

密度梯度离心法

R. 欣顿 M. 多布罗塔 著



科学出版社

密度梯度离心法

R. 欣顿 M. 多布罗塔 著

毕坎华 惠虎雄 李小洁 译

庞其方 杨振藩 校

科学出版社

1982

内 容 简 介

本书综述了密度梯度离心的原理、方法和应用。内容包括:离心机(各种转头)的使用和保养,离心分离的原理和条件,在普通转头和区带转头中的离心,离心结果的分析,密度梯度离心技术的应用及其展望。全书共分九章,附有参考文献和附录。

本书可供生物化学、分子生物学、医学工作者及从事生物制品、药品工作人员参考。

Richard Hinton and Miloslav Dobrota
DENSITY GRADIENT
CENTRIFUGATION
Elsevier/North-Holland Biomedical
Press, 1976

密度梯度离心法

R. 欣顿 M. 多布罗塔 著

毕坎华 惠虎雄 李小清 译

庞其方 杨振藩 校

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年2月第 一 版 开本: 787×1092 $\frac{1}{4}$

1982年2月第一次印刷 印张: 8 $\frac{5}{8}$

印数: 1—2,700 字数: 193,000

统一书号: 18031·1819

本社书号: 2471·13—10

定价: 1.35元

目 录

第一章 区带离心法入门	1
1.1.离心法在生物学中的主要应用	1
1.2.离心技术.....	2
1.2.1.分析超速离心法	2
1.2.2.差速沉淀法	4
1.2.3.速率区带离心法	6
1.2.4.等密度区带离心法	7
1.3.离心机和转头的发展	9
1.3.1.离心机	9
1.3.2.转头材料	11
1.3.3.转头形状	11
1.3.4.区带转头	12
1.4.离心技术的使用和限制.....	16
1.5.离心机实验室的设计.....	19
1.6.离心机的安全性	21
1.6.1.转头毁坏的原因和预防办法	21
1.6.1.1.超速	23
1.6.1.2.腐蚀	23
1.6.1.3.疲劳	24
1.6.1.4.高密度的梯度液	24
1.6.1.5.真空破坏.....	25
1.6.1.6.转头内液体冻结	25
1.6.2.离心机操作中的其它注意事项	25
1.6.2.1.靠近运转的转头	25

1.6.2.2. 液雾的形成	26
1.6.2.3. 电子线路的安全性	26
1.6.2.4. 转头的平衡和组装	27
1.6.2.5. 离心机和转头的配合	27
1.6.2.6. 漏水	27
1.6.2.7. 可燃的溶剂	27
1.7. 转头的保养	28
1.7.1. 转头的选择	28
1.7.2. 制造转头材料的性质和保养	28
1.7.3. 转头的洗涤和干燥	32
1.7.4. 组装、拆卸和贮存	33
1.7.5. 每个转头的保养	33
1.8. 转头的保证寿命	35
第二章 离心分离的理论	37
2.1. 速率区带分离的理论	37
2.1.1. 颗粒的沉降理论	38
2.1.2. 样品区带的稳定性	41
2.1.3. 沉降区带的稳定性	47
2.2. 等密度区带法的理论	49
2.2.1. 等密度区带法分离的区带形状	49
2.2.2. 密度梯度溶质在离心场中的再分布	50
2.2.3. 转头对梯度形状的影响	53
2.3. 密度梯度溶质对亚细胞结构的影响	54
第三章 离心分离的条件	59
3.1. 方法的选择	59
3.2. 转头的选择	64
3.3. 密度梯度材料	68
3.3.1. 碱金属盐	68
3.3.2. 小的亲水有机分子	69
3.3.3. 高分子量的有机化合物	71

3.3.4.其它类型的密度梯度材料	72
3.3.5.梯度材料的选择	78
3.4.梯度的选择	79
3.4.1.速率区带分离的梯度	79
3.4.2.等密度分离的梯度	81
3.4.3.复合梯度的设计	82
第四章 在普通转头中的离心	87
4.1.速率区带离心	87
4.1.1.密度梯度的制备	87
4.1.2.将样品铺于梯度上	93
4.1.3.离心	94
4.1.4.收取梯度	97
4.1.5.监测所替换的梯度	101
4.2.等密度区带离心	103
4.2.1.密度梯度的制备	103
4.2.2.将样品铺到梯度上	105
4.2.3.离心	106
4.2.4.替换和监测梯度	106
第五章 在区带转头中的离心	108
5.1.普通的非再定向的区带转头	110
5.1.1.转头的结构	110
5.1.2.区带转头的类型	120
5.1.2.1. A-XII转头	120
5.1.2.2. Z-15转头	121
5.1.2.3. HS 转头	122
5.1.2.4. B-IV 转头	123
5.1.2.5. B-XIV 和 B-XV 转头	124
5.1.2.6. B-XXK 和 B-XXX 转头	125
5.1.2.7. 一次型和连续流动型可互换的转头	127
5.1.2.8. 连续流动转头	129

5.1.2.9. 其它转头	130
5.1.3. 区带转头的操作	131
5.1.3.1. 离心的准备	132
5.1.3.2. 加梯度	141
5.1.3.3. 加样品	143
5.1.3.4. 加速、转动和减速	150
5.1.3.5. 取样	155
5.1.3.6. 监测和部分收集	161
5.1.4. 附属装备	166
5.1.4.1. 梯度仪	167
5.1.4.2. 泵	168
5.1.4.3. 折射仪和密度计	169
5.1.4.4. 分光光度计、比色计和紫外计	171
5.1.4.5. 流动池	171
5.1.4.6. 温度计	172
5.1.4.7. 灌注泵	172
5.1.4.8. 闪频光源	172
5.1.4.9. 记录器	172
5.1.4.10. 冷却装备	173
5.1.4.11. 次要的附件	173
5.1.4.12. 部分收集器	174
5.1.4.13. 积分仪	175
5.2. 再定向区带转头	175
第六章 密度梯度离心部分收集各级分的分析	183
6.1. 各级分的酶和化学分析	183
6.2. 各级分的电子显微镜检测	184
6.3. 密度梯度分离结果的分析	185
6.4. 沉降系数的计算	189
第七章 密度梯度离心的应用	190

7.1.活细胞的分离	190
7.2.哺乳动物组织细胞器的分离	193
7.2.1.粗制核级分的再分离和大片质膜的分离	194
7.2.1.1.提纯细胞核	196
7.2.2.线粒体级分的再分离	197
7.2.3.溶酶体级分的再分离	198
7.2.4.微粒体的再分离	202
7.2.5.分离核糖核蛋白体	206
7.2.6.染色质的分离	209
7.3.分离植物细胞的亚细胞结构	210
7.4.从单细胞生物分离亚细胞成分	213
7.5.大分子的分离	216
7.5.1.核酸	216
7.5.2.蛋白质	219
7.6.密度梯度离心在生物化学中的其它应用	220
7.6.1.血清脂蛋白的分离	220
7.6.2.分离病毒	223
7.7.密度梯度离心的其它应用	226
第八章 离心分离时出现的假象	227
8.1.离心期间对颗粒的损伤	227
8.1.1.由沉淀引起的损伤	228
8.1.2.由高流体静压引起的损伤	229
8.1.3.由高浓度的梯度溶质引起的损伤	229
8.2.影响密度梯度收集的各级分精确测定的因素	230
8.2.1.梯度溶质和测定分离组分时所用试剂间的反应	231
8.2.2.对分析仪器操作的影响	232
8.2.3.梯度溶质对检定灵敏度的干扰	232
8.3.测定颗粒密度和沉降系数中的误差	234
8.3.1.颗粒密度	234
8.3.2.沉降系数	235

第九章 密度梯度离心展望	238
9.1. 离心机设计	239
9.2. 离心转头的发展	240
9.3. 辅助系统的发展	242
9.4. 离心方法的应用	248
附录	245
参考文献	253

第一章 区带离心法入门

1.1. 离心法在生物学中的主要应用

在本文写作中，作者们意外而又高兴地发现了一些虽然没有用处但对他们来讲却是新奇的事实，如 Miescher 在 1872 年使用离心机分离生物的结构。当时多数人还很少注意细胞结构，在多年里，离心机仅仅用于诸如牛奶的分离，沉淀的收集等工作，只是在 1930 年左右才开始分离较大的颗粒，如细胞核。在那以后的一段时期内，大多数生化家的注意力转向纯化的各级分，特别是酶的分离，而不是分析细胞的结构。为了检验纯化各级分的均一性，又发展了先进的分析超速离心机，而制备离心机主要用来收集沉淀。

两个主要的进展为离心技术广泛的使用铺平了道路：第一，高强度/密度比值合金的发展可使大量的物质在高速下离心；第二，在电子显微镜下（参看 Palade 1971）检测生物样品的各种方法的发展显示出细胞内部结构的复杂性。早期的工作者们试图纯化核 (Behrens 1932) 和线粒体 (Bensley 和 Hoerr 1934)，但当时只能靠光学显微镜来分析这些产品。如果已经知道了要分离的细胞结构的复杂性和各个级分的主要特性，那么需要的就不是纯的制品，而是应该系统地定量地分析各个级分中的酶和亚细胞颗粒的分布。de Duve (1971) 指出：由于一些工作者例如 Claude、Schneider 和 Hogeboom (1951) 坚持做这些定量分析的必要性，所以在较好了解细胞内部结构之后，很快就能知道这些组分的生化作

用。

这些早期的研究都是使用后来叫作差速离心 (differential centrifugation) 或更确切一些应叫差速沉淀 (differential pelleting) 的技术 (Reid 1972b) 来完成。de Duve 等改进了这个方法, 将“线粒体”组分分成主要含有线粒体的“重”组分和含溶酶体多的“轻”组分 (de Duve 和 Bert-
het 1954, de Duve 等1955), 在随后分离不同类型细胞的大量工作中, 可看到这些进展的重要性。

差速沉淀法已成为分离细胞器的一项非常有用的技术, 同时, 一些工作者认识到: 只有那些在颗粒大小上显著不同的颗粒才能用这个方法分离。事实上, 在建立差速沉淀方法的同时提出了另一些技术: 速率和等密度区带离心法 (rate and isopycnic zonal centrifugation), 但这些方法的应用受到技术装备的限制 (Anderson 1956; Allfrey 1959; de Duve 等1959)。直到六十年代初发展成容量的甩开转头 (swing-out rotor) 和区带转头 (zonal rotor) 后, 才开始认识到密度梯度离心方法 (density gradient centrifugation) 的全部潜力。

1.2. 离心技术

1.2.1. 分析超速离心法

正如我们已经指出的, 最初的高速离心机主要用于研究细胞的“提取物”, 这种应用和金属材料强度的限制意味着: 样品的体积必须尽量小, 于是设计了带透明窗的转头, 以便在离心期间能测定离心池中颗粒的分布。图 1.1 表示一个典型的分析转头, 这种分析转头中有分析池, 可注入待

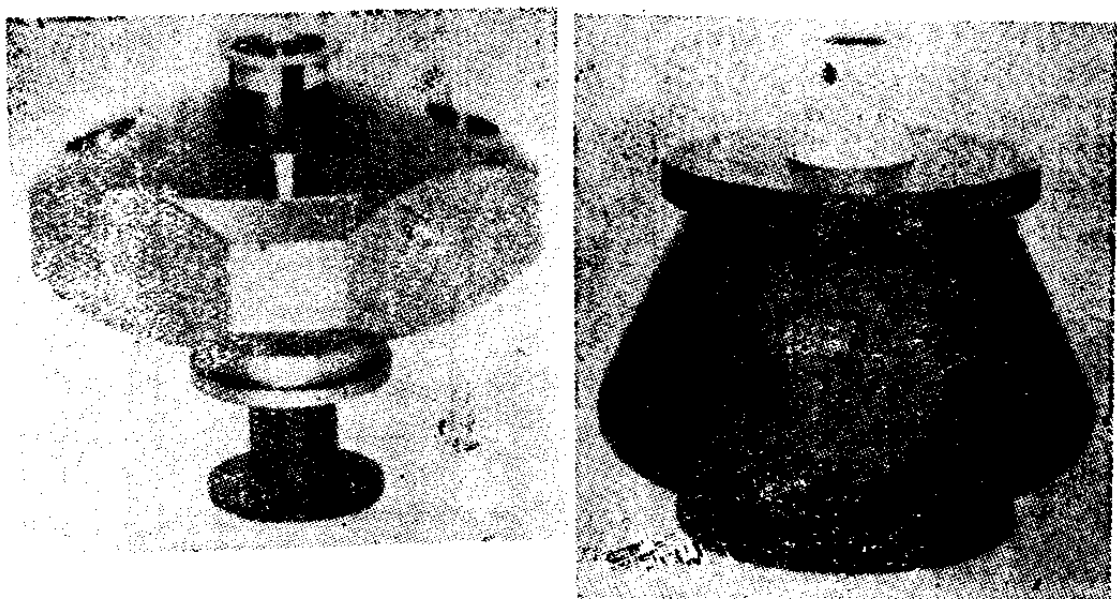


图1.1 (左) 分析离心机的转头, (右) 示出高速制备离心机的转头 (Beckman 65) 供比较。

分析的样品。分析样品是均一的悬液, 将转头加速到它的操作速度, 样品颗粒按一定速度下沉, 它们的大小、形状和离心力决定了它们的沉降速度。因此, 如果分析样品是仅含一种颗粒的均一悬液 (图1.2a1)。在分析池内由于颗粒不断沉降, 一个清晰的界面将慢慢向池底移动 (图1.2 b1)。如果分析样品是一些颗粒的混合物, 则每种颗粒将以它自己的速度沉降, 因而离心后各种颗粒的分布将如图1.2 b 2. 所示, 如果测量指标是颗粒的某些性质: 如折射率或紫外吸收, 则将得到图1.2c 样的图。如果所用的光学系统对折射率的变化敏感 (Schlieren 光路), 则得到的将是一系列峰 (图1.2 d), 通常选用 Schlieren 光路测量。必须指出的是, 这些峰并不表示通过透明介质移向池底的那些颗粒的区带, 而实际表示的是颗粒沉降区域的“尾端”。使用起始均一的悬液和测量池中峰的位移, 可研究颗粒的很多性质。

分析超离心法在这个基本的简单的基础上很快地发展起来了, 但它不是本书的目的, 读者如有兴趣的话, 可参考 Schachman (1959), Trautman (1964) 和 Bowen (1970)

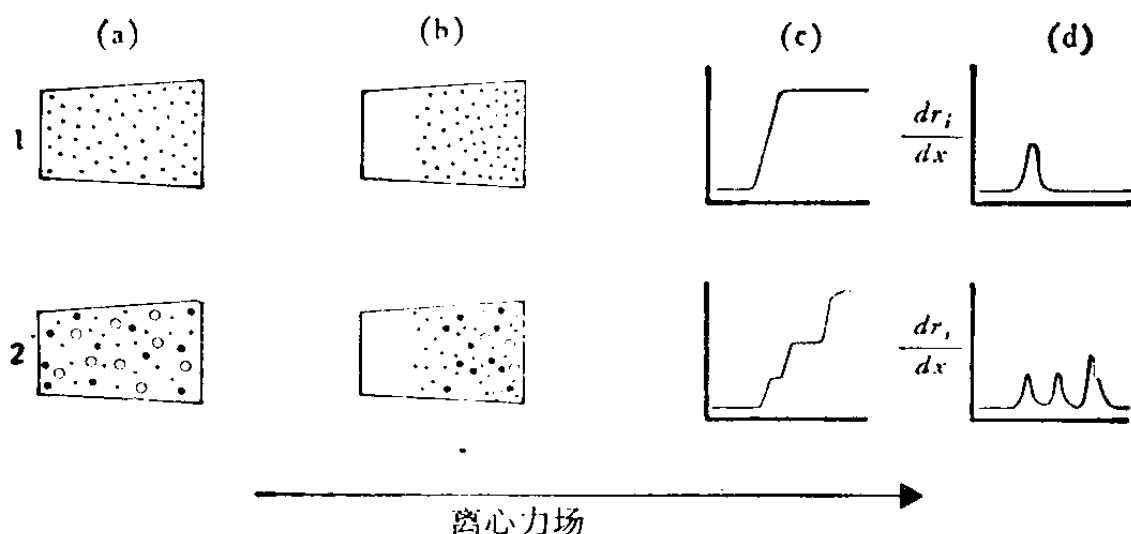


图1.2 在分析转头中的分离。开始池中颗粒的分布是均一的(A)，离心时颗粒向池底沉降, 每种颗粒将在一特定的速度下沉降。当有几种颗粒沉降时, 将形成几个界面(B), 这些界面在池中的沉降速度与其相关的颗粒的沉降速度相同。界面可以用这些颗粒共有的某些性质如紫外吸收值来测量, 即分析池中颗粒的分布(C) 或使用光学系统 (Schlieren 光路), 它所提供的图形与折射率变化的增量有关(D), Schlieren 光学系统的灵敏度低, 但所得到的图形更容易解释。

的书和文章。

1.2.2. 差速沉淀法

差速沉淀法在原理上与在分析超离心机中的分离一样, 离心管注入均一的悬液, 离心期间, 颗粒移向离心管底部, 并在底部沉淀。离心时间选择到刚好足以使所有的最大颗粒都沉淀 (图1.3 C), 这样将得到没有这种颗粒的上清液, 这个上清液可在更高的速度下离心, 以分离第二大的颗粒, 如此等等。缺点是沉淀将是不均一的, 假定如图 (图1.3) 所示, 三种颗粒中, 大小为中等和最小的颗粒, 分别以最大颗粒速度的一半和1/10的速度沉降, 开始时颗粒是均一分布

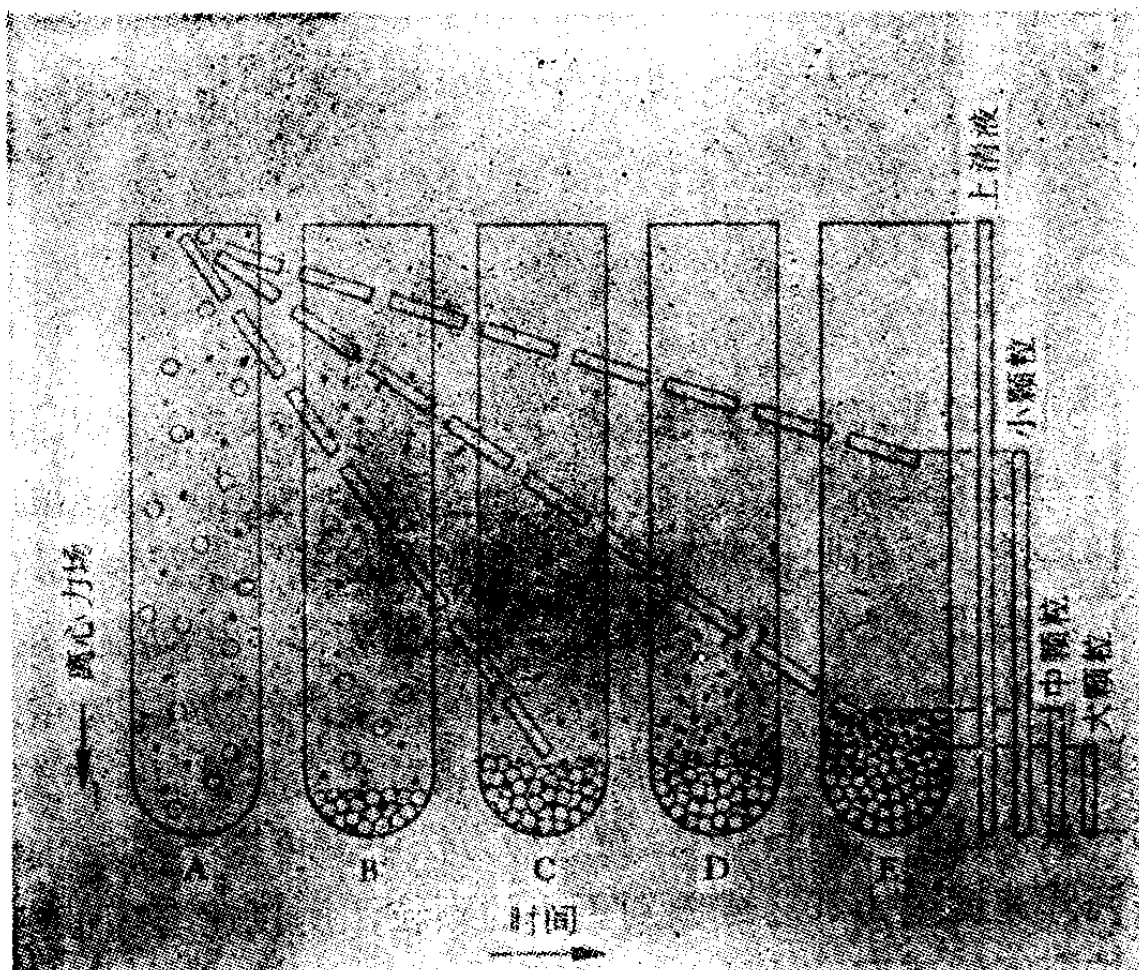


图1.3 用差速沉淀法分离颗粒 (引自 Anderson 1966a), 更详细的参看原文。

的，如果控制离心时间使最大颗粒刚好全部沉降（参看图1.3 C），在沉淀中将发现仍混有一半中等大小的颗粒和1/10的最小颗粒，更长时间的离心将会造成更多的混杂。

“洗”沉淀物可改进差速离心所取得的分离效果，将沉淀物再均匀地溶于介质中，按原来沉淀过程一样的条件再离心。在上述例子中，沉淀物C含有中等颗粒的一半和最小颗粒的1/10，如果将这个沉淀再溶于与原来悬液同样体积的溶液中，并按前述方法再离心，将在沉淀中回收所有的最大颗粒，但中等大小的颗粒仅有起始量的25%，最小的颗粒为1%。因此，通过洗沉淀物，差速沉淀法可有效地分离大小上差别很大的颗粒，但不能分离大小相近的颗粒，为此差速

沉淀法实际上只限于1955年 de Duve 等所述的五个级分的分离。如果需要得到更好的分辨力，则必须使用一些其它的技术。

1.2.3. 速率区带离心法

速率区带离心法技术最初是由 Brakke(1951) 提出的，本质上这个技术是非常简单的：将小量悬液放在一平缓的密度梯度液上，用此梯度液来稳定颗粒的沉降（参看第2.1.3节）。由于离心，颗粒离开起始区带而移动，移动的速度是由颗粒的大小、形状和它们所受到的离心力来决定的。离心一段时间后，各种颗粒将按它们的相对速度移动而各自分开成一系列区带（图1.4）。在这种方法中，可毫不困难的分离沉降速度差为20%或差别更小的颗粒，所以速率区带离心法扩大了差速沉淀法的分离范围。

和大多数技术一样，起先存在着一些问题，使它在最初的十年中未能推广使用（参看 Brakke 1960 对这时期所做工作的概述）。速率区带离心法不能在角转头中进行，因为在转头加速期间样品会与梯度液混合（第3.2节），直到目前，甩开转头的容量还受到明显的限制。由于沉降区带的宽度和起始区带一样宽或宽于起始区带，如果要取得满意的分离，就要限制装到转头中的样品的体积。此外，样品中物质的浓度不应太高，不然，整个带将与梯度顶部的溶液混合（参看第2.1.2节）。尽管此技术介绍后不久，Thomson等人（Thomson 和 Mikuta 1954；Thomson 和 Klipfe 1958）使用速率区带离心法去分离线粒体和溶酶体，但速率区带离心法最初主要用于分析分离，例如分析聚核糖体样品的大小、分布（McQuillen 等1959）或 RNA 的大小、分布

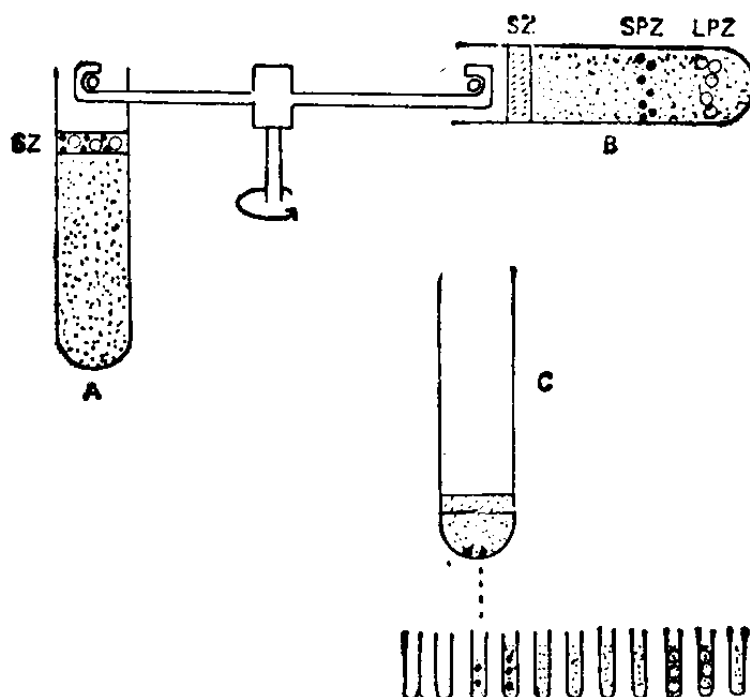


图1.4 在甩开转头中用速率区带离心法分离颗粒。静止时加入梯度液和样品，将管装到转头上，加速，甩到水平位(B)，颗粒按它们的特有的速度向离心管底移动，继续离心，直到获得适当的分离。然后将转头减速至静止，取出梯度液和分离的区带：样品区带(SZ)，小颗粒区带(SPZ)和大颗粒区带(LPZ)。取样方法，例如用离心管(C)底部针刺一个小孔，滴出梯度液的方法（重引自 Anderson 1966a）。

(Nomura 等1960)。甩开转头设计上的改进，特别是引入区带转头，大大扩展了速率区带离心法的应用，这正是我们将要介绍的主要方法，这个方法也可以使用垂直管转头（参看第244页）。

1.2.4. 等密度区带离心法

正如 Harvey (1931,1932)首先指出的那样，亚细胞颗粒不仅在大小上不同，而且密度也不同。将含有活细胞的悬液放到较细胞密度更大的溶液上，由于离心，细胞在二液交

界处成带。在显微镜中检查时，细胞的内含物似乎已分至若干层内，此分离尚不致杀死细胞，但如果增加离心的速度，细胞可分成两部分，核与较高密度的碎片在一起。再利用这两部分的密度差通过在有机溶剂中漂浮的方法可进一步纯化核(Behrens 1938)。很久以后，才有通过在密的蔗糖溶液中沉降来纯化核的工作 (Chauveau 等1956)。

大多数早期的分离是将颗粒悬于选定密度的液体中，离心后小于介质密度的颗粒漂浮，大于介质密度的颗粒沉淀。分段漂浮的分离方法既费时间又麻烦，特别是当分离一种以上的颗粒时更是如此，因此后来的研究者建立了等密度区带离心技术 (Meselson 等1957, de Duve 等1959)。将要分离的颗粒悬液放至密度梯度液上，或者实际上将颗粒溶于制作梯度的溶液中，通过离心，颗粒或者上浮或者下沉，到达与它们自己密度相同的液体处。在这里，它们没有重量，不管离心的时间多么长，它们再也不移动了。这些颗粒可成为一系列的区带，每种颗粒在它自己的密度区。

这项技术最初用于分析超速离心机，它没有速率区带离心法那么多的问题。1959年 Beaufay等使用这项技术表明：在过氧化氢的合成和分解中有一组酶，在差速离心时与溶酶体一起沉降，而实际上它是结合在与溶酶体十分不同的微体颗粒上的（或过氧化物酶体上的）。

从那时以来，等密度区带离心法已广泛地用于生物样品的分离，下面将更详细的讨论(第二、三、八章)。然而，与速率区带离心法相比，它有一个主要的缺点是在等密度分离期间，颗粒不可避免地暴露在高浓度的梯度溶液中，这可引起颗粒的损伤，并可能出现相当于损伤颗粒的一些额外的区带，这些分离物可能与活细胞的实际结构无关，在后面几节中，将较详细地考虑这些问题。