

自动化激光散射外差电泳术

谢 正 祥

(重 庆 医 学 院)

在经典电泳法中,电泳技术分成大分子电泳及显微(细胞)电泳两大类,实验装置及观察方法都有区别。而自动化激光外差电泳术^[1,2]却可用同一装置完成上述两类测量,除能同时测量扩散系数外,还可能完成反应动力学方面的测量。

自动化激光散射外差电泳术是由激光散射外差探测术及电泳术组合而成的。70年代初期 Ware^[1,3] 及 Uzgis^[2,4] 以略为不同的方法独立发表了实验及理论研究。按经典分类法, Ware 是从大分子电泳开始,而 Uzgis 则是从显微电泳开始,并已用于蛋白质^[1,3]、胶体^[6]、细胞学^[4] 及免疫学^[7-10] 研究。最近, Malher 等^[11] 报告了结构略为不同的类似装置。

一、原 理

1. 电泳

电泳是研究液体中荷电粒子在电场力作用下的运动。表征液体中带电粒子在电场作用下移动的特征物理量叫电泳率 μ , 它表示单位电场强度下荷电粒子的电泳速度,即

$$\mu = V_d / E \quad (1)$$

式中 μ 是电泳率, E 是电场强度, V_d 是电泳速度。实验表明, μ 与粒子的几何形状及荷电量有关,还与溶液的性质 (pH, 离子强度, 粘度等) 有关:

$$\mu = \frac{Ze}{f} f'(K) \quad (2)$$

式中 Z 是电荷数, e 是单位电荷, f 是与介质粘滞性有关, 与荷电粒子的几何形状有关的水力学摩擦系数, $f'(K)$ 是与荷电粒子周围的反离

子层性质有关的某函数, K 叫德拜-休克尔常数, 与溶液中离子强度平方根成正比。

在实际的密闭电泳室中的电泳比理想理论复杂得多。首先为保持电泳过程中的流体通量守恒, 即

$$\int V_d ds = 0 \quad (3)$$

的条件, 必然存在反向流动层, 该层中可观察到电荷的同极性迁移 (或反常迁移), 因而使遵从电学定律的有效迁移截面减小。另外, 荷电粒子的正常迁移还要服从流体力学规律支配, 在正常迁移截面内, 电泳速度 (因而电泳率) 近抛物线分布。对我们自己的扁平电泳室测量的荷电粒子的电泳率分布如图 1。一般认为电泳室中有一个稳定层存在, 对圆柱形电泳室稳定层在 $r = 0.707R$ 处, R 为电泳室半径。对扁平电泳室, 稳定层在室厚的 21.1% 处。最近 Bate-

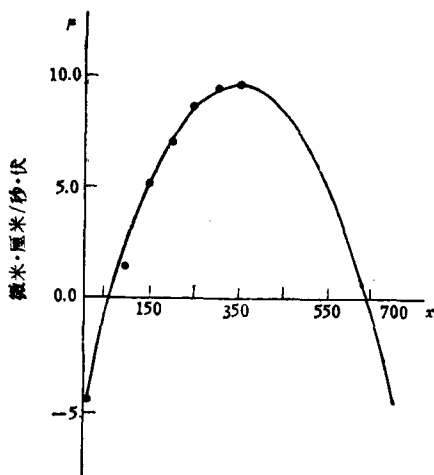


图 1 电泳室中荷电粒子的电泳率分布
x: 显微镜微调分度值, 相对单位

1s^[11] 由计算机自动化电泳研究指出,在稳定层观察到的运动是不稳定的。在常规电泳中,一般用下式

$$\mu = AV_e K / I \quad (4)$$

计算电泳率, A 是电泳室的总截面积, I 是工作电流强度, K 是溶液的电导率。在我们设计的电泳室中可用(1)式计算电泳率。

2. 激光散射外差探测法

当光路中充满均匀介质时,散射光是相消的。当光路中有非均匀性介质存在时,就表现出散射光谱,这种散射叫丁道尔散射。大分子均匀溶液也可观察到散射光,但比丁道尔散射弱得多,这种散射叫分子散射,也叫瑞利散射。瑞利的研究得出了散射光强与波长的四次方成反比。

$$I \propto 1/\lambda^4 \quad (5)$$

以上两种散射谱的频率与入射光的频率相同。当散射频率与入射光的频率不同并分别为 $\omega_0 \pm \omega_i$ ($i = 1, 2, 3 \dots$) 时的散射叫拉曼散射,其谱线分居于瑞利散射谱线两侧。红侧叫斯托克斯线,紫侧叫反斯托克斯线,拉曼谱对研究分子结构很重要。

由傅利叶光学原理可知,散射光功率谱 $I(\omega)$ 可由自相关函数 $C(\tau)$ 按傅利叶变换计算^[1,5]:

$$I(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} C(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau \quad (6)$$

对于散射光场:

$$C(\tau) = \langle E_s^*(t) E_s(t + \tau) \rangle \quad (7)$$

式中 E_s 表示散射光场, $\langle \rangle$ 表示平均。散射光场与溶液系统的统计涨落有关。根据各态历经假说,散射光场的自相关函数可以写为:

$$C(\tau) = N A^2 e^{-i\omega_0 \tau} \int G_s(\mathbf{R}, \tau) e^{i\mathbf{K} \cdot \mathbf{R}} d^3R \quad (8)$$

式中 N 为粒子数, $A^2 = A^*(t) \cdot A(t + \tau)$, 是散射场的振幅平方, $\mathbf{K}$ 是散射矢量。由图 2 可知 $\mathbf{K} = \mathbf{K}_0 - \mathbf{K}_s$, 所以 $K = \frac{4n\pi}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2}$, θ

是散射角, n 是介质折射率。 $\mathbf{R}$ 是位置矢量。 $G_s(\mathbf{R}, \tau)$ 是 $t = 0$ 时位于原点的粒子在时刻

$t = \tau$ 时位于 $\mathbf{R}$ 处的单位体积内的总体平均的条件概率。按涨落理论, G_s 遵从下列运动方程:

$$\partial G_s(\mathbf{R}, \tau) / \partial t = D \nabla^2 G_s(\mathbf{R}, \tau) \quad (9)$$

式中 D 为溶液粒子的平移扩散系数。(9) 式叫扩散方程或斐克第二定律。由(9)、(8)、(6)可得散射光功率谱为:

$$I(\omega) = (N A^2 D K^2 / \pi) [(\omega_0 - \omega)^2 + (D K^2)^2]^{-1} \quad (10)$$

(10) 式表明,散射光功率谱为洛伦兹型分布,半宽度 $\omega_{1/2} = D K^2$, 估算有 10^3 Hz 的量级,而 ω_0 的量级,确切地 $(\omega_0 - \omega)$ 的量级为 10^{14} Hz。要把 10^3 Hz 的谱线宽度显示出来,须用外差探测法,原理如图 2。用一束参考激光束(这里用小散射角探测法,以未受到粒子散射的电泳室壁散射光作参考束)与散射束在光电器件中成拍而检出中心为 0 频的半宽度为 $\Delta\omega_{1/2} = D K^2$ 的

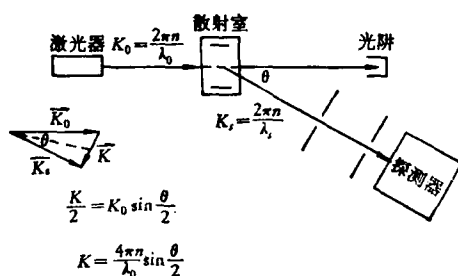


图 2 激光散射电泳原理
左下图为散射矢量 $\mathbf{K}$ 的求法

散射谱。由于用小散射角探测法,由 $K = (4n\pi/\lambda_0) \sin \frac{\theta}{2}$ 可知, K 值很小,故 $\Delta\omega_{1/2}$ 只有几 Hz 一几千 Hz 的量级。

当在如图 2 所示的散射室中加上电场(垂直于入射束)后,粒子就有一个定向的电泳速度,会产生激光多普勒现象,可用外差法检出这个多普勒漂移。因此,电泳散射谱是在上述散射谱的基础上,产生一个与电泳速度有关的多普勒频率漂移,故扩散方程(9)可以写为:

$$\partial G_s(\mathbf{R}, \tau) / \partial t = D \nabla^2 G_s(\mathbf{R}, \tau) \pm V_e \partial G_s(\mathbf{R}, \tau) / \partial x \quad (11)$$

对应的功率谱为:

$$I(\omega) = (A^2 N D K^2 / \pi)^{-1} [(\omega_0 - \omega \pm \mathbf{K} \cdot \mathbf{V}_d)^2 + (D K^2)^2] \quad (12)$$

在小散射角探测时, $\mathbf{V}_d$ 与 $\mathbf{K}$ 的夹角为 $\frac{\theta}{2}$, 故

$$\mathbf{K} \cdot \mathbf{V}_d = K V_d \cos \frac{\theta}{2}.$$

对电泳光散射探测, 重要的是要有足够的可观察到的频率漂移量。因此, 电泳光散射的分辨率 R 定义为多普勒频率漂移与谱线的半宽度之比:

代入 V_d 及 K 的值可得:

$$R = \Delta\omega_{ih} / \Delta\omega_{1/2} = \mathbf{K} \cdot \mathbf{V}_d / D K^2 = V_d \cos \frac{\theta}{2} / D K \quad (13)$$

$$R = \lambda_0 \mu E \cos \frac{\theta}{2} / 4 \pi n D \sin \frac{\theta}{2}$$

$$= \lambda_0 \mu E / 2 \pi n D \theta \quad (14)$$

由(14)式可知, 激光散射电泳术的分辨率 R 正比于电场强度 E , 反比于散射角 θ ; 正比于电泳率 μ , 反比于扩散系数 D ; 正比于入射光波长 λ_0 , 反比于介质折射率 n 。由(2)式及

$$D = K_B T / f \quad (15)$$

(式中 K_B 是玻尔兹曼常数, T 是绝对温度) 可得:

$$\mu / D = (Z_e / K_B T) f'(K) \quad (16)$$

故

$$R = (Z_e E \lambda_0 / 2 \pi K_B T n \theta) f'(K) \quad (17)$$

由上式可知, 激光散射电泳术的分辨率 R 与粒子的电荷成正比, 与 $f'(K)$ 成正比, 与绝对温度 T 成反比。

由(12)式可知, 多普勒频率漂移是电泳率的测量:

$$\begin{aligned} \Delta\omega_{ih} &= \mathbf{K} \cdot \mathbf{V}_d = \mu E K \cos \frac{\theta}{2} \\ &= \mu E (2 \pi n / \lambda_0) 2 \sin \frac{\theta}{2} \cos \frac{\theta}{2} \end{aligned} \quad (18)$$

在小散射角的情况下:

$$\Delta\omega_{ih} = 2 \pi n \mu E \theta / \lambda_0 \quad (19)$$

$$\Delta\omega_{1/2} = D K^2 = D \left(\frac{2 \pi n \theta}{\lambda_0} \right) \quad (20)$$

由(19)及(20)式可知, 测量激光散射电泳谱中

的 $\Delta\omega_{ih}$ 及 $\Delta\omega_{1/2}$ 就可同时测量出扩散系数 D 和电泳率 μ 。

图3是有外加电场及无外加电场时的大分子溶液的自相关函数及功率谱。从有场存在时的自相关函数及其图形可以看出: 自相关函数呈余弦式的衰减振动, 衰减系数为 $D K^2$, 振荡周期为 $K \mu E \cos \frac{\theta}{2}$ 。

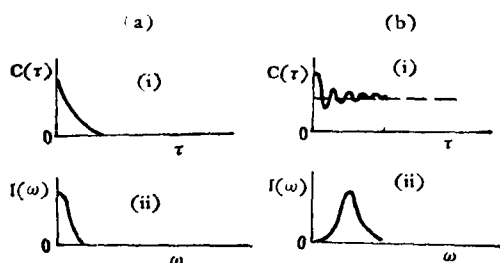


图3 大分子溶液激光散射电泳散射光功率谱 $I(\omega)$ 及自相关函数 $C(\tau)$

图中 a) 无外加场

$$(i) C(\mathbf{K}, \tau) = A e^{-i \omega_0 \tau} e^{-D K^2 \tau}$$

$$(ii) I(\omega) = A \frac{D K^2 / \pi}{(\omega - \omega_0)^2 + (D K^2)^2}$$

b) 加垂直于 $\mathbf{K}_0$ 的电场

$$(i) C(\mathbf{K}, \tau) = A e^{-i \omega_0 \tau} e^{-D K^2 \tau} e^{-i K \mu E \tau \cos(\theta/2)}$$

$$(ii) I(\omega) = A \frac{D K^2 / \pi}{\left(\omega - \omega_0 + E \mu E \cos \frac{\theta}{2} \right)^2 + (D K^2)^2}$$

当介质为相互独立的多种大分子溶液, 且如果在其散射光谱中, 可以单独识别出每种成分的峰时, 则激光散射电泳技术可以同时测量出各种成分的电泳率及扩散系数。Ware^[1] 提出了 BSA (小牛血清蛋白) 的两种成分的谱的例子, 如图4。Uzgiris^[4,6,7] 提出了几批聚苯乙烯混合物悬液及淋巴细胞与红血球的例子。

对照式(12), 多种大分子溶液的激光电泳散射光功率谱可表示为:

$$I(\omega) = \sum_{i=1}^n N_i A_i^2 D_i \pi / \{ [\omega - \omega_0 \pm K(V_d)_i]^2 + D_i K^2 \}^2 \quad (21)$$

Ware^[1] 指出, 激光散射电泳散射光功率谱的相对峰强度与各种大分子的相对浓度成正比。如果溶液大分子间有明显相互作用时, 则相互作用动力学就会反映在电泳散射光功率谱中。在

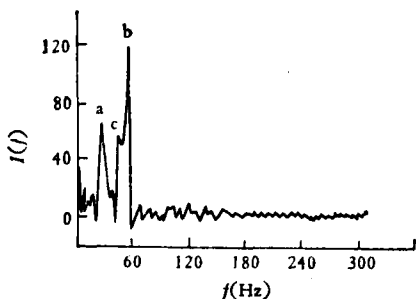


图4 FG、BSA 溶液的电泳散射光功率谱

a) FG (血纤维蛋白元)谱:

$$\mu_{FG} = 14.2 \times 10^{-3} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1},$$

b) BSA 单体 $\mu_1 = 30.3 \times 10^{-3} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1},$

c) BSA 双体 $\mu_2 = 25.0 \times 10^{-3} \text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{V}^{-1}$

分布函数的运动方程中,就要包含相互作用的项。Ware 等^[1]用计算机模拟了几种相互作用情况下的谱,但实验中尚未明确观察到。

必须指出,不但扩散运动可使谱展宽,连续的迁移率变化也可使谱展宽。在实际电泳室中,电泳率近似抛物线分布,这种连续分布必然也会使谱展宽。另外,同种粒子由于受了某种处理而使电泳率的分散程度增加时,也可使谱展宽。在 Ware 关于用 Con-A 处理人外周血的粒性白细胞的报告^[10]及处理荷兰猪巨噬细胞的报告中^[9]都指出了这种分布展宽的效应及平均电泳率降低的效应。

我们上面的讨论暗中假定了稳恒场,但 Ware 实际所用的是间断的计算机控制的双方向方波脉冲场。Uzgiris^[5]计算了无间断的双方向方波脉冲场作用下的电泳散射光功率谱,并指出,在方波脉冲场的作用下,将在脉冲谐波的角频

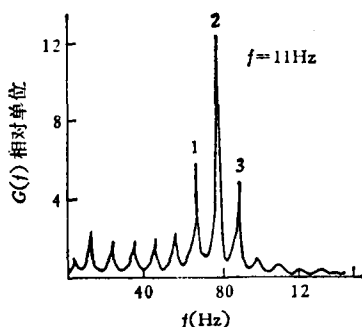


图5 频率为 11 赫的方波场作用下聚苯乙烯小球的电泳散射光功率谱

率 $\omega_n = n\pi/t_1$ 上 (t_1 是脉冲半周期) 出现系列谱峰,其半峰值全宽度频带为:

$$\Delta\omega_{FWHM} = 2r = 2DK^2 \quad (22)$$

中央峰的频率为电泳散射光的多普勒漂移频率,并指出中央峰的中心频率可由中央峰高度与两侧峰高度之比求平均而精确确定:

$$Q = \mu EK_x = 2\pi F = 2\pi G(n)/G(n') \quad (23)$$

式中 Q 为电泳多普勒漂移频率, $G(n)$ 、 $G(n')$ 分别为功率谱的中央峰高度及侧峰高度。从图 5 中可以看出,当谐波频率为 11 赫时,谱中央峰频率约 77 赫,谱宽度约 2.5 赫。

二、实验装置

1. 实验装置

Ware 等^[1]所用的自动化激光散射外差电泳术的实验装置原理,如图 6。可用 He-Ne、Ar 及 Kr 离子激光器作光源。光电倍增管可以任选,但以应选对所用波长有最大量子效率的为好。

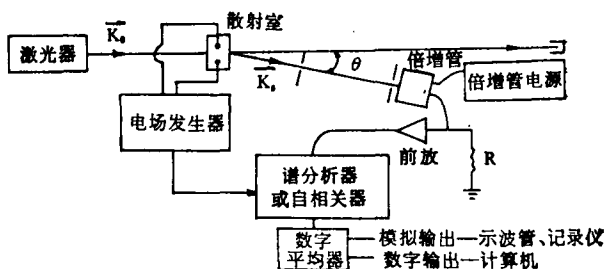


图6 自动化激光外差电泳装置原理图

2. 电泳室

Ware 等^[1,3]用的电泳室是 Tiselius 电泳室的改型,提供了激光束通过的窗,并用下式:

$$E = i/AK \quad (24)$$

计算场。式中 i 是电泳室工作电流, E 是电场强度, K 是电导率。这种电泳室的缺点是不能直接测量场强,而且 A 是电泳室的总截面,并非有效正向电泳截面。另外还需用电导仪测量溶液的电导率 K 。需用散热控温装置。Uzgiris^[2,4]用的是方形电泳室,用平板状铂黑电极作成一对窄隙电极,悬浸于溶液中。用这种电极可以直接测量电极上的电压和电极间的距离而计算场强,还可避免“电渗”干扰,不需控温。

3. 电极系统

Ware 等用的是传统的 Ag-AgCl 可逆电极。Uzgiris^[2,12]用的是电镀上一层海绵状铂黑的铂平板电极。为避免电极与溶液起反应,他用浸渍法将蛋白质薄层复于电极表面。电极间距 1mm 以下,便于以低电压形成高场强。平板铂黑电极悬浸于介质中,远离电泳室壁,因而可避免“电渗”效应。由于用悬浸式电极,周围介质散热好,故不需控温式的热稳定装置。最近我们在常规电泳中采用了平板碳电极,效果也好。近来 Malher 等^[11]报告了用甲基纤维素涂覆其电泳室可以消除电渗效应。

4. 悬浮介质

总的来说,这种技术用的都是低离子强度的悬浮介质,可以减小电流的加热效应,得到较高的电泳率。由(14)式可知,这可提高电泳分辨率。该技术使用过的介质有: 0.004M NaCl 水溶液^[3],生理盐水及 10mM Hepes + 10mM NaCl + 4.5% 山梨醇^[9,10]。0.032N NaCl 溶液^[2],0.0005N~0.15N NaCl 溶液^[4],蒸馏水^[2,4,6],等渗蔗糖缓冲液及 0.29M 蔗糖溶液^[8,9],0.145M 蔗糖溶液^[7]。电泳悬液的制备细节因具体对象的不同而异,这里从略。

三、实验结果与应用

激光散射外差电泳术可用于包括现行的各种大分子电泳分析及显微电泳术在内的许多领域。由于所用的测量时间短,因而还可用于有相互作用的系统及不稳定的系统。但它只是分析术而不是制备术。

已用该技术进行过研究的例子有: BSA 及血纤维蛋白元等蛋白质大分子^[11,13],聚苯乙烯小球胶体^[2,4,6],红细胞^[4,7],淋巴细胞,粒性白细胞、巨噬细胞^[7-10]及白血病^[11]等。

激光散射外差电泳术与常规电泳术比较有以下优点:(1) **多用性** 能同时测量电泳率及扩散系数;(2) **速度快** 比常规电泳快 3—4 个量级。(3) **分辨高** 无界面形成、无浓度梯度形成;(4) 能在较宽范围的离子强度下完成电泳测量,特别是能扩展到很低的离子强度;(5)

能用以研究系统的扰动,加热效应及反应动力学。

对于要求时间短,分辨高,离子强度低,需避免界面浓度梯度形成,特别是在常规电泳数据不稳时,激光散射外差电泳术更显示了突出的优点。(6) 能用同一设备兼行大分子电泳及细胞电泳。

最后简略提一下该技术用于细胞免疫研究方面的一些结果。Kaplan 等^[8]用 20 μ g/ml 以上浓度的 Con-A 处理人外周血淋巴细胞使等电点升高(带正电基团相对数增加)、电泳率降低,并认为这是细胞表面产生了结构重组所致。Petty 等^[9,10]用 25 μ g/ml 以上浓度的 Con-A 处理荷兰猪巨噬细胞、嗜酸性白细胞及人外周血多核白细胞使 EPM 降低 33%,电泳散射光谱增宽 3 倍,并认为 Con-A 处理的结果造成了这些细胞个体间的更大差异,电泳率降低是由于产生了内吞作用的结果。但 Lochner 等^[13]报告了小剂量 (10^{-6} μ g/ml 以下)的 Con-A 浓度处理鼠脾淋巴细胞会使电泳率增加,且认为这是由于 Con-A 作用于细胞表面后产生荷正电的氨基团数目减少的结果。

另外 Smith 等^[12]还用该技术研究了急性淋巴细胞性白血病的病人的外周血中淋巴细胞的电泳率改变,并指出: 1) 急性淋巴细胞性白血病病人的淋巴细胞的电泳率较正常人淋巴细胞的电泳率降低 7—28% 且呈单峰分布;2) 正常人外周血中的淋巴细胞的电泳率呈双峰分布,说明在正常人的外周血中有 T, B 淋巴细胞。

本文准备过程中陈良迟同志曾给与很大帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Ware, B. R.: *Adv. Colloid Interface Sci.*, 4, 1, 1974.
- [2] Uzgiris, E. E.: *Rev. Sci. Instrum.*, 45(1), 74, 1974.
- [3] Ware, B. R. et al.: *Chem. Phys. Lett.*, 12(1), 81, 1971.
- [4] Uzgiris, E. E. *Opt. Commun.*, 6(1), 55, 1972.
- [5] Bannett, A. J. et al.: *Phys. Rev. A. Gen. Phys.*

- 8(5), 2662, 1973.
- [6] Uzgiris, E. E. et al.: *Nature Phys. Sci.*, **242**, 77, 1973.
- [7] Uzgiris, E. E. et al.: *Anal. Biochem.* **60**, 455, 1974.
- [8] Kaplan, J. H. et al.: *J. Immuno. Method*, **7**, 337, 1975.
- [9] Petty, H. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2278, 1979.
- [10] Petty, H. R. et al.: *Cell Biophys.*, **3**, 19, 1981.
- [11] Malher, E. et al.: *Biorheology*, **19**, 647, 1982.
- [12] Batels, P. H. et al.: *Cell Biophys.*, **3**, 371, 1981.
- [13] Uzgiris, E. E. et al.: *Rev. Sci Instrum.*, **45**(1), 120, 1974.
- [14] Lochner, J. E. et al.: *Cell Biophys.*, **4**, 15, 1982.
- [15] Smith, B. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2388, 1976.

[本文于1983年2月8日收到]

cDNA 合成和产量计算

吴石君

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

以信使核糖核酸(mRNA)为模板合成互补的 DNA 链(cDNA), 并以此单链 DNA 合成双链 cDNA 的技术是基因工程中最初的和重要的环节之一。本文根据研究工作的体会介绍 cDNA 合成方法, 产量计算, 影响 cDNA 合成的因素和解决的方法。

一、cDNA 合成方法

自从1970年 Temin 和 Baltimore 发现鸡骨髓瘤病毒逆转录酶以后, 以 mRNA 为模板合成 cDNA 的技术很快应用到基因工程研究中。由于大多数合成反应都以 polyA-mRNA 为模板, 因此需要加入寡聚脱氧胸腺核苷酸作为引物。底物是四种脱氧核苷三磷酸, 其中一种按一定比例加入标记化合物。加入放线菌素 D 的目的在于抑制以混杂的 DNA 分子为模板的 DNA 合成, 由于它同样也会抑制随后的双链 cDNA 合成, 因此如确证无混杂 DNA 存在, 可不加放线菌素 D。下面列出单链 cDNA 合成混合物组成, 以供参考。

polyA-mRNA	1 μ g
dATP, dTTP, dGTP	各 1mM
dCTP	0.1~0.5 mM
Tris-HCl pH8.3	100mM
MgCl ₂	10mM

KCl	50mM
DTT	10mM
放线菌素 D	50 μ g/ml
Oligo d(T) ₁₂₋₁₈	20 μ g/ml
³ H-dCTP	10~50 μ ci
逆转录酶	20—50 单位

总反应体积为 25 μ l。

实验程序是: 取 mRNA 1 μ g, 加入四种脱氧核苷三磷酸及标记脱氧核苷三磷酸, 冰冻抽干。然后加入其他各溶液, 最后加入逆转录酶。并在酶加入前取样做为对照。37 $^{\circ}$ C 保温, 每间隔 10—15 分钟取样。

样品中 cDNA 合成产物的计数测定方法是: 首先取 100 μ l 0.4% 的牛血清白蛋白(BSA)置于测定管中作为沉淀 cDNA 的载体, 加样 1 μ l, 再加入 2ml 三氯乙酸(TCA)溶液(其中三氯乙酸 10%, 焦磷酸钠 0.2%)。滴加铺于硝酸纤维素微孔滤膜上, 抽滤, 并以 10% TCA 洗涤。加入水溶性(或烘干后加入脂溶性)闪烁液 5ml 计数。图 1 是兔血红蛋白 mRNA 为模板的 cDNA 合成保温时间曲线。

实验证明 37 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟, ³H-dCTP 掺入最高, 故一般采用 45—60 分钟的保温时间。保温后加入 0.2M EDTA 溶液至终浓度达 0.01M 终止反应。加入等体积水饱和酚及氯仿辛醇