

学术报告

色素双层类脂膜 (BLM 和 LMV) 的光效应*

田心棣

(美国密执安大学)

一、引言

二种人工重组类脂双层膜, 平板型双分子膜 (BLM) 以及球型脂质体 (LMV) 都已用做生物膜模型。如图 1 所示, 它们可模拟五种不同功能的生物膜。两种最引人注目的自然色素膜系统是绿色植物的叶绿体内囊体膜和脊椎动物视杆外端盘膜。内囊体膜在光合作用中, 将光能转换成化学能, 并贮存起来。视网膜盘膜将光作为信号触发视觉响应。人们还在嗜盐菌紫膜中发现了第三种色素膜系统, 它目前正受到广泛研究。它兼有光转换和光检测系统。用电镜观察, 所有这些光敏膜在结构上有惊人的相似性。它们的主要结构都是光敏色素镶嵌于类脂双层中。研究光敏生物膜光转换的理想方法与在乌贼神经膜上的研究一样, 是

难, 目前还不能采用。本文将介绍色素 BLM 和 LMV 作为生物膜的模型的研究技术以及新的研究结果, 最后讨论色素膜的能量转换机制。

二、实验技术

形成分隔开二种水溶液的平板膜很容易。在一玻璃池子内放置一个聚四氟乙烯杯, 杯壁上有小孔, 盐溶液充满容器及杯, 液面在小孔以上。用注射器注射约 $5\mu\text{l}$ 的类脂溶液于小孔上, 小孔上即形成薄膜, 在合适条件下自动变薄, 成 P-G 边支持的双层类脂黑膜。平板膜也可由单层和小泡形成。聚脂和纤维膜上能形成小面积的 BLM。叶绿体提取物、染料、提纯的叶绿素以及有关的卟啉类化合物, 都可作为色素 BLM 形成液用。图 2 的实验装置很容易测量色素膜的电性质。用作激发光源的有钨丝灯、卤素灯、汞灯、氙灯和激光。

不同波长的光激发色素 BLM, 得到光电作用光谱, 短脉冲光能研究快速的光过程。光化学和光生物学的仪器技术以及电化学和光谱方法已用于 BLM 系统的研究。

与平板 BLM 相比, LMV 更稳定, 便于大量地制作; 色素、组织提取物和染料都能包入 LMV 中。它适合于研究渗透性, 也可用常规的电化学和光谱技术来研究它的光电过程。目前的不足之处是, 虽可形成直径为一厘米的 LMV, 但尚不能用化学方法研究。因此最好同时使用 BLM 和 LMV 系统, 互相补充, 以取得更多数据。

三、观察

膜系统经光照射产生的光电现象是为直接或间接地产生电荷载流子。色素 BLM 中可观察到光电效应, 德拜 (Demmer) 效应、光发射和光电导等光电现象。在色素 LMV 中不能直接观察到光电效应, 但可测出光诱导的 pH 和渗透性变化, 荧光, 氧释放和氧化还原反应。下面介绍有关用 LMV 和 BLM 研究的

* 由胡坤生根据作者讲稿翻译整理而成。

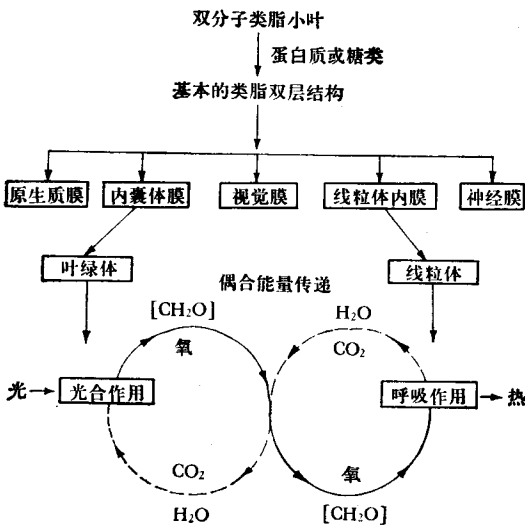


图 1 叶绿体内囊体膜和线粒体内膜的生命环中的生物能力学

光合作用的产物用作呼吸的反应物, 呼吸作用的产物又用作光合作用的反应物。两个耦合环描述一个生命的稳态换能系统, 此系统由太阳能驱动。

将电极放置于膜两侧, 直接测量, 但由于技术上的困

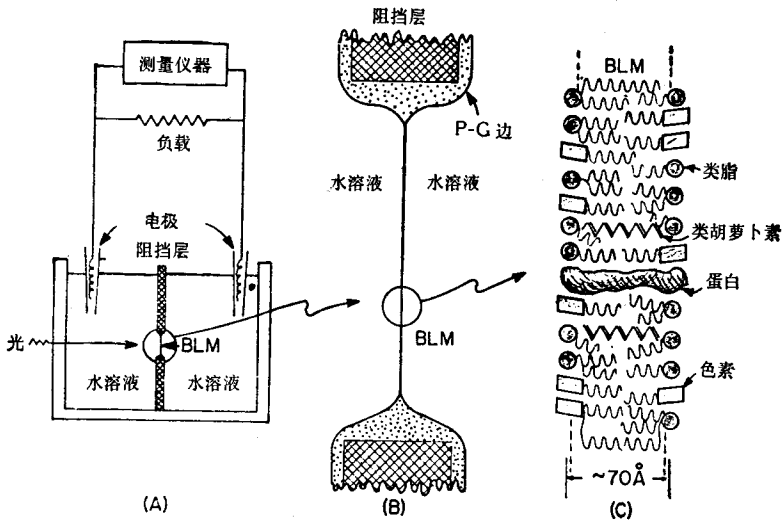


图 2 色素双层类脂膜 (BLM) 实验装置及分子结构简图

(A) 在分离两个水溶液阻挡层小孔上形成 BLM。(B) 放大的小孔面积、BLM 和它的支持 P-G 边。(C) BLM 的分子结构。

一些新发现,主要是我们实验室的结果。

1. 色素双层类脂膜 有人研究了含叶绿体及其有关化合物的平板 BLM 膜。色素 BLM 两边的非对称 (pH、电压、成份和水相浓度不同等) 是获得足够大的光电效应的必要条件。如叶绿体提取物形成的 BLM 在膜两侧溶液中分别溶有三氯化铁和维生素 c 时,可观察到大于 150mV 的光电压。若两侧分别为微克分子浓度的给体和受体 (例如亚铁氰化钾和黄素单核苷酸),其光电压小于 10mV。实验表明了色素 BLM 的高度光敏性。为了研究界面光诱导电子传递规律,可用脉冲光照射色素 BLM。实验证明脉冲光的色素 BLM 的光响应,并不是由 P-G 边产生的,而是由类脂双层部分产生的。为记录 10ns 的脉冲光得到的光电压瞬时结果, Huebner 详细地介绍了一个装置和用它测量,研究了大量的化青染料 (Cyanine dyes) 的结果。使用电压敏感的染料作为光学探针去研究膜水平上的分子机制是很重要的。Dragsten 和 Webb 研究含有部化青 (merocyanine) 540 的 BLM 的电压响应,它具有两个明显的时间常数,一个小于 6 微秒,另一个为 0.1 秒;二种响应的幅度都与外加电压成正比。这就是所谓的电色性。Loew 等观察到光学性质和外加场之间的关系,据此提出了电荷漂移的电化学机制。膜电压可用一系列通用探针检测。

我们获得了 250—700nm 光谱范围的叶绿体提取物所形成的色素 BLM 的光作用光谱,它与含此样品的吸收光谱十分类似。测量色素膜作用光谱的技术 (光电光谱术) 比常规的吸收光谱要灵敏几个数量级它在能量转换以及类脂-蛋白的相互作用研究中很有用处。

研究电子转移和电荷分离可用叶绿体提取物、纯化叶绿素、以及带有或不带醌和胡萝卜素修饰的卟啉化合物形成的 BLM。文献指出,醌是早期的电子受体,胡萝卜素是收集光的辅助色素。电子给体 (叶绿素或卟啉) 和电子受体 (醌) 彼此必须接近。为了证实此假设,合成了共价键连结卟啉-醌以及卟啉-胡萝卜素的络合物。我们把这些新的络合物作为光合作用反应中心的原初光物化事件的模型,嵌入人工重组 BLM 中。用它测量的光电动势列在表 1。它的电动势比含有叶绿素的 BLM 至少大 3 倍。这是至今所报道的最大光电动势值。

1963 年初有人将视色素嵌入 BLM, 形成人造光感受器。最早使用的色素是从蜜蜂、蛙、牛眼视网膜提取到的视紫红质,但未观察到有光敏性。这是因为提取用的试剂与提取物视紫红质一起在膜中,使膜不稳定。后发现油溶性的视黄醛和 β -胡萝卜素可嵌入氧化胆固醇或卵磷脂的 BLM 中。还发现类胡萝卜素 BLM 能产生足够大的光电效应。光电效应大小取决于 BLM 中的类胡萝卜素以及外界因素 (pH 和外加电压) 的影响。电压/时间曲线可以简单的单相响应变成双相响应。后又得到了很类似于早期感受器电位的含视黄醛的 BLM 的光电压曲线。最近 Fesenko 以及 Lyubarskity 报道了用闪光激发超声视杆外段片段修饰的 BLM,使通过膜的电流增加。Gambale 等发现含蜜蜂眼睛光色素的 BLM 与不含的相比,在黑暗中电导增加,有光照时进一步增加。这一结果现在是用 BLM 中有电异二聚物 (dimer) 的形成来解释。

最近,我们形成了含视紫红质的 BLM。形成液含 1% PS (磷脂酰丝氨酸), 1.67% PC (磷脂酰胆碱),

3.1%PE (磷脂酰乙醇胺)以及 1.1%的胆固醇的正辛烷溶液。任氏溶液 (Ringer) 和 Tris-HCl 充满池子两侧,在聚四氟乙烯杯的小孔上形成 BLM。超声处理 ROS 悬浮液,形成脂质体。放脂质体在池子一侧。ROS 是从暗适应的牛视网膜分离出来的。为了尽量减小视

表 1 与卟啉有关色素 BLM 的典型结果

| 化合物 | 光电势 (mV) | 光电流 (nA) | 膜电阻 ($10^8 \Omega$) |
|------------------------|----------|----------|-----------------------|
| 1. p-dic-12 | 42 | 0.01 | 9 |
| 2. Porphyrin | 83 | 0.10 | 4 |
| 3. Chloroplast extract | 86 | 0.75 | 5 |
| 4. P-VA | 154 | 1.2 | 3 |
| 5. PQ-2 | 190 | 12 | 4 |
| 6. PQ-3 | 302 | 22 | 8 |

表中缩写的化合物名称

1. 6-7-双(N-十二烷基)丙酰胺-1,2-二乙基-2,4,5,8-四甲基卟啉。
2. 4,5-双(丙酸甲酯)-1,2,5,7-四甲基-2,6-二戊基卟啉。
4. 8-丙酸视黄基-1,4,5,7-四甲基-2,3,6-三戊基卟啉。
5. 8-N-2(1,4-苯醌)-氧乙基-4-氧杂辛基-1,4,5,6-四甲基-2,3,6-三戊基卟啉。
6. 8-N-3(1,4-苯醌)-氧丙基-4-氧杂辛基-1,4,5,7-四甲基-2,3,6-三戊基卟啉。

紫红质的变性,不用有机溶剂以及去垢剂。ROS 的浓度(对于视紫红质来说是) $2 \times 10^{-6} M$, BLM 两侧的 pH 相同。图 3 表示了强闪光引导出来的光电位。它与用完整视网膜记录的光电位相似,电信号与早期感受器电信号里的 R_2 相等。图中还示出了 $34^\circ C$ 相继三次闪光的响应。如降低 BLM 温度,则电位降低,信号变化速度也降低。温度接近 $0^\circ C$ 或高于 $55^\circ C$ 时,光电位消失。由于形成溶液中有 PS, BLM 带负电。这有利于视紫红质在 BLM 上的排列。在此人工重建系统中所得到的结果与视杆外段盘膜中的结果相似。讨论视觉感受器膜和嗜盐菌紫膜的色素膜中的位移电流的还有 Hong。

因环境不同,嗜盐菌紫膜兼有光转换和光检测的功能。它只含一种蛋白和一种视紫红质的色素,故称为细菌视紫红质 (BR)。这种色素以高度有序的六角形晶体点阵矢量形式排列在脂双层膜内。在完整的细胞和含 BR 的脂质体中测量膜电位是困难的。可是有人将 BR 嵌在平板膜里,成功地进行了电位的测量。Karvaly 和 Dancshazy 观察了 BR 的 BLM 的光电压效应和光电导。光照时含色素的池子一侧是负的。他们也得到了色素 BLM 的光电压作用光谱,此光谱与水溶液中 BR 的吸收光谱有某些差别。这差别与类胡萝卜素的吸收带有关,表明类胡萝卜素起到了增强光电过程的作用。我们直接或通过脂质体将 BR 以及紫膜 (PM) 片断嵌入 BLM, 结果如下: (1) 当 PM 的

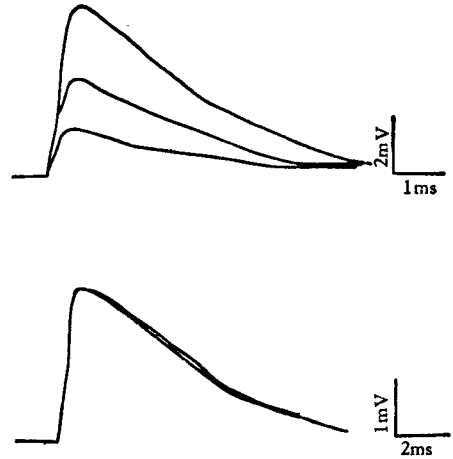


图 3 $8 \mu s$ 宽度氙灯闪光引导的光电位

光信号用甘汞电极接高阻抗放大器测量,记录在贮存示波器上。上图是 $pH = 7.0$, $34^\circ C$ 条件下记录的一系列光信号,图中上面的一条为第一次闪光后的光电位,中间一条为第二次闪光后的光电位,最低的一条是第三次闪光的光电位。

下图表示 $25^\circ C$ 条件下的光电位。

脂质体与 BLM 融合时可测量到光电响应;无论有无十八胺 (octadecyl mine) 以及电阻膜是否与 10^9 欧姆外电阻器并联,其光响应均衰减至某平衡值。在膜一边加入足量三乙胺,光响应消失。(2)直接的或通过脂质体形成的含 PM 的 BLM,其光电压作用光谱与 BR 的吸收光谱一致。(3)BR 的脂质体融合到平板膜一边,用闪光激发可产生光电压,其上升、下降受三个指数控制。两个上升指数:前沿时间常数分别为 $30 \pm 10 \mu s$ 和 $35 \pm 10 ms$,一个下降指数光电压衰减的时间常数为 $840 ms$ 。这与膜的暗电阻和电容给出的膜的时间常数一致。

上述膜系统中的生色团在类脂双层中的排列,可用 BLM 的偏振光谱来查明。已得到 β -胡萝卜素和视黄醛在不同种类的类脂双层里的排列的数据。McIntyre 和 Kirshfeld 报道,根据昆虫色素的绝对吸收可估计色素的浓度以及二色性。他们的结论是:光稳定色素为胡萝卜素,它与膜表面平行排列。Johansson 等人认为 β -胡萝卜素的长轴垂直于脂肪酸链排列,而视黄醛倾向于与膜中类脂酰链平行。Acuna 以及 Gonzalez-Kodriguez 报道,暗适应的 BR 中视黄醛与膜表面有一个 $20 \pm 3^\circ$ 的倾角。

2. 脂质体 (LMV) 有人研究了色素 LMV 中的光——诱导电子传输和氧化还原反应,目的是了解光合作用机制,和发现水分解成氢的太阳能利用的实用系统。Hurley 报道了叶绿素在 LMV 中三线态猝灭,并把电子转移给醌。Lanne 发现离子载体,如缬氨霉素能增加通过双层的电子转移速度。Kurihare 等发现

加入 CCCP (碳酰氰氯苯腙) 有利于电子的传输, 加入 $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-}$ 阻止氧的消耗。Sudo 等报道 $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}$ 在 LMV 系统中可被中性红和巯基组氨酸三甲基内盐这些氧化还原染料还原。Leblanc 等研究了含叶绿素 LMV 的甲基红染料敏化反应, 发现类胡萝卜素能使反应增强。但不加 β -胡萝卜素一类的电子载流子, 反应照常通过膜进行。除电子转移膜通道外, 氢离子传输和跨膜梯度也十分重要。Stilluell 以及 Doram 提出了测量通过 LMV 的转移膜的质子传输速度的方法, 即用氧化还原染料如溴甲酚绿和溴麝香草酚蓝测量 pH。我们报道过色素 LMV 中光诱导释放氢离子, 并耦合到氧消耗。Van Ginkel 发现有维生素时, 白光和红光下叶绿素 LMV 摄取氢离子。Walker 等发现光作用下含有光感受器蛋白的 LMV 能产生 pH 梯度; 为了确定 pH 梯度, 测定了 9-氨基吖啶荧光的猝灭。

我们研究了在亚铁氰化物和苯醌受体存在下磷脂 LMV 和内囊体膜片断融合的放氧能力, 发现氯化物和锰促进氧的释放, 二氯苯二甲脲 (DCMU), 羟氨、二硝基苯酚以及硫氰酸等抑制氧释放。这种有复合物与没有复合物的内囊体相比, 在老化和受热时要稳定得多。磷脂 LMV 和打碎的内囊体不是简单的粘附, 而是真正的融合。释放氧不仅需要膜片的存在, 而且还要有一个封闭的膜。图 4 表示磷脂成分对 LMV 内囊体放氧的作用。当磷脂的量超过 50 毫克时, 氧的量逐渐下降。LMV 和内囊体膜的融合过程有助于分离和最终提纯氧。

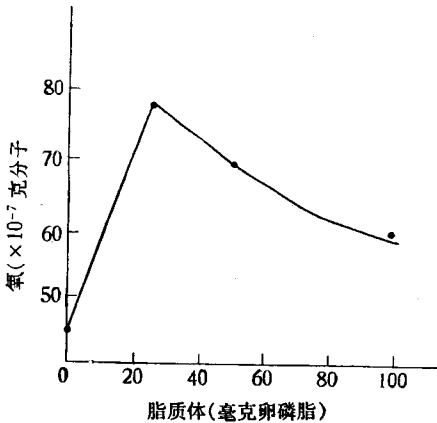


图 4 磷脂浓度对于融合脂质体内囊体膜放氧能力的影响

60 毫升样品加入反应槽, 用氮清除, 强度为 1.7×10^4 尔格 $\text{cm}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 的白光照射后用 YSI 型氧监测器测量氧的产量。记录最初 5 分钟照射的放氧速度。

四、光转换的机制

生物体为把光能用作自由能源或信息源, 必须将光转换成生物体可利用的能量。自然界必然存在有效

的光转换器官, 这就是边界膜。它们由类脂、蛋白和色素所组成。此膜的组成成分有特定地排列: 类脂以双层形式排列; 蛋白漂浮或横穿穿过双层膜排列; 色素有序地排列。关于这类膜的能量转换机制尚不清楚; 即使有, 也往往是模棱两可、甚至是互相抵触的。为了更好地对此作出解释, 我们将讨论光合作用和视觉的光转换机制, 重点是量子转换原初过程, 研究的材料主要是人工重组双层类脂膜 (BLM 和 LMV) 作为内囊体膜的模型。

色素 BLM 分隔两相溶液时, 行为与双极性电极类似。这种电极中, 电子和空穴可传递转移。由于 BLM 极薄 (小于 100 \AA), 一个小的电位差可产生大的场强。内囊体膜中的超薄类脂膜的作用至少有两个, 一个是起反应物和光产物的扩散势垒的作用, 另一个是对有序光合色素和磷酸化酶的平面起支持作用。

色素 BLM 中的光电效应有两类: 电容性的以及电阻性的。无论哪种, 光使膜上产生的电荷不平衡。通过溶液中的电极可测出光电压或光电流。由于类脂的化学结构, 使生物膜带负电, 负电荷在两个膜溶液表面产生稳定的电压; 溶液总电压为零。Guoy-Chapman 用扩散双层理论描述了 BLM 系统这一特性。离子浓度改变、吸收光等产生的双电层的任何扰动, 都可使膜上电位差产生变化。这种变化可以是短暂的, 也可以是稳定不变的。在一定的色素 BLM 上 (如视紫红质或含视黄醛的 BLM 上), 可观察到光诱导引起的短暂电位变化, 用电容器的作用可以很好地解释这种短暂的瞬变电响应。视紫红质及含视黄醛的 BLM 中, 光作为信号源, 是光检测的例子。有关色素 BLM 和 LMV 作为视觉感受器盘膜的模型, 此处不拟讨论。

从实验数据来看, 膜的光电化学过程的机制是什么? 我们把色素双分子类脂膜看作平面液晶, 这种液晶态中, 分子间相互作用力 (范德瓦力) 小。非涅科激子或分子激子 (电子-空穴对) 产生时, 可以在液晶膜任何地方出现, 但电子-空穴对总是同时存在。激子能从这个分子跳到另一个分子。这是随机运动, 需要活化能。这种激子也可强烈地与声子相互作用, 而失去他们的能量。分子激子可能的失活过程有: (1) 延滞荧光。这是单线态跃迁的结果, 发出的光频率相同。(2) Forsters 共振能量转移。受体和给体分子由库仑力结合 (偶极子相互作用)。(3) 三线态-三线态湮灭, 其最终过程是延滞荧光或电荷分离。两个激子相互作用, 可将能量从这个激子传递到另一个激子, 于是一个分子回到基态, 而另一个转变为一些能量较高的三线态, 最终结果是产生延滞荧光或内部转换的电荷分离。(4) 电荷分离。一个分子激子可分离成自由电子和带正电的空穴。电子迁移到电子受体上, 产生还原反应。空穴为强氧化剂, 迁移到电子给体上, 产生氧化反应。

在光能转换成电能或化学能过程中, 电荷分离以

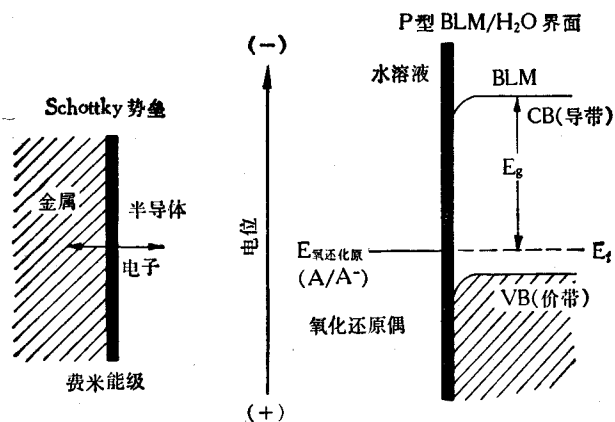


图 5 Schottky 势垒模型和色素 BLM/H₂O 界面的比较

左边: Schottky 势垒是半导体和金属(或电解质)之间的连接,空间电荷只在半导体中建立,势垒两端不发生电化学反应。右边: P型 BLM/H₂O 界面上空间电荷的形成。水溶液含有氧化还原偶 A/A⁻。CB: 导带、VB: 价带。E_f 黑暗中的费米能级, E_g 等于能隙。

界面上形成空间电荷域。水溶液不是电子导体,电流通过 BLM 时, BLM/H₂O 界面两端发生包括离子在内的氧化还原反应。类脂双层中的电流可能是电子。黑暗中色素双层类脂膜的行为基本上与有机半导体的相同(图 5)。可以将费米能级用于讨论 BLM 中的电子电位;当电子的化学位能与氧化还原电位相同时,还可用它来描述溶液中的电子受体和给体。图 6 表示模仿 Schottky 势垒电池的分开两水相的色素 BLM。最重要的是超薄色素膜双层(半导体)分开两相水溶液(高度导电)的界面两端容易形成高达每厘米十万伏的电场。在平衡时两个连结界面化学电位相等。绝缘的脂双层能产生 1 电子伏特的能量势垒。含不同氧化还原偶的色素“p-n”型 BLM,在黑暗中的 BLM 费米能级等于此溶液中氧化还原偶的氧化还原电位。但是内外的费米能级(分别用 E_F⁰ 和 E_F¹ 表示)可以不相同。在左侧的界面(图 6A),二

侧有电荷分布。BLM 的 P 型边与溶液中的氧化还原偶(E_{RX}⁰)相接,从膜得到多数载流子(空穴)。平衡时,多余的电子电荷在耗尽层左侧,它被溶液中极性相反的信号离子补偿,在界面形成了典型的双层。BLM 的 P 型和溶液中氧化还原偶之间的电子自由能的差别(用 E_F 和 E_{RX} 表示)是耗尽层(空间电荷)形成的驱动力。假设 P 型 BLM 中, E_{RX}⁰ 比 E_F⁰ 更负,则带的向上弯曲量为 (E_F⁰ - E_{RX}⁰)。膜的右侧 N 型情况也类似(表示在图 6A 中)。理论上可估计出 E_F⁰S 和 E_{RX}⁰S 的值。平衡时在黑暗中界面两端 E_{RX}⁰ = E_F⁰, 同时 E_{RX}¹ = E_F¹。但吸收光时,电子移到左侧界面,空穴从界面移

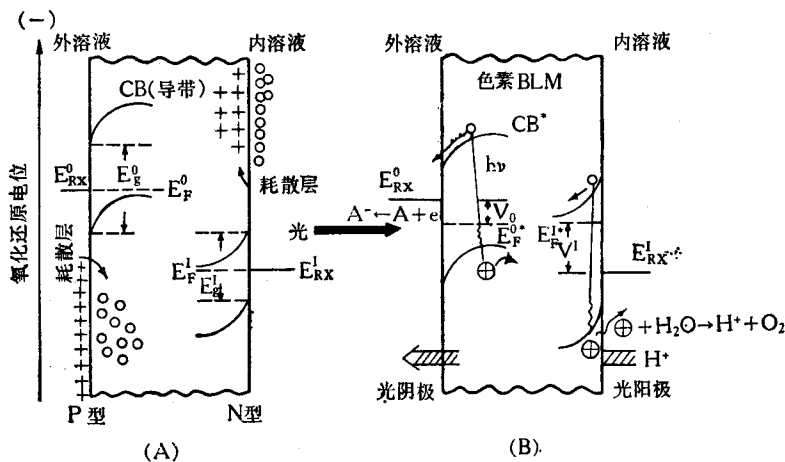


图 6

左边是黑暗中两个 BLM/溶液界面上空间电荷层(耗尽层)的形成。右边是内(I)外(O)界面光诱导氧化还原反应。(A) E_{RX}⁰ 氧化还原电位, E_F⁰ 费米能级, E_g 能隙, CB=导带, VB 价带。(A) 表示了耗尽层的形成。(B) V⁰ 和 V¹ 是光诱导电位。E_F^{0*} 和 E_F^{1*} 为光照下的费米能级, E_F^{0*} 向下移动, E_F^{1*} 向上移动,为了保持氧化还原反应(电流) H⁺ 必须如图表示的那样通过类脂双层。

及它们的氧化还原反应十分重要。我们用半导体能带理论中的 Schottky 势垒模型(图 5)来解释色素 BLM 系统。这个理论认为势垒是金属和半导体之间的一个连结面。空间电荷仅存在于半导体中,因金属的电荷载流子密度大得多。在 Schottky 势垒中是电子性的传导,电荷载流子很可能利用电子和空穴隧道通过势垒。半导体中的费米能级给出了电子和空穴的电压,大部分界面产生电,所以 BLM/H₂O 界面也能产生电。在色素 BLM/H₂O 界面中,水比脂双层的电荷载流子密度高得多,水溶液起了金属的作用。BLM 膜的每个

走而产生激子(电子-空穴对)。外界作用象光阴极,能降低溶液中的电子受体。图 6B 内(N型) BLM 界面与氧化偶接触(E_F¹ 比 E_{RX}¹ 更负),在黑暗中脂双层带向下弯曲,所以在脂双层右侧,产生的电子和空穴分别从内界面移走和移到内界面,其作用似光阳极(图 6B)。因此色素 P-N 型 BLM 的行为如同双极性电极(全电池),产生偶合氧化还原反应。P-N 型 BLM 电池中开路光电压(V_{OP})不能超过 V⁰ + V¹。它被系统内在的能隙(E_F⁰ + E_F¹)限制。应注意, P 型 BLM 在光照下由电子产生少数载流子, N 型则由空穴产生,

结果带弯曲下降。在 BLM 中, P 型费米能级(E_F^*)向下移, N 型(E_F^*)则向上移。实验测量得的开路光电电压总是小于 V^0 和 V^1 的总和。

控制双层 Schottky 型 BLM 电池的光电流的因素有三个: (a) 吸收的光子流量。(b) 分离电子——空穴对(激子)的量子产率。(c) 类脂双层的势垒高度。描述光电流的方程式为:

$$I_c = C_b \left[\left(\exp \frac{eV}{2KT} \right) - 1 \right] - I_e \quad (1)$$

I_c : BLM 电池电流。 C_b : 导带电子交换电流。 e : 电子电荷。 V : 电压, K : 玻兹曼常数。 I_e : 光电流。

从方程式(1)能得到电池的填充因子 (fill factor, FF):

$$FF = \frac{I_{\max} \times V_{\max}}{V_{op} \times I_{ss}} \quad (2)$$

I_{\max} 和 V_{\max} 为电池最大功率输出时的电流和电压。 FF 为测量色素 BLM 光电池的电流转换效率的参数。我们在别处进行了理论与实验的比较。要说明的是耗散层中电荷重组, 界面的极化, 类脂双层电阻都影响 FF 因子。

需要说明的是色素 BLM 中光电效应研究的时间较短, 目前还不能进行定量的讨论。

[本文由生物物理研究所胡坤生翻译整理]

新书介绍

《分子克隆 (Molecular Cloning)》

《分子克隆》一书系由哈佛大学 T. Maniatis, Michigan 大学的 E. F. Fritsch 和冷泉港实验室的 J. Sambrook 共同编著。它是冷泉港实验室的真核基因的分子克隆教程讲授时使用的各种实验方法及其原理的搜集, 也是该实验室多年所采用的成功方法的总结, 并吸收了美国其它研究单位的成功的方法。本书的编著目的旨在把现在美国分子克隆的研究实验方法规范化, 著成一本“统一的方法”书即 (Consensus Protocol), 所以本书包括分子克隆的全部系统实验方法。

这是一本极为有用的工具书, 已于 1982 年由冷泉港实验室印刷出版, 共分十二章, 附有近百幅图和二个重要的附录, 共 545 页。

1. 载体-宿主系统 包括质粒、噬菌体、柯斯质粒及单链噬菌体, 附有常用的质粒及噬菌体物理图谱。

2. 细菌菌株及病毒的生长和繁殖 包括单菌落的分离, 菌株的生长、繁殖和保藏。 λ 噬菌体的单斑纯化, 附有常用培养基和抗菌素用量表。

3. λ 噬菌体和质粒 DNA 的分离 λ 噬菌体的大量制备, 质粒 DNA 的大量分离。

4. 在分子克隆中所使用的各种酶, 限制性内切酶, 及其它有关的酶。

5. 凝胶电泳 琼脂糖凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以及分离单链的凝胶。

6. 真核细胞 mRNA 的提取、纯化和分析。

7. cDNA 的合成及无性繁殖 cDNA 的合成、双

链 cDNA 的分子克隆, cDNA 克隆的方法。

8. 将 λ 噬菌体 DNA 和质粒 DNA 引入到 *E. Coli* 中, 用质粒转化 *E. Coli*, λ 噬菌体 LNA 的体外包装。

9. 基因(组)文库的构建 以 λ 噬菌体为载体的基因(组)文库的构建, 和以柯斯质粒为载体的基因(组)文库的构建。

10. 重组克隆的鉴定 细菌菌落或噬菌斑的原位杂交, 用杂交选择来鉴定 cDNA 克隆, 用在 *E. Coli* 中重组的方法筛选 λ 噬菌体文库中的特异 DNA 序列。

11. 重组 DNA 克隆的分析 质粒或 λ 噬菌体 DNA 的快速分离, 用限制性内切酶构建切割位点图, Southern 转移法, 小的 DNA 片段在质粒中再行克隆 (Subcloning)。

12. 在 *E. Coli* 中克隆 DNA 的表达的载体 启动子, 核糖体结合位点, 真核基因的表达, 克隆基因的最大表达, 基因剂量的增加。

此外附录 A 生物化学技术,

附录 B 质粒 pBR322

附录 C 通用的菌株

每章首先阐述了方法的原理, 然后详细介绍实验方法和操作步骤, 同时指出应注意的问题与可能发生的现象。全书引用文献 380 多篇, 可供详细查阅。

[黑龙江省应用微生物研究所 杨志兴]