

超 速 离 心 技 术

超速离心是生物学研究中的一项重要技术，用于细胞、亚细胞组分和生物大分子(如蛋白质、核酸等)的分离与分析。习惯上把每分钟 4,000 转的离心机称为低速离心机；每分钟 20,000 转的离心机称为高速离心机，这类离心机有冷冻装置。每分钟 20,000 转以上的离心机称为超速离心机，为了减少空气的摩擦阻力，它的转头是在真空中运转的。由于多数生物样品(如病毒、亚细胞颗粒和生物大分子)都是极小的颗粒或溶质，它们在重力场中的沉降速度极慢，同时还存在扩散作用，只有超速离心所产生的强大的离心力场，才有可能将它们彼此分离开并研究其沉降行为。因此，超速离心在离心技术中占有重要的位置。

本文将简要介绍超速离心的基本概念、技术及其应用。

一、沉降理论的基本概念

球体的摩擦系数(f)与溶剂的粘度(η)和球体的半径(r)成正比，可用下式表示：

$$f = 6\pi\eta r$$

这就是著名的 Stoke 定律。它是沉降理论的基础。一个球形颗粒在重力场中的沉降速度达到一恒定值，颗粒上沉降的净力等于它通过液体运动所产生的阻力。这一阻力称为摩擦力。根据 Stoke 定律可计算一个颗粒的沉降速度 v ：

$$v = \frac{d^2(\rho_p - \rho_m)}{18\mu} \times g$$

从这一方程式可以看到：①某个颗粒的沉降速度与该颗粒直径(d)的平方成正比；②沉降速度同颗粒的密度与液体介质的密度之差($\rho_p - \rho_m$)成正比；③当颗粒密

度与液体介质密度相等时,沉降速度为零;④沉降速度随液体介质粘度(μ)的增加而降低;⑤沉降速度随力场(g)的增加而增加。

离心速度可以用每分钟旋转的次数表示,即 *RPM*,但大小不同的离心转头,由于旋转半径不同,即使离心速度相同,所产生的离心力也不同。因此常用相对离心力(*RCF* 或 *G*)表示,其单位为重力加速度 g (980 厘米/秒²)。可用下式表示 *RCF* 与转速和径向距离的关系:

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{980}$$

式中 r 为离心管内颗粒至旋转轴中心的距离(厘米), ω 为角速度,按下式求得:

$$\omega = \text{转/分} \times \frac{2\pi}{60} = \text{转/分} \times 0.10472$$

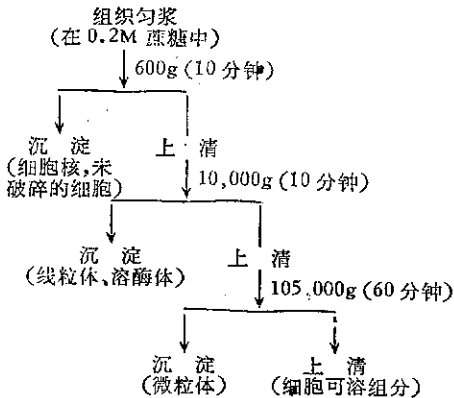
目前超速离心机的转速可达 80,000 转/分,最高离心力近 600,000 g ,也就是说比重力大 60 万倍。

二、制备超速离心

根据实验目的,可把超速离心分为两大类:①制备超速离心:用于分离和提纯各种亚细胞组分(如细胞膜、细胞核、线粒体、微粒体等)以及各种大分子蛋白质、核酸;②分析超速离心:用于测定大分子颗粒的沉降系数和分子量以及鉴定其纯度。

制备超速离心又可分为两类,即差速离心和区带离心(即密度梯度离心)。区带离心又有两种,即速度区带离心和等密度区带离心。

1. 差速离心:差速离心是选择不同的离心力和离心时间使大小不同的颗粒分开。这种最常用的离心方法操作简单,适合于大量制备样品。它在亚细胞组分的分离中占有很重要的位置。下面是分离亚细胞组分的差速离心经典方法。



差速离心对大小不同的颗粒分辨能力较差,因此在各种亚细胞组分的分离中常常彼此有不同程度的混杂,需反复离心或用其他方法再进一步精制。尽管如此,差速离心仍不失为一种有实用价值的分离方法而沿用至今。

2. 速度区带离心:在速度区带离心中,颗粒是在一个密度逐渐增加的介质中沉降,对比之下,差速离心中颗粒是在均匀密度的介质中沉降,因此速度区带离心的分级分离效果可以得到较显著的改善。利用惰性溶质(通常是蔗糖)的浓度梯度维持区带的稳定性,防止对流。样品铺在顶层,梯度的最大密度(在最低层)要低于颗粒的漂浮密度,这是速度区带离心的重要原则。由于大小不同的颗粒在离心力场下沉降的速度不同,经过一定的时间,从顶层到底部形成一条条区带。由于这是一种动力学方法,时间是很重要的因素,必须选定合适的时间,时间短,颗粒分不开;时间过长,所有的颗粒全沉到底部。速度区带离心最好在水平转头或区带转头上进行以减少离心管的边壁效应。

在速度区带离心中,颗粒的沉降速度依赖于它本身的大小、形状和密度,而且也与梯度每一层的密度、粘度和离心力场有关。

梯度的类型可以分为不连续梯度和连续梯度两种。不连续梯度制备方法很简单,例如欲配制 4—20% 的蔗糖梯度溶液,先分别配制 4%、8%、12%、16% 和

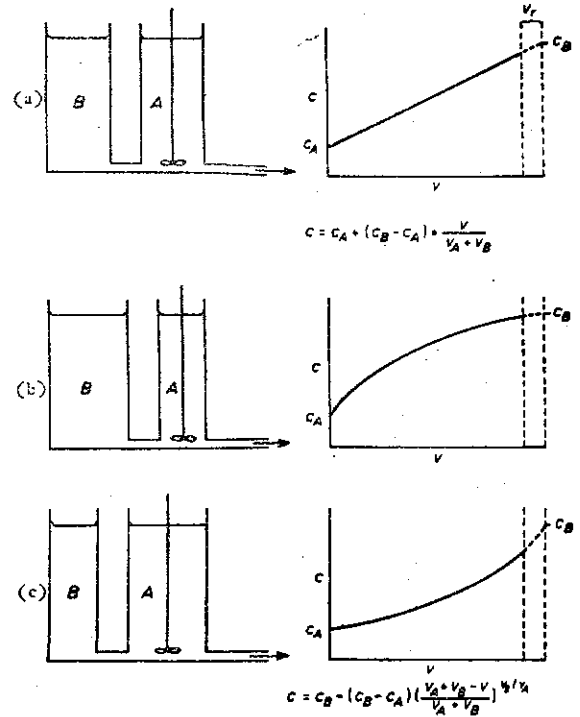


图 1 一个双室梯度混合器的工作原理

A 为混合室, B 为储液室。

当 A 室直径等于 B 室直径时,得到直线梯度(a);当 $A < B$ 时,得凸形指数曲线(b);当 $A > B$ 时,得凹形指数曲线(c)。C 为梯度的浓度, V 是梯度的容积(也就是梯度的位置)。C_A 和 C_B 分别表示梯度起始浓度与终止浓度;V_r 是残留容积

20%的蔗糖溶液(用阿贝折射仪校正蔗糖溶液的浓度),然后先浓后稀地沿管壁并紧靠液面一层层加入。经放置一段时间令其扩散,使梯度平滑,接近直线梯度。制备连续梯度可用梯度混合器(图1)。连续梯度的类型有三种:①直线型;②凸指数曲线型;③凹指数曲线型。其中以直线型最常用。

梯度离心的取样方法也很简单。在离心结束后,可从离心管底部钻一小孔,放出梯度液,分部收集。也可用浓的蔗糖液推到管底,将梯度液顶出离心管,再分部收集。

在水平转头上进行速度区带离心,除可作制备用外,还适于作分析用,测定大分子物质的沉降系数。这就是通常所说的密度梯度分析超速离心。这种方法有许多优点是光学分析超速离心所不及的。例如它可以测定亚细胞器的沉降系数,也可以作未提纯或暂无法提纯的样品沉降系数的测定。因为在密度梯度离心液中可以用放射性同位素示踪,也可在离心结束后分部收集各区带测生物活性。所有这些在光学分析超速离心机上都是作不到的。

早年, Svedberg 对沉降系数曾下过这样的定义:沉降常数 s 是单位离心力场下颗粒的沉降速度。这个定义说明沉降系数是某种颗粒在一定温度及一定溶剂中的特有的内在参数。沉降系数(s)的计算公式如下:

$$s = \frac{1}{\omega^2 r} \times \frac{dr}{dt}$$

式中 ω 是角速度(弧度/秒), r 是离心半径(厘米), t

是时间(秒), dr/dt 是颗粒的运动速度。沉降系数的量纲是秒,规定 10^{-13} 秒=1 S。因此,如果一个颗粒的沉降系数测为 10^{-12} 秒,即为 10×10^{-13} 秒=10 S

但 Svedberg 这个经典的概念引伸到具有密度梯度和粘度梯度的介质时,则遇到一些问题。为了使在不同梯度中所得到的沉降系数可以互相比较,必须从数学上把沉降系数转换到标准状态,习惯上是20℃的水中,经这样校正的沉降系数用 $S_{20,w}$ 符号表示。

在区带离心中沉降系数的定义可用下列积分方程式表示:

$$S_{20,w} \int_0^t \omega^2 dt = \frac{\rho_p - \rho_{20,w}}{\eta_{20,w}} \times \int_i^r \frac{\eta_{T,m}}{\rho_p - \rho_{T,m}} \times \frac{dR}{R}$$

式中 ρ_p 是颗粒的密度(克/厘米³), $\rho_{T,m}$ 是介质在温度 T 时的密度(克/厘米³), $\rho_{20,w}$ 是水在20℃时的密度(克/厘米³), $\eta_{T,m}$ 是介质在温度 T 时的粘度(厘泊), $\eta_{20,w}$ 是水在20℃时的粘度(厘泊),根据这个基本公式,设计了许多适于计算沉降系数的方程式,采用电子计算机计算区带离心的沉降系数。

但不少实验室对上述积分方程进行了简化,用表格或半图解法使区带离心和沉降系数在一般的实验室可以用笔算得出。

实际上,许多实验室常常在梯度液中放进已知沉降系数的标准蛋白或核酸,根据这些标志物的位置,对其 s 值作图,获得一标准曲线,然后找到未知样品的 s 值。对于大致推算未知样品的沉降系数,此法很有价值。

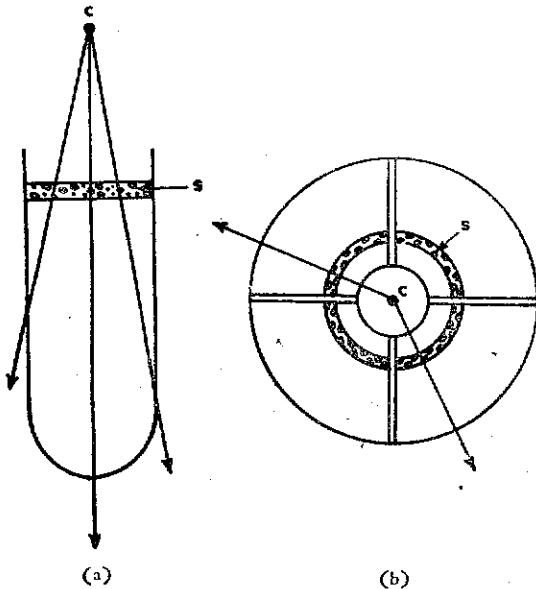


图2 从旋转中心(C)通过样品带(S)的离心力径向线(→)示意图
(a)在水平转头上 (b)在区带转头上

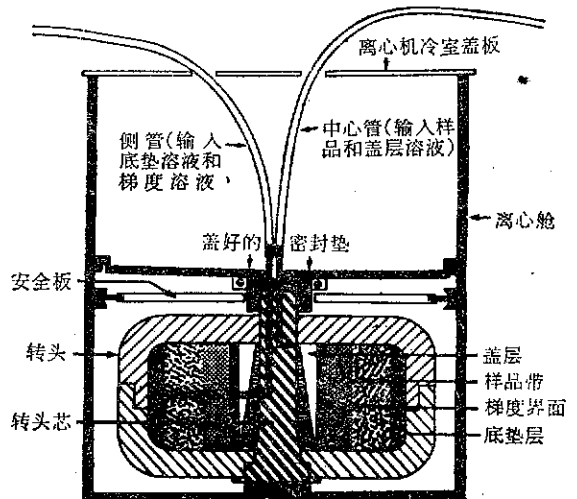


图3 一种区带转头(B-XV型)的结构示意图,表示正在旋转中的梯度位置

* 因“沉降常数”一词不确切,现已改称为“沉降系数”。

速度区带离心受水平转头容量的限制,不可能进行大量样品制备。区带转头的发展则克服了上述缺陷。区带转头没有离心管,整个转头内部由四个扇形隔室组成(图2-b, 3),转头中部有进样口和出样口。总容量高达300-1,700毫升。

在一个自旋转头中,离心力场是径向的。因此,在水平转头中只有通过离心管中心的那一部分,离心力场与管壁平行(图2-a)。在样品区带中心的颗粒才直接向管底沉降,所有不在中心位置的颗粒,均偏向管壁,偏离的程度与它们距样品带中心的距离成正比。这样一种“边壁效应”严重地影响了分离效果。但这种情况对于区带转头中扇形室内的样品则不存在(图2-b)。此外,为了减少梯度的扰动,将样品维持在狭窄的区带内,区带转头可以在旋转时加样和取样,消除了水平转头和固定角转头在加速和减速过程中所出现的梯度扰动和梯度转向,这样进一步提高了区带分离效果。

区带转头大体上可分为两种类型,一种是定容转头,即样品体积固定;另一种是连续区带转头,样品可不断送入梯度的表层。

区带转头一般采用高密度(如60%蔗糖)直线梯度或不连续梯度。这种转头适于分离各种类型的细胞以及细胞核、核膜、线粒体、溶酶体、过氧化质体、质膜、内质网、核蛋白体和多聚核蛋白体、脱氧核糖核酸、核糖核酸、血浆脂蛋白、病毒和细菌等。

3. 等密度区带离心: 又称平衡梯度离心,它的原理与速度区带离心不同。等密度区带离心是根据颗粒密度的差异,因此所用梯度的密度必须包括所有要分离的颗粒的密度范围,也就是说,其最小密度应小于分离颗粒的密度,最大密度应大于分离颗粒的密度。这实际上是一种静力学方法,在离心力场下,颗粒按其密度的不同沉降落到与它密度相同的那层梯度中,达到平衡。形成一个对称的区带(高斯区带),区带的峰顶即为该区带的密度。这样一种离心分离不受离心时间、颗粒大小与形状的影响,虽然这些参数决定达到平衡的速度以及在平衡时所形成的区带宽度。任何颗粒的有效漂浮密度是该颗粒实际密度和它的水合程度的函数。理解这一点很重要,例如非水合DNA的密度接近 $2.0\text{g}/\text{厘米}^3$,但它的漂浮密度的观察值可以从 $1.1\text{g}/\text{厘米}^3$ 变化到 $1.7\text{g}/\text{厘米}^3$ 这显然与梯度介质中水的活度有关。

等密度区带离心达到平衡的时间与颗粒的扩散作用以及离心管液柱长度都有关系。小分子达到平衡的时间要比大分子长。如果能用公式计算达到平衡的时间则有实用价值。下面所列方程式大致表示一个分子在 r 到 r_0 之间的时间关系:

$$\frac{r_0 - r}{r} = \frac{r_0 - r_0}{r_0} \exp\left(\omega^2 r_0 \frac{ds}{dr} t\right)$$

式中 r 为颗粒初始位置距旋转中心的距离; r_0 为液柱弯月面距旋转中心的距离; r_0 为颗粒在平衡时所在的

位置距旋转中心的距离。

梯度溶液的粘度与密度对分子的运动有阻滞作用,在最简化的条件下,大分子与梯度之间的密度差是主要的因素,速度的变化可用上面方程式中的 ds/dz 表示,只要算出 $(r_0 - r)/r$,则到平衡的时间就不难计算了。其实真正的平衡只是在无限的时间 $(r_0 - r)/r = 0$ 时才能达到,但从实际应用角度,人们规定 $(r_0 - r)/r = 0.001$ 。

在等密度区带离心技术中,选择合适的梯度介质很重要。由于需要配制高密度的介质,蔗糖就不适用了。一则蔗糖的浓溶液粘度大,渗透压高,二则蔗糖溶液最大浓度的密度只能到 $1.25\text{g}/\text{厘米}^3$ 。用碱金属盐(如氯化铯)可以达到很高的密度($1.35\text{g}/\text{厘米}^3$),而且氯化铯的梯度可以在离心过程中自动形成(称为“自成梯度”),它的粘度很低,可是渗透压太高。另一种用蔗糖人工聚合物—Ficoll(商品名)作梯度介质可大大降低渗透作用,可借这类介质密度低、粘度大。最近几年采用一种新的密度梯度介质,即三碘苯甲酸盐的衍生物。这是区带离心技术的一项重要进展。三碘苯甲酸盐的衍生物是一类医用的X光造影剂,其中一种就是国内已有生产的泛影葡胺。这类化合物可以配成的密度高达 $1.40\text{g}/\text{厘米}^3$,而粘度和渗透压都较低,在国外已广泛应用。

等密度区带离心可用于分离双股和单股DNA、各种类型的RNA、DNA-RNA杂交产物、脂蛋白和核蛋白的分离,某些噬菌体($\phi\text{X-174}$ 、 λ -噬菌体)、肿瘤病毒、淋巴细胞和各种细胞器也常用这类离心分离提纯。

三、分析超速离心

分析超速离心是20—40年代发展起来的技术,应该说并不是什么新的方法。它是在离心过程中用复杂的化学方法观察离心池中颗粒的沉降行为。原来在离心池中均匀分布的溶质,在强大的离心力场下向离心池底部移动,于是液面这一部分就形成纯溶剂层,结果在溶质层与溶剂层之间产生一个有浓度梯度的界面。溶质的移动可以从界面的移动反映出来,可以用光学方法测量这个界面移动的速度。

常用的光学观察方法有①柱面透镜法(Schlieren光学系统)、②光干涉法(Rayleigh光学系统)、③紫外光吸收法(图4—6)。

柱面透镜法观察起来最方便,可以在沉降过程中观察到沉降全过程的图象,它的位置、形状和数目,随时可以拍照记录下来,缺点是灵敏度较差,蛋白质样品浓度必须大于0.1%。光干涉法灵敏度有所提高,且可以根据条纹数目计算浓度。紫外光吸收法可以显著提高灵敏度,蛋白质浓度低至0.05%,核酸浓度低至0.004%都可以反映出来,但缺点是不能直接观察沉降过程,只有在底片冲洗后才能观察。近些年一些分析超

(下转第21页)

(上接第 60 页) 速离心机附有紫外光密度计扫描装置,可以自动记录样品沉降过程。

分析超速离心方法有两种类型,即沉降速度法和沉降平衡法。其中以沉降速度法使用最普遍。方法是在不同的时间测量沉降界面至转轴中心的距离(x),然后以 $\log x$ 对相应的离心时间 t 作图,得一直线,求出其斜率($d\log x/dt$),代入下式:

$$S = \frac{2.303 d\log x/dt}{(60) (\omega^2)}$$

即可求得沉降系数。通过校正可求出 $S_{20,w}$ 。

在沉降平衡法实验中,样品经长时间低速离心,使沉降作用和扩散作用在溶液中达到平衡状态。根据平衡的浓度梯度曲线求沉降常数。此法因离心时间过长,应用受到限制。

多年来分析超离心技术在生物学和医学研究中获得了广泛的应用。利用这种方法测定了许多蛋白质和核酸等大分子物质的沉降系数,分子量和分子形状,还用于鉴定蛋白质的纯度,研究一些病理条件下血浆蛋白的变化。但应该指出,近十余年来,由于制备超速离心机可用区带离心进行沉降系数和分子量的测定,凝胶电泳技术的发展提供了更为有效的蛋白质和核酸样品纯度鉴定的方法,同时又可作分子量测定。这些方法操作比较简单,因此几乎完全代替了昂贵、复杂的分析超速离心机,以致近几年在生化文献中很难看到有分析超离心应用的报道。

(本刊根据中国科学院动物研究所
傅湘琦同志来稿整理)