

用 CsCl, Percoll, Nycodenz, metrizamide 作自形成密度梯度离心

Yu.05.1

一) 概述:

近年来用重金属盐（主要是 CsCl）分离生物大分子的平衡等密度离心；用 Percoll（由瑞典 pharmacia-Biosystems AB 开发的胶体硅材料，即在硅颗粒外包覆 PVP 塑料、直径在 15nm~20nm 以下的胶状小颗粒）自形成梯度分离细胞和亚细胞构造；用 Nycoadenz 和 metrizamide（由挪威的 Nycomed pharma A/S 开发的碘化物梯度材料）的自形成梯度分离整细胞、亚细胞构造、核蛋白、病毒等方面的研究工作有令人满意的进展【参考文献（1）】，开发商也提供了很多技术资料、配制了很多实用的标准液用于梯度制备。

二) 自形成梯度离心分离的优点:

- | 不需要预先制备梯度，简化了离心工艺。
 - | 用于制备自形成梯度的材料化学性质稳定，对被分离物质无损害。
 - | 无毒性。
 - | 某些材料（如 Percoll, Nycofenz）在高速（ $RCF_{av}=20,000 \times g \sim 30,000 \times g$ ）短时间（10分~60分）就能自形成较缓和的或较陡的复合（由凸指数过渡到凹指数）梯度曲线，用于不用样品的分离纯化。
 - | 开发商提供了部分由梯度材料和稀释液配置的各种密度的等渗液，方便了用户配置。可与样品混合直接做自形成密度梯度实验（如生物大分子的 CsCl 平衡等密度离心），也可以预先离心制备自形成梯度后在梯度表面铺置样品再进行密度梯度离心。
 - | 可以用各种转头（固定角式、甩平、近垂直、垂直管、区带转头）制备自形成梯度，被分离样品的容量范围很宽。
 - | 由于近年来利用自形成密度梯度离心的论文增多，用户可以根据需要找到相应的参考资料（文献 3）。
 - | 自形成梯度材料的扩散很慢，一旦形成梯度，梯度曲线变化很小。同样，沉降在其等密度区的样品扩散也很小（等密度离心）。对于利用梯度材料预先离心制备的自形成梯度作速率一区带离心（Rate-zonal），样品的沉降速度变化稳定，重复试验的成功率高。某些材料（如 Percoll）一旦形成密度离心梯度后其梯度曲线静置数周后变化仍很小。

三) 重金属盐类自形成梯度有关计算公式 (参考文献 4)

- ### | 梯度斜率:

$$\frac{dr}{dr} = \frac{w^2 r}{b^0} = \frac{1.1 \times 10^{-2} N^2 r}{b^0} \quad \dots \dots \dots \quad ①$$

- ## | 密度范围:

- | 密度梯度形成后与初始密度相同的点的位置

$$r_c = \left[\frac{1}{3(r_1^2 + r_1 r_2 + r_2^2)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \dots \quad ③$$

| 任意点 r 处密度:

| 达到自形成梯度所需时间（用小时表示）

$$T = K(r_2 - r_1)^2$$

K 是反比例于：溶液扩散系数的常数。

对于 CsCl, 20°C, K=5.6

注意公式中 r_1 : 离心管表面(弯月面)到旋转中心距离(cm)

r_2 : 离心管底到旋转中心距离 (cm)

ρ_1 : 离心管表面液体密度(g/cm^3)

ρ_2 : 离心管底部液体密度(g/cm^3)

ρ_i : 初始密度(g/cm^3)

β^0 : 参考讲座文献 (10)

N: rpm

- | 需要说明的是以上计算的离心时间是理论上的达到完全平衡的时间，对于单管容量为 12ml 的角式转头，达到离心所需要的近似平衡的时间比理论计算值要短。上面的计算式结合实际实验需要的计算机模拟已在 80 年代末至 90 年代初实现了，最新的日立或贝克曼的超速离心机都具有这种模拟功能，有一些型号还可以与 PC 机联机运算。
- | 用重金属盐的自形成梯度分离纯化生物大分子从 80 年代起已普遍被应用，为了减少用甩平或角式转头作自形成梯度离心的时间，也为了避免垂直管转头 [($r_2 - r_1$) 最小、离心时间最短】在离心管外壁会形成 RNA 沉淀从而在梯度转换过程中会降低蛋白质，染色体，DNA 片断和质粒 DNA 的纯度，在 80 年代末开发了小角度 ($8^\circ \sim 10^\circ$ ，近垂直) 转头，主要用于这类实验。
- | 必须提醒的是模拟功能中有避免重金属盐在极大离心力和低温下结晶的警告，使用一般无模拟功能离心机的实验人员要注意最高转速和允许最低温度的限制（一般用 $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$ ）。离心过程中产生结晶是非常危险的，固态结晶硬度很高，在强离心场中会刺穿管壁并继续向外穿刺转头孔外壁，造成漏液和转头受损。避免的方法首先是合适的离心温度，其次是最高转速限制。为了既满足了转速限制又能减少分离时间，用逐级降速的分步 (step) 离心是有效的方法（分 4~5 级，逐级降速），而目前生产的超速离心机，除某些经济型外都有这种分步离心功能。
- | 用微量超速离心机在较小的容量时利用极高离心力和分步离心可以在 2~4 小时内分离纯化生物大分子的各种组份。
- | 自形成密度梯度在高转速时非常稳定，在减速时梯度会发生转换，由于自形成梯度材料的粘度很低，梯度转换时容易产生不同密度层之间的混合，因此必须利用离心机在降到 1,000rpm 以下时的慢减速功能，为了实现各种实验的最佳梯度方向转换，离心机 1,000rpm→0 的减速分级应在 5 档以上。
- | 此外，如果利用梯度材料在离心过程中自形成梯度后再在液面铺样品作速率一区带或等密度离心，铺样时要注意不使样品“冲”入梯度层。倾斜贴壁慢加样可以避免这一点。当样品中有较大颗粒成分时更要特别小心。

四) 碘盐自形成梯度: (Nycomedz 或 metrizamide)

| 这二种梯度材料在固定角式转头或垂直管转头,近垂直转头离心过程中会用较短的时间就可以自形成密度。

- | 和重金属盐一样，离心力、转头种类、离心时间对自形成梯度的形状都有很大的影响。
- | 由于碘盐的粘性系数对温度很敏感，很小的温升也会因粘性降低而加速自形成梯度的形成。
- | 碘盐的扩散速度比重金属盐要快一些，为了修正梯度曲线，一般在离心管底部铺较高密度材料（参考文献 2）
- | 可惜，碘盐的自形成梯度离心没有进行数学计算式的研究，但是大量的实验文献提供了足够的经验，使我们根据需分离样品的特点选择最佳的梯度形状（文献 2，以及 Rickwood.D.有关这方面一系列的文章）
- | 各种生物体组分在碘盐中的浮密度

	细胞核	线粒体	溶酶体	过氧化酶体	质膜	天然 DNA	降介 DNA
Nycodenz	1.23	1.17	1.15	1.22	1.11~1.19	1.13	1.17
metrizamide	1.22	1.16	1.13	1.22	1.14~1.26	1.12	1.14

	RNA	蛋白质	染色体	核糖体	mRNP
Nycodenz	1.18	1.27	1.18	1.32	1.2
metrizamide	1.17	1.26	1.19	1.32	1.2

表 (1) 用 NaCl 稀释的 Nycodenz 等渗液性质

浓度计算 $\%W/V = 628.7 \times RI - 839$

密度计算 $g/ml = 3.348 \times RI - 3.466$

浓度		RI	密度 g/ml	浓度		RI	密度 g/ml
百分比浓度 % (W/V)	Molar			百分比浓度 % (W/V)	Molar		
0.0	0.0000	1.3345	1.0030	14.0	0.1705	1.3568	1.0776
1.0	0.0122	1.3361	1.0083	15.0	0.1827	1.3584	1.0829
2.0	0.0244	1.3377	1.0137	16.0	0.1949	1.3599	1.0882
3.0	0.0365	1.3393	1.0190	17.0	0.2071	1.3615	1.0935
4.0	0.0487	1.3409	1.0243	18.0	0.2192	1.3631	1.0989
5.0	0.0609	1.3425	1.0296	19.0	0.2314	1.3647	1.1042
6.0	0.0731	1.3440	1.0350	20.0	0.2436	1.3663	1.1095
7.0	0.0853	1.3456	1.0403	21.0	0.2558	1.3679	1.1148
8.0	0.0974	1.3472	1.0456	22.0	0.2680	1.3695	1.1202
9.0	0.1096	1.3488	1.0509	23.0	0.2801	1.3711	1.1255
10.0	0.1218	1.3504	1.0563	24.0	0.2923	1.3727	1.1308
11.0	0.1340	1.3520	1.0616	25.0	0.3045	1.3743	1.1362
12.0	0.1462	1.3536	1.0669	26.0	0.3167	1.3759	1.1415
13.0	0.1583	1.3552	1.0722	27.0	0.3289	1.3774	1.1468

表 (2) 用葡萄糖稀释的 Nycodenz 等渗液性质

浓度计算 $\%W/V = 823.9 \times RI - 1108$

密度计算 $g/ml = 4.060 \times RI - 4.446$

浓度		RI	密度 g/ml	浓度		RI	密度 g/ml
百分比浓度% (W/V)	Molar			百分比浓度% (W/V)	Molar		
0.0	0.0000	1.3449	1.0140	14.0	0.1705	1.3619	1.0830
1.0	0.0122	1.3461	1.0189	15.0	0.1827	1.3631	1.0879
2.0	0.0244	1.3473	1.0239	16.0	0.1949	1.3643	1.0928
3.0	0.0365	1.3485	1.0288	17.0	0.2071	1.3655	1.0978
4.0	0.0487	1.3498	1.0337	18.0	0.2192	1.3667	1.1027
5.0	0.0609	1.3510	1.0386	19.0	0.2314	1.3680	1.1076
6.0	0.0731	1.3522	1.0436	20.0	0.2436	1.3692	1.1126
7.0	0.0853	1.3534	1.0485	21.0	0.2558	1.3704	1.1175
8.0	0.0974	1.3546	1.0534	22.0	0.2680	1.3716	1.1224
9.0	0.1096	1.3558	1.0583	23.0	0.2801	1.3728	1.1273
10.0	0.1218	1.3570	1.0633	24.0	0.2923	1.3740	1.1323
11.0	0.1340	1.3583	1.0682	25.0	0.3045	1.3752	1.1372
12.0	0.1462	1.3595	1.0731	26.0	0.3167	1.3765	1.1421
13.0	0.1583	1.3607	1.0781	27.0	0.3289	1.3777	1.1470

表（三）metrizamide 及其溶液的性质（20℃）

浓度		密度 g/ml	折射率	粘性	渗透率
百分比浓度% (W/V)	Molar				
0	0.000	0.9982	1.3330	1.0	0
10	0.127	1.0512	1.3483	1.3	107
20	0.253	1.1062	1.3646	1.6	180
30	0.380	1.1612	1.3809	2.3	247
40	0.507	1.2162	1.3971	3.6	320
50	0.633	1.2712	1.4133	6.0	385
60	0.760	1.3262	1.4295	11.0	440
70	0.887	1.3812	1.4456	26.0	—

表（四）Nycodenz 及其溶液的性质（20℃）

浓度		密度 g/ml	折射率	粘性	渗透率
百分比浓度% (W/V)	Molar				
0	0.000	0.999	1.3330	1.0	0
10	0.122	1.052	1.3494	1.3	112
20	0.244	1.105	1.3659	1.4	211
30	0.365	1.159	1.3824	1.8	299
40	0.487	1.212	1.3988	3.2	388
50	0.609	1.265	1.4153	5.3	485

60	0.731	1.319	1.4318	9.5	595
70	0.853	1.372	1.4482	17.2	1045

五) 胶体硅 (Percoll) 自形成梯度

Percoll 的性状 (参考文献 5)

成份: 硅颗粒外包覆 PVP (聚乙烯基吡咯烷酮)

密度: $1.130 \pm 0.005 \text{ g/ml}$

颗粒尺寸: $15 \sim 20 \text{ nm}$

渗透率: $< 25 \text{ mosm}$

粘性: 20°C 时 $10 \pm 5 \text{ mpa} \cdot \text{s}$

pH: 20°C 时 9.0 ± 0.5

折射率: 20°C 时 1.3540 ± 0.005

其他: 有少量 (1~2%) PVP 小颗粒存在

- | Percoll 在离心场中的沉降形成密度梯度，因此 Percoll 自形成密度梯度曲线的形状取决于离心转速和离心时间。Percoll 是带负电荷物质，离心过程中离子的积聚将影响梯度的稳定性。但由于 Percoll 颗粒较大 ($15\text{nm} \sim 20\text{nm}$)，扩散很慢，梯度一旦形成，可长时间保持稳定。Percoll 梯度离心可以直接与样品混合作自形成密度梯度离心，也可以先离心让 Percoll 自形成梯度再铺样品作预形成梯度离心。
- | 从下图可以看出用日立 R20A2 角转头 ($8 \times 50\text{ml}$, 最高转速 $20,000\text{rpm}$)。在 $15,000\text{rpm}$ ($\text{RCF}_{\text{AV}} = 20,000 \times g$)，初始密度 1.07g/ml ，不同离心时间的 Percoll 自形成密度梯度曲线 (也可以用其他品牌，同类转头)

密度 (g/ml)

从液面算起的离心管水平方向的距离 (毫米)

可以看出只要用很短时间，一般高速离心就可以得到我们需要的 Percoll 自形成梯度曲线。

- | 对于分离一些较大颗粒样品，如肝细胞，可以先让 Percoll 离心，自形成梯度，然后将肝细胞匀浆铺在 Percoll 已形成的梯度表面作速率一区带密度梯度离心。预形成梯度用 $1,000 \times g$, 30 分或用 $3,000 \times g$, 15 分，梯度形成后铺上匀浆作低速离心 ($1,000 \times g$)，

可以大大减少细胞的破损，自形成梯度形状取决于转头几何尺寸，离心转速和离心时间。Percoll 自形成梯度也可以用于亚细胞构造如质膜，重线粒体的离心分离。在这方面 Pharmacia-Biosystems AB 公司做了大量的实验，读者可以在网上查询或直接向该公司索取详细的实验资料。

| 附：表（五）用 0.25M 蔗糖稀释配制的 Percoll 等渗液的密度

Percoll 份数	0.25M 蔗糖份数	密度 g/ml
10	0	1.148
9	1	1.136
8	2	1.125
7	3	1.113
6	4	1.101
5	5	1.089
4	6	1.078
3	7	1.066
2	8	1.054
1	9	1.043
0	10	1.031

表（六）用 0.15M NaCl 稀释配制的 Percoll 等渗液的密度

Percoll 份数	0.15M NaCl 份数	密度 g/ml
10	0	1.123
9	1	1.111
8	2	1.100
7	3	1.088
6	4	1.076
5	5	1.065
4	6	1.053
3	7	1.041
2	8	1.029
1	9	1.018
0	10	1.006

参考文献：

- ① Houssais J.F.(1983) “Iodinated density gradient media : a practical approach ” P: 43 IRL press. Ltd. Oxford.
- ② Birnie, G.D, Rickwood, D “Biological Separations in iodinated density gradient media , P193, IR1 press, Oxford.
- ③ Miloslav, D., Richard, Hinton “Condition for density gradient separations” in “Preparative Centrifugation”.
IRL press . Oxford. Uni.press.1992
- ④ Rickwood .D. Birnie, G.D “Centrifugal separations in molecular and cell biology ,” Butterworths London(1998)
- ⑤ Rickwood, D. Ford, T. steengard , J
“Centrifugation, Essential Data” P.44
John Wiley and Sons 1994

如欲了解更多详细信息，请联系天美（中国）科学仪器有限公司 市场部，或访问天美官方网站：
www.techcomp.cn