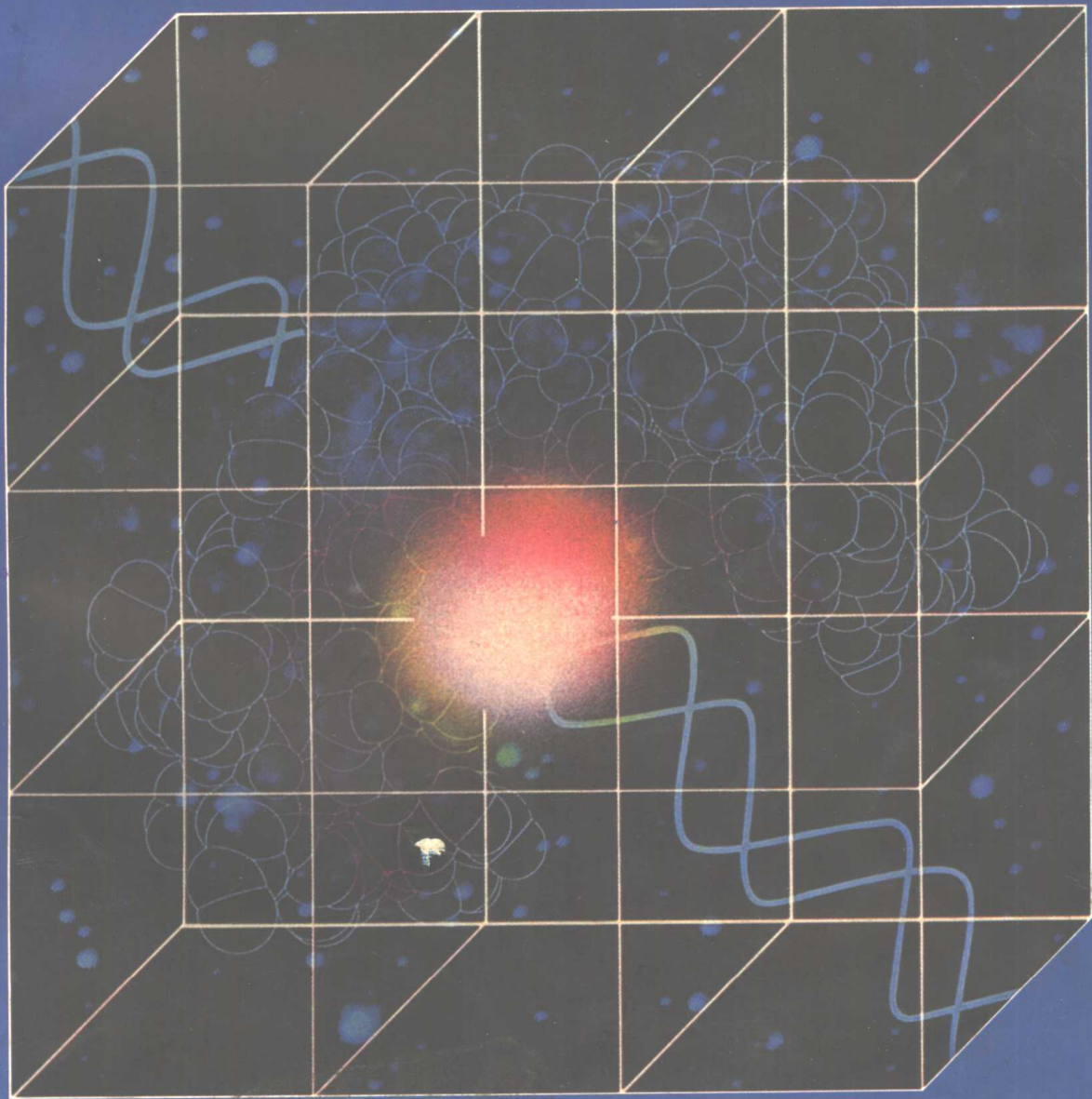


基因操作技術

鄒福強 梁意昭 周楨林 吳明義 吳應積 編

鄒福強 審校



 淑馨出版社

基因操作技術

鄒福強 梁意昭 周楨林 吳明義 吳應積 編

鄒福強 審校

 淑馨出版社

本書經作者授權出版繁體字版本發售，若有翻印者，依法必究。

基因操作技術

編者：鄧福強 梁意昭 周楨林
吳明義 吳應積

出版者：淑馨出版社

發行人：陸又雄

編輯：楊玉滿

地址：台北市安和路151號2樓(日光大廈)

電話：7006285 • 7080290 • 7039867

郵政劃撥：0534577-5 淑馨出版社

印刷者：建武企業有限公司

行政院出版事業登記證：台業字第2613號

中華民國七十八年五月出版

版權所有 • 翻印必究

定價380元

前 言

現在流行着一種觀點：二十一世紀將是生物科學的世紀。的確，生物科學近二十年來取得了驚人的進步，使人們感到鼓舞，對生物科學充滿期望和信心。以分子生物學為標志的現代生物科學，不僅使人們在分子水平上看到了生命的奧秘，而且也確實在醫學、農業、工業各方面給人們帶來越來越多的利益。今天，關心生物科學發展的不僅僅是生物學家了，各個領域的科學家、教育家、乃至政治家和實業家也把注意力投向生物科學，越來越多的自然科學工作者和有志青年也投身於生物科學這絕非偶然。

隨着分子生物學的發展和人類改造自然界的深度日益加深，七十年代初基因工程應運而生。基因工程不僅為人類改造生物世界提供了新的手段，也使基因操作技術日益發展和完善，為生物科學各領域的科學家提供了新的研究手段。基因操作技術的應用，使生物學家、醫學家、農學家和工業生物學家開始設計從前不能想像的研究計劃，實現以前無從着手的研究目標。基因操作技術還開始滲透到微電子工業和航空工業。現代科學工作者都應及時了解這一技術，並把它應用到自己的工作領域。

為適應這一需要，1980年和1981年，美國冷泉港分子生物學研究中心舉辦了兩期基因操作技術訓練班，並以訓練班教材為基礎編輯出版了《分子克隆》一書（“Molecular Cloning”，T. Maniatis, E. F. Fritschy和J. Sambrook 著），系統地介紹了基因操作技術。這本書具有實驗手冊特點，詳細地敘述了操作方法、實驗條件和注意事項。書中，各種操作方法按照分子克隆的實驗順序編排；為了正確運用這些技術，還介紹了技術要點和實驗設計原理。必須指出，原書的材料取自有關領域的著名實驗室，其中許多材料尚未公開發表於別處。

原著於1982年7月出版後，很快被世界各國學者廣泛採用，至1983年6月前筆者獲得此書時，在不到一年的時間內已修訂再版了六次。這不僅反映了基因操作技術的快速發展和普及，而且也說明了該書所受到的歡迎非同一般。筆者當時正在美國有關實驗室工作，從書中得益不淺，深知國內學人急需，回國後邀幾位同事把它譯成中文，並由筆者校審定稿。

原著的成功在於它的完整性、可靠性和實用性。它納入的技術、方案、方法、操作都已經過充分驗證。為幫助讀者運用這些技術和處理實驗中的具體問題，書中對各項技術的原理還提供了背景知識。在每項實驗之後，作者陳述了操作要領和注意事項。這對尚缺乏實際經驗的讀者，無疑是寶貴的借鑒。

寫在紙上的基因操作，看起來不難，但做起來却不易。一項實驗包含着繁多步驟；一步失足，全局失陷。因此，周密思考、精心設計、嚴格操作、質量求精、數量求準，如此等等均屬必須。但也並非“凡人”不能入境；依理操作，反覆實踐，有志者必能得心應手。為此，我們在編譯時不吝篇幅對常用生化實驗技術與操作做了介紹。這部分材料主要取自《分子生物學方法》（“Practical Methods in Molecular Biology”，R. F. Scelfo和P. C. Weisburger 著）。

翻譯一本書也好，編譯一本書也好，目的全在一個“用”字。既然為用，就得讓人家看

得懂，看得舒服，至少不被“洋味中文”所困惑。為此，我們在編譯本書時，力求在文字表達上變通，試求“漢化”。又為便於查閱，為各節段編上了號碼。還將個別物理量變換為我國的計量單位。這一些，也就是本書不是譯本，而是編譯本的原因。

筆者認為，經過上述加工，本書可能更具有實驗工具書的特點。因此，本書沒有沿用原著《分子克隆》的書名，而是稱作《基因操作技術》。

在編譯過程中，承蒙中山大學曾淑雲副教授校閱了初稿並提出許多寶貴意見；廣東省科學技術委員會對本書的出版給予熱情贊助。對此，我們致以衷心感謝。

書稿雖幾經修改，但限於筆者水平，錯誤仍所難免，敬請讀者教正是幸。

鄒 福 強

一九八六年六月於廣州

目 錄

第一章 常用蛋白質實驗技術	1
一、硫酸銨分級沈澱	1
二、相分配法除核酸	2
(一)試劑和貯備溶液	3
(二)從大量蛋白質中除去核酸	3
(三)從核蛋白中提純蛋白質	4
三、離子交換層析	5
(一)離子交換樹脂的處理	5
(二)離子交換層析操作	5
四、蛋白質濃度測定	8
(一)光吸收法	8
(二)雙縮脲法	8
(三)勞瑞 (Lowry) 法	9
(四)勞瑞微量法	9
五、蛋白質溶液的濃縮	10
六、穩定蛋白質的方法	11
七、聚丙烯醯胺凝膠電泳	12
(一)凝膠夾層的組裝	12
(二)帶濃縮膠的 SDS-凝膠電泳	14
(三)尿素-SDS-梯度凝膠電泳	16
(四)凝膠染色	18
(五)螢光顯影	18
第二章 常用核酸實驗技術	20
一、核酸濃度及純度測定	20
(一)分光光度法	20
(二)溴乙錠螢光法	20
二、核酸的製備	22
(一)大腸桿菌 DNA 的製備	22
(二)果蠅 DNA 的製備	23
(三)果蠅全 RNA 的製備	25
(四)果蠅 rRNA 的製備	26
三、DNA 的純化	27
(一)DEAE-纖維素層析	28
(二)HAP 吸附層析	29
四、Sephadex G-50 凝膠過濾	29
(一)Sephadex G-50 處理	30

(一)常規柱層析法	30
(二)旋轉柱層析法	30
五、DNA 凝膠電泳	31
(一)瓊脂糖凝膠電泳	32
(二)聚丙烯醯胺凝膠電泳	35
(三)凝膠染色與攝影	36
(四)從凝膠中洗脫DNA	37
六、核酸濃縮	38
(一)乙醇沈澱	38
(二)丁醇抽提	39
七、核酸沈澱	40
(一)乙醇沈澱	40
(二)三氯乙酸沈澱	40
(三)聚乙二醇沈澱	41
八、DNA 的貯存	42
九、三磷酸核苷溶液的配製	42
十、核苷酸紙層析	43
第三章 載體—宿主體系	44
一、質粒	44
(一)質粒載體舉例	44
(二)外源DNA 克隆	53
二、 λ 噬菌體	58
(一)溶菌生長途徑	59
(二)溶源生長途徑	60
(三) λ 載體的構建	61
(四)載體選擇	61
(五) λ 載體圖譜	62
三、科斯體	81
四、單股DNA 噬菌體	85
第四章 細菌和噬菌體繁殖與貯存	89
一、單菌落分離	89
(一)劃線法	89
(二)稀釋法	90
(三)塗布法	90
二、細菌的培養與貯存	91
(一)細菌培養	91
(二)細菌貯存	91
三、 λ 噬菌體的純化與增殖	92
(一)宿主菌培養	92
(二)噬菌斑形成	92
(三)噬菌斑選取	93

(四)噬菌體製備	93
四、培養基與抗生素	95
(一)液體培養基	95
(二)固體培養基	97
(三)抗生素	97
第五章 載體DNA的製備	99
一、 λ 噬菌體的大量製備	99
(一)感染法	99
(二)誘導法	100
(三) λ 噬菌體的純化	101
(四) λ DNA的提純	104
二、質粒DNA的大量製備	105
(一)細菌培養與質粒擴增	105
(二)菌體收集與溶菌	106
(三)閉環DNA的提純	108
(四)RNA的除去	109
第六章 用於基因操作的酶	110
一、限制性內切核酸酶	110
二、甲基化酶	116
(一) <i>dam</i> 甲基化酶	116
(二) <i>dcm</i> 甲基化酶	117
(三) <i>EcoR</i> I 甲基化酶(大腸桿菌)簡介	118
三、大腸桿菌DNA聚合酶 I	119
(一)DNA缺口轉移反應	119
(二)DNA聚合酶 I (大腸桿菌)簡介	121
四、Klenow聚合酶	123
(一)雙鏈DNA 3'-凹端的修補	123
(二)DNA末端的快速標記	124
(三)Klenow酶(大腸桿菌)簡介	126
五、T4DNA聚合酶	127
(一)DNA末端的快速標記	127
(二)置換合成	128
(三)T4DNA聚合酶(T4感染的大腸桿菌)簡介	130
六、T4多核苷酸激酶	131
(一)DNA 5'-末端的標記	131
(二)DNA平端或 5'-凹端的標記	132
(三)合成接頭的標記	133
(四)DNA 5'-末端的標記(交換反應)	134
(五)T4多核苷酸激酶(T4感染的大腸桿菌)簡介	135
七、以RNA為模板的DNA聚合酶	136
(一)脫氧寡核苷酸引物的製備	137

(二)雜交探針的製備	138
(三)以RNA為模板的DNA聚合酶(反轉錄酶)簡介	139
八、鹼性磷酸酯酶	140
(一)DNA 5' - 末端磷酸的去除	141
(二)鹼性磷酸酯酶(BAP和CIP)簡介	142
九、核酸酶 <i>Bal</i> 31	142
(一)DNA 限制位點作圖	143
(二)DNA 片段克隆	143
(三)核酸酶 <i>Bal</i> 31	144
十、核酸酶 <i>S</i> 1	145
十一、綠豆核酸酶	145
十二、核糖核酸酶	146
十三、脫氧核糖核酸酶 I	146
十四、外切核酸酶 <i>V</i>	147
十五、外切核酸酶 <i>III</i>	147
十六、 λ 外切核酸酶	149
十七、多聚(A)聚合酶	149
十八、T4 DNA 連接酶	150
十九、末端脫氧核甘酸轉移酶	151
二十、T4 RNA 連接酶	151
第七章 真核 mRNA 的製備與分析	152
一、細胞質 RNA 的製備	153
二、Poly (A) ⁺ RNA 的純化	155
三、細胞全 RNA 的製備	156
(一)胍-熱酚法	156
(二)胍-氯化銨法	157
四、RNA 凝膠電泳分析	158
(一)乙二醛-二甲亞碲系統	158
(二)甲醛系統	159
(三)氫氧化甲汞系統	161
五、RNA 的 <i>SI</i> 酶定位法	162
第八章 cDNA 的合成與克隆	165
一、合成 cDNA 的技術要點	165
(一)cDNA 第一鏈的合成	165
(二)cDNA 第二鏈的合成	166
(三)髮夾環的切割	166
二、克隆雙鏈 cDNA 的方法	167
(一)用勻聚物接尾	168
(二)用合成接頭接尾	169
(三)克隆 mRNA • cDNA	170

(四)用寡核苷酸引發 cDNA 第二鏈的合成	171
(五)用質粒引發 cDNA 兩條鏈的合成	171
三、克隆 cDNA 的謀略	172
(一)豐富 mRNA 的運用	172
(二)稀有 mRNA 的運用	173
(三)按分子長度富集 mRNA	174
(四)合成寡聚脫氧核苷酸的運用	174
(五)"對比雜交"的運用	175
(六)免疫沉澱法的運用	175
四、合成和克隆 cDNA 的操作	176
(一)勻聚物接尾法	176
(二)雙接頭法	184
第九章 重組 DNA 導入宿主菌	188
一、用質粒 DNA 轉化大腸桿菌	188
(一)用氯化鈣提高轉化率	188
(二)用氯化鈣和氯化鉀提高轉化率	189
(三)用多種鹽提高轉化率	190
二、 λ 噬菌體 DNA 的體外包裝	192
(一) λ 噬菌體溶源的貯存與檢驗	193
(二)包裝方法 I	194
(三)包裝方法 II	196
第十章 基因文庫的組建	199
一、用 λ 載體組建文庫	199
(一)載體 DNA 的製備	201
(二)真核 DNA 片段的製備	204
(三)連接與包裝	208
(四)文庫擴增	212
二、用科斯體組建基因文庫	213
(一)用去末端磷酸的科斯體克隆	213
(二)用去磷黏端不同的科斯體克隆	217
(三)科斯體文庫的篩選、擴增與貯存	220
第十一章 重組克隆體鑒別	222
一、原位雜交	222
(一)菌落雜交篩選	223
(二) λ 噬菌斑雜交篩選	226
(三)核酸分子雜交	228
二、cDNA 克隆體的雜交鑒別	231
(一)膜上雜交法	231
(二)溶胞物轉譯法	237
(三)蛙卵母細胞轉譯法	240
三、DNA 序列的重組鑒別	242

(一)原理.....	242
(二)實驗材料.....	245
(三)W3110r ⁻ m ⁺ (p3)的轉化.....	246
(四)噬菌體校正基因的遺傳學檢驗.....	246
(五)用λ文庫感染W3110r ⁻ m ⁺ (p3)(πVX).....	246
(六)πVX系統的檢驗.....	247
(七)πVX系統的使用.....	249
第十二章 重組克隆體分析	250
一、克隆體DNA的快速分離.....	250
(一)少量質粒DNA的快速分離.....	250
(二)少量λ噬菌體DNA的快速分離.....	253
二、限制酶切點定位.....	254
(一)依次消化法.....	255
(二)部分消化法.....	256
三、DNA序列定位.....	258
(一)SOUTHERN轉移.....	259
(二)膜上雜交.....	260
四、DNA片段次級克隆.....	262
(一)黏端DNA片段次級克隆.....	262
(二)合成接頭的安裝.....	263
(三)補齊5'-突端.....	263
(四)切除3'-突端.....	264
(五)合成接頭或銜接物安裝.....	265
(六)限制位點的恢復和組建.....	266
(七)快速克隆.....	268
第十三章 克隆基因的表達載體	269
一、啟動子.....	269
(一)λ噬菌體P _L 啟動子.....	270
(二)其它啟動子.....	272
二、核糖體結合位點.....	272
三、真核基因的表達型載體.....	273
(一)表達非融合蛋白質的載體.....	273
(二)表達融合蛋白質的載體.....	280
四、基因表達的放大.....	286
五、基因量的擴增.....	287
六、總 結.....	287
附錄 I 常用生物化學技術	289
玻璃和塑料器皿的處理.....	289
器皿表面的硅化處理.....	289
有機試劑處理.....	289
液體培養基.....	290

凝膠培養基	291
濃縮培養基	291
λ 噬菌體用培養基	291
抗生素溶液	292
貯備溶液	292
常用溶液	293
酶液配製	294
限制酶消化用緩衝液	295
常用電泳緩衝液	296
常用凝膠電泳加樣緩衝液	296
^{32}P -標記核苷酸處理	297
基因操作中的核酸純化	297
放射自顯影	298
核酸放射性的定量	299
質粒聚合物的製備	300
Maxam-Gilbert 序列測定法	300
附錄 II 常用數據	303
商品酸鹼濃度和密度	303
限制酶消化反應條件	307
pBR322 DNA 限制片段長度 (bp)	307
λ 噬菌體 DNA 限制片段長度 (bp)	308
RNA 凝膠電泳分子量標記物	309
三磷酸核苷和脫氧核苷物化常數	310
蛋白水解酶使用和貯存條件	310
附錄 III 常用菌株	311
參考文獻	313

第一章 常用蛋白質實驗技術

在分子生物學的大多數研究中，都要用到蛋白質和酶，因此提純或部分提純蛋白質和酶是不可少的。由於維持蛋白質結構的力僅僅稍大於使蛋白質結構破壞的力，因此蛋白質很不穩定。蛋白質結構易受酸鹼度、一價陽離子、二價陽離子、某些特殊離子與金屬、溫度以及蛋白質濃度的影響。因此，實驗時必須特別注意緩衝液的成分。蛋白質在低溫下比在室溫下穩定，因此通常在 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 進行提純，在盡量低的溫度下貯存。蛋白質的性質十分複雜，不可能提出一套適用於各種情況的實驗規則。有時實驗條件很苛刻，但也別無它擇，因為它是唯一可用的條件。

下面介紹提純蛋白質的常用方法。其中有些操作在提純蛋白質時經常用到，而有些操作只用於特定的步驟。

一、硫酸銨分級沉澱

蛋白質的粗抽提液可用硫酸銨初步提純。經初步提純的抽提液，蛋白質純度通常可提高 5 倍，而且常常還可同時除去游離的核酸。硫酸銨分級沈澱的原理是，不同的蛋白質在不同的鹽濃度下沈澱。沈澱蛋白質最常用的鹽是硫酸銨。其它溶解度大而又無毒的鹽類，如磷酸鉀等，也可用於蛋白質沈澱。進行硫酸銨分級沈澱時須注意如下幾點。

1 硫酸銨常含有金屬雜質，可使酶失活，因此要用超純的硫酸銨。在大量提純蛋白質時，有時可用低純度的硫酸銨，但需加入 EDTA 以螯合其中的金屬離子。使用高純度硫酸銨時，不必像使用低純度硫酸銨那樣注意保持溶液的酸鹼度恒定。

2 沈澱所需要的蛋白質時，不需要的蛋白質也常常一起被沈澱。如果改變了前面的提純步驟，沈澱所需蛋白質的硫酸銨濃度也應隨之改變。

3 蛋白質沈澱是鹽和蛋白質的綜合效應，因此從稀溶液中沈澱蛋白質時，可能需要較高濃度的硫酸銨。

4 沈澱不同的蛋白質時，所需的硫酸銨飽和度不同。例如，沈澱大腸桿菌的蛋白質時，少數蛋白質在 24% 以下的飽和度沈澱，而大多數蛋白質則在大約 35% 飽和度沈澱，核糖體在大約 45% 飽和度沈澱，大多數可沈澱的蛋白質在大約 55% 飽和度時都能沈澱。一般每 100 毫升 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 的緩衝液，加入 70.5 克的硫酸銨便飽和。在進行幾次硫酸銨沈澱時，硫酸銨用量的計算可假設比體積為 0.5 毫升 / 克，即溶解 1 克硫酸銨後溶液體積增加 0.5 毫升。

下面介紹的是分離在 25~33% 硫酸銨飽和度之間沈澱的蛋白質的操作步驟。

操 作

1 量抽提液體積。在這裏假定為 250 毫升。

2 將抽提液調至 25% 硫酸銨飽和度。硫酸銨用量為 $250 \times 0.25 \times (70.5 / 100) = 44$ 克

。將裝有抽提液的燒杯冰浴，並緩慢地（5～10分鐘）加入硫酸銨。這一過程中須檢查幾次酸鹼度，以不使 pH 有明顯改變。爲了保持酸鹼度恒定，每加入10克硫酸銨後通常須加入1～2滴1M NaOH或KOH溶液。

3. 不斷攪拌約20分鐘。由於蛋白質在攪拌後還將繼續沈澱，因此將已經沈澱的蛋白質分離後，清液在0～4℃繼續放置12小時。在放置過程中溶液又變混濁。

4. 分離沈澱的蛋白質。通常在10000×g離心20分鐘便可。

5. 測定蛋白質含量。將沈澱的蛋白質重新溶解，測定其中的蛋白質含量（這裏不必收集蛋白質，因爲已經沈澱的蛋白質不是我們需要的）。

6. 取上清液繼續進行硫酸銨分級沈澱。這裏須將硫酸銨飽和度調至33%。如果將原來的粗抽提液直接調至33%硫酸銨飽和度，應加入 $250 \times 0.33 \times (70.5/100) = 58$ 克硫酸銨。但上清液的硫酸銨飽和度爲25%，已含有44克硫酸銨，故只需再加入 $58 - 44 = 14$ 克硫酸銨。通常，上清液不能完全回收。假定從第一步沈澱只收回了 y 毫升上清液，將上清液調至33%飽和度時所需的硫酸銨則爲 $(y/272) \times 14$ 克。該式中的 272 是全部上清液調至25%飽和度時的體積毫升數（ $250 + 44 \times 0.5 = 272$ ）。

說明

計算硫酸銨用量的方法很多。當已決定採用某一計算方法後，就不要隨意更動該方法所規定的操作，例如不要把加入固體硫酸銨改爲加入硫酸銨飽和溶液。硫酸銨的飽和度取決於蛋白質溶液的體積和溫度，因此操作時尤應注意。加入固體硫酸銨時，硫酸銨的加入量與它的比體積有關，而後者又取決於蛋白質溶液的硫酸銨飽和度。通常假定比體積爲0.5毫升/克。這個數值有時可能與真實數值相差很遠，但對普通的實驗工作是適用的，因爲實驗後要報告的是向 y 毫升蛋白質溶液中加入 x 克硫酸銨，別人會照此去操作，不會去計算飽和度究竟是多少。在提純一種新酶時，通常會分別試用 0～28%、23～34%、34～40%、40～60% 硫酸銨飽和度進行分級沈澱。

二、相分配法除核酸

通常，提純蛋白質的第一步是除去核酸。除核酸的傳統方法是用陽離子（ Mn^{2+} 、鏈黴素和精蛋白等）沈澱核酸。但是此法在有些情況下不適用，例如所需要的蛋白質在沈澱核酸的條件下失活，或提取液中核酸含量太高，或所要提純的酶用於蛋白質體外合成實驗，在這些情況下就必須用相分配法除核酸。

右旋糖苷 T500 或聚乙二醇 6000 能在很寬的濃度範圍內形成雙相系統。這種雙相系統對分子生物學研究十分有用。蛋白質和核酸這兩類大分子在兩相中的分配，嚴格地取決於各自的結構和雙相系統的離子成分。多聚物的相分配規律爲分離核酸混合物、蛋白質混合物、核酸與蛋白質的混合物提供了溫和而有效的方法。相分配法能分離 DNA 和 RNA，以及雙鏈 DNA 和單鏈 DNA。這裏只討論核酸與蛋白質的分離、DNA 結合蛋白和 RNA 結合蛋白的提純。

(一)試劑和貯備溶液

1 右旋糖苷 T500 (D, Pharmacia產品) 每批產品質量不同, 新購入的批號最好經過抽樣檢查。

2 聚乙二醇 6000 (PEG6000) 工業用製劑, 價錢便宜。

3 配方 A (D 6.4, PEG 25.6, 4M NaCl) 將 500 毫升 4M NaCl 溶液加熱至近於沸騰, 緩慢加入 64 克 D (右旋糖苷 T500)。溶解後, 再加入 256 克 PEG。繼續加熱和攪拌, 直到黏稠物溶解並形成均勻的混合物。加入 4M NaCl 溶液, 使最後的質量為 900 克。也可以加入以緩衝液 (0.05M 或低於 0.05M) 的 4M NaCl, 使最後質量為 1000 克。

4. 配方 B (D 6.4, PEG 25.5, 不加鹽) 配法與配方 A 相同, 但用水代替 4M NaCl。

5 配方 C (PEG 6.9%) 分別加熱含有 1M、2M 和 4M NaCl 的緩衝液, 至溫度為 40~50 °C, 邊加熱邊攪拌。用溫熱的緩衝液分別配成 6.9% PEG 溶液 (W/W), 攪拌至 PEG 完全溶解。

含有右旋糖苷的溶液置 4 °C 貯存。

(二)從大量蛋白質中除去核酸

本法可用於從細胞提取液中除去 DNA、大分子 RNA 和大部分 tRNA。寡核苷酸不易除去, 因此盡量不要用核酸酶處理; 除非大量製備時, 非用核酸酶降低溶液黏度不可。在這種情況下, 可用 2 微克 (μg) DNase/毫升在 0 °C 處理 30 分鐘, 使黏度降低; 雖 DNA 未降解成寡核苷酸, 但仍可從蛋白質中除去。

操 作

1 用常規方法破碎細胞, 製備提取液。在 5000×g 離心提取液, 除去細胞碎片。提取液不甚清澈, 但盡量不用 DNase 處理。將提取液在 4 °C 放置。

2 當製備提取液時, 將聚合物的貯備液置於溫水中, 使聚合物流體化並混合均勻。要用力振盪, 使黏稠的底層 (右旋糖苷) 與上層混合。這一步很重要。

3 預先稱好燒杯如攪棒的質量, 再加入提取液一起稱重, 計算出提取液的質量 (W)。將提取液放回冷室或冰浴中。稱取足量的 NaCl, 加入提取液中, 便成 4M NaCl, 它相當於 19.6% NaCl (W/W) 溶液。加入 NaCl 的量按下式計算:

$$G_{\text{NaCl}} = \frac{0.196 W}{1 - 0.196} = 0.243 W$$

將所需量的 NaCl 加入提取液, 邊加入邊攪拌。

4. 如果配製了 1000 克聚合物貯備液, 取質量為含鹽提取液質量三分之一的聚合物貯備液加入提取液, 則右旋糖苷和 PEG 的最終濃度便達到所需數值。如果配製了 900 克聚合物貯備液, 貯備液的加入量應為含鹽提取物質量的 0.9/3:

$$G_{\text{聚合物}} = \frac{0.9}{3} (G_{\text{NaCl}} + W) = 0.3 (G_{\text{NaCl}} + W) = 0.37 W$$

然後加入 $(0.1/3)(G_{NaCl} + W) = 0.041$ 倍液體，以完成這個分配系統。加入的液體最好是破碎細胞用的10倍濃縮的緩衝液，也可以是水。

5. 將上述混合物在 4°C 攪拌30~60分鐘。

6. 在 $5000 \times g$ 離心10~15分鐘，上相為清澈的黃色，下相為混濁的褐色或灰色。取出上相，其中含有蛋白質， OD_{280}/OD_{260} 比值應為 0.9 ± 0.1 。該比值不高，可能是由於有寡核苷酸、單核苷酸和其它小分子殘留物的緣故。

7. 這時得到的蛋白質混合物含有 6.9% PEG。PEG 是否除去，依粗蛋白製劑的用途而定。如果蛋白質混合液要進行離子交換層析，需用10~40倍體積的緩衝液透析其中的 NaCl（透析12小時）；或者用緩衝液稀釋，使離子強度降至適宜程度。這時，便可進行離子交換層析，PEG 對層析沒有干擾。大多數型號的離子交換劑都可使用。

8. 如需濃縮蛋白質混合液以進行凝膠過濾或硫酸銨分級沈澱，則必須除去PEG。做法是：向蛋白質混合液中加入硫酸銨，使其飽和度達到30~35%。如果用固體硫酸銨，則應慢慢加入，並邊加邊攪拌。如果用硫酸銨飽和溶液，可一次加入。加入硫酸銨後形成一個新的雙相體系，溶液變濁。 $10000 \times g$ 離心1小時後，PEG 形成少量的油狀上相，故極易除去。如果硫酸銨飽和度大於24%，幾乎全部PEG 均可被除去。

9. 用裝有聚乙烯管的針筒取出下相，其中的蛋白質用飽和度為65%或略低的硫酸銨沈澱。在 4°C 攪拌20分鐘以上。然後高速離心，通常用 Spinco 30 轉頭在 $25000 \sim 30000$ 轉/分鐘 ($75000 \times g$) 離心20分鐘。取少量沈降物溶於緩衝液並測定光吸收。所得的 OD_{280}/OD_{260} 比值應為 $1.0 \sim 1.2$ ，這表示核酸占光吸收物質總量的 3% 以下。

(三)從核蛋白中提純蛋白質

相分配法的原理是，在有 $4M$ NaCl 溶液存在下，幾乎所有的蛋白質都分布在上相，而所有的核酸都分布於下相。如果蛋白質與核酸緊密地結合在一起，則需要先把它們拆開。降低溶液中的鹽濃度常常能把大多數核蛋白拆成蛋白質和核酸兩部分，然後再用分配法分離。大部分蛋白質分布在上相，而核酸留在下相。用這種方法可把RNA聚合酶和 $Q\beta$ 複製酶的純度提高10倍。

操 作

1 操作過程如前所述，但使用無鹽的聚合物貯備液（配方B），提取液中也不加鹽。

2 第一次低速離心後，取出上相，下相留在離心管中。向下相加入 NaCl，使其濃度為 $1M$ ，再加入約5倍體積的 6.9% PEG（溶於含有 $1M$ NaCl 的緩衝液中）。攪拌1小時，然後離心，取出上相。重複上述操作，但PEG 溶於含有 $2M$ NaCl 的緩衝液中，此時 $Q\beta$ 複製酶分布於上相。再用含有 $4M$ NaCl 的PEG 溶液重複上述操作，此時RNA聚合酶出現在上相。

說 明

1 PEG 干擾 Lowry 蛋白質比色測定法，但不干擾光密度測定。

2 PEG 在TCA中沈澱，長時間放置後在試管底部形成膠狀物。因此，做沈澱分析時必須迅速過濾，以防標記化合物被吸附。

3 PEG 抑制一些酶而激活另一些酶，因此測定酶活力之前要檢查酶活力有沒有異常現象。

4. 在相分配操作中，最好用一定鹽濃度的聚合物貯備液提取兩次；如只提取一次，酶的轉移不完全。

三、離子交換層析

這裏只討論常用的離子交換劑，如 DEAE-纖維素、TEAE-纖維素和磷酸纖維素。許多其它的離子交換劑，如酸性樹脂、鹼性樹脂、兩性樹脂、親合樹脂和羥基磷灰石等，也用於提純蛋白質，它們的使用方法與離子交換纖維素基本相同。

(一)離子交換樹脂的處理

用 0.5 M HCl 將乾的 DEAE-纖維素調成糊狀，攪拌洗滌，然後用水洗，洗至 pH4。再用 0.5 M NaOH 和水依次洗滌，洗至 pH9。最後用緩衝液洗。如果液體呈褐色或桔紅色，要繼續洗至液體無色。將洗好的 DEAE-纖維素用布氏漏斗過濾，除去液體。然後，用10倍體積以上的緩衝液懸浮，並沈降10分鐘，將含有細微顆粒的上清液傾出或虹吸掉。重複操作兩次，或重複操作至纖維素顆粒均勻的沈降。DE52 可不用酸和鹼處理，因為這種顆粒型的 DEAE-纖維素出廠前已洗滌和溶脹；但使用時要除去其中的細微顆粒。

P-11和其它磷酸纖維素的處理方法與 DEAE-纖維素相似，但要先用鹼洗，後用酸洗。磷酸纖維素中的磷酸根濃度約為 1 M ，緩衝能力大約是 DEAE-纖維素的10倍，是一種相當強的緩衝劑。因此，要用大量的 NaOH、HCl 或緩衝液處理，而且要檢查 pH。P-11常常很髒，要多洗幾次。由於洗滌次數多，處理磷酸纖維素通常要用整天的時間。

各種離子交換纖維素都可保存在緩衝液中，但緩衝液中需加少量甲苯，或 0.01% 疊氮化鈉，或其它防腐劑。

緩衝液的 pH 對離子的交換層析的重複性影響很大。磷酸纖維素尤其是這樣，因為它的離子平衡過程很慢。因此，裝柱前最好先用濃的緩衝液調 pH，然後再用層析時使用的稀緩衝液平衡。平衡磷酸纖維素的緩衝液 pH 與緩衝液的離子強度有密切關係，因此要用稀緩衝液反覆平衡；使用 DEAE-纖維素或磷酸纖維素時，緩衝液的 pH 範圍通帶為 $6.5 \sim 9$ 。pH 大於 9.5 時，DEAE 基團不帶電荷，失去離子交換能力。在這種情況下應使用 TEAE-纖維素，它帶有四級胺基，性質與 DEAE 相似。所用的緩衝液應不易被交換劑吸附，例如 DEAE-纖維素使用 Tris 緩衝液，而磷酸纖維素使用磷酸緩衝液。磷酸緩衝液中不可有二價陽離子，因為二價陽離子能與磷酸根牢固的結合。

(二)離子交換層析操作

裝 柱

離子交換劑裝入層析管之前，要把離子交換劑懸液放入真空乾燥器中抽氣幾分鐘，將懸液中的氣體排出；如果用 4°C 貯存的懸液在室溫下裝柱，排氣尤為重要。假如不排氣，層析柱內會出現氣泡，離子交換層析便不能正常進行。層析管的大小要適宜。層析管的長度與寬