

# 利用速率区带离心数据计算沉降系数

何宝俊 李忠民

(中国医科大学化学检测中心实验室, 沈阳)

速率区带离心法原本用于分离粒子和大分子。经 Martin<sup>[1]</sup> 的发展, 利用速率区带离心数据可以计算粒子的沉降系数, 结果相当满意。此法的优点在于, 不适于分析离心机测定的粒子, 如亚细胞, 可用此法测定其沉降系数, 并且可用测定生物活性的方法测定区带的位置, 样品不要求纯化, 这些都是优于分析离心机之处。又由于可在制备超速离心机上完成, 因此得到广泛的应用。

在 Martin 之后, 为了便于应用, 许多人在计算上做了些改进, 多数是就着某些型号转头、各别实验条件, 制成数值表供计算用。其中较详细又常被采用的是 McEwen<sup>[2]</sup> 制成的数值表, 但是也仅限于甩开转头, 线性蔗糖梯度, 和几个实验温度。由于粒子的沉降行为与粒子的密度、蔗糖密度梯度的形状、温度、以及转头的参数等关系密切, 而这些参数又是多种多样, 不能为列表所概括, 因而数据表在实际应用中常受到限制。

我们在前人的工作基础上, 在计算方法上做些改进, 扩大了适用范围, 用 TI-59 计算器就可以算出粒子的沉降系数, 离心时间; 也可以对沉降做模拟近似计算, 以便从中选出合适的实验条件。

## 一、原理与计算方法

沉降速率定义为:

$$\frac{dr}{dt} = s \cdot \omega^2 r \quad (1)$$

$s$  为沉降系数,  $\omega$  为角速度 (弧度/秒),  $r$  为离转轴中心的距离 (厘米)。又因:

$$s = S_{20, \omega} \cdot \frac{\eta_{20, \omega}}{\eta_{T, m}} \cdot \frac{\rho_p - \rho_{T, m}}{\rho_p - \rho_{20, \omega}} \quad (2)$$

故有

$$\frac{dr}{dt} = S_{20, \omega} \cdot \omega^2 r \cdot \frac{\eta_{20, \omega}}{\eta_{T, m}} \cdot \frac{\rho_p - \rho_{T, m}}{\rho_p - \rho_{20, \omega}} \quad (3)$$

$\eta_{20, \omega}$ ,  $\eta_{T, m}$  分别为 20°C 水及 T°C, 蔗糖溶液的粘度 (泊);  $\rho_{20, \omega}$ ,  $\rho_{T, m}$  分别为 20°C 水及 T°C 蔗糖溶液的密度 (克/厘米<sup>3</sup>);  $\rho_p$  为粒子的浮力密度。

(3) 式积分

$$S_{20, \omega} \cdot \int_0^t \omega^2 dt = \int_{r_0}^r \left( \frac{\rho_p - \rho_{20, \omega}}{\eta_{20, \omega}} \right) \cdot \left( \frac{\eta_{T, m}}{\rho_p - \rho_{T, m}} \right) \cdot \frac{dr}{r} \quad (4)$$

$\omega$  若取稳速时的角速度,  $t$  取等效时间, 则:

$$\int_0^t \omega^2 dt = \omega^2 t \quad (5)$$

其中  $t$  为 (假定离心机匀加速与匀减速)

$$t = \frac{1}{3} t_1 + t_2 + \frac{1}{3} t_3$$

$t_1$  为加速时间,  $t_2$  为稳速时间,  $t_3$  为减速时间。

令

$$\frac{\rho_p - \rho_{20, \omega}}{\eta_{20, \omega}} = \frac{\rho_p - 0.9982}{1.005} = a \quad (6)$$

样品指定后  $\rho_p$  为一定值,  $a$  为一常数。于是 (4) 式可写成:

$$S_{20, \omega} \cdot \omega^2 t = a \cdot \int_{r_0}^r \frac{\eta_{T, m}}{\rho_p - \rho_{T, m}} \cdot \frac{dr}{r} \quad (7)$$

(7) 式积分需数值积分。

$\eta_{T, m}$ , 和  $\rho_{T, m}$ , 是温度与蔗糖浓度的函数, Barber<sup>[3]</sup> 给出一精确的经验公式。蔗糖浓度是容积的函数, 具体形式决定于梯度液的形状; 而容积与轴心距 ( $r$ ) 的关系决定于转头的类型。它们分别如下:

1. Barber 公式

$$\rho_{T,m} = (B_1 + B_2T + B_3T^2) + (B_4 + B_5T + B_6T^2) \cdot C + (B_7 + B_8T + B_9T^2) \cdot C^2 \quad (8)$$

式中  $T$  为温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $C$  为蔗糖质量百分浓度 ( $w/w$ ), 各  $B$  为常数, 数值如下:

$B$	数 值
$B_1$	1.0003698
$B_2$	$3.9680504 \times 10^{-3}$
$B_3$	$-5.8513271 \times 10^{-6}$
$B_4$	0.38982371
$B_5$	$-1.0578919 \times 10^{-3}$
$B_6$	$1.2392833 \times 10^{-5}$
$B_7$	0.17097594
$B_8$	$4.7530081 \times 10^{-4}$
$B_9$	$8.9239737 \times 10^{-6}$

$$\eta_{T,m} = 10 \left[ A + \frac{B}{T+C} \right] \quad (9)$$

式中  $T$  为温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )  $A, B, C$ , 是只与组成有关的常数。其中

$$C = G_1 - G_2[1 + (Y/G_3)^2]^{1/2} \quad (10)$$

$Y$  为蔗糖溶液的摩尔分数, 与浓度  $C$  的关系为

$$Y = \frac{C}{C + (1-C) \times M_1/M_2} \quad (11)$$

其中  $M_1, M_2$ , 分别为蔗糖和水的相对分子质量。

$$G_1 = 146.06635$$

$$G_2 = 25.251728$$

$$G_3 = 0.070674842$$

常数  $A, B$  为多项式:

$$A(\text{或 } B) = D_0 + D_1Y + D_2Y^2 + D_3Y^3 + \dots + D_nY^n \quad (12)$$

$Y$  由 (11) 式定义。  $A, B$  的各项系数  $D_n$  值不同, 如右表。

$$2. V = f(r) \text{ 及 } r = f(V) \quad (13)$$

(1) 甩开转头

$$\left. \begin{aligned} V &= \pi d^2(r - r_i) \\ r &= r_i + V/\pi d^2 \end{aligned} \right\} \quad (14)$$

若考虑对半球形管底的修正, 可用下式:

**A 中各项系数 D 值**

系数	适用范围 (质量百分浓度 $C$ )	
	$A_1$ 0~0.48	$A_2$ 0.48~0.75
$D_0$	-1.5018327	-1.0803314
$D_1$	9.4112153	$-2.0003484 \times 10$
$D_2$	$-1.1435741 \times 10^3$	$4.6066898 \times 10^2$
$D_3$	$1.0504137 \times 10^5$	$-5.9517023 \times 10^3$
$D_4$	$-4.6927102 \times 10^6$	$3.5627216 \times 10^4$
$D_5$	$1.0323349 \times 10^8$	$-7.8542145 \times 10^4$
$D_6$	$-1.1028981 \times 10^9$	
$D_7$	$4.5921911 \times 10^9$	

**B 中各项系数 D 值**

系数	适用范围 (质量百分浓度 $C$ )	
	$B_1$ 0~0.48	$B_2$ 0.48~0.75
$D_0$	$2.1169907 \times 10^2$	$1.3975568 \times 10^3$
$D_1$	$1.6077073 \times 10^3$	$6.6747329 \times 10^3$
$D_2$	$1.6911611 \times 10^3$	$-7.8716105 \times 10^4$
$D_3$	$-1.4184371 \times 10^7$	$9.0967578 \times 10^3$
$D_4$	$6.0654775 \times 10^8$	$-5.5380830 \times 10^4$
$D_5$	$-1.2985834 \times 10^{10}$	$1.2451219 \times 10^7$
$D_6$	$1.3532907 \times 10^{11}$	
$D_7$	$-5.4970416 \times 10^{11}$	

$$\left. \begin{aligned} V &= b - \left\{ R_{\max} - wt - \frac{1}{3}(D-t) - r \right\} \\ &\quad \cdot \pi(D-t)^2 \\ r &= \left\{ R_{\max} - wt - \frac{1}{3}(D-t) \right\} \\ &\quad - \frac{b-V}{\pi(D-t)^2} \end{aligned} \right\} \quad (15)$$

$b$  管内盛有溶液的总体积,

$V$  从弯液面至  $r$  处溶液的体积,

$r$  与转轴中心间的距离,

$wt$  塑料管管底壁厚,

$t$  塑料管壁厚,

$d$  塑料管内半径,

$D$  转头孔穴半径,

$R_{\max}$  转头最大半径。

(2) 区带转头

可参考区带转头的说明书。如日立 RPZ

48T 和 RPZ 35 区带转头:

$$\left. \begin{aligned} V &= 18.6r^2 - 23.8r - 5.2 \\ r &= 0.6398 + (0.6889 + 0.05376V)^{1/2} \end{aligned} \right\} \quad (16)$$

3.  $C = f(v)$  及  $C = f(r)$

(1) 线性蔗糖梯度:

$$C = \left( \frac{C_b - C_i}{r_b - r_i} \right) \cdot r + \frac{C_i \cdot r_b - C_b \cdot r_i}{r_b - r_i} \quad (17)$$

$$C = \left( \frac{C_b - C_i}{V_b - V_i} \right) \cdot V + \frac{C_i \cdot V_b - C_b V_i}{V_b - V_i} \quad (18)$$

(17)式用于甩开转头, 注脚  $b, i$  分别表示管底与弯液面处; (18)式用于区带转头, 其中  $V_i$  等于覆盖液体积+样品体积,  $V_b$  为梯度液浓度为  $C_b$  处的体积,  $C_i$  为梯度开始处的浓度。

(2) 指数梯度

在双室法中, 混合室溶液体积固定, 配制出的溶液浓度为

$$C = C_R - (C_R - C_i) \cdot e^{-V/V_m} \quad (19)$$

$C_R$ : 贮液室的溶液浓度;  $C_i$ : 混合室的初始溶液浓度;  $V_m$ : 混合室溶液的体积;  $V$ : 由混合室流出的液体总体积。

(3) 式积分用辛卜森近似方法(连续函数)计算。积分上限  $r_n$  为区带中心与转轴中心间的距离; 下限  $r_0$  为样品层的中间与转轴中心间的距离。

具体的方法是离心后分部收集, 选合适方法检测样品浓度, 浓度最高的流分相当于区带中心的位置, 求出它的相应体积 ( $V$ ), 按图 1 所示流程计算。

欲了解粒子在不同条件下的沉降行为, 先

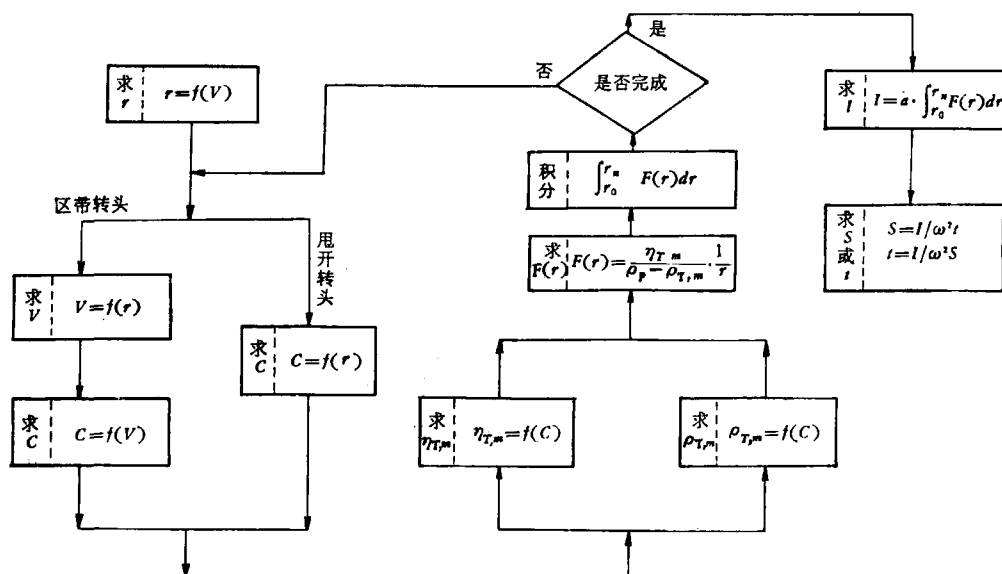


图 1 计算流程

算出不同  $r$  值时的  $s$  值 ( $t, \rho_p$  固定), 或  $t$  值 ( $S, \rho_p$  固定) 然后画制  $s \sim r$  及  $r \sim t$  曲线。

本算法的特点在于转头类型和梯度形状的改变不影响被积函数的形式, 只涉及求  $V$ , 求  $C$  及实验参数的预置。如用 TI-59 计算器, 可将这部分程序写入磁卡 2 分区, 用时读入相应磁卡即可构成完整程序。既方便又扩充了使用范围。

## 二、应用示例

1. McEwen<sup>[2]</sup> 梯度离心人血清得到两个

峰, 他算得  $S_{20, \omega}$  为:

峰 I 4.1S ( $\rho_p = 1.3$ ); 3.9S ( $\rho_p = 1.4$ )

峰 II 6.3S ( $\rho_p = 1.3$ ); 5.8S ( $\rho_p = 1.4$ )

另据 Wallenins 测得的值为 4.0S 和 6.6S。我们采用 McEwen 的实验参数, 蛋白质密度取  $\rho_p = 1.38$ , 并修正半球形管底, 按本文方法用 TI-59 计算器计算结果为 4.2S, 6.4S。

2. 不同密度粒子在指数蔗糖梯度液中的沉降行为。各参数为:  $\rho_p = 1.2, 1.38, 1.51, 1.70$ ,  $T = 5^\circ\text{C}$ ,  $\text{rpm} = 38000$ ,  $t = 8 \times 36000$ ,  $C_b = 0.2571$ ,  $V_m = 11.74$ ,  $C_i = 0.10$ ,  $r_0 = 6.3\text{cm}$ 。

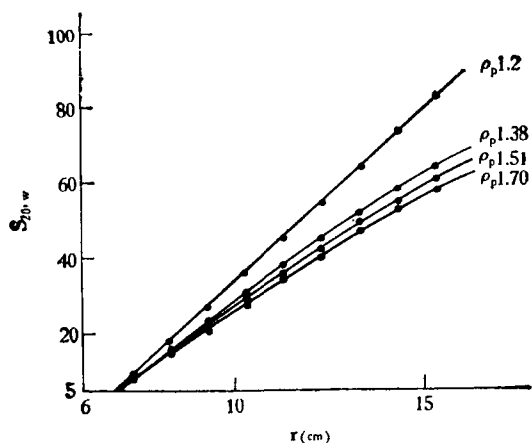


图2 不同密度粒子等速梯度的沉降行为  
 $\rho_p = 1.2$  时

此条件为  $\rho_p = 1.2$  粒子在日立 RPS 40T 转头的等速梯度。结果画成  $S_{20,w} \sim r$  曲线如图 2。若给定  $S_{20,w}$  值, 也可画出  $t \sim r$  曲线。

TI-59 可编程序计算器程序及用法, 本文从略。需用者可与作者联系索取。

### 参 考 文 献

- [1] Martin, R. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1372, 1961.
- [2] McEwen, C. R.: *Anal. Biochem.*, **20**(1), 114, 1967.
- [3] Barber, E. L.: *Natn. Cancer Inst. Monogr.*, No 21, 219, 1966.

[本文于 1984 年 6 月 14 日收到]

## DNA 的荧光染料 DAPI 的特性及其应用

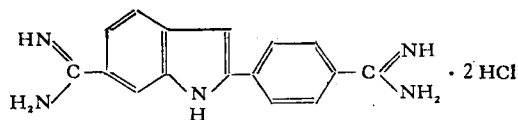
殷蔚蕙 邵莉楣 赵 军 白克智

(中国科学院植物研究所, 北京)

在检测 DNA 的各种染料中, DAPI 具有专一性强、灵敏度高、使用简便等特点。本文简要地就有关 DAPI 的文献作一综述, 并介绍我们在使用 DAPI 时的一些经验。

### 一、DAPI 的物理化学性质

DAPI 是一种二价阳离子的荧光染料, 由 Dann 等于 1971 年合成<sup>[1]</sup>。化学名为 4'6-二脒基-2-苯基吲哚 (4'6-Diamidino-2-phenylindole · 2HCl)。结构式为



分子量 350.3。黄色晶体, 易溶于水, 最大溶解度为 2.5%。可被高浓度的两价或高价阴离子 (硫酸盐离子和磷酸盐离子) 所沉淀。

DAPI 具有与各种来源的、富含 A-T 碱基对的 DNA 专一结合的特点。DAPI 与 DNA 形成的复合物发出高强度的浅蓝色荧光。其最

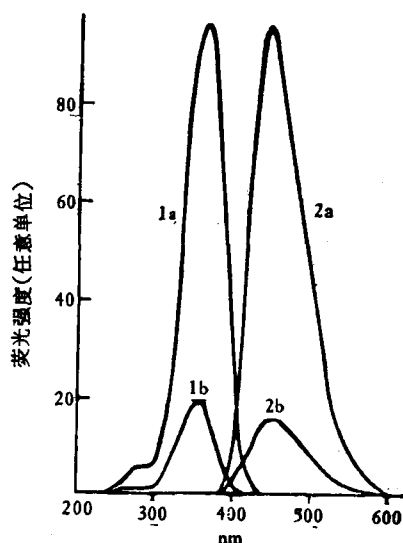


图1 DNA-DAPI 复合物及 DAPI 溶液的激发光谱 (1a, 1b) 和荧光光谱 (2a, 2b)

(摘自 *Anal. Biochem.*, **83**(1), 252, 1977.)

大的激发波长为 372nm, 最大的发射波长为 454nm (图 1)。其荧光可被适当浓度的  $SO_4^{2-}$  加强。