反应(许多物质的酶法测定都是选用这种生色反应)改为用化学发光反应来进行分析:



利用化学发光分析仪检测痕量葡萄糖的灵敏度可达 10^{-8} mol/L,其线性范围可达 3 个数量级。

2. 增强化学发光酶分析系统 化学发光的效率一般都很低,经典的化学发光物质鲁米诺的发光量子效率仅为 0.01,而萤火虫的生物发光量子效率却可接近 1。人们在化学发光系统中加入增强剂,以进一步提高化学发光分析的灵敏度。较常见的有过氧化物酶(POase)/ H_2O_2 /鲁米诺/增强剂(enhancer)系统,在此系统中,POase 可使 H_2O_2 产生新生的 O_2 作用于鲁米诺而产生化学发光。未使用增强剂的 POase/ H_2O_2 /鲁米诺系统为弱信号的闪光型发光,早期在系统中加入人工合成的萤火虫荧光素(synthetic firefly D-luciferin)为增强剂,建立了 POase/ H_2O_2 /鲁米诺/D-luciferin 系统。其发光时间可持续 7 min,发光强度提高了 7 倍,信号/本底比提高了约 80 倍。现在找到更好的增强剂:对位碘酚(*p*-iodophenol)和对位苯基酚(*p*-phenylphenol),发光强度可提高 1 000 倍以上,发光时间可持续 30~60 min。此系统已广泛用于化学发光酶免疫分析系列试剂盒商品中。

四、化学发光的测定

化学发光是利用化学发光分析仪来进行检测。化学发光分析仪类似一个没有光源的荧光光度计,它是由化学发光反应池、光电检测器、放大器、计算机控制系统和自动加样系统等构成。其机构如图 6-4。

化学发光分析仪在计算机的控制下,用自动取样器或蠕动泵按一定顺序把反应物注入反应池,以便产生发光反应,反应发出的光信号由光电检测器转换成电信号,送入放大器并经模数转换,由计算机进行数据采集分析处理,显示或打印发光强度,发光曲线和其他有关数据。常用的发光分析仪有:LKB1210 型发光仪、BLR-201 型发光仪、Aloka 型发光仪、Ciba Corning 自动发光分析仪等。

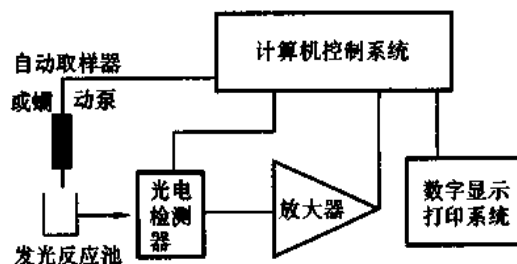


图 6-4 化学发光分析仪结构图

因为化学发光分析仪类似一个没有光源的荧光光度计,所以也可利用荧光分光光度计来进行化学发光的测定:关闭荧光分光光度计激发光路的光门,人工依次加入各种化学发光反应物质后,再进行发光强度的测定。

进行化学发光分析时的注意事项与荧光分析相同。溶剂、溶液的 pH 值、化学反应和发光分析时的温度、样品浓度等因素必须更为严格地控制。它们会对化学发光产生更大的影响,因为这些因素既能影响化学反应的速度,又能影响被激发分子返回基态的发光过程。

五、化学发光的应用

虽然化学发光的现象发现的较早,而且具有很高的灵敏度,但由于通常发光持续时间很短,衰减很快,仅为数秒或更短的闪光型,信号强度不高,易受环境条件的干扰,本底较高,信号比较小等,这些缺点使化学发光分析较长时间停留在研究阶段,难以广泛的实际应用。近十年来,通过不断的改进和发展,克服了上述缺点,化学发光分析已迅速从实验室研究进入常规临床诊断应用。特别是随着各种新型自动发光分析仪器的面市,以及不同类型的化学发光免疫分析试剂盒的推出,如以 HRP 为标记物,鲁米诺为发光底物的 Amerlite 系统,以吖啶酯标记的 ACS:180 系统和以 ALP 标记,AMPPD 为发光底物的 Immulite 系统等都在不断推出新的分析试剂盒。目前已推出的化学发光免疫分析试剂盒主要有进行甲状腺功能检测的 TST、 T_3 、 T_4 、TBG、 T_3U 、 FT_4 ;性激素方面的雌二醇、黄体酮、卵泡激素、孕酮、CEA、AFP 等;还有许多是用于其他激素检测、肿瘤检测、维生素分析、微量元素分析。同时以葡萄糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶为标记物的化学发光免疫分析也得到广泛的应用。用化学发光试剂标记核酸分子,制备基因探针,运用化学发光分析进行核酸分子杂交分析,是化学发光分析的前沿,其发展将为基因工程、基因诊断和治疗提供有效的检测手段。化学发光分析由于它极高的灵敏度和简便快捷的优点,以及广阔的应用范围,正越来越受到人们的重视和欢迎。

(同济医科大学 王淳本)

参 考 文 献

- 1 Soper S A, *et al.* Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry. Analytical Chemistry. America Chemical Society, 1994, 66 (12):428~444
- 2 Larry J K. Chemiluminescent and Bioluminescent Techniques. Clinical Chemistry. 1991, 37 (9): 1 472~1 481
- 3 何治柯. 化学发光分析进展. 分析测试学报. 广州:《分析测试学报》编委会, 1997, 16 (1):72~84
- 4 刘忠敏. 现代分析仪器. 北京:科学技术文献出版社, 1997
- 5 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京:北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社, 1998

第七章

生物大分子制备技术

生物大分子主要指蛋白质(包括酶)和核酸。以蛋白质和核酸的结构与功能为基础,从分子水平上认识生命现象,已经成为现代生物学发展的主要方向,研究生物大分子,首先要得到高度纯化并具有生物活性的目的物质。生物大分子的制备工作涉及物理、化学和生物等各方面的知识,但基本原理不外乎两方面:一是利用混合物中几个组分分配率的差别,把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中,如盐析,有机溶剂提取,层析和结晶等;二是将混合物置于单一物相中,通过物理力场的作用使各组分分配于不同区域而达到分离目的,如电泳,超速离心,超滤等。在所有这些方法的应用中必须注意保存生物大分子的完整性,防止酸、碱、高温、剧烈机械作用而导致所提物质生物活性的丧失。

生物大分子的制备一般分为以下四个阶段:选择材料和预处理,细胞的破碎及细胞器的分离,提取和纯化,浓缩、干燥和保存。下面分别介绍。

第一节 选择材料及预处理

微生物、植物和动物都可作为制备生物大分子的原材料,所选用的材料主要依据实验目的来确定。

对于微生物,应注意它的生长期,在微生物的对数生长期,酶和核酸的含量较高,可以获得高产量,以微生物为材料时有两种情况:①利用微生物菌体分泌到培养基中的代谢产物和胞外酶等;②利用菌体含有的生化物质,如蛋白质、核酸和胞内酶等。

植物材料必须经过去壳、脱脂并注意植物品种和生长发育状况不同,其中所含生物大分子的变化很大,另外与季节性关系密切。

对动物组织,必须选择有效成分含量丰富的脏器组织为原材料,先进行绞碎、脱脂等处理。

另外,对预处理好的材料,若不立即进行实验,应冷冻保存,对于易分解的生物大分子应选用新鲜材料制备。

第二节 细胞的破碎及细胞器的分离

一、细胞的破碎

1. 高速组织捣碎机捣碎 将材料配成稀糊状液,放置于筒内的 1/3 体积,盖紧筒盖,将调速器先拨至最慢处,开动开关后,逐步加速至所需速度。此法适用于动物内脏组织、植物肉质种子等。

2. 玻璃匀浆器匀浆 先将剪碎的组织置于管中,再套入研杵来回研磨,上下移动,即可将细胞研碎。此法对细胞破碎程度比高速组织捣碎机为高,适用于量少的动物脏器组织。

3. 超声波处理法 用一定功率的超声波处理细胞悬液,使细胞急剧震荡破裂,此法多适用于微生物材料,用大肠杆菌制备各种酶,常选用菌体质量浓度为 50~100 mg/ml,在 10~100 KHz 频率下处理 10~15 min。此法的缺点是在处理过程中会产生大量的热,应采取相应降温措施。对超声波敏感的酶和核酸应慎用。

4. 反复冻融法 将细胞在 -20℃ 以下冰冻,室温融解,反复几次,由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀,使细胞结构破碎。

5. 化学处理法 有些动物细胞,例如肿瘤细胞可采用十二烷基硫酸钠(SDS)、去氧胆酸钠等使细胞膜破坏。细菌细胞壁较厚,可采用溶菌酶处理效果更好。

无论用哪一种方法破碎组织细胞,都会使细胞内蛋白质或核酸水解酶释放到溶液中,使大分子物质降解,导致天然物质质量的减少。加入二异丙基氟磷酸(DFP)可以抑制或减慢自溶作用;加入碘乙酸可以抑制那些活性中心需要有巯基的蛋白水解酶的活性,加入苯甲磺酰氟化物(PMSF)也能消除蛋白水解酶活力,但不是全部,还可通过选择 pH、温度或离子强度等,使这些条件都要适合于目的物质的提取。

二、细胞器的分离

各类生物大分子在细胞内的分布是不同的,DNA 几乎全部在细胞核内,RNA 则主要在胞浆,各种酶在细胞内的分布也有特定的位置(表 7-1)。因此应根据某一目的物质的位置来选取材料。

表 7-1 蛋白质、酶及核酸在肝细胞内的分布

细胞器名称	主要蛋白质及酶	核 酸
细胞核	精蛋白、组蛋白、核酸合成酶系	全部的 DNA,总 RNA 的 10%
线粒体	电子传递、氧化磷酸化、三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸氧化、腺合成酶系	微量 DNA,总 RNA 的 5%~10%
内质网(微粒体)	蛋白质合成酶系,羟化酶类	总 RNA 的 50%
溶酶体	水解酶系(包括核酸酶,磷酸酯酶,组织蛋白酶及糖苷酶等)	
高尔基体	糖苷转移酶、粘多糖类固醇合成酶系	
细胞膜	载体与受体蛋白,特异抗体,ATP 酶,环化腺苷酶,葡萄糖 6-磷酸酶等	
细胞液	嘧啶与嘌呤代谢、氨基酸合成酶系,可溶性蛋白类	RNA(主要为 rRNA)占总量 30%

细胞器的分离,一般采用差速离心法。这是利用细胞各组分质量大小不同,沉降于离心管内不同区域,分离后即得到所需组分。细胞器分离中常用的介质有蔗糖、Ficoll(一种蔗糖多聚体)或葡萄糖、聚乙二醇等高分子溶液。

第三节 提取和纯化

提取是将经过处理或破碎的细胞,置于一定的条件和溶液中,让被提取的生物大分子充分释放出来的过程。影响提取的因素主要是被提取物质在提取的溶液中溶解度的大小及由固相扩散到液相的难易程度。某一物质在溶剂中溶解度大小与该物质的分子结构及溶剂理化性质有关,一般遵守“相似相溶”的原则。扩散作用对生物大分子的提取有一定的影响。减小溶剂的粘度、搅拌和延长提取时间可提高其扩散速度,增加提取效果,提取的原则是“少量多次”,即对于等量的提取溶液,分多次提取比一次提取效果好得多。

一、蛋白质(包括酶)的提取

大部分蛋白质都可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液,少数与脂类结合的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂中,因此,可采用不同溶剂提取分离和纯化蛋白质及酶。

(一) 水溶液提取法

稀盐和缓冲系统的水溶液对蛋白质稳定性好,溶解度大,是提取蛋白质最常用的溶剂,通常用量是原材料体积的1~5倍,提取时需要均匀地搅拌,以利于蛋白质的溶解。提取的温度视有效成分的性质而定。一方面,多数蛋白质的溶解度随着温度的升高而增大,因此,温度高利于溶解,缩短提取时间。但另一方面,温度升高会使蛋白质变性失活,因此,基于这一点考虑,提取蛋白质和酶时一般采用低温(5℃以下)操作。

为了避免蛋白质提取过程中的降解,可加入蛋白水解酶抑制剂(如二异丙基氟磷酸、碘乙酸等)。

下面着重讨论提取液的pH和盐浓度的选择。

1. pH 蛋白质和酶是具有等电点的两性电解质,提取液的pH应选择在偏离等电点两侧的pH范围内。用稀酸或稀碱提取时,应防止过酸或过碱而引起蛋白质可解离基团发生变化,从而导致蛋白质构象的不可逆变化,一般来说,碱性蛋白质用偏酸性的提取液提取,而酸性蛋白质用偏碱性的提取液提取。

2. 盐浓度 稀盐溶液可促进蛋白质的溶解,称为盐溶作用。同时稀盐溶液因盐离子与蛋白质部分结合,具有保护蛋白质不易变性的优点,因此在提取液中加入少量NaCl等中性盐,一般以0.15mol/L浓度为宜。缓冲液常采用0.02~0.05 mol/L磷酸盐或碳酸盐的等渗盐溶液。

(二) 有机溶剂提取法

一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶,不溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中,可用乙醇、丙酮或丁醇等有机溶剂,它们具有一定的亲水性,还有较强的亲脂性,是理想的提取脂蛋白的提取液,但必须在低温下操作。

丁醇提取法对提取一些与脂质结合紧密的蛋白质和酶特别优越,一是因为丁醇亲脂性强,特别

是溶解磷脂的能力强;二是丁醇兼具亲水性,在溶解度范围内不会引起酶的变性失活。另外,丁醇提取法的 pH 及温度选择范围较广,也适用于动植物及微生物材料。

二、蛋白质的分离纯化

蛋白质的分离纯化方法很多,主要有以下几类。

(一) 根据蛋白质溶解度不同的分离方法

1. 蛋白质的盐析 中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响,一般在低盐浓度下随着盐浓度升高,蛋白质的溶解度增加,称为盐溶;当盐浓度继续升高时,蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出,这种现象叫盐析。将大量盐加到蛋白质溶液中,高浓度的盐离子(如硫酸铵的 SO_4^{2-} 和 NH_4^+) 有很强水化作用,可夺取蛋白质分子的水化层,使之“失水”,于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。盐析时若溶液 pH 在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同,故盐析所需的盐浓度也不一样,因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀(表 7-2)。

影响盐析的因素有:①温度:除对温度敏感的蛋白质在低温(4°C)操作外,一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质(如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白)在较高的温度(25°C)比 0°C 时溶解度低,更容易盐析。②pH:大多数蛋白质在等电点时,在浓盐溶液中的溶解度最低。③蛋白质浓度:蛋白质浓度高时,欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质一起沉淀出来(共沉现象)。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释,使蛋白质含量在 $25\sim 30\text{g/L}$ 。

表 7-2 血浆蛋白质的分段盐析

硫酸铵的饱和度 $\text{g}\cdot(100\text{ml H}_2\text{O})^{-1}$	沉淀的主要蛋白质	占血浆总蛋白的质量分数/%
20	纤维蛋白	4
48~33	优球蛋白(含大部分 IgG、IgM 和一部分 IgA)	3
40~46	假球蛋白(含大部分 IgA,一部分 IgM 和 IgG)	24
>50	清蛋白	69

蛋白质盐析常用的中性盐,主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的是硫酸铵,它的优点是溶解度的温度系数小而溶解度大(25°C 时饱和溶液为 4.1mol/L , 即 541.2g/L ; 0°C 时饱和溶解度为 3.9mol/L 即 514.8g/L),在这一溶解度范围内,许多蛋白质和酶都可以盐析出来;另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好,不易引起蛋白质变性。

硫酸铵溶液的 pH 常在 $4.5\sim 5.5$ 之间,当用其他 pH 进行盐析时,需要硫酸或氨水调节。

蛋白质在用盐析沉淀分离后,需要将蛋白质中的盐除去,常用的办法是透析,即把蛋白质溶液装入透析袋内(常用的是玻璃纸),用缓冲液进行透析,并不断地更换缓冲液,因透析所需时间较长,所以最好在低温中进行。此外也可用葡聚糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐,所用的时间比较短。

2. 等电点沉淀法 蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小,因而溶解度也最小,各种蛋白质的等电点有差别,可利用调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点使之沉淀,但此法很少单独使用,可与盐析法结合使用。

3. 低温有机溶剂沉淀法 用与水可混溶的有机溶剂,甲醇、乙醇或丙酮,可使多数蛋白质溶解度降低并析出。此法分离效率比盐析高,但蛋白质较易变性,应在低温下进行。

(二) 根据蛋白质分子大小的差别的分离方法

1. 透析与超滤 透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分子分开。超滤法是利用高压或离心力,强使水和其他小的溶质分子通过半透膜,而蛋白质留在膜上,可选择不同孔径的滤膜截留不同相对分子质量的蛋白质。

2. 凝胶过滤法 也称分子排阻层析或分子筛层析,这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡聚糖凝胶(Sephadex gel)和琼脂糖凝胶(agarose gel)(详见色谱技术一章)。

(三) 根据蛋白质带电性质进行分离

蛋白质在不同 pH 环境中带电性质和电荷数量不同,可将其分开。

1. 电泳法 各种蛋白质在同一 pH 条件下,因相对分子质量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而得以分开(详见电泳技术一章)。值得重视的是等电聚焦电泳,这是利用一种两性电解质作为载体,电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度,当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时,到达各自等电点的 pH 位置就停止,此法可用于分析和制备各种蛋白质。

2. 离子交换层析法 离子交换剂有阳离子交换剂(如:羧甲基纤维素,CM-纤维素)和阴离子交换剂(二乙氨基乙基纤维素,DEAE-纤维素),当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时,带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上,随后用改变 pH 或离子强度的办法将吸附的蛋白质洗脱下来(详见色谱技术一章)。

(四) 根据配体特异性的分离方法——亲和层析法

亲和层析法(affinity chromatography)是分离蛋白质的一种极为有效的方法,它通常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来,而且纯度很高。这种方法是根据某些蛋白质与另一种称为配体(ligand)的分子能特异而非共价地结合。例如,酶-辅酶,抗原-抗体,激素-受体等。亲和层析的基本原理是:先把待提纯的目的蛋白的配体共价连接到琼脂糖一类的多糖表面的功能团上,当混合蛋白流经层析柱时,待提纯的蛋白质与其特异的配体结合,而吸附在层析柱上,其他杂蛋白流出,最后将与配体结合的特异蛋白洗脱下来。

蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在,每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质,因此蛋白质的分离(separation)、提纯(purification)和鉴定(characterization)是生物化学中的重要部分,至今还没有一个单独或一套现成的方法能把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来,因此往往采取几种方法联合使用。

三、核酸的提取

核酸都溶于水,而不溶于有机溶剂,利用此性质进行提取。在细胞内 DNA 与蛋白质结合成脱氧核糖核蛋白(DNP),RNA 与蛋白质结合成核糖核蛋白(RNP),在不同浓度的盐溶液中它们的溶解度差别很大,DNP 在纯水或 1 mol/L NaCl 溶液中溶解度较大,但在 0.14 mol/L NaCl 溶液中溶解度很低。相反,RNP 易溶解,因此,用 0.14 mol/L NaCl 溶液可简单地初步分开 DNP 和 RNP。

在分离核酸中最困难的是将核酸与紧密结合的蛋白质分开,而且还要避免核酸的降解。常用的解离剂是阴离子去垢剂,如脱氧胆酸钠,十二烷基硫酸钠(SDS),4-氨基水杨酸钠和萘-1,5-二磺酸钠等,它们具有溶解病毒、细菌的作用,可使核酸从蛋白质上游离出来,还具有抑制核糖核酸酶的作用。另外除去核酸中的蛋白质的一个有效办法是用酚-氯仿混合液,它们可使蛋白质变性

并对核糖核酸酶有抑制作用,另外氯仿比重大可使有机相和水相完全分开,减少残留在水相中的酚。在用酚-氯仿抽提核酸提取液时,还需要剧烈振摇,为防止起泡和促使水相与有机相的分离,在酚-氯仿抽提液中再加上一定量的异戊醇。

(一) DNA 的提取

组织细胞破碎后,加入 0.5 mol/L NaCl 溶液,离心去上清,取沉淀用 1.0 mol/L NaCl 溶解,用酚-氯仿混合液振摇抽提,离心取水相,加入 2 倍体积的乙醇沉淀 DNA。在提取 DNA 的溶液中加入 EDTA 等金属螯合剂,以除去 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,抑制脱氧核糖核酸酶(DNase)的活性,减少对 DNA 的水解。DNA 制品中的少量 RNA 可用纯的 RNase 水解除去。

(二) RNA 的提取

在提取 RNA 时最要紧的问题是防止 RNase 的降解,许多试剂中甚至手指上都有核糖核酸酶(RNase),常用的抑制 RNase 措施有:① 低温 4℃ 操作;② 所用器皿高压消毒,试剂中加入 RNase 抑制剂;③ 操作中戴手套。

细胞中的 RNA 有三种,rRNA、tRNA 和 mRNA,将它们完全分开不容易,可先将细胞匀浆进行差速离心,制得细胞核、线粒体、核糖体等细胞器和细胞质,然后再从这些细胞器中分离某一类 RNA

真核 mRNA 由于其结构上的特异性为提取和纯化带来方便。因 mRNA 3'端均含有多聚 A 序列(poly(A)),可利用寡聚脱氧胸腺核苷酸(oligo(dT))层析柱,将 mRNA 从总 RNA 中纯化出来。

目前普遍通用的从动物组织和培养细胞中提取完整的总 RNA 的方法是异硫氰酸胍法,它有很强的抑制 RNase 活性作用,使蛋白质变性效果也很好(详见核酸提取一章)。

四、核酸的纯化

核酸的纯化最关键步骤是去除蛋白质,通常只要用酚/氯仿、氯仿抽提核酸的水溶液即可。每当需要把 DNA 克隆操作的某一步所用的酶灭活或去除以便进行下一步时,可进行这种抽提。然而,如果从细胞裂解液等复杂的分子混合物中纯化核酸,则要先用某些蛋白水解酶消化大部分蛋白质后,再用有机溶剂抽提。这些广谱的蛋白酶包括链霉菌蛋白酶及蛋白酶 K 等,它们对多数天然蛋白质均有活性。

用酚/氯仿抽提:这两种有机溶剂合用,比单独用酚抽提的除蛋白效果更佳。继而用氯仿抽提则可除去核酸制品中的痕量酚。具体步骤如下:①核酸样品置有盖小离心管中,加入等体积的酚/氯仿;②旋涡混匀管内容物,使呈乳状;③12 000 g 室温离心 15 s;④水相移入另一离心管,弃去两相界面和有机相;⑤重复步骤①~④,直至两相界面上见不到蛋白质为止;⑥加入等体积的氯仿并重复②~④步操作;⑦按下述核酸浓缩法沉淀回收核酸。

五、核酸的浓缩

应用最广的核酸浓缩法是乙醇沉淀法。在中等浓度单价阳离子存在下,加入一定量的乙醇后,所形成的核酸沉淀可经离心而回收。甚至对低至 pg(皮克)量的 DNA 或 RNA,也可定量回收。回收的核酸可按所需浓度,再溶于适当的缓冲液中。

具体操作时,可向含样品的小离心管中加入 V/10 的单价阳离子盐贮存液(表 7-3),2V 无水乙醇,混匀,放冰水浴中 15~30 min,取出目测平衡,0~4℃,12 000 g 离心 10 min,吸弃上清,再加

70% 乙醇 0.5~1 ml, 12 000 g 0~4 °C 洗涤离心 2 min。吸弃上清, 沉淀用油泵抽干或打开盖子晾干后, 溶于适当体积的缓冲液中。

表 7-3 单价阳离子盐溶液

	贮存液/mol·L ⁻¹	终浓度/mol·L ⁻¹
醋酸铵	7.5	2.0~2.5
LiCl	8.0	0.8
NaCl	2.0	0.2
醋酸钠	3.0(pH5.2)	0.3

单价阳离子盐的选择, 主要基于下述考虑: 用醋酸铵可减少 dNTP 的共沉淀, 但在以后要作核酸的磷酸化时应避免用醋酸铵, 因铵离子是 T4 多核苷酸激酶的强烈抑制剂。当用较高浓度的乙醇沉淀 RNA 时, 常用 LiCl, 因 LiCl 在乙醇中溶解度很高, 不随核酸共沉淀。含有 SDS 的核酸样品, 应使用 NaCl, 这时该去垢剂在 70% 乙醇中仍保持可溶。DNA 和 RNA 的沉淀, 大多使用醋酸钠 (pH5.2)。

六、DNA、RNA 的定量

准确的方法是紫外分光光度法。但本法要求核酸样品是纯净的 (即无显著的蛋白质、酚、琼脂糖或其他核酸、核苷酸等污染物的制品)。用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 两个波长处的光吸收, 然后, 按 $1A_{260}$ 相当于 50 $\mu\text{g/ml}$ 双链 DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ 单链 DNA 或 RNA 及 20 $\mu\text{g/ml}$ 单链寡核苷酸, 计算样品含量。260 nm 和 280 nm 两处读数的比值 (A_{260}/A_{280}), 可反映核酸的纯度。DNA 和 RNA 纯品的 A_{260}/A_{280} 值分别为 1.8 和 2.0, 如果样品中有蛋白质或酚的污染, 则 A_{260}/A_{280} 将明显低于此值, 此时就无法对样品中的核酸进行精确定量。可将样品纯化后再作定量测定。有丰富实验室经验的人, 仅凭样品电泳后溴化乙锭染色荧光带的强度, 即可大致判断出样品中核酸含量, 故他们常不作核酸的紫外分光光度法定量。

七、核酸的凝胶电泳和相对分子质量参照物

(一) 琼脂糖凝胶电泳, 可用于分离、鉴定和提纯 DNA 片段。本法操作简单、迅速, 能分辨其他方法不能分开的 DNA 片段混合物, 分开的 DNA 可用低质量浓度的荧光染料 (0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭) 染色, 在紫外灯下直接观察可检测少至 1 ng 的 DNA。

DNA 通过琼脂糖凝胶的迁移率取决于以下参数: ① DNA 分子的大小: 线状双链 DNA 分子通过凝胶的速率与其相对分子质量的常用对数成反比。据此用已知相对分子质量的标准物质和待测相对分子质量的 DNA 片段同时电泳, 比较其电泳速率, 即可求出待测片段的分子大小, ② 琼脂糖浓度: 给定大小的 DNA 片段, 以不同速度通过不同浓度的琼脂糖凝胶。因此, 利用不同浓度的凝胶, 可分辨范围广泛、大小不同的 DNA 片段 (表 7-4)。③ DNA 的构型: 相同相对分子质量的闭环 (I 型), 开环 (II 型) 和线型 (III 型) DNA, 以不同速率通过凝胶, 一般情况下, 迁移率 I 型 > III 型 > II 型。④ 应用的电压: 在低电压时, 线状 DNA 片段的迁移率与所用电压成正比。但电压增加时, 大相对分子质量 DNA 片段迁移率的增大是不同的, 因此琼脂糖凝胶的有效分离范围随电压增大而减小。为了获得 DNA 片段的最大分辨率, 凝胶电泳时电压不应超过 $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

表 7-4 不同质量浓度琼脂糖凝胶的分离范围

质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	分离线状 DNA 分子的有关范围 / kb
3	5~60
6	1~20
7	0.8~10
9	0.5~7
12	0.4~6
15	0.2~3
20	0.1~2

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳可用于分析和制备小于 1 kb 长度的 DNA 片段(表 7-5)。

表 7-5 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶中的有效分离范围

凝胶质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	有效分离范围 / bp
35	100~1 000
50	80~500
80	60~400
120	40~200
200	10~100

聚丙烯酰胺凝胶多用垂直平板电泳,准备凝胶时,先配制 30% 单体母液(29 g 丙烯酰胺,1 g 双丙烯酰胺,加水溶解,定容到 100 ml),再用它来配制所需浓度的凝胶(表 7-6)

表 7-6 制备聚丙烯酰胺凝胶所用试剂的体积

试 剂	不同质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 凝胶所用试剂的 ml 数				
	35	50	80	120	200
30% 单体母液	11.6	16.6	26.6	40	66.6
H ₂ O	76.3	71.3	61.3	47.9	21.3
3% 过硫酸铵	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
10× TBE*	10	10	10	10	10
总体积**	100	100	100	100	100

* 每升含 108 g Tris, 55 g 硼酸, 40 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)

** 总体积可视灌注玻板的大小而增减,但所需各成分的体积亦要相应成比例地增减

每 100 ml 上述液体加 30 μl 四甲基乙二胺(TEMED),混匀后可灌注预先准备好的洁净不渗漏的凝胶玻板。待凝胶灌至近顶端时,立即插入适合的“梳子”,放室温聚合 60 min,若冬天室温太低,则可放 37℃ 温箱内,以促进聚合。聚合完成后,拔出“梳子”,将凝胶板固定于电泳槽中,向电泳槽倾入 1× TBE,用滴管冲洗加样孔和凝胶底部以除去气泡,即可加样电泳。一般所用电压为 1~8 $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$,随时观察标记染料的迁移。在溶于 1× TBE 的聚丙烯酰胺中,标记染料迁移率与下述 DNA 片段的迁移速率相同(表 7-7)。

表 7-7 标记染料在 PAGE 中的迁移*

凝胶质量浓度 /g·L ⁻¹	溴 酚 蓝	二甲苯青 FF
35	100	460
50	65	260
80	45	160
120	20	70
200	12	45

* 这些数字是与染料共同迁移的 DNA 片段的近似大小(以 bp 计)

电泳结束,从电泳槽中取出玻板并小心地撬开,凝胶浸于溴化乙锭液(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $1\times\text{TBE}$)染色,45 min 后放紫外灯下观察电泳结果。

(三) 相对分子质量参照物

为了判断目的 DNA 片段的大小,常在同一凝胶板的目的 DNA 旁加一相对分子质量参照物,同时电泳并染色后,就能在紫外灯下很快知道目的片段的大小。最常用的相对分子质量参照物是 $\lambda\text{Hind III}$ 消化物,各片段的大小以 bp 表示,分别为:23 130,9 416,6 557,4 361,2 322,2 027,564,125。

第四节 浓缩、干燥及保存

一、样品的浓缩

生物大分子在制备过程中由于过柱纯化而使样品变得很稀,为了保存和鉴定的目的,往往需要进行浓缩。

常用的浓缩方法有:

1. 减压加温蒸发浓缩 通过降低液面压力使液体沸点降低,减压的真空度愈高,液体沸点降得愈低,蒸发愈快。此法适用于一些不耐热的生物大分子的浓缩。

2. 空气流动蒸发浓缩 空气的流动可使液体加速蒸发,将铺成薄层的溶液,表面不断通过空气流;或将生物大分子溶液装入透析袋内置于冷室,用电扇对准吹风,使透过膜外的溶剂不断蒸发,而达到浓缩目的,此法浓缩速度慢,不适于大量溶液的浓缩。

3. 冰冻法 生物大分子在低温下结成冰,盐类及生物大分子不进入冰内而留在液相中,操作时先将待浓缩的溶液冷却使之变成固体,然后缓慢地融解,利用溶剂与溶质融解点的差别而达到除去大部分溶剂的目的。如蛋白质和酶的盐溶液用此法浓缩时,不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面,蛋白质和酶则集中于下层溶液中,移去上层冰块,可得蛋白质和酶的浓缩液。

4. 吸收法 通过吸收剂直接吸收除去溶液分子使之浓缩。所用的吸收剂必须与溶液不起化学反应,对生物大分子不吸附,易与溶液分开。常用的吸收剂有聚乙二醇,聚乙烯吡咯酮、蔗糖和凝胶等。使用聚乙二醇吸收剂时,先将生物大分子溶液装入半透膜的袋里,外加聚乙二醇覆盖置于 4℃ 下,袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去,聚乙二醇被水饱和后可更换新的,直至达到所需要的体积。

5. 超滤法 超滤法是使用一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择性的过滤的方法。当液体在一定压力下(氮气压或真空泵压)通过膜时,溶剂和小分子透过,大分子受阻保留。这是近年来发展起来的新方法,最适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐,并具有成本低,操作方便,条件温和,能较好地保持生物大分子的活性,回收率高等优点。

应用超滤法关键在于膜的选择,不同类型的膜的膜,水的流速,相对分子质量截止值(即大体上能被膜保留的分子最小相对分子质量数值)等参数均不同,必须根据工作需要来选用。另外,超滤装置形式、溶质成分及性质、溶液浓度等都对超滤效果有一定影响(表 7-8)。

用上面的超滤膜制成空心的纤维管,将很多根这样的管拢成一束,管的两端与低离子强度的缓冲液相连,使缓冲液不断地在管中流动。然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液流过纤维管时,则小分子很易透过膜而扩散,大分子则不能。这就是纤维过滤透析法。由于透析面积增大,因而使透析时间缩短 10 倍。

表 7-8 Diaflo 超滤膜的相对分子质量截止值

膜 名 称	相对分子质量截止值	孔的平均直径/0.1nm
XM-300	300 000	140
XM-200	100 000	55
XM-50	50 000	30
PM-30	30 000	22
UM-20	20 000	18
PM-10	10 000	15
UM-2	1 000	12
UM-0.5	500	10

二、干燥

真空干燥适用于不耐高温,易于氧化物质的干燥和保存,整个装置包括干燥器、冷凝器及真空泵三部分。干燥器内常放一些干燥剂如五氧化二磷,无水氯化钙等。冷冻真空干燥除利用真空干燥原理外,同时增加了温度因素。在相同压力下,水蒸汽压随温度下降而下降,故在低温低压下,冰很易升华为气体。操作时一般先将待干燥的液体冷冻到冰点以下使之变成固体,然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。此法干燥后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点,适用于各类生物大分子的干燥保存。

三、保存

生物大分子的稳定性与保存方法有很大关系。干燥的制品一般比较稳定,在低温情况下其活性可在数日甚至数年无明显变化,贮藏要求简单,只要将干燥的样品置于干燥器内(内装有干燥剂)密封,保存在 0~4℃ 冰箱即可。液态贮藏也有其优点,首先免去烦杂的干燥过程,生物大分子的活性和结构破坏较少,液态贮藏时应注意以下几点:

1. 样品不能太稀,必须浓缩到一定浓度才能封装贮藏,样品太稀易使生物大分子变性。

2. 一般需加入防腐剂和稳定剂,常用的防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿、百里酚等。蛋白质和酶常用的稳定剂有硫酸铵、蔗糖、甘油等,如酶也可加入底物和辅酶以提高其稳定性。此外,钙、锌、硼酸等溶液对某些酶也有一定保护作用。核酸大分子一般保存在氯化钠或柠檬酸钠的标准缓冲

液中。

3. 贮藏温度要低,大多数在 0℃ 左右冰箱保存,有的则要求更低,应视不同物质而定。

(第四军医大学 刘新平)

参考文献

- 1 陶慰孙等编著. 蛋白质分子基础. 北京:人民教育出版社,1981
- 2 Scopes R K. Protein purification. 2nd ed. New York:[s.n.]1989
- 3 郭立安编著. 高效液相色谱法纯化蛋白质理论与技术. 西安:陕西省科学技术出版社,1993
- 4 John Wiley and Sons et al. Current protocols in molecular biology. 3nd.

第二部分

分子生物学技术基本理论

第八章

DNA 重组技术

DNA 重组技术(recombinant DNA technique)即人们通常所说的基因克隆(gene cloning)或分子克隆(molecular cloning)。利用 DNA 重组技术可获取特定 DNA 片段的大量拷贝,以便深入分析基因的结构与功能,达到人为改造细胞遗传性状的目的。

DNA 重组技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一项生物工程技术,是分子生物学领域里的一项重要突破。一个完整的基因克隆流程包括:目的基因的获取、克隆基因载体的选择与改造、目的基因与载体的连接、重组 DNA 分子导入受体细胞、筛选出含重组 DNA 的转化细胞。图 8-1 是以质粒为载体进行 DNA 重组的模式图。

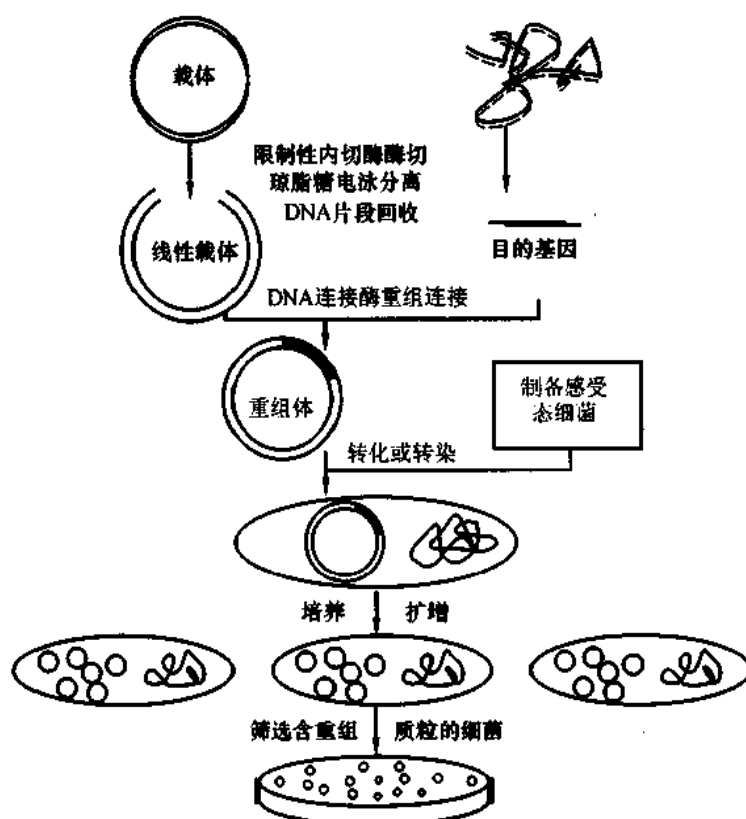


图 8-1 DNA 重组操作示意图

第一节 目的基因的获取

目的基因系指待检测或待研究的特定基因,亦可称为供体基因。但是一个简单的细菌 DNA 就有约 3 000 个以上的基因,更不用说真核生物染色体上的基因数目了,要从众多的基因中获得我们所需要的目的基因是很困难的。目前获得目的基因的方法主要有:直接从染色体中分离;人工化学合成;用逆转录酶合成 cDNA;构建和筛选基因组文库或 cDNA 文库,再从文库中筛选出目的基因;用聚合酶链反应(PCR)方法扩增出目的基因等几种。

一、直接从染色体中分离

适用于基因结构简单的原核生物,多拷贝基因。直接从组织或供体用机械(如超声波)或限制性内切酶将 DNA 切割(应注意选用合适的限制酶,否则很可能将所需要的基因切断失活),再用电泳或超速离心法进行分离,G-C 含量高者宜用超速离心法。

二、化学合成法

某些编码分子很小的蛋白质或多肽的基因,可以用人工合成的方法得到。如果已知目的基因的核苷酸序列,或根据某种基因产物的氨基酸顺序推导出该多肽编码基因的核苷酸序列,然后利用 DNA 合成仪人工合成。对于分子较大的基因,可以通过分段合成 DNA 短片段,再经过 DNA 连接酶作用,将这些片段依次连接成一个完整的基因链。人工合成的基因是单基因,无其他有害基因,比较完整。例如,采用人工合成的方式已经得到人胰岛素基因和生长激素释放抑制因子基因等,并在大肠杆菌内成功表达。

人工合成基因时,遗传密码的简并性会为选择密码带来很大困难。因为密码子的第三位碱基常有摆动性,当以氨基酸序列推测编码基因时,不一定与天然基因完全一致,易造成中性突变。或当选了一个低频使用的密码子时,它就可能成为表达的限速因素。而且目前尚不能合成太长的基因,费用也较高。

化学合成目的基因的优点主要是可以任意制造、修饰基因,在基因两端方便地设立各种接头以及选择各种宿主生物偏爱的密码子。

三、用逆转录酶合成 cDNA

从某些器官直接提取特异性蛋白质的 mRNA,这种特殊蛋白质在该器官中可占到 90% 以上,有关的 mRNA 在这里高度富集,比较容易提取纯化。例如,从网织红细胞提取珠蛋白 mRNA,从鸡输卵管提取卵丝素蛋白 mRNA,从眼球晶体提取晶体蛋白 mRNA 等。然后直接反转录成 cDNA,进行基因克隆,从而直接获得该特定基因的克隆。

四、构建和筛选基因组文库及 cDNA 文库

(一) 基因组文库

基因组文库(genomic library)是含有某种生物体全部基因片段的重组 DNA 克隆群体,又称为

G-文库。构建基因组文库时,先将原核或真核细胞染色体 DNA 提纯,用机械法(如超声波)或限制性核酸内切酶将染色体 DNA 切割成大小不等的许多 DNA 片段,其中含有我们感兴趣的基因片段。将它们与适当的克隆载体(一般为 λ 噬菌体)剪接成重组 DNA 分子,继而转入受体菌扩增、克隆,这样就构件了基因组 DNA 文库。基因组 DNA 文库就像图书馆库存万卷书一样,涵盖了基因组全部基因信息,也包括我们的目的基因。与一般图书馆不同的是,基因组 DNA 文库没有图书目录,建立基因文库后需结合适当筛选方法(如通过探针筛选法、免疫筛选法)从众多转化子菌落中筛选出含有目的基因的菌落,再行扩增、分离、回收,而获得目的基因。

基因组 DNA 中结构基因仅占一小部分,重复序列和假基因占有很大比重,使目的基因克隆的挑选有一定困难,含有的插入序列(内含子)又使得目的基因很难表达,而且长度很大的基因(如大于 50kb)很难得到完整的基因克隆。从基因组文库中得到的基因,原核生物基因可直接用于基因克隆的表达,而真核生物基因则需要重新剪接以去除内含子才可用于基因克隆的表达。

构建基因组文库的方法见第十一章。

(二) cDNA 文库

以 mRNA 为模板,利用反转录酶合成与 mRNA 互补的 cDNA(complementary DNA, cDNA),再复制成双链 cDNA 片段,与适当载体连接后转入受体菌,扩增为 cDNA 文库(cDNA library),又称 c-文库。与上述基因组 DNA 文库类似,由总 mRNA 经逆转录而成的 cDNA 文库包含了细胞全部 mRNA 信息,自然也含有我们感兴趣的编码 cDNA。然后采用适当方法从 cDNA 文库中筛选出目的 cDNA,当前发现的大多数蛋白质的编码基因几乎都是采用这种方法获得的。

在 cDNA 文库中,由 mRNA 反转录成 cDNA,得到相应的双链 cDNA 再进行克隆,就可以获得目的基因完整的连续编码序列,并排除了基因中可能存在的内含子序列,容易在宿主细胞中表达。但 cDNA 文库的构建难度较大,原核生物的 mRNA 和真核生物不带 poly(A)的 mRNA 不能用 oligo(dT)作引物构建 cDNA 文库。

五、聚合酶链反应

聚合酶链反应(PCR)技术是一种对已知序列基因的体外特异扩增的方法。此法要求对目的基因片段两侧的序列了解清楚,通过针对这两个已知区域设计特定的 DNA 引物,在 Tag 酶催化下,进行 2^n 指数递增方式的扩增,能在很短的时间里,利用这特异性的引物将仅有几个拷贝的基因扩增合成到有数百万倍的特异 DNA 拷贝。因此它能以极其简便而快速的链式反应克服构建基因组文库、cDNA 文库中一系列的 DNA 酶切、连接、转化、筛选等复杂繁琐的操作过程,从而大大地节省了人力物力。

PCR 方法可以从染色体和 cDNA 模板中迅速扩增得到目的基因,但该方法只能用于已知序列的基因或与其同源性高的未知序列基因,且扩增产物 DNA 序列发生差错的概率高达 0.25%。尽管如此,PCR 扩增方法因其快速简便的优点仍得到广泛的运用。

PCR 技术的原理和方法请见第十二章。

第二节 分子克隆载体与宿主的选择

载体(vector)是可携带目的基因并将其转入宿主细胞内进行扩增的工具。用上节分离得到的目的基因,即使能够单独进入到宿主细胞,也不能够增殖和表达。目的基因只有与适当的载体相连接,并由其引入相应的宿主细胞,才能在新的宿主细胞中得到增殖和表达。

在选择克隆目的基因的载体时,根据目的基因的特性,要着重考虑以下几个条件:

1. 必须具有自主复制能力,使重组 DNA 可在宿主细胞内进行复制表达,并且拷贝数多,易与宿主细胞的染色体 DNA 分开,便于分离提纯。

2. 相对分子质量较小,易于进行操作,并且有足够的接纳目的基因的容量。

3. 与宿主细胞有一个或多个利于检测的筛选标记(如对抗生素的抗性、营养缺陷型或显色表型反应等),最好具有两个以上的遗传标志基因,以分别用于检测重组和转化的成功与否。

4. 在非必要的 DNA 克隆区段有较多的限制性核酸内切酶的单一识别位点,易于目的基因片段与载体的连接、重组与筛选。

常用的载体除了大肠杆菌中的质粒、噬菌体、噬菌粒和粘粒四大类外,还有酵母菌质粒、枯草杆菌质粒等原核细胞克隆载体、酵母菌穿梭质粒、芽胞杆菌穿梭质粒、穿梭粘粒、反转录病毒、腺病毒以及其他动植物病毒等真核细胞克隆载体。不同的克隆载体必须选用特定的宿主细胞,我们下面介绍基因克隆常用的几种大肠杆菌中的载体和常用的大肠杆菌菌株。

一、质粒载体

质粒(plasmid)是存在于细菌染色体外的具有自主复制能力的小型环状双链 DNA 分子,分子小的为 2~3 kb,大的可达数百 kb,质粒分子能在宿主细胞内独立自主地进行复制,并在细胞分裂时恒定地传给子代细胞。按复制机制,质粒分为两类:严紧控制型质粒,它的复制受到宿主细胞的严格控制,在每个细胞中仅含 1 个或几个拷贝;松弛控制型质粒,这类质粒复制不受宿主细胞的严格控制,每个细胞中可含 10~200 个拷贝,而且当宿主细胞蛋白质合成受到抑制时,这种质粒的拷贝数可增殖至 1 000~3 000 个之多,该性质对 DNA 重组技术是十分有利的。质粒带有某些遗传信息,所以质粒在细菌内的存在会赋予宿主细胞一些新的遗传性状,如对某些抗生素或重金属的抗性等。根据质粒赋予细菌的表型可识别质粒的存在,这是筛选转化子细菌的依据。质粒分为天然质粒与人工改造质粒,DNA 重组技术都是使用人工改造质粒作为载体。质粒一般只能接受小于 15 kb 的外源 DNA 插入片段,插入片段过大,会导致重组子扩增速度减慢,甚至使插入片段丢失。常用的质粒有 pBR322、pUC 系列等。

(一) pBR322 质粒

pBR322 是由一系列大肠杆菌质粒通过 DNA 重组技术构建而成的环状双链 DNA 克隆载体。它的分子较小,为 4.36 kb,一个复制起始点,复制子为 pMB1,松弛控制型,转化的细胞生长在氯霉素的环境时能够被复制出高拷贝数,便于制备。有多个限制性内切酶的单一酶切位点用于克隆外源 DNA。有抗四环素(*Tet^r*)基因和抗氨苄青霉素(*Amp^r*)基因两个便于选择的抗药性标记,当缺失抗药性基因的大肠杆菌被 pBR322 质粒转化后便从该质粒获得抗生素抗性。两个抗生素抗性基

因中均含有供插入外源 DNA 用的不同的单一酶切位点,插入外源 DNA 后该基因即失活。因此它是一种适合多方面应用的克隆载体,其酶切图谱如图 8-2 所示。

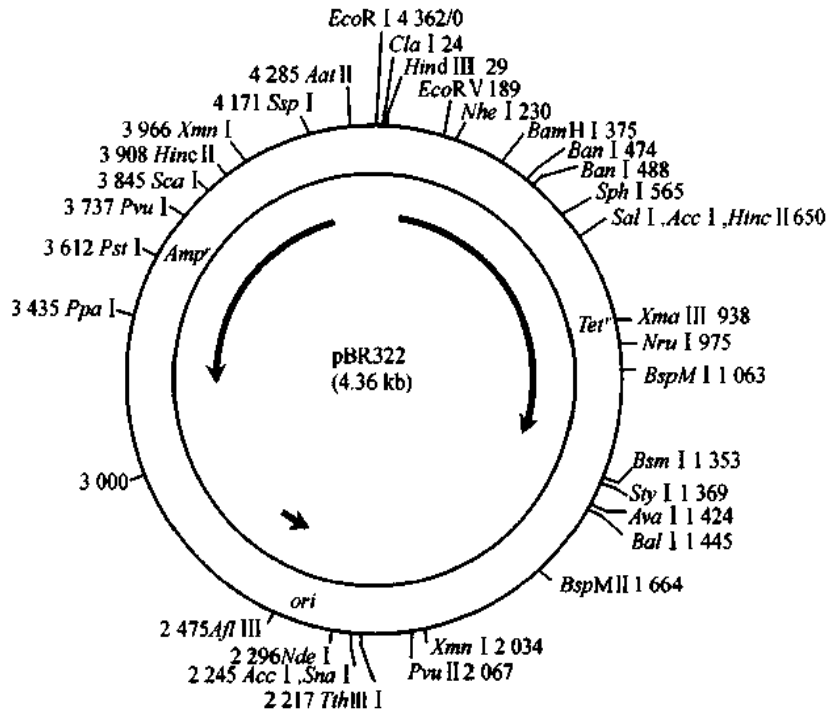


图 8-2 质粒 pBR322 的酶切图谱

(二) pUC18/19 质粒

pUC18/19 质粒是由大肠杆菌 pBR 质粒与 M13 噬菌体改建而成的环状双链 DNA 克隆载体,因此它具有这两者的共同优点。pUC18/19 长度为 2.69kb,有一个来自 pBR322 的复制起始位点、一个氨苄青霉素抗性基因、一段大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 的启动子及其编码 α -肽的 DNA 序列,此结构特称为 *lacZ'* 基因;一个位于 *lacZ'* 基因中的靠近 5' 端的一段多克隆位点 (MCS) 区段,但它不破坏 *lacZ'* 基因的功能。用 pUC 质粒转化有突变的大肠杆菌 (*gal⁻* 大肠杆菌) 时,由于质粒表达的 α -肽补充了大肠杆菌缺失的 α -肽,使其能产生有活性的 β -半乳糖苷酶,恢复分解半乳糖的能力,在加入 IPTG 和 X-gal 的培养基上长出蓝色菌落,这种现象称为 α 互补效应。当外源的 DNA 片段克隆到 pUC 的这个区段,就不能产生正常的 α -肽,也不能产生有活性的 β -半乳糖苷酶,在加入 IPTG 和 X-gal 的平板上将出现白色菌落,这就是鉴别载体内有无插入片段的蓝白筛选。pUC18 和 pUC19 同 M13 系列一样,也是成对的,相对于 *lacZ* 启动子的克隆区中限制性内切酶的多克隆位点以互为相反的方向排列。在 pUC18 中 *EcoR* I 位点紧接于 *P_{lac}* 下游,下面依次为 *Sac* I、*Kpn* I、*Sma* I (*Xma* I)、*Bam* HI、*Xba* I、*Hinc* II (*Sal* I、*Acc* I)、*Pst* I、*Sph* I、*Hind* III 位点。而在 pUC19 中则把顺序颠倒过来,是 *Hind* III 位点紧接于 *P_{lac}* 下游,最末是 *EcoR* I 位点。由于 pUC18/19 质粒具有分子较小,拷贝数多,易于检测重组子等便于分子克隆的优点,因此 pUC18/19 质粒是比 pBR322 用途更广泛的克隆载体。质粒 pUC18/19 的酶切图谱如图 8-3 所示:

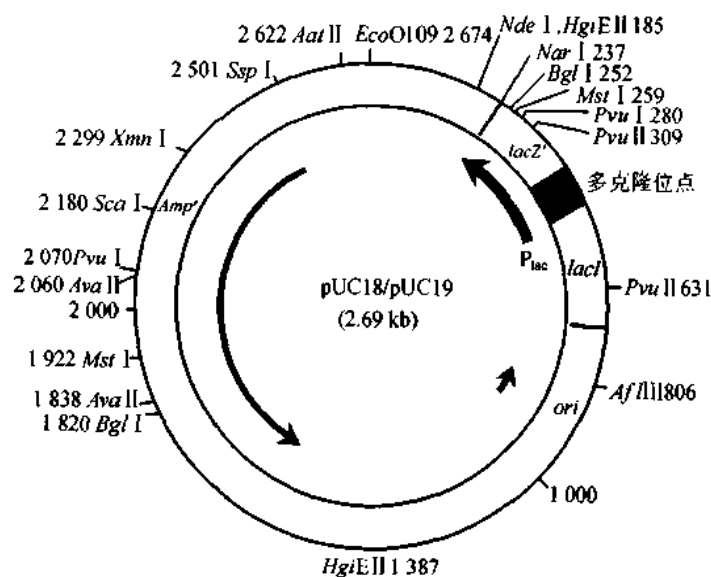


图 8-3 质粒 pUC18/19 的酶切图谱

二、噬菌体

噬菌体(phage)是一类细菌病毒的总称,有双链噬菌体与单链丝状噬菌体两大类。前者为 λ 噬菌体类,后者包括 M13 噬菌体和 ϕ 1 噬菌体。

λ 噬菌体(phage λ)是一种大肠杆菌病毒。 λ 噬菌体的基因组 DNA 约为 50 kb,在宿主体外为蛋白质包裹着双链线状 DNA 分子的颗粒结构,在线状分子末端分别有突出的 12 bp 单链结构(称为 COS 位点),COS 位点的核苷酸顺序完全互补。由于包装方面的原因,克隆的 DNA 与载体 DNA 相加,长度大于 λ 噬菌体基因组 105% 或小于 75% 时,重组噬菌体的活力会大大下降。根据克隆的方式不同, λ 噬菌体载体分为插入型载体和取代(置换)型载体两类,插入型的载体(λ gt 系列,适用于 cDNA 克隆)中只含有某一限制性核酸内切酶的一个酶切位点,在该切口中插入目的基因。这类载体允许克隆的外源 DNA 长度较小,一般为 7 kb 左右,如 λ gt10、 λ gt11 等。置换型载体(EMBL 系列,适用于基因组 DNA 克隆)含有某一限制性核酸内切酶的两个切点,切点之间的 DNA 片段可被目的基因替代。若未插入目的基因,则 λ DNA 太小,不能包装,这类载体允许克隆的外源 DNA 片段长度可达 30 kb。由于 λ 噬菌体允许克隆的外源 DNA 片段长度较大,所以广泛地应用于构建基因组 DNA 文库和 cDNA 文库。

M13 噬菌体是一种丝状的噬菌体,单链闭环状 DNA,长约为 6 400bp,只能感染雄性大肠杆菌,进入大肠杆菌后复制成双链的复制型(RF),并不断释放成熟的单链噬菌体。M13 载体克隆外源 DNA 的实际能力十分有限,一般仅为 1.5 kb。人们选用 M13 系列作载体主要用于测定序列时制备单链 DNA 模板及单链特异性 DNA 探针(检测 RNA 用)。

三、噬菌粒

噬菌粒(phagemid)是由质粒与单丝噬菌体(M13 噬菌体)结合而构成的载体系列。它既具有质粒的特性和复制起点,又有噬菌体的特性和复制起点。相对分子质量一般为 3 kb,可以克隆长达

10 kb 的外源 DNA 的单链序列。最常见的噬菌粒是 pUC118/119,它是在 pUC18/19 的基础上改建而成的。含有 M13 噬菌体 DNA 合成的起始、终止以及 DNA 包装进入噬菌体颗粒所必需的顺式序列。因此 pUC118/119 除了具有 pUC18/19 的所有特性外,还可以合成出单链 DNA 拷贝,并包装成噬菌体颗粒分泌到培养基中。

四、粘粒

粘粒(cosmid)就是粘性质粒,又叫柯斯质粒,它是由质粒和 λ 噬菌体的 cos 粘性末端构建而成的载体系列。粘粒的基因组包含有质粒的复制起始位点、一个或多个限制性内切酶位点、抗药性标记和 λ 噬菌体的 cos 粘性末端,粘粒兼具有 λ 噬菌体和质粒两方面的优点。粘粒自身分子大小约 4~6 kb,允许克隆的外源 DNA 片段长度为 31~45 kb,而且能被包装成为具有感染性能的噬菌体颗粒。常用的粘粒有 pJ 系列和 pH 系列。如 pHC79 粘粒就是由 λ 噬菌体片段与 pBR322 质粒构建而成。粘粒可用于真核细胞基因组文库的构建。

五、宿主细胞

对于不同的克隆载体必须选用特定的宿主细胞,大肠杆菌质粒,噬菌体载体的宿主细胞自然都是大肠杆菌,下面介绍常用的大肠杆菌菌株(表 8-1)。

对于质粒 pBR322 可使用 HB101、C600、K802 菌株,宿主细菌采用 LB 培养基,选择质粒培养基用 LB 加 100 μg/ml 氨苄青霉素。

对于 pUC 质粒、M13 噬菌体可使用 TG I、JM103、JM109 菌株。

表 8-1 常用的大肠杆菌菌株

菌株名称	主要特性及用途
HB101	是大肠杆菌 K12 与大肠杆菌 B 的杂交菌株,常用于大规模制备抑制型菌株
C600	常用于制备裂解物及增殖 λgt10 的抑制型菌株
K802	常用于增殖 λ 噬菌体及其重组体的抑制型菌株
TGI	是 JM101 的 EcoK ⁻ 衍生菌株,对转染的 DNA 既无修饰作用,也无限制作用,它是能支持带琥珀突变的载体生长的宿主菌株
JM103	一种常用于 M13 系列噬菌体的增殖与转染,并支持带琥珀突变的载体生长的宿主菌株
JM109	对转染的 DNA 有修饰作用而无限制作用,它支持带琥珀突变的载体生长的重组缺陷的抑制型菌株

第三节 分子克隆常用的工具酶

在 DNA 重组技术中,是利用各种不同的工具酶来对基因进行相应的加工处理操作。例如,利用能识别特异序列的限制性核酸内切酶在准确的位置进行切割,得到完整的目的基因片段,或把环状的质粒 DNA 切割成线性的质粒 DNA 片段。构建重组 DNA 分子时,是利用 DNA 连接酶的作用使目的基因 DNA 片段与克隆载体共价连接。此外,还有一些工具酶也都是 DNA 重组时必不可少的。现将一些常用工具酶概括于表 8-2。

表 8-2 DNA 重组技术中常用工具酶

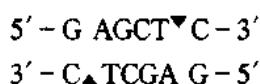
工 具 酶	功 能
限制性核酸内切酶	识别特异序列,切割 DNA
DNA 聚合酶 I	a. 合成双链 cDNA 的第二条链 b. 切口平移制备高比活性探针 c. DNA 序列分析 d. 填补 3' 末端
反转录酶	a. 合成 cDNA b. 替代 DNA 聚合酶 I 进行填补,标记或 DNA 序列分析
DNA 连接酶	催化 DNA 中相邻的 5'磷酸基和 3'羟基末端之间形成磷酸二酯键,使 DNA 切口封合或使两个 DNA 分子或片段连接
末端转移酶	在 3'羟基末端进行同聚物加尾
多聚核苷酸激酶	催化多聚核苷酸 5'羟基末端磷酸化,或标记探针
碱性磷酸酶	切除末端磷酸基

一、限制性核酸内切酶

在所有工具酶中,限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)具有特别的重要意义。所谓限制性核酸内切酶就是能够识别和切割双链 DNA 分子内特定核苷酸序列的一类内切酶,简称为限制酶(restriction enzyme, RE)。限制性核酸内切酶存在于细菌体内,与相伴存在的甲基化酶共同构成细菌的限制修饰体系,限制外源 DNA、保护自身 DNA,对细菌遗传性状的稳定遗传具有重要意义。目前发现的限制性核酸内切酶约有 2 千种,根据酶的组成,所需因子及裂解 DNA 方式的不同,可将限制性核酸内切酶分为 I 型、II 型和 III 型。重组 DNA 技术中常用的限制性核酸内切酶主要为 II 型酶,例如 *EcoR* I、*Bam* H I 等就属于这类酶。大部分 II 型酶识别 DNA 位点的核苷酸序列都是所谓的回文对称结构(palindrome),即同一条单链以中心轴对折可形成互补的双链。不同限制性内切酶不仅识别的序列不同,而且切割 DNA 后产生的片段的末端也是不同的,下面即为 *Bam* H I 识别序列,箭头处为 *Bam* H I 切割位点,它产生 5'突出的粘性末端。



还有一些限制性内切酶产生具有 3'突出的粘性末端,如 *Sst* I。



而另一些限制性内切酶切割 DNA 后产生平头或钝性末端,如 *Sma* I。



限制性内切酶识别 DNA 中核苷酸序列长度大多为 4~6 bp 最大为 8 bp,如果 DNA 序列是随机的,若识别位点为 4 bp,则 $4^4 = 256$ bp 可遇到一个切点,若为 6 bp,则平均 4^6 即 4 kb 遇到一个切点,8 bp 识别位点出现的间隔约为 65 kb。

有一些来源不同的限制性内切酶的识别位点具有相同的核苷酸序列,这类酶被称为同裂酶或异源同工酶,具有相同的识别顺序,切割 DNA 的方式可以相同,也可以不同。有一些同裂酶对于切割位点上的甲基化碱基的敏感性有所差别,故可用来研究 DNA 甲基化作用,如 *Sma* I 和 *Xma* I; *Hpa* II 和 *Msp* I; *Mbo* I 和 *sau* 3A 即为成对的同裂酶。与同裂酶对应的一类限制性内切

酶,它们虽然来源各异,识别序列也各不相同,但都产生出相同的粘性末端,被称为同尾酶。常用的限制性内切酶 *Bam*H I、*Bcl* I、*Bgl* II、*Sau* 3A 和 *Xho* II 就是一组同尾酶,它们切割 DNA 之后都形成由 GATC 4 个核苷酸组成的粘性末端。显而易见,由同尾酶所产生的 DNA 片段,是能够通过其粘性末端之间的互补作用而彼此连接起来的,因此在基因克隆实验中很有用处。但必须指出,由两种同尾酶消化产生的粘性末端,重组之后所形成的序列结构一般不能被原来的任何一种同尾酶所识别。常用限制性核酸内切酶的特性见表 8-3。

表 8-3 常用限制性核酸内切酶的特性

酶名称	识别序列	同裂酶	同尾酶	切割位点数目		
				λ DNA	SV40	pBR322
<i>Ava</i> I	C▼PyCGPuG		<i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I	8	0	1
<i>Bam</i> H I	G▼GATCC		<i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Mbo</i> I, <i>Sau</i> 3A, <i>Xho</i> II	5	1	1
<i>Bcl</i> I	T▼GATCA		<i>Bam</i> H I, <i>Bgl</i> II, <i>Mbo</i> I, <i>Sau</i> 3A, <i>Xho</i> II	7	1	0
<i>Bgl</i> II	A▼GATCT		<i>Bam</i> H I, <i>Bcl</i> I, <i>Mbo</i> I, <i>Sau</i> 3A, <i>Xho</i> II	6	0	0
<i>Cla</i> I	AT▼CGAT		<i>Acc</i> I, <i>Acy</i> I, <i>Azy</i> II, <i>Hpa</i> II, <i>Taq</i> I	15	0	1
<i>Eco</i> R I ⁽¹⁾	G▼AA* TTC			5	1	1
<i>Eco</i> R II ⁽²⁾	▼CC(A/T)GG	<i>Atu</i> I, <i>Apy</i> I		>35	16	0
<i>Hae</i> III	GG▼C* C	<i>Bsp</i> R I, <i>Bsu</i> R I		>50	19	22
<i>Hga</i> I ⁽³⁾	GACGC(N) ₅ ▼ CTGCG(N) ₁₀ ▲			>50	0	11
<i>Hha</i> I	GC* G▼C	<i>Fnu</i> D III, <i>Hin</i> P I		50	2	31
<i>Hinc</i> II	GtPy▼AC	<i>Hind</i> II,		34	7	2
<i>Hind</i> II	GtPy▼AC	<i>Hinc</i> II, <i>Hin</i> JC I		34	7	2
<i>Hind</i> III	A* ▼AGCTT	<i>Hsu</i> I		6	6	1
<i>Hinf</i> I	G▼ANTC	<i>Fnu</i> A I		>50	10	10
<i>Hpa</i> I	GTT▼AAC			13	4	0
<i>Hpa</i> II	C▼C* GG	<i>Hap</i> II, <i>Mno</i> I	<i>Acc</i> I, <i>Acy</i> I, <i>Asu</i> II, <i>Cla</i> I, <i>Taq</i> I	>50	1	26
<i>Kpn</i> I	GGTAC▼C		<i>Bam</i> H I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> II	2	1	0
<i>Mbo</i> I	▼GATC	<i>Dpn</i> I, <i>Sau</i> 3A I		>50	8	22
<i>Pst</i> I	CTGCA▼G	<i>Sal</i> P I, <i>Sf</i> II		18	2	1
<i>Pvu</i> II	CAG▼CTG			15	3	1
<i>Sac</i> II	CCGC▼GG	<i>Csc</i> I, <i>Sst</i> II		>25	0	0
<i>Sal</i> I	G▼TCGAC	<i>Hgi</i> C III, <i>Hgi</i> D II	<i>Ava</i> I, <i>Xho</i> I	1	0	0
<i>Sau</i> 3A	▼GATC	<i>Mbo</i> I	<i>Bam</i> H I, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Mbo</i> I, <i>Xho</i> II	>50	8	22
<i>Sma</i> I	CCC▼GGG	<i>Xma</i> I		3	0	0
<i>Sst</i> I	GAGCT▼C	<i>Sac</i> I		2	0	0
<i>Xba</i> I	T▼CTAGA			1	0	0
<i>Xho</i> I	C▼TCGAG	<i>Blu</i> I, <i>Pae</i> R7 I	<i>Ava</i> I, <i>Sal</i> I	1	0	0
<i>Xma</i> I	C▼CCGGG	<i>Sma</i> I	<i>Ava</i> I	3	0	0

识别序列用一条链按 5'→3' 方向表述,箭头所指系切点位置。Py 代表嘧啶碱基 C 或 T, Pu 代表嘌呤碱基 A 或 G。有的碱基已经知道被相应的特定的甲基化酶所修饰,则用星号(*)表示。A* 代表 N⁶-甲基腺嘌呤, C* 代表 5'-甲基胞嘧啶。

注释:

(1)、(2) 这两个酶的名称不是按规则命名的,控制这两个酶的基因分别定位在两个抗性转移基因上。因此叫做 R I 和 R II。

(3) *Hga* I 是 II 型限制性核酸内切酶,其切点位置如下:5' GACGCNNNNN▼

3' CTGCGNNNNNNNNNN▲

各种限制性内切酶均有其最适反应条件,如温度、pH、盐离子强度等。不同的限制酶,具有不同的最适温度,大多数限制性内切酶的最适温度在 37℃,但也有许多例外,如 *Sma*I 是 25℃; *Mae*I 45℃; *Bcl*I 50℃; *Mae*III 55℃; *Bst*II 60℃; *Taq*I 65℃ 等。不同的限制性内切酶需要的酶解缓冲液可能不同,在反应条件不恰当时,某些限制性内切酶会出现“星号”活力,即它不再严格遵循从识别序列酶解 DNA,而会在其他的序列中切断 DNA。在购买限制性内切酶时一般都会提供其 10× 反应缓冲液,使用起来十分方便。

在适当反应条件下(包括温度、pH、离子强度等),1 h 内完全酶解 1 μgλ 噬菌体 DNA 中所有特定识别切点所需要的限制性内切酶的量,定义为 1 个活性单位。所以理论上计算酶解靶 DNA 所需的某种限制性内切酶的活性单位时,可以根据它在 λDNA 上的酶切位点数进行推算。而在实际应用时,由于影响限制性内切酶反应的因素很多,DNA 制品中的污染(如蛋白质、酚、氯仿、乙醇、EDTA、SDS、高盐浓度)均能抑制酶切活性。这种抑制可通过增加酶量(10~20U/μg DNA),增大反应体积来稀释可能的抑制剂或延长反应时间来加以克服。消化超螺旋或病毒 DNA 较线状 DNA 需要更大的酶量(20 倍以上)。但是许多限制性内切酶在超量过大的情况下又会导致识别顺序的特异性下降而产生星号活力,因而也不能过分加大酶的用量,所以我们通常使用理论计算值的 3~5 倍,采用较长的反应时间(2~3 h,有时甚至消化过夜,12~16 h),以保证切割完全。

商品化的限制性内切酶为避免酶蛋白的反复冻融,多保存于 50% 的甘油缓冲液中, -20℃ 存放是很稳定的,限制酶的体积不能超过反应总体积的 1/10,否则酶活性会因为甘油浓度太大而受到抑制或出现星号活力。

二、DNA 聚合酶

DNA 重组技术中经常使用的 DNA 聚合酶(DNA polymerase)有大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(全酶)、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 大片段酶(Klenow 酶)、T4DNA 聚合酶、T7 DNA 聚合酶、修饰的 T7 DNA 聚合酶、Taq 酶以及反转录酶等。这些 DNA 聚合酶的共同特点在于,它们都能够把脱氧核糖核苷酸连续地加到双链 DNA 分子引物链的 3' 羟基末端。

(一) 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(全酶)

它是由大肠杆菌 poly(A) 基因编码的一种单链多肽,相对分子质量为 109×10^3 。具有三种酶活性,即 5'→3' 聚合酶活性、5'→3' 外切酶活性和 3'→5' 外切酶活性。它在分子克隆中的主要用途是,通过 DNA 切口平移,制备供核酸分子杂交用的带放射性标记的 DNA 探针。

(二) Klenow 聚合酶

它是由大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(全酶)经枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)的处理之后,产生出来相对分子质量 76×10^3 的大片段分子。Klenow 聚合酶仍具有 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 外切酶活性,但是失去了 5'→3' 外切酶活性。其主要用途有:修补经限制酶消化所形成的 DNA 3' 隐蔽末端;标记 DNA 片段的末端;cDNA 克隆中的 cDNA 第二链的合成;DNA 序列测定。

(三) Taq DNA 聚合酶

来源于栖热水生菌,相对分子质量 65×10^3 。具有 5'→3' 聚合酶活性和 5'→3' 外切酶活性,该酶耐热,高温时仍然稳定,最佳反应温度为 75~80℃,Taq DNA 聚合酶主要用于聚合酶链反应, DNA 序列测定。

(四) 反转录酶

反转录酶(reverse transcriptase)又叫做依赖 RNA 的 DNA 聚合酶或 RNA 指导的 DNA 聚合酶。它是一种多功能性酶,具有 5'→3'聚合酶活性、5'→3'外切酶活性,无 3'→5'外切酶活性,所需模板可以是 RNA,也可以是 DNA,引物是带 3'羟基的 RNA 或 DNA。目前,已经从许多种 RNA 肿瘤病毒中分离到这种酶,但最普遍使用的则是来源于鸟类成骨髓母细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus AMV)的反转录酶。

以 mRNA 为模板合成 cDNA,是反转录酶的最主要用途。由于真核生物的基因组相当复杂,使我们几乎无法从这些细胞中直接克隆某种特定的基因,但是,如果我们从这种特定基因的 mRNA 模板合成出 mRNA 的单链 cDNA 拷贝,然后再合成为双链 cDNA 分子,就相对容易。此外,还可以用来对有 5'突出末端的 DNA 片段作末端标记。

三、DNA 连接酶

DNA 连接酶(DNA ligase)可使两段 DNA 的 3'羟基末端和 5'磷酸末端形成 3',5'-磷酸二酯键,把两个 DNA 片段连接成一个共价结合的 DNA 片段。最常使用的是 T4 连接酶,其相对分子质量为 68×10^3 ,它有很高的连接效率,既可用于粘性末端的连接,也可用于平末端的连接。连接反应的温度是影响连接效率的最重要的因素之一,虽然 T4 连接酶的最佳反应温度是 37℃,但由于在这个温度下,粘性末端之间氢键的结合不够稳定,通常采用在低温 4~26℃ 进行连接反应。一般说来,片段越小,末端粘性越强,连接反应则可使用较高的温度。对于平末端的连接效率则低得多,一般在 10~20℃ 进行,且需要较高的末端浓度和 T4 连接酶的浓度。另一种 DNA 连接酶是大肠杆菌 DNA 连接酶,一般只用于粘性末端的连接。

四、末端脱氧核苷酸转移酶

末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase),催化一种或多种核苷酸连接到一个 DNA 片段的 3'羟基末端,形成同聚尾巴。其用途是使 DNA 片段的两端都接上一个同聚尾,可避免 DNA 片段自身粘合成环,即避免自我环化的形成。

五、核酸酶

核酸酶 SI(nuclease SI):又称单链特异的核酸酶。其功能是降解双链 DNA 或单链 RNA 形成 5'磷酸末端的单核苷酸或寡核苷酸片段。

六、脱氧核糖核酸酶

脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)可使双链 DNA 或单链 DNA 链的内部随机降解,形成带有 5'-磷酸末端的单或寡核苷酸混合物。因此,DNase I 是一种非限制性核酸内切酶。在 Mg^{2+} 存在时, DNase I 独立地降解双链 DNA 的每一条链。主要用于切口平移法标记放射性探针。

七、碱性磷酸酶

细菌碱性磷酸酶(BAP)和牛小肠碱性磷酸酶(CIP)能特异地切除 DNA 或 RNA 的 5'末端的磷酸基团,其底物可以是双链 DNA、单链 DNA 或 RNA,也可以是核糖或脱氧核糖核苷三磷酸。主要用于基因重组中,切除载体 DNA 5'末端的磷酸基团,阻止载体的自身环化。在用 ^{32}P 标记 DNA 5'

末端之前,除去磷酸。

第四节 DNA 限制性内切酶酶切及片段回收

在得到含有目的基因的 DNA 片段以及提纯的质粒闭环载体后,并不能直接把它们连接起来。实现目的基因与载体的重组,还需要利用限制性内切酶分别把它们切开,利用凝胶电泳把酶切后不同的 DNA 片段相互分离开来,从凝胶中回收所需的的目的基因片段和载体 DNA 的线性片段并加以纯化,以便下一步把它们连接成重组体。

一、限制性内切酶运用的设计

构建体外重组 DNA 分子,必须清楚地了解目的基因和载体的酶切图谱。所选用的限制性内切酶只能在目的基因的两端有酶切位点,而在目的基因内部不能有酶切位点。这样用一种或两种限制性内切酶就能切割得到完整的目的 DNA 基因。且所选用的酶在使用的载体上也只能有单一的酶切位点,如果这些位点又正好是在载体的抗生素抗性基因上面,则可利用其插入失活的特性,为后面的筛选工作带来极大的便利。

用一种限制性内切酶切割闭环载体会产生相同的粘性末端,其 3'末端的羟基与 5'末端的磷酸在连接反应中可能连接起来,产生自我环化现象。为防止线性载体的自身环化,降低非重组背景,通常需使用碱性磷酸酶去除其 5'末端的磷酸基团,脱磷后的线性载体不易自身环化,但仍能与未经脱磷的与其匹配的外源 DNA 片段的末端相连接。形成的重组子上含有两个缺口(开环分子),但仍能转化细菌,并可通过菌体内的修复系统修补。但由于目的基因片段可能会从正、反向两个方向插入到载体中,甚至会出现几个目的基因串连以后再插入载体中,因而重组效率较差,将会增加筛选正确重组子的工作量。

构建体外重组 DNA 分子时,较好的方式就是对合适的载体用两种不同的限制性内切酶进行酶解(双酶切方式),产生两种不同的粘性末端或是一个粘性末端、一个平末端。由于两个末端的碱基不能相互匹配,所以载体自身不能环化。同时用限制性内切酶对目的基因 DNA 进行酶切,也产生同样的末端,当目的基因与载体相连接时,只有当目的基因的末端分别与载体上相应的末端匹配时,才能相互连接。由于目的基因片段只能以一个方向插入到重组体中,所以这种方式又称作为定向克隆。定向克隆正确重组的效率,载体自我环化形成的假阳性背景低,易于筛选出正确的重组子。

二、限制性内切酶的酶切

限制性内切酶一般都较昂贵,而且比较容易失活,保存酶的缓冲液中一般含有 10 mmol/L Tris-HCl(pH7.4),50~100 mmol/L NaCl 或 KCl(盐离子),1 mmol DTT(还原性,保持酶的活性),100~200 μ g/ml BSA(保持蛋白浓度,使酶稳定),体积分数为 50% 甘油(保存于 -20℃ 不结冰,反复冻融将会使酶蛋白失活)。要特别注意酶活力的保持,防止污染,取用后立即放回 -20℃ 冰箱保存。

厂商出售的各种限制性内切酶都配套有指定的酶切反应缓冲液,一般可将各种缓冲液归纳为三类,即高盐、中盐与低盐离子强度的缓冲液。在采用双酶切方式时要注意两种酶适用的缓冲液是

否一致,如果一致可在同一体系内加两种酶同时酶切。如果两种酶适用的反应缓冲液的盐离子强度不相同,原则上先加低盐缓冲液和它的酶,电泳检查切好后,再补加 $1\sim 3\ \mu\text{l}$ 1mol/L NaCl ($20\ \mu\text{l}$ 反应体积时),使 NaCl 终浓度适合另一种酶消化,并加入另一种酶继续酶切相应时间。

绝大多数酶的反应温度是在 37°C ,也有极个别的酶要求在 25°C 、 30°C 、 50°C 、 60°C 、 65°C 等。酶切反应时间通常为 $1\sim 3\ \text{h}$,有时甚至过夜($12\sim 16\ \text{h}$)。一般来说,酶的纯度不佳,酶切时间不能太长。终止酶切反应时,许多酶在 65°C 水浴中保温 $10\ \text{min}$ 就被不可逆灭活。如 *EcoRI* 置于 65°C 水浴中 $10\ \text{min}$,就丧失 95% 的酶活性,这种方法简便易行,又不损失 DNA。少数较耐温的酶,可加入终浓度为 $10\ \text{mmol/L}$ 的 EDTA,EDTA 整合了反应系统中必需的 Mg^{2+} 离子,便终止了酶切反应。有时采用酚与氯仿重新抽提、乙醇沉淀 DNA 的方式终止反应,这种方法 DNA 损失较大,但 DNA 纯度好,连接效果好。

实验中经常会遇到某个酶切不动,或某个酶消化不完全的情况。酶的质量当然是关键,酶的来源不同质量也有差异,但因为酶保存不当而失活、酶被污染,以及 DNA 的纯度也都直接影响酶切的质量。DNA 中混有的蛋白质、RNA、SDS、酚、氯仿、乙醇、EDTA 等杂质都影响酶切效果,产生切不动或使酶产生星号活力的现象。使用的酶浓度太大时也会产生星号活力。DNA 中的核酸酶、蛋白(杂酶)往往随酶切时间的延长使 DNA 严重降解。DNA 的不同构型,也影响酶切效果。

一般来说酶切 $0.2\sim 5.0\ \mu\text{g}$ 的 DNA 时,控制反应体积为 $15\sim 20\ \mu\text{l}$ 。可根据酶解 DNA 的数量,按比例适当放大体积。如果酶切反应总体积太大,会使 DNA 浓度与限制酶浓度降低,分子之间难以接触,酶切效果变差,因此反应体积小些为宜。限制性内切酶一般都得保存在 50% 甘油的缓冲液中,但是酶切反应混合物中甘油的体积分数不能超过 5% ,否则将会抑制酶的活性。当使用的限制酶活性不高必须加大限制酶的用量时,因为酶的体积不能超过反应总体积的 10% ,也要相应地扩大酶切反应的总体积。

下面是典型的单酶切反应体系与操作步骤:

H_2O	$17-X\ \mu\text{l}$
$10\times$ 酶切缓冲液	$2\ \mu\text{l}$
DNA($0.2\sim 5\ \mu\text{g}$ 溶于 TE 缓冲液)	$X\ \mu\text{l}$
限制性内切酶($1\sim 5\ \text{U}/\mu\text{gDNA}$)	约 $1\ \mu\text{l}$
<hr/>	
总体积	$20\ \mu\text{l}$

按照水、缓冲液、DNA、酶的顺序加入到 Eppendorf 管中,盖好管盖,用振荡器振荡 $2\ \text{s}$,充分摇匀,于离心机内离心 $2\ \text{s}$,以集中样品。于 37°C 水浴 $1\ \text{h}$ 后,取酶切反应液 $1\ \mu\text{l}$,加 $7\ \mu\text{l}$ TE 与 $2\ \mu\text{l}$ 溴酚蓝点样液,进行琼脂糖凝胶电泳,观察酶切反应,剩余的样品继续在 37°C 水浴 $1\ \text{h}$ 。待电泳观察酶切反应完全后,将上述反应液置 65°C 水浴中保温 $10\ \text{min}$,终止酶切反应,进行凝胶电泳分离。

对于单酶切质粒,为了减少在连接反应时的自我环化现象,可采用碱性磷酸酶进行 $5'$ 末端去磷酸处理:加入 $2\ \mu\text{l}$ $10\times$ CIP 缓冲液和 $1\ \text{U}$ CIP, 37°C 温育 $30\sim 60\ \text{min}$, 75°C 加热 $15\ \text{min}$ 终止反应。

三、琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 和 DNA 片段的回收

酶解反应液中加入 $1/6$ 体积的溴酚蓝($6\times$ 点样液),混匀后即可进行琼脂糖凝胶电泳分离。电

泳使得不同长度及不同构象的 DNA 片段在凝胶中相互分离开来, DNA 与溴化乙锭结合后在紫外光照射下可发出荧光。可在波长为 300~360 nm 的长波段紫外灯下观察 DNA 片段电泳的情况, 待需要的 DNA 片段能被清楚地分离开时, 就可以停止电泳。

从琼脂糖凝胶中回收我们需要的 DNA 片段的方法很多: 电泳洗脱法、DEAE 纤维素膜插片法、低熔点琼脂糖凝胶电泳挖块法、冻融法、玻璃珠法、QIAEX 法等。其中 DEAE 纤维素膜插片法简便易行, 回收率、纯度都很高, 对回收 500 bp~5 kb 左右大小的 DNA 片段效果很好, 但由于 5 kb 以上的 DNA 片段难以从 DEAE 膜洗脱下来, 回收率就降低很多。电泳洗脱法对大于 5 kb 的 DNA 片段较适合, 回收率与纯度都较好。低熔点琼脂糖凝胶电泳挖块法应用较广, 但如果抽提掌握不好, 会影响回收率, 它还可直接进行胶内连接, 但效率不高。冻融法、SDS 溶液浸出法等方法都极为简便, 但纯度与回收率较差。

回收的 DNA 片段一般不能直接用于连接, 还需要进一步纯化处理。要特别注意把琼脂糖去除干净, 因为 DNA 连接酶对琼脂糖的污染很敏感。

(一) 电泳洗脱法

这种方法是利用电泳方式, 把需要的 DNA 片段迁移出凝胶介质, 进入一个可以回收的小体积溶液中, 再从该溶液中纯化 DNA 片段。有多种不同的操作方式, 主要可分为利用透析袋和利用特殊的电泳洗脱槽两大类。电泳洗脱回收 DNA 片段有较好的回收效果, 质量可以满足 DNA 酶切反应和 DNA 连接反应的要求, 是最常用的回收方法之一。

1. 透析袋电泳回收法 此法是在长波紫外灯下用解剖刀挖出含需要的 DNA 片段的凝胶块, 放在装有少量电泳缓冲液的透析袋内, 然后连同透析袋放入普通电泳槽内, 用 $4\sim 5\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压进行电洗脱, DNA 片段即从凝胶迁移到透析袋内的缓冲液中, 并被透析袋所阻挡, 当用紫外灯在凝胶内观察不到 DNA, 而在透析袋内侧可以看到 DNA 的橘红色荧光时(一般约需电泳 2~3 h), 倒转正负电极电泳 1 min, 让 DNA 从透析袋的内壁回到缓冲液中。然后停止电泳, 收集透析袋内的缓冲液, 接下一步 DNA 纯化工作。

2. 透析膜槽沟回收法 本法不需特殊的电洗脱设备。DNA 酶解液经凝胶电泳分离后, 暂时停止电泳, 减少电泳槽中的缓冲液使其略低于胶面。在长波紫外灯下观察需要的 DNA 片段的条带, 在其前缘用解剖刀挖一小槽, 槽沟阳极面插入一片单层透析膜, 沟内补充适量的电泳缓冲液。然后在紫外灯的监视下继续电泳, DNA 电泳迁移到槽沟中的缓冲液后, 被透析膜阻挡不能前进。倒转正负电极电泳 1 min, 让 DNA 从透析膜上返回到缓冲液中, 停止电泳, 收集槽沟中含有 DNA 片段的缓冲液, 接下一步 DNA 纯化工作。

3. “V”字形电洗脱槽回收 在长波紫外灯下用解剖刀挖出含需要的 DNA 片段的凝胶块, 放入一个专用的电洗脱槽装置(图 8-4)进行电泳洗脱, 其原理是在“V”字形槽的底部加入高离子浓度的电泳缓冲液(5 mol/L NaCl+ 溴酚蓝), 其上部分及整个电泳外槽中加入低离子浓度电泳缓冲液($0.5\times\text{TEB}$), DNA 迁移至高离子浓度溶液区域时, 由于此处离子浓度高, 电阻小, 电压降也很小, DNA 迁移率急剧下降。因此 DNA 片段迁移出凝胶后就停留在高盐溶

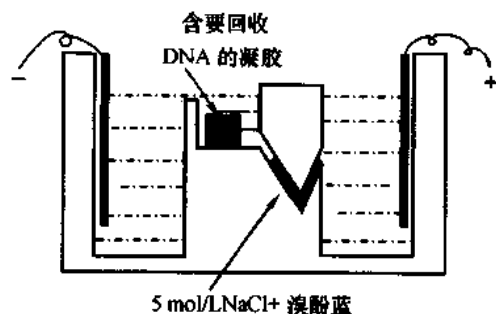


图 8-4 “V”字形槽电洗脱法示意图

液区域内,从而达到回收并浓缩 DNA 片段的目的。电洗脱时间视所用电压和 DNA 片段的大小而定,对于 5 kb 以下的片段,通电 150 V,30 min 左右即可。也可通电一定时间后在紫外灯下观察凝胶上的 DNA 是否已经被电泳洗脱下来。它不需透析膜,回收率高,洗脱体积小(50 μ l),回收的 DNA 的纯度适用于大多数工具酶反应。这种“V”字槽回收装置可以从 Pharmacia 公司及国内北京东方仪器厂购得。小心回收“V”字槽中含溴酚蓝的高盐溶液,接下一步 DNA 纯化工作。

(二) DEAE-纤维素膜回收法

DEAE(dierhylamenoethyl,二乙基氨基乙基纤维素)是一种阴离子交换纤维素,能把带有负电荷的 DNA 片段吸附转换到 DEAE 滤膜上,取出膜后,再从膜上把 DNA 洗脱出来。该方法简便易行,回收的 DNA 样品的纯度高,但对于 5 kb 以上 DNA 片段的回收率低,不宜用于 15 kb 以上的双链 DNA 及任何大小的单链 DNA 回收。

DEAE-纤维素膜使用前需要预处理,用 2.5 mol/L NaCl 浸泡几个小时后用无菌重蒸水清洗,浸泡在 1 mmol/L EDTA 溶液 4℃ 保存备用。利用普通琼脂糖凝胶电泳将 DNA 片段分离,暂时停止电泳,在需要的 DNA 所处位置的前方用解剖刀将琼脂糖凝胶切一裂隙,把一小张处理过的 DEAE 膜垂直插入,然后继续电泳约 10 min,在紫外灯下观察到所需的 DNA 片段全部进入膜中,即可停止电泳。

把 DEAE 膜用 ddH₂O 清洗后放入 Eppendorf 管中,加入 1mol 左右的 20 mmol/L TrisHCl (pH7.5),1 mmol/L EDTA,1.5 mol/L NaCl 溶液(溶液量一般为 1 ml/cm²),37℃ 保温 2 h 并不断振荡,取出 DEAE 滤膜重复一次上面的处理,在紫外灯下检查膜上的 DNA 确实已经洗脱下来后,合并 2 次高盐洗脱液,15 000 r/min 离心 10 min 后取出上清,接下一步 DNA 纯化工作。

(三) 低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法

普通琼脂糖凝胶需要加热到 100℃ 才能再次融化,那将会使双链 DNA 变性。在琼脂糖主链导入羟乙基修饰后其凝固温度降为 30℃,熔化温度降为 65℃,这一温度低于绝大多数双链 DNA 的变性温度。但是低熔点琼脂糖价格昂贵,灌注大块低熔点琼脂糖凝胶费用很高,因此改变为挖块法。

挖块法有两种方式:一种是先灌制普通琼脂糖凝胶,在加样孔前适当距离处切下一定大小的普通凝胶(一般 10 mm×10 mm 足够),用相应浓度的低熔点琼脂糖填充,然后进行点样及电泳分离;另一种是先直接在一块普通琼脂糖凝胶上进行 DNA 电泳分离,在紫外灯下观察分离良好后,再把所需要的 DNA 条带前面的普通琼脂糖凝胶用解剖刀切开挖掉一小块(可挖出比所需 DNA 区带稍大点的一块面积),用熔化了的低熔点琼脂糖把它补好,待它凝固后继续电泳。然后在紫外灯下密切注意观察所需 DNA 片段的迁移位置,一旦全部进入低熔点琼脂糖凝胶中,就可停止电泳。割取低熔点琼脂糖凝胶内的 DNA 条带,放置在 65℃ 水浴中,5~10 min 后就会融化,加入 TE 缓冲液以降低琼脂糖浓度至≤0.4%(一般为两倍胶体积),加入等体积的饱和酚剧烈振摇 5~10 min,15 000 r/min 离心 10 min 以除去琼脂糖。取出含 DNA 的上层水相,接下一步 DNA 纯化工作。由于低熔点琼脂糖的纯度较高,也可以在挖取含 DNA 条带的低熔点琼脂糖凝胶后直接用于连接,具体方法见下一节的胶内连接。

目前已有多种商品化的 DNA 回收试剂盒,可在低于 65℃ 时融化切下的普通琼脂糖凝胶块,简化了 DNA 回收的操作过程。

(四) 冻融法

本法十分简单,不需特殊试剂或设备,对较小的 DNA 片段有较好的回收效率,但回收的 DNA

中可能含有影响酶活性的污染物存在。

DNA 样品经琼脂糖凝胶电泳分离后,用小刀切出含所需 DNA 的琼脂糖凝胶条,装入 1.5 ml Eppendorf 管内捣碎,加入 200 μ l 饱和酚液,振荡混合样品后置 -80℃ 低温冰箱中冰冻 10 min, 37℃ 融化。重复 3 次后旋涡振荡,12 000 r/min 离心 10 min 使凝胶沉淀,吸出上层水相置另一管内,向含凝胶的管内再加 200 μ l TE 溶液,旋涡振荡后同上离心,吸出水相与前水相合并,接下一步 DNA 纯化工作。

四、琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的纯化

从琼脂糖凝胶中回收的 DNA 中通常仍存在有许多污染,可以采用下面两种方法处理去除。

(一) 有机溶剂直接抽提法

1. 回收的 DNA 溶液在台式高速离心机上 12 000 r/min 离心 10 min,去除凝胶残粒。
2. 为去除残留的 EB,用等体积的正丁醇抽提 DNA 溶液,振荡混合,8 000 r/min 离心 5 min,取出下层水相移入另 1 个 Eppendorf 管中。
3. 再用等体积的苯酚、酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)、氯仿/异丙醇(24:1)各抽提一次(加入有机试剂后,剧烈振摇 30 s,8 000 r/min 离心 5 min,小心地把上层水相取到另一 Eppendorf 管中)。
4. 上层水相加 0.2 倍体积的 10 mol/L 醋酸铵,2 倍体积无水乙醇,0℃ 冰浴放置 30 min,15 000 r/min 离心 10 min(琼脂糖中含有一定的硫酸根和羟基的多糖等杂质,这些物质容易与 DNA 一起从凝胶中被抽提出来,它会强烈地抑制内切酶、连接酶、聚合酶的活性,可经 2.5 mol/L 醋酸铵和乙醇沉淀处理时除去)。
5. 弃去乙醇,用体积分数为 70% 乙醇轻轻振摇,漂洗沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,倒去乙醇后,真空干燥,去除水分和乙醇。
6. 把 DNA 沉淀溶于 10 μ l TE(pH 8.0)缓冲液中备用。

(二) DEAE-Sephacel 柱层析法

本法是通过 DNA 的负电荷与阴离子交换树脂结合,去除 DNA 溶液的杂质,然后用高盐洗脱液将 DNA 洗脱下来;DEAE-Sephadex 和 DEAE-Sephacel 柱均能很好地完成这一任务。现在许多公司有这类层析柱出售,操作时应按厂家说明书进行。

1. 用 20 倍体积的 TE(pH 7.6 含 0.6 mol/L NaCl)溶液悬浮 DEAE-Sephacel,重复几次平衡树脂,于 4℃ 贮存。
2. 用 0.6 ml DEAE-Sephacel 灌制一个小柱。
3. 依次用以下溶液洗涤层析柱。

TE(pH 7.6)含 0.6mol/L NaCl	3 ml
TE(pH 7.6) .	3 ml
TE(pH 7.6)含 0.1mol/L NaCl	3 ml
4. 直接将含 DNA 的电泳缓冲液上柱,收集流出液再重新过柱 1 次。
5. 用含 0.3 mol/L NaCl 的 1.5 ml TE(pH 7.6)洗柱 2 次。
6. 用含 0.6 mol/L NaCl 的 1.5 ml TE(pH 7.6)洗柱 3 次,每份 0.5 ml 收集洗脱液。
7. 合并步骤 6 中的洗脱收集液,用等体积酚、酚/氯仿、氯仿各抽提 1 次,上清用 2 倍体积无水乙醇沉淀,70% 乙醇漂洗。干燥后,DNA 沉淀溶于 10 μ l TE 中,取 50 ng 左右 DNA 通过凝胶电泳

判断回收 DNA 的浓度和质量。

第五节 外源基因与载体的连接

DNA 的连接在本质上是一个酶促生化反应过程,含有匹配粘性末端的 DNA 片段在一起时,两个 DNA 片段的粘性末端单链间将形成碱基配对,仅在双链 DNA 上留下两个缺口:游离的 5' 末端磷酸基团以及相邻的 3' 末端羟基基团。在 DNA 连接酶催化作用下,形成磷酸二酯键封闭这两个缺口,连接成一个完整的 DNA 分子。

目的基因与载体 DNA 的连接方式很多,主要分为粘性末端连接法和平末端连接法两大类。前者是指由两段互补的粘性末端进行的连接,由于连接效率较高,得到广泛的应用,特别是对目的基因和载体都进行双酶切,产生两个不同的粘性末端,这样就能保证目的基因与载体的定向连接,有效地限制载体 DNA 分子的自我环化,降低非重组子的背景,成为 DNA 重组连接技术中的最佳方法。后者虽然适用范围很广,但是它存在连接效率低,所需酶量是前者的 10~100 倍,非重组背景高,多拷贝插入及双向插入等缺陷,因此应用受到限制。为了克服这些缺点,往往是先把平末端改造成恰当的互补粘性末端,然后按粘性末端的方式进行连接。改造的方式有利用 DNA 末端转移酶(terminal deoxynucleotide transferase)把互补的多聚核苷酸[poly(A)与 poly(T)或 poly(G)与 Poly(C)]分别接到两个 DNA 片段的末端;另外是使用人工接头(linker)法,在要连接的外源基因与载体 DNA 的末端,先接上一段互补的人工接头,这个接头通常就是内切酶的识别位点(已有多种人工接头商品出售,如 *Bam*HI 接头、*Eco*RI 接头、*Pst*I 接头等)。对于非互补的粘性末端,可采用绿豆核酸酶、Klenow 聚合酶等对其单链突出处进行削平或补齐,使它变成平末端,然后进行连接,或改造成互补的粘性末端后再进行连接。

由于粘性末端的氢键结合是不稳定的,不足以抵抗较高温度时的分子热运动,连接反应通常采用较低温度、较长时间的条件来进行。经常使用的条件是 12~16℃ 12~16 h,有时会用 4℃ 过夜。

在连接反应中除了要求有高质量的连接酶,还要求高纯度的 DNA 样品,以排除其他干扰因素。如果 DNA 样品纯度不够,其中混有的 EDTA、琼脂糖、蛋白质、各种杂酶、RNA 等都可能影响连接反应的进行。

一、粘性末端连接

对于粘性末端通常使用 T4 DNA 连接酶进行连接,可采用下面的方法:

1. 配制连接缓冲液,10×T4 DNA 连接酶缓冲液含有:

660 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)
50 mmol/L MgCl₂
50 mmol/L DTT
10 mmol/L ATP

2. 在 Eppendorf 管中依次加入:

10×连接缓冲液 1 μl
载体 DNA 200 ng

外源 DNA	1~3 倍载体摩尔数
T4 DNA 连接酶	1 μ l (0.1U)
加 ddH ₂ O	至总体积为 10 μ l

3. 盖紧盖子,用手指轻弹 Eppendorf 管,混匀样品,在离心机上转 2 s,把样品集中在管底。

4. 放在 15℃ 水浴中连接过夜(12~16 h)。

连接反应完成后,即可用于下一步的转化。

二、平末端的连接

理论上利用 T4 DNA 连接酶可使任何平末端的 DNA 片段相互连接起来,这给不同 DNA 分子的连接带来极大的方便,因为除了某些限制性内切酶直接产生平末端外,3'突出或 5'突出的粘性末端通过一定的修饰也能产生平末端。但是平末端的连接的效率较低,主要是 T4 DNA 连接酶对于平末端的 K_m 值约比粘性末端高 1 000 倍。平末端的连接条件也较严格,主要是以下几条:

1. ATP 的浓度不能高于 0.5 mmol/L。
2. Mg^{2+} 浓度不能低于 5 mmol/L。
3. 极高的连接酶浓度(50 weiss 单位/ml)。
4. 较高的 DNA 浓度。
5. 不存在亚精胺一类的多胺。
6. 需要加入凝聚剂。

常用的凝聚剂有聚乙二醇(PEG-8000),最终体积分数为 15%;或用氯化六氨合高钴,终浓度为 1.0~1.2 μ mol/L。对于使用 T4 DNA 连接酶进行平末端连接,可在 Eppendorf 管中依次加入:

10×连接缓冲液	1 μ l
载体 DNA	200 ng
外源 DNA	3~5 倍载体摩尔数
40% PEG-8000	2.7 μ l
T4 DNA 连接酶	1 μ l (1 U)
加 ddH ₂ O	至总体积为 10 μ l

在 15℃ 水浴中连接过夜。

三、DNA 的胶内连接

DNA 的胶内连接,就是从电泳分离后的低熔点琼脂糖凝胶上直接切下所需的 DNA 片段,不经纯化连同凝胶一起与载体 DNA 进行连接。这种胶内连接方法简便快速,对粘末端与平末端的连接都可采用此法。与常规的连接方法相比,该法连接效率较低,但可通过增加目的 DNA 片段与载体 DNA 片段的含量,以及连接酶的量来弥补。具体方法如下:

1. 连接前先配制 3 份 2×T4 DNA 连接酶反应混合液

Tris·Cl(pH 7.6)	1 mol/L	1.0 μ l
MgCl ₂	100 mmol/L	1.0 μ l
DTT	200 mmol/L	1.0 μ l
ATP	10 mmol/L	1.0 μ l

ddH ₂ O	5.0 μ l
T4 DNA 连接酶	1 μ l(1 U)

2. 在紫外灯下回收含目的 DNA 片段的低熔点琼脂糖凝胶,尽可能去除不含 DNA 片段的凝胶,一般体积为 40~50 μ l,放入一个 Eppendorf 管中。

3. 在 65℃ 水浴中保温 10~15 min,让胶块融化,并于振荡器上振匀。

4. 按照 2 比 1 的分子比例,取出适量融化的含目的 DNA 胶液,与 37℃ 预热的已酶切成线性的载体 DNA 溶液混匀,总体积为 10 μ l,放于另一新的 Eppendorf 管子中,另取同样量的目的 DNA 胶液作为阴性对照管,未酶切的载体 DNA 作为阳性对照管,均加 ddH₂O 使总体积为 10 μ l。

5. 将三只 Eppendorf 管 37℃ 保温 5~10 min,每管加入 10 μ l 冰上预冷的 2×T4 DNA 连接酶反应混合液,在琼脂糖凝固前立即混匀,16℃ 连接反应过夜(12~16 h)。

6. 转化前,将胶内连接液于 65℃ 保温 10~15 min,转化时取 5~10 μ l,小心快速与感受态细胞混匀后,再按常规转化步骤进行。

第六节 重组 DNA 导入宿主细胞

体外连接的 DNA 重组分子必须导入合适的受体细胞才能进行增殖和表达。受体细胞又称为宿主细胞,分为原核细胞和真核细胞两类。前者主要是大肠杆菌、链霉菌及枯草杆菌等,后者包括酵母菌及哺乳动物细胞。

以质粒为载体构建的重组体导入宿主细胞的过程称为转化(transformation);以噬菌体为载体构建的重组体导入宿主细胞的过程称为转染(transfection)。

影响转化效率的因素很多,最主要的因素是要建立一个合适的载体、受体系统。在微生物领域中,现有的载体受体系统有:大肠杆菌系统、酵母系统、枯草杆菌系统等。正在研究的有棒状杆菌、高温菌、芽胞杆菌、放线菌等系统。目前在 DNA 重组技术中应用最普遍的是大肠杆菌系统,本节也以质粒 DNA 转化大肠杆菌为例来介绍转化技术。外源重组 DNA 导入细胞的方法,因宿主细胞不同而异。对于大肠杆菌来说,主要有氯化钙转化法和电穿孔转化法二种。

在受体细菌基因组上不应存在载体的筛选标记基因,两者组成一对互补系统。如质粒 pBR322 以 *Amp^r* 和 *Tet^r* 基因作筛选标记,受体细菌则用 *Amp^s* 和 *Tet^s* 的大肠杆菌 HB101 细菌;pUC18、pUC19 和 M13 用 *lacZ* 基因作筛选标记,则需用 *lac⁻* 的大肠杆菌 JM103 等作受体细菌。

一、大肠杆菌的转化

细菌处于容易接受外源 DNA 的状态叫感受态,重组 DNA 转化细菌技术的关键就是通过物理或化学的方法,人工诱导细菌细胞成为敏感的感受态细胞(competent cell),以便外源重组 DNA 进入细菌内。

处于对数生长期早、中期的大肠杆菌细胞,经冰冷的 CaCl₂ 处理后,使其成为感受态细胞。将感受态细胞与重组体质粒 DNA 放置在冰浴中,经突然短暂热休克(42℃ 1~2 min)冲击处理,则更有利于细胞对 DNA 复合物的摄取,外源 DNA 分子通过吸附、转入、自稳而进入细胞内,并开始进行复制和表达。

1. 感受态细菌的制备(需无菌操作)

(1) 取一个单菌落菌种接种于 2 ml LB 培养液中, 37℃ 摇床振荡(250 r/min)培养过夜(约 16 h)。

(2) 取 0.5 ml 上述菌液(A_{590} 约为 1.5)转接到 50 ml LB 培养液中(接种量按菌液质量浓度而定, 一般为 10g/L), 于 37℃ 摇床振荡培养至对数生长期中期(A_{590} 约为 0.2~0.4, 一般需 2~3 h)。

(3) 菌液置冰浴 10 min, 于 4℃ 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。

(4) 取 1/2 菌液体积即 25 ml, 100 mmol/L 冰冷的 CaCl_2 溶液加入到离心管中, 把菌体悬浮在溶液中, 冰浴 10~15 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。

(5) 取 2 ml, 100 mmol/L 冰冷的 CaCl_2 溶液加入到离心管中, 把菌体悬浮, 按每份 200 μl 分装于预冷的无菌 Eppendorf 管中, 4℃ 存放。

这种新鲜感受态细胞 4℃ 保存可使用一周, 而在制备 24~48 h 后转化效率最高, 以后效率再逐渐降低。如需较长时间保存感受态细胞, 可将制备好的感受态细胞内加入终浓度为 10% 的灭菌甘油-70℃ 冻存, 可保存数周到数月, 解冻后即可使用。

2. 转化(需无菌操作)

(1) 取感受态细胞 200 μl , 加入 2.5 μl 含 40 ng 的重组质粒 DNA 溶液, 温和混匀, 冰浴放置 30 min。为了检测转化反应是否成功, 在此操作同时应设立两个对照组: 阳性对照组, 在 200 μl 感受态细胞中加入 2.5 μl 或 10 ng 未经酶切的载体质粒 DNA; 阴性对照组即不加任何 DNA 的感受态受体细菌。

(2) 迅速转入 42℃ 水浴 90 s, 再迅速放回冰中, 将细胞冷却 2 min 后, 加入 800 μl LB 培养基, 37℃, 水浴 5 min, 然后 37℃ 250 r/min, 振荡培养细菌 60 min, 让细菌复苏, 使进入细菌中的质粒表达抗生素抗性蛋白。

(3) 在已准备好的固体 LB(含适当浓度的抗生素)培养皿上, 各加入 10 μl 和 100 μl 转化菌液, 涂匀。室温下放置 20~30 min, 待溶液被琼脂吸收后, 倒置平皿, 37℃ 培养一般 12~16 h 后可出现菌落。

由于皿中抗生素的筛选作用, 正常的转化情况应该是在阳性对照平皿中出现较多的菌落, 有较高的转化率, 一般在 $10^5 \sim 10^8$ 转化子/ μg 闭环 DNA; 阴性对照的平皿上不出现转化菌落; 外源重组质粒 DNA 转化组有菌落出现, 但没有阳性对照组多。

二、电脉冲穿孔法转化大肠杆菌

电脉冲穿孔法不需要预先诱导细菌的感受态, 依靠短暂的高压电脉冲, 促使 DNA 进入细菌。因其操作简单, 受到人们的欢迎, 最初用于将 DNA 导入真核细胞, 现已用于大肠杆菌及其他细菌的转化。电脉冲穿孔转化细菌时, 电压高, 脉冲时间长, 转化率愈高, 但导致细胞死亡率增高。一般使用的电击条件在导致细胞死亡率为 50%~75% 时, 转化率能高达 $10^9 \sim 10^{10}$ 转化子/ μg 闭环 DNA, 远高于氯化钙法的转化率($10^5 \sim 10^8$ 转化子/ μg 闭环 DNA)。

培养 500 ml 细菌至对数生长期中期(A_{590} 为 0.5~0.6), 4℃ 5 000 r/min 离心 20 min 收获细胞, 用 500 ml 冰冷的双蒸水清洗, 5 000 r/min 离心 20 min。重复两次, 以降低细胞悬液的离子强度。估计细胞沉淀的体积(约 500 μl /500 ml 培养液), 将沉淀用等体积冰冷的双蒸水重悬(2×10^{11} 细胞/ml), 并按每管 40 μl 分装于预冷的微量离心管中。如不马上使用, 可用 10% 甘油制成细胞悬浮

液,然后分装成小份,速置于干冰中冰冻, -70°C 贮存,有效使用期可达6个月。新鲜制备的细菌转化效率高于冻存的细菌。

高压电脉冲穿孔法转化时,将电转化仪调到 2.5kV , $2.5\mu\text{F}$,脉冲控制器调到 $200\sim 400\ \Omega$ 。取 $20\sim 40\ \mu\text{l}$ 制备的细菌加入 $1\ \mu\text{l}$ 质粒DNA($5\ \text{pg}\sim 0.5\ \mu\text{g}$)混匀,转移到预冷的电脉冲转化池中,在低温下($0\sim 4^{\circ}\text{C}$)进行电脉冲转化。转化完毕后取出转化菌液到无菌的培养管中,加入 $1\ \text{ml}$ LB培养液,于 37°C ,振荡培养 $30\sim 60\ \text{min}$ 后,取几个稀释度转化混合物涂于含有抗生素的LB琼脂平板上。 37°C 培养,一般 $12\sim 16\ \text{h}$ 后可出现菌落。

电脉冲穿孔法的转化效率一般可达 10^9 转化子/ μg 闭环DNA,过大的样品体积、较高的盐离子浓度(应小于 $1\ \text{mmol/L}$)和高转化温度均会降低转化效率。

电脉冲穿孔转化需要特制的设备,美国Bio-Rad公司有成套设备供应。

第七节 含重组质粒的宿主菌落的筛选与鉴定

为了得到需要的重组DNA克隆,在技术路线设计时,首先就应考虑建立易于筛选重组子的方案。一个设计良好的方案往往可以事半功倍,节省许多人力物力。筛选方法的选择与设计主要依据载体、目的基因、宿主细菌三者不同的遗传学特性与分子生物学特性来进行。DNA重组技术中常用的筛选与鉴定的方法可分为两大类:一类是利用宿主细胞遗传学表型的改变直接进行筛选;另一类是分析重组子的结构特征进行鉴定。前者常利用来进行筛选的遗传表型有:抗药性、营养缺陷型、显色反应、噬菌斑形成能力等。此法简便快速,可以在大量群体中进行筛选,但由于插入重组分子的方向,多聚体假阳性等因素的影响,结果的可靠性较差。后者是根据目的基因的分子大小、核苷酸序列、基因表达产物的分子生物学特性来进行鉴定。例如:根据重组子酶切片段分子的大小、利用特定探针进行杂交筛选、核苷酸序列分析、放免分析等。这些方法条件要求高、难度大、费时费钱,但是灵敏度好,结果可靠性强,通常是在前面初筛的基础上用此法做最后鉴定。

一、利用宿主细胞遗传表型的改变进行筛选

重组子转化宿主细菌后,载体上的一些筛选标志基因的表达,会导致细菌的某些表型改变,通过在琼脂平板中添加一些相应筛选物质,可以直接筛选出含有重组子的菌落。操作比较简单,常是筛选阳性重组子的第一步。

(一) 抗生素筛选

大多数克隆载体均带有抗生素抗性基因,常见的有抗四环素基因(Tet^r)、抗氨苄青霉素基因(Amp^r)等。如果外源DNA片段插入载体的位点在抗药性基因之外,不导致抗药性基因的插入失活,仍能编码抗药性蛋白,含有这样重组子的转化细胞,能够在含有相应抗生素的琼脂平板上生长成菌落。但是除阳性重组子以外,自身环化的载体,未酶解完全的载体以及非目的基因插入载体形成的重组子均能转化细胞并形成菌落,只有未转化的宿主细胞不能生长,故本法假阳性较多,仅是阳性重组子的初步筛选。

(二) 插入失活双抗生素筛选

在含有两个抗生素抗性基因的载体上,利用目的基因插入失活其中一个抗生素抗性基因,在两

个含不同抗生素的培养皿上培养,对照筛选出阳性重组子。例如 pBR322 质粒含有 *Tet*^r 和 *Amp*^r 这两个抗生素抗性基因,若将目的基因通过 *Bam*HI 切点插入 *Tet*^r 中, *Tet*^r 被插入而失活, *Tet*^r → *Tet*^s。转化得到 *Tet*^s、*Amp*^r 的大肠杆菌中后,即形成能在 *amp* 中生长,而在 *tet* 中不能存活的阳性克隆。可在含 *amp* 条件下生长的转化菌落中,挑取单个菌落接种在分别含 *amp* 和 *tet* 的两个培养皿相互对应的位置上。37℃ 培养后,在含 *amp* 的皿中能够生长,而在含 *tet* 皿中不能生长的菌落为重组转化菌落;在两个皿中都能生长的是含有载体的假阳性菌落。

(三) β -半乳糖苷酶系统筛选

通过插入失活 *lacZ* 基因,破坏重组子与宿主之间的 α 互补作用,是许多携带 *lacZ* 基因的载体常用的筛选方式。这些载体包括 M13 噬菌体、pUC 质粒系列、pEGM 质粒系列等。它们的共同点是都带有一个大肠杆菌 DNA 的短区段,其中含有 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)的调控序列和头 146 个氨基酸(α 片段,酶的 N 端)的编码信息。在这个编码区中插入了一个多克隆位点,它并不破坏读框,也不影响功能。这种载体适用于突变型 *lac*⁻ 的大肠杆菌,这种大肠杆菌可编码 β -半乳糖苷酶的 ω 片段(酶的 C 端)。单独存在的 α 及 ω 片段均无 β -半乳糖苷酶的活性,只有宿主细胞与克隆载体共同表达两个片段时,它们才能融为一体,形成具有酶学活性的 β -半乳糖苷酶,在生色底物 X-gal 存在时形成蓝色菌落,这种互补现象叫 α 互补。当外源 DNA 片段插入到质粒的多克隆位点时,插入失活了 *lacZ* 基因,破坏了重组子与宿主之间的 α 互补作用,因此带重组质粒的细菌形成白色菌落。仅仅通过目测就可容易地从数千个菌落中识别筛选出可能带有重组质粒的菌落,然后通过小量制备质粒 DNA 进行限制性内切酶酶切分析,就可以鉴定这些质粒的结构。

具体操作步骤(需无菌操作):

1. 在一事先制备好的含相应抗生素的 LB 琼脂平板上加入 40 μ l X-gal 贮存液(溶于二甲基甲酰胺,浓度 20 mg/ml)和 4 μ l IPTG 溶液(异丙基硫代 β -D-半乳糖苷,浓度 200 mg/ml)。因为 X-gal 较为昂贵,采用将 X-gal 浓溶液涂布在琼脂平板表面的方式可以节省实验费用。

2. 用无菌玻璃涂布器把混合溶液涂布于整个平板的表面,等待吸收,由于二甲基甲酰胺挥发度低,一般需放置 3~4 h。

3. 将待筛选转化菌接种到平板上,可用接菌环或牙签划线接种,也可将 100 μ l 细菌悬液涂布在琼脂培养基表面。接种物吸收后,倒置平板于 37℃ 培养 12~16 h。

4. 于 4℃ 将平板放置数小时,使蓝色充分显现。带有 β -半乳糖苷酶活性蛋白的菌落中间为淡蓝色,外周为深蓝色。白色菌落偶尔也在中央出现一个淡蓝色斑点,但其外周无色。

二、分析重组子分子结构特性进行鉴定

由于插入重组分子的方向,多聚体假阳性等因素的影响,往往需要对重组子的分子结构作进一步的筛选和鉴定,来证实目的基因是否存在于受体细胞之中。

(一) 限制性核酸内切酶酶切电泳分析

将初筛阳性的一些菌落,分别经小量培养后快速分离出重组质粒或重组噬菌体,用克隆目的基因时同样的限制性内切酶酶切,经琼脂糖电泳后,观察检测插入的目的基因以及载体片段的大小是否正确。

(二) Southern 印迹杂交

为了进一步确定 DNA 插入片段的正确性,在内切酶消化重组子,凝胶电泳分离后,通过

Southern 印迹转移将 DNA 移至硝酸纤维膜上,再用放射性同位素或非放射性标记物与目的基因具有同源性的探针,进行分子杂交,鉴定重组子中的插入片段是否是所需的靶基因片段。有关方法请参阅第十章:分子杂交及探针标记。

(三) 菌落(或噬菌斑)原位杂交

菌落或噬菌斑原位杂交技术是大规模筛选最通用的技术,它是先将转化菌落直接铺在硝酸纤维素薄膜或琼脂平板上,再转移至另一硝酸纤维素薄膜上,原位裂解细菌并使其释出的 DNA 牢牢结合于硝酸纤维素薄膜上,用同位素标记的特异 DNA 或 RNA 探针进行分子杂交。由于探针与靶 DNA 有很好的碱基配对关系,结合很牢,而非特异结合的探针在后面的洗膜过程中被洗掉,经贴压 X 线胶片曝光、显影、定影后,放射性探针使胶片曝光,指示出阳性菌落的位置。本方法能进行大规模操作,一次可筛选上万个菌落或噬菌斑,对于从基因文库中挑选目的重组子,是一项首选的方法。

(四) PCR 法鉴定

利用 PCR 法可以对含有重组子的菌落进行快速鉴定,但要注意防止污染。

(五) DNA 序列分析

从阳性克隆中分离出重组体,用特定限制酶切出目的基因,进行序列测定,证实克隆的基因与目的基因的一致性。由于 DNA 序列分析费时费钱,故本法不作常规筛选之用,只是在其他筛选手段仍不能确定时采用。

(同济医科大学 王译本)

参考文献

- 1 Frederic M. Ausubel *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. U. S. A: John Wiley & Sons, 1995
- 2 J. Sambrook *et al.* Molecular Cloning. 2nd ed. U. S. A: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 3 吴乃虎等. 基因工程原理. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998
- 4 彭秀玲等. 基因工程实验技术. 第二版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997

第九章

重组 DNA 表达技术

重组 DNA 表达技术是指在适当的系统中,使克隆的基因有效地表达为该基因编码的蛋白质的技术。表达克隆基因的系统,可分为原核系统和真核系统两大类。原核系统主要有大肠杆菌(*E. coli*)表达系统和枯草杆菌表达系统等,真核表达系统主要有酵母系统、哺乳动物细胞系统、昆虫细胞(杆状病毒)系统和高等植物系统等。本章将对大肠杆菌表达系统和哺乳动物培养细胞表达系统作简要介绍。

第一节 大肠杆菌表达系统

人类对大肠杆菌的遗传背景了解得十分清楚,用大肠杆菌进行遗传操作的方法非常完善,由于 *E. coli* 生长繁殖周期短,容易大规模培养生产大量的目的蛋白,所以 *E. coli* 表达系统是最常用的系统之一。

一、*E. coli* 表达载体的结构

用于基因表达的载体,除了含有与基因克隆载体相同的元件(如松弛型复制子、多克隆位点、筛选标记等)之外,尚含有表达载体所需要的其他元件,包括:启动子、核糖体结合位点(SD 序列)、转录起始信号、转录终止信号、翻译起始密码子和终止密码子等一系列调控序列。

(一) 启动子

启动子是 DNA 链上一段能与 RNA 聚合酶结合并能起始 mRNA 合成的序列,它是基因表达不可缺少的重要调控序列,没有启动子,基因就不能转录。

E. coli 表达系统常用的启动子有 lac 启动子, P_{RPL} 启动子等,这些启动子都是可调控的强启动子。使用 lac 启动子的载体,当培养时加入诱导物(乳糖及其类似物,如 IPTG)后,诱导物即与阻遏蛋白结合,使基因开放,转录出 mRNA 链,进而翻译出相应的蛋白质。 P_{RPL} 启动子受 λ 噬菌体 CI 基因的负调控。CI 阻遏蛋白是温度敏感蛋白,在 28~30℃ 培养时,CI 蛋白产生抑制作用,当温度升至 42℃ 时,CI 被破坏,这样就解除了对启动子的封闭,使 P_{RPL} 启动子开始转录。

(二) 核糖体结合位点

在 mRNA 上距起始密码子 AUG 上游 3~10 个碱基处,有一段 3~9 个碱基组成的富含嘌呤核苷酸的序列,它刚好与 16 S rRNA 的 3'端富含嘧啶核苷酸的序列互补,是核糖体 RNA 识别和结合

的地方,称为核糖体结合位点(SD序列),如果没有SD序列,mRNA就不能翻译。SD序列与AUG之间的距离,也能影响mRNA翻译蛋白质的效率,一般认为以5~13个碱基为宜。所以在表达载体中都含有相应的SD序列及适当长度的SD-ATG间隔(图9-1)。

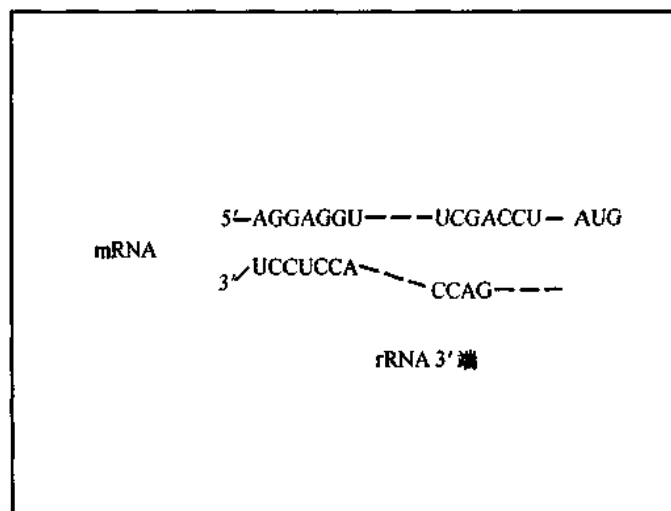


图9-1 SD识别序列

(三) 终止子

在基因或操纵子的3'端,常有一特定的核苷酸序列,具有终止转录的功能,该序列称为转录终止子,简称终止子(terminator)。它可能通过增加mRNA的稳定性和降低细胞内核苷酸消耗而有助于表达。在表达载体内,终止子多放在多克隆位点的下游。

二、常用的大肠杆菌表达载体

(一) 非融合蛋白表达载体

这类载体表达非融合蛋白,它与天然状态下存在的蛋白质在结构、功能以及免疫原性等方面基本一致,有利于以后的研究和应用。但是,由于欲表达的基因在克隆入载体时,其SD序列到ATG之间的距离等影响翻译的因素组织得不一定合理,所以有时可能达不到理想的表达。

1. pKK 223-3 是 Pharmacia 公司的非融合表达载体,使用 lac 强启动子,可用 IPTG 诱导表达。紧接启动子下游,依次为多克隆部位(MCS,供插入外源基因用)和 rrnB 核糖体终止子(图9-2)。

含有核糖体结合部位和 ATG 密码子的基因,插入 MCS 中任何酶切位点,均可表达;如果插入基因的起始密码子距 EcoRI 位点在 8 个碱基之内,则也可利用质粒上的核糖体结合位点进行表达。

2. pBV220 为国内学者张智清构建的非融合表达载体(图9-3),含有 P_RP_L 强启动子,CI857 基因和 rrnB 强终止信号,通过升高培养温度,常可诱导外源基因的高水平表达。该载体在国内应用较为普遍。

(二) 融合蛋白表达载体

这类载体其 SD-ATG 间距已固定,翻译起始信号组织合理,有利于翻译起始。用这类载体表

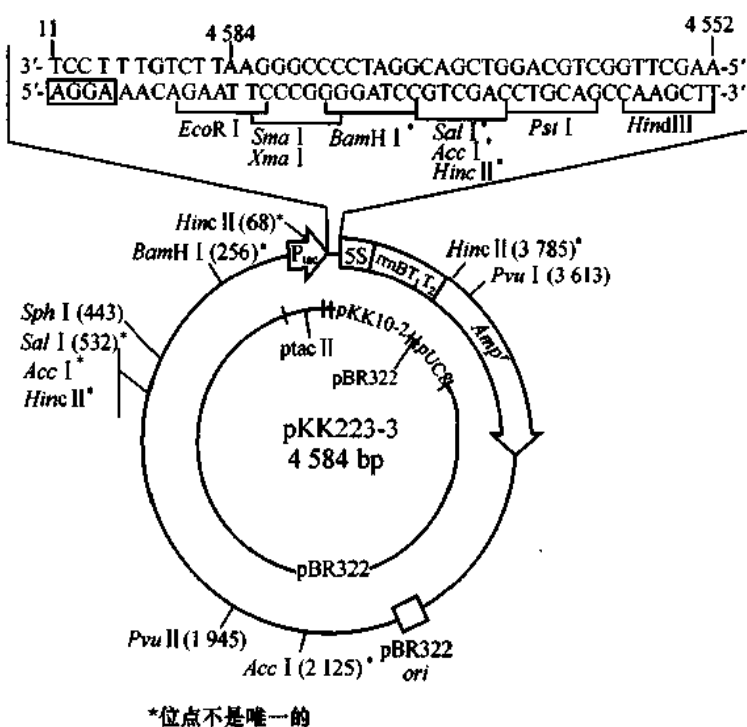


图 9-2 pKK 223-3 表达载体

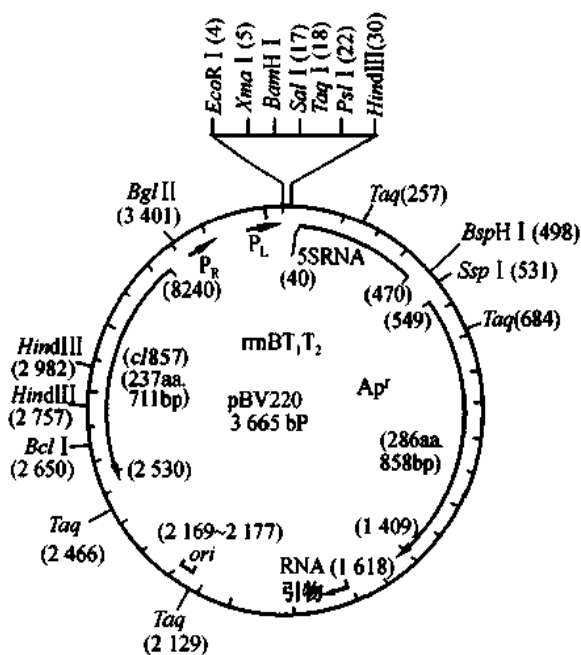


图 9-3 pBV220 载体

达的蛋白质常在其 N 端或 C 端融合有一段细菌的多肽或蛋白质,这有利于产物的检测和纯化。

1. pGEX 系列载体 为 Pharmacia 公司产品,其 SD 序列下游为谷胱甘肽巯基转移酶基因,克

隆的外源基因则与该基因相连。当进行表达时,表达产物为谷胱甘肽巯基转移酶和目的基因产物的融合体。pGEX系列表达载体具有以下优点:①本系列由三种不同阅读框架的质粒构成,可根据

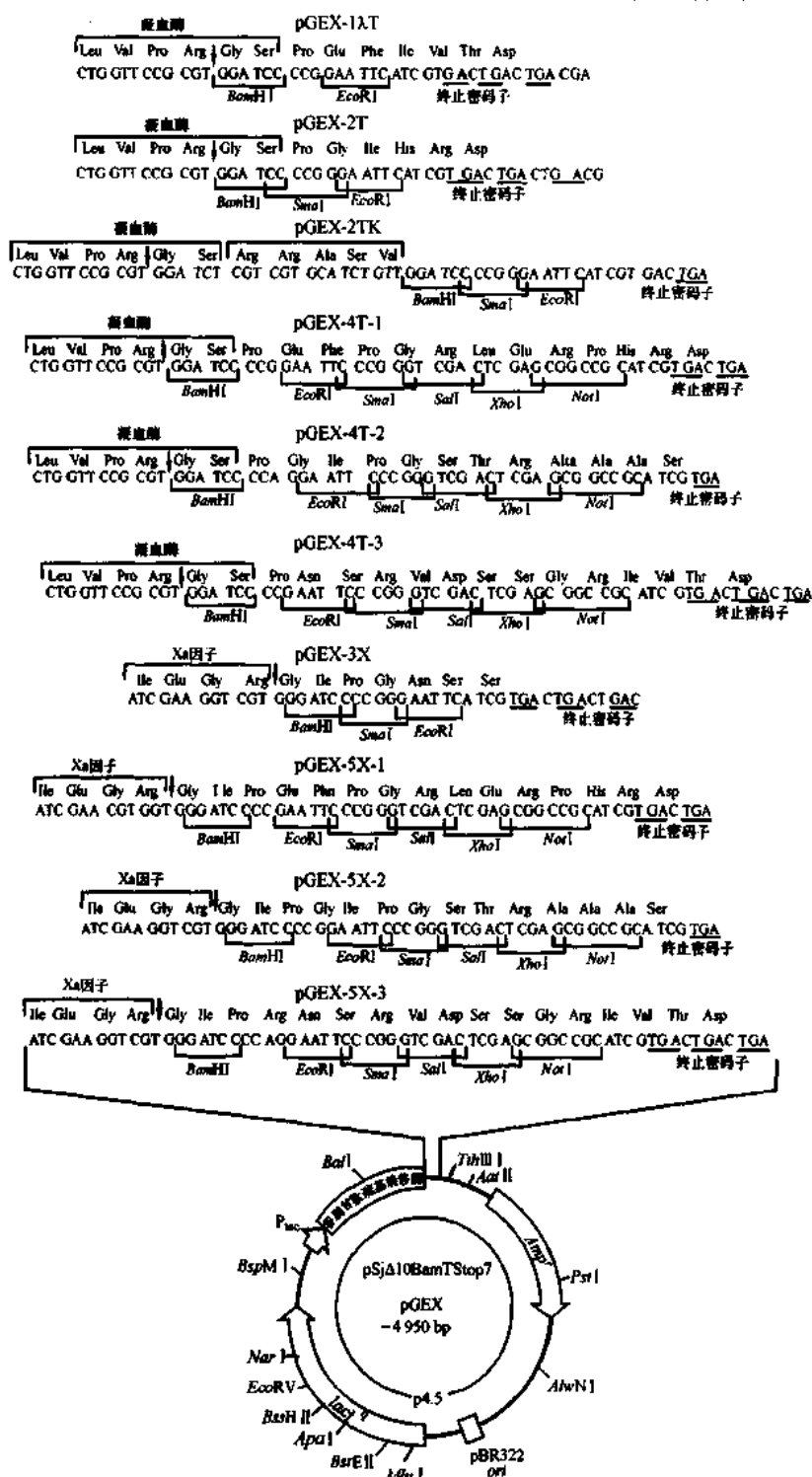


图 9-4 pGEX 系列载体及其多克隆部位序列

情况选用,以保证读框正确;②可用 IPTG 诱导表达;③表达产物可用比色分析或免疫学分析检测;④厂家生产的谷胱甘肽-sepharose 柱,可供表达产物的亲和纯化;⑤谷胱甘肽巯基转移酶部分可用凝血酶或因子 X 切除(图 9-4)。

2. pRSET 系列载体 为 Invitrogen 公司的产品,由 A,B,C 三种不同阅读框架的质粒组成,可从中选用插入外源基因后有正确读框的载体(图9-5)。在该载体SD序列和起始密码子下游,依

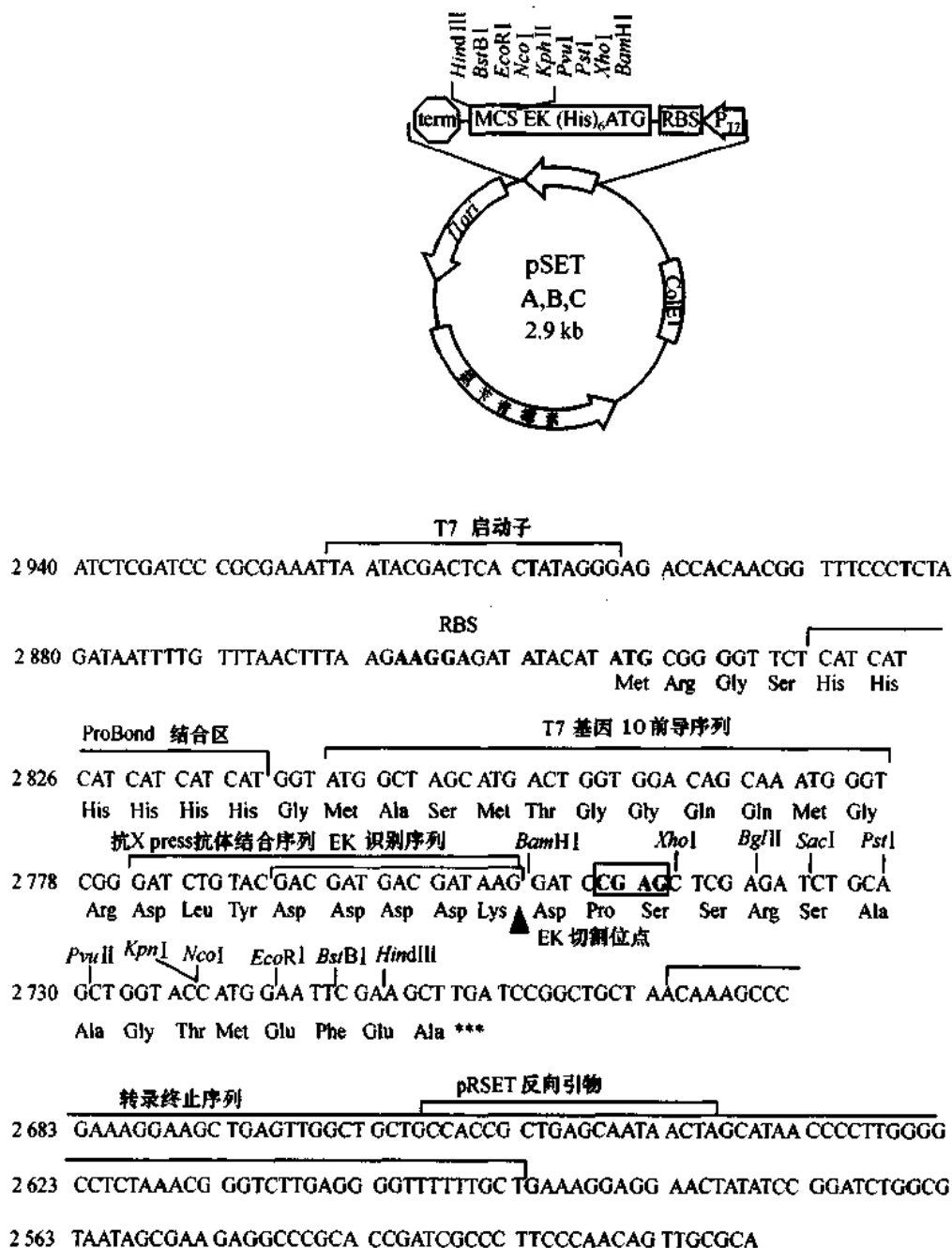


图 9-5 pRSET 系列载体及其多克隆部位附近序列

6723 bp

多接头克隆位点 2759-2807



图 9-6 pMALp2X 载体

3. pMAL 系列载体 为 NEB 公司产品。该系列中有 6 个质粒,分别是 pMALc2X、pMALc2E、pMALc2G、pMALp2X、pMALp2E、pMALp2G。外源基因插入上述载体后用 IPTG 诱导均可表达与麦芽糖结合蛋白融合的目的蛋白。在 pMALp2 载体中,含有正常的 *malE* 基因信号肽序列,合成的信号肽可引导融合蛋白通过浆膜;pMALc2 载体中 *malE* 基因的信号肽序列已被精确地删去,故表达的融合蛋白存在于胞浆内。与载体配套,NEB 公司还供应直链淀粉树脂,可用于融合蛋白的亲纯化。融合蛋白上的非目的蛋白部分,可用适当的蛋白水解酶[肠激酶(E)、因子 Xa(X)、Genenase(G)]切除。(图 9-6,9-7)

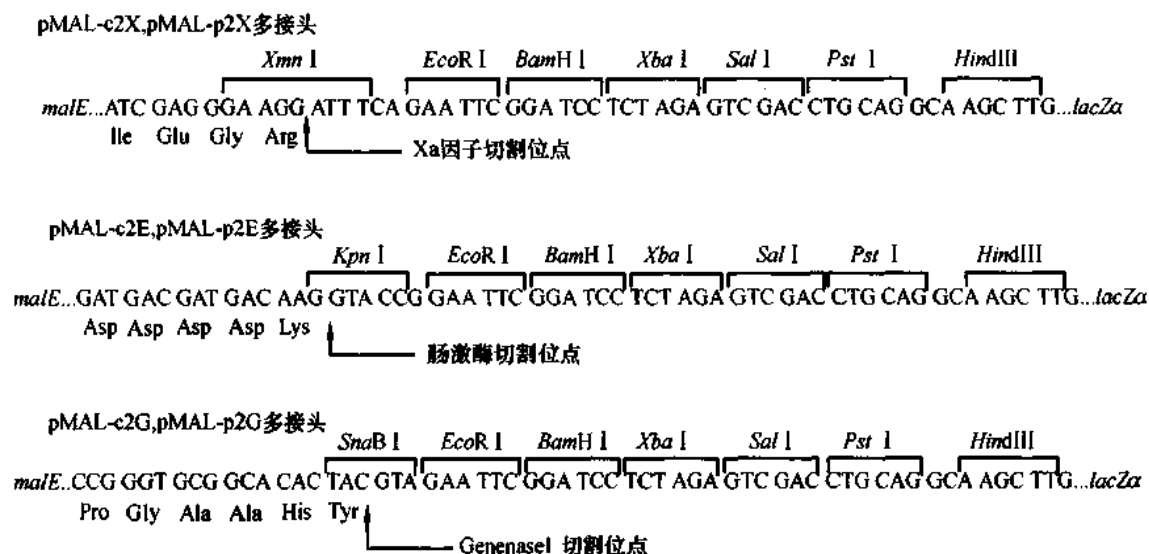


图 9-7 pMAL 系列载体的多克隆部位

三、表达中的其他问题

(一) 真核基因的表达

大肠杆菌缺乏真核细胞转录后的加工系统,不能切除前 mRNA 中的内含子,不能形成成熟的真核 mRNA。大肠杆菌也缺乏真核细胞翻译后的修饰系统(如不能糖基化等)。用于大肠杆菌表达的真核基因应删去 5'非编码区和基因中内含子的结构基因。同时目的基因最好只编码成熟蛋白或多肽。要获得符合要求的真核基因,可采用以下办法:

1. 从真核细胞中分离 mRNA,反转录成 cDNA,分离并克隆所需的 cDNA,再进行表达。
2. 体外 DNA 合成法,适于相对分子质量较小的蛋白质或多肽基因的克隆和表达。
3. PCR 扩增法,设计并合成已知基因 5'和 3'两端的引物,经 PCR 扩增技术获得所需基因。

(二) 提高表达水平

克隆入表达载体后的外源基因,有时不能获得理想的表达,对此可从以下几方面着手作适当调整:

1. 改用融合蛋白形式表达目的蛋白,以提高表达的稳定性和产量。
2. 改用更强的启动子以提高 mRNA 产量,并在基因下游加入稳定 mRNA 的强转录终止子。

3. 调整 SD 序列和 ATG 之间的距离。
4. 改用蛋白酶缺陷型宿主菌,或在宿主菌内表达蛋白酶抑制物,以减少表达蛋白的降解。
5. 改用分泌型表达,以减少反馈抑制或蛋白酶降解。
6. 使用诱导表达,适时加入诱导物可防止过早大量表达外源基因而影响宿主细胞的繁殖。
7. 根据密码子的简并性,在人工合成的基因中使用大肠杆菌的惯用码。
8. 以定位突变,消除核糖体结合位点附近可能的二级结构。重建基因 5'端,加大其 A 和 T 的含量而保留所编码的蛋白质序列,以减少二级结构提高翻译效率。

(三) 包含体

外源基因在大肠杆菌中高效表达时,表达产物常在细胞质内聚集,形成不溶性的包含体(inclusion body)。包含体内大部分为目的蛋白,此外还含有 RNA 聚合酶、外膜蛋白、rRNA、缺口质粒 DNA、脂质、肽聚糖、脂多糖等。包含体形成的原因及过程尚不十分清楚,有人认为可能与表达蛋白的生成速率高、局部浓度高、无足够时间使新生肽链正确折叠有关,而且还与培养宿主菌的温度、pH、某种金属离子不足等造成细胞内环境变化的因素有关。包含体的形成,有利也有弊。有利的是可防止蛋白酶对蛋白质的降解,也有利于表达产物的分离。不利的是包含体中的表达蛋白不溶于水,不具有生物活性,必须用变性剂溶解包含体并对表达蛋白作适当的复性处理。如欲避免包含体的出现,可尝试改变发酵条件,如降低培养温度(在 20~30℃ 培养)、降低诱导物浓度、缩短诱导时间、在细胞达到较高密度后再短时间诱导、增加通气等。如果改变发酵条件仍不能达到目的,则可尝试采用分泌型的表达载体,如 pMALp2 系列载体。

第二节 哺乳动物细胞表达系统

由于原核表达系统不能对表达的真核蛋白施行正确的折叠和翻译后加工(如二硫键形成、糖基化、磷酸化、聚合、蛋白酶降解等),原核系统表达真核蛋白的环境与真核系统也不全相同,加上其他未知因素的影响,因而常致原核系统所表达的真核蛋白的生物活性很低。人们在研究哺乳动物基因表达过程中,逐步发展了用哺乳动物细胞进行真核基因表达的系统。这些系统可以分为两类:一类是转染 DNA 的瞬时表达系统或稳定表达系统;另一类是采用病毒载体的表达系统(如 SV40、痘苗病毒、腺病毒、反转录病毒等)。由于对后一系统在技术等方面有较高的要求,故本节仅简要介绍利用 DNA 转染的表达系统。

一、真核表达载体

(一) 表达载体的功能元件

真核表达载体中常包括以下元件:

1. 原核 DNA 序列 由于哺乳动物细胞的培养较原核细胞困难,培养成本高,所以在真核表达载体中也带有一些原核 DNA 序列,常为能在大肠杆菌中复制的复制子、供筛选用的标记基因和便于基因操作的酶切位点。加入原核 DNA 序列,目的是让表达载体能在大肠杆菌中增殖以产生大量供转染哺乳动物细胞的重组 DNA。

2. 启动子 位于基因上游 100 bp 以内,为 RNA 聚合酶 II 与 DNA 的结合和转录正确起始所

必需。启动子的转录效率因细胞而异,需根据宿主细胞类型选择不同的启动子。

3. 增强子 由一些短的 DNA 序列组成,它的作用是增强启动子发动转录的能力,控制转录的速度和效率。增强子的增强作用基本上与其所处的位置无关,可在转录起始点前后 3 kb 范围内的任何位置发挥作用。增强子的作用也与其方向的正负无关。但在不同的宿主细胞中,增强子的活性相差很大,宜根据宿主细胞选择增强子。

4. 剪接信号 是指内含子和外显子交界处比较保守的序列。真核基因由许多内含子和外显子组成,它们需先转录成前 mRNA,再经剪接除去内含子后,才能成为成熟的 mRNA,所以剪接过程必须非常精确,否则合成蛋白质时,读框就不能保持一致。剪接信号的作用就在于此。

5. 终止信号和加 poly(A)信号 转录终止的确切位点尚不清楚,但转录常随机终止在多聚腺苷化位点下游一段长度为几百个核苷酸的 DNA 区域内。多聚腺苷化需要两种序列:①位于 poly(A)位点下游的 GU 丰富区或 U 丰富区;②位于 poly(A)位点上游 11~30 个核苷酸的一段高度保守的 AAUAAA 序列。因此为了保证目的 mRNA 能有效地多聚腺苷化,真核表达载体上必须包括 poly(A)位点下游的一段序列。

6. 病毒复制子和筛选标记 除了上面已讨论过的元件之外,真核载体还应带有用以提高基因表达水平以及便于挑选带转染 DNA 细胞的特殊元件。

(1) 病毒复制子 某些动物病毒具有促进病毒基因组在许可性细胞中进行染色体外复制的 DNA 序列。只要在质粒上或在宿主细胞基因组内带有编码适当反式作用因子的基因,带有这些病毒复制子的质粒就能以附加体形式进行复制。不同病毒复制子的工作效率有所不同,带有例如 SV40 或多瘤病毒等乳多空病毒复制子的质粒载体,可以在表达相应病毒 T 抗原的细胞中大量复制,达到极高的拷贝数。由于转染细胞将在三四天后,即当质粒分子数超过 10^4 拷贝/细胞时死亡,因此这些系统可用来瞬时而大量地表达转染基因。带有例如牛乳头瘤病毒和 EB 病毒等病毒复制子的质粒载体则可以作为附加体在染色体外以较低的拷贝数(通常低于 100 拷贝/细胞)进行自我增殖,一般并不至于引起细胞死亡。这些载体可以用来分离在较低水平上持续表达转染基因的稳定细胞系。

(2) 筛选标记 为了便于从大量细胞中得到转染成功的细胞,因此转染用的 DNA 必须带筛选标记。常用的筛选标记有胸腺核苷激酶基因(*tk*)、潮霉素 B 磷酸转移酶基因(*hyg*)、新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸糖基转移酶基因(*hgp*)和氯霉素乙酰转移酶基因(*cat*)等。

① 胸苷激酶基因(*tk*) 胸苷激酶催化胸苷生成胸苷一磷酸。几乎所有真核细胞都含有能表达胸苷激酶的基因(*tk*)。以 *tk* 作为筛选标记时,必须使用 *tk* 表型缺陷型(*tk*⁻)细胞株作宿主细胞。由于选择 *tk*⁺ 细胞的培养基含有次黄嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸苷(thymidine),故称 HAT 选择法。其选择原理为:氨基蝶呤(A)为叶酸类似物,可抑制二氢叶酸还原酶,使二氢叶酸生成四氢叶酸受阻。向培养基中加入(A),即阻断了四氢叶酸的生成。当培养基中的四氢叶酸耗尽后,于是从 dUMP 合成 TTP 以及 dATP、dCTP 的合成过程均被阻断。次黄嘌呤是 dATP、dCTP 补救合成途径的底物,培养基中含有这种物质时,细胞就可越过氨基蝶呤的抑制作用,利用补救途径合成出 dATP、dCTP。同时由于在 HAT 培养基中含有胸苷(T),所以 *tk*⁺ 细胞通过胸苷激酶的作用合成 TTP,继续存活下去;而 *tk*⁻ 细胞因缺乏胸苷激酶,不能利用 T 合成 TTP,因而死亡。如将 *tk* 基因导入 *tk*⁻ 细胞这些细胞将能继续存活。所以使用 HAT 培养基能够选择出经 *tk* 基因转化的 *tk*⁺ 细胞。

② 新霉素抗性基因(*neo^r*) 由细菌转座子 Tn5 和 Tn10 的 *neo^r* 基因编码的两种不同的氨基糖苷磷酸转移酶(APH), 都具抗氨基糖苷类抗生素如卡那霉素、新霉素和 G418 的活性。真核生物通常不表达内源的 APH 活性, 但当 *neo^r* 基因与能有效转录的真核 DNA 序列连锁时, 就可有效表达出 APH 活性, 故可用这些基因来筛选吸收外源 DNA 的真核细胞。

③ 潮霉素 B 磷酸转移酶基因(*hyg*) 该基因原来也是大肠杆菌的基因, 但当其通过适当的表达载体导入哺乳动物细胞之后, 转移细胞即具有潮霉素(hygromycin)抗性, 故也可用作筛选标记。

(二) 表达载体的分类与举例

用于 DNA 转染的表达载体, 可分为三类:

1. 不带真核复制子的质粒型载体 在原核质粒中插入一个完整的哺乳动物细胞转录单位和一个选择标记基因, 便可组成一个简单的载体系统。所得载体在转染哺乳动物培养细胞之前, 要在细菌中扩增。由于这些载体并不带有真核复制子, 因此转染 DNA 不会以附加体的方式进行扩增。相反, 这些 DNA 在大多数转染细胞中都要整合到细胞基因组中, 并在基因组调控之下低水平地表达相应的蛋白质。选择标记蛋白可有利于分离出摄取并表达外源基因的极少数转染细胞。质粒 pHyg 即为这类载体之一(图 9-8)。

2. 带真核病毒调控序列元件的质粒表达载体 这类载体的结构中, 含有真核病毒的调控序列。转染细胞后, 可作为附加体, 在细胞内复制和扩增, 也可整合入染色体, 经筛选获得稳定表达的细胞。

SV40 载体含有来自 SV40 的个别调控区, 但不含病毒基因组的大部分编码区, 转染哺乳动物

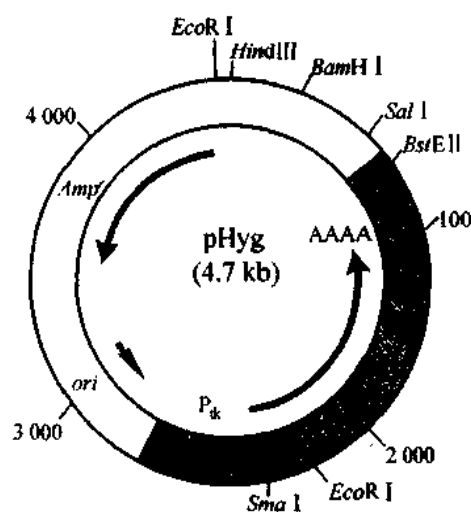


图 9-8 pHyg 载体

pHyg 利用单纯疱疹病毒启动子(P_k)及其加 poly(A)位点(HSV-poly(A):AAAA)表达编码潮霉素 B 磷酸转移酶的大肠杆菌基因(*hyg^r*)

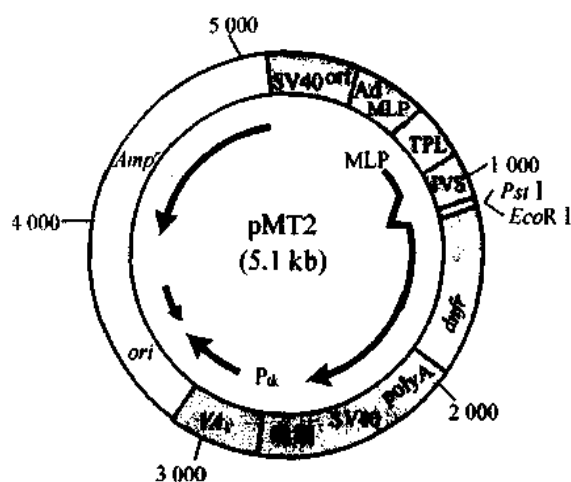


图 9-9 pMT2 瞬时表达载体

pMT2 瞬时表达载体, 其中腺病毒主要晚期启动子(Ad-MLP)与腺病毒三重前导序列(TPL)和小鼠免疫球蛋白基因的部分序列相联, 后两者分别带有 5' 和 3' 剪接点。在间隔序列(IVS)之后有两个克隆位点(*Pst* I 和 *EcoR* I), 二氢叶酸还原酶基因(*dhfr*), SV40 加 poly(A)位点(poly(A):AAAA)以及腺病毒 VA_1 基因。载体中还有 SV40 复制位点(SV40 ori)和增强子

细胞以后,克隆在载体中的外源 DNA 可以瞬时表达,但不产生病毒颗粒。如果用它转染猴源性的 COS 细胞,则每个细胞内可积聚小于 10^5 个带 SV40 复制起点的重组表达质粒,并高效表达外源 DNA 序列。由于转染质粒的无节制复制,以致细胞无法耐受在它的染色体外如此大量地复制 DNA 而最终死亡(大约在转染后 70~90h 内),所以这一系统的表达是瞬时性的。pMT2 即属 SV40 载体(图 9-9)。

含有牛乳头瘤病毒(BPV)69%转化片段的载体(如 pBV-1MTHA,图 9-10),可在哺乳动物细胞中以附加体的形式复制。这些载体一般不作瞬时表达,而多用作建立多拷贝外源基因的细胞系。

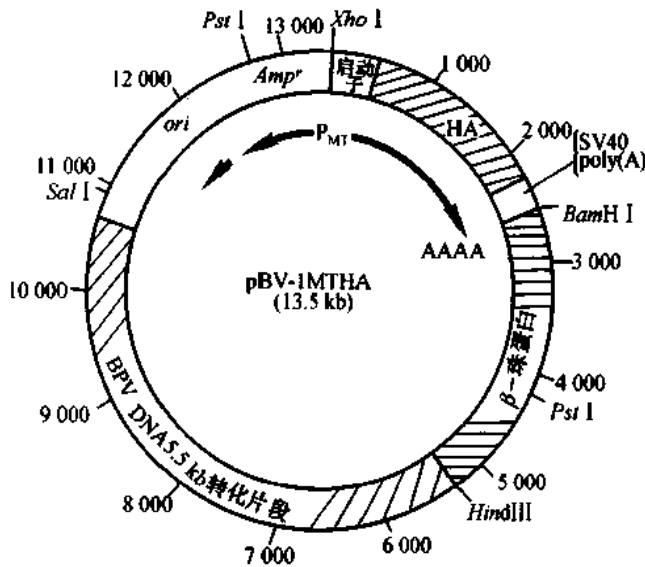


图 9-10 pBV-1MTHA 载体

带有载体在哺乳动物细胞以附加体形式进行复制所必需的 69% 转化片段(BPV DNA 的 5.5 kb 转化片段)。此外它还编码入 β -珠蛋白。以及在金属硫蛋白(MT)启动子(P_{MT})控制下表达的血凝素(HA)。SV40 加 poly(A)位点(SV40 poly(A):AAAA)如图所示

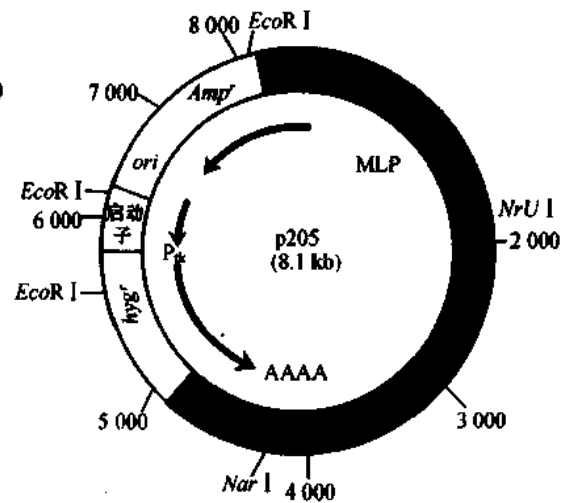


图 9-11 p205 载体

带有 EB 病毒 orip 区段(EBV orip),并可通过一个缺失 700 pb 序列的基因($\Delta 700$ bp)表达具有反式作用的 EB 病毒核抗原 EBNA-1。同时还采用单纯疱疹病毒启动子(P_H)及加 poly(A)位点(HSV poly(A):AAAA)表达编码潮霉素 B 磷酸转移酶的大肠杆菌基因(hyg^r)

EB 病毒的一个顺式作用要素 orip 可以在带有 EBV DNA 并表达具有反式作用的 EBNA-1 抗原的贴壁细胞中维持附加体 DNA 分子的存在,据此构建的载体可在范围广泛的哺乳动物细胞中表达外源基因,如质粒 p205(图 9-11)可在各种动物细胞中以附加体的形式复制,在某些啮齿动物细胞,还会出现质粒整合于宿主细胞染色体的情况。

3. 扩增系统 以 SV40、BPV 和 EBV 为基础的载体都有利于对整合于宿主细胞基因组的转染 DNA 序列进扩增,可用于建立含多拷贝外源基因并在中等水平上稳定表达目的蛋白的细胞系。利用带有整合于染色体并经过扩增的目的基因的细胞系,可以表达更为大量的外源蛋白质。方法是将外源基因与抗药性基因相联后转染细胞,也可用外源基因和抗药性基因共转染细胞。如果将带有上述两种组分的细胞置于浓度持续升高的相应药物之下,即可选出抗药性基因及外源基因的拷

贝数同时得到大量扩增的亚细胞系。

二、外源 DNA

真核表达用的外源 DNA,通常来自 cDNA 克隆,也可以是基因组 DNA。cDNA 上常有建库时引入的辅助序列[如 poly(G)、poly(C)、合成接头等],对这些序列是否必须除去,有不同的看法。然而由于这些序列从不会增强外源 DNA 在哺乳动物细胞中的表达水平,而且在某些情况下还会降低表达水平,因此大多数工作者倾向于在操作方便的前提下尽可能除去这些额外序列。一个来自基因组的完整拷贝,将含有该蛋白质在某些(并不一定是所有)型别的细胞中进行表达所必需的全部调控序列。这些序列的特异性决定了能够表达这一基因的细胞型别,因此为了在培养细胞系中有效表达这一基因,可能需要置换其中的增强子和(或)启动子序列。此外,真核生物转录中的第一个 AUG 应为起始密码子,否则翻译效率将显著下降。

三、宿主细胞

用于转染的哺乳动物细胞,应当具有较好的稳定性,以保证转入的外源基因在多次传代之后不会丢失。实际上许多正常的哺乳动物细胞都不具备这种稳定性,并且正常哺乳动物细胞长期传代培养不易。哺乳动物癌细胞不仅易于长期传代培养,生长速度快而均一,而且转入外源基因后稳定性好,因此大多转染实验选用癌细胞作为宿主细胞。不同的表达载体对宿主细胞具有相对的选择性,转染前应予注意。

四、重组载体导入哺乳动物细胞

已建立了多种方法将克隆化的真核 DNA 导入哺乳动物细胞,以下介绍几种较常用的方法:

(一) 磷酸钙介导的转染

这是最常用的方法之一,其转染机制不十分清楚,可能为 DNA 与之结合,形成 DNA-磷酸钙沉淀,粘附于单层细胞表面,迅速被细胞捕获。可用于产生含有稳定整合 DNA 的细胞系。

(二) DEAE-葡聚糖介导的转染

转染的机制也不清楚,可能是它与带负电荷的 DNA 形成复合物后,抑制了核酸酶对 DNA 的作用,也可能它与细胞结合而引发了细胞的内吞作用。本法多用于瞬时表达的转染,重复性较磷酸钙法好。用于产生稳定表达的细胞系则常不奏效。

(三) 阳离子脂质体介导的转染

转染机制不清,可能为带负电荷的 DNA 与阳离子脂质体的表面结合,脂质体的残留正电荷再介导与细胞表面带负电荷的唾液酸结合,有证据表明脂质体的 DNA 由细胞的内吞作用摄入,然后其中的某些 DNA 通过某种未知的机制释放进入胞浆。阳离子脂质体介导的转染,转染效率和可重复性较好。既可用于瞬时表达,也可用于稳定表达,故近年为各实验所乐用。

(四) 电穿孔转染

这是以很短促的高压脉冲,电击细胞,使原生质膜上形成纳米级的小孔,DNA 直接通过这些小孔进入细胞质。本法适于多数类型的细胞,既可用于瞬时表达的转染,也可用于建立稳定表达的细胞系。

在实验中,一般对贴壁细胞系,可用方法(一)、(二)、(三),对非贴壁细胞系,则可采用方法

(三)、(四)。选定方法后,还宜对转染条件优化。

五、基因表达产物的检测

外源基因导入宿主细胞后,是否已有效地表达,需通过一定的实验才能作出正确的判断。可从核酸水平和蛋白质水平来检测是否有外源基因的表达,但实践中则多从蛋白水平来设计检测方法。常用的方法有:ELISA、RIA、免疫组化或原位杂交、Western 印迹法、免疫沉淀、免疫荧光抗体等。关于这些方法,可参阅本书有关章节和其他相关文献资料。

(第四军医大学 陈南春)

参 考 文 献

- 1 Frederick Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1994
- 2 萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南, 第二版, 北京:北京科学出版社, 1992
- 3 李德葆, 徐平主编. 重组 DNA 的原理和方法, 第一版, 杭州:浙江科学技术出版社, 1994
- 4 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术, 第一版, 北京:北京高等教育出版社, 1993

第十章

分子杂交技术

DNA 分子是由两条方向相反的多核苷酸链,彼此通过碱基配对原则,靠氢键连接而形成的双链分子。因此 DNA 分子中的两条链之间是互补关系,在一定条件下,这两条链分开成为单链。不同来源的 DNA 或 RNA 单链,在一定条件下,只要两条链之间有一定程度的互补序列,它们又可以重新组成新的双链分子——即杂交分子。为了定性或定量目的核酸,在进行核酸杂交时,用一段已知序列的核酸将它作上标记(同位素或非同位素),去探测或追踪所要研究的目的核酸,这段带有标记的核酸分子称为探针(probe)。探针标记技术与核酸分子杂交技术相结合产生了多种多样检测目的核酸的实用方法,是目前分子生物学不可缺少的重要手段。

第一节 核酸杂交的基本理论——DNA 的变性与复性

一、DNA 变性

DNA 变性是指双螺旋之间氢键断裂,双螺旋解开,形成无规则线团,因而发生性质改变(如粘度下降,沉降速度增加,浮力上升,紫外吸收增加等),称为 DNA 变性。加热、改变 DNA 溶液的 pH、或受有机溶剂(如乙醇、尿素、甲酰胺及丙酰胺等)等理化因素的影响,均可使 DNA 变性。

通常,可利用 DNA 变性后波长 260 nm 处紫外吸收的变化追踪变性过程,因为 DNA 在 260 nm 处有最大吸收值这一特征是由于碱基中的共轭双键所致。DNA 双螺旋结构中碱基藏于内侧,变性时由于双螺旋解开,于是碱基外露,因而 260 nm 紫外吸收值增加,这一现象称为增色效应(hyperchromic effect)(图 10-1)。

如果温度升高使 DNA 变性,以温度对紫外吸收作图,可得到一条曲线,称为熔解曲线(图 10-2)。由图可见当温度升高到一定范围时 DNA 溶解,在 260 nm 处的吸光度突然明显上升至最高值,随后即使温度继续升高,其吸光度也无明显变化。由此说明 DNA 变性是在一个很窄的温度范围内发生,增色效应是爆发式的,当达到一定温度时, DNA 双螺旋几乎是同时解开的。通常人们把 50% DNA 分子发生变性的温度称为变性温度(即熔解曲线中点对应的温度),由于这一现象和结晶的溶解相类似,故又称熔点或熔解温度(melting temperature),简称 T_m ,它是指吸光值上升到最大吸光值一半时的温度。

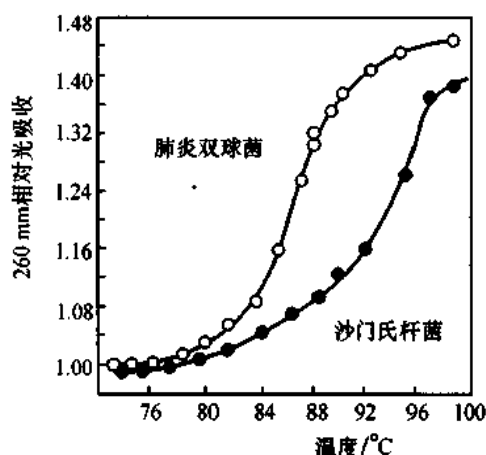
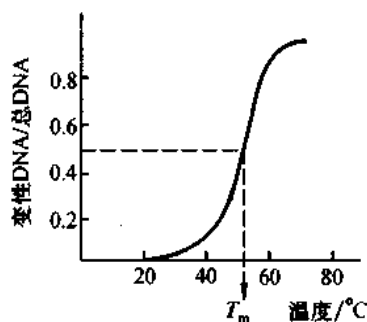


图 10-1 DNA 的增色效应

图 10-2 DNA 的 T_m 值

T_m 值和增色效应是目前描述 DNA 特性所常用的两个量,假定一个 DNA 大分子最初全部是双螺旋结构,在热变性后吸光值上升 30% 以上;如果 DNA 局部处于单链状态(例如在分子末端),则变性后上升较少。增色效应的大小是 DNA 性质的一个简单指标,与相对分子质量无关, T_m 不是一个固定的数值,它与很多因素有关。

DNA 的 T_m 值与以下因素有关:

(一) DNA 的均一性

均一 DNA 如病毒 DNA,解链发生在很窄的范围内,而不均一 DNA 如动物 DNA,其 T_m 值的范围则较宽。

(二) DNA 分子中(G+C)的含量

一定条件下 DNA 的 T_m 值,由 G+C 含量所决定,因为 G+C 之间有三个氢键,因此 G+C 含量较高的 DNA, T_m 值较高,两者的关系可用以下经验式表示:

$$T_m = 69.3 + 0.41 \times x_{G+C} \quad x_{G+C} \text{ 为 G+C 的摩尔分数}$$

实验表明,DNA 分子中(G+C)的摩尔分数的大小与 T_m 值的高低呈直线关系。

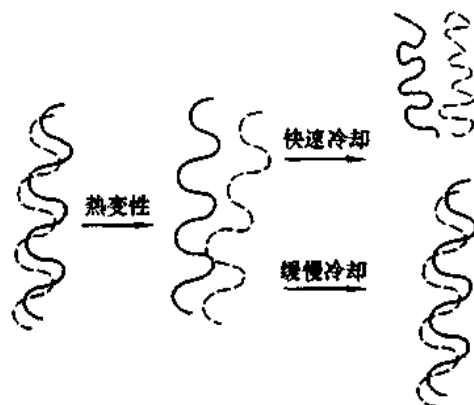
(三) 溶剂的性质

T_m 值不仅与 DNA 本身性质有关,而且与溶液的条件有关,通常溶液的离子强度较低时, T_m 值较低,熔点范围也较窄;离子强度增高时, T_m 值升高,熔点范围也变宽。因此,DNA 制剂不应保存在离子强度过低的溶液中,一般保存在 1 mol/L NaCl 溶液中较稳定。

二、DNA 复性

变性 DNA 只要消除变性条件,两条互补链还可以重新结合,恢复原来的双螺旋结构,这一过程称为复性(renaturation)。通常 DNA 热变性后,将温度缓慢冷却,并维持在比 T_m 低 25~30°C 左右时,变性后的单链 DNA 即可恢复双螺旋结构。因此,这一过程又叫做退火。复性后的 DNA,理化性质都能得到恢复,倘若 DNA 热变性后快速冷却,则不能复性(图 10-3)。

影响复性速度的因素很多,同样条件下,DNA序列简单的分子复性快,如poly(dT)和poly(dA)由于彼此互补,识别很快,能迅速复性,但序列较复杂的DNA分子复性则较慢。因此,通过复性速度的研究,可以了解DNA顺序的复杂性。DNA片段的大小也影响复性的速度,因为DNA片段愈大,扩散速度愈低,DNA线状单链互相发现互补的机会愈少。因此,在复性实验中,有时将DNA切成小片段,再进行复性。同样条件下,同一种DNA浓度愈高,复性速度也愈快。溶液的离子强度对复性速度也有影响,通常盐浓度较高时,复性速度较快。



三、核酸分子杂交

不同来源的核酸分子经变性后成为单链,当缓慢退火时,不同来源的核酸分子只要它们之间存在一定程度的互补序列,就可以重新结合成双链,这就是杂交分子。这个过程就叫做核酸的杂交(hybridization)。杂交可以发生在DNA与DNA之间,DNA与RNA之间以及RNA与RNA之间,由于核酸分子杂交的基础在于杂交分子的双方具有碱基互补序列,这就决定了核酸杂交作为一种方法的高度特异性。此外对于检测这种杂交分子存在的方法也必须高度灵敏。

核酸杂交分子的双方常常有一方是已知序列,把它作为探针去探测另一方(未知)是否存在,如果双方能形成杂交分子并被检测出来,说明未知的那一方具有与已知(探针)核酸同源的序列,这在研究疾病的发生、某些病原微生物的感染以及分子生物学许多方面都有不可替代的作用。

图 10-3 热变性过程和两种冷却过程示意图

第二节 核酸探针及其标记物

探针(probe)指的是能与特定的靶分子(DNA或RNA)发生特异性结合的核酸分子。根据其性质及检测目的不同可以分为DNA探针、RNA探针、cDNA探针及寡核苷酸探针等。作为探针的核酸分子必须在其分子中做上标记(放射性同位素或非放射性物质)才能起到检测目的核酸的作用。

一、核酸探针的种类及应用

根据核酸探针的来源及性质可分为基因组DNA探针、cDNA探针、RNA探针及人工合成的寡核苷酸探针等几类,根据你所要检测的目的不同,应仔细考虑选择哪一类最为合适,最基本的选择原则是核酸探针与要检测的目的核酸之间在核酸序列上具有高度的特异性。

(一) 基因组DNA探针

真核生物基因组中存在着大量的重复序列(如人基因组中的Alu序列)及非编码序列(如调控序列和内含子),因此选择基因组DNA做探针时,一定要充分考虑到实验的目的性。获得基因组中的某一段DNA序列,利用分子克隆的方法或PCR的方法已变得越来越容易,将这些DNA序列克隆到一个合适的质粒载体中,转化大肠杆菌后,就可以无限繁殖,取之不尽。

(二) cDNA 探针

cDNA(complementary DNA)是能与 mRNA 互补的 DNA 分子,它是利用 RNA 分子作为模板在逆转录酶的作用下产生的。

逆转录酶的作用是以 dNTP 为底物, RNA 为模板, tRNA(主要是色氨酸 tRNA)为引物,在 tRNA 3'—OH 末端上,沿 5'—3'方向,合成与 RNA 互补的 DNA 单链,称为互补 DNA(cDNA)。单链 cDNA 与模板 RNA 形成 RNA-DNA 杂交体,随后在逆转录酶的 RNase H 活性作用下,将 RNA 链水解成小片, cDNA 单链的 3'末端回折形成一个小引物末端,逆转录酶又以第一条 cDNA 链为模板再合成第二条 cDNA 链,至此,完成逆转录全过程,合成双链 cDNA。

所得到的双链 cDNA 分子经 S1 核酸酶切平两端后接一个有限制酶切点的接头(adapter);再经特定限制酶消化产生粘性末端,即可与含互补末端的载体进行连接。常用的克隆载体是 λ 噬菌体 DNA,如 λ gt, EMBL 和 Charon 系列等。用这类载体可以得到包含 10^5 以上转化子的文库,再经前面介绍的筛选方法筛选特定基因克隆。用这种技术获得的 DNA 探针不含有内含子序列,因此尤其适用于基因表达的检测。

(三) RNA 探针

RNA 探针是一类很有前途的核酸探针,由于 RNA 是单链分子,所以它与靶序列的杂交反应效率极高。早期采用的 RNA 探针是细胞 mRNA 探针和病毒 RNA 探针,这些 RNA 是在细胞基因转录或病毒复制过程中得到标记的,标记效率往往不高,且受到多种因素的制约。这类 RNA 探针主要用于研究目的,而不是用于检测。例如,在筛选逆转录病毒人类免疫缺陷病毒(HIV)的基因组 DNA 克隆时,因无 DNA 探针可利用,就利用 HIV 的全套标记 mRNA 作为探针,成功地筛选到多株 HIV 基因组 DNA 克隆。又如在进行的转录分析(nuclear run-on transcription assay)时,在体外将细胞核分离出来,然后在 $[\alpha-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的存在下进行转录,所合成的 mRNA 均掺入同位素而得到标记。此混合 mRNA 与固定于硝酸纤维素滤膜上的某一特定基因的 DNA 进行杂交,便可反映出该基因的转录状态,这是一种反向探针实验技术。

近几年体外转录技术不断完善,已相继建立了单向和双向体外转录系统。该系统主要基于一类新型载体 pSP 和 pGEM,这类载体在多克隆位点两侧分别带有 SP6 启动子和 T7 启动子,在 SP6 RNA 聚合酶或 T7 RNA 聚合酶作用下可以进行 RNA 转录。如果在多克隆位点接头中插入了外源 DNA 片段,则可以此 DNA 两条链中的一条为模板转录生成 RNA。这种体外转录反应效率很高,在 1 h 内可合成近 $10\ \mu\text{g}$ 的 RNA 产物。只要在底物中加入适量的放射性或生物素标记的 NTP,则所合成的 RNA 可得到高效标记。该方法能有效地控制探针的长度,并可提高标记物的利用率。

值得一提的是通过改变外源基因的插入方向或选用不同的 RNA 聚合酶,可以控制 RNA 的转录方向,即以哪条 DNA 链为模板转录 RNA,这样可以得到同义 RNA 探针(与 mRNA 同序列)和反义 RNA 探针(mRNA 互补)。反义 RNA 又称 cRNA,除可用于反义核酸研究外,还可用于检测 mRNA 的表达水平。因为探针和靶序列均为单链,所以杂交的效率要比 DNA-DNA 杂交高几个数量级, RNA 探针除可用于检测 DNA 和 mRNA 外,还有一个重要用途:在研究基因表达时,常常需要观察该基因的转录状况,在原核表达系统中外源基因不仅进行正向转录,有时还存在反向转录(即生成反义 RNA),这种现象往往是外源基因表达不高的重要原因。另外,在真核系统某些基因也存在反向转录,产生反义 RNA 参与自身表达的调控,在这些情况下,要准确测定正向和反向转

录水平就不能用双链 DNA 探针,而只能用 RNA 探针或单链 DNA 探针。

综上所述, RNA 探针具有 DNA 探针所不能比拟的高杂交效率,但 RNA 探针也存在易于降解和标记方法复杂等缺点。

(四) 人工合成的寡核苷酸探针

随着 DNA 合成仪的推广使用,使得人工合成寡核苷酸越来越经济实用,因此人工合成的寡核苷酸作为探针应用也越来越普及。在设计寡核苷酸探针时应注意以下几个问题:

1. 探针的序列及长度 寡核苷酸的序列主要根据靶分子的序列而定,它的长度一般认为 18~50 个核苷酸比较适宜。由于链短,其序列复杂度低,相对分子质量小,所以和等量靶位点完全杂交的时间比克隆探针短。例如,20nt 的寡核苷酸探针在浓度为 100 ng/ml,靶序列为 1~100 pg、1 kb 片段或 $3 \times 10^{-18} \sim 3 \times 10^{-16}$ mol/L 时,达到最大程度的杂交只需 10 min,而用 2 kb 的克隆探针在同样条件下达到完全杂交则需 16 h。

2. 碱基成分 G+C 含量为 40%~60%,超出此范围会增加非特异性杂交。

3. 探针分子内不应存在互补区,否则会出现抑制探针杂交的“发夹”状结构。

4. 避免单一碱基的重复出现(不能多于 4 个),如 CCCCC。

5. 一旦选定某一序列符合上述标准,最好将该序列与核酸库中核酸序列进行同源性比较,探针序列应与含靶序列的核酸杂交,而非靶区域的同源性不应超过 70%或有连续 8 个或更多的碱基的同源,否则,该探针不能用。

二、标记物的应用及选择

核酸分子杂交技术在分子生物学中的广泛应用,在很大程度上取决于高敏感性检测的各种标记物。根据标记物本身的性质及检测特点,可分为放射性同位素及非放射性物质标记物。

(一) 常用的放射性标记物

放射性同位素的应用十分广泛,这源于它具有以下特性①放射性同位素的灵敏度极高,一般可以检测到 $10^{-4} \sim 10^{-18}$ g 的物质,在最适条件下,可检测出样品中少于 1 000 个分子的核酸含量。②放射性同位素与核酸相应的元素具有完全相同的化学性质,因为两者之间的差别只在于中子数目上,质子和电子数完全一致,而元素的化学性质是由其核外电子决定的,因此对各种酶促反应无任何影响,也不会影响碱基配对的特异性与稳定性。③对于放射性同位素的检测具有很高的特异性,假阳性的结果比较少。④它的最大缺点就是可造成放射性污染,这是个十分要紧的问题。⑤不同的放射性同位素的半衰期不同,半衰期短的同位素应用受到限制,必须随时用随时标记,标记后立即使用,不能长时间存放,因此给应用带来诸多的不便。

常用于标记核酸探针的放射性同位素有 ^{32}P 、 ^3H 和 ^{35}S ,另外 ^{14}C 、 ^{125}I 和 ^{131}I 也有使用,各种放射性同位素的适用范围是由其物理特性决定的。见表 10-1。

1. ^{32}P 释放高能量的 β 粒子,因此放射性强,这就决定 ^{32}P 用于标记核酸时灵敏度高,自显影时所需时间短。 ^{32}P 可标记在核苷酸(NTP)或脱氧核苷酸(dNTP)的三磷酸的 α 位(切口平移法标记 DNA 探针),也可以标记在三磷酸的 γ 位(多核苷酸激酶标记 DNA)。它的缺点是半衰期只有 14 天,因此必须现标现用。

表 10-1 常用放射性同位素的物理性质

核 素	半衰期	100%纯度时的同位素放射活度 (3.7×10^{10} Bq/mmol)	射线粒子的最大能量/keV	
			β	γ
^3H	12.1 年	29	18.5	—
^{14}C	5 100 年	62	156	—
^{32}P	14.3 天	9 120	1 710	—
^{35}S	87.1 天	1 490	169	—
^{125}I	60 天	2 400	34.6	35.4
^{131}I	8.6 天	16 100	608	365

2. ^{35}S 释放 β 粒子,但能量较低。由于半衰期较长(87 天)用于细胞原位杂交也有较好的效果。 ^{35}S 原子可以取代磷酸分子上的一个氧原子,而成为 ^{35}S 标记的核苷酸分子(图 10-4),这种取代后的标记分子可以被细胞内 DNA 和 RNA 聚合酶等识别,因此不影响它的使用。

3. ^3H 释放非常低能量的 β 粒子,比较适用于细胞原位杂交,但放射自显影的时间较长,其半衰期长,标记好的探针可长时间存放。

(二) 常用的非放射性标记物

放射性标记物虽有很多优点,但它最大的问题是污染环境,对操作者造成一定程度的伤害,在目前环保意识越来越强的今天,为了可持续发展的需要,更多的研究和寻找非放射性标记物势在必行。

目前比较常用的非放射性标记物是生物素系统和地高辛系统。

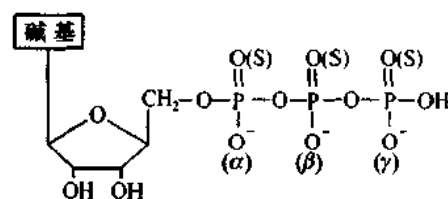


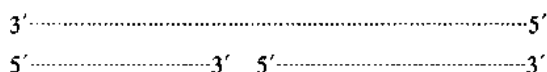
图 10-4 ^{32}P 及 ^{35}S 标记的核糖核苷三磷酸结构图

第三节 放射性同位素标记核酸探针

一、切口平移法(nick translation)

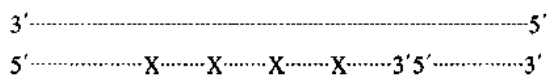
该技术由 Kelly 于 1970 年创立,其基本原理为:首先用 DNA 酶在双链 DNA 探针分子的一条链上切出一些切口(nick),切口处会形成 3'-羟基末端。同时根据大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3'核酸外切酶活性,此酶切缺口 5'侧核苷酸依次切除,其结果是在切口的 5'侧不断消除核苷酸而在 3'侧则依次添加核苷酸,从而使切口沿着互补 DNA 链移动,故称切口平移(nick translation)。根据这个原理,如果用高强度的放射性核苷酸(通常为 $[\alpha - ^{32}\text{P}] \text{dATP}$)置换先前存在的核苷酸,则可制备比活度高达 10^8 cpm(每分钟脉冲数)/ μg 的 ^{32}P 标记 DNA。用切口平移标记的 DNA 探针能满足大多数杂交要求。

由 DNA 酶切出带切口的双链 DNA



DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 外切活性

DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 聚合活性, 聚合过程中加入放射性磷标记的 [α - 32 P]dATP



切口平移标记 DNA 探针

二、随机引物法 (random primer)

目前市售的试剂盒中的随机引物是人工合成 6~8 个核苷酸长的各种不同排列顺序的混合物 ($4^6 = 4096$ 种排列顺序)。它们可以随机地互补到 DNA 探针的某一处, 作为引物, 在大肠杆菌聚合酶 I 大片段 (Klenow) 作用下, 合成与探针 DNA 互补的 DNA 链, 当在反应液中加入 [α - 32 P]dATP 时, 即可形成放射性同位素标记的 DNA 探针。但是这样合成的探针 DNA 是一系列长短不同的序列, 有些可能比较短。

用随机引物法标记的 DNA 探针或 cDNA 探针比活度显著高于切口平移法, 且结果较为稳定。这种方法尤其适用于真核 DNA 探针, 因为随机引物来自真核 DNA, 其与真核序列的退火率要高于原核序列。

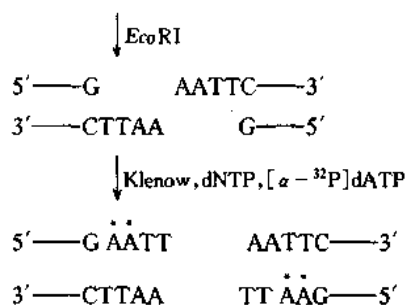
三、用 T4 多核苷酸激酶标记 DNA 5' 末端

寡核苷酸探针或短的 RNA 和 DNA 探针可选用此法标记, 寡核苷酸探针一般多用这种标记方法。T4 多核苷酸激酶 (polynucleotide kinase, PNK) 是由 T4 噬菌体感染的大肠杆菌中提取的, 此酶能催化 ATP 的 γ -磷酸转移至 DNA 或 RNA 的 5'-OH 末端。在超量 ADP 存在时, 也可促进磷酸交换反应, PNK 将 DNA 末端 5' 磷酸转移到 ADP 上生成 ATP, 然后催化 [γ - 32 P]ATP 上的磷酸转移至 DNA 的 5' 末端, 从而使 DNA 重新磷酸化, 并藉此得到标记。显然, PNK 标记 DNA 末端需要 [γ - 32 P]ATP, 这与前述切口平移法不同。通常, 对于 5' 磷酸化的 DNA 探针, 要先用碱性磷酸酶去掉磷酸基团, 然后再用于 PNK 催化的 5' 末端标记, 这样标记效率比较高。

四、大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段快速标记 DNA 探针末端

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 经枯草杆菌蛋白酶切割可得到两条多肽链, 其中相对分子质量为 76×10^3 的大片段称为 Klenow 片段, 该酶具有完整聚合酶 I 的 5'→3' 核酸聚合酶活性。利用 Klenow 片段可以填补由限制酶消解 DNA 所产生的 3' 凹陷末端。因此, 用这种方法可以标记双链 DNA 的凹缺 3' 末端。用 Klenow 片段标记末端一般只用一种 [α - 32 P]dNTP, 加入反应的 [α - 32 P]dNTP 取决于 DNA 末端延伸的 5' 末端序列。例如, 用 *EcoRI* 切割 DNA 所产生的末端可用 [α - 32 P]dATP 标记。标记反应可在一种限制酶消解 DNA 后立即进行, 不需去除限制酶或使其失活, 也不需更换缓冲液。具有 3' 延伸的 DNA 末端不能被 Klenow 片段有效地标记, 欲标记这类分

子可用 T4 DNA 聚合酶。



选用这种标记方法可用于凝胶电泳时作大小参照物的 DNA 片段的标记,因为标记 DNA 片段与其浓度成比例,而不与片段大小成比例,在限制酶消化物中,小的和大的片段都以相同程度被标记。因此,可使用放射自显影术确定不能被溴化乙锭染色的太小 DNA 带,尤其适用于 Southern 印迹杂交时相对分子质量标记物的标记。通过选择相应标记的 dNTP,该法还可以只标记 DNA 分子的一端,例如,若 DNA 片段的两个末端分别是 *Bam*H I 和 *Hind* III 粘端,在反应中只加入 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 或 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$,便可选择性标记两末端之一。

第四节 非放射性物质标记核酸探针

非放射性物质用于标记核酸的最大优点就是无环境污染,另一个优点是无半衰期的问题,标记好以后可以贮存较长时间,给应用和操作带来极大的方便。目前非放射性标记物用得最多的是生物素和地高辛。

一、生物素 (biotin) 标记核酸探针

生物素标记的脱氧核苷三磷酸有: Bio-11-dUTP, Bio-7-dATP, Bio-11-dCTP 等,这些生物素化的脱氧核苷三磷酸一般来自专业化公司制备。在 DNA 聚合酶的作用下, Bio-11-dUTP 代替 dTTP, Bio-7-dATP 代替 dATP, Bio-11-dCTP 代替 dCTP 掺入到 DNA 分子中,使这种 DNA 分子带上了生物素分子。

生物素化探针的检测系统主要有抗生素抗体及抗生物素蛋白 (avidin) 和链亲和素 (strept-avidin), 抗生物素蛋白是从卵清中提取的相对分子质量为 6 600, $p^I = 10.5$ 的一种糖蛋白, 它们与生物素具有很高的亲和能力。链亲和素是一种相对分子质量为 60 000 的蛋白质, p^I 为中性, 比抗生物素蛋白的特异性更高。检测系统中将抗生物素蛋白或链亲和素标上酶 (过氧化物酶或碱性磷酸酶), 当掺入 DNA 中的生物素与抗生物素蛋白或链亲和素特异性结合时, 标在上面的酶就可催化底物发生颜色变化, 以示阳性反应。

二、地高辛标记核酸探针

地高辛 (Dig) 是一种固醇类的半抗原, 通过碱不稳定的酯键连接到 dUTP 上, 因此这种标记的探针只能通过煮沸变性而不能用碱 (NaOH) 变性 (图 10-5)。

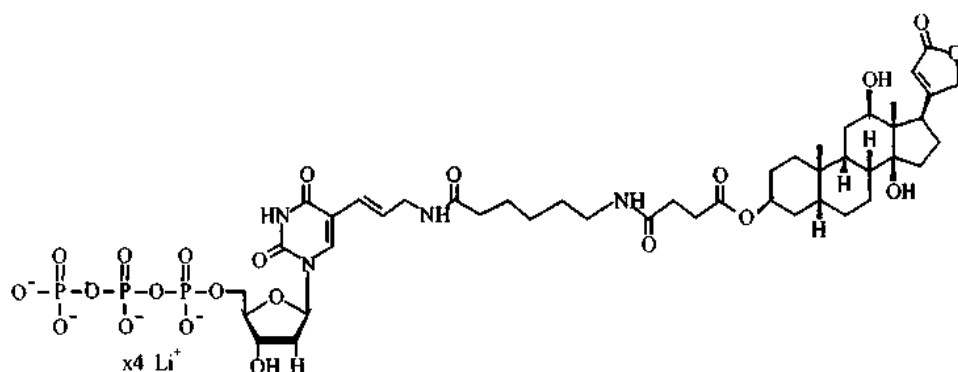


图 10-5 Dig-dUTP, 碱不稳定

(一) DNA 标记

Dig 标记 DNA 探针是根据随机引物标记方法进行的, 当这些随机片段与 DNA 模板互补后, 在 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow)的作用下, dNTP 和 Dig-dUTP 掺入到新合成的片段中。

(二) 标记效率

1 μg 对照 DNA(λ DNA)能产生 250 ng Dig 标记的 DNA, 标记的 DNA 片段的大小在 200 ~ 2 000 bp 之间。

(三) 杂交

Dig 标记的探针可用于所有杂交膜上靶核酸分子。

(四) 免疫检测

杂交在膜上的探针可以与连接 AP 的抗 Dig Fab 片段相结合。此酶的作用底物为 NBT(四氮唑蓝)/X-磷酸, 碱性磷酸酶水解底物后产生蓝色化合物(图 10-6)。

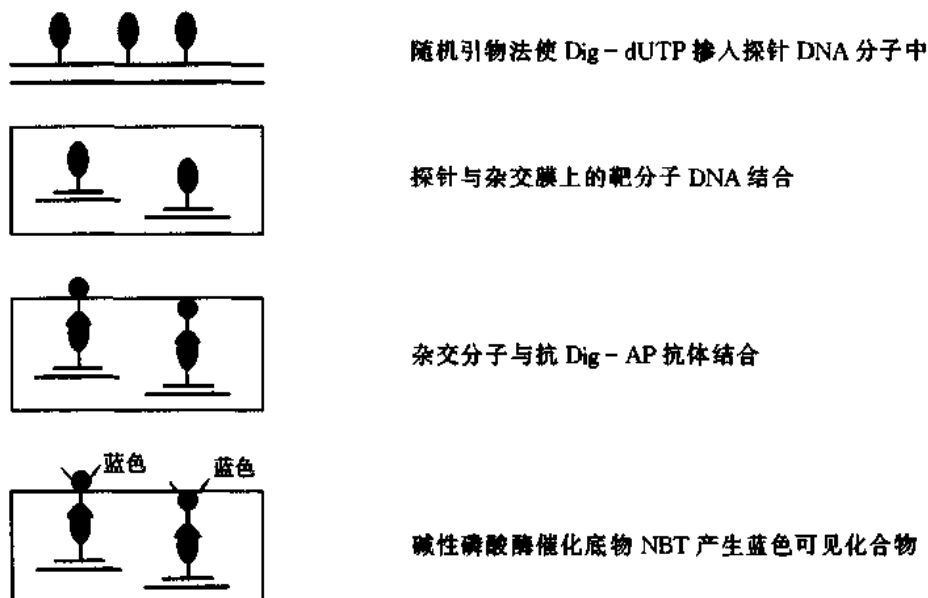


图 10-6 地高辛标记核酸探针的检测

用 Dig 标记的探针可以在 -20°C 存放一年以下,检测灵敏度可以达到测出单拷贝的靶核酸分子。

第五节 核酸分子杂交方法

一、核酸分子杂交的类型

大致可分为固相杂交和液相杂交两大类。固相杂交是将需要杂交的一条核酸先固定在固体支持物上,另一条核酸链游离在液体中,常用的固体支持物有硝酸纤维素膜、尼龙膜、乳胶颗粒、磁珠和微孔板,液相杂交是参加反应的两条核酸链都游离在液体中。

由于固相杂交后,未杂交的游离片段可容易地漂洗除去,膜上留下的杂交物容易检测和能防止靶 DNA 自我复性等优点,故该法最为常用。常用的固相杂交类型有:菌落原位杂交、斑点杂交、狭缝杂交、Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交、组织原位杂交和夹心杂交等。

液相杂交是一种研究最早且操作简便的杂交类型,在过去的 30 年里虽有时被应用,但总不如固相杂交那样普遍,其主要原因是杂交后过量的未杂交探针在溶液中除去较为困难和误差较高。近几年由于杂交检测技术的不断改进,商业性基因探针诊断盒的实验室应用,推动了液相杂交技术的迅速发展,下面对固相杂交和液相杂交分别进行介绍。

(一) 固相杂交支持物的选择

目前进行核酸杂交实验常采用下列固体支持物,它们各有优缺点,可根据实验目的进行选择,但总的原则是这些支持物必须具备下列要求:①具有较强的结合核酸的能力,一般每平方厘米结合核酸的量不应低于 $10\text{ }\mu\text{g}$ 。②与核酸的结合比较稳定,可耐受杂交时的温度变化及洗膜时缓冲液酸碱的改变。③尽量少的非特异性吸附,在洗膜条件下能将非特异性吸附在其表面的探针分子洗掉。下面介绍常用的几种固相支持物:

1. 硝酸纤维素滤膜(nitrocellulose filter membrane) 硝酸纤维素滤膜具有较强的吸附单链 DNA 和 RNA 的能力,特别是在高盐浓度下,其结合能力可达 $80\sim 100\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。吸附的单链 DNA 或 RNA 经真空烘烤后,依靠疏水性相互作用而结合在硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜还具有杂交信号本底较低的优点,因此被广泛应用于 Southern、Northern、斑点印迹及克隆筛选中。硝酸纤维素膜非特异性地吸附蛋白质的作用较弱,因此特别适合于那些涉及蛋白质作用(如抗体和酶等)的非放射性标记探针的杂交体系。

硝酸纤维素虽是应用最广泛的一种固相支持物,但它并不十分理想。因为硝酸纤维素膜是依靠疏水性相互作用结合 DNA 的,这种结合并不十分牢固,随着杂交及洗膜的进程, DNA 会慢慢脱离硝酸纤维素膜,特别是高温情况下,从而使杂交效率下降,因此不太适宜于在同一膜上重复进行杂交。再者,硝酸纤维素膜质地较脆,特别是经烘烤后操作不方便,须特别小心。硝酸纤维素膜与核酸的结合有赖于高盐浓度($>10\times\text{SSC}$),在低盐浓度时结合 DNA 效果不佳,因此不适用于电转印迹法。另外,硝酸纤维素膜对于小分子 DNA 片段(特别是小于 200 bp 的 DNA 片段)结合能力不强,因此现在更多的人倾向于使用尼龙膜。

2. 尼龙膜(nylon membrane) 尼龙膜是目前较理想的一种核酸固相支持物。它有多种类型,

除网眼大小不一样外,有些经过了正电荷基团的修饰。这种修饰的尼龙膜结合核酸的能力更强。如 Amersham 公司产品 Hybond - N 是普通尼龙膜,而 Hybond - N⁺、Bio - Rad 产品 Netaprobe、Dupont 产品 Gene - Screen Plus 及 Pharmacia 产品 Gene Bind 是正电荷修饰的尼龙膜。

尼龙膜结合单链及双链 DNA 和 RNA 的能力较硝酸纤维素膜更强,可达 350~500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。而且经烘烤或紫外线照射后,核酸分子可牢固地结合在尼龙膜上,特别是用短波紫外线照射后,核酸中的部分嘧啶碱基可与膜上的带正电荷的氨基相互交联,从而使结合更加牢固。碱处理也可使 DNA 牢固结合在尼龙膜上,因此使 DNA 的变性、吸印和固定可以一步完成。有报道微波处理也可使 DNA 结合在尼龙膜,此方法特别适合于菌落原位吸印法,使细菌的裂解、DNA 变性与固定可一步完成(注意,硝酸纤维素膜不能用微波处理,否则会引起燃烧)。另外,它的韧性较强,操作较方便;对于小分子的核酸片段亦有较强的结合能力,甚至短至 10 bp 的核酸片段也能结合;在低离子强度条件下也可较好地结合 DNA,因此比较适合于电转印迹法;再者,尼龙膜可重复用于杂交,一次杂交后探针分子可经碱变性而被洗脱下来,从而可用于与第二探针进行杂交。其缺点是杂交信号本底较高,可以用加大预杂交液中的非特异性封闭试剂的方法克服。

(二) 固相杂交的一般程序

1. DNA 的变性 DNA 变性解链是杂交成功的关键。Southern 印迹杂交时 DNA 在凝胶中变性,变性方法是将凝胶浸在数倍体积的 1.5 mol/L NaCl 和 0.5 mol/L NaOH 中 1 h,然后用数倍体积的 1 mol/L Tris·Cl(pH 8.0)和 1.5 mol/L NaCl 溶液中和 1 h。DNA 受酸、碱、热等处理均能发生变性,但强酸会使核酸降解,一般认为碱变性较好,可避免 DNA 的降解,热变性要在低 DNA 浓度(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和低盐浓度(0.1 \times SSC, 15 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L 柠檬酸三钠, pH 7.0)下进行。用 SSC 稀释 DNA 溶液为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,加 6 mol/L HCl 或 5 mol/L NaH_2PO_4 调 pH 到 7~8[亦可用碱变性后,调至中性,再加热 100℃ 10 min;或将碱(pH 13)加入,同时加热 100℃ 10 min 后,调到中性;或只加热 100℃ 10 min]。DNA 变性可用 A_{260} 增加(约 30%~40%)来检测,变性 DNA 乙醇沉淀呈雪样,完全失去纤维状沉淀。变性后加入等量冷的 12 \times SSC,冰浴保存。

2. 变性 DNA 在硝酸纤维素膜上的固定 硝酸纤维素滤膜(孔径 0.45 μm)先在蒸馏水中充分浸泡,再用 6 \times SSC 浸泡 30 min~2 h,晾干, DNA 样品转移或加至硝酸纤维素膜上后,先室温干燥 4 h,然后在 80℃ 真空干燥 2 h。

3. 预杂交 湿润的滤膜放入可加热封口的塑料袋中,按每平方厘米滤膜加 0.2 ml 预热至 60℃ 的预杂交液(6 \times SSC, 5 g/L SDS, 5 \times Denhardt 液, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鲑鱼精 DNA)。鲑鱼精 DNA 需经过剪切或 DNA 酶消化处理,然后酒精沉淀纯化,调浓度至 10 mg/ml,用前放 100℃ 水浴中煮沸变性 10 min,冰水骤冷。尽可能将袋中气泡赶净,用封口器将袋口封住。将杂交袋浸入 68℃ 水浴中保温 3~12 h,当预杂交液温度升至 68℃ 时,在滤膜表面常会形成小气泡,轻轻晃动袋中液体即可除去这些小气泡,这一点对于保证滤膜表面充分浸润预杂交液很重要。

4. 杂交 从水浴中取出塑料袋,用剪刀剪开一角,尽可能挤净预杂交液,用吸管或大枪头将杂交液加入袋中,用恰好足量的液体保持滤膜湿润(50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$)。溶液的组成是 6 \times SSC, 0.01 mol/L EDTA, 变性的标记核酸探针, 5 \times Denhardt 液, 5 g/L SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性的鲑鱼精 DNA。尽可能赶净气泡后,将塑料袋严密封口。杂交反应在 68℃ 水浴中进行,所需时间视探针和检测靶 DNA 的性质及探针的比活度等情况而定,一般为 4~20 h。

5. 洗膜 取出塑料袋,用剪刀剪开,小心取出滤膜,立即浸入盛有 2 \times SSC 和 0.5% SDS 溶液

的盘中,室温下漂洗 5 min,再将滤膜移入 $2 \times \text{SSC}$ 和 1 g/L SDS 溶液中,室温下洗涤 15 min(轻轻摇动),然后将滤膜移入 $0.1 \times \text{SSC}$ 和 5 g/L SDS 溶液中,68℃ 轻轻摇动保温 2 h,更换缓冲液后继续保温 30 min。

洗膜的温度一般应控制在低于 T_m 值 12℃ 以上, ($T_m = 69.3 + 0.41x_{G+C}$), 双链 DNA 的 T_m 值随错配碱基对数每增加 1% 而递减 1℃。

6. 结果显示 非放射性检测方法前已述及,此处主要介绍放射性测定方法。固相膜的放射性杂交结果显示有两种方式,一是放射自显影法,另一种是液闪计数法。前一种方法比较简单,只需将杂交膜与 X 线片在暗盒中曝光数小时至数天,再显影、定影即可。对于杂交信号较弱的固相膜,用一块增感屏可显著增强曝光强度。此外,为了减弱 ^{32}P 的散射,曝光通常在 -20℃ 或 -80℃ 下进行。液闪计数法主要用于斑点和狭缝杂交及为了比较两个杂交信号的强弱等情形,方法是将完成杂交的膜在漂洗结束后剪成小块(每份样品 1 块),80℃ 真空干燥后装闪烁瓶,加入 2~5 ml 闪烁液,剪 2~3 块无样品膜作为本底对照,在液体闪烁计数器上自动计数,液体计数测定放射性强度也可在放射自显影之后进行。

(三) 固相核酸分子杂交类型

1. 菌落原位杂交(colony *in situ* hybridization) 菌落原位杂交是将细菌从一主平板转移到硝酸纤维素滤膜上,然后滤膜上的菌落裂解以释出 DNA,将 DNA 烘干固定于膜上与 ^{32}P 标记的探针杂交,放射自显影检测菌落杂交信号,并与主平板上的菌落对位。这对于从众多的菌落中筛选出阳性克隆尤为适用。

实验步骤如下:

(1) 将硝酸纤维素滤膜置于含抗生素的平皿琼脂培养基上,用无菌牙签挑取单菌落种于滤膜和主琼脂平板上,排列成方格栅,膜和板上菌落位置相同。

(2) 培养细菌至产生 1~2 mm 大小菌落。

(3) 在一块平皿中置 4 张滤纸,用 100 g/L SDS 浸透,倒掉多余液体,将带有菌的滤膜取下,轻轻置于滤纸上,菌落面在上,注意防止滤膜底面存在气泡。

(4) 5 min 后,将滤膜转至用变性溶液(0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl)浸湿的滤纸上,放置 10 min。

(5) 将滤膜转至中和溶液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris·Cl pH 8.0)浸湿的滤纸上,放置 10 min,重复中和一次。

(6) 将滤膜移至用 $2 \times \text{SSPE}$ 溶液浸过的滤纸上,放置 10 min, SSPE 配成 $20 \times$ 贮备液: 3.6 mol/L NaCl, 0.2 mol/L NaH_2PO_4 (pH 7.4), 20 mmol/L EDTA (pH 7.4)。

(7) 将滤膜用滤纸吸干,80℃ 真空烘干 2 h。

以后操作参考前述方法。

2. 斑点杂交(Dot blotting) 斑点杂交法是将被检标本点到膜上,烘烤固定。这种方法耗时短,可做半定量分析。一张膜上可同时检测多个样品,为使点样准确方便,市售有多种多管吸印仪(manifolds),如 Minifold I 和 II, Bio-Dot(Bio-Rad) 和 Hybri-Dot, 它们有许多孔,样品加到孔中,在负压下就会流到膜上呈斑点状或狭缝状。反复冲洗进样孔,取出膜烤干或紫外线照射以固定标本,这时膜就可以进行杂交。

(1) DNA 斑点杂交

- ① 先将膜在水中浸湿,再放到 $15\times\text{SSC}$ 中。
- ② 将 DNA 样品溶于水或 TE,煮沸 5 min,冰中速冷。
- ③ 用铅笔在滤膜上标好位置,将 DNA 点样于膜上,每个样品一般点 $5\mu\text{l}$ ($2\sim 10\mu\text{g}$ DNA)。
- ④ 将膜烘干,密封保存备用。

(2) RNA 斑点杂交 与上法类似,每个样品至多加 $10\mu\text{g}$ 总 RNA(经酚/氯仿或异硫氰酸胍提取纯化),方法是 RNA 溶于 $5\mu\text{l}$ DEPC 水,加 $15\mu\text{l}$ 甲醛/SSC 缓冲液($10\times\text{SSC}$ 中含 6.15mol/L 甲醛);使 RNA 变性,然后取 $5\sim 8\mu\text{l}$ 点样于处理好的滤膜上,烘干。

对于培养细胞,标本处理技术可以简化,不用提取和纯化 RNA,方法是用含 0.5% Nonidet P40 的低渗缓冲液对多种动物细胞作简单处理,离心去掉细胞核和细胞碎片,就得到基本不带 DNA 而富含细胞质 RNA 的细胞质提取物。这一粗 RNA 在高盐下用甲醛变性,不需加工直接点到硝酸纤维素膜上,本法可以快速检测大量标本,而只需极少量的细胞(5×10^4)或组织。

整个 RNA 实验中,要防止激活内源性 RNase,有许多种预防措施,有一种是在样品中加入核糖核苷酸复合物(RVC)。

(3) 完整细胞斑点杂交 应用类似检测细菌菌落的方法,可以对细胞培养物的特异序列进行快速检测。将整个细胞点到膜上,经 NaOH 处理,使 DNA 暴露,变性和固定,再按常规方法进行杂交与检测。有人曾用此法从 10^5 个培养细胞中检测到 5pg 的 Epstein-Barr 病毒 DNA。完整细胞斑点印迹法可以用于筛选大量标本,因为它是使细胞直接在膜上溶解,所以 DNA 含量甚至比常用的提取法还高,又不影响与 ^{32}P 标记的探针杂交,但它不适用于非放射性标记探针,因为 DNA 纯度不够,会产生高本底。

3. Southern 印迹杂交(Southern blotting) 1975 年,由苏格兰爱丁堡大学 Southern E M 首先提出。Southern 印迹杂交的基本方法,是将 DNA 标本用限制性内切酶消解后,经琼脂糖凝胶电泳分离各酶解片段,然后经碱变性,Tris 缓冲液中和,高盐下通过毛细管虹吸作用将 DNA 从凝胶中转印至硝酸纤维素滤膜上,烘干固定后即可用于杂交。凝胶中 DNA 片段的相对位置在 DNA 片段转移到滤膜的过程中继续保持着,随着在滤膜上的 DNA 与 ^{32}P 标记的探针杂交,利用放射自显影技术确定探针互补的每一条 DNA 带的位置,从而可以确定在众多消解产物中含某一特定序列的 DNA 片段的位置和大小。

4. Northern 印迹杂交(Northern blotting) 这是一种将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素膜上的方法。DNA 印迹技术由 Southern 于 1975 年创建,称为 Southern 印迹技术, RNA 印迹技术正好与 DNA 相对应,故被趣称为 Northern 印迹杂交,与此原理相似的蛋白质印迹技术则被称为 Western blotting。Northern 印迹杂交的 RNA 吸印与 Southern 印迹杂交的 DNA 吸印方法类似,只是在进样前用甲基氢氧化银、乙二醛或甲醛使 RNA 变性,而不用 NaOH,因为它会降解 RNA。RNA 变性后有利于在转印过程中与硝酸纤维素膜的结合,它同样可在高盐中进行转印,但在烘烤前与膜结合得并不牢固,所以在转印后只能用低盐缓冲液洗脱,否则 RNA 会被洗脱。在胶中不能加 EB,因为它会影响 RNA 与硝酸纤维素膜的结合。为测定片段大小,可在同一块胶上加标记物一同电泳,之后将标记物胶切下,上色,照相,样品胶则进行 Northern 转印。标记物胶上色的方法是在暗室中将其浸在含 $5\mu\text{g/ml}$ EB 的 0.1mol/L 醋酸铵中 10 min,在水中脱色,在紫外光下用一次成像相机拍照时,上色的 RNA 胶要尽可能少接触紫外光,若接触太多或在白炽灯下暴露过久,会使 RNA 信号降低。琼脂糖凝胶中分离功能完整的 mRNA 时,甲基氢氧化银是一种强力、可逆变

性剂,但是有毒,因而许多人用甲醛作为变性剂。所有操作均应避免 RNase 的污染。

5. 组织原位杂交(tissue *in situ* hybridization) 组织原位杂交简称原位杂交,指组织或细胞的原位杂交。它与菌落原位杂交不同,菌落原位杂交需裂解细菌释出 DNA,然后进行杂交;而原位杂交是经适当处理后,使细胞通透性增加,让探针进入细胞内与 DNA 或 RNA 杂交。因此原位杂交可以确定探针的互补序列在胞内的空间位置,这一点具有重要的生物学和病理学意义。例如,对致密染色体 DNA 的原位杂交可用于显示特定序列的位置;对分裂期间核 DNA 的杂交可研究特定序列在染色质内的功能排布;与细胞 RNA 的杂交可精确分析任何一种 RNA 在细胞中和组织中的分布。此外,原位杂交还是显示细胞亚群分布和动向及病原微生物存在的方式和部位的一种重要技术。

用于原位杂交的探针可以是单链或双链 DNA,也可以是 RNA 探针。通常探针的长度以 100~400 个核苷酸为宜,过长则杂交效率减低。最近研究结果表明,寡核苷酸探针(16~30 nt)能自由出入细菌和组织细胞壁,杂交效率明显高于长探针,因此,寡核苷酸探针和不对称 PCR 标记的小 DNA 探针或体外转录标记的 RNA 探针是组织原位杂交的优选探针。

探针的标记物可以是放射性同位素,也可以是非放射性生物素和半抗原等,放射性同位素中, ^3H 和 ^{35}S 最为常用, ^3H 标记的探针半衰期长,成像分辨率高,便于定位,缺点是能量低; ^{35}S 标记探针活性较高,成像分辨率也较好;而 ^{32}P 能量过高,致使产生的影像模糊,不利于确定杂交位点。

原位杂交中,标本的固定条件是影响杂交效率的重要因素。标本组织蛋白质的消化程度对探针进入细胞极为重要,去除蛋白质的方法是,用 0.2 mol/L HCl 处理载玻片,用蛋白酶 K 消化,然后用不同浓度的乙醇脱水。原位杂交还是一种新技术,发展很快,在敏感性、特异性和稳定性上还需进一步完善和提高。

(四) 固相膜核酸杂交中“噪音”的排除

“噪音”(noise)是固相膜杂交方法常遇到的问题,指标记 DNA 结合到空白膜上的放射性计数,即本底。这个问题的克服一是使用高纯度的核酸制品和充分严格的杂交条件;二是选择合适的杂交的反应液和对膜进行处理。研究发现,随着离子强度的增加,空白膜(未固定 DNA 对照膜)上的“噪音”水平增加,而在 50% 甲酰胺,6×SSC 的杂交反应液中“噪音”最低。目前,最常使用的消除噪音的方法是用 Denhardt 液与固定膜预保温,这样可以充分封闭膜上多余非特异结合位点。

(五) 液相核酸分子杂交类型

1. 吸附杂交

(1) HAP 吸附杂交 羟基磷灰石(HAP)层析或吸附是液相杂交中最早使用的方法,在液相中杂交后,DNA:DNA 杂交双链在低盐条件可特异地吸附到 HAP 上,通过离心使吸附有核酸双链的 HAP 沉淀,再用缓冲液离心漂洗几次,然后将 HAP 置于计数器上进行放射性计数。

(2) 亲和吸附杂交 生物素标记 DNA 探针与溶液中过量的靶 RNA 杂交,杂交物吸附到酰化亲和素包被的固相支持物(如小球)上,用特异性抗 DNA:RNA 杂交物的酶标单克隆抗体与固相支持物上的杂交物反应,加入酶显色底物。这个系统可快速(2 h)检测 RNA。

(3) 磁珠吸附杂交 Gen-probe 公司最近应用吖啶酮酯(acridinium ester)标记 DNA 探针,这种试剂可用更敏感的化学发光来检测,探针和靶核酸分子杂交后,杂交物可特异地吸附在磁化的有孔小球(阳离子磁化微球体)上,溶液中的磁性小球可用磁铁吸出,经过简单的漂洗步骤,吸附探针的小球可用化学发光测定。

2. 发光液相杂交

(1) 能量传递法 Heller 等设计用两个紧接的探针,一个探针的一端用化学发光基团(供体)标记,另一个探针

的一端用荧光物质标记,并且这两个探针靠得很近,两个靠得很近的探针用不同的物质标记(光发射标记)。当探针与特异的靶核酸分子杂交后,这些标记物靠得很近,一种标记物发射的光被另一种标记物吸收,并重新发出不同波长的光,调节检测器使得自动记录第二次发射光的波长,只有在两个探针分子靠得很近时,才能产生受激发光,因此这种方法具有较好的特异性。

(2) 吖啶酯标记法 吖啶酯标记探针与靶核酸杂交后,未杂交的标记探针分子上的吖啶酯可以用专门的方法选择性除去,所以杂交探针的化学发光是与靶核酸的量成比例的。该法的缺点是检测的敏感度低(约 1 ng 的靶核酸),仅适用于检测扩增的靶序列,如 rRNA 或 PCR 扩增产物。

3. 液相夹心杂交

(1) 亲和杂交 在靶核酸存在下,两个探针与靶杂交,形成夹心结构。杂交完成后,杂交物可移到新的管或凹孔中,在其中杂交物上的吸附探针可结合到固相支持物上,而杂交物上的检测探针可产生检测信号。用生物素标记吸附探针,用¹²⁵I 标记检测探针。这个系统的敏感性要检测出 4×10^5 靶分子,该试验保持了固相夹心杂交的高度特异性。

(2) 采用多组合成探针和化学发光检测 第一类探针是未标记的检测探针和液相吸附探针,它们有 50 个碱基长,其中含有 30 个细菌特异序列碱基和 20 个碱基的单链长尾;第二类探针是固相吸附探针,它可吸附在小珠或微孔板上。未标记检测探针的单链长尾用于结合扩增多体(标记探针)、液相吸附探针和靶核酸杂交物,从溶液中分离并固定在小珠或微孔板上。典型的试验可有 25 个不同的检测探针和 10 个不同的吸附探针,第一个标记检测探针上附着很多酶(碱性磷酸酶或过氧化物酶),可检验未标记检测探针的扩增,使用化学发光酶的底物比用显色反应酶的底物更敏感。这个杂交方法用于乙肝病毒、沙眼衣原体、淋球菌以及质粒抗性的检测,敏感性应能检测 5×10^4 双链 DNA 分子。

4. 复性速率液相分子杂交 这个方法的原理是细菌等原生物体的基因组 DNA 通常不包含重复顺序,它们在液相中复性(杂交)时,同源 DNA 比异源 DNA 的复性速度更快,同源程度越高,复性速率和杂交率越快。利用这个特点,可以通过分光光度计直接测定变性 DNA 在一定条件下的复性速率,进而用理论推导的数学公式来计算 DNA-DNA 之间的杂交(结合)度。

二、核酸分子杂交实验因素的优化

(一) 探针的选择

根据不同的杂交实验要求,应选择不同的核酸探针。在大多数情况下,可以选择克隆的 DNA 或 cDNA 双链探针,但是在有些情况下,必须选用其他类型的探针如寡核苷酸探针和 RNA 探针。例如,在检测靶序列上的单个碱基改变时应选用寡核苷酸探针,在检测单链靶序列时应选用与其互补的 DNA 单链探针(通过克隆入 M13 噬菌体 DNA 获得)、RNA 探针或寡核苷酸探针。长的双链 DNA 探针特异性较强,适宜检测复杂的靶核苷酸序列和病原体,但不适宜于组织原位杂交,因为它不易透过细胞膜进入胞内或核内,在这种情况下,寡核苷酸探针和短的 PCR 标记探针(80 ~ 150 bp)具有较大的优越性。

在选用探针时经常会受到可利用探针种类的限制,如在建立 DNA 文库时,手头没有筛选特定基因的克隆探针,这时就可用寡核苷酸探针来代替,但必须首先纯化该基因的编码蛋白,并测定 6 个以上的末端氨基酸序列,通过反推的核苷酸序列合成一套寡核苷酸探针。如果已有其他动物的同种基因克隆,因为人类和动物间在同一基因的核苷酸顺序上存在较高的同源性,因此可利用已鉴定的动物基因作探针来筛选人类基因克隆。对于基因核苷酸序列背景清楚而无法获得克隆探针时,可采用 PCR 方法扩增某段基因序列,并克隆入合适的质粒载体中,即可得到自己的探针,这种方法十分简便,无论基因组 DNA 探针还是 cDNA 探针都可以容易地获得,而且,还可以建立 PCR

的基因检测方法,与探针杂交方法可作对比,可谓一举两得。

(二) 探针的标记方法

在选择探针类型的同时,还需要选择标记方法。探针的标记方法很多,选择什么标记方法主要视个人的习惯和可利用条件而定,但在选择标记方法时,还应考虑实验的要求,如灵敏度和显示方法等。一般认为放射性探针比非放射性探针的灵敏度高,放射性探针的实际灵敏度还依赖于所采用的标记方法,如随机引物延伸法往往得到比切口平移法更高的比活度。在检测单拷贝基因序列时,应选用标记效率高,显示灵敏的探针标记方法,在对灵敏度要求不高时,可采用保存时间长的生物素探针技术和比较稳定的碱性磷酸酶显示系统。

(三) 探针的浓度

总的来说,随探针浓度增加,杂交率也增加。另外,在较窄范围内随探针浓度增加,敏感性增加。依上所述,要获得较满意的敏感性,膜杂交中, ^{32}P 标记探针与非放射性标记探针的用量分别为 $5\sim 10\text{ ng/ml}$ 和 $25\sim 1\,000\text{ ng/ml}$,而原位杂交中无论应用何种标记探针,其用量均为 $0.5\sim 5.0\text{ }\mu\text{g/ml}$,探针的任何内在物理特性均不影响其使用浓度,但受不同类型标记物、固相支持物的非特异结合性的影响。

(四) 杂交率

传统杂交率分析主要用于 DNA 复性研究,在这种情况下,探针和靶链在溶液中的浓度相同。现代杂交实验无论在液相杂交还是固相杂交均在探针过剩的条件下进行,此外固相杂交中靶序列不在液相,故其浓度不能精确计算。因此,本文不讨论通常用于杂交反应的传统二级速度公式,而叙述一级动力学公式。

在探针过量的条件下,杂交率主要依赖于探针长度(复杂度)和探针浓度,下面列出的公式适用于过剩单链探针对靶序列杂交的情形。双链探针开始时(1~4 h),杂交动力学相同,但长时间杂交后,由于探针本身的复性,可用杂交的探针浓度会逐渐降低,公式(1)可用于估计半数探针与固定靶序列杂交所需的时间。

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{kc} \quad (1)$$

t :保温(杂交)时间(s); k :形成杂交体的速率常数 $[\text{mol}/(\text{L} \times \text{nt} \times \text{s})]$; c :溶液中的探针浓度(mol/L)。速率常数 k 决定于探针长度(l)、探针复杂度(N)、温度、离子强度、粘度和 pH。不含重复序列的探针, $l = N$,例如,对一个含两个 20 nt 序列的 40 mer 探针而言, $l = 40$, $N = 20$, k 与这些变量的关系为

$$k_n = 3.5 \times 10^5 \quad k = \frac{k_n l^{0.5}}{N} \quad (2)$$

k_n 是成核作用速率常数(nucleation rate constant), $k_n = 3.5 \times 10^5$ 。 Na^+ 浓度为 $0.4\sim 1.0\text{ mol/L}$, pH 5~9 和杂交温度低于探针-靶序列杂交体 T_m 值 2.5°C 时,公式(1)和(2)可合并为(3),用于计算半数探针与靶序列的杂交率(以秒计)。

$$t_{1/2} = \frac{N \ln 2}{3.5 \times 10^5 (l^{0.5})c} \quad (3)$$

对一长 500 个碱基的探针而言,此值为:

$$t_{1/2} = \frac{500(0.693)}{3.5 \times 10^2 (22) 6 \times 10^{-10}} = 75\,000 \text{ s 或 } 20 \text{ h}$$

长 500 个碱基的探针杂交时间很长(20 h),应用短探针和使用杂交促进剂有其优越性。由于实际应用的探针长度变化较大(对 >1 kb 的探针,因扩散与粘度效应不可能使因素 L 得到合适的补偿)。另外,固定靶序列也不可能都用于杂交,所以,由公式预计的随探针长度增加的杂交率不一定总是正确的。

(五) 杂交最适温度

杂交技术最重要的因素之一是选择最适的杂交反应温度,若反应温度低于 T_m 10~15℃,碱基顺序高度同源的互补链可形成稳定的双链,错配对减少,若反应温度再低(T_m - 30℃),虽然互补链之间也可形成稳定的双链,但互补碱基配对变少,错配对增多,氢键结合减弱,如两个同源性在 50% 左右或更低些的 DNA,调整杂交温度可使它们之间的杂交率变化 10 倍,因此在实验前必须首先确定杂交温度。通常有三种温度可供试验,即最适复性温度,苛刻复性温度及非苛刻复性温度,温度的选择及温度对杂交的影响见表 10-2。最适复性温度(optimum renaturation temperature, T_{or}): $T_{or} = T_m - 25^\circ\text{C}$

表 10-2 DNA-DNA 杂交温度的选择范围(2×SSC)

DNA 中 G+C 的摩尔分数/%	杂交反应温度/℃		
	T_{or}	T_s	T_{ns}
30	62.3	73.3	52.3
35	64.9	74.9	54.9
40	67.4	77.4	57.4
45	70.0	80.0	60.0
50	72.5	82.5	62.5
55	75.1	85.1	65.1
60	77.6	87.6	67.6
65	80.2	90.2	70.2
70	82.7	92.2	72.7
75	85.3	95.3	75.3

苛刻复性温度: $T_s = T_m - (10 \text{ 或 } 15^\circ\text{C})$

非苛刻复性温度: $T_{ns} = T_m - (30 \text{ 或 } 35^\circ\text{C})$

在 2×SSC 反应液中,可以根据下列公式计算最适复性温度:

$$T_{or} = 0.51x_{G+C} + 47^\circ\text{C}$$

可以看出 DNA 复性和 DNA-RNA, DNA-DNA 杂交通常要在高温反应条件下进行,其反应的最大速度是在低于 T_m 值约 25℃。然而对于那些反应时间需要延长,或对生物活性必须保护的复杂生物的核酸研究(如哺乳动物),核酸长时间处于高温下很显然是不利的,这会引起核酸链的断裂、脱嘌呤作用,结合到膜上的 DNA 脱落也会增多,这个问题可以通过使用高浓度盐溶液(如 6.2 mol/L NaClO_4),或使用某些有机溶剂的水溶液降低反应温度来解决。常使用的有机溶剂有两类,甲酰胺和二甲亚砜(DMSO),在杂交液中加入 30% 二甲亚砜可使 T2 噬菌体 DNA 的 T_m 值比原先降低 14℃,而使用甲酰胺甚至可使 DNA 在室温下变性和复性。Mc Conaughy 等发现反应液中每

增加 1% 的甲酰胺浓度, T_m 值可降低 0.72℃。

现在认为, 适当选择甲酰胺和盐浓度及合适的反应温度, 可使 DNA 复性和 DNA-RNA 杂交获得高特异性和更快反应速度。

(六) 杂交的严格性

影响杂交体稳定的因素决定着杂交条件的严格性, 一般认为在低于杂交体 T_m 值 25℃ 时杂交最佳, 所以, 首先要根据公式(4)计算杂交体 T_m 值。由此式可见, 通过调节盐浓度、甲酰胺浓度和杂交温度来控制所需的严格性。对用 20 个碱基以上的探针做 DNA-DNA 杂交的 T_m 值计算如下:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log c + 0.41x_{G+C} - (500/n) - 0.61x(\text{甲酰胺}) \quad (4)$$

n = 杂交体中最短链的长度, c 为单价阳离子浓度, x_{G+C} 为 G + C 的摩尔分数, 因此, 对一个 G + C 含量为 42% 的 500 个碱基探针于 $5 \times \text{SSC}$ (0.75 mol/L Na^+) 和 50% 甲酰胺杂交的 T_m 值为:

$$T_m = [81.5 + (-2.07) + 17.22 - 1 - (30.5)]^\circ\text{C} = 65^\circ\text{C}$$

$$T_{\text{杂交}} = 65^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C} = 40^\circ\text{C}$$

影响 T_m 值的其他因素:

(1) 对克隆或合成探针而言, 同源性每下降 1%, T_m 值就降低 1.5℃, 15~150 个碱基的寡核苷酸探针的这种作用更明显。

(2) RNA-DNA 杂交体的 T_m 值较同样 DNA-DNA 杂交体的高 10~15℃。

(3) RNA-RNA 杂交体的 T_m 值较同样 DNA-DNA 杂交体的高 20~25℃。

显然, 当用 RNA 探针或以 RNA 为靶序列时, 要使用甲酰胺来降低 T_m 值以保证合适的杂交温度。当以克隆的探针进行膜杂交时, 在最后的漂洗步骤中应达到最严格的条件, 对一个 500 个碱基探针而言, 典型最终漂洗条件为 $0.1 \times \text{SSC}$ (0.015 mol/L Na^+), 55℃, 代入公式(4)可得:

$$T_m = [81.5 + (-30.3) + 17.22 - 1 - 0]^\circ\text{C} = 67^\circ\text{C}$$

$$67^\circ\text{C} - 55^\circ\text{C} = 12^\circ\text{C}$$

因此, 较 T_m 低 12℃ 的漂洗条件与比 T_m 低 25℃ 的杂交条件相比条件更严格了。

对寡核苷酸探针而言, 杂交温度往往低于 T_m 值 5℃, 因此, 对一个 G + C 含量为 50% 的 30 nt 寡核苷酸探针来说, T_m 值为:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + (-30.3) + 20.5 - 500/30 - 0.61 \times 0 = 55^\circ\text{C}$$

$$T_{\text{杂交}} = 55^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C} = 50^\circ\text{C}$$

下面一个经典的公式适用于 14~20 个碱基的寡核苷酸探针:

$$T_m = 4^\circ\text{C}[(G+C)\text{碱基数}] + 2^\circ\text{C}[(A+T)\text{碱基数}]$$

在实际应用中, 寡核苷酸探针的最佳杂交温度必须精确确定, 最方便的一种方法是制备一张含不同的稀释度靶 DNA 和非特异靶 DNA (如鱼精或大肠杆菌 DNA) 的膜, 在不同温度下使膜与探针杂交, 特异靶结合探针信号很强而非特异靶序列与探针无任何反应的温度就是最适温度。在某些条件下, 可用二甲亚砜(DMSO)代替甲酰胺来降低 T_m 值。

用一个以上的探针在(如夹心杂交)杂交系统中, 估计 T_m 值更加复杂, 可用上述公式估计每一

探针的 T_m 值,然后求其均值作为杂交温度。

(七) 杂交反应时间

在条件都得到满足的情况下,杂交的成败就取决于保温时间。时间短了,杂交反应不完全,时间长了会引起非特异结合增多,一般杂交反应要进行 20 h 左右。1966 年 Birnstein 和 Kohne 推荐用 Cot 值来计算杂交反应时间, Cot 值实际上是杂交液中单链起始浓度(C_0)和反应时间(t)的乘积。实验表明 $Cot=100$ 时,杂交反应基本完成, $Cot=0.2$,基本上没有杂交。例如,在液相杂交中未标记的 DNA $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ (按单股 DNA 每微克紫外吸收值为 0.024 计算,总的吸收值为 9.6),如果反应时间为 21 h,那么对于未标记的 DNA 来说, $Cot=9.6/2\times 21=100.8$,杂交完成了,对标准 DNA(浓度为 $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$)来说 Cot 值为 0.05,这就充分排除了标记 DNA 的自我复性。

(八) 杂交促进剂

惰性多聚体可用来促进 250 个碱基以上的探针的杂交率,对单链探针可增加 3 倍,而对双链探针,随机剪切或随机引物标记的探针可增加高达 100 倍。而短探针不需用促进剂,因其复杂度低和相对分子质量小,短探针本身的杂交率就高。

硫酸葡聚糖是一种广泛用于较长双链探针杂交的促进剂,这是一种多聚胺,平均相对分子质量为 500 000,使用终浓度为 5%~10%。使用该分子的缺点是因其相对分子质量大而引起溶液粘度大大增加。另一种常见的促进剂是聚乙二醇(PEG),PEG 相对分子质量小(6 000~8 000),粘度低,价格低廉,但它不能完全取代硫酸葡聚糖。在某些条件下 5%~10% 硫酸葡聚糖效果较好,若用 5%~10% PEG 则可产生很高的本底,因此,使用促进剂时有必要优化条件。另一种多聚体促进剂是聚丙烯酸,用其钠盐,浓度为 2%~4%,与硫酸葡聚糖相比,其优点是价格低廉,粘度低(M_r : 90 000)。

小分子化学试剂酚和硫氰酸胍也能促进杂交,它们可能是通过增加小的疏水性和降低双链和单链 DNA 间的能量差异而发挥作用。酚作为杂交促进剂,只能在低 DNA 浓度的液相杂交中观察到,该方法曾被称作酚乳化复性技术,该法不能用于固相杂交,因酚可引起核酸与膜的非特异吸附作用,即使在液相杂交中的应用也是有限的。硫氰酸胍可通过降低双链 DNA 的 T_m 值而起作用,此外,该分子还可以促进 RNA 的杂交,有裂解细胞和抑制 RNase 的作用。总之,硫酸葡聚糖和聚乙二醇因能用于固相杂交是目前最常用的杂交促进剂。

第六节 蛋白质分子杂交

自从 1975 年苏格兰爱丁堡大学 Southern E M 首先提出 DNA 的印迹术(Southern Blotting)以来,给后人许多的启发,1977 年 Alwine 将此技术应用于 RNA 的研究——Northern Blotting。1979 年, Towbin 等人首先将印迹术引入对抗原(蛋白质)的检测——Immunoblotting, Western blotting。印迹术实际上是凝胶电泳技术,固相化技术及分子杂交技术三者融为一体的综合性技术,其核心在于把凝胶电泳已分离的区带转移并印迹到固定化膜上,有利于亲和分子的特异性结合并能耐受检出时的各种处理。因此印迹术在用于研究细胞中 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-蛋白质, RNA-蛋白质,以及蛋白质-蛋白质的相互作用方面是一个极好的方法,能方便而容易地获得分子间相互作用的直接证据,从而揭示细胞间相互识别的作用机制。下面先介绍两种与 DNA 相互作用蛋白

质的检测。

一、凝胶滞留法(gel retardation assay)

又叫做迁移率改变法(mobility shift assay)是用于检测 DNA 结合蛋白的一种简单灵敏的方法。基本原理是:基因组调控序列中有许多 DNA 片段必须与相应的蛋白质分子相互作用后调控结构基因的转录表达,当这些蛋白质分子结合在 DNA 上时形成了 DNA-蛋白质复合物,这种复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中的泳动速度较游离的这段 DNA 的电泳速度会慢得多,形成了一个滞后带。用 $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP 标记的待测 DNA 片段和已知的 DNA 结合蛋白或某细胞核蛋白提取液混合后,在相应浓度的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,再进行放射自显影,如果待测细胞核蛋白提取物中含有标记 DNA 的结合蛋白,或待测 DNA 片段中含有特定 DNA 结合蛋白的结合位点时,则会看到滞后条带。

二、Southern Western 印迹

这是将 Southern 和 Western 合二为一的实验方法。基本原理:某细胞核蛋白提取物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移到硝酸纤维素膜上,再用 $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP 标记的 DNA 片段进行杂交,如果此核蛋白提取物中含有此种 DNA 片段特异结合的蛋白质,则会从放射自显影结果中检测到。

三、Western Blotting

前面介绍的二种方法,只能了解某细胞核中存在着结合特定 DNA 片段的蛋白质,并可以了解它的相对分子质量。下面介绍的方法是证明蛋白质与蛋白质相互作用的常用方法,将抗原抗体的特异结合引入此方法中,这就是 Western Blotting,它可以从一个混合蛋白质中检测出特异性抗原。基本方法按二步进行,第一步,先将蛋白质混合物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳展开,然后将这些蛋白质条带转移到固相膜上(硝酸纤维素膜或 PVDF 膜)。第二步,用待测目的蛋白质的抗体(抗血清或单克隆抗体——第一抗体)与固相膜上的蛋白质混合物相互作用,再与(抗兔或抗鼠)辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的第二抗体作用,如果第一抗体能与目的蛋白结合,则二抗可以与第一抗体结合,那么通过二抗上的标记酶与底物的反应呈色,即可确定固相膜上靶蛋白的位置及相对分子质量大小。

四、免疫沉淀

这是将放射性同位素标记的高度灵敏性与抗原抗体特异性反应相结合,从蛋白质混合物中检测出抗原的最有效方法。

对待测细胞用放射性同位素(^{125}I 或 ^{35}S)进行细胞表面的标记或细胞内分泌蛋白的生物合成标记, ^{35}S -甲硫氨酸具有高放射比活度($>2.96 \times 10^{13} \text{Bq/mmol}$),是用于蛋白质合成标记的首选氨基酸。当细胞内的蛋白质进行合成反应时,会将 ^{35}S -甲硫氨酸掺入进去,使新合成好的蛋白质带上放射性硫的标记,然后将细胞裂解释放出其全部蛋白质,加入待测抗原的特异性抗体(单抗或多抗),再加入第二抗体(抗第一抗体的抗体,抗 Ig-sepharose),如果细胞裂解物中有特异性抗原,则抗原、抗体、抗抗体三者反应形成免疫复合物,在离心时会沉淀下来,而不能与抗体特异性结合的细胞内其他蛋白质留在裂解液的上清中而被除掉,最后再将免疫复合物进行 SDS-PAGE(SDS-聚

丙烯酰胺凝胶电泳)和放射自显影,在 X 线片上可看到待测抗原的位置。

(第四军医大学 刘新平)

参考文献

- 1 林万明主编. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海:上海科学技术出版社,1990
- 2 林万明主编. 核酸探针杂交实验技术. 北京:中国科学技术出版社,1991
- 3 林万明主编. 医学分子微生物学进展(下). 北京:中国科学技术出版社,1991
- 4 Amasino R M *et al* .Anal Biochem,1986(152):304
- 5 Eisenach K D *et al* .J Clin Microbiol,1988(26):2 240
- 6 Schmidtake J *et al* .Nucleic Acid Res,1988(16):403
- 7 Keller GH *et al* .Anal Biochem,1988(170):441
- 8 Urdea MS *et al* .Nucleic Acid Res,1988(16):4 937
- 9 Keller GH *et al* .Anal Biochem,1989(177):27
- 10 Datlagupata N *et al* .Anal Biochem,1989(177):85

第十一章

cDNA 文库的构建与筛选

第一节 概述:cDNA 文库概念

真核细胞约有 10^5 个表达基因,如何从复杂的“表达基因混合体”中分离出目标基因,在早期是非常困难的。要分离出目标基因,其前提条件必须将“基因混合体”中的每种基因单克隆化,cDNA 文库技术正是为满足这一要求而设计的。该技术的核心内容是将特定细胞表达的 mRNA 分子经反转录技术合成 DNA,然后将此 DNA 导入原核载体,从而达到对表达基因混合体进行单个分子克隆。该技术建立于 20 世纪 70 年代,并已经成为真核分子生物学研究的基本技术,是分离真核表达基因的经典方法。

传统的 cDNA 文库构建技术包括以下几个方面的内容:

- (1) 从目的细胞中分离 mRNA;
- (2) 在反转录酶的作用下将 mRNA 反转录成单链 cDNA;
- (3) 将单链 cDNA 合成双链 cDNA;
- (4) 将双链 cDNA 插入特定载体;
- (5) 将载体转化大肠杆菌,获得目的细胞表达基因的 cDNA 文库;
- (6) 筛选文库,获得目的基因。

虽然看起来 cDNA 文库构建并不复杂,但是要成功构建一个有用的 cDNA 文库并不是一件轻而易举的事。上述每一个环节都涉及到许多问题,一个步骤的失误可能导致前功尽弃。一个有用的 cDNA 文库至少有以下几个方面的要求:

- (1) 足够的库容量,也就是说,特定基因在该文库中出现的可能性有多大;
- (2) mRNA 的完整性,mRNA 降解导致 cDNA 文库的平均长度不够,含太多短序列的 cDNA 文库很难筛选出完整的基因序列;
- (3) 没有基因组 DNA 或外源 DNA 的污染,这一点往往最难做到,而且也容易忽略,但带来的后果可能是非常严重的。因为污染可能会造成研究结果的错误,而研究者还不知道,说不定几年的研究工作会因此付之东流。

对于研究人员来说,有两个问题是构建 cDNA 文库必须考虑的,第一是目的克隆在文库中的丰

度问题;第二是采用什么筛选方法的问题。围绕这两个问题发展出许多技术,从而也就有许多不同的 cDNA 文库类型。这些技术包括:

(1) PCR 介导的 cDNA 合成技术:增加 cDNA 合成时全长基因的比例,减少 mRNA 的用量,易于获得足量用于构建文库的 cDNA;

(2) mRNA 消减杂交技术:改善目的基因丰度,易于获得组织特异表达基因;

(3) cDNA 丰度平均化(normalizing)技术;使基因的丰度平均化,易于获得低丰度基因;

(4) cDNA 表达文库:可以直接进行蛋白筛选;

(5) 噬菌体表面呈现 cDNA 文库:可以富集筛选目的蛋白。

因此 cDNA 文库构建是一个策略问题,应该根据实际的需要和目的来设计所构建的 cDNA 文库,选择最佳的技术路线和最简单的技术方法。

值得一提的是,cDNA 文库的有些应用正被更简单的技术取代。而且构建 cDNA 文库是一件耗时费力的工作,自己动手有时并不一定能获得满意的结果。因此,最简单的方法是从公司购买或从相关研究者那里索取。这样不仅省去大量的时间,而且也更容易获得好的结果。如果想学习技术的话,倒是可以自己构建一个 cDNA 文库,虽然浪费一些财力和人力,可能会有所收获。

第二节 cDNA 文库构建的策略

在构建 cDNA 文库之前,必须确定研究目的。不同研究目的所采用的技术路线可能完全不一致,错误的实验设计可能会带来工作上的难度,而达不到目的。根据前人的研究经验,下面一些策略可以参考:

1. 大规模测序 大规模测序是研究细胞基因表达最直接的方法,但只适用于非常具有经济实力和条件的单位。构建这种 cDNA 文库应特别注意使用 cDNA 丰度平均化技术。

2. 具备某种单克隆抗体,或利用配体来筛选受体 一般采用 cDNA 表达文库,也可采用噬菌体表面呈现 cDNA 文库。但利用 cDNA 表达文库比噬菌体表面呈现 cDNA 文库成功的可能性要大。

3. 筛选组织差异表达基因 一般采用消减 cDNA 文库。

4. 筛选特异性抗体 噬菌体表面呈现抗体基因文库。

5. 知道基因片段序列或蛋白序列筛选全长基因 与大规模测序文库构建相同。建议不要采用 cDNA 文库技术来筛选,可以用更简单的技术取代,如 Race 技术。

下面将分别讨论构建 cDNA 文库的技术细节问题和注意事项。

一、mRNA 的制备

mRNA 是构建 cDNA 文库的原始材料,因此可以说 mRNA 的丰度、数量、质量和完整性直接决定着后续工作的成功与否。现将 mRNA 的一些问题列出,供实验参考:

1. 一个典型细胞含总 RNA 约 10^{-5} μg , mRNA 占总 RNA 的 1%~5% 左右,但是终末分化细胞和静息细胞的 mRNA 含量要低得多。

2. 即使是活细胞直接提取 mRNA 也存在降解 mRNA,因为 mRNA 在细胞内的半衰期很短,

细胞死亡后 mRNA 会很快降解。

3. 液氮中保存细胞数十年, mRNA 的完整性依然很好, -70°C 保存最好不要超过半年。

4. mRNA 的降解主要原因是 RNA 酶作用, 该酶是一种极难灭活的酶, 而且到处存在, 特别是研究人员的手往往是 RNA 酶污染的主要来源。

(一) mRNA 的来源、丰度及完整性

虽然根据研究目的的不同, mRNA 取材的组织会有所不同, 但是应该尽量选择目的基因含量丰富的组织, 以便于后续的研究工作。目的基因 mRNA 丰度直接决定 cDNA 文库容量的大小和后续筛选的工作量。虽然一个足够大的 cDNA 文库可能包含目的基因, 但是大容量 cDNA 文库的筛选工作并非那么简单。经验表明丰度低于 0.5% 的 mRNA 至少要筛选的克隆数一般在 10^5 以上, 这是一个令人头痛的问题。为了减少筛选的工作量, 早期的 cDNA 文库构建方法采用了很多技术来提高 mRNA 的丰度, 如按大小来分级分离 mRNA 或 cDNA、采用免疫学技术来纯化目的基因的多聚核糖体等, 但这些技术操作难度大, 已经基本不用。目前克隆低丰度基因多采用 cDNA 平均化技术, 大大提高了低丰度基因的克隆效率。

一个不可忽视的问题是 mRNA 的完整性。试想经过一番艰苦的劳动, 最终获得的还是一个基因片段, 而不是完整基因, 是不是一件很遗憾的事? 检测 mRNA 完整性最常用的技术是通过变性凝胶电泳来判断 mRNA 的大小, 典型的 mRNA 应分布在 0.5~8 kb 之间, 主要集中在 1.5~2 kb 之间, 如果 mRNA 主要集中在 0.5 kb 附近, 说明 mRNA 降解很厉害, 应该予以舍弃。

(二) mRNA 的分离纯化

mRNA 分离策略是基于真核细胞 mRNA 转录后加工所产生的 poly(A) 尾。利用 oligo(dT) 层析柱可以通过分子杂交原理将带有 poly(A) 尾的 mRNA 分离纯化出来。经典的层析柱是 oligo(dT) 纤维素, 由于其流速慢, 目前比较少用。改进的方法是用其他固相材料代替纤维素, 如铁粉(可以利用磁性分离)、聚苯乙烯基质(可以离心分离)等, 并形成了商品化的 mRNA 分离试剂盒, 操作简单方便, 结果稳定。

mRNA 分离的关键问题在于预防 mRNA 降解, 所以实验用品必须经过处理以解决 RNA 酶污染问题。常用的器材处理方法是使用 0.1% 的 DEPC(焦碳酸二乙酯)浸泡 12 h, 然后高压灭菌并除去 DEPC。液体试剂可以直接加入 DEPC, 于 37°C 放置 12 h 后再高压消毒。DEPC 可以使 RNA 上的嘌呤甲基化, 能与胺类发生化学反应(如 Tris), 且有致癌的可能性, 因此使用上要注意这些问题。耐高温器材可以在 180°C 干烤 8 h 以上灭活 RNA 酶。其他特异性 RNA 酶抑制剂有 RNasin、氧钒核糖核苷复合物、硅藻土等, RNasin 是一种 RNA 酶结合蛋白, 作用需要有巯基试剂, 不干扰其他酶的活性, 因此主要用于 mRNA 的反转录和体外翻译实验; 氧钒核糖核苷复合物和硅藻土主要用于 RNA 的提取实验, 可以通过酚抽提去除。

强烈变性剂盐酸胍或硫氰酸胍以及还原剂巯基乙醇不但可以使 RNA 酶失活, 而且能使细胞迅速裂解, 因此在提取 RNA/mRNA 时可以联合应用硫氰酸胍和巯基乙醇。常用 RNA/mRNA 提取方法几乎都是采用这种方案, 可以达到一举多得的效果。mRNA 提取目前多采用一步法, 基本方案是用 4 mol/L 硫氰酸胍和 2% 巯基乙醇裂解细胞, 离心去除细胞碎片和 DNA, 直接用 oligo(dT) 将 mRNA 从液体中纯化出来, 这样可以最大限度减少操作步骤以保持 mRNA 的完整性。

二、cDNA 的制备

(一) cDNA 合成

cDNA 的合成是基于反转录酶的作用。反转录酶是一种以 RNA 为模板来合成 DNA 的酶,同时也具有以 DNA 为模板来合成 DNA 的能力。目前常用的反转录酶有两种:一种来自禽的逆转录病毒,另一种来自鼠的逆转录病毒。两种酶有较大差别:禽源性反转录酶为二聚体,有较强的 RNase H 活性(可以在双链 RNA 或 RNA:DNA 杂交体上切割 RNA,因此不利于反转录时保证 mRNA 的完整性),活性最适温度为 42℃(有利于去除 mRNA 的二级结构),最佳 pH 为 8.3;鼠源性反转录酶为单链蛋白, RNase H 活性较弱,活性最适温度为 37℃,最佳 pH 为 7.6。新一代的反转录酶已经通过人工基因突变技术将 RNase H 的活性大大降低,使得 cDNA 合成的效率明显提高,长度限制降低。

传统的 cDNA 合成方法是以 oligo(dT)或随机引物来引导 cDNA 的第一链合成,然后用 RNase H 在 RNA:DNA 杂交体上随机切开 RNA 链,用 DNA polymerase I 来合成第二链(相当于切口平移反应, RNA 作为引物)。早期第二链合成采用的方法是自身引导合成,在 cDNA 第一链合成完成后,用碱来水解 RNA,此时单链 cDNA 5'端可以自身形成发夹结构,从而引导第二链的合成,然后再用单链 DNase(如 S1 核酸酶)将发夹水解。该方法的缺点是 mRNA 5'端序列毫无例外地要发生缺失或重排。

新一代的 cDNA 合成技术已经有很大的改进,特别是基于 PCR 的 cDNA 合成技术使得 cDNA 合成变得简单有效。该技术的原理是利用一“帽子引物”来识别 mRNA 5'端的“帽子结构”,利用反转录酶的“shift”活性(从一条模板合成 cDNA 转移到以另一条模板合成 cDNA,前提条件是另一条模板的 3'端必须能和原来模板的 5'端退火),在以 mRNA 为模板的反转录完成后转移到以“帽子引物”为模板继续合成 cDNA,因此在新合成的 cDNA 5'端可加上“帽子引物”序列。如果同时在 oligo(dT)的 5'端加上一段引物序列的话,这样在第一链反转录完成后, cDNA 的两端同时都可加上 PCR 引物序列,利用 PCR 技术扩增就能获得足量的 cDNA。该技术与传统的反转录方法相比,可以增加全长基因的比例,可以减少 mRNA 的用量,可以获得更大的库容量,操作简单。

(二) cDNA 的后续处理

1. cDNA 丰度平均化技术 cDNA 丰度平均化技术是为了解决 mRNA 丰度分布不均问题,该技术的基本原理与核酸复性动力学相关。理论上核酸复性与分子长度、浓度和时间等参数相关,浓度越低、片段越长就需要越长的复性时间。当核酸复性时间为一固定值时,那么影响核酸复性效率主要取决于片段的长度和浓度。将合成的双链 cDNA 变性,然后再复性,在一定的时间内,发生复性的主要是高丰度基因和短片段,这样没有复性的 cDNA 在丰度上趋于平均化。通过羟磷灰石柱去除复性的双链 cDNA 部分,将剩余没有复性的单链部分再用来构建 cDNA 文库。这种文库不但增加了低丰度基因的克隆,同时还降低了短片段基因的克隆,特别有利于文库后续筛选。

2. 消减杂交技术 消减杂交技术(subtracting hybridization)是克隆细胞特异表达基因的主要技术,主要用于研究细胞特异基因表达与细胞功能的关系,其基本原理也是基于核酸杂交。通过核酸杂交将两种组织或细胞的相同基因去除,剩下各组织的特异表达基因,再建立组织或细胞特异表达基因文库。在技术上主要有两种方案:基于单链 cDNA 的杂交方案和基于双链 cDNA 的杂交方案。前者的基本方法如下:① 制备目的细胞的 cDNA;② 制备扣除细胞的 mRNA;③ 将 cDNA 和

mRNA 进行杂交;④ 利用羟磷灰石柱分离出未杂交的目的 cDNA。后者是用目的双链 cDNA 与标记的双链 cDNA 进行杂交,采用特定方法去除杂交体(如用生物素标记 DNA,可以用亲和素去除)。其优点在于可以将目的 cDNA 和扣除 cDNA 进行 PCR 扩增,因此可以解决材料的来源不足问题,而且还可以进行多次扣除以提高特异表达基因的丰度。消减杂交 cDNA 文库可能是今后 cDNA 文库最主要的应用形式,作为一种细胞功能研究方法而存在。

3. 与 cDNA 克隆相关的处理技术 传统方法合成的 cDNA 两端为平末端,不能有效地插入载体或定向插入载体,所以必须对 cDNA 末端进行加工。最常用的方法是在 cDNA 两端加上含有限制酶切位点的接头,同时所选择的限制酶切位点必须是 cDNA 中切点极为稀少的限制酶,如 *Not*I、*Sfi*I 和 *Sal*I 等,但仍然还会有少数 cDNA 分子被切割。为了避免这种情况,可以选用衔接头(一端为平端,另一端为粘端的双链短片段,不需要对 cDNA 进行酶切),或者将 cDNA 甲基化并选用对甲基化敏感的限制酶(如用 *Eco*RI 甲基化酶使 cDNA 甲基化,接头上加入 *Eco*RI 位点),从而避免切断 cDNA。

上述方法处理的 cDNA 无法定向克隆入载体,在构建表达 cDNA 文库时,最好是将 cDNA 定向插入表达载体。目前通常使用的定向克隆方法是在 cDNA 第一链合成时,于 oligo(dT)的 5'端加上一段含有酶切位点序列,这样所合成的 cDNA 在 3'端就加上了酶切位点,同时 cDNA 5'端可以通过衔接头引入另外一种限制酶的粘性末端,就可以达到定向克隆的目的。最简单的方法是利用基于 PCR 的 cDNA 合成技术,cDNA 合成时就可可在 cDNA 5'端和 3'端引入酶切位点。cDNA 合成后,直接进行酶切,就可以定向插入载体了。

三、载体的选择

构建 cDNA 文库的载体主要有质粒载体和噬菌体载体,同时还有表达载体与非表达载体之分。质粒载体的特点是制备操作简单,但插入片段长度有限,所构建的文库不易于保存,多次扩增会导致某些克隆优势生长或丢失。噬菌体载体的特点是插入片段长、文库易于扩增和筛选,但操作相对复杂一些。

早期构建文库都用质粒载体,但是现在已经很少使用,几乎都用噬菌体载体。根据所构建 cDNA 文库的要求,有些情况下也可以(或只能)选用质粒载体,如构建一个小型的消减杂交 cDNA 文库、分级分离组分的 cDNA 文库等。在构建噬菌体表面呈现 cDNA 文库时,只能选用特定的质粒载体(如 pCANTAB5E,有关噬菌体表面呈现技术请参考相应文献,其基本原理是将外源蛋白融合表达在 M13 噬菌体外壳蛋白上,利用特异性识别分子将表达目的蛋白的噬菌体富集,从而获得目的基因)。

用于构建 cDNA 文库的噬菌体载体几乎都是来自 λ 噬菌体,常规应用的两种载体是 λ gt10 和 λ gt11。 λ gt10 构建的 cDNA 文库只能用核酸探针筛选,而 λ gt11 构建的 cDNA 文库是一个表达文库,还可以用免疫学方法来筛选。用 λ gt11 构建的 cDNA 文库几乎囊括了人体的每种组织细胞,但这两种载体均不能定向克隆 cDNA,特别是作为表达载体应用上有些限制。现在有许多改进的 λ 噬菌体载体可供选择,如 λ ORF8(可以定向克隆)、 λ gt18 和 λ gt19 及其系列载体(带有多克隆位点的 λ gt11)、 λ ZAP(多面性载体,在 λ 噬菌体载体中插入 Bluescript 质粒,质粒的多克隆位点为 cDNA 的插入位点,通过辅助噬菌体感染可以将质粒从噬菌体载体中“拯救”出来,这样一个噬菌体 cDNA 文库可以变成一个质粒 cDNA 文库)等,具体每种载体的特性可以查阅相关资料。

四、连接与转化

1. cDNA 片段与载体的连接 选择好载体和处理好 cDNA 片段后,接下来就是将 cDNA 与载体进行连接。对于构建 cDNA 文库来说,连接反应和通常的连接反应有一些差别。理论上,连接反应不是理想中只有片段与载体的连接,实际上会存在很多不同的连接情况,如载体与载体之间、片段与片段之间都有可能发生连接。优势连接产物取决于片段与载体的比例和载体的浓度。对于粘性末端连接,用 pUC18 一般大小的质粒,连接反应中应含有载体 DNA 为 20~100 $\mu\text{g/ml}$,外源 DNA 末端浓度等于或稍高于载体 DNA(大约一倍左右),此时获得最佳数量的目的连接产物。如外源 DNA 浓度比载体低得多,有效连接产物的数量会很低。

通常的连接反应主要追求克隆的正确效率,对克隆数目多少似乎不很注意。而 cDNA 文库就不同,第一,要用最少的 cDNA 得到最大的克隆效率,其含义是每种 cDNA 分子具有最大的可能性和载体连接;第二,要尽量减少空载体连接,这和第一项似乎是相矛盾的;第三,尽量减少一个载体中含多个片段的可能性。表现在实际操作中,就是片段和载体的比例问题。具体到每个试验,必须通过预试验来确定载体和片段的最佳比例。

2. 连接产物的转化 将连接产物转化大肠杆菌获得单个基因的克隆,才是构建 cDNA 文库的目的。要使每种基因都能获得表现,普通的大肠杆菌转化技术是不适宜的。对于 cDNA 文库而言,最重要的是效率,其中转化效率是至关重要的。高的转化效率才能使“最少 cDNA 得到最多克隆”成为可能。

对于质粒转化,一般采用电穿孔技术,以获得最高的转化效率。制备良好的电穿孔感受态细胞,1 μg pUC 质粒可以达到 10^{10} 克隆,而普通的化学转化技术只能达到 10^7 左右。

利用 λ 噬菌体构建 cDNA 文库,完全不同于质粒转化技术,而是通过噬菌体装配技术,将连接好的 DNA 和噬菌体包装蛋白混合,重新包装出具有细菌感染能力的噬菌体。不同商家的噬菌体包装系统使用方法有所差别,具体参考使用说明书。噬菌体感染细菌后,根据载体的不同有两种方法可以分辨“含有 cDNA 片段”(即重组噬菌体)和“不含有 cDNA 片段”(即非重组噬菌体)的克隆。重组噬菌体感染细菌后可以使细菌裂解,从而产生清亮的空斑;或在以半乳糖苷酶为基础的蓝白筛选系统中不显示蓝色。

五、库容量

用质粒构建的 cDNA 文库库容量一般在 10^5 左右,而用噬菌体构建的 cDNA 文库一般在 10^6 左右,对于消减 cDNA 文库 10^4 库容量就已经足够了。虽然可以构建更大容量的 cDNA 文库,但没有实际意义,因为大容量的 cDNA 文库操作起来十分不方便,既费力又费钱,而且也不可能全部进行筛选。实际上,库容量的大小只要达到目的就行了,不是越大越好。一个高丰度的基因可能只需要筛选 1 000 个克隆就够了,极低丰度的基因可能筛选 10^7 克隆也未必能筛选出来。另一个方面库容量也与所使用的筛选技术有关,同样丰度的基因,抗体筛选的库容量至少比核酸杂交筛选的库容量大 6 倍。另外,使用简单的筛选技术,操作的库容量可以大一些,如用噬菌体富集筛选技术;反之,复杂的筛选技术,相对操作的库容量只能很小。

第三节 cDNA 文库的筛选

完成 cDNA 文库的构建,整体的研究工作只是一个开始,更繁重的任务是 cDNA 文库的筛选。如前所述,筛选方案应在设计构建 cDNA 文库之前确定下来。虽然具体的研究工作可能有不同的筛选策略,但目前的技术不外乎以下几种:基于核酸探针的分子杂交筛选、基于抗体(或配体)的免疫学筛选和基于噬菌体表面呈现技术的富集筛选。对于消减 cDNA 文库,有条件可以应用大规模测序方法,对所有克隆进行测序,所获得的信息更具有研究和应用价值。

建立 cDNA 文库的目的在于分离目的基因,因此必须筛选数目巨大的重组克隆。原则上优先采用基于核酸探针的分子杂交筛选,因为它们可在各种严格性不同的条件下使用,从而最大限度地减少发生不希望出现的交叉反应的机会。此外,核酸探针可检出所有含目的 cDNA 序列的克隆。基于抗体(或配体)的免疫学筛选只能针对目的克隆的某一亚类(在某些情况,最多不过 1/6)发生反应。因为只有在这一亚类中的 cDNA 能够按正确读框和方向插入载体。因此,用抗体筛选的 cDNA 文库必须大于(至少 6 倍于)用核酸探针筛选的文库。结果,使用抗体寻找与出现频率 ≤ 1 分子/细胞的哺乳动物 mRNA 相对应的 cDNA 克隆时,需要构建含 10^7 以上成员的 cDNA 文库。这并非轻而易举,尤其是在 mRNA 量有限时。另外,筛选这样大小的文库既费力又费钱,很值得探究富集目的序列 mRNA(或它所产生的 cDNA)的方法。

1. 基于核酸探针的分子杂交筛选 该方法是从 cDNA 文库中筛选目的克隆的最常用、最可靠的方法。核酸杂交筛选法可以同时迅速地分析数目极大的克隆,而且可以使用的探针种类繁多,如完全同源探针、部分同源探针、合成寡核苷酸探针、扣除探针等。

完全同源探针至少含有所需 cDNA 克隆的一部分确切序列。例如,用一个现有的 cDNA 部位克隆以分离 cDNA 文库中的全长克隆。部分同源探针用来检测与探针序列相关但不相同的 cDNA 克隆。如克隆不同种属的同源基因;或从同一种属中克隆到相关基因。比较难于确定的问题是部分同源探针的杂交条件,大多数情况下,只有根据同源性高低来估计杂交条件。cDNA 扣除探针实际上是利用消减杂交技术来获得差异 cDNA,通常用于探测 cDNA 文库中与调节水平有所差别的 mRNA 相应的克隆。合成寡核苷酸探针是体外合成的具有确定序列的寡核苷酸片段。该探针的序列是根据遗传密码从目的蛋白的一小段氨基酸序列中推导出来的。由于遗传密码的简并性,一段给定的氨基酸序列,极不可能由单一的一段寡核苷酸序列来确定。相反,很多情况下,同一氨基酸序列可能由许多不同的寡核苷酸来确定,也无法肯定究竟哪一条寡核苷酸真正用于目的基因。一般情况下,合成一组囊括可编码给定氨基酸序列的所有可能序列的寡核苷酸,其成员的具体数目取决于特定氨基酸密码子的简并程度。既然含有所有可能的寡核苷酸序列,从中至少有一条会与目的 cDNA 克隆完全配对。为使每组寡核苷酸的成员数保持在可处理的范围内,一般使用最短长度而杂交中仍切实可行的寡核苷酸(14~17 个核苷酸),同时在高度简并位置上含有诸如次黄嘌呤一类碱基的寡核苷酸。次黄嘌呤可以同所有 4 种普通碱基配对,而不会严重损害所产生的杂交体的稳定性。这样可以减少寡核苷酸探针成员数而相对延长寡核苷酸探针长度。最后,如果是从蛋白质氨基端得到的蛋白质序列,待筛选的 cDNA 文库的质量必须较高,才能保证大部分 mRNA 的 5'端包括在内。

但是,目前更倾向使用更简单的 PCR 技术来获得全长序列,如 Race 技术可以在只知道部分序列的条件下扩增出全长基因;简并引物 PCR 可以扩增同源基因或通过蛋白序列推导的简并核苷酸序列。

2. 基于特异性抗原的免疫学检测 构建于 λ gt11、 λ gt18~23、 λ ZAP 和 λ ORF8 表达载体的 cDNA 文库可直接用抗目的蛋白的抗体进行筛选。将印有细菌裂解碎片的硝酸纤维素滤膜浸在含有抗体的溶液中。清洗后,滤膜与金黄色葡萄球菌 A 蛋白或抗一抗体特异性表位的第二抗体共温育。第二配体可由 ^{125}I 进行放射性标记或与酶(如碱性磷酸酶)共价连接。

该方法成功的关键是抗体的质量。至关重要的是抗体必须有效地识别变性蛋白(即它必须在 Western 印迹上产生强信号)。此外,使用来自高滴度多克隆抗血清的抗体进行筛选,既容易也更敏感。因为这种抗血清通常与许多不同表位反应,因而检出表达目的蛋白上一个片段的 cDNA 克隆的机会随之增加。多克隆抗血清带有识别细菌裂解非重组成分的交叉反应抗体,故在筛选中必须将其去除。

使用单克隆抗体作探针时,非特异结合背景明显降低。不过,能检出的重组体数目也相应减少,因为每个单克隆抗体只能与单一表位反应。理想的免疫学探针最好是几种不同的单克隆抗体组成的混合物,其中各个单克隆抗体均能与变性蛋白强烈反应。

3. 噬菌体(或细菌)表面呈现筛选技术 外源基因与噬菌体(或细菌)表面蛋白融合表达,可以呈现在噬菌体颗粒(或细菌)表面,利用特异抗体或配体可以富集表达目的蛋白的噬菌体(或细菌)。经过反复富集,最后可以获得目的基因。该技术的巧妙之处在于通过噬菌体(或细菌)将目的基因和蛋白偶连,筛选到目的蛋白就等于获得目的基因。目前有成熟的商品系统出售。

4. cDNA 克隆的确定 用抗体或核酸探针筛选 cDNA 文库时,常常以高密度铺平板。所以在第一轮筛选中反应阳性的克隆,还需经多轮稀释后铺平板和筛选才能认定为单一克隆。不过,通过杂交获得的克隆不一定是绝对正确的,序列测定是验证克隆最基本的方法。对于特定生物活性的蛋白尚需在原核或真核细胞中利用全长 cDNA 表达的蛋白质,显示正确的生物学或酶学活性。由 cDNA 的核苷酸序列推导的多肽,其性质应与真蛋白相符。例如,大多数分泌蛋白或质膜蛋白来源于氨基端带有疏水信号肽序列的多肽前体。若推导的多肽缺少这一信号,应引起注意。与之相似,多肽的预计大小,总电荷数和氨基酸组成、潜在糖基化位点数目,以及用作穿膜“着锚”的疏水区的存在,都应当与真蛋白的已知特性相吻合。

5. 克隆基因的计算机分析 对于用部分同源引物或简并引物筛选得到的基因,计算机分析是一种可以利用的最简单的方法。目前来说,大量的基因序列数据库、蛋白序列数据库、蛋白结构数据库、蛋白功能位点数据库(prosites or motifs)可供利用,通过数据库的同源比较,往往能获得一些有价值的信息。应该注意的是,对分子生物学研究工作者来说,计算机基因分析技术也是一项应当熟悉的基本技术。

(第四军医大学 赵忠良)

参考文献

- 1 Sagerstrom CG, Sun BI and Sive HL. Subtractive cloning: past, present, and future. *Annu Rev Biochem*, 1997(66):

751 ~ 783

- 2 Timblin C, Battey J, Kuehl WM. Application for PCR technology to subtractive cDNA cloning: identification of genes expressed specifically in murine plasmacytoma cells. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(6): 1 587 ~ 1 593
- 3 Barnes WM. PCR amplification of up to 35 - kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(6): 2 216 ~ 2 220
- 4 Thompson J, Solomon R, Pellegrino M, Sakai K, Lewin M, Feild M, et al. A noise - free molecular hybridization procedure for measuring RNA in cell lysates. *Anal Biochem*, 1989, 181(2): 371 ~ 378
- 5 Swaroop A, Xu JZ, Agarwal N, Weissman SM. A simple and efficient cDNA library subtraction procedure: isolation of human retina - specific cDNA clones. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(8): 1 954
- 6 Chenchik A, Moqadam F, Siebert P. A new method for full - length cDNA cloning by PCR. In: *A Laboratory Guide to RNA: Isolation analysis, and Synthesis*, Ed. Krieg, P. A. (Wiley - Liss, Inc.), pp. 273 ~ 321
- 7 Finckh U, Lingenfelter PA, Myerson D. Producing single - stranded DNA probes with the Taq DNA polymerase: a high yield protocol. *Biotechniques*, 1991, 10(1): 35 ~ 36
- 8 Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, 228: 1 315 ~ 1 317
- 9 Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 1991, 352(6 336): 624 ~ 628.
- 10 Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res*, 1996, 6(9): 791 ~ 806.
- 11 Soares MB, Bonaldo MF, Jelene P, Su L, Lawton L, Efstratiadis A. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(20): 9 228 ~ 9 232.

第十二章

聚合酶链反应(PCR)技术

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术,即试管内 DNA 的扩增,以其显著的三大特点即特异性、高效率 and 忠实性,在生命科学研究领域产生了巨大影响。成为核酸分子水平研究的基础及最为广泛应用的技术。

第一节 PCR 基本原理和影响因素

一、基本原理

PCR 技术实际上是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷三磷酸存在的条件下依赖于 DNA 聚合酶进行的酶促合成反应。PCR 技术的特异性取决于引物和模板 DNA 结合的特异性。

PCR 全过程包括三个基本步骤,即双链 DNA 模板加热变性成单链(变性);在低温下引物与单链 DNA 互补配对(退火);在适宜温度下 Taq DNA 聚合酶催化引物沿着模板 DNA 延伸(延伸)。这三个基本步骤构成的循环重复进行,可以使特异性 DNA 的扩增率达到数百万倍($\geq 2 \times 10^6$)。该过程见图 12-1 所示。

二、PCR 各步骤简介

PCR 扩增一个模板,要求一对寡核苷酸引物,4 种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、摩尔数超过 dNTP 的镁离子和进行 DNA 合成的 Taq DNA 聚合酶。

1. 变性 加热至 90~96℃时,模板 DNA 双螺旋的氢键断裂,双链解链,形成单链 DNA。
2. 退火 当温度突然降低至 25~65℃,引物与其互补的单链 DNA 模板在局部形成杂交链。
3. 延伸 70~74℃下,在 Taq DNA 聚合酶和 4 种脱氧核糖核苷三磷酸底物及 Mg^{2+} 存在的条件下,以引物为起始点沿着互补的单链模板进行 DNA 链延伸反应。

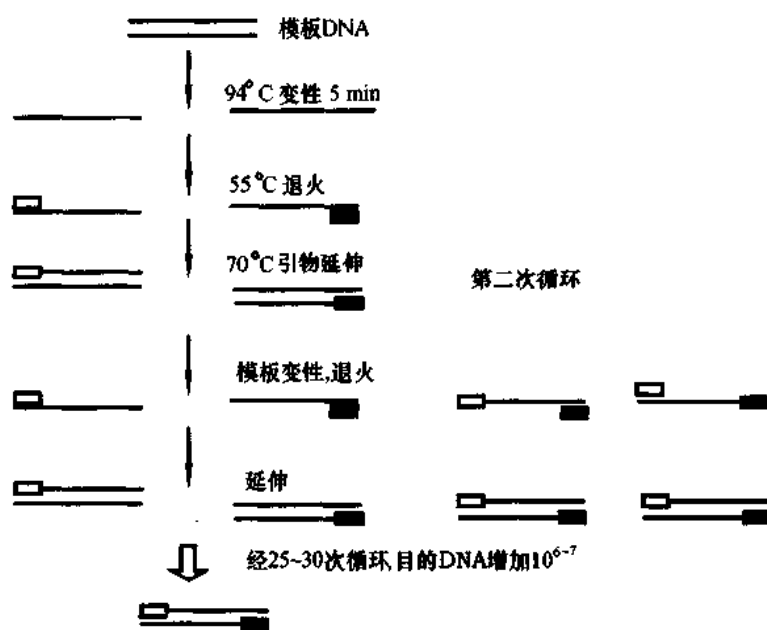


图 12-1 PCR 扩增 DNA 示意图

三、材料

(一) 仪器

DNA 扩增仪, 电泳仪、电泳槽, 紫外检测仪, 照相机。

(二) 器皿

移液器, Tip 头, Eppendorf 管等。

(三) 试剂

1. 模板 用合适方法制备模板 DNA。

2. 引物 DNA 合成仪合成后, 经纯化、定量, 无菌去离子水或三蒸水配制成 $10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 。

3. Taq DNA 聚合酶 商品供应一般为 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$, 使用时其终浓度为在 $100 \mu\text{l}$ 反应体积中含 Taq 酶 $2 \sim 2.5 \text{ U}$ 。

4. dNTPs 商品化的中性混合液浓度为各 2 mmol/L , 如需自己配制, 则将 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 钠盐各 100 mg 合并, 加去离子水 2 ml 溶解, 用 0.1 mol/L NaOH 调至 $\text{pH} 7.0 \sim 7.5$ (使其浓度为 5 mmol/L), 分装后 -20°C 保存备用。

5. PCR 反应缓冲液 有些公司将反应缓冲液随 Taq 酶提供给用户 (通常为 $10 \times$ 浓度), 若需自己配制, 其 $10 \times$ 浓度组分如下:

250~500 mmol/L KCl

100~500 mmol/L, Tris·Cl (pH 8.4)

15~20 mmol/L MgCl_2

0.5% Tween-20

1 mg/L BSA

6. 矿物油

7. 琼脂糖

8. 溴化乙锭(EB, 10 mg/ml)

四、方法

(一) 操作程序

向一 0.5 ml 无菌 Eppendorf 管内依次加入:

1. $10\times$ 扩增缓冲液 1/10 体积

2. $4\times$ dNTP 各 200 mmol/L

3. 引物 1 1 mmol/L

4. 引物 2 1 mmol/L

5. DNA 模板 $10^2\sim 10^5$ 拷贝

6. ddH₂O 补至终体积(终体积可为 25~100 μ l)

7. 混匀后, 离心 10 s, 使反应成分集于管底, 95℃ 变性 10 min, Taq 聚合酶 2.0~2.5 U/100 μ l, 离心混匀。

8. 矿物油 100 μ l

(二) 变性 90~96℃ 30~60 s

(三) 退火 25~65℃ 60~90 s

(四) 延伸 70~74℃ 30~60 s

(五) 重复(二)~(四)25~35 次。每次即为一个 PCR 循环, 最后一个循环 72℃ 增加 5 min, 迅速冷却。

(六) 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物。

五、注意事项

理想的 PCR 反应应该是特异、高效和忠实的。高度特异的 PCR 反应只产生一个扩增产物; 而扩增反应越有效, 经过相对少的循环会产生更多的产物。为了得到理想的 PCR 扩增效果, 必须注意以下几个方面。

(一) 模板

PCR 反应的模板可以是 DNA, 也可以是 RNA, 后者的扩增需首先逆转录成 cDNA 后才能进行正常 PCR 循环。

不同来源的核酸标本, 如临床标本(血液、痰液、尿液、粪便、体腔积液)、法医学标本(血斑、毛发、精斑等)、病理标本(如组织学)以及考古标本等, 可以选用不同的方法直接提取 DNA。无论标本来源如何, 扩增核酸均需要部分纯化, 操作过程应避免 DNA 的降解, 并尽量使核酸标本中不含蛋白酶、核酸酶, 特别是 Taq DNA 聚合酶抑制剂。

(二) 引物

引物是待扩增核酸片段两端的已知序列, 它决定了 PCR 扩增产物的大小。引物的选择是整个 PCR 扩增反应成功的关键因素。理想的引物应该有效地与靶序列杂交, 而与出现在模板中的其他相关序列的杂交是可以忽略的。

1. 引物合成的质量 合成的引物必须经聚丙烯酰胺凝胶电泳或反向高压液相层析(HPLC)纯

化,以减少发生非特异扩增和信号强度的降低,冻干引物可以在常温下运输。冻干引物于 -20°C 可以保存12~24个月,甚至更长,液体状态于 -20°C 可以保存6个月或更长。

2. 引物设计原则 引物设计的目的是要达到两个目标,即理想的扩增特异性和扩增效率。正确的引物设计,可以遵循如下的一些主要原则进行。

(1) 引物长度 特异性一般通过引物长度和退火温度控制。寡核苷酸引物长度一般为15~30碱基。这些寡核苷酸引物适于不含序列变异的、靶位确定的标准PCR。引物长度增加,能提高特异性,但是在退火时被引发的模板会减少,而降低反应效率。

实际应用中最适延伸温度不要超过Taq DNA聚合酶的最适温度(74°C),这样才能保证产物的特异性。

(2) 引物的3'末端和5'末端核苷酸 引物3'末端是PCR延伸的起始端,不能进行任何修饰,也不能有形成二级结构的可能,一般3'端也不能发生错配。

引物5'端仅起限定PCR产物长度的作用,它对扩增特异性影响不大,可以被修饰而不影响扩增的特异性。

(3) GC的合理含量 一对引物的GC含量和 T_m 值应该协调,G+C含量一般为40%~60%,如含有50%的G+C各20个碱基的寡核苷酸链的 T_m 值大概在 $56\sim 62^{\circ}\text{C}$ 范围内,这样可为有效退火提供足够热量,根据公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$,可估计引物 T_m 值, T_m 值最好接近 72°C ,使变性条件最佳[(G+C)即为G与C的碱基数之和]。

(4) 避免引物自身和引物之间的互补 引物自身和引物之间均应避免互补序列或互补性,尤应避免3'端的互补重叠。一般来讲,引物自身连续互补碱基不能超过3个,一对引物间也不宜多于4个连续碱基的互补性。

(5) 碱基的随机分布 选择缺乏单一核苷酸的区域作为引物序列,这样可以减少广范围引物-引物同源的机会。同时,也要注意引物对在长度和碱基组成上的平衡,使两个引物的 T_m 值相差在 $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 范围内。

(6) 避开产物的二级结构区 采用计算机软件可以预测估计mRNA的稳定二级结构,有助于选择模板。

3. 使用引物设计软件 现在有商品化的或免费的计算机软件程序,可用来在确定的区域中选择引物序列。在对所研究基因组全部序列并不完全知道的情况下,这些程序既方便又实用,但是即使是最好的程序也并非完美无缺。

使用计算机软件时,选择参数设置的越广泛,计算机需要考虑的情况越多,寻找引物所需的时间会较长。因此,在实验设计上明确限定用来寻找引物的参数应尽可能狭窄和独特。这样可以得到快速和高质量设计的引物。

4. 引物浓度 两条引物一般各在 $0.1\sim 0.5\text{ mmol/L}$,浓度太高会引起错配及非特异性产物扩增,且可增加引物之间形成二聚体的概率及造成浪费,太低则可能达不到扩增效果或产量太低。

(三) 循环温度和时间

PCR扩增反应的三个基本步骤即变性、退火和延伸是在反应体系的合适条件下进行。变性一步很重要,此步必须使靶基因模板完全变性,扩增才会成功。变性温度一般在 $90\sim 96^{\circ}\text{C}$,在此温度既能使DNA双链模板变性,又能保持Taq DNA聚合酶活力。如果实验温度低于 $90\sim 96^{\circ}\text{C}$,则DNA变性不完全,DNA变性不全会很快复性而减少扩增产量。退火温度必须严格规定,可根据

公式 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 进行计算,退火温度太低易出现非特异性扩增。一般退火温度应低于 T_m 值 5°C 。退火温度的范围一般在 $25 \sim 65^{\circ}\text{C}$ 之间。延伸温度常用 $70 \sim 74^{\circ}\text{C}$,延伸 $30 \sim 60\text{ s}$,延伸时间根据扩增 DNA 的长度而确定。循环次数的确定,以既达到扩增效果又尽量减少非特异性产物的扩增为原则,PCR 的循环次数一般在 $20 \sim 35$ 次,循环次数过多将增加非特异产物。

(四) Taq 酶浓度

Taq 酶在反应体系中的终浓度常为 $2 \sim 2.5\text{ U}/100\text{ }\mu\text{l}$ 。

酶量过少合成产物量低,酶量过高则非特异性产物随之增加。

(五) 镁离子浓度

镁离子浓度对 PCR 产物的特异性和产量影响明显,特别是对 Taq 酶的影响尤为明显。过量的 Mg^{2+} 会导致酶催化非特异产物的扩增,而 Mg^{2+} 浓度过低,又会使 Taq 酶的催化活性降低。一般 Mg^{2+} 浓度在 $0.5 \sim 2.5\text{ mmol/L}$ 之间。

(六) 脱氧核糖核苷三磷酸浓度

4 种 dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)在反应中浓度相等,一般为 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。浓度过高会抑制 Taq 酶活性,且引起 Taq 酶催化错配。

六、PCR 条件优化

PCR 扩增大量目的产物是理想的结果,但在未找到最佳扩增条件时可能产生许多不需要的非特异性产物或没有扩增到任何产物。这就需要对 PCR 条件进行优化,以达到预期的扩增目的。

(一) 常规的优化方法

改变已知对引物-模板的忠实性和引物延伸有影响的诸多因数中的一两个而实现。

1. 有利于增加特异性的条件 如降低 Mg^{2+} 浓度,降低 dNTP 浓度,优化 pH,降低 Taq 酶用量,减少循环中各部分的时间或循环数,增加退火温度,减少或去除抑制剂等。

2. 加入或优化增强剂 加入一系列辅助物如 DMSO($1\% \sim 10\%$)、PEG-6000($5\% \sim 15\%$)、甘油($5\% \sim 20\%$)、非离子去污剂、甲酰胺($1.25\% \sim 10\%$)和牛血清白蛋白($10 \sim 100\text{ mg/ml}$)到反应体系中可以提高特异性和产量。

3. 优化引物设计 借助于计算机引物设计软件来达到引物的优化。

4. 热启动技术 在 PCR 反应的第一个循环中待温度升高超过模板 T_m 值(80°C)后才加一两种关键试剂。例如在覆盖有矿物油的小试管的反应体系中先不加入 Taq DNA 聚合酶,而到第一个循环的变性阶段温度超过 80°C 以后再加,这样,可以大大减少引物二聚体和非特异性配对的形成,提高 PCR 反应的特异性。还可利用石蜡将需要后加的成分与反应液隔开,当加热至石蜡被融化后,上面的后加成分即进入反应体系;还有利用加入抗 Taq DNA 聚合酶的单克隆抗体于 PCR 反应管中,当温度升高到将中和抗体变性失活之前,抗体阻遏 Taq 酶活性,防止反应开始。

(二) 降落 PCR(touchdown PCR, TD-PCR)

降落 PCR 是连续改变反应管退火温度,以找到最佳扩增条件的方法。开始的退火温度选择为高于估计的 T_m 值,随着循环的进行,退火温度逐渐降到 T_m 值,并最终低于这个水平。TD-PCR 有利于确保第一个引物-模板杂交过程发生在最为互补的产生目的扩增产物的反应物之间。当目的扩增产物已开始几何扩增时,即使剩下循环的退火温度最终降到非特异杂交的 T_m 值,此时目的产物的扩增已经处于非常优势的地位。一般在编设 TD-PCR 程序时,退火温度的范围应该超过

15℃,从高于 T_m 值几度降低到低于它 10℃左右。

第二节 逆转录 PCR 技术

一、原理

逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)以 RNA 为起始模板产生 cDNA 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,从而获取目的基因或检测基因表达。

RT-PCR 主要用途:基因分离,获取目的基因,合成 cDNA 探针,构建 RNA 高效转录系统。

二、材料

(一) 仪器

同本章第一节。

(二) 器皿

同本章第一节。

(三) 试剂

1. DEPC(焦碳酸二乙酯)

2. RNA 酶抑制剂 10 U

3. 10×逆转录酶缓冲液

500 mmol/L Tris·Cl pH8.3

400 mmol/L KCl

60 mmol/L $MgCl_2$

10 mmol/L DTT

1 mg/ml BSA

4. AMV 逆转录酶

5. 4 种 dNTP 各 10 mmol/L

6. Taq DNA 聚合酶

7. 引物

三、方法

(一) mRNA 反转录产生 cDNA 第一链

1. 10×扩增缓冲液 2 μ l

2. 4 种 dNTP(每种浓度 10 mmol/L) 2 μ l

3. 下游引物(与 cDNA 第一链互补的引物) 1 μ g

4. RNA 酶抑制剂 20 U

5. mRNA 1~2 μ g

6. AMV 逆转录酶 20 U

7. 加 DEPC 处理水或三蒸水至 20 μ l

8. 充分混匀,于 42℃,反应 30~60 min

(二) 于 95℃ 加热 5~10 min,灭活反转录酶,使 RNA - cDNA 杂交体变性,然后迅速冰浴冷却。

(三) PCR 扩增

依次加入:

1. 10×PCR 缓冲液 5 μ l

2. “上游”引物(与初始 mRNA 互补引物) 0.2~1 μ mol/L

3. “下游”引物(与 cDNA 互补引物) 0.2~1 μ mol/L

4. 上述扩增转录产物 10 μ l

5. Taq DNA 聚合酶 2.5 U

6. 去离子水或三蒸水 50 μ l

混匀后短暂离心

7. 加 100 μ l 矿物油

在适当的温度及时间参数下扩增 30~35 循环,末次循环后延伸 5~7 min。

(四) 取扩增产物 5~10 μ l,于琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB 染色鉴定 PCR 扩增产物。

四、注意事项

1. 组织或细胞样本的选择 需注意并不是每种组织或细胞都表达所有的基因,即某些基因的 mRNA 不存在于组织或细胞中。因此,确定所选用的材料中是否含有所需扩增的基因模板是实验成败的关键。

2. 引物 合成 cDNA 第一条链时,引物可用随机 6 聚核苷酸,或下游引物,或 poly(dT),其中以 6 聚核苷酸的随机引物效果最好。

3. 逆转录酶 不同来源的逆转录酶均可较好地用于第一链 cDNA 的合成,其合成受不同 RNA 模板的影响。提高逆转录温度(55℃)、增加 1~3 倍的酶量可克服 RNA 二级结构的影响。

4. cDNA 反应产物 cDNA 第一链中的 RNA 模板不影响 PCR 反应,无需用碱或 RNase 处理去除。没有必要将 cDNA 反应产物全部用于 PCR,用其 1/10~1/25 即可。

5. 避免 RNA 酶污染 检测 RNA 时,使用的试管和能耐高压的试剂必经高压灭菌处理,同时使用 RNA 酶抑制剂,而且在操作时应戴一次性手套以防污染。

6. 其他 可参阅本章第一节。

第三节 PCR - SSCP 银染技术

聚合酶链反应 - 单链构象多态性分析(single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products,PCR - SSCP),是由 Orita 等 1989 年发展起来的一种基因分析新方法。该技术的应用为分子生物学研究提供了一种简单、快速、经济的手段。该技术首先利用 PCR 扩增目的 DNA,然后将扩增产物变性并进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,区别扩增产物单链

DNA 构象的多态性。为了高灵敏性特异显示 SSCP 分析结果,已发展为多种 PCR-SSCP 技术,例如扩增时利用引物标记或碱基掺入法而使扩增产物带有标记物(荧光物质、同位素、生物素等),也可以在电泳后用银染或溴化乙锭染色以显示结果。本节重点介绍 PCR-SSCP 银染法。

一、原理

在非变性条件下,DNA 单链在凝胶电泳中的迁移率除与 DNA 链的长短有关外,更主要是取决于 DNA 单链所形成的构象。单链 DNA 由于分子内作用力而形成卷曲构型,在 SSCP 分析中,单链 DNA 因其碱基序列的变异(单个碱基置换或多个碱基插入或缺失等的改变)而导致构型改变,其迁移率必然发生改变,从而将变异的 DNA 与非变异 DNA 区分开来。

PCR-SSCP 银染技术是按常规 PCR 扩增特定靶基因序列,扩增产物变性为单链进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,再通过硝酸银(AgNO_3)染色显示结果。其优点是需要样品量少,操作简便,费时少,其检测的敏感性与同位素法相近,且没有同位素污染,可用于常规诊断,应用前景广泛。

二、材料

(一) 仪器

PCR 仪,电泳仪,垂直电泳槽,水平振荡器。

(二) 器皿

Eppendorf 管,Tip 头,微量加样器,冰盒,塑料方盆(盆底应大于玻璃板),烧杯。

(三) 试剂

1. PCR 试剂盒。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂。

3. 银染液 称取 0.5 g 硝酸银(AgNO_3),溶于 500 ml 双蒸水。

4. 显影液 称取 15 g 无水碳酸钠(Na_2CO_3),溶于 500 ml 双蒸水(预冷)。

5. 固定液/终止液

乙醇 300 ml

冰乙酸 100 ml

双蒸水 600 ml

6. 10 mg/ml 硫代硫酸钠 称取 500 mg 硫代硫酸钠,溶于 50 ml 双蒸水。

7. 粘合硅烷(bind silane)液

95%乙醇 1 ml

冰乙酸 5 μl

粘合硅烷(购于 Promega 公司)5 μl

8. Sigma Cote 购于 Promega 公司。

9. 其他 无水乙醇、95%乙醇、37%甲醛。

三、方法

(一) 运用 PCR 进行 DNA 扩增

依据所用特异的 DNA 模板和引物设置理想的扩增条件,按常规 PCR 方法进行。

(二) 凝胶的制备

1. 用去污剂洗净凝胶玻板,用水洗后再用无水乙醇擦洗。

2. 用粘合硅烷液硅化短玻璃板(凹型玻板)。

3. 用 Sigma Cote 溶液涂于长玻璃板,防止粘附。

4. 配胶(以 5% 凝胶为例):

30% 丙烯酰胺-0.8% 双丙烯酰胺 17 ml

5× TBE 20 ml

dH₂O 62 ml

TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺) 30 μl

混匀后加 0.8 ml 1 g/L 过硫酸铵

5. 灌胶时注意不要产生气泡,上样前在冷室内预冷至少 30 min(低温下电泳除外)。

(三) 样品制备

1. 将 PCR 产物(约 3 μl)与样品缓冲液等体积混匀。

样品缓冲液:95% 甲酰胺,20 mmol/L EDTA(pH8.0)、0.05% 二甲苯青、0.05% 溴酚蓝。

2. 85~98℃ 变性 5~10 min,立即冰浴冷却。

(四) 电泳

1. 每孔上样 3~5 μl

2. 恒压 500 V,4℃ 电泳 12~15 h(使用测序电泳装置时);或根据扩增片段大小及电泳槽和凝胶的大小,选择电泳条件。

(五) 银染

将电泳完毕的凝胶从玻璃板剥下后,依次进行如下操作:

1. 将带胶玻璃板置一方盆中,加入固定液/终止液固定,并置水平振荡器在室温轻轻振荡至二甲苯青消失。回收固定液/终止液,用双蒸水漂洗凝胶 3 次,最后 1 次应弃尽双蒸水。

2. 现配制银染液 500 ml,并加入 0.75 ml 甲醛(如凝胶较小可相应减少银染液及甲醛),倒入方盆,水平振荡器轻轻振荡,染色 30 min。倒弃银染液,双蒸水快速漂洗一遍,约 5~10 s,立即竖起玻璃板沥干双蒸水。

(六) 显影与定影

将预冷的 500 ml 显影液内加入 0.75 ml 甲醛、100 μl(10 mg/ml)硫代硫酸钠,混匀后倒入方盆中一半,缓慢显影,当有带型出现时,倒弃显影液,再加入另一半显影液继续显影至所有带型显现为止。倒弃显影液,加入回收的固定液/终止液,终止显影并固定影像 5 min。双蒸水漂洗凝胶 2 次,2 min/次。

(七) 拍照

在看片灯箱上拍照。或将胶板置室温干燥,可长期保存。

四、注意事项

1. 凝胶 改变凝胶条件可以增加检测单个碱基改变的灵敏度,例如在 4%~12% 范围调整丙烯酰胺浓度,以及相应交联剂双丙烯酰胺的浓度(为前者的 2%~3.4%)。

2. 变性剂 凝胶中加入 5%~10% 的甘油,或 5% 尿素或甲酰胺以及 10% 二甲亚砜或蔗糖等

有助于提高敏感性。但在少数变异序列则检测条件不能加入甘油。

3. 温度 电泳的温度如不能很好控制,单链 DNA 的迁移率会出现难以预料的变化。可以采取减少凝胶厚度、降低电压,有效的空气冷却或循环水冷却等措施,使温度恒定。

4. 核酸片段大小 用于 SSCP 分析的核酸片段越小,检测的敏感性越高。一般小于 300 bp,尤其是 150 bp 左右的核酸片段更适于 SSCP 分析。

5. 银染 必须使用不含杂质的超纯水或双蒸水,含杂质如卤素和金属离子的水,将使扩增信号减弱甚至不能显影。硝酸银染色之后漂洗时间不宜过长,以 5~10 s 为宜,否则银离子会从 DNA 上游离下来而减弱显影信号。显影液必须在 4℃ 温度下进行显影反应,以控制背景清晰度。显影时间的控制必须长短适中,显色过浅或过深均影响结果的观察。

第四节 PCR 衍生技术介绍

PCR 技术的发展十分迅速,已形成了一系列的适用于不同目的的衍生技术,现简介如下:

一、重组 PCR(recombinant PCR, RPCR)

是指用 PCR 法在 DNA 片段上进行定点突变。突变的产物即是扩增物中含有与模板核苷酸序列相异的碱基,用 PCR 介导产生核苷酸的突变包括碱基替代、缺失或插入等。

重组 PCR 操作需要 2 对引物:“左方”PCR 的一对引物为 a 和 b, b 中含有一个“突变碱基”;“右方”PCR 一对引物 b' 和 c, b' 中含有一个和引物 b 中的“突变碱基”相互补的碱基。先用 2 对引物分别对模板进行扩增。除去引物后将 2 种扩增产物混合,变性并复性后进行延伸,然后再加入外侧引物 a 和 c,经常规的 PCR 循环后,便能得到中间部位发生特定突变的 DNA 片段(图 12-2)。重组 PCR 造成 DNA 片段的插入或缺失与其造成特定碱基的置换在操作上相类似。重组 PCR 制备克隆突变体,用作研究基因的功能。

二、原位 PCR(*in situ* PCR)

是原位杂交的细胞定位技术与 PCR 的高灵敏度相结合的技术。该技术可以获得靶基因(靶 DNA 或 RNA)在原始特异细胞的定位,而靶基因的细胞定位在多数情况都是重要的信息,例如了解 HIV-DNA 在血清阳性无症状病人哪些细胞型是病毒的原发灶等方面十分重要。

简要步骤:组织切片和细胞样品制备→蛋白酶消化→DNA 酶消化(用于原位 PCR 中的反转录)→反转录步骤→PCR 反应→检测。

三、固着 PCR(sanchorde PCR, SA-PCR)

膜结合 PCR 是将模板 DNA 固定,固着 PCR 是将引物固相化,再行 PCR。此时 PCR 产物就被固相化,易于分离。例如可将引物固着于琼脂糖珠上。

这种固相化的引物可用于 RT-PCR、常规 PCR,亦可进行 cDNA 末端快速分析(Race-PCR)等。总之,凡是需要快速方便的分离 PCR 产物,均可使用这一技术。

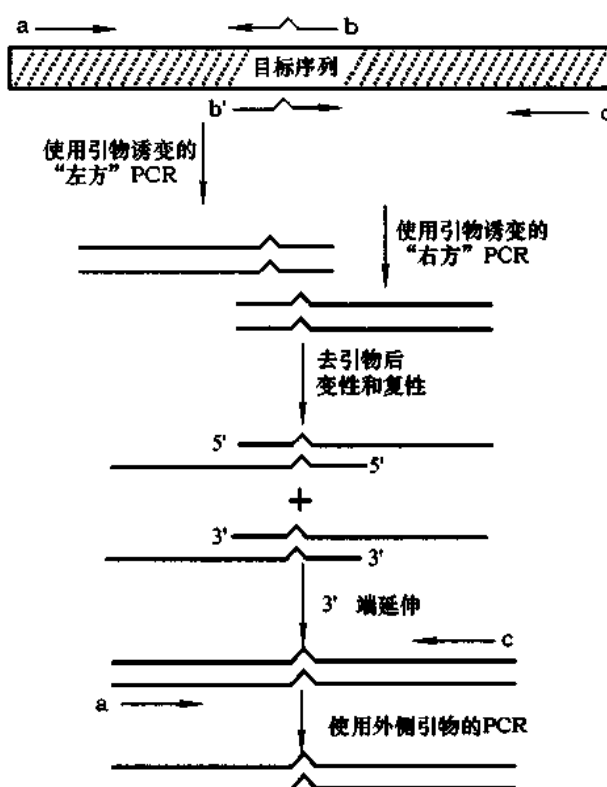


图 12-2 重组 PCR 造成特定碱基置换示意图

四、不对称 PCR (asymmetric PCR)

即在扩增循环中引入不同引物浓度,而得到单链 DNA。一般两条引物的浓度采用 50:1~100:1 比例。在最初 10~15 个循环中主要产物还是双链 DNA,但当低浓度引物被消耗尽后,高浓度引物介导的 PCR 反应就会产生大量单链 DNA。分离此扩增产物中的 ssDNA 可用原引物或第三条内部引物直接测序。

五、锚定 PCR (anchored PCR)

当待扩增的 DNA 或 RNA 序列本身或旁侧序列不清楚时,可以采用锚定 PCR 技术对目的片段进行扩增。具体方法是:分离细胞总 RNA 或 mRNA,在反转录酶作用下合成 cDNA,通过 DNA 末端转移酶在 cDNA 3' 末端加上 poly(dG) 尾。与此 poly(dG) 相对应的锚定引物为 poly(dC),为保证扩增特异性,选择此段旁聚 poly(dC) 在 12 聚以上为佳,5' 端可带上某些限制酶序列或其他序列信息。在与基因特异配对的引物参与下,可以扩增此带同源多聚物尾巴的 cDNA 序列。

六、反向 PCR (inverse PCR)

反向 PCR 是对一个已知的 DNA 片段两侧的未知序列进行扩增和研究。选择已知序列内部没有切点的限制酶对此段 DNA 进行酶切,连接形成环状 DNA 分子,此时选择合适方向的与已知序列两末端互补的引物,经 PCR 后,可以得到未知序列的 DNA 片段,用此方法建立基因组步移文库,

在分子生物学研究上是非常有意义的。

七、着色互补 PCR(color complementation PCR)

也称为荧光 PCR。即将 PCR 的引物 5' 端用荧光物质标记而进行的 PCR。荧光 PCR 的原理是用不同的荧光染料,如红色的罗丹明(6-carboxy-x-rhodamin, POX)和绿色荧光素(5'-carboxyfluorescein, FAM),等分别标记于不同的寡核苷酸引物上,同时扩增多个 DNA 区段,反应完毕后,利用分子筛除去多余的引物。用紫外线照射扩增产物,就能显示某一种或几种荧光染料颜色的组合,如果某一 DNA 区带缺失,则会缺乏相应的颜色,据此可以很快诊断是否某种基因缺失,或是诊断可疑病毒的感染等。荧光 PCR 也为核酸测序自动化创造了条件。此时 4 种核苷酸用不同荧光素标记,利用自动测序仪进行全自动 DNA 序列测定。

八、多重 PCR(multiplex PCR)

即在同一试管中加入多对引物,扩增同一模板的几个区域。如果基因的某一区段缺失,则相应的电泳图谱上这一区带就会消失,多重 PCR 反应和 southern blotting 一样可靠,但要简便得多。多重 PCR 可以同时检测多个突变或病原。有利于诊断遗传疾病和感染疾病。

第五节 PCR 技术的应用

一、分子生物学科研究领域

PCR 技术渗透到分子生物学研究的各个领域,有的替代了原有的方法,有的大大简便了原有的方法。现将最常用的研究方法介绍如下:

1. 基因克隆 基因的克隆和分离是分子生物学和细胞生物学研究中不可缺少的手段。运用 PCR 技术于基因克隆和亚克隆比传统的方法具有更大的优点。由于 1 次 PCR 可以对单拷贝的基因放大上百万倍,产生微克(μg)级的特异 DNA 片段,从而可省略从基因组 DNA 中克隆某一特定基因片段所必须经过的像 DNA 的酶切、连接到载体 DNA 上、转化、建立 DNA 文库及基因的筛选、鉴定、亚克隆等繁琐的实验步骤。

只要知道目的基因的两侧序列,通过一对和模板 DNA 互补的引物,可以十分有效地从基因组 DNA 中或从 mRNA 序列中,或从已克隆到某一载体上的基因片段中扩增出所需的 DNA 片段。为了克隆操作的方便或保证克隆后基因的方向正确性,可以在设计引物时在其 5' 端作一些修改,或加上一段不完全与模板互补的序列。这个添加的序列可以是带限制性内切酶切点的连接子,或某种启动子序列或起始或终止密码。经过 PCR 扩增后,添加的序列最终可整合到新合成的产物中,便于下一步的重组克隆和基因的表达和调控研究。如果加入的序列是包含限制性内切酶位点的连接子,PCR 产物经相应的内切酶消化后,即可进行定向克隆。

2. DNA 序列测定 PCR 技术使 DNA 测序大为简化。因此,现在几乎都采用 PCR 法进行序列测定。测定时,PCR 产物即可以克隆到测序载体中,也可以不经克隆而直接测序。由于直接测序既方便又可靠,且可标准化与自动化,因此直接测序就更为普遍。

现在已有 20 多种自动化测序的仪器,大都是使用荧光或放射性标记的核苷酸掺入,进行电泳与自动记录结果。用 PCR 测序的方法包括双链直接测序,双链克隆后测序,基因扩增转录测序及不对称 PCR 产生单链测序。

3. 分析突变 DNA 分子的碱基突变可引起肿瘤、遗传病、免疫性疾患等,因此,检测 DNA 突变分子对临床诊断与研究有重大意义。突变分子的检测有多种方法,例如寡核苷酸探针(ASO)、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)、变性凝胶电泳(DGGE)及其他等等,而聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)分析技术提供了简便、快速、经济的检测手段。

由于 PCR-SSCP 是检测单链 DNA,可使用不对称 PCR,将 PCR 反应产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,此时双链 DNA 走得最快,其次是正常的单链 DNA 分子,最后是突变分子。

4. 基因重组与融合 在分子生物学研究中常常需要将两个不同的基因融合在一起,通过 PCR 反应可以比较容易地实现这一目的。在两个 PCR 扩增体系中,两对引物分别由其中之一在其 5' 末端和 3' 末端引物带上一段互补的序列。混合两种 PCR 扩增产物,经变性和复性,两组 PCR 产物通过互补序列发生粘连,其中 1 条重组杂合链能在 PCR 条件下发生延伸反应,产生 1 个包含两个不同基因的杂合基因。

5. 基因定量 应用 PCR 技术可以定量检测标本中靶基因的拷贝数。这在研究基因的扩增等方面具有重要意义。它是将目的基因和一个单拷贝的参照基因置于同 1 个试管中进行 PCR 扩增。电泳分离后呈两条区带,比较两条区带的丰度,或在引物 5' 端标记上放射性同位素,通过检测两条区带放射性强度即可测出目的基因的拷贝数,利用差示 PCR 还可以对模板 DNA(或 RNA)的含量进行测定,在一系列 PCR 反应中,分别加入待测模板 DNA 和参照 DNA 片段。参照 DNA 片段基本上按待测 DNA 的方式进行构建,只是在其基因上增加了一小段内部连接顺序,这样使得两种 DNA 片段的 PCR 产物可在凝胶电泳上分开。由于这两种不同的 DNA 片段可以在同一种寡核苷酸引物作用下同步扩增,因此可以避免因使用不同的引物所引起的可能误差。这两种扩增产物的相对量就反映了在起始反应混合物中的目的 DNA 和参照 DNA 的相对浓度。

6. 其他 还有如鉴定与调控蛋白结合的 DNA 序列;转座子插入位点的绘图;检测基因的修饰;合成基因的构建以及构建克隆或表达载体等。

二、临床医学领域

1. 病原体诊断 利用 PCR 可以检测标本中的各种病毒、细菌、真菌、支原体、螺旋体直至寄生虫等病原体,标本可以是组织、细胞、血液、排泄物等等。只要设计的引物正确,通过 PCR 反应,将反应产物进行电泳,便可看到特异的区带。对于病毒或某些细菌,例如肝炎病毒、乳头瘤病毒,还可以进行分型。

使用 PCR 进行临床检验,通常应设置阳性对照与阴性对照,以防止出现假阳性或假阴性。

有时模板 DNA 含量太少,可以进行巢式 PCR。方法是设计两套引物,先用第一套引物进行 PCR,然后取少量 PCR 产物作模板,用第二套巢式引物(nested primer)再进行 PCR。巢式引物的退火互补位置位于第一套引物之内,因此称为巢式引物,它们只能扩增靶序列,不能扩增无关序列,从而获得理想的结果。

2. 遗传病的基因诊断 到目前为止已发现的遗传病有 4 000 多种。以地中海贫血为例,其主要病因是由于基因缺失,单个或少数核苷酸的缺失、插入或置换而造成基因的不表达或表达水平低

下,或导致 RNA 加工、成熟和翻译异常或无功能 mRNA,或合成不稳定的珠蛋白。用 PCR 进行诊断,由于其成本低、快速和对样品质量和数量要求不高等特点,使得可在怀孕早期取得少量样品(如羊水、绒毛)进行操作,发现异常胎儿可早期终止妊娠。地中海贫血常用的诊断方法如 ①发现基因缺失而出现特异性扩增带;②根据 RFLP 连锁分析作出诊断;③PCR 结合 ASO 斑点杂交进行基因诊断等。

3. 免疫学及器官移植 骨髓移植、器官移植等对有些疾病的治疗起独特作用。同基因移植(同卵双生子)不存在免疫排斥,而异基因移植时,受体会对供体器官排斥,需找到组织相容性抗原相适应的两个个体,才可进行成功的器官移植。例如骨髓移植治疗某些血液病,由于人类白细胞抗原(HLA)系统在骨髓移植免疫中起主导作用,因此要对 HLA 配型进行精确选择。

HLA 经典的配型方法是通过血清学或混合淋巴细胞培养方法分析 HLA 基因的表型。使用 PCR 法配型时,可使用有关的 HLA 基因引物,对 HLA 基因扩增,并利用寡核苷酸探针进行杂交,可方便精确地选择出适合的配型。

4. 肿瘤 根据各种肿瘤细胞内基因突变的情况设计引物,进行 PCR。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,根据正常基因顺序设计的引物与肿瘤基因设计的引物电泳结果的差异,即可判断是否为肿瘤。若标本为血液、淋巴结或肿瘤邻近组织或可疑活检,亦可有助于确定是否有肿瘤转移,由于 PCR 高度敏感,只需少量肿瘤细胞就可获得阳性结果。因此用 PCR 诊断比一般的方法要灵敏得多,利于早期诊断与治疗。

5. 法医学 法医生物学中应用 DNA 分析的目的包括个人识别和亲子鉴定。PCR 技术的应用和发展,有效地解决了法医学上很多取证上遇到的难点,如取量不够和 DNA 降解等问题。随着研究的不断深入,新的 DNA 多态位点的不断发现,制备出多种探针,为 DNA 指纹技术的发展和应用的开辟了道路。

三、动植物学的研究

如动物传染病的诊断以及植物病原的检测等。

四、其他领域

如组织和群体生物学、古生物学等。

(华西医科大学 白怀、方定志)

参考文献

- 1 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社,1993:408~434
- 2 林万明主编. PCR 技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社,1993
- 3 J Sambrook,等著. 金冬雁,黎孟枫,等译. 侯云德,等校. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京:科学出版社,1986:672~683
- 4 Erlich HA. PCR Technology in Principles and Applications for DNA Amplification. 1st ed. New York Stockton Press, 1989

-
- 5 CW. Dieffenbach, 等著 . 黄培堂, 等译 . PCR 技术实验指南 . 第 1 版 . 北京: 科学出版社, 1998
 - 6 谷志远主编 . 现代医学分子生物学 . 北京: 人民军医出版社, 1998: 440 ~ 444
 - 7 Gyllenstein UB. and HA Erlich. Proc Natl Acad Sci USA, 1988(85): 7 652
 - 8 Orita M, *et al*. Genomics, 1989(5): 874

第十三章

DNA 序列测定技术

20 世纪 70 年代中期建立的分子克隆技术使得大量制备均一的 DNA 片段成为可能,为测定 DNA 的核苷酸序列,进而为详细分析大量基因的结构与功能奠定了基础。目前,以 Sanger 等建立的链终止法为基础发展起来的荧光自动化测序技术不仅使 DNA 序列测定成为分子生物学实验室的一项常规实验技术,也极大地推动了以人类基因组计划为代表的各种生物的基因组计划的顺利开展与实施。

第一节 序列测定的技术和策略

目前应用的序列测定技术基本是基于 Sanger 等(1977)提出的酶法及 Maxam 和 Gilbert(1977)提出的化学降解法。虽然其原理不大相同,但这两种方法都生成有固定起点但却随机终止于一种(或多种)残基上的标记寡核苷酸。终止反应分为 G、A、T、C 四个(或多个),每个反应都在被测 DNA 片段的所有该碱基上出现机会均等的终止端,因此每一个反应都形成这些寡核苷酸片段的混合物,任何一个片段的长度由一个特定碱基在原 DNA 全片段上的位置所决定。然后在可以区分长度仅差一个核苷酸的不同 DNA 片段的条件下,对各组寡核苷酸进行电泳分析,只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶中若干个相邻的泳道之上,即可从凝胶的放射自显影片上直接读出 DNA 上的核苷酸顺序(图 13-1)。

一、双脱氧链终止法

现行的链终止法是从加减法序列测定技术(Sanger 和 Coulson,1975)发展而来的。加减法基于使用特异引物在 DNA 聚合酶作用下进行延伸反应,碱基特异性的链终止,以及采用聚丙烯酰胺凝胶电泳区分长度差一个核苷酸的单链 DNA 等 3 种技术。尽管有了这些进展,但加减法仍然不太精确,因此难以广为接受。直到引入双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)作为链终止剂(Sanger 等,1977),酶法 DNA 序列测定技术才得到广泛应用。

2',3'-ddNTP 与普通 dNTP 的不同之处在于它们在脱氧核糖的 3' 位置缺少一个羟基。它们可以在 DNA 聚合酶作用下通过其 5' 三磷酸基团掺入到正在增长的 DNA 链中,但由于没有 3' 羟基,它们不能同后续的 dNTP 形成磷酸二酯键,因此,正在增长的 DNA 链不可能继续延伸。这样,在 DNA 合成反应混合物的 4 种普通 dNTP 中加入少量的一种 ddNTP 后,链延伸将与随机发生但

却十分特异的链终止展开竞争,反应产物是一系列的核苷酸链,其长度取决于从起始 DNA 合成的引物末端到出现链终止的位置之间的距离。在 4 组独立的酶反应中分别采用 4 种不同的 ddNTP, 结果将产生 4 组寡核苷酸,它们将分别终止于模板链的每一个 G、A、T 或 C 的位置上(图 13-1)

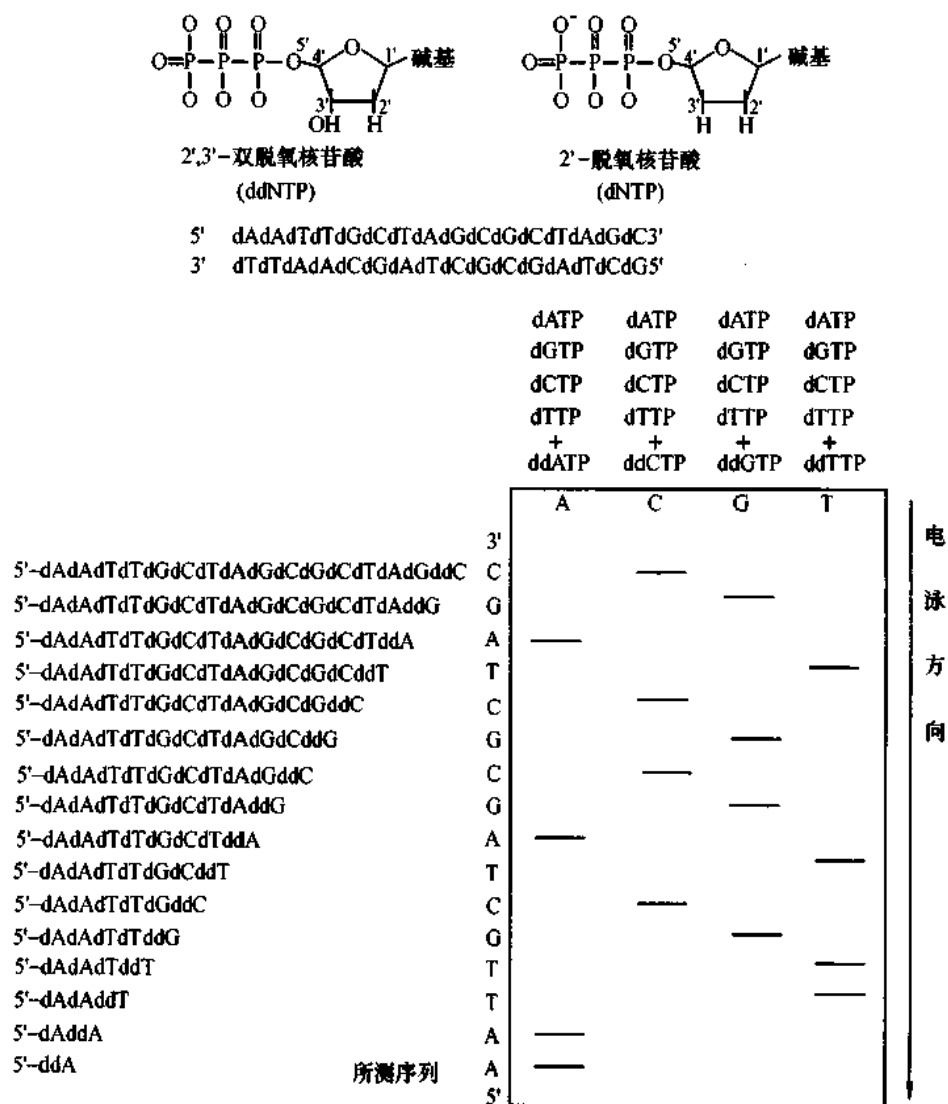


图 13-1 双脱氧链终止法测定 DNA 序列原理示意

双脱氧链终止法测定 DNA 序列反应的主要试剂包括:

1. 模板 有两类 DNA 分子可以用作酶法测序的模板:单链 DNA 和经过热变性或碱变性的双链 DNA。采用通常从重组 M13 噬菌体颗粒中分离得到的单链 DNA 模板效果最佳,只要掌握好单链模板与引物的最佳比率,就可以一组反应读得数百个核苷酸的序列。以变性双链 DNA 为模板时结果质量可能稍差。但若细心操作,也能够获得明确可信的结果。其中有两个因素是至关重要的,一是模板 DNA 的质量,二是所用 DNA 聚合酶的种类(见下文)。一般碱裂解法小量制备的质粒 DNA 常常被寡聚核苷酸及 DNA 聚合酶的抑制剂所污染,前者可能在反应中也被用作引物进行

DNA 合成,结果在测序凝胶上造成种种假象如“鬼”带、强终止现象等。现在常常使用各种离子交换柱提取的质粒质量较高,可用作酶法 DNA 测序的模板。PCR 产物一般也可用做 DNA 测序的模板。

2. 引物 引物是一段与模板 DNA 链的上游序列互补的寡核苷酸片段。在许多情况下,可将待测 DNA 片段克隆于 M13 噬菌体或质粒载体的多克隆位点,再采用能与多克隆位点一侧的载体序列相退火的通用引物进行序列测定。适于 M13 噬菌体的通用测序引物一般长 15~29 个核苷酸,可与紧靠 M13mp18 噬菌体多克隆位点区的 *Hind* III 位点或 M13mp19 噬菌体多克隆位点区 *Eco*R I 位点旁侧的序列互补。这些引物也可用于对克隆于 pUC 质粒多克隆位点的 DNA 片段进行“双链”测序。这些引物及其他常用质粒载体的测序引物通常可从厂商购得。也可自行合成引物对任何一个质粒上的 DNA 片段进行序列测定。

3. DNA 聚合酶 通常用于双脱氧法序列测定的 DNA 聚合酶包括大肠杆菌 DNA 聚合酶的 Klenow 片段(Sanger 等,1977)、反转录酶(见文献,如 Mierendorf 和 Pfeffer,1987),经过修饰消除了 3'→5'外切酶活性的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶,如测序酶(Sequenase)和测序酶 20 版(Sequenase Version 20, Tabor 和 Richardson,1987)以及从嗜热水生菌(*Thermus aquaticus*)分离的耐热 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶)。这些酶的特性(表 13-1)差别很大,因而可大大影响通过链终止反应所读得的 DNA 序列的长度和质量。

表 13-1 DNA 测序反应中所使用的 DNA 聚合酶的特性

酶	持续合成能力 ^a	聚合速率 ^b
大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段	10~15	45
反转录酶(禽类成髓细胞瘤病毒,AMV)	未测定	5
测序酶	约 2 000	300
测序酶 20 版	约 3 000	300
Taq DNA 聚合酶及 Ampli Taq DNA 聚合酶 ^c	>7 600	35~100

a: 持续合成能力以酶从模板上解离之前所合成的核苷酸的平均数表示。

b: 聚合速率的单位是核苷酸/秒。

c: Taq DNA 聚合酶的持续合成能力很强,适于对可形成稳定二级结构的 DNA 模板进行测序。

(1) 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段 最初用以建立 Sanger 法的酶,至今仍然广泛用于 DNA 序列测定。通常碰到以下两个问题:

① Klenow 片段的持续合成能力低,以致一些片段并非由于 ddNTP 的掺入,而是因为聚合酶从模板上随机解离而终止合成,因而导致背景增高。由于该酶不能沿模板进行长距离移动,因此利用该酶进行测序测得的序列长度有限。通常只能得到大约 250~350 个核苷的序列。如果分两步进行反应,所得序列的数目可以翻一番;其中第一步是初始标记步骤,采用低浓度的 dNTP,而随后的第二步是链终止反应,含有 ddNTP 和高浓度的 dNTP(Johoston-Dow 等,1987;Stambaugh 和 Blakesley,1988)。但即便如此,用 Klenow 酶所测序列的长度通常还是不如持续合成能力较强的测序酶(见下文)。

② 这种酶对模板中的同聚核苷酸区段或含其他牢固二级结构的区域进行复制的效能很低,将聚合反应的温度提高到 55℃,可以缓解但不能彻底解决这一问题(Gomer 和 Firtel,1985)。有时可采用一些 dNTP 类似物(如 dITP 或 7-deaza-dGTP)来分析模板中可形成稳定二级结构的区段

的序列,但 Klenow 酶对这些类似物的掺入作用不如测序酶有效,其原因也许是它们使 Klenow 酶原已较低的持续合成能力进一步降低。

总之,可以选用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段来测定从引物 5' 位置起 250 个碱基以内的一段 DNA 序列,但若用它来测定更长的 DNA 序列或者具有二级结构的 DNA 片段序列则较困难。

(2) 反转录酶 一般测序并不广泛使用反转录酶,但有时可用反转录酶来解决模板 DNA 中存在 A/T 或 G/C 同聚核苷酸区而引起的问题。来自禽类和鼠类反转录病毒的反转录酶在这一方面略优于 Klenow 酶(Karathanasis, 1982; Graham 等, 1988),但它们都不及测序酶(Cameron-Mills, Revak 等, 1988)。

(3) 测序酶 Sequenase™ 是一种经过化学修饰的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶。该酶原来具有很强的 3'→5' 外切核酸酶活性,经过修饰后,这一活性大部分被消除。测序酶 2.0 版是测序酶的基因工程产品,它完全缺失了 3'→5' 外切酶活性,极其稳定而且比活性要比经化学修饰的测序酶高 2 倍。测序酶持续合成能力很强,聚合速率很高,对诸如 dITP 和 7-deaza-dGTP 等核苷酸类似物的掺入能力也很强。它是测定长片段 DNA 序列的首选酶。测序酶可以沿模板移动很长的距离,因而一套反应常常就可以测定数百个核苷酸的 DNA 序列。实际上,测得序列的长度的主要制约因素是受聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨能力。

为了充分利用测序酶极高的持续合成能力,可采用两步测序反应。第一步首先采用低浓度的 dNTP 和较低温度以便将合成反应限制在适度之下并确保放射性标记 dNTP 的有效掺入,使引物仅仅延伸 20~30 碱基。再将第一步反应等分于 4 组 1 套的标准反应系统中,每组反应中都含有高浓度的 dNTP 和一种 ddNTP。这样聚合反应就得以继续,直至造成链终止的核苷酸掺入正在增长的链中。

(4) Taq DNA 聚合酶 Taq DNA 聚合酶适用于测定在 37℃ 形成大段稳定二级结构的单链 DNA 模板序列。这是因为 Taq DNA 聚合酶在 70~75℃ 活性最高,这一温度下即使是 GC 丰富的模板也无法形成二级结构。目前最常用的荧光自动测序主要依赖于 Taq DNA 聚合酶进行测序。

4. 放射性标记 dNTP 大多数 DNA 测序反应都用 α - ^{32}P 标记的某种 dNTP 进行,然而 ^{32}P 发射的强粒子造成两个问题。首先由于发生散射,放射自显影片上的条带远比凝胶上的 DNA 条带更宽、更为扩散,因此将影响到所读取的序列(尤其是从放射自显影片的上部所读取的序列)的正确性并将制约从单一凝胶上所能读出的序列的长度。其次 ^{32}P 的衰变会引起样品中 DNA 的辐射分解,因此用 ^{32}P 进行标记的测序反应只能保存一两天,否则 DNA 将被严重破坏,使测序凝胶的放射自显影模糊不清。

^{35}S 标记的 dNTP 的引入(Biggin 等, 1983)缓解了上述矛盾。由于 ^{35}S 的衰变产生较弱的 β 粒子,其散射较弱,凝胶和放射自显影片之间的分辨率上相差甚少,因此可以从一套反应中确切测定数百核苷酸的 DNA 序列。此外, ^{35}S 的低能辐射所引起的样品分解比较轻微,因此,测序反应产物可在 -20℃ 保存达一周。

目前大多数测序反应都用荧光标记,产物用全自动激光荧光 DNA 测序仪进行分析。

二、DNA 化学降解法

与包括合成反应的链终止技术不同,Maxam-Gilbert 建立的化学降解法(Maxam 和 Gilbert,

1980)要对原 DNA 进行化学降解。这一方法是在体外研究 lac 阻抑物与 lac 操纵基因相互作用时发展起来的。目前已鲜有用此方法进行 DNA 序列测定,但此方法在探讨 DNA 构象和蛋白质 - DNA 相互作用上仍然具有独到之处。

在这一方法中,一个末端标记的 DNA 片段在 5 组互相独立的化学反应中分别被部分降解。其中每一组反应特异地针对某一种或一类碱基。因此,生成 5 组放射性标记分子,从共同起点(放射性标记末端)延续到发生化学降解的位点。每组混合物中均含有长短不一的 DNA 分子,其长度取决于该组反应所针对的碱基在原 DNA 片段上的位置。然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,再通过放射自显影显示结果。Maxam-Gilbert 法所用的化学修饰技术如表 13-2 所示。

表 13-2 Maxam-Gilbert 法所用的化学修饰技术

碱 基	特 异 修 饰 方 法 ^a
G	在 pH 8.0 下,用硫酸二酯对 N7 进行甲基化,使 C8-C9 键对碱裂解具有特异的敏感性。
A + G	在 pH 2.0 下,嘧啶甲酸可以使嘌呤环的 N 原子质子化,从而导致脱嘌呤,并因此削弱腺嘌呤和鸟嘌呤的糖苷键。
C + T	胍可打开嘧啶环,后者重新环化成环后易于除去。
C	在 1.5 mol/L NaCl 存在下,只有胞嘧啶可同胍发生明显可见的反应。
A > C	在 90℃ 下,用 1.2 mol/L NaOH 处理可使 A 位点发生剧烈的断裂反应而 C 位点的断裂反应较微弱。

a: 热嘧啶溶液(90℃, 1 mol/L 溶于水)可以在经过化学修饰的位点使 DNA 的糖-磷酸链发生裂解。

三、测序策略

开始测序之前,必须根据被测序列片段的长度、所要求的测序精确度以及现有的设施来制定测序总策略。只有一小部分的研究计划需要从头测定大段从未测定过的序列,而更多的情况是要通过测序对突变(如点突变和缺失)进行定位和鉴定,并证实所构建的重组 DNA 的方向与结构。

(一) 验证性测序

验证性测序例如对利用寡核苷酸介导的诱变而产生的突变体进行测序只需进行一套反应,以取得双链 DNA 中一条链上局部区域的核苷酸序列。通常将待测片段先亚克隆于 M13 噬菌体或噬菌粒载体的多克隆位点,然后利用通用引物进行测序。

(二) 从头测序

从头测序的目的是要提供一段未知 DNA 片段的准确核苷酸序列。由于单套测序反应所能准确测定的靶 DNA 序列一般可达 400 碱基左右,因此对于长片段的序列测定须先经过精心计划。可将长约 400 碱基的靶 DNA 片段按互为相反的方向分别克隆于 2 种 M13 噬菌体载体(如 M13mp18 和 M13mp19)上。然后每条链的全序列可以通过利用通用测序引物进行的单套反应得到测定。如果要对更长的靶 DNA(如长达数千碱基)进行测序则可在以下两种通用策略中择一而行:

1. 随机法(或鸟枪测序法) 即先把待测 DNA 的随机片段亚克隆入测序载体中分别进行测序,然后收集序列资料,最后排出待测 DNA 片段的全长序列。

2. 定向法 先将待测 DNA 片段通过一定的亚克隆过程插入克隆载体,得到一系列重叠的亚克隆,它们具有共同的起点(通常在靶 DNA 的一端)并分别包含靶 DNA 中的不同片段。利用通用引物进行测序之后可一次读出待测片段的全长序列。另一种方法是利用一次测序所读取的序列设

计新的寡核苷酸用作下一次反应的引物,从而循序渐进地获得待测 DNA 片段的序列。

第二节 Sanger 双脱氧链终止法测序

一、测序反应

(一) 单链 DNA 的制备

可从单一噬斑形成的噬菌体颗粒或从细菌菌落小规模制备单链 M13 噬菌体或噬菌粒 DNA。所得 DNA 一般足够进行 5~10 套测序反应。开始测序反应之前,应检查每批单链 M13 噬菌体或噬菌粒 DNA 样品中的单链模板量。可以从每批 DNA 样品中取出少量用琼脂糖凝胶电泳进行分析,并采用已知浓度的 M13 噬菌体 DNA 的作为标准参照物。单链 M13 噬菌体 DNA 在琼脂糖电泳中条带不大清晰,溴化乙锭染色也弱,但仍然能估计出不同样品中 DNA 的相对含量。

(二) 引物的准备

引物需要用 TE(pH 8.0)溶解成 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度,贮存于 -20°C 。1 μg 通用引物(19 个核苷酸)大约相当于 160 pmol。引物的长度可以介于 15~26 个核苷酸,但若用变性的双链 DNA 为模板,如噬菌体或质粒,则宜选用较长的引物(25~29 个核苷酸)以减少假带的产生。

在实验室中自行合成的引物用前一般不必经过凝胶电泳纯化。合成产物中长度不足的寡核苷酸的量通常较低($<10\%$),不足以影响 DNA 测序反应的质量。但使用实验室合成的引物时常常需要进行预实验,以决定测序反应中引物与模板的最佳比例。

(三) 微量滴定板

采用 Klenow 酶或反转录酶的测序反应分两个阶段进行:一是退火反应,使寡核苷酸引物与模板 DNA 杂交;二是 4 组链延伸终止反应,此时以退火寡核苷酸为引物开始链延伸,所合成的 DNA 链由于 ddATP、ddGTP、ddCTP 或 ddTTP 在模板相应位置上的掺入而终止。采用测序酶的测序反应中,还包括一个步骤,即掺入反应,以确保放射性标记的前体能够有效地掺入新合成的 DNA 中。

链延伸终止反应通常在普通微量离心管中进行。测定大批样品的序列时,也可在一次性使用的 96 孔 U 形底微量滴定板中进行。从每孔的边上加入试剂,试剂沿孔的边缘形成单个液滴,在备有微量滴定板套筒的低速离心机上将 96 孔板略加离心,即可使反应同步开始。离心可使液滴沉于孔底,并使反应液中的各个组分得以混匀。微量滴定板有许多优点:可同时操作 24 套链延伸终止反应;可用多头分液器加试剂;可同步进行多套测序反应。

(四) 链延伸终止反应

链延伸与链终止之间的竞争取决于 4 组测序反应的每一组中 dNTP 与 ddNTP 之比。每种用于双脱氧测序的 DNA 聚合酶对普通 dNTP 和造成链终止的 ddNTP 的亲合力不同,因此适用于一种酶的反应条件可能不适用于另一种酶。如果首次采用特定的酶(测序酶聚合酶、或大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段)进行测序,最好购置含有相应 DNA 聚合酶、经过预试验检验的链延伸-链终止混合液、单链模板和寡核苷酸引物的试剂盒。试剂盒的组分用完后,再以自配的试剂补充。这些试剂比较廉价并可配成各种不同浓度。每一批新试剂都必须经过预实验检验。在一系列预实验反应中,可采用标准模板和引物,以及一定浓度范围的 dNTP 和 ddNTP。开始时,最好采用

固定浓度的 dNTP 及不同浓度的 ddNTP,通常需要进行系列的预实验反应,才能够决定最佳条件。

二、变性聚丙烯酰胺凝胶

核苷酸序列的读取数量和准确度均取决于聚丙烯酰胺凝胶电泳的质量。在最佳条件下,可从变性聚丙烯酰胺凝胶中可靠地读得 300~400 核苷酸的序列。如果把测序反应液分为数份分别按不同的时间长度进行电泳,则可从一块凝胶中读出 500 核苷酸的序列。

用于配胶的丙烯酰胺浓度取决于待分析 DNA 片段的长短。如要读出距引物 5'端 50 个核苷酸以内的序列,应配制丙烯酰胺浓度(12%~20%)较高的凝胶。距离引物端 25~400 核苷酸之间的序列,可用丙烯酰胺浓度为 6%的凝胶读取;距离更远的序列,则可通过 4% 或 5%的聚丙烯酰胺凝胶来测定。

测序凝胶装置的大小和形状各异。其主要参数包括:

(1) 凝胶的长度 标准长度为 40~50cm。

(2) 凝胶的宽度 窄胶(20 cm)可以容纳 40 个泳道并且易于处理,而宽胶(40 cm)则可接受多一倍的样品。

(3) 凝胶的厚度 测序凝胶的厚度是由前后玻璃之间用作间隔片的薄塑料条的厚度所决定的。标准测序凝胶的厚度为 0.3~0.4 mm。更薄(0.2 mm)的凝胶可以得到更好的分辨率,但却易于破裂;厚凝胶(0.6 mm)可以上样体积增大,但却更难固定和干燥。

(4) 凝胶的横截面形状 大多数测序凝胶的厚度均匀,在这种凝胶中,DNA 片段的长度与其迁移率之间成对数关系,因而在凝胶底部产生分隔较疏的条带而在凝胶顶部产生密集的条带。这种现象制约了可从一块凝胶上可靠读出的核苷酸序列的长度。锥形或楔形凝胶可缓解这一矛盾,其底部较厚(0.6~0.75 mm)而顶部较薄(0.25 mm)(Bankier 和 Barrell,1983;Reed 等,1986)。楔形凝胶可降低电阻并减少单位长度上的电压差,从而压缩邻近 DNA 条带之间的空隙。因而随着凝胶厚度的增加,DNA 的泳动减慢。但楔形凝胶干燥时间要较长,并很易在干燥机上发生破裂,而且有些时候凝胶底部条带的分辨率较差,所以用这种凝胶进行测序并不常见。另一种可以减少凝胶底部 DNA 条带之间的空隙的方法是逐渐提高凝胶下部的缓冲液浓度(Biggin 等,1983;Hong,1987)。因为凝胶的电压随离子强度的提高而降低,因此 DNA 越接近凝胶底部,泳动就越慢。这样可使从一块凝胶上读出的核苷酸总数增加约 30%。

(5) 加样槽 测序凝胶可用下述两种加样槽:

① 在丙烯酰胺溶液聚合前将梳子插在溶液顶部形成常规加样孔。从凝胶中抽出梳子后用缓冲液冲洗加样槽,除去未聚合的丙烯酰胺,然后再加入样品。这样形成的泳道间分隔较宽。

② 在凝胶聚合以后插入鲨鱼齿梳子形成加样槽。鲨鱼齿梳子的齿尖可以轻轻插入胶面以防止邻近 DNA 样品间相混。鲨鱼齿梳子减少了加样槽破损或变形的危险,并可产生一个更为平整也更为一致的表面以供加样。此外,鲨鱼齿梳子实际上在相邻泳道之间不留空隙,因此有利于准确读限度序列。其缺点是较难加样,有时会发生渗漏。因此鲨鱼齿梳子应与间隔片厚度一致,配套使用。

(6) 整块凝胶上的温度梯度 电泳过程中,随着凝胶发热将形成一个温度梯度,可使 DNA 条带变弯。最简单的温控系统是夹在玻璃板上并带塑料涂层的金属板。更好的装置则采用电泳缓冲液来冷却凝胶的背面,使凝胶电泳能在恒定的温度下进行。在更为先进的装置中,支持凝胶的两块

玻璃中有一块为恒温玻璃板。恒温玻璃板本身的双层玻璃之间可通过循环水,经恒温循环水浴系统控制,使凝胶电泳能在较高的恒温(60℃)条件下进行。

(一) 配制缓冲液梯度的聚丙烯酰胺凝胶

下述方法介绍了灌制从上部至基底部之间缓冲液浓度不断提高的测序凝胶并进行电泳的步骤(Biggin 等,1983;Hong 1987)。略加修改后本法可用于常用的各种电泳装置。测序凝胶应至少在用前 2 h 配制,配好的凝胶可在 24 h 内使用。

1. 配制以下贮存液:

(1) 40% 丙烯酰胺溶液

丙烯酰胺(DNA 测序级)	380g
N,N'-亚甲双丙烯酰胺	20g
加蒸馏水至 600 ml	

将溶液加热至 37℃ 使试剂溶解,用蒸馏水将体积调至 1 L。用硝酸纤维素滤膜过滤后室温保存于棕色瓶中。在贮存期间,丙烯酰胺和双丙烯酰胺缓慢转化为丙烯酸和双丙烯酸,这一脱氢反应受光催化和碱催化。应检查丙烯酰胺溶液的 pH 是否在 7.0 或更低,并应在室温下避光保存溶液。每隔数月应重新配制溶液。

小心:丙烯酰胺是强烈的神经毒剂,可经皮肤吸收。丙烯酰胺的作用具有累积性。称取粉末丙烯酰胺及亚甲双丙烯酰胺时必须戴手套和口罩。取用含上述试剂的溶液也要戴手套。一般认为聚丙烯酰胺无毒,但其中可能含有少量未聚合的丙烯酰胺,故仍应小心处理。

(2) 5×TBE

Tris 碱	54 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	20 ml
加去离子水至 1L	

用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的 TBE 使用强度为 1×TBE(89 mmol/L Tris-硼酸,2 mmol/L EDTA)。这一强度要比通常用于琼脂糖凝胶电泳时大一倍。用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的垂直电泳槽上的缓冲液池一般较小,故所通过的电流强度通常很大。要用 1×TBE 才能够形成适当的缓冲容量。缓冲液 pH 大约为 8.3。

应用同批次的 5×TBE 贮存液配制凝胶和电泳缓冲液。离子强度或 pH 的细小差异将会严重地扭曲 DNA 条带。

(3) 100g/L 过硫酸铵

过硫酸铵	1 g
加水至 10 ml	
可在 4℃ 保存数周。	

(4) 6% 丙烯酰胺-尿素顶层溶液

40% 丙烯酰胺溶液	75 ml
5×TBE	50 ml
尿素(超级纯)	230 g

用去离子水将体积调至 500 ml,用硝酸纤维素滤膜过滤。可在 4℃ 存放数周。

(5) 6% 丙烯酰胺 - 尿素底层溶液

40% 丙烯酰胺溶液	30 ml
5×TBE	100 ml
尿素(超级纯)	92 g
蔗糖	20 g
溴酚蓝	10 mg

用硝酸纤维素滤膜过滤。可在 4℃ 贮存数周。

加入蔗糖是为了提高底层溶液的密度以利于灌制缓冲液梯度。溴酚蓝可以作为检查缓冲液梯度是否正确形成的可见指示剂。

2. 洗净玻璃板 首先估算容纳所有的测序样品所需的玻璃板总数。可用 KOH - 甲醇(在 100 ml 甲醇中加入大约 5 g 片状 KOH)从玻璃板上除去原有的硅烷化试剂(取用 KOH 和 KOH - 甲醇溶液应十分小心)。然后用去污剂温溶液洗涤玻璃板和间隔片,用自来水彻底冲洗,再用去离子水洗净。应从边上搬动玻璃板以免手套上的污物或手上的油脂粘在玻璃板的表面。用乙醇冲洗玻璃板,并放于一旁晾干。玻璃板必须小心洗净,以防灌胶时产生气泡。

每块玻璃板的凝胶面都应硅烷化处理,以防止凝胶与玻璃板粘贴使凝胶在电泳完后难以从玻璃板上取下。但有些类型的电泳装置的恒温玻璃板用剥脱硅烷处理,另一块玻璃板用结合硅烷处理,电泳完毕后使凝胶结合在这块玻璃板上进行后续处理。

3. 组装玻璃板 商品化的电泳装置有多种类型,玻璃板与间隔片的配置也因厂商的不同而有差异。但其共同的目标是在玻璃板与间隔片之间形成不透水的密封,以免未聚合的凝胶溶液漏出。一般两块玻璃板的大小略有差异,其中一块带凹口。间隔片是用软塑料薄片(通常厚 0.4 mm)制成的。将较大(或不带凹口)的玻璃板平放在实验桌上并将两块间隔片沿玻璃板边缘放置妥当。确认玻璃板上没有尘埃,再将较小(或带凹口)的玻璃板放置在间隔片上。用几个大弹簧夹(长 5 cm)将玻璃板的一边夹起来。在玻璃板另一边及玻璃板底部贴上凝胶密封带。应特别注意玻璃板的底角,因为这里是最容易发生渗漏的地方。将弹簧夹换到已封好的一边,在玻璃板的另一边贴上凝胶密封带。

4. 将梳子放在组装好的玻璃板的敞开端并检查是否贴切。

5. 在实验台上铺保护纸,戴上手套。按下列步骤配制用于一块 20 cm × 40 cm 的测序凝胶的聚丙烯酰胺溶液:

(1) 在一个小三角烧瓶中加入 10 ml 6% 丙烯酰胺 - 尿素底层溶液。

(2) 在一个 10 ml 烧杯中加入 35 ml 6% 丙烯酰胺 - 尿素顶层溶液。

(3) 在 6% 丙烯酰胺 - 尿素底层溶液中加入 40 μl 100g/L 过硫酸铵,迅速旋动三角烧瓶使溶液混匀。

(4) 在 6% 丙烯酰胺 - 尿素顶层溶液中加入 120 μl 100g/L 过硫酸铵,迅速旋动烧杯使溶液混匀。

(5) 在顶层溶液中加入 50 μl TEMED(N,N,N',N' - 四甲基乙二胺)并混匀。将 7 ml 溶液吸至带有移液吸球的 25 ml 移液管中,余下的溶液吸入 50ml 注射器。

(6) 在底层溶液中加入 50 μl TEMED 并混匀。用(5)中的 25 ml 移液管吸取 7 ml 底层溶液。吸入几个气泡使气泡沿移液管内的两种丙烯酰胺溶液向上排出,以形成粗略的缓冲液梯度。

(7) 用手托起玻璃板使之与台面成大约 45° 角。沿一边从移液管中缓缓灌入凝胶溶液。注意避免产生气泡。在移液管中的凝胶溶液接近流空时,将玻璃板放低至水平位置。迅速用 50 ml 注射器中的顶层溶液继续灌胶。注意勿使气泡形成,勿使倒入的顶层溶液将底层溶液冲起。

(8) 仔细检查凝胶中是否有气泡。靠近凝胶底部的缓冲液梯度中的气泡对结果影响较大且难以排除。处于凝胶上部的气泡有时可用薄间隔片赶至不干扰 DNA 样品泳动的位置。出现气泡表明在玻璃板组装好之前没能彻底洗净玻璃板。

6. 将灌好胶的玻璃板放下,顶部抬高约 5 cm,以减少底部的静水压力并防止渗漏。

7. 立即将鲨鱼齿梳子的平整侧插入凝胶液约 0.5 cm。梳子两端插入液面的深度应当相同。用弹簧夹夹住梳子使之固定,用注射器中剩余的 6% 丙烯酰胺-尿素顶层溶液沿凝胶顶部形成一串丙烯酰胺液滴。让凝胶液聚合 1~2 h。

8. 聚合 45 min 后对凝胶进行检查,若聚合完全则在梳子平整面之下出现的一道折射率不同的线。聚合完毕后,凝胶可于室温保存 24 h。为防止保存期间发生脱水,可将梳子留于凝胶内并在凝胶顶部围放一些用 $1\times$ TBE 湿润的纸巾,再可用保鲜膜覆盖。

(二) 加样和电泳

1. 凝胶聚合完毕后,用湿润的纸巾擦去外侧的聚丙烯酰胺-尿素,小心地从凝胶顶部拔去鲨鱼齿梳子,从底部撕去胶带。

2. 用弹簧夹将玻璃板固定在电泳装置上。有些电泳装置需要在玻璃板上夹金属板以确保电泳过程中能够均匀散热。在上槽中注满 $0.5\times$ TBE。

3. 加热样品至 80°C 使反应产物变性。

4. 用带有 22 号针头的 10 ml 注射器吸满 $1\times$ TBE 溶液,冲洗平整胶面上侧以除去尿素和聚丙烯酰胺的碎片。

5. 重新插入鲨鱼齿梳子,使鲨鱼齿恰好与凝胶表面相贴。然后再用 $1\times$ TBE 冲洗凝胶上的加样槽。

6. 加热变性好的样品转移至冰中。加样前应有将样品放于 0°C ,以便延迟模板和放射性标记链之间的复性。

7. 从每种测序反应产物中取 1~2 μl 依次加于凝胶上样槽中。记录样品的顺序并使每套样品均按相同次序加样。最好用 TCGA 的次序,因为 G 和 C 泳道易发生不正常迁移,互相紧邻时便于比较。此外,如果凝胶按 TCGA 的次序加样,那么只要将放射自显影片的两面翻转,并从凝胶底部开始阅读,即可读出互补链($3'\rightarrow 5'$)的序列。

如果凝胶的边缘上尚有多余的加样槽,可在其中一个槽内加入一份旧的测序反应物,以便正确地区分放射自显影胶片的左右方向。

8. 所有样品加样完毕后,将电极与电源相连(正极接于下槽),凝胶电泳应在恒定功率下进行(20 cm \times 40 cm 的凝胶应为 35~40 W;约 170 V),电泳时间应使目的序列的分辨率达到最佳。所需时间可通过监测甲酰胺-EDTA-XC-BPB 凝胶加样缓冲液中标准参照染料的迁移情况进行估计。

根据目的序列和寡核苷酸引物之间距离的长短,当第一次加样的缓冲液中溴酚蓝迁移出梯度凝胶约 15 min 后(共需约 3 h),可进行第二次加样。第一次加样得到的序列离引物远,而第二次加样得到的序列离引物近。用于第二次加样的样品临用前应在 80°C 变性 2~3 min。

(三) 放射自显影

1. 电泳结束后弃去电泳缓冲液,从电泳装置中取出玻璃板。

2. 将玻璃板平放在保护纸上,使较小的(带凹口)的玻璃板位于上方,除去弹簧夹和所有胶带,慢慢将玻璃板撬开。凝胶仍应与下边一块玻璃板相贴。(在有些类型的电泳装置,凝胶与结合硅烷处理过的玻璃板相贴,而与剥脱硅烷处理的恒温玻璃板分开)

3. 分开两块玻璃板后,可把加样次序在先的一侧的凝胶底角切去,以便在后续操作中能够认准凝胶的方向。将凝胶玻璃板转移至一个装有 10% 甲醇和 10% 乙酸的水溶液浅盘中,使凝胶固定并除去尿素和蔗糖以利于干燥。固定凝胶时不必摇动液体。所需固定时间因凝胶厚度而异:0.2 mm 的凝胶需 5 min,0.4 mm 的凝胶需 15 min,0.6 mm 的凝胶则需约 40 min。

4. 从固定液中取出玻璃板和凝胶。小心勿使凝胶从玻璃板上滑走。小心使剩余的固定液流出。

5. 将玻璃板放在一张保护纸上(凝胶朝上)。用手指小心抹平皱折或破损处。从玻璃上擦去剩余固定液但勿使纸巾与凝胶表面接触。

6. 在凝胶上放一张 Whatman 3MM 滤纸,其长与宽均应比凝胶大出 2~3cm。轻压滤纸使凝胶与滤纸的粗糙面紧贴。一手将滤纸扶住,另一手将玻璃板提起,迅速将玻璃板翻转,放在一张干的保护纸上。

7. 将保护纸移至实验台边缘,一边拿住 3MM 滤纸的前边缘向下接,加一边将玻璃板慢慢向实验桌的边缘移动。3MM 滤纸从玻璃板上剥落时,凝胶应与滤纸相贴。

对于凝胶贴在结合硅烷处理过的玻璃板上的装置,凝胶不必从玻璃板剥离,凝胶的干燥和 X 光片的压片与曝光均在玻璃板上进行。

8. 将 3MM 滤纸(凝胶朝上)放在另两张同样大小的 3MM 滤纸之上,剪一张略长于且略宽于凝胶的保鲜膜放在凝胶上。注意勿起皱褶及产生气泡。

9. 用切纸刀将所有 3 张 3MM 滤纸和保鲜膜修平使之大致与凝胶大小相同。

10. 放于凝胶干燥机上真空 80℃ 干燥 30~40 min。

11. 从干燥机中取出凝胶并剥去保鲜膜。为了便于确定放射自显影的方向,应在切去凝胶底角[步骤 3]的部位贴上用放射性墨水标记的标签。

12. 室温对 X 光片曝光 16~24 h,进行放射自显影。不加增感屏。

13. 冲洗放射自显影胶片,按下文所述读取 DNA 序列。

(四) 从凝胶的放射自显影片上读限度 DNA 序列

1. 放射自显影片冲洗完毕后,马上标上日期、模板名称及各测序反应的名称。

2. 确任凝胶的左右。放射性墨水的影像应在最先加样的测序反应物第一泳道的底部。

3. 如果要搜寻新序列与已知序列之间的相应部位,可寻找显著的特征序列,如连续出现的相同核苷酸或交替出现的嘌呤和嘧啶(如 GTGTGT),一旦找出这种序列,即可迅速确定目的序列的位置。

4. 未知序列至少应读两次并最好由不同的人来读,然后对不同的阅读结果进行比较。如有必要,可再次测序加以确定。

5. 如果凝胶的加样次序 TCGA,将放射自显影片翻转并从底部读起,即可读取互补链(3'→5')的序列。

6. 阅读凝胶时应注意以下各点:

- (1) C 的带常常比其他 3 种核苷酸的带弱。
- (2) 连续出现的同聚 A 中的第一个 A 一般比另几个 A 要强。
- (3) 连续出现的同聚 C 中的第一个 C 通常比第二个 C 要弱得多。
- (4) 在 T 之后出现的 G 带较弱。

三、应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段进行的双脱氧测序反应

(一) 准备

1. 按前述准备引物($0.3 \mu\text{mol}/\mu\text{l} \approx 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$)和单链 DNA 模板($0.1 \sim 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

2. 配制 dNTP 和 ddNTP 的使用液。先配制下列 3 套使用液:

(1) 浓度各为 0.5 mmol/L 的 4 种 dNTP, 分装后贮存于 -70°C 。

(2) 含 dTTP、dCTP 和 dGTP 的使用液 在使用液的每一种溶液中, 3 种 dNTP 各有 2 种浓度较高, 其余 1 种浓度较低。3 种使用液各按浓度较低的一种 dNTP 进行命名。例如, dCTP 使用液中 dCTP 的浓度较 dTTP 或 dGTP 低。

按下述比例混合 4 种 0.5 mmol/L dNTP 贮存液。例如, 混合 2 ml 0.5 mmol/L dCTP, 2 ml 0.5 mmol/L dGTP, 0.1 ml 0.5 mmol/L dATP 和 0.1 ml 0.5 mmol/L dTTP, 即可配成 dTTP 使用液。将使用液分装后贮存于 -70°C 。

dNTP 使用液	0.5 mmol/L dNTP 贮存液(比例)			
	dTTP	dCTP	dGTP	dATP
dTTP	1	20	20	1
dCTP	20	1	20	1
dGTP	20	20	1	1

(3) 4 种 ddNTP 的使用液 每种使用液各含一种 ddNTP。按下表用 TE(pH8.0)和水稀释 4 种 10 mmol/L 的 ddNTP 贮存液配成 ddNTP 使用液。分装后贮存于 -70°C 。

ddNTP 使用液	10 mmol/L ddNTP/ μl	TE(pH8.0)/ μl	水/ μl
ddTTP	60	40	900
ddCTP	8	92	900
ddGTP	20	80	900
ddATP	9	91	900

用前应将适量的 dNTP 和 ddNTP 使用液混匀以构成 4 种链延伸-链终止混合液, 例如应将 ddCTP 使用液加于 dCTP 使用液中。通过变更混合液中两种使用液的相对含量, 可以改变链延伸与链终止之间的平衡, 以便适应于手头上具体的测序工作。

3. 灌制聚丙烯酰胺测序凝胶。

(二) 测序反应

1. 如果要测定 N 个不同 DNA 模板的序列, 可在微量离心管中加入:

引物(0.3 pmol \approx 2 ng = 1 μ l)	$N + 1\mu$ l
Tris - Mg 溶液	$N + 1\mu$ l
水	$7N + 7\mu$ l

管中退火混合液的总体积应为 $9N + 9\mu$ l。Tris - Mg 溶液的组成为:

100mmol/L	Tris·Cl(pH8.5)
100mmol/L	MgCl ₂

每种引物应单配一种退火混合液。

2. 在微量离心管中放入 9 μ l 退火混合液, 然后加入 2 μ l 单链 DNA 模板。盖上管盖, 于 55℃ 温育 30 min。

3. 引物和模板仍在 55℃ 退火时, 将下列溶液取出融化:

dNTP 使用液

ddNTP 使用液

[α - ³⁵S] dATP(2.22×10^{13} Bq/mmol, 3.7×10^8 Bq/ml 水溶液)

融化的溶液应放在冰上。

4. 按下列步骤设立 4 组链延伸 - 链终止混合液:

(1) 在四个微量离心管上分别标明 ddA、ddC、ddT 和 ddG;

(2) 对每一个待测序模板, 在标记好的相应管加入:

相应 ddNTP 使用液 2.5 μ l

相应 dNTP 使用液 7.5 μ l

[α - ³⁵S] dATP(1.48×10^{11} Bq) 0.4 μ l

每管的总体积(μ l)应等于模板数(N)的 10.4 倍。

5. 在另一微量离心管中, 设立 Klenow 反应混合液。对每一待测序模板, 须混匀:

10 mmol/L Tris·Cl (pH8.0) 8 μ l

0.1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT) 1 μ l

每管总体积(μ l)应等于模板数(N)的 9 倍, Klenow 反应混合液应保存于室温。

6. 温育完毕后(步骤 2), 从 55℃ 取出引物 - 模板混合液, 在微量离心机上略加离心收集溶液。

7. 在 96 孔微量滴定板上, 按 4 个 1 组(分别标明 T、C、G、A)给每份模板划定相邻的反应孔。用自动移液器将 2 μ l 经过退火的引物模板混合液(步骤 2)逐一加到 4 个 U 形孔底部。

8. 将 2 μ l 步骤 4 配制的相应链延伸 - 链终止混合液逐一加入各孔中。标明 A 的孔应加入 ddA 混合液; 标明 C 者应加入 ddC 混合液, 如此类推。所加液体应在孔壁上近边缘处积聚为液滴。

9. 在步骤 5 配制的 Klenow 混合液中加入 Klenow 酶(每一模板加入 6 U, 即 1.5U/反应), 用手指轻轻弹击反应管外壁彻底混匀管中内容物。

10. 用多头重复分液器迅速在各孔中加入 2 μ l Klenow 反应混合液, 液体应在孔壁近边缘处形成液滴。动作要迅速以避免蒸发。所有反应孔内均已加入 Klenow 反应混合液后即用塑料盖将滴定板盖上。

11. 离心使液滴沉于 U 形孔底部以混匀各试剂并开始链延伸 - 链终止反应。可将带盖的微量滴定板置于甩平式离心机的套筒内, 以最大加速度启动离心机。一旦转头速度达到

2 000 r/min, 马上关机。

12. 从离心机上取出滴定板, 室温温育 15 min。

13. 在温育的同时, 取出浓度为 0.5 mmol/L 4 种 dNTP。

14. 温育 12 min 后, 开始在每一孔壁上加入 2 μ l 相应的 0.5 mmol/L 的 dNTP。累计温育 15 min 后, 按步骤 11 将滴定板略加离心使溶液混合。继续温育 12 min。

15. 累计温育 27 min 后, 开始在每一孔壁上加入甲酰胺 - EDTA - XC - BPB 凝胶加样缓冲液 (4 μ l); 累计温育 30 min 后, 按步骤 11 离心滴定板使溶液混匀。滴定板加盖并加封石蜡膜后, 可在 -20℃ 过夜保存。

甲酰胺 - EDTA - XC - BPB 凝胶加样缓冲液的组成:

甲酰胺	10 ml
二甲苯青 FF	10 mg
溴酚蓝	10 mg
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	200 μ l

16. 按前述进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影。

第三节 全自动激光荧光 DNA 测序

事实上目前绝大多数 DNA 测序的工作都利用先进的全自动激光荧光 DNA 测序仪进行。虽然它也是利用链延伸 - 链终止的原理进行测序反应, 但与普通的酶法相比有许多重要的改进。如荧光自动测序用四种荧光标记的 dNTP 底物而不是用同位素标记延伸的 DNA 链, 链延伸 - 链终止反应一般用 Taq DNA 聚合酶催化进行。此外虽然也用聚丙烯酰胺凝胶分离测序反应产物, 但荧光自动测序所用的电泳装置与普通的测序装置完全不同, 具有很高的专业化水平。在凝胶装置的底部有由激光源和探测器组成的探测系统, 当 DNA 片段(电泳带)迁移到探测区并遇上激光时, DNA 片段中的荧光标记便被激发, 电泳带发出的荧光被探测器检测到并传送给计算机收集和保存, 最后经处理后就得到所测的序列。这样在电泳的同时就完成了序列测定, 而不需在电泳完毕后再去处理凝胶。

一般的测序试剂和电泳装置都必须由专业厂商提供。使用者只需要准备好样品和引物, 按照厂商的说明书操作即可。下面以 PE 公司的荧光测序试剂为例, 说明其反应和反应产物纯化的操作过程。电泳装置应根据具体的仪器型号进行操作。

1. 反应液的组成

模板 DNA	单链 DNA	50~100 ng
	双链 DNA	200~500 ng
	PCR 产物	30~90 ng
引物		3.2 pmol
无离子水		至 12 μ l
反应混合液		8 μ l

Vortex 混匀后,离心收集液体于管底,进行 PCR。

2. PCR 循环参数

96℃, 10 s

50℃, 5 s

60℃, 4 min

共 25 循环。

3. 产物纯化

(1) 将反应产物转移至 1.5 ml 离心管中。

(2) 加入 16 μ l 无离子水,64 μ l 95% 乙醇(乙醇的终浓度应为 60% \pm 3%)。

(3) Vortex 混匀,室温放置 15 min。

(4) 以最大速度在微量离心机上离心 20 min。

(5) 小心、彻底地吸弃上清。

(6) 加 250 μ l 的 70% 乙醇,Vortex 混匀,同上离心 10 min。

(7) 彻底吸弃上清,真空干燥 10~15 min 或打开管盖在 90℃ 放置 1 min 以干燥。

(8) 加 6 μ l 上样缓冲液,按电泳装置的要求上样。

也可自制 Sephadex G-50 层析柱纯化 PCR 产物。步骤如下:

(1) 去掉一次性 1 ml 注射器的芯,向套管底部塞上少许消毒的棉花。

(2) 向套管中加入溶胀好的 Sephadex G-50 至顶部,注意勿留气泡。

(3) 将注射器套管放在离心管中,水平离心 1 500 r/min,3 min。

(4) 向 Sephadex G-50 上加入 200 μ l TE 缓冲液,同上离心。

(5) 向 Sephadex G-50 上加入 20 μ l TE 缓冲液,同上离心。

(6) 将注射器套管放在新离心管中,将 PCR 产物加在 Sephadex G-50 上,同上离心。

(7) 将流出物转移到 1.5 ml 离心管中,干燥后上样电泳。

(第四军医大学 韩 群)

参 考 文 献

- 1 Adams MD, Keller JM, Gocayne JD, *et al.* Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 1991(252):1 651~1 656
- 2 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977(74):5 463~5 467
- 3 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977(74):560~564
- 4 Connel C, Fung S, Heiner C, Bridgman J, *et al.* Automated DNA sequence analysis. *BioTechniques*, 1987(5):342~348

第十四章

蛋白质分子结构测定技术

蛋白质是组成生物有机体的基本大分子之一,在生命活动中起着重要的作用。蛋白质的功能与它们的结构关系密切,特别是蛋白质的空间结构(三维结构),对于理解其功能有极其重要的作用。蛋白质结构的研究很早就受到许多科学家的关注,并提出了多种假设,但是一直没有一个令人满意的理论。直到1952年丹麦生物化学家 Linderstrom-Lang 第一次提出蛋白质三级结构的概念,才使蛋白质结构的研究走上了正确的道路。

Linderstrom-Lang 三级结构概念包括:一级结构,指多肽链中氨基酸的一定的顺序,靠共价键维持多肽链的连接,而不涉及其空间排列;二级结构,指多肽链骨架局部空间结构,不考虑侧链的构象及整个肽链的空间排列;三级结构则是指整个肽链的折叠情况,包括整个侧链的排列,也就是蛋白质分子的空间结构即三维结构。这一概念提出之后,立即被各国科学家所接受。1958年英国晶体学家 Bernal 在研究蛋白质晶体结构时发现,并非所有蛋白质的结构都达到三级结构水平,而有些蛋白质则有更复杂的结构,即由几个蛋白质的亚基组合形成一定的几何形状。许多蛋白质是由相同的或不同的亚基组成,靠非共价键结合在一起,他将这种结构称为四级结构。现在蛋白质的一、二、三、四级结构的概念已由国际生物化学与分子生物学协会(IUBMB)的生化命名委员会采纳并做出正式定义。蛋白质的一级结构测定已由 Sanger 提出的第一个胰岛素序列发展到几万种蛋白质,三级结构也由 Kendrew 及 Perutz 提出的肌红蛋白及血红蛋白的开创性研究迅速发展起来。目前已有9000多种蛋白质的三维结构利用X射线衍射及核磁共振技术在不同分辨率水平上得到阐明,极大地丰富了人们对蛋白质结构的认识。

随着蛋白质三维结构研究资料的不断丰富,原有蛋白质四级结构水平的概念已不能满足实际的要求,近年来蛋白质化学家又在四级结构水平的基础上增加了两种新的结构层次,即超二级结构(supersecondary structure)和结构域(structural domain)。超二级结构是1973年 Rossmann 提出的,特指几种二级结构单位,被连接多肽连接组合成的特殊几何排列的局部空间结构,这种局部结构区域往往与某种生物活性有关。结构域概念是由免疫化学家 Porter 提出的。结构域指蛋白质分子中明显独立的构象单元组成的具三级结构的实体(图14-1)。有的书上将之定义为外显子编码的具有特征性结构和功能统一的结构单元。

本章主要描述蛋白质结构的测定方法。其中包括蛋白质的一级结构和空间结构的测定。蛋白质一级结构的测定方法主要涉及:

① 氨基酸组成定量测定;② 蛋白质多肽链 N 末端测定;③ 采用多种方法对多肽链氨基酸组成序列测定;④ 结构中,二硫键及酰胺基位置的确立。

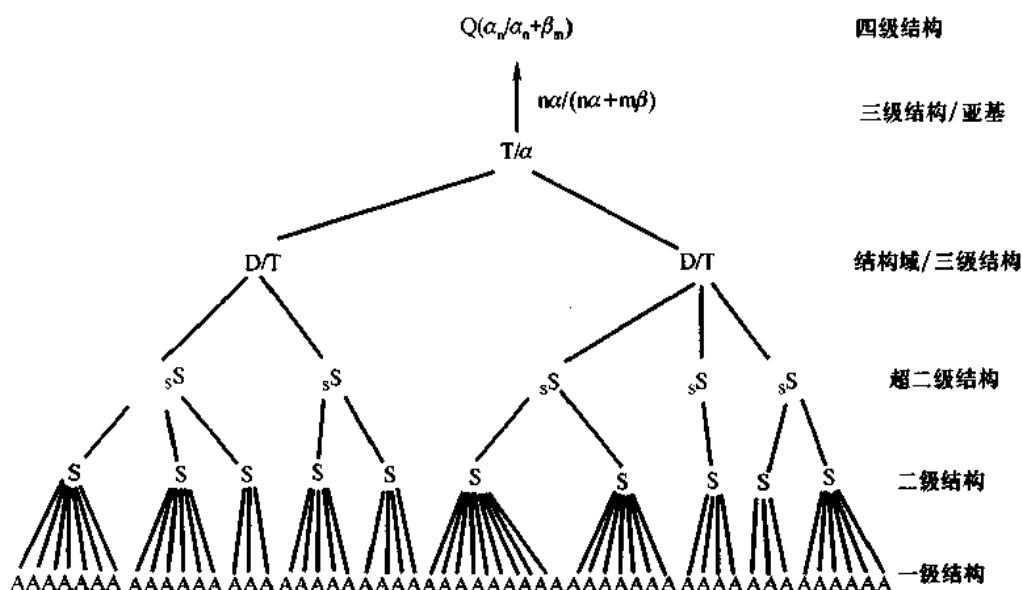


图 14-1 蛋白质结构层次及其关系的示意图

图中 A 代表组成一级结构的各种氨基酸；S 和 sS 分别代表蛋白质中的二级结构和由它们组合成的超二级结构；D/T 表示蛋白质的结构域，如果是单结构域的蛋白质，此结构即蛋白质的三级结构；同样，T/a 表示由结构域构成的蛋白质的三级结构或亚基；Q 代表蛋白质的四级结构，可以是 n 个相同亚基 α 装配成的同源聚集体，也可以是 n 个 α 亚基和 m 个 β 亚基（甚至更多种亚基）形成的异源聚集体

蛋白质三维结构的测定主要依靠 X 射线晶体学，近年来发展的核磁共振(NMR)以及电子晶体学也对研究生物大分子的溶液构象及三维构象做出了贡献。本章着重就蛋白质晶体结构分析基本原理和主要方法，质谱技术和多维核磁共振对蛋白质溶液构象的测定方面作一介绍。

第一节 蛋白质一级结构的测定

蛋白质是由氨基酸按照一定的顺序通过肽键连接起来的生物大分子。所谓“一级结构”是指分子中氨基酸的排列顺序，它决定了蛋白质的高级结构及功能。因此蛋白质一级结构的测定是进行蛋白质分子结构与功能研究中的重要部分；再者，蛋白质的氨基酸序列信息也有助于其基因结构的研究。1955 年 Sanger 等首次采用化学方法测定了牛胰岛素的一级结构，之后随着测定方法和手段的更新，迄今已搞清楚数万种蛋白质的一级结构，并建立了相应的文库。

由于核酸序列测定技术的发展，越来越多蛋白质的一级结构通过测定其核苷酸顺序来推测相应的氨基酸排列顺序。但是，蛋白质一级结构的化学测序法仍然是实验常采用的重要研究手段。本节重点介绍化学测序法。

在对蛋白质一级结构进行分析以前，应对蛋白质的纯度及相对分子质量进行测定，其纯度应在 97% 以上。测定的主要内容如下：

- (1) 氨基酸组成的定量测定。
- (2) N 末端和 C 末端的测定。

- (3) 亚单位拆离,肽链的降解和肽段的分离纯化。
- (4) 肽段氨基酸顺序的测定。
- (5) 用重叠肽法,确定多肽链的一级结构。
- (6) 蛋白质分子中,二硫键和酰胺基位置的确定。

一、蛋白质或肽的氨基酸组成的定量测定

在进行蛋白质或肽的氨基酸序列分析之前,首先要测定蛋白质或肽的氨基酸组成和各种氨基酸的分子比。可以把蛋白质或肽水解成各种游离氨基酸,然后进行定性与定量分析。

(一) 蛋白质或肽的水解

1. 酸水解法 酸水解是常用的方法。一般使用重蒸 5.7 mol/L 盐酸(恒沸点盐酸),在密封的水解管中,于 105~115℃ 水解 20 h 以上。真空抽干盐酸,加入少量水,再次抽干,以除去剩余的盐酸。

用盐酸水解后,得到的氨基酸不消旋,但色氨酸全部被破坏;丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸也有某种程度的破坏。对这些氨基酸的破坏率,需要用不同水解时间测定这些氨基酸的含量,然后外推到水解时间为 0 时,算得的氨基酸含量,即代表了真正数值。

2. 碱水解法 此法是盐酸水解法的互补法。碱水解时,可使多数氨基酸遭到破坏,仅色氨酸是稳定的,所以此法仅限于测定色氨酸的含量。水解样品加入 5 mol/L NaOH 中,充氮气后封管,110℃ 水解 22 h。在水溶液中用 6 mol/L 盐酸中和使 pH 至 6~7 后,即可测定。

3. 磺酸水解法 此法为盐酸水解法的改进。磺酸是非氧化性的强酸。用 4 mol/L 甲基磺酸,并加入色氨酸的保护剂,0.2% 的 3-(2-氨基乙基)吡啶和水解剂水解肽链。方法同上,水解后,用 3.5 mol/L NaOH 中和水解液至 pH 中性。此方法可以测定除半胱氨酸以外的所有氨基酸。

4. 酶水解法 本法用一组混合的蛋白酶水解肽链,可以保持所有的组成氨基酸不被破坏。缺点是水解不完全。另外,因为酶本身也是蛋白质,对样品的测定结果会有干扰。

(二) 氨基酸的定性与定量分析

氨基酸的定性与定量分析一般采用纸层析、薄层层析(图 14-2)、离子交换柱层析等方法。采用 HPLC 仪和氨基酸自动分析仪更好。随着仪器的不断改进,一个样品的测定仅需 20 min 即可完成。

HPLC 仪和氨基酸自动分析仪的工作原理是利用不同的氨基酸在一定 pH 下其带电荷性质和数量不同,用离子交换柱层析分离后,进行定量比色测定。比色测定可采用柱前衍生法和柱后反应法,前一种方法是先将水解氨基酸与可供检测的化学偶联试剂反应生成衍生物,经柱层析分离后,直接测定衍生物的光吸收或荧光发射(图 14-3)。后一种方法是经柱层析分离后的各种氨基酸与显色剂(茚三酮、荧光剂等)反应,测定反应物的颜色变化即可定量各种氨基酸。

蛋白质中氨基酸的组成一般用每摩尔蛋白质中含氨基酸残基的摩尔数表示;或每 100 g 蛋白质中含氨基酸

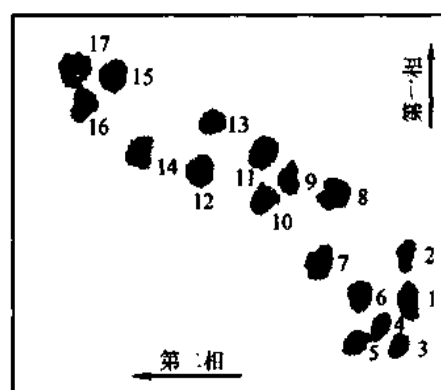


图 14-2 氨基酸的双相纸层析图谱

第一相,正丁醇:88% 甲酸:水 = 15:3:2

第二相,正丁醇:12% 氨水 = 13:3

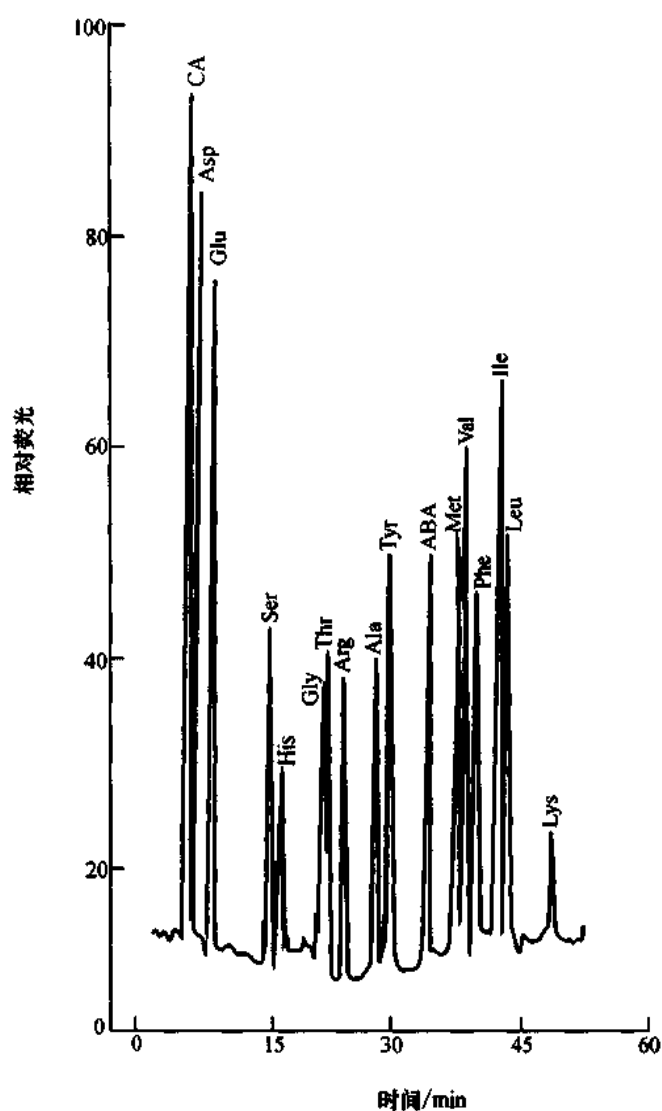


图 14-3 邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生法分析氨基酸

的克数表示。所以只有知道蛋白质的相对分子质量,才能推出它的氨基酸组成。

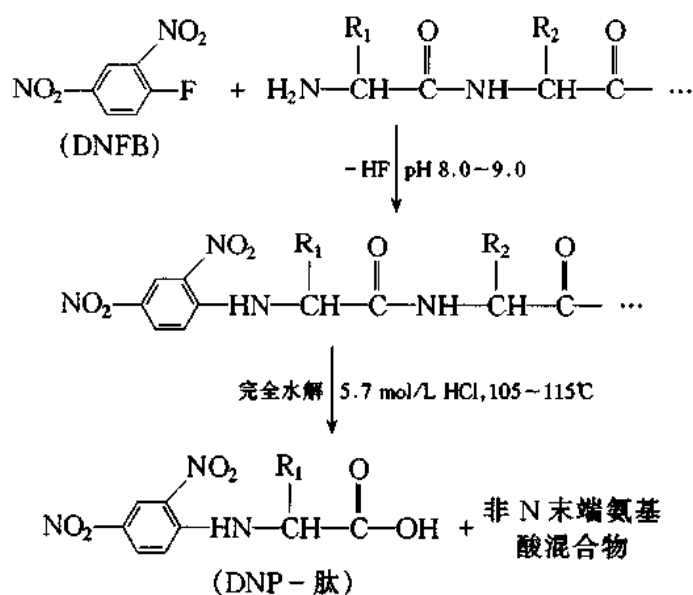
二、蛋白质或肽的末端测定

末端测定不仅可确定末端氨基酸,更重要的是可了解蛋白质由几条多肽链组成的。

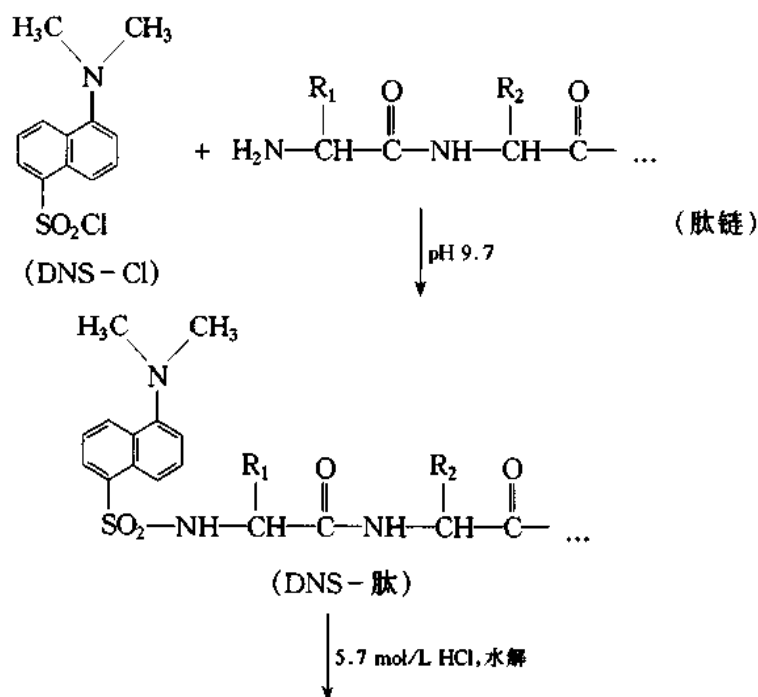
(一) N末端的测定

N末端测定方法比较C末端更加成熟、可靠和准确,主要的方法有:

1. 二硝基氟苯法(DNFB法) 肽链N末端氨基与2,4-二硝基氟苯(DNFB)反应,生成二硝基苯的衍生物(DNP-肽),其经酸水解后生成的DNP-氨基酸可用有机溶剂(如乙酸乙酯)抽提,再与其他氨基酸分开,鉴定得知N末端的氨基酸。

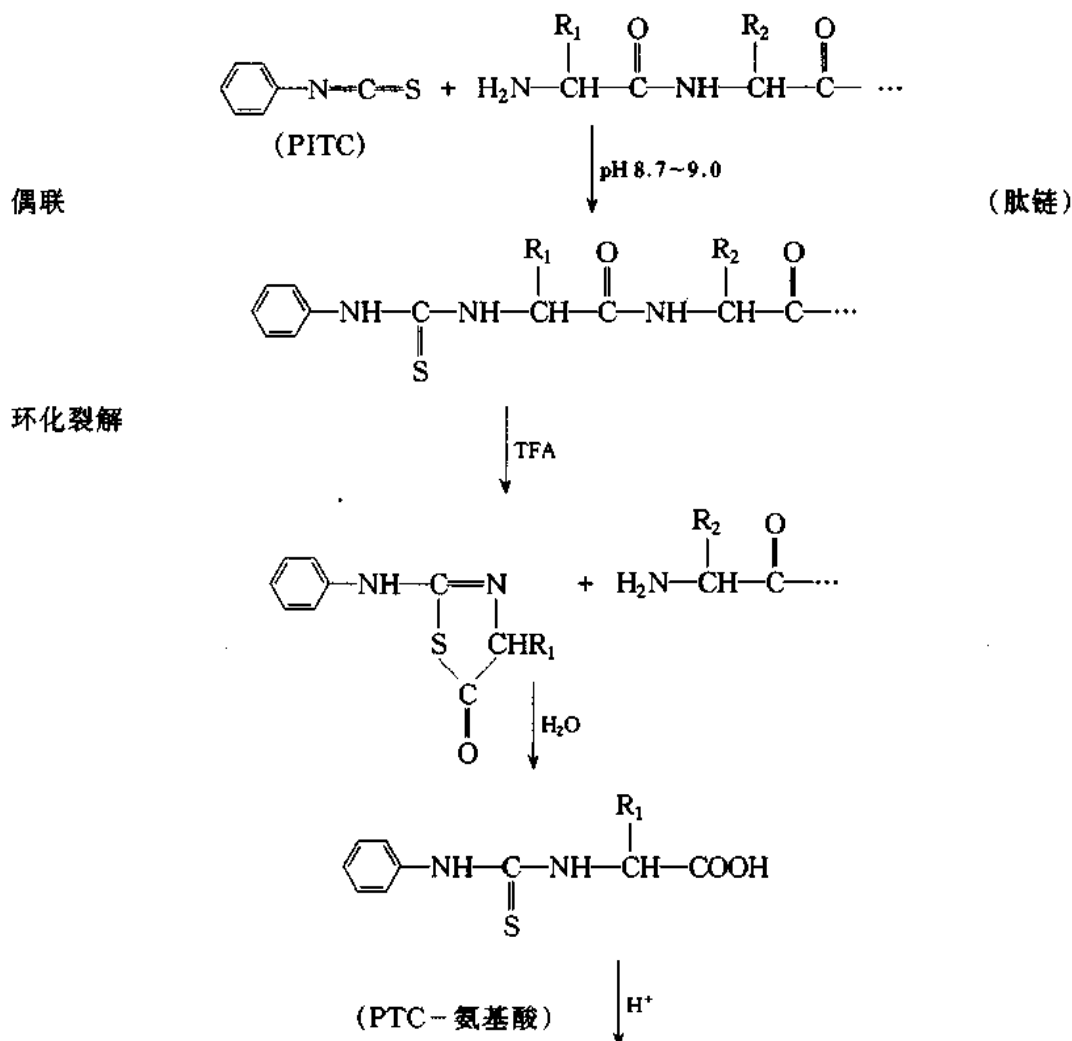


2. 二甲氨基萘磺酰氯法 (DNS-Cl 法) 荧光剂二甲氨基萘磺酰氯 (dansyl-chloride, DNS-Cl) 可以作为标记试剂专一地与肽链 N 末端氨基反应生成 DNS-肽。同样, 酸水解后可得 DNS-氨基酸, 用乙酸乙酯抽提, 然后用层析法鉴定。DNS-氨基酸于 360 nm 或 280 nm 处产生强烈的荧光, 根据荧光点的位置, 确定 N 末端的氨基酸。此方法反应原理同 DNFB 法, 但其灵敏度比 DNFB 法高约 100 倍, 用于层析分析的样品只需 1 nmol。

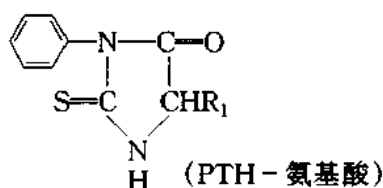




3. 异硫氰酸苯酯法(PITC法) 异硫氰酸苯酯能与 N 末端氨基偶联生成苯氨基硫甲酰衍生物(PTC-肽)。在酸性溶液中,PTC-肽经环化裂解生成 PTC-氨基酸和 N 末端少一个氨基酸的剩余多肽,前者可用于 N 末端氨基酸鉴定,但是该产物不稳定,很快进一步转化成 3-苯基-2-乙内酰硫脲-氨基酸(PTH-氨基酸)。生成的 PTH-氨基酸非常稳定,它在 268 nm 处有强吸收峰。剩余多肽链的 N 末端仍是自由的,可以进一步与异硫氰酸苯酯反应进行第二步降解。这样就可以从 N 末端开始逐次降解下去,进行顺序测定。该方法也称 Edman 顺序降解,它是制造氨基酸顺序分析仪的理论基础。



转化



4. DABITC法 DABITC为4-N,N-对甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯,它与N末端氨基反应生成DABTH-氨基酸,经层析分离后,用盐酸气熏即可出现红色斑点,很容易鉴定。

蛋白质和多肽的 N 末端氨基酸也可用酶学方法,即氨肽酶法测定。氨肽酶可以从多肽链的 N 末端逐个地水解氨基酸,由于酶的特异性和对各种氨基酸水解速度不同,在实际应用中存在着许多困难。

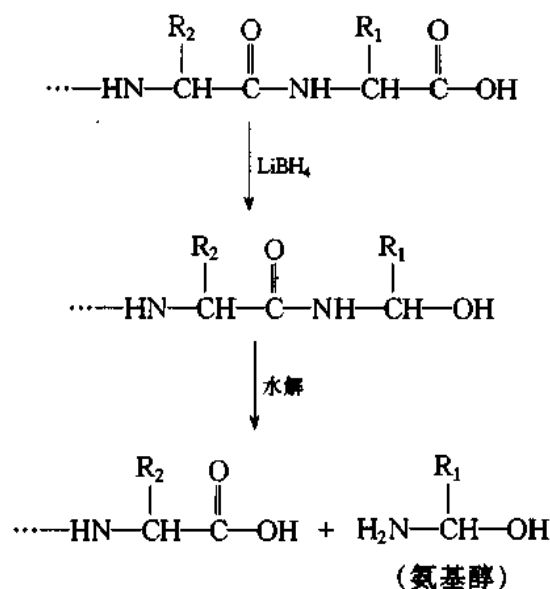
(二) C末端的测定

一般说来,C末端测定较N末端分析的误差大。可采用的方法有:

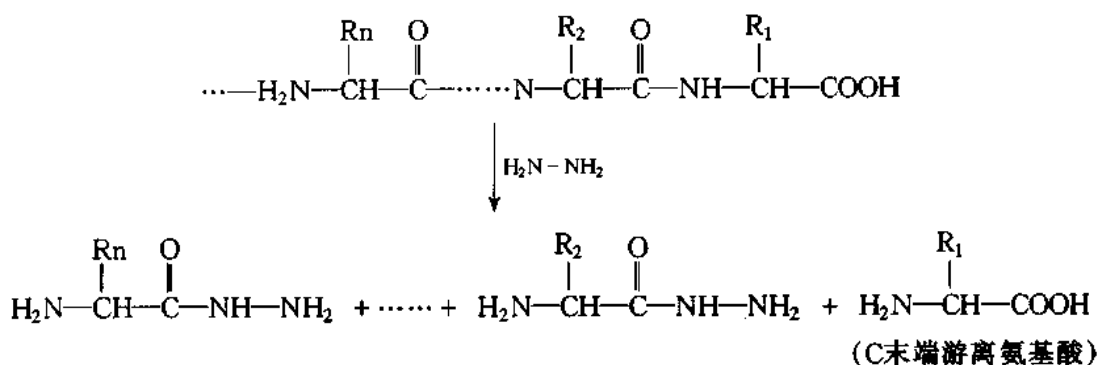
1. 羧肽酶法 这是C末端测定的主要方法。羧肽酶能特异地水解C末端氨基酸形成的肽键,而用于测定C末端氨基酸。羧肽酶分A、B、C、Y4种,羧肽酶A使用最多,但对C末端的Pro、Arg、Lys及Hyp不起作用。羧肽酶B,只释放C末端的Lys和Arg,可以和羧肽酶A互补使用。羧肽酶C的作用范围宽。但对C末端Hyp或连续几个甘氨酸(-Gly-Gly-Gly)无作用。羧肽酶Y也具有很宽的作用范围。

实际应用时,由于羧肽酶对不同的 C 末端氨基酸作用的速度不同,而且反应是连续的,不能停在某一步上,因此给正确判断氨基酸的顺序造成了一定的困难。

2. 硼氢化锂法(LiBH_4 法,也称“还原法”) 硼氢化锂可以与C末端氨基反应生成相应的 α -氨基醇,水解后抽提氨基醇,可用层析法分离、鉴定。



3. 肼解法(hydrazinolysis) 这是化学法测定 C 末端氨基酸一种较为重要的方法。多肽与无水肼发生反应时,肼可断裂所有的肽键形成肼的衍生物,唯有 C 末端氨基酸以游离形式存在,故可通过层析鉴定。



三、亚基拆离、肽链降解和肽段的分离

从蛋白质相对分子质量的测定和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果,可以知道是否有亚基组成。若末端分析只有单一的结果,说明分子由相同亚基组成,无需将亚基拆开、分离。

反之,分子若有两种以上不同亚基组成,首先要将不同亚基之间的连接拆开,并进行分离提纯。提纯后的亚基肽链一般来说相对分子质量亦比较大,尚无法直接进行顺序测定,需要将大的肽链降解成小的肽段,并将肽段提纯,然后才能正式开始顺序测定工作。

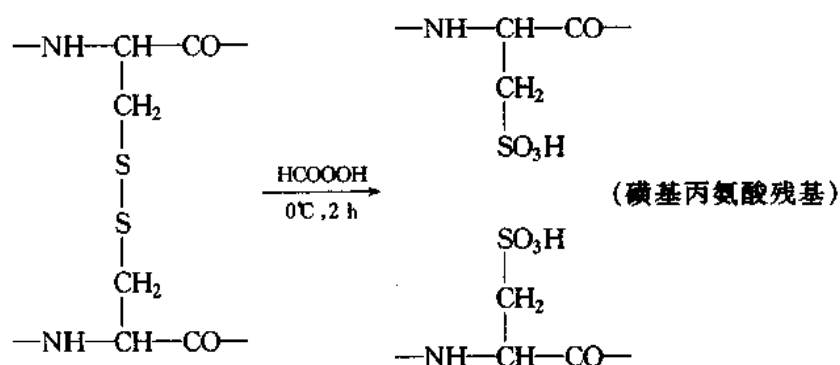
(一) 亚基拆离和二硫键断裂

多数亚基之间以非共价键联接,这些键是比较弱的。所以,在温和条件下即可以拆离亚基,如改变溶液 pH,将 pH 降低到 3~4 或升高到 9~10;或者加入变性剂,如 8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍;拆离后的亚基可以用凝胶过滤方法进行分离。

如果蛋白质分子中两条肽链是通过二硫键连接的,就需要较强的条件才能将二硫键断裂,拆开肽链。切断二硫键主要采用以下两种方法:

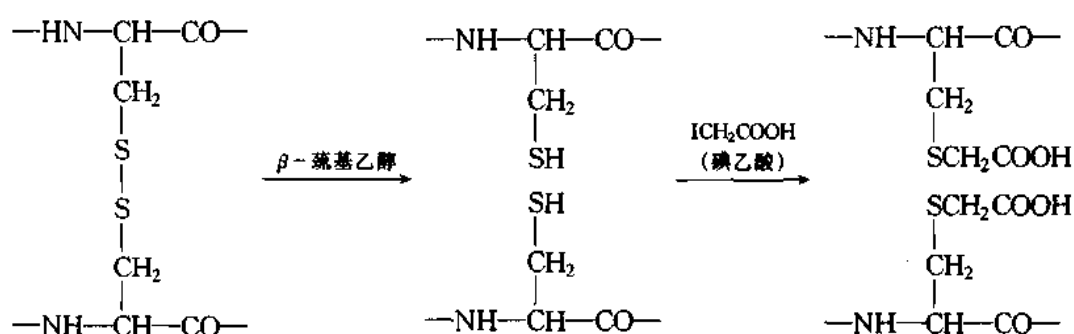
1. 过甲酸氧化法

氧化法优点是能将巯基(—SH)和二硫键(—S—S—)同时氧化成磺基,生成的磺基很稳定,肽链不再重新形成二硫键,便于肽链分离。缺点是氧化过程中,同时将蛋氨酸的侧链氧化成亚砷,色氨酸的侧链也遭破坏。由于这些缺点,拆链时较多采用还原法。



2. 还原法 一般可使用过量巯基化合物,如 β -巯基乙醇。在室温和 pH 8~9 条件下放置数小时,即可使二硫键还原成巯基。

还原反应体系一般需要加入 8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍,它们可以使蛋白质变性。



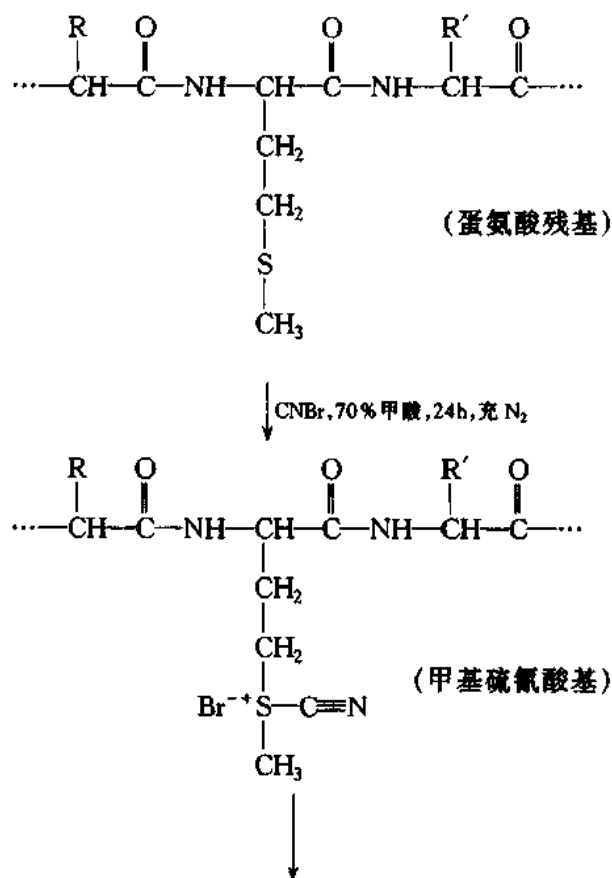
在这种情况下,还原剂才能有效地作用于暴露的二硫键。二硫键还原后,需要用巯基保护试剂,如碘乙酸,以防其重新被氧化。

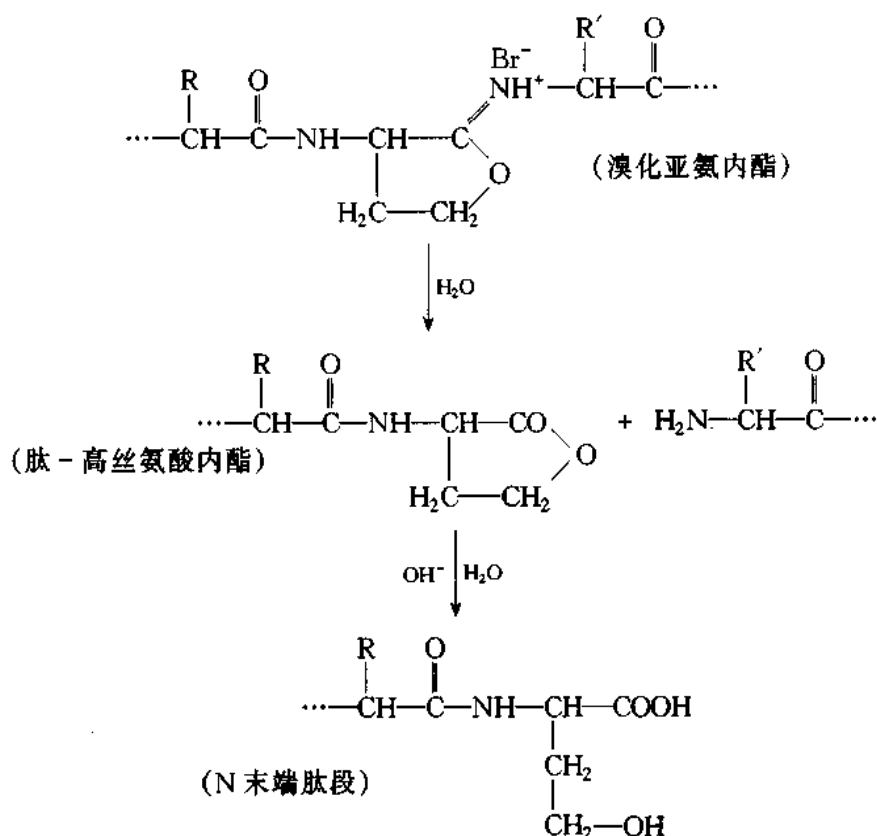
(二) 肽链的部分降解

由于氨基酸顺序测定是采用 Edman 降解法,它一次能分析肽链长度约 10 余个氨基酸残基,所以肽链拆分后,必须将长的肽链断裂成易分析的较短肽链。肽链部分降解的方法要求选择性强、裂解点少、反应率高,一般采用化学裂解法和酶解法二种。

1. 化学裂解法 化学裂解法是指专一性化学试剂(如溴化氰等)的裂解或酸水解等方法。

(1) 溴化氰裂解法 它是化学裂解法中较为常用的一种方法。溴化氰(CNBr)与肽链中蛋氨酸侧链的硫醚基发生反应,生成环化的溴化亚氨内酯,此产物水解后,产生高丝氨酸内酯,使蛋氨酸羧基端的肽键断裂。其反应如下:





这一方法的优点是产率高(可达85%)、专一性强,故实际应用较多。

(2) 羟胺裂解法 羟胺(NH_2OH)在碱性条件下(pH 9.0)能专一裂解 - Asn - Gly - 间的肽键,也能部分裂解 - Asn - Leu - 或 - Asn - Ala - 间的肽键;在酸性条件下可以断裂 - Asp - Pro - 间的肽键,产率可达80%。

(3) 部分酸水解 一般认为酸水解没有什么专一性,而被忽视,后来发现部分酸水解还是有一定的专一性。Sanger 早期研究胰岛素的一级结构时就使用了稀酸部分水解的方法。

部分酸水解一般分稀酸和浓酸两种条件。在稀酸的条件下,也即在高浓度胍的甲酸中(pH 2.5),可裂解 - Asp - Pro - 间的肽键,产率高达80%~90%。在浓酸条件下,含羟基氨基酸氨基端肽键容易断裂。但是,终究部分酸水解的专一性差,副反应多,此法比较难掌握。

此外,还可采用 N-溴代琥珀酰亚胺(NBS)裂解 Trp 的羧基端肽键。

2. 酶解法 酶解法相对化学裂解法而言,有许多优点,如专一性强、裂解条件温和、副反应少等;再则蛋白水解酶对肽链的水解率也比较高。而且,不同的蛋白水解酶对不同氨基酸形成的肽键水解专一性不同(表 14-1)。因此,酶解法被广泛使用。

在进行酶裂解之前,一般都要将所研究蛋白质变性,变性之后的肽链更容易被酶裂解。很多事实证明,天然的蛋白质和此蛋白质变性之后,用同一种酶裂解,肽链被切断的部位是不同的。

目前,最常用的蛋白水解酶是胰蛋白酶,因为它的酶切位点专一性强,只作用于 Arg、Lys 羧基端的肽键,但对 - Arg - Pro - 或 - Lys - Pro - 之间的肽键没有作用。为获得合适大小的肽片段,可通过化学修饰,控制酶切位点的数量。若肽链中 Arg 或 Lys 含量较高,可用柠檬酸酐、马来酸酐

表 14-1 几种常用蛋白水解酶的作用位点

蛋白水解酶	主要作用位点
胰蛋白酶(trypsin)	Lys、Arg 等碱性氨基酸的羧基端
胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)	芳香族氨基酸的羧基端
胃蛋白酶(pepsin)	Phe、Trp、Leu、Ala 等氨基酸的羧基端
梭菌蛋白酶(clostripain)	Arg 的羧基端
V8 蛋白酶(staphylococcal protease)	Asp、Glu 等酸性氨基酸的羧基端
内肽酶 Lys-C(endoproteinase)	Lys 的羧基端

(顺丁烯二酸酐)或桂-顺-3,6-桥- Δ^4 四氢化酞酸酐(EPTA)保护 Lys 残基的 ϵ -氨基,保护后的 Lys 羧基端不再为胰蛋白酶所识别。反之,若肽链中 Arg 或 Lys 数量太少,则可用吡丙啶修饰 Cys 的-SH 基,生成与 Lys 类似的结构,使之成为胰蛋白酶作用的新位点。

其余蛋白质水解酶的专一性没有胰蛋白酶高,酶切位点多,易切成小片段,所以只适用于 2,3 次裂解用,这样小的片段有利于氨基酸顺序分析,而大片段有利于结果的拼接分析。

(三) 肽段的分离提纯

肽链经部分裂解得到肽片段必须分离提纯,才能进一步测定其氨基酸顺序。肽片段的分离提纯,主要根据实践经验和不断改进方法来实现。它是蛋白质一级结构测定中最为麻烦的一步。分离提纯的方法可参照有关章节。通常,先采用凝胶过滤,得到不同相对分子质量的肽片段组分,同时也脱去了样品中的盐类。然后,肽片段组分可用离子交换层析法进一步提纯,也可应用双相高压纸电泳和层析相结合的方法,HPLC 或 FPLC 具有更高的分辨率。

四、肽段的氨基酸顺序测定

肽片段提纯后,就可以进行氨基酸顺序测定。一般认为能够连续进行 N 末端分析的方法,均可用于肽段氨基酸顺序分析。目前,常用的分析方法有:

(一) Edman 降解法(PITC 法)

原先,Edman 降解法仅用于肽链 N 末端氨基酸分析,后来被用于从 N 末端开始的氨基酸顺序测定,结果也比较满意。根据前述的反应机制,这方法不仅适用于手工操作,而且还可设计为自动顺序测定仪。从而,使氨基酸顺序分析工作从繁杂的手工操作走向仪器化和自动化,被测样品量也从常规量减至微量。现在就几种具有代表性的自动顺序测定方法作简单介绍。

1. 液相旋转杯序列仪 这是最初的自动化仪器。多肽链样品经裂解后,经一根导管注入反应杯,随着旋转的离心力样品被均匀地涂在杯壁上。反应中的试剂和溶剂由导管引入反应杯,与杯壁上的肽片段进行 Edman 降解反应。此方法所需的样品量较大,故使用受到限制。

2. 固相序列分析仪 将结合了样品的载体装入仪器反应柱内,然后顺序注入试剂和溶剂,在柱内进行 Edman 降解。由于固化了样品,从而减少了流失,降低了用量。

3. 气相序列仪 气相序列仪用弹筒型玻璃反应室代替液相序列仪中的旋转玻璃反应杯。多肽链与气态反应试剂作用完成 Edman 降解反应。此仪器较之上述几种序列仪有明显优点:①灵敏度高,耗费样品量少,通常仅需 10~100 pmol;②试剂和溶剂消耗少,降低了费用;③缩短了时间,提高了分析效率。

(二) DNS-Edman 顺序法

此方法实际上是将灵敏度高但不能连续进行的 DNS-Cl 方法与能连续进行的 Edman 降解法结合。可分别获得一系列的肽链,即 n 肽、 $(n-1)$ 肽、 $(n-2)$ 肽……反应中,DNS-Cl 试剂按 N 末端测定法中所述,同 Edman 试剂同步地与各步获得的肽链 N 末端的游离氨基结合,经酸水解生成 DNS-氨基酸,然后,用薄层层析等方法鉴定。可用图 14-4 表示该过程。

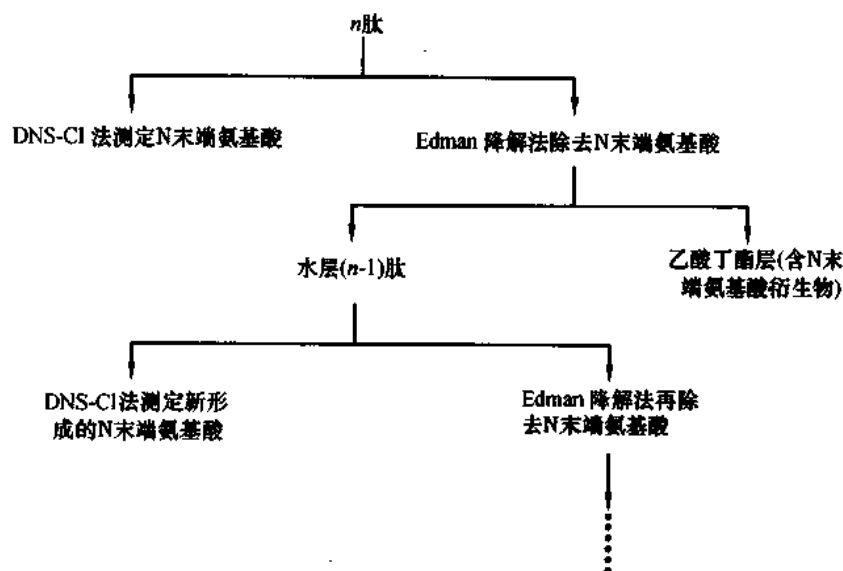


图 14-4 DNS-Edman 顺序法流程示意图

DNS-氨基酸具有强的荧光,所以此反应比单纯的 Edman 法灵敏度提高 310 余倍,样品用量也相应降低。缺点是不能测定被酸水解破坏的氨基酸。

(三) DABITC/PITC 双偶合微量顺序法

DABITC(4-N,N-对甲氨基偶氮苯 4'-异硫氰酸酯)也是一种有色的 Edman 降解法反应试剂,其工作原理和 PITC 法相同(图 14-5)。

DABITC 与肽链的 N 末端氨基偶合率低,只有 20%~50% 左右,所以使肽链的降解步骤受到限制。用此方法和 PITC 法偶联,利用 PITC 可以有效地和肽链 N 末端氨基结合的特性,使未被 DABITC 结合的氨基,由 PITC 结合后,有效地释放出肽链的第二个氨基酸的 α -氨基,使反应能顺利地依次循环下去。反应中生成的 DABTH-氨基酸(4-N,N-二甲氨基偶氮苯-4'-乙内酰硫脲-氨基酸)层析后用浓盐酸气熏可出现红色斑点,肉眼可见。该法将灵敏度提高了 10~20 倍,并可直接用到液相和固相顺序仪。

在蛋白水解酶中有一类酶能从端基逐个地将氨基酸按顺序水解下来,如氨肽酶和羧肽酶。从理论上说,这两种酶都可用于氨基酸顺序测定。但是,实际进行起来却有很多问题。

五、重叠肽法确定肽链的一级结构

若一条多肽链,最初只不过 1~2 个断裂点,只要测定 N 和 C 末端氨基酸,便很容易确定其一级结构。若为复杂的肽链,就不能只靠一套肽链断裂方法,有时要有两套甚至更多的断裂方法分别分析后,通过找重叠肽的方法,分析确定完整的氨基酸顺序。如一条 15 个氨基酸残基组成的多肽,其

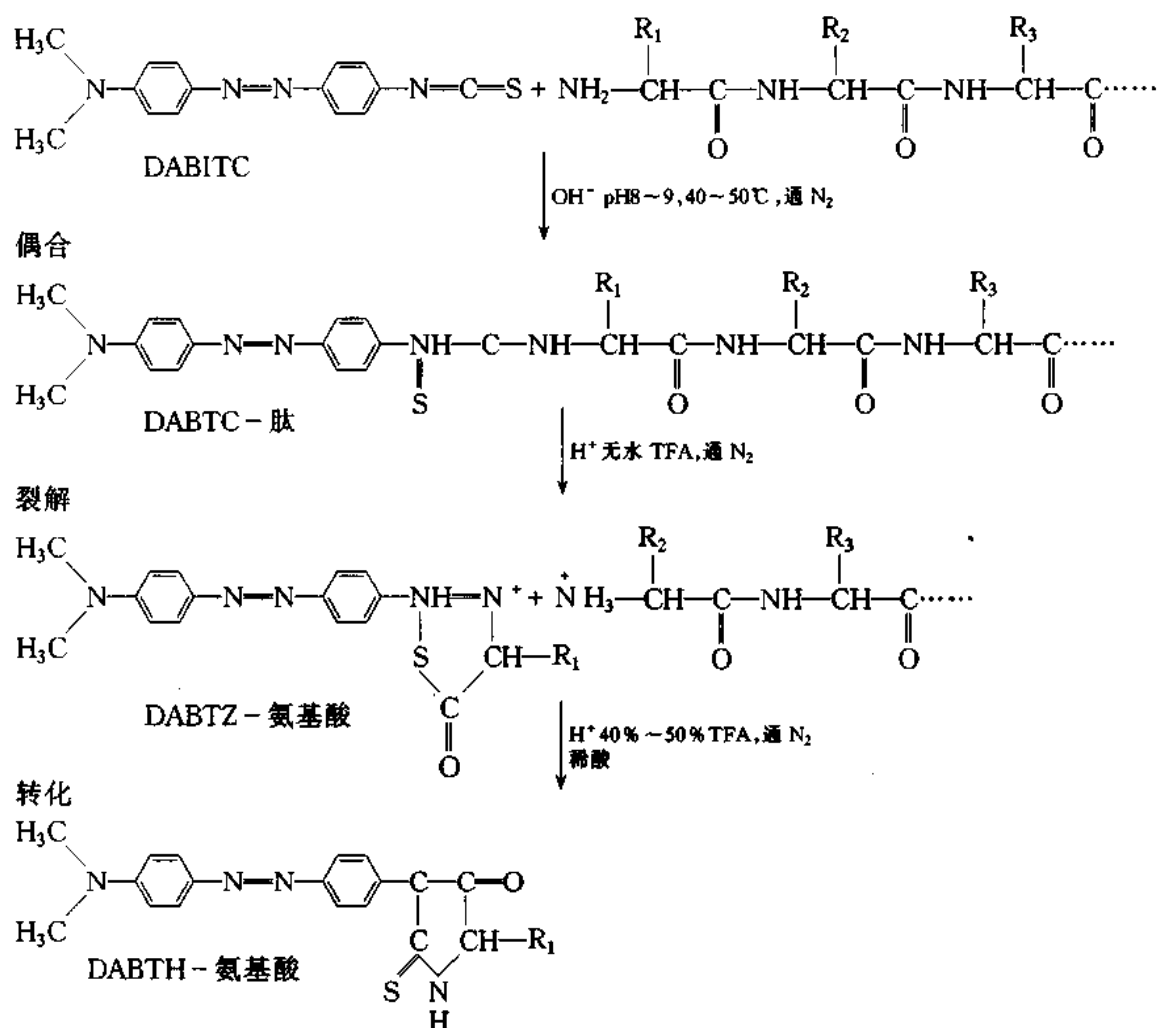


图 14-5 DABITC/PITC 双偶合微量顺序法原理

N 末端为 His, C 末端为 Glu。采用两套断裂方法: 第一套将肽段断裂为 5 个小片段, 分别为 Lys-Trp-Glu, Cys-Glu, Asp-Lys-Val-Asp, Leu-Pro-Ala 和 His-Lys-Ile-Tyr。第二套肽段断裂为 Glu-Asp-Lys, Ile-Tyr-Lys-Trp, Val-Asp-Leu-Pro, Ala-Cys-Glu 和 His-Lys。

通过 N, C 末端及重叠肽最后可定编为:

第一套 His-Lys-Ile-Tyr-Lys-Trp-Glu-Asp-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Ala-Cys-Glu

第二套 His-Lys-Ile-Tyr-Lys-Trp-Glu-Asp-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Ala-Cys-Glu

六、蛋白质分子中二硫键和酰胺基位置的确定

多肽链的氨基酸顺序测定完成以后, 最后一项工作是确定其二硫键和酰胺基的位置。

(一) 二硫键位置的确定

取少量的样品, 首先用碘代乙酰胺将肽链中未参与二硫键形成的巯基保护起来, 然后用胃蛋白

酶水解。此酶专一性差,降解的片段小,而且在其活性范围内(pH 2.0)二硫键稳定。肽水解后,可用 Brown 和 Hartlay 提出的对角线法电泳分离(图 14-6)。将样品点在一方形滤纸的中心点上,在 pH 6.5 的条件下行第一相电泳分离。然后将滤纸暴露在过甲酸蒸汽中,使二硫键氧化成半胱氨磺酸。若含有二硫键,即分成 2 个小肽。然后,将处理后的滤纸旋转 90°,在相同条件下继续电泳。可发现除了含二硫键的肽外,其余的肽均仍在滤纸的对角线的位置上。而含半胱氨磺酸的肽比原来小,且带了更多的负电荷,因而偏离了对角线。染色后,剪下偏离对角线的肽斑,分析其氨基酸顺序,与已确定的氨基酸顺序比较,即可确定二硫键的位置。

(二) 酰胺基位置的确定

多肽链中酰胺基以 Asn 或 Gln 形式存在。酰胺基在水解时,以 NH_4^+ 的形式释放,通过测定 NH_4^+ 量可以推测酰胺基的量。通常,用蛋白水解酶水解可以得到含有酰胺基的肽段,将这些肽段分离后,测定其酰胺基数和推测可能形成酰胺基的数量(不包括 C 末端),如果二者数量相等,就可以确定酰胺基位置。若不符,应将肽链裂解为更小片段,再测酰胺基含量和可能存在的位置数目,直到两者相符为止。

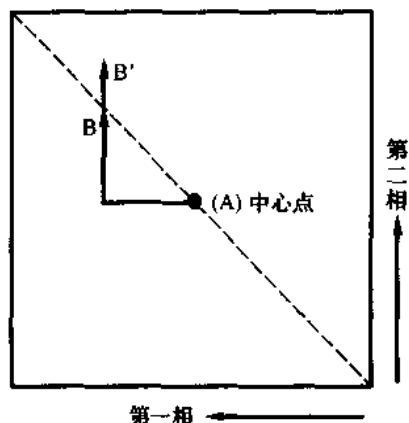


图 14-6 对角线法电泳分离示意图

B 不含二硫键的肽氧化后,电泳位置,

B' 含二硫键的肽氧化后,电泳位置

第二节 蛋白质晶体结构分析

(一) 蛋白质晶体结构的一些基本概念

1. 晶体的对称性和空间群 晶体在宏观上看具有完整外形,是一种多面体。它是由按一定规则排列的基本单位周期性重复组成的。这种排列的规则性是晶体所具有的对称元素的反映,晶体中的对称元素类型有对称中心(倒反)、镜面、旋转轴和旋转反轴。由于晶体的点阵结构制约,晶体中的旋转或旋转反轴的轴次,只能以二次轴、三次轴、四次轴和六次轴 4 种方式存在。晶体中的基本单位可以用一个平行六面体来描述,称为晶胞,它可用平行六面体的 3 个边长 a, b, c 和边长之间的 3 个夹角 α, β, γ 6 个参数来表述,这 6 个参数称为晶胞参数。根据晶胞的形状和所具有的特征对称元素,可以把不同的晶胞分成 7 个晶系(表 14-2)。

在这 7 个晶系中,每个又可容纳各种不同的对称元素组合。这样的组合共有 32 种,称为 32 个点群,32 个点群突出地反映了晶体宏观的对称性。每一个点群中包含的所有对称元素至少有 1 个公共的点,经过点群中任一对称元素的操作,晶体中至少有 1 个点是不动的,这就是点群名称的由来。

如果把晶体抽象成一个无限的三维点阵结构,为了描述晶体内部的微观对称性,点群中的对称元素镜面和旋转轴可扩展成空间群中的对称元素滑移面和螺旋轴。另外,为了使所选的晶胞具有尽可能高的对称性,有时不得不选取较大的晶胞,使晶胞成为带心的格子类型,带心的格子类型有体心格子(I)、面心格子(F)、底心或侧心格子(C)。在 7 个晶系中共有 14 种不同格子的类型,称为布拉菲(Bravais)格子。带心格子类型的晶胞称为复晶胞,不带心的晶胞称为素晶胞。把反映晶体内螺旋轴、滑移面和 14 种布拉菲格子类型与 32 个点群相结合,则可推出反映晶体内部对称性的 230 个空间群。

表 14-2 7 个晶系及其特征对称元素

晶系	特征对称元素	晶胞参数	对称元素方向
立方	4 个按立方体的对角线取向的三重轴	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a \quad a + b + c$ $a + b$
六方	六重轴(平行于 C 轴)或六重反轴	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$c \quad a \quad 2a + b$
四方	四重轴(平行于 C 轴)或四重反轴	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$c \quad a \quad a + b$
三方	三重轴(平行于 C 轴,按六方取)或三重反轴	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	$c \quad a$
正交	两个相互垂直的对称面或 3 个相互垂直的二重轴	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a \quad b \quad c$
单斜	1 个二重轴或对称面	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$	b
三斜	无或仅有 1 个对称中心	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	

当 X 射线入射到晶体时,会产生一套衍射图,这些衍射图谱又如何反映晶体内部的对称性呢? 由于 Friedel 定律,无论晶体中原来是否有对称中心的对称性,晶体的衍射图谱一般都具有对称中心的对称性。这样衍射图谱的对称性较晶体原有的对称性要高,是晶体原有点群加上对称中心后所形成的点群的对称元素的集合。这样反映晶体宏观对称性的 32 个点群在衍射图谱中只有 11 种不同的对称性,称为劳埃(Laue)群。晶体中反映微观对称性的螺旋轴和滑移面,在衍射图谱中则变成了相应的旋转轴和镜面,但螺旋轴、滑移面中所包含的平移向量会在衍射图谱中有相应的反映,表现为某些特定衍射点的系统缺失。带心格子类型的复晶胞也表现为某些特定衍射点的系统缺失。这些系统缺失统称为系统消光,根据系统消光,只可以确定 120 种衍射群。也就是说对某些衍射群来说,可以有几个空间群都对应于同一个衍射群,它不可能唯一确定相应的空间群,这就需要通过其他方法来加以区别。对于蛋白质晶体,由于它只具有 65 种轴对称类型的空间群,只要区分开对映体就能唯一确定空间群了。

2. 劳埃方程和布拉格方程 1895 年伦琴发现了 X 射线,它是波长在 0.1 nm 左右的电磁波。而晶体中原子间的距离恰巧是在这一范围内;晶体重复的周期也正是 X 射线波长的几倍至几十倍,正如光栅对可见光的衍射一样,劳埃(Laue)认为晶体可用作 X 射线的立体衍射光栅,并用五水合硫酸铜、辉钨矿等晶体作了一系列的衍射实验,为了解释这些衍射图谱,导出劳埃方程:

$$a (\cos \alpha - \cos \alpha_0) = h \lambda$$

$$b (\cos \beta - \cos \beta_0) = k \lambda$$

$$c (\cos \gamma - \cos \gamma_0) = l \lambda$$

这里 $\alpha_0, \beta_0, \gamma_0$ 是 X 射线入射方向与晶轴 a, b, c 的交角, α, β, γ 是 X 射线衍射方向与晶轴 a, b, c 的交角, λ 是 X 射线波长, h, k, l 是整数称为衍射指数。

布拉格 (Bragg) 从另一个角度更方便地解释了劳埃的衍射实验,他把晶体对 X 射线的衍射作为晶体中平面点阵组对 X 射线的反射。从图 14-7A 中可知,来自 A, B 两点反射线的光程差 $CB - AD = 0$, 即同一平面上任意两点产生的反射线其位相是相同的。从图 14-7B 中可知,相邻两个反射面反射的 X 射线的光程差为 $BA' + A'C$, 它等于 $2d (h^* k^* l^*) \sin \theta (nh^* nk^* nl^*)$, 当这个光程差等于波长 λ 的整数倍时,才能发生衍射。这就是著名的布拉格方程。

$$2d (h^* k^* l^*) \sin \theta (nh^* nk^* nl^*) = n \lambda$$

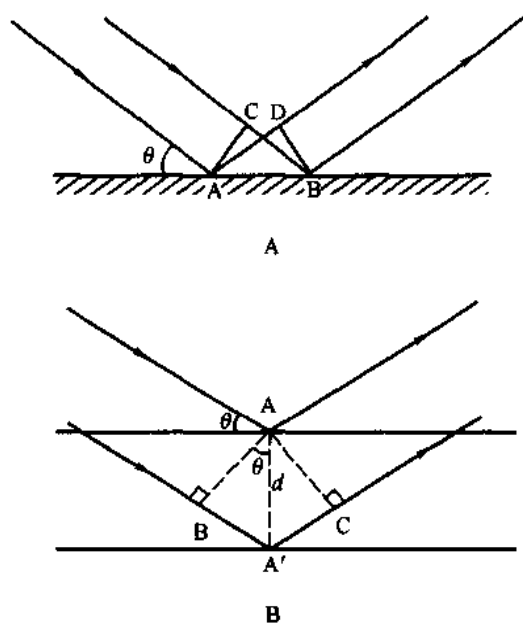


图 14-7 布拉格对劳埃衍射实验的解释

A. 从一个平面上不同点反射的平行射线,反射后是同相的;

B. 当满足布拉格定律时,从两个相邻反射平面上的点反射的平行射线是同相的

这里 $(h^* k^* l^*)$ 是平面点阵组的指标,是三个互质的整数, $(nh^* nk^* nl^*)$ 是衍射指标。

如果把距离为 $d(h^* k^* l^*)$ 的平面点阵组 $(h^* k^* l^*)$ 的 n 级反射作为距离为 $d(nh^* nk^* nl^*)$ 的平面的一级反射,则布拉格方程变成

$$2d(hkl)\sin\theta(hkl) = \lambda$$

式中 (hkl) 是衍射指标, θ 称为布拉格角。

3. 位相问题 布拉格方程解决了衍射的方向问题,它仅与晶胞的形状和大小有关。晶体结构分析更主要的任务是要知道原子在晶胞中的分布,那么原子在晶胞中的分布又与什么有关系呢?

当X射线通过晶体时会在晶体中产生交变的电场,这电场使晶体中原子核外的电子发生振动,成为发射次生球面电磁波的波源,这种次生射线与原X射线有相同的波长和位相,它们是一群相干的波源,这种现象称为散射。原子的散射能力与原子核外的电子数成正相关,用原子的散射因子 f 表达,它是随布拉格角增大而减小的。它的值可从X射线晶体学国际表第三卷中查得。由于晶胞中各原子占有的位置不同,因此,由它们产生的次生射线的位相也是不同的。位于分数坐标 (x_i, y_i, z_i) 的第 i 个原子的散射波位相与位于晶胞原点的散射波的位相差为 $2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)$ 。这样晶胞中所有原子的相干波的叠加就可得到该衍射 hkl 的结构因子 $F(hkl)$:

$$\begin{aligned} F(hkl) &= \sum_{i=1}^N f_i e^{2\pi i(hx_i + ky_i + lz_i)} \\ &= |F(hkl)| e^{i\phi(hkl)} \end{aligned}$$

$|F(hkl)|$ 称为衍射 hkl 的结构振幅, $\phi(hkl)$ 称为衍射 hkl 的相角。由此可知,晶胞中的原子分布是与结构因子相关的。知道了原子在晶胞中的分布就可算出一套结构因子,反过来,知道一套结构因子,则可计算晶胞中的电子密度分布函数:

$$\rho(xyz) = (1/v) \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

$$= (1/v) \sum_{-\infty}^{\infty} \sum_{-\infty}^{\infty} \sum_{-\infty}^{\infty} |F(hkl)| \exp\{-[2\pi i(hx + ky + lz) - \phi(hkl)]\}$$

式中的 v 是晶胞体积。从 $\rho(xyz)$ 的峰值位置可确定原子在晶胞中的位置。X 射线衍射实验能记录衍射点的强度和方位,从衍射点的强度可推算出该点的结构振幅,而该衍射点的相角信息却无法从实验中直接得到。因此,晶体结构分析的核心问题就是要找出各衍射点的位相。

4. Patterson 法 为了解决晶体结构分析中的位相问题,1934 年 Patterson 提出了一个函数:

$$P(uvw) = \int_0^1 \int_0^1 \int_0^1 \rho(xyz) \rho(x+u, y+v, z+w) dx dy dz$$

它表示晶胞中相距为向量 (uvw) 的两点电子密度乘积在整个晶胞中的加和,通过傅里叶变换可以写成:

$$P(uvw) = (1/v) \sum_{-\infty}^{\infty} \sum_{-\infty}^{\infty} \sum_{-\infty}^{\infty} |F(hkl)|^2 \exp[-2\pi i(hu + kv + lw)]$$

由上式可知 Patterson 函数只要有结构振幅就可计算,不必知道其位相,而且只有当向量 (uvw) 为两个原子间的向量时函数才会有峰值,所以 Patterson 图上的峰,反映了晶胞中任意两个原子的向量,峰的数目为 $N(N-1)+1$, N 为晶胞中的原子数,其中所有原子的自身向量峰均位于原点;峰值的大小与这两个原子含有的电子数的乘积成正比。如果晶胞中有少数原子序数较大的原子(称为重原子),则由晶胞中对称元素联系起来的原子之间的向量峰就比其他的峰更突出。由对称元素联系起来的向量峰称 Harker 峰,而且这些 Harker 峰往往位于晶胞中一些特殊的面或线上,很容易发现。根据峰的位置和相应的对称元素就可以解出重原子的位置。所以 Patterson 法不是去直接求算各衍射点的位相,而是通过 Patterson 峰去找到少数重原子在晶胞中的分布。由于这些重原子对结构因子的贡献较大,可以利用这些已知的重原子位置计算各衍射点的位相,并把它作为整个结构的近似位相,用于电子密度函数的计算。在电子密度图中除了已知的重原子峰外,还应反映出结构中未参加位相计算的其他原子的峰,经过辨别,去伪存真,得到更多的原子位置信息;再把这些新找出的原子位置加入到位相计算中去,然后再计算电子密度图,找出更多的原子位置,如此反复,直至找出结构中的所有原子。有了这个初始结构模型,经过修正得到更为精确的结构,也就完成了结构分析的全过程。

Patterson 法在解决蛋白质晶体的位相问题时也是很有用的,只是为了适应蛋白质晶体的特点,要略有改造。

(二) 蛋白质结晶的条件

1. 蛋白质的纯度 各种物质在溶液中结晶析出均需达到一定纯度才能发生,蛋白质也不例外。一般蛋白质样品的纯度应该达到凝胶电泳一条带的水平,总的趋势是制品愈纯愈易结晶。但已结晶的制品不表示达到了绝对的纯化,只能说达到相当纯的程度。有时样品带有一些性质相差很大的杂质也能长出很好的结晶,这是因为结晶本身也是很好的纯化手段。大多数蛋白质第一次得到结晶后仍可进行多次的重结晶,每次重结晶纯度均有一定提高。

2. 浓度 浓度愈高愈有利于溶液中溶质分子间的相互碰撞聚合。结晶液的浓度一般要求较高。但在过饱和溶液中结晶,杂质含量多且晶形也不好,故样品浓缩至一定的浓度,经过离心所得沉淀溶解至适合浓度后,缓慢地(可通过毛细管或透析方法)加入盐溶液或有机溶剂至呈现微弱混浊或一定饱和度时,然后放置在一定温度下,让其缓慢析出结晶,如此时酌情补充加入少量盐或有机溶剂可使其结晶更加完全。

3. pH 有些蛋白质分子只有在一定 pH 范围内才是稳定的,因此,要根据蛋白质分子的性质选取缓冲液种类,以适应一定的 pH 范围。通常在等电点时蛋白质分子的溶解度最小,在接近大多数带电残基的 pK 值附近,蛋白质分子的溶解度变化激烈。一般情况 pH 的微小改变对溶解度的影响不大。但改变溶液的 pH 也能改变蛋白质分子的电荷分布,所以在不同的 pH 缓冲液中可长出不同晶型的晶体。

4. 温度 除少数情况下,通常选择低温条件进行蛋白结晶,低温条件对蛋白质和酶不仅溶解度低且不易变性。在中性盐溶液中结晶时,温度可在 0℃ 至室温范围内选择,在有机溶剂中结晶一般要求温度较低。

5. 离子强度 不同的离子强度会产生不同的电荷屏蔽效应,因而影响蛋白质分子之间的静电相互作用,同时

盐的阴阳离子本身也可直接与蛋白质分子表面的带电残基形成静电相互作用。在低离子强度时($<0.5 \text{ mol/L}$),蛋白质溶解度是增加的,这是盐溶现象,在高离子强度时,蛋白质溶解度降低,即盐析作用。在盐析效应中,高价的小离子比低价的大离子作用大。

6. 有机分子添加剂的影响 有机分子会降低水的介电常数,增加蛋白质分子间的静电作用,而且还可使有机分子取代蛋白质分子表面上的束缚水分子而降低蛋白质的溶解度。

7. 结晶时间 在结晶条件比较适合的情况下,在几小时甚至几分钟即可获得结晶。但有些情况需数天甚至数月才能结晶完全,视各种蛋白质和酶的具体情况不同而定。蛋白质和酶的结晶大多数是针状、棒状、片状,有的为八面体或立方体的菱状结晶。

(三) 蛋白质晶体的生长

从溶液里生长晶体,一般总要使溶液达到适宜的过饱和度,由此生成少数晶核,随着晶核慢慢长大,溶液过饱和度逐渐降低,最后使溶液和晶体处于平衡状态,晶体就停止继续长大。

如果过饱和度太高,大量晶体会很快析出,易形成微晶,甚至无定形态。对于蛋白质晶体来说,影响溶解度的因素很多,而且由于蛋白质分子本身构象的柔性,使得它在结晶时对外界因素改变特别敏感,要控制一个适宜的过饱和度,使生成的晶核少,长成的单晶大,这需要经过艰苦的摸索,才能达到理想条件。因为每种蛋白质分子结构不同形成晶体的最佳期条件也不同,没有一个现成的条件可供直接应用。

蛋白质结晶方法常分成:盐析法(加固体盐法、加饱和盐溶液法、透析法)、有机溶剂法(又分成直接加有机溶剂法、挥发性有机溶剂蒸发法、冷冻真空干燥法)、等电点法、脱盐结晶法等。其基本原理都是建立在采用温和条件降低蛋白质溶解度的基础上。

现将微量结晶气相扩散法形成蛋白质晶体生长过程作一简要介绍。其形式可以是悬滴或坐滴方式。悬滴法如图 14-8 所示。洗净干燥的小方盖玻片先要硅化处理。

把盖玻片放在含有 1% 的二氯二甲基硅烷的甲苯溶液中浸润 10 min,然后在 120°C 干燥,把甲苯蒸发,使液滴在盖玻片上不会扩散延伸,在晶体培养盒的池内注入 1ml 含有结晶所需的各种沉淀剂、添加剂的缓冲液,在液池的边上均匀地涂上一层真空脂。在硅化过的盖玻片上,将 $2\sim 5\mu\text{l}$ 的蛋白质溶液与等体积的液池内的缓冲液细心混合,根据需要也可按不同的体积比相混合。然后把盖玻片覆在液池上面,液滴朝向液池,轻轻挤压盖玻片,以保证体系处于完全密封状态。把晶体培养盒置于干净而少振动的地方。由于液池内缓冲液中的各种试剂的浓度均高于液滴中的浓度(蛋白质浓度除外),因此,两者的饱和蒸气压是不同的,通过水或其他更易挥发有机分子的蒸发,使两者的饱和蒸气压逐渐相等,体系达到平衡状态。当溶剂水分子从液滴向液池迁移后,使液滴中蛋白浓度和各种沉淀剂、添加剂的浓度逐渐提高,液滴中的蛋白浓度从不饱和到达饱和,当达到一定的过饱和度后,晶核开始形成,随着晶体的长大,蛋白浓度又逐渐降低,最后,晶体和液滴成平衡状态,晶体停止生长。

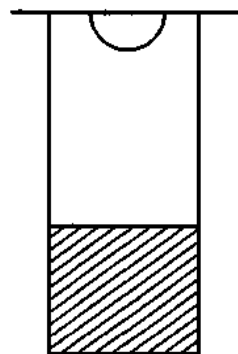


图 14-8 悬滴法示意图

在开始摸索晶体生长条件时使用悬滴法更有利,它的样品用量少。通过改变液池中和液滴中沉淀剂、添加剂的浓度差别,可以控制晶核生长的速度,达到改进晶体质量的目的。由于重力的影响悬滴法的液滴体积不宜过大。采用坐滴法可以加大液滴的体积,以得到更大的晶体,对以后的晶体安装操作也更方便一些。

(四) 蛋白质晶体的 X 射线衍射

晶体 X 射线衍射已证明是目前研究蛋白质空间结构的最有效方法。它们提供的丰富结构资料,加深了人们对蛋白质的了解。1934 年 Bernal 与 Crowfoot 首次摄得蛋白质(胃蛋白酶)晶体的 X 衍射照片。次年又获得胰岛素晶体的衍射像。这些结果充分证明,与生命现象密切相关的蛋白质分子在晶格中完全有序排列。但是当时要解决蛋白质大分子晶体的衍射相位问题尚没有可行的方法。直到 1954 年,Perutz 等发现,重原子可以同晶置换的方法进入蛋白质晶体中,改变原来晶体的衍射效应,从而用于解决相位问题,使蛋白质晶体学得到飞速发展。50 年代后期肌红蛋白和血红蛋白低分辨率的晶体结构测定成功,使得蛋白质三维结构的知识充实,并且促成新兴的蛋白质晶

体学的诞生。60年代又有一批重要的蛋白质晶体结构被测定,如溶菌酶、核糖核酸酶、胰凝乳蛋白酶和羧肽酶等。说明蛋白质晶体学已走上成熟发展的道路。进入70年代,测定的蛋白质晶体结构越来越多,结构测定的精度也越来越高,结构测定的速度也越来越快。一些具有重要生物学功能的蛋白质,在结构测定的基础上,结合其生物学活性,探讨了它们的作用机制。

蛋白质晶体学的发展也有赖于X射线衍射实验技术的发展,最初是底片法收集衍射数据,后来有了计算机控制的衍射仪,现在采用面探测器,完成一套高分辨率的数据收集只需花几天时间。高强度的同步辐射光源和劳埃照相法的应用使得测定时间分辨率的蛋白质晶体成为可能。

1. 多对同晶型置换法 多对同晶型置换法(multiple isomorphous replacement method)是测定蛋白质分子晶体结构的基本方法。1937年Robertson和Woodward首次将此引入酞菁染料结构测定。他们用较重的原子置换酞菁分子中较轻的原子(如用硒替换硫,用碘替换溴),而不改变分子在原来晶格中的排布,也不改变分子的结构。这样制备的含重原子的晶体称为同晶型重原子衍生物。所谓“同晶型”是要求重原子衍生物中的电子密度分布,除在置换位置上有变化以外,其余应与原来的晶体(以下称母体或母体晶体)中的完全一样。以共价键的方式置换蛋白质分子中个别原子相当困难,只有对一些可脱除的金属原子才可做到(如用铅或汞替换锌)。但蛋白质晶体中却有大量的溶剂通道,通过扩散重原子可以“进驻”并接近蛋白质分子表面的溶剂位置,从而与母体分子的某些特定部位的基团结合(通常采取络合、静电吸引、偶极子作用或范德华力作用等方式),同时又不影响母体分子及晶体的结构,严格说来这是同晶“加成”而非“置换”,但对被取代的无序溶剂分子来说,这的确是置换。多对同晶型置换法是借助多个同晶型重原子衍生物来解决蛋白质晶体衍射波的相位问题的方法。由于重原子像蛋白质分子那样有序地处于晶格中,会使母体晶体衍射波的强度发生显著变化,利用强度变化量即可以推出相应母体晶体衍射波的相位值。

用几何图解的方法可以清楚地了解利用同晶型重原子衍生物求解衍射波相位的原理。一个正弦波可以用矢量来表征,波的振幅即矢量的大小,波的相位即矢量的方向(图14-9A)。如果知道该矢量的大小(波的振幅 F_p)而不知道它的方向(波的相位 α_p),画在平面上就是一个以此大小为半径的圆(图14-9B)。所以相位值未知的蛋白质母体的衍射波的几何表达,就是以其振幅大小 F_p 为半径的一个圆。所谓相位问题就是要确定从圆心指向圆周的矢量的正确位置。当获得一个重原子衍生物后,就有了3个矢量:母体的衍射波 F_p ,衍生物的衍射波 F_{PH} ,重原子的衍射贡献 f_H ,显然,它们之间有下列关系。

$$F_{PH} = F_p + f_H$$

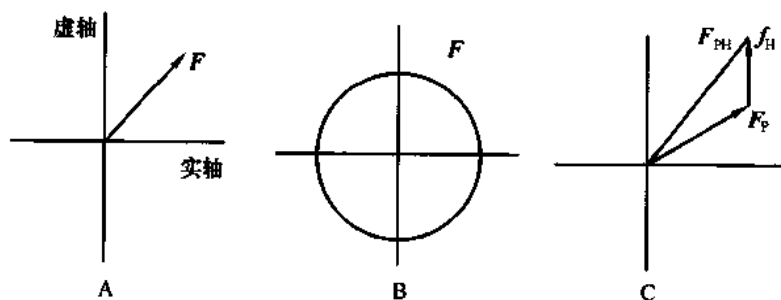


图 14-9 衍射波的矢量表达

- A. 振幅和相位均已知的衍射波 F ; B. 只知振幅而相位不定的衍射波;
C. 蛋白质母体,重原子衍生物和重原子衍射波 F_p 、 F_{PH} 和 f_H 之间的闭合三角形关系

这在几何上就是一个闭合三角形的关系(图14-9C)。从衍射强度测量可以分别求得母体和衍生物衍射波的振幅 F_p 和 F_{PH} 。同时通过衍生物衍射强度的变化寻找出重原子在晶胞中的位置之后,可以单独计算出 f_H 的大小和方向,从而可以画出分别以 F_p 和 F_{PH} 为半径的两个矢量轨迹圆。要使它满足前面列出的闭合三角形关系,

F_{PH1} 的圆心必须在 $-f_{H1}$ 矢量的端点上(图 14-10A)。一般情况下 F_{PH1} 圆必然与 F_P 圆相交两点(H 和 L)。这就是母体衍射波相位值的两个解 α 和 α' (图 14-10A)。如果有第 2 个重原子衍射物,可以得到第 2 套 F_{PH2} 和 f_{H2} ,从而可以画出 F_{PH2} 为半径的第 3 个圆。此圆与母体圆又交两点 H 和 G,其中一点是真解,它必然也是 F_{PH1} 与母体圆相交两点中之一。换言之,从三圆共交的点 H 就可得到母体衍射波相位解 α 。一般说来至少要有两个同晶型重原子衍生物方可获得母体衍射波相位值的唯一解。在实际中,由于各种误差的存在,用两个重原子衍生物并不一定能得到一个交点,而往往需要多个才能得到较为准确的解,称为多对同晶置换法。重原子衍生物的质量愈好,数量愈多,结果愈准确。上述实际工作过程称为 Harker 图解法。肌红蛋白 0.6 nm 分辨率的相位问题,就是用这一办法解决的,现在普遍应用概率来求得最佳相位和最可几相位值。

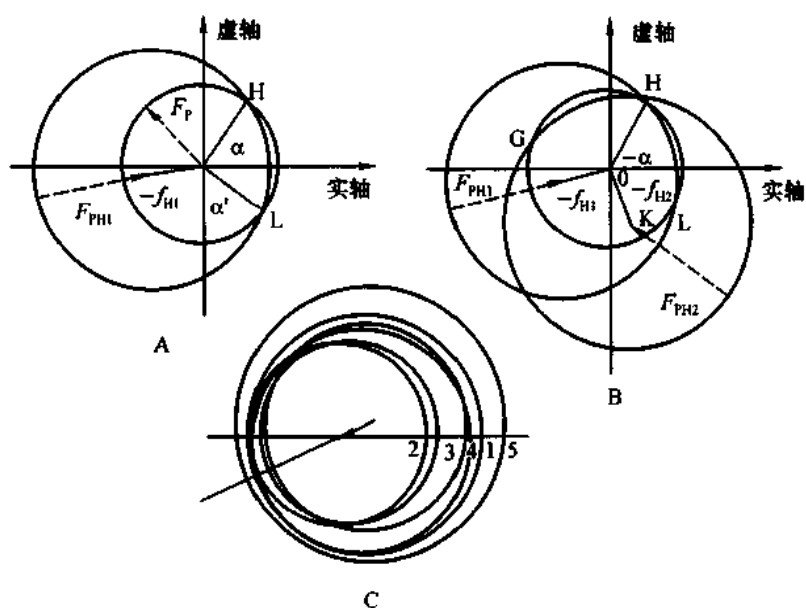


图 14-10 用同晶置换法测定相位的原理

A. 单对同晶,相位值有双解 α 和 α' ; B. 多对同晶,相位值获唯一解 α ;
C. 肌红蛋白一个反射相位的实际测定

2. 多对同晶置换法测定蛋白质结构的一般步骤 一般要经历下列步骤:

(1) 培养蛋白质晶体 获得足够大的蛋白质单晶体是进行结构测定的先决条件。许多蛋白质在生化研究中就可得到微晶,然后精心培养使它以单晶形式长大到约 1 mm 线性大小,方能进行较满意的 X 射线衍射分析。足够的大小,一定的厚度,优良的衍射强度和较高的分辨率,这些都是晶体质量的重要指标。要获得可用的单晶体,必须掌握好影响晶体生长的因素,诸如溶解度、pH、温度以及溶剂成分(缓冲体系与离子强度)等。很多蛋白质只能提供很小的量,因此近年来十分注意晶体微量生长的方法和技术,其中气相扩散法得到较广泛运用。迄今,对蛋白质晶体生长的规律所知尚少,经验和机遇仍是成功的重要因素。

(2) 制备重原子衍生物 得到蛋白质晶体后要设法将重原子引入,制备同晶型重原子衍生物。质量好的重原子衍生物必须符合两方面要求:引入的重原子对蛋白质分子的构象和在晶体内堆积破坏极小,具有足够高的同晶度,Crick 和 Magdeff 曾计算,在 3 nm 分辨率下,晶胞参数 0.5% 的变化就会产生 15% 的衍射强度变化,衍生晶胞尺寸的变异一般不应大于此量;重原子结合专一,位置集中,占有率高,对一些特定的蛋白质可以用一些专一性很强并能很好控制的方法制备衍生物。大多数情况下,普遍使用的是浸泡扩散法或共晶法,这基本上还是一种类似药物筛选的过程。图 14-11 是重原子试剂对氯汞苯磺酸进入肌红蛋白晶体形成重原子汞衍生物的情况,带有重原子

的小分子正好结合在两个分子之间的合适的空间里,并被蛋白分子表面的相应基团所结合。

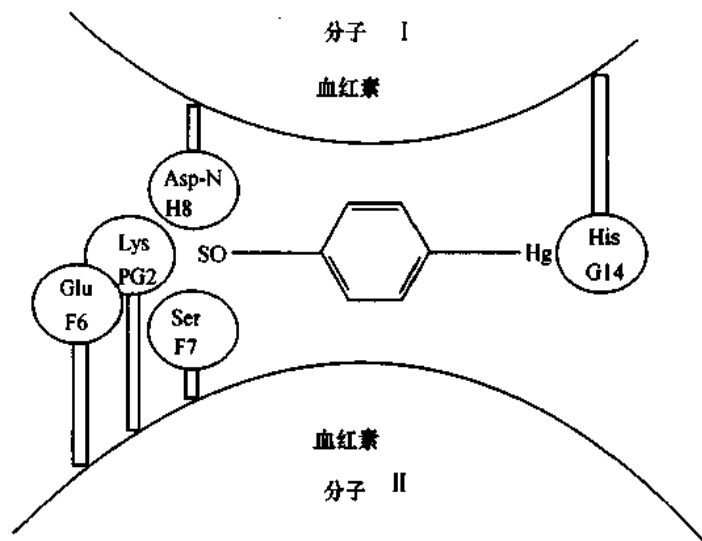


图 14-11 肌红蛋白与对氯汞苯磺酸的结合

(3) 收集和校正处理衍射数据 高质量的衍射数据是获得良好结果的基础,必须予以充分重视。蛋白质晶体衍射波,数量大、强度弱,其收集方法有两大类:照相记录和衍射仪记录,20 世纪 60 年代以衍射仪法占优势,由于它测量精确,易于自动化,所以得到广泛应用。主要设备是带计算机控制的线性衍射仪和四圆衍射仪,至今四圆衍射仪仍在广泛使用。图 14-12 是其原理和机械装置示意图,通过图中所示的 4 个圆周运动,晶体可达到任何所需的取向位置,从而对入射的 X 射线产生衍射,并被准确定位的探测器(计数管)所收集。

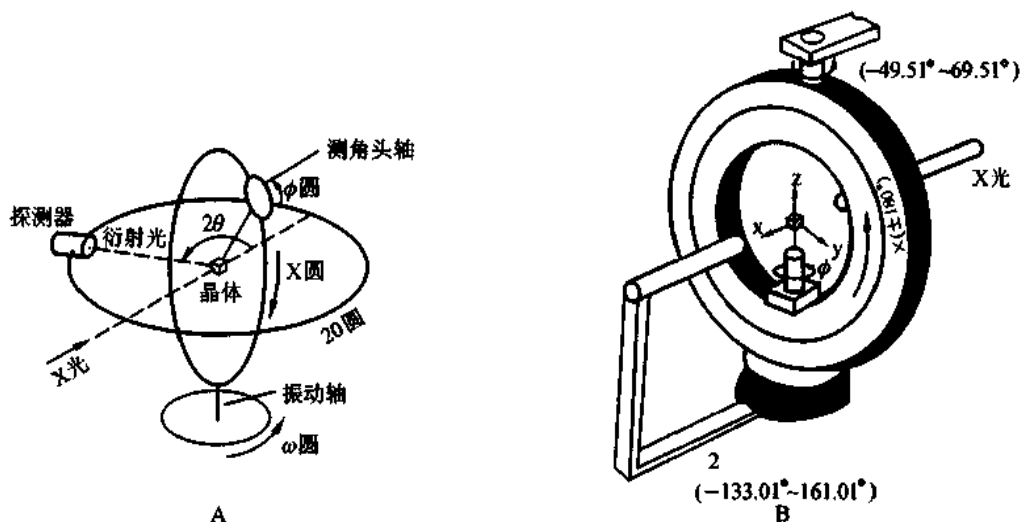


图 14-12 四圆衍射仪原理示意

A. 晶体和探测器的四圆运动; B. 机械装置

进入 70 年代,由于计算机的控制光密度的出现,底片感光的衍射强度测量问题获得解决,照相法又重新获得生命力。由于底片作为一个面探测器,记录迅速,特别对相对分子质量较大的生物大分子的研究带来一系列好处,近年已愈来愈广泛地应用起来。收集到的数据必须经过一系列实验因素(偏极化分子、角因子、温度因子、吸收因

它的同族蛋白质的结构及其某些类似物的结构,常常能以全相同的密堆积方式(空间对称群)结晶。这时它们的结构测定通常无需再经同晶置换,而只用差值电子密度法就可解决。Stryer 等人(1964 年)首次用此法研究叠氮离子与肌红蛋白的结合。由于这一方法简便易行,随后广泛用于研究抑制剂和类底物与大量蛋白质的结合,特别对于探知许多酶的活性位置,以及对了解酶的作用机制等,发挥了重要作用。同时,它可用于测定与蛋白质表面结合的小分子的结构,用作探测母体蛋白质构象变异的灵敏手段。

(3) 分子置换法(molecular replacement method) 这是利用晶胞(即晶体中最小的重复单元,晶体即由这些最小单元在三维方向上周期重复所构成)的对称独立单位中具有结构的类似性或等同性,帮助测定结构的一种方法。它愈来愈多地应用于下述研究中:当一个基本蛋白质的结构已经测定,在对那些结晶类型(空间对称群)不同的它的类似物以及它的同源“家族”进行系列研究时,其余的结构往往无需同晶置换途径,而只用分子置换法即可测定。一个晶体中具有局部对称性和不同晶体具有结构类似性,一定会在衍射图样中反映出来。如前所述,晶体的衍射图样是由分子的傅里叶变换和晶格的变换两部分合成的。所以,分子的结构类似,其衍射花样必然有某种类似。分子置换法即利用这种类似性来帮助测定蛋白质结构的方法。它一般包括下列几个步骤:① 测定独立分子或分子的亚基在一个晶胞中或在不同晶型的晶胞之间的相对取向。这可由一个矢量函数的系统考查来完成,称为旋转函数。② 对给定的坐标系及其原点,确定亚基的平移量。这也可用矢量函数作系统检测来解决,称为平移函数。③ 建立和求解分子置换方程,通过求解相位,结合结构修正技术测定结构。显然,应用分子置换法的基本条件是,或在不对称单位内部或在不同晶型的晶胞之间,必须具有分子(或亚基)结构的相同或类似。而且一般只能在相关系列中至少有一个结构已经较精细地测定时,方可用分子置换法获得完整的结构解。其优越之处在于可以回避同晶置换途径的冗长而繁杂的实验和计算过程。

第三节 质谱技术

一、质谱技术简介和原理

20 世纪 70 年代 Macfarlane 等人运用等离子体解吸(plasma desorption, PD) 的离子化技术,使得质谱技术从原来的有机小分子结构测定扩展到相对分子质量大于几千以及难以气化的多肽和蛋白质分子。80 年代 Barber 等人又引入快原子轰击电离(fast atom bombardment, FAB)技术运用于质谱分析,使得多肽和蛋白质结构测定更为准确并得以推广运用。FAB 质谱又叫液体二次离子质谱(liquid secondary ion mass spectrometry),它是一种用快速原子轰击被分散在高沸点溶剂(如甘油)中的待测化合物,从而产生分子离子。快原子的产生是通过电离惰性气体 Ar、Xe、He 产生的 Ar^+ 、 Xe^+ 、 He^+ 被电场加速,从而具有较大动能,通过 Ar 气室进行电荷交换反应: $\text{Ar}^+(\text{快}) + \text{Ar} \longrightarrow \text{Ar}^+(\text{快}) + \text{Ar}^+$

经电荷交换后的低动能 Ar^+ 被偏转出快原子流,获得高动能快速的 Ar 原子对样品分子进行轰击,处于基质如甘油中的样品分子,一般涂于金属板上,受快原子束轰击后样品挥发和离解,而快原子大量动能则以各种方式消散如图 14-14。

FAB 产生的分子离子非常稳定,不易裂解,且方法简单,灵敏度高,是准确测定多肽化合物相对分子质量的有效方法。应用于一些较复杂的混合物,能测出所含各组分的相对分子质量。

然而 FAB 法不易获得碎片峰,对于测定多肽的顺

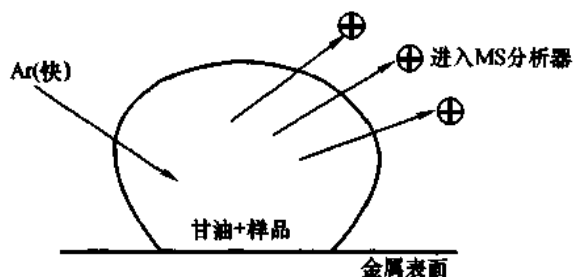


图 14-14 FAB 法示意图

序遇到困难。为此可应用另一种串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)技术。

MS/MS是将FAB产生的分子离子用惰性原子再次轰击(collision induced dissociation, CID或collisionally activated dissociation, CAD)从而获得碎片物图谱,这样,对于一些蛋白质裂解多肽碎片,可从MS/MS上得到相对分子质量值及顺序信息。对于一些较复杂的多肽混合物,可从FAB上得到每个组分的分子离子,再通过CID或者CAD对其中某一个或全部离子依次分析。

80年代末,另两种更新的技术得到发展,它们分别是电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)和基质辅助的激光解吸电离(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)这两种技术解决了极性大、热不稳定的蛋白质、多肽分子的离子化和大相对分子质量的测定问题。

ESI是靠强的电场使分子电离,样品溶液以低流速($1\sim 20\ \mu\text{l}/\text{min}$)从毛细管流出,在毛细管柱头上遇到高电压场($1\sim 5\ \text{kV}$),造成柱头液雾化形成带电液滴,这种带电液滴在逆向干燥气流中(如 N_2)因挥发而使液滴表面的电荷密度增大,直至液滴爆裂,形成更为细小液滴,随着小液滴进一步蒸发,爆裂将再次发生,这个过程可持续进行,结果在液滴表面形成非常强的电场,足以从液滴中解析出离子并使其进入到周围气体中(图14-15),这种分子离子特点是分子离子往往带多个电荷,离子化的形成是依靠吸附或者失去若干质子而形成,所以正离子或负离子谱上会观察到 $(M+nH)^{n+}$ 或 $(M-nH)^{n-}$ 峰。对于生物大分子,在ESI谱上显示的是一组带不同电荷的分子离子峰,根据每个峰的质荷比及电荷数即可算出相对分子质量值。实际上一组峰上可算出无数个相对分子质量值,它们相互之间会略有差别,一般需在计算机上经特定的程序处理,找出最接近实际的相对分子质量值。

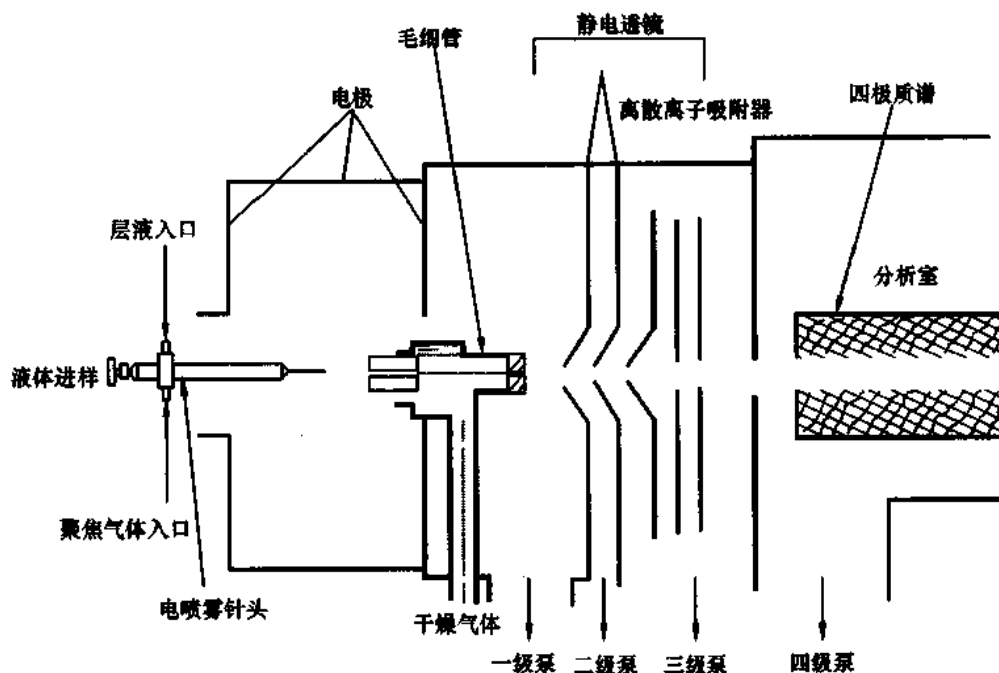


图 14-15 电喷雾离子源示意图(和四极质谱相连)

基质辅助的激光解析电离(MALDI)技术常用离子飞行时间(time-of-flight, TOF)作检测指标,其电离的基本原理是利用激光脉冲辐射分散在底物中的分析物使其解析形成离子,并根据不同质荷比离子在仪器电场区飞行和到达检测器时间不同而形成一张完整质谱图(图14-16),其计算公式如下:

$$\frac{1}{2}mv^2 = ZV \quad (\text{其中 } m \text{ 为质量, } Z \text{ 为电荷数, } V \text{ 电压, } v \text{ 为飞行速度}),$$

$$\text{那么, } v = \sqrt{2ZV/m} \quad t = L/v \quad (t \text{ 为飞行时间, } L \text{ 为飞行管长})$$

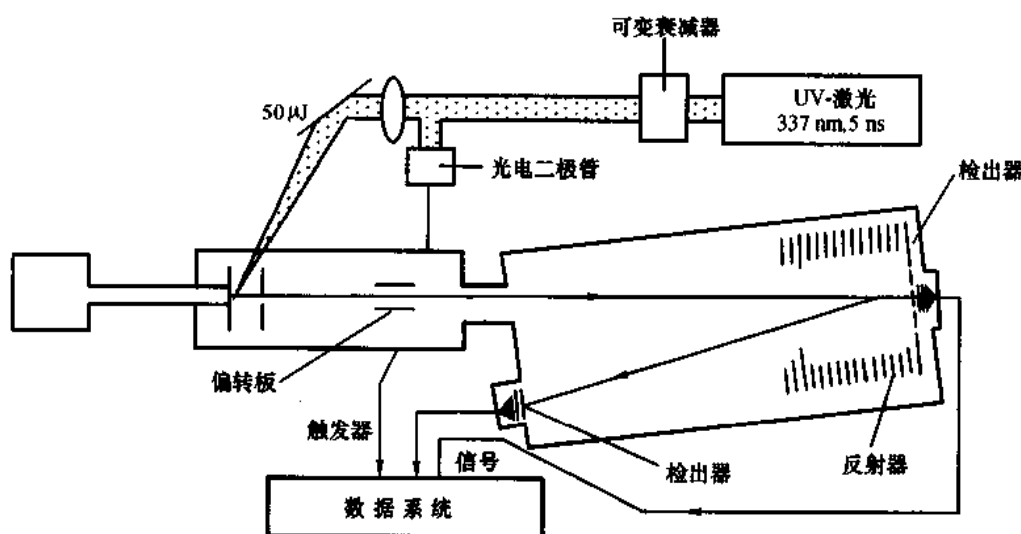


图 14-16 有基质辅助的激光解析飞行时间质谱仪器示意图

$$t = L/v = L \times \sqrt{m/2ZV}$$

$$m/Z = 2 \times Vt^2/L^2 \quad \text{其中 } V, L \text{ 为仪器常数。}$$

测得飞行时间 t 即可得到 m/z 。

MALDI 技术关键是找到合适的基质,要求该种基质与被分析物质(蛋白质、多肽)不起化学反应,在固相中基质与被分析物形成单相,在真空中要低蒸气压,能促进离子化并给出质子的化合物是基质的基本要求。常用的基质是尼古丁酸或其同系物,如肉桂酸衍生物,苯甲酸衍生物和香豆酸等。

ESI 质谱和液相色谱联用,能提高检测物的范围和灵敏度,原则上讲,能检测到所测物中所有组分,对于相对分子质量较大或疏水性强的蛋白样品采用 MALDI 效果更好。MALDI 还能有效地分析较复杂的肽混和物或物理化学性质相差较大的蛋白质混和物,且测定时不受样品所含添加剂、缓冲液或盐的影响,灵敏度要比 PD、FAB 等质谱高。但是 MALDI 对基质的选择具一定难度。

二、质谱技术在蛋白质、多肽结构测定中的应用

主要用于测定蛋白质或多肽相对分子质量及一级结构顺序。质谱测定的主要优点在于快速、灵敏,所需的样品量少到只需几十个 pmol 数量级,并且能解决一些用经典的蛋白质结构测定方法难以解决的问题,如对于 N 端封闭的肽和环肽样品,不能直接用蛋白质、多肽气相顺序仪测定其顺序的样品,选用质谱技术则不受影响。一些很难纯化的肽和蛋白质样品,质谱技术可测出其各组分。用 ESI-MS 和 MALDI-TOF-MS 测定蛋白质和多肽的相对分子质量,精确度可达 0.1%~0.01%,这远比其他方法(如 SDS-PAGE、凝胶过滤、超离心等)精确。正确测定蛋白质相对分子质量,可以提供很多信息,如确定分子大小,从氨基酸组成分析的结果求得准确的氨基酸组成,验证已测定的一级结构是否正确等。此外,ESI-MS 和 MALDI-TOF-MS 又可成为蛋白质、多肽样品的纯度鉴定的有力工具。只要质量有差异的杂质都可从样品中被检出,如人和猪胰岛素混合一起, MALDI-TOF-MS 也能够清楚地分出二个峰,两者仅在 B 链 32 位相差一个氨基酸残基。用 MS 测定蛋白质顺序,一般的方法是先利用 3、4 种不同蛋白质水解酶对样品进行酶解,如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、SV8 酶,各种酶解法后经 HPLC 等分离得到的纯肽或简单的混合肽,再用 MS/MS 测定各组分的一级结构,然后从不同蛋白质水解酶酶解肽段顺序,找到其重叠部分,即可得到整个蛋白质顺序。质谱法测定蛋白质或多肽顺序并不受 N 端乙酰基、甲基的封闭或是环肽的限制, MALDI-TOF-MS 还能测定蛋白质结构中磷酸化、硫-硫键及其他化学修饰的位置等。各种质谱仪技术特别是与高效液相色谱、毛细管电泳等连用,使蛋白质、多肽结构测定向更微量、快速化发展,也许在

若干年后它将取代经典 Edman 降解测定蛋白质、多肽一级结构的方法,成为蛋白质、多肽结构研究的重要工具,这将大大促进生命科学的发展。

第四节 核磁共振技术

核磁共振技术是目前确定蛋白质和核酸等生物大分子溶液三维空间结构的有效手段。20 世纪 80 年代末随着遗传工程技术迅速发展,成功地制备了许多 ^{15}N 和 ^{13}C 等稳定同位素标记的蛋白质样品,使二维异核核磁共振方法得以实施,同时在蛋白质等生物分子的结构与功能研究中得到广泛应用。90 年代初期美国 A. Box 等人提出异核三维和四维核磁共振方法,使其测定相对分子质量扩大且精度可与 0.2 nm 分辨率的 X 射线衍射晶体结构相比较。现今,多维核磁共振技术与 X 射线衍射晶体结构技术相互补充,在结构分子生物学中占有重要的地位。

一、核磁共振确定蛋白质三维结构的基本原理

对蛋白质溶液样品进行各种类型的同核或异核多维核磁共振实验,并由这些实验所提供的核磁共振波谱信息,建立用于蛋白质溶液三维结构计算的核磁共振数据文件,这是多维核磁共振方法确定蛋白质溶液三维结构的基本构想。其中,波谱信息与蛋白质结构信息之间的对应关系是这一构想的基础。

(一) 蛋白质的结构信息

蛋白质分子是由 20 种氨基酸按不同的比例和排列顺序结合而成的。各氨基酸的主要组成元素是碳、氢、氮、氧和硫。由蛋白质分子的一级结构,也就是蛋白质的氨基酸序列,可以获知蛋白质的氨基酸组分、排列以及各类氨基酸的键长和键角。 α 螺旋、 β 折叠、转角、环等蛋白质分子的二级结构,体现了蛋白质分子主链原子在三维空间中不同的排列规律性。在 α 螺旋中,相邻两个氨基酸残基的酰胺质子($^1\text{H}_\text{N}$)在空间距离上很接近,而前一位残基的 α 质子($^1\text{H}_\alpha$)与后一位残基的酰胺质子在空间上相距甚远。但是,在 β 折叠中情况正相反, α 螺旋肽链上的每一亚氨基与前面第四位残基的羰基形成氢键,而反平行 β 折叠的两条单链上相对的亚氨基与羰基之间形成氢键。 β 折叠肽键二面角 ϕ 远大于 α 螺旋中的 ϕ 。所以,不同的二级结构域提供了具有不同结构特征的原子间距离及肽键二面角。二级结构域在空间中的进一步折叠形成了蛋白质分子的三级结构。由此而导致的几个 β 折叠相对集中的区域就会形成一个比较刚性的疏水区,而空间位置上比较靠近的几个环就可能成为比较柔性的活性部位。因此,位于不同二级结构域的原子核间距、原子核之间的相互作用,以及不同二级结构域内多肽链肽段的动态特性,都直接反映了蛋白质的三维结构特征。这些具有不同结构特征的原子核间距、肽键二面角、肽链的动态特性等都是多维核磁共振所要提取的蛋白质的结构信息。

(二) 核磁共振的波谱信息

核磁共振是以组成蛋白质的最基本元素: C, N, H, O 等原子的原子核为探针检测蛋白质的结构信息。而原子核自旋量子数 $I=1/2$ 的核: ^1H , ^{13}C , ^{15}N 是多维核磁共振检测的主要对象。在外加静磁场 H_0 , 即恒定超导磁场的作用下,这些核自旋量子数不为零的原子核会发生能级分裂。如果同时将射频磁场 H_1 作用到原子核系统上,当射频场频率 ω 满足关系式: $\omega = \gamma H_0$, 原子核将吸收射频场能量从低能级跃迁到高能级。这种共振跃迁现象就是核磁共振现象。上述关系式即为核磁共振条件。式中 γ 为旋磁比。不同的原子核的旋磁比不同,因而 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 的核磁共振频率不同,所以有核磁共振氢谱、碳谱、氮谱之分。在多维核磁共振实验中,射频场 H_1 是以脉冲序列的方式作用到蛋白质样品上。所谓脉冲序列就是由一串以特定时间间隔区分开的 90° 、 180° 或其他宽度的脉冲组成。为了阐明 90° (180°) 脉冲的作用,我们可以在 xyz 坐标系统中,运用半经典观点对原子核系统在静磁场 H_0 (沿 z 轴方向)和 90° 射频脉冲场 H_1 (沿 x 轴方向)共同作用下的运动行为作简单的描述。通常用核磁化强度矢量 M 表示单位体积内的位于磁场 H_0 中的原子核磁矩矢量之和。可以认为,一个处于热平衡状态的原子核系统的磁化强度矢量将平行于 H_0 方向。在 90° 脉冲作用期间,当射频频率满足核磁共振条件时,原子核将吸收射频场能量,核磁化强

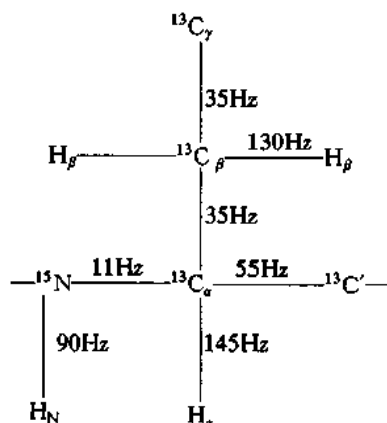
度矢量由 z 方向朝 xy 平面进动而到达高能态 y 方向。当 90° 脉冲关闭后,由于弛豫机制,核磁化强度矢量将从高能态回到平衡态,即由 y 轴方向自由进动到平行于 z 轴方向。这时,在 y 轴方向的接收线圈就会感应出一个高频的衰减信号,经检波后即产生一个自由感应衰减(FID)信号。FID 信号经傅里叶变换后,就由时间域信息变成频率域信息,即核磁共振波谱。

核磁共振波谱的谱峰包含有相当丰富的与蛋白质分子结构有关的波谱信息,它们由波谱参数表示。直接用于确定蛋白质分子溶液三维结构的主要波谱参数有:

1. 化学位移 核磁共振谱线的化学位移是由于核外电子的屏蔽作用而引起的。如果所研究的样品是抗磁性物质,那么物质中的抗磁性屏蔽将使原子核实际感受到的磁场小于外加静磁场 H_0 ,因而我们实际上所观察到的原子核共振条件就发生了一些微小的变化。可以在核磁共振条件的公式中附加一个系数 σ 来描写原子核所受到的屏蔽的情况,这时核磁共振条件应写成 $\omega = \gamma(1 - \sigma) H_0$ 。 σ 与分子的结构以及原子核所处的化学环境有关。因而,同一种原子核在不同的化合物中,或在同一化合物的不同化学微环境中,由于有不同的磁屏蔽,其核磁共振条件不同,即谱线出现的位置不同,产生了核磁共振谱线化学位移的现象。对于蛋白质分子而言,同一类型氨基酸残基的 ^{15}N 以及 ^1H 和各碳位的 ^{13}C 原子核,由于这一类氨基酸残基在蛋白质一级结构中序列位置不同,因而位于不同的二级结构域以及三级折叠的不同空间位置,取决于核所在的具体结构环境, ^1H , ^{13}C , ^{15}N 共振峰将出现在各自波谱的不同频率位置上,所以 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 共振谱线的化学位移完全反映了蛋白质的三维空间结构以及局域微环境结构情况。

2. J 耦合常数 J 耦合常数也称为自旋-自旋耦合常数。它是核磁矩通过围绕在核外的电子云的间接传递作用而产生的能量耦合,是反映了被测核与其周围原子核之间通过成键电子传递的磁相互作用。分子内部原子核的这种磁相互作用改变了被测核的共振条件,使谱线分裂为多重峰。谱线分量之间的距离表示两种核耦合的强弱,定义为耦合常数,单位为赫(Hz)。在蛋白质分子中, $^{15}\text{N}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ 等核间的单键 J 耦合常数都具有较大值(见下图),是多维核磁共振方法的基础。而邻位 ^1H 间的耦合常数 $^3J_{\text{HH}}$ 与耦合核的扭转角有关。也就是酰胺质子与 α 质子之间的耦合常数 $^3J_{\text{NH}}$ 与扭转角 ϕ 有关,而 α 质子与 β 之间的耦合常数 $^3J_{\alpha\beta}$ 与扭转角 χ' 有关,所以 J 耦合常数可用于描述蛋白质主链及侧链的构象。

3. NOE(核欧沃豪斯效应) NOE 反映了原子核自旋之间通过空间的偶极-偶极相互作用,是核自旋体系弛豫过程引起的现象。不同核间的偶极-偶极弛豫,分子内部运动以及化学交换过程都可产生核自旋间的交叉弛豫,从而引起 NOE 的发生。对于蛋白质分子,如果质子间($^1\text{H}-^1\text{H}$)距离小于或等于 0.5 nm,那么,在其核磁共振氢谱中就可观察到 NOE 信号,而且 NOE 的信号强度与质子间距离的 6 次方成反比。所以,NOE 信号的强度提供了蛋白质中氢原子对之间的距离,是蛋白质分子溶液三维结构测定的最重要的波谱参数。此外,蛋白质分子酰胺质子与溶液中水分子质子之间的慢交换现象,通常指示主链不同部分的羰基与亚氨基之间形成了氢键。因而,慢交换酰胺质子的确定,将有助于正确判断蛋白质二级结构域中的氢键受体原子,从而可以获得形成氢键的供体与受体原子之间的距离。



肽键的异核单键 J 耦合常数

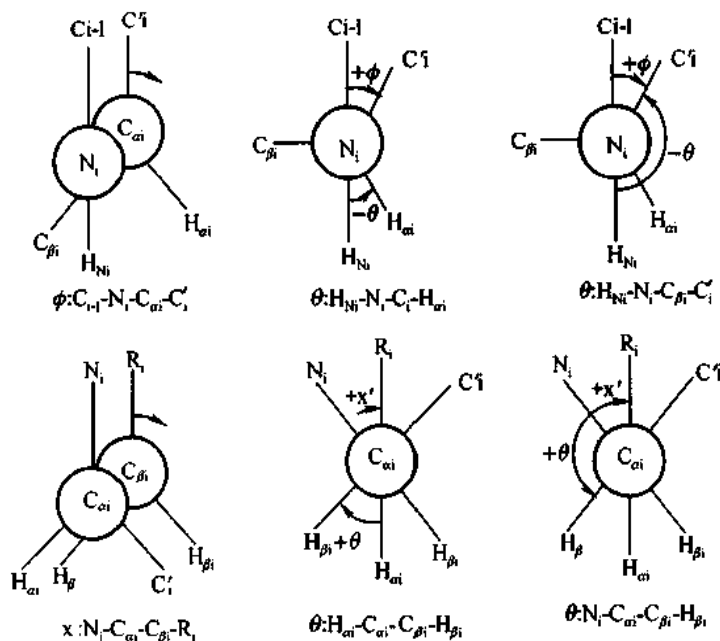
(三) 从波谱信息获取蛋白质结构信息

核磁共振谱线所包含的上述波谱信息如实地反映了分子的结构信息,可用以正确地测定蛋白质的二级结构和三级折叠。其中化学位移参数已用于直接判断在蛋白质氨基酸序列中,位于 α 螺旋及 β 折叠等二级结构单元中的氨基酸肽段位置。化学位移的这一应用是基于这样一个普遍现象,即相对于无规卷曲肽链中氨基酸残基的 α 质子($^1\text{H}_\alpha$)的化学位移,位于蛋白质 α 螺旋中的 $^1\text{H}_\alpha$ 的化学位移向高场方向平均偏移0.39;而位于 β 折叠中的 $^1\text{H}_\alpha$ 的化学位移朝低场方向平均偏移0.37。根据这一统计规律,提出了简便的化学位移索引(chemical shift index, CSI)方法:由蛋白质的 $^1\text{H}_\alpha$ 化学位移确定其化学位移索引值是-1,0或1。根据“1”或“-1”在蛋白质一级结构中的密集情况,可以推断“1”密集的肽段是 α 螺旋结构域,而“-1”则指示了 β 折叠结构域。对于 ^{13}C 核化学位移在二级结构域中的偏移,也有类似的统计。由此,进一步综合, $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^{13}\text{C}'$ 等4组化学位移所确定的CSI值,可对 α 螺旋及 β 折叠出现的肽段做出更确切的判断,其正确率可达到92%。

与蛋白质主链以及侧链构象有关的 J 耦合常数可由Karplus方程直接推算出相应的 ϕ 和 χ' 扭转角。 $\text{N}_i-\text{C}_\alpha$ 键的扭转角 ϕ 定义见图14-17。而我们在实验中实际检测的是 $\text{H}_{\text{N}_i}-\text{N}_i-\text{C}_\alpha-\text{H}_{\alpha i}$ 键或 $\text{H}_{\text{N}_i}-\text{N}_i-\text{C}_\alpha-\text{C}'_i$ 形成的二面角 θ ,前者是 $\text{H}_{\text{N}_i}-\text{N}_i-\text{C}_\alpha$ 键构成的平面与 $\text{N}_i-\text{C}_\alpha-\text{H}_{\alpha i}$ 键构成的平面之间的夹角, $\theta = \phi - 60^\circ$,后者是 $\text{H}_{\text{N}_i}-\text{N}_i-\text{C}_\alpha$ 键构成的平面与 $\text{N}_i-\text{C}_\alpha-\text{C}'_i$ 键构成的平面之间的夹角, $\theta = \phi - 180^\circ$ 。Karplus方程

$$^3J_{\alpha\text{N}} = 6.4 \cos^2 \theta - 1.4 \cos \theta + 1.9$$

$$^3J_{\text{NC}'} = 5.8 \cos^2 \theta - 2.7 \cos \theta + 0.1 \sin^2 \theta$$

图 14-17 扭转角 ϕ 和 χ' 的定义

描写了 $^3J_{\alpha\text{N}}$ 以及 $^3J_{\text{NC}'}$ 与 θ 之间的关系。蛋白质的 α 螺旋给出的 $^3J_{\alpha\text{N}}$ 值通常分布在4.0~7.0 Hz范围,而 β 折叠由于其主链骨架为伸展构象, $^3J_{\alpha\text{N}}$ 值相对较大,通常大于8.0 Hz。在图14-17所示的 $\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$ 键扭转角 χ' 的定义中,R表示丝氨酸中的 O_γ 、半胱氨酸中的 S_γ 以及其他氨基酸中的 C_γ 。实际检测的是 $\text{H}_\alpha-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{H}_\beta$ 键形成的二面角 θ 。Karplus方程式

$$^3J_{\alpha\beta} = 9.5 \cos^2 \theta_3 - 1.6 \cos \theta_3 + 1.8$$

$$^3J_{\alpha\beta 2} = 9.5 \cos^2 \theta_2 - 1.6 \cos \theta_2 + 1.8$$

描述了 χ' 所对应的二面角 θ 与 $^3J_{\alpha\beta}$ 的关系。式中 $\theta_2 = \theta_3 - 120^\circ$ 。实验中还检测另一种可以导出与 χ' 相应的二面角 θ 的 $^3J_{\text{Np}}$ 耦合常数,其 Karplus 方程为

$$^3J_{\text{Np}} = -3.75 \cos^2 \theta + 0.26 \cos \theta - 0.54$$

式中 θ 为 $^{15}\text{N}_i - \text{C}_\alpha - \text{C}_\beta - \text{H}_\beta$ 键形成的二面角。扭转角 χ' 等于 $60^\circ, 180^\circ$ 和 -60° 时,相应为蛋白质侧链 $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$ 键的构象处于 3 种扭转能量最低状态。 $^3J_{\alpha\text{N}}$ 和 $^3J_{\alpha\beta}$ 耦合常数的正确测量较困难。尤其是对于相对分子质量较大的蛋白质样品,需要由 $^3J_{\text{NC}}$ 和 $^3J_{\text{Np}}$ 提供必要的 J 耦合常数实验数据。

由 NOE 导出的质子间距离是计算蛋白质三维溶液结构最主要的实验依据。按照产生 NOE 的两个质子之间相隔的氨基酸残基数分类,有相邻氨基酸残基间的短程 NOE;相隔 1~4 个氨基酸基间的中程 NOE;相隔 5 个以上的远程 NOE。NOE 信号强度相应地为强、中、弱三种。蛋白质分子的 α 螺旋、 β 折叠以及转角等二级结构所给出的 NOE 信号的强弱具有不同特征。在 α 螺旋出现的氨基酸肽段中,相邻氨基酸残基的酰胺质子间产生强 NOE。用 $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ 表示第 i 个残基的酰胺质子与第 $i+1$ 个残基的酰胺质子之间的距离,角标 N 代表酰胺质子。由于 α 螺旋的结构特点, $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ 较小,所以相应的 NOE 信号较强,整个 α 螺旋肽段内可以观察到每两个相邻残基间的 $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ 强 NOE 信号。同时 α 螺旋区还产生 $d_{\text{Np}}(i, i), d_{\text{Np}}(i+1, i)$ 强 NOE; $d_{\alpha\text{N}}(i, i+3), d_{\text{NN}}(i, i+2), d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ 等中等 NOE; $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ 弱 NOE。 α 螺旋中氢键的形成还可以产生 $d_{\text{Np}}(i, i-3)$ 和 $d_{\text{Np}}(i, i-4)$ 弱 NOE。在反平行 β 折叠中,可以观察到 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ 强 NOE、 $d_{\text{NN}}(i-1, j+1), d_{\text{NN}}(i+1, j-1), d_{\alpha\alpha}(i, j), d_{\alpha\text{N}}(i, j+1), d_{\alpha\text{N}}(j, i+1)$ 等中等 NOE; $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ 弱 NOE。这里 i 和 j 表示位于不同 β 链内的残基序列位。两条 β 单链之间的这些 NOE 与氢键形成有关。在平行 β 折叠结构中,氨基酸残基间将产生 $d_{\alpha\text{N}}(j, i+1)$ 强 NOE, $d_{\alpha\text{N}}(i, j)$ 和 $d_{\alpha\text{N}}(j, i)$ 中等 NOE,微弱的 $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ NOE,但是不会产生 $d_{\alpha\alpha}(i, j), d_{\text{NN}}(i-1, j+1), d_{\text{NN}}(i+1, j-1)$ 等 NOE 信号。转角类型 II 会引起 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$ NOE 的产生,但不会产生 $d_{\text{NN}}(i, i+1)$ NOE。然而,有时可以观察到一些 $d_{\alpha\text{N}}(i, i+2)$ 和 $d_{\text{NN}}(i, i+2)$ NOE 信号。转角类型 I 的 NOE 特征使它很难与小片段 α 螺旋相区分。

近些年发展的多维核磁共振方法,对于蛋白质相对分子质量增加而带来的核磁共振谱峰加宽和重叠所造成的问题,建立蛋白质主链和侧链的 $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ 和 ^1H 共振信号的相关性,提供了多种实际有效的、可获不同结构信息的实验脉冲程序。有关多维核磁共振方法的基本原理,与之相关的脉冲序列和振波谱折要点应参考有关专著。

二、蛋白质溶液三维结构的计算

由核磁共振数据计算蛋白质溶液三维结构的原理概括于图 14-18 中。首先,将核磁共振波谱提供的 NOE 和 J 耦合常数数据转换为用于结构计算的 ^1H 间距离和二面角约束文件,其中也包括形成氢键的原子对之间距离的约束。其次,结合从蛋白质氨基酸组分得到的蛋白质分子中的键角和键长数据,建立距离约束矩阵(bounds matrix)。然后,将距离空间的约束矩阵转换为坐标空间的矩阵。接着,由坐标空间矩阵构建蛋白质分子的初始结构。最后,运用模拟退火等计算方法对初始结构进行优化,并由分子动力学进行能量最小化计算,由此得到一组收敛的蛋白质三维结构的坐标。

(一) 建立核磁共振谱数据约束文件

在具体计算蛋白质三维结构时,由 NOE 导出的氢原子对之间的距离,以及由 J 耦合常数导出的 ϕ 和 χ' 扭转角不是直接输入计算程序,而是以上限(upper-bound)和下限(lower-bound)的格式输入。这就构成了距离约束文件和二面角约束文件。

距离约束文件包括两个方面:一个是由 NOE 导出的 NOE 距离约束,另一个是由氢键提供的距离约束。在这些有约束条件的构象空间中,计算程序可以充分取样而找到合理的优化结构。通常 NOE 距离约束的下限取 0.18 nm(范德华半径之和),而距离约束的上限则需全面洞察所得到的 NOE 强度的总体情况,然后分成几类。一般可以分为:0.25~0.27 nm, 0.30~0.35 nm, 0.50 nm, 0.60 nm, 分别相应于强 NOE、中等 NOE、弱 NOE、很弱 NOE 距离

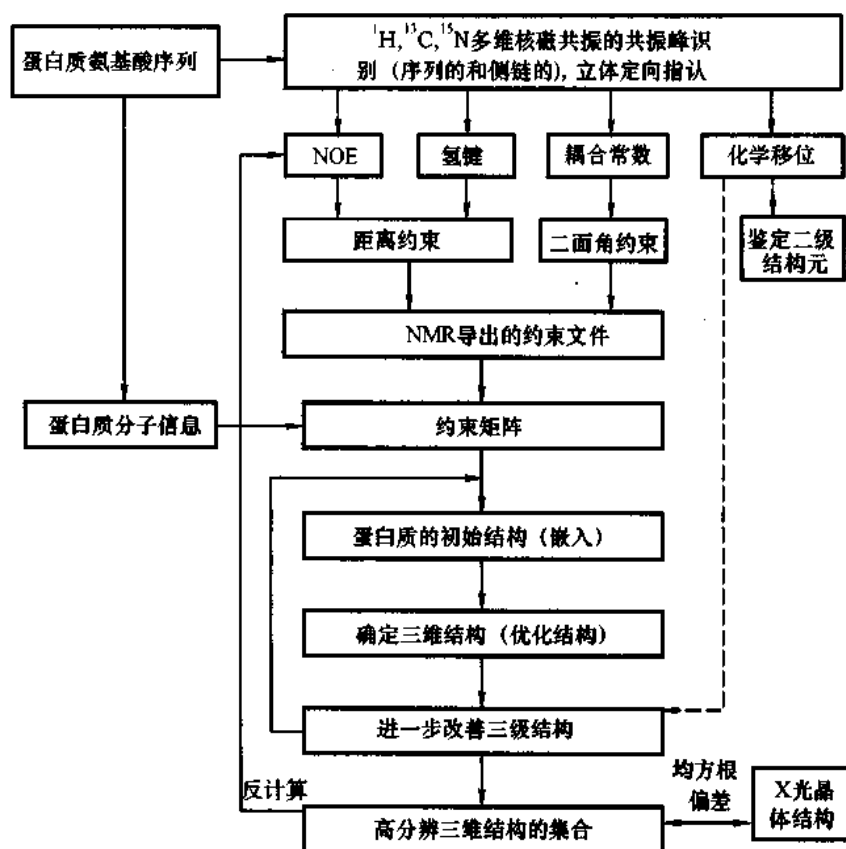


图 14-18 由 NMR 导出的蛋白质溶液三维结构计算的流程图

约束的上限。对于甲基质子,不能指认立体定向的 $^1\text{H}_\beta$ 以及芳香环质子都需加上一定的距离修正。对于远程 NOE 所导出的 ^1H 间距离也需加不定期的修正值。已经完成立体定向指认的 $^1\text{H}_\beta$ 和甲基质子需按约束文件的格式输入到计算程序中。氢键距离约束的上下限是根据在蛋白质分子中形成氢键的条件而定。也就是 $^1\text{H}_\text{N}$ 与羰基氧原子间距离的上下限分别为 0.23 nm 和 0.18 nm,亚氨基 ^{15}N 与羰基氧原子间距离的上、下限分别为 0.34 nm 和 0.24 nm。对于 α 螺旋及反平行 β 折叠中的氢键,首先需要根据在这些二级结构域中产生的 NOE 以及慢交换酰胺质子的情况作出形成氢键的判断,然后方可写入距离约束文件。

二面角约束文件主要包括主链 ϕ 角和侧链 χ' 角的约束。 χ' 角的最小约束范围为 $\pm 60^\circ$,而 ϕ 角的最小约束范围为 $\pm 30^\circ$ 。当 $^3J_{\alpha\text{N}} < 6.0\text{ Hz}$ 时, ϕ 角约束范围为 $-85^\circ < \phi < -35^\circ$;在 $^3J_{\alpha\text{N}} > 8.0\text{ Hz}$ 时, ϕ 约束范围设为 $-175^\circ < \phi < -80^\circ$;而当 $^3J_{\alpha\text{N}} > 10\text{ Hz}$ 时, ϕ 约束范围可设为 $-140^\circ < \phi < -100^\circ$ 。

(二) 获得蛋白质三维结构的不同构象集合

目前已有许多计算蛋白质三维结构的软件,如 DG II, X-PLOR, DIANA 等。这些软件的设计都是要解决一个纯几何问题,也就是要找到与核磁共振导出的距离约束、二面角约束以及蛋白质分子提供的经验结构数据相符合的分子构象。它们的具体计算原理不是本章节所要包括的内容。这里需要阐明的是,在具体计算蛋白质三维结构时,必须要获得一个蛋白质构象的集合,而这一集合是由数量足够多的(如 40~50 个)蛋白质三维结构组成。

在具体计算蛋白质结构中,无论是运用哪一个基于距离几何方法的计算软件,都是将核磁共振导出的距离约束、二面角约束、手性等结构数据与蛋白质分子的固定键长、键角、手性等经验数据相结合,经过一定的几何运算,从这些数量有限的、已知的约束上下限,推演出蛋白质分子中其他未知的约束上下限,从而建立起蛋白质三维结构模型。因此许多蛋白质的几何特征不是由核磁共振实验数据直接确定。这就需要计算一个拥有几十个结构的集

合,以便允许在尽可能大范围的空间构象中取样。对整个构象集合进行分析后,可以找到存在于集合内所有结构中的一种蛋白质结构特征。如果这一结构特征在所有结构中都不违背核磁共振导出的距离和二面角约束,同时随着在计算中加入集合的结构数增多,这一结构特征没有显著的变化,那么可以认为这就是由核磁共振实验数据导出的蛋白质溶液三维空间结构。

(三) 蛋白质三维结构的精确性和正确性

在分析蛋白质结构的集合时,通常运用均方根偏差(RMSD)值来衡量蛋白质骨架重原子、骨架上全部原子、蛋白质分子的全部重原子等原子空间坐标相互偏离的程度,或者是相对于平均结构偏离的程度。然后,抽去那些由于局域结构不理想,或者仍有违背距离约束和二面角约束的部分而偏离较大的结构,从而获得比较精确的蛋白质结构的集合。但是,由此得出的蛋白质结构计算的精确性并不等于蛋白质结构的正确性,必须要对蛋白质结构的正确性进行相应的检查。在有已知 X 射线衍射晶体结构的情况下,可以将蛋白质溶液结构与晶体结构作比较,以判断溶液结构是否正确。通常是将蛋白质晶体结构叠合到核磁共振数据导出的结构集合上,由溶液结构对晶体结构的 RMSD 值,分析晶体结构是否表现为溶液结构集合中的一员。如果没有晶体结构作为依据,则需要对核磁共振导出的溶液结构进行反计算,也就是根据溶液三维结构,计算可能产生的 NOE 交叉峰,并与核磁共振实验结果相对照,由此可以对核磁共振导出的蛋白质溶液三维结构的正确性作出合理的判断。然而,近年来发展的 PROCHECK 软件逐渐取代反计算方法,用以判断由核磁共振方法导出的蛋白质溶液三维结构的正确性。

(第二军医大学 胡惠民、毛积芳)

第三部分

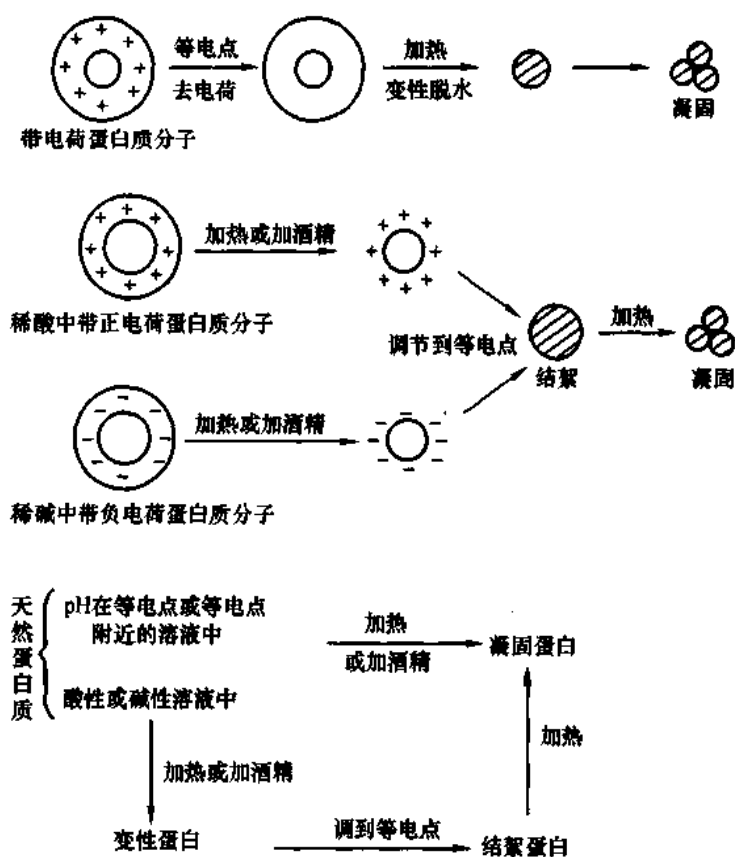
生物化学与分子生物学教学实验

实验一 蛋白质的变性、凝固及沉淀反应

一、蛋白质的加热变性凝固

(一) 原理

蛋白质受热作用后,其分子内部结构发生变化,常使疏水基暴露于表面,因而失去原有的亲水性质,成为溶解度很低的变性蛋白。蛋白质在其等电点或等电点附近受热作用,则凝固而沉淀。若在稀酸稀碱中加热,由于变性蛋白质带正电荷或负电荷,故不易析出,此时如调节到等电点或等电点附近则沉淀析出,称为结絮。结絮的变性蛋白尚可溶于稀酸或稀碱中。结絮蛋白继续加热,则成较大的块状凝固蛋白,此时即不再溶于稀酸或稀碱中。



图实-1 蛋白质的变性与凝固

(二) 操作

1. 取试管 3 支分别加入

(1) 10% 蛋白液 10 滴 + pH4.8 缓冲溶液 10 滴

- (2) 10% 蛋白液 10 滴 + H_2O 8 滴 + 0.1 mol/L HCl 2 滴
- (3) 10% 蛋白液 10 滴 + H_2O 8 滴 + 0.1 mol/L NaOH 2 滴
2. 将上述三管分别混匀,于酒精灯上加热煮沸,观察有何变化。
3. 冷却后向①管加 0.1 mol/L HCl 2 滴观察有何变化?为什么?
4. 向②管慢慢滴加 0.05 mol/L Na_2CO_3 边加边摇,直至呈现浓厚之絮状物为止。
5. 向③管慢慢加 0.1 mol/L HAc 直至出现浓厚之絮状为止。
6. 将②③两管分别于酒精灯上煮沸,注意有无凝固现象。冷却后再分别向②管滴加 0.1 mol/L HCl 2 滴,③管滴加 0.1 mol/L NaOH 2 滴,是否仍能溶解?为什么?

二、蛋白质沉淀反应

蛋白质由于水化层和电荷的存在,因此其水溶液具有亲水胶体的性质。凡能破坏蛋白质水化层和电荷存在的因素,均可使蛋白质从溶液中沉淀出来,这种蛋白质由溶液中析出的现象称为蛋白质的沉淀反应。

大多数蛋白质经盐析反应,或在低温下用乙醇或丙酮短时间作用使蛋白质沉淀后,除去上述因素,蛋白质又能溶于原来的溶液中,属于可逆的沉淀反应。但用重金属盐类、生物碱试剂、加酸及加热引起的蛋白质沉淀反应,一般均属于不可逆沉淀反应。

(一) 蛋白质的盐析

1. 原理 蛋白质属亲水胶体,向蛋白质溶液中加入一定浓度的各种中性盐类,既能除去蛋白质颗粒的电荷,又能除去其水化层,因此蛋白质容易从溶液中沉淀下来。由于大量盐类存在而使蛋白质从溶液中沉淀出来的方法叫做盐析。不同蛋白质盐析时所需盐的浓度各异,因而可以用不同浓度盐溶液分离不同的蛋白质,这种方法称为分段盐析。

常用作盐析的中性盐有: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 Na_3PO_4 、 NaCl 、 MgSO_4 等。几乎所有的蛋白质都可用饱和硫酸铵溶液盐析出来,而某些蛋白质(如球蛋白)在半饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中析出。

由盐析获得的蛋白质沉淀,经透析或水稀释降低盐浓度时,沉淀又能溶解,故蛋白质的盐析是可逆过程,常用于提纯各种蛋白质及酶类。

2. 操作

(1) 向试管内加入蛋白质溶液 2 ml 及等量的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 液混匀,即为半饱和硫酸铵,静置 3 min 后,观察及解释所见现象。

(2) 将上述试管内容物过滤。把滤液分为两份,于一份中加入结晶硫酸铵粉末(约 0.3 g),直到最后粉末不再溶解为止,则呈饱和硫酸铵溶液。另一份滤液作为对照,比较两份滤液有何不同?试解释之。

(二) 重金属盐沉淀蛋白质

1. 原理 在等电点碱侧,蛋白质呈负离子,能与重金属离子(如铜、银、汞等)结合成不溶性蛋白盐而沉淀。

2. 操作 取试管 1 支,加蛋白液 1 ml, 0.1 mol/L NaOH 2 滴,混匀,滴加 CuSO_4 溶液,随加随摇匀至出现沉淀为止。

(三) 生物碱试剂沉淀蛋白质

1. 原理 蛋白质在等电点的酸侧,带有正电荷,能受生物碱试剂的作用而沉淀。常用作沉淀

蛋白质的生物碱试剂有:苦味酸、三氯醋酸、钨酸、磷钨酸、鞣酸等。生物碱试剂对蛋白质的沉淀常较完全,故常用来制备无蛋白滤液。

2. 操作 取试管 1 支加入蛋白液 1 ml,滴加饱和苦味酸 6 滴,观察并解释。

三、注意事项

1. 严格滴定操作,逐滴加入,边加边摇,仔细观察,记录前后变化。
2. 酒精灯加热试管时,务必正确操作,即用木夹夹在试管上 1/3 处,试管倾斜 45°,管口朝无人方向,严防液体喷出伤人。
3. 用过滤纸集中放于污缸,切务乱丢弃。
4. 苦味酸属危险试剂(有毒,有爆炸性),配制时,用水浴加热促溶,用过的容器先用大量清水冲洗,尔后再行清洁处理。

四、材料和试剂

1. 主要材料 酒精灯,中试管,木试管夹,各种规格点滴瓶(管),滤纸,漏斗等。
2. 主要试剂 鲜鸡蛋, HCl, NaOH, 冰 HAc, NaAc, 硫酸铵, CuSO₄, 苦味酸等。
3. 配制
 - (1) 10% 蛋白液 取新鲜鸡蛋清 30 ml (约 2 个鸡蛋),用蒸馏水配制,注意充分搅拌,最后定容到 300 ml,用少量脱脂棉过滤。滤液放 4℃ 备用,可保存一周。
 - (2) pH4.8 NaAc-HAc 缓冲液 见附录 II
 - (3) 饱和硫酸铵溶液 1 000 ml 称固体 (NH₄)₂SO₄ 850 g 加于 1 000 ml 蒸馏水中,在 70~80℃ 下搅拌促溶,室温中放置过夜,瓶底析出白色结晶,上清即为饱和硫酸铵溶液。
 - (4) 饱和苦味酸溶液 100 ml 取 2 g 苦味酸放入三角烧瓶,加蒸馏水 100 ml, 80℃ 水浴约 10 min 左右完全溶解,于室温下冷却后瓶底析出黄色结晶,上清即为饱和苦味酸,此液可存放数年。

(第四军医大学 王国华)

实验二 蛋白质含量测定

蛋白质含量测定是生物化学与分子生物学的常用实验。根据蛋白质的理化性质,其含量测定方法主要有折射率、比重、紫外吸收、定氮、双缩脲反应、Folin-酚试剂法(Lowry 氏法)、染料法(Bradford 法)等,其中以 Lowry 法及染料法灵敏度较高,方法简便可靠,是一般实验室中最常用的方法。

福林(Folin)-酚试剂法(Lowry 氏法)

一、原理

蛋白质含有两个以上的肽键,在碱性溶液中蛋白质与 Cu²⁺ 形成紫红色络合物(双缩脲反应),

然后这个络合物以及酪氨酸和色氨酸残基,使磷钼酸-磷钨酸试剂(Folin 试剂)还原,产生蓝颜色,蓝色的深浅与芳香族氨基酸的含量成正比,故可作为比色法测定。

这个测定法比双缩脲法灵敏,并适用于酪氨酸和色氨酸的定量测定,对那些含这两个残基与标准蛋白差异较大的蛋白质来说定量有误差。进行测定时,加 Folin 试剂要特别小心,因为 Folin 试剂仅在酸性条件下稳定,但上述还原反应只是在 pH10 的情况下发生,因此,当 Folin 试剂加到碱性的铜与蛋白质溶液中必须立刻混匀,以便在 Folin 试剂被破坏之前,还原反应即能发生。该法可用 500 nm 比色测定,范围为 0.05~0.5 mg 蛋白质/ml。

由于 Folin-酚试剂法使用很广泛,对其干扰因素了解得最多。已知的干扰因素包括 Tris、柠檬酸、琥珀酸、谷氨酸、组氨酸、甘氨酸、甘氨酸甘氨酸等缓冲液;EDTA 等螯合剂;蔗糖、甘油、氨基葡萄糖、甘露糖、果糖等糖类;酚、二巯基苏糖醇、巯基乙醇、谷胱甘肽等还原剂;Triton 和 Lubrol 等去垢剂以及乙烯、乙二醇、载体两性电解质等等。高浓度的尿素、胍、硫酸铵、三氯醋酸、乙醇、乙醚、丙酮、脂质等化合物也对测定有影响。上述干扰因素有些可用对照试验来纠正。

二、操作

(一) 标准曲线的绘制

管 号	0	1	2	3	4	5	6
标准蛋白质溶液/ml	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蒸馏水/ml	0.25	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1	0
试剂 A/ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
混匀,室温放置 10 min,各管再加试剂 B							
试剂 B/ml	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

立即混匀,室温放置 30 min,然后在 500 nm 波长处以 0 号管调 0 点测定各管吸光度(A),以吸光度值为纵坐标,蛋白质浓度为横坐标,绘制标准曲线。

蛋白质浓度/mg·ml ⁻¹	0
A _{500nm}	

* 按标准牛血清白蛋白溶液浓度和每管用量计算

(二) 样品测定

取未知浓度的蛋白质溶液 0.5 ml(注意样品浓度不要超过 0.5 mg/ml,否则要适当稀释),置于试管内,加入试剂 A 2.5 ml,混匀,室温放置 10 min 后,再加试剂 B 0.25 ml,立即混匀,室温放置 30 min 后,测其 500 nm 波长处的吸光度值,对照标准曲线求得样品中蛋白质浓度。

三、材料和试剂

(一) 器材

吸量管,试管,721 型分光光度计

(二) 试剂

1. 试剂 A 由下述三种溶液配制:① 称取 20 g 无水碳酸钠、4 g 氢氧化钠溶解于 1 L 水中;②

称取 0.2 g 硫酸铜溶于 20 ml 水;③ 称取 0.4 g 酒石酸钾钠溶于 20 ml 水。在测定的当天将这三种溶液按 100:1:1 的体积比混合,即为 Folin-酚试剂 A,混合放置 30 min 后使用,混合液只能用一天。三种溶液分开可长期保存。

2. 试剂 B(Folin 试剂) 在 2 L 的磨口回流装置内加入钨酸钠($\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)100 g,钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)25 g,水 700 ml,85% 磷酸 50 ml 及浓 HCl 100 ml,充分混匀后,以小火回流 10 h,再加硫酸锂(LiSO_4)150 g,水 50 ml 和数滴溴水,然后开口继续沸腾 15 min,以便驱除过量的溴,冷却后稀释到 1 000 ml,过滤,溶液呈黄绿色,置于棕色试剂瓶中贮于暗处。使用时将购买的或自制的试剂 B 用标准氢氧化钠溶液滴定,以酚酞为指示剂,而后用水适量稀释,使酸浓度最后为 1 mol/L,此为 Folin 酚试剂 B。

3. 标准牛血清白蛋白溶液 牛血清白蛋白用凯氏定氮法配制成浓度为 0.5 mg/ml 的溶液。

4. 待测蛋白质溶液。

染料法

一、原理

在酸性溶液中染料考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合,此时考马斯亮蓝 G-250 颜色从红色变为蓝色,吸收高峰从 465 nm 移至 595 nm。利用这个原理可测定蛋白质浓度。

该法近年来在某些方面有取代经典的 Lowry 法的趋势,因为它操作简单,反应时间短,染料-蛋白质颜色稳定,抗干扰性强。本法的缺点是:对于测定那些与标准蛋白质氨基酸组成有较大差异的蛋白质,有一定误差,因为不同的蛋白质与染料结合量是不同的,故该法适合测定与标准蛋白质氨基酸组成相似的蛋白质。

二、操作

(一) 标准曲线的绘制

管 号	0	1	2	3	4	5
标准蛋白质溶液/ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
H ₂ O/ml	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
染料溶液/ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质浓度/ml *						
$A_{595\text{nm}}$						

* 按标准牛血清白蛋白溶液浓度和每管用量计算

按表分别向各支试管内加入各种试剂,充分混匀,5 min 后在 595 nm 波长处以 0 号管调 0 点测定各管吸光度值(A)。以吸光度值为纵坐标,蛋白质浓度为横坐标绘制标准曲线。

(二) 样品测定

取 1 ml 样品溶液(约含 25~250 μg 蛋白质),加入染料溶液 5 ml,混匀,5 min 后,测其 595 nm 吸光值,对照标准曲线求得其蛋白质浓度。

三、器材和试剂

(一) 器材

吸量管, 试管, 721 型分光光度计。

(二) 试剂

1. 标准牛血清白蛋白溶液 配制成 0.1 mg/ml 的溶液。
2. 待测蛋白质溶液。
3. 染料溶液 称取考马斯亮蓝 G-250 0.1 g 溶于 95% 酒精 50 ml 中, 再加 85% 的浓磷酸 100 ml, 用水稀释至 1 000 ml, 混匀, 备用。

(第二军医大学 邹鲁峰)

实验三 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量

相对分子质量(relative molecular mass, M_r)是蛋白质的一个重要参数, 研究蛋白质(包括酶)常常要涉及到它。最准确的相对分子质量是根据分子中含有的全部相对原子质量的总和求得, 但对于一般实验室来说是比较困难的。实际上, 可以依据蛋白质的某些理化性质测定其相对分子质量, 诸如渗透压、离心沉降、排阻层析、粘度等。本实验利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)法, 即 SDS-PAGE 法, 测定蛋白质的相对分子质量。该法虽有一定的误差, 但因简便、快速、量微、价廉, 并具有分辨率高、重复性好等特点, 是目前分子生物学中常用的方法之一。

一、原理

用 SDS-PAGE 法测定蛋白质相对分子质量, 可分为圆盘状和垂直板状、连续系统和不连续系统。本实验采用垂直板状不连续系统。所谓“不连续”是指电泳体系由两种或两种以上的缓冲液、pH 和凝胶孔径等所组成。这里仅对一些基本原理作些简要介绍。

(一) 相对分子质量与迁移率的关系

凝胶电泳把大分子混合物分开, 主要依赖于样品中各种分子携带的电荷、分子的大小与形状的差别。利用凝胶电泳测定某一物质的相对分子质量, 必须排除电荷、分子形状等因素(或使其作用减少到忽略不计的程度), 使该物质迁移率(泳动率)的大小仅仅取决于其相对分子质量的大小。在一定条件下, 蛋白质的相对分子质量与电泳迁移率间的关系符合下列公式:

$$\lg M_r = K - b_m$$

式中 M_r 为相对分子质量, K 、 b 可视为常数, m 称为迁移率。这样就可根据一组已知的标准蛋白质相对分子质量的对数和迁移率作图, 横坐标为迁移率, 纵坐标为标准蛋白质相对分子质量的对数, 在半对数坐标纸上可得到标准工作曲线。将未知蛋白质在相同条件下电泳, 根据它的迁移率, 可在标准曲线上求得其相对分子质量。目前, 常用的消除电荷因素的方法, 是在电泳体系中加入一

定量的 SDS。此种阴离子表面活性剂 $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3\cdot\text{Na}^+]$ 能打断氢键和疏水键,并按一定的比例和蛋白质分子结合成复合物,使蛋白质带负电荷的量远远超过其本身原有的电荷,掩盖了各种蛋白分子间天然的电荷差异。现已知道,当 SDS 浓度大于 1 mmol/L 时,大多数蛋白质以“ $1.4\text{ g SDS}/1\text{ g 蛋白质}$ ”的比例相结合。由于在系统中加入还原剂巯基乙醇,它能破坏蛋白质的二硫键,使蛋白质的构象和形状改变,几乎全部呈长椭圆棒状,其短轴约为 1.8 nm ,长轴与蛋白质的相对分子质量成正比。因此,各种 SDS 蛋白质复合物在电泳时的迁移率,不再受原有电荷和分子形状的影响,而只是棒长(即相对分子质量)的函数。

(二) 样品的浓缩效应

在不连续电泳系统中,含有上、下槽缓冲液(Tris - Gly, $\text{pH}8.3$)、浓缩胶缓冲液(Tris - HCl, $\text{pH}6.8$)、分离胶缓冲液(Tris - HCl, $\text{pH}8.8$),两种凝胶的浓度(即孔径)也不相同。在这种条件下,缓冲系统中的 HCl 几乎全部解离成 Cl^- ,两槽中的 Gly($\text{pI}=6.0, \text{pK}_a=9.7$)只有很少部分解离成 Gly 的负离子,而酸性蛋白质也可解离出负离子。这些离子在电泳时都向正极移动。 Cl^- 速度最快(先导离子),其次为蛋白质, Gly 负离子最慢(尾随离子)。由于 Cl^- 很快超过蛋白离子,因此在其后面形成一个电导较低、电位梯度较陡的区域。该区电位梯度最高,这是在电泳过程中形成的电位梯度的不连续性,导致蛋白质和 Gly 离子加快移动,结果使蛋白质在进入分离胶之前,快、慢离子之间浓缩成一薄层,有利于提高电泳的分辨率。

(三) 分子筛效应

蛋白质离子进入分离胶后,条件有很大变化。由于其 pH 升高(电泳进行时常超过 9.0),使 Gly 解离成负离子的效应增加;同时因凝胶的浓度升高,蛋白质的泳动受到影响,迁移率急剧下降。此两项变化,使 Gly 的移动超过蛋白质,上述的高电压梯度不复存在,蛋白质便在一个较均一的 pH 和电压梯度环境中,按其分子的大小移动。分离胶的孔径有一定的大小,对不同相对分子质量的蛋白质来说,通过时受到的阻滞程度不同,即使净电荷相等的颗粒,也会由于这种分子筛的效应,把不同大小的蛋白质相互分开。

关于聚丙烯酰胺凝胶的形成、凝胶浓度以及交联度等基本原理,见本书理论部分的有关内容。

用连续系统的 SDS - PAGE 法也可测定蛋白质的相对分子质量,有人研究了 37 种不同的蛋白质,其结果也较好。

二、操作

(一) 低相对分子质量标准蛋白质样品的制备

按上海东风丽珠生化试剂厂的说明书要求开管分装,即每个包装加入 $200\text{ }\mu\text{l}$ 去离子水充分溶解,然后分装于 20 个小塑料离心管, -20°C 保存。分装后每份体积 $10\text{ }\mu\text{l}$,每种标准蛋白的含量为 $2\text{ }\mu\text{g}$,用时按下述待测样品的加热变性处理。

(二) 待测蛋白质样品的制备

取蛋白样品 0.5 mg ,加入 0.01 mol/L 磷酸缓冲液($\text{pH}7.0$) 1 ml 溶解。以下同标准蛋白质一样,加入等体积的样品缓冲液,混匀,在沸水浴中加热 3 min ,待电泳时用于上样(可在分离胶聚合的间隙中制备)。

(三) 垂直板状 SDS - PAGE 的灌制

按以下各步进行:

1. 安装

按电泳仪(Bio-RAD Mini-PROTEAN II CELL)说明书安装在灌胶架上。

2. 用小锥形瓶,按表实-1 配制分离胶溶液。

表实-1

试 剂/ml	分 离 胶	浓 缩 胶
H ₂ O	1.6	1.4
30% 丙烯酰胺凝胶贮液	2.0	0.33
1.5 mol/L Tris(pH8.8)	1.3	0.25
100 g/L SDS	0.05	0.02
100 g/L 过硫酸铵(AP)	0.05	0.02
TEMED	0.002	0.002

加入 100 g/L AP,立即摇匀,将其迅速、连续地灌注在两块玻板的间隙中,高度距玻板上边约 2 cm。之后,用带有针头的注射器小心地在丙烯酰胺溶液上部覆盖一层去离子水(注意勿冲击胶面),在室温下垂直放置 30 min 左右,使其完全聚合凝固。

3. 倾出(或吸出)覆盖层溶液,用去离子水洗涤顶部 1~2 次,弃去多余的溶液。

4. 另取一个锥形瓶,按表实-1 配制浓缩胶溶液,一旦加入 100 g/L AP,立即摇匀,迅速灌在已聚合的分离胶的上部。随即插入干净的有机玻璃梳子(无气泡),梳齿前沿与分离胶间距离约为 0.5 cm。在室温下使其完全凝固(约 10~15 min)。至此,灌胶结束。

(四) 加样

1. 小心将灌好胶的胶板从灌胶架上取下,按电泳仪说明书所示放入电泳槽中,加入稀释过的电泳缓冲液(Tris-Gly, pH8.3)至高出内侧玻板上边约 0.4 cm。小心移出梳子,如有必要,用微量进样器整理上样槽,扶直歪斜的齿状凝胶(注意:动作要轻)。

2. 用微量进样器吸取已处理好的标准蛋白和待测蛋白样品液 5~10 μ l,按预定顺序,通过缓冲液小心地把样品加在每个小槽的底部凝胶面上。因样品比重大,可在凝胶的顶部形成致密的一层。

(五) 电泳

盖好电泳槽盖,下槽为正极、上槽为负极。接通电泳仪电源,电压调至 50 V(约 8V/cm),样品开始进入上层胶中,逐渐被浓缩(约 30 min 左右)。当染料前沿进入分离胶(下层)时,调至 120 V,继续电泳,直至溴酚蓝接近分离胶底部,调电压至零,切断电源,电泳完毕。

(六) 剥胶

卸下电泳胶板,用刮勺小心撬开玻璃板,使两者分离(防止弄破凝胶和玻板)。在每个样品溴酚蓝区带的中心,用回形针的一端刺成小洞以示标记。如果需要,可切任一个角,对整块凝胶进行方位标记。

(七) 染色和褪色

切去浓缩胶,将整块分离胶浸没在 0.25% 考马斯亮蓝 R250 溶液中,染色 0.5~1 h。取出凝胶,用水漂洗几次,然后加入脱色液,根据情况更换次数,使凝胶背景蓝色褪去,显现清晰的蛋白质色带(在 45℃ 或摇动条件下,可加快脱色)。

(八) 电泳迁移率的计算

测量染料和蛋白质区带移动的距离(cm),即从分离胶电泳起始至染料区带孔洞及蛋白质区带中心位置的距离。

通常以相对迁移率(relative mobility, R_m)表示蛋白质的泳动行为,其涵义和计算方法为:

$$R_m = \frac{\text{样品移动的距离(cm)}}{\text{指示染料移动的距离(cm)}}$$

(九) 标准曲线的制作

取一张半对数纸(即纵轴为对数、横轴为十进制的等分格),参照图实-1填写两坐标轴,并直接用表实-2中的标准蛋白质相对分子质量和 R_m 绘出各实验点,相连后便可得到测定蛋白质相对分子质量的标准曲线。

(十) 待测样品蛋白质相对分子质量的求得

根据实验中得到的待测蛋白质样品的 R_m 数值,从标准曲线上求得其相对分子质量,将结果填在表实-2之中。

表实-2

低相对分子质量 标准蛋白质	相对分子质量	移动距离/cm		相对迁移率(R_m)
		蛋白质	溴酚蓝	
兔磷酸化酶 B	97 000			
牛血清白蛋白	66 200			
兔肌动蛋白	43 000			
牛碳酸酐酶	31 000			
胰蛋白酶抑制剂	21 100			
鸡蛋清溶菌酶	14 400			
待测样品 1				
待测样品 2				

(十一) 如需要,可对实验结果拍照。

三、注意

1. 丙烯酰胺(Acr)和双丙烯酰胺(Bis)有很强的神经毒性,容易吸附在皮肤上,作用有累积性,称量时应小心,最好戴手套、口罩。聚丙烯酰胺可认为无毒,但难免有少量的未能聚合的丙烯酰胺单体,故在整个操作过程中都应注意。

2. 微量进样器针头极易堵塞,吸样后应及时清洗;玻管中的金属芯子不宜拔出,防止弯曲和弄脏。

3. 吸取溶胶的滴管、吸管等,要立即排空和冲洗,以防凝固堵塞。

4. 实验过程中,注意勿弄破平板玻璃。

5. 实验器材和步骤较多,应随时进行整理,结束时认真清洗并放回原位。

四、材料和试剂

(一) 材料

1. DY-1 型电泳仪

2. 垂直板状电泳仪(Bio-RAD Mini-PROTEAN II CELL)

3. 微量进样器、带针头注射器、染色缸、脱色缸、刮勺

4. 刻度尺、小锥形瓶、吸量管、滴管、刀片、回形针

(二) 试剂

1. 低相对分子质量标准蛋白质

含有 6 种已知相对分子质量的蛋白质组合试剂(上海东风丽珠生化试剂厂产品),蛋白质名称及相对分子质量数值列在表实-2 之中(见前)。

2. 待测蛋白质样品

3. 30% 丙烯酰胺凝胶贮液 称取 29 g 无结块的丙烯酰胺(Acr, acrylamide)和 1 g 甲叉-双丙烯酰胺(Bis, N,N'-methylene (Bis)acrylamide),用去离子水溶解(可温热至 37℃ 助溶),定容到 100 ml,滤去不溶物,装入棕色瓶置于 4℃ 保存。

4. 1.5 mol/L Tris(pH8.8)

5. 1.0 mol/L Tris(pH6.8)

6. 100 g/L SDS 称取 SDS 10 g,用 50 ml 水溶解,加水至 100 ml。

7. 5×电泳缓冲液(pH8.3) 称取 Tris 3.78 g, Gly 23.50 g, SDS 1.25 g,加去离子水至 250 ml,溶解,用时稀释 5 倍。

8. 100 g/L 过硫酸铵(AP, ammonium persulfate)溶液 取 1 g 过硫酸铵,加水溶解,并定容至 10 ml,置 4℃ 保存(可用 2 周)。

9. TEMED(四甲基乙二胺, N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)

10. 样品缓冲液 称取蔗糖 2.5 g、SDS 0.46 g、Tris 0.15 g、2-巯基乙醇 1 ml,用水定容至 10 ml,加溴酚蓝 0.01 g,使完全溶解。

11. 染色液(0.25% 考马斯亮蓝溶液) 取 1.25 g 考马斯亮蓝 R250,溶于 227 ml 蒸馏水中,加甲醇 227 ml,再加入冰乙酸 46 ml(近似 5:5:1),搅拌使之充分溶解,必要时滤去颗粒状物质。

12. 脱色液 将甲醇、冰乙酸、水按体积 3:1:6 的比例混合。

(第二军医大学 邹鲁峰)

实验四 等电聚焦法测定蛋白质等电点

一、原理

等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)是 20 世纪 60 年代建立起来的一种蛋白质分离分析手段,多年来发展很快,已成为单相电泳中具有最高分辨率的技术。IEF 的特点是在凝胶柱中加入一种称为两性电解质载体(Ampholine)的物质,从而使凝胶柱在电场中形成稳定、连续和线性 pH 梯度。以电泳观点看,蛋白质最主要特点是它的带电行为,它们在不同的 pH 环境中带不同数量的正电荷或负电荷,只有在某一 pH 时,蛋白质的净电荷为零,此 pH 即为该蛋白质的等电点(isoelectric point, pI)。在电场中,蛋白质分子在大于其等电点的 pH 环境中以阴离子形式向正极移动,在小于其等

电点的 pH 环境中以阳离子形式向负极移动。如果在 pH 梯度的环境中将含有各种不同等电点的蛋白质混合样品进行电泳, 不管混合蛋白质分子的原始分布如何, 都将按照它们各自的等电点大小在 pH 梯度中相对应位置聚集, 最终使不同等电点的蛋白质分子分隔在不同区域, 这种按等电点大小在 pH 梯度某一位置进行聚集的行为即是聚焦。聚焦部位的蛋白质质点的净电荷为零, 测定聚焦部位的 pH 即可知道该蛋白质的等电点。

等电聚焦法用聚丙烯酰胺作支持物与圆盘电泳有很大差异, 前者不利用凝胶的分子筛作用。等电聚焦法消除了扩散作用的影响, 电泳时间愈长, 区带愈窄, 所测物质愈集中, 所以它较一般电泳法的分辨率高。

二、操作

1. 装管 取 2 支玻管 ($\phi 0.5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 或 $\phi 0.25 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$), 两端用金砂磨平, 用 Parafilm (或乳胶橡皮) 紧紧与一端管口相贴以保证封闭管口。封端朝下作为管底, 垂直放置在制胶管架上, 加入 40% 蔗糖 3~4 滴, 然后加第 2 步制好凝胶液于玻管中, 直至离玻管顶端 1 cm 处为止, 上面再以 2~3 滴蒸馏水覆之。注意不要搅动凝胶, 既要保证混合液与空气隔绝, 又要保持其表面平整。

2. 制胶和加样 按下表操作进行制胶和加样。

试剂名称	用量
30% 丙烯酰胺	2.5 ml
两性电解质载体 (pH 3.5~10)	0.75 ml
H ₂ O	15 ml
400 g/L 过硫酸铵	30 μl
TEMED	7 μl
蛋白溶液	0.15 ml

3. 聚合、电泳 装好凝胶液的玻管室温静置进行聚合, 当凝胶表面与水之间出现清晰界面时, 表示聚合完成。用滤纸吸去顶端的水, 剥去管底 Parafilm, 使蔗糖液流出, 并用少量蒸馏水洗涤, 然后将玻管放入圆盘电泳装置中, 上槽装 5% 磷酸溶液, 接正极, 下槽装 20 g/L NaOH 溶液, 接负极, 注意把凝胶与电极液之间的气泡排净, 打开直流电源, 恒压 160 V, 聚焦约 4 h, 当电流接近于零时停止电泳。

4. 聚焦结束后取出凝胶管, 先用蒸馏水将其两端洗几遍, 再用带有长针头 (长约 10 cm) 的注射器, 吸水进行剥胶, 先把长针头插入胶柱与玻管内壁之间, 慢慢旋转玻管, 一边压水一边将针头呈螺旋式推进, 使凝胶条与管壁脱离, 然后用洗耳球对玻管一端轻轻加压, 使凝胶条从玻管内滑出, 标明胶条正负端, 并对凝胶条编号。

5. 将凝胶条平放于胶条托板 (黑色) 上, 测量每一根凝胶条长度并记录于表实-4 中。

6. 固定 将一条量过长度的凝胶放入培养皿中, 加入 12% 三氯乙酸溶液直至凝胶柱被淹没, 固定 2 h 以上, 即可看见白色蛋白带出现。

7. 量出经三氯乙酸固定后的凝胶长度及凝胶条正极端到蛋白质白色沉淀区带中心的距离, 并记录于表实-4。

8. 测定 pH 梯度 取试管 18 支, 每支加 1 ml 蒸馏水, 将另一条未经三氯乙酸溶液固定的凝胶平放在玻璃板上, 按照从正极端到负极端顺序用刀片依次切成 5 mm 长的小段, 共 18 段, 分别置于

有 1 ml 蒸馏水的试管中浸泡过夜,次日测其 pH,附表实-3。

9. 数据处理

(1) pH 梯度曲线制作 以凝胶柱长度为横坐标, pH 为纵坐标作图可得 pH 梯度曲线。由于所测得的每一管之 pH 是 5 mm 长的小段胶条的 pH 混合平均值,作图时应把此 pH 视为 5 mm 小段的中心区 pH,即第一小段的 pH 所对应的胶条长度应为 2.5 mm,依次按 $(5n - 2.5)$ mm 式子类推。

(2) 蛋白质样品等电点的计算 根据蛋白聚焦部位距凝胶条正极端的实际长 L_p ,从 pH 梯度曲线上查到对应 pH 即为该蛋白的等电点。

三、注意事项

1. 等电聚焦电泳的支持介质为聚丙烯酰胺,用聚丙烯酰胺凝胶只可分析相对分子质量小于 30 万的蛋白质(琼脂糖凝胶可分析相对分子质量大至 2 百万的大分子)。在聚丙烯酰胺凝胶中添加甘油,可以增加凝胶的机械稳定性和渗透能力,减少电泳时凝胶表面的渗出水并可以增加凝胶与玻璃的粘着度。

2. 制胶过程中溶液体积视凝胶大小按比例增减,载体两性电解质的量按凝胶厚薄适量增减,过硫酸铵和 TEMED 的量视聚合情况增减。

3. 通常凝胶聚合应在 30 min 到 1 h 内完成,过快地聚合表示过硫酸铵和/或 TEMED 用量过多,此时凝胶太硬易龟裂,且在电泳时易烧胶。聚合太慢,甚至不聚合,则表示此两种试剂用量不当,或凝胶系统中的试剂不纯或已失效,特别要注意过硫酸铵生产日期。

4. 丙烯酰胺凝胶的聚合方式有光聚合和化学聚合二种。光聚合常用核黄素-四甲基乙二胺催化系统,化学聚合常用过硫酸铵-四甲基乙二胺催化系统。后者比较常用。

5. 两性电解质载体有 Ampholine(LKB 公司)、Servalyte(Serva 公司)、Pharmalyte(Pharmacia 公司)及国产两性电解质载体。两性电解质载体的选择主要依据被测蛋白质的大概等电点范围。

6. 样品要脱盐,否则区带扭曲;要彻底溶解,未彻底溶解的颗粒易引起拖尾;样品溶液中可加变性剂如尿素(6~8 mol/L),去污剂等。加样量取决于样品中蛋白质种类及检测方法的灵敏度。一般认为以 0.5~1 mg 蛋白/ml 为宜,最适加样体积约 10~30 μ l,对不稳定样品可进行预电泳。

7. 电极缓冲液应根据两性电解质 pH 范围加以选择,可参见相应产品说明书。

8. 样品可直接加在胶的顶部,亦可以在胶聚合前加入胶的混合物内一起聚合,须视样品的浓度及稳定性而定。如果样品比较浓,且易失活,一般在电泳前加到胶的顶部。为了不使样品接触电极溶液,在加样品后,再将胶管顶部充满 1% 两性电解质。样品也可以经预电泳后再加入,这也要看蛋白质样品对 pH 的敏感程度。

四、材料和试剂

1. 30% 丙烯酰胺 称取 29.1 g 丙烯酰胺,0.9 g 甲叉丙烯酰胺加水溶解,定容至 100 ml,过滤,低温贮存备用。丙烯酰胺有毒,避免皮肤直接接触。

2. 两性电解质载体(Ampholines pH3.5~10) 商品 Ampholine 浓度为 40%,可直接使用,取用时须用消毒的器具。

3. 蛋白质溶液 纯牛血清白蛋白 7 mg,溶于 1 ml 蒸馏水中。

4. 400 g/L 过硫酸铵 称取过硫酸铵 0.8 g, 用 2 ml 水溶解, 临用时配制。
5. TEMED
6. 5% 磷酸溶液 85% 磷酸 29.4 ml 加水稀释至 500 ml,
7. 20 g/L NaOH NaOH 10 g 溶于蒸馏水定容至 500 ml。
8. 染色液 取考马斯亮蓝 R250 0.1 g, 冰乙酸 10 ml, 甲醇 35 ml, 加蒸馏水溶解后定容至 100 ml, 棕色瓶保存。
9. 固定液 称取三氯乙酸 125 g, 加水溶解并定容至 1 000 ml。
10. 漂洗液 冰乙酸 70 ml, 加水稀释至 1 000 ml
11. 器材 电泳仪、圆盘电泳槽、7 号穿刺针头、凝胶管、注射器等。

五、附表

表实-3 pH 梯度曲线的制作

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
pH 所对应的凝胶柱长度/mm	2.5	7.5	12.5	17.5	22.5	27.5	32.5	37.5	42.5	47.5	52.5	57.5	62.5	67.5	72.5	77.5	82.5	87.5
pH 梯度																		

表实-4 蛋白质样品等电点的求算

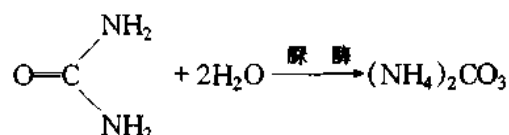
l_1 (凝胶柱固定前长度)/mm	l_2 (凝胶柱固定后长度)/mm	l_p (蛋白质白色沉淀区带中心距凝胶柱正极端的长度)/mm	$L_p = l_p \times (l_1/l_2)$ (蛋白质聚焦部位距凝胶柱正极端的实际长度)/mm	pI (根据 pH 梯度曲线所得出的等电点)

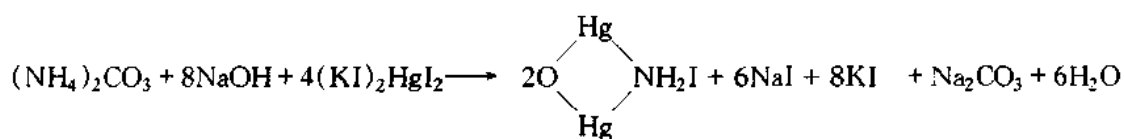
(华西医科大学 朱红、方定志)

实验五 脲酶 K_m 值简易测定

一、原理

脲被脲酶催化分解, 产生碳酸铵。碳酸铵在碱性溶液内与奈氏试剂作用, 产生橙黄色的碘化双汞铵, 在一定范围内, 呈色深浅与碳酸铵多少成正比。故借比色法可测定单位时间所产生碳酸铵量, 从而求得酶促反应速度。其反应式如下:





碘化双汞铵(橙黄色)

在保持恒定的合适条件(时间、温度及 pH)下,以同一浓度的脲酶催化不同浓度的脲分解,于一定限度内,酶促反应速度成正比,因此,用酶促反应速度倒数($1/v$)为纵坐标,脲浓度倒数($1/c$)为横坐标,依 L、K 法作图,即可求出脲酶的 K_m 值。

二、操作

取试管 5 支,编号依下表加入试剂

管 号	1	2	3	4	对 照
脲液终浓度/(mol·L ⁻¹)	1/100	1/150	1/200	1/250	1/250
脲稀释液加入体积/ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
浓度/(mol·L ⁻¹)	1/20	1/30	1/40	1/50	1/50
1/15 mol/L PB(pH7.0)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
脲酶液/ml	0.2	0.2	0.2	0.2	—
煮沸脲酶液/ml	—	—	—	—	0.2
摇匀,37℃水浴 15 min					
100 g/L ZnSO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
蒸馏水	3	3	3	3	3
0.5 mol/L NaOH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
充分摇匀,室温下静放 5 min,过滤,另取 5 支中试管,同上编号,按下表加入试剂。					
滤液/ml	1	1	1	1	1
蒸馏水/ml	2	2	2	2	2
显色液/ml	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75

迅速摇匀,用 72 型分光光度计,420 nm,以对照调 0,测定各管 A 值。作图:以脲液终浓度 $[1/c]$ 为横坐标, $1/A$ ($1/v$) 为纵坐标作图,然后依 $[1/c]$ 找出对应 $1/A$ 点,将各点连成延长与 $[1/c]$ 轴相交,得 $-1/K_m$,表示即以 $K_m = 1 \times 10^{-4}$ mol/L。

三、注意事项

1. 操作中,每加一样试剂请务必摇匀,尤其在 37℃ 保温后和加显色液二步。
2. 变性脲酶液,要煮沸完全,沸后继续加热片刻,以防空白管读数偏高。
3. 一些重金属离子、硫胺、蛋白质等可影响酶的活性,故实验后务必按洗洁精刷洗→大量自来水冲洗→蒸馏水三步彻底清洁试管、漏斗等玻璃器皿,以防影响酶的活性,确保下次实验结果的准确性。
4. pH、离子强度、温度、试管的洁净度等均可影响酶的活性,故务必固定实验条件,严格按操作程序,变化任何一个因素,都要做预实验,做到心中有数。
5. 豆粉原料不同,所得结果也不一样。由黄豆、黑豆、大豆中提取的脲酶所得 K_m 值较一致,红豆、江豆不宜作为提取脲酶的原料。

四、材料和试剂

1. 主要材料 恒温水浴锅, 72 型分光光度计, 小漏斗, 滤纸, 移液器等。
2. 主要试剂 豆粉, 无水酒精, 尿素 (AR), Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 , 硫酸锌, NaOH , 酒石酸钾钠, KI , 碘, 汞等。
3. 配制
 - (1) 脲酶液 取豆粉 2 g 移入 250 ml 三角烧瓶, 加 30% 酒精 100 ml, 连续摇 15 min, 室温下静止 1~4 h, 离心或脱脂棉过滤, 收上清备用 (上清必须清亮、透明)。
 - (2) 0.1 mol/L 脲液 取尿素 0.6 g 加水溶解, 稀释至 100 ml。
 - (3) 1/15 mol/L PB (pH7.0) 1/15 mol/L Na_2HPO_2 、1/15 mol/L KH_2PO_4 , 见附录 II
 - (4) 奈氏试剂
母液: 取 KI 150 g、碘 110 g、水 100 ml、汞 140~145 g 同置于 500 ml 平底烧瓶内, 强力振荡 7~15 min, 待碘之红色将褪尽, 用冷水冷却, 继续振荡至有绿色出现为止, 倾出上清液, 用少许水冲洗剩余之汞, 将冲洗液与上清液合并, 用水稀释至 2 000 ml, 贮于褐色瓶中。
应用液: 向 1 000 ml 量筒加入母液及蒸馏水各 150 ml, 摇匀后, 再加入 100 g/L NaOH 至 1 000 ml, 充分混匀后, 用棕色瓶可长期保存。
 - (5) 100 g/L 硫酸锌
 - (6) 100 g/L 酒石酸钾钠
 - (7) 0.5 mol/L NaOH
 - (8) 显色液 将 100 g/L 酒石酸钾钠和奈氏试剂应用液按 1:2 混合即成显色液 (临用前混合)

(第四军医大学 王国华)

实验六 碱性磷酸酶的分离纯化

一、原理

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP 或 ALP, Ec 3.1.3.1) 是一种底物特异性较低, 在碱性环境中能水解多种磷酸单酯化合物的酶, 需要镁和锰离子为激活剂。研究发现 AKP 具有磷酸基团转移活性, 能将底物中的磷酸基团转移到另一个含有羟基的接受体上, 如磷酸基团的接受体是水, 则其作用就是水解。碱性磷酸酶最适 pH 范围为 8.6~10, 主要存在于小肠粘膜、肾、骨骼、肝和胎盘等组织的细胞膜上。血清 AKP 主要来自肝, 小部分来自骨骼。分离纯化的方法与一般蛋白质的分离纯化方法相似, 常用中性盐析法、电泳法、层析法, 有机溶剂沉淀法等方法分离纯化。有时需多种方法配合使用, 才能得到纯净的酶蛋白。

该实验利用有机溶剂分步沉淀法, 从兔肝中提取碱性磷酸酶。用 30% 乙醇、33% 丙酮提取时, AKP 溶于 30% 乙醇、33% 丙酮, 离心后弃沉淀以除去杂质和杂质蛋白, 再将 AKP 用 60% 乙醇、50% 丙酮提取时, AKP 不溶于 60% 乙醇、50% 丙酮, 离心后弃上清除去杂质和杂质蛋白, 获得较纯

的碱性磷酸酶。

酶的比活性是指每单位重量(mg)酶蛋白样品中含的酶活性单位,随着酶蛋白逐步被纯化,其比活性随之逐步升高,因此,比活性可以用来鉴定酶的纯化程度。测定比活性时须测定每毫升样品中蛋白质的毫克数及酶的活性单位。AKP 活性测定采用磷酸苯二钠法,以磷酸苯二钠为底物,被碱性磷酸酶水解后,产生游离酚和磷酸盐,酚在碱性溶液中与 4-氨基安替比林作用,经铁氰化钾氧化产生红色的醌类衍生物。根据红色深浅就可测出酶的活性。碱性磷酸酶蛋白含量测定采用 Marionm bradford 法,利用考马斯亮蓝与蛋白着色,在一定浓度范围内蛋白质含量与颜色深浅成正比。最后根据测得的酶蛋白毫克数及酶活性单位数计算出比活性,鉴定酶的纯化程度。

二、操作

(一) 分离纯化

1. 匀浆 称取新鲜兔肝 2 g,剪碎后,置于玻璃匀浆器中加入 0.01 mol/L 醋酸镁及醋酸钠混合液 6 ml,在电动匀浆器中匀浆 3~4 min,匀浆液倒入刻度离心管,记录体积。取 0.1 ml 于另一试管中,加 4.9 ml pH 8.8 Tris 醋酸镁缓冲液稀释,作为 A 液待测比活性用。

2. 提取 加 2 ml 正丁醇于匀浆液中,用玻棒充分搅拌 2 min,室温放置 30 min,纱布过滤。滤液置于刻度离心管中。

3. 丙酮沉淀 滤液中加入等体积的冷丙酮,立刻混匀后离心 3 000 r/min,5 min。将上清液倒弃,在沉淀中加入 0.5 mol/L 醋酸镁 4 ml,用玻棒充分搅拌使其溶解,同时记录悬液体积。取 0.1 ml 于另一试管中,加入 pH 8.8 Tris 醋酸镁缓冲液 4.9 ml 混匀,作为 B 液待测比活性用。

4. 分步分离 于混悬的悬液中加入冷 95% 乙醇,使乙醇最终体积分数达 30%,混匀后立即离心 2 000 r/min,5 min,将上清液倒入另一离心管,弃沉淀。上清液中加入冷 95% 乙醇,使乙醇最终体积分数达 60%,混匀后离心 3 000 r/min,5 min,上清液倒弃,沉淀中加入 0.01 mol/L 醋酸镁及醋酸钠混合液 4 ml,充分搅拌,使其完全混悬。

5. 重复上述操作,在悬液中加入冷 95% 乙醇,使其最终体积分数达 30%,混匀后离心 2 000 r/min,5 min,将上清液倒入另一离心管中,弃沉淀。上清液中加入 95% 乙醇,使其最终体积分数达 60%,混匀后离心 3 000 r/min,5 min,上清液倒弃,沉淀中加入 0.5 mol/L 醋酸镁 3 ml 充分混悬,并记录体积,取 0.1 ml 加 pH 8.8 Tris 醋酸镁缓冲液 0.9 ml 混匀,作为 C 液待测比活性用。

6. 其余悬液中加入冷丙酮,使丙酮终体积分数为 33%,混匀后离心 2 000 r/min,5 min,弃沉淀,上清液中加入冷丙酮,使丙酮终体积分数达 50%,混匀后离心 3 000 r/min,15 min,弃上清液,沉淀中加入 pH 8.8 Tris 醋酸镁缓冲液 5 ml,混匀后离心 3 000 r/min,5 min,上清液即为纯化酶液,作为 D 液用于比活性测定。

(二) 碱性磷酸酶的活性测定(磷酸苯二钠法)

1. 取试管 6 支编号,按下表操作

管 号	A	B	C	D	标准	空白
各阶段稀释酶液/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	/	/
酚标准液(0.1 mg/ml)/ml	/	/	/	/	0.1	/
pH8.8 Tris 醋酸镁缓冲液/ml	/	/	/	/	/	0.1
预热至 37℃ 复合底物液/ml	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

2. 加入复合底物液后,立即混匀,在 37℃ 水浴中准确保温 15 min。保温结束后,各管加入 0.5% 铁氰化钾液 2.0 ml,立即混匀以终止酶促反应,静置 15 min 显色后,在 510 nm 波长下比色。

3. 酶活性单位计算:在 37℃ 下保温 15 min,产生 1 mg 酚,为该酶 1 个活性单位。故每毫升酶液中的酶活性单位为:

$$\frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{标}}} \times \text{标准管中酚含量} \times \frac{1}{0.1} \times \text{稀释倍数}$$

(三) 碱性磷酸酶蛋白含量测定

1. 取试管 6 支编号,按下表操作:

试 剂	A 液	B 液	C 液	D 液	对照	标准
各阶段酶液/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	/	/
pH8.8 Tris-磷酸镁缓冲液/ml	/	/	/	/	0.1	/
蛋白质标准液/ml	/	/	/	/	/	0.1
显色液/ml	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

各管充分混匀,2 min 以后在波长 595 nm 处比色。

2. 蛋白含量计算

$$\frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{标}}} \times \text{标准管蛋白含量} \times \frac{1}{0.1} \times \text{稀释倍数}$$

(四) 比活性计算

$$\text{碱性磷酸酶比活性} = \frac{\text{每毫升样品的酶活性单位}}{\text{每毫升样品蛋白毫克数}}$$

(五) 将实验结果填入下表,并计算出各阶段 AKP 的纯化倍数及得率。

分离阶段	蛋白质/(mg/ml)	酶活性/(U/ml)	比活性/(U/mg)	纯化倍数	得 率
A					
B					
C					
D					

三、注意事项

1. 有机溶剂必须预先冷冻。
2. 提取过程中有机溶剂终浓度应计算正确,加量准确。
3. 分清实验过程中每次离心后保留的是上清液,还是沉淀。
4. 由前碱性磷酸酶分离纯化过程可见,A 液、B 液均稀释 50 倍,C 液稀释 10 倍,D 液未稀释,如 D 液颜色过深则需适当稀释后再测定。
5. 比色应在显色后 1 h 内完成。

四、材料和试剂

1. 0.5 mol/L 醋酸镁溶液 称取醋酸镁 ($M_r = 214.45$) 107.25 g 溶于蒸馏水中, 稀释至 1 000 ml。

2. 0.1 mol/L 醋酸钠溶液 称取醋酸钠 ($M_r = 82.03$) 8.2 g 溶于蒸馏水中, 稀释至 1 000 ml。

3. 0.01 mol/L 醋酸镁及醋酸钠混合液 取 0.5 mol/L 醋酸镁 20 ml, 0.1 mol/L 醋酸钠 100 ml, 混匀后加蒸馏水稀释成 1 000 ml。

4. 丙酮(AR)。

5. 95%乙醇(AR)。

6. 正丁醇(AR)。

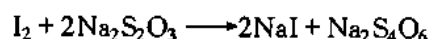
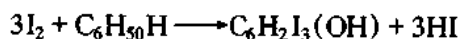
7. pH 8.8 Tris 醋酸镁缓冲液 称取三羟甲基氨基甲烷(Tris) 12.1 g, 用蒸馏水溶解, 并稀释至 1 000 ml 即成 0.1 mol/L Tris 溶液。取 0.1 mol/L Tris 溶液 100 ml, 加蒸馏水约 800 ml, 再加 0.1 mol/L 醋酸镁 100 ml, 混匀后用 1% 醋酸调节 pH 至 8.8, 再用蒸馏水稀释至 1 000 ml 即可。

8. 复合底物液 称取磷酸苯二钠·2H₂O 6 g, 4-氨基安替比林 3 g, 分别溶于煮沸并冷却后的蒸馏水中, 两液混合并稀释至 1 000 ml, 加入 4 ml 氯仿防腐。贮存于棕色瓶内, 置冰箱中保存, 可用一周。临用时将此液用 0.1 mol/L pH 10 碳酸盐缓冲液等量混合即可。

9. 0.1 mol/L pH 10 碳酸盐缓冲液 称取 Na₂CO₃ 6.36 g 及 NaHCO₃ 3.36 g 溶于蒸馏水中并稀释至 1 000 ml。

10. 5 g/L 铁氰化钾液 称取铁氰化钾 5 g, 硼酸 15 g, 分别溶于 400 ml 蒸馏水中, 溶解后将两液混合。

11. 酚标准液 称取重结晶酚(或 AR 酚) 1.5 g 溶于 0.1 mol/L HCl 中, 并用此盐酸稀释至 1 000 ml 即成贮备液。取上述酚液 25 ml 于 250 ml 碘量瓶中, 加 50 ml 0.1 mol/L NaOH 并加热至 65℃, 再加入 0.1 mol/L 碘液 25 ml, 盖好碘量瓶塞, 放置 30 min 后, 加浓盐酸 5 ml, 再加 0.1% 淀粉液(新配制)作指示剂, 用 0.1 mol/L 标准硫代硫酸钠滴定, 滴定反应如下:



根据上述反应, 3 分子碘 ($M_r = 254$) 与 1 分子酚 ($M_r = 94$) 起作用, 因此每毫升 0.1 mol/L 碘溶液(含碘 12.7 mg)所相当的酚毫克数为: $\frac{12.7 \times 94}{3 \times 254} = 1.567$ 。假设 0.1 mol/L 碘液 25 ml 与 25 ml 酚液作用后剩余的碘用 Na₂S₂O₃ 滴定至 x ml, 则 25 ml 酚溶液中所含酚量为 (25 - x) × 1.567 mg, 由此推算酚贮备液浓度。最后将贮备液稀释成 0.1 mg/ml 应用液。

12. 蛋白标准 称取牛血清白蛋白 100 mg 溶于 9 g/L NaCl 溶液, 至 100 ml。

13. 显色液 称取考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 ml 95%乙醇, 加入 100 ml 850 g/L 磷酸(质量浓度), 用蒸馏水稀释至 1 000 ml。

终浓度:

考马斯亮蓝 G-250 0.1 g/L

乙醇 4.7%

- 磷酸 85 g/L
14. 匀浆器
 15. 刻度离心管(10 ml)
 16. 玻棒
 17. 离心机
 18. 试管(10 ml)
 19. 恒温水浴
 20. 722 型分光光度计

(华西医科大学 朱红、方定志)

实验七 血清白蛋白、 γ -球蛋白的分离纯化及鉴定

分离纯化

一、原理

欲研究蛋白质的分子结构、组成和某些物理化学性质以及生物学功能等,需要纯的均一的甚至是晶体的蛋白质样品。分离和纯化蛋白质的各种方法都是基于不同蛋白质之间各种特性的差异,如分子的大小和形状、等电点(pI)、溶解度、吸附性质和对其他分子的生物学亲和力,采用的程序一般分三步,预处理→粗分级→细分级。

本实验是利用盐析(粗分级)、离子交换层析(细分级)来分离、纯化血清白蛋白和 γ -球蛋白(目标蛋白):首先用盐析作初步分离,在半饱和硫酸铵溶液中,血清球蛋白沉淀下来,经离心后上清中主要含白蛋白。第二步用凝胶层析法脱盐,蛋白质的相对分子质量较硫酸铵大得多,选择适宜的凝胶分级范围,依分子筛效应,除去粗分离样品中盐类。最后经离子交换层析纯化目标蛋白,利用蛋白质的 pI、选择合适的 pH 缓冲溶液、改变溶液的离子强度、以使目标蛋白和杂蛋白分开,经脱盐的样品溶解在 0.02 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH6.5)中,加到二乙基氨基乙基(DEAE)纤维素层析柱上,在此 pH 时,DEAE 纤维素带有正电荷,能吸附带负电荷的白蛋白(pI 为 4.9)、 α -及 β -球蛋白(绝大多数 α -及 β -球蛋白的 pI 均小于 6)。而 γ -球蛋白(pI 约 7.3)带正电荷,不被吸附故直接流出,此时收集所得即为提纯的 γ -球蛋白。提高盐浓度(用 0.06 mol/L 醋酸铵),离子交换柱上的 β -球蛋白及部分 α -球蛋白可被洗脱下来。继而将盐浓度提高至 0.3 mol/L 醋酸铵,则白蛋白被洗脱下来,此时收集的即为较纯的白蛋白(尚混有少量 α -球蛋白)。

收得的蛋白质可进行纯度和含量的测定。

二、操作

(一) 层析柱的准备

1. 葡聚糖凝胶 G-25 层析柱

(1) 凝胶的准备 称取葡聚糖凝胶 G-25(粒度 50~100 目)干胶(100 ml 凝胶床需干胶 25 g),按每克干胶加入蒸馏水约 50 ml,轻轻摇匀,置于沸水浴中 1 h 并经常摇动使气泡逸出,取出冷却。凝胶沉淀后,倾去含有细微悬浮物的上层液,加入 2 倍量 0.02 mol/L NH_4Ac (pH 6.5)缓冲液混匀。静置片刻待凝胶颗粒沉降后,倾去含细微悬浮的上层液。再用 0.02 mol/L NH_4Ac (pH 6.5)重复处理一次。

(2) 装柱 选用细而长层析柱(1 cm×25 cm),柱出口端套上粗而短聚乙烯管,下端内塞一小段浸泡 0.02 mol/L NH_4Ac 、除去气泡的石棉网或海绵(不宜太紧或太松,以凝胶粒不致漏出而又不影响流速为好)。将管垂直固定于架上,管内加入少量 0.02 mol/L NH_4Ac ,再将经上述处理的凝胶粒悬液连续注入层析管,直至所需凝胶床高度(20 cm)。装柱时应注意凝胶粒均匀,凝胶床内不得有界面、气泡,床表面应平整。装柱后,层析柱接上恒压贮液瓶,调节流速约 2 ml/min,用 0.02 mol/L NH_4Ac 洗涤平衡。

(3) 再生及保存 此凝胶层析柱可反复使用。每次用后以所需的缓冲液洗涤平衡后即可再用。

久用后,若凝胶床表层有沉淀物等杂质滞留,可将表面一层凝胶粒吸出,再添补新的凝胶;若凝胶床内出现界面、气泡或流速明显减慢,应将凝胶粒倒出,重新装柱。为防止凝胶霉变,暂不用时应当用含 0.2 g/L NaN_3 的缓冲液洗涤后放置,久不用时宜将凝胶粒由柱内倒出,加 NaN_3 至 0.2 g/L,湿态保存于 4℃ 冰箱但应严防低于 0℃,以免冻结损坏凝胶粒。

2. DEAE-纤维素层析柱

(1) 酸碱处理 DEAE(cm)-纤维素(cellulose)均可按 0.5 mol/L NaOH →0.5 mol/L HCl →0.5 mol/L NaOH (碱→酸→碱)程序处理。称取 DEAE-cellulose 干粉,按干重 1:(10~15)之比,先于 0.5 mol/L NaOH 浸泡 30 min、水洗至 pH 7.0,改用 0.5 mol/L HCl 浸泡 30 min、水洗至 pH 4.0,再用 0.5 mol/L NaOH 浸泡 30 min,后水洗至 pH 7.0。

(2) 装柱、平衡 选用短而粗的层析柱(1 cm×15 cm),柱出口端套上细而长聚乙烯管,将经上酸碱处理的 cellulose 用 0.02 mol/L NH_4Ac (pH 6.4)浸泡,滴入醋酸调节 pH,搅拌、放置 10 min 后, pH 应为 6.5。倾去上清液,装柱,柱床体积约 1 cm×6 cm。装柱时同应注意装得均匀,床内不得有界面、气泡,表面要平整。装柱后接上恒压贮液瓶,用 0.02 mol/L NH_4Ac 洗涤平衡。

(3) 再生及保存 纤维素用过一次样品分离后,可用 1.5 mol/L NaCl -0.3 mol/L NH_4Ac 缓冲液流洗,再用 0.02 mol/L NH_4Ac 缓冲液(pH 6.5)洗涤平衡后可重复使用。若柱床顶部有洗脱不下来的杂质,应将顶层的纤维素吸弃,补添新的、经酸碱处理过的 DEAE 纤维素,并用缓冲液流洗平衡。多次使用后如杂质较多或流速过慢,可将纤维素倒出,先用 1.5~2 mol/L NaCl 浸泡,水洗,再如上述用酸碱处理后重新装柱。如暂不使用,应以湿态(在柱中或倒出)保存在含 1% 正丁醇的缓冲液中,以防霉变。

(二) 分离、纯化

1. 盐析 取 0.5 ml 血清(人或动物血清均可),边摇边缓慢滴入 0.5 ml 饱和硫酸铵,混匀后室温下静止 10 min,3 000~5 000 r/min 离心 10 min,用点滴管小心吸出上层清液(尽量全部吸出,但不得有沉淀物),作为纯化白蛋白之用。沉淀加入 0.6 ml 蒸馏水,振摇使之溶解,作为纯化 γ -球蛋白用。

2. 脱盐

(1) 上样 用经 0.02 mol/L NH_4Ac 流洗平衡 G-25 层析柱, 取下恒压贮液瓶塞, 小心控制柱下端聚乙烯管, 使柱上的缓冲液面刚好下降到凝胶床表面, 柱下面用 10 ml 刻度量筒接液, 以便了解加样后液体的流出量。立即用细长点滴管将经盐析所得的粗制蛋白质溶液小心而缓慢地加到柱床表面, 放低聚乙烯管使样品进入凝胶床至液面降至床表面为止。用 2 ml 0.02 mol/L NH_4Ac 洗涤层析柱壁, 将其放入凝胶床后, 重复三次以洗净沾在管壁上的蛋白质样品液。接上恒压贮液瓶。

(2) 收集 继续用 0.02 mol/L NH_4Ac 流洗, 在反应板凹孔内每孔加 2 滴 200 g/L 磷基水杨酸, 随时检查流出液中是否含有蛋白质, 若流出液滴入凹孔接触到磷基水杨酸溶液时, 衬着黑色背景观察可见白色混浊或沉淀, 表示已有蛋白质流出。立即收集流出的蛋白质液体, 白蛋白脱盐时可继续收集 3~4 管, 每管收集 15 滴 (约 1 ml), 收集的各管中取 2 滴流出液于反应板各孔内, 加 1 滴 10 g/L BaCl_2 检查有无 SO_4^{2-} , 将无 SO_4^{2-} 的各管合并, 有 SO_4^{2-} 的弃去。 γ -球蛋白脱盐时可继续收集 2~3 管, 每管收集 10 滴, 用 10 g/L BaCl_2 检查有无 SO_4^{2-} , 将无 SO_4^{2-} 、蛋白质浓度最高的管合并, 待纯化。

(3) 平衡 收取蛋白质后的凝胶层析柱继续用 0.02 mol/L NH_4Ac 流洗, 用 10 g/L BaCl_2 检查流出液, 当检查为阴性后, 继续洗涤 1~2 个柱床体积。凝胶层析柱即已再生平衡, 可再次使用。

3. 纯化

(1) 准备 将经上流洗平衡 DEAE-cellulose 层析柱, 取下其恒压贮液瓶塞, 小心控制柱下端聚乙烯管, 使柱上缓冲液面刚好下降到 cellulose 床表面, 柱下用 10 ml 刻度量筒收集液体, 以便了解加样后液体流出量。在反应板凹孔内每孔加 2 滴 20% 磷基水杨酸, 随时准备检测流出液中是否含有蛋白质。

(2) 纯化 γ -球蛋白 缓慢将脱盐后 γ -球蛋白样品加到柱上, 调节层析柱下端的聚乙烯管, 使样品进入柱床内, 至液面降到床表面为止。小心用 1 ml 0.02 mol/L NH_4Ac 缓冲液洗涤沾在管壁上的蛋白质样品, 然后将其放入床内, 并重复一次。继续用缓冲液流洗, 并随时用 200 g/L 磷基水杨酸检查流出液中是否含蛋白质, 当见轻微白色混浊 (约流出一个柱床体积), 立即连续收集 3 管, 每管 10 滴, 此不被纤维素吸附的蛋白质即为纯化的 γ -球蛋白。取其中蛋白质浓度高的两管留作含量测定和纯度鉴定用。继续流洗 2 个柱床体积, 待纯化白蛋白。

(3) 纯化白蛋白 脱盐后白蛋白样品上柱后, 改用 0.06 mol/L NH_4Ac 缓冲液 (pH6.5) 洗涤, 流出约 30 ml (其中含 α -及 β -球蛋白) 后, 将柱上的缓冲液面降至与纤维素床表面平齐。然后改用 0.3 mol/L NH_4Ac 缓冲液 (pH6.5) 洗脱, 并用 20% 磷基水杨酸检查流出液是否含有蛋白质。由于纯化的白蛋白仍然结合有少量胆色素等物质, 故肉眼可见一层浅黄色的成分被 0.3 mol/L NH_4Ac 缓冲液洗脱下来, 大约改用 0.3 mol/L NH_4Ac 洗脱约 4 ml 时, 即可试出有蛋白质白色混浊, 立即连续收集 3 管, 每管 10 滴, 此即为纯化的白蛋白液, 取其中蛋白质浓度高的两管留作含量测定和纯度鉴定用。用过的 DEAE-cellulose 层析柱, 应重新再生平衡, 方法如下, 先用 20 ml 1.5 mol/L NaCl -0.3 mol/L NH_4Ac 流洗, 再用 40 ml 0.02 mol/L NH_4Ac (pH6.5) 流洗平衡即可。

三、注意事项

1. 准确配制 NH_4Ac 缓冲液并严格调整其 pH 至 6.5。
2. 所用血清应新鲜, 无沉淀物。
3. 为使试验成功, 层析时应特别注意以下几点:

(1) 严防空气进入层析柱床内,小心控制柱下端聚乙烯管,使柱上缓冲液刚好下降到柱床表面。

(2) 保持层析柱床表面完整,上样或加缓冲液时,动作应轻、慢,切勿将柱床表面冲起。

(3) 上样时,点滴管应沿柱上端内壁加入样品,切勿将点滴管插入过深,避免管尖部折断在层析柱内。

(4) 流洗时注意收集样品,切勿使样品跑掉,并注意层析柱不要流干,进入气泡。

4. 本实验白蛋白结果很明显, γ -球蛋白极易跑掉,防止方法:一是增加血清用量(人血清 1~2 倍,动物血清 3~4 倍);二是加样后,随时检测,有轻微乳白色沉淀,立即收集。

5. 切勿将检查蛋白质和检查 SO_4^{2-} 的试剂搞混,因二者与相应物质生成的沉淀均为白色。

6. 用过层析柱必须再生、平衡。

四、材料和试剂

1. 主要材料 pH 计,层析柱(1 cm×15 cm、1 cm×25 cm),固定架,聚乙烯管(不同规格),凹孔反应板,水浴锅等。

2. 主要试剂 醋酸铵(NH_4Ac),NaCl,硫酸铵,磺基水杨酸, BaCl_2 等。

3. 试剂

(1) 0.3 mol/L NH_4Ac 缓冲液(pH6.5) 1 000 ml 称取 NH_4Ac 23.13 g,加蒸馏水 800 ml 溶解,用 pH 计在电磁搅拌下滴入稀氨水或稀 HAc,准确调 pH6.5,再加蒸馏水至 1 000 ml。

(2) 0.06 mol/L NH_4Ac (pH6.5) 取 0.3 mol/L 用蒸馏水作 5 倍稀释。

(3) 0.02 mol/L NH_4Ac (pH6.5) 取 0.06 mol/L 用蒸馏水作 3 倍稀释。

上述三种缓冲液必须准确配制,并用 pH 计准确调整 pH,用蒸馏水稀释后应再用 pH 计测试 pH。由于 NH_4Ac 是挥发性盐类,故溶液配制时不得加热,配好后必须密塞保存,以防 pH 和浓度发生改变,否则将影响所分离的蛋白质纯度。

(4) 1.5 mol/L NaCl-0.3 mol/L NH_4Ac 称取 NaCl 87.7 g 溶于 0.3 mol/L NH_4Ac (pH6.5) 中至 1 000 ml。

(5) 饱和硫酸铵液 称 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 850 g 加入 1 000 ml 蒸馏水中,在 70~80℃ 水浴中搅拌促溶,室温下放置过夜,瓶底析出白色结晶,上清即为饱和硫酸铵液。

(6) 200 g/L 磺基水杨酸

(7) 10 g/L BaCl_2

电 泳

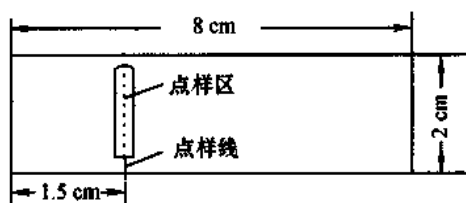
一、原理

血清中各种蛋白质的等电点不同,在 pH8.6 的巴比妥缓冲液中,各种蛋白质所带的净电荷量不相等,加上蛋白质分子大小不相同,在电场中移动的速度就不等,例如,白蛋白等电点比其他蛋白质低,在 pH8.6 时带的负电荷比其他蛋白质多,加上白蛋白的分子较小,因此在电场中比其他蛋白质移动速度快。这样,血清蛋白质在醋酸纤维素薄膜上就可以形成区带,用以分离和分析蛋白质。

二、操作

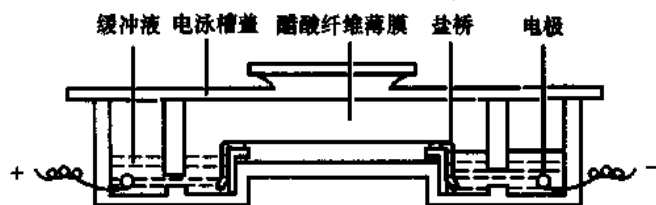
1. 薄膜准备 将醋酸纤维素薄膜切成 $8\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 条状(或根据需要决定薄膜大小),在薄膜一端 1.5 cm 处用铅笔轻轻画一条线(点样线),浸入巴比妥缓冲液中至完全浸湿均匀(浸泡所需时间随薄膜出厂质量而异,一般需浸泡 20 min 或更长时间)。用镊子取出浸透的薄膜,夹在两层滤纸中间,轻轻按压,吸去多余的液体。

2. 点样 用管内较尖的血色素吸管或其他点样管吸取样品 $2\sim 3\text{ }\mu\text{l}$ (血清、纯化的白蛋白或 γ -球蛋白液等样品,若该样品液浓度较稀时,要适当增加其量),涂在玻片的一端截面上(玻璃宽度应小于薄膜宽度),然后将沾有样品之玻片截面与纤维薄膜点样线处轻轻接触,样品即呈一条线“印”在薄膜上,使样品尽量点得细窄而均匀。



图实-2 点样示意图

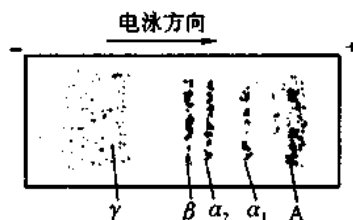
3. 电泳 已点好样品的薄膜架在铺有滤纸盐桥的电泳槽上,使点样端靠近阴极,膜应轻轻拉平,如下图。



图实-3 电泳槽剖面图

电泳槽加盖密封,通电,控制电流强度为 $0.7\sim 0.8\text{ mA/cm}$ 膜宽,当白蛋白(仔细观察可见淡黄色)移动约 3 cm 即可切断电源停止电泳,一般通电 $40\sim 60\text{ min}$ 。

4. 染色和漂洗 取下薄膜,立即浸入染色液中 10 min 。取出移入 2.5% 醋酸中漂洗脱色,每隔 5 min 换一次漂洗液,直至薄膜背景无色为止(约更换 3 次),即可观察到清晰的电泳图谱,如下图:



图实-4 血清脂蛋白醋酸纤维素薄膜电泳图谱

5. 薄膜和透明 待漂洗干净的电泳图谱完全干燥后(可用吹风机吹干),浸入透明液中 0.5 min 后,立即取出,平贴在玻璃板上,完全干燥后即成为透明的薄膜图谱,可作扫描或照相。如将该玻璃板浸入水中,则透明的薄膜可脱下,吸干水分,可长期保存。

6. 定量 未经透明处理的电泳图谱,可直接用于定量测定,一般采用洗脱法或光密度计法,测定各蛋白质组分的相对百分含量。

(1) 洗脱法 取漂洗好的薄膜用滤纸吸干后,剪下各蛋白质区带,分别放进试管内,白蛋白加 0.02 mol/L NaOH 5.0 ml,其余每管各加 2.5 ml(加入 NaOH 的量可随薄膜条数及选用的比色杯大小而异),置 37℃ 水浴中洗脱 10 min,中途振动几次,使染色蛋白质洗涤下来。在无蛋白质区带处剪相同大小的薄膜作为空白管,以同样方式洗脱。洗脱液用 721 型分光光度计,在 620 nm 波长处测定,用空白管调零点,测定各管的光密度值,结果按下式计算:

$$\text{每种蛋白占总蛋白量的百分数}(\%) = \frac{\text{该种蛋白管光密度读数}}{\text{各管光密度读数之和}} \times 100\%$$

注意! 白蛋白因加入 NaOH 的量比其他管多,其光密度值应乘以稀释倍数,得到数值再代入上式中计算。

(2) 光密度计法 将干燥的蛋白质醋酸纤维素薄膜电泳图谱放入自动扫描光密度仪(或色谱扫描仪)内,通过反射(用未透明薄膜)或透射(用已透明的薄膜)方式,在记录器上自动绘出蛋白质组分曲线图,横坐标为膜的长度,纵坐标为光密度(或光强度),每一个峰代表一种蛋白质组分。然后用求积仪测量出各峰的面积,计算每个峰的面积与它们的总面积的百分比就代表血清中各种蛋白质组分的百分含量。在使用具有电子计算机附件的自动扫描光密度仪时,可以从数字显示部分或打字带上直接获得每条区带蛋白质百分含量。

(3) 用本法定量,正常人数值为:

白蛋白	54.0% ~ 73.0%	540 ~ 730 g/L
α_1 球蛋白	2.8% ~ 5.1%	28 ~ 51 g/L
α_2 球蛋白	6.3% ~ 10.6%	63 ~ 106 g/L
β 球蛋白	5.2% ~ 11.0%	52 ~ 110 g/L
γ 球蛋白	12.5% ~ 20.0%	125 ~ 200 g/L

三、注意事项

1. 醋酸纤维素薄膜的质量对结果影响很大,最好选用同一批号、薄膜厚度均匀、质量良好的醋酸纤维素薄膜。

2. 血清或其他电泳样品应新鲜

3. 点样应细窄、均匀、集中。点样量不宜过多,点样位置要合适。

4. 盐桥要放置平整,保证电场均匀。

5. 电泳槽盖应密封,盖内空间不宜过大。

6. 较低温度下电泳一般能获得较好的图谱,故室温不宜过高。

7. 选合适的缓冲液离子强度。离子强度低时,电泳速度快,但分辨率较差,缓冲液 pH 也容易改变;离子强度高时,电泳速度慢,所需电泳时间长,但区带分辨较好。一般气温低时可采用较高离

子强度:气温高时宜选用较低离子强度,否则薄膜上局部发热、水分蒸发过多。得不到良好图谱。

8. 两电泳槽内缓冲液面应在同一水平,否则会因虹吸影响电泳结果。

9. 要控制好电流,电压和电泳时间。电压高、电流大、电泳快、电泳时间可以缩短,但产热多,薄膜上水分蒸发也多,严重时会使图谱短而不清晰;相反,电流、电压过小时,电泳所需时间过长,由于样品的扩散也不能获得良好的图谱。一般气温低时可用较大的电流,电压,气温高时则宜用较低电流、电压。

10. 电泳槽内缓冲液可以多次使用。但操作时应尽量减少缓冲液的污染、水分蒸发、pH及离子强度的改变,并应防止霉菌的滋长。如电泳缓冲液受污染,或其pH、浓度显著发生变化,霉菌滋长,电泳得不到满意结果,就应更换。

11. 染色、漂洗及洗脱时间要控制好,才能获得重复性良好的定量结果。

四、材料和试剂

1. 材料 电泳仪;电泳槽;721型分光光度计;恒温水浴箱;染色缸及培养皿等。

2. 试剂

(1) 0.05 mol/L 巴比妥缓冲液(pH8.6) 取巴比妥钠10.3 g,加蒸馏水约800 ml溶解后,加入1 mol/L HCl 9.55 ml,补加蒸馏水至1 000 ml,测试其pH应为8.6。

(2) 染色液 取氨基黑10B 1.0 g,磺基水杨酸10 g,加冰醋酸20 ml,蒸馏水400 ml,摇匀溶解。

(3) 漂洗液 2.5%醋酸

(4) 洗脱液 0.02 mol/L NaOH溶液

(5) 透明液 无水乙醇7份,冰醋酸3份混合即成。

(第四军医大学 药立波)

实验八 胰凝乳蛋白酶的制备及活力测定

一、原理

胰凝乳蛋白酶(亦称糜蛋白酶,chymotrypsin)是胰腺产生的一种消化酶。最初以酶原形式被合成与分泌,然后在胰蛋白酶的作用下被水解而激活。胰凝乳蛋白酶是一种催化肽键水解的肽链内切酶,主要切断色氨酸、苯丙氨酸或酪氨酸的羧基侧肽键。本实验介绍从猪胰腺制备胰凝乳蛋白酶的方法及以N-乙酰-L-酪氨酸乙酯(ATEE, N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester)为底物,用紫外吸收法测定胰凝乳蛋白酶的活力的方法。

二、操作

(一) 胰凝乳蛋白酶的制备

1. 提取 取1~2 kg新鲜猪胰脏,在冷处剥去脂肪,在低温下用绞肉机绞碎。按其重量加入约10倍的乙酸酸化水提取。若pH高于3.0,则用10%乙酸调节,使提取液维持在pH3.0左右。

在 20℃ 左右间歇搅拌 18~20 h, 用甩干机分离去残渣, 收集呈乳白色的提取液。

2. 盐析 量提取液体积, 然后按每升提取液加入 516 g 工业硫酸铵粉末, 使之达到 0.75 饱和度(20~25℃), 于室温下静置过夜。第二天, 弃去上清液, 沉淀用布氏漏斗抽滤或在室温下以 3 600 r/min 离心 10 min, 得到半干盐析物约 350~400 g, 其中主要含有一些粗酶原的混合物。

3. 激活 在半干盐析物中分次加入约 10 倍体积的冰冷蒸馏水(约 4 L), 缓慢搅拌促使大部分蛋白质溶解, 按半干盐析物重量的 1/4 作为硫酸铵的含量(重量), 然后根据溶液体积计算出硫酸铵的物质的量浓度(也可用微量等温蒸馏定氮法测定溶液中的氮含量, 由此计算出溶液中硫酸铵的物质的量浓度)。在溶液中缓缓加入研细的氯化钙粉末, 其加入量为原来溶液中所含硫酸铵的摩尔含量加上 0.1 物质的量浓度的量。然后, 用 5 mol/L NaOH 溶液调节溶液到 pH8.0, 加入少许结晶胰蛋白酶, 在冷处激活。在激活过程中应在不同时间间隔时取样测定酶活力, 当酶活力基本上趋于恒定时, 即可终止激活, 一般需要 18~24 h。激活完成后立即抽滤除去硫酸钙沉淀。并迅速用 2.5 mol/L H₂SO₄ 将滤液调至 pH2.5, 若有不溶物应过滤除去。

4. 再次盐析 量滤液体积, 在不断搅拌下, 慢慢加入工业硫酸铵粉末至 0.75 饱和度(516 g/L), 静置过夜。次日, 弃去上清液, 同上抽滤或离心收集沉淀, 得到半干盐析物。

5. 透析去盐 将上面制得的半干盐析物溶于适量的预冷 0.001 mol/L 盐酸中, 用 2 mol/L 盐酸调至 pH3.0, 在冷处以 0.001 mol/L 盐酸透析去盐(不时用 50 g/L 乙酸钡溶液检查透析外液, 到没有硫酸根离子检出为止), 得到“激活后”的酶液。

6. 柱层析 将透析去盐后的酶液再用 0.01 mol/L, pH5.0 柠檬酸钠缓冲液进行透析平衡, 所得溶液用离心或过滤除去残存的不溶物。上柱吸附于已经用相同缓冲液平衡好的羧甲基纤维素(CMC)柱(1.5 cm×26 cm), 并继续用此缓冲液缓慢洗柱, 直到流出液呈无色, 且无明显蛋白质时(可用紫外分光光度计在 280 nm 处检查)。整个柱层析应在 10℃ 左右进行。

7. 胰凝乳蛋白酶的洗脱 用 0.05 mol/L, pH5.0 的柠檬酸钠缓冲液缓慢进行洗脱, 所得洗脱液主要成分为较高纯度的胰凝乳蛋白酶。洗脱液中加入分析纯硫酸铵粉末至 0.5 饱和度(291 g/L)盐析过夜。次日离心收集沉淀, 并溶于适量 0.001 mol/L 盐酸, 冷处透析去盐, 冰冻干燥, 即得胰凝乳蛋白酶粉。

(二) 胰凝乳蛋白酶的活力测定

取 2 个石英比色杯(带盖, 光程为 1 cm), 其中一个加蒸馏水, 用于调零点。另一个比色池加入 2.80 ml ATEE-0.05 mol/L 磷酸缓冲液, pH7.0。加入 0.20 ml 酶液, 立即混匀并计时, 于 237 nm 处测其光密度, 每隔半分钟读一次数, 共 3~5 min。若 $\Delta A/\text{分} > 0.400$, 则酶液需要适当稀释后再测定。

从时间~光密度关系曲线中的直线部分, 任选一时间间隔与相应的光密度值变化(ΔA), 按以下公式计算胰凝乳蛋白酶的活力单位和比活力。

$$\text{酶活力单位(ATEE 单位)} = \Delta A_t / t \times 0.001$$

$$\text{比活力} = \text{酶活力单位数} / \text{毫克蛋白质}$$

$$A_t = \frac{\Delta A_t \times 1\,000}{\epsilon \times t \times 0.001}$$

式中: ΔA_t 为任选的 t 时间间隔(min)内光密度值的变化(降低); ϵ 为测定时所用酶蛋白量(μg); 1 000 为酶蛋白由微克换算成毫克的转值; 0.001 为光密度值增加 0.001 定为 1 个 ATEE 活

力单位的常数。

三、材料和试剂

1. 试剂

① 10% 醋酸; ② 硫酸铵粉; ③ 氯化钙粉; ④ 5 mol/L NaOH; ⑤ 结晶胰蛋白酶; ⑥ 2.5 mol/L 硫酸; ⑦ 0.001 mol/L 盐酸, 2 mol/L 盐酸; ⑧ 50 g/L 醋酸钡; ⑨ 0.01 mol/L, pH5.0 柠檬酸钠缓冲液; ⑩ 0.05 mol/L, pH5.0 柠檬酸钠缓冲液; ⑪ ATEE - 0.05 mol/L, pH7.0, 磷酸盐缓冲液(每毫升磷酸盐缓冲液含 0.25 mg ATEE); ⑫ 0.05 mol/L, pH7.0, 磷酸盐缓冲液。

注意: 底物溶液和酶液必须临用前配制, 放置冰箱内, 当天有效。

2. 器材

① 羧甲基纤维素柱, 1.5 cm × 26 cm; ② 恒温水浴; ③ 抽滤瓶及布氏漏斗; ④ 离心机; ⑤ 透析袋; ⑥ 紫外分光光度计; ⑦ 部分收集器; ⑧ 紫外检测仪(包括记录装置); ⑨ 贮液瓶(柱层析洗脱用); ⑩ 秒表。

(第四军医大学 韩骅)

实验九 蛋清溶菌酶的分离

一、原理

溶菌酶 E.C.3.2.1.7 是糖苷水解酶, 相对分子质量 14 307, 由 129 个氨基酸残基构成。由于其中含有较多碱性氨基酸残基, 所以其等电点高达 11 左右。

几乎所有的细菌都有坚韧的细胞壁。革兰氏阳性细菌细胞壁的主要化学成分是肽聚糖。肽聚糖是由 N-乙酰葡萄糖胺(NAG)与 N-乙酰胞壁酸(NAM)靠 β -1,4-糖苷键形成骨架, 并通过 NAM 部分的乳酰基与寡肽交联而成。溶菌酶能水解 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4-糖苷键。甲壳质是 N-乙酰葡萄糖胺以 β -1,4-糖苷键连接起来的聚合物, 也能被溶菌酶水解。

从鸡蛋清中分离溶菌酶可以选用多种不同的方法和步骤。本实验采用下列分离纯化步骤, 即热变性与等电点选择性沉淀; 聚丙烯酸处理; 葡聚糖凝胶柱层析; 聚乙二醇浓缩。溶菌酶具有耐热性, 它在酸性条件下能经受较长时间的高温处理而不丧失酶活性, 并且溶菌酶又有特别高的等电点。据此, 用热变性与等电点沉淀相结合的方法可除去大部分杂蛋白。聚丙烯酸是一种多聚电解质, 在特定的 pH 和离子强度条件下, 它能和某些蛋白质一起凝聚沉淀, 而对多糖、核酸等物质则没有这种作用。溶菌酶在酸性条件下能与聚丙烯酸结合形成凝聚物, 当有钙离子存在时溶菌酶又能从这种凝聚物中分离出来, 并生成聚丙烯酸钙沉淀, 后者经过硫酸的酸化可再变为聚丙烯酸。同时, 一旦抽提液内的溶菌酶与聚丙烯酸结合, 所形成的凝聚物立即沉降粘附于容器底部, 倾倒除去上层液体使溶菌酶既得到纯化, 又得到浓缩。最后, 用葡聚糖凝胶柱层析使杂蛋白、溶菌酶和钙离子分开。

二、操作

(一) 蛋清溶菌酶的分离

1. 热变性与等电点选择性沉淀 取新鲜蛋清用 1% NaCl-0.05% mol/L HCl 溶液搅拌稀释,加 20% HAc 调至 pH4.6,滤液,记录体积,并留样 2 ml,待分析(I)。预先准备好沸水浴,滤液置于沸水浴迅速升温至 75℃,全过程 3 min 左右。用流动水速冷后,3 000 r/min 离心 20 min,其沉淀物为热变性杂蛋白,而溶菌酶在上清液中。收集上清液,记录体积,并留样 2 ml 待分析(II)。

2. 聚丙烯酸处理 在上述上清液内(约 pH6.0 左右)滴加 10% 聚丙烯酸(用量为上清液体积的 25%),并慢速搅拌,当凝聚物出现后,溶液应为 pH3 左右。静止 30 min 以后,凝聚物粘附在容器底部。倾去上层清液,加入约 1 ml 蒸馏水,并滴加少量 0.5 mol/L Na_2CO_3 使凝聚物溶解。此时为 pH6 左右。然后边搅拌边滴加 500 g/L CaCl_2 溶液(体积为聚丙烯酸量的 1/12.5)。将沉淀物压干后弃去。溶液如果不清亮,可以离心或简易过滤,并用极少量水洗涤滤纸(注意:由于要求柱层析上样量在 10 ml 以内,因此加入的各种液体体积要尽量小)。收集滤液于刻度试管中,记录体积,并留样 0.5 ml 待分析(III)。

3. Sephadex G-50 柱层析

(1) 装柱:称取 15 g Sephadex G-50,加入 300 ml 蒸馏水溶胀 6 h 以上,并于水浴中加热去气泡,冷却后装入玻璃层析柱(床体积约 2.5 cm×25 cm)。用 6 g/L NaCl 溶液 200 ml 流洗平衡。

(2) 上样:在上述滤液内加入固体 NaCl 使终浓度为 50 g/L,准备上样。上样时,先吸去层析柱凝胶面上的溶液,在用滴管沿壁加入样品。样品量不宜超过 10 ml。加完后打开层析柱出口,让样品均匀地流入凝胶内。

(3) 洗脱:样品流完后,先分次加入少量 6 g/L NaCl 洗脱液洗下柱壁上样品,最后接通蠕动泵,继续以 6 g/L NaCl 洗脱,调节操作压使流速约为 7~8 ml/10 min,用部分收集器收集后,每 10 min 一管,总共收集 200 ml 左右。

(4) 分析:记录各管体积,并用紫外光吸收法测定蛋白质浓度。合并含有蛋白质的收集管,并用草酸检定 Ca^{2+} ,待测定酶活性(IV)。

4. 聚乙二醇浓缩 为了提高酶浓度,需将上述层析洗脱液进行浓缩。将洗脱液放入透析袋内,置容器中,外面覆以聚乙二醇(相对分子质量 2 万左右),容器加盖,酶液中的水分很快被透析膜外的聚乙二醇所吸收。当浓缩到 5 ml 左右时,用蒸馏水洗去透析膜外的聚乙二醇,小心取出浓缩液,记录体积,留样 0.5 ml,待分析(V)。

(二) 溶菌酶活性测定

取含有蛋白质的流出液稀释 30~50 倍进行酶活性测定。为了简化稀释步骤,可用微量进样器取样品 10 μl ,加 0.5 ml 的 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(相当于稀释 50 倍),pH6.5,混合均匀,37℃ 预热 2 min。然后加入 37℃ 预热的底物溶液 0.5 ml,反应 15 min 后,加入 2 ml 乳化剂停止反应。反应液经 3 000 r/min 离心 10 min。取上清液在 721 型分光光度计上 540 nm 波长处比色。空白管以磷酸盐缓冲液代样品,其他操作同上。

三、试剂和仪器

(一) 试剂

1. Sephadex G-50;
2. 10 g/L NaCl-0.05 mol/L HCl;
3. 20% HAc;
4. 10% 聚丙烯酸(临用时配制);
5. 0.5 mol/L Na_2CO_3 ;
6. 500 g/L CaCl_2 ;
7. NaCl;
8. 6 g/L NaCl;
9. 饱和草酸溶液(室温条件下);
10. 酶活力测定所用试剂:

(1) 底物溶液 取 1 g 艳红 K-2BP 标记溶性微球菌 *M. lysodeikticus* 悬于 100 ml 0.5 mol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液置冰箱内保存备用。

(2) 乳化剂 2 g Brij-35(聚氧乙烯脂肪醇醚)加 50 ml 蒸馏水微热使溶解,冷却后定容至 100 ml。吸取此液 10 ml,用 0.6 mol/L HCl 定容至 200 ml 备用。

(3) 0.5 mol/L pH6.5 磷酸盐缓冲液。

(二) 主要仪器

1. 10 μl 微量进样器;
2. 层析柱(2.5 cm \times 34 cm);
3. 电热恒温水浴锅;
4. 部分收集器;
5. 离心沉淀机;
6. 721 型分光光度计;
7. 751G 型分光光度计。

(第四军医大学 韩群)

实验十 组织 DNA 与 RNA 的分离和提纯

一、原理

脱氧核糖核蛋白(DNP)在 0.14 mol/L NaCl 中溶解度很低,而核糖核蛋白(RNP)却较易溶解,故用 0.14 mol/L NaCl 洗涤组织匀浆,可得到 DNP,再用氯仿-异戊醇除蛋白即可得到 DNA。

RNA 的分离提纯目前多用苯酚法。组织匀浆在酚与十二烷基硫酸钠存在下,RNA 与蛋白质分离。酚使蛋白质变性凝固,RNA 溶解在水相中,用乙醇使 RNA 从水相中沉淀而达到分离。

二、操作

(一) DNA 的提纯

1. 取小鼠剪断颈动脉,放血处死。立即开腹,取其脾脏及两肾脏(约 0.3 g),浸于预冷至 0℃ 的 0.14 mol/L NaCl-0.01 mol/L EDTA 中,洗去其血液,剥去周围的脂肪及结缔组织,用滤纸吸干水分。

2. 将组织剪碎,转入玻璃匀浆器中,加入 0.14 mol/L NaCl-0.01 mol/L EDTA 液 7 ml,旋转上下匀浆,至绝大部分细胞破碎为止。

3. 离心,2 500 r/min,15 min。吸弃上层液体,向沉淀中再加 0.14 mol/L NaCl-0.01 mol/L EDTA 液混匀,离心洗涤之(如欲获取掺杂 RNA 较少的纯 DNA 时,此步离心洗涤应重复多次)。

4. 经洗涤后的沉淀,加入 3 ml 0.14 mol/L NaCl-0.01 mol/L EDTA,在搅拌下缓缓滴入 250 g/L SDS 0.4 ml,转入匀浆器内匀浆,使沉淀悬浮均匀,再加入 2 mol/L NaCl 4 ml,这时由于大分子脱氧核糖核蛋白的溶出,溶液粘度骤然升高,再匀浆一次,使之均匀。

5. 转入三角烧瓶,加等容积的氯仿-异戊醇 8 ml,剧烈振摇 10 min。将此混合液离心 3 000 r/min,10 min。上层为水液,下层为氯仿,变性蛋白质在氯仿与水层的界面上。吸出上层水液(如欲获取掺杂蛋白质较少的 DNA,此氯仿振摇、离心的操作可重复多次,直至界面完全见不到变性蛋白层为止)。氯仿层液体不要废弃,可倒入收集瓶内,以便蒸馏回收再用。

6. 上层水液边摇边加入等积 95% 乙醇,即可见有长纤维线状 DNA 析出,用玻棒搅之,DNA 纤维即粘缠在玻璃棒上,在玻璃壁上尽量将水分挤干。

7. 缠在玻璃棒上的 DNA 纤维溶于 1 ml 0.1 mol/L NaCl 溶液中留作定量、电泳用。

(二) RNA 的提取

1. 饥饿一日的小白鼠,放血处死。立即剖腹,取出其肝脏,浸于预冷至 0℃ 的 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.0)中,剥去肝门处的结缔组织,洗去血液,用滤纸将水分吸干,称取 0.3 g。

2. 取 0.3 g 肝脏,加入 0.05 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.0) 3 ml、250 g/L SDS 0.5 ml,移入匀浆管,匀浆后,再加入等体积 80% 酚,再匀浆一次。

3. 移入三角烧瓶内,置 65℃ 水浴中继续振摇 5~8 min。取出流水冷却。

4. 离心,3 000 r/min,10~15 min,上层为稍混浊含有 RNA 的水相,中层为变性蛋白质,下层为酚液,管底残渣含有 DNA。吸出上层水液(若要提高 RNA 的收获量,可向中、下层液中再加 1/2 体积的醋酸钠缓冲液,同样在 65℃ 水浴中振摇提取一次,离心后所收得上层水液,可与上述水液合并)。

5. 用量筒测水液的量,加入 1/10 体积的 2 mol/L 醋酸钠,混匀。再加入 2.5 倍体积预冷的 95% 乙醇,混匀,冷处放置至絮状沉淀充分形成。

6. 离心,3 000 r/min,10 min。倾出上清(不要废弃,可倒入收集瓶中,作蒸馏回收乙醇用)。离心管倒置滤纸片上,尽量使液体流干。

7. 沉淀用蒸馏水 1 ml 溶解(慢慢向沉淀中加蒸馏水,至沉淀完全溶解即可),再作定量及电泳用。

三、注意事项

1. 在 DNA 和 RNA 的提取操作中,有条件应在 0~4℃ 进行。

2. 手指上有 RNA 酶,在提取 RNA 的过程中应尽量避免 RNA 酶污染。

3. 酚有腐蚀性,操作时应小心,若沾洒在皮肤上立即用水或用 70% 酒精棉球擦洗。

4. 提取 DNA 时,须待纤维状 DNA 大分子充分析出后,再用玻棒轻轻将其缠捞出来。

四、试剂

1. 0.14 mol/L NaCl-0.01 mol/L EDTA: 称 NaCl 8.18 g, 乙二胺四醋酸二钠盐 3.72 g, 加蒸馏水溶解, 调 pH 至 7, 稀释至 1 000 ml, 贮放冰箱中。
2. 250 g/L SDS: 称取十二烷基硫酸钠 25 g, 溶于 50% 乙醇中至 100 ml, 室温存放。
3. 2 mol/L NaCl: 称 11.7 g NaCl, 用蒸馏水配成 100 ml 溶液。
4. 氯仿-异戊醇: 氯仿 24 份与异戊醇 1 份混合。
5. 80% 酚: 取苯酚 80 份, 加蒸馏水 20 份, 混匀后装棕色瓶中。
6. 0.05 mol/L 醋酸缓冲液(pH 5.0): 0.5 mol/L 醋酸钠 35 ml, 0.2 mol/L 醋酸 15 ml, 加蒸馏水稀释至 1 000 ml, 混匀后测 pH 应为 5.0。
7. 2 mol/L 醋酸钠: 取无水醋酸钠 16.4 g, 用蒸馏水溶解后配成 100 ml。
8. 95% 乙醇

(第四军医大学 陈南春)

实验十一 核酸的琼脂糖凝胶电泳

潜水电泳

一、原理

核酸在 pH 高于其等电点的溶液中带负电荷, 在电场中向正极移动。琼脂糖凝胶具有多孔的网状结构, 以其为介质电泳时, 不同大小的核酸可借凝胶的分子筛作用而得以分开。用溴化乙锭染色后, 在紫外灯下, 可见染成橘红色的核酸条带。琼脂糖凝胶常制成水平平板状, 电泳缓冲液覆盖在平板表面, 加样后, 再通电电泳, 故称为潜水式电泳。

二、操作

1. 灌胶 1 g 琼脂糖加 0.5×TBE 缓冲液 100 ml, 在微波炉上加热融化, 冷却至放在手背不觉烫手(约 50℃)后, 倾入架有样品孔形成器(梳子)的微型水平电泳槽中。胶液固化后, 倒入 0.5×TBE 至高出胶面 1~2 mm, 拔出梳子, 接好电源线(注意正负极)。
2. 加样 核酸样品中加入样品体积 1/6 的 6×载样缓冲液, 混匀后, 用移液器加入样品孔内。
3. 电泳 接通电泳, 施加的电压应小于 $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 待溴酚蓝跑至适当位置时, 关闭电源。
4. 染色和结果观察 向微型电泳槽内滴加溴化乙锭液, 至终浓度约为 $0.5 \mu\text{g/ml}$, 混匀后放置约半小时, 在 254 nm 紫外灯下观察电泳结果, 作好记录。

三、注意事项

1. 溴化乙锭是诱变剂, 并有中度毒性, 实验中要戴防水手套, 注意不污染环境。紫外灯下观察

结果时,应戴防护眼镜。

2. 也可将溴化乙锭预先加入琼脂糖中,使浓度达 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 凝胶。

3. 琼脂糖的浓度可随欲分离核酸分子的大小作调整,分子大用低浓度凝胶,分子小用高浓度胶。分离 RNA 则多用变性胶。

四、试剂

1. $5\times\text{TBE}$: 54 g Tris 碱
27.5 g 硼酸
20 ml 0.5 mol/L EDTA($\text{pH } 8.0$)
2. $0.5\times\text{TBE}$:取 $5\times\text{TBE}$ 作 10 倍稀释
3. 溴乙锭液: $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 水
4. $6\times$ 载样缓冲液: 0.25% 溴酚蓝
400 g/L 蔗糖水溶液

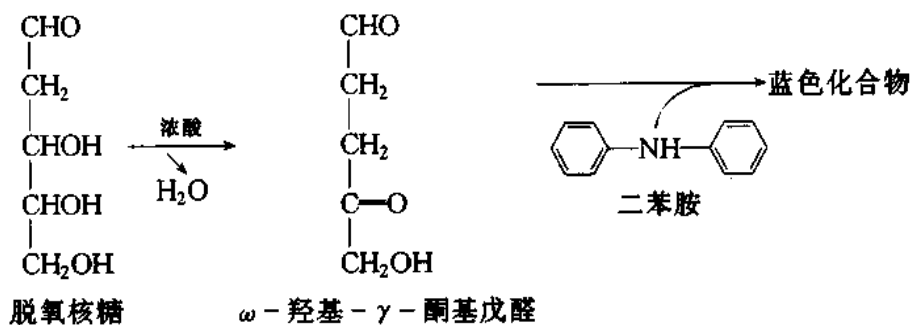
(第四军医大学 陈南春)

实验十二 DNA 与 RNA 的定量测定

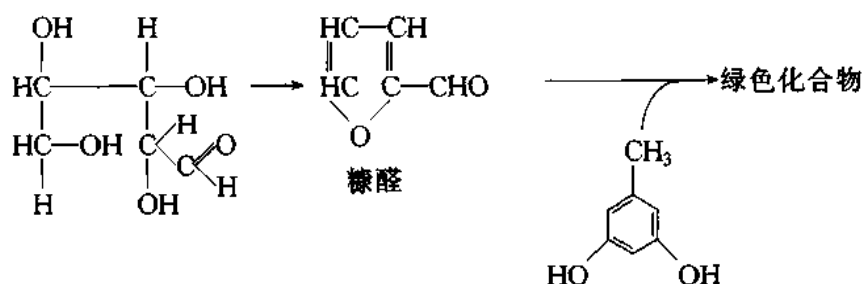
比 色 法

一、原理

脱氧核糖在浓酸作用下生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛,可与二苯胺生成蓝色化合物:



核糖在浓酸作用下脱水生成糠醛,后者能与 3,5-二羟甲苯缩合生成绿色化合物:



将核酸样品液与标准液在同样条件下操作呈色,比色后根据光密度读数即可计算样品中的核酸含量。

二、操作

(一) DNA 定量操作

1. 取试管三支,测定管加样品液 1.0 ml,标准管加 DNA 标准应用液(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)1.0 ml,空白管加蒸馏水 1.0 ml。
2. 三管均各加二苯胺试剂 3.0 ml,混匀,立即放入沸水浴中 10 min。取出后流水冷却。
3. 于 595 nm 波长下比色,读取光密度值。
4. 计算

$$\frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{空白管光密度}} \times 200 = \text{测定管内 DNA 含量}(\mu\text{g})$$

(二) RNA 定量操作

1. 取试管三支,测定管加样品液 1.0 ml,标准管加 RNA 标准应用液(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)1.0 ml,空白管加蒸馏水 1.0 ml。
2. 三管均各加 3,5-二羟甲苯应用液 3.0 ml,混匀,立即置沸水浴中煮 20 min。取出后立即流水冷却。
3. 于 660 nm 波长下比色,读取光密度。
4. 计算

$$\frac{\text{测定管光密度} - \text{空白管光密度}}{\text{标准管光密度} - \text{空白管光密度}} \times 50 = \text{测定管内 RNA 含量}(\mu\text{g})$$

三、注意事项

1. 提取的 RNA、DNA 应在定量测定前作适当稀释。
2. 请测定你提取的 RNA 中有多少 DNA, DNA 中有多少 RNA。
3. 上述两个定量实验中酸的浓度对结果有较大影响,所用的冰醋酸、浓盐酸、浓硫酸必须为分析纯试剂,并应保持其浓度。若市售的二苯胺不纯,亦应重结晶。
4. 其他一些戊糖也可能发生上述颜色反应,干扰测定。故实验器材与试剂应避免其他戊糖的污染,例如,所有的试剂瓶及试管均不得采用软木塞。
5. 上述核酸的呈色法可用于组织中 RNA 及 DNA 的定量测定。即将一定量的组织磨成匀浆,

用 10% 三氯醋酸沉淀核蛋白, 沉淀用 5% 三氯醋酸、乙醇、醇-醚混合液、乙醚洗涤除去小分子酸溶性及脂溶性物质, 再将沉淀中的 DNA 及 RNA 溶解出来, 分别用上述比色法测定 DNA 及 RNA 的含量。

6. 上述测定 DNA 及 RNA 的方法中, 仅嘌呤核苷酸中的戊糖呈色, 嘧啶核苷酸则不呈色。不同来源的核酸, 其中嘌呤、嘧啶核苷酸的含量不同, 故其呈色深浅也有所不同。因此最好用同一来源的纯核酸作为标准, 习惯上也常用纯化的酵母 RNA 或胸腺 DNA 作为标准。

7. 在 3,5-二羟甲苯的反应中, 脱氧核糖也会呈色, 但色泽较浅, 仅为核糖呈色强度的 1/6。测定 RNA 时, 若样品液中含 DNA 较多时, 应同时测定 DNA, 以校正 RNA 的比色测定结果; 若 DNA 含量少时, 则可不校正。

四、试剂

1. DNA 标准液

贮存液(400 μg DNA/ml): 取纯 DNA 置真空干燥器中干燥后, 精确称取 40 mg, 用量瓶配成 100 ml 溶液, 混匀, 存放于冰箱中。

应用液(200 μg DNA/ml): 取贮存液作 2 倍稀释。

2. RNA 标准液

贮存液(500 μg RNA/ml): 取纯酵母核糖核酸置真空干燥器中干燥后, 精确称取 50 mg, 加少量 0.1 mol/L NaOH 溶解之, 洗入 100 ml 量瓶内, 加蒸馏水至刻度, 混匀, 存放于冰箱中。

应用液(50 μg RNA/ml): 取贮存液精确作 10 倍稀释。

3. 二苯胺试剂 称取二苯胺 1.0 g, 加冰醋酸 98 ml, 浓硫酸 2.0 ml, 混匀。此试剂需临用前新配。

4. 3,5-二羟甲苯贮存液 称硫酸铁铵 1.35 g, 3,5-二羟甲苯(orcinol) 2.0 g, 溶于蒸馏水至 50 ml, 此液应呈紫黑色, 贮存于冰箱中。

5. 3,5-二羟甲苯应用液 取贮存液 2.5 ml, 加浓硫酸 41.5 ml, 蒸馏水 9.0 ml, 混匀。此液呈黄色, 必须在临用前新配制。

6. 样品液 可用实验十提取的 DNA 或 RNA, 加适量 10 g/L NaCl 液溶解作为样品。

紫外分光光度法

一、原理

具有共轭双键的有机分子, 对紫外光有强烈的吸收, 核酸分子中的碱基就有共轭双键, 因此也强烈吸收紫外光。核酸的最大吸收波长为 260 nm, 吸收低谷在 230 nm。核酸的这一物理特性为测定核酸溶液的浓度提供了基础。在波长为 260 nm 的光程为, 一个吸收单位(1 A_{260}) 相当于双链 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 单链 DNA 为 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 单链 RNA 为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 寡核苷酸为 20~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。所以测出核酸溶液的 A_{260} 值后, 即可据此计算出它的浓度。

二、操作

待测核酸以水为溶剂并作适当稀释, 使用 1 cm 光程的石英比色杯, 以水调好仪器的零点, 然后

测定并记录样品液的 A_{260} 值。根据上述核酸的吸收系数,计算出样品液中核酸的浓度。计算(RNA定量举例)

RNA 样品体积:100 μl

稀释:10 μl RNA 样品 + 490 μl 蒸馏水(50 倍稀释)

稀释后样品的 A_{260} 值(1 cm 光程) = 0.55

RNA 浓度 = $40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{稀释倍数}$

= $40 \mu\text{g/ml} \times 0.55 \times 50$

= 1100 $\mu\text{g/ml}$

RNA 总量 = 浓度 \times 样品体积(ml)

= $1100 \mu\text{g/ml} \times 0.1 \text{ ml}$

= 110 μg RNA

三、注意事项

1. 待测核酸样品,必须是纯净(即无显著的蛋白质、酚、琼脂糖或其他核酸、核苷酸等污染物)的制品。若样品中有污染物,则无法用紫外分光光度法测准其浓度。要使用与样品相同的溶剂调仪器的零点,样品读数应在 0.1~1.0 之间,以保证读数的可靠性。

2. 前述吸收系数是以水为溶剂的。以缓冲液为溶剂的吸收系数可能与以水为溶剂时略有不同。

3. 测定 RNA 浓度时,要确保比色杯无 RNase 污染。为此可用 0.1 mol/L NaOH - 1 mmol/L EDTA 液清洗比色杯,然后以无 RNase 的蒸馏水淋洗。

4. 为判断核酸的纯度,可在低盐缓冲液中,测定 A_{260}/A_{280} 的比值。在缓冲溶液中,可获得比在水中更为正确、可靠的测定值,这是因为 A_{260}/A_{280} 比值受 pH 的影响很大,pH 较低时引起 A_{260}/A_{280} 值的降低,并且降低了对蛋白污染的灵敏度。纯 DNA 在 pH8.5 的 10 mmol/L Tris·Cl 中,其 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8~2.0。纯 RNA 在 pH7.5 10 mmol/L Tris·Cl 中,其 A_{260}/A_{280} 比值为 1.9~2.1。

5. 如在 280 nm 有强吸收则 A_{260}/A_{280} 比值降低,表明有污染物(如蛋白质)的存在;270~275 nm 的强吸收,提示有污染的酚存在。

(第四军医大学 陈南春)

实验十三 RNA的合成及其抑制

一、原理

代谢旺盛的活细胞能摄取外环境中的尿嘧啶核苷(UR)作为原料,合成 RNA。放线菌素 D(更生霉素)能特异性地抑制大部分 RNA 的转录合成,而已死亡的细胞则完全不能进行这种生物合成。

尿嘧啶核苷可用放射性同位素 ^3H 标记。将此 ^3H -UR 加到细胞培养液中,则细胞新合成的 RNA 就带有 ^3H 。用液体闪烁计数器测定细胞 ^3H 的放射性强度,就能相对确定细胞合成 RNA 的速度。

^3H -UR 在细胞中除用作合成 RNA 外,还有其他的代谢途径,但一般并不掺入到蛋白质和 DNA 等大分子中。细胞在含 ^3H -UR 的培养液中保温培育一定时间后,用三氯醋酸使蛋白质沉淀,洗去可溶于三氯醋酸的小分子物质,再用乙醇、乙醚洗去脂溶性物质,剩余不溶性沉淀物中含有细胞在温育期间新合成的 RNA 分子。

二、操作

(一) 细胞悬液的制备

采用 H22 腹水型癌细胞为实验对象。正常小白鼠每只腹腔注射 H22 癌细胞约 1×10^7 个,5~7 日后见小鼠腹部明显膨隆,表明癌细胞已在小鼠腹腔内繁殖并形成腹水。击毙小鼠,无菌操作下,剪开小鼠腹壁,用点滴管吸出乳白色腹水,置于盛有灭菌生理盐水的离心管中混匀,3 000 r/min 离心 1 min,用点滴管吸弃上清液,并尽量吸弃红细胞。加入灭菌生理盐水混匀,3 000 r/min 离心 1 min。如此反复用灭菌生理盐水将腹水癌细胞离心洗涤三次。

离心所得白色沉淀即为癌细胞,加入适量 Tris-NaCl 液,用点滴管轻轻吹吸数次,使癌细胞均匀分散成悬液。吸取此细胞悬液,用 0.4 g/L 台盼蓝作适当稀释,滴在血球计数盘上分别计活癌细胞(不被台盼蓝染色)数及死癌细胞(台盼蓝着染成蓝色)数,活癌细胞数应占 90% 左右,按活癌细胞数计算,将癌细胞悬液用细胞培养液稀释为 5×10^6 个/ml 活癌细胞,置冰水浴或冰箱贮存。

注意:① 离心洗涤、稀释等操作最好在低温(4℃ 左右)进行,这样可获得存活率较高的癌细胞悬液;② 活细胞最好在实验当天制备。

另取经离心洗涤及细胞计数的癌细胞悬液 5×10^6 个/ml,加入 NaN_3 至终浓度为 0.5%,置于微量振荡器上,37℃ 振荡温育过夜。次晨取出 1 滴悬于载玻片上,加 1 滴台盼蓝液混匀,显微镜下观察,癌细胞应全部死亡。此经 NaN_3 处理的死癌细胞亦置于冰箱中备用。

(二) ^3H -UR 掺入细胞 RNA

1. 取小试管 3 支,按下表依次加入液体(注意! ^3H -UR 加入量极微,须用微量移液器准确地直接加在管底,不得粘在管壁或其他处;癌细胞悬液则应充分混匀后方可吸取)混匀,置于 37℃ 温育,并经常摇匀。

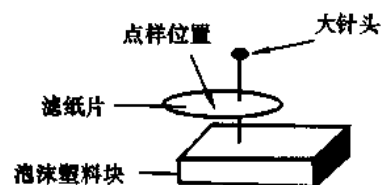
	1	2	3
^3H -UR	4 μl	4 μl	4 μl
Tris-NaCl(pH7.4)	50 μl	50 μl	—
更生霉素液	—	—	50 μl
癌细胞悬液	—	50 μl	50 μl
经 NaN_3 处理的癌细胞悬液	50 μl	—	—

2. 剪三张直径约 2 cm 的圆滤纸片,分别用铅笔在滤纸边缘编号,用大头针穿过滤纸边缘,将滤纸片钉在泡沫塑料上(图实-5)。

上述三支试管温育一定时间(1 或 2 小时)后,同时取出,充分摇匀,分别吸取细胞悬液 50 μl 滴

于相应的滤纸片中央(注意:温育液不要洒落他处,并尽量不要使液体碰到大针头)。将滤纸片放在红外线灯箱内烘干,一般烘 10 min 即可。

3. 用手术镊从大针头上将三张滤纸片取下,浸于 10 ml 10% 三氯醋酸中,并用镊子夹持滤纸片的边缘经常摇动洗涤之。10 min 后,移入 10 ml 5% 三氯醋酸中摇动洗涤 10 min,再用 5% 三氯醋酸同样洗涤一次。然后依次用无水乙醇、醇醚混合液、乙醚各 5~10 ml 分别洗涤一次,每次 5 min。置于红外灯下烘烤 5 min。



图实-5

4. 将干燥的滤纸片置于盛有 0.5~2 ml 闪烁液的闪烁瓶底,记录闪烁瓶编号。

5. 将闪烁瓶放入液体闪烁计数器,测量样品的放射性,记录各样品计数率,并讨论分析实验结果。

三、注意事项

1. 本实验是放射性同位素示踪实验,应注意放射防护。 ^3H 物理半衰期为 12.5 年,发射低能量的 β 射线(0.018 6 MeV),生物半衰期较短。实验中仅用到几万贝可勒尔水平的剂量,外照射防护可不必特殊考虑,但应特别注意内照射的防护。

(1) 所有操作应在指定的搪瓷盘中进行。吸取或接触含有 ^3H 的溶液、滤纸时,应使用专门供应的器具,不得与实验室常用器具相混淆。

(2) 吸取、转移含有 ^3H 的液体时,要小心操作,严防洒落、喷出。如发生这些情况,应立即报告教员,及时采取除污染措施。

(3) 除专用吸取 ^3H -UR 的器具外,其他用品(包括搪瓷盘)在每次实验后应及时清洗,清除放射性污染。

(4) 实验结束,要仔细洗手。

2. 本实验各试剂用量甚微,操作时务必小心仔细、力求准确,方可获得良好的实验结果。

四、试剂

1. ^3H -UR ^3H 标记于尿嘧啶第 5 位置上,即尿苷-5- ^3H ,放射性比活度约 7.4×10^{11} Bq/mmol。用无菌双蒸馏水稀释成 3.7×10^6 Bq/ml,于 4℃ 冰箱中贮存。

2. 0.05 mol/L pH7.4 Tris-NaCl 称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)0.605 7 g, NaCl 0.85 g,加蒸馏水约 50 ml 溶解之,加入 1 mol/L HCl 14.2 ml,再加入蒸馏水至 100 ml,测其 pH 应为 pH7.4,高压灭菌,密封贮存于 4℃ 冰箱中。

3. 更生霉素液 用上述 Tris-NaCl 液配成含更生霉素 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,避光贮存于 4℃ 冰箱中。

4. 培养液 称取水解乳蛋白 0.5 g,加上述 Tris-NaCl 液 10 ml 溶解之,再加入 0.2% 酚红 1 ml、青霉素 10 000 U、链霉素 10 000 U,加入 Hank's 液至 100 ml,过滤除菌,于 4℃ 冰箱贮存。

5. 灭菌生理盐水 市售。

6. 50 g/L NaN_3 称取分析纯 NaN_3 5 g,用无菌双蒸馏水溶解至 100 ml 终体积。

7. 0.4 g/L 台盼蓝 称取台盼蓝(trypsin blue)40 mg,加上述 Tris-NaCl 液 100 ml 溶解之,过

滤, 4℃ 冰箱贮存。

8. 10% 三氯醋酸

9. 5% 三氯醋酸

10. 无水乙醇 市售分析纯。

11. 乙醚 市售分析纯。

12. 醇醚混合液 取 3 份无水乙醇与 1 份乙醚混合。

13. 闪烁液 称取 2,5-二苯基噻唑(PPO)0.5 g, 1,4-双-[2'-5'-苯基噻唑]-苯(POPOP)50 mg, 加甲苯 100 ml 溶解之。此液应密塞避光贮藏, 严防甲苯挥发。(本实验中采用纸片法测量, 此闪烁液可反复使用, 但应在用前先测闪烁液的本底计数)。

(第四军医大学 陈萍)

实验十四 质粒 DNA 的提取

煮沸法

这是一种提取大肠杆菌质粒的简单而快速的方法。它主要适用于大肠杆菌中检验转化体及提取质粒 DNA。

一、原理

大肠杆菌细胞经溶菌酶和 Triton X-100 处理后, 在高温条件下使蛋白质变性。变性蛋白带着染色体 DNA 一起沉淀下来, 质粒 DNA 仍留在上清液中。用异丙醇或乙醇处理可以沉淀 DNA, 获得质粒 DNA 的制品。

二、操作

1. 把带有质粒的大肠杆菌菌株如 JM103(pJE423), 较大量地接种在 LB 固体培养基上, 37℃ 培养过夜。也可以接种在 LB 液体培养基中振荡培养过夜。

2. 从培养基上收集细胞; 将其悬浮于 300 μl 蔗糖-Triton X-100 缓冲液中。这一步在 1.5 ml 的微量离心管中进行。一定要将所有的细胞均匀地悬浮在缓冲液中。从一个平板所收集的细胞可以被分在 4~5 个离心管中。

3. 加入等体积的包含 2 mg/ml 溶菌酶的上述缓冲液, 混匀并置于室温下 5 min。

4. 把上述离心管放在 100℃ 水浴加热 3 min。

5. 上述离心管在冰浴中冷处理 5 min。

6. 在台式高速离心机中以 12 000~15 000 r/min 离心 10~15 min。

7. 用微量吸量管把上清液吸到另一个无菌的微量离心管中。

8. 在上清液中加入等体积的异丙醇, 置于 -20℃, 30 min, 或加入 2~2.5 倍体积的乙醇, 置于 -20℃ 过夜。

9. 在台式离心机中以 15 000 r/min 离心 15 min。

10. 倾去上清液,把离心管倒置于吸水纸上吸干剩余的液体。不要用真空泵抽干。

11. 把沉淀下来的 DNA 溶解在 150 μ l TE 缓冲液中。

这样制备的质粒 DNA 样品可用于转化及体外重组实验。为了除去样品中存在的 RNA,可以在 TE 缓冲液中加入 RNA 酶(10~20 μ g/ml)。

上述 DNA 粗制品也可以用蔗糖密度梯度离心进一步纯化。此方法的优点是快速、简便并且所获得的样品中绝大部分是环状质粒 DNA,染色体和开环质粒 DNA 的比例很低。这样方法所得的 DNA 产率很高,粗制品经蔗糖梯度离心后,从每个平板上所长的细菌中能得到 50 μ g 以上的纯 DNA 样品。

三、器材和试剂

(一) 器材

台式高速离心机;微量吸量管;微量离心管;水浴箱。

(二) 试剂和培养基

1. 培养基 LB 和 LB 固体培养基

2. 提取质粒 DNA 所需的试剂

(1) 蔗糖-Triton X-100 缓冲液 50 mmol/L Tris, 50 mmol/L EDTA, pH 8.0, 8% 蔗糖, 5% Triton X-100。

(2) 溶菌酶

(3) TE 缓冲液 0.02 mol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4

碱裂解法

这是一种快速提取细菌质粒的方法,适用于各种不同的细菌。尤其是一些用溶菌酶很难溶解的细菌,使用此法更显其优越性。

一、原理

在很高的 pH(pH12.6)条件下,用 SDS 及高温处理,能使各种细菌发生溶菌。线形的染色体 DNA 在这种强碱性并结合热处理的环境中发生不可逆的变性作用。随之苯酚-氯仿抽提,染色体 DNA 和蛋白质一起沉淀,而质粒 DNA 仍然留在水相中。

二、实验步骤

1. 在 3 mol LB 培养基接入带质粒的细菌菌株,37℃ 培养过夜。如所用的细菌是大肠杆菌,则可将菌种在 1 cm² 的 LB 固体培养基上,37℃ 培养后收取 1/4 的菌。如用脓杆菌则在 30℃ 培养。

2. 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。

3. 将菌体悬浮在 1 ml E 缓冲液中。

4. 加入 2 ml 溶菌液。轻微振荡,使之混匀。

5. 在 50~60℃ 的热水浴中加热约 20 min。对于不同种的细菌,这一步热处理所用的温度及时间可以是不相同的。对大肠杆菌而言,热处理的温度以 55℃ 为宜,所需时间为 15~60 min。对于

含有小质粒及重组质粒的大肠杆菌细胞,这一热处理的步骤可以省掉。对脓杆菌而言,热处理以 65℃,1 h 为宜。

6. 加入 2 倍体积的苯酚-氯仿液,轻微摇动使之成为乳浊液。
7. 4 000 r/min 离心 10~15 min,使乳浊液分层。
8. 用粗头滴管取出水相。此样品可以直接用于电泳检查。
9. 用等体积乙醚抽提 2~4 次,以除去残余的苯酚。
10. 加入 2~2.5 倍体积乙醇置 -20℃ 过夜。
11. 离心,弃乙醇
12. 将沉淀溶于 TE 缓冲液中。

对于大相对分子质量的 Ti 质粒而言,乙醇沉淀 DNA 的步骤可以省去。经苯酚-氯仿处理后的水相,用 10 mmol/L Tris/HCl 缓冲液(pH7.4)透析,除去残余的苯酚和氯仿,此样品即可直接用于转化。

用上述方法提取的质粒 DNA 可用于转化和 DNA 体外重组实验。这个方法的优点是快速,并且使用范围极广。这种方法的另一优点是不用溶菌酶,因而不像其他方法,受溶菌酶质量好坏的影响。

三、器材和试剂

(一) 器材

同煮沸法

(二) 试剂和培养基

1. 培养基 LB 和 LB 固体培养基

2. 提取质粒 DNA 所需的试剂

(1) 溶菌液 30 g/L SDS 溶于 50 mmol/L Tris 中,用 NaOH 调 pH 至 12.6。

(2) E 缓冲液 40 mmol/L Tris, 2 mmol/L EDTA, 用冰醋酸调 pH 至 7.9。

(3) 苯酚-氯仿液 重蒸酚在冰冻条件下保存,临用前,将冰冻保存的重蒸酚融解,与氯仿按 1:1(体积)的比例混匀。

(4) 95% 乙醇

(5) TE 缓冲液 0.02 mol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, pH7.4。

(三) 实验材料

各种含有质粒的细菌菌株,如大肠杆菌 SF8(pBR322)

(第四军医大学 陈南春)

实验十五 聚合酶链反应

一、原理

PCR 是由一系列的变性→退火→延伸反复循环构成。① 变性:加热使模板 DNA 双链间的氢键断裂而形成两条单链;② 退火:突然降温后模板 DNA 与引物按碱基配对原则互补结合,此时也存在两条模板链之间的结合,但由于引物的高浓度、结构简单等特点,从而使主要的结合发生在模板与引物之间;③ 在 DNA 聚合酶和 4 种脱氧核糖核苷三磷酸及 Mg^{2+} 存在的条件下,以引物 3' 端为起始点,催化 DNA 链延伸。以上三步为一个循环,每一个循环的产物可以作为下一个循环的模板。因此扩增产物的量以指数方式增加。理论上,经过 N 次循环特定片段扩增 2^N 倍。考虑到扩增效率不可能 100%,实际上要少些,通常经 25~30 次可扩增目的片段约 10^5 倍,这个量足够分子生物学研究的一般要求。本实验以 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 GST(glutathione S-transferase)融合表达载体 pGEX 质粒为模板,经 PCR 扩增后可得到 760 bp 的产物片段。

二、器材

台式高速离心机,0.5 ml PCR 薄壁 eppendorf 管,可调式取液器(20 μ l,200 μ l),PCR 自动扩增仪,电泳仪,电泳槽。

三、试剂

1. 模板 pGEX-4T 质粒(Amersham Pharmacia Biotech)
2. 引物 P1:5' - caccaatgcttctggcgctcagg - 3'
P2:5' - ttgggaacgcacccagcagcattg - 3'
3. Taq DNA 聚合酶 此酶是从嗜热水生菌 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株中分离提纯的,能耐受高温,在 70~75 $^{\circ}$ C 时具有最高的生物学活性。
4. 10 \times 缓冲液 500 mmol/L KCl,100 mmol/L Tris-HCl (pH8.4, 20 $^{\circ}$ C),15 mmol/L $MgCl_2$,1 mg/ml 明胶,高压消毒后备用(本缓冲液商品 Taq DNA 聚合酶中配备)。
5. 各 2.5 mmol/L dNTP 将 10 mmol/L dATP,dCTP,dGTP,dTTP 钠盐(Sigma 产品)合并,分装成 40 μ l/管。
6. 7 g/L 琼脂糖。

四、操作

1. 在 0.5 ml PCR 薄壁 eppendorf 管中加入:

10 \times PCR:	5 μ l
dNTP:	4 μ l
模板(质粒):	1 μ l(约 10 ng)

引物 P1: 5 μ l (约 500 ng)

引物 P2: 5 μ l (约 500 ng)

ddH₂O: 29 μ l

2. 煮沸 5 min, 冰浴 2 min 后稍离心加入 Taq 酶 1 μ l (1~5 U), 再用 40 μ l 矿物油封顶。

3. PCR 扩增

94℃ 20 s \rightarrow 56℃ 30 s \rightarrow 72℃ 20 s \rightarrow 72℃ 5 min \rightarrow 4℃

30 次循环

4. 取 20 μ l PCR 反应液于 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。可见 760 bp 长的扩增条带。

(第二军医大学 邹鲁峰)

实验十六 分子杂交实验

DNA 片段的 Southern 印迹转移

一、原理

Southern 印迹转移是指先用凝胶电泳分离 DNA 片段, 然后用碱处理凝胶, 使其中的 DNA 片段变性。在高盐条件下, 将单链 DNA 片段吸印在硝酸纤维素滤膜上, 经烤干固定后与 ³²P 标记的 DNA 探针进行分子杂交。用放射自显影观察和计算被探针杂交的 DNA 片段的大小。

二、操作

1. DNA 琼脂糖凝胶电泳分离 利用琼脂糖凝胶电泳可以很容易地将 DNA 限制酶消解片段 (M_r : $0.3 \times 10^3 \sim 25 \times 10^3$) 分离开, 分离大分子 DNA 片段 (800~12 000 bp) 用低浓度琼脂糖 (7 g/L), 分离小分子片段 (500~1 000 bp) 用高浓度琼脂糖 (10 g/L), 300~5 000 bp 的片段则用 13 g/L 的琼脂糖凝胶。根据分离样品量, 分离速度和分辨率要求的不同, 可选用不同规格的电泳槽。

电泳时, 同时将标记物加到旁边孔中, 便于确定样品 DNA 的相对分子质量。20 V 恒压电泳过夜, 电泳毕, 将胶浸到含 0.5 μ g/ml EB 的 TBE 缓冲液中染色 30 min, 也可将 EB 直接加到电泳缓冲液中或在灌胶前加入胶中。在 254 nm 短波透射灯下拍照, 加橙黄色滤色镜, 使用高速一次成像胶片, 光圈 f4.5, 曝光 20~40 s。

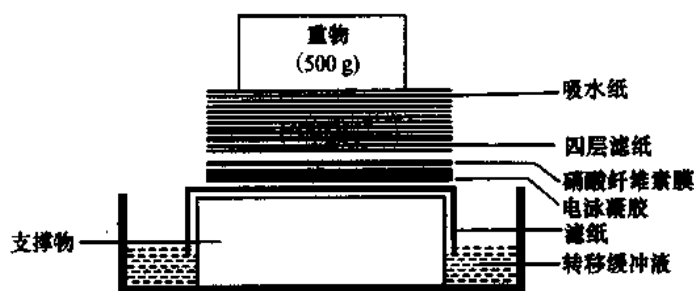
2. DNA 碱变性 电泳结束后, 小心取出琼脂糖凝胶, 切去多余部分, 放入塑料盘内, 倒入 0.5 mol/L NaOH, 0.6 mol/L NaCl 溶液, 缓慢摇动 30 min, 倒掉碱溶液, 用蒸馏水洗凝胶。

3. 中和碱性凝胶 将中和液倒入盘内, 缓慢摇动 30 min。

4. 硝酸纤维素膜处理 取一张和凝胶同样大小的硝酸纤维素膜, 先用蒸馏水浸透 5 min, 再浸入 $20 \times$ SSC 溶液中 5 min。

5. DNA 转移准备 取大小合适的塑料盘和玻璃板一块,裁五张与凝胶大小相同的普通滤纸,再裁一叠(约 10 cm 厚)与凝胶同样大小的卫生纸。

6. DNA 转移 塑料盘内倒入足够的 $20\times$ SSC 溶液,盘上架上玻璃板,将两张滤纸条在 $20\times$ SSC 溶液中浸湿,平铺在玻璃板上。滤纸两端浸在溶液中,去净气泡。将中和好的凝胶小心地置于滤纸中央,去除两者间的气泡。将处理好的硝酸纤维素膜盖在凝胶上(光面朝上),同样去除气泡。再在上面盖上 4~6 层滤纸,然后上面放约 10 cm 厚的吸水性好的卫生纸,最上面放上一块玻璃板,玻璃板上再压一个 600 g 左右的重物,室温下压印转移 12~14 h。次日取出硝酸纤维素滤膜,将滤膜夹在两层普通滤纸间。在室温中晾干,然后在 80°C 真空烘烤 2 h,以使印迹在滤膜上的 DNA 更牢固地吸附在滤膜上。注意不要用手直接接触硝酸纤维素膜。



图实-6 Southern 印迹转移装置示意图

三、试剂和材料

1. DNA 变性液 0.5 mol/L NaOH , 0.6 mol/L NaCl
2. 中和溶液 $0.5\text{ mol/L Tris-HCl}(\text{pH}7.0)$, 1.5 mol/L NaCl
3. $20\times$ SSC 800 ml 水中溶解 175.3 g, NaCl 和 88.2 g 柠檬酸钠,加入数滴 10 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,加蒸馏水到 1 000 ml,高压灭菌。
4. 硝酸纤维素膜
5. 滤纸,卫生纸

切口平移法标记 DNA 探针

一、原理

切口平移(nick translation)是把具有放射活性的核苷酸掺入到双链 DNA 分子中的一种常用方法。先利用 DNase I 在 DNA 双链上随机切开许多带有 $3'-\text{OH}$ 的切口,再利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 在切口处 $5'\rightarrow 3'$ 连续切除核苷酸残基的同时也从 $5'\rightarrow 3'$ 连续聚合核苷酸残基的性质,把 ^{32}P 标记的核苷酸残基掺入到新合成的双链 DNA 中。用于切口平移标记的 DNA 可以是线性的,也可以是环状的质粒 DNA。此法标记物的比放射性活度通常为 $10^8\text{ cpm}/\mu\text{g}$ 。

二、操作步骤

1. 取一 Eppendorf 管按以下次序逐一加入

待标记的 DNA(0.5~1 μg)	1 μl
10 \times dNTP 缓冲液	2 μl
dGTP、dCTP、dTTP 混合底物(0.6 mmol/L)	4 μl
DNase I	1 μl (25 pg/ μl)
DNA 聚合酶 I	1 μl (5 U/ml)
ddH ₂ O	7 μl
在同位素室加入 [α - ³² P] dATP	4 μl (1.48×10^6 Bq)
混匀, 盖好	

放入 12~16℃ 水浴中反应 10 min, 反应结束后加入 180 μl 终止缓冲液

2. Sephadex G-50 柱分离标记 DNA 片段 取一支 1 ml 塑料注射器, 底部填少量硅化玻璃纤维, 注射器放入 10 ml 玻璃离心管内将已用 TE 缓冲液平衡好的 Sephadex G-50 装入注射器内, 台式离心机 3 000 r/min 离心 2 min, 反复数次直至离心后凝胶面离管口约 1.5 cm 处用 5 倍于柱体积的 TE 缓冲液稀释。在玻璃离心管内放入一个去盖的 1.5 ml 塑料离心管, 再把装有凝胶的注射器放入玻璃离心管内, 小心把标记好的反应液体加到凝胶表面, 3 000 r/min 离心 2 min, 再加 100 μl TE 缓冲液于凝胶表面, 同样离心。用小镊子取出 1.5 ml 塑料离心管, 置于铅罐中, -20℃ 保存备用。

3. 测总 cpm 取 2 μl 标记物滴于 1 cm 见方的干净滤纸上, 晾干后, 将纸片放入闪烁瓶内, 加 3 ml 闪烁液, 用液体闪烁仪测 cpm, 计算总放射性活度和比放射性活度。

$$\text{总 cpm} = \text{测到的 cpm} \times \text{总体积} / 2$$

$$\text{探针的比放射性} = \text{总 cpm} / \text{标记片段 } \mu\text{g 数}$$

三、材料和试剂

1. α -³²P 标记试剂盒 [α -³²P] dATP (1.11×10^{11} Bq/mmol), dNTP 混合物(其中缺 dATP), 10 \times 缓冲液, DNase I, DNA 聚合酶 I, 反应终止液。

2. 做探针用的 DNA 片段或质粒

3. 1 ml 塑料注射器

4. Sephadex G-50

5. 闪烁液

PPO (2, 5-二苯基噁唑) 6.0 g

POPOP [1,4-双-(2',5'-苯基噁唑)苯] 0.01 g, 加甲苯到 1 000 ml

硝酸纤维素膜的杂交与放射自显影

一、原理

双链结构的 DNA 分子在加热、碱性环境或受尿素、甲酰胺等氢键解离剂的作用下, 形成单链, 称为核酸的“变性”。如果用一段已知序列并标记放射性同位素的核酸片段, 作为探针, 与未知样品中的核酸分子在变性条件下作用, 当样品核酸与探针之间碱基有互补序列时, 它们之间就会形成双链

——杂交分子。这个过程叫“退火”。由于探针具有放射性,通过放射自显影能在 X 光胶片上显示杂交带的位置,根据标准相对分子质量片段的位置,可以计算出与探针杂交的 DNA 片段的大小。

二、操作

1. 预杂交 将烘烤后的硝酸纤维素滤膜,放入稍大于滤膜面积的食品塑料袋中,加入 10 ml 预杂交液。仔细除去袋内所有气泡,用塑料封口机封口,塑料袋千万不要有渗漏,将封好的塑料袋放入 42℃ 水浴中,预杂交 6 h 以上或过夜。

2. 杂交 塑料袋剪一小口,将标记好的 DNA 探针全部加入预杂交液中,混匀,排除气泡,仔细封口。严格检查塑料袋有否渗漏,为防止万一,可再套上一个塑料袋。最后放入 42℃ 水浴中保温 20 h。

3. 漂洗滤膜 取出杂交袋,倒掉杂交液(内有同位素,千万不许乱倒),用 2×SSC,0.1% SDS 室温漂洗,每次 10 min,共 3 次。然后用 β 射线仪检测,如本底太高,再用 0.1×SSC,0.1% SDS 在 50℃ 水浴中漂洗 1~2 次,漂洗时缓慢摇动。

4. X 光胶片自显影 漂洗好的滤膜,用滤纸吸去水珠,用保鲜膜包好,以下步骤在暗室内进行,两侧各放一张 X 光胶片,夹在暗匣内,入 -20℃ 冰箱 3~5 天。

5. X 光胶片的显影与定影 在暗室内,打开暗匣,小心取出一张 X 光胶片,(千万别移动下面的杂交膜和另一张 X 光胶片),取出的 X 光胶片浸入显影液中(20℃)轻轻摇动,在红灯下观察,直至显示清晰的感光带。自来水冲洗一下,浸入定影液中 10 min 以上,然后用自来水漂洗,晾干,分析结果。

三、材料和试剂

1. 20×SSC (3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸三钠)
 2. 200 g/L SDS
 3. 甲酰胺
 4. 10% 焦磷酸钠(pH 6.5)
 5. 鲑精 DNA(5 mg/ml)或小牛胸腺 DNA
 6. 60% 硫酸葡聚糖
 7. 50×Denhardt's (Ficoll M_r 400 万 1 g, PVP 1 g, BSA 1 g 加重蒸馏水至 100 ml)
 8. 预杂交液 20×SSC 2.5 ml, 200 g/L SDS 0.1 ml, 甲酰胺 5 ml, 100 g/L 焦磷酸钠 0.1 ml, 鲑精 DNA 0.3 ml, 50×Denhardt's 1 ml, ddH₂O 1 ml, 混匀。
 9. ³²P 标记 DNA 探针
 10. X 光胶片,显影液和定影液
- 注意:同位素实验要严格遵守有关制度。

地高辛标记 DNA 探针及检测

一、原理

地高辛标记 DNA 探针,多采用随机引物标记法,地高辛连接到 dUTP 上,与其余三种 dNTP

(dATP, dCTP, dGTP)为共同合成DNA片段的原材料。随机引物为各种序列组成的六核苷酸,它们可以互补于单链DNA模板的某一位置。作为引物,在DNA聚合酶作用下延长DNA片段,在此过程中将地高辛标记的dUTP掺入到新合成的DNA片段中,样品DNA处理及转移与第一个实验相同,转移到膜上的DNA样品在与DNA探针杂交时,有同源序列的探针将与样品DNA杂交在膜上,然后用抗地高辛抗体进行检测,连接在抗地高辛抗体上的碱性磷酸酶可使底物NBT呈色。

二、操作步骤

1. 标记

- ① 稀释模板DNA到15 μ l (0.5~3 μ g DNA),沸水浴中加热10 min,然后迅速插入冰盐水中。
- ② 加2 μ l引物,2 μ l dNTP,1 μ l DNA聚合酶(Klenow),混匀。
- ③ 37℃保温至少60 min。
- ④ 加2 μ l 0.2 mol/L EDTA以终止反应。
- ⑤ 加2.5 μ l 4 mol/L 氯化锂和75 μ l 预冷(-20℃)的乙醇,混合。
- ⑥ -70℃放置30 min或-20℃放置2 h。
- ⑦ 离心15 min去上清,用50 μ l 冷乙醇洗沉淀一次。
- ⑧ 离心15 min去上清,真空干燥管底的DNA沉淀,并用50 μ l TE缓冲液溶解。
- ⑨ 对于大多数的膜杂交而言,地高辛标记的DNA探针不用特殊的纯化,但一定不能用酚/氯仿处理,因为地高辛会进入有机相。

2. 杂交

- ① 预温适当体积的杂交液(20 ml/100 cm²),杂交膜在其中轻轻摇动。
- ② 地高辛标记的DNA探针,100℃,5 min,并迅速放冰冷水中。
- ③ 加入杂交液中,避免杂交膜漂浮。
- ④ 温浴,至少6 h,如果检测单拷贝和低浓度的靶DNA,可延长杂交时间到16 h。

3. 洗膜

- ① 2×SSC,1 g/L SDS洗2次,每次5 min,室温。
- ② 0.1×SSC,1 g/L SDS,68℃洗2次,每次15 min。

4. 检测

- ① 杂交后的膜不要干燥,浸在马来酸中1~5 min。
- ② 在封闭液中浸30 min。
- ③ 用封闭液稀释抗地高辛连接碱性磷酸酶的抗体到75 pmol/ml (1:10 000)。
- ④ 杂交膜浸入抗体液中30 min。
- ⑤ 用马来酸洗2次,15 min/次。
- ⑥ 在检测缓冲液中浸2~5 min。
- ⑦ 杂交膜在新鲜制备的冷的呈色溶液中浸5 min,最好避光。
- ⑧ 呈色的条带或点在几分钟内即可出现。
- ⑨ 终止呈色可用水洗。

三、材料和试剂

此实验的材料来自 Boehringer 公司的试剂盒。

(第四军医大学 刘新平)

实验十七 DNA 重组实验

DNA 重组实验是一组系列实验。它包括载体 DNA 和目的基因的限制性内切酶酶切、酶切后 DNA 片段的琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 片段的回收纯化、重组体的构建、重组体转化宿主细菌、重组体的筛选鉴定等 5 个小实验。本实验用 p53 抑癌蛋白的 cDNA 基因片段作为目的基因,以质粒 pUC19 作为克隆载体介绍 DNA 重组实验。也可以根据情况,选用适宜的目的基因和载体进行实验。

一、原理

p53 抑癌蛋白的 cDNA 基因长度约 1.7 kb,其 3'、5'末端及 pUC19 质粒多克隆位点上分别有限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 的唯一酶切位点。酶切后经琼脂糖电泳分离、回收纯化,在 T4 DNA 连接酶催化下目的基因与载体定向连接成重组子,用 CaCl_2 法转化入感受态宿主菌 *E. Coli* JM103 中繁殖扩增,利用 α 互补的插入失活,筛选出含有阳性重组体的菌落,并用质粒快速抽提法提取阳性菌落的质粒,进行酶切电泳分析鉴定。

二、操作

(一) 质粒和目的基因的酶切

因为限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 都是使用高盐缓冲液,可在同一缓冲液内同时进行双酶切。取两只 Eppendorf 管,编号后分别加入:

	1 号	2 号
双蒸水	16 μl	16 μl
10 \times 内切酶缓冲液	2 μl	2 μl
pUC19 质粒	1 μl (1 μg)	p53 cDNA 1 μl (1 μg)
内切酶 <i>EcoR</i> I	0.5 μl (5 U)	0.5 μl (5 U)
内切酶 <i>Sal</i> I	0.5 μl (5 U)	0.5 μl (5 U)
总体积	20 μl	20 μl

按照水、缓冲液、DNA、酶的顺序加入到 Eppendorf 管中,盖好管盖,用振荡器振荡 2 s,使液体充分混匀,置于离心机内离心 2 s,使液体集中在管底。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1~3 h,然后在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min 终止酶切。各加入 6 \times 点样液 4 μl ,混匀,准备电泳。

(二) DNA 片段的琼脂糖电泳及回收

1. 制备琼脂糖电泳凝胶平板

(1) 把凝胶成型模具两端用透明胶带封好,水平放置,将选好的加样梳放好,注意梳底与模具底部之间需留有 1 mm 的间隙。

(2) 按所分离的 DNA 分子片段大小选择合适的凝胶浓度。称取 0.8 g 琼脂糖放入 250 ml 的三角烧瓶,加入 100 ml 1×TAE 缓冲液,在微波炉中加热至完全熔化,放置冷却到 70 ℃ 左右(以不烫手为宜),加入 5 μl (10 mg/ml) 溴化乙锭溶液,混匀后把凝胶倒入凝胶成型模具。

(3) 室温下待凝胶完全凝固,在需要的 DNA 片段预计出现的位置,挖出一小块琼脂糖凝胶(约 10 mm×10 mm),然后加入熔化了同样浓度并已加入溴乙锭的低熔点琼脂糖,待其凝固后,揭去两端透明胶带,把胶板放入电泳槽中,在电泳槽内加入 1×TAE 缓冲液,以高出胶面 2 mm 为宜,小心地拔出梳齿。

2. 电泳和回收

(1) 两种酶切反应液各取 10~20 μl,分别小心加入凝胶样品孔内,在另一孔加入 DNA 相对分子质量标准参照物(λ DNA + HindIII 酶解片段)。加样端接电泳仪负极,接通电源,按 5 V/cm 电场强度,电泳 90 min。在紫外灯下观察电泳结果,电泳结束时,应能使 DNA 相对分子质量标准参照物分离良好,在 2.7 kb 位置观察到酶切质粒条带,在 1.7 kb 位置观察到目的基因条带。

(2) 电泳分离的 DNA 片段可用多种方法进行回收,我们选用低熔点琼脂糖挖块法回收。在紫外灯的监视下电泳,观察所需 DNA 片段完全迁移到低熔点琼脂糖中后,停止电泳,用小刀挖出含有 DNA 片段的低熔点琼脂糖。

3. 抽提纯化 DNA 片段

(1) 在紫外灯下,把挖出的低熔点琼脂糖中不含 DNA 片段的部分尽量切除,将含有 DNA 片段的凝胶小心转移至 Eppendorf 管中,放置在 65 ℃ 水浴中,5~10 min 后就会融化,再加入 2 倍胶体积 TE 缓冲液以降低琼脂糖浓度,加入等体积的饱和酚剧烈振荡 5~10 min,15 000 r/min 离心 10 min 以除去琼脂糖。

(2) 取出含 DNA 片段的上层水相,加等体积的正丁醇,充分振荡混匀后 8 000 r/min 离心 5 min,弃去上层液,此步为去除溴乙锭。

(3) 再用等体积的苯酚、酚/氯仿/异丙醇、氯仿/异丙醇各抽提一次(加入有机试剂后,剧烈振荡 30 s,8 000 r/min 离心 5 min,小心取出上层水相,转移到另一离心管中)。

(4) 上层水相加 0.2 倍体积的 10 mol/L 醋酸铵,2 倍体积无水乙醇,0℃ 冰浴放置 30 min,15 000 r/min 离心 10 min,弃去乙醇。用 0.5 ml 70 % 乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,弃去乙醇后,真空干燥,去除水分和残余的乙醇。

(5) 加入 10 μl TE(pH 8.0) 缓冲液,用加样器反复冲洗,使 DNA 沉淀溶解,离心 2 s 以集中 DNA 溶液于管底。

(三) 载体 DNA 与目的 DNA 片段的连接

经酶解、电泳分离后,可回收得到 pUC19 和 p53 蛋白 cDNA 具有互补粘性末端的 DNA 片段,在 T4 DNA 连接酶的催化下,载体与目的基因的粘性末端共价结合,定向连接,环化成为一个重组的环状 DNA 分子。

1. 在 Eppendorf 管中依次加入:

重蒸水	4 μl
10 \times DNA 连接酶缓冲液	1 μl
pUC19 载体片段	1 μl (0.1 μg)
p53 蛋白 cDNA 片段	3 μl (0.3 μg)
T4 DNA 连接酶	1 μl (0.1 U)
总体积	10 μl

2. 盖紧管盖,振荡 Eppendorf 管 2 s,混匀溶液样品,在离心机上离心 2 s,使样品集中在管底,放在 15 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中连接过夜(12~16 h)。连接反应完成后,即可用于下一步的转化。

(四) 重组 DNA 的转化

1. 感受态细菌的制备(无菌操作)

(1) 取一个单菌落 *E. Coli* JM103 菌种接种于 2 ml LB 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡 (250 r/min) 培养过夜(约 16 h)。

(2) 取 0.5 ml 上述菌液(A_{590} 约为 1.5)转接到 50 ml LB 培养液中(接种量按菌液浓度而定,一般为 1%),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养至对数生长期中期(A_{590} 约为 0.2~0.4,一般需 2~3 h)。

(3) 冰浴菌液 10 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清。

(4) 取 25 ml,100 mmol/L 冰冷的 CaCl_2 溶液加入到离心管中,使菌体悬浮在溶液中冰浴 10~15 min,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清。

(5) 取 2 ml,100 mmol/L 冰冷的 CaCl_2 溶液加入到离心管中,把菌体悬浮,按每份 200 μl 分装于无菌 Eppendorf 管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 存放。在制备好感受态细菌后 24~48 h 进行转化。

2. 转化反应(无菌操作)

(1) 取感受态细菌 3 份,按下表操作

① 实验管	② 阳性对照	③ 空白对照
菌液 200 μl	菌液 200 μl	菌液 200 μl
重组 DNA 质粒 2 μl	未酶切 pUC19 质粒 2 μl	H_2O 2 μl

温和混匀,冰浴中放置 30 min。

(2) 迅速转入 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s,再迅速放回冰中,将细胞冷却 2 min 后,加入 800 μl LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,水浴 5 min,然后 37 $^{\circ}\text{C}$,250 r/min,振荡培养细菌 60 min,让细菌复苏,使进入细菌中的质粒表达抗生素抗性蛋白。

(3) 在已准备好的固体 LB(含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的氨苄青霉素)培养皿上,各加入 50 μl 转化菌液,涂匀。室温下放置 20~30 min,待溶液被琼脂吸收后,倒置平皿,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,一般 12~16 h 后可出现菌落。

(五) 重组体的筛选鉴定

1. 蓝白筛选(无菌操作) 因为载体选用 pUC19 质粒,可与宿主菌进行 α 互补,形成具有酶学活性的 β -半乳糖苷酶,在生色底物 X-gal 存在时形成蓝色菌落,插入外源基因后,破坏了 β -半乳糖苷酶的结构基因,也破坏了 pUC19 质粒与宿主之间的 α 互补作用,因此带重组质粒的细菌形成白色菌落。

(1) 在一事先制备好的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平皿上加入 40 μl X-gal 贮存液和 4 μl IPTG 溶液。用无菌玻璃涂布器把混合溶液涂布于整个平板的表面,等待吸收,由于二甲基酰胺挥发度低,一般需放置 3~4 h。

(2) 将 50 μl 实验管菌液涂布在琼脂培养基表面,待吸收后,倒置平皿于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h。

(3) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 将平皿放置数小时,使蓝色充分显现。无重组子的菌落中间为淡蓝色,外周为深蓝色。有重组子的菌落为白色。

2. 酶切鉴定

(1) 挑选平皿中若干个单独生长的白色菌落,分别接种于 4 ml LB 培养基中,并进行编号。37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min, 振荡培养过夜(LB 培养基中含有 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素)。

(2) 次日,各取 3 ml 菌液快速提取质粒 DNA,方法见“实验十四 质粒 DNA 的分离与提纯”,剩余的菌液冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂时保存。

(3) 按本实验“(一) 质粒和目的基因的酶切”的操作对快速提取的重组质粒分别进行单、双酶切,以得到线性重组质粒以及插入的片段;按本实验“(二) DNA 片段的琼脂糖电泳”的操作进行琼脂糖电泳。

(4) 在紫外灯下观察电泳结果,进行分析鉴定。pUC19 质粒长度为 2.7 kb, p53 蛋白 cDNA 长度为 1.7 kb。总长度为 4.4 kb,并含有 2.7 kb 和 1.7 kb 两个片段的质粒为正确的重组质粒。由于采用双酶切定向克隆方案,不需要鉴定目的基因的插入方向。

(5) 把含有正确重组质粒的细菌扩增培养,加终浓度为 50 % 的灭菌甘油,小管分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。或液氮速冻后,转至 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存菌种。

三、注意事项

1. 注意酶切和连接反应时加样的次序,一般次序为水、缓冲液、各种 DNA,最后才加酶。所有 Eppendorf 管和 Tip 头都要使用新的,经高压灭菌,一次性使用。待用的酶要放在冰浴内,用后盖紧盖子,立即放回 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,防止酶被污染或失活。

2. 琼脂糖凝胶电泳时,电泳缓冲液要用 TAE 而不能用 TBE 缓冲液,因为 TBE 中的硼酸溶液与琼脂糖的反式糖单体或多聚体形成复合物,将使低熔点琼脂糖凝胶难以熔解。电泳操作中要特别注意防止 EB 的污染(EB 为强诱变剂)以及紫外线对眼睛和皮肤的伤害。

3. 转化和筛选实验均需无菌操作,所有器具及试剂都需进行灭菌处理,部分实验操作需要在超净工作台中进行。42 $^{\circ}\text{C}$ 热休克处理很关键,温度和时间都要求准确。

四、材料和试剂

1. pUC19 质粒(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. p53 蛋白 cDNA(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
3. 限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Sal* I
4. 10 \times 酶切缓冲液(厂商提供,高盐型)
5. 高压灭菌双蒸水
6. 水浴箱,恒温空气摇床
7. 电泳用琼脂糖、低熔点琼脂糖

8. 电泳仪、电泳槽
9. $1\times$ TAE 缓冲液 0.04 mol/L Tris-HAc, 0.002 mol/L EDTA
10. $6\times$ 点样液 0.25 % 溴酚蓝、400 g/L 蔗糖
11. 溴乙锭(10 mg/ml)
12. 正丁醇、氯仿、饱和重蒸酚、无水乙醇、70 % 乙醇
13. 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)
14. 10 mol/L 乙酸铵
15. TE 缓冲液 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA (高压灭菌后使用)
16. T4 DNA 连接酶
17. $10\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 660 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L $MgCl_2$
50 mmol/L DTT、10 mmol/L ATP
18. 100 mmol/L $CaCl_2$ 高压灭菌
19. LB 液体及固体培养基
20. *E. Coli* JM103 菌种
21. X-gal 溶液(溶于二甲基甲酰胺, 浓度 20 mg/ml)
22. IPTG 溶液(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 浓度 200 mg/ml)

(同济医科大学 王淳本)

第四部分

附 录

I 实验须知

前言

生物化学与分子生物学是生命科学中发展最迅速的前沿学科之一,其理论已和临床医学、遗传学、微生物学、免疫学、生物学等相互交融、互相渗透。它的实验方法和研究手段已成为基础、临床众多学科间共同拥有的技术。这门实验技术将为你今后的研究工作提供科学的思维、严谨的方法。进入实验室之前,细细阅读《实验须知》。对于实验室常识、规则、安全等你应熟知,玻璃器皿的处理你应小心,微量移液器(枪)的正确使用你应掌握。当你步入实验室后,每做一个实验,都应养成“预习—操作—小结”良好习惯。预习:有二层含义,即预习和做笔记。预习是为复习、巩固先前所学理论知识,是要运用这些知识解释实验原理、实验现象。对于每步操作,不仅要知其然,更应知其所以然。每加一种试剂都应问一个“为什么”?实验中应掌握什么?了解什么?注意什么等等你都应圈圈点点,记录在案,心中有数,有备而行,你的实验就取得了一半的成功。操作:假如你对于实验操作及其依据的理解得非常透彻,那么不仅使你顺利进行试验,又为你在实验室内节约大量时间。严格遵守实验规则,按部就班实验操作(在独创性研究中是没有操作步骤可循的,它是建立在渊博理论知识基础之上的),详细记录试验中每一细小变化,记录有关现象,准确地记下数据。小结:实验报告的格式可因指导教员风格而有所差异,但基本点都应该是书写工整、内容翔实、表述清晰、分析得体、文字流畅等。

一、实验室规则

1. 保持肃静 不许喧哗、打闹,创造整洁、安静、有序的实验环境。
2. 保持整洁 实验时应穿工作服,书包等物品按规定放置整齐,不许乱丢污物和随地吐痰。实验结束后,清理器材,彻底清洗试管、烧杯等实验用品,物归原处,实验废品(火柴棍、滤纸等)放指定地方,不得随意乱丢。
3. 严格操作 认真预习、切忌盲目、做好准备、提高效率。实验时严格遵守操作规程,仔细观察,作好记录,认真书写实验报告,不合格者必须重写。枪头、滴管专用专放、防交叉污染。使用仪器必须在教员的指导下进行,不得随意乱动。使用枪时,必须先熟读“枪的使用方法”,玻璃器皿轻拿轻放。
4. 注意节约 爱护标本、器材,节约试剂、水电、防止破损浪费。无故损坏酌情赔偿。
5. 保证安全 室内严禁吸烟。用试管加热煮沸时,管口不能对人。使用危险、有毒物品时严格按照要求操作,使用同位素应注意防护和防止污染。如有意外立即报告。实验完毕,清洁卫生,关好门、窗、水、电等。

二、实验室常识

1. 凡挥发性、有烟雾、有毒和有异味气体的实验,均应在通风柜内进行,用后试剂严密封口,尽量缩短操作时间、减少外泄,操作者最好戴口罩,手套。

2. 凡使用有机溶剂,记住两点:第一,许多有机溶剂易燃(乙醚、丙酮、乙醇、苯等),遇明火或点燃的火柴时就会燃烧,所以在使用这类试剂时,一定要远离火源,或将火源熄灭后,方可大量倾倒。第二,许多有机溶剂有毒,例如许多含氯有机溶剂累积于人体内对肝脏有损害,因此要最大限度减少与有机溶剂接触,对挥发性有机溶剂一定在通风柜内操作。

3. 凡见光易变质的试剂,用棕色瓶贮存,或用黑纸包裹,并每次少量配制。

4. 量瓶是量器,不要用量瓶作容器。

5. 称量试剂,应用硫酸纸,不可用滤纸。

6. 标签纸的大小应与容器相称,标签上要写明物质的名称、规格和浓度、配制日期及配制人,标签应贴在试剂瓶 2/3 处。

7. 取用试剂和标准溶液后,需立即将瓶塞严,放回原处。取出的试剂和标准溶液,如未用尽,切勿倒回瓶内,以免掺混。

8. 配制试剂时,对所配的每种试剂,从纯度、结构式、相对分子质量、特性等都应熟悉,做到“有的放矢”。用过器皿应及时用自来水浸泡,以便于清洗和减少对器皿的侵蚀。

9. 使用贵重仪器如分析天平、分光光度计、离心机、微量移液器(枪),应十分重视,加倍爱护,使用前,应熟知使用方法。若有问题随时请示指导教师。使用时,要严格遵守操作规程,如遇试剂溅污仪器及时用洁净纱布擦拭。发生故障时,应立即关机,告知管理人员,不得擅自拆修。

10. 洗净器皿应倒置架上自然干燥,不能用抹布擦拭。

三、实验室安全

在实验室里,经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧或是有爆炸性的化学药品直接接触,常常使用易碎的玻璃皿,以及水、电、高温电器设备等。因此,必须十分重视安全工作。

1. 了解电闸、水阀门、煤气总阀门所在处,离开实验室时,一定要将室内检查一遍,应将水电、煤气等关好,门窗锁好。

2. 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴、离心机、电泳仪等)时,严防触电,绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。检查电器设备是否漏电时,应将手背轻轻触及仪器表面,凡是漏电的仪器,一律不能使用。

3. 使用高压锅消毒时,不得离人。易燃、易爆、腐蚀、有毒等试剂,决不能放高压锅内消毒,以防发生爆炸,造成人身伤亡。

4. 使用可燃物,特别是易燃物(乙醚、丙酮、乙醇等)时,应特别小心。如果不慎倒出相当量的易燃液体,应按下法处理。

(1) 立即关闭室内所有的电源和电加热器。

(2) 关门,开启小窗及窗户。

(3) 用毛巾或抹布擦拭溅出的液体,并将液体拧到大的容器中,然后再倒入带塞的玻璃缸中。

5. 凡使用腐蚀性试剂(浓酸、浓碱等),必须极为小心地操作,防止溅出,对于挥发性酸(HCl 等)应在通风柜内进行,同时应在盘内操作,一旦有洒出,立即用大量自来水冲洗,若溅在实验台或地面,必须及时用湿抹布或拖布反复擦洗干净,不得留痕迹。

6. 废液,特别是强酸和强碱不能直接倒在水池中,应先稀释,然后倒入水池,再用大量自来水冲洗水池及下水道。

7. 毒物应按实验室的规定办理审批手续后方可领取,使用时严格操作,用后妥善处理。

四、实验室急救

在实验过程中不慎发生意外事故时,不要惊慌,应立即采取适当的急救措施。

1. 触电 触电时可按下列方法紧急处理:① 关闭电源;② 用干木棍使导线与被害者分开;③ 将被害者移至木制板上,与土地分离;④ 急救者应先做好防止触电的安全措施,手或脚必须绝缘。

2. 火灾 发生火灾应先将电源关闭,移走一切易燃物品,然后迅速将火扑灭。根据火势大小,可采用湿抹布、湿工作衣、沙土、灭火器、灭火水龙头等灭火。但应注意,起火之物能与水混合者(如酒精)方可用水灭火;不能与水混合者(如汽油、乙醚)因浮于水面,更易扩大燃烧面积,因而不能用水灭火。衣服着火,切勿奔跑,免致火势加剧,可就地打滚压住着火部位,再以水浇灭之。

3. 烫伤 一般用 90%~95% 酒精消毒后,涂 2% 苦味酸或 5% 鞣酸,若皮肤起泡(二级烫伤),不要弄破水泡,防止感染;若烧伤严重者,应用无菌纱布盖好伤口,急送医院处理。

4. 受玻璃割伤及其他机械损伤 首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等碎片,然后用硼酸水洗净,再涂上碘酒,必要时用无菌纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血时,应迅速采取止血措施,同时送医院急救。

5. 强碱(NaOH、KOH) 钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时,要先用大量自来水冲洗,再用 5% 硼酸溶液或 2% 乙酸溶液涂洗。

6. 强酸、溴等触及皮肤而致灼伤 应立即用大量自来水冲洗,再用 5% NaHCO_3 溶液或 5% 氨水溶液洗涤。

7. 如苯酚触及皮肤引起灼伤时,可用酒精洗涤。

8. 若煤气中毒时,应到户外呼吸新鲜空气,严重时送医院处理。

五、移液器的使用及注意事项

移液器(取液器、枪)是一种取液量连续可调的精密取液仪器。它具有重量轻、精度高、读数直观、使用方便等特点,移液器好似战士手中的枪,是实验室使用频率最高、必备的取液仪器。枪价贵、精巧而且由你负责,故要小心对待,重视它们,实验室中对枪不加爱惜就会造成金钱、时间的耗费。因此,务必仔细阅读本节。

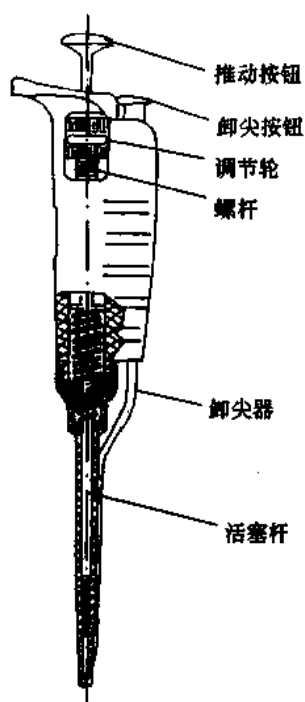
(一) 枪的构造及工作原理

1. 构造(图附-1)

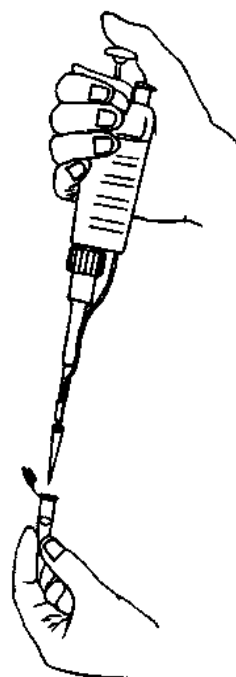
2. 标准持枪(图附-2)

3. 容量数据表示

20 μl	100 μl	200 μl	1 000 μl	5 000 μl
1	0	1	0	5
2	8	5	4	0
5	0	0	5	0
12.5 μl	80 μl	150 μl	450 μl	5 000 μl

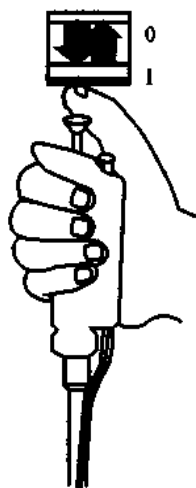


图附-1 枪的构造



图附-2 标准持枪

4. 工作原理 活塞移动的距离是由调节轮控制螺杆机构来实现的,推动按钮带动推杆使活塞向下移动、排出了活塞腔内气体,松手后,活塞在复位弹簧的作用下恢复其原位,从而完成一次吸液过程(图附-3、-4)。



图附-3 吸入



图附-4 排出

(二) 操作程序

1. 准备 将移液器吸头(枪头)套在移液器杆上,稍加扭转压紧枪头使之与枪杆间无空气间

隙。转动调节轮至所需容积,按图附-2所示手握移液器。

2. 吸液 轻轻按下推动按钮,使按钮由位置“0”推到位置“1”,将枪头垂直浸入液体2~4 mm处,缓慢松开按钮,即使按钮位置“1”复位到“0”位,完成吸液程序,停1~2 s后将枪移出液面(若枪头表面残留液体,可用少许滤纸轻轻擦掉,注意勿触及枪头口)。

3. 排液 将枪头尖部(口)以 $10^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 倾斜于容器内壁,缓慢按下推动按钮至位置“1”,继续按至位置“2”处,排放所有液体。停1~2 s后移走枪,松开推动按钮,压下枪头,即全部完成一次吸、排液过程。

(三) 使用注意事项

1. 特别强调二点,第一看准枪的最大量程,切勿拧过头!否则易导致调节轮失灵甚至报废,造成不必要的经济损失。第二移液器是实验必备量液精密仪器,它不是手中的“玩具”,因此,请不要用枪敲打桌面等物体,并严防摔地。

2. 排液时要按下二档至图示位置“2”,以便排净液体。

3. 移液过程中每步操作一致可获得最佳重复性,请注意速度及平稳性,浸入试样的深度,垂直握持移液器。

4. 为了避免液体进入移液器套筒内,请压放按钮时要慢且稳,放液要保持垂直,吸头中有液体时绝对不准放倒。

5. 为获得较高的精度,在取液时应先用吸液的方法浸渍吸头尖,以消除误差,因为当所吸液体是血清蛋白质及有机溶剂时,吸头内壁会明显残留一层“液膜”,如果吸头只用一次,这样误差可能会超出规定的误差范围,因为这个值对同一个吸头是一个常数,如果用这个吸头再吸一次,则精度是可以保证的。

6. 浓度大的液体其消除误差的补偿量由试验确定,其取液量可通过增加或减少容量计上的读数加以补偿。

六、玻璃仪器的清洗及各种溶液的配制

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否,直接影响实验结果,往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差,甚至会出现相反的实验结果。因此,玻璃仪器清洁工作是非常重要的。洗涤液的种类很多,应根据实验的要求、污物的性质和玷污程度来选择。

1. 初用玻璃仪器的清洗 新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质,可先用肥皂水(或去污粉)洗刷再用自来水洗净,然后浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜(不少于4 h),再用自来水冲洗,最后用蒸馏水或无离子水冲洗2~3次,自然控干或在 $100\sim 130^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烤干备用。使用蒸馏水的目的,只是洗去附着在仪器壁上的自来水,所以应采用少量多次的原则。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 一般玻璃仪器 如试管、烧杯、锥形瓶等(包括量筒),先用自来水洗刷至无污物,再选用大小合适的毛刷沾取去污粉(掺入肥皂粉)或浸入肥皂水内。将器皿内外(特别是内壁)细心刷洗,用自来水冲洗干净后,蒸馏水冲洗2~3次,烤干或倒置在清洁处,干后备用。凡洗净的玻璃器皿,不应在器壁上带有水珠,否则表示尚未洗干净,应再按上述方法重新洗涤。若发现内壁有难以去掉的污迹,应分别试用下述各种洗涤剂予以清除,再重新冲洗。

(2) 量器 如吸量管、滴定管、量瓶等。使用后应立即浸泡于自来水中,勿使物质干涸。工作

完毕后用流水冲洗,以除去附着的试剂、蛋白质等物质,晾干后浸泡在铬酸洗液中4~6 h(或过夜),再用自来水充分冲洗,最后用蒸馏水冲洗2~4次,风干备用。

(3) 其他 具有传染性样品的容器,如病毒、传染病患者的血清等玷污过的容器,应先进行高压(或其他方法)消毒后再进行清洗。

3. 洗涤液的种类和配制方法

(1) 铬酸洗液 铬酸洗液是浓硫酸和饱和重铬酸钾溶液的混合液,具有很强的氧化性、腐蚀性、酸性和去污能力,是实验室最常用的洗涤液。在配制铬酸洗液时,务须记住应把浓硫酸加到重铬酸钾盐溶液中!把水溶液加到浓硫酸中是极其危险的,因会发生迸溅。切勿让洗涤液接触皮肤或衣服,一旦溅出,马上用大量自来水冲洗。洗液用后收回,可反复使用。若已变为暗绿色,示已失效,无氧化性,不能继续再用,可倒入下水道,注意边倒边用大量自来水冲刷。常用洗液有下列三种:

① 称取10 g重铬酸钾,移入500 ml烧杯中,加100 ml自来水,搅拌下促溶,缓缓加入200 ml浓硫酸,随加随搅拌。

② 称取80 g重铬酸钾,溶于1 000 ml自来水中,慢慢加入100 ml浓硫酸(边加边用玻璃棒搅动)。

③ 称取200 g重铬酸钾,溶于500 ml自来水中,慢慢加入500 ml浓硫酸500 ml(边加边搅拌)。

(2) 浓盐酸(工业用) 可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

(3) 5%草酸溶液 用数滴硫酸酸化,可洗去高锰酸钾的痕迹。

(4) 5%~10%磷酸三钠($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)溶液 可洗涤油污。

(5) 5%~10%硝酸溶液 洗涤铝和搪瓷器皿中的污垢。30%硝酸溶液可用于洗涤 CO_2 测定仪器及微量滴管。

(6) 5%~10%乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA}-\text{Na}_2$)溶液 加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

(7) 尿素洗涤液 为蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

(8) 酒精与浓硝酸混合液 最适合于洗净滴定管,在滴定管中加入3 ml酒精,然后沿管壁慢慢加入4 ml浓硝酸(比重1.4),盖住滴定管管口,利用所产生的氧化氮洗净滴定管。

(9) 有机溶剂 如丙酮、乙醇、乙醚等可用于洗脱油脂、脂溶性染料等污痕。二甲苯可洗脱油漆的污垢。

上述洗涤液可多次使用,但是使用前必须将待洗涤之玻璃仪器先用水冲洗多次,除去肥皂、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂时,应先用软纸擦去,然后用乙醇或乙醚擦净后才能使用洗液,否则会使洗涤液迅速失效。例如:肥皂水,有机液剂(乙醇、甲醛等)及少量油污皆会使重铬酸钾-硫酸洗液变绿,减低洗涤能力。

七、实验误差与数据处理

在任何一种测量中,无论所用仪器多么精密,方法多么完善,实验者多么细心,所得结果常不能完全一致,而有一定的误差或偏差。误差是指测量值与真值之差,偏差是指测量值与平均值之差。

(一) 误差

根据误差的性质及其产生的原因,可将误差分为三种:① 系统误差或恒定误差;② 偶然误差;③ 过失误差。

1. 系统误差或恒定误差 恒定误差是指在测定中未发觉或未认识的因素所引起的误差。这些因素影响结果永远朝一个方向偏,其大小及符号在同一实验中完全相同。检查或改正的方法是扩大实验范围,采用不同的方法选取样品,用不同方法分离和提纯样品等。

系统误差是指因为:① 仪器不良,如刻度不准;② 试剂不纯;③ 周围环境的改变。如外界温度、压力、湿度变化;④ 个人的习惯和偏向,如读数偏高或偏低等所引起的误差。

系统误差与分析结果的准确有关,为了减少系统误差常采用下列措施:

(1) 空白试验 为了消除由试剂等因素引起的误差,可在测定时不加样品的情况下,按照与样品测定完全相同的操作手续,在完全相同的条件下进行分析,得到的结果为空白值,将样品分析得到的结果扣除空白值,可以得到比较准确的结果。

(2) 回收率测定 取一标准物质与待测的未知样品同时做平行测定。测得的量与所取的量之比的百分率就称回收率。这种由标准样品测得的回收率可以用来检验、表达某些分析过程的系统误差,因为系统误差越大,回收率越低。

(3) 仪器校正 对所用仪器进行校正,以减少误差。

2. 偶然误差 在测量中,当已经消除引起系统误差的一切因素后,所测数据仍在末一位或末二位数字上有差别,这类误差称为偶然误差。

偶然误差有时大,有时小,有时正,有时负,方向不一定,似乎没有规律性,但如果测量次数足够多,便可发现 ① 正误差与负误差出现的几率相等,② 出现小误差次数多,大误差次数少。减少偶然误差可采取下列措施:

A. 平均取样 动植物新鲜组织可制成匀浆后取样,固体样品可先进行粉碎、混匀后取样;细菌制成悬液,充分打散摇匀后取样。

B. 多次取样 根据误差出现的规律,进行多次平行测定,取其算术平均值,可以减少偶然误差。平行测定的次数愈多,其偶然误差就愈小。

3. 过失误差 过失误差是一种显然与事实不符的误差,它主要是由于粗枝大叶、过度疲劳、操作不正确等引起。例如读错刻度值,反读游标尺,加错试剂,记录错误,计算错误等。此类误差无规律可循,只要细心操作,多方警惕即可避免。

(二) 精确度与准确度

1. 精确度 精确度是指在测量中所测数值重复性的大小。精确度常用偏差来表示:

绝对偏差 = 个别测定值 - 算术平均值(不算正负号)

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{绝对偏差}}{\text{算术平均值}} \times 100\%$$

2. 准确度 准确度是指所测数值与真值符合程度,通常用误差来表示。误差越小,准确度愈高。误差分绝对误差和相对误差,可用下式表示:

绝对误差 = 测定值 - 真实值

$$\text{相对误差}(\%) = \frac{\text{绝对误差}}{\text{真实值}} \times 100\%$$

在实验中,通常真实值并不知道,因此在实际工作中无法求出分析的准确度,只能用精确度来评价分析结果。

在一组测量中,尽管精确度很高,但准确度不一定很好;反之,若准确度好,精确度也一定高。因此用精确度来评价分析的结果具有一定的局限性。

(三) 有效数字

有效数字就是在表示测量的精密度上有意义的数字。应该选取几位有效数字,取决于实验方法与所用的仪器的精确程度。认为在一个数值中小数点后的位数愈多,或在计算中,保留位数愈多准确度就愈大都是错误的。

有效数字包括所有准确的数字和第一位可疑数字。例如用量筒量取 25 ml 的溶液,应该写成 25 ml(两位有效数字),因为量筒测量体积时可发生 ± 1 ml 的误差,故 25 ml 的最后一位数字“5”是可疑的。应用校正过的移液管取 25 ml 的溶液,因为移液管测量体积只发生 ± 0.01 ml 的误差,故应写成 25.00 ml。可见有效数字的位数与所用仪器精密度关系很大。从 0 到 9 的十个数字中,0 具有双重意义。它可以用作有效数字,也可以用来表示单位。例如在 0.060 50 g 这个数字中,“6”后面两个 0 都是有效数字,而“6”前的两个“0”就不是有效数字,很大或很小的数目用 0 表示单位不方便,可以用幂次表示,例如 0.000 060 50 g 可以写成 6.050×10^{-5} g。用幂次表示很大或很小数目时,习惯上总是在小数点前面留一位整数。

在实际工作中可用下列法则进行计算

1. 当弃去不要的可疑数字时,采取四舍五入的原则。
2. 计多数值相加时,所得结果的误差比较任何一个数的误差为大。所以结果中的可疑数字应以各数中具有最大可疑位数的某一数值为准。例如在计算 0.012 1、25.64 及 1.057 82 三数之和时,25.64 的误差最大应以 25.64 为准,故其和应是 $0.01 + 25.64 + 1.06 = 26.71$
3. 许多数值相乘时,所得结果的百分误差较任何一数的百分误差为大。所以结果中的有效数字应以各数中含有效数字位数最少的为准。例如求 11.62、0.011 2 及 1.672 三个数之积时,其中有效数字位数最小的是 0.011 2,故其乘积应是 $11.6 \times 0.011 2 \times 1.672 = 0.217$
4. 若一数值的首位数大于 8,则有效数字可多算一位,例如 9.14 虽只有三位有效数字,但首位大于 8,在运算时可看成四位有效数字。
5. 在平方与立方时,底数有几位有效数字结果中就只保留几位。

然而,有的数字是绝对的,不能运用上述计算法则。例如计算相对分子质量时,各相对原子质量是绝对量,一点误差也没有。一个氯原子重 35.457,三个氯原子重为 $35.457 \times 3 = 106.371$,不能写成 1×10^2 。

II 生物化学与分子生物学常用试剂的配制及参数

试剂的配制

一、溶液浓度的表示与计算

(一) 溶液浓度的表示方法

我们把一定量的溶液或溶剂中所含溶质的量称为浓度。常用的浓度的表示方法有下列几种。

1. 物质的量浓度

物质的量浓度又叫物质 B 的浓度或 B 的物质的量浓度,可简称为 B 的浓度。符号为 c_B 。其定义为:物质 B 的物质的量 n_B 除以溶液的体积 V 。定义方程式为:

$$c_B = \frac{n_B}{V}$$

物质的量浓度的 SI 单位是 $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$,多采用 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照规定,物质 B 的基本单元必须予以指明。例如:

$$c_{\text{NaOH}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 或 } 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH 溶液};$$

$$c_{\text{SO}_4^{2-}} = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 或 } 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-} \text{ 溶液};$$

上两式分别表示氢氧化钠的浓度和硫酸根浓度。

例: 0.03 mol NaHCO_3 溶解后配成 200 mL 溶液,该溶液物质的量浓度是多少?

解:
$$c_{\text{NaHCO}_3} = \frac{0.03 \text{ mol}}{(200/1000)\text{L}} = 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

答:该溶液物质的量浓度是 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2. 质量浓度

质量浓度又叫做物质 B 的质量浓度,符号是 ρ_B 。其定义为:溶液中物质 B 的质量 m 除以溶液的体积 V 。定义方程式为:

$$\rho_B = \frac{m_B}{V}$$

质量浓度 ρ_B 的 SI 单位是 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$,医学中多用 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

例:某病员滴注生理盐水 0.5 L ,有多少克 NaCl 进入体内?

解:生理盐水的质量浓度是 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.5 L 生理盐水中含 NaCl 的质量为:

$$9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \times 0.5 \text{ L} = 4.5 \text{ g}$$

答:滴注 0.5 L 生理盐水,有 4.5 g NaCl 进入体内。

3. 质量分数

质量分数又叫物质 B 的质量分数。符号为 w_B 。定义为:物质 B 的质量 m_B 除以混合物(溶液)的质量 m 。定义方程式为:

$$w_B = \frac{m_B}{m}$$

质量分数 w_B 可用小数或百分数表示。例如:浓 H_2SO_4 溶液的质量分数 $w = 0.98$, 表示纯 H_2SO_4 质量与 H_2SO_4 溶液质量比为 0.98。

例: 500ml 质量分数为 0.36 的浓 HCl 溶液, 含 HCl 多少克($\rho_{HCl} = 1.18 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$)?

解: 500 ml 浓 HCl 溶液质量为:

$$(500/1000)\text{L} \times 1.18 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1} = 0.59 \text{ kg}$$

根据质量分数公式:

$$w_{HCl} = \frac{m_{HCl}}{m}$$

$$\therefore m_{HCl} = w_{HCl} \cdot m = 0.36 \times 0.59 \text{ kg} = 0.212 \text{ kg} = 212 \text{ g}$$

答: 500 ml 质量分数为 0.36 的浓 HCl 溶液含 HCl 212g。

市售的硫酸、盐酸、硝酸、氨水等都是用质量分数来表示含量。

4. 体积分数

体积分数又叫物质 B 的体积分数。符号为 φ_B 。其定义为:纯物质 B 的体积分数 φ_B 就是纯物质 B 与混合物(溶液)在相同温度和压力下的体积比。定义方程式为:

$$\varphi_B = \frac{V_B}{V}$$

纯物质与混合物的体积单位必须相同。体积分数量纲为 1, 可用小数或百分数表示。对于溶液来说, 物质 B 的体积分数代表溶质与溶液的体积比。例如消毒酒精的体积分数 $\varphi = 0.75$, 表示纯酒精与酒精溶液的体积比为 0.75。

例: 药典规定, 药用酒精的体积分数 $\varphi_{酒精} = 0.95$, 问 500ml 药用酒精含纯酒精多少毫升?

解:

$$\therefore \varphi_{酒精} = \frac{V_{酒精}}{V}$$

$$\therefore V_{酒精} = \varphi_{酒精} \cdot V = 0.95 \times 500 \text{ ml} = 475 \text{ ml}$$

答: 500ml 药用酒精含纯酒精 475ml。

医学上, 溶质为固体的溶液浓度, 常以质量浓度和物质的量浓度表示, 如果溶质是固体或气体, 则常以质量分数表示; 溶质是液体, 常以体积分数来表示。

(二) 溶液浓度的计算

1. 溶液的配制 对于以一定体积的溶液中含溶质的质量或体积表示的体积分数、质量浓度、物质的量的浓度等, 是将一定量的溶质先加入适量溶剂使其完全溶解, 然后在量筒或容量瓶中加入溶剂, 至所要求的体积, 混合均匀而得到。

在计算溶质的量时, 应注意的是许多固体药品含有结晶水, 配制溶液时, 要将结晶水计算在内。

设 W = 无水物质的重量

X = 含结晶水物质的重量

M = 无水物质的相对分子质量 M_{H_2O} = 含结晶水物质的相对分子质量

则它们之间的关系如下式: $W:X = M:M_{H_2O}$

依据此关系式可将无水物质的量换算为含结晶水物质的量

2. 溶液的稀释 稀释是指向浓溶液中加入溶剂变成稀溶液的过程。稀释时溶质的量没有变, 故式中 C 为浓度, V 为体积。即浓度与体积成反比关系。依据此式可进行计算。

$$\text{溶质的量} = C_{\text{浓}} \times V_{\text{浓}} = C_{\text{稀}} \times V_{\text{稀}}$$

3. 溶液的混合 两种溶液(含同种溶质)混合后, 混合后溶液中溶质的量应等于混合前两溶液中溶质的量之和。故

$$C_1 V_1 + C_2 V_2 = C_{\text{混}} V_{\text{混}}$$

4. 质量浓度的配制

例: 用纯 NaCl 固体配制 100ml 质量浓度为 $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液。

5. 溶液浓度的换算

浓度的换算是把一种浓度换算成另外一种浓度。

(1) 质量浓度和物质的量浓度的换算

在质量浓度和物质的量浓度中, 体积都用升表示, 只是所用溶质的量不同。在质量浓度中, 溶质的量是用质量表示, 而在物质的量浓度中, 溶质的量是用物质的量表示。因此质量浓度和物质的量浓度之间的换算就是溶质的质量和物质的量之间的换算。

例: 生理盐水的质量浓度是 $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 问生理盐水的物质的量浓度是多少?

解: 已知 NaCl 的摩尔质量是 $58.5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 所以生理盐水的物质的量浓度为:

$$c = \frac{9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}{58.5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}} = 0.154\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

答: 生理盐水的物质的量浓度是 $0.154\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

根据上述解法分析, 质量浓度和物质的量浓度的换算公式为:

$$\text{物质的量浓度} = \frac{\text{质量浓度}}{\text{溶质的摩尔质量}} \quad \text{即 } c_B = \frac{\rho_B}{M_B}$$

(2) 质量分数与物质的量浓度的换算

此种换算需要利用溶液密度的数据。我们通过例题, 推导换算公式。

例: 浓硫酸的质量分数是 0.98, 溶液密度为 $1.84\text{kg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。求浓硫酸物质的量浓度是多少?

解: 依题意 $\rho = 1.84\text{kg}\cdot\text{L}^{-1} = 1840\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

即 1L 浓硫酸的质量是 1840 g

$\therefore w = 0.98$

\therefore 1L 浓硫酸中含硫酸的质量(即质量浓度)为:

$$\rho_{H_2SO_4} = \rho \cdot w = 1840\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \times 0.98 = 1803.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$\therefore c_{H_2SO_4} = \frac{\rho_{H_2SO_4}}{M_{H_2SO_4}}$; 硫酸的摩尔质量为 $98\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

$$\therefore c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{1803.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}}{98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} = 18.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

答:质量分数为 0.98 的浓硫酸物质的量浓度为 $18.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

分析上述解题步骤,推导出质量分数与物质的量浓度的换算公式:

$$c_B = \frac{\rho \cdot w_B}{M_B}$$

式中 ρ 为溶液密度,注意不可与质量浓度 ρ_B 混淆。

二、常用缓冲溶液的配制

1. 0.05 mol/L 甘氨酸 - 盐酸缓冲液

X 毫升 0.2 mol/L 甘氨酸 + Y 毫升 0.2 mol/L HCl,再加水稀释至 200 ml

pH	X	Y	pH	X	Y
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

甘氨酸相对分子质量 = 75.07

0.2 mol/L 甘氨酸溶液含 15.01 g/L

2. 0.05 mol/L 邻苯二甲酸 - 盐酸缓冲液

X 毫升 0.2 mol/L 邻苯二甲酸氢钾 + Y ml 0.2 mol/L HCl,再加水稀释到 20 ml

pH(20℃)	X	Y	pH(20℃)	X	Y
2.2	5	4.670	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	3.6	5	0.597
2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.032		5	

邻苯二甲酸氢钾相对分子质量 = 204.23

0.2 mol/L 邻苯二甲酸溶液含 40.85 g/L

3. 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液

pH	0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$	0.1 mol/L 柠檬酸/ml	pH	0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$	0.1 mol/L 柠檬酸/ml
2.2	0.40	19.60	4.0	7.71	12.29
2.4	1.24	18.76	4.2	8.28	11.72
2.6	2.18	17.82	4.4	8.82	11.18
2.8	3.17	16.83	4.6	9.35	10.65
3.0	4.11	15.89	4.8	9.86	10.14
3.2	4.94	15.06	5.0	10.30	9.70
3.4	5.70	14.30	5.2	10.72	9.28
3.6	6.44	13.56	5.4	11.15	8.85
3.8	7.10	12.90	5.6	11.60	8.40

续表

pH	0.2 mol/L Na ₂ HPO ₄ /ml	0.1 mol/L 柠檬酸/ml	pH	0.2 mol/L Na ₂ HPO ₄ /ml	0.1 mol/L 柠檬酸/ml
5.8	12.09	7.91	7.0	16.47	3.53
6.0	12.63	7.37	7.2	17.39	2.61
6.2	13.22	6.78	7.4	18.17	1.83
6.4	13.85	6.15	7.6	18.73	1.27
6.6	14.55	5.45	7.8	19.15	0.85
6.8	15.45	4.55	8.0	19.45	0.55

Na₂HPO₄ 相对分子质量 = 141.98; 0.2 mol/L 溶液为 28.40 g/L。Na₂HPO₄·2H₂O 相对分子质量 = 178.05; 0.2 mol/L 溶液含 35.61 g/L。C₆H₈O₇·H₂O 相对分子质量 = 210.14; 0.1 mol/L 溶液含 21.01 mg/L。

4. 柠檬酸 - 氢氧化钠 - 盐酸缓冲液

pH	钠离子浓度 /mol/L	柠檬酸/g C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	氢氧化钠/g NaOH 970g/L	盐酸/ml HCl	最终体积/L*
2.2	0.20	210	84	160	10
3.1	0.20	210	83	116	10
3.3	0.20	210	83	106	10
4.3	0.20	210	83	45	10
5.3	0.35	245	144	68	10
5.8	0.45	285	186	105	10
6.5	0.38	266	156	126	10

* 使用时可以每升加入 1 g 酚,若最后 pH 有变化,再用少量 50% 氢氧化钠溶液或浓盐酸调节,冰箱保存。

5. 0.1 mol/L 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液

pH	0.1 mol/L 柠檬酸/ml	0.1 mol/L 柠檬酸钠/ml	pH	0.1 mol/L 柠檬酸/ml	0.1 mol/L 柠檬酸钠/ml
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

柠檬酸 C₆H₈O₇·H₂O 相对分子质量 210.14; 0.1 mol/L 溶液为 21.01 g/L柠檬酸钠 Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 相对分子质量 = 294.12; 1 mol/L 溶液含 29.41 g/L。

6. 乙酸 - 乙酸钠缓冲液

pH(18℃)	0.2 mol/L NaAc/ml	0.2 mol/L HAc/ml	pH(18℃)	0.2 mol/L NaAc/ml	0.2 mol/L HAc/ml
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

NaAc·3H₂O 相对分子质量 = 136.09; 0.2 mol/L 溶液含 27.22 g/L。

7. 磷酸盐缓冲液(PB)

0.2 mol/L 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠缓冲液

pH	0.2 mol/L Na_2HPO_4 /ml	0.2 mol/L NaH_2PO_4 /ml	pH	0.2 mol/L Na_2HPO_4 /ml	0.2 mol/L NaH_2PO_4 /ml
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.0	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 178.05; 0.2 mol/L 溶液为 35.61 g/L。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 358.22; 0.2 mol/L 溶液为 71.64 g/L。

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 138.01; 0.2 mol/L 溶液为 27.6 g/L。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 156.03; 0.2 mol/L 溶液为 31.21 g/L。

mol/L⁻¹/15 磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钾缓冲液

pH	mol/L/15 Na_2HPO_4 /ml	mol/L/15 KH_2PO_4 /ml	pH	mol/L/15 Na_2HPO_4 /ml	mol/L/15 KH_2PO_4 /ml
4.92	0.10	9.90	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0
6.98	6.00	4.00			

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 178.08; 1/15 mol/L 溶液为 11.876 g/L。

KH_2PO_4 相对分子质量 = 136.09; 1/15 mol/L 溶液为 9.078 g/L。

8. 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)

0.01 mol/L PBS 1 000 ml 按 0.2 mol/L PB (pH7.1)

取 0.2 mol/L Na_2HPO_4 33.5 ml

0.2 mol/L NaH_2PO_4 16.5 ml

NaCl 8.5 g

用蒸馏水稀释到 1 000 ml

0.02 mol/L PBS 100 ml 按 0.2 mol/L PB (pH7.1)

取 0.2 mol/L Na_2HPO_4 67 ml

0.2 mol/L NaH_2PO_4 33 ml

NaCl 8.5 g

用蒸馏水稀释到 1 000 ml

9. 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 - 氢氧化钠缓冲液

X ml 0.2 mol/L KH_2PO_4 + Y ml 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 20 ml

pH(20℃)	X/ml	Y/ml	pH(20℃)	X/ml	Y/ml
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

10. 巴比妥钠 - 盐酸缓冲液(18℃)

pH	0.04 mol/L 巴比妥钠 盐溶液/ml	0.2 mol/L 盐酸/ml	pH	0.04 mol/L 巴比妥 钠盐溶液/ml	0.2 mol/L 盐酸/ml
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

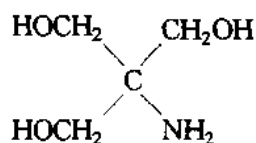
巴比妥钠盐相对分子质量 = 206.18; 0.04 mol/L 溶液为 8.25 g/L。

11. 0.05 mol/L Tris - 盐酸缓冲液(25℃)

50 ml 0.1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液与 X ml 0.1 mol/L 盐酸混匀后, 加水稀释至 100 ml

pH	X/ml	pH	X/ml
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

三羟甲基氨基甲烷相对分子质量 = 121.14;



0.1 mol/L 溶液为 12.114 g/L。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳,使用时注意将瓶盖盖严。

12. 硼酸-硼砂缓冲液(0.2 mol/L 硼酸根)

pH	0.05 mol/L 硼砂/ml	0.2 mol/L 硼酸/ml	pH	0.05 mol/L 硼砂/ml	0.2 mol/L 硼酸/ml
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 相对分子质量 = 381.43; 0.5 mol/L 溶液 (= 0.2 mol/L 硼酸根) 含 19.07 g/L。

硼酸 H_3BO_3 , 相对分子质量 61.84, 0.2 mol/L 溶液为 12.37 g/L。

硼砂易失去结晶水, 必须在带塞的瓶中保存。

13. 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液

X ml 0.2 mol/L 甘氨酸 + Y ml 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 200 ml

pH	X	Y	pH	X	Y
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

甘氨酸相对分子质量 = 75.07; 0.2 mol/L 溶液含 15.01 g/L。

14. 硼砂-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol/L 硼酸根)

X ml 0.05 mol/L 硼砂 + Y ml 0.2 mol/L NaOH 加水稀释至 200 ml

pH	X	Y	pH	X	Y
9.3	50	0.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

硼砂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 相对分子质量 = 381.43; 0.05 mol/L 溶液为 19.07 g/L。

15. 0.1 mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液

Ca^{2+} , Mg^{2+} 存在时不得使用

pH		0.1 mol/L Na_2CO_3 /ml	0.1 mol/L NaHCO_3 /ml
20℃	37℃		
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3

续表

pH		0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{ml}$	0.1 mol/L NaHCO_3/ml
20℃	37℃		
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 相对分子质量 = 286.2; 0.1 mol/L 溶液为 28.62 g/L。

NaHCO_3 相对分子质量 = 84.0; 0.1 mol/L 溶液为 8.40 g/L。

三、体积分数酸、碱溶液的配制

配一升某体积分数的酸、碱溶液, 所需浓酸或浓碱的毫升数为:

溶 液	体 积 分 数					
	25 %	20 %	10 %	5 %	2 %	1 %
HAc	248	197	97	48	19	9.5
HCl	635	497	237	116	46	23
HNO_3	313	244	115	56	22	11
H_2SO_4	168	130	61	29	12	6
$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	不稀释	814	422	215	87	44

四、闪烁液的配方

(一) 基本闪烁液

1. PPO 4 g
POPOP 0.1 g
甲苯或二甲苯 1 000 ml
2. PPO 10 g
POPOP 0.25 g
萘 100 g
二氧六环 100 ml

(二) 水或溶液计数系统

1. PPO 5 g
POPOP 0.1 g
甲苯或二甲苯 1 000 ml
(10 ml 溶剂中可保持 0.3 ml 水, 可用 4 ml 无水乙醇, 计数效率小于 10%)
2. PPO 10 g
POPOP 0.25 g
萘 100 g
二氧六环 1 000 ml
(15 ml 总体积中可保持 3 ml 水, 计数效率 8%)

3. PPO	10 g
POPOP	0.25 g
萘	100 g
二氧六环	1 000 ml

(15 ml 总体积中可保持 1 ml 水, 计数效率 15%)

4. PPO	6.5 g
POPOP	0.13 g
萘	104 g
甲醇	300 ml
二氧六环	500 ml
甲苯	500 ml

(10 ml 溶剂中加 3 ml 0.5 mol/L KOH 乙醇液, 可保持 10% 水或浓 HCl, 最大计数效率达 15%)

5. PPO	4 g
POPOP	0.2 g
萘	60 g
乙二醇	20 ml
甲醇	100 ml
二氧六环	880 ml

(保持 10% 水, 计数效率 10%)

6. PPO	5.5 g
POPOP	0.1 g
甲苯	667 g
Triton X-100	333 ml

(水样品, 能耐受 12% 水及 23%~50% 盐及颗粒, 水在 12%~23% 时不连续)

7. PPO	5 g
POPOP	0.1 g
Carb-O-sil	40 g
甲苯	1 000 ml

(颗粒样品, 或趋于吸附在壁上的样品)

PPO: 2,5-二苯基噁唑, 相对分子质量 221.3, 熔点 72~73℃, 溶解度(20℃): 414 g/L 甲苯, 395 g/L 甲苯

POPOP: 1,4-二-2-(5-苯基噁唑基)-苯, 相对分子质量 364, 熔点 245~246℃ 溶解度(20℃): 2.2 g/L 甲苯, 1.4 g/L 二甲苯。

五、硫酸铵饱和度的常见表

1. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(25℃)

		硫酸铵终浓度(%饱和度)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		每1升溶液加固体硫酸铵的克数量*																
硫酸铵初浓度(%饱和)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	236	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														36	72	153	237
	75															36	115	198
80																	77	157
90																		79

* 在25℃下,硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时,每1 000 ml溶液所加固体硫酸铵的克数。

2. 调整硫酸铵溶液饱和度计算表(0℃)

		在 0℃ 硫酸铵终浓度(%饱和度)																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
		每 100 毫升溶液加固体硫酸铵的克数量 *																	
硫酸铵 初浓度 (%饱和)	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	66.7	
	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2	
	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.5	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7	
	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	31.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2	
	20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7	
	25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.5	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	46.8	52.2	
	30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.6	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8	
	35				0	2.8	5.7	8.7	11.7	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3	
	40					0	2.9	5.8	8.7	12.0	15.3	18.2	21.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8	
	45						0	2.9	5.8	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3	
	50							0	2.9	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8	
	55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3	
	60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9	
	65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4	
	70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9	
	75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4	
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9		
85														0	3.4	6.8	10.5		
90															0	3.4	7.0		
95																0	3.5		
100																	0		

在0℃下,硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时,每100 ml溶液所加固体硫酸铵的克数。

3. 硫酸铵饱和溶液

温度/℃	0	10	20	30	40
每 1 000 g 水中含硫酸铵摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
1 000 ml 水用硫酸铵饱和所需克数	706.8	730.5	755.8	766.8	777.50
每升饱和溶液含硫酸铵克数	514.8	525.2	536.5	541.2	545.90
饱和溶液物质的量浓度	1.95	1.98	2.03	2.05	2.06

常用参数

一、一些化学试剂的分级

	一级试剂	二级试剂	三级试剂	四级试剂	生物试剂
我国标准	保证试剂 G.R. 绿色标签	分析纯 A.R. 红色标签	化学纯 C.P. 蓝色标签	实验试剂 化学用 L.R.	B.R. 或 C.R.
国外标准	A.R. G.R. A.C.S P.A. X.II.	C.P R.U.S.S Puriss II, II, A	L.P E.P II.	P. Pure	
用途	纯度最高,杂质含量很少的试剂。适用于最精确分析及研究工作。	纯度较高,杂质含量较低。适用于精确的分析工作,为分析实验室广泛使用	质量略低于二级试剂,适用于一般的微量分析实验,包括要求不高的工业分析和快速分析。	纯度较低,但高于工业用的试剂,适用于一般定性检验。	根据说明使用

二、易变质及需要特殊方法保存的试剂

注 意 事 项		试 剂 名 称 举 例
需要密封	易潮解吸湿	氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、碘化钾、三氯醋酸
	易失水风化	结晶硫酸钠、硫酸亚铁、含水磷酸氢二钠、硫代硫酸钠
	易挥发	氨水、氯仿、醚、碘、麝香草酚、甲醛、乙醇、丙酮
	易吸 CO ₂	氢氧化钾、氢氧化钠
	易氧化	硫酸亚铁、醚、醛类、酚、抗坏血酸和一切还原剂
	易变质	丙酮酸钠、乙醚和许多生物制品(常需冷藏)
需要避光	见光变化	硝酸根(变黑)、酚(变淡红)、氯仿(产生光气)、茚三酮(变淡红)
	见光分解	过氧化氢、氯仿、漂白粉、氰氢酸
	见光氧化	乙醚、醛类、亚铁盐和一切还原剂
特殊方法 保存管	易爆炸、剧毒	苦味酸、硝酸盐类、过氯酸、叠氮化钠、氰化钾(钠)、汞、砷化物、溴
	易燃	乙醚、甲醇、乙醇、丙醇、苯、甲苯、二甲苯、汽油
	腐蚀	强酸、强碱、酚

三、常用酸碱的相对密度和质量分数、物质的量浓度的关系

名 称	分子式	相对分子质量	相对密度	质量分数/%	物质的量浓度/mol/L (粗略)	配 1 升 1 mol/L 溶液所需 毫升数
盐酸	HCl	36.47	1.19	37.2	12.0	84
			1.18	35.4	11.8	
			1.10	20.0	6.0	
硫酸	H ₂ SO ₄	98.09	1.84	95.6	18.0	28
			1.18	24.8	3.0	
			1.42	70.98	8.0	
硝酸	HNO ₃	63.2	1.40	65.3	14.5	63
			1.20	32.36	6.1	
			1.05	99.5	17.4	
冰乙酸	CH ₃ COOH	60.5	1.05	99.5	17.4	59
乙酸	CH ₃ COOH		1.075	80.0	14.3	
磷酸	H ₃ PO ₄	98.06	1.71	85.0	15, 30, 45 (依反应而定)	67 (以上 15 mol/L 计)
			0.90		15	67
			0.904	27.0	14.3	70
氨水	NH ₄ OH	35.05	0.91	25.0	13.4	
			0.96	10.0	5.6	
氢氧化钠 溶液	NaOH	40.0	1.5	50.0	19	53

四、常用酸碱体积分数、相对密度和物质的量浓度的关系

体 积 分 数 /%	H ₂ SO ₄		HNO ₃		HCl		KOH		NaOH		氨溶液	
	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度
2	1.013		1.011		1.009		1.016		1.023		0.992	
4	1.027		1.022		1.019		1.033		1.046		0.983	
6	1.040		1.033		1.029		1.048		1.069		0.973	
8	1.055		1.044		1.039		1.065		1.092		0.976	
10	1.069	2.1	1.056	1.7	1.049	2.9	1.082	1.9	1.115	2.8	0.960	5.6
12	1.083		1.068		1.059		1.100		1.137		0.953	
14	1.098		1.080		1.069		1.118		1.159		0.946	
16	1.112		1.093		1.079		1.137		1.181		0.939	
18	1.127		1.106		1.089		1.156		1.213		0.932	
20	1.143	4.7	1.119	3.6	1.100	6	1.176	4.2	1.225		0.926	10.9
22	1.158		1.132		1.110		1.196		1.247		0.919	
24	1.178		1.145		1.122		1.217		1.268		0.913	12.9
26	1.190		1.158		1.132		1.240		1.289		0.908	13.9
28	1.205		1.171		1.142		1.263		1.310		0.903	

续表

体积 分数 /%	H ₂ SO ₄		HNO ₃		HCl		KOH		NaOH		氨溶液	
	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度	相对密度	物质的 量浓度
30	1.224	7.5	1.184	5.6	1.152	9.5	1.268	6.8	1.332	10	0.898	15.8
32	1.238		1.198		1.163		1.310		1.352		0.893	
34	1.255		1.211		1.173		1.334		1.374		0.889	
36	1.273		1.225		1.183	11.7	1.358		1.395		0.884	18.7
38	1.290		1.238		1.194	12.4	1.384		1.416			
40	1.307	10.7	1.251	7.9			1.411	10.1	1.437	14.4		
42	1.324		1.264				1.437		1.458			
44	1.342		1.277				1.460		1.478			
46	1.361		1.290				1.485		1.499			
48	1.380		1.303				1.511		1.519			
50	1.399	14.3	1.316	10.4			1.538	13.7	1.540	19.3		
52	1.419		1.328				1.546		1.560			
54	1.439		1.340				1.590		1.580			
56	1.460		1.351				1.616	16.1	1.601			
58	1.482		1.362						1.622			
60	1.503	18.4	1.373	13.3					1.643	24.6		
62	1.525		1.384									
64	1.547		1.394									
66	1.571		1.403	14.6								
68	1.594		1.412	15.2								
70	1.617	23.1	1.421	15.8								
72	1.640		1.429									
74	1.664		1.437									
76	1.687		1.445									
78	1.710		1.453									
80	1.732	28.2	1.460	18.5								
82	1.755		1.467									
84	1.776		1.474									
86	1.793		1.480									
88	1.808		1.486									
90	1.819	33.4	1.491	23.1								
92	1.830		1.496									
94	1.837		1.500									
96	1.840	36	1.504									
98	1.841	36.8	1.510									
100	1.858	37.5	1.522	24								

五、一些常用化合物的溶解度(20℃)

名 称	分子式	溶解度	名 称	分子式	溶解度
硝酸银	AgNO ₃	218	硝酸钾	KNO ₃	31.6
硫酸铝	Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	36.4	氢氧化钾	KOH·2H ₂ O	112
氯化钡	BaCl ₂	35.7	硫酸锂	Li ₂ SO ₄	24.2
氢氧化钡	Ba(OH) ₂	3.84	硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	26.2
氯化钙	CaCl ₂	74.5	草酸铵	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	4.4
乙酸钙	Ca(C ₂ H ₃ O ₂)·H ₂ O	34.7	氯化铵	NH ₄ Cl	37.2
氢氧化钙	Ca(OH) ₂	1.65×10 ⁻¹	硫酸铵	(NH ₄) ₂ SO ₄	75.4
硫酸铜	CuSO ₄	20.7	硼砂	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	2.7
三氯化铁	FeCl ₃	91.9	乙酸钠	Na ₂ C ₂ H ₃ O ₂ ·2H ₂ O	46.5
硫酸亚铁	FeSO ₄ ·7H ₂ O	26.5	乙酸钠	Na ₂ C ₂ H ₃ O ₂	123.5
氯化汞	HgCl ₂	6.6	氯化钠	NaCl	36.0
碘	I ₂	2.9×10 ⁻²	氢氧化钠	NaOH	109.0
溴化钾	KBr	65.8	碳酸钠	Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O	21.5
氯化钾	KCl	34.0	碳酸钠	Na ₂ CO ₃ ·H ₂ O	50.5(30℃)
碘化钾	KI	144	碳酸氢钠	NaHCO ₃	9.6
重铬酸钾	K ₂ Cr ₂ O ₇	13.1	磷酸氢二钠	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.7
碘酸钾	KIO ₃	8.13	硫代硫酸钠	Na ₂ S ₂ O ₃	70.0
高锰酸钾	KMnO ₄	6.4			

表中数值表示 100 克水中所含溶质克数。凡不是在 20℃ 时的溶解度, 都在溶解度数据后面注明温度。

六、某些有机溶剂的主要物理常数

名 称	化学式	相对密度 20/4℃	沸点或沸 程/℃	溶解度(20℃)/ g·(100g·H ₂ O) ⁻¹	闪光点/℃	爆炸极限/% 质量分数
苯	C ₆ H ₆	0.897	80.1	0.08	-16	—
甲苯	C ₆ H ₅ CH ₃	0.866	110.8	0.05	-5	1.2~7.0
二甲苯(邻对 间混合物)	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂	0.86~0.87	136~145	不溶	-0.2	—
汽油	—	0.69~0.73	40~200	不溶	<-25	—
甲醇	CH ₃ OH	0.791 5	64.65	∞	-10	6.5~36.5
乙醇	C ₂ H ₅ OH	0.789 3	78.4	∞	12	3.5~18.0
正丙醇	C ₃ H ₇ OH	0.803 6	97.19	∞	15	2.5~8.7
异丙醇	C ₃ H ₇ OH	0.785 1	82.5	∞	12	3.8~10.2
正丁醇	C ₄ H ₉ OH	0.809 8	117.7	9*	28	3.7~10.2
异丁醇	C ₄ H ₉ OH	0.806 *	107	9.5	22	2.40
异戊醇	C ₅ H ₁₁ OH	0.811 0 (25/4℃)	137.8	2.6	40	—
甘油	C ₃ H ₅ (OH) ₃	1.261 3	290(分解)	∞	—	—
乙醚	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	0.713 5	34.5	7.5	-40	1.85~36.5
乙酸乙酯	CH ₃ COOC ₂ H ₅	0.901	77.15	8.6(35℃)	-15	—
乙酸异戊酯	CH ₃ COOC ₃ H ₇	0.876	142.5	0.2	25	—
丙酮	CH ₃ COOCH ₃	0.789 8	56.5	∞	-20	2.55~12.8
环乙酮	CO(CH ₂) ₄ CH ₂	0.947 8	155.7	24(31℃)	-44	—
硝基苯	C ₆ H ₅ NO ₂	1.203 7	210.9	0.19	-20	—
吡啶	C ₅ H ₅ N	0.978	115.56	∞	20	1.8~12.4

闪光点: 使物质的蒸气在移近为焰时, 表面上可与空气生成可燃混合物的最低温度(能燃烧并不传播, 很快熄灭), 闪点低于 45℃ 的物质, 按一般分类属于易燃物质。* 为 15℃ 时数值

七、冷却剂和干燥剂

(一) 冷却剂

组成的物质成分(按重量比)	可达低温/℃
NH_4Cl : 水 = 30 : 100	-5.1
NH_4Cl : 雪或碎冰 = 25 : 100	-15.4
NH_4NO_3 : 水 = 106 : 100	-4.0
NH_4NO_3 : 水 = 83 : 100	-14.0
NH_4NO_3 : 水 = 76 : 100	-17.5
NH_4NO_3 : 雪或碎冰 = 59 : 100	-18.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 雪或碎冰 = 62 : 100	-19.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: 雪或碎冰 = 9.6 : 100	-1.2
NH_4CNS : 水 = 133 : 100	-18.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 143 : 100	-50.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 水 = 250 : 100	-12.4
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 204 : 100	-19.7
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 164 : 100	-39.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 143 : 100	-54.9
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 124 : 100	-40.3
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 81 : 100	-21.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 40 : 100	-9.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (晶体) : 雪或碎冰 = 20 : 100	-4.0
KCl : 水 = 30 : 100	-0.6
KCl : 雪或碎冰 = 30 : 100	-11.1
KI : 水 = 140 : 100	-11.7
KNO_3 : 雪或碎冰 = 13 : 100	-2.9
KCNS : 水 = 150 : 100	-23.7
NaAc (晶体) : 水 = 85 : 100	-4.7
NaCl : 雪或碎冰 = 33 : 100	-21.3
$\text{N}-\text{NO}_3$: 水 = 75 : 100	-5.3
NaNO_3 : 雪或碎冰 = 50 : 100	-17.8
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 水 = 110 : 100	-8.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 雪或碎冰 = 67.5 : 100	-11.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 雪或碎冰 = 51.3 : 100	-3.9
H_2SO_4 (66.1%) : 雪或碎冰 = 91 : 100	-37.0
H_2SO_4 (66.1%) : 雪或碎冰 = 40 : 100	-30.0
H_2SO_4 (66.1%) : 雪或碎冰 = 23 : 100	-25.0
H_2SO_4 (66.1%) : 雪或碎冰 = 13 : 100	-20.0
H_2SO_4 (66.1%) : 雪或碎冰 = 8 : 100	-16.0
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: 雪或碎冰 = 105 : 100	-30.0

(二) 干燥剂

1. 气体干燥剂

干燥剂的名称	适用于干燥的气体
石灰	NH_3 , 胺类
无水氯化钙	H_2 , HCl , CO , CO_2 , SO_2 , N_2 , O_2 , CH_4 , 醚等
五氧化二磷	H_2 , CO , CO_2 , SO_2 , N_2 , O_2 , CH_4 , C_2H_4 等
浓硫酸	H_2 , CO , CO_2 , N_2 , Cl_2 , CH_4 等
氢氧化钾	NH_3 , 胺类

2. 液体的干燥剂

干燥剂名称	适用于干燥的液体	不 适 用
五氧化二磷	二硫化碳, 碳氢化合物, 卤烷	碱类, 酮等
浓硫酸	饱和碳氢化合物, 卤烷	碱类, 醇, 酚等
无水氯化钙	醚, 酯, 卤烷	醇, 胺, 酚, 脂肪酸等
氢氧化钾	碱类	醚, 酮, 酯, 酸等
无水碳酸钾	碱类, 酮, 某些卤化物	脂肪酸, 酯等
无水硫酸钠	很多液体均可	
无水硫酸镁	很多液体均可	
无水硫酸钙	很多液体均可	
金属钠	醚, 饱和碳氢化合物	醇, 胺, 酯等

八、常用蛋白质(酶)的理化特性

(一) 纯化的人血浆蛋白质的某些参数

名 称	消光系数 E_{280}	沉降系数 S_{20w}	扩散系数 D_{20w}	相对分子 质量	等电点 pI	电泳迁移率 (巴比妥 pH8.6 $I=0.1$)	在正常血浆 中含量 /mg/100ml
1. 前白蛋白(prealbumin)	13.2	4.2		61 000	4.7	7.6	28~35
2. 白蛋白(albumin)	5.8	4.6	6.1	69 000	4.9	5.92	3 500~4 500
3. α_1 -脂蛋白(α_1 -Lipoprotein), 高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)							
HDL ₂		5.5		435 000			37~117
HDL ₃		5.0		195 000			217~270
HDL ₁₊₁₈₅		4.6	5.2	166 000~ 175 000			
VHDL ₁		4.5	5.4	148 000~ 153 000			
4. α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -acid glyco-protein, orsomucoid)	8.9	3.11	5.27	44 100	2.7	5.2	75~100
5. 4.6S-后白蛋白(4.6S-postalbumin)	8.0	4.6					
6. α_1 -T-糖蛋白(α_1 -T-Glyco-protein)	6.0	3.3		55,000~ 60,000			
7. 皮质类固醇结合球蛋白(corticosteroid binding globulin, CGB)	6.45	3.79	6.15	51 700		4.9	4.1±0.4
8. α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 -antitrypsin)	5.3	3.41	5.2	45 000	4.0	5.42	210~400
9. α_1 X-糖蛋白(α_1 X-Glyco-protein, α_1 -antichymotrypsin)	6.0	3.9		68 000			40~60
10. α_1 B-糖蛋白(α_1 B-Glyco-protein)	9.0	3.8		50 000			19~25
11. 9.5S- α_1 -糖蛋白(9.5S- α_1 Glyco-protein)	18.2	9.3		308 000	5.0		5.5

续表

名 称	消光系数 E_{280}	沉降系数 S_{20W}	扩散系数 D_{20W}	相对分子 质量	等电点 pI	电泳迁移率 (巴比妥 pH8.6 $I=0.1$)	在正常血浆 中含量 /mg/100ml
12. 血液凝固活化因子 X(activated factor X of blood coagulation)		2.1		25 000 ± 2 000			0.5~1
13. Zn- α_2 糖蛋白(Zn- α_2 -Glycoprotein)	18	3.2		41 000	3.8	4.2	4.2~5.4
14. 甲状腺素结合球蛋白(thyroxin-binding globulin, TBG)	7.25 6.9	3.0 3.4	7.39	36 000 64 000	3.8		1.5
15. 抗凝血酶 III(antithrombin III)				65 000			25~25
16. GC-球蛋白(GC-globulin)	6.3	3.7		50 000			63~87
17. 补体活化因子 C _{1s} (activated C _{1s} factor of compleuf)	16.7	4.0		79 000			3.3 ± 0.6
18. 中间- α -胰蛋白酶抑制子(inter- α -trypsin inhibitor)	7.1	6.4		18 000			28~30
19. 过敏毒素失活因子(anaphylatoxin inactivator)		9.5	2.9	325 000			3~4
20. 视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein)	18.7	2.3	9.8	21 000	4.4~4.8		4~6
21. α_2 HS-糖蛋白(α_2 HS-glycoprotein)	5.6	3.3		49 000	4.1~4.3	4.2	30~90
22. 凝血因子(factor II of blood coagulation)	8.84	5.11	5.14	70 200	3.8		11~30
23. 可溶性成纤维细胞抗原(soluble fibroblast antigen)		13.5		355 000			10
24. 失活因子 C ₁ (C ₁ -inactivator)	4.3	3.67		104 000		2.7~2.8	17~30
25. 血清灭菌蛋白 D 因子(factor D of properdin)		3.0		25 000			9
26. 富含组氨酸 3.8S α_2 -糖蛋白(histidine-rich 3.8S α_2 -glyco-protein)		3.8		55 600	5.6~6.2		9
27. 补体 C ₉ (C ₉ -factor of complement)		4.5		79 000			0.1
28. 结合妊娠 α_2 -糖蛋白(pregnancy associated α_2 -glycoprotein, PAG)		12		359 000	4.7		0.3
29. 结合珠蛋白(haptoglobin) 1-1 型 2-1 型 2-2 型	12.0	4.4 4.3, 6.5 7.5	4.7	100 000	4.1 4.5		10~22 16~30 12~26
30. 血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)	14.9	7.1	4.4	134 000	4.4	4.6	27~39
31. 胆碱酯酶(cholinesterase)		12		348 000	3.0	3.1	0.8~1.1
32. α_2 -巨球蛋白(α_2 -macro-globulin)	8.1	19.6 18.1	2.41	820 000 725 000	5.4	4.2	265 ± 55(男) 335 ± 57(女)
33. 激肽原(kininogen)				70 000	4.5~4.7		25~50
34. α_2 -脂蛋白(α_2 -lipoprotein, low-density lipoprotein, LDL)		Sf > 12		$5 \times 10^5 \sim 20 \times 10^6$			150~230
35. 8S α_3 -糖蛋白(8S α_3 -glycoprotein)	10	7.87		220 000	4.2~4.6		3~4

续表

名 称	消光系数 E_{280}	沉降系数 S_{20W}	扩散系数 D_{20W}	相对分子 质量	等电点 pI	电泳迁移率 (巴比妥 pH8.6 $I=0.1$)	在正常血浆 中含量 /mg/100ml
36. 冷不溶性球蛋白(gold insoluble globulin)	12.8	12.3					2.6×10^{-1} 3.8×10^{-1}
37. 血纤维蛋白溶酶原(plasminogen)	17	4.2	4.31	81 000	5.6	3.7	
38. 血纤维蛋白溶酶(plasmin)		3.9		75 400	6.1~84		
39. 补体 C_{3C} (C_{3C} - factor of complement)	6.7	4.0		151 000			
40. 无唾液酸 β_1 糖蛋白(sialic - acidfree β_1 - glycoprotein)	11.2	2.9	7.5	30 700 31 000	4.4	3.3	2×10^{-1}
41. 血液结合素(hemopexin)	19.7	4.8		57 000		3.1	50~100
42. 转铁蛋白(transferrin)	14.9 (结合 Fe^{3+}) (不结合 Fe^{3+})	4.9	5.85	76 000	5.2 5.5	3.63 3.03	200~400
43. 性类固醇结合蛋白(sex steroid binding protein)	12.5	4.1		65 000			0.1~1.2(男) 0.3~1.5(女)
44. 妊娠专一性 β_1 糖蛋白(pregnacy - specific β_1 - glycoprotein, SP1)	11.2	4.6		90 000			5~20
45. β - 脂蛋白(β - Lipoproteins, low - density lipoprotein, LDL)		Sf = 0.12		3.2×10^6		3.1	280~440
46. C_1 前酯酶(C_1 - proesterase)		8.4		104 000 118 000 180 000			
47. 失活因子 C_{3b} (C_{3b} - inactivator)		4.9					2.5
48. 补体 C_2 (C_2 - factor of complement)		5.5		117 000			0.3
49. 血清灭菌蛋白 B 因子(factor B of properdin)	8.8	6.2		80 000			9.4~46
50. 凝血因子 VIII(factor III of blood coagulation)		23.7		1 120 000			1
51. 补体 C_{1r} (C_{1r} - factor of complement)	7.5	3.5		188 000			
52. β_2 - 巨球蛋白(β_2 - microglobulin)	16.8	1.6	13.3	115 000			1.3×10^{-1} 2.3×10^{-1}
53. 补体 C_5 (C_5 - factor of complement)		8.7		206 000			7.5
54. 补体 C_3 (C_3 - factor of complement)	10.0	9.5	3.6	185 000			120~150
55. 补体 C_4 (C_4 - factor of complement)	8.8	10		209 000			43
56. 补体 C_6 (C_6 - factor of complement)		5.7	4.0	95 000 125 000			6 6
57. 补体 C_7 (C_7 - factor of complement)		5.7		120 000 140 000			
58. 纤维蛋白原(fibrinogen)	13.6	7.63	1.97	341 000	5.8	2.1	200~600

续表

名 称	消光系数 E_{280}	沉降系数 S_{20W}	扩散系数 D_{20W}	相对分子 质量	等电点 pI	电泳迁移率 (巴比妥 pH8.6 $I=0.1$)	在正常血浆 中含量 /mg/100ml
59. β_2 -糖蛋白 III (β_2 -glycoprotein III)	13.2	2.14		35 000			5~15
60. 血清灭菌蛋白活化因子 B (activated factor B of properin)	11.0	4.2		60 000			18
61. β_2 -糖蛋白 I (β_2 -glycoprotein I)	9.4	2.9		40 000	6.2	1.6	15~30
62. 凝血因子 XI (factor XI of blood coagulation)		6.9		158 000 170 000	9.1		7~9
63. 前激肽释放酶 (prekallikrein)		5.2		107 000	5.9		5~10
64. 凝血因子 XII (factor XII of blood coagulator)		4.5		90 000 110 000	6.1 5.8~7.5		
65. 补体 C_3 (C_3 -factor of complement)		8.0		153 000			
66. 凝血因子 XIII (factor XIII of blood coagulation)	13.8	9.9	2.5	320 000			
67. 免疫球蛋白 E (immunoglobulin E)	15.3	8.2	3.71	190 000			$6 \times 10^{-3} \sim 10^{-1}$
68. 免疫球蛋白 D (immunoglobulin D)	17	17	6.14~ 7.04	172 000 184 000			0.3~40
69. 免疫球蛋白 A (immunoglobulin A)	13.4	6.3~6.9	3.0~3.6	162 000		2.1	328
70. 免疫球蛋白 M (immunoglobulin M)	12.5	18~20	1.71~1.75	1 000 000	5.1~7.8	2.1	80~90
71. 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G)	13.8	6.6~7.2	4.0	153 000	5.8~7.3	1.2	120~180
72. 血浆纤维蛋白溶酶原活化因子 (plasminogen proactivator)				100 000	8.9		
73. 0.6S- γ_2 -球蛋白 (0.6S- γ_2 -globulin)		0.6		5 100~5 700			0.55×10^{-1}
74. G-反应蛋白 (G-reactive protein GRP)		7.5	1.1	129 000			2×10^{-3} 13.5×10^{-1}
75. 补体 C_{1q} (C_{1q} -factor of complement)	6.8	11.1 10.2	2.5	410 000			19
76. 血清灭菌蛋白 (properdin)		5.2	2.15	184 000			1.5
77. 乳运铁蛋白 (lactoferrin)	14.6 (含 Fe^{3+}) 11.2 (不含 Fe^{3+})	4.93	5.6	77 000	8.2~9.2		4×10^{-2} 1.6×10^{-1}
78. 溶菌酶 (lysozyme)	25.65	2.19	11.92	15 000~ 16 000	10.5~ 11.0		5×10^{-1} 15×10^{-1}

(二) 常用参考蛋白质相对分子质量

蛋 白 质	相对分子质量
肌球蛋白	220 000
β -半乳糖苷酶	130 000
副肌球蛋白	100 000

续表

蛋 白 质	相对分子质量
磷酸化酶 Q	94 000
血清白蛋白	68 000
L-氨基酸氧化酶	63 000
过氧化氢酶	60 000
丙酮酸激酶	57 000
谷氨酸脱氢酶	53 000
亮氨酸氨肽酶	53 000
γ -球蛋白、H 链	50 000
富马酸酶(Fumarase)	49 000
卵白蛋白	43 000
乙醇脱氢酶(肝)	41 000
烯醇化酶	41 000
醛缩酶	40 000
肌酸激酶	40 000
D-氨基酸氧化酶	37 000
乙酰脱氢酶(酵母)	37 000
甘油醛磷酸脱氢酶	36 000
原肌球蛋白	36 000
乳酸脱氢酶	36 000
胃蛋白酶	35 000
天门冬氨酸氨甲酰转移酶 C 链	34 000
羧肽酶 A	34 000
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	29 000
枯草菌溶素(Subtilisin)	27 600
γ -球蛋白、L 链	23 500
胰凝乳蛋白酶原	25 700
胰蛋白酶	2 300
木瓜酶(羟甲基)	23 000
β -乳球蛋白	18 400
烟草花叶病毒外壳蛋白	17 500
肌红蛋白	17 200
天门冬氨酸氨甲酰转移酶 R 链	17 000
血红蛋白	15 500
Q β 外壳蛋白	15 000
溶菌酶	14 300
R ₁₇ 外壳蛋白	13 750
核糖核酸酶	13 700
细胞色素 c	11 700
胰凝乳蛋白酶, 2 链	11 000 和 13 000

(一) 离子交换纤维素

(一) 离子交换纤维素

离子交换剂	游离基团	结构
阴离子交换剂		
AE	氨基乙基	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
DEAE	二乙基氨基乙基	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
TEAE	三乙基氨基乙基	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
GE	胍乙基	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})=\text{NH}_2$
PAB	对氨基苯甲基	$-\text{OCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$
ECTEOA	三乙醇胺经甘油和多聚甘油链偶联于纤维素的混合基因 (混合胺类)	
DBD	苯甲基化的 DEAE 纤维素	
BND	苯甲基化蔡酚的 DEAE 纤维素	
PEL	聚乙烯亚胺吸附于纤维不比或较弱磷酸化的纤维素	
阳离子交换剂		
CM	羧甲基	$-\text{OCH}_2\text{COOH}$
P	磷酸	$-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2$
SE	磺酸乙基	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{OH})_2$
SP - Sephadex	磺酸丙基	$-\text{C}_3\text{H}_6-\text{S}(\text{OH})_2$
QAE - Sephadex	二乙基 - (2-羟丙基) - 季胺	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
用酸和碱处理离子交换剂的顺序		
交换剂	第一次处理	第二次处理
阴离子	0.5 mol/L HCl	0.5 mol/L NaOH
阳离子	0.5 mol/L NaOH	0.5 mol/L HCl

(二) 葡萄糖凝胶的某些技术数据

分子筛类型	干颗粒直径 / μm	相对分子质量分级的范围		床体积 /(ml)	得水值	溶胀最少平衡 时间/h		柱头压力 (厘米 H_2O) (2.5 cm 直径柱粗)
		肽及球形 蛋白质	葡萄糖 (线性分子)			室温	沸水浴	
Sephadex G-10	40~120	-700	-700	2~3	1.0 ± 0.1	3	1	
Sephadex G-15	40~120	-1 500	-1 500	2.3~3.5	1.5 ± 0.2	3	1	
Sephadex G-25								
粗	100~300 (=50~100目)	1 000~	1 00~					
中	50~150 (=100~200目)	5 000	5 000	4~6	2.5 ± 0.2	6	2	
细	20~80 (=200~400目)							
超细	10~40							
Sephadex G-50								
粗	100~300	1 500~	500~	9~11	5.0 ± 0.3	6	2	
中	50~150							
细	20~80	30 000	10 000					
超细	10~40							
Sephadex G-75	40~120 10~40	3 000~ 70 000	1 000~ 50 000	12~15	7.5 ± 0.5	24	3	40~160
Sephadex G-100	40~120 10~40	4 000~ 150 000	1 000~ 100 000	15~20	10.0 ± 1.0	48	5	24~96
Sephadex G-150	40~120 10~40	5 000~ 400 000	1 000~ 150 000	20~30 18~22	15.0 ± 1.5	72	5	9~36
Sephadex G-200	40~120 10~40	5 000~ 800 000	1 000~ 200 000	30~40 20~25	20 ± 2.0	72	5	4~16

(三) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

型 号	排阻的下限 (相对分子质量)	分级分离的范围 (相对分子质量)	膨胀后的床体积 /(ml/g 干凝胶)	膨胀所需最少时间/h (室温)
Bio-gel-P-2	1 600	200~2 000	3.8	2~4
Bio-gel-P-4	3 600	500~4 000	5.8	2~4
Bio-gel-P-6	4 600	1 000~5 000	8.8	2~4
Bio-gel-P-10	10 000	5 000~17 000	12.4	2~4
Bio-gel-P-30	30 000	20 000~50 000	14.9	10~12
Bio-gel-P-60	60 000	30 000~70 000	19.0	10~12
Bio-gel-P-100	100 000	40 000~100 000	19.0	24
Bio-gel-P-150	150 000	50 000~150 000	24.0	24
Bio-gel-P-200	200 000	80 000~300 000	34.0	48
Bio-gel-P-300	300 000	100 000~400 000	40.0	48

注:上述各种型号的凝胶都是亲水性的多孔颗粒,在水和缓冲液中很容易膨胀。生产厂为 Bio-Rad Laboratories Richmond California U.S.A.

(四) 琼脂糖凝胶的技术数据

名称、型号	凝胶内琼脂糖 百分含量(W/W)	排阻的下限 (相对分子质量)	分级分离的范围 (相对分子质量)	生 产 厂 商
Sephacrose 4B	4		$0.3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$	Pharmacia Uppsala Sweden
Sephacrose 2B	2		$2 \times 10^6 \sim 25 \times 10^6$	
Sagavac 10	10	2.5×10^5	$1 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$	Seravac Laboratories Maidenhead, England
Sagavac 8	8	7×10^5	$2.5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^5$	
Sagavac 6	6	2×10^6	$5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	
Sagavac 4	4	15×10^6	$2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$	
Sagavac 2	2	150×10^6	$5 \times 10^5 \sim 15 \times 10^7$	
Bio-GelA-0.5M	10	0.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$	Bio-Red Laboratories California, U. S. A.
Bio-GelA-1.5M	8	1.5×10^6	$< 1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	
Bio-GelA-5M	6	5×10^6	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	
Bio-GelA-15M	4	15×10^6	$4 \times 10^4 \sim 15 \times 10^6$	
Bio-GelA-50M	2	50×10^6	$1 \times 10^5 \sim 50 \times 10^6$	
Bio-GelA-150M	1	150×10^6	$1 \times 10^6 \sim 150 \times 10^6$	

琼脂糖是琼脂内非离子型成分,它在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$, pH4~9 范围内是稳定的

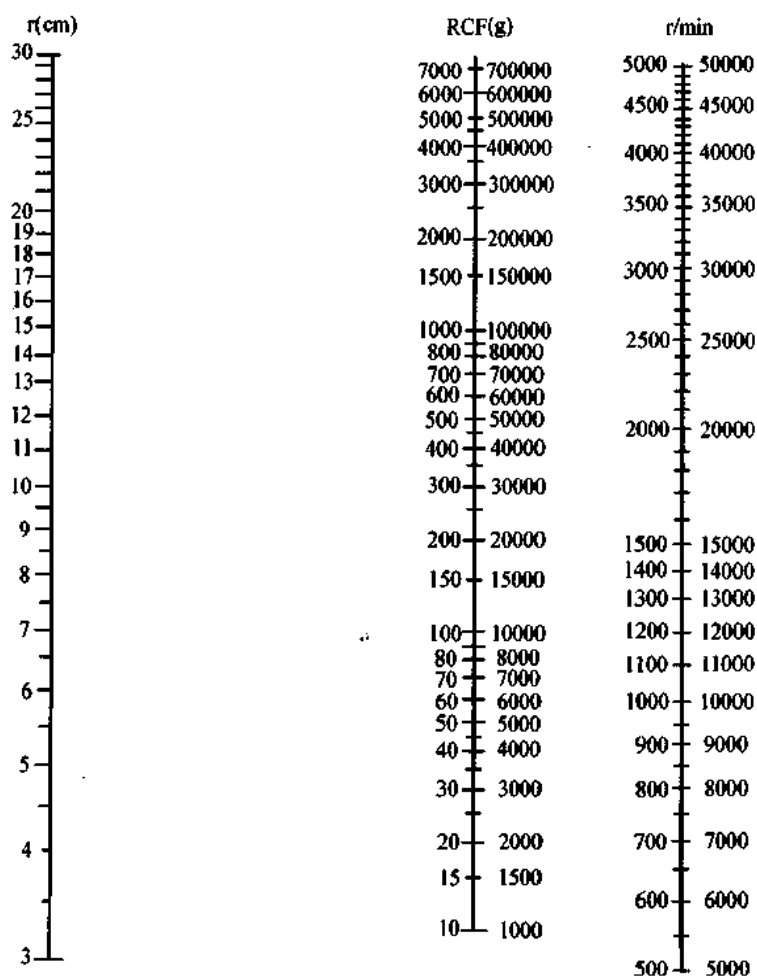
(五) 各种凝胶所允许的最大操作压

凝 胶	建议的最大静水压(厘米 H_2O)
Sephadex G-10	100
G-15	100
G-25	100
G-50	100
G-75	50
G-100	35
G-150	15
G-200	10
Bio-Gel P-2	100
P-4	100
P-6	100
P-10	100
P-30	100
P-60	100
P-100	60
P-150	30
P-200	20
P-300	15
Bio-Gel A-0.5M	100
A-1.5M	100
A-5M	100
A-15M	90
A-50M	50
A-150M	30

十、同位素衰减表

^3H		^{35}S		^{32}P		^{125}I		^{131}I	
时间/年	剩余活性/%	时间/年	剩余活性/%	时间/年	剩余活性/%	时间/年	剩余活性/%	时间/年	剩余活性/%
1	94.5	2	98.4	1	95.3	4	95.5	0.2	98.3
2	89.3	5	96.1	2	90.8	8	91.2	0.4	96.6
3	84.4	10	92.3	3	86.5	12	87.1	0.6	95.0
4	79.8	15	88.7	4	82.4	16	83.1	1.0	91.8
5	75.4	20	85.3	5	78.5	20	79.4	1.6	87.2
6	71.3	25	82.0	6	74.8	24	75.8	2.3	81.2
7	67.4	31	78.1	7	71.2	28	72.4	3.1	76.7
8	63.7	37	74.5	8	67.8	32	69.1	4.0	71.0
9	60.2	43	71.0	9	64.7	36	66.0	5.0	65.2
10	56.9	50	67.0	10	61.5	40	63.0	6.1	59.3
11	53.8	57	63.6	11	58.7	44	60.2	7.3	53.4
12	50.9	65	59.6	12	55.9	48	57.4	8.1	50.0
12.3	50.0	73	56.0	13	53.2	52	54.8		
		81	52.5	14	50.7	56	52.4		
		87.1	50.0	14.3	50.0	60	50.0		

十一、离心机转速与相对离心力的换算



图附-5 离心机转速与相对离心力列线图

其中 RCF 为相对离心力,以重力加速度的倍数(g 或 $\times g$)表示。 r 为离心机转头半径,或离心管中轴底部内壁到离心机转轴中心的距离(单位 cm), r/min 为离心机每分钟转数。

十二、数字词头

$\frac{1}{2}$ ……Hemi	8……Octa	17……Heptadeca
1……Mono	9……Nona	18……Octadeca
$1\frac{1}{2}$ ……Sesqui	10……Deca	19……Nonadeca
2……Di 或 Bi	11……Undeca	20……Eicosa
3……Tri	12……Dodeca	21……Henicosa
4……Tetra	13……Trideca	30……Triconta
5……Penta	14……Tetradeca	40……Tetraconts
6……Hexa	15……Pentadeca	50……Pentaconta
7……Hepta	16……Hexadeca	60……Hexaconta

十三、常用药品中英文对照及分子式、相对分子质量表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
醋酸	acetic acid	CH_3COOH	60.05
酞酐	acetic anhydride	$(CH_3CO)_2O$	102.09
乙酰醋酸	acetoacetic acid	CH_3CO-CH_2COOH	102.09
丙酮	acetone	CH_3COCH_3	58.08
琼脂	agar		
无水酒精	alcohol, absolute	C_2H_5OH	46.05
硫酸铝铵(铵明矾)	aluminum ammonium sulfate	$AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	453.32
氢氧化铝	aluminium hydroxide	$Al(OH)_3$	78.00
氧化铬	aluminium oxide	Al_2O_3	101.94
氯化铵	ammonium chloride	NH_4Cl	53.50
柠檬酸铵	ammonium citrate	$(NH_4)_3C_6H_5O_7$	243.22
氢氧化铵	ammonium hydroxide	NH_4OH	35.10
钼酸铵	ammonium molybdate	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	1 235.95
草酸铵	ammonium oxalate	$(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$	142.12
磷酸二氢铵	ammonium phosphate monobasic	$NH_4H_2PO_4$	115.04
硫酸铵	ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	132.15
硫化铵	ammonium sulfide	$(NH_4)_2S$	68.15
硫氰酸铵	ammonium thiocyanate	NH_4SCN	76.12
乙酸戊酯	amylacetic ester	$CH_3COOC_5H_{11}$	130.13
戊醇	amyl alcohol	$C_5H_{11}OH$	88.15
苯胺	aniline	$C_6H_5NH_2$	93.13
亚砷酸酐	arsenic trioxide	As_2O_3	197.90
抗坏血酸	ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	176.12
巴比妥酸	barbituric acid	$H_2C(CONH)_2CO \cdot 2H_2O$	128.09
氯化钡	barium chloride	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	244.31
氢氧化钡	barium hydroxide	$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$	315.50
过氧化钡	barium peroxide	BaO_2	169.4
硫酸钡	barium sulfate	$BaSO_4$	233.43

续表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
苯	benzene	C_6H_6	78.11
联苯胺	benzidine	$H_2NC_6H_4 \cdot C_6H_4NH_2$	184.23
苯甲酸	benzoic acid	C_6H_5COOH	122.12
硼砂(硼酸钠)	borax (sodium tetraborate)	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	381.43
硼酸	boric acid	H_3BO_3	61.84
溴	bromine	Br_2	159.81
乙酸丁酯	butyl acetate	$CH_3COOC_4H_9$	116.09
正丁醇	n-butyl alcohol	$CH_3(CH_2)3OH$	74.12
碳酸钙	calcium carbonate	$CaCO_3$	100.09
氯化钙	calcium chloride	$CaCl_2$	110.99
氢氧化钙	calcium chloride	$Ca(OH)_2$	74.10
次氯酸钙	calcium hypochlorite	$Ca(OCl)_2 \cdot 4H_2O$	215.00
硝酸钙	calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2$	164.10
磷酸钙	calcium phosphate	$Ca_3(PO_4)_2$	310.20
咖啡因	caffeine	$C_8H_{10}O_2N_4$	194.19
四氯化碳	carbon tetrachloride	CCl_4	153.54
干酪素(酪蛋白)	casein		
蓖麻油	castor oil		
氯仿	chloroform	$CHCl_3$	119.39
胆固醇	cholesterol	$C_{27}H_{45}OH$	386.36
铬矾(硫酸铬钾)	chrome alun	$Cr_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24H_2O$	998.36
铬酸	chromic acid	H_2CrO_4	118.02
柠檬酸	ctric acid	$C_3H_4(OH)(COOH)_3 \cdot H_2O$	210.14
硝酸钴	cobalt nitrate	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	291.05
硫酸钴	cobalt sulfate	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	281.11
火棉胶	collodion		
皮质素(皮质酮)	cortisone	$C_{21}H_{28}O_5$	270.434
肌酸	creatine	$C_4H_9O_3N_3$	131.14
醋酸铜	cupric acetate	$Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$	199.64
氯化铜	cupric chloride	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	170.49
硫酸铜	cupric sulfate	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.69
无水硫酸铜	cupric sulfate, anhydrous	$CuSO_4$	159.63
半胱氨酸	cysteine	$HSCH_2CH(NH_2)COOH$	121.16
胱氨酸	cystine	$[HO_2CCH(NH_2)CH_2S]_2$	240.30
2,6-二氯酚酞基酚 (2,6-二氯酚酞)	2,6-dichlorophenol indophenol		
铬黑 T	eriochrome black T	$1-HOC_{10}H_6-2N:N-1-C_{10}H_4-2HO-6NO_2-4-SO_3Na$	461.58
乙酸乙酯	ethyl acetate	$CH_3COOC_2H_5$	88.10
乙醇	ethyl alcohol	CH_3CH_2OH	46.07
乙醚	ethyl ether	$(C_2H_5)_2O$	74.12
柠檬酸铁铵	ferric ammonium citrate	$Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)_2$	480
硫酸铁铵(铁铵矾)	ferric ammonium sulfate	$Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	482.21
氯化铁	ferric chloride	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270.32
硫酸铁	ferric sulfate	$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	399.90
硫酸亚铁铵	ferrous ammonium sulfate	$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	392.16
氯化亚铁	ferrous chloride	$FeCl_2 \cdot 2H_2O$	162.80
硫酸亚铁	ferrous sulfate	$FeSO_4$	151.80

续表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
甲醛	formaldehyde	HCHO	30.03
甲酸	formic acid	HCOOH	46.03
果糖	fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.16
1,6-二磷酸果糖	fructose-1,6-diphosphate	$C_6H_{14}O_{12}P_2$	340.1
半乳糖	galactose	$C_6H_{12}O_6$	180.16
明胶	gelatin		
葡萄糖	glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.16
谷氨酸	glutamic acid	$NH_2CH(COOH)CH_2CH_2COOH$	147.14
甘油	glycerol	$C_3H_5(OH)_3$	92.09
氯化金	gold chloride	$AuCl_3 \cdot HCl \cdot 4H_2O$	412.10
阿拉伯树胶	gum acacia		
肝素	heparine		
盐酸	hydrochloric acid	HCl	36.47
氟化氢	hydrogen fluoride	HF	20.00
过氧化氢	hydrogen peroxide	H_2O_2	34.02
对苯二酚	hydroquinone	$C_6H_4(OH)_2$	110.11
盐酸羟胺	hydroxylamine hydrochloride	$NH_2OH \cdot HCl$	69.60
胰岛素	insulin		
碘	iodine	I_2	253.82
碘乙酸	iodo-acetic acid	$CH_2I-COOH$	185.95
乳酸	lactic acid	$CH_3CHOHCOOH$	90.08
乳糖	lactose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.32
醋酸铅	lead acetate	$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$	379.35
硝酸铅	lead nitrate	$Pb(NO_3)_2$	331.23
碳酸锂	lithium carbonate	Li_2CO_3	73.90
草酸锂	lithium oxalate	$Li_2C_2O_4$	101.90
醋酸镁	magnesium acetate	$Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$	214.47
氧化镁	magnesium oxide	MgO	40.23
硫酸镁	magnesium sulfate	$MgSO_4$	120.37
麦芽糖	maltose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.20
水银(汞)	mercury	Hg	200.61
氯化汞	mercuric chloride	$HgCl_2$	271.50
硝酸汞	mercuric nitrate	$Hg(NO_3)_2 \cdot 1/2 H_2O$	333.63
红降汞(氧化高汞)	mercuric oxide, red	HgO	216.61
硝酸亚汞	mercurous nitrate	$Hg_2(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	561.26
偏磷酸	metaphosphoric acid	HPO_3	80.10
甲醇	methyl alcohol	CH_3OH	32.04
甲基橙	methyl orange	$(CH_3)_2NC_6H_4N:NC_6H_4-$	327.35
钼酸	molybdic acid	$H_2MoO_4 \cdot SO_3Na$	162.00
紫尿酸铵(红紫酸铵)	murexide	$C_8H_4O_6N_5NH_4 \cdot H_2O$	302.21
α -萘酚	α -naphthol	$C_{10}H_7OH$	144.17
α -萘胺	α -naphthylamine	$C_{10}H_7 \cdot NH_2$	143.18
茚三酮(茚满三酮)	ninhydrin	$C_9H_6O_4$	178.14
硝酸	nitric acid	HNO_3	63.02
辛醇	octyl alcohol	$C_8H_{17}(C_2H_5)C_2H_4OH$	130.22

续表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
油酸	oleic acid	$C_{17}H_{33}COOH$	282.45
草酸	oxalic acid	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	126.07
软脂酸	palmitic acid	$C_{15}H_{31}COOH$	256.30
对氨基苯甲酸	para - amino - benzoic acid	$H_2NC_6H_4COOH$	137.13
对二甲氨基偶氮苯	para - dimethylamino - azobenzene	$(CH_3)_2NC_6H_4N \cdot NC_6H_5$	225.13
石蜡	paraffin		
石蜡油	paraffin oil		
胃蛋白酶	pepsin		
蛋白胨	pepsin		
(高)过氯酸	perchloric acid	$HClO_4$	100.50
石油醚	petroleum ether		
(苯)酚	phenol	C_6H_5OH	94.11
酚酞	phenolphthalein	$(C_6H_4OH)_2COOC_6H_4CO$	318.33
盐酸苯肼	phenylhydrazine hydrochloride	$C_6H_5NH \cdot NH_2 \cdot HCl$	144.50
磷酸	phosphoric acid	H_3PO_4	98.0
磷钼酸	phosphomolybdic acid	$H_3PO_4 \cdot MoO_3$	241.937
磷钨酸	phosphotungstic acid	$20WO_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 25H_2O$	5 286.00
醋酸钾	potassium acetate	CH_3COOK	98.15
铝钾矾	potassium aluminium sulfate	$KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	474.40
邻苯二甲酸氢钾	potassium biphthalate	$KH(COO)_2C_6H_4$	204.23
氯酸钾	potassium chlorate	$KClO_3$	122.55
氯化钾	potassium chloride	KCl	74.55
铬酸钾	potassium chromate	K_2CrO_4	194.20
氰化钾	potassium cyanide	KCN	65.11
重铬酸钾	potassium ferricyanide	$K_2Cr_2O_7$	294.22
铁氰化钾	potassium ferricyanide	$K_3Fe(CN)_6$	329.26
亚铁氰化钾	potassium ferricyanide	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	422.39
氢氧化钾	potassium hydroxide	KOH	56.1
碘酸钾	potassium iodate	KIO_3	214.0
碘化钾	potassium iodide	KI	166.02
硝酸钾	potassium nitrate	KNO_3	101.10
草酸钾	potassium oxalate	$K_2C_2O_4 \cdot 10H_2O$	184.24
高锰酸钾	potassium permanganate	$KMnO_4$	158.03
过硫酸钾	potassium persulfate	$K_2S_2O_8$	270.32
磷酸氢二钾	potassium phosphate, dibasic	K_2HPO_4	174.18
磷酸二氢钾	potassium phosphate, monobasic	KH_2PO_4	136.09
酒石酸钠钾	potassium sodium tartrate	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	282.23
硫氰酸钾	potassium thiocyanate	$KSCN$	97.18
异丙醇	iso - propyl alcohol	$(CN_3)_2CHOH$	60.09
吡啶	pyridine	C_5H_5N	79.10
焦栲酚	pyrogallol	$C_6H_3(OH)_3$	126.05
(焦性没食子酸)			
丙酮酸	pyruvic acid	$CH_3COCOOH$	88.06
硫酸奎宁	quinine sulfate	$(C_{20}H_{24}O_2N_2)_2H_2SO_4 \cdot 2H_2O$	782.97
间苯二酚	resorcinol	$C_6H_4(OH)_2$	110.11
水杨酸	salicylic acid	$C_6H_4(OH)COOH$	138.12

续表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
硅	silicon	Si	28.09
硝酸银	silver nitrate	AgNO ₃	169.86
结晶醋酸钠	sodium macerate cryst	CH ₃ COONa·3H ₂ O	136.09
无水醋酸钠	sodium acetate anhydrous	CH ₃ COONa	82.04
巴比妥酸钠	sodium barbiturate	NaC ₄ H ₃ O ₃ N ₂	150.08
苯甲酸钠	sodium benzoate	C ₆ H ₅ CO ₂ Na	144.10
碳酸氢钠	sodium bicarbonate	NaHCO ₃	84.00
硫酸氢钠	sodium bisulfate	NaHSO ₄ ·H ₂ O	138.09
亚硫酸氢钠	sodium bisulfite	NaHSO ₃	104.07
溴化钠	sodium bromide	NaBr	102.91
碳酸钠	sodium chlorate	Na ₂ CO ₃	105.99
氯酸钠	sodium chlorate	NaClO ₃	106.45
氯化钠	sodium chloride	NaCl	58.45
柠檬酸钠	sodium citrate	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·2H ₂ O	294.12
氰化钠	sodium cyanide	NaCN	49.02
氟化钠	sodium fluoride	NaF	41.99
次氯酸钠	sodium hypochlorite	NaClO	74.45
乳酸钠	sodium lactate	Na ₂ C ₃ H ₅ O ₃	112.07
硝酸钠	sodium nitrate	NaNO ₃	85.01
亚硝酸钠	sodium nitrite	NaNO ₂	69.01
亚硝基铁氰化钠	sodium nitroprusside	Na ₂ Fe(NO)(CN) ₅ ·2H ₂ O	297.97
草酸钠	sodium oxalate	Na ₂ C ₂ O ₄	134.00
高氯酸钠	sodium perchlorate	NaClO ₄	122.45
磷酸氢二钠(十二水)	sodium phosphate, dibasic	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358.16
磷酸氢二钠(无水)	sodium phosphate, dibasic - anhydrous	Na ₂ HPO ₄	141.98
磷酸二氢钠(一水)	sodium phosphate, monobasic	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	138.01
磷酸三钠	sodium pyrophosphate, tribasic	Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	380.16
焦磷酸钠	sodium pyrophosphate	Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	446.07
丙酮酸钠	sodium pyruvate	CH ₃ COCOONa	110.021
无水硫酸钠	sodium sulfate, anhydrous	Na ₂ SO ₄	142.06
结晶硫酸钠	sodium sulfate, cryst	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	322.22
亚硫酸钠	sodium sulfite	Na ₂ SO ₃ ·7H ₂ O	252.16
无水亚硫酸钠	sodium sulfite, anhydrous	Na ₂ SO ₃	126.05
硫代硫酸钠	sodium thiosulfate	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	248.21
钨酸钠	sodium tungstate	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	329.93
氯化亚锡	stannous chloride	SnCl ₂ ·2H ₂ O	225.65
可溶性淀粉	starch, soluble	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _x	
硬脂酸	stearic acid	C ₁₇ H ₃₅ COOH	248.3
蔗糖	sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.31
对氨基苯磺酸	sulfanilic acid	C ₆ H ₄ (NH) ₂ SO ₃ H·H ₂ O	191.21
硫(磺)	sulfur	S	32.07
硫酸	sulfuric acid	H ₂ SO ₄	98.08
亚硫酸	sulfurous acid	H ₂ SO ₃	82.08
鞣酸	tannic acid	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	322.10
酒石酸	tartaric acid	HOOC-(CHOH) ₂ -COOH	150.09
硫脲	thiourea	(NH ₂) ₂ CS	76.12

续表

中 文	英 文	分 子 式	相对分子质量
甲苯	toluene	$C_6H_5CH_3$	92.14
三氯醋酸	trichloroacetic acid	CCl_3COOH	163.40
胰蛋白酶	trypsin		
色胺	tryptamine	$C_{10}H_{12}N_2$	160.21
色氨酸	tryptophane	$C_{11}H_{12}O_2N_2$	204.218
松节油	turpentine	$C_{10}H_{16}$	136.24
醋酸双氧铀	uranyl acetate	$UO_2(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$	424.30
脲(尿素)	urea	$(NH_2)_2CO$	60.06
脲酶	urease		
尿酸	uric acid	$C_5H_4N_4O_3$	168.11
凡士林	vaseline		
二甲苯	xylene	$C_6H_4(CH_3)_2$	106.16
木糖	xylose	$CH_2OH(CHOH)_3CHO$	150.1
醋酸锌	zinc acetate	$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	219.50
无水醋酸锌	zinc acetate, anhydrous	$Zn(CH_3COO)_2$	183.40
硫酸锌	zinc sulfate	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287.56