



超离心法及其在放射损伤研究中的应用

程 伊 洪

超离心机是研究高分子化合物如生物大分子蛋白质、核酸和病毒等的一个重要工具。在分析方面主要用以测定这些生物大分子的沉降系数与分子量。在制备方面可用以分离这些生物大分子和有关的亚细胞成分。

在研究电离辐射对细胞原发损伤的规律时,观察射线对生物大分子的损伤和亚细胞成分的破坏,及其对生化功能的影响等问题,超离心机将是可供利用的研究工具之一。本文先简要地介绍超离心机的一般原理和应用范围,然后说明在研究放射损伤方面的一些实例。

超离心分析法

为了研究胶体颗粒的理化特性, Svedberg^[1] (1940) 设计制造了一种高速离心机, 在离心过程中可以利用光学方法观察胶体颗粒的沉降行为。他称这种离心机为超离心机(Ultracentrifuge)以区别于其它离心机。以后又试用超离心机研究蛋白质的分子特性, 表明某些分离的天然蛋白质是相当均一的, 并利用超离心分析法测定了马血红蛋白的分子量。这些实验的成功, 说明了超离心机是适于研究高分子化合物的一种很有用的研究工具。

超离心机的应用现已日趋普遍, 例如在生物化学方面已广泛应用于蛋白质、酶、激素、核酸和病毒的研究^[2], 及医学诊断指标方面的应用^[3]。其主要用途为生物大分子和高聚合物的分离及其沉降系数与分子量的测定, 以及他们的缔合、离解和降解等研究; 追随大分子的分离提纯过程, 并鉴定其均一程度和组成等^[4]。现在超离心机几乎是研究蛋白质和核酸所必备的

重要仪器。由于多年来在各种不同条件下研究沉降现象的经验积累和广泛的理论探讨, 对于超离心机实验结果的数理分析也日趋完善^[5,6]。

我们知道在地球重力场中悬浊液内悬浮的颗粒越重则下沉越快; 反之, 比液体为轻的颗粒将向上浮。在重力场中这种颗粒的移动速度, 将与颗粒的密度、大小和形状以及重力场的强度与液体的粘度有关。如果仅利用重力观察颗粒的沉降速度, 则限于红细胞等较重的颗粒, 它们的大小范围约数个微米或更大一些。小于几个微米的颗粒如病毒和蛋白质分子, 已不可能仅用重力来观察沉降速度。因为颗粒越小沉降越慢, 而且扩散现象也越严重, 故需要利用高速离心方法, 以产生强大的离心力场。若超离心机的转速每分钟为 60,000 转, 离心池中溶液与转轴中心的距离为 6 厘米, 则离心加速度应为 $24 \times 10^4 g$, g 为地球的重力加速度 (980 厘米/秒^2), 即所产生的离心力比重力大 24 万倍。利用这样大的离心力, 有可能在所有胶体颗粒大小范围内研究胶体颗粒和分子的沉降行为。

一般所指超离心分析法可分为两种类型, 即沉降速度法与沉降平衡法^[7]。在沉降速度法实验中若转速达到 50,000—60,000 转/分, 则在原来溶液中分布均一的高分子将以一定速度移向离心池底部。因此离心池顶部溶液由于溶质分子的离去, 将产生仅有溶剂分子的上清液层。此上清液层以下浓度均一的溶液部分称为“坪区”。在上清液层与“坪区”之间有一过渡区域, 在这区域内沉降物质的浓度随着与转轴中心的不同距离而变化, 这个区域称为界面, 沉降速度法主要是利用光学方法来测量这种界面的移

动,也即是测量坪区溶质分子的移动。通常光学系统并不直接记录浓度,而是记录浓度的变化(相当于光折射率梯度的变化),这样所得的峰形谱线沉降图象,类似于界面电泳实验中所见到的峰形谱线电泳图象,一个峰形相当于溶液中一个沉降的溶质成分。

在沉降速度实验中若试样为蛋白质溶液,蛋白质分子的密度比溶剂的密度为大,离心时则蛋白质分子下沉。每种蛋白质分子在一定条件下,有一定的沉降速度,其它大分子亦然,这可用一种特性常数,称为沉降系数表示之,单位为秒。又常用 Svedberg (S) 单位表示, $1S = 10^{-13}$ 秒。若溶质分子的密度比溶剂为小,如为脂蛋白,则溶质将向液面上浮,而向心移动,所测沉降系数将为负值,故称为上浮系数,目前习惯用 S_f 表示之。因为沉降系数是溶质分子大小,形状和密度的函数,故在测定分子量时尚需溶质分子的扩散系数和微分比容。

在沉降平衡法实验中,将超离心机维持在较低转速,例如以分子量为 60,000 的蛋白质分子进行沉降平衡实验时,仅需 8000 转/分。因此沉降分子循离心方向向离心池底部移动的速度很小,另一方面由于溶质分子的部分沉降产生浓度梯度而引起扩散,故两个相反方向移动的溶质分子的量,在适当时间可能相等而达到平衡状态。此时测定平衡时溶质分子的浓度分布,可以直接计算分子量,并不需要扩散系数,这与沉降速度法不同,但两者均需溶质分子的微分比容数据,此法的理论基础较好,但达到平衡的时间很长,有的实验需要数天,甚至更长的时间。这是缺点,故应用不普遍。

由于技术上的不断改进和理论研究上的进展,已有可能在沉降平衡的开始阶段,利用离心池液面和底部的界面条件测定分子量,可以节省很多时间,故此法(Archibald^[8]法)有可能与沉降速度法一样,将成为测定分子量的常规方法^[9]。

开始应用的超离心机是低速的,由压缩空气驱动或电动。后来发展用油涡轮,利用压力油喷射在涡轮翼上,使之带动钢制的转子高速

转动,现在新型的超离心机都是电动,设备紧凑,使用方便。

超离心机设备的基本要求应能保证在离心时,离心池内溶液不产生振动和对流,光学观察系统优良,足以得到清晰的沉降图象,并能维持恒温。其主要部分为:(1)动力部分与转动机械;(2)转头;(3)真空室;(4)转速和温度的自动控制系统;(5)光学观察系统。为了便于研究核酸和病毒,需要紫外线光源,因为核酸吸收紫外线特强,对于难得的少量试样可进行分析。

新型的超离心机^[10]往往是多用的。除了可以进行超离心分析外,还可附带进行制备实验。专供制备用的超离心机没有光学系统,故价格较低。它具有低温设备,离心池的容量也较大。最高速也可达 60,000 转/分(相当于 300,000g),有这样大的离心力,足以分离所有的病毒,甚至血清蛋白质大小范围的物质。

据报导,1947 年以前国际上应用 Svedberg 设计的油涡轮超离心机仅约 8 台,另有约相同数目的 Beams-Pickels 式的空气涡轮超离心机。至 1959 年加上电动超离心机之数,总估计已超过 300 台以上。至 1966 年仅 Spinco E 型的分析用电动超离心机已超过 3000 台以上,可见超离心机应用日益广泛。

研究 DNA 分子与亚细胞成分的损伤

电离辐射对细胞的原发损伤原理^[11],到现在还知道得很少,可以设想有三个重要方面:(1)染色体的损伤,包括核蛋白与核酸的损伤;(2)细胞内部微结构的破坏、导致细胞内膜通透性的改变和定位酶的释放,扰乱了生化代谢的正常进行;而释放的水解酶又能直接损害某些大分子;(3)信使 RNA 分子的损伤,使某些活性蛋白质和关键性酶的合成受到障碍。

为探索电离辐射对细胞原发损伤的作用原理,研究生物大分子的损伤和细胞微结构的破坏及其对生化功能的影响,超离心机是可供利用的研究工具。

DNA 分子射线损伤的研究 电离辐射能引起大分子的损伤,对于大分子一次电离辐射所提供的能量(32 电子伏),足以造成弱键的广泛破坏。例如一次电离辐射可以造成一百个以上氢键断裂,射线损伤的大分子提高了对热变性的敏感性,也正是反映了分子内部和分子间正常结构形式的改变。Shotter^[12](1956)将胸腺 DNA 的稀溶液(0.005%)以 X 射线照射 9000 伦后,用超离心机测定其沉降系数(S_0)和分子量(M)的变化,并比较受过照射的 DNA 分子对热敏感性的变化(100℃ 加热 15 分钟)。此外还测定它们的特性粘度 $[\eta]$ 。结果见下表:

样 品	加 热 前			加 热 后		
	$S_0 \times 10^{13}$	$[\eta]$	$M \times 10^{-6}$	$S_0 \times 10^{13}$	$[\eta]$	$M \times 10^{-6}$
正常 DNA	26 ± 2	50	11.6 ± 1.4	26	1	1.6
9000 伦照后 DNA	16.5	24	4	9	2	0.5

从上表可见受照射 DNA 分子的沉降系数、分子量和粘度降低很多,说明 DNA 分子已经断裂成为较小的分子。在加热以后,受照射的 DNA 分子变化更大,表明对热敏感性更大,这是由于扩大了射线对 DNA 分子的隐藏破坏。

也有报导照射整体动物对机体内 DNA 分子的损伤,以 X 射线(1000 伦)全身照射大鼠 24 小时后,提取胸腺 DNA,测定它的分子量已降低到 3.1×10^6 ,而正常大鼠胸腺 DNA 的分子量为 $7.4-9.1 \times 10^6$ 。但这种变化不能断定完全是由于射线的直接作用,因为射线对细胞内膜的破坏所释放的 DNA 分解酶能降解 DNA 分子。

为了探讨射线对细胞的隐藏破坏与其自然修复规律, McGrath 等^[13a,b](1969)应用超离心机研究细胞核中 DNA 分子的断裂和自然重接的修复原理。以 X 射线 20 千拉得照射大肠杆菌 B/r 菌种,照后 37℃ 分别保温 20 分钟和 40 分钟。

保温完毕后,将细胞放在具有密度梯度(离心池内蔗糖溶液浓度分布自 5% 至 20%)的碱性蔗糖溶液(pH 12)的液面上,细胞很快被溶

解后即放出 DNA,此时在 30,000 转/分、20℃ 离心 90 分钟。离心后,测定自液面到液底的 DNA 放射性,观察 DNA 的分布,并测定 DNA 的沉降系数和分子量,结果得到正常细胞的 DNA 沉降系数为 113,分子量为 2.2×10^8 。照后不保温的细胞 DNA 沉降系数为 88,分子量为 1.1×10^8 。然后经 20 分钟和 40 分钟保温的细胞 DNA,它们的沉降系数分别为 98 和 108,分子量分别为 1.5×10^8 和 1.9×10^8 。以上数据表明照后细胞的 DNA 分子断裂了,故其分子量和沉降系数均降低。但经保温后均相应有所提高,保温时间较长的 DNA 分子自然重接的程度也较大。对于哺乳类^[14a,b,c]和人类^[14d]的细胞也发现有这种重接能力。实验证明 DNA 分子损伤的可恢复性,反映了细胞内射线隐藏破坏的自然修复能力的一个重要方面。

亚细胞成分损伤的研究 射线照射动物后,可利用超离心法从组织中分离各种亚细胞成分,研究它们的结构变化及其对生化功能的影响。

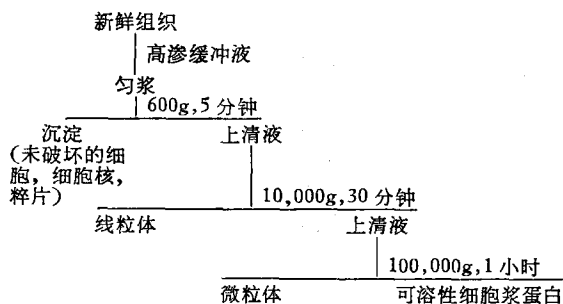
例如细胞核的磷酸化是比较敏感的^[15,16],X 射线 25 伦照射大鼠后,1 小时内即可看到分离的骨髓细胞核磷酸化完全受到抑制,脾脏和胸腺的细胞核磷酸化分别受到抑制 70—82% 和 23—55%。

大鼠受全身照射(800—1000 伦)4—6 小时后,分离脾脏细胞的线粒体,可观察到线粒体的氧化磷酸化受抑制 40%。离体的线粒体则在 20,000—30,000 伦照射后可抑制氧化磷酸化 50%。用电子显微镜也可观察到线粒体的结构损伤^[17]。照射整体动物对线粒体氧化磷酸化的抑制较敏感,这可能是通过体内激素对线粒体内膜通透性改变而引起的间接作用^[18]。

利用分离的微粒体可研究射线对离体的蛋白质合成酶系统的影响^[20]。利用分离的溶酶体则可研究射线对其水解酶释放的影响^[19]。研究射线对亚细胞成分损伤与其对生化功能的影响,有助于了解射线对细胞损伤的规律。下面简要地介绍应用超离心机分离亚细胞成分的方法。

许多具有生物活性的生物大分子和亚细胞成分很不稳定,分离过程中要求低温与操作温和,不能应用一般的化学分离方法,因此需要低温的高速离心方法。例如分离血清中的各种活性蛋白质和从组织中分离小量的病毒;分离亚细胞成分:细胞核、线粒体、核糖核蛋白体与聚核糖核蛋白体及其他亚单位等。

在最常用的差速分级离心沉淀法中离心后,惯常以倾倒的办法把上清液与沉淀分开,在分离细胞的亚结构单位时,要注意尽可能地保存它们的原来活性和结构形态。例如低温条件下捣碎新鲜组织,应用高渗的蔗糖磷酸缓冲溶液制匀浆,要温和,不能破坏其原来结构。下为分离亚细胞成分的常用差速分级离心沉淀法^[21]:



另一个重要的超离心分离法为区带离心法^[23] (zonal centrifugation)。这个方法对亚细胞成分具有较高的分离能力,主要有两种类型:(1)根据分离颗粒的不同沉降速度而分层,称为差速区带离心法 (rate-zonal centrifugation); (2)根据颗粒的不同密度而分层,称为等密度区带离心法 (isopycnic-zonal centrifugation)。

在差速区带离心法中离心时需要使离心管成水平(垂直于转头轴),在离心管内的溶液要造成密度梯度。例如加入蔗糖溶液使其浓度自液面到离心管底部分布为 10% 至 40% 的范围,也就是造成一个密度梯度的分布,越近管底溶液密度越大。在离心之前,把要分离的混合物小心地放在液面成为很狭的一层(见图 1A),离心开始时很慢,避免扰乱溶液的密度梯度和加样层。由于颗粒沉降的速度不同,离心后分成区带(B),最后停止离心,惯常把离心管底部开

一小孔(C),分别收集已经按颗粒大小分布的各区带,如图 1 所示:

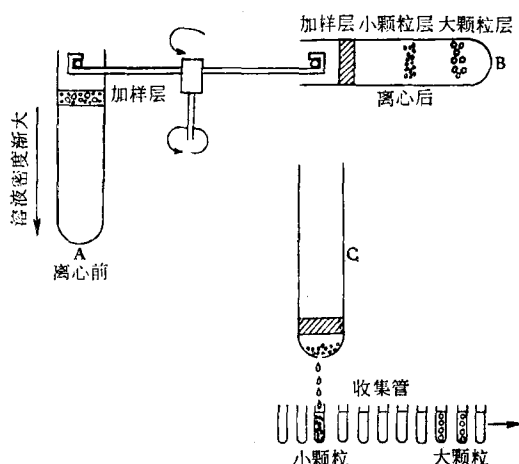


图 1

在等密度区带离心法中与要分离的颗粒的大小无关,而与它们的密度大小有关。开始离心前可如前法把样品加在密度梯度液面上(见图 2B),或均匀地分布在溶液内(A),最后在离心平衡时(C),不同密度的各种颗粒分别分布在与其等密度的区带内:

以上两种方法的选择按具体情况而定。例如微粒体和脏粉有几乎相同范围的沉降系数,但它们上浮的密度相差很大,分别为 1.18 和 1.62。而线粒体和微粒体几乎有相同的上浮密度,但沉降速度却差别很大。故分离前两者适用等密度区带离心法,而后两者则适用差速区带离心法。应用区带离心法近年来已初步地分离得骨髓中造血干细胞^[22],除了分离各种亚细胞成分外,并已推广到分子水平如病毒, DNA、RNA 与 DNA-RNA 杂交分子等。

由于近十年来核酸研究工作的迅速发展,对于分离基因,核酸的杂交分子和在不同条件下核酸复制机制的研究, Meselson (1957)^[28] 发展的氯化铯密度梯度沉降平衡法特别有用。例如,含有不同碱基组成的核酸和同位素或重元素标记的核酸,由于它们的密度差别,可以利用这个方法进行分离,这个方法现已受到核酸研究工作者的重视和推广^[29,30,31]。

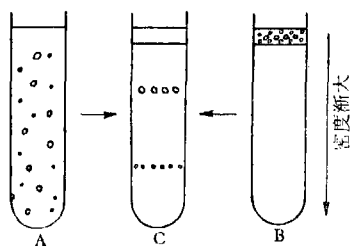


图 2

电离辐射对动物血清脂蛋白含量的影响

射线照射动物后，可以观察到血清中脂蛋白含量的变化。例如家兔受 830 伦照后立即、30 小时后取血样。先用制备超离心机分离血清中的脂蛋白，分离后再进行超离心分析。发现上浮系数 (S_f) 为 300—400 的脂蛋白大量增加(照前为 8 毫克%，照后为 1619.3 毫克%)，动物则在 1 至 4 天死亡。变化不大的(照前为 8 毫克%，照后为 22.5 毫克%)，则在 30 天后可以存活。对于狗也得到类似的结果^[25]。故血清中较轻的、即 S_f 值大的脂蛋白增加时，可预测动物即将死亡^[24]。这些资料表明射线对肝脏的蛋白质合成功能和脂肪代谢有损害作用。

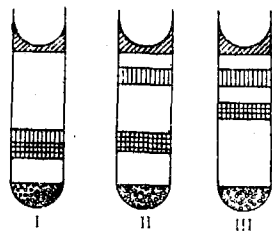
现对脂蛋白的超离心分析作一简要介绍。超离心分析正常人血清^[27]，可观察到下面几种主要成分：4.7S (83.5% ± 2.0) 属于清蛋白；7S (11.4% ± 1.5) 属于球蛋白；20S (2.0% ± 0.9) 属于巨球蛋白和近于百万分子量的蛋白质 (3.3% ± 1.0)。

人血清总蛋白中尚含有 4—14% 的脂蛋白。因为脂蛋白有低密度的脂质，故脂蛋白的水合密度只有 0.93 到 1.16 克/毫升，而一般蛋白质的密度为 1.33—1.37 克/毫升。故可将溶液的密度调节在脂蛋白和其它蛋白质之间，在离心力的作用下，则所有的脂蛋白可以上浮而其他蛋白质则下沉，因而得以分离。脂蛋白上浮速度的物理特性用上浮系数 S_f 表示之^[26]。

按脂蛋白的水合密度可分为下列五类：

- | | |
|---------------------------------|----------|
| (1) 乳糜微粒——密度为 0.94 左右 | } 低密度脂蛋白 |
| (2) β_1 脂蛋白——密度为 0.98 左右 | |
| (3) β_2 脂蛋白——密度为 1.03 左右 | |
| (4) α_1 脂蛋白——密度为 1.09 左右 | } 高密度脂蛋白 |
| (5) α_2 脂蛋白——密度为 1.14 左右 | |

为了很好地分离这些脂蛋白，一般以氯化钠、溴化钠、溴化钾、重水或硝酸钠配成不同密度的溶液来上浮各种脂蛋白。在不同溶液密度中血清脂蛋白在离心中分别上浮的情况见图 3。



- | | | |
|------------------|--|----------------------|
| I. 溶液密度为 1.063 | | β 脂蛋白(低密度脂蛋白) |
| II. 溶液密度为 1.125 | | HDL ₂ 脂蛋白 |
| | | HDL ₃ 脂蛋白 |
| | | } 高密度脂蛋白 |
| III. 溶液密度为 1.205 | | 其他脂蛋白 |

图 3

使血清中某种脂蛋白与其它血清蛋白质很好分离，除了需要采用适当溶液密度外，还需要较长的离心时间方能使某种脂蛋白完全上浮，而其它蛋白质则下沉。一般当溶液密度为 1.063 时，离心力为 114,000g，离心 10 小时，可将低密度脂蛋白上浮。但要分离高密度脂蛋白 HDL₂ 和 HDL₃，则需要离心 24 小时以上。

脂蛋白用上述方法经制备超离心机分离后，尚须用分析超离心机分析和鉴定其纯度与性质。低密度的脂蛋白在 50,000 转/分作超离心分析，按上浮速度的不同可得从 $S_f 0$ 到 $S_f 40,000$ 的脂蛋白谱。Cofman 等将它们归为三大类，即 $S_f 0—20$ ， $S_f 20—400$ 及 $S_f 400—10^5$ 。

参 考 资 料

- [1] Svedberg, T. and Pedersen, K. O.: "The Ultracentrifuge", Oxford University press, 1940.
(下转 53 页)

- of 2nd International Conference, Geneva, 22, p. 213, 1958.
- [5] S. Lindsay et al.: Thyroid Neoplasm in the rat. A comparison of naturally occurring and ^{131}I induced tumors. *Cancer Research*, 17, 183, 1957.
- [6] V. K. Frantz et al.: A comparison of the carcinogenic effect of internal irradiation and external irradiation on the thyroid gland of the male Long-Evans rats. *Endocrinology*, 61, 574,

1957.

- [7] M. B. Levene: Large doses of ^{131}I in dogs. *Am. J. Roentg. Rad. Therapy and Nuclear Med.*, 73, 88, 1955.
- [8] J. Robbins et al.: Late effects of radioactive iodine in fallout. *Annals of internal medicine*, 66, 1214, 1967.
- [9] R. A. Conard et al.: Thyroid Neoplasia as late effect of exposure to radioactive iodine in fallout. *JAMA*. 214(2): 316—324, 1970.

(上接 58 页)

- [2] Schachman, H. K.: "Ultracentrifugation in Biochemistry", 1959.
- [3] Bolt, W. et al: in "Moderne Chemische Methoden in der Klinik", 1961.
- [4] Nichols, J. B. and Bailey, E. D.: in "Physical Methods of Organic Chemistry", 1959.
- [5] Williams, J. W. et al: *Chem. Rev.* 58, 715, 1958.
- [6] Williams, J. W. (Ed.): Ultracentrifugal Analysis in Theory and Experiment, 1963.
- [7] Claesson, S. and Marinr-Claesson, I.: Ultracentrifugation in "A Laboratory manual of Analytical Methods of Protein Chemistry" III, p. 119, 1961.
- [8] Schachman, H. K.: in "Method in Enzymology", 1966.
- [9] 陶宗晋、胡世真、王德宝: 生物化学与生物物理学报, 5 (1), 35, 1965.
- [10] Goldwin, T. W. (Ed.): Laboratory Centrifuges in "Instrumentation in Biochemistry", 1966.
- [11] Hutehimon, F.: *Cancer Res.* 26, 2045, 1966.
- [12] Shotton, K. V. et al: *Biochim. Biophys. Acta* 20, 497, 1956.
- [13a] Whitmores: in "Time and dose relationships in radiation biology as applied to radiotherapy", p. 41, 1969.
- [13b] McGrath, R. A. and Williams, R. W.: *Nature* 212, 534, 1966.
- [14a] Leit, J. T. et al: *Nature* 214: 790, 1967.
- [14b] Sawada, S., et al: *Rad. Res.* 41, 145, 1970.
- [14c] Gunar Ahuström, et al: *Int. J. Rad. Biol.* 23, 285, 1973.
- [14d] Paley, B., et al: *Int. J. Rad. Biol.* 21, 535,

1972.

- [15] Creasy, W. A. and Stocken L. A.: *Biochem. J.* 72, 519, 1959.
- [16] Lawrence, R. et al: *Biochemistry* 10, 1588, 1971.
- [17] Goldfeder, A. and Miller, L. A.: *Rad. Res.* 37, 499, 1969.
- [18] Bejemin, I. T. and Henry, T. Y.: *Rad. Res.* 12, 613, 1960.
- [19] Desai, D.: *Biochim. Biophys. Acta* 86, 277, 1964.
- [20] Bishop, J.: *Nature* 203: 4940, 1964; *NSA* 25, 27006, 1971.
- [21] De Duve, C.: in "Conference on Enzymes", 1959.
- [22] Bekkum, A. W. et al: *Blood* 38, 547, 1971.
- [23] Anderson, G. N. (Ed.): in National Cancer Inst. Monograph No. 21, 1966.
- [24] Hayes, T. L. and Hewitt, J. E.: *Amer. J. Physiol.* 181, 281, 1955.
- [25] Goldwater, W. H. and Entenman, C.: *Rad. Res.* 4, 243, 1956.
- [26] De Lalla, O. F. and Gofman, J. W.: in "Method of Biochemical Analysis", Vol. I, 1954.
- [27] Pedersen, K. O.: Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions, 1945.
- [28] Meselson, M., et al: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 43, 581, 1957; 44, 671, 1958.
- [29] Hanawalt, P. C.: in "Method in Enzymology", 12, Part A, 202, 1967.
- [30] Cleaver, J. E.: *Nature* 218, 652, 1968.
- [31] Brown, D. D. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3175, 1971.