

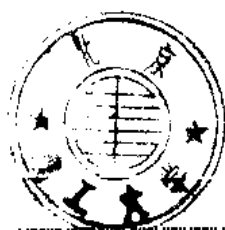
生物化学与分子生物学 实验常用数据手册

吴冠芸 潘华珍 吴 翠 主编

科学出版社

生物化学与分子生物学
实验常用数据手册

吴冠芸 潘华珍 吴 翠 主编



965177

科学出版社

1999

内 容 简 介

本书分为两部分,分别收集生物化学与分子生物学实验常用数据多种。由于学科涉及面广,编汇时不在求全,而是求精、求新、求实用,而且大量数据以图表形式出现,查阅方便快捷。目前国内图书馆尚难觅到这样资料丰富的同类工具书。分子生物学业已渗透到生物学、医学、药学等各个学科。本手册可供各有关专业的教学、科研、临床技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验常用数据手册/吴冠芸等主编.
-北京:科学出版社,1999
ISBN 7-03-006873-4

I. 生… I. 吴… III. ①生物化学-实验数据-手册
②分子生物学-实验数据-手册 N. Q5-83

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 19107 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717

新蕾印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1999年5月第一版 开本:787×1092 1/16
1999年5月第一次印刷 印张:29 1/2
印数:1—3 600 字数:668 000

定价:58.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

编写人员名单

主编 吴冠芸 潘华珍 吴 翠
编者 吴冠芸 潘华珍 吴 翠 缪时英
张俊武 黄秉仁 陈雨亭 刘国仰
袁建刚 胡松年

前 言

分子生物学是当前生命科学中最重要的前沿学科,发展迅速并已深深渗透到生命科学的各个领域,从而出现了分子遗传学、分子病理学、分子药理学、分子免疫学等学科。生物化学是分子生物学的基础,两者密不可分。因此,有关生物化学和分子生物学技术和方法的有关资料对很多从事生命学科的工作者都显得十分需要。

本书广泛汇集了生物化学与分子生物学的一些重要技术和方法中常用的试剂、反应条件等方面的资料,主要以表或图的形式表达,便于读者在进行研究或实验时参考使用。一些原需繁琐计算的数据,从表格或图中随手可以查到。由于本书主要采用图和表的方式,因此与同样篇幅的图书相比,信息量大。为了便于非生物化学与分子生物学工作领域的读者理解,书中对一些基本概念也作了简单的介绍。这类书国外也不多见,90年代出版的手册,仅有LABFAX系列。其中已出版的有分子生物学、细胞生物学、细胞培养、生物化学、酶学及蛋白质等,在国内图书馆还很少见到。

全书共27章,前13章包括生物化学实验的基本常用数据,后14章包括分子生物学领域的常用新技术、新资料。生物化学与分子生物学的资料浩如烟海,如何取舍是十分重要的问题。我们选择本书内容的基本原则:①常用,不求全。尤其在生物化学部分,有些基本材料目前仍然应用甚多,我们尽量做到精而实用。②资料新。在常用的基础上求新,尽量追随到近年的文献。如在蛋白质物理化学常数一章中收集了新的白介素及分化抗原决定簇(CD)的有关资料。又如在核酸序列测定一章中还介绍了核酸序列数据库的查寻和应用;克隆载体方面选择了新而常用的载体。我们还尽量将查阅到的资料吸取其中之精华,编在书内。但限于水平及力量,仍可能存在许多不足之处,期待广大读者赐教。

另外,本书所用的名词,大部分以科学出版社出版的《英汉-汉英生物化学词汇》及《英汉化学化工词汇》为准。分子生物学发展甚快,不断有新的名词出现,两本词汇中查不到的,按意翻译并附英文原文。

目 录

1. 酸、碱、盐和有机溶剂的基本数据

非离子合成聚合物的特性及指示剂

1.1. 酸、碱、盐和有机溶剂的基本数据	1	图 1-1 聚合物的结构式	8
表 1-1 常用酸及碱的性质	1	1.3. 指示剂	9
表 1-2 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值	2	1.3.1. 常用的酸碱指示剂	9
表 1-3 常用酸及碱溶液的浓度和密度	2	表 1-7 一些常用的酸碱指示剂	9
表 1-4 常用盐的性质	5	1.3.2. 通用指示剂	10
表 1-5 常用有机溶剂的性质	6	表 1-8 两种配方的通用指示剂在不同 pH 时所显示的颜色	10
1.2. 非离子合成聚合物	7	1.3.3. 混合指示剂	10
表 1-6 一些非离子合成聚合物的物理 与化学特性数据	8	表 1-9 混合指示剂的变色范围	10
		参考文献	12

2. 缓冲溶液

2.1. 两种缓冲液的应用范围	13	表 2-3 0.1 mol/L 磷酸缓冲液的配制	19
2.2. 生物体系的适应性及化学活性	13	表 2-4 0.1 mol/L 醋酸缓冲液的配制	19
图 2-1 非双性离子缓冲液的 pH 范围	14	2.4. 具有缓冲能力的生理盐水	20
图 2-2 双性离子缓冲液的 pH 范围	15	2.5. 标准缓冲液的配制	20
表 2-1 非双性离子缓冲液的组成	16	表 2-5 标准缓冲液的配制	20
表 2-2 双性离子缓冲液的特性	17	参考文献	20
2.3. 缓冲液的配制	19		

3. 螯合剂、变性剂、巯基试剂及表面活性剂

3.1. 螯合剂	21	3.3. 巯基试剂	24
表 3-1 螯合剂; 溶解度与 pK_a	21	表 3-5 巯基试剂	25
表 3-2 螯合剂; 稳定常数	22	3.4. 表面活性剂	25
3.2. 变性剂	22	图 3-1A 去垢剂微团的结构	26
3.2.1. 变性剂的作用机制	22	图 3-1B 去垢剂溶解膜蛋白的作用	26
3.2.2. 混合变性剂	23	表 3-6 去垢剂与表面活性剂的物理化 学性质	26
3.2.3. 变性剂的特性	23	图 3-2 去垢剂的结构式	30
表 3-3 溶解型变性剂	24	参考文献	30
表 3-4 沉淀型变性剂	24		

4. 干燥剂、致冷剂、浓缩剂及硅化剂

4.1. 干燥剂	31	4.3. 浓缩剂	34
表 4-1 实验室中常用干燥剂的吸水能力	31	4.3.1. 蔗糖	34
表 4-2 干燥器内常用的干燥剂	31	4.3.2. 聚乙二醇	34
表 4-3 气体用干燥剂	32	表 4-10 固体聚乙二醇的数据	34
4.2. 致冷剂	32	4.3.3. 葡聚糖凝胶	35
表 4-4 冰与食盐组成的致冷剂	32	4.3.4. 聚丙烯酰胺凝胶	35
表 4-5 水和混合盐类组成的致冷剂	32	4.3.5. 聚乙烯吡咯烷酮	35
表 4-6 冰和混合盐类组成的致冷剂	33	4.4. 硅烷化剂	35
表 4-7 冰和盐类组成的致冷剂	33	4.4.1. 二氯二甲基硅烷或二甲基二氯硅烷	36
表 4-8 液化气体致冷剂	33	4.4.2. 其他硅烷化剂	36
表 4-9 固体二氧化碳与有机溶剂组成的致冷剂	33	4.4.3. 硅烷化剂的使用方法	36
		参考文献	36

5. 离子交换剂

5.1. 离子交换树脂	38	表 5-9 DEAE Sepharose CL-6B 交联琼脂糖离子交换剂的数据	45
表 5-1 常用阴离子交换树脂及其数据	38	表 5-10 Sepharose Fast Flow 的技术数据	46
表 5-2 常用阳离子交换树脂及其数据	40	表 5-11 Sepharose High Performance 的技术数据	46
5.2. 纤维素离子交换剂	41	5.4.2. Bio-Gel A 系交联琼脂糖离子交换剂	47
表 5-3 Whatman 公司的商品纤维素离子交换剂	42	表 5-12 DEAE Bio-Gel A 和 CM Bio-Gel A 的技术数据	47
表 5-4 DEAE-Sephacel 纤维素离子交换剂	42	5.5. Source 系离子交换剂	47
表 5-5 Cellex 系纤维素离子交换剂	43	表 5-13 Source 的技术数据	48
表 5-6 纤维素离子交换剂常用的抑菌剂	43	5.6. MonoBeads 系离子交换剂	48
5.3. 葡聚糖系离子交换剂	43	表 5-14 三种功能基 MonoBeads 柱的性能	48
表 5-7 离子交换交联葡聚糖的技术数据	43	表 5-15 不同尺寸 MonoBeads 柱的技术数据	49
表 5-8 离子交换交联葡聚糖的应用数据	44	5.7. Toyopearl 系离子交换剂	49
5.4. 琼脂糖系离子交换剂	44	表 5-16 Toyopearl 系离子交换剂	49
5.4.1. Sepharose 系的离子交换剂	44	参考文献	50

6. 凝胶过滤介质

6.1. 葡聚糖凝胶	51	表 6-1 Sephadex G 型葡聚糖凝胶的数据	51
6.1.1. Sephadex G 型葡聚糖凝胶的特性要点	51	6.1.2. Sephadex G 型葡聚糖凝胶的溶	

胀	52	6.4.1. Bio-Gel P 型凝胶的特性要点	57
表 6-2 Sephadex G 型葡聚糖凝胶溶胀		表 6-9 Bio-Gel P 型凝胶的数据	58
所需时间	52	6.5. 交联聚苯乙烯凝胶 Bio-Beads	58
6.1.3. 凝胶的回收与保存	52	6.5.1. Bio-Beads 层析凝胶的特性要点	58
6.1.4. 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex		表 6-10 Bio-Beads S-X 型的数据	59
LH 型的特性要点	53	6.6. Superdex 凝胶过滤介质	59
表 6-3 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex		6.6.1. Superdex 凝胶的特性要点	59
LH 型的数据	53	表 6-11 制备级 Superdex 凝胶过滤介质的数据	60
表 6-4 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex		6.7. 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl	60
LH 型的柱床体积	54	6.7.1. 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的特性要点	60
6.2. 聚丙烯酰胺葡聚糖	54	表 6-12 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的数据	60
6.2.1. 聚丙烯酰胺葡聚糖 Sephacryl		6.8. 凝胶过滤用分子量标准	61
S 型的特性要点	54	表 6-13 凝胶过滤用低分子量标准的组成	61
表 6-5 聚丙烯酰胺葡聚糖 Sephacryl S 型凝胶的数据	54	表 6-14 凝胶过滤用高分子量标准的组成	61
6.3. 琼脂糖凝胶	55	表 6-15 凝胶过滤用分子量标准品	62
6.3.1. 琼脂糖凝胶 Sepharose	55	参考文献	62
表 6-6 琼脂糖凝胶的数据	55		
6.3.2. 琼脂糖凝胶 Superose	56		
表 6-7 Superose 的数据	56		
6.3.3. 琼脂糖凝胶 Bio-Gel A	56		
表 6-8 琼脂糖凝胶 Bio-Gel A 型的数据	57		
6.4. 聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel P	57		

7. 亲和层析

7.1. 亲和层析	63	表 7-3 有间隔臂的琼脂	65
表 7-1 亲和层析常用的基质	64	7.3. 吸附剂的配基	68
7.2. 制备亲和吸附剂的材料	64	表 7-4 用于亲和吸附剂的配基	68
表 7-2 活化的琼脂	64	参考文献	70

8. 透析袋、微孔滤膜和超滤膜

8.1. 透析袋	71	表 8-4 醋酸纤维滤膜	75
8.1.1. 纤维素膜透析袋	71	8.2.2. 硝酸纤维滤膜	75
表 8-1 Spectro por 再生纤维素膜透析袋的数据	71	表 8-5 硝酸纤维滤膜	75
表 8-2 纤维素酯膜透析袋的数据	73	8.2.3. 印迹及其他工作中用的硝酸纤维滤膜	76
8.1.2. 透析袋的预处理	74	表 8-6 用于印迹工作的硝酸纤维滤膜	76
8.1.3. 透析袋的保存	74	8.2.4. 尼龙滤膜	76
8.2. 微孔滤膜和印迹杂交膜	74	表 8-7 用于微孔过滤的尼龙滤膜	76
8.2.1. 醋酸纤维滤膜	74	表 8-8 用于印迹实验的尼龙滤膜	77
表 8-3 微孔滤膜的种类	75		

8.2.5. 聚四氟乙烯滤膜.....	77	8.3.6. 新型聚砜滤膜滤器	80
表 8-9 常用的聚四氟乙烯滤膜	77	表 8-19 新型聚砜滤膜滤器	80
8.2.6. 聚砜滤膜.....	77	8.4. 超滤膜	80
表 8-10 常用的聚砜滤膜	77	表 8-20 Amicon 圆形超滤膜的规格	
8.2.7. 聚偏二氟乙烯滤膜.....	77	和有效过滤面积的数据	81
表 8-11 聚偏二氟乙烯滤膜	78	表 8-21 Amicon 圆形超滤膜对溶质	
8.3. 针筒式滤器或针头式滤器	78	的排阻率	81
表 8-12 一次性使用的针头式滤器	78	表 8-22 Amicon 圆形超滤膜的流速.....	82
表 8-13 一次性使用滤膜滤器的说明	78	表 8-23 Amicon diaflo 超滤膜的数据	83
8.3.1. 玻璃纤维预滤和终滤器	78	表 8-24 Amicon 卷式中空纤维超滤膜	
表 8-14 玻璃纤维滤器	79	的数据	83
8.3.2. 一次性醋酸纤维滤膜滤器	79	表 8-25 Amicon 卷式中空纤维超滤膜	
表 8-15 一次性醋酸纤维滤膜滤器	79	的效能及其应用数据	84
8.3.3. 尼龙滤膜滤器	79	表 8-26 Amicon Y 系卷式中空纤维超	
表 8-16 尼龙滤膜滤器	79	滤膜对溶质的排阻率	84
8.3.4. 聚四氟乙烯滤膜滤器	79	表 8-27 Amicon P 系中空纤维滤膜对	
表 8-17 聚四氟乙烯滤膜滤器	80	溶质的排阻率	85
8.3.5. 硝酸纤维滤膜滤器	80	参考文献.....	86
表 8-18 硝酸纤维滤膜滤器	80		

9. 超速离心

9.1. 相对离心力的计算	87	度及百分浓度的换算	93
9.2. 离心时间的计算.....	87	图 9-2 稀释成百分比浓度(w/w)的	
图 9-1 计算近似 RCF 的列线图	88	蔗糖稀释曲线	93
9.3. 离心转头的应用	89	表 9-9 25℃时氯化铯溶液的密度、折	
表 9-1 离心转头的选择	89	光指数与浓度	94
9.4. 密度梯度离心	89	表 9-10 20℃时蔗糖溶液的密度、折	
表 9-2 沉降速度离心和沉降平衡离		光指数与浓度	95
心的特点	90	表 9-11 Metrizamide 与 Nycodenz 溶	
表 9-3 常用的梯度介质物理特性与		液的特性	96
应用	90	表 9-12 聚蔗糖溶液的性质	96
表 9-4 等密度梯度介质的应用	91	图 9-3 稀释成摩尔浓度(mol/L)的	
表 9-5 各种大分子在蔗糖梯度溶液		蔗糖稀释曲线	97
中的大约密度	91	9.6. 离心转头的减速计算	97
表 9-6 各种大分子在一些梯度介质		9.7. 离心转头和离心管的使用和保护	97
中的大约密度	92	表 9-13 离心管和离心瓶材料的特性	
表 9-7 动物细胞器在下列梯度介质		98
中的大约密度	92	表 9-14 离心管和离心瓶的使用和保	
表 9-8 分离人不同类型血细胞的商		护	98
品介质	92	表 9-15 各种材料的化学抗性	99
9.5. 一些常用梯度介质的密度、折光指数与浓		表 9-16 消毒与灭菌的方法	103

9.8. 离心机的计算机控制	103	表 9-18 应用 NTV 转头分离质粒 DNA(20℃)	104
表 9-17 质粒 DNA 的 5 步分离法 (NTV90 转头)	104	参考文献	104

10. 放射性核素

10.1. 有关放射性核素的一些名词	105	表 10-6b 几种常用的放射性核素衰变表(2)	111
10.2. 一些与放射线有关的单位	106	10.9. 放射性的测量	112
表 10-1 与放射线有关的单位	106	10.9.1. 各种测量仪器的计数效率	112
10.3. 一些应用于生物化学研究中的放射性核素	106	表 10-7 各种测量仪器的计数效率的比较	112
表 10-2 一些应用于生物化学研究中的放射性核素	107	10.9.2. 液体闪烁测量	112
10.4. 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 β 衰变的放射性核素	108	表 10-8 切仑克夫计数的计数效率	112
表 10-3 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 β 衰变的放射性核素	108	表 10-9 几种最常用闪烁体的部分理化性质	113
10.5. 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 γ 射线的放射性核素	109	表 10-10 一些实验室中常用的闪烁液配方	113
表 10-4 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 γ 射线的放射性核素的数据	109	10.9.3. 放射自显影	113
10.6. 放射性国际标准单位(SI)换算	109	表 10-11 放射自显影常用的核素及其在照相乳胶中的射程	114
10.6.1. 放射性活性单位换算	109	表 10-12 三种不同乳胶检测方法的比较	114
表 10-5 Bq/Ci 换算	110	10.10. 辐射的防护	114
10.7. 放射性衰变校正计算	110	表 10-13 对 β 粒子的屏蔽	115
10.8. 几种最常用的放射性核素衰变表	110	表 10-14 对 γ 射线的屏蔽	115
表 10-6a 几种常用的放射性核素衰变表(1)	111	10.11. 放射性污染的清除	115
		表 10-15 清除放射性污染的方法	116
		参考文献	116

11. 生理体液与培养基

11.1. 生理体液	117	基	121
表 11-1 Krebs Ringer 溶液	117	表 11-9 L-15 培养基	122
表 11-2 等渗(平衡盐)溶液的配制方法	118	表 11-10 199 培养基	122
表 11-3 人造海水	119	表 11-11 RPMI-1640 培养基	123
11.2. 各种培养基的配方	119	表 11-12 Ham 培养基	123
表 11-4 BME 培养基	119	表 11-13 改良的 MEM 培养基	124
表 11-5 MEM 培养基	120	11.3. 分子克隆中常用的培养基	125
表 11-6 McCoy 5A 培养基	120	11.3.1. <i>E. coli</i> 及酵母培养基	125
表 11-7 Trowel T-8 培养基	121	表 11-14 <i>E. coli</i> 及酵母培养基	125
表 11-8 Waymouth MB 752/1 培养基	121	表 11-15 Complete minimal (CM) dropout 培养基	126

表 11-16	LB (Luria-Bertzani) 培养基	127	表 11-27	软琼脂培养基	129
表 11-17	Minimal 培养基	127	表 11-28	诱导培养基	129
表 11-18	M9 培养基	127	表 11-29	抗生素溶液的配制	130
表 11-19	M63 培养基	127	11.3.3.	保存培养基	130
表 11-20	NZYCM 培养基	127	表 11-30	细菌和噬菌体储存培养基	131
表 11-21	NZYM 培养基	128	11.3.4.	固体培养基	131
表 11-22	NZM 培养基	128	表 11-31	YPD, Minimal 及 CM dro- pout 盘配制	131
表 11-23	Rich 培养基	128	表 11-32	5-氟乳清酸盘	131
表 11-24	SOB 培养基	128	表 11-33	Xgal 盘	131
表 11-25	SOC 培养基	128	表 11-34	α 氨基己二酸盐盘	132
表 11-26	高浓度肉汤	128	表 11-35	刀豆氨酸盘	132
11.3.2.	含有琼脂或琼脂糖的培养基	128	表 11-36	环己酰亚胺盘	132
	参考文献	132			

12. 数据处理

12.1.	有效数字	133	12.4.1.	准确度	135
12.2.	误差	133	12.4.2.	精密度	135
12.2.1.	系统误差	133	12.4.3.	灵敏度	135
12.2.2.	偶然误差	134	12.5.	统计学的一些基本概念和计算公式	135
12.2.3.	责任误差	134	12.5.1.	标准差	136
12.3.	误差的表示方法和计算	134	12.5.2.	标准误	136
12.3.1.	平均误差	134	12.5.3.	显著性的测定(t 值的计算)	137
12.3.2.	标准误差	134	表 12-1	相当于机率 5%、1% 及 0.1% 的 t 值(t 值表)	139
12.3.3.	绝对误差	134	参考文献	140	
12.3.4.	相对误差	135			
12.4.	与质量控制有关的几个基本概念	135			

13. 安全防护

13.1.	不稳定的化学药品及防护	141	13.5.	非电离辐射危害的来源	144
13.2.	危险的化学混合物及防护	141	13.6.	放射性核素的防护(见第 10 章)	145
13.3.	对有害微生物的防护	141	表 13-4	联合国化学危险品分类	145
13.3.1.	病源体的分类	142	表 13-5	欧洲规定的危险品符号	145
表 13-1	A 类病源体	142	表 13-6	欧洲规定的安全符号	146
表 13-2	B 类病源体	142	表 13-7	毒品的毒性及毒品和爆炸物 防护的有效措施	147
13.3.2.	病源体的防护	143	表 13-8	对各种不同试剂的防护材料	151
表 13-3	对不同感染源的有效防护	143	图 13-1	危险化学药品及警告标志	152
13.4.	致癌、致突变、致畸	143	表 13-9	高压消毒压力与温度的关系	153
13.4.1.	化学分类	143	参考文献	153	
13.4.2.	天然产物	144			
13.4.3.	按功能分类	144			

14. 氨基酸、多肽及蛋白质沉淀分离

14.1. 蛋白质水解	154	色反应	159
表 14-1 化学法水解蛋白质	154	表 14-7 几种重要活性多肽的结构 ...	159
14.2. 氨基酸	155	14.4. 蛋白质的沉淀分离	161
表 14-2 氨基酸的简写、三联密码及 化学性质	155	14.4.1. 盐析法	161
表 14-3 氨基酸的物理化学常数	156	表 14-8a 0℃下由 S ₁ 提高到 S ₂ 时每 100 毫升加固体硫酸铵的 克数	162
14.3. 多肽	157	表 14-8b 室温下由 S ₁ 提高到 S ₂ 时每 升加固体硫酸铵的克数 ...	163
14.3.1. 多肽的合成	157	14.4.2. 低温乙醇沉淀法	164
表 14-4 合成多肽的支持物	157	表 14-9 不同浓度乙醇的配制方法 ...	164
表 14-5 固相合成时基团保护的方法 ...	158	参考文献	165
表 14-6 树脂上定性检测氨基酸的颜			

15. 蛋白质的物理化学常数

15.1. 蛋白质的浓度测定	166	表 15-4 血浆凝血因子的物理化学性 质	180
表 15-1 测定蛋白质浓度的方法	166	表 15-5 分化抗原决定簇(CD)的物化 性质及功能	181
15.2. 常用重要的蛋白质的性质及功能	167	表 15-6 一些不属 CD 的重要的粘附 分子	188
15.3. 细胞因子	174	参考文献	189
表 15-2 白细胞介素家族(ILs)的来 源及功能	174		
表 15-3 除白介素以外的一些重要细 胞因子的来源及功能	176		

16. 蛋白质电泳

16.1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳	190	16.1.5. 上样体积	192
16.1.1. 原理	190	表 16-8 齿深 25mm 时,上样体积与 齿宽、齿厚的关系	193
16.1.2. 凝胶浓度的选择	190	16.1.6. 分子量标准	193
表 16-1 凝胶浓度与蛋白质分离范围	191	表 16-9 标准蛋白质的分子量	193
16.1.3. 凝胶的配置	191	16.1.7. 凝胶染色	194
表 16-2 不同浓度分离胶的制备	191	表 16-10 凝胶染料的种类及特点 ...	194
表 16-3 成层胶的制备	191	16.1.8. 印迹技术	194
表 16-4 肽类分离时各部分凝胶的制 备	191	表 16-11 常用固相膜的种类和特点	195
16.1.4. 缓冲液的选择	192	表 16-12 印迹技术的常用封闭物 ...	195
表 16-5 电泳缓冲液的组成	192	表 16-13 印迹膜上的蛋白质染色 ...	196
表 16-6 样品缓冲液的组成	192	表 16-14 偶联酶的种类及特点	196
表 16-7 Tricine 胶的样品缓冲液的配 制,2X	192	16.1.9. 问题及解决方法	197
		表 16-15 疑点指南	197

16.2. 等电聚焦	198	表 16-18 电聚焦缓冲液组分与 pH 间的关系	200
16.2.1. 原理	198	16.3. 双向凝胶电泳	201
16.2.2. pH 梯度	199	表 16-19a 第一相电泳条件	201
表 16-16 蛋白质的 pI 标准	199	表 16-19b 第二相电泳条件	202
16.2.3. 染色	199	表 16-20 双向凝胶电泳的蛋白质标准	202
表 16-17 等电聚焦电泳的染色与检测	199	参考文献	204
16.2.4. 制备等电聚焦	200		

17. 蛋白水解酶

表 17-1 酶纯度测定方法	206	表 17-5 内切水解酶	209
表 17-2 氨基肽酶	207	表 17-6 蛋白水解酶抑制剂	211
表 17-3 羧肽酶	208	表 17-7 几种有关合成与代谢酶的抑制剂	214
表 17-4 特异与非特异蛋白水解酶	208	参考文献	215

18. 几种重要蛋白质的特性

18.1. 糖蛋白	216	18.3. 糖蛋白与蛋白聚糖的合成	223
18.1.1. 糖蛋白结构的特点	216	表 18-9 糖转移酶的种类	224
表 18-1 天然糖蛋白的糖链联结形式	216	表 18-10 糖蛋白翻译后的修饰	225
表 18-2 糖蛋白的联结方式	217	图 18-2 糖链的生物合成途径	226
表 18-3 O-联结寡糖的核心结构	218	18.4. 血浆脂蛋白	227
图 18-1 与天冬酰胺连接的寡糖, 其主要类型的构造	218	表 18-11 脂蛋白的物理性质及组成	227
表 18-4 糖蛋白末端寡糖的结构	219	表 18-12 血浆载脂蛋白的性质及功能	228
表 18-5 糖蛋白寡糖链的单糖与单糖端基异构联结方式	219	18.5. 免疫球蛋白	228
18.1.2 糖蛋白的分离纯化	220	图 18-3 血浆脂蛋白的一般结构示意图	229
表 18-6 常用外源凝集素的糖特异性	220	图 18-4 IgG 结构模式图	229
18.2. 蛋白聚糖	221	图 18-5 Ig 结构示意图	230
18.2.1. 蛋白聚糖的结构特点	221	表 18-13 人免疫球蛋白的理化特性	231
表 18-7 糖胺聚糖的二糖重复单位	222	表 18-14 人免疫球蛋白的生物学功能	231
表 18-8 蛋白聚糖的糖链与核心蛋白的联结	223	参考文献	231

19. 蛋白质的化学修饰

表 19-1 蛋白质选择性化学修饰常用的试剂	232	表 19-3 蛋白质修饰后逆行的酶	239
表 19-2 化学修饰蛋白质常用的特殊试剂	233	19.1. 蛋白质的氨基酸残基修饰后的化学性质	240
		表 19-4 修饰氨基酸的鉴定方法	240

19.2. 蛋白质修饰的特殊要求	241	顺序及修饰基的供应者	241
19.3. 修饰后蛋白质的生理作用	241	表 19-6 蛋白质修饰作用的抑制剂	242
表 19-5 蛋白质修饰的识别区氨基酸		参考文献	242

20. 核酸及其组成成分

20.1. 基本结构	243	20.5. 常用的核酸换算公式及某些核酸的性质	250
图 20-1 碱基、核苷及核苷酸的结构	244	表 20-5 常用的核酸换算公式	250
图 20-2 修饰碱基的结构	244	表 20-6 常见核酸的长度和分子量	251
图 20-3 DNA 中的碱基配对	245	图 20-4 DNA 长度与分子量的关系	251
20.2. 物理化学性质	245	20.6. 核酸的纯化与浓缩	252
表 20-1 碱基、核苷及核苷酸的性质	245	表 20-7 核酸纯化与浓缩的方法	252
表 20-2 三核苷酸的物理化学性质	246	表 20-8 用乙醇沉淀时的盐溶液	252
20.3. 核苷酸的衍生物	247	图 20-5 Centricon 的装置	253
表 20-3 核苷酸的衍生物	247	表 20-9 离心小柱(Centricon)特性	253
20.4. 核酸含量的测定	249	表 20-10 离心小柱(microSpin columns)特性	254
表 20-4 核酸含量的测定方法	249	参考文献	254

21. 核酸的凝胶电泳

21.1. 凝胶及其浓度的选择和配制	255	胶的配制(改进方法)	259
表 21-1 不同浓度琼脂糖的分离范围	255	表 21-12 凝胶阻滞分析	260
表 21-2 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶中的有效分离范围	255	表 21-13 分析 DNA-蛋白质复合物的琼脂糖-丙烯酰胺平板电泳凝胶配制	260
表 21-3 琼脂糖电泳中可采用的琼脂糖型号和应用范围	256	21.2. 电泳缓冲液	260
表 21-4 不同浓度聚丙烯酰胺凝胶的配制	257	表 21-14 常用的电泳缓冲液	260
表 21-5 分离核糖核蛋白体与聚核糖核蛋白体聚丙烯酰胺凝胶的配制	257	表 21-15 变性琼脂糖凝胶电泳	261
表 21-6 双向电泳分离 RNA 片段凝胶的配制	258	表 21-16 电泳加样缓冲液	262
表 21-7 小 RNA 的电泳分离	258	21.3. 凝胶中核酸的染色	262
表 21-8 双向电泳分离 DNA 限制酶片段凝胶的配制	258	表 21-17 凝胶中核酸的染色	263
表 21-9 双向变性电泳分离 DNA 片段梯度凝胶的配制	259	21.4. 核酸分子量标准参照物	263
表 21-10 双向电泳分离寡核苷酸凝胶的配制	259	图 21-1 DNA 分子量标准参照物一览图	264
表 21-11 双向电泳分离寡核苷酸凝胶的配制(改进方法)	259	表 21-18 λ 噬菌体 DNA 限制酶片段长度(bp)	264
		表 21-19 pBR322 DNA 限制酶片段长度(bp)	265
		表 21-20 ϕ X174 DNA 限制酶片段长度(bp)	265
		表 21-21 脉冲场电泳(PFGE)分子量标准参照物	266
		表 21-22 RNA 分子量标志物	266

表 21-23 RNA 分子量标准参照物	267	参考文献	267
----------------------	-----	------	-----

22. 核酸研究的工具酶——限制性内切酶与甲基化酶

22.1. 限制性内切酶的分类和识别序列	268	22.5. 酶末端的改造及应用	291
表 22-1 三类限制性内切酶的特性	268	表 22-12 平整末端连接产物可被重新切割的限制酶	291
表 22-2 具有回文结构的 4 与 6 核苷酸识别序列	269	表 22-13 粘性末端连接产物可被重新切割的限制酶	299
表 22-3 具有回文结构的 5 核苷酸识别序列	271	表 22-14 补齐 5' 端突出单链连接构建限制酶新切割位点	302
表 22-4 识别序列大于 6 核苷酸的限制酶	273	表 22-15 除去 3' 端突出单链连接构建限制酶新切割位点	303
表 22-5 识别被一个或数个核苷酸间隔的回文序列的限制酶	273	22.6. 甲基化酶	304
表 22-6 有多个识别位点的限制酶	274	表 22-16 对序列特异甲基化作用敏感性不同的若干对同裂酶	305
表 22-7 识别非回文序列的限制酶	275	表 22-17 限制酶识别序列甲基化后与酶活力的关系	306
表 22-8 以字母排列的限制酶识别序列	276	表 22-18 应用甲基化改变限制酶的切割特异性	316
22.2. 同裂酶	278	表 22-19 应用甲基化改变限制酶的切割特异性	317
表 22-9 同裂酶	279	表 22-20 DNA 甲基化转移酶及其特性	318
22.3. 酶的切割方式	284	参考文献	319
22.4. 酶的反应条件	285		
表 22-10 商品化限制酶的反应条件	286		
表 22-11 有星号活性的一些限制酶	290		

23. 其他核酸研究工具酶

23.1. DNA 聚合酶	320	聚合酶的特性	323
23.1.1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I(全酶)	320	23.1.6. 逆转录酶	324
图 23-1 DNA 聚合酶 I 的作用方式	320	表 23-3 依赖于模板的 DNA 聚合酶的比较	324
图 23-2 DNA 聚合酶的作用方式(交换反应)	320	23.2. RNA 聚合酶	325
23.1.2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段)	321	23.2.1. SP6 噬菌体 RNA 聚合酶	325
23.1.3. T4 噬菌体 DNA 聚合酶	321	23.2.2. T3 与 T7 噬菌体 RNA 聚合酶	325
23.1.4. T7 噬菌体 DNA 聚合酶	321	23.3. 核酸酶	326
23.1.5. Taq DNA 聚合酶	322	23.3.1. BAL 31 核酸酶	326
表 23-1 Perkin Elmer 公司的一些耐热 DNA 聚合酶的特性	322	图 23-3 结合 BAL 31 核酸酶的外切活性与内切活性缩短 DNA 片段的示意图	326
表 23-2 其他公司的一些耐热 DNA		23.3.2. S1 核酸酶	326
		23.3.3. 绿豆核酸酶	326

23.3.4. S7 核酸酶	327	23.7. 末端修饰酶	330
23.4. 核糖核酸酶	327	23.7.1. T4 噬菌体多核苷酸激酶	330
23.4.1. 核糖核酸酶 A	327	图 23-6 T4 多核苷酸激酶的激酶反应	330
图 23-4 核糖核酸酶 A 的作用方式	327	图 23-7 T4 多核苷酸激酶的交流反应	330
23.4.2. 核糖核酸酶 T1	327	23.7.2. 碱性磷酸酶	331
图 23-5 核糖核酸酶 T1 的作用方式	327	表 23-5 T4 噬菌体多核苷酸激酶的特性	331
23.4.3. 核糖核酸酶 H	328	23.7.3. 末端脱氧核苷酸转移酶	332
23.5. 脱氧核糖核酸酶	328	23.8. DNA 结合蛋白	332
23.5.1. 脱氧核糖核酸酶 I	328	23.8.1. 单链 DNA 结合蛋白	332
23.5.2. 外切核酸酶 III	328	23.8.2. RecA 蛋白	332
23.5.3. λ 噬菌体外切核酸酶	329	23.8.3. DNA 拓扑异构酶 I 和 II	332
23.5.4. T7 核酸酶	329	23.9. 核酸工具酶的应用	333
23.6. 连接酶	329	表 23-6 DNA 和 RNA 聚合酶的应用	333
23.6.1. T4 噬菌体 DNA 连接酶	329	表 23-7 核酸酶的应用	334
表 23-4 T4 噬菌体 DNA 连接酶的特性	329	表 23-8 连接酶及其他酶的应用	334
23.6.2. 大肠杆菌连接酶	330	参考文献	335
23.6.3. T4 噬菌体 RNA 连接酶	330		
23.6.4. Taq DNA 连接酶	330		

24. 杂交分析

24.1. 核酸杂交滤膜	336	表 24-9 典型的预杂交/杂交溶液	341
表 24-1 用于固定核酸的滤膜的性质	336	表 24-10 对于不同应用的预杂交/杂交溶液及杂交温度	341
表 24-2 各种类型固定滤膜的推荐使用	337	表 24-11 典型的杂交后冲洗条件	342
24.2. 影响杂交的因素	338	24.4. 使用寡聚核苷酸探针的滤膜杂交	342
表 24-3 影响核酸杂交体 T_m 的因素	338	24.4.1. 单一的寡聚核苷酸探针杂交	342
表 24-4 T_m 计算公式	338	表 24-12 寡聚核苷酸浓度计算资料	342
表 24-5 影响核酸杂交速率的因素	339	表 24-13 不同长度及碱基组成的寡聚核苷酸的 T_m ($^{\circ}\text{C}$)	344
24.3. 试剂和杂交条件	339	24.4.2. 混合的寡聚核苷酸探针杂交	345
表 24-6 杂交分析中使用的高盐溶液	339	表 24-14 不同氨基酸的密码选择	345
表 24-7 滤膜杂交常用的阻塞剂	340	参考文献	345
表 24-8 对阻塞剂选择的推荐	340		

25. 核酸探针的非放射性标记与检测

25.1. 引言	346	种方法示意图	363
25.2. 标准指示剂系统	347	25.5. 印迹步骤	364
图 25-1 四种非放射性标记物的结构	347	25.5.1. 斑点印迹	364
25.2.1. 地高辛配基系统	348	25.5.2. Southern 印迹	364
25.2.2. 生物素系统	348	25.5.3. Northern 印迹	364
25.2.3. 荧光素系统	348	25.6. 用非放射性核酸探针进行杂交	364
25.2.4. 二硝基苯基系统	348	25.6.1. 用 DIG 标记的探针进行杂交	365
25.2.5. 碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶系统	349	表 25-5 DIG 标记探针的杂交	365
25.3. 标准的标记、杂交和检测方法	349	25.6.2. 其他非放射性探针的杂交	366
表 25-1 标准标记、杂交和检测方法的综合	349	25.7. 检测	367
25.4. 核酸探针的非放射性标记	349	25.7.1. 光学检测	367
25.4.1. DNA 标记	350	25.7.2. 化学发光检测	368
表 25-2a 用于非放射性标记的主要试剂	351	25.7.3. 检测试剂	369
表 25-2b 核酸探针的一些非放射性标记方法	354	25.8. 非放射性探针膜的重新杂交	370
图 25-2 PCR 原理示意图	358	25.8.1. 化学发光检测后从膜上移去 DIG 标记 DNA 或寡核苷酸探针的试剂和方法	370
25.4.2. RNA 的标记	359	25.8.2. 化学发光检测后从膜上移去 DIG 标记的 RNA 探针的试剂和方法	371
25.4.3. 寡脱氧核苷酸的标记	360	25.9. 故障咨询	371
表 25-3 寡脱氧核苷酸的标记反应	361	25.9.1. 检测的灵敏度低	371
表 25-4 任一核苷酸混合物的平均加尾长度和掺入比率	361	25.9.2. 高本底	373
图 25-3 合成非放射性核酸探针的		参考文献	373

26. 核酸序列分析

26.1. 末端终止法测序	375	377
26.1.1. 末端终止法测序有关缓冲液	375	26.1.3. 模板的选择和制备	377
26.1.2. 双脱氧核苷酸的结构图及其测序核苷酸混合液	376	表 26-5 末端标记引物测序法模板 DNA 的用量	378
表 26-1 Taq DNA 聚合酶常规测序核苷酸混合液成分	376	表 26-6 银染法所需 DNA 模板量	378
表 26-2 Taq DNA 聚合酶 Deaza-GTP 测序核苷酸混合液成分	376	表 26-7 ABI 公司荧光标记 ddNTP 热循环测序所需 DNA 模板量	378
表 26-3 银染法 DNA 测序核苷酸混合液成分	377	26.1.4. 测序引物	378
表 26-4 Sequenase 测序终止液成分	377	表 26-8 不同长度的引物相当于 10 pmol 的 ng 数	378
		表 26-9 测序引物的种类及其顺序	379

26.1.5.	测序酶.....	379	表 26-15	DNA 末端标记方法	381
表 26-10	测序酶性质比较	379	26.2.2.	化学法 DNA 测序的碱基特 异性裂解反应.....	381
26.1.6.	掺入放射性核素的有关性质	379	表 26-16	碱基特异性裂解反应	381
表 26-11	掺入放射性核素的有关性 质	379	26.2.3.	碱基特异性裂解反应过程 ...	382
表 26-12	相当于 10 pmol 的不同放射 性比活 γ - ^{32}P -ATP 的体积...	380	表 26-17	化学法测序特异碱基反应过 程	382
26.1.7.	测序凝胶的组成	380	26.3.	核酸序列数据库	383
表 26-13	测序凝胶的组成	380	26.3.1.	Genbank 等大型核酸序列数 据库.....	383
26.1.8.	测序凝胶中示踪染料相当 DNA 碱基对数	380	26.3.2.	特定序列数据库和一些序列 分析软件.....	385
表 26-14	测序凝胶中示踪染料与 DNA 碱基对数的关系	380	26.3.3.	其他有用的生物系资源.....	387
26.1.9.	银染法 DNA 测序系统	380	表 26-18	E-mail 服务器和地址以及其 功能	388
26.2.	化学法测序	381	表 26-19	BLAST 和 RETRIEVE 可以 查寻的数据库及其缩写名 ...	389
26.2.1.	用于 DNA 测序的 ^{32}P 末端 标记反应.....	381	参考文献		390

27. 常用的克隆载体和宿主系统

27.1.	质粒载体	391	图 27-10	λ gt11 载体图谱.....	422
27.1.1.	克隆载体.....	392	图 27-11	λ TripIEx 载体图谱	423
图 27-1	pBR322 的质粒图谱	392	27.2.2.	置换型载体.....	424
图 27-2	pUC18/19 的质粒图谱	393	图 27-12	EMBL4 载体图谱	425
27.1.2.	PCR 产物克隆及表达载体...	396	27.3.	宿主系统	426
27.1.3.	表达载体.....	399	27.3.1.	常用于分子克隆的宿主系统 的基因型.....	426
图 27-3	pTrc 99A 的质粒图谱	401	表 27-1	分子克隆常用宿主系统的基 因型	426
图 27-4	pGEMEX-1/2 的质粒图谱 ...	402	27.3.2.	常用宿主菌株的遗传标记	428
图 27-5	pTrcHis 的质粒图谱	404	表 27-2	常用宿主菌株的遗传标记	428
图 27-6	pTet-Off 和 pTet-On 的质粒 图谱	409	27.3.3.	各种克隆载体的常用宿主系 统.....	429
图 27-7	pcDNA 3.1 的质粒图谱	412	表 27-3	各种克隆载体常用的宿主系 统	429
27.1.4.	突变载体——pALTER ...	417	参考文献		430
图 27-8	pALTER 的质粒图谱.....	417			
27.1.5.	报告载体.....	418			
图 27-9	报告载体的质粒图谱	418			
27.2.	λ 噬菌体载体.....	421			
27.2.1.	插入型载体.....	421			

附 录

1. 国际原子量表	431	8. 几种常用实验动物的总血液量	438
2. 系统国际单位制	434	9. 几种常用实验动物的采血量和采血 方法	439
3. 用于化合物名词的数字前缀	435	10. 标准筛目与其直径尺寸对照表	439
4. SI 单位的前缀	435	11. 各种铬酸洗液	440
5. 罗马数字表	436	12. 生物化学和分子生物学研究中常用的部 分专业性期刊	441
6. 希腊字母表	436		
7. 常用实验动物的选择	437		

1. 酸、碱、盐和有机溶剂的基本数据 非离子合成聚合物的特性及指示剂

1.1. 酸、碱、盐及有机溶剂的基本数据

酸、碱、盐及有机溶剂是实验室中最常用的试剂,表 1-1、1-2 及 1-4 分别列出了它们的性质。表 1-3 是常用酸及碱溶液的浓度和密度。化学试剂中有许多是有害的和有危险性的,操作时应注意安全。

表 1-1 常用酸及碱的性质

名称	分子式	分子量	密度 (20℃)	重量 百分比	mol/L	配制 1mol/L 溶液 的加入量(ml/L)	危险性	安全 措施
酸								
冰乙酸	CH ₃ COOH	60.05	1.05	99.5	17.4	57.5	R10,R35	S2,S23,S26
乙酸			1.045	36	6.27	159.5		
甲酸	HCOOH	46.03	1.22	90	23.6	42.4	R35	S2,S3,S23,S26
				98	25.9	38.5		
盐酸	HCl	36.46	1.18	36	11.6	85.9	R34-37	S2,S26
硝酸	HNO ₃	63.02	1.42	71	15.99	62.5	R35	S2,S23,S26,S27
			1.40	67	14.9	67.1		
			1.37	61	13.3	75.2		
正磷酸	H ₃ PO ₄	98.00	1.7	85	14.7	67.8	R34	S26
硫酸	H ₂ SO ₄	98.07	1.84	96	18.3	54.5	R35	S2,S26,S30
高氯酸	HClO ₄	100.5	1.67	70	11.65	85.8	R35	S2,S23,S26,S27
			1.54	60	9.2	198.7		
碱								
氨水	NH ₄ OH	17.03	0.91	25	13.3	75.1	R34,R36,	S2,S3,S7,S26
			0.88	35	18.1	55.2	R37/R38	
氢氧化钾	KOH	56.11	2.0	固体			R35	S2,S26,S37,S39
氢氧化钠	NaOH	40.0	2.12	固体			R35	S2,S26,S37,S39

注:危险性与安全措施见表 13-5,13-6。

本表引自 Chambers, J A A, Rickwood, D. Biochemistry: LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

表 1-2 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值

溶 质	1N*	0.1N	0.01N	0.001N
乙酸	2.4	2.9	3.4	3.9
盐酸	0.10	1.07	2.02	3.01
硫酸	0.3	1.2	2.1	
柠檬酸		2.1	2.6	
氢氧化铵	11.8	11.3	10.8	10.3
氢氧化钠	14.05	13.07	12.12	11.13
碳酸氢钠		8.4		
碳酸钠		11.5	11.0	

注：* N 为当量浓度 [$N \approx (\text{mol/L}) \times \text{离子价数}$]。

本表引自金冬雁等译, 分子克隆实验指南(第 2 版), 科学出版社, 1992。

表 1-3 常用酸及碱溶液的浓度和密度

硝酸溶液的浓度和密度					
密度 20°C g/ml	HNO ₃ 浓度		密度 20°C g/ml	HNO ₃ 浓度	
	g/100g 溶液	mol/L		g/100g 溶液	mol/L
1.000	0.333	0.0523	1.300	48.42	9.990
1.020	3.982	0.6445	1.320	51.71	10.83
1.040	7.530	1.243	1.340	55.13	11.72
1.060	10.97	1.845	1.360	58.78	12.68
1.080	14.31	2.453	1.380	62.70	13.73
1.100	17.58	3.068	1.400	66.97	14.88
1.120	20.79	3.696	1.420	71.63	16.14
1.140	23.94	4.330	1.440	76.71	17.53
1.160	27.00	4.970	1.460	82.39	19.03
1.180	30.00	5.618	1.480	89.07	20.92
1.200	32.94	6.273	1.500	96.73	23.02
1.220	35.93	6.956	1.504	97.74	23.33
1.240	39.02	7.679	1.508	98.76	23.63
1.260	42.14	8.426	1.511	99.52	23.86
1.280	45.27	9.195	1.513	100.00	24.01

硫酸溶液的浓度和密度								
密度 20℃		H ₂ SO ₄ 浓度		密度 20℃		H ₂ SO ₄ 浓度		
g/ml	g/100g 溶液	mol/L	g/ml	g/100g 溶液	mol/L	g/ml	g/100g 溶液	mol/L
1.000	0.2609	0.02660	1.460	56.41	8.397	1.460	56.41	8.397
1.020	3.242	0.3372	1.480	58.31	8.799	1.480	58.31	8.799
1.040	6.237	0.6613	1.500	60.17	9.202	1.500	60.17	9.202
1.060	9.129	0.9865	1.520	62.00	9.608	1.520	62.00	9.608
1.080	11.96	1.317	1.540	63.81	10.02	1.540	63.81	10.02
1.100	14.73	1.652	1.560	65.59	10.43	1.560	65.59	10.43
1.120	17.43	1.990	1.580	67.35	10.85	1.580	67.35	10.85
1.140	20.08	2.334	1.600	69.09	11.27	1.600	69.09	11.27
1.160	22.67	2.681	1.620	70.82	11.70	1.620	70.82	11.70
1.180	25.21	3.033	1.640	72.52	12.13	1.640	72.52	12.13
1.200	27.72	3.391	1.660	74.22	12.56	1.660	74.22	12.56
1.220	30.18	3.754	1.680	75.92	13.00	1.680	75.92	13.00
1.240	32.61	4.123	1.700	77.63	13.46	1.700	77.63	13.46
1.260	35.01	4.498	1.720	79.37	13.92	1.720	79.37	13.92
1.280	37.36	4.876	1.740	81.16	14.40	1.740	81.16	14.40
1.300	39.68	5.259	1.760	83.06	14.90	1.760	83.06	14.90
1.320	41.95	5.646	1.780	85.16	15.46	1.780	85.16	15.46
1.340	44.17	6.035	1.800	87.69	16.09	1.800	87.69	16.09
1.360	46.33	6.424	1.820	91.11	16.91	1.820	91.11	16.91
1.380	48.45	6.817	1.824	92.00	17.11	1.824	92.00	17.11
1.400	50.50	7.208	1.828	93.03	17.34	1.828	93.03	17.34
1.420	52.51	7.603	1.832	94.32	17.62	1.832	94.32	17.62
1.440	54.49	8.000	1.835	95.72	17.91	1.835	95.72	17.91

盐酸溶液的浓度和密度								
密度 20℃		HCl 浓度		密度 20℃		HCl 浓度		
g/ml	g/100g 溶液	mol/L	g/ml	g/100g 溶液	mol/L	g/ml	g/100g 溶液	mol/L
1.0000	0.3600	0.09872	1.110	22.33	6.796	1.110	22.33	6.796
1.010	2.364	0.6547	1.120	24.25	7.449	1.120	24.25	7.449
1.020	4.388	1.227	1.130	26.20	8.118	1.130	26.20	8.118
1.030	6.433	1.817	1.140	28.18	8.809	1.140	28.18	8.809
1.040	8.490	2.421	1.150	30.14	9.505	1.150	30.14	9.505
1.050	10.52	3.029	1.160	32.14	10.225	1.160	32.14	10.225
1.060	12.51	3.638	1.170	34.18	10.97	1.170	34.18	10.97
1.070	14.495	4.253	1.180	36.23	11.73	1.180	36.23	11.73
1.080	16.47	4.878	1.190	38.32	12.50	1.190	38.32	12.50
1.090	18.43	5.5095	1.198	40.00	13.14	1.198	40.00	13.14
1.100	20.39	6.150						

乙酸溶液的浓度和密度					
密度 20℃ g/ml	HAc 浓度		密度 20℃ g/ml	HAc 浓度	
	g/100g 溶液	mol/L		g/100g 溶液	mol/L
1.000	1.20	0.200	1.050	40.2	7.03
1.010	8.14	1.37	1.060	53.4	9.43
1.020	15.4	2.61	1.070	77~79	13.7~14.1
1.030	23.1	3.96	1.060	95.4	16.8
1.040	31.6	5.46	1.050	99.9	17.5

氨水溶液的浓度和密度					
密度 20℃ g/ml	NH ₃ 浓度		密度 20℃ g/ml	NH ₃ 浓度	
	g/100g 溶液	mol/L		g/100g 溶液	mol/L
0.998	0.0465	0.0273	0.934	16.65	9.13
0.994	0.977	0.570	0.930	17.85	9.75
0.990	1.89	1.10	0.926	19.06	10.37
0.986	2.82	1.635	0.922	20.27	10.97
0.982	3.78	2.18	0.918	21.50	11.59
0.978	4.76	2.73	0.914	22.75	12.21
0.974	5.75	3.29	0.910	24.03	12.84
0.970	6.75	3.84	0.906	25.33	13.48
0.966	7.77	4.41	0.902	26.67	14.12
0.962	8.82	4.98	0.898	28.00	14.76
0.958	9.87	5.55	0.894	29.33	15.40
0.954	10.95	6.13	0.890	30.685	16.04
0.950	12.03	6.71	0.886	32.09	16.69
0.946	13.24	7.29	0.884	32.84	17.05
0.942	14.29	7.91	0.882	33.595	17.40
0.938	15.47	8.52	0.880	34.35	17.75

表 1-4 常用盐的性质

名称	分子式	分子量	溶解度(g/100ml 水)		危险性	安全措施
			冷(°C)	热(°C)		
醋酸铵	CH ₃ COONH ₄	77.08	148(4)	分解	—	—
氯化铵	NH ₄ Cl	53.49	29.7(0)	75.8(100)	—	—
硝酸铵	NH ₄ NO ₃	80.04	118.3(0)	871(100)	R8—9	S24—25
硫酸铵	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.13	70.6(0)	103.8(100)	—	—
氯化钙	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	97.7(0)	326(60)	—	—
氯化钙	CaCl ₂ ·6H ₂ O	219.08	279(0)	536(20)	—	—
次氯酸钙	Ca(HOCl ₂)	142.99	溶	溶	R8,R31,R34	S2,S26,S43
氯化锂	LiCl	42.39	63.7(0)	130(95)	R22	S24/S25
醋酸镁	(CH ₃ COO) ₂ Mg·4H ₂ O	214.4	120(15)	极易溶	—	—
氯化镁	MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.3	167(0)	367(100)	—	—
硝酸镁	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256.41	125(0)	极易溶	—	—
硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	71(20)	91(40)	—	—
氯化锰	MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.9	151(8)	656(100)	—	—
硫酸锰	MnSO ₄ ·7H ₂ O	223.06	172	—	—	—
醋酸钾	CH ₃ COOK	98.14	253(20)	492(62)	—	—
氯化钾	KCl	74.55	34.7(20)	56.7(100)	—	—
碘化钾	KI	166.00	127.5(0)	208(100)	—	—
硝酸钾	KNO ₃	101.1	13.3(0)	247(100)	R8,R12	—
高锰酸钾	KMnO ₄	158.03	6.4(20)	25(65)	R8,R22	S2,S24/S25,S27
酒石酸 钾钠	KOCOC(OH) CH(OH)COONa·4H ₂ O	282.22	26(0)	66(25)	—	—
硫酸钾	K ₂ SO ₄	174.52	12(25)	24.1(100)	—	—
氯化钠	NaCl	58.44	35.7(0)	39.1(100)	—	—
焦亚硫酸钠	Na ₂ S ₂ O ₅	190.1	54(20)	81.7(100)	R31	—
硝酸钠	NaNO ₃	84.99	92.1(25)	180(100)	R8,R22	—
亚硝酸钠	NaNO ₂	69.0	81.5(15)	163(100)	R8,R25,R31	S44
水杨酸钠	C ₆ H ₄ (OH)·COONa	160.1	111(15)	125(25)	—	—
琥珀酸钠	(CH ₂ COONa) ₂ ·6H ₂ O	270.14	21.5(0)	86.6(75)	—	—
硫酸钠	Na ₂ SO ₄	142.04	4.7(0)	42.7(100)	—	—
	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	322.19	11(0)	92.7(30)	—	—
氯化锌	ZnCl ₂	136.29	423(25)	615(100)	R34	S7/S8,S28
硫酸锌	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	96.5(20)	663.6(100)	—	S22,S24/S25

危险性与安全措施见表 13-5, 13-6。

本表引自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry: LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

表 1-5 常用有机溶剂的性质

名称	分子量	熔点 (°C)	沸点 (°C)	闪点 (°C)	密度*	溶解性	危险性	安全措施
丙酮 (acetone)	58.08	-94	56.5	-18	0.788	与水,醇,醚等混溶	R10, R20, R21	S16, S23/S24
乙腈 (acetonitrile)	53.06	-83.5	77.3	0	0.806	溶于水,醇,醚	R21,R23	S23,S24 S27
苯 (benzene)	78.11	5.5	80.1	-11	0.878	微溶于水,与醚、丙酮、苯、氯仿等混溶	R25,R26	S20,S21
正丁醇 (n-butanol)	74.1	-89	118	29	0.81	溶于水,与醇,醚等混溶	R10, R18, R20	S16
氯仿 (chloroform)	119.4	-63	61	-	1.48	微溶于水,与醇,醚及有机溶剂混溶	R20	S2, S24/ S25
N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-dimethyl formamide)	73.1	-16	153	57	0.95	易溶于水,能与多种有机溶剂混溶	R20/R21, R36	S26, S28,S36
二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)	78.1	18	190	95	1.10	易溶于水,醚,丙酮及氯仿等	R22	S24/S25
乙醇 (ethanol)	46.1	-117	78	13	0.8	易溶于水及多种有机溶剂	R11	S7,S16
乙醚 (ether)	74.12		34.6	-40	0.714	微溶于水,易溶于多种有机溶剂	R12, R20, R23	S16, S23,S24
乙酸乙酯 (ethyl acetate)	88.1	-83	77	7.2	0.898	能溶于水,能与醇、醚及氯仿等混合	R23	S23
甲醛 (formaldehyde)	30.0	-	96	49	1.08	溶于水及醇	R10, R23/ R24, R25, R43	S2, S26, S28
甲酰胺 (formamide)	45.1	2.5	210	154	1.13	溶于水及醚	R23/R24/ R25	S23, S24,S25
甘油(glycerol)	92.1	18	290	160	1.26	溶于水及醇,不溶于醚、氯仿及酚	-	-

续表 1-5

名称	分子量	熔点 (°C)	沸点 (°C)	闪点 (°C)	密度 ^a	溶解性	危险性	安全措施
异戊醇 (isoamyl alcohol)	88.2	-117	130	45	0.81	微溶于水,能溶于醇,醚,苯,氯仿,冰醋酸和油混合	刺激性	
异丙醇 (isopropanol)	60.1	-89.5	82.4	22	0.79	与水,醇,氯仿混溶	R2,R36/R38	S23
甲醇 (methanol)	32.04	-97.8	64	12	0.81	能溶于水,醇,醚等	R23/R24	S23,S24
酚 (phenol)	94.1	41	182	80	1.07	溶于水,酒精,醚,氯仿,甘油及石油	R24/R25, R34	S2,S28, S44
硅化溶液 (siliconizing solution)	129.06		—		1.31	不溶于水	R20/R22	S2,S24/ S25
甲苯 (toluene)	92.13	-95	110.6	4.4	0.866	微溶于水,能与醇、醚及氯仿等混合	R23	S23
二甲苯 (xylene)	106.16		137~140	29	0.86	不溶于水,溶于醇及醚	R23	S23
吡啶 (pyridine)	79.10		115~116	23	0.98	溶于水,醇,醚,苯,石油醚及脂肪酸	R26,R37	S23

a: 危险性与安全措施见表 13-5,13-6。

b: 市售的硅化溶液为溶于 1,1,1-三氯乙烷的 2%二甲基二氯硅烷(dimethyldichlorosilane)溶液。

c: 作为溶剂的二甲苯是邻、间与对位三种异构体的混合物,没有明显的熔点与沸点。

d: 除苯与异戊醇为 15°C 时的密度外,其他均为 20°C 的密度。

1.2. 非离子合成聚合物

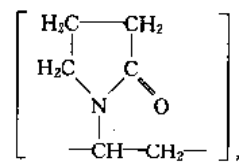
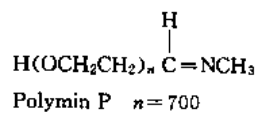
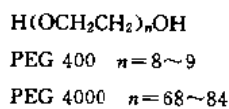
以下一些非离子合成聚合物在细胞生物学与分子生物学中都很有用处。常用于核酸的杂交反应、细胞培养的介质、沉淀嗜菌体及分离质粒 DNA 等。

表 1-6 一些非离子合成聚合物的物理与化学特性数据

化合物	平均分子量	水中的溶解度	用途
葡聚糖硫酸酯系列 (dextran sulfate)	5 000 8 000 10 000 50 000	溶解	核酸杂交, 密度梯度 离心介质
聚蔗糖 70(ficoll) 聚蔗糖 400	~70 000 ~400 000	易溶	密度梯度离心介质, 细胞培养 介质
聚乙二醇系列 (polyethylene glycol, PEG)			
PEG 200	200	易溶	核酸杂交, 沉淀嗜菌体, 分离 质粒, 促进核酸片段平端连接
PEG 300	300		
PEG 400	400		
PEG 550	550		
PEG 600	600		
PEG 1 000	1 000		
PEG 1 450	1 450		
PEG 1 500	1 500		
PEG 2 000	2 000		
PEG 3 000	3 000		
PEG 3 350	3 350		
PEG 4 000	4 000		
PEG 6 000	6 000		
PEG 8 000	8 000		
PEG 10 000	10 000		
PEG 12 000	12 000		
PEG 20 000	20 000		
PEG 35 000	35 000		
Polymin P (polyethyleneimine)	30 000~40 000	易溶	
Polymin P	60 000~750 000	易溶	
聚乙烯吡咯烷酮系列 (polyvinylpyrrolidone, PVP)*			
PVP 10(K15)	10 000	易溶	核酸杂交 组织培养介质
PVP K25	24 000		
PVP 40	40 000		
PVP K60	160 000		
PVP 360(K90)	360 000		

葡聚糖硫酸酯是一种具有高度支链的葡聚糖。ficoll 400 是具有高度支链的蔗糖和氯代氧丙烷的共聚体。

* PVP K 系列为 Fluka 公司产品, 其他为 Sigma 公司产品。



PVP 重复单位

1.3. 指示剂

使用酸碱指示剂来测定溶液的 pH 值是许多测定方法中常用者之一。指示剂一般多为弱的有机酸或弱的有机碱以及一些两性物质,种类繁多,但在实际应用中有些指示剂因其在近似的 pH 范围内所显示的颜色基本相同,故在众多的指示剂中有些很少使用。本章仅择其常用者列出。

1.3.1. 常用的酸碱指示剂

见表 1-7。

表 1-7 一些常用的酸碱指示剂

指示剂名称		配制方法 0.1 克溶于 250 ml 下列溶剂	颜色		变色 pH 范围
中文名称	英文名称		酸	碱	
甲酚红(酸范围)	cresol red(acid range)	水,含 2.62ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	0.2~1.3
间苯甲酚紫(酸范围)	m-cresolpurple(acid range)	水,含 2.72ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	1.0~2.6
麝香草酚蓝(酸范围)	thymol blue(acid range)	水,含 2.15ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	1.2~2.8
甲基黄	methyl yellow	90%乙醇	红	黄	2.9~4.0
溴酚蓝	bromophenol blue	水,含 1.49ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫	3.0~4.6
四溴酚蓝	tetrabromophenol blue	水,含 1.0ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	3.0~4.6
刚果红	congo red	水或 80%乙醇	紫	红橙	3.0~5.0
甲基橙	methyl orange	游离酸;水	红	橙黄	3.1~4.4
		钠盐;水,含 3ml 0.1mol/L NaOH			
溴甲酚绿(蓝)	bromocresol green(blue)	水,含 1.43ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	3.6~5.2
甲基红	methyl red	钠盐;水	红	黄	4.2~6.3
		游离酸;60%乙醇			
氯酚红	chlorophenol red	水,含 2.36ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫红	4.8~6.4
溴甲酚紫	bromocresol purple	水,含 1.85ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫	5.2~6.8
石蕊	litmus	水	红	蓝	5.0~8.0
溴麝香草酚蓝	bromothymol blue	水,含 1.6ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	6.0~7.6
酚红	phenol red	水,含 1.82ml 0.1mol/L NaOH	黄	红	6.8~8.4
中性红	neutral red	70%乙醇	红	橙棕	6.8~8.0
甲酚红(碱范围)	cresol red	水,含 2.62ml 0.1mol/L NaOH	黄	红	7.2~8.8
间苯甲酚紫(碱范围)	m-cresol purple(basic range)	水,含 2.62ml 0.1mol/L NaOH	黄	红紫	7.6~9.2
麝香草酚蓝(碱范围)	thymol blue	水,含 2.15ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	8.0~9.6
酚酞	phenolphthalein	70~90%乙醇 (60%2-乙氧基乙醇)	无色	桃红	8.3~10.0
麝香草酚酞	thymol phthalein	90%乙醇	无色	蓝	9.3~10.5
茜素黄	alizarin yellow	乙醇	黄	红	10.1~12.0
金莲橙 O	tropeolin O	水	黄	橙	11.1~12.7

1.3.2. 通用指示剂

通用指示剂是由三或四种不同 pH 范围的指示剂混合配制而成的,然后用 0.1mol/L NaOH 调成黄色或绿色。这种指示剂仅能用于粗略地测定溶液的 pH 值。

通用指示剂配方 1:溶解 60mg 甲基黄,40mg 甲基红,80mg 溴麝香草酚蓝和 20mg 酚酞于 100ml 95%乙醇中,并加入 0.1mol/L NaOH 溶液调整指示剂的颜色,使之成为黄色。

通用指示剂配方 2:溶解 1.5mg 甲基红,60mg 溴麝香草酚蓝和 64mg 酚酞于 100ml 50%乙醇,并加入 0.1mol/L NaOH 溶液调整指示剂的颜色,使之成为绿色。

两种配方的通用指示剂在不同的 pH 时所显示的颜色,见表 1-8。

表 1-8 两种配方的通用指示剂在不同 pH 时所显示的颜色

显示的颜色			显示的颜色		
pH	配方 1	配方 2	pH	配方 1	配方 2
1	樱桃红	红色	7	浅黄~绿色	浅绿~黄色
2	玫瑰色	红色	8	绿色	绿色
3	红橙色	红色	9	浅蓝~绿色	浅绿~蓝色
4	橙红色	深红色	10	蓝色	紫色
5	橙色	橙红色	11		浅红~紫色
6	黄色	橙黄色			

1.3.3. 混合指示剂

混合指示剂一般均为由两种指示剂以不同含量混合配制而成,虽在配制时稍繁琐些,但因其具有较准的变色点 pH,故常为人们所选用。下表只列出其变色点为 3~11 范围者。

表 1-9 混合指示剂的变色范围

指示剂		含量 (%)	溶剂	变色点 pH	颜色变化		
中文名称	英文名称				酸性	过渡色	碱性
二甲基黄	dimethyl yellow	0.05	乙醇	3.2	蓝~紫	—	深紫
亚甲蓝	methylene blue	0.05					
甲基橙	methyl orange	0.02	50%乙醇	3.9	红	灰	绿
二甲苯蓝 FF	xylene blue	0.28					
甲基黄	methyl yellow	0.08	乙醇	3.9	粉红	淡粉	黄~绿
亚甲蓝	methylene blue	0.004					
甲基橙	methyl orange	0.1	水	4.1	紫	灰	黄~绿
靛红	indigocarmine	0.25					
溴甲酚绿	bromocresol green	0.1	水	4.3	橙	淡绿	深绿
甲基橙	methyl orange	0.02					

续表 1-9

中文名称	指示剂		溶剂	变色点 pH	颜色变化		
	英文名称	含量 (%)			酸性	过渡色	碱性
甲基红 溴甲酚绿	methyl red bromocresol green	0.05 0.075	乙醇	5.1	酒红	—	绿
甲基红 亚甲蓝	methyl red methylene blue	0.1 0.05	乙醇	5.4	红~紫	褐蓝	绿
溴甲酚绿 氯酚红	bromocresol green chlorophenol red	0.05 0.05	水	6.1	黄~绿	—	蓝~紫
溴甲酚紫 溴麝蓝	bromocresol purple bromothymol blue	0.05 0.05	水	6.7	黄	紫	紫~蓝
中性红 亚甲蓝	neutral red methylene blue	0.05 0.05	乙醇	7.0	紫~蓝	紫蓝	绿
溴麝蓝 酚红	bromothymol blue phenol red	0.05 0.05	水	7.5	黄	紫	深紫
甲酚红 麝香草酚蓝	cresol red thymol blue	0.025 0.15	水	8.3	黄	玫瑰红	紫
酚酞 甲基绿	phenolphthalein methyl green	0.033 0.067	乙醇	8.9	绿	灰~蓝	紫
酚酞 麝香草酚蓝	phenolphthalein thymol blue	0.075 0.025	50%乙醇	9.0	黄	绿	紫
酚酞 萘酚酞	Phenolphthalein naphtholphthalein	0.067 0.033	50%乙醇	9.6	—	—	紫
酚酞 耐尔蓝	phenolphthalein nile blue	0.033 0.133	乙醇	10.0	蓝	紫	红
茜素黄 耐尔蓝	alizarin yellow nile blue	0.033 0.133	乙醇	10.8	绿	—	红~棕

(吴冠芸 吴 肇)

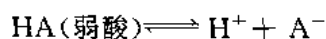
参 考 文 献

- 杭州大学化学教研组. 分析化学手册(第一分册)基础知识与安全知识. 1979
- 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992
- Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991
- Buavari S. The Merck Index, 11th ed. Merck & Co., 1994
- Chamber J J A and Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
- Fluke Catalog. Chemika-Biochemicals, Fluke Chemika, AG Switzzeland, 1995/1996
- Sigma. Biochemical and Reagents for Life Science Research. 1997

2. 缓冲溶液

纯水或中性盐溶液中加入少量酸或碱后,其 pH 即有明显的改变。但弱酸及其盐(或弱碱及其盐)的混合液中,在一定的 pH 范围内加入少量的酸或碱时,其 pH 几无变化,可见此种混合液具有保持原有 pH 的能力,故称为缓冲溶液。

弱酸或弱碱在溶液中是不完全解离的,解离和不解离形式呈平衡状态,如下所示:



若在缓冲液中,加入少量碱,则新加入的 OH^- 与缓冲液中的 H^+ 化合成水,故缓冲液的 pH 几不受影响。同理,若加入少量酸,则新加入的 H^+ 与缓冲液中的 A^- 化合成成为解离甚小的 HA,缓冲液的 pH 几乎也不变。

由 Henderson-Hasselbalch 公式可以看出,当弱酸及其盐(或弱碱及其盐)的浓度比接近 1 时,此缓冲体系的缓冲能力最强。因此在选用缓冲液时,如欲获得最大的缓冲力,则应考虑(1)所选用的弱酸(或弱碱)的 pK 值是否接近你所需要的 pH,缓冲液的缓冲能力在接近其 pK 时的 pH,能力最强。一般说来,缓冲液有效的 pH 范围约为 $\text{pK} + 2.0 \text{ pH}$ 。(2)弱酸及其盐(或弱碱及其盐)的比应接近 1,不要相差太远。

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{BA}]}{[\text{HA}]}$$

2.1. 两种缓冲液的应用范围

图 2-1, 图 2-2 显示了两类缓冲溶液的 pH 范围。缓冲溶液可分成两类。一类是非-双性离子即弱酸及其盐(或弱碱及其盐),图中列出的一些缓冲溶液曾都应用过,但目前只有其中一些尚应用甚广。有一些特殊的缓冲溶液在特异的系统中仍在应用。表 2-1 列出了非-双性离子缓冲化合物的特性。另一类是 Goods 缓冲溶液,它是一类双性离子有机化合物,最初用的是磷酸盐和叔胺。它们具有良好的缓冲能力,溶解度和生物学及化学上的惰性,所以和生物体系有良好的适应性。表 2-2 列出了双性离子缓冲溶液的特性。所有的缓冲液对温度均有一定的敏感性,表中以 $\Delta t^\circ\text{C}$ 表示。有些缓冲液对温度较敏感,如 Tris 缓冲液,配制时应调至工作温度的 pH。同样,有些缓冲液(如磷酸缓冲液)稀释时 pH 改变较大,故稀释后的缓冲液应用 pH 计进行校正。

2.2. 生物体系的适应性及化学活性

极大多数缓冲液在其最适 pH 范围内,是与生物体系相适应的,但也有例外,尤其是在超出其最适 pH 范围时。有些缓冲化合物变得具有化学活性、不溶解或与金属离子成为

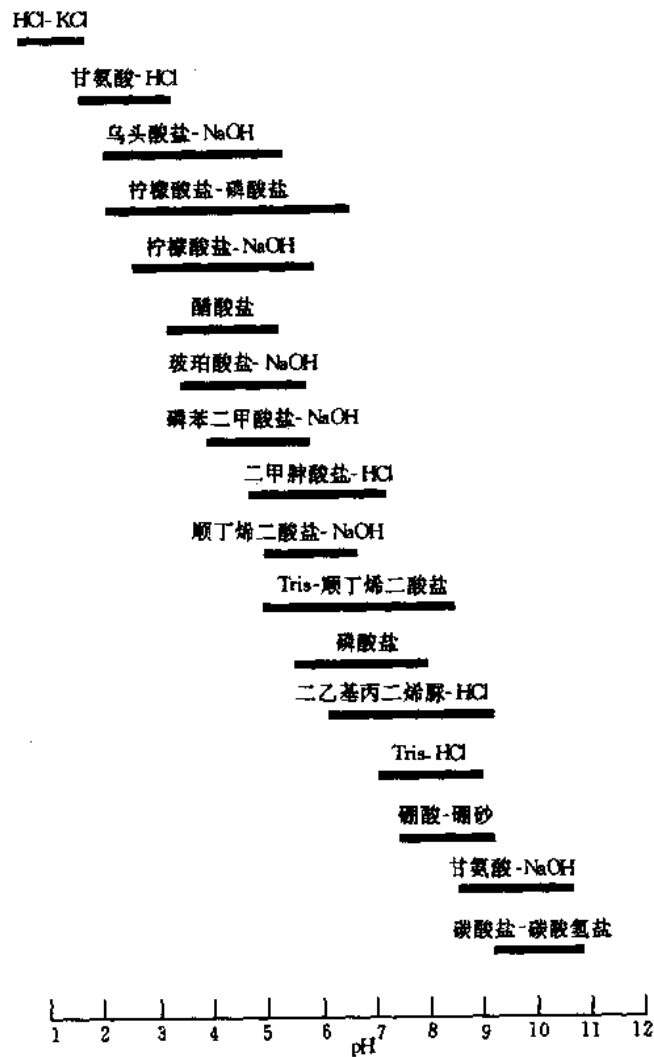


图 2-1 非两性离子缓冲液的 pH 范围

复合物,而不能发挥其缓冲作用。

有些经典的缓冲化合物有一定的缺点,如反应性、在某些体系中有代谢作用[如甘氨酸盐、柠檬酸盐和乌头酸盐(aconitate)]和有限的缓冲能力等。如 Tris 抑制磷酸脂酶 C,复合金属离子对细胞具有毒性,Tris 和甘氨酸的氨基能与醛类(如甲醛)作用。甘氨酸、柠檬酸、乌头酸与顺丁烯二酸的羧基与羟基均具有与咪唑(imidazole)一样广泛的化学活性。二甲胂酸盐(cacodylate)能与巯基(thio group)反应并有中等毒性。磷酸与硼酸缓冲液在高离子浓度时能与无机阳离子螯合形成不溶性的盐(尤其是磷酸)。此外,硼酸能与 1,2-连二醇(1,2-vic-diols)形成复合物。

两性离子缓冲液虽有很多优点,但依然存在下列反应性与不适应性的问题。两性离子缓冲液包括 Hepes 不适应于所有的组织培养(如软骨细胞 chondrocytes)。Hepes 也是 r-

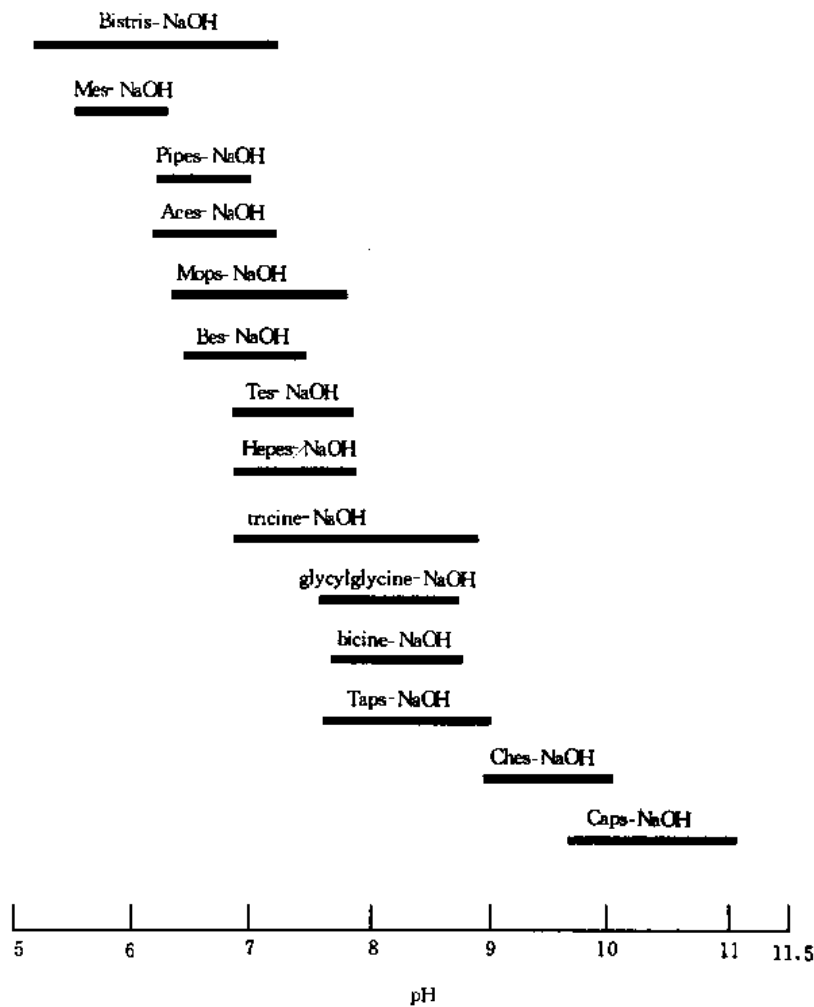


图 2-2 两性离子缓冲液的 pH 范围

氨基丁酸的拮抗剂(抑制受体)。Pipes 干扰由微管蛋白聚合成微管的作用,但 Mes 无此作用。带有乙醇胺基团的两性离子缓冲液干扰 Lowry 法测定蛋白。在酰化叔胺醇时,N-二羧乙基甘氨酸可与活性酯类作用[如 N-羧基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide)]。同样, Tes 可与琥珀酸酐作用。Bistris 干扰 DNA 的二氨基苯甲酸荧光测定法,在含有血红素的系统中能与超氧化阴离子反应。Caps、Ches、Taps 与 Mes 在一些质子转移反应中有活性或催化性。Hepes 在某些芳香族化合物存在下,铜可促进其自身氧化。环己烷类的缓冲液,于某些金属离子存在下,具有发光的氧化作用。

表 2-1 非双性离子缓冲液的组成

化合物	分子式	溶解度		pKa(20°C)			滴定试剂	危险性	安全措施
		分子量	(g/100 ml H ₂ O, 20°C)	1	2	3			
硼酸	H ₃ BO ₃	61.8	6.4	9.14	12.74	13.8	tris, NaOH	—	—
柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	192.4	146.0	3.14	4.77	6.39	磷酸钠 (18°C) NaOH, KOH	—	—
咪唑	C ₃ H ₄ N ₂	68.1	易溶	6.95	—	—	NaOH, KOH	R21/R22	S25
				(25°C)					
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	136.1	33	2.12	7.21	12.61	K ₂ HPO ₄	—	—
							(25°C)		
磷酸氢二钾	K ₂ HPO ₄	174.2	167	2.12	7.21	12.61	KH ₂ PO ₄	—	—
							(25°C)		
邻苯二甲酸二氢钾	C ₈ H ₆ KO ₄	204.2	10	2.89	5.51	—	KOH		
醋酸钾									
无水	CH ₃ COOK	82.0	119.0(0°C)	4.75	—	—		醋酸	
3H ₂ O	CH ₃ COOK · 3H ₂ O	136.1	76.2(0°C)						
二钾砷酸钠	(CH ₃) ₂ AsO ₂ Na · 3H ₂ O	214.0	200	6.21	—	—	NaOH	R23/R25, R33	S1/S2, S7, S20, S28, S44
碳酸钠									
无水	Na ₂ CO ₃	106.0	7.1(0°C)	6.37	10.25	—	CO ₂ ,	—	—
10H ₂ O	Na ₂ CO ₃ · 10H ₂ O	286.1	21.5(0°C)				碳酸盐		
柠檬酸三钠	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	294.1	72.0	3.09	4.75	5.41	磷酸盐 (18°C) 氢氧化合物		—
磷酸二氢钠	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	156.0	易溶	2.12	7.21	12.67	Na ₂ HPO ₄	—	—
碳酸氢钠	NaHCO ₃	84.0	9.6	6.37	10.25	—	CO ₂ , 碳酸盐	—	—
磷酸氢二钠									
无水	Na ₂ HPO ₄	142.0		2.12	7.21	12.67	NaH ₂ PO ₄		
2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	178.0	60.0						
10H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ · 10H ₂ O	358.1	4.2						
四硼酸钠									
无水	Na ₂ B ₄ O ₇	201.2	1.1(0°C)	9.14	12.74	13.80	硼酸	—	—
10H ₂ O	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	381.4	2.0(0°C)						
三乙醇胺	C ₆ H ₁₅ NO ₃	149.2	与水混溶						
Tris*	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121.1	39.6	8.3	—	—	HCl, HAc, 磷酸		—

* 三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]。

本表引自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry, LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

表 2-2 两性离子缓冲液的特性

化合物	分子量	溶解度 (0°C)(mol/L)	pKa		应用范围	与金属离子的作用
			20°C	Δt C		
Mes	213.3	0.65	6.15	-0.011	5.8~6.5	<i>n</i>
Bis tris	209.2	-	6.5	-	5.5~7.5	
Ada	190.2	极易溶	6.62	-0.011	5.6~7.5	Mg ²⁺ , <i>w</i> ; Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , <i>m</i> ; Cu ²⁺ , <i>s</i>
Aces	182.2	0.22	6.88	-0.02	6.4~7.4	Cu ²⁺ , <i>m</i>
Mopso	225.27	0.75	6.77	-0.015	6.2~7.6	<i>n</i>
Pipes	302.4	1.4	6.82	-0.009	6.4~7.2	<i>n</i>
Bes	213.3	3.2	7.17	-0.016	6.6~7.6	Cu ²⁺ , <i>m</i>
Mops	209.3	3.1	7.2	-0.011	6.5~7.9	<i>n</i>
Tes	229.3	2.6	7.5	-0.02	7.0~8.0	Cu ²⁺ , <i>m</i>
Hepes	238.3	2.25	7.55	-0.014	7.0~8.0	<i>n</i>
Dipso	213.2	0.24	7.42	-0.015	7.0~8.2	
Tapso	259.3	1.0	7.49	-0.018	7.0~8.2	
Heppso	268.3	2.2	7.77	-0.010	7.1~8.5	
Popso	398.4	极易溶	7.82	-0.013	7.2~8.5	
Hepps	252.3	1.6	8.0	-0.011	7.6~8.6	<i>n</i>
tricine	179.2	0.8	8.15	-0.028	7.0~9.0	Mg ²⁺ , <i>w</i> ; Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , <i>m</i>
双甘氨酸	132.1	1.01(25°C)	8.25	-0.026	7.7~8.8	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , <i>w</i> ; Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , <i>m</i>
bicine	163.2	1.1	8.35	-0.018	7.8~8.8	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , <i>m</i> ; Cu ²⁺ , <i>s</i>
Taps	243.3	极易溶	8.4(25°C)	0.018	7.7~9.1	
Ches	207.1	1.15	9.55	-0.011	9.0~10.1	
Caps	221.3	0.47	10.4	-0.032	9.7~11.1	

缩写: *n* 表示可忽略不计; *w* 表示与金属离子结合力弱($\log K_M=1\sim 2$); *m* 表示与金属离子结合力中等($\log K_M=2\sim 5$); *s* 表示与金属离子结合力强($\log K_M>5$)。K_M 为金属-缓冲液结合常数。

两性离子缓冲化合物的中英文全名:

Mes	2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate 2-吗啉代乙磺酸一水合物
Bis-tris	bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxyl)methane 双(2-羟乙基)亚氨基-三羟甲基甲烷
Ada	N-(2-acetamido)-2-imidodiacetic acid N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基乙酸

Aces	N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid N-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸
Mopso	3-(N-morpholino)-2-hydroxypropane sulfonic acid 3-(N-吗啉代)-2-羟基丙磺酸
Pipes	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) 哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)
Bes	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸
Mops	3-morpholinopropanesulfonic acid 3-吗啉代丙磺酸
Tes	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸
Dipso	3-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid 3-[N,N-双(2-羟乙基)-氨基]-2-羟基丙磺酸
Tapso	3-[N-tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxypropanesulfonic acid 3-[N-三(羟甲基)-甲基]-2-羟基丙磺酸
Heppso	N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-hydroxypropanesulfonic acid N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸
Popso	piperazine-N-N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid) 哌嗪-N-N'-双(2-羟基丙磺酸)
Hepps	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid 4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸
tricine	N-[tris(hydroxymethyl)methyl] glycine N-[三(羟甲基)甲基] 甘氨酸
双甘氨酸	N-glycylglycine
bicine	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸
Taps	N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid N-[三(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸
Ches	2-(cyclohexylamino)-1-ethanesulfonic acid 2(环己氨基)-1-乙磺酸
Caps	3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid 3-(环己氨基)-1-丙磺酸

2.3. 缓冲液的配制

缓冲液的配制,一般采用以下两种方法:

(1) 将溶解好的缓冲液用强酸(如 HCl)或强碱(如 NaOH 或 KOH)调至正确 pH。与缓冲液相反的离子如用 Na^+ 或 K^+ 并不重要,主要取决于便利和体系的适应性。有时也采用复合缓冲液,如 Tris-醋酸或 Tris-磷酸。

(2) 将贮存液混合,此方法常用于磷酸与醋酸缓冲液的配制。表 2-3, 2-4 列出了磷酸与醋酸缓冲液的配制方法,只要将缓冲液的组成成份配成 0.2 mol/L 的贮存液,然后按表中比例混合,最后稀释成 200ml,即为 0.1 mol/L 缓冲液。

表 2-3 0.1 mol/L 磷酸缓冲液的配制

溶液 A: 0.2 mol/L NaH_2PO_4 (27.8 g 溶于 1000ml 水)。

溶液 B: 0.2 mol/L Na_2HPO_4 (53.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或 71.7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 000 ml 水。

溶液 A 与 B 按表中比例混合后,用水稀释至终体积为 200ml。也可用相应的钾盐。

体积 A (ml)	体积 B (ml)	pH	体积 A (ml)	体积 B (ml)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	89.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

表 2-4 0.1 mol/L 醋酸缓冲液的配制

溶液 A: 0.2 mol/L 醋酸 (11.55 ml 冰醋酸溶于 1000 ml)

溶液 B: 0.2 mol/L 醋酸钠 (16.4g CH_3COONa 或 27.2g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1000ml 水,将 0.2 mol/L 醋酸与醋酸钠溶液按下表混合,最后稀释成 100ml。

体积 A (ml)	体积 B (ml)	pH	体积 A (ml)	体积 B (ml)	pH
46.3	3.7	3.6	20.0	30.0	4.8
44.0	6.0	3.8	14.8	35.2	5.0
41.0	9.0	4.0	10.5	39.5	5.2
36.8	13.2	4.2	8.8	41.2	5.4
30.5	19.5	4.4	4.8	45.2	5.6
25.5	24.5	4.6			

2.4. 具有缓冲能力的生理盐水

具有缓冲能力的生理盐水,常作为灌注液维持渗透压及稀释剂,用于动物组织及免疫化学试验。

生理盐水	0.9% w/v NaCl
磷酸缓冲液-生理盐水	NaCl 7.2 g/L Na ₂ HPO ₄ (无水) 1.48 g/L KH ₂ PO ₄ (无水) 0.43 g/L
Tris-缓冲液-生理盐水	含有 10~50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.2)的生理盐水,但 Tris 对某些细胞有毒,故用 tricine 较好。

2.5. 标准缓冲液的配制

用于校正 pH 计的标准缓冲液,常用的有 pH4, pH6~7, pH9,其配制方法如表 2-5。

表 2-5 标准缓冲液的配制

	酒石酸盐	邻苯二甲酸盐	中性磷酸盐	硼酸盐
缓冲物 g/L 溶液, 25°C	KHC ₈ H ₄ O ₆ 饱和, 25°C	KHC ₈ H ₄ O ₄ 10.12	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ ^b 3.39 ^c 3.53	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O 3.80
mol/L	0.034	0.04958	^a 0.02490	0.009971
密度(g/L)	1.0036	1.0017	1.0028	0.9996
pH 25°C	3.557	4.008	6.865	9.180
稀释值 ΔpH1/2	+0.049	+0.052	+0.080	+0.01
缓冲容量 β	0.027	0.016	0.029	0.020
温度系数 Δ/C	-0.0014	+0.0012	-0.0028	-0.0082

a: 每种磷酸盐的浓度; b: KH₂PO₄; c: Na₂HPO₄.

(吴冠芸)

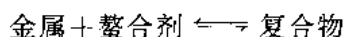
参 考 文 献

- 中南矿业学院分析化学教研室等. 分析化学手册. 科学出版社, 1982
 Chambers J A A, Dickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
 Dawson R M C, Elliot D C, Elliot W H, Jones K M. Data for Biochemical Research (3rd Ed.). Oxford University Press, Oxford, 1986
 Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1996
 Fluka Catalog. Chemika-Biochemical. Fluke Chemika, AG Switzeland, 1995/1996

3. 螯合剂、变性剂、巯基试剂及表面活性剂

3.1 螯合剂

螯合剂(chelating agents)用于控制反应中的金属离子浓度或去除金属离子。螯合剂对金属离子的亲和力以稳定常数(SC)表示,即复合物解离常数的对数(log10)。



虽然它只是一个简单的二元反应,在形成复合物时,实际上还有一系列中间化合物形成。文献上报道的是最稳定复合物的稳定常数。两种金属离子的稳定常数之比可显示出两者与螯合剂结合的效力。如 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 对 EDTA 的稳定常数分别为 10.61 与 8.83, 两者之差 ~ 1.8 。这是 60 的对数。 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 在等克分子浓度的混合液中,与 EDTA 螯合的比为 60 : 1。对于 EGTA, Mg^{2+} 稳定常数较低, Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 之比 $\sim 4 \times 10^5$ 。表 3-1 与表 3-2 列出了最常用的 EDTA 和 EGTA 以及两种特殊用处的螯合剂的稳定常数。柠檬酸在一些系统中用作弱的螯合剂,磷酸则作为对比之用。

表 3-1 螯合剂: 溶解度与 pKa

	EDTA	EGTA	1,10-二氮杂菲	2,2'-联吡啶	柠檬酸	磷酸
分子式	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	H_3PO_4
分子量	372.2	380.4	180	156	192	98
	(2Na · 2H ₂ O)					
溶解度 (20 C, g/100ml H ₂ O)	11.1	极易溶	微溶	微溶	极易溶	混溶
pKa(25 C)						
pKa1	10.17	9.40	4.93	4.42	5.69	11.74
pKa2	6.11	8.78	1.9	—	4.35	6.57
pKa3	2.68	2.66*	—	—	2.87	1.72
pKa4	2.0	2.0*	—	—	—	—

* 20 C

缩写与英文名称:

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 乙二胺四乙酸

EGTA (ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetracetic acid 乙二醇-双(β-乙胺醚)N,N,-N',N'-四乙酸

1,10-二氮杂菲 1,10-phenanthroline

2,2'-联吡啶 2,2'-bipyridine

表 3-2 整合剂:稳定常数

	EDTA	EGTA	1,10-二氮杂菲	2,2'-联吡啶	柠檬酸	磷酸
常用生理阳离子						
Na ⁺	1.64	—	—	—	0.7	0.60
K ⁺	0.8	—	—	—	0.59	0.49
Ca ²⁺	10.61	10.86	0.7 ^a	—	3.5	3.4 ^a
Mg ²⁺	8.83	5.28	1.2	—	3.37	1.5
其他生理阳离子						
Co ²⁺	16.26	12.35	19.8 ^b	15.9 ^b	5.0	2.18
Co ³⁺	41.4	—	—	—	—	—
Cu ⁺	—	—	15.8 ^a	12.95	—	—
Cu ²⁺	18.7	17.57	10.69	6.33	5.9	3.2
Fe ²⁺	14.27	11.8	21.0 ^b	17.2 ^b	4.4	3.6
Fe ³⁺	25.0	20.5	14.1 ^b	16.29	11.5	8.3
Mn ²⁺	13.81	12.18	10.3 ^b	2.62	4.15	—
Ni ²⁺	18.52	13.5	24.3	20.16 ^b	5.4	2.08
Zn ²⁺	16.44	12.6	—	13.2 ^b	5.9 ^b	2.4
其他阳离子						
Ag ⁺	7.32 ^a	6.88	12.6 ^b	6.67 ^b	—	—
Al ³⁺	16.5	13.9	—	—	—	—
Cd ²⁺	16.36	16.5	14.6 ^b	10.3 ^b	4.54 ^b	—
Hg ²⁺	21.5	22.9	23.35 ^b	19.5 ^b	10.9	—
Pb ²⁺	17.88	14.5	4.65	2.9	6.1	—

a: 20℃; b: 最稳定复合物, 缩写与英文名称见表 3-1。

本表引自 Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1996。

3.2. 变性剂

3.2.1. 变性剂的作用机制

蛋白质变性剂(denaturant)的作用是破坏蛋白质的次级键(如氢键、盐键和疏水基的相互作用等),引起天然构象的解体;它们并不破坏共价键(如肽键和二硫键),故不涉及一级结构的改变。各种变性剂的作用机制有所不同,如尿素和胍能与多肽主链竞争氢键,破坏蛋白质的二级结构,并能增加非极性侧链在水中的溶解度,降低了维持蛋白质三级结构的疏水相互作用(hydrophobic interaction)。十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)能破坏蛋白质分子内的疏水相互作用,使非极性基团暴露于介质水中,降低非极性侧链从水介质到疏水内部的自由能。蛋白质溶液是一种胶体,甲醇、乙醇或丙酮等因引起蛋白质脱水层以及降低介电常数,从而增加带电质点的相互作用,致使蛋白质容易凝集而沉淀。

变性剂有溶解型和沉淀型两类,尿素与胍盐是有效的溶解型变性剂,而三氯醋酸、甲醇和氯仿/异戊醇则是有效的沉淀型变性剂。沉淀型变性剂用于除去反应后溶液中干扰以后步骤的酶,释放与配位体紧密结合的蛋白质。过去也用于蛋白质的沉淀、纯化。溶解型变性剂则常用于电泳,分离与膜结合的蛋白质。

一般而言,变性剂应用时常大大过量,破坏氢键的变性剂用量至少二倍于氨基酸的克分子数,与蛋白质结合成为复合物,1 g 蛋白质可结合 1.4 g SDS。很多变性剂,特别是可溶解的,含有高浓度的巯基,有助于 S-S 键还原成巯基而使三级结构完全破坏。

蛋白质变性作用的深度也不一样,有的可逆,当变性因素除去后,又可重新回复到天然构象,有的是不可逆的。

3.2.2. 混合变性剂

大量的研究表明两种变性剂混合使用时,与蛋白质的结合能力两者均会降低,所以最好根据实验要求选择最强的单一变性剂。

3.2.3. 变性剂的特性

SDS 溶于水可达 25% w/v,对温度敏感,配成 20% w/v 贮存液最为方便,市售十二烷基肌氨酸钠(sarkosyl,N-laurylsarcosine)通常为 30% 贮存液。SDS 的钾盐在室温较低时,应用比 SDS 或 sarkosyl 更为有效。SDS 的钾盐是不溶性的,所以 SDS 溶液中要避免混入钾盐。

尿素极易溶于水,可达 10 mol/L,在 8 mol/L 以上要注意温度以防止沉淀。尿素在水中缓慢分解形成氨及高度活泼的氰酸离子,故要防止高温。尿素溶液用前应以混合离子交换剂处理或加入少量含胺的化合物(如 Tris,赖氨酸)以去除形成的氰酸盐。

酚是一种温和的变性剂,并能抑制核酸酶。他在与水形成两相系统前,可溶于水达 12%(v/v),蛋白质易进入酚层。酚与氯仿/异戊醇的混合物是一个十分有效的去蛋白质试剂。蛋白质可有效的被氯仿/异戊醇变性沉淀,离心后,变性蛋白质在水和氯仿两层之间形成沉淀,易于除去,故常用于核酸提取中去除蛋白质。核酸、糖类与蛋白质的溶解度依赖于 pH,酚也会进入水层,所以用前应先以等体积 Tris 缓冲液抽提,以配成一定 pH 为水所饱和的酚。水层中残留的酚用醚或氯仿/异戊醇抽提以去除之。8-羟喹啉是常用的抗氧化剂,它能与水层中的镁离子结合成为更易溶于酚层的复合物。有时也加入对-氨基水杨酸作为螯合剂,三异丙基萘磺酸(tri-isopropyl naphthalene sulfonate)作为乳化剂。

三氯醋酸与过氯酸(TCA,PCA),两者均为极好的沉淀剂,能沉淀蛋白质与核酸。TCA 应用更为广泛,因为 PCA 是氧化剂,但不影响核酸的紫外测定,核酸用热酸水解后以 PCA 沉淀可直接在 260nm 下测定。

加入两体积的乙醇可沉淀蛋白质,但在更高的乙醇比例下,蛋白质会重新溶解。甲醇较有效,也可与醋酸共用以保证沉淀的完全和不可逆。

胍盐如盐酸胍、异硫氢酸胍能抑制核糖核酸酶,故常用于 mRNA 的制备。

表 3-3 溶解型变性剂

名称	分子式/分子量	溶解度		工作浓度	附注
		(g/100ml,	20 C)		
十二烷基硫酸钠	$C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$	288.38	25 ^a	0.1%~2%	阳离子去垢剂,对盐与冷敏感
十二烷基肌氨酸钠	$C_{15}H_{29}NO_3 \cdot Na$	294.4	30 ^b	0.5%~2.5%	阳离子去垢剂,对盐与冷较 SDS 敏感度低,但效力也较差
十二烷基硫酸锂	$C_{12}H_{25}O_4S \cdot Li$	257.3	30	0.1%~2%	对盐与冷较 SDS 与肌氨酸敏感度低
尿素	CH_4N_2O	60.06	48~60	4~10mol/L	非离子离液剂不破坏离子键
盐酸胍	CH_6N_3Cl	95.53	76	4~6mol/L	离子离液剂,不破坏离子键
硫氰酸胍	$C_2H_3N_4S$	118.1	47	3~4mol/L	与氯化胍相似,但更有效

a 25% SDS 对温度与盐非常敏感,故工作浓度常为 20%。注意:含有 SDS 的溶液,避免加入 K^+ ,因为 K^+ 与 SDS 形成十二磺酸钾的沉淀。

b 市售为 30% 溶液

表 3-4 沉淀型变性剂

名称	分子式	分子量	溶解度		附注
			(g/100ml,	20 C)	
醋酸	$C_2H_4O_2$	60.05	与水自由混溶	5~10v/v%	也沉淀核酸
丙酮	C_3H_6O	58.08	与水自由混溶	2~6 体积	可用于选择性沉淀,也沉淀核酸
氯仿/异戊醇 24:1(v/v)	$CHCl_3/C_5H_{12}O$		与水溶液不混溶	等体积	有效的变性剂
乙醇	C_2H_6O	46.1	与水自由混溶*	1~2 体积	也沉淀核酸
乙醇/过氯酸	$C_2H_6O/HClO_4$		与水混溶	5~10 体积	沉淀蛋白质,溶解核酸
甲醇	C_2H_4O	32.04	与水自由混溶	1~2 体积	

* 溶液中需加入一种 $>0.1mol/L$ 的盐(常用醋酸盐或氯化物),以加强沉淀的有效性。

表 3-3,3-4 引自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

3.3. 巯基试剂

巯基试剂(thiol reagent)在生化反应中有两个用途,一是防止蛋白质或酶等(如辅酶 A)分子中 SH-基氧化成 S-S,二是在某些酶反应中维持体系的还原环境。应用过的一些巯基试剂中,二硫丁醇类(dithiol butanols)化合物[如二硫赤藓糖醇(dithioerythritol, DTE)和二硫苏糖醇(dithiothretol, DTT)]与 2-巯基乙醇应用最广。谷胱甘肽也常应用,由于它是生物体中原有的还原剂,同时氧化后能被谷胱甘肽还原酶原位释放。一般二硫丁醇类是常选用的巯基试剂,不但他们挥发性低,难闻的巯基味较少,而且氧化还原电位低,比 2-巯基乙醇浓度低很多的情况下,可以使其他二硫化物完全还原。但有个别情况,由于化学活性或立体化学的问题,如 DTT 似与硫氰酸胍不能同时应用。

表 3-5 巯基试剂

名称	分子式	分子量	溶解度
半胱氨酸	C ₃ H ₇ NS	121.16	极易溶
二硫苏糖醇	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	154.25	溶解 ^a
二硫赤藓糖醇	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	154.25	溶解 ^a
2-巯基乙醇	C ₂ H ₆ OS	78.1	与水自由混溶 ^b
谷胱甘肽	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	307.3	溶解
2,3-二巯基丙醇	C ₃ H ₈ OS ₂	124.2	8.7g/100ml H ₂ O ^c

a: 这些化合物常用的工作浓度为 1~5 mmol/L, 可配成 >100 mmol/L 贮备液保存。

b: 常用工作浓度为 0.1%~2% (v/v), 纯液体浓度为 14.3 mol/L。

c: 更易溶于植物油, 市上常以 10% 的花生油贮存液出售。

本表引自 Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1996。

3.4. 表面活性剂

合成的或天然存在的表面活性剂 (surfactant) 具有去污作用, 故也称为去垢剂 (detergent)。生物化学上去垢剂主要用于: ①溶解膜与膜脂; ②溶解与稳定蛋白质, 特别是膜蛋白质以及有疏水表面的蛋白质; ③作为蛋白质的变性剂; ④作为润湿剂; ⑤作为乳化剂。去垢剂是一种两性分子, 结构上他们均有一个亲水的“头”和一个疏水的长“尾”。去垢剂在一定浓度时会聚合成小球形微团 (micelle), 亲水部分向外, 疏水部分集聚在中央 (图 3-1A)。去垢剂的疏水部分可附着在油脂的烃基链上, 而它的亲水部分强有力的和水结合, 这样可使油脂分散于水中。同理, 它们可通过形成去垢剂、磷脂和蛋白质的混合微团溶解生物膜 (图 3-1B)。形成微团的浓度叫做临界微团浓度 (critical micellar concentration, CMC)。它反应去垢剂溶解蛋白质和脂质的能力以及其可透析性。形成微团的平均分子数称为聚合数 (aggregation number)。HLB (hydrophile-lipophile balance) —— 亲水物-亲脂物 平衡值, 它是定量衡量去垢剂亲水性与亲脂性以及溶解性的

3.10)的不同,仅是烷基的长短不同而已。

(4) 非离子型,常用的有 Triton 系列和 Tween 系列,它们没有极性,均有聚氧乙烯基团,前者是酚类化合物,而后者是山梨醇酯。

图 3-2 列出了上述去垢剂的结构式。表 3-6 列出了它们的物理化学特性。一般说来,离子型去垢剂往往是变性剂,双性离子型与非离子型去垢剂是非变性剂,可用于溶解蛋白质。

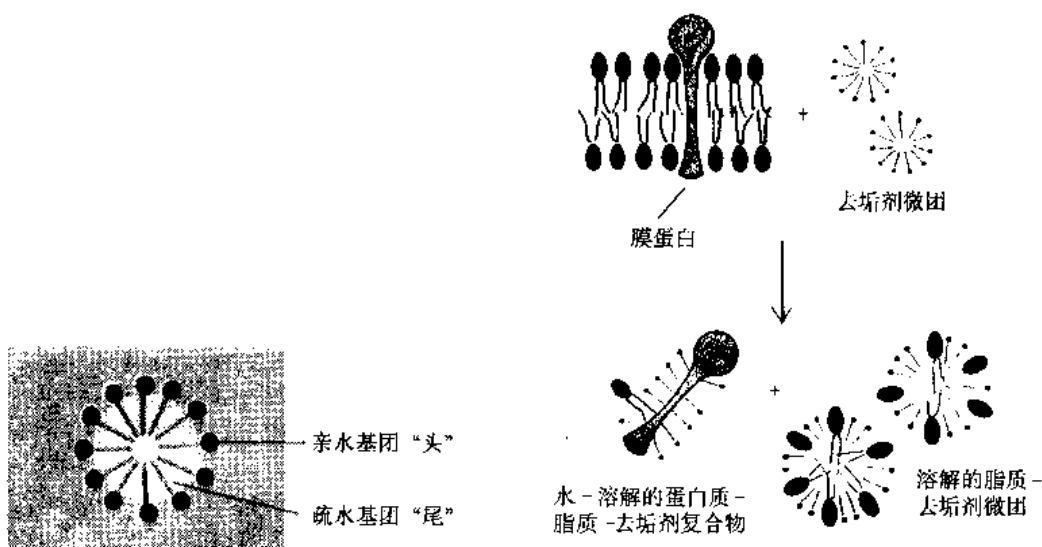


图 3-1A 去垢剂微团的结构

图 3-1B 去垢剂溶解膜蛋白的作用

表 3-6 去垢剂与表面活性剂的物理化学性质

名称	分子量	HLB	CMC($\mu\text{mol/L}$)	聚合数 (20~25 $^{\circ}\text{C}$, 0~0.1mol/L. Na^+)	危险性	安全措施
阴离子去垢剂						
Sarkosyla	295.4					
SDS	288.4	≈ 40	8200	620	R22, R36/R38	
阳离子去垢剂						
CPB	402.5				R21/R22	S24/S25
CTAB	364.5		1030	170	R21/R22	S26
双性离子去垢剂						
CHAPS	614.9		$6\sim 10\times 10^3$	10	有刺激性	
CHAPSO	630.9		8000	11	有刺激性	
Zwittergent						
3.08	280		33×10^4			

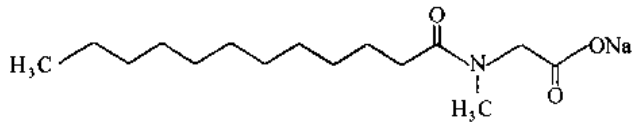
名称	分子量	HLB	CMC($\mu\text{mol/L}$)	聚合数 (20-25 $^{\circ}\text{C}$, 0.1mol/L Na $^{+}$)	危险性	安全措施
3.10	308		25~40 $\times 10^3$	41		
3.12	336		2~4 $\times 10^3$	55		
3.14	364		100~400	83		
3.16	392		10~60	155		
非离子去垢剂						
Brij 35	≈ 1200	16.9	75	40	有刺激性	
56	682	12.9	2	40	有刺激性	
58	1122	15.7	77	40	有刺激性	
octyl- β -d-glucopyranoside	292.4		25 $\times 10^3$	84		
Triton X-100	625	13.5	250	100~155		
X-114	537	12.4				
Nonidet P40	625	13.1	250	100~155		
Tween 20	1228	10.7	59			
60		14.9				
80	1310	15.0	12	58		

本表引自 Chambers J A A and Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

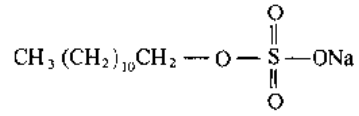
去垢剂的中英文全名:

Sarkosyl	laurylsarcosine sodium salt 十二烷基肌氨酸钠
SDS	sodium dodecyl (lauryl)sulfate 十二烷基硫酸钠
CPB	cetylpyridiniumbromide 溴化十六烷基吡啶
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide 十六烷基三甲基溴化铵
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate 3-[(3-胆烷酰胺丙基)-二甲铵]-1-丙磺酸盐
CHAPSO	3 [(3 cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate 3-[(3-胆烷酰胺丙基)-二甲铵]-2-羟-1-丙磺酸盐
Zwittergent	

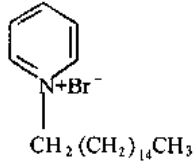
3.08	<i>N</i> -octylsulfobetaine <i>N</i> -辛基磺酸甜菜碱
3.10	<i>N</i> -decylsulfobetaine <i>N</i> -癸基磺酸甜菜碱
3.12	<i>N</i> -dodecylsulfobetaine <i>N</i> -十二烷基磺酸甜菜碱
3.14	<i>N</i> -tetradecylsulfobetaine <i>N</i> -十四烷基磺酸甜菜碱
3.16	<i>N</i> -hexadecylsulfobetaine <i>N</i> -十六烷基磺酸甜菜碱
Brij 35	polyoxyethylene(23)lauryl ether 聚氧乙烯(23)十二烷基醚
56	polyoxyethylene(10)cetyl ether 聚氧乙烯(10)十六烷基醚
58	polyoxyethylene(20)cetyl ether 聚氧乙烯(20)十六烷基醚 octyl- β -D-glucopyranoside 辛- β -D-吡喃葡萄糖苷
Triton X-100	nonaethylene glycol octylphenyl ether 壬-(乙二醇)苯辛基醚
X-114	heptaethylene glycol octylphenyl ether 庚-(乙二醇)苯辛基醚
Nonidet P40	polyoxyethylene(9)-p-t-octylpheno! 聚氧乙烯(9)-对-t-辛基酚
Tween 20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate 聚氧乙烯甜菜碱月桂酸酯
60	polyoxyethylene sorbitan monosterate 聚氧乙烯甜菜碱硬脂酸酯
80	polyoxyethylene sorbitan monooleate 聚氧乙烯甜菜碱油酸酯



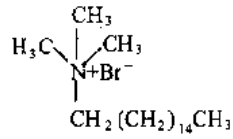
sarkosyl



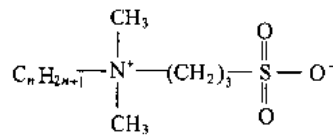
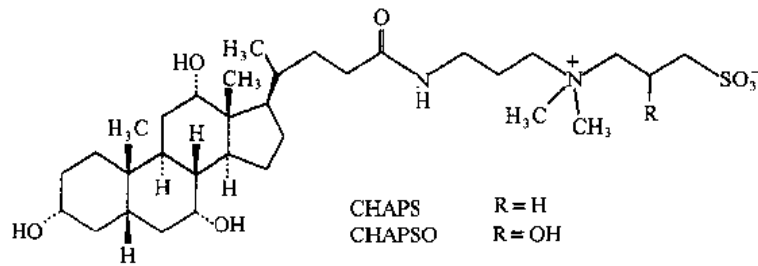
SDS



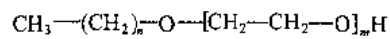
CPB



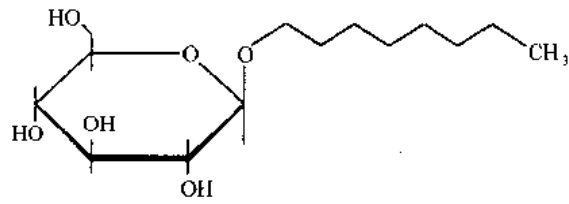
CTAB



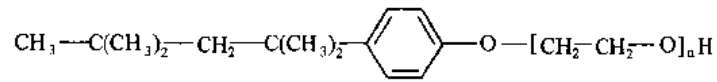
zwittergent 3. *n*



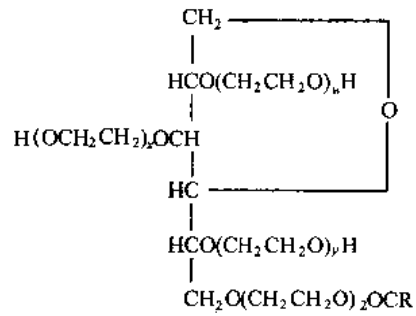
Brij	35	<i>m</i> =23	<i>n</i> =10
	56	<i>m</i> =10	<i>n</i> =15
	58	<i>m</i> =20	<i>n</i> =15



octyl - β - D - glucopyranoside



nonidet P40 $n=9$
triton X-100 $n=9,10$



TWEEN 20 $w+x+y=20$
R=monolaurate
TWEEN 80 $w+x+y=20$
R=monooleate

图 3-2 去垢剂的结构式

(吴冠芸)

参 考 文 献

- Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al.* Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., 1989
 Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991
 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
 Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1996

4. 干燥剂、致冷剂、浓缩剂及硅化剂

4.1. 干燥剂

实验室中经常需使用各种不同的干燥剂(desiccant, dry agent),藉以除去诸如有机溶剂中的微量水分,对某些参与反应或操作的气体进行干燥,待分析鉴定的样品中残存的水分或溶剂的除去。另外制成品的干燥等也需藉助一些干燥剂来进行。常用的干燥剂一般多为无机化合物,液化气体,分子筛或某些金属(金属钾,钠及金属镁带)等。

表 4-1 实验室中常用干燥剂的吸水能力

干燥剂名称	分子式	每升空气中残存的水分(mg)	备注
无水硫酸铜	CuSO ₄	2×10^{-3}	吸湿后变为蓝色的五水硫酸铜
氧化钡	BaO	6.5×10^{-4}	
氢氧化钾(融熔)	KOH	1.4×10^{-4}	
氢氧化钾(粒状)	KOH	2×10^{-3}	
氧化钙	CaO	2×10^{-1}	
氯化钙	CaCl ₂	2×10^{-1}	
硅胶	(SiO ₂) _n	3×10^{-2}	加氯化钴者为变色硅胶
五氧化二磷	P ₂ O ₅	2×10^{-5}	
活性氧化铝	Al ₂ O ₃	5×10^{-3}	
硫酸钙	CaSO ₄	5×10^{-3}	
氧化镁	MgO	5×10^{-3}	
钠石灰			同时吸收二氧化碳
硫酸镁	MgSO ₄		
氢氧化钠	NaOH	1.6×10^{-1}	
液化气体	H ₂ , N ₂ , O ₂ 等	1.6×10^{-23}	推荐使用液体氯气
分子筛 3A, 4A, 5A 等	因型号而异	3.9×10^{-3}	

表 4-2 干燥器内常用的干燥剂

干燥剂名称	能除去的水分, 酸, 气体及残存的溶剂
无水氯化钙 CaCl ₂	水, 醇水
浓硫酸 H ₂ SO ₄	水, 醇, 乙酸
钠石灰(soda lime)	二氧化碳
硅胶(silica gel)	水
氧化钙 CaO	水, 乙酸, 盐酸
五氧化二磷 P ₂ O ₅	水, 醇
氢氧化钠 NaOH(粒状)	水, 乙酸, 盐酸, 酚, 醇, 胺类
氢氧化钾 KOH(粒状, 融熔)	水, 氨及胺类物质
石蜡薄片(paraffin)	多种有机溶剂
橄榄油(olive oil)	多种有机溶剂

表 4-3 气体用干燥剂

干燥剂名称	可干燥的气体
无水氯化钙 CaCl_2	氢, 氧, 氮, 一氧化碳, 二氧化碳, 氯化氢(盐酸气), 二氧化硫, 醚, 烯烃, 低级烷烃及卤烃等
浓硫酸 H_2SO_4	氢, 氮, 氧, 一氧化碳, 二氧化碳, 氯化氢(盐酸气)及烷烃
生石灰(煅石灰) CaO	氨及胺类
氢氧化钠 NaOH	氨及胺类
氢氧化钾 KOH	氨及胺类
溴化钙 CaBr_2 , 溴化锌 ZnBr_2	溴化氢
次氯酸镁 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$	中性或酸性气体
五氧化二磷 P_2O_5	氢, 氧, 氮, 一氧化碳, 二氧化碳, 二氧化硫, 乙烯及烷烃等

4.2. 致冷剂

实验室中经常要在较低的温度下进行生物提取、分离、纯化及分析检验等工作,以防止在反应及操作过程中物质的降解、失活或变性。实验室中许多物质均可作为不同程度降低温度用的致冷剂(cooling agent)。最常用的如冰,冰与盐类以不同比例所组成的致冷剂。而液化气体、固体二氧化碳(即干冰),则用于需要更低温度的操作。

表 4-4 冰与食盐组成的致冷剂

冰中食盐含量 %	混合物的温度(°C)
5	-3
10	-6.2
15	-9.9
20	-13.7
25	-17.8
30	-21.2

表 4-5 水和混合盐类组成的致冷剂

致冷剂的组成	重量比	临界温度(°C)
水	6	-12
氯化铵	5	
硝酸钠	5	
水	1	-5
硝酸铵	1	
水	1	-22
碳酸氢钠	1	
硝酸铵	1	

表 4-6 冰和混合盐类组成的致冷剂

混合盐名称	加入量(g)/100g 冰	可达到的最低温度(°C)
氯化钠-氯化铵	40 : 20	-25
氯化钠-硝酸铵	42 : 42	-25
硝酸铵-硫氰酸铵	32 : 59	-32
硝酸钾-硫氰酸铵	9 : 67	-28
硝酸钠-硫氰酸铵	55 : 40	-30

表 4-7 冰和盐类组成的致冷剂

化合物名称	加入量(g)/ 100g 冰	可达到的最低温度(°C)
氯化钙(含 6 水)	150	-49
氯化钠	33	-21
硝酸钠	50	-17
硝酸铵	45	-16
氯化铵	25	-15
氯化钾	30	-11

表 4-8 液化气体致冷剂

液化气体致冷剂名称	可达到的最低温度(°C)*
液体氢气**	-192
液体氮气	-196
液体氦气	-273
液体空气***	-253
氟利昂 1 (CHClF ₂)	-41
氟利昂 2 (CHCl ₂ F ₂)	-30

* 0 °C 时一气压的沸点。

** 不推荐使用,因遇可燃物质有爆炸的危险。

*** 本身为爆发性气体,一般不宜使用。

表 4-9 固体二氧化碳*与有机溶剂组成的致冷剂

有机溶剂	可达到的最低温度(°C)
乙醇(C ₂ H ₅ OH)	-72
乙醚(C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅)**	-100
二氯甲烷(CH ₂ Cl ₂)	-80
一氯甲烷(CH ₃ Cl)	-82
丙酮(CH ₃ COCH ₃)	-86
三氯甲烷(CHCl ₃)	-77

* 干冰本身的挥发可达-78.5°C。

** 易爆;一般不推荐使用。

4.3. 浓缩剂

在生物制备、分离、纯化会分析鉴定时,经常需要将较大量或很大的液体,浓缩至较小或很小的体积,以便于操作或使之符合于实验需要的浓度和体积;通常所使用的方法不外旋转蒸发,透析,超滤,冷冻干燥或在冷室中用流动的空气来吹悬吊着的透析袋等方法。另外就是使用各种浓缩剂(concentration agent)以除去溶液中的水分、缓冲液等。常用的浓缩剂有蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、葡聚糖及聚丙烯酰胺浓缩凝胶等。一般的方法是将待浓缩的液体装入透析袋内,扎紧后包埋于浓缩剂中,藉浓缩剂的溶解或溶化将袋内的水分、缓冲液或小分子物质析出。有的浓缩剂液可直接投入到溶液中使用(如葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶干燥剂等),藉凝胶的吸水膨胀来达到浓缩的目的。

4.3.1. 蔗糖

蔗糖(sucrose)($C_{12}H_{22}O_{11}$)分子量为342.30。

蔗糖是浓缩剂中价格较低的物质。将待浓缩的液体装入透析袋中扎紧后,用粉状蔗糖将其整个包埋起来,可以很快地将袋内的水分藉蔗糖的溶解而析出。吸水速度快,吸水量大,但因其分子较小极易进入到透析袋内,因此透析到最后仍需将进入到袋内的蔗糖透析出来,增加了一定的工作量,较为繁琐,若作为初始浓缩剂则是较为理想的。

4.3.2. 聚乙二醇

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) $H(OCH_2CH_2)_nCH_3$ 有PEG 200~PEG 35 000的各种不同标号的十几种规格。其分子量决定于化学式中n的值。其标号与其分子量并不完全一致。例如PEG 200的分子量是190~210,PEG 10 000的分子量是8500~11 500。PEG的标号一般是指其平均的分子量,PEG 200~PEG 600为黏稠的液体,PEG 900以上为固体;有粉状及小碎薄片状等。作为浓缩剂的使用一般应选择其分子量要大于所使用的透析袋所标明的截留分子量的数值。如所使用的透析袋未标明分子量截留值的,则建议使用PEG标号10 000以上的为好,其浓缩安全性要好些。

固体PEG的数据见表4-10。

表 4-10 固体聚乙二醇的数据

聚乙二醇的标号	分子量范围	熔点(°C)	闪点(°C)
PEG 900	850~950	32~35	110
1000	950~1050	37~40	260
1500	1400~1600	45~50	250
2000	1900~2200	50~52	—
3000	2700~3300	55~59	230
4000	3500~4500	59~61	100

聚乙二醇的标号	分子量范围	熔点(C)	闪点(C)
6000	5700~7000	60~63	100
8000	7000~9000		270
10 000	8500~11 500	63~65	240
12 000	10 000~13 000	64~65	240
17 500	15 000~20 000	59~63	—
20 000	17 500	63~66	240
35 000	35 000	64~66	240

4.3.3. 葡聚糖凝胶

葡聚糖凝胶(sephadex)是葡聚糖和甘油的醚桥交联的立体网状结构。所使用的交联剂是1-氯代-2,3-环氧丙烷。其用量决定了糖的长链间交联的多少和孔隙的大小。葡聚糖G后边的数字是其吸水量的10倍,有人将球型的葡聚糖凝胶直接投入到待浓缩的液体中,藉助于其自身的溶胀,将水分吸收而达到浓缩的目的。本品的价格较为昂贵;虽可回收再用,但其回收的操作步骤较为繁琐。一般的透析工作皆不使用。浓缩时Sephadex G-10, G-15和G-25为首选的型号。

4.3.4. 聚丙烯酰胺凝胶

聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel)干燥剂是用丙烯酰胺和甲撑双丙烯酰胺交联聚合而成,其商品为小球形或细小柱状的干燥颗粒,呈白色或淡黄色。其丙烯酰胺含量可以从10%至25%。丙烯酰胺含量小的适用于浓缩分子量大的蛋白质等大分子溶液,丙烯酰胺含量大的则适用于分子量较小的蛋白质溶液的浓缩。该浓缩凝胶可以吸收水分和低分子量物质。其缺点是吸水至饱和量的时间较长;一般约需10~18小时,而且对被浓缩物质的回收率有一定的影响。分子量愈低,回收率也愈低;有时仅达80%左右。即使分子量大的大分子蛋白质的回收率最高也不到95%。

4.3.5. 聚乙烯吡咯烷酮

用于浓缩的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)的分子量为10 000和24 000者。聚乙烯吡咯烷酮浓缩时的情况与使用基本上和PEG相同。

4.4. 硅烷化剂

为了防止玻璃器皿或塑料制品对实验材料的吸附,有时对他们要进行硅烷化处理(简称硅化处理),以避免或减少宝贵的实验样品的损失。硅化时所使用的有机硅物质称之为硅烷化剂(silanizing agent)。作为硅烷化剂需有耐热、憎水、抗氧化力强、介电系数要高以及蒸汽压力要低等特性,尤其是化学稳定性要好。这样的硅烷化剂可以在硅化后牢固地附着于被硅化的实验用品上。

4.4.1. 二氯二甲基硅烷或二甲基二氯硅烷

金冬雁等译. 分子克隆实验指南 (第 2 版). 科学出版社, 1992
苏拔贤主编. 生物化学制备技术. 科学出版社, 1986
Budavari S. The Merck Index, 11th ed, Merck & Co. , 1989
Fluke Catalog. Chemika-Biochemika Analytika, Fluka Chemika, AG Switzerland, 1995/96
Riedel-deHaen Catalog. Laboratory Chemicals, 1990
Sigma Catalog: Biochemicals and Reagents for Life Science Research. Sigma Chemical Company, 1997

5. 离子交换剂

离子交换层析是生物化学、分子生物学研究中应用非常广泛的分离、提纯技术,并大量地应用于生产中。由于近年来研制出许多先进的仪器设备和新型的离子交换剂,使得这一技术又有了很大的发展。本章着重介绍一些常用的离子交换剂的性质及其应用。对于一些已被更先进的产品逐渐淘汰或厂家已不再提供的商品,以及国内较少进口的商品,此处不再介绍。常用的离子交换剂一般有三种类型:①离子交换树脂;②离子交换纤维素;③离子交换球型多糖。此外,还有其他类型的离子交换剂,其应用形式也较多,如离子交换柱、离子交换膜、离子交换薄层板及离子交换纸等。从离子交换剂的性质上又可分为阳离子交换剂、阴离子交换剂、兼性离子交换剂、吸附性交换剂等。无论是阳离子交换剂或是阴离子交换剂,均有强酸型、弱酸型、强碱型和弱碱型之分。

5.1. 离子交换树脂

离子交换树脂是一种特殊网状分子结构的不溶性高分子化合物,大多数离子交换树脂的母体或原料是不溶性的交联聚苯乙烯、交联聚甲基丙烯酸、酚醛、硅酸铝钠等,通过化学反应把带电的集团连接到母体上。带负电的具结合阳离子的功能,称为阳离子交换剂;带正电的具结合阴离子的功能,称之为阴离子交换剂。除极少数为不规则粒状外,一般均为球型颗粒。通过特殊的纯化处理和颗粒筛选可用于分析或层析制备等工作。

离子交换树脂的种类很多,各个生产厂家所标明的名称及型号虽各有不同,但有些树脂在性能上是十分类似的。这里仅择要介绍一些主要的常用离子交换树脂的规格型号及其技术数据。

表 5-1 常用阴离子交换树脂及其数据

Dowex 阴离子交换树脂							
树脂名称及 型号	基质 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目) 干	湿交换容量 (mEq/ml)	排阻限	使用温度 (°C)
Dowex1-X2 (AG 1-X2)	S	强碱	2	50~100, 100~200, 200~400, <400	0.6	2700	50(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)
Dowex1-X4 (AG 1-X4)	S	强碱	4	20~50, 50~100, 100~200, 200~400, <400	1	1400	50(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)
Dowex1-X8 (AG 1-X8)	S	强碱	8	20~50, 50~100, 100~200, 200~400, <400	1.2	1000	50(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)
Dowex2-X8 (AG 2-X8)	S	强碱	8	20~50, 50~100, 100~200, 200~400	1.4	1000	30(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)

续表 5-1

Dowex 阴离子交换树脂							
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目)干	湿交换容量 (meq/ml)	排阻限	使用温度 (°C)
Dowex2-X10 (AG 2-X10)	S	强碱	10	100~200	1.5		30(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)
Dowex3-X4A (AG 3-X4A)	S	弱碱	4	20~50, 100~200 200~400	1	1400	60
Dowex4-X4 (AG 3-X4A)	S	弱碱	4	100~200	0.8	1400	60
Bio-Rex 树脂							
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目)干	湿交换容量 (mEq/ml)	排阻限	使用温度 (°C)
Bio-Rex 5	AA	混合强 弱碱	4	20~50, 100~200 100~200, 200~400	2.8	1400	60
Bio-Rex 9		强碱		20~50, 100~200, 100~200, 200~400	1.3	1400	50(OH ⁻ 型) 150(Cl ⁻ 型)
Amberlite 阴离子交换树脂							
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目)干	湿交换容量 (mEq/ml)		使用温度 (°C)
Amberlite							
IRA-401	S	强碱	4	(湿)16~50	1.0		60 (OH ⁻ 型) 77 (Cl ⁻ 型)
IRA-402	S	强碱	6	(湿)16~50	1.25		60 (OH ⁻ 型) 77 (Cl ⁻ 型)
CG-400	S	强碱	8	(干)100~200, 200~400	1.4		60 (OH ⁻ 型) 77 (Cl ⁻ 型)
IRA-904	MR	强碱	4	(湿)20~50	0.7		40 (OH ⁻ 型) 77 (Cl ⁻ 型)
IRA-410	S	强碱	8	(湿)16~50	1.4		60 (OH ⁻ 型) 77 (Cl ⁻ 型)
IR-45	S	弱碱		(湿)16~50	1.9		100
IRA-67	A	弱碱		(湿)18~50	1.6		75
IRA-93	MR	弱碱		(湿)16~50	1.4		100

Duolite 阴离子交换树脂						
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目) 湿	湿交换容量 (mEq/ml)	使用温度 (°C)
Duolite						
113	S	强碱	2~3	16~50	1.3	60
	S	强碱	3~5	16~50	1.3	60
	S	强碱	7~9	16~50	1.3	60
A161	MP	强碱		50~100 16~45	1.1	60 (OH ⁻ 型) 100 (Cl ⁻ 型)
A116	S	强碱		16~50	1.4	35 (OH ⁻ 型) 75 (Cl ⁻ 型)
A162	MP	强碱		16~45	1.1	35 (OH ⁻ 型) 75 (Cl ⁻ 型)
A303	S	强碱	7~9	16~50	1.3	70
A378	MP	强碱		16~50	1.1	60 (OH ⁻ 型) 100 (Cl ⁻ 型)

表 5-2 常用阳离子交换树脂及其数据

Dowex 阳离子交换树脂						
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目) 干	湿交换容量 (mEq/ml)	使用温度 (°C)
Dowex50W-X2 (AG 50W-X2)	S	强酸	2	50~100, 100~200 200~400	0.7	150
Dowex 50W-X4 (AG 50W-X4)	S	强酸	4	20~50, 50~100, 100~200, 200~400, 400	1.2	150
Dowex 50W-X8 (AG 50W-X8)	S	强酸	8	20~50, 50~100, 100~200, 200~400, <400	1.7	150
Dowex 50W-X12 (AG 50W-X12)	S	强酸	12	50~100, 100~200, 200~400, <400	2.3	150
Bio-Rex 阳离子交换树脂						
树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目) 干	湿交换容量 (mEq/ml)	使用温度 (°C)
Bio-Rex 70	MR,A	弱酸	10	20~50, 50~100, 100~200, 200~400, <400	3.3	100

Amberlite 阳离子交换树脂

树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目)	湿交换容量 (mEq/ml)	使用温度 (°C)
Amberlite						
IR-120	S	强酸	8	(湿)16~50	1.9	120
GC-120	S	强酸	8	(干)100~200, 200~400	1.9	120
IRC-50	A	弱酸	5	(湿)16~50	3.5	120
GC-50	A	弱酸	5	(干)100~200, 200~400	3.5	120

Duolite 阳离子交换树脂

树脂名称及 型号	基质* 类型	功能基 性质	交联度 (%)	粒 度 (目)湿	干交换容量 (mEq/g)	使用温度 (°C)
Duolite						
225	S	强酸	4	16~50,50~100	4.5~5.0(meq/g) 干	120
	S	强酸	8	16~50,50~100 100~200,<200	4.5~5.0(meq/g) 干	120
	S	强酸	12	16~50,50~100	4.5~5.0(meq/g) 干	120
C255	S	强酸	10	16~35	2.0	140
C26C	MP	强酸	高	16~50	1.8	140

a: S 为 polystyrene resin, A 为 polymethacrylic resin, AA 为 polyalkyleneamine resin, MP 为 macroporous resin, MR 为 macroreticular resin.

5.2. 纤维素离子交换剂

纤维素离子交换剂为早期的分离介质之一,而且一直沿用至今,一般分为纤维状、微粒、短纤维及球状四种类型。纤维素离子交换剂具有表面积大,开放性的支持骨架使大分子能自由地进入和快速地扩散,同时对大分子的吸附容量较大,洗脱方便而不易导致大分子的变性且回收率高。多用于蛋白质、核酸、酶、寡核苷酸、肽及病毒等的分离纯化和分析工作。较常用的纤维素离子交换剂有 Whatman 公司的商品 DE-、CM-、P-、AE-、SE 及 QA-等纤维素离子交换剂,Bio-Rad 公司生产的 Cellex D、Cellex E、Cellex P 和 Cellex CM 等纤维素离子交换剂以及 Pharmacia 公司生产的 DEAE Sephacel 等。DEAE Sephacel 是常规层析用的离子交换剂,适用于蛋白质核酸及其他生物高分子的层析,使用方便简单,物理稳定性好,回收率高。

表 5-3 Whatman 公司的商品纤维素离子交换剂

阴离子交换纤维素					
纤维素名称	交换剂类型	基质性状	工作 pH 范围	标称流速 (cm/h)	蛋白容量 (mg/ml)
DE51	弱阴离子	微粒	2~9	40	30
DE52	弱阴离子	微粒	2~9	40	120
DE53	弱阴离子	微粒	2~9	40	120
QA52	强阴离子	微粒	2~12	40	140
DE92	弱阴离子	纤维状	2~9	75	40
QA92	强阴离子	纤维状	2~12	75	40
阳离子交换纤维素					
纤维素名称	交换剂类型	基质性状	工作 pH 范围	标称流速 (cm/h)	蛋白容量 (mg/ml)
SE52	强阳离子	微粒	2~12	40	200
SE53	强阳离子	微粒	2~12	40	280
CM52	弱阳离子	微粒	4.5~10	40	180
SE92	强阳离子	纤维状	2~12	75	180
CM92	弱阳离子	纤维状	4.5~10	75	200
P11	强弱混	纤维状	3~10	30	40

表 5-4 DEAE-Sephacel 纤维素离子交换剂

名称	DEAE-Sephacel
离子交换类型	弱阴离子交换剂
全离子交换容量 $\mu\text{mol/ml}$	95~135
排阻限 (球蛋白)	$\approx 1 \times 10^6$
平均容量 甲状腺球蛋白	$\approx 6.4 \text{mg/ml}$
人血清白蛋白	$\approx 150 \text{mg/ml}$
α 乳清蛋白	$\approx 120 \text{mg/ml}$
粒型及粒度	球型颗粒, 粒径: 40~160 μm (湿)
结构	纤维素用表氯醇交联
化学稳定性	对常用缓冲液稳定 对强酸强碱敏感
物理稳定性	床体积在 $I=0.05$ 和 $I=0.5$ 时有 % 体积变化
pH 稳定性	2~12 (工作), 2~12 (清洗)
灭菌	Cl ⁻ 型在 pH 7 时可 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 分钟
抗菌剂	20% 乙醇

Bio-Rad 生产的商品纤维素离子交换剂是 Cellex 系列。其技术数据见表 5-5。

表 5-5 Cellex 系纤维素离子交换剂

纤维素名称	交换剂类型	基质性状	溶胀体积 ml(干)	全交换容量 meq/g
Cellex D	阴离子型	纤维状	8	0.7±0.1
Cellex CM	阳离子型	纤维状	7	0.7±0.1
E	阳离子型	纤维状	3.5	0.3±0.05
P	阴离子型	纤维状	4.5	0.85±0.1

表 5-6 纤维素离子交换剂常用的抑菌剂

功能团	常用抑菌剂及其浓度
DE 或 QA	0.2% (w/v) 氯化烷基二甲苯铵, 20% 乙醇
CM 或 SE	0.1% (w/v) 叠氮钠 或 0.1% (w/v) 2,2'-二硫双(氧化吡啶) 或 0.02% (w/v) 乙基汞硫代水杨酸钠
P11	0.1% (w/v) 2,2'-二硫双(氧化吡啶)

5.3. 葡聚糖系离子交换剂

离子交换葡聚糖为 Pharmacia 公司以 G 系葡聚糖凝胶 G-25 和 G-50 两种凝胶过滤介质, 与四种不同的功能基团连结而成的葡聚糖离子交换剂。分为 A 型阴离子交换剂和 C 型阳离子交换剂, 分别标以 A-25 或 A-50, C-25 或 C-50。离子交换葡聚糖与离子交换纤维素不同的是这种离子交换剂不仅具有离子交换的作用, 同时还具有分子筛的作用。离子交换葡聚糖由于其单位重量所携带的大量离子交换集团, 使得他的总交换容量要远远大于常用的离子交换纤维素。但由于其所使用的母体关系, 故在不同的离子强度的缓冲体系中的床体积变化要比离子交换纤维素明显。离子交换交联葡聚糖的技术数据见表 5-7。

表 5-7 离子交换交联葡聚糖的技术数据

	DEAE-Sephadex		QAE-Sephadex		CM Sephadex		SP-Sephadex	
	A-25	A-50	A-25	A-50	C-25	C-50	C-25	C-50
性能	弱碱	弱碱	强碱	强碱	弱酸	弱酸	强酸	强酸
粒径	离子交换交联葡聚糖的湿粒径依缓冲体系的离子强度和 pH 而改变							
pH 稳定性(工作)	2~9	2~9	2~10	2~10	6~13	6~10	2~10	2~10
(清洗)	1~4	1~4	2~12	2~12	2~13	2~13	2~13	2~13
全交换容量(mmol/g)	3.0~4.0		2.6~3.4		4.0~5.0		2.0~2.6	
有效 Mr 范围	A-25, C-25 型: $< \approx 3 \times 10^4$ 和 2×10^5 A-50, C-50 型: $< \approx 3 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$							

	DEAE-Sephadex		QAE-Sephadex		CM-Sephadex		SP-Sephadex	
	A-25	A-50	A-25	A-50	C-25	C-50	C-25	C-50
珠体及粒径	珠体为球型,干凝胶粒径范围 40~125 μ m							
珠体结构	交联葡聚糖							
化学稳定性	对水,盐溶液,有机溶剂,碱和弱酸稳定							
物理稳定性	A-25,C-25 型:稳定性好 A-50,C-50 型:在不同的离子强度和 pH 时有体积变化							
灭菌	离子交换葡聚糖在盐型时可于 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 分钟							
抑菌剂	阴离子	0.001% 苯基汞盐(仅限弱碱溶液)						
	阳离子	0.005% 乙基硫代水杨酸汞(仅限弱酸性溶液)						
	或使用	0.05% 氯丁醇,氯蒽酮,(仅限弱酸性溶液),20% 乙醇三者中之一						

本表摘编自 Pharmacia Biodirectory 1996 Pharmacia Biotech.

表 5-8 离子交换交联葡聚糖的应用数据

型号	载量/ml	粒径(干)	pH 稳定性	耐压	最快流速	特性/应用
Sephadex	(mg)	(μ m)	工作[清洗]	Mpa	cm/h	
DEAE						
A-25	140 (α -乳清蛋白)	40~120	2~9 [2~13]	0.11	475	小蛋白以及巨大分子
A-50	110 (HSA)	40~120	2~9 [2~12]	0.01	45	中等大小的生物分子
QAE						
A-25	10 (HSA)	40~120	2~10 [2~13]	0.11	475	低分子量蛋白多肽 核苷酸以及巨大分子
A-50	80 (HSA)	40~120	2~11 [2~12]	0.01	45	中等大小的生物分子
SP						
C-25	230 (核糖核酸酶)	40~120	2~10 [2~13]	0.13	475	小蛋白以及巨大分子
C-50	110 (牛碳氧血红蛋白)	40~120	2~11 [2~12]	0.01	45	中等大小的生物分子
CM						
C-25	190 (核糖核酸酶)	40~120	6~13 [2~13]	0.13	475	小蛋白以及巨大分子
C-50	110 (牛碳氧血红蛋白)	40~120	6~10 [2~12]	0.01	45	中等大小的生物分子

5.4. 琼脂糖系离子交换剂

离子交换琼脂糖是带有功能基团的交联琼脂糖,常用的如 Pharmacia 公司生产的 Sepharose 系的离子交换剂和 Bio-Rad 公司生产的 Bio-gel A 离子交换剂等。

5.4.1. Sepharose 系的离子交换剂

Pharmacia 公司生产的琼脂糖离子交换剂有 Sepharose CL-6B, Sepharose High

Performance (Sephacrose HP) 和 Sepharose Fast flow (Sepharose FF) 数种。

Sephacrose CL-6B 交联琼脂糖离子交换剂属偶联离子交换凝胶,是大孔珠状离子交换剂,是引入两种功能基的交联琼脂糖。DEAE Sepharose CL-6B 是弱阴性离子交换剂,CM Sepharose CL-6B 是弱阳性离子交换剂。这类离子交换剂有较好的分辨力,载量很高,适合于蛋白、多糖、核酸及其他大分子物质的分离。其床体积不因溶液的 pH 或离子强度的变化而改变。其技术数据见表 5-9。

表 5-9 DEAE Sepharose CL-6B 交联琼脂糖离子交换剂的数据

	DEAE Sepharose CL-6B	CM Sepharose CL-6B
交换剂类型	弱阴离子	弱阳离子
全交换容量	0.13~0.17	0.1~0.14
排阻限(球状蛋白)	$\approx 4 \times 10^6$	$\approx 4 \times 10^6$
有效容量:		
甲状腺球蛋白	2.0 mg/ml	—
人血清白蛋白	170 mg/ml	—
α 乳清蛋白	150 mg/ml	—
	—	9.5 g/m
牛血红蛋白	—	75 mg/m
核糖核酸酶	—	120 mg/m
pH 稳定性(工作)	3~12	3~12
(清洗)	2~14	2~14
珠型与粒径	球型结构,湿粒径 45—165 μ m,均值 90 μ m	
珠体结构	6%交联琼脂糖	6%交联琼脂糖
化学稳定性	对所有常用水性缓冲液: 1mol/L NaOH, 1mol/L 乙酸, 8mol/L 尿素, 8 mol/L 盐酸胍,乙醇及甲醇等均稳定	
物理稳定性	pH 及离子强度的变化对其体积的影响极微	
最大流速*	150cm/h	150cm/h
灭菌	各自的反荷离子为 Cl ⁻ 和 Na ⁺ , pH 为 7 时 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 分钟	
抗菌剂	20% 乙醇	20% 乙醇

引自 Pharmacia BioDirectory 1996。

Sepharose FF 离子交换剂是 6% 的交联琼脂糖引入功能基而生成的珠状琼脂糖离子交换剂。具有极好的流速性能。对较宽的分子量范围均有极高的容量。而且可以在位清洗。有很好的物理和化学稳定性,其线性流速可达 750 cm/h。离子强度及 pH 的变化对其体积没有明显的影响。由于他的高流速和高载量,最适合于进行大量粗制产品的纯化工作。商品的 Sepharose FF 离子交换剂有 Q Sepharose FF 和 SP Sepharose FF 两种强阴性和强阳性的离子交换剂,以及 DEAE Sepharose FF 和 CM Sepharose FF 两种弱阴性和弱阳性的离子交换剂。这四种商品的技术数据见表 5-10。

Sepharose HP 离子交换剂有 Q Sepharose HP 强阴性离子交换剂和 SP Sepharose HP 强阳性离子交换剂两种产品,其功能基类似于 Q Sepharose FF 和 SP Sepharose FF 这种高载量和高分辨率的基质,是琼脂糖凝胶中颗粒最细、分辨率最高、化学稳定性和 pH 稳定性好,其流速和载量均适合实验室或大量制备应用。Sepharose High Performance 系离子交换剂的技术数据见表 5-11。

表 5-10 Sepharose Fast Flow 的技术数据

	Q Sepharose Fast Flow	SP Sepharose Fast Flow	DEAE Sepharose Fast Flow	CM Sepharose Fast Flow
交换剂类型	强阴性	强阳性	弱阴性	弱阳性
总离子容量 (mmol/ml)	0.18~0.25	0.18~0.25	0.11~0.16	0.09~0.13
排阻限(球状蛋白)	$\approx 4 \times 10^6$	$\approx 4 \times 10^6$	$\approx 4 \times 10^6$	$\approx 4 \times 10^6$
有效容量:				
人血清白蛋白	120 mg/ml	—	110 mg/ml	—
α -乳清蛋白	110 mg/ml	—	100 mg/ml	—
免疫球蛋白 G	—	50 mg/ml	—	15 mg/ml
核糖核酸酶	—	70 mg/ml	—	50 mg/ml
平均粒径	90	90	90	90
粒径范围	45~165	45~165	45~165	45~165
珠型	球形,直径 45~165(湿)			
珠体结构	6%交联琼脂糖			
pH 稳定性(工作)	2~12	4~13	3~12	4~13
(清洗)	1~14	3~14	1~14	2~14
化学稳定性*	对所有常用水性缓冲液,1 mol/L NaOH,8 mol/L 尿素,8 mol/L 盐酸胍,70%乙醇(在 40℃ 试验 7 天)			
物理稳定性	pH 及离子强度的改变对其体积的影响极微			
最大流速**	750 cm/h	750 cm/h	750 cm/h	750 cm/h
灭菌	反离子为 Cl^- (Q 及 DEAE) 和 Na^+ (SP 及 CM) 时,可于 pH 7、121℃ 高压灭菌 30 分钟			
抗菌剂	20% 乙醇	20% 乙醇	20% 乙醇	20% 乙醇

本表数据引自 Bio Directory 96*Pharmacia Biotech.

* 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L 乙酸只能用于清洗。

** 用丙酮进行的试验。

表 5-11 Sepharose High Performance 的技术数据*

	SP Sepharose High Performance	Q Sepharose High Performance
交换剂类型	强阳性	强阴性
荷电基团	$-\text{SO}_3$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
离子载量(mmol/ml)	0.14~0.20	0.14~0.20
动力学载量(mg/ml)	55 (RNase)	70 (HSA)
流速,水在 25℃ (cm/h)	>50	>150
平均粒径(μm)	34	34
粒径范围(μm)	24~34	24~34
珠体结构	交联琼脂糖,6%	交联琼脂糖,6%
排阻限	$\approx 4 \times 10^6$	$\approx 4 \times 10^6$
pH 稳定性(长时)	4~13	2~12
(短时)	3~14	2~14
化学稳定性	对所有常用水溶性缓冲剂,8 mol/L 尿素,6 mol/L 盐酸胍,70%乙醇及 1 mol/L NaOH^{**} 均稳定	

* 本表数据引自 Bio Directory 96*Pharmacia Biotech.

** 1 mol/L NaOH,1 mol/L 乙酸只能用于清洗。

5.4.2. Bio-Gel A 系交联琼脂糖离子交换剂

Bio-Rad 公司生产的 Bio-Gel A 系交联琼脂糖离子交换剂,有 DEAE Bio-Gel A 离子交换剂和 CM Bio-Gel A 离子交换剂两种。为 4% 的交联琼脂糖珠,可用于生化分离、制备和分析工作。DEAE Bio-Gel A 是弱阴性离子交换剂,是二乙基氨基交换基团与琼脂糖基质偶联的。CM Bio-Gel A 是弱阳性离子交换剂,是羧甲基交换基团与琼脂糖偶联的。它们的层析特点是具有极高的回收率,缓冲体系的离子强度或 pH 改变时,体积的膨缩变化极小。pH 和化学稳定性好。DEAE Bio-Gel A 和 CM Bio-Gel A 的技术数据见表 5-12。

表 5-12 DEAE Bio-Gel A 和 CM Bio-Gel A 的技术数据

	DEAE Bio-Gel A	CM Bio-Gel A
功能基团	二乙基氨基乙基	羧甲基
基质	Bio-Gel A-5m	Bio-Gel A-5m
工作 pH 范围	2~9.5	4.5~10
离子载量	20±5μeg/ml	20±5μeg/ml
反离子	Cl ⁻	Na ⁺
结合容量(血红蛋白,mg)	45±10*	45±10**
粒径范围	80~150μm	80~300μm
排阻限	5 000 000 D	5 000 000 D
线形流速***	>20 cm/h	>20 cm/h
化学稳定性在 10mmol/L HCl	极好	极好
在 10mmol/L NaOH	极好	极好
体积变化 pH (4~12)	极微	极微
离子强度(0~0.45 mol/L)	极微	极微
工作温度范围	2~30°C	2~30°C
水合物,水溶液	pH 8	pH 7
抗菌剂	0.05% NaN ₃	0.05% NaN ₃

* 在 10mmol/L 醋酸钠溶液 pH5.0 时测定。

** 在 5 mmol/L Tris-HCl 溶液 pH8.6 时测定。

*** 用 1.5×15cm 柱测定。

本表引自 Bio-Rad Life Sciences Research Products 1996。

5.5. Source 系离子交换剂

是低压层析系统中分辨率最高,流速极快而且反压,特别适合生物分子的分离。Source 离子交换介质颗粒大小均一。由于其在 1000 cm/h 以上的流速时仍能保持较高的分辨率和高载量,所以能使试验在数分钟内完成。因其具有极高的化学物理稳定性,可用 1mol/L HCl 和 1mol/L NaOH 在位清洗。因此大大地延长了它的使用寿命。此外,Source 离子交换介质还具有低的非特异性吸附、回收率高、良好的重复性和工艺放大能力等特点。商品的 Source 离子交换介质有 Q 和 S 两种。其技术数据见表 5-13。

表 5-13 Source 的技术数据

Source	15Q	15S	30Q	30S
功能基性能	强阴性	强阳性	强阴性	强阳性
基质		聚苯乙烯/二乙烯基苯		
珠体型		刚性,球型,多孔,单分散体,15 μ m		
孔径		20~1000nm		
最大反压		依层析柱的说明而定		
pH 稳定性		2~12 (长时间工作), 1~14 (短时间清洗)		
长时间操作		所有常用水性缓冲液均可使用		
工作温度		4~40 $^{\circ}$ C		
商品		以 Na ⁺ 或 SO ₄ ²⁻ 为反离子在 20%乙醇中		
预装柱				
床体积		1 ml 或 6 ml		
床直径		6.4 mm (1 ml 柱), 16 mm (6 ml 柱)		
床高		30 mm		
最大滴压		1.5 MPa (15 bar, 220 psi)		
最大流速		9.6 ml/min (1800 cm/h)		

数据引自 BioDirectory 1996 Pharmacia Biotech.

5.6. MonoBeads 系离子交换剂

MonoBeads 离子交换剂是近几年来 Pharmacia 公司推出的一类新型的以亲水性聚酯为骨架的离子交换剂。能快速,高效地分离蛋白、肽和低聚核苷酸。分辨率极高。对 pH 稳定,粒径分布范围极窄(10 \pm 0.5 μ m)。动态载量大,用在纯化单克隆抗体时,可从毫克到克。MonoBeads 柱的寿命长。

表 5-14 三种功能基 MonoBeads 柱的性能

MonoBeads	Mono Q	Mono S	Mono P
类型	强阴	强阳性	层析聚焦
带电基团	-CHN(CH)	-CHSO	混合阴离子
离子载量 (mmol/ml)	0.32 \pm 0.05 (Cl ⁻)	0.16 \pm 0.02 (Na ⁺)	0.18 \pm 0.03 (Cl ⁻)
柱尺寸			
HR 5/5	5 \times 50 mm	5 \times 50 mm	5 \times 50 mm
RH 5/20	n. a.	n. a.	5 \times 200 mm
HR 10/10	10 \times 100 mm	10 \times 100 mm	n. a.
HR 16/10	16 \times 100 mm	16 \times 100 mm	n. a.
平均粒度 (μ m)	10 \pm 0.5	10 \pm 0.5	10 \pm 0.5
标准偏差 (μ m)	\leq 0.3	\leq 0.3	\leq 0.3
M _r (蛋白质)	>10 ⁷	>10 ⁷	>10 ⁷
pH 稳定性(长时间)	2~12	2~12	2~12
pH 稳定性(短时间)	2~14	2~14	2~14
化学稳定性	MonoBeads 柱对水/(C ₁ -C ₄)醇溶液稳定, 100%二甲基亚砜,二甲基甲酰胺及甲酸能改变凝胶的分离性质。避免氧化和活化试剂。但可以使用非离子化去污剂		

数据引自 BioDirectory 1996 Pharmacia Biotech.

表 5-15 不同尺寸 MonoBeads 柱的技术数据

	Mono Q	Mono Q	Mono Q	Mono S	Mono S	Mono Q	Mono P	Mono P
HR	5/5	10/10	16/10	5/5	10/10	6/10	5/5	5/20
标称全交换容 量(mg/柱)								
人血清清蛋白	65	500	1300	—	—	—	—	—
免疫球蛋白 G	—	—	—	75	600	1500	—	—
标称蛋白回收%	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100	90~100
标称酶活性回收%	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80	>80
推荐流速 (ml/min)*	0.5~2	6	10	0.5~2	6	10	0.5~1	0.5~1
正常分离时间(min)	5~20	40	40	5~20	40	40	5~10	5~10
最大压力(Mpa)	5	5	3	5	5	3	5	5

* 蒸馏水, 25 °C

数据引自 Pharmacia BioDirectory 1996 Pharmacia Biotech.

5.7. Toyopearl 系离子交换剂

Toyopearl 系离子交换剂是用聚乙烯醇 Toyopearl 系凝胶过滤介质, 连接不同的离子交换基团制成的。目前商品的 Toyopearl 系离子交换剂有 DEAE-和 CM-两种, 见表 5-16。

表 5-16 Toyopearl 系离子交换剂

	DEAE-Toyopearl 650	CM-Toyopearl 650
交换剂类型	弱碱性	弱酸性
粒径 (μm)	20~40, 40~80	20~40, 40~80
工作 pH 范围	2~9	6~10
功能基 pH 值	11.5	4.7
排阻限 (PEG)	1 000 000	1 000 000
全交换容量 mmol/ml	108	120
有效交换容量 mg/ml		
牛血清清蛋白	26	45
铁蛋白	15.0	—
甲状腺球蛋白	11.5	—
流速 ml/(h·cm ²)	>300	>300

数据引自刘国诠主编, 生物工程下游技术。化学工业出版社, 1993。

(吴 翠)

参 考 文 献

- 井村伸正等編. 生化学ハンドブック. 丸善株式会社, 1984
- 刘国詮. 生物工程下游技术. 化学工业出版社, 1993
- 林卓坤等. 色谱法(一). 科学出版社, 1986
- 苏拔贤等. 生物化学制备技术. 科学出版社, 1986
- Brown. T. A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991
- Bio-Rad Laboratories Catalog. Life Science Research Products, California, U. S. A. 1996
- Budavari S. The Merck Index. 10th ed, Merck & Co. U. S. A. ,1984
- Chembers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
- Fluka Chemie AG Catalog. Chemika-Biochemika Analytika, Switzerland, 1995/96
- Pharmacia Biotech. Catalog. BioDirectory, Uppsala, Sweden. 1996
- Rex M C Dawson et al. Data for Biochemical Research. 3rd Edition. Oxford Science Publications, 1986
- Whatman Brochure. Process Scale Ion-exchange Chromatography. Whatman International Ltd, England
- Whatman International Ltd. Ion-exchange Chromatography. 4/95 1996

6. 凝胶过滤介质

凝胶过滤又称分子筛层析,凝胶渗透和排阻色谱等。适合用于凝胶过滤的介质很多,为了取得预期的分离纯化效果及保持层析分离后的产品不因之变性失活,应选用最适合于被分离物的介质和层析条件。作为凝胶过滤介质的性质、筛孔大小、颗粒的均一性、机械强度及化学稳定性等都应符合于凝胶过滤的要求。

6.1. 葡聚糖凝胶

6.1.1. Sephadex G 型葡聚糖凝胶的特性要点

名称: Sephadex G-。

型号: Sephadex G-10~Sephadex G-200 共 8 种。

结构: 葡聚糖微网状结构的干凝胶。

特性: 葡聚糖 G 后边的数字代表不同的交联度,数值愈大交联度愈小,吸水量愈大。其数值大致为吸水量 X 的 10 倍。Sephadex 对碱和弱酸稳定(在 0.1 mol/L 盐酸中可以浸泡 1~2 小时)。在中性时可以高压灭菌。不同型号中又有颗粒粗细之分。颗粒粗的分离效果差,流速快。颗粒愈细分离效果愈好,但流速也愈慢。超细型的多用于精密的分离工作。交联葡聚糖工作时的 pH 稳定性在 2~11 的范围内。葡聚糖 G 型凝胶分离的分子量分级范围为 $\sim 8 \times 10^5$ 。Sephadex G 型葡聚糖凝胶的数据见表 6-1。

表 6-1 Sephadex G 型葡聚糖凝胶的数据*

Sephadex 型号	粒度范围 (湿球) μm	得水值 (ml/g) 干胶	床体积 (ml/g) 干胶	有效分离范围		pH 稳定性 (工作)	最大 流速* (ml/min)
				葡聚糖	球型蛋白		
G-10	55~166	1.0 \pm 0.1	2~3	$<7 \times 10^2$	$<7 \times 10^2$	2~13	D
G-15	60~181	11.5 \pm 0.2	2.5~3.5	$<1.5 \times 10^3$	$<1.5 \times 10^3$	2~13	D
G-25 粗	172~516	2.5 \pm 0.2	4~6	$1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$	$1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$	2~13	D
中	96~256						
细	34~138						
超细	17.2~69						
G-50 粗	200~606	5.0 \pm 0.3	9~11	$5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$	2~10	D
中	101~303						
细	40~60						
超细	20~80						
G-75	92~277	7.5 \pm 0.5	12~15	$1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$	$3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^4$	2~10	6.4
超细	23~92				$3 \times 10^3 \sim 7 \times 10^4$		1.5

续表 6-1

Sephadex 型号	粒度范围 (湿球) μm	得水值 (ml/g) 干胶	床体积 (ml/g) 干胶	有效分离范围		pH 稳定性 (工作)	最大 流速** (ml/min)
				葡聚糖	球型蛋白		
G-100	103~31	10.0 \pm 1.0	15~20	1 \times 10 ³ ~1 \times 10 ⁵	4 \times 10 ³ ~1.5 \times 10 ⁵	2~10	4.2
超细	26~103				4 \times 10 ³ ~1 \times 10 ⁵		
G-150	116~34	15.0 \pm 1.5	20~30	1 \times 10 ³ ~1.5 \times 10 ⁵	5 \times 10 ³ ~3 \times 10 ⁵	2~10	1.9
超细	29~116		18~22		5 \times 10 ³ ~1.5 \times 10 ⁵		0.5
G-200	129~388	20.0 \pm 2.0	30~40	1 \times 10 ³ ~2 \times 10 ⁵	5 \times 10 ³ ~6 \times 10 ⁵	2~10	1.0
超细	32~19		20~25		5 \times 10 ³ ~2.5 \times 10 ⁵		0.25

* 本表数值取自 Pharmacia Biotech Biodirectory 1996。

** 为 2.6 \times 30 cm 层析柱在 25 $^{\circ}$ C 用蒸馏水测定之值。

D=Darcy's law.

6.1.2. Sephadex G 型葡聚糖凝胶的溶胀*

G 系交联葡聚糖凝胶亲水性强,只能在水中溶胀(仅有极少数的有机溶剂也可以使之溶胀),有机溶剂或含有机溶剂较多的水溶液会改变其孔隙,使之收缩失去或降低凝胶的分离能力。在水中溶胀时如在室温则需要较长的时间,才能达到充分溶胀的程度,但可煮沸到 100 $^{\circ}$ C,以缩短其溶胀时间。Sephadex G 型葡聚糖凝胶溶在室温溶胀和在 100 $^{\circ}$ C 溶胀所需时间见表 6.2。

表 6-2 Sephadex G 型葡聚糖凝胶溶胀所需时间

凝胶型号 G-10~G-200	所需最小溶胀时间*	
	20~22 $^{\circ}$ C (室温)	100 $^{\circ}$ C (沸水浴)
Sephadex G-10	3	1
G-15	3	1
G-25	3	1
G-50	3	1
G-75	24	3
G-100	72	5
G-150	72	5
G-200	72	5

* 溶胀时要将凝胶浸泡在过量的水或缓冲液中。在整个溶胀过程中应避免剧烈地搅拌,尤其不能使用电磁搅拌,以免破坏了它的颗粒结构,以及产生许多碎末而影响洗脱时的流速。

6.1.3. 凝胶的回收与保存

凝胶过滤介质在层析过程中不与被分离的物质及洗脱缓冲体系中的任何成分发生作用。在一般情况下使用过的柱子只要经过简单地重新平衡即可继续使用,但凝胶柱经过多次使用后,柱子的顶端会沉积一些杂质,可将柱顶端被污染的部分适当地除去一些并加以

补充,然后重新平衡即可使用。如果层析过程中发现柱效降低时(如柱的流速降低,分离效果差等),则凝胶需再生处理,以恢复其分离功能。凝胶的再生最好不在柱上进行(有些凝胶可在位清洗),可将凝胶在 0.5 mol/L 氯化钠及 0.5 mol/L 氢氧化钠的混合液中浸泡;一般约需 30 分钟以上。然后用蒸馏水洗至中性,最后用缓冲液平衡即可恢复使用。

经常使用的凝胶,一般加入一些抗菌剂放在普通冰箱中,即可保存较长的时间。如确切在相当长的时间里不准备使用时,则以保存干凝胶为好。处理时可先用较浓的氯化钠浸泡(如 0.5 mol/L),再用 0.5 mol/L 氢氧化钠处理并用蒸馏水洗至中性,然后用递增百分浓度的乙醇分多次作脱水处理。一般可从 30% 的乙醇开始;每次均应让凝胶在乙醇中多浸泡一些时间。在用无水乙醇处理后,最后再用乙醚处理一次以加速乙醇的挥发。处理后的凝胶宜在 80℃ 以下的温度烘干。在进行凝胶的回收时,如在每一步操作时,均使用布氏漏斗抽滤可大大地加快整个回收过程。

注意:

(1)凝胶在氢氧化钠溶液中浸泡的时间不要过长。

(2)不要图快过早地使用百分浓度太大的乙醇,以免凝胶颗粒收缩太快,破坏了他的结构,因而影响了它的分离能力。

(3)在乙醚未充分挥发完以前,切不可将含多量乙醚的凝胶放入烘箱,以免发生危险。

(4)溶胀了的凝胶不可放入低温冰箱中冻结,以免其球形结构被破坏。

6.1.4. 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex LH 型的特性要点

名称: Sephadex LH。

型号: Sephadex LH-20 及 Sephadex LH-60 共二种。

结构: 羟丙基取代羟基后的交联葡聚糖凝胶。

特性: G 型交联葡聚糖凝胶只适合在水及极少数的有机溶剂中溶胀,而当其羟基被羟丙基取代后,则不仅能在水中溶胀,而且能在多数有机溶剂中溶胀。溶胀后的体积与所使用的有机溶剂的种类有关。膨胀体积较大的有二甲基亚砷、吡啶、二甲基甲酰胺及甲醇等,膨胀体积较小的如乙酸乙酯及甲苯等。LH 型的葡聚糖凝胶在膨胀后与 G 型的凝胶相似,也有较好的稳定性。

嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex LH 型分离的分子量范围为 $\sim 10^4$ 。

嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex LH 型的数据见表 6-3。在不同溶剂中的柱床体积见表 6-4。

表 6-3 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex LH 型的数据

Sephadex	颗粒直径	筛孔	分离的分子量范围	持水量	膨胀所需时间
LH-20~LH-60	(μm)	(目)	肽或蛋白质	ml/g 干胶	(室温)
Sephadex LH-20	25~100	200	$1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ (乙醇)	4(水,乙醇及	3 小时
			$1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^3$ (三氯甲烷)	三氯甲烷)	
LH-60	40~120	200	$1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ (水,甲醇)	12~13(水,乙醇	
			$1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^4$ (三氯甲烷)	及三氯甲烷)	

表 6-4 嗜脂性葡聚糖凝胶 Sephadex LH 型的柱床体积

溶剂	柱床体积 ml/g 干胶		溶剂	柱床体积 ml/g 干胶	
	LH-20	LH-60		LH-20	LH-60
二甲基亚砜	4.4~4.6	13.4~13.8	二氯甲烷	3.6~3.9	11.0~11.3
吡啶	4.2~4.4	13.4~13.8	丁醇	3.5~5.8	11.0~11.3
二甲基甲酰胺	4.2~4.4	12.9~13.3	异丙醇	3.3~3.6	10.0~10.3
水	4.0~4.4	12.4~12.8	四氢呋喃	3.3~3.6	9.6~9.9
甲醇	3.9~4.3	11.9~12.2	二氧六环	3.2~3.5	9.8~10.1
二氯乙烷	3.8~4.1	11.0~11.3	丙酮	2.4~2.6	3.1~3.3
氯仿(含1%乙醇)	3.8~4.1	12.3~12.6	四氯化碳	1.8~2.2	1.9~2.1
丙醇	3.7~4.0	11.0~11.3	苯	1.6~2.0	2.4~2.6
乙醇(含1%苯)	3.6~3.9	12.0~12.3	乙酸乙酯	1.6~1.8	2.0~2.1
异丁醇	3.6~3.9	10.8~11.1	甲苯	1.5~1.6	1.9~2.1
甲酰胺	3.6~3.9	8.6~8.9			

6.2. 聚丙烯酰胺葡聚糖

6.2.1. 聚丙烯酰胺葡聚糖 Sephacryl S 型的特性要点

名称: Sephacryl。

种类: Sephacryl S-100 HR~S-1000 HR 共 6 种。

结构: 丙烯葡聚糖用甲撑双丙烯酰胺交联的球型凝胶。

特性: 介质的反压特别低, 具有良好的机械性能, 分离速度快, 分辨率高, 化学稳定性高过传统凝胶, 并可用 0.5 mol/L NaOH 在位清洗。中性时(pH 7 左右)可以高压灭菌。与 Sephadex 相比, 力学稳定性较好。在 SDS、6mol/L 盐酸胍及 8mol/L 尿素中均可使用。在较低的流速时可获得高分辨率。可以在 3~11 的 pH 范围时使用。

聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶分离的分子量范围为 $1 \times 10^3 \sim$ 或 $> 10^8$ 。聚丙烯酰胺葡聚糖 S 型的数据见表 6-5。

表 6-5 聚丙烯酰胺葡聚糖 Sephacryl S 型凝胶的数据*

Sephacryl	S-100 HR	S-200 HR	S-300 HR	S-400 HR	S-500 HR	S-1000 SF
有效分离范围						
球形蛋白	$1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$	$5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$	$1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	$2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$	-	-
多糖	-	$1 \times 10^3 \sim 8 \times 10^4$	$2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$	$1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	$4 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$	$5 \times 10^4 \sim$ 或 $> 10^8$
DNA 排阻限(bp)	-	118	118	271	1078	20 000
珠型	球形的, 粒度范围 25~75 μ m (平均 47 μ m)					
结构	丙烯葡聚糖和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺					
化学稳定性	对所有常用缓冲液稳定; 0.2mol/L 或 0.1mol/L 盐酸, 1mol/L 乙酸, 8mol/L 尿素, 6mol/L 盐酸胍, 1%十二烷基硫酸钠, 2mol/L 氯化钠, 24%乙醇, 30%丙醇, 30%乙腈 (在 40℃时试验 7 天), 0.5mol/L 氢氧化钠 (仅用于在位清洗)。					
pH 稳定性(长时)	3~11	3~11	3~11	3~11	3~11	3~11
pH 稳定性(短时)	2~13	2~13	2~13	2~13	2~13	2~13
物理稳定性	对因 pH 及离子强度所引起的体积变化可忽略不计					
高压灭菌	可在 121℃, pH 7 时, 消毒 30 分钟					
抗菌剂	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇	20%乙醇

* 本表数据取自 Pharmacia 公司 Biotech BioDirectory 1996。* 老的产品目录上为 $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 。

6.3. 琼脂糖凝胶

6.3.1. 琼脂糖凝胶 Sepharose

(1) 琼脂糖凝胶的特性要点

名称: Sepharose。

种类: Sepharose 6B, 4B, 2B 三种。

结构: 琼脂糖球型结构。

特性: 琼脂糖凝胶是由糖链间的次级氢键来稳定网状结构的。用琼脂糖的浓度来控制网状结构的疏密程度, 是传统的偶联琼脂糖介质。非特异性吸附极低。分离范围极为宽阔, 可以从 $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$ 。其力学稳定性不如 Sephacryl, 40°C 以上融化, 0°C 以下则发生不可逆转的球形结构上的破坏。因此既不能冻结也不能高压灭菌。如需无菌试验可用化学法灭菌, 如用二乙基焦碳酸酯等。本品适用于分离分子量差异大, 但对分辨率要求不太高的样品。

(2) CL 琼脂糖的凝胶的特性要点

名称: CL Sepharose。

种类: Sepharose CL-2B, CL-4B, CL-6B 共三种。

结构: Sepharose 和 2,3-二溴丙醇反应交联而成 Sepharose CL 型凝胶。

特性: 除具有 Sepharose 2B、4B、6B 的性质外, CL 型凝胶增强了化学和物理的稳定性。尤其是在有机溶剂中凝胶的结构无变化, 特别是适合于含有有机溶剂样品的分离。并能承受较强的在位清洗。流速也比 Sepharose 有明显的提高。

表 6-6 琼脂糖凝胶的数据[®]

琼脂糖	2B	CL-2B	4B	CL-4B	6B	CL-6B
琼脂糖含量%	2	2	4	4	6	6
分离范围						
球蛋白	$7 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$	$7 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$	$6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$	$6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$	$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$	$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$
多糖	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$	$3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	$3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$	$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$
DNA 排阻限(bp)	1353	1353	872	872	194	194
颗粒范围(μm)	60~200	60~200	45~165	45~165	45~165	45~165
pH 稳定度(长时)	4~9	3~13	4~9	3~13	4~9	3~13
pH 稳定度(短时)	3~11	2~14	3~11	2~14	3~11	2~14
灭菌*	C	A	C	A	C	A
最大体积流速**	0.83	1.2	0.96	2.17	1.16	2.5
最大线性流速***	10	15	11.5	26	14	30

[®]引自 Pharmacia 公司 Biotech BioDirectory 1996。

* A: 化学消毒, C: pH 7 时于 120°C 高压灭菌 30 分钟。

** ml/min。

*** cm/h。

6.3.2. 琼脂糖凝胶 Superose

琼脂糖凝胶 Superose 是 Pharmacia 公司提供的一种高分辨率,在较宽的缓冲体系范围内流速都很快新型凝胶过滤介质。能一次性分离生物分子大小差异很大的混合物,适合于蛋白质、多糖、核酸及病毒等的分离。商品的 Superose 有琼脂糖含量为 6% 的 Superose 6 和琼脂糖含量为 12% 的 Superose 12 两种及其他的衍生物等。

(1) Superose 的特性要点

名称: Superose。

种类: Superose 6 和 Superose 12 两种,每种均有普通级和制备级之分。

结构: 珠状琼脂糖经两次交联的新型凝胶。

特性: Superose 的刚性特好,物理化学稳定性高,在高粘性液体(如 8mol/L 尿素)下也能保持较好的流速,适合于糖类,核酸,病毒的分离纯化,特别是包含体蛋白在促溶剂中的纯化。它的颗粒细小,大小分布均匀。工作的 pH 稳定性为 3~12,清洗时的 pH 稳定性为 1~14。具有宽广的分离范围,能进行高流速纯化,适合高低压层析使用,而且他的使用寿命特别长。Superose 的数据见表 6-7。

表 6-7 Superose 的数据

	Superose 6	Superose 6 pg	Superose 12	Superose 12 pg
商品类型	预装柱 HR 10/30	大包装, 125ml	预装柱 HR 10/30	大包装, 125ml
床体积	24ml	—	24ml	—
柱尺寸 (mm)	10×300	—	10×300	—
推荐用柱	—	HR 16/50	—	HR 16/50
分离范围蛋白质 Mr	$5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$	$5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$	$1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^5$	$1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^5$
排阻限	4×10^7	4×10^7	2×10^6	2×10^6
粒径范围 (μm)	11~15	20~40	8~12	20~40
样品载量 (μl)	200	A	200	A
pH 稳定性 (工作)	3~12	3~12	3~12	3~12
(清洗)	1~14	1~14	1~14	1~14
最大反压 (Mpa)	1.5	0.4	3.0	0.7
推荐流速 (ml/min)*	0.3~0.5	0.3~0.5	0.5~1.0	0.5~1.0
标称分离时间 (min)	20~30	A	20~30	A

A: 视柱的尺寸而定。

* 蒸馏水, 25℃。

HR 10/30 的数值。

本表摘自 Pharmacia catalog, Pharmacia Biotech BioDirectory 1996。

6.3.3. 琼脂糖凝胶 Bio-Gel A

名称: Bio-Gel A。

种类: Bio-Gel A-0.5~Bio-Gel A-150 共 6 种。

结构: 琼脂糖的球型结构。

特性: Bio-Gel A 型琼脂糖的结构与 Sepharose 的相同, 在 2~30 °C 时稳定, 其孔径大小是以琼脂糖含量百分数来控制的。Bio-Gel A 型凝胶琼脂糖含量从 10%~1%, 适用于各种常用缓冲液和高盐缓冲液的分离, 而无多大床体积的改变。其他性质与 Sepharose 基本上相同。可在 pH 4~13 使用。多用于蛋白质, 多肽及 DNA 等的纯化。琼脂糖凝胶 Bio-Gel A 的数据见表 6-8。

表 6-8 琼脂糖凝胶 Bio-Gel A 型的数据*

型号 Bio-Gel A	规格	颗粒直径 (湿 μm)	粒度 (湿 目)	琼脂糖 含量%	分级范围 (球蛋白)	排阻限 核酸(bp)	最大承受压力 (cm 水柱)	流速 (cm/h)
A-0.5m	粗	150~300	50~100					20~25
	中	75~150	100~200	10	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$	200	>100	15~20
	细	38~75	200~400					7~13
A-1.5m	粗	150~300	50~100					20~25
	中	75~150	100~200	8	$1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$	750	>100	15~20
	细	38~75	200~400					7~13
A-5m	粗	150~300	50~100					20~25
	中	75~150	100~200	6	$1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$	2000	>100	15~20
	细	38~75	200~400					7~13
A-15m	粗	150~300	50~100					20~25
	中	75~150	100~200	4	$4 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^7$	7000	90	15~20
	细	38~75	200~400					7~13
A-50m	粗	150~300	50~100					20~25
	中	75~150	100~200	2	$1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$	20000	50	5~15
	细	38~75	200~400					7~13
A-150m	粗	150~300	50~100	1	$1 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^8$	70 000	20	5~10
	细	75~150	100~200					5~15

* 新的 Bio-Rad 公司目录中 Bio-Gel A-150 未列入, 但国内有些单位仍有该型号的凝胶, 故仍列入供参考。表中数值取自 Bio-Rad 公司 Life Sciences Research Products 1996。

6.4. 聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel P

6.4.1. Bio-Gel P 型凝胶的特性要点

名称: Bio-Gel P。

种类: Bio-P2 Gel~Bio-P100 Gel 共 7 种。

结构: 丙烯酰胺用甲撑双丙烯酰胺交联成球型的聚丙烯酰胺的亲水性干凝胶。

特性: Bio-Gel P 与 Sephadex 类同。过酸或碱作用下不如 Sephadex 稳定, 强的酸或碱会使酰胺基水解。水解时引起羧基脱落。在 pH 5.5~6.5 时可以高压消毒 (120 °C)。交联聚合时交联剂的多少决定其孔径的大小(成反比)。交联度小的力学稳定性较差。大多

数的缓冲液均可使用。另外 SDS、盐酸胍及尿素, 20% 的乙醇溶液(v/v) 亦可安全使用。其工作的 pH 范围为 2~10。Bio-Gel P 型凝胶的数据见表 6-9。

表 6-9 Bio-Gel P 型凝胶的数据

型号	规格	粒 径(目)	径(湿) (μm)	得水值 (ml/g 干胶)	床体积 (ml/g 干胶)	分级范围 (道尔顿)	溶胀时间 (20°C 100°C)		流速 (cm/h)
Bio-Gel P-2	细	200~400	45~90	1.5	3	$1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3$	4	2	5~10
	特细	~400	<45						<10
Bio-Gel P-4	中	100~200	90~180	2.4	4	$8 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$	4	2	15~20
	细	200~400	45~90						10~15
	特细	~400	<45						<10
Bio-Gel P-6	中	100~200	90~180	3.7	6.5	$1 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$	4	2	15~20
	细	200~400	45~90						10~15
	特细	~400	<45						<10
Bio-Gel P-6 DG		100~200	90~180						15~20
Bio-Gel P-10	中	100~200	90~180	4.5	7.5	$1.5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$	4	2	15~20
	细	200~400	45~90						10~15
Bio-Gel P-30	中	100~200	90~180	5.7	9	$2.5 \times 10^3 \sim 4 \times 10^4$	12	3	7~13
	细	200~400	45~90						6~11
Bio-Gel P-60	中	100~200	90~180	7.2	11	$3 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$	12	3	4~6
	细	200~400	45~90						3~5
Bio-Gel P-100	中	100~200	90~180	7.5	12	$5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$	24	5	4~6
	细	200~400	45~90						3~5

本表所列数值取自 Bio-Rad 公司 Life Sciences Research Products。新目录中一些老型号产品均未列入, 如 Bio-Gel P-150、Bio-Gel P-200 和 Bio-Gel P-300。

6.5. 交联聚苯乙烯凝胶 Bio-Beads

交联聚苯乙烯是由苯乙烯和二乙烯苯聚合而成的有机凝胶。凝胶孔径的大小是用控制加入交联剂的量和变换稀释剂的种类来形成的。

6.5.1. Bio-Beads 层析凝胶的特性要点

名称: Bio-Beads S-X Beads。

种类: Bio-Beads S-X1 Beads ~ Bio Beads S-X12 Beads 共四种。

结构: Bio-S-X 凝胶是苯乙烯, 二乙基苯聚合的凝胶。

特性: Bio-Beads S-X Beads 系列凝胶。对强酸及强碱稳定, 在中性范围时可耐热至 200 °C 以上稳定不变。使用温度太高时凝胶易老化而会降低凝胶的分离效能。适用于苯、甲苯、二甲苯、四氯化碳、二甲基甲酰胺、酮类、芳香类、二氯甲烷、邻二氯苯、四氢呋喃和三氯代苯等非极性有机溶剂。凝胶在上述有机溶剂中溶胀的柱床体积各不相同。极性有机

溶剂如乙醇及丙酮等则不能使用。其 X 后面的数字代表交联度%。

Bio-Beads S-X Beads 的分离范围为 $4 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$ 。Bio-Beads S-X Beads 的数据见表* 6-10。

表 6-10 Bio-Beads S-X 型的数据

Bio-Beads 型号	交联度 (%)	粒度 (目)	颗粒大小 (μm)	在苯中膨胀的体积 (ml/g 干胶)	分离范围 (道尔顿)	排阻限 (道尔顿)
Bio-Beads						
S-X 1 Beads	1	200~400	40~80	7.5	$6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$	1.4×10^4
S-X 2 Beads	2	200~400	40~80	6.2	$1 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^2$	2.7×10^3
S-X 3 Beads	3	200~400	40~80	4.75	$\sim 2 \times 10^3$	2×10^3
S-X 4 Beads	4	200~400	40~80	4.2	$\sim 1 \times 10^3$	1.4×10^3
S-X 8 Beads	8	200~400	40~80	3.1	$\sim 1 \times 10^3$	1×10^3
S-X12 Beads	12	200~400	40~80	2.75	$\sim 4 \times 10^2$	4×10^2
S-M 2 Beads	2	20~50		2.9	$6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$	1.4×10^4

本表数据根据 Bio-Rad Life Sciences Research Products 96 编辑。其中老产品目录中尚有 Bio-Beads S-X 2、Bio-Beads S-X 4 及 Bio Beads S-M 2 数种规格，新目录中均未列入。这儿种型号的数据均系老产品目录中的数据。

6.6. Superdex 凝胶过滤介质

Superdex 是一种由 Pharmacia 公司提供的新型凝胶过滤介质，是目前分辨率和选择性最高的凝胶过滤介质，流速快，反压低。是一种用葡聚糖以共价结合到交联多孔琼脂糖珠体上的复合凝胶。

6.6.1. Superdex 凝胶的特性要点

名称：Superdex。

种类：Superdex 30~ Superdex 200 共三种。

结构：葡聚糖以共价结合到交联多孔琼脂糖珠体上的球形凝胶珠。

特性：Superdex 凝胶介质的非特异性吸附很低，因而提高了回收率。其化学物理稳定性很高，仅在极低的离子强度下才有极微弱的非特异性吸附。在 0.1 mol/L HCl 及 0.1 mol/L NaOH 中保温 40℃ 经 400 小时后分辨率仍保持不变。对 1% SDS、8 mol/L 尿素及 6mol/L 盐酸胍均可使用，并保持其良好的色谱性能。在中性时(pH 7)可进行高压消毒灭菌。其 pH 稳定性为 3~12(工作)，1~14(清洗)。Superdex 的平均粒径为 34 μm ，粒径范围为 24~44 μm 。其所使用的抗菌剂为 20% 乙醇。制备级 Superdex 凝胶的技术数据见表 6-11。

表 6-11 制备级 Superdex 凝胶过滤介质的数据

Superdex 型号	粒径 μm	分离范围		pH 稳定性		耐压 Mpa	推荐流速 cm/h	应用范围
		球蛋白	葡聚糖	工作	清洗			
30	24~44	<1×10 ⁴		3~12	1~14	0.3	100	肽类,多糖,小蛋白等
75	24~44	3×10 ³ ~7×10 ⁴	5×10 ² ~3×10 ⁴	3~12	1~14	0.3	100	重组蛋白,细胞色素等
200	24~44	1×10 ⁴ ~6×10 ⁵	1×10 ³ ~1×10 ⁵	3~12	1~14	0.3	100	单抗,大蛋白等

* Pharmacia 公司提供平均粒径为 13μm 的预装柱和不同规格的制备级预装柱。

6.7. 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl

6.7.1. 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的特性要点

名称：Toyopearl。

型号：Toyopearl HW 40~HW 70 共 6 种。

结构：交联聚乙烯醇。

特性：为多孔三向网状结构，理化性能稳定，不受强酸和强碱的影响。可在 120℃ 高压灭菌。在尿素，盐酸胍等高盐浓度的溶液体系中柱床体积变化不大，虽其骨架为高亲水性，但即使在有机溶剂中的体积变化也较小。Toyopearl 的高流速和优良的分离效果均较稳定，而且使用寿命长。其最大操作压力约为 7kg cm⁻²。

表 6-12 聚乙烯醇型凝胶 Toyopearl 的数据

Toyopearl 型号	粒度	湿粒径 (μm)	得水值 (ml/g 干凝胶)	分离范围		最大操作压力 (kg cm ⁻²)
				球形蛋白	葡聚糖	
HW 40	粗	50~100				
	细	30~60	3~4	1×10 ² ~1.5×10 ⁴	1×10 ² ~8×10 ³	约 7
	超细	20~40				
HW 50	粗	50~100				
	细	30~60	4~5	5×10 ² ~8×10 ⁴	5×10 ² ~2×10 ⁴	7
	超细	20~40				
HW 55	粗	50~100				
	细	30~60	4~5	1×10 ² ~7×10 ⁵	1×10 ³ ~2×10 ⁵	7
	超细	20~40				
HW 60	粗	50~100				
	细	30~60	5.5~4.5	5×10 ³ ~1×10 ⁶	2×10 ³ ~3×10 ⁵	7
	超细	20~40				
HW 65	粗	50~100				
	细	30~60	3~4	5×10 ² ~5×10 ⁶	1×10 ² ~1×10 ⁶	10
	超细	20~40				
HW 70	粗	50~100				
	细	30~60	3~4	5×10 ² ~5×10 ⁷	1×10 ⁵ ~1×10 ⁷	7
	超细	20~40				

本表引自井村伸正等編，生化学ハンドブック，丸善株式会社，1984。

6.8. 凝胶过滤用分子量标准

凝胶过滤用分子量标准试剂盒包括一组低分子量标准 (LMW); 其分子量范围为 13 700 到 67 000 道尔顿和一组高分子量标准 (HMW); 其分子量范围为 158 000 到 669 000 道尔顿, 两种分子量标准试剂盒均配有蓝色葡聚糖 2000, 其分子量为 ~2 000 000 道尔顿。凝胶过滤用分子量标准试剂盒的组成见表 6-12 和表 6-13。除商品的凝胶过滤用分子量标准品试剂盒外, 一些可用于凝胶过滤的分子量标准品见表 6-14。

表 6-13 凝胶过滤用低分子量标准的组成

分子量范围 13 700~67 000	
蛋白质	分子量
核糖核酸酶 A (ribonuclease)	13 700
胰凝乳蛋白酶原 (chymotrypsinogen A)	25 000
卵清蛋白 (ovalbumin)	43 000
牛血清清蛋白 (bovine serum albumin)	67 000
蓝色葡聚糖 (blue dextran 2000)	~2 000 000

表 6-14 凝胶过滤用高分子量标准的组成

分子量范围 158 000~669 000	
蛋白质	分子量
醛缩酶 (aldolase)	158 000
过氧化氢酶 (catalase)	232 000
铁蛋白 (ferritin)	440 000
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	669 000
蓝色葡聚糖 (blue dextran 2000)	~2 000 000

除以上商品的分子量标准试剂盒外, 可用于凝胶过滤的分子量标准品尚有许多可供选择使用。见表 6-15。

表 6-15 凝胶过滤用分子量标准品

分子量标准品		分子量
中文名称	英文名称	
谷胱甘肽(还原型)	glutathionin reduced	300
谷胱甘肽(二硫化物)	glutathionin disulfide	600
维生素 B-12	vitamin B-12	1300
杆菌肽	bacitracin	1400
促肾上腺皮质激素	ACTH	3500
细胞色素 C	cytochrome-C	13 000
肌红蛋白	myoglobin	17 000
α 糜蛋白酶原	α -chymotrypsinogen	24 500
碳酸酐酶	carbonic anhydrase	31 000
卵清蛋白	ovalbumin	43 000
牛血清清蛋白	bovin serum albumin	67 000
转铁蛋白	transferrin	74 000
免疫球蛋白 G	Ig G	158 000
血纤维蛋白原	fibrinogen	341 000
铁蛋白	ferritin	470 000
甲状腺球蛋白	thyroglobulin	670 000
病毒核酸	nucleic acid viruses	>1 000 000

(吴 肇)

参 考 文 献

- 井村伸正等编. 生化学ハンドブック. 丸善株式会社, 1984
- 林卓坤主编. 色谱法(一). 科学出版社, 1981
- 刘国诠主编. 生物工程下游技术. 化学工业出版社, 1993
- 苏拔贤主编. 生物化学制备技术. 科学出版社, 1986
- 施良和编. 凝胶色谱法. 科学出版社, 1985
- Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991
- Bio-Rad Catalog. Life Science Research Products 96. Bio-Rad Laboratories California U. S. A., 1996
- Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX, Bios Scientific Publishers, 1993
- Fluka Catalog. Chemika-Biochemika Analytika. Fluka Chemie AG Switzerland, 1995~1996
- Pharmacia Catalog. Pharmacia BioDirectory 96'. Pharmacia Biotech Uppsala Sweden, 1996
- Rex M. C. Dawson et al., Data for Biochemical Research. Oxford Science Publications, 1986

7. 亲和层析

7.1. 亲和层析

亲和层析是一种吸附层析,利用生物分子间的亲和吸附和解离而设计的层析方法。通过固定于水不溶性的支持物(载体)上的互补物(配体)的特异和可逆性的吸附,从而使所需纯化的物质提纯。如酶可与固定在载体上的底物反应,碳水化合物的特异糖基与固定在载体的凝集素反应,受体蛋白与固化的特异配基反应等。吸附在载体上的物质,再经洗脱液洗去杂质,可达到提纯的目的。有的洗脱液是特异的,如酶的竞争性抑制剂,非特异的洗脱液多是不同浓度的盐溶液,或不同 pH 的溶液等。亲和层析的特点是在温和条件下操作,过程简单,纯化倍数高,可达几千倍,而活化物质回收率非常高,对分离含量极少又不稳定的生物活性物质极为有效。

亲和层析包括三个共价结合的组分:不溶的基质(matrix)、一个间隔臂(spacer)及特异的配基(ligands)。

(1) 不溶性基质:一般用 4%~6% 琼脂糖球,琼脂糖可与表氯醇(epichlorohydrin), 二乙烯砜(divinylsulphone), 双环氧化物(bisepoxide, bisoxirane)交联,使其稳定。寡核苷酸配基一般用纤维素作基质,如寡脱氧胸苷酸-纤维素(oligo-dT-cellulose)。其他支持物有交联的右旋糖酐(dextran)、聚丙烯酰胺(polyacrylamide), 羟烷异丁烯酸盐多聚体(hydroxyalkyl-methacrylate polymers)及硅胶等(参考表 7-1、7-2)。

(2) 间隔臂:如是小分子的配基,可直接结合基质,但空间效应(steric effect)可能会影响蛋白与配基的反应。为解决此问题,所以在基质和配基之间引入一个间隔臂。最常用的间隔臂是 6~8 个碳原子的碳氢链,从基质到配基之间长度约 0.5~1nm,有时也可用较长的,可达 17 个碳原子。碳氢化合物与大分子进行疏水反应可能影响吸附,所以基质含有亲水基较合适。当配基是大分子,如是蛋白质,常常不须要间隔臂,直接接到固化基质即可。表 7-3 有制备亲和层析的间隔臂结构所结合的基质,与配基交联的末端反应基团。

(3) 配基:任何大分子或小分子只要与蛋白、核酸(或其它分子)有特异结合的都可以作为配基。许多配基如酶的底物、凝集素或抗原等。但这种配基有一定的局限性,只能特异的与某一种物质结合。如辅基(NAD、NADP)、核苷酸(ATP、cAMP 等)及固化的染料,这些化合物作为配基,反应的局限性较小,应用稍广(参考表 7-4)。应用这些配基与吸附剂结合,可用于提取与配基特异结合的物质。

表 7-1 亲和层析常用的基质

基 质	颗粒大小 (μm)	孔隙大小 (nm 或排出限度)	稳定性		表面基团	注释
			pH	耐压限度 (bar)		
天然						
交联的琼脂糖 (12%)	3~10	450×10^3	2~14	60	羟基	不需干燥
交联的琼脂糖 (12%)	5~40	450×10^3	2~14	60	羟基	
葡聚糖	40~120		2~12			
superose 6	13	$5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$	1~14	15	羟基	涨与缩依赖 离子强度
superose 12	10	$< 3 \times 10^5$	1~14	30	羟基	
硅胶						
Hypersil WP 300	5, 10	30nm	2~8	1035	硅烷醇	超过 pH 8 不稳定
LiChrospher range	10	30~400nm	2~8	—	硅烷醇	
Selectispher-10	10	50nm	2~8	80	结合 Tressyl-2 醇	
Ultrafinity-EP	—	—	2~8	—	结合环氧	
合成						
TSK-PW range	10~20	$10^3 \sim 3 \times 10^7$	1~13	130	羟基	
separon H 1000	10	$< 1 \times 10^6$	1~13	50	羟基	
Dynospheres						
XP-2507	20	5~200 nm	1~13	140	羟基	
Eupergit C30 N	30	$10^3 \sim 25 \times 10^3$	1~12	100	环氧	
聚丙烯酰胺			2~11			N-N'bis 有毒
聚苯乙烯	可达 1100		任何 pH			非离子作用

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

7.2. 制备亲和吸附剂的材料

表 7-2 活化的琼脂

活化的类型	活化胶的反应基团	配基的 反应基团	配基与胶的反应	注 释
活化的羰基-咪唑		R-NH ₂		结合后的产物比溴化氰活化的稳定, 所以联结的较少。在弱碱易水解
活化的溴化氰		R-NH ₂		蛋白及核酸最常用的方法, 可直接与胶结合。溴化氰有毒, 制备时必须小心。溴化氰化的琼脂, 其氰酸酯基很活跃, 在碱性(pH 低于 4 稳定)条件下不稳定。环形的在碱性条件下稳定, 但反应小

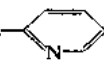
活化的类型	活化胶的反应基团	配基的反应基团	配基与胶的反应	注 释
活化的 N-羧琥珀酰亚胺		R-NH ₂		N-羧琥珀酰亚胺酯结合到活化的胶上。pH 高于 8.5 即很快水解。产物比较稳定
活化 p-硝基苯		R-NH ₂		比较稳定
Tresyl 活化		R-NH ₂ R-SH		活化后的胶比较稳定。放冷处, pH7.5 可过夜, 在 1 mmol/L HCl 可放几周。活化的胶可与 SH 及 NH ₂ 反应, 形成稳定的键

表 7-3 有间隔臂的琼脂

间隔臂类型	结 构	配基的反应基团	配基的结合形式	注 释
末端是氨基	$-NH \cdot (CH_2)_n \cdot NH_2$	R-COOH	$-NH-CO-R$	产物中 n=2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 可变的。与琥珀酸酐反应间隔臂可伸展。结合物可用水溶性的碳二亚胺(carbodi-imide) n=2, 3, 6, 10 合用
	$-O \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot (CH_2)_2 \cdot NH_2$	R-COOH	$-NH-CO-R$	
	$-CH_2 \cdot NH \cdot (CH_2)_3 \cdot NH \cdot (CH_2)_3 \cdot NH_2$	R-COOH	$-NH-CO-R$	
	$-O \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot O(CH_2)_4$ 	R-COOH	$-NH-CO-R$	
末端是羧基	$NH_2 \cdot (CH_2)_n \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot CH_2$			
	$-O \cdot CH_2 \cdot COOH$	R-NH ₂	$-O \cdot CH_2 \cdot CO-NH-R$	一般用水溶性碳二亚胺
	$-NH \cdot (CH_2)_5 \cdot COOH$	R-NH ₂	$-NH \cdot (CH_2)_5 \cdot CO-NH-R$	
	$-O \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot (CH_2)_2 \cdot NH$ $HOOC - (CH_2)_2 \cdot CO$	R-NH ₂	$-CO-NH-R$	10 个原子的亲水间隔臂

间隔臂类型	结构	配基的反应基团	配基的结合形式	注释
末端是环氧(环氧活化的琼脂)	$\begin{array}{c} \text{---CH---CH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$ $\text{---O---CH}_2\text{---CHOH---CH}_2\text{---O---} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{(CH}_2\text{)}_4 \\ \diagdown \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---CH---CH}_2\text{---O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\text{R} \cdot \text{NH}_2$ $\text{R} \cdot \text{OH}$ $\text{R} \cdot \text{SH}$	$\text{---CH---CH}_2\text{---}$ O $\begin{array}{c} \text{---CHOH---CH}_2\text{---NH---R} \\ \text{---CHOH---CH}_2\text{---O---R} \\ \text{---CHOH---CH}_2\text{---S---R} \end{array}$	琼脂与双环氧化物 (bisepoxyde), 形成 12 个碳原子的间隔臂。联结配基时需要 pH12~13, 可与氨基、羟基及巯基联结, 分别形成稳定的仲胺、醚及硫醚键。可用来联结含羟基的配基, 如碳水化合物
末端联胺基	---NH_2 $\cdot \text{NH}_2$ $\text{---NH} \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot (\text{CH}_2)_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{NH}_2$	$\text{R} \cdot \text{CHO}$	---NH---N=CH---R $\downarrow \text{NaBH}_4$ $\text{---NH---NH---CH}_2\text{---R}$	可与醛基联结
末端 N-羧琥珀酸亚胺酯 (N-琥珀酸亚胺活化的琼脂)	$\text{---NH} \cdot (\text{CH}_2)_5 \cdot \text{CO} \cdot \text{O} \cdot \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{---O---CH}_2\text{---CO---NH---} \\ \\ \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{---O---CH}_2\text{---CO---NH---} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\text{R} \cdot \text{NH}_2$ $\text{R} \cdot \text{NH}_2$	---CO---NH---R ---CO---NH---R	形成 6 个原子的疏水间隔臂。N-羧琥珀酸亚胺酯在 pH8.5 以上很快水解 含 10 个原子亲水的间隔臂
	$\text{---O---CH}_2\text{---CO---NH---} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}^+ \\ \\ \text{(CH}_2\text{)}_3 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{---O---CH}_2\text{---CO---} \\ \\ \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{---O---CH}_2\text{---CO---} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\text{R} \cdot \text{NH}_2$	---CO---NH---R	含 15 个原子的亲水间隔臂
	$\text{---NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SH}$	$\text{R} \cdot \text{SH}$	---S---S---R	配基与二硫键可逆联结
末端巯基 -SH	$\text{---NH} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SH}$ $\text{---O---CH}_2\text{---CO---NH}(\text{CH}_2)_2\text{---NH}$ $\text{HS} \cdot (\text{CH}_2)_2 \cdot \text{CH} \cdot \text{CO}$ $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}$	$\text{R} \cdot \text{SH}$ $\text{R} \cdot \text{SH}$	---S---S---R ---S---S---R	与 N-乙酰同型半胱氨酸联结形成间隔臂

续表 7-3

间隔臂类型	结构	配基的反应基团	配基的结合形式	注 释
可与巯基起反应的基团	$\text{—O—CH}_2\text{—CHOH—CH}_2\text{—S—S—}$ 	R—SH	—S—S—R	与硫化合物可逆联结, 包括含巯基的蛋白, 进行二硫键的交换
	$\begin{array}{c} \text{HOOC—CH}_2\text{—NH—CO} \quad \text{CO} \\ \quad \quad \quad \\ \text{—NH—CH—(CH}_2\text{)}_2\text{—CO—NH—CH—CH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \quad \quad \text{CH} \\ \\ \text{—S—S—CH}_2 \\ \\ \text{Pyridine ring} \end{array}$	R—SH	—S—S—R	间隔臂基团是谷胱甘肽, 与巯基化合物可逆联结, 包括与蛋白二硫键交换
多价间隔臂:	<p>多聚赖氨酸</p> $\begin{array}{c} \\ \text{—NH—赖氨酸} \\ \\ \text{(赖氨酸)}_n\text{—NH}_2 \\ \\ \text{—NH—赖氨酸} \end{array}$ <p>聚丙烯酰胺胍琼脂</p> $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{—NH—NH—CO—(CH}_2\text{)}_2\text{CH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CO} \quad \quad \quad \text{NH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH—(CH}_2\text{)}_2\text{—CO—NH—NH}_2 \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{—NH—NH—CO—(CH}_2\text{)}_2\text{CH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CO} \end{array}$	RCOOH	—NH—CO—R	多聚赖氨酸通过氨基与琼脂多部位结合, 但影响与配基结合
				聚丙烯酰胺胍与琼脂多部位结合, 影响配基结合

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

7.3. 吸附剂的配基

表 7-4 用于亲和吸附剂的配基

配基的分类	配基	注 释
核苷酸类	ATP, ADP, 5' AMP, 2' AMP 3'5'-cAMP, 2'5'-ADP, 3'5'-ADP, dATP, AP ₅ A, 腺嘌呤	吸附剂通过 C6 酰肼(hydrazide)与核苷酸中被过磷酸氧化的核糖醛基结合
	CTP, CDP, 5'-CMP GTP, GDP, 5'-GMP 7-甲基-GTP	有些吸附剂通过磷酸基联到对氨基酚间隔臂
	UTP, UDP, 5'-UMP UDP-葡萄糖酸	2'5' ADP 及 3'5' ADP 是对 NADP 及需要 CoA 的特异配基
寡核苷酸及多核苷酸	oligo dT, oligo dA, oligo dC oligo dG, oligo dI, DNA (天然及变性)	通过 5' 磷酸联结到纤维素基质。联结到琼脂糖基上的寡核苷酸长度小于 20 个核苷酸残基
	Poly rA, poly rC, poly rG, poly rI, poly rU, poly rI. poly rC, DNA(变性)	
辅酶及维生素	NAD, NADP, FMN CoA, HMG-CoA 生物素, 脱羧生物素 亚胺生物素, 其它生物类似物 氨甲喋呤	NAD, NADP 适合联 6~8 个原子的间隔臂上 辅酶 A 可通过-SH 基或游离-SH 结合。生物素通常通过侧链的羧基联结到间隔臂上
	氨基酸, 肽及胺	蛋白中 20 个 L-氨基酸, D-精氨酸, D-苯丙氨酸, D-色氨酸, L-甲状腺素 谷胱甘肽(还原及氧化), 己基谷胱甘肽, 硫溴化二甲基苯甲酸-硫-谷胱甘肽 5-羟色胺, 组胺, 精胺, 半胱胺, 抑胃酶肽
凝集素	伴刀豆球蛋白 A, 花生凝集素, 抗蛋白 A 凝集素, 黄豆凝集素, 小扁豆凝集素, 豌豆凝集素, 麦芽凝集素, 植物凝集素, 红细胞凝集素	一般凝集素可直接联到溴化氰活化的琼脂糖上

续表 7-4

配基的分类	配基	注 释
蛋白质	免疫球蛋白, 蛋白 A, 亲和素(单体及四聚体), 胃蛋白酶抑制剂, 钙调素, 血清蛋白, 明胶, 血红蛋白, 卵清蛋白, α -乳清蛋白, 鱼精蛋白, 胰岛素, 酶类	一般蛋白在温和条件下固化到溴化氰活化的琼脂糖上
糖类	D-木糖, L-岩藻糖, D-葡萄糖, D-半乳糖, D-甘露糖, D-葡萄糖胺, N-乙酰-D-葡萄糖胺, D-半乳糖胺, N-乙酰-D-半乳糖胺, D-乳糖, D-密二糖, D-麦芽糖, 肝素	单糖及双糖一般以糖苷(硫糖苷)联接到 P-氨基酚间隔臂上或是以糖胺联到氨基己糖的间隔臂上。糖的连接在第一个碳处有 α 或 β 构型的特异性 配基是糖的亲吸附剂, 一般是先将间隔臂与糖联结, 再与活化的琼脂反应
染料	西巴蓝 F3G-A(Cibacron Blue) 普施安红 HE 3B, (Procion red) 非特异的染料	这些染料是特异基团的配基特别是对需要核苷酸的酶及一些其它蛋白 普施安红 HE3B 对含有 NADP 的酶, 有较高的亲和力
疏水的	琼脂糖-NH-(CH ₂) _n -CH ₃ n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 琼脂糖-NH-(CH ₂) ₄ -C ₆ H ₅ 琼脂糖-O-CH ₂ CHOH-CH ₂ -O-R R=-(CH ₂) ₇ CH ₃ 或 C ₆ H ₅	基于与蛋白的疏水作用达到分离的效果 琼脂糖-NH-(CH ₂) _n -CH ₃ 可作为疏水层析的吸附剂
其它类的配基	氨基苯硼酸(aminophenyl boronic acid) m 及 P-氨基苯胺(m and P-amino benzamidine) 氯霉素(chloramphenicol) 胆固醇基半琥珀酸盐 (cholesteryl hemisuccinate) 胆酸, 脱氧胆酸 胆碱磷酸盐 乙醇胺基磷酸 p-羟基汞苯甲酸 亚胺二醋酸(imindiacetic acid) 三羧基甲基乙烯 (tri-carboxylmethylethylene) 二氨基(diamine) 草氨酸(oxamic acid) 吩噻嗪(phenothiazine) 酒石酸	对顺式二醇(cis-diol)有亲和 与含硫化合物形成巯基化合物 对钙调素特异

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

(潘华珍)

参 考 文 献

- 王琳芳. 分子生物学基本技术. 北京生理科学会出版, 1991
- Chandra P. Appel W. 李申德译. 分子生物学方法. 科学出版社, 1977
- Lowe C R. 刘毓秀译. 亲和层析导论. 科学出版社, 1983
- Mohr P. Chromatography, affinity. Marcel Dekker Inc, 1985
- Sewell P A. Chemistry analytical. John Wiley & Sons, 1987

8. 透析袋、微孔滤膜和超滤膜

8.1. 透析袋

透析也称渗析,是生物提取、分离、纯化过程中经常使用的一种方法。透析可以起到脱盐、分离和浓缩的作用。它是利用纤维素在透析袋(管)上形成不同孔径的小孔,使被透析物中的小分子物质和溶液透过,而将大分子的成分截留于透析袋内。其渗析小分子物质的范围取决于纤维素半透膜上小孔孔径的大小。譬如单纯除去制备过程中残存的盐,则只起到脱盐的作用。如欲除去在制备过程中由于分解所产生的小分子碎片或多余的溶剂,则可达到分离与浓缩的效果。如果对盐水或缓冲液透析,则又可制备成特定条件下的缓冲介质溶液。

目前商品透析袋分两类;一类是一直沿用的再生纤维素膜透析袋,另一类是较新的纤维素酯膜透析袋。这种产品充分考虑到了生物制备中小分子物质的透析。其截留值可达 $1 \times 10^5 D$ 。下面以 Spectro por 透析袋为例介绍这两类商品。

8.1.1. 纤维素膜透析袋

Spectro por 再生纤维素膜透析袋的品种和规格较全,其数据见表 8-1。

表 8-1 Spectro por 再生纤维素膜透析袋的数据

型号	规格	分子量截留值 (D)	扁平宽度 (mm)	直径 (mm)	厚度 (mm)	体积 (ml/cm)
Spectra por 1	7	$6 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$	10	6.4	0.051	0.32
			23	14.6	0.028	1.7
			32	20.4	0.028	3.2
			40	25.5		5.0
			50	31.8	0.046	8.0
			100	63.7		31.8
Spectra por 2	6	$1.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$	120	76.4		45.8
			1	2.5		0.05
			10	6.4	0.051	0.032
			25	15.9	0.020	2.0
			45	28.6	0.025	6.4
			105	63.7		31.8
Spectra por 3	3	3.5×10^4	120	76.4		45.8
			18	11.5	0.030	1.0
			45	28.6	0.025	6.4
			54	34.4	0.03	9.3

续表 8-1

型号	规格	分子量截留值 (D)	扁平宽度 (mm)	直径 (mm)	厚度 (mm)	体积 (ml/cm)
Spectra por 4	5	$1.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$	10	6.4	0.051	0.32
			25	15.9	0.020	2.0
			32	20.4	0.028	3.2
			45	28.6	0.025	6.4
			75	47.7	0.041	17.9
Spectra por 5*	4	$1.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$	65	41.4		13.4
			100	63.7		32.2
			120	76.4		45.8
			140	89.2	0.092	63.6
Spectra SMT**	4	$1.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$	4	2.5		0.05
			8	5.1		0.20
			10	6.4	0.51	0.32
			16	10.2		0.81
Spectra por 6*** (1)	4	1×10^3	12	7.6		0.46
			18	11.5		1.0
			38	24.2		4.6
			45	28.6		6.3
Spectra por 6 (2)	4	2×10^3	12	7.6		0.46
			18	11.5	0.30	1.0
			38	24.2		4.6
Spectra por 6 (3)	3	3.5×10^3	45	28.6	0.025	6.3
			18	11.5	0.030	1.0
			45	28.6	0.025	6.4
Spectra por 6 (4)	3	8×10^3	54	34.4	0.030	9.3
			23	14.6	0.020	1.7
			32	20.4	0.028	3.2
Spectra por 6 (5)	4	1×10^4	50	31.8	0.028	8.0
			10	6.4	0.051	0.32
			25	15.9	0.020	2.0
Spectra por 6 (6)	4	1.5×10^4	32	20.4	0.028	3.2
			45	28.6	0.025	6.4
			10	6.4	0.051	0.32
			25	15.9	0.020	2.0
Spectra por 6 (7)	3	2.5×10^4	32	20.4	0.028	3.2
			12	7.6		0.46
			18	11.5	0.030	1.0
Spectra por 6 (8)	3	5×10^4	14	21.6	0.025	3.7
			12	7.6		0.46
			18	11.5	0.030	1.0
			14	21.6	0.025	3.7

* 新产品目录中未列入,仅供定货订购及使用参考。

** SMT; Simemicro tubing 半微量透析袋。

*** por 6 透析袋是湿润形的,其防腐剂是1%苯甲酸钠。另有规格型号与 por 6 完全相同的产品,但不含重金属及硫化物。无需预处理即可使用。

表 8-2 纤维素酯膜透析袋的数据

型号 Spectra por	种类	分子量截留值 (D)	扁平宽度 (mm)	直径 (mm)	体积 (ml/cm)
CE*(1)	4	1×10^2	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(2)	4	5×10^2	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(3)	4	1×10^3	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(4)	4	2×10^3	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(5)	4	3.5×10^3	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(6)	4	5×10^3	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(7)	3	8×10^3	10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(8)	4	1×10^4	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(9)	4	1.5×10^4	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79
CE(10)	4	2.5×10^4	8	5	0.20
			10	6.4	0.32
			12	7.5	0.44
			16	10.2	0.79

8.1.2. 透析袋的预处理

干燥的透析袋在制备时曾用 10% 的甘油处理过,以防止干燥脆裂。一般透析时,只要浸泡润湿,并用蒸馏水充分洗涤,即可使用。对于要求较高的实验,除将甘油充分洗净外,还应将所含有的硫化物(约含 0.1%)及痕量的重金属除去。可用 10mmol/L 的碳酸氢钠浸洗,也可用煮沸的方法或用 50% 的乙醇浸泡。10mmol/L 的 EDTA 可以很好地除去重金属。EDTA 处理过的透析袋要用去离子水或超纯水冲洗,以免再度被重金属离子污染。

8.1.3. 透析袋的保存

1. 新的干燥透析袋应保存在密封的聚乙烯袋中,防止受潮生霉和被微生物蚀孔。最好能保存在普通冷柜中。

2. 湿润型的透析袋用 1% 的苯甲酸钠或 0.05% 叠氮化钠防腐,并应保存在密闭的塑料袋中以保持其湿润状态,勿使干燥,于 4℃ 冷柜中保存。

3. 经过处理或使用过的透析袋,原来添加的保湿剂已被除去,不允许使其再次干燥,否则极易脆裂破损。

4. 用过的透析袋应将其充分洗净,特别是上面附着的粘性物质,必要时可浸泡一段时间,或用含有氯化钠的溶液处理,以溶去透析袋上粘附的蛋白质等物质。再用蒸馏水洗净。保存在 50% 的甘油或 50% 的乙醇中。

8.2. 微孔滤膜和印迹杂交膜

滤膜的种类很多,其孔径与用途也各异,目前使用非常广泛,从一般过滤,微孔过滤,到超滤或在膜上进行分子杂交转移等。有些种类的膜也可以用来进行薄膜电泳分析(如醋酸纤维薄膜电泳分析)。纤维素薄膜尚可用于免疫分析和酶联免疫分析等。本处将介绍常用微孔滤膜的一般性质。

微孔滤膜主要用于微孔过滤,以除去溶液中的微小颗粒、细菌,或除去一些可交换的离子(如重金属离子等)。微孔滤膜的种类很多,其区别主要在于制备滤膜的原料、厚度、孔径的大小、对化学试剂的耐受性及消毒方式等。各个厂家生产的品种虽然名称各异,但在孔径大小及规格上没有多大的差别。微孔滤膜广泛用于培养基的除菌,高纯水中颗粒的滤除,配制高压液相色谱用流动相的过滤等。表 8-3 介绍各种微孔膜的种类,简称及其所使用的原料。

以下介绍几种常用的滤膜。

8.2.1. 醋酸纤维滤膜

醋酸纤维滤膜(cellulose acetate membrane)是使用较多的品种之一。与硝酸纤维滤膜不同的是醋酸纤维滤膜对大分子的亲和力较低,可耐受 180℃ 的高温,能高压蒸汽灭菌,平均厚度约 150 μ m。多用于溶液的除菌过滤,如细胞培养基的过滤,精密分析仪器中使用的要求较高的水和溶液中微小颗粒的滤除。此外还用于醋酸纤维薄膜电泳等。商品醋酸纤维滤膜的国内外规格型号大同小异。常用于微孔过滤的醋酸纤维滤膜见表 8-4。

表 8-3 微孔滤膜的种类

滤膜种类	简称	制膜原料
醋酸纤维膜	CA 膜	醋酸纤维 cellulose acetate
硝酸纤维膜	CN 膜	硝酸纤维 cellulose nitrate
聚碳酸酯膜	PC 膜	聚碳酸酯 polycarbonate
聚酰胺膜	PA 膜	聚酰胺 polyamide
再生纤维素膜	RC 膜	再生纤维素 regenerated cellulose
混合纤维素酯膜	CE 膜	混合纤维素酯 mixed cellulose ester
尼龙膜	—	尼龙 nylon
聚四氟乙烯膜	PTFE 膜	聚四氟乙烯 polytetrafluoroethylene
聚丙烯纤维膜	PP 膜	聚丙烯纤维 polypropylene
聚砜膜	PS 膜	聚砜 polysulfone
聚偏二氯乙烯膜	PVDF 膜	聚偏二氯乙烯 polyvinylidene difluoride
聚氯乙烯膜	PEC 膜	聚氯乙烯 polyethylene chloride

表 8-4 醋酸纤维滤膜

孔径 (μm)	流速(L/min · cm^2)		起泡点 (psi)	规格 直径(mm)*
	水	氮气		
0.22	0.016	1.9	47	13, 25, 47, 90, 142
0.45	0.03	4.0	37	13, 25, 47, 90, 142
0.80	0.16	13.5	14.2	13, 25, 47, 90, 142

* 国产滤膜的规格一般为 13, 25, 50, 100, 150mm。此外尚有 300mm×300mm 页膜等。

8.2.2. 硝酸纤维滤膜

硝酸纤维滤膜(nitrocellulose membrane)是用 100%硝酸纤维制造的,其强度及温度稳定性均较醋酸纤维滤膜好。可耐受 127℃ 的高温,一般可以在 121℃ 高压灭菌数次。硝酸纤维滤膜用于微孔过滤的较少,在生物化学和分子生物学研究中主要用于蛋白印迹法、核酸印迹法、分子杂交、免疫印迹等。孔径 0.45 μm 的硝酸纤维滤膜多用于蛋白质分析的工作中,常用以转移低分子量的蛋白质(<15 000D),特别是用半干膜的转移。0.2 μm 的硝

表 8-5 硝酸纤维滤膜

孔径 (μm)	流速(L/min · cm^2)		起泡点 (psi)	规格 直径(mm)*
	水	氮气		
0.10	0.027	0.67	44	13, 25, 47, 90, 142
0.20	0.018	2.4	61	13, 25, 47, 90, 142
0.45	0.045	5.0	40	13, 25, 47, 90, 142
0.80	0.165	15.0	19	13, 25, 47, 90, 142
1.2	0.22	20.4	16	13, 25, 47, 90, 142
2.0	0.30	28.3	13	13, 25, 47, 90, 142
5.0	0.40	40.9	11	13, 25, 47, 90, 142

酸纤维滤膜曾被报告过用于免疫检测工作中。近年来在临床诊断检测实验方面亦多用于生产快速诊断免疫试剂盒等(如早早孕诊断试剂盒等)。硝酸纤维素滤膜一般为白色光滑的有网格或无网格膜。厚度约为从 110~160 μm 。其规格及孔径等见表 8-5。

8.2.3. 印迹及其他工作中用的硝酸纤维滤膜

印迹用的硝酸纤维滤膜一般有 0.45 μm 和 0.2 μm 两种孔径的商品,其孔径、规格及用途等见表 8-6。

表 8-6 用于印迹工作的硝酸纤维滤膜

孔径 (μm)	结合容量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	商品规格 (页膜)	用途
0.45	80~100	20cm×20 cm	蛋白转移(抗原,免疫球 蛋白,糖蛋白,组蛋白和 非组蛋白等)
		15 cm×15 cm	
		15 cm×9 cm	
		9 cm×12 cm	
		7 cm×8.4 cm	
		11 cm×16 cm	
		卷筒装 33 cm×3 m	
		其他规格	
0.2	80~100	7 cm×8.4 cm	同上
		13.5 cm×16.5 cm	
		20×20	
		卷筒装 33 cm×3 m	
		其他规格	

8.2.4. 尼龙滤膜

尼龙滤膜(nylon membrane)是用纯尼龙制成的,是较为理想的溶液过滤和除菌的滤膜;它不仅能过滤水溶液,还能过滤各种有机溶剂。在 180 $^{\circ}\text{C}$ 时仍稳定,而且可以反复地进行高压灭菌。在印迹实验中还有用于核酸转移的尼龙 66 页膜和卷筒装膜。各生产和经销尼龙滤膜的厂商均有各自的规格和不同的商标,可根据需要选购。常用的微孔过滤尼龙膜和印迹用的尼龙膜的孔径规格等见表 8-7 和表 8-8。

表 8-7 用于微孔过滤的尼龙滤膜

孔径 (μm)	流速 水 ($\text{L}/\text{min} \cdot \text{cm}^2$)	起泡点 (psi)	规格 直径(mm)
0.2	44	40	13, 25, 47, 90, 142
0.45	54	25	13, 25, 47, 90, 142

表 8-8 用于印迹实验的尼龙滤膜

孔径 (μm)	规格 (cm)
0.2	9×12, 12×15, 15×15, 15×200, 20×20, 20×25 及 20×330, 30×330 (卷筒装)
0.45	7×8, 9×12, 12×15, 15×15, 15×200, 20×20, 20×25 及 20×330, 30×330 (卷筒装)

8.2.5. 聚四氟乙烯滤膜

聚四氟乙烯滤膜(polytetrafluoroethylene membrane, PTFE)是可以耐受较浓的酸、碱和许多有机溶剂的微孔膜。多用于溶液、溶剂和气体的过滤。能耐受 100~130℃ 的使用温度。见表 8-9。

表 8-9 常用的聚四氟乙烯滤膜

孔径 (μm)	流速 水 [L/(min·cm ²)]	起泡点 (psi)	规格 直径(mm)
0.2	50	13	13, 25, 47, 90, 142
0.5	110	7	13, 25, 47, 90, 142
1.0	350	3	13, 25, 47, 90, 142

8.2.6. 聚砜滤膜

聚砜滤膜(polysulfone membrane)具有比醋酸纤维滤膜和硝酸纤维滤膜更高的流速和较好的强度。适合用于生物领域、制药、纯水过滤、血清、组织培养用培养基的过滤和除菌等。其最高使用温度不如其他滤膜,一般为 100℃。可用于盐酸、四氯化碳、乙二醇、乙醚、甲醇和甲苯等有机溶剂。其规格见表 8-10。

表 8-10 常用的聚砜滤膜

孔径 (μm)	厚度 (μm)	流速 [L/(min·cm ²)]		规格 直径(mm)
		空气*	水**	
0.1	150	1	5	25, 47, 142, 293
0.2	150	3	22	13, 25, 47, 90, 142, 293
0.45	150	5	35	13, 25, 47, 90, 102, 142
0.8	150	11	100	13, 25, 47, 90, 142

* L/(min·cm²)在 250mmHg(10psi)

** ml/(min·cm²)在 250mmHg(10psi)

8.2.7. 聚偏二氟乙烯滤膜

聚偏二氟乙烯滤膜(polyvinylidene difluoride membrane, PVDF 膜)一般不会用于微

孔过滤,这种微孔膜主要用于蛋白质序列分析,包括氨基酸末端顺序和总的氨基酸组成,商品的 PVDF 膜见表 8-11。

表 8-11 聚偏二氟乙烯滤膜

孔径 (μm)	结合量 ($\mu\text{g}/\text{cm}$)	规格 (cm)	应用范围
0.2	170~200	7×8.4, 10×15	蛋白印迹,蛋白序分
		15×15, 20×20	析,氨基酸分析,免
		24×33 (卷筒装)	疫扩散分析等

8.3. 针筒式滤器或针头式滤器

一次性使用的针头式滤器(needle filter)具有使用方便和快捷的优点。这种滤器是预先把各种不同孔径和规格的滤膜装入聚酯材料制成的外壳中,并封闭。然后经 γ 射线照射灭菌。其外壳的材料有丙烯酸和聚丙烯等。一次性使用的针头式滤器的种类和应用见表 8-12。

表 8-12 一次性使用的针头式滤器

膜类型	应用
玻璃纤维	预滤和终滤一步完成,须根据需要,选择适合于终滤的滤膜
醋酸纤维	水溶液的除菌和液体澄清
尼龙	水溶液和有机溶剂的过滤
聚四氟乙烯	气体和醇的除菌,酸碱和有机溶剂的澄清
硝酸纤维	微生物分析和废水处理

有关一次性使用滤膜滤器的说明见表 8-13。

表 8-13 一次性使用滤膜滤器的说明

滤膜直径	过滤面积	残留体积*	压力极限
4mm	0.2cm ²	<0.012ml	25℃时 75 psi
13mm	0.8cm ²		25℃时 75 psi
25mm	3.9cm ²	<0.1ml	25℃时 75 psi
50mm	20cm ²	<0.01ml	25℃时 60 psi

* 仅指滤膜的残留体积而非滤器的残留体积。

8.3.1. 玻璃纤维预滤和终滤器

这种一次性使用滤器是硅硼玻璃纤维滤器的复合醋酸纤维滤膜或尼龙滤膜制成的,具有较快的过滤速度,并使预滤和终滤一次完成。省去了一般的预滤步骤,减少了样品的损失,并延长了滤膜的使用寿命。其外壳使用的是白色的聚丙烯材料。

表 8-14 玻璃纤维滤器*

滤膜		孔径 (μm)	残留体积 (ml)	外壳材料
类型	直径			
醋酸纤维	25mm	0.22	0.3	白色聚丙烯
		0.45		
		0.80		
尼龙	25mm	0.22	0.3	聚丙烯
		0.45		
尼龙	50	0.22	0.5~0.6	白色聚丙烯
		0.45		

* 商品的一次性滤器有无菌的和未消毒的两种。

8.3.2. 一次性醋酸纤维滤膜滤器

醋酸纤维滤膜的蛋白质结合量较低,是较为理想的生物制品过滤用的滤器。其外壳使用的是不同颜色的丙烯酸材料。有关一次性醋酸纤维滤膜滤器的孔径、规格和壳体材料等见表 8-15。

表 8-15 一次性醋酸纤维滤膜滤器

滤膜直径	孔径(μm)	外壳材料	颜色
25mm	0.22	丙烯酸	蓝色
	0.45		无色
	0.80		绿色

8.3.3. 尼龙滤膜滤器

尼龙滤膜滤器是理想的药物制备和除菌用的滤器,其外壳依孔径和规格的不同,使用了不同颜色的聚丙烯或丙烯酸,加以区别。其数据见表 8-16。

表 8-16 尼龙滤膜滤器

滤膜直径	孔径(μm)	外壳材料*	颜色
4mm	0.22	聚丙烯	无色
	0.45		无色
25mm	0.22	聚丙烯	红色
	0.45		黄色
50mm	0.22	聚丙烯	白色
	0.45		白色

* 滤膜直径为 25mm 的未消毒的滤器,其外壳材料是丙烯酸。

8.3.4. 聚四氟乙烯滤膜滤器

聚四氟乙烯滤膜不受大多数有机溶剂、浓的酸和碱,以及低温溶液的影响,适用于各

种气体和空气及有机溶剂的过滤,其外壳材料为聚丙烯,其数据见表 8-17。

表 8-17 聚四氟乙烯滤膜滤器

滤膜直径	孔径(μm)	外壳材料	颜色
25mm	0.22	聚丙烯	深蓝色
	0.45		白色
	0.50		灰色
50mm	0.20	聚丙烯	白色
	0.45		
	1.0		

8.3.5. 硝酸纤维滤膜滤器

硝酸纤维滤膜滤器的孔径、规格等的的数据,见表 8-18。

表 8-18 硝酸纤维滤膜滤器

滤膜直径	孔径(μm)	外壳材料	颜色
25mm	0.20	丙烯酸	蓝色
	0.50		

8.3.6. 新型聚砜滤膜滤器

新型聚砜滤膜具有非常低的蛋白质结合量,因而有极高的回收率。使用未消毒的聚砜滤膜滤器,非常适合于制备水溶液的分析样品,和用于 HPLC 的生物样品的制备。其最高使用温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。最大操作压力为 75psi (5.2 bar)。商品的新型聚砜滤膜滤器的孔径规格和有效过滤面积等的的数据见表 8-19。

表 8-19 新型聚砜滤膜滤器

滤膜直径	孔径(μm)	有效过滤面积	残留体积	外壳材料
13mm	0.20	0.8 cm^2	20 μl	丙烯酸
25mm	0.20	2.8 cm^2	50 μl	
	0.45	2.8 cm^2	50 μl	

8.4. 超滤膜

超滤膜技术是应用最为广泛的膜过滤技术中的一种。就其所用的滤膜孔径、驱动压力及设备来说,都不同于一般简单除菌,或澄清高纯水及溶液中的微小颗粒用的微孔过滤。超滤膜技术广泛应用于生物制备中的透析、分离、纯化及浓缩等,在生物化学、分子生物学、基因工程、制药及生物制品学等领域中,均广泛地应用。这种方法具有工作效率高,对被处理物的影响小,速度快,而且回收率高。可一次操作同时完成几个目的。尤其是分离

一些分子量差别较大的溶液,更显示出它的优越性。这种方法操作简便,成本低廉,而且效率极高。

制备超滤膜的材料多是高分子聚合物,如聚砜类、聚四氟乙烯、混合纤维素、聚酰胺、尼龙、聚碳酸酯、聚偏二氟乙烯及聚丙烯等。新型的超滤膜是中空纤维型滤膜或膜卷,或是把大量的中空纤维捆扎成束,而进行透析的。目前的超滤膜组件有中空纤维膜组件、卷式组件和膜盒式三种。

生产及研制超滤膜装置和超滤膜的国内外厂商很多,有些仅见于报道,有些商品则多用于工业生产方面。适合于生物化学或分子生物学的实验室研究应用较少,现仅扼要地介绍已为我国科技工作者使用较多的 Amicon 等厂的产品。

表 8-20 Amicon 圆形超滤膜的规格和有效过滤面积的数据

超滤膜直径 mm	有效过滤面积 cm ²
14	0.92
25	4.1
43	13.4
62	28.7
76	41.8
90	63
150	162

表 8-21 Amicon 圆形超滤膜对溶质的排阻率

(1)						
溶质	分子量	YC05	YM1	YM3	YM10	YM30
氯化钠	58	<20	0	0	—	—
葡萄糖	180	>70	0	0	—	—
蔗糖	342	>85	45	20	—	—
棉子糖	504	95	65	25	—	—
杆菌肽	1 400	98	92	80	20	—
菊粉	5 000	>98	95	—	25	—
细胞色素 c	12 400	>98	>98	>98	>95	<15
肌红蛋白	17 000	>98	>98	>98	>98	—
α 胰凝乳蛋白酶原	24 500	>98	>98	>98	>98	>80
白蛋白	67 000	>98	>98	>98	>98	>98
IgG	160 000	>98	>98	>98	>98	>98
脱铁铁蛋白	480 000	>98	>98	>98	>98	>98
IgM	960 000	>98	>98	>98	>98	>98

(2)*						
溶 质	分 子 量	PM10	PM30	XM50	YM100	XM300
氯化钠	58	0	0	0	0	0
葡萄糖	180	0	0	0	0	0
蔗糖	342	0	0	0	0	0
棉子糖	504	0	0	0	0	0
杆菌肽	1 400	—	—	—	—	—
菊粉	5 000	—	0	0	0	0
细胞色素 c	12 400	>90	60	38	—	—
肌红蛋白	17 000	94	76	20	12	—
α 胰凝乳蛋白酶原	24 500	>98	90	70	10	0
白蛋白	67 000	>98	>98	95	20	20
IgG	160 000	>98	>98	>98	>95	65
脱铁铁蛋白	480 000	>98	>98	>98	>98	85
IgM	960 000	>98	>98	>98	>98	98

* 引自 Amicon Catalog Membrane Filtration, Amicon Inc., USA.

除 M100 和 XM300 是在 10psi (0.7/bar) 外,其余均是在 55psi (3.9/bar) 的压力下的数据。

表 8-22 Amicon 圆形超滤膜的流速

超滤膜 型号	标称分子量 截留值	水流量 [ml/(min·cm ²)]	溶 质	溶质流量 [ml/(min·cm ²)]
YCO5	500	0.03~0.04	蔗 糖	0.03
YMI	1 000	0.02~0.04	蔗 糖	0.03
YM3	3 000	0.06~0.08	白蛋白	0.07
YM10	10 000	0.15~0.20	白蛋白	0.15
PM10	10 000	1.5~3.0	白蛋白	0.17
YM30	30 000	0.8~1.0	白蛋白	0.20
PM30	30 000	2.0~6.0	白蛋白	0.20
XM50	50 000	1.0~2.5	白蛋白	0.15
YM100	100 000	0.6~1.0	白蛋白	0.75
XM300	300 000	0.5~1.0	组分 I	0.06

表 8-23 Amicon diaflo 超滤膜的数据

	PM 系列	XM 系列	YM 系列	YC 系列
灭菌	5%甲醛, 20%乙醇或标准混合灭菌气体	5%甲醛, 70%乙醇或标准混合灭菌气体	70%乙醇, 标准灭菌气体或浸没在缓冲液, 生理盐水或水中于 121°C 高压灭菌	5%甲醛或标准混合灭菌气体
最高使用温度	100°C	70°C	121°C	50°C
禁用物质	> 10%的磷酸, 酮类, 二甲亚砜, 极性芳香化物及脂族醚等	丙酮, 乙腈, 环己酮, 咪唑, 硝基乙烷, 硝基甲烷, 胺类及环酮等	胺类, > 5%酚, > 10%磷酸, 甲醛, 1mol/L 盐酸及次氯酸钠等	> 0.01mol/L NaOH, 10%乙醇, 丙酮, 乙腈, 脂族醚, 吡啶, 氯仿, 酮类, 浓酸或浓碱等
用后处理	用稀 NaOH, NH ₄ OH, 1~2 mol/L NaCl 或稀的表面活性剂洗, 然后用大量的水洗, 对于较浓的蛋白质的污染, 则用 0.1%的蛋白酶溶液浸泡, 并用大量水冲洗。			用 1~2 mol/L NaCl 或稀的表面活性剂洗, 然后再用大量水洗

表 8-24 Amicon 卷式中空纤维超滤膜的数据

中空纤维卷膜型号	截留分子量	表面积		长度		推荐再循环速率 L/min	水通过速率 L/min
		m ²	ft ²	cm	in		
S1N1	1 000	0.09	1.0	15.9	6.25	2~4	0.015
S1Y3	3 000						0.028~0.05
S1Y10	10 000						0.046~0.07
S1Y30	30 000	0.09	1.0	15.9	6.25	1~4	0.18~0.25
S1Y100	100 000						0.1~1.3
S3Y3	3 000						
S3Y10	10 000						
S3Y30	30 000						
S3Y100	100 000						
S10N1	1 000	0.93	10	31.9	12.55	18~37	0.15
S10Y3	3 000						0.28~0.5
S10Y10	10 000						0.46~0.70
S10Y30	30 000	0.93	10	31.9	12.55	5~35	1.8~2.5
S10Y100	100 000						1.0~13.0
S40Y3	3 000						1.1~2.0
S40Y10	10 000						1.6~2.8
S40Y30	30 000	3.7	40	30.5	12	60~180	7.2~10.0
S40Y100	100 000						4.0~52.0

表 8-25 Amicon 卷式中空纤维超滤膜的效能及其应用数据

溶质	浓缩范围	Cartridge 型号	压力		温度 °C	滤速	
			psi	bar		ml/min	L/(m·h)
白蛋白	1g/L	SI0Y10	48	3.4	5	930	60
	22~29%	SI0Y10	50	3.5	16	80	5.4
	1%	SI0Y10	30	2.1	25	930	60
	1%	SIY30	30	2.1	25	165	106
	1%	SI0Y30	30	2.1	25	1650	106
无血清培养基							
浓	37×	SI0Y10	33	2.3	—	880	59
透滤	17×	SI0Y10	33	2.3	—	880	59
因子Ⅱ	1~3×	SIY10	—	—	—	48~24	32~16
球蛋白	1%	SIY100	30	2.1	25	200	80
组分Ⅰ	1%	SI0Y100	30	2.1	25	1200	80
白介素	1~10×	SIY10	15	1.1	25	20	14.3
Leukokyne	0.5mg/ml	SI0Y10	27	1.9	—	475	30
蛋白质 (mg/ml)							
5~100K 溶液	0.25~0.88	SI0Y10	20	1.4	23	200	13.4
30K MW	0.25~0.88	SI0Y10	20	1.4	23	200	13.4
34K MW	0.5~10	SI0Y10	25	1.8	4	150	10
74K MW	2×	SI0Y10	26	1.8	23	770	52
蛋白基质	30~98 g/L	SIY10	45	3.2	5	112~58	75~39
血清							
浓	2~3%	SI0Y10	50	3.4	12	655	42
透滤	5×DF	SI0Y10	50	3.4	12	620	40
浓	3~9%	SI0Y10	50	3.4	12	444	29
病毒回收	7.5×透滤	SIY10	20	1.4	—	61	39

表 8-26 Amicon Y 系卷式中空纤维超滤膜对溶质的排阻率

溶质	分子量	标称排阻率 %			
		Y3	Y10	Y30	Y100
棉子糖	504	25	—	—	0
维生素 B ₁₂	1330	>60	10	8	—
胰岛素	6000	—	—	—	—
PVP K-15	10000	—	55	—	—
细胞色素 C	12400	>98	98	15	7
α 胰凝乳蛋白酶原	24500	>98	>98	95	10
PVP K-30	40000	—	>80	60	20
白蛋白	67000	>98	>99	99	20
PVP K-60	160000	>98	—	>90	65

溶质	分子量	标称排阻率 %			
		Y3	Y10	Y30	Y100
PVP K-90	360 000	>98	—	—	85
γ 球蛋白组分 I	160 000~900 000	>99	99	99	95
葡聚糖 T-500	500 000	>98	—	—	—
脱铁铁蛋白	480 000	>99	>99	>98	>98
IgM	960 000	>99	>99	>99	>98
蓝色葡聚糖	2 000 000	>98	—	—	—

均在 27 psi (1.9 bar)。

表 8-27 Amicon P 系中空纤维滤膜对溶质的排阻率

溶质	分子量	P3	标称排阻率 %		中空纤维	
			P10	P30	P300	MP01
棉子糖	504	0	—	—	—	—
杆菌肽	1 400	50	35	—	—	—
胰岛素	6 000	>98	—	—	—	—
PVP K-15	10 000	85	70	45	—	—
细胞色素 C	12 400	98	85	45	—	—
α 胰凝乳蛋白酶原	24 500	>98	95	75	20	—
PVP K-30	40 000	>98	>98	75	15	—
白蛋白	67 000	>98	>98	95	30	0
PVP K-60	160 000	>98	>98	>98	60	0
PVP K-90	360 000	>98	>98	>98	90	35
γ 球蛋白组分 I	160 000~900 000	>98	>98	>98	98	70
葡聚糖 T-500	500 000	—	—	—	—	0
脱铁铁蛋白	480 000	>98	>98	>98	>98	—
IgM	960 000	>98	>98	>98	>98	—
蓝色葡聚糖	2 000 000	—	—	—	—	90
牛血清蛋白 1%	—	—	—	—	—	50 ^a
牛血清蛋白 1%	—	—	—	—	—	35 ^b

均在 10psi (0.7 bar)。

a. 在 5psi (0.35 bar), b. 在 1psi (0.07 bar)。

说明: Amicon 超滤膜的数据均系引自 Amicon Catalog。

(吴 肇)

参 考 文 献

- 刘国论主编. 生物工程下游技术. 化学工业出版社, 1993
- 苏拔贤主编. 生物化学制备技术. 科学出版社, 1986
- 医学生物制品学编委会. 医学生物制品学, 1992
- 张天民等主编. 动物生化制药学. 人民卫生出版社, 1981
- Amicon Catalog. Microseparation, Membrane Filtration and Chromatography. Amicon Inc., MA, USA
- Cole-Parmer Catalog 97~98. Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA
- Fisher Catalog 914, Fisher Scientific. PA, USA
- Pall Catalog. Ultrafiltration for the Pharmaceutical and Bioprocessing Industries. Pall Ultrafine Filtration Company, New York, USA
- Spectrum Inc., Brochure. Spectrapor Membrane: Concentrate, Desalt and Purify. Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, USA
- Whatman Catalog. Whatman International Ltd., England

9. 超速离心

超速离心是生物化学与分子生物学不可缺少的技术手段。广泛应用于大分子、细胞、细胞器等的分离,纯化。根据不同的目的,可以采用不同的方法和技术。溶液经过超速离心可以分成上清与沉淀,但得到的沉淀与上清都是不均一的。前者含有最初溶液中所有的颗粒,而后者也仍含有少量的颗粒,但其大小比沉淀颗粒要小得多。这样得到的上清,可进一步用更高速度的离心来分离其中的成分,称为差速离心。如需得到纯的物质,则应采用分析超速离心技术。应用密度超速离心可以了解物质的某些物理性质,如沉降系数及近似密度并得到一定量的较纯物质。

9.1. 相对离心力的计算

相对离心力(relative centrifugal field, RCF)取决于角速度和旋转半径。RCF 用下列公式计算,以地球引力来表示即“数字 $\times g$ ”。

$$RCF = (1.118 \times 10^{-5})(r/\text{min})^2$$

r/min 为每分钟转速, r 为半径(离心机旋转中心至离心管的距离),由于转头的形状及设计的不同,离心管的管顶和管底各点到旋转中心的距离是不同的,所以离心力也不相同,如在角式头管顶与管底的离心力几差一倍。为了计算 RCF 可用平均相对离心力来表示。

图 9-1 可用于近似 RCF 的计算。用图 9-1 计算 RCF,先要测定 $r(\text{cm})$,然后以直线连接 r (左侧行)与转速(r/min ,右侧行),直线与 RCF(中间行)交叉处,即所求的 RCF,可直接读出。

9.2. 离心时间的计算

K 因子与每个转头的离心效力有关,可以用于推算颗粒经过水溶液形成沉淀所需要的时间(小时)。离心头的 K 值一般由出售离心机公司提供

$$t = K/S$$

知道 K 因子和 S 值(沉降系数)就可计算出离心时间。但提供的 K 因子是指最高速度时的 K 值,但所有的离心并不都在最高速度。减低速度后所需离心时间,则应用下列公式计算。

$$t = K/S(\text{最高离心速度} / \text{所需离心速度})^2$$

从上式看来, K 值小,所需离心时间短; K 值大,所需离心时间长。由此可以决定离心头的效力。 K 值愈大,离心头的效力愈低。如应用的离心头不知道 K 值时,则可用下列方法计算 K 值。

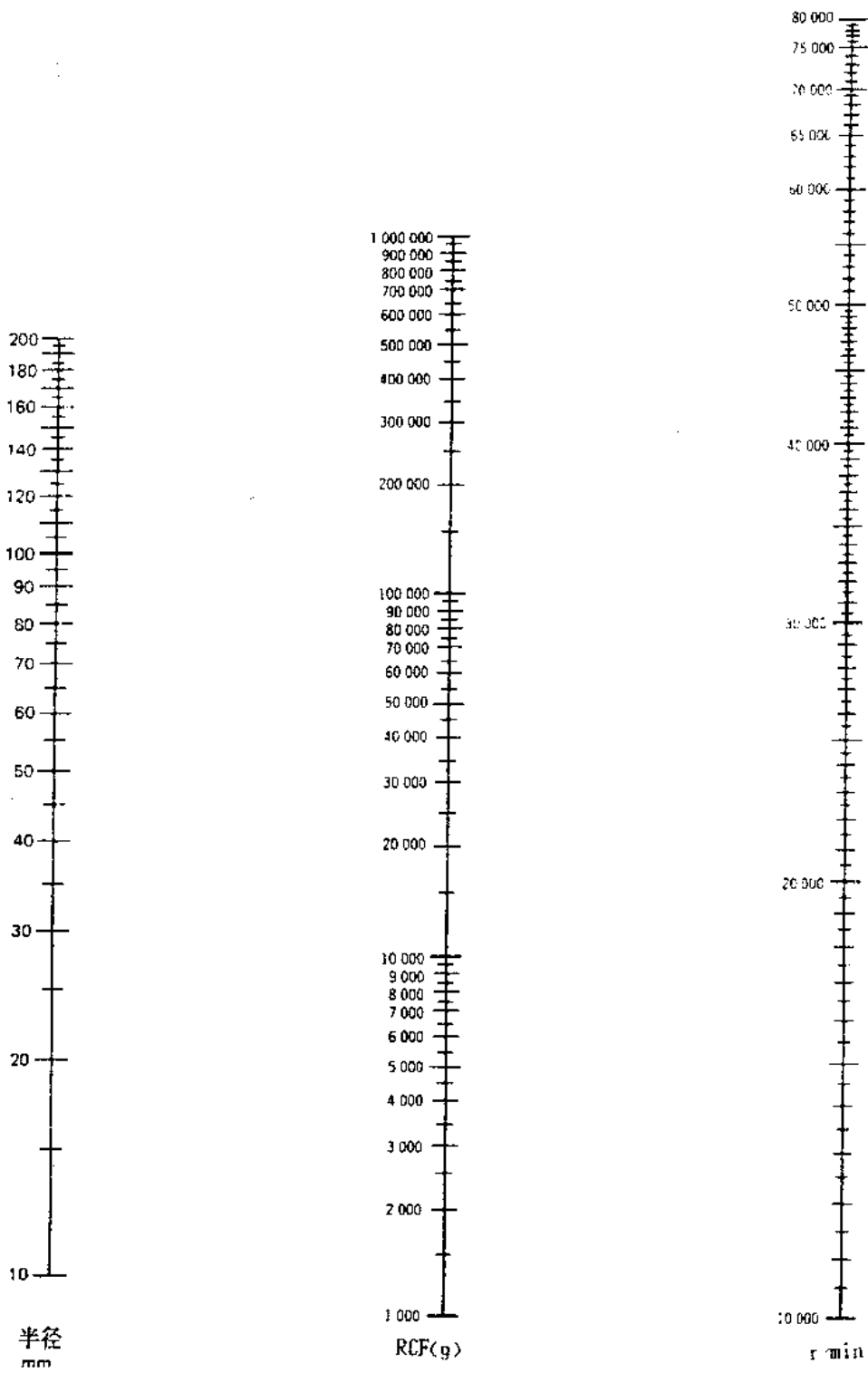


图 9-1 计算近似 RCF 的列线图

$$K = \ln r_2 - \ln r_1 \times 2.53 \times 10^{11} / (r/\text{min})^2$$

r_1 = 最小半径(轴心至管顶的距离)

r_2 = 最大半径(轴心至管底的距离)。

应用以上述方法,可以比较准确的计算出,在你的离心条件下所需的离心时间,而避免猜测。

9.3. 离心转头的应用

制备离心机现有的离心转头种类繁多。其中区带离心转头(zonal rotor),根本不用离心管,离心转头的中空分成几个扇形部分,可将溶液直接加入离心转头中,常用于区带离心法。其它离心转头可分成三种类型,即固定角式离心转头(FA)、直角离心转头(VT)及水平离心转头(SW)。VT与FA均可看作固定角度的离心转头,因为在离心过程中,离心管与轴之间的角度是固定的。而SW从开始0度变成90度,停止时又成为0度。因此,对管壁来讲,不论离心时或停止后,溶液是定向不变的,颗粒经过溶液沉于管底。FA,离心过程中,区带的定向是改变的。颗粒打击管壁,然后沿管壁滑下,离心后可以把上清倾出,沉淀仍留在管底。VT离心时,区带定向改变,沉淀由于离心力的支持沉在远侧管壁上。当减速时,溶液又重新恢复至原来的方向,离心力消失,管壁上的沉淀失去支持,掉入溶液中。因此,沉淀的回收率很低。

对于沉降速度离心,SW,颗粒经过途径长,分离效果最好。FA头次之。VT,由于区带与梯度介质的接触面大,易于扩散,区带较宽。同时由于颗粒经过的距离短,分离的区带之间距离接近,离心停止时,更易混合,分离效果最差。

等密度梯度离心时,以VT分离效果最好,需要的离心时间最少。SW分离效果最差,离心时间长,不能用太高速。所以密度梯度离心时,一般不用SW,常用VT或FA,角度大的FA与VT的分离效果接近。下表供离心时选择转头之用。

表 9-1 离心转头的选择

离心转头 类型	离心管 角度	分离的类型		
		沉淀	沉降速度离心	沉降平衡离心
SW	90	不完全	很好	差
FA	20~45	很好	差	与VT接近
NVT	8~10	差	差	好
VT	0	差	差	很好
区带离心转头		不用	很好	可用

9.4. 密度梯度离心

密度梯度离心通常应用的有两种技术,沉降速度离心与沉降平衡离心。前者又称区带速度离心,是根据沉降系数(S)的不同进行分离,通常用蔗糖作为梯度介质。梯度的类型

表 9-2 沉降速度离心和沉降平衡离心的特点

	沉降速度离心	沉降平衡离心
其他名称	区带速度离心	等密度梯度离心
梯度介质	通常应用蔗糖 最大的梯度密度低于最小密度的沉降样品	通常应用氯化铯 最大的梯度密度大于密度最大的沉降样品
离心条件	在最前的沉降物质达到管底前停止,短时间,低速度	使各组分沉降到其平衡的密度区,长时间,高速度

表 9-3 常用的梯度介质物理特性与应用

名称	分子量	最高密度 (g/cm ³)	离子强度	粘度	渗透压	应用举例
无机盐类						
氯化铯	169	1.9	高	+	高	核酸与核蛋白
硫酸铯	362	2.0	高	+	高	
三氟醋酸铯(CsTFA)	246	2.6	高	+	高	核酸
氯化铷	121	1.5	高	+	高	蛋白质,脂蛋白,核酸
溴化钠	103	1.5	高	+	高	
碘化钠	150	1.9	高	-	高	
高渗透化合物类						
蔗糖(66%)	342	1.3	非离子型	++	中等	很多
山梨糖醇	182	1.26	非离子型	++	中等	细胞,膜蛋白
甘油	92	1.26	非离子型	+++	高	膜蛋白,细胞核
碘化合物类						
Urografin	614	1.45	中等	+	中等	细胞
Metrizamide	789	1.46	非离子型	++	低	很多
Nycodenz	821	1.45	非离子型	++	低	很多
Iodixanol		1.32	非离子型	++	低	很多
聚合物类						
聚蔗糖(Ficoll)	400 000	1.23	非离子型	+++	低	细胞,细胞膜
糊精(Dextran)	50~500 000	1.05	非离子型	+++	低	细胞,细胞膜
牛血清清蛋白	69 000	1.12	低	+++	低	细胞
胶体硅						
Ludox	--	1.2	低	+	低	细胞
Percoll	-	1.23	低	+	低	细胞,细胞器

+ 表示溶液的流动性如水一样; ++ 表示溶液的粘度类似于同样浓度的蔗糖溶液; +++ 表示溶液的粘度类似于同样浓度的聚蔗糖溶液。

有三种,即线性梯度,非线性梯度(等动力梯度)及不连续梯度。线性梯度只用于区带速度离心分离。大分子如蛋白质、核糖核蛋白体等的分离常用陡直的梯度,以防止它们的扩散。平坦的梯度常用于细胞与细胞器的分离。等动力梯度也称线性对数梯度。此种梯度仅用于长离心管的水平式离心头。不连续梯度又称阶段梯度。这种梯度常用于组织匀浆中蛋白质和细胞器的分离。分离效果依赖于离心时间的恰当。

等密度梯度离心也称沉降平衡离心,是根据颗粒的密度不同而进行分离的。离心时被分离的物质达到与其相同的密度介质时就不再移动。所以,样品密度必须小于介质的最大密度。等密度梯度离心常用氯化铯作为梯度介质,用氯化铯制备阶段梯度,一般不大于三个梯度,常用两个梯度。两个浓度的氯化铯梯度,放置两小时,就成为线性梯度。用等密度梯度离心可以算出样品密度,因为从氯化铯的折光指数可以查出氯化铯的密度,样品所在部位的氯化铯密度也就是样品的密度。表 9-2 比较了沉降速度离心和沉降平衡离心的特点。表 9-3 列举了常用的梯度介质。表 9-4 为等密度梯度介质的应用。表 9-5 和 9-6 分别列出了各种大分子在蔗糖及一些常用梯度介质中的密度。

表 9-4 等密度梯度介质的应用

介质	DNA	RNA	核蛋白	膜	细胞器	细胞	病毒
蔗糖	-	-	+	++	++	+	++
聚蔗糖	-	-	-	+	+	+++	++
氯化铯	+++	++	+	-	-	-	++
Percoll	-	-	-	+	++	++	+
碘化物	+	+	+++	+++	+++	++	++

+++ ,很好; ++ ,好; + ,可以; - ,不适用。

表 9-5 各种大分子在蔗糖梯度溶液中的大约密度

样品	密度(g/cm ³)	样品	密度(g/cm ³)
高尔基体	1.05~1.10	过氧化物酶体	1.23
质膜	1.16	植物病毒	1.30~1.45
光滑的内质网膜	1.16	可溶性蛋白	1.30
完整癌病毒	1.15~1.18	鼻及肠道的病毒	1.30~1.45
线粒体	1.19	核蛋白,核酸,核糖体	1.60~1.75
溶酶体	1.21	糖原	1.70

本表引自 Owen Mitch Griffith. Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation. Beckman instruments, Inc. ,1986.

Percoll 是以聚乙烯吡咯烷酮(PVP)包裹的胶体硅,渗透压很低,并有不同大小的颗粒,平均直径约为 21~22nm,没有毒性,适用于分离完整细胞和细胞器。Ficoll 是一种蔗糖的聚合物渗透压低,也用于分离完整的细胞和细胞器。氯化铯或硫酸铯或甲酸铯的等密度梯度离心用于分离 DNA 与 RNA。蔗糖是广泛应用的一种梯度介质。它密度低(1.3),渗透压高,易使蛋白质变性,故可与 Ficoll 或 Percoll 合用以保护蛋白质的活性。

表 9-6 各种大分子在一些梯度介质中的大约密度

样品	梯度介质中的大约浮力密度(g/cm ³)					
	CsCl	CsSO ₄	NaCl	CsTFA	Metrizamide	Nycodenz
DNA	1.70	1.43	1.52	1.62	1.12	1.13
变性 DNA	1.73	1.45	1.55	1.70	1.14	1.17
RNA	>1.9	1.64	1.65	1.80	1.17	1.18
蛋白质	1.33	1.3	—	1.45	1.26	1.27
染色质	1.4	—	—	—	1.19	1.18
核糖体	1.55	—	—	—	1.32	1.32
mRNP	1.4	—	—	—	1.2	1.2

表 9-7 动物细胞器在下列梯度介质中的大约密度

样品	梯度介质中的大约浮力密度(g/cm ³)				
	蔗糖	Metrizamide	Nycodenz	聚蔗糖	Percoll
细胞核	>1.3	1.22	1.23	—	1.09
线粒体	1.19	1.16	1.17	1.14	1.10
溶酶体	1.21	1.13	1.15	—	1.06
过氧化物酶体	1.23	1.22	1.22	—	1.06
质膜	1.13~1.18	1.14~1.26	1.11~1.19	1.05	1.03

表 9-8 分离人不同类型血细胞的商品介质

介质	组成	目标细胞	供应厂家
Lymphoprep	9.6% metrizoate 钠盐 5.6% 聚蔗糖	单核细胞	Nycomed-Pharma
Ficoll-paque	9.6% diatrizoate 钠盐 5.6% 聚蔗糖	单核细胞	Pharmacia-Biosystems
Mycoprep 1.077	14.1% Nycodenz 0.44% NaCl	单核细胞	Nycomed-Pharma
Nycoprep mixer	19.0% Nycodenz 0.2% NaCl	单核细胞	Nycomed-Pharma
Nycoprep 1.068	13.0% Nycodenz 0.58% NaCl	单核细胞	Nycomed-Pharma
Nycoprep 1.063	12.0% Nycodenz 0.56% NaCl	血小板	Nycomed-Pharma
Mono-poly resolving medium	15.5% diatrizoate 钠盐 8.18% 聚蔗糖	多形核细胞	Flow Laboratories
Polymorphprep	13.8% Metrizoate 钠盐 8.0% 葡聚糖 500	多形核细胞	Nycomed-Pharma

Metrizamide 与 Nycodenz 均为碘化合物,渗透压低,可以消毒,可代替蔗糖分离活细胞及核糖核蛋白体,但它具有很高的紫外吸收,对³H 或¹⁴C 有淬灭作用。Iodixanol(碘克沙醇)基本上是以 Nycodenz 二聚体存在,能自我生成梯度,是一种非离子型的,对细胞无毒,适用于分离多种生物颗粒的新介质(商品名为 Optiprep™)。

CsTFA(三氟醋酸),是 Pharmacia Biosystems AB 的注册商标。

表 9-7 列举的密度是肝细胞的细胞器,其他动物组织细胞器的密度可能有一定变化,变化最大的是植物和霉菌。

表中列举的密度是大约密度,因为观察到的密度决定于样品在梯度介质中的真实性质和组成。

表 9-6 与 9-7 及 9-8 引自 Rickwood D., Preparative Centrifugation. A Practical Approach. Oxford University Press, 1992。

9.5. 一些常用梯度介质的密度、折光指数与浓度及百分浓度的换算

从表 9-9 至 9-12 列出了一些常用梯度介质的特性,便于读者参考应用。用重量/重量百分数(w/w %)表示的浓度与重量/体积百分数(w/v %)表示的浓度在数值上相差甚大,如 65%(w/w)的蔗糖溶液在 0℃时相当于 86%(w/v),53%(w/w)的氯化铯相当于 87%(w/v)。两种浓度的相互转换可用下列公式计算:

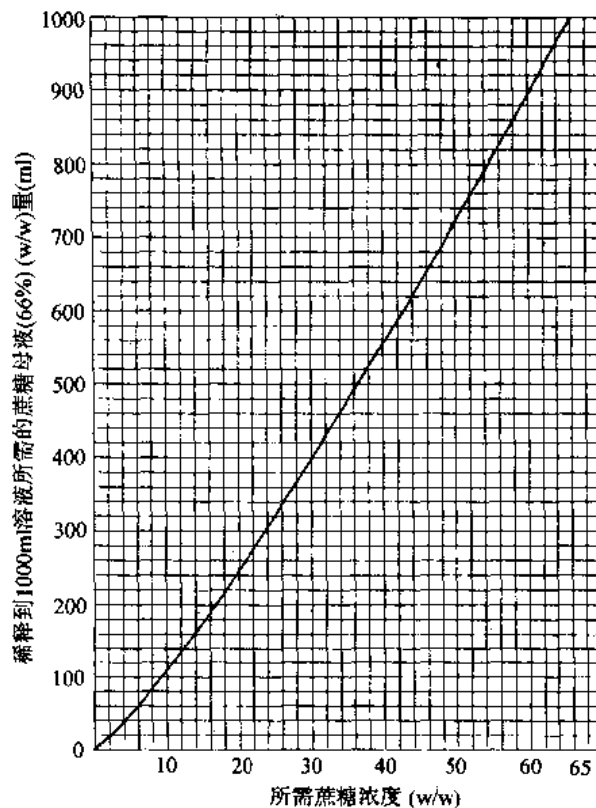


图 9-2 稀释成百分比浓度(w/w)的蔗糖稀释曲线

表 9-9 25 °C 时氯化铈溶液的密度、折光指数与浓度

(分子量=168.37)

密度*	折光指数	重量%	溶液的	摩尔浓度	密度*	折光指数	重量%	溶液的	摩尔浓度
g/cm ³		(w/w)	mg/ml	mol/L	g/cm ³		(w/w)	mg/ml	mol/L
1.0047	1.3333	1	10.0	0.056	1.336	1.3657	34	454.2	2.698
1.0125	1.3340	2	20.2	0.119	1.3496	1.3670	35	472.4	2.806
1.0204	1.3348	3	30.6	0.182	1.363	1.3683	36	490.7	2.914
1.0284	1.3356	4	41.1	0.244	1.377	1.3696	37	509.5	3.026
1.0365	1.3364	5	51.8	0.308	1.391	1.3709	38	528.6	3.140
1.0447	1.3372	6	62.8	0.373	1.406	1.3722	39	548.3	3.257
1.0531	1.3380	7	73.7	0.438	1.4196	1.3735	40	567.8	3.372
1.0615	1.3388	8	84.9	0.504	1.435	1.3750	41	588.4	3.495
1.0700	1.3397	9	96.3	0.572	1.450	1.3764	42	609.0	3.617
1.0788	1.3405	10	107.9	0.641	1.465	1.3778	43	630.0	3.742
1.0877	1.3414	11	119.6	0.710	1.481	1.3792	44	651.6	3.870
1.0967	1.3423	12	131.6	0.782	1.4969	1.3807	45	673.6	4.001
1.1059	1.3432	13	143.8	0.854	1.513	1.3822	46	696.0	4.134
1.1151	1.3441	14	156.1	0.927	1.529	1.3837	47	718.6	4.268
1.1245	1.3450	15	168.7	1.002	1.546	1.3852	48	742.1	4.408
1.1340	1.3459	16	181.4	1.077	1.564	1.3868	49	766.4	4.552
1.1437	1.3468	17	194.4	1.155	1.5825	1.3885	50	791.3	4.700
1.1536	1.3478	18	207.6	1.233	1.601	1.3903	51	816.5	4.849
1.1637	1.3488	19	221.1	1.313	1.619	1.3920	52	841.9	5.000
1.1739	1.3498	20	234.8	1.395	1.638	1.3937	53	868.1	5.156
1.1843	1.3508	21	248.7	1.477	1.658	1.3955	54	895.3	5.317
1.1948	1.3518	22	262.9	1.561	1.6778	1.3973	55	922.8	5.481
1.2055	1.3529	23	277.3	1.647	1.699	1.3992	56	951.4	5.651
1.2164	1.3539	24	291.9	1.734	1.720	1.4012	57	980.4	5.823
1.2275	1.3550	25	306.9	1.823	1.741	1.4032	58	1009.8	5.998
1.2387	1.3561	26	322.1	1.913	1.763	1.4052	59	1040.2	6.178
1.2502	1.3572	27	337.6	2.005	1.7846	1.4072	60	1070.8	6.360
1.2619	1.3584	28	353.3	2.098	1.808	1.4093	61	1102.9	6.550
1.2738	1.3596	29	369.4	2.194	1.831	1.4115	62	1135.8	6.746
1.2858	1.3607	30	385.7	2.291	1.856	1.4137	63	1167.3	6.945
1.298	1.3619	31	402.4	2.390	1.880	1.4160	64	1203.2	7.146
1.311	1.3631	32	419.5	2.492	1.9052	1.4183	65	1238.4	7.355
1.324	1.3644	33	436.9	2.595					

* 氯化铈在 1.29~1.80(25 °C)之间的密度,任一密度均可从其浓度,用下式算出:

$$\text{百分浓度}(w/w) = 137.48 - 138.11(1/P_{25}) P_{25} \text{为所求密度。}$$

表 9-10 20 °C 时蔗糖溶液的密度、折光指数与浓度

(分子量=342.3)

密度 g/cm ³	折光指数	重量% (w/w)	溶液的 mg/ml	摩尔浓度 mol/L	密度 g/cm ³	折光指数	重量% (w/w)	溶液的 mg/ml	摩尔浓度 mol/L
0.9982	1.3330	0			1.1463	1.3883	34	389.7	1.138
1.0021	1.3344	1	10.0	0.029	1.1513	1.3902	35	403.0	1.177
1.0060	1.3359	2	20.1	0.059	1.1562	1.3920	36	416.2	1.216
1.0099	1.3374	3	30.3	0.089	1.1612	1.3939	37	429.6	1.255
1.0139	1.3388	4	40.6	0.119	1.1663	1.3958	38	443.2	1.295
1.0179	1.3403	5	50.5	0.149	1.1713	1.3978	39	456.8	1.334
1.0219	1.3418	6	61.3	0.179	1.1764	1.3997	40	470.6	1.375
1.0259	1.3433	7	71.8	0.210	1.1816	1.4016	41	484.5	1.415
1.0299	1.3448	8	82.4	0.211	1.1868	1.4036	42	498.5	1.456
1.0340	1.3464	9	93.1	0.272	1.1920	1.4056	43	512.6	1.498
1.0381	1.3479	10	103.8	0.303	1.1972	1.4076	44	526.8	1.539
1.0423	1.3494	11	114.7	0.335	1.2025	1.4096	45	541.1	1.581
1.0465	1.3510	12	125.6	0.367	1.2079	1.4117	46	555.6	1.623
1.0507	1.3526	13	136.6	0.399	1.2132	1.4137	47	570.2	1.666
1.0549	1.3541	14	147.7	0.431	1.2186	1.4158	48	584.9	1.709
1.0592	1.3557	15	158.9	0.464	1.2241	1.4179	49	599.8	1.752
1.0635	1.3573	16	170.2	0.497	1.2296	1.4200	50	614.8	1.796
1.0678	1.3590	17	181.5	0.530	1.2351	1.4221	51	629.9	1.840
1.0721	1.3606	18	193.0	0.564	1.2406	1.4242	52	645.1	1.885
1.0765	1.3622	19	204.5	0.597	1.2462	1.4264	53	660.5	1.930
1.0810	1.3639	20	216.2	0.632	1.2519	1.4285	54	676.0	1.975
1.0854	1.3655	21	227.9	0.666	1.2575	1.4307	55	691.6	2.020
1.0899	1.3672	22	239.8	0.701	1.2632	1.4329	56	707.4	2.067
1.0944	1.3689	23	251.7	0.735	1.2690	1.4351	57	723.3	2.113
1.0990	1.3706	24	263.8	0.771	1.2748	1.4373	58	739.4	2.160
1.1036	1.3723	25	275.9	0.806	1.2806	1.4396	59	755.6	2.207
1.1082	1.3740	26	288.1	0.842	1.2865	1.4418	60	771.9	2.255
1.1128	1.3758	27	300.5	0.878	1.2924	1.4441	61	788.3	2.303
1.1175	1.3775	28	312.9	0.914	1.2983	1.4464	62	804.9	2.351
1.1222	1.3793	29	325.4	0.951	1.3043	1.4486	63	821.7	2.401
1.1270	1.3811	30	338.1	0.988	1.3103	1.4509	64	838.6	2.450
1.1318	1.3829	31	350.9	1.025	1.3163	1.4532	65	855.6	2.500
1.1366	1.3847	32	363.7	1.063	1.3224	1.4558	66	872.8	2.550
1.1415	1.3865	33	376.7	1.100	1.3286	1.4581	67	890.2	2.864

表 9-11 Metrizamide 与 Nycodenz 溶液的特性

Metrizamide 溶液(20℃)					
浓度 (% w/v)	摩尔浓度 (mol/L)	密度 (g/cm ³)	折光指数	粘度 (mPas)	渗透度 (mOsm)
0	0.0000	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	—
Nycodenz 溶液(20℃)					
浓度 (% w/v)	摩尔浓度 (mol/L)	密度 (g/cm ³)	折光指数	粘度 (mPas)	渗透度 (mOsm)
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

表 9-12 聚蔗糖溶液的性质

浓 度		温度 4℃			
(% w/w)	(% w/v)	折光指数	密度 (g/cm ³)	粘度 (mPas)	
0.00	0.00	1.3346	1.0004	1.56	
4.00	4.06	1.3392	1.0145	3.40	
6.00	6.13	1.3420	1.0215	5.01	
8.00	8.23	1.3454	1.0290	7.37	
10.00	10.37	1.3484	1.0365	10.35	
12.00	12.53	1.3514	1.0441	14.27	
14.00	14.73	1.3538	1.0518	20.21	
16.00	16.96	1.3579	1.0597	27.42	
18.00	19.21	1.3608	1.0673	38.33	
20.00	21.50	1.3645	1.0752	52.31	

$$Cw/v = Cw/w \cdot \rho \text{ 或 } Cw/w = \frac{Cw/v}{\rho}$$

由于蔗糖广泛用于梯度离心,常将蔗糖配成 66%(w/w)贮备液(1710g 蔗糖溶于 900ml 水),保存于冰箱,可长期应用,极为方便。应用时按图 9-2(见 93 页)或 9-3 即可得到所要的百分浓度或摩尔浓度(mol/L)。

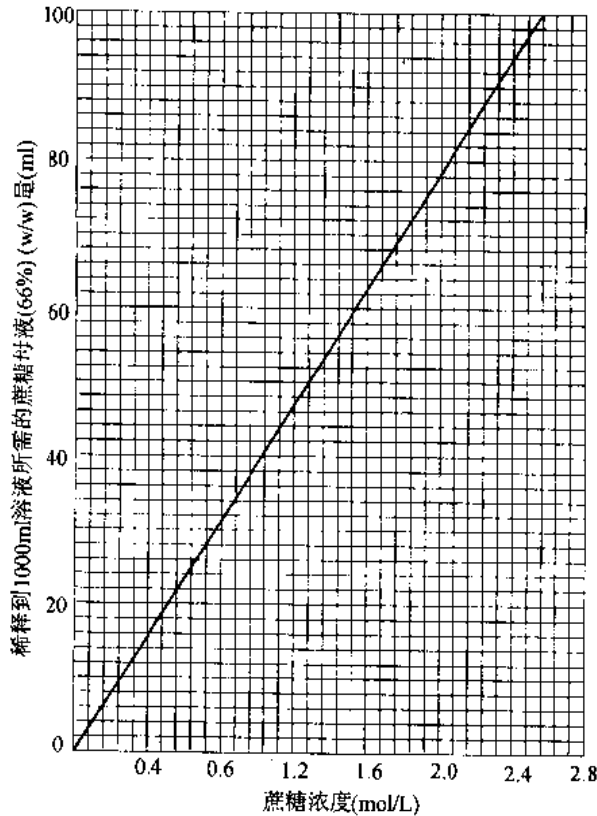


图 9-3 稀释成摩尔浓度(mol/L)的蔗糖稀释曲线

9.6. 离心转头的减速计算

离心转头只能在样品密度不超过厂家设计的密度(一般为 1.2g/cm^3 ,也有为 1.7g/cm^3 或高达 4g/cm^3)时,才可采用最高速度。在离心高于规定密度的样品时要减速,对水平离心转头尤为重要。用下列公式可计算出在所用样品密度时应采取的最高离心速度。

$$Q_d = Q_n \times (D/E)$$

D 为离心转头设计的密度。 E 为离心样品的密度, Q_n 是正常最高离心速度, Q_d 是所求的离心速度。

9.7. 离心转头和离心管的使用和保护

制作离心头和离心管有各种不同的材料,它们的性能也各不相同。如使用不当,会造

表 9-13 离心管和离心瓶材料的特性

材料特性	外观	最高温度 (°C)	能否打孔 和切片	一般特性
聚碳酸酯 (polycarbonate)	透明无色	120	不	坚硬,似玻璃,可重复应用,但有脆性,耐温和耐速度,对碱性溶液(pH>8)非常敏感
聚丙烯 (polypropylene)	半透明无色	120	能	有宽广的化学抗性和耐压性,如没有支持物,在离心>50 000g 时会变形
聚砜 (polysulfone)	透明黄色	120	能	是坚硬、耐温的塑料,有极好的化学抗性,包括碱
polyclear ^R ultraclear ^R	透明无色	60	能	对很多有机溶剂,包括酒精、DMSO 以及酸和强碱均敏感
醋酸-丁酸纤维素 (cellulose acetat butyrate)	透明无色	60	能	有良好的化学抗性,对破坏结构的试剂敏感
不锈钢 (stainless steel)	不透明	>180	不	耐高温、高速和化学试剂,但常需减速
硼硅酸盐(耐热 硬质)玻璃	清澈透明	120	不	有极好的化学抗性,使用寿命受运用时间、高速离心、消毒灭菌的影响
高强度玻璃 (corex glass)	清澈透明	300	不	强度 4~6 倍于普通玻璃,有极好的化学抗性和耐用性

表 9-14 离心管和离心瓶的使用和保护

离心管和离心瓶的材料	化学抗性						最高速度	消毒和灭菌			
	弱酸	强酸	弱碱	强碱	有机溶剂	氯化物 次氯酸		高压	气体	化学	UV
晶形塑料	可	<60°C	可	<60°C	<60°C	可	80×10 ³	可	可	可	不
聚碳酸酯	可	不	不	不	不	可	65×10 ³	可	可	可	不
聚丙烯	可	<60°C	可	<60°C	<60°C	可	60×10 ³	可	可	可	不
聚砜	可	可	可	可	不	可	60×10 ³	可	可	可	可
polyclear ^R ultraclear ^R	可	不	可	不	不	可	80×10 ³	不	可	可	—
醋酸-丁酸 纤维素	可	不	可	不	不	可	40×10 ³	不	—	可	可
不锈钢	不	不	可	可	可	不	减速	可	可	可	可
硼硅酸盐玻璃	不	不	可	不	可	可	5 000	可	可	可	可
高强度玻璃	可	可*	可	可	可	可	10×10 ³	可	可	可	可

* 除 HF 与 H₃PO₄ 外。

表 9-13 和 9-14 引自 Chamber J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

表 9-15 各种材料的化学抗性

化学试剂	材 料																			
	铝	碳纤维	醋酸纤维素 丁酸	1	玻璃	聚氯丁烯	2	尼龙	晶形塑料	聚碳酸酯	3	聚丙烯	聚砜	聚氯乙稀	四氯乙稀	硅橡胶	不锈钢	钛	4	5
乙醚	S	S	U	-	-	U	-	-	M	U	M	M	-	M	S	M	-	S	-	U
醋酸(5%)	S	S	S	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	S	S	M
醋酸(60%)	S	S	U	U	S	M	S	U	S	U	S	S	S	M	S	M	M	S	M	U
冰醋酸	S	U	U	U	S	U	S	U	S	U	S	S	M	U	S	M	M	S	-	U
丙酮	M	U	U	M	S	U	U	S	S	U	S	S	U	U	S	M	M	S	U	U
乙腈	S	U	-	S	S	S	U	S	S	U	S	M	U	U	S	S	S	S	U	U
烯丙醇	-	-	U	S	-	-	-	S	-	U	S	S	-	M	S	-	-	S	-	-
氯化铝	U	M	S	U	S	S	S	M	S	S	S	S	S	S	S	M	U	U	S	S
醋酸铵	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
碳酸铵	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氢氧化铵(10%)	U	S	U	M	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S
氢氧化铵(28%)	U	S	U	M	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S
氢氧化铵(浓)	-	U	U	M	-	S	-	S	S	U	S	S	-	M	S	S	S	S	-	U
磷酸铵	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
硫酸铵	U	S	-	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	U
戊醇	S	M	U	S	-	M	-	S	S	S	S	S	-	-	-	U	-	S	-	M
苯胺	S	U	U	S	S	U	U	U	M	U	S	S	U	U	S	S	S	S	U	S
王水	U	U	U	U	-	-	-	-	U	U	U	U	-	-	-	-	-	S	-	M
钡盐	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
苯	S	U	U	M	S	U	U	S	M	U	M	M	U	U	S	U	S	S	U	S
苯甲醇	S	U	U	M	-	M	-	S	U	U	U	U	-	M	S	M	-	S	-	S
硼酸	U	S	M	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
正丁醇	S	-	U	S	-	S	M	-	-	U	S	S	M	M	S	M	-	S	-	S
正丁基邻苯二甲酸盐	S	-	-	S	S	U	U	S	M	U	U	U	S	U	S	M	M	S	U	S
氯化钙	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
次氯酸钙	M	M	-	M	-	M	-	S	S	M	S	S	S	M	S	M	U	S	-	S
四氯化碳	U	U	S	M	S	U	U	S	M	U	M	M	S	M	M	M	U	S	S	S
醋酸铯	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
溴化铯	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氯化铯	M	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
甲酸铯	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
碘化铯	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
硫酸铯	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
氯仿	U	S	U	M	S	U	U	M	M	U	M	M	U	U	S	U	M	U	M	S
铬酸(10%)	M	U	U	U	S	S	S	U	S	S	S	S	U	M	S	M	U	S	S	S
铬酸(50%)	U	U	U	U	-	-	S	-	S	S	U	S	U	M	S	-	U	S	-	S
柠檬酸(10%)	S	S	M	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

1. Delrin^R 2. Noryl^R 3. Polyclear^R/ultraclear^R 4. Tygon^R 5. Viton^R

续表 9-15

化学试剂	材 料																			
	铝	碳纤维	醋酸纤维素 丁酸	1	玻璃	2	尼龙	晶形塑料	3	聚碳酸酯	聚丙烯	聚砜	聚氯乙稀	四氯乙稀	硅橡胶	不锈钢	钛	4	5	
甲酚	S	U	-	S	S	U	U	U	M	U	U	M	-	U	S	S	S	S	U	S
环己烷	S	-	-	S	S	U	S	S	M	S	M	M	M	S	U	M	M	U	S	
脱氧胆酸盐	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
糊精	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	
乙醚	S	-	U	S	S	U	U	S	U	U	U	U	U	S	S	S	S	M	U	
二乙基甲酮	S	-	U	M	S	U	-	S	M	U	M	M	-	U	S	-	-	S	U	
焦碳酸二乙酯	S	S	-	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S	M	S	S	S	S	S	
N,N-二甲酯甲酰胺	S	S	U	S	S	S	U	S	S	U	U	S	U	U	S	M	S	S	U	
二甲基亚砷	S	S	U	S	S	U	S	S	S	U	S	S	U	U	S	S	S	S	U	
二氧六环	M	-	U	M	S	U	U	S	M	M	U	M	M	U	S	S	S	S	U	
乙酸乙酯	M	-	U	M	S	S	U	S	S	U	U	S	U	U	S	M	M	S	U	
乙醇(50%)	S	S	S	M	S	S	S	S	S	M	U	S	S	S	S	S	S	S	M	
乙醇(95%)	S	S	U	M	S	S	S	S	S	M	U	S	M	S	S	S	S	S	M	
二氯乙烷	-	-	U	S	-	U	U	S	U	U	U	U	-	U	S	U	-	S	-	
乙二醇	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	S	S	S	M	S	M	
环氧乙烷气体	S	U	-	-	S	U	-	S	S	M	S	S	S	U	S	U	-	S	S	
氯化铁	-	S	-	M	-	M	-	S	S	-	S	S	-	-	-	M	U	S	-	
Ficoll-Hypaque ^R	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	
甲醛(40%)	M	M	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	M	S	S	S	S	M	S	
甲醛(100%)	-	M	U	U	-	-	-	U	S	M	S	S	-	U	S	-	U	S	-	
戊醛	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	S	S	S	-	
甘油	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
氯化胍	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	
硫氰酸胍	U	S	U	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	U	S	S	
己烷	S	S	-	S	S	S	U	S	M	M	U	S	S	M	S	U	S	S	U	
盐酸(10%)	U	M	S	U	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S	S	S	U	S	S	
盐酸(50%)	U	U	U	U	S	M	S	U	S	M	U	S	S	M	S	M	U	M	M	
盐酸(浓)	-	U	U	U	-	U	M	U	S	U	U	S	-	U	S	U	U	U	-	
氢氟酸(10%)	-	U	M	U	-	U	U	S	S	M	U	S	S	M	S	U	U	U	-	
氢氟酸(50%)	-	U	U	U	-	U	U	U	-	U	U	S	M	M	S	U	U	U	-	
过氧化氢(3%)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
过氧化氢(10%)	U	M	S	U	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	M	S	U	S	
碘酸	S	-	-	S	S	M	S	S	S	S	-	S	S	S	S	M	S	S	M	
异丁醇	-	M	U	S	-	U	-	S	-	S	U	S	-	S	S	S	-	S	-	
异丙醇	M	M	U	S	S	U	S	S	S	S	U	S	S	S	S	M	M	M	S	
煤油	S	S	-	S	S	M	U	S	M	M	U	M	M	S	S	U	S	S	U	
乳酸(20%)	-	S	S	-	-	M	S	M	S	S	U	S	S	M	S	M	S	S	-	

续表 9-15

化学试剂	材 料																			
	铝	碳纤维	醋酸纤维素	1	玻璃	2	尼龙	晶形塑料	聚碳酸酯	3	聚丙烯	聚砜	聚氯乙烯	四氟乙烯	硅橡胶	不锈钢	钛	4	5	
乳酸(100%)	-	S	-	-	-	M	S	U	S	S	U	S	-	M	S	M	S	S	-	S
氯化镁	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	S
巯基乙酸	U	U	-	S	S	M	S	U	S	U	U	U	S	M	S	U	S	S	S	S
2-巯基乙醇	S	U	-	S	S	U	S	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S	S	S	S
Metrizamide	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	S
甲醇	S	S	U	M	S	S	S	S	S	M	U	S	S	S	S	S	S	M	U	U
甲基乙基丙酮	S	-	U	M	S	U	U	S	S	U	U	S	U	U	S	S	S	U	U	U
二氯甲烷	U	S	U	S	S	U	U	S	U	U	U	U	U	U	S	S	S	U	S	M
镍盐	M	S	S	-	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
硝酸(10%)	M	U	S	U	S	U	S	U	S	S	U	S	S	S	S	M	S	S	S	S
硝酸(50%)	M	U	M	U	S	U	S	U	S	M	U	M	S	S	S	U	S	S	M	S
硝酸(95%)	M	U	U	U	-	U	U	U	M	U	U	M	U	U	S	U	S	S	-	S
Nycodenz ^R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
汽油	S	S	-	S	S	S	S	S	S	M	U	M	S	S	S	U	S	S	S	S
油酸	S	U	S	U	S	U	S	S	S	S	U	S	S	S	S	M	M	S	M	M
草酸	M	M	S	U	S	S	S	S	S	M	U	S	S	S	S	S	M	M	S	S
高氯酸(10%)	U	U	-	U	S	M	U	-	S	U	U	S	-	M	M	U	-	-	-	S
高氯酸(70%)	U	U	-	U	S	U	M	U	M	U	U	M	U	M	S	U	U	S	U	S
酚(5%)	M	U	-	M	S	U	M	U	S	M	U	S	U	U	S	U	M	M	M	S
酚(50%)	U	U	-	M	S	U	M	U	U	M	U	S	U	U	S	U	U	M	M	S
磷酸(10%)	U	S	S	U	S	S	S	U	S	S	U	S	S	S	U	S	M	U	S	S
磷酸(浓)	-	M	M	U	-	M	S	U	S	M	U	S	S	M	S	U	M	M	-	S
苦味酸	S	M	-	S	S	M	S	U	S	S	S	S	S	U	S	U	M	S	M	S
溴化钾	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	M	S	S	S
碳酸钾	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
氯化钾	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S
氢氧化钾(5%)	U	S	S	M	S	S	S	S	S	U	U	S	S	S	S	M	M	M	S	M
氢氧化钾(浓)	U	M	U	M	M	S	S	-	S	U	U	S	-	M	U	-	S	U	-	M
高锰酸钾	S	S	-	S	S	S	S	U	S	S	-	S	S	U	S	S	M	S	U	S
吡啶(50%)	U	-	U	U	U	S	S	U	M	U	-	S	M	U	S	S	U	U	U	U
溴化铷	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
氯化铷	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
硼酸钠	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
溴化钠	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S
碳酸钠(2%)	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S

续表 9-15

化学试剂	材 料																			
	铝	碳纤维	醋酸纤维素	1	玻璃	2	尼龙	晶形塑料	3	聚碳酸酯	聚丙烯	聚砜	聚氯乙稀	四氟乙稀	硅橡胶	不锈钢	钛	4	5	
氯化钠(10%)	S	S	S	S	-	-	-	S	S	S	S	S	S	-	S	S	M	-	S	
氯化钠(饱和)	S	S	U	S	-	-	-	S	S	-	S	S	-	S	S	S	-	S		
十二烷基硫酸钠	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
氢氧化钠(<1%)	-	S	S	-	S	M	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-	S	
氢氧化钠(10%)	U	M	U	U	M	M	S	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	-	S	
次氯酸钠(5%)	U	M	S	U	S	M	S	S	S	S	S	S	S	S	M	M	S	M	S	
碘化钠	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	
硝酸钠	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	
硫酸钠	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	S	
硫化钠	S	S	S	-	-	-	-	S	S	-	-	S	-	-	S	S	M	-	S	
亚硫酸钠	S	S	-	S	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
硬脂酸钠	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	M	S	S	S	
蔗糖	M	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	M	S	S	S	
蔗糖(碱性)	M	S	-	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	S	M	S	S	S	S	
磺基水杨酸	U	S	S	S	S	S	S	U	S	S	S	-	S	S	U	S	S	S	S	
硫酸(10%)	U	U	S	U	S	S	M	U	S	S	U	S	S	S	U	U	M	S	S	
硫酸(50%)	U	U	U	U	S	S	M	U	S	M	U	S	S	S	U	U	M	M	S	
硫酸(浓)	S	U	U	U	-	-	M	U	S	U	U	S	U	M	S	U	S	U	-	S
四氢呋喃	S	U	U	U	S	U	U	S	M	U	U	M	U	U	S	U	S	S	U	U
Tris 缓冲液	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
甲苯	S	-	U	M	S	U	U	S	M	U	U	M	U	U	S	U	S	U	U	M
三氯乙酸	U	M	-	U	S	U	S	U	S	M	U	S	U	U	S	U	U	M	U	U
三氯乙烷	-	U	-	M	-	U	-	S	U	U	U	U	U	U	S	U	-	S	-	S
三氯乙稀	-	U	U	-	-	U	-	S	U	U	U	U	U	U	S	U	-	U	-	S
磷酸三钠	-	S	S	M	-	-	-	-	S	-	S	S	-	-	S	-	-	S	-	S
Triton X 100	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
尿素	S	S	S	S	-	-	-	S	S	-	S	S	-	S	S	-	-	S	-	-
二甲苯	S	U	S	M	S	U	U	U	U	U	U	U	U	S	U	M	S	U	S	S
氯化锌	M	S	S	U	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	S	S	M	M
硫酸锌	U	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

M,中等程度的侵蚀,也可能满意,取决于离心时间的长短,速度的高低等.建议实际试验.S,满意.U,不满意,不建议采用.-,不清楚.

注意:表中列出的化学抗性仅供选择离心管或离心瓶时的指导,因为在离心力下各种材料的化学抗性未有完整的数据,所以有怀疑时,可进行预试验.

表 9-16 消毒与灭菌的方法

化学试剂	材										料									
	铝	碳纤维	醋酸纤维素	1	玻璃	2	尼龙	晶形塑料	聚碳酸酯	3	聚丙烯	聚砜	聚氯乙稀	四氟乙稀	硅橡胶	不锈钢	钛	4	5	
消毒																				
高压(121 C)	U	M	U	M	S	U	S	U	S	M	U	S	M	M	S	S	S	S	M	S
紫外光照射	-	S	S	S	S	-	S	M	U	U	S	U	S	S	S	S	S	S	S	-
环氧乙稀	S	U	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
甲醛(气体)	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
戊醛(2%)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
灭菌																				
酒精(70%)	S	S	M	M	S	S	S	S	M	U	S	M	M	S	S	M	S	M	M	
次氯酸盐(5%)	U	M	S	U	S	M	S	S	S	S	S	S	M	S	M	M	M	M	S	
戊醛(2%)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
酚类化合物	U	U	-	U	S	U	S	U	M	U	S	M	U	U	S	U	U	U	U	S
甲醛(40%)	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	M	M	S	S	S	S	M	S

缩写: M, 中等程度侵蚀, 也可能满意, 建议试验。S, 满意。U, 不能用。-, 不清楚。

1. Delrin[®] 2. Noryl[®] 3. Polyclear[®]/ultraclear[®] 4. Tygon[®] 5. Viton[®]

成损坏。表 9-13、9-14、9-15 及 9-16 分别列出了制作离心管或离心瓶材料的特性、消毒和灭菌的方法, 以及对化学试剂的抗性。

消毒最常用的方法是蒸汽, 一般为 121 C, 15 psi, 15 min, 环氧乙烷(ethylene oxide) 气体易扩散, 渗透性强, 可达到蒸汽和液体所不易达到的地方。甲醛气体也可用来消毒, 条件为浓度 10g/m³, 温度大于 21 C, 相对湿度大于 70%, 3 小时。浸入戊醛溶液 10 小时可达到消毒目的。紫外光消毒时应注意时间要足够长以保证消毒, 此外, 很多塑料吸收紫外光, 由这些材料制作的容器, 其内部不能得到消毒。灭菌的一些常用方法, 有 70% 酒精, 70% 异丙醇, 次氯酸钠(1:8 稀释), 37% 甲醛(formalin), 戊醛溶液及酚类化合物(市售 Lysol) 至少浸泡 10 分钟。

9.8. 离心机的计算机控制

由于计算机高速度的发展和广泛应用, 近年来一些厂家, 如 Beckman 公司生产的 XL-90 型就带有计控装置和软件。本章提到的一些计算都可在计算机上进行。如输入离心头的型号和 r/min, 计算机就可以立即显示最大、最小和平均离心力。有些原需要长时间离心分离的样品, 也因研究和计算机应用, 不但时间可大大缩短, 而且只要输入必要的参数, 即可自动控制。例如, 过去用氯化铯超离分离和纯化质粒需要 30 小时左右, 经过该公司的研究缩短到 3 个小时。他们研究了不同角度(5°, 7.5°, 10°, 12.5°) 的 NTV 转头, 观察到离心管角度愈小, 分离时间愈短, ≥7.5° 的离心管就可将 DNA 与蛋白和 RNA 分离。

加入 0.001%~0.1%的 TritonX-100 可以提高分离效果。通过数学计算模拟分离方法,最后提出了 5 步法(见表 9-17,9-18),离心分离质粒 DNA 的时间缩短到 3 小时,并将此程序制成软件名为 ESP(efficient sedimentation program)即高效沉降程序。工作者输入必要数据即自动完成。各种离心机应用的软件将会愈来愈多,使用也会愈来愈方便。

表 9-17 质粒 DNA 的 5 步分离法(NTV 90 转头)

速度 (r/min)	每步时间 (h)	总需时间 (h)
90 000	1.50	1.50
87 000	0.25	1.75
83 000	0.25	2.00
81 000	0.50	2.50
80 000	0.50	3.00

表 9-18 应用 NTV 转头分离质粒 DNA(20℃)

转 头	Triton X-100 (1 : 100 稀释, μ l)	速 度 (r/min)	时 间 (h)	5 步法的时间 (h)
NVT 65(7.5°)*	135	65 000	4	—
NVT 90(8°)*	51	78 000	4	3
NVT 100(9°)*	39	100 000	4	—

(吴冠芸)

参 考 文 献

- 刘培楠,梁植权,宋振玉等. 仪器分析在分子生物学中的应用(第三册). 科学出版社,1978
- Chambers J J A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
- Condino J, Marque J J. ESP™ Efficient Sedimentation Program: What Is It? Ultracentrifugation Application Data DS-755. Beckman Instruments Inc., 1989
- Little S E. Plasmid Separations in NVT Near Vertical Tube Rotors. Ultracentrifugation Application Information A-1824A. Beckman Instruments Inc., 1996
- Owen Mitch Griffith. Techniques of Preparative, Zonal, and Continuous Flow Ultracentrifugation. Beckman Instruments Inc., 1986
- Rickwood D. Iodinated Density Gradient Media: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 1991
- Rickwood D. Centrifugation A Practical Approach. IRL Press, Oxford, 1992

10. 放射性核素

10.1. 有关放射性核素的一些名词

- (1) 核素(isotope) 有相同的质子及原子序数但有不同的质量数的元素。
- (2) 半衰期(half-life) 放射性核素的活性衰变时,其质量或原子数消失了一半所需的时间。
- (3) 居里(Curie) 放射性活性单位。1 居里为 3.7×10^{10} 次蜕变或每秒产生 3.7×10^{10} 次蜕变的放射性核的量(简称为 Ci)。
- (4) 贝克(Becquerel) 国际标准放射性单位。1Bq 等于每秒 1 个核裂变。1Bq = 2.70×10^{-11} Ci。
- (5) 戈瑞(Gray) 国际标准稀释剂量单位。1Gy 等于 1 J/kg, 等于 100rad。
- (6) 希沃特(Sievert) 国际标准剂量当量单位。1Sv 等于 100rem。
- (7) 伦琴(Roentgen) 照射单位。在标准状况下,每立方厘米干燥空气的缔合粒子在空气中发射所产生的离子数,这些离子携带 1 个 X 或静电单位(简称为 R)。
- (8) 人伦琴当量(Roentgen equivalentman) 剂量当量单位。辐射吸收剂量(rad)与相对生物学效应的产物,当被人体吸收时,产生相当于吸收 1 伦琴 X 或辐射量的效应(简称为 rem)。
- (9) 拉德(rad) 辐射吸收剂量单位。即每克组织吸收 100erg 的能。1rad 等于 0.01Gy。
- (10) 电子伏特(electron volt) 能的单位。一个电子通过一伏特电位梯度所获得的能量为 1eV(1eV = 1.60×10^{12} erg)。
- (11) 亲代(parent) 一种有放射活性的核素通过衰变后形成与其相关的核素。
- (12) 子代(daughter) 由一个亲代的核素经过放射性衰变释放其能量后所形成的核素。
- (13) 比放射性(specific activity) 元素或化合物单位质量中所含的放射活性单位的数目,通常以每毫克毫居里数(mCi/mg)、每毫克千贝克数(kBq/mg)、每毫摩尔毫居里数(mCi/mmol),或每毫摩尔千贝克数(kBq/mmol)来表示。
- (14) 电子俘获(electron capture) 放射性的衰变方式。在这方式中轨道电子被原子的核所吸引并和核中质子结合。该电子通常来自原子的 K-层;而其与质子的结合引致中子的形成,并以 X 线形式的能量发射(简称为 EC)。
- (15) 韧致辐射(bremsstrahlung) 是一种电磁辐射。高能粒子在原子核的静电磁场中减速时产生的。
- (16) 物理伦琴当量(Roentgen equivalent physical) 使每克组织产生 1.615×10^{12} 离子对的电离辐射量;每克组织吸收 93 尔格时产生的电离辐射量(简称为 REP)。
- (17) 半值层(half-value thickness) 一种吸收性物质的厚度,能够使入射的辐射

线强度降低一半称之为半层值(简称为 HVT)。与 half-value layer(HVL)的意义相同。

(18)核素效应(isotope effect) 由于核素质量不同而对反应速度的一种影响。这种效应又可分为核素本身起键的裂解的一级核素效应,和核素本身不参与键裂解的二级核素效应。

(19)核素丰度(isotopic abundance) 在一种元素的总量中,其核素含量的百分数。

(20)标记化合物(labeled compound) 在一个化合物中的一个或多个原子,被同种放射性原子或稳定性原子所取代的,称之为标记化合物。

(21)无载体(carrier-free) 在放射性核素中没有同种稳定性核素的掺入。

以上有关放射性核素的有关名词的一些解释均取材自 Amersham Life Science Data Guide 及科学出版社 1983 年编译的英汉生物化学词典综合整理。

10.2. 一些与放射线有关的单位

表 10-1 与放射线有关的单位

量	符号	名称	换算率
长度	F	费密	$1 \times 10^{-15} \text{m}$
质量	u	原子质量单位	$1.6605655 \times 10^{-27} \text{kg}$
能量	eV	电子伏	$1.6021892 \times 10^{-19} \text{J}$
截面	b	靶恩	$1 \times 10^{-28} \text{m}^2$
放射性	Ci	居里	$3.7 \times 10^{10} \text{Bq}$
	Bq	贝克	$1 \text{s}^{-1}, 1 \text{Bq} = 2.703 \times 10^{-11} \text{Ci}$
	dPs	衰变/秒	1s^{-1}
照射量	R	仑琴	$2.58 \times 10^{-4} \text{Ckg}^{-1} = 0.258 \text{mC kg}^{-1}$
	Ckg^{-1}	库仑千克 ⁻¹	$1 \text{Ckg}^{-1}, 1 \text{Ckg}^{-1} = 3876 \text{R}$
照射剂量率	Akg^{-1}	安培千克 ⁻¹	$1 \text{Ckg}^{-1} \text{s}^{-1}, 1 \text{Akg}^{-1} = 3876 \text{Rs}^{-1}$
吸收剂量	rad	拉德	$1 \times 10^{-2} \text{Jkg}^{-1}, 1 \text{rad} = 1 \times 10^{-2} \text{Gy}$
	Gy	戈瑞	$1 \text{Jkg}^{-1}, 1 \text{Gy} = 100 \text{rad}$
吸收剂量率	Wkg^{-1}	瓦特千克 ⁻¹	$1 \text{Jkg}^{-1} \text{s}^{-1}, 1 \text{Wkg}^{-1} = 100 \text{rads}^{-1}$
剂量当量	Sv	希沃特	100rem

* 引自井村伸正等編,生化学ハンドブック,丸善株式会社 1984。

10.3. 一些应用于生物化学研究中的放射性核素

应用于生物化学研究中的放射性核素的数据见表 10-2。

表 10-2 一些应用于生物化学研究中的放射性核素

元素 (质量顺序)	辐射 (种类)	半衰期	辐射能(MeV)		检测的闪烁 剂或方法
			粒 子	γ 线	
^3H	β^-	12.3a	0.158	—	LSC
^{11}C	β^+	20.5min	0.95	—	LSC
^{14}C	β^-	5760a	0.156	—	LSC
^{22}Na	β^+, γ^-	2.6a	0.58(90%)	1.3	LSC 或 SS
^{24}Na	β^-, γ	14.8h	1.39	1.38, 2.76	LSC 或 SS
^{26}Mg	β^-	21.4h	0.459	—	LSC
^{31}Si	β	170min	1.8	—	C
^{32}P	β^-	14.3d	1.71	—	LSC, C
^{35}S	β^+	87.1d	0.169	—	LSC
^{36}Cl	β^+, k, β^-	$3.1 \times 10^5\text{a}$	0.71	—	LSC
^{38}Cl	β^-, γ	38.5min	1.19(36%)	1.60(43%)	LSC, C, SS
			2.07(51%)	2.12(57%)	
			5.20(53%)		
^{42}K	β^-, γ	12.4h	2.04(25%)	1.4, 2.1	LSC, C, SS
			3.58(75%)		
^{45}Ca	β^+	165d	0.260	—	LSC
^{51}Cr	k, γ	28d	—	0.323, 0.237	LSC, SS
^{52}Mn	$\beta^+(35\%)$	5.8d	0.58	1.0, 0.37	LSC
	$k(55\%)$			0.94, 1.46	
^{54}Mn	k, γ	31Cd	—	0.835	SS
^{55}Fe	k	2.94a	—	—	LSC
^{57}Co	γ	270d	—	0.136(10%)	SS
				0.122(88%)	
^{58}Co	$\beta^+(14.5\%), \gamma$	72d	0.42	0.805	LSC, SS
^{59}Fe	β^-, γ	46.3d	0.46(50%)	1.3(50%)	LSC
			0.26(50%)	1.1(50%)	
^{60}Co	γ	5.3a	0.31	1.16, 1.32	LSC, SS
^{64}Cu	$k(54\%)$	12.8h	0.57(β^-)	1.35(2.5%)	LSC
	$\beta^-(31\%)$			0.66(β^-)	
	$\beta^+(15\%)$				
	$\gamma+k(1.5\%)$				
^{65}Zn	$\beta^+(1.3\%)$	250d	0.32	1.14(46%, k)	LSC
	$k(98.7\%)$				
^{75}Se	k, γ	121d	—	0.076~0.405	SS

续表 10-2

元素 (质量顺序)	辐射 (种类)	半衰期	辐射能(MeV)		检测的闪烁 剂或方法*
			粒 子	γ 线	
^{76}As	β^- , γ	26.8h	3.04(60%)	1.075	LSC,SS
			2.49(25%)	1.20	
			1.29(15%)	0.55	
^{82}Br	β^- , γ	36h	0.465	0.547,0.787 1.35	LSC,SS
^{86}Rb	β^- , γ	18.7d	1.822(80%)	1.081	LSC,C,SS
			0.716(20%)		
^{89}Sr	β^-	51d	1.46	—	LSC,C
^{90}Sr	β^-	28.5a	0.61	—	LSC
^{99}Mo	β^- , γ	68h	1.3	0.75,0.24	
^{125}Sb	β^- , γ	2.7a	0.3(65%)	0.55	LSC,C
			0.7(35%)		
^{125}I	γ	60d	—	0.035	SS,LSC
^{131}I	β^- , γ	8.1d	0.605(86%)	0.637,0.363	LSC,SS
			0.282(14%)	0.282,0.08	

* LSC = liquid scintillation counting, C = Cerenkov Counter, SS = gamma counter (solid scintillant), k = electron capture.

10.4. 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的 几种 β 衰变的放射性核素

表 10-3 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 β 衰变的放射性核素

核素种类	半衰期	B 线能量 最大(平均)	生物 半衰期(d)	最大射程 空气中*	空气中最大允许浓度 ($\mu\text{Ci cm}^{-1}$)	必要的防护**
^3H	12.3 a	0.0186 (0.0057)	12	6mm ($6 \times 10^{-3}\text{mm}$)	5×10^{-6}	—
^{14}C	5730 a	0.156 (0.049)	10	24cm (0.28mm)	2.5×10^{-6}	1cm 塑料 1cm 有机玻璃
^{32}P	14.3 d	1.709 (0.69)	44.3	30cm (0.28mm)	2.25×10^{-7}	1cm 塑料
^{35}S	87.1 d	0.167 (0.049)	13.5	720cm (8mm)	5×10^{-8}	

* 括号内为在水中的射程。

** ^3H 的外照射无需特别防护, ^{14}C 及 ^{35}S 建议用 3~5mm 厚的有机玻璃, ^{32}P 则建议用 1cm 厚的有机玻璃来防护。

10.5. 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的 几种 γ 射线的放射性核素

表 10-4 生物化学和分子生物学研究工作中最常用的几种 γ 射线的放射性核素的数据

核素种类	半衰期 (d)	主要 γ 线能量 (MeV)	生物半衰期 (d)	空气中最大允许浓度 ($\mu\text{Ci cm}^{-3}$)	剂量率 (mR h^{-1})	必要的防护材料 及厚度
^{51}Cr	27.7	0.005	26.6	2×10^{-6}	1.59×10^{-2}	铅 (3.2mm)
^{125}I	60	0.035	41.8	7.5×10^{-9}	1.51×10^{-1}	铅 (0.25mm)
$^{131}\text{I}^*$	8.1	0.637, 0.363 0.282, 0.08	7.6	7.5×10^{-9}	2.095×10^{-1}	铅 (12.7mm)

* ^{131}I β 线能量最大的为 0.806MeV, 平均为 0.180MeV。

10.6. 放射性国际标准单位(SI) 换算

10.6.1. 放射性活性单位换算

$$1 \text{ Bq} = \text{每秒 1 个核裂变} = 2.7 \times 10^{11} \text{ Ci}$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 37 \text{ GBq}$$

(1) 居里-贝克换算

1 pCi	1 nCi	1 μCi	1 mCi	1 Ci
↓	↓	↓	↓	↓
37 mBq	37 Bq	37 kBq	37 MBq	37 GBq

(2) 贝克-居里换算

1 Bq	37 kBq	1 MBq	1 GBq	1 TBq
↓	↓	↓	↓	↓
27 pCi	27 nCi	27 μCi	27 mCi	27 Ci

表 10-5 Bq/Ci 换算

kBq																					
MBq	3.7	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	37	74	92.5	111	148	185	222	259	296	333	370	444	555	740	925
GBq																					
μCi																					
mCi	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	1	2	2.5	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	25
Ci																					
MBq																					
GBq	1.11	1.48	1.85	2.22	2.59	2.96	3.33	3.7	4.625	5.55	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	22.2	25.9	27.75	29.6	33.3	37
TBq																					
μCi																					
mCi	30	40	50	60	70	80	90	100	125	150	200	250	300	400	500	600	700	750	800	900	1000
Ci																					

10.7. 放射性衰变校正计算

$$\log_{10} N_0 / N_t = 0.3010 (t/h)$$

剩余核素的 %

$$= 100 / \text{反对数}(0.3010 t/h) \text{ 或 } 100 \times e^{-0.6931(t/h)}$$

t = 衰变时间

h = 半衰期货源时或原始放射性衰变了 50% 的时间

N_0 = 时间为 0 时的放射性

N_t = 时间为 t 时的放射性

经过 x 个半衰期或后剩余原始放射性的 % 为 $2^{-x} \times 100$, 因而

$$x=1 \quad 50\% \quad x=2 \quad 25\% \quad x=3 \quad 12.5\% \quad x=4 \quad 6.25\% \quad x=5 \quad 3.13\%$$

$$x=6 \quad 1.56\% \quad x=7 \quad 0.78\% \quad x=8 \quad 0.39\% \quad x=9 \quad 0.20\% \quad x=10 \quad 0.1\%$$

所以,任何放射性核素不论其物理半衰期的长短,经过 10 个半衰期后,均只剩下其原始放射性的 1%。

10.8. 几种最常用的放射性核素衰变表

在生物化学和分子生物学研究的最常用的几种放射性核素中除了 ^{14}C 的标记化合物由于其物理半衰期相当长;在使用中对其衰变量一般均可忽略不计外,其他的几种常用的放射性核素标记化合物在使用时均可从其自检定时的日期和放射性物质的量自衰变表中查出各自经过了若干时间后的剩余量。见表 10-6(1)和(2)。

表 10-6a 几种常用的放射性核素衰变表(1)

$^3\text{H} \rightarrow ^3\text{H} \rightarrow ^3\text{He}$ $E_{\text{mx}}=0.086 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=12.3 \text{ a}$		$^{32}\text{P} \rightarrow ^{32}\text{P} \rightarrow ^{32}\text{S}$ $E_{\text{mx}}=1.708 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=14.3 \text{ d}$		$^{35}\text{S} \rightarrow ^{35}\text{S} \rightarrow ^{35}\text{Cl}$ $E_{\text{mx}}=0.258 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=87.1 \text{ d}$		$^{42}\text{K} \rightarrow ^{42}\text{K} \rightarrow ^{42}\text{Ca}$ $E_{\text{mx}}=3.58 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=12.4 \text{ h}$	
t (年)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)
1	94.5	1	95.3	2	98.4	1	94.6
2	89.3	2	90.8	5	96.2	2	89.5
3	84.4	3	86.5	10	92.3	3	84.5
4	79.8	4	82.4	15	88.7	4	80.0
5	75.4	5	78.5	20	85.3	5	75.6
6	71.3	6	74.8	25	82.0	6	71.5
7	67.4	7	71.2	31	78.1	7	67.6
8	63.7	8	67.8	37	74.5	8	63.9
9	60.2	9	64.7	43	71.0	9	60.5
10	56.9	10	61.5	50	67.0	10	57.2
11	53.8	11	58.7	57	63.6	11	53.9
12	50.9	12	55.9	65	59.6	12	51.2
12.3	50.0	13	53.2	73	56.0	12.4	50.0
		14	50.7	81	52.5		
		14.3	50.0	87.1	50.0		

表 10-6b 几种常用的放射性核素衰变表(2)

$^{45}\text{Ca} \rightarrow ^{45}\text{Ca} \rightarrow ^{45}\text{Sc}$ $E_{\text{mx}}=0.260 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=165 \text{ d}$		$^{51}\text{Cr} \rightarrow ^{51}\text{Cr} \rightarrow ^{51}\text{V}$ $E_{\text{mx}}=0.260 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=28 \text{ d}$		$^{125}\text{I} \rightarrow ^{125}\text{I} \rightarrow ^{125}\text{Te}$ $E_{\text{mx}}=0.035 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=60 \text{ d}$		$^{131}\text{I} \rightarrow ^{131}\text{I} \rightarrow ^{131}\text{Xe}$ $E_{\text{mx}}=0.637 \text{ MeV}$ $t_{1/2}=8.1 \text{ d}$	
t (d)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)	t (d)	剩余量 (%)
10	95.9	2	95.2	4	95.5	0.2	98.3
20	91.9	4	90.6	8	91.2	0.4	96.6
30	88.2	6	86.2	12	87.1	0.6	95.0
40	84.5	8	82.0	16	83.1	1.0	91.8
50	81.1	10	78.1	20	74.9	1.6	87.2
60	77.7	12	74.3	24	75.8	2.3	81.2
70	74.5	14	70.7	28	72.4	3.1	76.7
80	71.5	16	67.3	32	69.1	4.0	71.0
90	68.5	18	64.0	36	66.0	5.0	65.2
100	65.7	20	61.0	40	63.0	6.1	59.3
110	63.0	22	58.0	44	60.2	7.3	53.4
120	60.4	24	55.2	48	57.4	8.1	50.0
130	57.9	26	52.5	52	54.8		
140	55.5	28	50.0	56	52.4		
150	53.3			60	50.0		
160	51.1						
165	50.0						

10.9. 放射性的测量

10.9.1. 各种测量仪器的计数效率

表 10-7 各种测量仪器的计数效率的比较

核素种类	计 数 效 率 (%)				
	底窗型 GM 计数管	薄窗型 2x 气流计数器	无窗型 2x 气流计数器	无窗型 4x 气流计数器	液体闪烁 计数器
³ H	0	0	<5	15	30~60
¹⁴ C	<0.5	5	25	50	70~90
³² P	5	30	60	>90	>90

10.9.2. 液体闪烁测量

1. 切仑克夫计数 对于大于 0.5 MeV β 粒子的测量切仑克夫计数是较为理想的。这种方法具有直接在水溶性缓冲系统中测量,不需要使用任何闪烁剂即可用液体闪烁谱仪进行计数。样品的制备也很简单。但他对于像³H、¹⁴C、³⁵S 等一些低能量核素的测量是不适用的。切仑克夫计数的计数效率见表 10-8。

表 10-8 切仑克夫计数的计数效率

放射性核素	E_{max} (MeV)	β 谱 % >0.5 MeV	计数效率 (%)
²⁴ Na	1.39	60	40
³² P	1.71	80	50
³⁶ Cl	0.71	30	10
⁴² K	3.58	90	80

2. 几种常用的第一闪烁体和第二闪烁体的名称和简写

(1) 2,5-二苯基噁唑

(2,5-diphenyloxazole, PPO)

(2) 2-苯基-5-(4'-联苯基)1,3,4-噁二唑

[2-phenyl-5-(4'-biphenyl) 1,3,4-oxdiazole, PBD]

(3) 2-(4'-叔丁基苯)-5-(4''-联苯基)1,3,4-噁二唑

[2-(4'-t-butyl-octyloxy)-p-quaterphenyl, Bu-PBD]

(4) 1,4-双-[2'-(5'-苯基噁唑基)]苯

{1,4-Di-[2'-(5'-phenyloxazolyl)]-benzene}

3. 几种常用的第一闪烁体和第二闪烁体的部分理化性质

实验室中几种最常用

的第一闪烁体和第二闪烁体的部分理化性质以及他们的使用浓度见表 10-9。

表 10-9 几种最常用闪烁体的部分理化性质

闪烁体 名称	外观	分子量	熔点 (°C)	吸收光谱 (nm)	发射光谱(nm)		溶解度(20°C, g/L)		使用浓度 (g/L)
					最大	平均	甲苯	二甲苯	
PPO	白色针状结晶	221.26	70~72	303	363,464	341.8	414	395	4-7
PBD	白色结晶	298.35	165~167	300	360,363	370.3	21	18	7-20
BU-PBD	白色粉末	354.45	137~139	305	368,367	375.0	130	77	6-20
P-TP	白色针状结晶	230.31	213~215	276	335,344	341.8	5.5	—	6-8
POPOP	黄-黄绿色结晶	64.430	244~246	385	418	415,414.9	2.2	1.4	0.5-1

4. 一些实验室中常用的闪烁液配方 实验室中使用的闪烁液配方很多,各个实验室根据各自的实验需要,以及各自的使用习惯,研究了许多不同组成的闪烁液。这里仅介绍几个最常用的闪烁液,见表 10-10。

表 10-10 一些实验室中常用的闪烁液配方

配方	组成	应用
1	乙二醇 35ml, 乙醇 140ml, 二甲苯 575 ml, Triton X-100(X-114) 250 ml, PPO 3.0 g, POPOP 0.2 g	含水样品的测定,样品中的含水量可达 30%
2	甲苯或二甲苯 660 ml, Triton X-100(X-114) 340 ml, PPO 5 g, POPOP 0.1 g(闪烁体可用 PBD10 g 或 Bu-PBD15 g 代替)	乳液样品的测定
3	萘 60 g, PPO 4 g, POPOP 0.2 g, 甲醇 100 ml, 乙二醇 20 ml, 加二氧六环至 1 L	含水样品的测定
4	萘 60 g, BuPBD 或 PBD 15 g, 加二氧六环至 1 L	水性样品的测定
5	TP 6 g, POPOP 0.4 g, 加甲苯至 1 L	脂溶性样品的测定
6	萘 100 g, PPO 4 g, POPOP 0.4 g, 加甲苯至 1 L	脂溶性样品的测定
7	PPO 4 g, POPOP 0.05 g, 加甲苯至 1 L	非均相测定
8	萘 70 g, BuPBD 6~7g, POPOP 0.5 g, 加甲苯至 1 L	脂溶性样品的测定
9	萘 100 g, PBD 11~12 g, POPOP 0.4 g, 加二氧六环至 1 L	含水样品的测定
10	萘 100~110 g, PPO 7 g, POPOP 0.5 g, 加二氧六环至 1 L	含水样品的测定

5. γ 射线及强辐射 β 离子的测量 对于那些发射 γ 射线或辐射能量较强的 β 粒子的测量,可以使用 γ 计数器进行测量,通常使用的闪烁体为 NaI (TI)。

10.9.3. 放射自显影

放射自显影是利用放射性核素所产生的核射线,使照相乳胶、核子乳胶或 X 线胶片、乳胶干板等感光,从而对样品或标本中的放射性物质进行测量的一种方法。既能观察到放射性物质在标本或样品中的分布情况和定位,又可通过颗粒计数或利用光密度计扫描进行定量测定。不但定位准确而且灵敏度很高,应用极为广泛。

1. 放射自显影常用的核素及其在照相乳胶中的射程(见表 10-11)。

表 10-11 放射自显影常用的核素及其在照相乳胶中的射程

核素种类	β 粒子能量(MeV)		在核子干板中的射程 (μm)		在乳胶中的射程 (μm)	
	最大	平均	最大	平均	最大	平均
³ H	0.0186	0.0057	5	0.5	2	0.2
¹⁴ C	0.156	0.050	100	15	90	15
³² P	1.711	0.693		700	2000	1400
³⁵ S	0.167	0.005	120	20	100	20
⁴⁵ Ca	0.257	0.076	200	50		50
⁵⁹ F	0.46	0.120	500	60		60
¹²⁵ I	0.036	—				<0
¹³¹ I	0.608	0.18	600	160	1000	160

2. 放射自显影中的测效增强 在放射自显影的操作中有时因放射核素的能量和剂量都很低,用加入 PPO 的荧光显影法或在暴光时加用增感屏,均可大大地提高放射自显影的效果。三种不同乳胶检测方法所得的测量效果进行比较,以直接放射自显影的测效为 1(见表 10-12)。

表 10-12 三种不同乳胶检测方法的比较

核素种类	方 法	检测限	相对测效比较
		(d. p. m. cm/24h)	
³ H	直接放射自显影	$>8 \times 10^6$	1
	荧光显影,使用 PPO	8000	>1000
¹⁴ C 或 ³⁵ S	直接放射自显影	6000	1
	荧光显影,使用 PPO	400	15
³² P	直接放射自显影	525	1
	使用增感屏	50	10.5
¹²⁵ I	直接放射自显影	1600	1
	使用增感屏	100	16

10.10. 辐射的防护

辐射的防护问题是应当认真对待的。在从事放射性核素工作时,应尽量避免将放射性物质引入体内,同时对可能来自外照射的危险也应引起足够的重视。通常对来自核素外照射的辐射损伤,除了在进入放射性核素工作区时佩带个人剂量计用以记录工作人员所接受的照射剂量之外,还要通过三个环节来防护,即:

(1) 缩短时间: 尽量缩短与核素接触的时间。以十分熟练的操作来迅速地完成实验工

作。

(2)加大距离：对于一些辐射能量较强的核素，可以使用操作钳等，以加大操作人员与辐射源之间的距离。

(3)增加屏蔽：放射性物质的辐射强度在通过一些物质时其能量减弱。因此增加屏蔽物的厚度可以对核素的外照射损伤进行有效地防护。对不同能量的 β 粒子的屏蔽数据见表 10-13 及 10-14。

表 10-13 对 β 粒子的屏蔽

β 粒子的能量 (MeV)	减少其强度一半的物质 每平方厘米的重量 (cm^2/mg)	减少其强度一半的物质 所需物质的厚度(mm)			
		水	玻璃(d=2.5)	铅	有机玻璃
0.1	1.3	0.013	0.005	0.0011	0.0125
1.0	48	0.48	0.192	0.042	0.38
2.0	130	1.3	0.52	0.115	1.1
5.0	400	4.0	1.6	0.35	4.2

表 10-14 对 γ 射线的屏蔽

γ 射线的能量 (MeV)	降低 γ 射线强度所需物质的厚度(cm) (因数 10)		
	铝	铁	铅
0.533	203	61	18
1.0	254	82	38
2.0	320	110	59
3.0	370	120	64
4.0	400	127	63
5.0	440	130	61

10.11. 放射性污染的清除

放射性实验室中穿着的工作服、各种布类及使用过的物品(包括玻璃仪器、有机玻璃、塑料、橡胶制手术器械及其他金属制陶瓷器皿等),以及可能被放射性核素污染的其他物品或场所如瓷砖,或带油漆涂料的物件等污染的清出,除所使用的清除剂及处理方法,见表 10-15。

表 10-15 清除放射性污染的方法

污染的物品	使用的清除剂	处理方法及注意事项
玻璃器皿和陶瓷	中性洗涤剂,肥皂,浓酸及铬酸洗液 3%~5%的柠檬酸或柠檬酸铵,EDTA 以及 10%的磷酸三钠等	先浸泡,然后大量清水冲洗,凉干或烘干,检查后使用。 ¹⁴ C 及 ¹³¹ I 禁止使用浓酸
金属制品	中性洗涤剂,肥皂,氟氢酸铵,柠檬酸钠,EDTA,稀酸(不锈钢制品),金属抛光粉等	浸泡,擦洗,用抛光粉擦等
橡胶制品	肥皂,中性洗涤剂,稀硝酸,柠檬酸复合洗剂及 EDTA 等	浸洗 ¹⁴ C 及 ¹³¹ I 禁止使用稀硝酸
油漆及其他涂料	油漆及涂料清洗剂,溶剂或碱性清洗剂,磷酸三钠,EDTA,柠檬酸及洗涤剂	擦洗,对于使用上述清洗剂无法清除的污染,可用氢氧化钾或氢氧化钠去除
布类及织物	中性洗涤剂或肥皂 3%柠檬酸或 3%草酸	除用中性洗涤剂或肥皂洗涤外,丝绸织物、尼龙制品用柠檬酸,乙烯,粘胶及棉织品用草酸。注意:必须使用专用洗衣机
手及皮肤	肥皂,中性洗涤剂,20%柠檬酸钠,高锰酸钾配合亚硫酸氢钠,氧化钛配合羊毛脂	每次洗 2 分钟。一般洗 3~4 次。可用氧化钛与羊毛脂调合,搓洗。使用高锰酸钾后,必须用 5%亚硫酸氢钠溶液洗,最后大量清水清洗即可

(吴 肇)

参 考 文 献

- 中国医学科学院分院第七研究室主编. 核素技术及其在生物医学中的应用. 科学出版社,1975
- 杨守礼等. 液体闪烁测量技术的进展与应用. 科学出版社,1987
- 科学出版社编译. 英汉生物化学词典. 科学出版社,1983
- 井村伸正等编. 生化学ハンドブック. 丸善株式会社,1984
- Amersham Life Science Data Guide 3. Data for Radiochemical Users
- Budavari S. The Merck Index. 11th ed., Merck & Co., 1989
- Long. E. C. Liquid Scintillation Counting Theory and Techniques. Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, 1976
- Neary. M. P. Nuclear Laboratory Experiment Manual Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, 1971
- Rex. M. C. Dawson et al. Data for Biochemical Research. 3ed, Oxford Science Publications,1986
- Sigma Catalog. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical Company, 1997

11. 生理体液与培养基

11.1. 生理体液

表 11-1 Krebs Ringer 溶液

溶液(大约与血清等渗)	A	B	C	D	E	F
0.90% NaCl (0.154 mol/L)	100	100	80	83	95	
1.15% KCl (0.154 mol/L)	4	4	4	4	4	
1.22% CaCl ₂ (0.11 mol/L)	3*	3*	3*		3*	100 vol
2.11% KH ₂ PO ₄ (0.154 mol/L)	1	1	1	1	1	血清
3.8% MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.15 mol/L)	1**	1**	1**	1**	1**	
1.3% NaHCO ₃	21***		21***	3	3	
0.1mol/L-磷酸缓冲液 pH 7.4	21					
0.16 mol/L-丙酮酸钠(或 L-乳酸钠)			4	4	4	3
0.1 mol/L-延胡索酸钠			7	7	7	6
0.16mol/L-谷氨酸钠			4	4	4	3
0.3mol/L-(5.4%) 葡萄糖			5	5	5	5
0.1mol/L 磷酸缓冲液, 钠盐				18	3	

注释: A. 原始的 Krebs Henseleit Ringer 溶液. 碳酸氢盐(通 5% CO₂); Cl⁻比哺乳动物血清约高 20%。

B. 原始 Krebs Ringer 溶液. 磷酸盐(通 5% CO₂); Cl⁻离子比哺乳动物血清约高 20%。

C. 改进的 Krebs Ringer. 电解质及有机酸浓度与哺乳动物血清相似, 含内源底物。

D. 改进的 Krebs Ringer II. 低碳酸氢盐, 无 Ca²⁺. 适合于测定 CO₂ 的产生。在无 Ca²⁺ 培养基下, 用切碎的或均浆的组织, 测呼吸速度。磷酸盐浓度比生理状态下高 20 倍, 碳酸盐浓度比生理状态下低 10 倍。

E. 改进的 Krebs Ringer III. 低磷酸盐, 碳酸氢盐及 CO₂。适合用吸收法测定 CO₂ 的产生。Ca 的浓度比血清游离钙高两倍。缓冲能力有限。

F. Krebs 含血清及内源底物(通 5% CO₂); 血清从冷冻的血中快速分离。

* 血清 Ca 离子浓度的两倍。

** 人血清代用品, 用 0.154mol/L MgCl₂ 代替一半 3.8% MgSO₄。

*** 与其他溶液混合之前通 100%CO₂ 一小时。

以上这些 NaCl、KCl、CaCl₂、KH₂PO₄、MgCl₂ 都是无机盐, 3 体积 NaHCO₃ 一般不会沉淀 Ca 或 Mg, 危险的是细菌污染, 最好将以上溶液配成比所需浓度约高 5 倍的储备液, 用时稀释。有机酸及葡萄糖必须消毒, 冻存或新鲜配制。

表 11-2 等渗(平衡盐)溶液的配制方法

名称	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	注 释
Ringer	0.65	0.041	0.012				0.001		0.2	0.02	空气	用于蚌心
Loeke	0.9	0.042	0.024						0.1~ 0.25	0.01~ 0.03	空气	用于哺乳 动物心脏
Tyrode	0.8	0.02	0.02		0.1	0.006			0.1	0.1	空气	用于兔心 脏及肠
Gey(1)	0.7	0.037	0.017	0.007	0.021		0.015	0.003	0.1	0.027	空气中通 5%CO ₂	
Gey(2)	0.8	0.037	0.0275		0.021		0.015	0.0025	0.2	0.025	空气	
Simms	0.8	0.02	0.0147		0.02		0.021		0.1	0.1	空气中通 2%CO ₂	
Earle	0.68	0.04	0.02	0.01		0.0125			0.1	0.22	空气中通 5%CO ₂	
Hanks	0.80	0.04	0.014	0.01	0.01		0.006	0.006	0.1	0.035	空气	指示剂 用酚红
Dubecco	0.80	0.02	0.01		0.01		0.115	0.02			空气	
Amphi- bian Ringer	0.65	0.025	0.03							0.02	空气	
Marine Mollusc saline	2.34		0.56		1.62						空气	
Marine crus- tacea saline	2.92	0.075	0.44								空气	
Elasmobranch saline	1.64	0.089	0.11			0.007			0.1	0.038		100ml 加 2.16克脲
Locke	0.9	0.042	0.025						0.25	0.02	空气	用于昆虫
Wyatt		0.298	0.081	0.37	0.304	0.127			0.07			100ml 加 果糖及蔗糖 40mg
Carlson	0.7	0.02	0.002		0.01	0.023			0.08	0.005	空气	
Holtreter	0.35	0.005	0.0076							0.02	空气	用于两栖 动物
Cortland	0.725	0.038	0.018	0.023		0.041			0.1	0.1	空气	用于鱼类

注释: A, NaCl; B, KCl; C, CaCl₂ 无水; D, MgSO₄ · 7H₂O; E, MgCl₂ · 6H₂O; F, NaH₂PO₄ · H₂O; G, Na₂HPO₄ · 2H₂O; H, KH₂PO₄; I, 葡萄糖; J, NaHCO₃; K, 气体。

以上这些数字是指 100 ml 水溶液中所含的克数。

溶液中有 NaHCO₃, 不可加热消毒, 因为 CO₂ 丢失, 使溶液偏碱, 最好用细胞滤器消毒。

表 11-3 人造海水(按下列配方制备的溶液与海水等渗)

浓度 (mol/L)	盐	ml
0.54	NaCl	739.6
0.54	KCl	18.05
0.36	MgCl ₂	145.7
0.36	CaCl ₂	28.0
0.44	Na ₂ SO ₄	63.0
0.54	NaHCO ₃	4.6
0.54	NaBr	1.05
	(NaCl)	

另一种配方,也可将下列的盐,按所要求的量,用蒸馏水稀释到 1L。

24.7g NaCl; 0.7g KCl; 6.3g MgSO₄ · 7H₂O; 4.6g MgCl₂ · 6 H₂O; 1.0g 无水 CaCl₂; 0.2g NaHCO₃。

表 11-1 到表 11-3 均摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

11.2. 各种培养基的配方

表 11-4 BME 培养基(Basal Medium Eagle)

氨基酸 (mg/L)	维生素 (mg/L)	无机盐(mg/L)		其他组分(mg/L)				
		(Earle's)	(Hanks')					
L-精氨酸	21.1	D-Ca-泛酸	1.0	NaCl	6800.0	8000.0	葡萄糖	1000.0
L-胱氨酸	12.0	生物素	1.0	KCl	400.0	400.0	酚红	17.0
L-谷酰胺	292.0	氯化胆碱	1.0	CaCl ₂	200.0	140.0		
L-组氨酸	10.5	叶酸	1.0	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200.0	200.0		
HCl · H ₂ O				NaHCO ₃	2200.0	350.0		
L-异亮氨酸	26.2	肌醇	2.0	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140.0	—		
L-亮氨酸	26.2	尼克酰胺	1.0	Na ₂ HPO ₄	—	47.5		
L-赖氨酸 · HCl	36.5	吡哆醛 · HCl	1.0	KH ₂ PO ₄	—	60.0		
L-甲硫氨酸	7.5	核黄素	0.1					
L-苯丙氨酸	18.5	硫胺素 · HCl	1.0					
L-苏氨酸	23.8							
L-色氨酸	4.0							
L-酪氨酸	18.1							
L-缬氨酸	23.4							

表 11-5 MEM 培养基

氨基酸 (mg/L)	维生素 (mg/L)	无机盐 (mg/L)		其他组分 (mg/L)				
		(Earle's)	(Hanks')					
L-精氨酸·HCl	126.4	D-Ca-泛酸	1.0	NaCl	6800.0	8000.0	葡萄糖	1000.0
L-胱氨酸	24.0	生物素	1.0	KCl	400.0	400.0	酚红	17.0
L-谷酰胺	292.0	氯化胆碱	1.0	CaCl ₂	200.0	140.0		
L-组氨酸	41.9	叶酸	1.0	MgSO ₄ ·7H ₂ O	200.0	200.0		
HCl·H ₂ O								
L-异亮氨酸	52.5	肌醇	2.0	NaHCO ₃	2200.0	350.0		
L-亮氨酸	52.4	尼克酰胺	1.0	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140.0	—		
L-赖氨酸·HCl	73.1	吡哆醛·HCl	1.0	Na ₂ HPO ₄	—	47.5		
L-甲硫氨酸	14.9	核黄素	0.1	KH ₂ PO ₄	—	60.0		
L-苯丙氨酸	33.0	硫酸素·HCl	1.0					
L-苏氨酸	47.6							
L-色氨酸	10.0							
L-酪氨酸	36.2							
L-缬氨酸	46.8							

上述成分及 MEM 培养粉已有商品出售,可买标准单位包装。配制方法如下:

先将无菌去离子蒸馏水 600 ml 内加入粉末,搅匀,待全溶解。每升 MEM 加 2.2g 碳酸氢钠,或 29.3 ml 7.5%碳酸氢钠溶液,同时加入其他补充抗生素,HEPES 等。再用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调 pH,调 pH 可比所需的高 0.1。最后用蒸馏水补足 1000ml。用 G₆滤器滤过消毒(或用膜压器,膜孔<0.2μm)。可存放于 2~6℃即可。

表 11-6 McCoy 5A 培养基

氨基酸 (mg/L)	维生素 (mg/L)	无机盐 (mg/L)	其他组分 (mg/L)				
L-丙氨酸	13.4	L 维生素 C	0.5	NaCl	6460.0	细菌脲	600.0
L-精氨酸·HCl	42.1	D-Ca-泛酸	0.2	KCl	400.0	葡萄糖	3000.0
L-天冬酰胺		生物素	0.2	CaCl ₂	100.0	谷胱甘肽	0.5
·H ₂ O	45.0	氯化胆碱	5.0	MgSO ₄ ·H ₂ O	200.0	酚红	10.0
L-天冬氨酸	20.0	叶酸	10.0	NaHCO ₃	2200.0		
L-半胱氨酸	35.1	肌醇	36.0	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	580.0		
HCl·H ₂ O		尼克酸	0.5				
L-谷酰胺	219.2	氨基苯甲酸	1.0				
L-谷氨酸	22.1	吡哆醛·HCl	0.5				
L-组氨酸	21.0	吡哆醇·HCl	0.5				
HCl·H ₂ O		核黄素	0.2				
L-甘氨酸	7.5	硫酸素·HCl	0.2				
L-异亮氨酸	39.4	维生素 B ₁₂	2.0				
L-亮氨酸	39.4	尼克酰胺	0.5				
L-羟脯氨酸	19.7						
L-脯氨酸	17.3						
L-丝氨酸	26.3						
L-赖氨酸·HCl	36.5						
L-甲硫氨酸	14.9						
L-苯丙氨酸	16.5						
L-苏氨酸	17.9						
L-色氨酸	3.1						
L-酪氨酸	18.1						
L-缬氨酸	17.6						

表 11-7 Trowel T-8 培养基

氨基酸 (mg/L)		维生素 (mg/L)		无机盐(mg/L)		其他组分(mg/L)	
L-精氨酸·HCl	21.1	P-氨基苯甲酸	35.0	NaCl	6100.0	葡萄糖	4000.0
L-半胱氨酸·HCl	47.0	硫胺素·HCl	17.0	KCl	450.0	胰岛素	50.0
L-组氨酸·HCl	10.0			CaCl ₂	220.0	酚红	10.0
L-异亮氨酸	26.0			MgSO ₄ ·7H ₂ O	250.0		
L-亮氨酸	26.0			NaHCO ₃	2820.0		
L-赖氨酸·HCl	36.0			NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	398.0		
L-甲硫氨酸	7.5						
L-苯丙氨酸	33.0						
L-苏氨酸	48.0						
L-色氨酸	4.0						
L-酪氨酸	18.0						
L-缬氨酸	23.0						

表 11-8 Waymouth MB 752/1 培养基

氨基酸 (mg/L)		维生素 (mg/L)		无机盐(mg/L)		其他组分(mg/L)	
L-精氨酸·HCl	75.0	L-维生素 C	17.5	NaCl	6000.0	葡萄糖	5000.0
L-半胱氨酸		生物素	0.02	KCl	150.0	谷胱甘肽	15.0
HCl·H ₂ O	90.0	硫胺素·HCl	10.0	CaCl ₂	90.6	次黄嘌呤	25.0
L-胱氨酸	15.0	D-钙-泛酸	1.0	MgSO ₄	239.8	酚红	10.0
L-天冬氨酸	60.0	氯化胆碱	250.0	NaHCO ₃	2240.0		
L-谷氨酰胺	350.0	叶酸	0.4	Na ₂ HPO ₄	300.0		
L-谷氨酸	150.0	肌醇	1.0	KH ₂ PO ₄	80.0		
L-组氨酸		尼克酰胺	1.0				
·HCl·H ₂ O	164.1	吡哆醇·HCl	1.0				
L-异亮氨酸	25.0	核黄素	10.0				
L-亮氨酸	50.0	维生素 B ₁₂	0.2				
L-赖氨酸·HCl	240.0						
L-甲硫氨酸	50.0						
L-苯丙氨酸	50.0						
L-脯氨酸	50.0						
L-苏氨酸	75.0						
L-色氨酸	40.0						
L-酪氨酸	40.0						
L-缬氨酸	65.0						
甘氨酸	50.0						

表 11-9 L-15 培养基

氨基酸 (mg/L)	维生素 (mg/L)	无机盐 (mg/L)	其他组分 (mg/L)
L-丙氨酸	225.0 D-Ca-泛酸	1.0 NaCl	8000.0 D(+)半乳糖 900.0
L-精氨酸	500.0 硫胺素 -1 磷酸	KCl	400.0 酚红 10.0
L-半胱氨酸	120.0 · 2H ₂ O	1.0 CaCl ₂	140.0 丙酮酸钠 550.0
L-天冬氨酸 · 2H ₂ O	250.0 氯化胆碱	1.0 Na ₂ HPO ₄	190.0
L-谷氨酰胺	300.0 叶酸	1.0 KH ₂ PO ₄	60.0
L-丝氨酸	200.0 肌醇	2.0 MgSO ₄ · 7H ₂ O	400.0
L-组氨酸	250.0 尼克酰胺	1.0	
L-异亮氨酸	125.0 核黄素 · 5-磷酸钠		
L-亮氨酸	125.0 · 2H ₂ O	0.1	
L-赖氨酸 · HCl	93.7 吡哆醇 · HCl	1.0	
L-甲硫氨酸	75.0		
L-苯丙氨酸	125.0		
L-苏氨酸	300.0		
L-色氨酸	20.0		
L-酪氨酸	300.0		
L-缬氨酸	100.0		
甘氨酸	200.0		

表 11-10 199 培养基

氨基酸 (mg/L)	维生素 (mg/L)	其他组分 (mg/L)	无机盐 (mg/L)
L-丙氨酸	25.0 维生素 D ₂	0.100 鸟嘌呤 · HCl	0.3 Earle's Hanks'
L-精氨酸 · HCl	70.0 维生素 C	0.050 次黄嘌呤	0.3 NaCl 6800.0 8000.0
L-半胱氨酸	生物素	0.010 酚红	17.000 KCl 400.0 400.0
· HCl · H ₂ O	0.10 硫胺素 · HCl	0.010 D-核糖	0.5 CaCl ₂ 200.0 140.0
L-胱氨酸	20.0 D-钙-泛酸	0.010 醋酸钠	36.71 MgSO ₄ · 7H ₂ O 200.0 200.0
L-天冬氨酸	20.0 氯化胆碱	0.500 胸腺嘧啶	0.3 NaHCO ₃ 2200.0 350.0
L-谷氨酰胺	100.0 叶酸	0.010 吐温 80	5.000 NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 140.0 —
L-谷氨酸	66.8 肌醇	0.050 尿嘧啶	0.3 Na ₂ HPO ₄ — 47.5
L-组氨酸	尼克酰胺	0.025 黄嘌呤	0.3 KH ₂ PO ₄ — 60.0
· HCl · H ₂ O	21.9 吡哆醇 · HCl	0.025	
L-异亮氨酸	20.0 核黄素	0.010	
L-亮氨酸	60.0 维生素 K ₃	0.010	
L-赖氨酸 · HCl	70.0 DL-生育酚		
L-甲硫氨酸	15.0 磷酸钠, Na ₂	0.010	
L-苯丙氨酸	25.0 吡哆醇 · HCl	0.025	
L-脯氨酸	40.0 维生素 A	0.01	
L-羟脯氨酸	10.0 尼克酸	0.025	
L-苏氨酸	30.0 P-氨基苯甲酸	0.050	
L-色氨酸	10.0		
L-酪氨酸	40.0		
L-缬氨酸	25.0		
L-丝氨酸	25.0		
甘氨酸	50.0		

表 11-11 RPMI-1640 培养基

氨基酸 (mg/L)		维生素 (mg/L)		无机盐 (mg/L)		其他组分 (mg/L)	
L-精氨酸	200.0	P-氨基苯磺酸	1.00	NaCl	6000.0	葡萄糖	2000.0
L-天冬酰胺·H ₂ O	56.8	生物素	0.20	KCl	400.0	谷胱甘肽	1.0
L-天冬氨酸	20.0	D-钙-泛酸	0.25	MgSO ₄ ·7H ₂ O	100.0	酚红	5.0
L-胱氨酸	50.0	氯化胆碱	3.00	NaHCO ₃	2000.0		
L-谷氨酰胺	300.0	叶酸	1.0	Na ₂ HPO ₄	800.0		
L-谷氨酸	20.0	肌醇	35.0	Ca(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	100.0		
L-组氨酸	15.0	尼克酰胺	1.0				
L-羟脯氨酸	20.0	吡哆醇·HCl	1.0				
L-异亮氨酸	50.0	核黄素	0.2				
L-亮氨酸	50.0	维生素 B ₁₂	0.005				
L-赖氨酸·HCl	40.0	硫氨酸·HCl	1.0				
L-甲硫氨酸	15.0						
L-苯丙氨酸	15.0						
L-脯氨酸	20.0						
L-苏氨酸	20.0						
L-色氨酸	5.0						
L-酪氨酸	20.0						
L-缬氨酸	20.0						
L-丝氨酸	30.0						
甘氨酸	10.0						

表 11-12 Ham 培养基

组 分	F-10	F-12	F-12K
氨基酸 (mg/L)			
L-丙氨酸	8.9	6.9	8.9
L-精氨酸·HCl	210.7	210.7	472.0
L-天冬酰胺·HCl	15.0	15.0	30.0
L-天冬氨酸	13.3	13.3	26.6
L-半胱氨酸·HCl·H ₂ O	35.1	35.1	70.0
L-谷氨酰胺	146.2	146.2	292.0
L-谷氨酸	14.7	14.7	29.4
L-组氨酸·HCl·H ₂ O	21.0	21.0	41.9
甘氨酸	7.5	7.5	15.0
L-异亮氨酸	2.6	3.9	7.9
L-亮氨酸	13.1	13.1	26.2
L-脯氨酸	11.5	34.5	73.0
L-丝氨酸	10.5	10.5	21.0
L-赖氨酸·HCl	29.3	36.5	73.0
L-甲硫氨酸	4.5	4.5	9.0
L-苯丙氨酸	5.0	5.0	9.9
L-苏氨酸	3.6	11.9	23.6
L-色氨酸	0.6	2.0	4.1
L-酪氨酸	1.8	5.4	10.9
L-缬氨酸	3.5	11.7	23.8
维生素 (mg/L)			
D-Ca-泛酸	0.72	0.48	0.48
生物素	0.02	0.007	0.07
氯化胆碱	0.70	14.0	13.8

续表 11-12

组 分	F-10	F-12	F-12K
叶酸	1.32	1.32	1.32
肌醇	0.54	8.02	18.0
尼克酰胺	0.61	0.04	0.04
吡哆醇·HCl	0.21	0.06	0.06
核黄素	0.38	0.04	0.04
硫酸素·HCl	1.01	0.34	0.34
维生素 B ₁₂	1.36	1.36	1.36
无机盐 (mg/L)			
NaCl	7400.0	7600.0	7550.0
KCl	285.0	223.7	285.0
CaCl ₂	33.3	33.5	103.9
CuSO ₄	0.002	0.002	0.002
FeSO ₄	0.46	0.46	0.46
MgSO ₄	74.6	72.2	255.0
KH ₂ PO ₄	83.0	—	59.0
Na ₂ HPO ₄	156.2	142.0	127.1
NaHCO ₃	1200.0	1176.0	2500.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	0.86	0.14

表 11-13 改良的 MEM 培养基

组 分	Alpha	Dubecco	Glasgo	Joklik	Suspension
氨基酸 (mg/L)					
L-丙氨酸	25.0				
L-精氨酸·HCl	126.4	84.0	42.0	105.0	126.4
L-天冬酰胺·H ₂ O	50.0				
L-天冬氨酸	30.0				
L-半胱氨酸·HCl·H ₂ O	100.0				
L-胱氨酸	24.0	48.0	24.0	29.6	24.0
L-谷酰胺	292.0	584.0	292.0	292.0	292.0
L-谷氨酸	75.0				
L-组氨酸·HCl·H ₂ O	41.9	42.0	19.2	41.9	41.9
甘氨酸	50.0	30.0			
L-异亮氨酸	52.5	104.8	52.5	52.0	52.5
L-亮氨酸	52.5	104.8	52.5	52.0	52.5
L-脯氨酸	46.0				
L-丝氨酸	25.0	95.2			
L-赖氨酸·HCl	73.1	146.2	73.1	72.5	73.1
L-甲硫氨酸	14.9	30.0	15.0	15.0	14.9
L-苯丙氨酸	33.0	66.0	33.0	32.0	33.0
L-苏氨酸	47.6	95.2	47.6	48.0	47.6
L-色氨酸	10.2	16.0	8.0	10.0	10.2
L-酪氨酸	36.2	72.0	35.2	37.8	36.2
L-缬氨酸	46.9	93.6	46.8	46.0	46.9
维生素 (mg/L)					
L-维生素 C	5.0				
D-Ca-泛酸	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0

续表 11-13

组 分	Alpha	Dubecco	Glasgo	Joklik	Suspension
氨基酸(mg/L)					
生物素	0.1				
氯化胆碱	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0
叶酸	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0
肌醇	2.0	7.0	3.5	2.0	2.0
尼克酰胺	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0
吡哆醇·HCl	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0
核黄素	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1
硫胺素·HCl	1.0	4.0	2.0	1.0	1.0
维生素 B ₁₂	1.4				
无机盐 (mg/L)					
NaCl	6800.0	6400.0	6800.0	6500.0	6800.0
KCl	400.0	400.0	400.0	400.0	400.0
CaCl ₂	200.0	200.0	200.0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200.0	200.0	200.0	242.0	200.0
MgCl ₂ ·6H ₂ O				200.0	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140.0	125.0	140.0	1327.0	1400.0
NaHCO ₃	2000.0	3700.0	2000.0	2000.0	2000.0
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O		0.1			
其他组分 (mg/L)					
葡萄糖	1000.0	4500.0	1000.0	2000.0	1000.0
硫辛酸	0.2				
丙酮酸钠	110.0	110.0			
酚红	10.0	15.0	10.0	10.0	17.0
K-盘尼西林 G				75000.0U	
二氢硫酸链霉素				50 000.0 mcg	

表 11-4~11-13 摘自 宗村庚修著, 细胞培养マニエアル, 講談社出版, 1982。

11.3. 分子克隆中常用的培养基

11.3.1. *E. coli* 及酵母培养基

表 11-14 *E. coli* 及酵母培养基

培养基	配 方 (1000 ml)*
BBL 肉汤	10g BBL 胰化酪蛋白胨, 5g NaCl
dYT (2YT)	16g bacto-胰化蛋白胨, 10g bacto-酵母提取物, 5g NaCl
λ 肉汤	10g bacto-胰化蛋白胨, 2.5g NaCl
N 肉汤	25g bacto-营养肉汤
TB	10g bacto-胰化蛋白胨, 5g NaCl
YT	8g bacto-胰化蛋白胨, 5g bacto-酵母提取物, 5g NaCl
X 1776 肉汤	25g bacto-胰化蛋白胨, 7.5g bacto-酵母提取物, 20ml/L tris-HCl (pH 7.5), 高压消毒后冷却, 加 5ml 1mol/L MgCl ₂ , 10ml 1% 二氨基庚二酸, 10 ml 0.4% bacto 胞嘧啶脱氧核苷, 25 ml 20% 葡萄糖
CM dropout	见表 11-15
LB	见表 11-16

培养基	配 方 (1000 ml) ^a
M (Minimal)	见表 11-17
M9 (minimal 9)	见表 11-18
M63 (Minimal 63)	见表 11-19
NZYCM	见表 11-20
NZYM	见表 11-21
NZM	见表 11-22
Rieb	见表 11-23
SOB	见表 11-24
SOC	见表 11-25
Tartof 高浓度肉汤	见表 11-26

a. 用 NaOH 调 pH 到 7.0~7.2。高压消毒 20 分钟。

表 11-15 Complete minimal (CM) dropout 培养基

这个培养基是在 Minimal 培养基的基础上加营养物。dropout 是一组完全的营养物,可根据需要减少某一种营养物,为研究某种基因参与生物合成作用而配制的。

- 1. 3g dropout 粉末^a
- 1. 7g YNB-AA/AS
- 5g (NH₄)₂SO₄
- 20g 葡萄糖

可用 27g minimal 培养基代替后三种物质。最好用 dropout 粉末配好浓(10 倍)溶液,即取 13g 粉末加 100ml 水。然后消毒。加到已配好的其他的消毒溶液中。

dropout 粉末^a 配方

营养物 ^b	粉末量(g) ^c	终浓度(μg/ml)	储存液浓度(mg/100ml) ^d
腺嘌呤(半硫酸盐)	2.5	40	500
L-精氨酸·HCl	1.2	20	240
L-天冬氨酸 ^e	6.0	100	1200
L-谷氨酸(单钠盐)	6.0	100	1200
L-组氨酸	1.2	20	240
L-亮氨酸	3.6	60	720
L-赖氨酸·HCl	1.8	30	360
L-甲硫氨酸	1.2	20	240
L-苯丙氨酸	3.0	50	600
L-丝氨酸	22.5	375	4500
L-苏氨酸 ^e	12.0	200	2400
L-色氨酸	2.4	40	480
L-酪氨酸	1.8	30	180
L-缬氨酸	9.0	150	1800
尿嘧啶	1.2	20	240

a. 表中列出的是 CM dropout 粉末全营养物,如缺某一种营养物,即称某(-) 粉末。

b. 未列入表内的氨基酸可加到终浓度为 40μg/ml (40 mg/L)。

c. 在清洁的研磨器中将所有粉末混合均匀。

d. 特别营养物的储存液用 8.3 ml/L。腺嘌呤、天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸及尿嘧啶,可在室温存放,其他存于 4℃。

e. 最好在高压消毒后再加。

表 11-16 LB(Luria-Bertani) 培养基

配制每升培养基,应在 950 ml 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨(bacto-tryptone)	10 g
细菌培养用酵母提取物(bacto-yeast extract)	5 g
NaCl	10 g

摇动容器,直至溶质完全溶解,用 5 mol / L NaOH (约 0.2 ml) 调节 pH 值至 7.0

加入去离子水至总体积为 1 L, 在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸气灭菌 20 分钟

表 11-17 Minimal 培养基

每升	预混合	终浓度
1.7g YNB-AA/AS	68g YNB-AA/AS	0.17% YNB-AA/AS*
5g (NH ₄) ₂ SO ₄	200g (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5% (NH ₄) ₂ SO ₄
20g 葡萄糖	800g 葡萄糖 27g/L	2% 葡萄糖

在这培养基中酵母可生长,属于基本培养基,无需其他营养,如需要时可在此基础上,补加所需的营养素。制备大量的培养基时,最好先将葡萄糖与其他物质用研磨器混合好。

* YNB-AA/AS; Yeast Nitrogen Base(Difco), 无氨基酸(AA) 或硫酸铵(AS)。

表 11-18 M9 培养基

配制每升培养基,应在 750 ml 无菌去离子水(冷却至 50℃ 以下)中加入:

5XM9 盐溶液* 200ml

灭菌的去离子水至 1 L

适当碳源的 20% 溶液(如 20% 葡萄糖) 20 ml

如有必要,可在 M9 培养基中补加含有适当种类的氨基酸的贮存液

* 5XM9 溶液的配制: 在去离子水中,溶解下列盐类,终体积为 1 L

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	64g
KH ₂ PO ₄	15g
NaCl	2.5g
NH ₄ Cl	5.0g

把上述盐溶液分成 200ml 一份,在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 15 分钟。

表 11-19 M63 培养基

KH ₂ PO ₄	3g
K ₂ HPO ₄	7g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
FeSO ₄	5mg

用前加入

0.1ml MgSO₄, 0.2 ml 50mg/ml 硫胺素, 1.0 ml 20% 葡萄糖, 调 pH 到 7.0~7.2, 高压消毒

表 11-20 NZYCM 培养基

配制每升培养基,应在 950 ml 去离子水中加入:

NZ 胺*	10 g
NaCl	5 g
细菌培养用酵母提取物(bacto-tryptone)	5 g
酪蛋白氨基酸(casamino acid)	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g

摇动容器直至溶质完全溶解,用 5 mol / L NaOH (约 0.2 ml) 调节 pH 值至 7.0, 加入去离子水至总体积为 1 L, 在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟

* NZ 胺, 酪蛋白酶促水解物(ICN Biochemicals 101290)。

表 11-21 NZYM 培养基

NZYM 培养基除不含有酪蛋白氨基酸外,其他成分与 NZYCM 培养基相同

表 11-22 NZM 培养基

NZM 培养基除不含有酵母提取物外,其他成分与 NZYM 培养基相同

表 11-23 Rich 培养基(营养丰富的培养基,又称 YPD 或 YEPD, yeast extract, peptone, dextrose)

每升	预混合	终浓度
10g 酵母提取液(bactoyeast extract)	250g 酵母提取液	1% 酵母提取液
20g 胨(bacto-peptone)	500g 胨	2% 胨
20g 葡萄糖	500g 葡萄糖(50g/L)	2% 葡萄糖

最好用 20% 过滤除菌的葡萄糖溶液(或与其他溶液分别高压消毒)加到配好的消毒溶液中,以免培养基变黑。

表 11-24 SOB 培养基

配制每升培养基,应在 950 ml 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨(bacto-peptone)	20g
细菌培养用酵母提取物(bacto-yeast extract)	5g
NaCl	0.5g

摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 250 mmol / L KCl 溶液* 10 ml,用 5 mol / L NaOH(约 0.2 ml)调节溶液的 pH 值至 7.0。然后加入去离子水至总体积为 1 L,在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下灭菌 20 分钟
该溶液在使用前加入 5 ml 经灭菌的 2 mol / L MgCl₂溶液**

* 250 mmol / L KCl 溶液配制方法:在 100ml 去离子水中溶解 1.86g KCl。配制成 250 mmol / L KCl 溶液。

** 2 mol / L MgCl₂溶液配制方法:在 90ml 去离子水中溶解 19g MgCl₂,然后加入去离子水至总体积为 100ml,在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下灭菌 20 分钟。

表 11-25 SOC 培养基

SOC 培养基除含有 20 mmol / L 葡萄糖外,其余成分与 SOB 培养基相同。SOB 培养基经高压灭菌后,降温至 60℃ 以下,然后加入 20 ml 经除菌的 1 mol / L 葡萄糖溶液*

* 1 mol / L 葡萄糖溶液配制方法:在 90 ml 的去离子水中溶解 18g 葡萄糖,待糖完全溶解后,加入去离子水至总体积为 100 ml,然后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

表 11-26 高浓度肉汤(Tartof 和 Hobbs, 1987)

配制每升高浓度肉汤,应在 900 ml 去离子水中加入:

细菌培养用胰化蛋白胨(bacto-tryptone)	12g
细菌培养用酵母提取物(bacto-yeast extract)	24g
甘油	4 ml

摇动容器使溶质完全溶解,在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟,然后使该溶液降温至 60℃ 以下,再加入 100 ml 经灭菌的 0.17 mol / L KH₂PO₄, 0.72 mol / L K₂HPO₄溶液*

* 溶液配制方法:在 90 ml 的去离子水中溶解 2.31g KH₂PO₄和 12.54g K₂HPO₄,然后加入去离子水至总体积为 100 ml,在 15 lbf / in²(1.034 × 10⁵ Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟。

表 11-15~11-26 摘自 Ausubel F. M. Short protocols in Molecular Biology; 3rd edition, Wiley and Sons Inc. 1995.

11.3.2. 含有琼脂或琼脂糖的培养基

选择所需的液体培养基,按配制方法配制,临高压灭菌前,加入下列试剂中的一份:

细菌培养基用琼脂(bacto-agar) 15g/L(铺制平板用)

细菌培养基用琼脂(bacto-agar)	7g/L (配制顶层琼脂用)
琼脂糖	15g/L(铺制平板用)
琼脂糖	7g/L (配制顶层琼脂糖用)

在 15 lbf/in²(1.034×10⁵Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟,从高压灭菌器中取出培养基时,应轻轻旋转使琼脂或琼脂糖能均匀分布于整个培养基溶液中,必须小心,此时培养基溶液可能过热,旋动液体会发生暴沸,应使培养基降温至 50℃,方可加入不耐热的物质(如抗生素,配方见表 11-29)。为避免产生气泡,混匀培养基时应采取旋动方式,然后可直接从烧瓶中倾出培养基铺制平板。90mm 直径的培养皿约需 30~50ml 培养基。如果平板上的培养基有气泡形成,可在琼脂或琼脂糖凝结前用本生灯灼烧培养基表面除去气泡。

培养基完全凝结后,应倒置平皿并贮存于 4℃ 备用。使用前 1~2 小时取出贮存的平板。如果平板是新鲜制备的,在 37℃ 温育时会“发汗”,便会导致细菌克隆或噬菌体噬斑在平板表面交叉污染的机会。为了避免这一问题,可以拭去平皿内部的冷凝水,并把平皿倒置于 37℃ 温浴数小时方可使用,也可快速甩一下平皿盖,以除去冷凝水,为尽可能减少污染的机会,除去盖上的水滴时,应把开盖的平皿倒置握在手上。

表 11-27 软琼脂培养基

培养基	配方(100ml) ^{a,b}
上层琼脂	0.8g 琼脂
BBL 上层琼脂	1g BBL 胰化酪蛋白胨,0.5g NaCl,0.6g bacto-琼脂
dYT 上层琼脂	1.6g bacto-胰蛋白胨,1g bacto-酵母提取物,0.5g 或 0.7g bacto-琼脂
F 上层琼脂	0.8g NaCl,0.7g bacto-琼脂
λ 上层琼脂	1g bacto 胰蛋白胨,0.25g NaCl,0.7g bacto-琼脂
LB 上层琼脂	1g bacto-胰蛋白胨,0.5g bacto-酵母提取物, 1g NaCl, 0.7g bacto-琼脂
TB 上层琼脂	1g bacto-胰蛋白胨, 0.5g NaCl, 0.7g bacto-琼脂
Water 上层琼脂	0.6g bacto-琼脂

a. 应用 NaOH (液体或固体) 调 pH 到 7.0~7.2。在 15 lbf/in²高压下消毒 20 分钟。

b. 根据需要琼脂的用量范围为 0.3~1.2。

表 11-28 诱导培养基

培养基	配方(1000 ml) ^a
MacConkey ^b	称 5.0g MacConkey 粉末,加 100ml 蒸馏水,在 15 lbf/in ² 高压消毒 20 分钟(注意:IPTG 加入时,先铺好平板,涂细菌时,在平板上加入 4 μl IPTG, 200mg/ml,与菌一起涂布)
四唑琼脂	25.5g bacto-抗生物素培养基,2.50mg 2,3,5,-三苯基-2H 四唑氯化物。高压消毒后冷却,加 50ml 20%葡萄糖
X-gal 琼脂	铺板时,需待上层琼脂冷却后,再加 X-gal, IPTG。3ml 上层琼脂中含有:40μl 储存浓度为 200mg/ml 的 IPTG (-20℃ 存)

a. 应用 NaOH 调 pH 到 7.0~7.2。在 15 lbf/in²(1.034×10⁵Pa) 消毒 20 分钟。

b. MacConkey 是一种选择性培养基,可通过转化菌落或转染斑的颜色变化来判断是否发生 α 互补,以此来确定是否重组成功。其原理是该培养基中含有胆碱中性红,当没有外源 DNA 片段插入到载体多克隆位点时,则质粒上所带有的 β-半乳糖苷酶操纵子在 IPTG 的诱导下表达,多肽氨基端从而发生 α 互补,具有活性的 β-半乳糖苷酶可以发酵使环境 pH 发生改变,从而使菌落呈红色。如果插入了外源基因,则失去 α 互补,不能发酵,因而环境 pH 不发生改变,使菌落呈白色。该培养基可代替极贵的 X-gal。

表 11-29 抗生素溶液的配制

抗生素	储存液 ^a		工作浓度	
	浓度 (mg/ml)	保存条件 (°C)	严密型质粒 (μg/ml)	松弛型质粒 (μg/ml)
氨苄青霉素	50 (溶于水)	-20	20	60
羧苄青霉素	50 (溶于水)	-20	20	60
氯霉素	34 (溶于乙醇)	-20	25	170
卡那霉素	10 (溶于水)	-20	10	50
链霉素	10 (溶于水)	-20	10	50
四环素 ^b	10 (溶于水)	-20	10	50

a. 以水为溶剂的抗生素储存液,应通过 0.22μm 滤器过滤细菌。以乙醇为溶剂的抗生素溶液,无须除菌处理。所有的抗生素溶液均应保存于不透光的容器。

b. 镁离子是四环素的拮抗剂,四环素抗性菌的筛选应使用不含镁盐的培养基(如 LB 培养基)。

11.3.3. 保存培养基

1. 穿刺培养物 使用容量为 2~3 ml 并带有螺口旋盖和橡皮垫圈的玻璃小瓶,加入相当于约 2/3 容量的熔化 LB 琼脂,旋上盖子,但并不拧紧,在 15lbf/in² (1.034 × 10⁵Pa) 高压下蒸汽灭菌 20 分钟。从高压蒸汽灭菌器中取出玻璃试管,冷却至室温后拧紧盖子,放室温保存备用。

保存细菌时,用一灭菌的接种针挑取分散良好的单菌落,把针穿过琼脂直达瓶底数次,盖上瓶盖并予拧紧,在瓶身和瓶盖上均作好标记。室温下存放在暗处。(更加广为接受的作法是将瓶盖放松,在适当温度下培养过夜,然后拧紧瓶盖并加封 parafilm 膜,于室温或最好于 4°C 避光保存。)

2. 含甘油的培养物 在液体培养基中生长的细菌培养物,取 0.85 ml 细菌培养物,加入 0.15 ml 灭菌甘油(在 15 lbf/in² 高压蒸汽灭菌 20 分钟),振荡培养物使甘油分布均匀,然后转移到标记好的,带有螺口和空气密封的保存管内,在乙醇干冰或氮中冻结后,转至 -70°C 长期保存。

复苏菌种时,用灭菌的接种针刮拭冻结培养物表面,然后立即把粘附在接种针上的细菌划于含适当抗生素的 LB 琼脂平板表面。冻干保存的菌种管重置于 -70°C,而琼脂平板于 37°C 培养过夜。

在琼脂平板上生长的细菌培养物:从琼脂平板表面刮下细菌放入装有 2 ml 的无菌试管内,再加入等量的含有 30% 灭菌甘油的 LB 培养基,振荡混合物使甘油完全分布均匀后,分装于带有螺口盖和空气密封圈的无菌试管中,按上述方法冰冻保存。

这一方法可用于保存在质粒载体上建立的 cDNA 文库。

细菌可在穿刺培养物中保存 2 年之久,或在甘油培养物中无限期保存。

3. 除上述的方法外,还有一些用于细菌和噬菌体的培养基列表如下页。

表 11-30 细菌和噬菌体储存培养基

培养基	配方 (100 ml) ^a
λ 储存	0.7g Na ₂ HPO ₄ , 0.3g KH ₂ PO ₄ , 0.5g NaCl, 1 ml 1 mol/L MgSO ₄ , 1 ml 0.01 mol/L CaCl ₂ , 0.1% 明胶
M13 储存	1g bacto-胰化蛋白胨, 0.5g bacto-酵母提取物, 0.63g K ₂ HPO ₄ , 0.18g KH ₂ PO ₄ , 45mg 柠檬酸钠, 90mg MgSO ₄ · 7H ₂ O, 3.5 ml 甘油
N-stab 琼脂	2.5g bacto-营养肉汤, 0.7g bacto-琼脂
SM	0.58g NaCl, 0.2g MgSO ₄ · 7H ₂ O, 5 ml 1mol/L Tris-HCl (pH7.5), 2% 明胶
Stab 琼脂	1g bacto-胰化蛋白胨, 0.7g bacto-琼脂

^a 应用 NaOH 调 pH 到 7.0~7.2 在 1 lbf/in² 高压消毒 20 分钟。

以上表 11-27 到 11-30 摘自梁世中, 生物分离技术, 华南理工大学出版社, 1995。

11.3.4. 固体培养基

制备固体培养基的基本方法与其他固体培养基一样, 琼脂浓度为 2% (20g/L)。在 1 L 中加一粒 NaOH (~0.1g), 提高 pH, 以避免高压消毒时琼脂降解, 其他注意事项与一般固体培养基相同。1 L 培养基可倒 30~35 个盘。大多数盘在室温可保存 4 个月。特殊有药的盘在 4℃ 可保存 2~3 个月。

表 11-31 YPD, Minimal 及 CM dropout 盘配制

分别在以上 YPD, Minimal 及 CM dropout 的液体配方中每 1 L 加 20g 琼脂及一粒 NaOH

表 11-32 5-氟乳清酸盘

在一个 2 L 的瓶内加以下试剂:
 1g 乳清酸粉, 500ml H₂O
 5 ml 2.4mg/ml 尿嘧啶溶液
 低温下搅拌 1 小时, 直到完全溶解, 滤过消毒

另一个 2 L 的瓶内加以下试剂:
 1.7g YNB-AA/AS, 5g (NH₄)₂SO₄, 20g 葡萄糖, 20g 琼脂
 1.3g 尿嘧啶 dropout 预混合粉 (见表 11-15)
 加热溶琼脂, 冷到 ~65℃, 缓缓加入第一个含乳清酸及尿嘧啶的溶液, 混均后, 倒盘
 URA³⁻ 在 5-FOA 的培养基内不能生长, 此培养基可用于研究 URA3 基因的功能
 此种选择称“负选 (negative selection)”。这类的方法可用于野生型 LYS2, CAN1 及 CYH2 基因

表 11-33 Xgal 盘

1.7g YNB-AA/AS, 5g (NH₄)₂SO₄, 20g 葡萄糖, 20g 琼脂
 0.8g dropout 粉末 (可按表 11-15 选择取消某个氨基酸)
 加水到 900ml 高压消毒, 再加 100 ml 0.7 mol/L 磷酸钾 pH7.0 及 2 ml Xgal 溶液 [20mg/ml Xgal, 配在 N,N-二甲
 基甲酰胺 (N,N-dimethylformamide)]

表 11-34 α 氨基己二酸盐盘

1.7g YNB-AA/A, 20g 葡萄糖, 20g 琼脂加 H_2O 到 1 L, 将以上试剂放在 2 L 的瓶中, 高压消毒。当琼脂冷到 $\sim 65^\circ C$ 时, 加 34 ml 6% α 氨基己二酸(溶于 100 ml 水中, 用 1 mol/L KOH 调到 pH ~ 6.0)。 α 氨基己二酸的终浓度应是 0.2%。混合均匀后, 倒盘。

Lys^2^- 酵母用氨基己二酸作为氮源。因为酵母可用其他氨基酸作为氮源。仅一些氨基酸对某些特别的酵母是需要的。如用这培养基分离 Lys^2^- 酵母, 必须加 30 $\mu g/ml$ 赖氨酸。

表 11-35 刀豆氨酸盘

在 CM dropout 固体培养基配方中除去精氨酸, 当冷到 $\sim 65^\circ C$ 时, 加 10 ml 6mg/ml 滤过消毒的刀豆氨酸(Canavanine)硫酸盐溶液。刀豆氨酸的终浓度 60 $\mu g/ml$ 。消毒的储备液可冻存。

表 11-36 环己酰亚胺盘

按 YPD 固体培养基配制, 当冷到 $\sim 65^\circ C$, 加入 1 ml 10mg/ml 的滤过消毒的环己酰亚胺(Cycloheximide)溶液。环己酰亚胺的终浓度是 10 $\mu g/ml$ 。消毒的储备液可冻存。

以上表 11-31 到 11-36 培养基组成摘自 Ausubel F M. Short protocols in Molecular Biology, 3rd edition, Wiley and Sons Inc., 1995.

(潘华珍)

参 考 文 献

- 梁世中, 生物分离技术, 华南理工大学出版社, 1995
Ausubel F M. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd edition, Wiley and Sons Inc, 1995
Chambers J A A and Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993

12. 数据处理

12.1. 有效数字

作实验每天接触千千万万的数字,什么是有效数字?是否小数点后数字愈多愈准确?数字1、2、3、4、5、6、7、8、9是有效数字。数字0可以是有效数,也可能不是,如果零只用来表示小数点的位置时,它即不是有效数。例如,0.070080kg,这个数字的前两个零都不是有效数字,它们只是用来表示小数点的位置。如改用另一个单位,即可把它们取消,如采用克为单位,就可写成70.080g。7和8之间的两个零,是有效数字,如去除其中的两个零,数值就完全变了(0.0708或0.0780kg)。最后一位零也是有效数字,它指出在该项称重中,可以测定到0.000010kg,只不过数字正好是零。如果将最后的零去除,则意味着重量只能称到0.00001kg。有效数字的位数说明一个测定的准确度,应当符合这个测定(包括这个测定的每一个步骤)总的准确度。在作一项测定(长度、重量、容积、光密度、时间、电流、电压等),进行一项计算或报告一项实验结果,在数值上都包括一位估计的数字。例如用一刻度最小到毫米的尺来量一个长度时,可以估算到刻度的1/10,就是估计到0.1mm,如623.3mm,0.3这个数是估计的,真实的数可能是623.1或623.5mm,最后一个数字是有误差的。如计算一个乘数,如将3.625mg/ml,乘以1.26ml,在乘积中的值只能保留三位数字,因为乘积不可能比它原来的数字更为准确。又如将几个数值相加(0.410+0.1263+9.04),其和应是9.58,而不是9.5763,因为数的和不会比它准确度最差的一项为好。据以上的原因,在一个测定的各个环节中在可能范围内要注意应选择准确度相类似的仪器,否则在某一环节中使用了准确度很低的仪器,则整个测定结果的准确度便降低了。同样,在某一个实验环节使用了一次准确度很高的仪器,这种测量也是徒劳无功的,毫无意义。例如在滴定管的校正中,由于滴定管只能读到四位数字如32.18ml,水及称量瓶的重量也只需称到四位有效数字(如49.19g),虽然分析天平可称至有效数六位。也是无用的。这时可改用准确数四位的天平即可。

12.2. 误差

误差即指一种被测物的测定结果与其真值的不符合性,真值往往是不能确切知道的,通常以多次测定结果的平均数来近似地代表真值。尽管实验的分析方法相当准确,仪器亦很精密,试剂纯度很高,操作者技术很熟练,然而这些都不能使某种物质的测定结果与其真值绝对相符。同一个样本多次重复测定,其结果亦不能完全相同。因此实验中的误差是绝对的。根据误差的来源和性质,通常可分下述三大类。

12.2.1. 系统误差

系统误差是指一系列测定值存在有相同倾向的偏差,或大于真值,或小于真值,一般

是恒定的。多是由于某种确定的原因引起的,在一定条件下可以重复出现,误差的大小一般可以测出。经分析找出原因,可采取一定措施,减少或纠正。其原因不外是来自分析方法的不完善,或实验方法本身有问题;或是仪器性能不良,试剂配制不当所致;或是由于操作人员对某项操作技术不熟练,不正规。

12.2.2. 偶然误差

与系统误差不同,误差的大小,正负是偶然发生的。误差时大时小,时正时负,不固定,一般不可预测。分析的步骤愈多,出现这种误差的机会愈多,所以也不易控制。如遇到这种情况时,应对仪器、试剂、方法作全面的检查。

12.2.3. 责任误差

这种误差是由于工作人员工作态度不严肃,责任心不强,思想不集中,操作粗枝大叶所引起的,这种误差是可以避免的。

12.3. 误差的表示方法和计算

实验误差为一统称,严格地说应包括误差和偏差。所谓误差是指测定值与真值之差;而偏差是指测定值与测定均值之差;但通常将这两者混用,统称为误差。

12.3.1. 平均误差

平均误差是指一组测定值中,测定值与测定均值的算术平均偏差。

$$dm = \frac{\sum |di|}{n}, \quad di = (X - \bar{X}),$$

dm 为平均误差, X 为测定值, \bar{X} 为均值, di 为离均差, n 为次数。其缺点是取绝对值,无法表示出各次测量间彼此的符合情况。

12.3.2. 标准误差(标准差)

标准误差是指一组测定值中,每一个测定值与测定平均值间的偏离程度(详见统计方法)。

12.3.3. 绝对误差

绝对误差是测定值与真值间的差数,表示准确度的一种方法。

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{真值}(U)$$

绝对误差有正值与负值,正值说明结果偏高,负值说明结果偏低。测定值与测定均值间的差异为绝对误差。所谓真值是未知的,实际上需用多次精确测定的结果(平均值),代替真值来使用,但一定要消除系统误差之后,所以

$$\text{绝对误差} = \text{测定值}(X) - \text{测定均值}(X)$$

12.3.4. 相对误差

绝对误差表示误差绝对值的大小,在应用上受到一定的限制,无法比较测定中误差相互之间的大小。为了便于误差间的相互比较,常用相对误差。实践中常用的是

$$\text{相对误差} = \frac{\text{测定值} - \text{真值}}{\text{真值}} \times 100\%$$
$$\text{相对偏差} = \frac{\text{测定值} - \text{测定均值}}{\text{测定均值}} \times 100\%$$

12.4. 与质量控制有关的几个基本概念

12.4.1. 准确度

准确度是指测定值与真值之间相符合的程度,测定值愈接近真值,测定结果的误差愈小,准确性愈高,说明方法愈好。衡量准确度通常用回收实验,也即是在样品中加入一定量的已知浓度的标准液,测定回收量,计算回收率,以百分数表示。

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{加标准液后的测定值}}{\text{测定样品量} + \text{标准量}} \times 100\%$$

12.4.2. 精密度

精密度是指在相同条件下,用同一仪器,同一方法,对同一标本进行多次重复测定时,测定值与测定均值之间或各测定值间的符合程度。它是衡量在规定条件下实验方法测定结果的稳定性、重复性的一个指标,它只代表各测定值的分散和密集的程度。各测定值之间彼此愈接近,表示重复性愈好,测定值的偏差愈小,精密度愈高,方法愈稳定。

精密度与准确度有一定的关系,但两者不是统一的,精密度高不等于准确度高,反之亦然。准确度的高低是表示测定结果的好坏,系统误差的大小。而精密度的高低是说明方法稳定性、重复性的好坏。只有在消除了系统误差之后,使用精密度高的方法,才能做到既精密又准确,可称之为精确的方法。

12.4.3. 灵敏度

灵敏度的高低有几种表示方法:一种是指被测物质单位浓度变化所引起的指示物理量的变化,如吸光度,相同的单位浓度,引起吸光度变化大的,称之为灵敏度高,反之称灵敏度低。灵敏度与取样体积,分析方法以及最后比色或检测需要量都有密切关系。要使方法的灵敏度保持稳定,必需结合灵敏度及准确度作全面考虑。特别是在微量分析中,空白值的大小及稳定性对灵敏度影响很大,不可忽视。

12.5. 统计学的一些基本概念和计算公式

人们在工作、学习、日常生活中常常遇到各种各样的问题,许多重要问题如医生看

病,科学研究等需要解决各种问题,可以说,解题是人类最经常、最重要的活动之一。科学研究亦可说是解题的过程。例如提出某种生理现象与疾病的发生有何关系。为了解决这个大问题,必须提出一系列的小问题,进行观察和实验,然后对所得数据进行分析,从而得到问题的解答。整个过程可分以下几个步骤:提出问题;实验设计;实验;数据分析;得出结论。概括起来,前面的三项说的是取得数据,后两项是分析数据。为了解决科研提出的问题,往往需要做许多观察,得到大量的数据,这时即需要进行统计。

统计学有两个重要的职能:一个是压缩数据,另一个是由一个样本(指一组数据)推断总体。压缩数据,即是将千千万万的数据经处理,成为简单的数,如平均值、百分率等。但这还不够,这只反应一组数据(即一个样本)。一个样本不能作为对整体的推断,从样本到整体,从部分到全体,必需作归纳推理,所以要作统计学处理。

12.5.1. 标准差

一个样本的平均值只说明资料量数的水平,不能说明资料中个体的分散情况和程度。同一平均数的资料,可有不同的分散度。例如 12,13,14,15,16,17,18 的均数为 15; 1,4,10,15,20,26,29 的均数也是 15,但后者的分散度较前者大的多,因此需要有方法来说明资料变异情况。标准差就是用来表示资料变异程度的方法之一。

小样本的标准差算法:公式如下

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - (\sum X)^2 / N}{N-1}}$$

S = 标准差

X = 量数或变异数

\bar{X} = 平均数

N = 例数或观察的次数

$N-1$ = 自由度

如样本很大,用此公式不太合适,需用另一个公式。一般大样本即用计算机计算,在此不多介绍。

12.5.2. 标准误

从一个整体中,抽出许多个样本,便会得到许多均数,这些均数的标准差,就称标准误。标准误是表示一批均数分散情况,正如标准差表示每一个数量的分散情况一样。实验的标准误,可用来表示同样实验重复若干次,每次结果的离散程度。精密的实验,应该每次结果相差很少,如果相差很大,说明实验中存在问题。所以计算实验标准误,可以知道实验的精密度如何,亦可知道实验的重复性如何。如果求得的标准误小,则重复实验得到同样结果的可能性就大,也就是实验的精密度大,或重复性好。事实上我们不可能重复许多次实验,汇集许多均数,我们通常只有一个样本,所以就从这个样本(即一次实验)的结果来估算标准误,如标准误很小,表示这次实验有一定的代表性,结果比较可靠,反之则否。

标准误($S_{\bar{X}}$)的计算公式如下:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N(N-1)}}$$

标准误除了可表示实验的精确度外,还可以用来计算两组实验之间相比有无显著差别(称显著性)。

12.5.3. 显著性的测定 (t 值的计算)

显著性是说明这次实验是否由于机遇,或是由于必然规律,换句话说,这次结果是否由于偶然的,还是有意义的。

如对一批测试者前后作两次观察,第一次和第二次实验是同一批测试者,观察两次实验是否有显著性差异,可用显著性来计算。例如:观察豚鼠注射肾上腺素,对支气管灌流液经过支气管流速的变化,以每分钟的滴数计算。实验结果如下:

豚鼠号	用药前	用药后	增加数 (X)	X ²
1	30	46	16	256
2	38	50	12	144
3	48	52	4	16
4	48	52	4	16
5	60	58	-2	4
6	46	64	18	324
7	26	56	30	900
8	58	54	-4	16
9	46	54	8	64
10	48	58	10	100
11	44	36	-8	64
12	46	54	8	64
			96	1968

求 t 值的公式为
$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{x}}}$$

\bar{X} : 实验后增加均数

m: 实验前均数

$S_{\bar{x}}$: 标准误

按上表算出实验后增加的

$$\bar{X} = 96 / 12 = 8 \text{ 滴}$$

按公式求出标准差

$$\begin{aligned} S &= \sqrt{\frac{1968 - (96)^2 / 12}{12 - 1}} = \sqrt{\frac{1968 - 768}{11}} = \sqrt{\frac{1200}{11}} \\ &= \sqrt{109.09} = \pm 10.44 \text{ 滴} \end{aligned}$$

再求标准误:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{N}} = \frac{10.44}{\sqrt{12}} = \frac{10.44}{3.46} = 3.02$$

求 t 值

$$t = \frac{\bar{X} - m}{S_{\bar{x}}} = \frac{8 - 0}{3.02} = 2.649$$

自由度 = $12 - 1 = 11$

查 t 值表 $5\% = 2.201$

$1\% = 3.106$

所以 $P < 0.05$ 有显著性

> 0.01 从此结果可以得出,加肾上腺素,流速有显著的增加。

以上计算可用于实验动物个体差异较大时,可以作自身对照的比较,这些实验设计,可以消除个体差异的因素,但不是所有的实验都可以作自身比较的,因此必须进行组与组间的比较。

组间比较计算公式如下:

计算二组的均值为 \bar{X}_1 及 \bar{X}_2

计算二组离均数平方和 $\sum (X_1 - \bar{X}_1)^2$ 及 $\sum (X_2 - \bar{X}_2)^2$

求出综合估计标准差

$$S = \sqrt{\frac{(X_1 - \bar{X}_1)^2 + (X_2 - \bar{X}_2)^2}{(N_1 - 1) + (N_2 - 1)}}$$

估计差数标准误

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = S \sqrt{1/N_1 + 1/N_2}$$

$N_1 = N_2$ 时

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = S \sqrt{2/N} = \sqrt{2S^2/N}$$

计算 t 值:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

最后根据自由度 $(N_1 + N_2 - 2)$ 及 t 值查表得到 P 值。 P 值 < 0.05 即有显著性, < 0.01 , < 0.001 即非常显著。

表 12-1 相当于机率 5%、1% 及 0.1% 的 t 值 (t 值表)

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
1	1.960	2.878	3.078	10	1.812	2.228	2.358
2	1.886	2.746	2.924	20	1.730	2.086	2.205
3	1.895	2.706	2.877	30	1.699	2.042	2.157
4	1.881	2.689	2.845	40	1.684	2.015	2.129
5	1.876	2.676	2.827	50	1.674	2.000	2.116
6	1.871	2.667	2.819	60	1.667	1.990	2.106
7	1.867	2.660	2.814	70	1.662	1.984	2.100
8	1.864	2.656	2.810	80	1.658	1.980	2.096
9	1.861	2.653	2.807	90	1.655	1.977	2.093
10	1.859	2.651	2.805	100	1.653	1.975	2.091

续表 12-1

自由度	5%	1%	0.1%	自由度	5%	1%	0.1%
73	1.993	2.645		92	1.987	2.631	
74	1.992	2.644		93	1.986	2.630	
75	1.992	2.643		94	1.986	2.630	
76	1.992	2.642		95	1.985	2.629	
77	1.991	2.641		96	1.985	2.628	
78	1.991	2.640		97	1.985	2.628	
79	1.990	2.639		98	1.985	2.627	
80	1.990	2.638		99	1.984	2.627	
81	1.990	2.637		100	1.984	2.626	
82	1.989	2.637		120			3.373
83	1.989	2.636		125	1.979	2.616	
84	1.989	2.636		150	1.976	2.609	
85	1.988	2.635		200	1.972	2.601	
86	1.988	2.634		300	1.968	2.592	
87	1.988	2.634		400	1.966	2.588	
88	1.988	2.633		500	1.965	2.586	
89	1.987	2.633		1000	1.962	2.581	
90	1.987	2.632		∞	1.960	2.576	3.291
91	1.987	2.631					

(潘华珍)

参 考 文 献

顾方舟等译. 医学研究入门. 人民卫生出版社, 1981

苏学良, 罗·盖伦. 临床生物化学实验数据处理. 天津科学技术出版社, 1990

汤旦林. 医学统计学基础. 人民卫生出版社, 1988

王克勤. 实验手册, 第二分册. 实验医学研究所(现基础医学研究所)生化系出版内部资料, 1965

13. 安全防护

13.1. 不稳定的化学药品及防护

某些危险的化学药品,释放的热易引起火灾,或可能使仪器破碎,把试剂溅出来,因此须小心。对下列试剂要特别注意:

(1) 醚(包括二乙醚、二氧六环、四氢呋喃):在没有抗氧化剂的情况下,存储期间会形成过氧化物。当过氧化的醚挥发到很少时,残余物可爆炸。机械性的震荡,可引起爆炸和起火。对装醚的容器要注明存放日期,并一定时期(如三个月)即测试一次过氧化物的量。(一般加碘化钾溶液,如变黄即为阳性,需注意。)

(2) 高氯酸(60%和72%,W/V):应存放冷处和无尘的地方。如变成棕色则必须加水稀释废弃。木料或其他可燃性吸附剂,吸附了高氯酸,能自燃。和硫酸接触,可引起爆炸。不可将高氯酸与酒精放在一起,即使是室温也不成。

(3) 苦味酸:存储需保持在湿的状态下,只有在有水的条件下才可与易燃物或有机物接触。干的苦味酸,或沾过苦味酸的滤纸,干后如加热或微震荡可引起着火或爆炸。

(4) 作为干燥用的钠:经常用钠作为干燥剂加到乙醚(或其他溶剂)中。当用毕的残余钠必须溶解在乙醇内。

(5) 所有的有机溶剂(除四氯化碳)必须看作是可燃的,如沸点低于100℃,闪燃点低于周围温度,更加需要注意。把溶剂放在远离灯火、燃源、氧化剂存放的地方。

13.2. 危险的化学混合物及防护

(1) 避免把有机物(特别是酒精)和强氧化剂,如高锰酸盐、过硫酸盐、硝酸、硝酸盐、高氯酸盐、(或浓过氧化氢)混合一起。如有浓硫酸,则起火和爆炸的危险性更大。有机硝酸盐、硝基化合物和有机过氧化物都具有潜在的爆炸性。

(2) 铝、锰、镁的碎屑搬动时要特别小心。它们燃烧的很剧烈,与氧化剂及有机氯化物作用很猛烈。处理时不要放入垃圾箱,用稀盐酸把它们溶解。

(3) 液态空气,特别是液态氧能加速燃烧。

13.3. 对有害微生物的防护

研究室的研究人员都有意或无意地经常与微生物接触。这些微生物大多数对人的健康没有威胁,但它们污染了溶液、制剂、组织或培养基时,会带来一定的危险。例如动物或人体组织标本,尸体解剖的材料或血液,可能包含有害的细菌或病毒,对工作人员的危险性很大,其中最主要的是诊断实验室、兽医及微生物研究所等。

13.3.1. 病源体的分类

将特殊危险的病源体,按毒性程度分为两类:A类,是剧毒;B类。见表13-1及表13-2。

表 13-1 A类病源体

拉沙氏热病毒 (Lassa-fever virus)
马尔堡病毒 (Marburg virus)
狂犬病病毒 (Rabies virus)
猿猴乙型疱疹病毒 (Simian herpes B-virus)
天花病毒 (Smallpox virus)
克里米亚出血热病毒 (Crimean-haemorrhagic-fever virus)
马休波出血热病毒 (Machupo-haemorrhagic-fever virus)
胡宁出血热病毒 (Junin-haemorrhagic-fever virus)
委内瑞拉型脑膜炎病毒 (Venezuelan-equine-encephalitis virus)

表 13-2 B类病源体

病毒
节肢介体病毒 (Arboviruses)
淋巴球性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic-choriomeningits virus)
血清肝炎病毒 (Serum hepatitis) (HBAg)
未弱化的黄热病病毒 (Unattenuated yellow-fever virus)
细菌
炭疽杆菌 (<i>Bacillus anthracis</i>)
布鲁氏菌属 (<i>Brucella</i>)
肉毒杆菌 (<i>Clostridium botulinum</i>)
钩端螺旋体属 (<i>Leptospira</i>)
麻疯分支杆菌 (<i>Mycobacterium leprac</i>)
结核分支杆菌所有的菌株 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
鼻疽假单胞菌 (<i>Pseudomonas mallei</i>) (<i>Loefflerella mallei</i>)
类鼻疽假单胞菌 (<i>Pseudomonas pseudomallei</i>)
伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhi</i>)
霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>)
鼠疫杆菌 (<i>Yersinia pestis</i>) (<i>Pasteurella pestis</i>)
立克次氏体
立克次氏体属 (<i>Rickettsia</i>)
伯氏考克斯氏体(Q热) (<i>Coxiellia burnetii</i>) (Q fever)
衣原体
鹦鹉热衣原体 (<i>Chlamydia psittaci</i>)

13.3.2. 病原体的防护

对 A 类病原体,必须有带独立通风系统的高度安全性的实验室。出口处要有淋浴设备及更衣处。进入该实验室要有限制。

A 类病原体操作时需完全防护型安全橱内,包括一个维持在“负”压下的密封箱,通过厚的橡皮手套在外面进行操作。入气口和排气口空气都要过滤。

在病原体防护实验室需要有保护工作人员免受气溶胶的侵害,气溶胶是悬浮空气中的微细颗粒,当悬浮液喷成雾状,或感染的固体物质研磨成很小的颗粒时,都可以形成气溶胶。其他如机械性匀浆、超声、未盖盖的离心管,离心机突然停止及开安培瓶等均可产生气溶胶,所以操作要非常小心。为了预防感染,要注意下列事项:

- (1) 衣服:要穿前面不开缝的长工作服,不能露脚面。
- (2) 吸量:任何情况下不得用口吸量。
- (3) 个人卫生:在每一次操作之后,一定要洗手。
- (4) 一定不能在实验室吃、喝、吸烟。

对不同感染源的有效防护,参考表 13-3。

表 13-3 对不同感染源的有效防护

防护剂	细菌		病毒		真菌
	植物性	孢子	液体	非液体	
5% 次氯酸	+++	+++	+++	+++	+
酚	+++		+++	+	+++
90%乙醇	+++	-	+++	+	-
2% 戊二醛	+++	+++	+++	+++	+++
37% 甲醛	+++	+++	+++	+++	+++

注: -, 无效, 勿用。

+, 有些情况下有效。

+++ , 有效, 推荐的方法。

13.4. 致癌、致诱变、致畸

致癌(C)、致诱变(M)及致畸(T)物质很多,按某一个特定的问题分类,都包括不全面,现将不同原则分类的试剂举例如下:

13.4.1. 化学分类(括号内的 C, M, T 代表致癌,致诱变及致畸)

(1) 烷基化试剂(M)其中有很多是易挥发的或是容易通过皮肤吸收进入体内的。

硫芥(T)、氮芥(T),环氧化物、乙撑亚胺(arizdines)(T),黄曲霉毒素 G1(T)、二烷基硫酸盐(T)、二烷基亚砷(T)、烷基链烷磺酸盐(T)、烷基苯磺酸盐(T)、磷酸三酯。

(2) 潜在烷基化试剂(M)在活细胞中转化成烷基化合物。

卤代 C1—C4 烃(T)、卤代芳香族烃(DDT、多溴联苯、多氯联苯)(T)、脂肪族胍撑、偶

氮和氧化偶氮化合物、肼、烷基肼、芳香基肼、羟胺、尿素和相关的化合物(T)、N-亚硝基化合物(T)、亚硝基苯酚、氯乙醇和相关化合物、脂肪族硫化物。

芳香胺和相关化合物。主要的分子结构包括几个芳香环和一个或几个氨基。这些化合物有许多的化学变异,如氨基可能被乙酰基胺基、硝基、亚硝基、羟氨基(接近致癌物)取代。甲基衍生物往往比其母体更活跃。萘胺、氨基联苯、二氨基联苯、氨基菲、氨基芪、许多染料和颜料。

包括有一个或更多个杂环(咪唑、三唑、三嗪)的氨基化合物。

芳香族偶氮化合物和重氮化合物。氨基偶氮苯和氨基偶氮甲苯(M)、大多成为二甲基氨基衍生物(T)。4-硝基喹啉 N-氧化物(M)。

稠环芳香烃(M)至少包括一个由四个苯并合成的环[苯并蒽和二苯并蒽、苯并芘和二苯并芘(T)、胆蒽]。含氮、氧和硫原子的杂环化合物。

DNA 合成的抑制剂。抗代谢物(M、T)、嘌呤和嘧啶类似物。

重金属及其衍生物。金属铬及镍(粉尘)、易挥发的铬化合物、羟基镍。铍、镉、铬、钴、铅等盐类、氧化钍。

其他杂项。石棉粉尘、切削油、8-羟基喹啉、磺胺、环乙胺(T)。

13.4.2. 天然产物

来源于真菌的毒素和抗生素(M、T)。如黄曲霉毒素、小梗囊胞菌素、丝裂霉素、灰黄霉素蕨属生物碱、吡咯双烷类生物碱、黄樟油、巴豆油等。

13.4.3. 按功能分类

农业喷洒的化学药物、如农药、杀虫剂、除锈剂和杀菌剂等。

电离辐射(M、T)。

致癌病毒。

13.5. 非电离辐射危害的来源

(1) 波长在 310 nm 以下的紫外辐射是对人有害的。凡是能产生波长在 310nm 以下的辐射的弧光源,特别是汞弧光,必须适当滤过或加屏蔽。

(2) 激光束是极危险的,其强度非常高,甚至能使身体烧伤。注意:激光束照射不到一秒就可使人致盲。

(3) 微波和射频辐射能也可造成生物损伤。在高频率下,皮肤的灼热感觉是个信号,可适当的保护。但有的穿透力较强,在低频率下,就没有安全屏蔽,所以要特别小心。

(4) 高强度的超声束也能造成生物损伤。

对非辐射所造成的损伤没有明文规定,因为危险取决于辐射的环境。对眼睛最为危险,应适当保护。

13.6. 放射性核素的防护 (见第 10 章)

表 13-4 联合国化学危险品分类

危险品类别	注释	危险品类别	注释
1	爆炸	5.1	氧化剂
2	气体	5.2	有机的过氧化物
3.1	易燃液体, 闪点低于 -18°C	6.1	有毒性
3.2	易燃液体, 闪点低于 -18°C 到 +23°C	7	有辐射
3.3	易燃液体, 闪点 +23°C 到 +16°C	8	有腐蚀
4.1	易燃固定	9	混有危险物质
4.2	自燃	NR	未规定
4.3	潮湿时危险		

表 13-5 欧洲规定的危险品符号

符号	注释	符号	注释
危险符号		R21	与皮肤接触有害
R1	干燥时爆炸	R22	吞食有害
R2	振荡, 摩擦, 火或其他火源, 都有爆炸危险	R23	吸入有毒
R3	振荡, 摩擦, 火或其他火源, 都有极危险的爆炸	R24	与皮肤接触有毒
R4	形成易爆炸的金属化合物	R25	吞入有毒
R5	加热可引爆	R26	吸入极毒
R6	与空气接触与否都爆炸	R27	与皮肤接触极毒
R7	可引起着火	R28	如吞食极毒
R8	与可燃物接触可着火	R29	遇水释放毒气
R9	当与可燃物混合时可爆炸	R30	用时易燃烧
R10	易燃	R31	遇酸释放毒气
R11	高度易燃	R32	遇酸释放极毒气
R12	极易燃	R33	聚集反应很危险
R13	液化的气体极易燃	R34	烧伤
R14	与水反应强烈	R35	严重烧伤
R15	与水反应产生极易燃性气体	R36	对眼有刺激
R16	当与氧化剂混合时可爆炸	R37	对呼吸系统有刺激
R17	在空气中自燃	R38	对皮肤有刺激
R18	用时可形成易燃/易爆蒸汽与空气的混合物	R39	危险在于它的严重不可逆影响的危害
R19	可形成爆炸的过氧化物	R40	可能在不可逆影响的危害
R20	吸入有害	R41	严重不可逆影响的危害

符号	注释	符号	注释
R42	吸入致敏	R21/22	食入与皮肤接触有害
R43	皮肤接触致敏	R23/24	食入与皮肤接触有毒
R44	封闭体系加热有爆炸危险	R24/25	食入与皮肤接触有毒
R45	可能致癌	R26/27	食入与皮肤接触极有毒
R46	致后天基因改变	R26/27/28	吸入,食入与皮肤接触极有毒
R47	致分娩反应(Birth-effect)	R27/28	食入与皮肤接触极有毒
R48	长期暴露对健康有严重影响	R36/37	对眼及呼吸系统有刺激
R14/15	与水有强烈反应,并释放高度可燃性气体	R36/37/38	对眼,皮肤及呼吸系统有刺激
R15/29	与水接触释放有毒,高可燃性气体	R36/38	对眼及皮肤有刺激
R20/21	吸入,与皮肤接触有害	R37/38	皮肤及呼吸系统有刺激
R20/21/22	吸入,食入与皮肤接触都有害	R42/43	吸入及皮肤接触致敏
R20/22	吸入,食入有害		

表 13-6 欧洲规定的安全符号

符号	注释	符号	注释
S1	封存	S25	勿接触眼睛
S2	儿童不要接近	S26	如接触眼睛,快用大量水冲洗,去看医生
S3	储存阴凉处	S27	将所接触的衣服丢掉
S4	远离住处	S28	接触皮肤后,立刻按出厂注明,所要求的溶液冲洗
S5	存放液体按出厂要求	S29	勿倒入下水道
S6	按出厂要求存放惰性气体	S30	千万不要加水入内
S7	封紧	S33	防止静电释放
S8	容器干燥	S34	避免振荡及摩擦
S9	放通风处	S35	物质及容器放置安全地方
S12	容器不要封闭	S36	穿防护衣
S13	远离食物,饮料及动物饲料	S37	戴防护手套
S14	按说明书存放	S38	如通风不好,带合适的呼吸器
S15	远离热源	S39	戴眼/面防护罩
S16	远离火源- 禁止吸烟	S40	污染的地方及容器都需清洗
S17	远离起火的物质	S41	如着火/爆炸,千万勿吸入烟雾
S18	拿取及开容器时要小心	S42	当发烟/喷雾需带呼吸器
S20	用时不要吃东西	S43	如着火,用灭火器,万不可用水,会引爆
S21	用时不要吸烟	S44	如感不适,应去看医生
S22	勿吸入尘土	S45	如已发生意外,又感不适,赶快找医生
S23	勿吸气体/烟/蒸汽/喷雾	S46	如已误服,带着容器及标签,找医生
S24	勿与皮肤接触		

续表 13-6

符号	注释	符号	注释
S47	按厂家提出的温度存放	S3/9/14/49	存放原装容器内,存放在阴凉处,按标签指示远离不能接触的物质
S48	需存放潮湿处(按厂家指出的物质一起存放)	S3/9/49	存放原装容器内,存放在阴凉处
S49	存放在原装容器内	S3/14	存放阴凉处,按标签指示远离不能接触的物质
S50	不要与其它物混合(不能混合的物质说明书有说明)	S7/8	密封并干燥
S51	仅能在通风处使用	S7/9	存放原装容器内,存放在通风处
S52	不要在内部大面积使用	S20/21	当用时勿吃东西,饮水及吸烟
S53	避免爆炸	S24/25	勿接触皮肤及眼睛
S1/2	密封,远离儿童	S36/37	戴防护手套及衣服
S3/7/9	密封,存放在通风处	S36/37/38	戴防护手套及衣服,眼面罩
S3/9	存放通风在阴凉处	S36/39	戴防护手套及衣服,眼面罩
S3/9/14	存放原装容器内,存放在阴凉处	S47/49	存放原装容器内,存放温度不要高过所指定的温度

表 13-7 毒品的毒性及毒品和爆炸物防护的有效措施

化合物名称	Car	Ter	HT	T	溶剂	措施
A23187				+	丙酮	1,3,6
碘化乙酰硫胆碱			+		水	1,3,4
丙甲菌素			+		水	1,4
放线菌素 D	+	+	+		水分	1,3,4,6
放线菌素 D,7 氨基	+	+	+		丙酮	1,3,4,6
黄曲霉毒素 B1	+	+	+		氯仿	4,5,6
凝集素,蓖麻	+	+	+		水	3,4
α -鹅膏菌素	+		+		水	1,3,4
β -鹅膏菌素	+		+		水	1,3,4
氨基嘌呤	+	+	+		水	1,3,4
两性霉素 B			+		水 pH 2	1,3,4
血管紧张素 I		+		+	水	3,4,6
血管紧张素 II		+		+	水	3,4,6
血管紧张素 II 拮抗剂				+	水	3,4,6
抗霉素	+		+		丙酮	1,3,4
9- β -D-阿拉伯呋喃糖腺嘌呤	+	+	+		1 mol/L HCl	1,3
1- β -D-阿拉伯呋喃糖胞嘧啶	+	+		+	1 mol/L HCl	1,3
去甲肾上腺素		+	+		水	1,3,4
偶氮胂 III				+	水	9
重氮丝氨酸	+	+			水	3,4

续表 13-7

化合物名称	Car	Ter	HT	T	溶剂	措施
肉毒毒素			+		水	1,3,4
舒缓激肽	+	+			1 mol/L HCl	4
短杆菌 pbTx-1			+		丙酮	1,3
pbTx-2			+		丙酮	1,3
pbTx-3			+		丙酮	1,3
pbTx-7			+		丙酮	1,3
pbTx-9			+		丙酮	1,3
菠萝蛋白酶				+	水	1,3,4
α -金环蛇毒			+		水	1,4,8
β -金环蛇毒			+		水	1,4,8
神经-金环蛇毒			+		水	1,3,4
二甲砷酸				+	水	9
碳酸胆碱			+		水	1,3
羧基氧				+	DMSO	1,4
心脏毒, NNK			+		水	1,4,8
心脏毒, NNA			+		水	1,4,8
心脏毒, NNG			+		水	1,4,8
溴化鲸蜡醇三甲基氨 (Cetyltrimethyl ammonium bromide)		+		+	水	1,9
霍乱毒素			+		醋酸	1,3
胆固醇		+	+		氯仿	4,5
色霉素	+	+	+		水	1,3,4
眼镜蛇毒因子				+	水	1,4,8
α -眼镜蛇毒, NNK			+		水	1,4,8
α -眼镜蛇毒, NNA			+		水	1,4,8
α -锥毒, GVLA			+		水	1,3,4
秋水仙碱				+	水	1,3,4
响尾蛇毒蛋白				+	水	1,3
环己酰亚胺	+	+	+		乙醇	1,3
细胞松弛素 B	+	+		+	丙酮	1,3
石斛毒			+		水	1,4,8
地塞米松	+	+		+	水	1
1,4-双乙酸, 2,3-二氧苯			+		DMSO	1,4
重氮磺胺盐				+	水	4
二乙基焦磷酸	+				5% KOH	4,5
毛地黄皂苷	+	+			甲醇	3,4

续表 13-7

化合物名称	Car	Ter	HT	T	溶剂	措施
二异丙基氟磷酸(DFP)	-	+			水	1,4,5
白喉毒素		+	+		水	1,4,8
雌二醇(β)	-	+			丙酮	1,3
溴乙锭(ethidium bromide)	+				水	6
乙基马来酰亚胺	+			+	丙酮	1,3
胰高血糖素	+	+			1 mol/L HCl	4
羟基脲	+	+			水	1,3
潮霉素	+			+	水	1,3,4
吲哚-乙酰对甲氧基苯胺 (indomethacin)	+	+			乙醇	1,6
碘代醋酸	+	+			水	1
离子霉素(ionomycin)				+	丙酮	1,3
异丙基肾上腺素	+	+			水	1,3,4
脂糖		+			水	1,4
N-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶			+		水	1,3
丝裂霉素	+	+	+		水	1,4,8
莫能菌素				+	丙酮	1,3
莫能菌素甲酯			+		丙酮	1,3
制霉菌素		+	+		甲醇	1,3
肌毒 A				+	水	1,4
粘噻唑(myxothiazol)	+		+		水	1,4
冈田酸			+		DMF	1,4
寡霉素			+		丙酮	1,3
哇八因			+		乙醇	1,3
孢子素			+		DMF	1,4
百日咳毒素			+		水	1,4,8
毒伞素			+		1mol/L HCl	1,3
酚	+	+			水	1
苯甲基磺酰氟(PMSF)			+		乙醇	1,5
弗波醇	+				DMF	4,5
弗波醇,12,13,二醋酸	+			+	DMF	4,5
弗波醇,12,13,二葵酸盐	+				DMF	4,5
4 α -弗波醇,12,13,二葵酸盐	+				DMF	4,5
弗波醇,12-棕榈酸盐	+				DMF	4,5
弗波醇,12-棕榈酸,13-醋酸	+	+	+		DMF	4,5

续表 13-7

化合物名称	Car	Ter	HT	T	溶剂	措施
弗波醇, 4-O-甲基, 12-棕榈酸, 13-醋酸	+				DMF	4,5
弗波醇, 20-桥氧, 20-脱氧, 12,13-二丁酸盐	+				DMF	4,5
4- α -弗波醇		+			DMF	4,5
弗波醇, 12,13-二丁酸盐		+			DMF	4,5
多氧菌素(D)				+	稀 HCl	1,3
碘化丙锭	+			+	水	1,3,6
硫酸鱼精蛋白				+	水	3,4
吡唑咪喃菌素	+			+	水	1,3
含树脂的毒素	+		+		DMSO	4
蓖麻毒 A 链	+	+	+		水	1,4,8
盐霉素				+	水	3,4
乌柏毒 D				+	水	3,4
岩苔毒			+		水	1,3,5
硒甲硫氨酸	+				稀 HCl	1,3
短神经毒 α			+		水	4
短神经毒 α'			+		水	4
精胺, 四盐酸				+	水	1,3
链脲佐菌素	+	+			水	3,4
四氢氨苄啉				+	水	1,3,6
河豚毒			+		水	1,3,4
α -毒				+	水	1,4,8
T-2 毒			-		1 mol/L HCl	3,4
毒-II(ATX II)			+		1 mol/L HCl	3,4
毒-II (ATX H-ILe)			+		1 mol/L HCl	3,4
毒-II (ATXII-Val)			+		1 mol/L HCl	3,4
D-氯化管箭毒碱			+		水	1,3,4
衣霉素	+	+			乙醇	1,3,4
癸氮霉素			+		丙酮	1,4
长春天盐碱	+	-	+		水	1,3,4
长春新碱	+	+	+		水	1,3,4
维生素 B ₁₂	+				乙醇	4,6

毒品处理措施:

1. 溶于适当溶剂,并在允许的燃烧炉内灼烧,温度要控制,必须使物质完全被破坏。
2. 用大量水冲入许可的下水道。
3. 用高浓度的铬酸氧化,处理时千万不要溅出,然后倒入许可的下水道。
4. 用次氯酸钠溶液在室温氧化至少 24 小时,然后倒入下水道。
5. 用 1 mol/L KOH 或者 NaOH 处理,然后倒入下水道。
6. 用碳末吸附或燃烧如方法 1。
7. 用 6mol/L 硫酸或盐酸中和,然后倒入下水道。
8. 蛋白毒需加热,70% 乙醇稀释的酚或甲醛使其变性。
9. 深埋在许可的坑内。

缩写注释

car, carcinogenic 致癌
DMF, dimethylformamide 二甲基甲酰胺
DMSO, dimethylsulfoxide 二甲基亚砜
HT, highly toxic 极毒
T, toxic 毒性
Ter, teratogenic 致畸

表 13-8 对各种不同试剂的防护材料

试剂	防护材料的防护作用						
	NR	PE	Neo	Nit	N-PVC	HG-PVC	PVA
一般试剂							
酒精	+	+	+	+	+	+	+
醛	-	-	-	+	-	+	?
氯化的溶剂	-			+	-	+	+
稀酸	+		+	+	+	+	+
稀碱	+		+	+	+	+	+
酚	-	-	+	+	-	+	?
特殊试剂							
醋酸	+	-	+	+	+	+	+
丙酮	+	-	+	+	+	+	-
氢氧化铵	+		+	+	+	+	+
苯	-			+	-	+	?
丁醇	-	-	+	+	+	+	+
氯仿	-	-	-	+		+	+
铬酸(<50%)	+		-	-	+	+	-
二乙基醚	-	-	+	+	-	+	?
乙醇	+	+	+	+	+	+	+
甲醛	-	-	-	+	+	+	?
甲酸	+	-	+	+	+	+	+
甘油	+	+	+	+	+	+	+
次氯酸(<40%)	+		+	+	+	+	+
硝酸(<50%)	-	-		-	+	-	-
氢氧化钾	+	-	+	+	+	+	+
异丙醇	+	+	+	+	+	+	+
氢氧化钠	+	-	+	+	+	+	+
硫酸(<50%)	+	-	+		+	+	+
酚	+	-	+	+	+	+	?
甲苯	-	-	-	+		+	?
二甲苯		-	-	+	-	+	?

NR,天然橡胶 (nature rubber)。

PE,聚乙烯 (polyethylene)。

Neo,氯丁橡胶 (neoprene)。

Nit, 腈睛 (nitrile)。

N-PVC, 正聚氯乙烯 (normal polyvinylchloride)。

HG-PV, 高度聚氯乙烯 (high grade polyvinylchloride)。

PVA, 聚乙烯醇 (polyvinylalcohol)。

表 13-4~13-8 摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LabfAX. Bios Scientific Publishers, 1993。



生物危險品



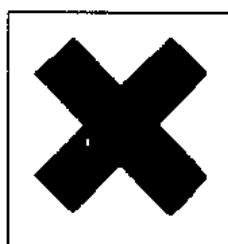
輻射性的

(a)

展示在門上和工工作地點的警告標誌



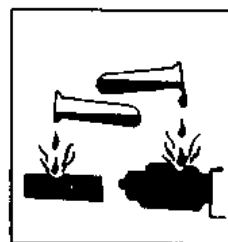
有毒的



刺激性的和有害的



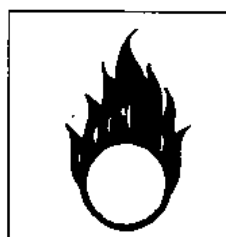
爆炸性的



腐蝕性的



高度可燃的



可氧化的

(b)

圖 13-1 危險化學藥品及警告標誌

表 13-9 高压消毒压力与温度的关系

压力 (lb/in ²)	kPa	温度		压力 (lb/in ²)	kPa	温度	
		C	°F			C	°F
0	0	100.0	212.0	16	110.32	122.0	251.6
1	6.89	101.9	215.4	17	117.21	123.0	253.4
2	13.79	103.6	218.5	18	124.11	124.1	255.4
3	20.68	105.3	221.5	19	131.00	125.0	257.0
4	27.58	106.9	224.4	20	137.90	126.0	258.8
5	34.47	108.4	227.1	25	172.37	130.4	266.7
6	41.37	109.8	229.6	30	206.84	134.5	274.1
7	48.26	111.3	232.3	35	241.32	138.1	280.6
8	55.16	112.6	234.7	40	275.57	141.5	286.7
9	62.05	113.9	237.0	45	310.26	144.6	292.3
10	68.95	115.2	239.4	50	344.74	147.6	297.7
11	75.84	116.4	241.5	60	413.69	153.0	307.4
12	82.74	117.6	243.7	70	482.63	157.8	316.0
13	89.63	118.8	245.8	80	551.58	162.1	323.8
14	96.53	119.9	247.8	90	620.53	166.2	331.2
15	103.42	121.0	249.8	100	689.48	169.9	337.8

压力的换算系数。

1 lb/in² = 6895 Pa; 1 atmosphere = 101325 Pa; 1 mm Hg = 133.3 Pa。

(潘华珍)

参 考 文 献

- 哈特里 E, 布恩 V, 编. 李令媛, 杨安峰译. 生物化学实验室的安全问题. 科学出版社, 1981
- Ashby Committee. Report of the Working Party on the Experimental Manipulation of the Genetic Composition of Microorganisms. Cmnd 5880, Majesty's Stationery Office, London, 1975
- Collins C H. A Bibliography of Safety in Pathology Laboratories, Institute of Medical Laboratory Sciences, London, 1976
- Collins C H, Hartley E G, Pilsworth R. The prevention of Laboratory Acquired Infection; Public Health laboratory Service Monograph no. Majesty's Stationery Office, London, 1974
- Gaston P J. The Care, Handling and Disposal of Dangerous Chemicals. Northern Publishers, Aberdeen, 1970
- Pieters H A, Creighton J W. Safety in the Chemical Laboratory. Butterworths, London, 1951

14. 氨基酸、多肽及蛋白质沉淀分离

14.1. 蛋白质水解

研究蛋白质中氨基酸的组分,首先需将蛋白质水解成游离氨基酸。水解方法有两类:化学法及酶法。化学法见表 14-1。

表 14-1 化学法水解蛋白质

试剂	温度(°C)	时间(h)	注释
6 mol/L HCl (+ 2 mmol/L 酚) ^a	110	24~72	谷氨酰胺,天冬酰胺用酸水解后都转化成谷氨酸及天冬氨酸。如用酶水解可测定。丝氨酸、苏氨酸酸水解 24 小时可破坏 6%~10%,3%~5%。需作校正。酪氨酸也有破坏,需注意。半胱氨酸测定时以胱氨酸量表示。甲硫氨酸有部分被氧化。
6 mol/L HCl ^a	150	1~4	真空下
HCl/丙酸 (1:1)	150~160	15~30min	
HCl/丙酸 (1:1)	130	2	真空下
HCl/三氟醋酸 (2:1)	166	25min	真空下
6 mol/L HCl+Na ₂ SO ₃	110	24	真空下,可改进对甲硫氨酸、半胱氨酸及酪氨酸的回收
6mol/L HCl, 0.5~6%(V/V) 巯基乙酸 (thioglycolic acid)	110	24~64	可改进对色氨酸的回收
3mol/L p-甲苯磺酸(p-toluensulfonic acid) ^b + 0.2%色胺[3-(2-氨基乙基)吲哚] tryptamine [3-(2-aminoethyl) indol]	110	24~72	真空下,可改进对色氨酸的回收
4mol/L 甲磺酸(methanesulfonic acid) ^b + 0.2%色胺	110	24~72	真空下
3mol/L 巯基乙基磺酸(mercaptoethanesulfonic acid)	110	24~72	真空下
6mol/L HCl	110	1~2	特别为含磷氨基酸(O-phospho-Ser)
6mol/L HCl	110	2~4	特别为含磷氨基酸(O-phospho-Thr)
6mol/L HCl	110	1	特别为含磷氨基酸(O-phospho-Tyr)
5 mol/L KOH	155	30min	特别为含磷氨基酸(O-phospho-Tyr)
3.3 mol/L HCl	110	14	水解氨基糖,可回收 80%

a: 如含缬氨酸或异亮氨酸,水解时需延长时间。

b: 如蛋白含糖~20%,不能用。

摘自 Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996.

14.2. 氨基酸

表 14-2 氨基酸的简写、三联密码及化学性质

氨基酸	3 字简写	1 字简写	分子量	密码	性质	电荷
丙氨酸	Ala	A	89	GCA	疏水,非极性	0
				GCC		
				GCG		
				GCU		
精氨酸	Arg	R	174	AGA	亲水,碱性	+
				AGG		
				CGA		
				CGG		
天冬酰胺	Asn	N	132	AAC	亲水,极性	0
				AAU		
天冬氨酸	Asp	D	133	GAC	亲水,酸性	-
				GAU		
半胱氨酸	Cys	C	121	UGC	亲水,含硫	0
				UGU		
谷氨酸	Glu	E	147	GAA	亲水,酸性	
				GAG		
谷酰胺	Gln	Q	146	CAA	亲水,极性,	0
				CAG		
甘氨酸	Gly	G	75	CGA	亲水,极性	0
				CGC		
				GGG		
				GGU		
组氨酸	His	H	155	CAC	亲水,碱性	+
				CAU		
异亮氨酸	Ile	I	131	AUA	疏水,非极性	0
				AUC		
				AUU		
亮氨酸	Leu	L	131	CUA	疏水,非极性	0
				CUC		
				CUG		
				CUU		
				UUA		
赖氨酸	Lys	K	146	AAA	亲水,碱性	+
				AAG		
甲硫氨酸	Met	M	149	AUG	疏水,非极性	0
苯丙氨酸	Phe	F	165	UUC	疏水,非极性	0
				UUU		
脯氨酸	Pro	P	115	CCU	疏水,非极性	0
				CCC		
				CCA		
				CCG		
丝氨酸	Ser	S	105	AGC	亲水,极性	0

氨基酸	3字简写	1字简写	分子量	密码	性质	电荷
				AGU		
				UCA		
				UCC		
				UCG		
				UCU		
终止符 (termination)	end			UAA		
				UAG		
				UGA		
苏氨酸	The	T	119	ACA	亲水, 极性	0
				ACC		
				ACG		
				ACU		
色氨酸	Trp	W	204	UGG	疏水, 非极性	0
酪氨酸	Tyr	Y	181	UAC	亲水, 极性	0
				UAU		
缬氨酸	Val	V	117	GUA	疏水, 非极性	0
				GUC		
				GUG		
				GUU		

表 14-3 氨基酸的物理化学常数

名称	溶解度 25°C g/100ml H ₂ O	解离常数(pKa)			等电点 (pI)
		-COOH	-NH ₂	R-group	
丙氨酸	16.65	2.35	9.87	—	6.11
精氨酸	15.00 ^a	1.82	8.99	12.48	10.76
天冬酰胺	2.99	2.14	8.72	—	5.43
天冬氨酸	0.5	1.99	9.9	3.9	2.98
半胱氨酸	很易溶 ^b	1.92	10.7	8.37	5.15
谷氨酸	0.86	2.10	9.47	4.07	3.08
谷酰胺	3.6 ^a	2.17	9.13	—	5.65
甘氨酸	25	2.35	9.78	—	6.05
组氨酸	4.16	1.80	9.33	6.04	7.64
异亮氨酸	4.12	2.32	9.76	—	6.04
亮氨酸	2.43	2.33	9.74	—	6.04
赖氨酸	66.6 ^a	2.16	9.06	10.54	9.47
甲硫氨酸	5.14 ^a	2.13	9.28	—	5.71
苯丙氨酸	2.96	2.20	9.31	—	5.76
脯氨酸	162.3	1.95	10.64	—	6.3
丝氨酸	25.0 ^a	2.19	9.21	—	5.7
苏氨酸	很易溶	2.09	9.10	—	5.6
色氨酸	1.14	2.46	9.41	—	5.88
酪氨酸	0.045	2.20	9.21	10.46	5.63
缬氨酸	8.85	2.29	9.74	—	6.02

a: 温度: Arg, 21°C; Gln, 18°C; Lys, 20°C; Met, 20°C; Ser, 20°C。

b: 测定的盐酸盐。

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

14.3. 多肽

14.3.1. 多肽的合成

研究蛋白质的结构,多肽的合成是很重要的一方面。特别是当发现许多生物活性物质是多肽时,多肽的合成即愈发重要。1953年合成了第一个6肽。后来 Merrifield 用固体作为支持物,在支持物上合成多肽(支持物的种类见表 14-4),解决了很多难题。多肽合成有了飞跃的进展。他在 1984 年获诺贝尔奖。近几年又有 Fmoc 方法也比较好,现将两种方法列表于 14-5 和 14-6,以作参考。

表 14-4 合成多肽的支持物

材料	特点
微孔胶支持物	软的可压缩胶,必需用于“batchwise”型的仪器,不可装柱
1% 交联的聚苯乙烯 (polystyrene)	Merrifield 的原始支持物,一般衍化作用较低,用于接第一个氨基酸或无衍化的多聚物
1~2% 交联的聚二甲基丙烯酰胺 (polydimethylacrylamide)	改进的支持物,多用于接第一个氨基酸及无衍化的多聚物
5% 交联的聚羟苯基乙基丙烯酰胺 (polyhydroxyphenylethylacrylamide)	荷载量很高,5 mmol / g 多肽,近理论最高值
大孔的硬的支持物	硬的,不可压缩,可装在柱内,用于连续合成方法,可节省溶剂
硅藻土支持的聚胺复合材料 (Kieselguhr-supported polyamide composite)	聚胺被支持在硬的硅藻土基质的孔内。最初用于连续合成方法的材料
聚苯乙烯支持的聚胺复合材料 (polystyrene-supported polyamide composite)	聚胺被支持在高度交联的硬的聚苯乙烯的孔内
聚氧乙烯嫁接的聚苯乙烯 (polyoxyethylene grafted on to polystyrene)	近年常用的支持物
不常用的支持材料	
聚丙烯支柱	在聚丙烯柱上合成多肽,此柱可反复应用
棉花	最简单、最便宜的方法
纤维素	纤维素纸可用于点合成 (spot synthesis)

摘自 Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996.

表 14.5 固相合成时基团保护的方法

方法	接头及保护基团	氨基酸及注意事项
Merrifield		
N 末端保护	叔-丁氧羰基(tertbutyloxycarbonyl)	用三氟醋酸洗脱
树脂接头	苄基酯(benzyl esters)	用氢氟酸解析,露出 C-末端游离酸
侧链保护	硝基(nitro)	精氨酸
	2,4-二硝基苯(2,4-dinitrophenyl)	组氨酸,用苯硫酚(thiophenol)洗脱
	苄基醚(benzyl ethers)	丝氨酸,苏氨酸
	苄基醚(benzyl ethers)	酪氨酸
	苄基硫醚(benzyl thioethers)	半胱氨酸
	苄基酯(benzyl esters)	天冬氨酸,谷氨酸
Fmoc		
N 端保护	9-芴甲氧羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl)	用 DMF 溶的 20% 甲基吡啶胺(piperidine)洗脱, 7 分钟
树脂	p-苄基氧苄基酯(p-benzyloxybenzy ester)	用三氟醋酸解析,露出 C-端游离酸
接头	羟甲基苯氧酯(hydroxymethylphenoxy ester)	用三氟醋酸解析,露出 C-端游离酸
	二甲基氧苯基-Fmoc-氨基-甲基苯氧 (dimethoxyphenyl-Fmoc-amino-methyl- phenoxy)	用三氟醋酸解析,露出 C-端游离酸
侧链 保护	4-甲氧-2,3,6-三甲基苯磺酸基(4-methoxy-2,3, 6 trimethyl benzenesulfonyl)	精氨酸
	-2,2,5,-7-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酸(-2,2, 5,7,5pentamethyl chroman-6-sulfonyl)	精氨酸
	三苄甲基(trityl)	谷氨酰胺,天冬酰胺
	叔丁酯(tert-butyl ester)	谷氨酸,天冬氨酸
	三苄甲基	半胱氨酸
	叔丁氧甲基(tert-butyloxymethyl)	组氨酸
	叔丁氧羰基(tert-butylcarbonyl)	赖氨酸
	叔-丁基醚(tert-butyl ethers)	丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸
	叔-丁基氧羰基(tert-butylloxycarbonyl)	色氨酸

摘自 Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996.

表 14-6 树脂上定性检测氨基酸的颜色反应

方法及注意事项	试剂及方法
茚三酮:测初级胺,不能测脯氨酸。灵敏度为 5 μ mol/g 树脂	试剂 1: 0.5g 茚三酮溶于 10 ml 乙醇 试剂 2: 80g 酚溶于 20 ml 乙醇 试剂 3: 氰化钾(毒)(2 ml 0.01 mol/L KCN,用吡啶稀释到 100ml) 方法: 取几粒反应完的树脂,洗后干燥,放于小试管,加上三种试剂每个加 2~3 滴,加热 100 C 5 分钟,树脂出现黄色是阴性,阳性应是蓝色/紫色
靛红(isatin): 用于次级胺测定,N-末端与脯氨酸相接的氨基酸,灵敏度与茚三酮相似	试剂: 加 2g 靛红到 60 ml 苯基醇,搅拌 2 小时。过滤,再加 2.5g Boc-苯丙氨酸到 50ml 的滤液中 方法: 取几粒反应完的树脂,洗后干燥,放于小试管,加 2~3 滴靛红试剂,同时加茚三酮的三种试剂,每个 2~3 滴,加热 100 C 5 分钟,待冷,用丙酮洗脱,弃上清,树脂从蓝到红是阳性,无色是阴性
二硝基苯磺酸(TNBS): 测初级胺,不能测脯氨酸,灵敏度为 3 μ mol/g 树脂	试剂 1: 二异丙基胺(diisopropylamine)在 DMF 内,配成 10%溶液(新鲜配制) 试剂 2: 5 mg TNBS,加 0.5 ml 试剂 1。(测定前配制) 方法: 取几粒反应完的树脂,洗后干燥,放于小试管,每一个试剂加 2~3 滴,树脂变橘黄色是阳性,无色是阴性
荧光胺(fluorescamine): 对初级胺很灵敏,不能测脯氨酸。灵敏度为 0.6 μ mol / g 树脂。小心有假阳性,特别对多酰胺树脂	试剂 1: 10%三乙基胺(triethylamine)氯仿溶液 试剂 2: 10mg 荧光胺溶于 1 ml 氯仿 方法: 取几粒反应完的树脂,洗后干燥。放于小试管,加 2~3 滴试剂 1。树脂用乙醇及氯仿洗四次,再加试剂 1 及试剂 2 各 2~3 滴,紫外光(360nm)下观察,阳性为黄绿色荧光(475nm),无荧光为阴性

摘自 Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers. Academic Press, 1996。

表 14-7 几种重要活性多肽的结构

中文名	英文名	分子量	结构
内源激活神经递质	endogenous excitatory neurotransmitter	304.26	Ac-Asp-Glu.
促肾上腺皮质激素	adrenocorticotropic hormone	2933.5	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro
淀粉样 β 蛋白	amyloid- β Protein	4329.9	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
血管紧张肽	angiotensin	1296.5	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
A-钠尿酸	A-type natriuretic peptide	3080.5	Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr

续表 14-7

中文名	英文名	分子量	结构
B-钠尿肽	B-type natriuretic peptide	3464.1	Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-Cys-Phe-Gly-Arg-Lys-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Lys-Val-Leu-Arg-Arg-His
C-钠尿肽	C-type natriuretic peptide	2197.6	Gly-Leu-Ser-Lys-Gly-Cys-Phe-Gly-Leu-Lys-Leu-Asp-Arg-Ile-Gly-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys
蜂毒明肽	apamin	2027.3	Cys-Asn-Cys-lys-Ala-Pro-Gln-Thr-Ala-Leu-Cys-Ala-Arg-Arg-Cys-Gln-His-NH ₂
徐缓激肽	bradykinin	1060.2	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
降钙素	calcitonin	3417.9	Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂
芋螺毒素	α -conotoxin	1437.6	Glu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Gly-Arg-His-Tyr-Ser-Cys-NH ₂
肾上腺皮质激素释放因子	corticotropin releasing factor	4757.5	Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Ile-Glu-Met-Ala-Arg-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH ₂
防御素	defensin1	3442.1	Ala-Cys-Tyr-Cys-Arg-Ile-Pro-Ala-Cys-Ile-Ala-Gly-Glu-Arg-Arg-Tyr-Gly-Thr-Cys-Ile-Tyr-Gln-Gly-Arg-Leu-Trp-Ala-Phe-Cys-Cys
强啡肽	dynorphin	1604	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys
缩血管肽(内皮肽)	endothelin	2491.9	Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp
脑啡肽	enkephalin	555.63	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
胃泌素	gastrin	2098.2	Pyr-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
胃泌素释放肽	gastrin releasing peptide	2859.4	Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Thr-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
胰高血糖素	glucagon	3482.7	His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr
生长激素释放因子	growth hormone releasing factor	5039.8	Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-; Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂
胰岛素	insulin	5807.6	A-链 Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn B-链 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
促黄体素释放因子	lutetizing hormone Releasing hormone (LH-RH)	1182.3	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂

续表 14-7

中文名	英文名	分子量	结构
α 交配因子	α mating factor	1684.0	Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln
肥大细胞脱粒肽	mast cell degranulating peptide	2587.2	Ile-Lys-Cys-Asn-Cys-Lys-Arg-His-Val-Ile-Lys-Pro-His-Ile-Cys-Arg-Lys-Ile-Cys-Gly-Lys-Asn-NH ₂
促黑激素	α -MSH	1664.9	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
吗啡耐受肽	morphine tolerance peptide	170.21	Cyclo (Leu-Gly)
α -新内啡肽	α -neo-endorphin	1228.5	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
神经激肽	neurokinin	1133.3	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe Val Gly-Leu-Met-NH ₂
神经降压肽	neurotensin	1672.9	Pyr-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu
伤害感受素	nociceptin	1809.1	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
催产素	oxytocin	1007.2	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂
甲状旁腺激素	parathyroid hormone (PTH)	4117.8	Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe
裂殖有关的肽	schizophrenia related peptide	331.4	Thr-Val-Leu
血清胸腺因子	serum thymic factor	858.86	Pyr-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
P 物质	substance P	1347.6	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
促甲状腺素释放激素	thyrotropin releasing hormone	362.39	Pyr-His-Pro-NH ₂
血管活性肠肽	vasoactive intestinal peptide	3325.8	His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH ₂
加压素	vasopressin	1084.2	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly NH ₂

注释: Pyr 为 pyroglutamic acid.

摘自 Peptides Institute. peptides Catalog. peptides Institute Inc, 大阪, 1997~1998.

14.4. 蛋白质的沉淀分离

蛋白质是亲水溶胶,它的稳定因素有二:一是胶粒上的电荷,使它们之间互相排斥,不易凝固成团。二是水化膜,它使胶粒与水相融,又在胶粒间起隔离作用。如果这两个因素全被破坏,蛋白质即会沉淀。如溶液的 pH 值,溶剂的极性,蛋白质的沉淀剂及盐离子浓度都会影响蛋白质的溶解度。盐析法及乙醇法是分离蛋白质常用的方法。

14.4.1. 盐析法

需注意以下几个问题:

1. 盐的离子浓度:盐的离子浓度是影响蛋白质溶解度的重要因素,不同蛋白质要求

离子的浓度不同。蛋白质在低盐浓度时,由于静电作用,使蛋白质分子外围聚集了带相反电荷的离子,从而加强了蛋白质的水合作用,减小了蛋白质分子之间的作用力,故增强蛋白质的溶解度。但随着盐浓度增大,盐离子可与蛋白质竞争溶液中的水分子,从而降低了蛋白质分子的水合,易于聚集而沉淀。不同蛋白质分子所要求的盐离子浓度不同。因此可通过在蛋白质溶液中加入不同量的中性盐,而使蛋白质与杂质分离,这种方法称盐析法。分离几个蛋白质混合在一起的溶液时,盐的饱和度常由稀到浓逐渐增加,每出现一种蛋白质沉淀,经离心分离后,再继续增加盐的饱和度,使第二种蛋白质沉淀。如用硫酸铵盐析分离血浆中的蛋白质,其饱和度达 20%时,纤维蛋白原首先析出;饱和度增至 28%~33%时,优球蛋白析出;饱和度增至 50%,假球蛋白析出;饱和度大于 50%时,清蛋白析出。如何从饱和硫酸铵配制成各种不同的%硫酸铵见表 14-8。

表 14-8a 0℃下由 S_1 提高到 S_2 时每 100 毫升加固体硫酸铵的克数

饱和度	在 0℃时所达到的硫酸铵饱和度%(S_2)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	在 100 ml 中加固体硫酸铵的克数																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	6.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.3
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

表 14-8b 室温下由 S_1 提高到 S_2 时每升加固体硫酸铵的克数

$S_1 \backslash S_2$	0.10	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
0	55	113	144	175	209	242	278	312	350	390	430	474	519	560	608	657	708	760
0.10		57	67	118	149	182	215	250	287	325	365	405	448	494	530	585	634	685
0.20			29	59	90	121	154	188	225	260	298	337	379	420	465	512	559	610
0.25				29	60	91	123	157	192	228	265	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	93	125	160	195	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	62	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40							31	63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45								31	64	98	133	169	206	245	286	330	373	420
0.50									32	63	100	135	172	211	250	292	335	380
0.55										33	66	101	138	176	214	255	298	334
0.60											35	67	103	140	179	219	261	305
0.65												34	69	105	143	182	224	267
0.70													34	70	108	146	187	228
0.75														35	72	110	149	170
0.80															36	73	112	152
0.85																37	75	114
0.90																	37	76
0.95																		38

2. pH 值: 在蛋白质等电点时, 蛋白质溶解度最小, 沉淀易析出。因此, 盐析时除个别特殊情况外, pH 值应选在被分离蛋白质等电点附近。

3. 蛋白质浓度: 在相同盐析条件下, 蛋白质浓度越大, 越容易沉淀, 使用盐饱和度的极限愈低, 如血清球蛋白的浓度从 0.5% 增至 3.0% 时, 用硫酸铵的饱和度可从 29% 降至 24%。如一种欲进行两次盐析时, 第一次由于浓度较稀, 盐析分段范围较宽, 第二次则逐渐收窄, 如胆碱酯酶用硫酸铵盐析时, 第一次硫酸铵饱和度为 35% 至 60%, 第二次为 40% 至 60%。蛋白质浓度高些对沉淀有利, 但浓度过高, 也容易引起其他杂蛋白的共沉淀作用; 因此, 必须选择适当浓度, 尽可能避免其共沉淀作用的干扰。

4. 温度: 用于浓盐液对蛋白质有一定的保护作用, 盐析操作一般可在室温下进行, 至于某些对温度特别敏感的酶, 则宜维持低温条件。蛋白质盐析时对温度要求不太严格, 但在中性盐下结晶纯化时, 温度影响则比较明显。

5. 脱盐: 蛋白质、酶用沉淀法分离后, 常需脱盐才能获得纯品。脱盐方法最常用的是透析法, 即是把蛋白质溶液装入透析袋内。透析袋可用玻璃纸、火棉胶、动物膜、羊皮纸制成。袋的二端用线扎紧, 然后对蒸馏水或缓冲液进行透析, 通过不断更换蒸馏水及缓冲液, 直至袋内盐分透析完毕。透析需要较长的时间, 最好在低温下进行, 并加入防腐剂避免蛋白质及酶变性或微生物污染。透析也可在外加电场中进行, 称电透析, 速度较快。

14.4.2. 低温乙醇沉淀法

这是蛋白质提纯最早沿用的方法,用不同浓度的酒精将蛋白质分段沉淀,可用此法进行初步分离,去除大部分的杂蛋白,再进一步提纯,也无不可。不同浓度乙醇溶液的配制见表 14-9。

表 14-9 不同浓度乙醇的配制方法 (用水稀释法, 15.6°C)
X = 稀释前乙醇的含量(V%) Y = 稀释后乙醇的含量(V%)

要制备含 Y%(按体积计)的乙醇溶液时,于 100 体积含 X%(按体积计)的乙醇 中加入水的体积数									
Y \ X	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6.56								
80	13.79	6.83							
75	21.89	14.48	7.2						
70	31.05	23.14	15.35	7.64					
65	41.53	33.03	24.66	16.37	8.15				
60	53.65	44.48	35.44	21.47	17.58	8.76			
55	67.87	57.90	48.07	38.32	28.63	19.02	9.47		
50	84.71	73.90	63.04	52.43	41.73	31.25	20.47	10.35	
45	105.34	93.30	81.38	69.54	57.78	46.09	34.46	20.90	1.41
40	130.80	117.34	104.01	90.76	77.58	64.48	51.43	38.46	25.55
35	163.28	148.01	132.88	117.82	102.84	87.93	73.08	58.31	43.57
30	206.22	188.57	171.05	153.61	136.04	118.94	101.71	84.54	67.45
25	266.12	245.15	224.30	203.53	182.83	162.21	141.65	121.16	100.73
20	355.80	329.84	304.01	278.26	252.58	226.98	201.43	175.96	150.55
15	505.27	471.00	436.85	402.81	368.83	334.91	301.07	267.26	233.64
10	804.54	753.65	702.89	652.21	601.60	551.96	500.59	450.19	399.85

注:蛋白质制备时有时需冷冻或保存时需低温,可参考下表配冷冻剂。

冷冻剂的组成	配比(g)	最低冷冻温度
KCl:冰块	30:100	-11°C
NH ₄ Cl:冰块	25:100	-15°C
NaCl:冰块	33:100	-21°C
CaCl ₂ ·6H ₂ O:冰块	20:100	-4°C
NH ₄ Cl:KNO ₃ :水(20°C)	31:20:100	-7.2°C
NH ₄ Cl:NaCl:冰块	20:40:100	-30°C
酒精+固体 CO ₂		-72°C
氯仿+固体 CO ₂		-77°C

(潘华珍)

参 考 文 献

- 莱蒂西 H A, 哈里斯 W E 著. 化学分析. 人民卫生出版社, 1982
- Lin G S. Peptide Biology and Chemistry. Tam JP Escom, 1994
- Peptides Institute. Peptides Catalog. Peptides Institute Inc., 大阪, 1997~1998
- Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996

15. 蛋白质的物理化学常数

15.1. 蛋白质的浓度测定

研究蛋白质的结构及功能,蛋白质浓度的测定是很重要的,方法必须准确。譬如酶及激素这些活性物质的提纯,需测定提纯前后的活性,不然无法比较。选择测定方法需考虑下面的几个问题:

- (1) 灵敏度是否高,需要多少蛋白质?
- (2) 测定后,蛋白质可否回收?
- (3) 方法简单与否?
- (4) 测定值是绝对值(近似值)还是标准的比值?

这些问题可参考表 15-1。

在测定蛋白质浓度时,如溶液太稀,含蛋白质量极少,此时需考虑将蛋白质溶液浓缩。但须注意有些蛋白质在稀溶液内失活。可能是由以下的一些因素引起。

- (1) 容器对蛋白质有吸附,如 10mg 吸附 10 μ g。假如只有 20 μ g,吸附 10 μ g 即无法作。
- (2) 亚基解离。许多蛋白质在寡聚体时较稳定,在稀溶液中解离成单体而失活。

(3) 缓冲液中有杂质及氧,特别是在稀溶液的条件下,有微量的杂质可使酶失活,有氧也可使蛋白质变性。

表 15-1 测定蛋白质浓度的方法

方法	蛋白质用量(μ g)	蛋白质回收	参比蛋白质	主要干扰物	所需仪器
重量法	5000~20 000	不能	不需要	其他溶质	精密天平
双缩脲	500~5000	不能	需要	tris, NH ₄ , 甘油, 蔗糖	分光光度计
280 光吸收	100~1000	能	不需要	核酸, 有色基团, 如血色素	分光光度计
远紫外	5~10	能	不需要	在远紫外有吸收的物质	分光光度计
氨基酸分析	10~200	不能	不需要	有其他杂蛋白	氨基酸分析仪
Lowry	5~100	不能	需要	某些氨基酸, NH ₄ , 兼性离子 缓冲液, 非离子表面活性剂, 蔗糖, 含硫化物	分光光度计
考马氏亮蓝结合	5~50	不能	需要	Triton, SDS	分光光度计
O-邻苯二醛	0.1~2	不能	需要	tris, NH ₄ , 甘氨酸	荧光分光光度计
bicinchoninic acid (BCA)	5~100	不能	需要	葡萄糖, NH ₄ , EDTA	分光光度计

15.2. 常用重要的蛋白质的性质及功能

已提纯的非酶蛋白有数千,对它们的结构、化学性质及功能都已较清楚。下面选择一些常用的重要的蛋白质,概括的介绍其性质及生物学活性。

(1) actin-bind protein 肌动结合蛋白

ABP-120, ABP-280 延展的肌动蛋白可使肌动蛋白微丝形成胶状。

ABP-120 的分子量为 120kD。ABP-280 是 ABP-120 蛋白尾尾相联的二聚体。

(2) actinin 辅肌动蛋白 是骨架蛋白之一,与肌动蛋白、肌球蛋白及肌动蛋白的抑制蛋白(profilin)结合,活化的辅肌动蛋白是 90~103kD 的同源二聚体。N-末端是与球状肌动蛋白结合的结构域。C-末端是 Ca^{2+} 结合的结构域。

(3) actinogelin 肌动胶蛋白* 在 Ca^{2+} 存在下,与肌动蛋白结合,交联形成骨架。

(4) actin 肌动蛋白 是肌肉及骨架的组成之一,单体为 43kD pI 4.3~4.5。

单体溶于水,在肌肉与肌球蛋白结合,在细胞骨架中参与许多微丝-调节蛋白的结合。

(5) adhesin 粘附素

粘附于靶细胞的致病菌的蛋白,特别结合细胞表面的糖基。

(6) adseverin 肌动蛋白结合蛋白*

74 kD, 与肌动蛋白结合,受 Ca^{2+} 及磷脂调节。结构与 gelsolin, vimentin 相似。

(7) albumin 清蛋白,包括卵清蛋白,乳清蛋白,血清蛋白。

68 kD, 在血清中结合许多小分子的化合物,游离状态溶于水。

(8) ankyrin (anchorin) 锚蛋白

215 kD 的膜蛋白,与红细胞及神经组织的收缩蛋白结合。可与微管蛋白单体结合。

(9) annexin 钙结合蛋白

一类被 Ca^{2+} 活化后可与膜磷脂结合的蛋白,参与膜运转及膜表面其他一系列依赖于钙调蛋白的活动,分为 I、II、III 等多种, I 即脂皮质蛋白 I (lipocortin I)。I 指依赖钙结合蛋白(capactin), IV 即内联蛋白(endonexin), V 即内联蛋白 I, 或锚蛋白(anchorin), VI 即钙磷脂结合蛋白(calphobindin), 或钙电蛋白(calectrin), VII 即膜融合蛋白(synexin), XI 即膜融合蛋白 I。

(10) APs (activator, adaptor or associated protein)

AP 是指有活化,吸附或结合功能的一些蛋白。与网格蛋白(clathrin)作用,形成包被小窝(coated pit)。与受体结合。

(11) axonin 轴突蛋白

轴突分泌的蛋白,参与细胞生长。

(12) brevin 短杆菌素

85 kD 结合受 Ca^{2+} 及磷脂调节。

(13) cadherin 细胞选择蛋白

分子量 86~90kD, 依赖 Ca^{2+} 的细胞内的粘附分子,是一类跨膜蛋白大家族,包括 L-CAM 及细胞 CAM 家族中有三个主要成员:E(表皮),N(神经)及 P(胎盘)的细胞选择蛋白。

(14) calbindin 钙结合蛋白

VIT D 诱导的钙结合蛋白,参与 Ca^{2+} 摄取,有两种形式:9 kD 或 28 kD,28 kD 的是结合 4 个 Ca^{2+} 分子。

(15) caldesmon 钙调结合蛋白

有两个形式:H 在平滑肌内,120~150 kD; L 在非平滑肌,70~80 kD,参与肌肉收缩及细胞运动。

(16) calmodulin 钙调蛋白

17 kD, pI 4.0, 含大量酸性氨基酸,热稳定,溶于水。细胞内 Ca^{2+} 反应的主要结合物,当 Ca^{2+} 结合后,发生变构,再与调节钙调蛋白的蛋白结合。

(17) calponin 肌钙结合蛋白

35 kD, 平滑肌内的结合蛋白,可与钙调蛋白、肌动蛋白及原肌球蛋白结合。

(18) casein 酪蛋白

乳中的主要蛋白,

S1 199 个氨基酸,7~9 磷酸

S2 207 个氨基酸,2 个半胱氨酸,10~13 磷酸

β 209 个氨基酸,5 磷酸

r 乳蛋白的降解产物

κ 169 个氨基酸,2 个半胱氨酸,1 磷酸,

主要起稳定乳蛋白微囊作用

(19) ceruloplasmin 血浆铜蓝蛋白

132 kD, 血浆内的一种与铜结合的 α -糖蛋白,参与铜的运转,分子中有 6 个铜原子结合得非常紧密。

(20) chaperonin 蛋白伴侣

是分子伴侣,主要作用是协助新生肽折叠形成正确的空间结构。

(21) chlorophylla/binding protein 叶绿素结合蛋白

是叶绿体光合作用的中心。内在的膜蛋白含有 3 个双形 α -螺旋。

(22) clathrin 网格蛋白

由六个亚基形成的大的网格蛋白,有 3 个不同的亚基; α 为 180 kD, β 及 β' 为 33, 36 kD。

(23) cojilin 肌动蛋白结合的磷蛋白

(24) collagen 胶原

100 kD, 结缔组织的结构蛋白,由 Gly-Xxx-Yyy-Gly, 重复单位组成, Xxx 为脯氨酸, Yyy 为羟脯氨酸。由三股螺旋组成稳定的结构。

(25) conalbumin 伴清蛋白

非血红素的铁结合蛋白,参与铁的摄取。

(26) connectin 联接蛋白

32kD, 膜内在蛋白,参与细胞内间隔连接(gap junction)。在膜内形成六聚体,中空。可转运无机离子。

(27) crystallin 晶体蛋白

- 在眼晶体内主要的可溶性蛋白。
- (28) cyldrin 圆柱蛋白
红细胞膜内的结构蛋白,有五个 22~25kD 的亚基。
- (29) cytochrome 细胞色素
含血红素的蛋白,参与呼吸爆发氧化还原反应。参与线粒体呼吸链的有三个主要蛋白:
- b: 60 kD; c: 强碱性质, pI 10.1, 13 kD, 水溶性; c₃: 37kD 水不溶。
a+a₃: 四聚体, 4~6 个不同的亚基, 440 kD。
- (30) cytochrome P450 细胞色素 P450
含血红素基, 当与 CO 反应, 在 450nm 有吸收峰, 是混合功能氧化酶(mixed-function oxidase), 与微粒体膜结合的非特异性氧化酶。
- (31) cytokeratin 细胞骨架蛋白
- (32) cytoactin 胞动蛋白
- (33) desmin 肌纤维蛋白
52kD, 介导成纤作用的纤维蛋白。
- (34) desmocalmin 桥粒钙调蛋白
240 kD, 结合钙调蛋白及角蛋白。
- (35) desmoglein 桥粒蕊糖蛋白
165 kD。
- (36) desmoplakin 桥粒斑蛋白
桥粒的结构蛋白。
- (37) dynamin 发动蛋白
100 kD, 是核苷-敏感微管结合蛋白, 可能是 ATP 酶。
- (38) dynein 动力蛋白
胞浆内蛋白, 是 1200 kD 微管结合蛋白, 亦是依赖微管的 ATP 酶, 由四个 53~59 kD 亚基及二个 440 kD 亚基组成。
- (39) dystrophin 肌营养不良蛋白
是肌动蛋白-结合蛋白与收缩蛋白相似。
- (40) elastin 弹性蛋白
弹性组织的结构蛋白, 不溶于水及碱, 对变性剂及蛋白水解酶有耐性。
- (41) elastonectin 弹性粘连蛋白
120 kD, 参与细胞粘附到弹性纤维上。
- (42) entactin 巢蛋白
158 kD, 内在基底膜糖蛋白。
- (43) epidermal growth factor(EGF) 表皮生长因子
属于非激素与生长及许多生理作用有关的蛋白, 由 150 kD 的前体蛋白经水解形成。
- (44) erythrocrucine 无脊椎动物的血红蛋白
与哺乳类动物血红蛋白相似。
- (45) extensin 伸展蛋白

植物细胞壁结构组成的糖蛋白,可与细胞壁其他组分交联,交联网络伸展,随年龄递增。

(46) ferredoxin 铁氧还原蛋白

铁硫蛋白参与细菌及植物的氧化还原作用。

(47) ferritin 铁蛋白

存储铁的蛋白,单体 18.5 kD,成熟的铁蛋白有 24 个单体及 16 个铁原子。

(48) α -fetoprotein 胚胎铁蛋白

70 kD 在胚胎期第一个形成的球蛋白,成熟后即由血清清蛋白代替。

(49) fibrin and fibrinogen 血纤维蛋白及血纤维蛋白原

血纤维蛋白原是血纤维蛋白的前身,350kD,六聚体以二硫键相联。当血凝因子作用于血纤维蛋白原时,变成血纤维蛋白并交联。

(50) fibronectin 纤连蛋白

200~250 kD,与胶原蛋白及纤维蛋白紧密结合,在结缔组织基质及细胞粘附中起重要作用。

(51) filamin 细丝蛋白

包含同源二聚体 250 kD 的亚基。每个亚基至少结合一个肌动蛋白亚基。

(52) fimbrin 丝束蛋白

有两个不同的类别。一是细菌纤毛的结构蛋白;一是肠微绒毛内的肌动蛋白结合蛋白。

(53) flagellin 鞭毛蛋白

33~40 kD,细菌鞭毛的主要组成成员。

(54) gragmin 片段化蛋白

42 kD,可将肌动蛋白断成片断。

(55) gelactin 胶肌动蛋白

190 kD,二聚体,pI 5.45,肌动蛋白胶化(gelling)的蛋白。

(56) gelsolin 胶溶素

90 kD,即 4.1 蛋白,每个分子的凝溶蛋白结合 1 分子的肌动蛋白,可被 Ca^{2+} 及肌醇磷脂调节。

(57) globulin 球蛋白

血浆内的一组球蛋白,指血浆内除清蛋白外的球蛋白。

(58) haptoglobin 触珠蛋白

四聚体,310 kD,酸性血浆糖蛋白,参与游离血红蛋白降解,可将游离血红蛋白消化而除去。

(59) heat-shock protein 热休克蛋白

在热或其他生理的刺激下产生的。有两种;一是 hsp 70,70 kD,有弱 ATP 酶活性;hsp60 与蛋白非折叠和再折叠有关,是蛋白伴侣。

(60) hemocyanin 血蓝蛋白

含铜带氧的蛋白,存于软体动物。一个亚基是 400 kD,含 16 个铜原子,可结合 8 个氧分子。

- (61) hemoglobin 血红蛋白
每个亚基为 16.3 kD, 血液内带氧者, $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。
- (62) hemopexin 血红素结合蛋白
57 kD 血色素结合的糖蛋白。
- (63) high-mobility group (HMG) protein 高迁移率类蛋白
真核的酸性蛋白, 有四个主要的 HMG, 特点是溶于稀 TCA、 HClO_4 及弱酸。
- (64) histone 组蛋白
分子量 10 000~12 000. pI 11~12, 核内主要的结构蛋白, 有五类型, H1、H2A、H2B、H3 及 H4。
体内 H2A、H2B、H3、H4 形成 8 聚体, 称核小体。
- (65) HLA antigen 组织相容抗原
人白细胞抗原, 膜的内在蛋白, 控制人免疫反应的组织相容性。
- (66) immunoglobulin 免疫球蛋白
免疫系统的抗原结合蛋白, 两个大亚基两个小亚基。主要的组有 IgA、IgD、IgE、IgG、IgM。
- (67) integrin 整合蛋白
膜内在糖蛋白, 参与细胞粘附。
- (68) intercellular adhesion molecule (ICAM) 细胞内粘附分子
跨膜糖蛋白, 参与白细胞粘附到靶体细胞上。ICAM-1, 55 kD, ICAM-2, 29 kD。
- (69) interferon 干扰素
有抗病毒的活性, 通过细胞代谢过程参与蛋白质及 RNA 的合成。
 α -白细胞干扰素, 16~23 kD;
 β -纤维母细胞干扰素, 20 kD;
 γ -免疫系统, 20 kD。
- (70) involucrin 外皮蛋白
92 kD, pI 4.5, 表皮的角化外套蛋白的前体。
- (71) keratin 角蛋白
40~68 kD, 毛发的结构蛋白。有四个主要的类别: 50, 56.5, 58 及 60 kD。
- (72) kinesin 移动素
600 kD, 神经中枢组织的微管结合蛋白。
- (73) kininogen 激肽原
有两形: H-激肽原, 110 kD; L-激肽原, 68 kD。
- (74) kinin 细胞分裂素
激肽释放酶特异水解激肽原产生的蛋白, 可使血管通透性增加, 肌肉收缩。
- (75) lactoferrin 乳铁蛋白
乳内的铁结合蛋白。
- (76) laminin 层粘连蛋白
900 kD, 细胞外基质蛋白。有三个亚基即 A, B1, B2。
- (77) lamin 核层蛋白

核层蛋白是主要结构蛋白,结构很像中间丝蛋白,有 2~4 个多肽,分子量 A 为 70 kD; B 为 68 kD; C 为 60 kD。

(78) legumin 豆球蛋白

豆内的存贮蛋白,11S(S 指沉降系数)。

(79) matrix γ -carboxyl glutamic acid protein (MGP) 基质 γ -羧基谷氨酸蛋白含 γ -羧谷氨酸骨蛋白,很不溶于水。含 79 个氨基酸。

(80) metallothionein 金属硫蛋白

6~7 kD,富含硫的重金属蛋白。

(81) microglobulin 微球蛋白

12 kD,外在膜糖蛋白,是 HLA-A 抗原的一个亚基。

(82) microtubule-associated protein (MAP) 微管结合蛋白

70~250 kD,结合管蛋白及微管蛋白的高分子量蛋白。主要组成是 MAP1 及 MAP2。

(83) mucin 粘蛋白

105~107 kD,含糖量很高的糖蛋白,蛋白大约 100 kD,其他都是糖。

(84) myoglobin 肌红蛋白

肌肉中的带氧蛋白与血红蛋白相似。

(85) myosin 肌球蛋白

与肌动蛋白一起作为肌肉内的主要蛋白。由 α 、 β 、 τ 三个亚基组成的 6 聚体。

(86) nidogen 巢蛋白

与 entactin 是同一个蛋白,只是 Nidogen 是 entactin 的水解产物。

(87) nucleotide-binding Protein 核苷结合蛋白

参与跨膜信息蛋白,即是 G 蛋白。

(88) opsin 视蛋白

40 kD,视网膜内视黄醛结合蛋白。

(89) osteocalcin 骨钙蛋白

5.2~5.9 kD,骨基质的主要蛋白,可与钙结合。

(90) osteonectin 骨粘连蛋白

亦是 SPARC,酸性,富含胱氨酸的细胞外蛋白。

(91) osteopontin 骨桥蛋白

44 kD,是骨含磷的糖蛋白,可与细胞结合,充当细胞与细胞外基质糖质之间的桥梁。

(92) plakoglobin 斑株蛋白

同源二聚体,亚基为 83 kD 的端粒的结构蛋白,参与细胞与细胞之间的粘附。

(93) plastin 丝束蛋白

65 kD,有两个型: L 及 T 型。

(94) plectin 网格蛋白

广布各种细胞,可与波形蛋白及纤维蛋白结合。

(95) ponticulin 膜桥蛋白

17 kD,跨膜糖蛋白,促进肌动蛋白丝的成束。

- (96) porin 膜孔蛋白
是格兰氏细菌细胞壁外膜的疏水蛋白,可形成跨膜通道。
- (97) prolamine 谷醇溶蛋白
酸性,谷内溶于醇的蛋白。
- (98) proliferating cell nuclear antigen (PVNA) 增殖细胞核抗原
33~36 kD,与 DNA 多聚酶结合的核抗原。
- (99) protamine 鱼精蛋白
4~4.5 kD,鱼精子的强碱性 DNA 结合蛋白。
- (100) protein synthesis initiation and elongation factor 蛋白合成起始及延伸因子
IF-1, 8 kD; IF-2, 75 kD; IF-3, 30 kD。
- (101) ribosomal protein 核糖体蛋白
核糖体的一个组分。有 31 种蛋白在大亚基(5.4~30 kD),有 21 种在小亚基(8.4~61.2 kD),每一种的功能不清。
- (102) spectrin 血影蛋白
与肌动蛋白结合, $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。
- (103) synapsin 突触蛋白
神经组织的主要蛋白,有四种:
Ia, 86 kD; Ib, 80 kD, pI > 10.5; IIa, 74 kD; IIb, 55 kD, pI 6.6~7.12. 主要参与 cAMP 或 Ca^{2+} 介导的磷酸化,及与微丝微管结合。
- (104) talin 踝蛋白
225~235 kD,参与细胞-细胞之间,细胞-基质之间作用。在生理的离子强度下是个延长的分子。经常是单体,也可形成聚体。
- (105) (tau) protein τ 蛋白
40~60 kD,微管结合蛋白的主要成员。
- (106) tenascin 腱生蛋白
在体内的 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 二聚体为 1200 kD, α 亚基为 250 kD, β,γ 分别为 225 及 215 kD,以二硫键相联,是细胞外基质、介导细胞及基质作用。
- (107) thioredoxin 硫氧还原蛋白
12 kD,在氢转移反应中的多肽辅因子。
- (108) transcuprein 转铜蛋白
血清中铜结合蛋白,参与铜离子摄取及运转。
- (109) transducin 转导素
是一类 G 蛋白,与信息传递有关。
- (110) transferrin 运铁蛋白
74~80 kD, pI 5.4~5.9,血清中结合铁的糖蛋白,富含二硫键,有 19 个二硫键一个分子蛋白结合二个铁原子。
- (111) tropoelastin 原弹性蛋白
70 kD,在弹性纤维中与弹性蛋白结合。
- (112) tropomyosin 原肌球蛋白

与肌球蛋白共同调节肌肉收缩。

(113) troponin 肌钙蛋白

肌钙蛋白 C : 17.8 kD, pI 4.1~4.4, 与钙调蛋白相似。

平滑肌内的肌钙蛋白 I: 20.9 kD, pI 9.3, 与肌动蛋白结合避免与肌球蛋白结合。肌钙蛋白 T: 30.5 kD, pI 9.1 与原肌球蛋白结合。

(114) tubulin 微管蛋白

有多种不同的形式, 有多个亚基数目不等, 每个亚基 50 kD。

(115) ubiquitin 泛素

8.5 kD, pI 6.7。

(116) vicillin 豌豆球蛋白

7S 存储糖蛋白, 有三个亚基: 43~46kD, 47~48kD 及 51~53 kD。

(117) vimentin 波形蛋白

52 kD。

(118) vinculin 粘着斑蛋白

116 kD, 参与细胞-细胞及细胞基质的粘附。

(119) vitronectin 玻连蛋白

粘附蛋白之一, 属 α -糖蛋白类。

15.3. 细胞因子

细胞因子(cytokines, CKs)是一类由免疫及非免疫细胞产生的可溶性蛋白质, 它们在调节免疫反应、炎症反应、组织修复及某些疾病发生中起着重要的作用。50年代初期, 在研究传染病原诱导的免疫反应中, 发现由不同的细胞产生许多具有介导特异生物学功能的蛋白因子, 如干扰素等。后又发现许多由白细胞合成, 又作用于白细胞的因子, 称白细胞介素(interleukins, ILs)。80年代, CKs的研究取得了很大的进展, 应用分子克隆技术和单克隆抗体, 不仅对各种细胞因子的结构功能有了更多的了解, 而且揭示许多新的性质, 并发现许多新的 CKs。目前, 发现的有数百种, 仅 ILs 已有 18 种之多。(其性质见表 15-2。)

表 15-2 白细胞介素家族(ILs)的来源及功能

细胞因子	来源	分子量(kD)	主要靶细胞	主要功能
IL-1 α	巨噬细胞	17.5	T, B 细胞	活化淋巴细胞
	内皮细胞		巨噬细胞	激活巨噬细胞
	纤维母细胞			活化血管内皮细胞
IL-1 β	B 细胞	17.3	内皮细胞	白细胞/内皮细胞粘附性增高
	NK 细胞		NK 细胞	促进神经的生长, 分化及修复

续表 15-2

细胞因子	来源	分子量(kD)	主要靶细胞	主要功能
IL-2	肿瘤细胞	15~18 (糖蛋白)	肿瘤细胞	T 细胞增生及分化 活化细胞毒淋巴细胞及巨噬细胞
	胶质细胞		嗜中性细胞	
	T 细胞		T 细胞	
	NK 细胞		NK 细胞	
L-3	T 细胞	28(糖蛋白)	肿瘤细胞	多谱系克隆激活因子 刺激胆碱能神经原的活性
	小胶质细胞		干细胞, 巨噬细胞 T 细胞, 肿瘤细胞	
IL-4	T 细胞	20	T, B 细胞	B 细胞生长因子 促产生 IgE, IgG1 促进神经原的分化及增生
			NK, 巨噬细胞	
IL-5	T 细胞	45 (同源二聚体)	B 细胞	B 细胞生长及分化 合成 IgA
IL-6	T, B 细胞	26 (糖蛋白)	B 细胞, 肝细胞	B 细胞分化 诱导急性相蛋白 促进神经原存活
	巨噬细胞		NK, T 细胞	
	纤维母细胞		肿瘤细胞	
	小胶质细胞			
IL-7	骨髓基质细胞	25(糖蛋白)	B 前体细胞	T, B 细胞增生, 存活 活化中性粒, 提高游走能力, 有趋化性
			T 细胞, 巨噬细胞	
IL-8	单核细胞	8.0	中性粒细胞	
			嗜碱性细胞	
			内皮细胞	
			肿瘤细胞	
IL-9	T, 肿瘤细胞	40	T 细胞	T 细胞生长因子 刺激红系发育
IL-10	T _{H2} 细胞, 单核, 巨噬,	18.0	辅助性 1(T _H) 细胞	抑制细胞因子合成, 促进 T 细胞增生, 成熟 对神经细胞有保护作用
	活化的 B 细胞			
	肥大细胞, 角化细胞			
IL-11	肿瘤细胞	19.0~23	巨核细胞前驱细胞	促进脂肪细胞, 神经原细胞及破骨 细胞发育
	骨髓基质细胞			
IL-12	巨噬细胞	75.0 [异二聚体 (p35, p40) 糖蛋白]	NK 细胞, T 细胞	促进 NK 细胞刺激因子, 细胞毒淋 巴细胞成熟因子 (cytotoxic lym- phocyte maturation factor)
IL-13	活化的 T 细胞	12.4 (糖蛋白)	B 细胞, 巨噬细胞	调节巨噬细胞功能, 诱导活化 B 细 胞的增生
IL-14	T 细胞	53		

细胞因子	来源	分子量(kD)	主要靶细胞	主要功能
IL-15	激活的 T 细胞 肺,肝,心,胎盘 骨骼肌	(114 氨基酸)	T,B 细胞 NK 细胞	激活 NK 细胞生长 活化 T,B 细胞 刺激免疫球蛋白分泌,诱导特异性抗原产生,诱导产生 LAK 细胞
IL-16	CD8+T 淋巴细胞	14	T 淋巴细胞	活化 T 淋巴细胞,诱导细胞能动性
IL-17	活化的 T 细胞	97.8		诱导 IL-6,IL-8 及 ICAM-1, 活化转录因子 NK-kB
IL-18	人及鼠肝脏	18.3	NK 细胞	诱导 γ 干扰素产生,增加 NK 细胞的细胞毒作用

CKs 包括由单核吞噬细胞、成纤维细胞等产生的单核细胞因子(monokines, MKs)活化淋巴细胞因子(lymphokines, LKs)及单核细胞和淋巴细胞产生的集落因子(colony-stimulating factors, CSFs)。MKs 的主要功能是介导天然免疫。LKs 具有调节各种淋巴细胞活化、生长和分化,以及活化和调节炎症细胞的功能;CSFs 能刺激骨髓中未成熟白细胞的生成和分化。MKs, CSFs, LKs 性质见表 15-3。

表 15-3 除白介素以外的一些重要细胞因子的来源及功能

细胞因子	来源	分子量(kD)	功能
AR (amphiregulin)双调蛋白	肿瘤细胞,纤维母细胞,角质细胞	(78 氨基酸)	EGF 受体的配基,刺激纤维母细胞、上皮及角质细胞生长
BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 脑衍生的神经营养因子	神经系统		神经系统发育
BTC (betacellulin)	平滑肌细胞	(80 氨基酸)	Balb/c 纤维母细胞及平滑肌细胞分裂原
* C10 (anovel mouse C-C chemokine)	GM-CSF 激活的骨髓细胞	(95 氨基酸)	单核细胞趋化剂
CNTF (ciliary neurotrophic factor) 睫状神经营养因子 包括 LIFZ (leukemia Inhibitory factor), OSM(oncostatin M)	胚胎副交感神经原	22.7	神经系统的成活及分化因子
EGF (epidermal growth factor) 表皮生长因子	体液,卵母细胞,肾小管上皮细胞,甲状腺滤泡的上皮细胞,平滑肌细胞	6.0	诱导上皮细胞发育,促进血管生成
* ENA-78 (epithelial neutrophil activating peptide-78)活化上皮神经营养的多肽	中性粒细胞	8357 D	中性粒细胞的引诱剂及活化剂
Epo (erythropoietin) 红细胞生成素	肾,肝(少量)	30	刺激骨髓造血前体细胞的增生及成熟,促进胆碱能神经原成活
FGF (fibroblast growth factor)成纤维细胞生长因子	肿瘤细胞纤维母细胞,酸性:脑,视网膜,骨基质	16~18	调节细胞增生,分化及功能

细胞因子	来源	分子量(kD)	功能
	碱性: 神经组织, 垂体, 肾上腺, 胎盘	18~24	
FGF-3	细胞核内或胞浆		int-2 基因产物, 调节细胞的发育
FGF-4	肿瘤细胞		hst-1 基因产物, 调节细胞发育
FGF-5	神经原细胞, 肌细胞		纤维母细胞、内皮细胞的细胞分裂原
FGF-6	肿瘤细胞		hst-2 基因产物
FGF-7 (KFG)			
FGF-8		28~32	
FGF-9	胶质细胞	30	胶质细胞活化因子促纤维母细胞分裂及增生
G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) 粒细胞集落刺激因子	单核及巨噬细胞, 纤维母细胞, 血管内皮, 成骨细胞, 骨髓基质细胞	19	造血细胞增生、分化及活化
GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) 松果体细胞衍生神经营养因子	神经原, 松果体细胞, 骨骼肌, 星状细胞, 氏网细胞	20	促进神经原存活
GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) 粒巨噬集落刺激因子	T 细胞, 巨噬细胞, 血管内皮细胞, 纤维母细胞, 骨髓细胞	18~24	刺激造血细胞的增生及成熟
*GRO (growth related protein, a C-X-C chemokine) 生长有关蛋白	肿瘤细胞	(73 氨基酸)	刺激细胞生长
HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor) 肝素结合的表皮生长因子	单核细胞, 血管内皮细胞, 嗜酸性细胞, T 细胞	(208 氨基酸)	纤维母细胞, 平滑肌细胞及肝细胞的细胞分裂原
HGF (hepatocyte growth factor) 肝细胞生长因子	肝脏, 血小板, 纤维母细胞	82	刺激正常表皮黑色素细胞, 角质细胞, 血管内皮细胞, 胃、胆及肾上皮细胞的生长及 DNA 合成
IGF (insulin-like growth factor) 类胰岛素生长因子			
IGF-1	肝细胞, 神经原细胞, 肾曲管, 纤维母细胞	(70 氨基酸)	自分泌, 调节骨生长及蛋白质代谢
IGF-II	成骨细胞, 肺血管上皮细胞, 软骨细胞	(67 氨基酸)	促进神经细胞发育及营养作用
IFN- α (interferon)	白细胞		诱导 MHC -I 抗原, 抗病毒作用, 激活 NK 细胞
IFN- β			
IFN- γ	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T 细胞, NK 细胞	20~25	诱导 MHC I 及 II 抗原, 巨噬细胞活化, 调节免疫功能, 抑制病毒复制
*I-309	T 细胞	(73 氨基酸)	单核细胞趋化剂

续表 15-3

细胞因子	来源	分子量(kD)	功能
*IP-10 (interferon gamma inducible protein 10) 干扰素诱导蛋白 10	单核, 内皮细胞, 活化 T 细胞, 纤维母细胞	(77 氨基酸)	参与炎症反应
KGF (keratinocyte growth factor) 角质细胞生长因子	角质细胞, 纤维母细胞, 血管及内脏的平滑肌细胞	28	促进上皮及角质细胞增殖
LIF (Leukemia inhibitory factor) 白细胞抑制因子 包括 D-factor (Differentiating stimulating factor); DIF (differentiating inhibiting factor); DIA (differentiating inhibiting activity); DRF (differentiating retarding factor); HSF-III (hepatocyte-stimulating factor III) CNF/CDF/CNDF (cholinergic neuronal differentiation factor); OAF (osteoclast-activating factor); MLPLI (melanoma-derived lipoprotein lipase inhibitor)	T, 单核细胞, 纤维母细胞, 成骨细胞, 骨髓基质细胞, 氏网, 星状细胞	38~67	抑制细胞增生, 诱导巨噬细胞分化 (白血病细胞株 M1)
*MCP 1 (monocyte chemoattractant protein) 单核细胞趋化蛋白	肿瘤细胞	8525 D	趋化诱导单核细胞
M-CSF (macrophage colony stimulating factor) 巨噬细胞集落刺激因子	骨髓造血祖细胞, 骨髓基质细胞, 纤维母细胞, 脑星状细胞, 成骨细胞	(522 氨基酸)	调节单核的吞噬细胞的生长, 分化及功能
MIF (macrophage migration inhibitory factor) 巨噬细胞移动抑制因子	T-细胞		抑制细胞迁移作用
*MIP-1 (macrophage inflammatory protein) 巨噬细胞炎症蛋白	多糖激活的巨噬细胞, 肿瘤细胞, 活化的中性粒, 内皮细胞	(69~72 氨基酸)	趋化引诱单核细胞, MIP-1 α 诱导粘附 CD8 ⁺ T 细胞, MIP-1 β 诱导粘附 CD4 ⁺ T 细胞
MK (midkine) 中蛋白	肾脏	15	在胚胎发育过程中中期表达, 在分化过程中起作用, 是与肝素结合的分子
β -NGF (beta nerve growth factor) β -神经生长因子	神经原, 氏网细胞, 母细胞, 平滑肌细胞, 星状细胞, CD4 ⁺ T 细胞, 巨噬细胞	26	参与神经原增殖、分化、存活及功能作用, 促进神经损伤的修复和再生, 参与活化免疫系统的调节
NT (neurotrophins) 神经营养蛋白	神经细胞		促使神经系统成活, 免受凋亡
OSM (oncostatin M) 致瘤蛋白 M	活化的单核/巨噬细胞, T 细胞	28	多种细胞生长及分化
PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) 血小板衍生的内皮细胞生长因子	血小板, 胎盘, 肝, 肾, 心, 脾, 淋巴结, 外周淋巴细胞	45	对内皮细胞有特异的丝裂原作用, 刺激内皮细胞生长
PDGF (platelet-derived growth factor) 血小板衍生的生长因子	血小板颗粒分泌	30	刺激成纤维细胞与肌细胞的生长与分化, 与肝素结合, 并促进单核细胞的化学趋化

续表 15-3

细胞因子	来源	分子量(kD)	功能
PTN (pleiotrophin) 包括 HBNF (heparin-binding neurotrophic factor); HBBM (heparin binding brain mitogen); HARP (heparin-affinity regulatory peptide); HB-GAM (heparin-binding growth associated molecule); OSF-1(osteoblast-specific factor)	成骨细胞, 软骨细胞, 纤维母细胞, 星状细胞, 神经原, 角质细胞	15.3	刺激轴突生长及神经原分化
SCF/KL(stem cell factor/ c-kit ligand) 干细胞生长因子	纤维母细胞, 肝细胞, 内皮, 巨噬细胞, 卵细胞, 氏网细胞	45 (KL-1) 32 (KL-2)	介导细胞-细胞之间粘附, 介导 CD ₃₄ ⁺ 细胞增生的全过程
SLPI(secretory leukocyte protease inhibitor) 白细胞分泌的蛋白水解酶抑制剂	腮腺分泌	11.7	抑制白细胞弹性蛋白酶, 组织蛋白酶及胰蛋白酶活性
STAT (signal transducer and activator or transcription) 信息传导剂及活化剂或转录剂, 是一类新转录因子家族, 共 STAT 1-6 种			
STAT1	蜕膜	(734~851 氨基酸)	抗病毒应答
STAT2	多种细胞		抗病毒应答
STAT3	IL3 培养的髓类前体细胞		诱导各种急性相应答基因的表达
STAT4	睾丸, 胸腺		获得性免疫中起作用
STAT5a/STAT5b	髓类细胞系		介导催乳素诱导的乳汁多种蛋白的转录
STAT6	胸腺		获得性免疫中起作用
TGF- α (transforming growth factor) 转移生长因子	肿瘤细胞	18~20	有纤维母细胞分裂原作用 诱导上皮细胞发育, 促血管生成因子
TGF- β	血小板, 骨, 神经细胞, 胶质细胞	25	细胞增生, 分化及活化起重要作用, 抑制或激活(不同情况下), 胚胎发生期的神经细胞发育, 免疫反应和炎症过程起重要作用
TNF- α (tumor necrosis factor) 肿瘤坏死因子	中性粒细胞, 巨噬细胞, 活化的淋巴细胞, NK 细胞, LAK 细胞, 内皮细胞, 平滑肌细胞, 小胶质细胞	17	活化巨噬细胞, 粒细胞及细胞毒细胞, 白细胞/内皮细胞粘附增加, 杀伤某些肿瘤细胞, 可引起神经原损伤
TNF- β	T-细胞	25	诱导, 激活急性相蛋白, 刺激血管生成素的生成, 诱导 MHC I 抗原生成
TPO (thrombopoietin) 血小板生成素	巨核细胞	(332 氨基酸)	刺激前巨核细胞的发育及增殖
VEGF (vascular endothelial growth factor) 血管内皮细胞生长因子	活化的巨噬细胞, 角质细胞, 肝细胞, 肌细胞, 肿瘤细胞	34~42	血管及内皮细胞特异的促分裂、增生, 促进血管通透性

* ,趋化因子。趋化因子分两支: 一个是 α 家族, 氨基酸顺序 C-X-C, C 是半胱氨酸, X 是任何氨基酸。另一个是 β 家族, 氨基酸顺序是 C-C, 它们主要参与免疫及炎症反应。它结合到氨基多糖及肝素, 促进固着到内皮细胞或细胞外基质。

虽然 CKs 种类甚多,每种 CK 的主要生物活性不同,但他们都有以下共性:

(1) 诱导表达:正常休止期的细胞必须经刺激活化才能合成及分泌 CK。经过实验证实,CK 的产生需要启动基因的转录。

(2) 作用时间短:CKs 基因的转录历时较短,与哺乳动物基因的 mRNA 相比,CK 的 mRNA 分子半生期极短,如 GM-CSF 和 G-CSF 的 mRNA 半生期 < 30 分钟。

(3) 活性强:CKs 是一类有很强生物活性的蛋白质分子,通常的 pmol 浓度水平即有生物效应,这与在靶细胞上有高亲和力的受体有关。

(4) 多向性:一方面,一种细胞可产生多种 CKs,这与许多 CKs 基因 5' 端上游调控区中有同源序列,称保守的 LKs 元件有关。而且,某些 CK 基因在染色体定位上相接近,故细胞在受刺激后,几种基因同时被活化,而分泌多种 CK;另一方面,一种 CK 不仅由多种细胞产生,而且作用于多种靶细胞。

(5) 多功能:一种 CK 有多种功能,如 IL2 刺激 T 细胞,又激活 B 细胞。有些不同的因子又有相同的作用。

(6) 相互影响:一种 CK 可刺激或抑制其它 CK 的产生,或对其它 CK 起拮抗,相加或协同作用,从而对机体的免疫或炎症反应起正或负的调控作用。

(7) 受体表达的调节:许多 CKs 受体的表达接受来自与受体接合的因子(自分泌调节)或其它因子(旁分泌调节)的特异信号的调节,从而对免疫效应起放大或负反馈作用。

表 15-4 血浆凝血因子的物理化学性质

因子	化学性质	分子量 (kD)	合成	生物半衰期 (h)	功能
纤维蛋白原 (factor I)	多聚糖蛋白 三对多肽链	340	肝脏	72~120*	纤维蛋白的前体
凝血酶原 (factor II)	单链糖蛋白	69	肝脏	67~106	凝血酶的前体
组织因子 (factor III)	单链糖蛋白	45	VIT K 依赖 单核 血管内皮细胞 各种组织	—	辅因子
易变因子 (factor V)	多聚糖蛋白	200~400	肝脏	12~15	辅因子
稳定因子 (factor VII)	单链糖蛋白	63	肝脏	4~6	酶原
因子 VIII-vWF 复合物 (factor VIII-vWF complex)	多聚糖蛋白	1200	维生素 K 依赖		辅因子,血小板粘附
VIIIc 因子 (factor VIIIc)	单链糖蛋白	267	?	10~14	辅因子 a
vW 因子 (factor vW)	多聚糖蛋白	1200	内皮巨核细胞	22~40	血小板粘附, VIIIc 分子载体
血浆凝血活酶成分 (factor IX)	单链糖蛋白	55	肝脏	18~40	酶原
			VIT K 依赖		

续表 15-4

因子	化学性质	分子量 (kD)	合成	生物半衰期 (h)	功能
Stuart-Prower 因子 (factor X)	双链糖蛋白	55	肝脏 VIT K 依赖	24~60	酶原
血浆凝血活酶前质 (factor XI)	双链糖蛋白	160	肝脏	48~84	酶原
hageman 因子 (factor XII)	单链糖蛋白	80	?	52~60	酶原
前激肽释放酶 (prekallikrein)	单链糖蛋白	88	肝脏?	?	酶原
高分子量激肽原 (HMW kininogen)	单链糖蛋白	110	肝脏?	?	辅因子
纤维蛋白稳定因子 (factor XIIIa)	多糖糖蛋白	320	三核细胞 肝脏	72~168?	辅酶

* 同位素方法测定结果。

? 未肯定结果。

表 15-5 分化抗原决定簇 (CD) 的物化性质及功能

CD	来源	家族	结构	功能
CD1	胸腺皮质细胞	I _g -SF	重链 50~55kD, 轻链 12kD, 同种型:CD1a、 b、c、d、e	CD1d 是多肽抗原, CD1b 是指 抗原, 与 CD4 CD8 T-细 胞作用
*CD2	胸腺细胞, 成熟 T 细胞	I _g -SF	47~58kD 糖蛋 白	与粘附分子 LFA-3 作用, 粘附 CTL 到靶细胞, T 细胞到内 皮细胞, 胸腺细胞到胸腺上 皮细胞, 活化 T 细胞
CD3	所有的 T 细胞	I _g SF	γ: 25~28kD δ: 21kD ε: 20kD ζ: 16kD η: 21kD	T 细胞活化, 信息传递
CD4	胸腺细胞, 单核细胞, 骨髓细胞, 辅助 T 细胞	I _g -SF	60 kD 单体, 是 跨膜蛋白, 胞外有四个 I _g G 样区, 胞 内区较短	TCR 辅受体, 对 MHCII 型识 别
CD5	胸腺细胞, 成熟 T 细胞, 成熟 B 细胞亚群	SRCR	67 kD 单体	T 及胸腺细胞的辅激活信息, T 细胞增生
CD6	胸腺细胞, 成熟 T 细胞	SRCR	100~130kD	作用于 TCR 介导的活化, 胸腺细胞-基质作用
CD7	胸腺细胞, 成熟 T 细胞, 胚胎肝 细胞	I _g -SF	跨膜糖蛋白 40kD	信息传递
CD8	胸腺细胞, CTLs, iELs	I _g -SF	α 及 β 分别为 34kD	MHCI 型限制的 CTL 细胞的 成熟及阳性选择, 稳定 TCR-MHCI 型的作用
CD9	早期 B 细胞, 血小板, 嗜酸、嗜碱 性细胞, 活化的 T 细胞	TM4-SF	22--27 kD	活化血小板及血小板聚集, 细 胞-细胞之间的粘附

续表 15-5

CD	来源	家族	结构	功能
CD10	不成熟的 TN 细胞,胸腺细胞,B 细胞,中性粒细胞	膜结合的内肽酶	100 kD 单体,II 型跨膜蛋白	T 细胞的活化,调节 B 细胞的生成
*CD11a	造血细胞,淋巴,单核,巨噬及嗜酸性细胞,中性粒细胞	β -2 整链蛋白	180/95 kD	LFA-1(粘附分子)的 α 链
*CD11b	NK 细胞,单核细胞,中性粒细胞	β -2 整链蛋白	265 kD	补体受体 CR3 的 α 链
*CD11c	NK 细胞,单核细胞,粒细胞, B 细胞	245kD	补体受体 CR4 的 α 链	
CDw12	单核及粒细胞		90~120 kD	
CD13	单核及粒细胞		150 kD	氨基肽酶 N
CD14	单核及粒细胞		55 kD	LPS 结合蛋白
CD15	粒细胞			ELAM 的受体
CD16	不成熟 T、B 细胞,单核细胞,B 细胞亚群,祖细胞,NK 细胞	Ig-SF	50 ~ 65 kD 单体, GPI-联结跨膜蛋白	IgG(Fc γ RIII)的 Fc 受体
CDw17	单核,粒细胞,血小板			乳糖化神经酰胺(lactosyl ceramide)
CD18	所有的血细胞		95 kD	CD11 的 β 链
CD19	B 细胞,前 B 细胞,FDCs		95 kD	免疫反应中调节 B 细胞活化和增生
CD20	B 细胞		35~37 kD	Ca ²⁺ 离子通道,调节 B 细胞活化及增殖
CD21	成熟 B 细胞,FDCs,正常胸腺细胞		140 kD	C3d 受体(CR2),EB 病毒受体
CD22	正常及肿瘤 B 细胞		135 kD	介导 T、B、单核及中性粒,粘附到红细胞
CD23	成熟 B 细胞,单核,IL4-活化的巨噬细胞,血小板		45~50 kD	IgE(FcRII)低亲和受体,调节 IgE 作用
CD24	不成熟胸腺细胞,活化的 T 细胞,B 细胞,造血细胞		38~70 kD 膜蛋白	粘附及信息传递作用的辅助信息
CD25	不成熟 TN 细胞,DP 胸腺细胞,活化的 T 细胞,前 B 细胞	血细胞生成素,受体 SF	55 kD	结合 IL-2 到 IL-2R,诱导 T 细胞活化及增生,活化 NK 细胞,IL-2R α 链
CD26	胸腺细胞,T、NK 细胞,上皮细胞,活化的 T 细胞	外肽酶 IV	II 型膜涎糖蛋白	细胞表面蛋白水解酶,结合及转移 ADA 到细胞表面与纤联蛋白及胶原结合
CD27	T、B 细胞,外周血 T 细胞,NK 细胞亚群	NGFR-SF	55 kD 同源二聚体	T 细胞活化的辅助信息
CD28	T 细胞,PBL 细胞	Ig-SF	44 kD 同源二聚体	信息传递的辅助激活信号(co-stimulatory signal)
CD29	T、B 细胞,NK 细胞,单核,巨噬细胞,血小板		130 kD	VLA(β 链)
CD30	活化的 T、B 细胞,巨噬,NK 细胞,血小板,内皮细胞	NGFR-SF	105 kD,膜结合糖蛋白	传递细胞程序死亡的信息,同嗜性粘着,异嗜性粘着
CD31	单核细胞,血小板,中性粒细胞,NK 细胞,内皮细胞	Ig-SF	130kD 糖蛋白	同嗜性及异嗜性粘附,中性粒、单核及 NK 细胞的迁移,活化 T 细胞
CDw32	B 细胞,巨噬细胞		40 kD	IgG(Fc γ RII)受体

续表 15-5

CD	来源	家族	结构	功能
CD33	单核细胞,干细胞		67 kD	髓系前体(myeloid precursors)
*CD34	干细胞,血管内皮细胞,内皮细胞	类粘蛋白	115 kD	干细胞标志,结合造血干细胞到骨髓的基质微环境
*CD35	B细胞,单核细胞,粒细胞,红细胞,T细胞亚群,吞噬细胞,中性粒细胞,FDCs	CCP-SCR	有四个同种异型 A:235 kD B:290 kD C及D	C3b/4b受体(CR1),转运免疫复合物到肝
*CD36	活化B细胞,单核细胞,小血管内皮细胞,血小板		90 kD	吞噬凋亡细胞,血小板糖蛋白IV, GPIIb, MFGM PASIV相似
CD37	活化的T及巨噬细胞,成熟的B细胞		88 kD	作用于信息传递及细胞内转运,B细胞活化和增生
CD38	胸腺细胞,早期T,B细胞,活化B,T细胞,骨髓细胞		46 kD II型跨膜糖蛋白	信息传递,细胞粘附
CD39	成熟的B细胞,活化的单核细胞		70~100	
CD40	正常及肿瘤B细胞,内皮细胞,胸腺上皮巨噬细胞,淋巴瘤细胞	NGFR-SF	50 kD	参与B细胞活化,增生及分化
CD40L	活化CD4 ⁺ T细胞,NK细胞,单核细胞,嗜碱细胞	NGF-SF	33 kD II型膜糖蛋白	辅助细胞增生,辅助T细胞分泌淋巴因子,活化和诱导B细胞增生及分化
*CD41	血小板	β 3整联蛋白	125/22 kD	血小板聚集,纤维蛋白原,纤联蛋白及血小板反应蛋白受体,GPIIb-IIIa复合体
*CD42	血小板			vWF及凝血酶的受体,介导血小板粘附及聚集
CD42a			23 kD	GPIX
CD42b			135/25 kD	GPIba
CD42c			22 kD	GPIb β
CD42d			85 kD	GPV,GpIb-IX-V复合物
CD43	T细胞,活化的CD4 ⁺ T细胞,前B细胞		115 kD,涎化粘蛋白样分子	T细胞增生,辅助粘附到T细胞,调节HPC增生,凋亡、细胞-细胞之间作用
*CD44	胚胎胸腺细胞,记忆T细胞,上皮细胞,内皮细胞,巨噬细胞	蛋白多糖	85 kD糖蛋白	淋巴细胞归巢,T及NK细胞活化,细胞移动,促进淋巴细胞凋亡,细胞-细胞,细胞-ECM粘附,H-CAM,Pgp-1
CD45	成熟及活化T细胞,不成熟及幼稚T细胞		180~220 kD,跨膜蛋白	蛋白酪氨酸磷酸酶,T,B细胞信号,胸腺细胞的成熟化
CD46	T,B细胞,NK细胞,单核,巨噬及粒细胞,血小板		56/66 kD	膜辅助蛋白(membrane cofactor protein)
CD47	T,B细胞,NK细胞,单核,巨噬及粒细胞,血小板,干细胞		47~52 kD	
*CD48	T,B细胞,NK细胞,单核,巨噬及粒细胞	Ig-SF	41 kD,GPI-Pr	CD2的配基,粘附T细胞到靶细胞
*CD49a	纤维母细胞,活化T细胞内皮,NK及单核细胞	β 1整联蛋白	200~210 kD	层粘链蛋白受体
*CD49b	T,B细胞,NK细胞,单核,巨噬及粒细胞,血小板	β 1整联蛋白	155~165 kD	I~IV型胶原受体

续表 15-5

CD	来源	家族	结构	功能
*CD49c	纤维母细胞, B 细胞, 角质形成细胞	$\beta 1$ 整联蛋白	亚基 145~150 kD	层粘链蛋白受体
*CD49d	T、B 及单核细胞, NK, 胸腺细胞, 血小板, 树状细胞, 嗜酸细胞	$\beta 1$ 整联蛋白	亚基 150 kD	结合 VCAM-1, 纤联蛋白, MAdCAM-1 及侵袭素, 作用于白细胞迁移到淋巴结, 粘附造血祖细胞到骨髓基质
*CD49e	纤维母细胞, 内皮细胞, 血小板, 胸腺细胞	$\beta 1$ 整联蛋白	亚基 160 kD	结合纤联蛋白, L1 细胞, 粘附分子, 参与调节细胞迁移, 细胞粘附, 基质装备, VLA $\alpha 5$
*CD49f	活化 T 细胞, 单核细胞, 血小板, 胸腺及嗜酸细胞	$\beta 1$ 整联蛋白	150/130 kD	VLA $\alpha 6$, 细胞粘附, 与层粘联蛋白作用, 使细胞伸展及移动
*CD50	单核, 中性粒, 淋巴细胞	Ig-SF	116~140 kD, 糖蛋白	T 细胞信息及协同激活分子
CDw50	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞		148/108 kD	
*CD51	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞, 血小板	$\beta 3$ 整联蛋白	125/24 kD	透明连结蛋白, (vitronectin) 受体 α , 介导血小板聚集
CD52	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞		21~28 kD	Campath-1
CD53	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞, 骨髓干细胞		32~40 kD	
*CD54	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞, 血小板, 干细胞	Ig-SF	90~115 kD, 糖蛋白	ICAM-1, 介导白细胞到内皮细胞, T-T 细胞, T-B 细胞作用
CD55	T、B 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞		70 kD	加速衰变因子 (DAF)
*CD56	T 细胞, 依赖 IL-2 的 T 细胞株, NK 细胞	Ig-SF	200~220 kD, 糖蛋白	介导杀伤细胞活化, MHC 非限制性的细胞毒性, NCAM
CD57	成熟 T 细胞, CD16 ⁺ NK 细胞		110 kD, 糖蛋白	介导 MHC 非限制性细胞毒
*CD58	活化 T 细胞, NK 细胞, 单核, 巨噬及粒细胞, 血小板及干细胞		40~65 kD, 跨膜蛋白 GPI 蛋白	LFA-3 参与 T 细胞粘附到红细胞
CD59	不同 T 细胞亚群		18~20 kD, 糖蛋白	保护补体介导的溶血
CDw60	血小板			NeuAc-NeuAc-Gal
CD61	血小板		105 kD	透明连结蛋白 (vitronectin) 受体 β
CD62	血小板		140 kD	p 选择素
*CD62L (L-selectin)	血循环中白细胞	C 型凝集素	70~90 kD 跨膜蛋白	淋巴细胞迁移到炎症部位
*CD62E	自身表达 CD62E (E-selectin) 的内皮细胞, 由细胞因子作用后表达 CD62E 的血管内皮细胞	C 型凝集素	110 kD	与白细胞 ESL-1 结合
*CD62P	凝血酶/组织胺激活的, 血小板及内皮细胞	C 型凝集素	140 kD	血小板粘附到单核及中性粒细胞
CD63	活化 T、B 及粒细胞, 单核细胞, 血小板		53 kD	
CD64	单核细胞		70 kD	IgG (Fc γ RI) 受体
CDw65	单核及粒细胞			神经酰胺十二糖

续表 15-5

CD	来源	家族	结构	功能
CD66	粒细胞		180~200 kD	
CD67	粒细胞		100 kD	
CD68	巨噬细胞		110 kD	
CD69	T 细胞前体, TN 胸腺细胞, NK 细胞, 血小板, 骨髓造血细胞前体	C 型凝集素 SF	85 kD, 由二硫键联结两个异二聚体 (28, 32kD)	T 细胞信息传递, 嗜酸性细胞凋亡, 启动 $\gamma\delta$ T 细胞的细胞溶解作用
CDw70	活化的 T, B 细胞			
CD71	活化的 T, B, NK 及单核细胞, 巨噬细胞		95 kD	转铁蛋白受体
CD72	B 细胞		43/39 kD	CD5 受体
CD73	T, B 细胞亚群		69 kD	外-5' 核苷酸酶
CD74	B 及单核细胞		41/35/33 kD	MHCII 型
CDw75	成熟的 B 细胞, T 细胞亚群		53 kD	α 2, 6 涎糖转移酶
CD76	T 细胞, 成熟 B 细胞		85 / 67 kD	
CD77	B 细胞			
CDw78	B 细胞			
CD79a	正常及肿瘤细胞, 发育早期的 B 细胞	Ig-SF	33akD	与 sLg 形成非共价结合, 起信息传递作用
CD79b			39 β kD	介导转运 IgM 到细胞表面
CD80	活化 T, B 细胞, IFN- γ 活化的单核细胞	Ig-SF	60 kD	与 CD28/CTLA-4 结合, 调节 IL-2 表达, 活化 T 细胞
CD81	T, B 细胞, NK, 胸腺细胞, 白血病及淋巴瘤细胞株, 嗜酸细胞	TM4-SF	26 kD	TAPA-1
CD82	B, T 细胞, 单核细胞, 粒细胞, 上皮细胞, 内皮细胞, 血小板	TM4-SF	60 kD	参与信息传递
CD83	B 细胞	Ig-SF	43 kD	HB15
CDw84	B 细胞		74 kD?	可能是激活 T 细胞的辅助因子树突细胞标志
CD85	B 细胞			
CD86	B 细胞, 单核细胞		80 kD	与 CD28 / CTLA-4 结合调节 IL-2 表达
CD87	髓系细胞			
CD88	单核细胞/中性粒细胞			C5a 受体
CD89	髓系细胞			Fc α 受体
CDw90	T 细胞谱系, 造血干细胞, 前 B 细胞	Ig-SF	25~35 kD 膜蛋白	作用于淋巴细胞再循环, 粘附作用, 活化 T 细胞, 细胞识别
CD91	髓系细胞			α 2-巨球蛋白受体
CDw92	髓系细胞			
CD93	髓系细胞			
CD94	NK 细胞			
CD95	胸腺细胞, 成熟 T 细胞, 活化的淋巴细胞	NGFR-SF	36~45 kD, 1 型跨膜蛋白	当 Fas-L 激活, 传递凋亡信息
CD96	活化的细胞			TACTILE
CD97	活化的细胞			
CD98	活化的 T 细胞, B 细胞		85 kD 重链与 40 kD 轻链的蛋白	调节细胞内 Ca^{2+} , 细胞增生

续表 15-5

CD	来源	家族	结构	功能
CD99	胸腺皮质及髓质, T 细胞		32 kD, 单链, 跨膜糖蛋白	作用于 T 细胞与红细胞, 生成玫瑰花簇
CD100	正常 PBLs, 静止及活化的 T 细胞, 所有的造血细胞		150 kD, 糖蛋白, 二聚体	外周血单核细胞的增殖
CDw101	在 PBLs 的亚群	Ig-SF	140 kD, 二硫键联结的二聚体	抑制 T 细胞的增殖
*CD102	内皮细胞, HEV, 淋巴, 单核, NK 细胞, 血小板	Ig-SF	55~65 kD, 糖蛋白	ICAM-2, 在免疫及炎症反应中激活白细胞
CD103	所有的 IELs, 2~7% 血循环中的 T 细胞, 活化的 CD8 ⁺ T 细胞	$\beta 7$ 整联蛋白	250 kD	粘附 T 细胞及上皮细胞
CD104	淋巴细胞			$\beta 4$ 整联蛋白
CD105	内皮细胞			endoglin
*CD106	活化的内皮细胞, APCs, 骨髓基质细胞, 胚胎组织	Ig-SF	90~110 kD GPI 蛋白	VCAM-1, 参与淋巴细胞迁移及活化, 白细胞迁到炎症部位
CD107a	血小板			LAMP-1
CD107b	血小板			LAMP-2
CDw108	内皮细胞			
CDw109				
CD110				
CD111				
CD112				
CD113				
CD114	髓系细胞			G-CSF 受体
CD115	单核细胞/巨噬细胞			M-CSF 受体
CD116	髓系细胞前体			GM-CSF 受体
CD117	TN 胸腺细胞, 造血祖细胞	Ig-SF	145~150 kD	细胞增殖的信息传递, 调节细胞粘附
CD118				SCF-R
CDw119				IFN α 受体
CD120a			55 kD	TNF 受体
CD120b			75 kD	TNF 受体
CDw121a	胸腺细胞, T 细胞, 纤维母细胞, 内皮细胞	Ig-SF	80 kD	与 IL-2, IL-4 协同激活 T 细胞, IL-1 受体 1
CDw121b				IL-1 受体
CD122	活化的 T 细胞	CKR-SF	α (CD25)55 kD β (CD122)70 kD γ_c 64 kD	T 细胞生长, IL-2 受体, β 链增加 NK 细胞溶解活性, 增加 B 细胞合成 Ig
CDw123				IL-3 受体 α
CD124 (IL-4R)	T, B 细胞造血细胞前体, 上皮, 内皮细胞, T 淋巴瘤细胞	CKR-SF	140 kD γ_c 64 kD	诱导及促进 T 细胞生长, 激活 CTL 发育, gp140
CD125				IL-5 受体 α
CD126	活化 T, B 细胞	CKR-SF	80 kD(CD126 α 链)	IL-6 受体
CDw130	单核细胞, 上皮细胞, 非淋巴细胞, 肝细胞, 纤维母细胞	Ig-SF	130 kD (CDw130)	
CD127/ γ_c	未成熟的胸腺细胞, 有些淋巴细胞, 前 B 细胞, T 细胞, 单核细胞	CKR-SF	75 kD	诱导单核细胞活化, 促进未成熟 B 细胞及成熟的 T 细胞的增殖, IL-7 受体, 信息传递

CD	来源	家族	结构	功能
CD128				IL-8 受体
CD129 (IL-9R)	T, B 细胞 巨噬细胞	CKR-SF	64 kD	对 T 细胞及肿瘤有促进 抑制胸腺肿瘤的凋亡
CD130				IL-6 受体, gp130, 信息传递
CD131				β 细胞因子
CD132				γ 细胞因子
CD133				
CD134			50 kD	活化 T 细胞粘附到 血管内皮细胞
OX40				FLt3, Flk2
CD135				巨噬细胞激活蛋白受体 (MSP-R)
CDw136				4-1BB
CD137				
CD138	B 细胞			多聚体蛋白聚糖-1 (syndecan-1)
CD139	B 细胞			
CD140a	内皮细胞			血小板-衍生生长因子受体 (PDGFR α)
CD140b	内皮细胞			血小板-衍生生长因子受体 (PDGFR β)
CD141	内皮细胞			凝血调节蛋白(thrombo- modulin)
CD142	内皮细胞			组织因子(tissue factor)
CD143	内皮细胞			血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme)
CD144	内皮细胞			VE-钙粘着蛋白(VE-cadherin)
CDw145	内皮细胞			
CD146	内皮细胞			MUC18, S-endo neurothelin,
CD147	内皮细胞			basign
CD148	非系列特异性			p260 磷酸酶
CDw149	非系列特异性			MEM-133
CDw150	非系列特异性		SLAM, IPO-3	
CD151	血小板		PETA-3	
CD152	T 细胞			CTLA-4
CD153	T 细胞			CD30 的配基
CD154	T 细胞			CD40 的配基
CD155	髓系细胞			小儿麻痹病毒受体
CD156	髓系细胞			ADAM8
CD157	髓系细胞			BST-1, MO-5
CD158b	NK 细胞			MHC I 型 特异 NK 受体 (MHC-class-I specific NK receptor)
CD159				
CD160				
CD161	NK 细胞			NKRP-1
CD162	粘附分子			PSGL-1
CD163	髓系细胞			M130
CD164	粘附分子			MGC-24
CD165	粘附分子			Gp37/AD2
CD166	粘附分子			ALCAM ¹

注释:CD, Human leukocyte differentiation antigens;

* , Adhesion molecules;

APCs, Antigen presenting cells;

CTL, Cytotoxic T lymphocyte;

CCP-SCR, Complement control protein short consensus repeat;

DP, CD4, CD8 double positive;

ECM, Extracellular matrix;

ESL-1, E selectin ligand 1;

GPI, Glycosyl-phosphatidylinositol;

HEV, High endothelial venule;

ICAM, Intercellular adhesion molecule;

IEL, Intraepithelial lymphocyte;

IFN, Interferon;

LFA, Lymphocyte function associated antigen;

MAdCAM-1, Mucosal addressin cell adhesion molecule 1;

MHC, Major histocompatibility complex;

NCAM, Neural cell adhesion molecule;

PBL, Peripheral blood lymphocyte;

PBMC, Peripheral blood mononuclear cell;

PECAM-1, Platelet-endothelial cell adhesion molecule;

TCR, T-cell receptor;

TN, CD3, CD4, CD8 triple negative;

VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule 1;

VLA, Very late antigen.

CKR-SF, Cytokine receptor superfamily;

Ig-SF, Immunoglobulin superfamily;

MHC, Major histocompatibility complex;

NGF-SF, Nerve growth factor superfamily;

NGFR-SF, Nerve growth factor receptor superfamily;

SRCR-SF, Scavenger receptor cysteine-rich superfamily;

TM4-SF, Transmembrane 4 superfamily.

表 15-6 一些不属 CD 的重要的粘附分子

粘附分子在细胞-细胞;细胞-基质之间起粘附作用,这些粘附分子是属 CD,上表已列出,有些粘附分子,现尚未属 CD,也很重要。

名称	来源	家族	结构	功能
MAdCAM-1	肠固有层的小静脉		66kD, I型跨膜蛋白	通过 $\alpha_4\beta_7, \alpha_4\beta_1$ 介导白细胞粘附到内皮细胞
$\alpha_4\beta_2$	粒细胞, 泡沫细胞	β_2 整联蛋白	230 kD	参与巨噬细胞特异的吞噬作用, 通过 ICAM-1 识别 ICAM-3
$\alpha_5\beta_1$	分层的上皮细胞的基底层	β_4 整联蛋白	150 kD	在层粘联蛋白上迁移
$\alpha_4\beta_1$	外周血的淋巴细胞	β_7 整联蛋白	130 kD	LPAM-1, 介导淋巴系归巢到粘膜淋巴组织
$\alpha_E\beta_1$	上皮内的 T 细胞	β_7 整联蛋白	270 kD	HML-1, 通过钙粘着蛋白粘附淋巴细胞到上皮细胞
E-粘着蛋白 (E-cadherin)	上皮细胞	粘着蛋白	80 kD	Ca^{2+} -依赖同型细胞的相嗜作用
ESL-1			150 kD	E-选择素配基, 介导髓细胞到 E-选择素

名称	来源	家族	结构	功能
PSGL-1		类粘蛋白	240 kD	P-选择素配基,介导髓系细胞和白细胞到P-选择素
GlyCAM-1	上皮细胞	类粘蛋白	50 kD	L-选择素与L-选择素阳性的白细胞结合
层粘联蛋白 (laminin)	基底膜	层粘联蛋白	140~400 kD, α, β, γ 三聚体	参与基底膜形成网状,整合骨髓细胞结构起重要作用
纤联蛋白 (fibronectin)	可溶性的存于血液,不溶者存于结缔组织的细胞外基质	纤联蛋白	250 / 235 kD	与氨基葡糖多糖,纤维,肝素及细胞表面整合蛋白结合,介导粘附
OX40	活化的 T 细胞	NGFR-SF	50 kD, 1 型跨膜蛋白	通过 gp34 将活化的 T 细胞粘附到血管内皮细胞
涎糖粘附素		Ig-SF	185 kD	含NAc的涎糖蛋白,促细胞-细胞之间接触

(潘华珍)

参 考 文 献

- 方 圻. 现代内科学. 第三篇免疫学基础与内科疾病. 人民军医出版社, 1995
- 咎云红. 白细胞介素 2 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1996, 18(2): 76~78
- 孔宪寿. 细胞粘附分子. 国外医学分子生物学分册, 1994, 16(1): 1~5
- 苏琴. 人白细胞介素 8 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17(1): 1~3
- 唐建武. 白介素 2 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17(1): 12~16
- 王振义, 阮长耿. 血栓与止血基础理论与临床. 上海科技出版社, 1996
- 王宜强. IL-13 的基础和临床研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17(1): 3~8
- 须田年生. 细胞因子与造血系统. 麒麟医药有限公司出版, 1997
- 张亮林. 白介素 13 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17(1): 8~12
- 张津辉. IL-9 及其受体的分子生物学. 国外医学分子生物学分册, 1996, 18(6): 244~247
- 周俐梅. 白介素 17 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1997, 19(3): 116~118
- Chambers JAA and Richwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
- Immunology Today, Supplement, 1996, Oct.

16. 蛋白质电泳

蛋白质分子在溶液中由于其末端氨基、末端羧基及侧链的游离基团而成为带电颗粒，并可在电场内移动，其移动方向取决于蛋白质分子所带的净电荷。不同蛋白质分子根据其氨基酸组成及所在溶液的 pH 值，携带的净电荷量不尽相同，致使它们在电场中的迁移率各异。1937 年 Tiselius 据此发明了移动界面电泳仪，使电泳技术作为蛋白质分析的手段而问世。随后，特别是 70 年代以来，电泳技术得到迅猛发展，成为当前蛋白质分子生物学研究不容置疑的重要方法之一。

电泳依其支持物种类可分为纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、琼脂糖电泳、淀粉胶电泳以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等。后者对蛋白质分析除电荷作用外，又具分子筛作用，从而显著提高了分辨力，因此在蛋白质分离鉴定研究中备受青睐。本节主要介绍聚丙烯酰胺凝胶电泳（简称 PAGE）、等电聚焦电泳（简称 IEF）和双相电泳（2D-PAGE）。

16.1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

16.1.1. 原理

聚丙烯酰胺凝胶是由丙烯酰胺（称单体）和甲撑双丙烯酰胺（称交联剂）在催化剂作用下，通过自由基引发聚合反应，形成不带电荷、且具有分子筛性质的网状结构凝胶。凝胶的物理性质如：筛孔大小、机械强度、透明度等，很大程度上取决于两个参数，即凝胶浓度及交联度。随着此两个参数的改变，可获得对欲检测分子分离、分辨的最适孔径。

凝胶浓度以 %T 表示，

$$\%T = [(\text{丙烯酰胺 } g + \text{甲撑双丙烯酰胺 } g) / \text{总体积}] \times 100$$

交联度以 %C 表示

$$\%C = [\text{甲撑双丙烯酰胺 } g / (\text{丙烯酰胺 } g + \text{甲撑双丙烯酰胺 } g)] \times 100$$

电泳时，使用两种浓度的凝胶（成层胶和分离胶），并依据电化学中的弱电介质调节函数理论，采用不连续缓冲体系。在成层胶，由于蛋白质分子的迁移率比 Cl^- 低，比 gly 高，泳动过程中蛋白质分子夹在引导离子（ Cl^- ）和后随离子（gly）之间，并逐渐浓缩为一薄层；进入分离胶后，pH 升高，gly 有效迁移率增加而越过蛋白质分子，蛋白质分子便在随后均一的缓冲系统下分离。

通常聚丙烯酰胺凝胶电泳包括 native PAGE 和 SDS-PAGE 两种，后者系在凝胶与缓冲系统中加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS），蛋白质分子被大量 SDS 阴离子包裹，消除了它们间原来携带的电荷差别，因而其电泳迁移率仅反映蛋白质分子大小，故广泛用于蛋白质分子量的测定。

16.1.2. 凝胶浓度的选择

根据欲分离样品的分子量范围，可选择不同的凝胶浓度和种类。当分离样品的分子量

范围不宽时,可选择单一百分度,因为在一般情况下,单一百分度可使分子量接近的任意两条带之间获得最大的分离度,特别是胶的下1/2部分。如若分离样品的分子量范围宽,则用线性梯度可同时获得不同分子量区带的最佳分辨效果(表16-1)。

表 16-1 凝胶浓度与蛋白质分离范围

凝胶种类	分离胶浓度 (% T)	成层胶浓度 (% T)	交联度 (% C)	最适分离范围 (kD)	应用
Tris-glycine gels	7.5	4	2.6	65~200	SDS-PAGE
	10	4	2.6	21~200	PAGE
	12	4	2.6	14~100	
	15	4	2.6	6.5~200	
	4~15	—	2.6	40~200	
	4~20	—	2.6	6.5~200	
	10~20	4	2.6	6.5~100	
Tris-tricine gels	16.5	4	3.3	2.0~70	肽,小蛋白质
	16	10	3	3.5~31	肽,小蛋白质
	10~20	4	3.3	2.0~120	肽,小蛋白质

16.1.3. 凝胶的配置

分离胶(separating gel)与成层胶(stacking gel)的配置见表16-2、16-3。

表 16-2 不同浓度分离胶的制备

组分	8%	10%	12%	15%	20%
缓冲液,4×*	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
蒸馏水	5.4ml	4.9ml	4.4ml	3.65ml	2.4ml
丙烯酰胺溶液,40%**	2.0ml	2.5ml	3.0ml	3.75ml	5.0ml
过硫酸胺,10%	50.0μl	50.0μl	50.0μl	50.0μl	50.0μl
TEMED	5.0μl	5.0μl	5.0μl	5.0μl	5.0μl

* 1.5mol/L Tris-HCl, pH8.8, 0.4%SDS。

** 38.9g 丙烯酰胺,1.1g 甲撑双丙烯酰胺/100ml 水。

表 16-3 成层胶的制备

组分	体积
缓冲液,4×*	2.5ml
蒸馏水	6.6ml
丙烯酰胺溶液,40%	0.8ml
过硫酸胺,10%	100μl
TEMED	10μl

* 0.5mol/L Tris-HCl, pH6.8,
0.4%SDS,

表 16-4 肽类分离时各部分凝胶的制备

组 分	分离胶	样品胶	成层胶
丙烯酰胺溶液,48%(w/v)*	5.0ml	1.25ml	1.0ml
缓冲液**	5.0ml	2.0ml	3.1ml
蒸馏水	2.5ml	2.75ml	8.4ml
甘油,80%	2.5ml	—	—
过硫酸胺,10%	75.0μl	30.0μl	100.0μl
TEMED	7.5μl	3.0μl	10.0μl

* 48.02g 丙烯酰胺,1.48g 甲撑双丙烯酰胺/100ml(32:1)。

** 3mol/L Tris-base, pH8.45, 0.3%SDS。

对于小分子肽类的分析,选用 16~16.5% 的分离胶,10% 的成层胶及样品胶(spacer gel)。样品胶是指从齿孔顶至齿底空间所灌注的凝胶,配置见表 16-4。

16.1.4. 缓冲液的选择

通常在 SDS-PAGE 均选择 Tris-glycine 作为电泳的缓冲系统,80 年代末推出 Tris-tricine 系统,为肽和小分子蛋白质的分离提供了满意的分辨效果。在大部分缓冲系统中,SDS 微团会干扰小分子蛋白质的分离,而 Tris-tricine 系统则可使小蛋白质-SDS 复合物与微团(micelle)分离,去除干扰。此外,也已证明该系统还对脂多糖和脂寡糖混合物的分离有效。

电泳缓冲液及样品缓冲液的组成见表 16-5~16-7。

表 16-5 电泳缓冲液的组成

种类	Tris	glycine	Tricine	SDS
Tris-glycine-SDS	25mmol/L	192mmol/L		0.1%
Tris-glycine	25mmol/L	192mmol/L		
Tris-tricine-SDS				
阳极, pH8.9	200mmol/L			
阴极, pH8.25	100mmol/L		100mmol/L	0.1%

表 16-6 样品缓冲液的组成

种类	tris-HCl pH6.8	SDS	甘油	溴酚蓝
SDS-PAGE 样品缓冲液	62.5mmol/L	2%	25%	0.01%
PAGE 样品缓冲液	62.5mmol/L		40%	0.01%

表 16-7 Tricine 胶的样品缓冲液的配制, 2X

组 成	用 量
3mol/L Tris-HCl, pH 8.45	3ml
甘油	2.4ml
SDS	0.8g
0.1% 考马斯亮蓝 G	1.5ml
0.1% 酚红	0.5ml

以上各项混合后加水至 10ml,室温保存。用前加入 DTT,使终浓度为 0.3mol/L(0.046g/ml 缓冲液)。

16.1.5. 上样体积

由于聚丙烯酰胺凝胶电泳是使被分离蛋白质层压缩后再行分离,因此只要分析样品量达到检测灵敏度,对其浓度要求则不高。上样体积仅与凝胶制备时所用梳子的厚度、齿宽及齿深有关,详见表 16-8。

表 16-8 齿深 25mm 时, 上样体积与齿宽、齿厚的关系

齿 宽	齿 厚 (μl)				
	0.5mm	0.75mm	1.0mm	1.5mm	3.0mm
3.5mm	—	60	80	120	—
5.0mm	54	82	110	164	328
6.5mm	74	110	147	221	442
10.0mm	114	172	229	343	687
23.0mm	—	—	522	783	1570
40.0mm	—	2440	3260	4880	9760

16.1.6. 分子量标准

SDS-PAGE 中通常选用的分子量标准参见表 16-9。

表 16-9 标准蛋白质的分子量

名 称	来 源	分子量(D)	一般应用
肌球蛋白(myosin)	兔骨骼肌	200 000	高分子量标准
β-半乳糖苷酶 (β-galactosidase)	大肠杆菌	116 250	高分子量标准
磷酸化酶 B (phosphorylase B)	兔肌肉	97 400	高、低分子量标准
血清清蛋白 serum albumin	牛	66 200	高、低分子量标准
卵清蛋白(ovalbumin)	鸡蛋清	45 000	高、低分子量标准
碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)	牛	31 000	低分子量标准
磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase)	兔	26 625	肽分子量标准
胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor)	大豆	21 500	低分子量标准
肌红蛋白(myoglobin)	马	16 950	肽分子量标准
α-乳清蛋白 (α-lactalbumin)	牛	14 437	肽分子量标准
溶菌酶(lysozyme)	鸡蛋清	14 400	低分子量标准
牛胰蛋白酶抑制剂 (aprotinin)	牛脾	6 500	肽分子量标准
氧化的胰岛素 b 链 insulin, b chain, oxidized	牛	3 496	肽分子量标准
杆菌肽(bacitracin)		1 423	肽分子量标准

16.1.7. 凝胶染色

随着新染料的开拓及技术的不断改进,凝胶染色的灵敏度有极大的提高,从最初的氨基黑到现今的银染几近提高了千倍。80年代后期发展的铜染和锌染更以其快速,可逆固定,脱色后可继续进行免疫印迹、氨基酸组成分析或末端序列测定等受到人们关注。橙染则因其荧光显色,配合目前发展的 imagine system,将获得最高灵敏度。各类染料的检测范围及特点列于表 16-10。

表 16-10 凝胶染料的种类及特点

名 称	灵敏度	特 点
氨基黑 10B (amino black 10B)	1~10 μ g/band	适于一般凝胶染色,也适用尿素胶和硝酸纤维素膜
考马斯亮蓝 R-250 (coomassie brilliant blue R-250)	0.1~1 μ g/band	一般染色,简单,快速,牢固
银染 (silver stain)	2~10ng/band	高度敏感
铜染 (cooper stain)	20~100ng/band	简单,快速(5分钟染色),可逆,回收后可继续其他测定,只适用 SDS-PAGE,凝胶背景呈暗蓝绿色
锌染 (zinc stain)	10~100ng/band	简单,快速,可逆,回收后可继续其他测定,只适用 SDS-PAGE
橙染 (sypro orange)	1~10ng/band	高度敏感的荧光显色,回收后可继续其他测定

16.1.8. 印迹技术

印迹技术(western blot)是 SDS-PAGE 的进一步发展,将凝胶中经电泳已分离的蛋白质区带转移至固相膜上,再行免疫测定或其他用途,使蛋白质分析与功能检测结合起来。

1. 固相膜的选择 参见表 16-11。

2. 转移印迹缓冲液种类

(1) 25mmol/L Tris, 192mmol/L glycine, 20%(v/v) methanol, pH8.3, 也可含有 0.05~0.1%(w/v)SDS。

(2) 48mmol/L Tris, 39mmol/L glycine, 20%(v/v) methanol, pH9.2, 也可含有 0.0375%(w/v)SDS。

(3) 10mmol/L NaHCO₃, 3mmol/L NaCO₃, 20%(v/v) methanol, pH9.9。

(4) 0.7%(v/v) acetic acid。

表 16-11 常用固相膜的种类和特点

种 类	结合力 ($\mu\text{G}/\text{cm}^2$)	规 格	特 点
玻璃纤维 (glass fiber)	10~20		适用于蛋白质的氨基酸分析,蛋白质从 SDS-PAGE 胶转移后,可直接于膜上酸水解
硝酸纤维素 (nitrocellulose, NC)	80~100	0.45 μm 0.2 μm	适用于大部分蛋白质 适用小于 15 000 的低分子量蛋白质,在免疫检测中提供较高灵敏度
supported nitro-cellulose	80~100	0.45 μm 0.2 μm	强度好,可多次使用,可消毒
尼龙(nylon)	~480		适于多肽自 SDS-PAGE 行电转移,带正电荷的 Zeta-Probe 适用于从 SDS-PAGE 上电洗脱。主要缺点无简易的染色方法
polyvinylidene difluoride(PVDF)	170~200	0.2 μm	灵敏,除用于一般免疫印迹外,还可进行蛋白质顺序测定

3. 封闭物的选择 在印迹技术中,为避免因探针与固相膜的非特异结合而导致的高背景,通常于加入探针前,先对膜行封闭。常用的封闭物见表 16-12。

4. 蛋白质的检测

(1) 全蛋白染色 将转至膜上的蛋白质进行全部显示的常用方法是采用阴离子染料,如:氨基黑、胶体金和生物素印迹等,各种染料的优缺点见表 16-13。

表 16-12 印迹技术的常用封闭物

封闭物	浓度 (% w/v)
牛血清清蛋白[bovine serum albumin (BSA)]	0.5~10
酪蛋白(casein)	1~2
乙醇胺(ethanolamine)	10
胎牛血清[fetal calf serum (FCS)]	10
明胶(gelatin)	0.25~3
牛奶 milk	5
新生牛血清[newborn calf serum (NCS)]	5
卵清蛋白(ovalbumin)	1~5
聚乙烯吡咯酮(polyvinyl pyrrolidone)	2
特威恩(tween 20)	0.05~0.5

表 16-13 印迹膜上的蛋白质染色

染色方法	灵敏度	优点	缺点
氨基黑 (amido black 10B)	100~1000ng	价廉,快速	灵敏度低,使硝酸纤维素膜皱缩,背景高
考马斯亮蓝 (coomassie blue R-250)			
印度墨水 india ink	100ng		
生物素化+辣根过氧化物酶偶联的抗生物素蛋白 (biotinylation+HRP-avidin)	30~50ng	灵敏,适用尼龙膜	测定结果随时间褪色
胶体铁 (colloidal iron)	30ng	灵敏,适用尼龙膜	
胶体金 (colloidal gold)	1~4ng	极灵敏,快速,适当放大可增加灵敏度	尼龙膜有高背景

表 16-14 偶联酶的种类及特点

偶联酶	检出量	酶偶联物	酶底物	优点	缺点
辣根过氧化物酶	500pg	羊抗鼠 IgG 羊抗兔 IgG 羊抗人 IgG 蛋白 A 蛋白 G	4CN 或 DAB	价格不高	易褪色; 叠氮化物可抑制酶活性; 内源性过氧化物酶有非特异染色
碱性磷酸酶	100pg	羊抗鼠 IgG 羊抗兔 IgG 羊抗人 IgG	BCIP 和 NBT	敏感;结果保存稳定;可用于多种抗原检测	内源性磷酸酶有非特异染色;比辣根过氧化物酶贵
碱性磷酸酶	10pg	羊抗鼠 IgG 羊抗兔 IgG 羊抗人 IgG	化学发光底物	光时间短;可多次曝光;易定量	需X光片或 image system
扩增的碱性磷酸酶	5pg	羊抗兔 IgG-生物素-抗体 生物素-生物素	BCIP 和 NBT	最敏感;保存稳定	内源性磷酸酶有非特异染色;步骤复杂
放大的胶体金	100pg (未放大)10pg (放大)	羊抗鼠 IgG 羊抗兔 IgG 羊抗人 IgG 蛋白 A 蛋白 G	无需显色试剂	敏感;保存稳定;一步检测,不受内源酶影响	比辣根过氧化物酶贵

(2) 特异蛋白质检测 依据被检蛋白质的不同特性,可以采用不同的检测手段。如

抗原,可通过免疫方法,含糖蛋白作糖特异鉴定等。

① 抗原测定。被检蛋白若是一种抗原,可将印迹膜封闭后,首先与被检蛋白的抗体(第一抗体)反应,再与酶联的抗兔或鼠 IgG 的抗体(第二抗体)作用,然后通过酶与相应底物的特殊反应,显示出被检蛋白带。与第二抗体偶联的酶及其底物种类颇多,选择依据见表 16-14。

② 糖蛋白检测。被检蛋白为糖蛋白,可采用一快速灵敏的方法进行测定。样品首先以高碘酸氧化,使末端单糖产生自由醛基,随后插入生物素标记(以上步骤可在电泳前的蛋白质溶液中进行,也可在转膜后完成),标记蛋白再与抗生物素偶联碱性磷酸酶反应,与底物作用后显色。

16.1.9. 问题及解决方法

对操作过程中可能遇到的一些现象及其出现的原因和解决办法列表于下,供参考。

表 16-15 疑点指南

现象	原因	纠正
1. 凝胶聚合太快或太慢,甚至不凝	试剂浓度不对;漏加某项试剂;试剂不纯;过硫酸胺母液不新鲜	用纯试剂重新配置母液;检查并改变聚合催化剂浓度
2. 聚合时凝胶碎裂	聚合时有过量热产生	试剂预冷
3. 电泳时凝胶从玻板脱开	玻板清洗不当	用强清洁剂彻底清洁玻板
4. 样品不能在加样孔底成层	样品缓冲液中无蔗糖或甘油;梳齿与玻板不严密,致使凝胶在两者间聚合	重新配置样品缓冲液;更换样品梳;用针头除去加样孔中过多的胶
5. 样品内有不溶物	样品缓冲液离子强度足够高,则是变性蛋白所引起	离心除去不溶物
6. 含 SDS 缓冲液中出现沉淀	SDS、还原剂、pH 太低	调整所提诸项因素;另加入适量尿素
7. 沿玻板有条纹状蛋白质	随电泳时蛋白质沉淀物的溶解再现的蛋白质沉淀	离心除去沉淀物
8. 在整块凝胶中包括非加样部位,均见蛋白染色带	样品缓冲液或电泳缓冲液不洁;加样过量	配置新鲜缓冲液;降低上样量
9. 染色高背景	SDS 不纯	使用纯度高的 SDS
10. 蛋白质带谱不重复	样品制备问题;蛋白质水解	低温下制备样品;加入蛋白水解酶抑制剂;SDS-PAGE 样品加热至少 90℃ 2 分钟
11. 区带扭曲	有不溶物质;凝胶中有气泡;胶孔大小不均;凝胶内温度不均	凝胶充分混匀,抽气并过滤;电泳时置冷却装置内或降低电流
12. 区带随带宽染色密度改变	凝胶表面不平,使样品在电泳前就堆积在低处	小心在平稳的台面铺胶

续表 16-15

现 象	原 因	纠 正
13. 样品起始处凝胶染色深	蛋白质不能进入分离胶;在电泳前蛋白质聚合;使用非变性的不连续缓冲系统,高浓度蛋白质在成层胶电泳时形成沉淀	离心除去聚合蛋白质;较低浓度样品在连续缓冲系统下电泳
14. 样品有颗粒,胶上呈条纹状	增溶剂与样品之比太低	加大抽提液与样品的比例
15. SDS-PAGE 后染色浅;脱色后染色带丢失		增加染色液体积,释出 SDS;增长染色时间;使用好的固定液
16. 银染的高背景	acrylamide 和 bis 中污染 acrylic acid	采用高质量的试剂及无离子水
17. 转移后蛋白质在胶内滞留	蛋白质可能有沉淀	在转移缓冲液中加入 SDS (<0.01%)
18. 转移后,胶和膜中均无蛋白质	蛋白质丢失	转移时,保证电极方向正确
19. 转移后膜上蛋白质染色弱,膜的正反面染色相当	蛋白质转移出膜;蛋白质量太少;膜的结合力低	检查样品中蛋白质浓度;减少转移缓冲液中的去污剂;检查转移缓冲液的 pH 和是否存在甲醇
20. NC 膜上蛋白质的染色强度低	蛋白质上样不足;蛋白质转移出膜	测定蛋白质浓度;参考 19 项
21. 膜上蛋白质带模糊	电泳系统不当;凝胶与膜间有气泡	检查电泳系统;除去气泡

16.2. 等电聚焦

16.2.1. 原理

蛋白质作为一种两性电解质,在不同 pH 溶液下,所带净电荷不同。当其净电荷为零时的 pH 值即为该蛋白质的等电点 pI。蛋白质在具有 pH 梯度的电场中,如所处 $pH < pI$ 时,向负极移动;反之则向正极移动。随着泳动,蛋白质的净电荷逐渐减小,直至为零,此时 $pH = pI$,蛋白质不再移动而被聚焦。因此,等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)就是利用具有不同等电点的蛋白质在线形 pH 梯度下泳动,并聚焦于与其 pI 值相同的 pH 位置,达到蛋白质混合物分离的方法。

形成 pH 梯度的两性电解质最常用的是 Ampholine,为一种多羧基多氨基脂肪族化合物,分子量大约 300~1000,在直流电场下,形成从正极到负极的连续 pH 梯度,分辨率

可达 0.01 pH。为了克服小分子 Ampholine 在电泳系统中容易移动,使 pH 梯度不够稳定的缺点,随后又发展了一种新的凝胶 IEF 固相系统(Immobiline system),Immobiline 是由 7 种丙烯酰胺衍生物组成,可与丙烯酰胺和甲撑双丙烯酰胺共同聚合,使 pH 梯度稳定固定于凝胶中,故也称为固相 pH 梯度。此系统分辨率较 Ampholine 高,达 0.001 pH 单位,但由于其聚焦时间长,使用尚不广泛。

16.2.2. pH 梯度

电泳后凝胶 pH 梯度的测定有两种方法:一为凝胶测定法,常用的是按 pH 梯度方向将凝胶以 0.5cm 为单位,切成小块,分别浸泡于煮沸的蒸馏水中过夜,再测定浸出液 pH 值并作图。此外,也可用微电极直接测定凝胶 pH 值,精确但需特殊设备。二为标准蛋白质 pI 值测定法,目前已有商品供应,使测定方便快捷。常用的蛋白质 pI 标准见表 16-16。

表 16-16 蛋白质的 pI 标准

蛋白质	pI
藻蓝蛋白(三条带)(phycocyanin)	4.45, 4.65, 4.75
β -乳球蛋白 B (β -lactoglobulin B)	5.10
牛碳酸酐酶(bovine carbonic anhydrase)	6.00
人碳酸酐酶(human carbonic anhydrase)	6.50
马肌红蛋白(两条带)(equine myoglobin)	7.00
人血红蛋白(human hemoglobin A)	7.10
人血红蛋白(human hemoglobin C)	7.50
扁豆外源凝集素(三条带)(lentil lectin)	7.8, 8.0, 8.2
细胞色素 C(cytochrome C)	9.6

16.2.3. 染色

在等电聚焦电泳中,蛋白质染色及检测方法见表 16-17。

表 16-17 等电聚焦电泳的染色与检测

方法	应用
alcian blue	糖蛋白
放射自显影(autoradiography)	同位素标记蛋白
印迹(blotting)	抗原
考马斯亮蓝 G(coomassie blue G-250)	一般蛋白
考马斯亮蓝/尿素/过氯酸(coomassie blue G-250/urea/perchloric acid)	去污剂增溶蛋白
考马斯亮蓝 R/硫酸铜(coomassie blue R-250/CuSO ₄)	一般蛋白
考马斯亮蓝/磺基水杨酸(coomassie blue R-250/sulfosalicylic acid)	去污剂增溶蛋白
铜染(copper stain)	一般蛋白
固绿(fast green FCF)	一般蛋白
荧光谱法(fluorography)	同位素标记蛋白
原位免疫沉淀(immunoprecipitation in situ)	抗原
过碘酸(periodic acid-Schiff, PAS)	糖蛋白
免疫固定(print-immunofixation)	抗原
银染(silver stain)	一般蛋白
苏丹黑(Sudan black)	脂蛋白
酶谱(zymograms)	酶

16.2.4. 制备等电聚焦

在常规使用 Ampholine 聚焦的基础上, Bio-Rad 公司为制备电泳系统 Rotofor cell 推出一种无 Ampholine 的制备电聚焦缓冲液 (rotolyte buffer), 其显著优点是缓冲液与蛋白质不发生相互作用; 分离后的蛋白质容易与低分子量的缓冲液介质分开; 缓冲液介质不具抗原性和生物功能, 因而不干扰蛋白质抗原决定簇的测定; 缓冲液本身由 13 套缓冲试剂组成, 每一套试剂内两种组分之间比例的改变可产生略有变化的 pH 梯度。表 16-18 介绍电聚焦缓冲液组分与 pH 间的关系。

表 16-18 电聚焦缓冲液组分与 pH 间的关系

Rotolyte ranges	(A) acidic compound (B) basic compound	pH gradient (80%A) : (20%B)	pH gradient (50%A) : (50%B)	pH gradient (20%A) : (80%B)
2.9~4.1	(A)propionic acid (B)DL-serine	2.9~3.7	3.2~3.9	3.4~4.1
3.9~5.6	(A)MES (B)GLY-GLY	3.9~4.7	4.5~5.0	4.8~5.6
4.5~6.1	(A)MOPSO (B) β -alanine	4.5~5.7	5.2~5.7	5.4~6.1
4.9~6.2	(A)MOPS (B)-amino-n-butyric acid	4.9~5.6	5.4~6.0	5.8~6.2
5.1~6.8	(A)TAPS (B) ϵ -amino-n-caproic acid	5.5~6.3	5.7~6.4	6.2~6.8
6.0~7.2	(A)HEPPS (B)creatinine	6.0~6.5	6.4~7.0	6.6~7.2
6.4~7.5	(A)CAPSO (B) ϵ -amino-n-caproic acid	6.4~7.1	6.7~7.2	7.2~7.5
6.9~8.2	(A)AMPSO (B) β -picoline	6.9~7.6	7.4~7.9	7.8~8.2
7.2~8.3	(A)AMPSO (B)Bis-Tris	7.2~8.1	7.8~8.6	8.3~9.0

isoelectric ranges	(A) acidic compound (B) basic compound	pH gradient (80%A) : (20%B)	pH gradient (50%A) : (50%B)	pH gradient (20%A) : (80%B)
7.8~8.9	(A) hydroxyproline (B) Bis-Tris	7.8~8.4	8.3~8.7	8.5~8.9
8.5~9.5	(A) ε-amino-n- caproic acid (B) Bis-Tris	8.5~9.0	8.8~9.3	9.0~9.5
9.2~10.4	(A) ε-amino-n- caproic acid (B) triethanolamine	9.2~9.8	9.6~10.1	9.8~10.4
9.5~11.0	(A) ε-amino-n- caproic acid (B) TrisBase	9.5~10.1	9.6~10.6	9.9~11.0

16.3. 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DGE)通常第一向采用等电聚焦分离,第二向为 SDS-PAGE 分离。由于 2-DGE 是依据蛋白质的两种不同性质,即电荷与分子量进行分析,因此分辨率远高于其它任何一种单一的电泳方法,是目前分析混合蛋白质样品最有效的手段。

双向凝胶电泳条件见表 16-19。

表 16-19a 第一相电泳条件

凝胶液	28.38%acrylamide-1.62%BIS 1.33ml;ultrapure urea 5.5g; 10%NP-40 2ml; 40%ampholines(pH5.0~7.0)0.4ml;40%Ampholines (pH3.5~10.0)0.1ml;water 1.95ml;10%(w/v)APS 10μl;TEMED 10μl
样品缓冲液	9.5mol/L urea;5% 2-mercaptoethanol;2% NP-40;1.6% Ampholines (pH5.0~7.0);0.4% Am- pholines(pH3.5~10.0)
电极液	阳极 10mmol/L. H ₃ PO ₄ ;阴极 20mmol/L. NaOH
平衡缓冲液	2.5%(w/v)SDS;5mmol/L DTT;125mmol/L Tris-HCl pH6.8; 10%(w/v)glycerol;0.05% bromophenol blue

表 16-19b 第二相电泳条件

原液	成层胶 ml	分离胶 ml	
		稀溶液	浓溶液
凝胶液 29.2% acrylamide, 0.8% bis	0.75	5.3	4.3
0.5mol/L Tris-HCl pH6.8, 0.4% (w/v) SDS	1.25	—	—
1.5mol/L Tris-HCl pH8.8, 0.4% (w/v) SDS	—	4.0	2.0
75% glycerol	—	—	1.7
Water	3.0	6.7	—
10% (w/v) APS	0.015	0.25	0.010
TEMED	0.005	0.008	0.004
电泳液 25mmol/L Tris, 0.192mol/L glycine, 0.1% (w/v) SDS			
封口胶 0.1% (w/v) agarose in 0.125mol/L Tris-HCl pH6.8			

双向凝胶电泳的检测方法除一般选用银染外,更多采用较常规染色法灵敏的荧光和放射自显影技术。由于双向凝胶电泳兼有两种分离手段,故所用蛋白质标准也异于其他电泳,参见表 16-20。

表 16-20 双向凝胶电泳的蛋白质标准

蛋白质	种属	等电点 (pI)	亚基数	亚基分子量 (kD)
乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase)	电鳗	4.5	4	70.1
腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (adenine phosphoribosyltransferase)	人	4.8	3	11.0
腺苷酸激酶(adenylate kinase)	大鼠	7.5	3	23.0
凝集素(agglutinin)	小麦	—	2	17.0
乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	酵母	5.4	4	35.0
醛缩酶(aldolase)	酵母	5.2	2	40.0
碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)	小牛	4.4	2	69.0
精氨酸酶(arginase)	人	9.2	4	30.0
牛血清蛋白(bovine serum albumin)	牛	4.7	1	68.0
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	牛	5.9, 6.0		31.0
	欧芹	—	6	28.7
过氧化氢酶(catalase)	母牛	5.4	4	57.5
N-脂酰鞘氨醇三己糖苷酶 (ceramide trihexosidase)	人	3.0	4	22.0

续表 16-20

蛋白质	种 属	等电点 (pI)	亚基数	亚基分子量 (kD)
糜蛋白酶原(chymotrypsinogen)	牛	9.2	1	25.7
脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I)	母牛	4.8	1	31.0
脱氧核糖核酸酶 II (deoxyribonuclease II)	猪	10.2	1	38.0
卵清伴清蛋白 (egg white conalbumin)	母鸡	6.0, 6.3, 6.6		76.0
烯醇化酶(enolase)	兔	8.8	2	42.0
延胡索酸酶(fumarase)	猪	—	4	48.5
半乳糖苷激酶(galactokinase)	人	5.7	2	27.0
β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)	大肠杆菌	—	4	130.0
β -葡糖苷酸酶 (β -glucuronidase)	大鼠	6.0	4	75.0
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	兔	8.5	2	72.0
甘油-3-磷酸脱氢酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)	兔	6.4	2	34.0
糖原合成酶(glycogen synthase)	猪	4.8	4	92.0
血红蛋白(hemoglobin)	兔	7.0	4	16.0
己糖激酶(hexokinase)	酵母	5.3	2	51.0
乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase)	猪	—	4	36.0
β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin)	牛	5.3	2	17.5
脂氧化酶(lipoxygenase)	大豆	5.7	2	54.0
赖氨酸脱羧酶 (lysine decarboxylase)	大肠杆菌	4.6	10	80.0
溶菌酶(lysozyme)	鸡	10.7	1	14.3
苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)	猪	5.1	2	35.0
微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)	金黄色葡萄球菌	9.6	1	16.8
肌动蛋白(muscle actin)	牛	5.0, 5.1		43.0

续表 16-20

蛋白质	种 属	等电点 (pI)	亚基数	亚基分子量 (kD)
肌肉 GAPDH (muscle GAPDH)	兔	8.3, 8.5		36.0
肌红蛋白(myoglobin)	马	6.8	1	16.9
肌球蛋白重链(myosin heavy chain)	兔	—	2	212.0
黑芥子硫苷酸酶(myrosinase)	油菜子	5.0	2	65.0
神经生长因子(nerve growth factor)	小鼠	9.3	2	13.3
胃蛋白酶原(pepsinogen)	猪	3.7	1	41.0
磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate carboxylase)	大肠杆菌	5.0	4	99.6
	菠菜	4.9	2	130.0
磷酸甘油变位酶 (phosphoglycerate mutase)	猪	9.3	2	33.0
磷酸化酶 α (phosphorylase α)	兔	5.8	4	92.5
丙酮酸激酶(pyruvate kinase)	兔	6.6	4	57.2
核糖核酸酶(ribonuclease)	牛	7.8	1	13.7
甲状腺球蛋白(thyroglobulin)	猪	4.5	—	330.0
磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase)	兔	6.8	2	26.5
胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor)	大豆	4.5		21.5
胰蛋白酶原(trypsinogen)	母牛	9.3	1	24.5
微管蛋白(tubulin)	猪	5.5	1	56.0
脲酶(urease)	刀豆	4.9	2	240.0
尿酸酶(uricase)	猪	6.3	4	32.0

90年代初期发展的毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)为生物分子的分离分析提供了更精细和快捷的手段。由熔融石英加工制得的毛细管中充填一定的缓冲液,在两端高电压下进行电泳。被分析物的迁移力主要受缓冲液条件、电渗及分子本身的泳动力等要素决定。毛细管电泳分离的分子范围极广,包括多肽、蛋白质、核酸、寡核苷酸及小分子物质。毛细管电泳依其分离方法又可分为多种:毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管凝胶电泳(CGE)、微团电动毛细管色谱(MECC)及毛细管等速电泳(CITP)。由于毛细管电泳的进行依赖于特定的仪器装置,因此对其有关操作细节就不在此赘述。

(缪时英)

参 考 文 献

- 王琳芳,潘华珍主编. 分子生物学基本技术. 北京生理科学会,1991
- BIO-RAD. Life Science Research Products,1997
- Fernandez-Paton C, Castellanos-Serra Lila and Rodriguez P. Reverse Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels by Imidazole-zinc Salts, Sensitive Detection of Unmodified Proteins. *Bio Techniques*, 1992, 12(4),564
- Lee C, Levin A and Branton D. Copper Staining, A Five-minute Protein Stain for Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 1987,166,308
- Promega Protocols and Applications Guide. Third edition, Promega Corporation, 1996
- Price N C. Proteins LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996
- Schagger H and von Jagow G. Tricine-Sodium Decyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100kD. *Analytical Biochemistry*, 1987,166,368

17. 蛋白水解酶

蛋白质分子很大,欲研究其结构功能,必须先将其蛋白水解成为数个多肽,再对每个多肽进行分析。蛋白水解酶是研究蛋白质结构功能最好的工具。蛋白水解酶种类很多,它们的最适作用条件及特异性见表 17-1 到 17-5。

表 17-1 酶纯度测定方法

方 法	需 要 量	注 释
比活性测定*	根据不同的酶而异	检测酶最重要的指标,比活性必须达到恒定值。
电泳(非变性)	ng~μg	必须作不同 pH 下的电泳,因为在一个 pH 下,两个蛋白可能只出现一条带。
SDS 电泳	ng~μg	如杂质与样品的亚基分子量不同,这是最好的检测方法。如样品本身亚基的分子量即不同,需考虑其他方法。
等电点聚胶/层析聚胶	ng~μg	检测杂质最好的方法。等电点的 pH 只差 0.01 即可检出。如出现问题可能来自两性电解质。
毛细管电泳	ng~pg	快速,样品用量少(只用 nl 或 pg),所需时间短(1~30 分钟)
层析(HPLC/FPLC/常规)		
凝胶过滤	μg	分子筛
离子交换	μg	离子
亲和层析	μg	特异结合
超速离心		
速度	μg	杂质含量少,不易测出(<5%)
平衡	μg	结合-解离系统之间可能出问题
质谱分光光度法	ng~μg	可准确到 0.01%。如杂质与样品质量(mass)很接近,可准确到 0.1%。可测出蛋白水解片段及蛋白衍生物。快速(15~30 分钟)
氨基酸分析		用于比较从 DNA 顺序推测的,及已纯化的酶之间的氨基酸组成。如 N 端封闭不能测。
N 端分析		可知 N 端的数(即多肽链的数)
N 端顺序		可知 N 端顺序
活性部位滴定	不定	可测出同源制备中含有不活化型的酶

*注:FPLC, Fast protein liquid chromatography 快速蛋白质液相层析。

HPLC: High performance liquid chromatography 高效液相层析。

* 指每毫克蛋白质所含的酶单位称比活性。由于酶的真实分子量及质量都不易求得,所以酶测定结果多以酶活性单位表示。使不同萃取液中的相对酶含量,可以相互比较。酶活性单位的最佳表示方法是:每分钟消耗或合成多少 μmol(10⁻⁶mol), nmol(10⁻⁹mol), pmol(10⁻¹²mol)的反应物或产物。国际酶单位表示则为 μU, nU, pU。

摘自 Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1996。

蛋白水解酶也同一般的蛋白质一样,其纯度要求达>95%。更重要的是它的活性,所以在使用酶之前必须鉴定其纯度及活性。检测纯度的方法见表 17-1。

表 17-2 氨基肽酶(N 端特异的酶)

名称	来源	分子量(kD)	特异的作用	最适 pH	抑制剂
氨基肽酶 M (aminopeptidase M)	猪肾	80	二肽或三肽的 N-末端	7.2	抑氨肽酶肽(amastatin) 丙酮 乙醇
组织蛋白酶 B (cathepsin B)			被 Lys, Arg, 或 Pro 阻断		e-氨基己酸 抑蛋白酶肽(leupeptin) 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin) 抗蛋白酶(antipain)
组织蛋白酶 C (cathepsin C)	牛脾	210	二肽的 N-末端	5.0	碘乙酸 甲醛 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin)
组织蛋白酶 H (cathepsin H)					
亮氨酸氨肽酶 (leucine aminopeptidase)	猪肾	300	N-末端残基	9.2	抑氨肽酶肽(amastatin) 苯丁抑制素(bestatin) 氯甲基酮(chloromethyl ketones) t-丁基-苏氨酸-苯丙氨酸- 脯氨酸 (t-butyl-thr-phe-pro)
焦谷氨肽酶 (pyroglutamate aminopeptidase)	牛肝		N-末端焦谷氨酸	8.0	5-氧脯氨焦谷氨酸重氮甲 基酮 (5-oxoprolinal pyroglu- tamyl diazomethyl ketone)

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

表 17-3 羧肽酶

名称	来源	分子量(kD)	特异性	最适 pH	抑制剂
羧肽酶 A (carboxy peptidase A)	牛胰	34.5	芳香族及脂肪族 氨基酸羧基	8.0	马铃薯羧肽酶抑制剂 (potato CPI) 大黄酸(rhein) 苯丙氨酸磷酸脂 (phenylalanine phosphonates) 苯甲基苹果酸盐 (benyl malate) talopeptin Zn 的螯合剂
羧肽酶 B (carboxy peptidase B)	猪胰	34.3	Arg, Lys, Orn	8.0	arphamenine histargin
羧肽酶 P (carboxy peptidase P)	盘尼西林 霉菌		任何 C 末端	3.7	
羧肽酶 Y	酵母菌	61	芳香族及脂肪 族氨基酸羧基		P-羟苯甲酸汞 (P-hydroxy mercuribenzoat) 酵母羧肽酶抑制剂

注: Arg, 精氨酸; Lys, 赖氨酸; Orn, 鸟氨酸。

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993.

表 17-4 特异与非特异蛋白水解酶

名称	来源	分子量	特异性	最适 pH	抑制剂
碱性蛋白水解酶 (alkaline protease)	链霉菌 (<i>Streptomyces griseus</i>)			8.0	卵粘蛋白(ovomuroid)
分散酶(dispace)	芽胞杆菌 (<i>Bacillus polymyza</i>)	35.9	任何蛋白	8.5	无
胃蛋白酶(pepsin)	猪胃	35.0	Phe-X, Met-X, Leu-X, Try-X X 疏水氨基酸	1.0	胃蛋白酶抑制剂 (pepstatin)
纤溶酶(plasmin)	牛及人血浆	85.0	Arg-X, Lys-X	8.9	α_1 -球蛋白 α_2 -球蛋白 巨球蛋白 蚕豆胰蛋白酶抑制剂
蛋白水解酶 K (protease K)	<i>tritirachium album</i>	18.5	任何蛋白	8.0	卵粘蛋白 (ovomuroid) 氯甲基酮 (chloromethyl ketones)

续表 17-4

名称	来源	分子量	特异性	最适 pH	抑制剂
链霉菌蛋白酶 (pronase)	链霉菌 (<i>Streptomyces griseus</i>)		任何蛋白	7.0	胰蛋白酶抑制剂
枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)	芽胞杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	27.6	任何蛋白	8.0	二异丙酸磷酸胍化酯 α_2 -球蛋白 苯甲酸磺酸胍

摘自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

表 17-5 内切水解酶

名称	来源	分子量(kD)	最适 pH	特异性	抑制剂
红口蝮蛇毒酶 (ancrod)	蝮蛇 (<i>Agkistrodon</i>)		7.5	Arg-X Arg-Gly	胍基肉桂酸盐 (guanidino cinnamates) 胍基苯丙酸盐 (guanidinophenyl propionates)
菠萝蛋白酶 (bromelain)	菠萝 (pineapple)	33	8.2	Lys-X, Ala-X Tyr-X	estatin A, B α_1 -抗胰蛋白酶 α_2 -巨球蛋白
α -胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)	牛胰	25	8.0	Tyr-X, Phe-X, Try-X, Leu-X, Met-X, Ala	苯甲酸磺酰胍 (PMSF) α_1 -抗胰蛋白酶 α_2 -巨球蛋白
梭菌蛋白酶 (clostripain)	梭菌 (<i>Clostridium histolyticum</i>)	50	7.2	Arg-X	胰蛋白酶抑制剂 EDTA, Cd^{2+} , Co^{2+} α_2 -巨球蛋白
胶原酶 (collagenase)	无色杆菌 (<i>Achromobacter iophagus</i>) 梭菌 (<i>Clostridium histolyticum</i>) 水蛭 (leech)	105	7.2	Pro-X-Gly-Pro 胶原	EDTA, 半胱氨酸 组氨酸

续表 17-5

名称	来源	分子量(kD)	最适 pH	特异性	抑制剂
分散酶 (dispase)	芽胞杆菌 (<i>Bacillus polymyxa</i>)	35.9			EDTA
弹性蛋白酶 (elastase)	肌肉	25	8.5	多肽	α_1 -抗胰蛋白酶 α_2 -巨球蛋白
因子 Xa	牛或人血浆	55(牛)	8.3	多肽	抗凝血酶 III
无花果蛋白酶 (ficin)	无花果	24	6.5	蛋白质及多肽	N-乙酰马来酰亚胺 N-氯乙酰胺 碘代醋酸 α_2 -巨球蛋白
激肽释放酶 (kallikrein)	猪胰		7.5	Arg-X, Phe-Arg-X	牛胰蛋白酶抑制剂 (aprotinin)
木瓜酶	木瓜		6.5	与 Arg, His, Glu, Lys, Gly, tyr 结合的键	抑酶醛肽 (leupeptin) 凝乳蛋白酶抑制剂 (chymostatin) 胱蛋白酶抑制剂 (cystatin)
耐热菌蛋白酶 (thermolysin)	杆菌 (<i>Bacillus thermo preteolyticus</i>)	38.0	8.0	X-leu, X-phe 及其他非极性基	EDTA HgCl ₂ AgNO ₃
凝血酶 (thrombin)	牛血浆		8.6	Arg-X	抗凝血酶 (antithrombin)
胰蛋白酶	牛胰		8.0	Arg-X	胰蛋白酶 (trypsin) 抑蛋白酶肽 PMSF
V8 蛋白水解酶 (V8 protease)	金黄色酿脓 葡萄球菌 (<i>Staphy- coccus aureus</i>)		4.0, 7.8	Glu-X, Asp-X	3,4-二氯异香豆素 (3,4-dichloro- isocoumarin)

表 17-6 蛋白水解酶抑制剂

抑 制 剂	分子量(kD)	作 用 物
抑氨肽酶肽 (amastatin)	474.3	氨肽酶 A, M (aminopeptidase A, M) 亮氨酸氨肽酶
ε-氨基己酸 (ε-amino caproic acid) anticin	131.1	组织蛋白酶 B, C 纤溶酶 无花果蛋白酶 木瓜酶 菠萝蛋白酶
抗蛋白酶	604.3	木瓜蛋白酶, 胰蛋白酶
抗凝血酶 III		凝血酶
α ₁ -抗胰蛋白酶		链霉蛋白酶
广谱蚕豆胰蛋白酶抑制剂		蛋白水解酶 K, 菠萝蛋白酶
APMSF	216.1	丝氨酸水解酶
牛胰蛋白酶抑制剂 (aprotinin)		胰蛋白酶, 激肽释放酶 (Kallikrein)
arphamenines A	320.2	氨肽酶 B, 羧肽酶 A, 羧肽酶 B
arphamenines B	336.2	
苄脒 (benzamidine) 及其衍生物	120.1	纤溶酶, 凝血酶, 因子 Xa, 胰蛋白酶, 血管紧张素 II-形成丝氨酸蛋白水解酶 (angiotensin II-forming serine protease)
苯基苹果酸	224.9	羧肽酶 A
苯丁抑制素	308.2	亮氨酸氨肽酶
蚕豆胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor)		胰蛋白酶
t-丁基苏氨酸苯丙氨酸脯氨酸 (t-butylthreoyl-phenylalanyl proline)	419.3	亮氨酸氨肽酶
钙蛋白酶抑制剂 (calpastatin)		钙蛋白酶
N-α-苄氧羰基重氮酮 (N-α-carbobenzoxy diazoketone)	287.1	焦谷氨酸氨肽酶 (pyroglutamate aminopeptidase)
胰凝乳蛋白酶抑制剂 (chymostatin)		胰凝乳蛋白酶, 木瓜蛋白酶
半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cystatin)		巯基蛋白酶 (thiol proteases)

续表 17-6

抑 制 剂	分子量(kD)	作 用 物
3,4-二氯香豆素	215.0	丝氨酸蛋白水解酶 乙酰胆碱酯酶 激肽释放酶 因子 Xa 因子 XIa 因子 XIIa 肥大细胞中性蛋白水解酶 纤溶酶 补体因子 D 凝血酶 胰蛋白酶 芽胞菌素
E64	357.2	木瓜酶, 组织蛋白酶 B
水蛭蛋白酶抑制剂(eglin)		胰糜蛋白酶 弹性蛋白酶 组织蛋白酶 G
elafin		弹性蛋白酶, 蛋白水解酶 3
estatin A	391.2	菠萝蛋白酶
estatin B	407.2	菠萝蛋白酶
FMP1	401.2	羧肽酶 A 金属蛋白酶 (<i>aspergillus oryzae</i> metalloprotease) 血管紧张素转换酶 (angiotensin-converting enzyme)
gabexate mesilate	417.3	蛇毒蛋白酶 胰酶
肝素		因子 Xa
histargin	355.2	羧肽酶 B
α -羟汞苯甲酸	360.6	硫化蛋白水解酶
碘代醋酸	185.9	硫化蛋白水解酶
亮异蛋白酶肽		组织蛋白酶 B, C, 梭菌蛋白酶
α_2 -巨球蛋白		胰蛋白酶

续表 17-6

抑 制 剂	分子量(kD)	作 用 物
2-汞甲基-3-胍乙基硫丙酸盐	237.2	羧肽酶 N, 血管紧张素转换酶
MK-1	543.3	耐热菌蛋白酶, 弹性蛋白酶
OM-189	448.3	纤溶酶, 凝血酶, 因子 Xa, 胰蛋白酶, 蛋白酶
粘蛋白		胰蛋白酶, 蛋白酶
PCMB		硫化蛋白酶, 组织蛋白酶 A, B, C, D
胃酶抑制剂		胃蛋白酶, 酸性蛋白水解酶 天冬蛋白水解酶, 酵母蛋白酶, 组织蛋白酶 D
苯基丙氨酸磷酸盐	392.1, 391.1, 408.2	羧肽酶 A
膦酰二肽(phosphoramidon)	543.2	耐热菌蛋白酶二肽, 羧基肽酶
纤溶酶原活化剂的抑制剂		丝氨酸水解酶, 纤溶蛋白酶原活化剂
α_2 -纤溶酶抑制剂		因子 Xa, 因子 XII, 凝血酶, 因子 XIa
PMSF	174.1	丝氨酸水解酶, 胰糜蛋白酶, 胰酶
rhein	284.1	胃酶 A, 胰酶, 弹性蛋白酶, 羧肽酶
serpin		丝氨酸蛋白酶
SSI		芽胞菌素
stefin. A, B		半胱氨酸水解酶
端肽素(talopeptin)		耐热菌素, 金属蛋白水解酶
thiostatin		半胱氨酸水解酶
TIMP		弹性蛋白酶, 胶原蛋白酶, 半胱氨酸水解酶
TK-23		芽胞菌素
TLCK		胰蛋白酶
TPCK		胰糜蛋白酶
胰蛋白酶抑制剂		胰蛋白酶, 梭菌蛋白酶, 纤溶酶

注: APMSF, amidino-phenylmethyl fluoride;
 FMP, N₂-(N-phosphono-L-phenylalanyl)-L-arginine;
 PCMB, p-chloromercuribenzoate;
 PMSF, phenyl methylsulfonyl fluoride;
 SSI, Streptomyces subtilisin inhibitor;
 TLCK, Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone;
 TIMP, tissue inhibitor of metalloproteases;
 TPCK, N-tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone.

表 17-7 几种有关合成与代谢酶的抑制剂

抑 制 剂	所抑制的酶
3-苯丙基胺盐酸盐(3-phenylpropargylamine HCl)	多巴胺-β羟化酶(dopamine-β-hydroxylase)
2,4-二氨基-6-羟吡啶(2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine)	GTP 环水解酶(GTP cyclohydrolase 1)
锌原卟啉 IX (zinc protoporphyrin IX)	血红素加氧酶(heme oxygenase)
羟胺 HCl (hydroxylamine HCl)	单胺氧化酶(monoamine-oxidase)
喹因 HCl (quinacrine HCl)	单胺氧化酶(monoamine-oxidase)
氨基脲 HCl (semicarbazide HCl)	单胺氧化酶(monoamine-oxidase)
血根碱 (sanguinarine chloride)	Mg ²⁺ , Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
蜂毒素 (melittin)	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
哇巴因 (ouabain)	Na ⁺ /K ⁺ ATPase
氨基胍半硫酸盐 (aminoguanidine hemisulfate)	氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)
7-硝基吡唑 (7-nitroindazole)	氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)
1,3-二丙基 7-甲基黄嘌呤 (1,3-dipropyl-7-methylxanthine)	磷酸二酯酶(phosphodiesterase)
罂粟碱 (papaverine HCl)	磷酸二酯酶(phosphodiesterase)
manoalide	磷脂酶 C, A ₂ (phospholipase c, A ₂)
indomethacin	前列腺素环氧酶(PG cyclooxygenase)
苯甲酰胺 (benzamide)	多聚 (ADP-核糖) 合成酶 [poly (ADP-ribose) synthetase]
白屈菜赤碱 HCl (chelerythrine chloride)	蛋白激酶 C (protein kinase C)
星型孢菌素 (staurosporine)	蛋白激酶 C (protein kinase C)
H-7	蛋白激酶 C, A (protein kinase C, A)
H-8	蛋白激酶 (cGMP>PKA>PKC)
花萼海绵诱癌素 (calyculin A)	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
微囊藻素 LR (microcystin LR)	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
结瘤素 (nodularin)	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
冈田酸 (okadaic acid)	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
冈田酸钠盐	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
冈田酸铵盐	蛋白磷酸酶 (protein phosphatase)
3'-叠氮-脱氧胸腺核苷 (3'-azido-3'-deoxythymidine)	反转录酶 (reverse transcriptase)
p-aminoglutethimide (±)	固醇合成酶 (steroid synthase)
α-甲基-p-酪氨酸 DL (α-methyl-p-tyrosine, DL)	酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase)
α-甲基-p-酪氨酸 L (α-methyl-p-tyrosine, L)	酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase)
5,7,4'-三羟异黄酮 (genistein)	酪氨酸激酶 (tyrosine kinase)
除莠霉素 A (herbimycin A)	酪氨酸激酶 (tyrosine kinase)
熏草菌素 A (Lavendustin A)	酪氨酸激酶 (tyrosine kinase)
别嘌呤醇 (allopurinol)	黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase)
EHNA	腺嘌呤核苷脱氨酶 (adenosine deaminase)

抑 制 剂	所抑制的酶
碘化杀结核菌素 (iodotubercidin)	腺嘌呤激酶 (adenosine kinase)
水合氯醛 (chloral hydrate)	醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase)
7,4,-二羟基异黄酮 (daidzein)	醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase)
p-bromotetramisole, S(-)	碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)
captopril	血管紧张素-转换酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE)
calmidazolium chloride	钙调蛋白/磷酸二酯酶 (Calmodulin/phospho-diesterase)
钙蛋白酶抑制肽 (Calpain inhibitor peptide)	钙蛋白酶 (calpain)
乙酰唑胺 (acetazolamide)	碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)
氯噻唑 (chlorothiazide)	碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)
physostigmine	胆碱酯酶 (cholinesterase)
furafylline	细胞色素 P450 IA2
ketoconazole	细胞色素 P450 c17
sulfaphenazole	细胞色素 P450 2C
二酰甘油激酶抑制剂 I	二酰甘油激酶
(diacylglycerol kinase inhibitor I)	(diacylglycerol kinase)
二酰甘油激酶抑制剂 II	二酰甘油激酶
(diacylglycerol kinase inhibitor II)	(diacylglycerol kinase)
胺喋呤 (aminopterin)	二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase)
三甲氧苄二氮嘧啶 (trimethoprim)	二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase)
镰孢菌酸 (fusaric acid)	多巴胺-β-羟化酶 (dopamine-β-hydroxylase)

(潘华珍)

参 考 文 献

- Engel P C. Enzymology LABFAX. Bios Scientific Publishers, Academic Press, 1996
 Guisnen Liu, Jam J P. Peptides Biology and Biochemistry. Escom, 1994
 Peptide Institute, Inc, Enzymes Inhibitors. vol 21. 株式会社ペプチド研究所, 大阪, 1997~1998
 Proteases, Substrates and Inhibitors, Boehringer Mannheim Company Catalog, German, 1995

18. 几种重要蛋白质的特性

18.1. 糖蛋白

18.1.1. 糖蛋白结构的特点

糖蛋白(glycoprotein)是寡糖链以共价键与多肽链结合的蛋白。广泛存在于生物体中,从低等的病毒、细菌到人都有天然糖蛋白的分布,见表 18-1。分两种:一是 O-联结的糖蛋白;另一种是 N-联结的糖蛋白。联结的方式见表 18-2。

表 18-1 天然糖蛋白的糖链联结形式

名 称	糖链连接形式	寡糖链数目	分子量 (kD)	所在部位
病毒及微生物				
流感病毒				
血细胞凝集素 (HA1)	N-	6	36	病毒外套
新培思病毒(Sindbis virus)				
E1-糖蛋白	N-	2	50	病毒外套
HIV-1 病毒:				
gp-120	N-	24	120	病毒外套
哈落细菌(Halobacteria)				
细胞表面	O-Gal-Thr	15	120	膜表面
糖蛋白	N-Glc-Asn	10		
	N-GalNAc-Asn	1		
锥虫(Trypanosomal)				
变种表面糖蛋白	N-	2~3	60	细胞外套
利氏曼虫				
Zn-蛋白水解酶	N-	2	63	细胞表面外酶
动物				
N-CAM	N-	6	130~160	神经膜
HLA II 型链	N-	2	34	质膜
EGF 受体	N-	12	170	质膜
胰岛素受体β亚基	N-	4	95	质膜
转铁蛋白	N-	3	90	质膜

名 称	糖链连接形式	寡糖链数目	分子量 (kD)	所在部位
转铁蛋白受体亚基	O-	1	160	质膜
红细胞膜带3蛋白	N-	1	90~100	膜蛋白,阴离子通道
葡萄糖转运蛋白(GLUT 1)	N-	1	55	红细胞六碳糖运转
视紫质	N-	2	40	哺乳动物红细胞膜
钠离子通道-亚基	N-	2	36	质膜
胰岛素受体- α 亚基	N-	11	130	质膜,蛋白激酶活性
Thy-1受体	N-	3	23	胸腺细胞质膜
磷脂酰肌醇糖蛋白(glypican)	PG-HS	3~4		纤维母细胞 上皮细胞
NCAM	N-	6	120	神经细胞

注: Asn (L-asparagine), 天冬酰胺; EGF (epidermal growth factor), 表皮生长因子; Gal (D-galactose), 半乳糖; GalNAc (N-acetyl-galactosamine, N-乙酰半乳糖胺; Glc (D-glucose), 葡萄糖; HIV (human immunodeficiency virus), 人免疫缺陷病毒; LDL (low-density lipoprotein), 低密度脂蛋白; N-CAM (neural cell adhesion molecule), 神经细胞粘附分子; PG-HS (proteoglycan-heparan sulfate), 蛋白聚糖肝素硫酸。

表 18-2 糖蛋白的联结方式

氨基酸	与蛋白联结的单糖	联结方式	结 构	蛋 白
天冬酰胺	N-acetyl-D-glucosamine	N-	GlcNAc α 1-Asn	N-糖蛋白
L-丝氨酸	N-acetyl-D-galactosamine	O-	GalNAc α 1-Ser	O-糖蛋白
L-苏氨酸	N-acetyl-D-galactosamine	O-	GalNAc α 1-Thr/Ser	O-糖蛋白
L-丝氨酸	N-acetyl-D-glucosamine	O-	GlcNAc α 1-Ser	O-乙酰氨基葡萄糖蛋白
L-丝氨酸	N-xylose	O	Xyl β 1-Ser	蛋白聚糖
羟基-1-赖氨酸	D-galactose	O-	Gal β 1-Hyl	胶原蛋白

注: xylose, 木糖; GalNAc, 乙酰氨基半乳糖; GlcNAc, 乙酰氨基葡萄糖; Hyl, 羟基赖氨酸。

O-联接糖蛋白: 以多肽链中的丝氨酸或苏氨酸的羟基与寡糖链结合, 一般在多肽链中的丝氨酸(苏氨酸)顺序是 Asn-Y-Ser(Thr), Y 是任何一个氨基酸。结合的糖多是 N-

乙酰胺基半乳糖(GalNAc)。另外在胶原蛋白中找到一种以赖氨酸的羟基与半乳糖结合的 O-联接糖蛋白。O-联接糖蛋白种类繁多,通常有共同的核心寡糖,结构见表 18-3。

表 18-3 O-联接寡糖的核心结构

核心型	核心结构	核心型	核心结构
1	Gal β 1-3GalNAc-O-Ser(Thr)	4	GlcNAc β 1-6(GlcNAc 1-3)GalNAc-O-Ser(Thr)
2	GlcNAc β 1-6(Gal 1-3)GalNAc-O-Ser(Thr)	5	GalNAc α 1-3GalNAc-O-Ser(Thr)
3	GlcNAc β 1-3GalNAc-O-Ser(Thr)	6	GlcNAc β 1-6GalNAc-O-Ser(Thr)

N-联接糖蛋白;以多肽链中的天冬酰胺与 N-乙酰葡萄糖(GlcAc)结合。N-联接的糖蛋白有三种:复合体型(complex),杂化型(hybrid),高甘露糖型(high mannose)。这三种都有一个共同的五糖核心结构(见图 18-1)。

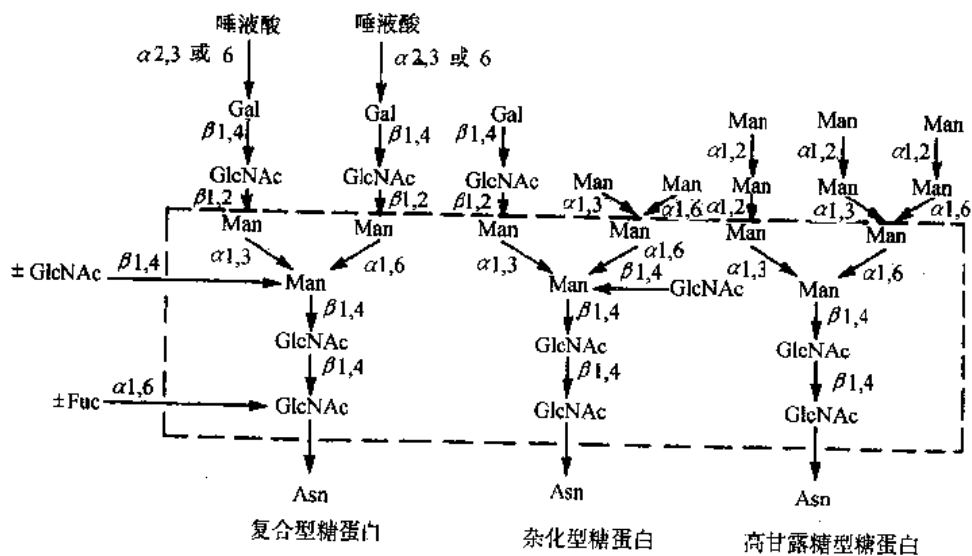


图 18-1 与天冬酰胺连接的寡糖,其主要类型的构造
框中是所有 N-联接糖蛋白所共有的五糖。

糖蛋白多存在于细胞膜表面,细胞的许多功能都与糖蛋白的糖链末端糖基有密切关系,如抗原性,细胞与细胞之间的识别等,不论是 O-还是 N-联接糖蛋白都有同样的问题。各种不同功能的糖蛋白其糖链末端结构不同,参见表 18-4。糖链结构比较复杂,它是由许多单糖组成,糖有 α 及 β 型,单糖与单糖的联接方式又有不同(1,2、1,4、1,6 联接),所以糖蛋白的种类很多,即使糖的组成一样,结构还有许多异构体,每个异构体的功能不同,一般糖蛋白的联接方式见表 18-5。

表 18-4 糖蛋白末端寡糖的结构

寡糖结构		糖蛋白
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -3GalNAc α 2-6 Neu5Ac		O-联结糖蛋白
Neu5Ac α 2-3 / 6Gal β 1-4NAc β 1-		N-联结糖蛋白
Neu5Ac α 2-8(Neu5Ac α 2-8)n-	(多唾液酸寡糖)	胚胎人 N-CAM
SO ₃ -GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-	(硫酸 N-联结寡糖)	人促黄体激素(lutropin)
GalNAc α 1-3Gal β 1-3Glc β 1- α 1-2 Fuc		N-及 O-联结糖蛋白
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1- α 1-2 Fuc	(血型 A-1 型链)	N-及 O-联结糖蛋白
Gal β 1-4GlcNAc β 1- α 1-2 Fuc	(血型 B-2 型链)	N-及 O-联结糖蛋白
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1- α 1-3 Fuc	(血型 H-2 型链)	中性粒细胞及单核细胞膜糖蛋白
GalNAc β 1-4GlcUA β 1- 4-O-SO ₃ ⁻	(血型 Sialyl-Lewis X)	GalNAc-4-O-SO ₃ 作为合成硫酸软骨素的末端结构

注: Fuc (fucose) 岩藻糖; GalNAc (N-acetyl-d-galactosamine), 乙酰氨基半乳糖; GlcNAc (N-acetyl-d-glucosamine), 乙酰氨基葡萄糖; GlcUA (d-glucouronic acid), 葡萄糖醛酸; Man (d-mannose), 甘露糖; N-CAM (neural cell adhesion molecule), 神经细胞粘附分子; Neu5Ac (N-acetylneuraminic acid), 乙酰神经氨酸。

表 18-5 糖蛋白寡糖链的单糖与单糖端基异构联结方式

单糖	端基异构 联结方式	联结的位置	单糖	端基异构 联结方式	联结的位置
D-木糖	β	2	D-葡萄糖醛酸	β	3,4
L-岩藻糖	α	2,3,4,6	L-艾杜糖醛酸	α	3,4
D-半乳糖	α	3	N-乙酰-D-氨基葡萄糖	β	2,3,4,6
	β	3,4,6	N-乙酰-D-氨基半乳糖	α	3
D-甘露糖	α	2,3,6		β	4
	β	4	N-乙酰神经氨酸	α	3,6,8

18.1.2. 糖蛋白的分离纯化

糖蛋白的结构特点是它位于细胞表面,糖链的非还原端残基可被外源凝集素(lectin)所识别。外源凝集素可与糖蛋白的末端糖残基结合。利用此性质可用于糖蛋白的分离纯化和鉴定。常用的外源凝集素及其特异性见表 18-6。

表 18-6 常用外源凝集素的糖特异性

来源	特异性	分子量(kD)	亚单位数
植物			
蓖麻(<i>Ricinus communis</i>)	D-半乳糖	120	4
野豌豆(<i>Vicia sepim</i>)	β -D-半乳糖	100	
花生(<i>Arachis hypogaea</i>)	β -D-半乳糖	98	4
菜豆(<i>Phaseolus vulgaris</i>)	N-乙酰半乳糖胺	126	4
刀豆(<i>Jagybeans gladiata</i>)	α -D-葡萄糖, α -D-甘露糖	25	4
豌豆(<i>Pisum sativum</i>)	D-甘露糖	154	2
扁豆(<i>Dolichos lablab</i>)	N-乙酰半乳糖胺	124	2
大豆(<i>Glycine max</i>)	α -或 β -D-N-乙酰半乳糖胺, 半乳糖	120	4
草蓼(<i>Vicia cracca</i>)	甲基- α -D-N-乙酰半乳糖胺	100	4
兵豆(<i>Lens culinaris</i>)	β -D-N-乙酰半乳糖胺, α -葡萄糖	52	4
金雀花(<i>Cystisus scoparius</i>)	β -D-N-乙酰半乳糖胺		
小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	N-乙酰葡萄糖胺	360	2
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	N-乙酰葡萄糖胺	120	2
百脉根(<i>Lotus tetragonobus</i>)	L-岩藻糖	A-120 B-590 C-120	4 2 4
荆豆(<i>Ulex europaus</i>)	α -L 岩藻糖 纤维二糖	60 110	2
相思子树(<i>Abrus precatorius</i>)	半乳糖	134	4
绿豆(<i>Phaseolus aureus</i>)	半乳糖	160	4
香草豌豆(<i>Lathyrus sativus</i>)	葡萄糖, 甘露糖	43	2
曼陀罗(<i>Datura stramonium</i>)	几丁基水解物	120	
刺槐(<i>Robinia pseudacacia</i>)	N-乙酰半乳糖胺	100	4
米糠(<i>Rice bran</i>)	N-乙酰葡萄糖胺	37	2

续表 18-6

来源	特异性	分子量(kD)	亚单位数
微生物			
粗糙链孢霉 (<i>Neurospora crassa</i>)	N-乙酰半乳糖胺	39	
粉酶菌 (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	N-乙酰半乳糖胺	1100	4
大肠杆菌 (<i>E. coli</i>)	甘露糖	(36) _n	4
无脊椎动物			
蜗牛 (<i>Helix pomatia</i>)	α -N-乙酰半乳糖胺	79	6
蜗牛 (<i>Helix hortensis</i>)	α -N-乙酰半乳糖胺, 唾液酸		
鲎 (<i>Limulus polyphemus</i>)	α -N-乙酰神经氨酸	335	18
脊椎动物			
红鲟 (<i>Salmo irideus</i>)	α -D-半乳糖, L-鼠李糖		
鲑 (<i>Salmo salar</i>)	α -D-半乳糖, L-鼠李糖		
白鲑 (<i>Coregonus lavaretus maraemua</i>)	甲基-鼠李糖	25	
鲤 (<i>Cyprinus carpio</i>)	D-葡萄糖		
美洲鳗 (<i>Anguilla rostrata</i>)	半乳糖	123	
电鳗 (<i>Electrophorus electricus</i>)	半乳糖	33	

摘自吴东儒主编. 糖类的生物化学. 高等教育出版社, 1986.

18.2. 蛋白聚糖

蛋白聚糖 (proteoglycan) 是由蛋白质和糖胺聚糖 (glycosaminoglycan) 通过共价键联结而成的蛋白。糖胺聚糖有 7 种: 6-硫酸软骨素; 4-硫酸软骨素; 硫酸皮肤素; 肝素; 硫酸乙酰肝素; 透明质酸及硫酸角质素。蛋白聚糖是细胞外间隙中的主要组成成分, 在软骨、角膜、髓核、皮肤和血管壁含量最丰富。

18.2.1. 蛋白聚糖的结构特点

蛋白聚糖的糖链是由一个不分支的长的糖链组成。与糖蛋白不同, 每一个糖链都是由重复的双糖单元组成, 重复单位结构见表 18-7。双糖中的糖, 一个是 D-葡萄糖胺或半乳糖胺, 另一个大多是 L-葡萄糖醛酸 (L-Glucuronic acid) 或 L-艾杜糖醛酸 (L-iduronic acid) [硫酸角质素 (keratan sulfate) 除外]。蛋白聚糖所含的醛糖大多有硫酸基 (透明质醛酸除外), 一般是 O-酯类 (O-ester) 或硫酸基 (N-sulfate)。蛋白聚糖的多糖与多肽链结合方式大约可分三型, 其结构见表 18-8。

- (1) 木糖 (xylose) 和丝氨酸之间的 O-糖苷键,
- (2) N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 与丝氨酸之间的 O-糖苷键,
- (3) N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺之间的 N-糖胺键 (N-glycosylamine bond)

表 18-7 糖胺聚糖的二糖重复单位

糖胺聚糖	分子量($\times 10^3$)	二糖重复结构	硫酸化
透明质酸 (hyaluronic acid)	4000~8000	$\rightarrow 3\beta \text{GlcNAc}1 \rightarrow 4\beta \text{GlcUA}1 \rightarrow$	
硫酸软骨素 (chondroitin sulfate)	5~50	$\rightarrow 3\beta \text{GalNAc}1 \rightarrow 4\beta \text{GlcUA}1 \rightarrow$ ↓ 4 or 6-O-SO ₃ ⁻	O-硫酸
硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate)	50	$\rightarrow 4\alpha \text{IDuA}1 \rightarrow 4\alpha \text{GlcN}1 \rightarrow$ ↓ 6-O-SO ₃ ⁻	N-硫酸
		$\rightarrow 4\beta \text{GlcUA}1 \rightarrow 4\alpha \text{GlcN}1 \rightarrow$ ↓ 6-O-SO ₃ ⁻	N-硫酸
肝素 (heparin)	4~16	$\rightarrow 4\alpha \text{IDUA}1 \rightarrow 4\alpha \text{GlcNAc}1 \rightarrow$ ↓ 2-O-SO ₃ ⁻	O-硫酸
		$\rightarrow 4\beta \text{GlcUA}1 \rightarrow 4\alpha \text{GlcN}1 \rightarrow$ ↓ 6-O-SO ₃ ⁻	O-硫酸
硫酸皮肤素 (dermatan sulfate)	15~40	$\rightarrow 3\beta \text{GalNAc}1 \rightarrow 4\alpha \text{IDuA}1 \rightarrow$ ↓ 4 or 6-O-SO ₃ ⁻	O-硫酸
硫酸角质素 (keratan sulfate)	4~19	$\rightarrow 3\beta \text{Gal} \beta 1 \rightarrow \beta \text{GlcNAc}1 \rightarrow$ ↓ 6-O-SO ₃ ⁻	O-硫酸

注: GalNAc (N-acetyl-D-galactosamine), N-乙酰氨基半乳糖;
 GlcN (D-glucosamine), D-氨基葡萄糖;
 GlcNAc (N-acetyl-D-glucosamine), N-乙酰-D-氨基葡萄糖;
 GlcUA (D-glucuronic acid), D-葡萄糖醛酸;
 IdUA (L-Iduronic acid), L-艾杜糖醛酸.

表 18-8 蛋白聚糖的糖链与核心蛋白的联结

蛋白聚糖	聚糖与核心蛋白的联结
硫酸软骨素	
硫酸皮肤素	$-\beta$ 1-4GlcUA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-0-Ser
硫酸肝素	
硫酸乙酰肝素	
硫酸角质素	$-\beta$ 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α
角膜	<p style="text-align: center;"> $-\beta$ 1-3Galβ 1-4GlcNAcβ 1-2Manα Manβ 1-4GlcNAcβ 1-4AGlcNAcβ 1-N-Asn α 1-6 Fuc $-\beta$ 1-3Galβ 1-4GlcNAcβ 1-2Manα </p>
软骨	<p style="text-align: center;"> $-\beta$ 1-3Gal1-4GlcNAcβ GalNAcα1-0-Ser (Thr) $-\text{Neu5Ac}\alpha$ 2-3Galβ </p>

18.3. 糖蛋白与蛋白聚糖的合成

糖蛋白与蛋白聚糖的糖链合成与蛋白质不同,没有模板,而是一个糖一个糖的连接,每连接一个糖需要有三个物质:一是糖的载体,一般是核苷酸类化合物(UDP-单糖, GDP-单糖);二是糖基转移酶(glycosyltransferase),每一种糖有其特异的酶,所以酶有多种(见表 18-9);三是糖的接受者,称焦磷酸多萜醇(pyrophosphoryl-dolichol, P-P-DOL)。多萜醇是由 16~20 个异戊二烯(isoprene)组成。第一个糖先接到 P-P-DOL 上,然后糖再依次结合,见图 18-2。糖的合成在内质网,内质网的不同相(cis, middle, trans)所含的酶不同,所以各种结构不同的糖链合成部位都不一样。糖链合成途径见图 18-2。糖蛋白合成后还要进行修饰,一般有碘化、磷酸化、乙酰化及脂化,见表 18-10。

表 18-9 糖转移酶的种类

糖转移酶	反应	糖载体(核苷酸-单糖)	糖化蛋白
半乳糖转移酶	β 1-4Gal \rightarrow GlcNAc 在 GlcNAc β 1-2Man α 1-反应	UDP-Gal	N-联结(乳糖或乳糖胺)
	α 1-3Gal \rightarrow Gal 在 Fuc α 1-2Gal β 1-反应	UDP-Gal	N/O-联结
	β 1-3Gal \rightarrow GalNAc 在 GalNAc α -O-Ser(Thr)-反应	UDP-Gal	O-联结
甘露糖转移酶	α Man \rightarrow Dolichol Man β -O-Dolichol	GDP-Man	脂质联结(N-联结)
	β 1-4Man \rightarrow GlcNAc 在 GlcNAc α 1-4GlcNAc α -反应	GDP-Man	脂质联结(N-联结)
	α 1-3Man \rightarrow β Man 在 Man β 1-4GlcNAc β 1-反应	Man1-O-p-Dol	脂质联结(N-联结)
唾液酸转移酶	α 2-6Neu5Ac \rightarrow Gal Gal β 1-4GlcNAc	CMP-Neu5Ac	N-联结
	α 2-3Neu5Ac \rightarrow Gal Gal β 1-4GlcNAc	CMP-Neu5Ac	N-联结
	α 2-3Neu5Ac \rightarrow Gal β 1-3Gal- GalNAc	CMP-Neu5Ac	O-联结
	α 2-8Neu5Ac \rightarrow Neu5Ac -(α 2-8Neu5Ac) $_n$ -	CMP-Neu5Ac	N-(O-?)联结 多唾液酸
岩藻糖转移酶	α 1-6Fuc \rightarrow GlcNAc -4GlcNAc β 1-N-Asn	GDP-Fuc	N-联结
	α 1-2Fuc \rightarrow Gal Gal β 1-3/4	GDP-Fuc	N/O-联结
	α 1-3Fuc \rightarrow GlcNAc 在 Gal β 1-4GlcNAc 反应	GDP-Fuc	N/O-联结
N-乙酰氨基葡萄糖转移酶	β 1-2GlcNAc \rightarrow Man 在 Man α 1-3Man β 1-4 反应	UDP-GlcNAc	N-联结
	β 1-4GlcNAc \rightarrow Man 在 Man β 1-4GlcNAc 反应	UDP-GlcNAc	N-联结
	β 1-3GlcNAc \rightarrow Gal 在 Gal β 1-3GalNAc α -	UDP-GlcNAc	O-联结

糖转移酶	反应	糖载体(核苷酸-单糖)	糖化蛋白
	α 1-4GlcNAc \rightarrow GlcUA β 1 GlcUA β 1-4GlcNAc α 1 -4IdUA α 1-反应	UDP-GlcNAc 或	蛋白聚糖(硫酸肝素)
N-乙酰氨基半乳糖 转移酶	α GalNAc \rightarrow Ser(Thr)-peptide α GalNAc \rightarrow Gal Fuc α 1-2Gal β 1- (血型 A 的酶) β 1-4GalNAc \rightarrow GlcUA 在 GlcUA β 1-3GalNAc β 1-反应	UDP-GalNAc UDP-GalNAc UDP-GalNAc	O-联结 N/O-联结 蛋白聚糖 (硫酸软骨素)
葡萄糖醛酸转移酶	β 1-3GlcUA \rightarrow GalNAc 在 GalNAc β 1-4GlcUA β 1-反应	UDP-GlcUA	蛋白聚糖(硫酸皮肤素)

注: Asn(L-asparagine), 天冬酰胺; CMP (cytidine monophosphate), 胞苷一磷酸; Dol (dolichol), 多萜醇; Fuc (fucose), 岩藻糖; GDP (guanosine diphosphate), 鸟苷二磷酸; GlcUA (d-glycuronic acid), 葡萄糖醛酸; Id-
UA (L-iduronic acid), 艾杜糖醛酸; Neu5Ac (N-acetylneuraminic acid), N-乙酰神经氨酸; p (phosphate),
磷酸; UDP (uridine diphosphate), 尿苷二磷酸。

表 18-10 糖蛋白翻译后的修饰

修 饰	部 位	蛋 白
硫酸化 (sulfation)	Gal, GlcNAc GalNAc IdUA,	粘糖蛋白 蛋白聚糖 激素糖蛋白
磷酸化 (phosphorylation)	多肽, 丝氨酸	红细胞膜 4.1 蛋白 EGF 受体
O-乙酰化	Neu5Ac/Neu5Ge	粘液蛋白 B-细胞糖蛋白
脂肪酸酰化	多肽	胰岛素受体 红细胞膜带 3 及 4.1 蛋白 红细胞血型物质 粘液蛋白
GPI-锚固化	多肽 C 端	碱性磷酸酶 磷脂酰肌醇聚糖(glypican) 神经细胞粘附分子(N-CAM) 乙酰胆碱酯酶

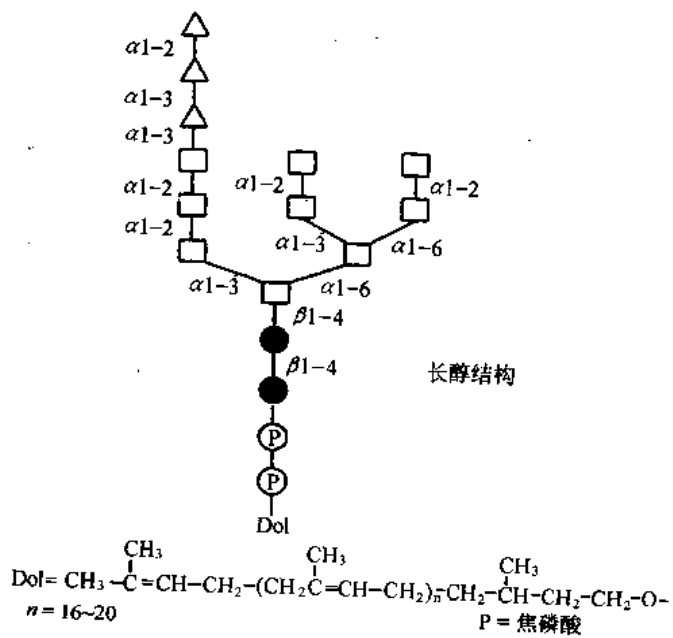
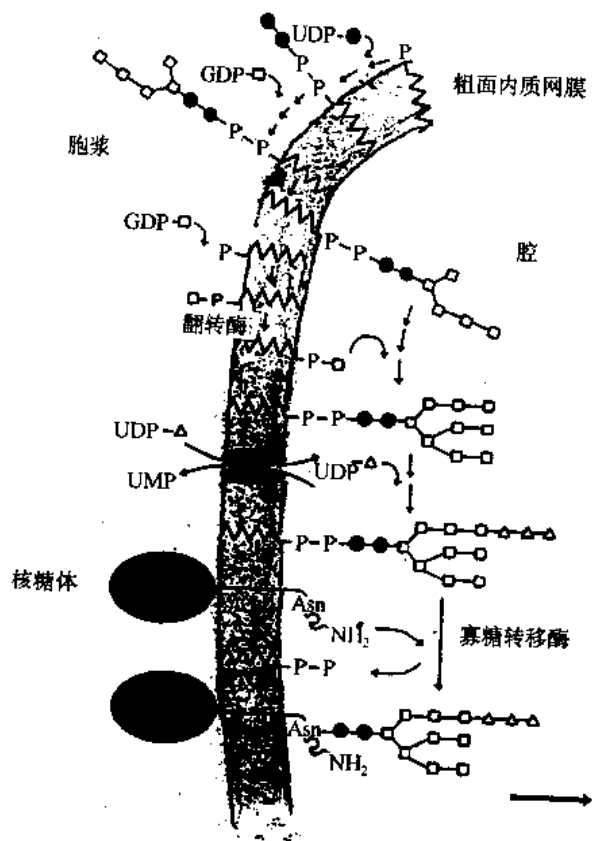


图 18-2 糖链的生物合成途径

18.4. 血浆脂蛋白

血浆中有许多脂质(胆固醇、磷质、甘油三酯、胆固醇酯及游离脂肪酸)。有些脂质与蛋白结合,称脂蛋白(lipoprotein)。如将血浆脂蛋白进行离心分离,由于脂肪的密度比水小,脂蛋白中脂质的比例愈高,其密度愈低,所以离心法可将脂蛋白分成许多组分:乳糜微粒(CM);极低密度脂蛋白(VLDL);中密度脂蛋白(IDL);低密度脂蛋白(LDL);高密度脂蛋白(HDL)。这些脂蛋白所含的脂质都不相同。其物理化学性质见表 18-11。

表 18-11 脂蛋白的物理性质及组成

脂蛋白	来源	直径	密度	sf	组成						
					蛋白质 %	总脂质 %	占总脂百分比				
					TG	PL	Chol E	Chol	FA		
CM	肠道	100~1000	<0.96	>400	1~2	98~99	88	8	3	1	
VLDL	肠,肝	30~90	0.96~1.006	20~400	7~10	90~93	56	20	15	8	1
IDL	VLD LCM	20~35	1.006~1.019	12~20	11	89	29	26	34	9	1
LDL	VLDL,CM	20~25	1.019~1.063	2~12	21	79	13	28	48	10	1
HDL	肝,肠		1.063~1.125		33	67	16	43	31	10	
HDL ₂	CM?	10~20									
HDL ₃		7.5~10	1.125~1.210		57	43	13	46	29	6	6
FFA-Alb	脂肪组织		>1.2810		99	1	0	0	0	0	100

注: CM, 乳糜微粒; VLDL, 极低密度脂蛋白; IDL, 中密度脂蛋白; LDL, 低密度脂蛋白; HDL, 高密度脂蛋白; FFA-Alb, 脂肪酸-白蛋白复合体; sf (Svedberg units), 脂蛋白在 NaCl 的溶液(比重值: 1.063)中的沉降速率, 26°C, 一个 sf 单位相当于 $10^{-13}\text{cm/s/dyneN/g}$; Chol, 胆固醇; CholE, 胆固醇酯; TG, 甘油三酯; LP, 磷脂。

脂蛋白的结构较复杂。如乳糜微粒或 VLDL, 有一个由非极性的甘油三酯和胆固醇酯形成的脂质核, 其表面围绕着一层具有极性的磷脂、胆固醇和蛋白。由于这种蛋白有运载脂质作用, 称之为载脂蛋白(apolipoprotein)。脂蛋白结构参见图 18-3。有的蛋白与磷脂相嵌, 无法移动(图 18-3 中 Apo B), 另有一些游离在外(图 18-3 中 Apo C), 可移到别的脂蛋白上去。现知脂蛋白中的载脂蛋白共有 18 种, 其中较清楚的有 15 种, 即 ApoAI, AII, AIV, B₁₀₀, B₄₈, CI, CII, CIII, D, E, F, G, H, J, Apo(a)。其理化性质见表 18-12。

载脂蛋白的功能很多, 可概括五种:

- (1) 脂质的亲和作用, 使脂质成为溶于水的介质;
- (2) 运转胆固醇酯及甘油三酯;
- (3) 是脂蛋白结构的支柱, 依赖它与脂蛋白外的信息相联;
- (4) 细胞膜有特异的亲和作用, 调节胆固醇代谢;
- (5) 是胆固醇代谢的关键酶, 卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(LCAT)、脂蛋白脂肪酶(LPL)和胆固醇酯转移蛋白(CETP)因子的激活剂, 调节脂蛋白的代谢和其本身在脂蛋

白之间的转换。

表 18-12 血浆载脂蛋白的性质及功能

载脂蛋白	分子量(kD)	氨基酸数	结合的脂蛋白	功能	来源
A1	2.85	243	HDL, CM	稳定 HDL 结构, 激活 LCAT, 识别 HDL 受体等	肝, 肠
AII	1.75*	77X2	HDL, CM	激活肝脂酶, 抑制 LCAT, 参与识别 HDL 受体	肝, 肠
AIV	4.6	376	CM, HDL	参与脂肪吸收, 胆固醇逆向转, 辅助激活 LPL	肠
B ₁₀₀	51.27	4536	VLDL, LDL	运转 TG 识别 LDL 受体	肝
B ₄₈	24.6	2152	CM	促进 CM 生成, 运转外源性 TG	肠
(a)	50.0**	4529	LP(a)	抑制纤维蛋白溶酶活性,	肝
CI	0.65	57	HDL, VLDL, CM	激活 LCAT	肝
CII	0.88	79	HDL, VLDL, CM	激活 LPL	肝
CIH _{0~2}	0.89	79	HDL, VLDL, CM	抑制 LPL 及肝 ApoE 受体	肝
D	2.2	169	HDL	转运胆固醇酯	肝
E	3.4	299	VLDL, CM, HDL	识别 LDL 受体及肝 Apo E 受体	肝
J	7.0	427	HDL	?	肝

*, 二聚体; **, 有多种聚体, 分子量在 30~80 kD 之间。

LCAT, 胆固醇酰基转移酶; LPL, 脂蛋白脂酶; TG, 甘油三酯。

摘自王克勤主编. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 人民卫生出版社, 1997。

18.5. 免疫球蛋白

免疫球蛋白(IgG)是一类由淋巴细胞产生介导体液免疫的糖蛋白, 通过与抗原特异结合表现其生物功能。Ig 类蛋白共有四个肽链, 两条分子量为 22~23kD 的轻链(L 链)及两条 50~75kD 重链(H 链)。四条链通过二硫键相联, 结构见图 18-4。根据其性质、分子大小、电荷、溶解度及抗原将 IgG 分成 5 类: IgG, A, M, D 和 E。由于 H 链抗原结构及链间二硫键位置及数目不同, 又将 IgG 及 IgA 分成亚类或亚型(图 18-5)。五类的 H 链分别用希腊字母 $\gamma, \alpha, \mu, \delta$ 和 ϵ 表示。L 链又可分为 κ 型及 λ 型, 因此每一类 Ig 又可分为 κ 型及 λ 型。Ig 的理化性质及功能见表 18-13, 18-14。

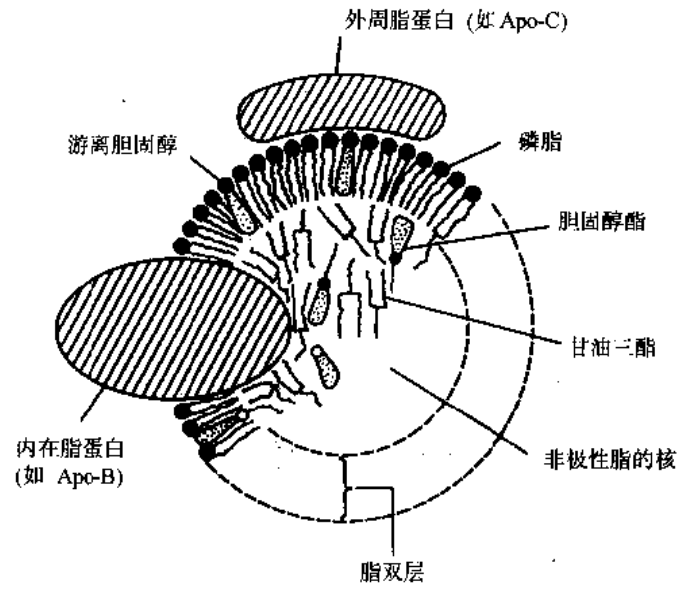


图 18-3 血浆脂蛋白的一般结构示意图

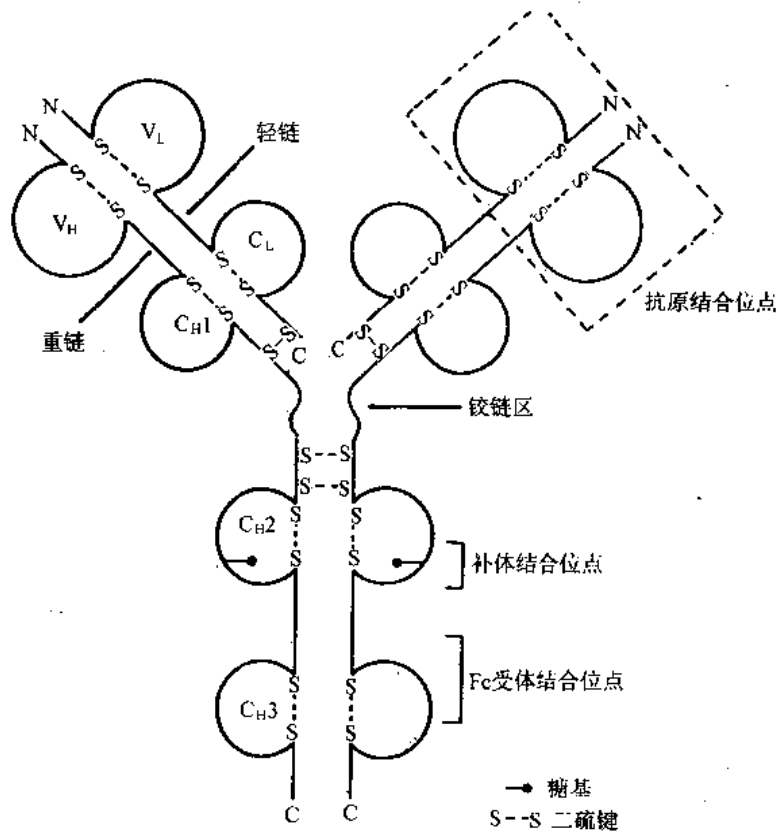


图 18-4 IgG 结构模式图
V 和 C 代表可变区及恒定区。

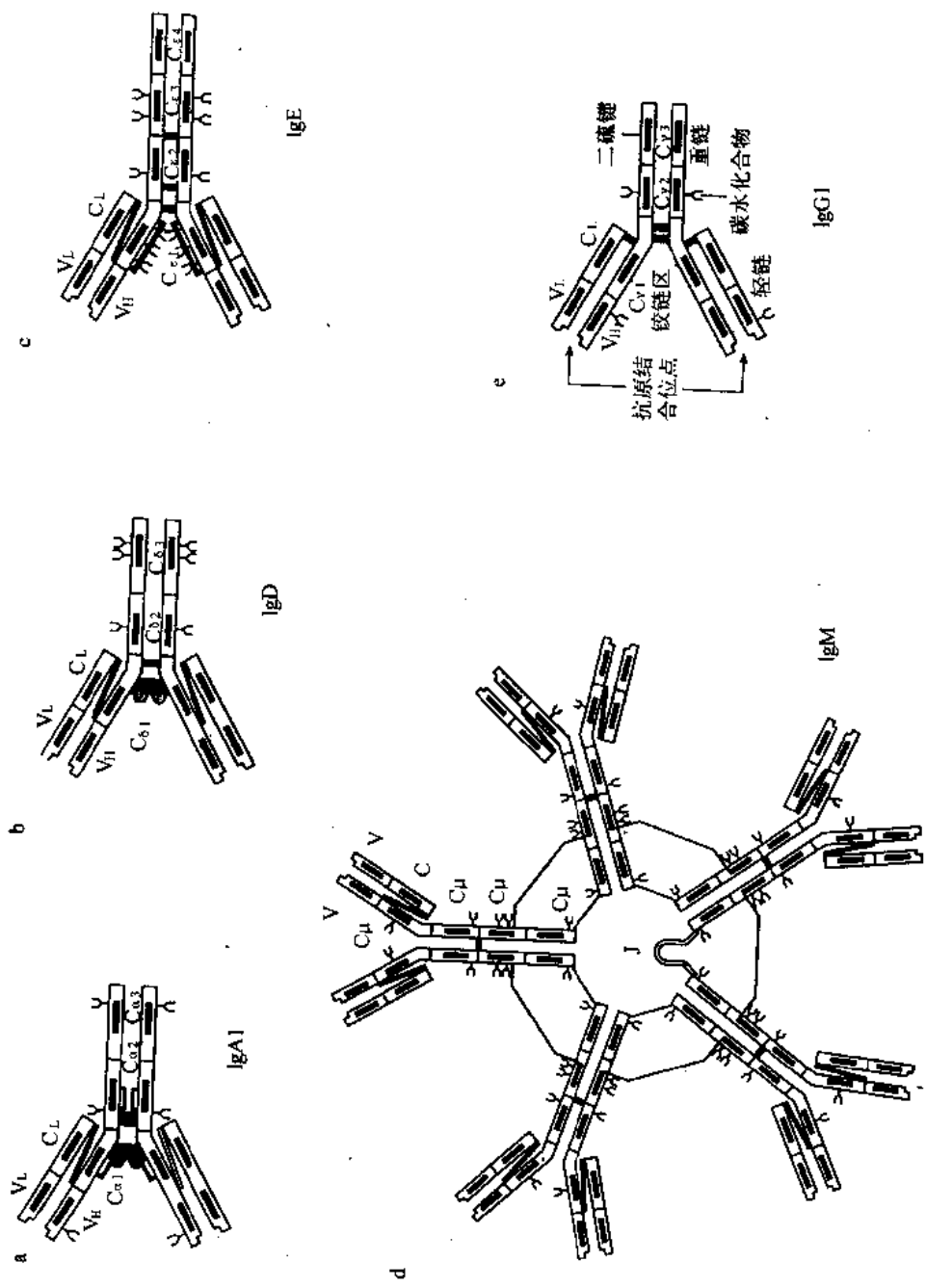


图 18-5 Ig 结构示意图
 ——: 二硫键 Y: 糖苷键

表 18-13 人免疫球蛋白的理化特性

类别	亚类数目	平均血浆浓度 (mg/ml)	沉降系数 (S)	分子量 (kD)	糖含量 (%)	型别	重链分子量 (kD)
IgG	4	13.2	7	160	2.9	γ	53
IgA	2(血清)	1.6	7(9,11,13)	170	9.9	$\alpha 1$	56
IgA	分泌 2	—	11	39	11.7	$\alpha 2$	52
IgM	2	0.9	19	90	11.8	μ	65
IgD	2	0.1	7	184	13.0	δ	69.7
IgE		0.000033	8	188	11.6	ϵ	72.5

表 18-14 人免疫球蛋白的生物学功能

类别	生物活性	与补体结合 (经典)	与补体结合 (替代)	与细胞结合	溶解细菌	中和 毒素	反应性 毒素
IgG	能抑制微生物	+	+	巨噬细胞 中性粒细胞	+	+	?
IgA	与IgG相同,在消化道、呼吸 道粘膜上发挥作用	-	+	-	+	+++	-
IgM	具有强力的凝集素作用可使 多种细菌凝集	++	-	-	-	+-+	+
IgD	功能不明,主要存在于淋巴细 胞表面,可能为抗原受体	-	+	-	?	?	?
IgE	与I型超敏反应有关,寄生虫 感染含量增高	-	-	肥大细胞 嗜碱粒细胞	?	?	+-+

摘自方圻. 现代内科学. 北京:人民军医出版社,1995.

(潘华珍)

参 考 文 献

- 王克勤主编. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 人民卫生出版社, 1995
 吴东儒主编. 糖类的生物化学. 高等教育出版社, 1987
 方圻主编. 现代内科学(免疫学, 内科疾病), 人民军医出版社, 1995
 Allen H J, Kisailus E C. Glycoconjugates Composition, Structure and Function. Masel, 1992
 Carlstedt I, Sheehan J K, *et al.* Essays Biochem. 1985, 20:40
 Kjellen L, Lindahl U. Ann. Rev. Biochem., 1991, 60: 443
 Mayes M G. Harper's 生物化学. 合记图书出版社(台湾), 1992
 Steward M W 著. 施秉仪译. 免疫化学. 科学出版社, 1978
 Sadler J E. Biology of Carbohydrates. Ginsberg V, Robbins, eds, Wiley, New York, 1984, 199
 Silverman M. Ann. Rev. Biochem. 1991, 60:757

19. 蛋白质的化学修饰

研究蛋白质结构和功能的关系,应用化学修饰是个良好又简单易行的方法。许多氨基酸有特异的残基,可以结合不同的试剂,将欲研究蛋白质的某些氨基酸,选择适当的试剂进行修饰,观察其结构改变,对功能的影响。表 19-1 及 19-2 列出某些氨基酸的残基与试剂的反应。

表 19-1 蛋白质选择性化学修饰常用的试剂

氨基酸侧链	反应	试剂	竞争性反应
赖氨酸(ϵ -NH)	脲基化(amidination)	甲基或乙基乙酰亚胺·HCl (methyl or ethyl acetimidate·HCl)	α -NH ₂ *
		二甲基庚基亚胺,二甲基乙二酰亚胺及其他二亚胺酯(dimethyl suberimidate, dimethyl adipimate, many other bis-imido ester),通常为盐酸盐	α -NH ₂ *
		2-亚胺磺酸盐·HCl (2-iminothiolate·HCl, Traut's reagent)	α -NH ₂
赖氨酸(-NH ₂)	还原甲基化 (reductive methylation)	甲醛+NaBH ₄ , NaBH ₄ CN 或吡啶硼烷(pyridine borane)	α -NH ₂ *
		乙酰化(acetylation)	乙酸酐
		N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯) (N-hydroxysuccinimidy esters, NHS esters)	α -NH ₂
		顺式丁烯二酸及甲基顺(式)丁烯二酸酐(maleic and citraconic anhydride) 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)	α -NH ₂ , -SH -SH*
精氨酸(胍基)		2,3-丁二酮(2,3-butanedione) 苯乙二醛(水合) (phenylglyoxal, hydrate)	-NH ₂ -NH ₂
组氨酸(咪唑基)		乙氧基甲酸酐 (ethoxyformic anhydride)	-NH ₂ Tyr*
谷氨酸及天冬氨酸		碳化二亚胺+胺 (carbodiimide+amine)	α -COOH* Tyr -SH
半胱氨酸(-SH)	烷基化	碘乙酸,碘乙酸胺,溴乙酸,溴乙酰胺	His -NH ₂ Met
		N-乙酰马来酰亚胺 (N-ethylmaleimide)	-NH ₂ His

续表 19-1

氨基酸侧链	反应	试剂	竞争性反应
		5,5'-二硫二(2-硝基苯甲酸) (DTNB, Ellmans reagent) p-羟基汞苯甲酸 (p-hydroxymeribenzoate)	
甲硫氨酸(硫醚)		过氧化氢	-SH* Trp
酪氨酸	碘化	I ₂ , I ₃ ⁻ , ICl (I ⁻ + 氯氨 T 或许多 Cl ⁺ 供体之一 或乳过氧化物酶 + I + H ₂ O ₂)	His* -SH Trp
	硝基化	4-硝基甲烷	-SH* Trp
	乙酰化	乙酰咪唑	-NH ₂ *
色氨酸(吲哚)		N-溴化琥珀酸亚胺	-SH* Tyr Met His

* 在一般情况下,其他基团也可反应。

表 19-2 化学修饰蛋白质常用的特殊试剂

试剂	氨基酸侧链								
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (Cys S)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)
酯酸酐	+++	-	±	-	±	-	-	+++	-
N-乙酰同型半胱氨酸硫内酯 (N-acetylhomocysteine thiolactone)	+++	-	±	-	-	-	-	-	-
乙酰咪唑 (acetyl imidazole)	+++	-	±	-	±	-	-	+++	-
S-乙酰硫琥珀酸酐 (S-acetylthio succinic anhydride)	+++	-	±	-	±	-	-	±	-
丙烯(acrylodan)	-	-	+	-	+++	-	-	-	-
丙烯腈(acrylnitrile)	+	-	+	-	+++	-	-	-	-

续表 19-2

试剂	氨基酸侧链									
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)	
甲醛+										
NBH ₄ , NBH ₃ (CN), 或吡啶硼酸	--++	-	-	-	-	-	--	-	-	-
4-(氨基磺酸)-7-氟苯-2-噁-1,3-二唑 [4 (amino-sulfonyl)-7-fluoro-benz-2-oxa-1,3-diazole]	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
铵-4-氯-7-磺酸苯-2-噁-1,3-二唑 (ammonium-4-chloro-7-sulfo-benz-2-oxa-1,3-diazole)	+	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
亚砷酸钠 (NaAsO ₂)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
芳香基叠氮 (aryl azides)	+	+	+	+	+	+	-	+	++	++
偶氮苯-2-亚氧硫基溴 (azobenzene-2-sulfonyl bromide)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
4,4'-双(甲基氨基)二苯甲醇 [4,4'-bis (methyl-amino) diphenylcarbinol]	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
双马来酰亚胺己烷 (bismaleimidyl hexane)	+	-	+	-	+++	-	-	-	-	-
溴化乙基胺 (bromoethyl amine)	-	-	+	-	+++	+	-	-	-	-
p-溴苯酚酰溴 (p-bromo phenacyl bromide)	+	-	++	+	+++	+	-	-	-	-
N-溴琥珀酰亚胺 (N-bromo succinimide)	-	-	+	-	+++	++	-	++	+++	+++
丁二酮 (butanedione)	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
碳化二亚胺 (carbodiimide)	+	-	-	+++	+	-	-	+	-	-
碳化二亚胺(水溶)+RNH ₂	+	-	-	+++	+	-	-	+	-	-
N-羧基酐	+++	-	±	-	±	-	-	±	-	-
7-氯-4-硝基苯-2-噁-1,3-二唑 (7-chloro-4-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazole)	+++	-	-	-	+++	-	-	+	-	-

试 剂	氨基酸侧链								
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)
N-氯琥珀酰亚胺 (N-chloro succinimide)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+
柠檬酸酐(citraconic)	+++	-	±	-	+	-	-	±	-
氰化钾	+++	-	±	±	±	-	-	±	-
溴化氰(cyanogen bromide)	-	-	+	-	+++	+++	-	-	-
氰尿酸氟(cyanuric fluoride)	+	-	+	-	+	-	-	+++	-
1,2 环己二酮 (1,2-cyclo hexanedione)	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
丹酰氮丙啶 (dansyl aziridine)	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
二胺(diamide)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
重氮基乙酸盐 (diazacetate)	-	-	-	+++	++	-	-	-	-
重氮甲基-N,N-二甲基苯磺胺 (diazo methyl-N,N- methylbenzene sulfoamide)	-	-	-	+++	+	-	-	-	-
重氮化离子 (diazonium ions)	+++	+	+++	-	++	-	-	+++	+
二氯三嗪 (dichloro-triazine)	+++	-	+	-	++	-	-	+++	-
二丹酰胱氨酸 (didansyl cystine)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
二乙基焦碳酸酯 (diethyl pyro carbonate)	+	-	+++	±	+	-	-	+	+
二甲基氨基萘酚磺酰氯 (dimethyl-aminonaph- thalene-sulfonyl chloride)	+++	-	++	-	++	-	-	+++	+
二甲基(2-羟-5-硝基苯)硫溴 [dimethyl(2-hydroxy-5-ni- trobenyl)sulfonium-bromide]	-	-	-	-	+++	±	-	-	++
二甲基环庚酰亚胺 (dimethyl suberimidate)	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

续表 19-2

试剂	氨基酸侧链								
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	硫基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)
二硝基氟苯 (dinitrofluoro benzene)	+++	-	++	-	+++	-	-	++	-
二苯二重氮甲烷 (diphenyldiazomethane)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)]	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
二硫双(琥珀酸亚胺丙酸盐) [dithiobis (succinimidyl propionate)]	+++	-	±	-	±	-	-	+	-
2,2'-二硫二吡啶 (2,2'-thio dipyridine)	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
二硫苏糖醇 (dithiothreitol)	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
吖丙啶(ethyleneimine)	-	-	-	+	+++	-	-	-	-
N-乙基马来酰亚胺 (N-ethyl maleimide)	+	-	+	-	+++	-	-	-	-
N-乙基-5-苯-异恶唑基-3-磺酸 (N-ethyl-5-phenyl isoazolium-3-sulfonate)	+	-	-	+++	-	-	-	-	-
乙基硫三氟乙酸 (ethyl thio trifluoro acetate)	+++	-	±	-	±	-	-	±	-
芬顿试剂(fentons reagent) Fe(II)O ₂ /±抗坏血酸盐	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
K ₂ FeO ₄	-	-	++	-	++	++	-	++	++
异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate)	+++	-	++	-	++	-	-	+	-
甲醛	±±±	+	±±±	-	±±±	-	-	++	++
戊醛	+++	=	++	-	+	-	-	-	-
乙二醛	+	+++	-	-	+	-	-	-	-

续表 19-2

试 剂	氨基酸侧链									
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)	
脒基 3,5-二甲基吡唑 (guanyl-3,5 dimethyl pyrazole)	+++									
α -卤醋酸, 胺基及酮 (α -haloacetate, amides, ketone)	+	-	!	.	++!	-	-	.	-	
H ₂ O ₂	-	-			+++!	++			.	
溴2-羟-5-硝基苯 (2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide)					+++			.	+++	
p-羟基苯乙二醛 (p hydroxyphenyl glyoxal)	!	! !			!					
N-羟琥珀酰亚胺酯 (N-hydroxysuccinimidyl ester)	. ! !		-		+	.	-	-	-	
碘等 (I ₃ etc)	.	-	++	-	+++	-	-	+++	+	
N-(碘乙基)三氟乙酰胺 [N-(iodoethyl) trifluoroacet amide]	-	-	-	-	. ! !	-	-			
异氰酸(RNCO)	+++	-	++	-	++	-	-	! !	-	
异硫氰酸(RCNS)	! ++	.	++	-	++	-	-	++	-	
苹果酸酐	+++	-	!	-	-	-	-	±	.	
汞化合物	-	-	-	-	! ! !	-	-		-	
甲醇/HCl			-	+++	-	-	-	-	-	
2-甲氧基-5-硝基环庚三烯酮 (2-methoxy- 5-nitrotropone)	! ! !					-	-	-	-	
甲基乙酰亚胺 (methyl acetamide)	+++	-	-	-	-	-	-	-		
O-甲基异脲 (O-methyl isourea)	+++	-	-	-	+	-	-	-		
甲基-甲烷硫磺酸 (methyl-methane thiosulfonate)	-	-	-	-	+++	-	-		.	
甲基-p-硝基苯磺酸	-		+++	-	+++	-	-	-		
一氯三嗪 (monochloro triazines)	+++	-	!		++		-	+++	.	

续表 19-2

试 剂	氨基酸侧链								
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)
p-硝基苯亚氧磺基氯 (p-nitrophenyl sulfonyl chloride)	-		-		+++	-	-	-	+++
p-硝基氧化苯磺酸 (p-nitropheny sulfonyl fluoride)	-		-		-	-	-	++	-
亚铁氰化钾 Na ₂ Fe(CN) ₅ · NO · 2H ₂ O	+	-		-	±±±	-	-	-	-
2-硝基-5-硫氧酰苯甲酸	-	-	-	-	+++		-	-	-
亚硝酸	+++	-	-	-	+++	-	-		+
2,4-戊二酮 (2,4-pentane dione)	+++	++		-		-	-	-	-
过甲酸	...	-		-	+++	+++	+++	-	+++
过碘酸钠	-	-		-	+++	++	-	+	+
苯氧化钾	-	-		-	+++	-	-	-	-
苯乙二醛	+	+++	-	-	+	-	-	-	-
硫代磷酸钠(Na ₃ SP ₃)	-		-	-	-		+++		-
光氧化(photo-oxidation)	-		+++		+++	+++	-	+	+++
邻苯二醛+RSH	+++	-	-	-	+	-	-		-
水杨醛	+++	-	-	-	-	-	-	-	...
四氢硼酸钠(NaBH ₄)	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
亚硫酸钠	-		-		-		+++	-	-
琥珀酸酐	+++	-	+	-	+		-	±±	-
N-琥珀酰亚胺乙酸 (N-succinimidyl acetate)	+++	-	±	-	±	-	-		-
N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶-硫)丙 酸 [N-succinimidyl-3- (2-pyridyl-thio)- propionate]	+++	-	±	-	±±	-	-	±	-
四硝基甲烷 (tetraniro methane)	-	-	-		+++	+	-	+++	+
四硫代硫酸钠	-	-	-	-	+++	-		-	-

试剂	氨基酸侧链								
	氨基 (Lys)	胍基 (Arg)	咪唑 (His)	羧基 Glu, Asp	巯基 (Cys)	硫醚 (Met)	二硫 (CysS)	酚 (Tyr)	吲哚 (Try)
(Na ₂ S ₃ O ₃) 二氧硫脲 (thiourea dioxide)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2,4,6-三溴-4-甲基环己二酮 (2,4,6 tribromo 4-methyl- cyclohexane dione)	-	-	+	-	+++	-	+	+	+++
三正丁基膦 (tributylphosphine)	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
三甲氧鎓四氟硼酸盐 (trimethyl oxonium- tetrafluoro borate)	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
三硝基苯磺酸	+++	-	-	-	++	-	-	-	-
钒酸(V ₂ O ₅)									
4-乙烯吡啶 (4-vinylpyridine)	+	-	-	-	+++	-	-	-	-

体内有许多具有活性的蛋白质,都是由蛋白质翻译后经酶反应修饰而成的,所以蛋白质修饰与机体的各种生物信息有关,这些反应大多是双向的(可逆的)循环。例如磷酸化,脱磷酸化;乙酰化,脱乙酰化;ADP核糖化,脱ADP核糖化等。可能修饰反应后是“激活”状态,逆反之后,又回到“去激活”状态,依赖这些反应在调节机体的平衡中起着重要的作用。有些反应是不可逆的,如“瀑布式”的,只要开始第一个酶反应即可依次进行,并将信息逐步放大,酶解反应,生物合成反应等。在设计蛋白质修饰反应时,最好是能进行可逆反应。蛋白质修饰后的逆反应见表 19-3。

表 19-3 蛋白质修饰后逆行的酶(指修饰后再脱修饰作用的酶)

修饰作用	供体	逆行
乙酰化	乙酰辅酶 A	酰基-肽-水解酶(acyl-peptide-hydrolase)
ADP 核糖化	NAD ⁺	单 ADP 核糖基水解酶(mono ADP-ribosyl hydrolase) 多 ADP-核糖基糖基水解酶(Poly ADP-ribosyl glycosyl-hydrolase) ADP-核糖基焦磷酸酶 (ADP-ribosyl pyrophosphatase) ADP-核糖基蛋白裂合酶(ADP-ribosyl protein lyase)
糖基化	NDP-葡萄糖	蛋白质-N-酰胺酶(protein-N-amidase)
甲基化	S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine)	甲基酯酶(methylesterase)
磷酸化	ATP	蛋白磷酸酶(protein phosphatase)
泛素化 (ubiquitination)	泛素 (ubiquitin)	泛素水解酶(ubiquitin hydrolase)

19.1. 蛋白质的氨基酸残基修饰后的化学性质

蛋白质的氨基酸残基修饰后会改变它们的化学性质,如精氨酸进行ADP核糖化(riboseylation),从一个带有正电荷的改变成带有负电荷的蛋白质,或羟基进行磷酸化或硫酸化,引入一个负电荷基团,性质即有改变,一般含羟基氨基酸如丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸可磷酸化,谷氨酸、半胱氨酸及精氨酸残基可进行ADP-核糖化,更重要的是修饰后影响一些疏水氨基酸的性质,如糖化、脂化及酰化,这些修饰直接影响蛋白质整合到膜内或与膜解离。有时不仅化学性质改变,物理性质也有改变,例如迁移率的变化。在设计修饰反应时,需注意所修饰后蛋白质的氨基酸残基在酸碱中的稳定性,如果是稳定的,可用常规方法(如质谱、气层析及高压液相层析等)进行鉴定,表19-4列出修饰后蛋白质氨基酸残基的稳定性。

表 19-4 修饰氨基酸的鉴定方法

修饰作用	氨基酸	对 HCl 水解的稳定性	其他的鉴定方法
乙酰化	氨基端	N	用蛋白水解酶消化
	Lys		用蛋白水解酶消化
ADP-核糖化	Arg	N	对 NH ₂ OH 敏感
	Cys	N	对 NH ₂ OH 敏感
	Glu	N	对 NH ₂ OH 敏感
酰胺化	羧基端	N	用蛋白水解酶消化
羧化	Asp	N	用碱水解
	Glu	N	KOH 水解
糖基化	Asp	N	用三氟甲烷磺酸
	Thr	N	酶消化
羟化	Pro	Y	
碘化	Tyr	Y	
异戊二烯化	Cys	N	用甲基碘化物还原
甲基化	Arg	Y	用酶水解
	Asp(异肽 isopeptide)	N	
	Glu	N	用碱水解
	His	Y	
	Lys	Y	
豆蔻酰化	N-末端 Gly	N	蛋白水解酶消化再进行脂肪酸分析
核苷酸化	Tyr	N	酶水解
棕榈酰化	Cys	N	甲醇化的 KOH
磷酸化	Ser	N	用碱水解
	Thr	N	用碱水解
	Tyr	N	用碱水解
硫酸化	Tyr	N	Ba(OH) ₂ 水解

19.2. 蛋白质修饰的特殊要求

蛋白质修饰时对修饰基团有特殊的要求。如蛋白质进行脂化时,与异戊二烯作用,需首先经水解露出半胱氨酸,而且末端结构必须是胱氨酸-脂肪族氨基酸-脂肪族氨基酸-丝氨酸(或谷氨酸、甲硫氨酸)。如是以上的几种氨基酸,即是法尼酸化(farnesylation),若是亮氨酸脂化是牻牛儿基牻牛儿酸化(geranylgeranylation)。又如蛋白激酶(cAMP 依赖的)及磷酸化酶,在磷酸化部位的邻近氨基酸必须是碱性的。酪蛋白激酶 II 作用时,在磷酸化部位的邻近氨基酸必须是酸性的。此外还有许多修饰作用需要很特殊的顺序,所需的识别结构顺序见表 19-5。

19.3. 修饰后蛋白质的生理作用

研究蛋白质修饰后的生理功能有许多方法。最简单易行的是用修饰反应的特殊抑制剂。加入抑制剂后观察生理功能的变化,亦可用微注射法,将抑制剂直接导入细胞,观察生理效应。表 19-6 列出特殊抑制剂以供参考。

表 19-5 蛋白质修饰的识别区氨基酸顺序及修饰基的供应者

修饰作用	识别区氨基酸顺序	供者
乙酰化	氨基末端残基	乙酰辅酶 A
酰胺化	羧基末端 Gly	末端 Gly 的转化
羧基化	Glu-X-X-X Glu-X-Cys	CO ₂
糖化	Asn X-Thr/Ser	糖苷二磷酸盐
羟化	X-Pro-Gly	
4-Pro	Pro-(4-Hydroxyl) Pro-Gly	
3-Pro		
异法尼酸化	Cys-Ali Ali-X-OOH	甲羟戊酰 CoA
甲基化		S-腺苷甲硫氨酸
豆蔻酸化	氨基末端 Gly	豆蔻酰 CoA
磷酸化	多种氨基酸残基	ATP
硫酸化	酸性残基	PAPS

注: Ali, (aliphatic residues), 脂族残基。

PAPS(adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate), 腺嘌呤核苷 3'-磷酸-5'-磷硫酸。

表 19 6 蛋白质修饰作用的抑制剂

修饰作用	抑制剂
乙酰化	n-丁酸盐 天化粉蛋白 A (trichosanthin A)
ADP-核糖化	苯甲酰胺 (benzamide) 偏-碘化苯胍 (meta-iodobenzylguanidine)
酰胺化	4-苯基-3-丁烯酸 (4-phenyl-3-butenic acid)
羧基化	杀鼠灵 (warfarin) 四氯吡啶 (tetrachloropyridin)
糖化	衣霉素 (tunicamycin) 羟基正缬氨酸 (hydroxynorvaline)
羟化	多聚(ADP-核糖) poly(ADP-ribose)
异戊二烯化	氟化甲羟戊酸盐 (fluoromevalonate)
甲基化	S-腺苷高半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine)
豆蔻酰化	氧代肉豆蔻酸(oxo-myristic acid)
磷酸化	蛋白激酶抑制剂 星形孢菌素(staurosporine) 酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostin)
硫酸化	氯酸盐 (chlorate)
泛素化(ubiquitination)	亚砷酸盐

(潘华珍)

参 考 文 献

- Alfrey V G, Dipaola E A, Sterner R. *Methods Enzymol.* 1984, 107: 224
 Chock P B, Rhce S G, Stadtman E R. *Ann Rev Biochem*, 1980, 49: 813
 Clark S, Mcfadden P N, O'Connor C M. *Methods Enzymol.* 1984, 106: 330
 Kivirikko K I, Myllyla R. *The Enzymology of Post-translational Modification of Protein*, Freedman R B, Hawkins H C eds. Academic, New York, 1980 Vol 1, p64
 McCall M J, Diril H, Meares F. *Bioconjugate Chem.* 1990, 1: 222
 Pike L J, *Methods Enzymol.* 1987, 146: 353

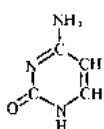
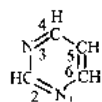
20. 核酸及其组成成分

20.1. 基本结构

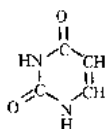
核酸是一种线性多核苷酸(nucleotide),核苷酸是它的基本结构单位。核苷酸是核苷(nucleoside)的磷酸酯,核苷由戊糖和碱基缩合而成,以糖苷键相连接,即以戊糖上的 C1 与碱基的 N 相连(N—C 键)。

核酸中的戊糖有两类,D-核糖(D-ribose)和 D-2-脱氧核糖(D-2-deoxyribose)。核酸是按其所含的戊糖分类的,含有脱氧核糖的称为脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA),含有核糖的称为核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。DNA 中的碱基有四种:腺嘌呤,鸟嘌呤,胞嘧啶和胸腺嘧啶。RNA 中的三种碱基与 DNA 相同,其余的一种胸腺嘧啶为尿嘧啶所代替。图 20-1 是戊糖与常见碱基、核苷及核苷酸的结构。tRNA 与 rRNA 中含有一些修饰了的碱基,也称为稀有碱基。图 20-2 是较常见的修饰碱基。

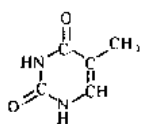
嘧啶碱基



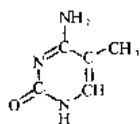
胞嘧啶(C)



尿嘧啶(U)

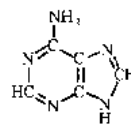
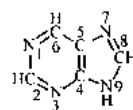


胸腺嘧啶(T)

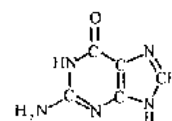


5'-甲基胞嘧啶

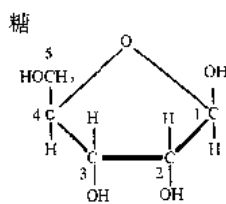
嘌呤碱基



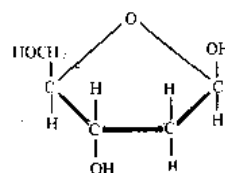
腺嘌呤(A)



鸟嘌呤(G)

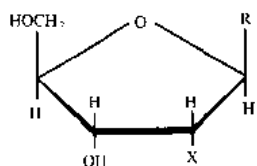


核糖



2'-脱氧核糖

核苷基本结构



X=OH R=A,C,G,T,U X=H 相应的脱氧核苷

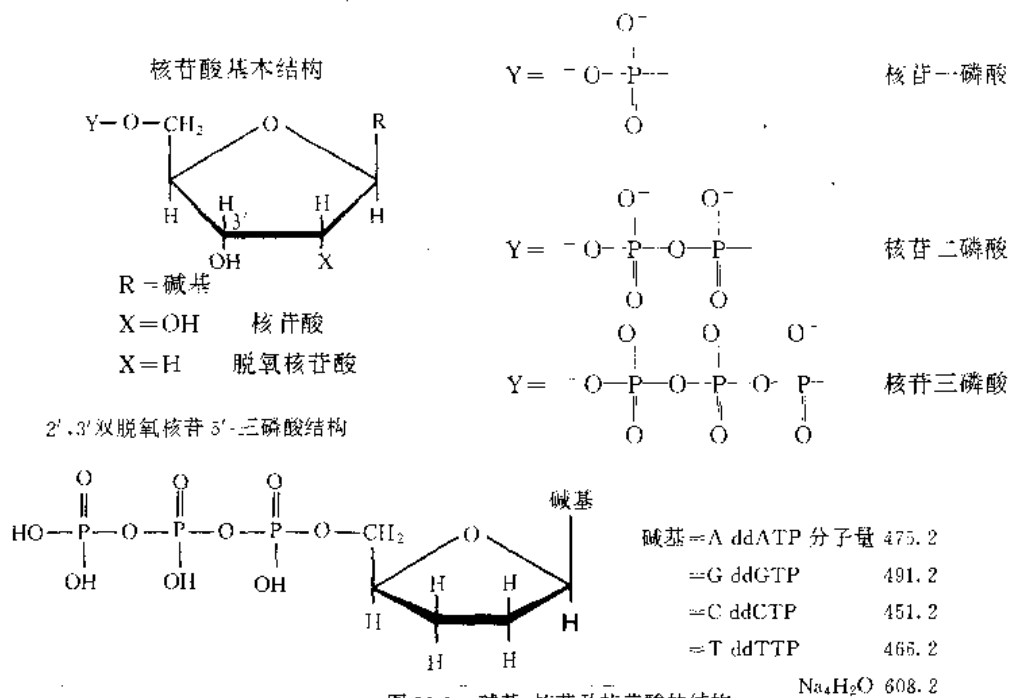


图 20-1 碱基、核苷及核苷酸的结构

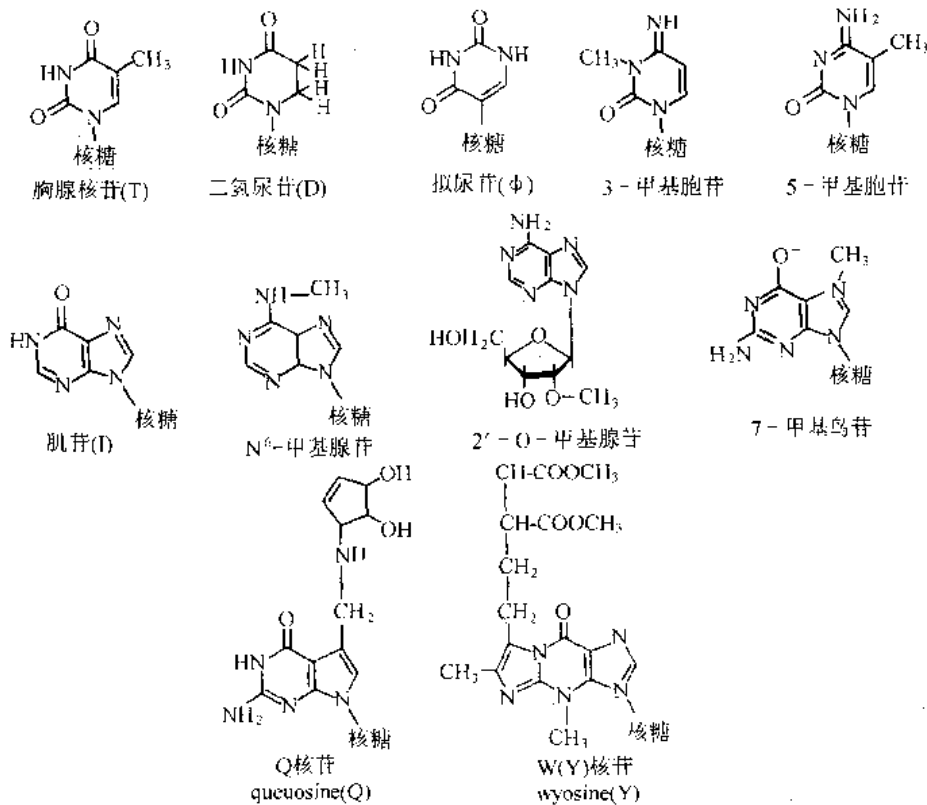


图 20-2 修饰碱基的结构

DNA 分子是由两条方向相反的多核苷酸链通过碱基配对以氢键连接而成,通常 A 与 T, G 与 C 配对,RNA 中则 G 与 U 配对(图 20-3)。

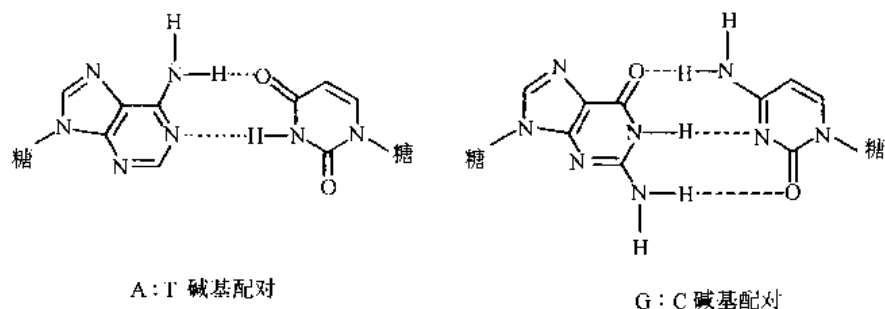


图 20-3 DNA 中的碱基配对

本图引自 Chambers J A A, Richwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers. , 1993.

20.2. 物理化学性质

DNA 和 RNA 的碱基有极强的紫外吸收,其最大吸收峰(λ_{\max})及克分子消光系数(ϵ_{\max})以及 OD_{254}/OD_{280} 可以用于碱基,核苷及核苷酸定性和定量的测定。它们的光密度与 OD_{250}/OD_{280} 依赖于 pH。表 20-1 及 20-2 列出了碱基、核苷与核苷酸的物理性质。

表 20-1 碱基、核苷及核苷酸的性质

名称	分子量 ^a	溶解度 (g/100ml)	酸性 pH			比值 (280/260)
			λ_{\max}	ϵ_{\max}^h ($\times 10^3$)	ϵ_{260}^b ($\times 10^3$)	
碱基						
腺嘌呤	135.1	0.09	263	13.20	13.0	0.37
胞嘧啶	111.1	0.77	276	10.00	6.0	1.53
鸟嘌呤	151.1	0.01	276	7.35	8.0	0.84
胸腺嘧啶	126.1	0.40	265	7.89	7.1	0.53
尿嘧啶	112.1	0.36	259	8.20	8.2	0.17
核糖核苷						
腺嘌呤核苷	267.2	sol. ^a	257	14.60	14.3	0.22
胞嘧啶核苷	243.2	v. sol. ^a	280	13.40	6.4	2.10
鸟嘌呤核苷	238.2	0.08	256	12.30	11.8	0.70
尿嘧啶核苷	244.2	sol.	232	10.10	9.9	0.35
脱氧核苷						
腺嘌呤脱氧核苷	251.2	sol.	258	14.10	—	0.24
胞嘧啶脱氧核苷	227.2	sol.	280	13.20	6.2	2.16
鸟嘌呤脱氧核苷	267.2	sol.	255	12.30	—	0.70
胸腺嘧啶脱氧核苷	242.2	sol.	267	9.65	8.8	0.72

续表 20-1

名称	分子量 ^a	溶解度 (g/100ml)	酸性 pH			比值 (280/260)
			λ_{max}	ϵ_{max}^b ($\times 10^3$)	ϵ_{260}^b ($\times 10^3$)	
核糖核苷酸						
AMP	347.2	v. sol.	257	15.10	14.5	0.22
ADP	427.2	v. sol.	257	15.00	14.5	0.22
ATP	507.2	v. sol.	257	14.70	14.3	0.22
CMP	323.2	v. sol.	281	13.20	6.2	2.09
CDP	403.2	v. sol.	280	12.80	6.2	2.07
CTP	483.2	v. sol.	280	12.80	6.0	2.12
GMP	363.2	v. sol.	256	12.20	11.8	0.67
GDP	443.2	v. sol.	256	12.30	11.8	0.67
GTP	523.2	v. sol.	256	12.30	11.8	0.67
UMP	324.2	v. sol.	262	10.00	9.9	0.39
UDP	404.2	v. sol.	262	10.00	9.9	0.39
UTP	484.2	v. sol.	262	10.00	9.9	0.38
脱氧核糖核苷酸						
dAMP	331.2	v. sol.	258	14.30	14.2	0.23
dADP	411.2	v. sol.	258	14.30	14.2	0.23
dATP	491.2	v. sol.	258	14.30	14.2	0.23
dCMP	307.2	v. sol.	280	13.20	6.3	2.12
dCDP	387.2	v. sol.	280	12.90	6.2	2.07
dCTP	467.2	v. sol.	280	12.90	6.2	2.14
dGMP	347.2	v. sol.	255	11.80	10.6	0.70
dGDP	427.2	v. sol.	255	11.80	10.6	0.70
dGTP	507.2	v. sol.	255	11.80	10.6	0.70
dTMP	322.2	v. sol.	267	9.64	8.4	0.73
dTDP	402.2	v. sol.	267	9.64	8.9	0.71
dTTP	482.2	v. sol.	267	9.64	8.9	0.72

注:缩写 sol. 可溶; v. sol. 极易溶。

a: 分子量不包括阳离子与结晶水。

b: 分子消光系数。

本表引自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993。

表 20-2 三核苷酸的物理化学性质

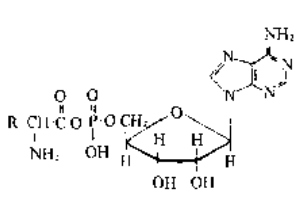
化合物	分子量	λ_{max} (pH 7.0)	$\epsilon_{\text{max}} \times 10^3$ (pH 7.0)
ATP	507.2	259	15.4
CTP	483.2	271	9.0
GTP	523.2	253	13.7
UTP	484.2	262	10.0
dATP	491.2	259	15.2
dCTP	467.2	271	9.3
dGTP	507.2	253	13.7
dTTP	482.2	260	7.4

核苷酸应贮存-20℃。GTP及dGTP的钠盐十分不稳定,尽可能采用锂盐为好。核苷酸因磷酸基团的存在,溶液呈酸性,故所有贮存液必须加入一定量的阳离子或碱性缓冲液,如Tris或Tricine进行中和。

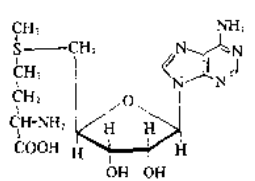
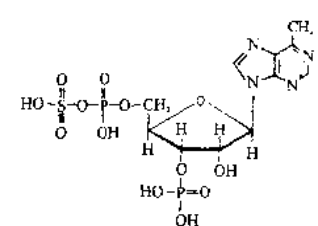
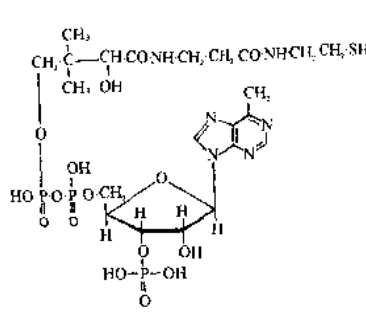
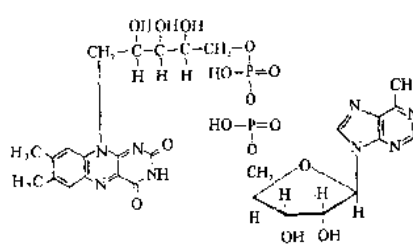
20.3. 核苷酸的衍生物

核苷酸的衍生物广泛存在于生物体中,各种核苷酸衍生物在生命活动中起着重要的作用,其中有些是活性代谢中间体,如酰基腺苷酸,核苷二磷酸糖类,很多辅酶也都是核苷酸的衍生物。表 20-3 选择性地列出了一些分布较广泛的核苷酸衍生物。

表 20-3 核苷酸的衍生物

名称	结构	分子量	作用
脂酰腺苷酸 acyl adenylate	 <p style="text-align: center;">R=氨基酸侧链</p>		RNA 转运 氨基酸过 程中,活化 氨基酸的 中间产物

续表 20-3

名称	结构	分子量	作用
S-腺苷甲硫氨酸 S-adenosylmethionine(SAM)		398.4 (自由阳离子)	甲基载体
PAPS		507.3	硫酸根供体, 无 3' 磷酸的 APS 具有类似作用
辅酶 A		767.6	酰基载体
FMN		456.4	氧化还原辅酶

名称	结构	分子量	作用
NAD ⁻ / NADP ⁺	<p>还原型</p> <p>NAD⁺ R=H NADP⁺ R= $\begin{matrix} \text{OH} \\ \\ \text{P}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{matrix}$</p>	NAD ⁺ 663.4 NADP ⁺ 743.4	氧化还原辅酶
3'-5'-cAMP/ 3'-5'-cGMP/	<p>cAMP R=腺嘌呤 cGMP R=鸟嘌呤</p> <p>cAMP R=腺嘌呤 cGMP R=鸟嘌呤</p>	cAMP=329.2 cGMP=345.2	为细胞内反应的信号分子,调节糖原和脂肪代谢,称为第二信使

缩写: PAS(adenosine phosphosulfate),腺苷磷酸硫酸酯;PAPS(adenosine 3'-phosphate 5'-sulfatophosphate),腺苷3'-磷酸5'-硫酸磷酸酯;FAD(flavin adenine dinucleotide),黄素腺嘌呤二核苷酸;FMN(flavin mononucleotide),黄素单核苷酸;NAD(nicotinamide adenine dinucleotide),尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸,辅酶I;NADP(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate),尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,辅酶II;tRNA(transfer RNA),转移RNA;cAMP(cyclic adenosine monophosphate),环腺苷酸;cGMP(cyclic guanosine monophosphate),环鸟苷酸。

20.4. 核酸含量的测定

DNA与RNA含量的测定常用的方法有两类,对纯的样品(无显著蛋白质,酚,琼脂糖及其他核酸污染)用分光光度法测定碱基的紫外吸收,可计算出核酸含量,简单而又准确。如果DNA或RNA的量很少或有较多杂质,其含量可用荧光法测定,最常用的为溴乙锭荧光法。具体方法详见参考文献3。表20-4总结了现有的常用方法。

表 20-4 核酸含量的测定方法

方法	类型 S/F	最小测定量	干扰化合物
DNA			
UV吸收(260nm)	S	1μg	UV吸收化合物
二苯胺	S	50μg	糖,蛋白质
DAPI	F	20ng	荧光依赖于DNA碱基组成
溴乙锭	F	50ng	
甲基绿	S	2μg	甲基绿中的杂质,去垢剂
RNA			
UV吸收(260nm)	S	1μg	UV吸收化合物
5-甲基-1,3-苯二酚	S	20μg	糖,核苷,蛋白质
溴乙锭	F	100ng	

缩写: S,分光光度法;F,荧光法;DAPI,4,6-二脒-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole)。本表引自Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers,1993。

分光光度法测定核酸含量时,260nm 的读数用于计算样品中核酸的含量,260nm 与 280nm 的读数比则用于检验核酸的纯度。纯的 DNA 和 RNA,其 OD_{260}/OD_{280} 应分别为 1.8 和 2.0,若污染了蛋白质或酚, OD_{260}/OD_{280} 比值明显低于此值,因此不能准确测出样品中的核酸含量。以下是分光光度法换算的公式:

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ 双链 DNA} = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ 单链 DNA} = 37 \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ 单链 RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$$

20.5. 常用的核酸换算公式及某些核酸的性质

其他常用的一些核酸换算的公式以及常见核酸的长度和分子量,分别见表 20-5 与 20-6。

表 20-5 常用的核酸换算公式

(1) 重量换算

$$1 \mu\text{g} = 10^{-6} \text{ g}$$

$$1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$$

$$1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$$

$$1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$$

(2) DNA 克分子换算

$$1 \mu\text{g} \text{ 的 } 1000\text{bp DNA} = 1.52 \text{ pmol} (3.03 \text{ pmol 的末端})$$

$$1 \mu\text{g} \text{ 的 pBR 322 DNA} = 0.36 \text{ pmol DNA}$$

$$1 \text{ pmol 的 } 1000\text{bp DNA} = 0.662 \mu\text{g}$$

$$1 \text{ pmol 的 pBR 322 DNA} = 2.83 \mu\text{g}$$

(3) 蛋白质/核酸换算

$$1\text{kb DNA} = \text{编码 } 333 \text{ 个氨基酸} = 3.7 \times 10^4 \text{ MW}$$

$$270\text{bp DNA} = 10000 \text{ D 蛋白质}$$

$$810\text{bp DNA} = 30000 \text{ D 蛋白质}$$

$$1.35\text{kb DNA} = 50000 \text{ D 蛋白质}$$

$$2.7\text{kb DNA} = 100000 \text{ D 蛋白质}$$

$$\text{一个氨基酸的平均分子量} = 120 \text{ D}$$

(4) 分子量计算

$$1 \text{ 个 D(道尔顿)} = 0.992 \text{ 原子质量单位(u)}$$

$$1 \text{ 个脱氧核苷酸的平均分子量} = 324.5\text{D} = 321.9 \text{ 原子质量单位(u)}$$

$$1 \text{ 个脱氧核苷酸对的平均分子量} = 649 \text{ 道 D} = 321.9 \text{ 原子质量单位}$$

$$1\text{kb 双链 DNA(钠盐)} = 6.5 \times 10^5 \text{ D} = 6.45 \times 10^5 \text{ 原子质量单位}$$

$$1\text{kb 单链 DNA(钠盐)} = 3.3 \times 10^5 \text{ D} = 3.27 \times 10^5 \text{ 原子质量单位}$$

$$1\text{kb 单链 RNA(钠盐)} = 3.4 \times 10^5 \text{ D} = 3.37 \times 10^5 \text{ 原子质量单位}$$

表 20-6 常见核酸的长度和分子量

核酸	核苷酸数	分子量
lambda DNA	48 502(dsDNA)	3.0×10^7
pBR 322 DNA	4 363(dsDNA)	2.8×10^6
28S rRNA	4 800	1.6×10^6
23S rRNA	3 700	1.2×10^6
18S rRNA	1 900	6.1×10^5
16S rRNA	1 700	5.5×10^5
5S rRNA	120	3.6×10^4
tRNA(<i>E. coli</i>)	75	2.5×10^4

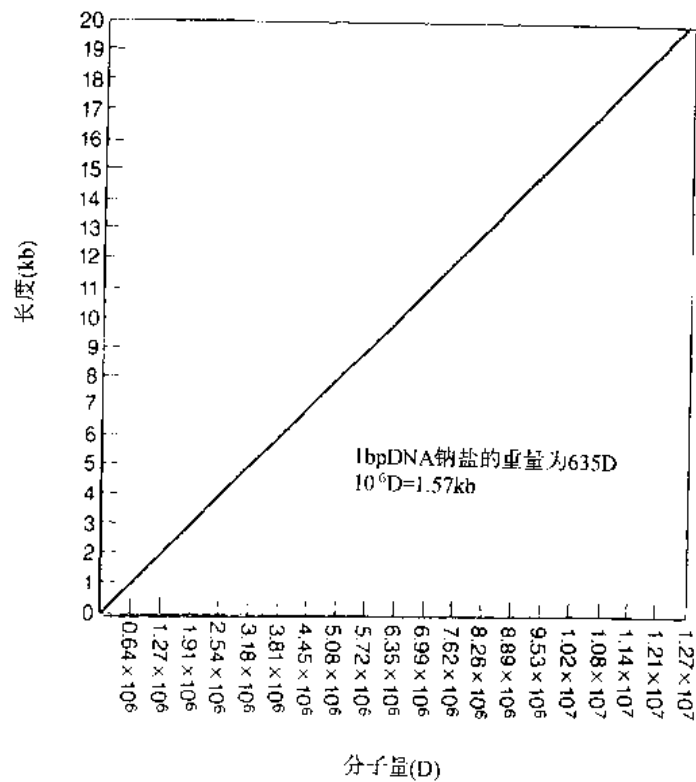


图 20-4 DNA 长度与分子量的关系

引自金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南第 2 版. 科学出版社,1992.

20.6. 核酸的纯化与浓缩

核酸的纯化与浓缩是分子生物学中最常用的技术之一。如核酸的粗制样品与 PCR 产物中均有一些杂质,在进一步工作时需要纯化或浓缩。表 20-7 及表 20-8 分别列出了一些常用方法与乙醇沉淀时的盐浓度。

表 20-7 核酸纯化与浓缩的方法

试剂	目的	陈注	参考文献
酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)	去除蛋白质	在酚试剂中加入 8-羟喹啉(终浓度 0.1%),能抑制部分 RNase 活力并有助于辨认有机相。酚需用缓冲液充分平衡,否则核酸将会进入有机相。	3
蛋白酶(链霉菌蛋白酶 或蛋白酶 K)	去除蛋白质	从细胞裂解液中纯化核酸,可先用蛋白酶消化,以去除大部分蛋白质,再用酚试剂抽提。	3
乙醇或异丙醇	沉淀核酸进行浓缩, 去盐	在单价阳离子存在下,加入 2~2.5 体积乙醇,可以定量回收。使用何种阳离子,根据实验目的决定(见下表)。异丙醇用量小,可减小离心液体积,但不易挥发,蔗糖或氯化钠易与 DNA 共沉淀	3
离心小柱	去盐、交换缓冲液、 纯化 PCR 产物及 DNA	详见表 20-9 及 20-10	4,5

表 20-8 用乙醇沉淀时的盐溶液

名称	贮存液 (mol/L)	终浓度 (mol/L)	备注
乙酸铵	10.0	2.0~2.5	乙酸铵可以避免 dNTP 共沉淀
氯化锂	8.0	0.8	用较高浓度沉淀 RNA 时, LiCl 不随核酸共沉淀。如 RNA 用于无细胞翻译体系或反转录,有抑制作用,避免使用 LiCl
氯化钠	5.0	0.2	含有 SDS 的样品,应使用 NaCl,它在 70%乙醇中仍保持可溶
乙酸钠 (pH5.2)	3.0	0.3	DNA 与 RNA 大多使用乙酸钠

近年来为了方便与节省时间,有人采用现成的离心小柱(图 20-5)。出售的商品柱种类繁多,由于各厂家填装小柱所用去除杂质的基质不同,能去除的杂质也不同。因此要根据需要选择适当的牌号和型号。如百乐(BioRad)公司柱内填装的是玻璃珠,Supel 公司则为硅胶类物质,均用以吸附 DNA。离心去除杂质后,用缓冲液洗脱 DNA,可除去 PCR 产物中的引物、核苷酸、油脂和盐等。Boehringer 公司柱内装有葡聚糖凝胶(G-25 或 G-50),

可从同位素标记后的反应液中去掉没有标记上的 DNA, 得到纯化的标记 DNA。Pharmacia 公司采用的分离基质为烯丙基葡聚糖-丙烯酰胺 HR 凝胶。Amicon 公司出品的微量浓缩器(Centricon), 蛋白质与核酸均可用以纯化与浓缩, 所用的分离基质为超滤膜。离心后小于切除分子量的杂质可以滤过, 柱中保留纯化或浓缩的样品, 颠倒柱子, 装在另一收集管上, 离心即可得到纯化样品。也可用酒精沉淀回收 DNA。图 20-5 是 Centricon 的装置。Millipore 公司也有类似产品, 称为 Sep-Pak。表 20-9 与 20-10 分别列举了 Pharmacia 与 Amicon 两个公司产品的特性, 以供参考。纯化 mRNA 的离心小柱, 其支持物上联结了 polyT, 因此带有 polyA 尾的 mRNA 可被特异结合而与杂质分离。

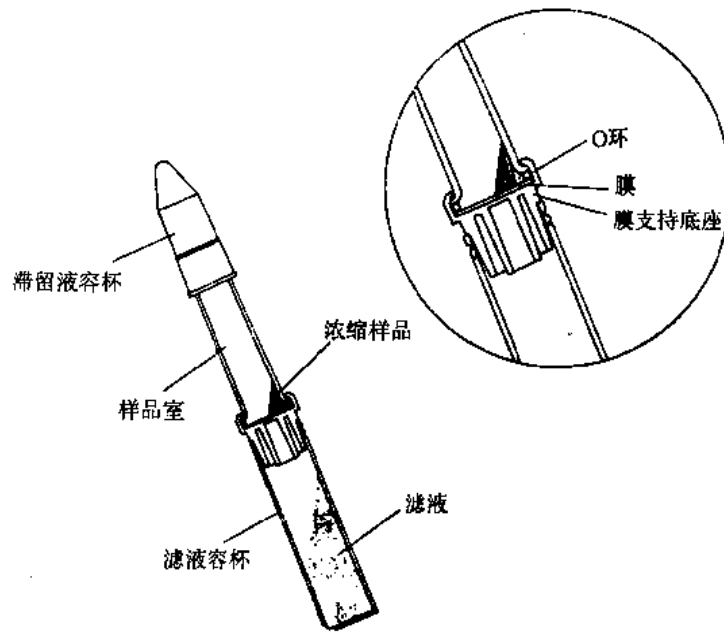


图 20-5 Centricon 的装置

每个一次性 Centricon 装置包括一个浓缩器、滤液容杯和滞留液容杯。浓缩器则包括一张 YM 型膜和一个 O 环。O 环在样品室与支持底座之间起持久密封作用。
(本图引自金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南, 第 2 版. 科学出版社, 1992)

表 20-9 离心小柱(Centricon)特性

型号	切除核苷酸数		离心时间 25°C	最高离心力(g)
	单链	双链		
Centricon-SR3*	10	10	2 小时	7 500
Centricon-3	10	10	2 小时	7 500
Centricon-10	30	20	1 小时	5 000
Centricon-30	60	50	30 分钟	5 000
Centricon-50	60	50	15 分钟	5 000
Centricon-100	300	125	30 分钟	1 000

* Centricon-SR3, 耐有机溶剂。

表 20-10 离心小柱(microSpin columns)特性

DNA	应用	效果	型号	体积
PCR 产物 ^a	PCR 后缓冲液交换、	缓冲液交换/去盐	S-200 HR	25~50 μ l
	测序或克隆前纯化 PCR 产物	去除多余引物	S-300 HR	25~50 μ l
	两个 PCR 间纯化 PCR 产物	去除多余引物	S-400 HR	50~100 μ l
			S-400 HR	25~50 μ l
标记 DNA ^b >100 碱基	标记产物的纯化	去除游离核苷酸	S-200 HR	25~50 μ l
			S-300 HR	50~75 μ l
			S-400 HR	75~100 μ l
质粒 DNA	测序前从变性质 粒DNA(RNase 处理) 去除 NaOH	缓冲液交换/去盐	S-200 HR	25~50 μ l
	测序前从变性质粒 DNA (RNase 未处理) 去除 NaOH	从 RNA 纯化质粒 DNA	S-300 HR	25~50 μ l
		缓冲液交换/去盐	S-400 HR	50~100 μ l
	寡核苷酸 ^c	纯化合成寡核苷酸	缓冲液交换	S-200 HR
从标记的寡核苷酸 除去未标记的寡核苷酸			无	无
DNA > 100 碱基		酶反应间交换缓冲液	缓冲液交换	S-200 HR

a: 克隆前用 S-400 HR 柱,其他用 S-300 HR 柱;下列情况除外:(1)PCR 产物长度 < 200bp,用 S-300 HR 柱;(2)凡引物长度 > 24bp,不论 PCR 产物多长,均用 S-400 HR 柱。

b: DNA 长度 > 100bp 不建议采用此法从标记的寡核苷酸除去未标记的寡核苷酸。

c: 纯化一般寡核苷酸,样品加量为 100 μ l,纯化染料标记的寡核苷酸,样品加量为 150 μ l。

(吴冠芸)

参 考 文 献

- 王德宝,祁国荣主编. 核酸. 科学出版社, 1986.
 Biochemicals Catalog, Boehringer Mannheim GmbH, 1996
 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1993
 Centrion Concentrators, Operating Instructions. Amicon Inc, 1994
 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning, a Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
 Stratagene Catalog, stratagene cloning Systems, 1995

21. 核酸的凝胶电泳

凝胶电泳是分离、鉴定、纯化及制备 DNA 片段最常用的方法,也用于 RNA 的纯化与分离。常用的支持物有琼脂糖和聚丙烯酰胺。聚丙烯酰胺适用于小分子 DNA 的分离(以 5~500bp,最佳),琼脂糖则适用于 200bp 至近 50kb DNA 片段的分离。核酸电泳可以在非变性或变性条件下进行。分离核蛋白时,在低浓度的聚丙烯酰胺中(2%)加入低浓度的琼脂糖可以增加胶的强度。长度大于 50kb 的 DNA 片段则可用脉冲场凝胶电泳进行分离。

21.1. 凝胶及其浓度的选择和配制

线状双链 DNA 在一定浓度琼脂糖凝胶中的泳动距离与分子量的对数成反比。不同浓度的凝胶分离 DNA 片段有不同的有效范围,所以应根据被分离 DNA 片段的大小,选择合适的凝胶浓度,使迁移率在要求的范围内与分子量大小成线性关系,这样能较准确地测出分子量或进行比较鉴定。在变性条件下,核酸的二级结构不复存在,不论 DNA 或 RNA 均以单链分子迁移,其迁移率与分子量直接有关,因此可准确地测出分子量。表 21-1 与 21-2 列出了凝胶浓度与 DNA 的分离范围。

表 21-1 不同浓度琼脂糖的分离范围

凝胶的浓度[% (w/v)]	线状双链 DNA 片段的分离范围(kb)
0.3	5~60
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.4~6
1.5	0.2~3
2.0	0.1~2

本表引自金冬雁,黎孟枫等译。分子克隆实验指南。第二版,科学出版社,1992。

表 21-2 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶中的有效分离范围

聚丙烯酰胺 [% (w/v)] ^a	DNA 有效分离范围(bp)		二甲基苯青 FF ^b	溴酚蓝 ^b
	双链	单链		
3.5	1 000~2 000	750~2 000	460	100
5.0	80~500	200~1 000	260	55
8.0	60~400	50~400	160	45
12.0	40~200		70	20
15.0	25~150		60	15
20.0	6~100		45	12

a: N,N'-亚甲双丙烯酰胺占 1/30;

b: 表中数字是迁移率与染料相等的双链 DNA 片段的粗略大小(bp)。

近些年来,由于分子生物学对琼脂糖纯度、强度及筛分度等的要求,各厂家在琼脂糖的性质上作了有用的改进,以满足不同的要求,工作者可根据需要加以选择。①高纯或超纯琼脂糖:DNA和RNA片段以及基因组DNA在分离回收后,琼脂糖中的杂质往往会干扰进一步克隆、标记或酶切等操作,应用高纯度或超纯琼脂糖效果要好得多。②低熔点琼脂糖:一般琼脂糖要加热到80~90℃才能熔化,这一温度足以使DNA双链解开。多糖链上引入羟乙基可使琼脂糖的熔点降低,低熔点胶65℃即可熔化。成胶温度低于30℃。从胶中回收DNA就无上述问题,但低熔点胶分辨率与机械强度往往较差。③高强度琼脂糖:琼脂糖胶的浓度低于0.4%时,脆性大,易破碎。在进行大分子分离如胶浓度≤0.5%应采用高强度琼脂糖,它的强度比一般琼脂糖要大2~6倍。④高筛分琼脂糖:一般琼脂糖的孔径较大,因此对1000bp以下的分子分辨率较差。目前这类产品很多,如3:1的Nusieve(Nusieve GTG^R, genetic technology grade)胶和Metaphor(FMC Bioproducts)均可用以分离小的DNA片段。据报告Metaphor在200bp水平可以分辨4个碱基。VisgelTM琼脂糖,它的透明度好,筛分度高,不易破裂,可用于分离100~1200bp的核酸片段,包括PCR产物。最近提出的有分子筛作用的琼脂糖,如琼脂糖MS可筛分50~1500bp DNA片段,具有高分辨率,能区分相差4个碱基的DNA片段,并具有高强度,除可用于PCR产物的分析外,还能用于基因分型,四核苷酸重复序列的分析。SeparideTM是胶基质与多糖混溶的产物,专用于小分子(<1000bp)双链核酸的分离,比琼脂糖分辨率高,清澈度好,易操作。表21-3列出了琼脂糖电泳中可采用的一些琼脂糖类型和应用范围。

表 21-3 琼脂糖电泳中可采用的琼脂糖型号和应用范围

实验操作	适用的琼脂糖型号	应用范围
核酸的分离	SeaKem GTG ^R ,	500~23 000bp
	SeaPlaque GTG ^R , ID NAR,	
	LM-MP 琼脂糖	100~10 000bp
	SeaKem Gold, SeaKem LE	700~8 500bp
	Visgel TM	100~1 000bp
	AmpliSize 琼脂糖	50~2 000bp
	MS	50~1 500bp
	Separide TM	<1 000bp
	Nusieve ^R GTG, MetaPhor ^R	4~1 000bp
脉冲场电泳	MP Agarose, PFGE 级琼脂糖	
	InCert, SeaKem GTG	
MegabaseDNA	染色体级琼脂糖, FastLane	
脉冲场电泳		

出产厂家: SeaKem, SeaPlaque, ID NATM, Nusieve, InCert, SeaKem LE 均系 FMC Bioproducts 生产; LM-MP, MP 及 MS 均为 Boehringer Mannheim 产品; VisgelTM系 Stratagene 产品; AmpliSize, PFGE 级, 染色体级琼脂糖系 BioRad 产品; SeparideTM系 BRL 产品。

表 21-4 不同浓度聚丙烯酰胺凝胶的配制

试剂 (ml)	聚丙烯酰胺最后浓度				
	3.5%	5.0%	8.0%	12.0%	20.0%
30% 聚丙烯酰胺 ^a	11.6	16.6	26.6	40.0	66.6
水	67.7	62.7	52.7	39.3	12.7
5×TBE(见表 21-12)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
10% 过硫酸铵 ^b	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
总体积	100	100	100	100	100
TEMED ^b (1%)	35μl	35μl	35μl	35μl	35μl

a 30% 聚丙烯酰胺配制:29g 丙烯酰胺,1g 亚甲双丙烯酰胺;

b 接触剂;过硫酸铵应新鲜配制;TEMED(N, N, N', N'-四甲基乙二胺,N, N, N', N'-tetramethylenediamine,) 在其他试剂混合后加入,加入量可随室温高低减少或增加。

表 21-5 分离核糖核蛋白体与聚核糖核蛋白体聚丙烯酰胺凝胶的配制

凝胶组成 (聚丙烯酰胺 /琼脂糖)	凝胶缓 冲液	贮备缓冲液								
		琼脂糖 (g)	H ₂ O (ml)	20%丙烯酰胺 ^a - 双丙 烯酰胺 溶液(ml)	6.4% DMA- PN ^b (ml)	10×Tris -硼酸 ^c EDTA (ml)	1mol/L Tris- HCl (ml)	3mol/L KCl (ml)	1mol/L MgCl ₂ (ml)	1.6% 过硫酸 铵 (ml)
2.25%/0.5%	25mmol/L Tris-HCl 60mmol/L KCl 10mmol/L MgCl ₂	0.8	118	18	10	—	4	3.2	1.6	5
2.25%/0.5%	25mmol/L Tris-HCl 6mmol/L KCl 2mmol/L MgCl ₂ (pH7.6)	0.8	122	18	10	—	4	0.32	0.32	5
2.75%/0.5%	25mmol/L Tris-HCl 0.2mmol/L MgCl ₂ (pH7.5)	0.8	119	22	10	—	4	—	0.032	5
3%/0.5%	Tris-硼酸- EDTA(pH8.3)	0.8	105	24	10	16	—	—	—	5

a 20% 丙烯酰胺;19% 丙烯酰胺, 1% 双丙烯酰胺;

b DMAPN, 3-二甲氨基丙腈(3-dimethylaminopropionitrile);

c 10×Tris 硼酸-EDTA 配制见表 21-12。

本表引自 Chambers J A A, Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publishers,1993.

琼脂糖的制备较为简单,用电泳缓冲液加热使琼脂糖完全溶解即可。表 21-4 是聚丙烯酰胺凝胶的配制方法。表 21-5 是分离核糖体与聚核糖体凝胶的配制方法。在单向电泳分离核酸不能达到分离目的时,可采用双向电泳。表 21-6 至 21-11 列出了双向电泳分离

DNA、RNA 与寡核苷酸的凝胶配制方法。表 21-12 与表 21-13 列出了应用简单的电泳测定核酸与蛋白质的相互作用。凝胶阻滞试验在核酸与蛋白质的结合反应中可以分离与定量自由和复合的组分。自由 DNA 与 DNA-蛋白质复合物在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率是不相同的,自由的 DNA 很快进入凝胶,而 DNA-蛋白质复合物的迁移率明显降低。

表 21-6 双向电泳分离 RNA 片段凝胶的配制

向	凝胶浓度(% w/v)		缓冲液	分离的 RNA 片段
	丙烯酰胺	双丙烯酰胺		
第一	12.1	0.4	0.04mol/L Tris-醋酸 pH8.4	13 ≤ N ≤ 79
第二	12.1	0.4	0.04mol/L Tris-醋酸, 8mol/L 尿素, pH8.4	
第一	10.0	0.325	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素	10 ≤ N ≤ 80
第二	20.0	0.65	0.04mol/L Tris-柠檬酸 pH8.0	
第一	8.0	0.26	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素	N > 80
第二	16.0	0.52	0.04mol/L Tris-柠檬酸 pH8.0	

平衡液: 水与 8mol/L 尿素; 密封胶溶液不含缓冲液。

方法 1: 双向聚合均用 0.1ml TEMED 与 0.04%(w/v)APS, 方法 2 与 3 参照表 21-11。

表 21-7 小 RNA 的电泳分离

向	凝胶浓度(% w/v)		缓冲液
	丙烯酰胺	双丙烯酰胺	
第一	9.5	0.5	0.089mol/L Tris 碱, 0.0025mol/L EDTA 0.089mol/L H ₃ BO ₃ , pH8.3
第二	19.0	1.0	0.089mol/L Tris 碱, 0.0025mol/L EDTA 0.089mol/L H ₃ BO ₃ , pH8.3
第一	15.2	0.8	0.089mol/L Tris 碱, 0.0025mol/L EDTA 0.089mol/L H ₃ BO ₃ , 7mol/L 尿素
第二	15.2	0.8	0.089mol/L Tris 碱, 0.0025mol/L EDTA 0.089mol/L H ₃ BO ₃ , pH8.3

注: 方法 1: 双向均用 0.4ml DMAPN 与 0.04%(w/v)APS 为聚合物;

方法 2: 双向均用 0.42ml DMAPN 与 0.056%(w/v)APS 为聚合物, 并在分离胶上加约 1.5ml 成层胶。成层胶中含有丙烯酰胺-双丙烯酰胺(4.75 : 0.25)与 0.05mol/L Tris-HCl, 5ml 丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液中加入 0.25ml 核黄素(0.02%), 用紫外光催化。

表 21-8 双向电泳分离 DNA 限制酶片段凝胶的配制

双向胶均为: 0.7%(w/v)琼脂糖溶于 2×TBE, 见表 21-11
电泳缓冲液为: 2×TBE
密封胶: 0.7%(w/v)琼脂糖溶于 2×TBE

表 21-9 双向变性电泳分离 DNA 片段梯度凝胶的配制

向	胶 配 制
第一	1%琼脂糖溶于 TAE(40mmol/L Tris, 20mmol/L NaAc, 1mmol/L EDTA, pH 8.0
第二	低密度: TAE 中含有 4%丙烯酰胺 ^a , 加入 0.2ml 20%(w/v)APS 与 4μl TEMED 高密度: TAE 中含有 4%丙烯酰胺 ^a , 7mol/L 尿素和 40%甲酰胺, 加 0.2ml 20% (w/v)APS 与 4μl TEMED

电泳缓冲液: 1×TAE;

密封胶: 含有 1%(w/v)琼脂糖的 TAE;

a: 4%丙烯酰胺制自丙烯酰胺-双丙烯酰胺(30:0.8)贮备液。

表 21-10 双向电泳分离寡核苷酸凝胶的配制

贮备液	第一向 (10%丙烯酰胺) ^a	第二向 (20%~23%丙烯酰胺) ^a
丙烯酰胺-双丙烯酰胺(40:1.3)	37.5	75
9 mol/L 尿素	100	—
1mol/L 柠檬酸	3.75	—
1mol/L Tris pH 8.0 ^b	—	6
2.5%(w/v)FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.6	—
10%(w/v)抗坏血酸	0.6	—
30%(w/v)H ₂ O ₂	0.06	—
H ₂ O	7.49	68.35
10%(w/v)APS	—	0.6
TEMED	—	0.05

a: 表中数字为制备 150 ml 凝胶混合液所需各贮备液的毫升数。

b: 用柠檬酸调至 pH 8.0。

表 21-11 双向电泳分离寡核苷酸凝胶的配制(改进方法)

向	凝胶浓度(% w/v) ^a		缓 冲 液
	丙烯酰胺	双丙烯酰胺	
第一	10.0	0.325	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素
第二	20.0	0.65	0.04mol/L Tris-柠檬酸, pH 8.0
第一	10.0	0.35	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素
第二	20.0	0.66	0.1mol/L Tris-硼酸, 0.0025mol/L EDTA, pH8.3
第一	10.0	0.325	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素
第二	20.0	0.65	0.2mol/L Tris-硼酸, 0.005mol/L EDTA, pH8.3
第一	10.0	0.3	0.025mol/L 柠檬酸, 6mol/L 尿素 ^b
第二	22.8	0.8	0.5mol/L Tris-硼酸, pH8.3

a: 所有方法的接触剂均同表 21-9。

b: 本方法只有凝胶中含尿素, 电泳缓冲液用 0.025mol/L 柠檬酸。

表 21-12 凝胶阻滞分析

凝胶配制(5%丙烯酰胺);	12.5ml 30%丙烯酰胺-双丙烯酰胺贮备液(29:1);
	3ml 5×TBE
	59.5ml 水
	0.4ml 10%(w/v)APS
	0.03ml TEMED
电泳缓冲液;	0.2×TBE

表 21-13 分析 DNA-蛋白质复合物的琼脂糖-丙烯酰胺平板电泳凝胶配制

凝胶配制, 15ml 1×TBE 含有 1%(w/v)琼脂糖	
5.2ml 1×TBE 含有 15%丙烯酰胺-双丙烯酰胺贮备液(30:1)	
10ml 水	
0.2ml 10%(w/v)APS	
0.02ml TEMED	
电泳缓冲液;	1×TBE

21.2. 电泳缓冲液

表 21-14 是常用的几种电泳缓冲液(TAE, TBE, TPE 及碱性缓冲液), 用于天然双链 DNA 片段的分离。其中 TAE 最为常用, 但它的缓冲容量低, 高压和长时间的电泳会使其缓冲能力完全丧失。应采取在两槽之间进行缓冲液循环或更换新缓冲液等措施。纯化单链 DNA 如放射性探针的分离, S1 核酸酶消化产物的分析, DNA 测序反应产物的分析以及 RNA 的分离纯化均需进行变性凝胶电泳, 表 21-15 列出了几种变性凝胶电泳。电泳加样缓冲液(表 21-16)中含有蔗糖或甘油或聚蔗糖以及可预知速率的染料, 前者可增加加样液的密度以利于样品能均匀地进入样品孔, 后者便于操作。

表 21-14 常用的电泳缓冲液

缓冲液化	使用液	贮存液
Tris-乙酸(TAE)	1×; 0.04mol/L Tris-乙酸 0.001mol/L EDTA	50×; 242g Tris 57.1ml 冰醋酸 100ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0)
Tris-磷酸(TPE)	1×; 0.09mol/L Tris-磷酸 0.002mol/L EDTA	10×; 108g Tris 15.5ml 85% (1.679g/ml) 40ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0)
Tris-硼酸(TBE) ^a	0.5×; 0.045mol/L Tris-硼酸 0.001mol/L EDTA	5×; 54g Tris 27.5g 硼酸 20ml 0.5mol/L EDTA(pH8.0)

缓冲液化	使用液	贮存液
碱性缓冲液 ^b	1 × : 50mmol/L NaOH 1mmol/L EDTA	1 × : 5ml 10mmol/L NaOH 2ml 0.5mmol/L EDTA(pH8.0)

a: TBE 浓溶液长时间存放会形成沉淀,可在室温下用玻璃瓶保存 5×溶液,出现沉淀后予以废弃。聚丙烯酰胺凝胶电泳时用 1×TBE, 以提供足够的缓冲容量。

b: 碱性电泳缓冲液应现用现配。

本书引自金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版,科学出版社,1992.

表 21-15 变性琼脂糖凝胶电泳

变性剂	凝胶缓冲液	电泳缓冲液	加样液	说明
碱	50 mmol/L NaCl, 1mmol/L Na ₂ EDTA, 中性缓冲液	30 mmol/L NaOH, 1mmol/L Na ₂ EDTA 加样前胶 在此缓冲液中浸 泡 30 分钟	样品悬浮于 50mmol/L NaOH, 1mmol/L Na ₂ EDTA, 加 30% 聚蔗糖 400, 溴甲酚绿及二甲 苯青各 0.025%(w/v)	仅用于 DNA 琼脂糖 电泳
乙二醛	10 mmol/L 磷酸钠, pH7.0, 中性缓冲液	同凝胶缓冲液	样品重悬浮于 8μl 1mol/L 乙二 醛, 50%(v/v)DMSO, 10mmol 磷酸钠, pH7.0, 50℃保温 1 小 时, 冷却后加入 2μl 10mmol/L 磷酸钠, pH 7.0, 50%甘油, 0.4%(w/v)溴酚蓝	可用于 DNA 与 RNA 琼脂糖电泳。电泳 前样品用乙二醛变 性。乙二醛不稳定, 自身有氧化还原作 用
氢氧化 甲基汞	琼脂糖溶于 50mmol/L 硼 酸, 5mmol/L 硼酸钠, 10mmol/L 硫酸钠, pH 8.2 缓冲液, 冷至 50℃, 加氢氧化甲基汞到 5mmol/L	50 mmol/L 硼酸, 5mmol/L 硼酸 钠, 10mmol/L 硫 酸钠, pH8.2	500μl 4×电泳缓冲液, 200μl 30% 聚蔗糖, 25μl 1mol/L 氢氧化甲 基汞加水至 1ml。再加溴酚蓝 与二甲苯青(终浓度为 0.1% w/v)	可用于 DNA 与 RNA 琼脂糖电泳。氢氧 化甲基汞有毒性。
甲醛	40 mmol/L MOPS pH 7.0 10mmol/L NaAc 1mmol/L Na ₂ EDTA 2.2mol/L 甲醛	同凝胶液缓冲液, 不加甲醛	样品在 2μl 5×电泳液, 10μl 甲酰 胺, 3.5 μl 浓甲醛(12.3 mol/L) 中, 55℃保温 15 分钟。再加入 2μl 30%聚蔗糖, 1 mmol/L Na ₂ EDTA, 0.25%(w/v)溴酚 蓝和 0.25%(w/v)二甲苯青	用于 RNA 聚丙烯酰 胺凝胶电泳; 常用, 易操作, 但刺激粘 膜
尿素	6~8 mol/L 尿素, 100 mmol/L TBE 20mmol/L Na ₂ EDTA, 0.1% (w/v) 过硫酸胺, 10~ 25μl TEMED	1×TBE	10 mmol/L Na ₂ EDTA(pH 8.0), 0.1%(w/v)二甲苯青与 0.1% (w/v)溴酚蓝。样品在加样前 加热 80℃ 15 分钟进行变性	用于 DNA 聚丙烯酰 胺凝胶电泳, 常用

表 21-16 电泳加样缓冲液

缓冲液类型	5× 缓冲液	贮存温度
I	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 40% (w/v) 蔗糖水溶液	4℃
II	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 15% 聚蔗糖 (ficoll 400 型, Pharmacia) 水溶液	室温
III	0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲苯青 FF 30% 甘油水溶液 ^a	4℃
IV	0.25% 溴酚蓝 40% (w/v) 蔗糖水溶液	4℃
V	碱性加样缓冲液 30 mmol/L NaOH 6 mmol/L EDTA 18% 聚蔗糖 400 0.25% 溴甲酚绿, 0.25% 二甲苯青 FF	

a: 甘油加样液不宜用于 TBE 电泳缓冲液, 因甘油可促进硼酸多次解离, 引起 pH 的改变。

本表引自金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 第二版, 科学出版社, 1992。

21.3. 凝胶中核酸的染色

电泳后, 凝胶中的核酸可经染色直接观察, 溴乙锭 (ethidium bromide, EB) 是最常用的染料。EB 嵌入 DNA 碱基, 呈现橙红色荧光, 灵敏度高, 在琼脂糖凝胶中可检测出少于 10ng 的 DNA。聚丙烯酰胺会淬灭 EB 的荧光, 灵敏度降低, 不能检测出少于 10ng 的 DNA。银染也可用于 DNA 的染色, 它的灵敏度比 EB 高 5 倍。其他一些染色方法也可采用 (表 21-17)。

表 21-17 凝胶中核酸的染色

染色	脱色	建议
胶在 1~5 μ g EB/ml(水或 0.5mol/L NH ₄ Ac)溶液中浸泡 30~60 分钟	水或 0.5 mol/L NH ₄ Ac 漂洗,放置暗处	贮存液: EB 用水配成 10mg/ml 存于棕色瓶
胶用 10%乙醇和 0.5%冰醋酸固定 6 分钟,两次;0.2% AgNO ₃ 溶液中浸泡 10~12 分钟,蒸馏水充分漂洗; 1.5%NaOH 和 0.4%甲醛显色适度; 0.75%Na ₂ CO ₃ 终止显色,抽干或压干		
胶浸于 0.1% 焦宁 (pyronin Y) 的 0.5% HAc 和 1mmol/L 柠檬酸溶液中	0.5% HAc	甲酰胺胶分离 RNA 时也可用 10%醋酸脱色
胶浸于 0.2% 甲基蓝的 0.2mol/L NaAc 溶液中 (pH7.4)过夜	蒸馏水	也可用甲苯胺蓝 (toluidine blue), 硫堇蓝 (thionin) 或天青 A (azure A)

21.4. 核酸分子量标准参照物

每次电泳时均加入已知分子量的 DNA 片段作为标准参照物。从 DNA 标准参照物分子量的高低来讲,大致可分为三类:(1)极高分子量的准参照物极大多数在百万碱基水平 (megabase, mb),用于脉冲场凝胶电泳。(2)正常范围分子量标准参照物。(3)低分子量标准参照物,主要用于 PCR 产物分子量的测定。

制备的方法主要用限制酶水解嗜菌体或质粒 DNA 得到的片段。有的用一个酶,有的用双酶解,也有的用单酶解后,产物再合在一起。如 DNA 用 ApaI、XhoI、KpnI 和 XbaI 分别水解,然后再混合在一起(表 21-21),成为一个很有用的脉冲场凝胶电泳分子量标准参照物。低分子量的标准参照物常做成梯状 (ladder),如 10bp、50bp、100bp 等梯状。RNA 分子量标准参照物,过去采用已知分子量的 RNA 作为标准参照物(表 21-22),现已有制备的 RNA 片段作为分子量标准参照物,如线性化质粒分别用 Sp6 或 T7 在体外转录,然后按一定比例混合在一起作为分子量标准。各种分子量标准参照物有成品出售,也可自制。图 21-1 为分子量标准参照物的一览图。

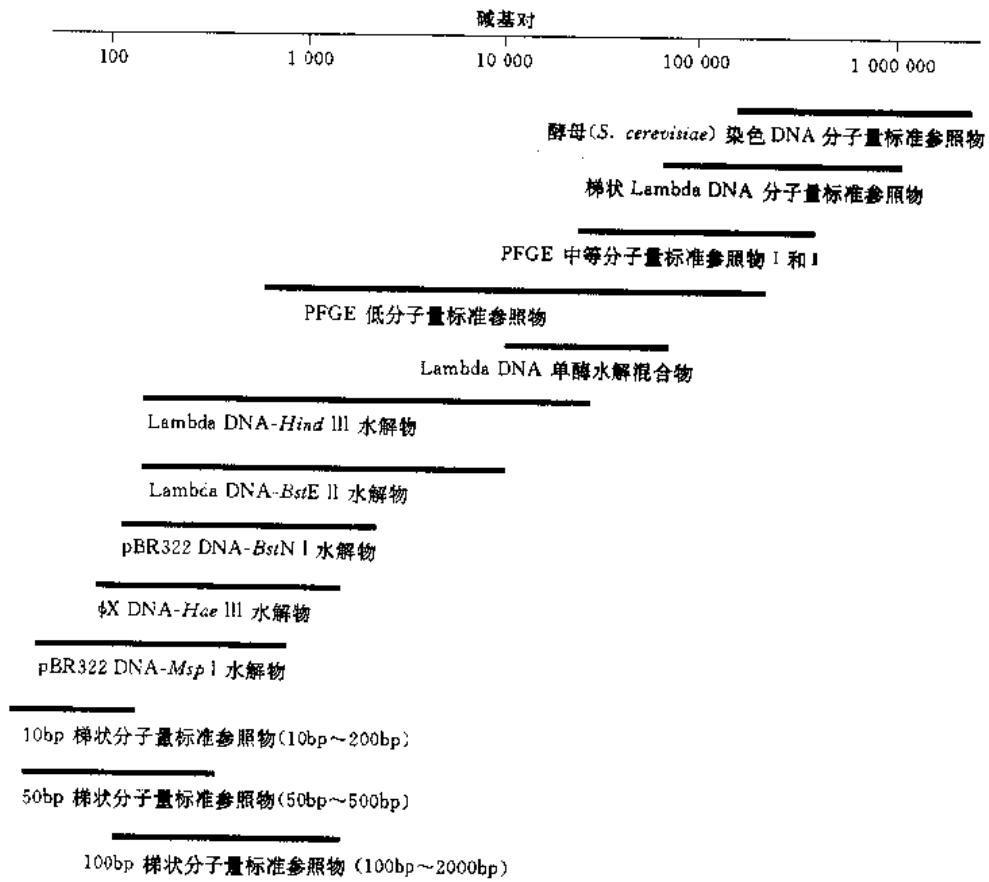


图 21-1 DNA 分子量标准参照物--览图

表 21-18 λ 噬菌体 DNA^a 限制酶片段长度(bp)

Xho I	Kpn I	Sst I	Pvu I	SmaI	Sst I	BamH I	EcoR I	Bgl I	BssH I	Hind II	Bcl I	BstE I	Pvu I
33 520	29 960	24 790	14 310	19 420	20 340	16 840	21 240	22 010	20 494	23 150	18 909	8453	21 110
15 020	17 070	22 550	12 730	12 220	18 780	7230	7420	13 290	11 359	9420	8844	7242	4775
	1500	1190	11960	8630	8130	6785	5810	9700	9188	6560	6330	6369	4420
			9540	8270	1080	6530	5650	2390	3522	4380	4623	5687	4270
					210	5620	4880	650	1834	2320	4459	4822	3980
						5530	3540	435	1501	2020	2684	4324	3910
								60	604	560	1576	3675	2300
										125	560	2323	1710
											517	1929	640
												1371	530
												1264	470
												702	230
												224	140
												117	60

a. λ 噬菌体, 线状, 48 502bp。

表 21-19 pBR322 DNA^a 限制酶片段长度(bp)

Enzyme	Taq I	Ava I	Xho I	Hinf I	Hae II	Sau961	Alu I	Hae III	Msp I
1857	1444	1746	1449	1631	1876	1461	910	587	622
1058	1307	1434	1292	517	622	616	659	540	527
929	475	303	768	506	439	352	655	504	404
383	368	279	728	396	430	279	521	458	307
121	315	249	86	344	370	275	403	434	242
13	312	222	17	298	227	249	281	267	238
	141	88	12	221	181	222	257	234	217
		42	11	220	83	191	226	213	201
				154	60	189	136	192	190
				75	53	179	100	184	180
					21	124	63	124	160, 160
						88	57	123	147, 147
						79	49	104	123
						42	19	89	110
						17	15	80	90
							11	64	76
								57	67
								51	34, 34
								21	26, 26
								18	15
								11	9, 9
								7	

a: pBR322, 环状, 4363bp.

表 21-20 ϕ X174 DNA^a 限制酶片段长度(bp)

Hpa I	2748, 1697, 374, 348, 219
Hae I	2712, 872, 738, 603, 389, 72
Hae III	1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72
Mbo I	1103, 1064, 857, 812, 396, 396, 324, 224, 118, 89, 3
Hinc II	1057, 770, 612, 495, 392, 345, 341, 335, 297, 291, 210, 162, 79
Hinf I	726, 713, 553, 500, 427, 413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 65, 48, 42, 40, 24

a: ϕ X174 DNA, 环状, 5386bp.

表 21-21 脉冲场电泳(PFGE)分子量标准参照物

酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 染色体 DNA

染色体: XII, IV, VI, XV, XVI, XIII, I, XIV, X, XI, V, VII, IX, III, II, VIII, I

长度(kb): 1 900, 1 640, 1 120, 1 100, 945, 915, 815, 785, 745, 680, 610, 555, 450, 375, 295, 225

梯状 Lambda DNA 分子量标准参照物 (kb):

1018.5, 970.0, 921.5, 873.0, 824.5, 776.0, 727.5, 679.0, 630.5, 582.0, 533.5, 485.0, 436.5, 388.0, 339.5, 291.0, 242.5, 194.0, 145.5, 97.0, 48.5

PFGE 中等分子量标准参照物 I 和 II (kb)

I: 291.0, 276.0, 257.5, 242.5, 227.5, 209.0, 194.0, 179.0, 160.5, 145.5, 130.5, 112.0, 97.0, 82.0, 63.5, 48.5, 33.5, 15.0

II: 291.0, 267 + 266.5, 242.5, 218.5 + 218.0, 194.0, 170.0 + 169.5, 145.5, 121.5 + 121.0, 97.0, 73.0 + 72.5, 48.5, 24.5 + 24.0

PFGE 低分子量标准参照物 (kb)

194.0, 145.5, 97.0, 48.5, 23.1, 9.42, 6.55, 4.36, 2.32, 2.03, 0.56, 0.13

Lambda DNA 单酶水解混合物(kb)

Lambda DNA: 48-502

Lambda DNA-Apa I 水解物: 38.416, 10.086

Lambda DNA-Xho I 水解物: 33.498, 15.004

Lambda DNA-Kpn I 水解物: 29.946, 17.053, 1.503

Lambda DNA-Xba I 水解物: 24.508, 23.994

Lambda DNA 单酶水解混合物: 48.502, 38.416, 33.498, 29.946, 24.508, 23.994, 17.053, 15.004, 10.086, 1.503

表 21-22 RNA 分子量标志物

RNA 名称	来源	分子量 ($\times 10^6$) ^a	核苷酸数
4S RNA	曲霉 (<i>Aspergillus</i>)	0.0263	85
5S RNA	大肠杆菌	0.0372	120
5.8S RNA	曲霉	0.0489	158
组蛋白 H4 mRNA	海胆	0.13	410
α -珠蛋白 mRNA	兔	0.20	630
α -珠蛋白 mRNA	小鼠	0.22	696
β -珠蛋白 mRNA	兔	0.22	710
β -珠蛋白 mRNA	小鼠	0.24	783
免疫球蛋白轻链 mRNA	小鼠	0.39	1 250
A2 结晶 mRNA	小牛水晶体	0.45	1 460
16rRNA	大肠杆菌	0.53	1 776
17rRNA	曲霉	0.62	2 000
18rRNA	HeLa 细胞	0.71	2 366
23rRNA	大肠杆菌	1.07	3 566
25rRNA	曲霉	1.24	4 000
28rRNA	HeLa 细胞	1.90	6 333
肌球蛋白重链 mRNA	小鸡	2.02	6 500
丝心蛋白	蚕	57.0	19 \times 103

a: 分子量根据每个核苷酸平均分子量为 310 计算而得, 故为大致数值。

本表引自 Rickwood D and Hames B D. Gel Electrophoresis of Nucleic Acid; A Practical Approach. IRL Press, 1993.

表 21-23 RNA 分子量标准参照物 (kb)

(1) 0.3~7.4 kb ^a
0.3, 0.4, 0.6, 1.0, 1.6, 1.9, 2.8, 5.3, 7.4
(2) 1.6~7.4 kb ^a
1.6, 1.9, 2.8, 5.3, 7.4
(3) 0.3~1.6 kb ^a
0.3, 0.4, 0.6, 1.0, 1.6
(4) 0.28~6.58 kb ^b
6.583, 4.981, 3.638, 2.604, 1.908, 1.383, 0.955, 0.623, 0.281

^a: RNA 分子量标准参照物 1,2 及 3 系 Boehringer Mannheim 产品。

^b: RNA 分子量标准参照物 4 系 Promega 产品。

(吴冠芸)

参 考 文 献

- 金冬雁等. 分子克隆实验指南(第二版). 科学出版社, 1992
- 蔡良琬. 核酸研究技术. 科学出版社, 1987
- Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publisher, 1991
- Budowle A. Gel Electrophoresis of Protein and Nucleic Acid Selected Techniques, Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1994
- Martin R. Gel Electrophoresis; Nucleic Acid. Scientific Publishers, 1996
- Bio-Rad Life Sciences Research Products 96
- Biochemical Catalog. Boehringer Mannheim GmbH 1998
- Chambers J A A and Rickwood D. Biochemistry LABFAX. Bios Scientific Publisher, 1993
- Gibco BRL Products & Reference Guide, Life Technologies, 1996
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual (2nd Ed). Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- New England Biolabs, 1996/97 Catalog, New England Biolabs, Inc, 1996
- The World of Pharmacia Biotech '95, Pharmacia Biotech, Inc, 1995

22. 核酸研究的工具酶——限制性内切酶与甲基化酶

工具酶顾名思义是指那些在核酸及有关研究中像基本工具一样不可缺少的酶类。重要的有限制性内切酶与甲基化酶,核酸聚合酶,核酸水解酶,连接酶,末端修饰酶及拓朴异构酶等。限制性内切酶(restriction endonuclease,简称限制酶)是一类能识别双链 DNA 分子特异核苷酸序列的 DNA 水解酶。他是体外剪切基因片段的重要工具,基因物理图谱的绘制,基因片段的体外切割重组,转化菌中重组子的筛选等都需要限制性内切酶。限制性内切酶长度多态性(RFLP)是基因物理图谱的第一代标记物,还广泛应用于基因诊断,致病机制的研究。

22.1. 限制性内切酶的分类和识别序列

限制性内切酶根据其特性可分为三种类型(表 22-1)。I 型与 III 型限制性内切酶蛋白同时具有甲基化作用,目前常用的是 II 型酶。

表 22-1 三类限制性内切酶的特性

	酶 的 类 型		
	I	II	III
DNA 底物	双链 DNA	双链 DNA	双链 DNA
辅助因子	Mg ²⁺ ATP SAM	Mg ²⁺	Mg ²⁺ ATP
识别序列	特异	特异	特异
切割位点	非特定 (切于识别序列前后 100 ~1 000bp 范围内)	特定 (切于识别序列之中 或近处)	特定 (切点在识别序列之 后 25~27bp 位置上)
与甲基化 作用的关系	内切酶蛋白同时具有 甲基化作用	酶蛋白不具有甲基化 作用	内切酶蛋白同时 具有甲基化作用

缩写: SAM, S-腺苷酰甲硫氨酸;

本表引自蔡良琬主编核酸研究技术,科学出版社,1987。

大部分 II 型酶能识别具有双轴对称的回文序列(palindromic sequence),如 EcoR I 的识别序列:



表 22-2 具有回文结构的 4 与 6 核苷酸识别序列

	AATT	ACGT	AGCT	ATAT	CATG	CCGG	CGCG	CTAG	GATC	GGGC	GGCC	GTAC	TATA	TCGA	TGCA	TTAA
□□□□	Tsp5091								Dpn II Mbo I Sau3A I							
□□□□	Mae II				Msp I Hpa II		Bfa I		HinP I		Csp6 I			Taq I		Mse I
□□□□		Alu I CviJ I*				HstU I			Dpn I		Hae III CviJ I*	Rsa I				
□□□□									Hha I							
□□□□	Tai I															
□□□□					Nla III											
A□□□□T	Apo I*	Hind III			BspLU III Afl III* Age I EsrF I* BsaW I*	Mlu I Afl III*	Spe I		Bgl II BstY I*					Ppu10 I		
A□□□□T	Psp1406 I													Cla I* BspD I		Asc I
A□□□□T			Ssp I						Eco47 III	Stu I		Sca I				
A□□□□T																
A□□□□T					Nsp I*					Hae II*					Nsi I	

	AATT	ACGT	AGCT	ATAT	CATG	CCGG	CGCG	CTAG	GATC	GGCC	GTAC	TATA	TCGA	TGCA	TTAA
C□□□□□G	Mfe I				Nco I Sty I* Dsa I*	Xma I Ava I* BsoB I*	Dsa I*	Avr II Sty I*		Eag I Eae I*	BstW I	Sfc I*	Xho I Ava I* BsoB I*	Sfc I*	Afl II
C□□□□□G				Nde I											
C□□□□□G		Pvu II BsaA I* MspA I*			Sma I		Msp A I I*								
C□□□□□G							Sac II		Pvu I BstE I*	BstE I*					
C□□□□□G														Pst I	
G□□□□□C	EcoR I Apo I*				NgoM I BsrF I*	BesII II	Nhe I	BamH I EstY I*	Kas I* Ban I*	BspI20 I	Acc65 I Ban I*		Sac I	ApaL I	
G□□□□□C		BsaH I*							Nar I BsaH I*			Acc I*	Acc I*		
G□□□□□C			EczA36 II	EcoRV	Nae I				Ehe I			BstI107 I	Hinc II*	Hpa I Hinc II*	
G□□□□□C															
G□□□□□C		Aat II			Sph I Nsp I*				Bbe I Hae II*	Apa I Ban II* BspI286 I*	Kpn I			BspI286* BstHKA I*	

T [↓] □□□□A	BspH I BspE I BsaW I*	Xba I	Bcl I	Eac I*	BsrG I	
T [↓] □□□□A						BstB I
T□□□□A	SnaB I BsaA I*	Nru I	Fsp I	Msc I		Dra I
T□□□□A						
T□□□□A						

表上端的第一行是核苷酸识别序列从 5'→3'；左侧第一行：方框代表酶识别序列核苷酸的位置，▼代表切割位点，相应互补序列和切割位点未列出。带有*的酶识别多个序列。

表 22-3 具有回文结构的 5 核苷酸识别序列

Y□□N□□	AA□TTAC□GT AG□CT AT□ATCA□TG CC□GG CG□CG CT□AGGA□TC GC□GC GG□CC GT□AC	TA□TA TC□GA TG□CA TT□AA
□□N□□	BssK I	MaeI I
□□N□□		Sau96 I
□□N□□	ScrF I	Fnu4H I
□□N□□	Tsp4C I	
□□N□□		Fnu I
□□N□□		

Λ □□TTAC□GT AG□GT AT□ATCA□TG□CC□GG□CG□CG CT□AGGA□TCGC□GC GG□CC GT□AC TA□TA TC□GA TG□CA TT□AA				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{A} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$	EcoR II	VpaIIA I		
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{A} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$	BstN I	Tfi I Tse I Ava II		
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{A} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{A} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{A} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{T} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$			Tsp45 I	
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$	Not I			
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$				
$\begin{matrix} \blacktriangledown \\ \square \\ \square \end{matrix} \begin{matrix} \text{G} \\ \text{C} \\ \square \end{matrix} \square \square$				

有的酶也可以识别序列被一个或几个特定核苷酸(N可为A、G、C、T任一种)所间隔的非紧密回文序列,因此可同时识别几种特异序列。如 Acc I 识别特异顺序为 GT/MKAC (M代表A和C,K代表G和T),因此 Acc I 可同时识别以下四种序列:

GT / AGAC GT / ATAC GT / CGAC GT / CTAC

有的 II 型酶可识别非回文序列,如 Bsa I 识别以下序列:GGTCTC(1/5),这表明它识别 GGTCTC 而切割位置在 DNA 两条链的第 1 个 N 和第 5 个 N 处,即 5'—GGTCTCN/—3'与 3'—CCAGAGNNNN/—5'。一般 II 型酶识别序列为 4~6 个核苷酸,有少数酶可识别 6 个以上的核苷酸序列,称为稀有切割限制酶(rare cutter)。表 22-2,22-3 及 22-4 分别列出了识别 4~6 及 6 个以上核苷酸序列的限制酶及其识别序列。表 22-5 为识别一个或多个核苷酸间隔的回文序列的限制酶。表 22-6 和 22-7 分别是有多个识别位点及识别非回文序列的限制酶。表 22-8 是以字母排列的限制酶识别序列。

表 22-4 识别序列大于 6 核苷酸的限制酶

Asc I	GG/CGGCC	SexA I	A/CCWGGT
Bae I*	ACNNNGTAYC	Sfi I	GGCCNNNN/NGGCC
Fse I	GGCCGG/CC	Sgf I	GCGAT/CGC
Not I	GC/GGCCGC	SgrA I	CR/CCGGYG
Pac I	TTAAT/TAA	Srf I	GCCC/GGGC
Pme I	GTTT/AAAC	Sse8387 I	CCTGCA/GG
PpuM I	RG/GWCCY	Sse8647 I*	AG/GWCCT
RsrI I	CG/GWCCG	Swa I	ATTT/AAAT
SanD I*	GG/GWCCC	UhaD I*	GAACNNNNNTCC
Sap I	GCTCTTC(1/4)		

表 22-5 识别被一个或数个核苷酸间隔的回文序列的限制酶

Ahd I	GACNNN/NNGTC	Dde I	C/TNAG
AlwN I	CAGNNN/CTG	Dra III	CACNNN/GTG
ApaB I*	GCANNNNN/TGC	Drd I	GACNNNN/NNGTC
Bgl I	GCCNNNN/NGGC	EcoN I	CCTNN/NNNAGG
Blp I	GC/TNAGC	EcoO109 I	RG/GNCCY
Bpl I*	GAGNNNNNCTC	Fru4H I	GC/NGC
BsaB I	GATNN/NNATC	HgiE II*	ACCNNNNNNGGT
BsaJ I	C/CNNGG	Hin4 I*	GABNNNNNVTC
Bsl I	CCNNNNN/NNGG	Hinf I	G/ANTC
BsoF I	GC/NGC	Mae III	/GTNAC
BssK I	/CCNNGG	Msl I	CAYNN/NNRTG
BstE II	G/GTNACC	Mwo I	GCNNNNN/NGGC
BstX I	CCANNNNN/NTGG	Nla IV	GGN/NCC
Bsu36 I	CC/TNAGG	PflM I	CCANNNN/NTGG
Cac8 I	GCN/NGC	PshA I	GACNN/NNGTC

Sau96 I	G/GNCC	Tth111 I	GACN/NNGTC
ScrF I	CC/NGG	Xcm I	CCANNNNN/NNNNTGG
Sfi I	GGCCNNNN/NGGCC	Xmn I	GAANN/NNTTC
Tsp4C I*	ACN/GT		

表 22-4 和 22-5 的缩写: R=A 或 G; Y=C 或 T; M=A 或 C; K=G 或 T; S=C 或 G; W=A 或 T; H=A 或 C 或 T; B=C 或 G 或 T; V=A 或 C 或 G; D=A 或 G 或 T; N=A 或 C 或 G 或 T。
带有*的酶未商品化。

表 22-6 有多个识别位点的限制酶

Acc I	GT/MKAC	HaeI*	WGG/CCW
Afl III	A/CRYGT	Hae II	RGCGC/Y
Apo I	R/AATY	Hin4 I*	GABNNNNNVTC
Ava I	C/YCGRG	Hinc II	GTY/RAC
Ava II	G/GWCC	Mme I*	TCCRAC(20/18)
Bae I*	ACNNNNGTAYC	Ms II	CAYNN/NNRTG
Ban I	G/GYRCC	MspA1 I	CMG/CKG
Ban II	GRGCY/C	Nci I	CC/SGG
Bmg I*	GKGCCC	Nsp I	RCATG/Y
BsaA I	YAC/GTR	PpuM I	RG/GWCCY
BsaH I	GR/CGYC	Rsr II	CG/GWCCG
BsaW I	W/CCGGW	SanD I*	GG/GWCCC
BsiE I	CGRY/CG	SexA I	A/CCWGGT
BsiHKA I	GWGCW/C	Sfc I	C/TRYAG
BsoB I	C/YCGRG	SgrA I	CR/CCGGYG
Bsp1286 I	GDGCH/C	Sse8647 I*	AG/GWCCT
BsrF I	R/CCGGY	Sty I	C/CWWGG
BstN I	/CCWGG	Tat I*	WGTACW
BstY I	R/GATCY	Tau I*	GCSGC
CviJ I	RG/CY	Tfi I	G/AWTC
Dsa I	C/CRYGG	Tse I*	GCWGC
Eae I	Y/GGCCR	Tsp45 I	/GTSAC
Eco0109 I	RG/GNCCY	Tth111 II*	CAARCA(11/9)
Gdi II*	YGGCCG(-5/-1)		

缩写: R=A 或 G Y=C 或 T M=A 或 C
 K=G 或 T S=C 或 G W=A 或 T
 H=A 或 C 或 T B=C 或 G 或 T
 V=A 或 C 或 G D=A 或 G 或 T
 N=A 或 C 或 G 或 T
 带有*的酶未商品化。

表 22-7 识别非回文序列的限制酶

AccBS I	CCGCTC(-3/-3)	Bsr I	ACTGG(1/-1)
AceII*	CAGCTC(7/11)	BsrB I	CCGCTC(-3/-3)
Aci I	CCGC(-3/-1)	BsrD I	GCAATG(2/0)
Ac/W I	GGATC(4/5)	BsrS I	ACTGG(1/-1)
Alw I	GGATC(4/5)	BssS I	C/TCGTG
Alw26 I	GTCTC(1/5)	Bst2B I	CACGAG(-5/-1)
AsuHP I	GGTGA(8/7)	Bst7I I	GCAGC(8/12)
Bae I*	ACNNNNGTAYC	BstF5 I	GGATG(2/0)
Bbs I	GAAGAC(2/6)	Cje I*	(9/15)ACNNNNNNTGG(14/8)
Bbv I	GCAGC(8/12)	CjeP I*	(7/13)CCANNNNNNNTC(14/8)
Bbv II*	GAAGAC(2/6)	Drd II*	GAACCA
Bbv16 II	GAAGAC(2/6)	Eam1104 I	CTCTTC(1/4)
Bcc I*	CCATC	Ear I	CTCTTC(1/4)
Bce83 I*	CTTGAG(16/14)	Eci I*	GGCGGA
Beef I*	ACGGC(12/13)	Eco3I I	GGTCTC(1/5)
Beg I	(10/12)CGANNNNNNTGC(12/10)	Eco57 I	CTGAAG(16/14)
Bfi I*	ACTGGG	Esp3 I	CGTCTC(1/5)
Bin I*	GGATC(4/5)	Fau I*	CCCGC(4/6)
Bmg I*	GGGCMC	Fin I*	GGGAC
Bpi I	GAAGAC(2/6)	Fok I	GGATG(9/13)
Bpm I	CTGGAG(16/14)	Gdi II*	CGGCCR(-5/-1)
Bpu10 I*	CCTNAGC(-5/-2)	Gsu I	CTGGAG(16/14)
BpuA I	GAAGAC(2/6)	Hga I	GACGC(5/10)
Bsa I	GGTCTC(1/5)	Hph I	GGTGA(8/7)
BsaM I	GAATGC(1/-1)	Ksp632 I	CTCTTC(1/4)
BsaX I*	ACNNNNNCTCC	Mbo II	GAAGA(8/7)
Bsb I*	CAACAC	Mme I*	TCCRAC(20/18)
BscG I*	ACGGG	MnI I	CCTC(7/6)
BseI I	ACTGG(1/-1)	Mva1269 I	GAATGC(1/-1)
BseN I	ACTGG(1/-1)	PfI1108 I*	CTACGA
BseR I	GAGGAG(10/8)	Ple I	GAGTC(4/5)
Bsg I	GTGCAG(16/14)	RleA I*	CCCACA(12/9)
Bsi I*	CACGAG(-5/-1)	Sap I	GCTCTTC(1/4)
BsmA I	GTCTC(1/5)	SfaN I	GCATC(5/9)
BsmB I	CGTCTC(1/5)	Sim I*	GGGTC(-3/0)
BsmF I	GGGAC	Taq II*	CACCCA(11/9)
Bsm I	GAATGC(1/-1)	Taq II*	GACCGA(11/9)
Bsp24 I*	GACNNNNNNTGG(12/7)	TspR I	CACTG(2/-7)
BspG I*	CTGGAC	Tth111 II*	CAARCA(11/9)
BspLU11 III*	GGGAC(10/14)	UbaD I*	GAACNNNNNNTCC
BspM I	ACCTGC(4/8)		

表 22-8 以字母排列的限制酶识别序列

AA/CGTT	Psp1406 I	C/CGC	Aci I
A/AGCTT	Hind III	CCGC/GG	Sac II
AAT/ATT	Ssp I	CCG/CTC	BsrB I
/AATT	Tsp509 I	C/CGG	Hpa II
A/CCGGT	Age I	C/CGG	Msp I
ACCTGC(4/8)	BspM I	/CCNGG	BssK I
A/CGCGT	Mlu I	CC/NGG	ScrF I
ACGT/	Tai I	C/CNNGG	BsaJ I
A/CRYGT	Afl III	CCN5/N2GG	Bst I
A/CTAGT	Spe I	CC/SGG	Nei I
ACTGG(1/-1)	Bsr I	C/CTAGG	Avr II
A/GATCT	Bgl II	CCTC(7/6)	MnI I
AGC/GCT	Eco47 III	CC/TNAGG	Bsu36 I
AG/CT	Afu I	CCTN2/N3AGG	EcoN I
AGG/CCT	Stu I	CC/WGG	BstN I
AGT/ACT	Sea I	(10/12)CGAN6TGC(12/10)	Bcg I
AT/CGAT	Cla I	C/CWWGG	Sty I
AT/CGAT	BspD I	CGAT/CG	Pvu I
ATGCA/T	Nsi I	CG/CG	BstU I
A/TGCAT	Ppu10 I	C/GGCCG	Eag I
AT/TAAT	Ase I	CG/GWCCG	Rsr II
		CGRY/CG	BsiE I
C/AATTG	Mfe I(Mun I)	C/GTACG	BsiW I
C/ACGAG	BssS I	CGTCTC(1/5)	BsmB I(Esp3 I)
CAC/GTG	Pml I	CMG/CKG	MspA1 I
CACN3/GTG	Dra III	C/TAG	Bfa I(Mae I)
(-7/2)CACTG	TspR I	(14/16)CTCCAG	Bpm I(Gsu I)
CAG/CTG	Pvu II	(8/10)CTCCTC	BseR I
CAGN3/CTG	AzwN I	C/TUGAG	Xho I
CAGTG(2/-7)	TspR I	C/TCGRG	M. Hpa II + Ava I
CA/TATG	Nde I	C/TCGTG	BssS I
(13/9)CATCC	Fok I	CTCTTC(1/4)	Ear I
CATG/	Nla III	CTGAAG(16/14)	Eco57 I
(0/2)CATTGC	BsrD I	(14/16)CTGCAC	Bsg I
CAYNN/NNRTG	Msz I	CTGCA/G	Pst I
(-1/1)CCAGT	Bsr I	CTGGAG(16/14)	Bpm I(Gsu I)
CCAN5/N4TGG	Xcm I	C/TNAG	Dde I
CCAN5/NTGG	BstX I	C/TRYAG	Sfc I
CCAN4/NTGG	PfiM I	C/TTAAG	Afl II
C/CATGG	Nco I	(14/16)CTTCAG	Eco57 I
C/CCGGG	Xma I	C/YCGAG	M. Hpa II + Ava I
CCC/GGG	Sma I	C/YCGGG	M. Taq I + Ava I
C/CCGRG + CYCGG/G	M. Taq I + Ava I	C/YCGRG	Ava I

C/YCGRG	BsoB I	G/CCGGC	NgoM I
DGC/GGCCGCH	M. FnuD II + Not I	GCCN4/NGGC	Bgl I
		G/CGC	HinP1 I
GAAGA(8/7)	Mbo II	GCG/C	Hha I
GAAGAC(2/6)	Bbs I	G/CGCGC	BssH II
(4/1)GAAGAG	Ear I	G/CGG	Aci I
(4/1)GAAGAGC	Sap I	GC/GGCCGC	Not I
GAANN/NNTTC	Xmn I	(10/5)GCGTC	Hga I
GAATGC(1/-1)	Bsm I	GC/NGC	Fnu4H I
G/AATTC	EcoR I	GCN/NGC	Cac8 I
GACGC(5/10)	Hga I	GCN5/N2GC	Mwo I
GACGT/C	Aat II	G/CTAGC	Nhe I
GACN/NGTC	Tth111 I	GCTCTTC(1/4)	Sap I
GACNN/NGTC	PshA I	GC/TNAGC	Blp I(Bpu1102 I, Esp I)
GACN3/N2GTC	Ahd I(Eam1105 I)	(12/8)GCTGC	Bbv I
GACN4/N2GTC	Drd I	G/CWGC	Tse I
(5/4)GACTC	Ple I	GDGCH/C	Bsp1286 I
(5/1)GAGAC	BsmA I	GDGCW/C	M. Hae III + Bsp1286 I
(5/1)GAGACC	Bsa I	GGATC(4/5)	Alw I
(5/1)GAGACG	BsmB I(Esp3 I)	G/GATCC	BamH I
GAG/CGG	BsrB I	GGATG(9/13)	Fok I
GAG/CTC	Eco136 II	GG/CC	Hae III
GAGCT/C	Sac I	GGCCGG/CC	Fse I
G/AGCYC	M. Hae III + Ban II	GGCCN4/NGGCC	Sfi I
(6/7)GAGG	MnI I	GGC/GCC	Ehe I
GAGGAG(10/8)	BseR I	GG/CGCC	Nar I
GAGTC(4/5)	Ple I	G/GCGCC	Kas I
G/ANTC	Hinf I	GG/CGCGCC	Ase I
GAT/ATC	EcoRV	(14/10)GGGAC	BsmF I
/GATC	Mbo I	GGGCC/C	Apa I
/GATC	Sau3A I	G/GGCC	Bsp120 I
/GATC	Dpn II	GGGCY/C	M. Alu I + Ban II
G(mA)/TC	Dpn I	G/GNCC	Sau96 I
(5/4)GATCC	Alw I	GGN/NCC	Nla IV
(9/5)GATGC	SfaN I	GGTAC/C	Kpn I
GATN2/N2ATC	BsaB I	G/GTACC	Acc65 I
G/AWTC	Tfi I	GGTCTC(1/5)	Bsa I
GCAATG(2/0)	BsrD I	GGTGA(8/7)	Hph I
GCAGC(8/12)	Bbv I	G/GTNACC	BstE II
(8/4)GCAGGT	BspM I	G/GWCC	Ava II
(10/12)GCAN6TCG(12/10)	Beg I	G/GYRCC	Ban I
GCATC(5/9)	SfaN I	GKGCH/C	M. Alu I + Bsp1286 I
GCATG/C	Sph I	GR/CGTC	M. Hha I + BsaH I
(-1/1)GCATTC	Bsm I	GR/CGYC	BsaH I(Aha II)
GCC/GGC	Nae I	GRGCC/C	M. Alu I + Ban II

GRGCT/C	M. Hae III+Ban II	R/GATCY	BstY I
GRGCY/C	Ban II	RGCGC/Y	Hae II
GT/AC	Rsa I	RG/GNCCY	EcoO109 I
G/TAC	Csp6 I	RG/GWCCY	PpuM I
GT/AKAC	M. Taq I+AccI	TAC/GTA	SnaB I
GTA/TAC	Bst1107 I(SnaI)	(7/8)TCACC	Hph I
GTCCC(10/14)	BsmF I	T/CATGA	BspH I
G/TCGAC	Sal I	T/CCGGA	BspE I
GTCTC(1/5)	Alw26 I	T/CGA	Taq I
(6/2)GTCTTC	Bbs I	TCG/CGA	Nru I
G/TGCAC	ApaI I	T/CTAGA	Xba I
GTGCAG(16/14)	Bsg I	(7/8)TCTTC	Mbo II
GTGCW/C	M. Alu I+HgiA I	T/GATCA	Be II
GT/MKAC	Acc I	TGC/GCA	Fsp I
GT/MTAC	M. Taq I+Acc I	TGG/CCA	Msc I(BaI I)
/GTSAC	Tsp45 I	T/GTACA	BsrG I
GTT/AAC	Hpa I	T/TAA	Mse I
GTT/RAC	M. Taq I+Hinc II	TTAAT/TAA	Pac I
GTTT/AAAC	Pme I	TT/CGAA	BstB I
GTY/AAC	M. Taq I+Hinc II	TTT/AAA	Dra I
GTY/RAC	Hinc II		
GWGCA/C	M. Alu I+HgiA I		
GWGCW/C	BsiHKA I(HgiA I)	W/CCGGW	BstW I(Bca77 I)
HAT/CGATD	dam+Cla I	YAC/GTR	BsaA I
HCG/CGD	M. Hha I+BstU I	Y/GGCCR	Eae I
HGCCN4/NGGCD	M. Hae III+Bgl I	缩写	
(2/-7)CAGTG	TspR I	R=A 或 G	Y=C 或 T
		K=G 或 T	S=C 或 G
		H=A 或 C 或 T	B=C 或 G 或 T
		D=A 或 G 或 T	N=A 或 C 或 G 或 T
R/AATTY	Apo I		
R/CCGGY	BsrF I(Cfr10 I)		

22.2. 同裂酶

通常不同的限制酶有不同的识别序列,但有些不同来源的酶能识别相同的序列,称为同裂酶(isoschizomer),如 Hae III、BsuR I 和 Pal I 识别同样的序列(GG/CC),具有相同的切割位置。又如 Mbo I(/GATC) 有数个同裂酶(Dpn II, Sau3A I, Nde II, Bsp143 I 和 Dpn I),它们识别同样的序列,但其中 Dpn I(GA/TC)切割的位置与 Mbo I 不同。表22-9列出了同裂酶的名称及识别序列。

表 22-9 同裂酶

限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Aat II		GACGT/C	Asc I		GG/CGCGCC
Acc I		GT/MKAC	Asu I		G/GNCC
Acc II	Bsp50 I	CG/CG		Cfr13 I	G/GNCC
	BstU I	CG/CG		Nsp IV	G/GNCC
	FnuD II	CG/CG		Sau96 I	G/GNCC
	Mvn I	CG/CG	Asu II		TT/CGAA
	Tha I	CG/CG		BsiC I	TT/CGAA
Acc III		T/CCGGA		Bsp119 I	TT/CGAA
	BspM II	T/CCGGA		BstB I	TT/CGAA
	Mro I	T/CCGGA		Csp45 I	TT/CGAA
Aci I		CCGC(2/2)		Lsp I	TT/CGAA
Acy I		GR/CGYC		Nsp V	TTCGAA
	Bbi II	GR/CGYC		Sfu I	TT/CGAA
	BsaH I	GR/CGYC	Ava I		C/YCGRG
	HinI J	GR/CGYC		Beo I	C/YCGRG
Afl II		C/TTAAG		Eco88 I	C/YCGRG
	Bfr I	C/TTAAG		Nsp III	C/YCGRG
	Esp4 I	C/TTAAG	Ava II		G/GWCC
Afl III		A/CRYGT		Eco47 I	G/GWCC
Age I		A/CCGGT		NspH II	GGWCC
Aha III		TTT/AAA		Sin I	G/GWCC
	Dra I	TTT/AAA	Ava III		ATGCAT
Alu I		AG/CT		EcoT22 I	ATGCA/T
AlwN I		CAGNNN/CTG		Mph1103 I	ATGCA/T
Aoc I		CC/TNAGG		Nsi I	ATGCA/T
	Axy I	CC/TNAGG	Avr III		C/CTAGG
	Bsu36 I	CC/TNAGG		Bln I	C/CTAGG
	Cvn I	CC/TNAGG	Bae I		ACNNNNGTAYC
	Eco81 I	CC/TNAGG	Bal I		TGG/CCA
	Mst II	CC/TNAGG		Msc I	TGG/CCA
	Sau I	CC/TNAGG	BamH I		G/GATCC
Apa I		GGGCC/C		Bst I	G/GATCC
	Bsp120 I	G/GGCC	Bbv I		GCAGC(8/12)
ApaB I		GCANNNNN/TGC		Bst71 I	GCAGC(8/12)
ApaL I		G/TGCAC	Bbv II		GAAGAC(2/6)
	Alw44 I	G/TGCAC		Bbs I	GAAGAC
	Sno I	G/TGCAC	Bcc I		CCATC

续表 22-9

限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Beef I		ACGGC(12/13)	Bsp50 I	FnuD II	CG/CG
Bcg I		GCANNNNNNCG(12/10)		Mvn I	CG/CG
Bel I		T/GATCA		Tha I	CG/CG
	BsiQ I	T/GATCA	BspG I		CG/CGCTGGAC
	Fba I	T/GATCA	BspH I		T/CATGA
Bet I		W/CCGGW		RspX I	T/CATGA
Bgl I		GCCNNNN/NGGC	BspM I		ACCTGC(4/8)
Bgl II		A/GATCT	BspM II		T/CCGGA
Bin I		GGATC(4/5)		Acc III	T/CCGGA
	Alw I	GGATC(4/5)		BspE I	T/CCGGA
Bpu10 I		CCTNAGC(-5/2)		Kpn2 I	T/CCGGA
Bpu1102 I		GC/TNAGC		Mro I	T/CCGGA
	Cel II	GC/TNAGC	Bsr I		ACTGG(1/-1)
	Esp I	GC/TNAGC	BsrB I		GAGCGG(-3/-3)
Bsp1286 I		GDGCH/C	BstE II		G/GTNACC
	Aoc II	GDGCH/C		BstP I	G/GTNACC
	Nsp II	GDGCH/C		Eco91 I	G/GTNACC
	Sdu I	GDGCH/C		EcoO65 I	G/GTNACC
Bsp106 I		AT/CGAT	BstN I		CC/WGG
	Cla I	AT/CGAT		Apy I	CC/WGG
BspC I		CGAT/CG		Mva I	CC/WGG
	Pvu I	CGAT/CG	BstX I		CCANNNNN/NTGG
	Xml I	CGAT/CG	Cac8 I		GCN/NGC
BsaA I		YAC/GTR	Cau II		CC/SGG
BsaB I		GATNN/NNATC		Bcn I	CC/SGG
	BsiB I	GATNN/NNATC		Nci I	CC/SGG
	Mam I	GATNN/NNATC	Cfr I		Y/GGCCR
BseP I		GCGCGC		Eae I	Y/GGCCR
	BssH II	G/CGCGC	Cfr10 I		R/CCGGY
Bsg I		GTGCAG(16/14)		BsrF I	R/CCGGY
Bsi I		CTCGTG(5/1)	Cla I		AT/CGAT
BsiY I		CCNNNNN/NNGG		Ban III	ATCGAT
	Bsl I	CCNNNNN/NNGG		Bsc I	AT/CGAT
Bsm I		GAATGC(1/-1)		BsiX I	AT/CGAT
BsmA I		GTCTC(1/5)		Bsp106 I	AT/CGAT
	Alw26 I	GTCTC(1/5)		BspD I	AT/CGAT
Bsp50 I		CG/CG		Bsu15 I	AT/CGAT
	Acc II	CG/CG	CviJ I		RG/CY
	BstU I	CG/CG	CviR I		TG/CA

限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Dde I		C/TNAG	FnuD II	Bsp50 I	CG/CG
Dpn I*		GA/TC		BstU I	CG/CG
Dra I		TTT/AAA		Mvn I	CG/CG
	Aha III	TTT/AAA		Tha I	CG/CG
Dra II		RG/GNCCY	Fok I		GGATG(9/13)
	EcoO109 I	RG/GNCCY	Fse I		GGCCGG/CC
	Pss I	RGGNC/CY	Fsi I		R/AATTY
Dra III		CACNNN/GTG	Gdi II		YGGCCG(-5/-1)
Drd I		GACNNNN/NNGTC	Gsu I		CTGGAG(16/14)
Drd II		GAACCA		Bpm I	CTGGAG(16/14)
Dsa I		C/CRYGG	Hae I		WGG/CCW
EamI 105 I		GACNNN/NNGTC	Hae II		RGCGC/Y
Eci I		TCCGCC		Bsp143 II	RGCGC/Y
Eco3 II		GGTCTC(1/5)	Hae III		GG/CC
	Bsa I	GGTCTC(1/5)		BssC I	GGCC
Eco47 III		AGC/GCT		BsuR I	GG/CC
Eco52 I		C/GGCCG		Pal I	GG/CC
	Eag I	C/GGCCG	Hga I		GACGC(5/10)
	Xma III	C/GGCCG	HgiA I		GWGCW/C
Eco57 I		CTGAAG(16/14)		Alw21 I	GWGCW/C
EcoN I		CCTNN/NNNAGG		AspH I	GWGCW/C
EcoR I		G/AATTC	HgaC I		G/GYRCC
EcoR II		/CCWGG		Ban I	G/GYRCC
	Apy I	CC/WGG		Eco64 I	G/GYRCC
	BsiL I	CC/WGG	HgiE II		ACNNNNNNNGGT
	BstN I	CC/WGG	HgiJ II		GRGCY/C
	Mva I	CC/WGG		Ban II	GRGCY/C
	TspA I	CCWGG		Eco24 I	GRGCY/C
EcoR V		GAT/ATC	Hha I		GCG/C
	Eco32 I	GAT/ATC		Cfo I	GCG/C
Esp I		GC/TNAGC		Hin6 I	G/CGC
	BpuI102 I	GC/TNAGC		HinP1 I	G/CGC
	Cel II	GC/TNAGC	Hind II		GTY/RAC
Esp3 I		CGTCTC(1/5)		Hinc II	GTY/RAC
Fau I		CCCGC(4/6)	Hind III		A/AGCTT
Fin I		GTCCC	Hinf I		G/ANTC
Fnu4H I		GC/NGC	HinI I		GR/CGYC
FnuD II		CG/CG		Acy I	GR/CGYC
	Acc II	CG/CG		Aha II	GR/CGYC

限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Hind I	Bbi II	GR/CGYC	Mst I		TGC/GCA
	BsaH I	GR/CGYC		Aos I	TGC/GCA
Hpa I		GTT/AAC		Avi II	TGC/GCA
Hpa II		C/CGG		Fdi II	TGC/GCA
	Hap II	C/CGG		Fsp I	TGC/GCA
	Msp I	C/CGG	Mst II		CC/TNAGG
Hph I		GGTGA(8/7)		Aoc I	CC/TNAGG
Kpn I		GGTAC/C		Axy I	CC/TNAGG
	Acc65 I	G/GTACC		Bsu36 I	CC/TNAGG
	Asp718 I	G/GTACC		Cvn I	CC/TNAGG
Ksp632 I		CTCTTC(1/4)		Eco81 I	CC/TNAGG
	Eam 1104 I	CTCTTC(1/4)		Sau I	CC/TNAGG
	Ear I	CTCTTC(1/4)	Mwo I		GCNNNNN/NNGC
Ksp I		CCGC/GG		BspW I	GCNNNNN/NNGC
	Sac II	CCGC/GG	Nae I		GCC/GGC
	Sst II	CCGC/GG		NgoM I	G/CCGGC
Mae I		C/TAG	Nar I		GG/CGCC
	Bfa I	C/TAG		Bbe I	GGCGC/C
	Rma I	C/TAG		Ehe I	GGC/GCC
Mae II		A/CGT		Kas I	G/GCGCC
Mac III		/GTNAC	Nci I		CC/SGG
Mbo I		/GATC		Aha I	CC/SGG
	Bsp143 I	/GATC		Bcn I	CC/SGG
	Dpn II	/GATC	Nco I		C/CATGG
	Nde II	/GATC	Nde I		CA/TATG
	Sau3A I	/GATC	Nhe I		G/CTAGC
Mbo II		GAAGA(8/7)	Nla III		CATG/
Mcr I		CGRY/CG	Nla IV		GGN/NCC
	BsiE I	CGRY/CG		BscB I	GGN/NCC
Mfe I		C/AATTG	Not I		GC/GGCCGC
	Mun I	C/AATTG	Nru I		TCG/CGA
Mlu I		A/CGCGT		Bsp68 I	TCG/CGA
Mly I		GACTC(5/5)		Spo I	TCG/CGA
Mme I		TCCRAC(20/18)	Nsi I		ATGCA/T
Mnl I		CCTC(7/7)		Ava III	ATGCA/T
Mse I		T/TAA		EcoT22 I	ATGCA/T
Msp I		C/CGG	Nsp I		RCATG/Y
	Hap II	C/CGG	NspB II		CMG/CKG
	Hpa II	C/CGG	Pac I		TTAAT/TAA

续表 22-9

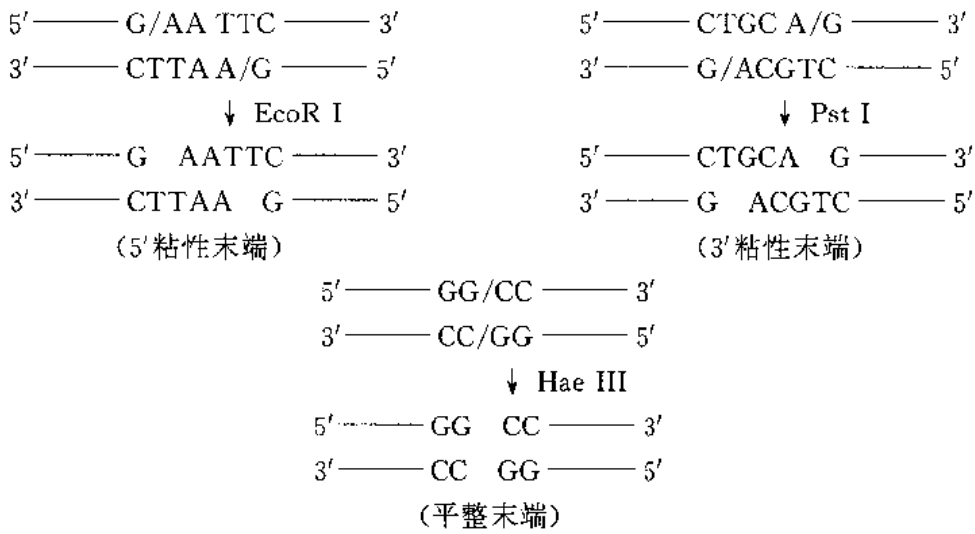
限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Pal I		GG/CC	Sau3A I	Nde II	/GATC
	BsuR I	GG/CC	Sau96 I		G/GNCC
	Hae III	GG/CC		Asu I	G/GNCC
PflI108 I		TCGTAG		Cfr13 I	G/GNCC
PflMI		CCANNNN/NTGG		Nsp IV	G/GNCC
	Van91 I	CCANNNN/NTGG	Sau I		CC/TNAGG
Ple I		GAGTC(4/5)		Axy I	CC/TNAGG
PmaC I		CAC/GTG		Bsu36 I	CC/TNAGG
	BbrP I	CAC/GTG		Cvn I	CC/TNAGG
	Eco72 I	CAC/GTG		Eco81 I	CC/TNAGG
	Pml I	CAC/GTG		Mst II	CC/TNAGG
Pme I		GTTT/AAAC	Sca I		AGT/ACT
PpuM I		RG/GWCCY	ScrF I		CC/NGG
PshA I		GACNN/NNGTC		Dsa V	/CCNGG
PspA I		C/CCGGG	Sdu I		GDGCH/C
	Xma I	C/CCGGG		Bmy I	GDGCH/C
Pst I		CTGCA/G		Bsp1286 I	GDGCH/C
Pvu I		CGAT/CG		Nsp II	GDGCH/C
	BspC I	CGAT/CG	Sec I		C/CNNGG
	Xor II	CGAT/CG		BsaI I	C/CNNGG
Pvu II		CAG/CTG	SfaN I		GCATC(5/9)
RleA I		UCCACA(12/9)	Sfc I		CTYRAG
Rsa I		GT/AC	Sfe I		C/TYRAG
	Afa I	GT/AC	Sfi I		GGCCNNNN/NGGCC
	Csp6 I	G/TAC	SgrA I		CR/CCGGYG
Rsr II		CG/GWCCG	Sma I		CCC/GGG
	Cpo I	CG/GWCCG		Cfr9 I	C/CCGGG
	Csp I	CG/GWCCG		Xma I	C/CCGGG
Sac I		GAGCT/C	Sna I		GTATAC
	Ecl136 II	GAG/CTC	SnaB I		TAC/GTA
	Sst I	GAGCT/C		Eco105 I	TAC/GTA
Sac II		CCGC/GG	Spe I		A/CTAGT
	Cfi42 I	CCGC/GC	Sph I		GCATG/C
	Ksp I	CCGC/GG		Bbu I	GCATG/C
	Sst II	CCGC/GG		Pae I	GCATG/C
Sal I		G/TCGAC	Spl I		C/GTACG
Sap I		GCTCTTC(1/4)		BsiW I	C/GTACG
Sau3A I		/GATC	Srf I		GCCC/GGGC
	Mbo I	/GATC			

限制酶	同裂酶	识别序列	限制酶	同裂酶	识别序列
Sse838 I		CCTGCA/GG	Xba I		T/CTAGA
Ssp I		AAT/ATT	Xcm I		CCANNMNN/NNNNTGG
Stu I		AGG/CCT	Xho I		C/TCGAG
	Aat I	AGG/CCT		Cer I	C/TCGAG
	Eco147 I	AGG/CCT		PacR7 I	C/TCGAG
Sty I		C/CWWGG	Xho II		R/GATCY
	Eco130 I	C/CWWGG		BstY I	R/GATCY
	EcoT14 I	C/CWWGG		MfI I	R/GATCY
Swa I		ATTT/AAAT	Xma I		C/CCGGG
Taq I		T/CGA		PspA I	CCCGGG
	TthHB8 I	T/CGA	Xma III		C/GGCCG
Taq II		GACCGA(11/9)		BstZ I	C/GGCCG
		CACCCA(11/9)		Eag I	C/GGCCG
Tfi I		GAWTC		EclX I	C/GGCCG
Tsp45 I		GTSAC		Eco52 I	C/GGCCG
TspE I		AATT	Xmn I		GAANN/NNTTC
Tth111 I		GACN/NNGTC		Asp700 I	GAANN/NNTTC
	Asp I	GACN/NNGTC	缩写: R=A 或 G Y=C 或 T M=A 或 C		
Tth111 II		CAARCA(11/9)	K=G 或 T S=C 或 G W=A 或 T		
Vsp I		AT/TAAT	H=A 或 C 或 T B=C 或 G 或 T		
	Ase I	AT/TAAT	V=A 或 C 或 G D=A 或 G 或 T		
	Asn I	AT/TAAT	N=A 或 C 或 G 或 T		

22.3. 酶的切割方式

限制酶作用于双链 DNA, 水解核苷酸磷酸双酯键中 3' 位的酯键, 产生 3' 端带羟基, 5' 为磷酸单酯的片段。根据酶切割后产生的末端结构可以分成粘性末端和平整末端两类。

粘性末端 (cohesive end): 双链 DNA 为限制性内切酶降解后, 产生的 DNA 片段的末端都带有突出的单链, 每一片段的两个单链末端碱基是互补的, 在有利于形成碱基配对的条件下, 彼此可粘合在一起, 并可为 DNA 连结酶重新连结。随突出单链的位置不同, 又可分成 5' 和 3' 粘性末端。限制酶在双重对称轴的 3' 侧切割, 产生 3' 突出的末端, 如 Pst I; 酶在双重对称轴的 5' 侧切割, 产生突出的 5' 末端, 如 EcoR I。平整末端 (flush end 或 blunt end): 限制酶在双重对称轴切割 DNA 则产生带平整末端的片段, 如 Hae III。以下列举了三种末端的例子。



22.4. 酶的反应条件

限制酶反应体系中,主要包含 Tris 缓冲液, Mg^{12} , 巯基化合物和 NaCl。不同的酶需要的 NaCl 浓度不同,所以不同缓冲液的主要差别在于所含的 NaCl 浓度。各厂家往往将前几个成分配成一个基本缓冲液,以此配成含有不同浓度 NaCl 的反应缓冲液。NaCl 浓度一般为三或四种(0, 50, 100 或 150 mmol/L),使用者可按不同的酶选择需要的 NaCl 浓度。表 22-10 列出了多种酶的反应液,但不是一点也不可改变的,对于某种类型 DNA 显示酶最高活力的缓冲液,对于另一种 DNA 并不一定如此,特别是 Mg^{+2} 浓度一般从 5~10 mmol/L 对酶活力并无显著影响。 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, 2ME)与二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)一般是可互换的,但也有其中一个比另一个更合适的情况,缓冲液中加入 100 μ g/ml 的牛血清蛋白,尤其是长时间消化时是有益的。各厂出售的酶都有各自相应的缓冲液,应用厂家提供的酶缓冲液,一般效果较好。

限制酶的星号活力是指酶反应条件改变时,酶不能识别其特异序列,而在新的识别位点上切割 DNA,如 EcoR I, 正常识别序列 GAATTC, 而星号活力识别序列则为 AATT。造成星号活力的主要因素有(1) 酶单位数/DNA 比值过高,超过 10 单位/ μ g DNA;(2) 甘油浓度过高(超过 5%);(3) 二价离子的改变, Mg^{12} 如为 Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} 代替, EcoR I 和 Hind III 等均可出现星号活力;(4) 低离子强度 < 25mmol/L;(5) 高 pH 值 (> pH8);(6) 有机溶剂如 DMSO、乙醇、乙二醇、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺的存在。星号活力的出现会干扰实验结果的分析,操作中要注意上述因素。

限制酶一般在 50%甘油中保存于 -20% 是稳定的,用前从冰箱中取出,放在冰上,用后立即放回原处以防止污染。表 22-10 列出了商品化限制酶的反应条件。表 22-11 列出了有星号活性的一些酶。

表 22-10 商品化限制酶的反应条件

酶	Tris		MgCl ₂	NaCl	DTT ^a	2Me ^a	其他 ^a	温度		NaCl 影响 ^d				KCl 影响 ^d			
	(mmol/L)	pH						反应 ^c	失活 ^c	0	50	100	150	0	50	100	150
Aat I	10	7.5	7	-	-	6	60 mmol/L KCl	37	75	+-	+	++	++	++	++	++	++
Aat II	10	7.5	10	-	1	-	50 mmol/L KCl	37	+		+	+			++		
Acc I	6	8.0	6	6	-	6	0.01% TX ^a -100	37	85	++	++	++					
Acc III	10	7.7	10	100	1	-	-	65	-								
Afl I	10	7.9	10	50	-	10	-	37	-								
Afl II	10	7.9	10	50	1	-	100 μg/ml BSA	37	+		++	+	+				
Afl III	50	7.9	10	100	1	-	100 μg/ml BSA	37	-								
Age I	10 ^e	7.0	10	-	1	-	-	25	+								
Aha II	10	8.0	10	100	-	10	-	37			+	++	++	++			
Alu I	10	7.5	6	50	-	6	-	37	-		++	++	++	+			
Alw I	20 ^g	7.9	10 ^f	-	1	-	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	++	+				
AlwN I	20 ^g	7.9	10 ^f	50	1	-	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	+	++				
Alw26 I	33 ^g	7.9	10 ^f	-	-	-	66 mmol/L KAc	37	+								
							100 μg/ml BSA										
Apa I	10	7.5	6	6	-	6	100 μg/ml BSA	37	+	++	++	++	+				
Apal I	10	7.5	10	-	-	10	100 μg/ml BSA	37	+	++	+						
Asc I	20 ^g	7.9	10 ^f	-	1	-	50 mmol/L KAc	37	+								
Ase I	10	7.5	10	-	-	-	150 mmol/L KCl	37	+		++	++	++	+-	++	++	++
Asn I	50	7.5	10	100	1	-	-	37	+								
Asp718 I	50	7.5	10	100	1	-	-	37	+								
Ava I	10	8.0	10	50	-	6	0.01% TX-100	37	+/-	++	++	++	++	++	++	++	
Ava II	10	8.0	10	60	-	6	-	37	+	++	++	+	+				
Bal I	50	8.5	5	-	-	10	-	37	+	++	+	+					
BamH I	20	7.4	7	100	-	6	-	37	60		+	++	++				
Ban I	10	8.0	7	-	-	6	-	37	+	++	++	+	+				
Ban II	10	7.5	7	50	-	6	-	37	60	++	++	++	++	++			
Bbv I	10	8.0	10	50	-	10	-	37	+	++	++	++	++	++			
Bcl I	10	8.0	10	-	-	6	75 mmol/L KCl	50	85	+	+	+	+		++	++	
Bgl I	100	8.0	10	60	-	-	-	37	+		++	++	++	++			
Bgl II	100	8.0	5 ^b	60	-	6	-	37	85	+	++	++	++	++			
Bpi I	10	7.5	10	50	-	-	-	37	+								
Bpu 1102 I	33 ^g	7.9	10 ^f	-	-	-	66 mmol/L KAc	37	-								
BseI D1	33 ^g	7.9	10 ^f	-	-	-	66 mmol/L KAc	60	-								
							100 μg/ml BSA										
BseN I	10	7.5	10	-	-	-	100 μg/ml BSA	65									
Bsh 1236 I	10	8.5	10	100	1	-	100 mmol/L KCl	37	+								
							100 μg/ml BSA										
Bsm I	10	7.5	10	50	-	10	-	60	-	++	++	++	++	++			
BsoR I	10	7.9	10	50	1	-	-	65									

续表 22-10

酶	Tris (mmol /L)	pH	MgCl ₂	NaCl	DTT ^a	2Me ^a	其他 ^a	温度		NaCl 影响 ^d				KCl 影响 ^d				
								反应 ^c	失活 ^c	0	50	100	150	0	50	100	150	
BspE I	50	7.9	10	150	1	—	—	37	—									
BspH I	20 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	—	+	++	++	+	+	+++	++	+	
BspM I	10	7.9	10	150	1	—	—	37	+	+	—	++	++					
BssH II	10	7.5	10	25	—	10	—	50	—	++	++	++	++					
BssK I	50	7.9	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	60	—									
BssS I	50	7.9	10	100	1	—	—	37	—									
BstB I	20 ⁸	7.9	10 ^f	50	1	—	50 mmol/L KAc	65	—	++	++	+						
BstE II	6	8.0	6	150	—	6	—	60	100	—	—	++	++					
BstN I	10	7.7	10	150	1	—	—	60	—	+	+	++	++					
BstU I	10	8.0	10	—	1	—	—	60	—	++	++	+						
BstX I	10	7.6	7	150	—	6	—	55	+	+	++	++	++					
BstY I	10	8.0	10	—	—	—	100 μg/ml BSA	60	—	++	++	+	+					
Cfr I	33 ⁸	7.9	10 ^f	—	—	—	66 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	—									
Cfr10 I	10	8.0	5	100	—	—	0.02% TX-100	37	—		++	++	++	++		++	++	++
Cfr13 I	33 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	66 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	—									
Cla I	20 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	++	++	+				
Csp I	10	7.4	10	—	—	—	150 mmol/L KCl	30	+									
Csp6 I	10	7.5	10	—	—	—	—	37	+									
Csp45 I	10	7.5	7	60	—	—	—	37	+	++	++							
Cvn I	10	7.5	10	50	1	—	—	37	+									
Dde I	50	7.9	10	100	1	—	—	37	+	+	++	++	++					
Dpn I	20 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+		+	++	++					
Dra I	20 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+	+	++							
Dra III	50	7.9	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	+	++	++	+					
Eae I	10 ⁸	7.0	10	—	1	—	—	37	+	+	++	+		+	++	+		
Eag I	50	7.9	10	100	1	—	—	37	+	+	++	++	++					
Ecl 136 II	33 ⁸	7.9	10 ^f	—	—	10	66 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	+									
Eco47 I	10	8.5	10	—	—	—	100 mmol/L KCl	37	+		+	++	++					
Eco 47 III	50	7.5	10	100	—	—	—	37	+		+	++	++					
Eco52 I	10	9.0	3	100	—	—	—	37	+	+	++	++	+					
Eco81 I	10	8.5	7	—	—	7	20 mmol/L KCl	37	90	++	++			++				
Eco105 I	10	7.5	5	20	—	10	—	37	+	++	+							
EcoN I	10	7.5	10	50	—	10	—	37	+	+	++	++	++	++				
EcoO109 I	20 ⁸	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	+	++	++	++	++					
EcoR I	100	7.5	10	50	—	6	—	37	+		++	++	++					

续表 22-10

酶	Tris		MgCl ₂	NaCl	DTT ^a	2Me ^a	其他 ^a	温度		NaCl 影响 ^d				KCl 影响 ^d			
	(mmol/L)	pH						反应 ^c	失活 ^c	0	50	100	150	0	50	100	150
EcoR II	25	7.7	10	50	—	10	—	37	+	++	++	—	+				
EcoR V	10	8.0	6	100	—	6	—	37	—					++			
Ehe I	33 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	66 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	+	++	++						
Fnu4H I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	+					
Fok I	10	7.7	10	—	—	10	10 mmol/L KCl	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Fsp I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+		++	+	+				
Hae II	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	—	++	++	++	+				
Hae III	50	7.5	6	50	1	—	—	37	90	++	++	++	+				
HgiA I	10	8.0	10	150	—	10	—	37	+					+	++		
Hha I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc 100 μg/ml BSA	37	+		+	++	++				
Hinc II	50	7.9	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	+	++	++	++				
Hind II	10	7.5	10	50	1	—	—	37									
Hind III	50	8.0	10	60	—	—	—	37	+/-	+	++	++	+				
Hinf I	10	7.5	7	60	—	6	—	37	—	+	++	++	++				
Hpa I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	90		++	++		++	++	++	
Hpa II	10 ^e	7.0	10	—	1	—	—	37	90	++	++	+		++	++	+	
Hph I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	++		++	++	++	
Kpn I	10 ^e	7.0	10	—	1	—	100 μg/ml BSA	37	60	++							
Mae I	40	8.0	12	500	—	14	—	45									
Msc II	100	8.8	12	440	—	14	200 μg/ml BSA	50	85								
Msc III	40	8.2	12	350	—	14	—	55	85								
Mbo I	10	7.5	10	100	1	—	—	37	+	+	++	++	++				
Mbo II	10	7.4	10	—	1	—	10 mmol/L KCl	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Mlu I	50	7.9	10	100	1	—	—	37	+/-	+	++	++	+				
Mnl I	10	7.9	10	50	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	++	++	++	+				
Msc I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+								
Msc I	10	7.9	10	50	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	++	++	+					
Msp I	10	7.5	10	50	—	6	0.02% TX-100	37	90	++	++	++	++				
Mun I	10	7.5	10	50	1	—	—	37									
Mva I	10	8.5	10	—	1	—	100 mmol/L KCl 100 μg/ml BSA	37	—								
Mwo I	50	7.9	10	150	1	—	100 μg/ml BSA	60	—								
Nae I	10 ^e	7.0	10	—	1	—	—	37	+	++	++	++					
Nar I	10	7.5	10	—	—	6	10 mmol/L KCl	37	+	++	++			++	++		
Nci I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	80	++	++	+					
Nco I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+		+	++	++				

续表 22-10

酶	Tris (mmol/L)	pH	MgCl ₂	NaCl	DTT ^a	2Me ^a	其他 ^a	温度		NaCl 影响 ^d				KCl 影响 ^d			
								反应 ^c	失活 ^c	0	50	100	150	0	50	100	150
Nde I	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+			+	++				
Nhe I	10	8.0	10	50	—	10	—	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Nla III	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+								
							100 μg/ml BSA										
Nla IV	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+								
							100 μg/ml BSA										
Not I	10	7.5	10	150	—	6	0.01% TX-100	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Nru I	50	7.7	10	—	—	6	100 mmol/L KCl	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Nsi I	10	8.4	10	100	1	—	—	37	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
Nsp I	10	8.0	10	20	—	7	—	50									
Nsp V	10	8.0	10	25	—	6	—	50									
PacR7 I	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	—	++	++	++	++	++	++	++	++
Pal I	10	7.5	10	—	1	—	—	37									
PflM I	10	7.4	10	50	—	10	—	37	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Ple I	20*	7.9	10 ^f	—	—	—	50 mmol/L KAc	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
PpuM I	10	7.4	10	50	—	10	—	37		++	++	++	++	++	++	++	++
Pst I	10	7.5	10	100	—	6	—	37	70	++	++	++	++	++	++	++	++
Pvu I	50	7.9	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	37	85		+	++	++	++	++	++	++
Pvu II	10	7.5	6	60	—	6	—	37	—	++	++	++	++	++	++	++	++
Rsa I	10*	7.0	10	—	1	—	—	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Rsr I	25	7.7	10	—	1	—	—	37									
Sac I	10*	7.0	10	—	1	—	100 μg/ml BSA	37	60	++	+	+	+	+	+	+	+
Sac II	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	—	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Sal I	6	7.9	6	150	1	—	—	37	—			+	++	++	++	++	++
Sau3A I	10e	7.0	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Sca I	10	7.4	6	100	—	6	—	37	85		++	++	++	++	++	++	++
ScrF I	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Sdu I	10	7.2	3	150	—	—	100 μg/ml BSA	37	+								
SfaN I	50	7.9	10	100	1	—	—	37	+			++	++	++	++	++	++
Sfi I	10	7.8	10	50	1	—	—	50	85	++	++	++	++	++	++	++	++
Sgf I	10	7.9	10	50	1	—	—	37	+/-								
Sma I	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	25	+	++	++	++	++	++	++	++	++
SnaB I	20*	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	37		++	++	++	++	++	++	++	++
							100 μg/ml BSA										
Spe I	10	7.9	10	50	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	+	++	++	++	++	++	++	++
Sph I	10	7.9	10	50	1	—	—	37	—			++	++	++	++	++	++
Ssp I	100	7.5	10	50	—	—	0.025% TX-100	37	—	+	++	++	++	++	++	++	++
Stu I	10	7.9	10	50	—	6	—	37	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Sty I	50	7.9	10	100	1	—	100 μg/ml BSA	37	—			+	++	++	++	++	++

续表 22-10

酶	Tris (mmol/L)	pH	MgCl ₂	NaCl	DTT ^a	2Me ^a	其他 ^a	温度		NaCl 影响 ^d				KCl 影响 ^d				
								反应 ^c	失活 ^c	0	50	100	150	0	50	100	150	
Tai I	10	8.5	10	—	—	—	100 mmol/L KCl	65	—									
							100 μg/ml BSA											
Taq I	10	8.4	10	100	—	—	100 μg/ml BSA	65	90	++	++	++	++	+				
Tha I	10	7.5	10	—	1	—	—	60		++	++							
Tth111 I	20 ^e	7.9	10 ^f	—	1	—	50 mmol/L KAc	65	—	++	++	++						
Xba I	10	7.9	10	50	1	—	100 μg/ml BSA	37	70	++	++	++						
Xho I	10	7.9	10	50	1	—	100 μg/ml BSA	37	+	+	++	++	++	++				
Xho II	10	7.9	10	50	1	—	—	37	+									
Xma I	10 ^e	7.9	10	—	1	—	—	37	+	++	++	++	+					
Xma III	10	7.5	10	—	1	—	—	25	+	++	++	++	++					
Xmn I	10	8.0	10	6	—	10	—	37	+	++	++	++						
Van91 I	10	8.5	10	—	—	—	100 mmol/L KCl	37	+									
							100 μg/ml BSA											
Vsp I	50	7.5	10	100	—	—	100 μg/ml BSA	37	+									

^a: DTT, 二硫苏糖醇(dithiothreitol); 2ME, β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol); TX-100, Triton-100。

^b: MgSO₄ 代替 MgCl₂。

^c: 失活温度一般为在该温度下 20 分钟, “+”代表 65℃ 失活, “-”代表 65℃ 不失活。有时少量化合物能使酶稳定, 因此本表提供的失活温度供参考。有时要求 100% 失活, 最好以你的条件进行试验或用酚抽提以去除酶。

^d: + 代表活力为最高活力的 10%~50%;
++ 代表活力为最高活力的 50%~100%。

^e: 以 Bis Tris propane-HCl 代替 Tris-HCl。

^f: 以 MgAc₂ 代替 MgCl₂。

^g: 以 Tris-HAc 代替 Tris-HCl。

表 22-11 有星号活性的一些限制酶

酶	影响因素	酶	影响因素
Alw26 I	1	Mva I	1,4
Ase I	2,5	Nco I	1
Ava I	2	Nde I	2
Cfr10 I	1	Nhe I	2
Eco72 I	1,4	Pru II	1
Eco105 I	1	Pst I	1,2
EcoR I	1,2,3,4,5	Sal I	2
Ehe I	1	Sca I	2
Hind III	3	Sdu I	1,4,5
Hpa I	1	Sgf I	1,2
Kpn I	1,2	Ssp I	1
Mun I	1	Xmn I	1,2

引起星号活力的因素: 1, 酶单位数/DNA 比值过高; 2, 甘油浓度过高; 3, 低离子强度; 4, 高 pH 值; 5, 有机溶剂的存在; 6, 二价离子的改变。

22.5. 酶末端的改造及应用

DNA 重组技术是一种在体外进行剪切和拼接的技术,最简单的方法是用同一种限制酶切割供体和载体 DNA,得到的片段具有完全相同结构的粘性末端,可以直接在体外进行连接,但是很多情况下用同一种限制酶不能达到实验目的,这时就要采用别的办法。最常用的办法是采用可产生相同粘性末端而有不同特异性的限制酶(表 22-13),分别切割供体和载体 DNA,然后连接起来。但是往往连接后,不能为原有的两种酶切开,如 BamH I 与 Bgl II 的末端连接后,其杂合序列不能为 BamH I 与 Bgl II 切开,需用另一种酶如 Alw I 或 Mbo I 才能切开。不同限制酶产生的平整末端(表 22-12),他们互相连接后,也不一定能为原来的酶切开。有时由于实验要求,需要把末端结构不同的片段互相连结。在连结前这类片段末端往往需要改造。Klenow 片段具有 5'→3'的聚合酶和 3'→5'的外切酶的活力,因此 5'端突出单链可用 Klenow 片段将其补齐。3'端突出单链则可利用 Klenow 3'→5'的外切酶的活力将突出单链部分削平,然后再重新连接,建造新的酶切位点。表 22-14 及 22-15 分别列出了应用上述方法构建新酶切位点的限制酶。

表 22-12 平整末端连接产物可被重新切割的限制酶

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
Alu I	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG)	Aci I
(AG/CT)	Bst1107 I	Rsa I
	Ecl136 II, MspA1 I(CMG/CTG), Pvu II	Alu I
	EcoRV	Mbo I
	Ehe I	Hae III
BsaA I		
(YAC/GTR)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG)	Hpa II
(YAC/GTR)	Ecl 136 II	Mnl I
(CAC/GTR)	Pml I	BsaA I, Pml I
(TAC/GTR)	Pml I, SnaB I	BsaA I
(TAC/GTR)	SnaB I	BsaA I, SnaB I
BsrBI	Alu I, MspA1 I(CMG/CTG), Pvu II	Alu I
(GAG/CGG)	BsaA I(YAC/GTR), Fsp I, Hinc II(GTY/GAC)	
	Nae I, Pml I, Sma I, SnaB I	Mnl I
	Bst1107 I	Rsa I
	Ecl136 II	Alu I, Ban II, BsiHKA I
		Bsp1286 I, Sac I
	Eco47 III	Mn II
	EcoRV	Mbo I
	Ehe I	Hae III, Mnl I
	MspA II(CMG/CGG)	Aci I, BsrB I
	Rsa I, Sca I	BsmA I

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
Bst1107 I (GTA/TAC)	Alu I, BsrB I, BstU I, Ecl138 II, Hae III, Msc I MspA1 I(CMG/CKG), Nru I, Pvu II, Stu I Eco47 III Hinc II(GTY/GAC) Ssp I	Rsa I Alu I Acc I Tsp509 I
BstU I (CG/CG)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Bst1107 I EcoRV Ehe I Nru I	Aci I, BstU I Rsa I Mbo I Hae III BstU I
Dra I (TTT/AAA)	Hinc II(GTY/AAC), Hpa I Nru I Pme I	Mse I Taq I Dra I, Mse I
Ecl136 II (GAG/CTC)	Alu I, MspA1 I(CMG/CTG), Pvu II BsaA I(YAC/GTR), Fsp I, Hinc II(GTY/GAC) Nae I, Pm II, Sma I, SnaB I BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Bst1107 I Eco47 III EcoRV Ehe I Rsa I, Sca I	Alu I Mn II Aci I, BsrB I Rsa I Mn II Mbo I Hae III, Mn II BsmA I
Eco47 III (AGC/GCT)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Bst1107 I Ecl136 II EcoRV Ehe I Fsp I Nae I Sma I	Hpa II Alu I Mn II SfaN I Hae II, Hha I Hha I Aci I, BsoF I Aci I
EcoR V (GAT/ATC)	Alu I, BsrB I, BstU I, Ecl136 II, MspA1 I(CMG/CKG), Pvu II Hae III, Msc I, Stu I Eco47 III, Ehe I, Fsp I Nru I	Mbo I Alw I, Mbo I StaN I Mbo I, Taq I
Ehe I (GGC/GCC)	Alu I, BstU I, MspA1 I(CMG/CKG), Nru I, Pvu II BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Hae III, Msc I, Stu I	Hae III Hae III, Hpa II Hae III, Sau96 I

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
	Ecl136 II	Hae III, Mn II
	Eco47 III	Hae II, Hha I
	EcoRV	StaN I
	Fsp I	Hha I
	Nae I	Aci I, BsoF I
	Sma I	Aci I
Fsp I (TGC/GCA)	BsrB I, MspA1 I (CMG/CGG)	Hpa II
	Ecl136 II	Mn II
	Eco47 III, Ehe I	Hha I
	EcoRV	StaN I
	Nae I	Aci I, BsoF I
	Sma I	Aci I
Hae III (GG/CC)	BsrB I, MspA1 I (CMG/CGG)	Aci I
	Bst1107 I	Rsa I
	Msc I, Stu I	Hae III
	EcoRV	Alw I, Mbo I
	Ehe I	Hae III, Sau96 I
	Hinc II (GTY/GAC)	BsmF I
Hpa I (GTT/AAC)	Dra I, Pme I	Mse I
	Hinc II (GTY/AAC)	Hinc II, Hpa I, Mse I
	Hinc II (GTY/GAC)	Hinc II
	Nru I	Taq I
	Hinc II	
(GTC/RAC)	BsrB I, MspA1 I (CMG/CGG)	Hpa II
(GTC/RAC)	Bst1107 I	Acc I
(GTC/RAC)	Hae III, Msc I, Stu I	BsmF I
(GTT/RAC)	Dra I, Pme I	Mse I
(GTC/RAC)	Ecl136 II	Mn II
(GTC/RAC)	Hpa I	Hinc II
(GTT/RAC)	Hpa I	Hinc II, Hpa I, Mse I
(GTT/RAC)	Nru I	Taq I
(GTC/RAC)	Rsa I, Sca I	Tsp45 I
Msc I (TGG/CCA)	BsrB I, MspA1 I (CMG/CGG)	Aci I
	Bst1107 I	Rsa I
	Hae III, Stu I	Hae III
	EcoRV	Alw I, Mbo I
	Ehe I	Hae III, Sau96 I
	Hinc II (GTY/GAC)	BsmF I
MspA1 I		

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
(CAG/CKG)	Alu I, Ecl136 II	Alu I
(CCG/CKG)	Alu I, Hae III, Msc I, Stu I	Aci I
(CCG/CKG)	BsaA I(YAC/GTR), Fsp I	
	Hinc II(GTY/GAC), Pml II, SnaB I	Hpa II
(CAG/CKG)	BsrB I, Pvu II	Aci I, MspA1 I
(CCG/CKG)	BsrB I	Aci I, BsaJ I, BstU I, MspA1 I, Sac II
(CMG/CKG)	Bst1107 I	Rsa I
(CCG/CKG)	BstU I, Nru I	Aci I, BstU I
(CCG/CKG)	Ecl136 I	Aci I, BstB I
(CCG/CKG)	Eco47 III	Hpa II
(CMG/CKG)	EcoRV	Mbo I
(CMG/CKG)	Ehe I	Hae III
(CCG/CKG)	Ehe I	Hae III, Hpa II
(CCG/CKG)	Nae I	Hpa II, Nci I, ScrF I
(CAG/CKG)	Pvu II	Alu I, MspA1 I, Pvu II
(CCG/CKG)	Sma I	BsaJ I, Hpa II, Nci I, ScrF I
Nae I	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG), Sma I	Hpa II, Nci I, ScrF I
(GCC/GGC)	Ecl136 II	Mn II
	Eco47 III, Ehe I, Fsp I	Aci I, BsoF I
Nru I	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG)	Aci I, BstU I
(TCG/CGA)	Bst1107 I	Rsa I
	BstU I	BstU I
	Dra I, Hinc II(GTY/AAC), Hpa I	
	Pme I, Rsa I, Sca I, Ssp I	Taq I
	EcoRV	Mbo I, Taq I
	Ehe I	Hae III
Pme I	Dra I	Dra I, Mse I
(GTTT/AAAC)	Hinc II(GTY/AAC), Hpa I	Mse I
	Nru I	Taq I
Pml I	BsaA I(YAC/GTA), SnaB I	BsaA I
(CAC/GTG)	BsaA I(YAC/GTG)	BsaA I, Pml II
	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG)	Hpa II
	Ecl136 II	Mn II
Fvu II	Alu I, Ecl136 II	Alu I
(CAG/CTG)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG)	Aci I, MspA1 I
	Bst1107 I	Rsa I
	EcoRV	Mbo I
	Ehe I	Hae III
	MspA1 I(CMG/CTG)	Alu I, MspA1 I, Pvu II

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
Rsa I (GT/AC)	Ecl136 II Hinc II(GTY/GAC) Nru I Sca I	BsmA I Tsp45 I Taq I Rsa I
Sca I (AGT/ACT)	Ecl136 II Hinc II(GTY/GAC) Nru I Rsa I	BsmA I Tsp45 I Taq I Rsa I
Sma I (CCC/GGG)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Ecl136 II Eco47 III, Ehe I, Fsp I Nae I	BsaI I, Hpa II, Nci I, ScrF I MnI Aci I Hpa II, Nci I, ScrF I
SnaB I (TAC/GTA)	BsaA I(YAC/GTA) BsaA I(YAC/GTG), Pml BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Ecl136 II	BsaA I, SnaB I BsaA I Hpa II MnI
Ssp I (AAT/ATT)	Bst1107 I Nru I	Tsp 5091 Taq I
Stu I (AGG/CCT)	BsrB I, MspA1 I(CMG/CGG) Bst1107 I Hae III, Msc I EcoRV Ehe I Hinc II(GTY/GAC)	Aci I Rsa I Hae III Alw I, Mbo I Hae III Sau96 I BsmF I
BsrF I (A/CCGGY) (G/CCGGY) (R/CCGGY) (A/CCGGY) (R/CCGGY) (G/CCGGY)	Age I, BsaW I Age I, BsaW I, NgoM I Ava I(C/CCGGG), Xma I BsaW I, BspE I BsaW I, BspE I NgoM I	Age I, BsaW I, BsrF I, Hpa II BsrF I, Hpa II Hpa II, Nci I, ScrF I BsaW I, Hpa II Hpa II BsrF I, Cac8 I, Hpa II, Nae I
BsrG I (T/GTACA)	Acc65 I, Ban I(G/GTACC), BsiW I	Rsa I
BssH II (G/CGCGC)	Afl III(A/CGCGT), Mlu I Asc I	BstU I, Hha I BssH I, BstU I, Cac8 I, Hha I
BstB I (TT/CGAA)	Acc I(GT/CGAC), Cla I, Taq I Aci I, BsaH I(GR/CGYC), HinPI I, Hpa II, Nar I, Psp1406 I	Taq I —
BstY I	--	

续表 22-12

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
(A/GATCY)	BamH I, Bgl II	A/w I, BstY I, Mbo I
(G/GATCY)	BamH I	Alw I, BamH I, BstY I, Mbo I, NlaIV
(R/GATCY)	Bcl I, Mbo I	Mbo I
(G/GATCY)	Bcl I, Mbo I	A/w I, Mbo I
(A/GATCY)	Bgl II	EgI II, BstY I, Mbo I
ClaI	Acc I(GT/CGAC), BstB I, Taq I	Taq I
(AT/CGAT)	Aci I, BsaH I(GR/CGYC), HinpI I, Hpa II, Nar I, Psp1406 I	—
Csp6 I		
(G/TAC)	Ase I, Bta I, Mse I, Nde I	—
DpnI I/Mbo I/	BamH I, BstY I(R/GATCC)	A/w I, Mbo I
Sau3A I(GATC)	Bcl I, Bgl II, BstY I(R/GATCY)	Mbo I
Eae I		
(Y/GGCCR)	Bsp120 I	Hae III, Sau96 I
(C/GGCCR)	Eag I	BsiE I, Eae I, Eag I, Hae III
(T/GGCCR)	Eag I	Eae I, Hae III
(C/GGCCR)	Not I	Aci I, BsiE I, BsoF I, Eae I, Eag I, Hae III
(T/GGCCR)	Not I	Aci I, BsoF I, Eae I, Hae III
Eag I	Bsp120 I,	Hae III, Sau96 I
(C/GGCCG)	Eae I(Y/GGCCR)	Eae I, Hae III
	Eae I(C/GGCCG)	BsiE I, Eae I, Eag I, Hae III
	Not I	Aci I, BsiE I, BsoF I, Eae I, Eag I, Hae III
EcoR I	Apo I(G/AATTC)	Apo I, EcoR I, Tsp509 I
(G/AATTC)	Apo I(R/AATTY)	Apo I, Tsp509 I
	Mfe I, Tsp509 I	Tsp509 I
HinPI I	Aoc I(GT/CGAC), Cla I, BstB I, Psp1406 I, Taq I	—
(G/CGC)	Aci I, BsaH I(GR/CGCC), Nar I	Hba I
	BsaH I(GR/CGTC)	Hga I
	Hpa II	Aci I
Hpa II/Msp I	Acc I(GT/CGAC), Cla I, BstB I, Psp1406 I, Taq I	—
(C/CGG)	Aci I, BsaH I(GR/CGCC), HinPI I, Nar I	Aci I
Kas I	Ban I(G/GCGCC)	Ban I, BsaH I, Hae II, Hba I,
(G/GCGCC)		Nar I, NlaIV
Mfe I		
(C/AATTG)	Apo I(R/ATTTY), EcoR I, Tsp509I	Tsp509 I
Mlu I	Afl III(A/CGCGT)	Afl III, BstU I, Mlu I
(A/CGCGT)	Asc I, BssH II	BstU I, Hba I

限制酶	连接的限制酶	可切制的限制酶
Mse I (T/TAA)	Ase I Bfa I, Csp61, Nde I	Mse I —
Nar I (GG/CGCC)	Acc I(GT/CGAC), Cla I, BstB I, Psp1406 I, Taq I	—
Hha I	BsaH I(GR/CGCC) BsaH I(GR/CGTC) Hpa II	Aci I, HinP1 I Ban I, EsaH I, Hae II, Hha I, Nar I, NlaIV BsaH I, Hga I Aci I
Nco I (C/CATGG)	Afl III(A/CATGT), BspH I Sty I(C/CATGG)	Nla III BsaJ I, Nco I, Nla III, Sty I
Nde I (CA/TATG)	Ase I, Bfa I, Csp61, Mse I	—
NgoM I (G/CCGGC)	Age I, BsaW I, BsrF I(R/CCGGY) Ava I(C/CCGGG), Xma I BsaW I, BspE I BsrF I(R/CCGGC)	BsrF I, Hpa II Hpa II, Nci I, ScrF I Hpa II BsrF I, Cac8 I, Hpa II, Nae I
Nhe I (G/CTAGC)	Avr II, Spe I, Sty I(C/CTAGG), Xba I	Bfa I
Nla III (CATG/)	Sph I	Nla III
Not I (GC/GGCCGC)	Eae I(Y/GGCCR), Bsp120 I Eae I(Y/GGCCR), Eag I	Aci I, BsoF I, Eae I, Hae III Aci I, BsiE I, BsoF I, Eae I, Eag I, Hae III
Nsi I (ATGCA/T)	BsiHKA I(GTGCA/C), Bsp1286 I(GTGCA/C), Pst I	—
Pac I (TTAAT/TAA)	BsiE I(CGAT/CG), Pvu I	Mse I
Ppu10I (A/TGCAT)	ApaL I, Stc I(C/TGCAG)	—
PpuM I (RG/GWCCY) (GG/GTCCY) (GG/GACCY)	Ava II, Rsr II Ava II, Rsr II Ava II, Rsr II	Ava II, Sau96 I Ava II, BsmF I, NlaIV, Sau96 I Ava II, NlaIV, Sau96 I
Psp1406 I (AA/CGTT)	Acc I(GT/CGAC), Aci I, Cla I, BstB I, HinP1 I, Hpa II, Nar I, Taq I	—
Pst I (CTGCA/G)	BsiHKA I, Bsp1286 I(GTGCA/C) Nsi I	Bsg I —
Pvu I	Pac I	Mse I

续表 22-12

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
(CGAT/CG)	BsiE I(CGAT/CG)	BsiE I, Mbo I, Pvu I
Rsr II	Ava II, PpuM I(RG/GACCY)	Ava II, Sau96 I
(CG/GWCCG)	PpuM I(RG/GACCY)	Ava II, NlaIV, Sau96 I
	PpuM I(RG/GTCCY)	Ava II, BsmF I, NlaIV, Sau96 I
Sac I	Ban II(GAGCT/C), BsiHKA I, Bsp1286 I (GAGCT/C)	Alu I, Ban II, BsiHKA I, Bsp1286 I, Sac I
(GAGCT/C)		Bsp1286 I, Sac I
Sac II		
(CCGC/GG)	BsiE I(CGGC/CG)	Aci I
SaI I		
(G/TCGAC)	Ava I(C/TCGAG), Xho I	Taq I
Stc I		
(C/TGCAG)	ApaL I	Bsg I
(C/TGCAG)	Ppu10 I	—
Spe I		
(A/CTAGT)	Avr II, Nhe I, Sty I(C/CTAGG), Xba I	Bfa I
Sph I		
(GCATG/C)	Nla III	Nla III
Sty I	Avr II	Avr II, Bfa I, BsaJ I, Sty I
(C/CTAGG)	Nhe I, Spe I, Xba I	Bfa I
(C/CATGG)	BspH I	Nla III
	Nco I	BsaJ I, Nco I, Nla III, Sty I
Tai I	Aat II	Tai I
(ACGT/)		
Taq I	Acc I(GT/CGAC), Cla I, BstB I	Taq I
(T/CGA)	Aci I, BsaH I(GR/CGYC), HinP1 I Hpa II, Nar I, Psp1406 I	—
Tsp509 I		
(/AATT)	Apo I(R/AATTY), EcoR I, Mfe I	Tsp509 I
Xba I		
(T/CTAGA)	Avr II, Nhe I, Spe I, Sty I(C/CTAGG)	Bfa I
Xho I	Ava I(C/TCGAG)	Ava I, Taq I, Xho I
(C/TCGAG)	SaI I	Taq I
Xma I	Age I, BsaW I, BspE I, BsrF I(R/CCGGY), NgoM I	Hpa II, Nci I, ScrF I
(C/CCGGG)	Ava I(C/CCGGG)	Ava I, BsaJ I, Hpa II, Nci I, ScrF I, Sma I, Xma I

表 22-13 粘性末端连接产物可被重新切割的限制酶

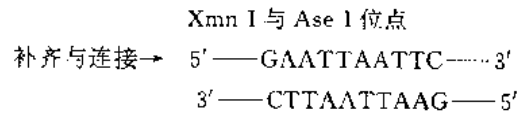
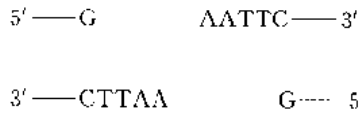
限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
Aar II	Tai I	Tai I
(GACGT/C)		
Acc65 I	Ban I(G/GTACC)	Ban I, Kpn I, Nla IV, Rsa I
(G/GTACC)	BsiW I, BsrG I	Rsa I
Acc I		
(GT/CGAC)	Aci I, BsaH I(GR/CGYC), HinP II, Hpa II, Nar I, Psp1406 I	—
(GT/CGAC)	Cla I, BstB I, Taq I	Taq I
Aci I	Acc I(GT/CGAC), Cla I, BstB I, Psp1406 I, Taq I	—
(C/CGC)	BsaH I(GR/CGCC), HinP I I, Nar I Hpa II	Aci I Hpa II
Afl III		
(A/CGCGT)	Asc I, BssH II	BstU I, Hha I
(A/CATGT)	BspH I, Nco I,	Nla III
(A/CGCGT)	Mlu I	Afl III, BstU I, Mlu I
Age I	Ava I(C/CCGGG), Xma I	Hpa II, Nci I, ScrF I
(A/CCGGT)	BsaW I, BspE I BsrF I(A/CCGGT) NgoM I	BsaW I, Hpa II Age I, BsaW I, BsrF I, Hpa II BsrF I, Hpa II
Apa I	Ban II(GGGCC/C), Bsp1286 I(GGGCC/C)	Apa I, Ban II, Bsp120 I, Bsp1286 I, Hae III, Nla IV, Sau96 I
(GGGCC/C)		
ApaL I	Sfc I(C/TGCAG)	Bsg I
(G/TGCAC)	Ppu10 I	—
Apo I		
(A/AATY)	EcoR I	Apr I, Tsp509 I
(G/AATY)	EcoR I	Apr I, EcoR I, Tsp509 I
(R/AATY)	Mfe I, Tsp509 I	Tsp509 I
Asc I	Afl III(A/CGCGT), Mlu I	BstU I, Hba I
(GG/CGCGCC)	BssH II	BssH II, BstU I, Cac8 I, Hha I
Ase I	Bfa I, Csp6 I, Nde I	—
(AT/TAAT)	Mse I	Mse I
Ava I		
(C/CCGGG)	Age I, BsaW I, BspE I, BsrF I(R/CCGGY), NgoM I	Hpa II, Nci I, ScrF I
(C/TCGAG)	Xho I	
(C/TCGAG)	Sal I	Taq I
(C/CCGGG)	Xma I	Ava I, BsaI I, Hpa II, Nci I, ScrF I, Sma I
Ava II	PpuM I(RG/GACCY)	Ava II, Nla IV, Sau96 I

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
(G/GWCC)	Rsr II PpuM I (RG/GTCCY)	Ava II, Sau96 I Ava II, BsmF I, Nla IV, Sau96 I
Avr II	Nhe I, Spe I, Xba I	Bfa I
(C/CTAGG)	Sty I (C/CTAGG)	Avr II, Bta I, BsaJ I, Sty I
BamH I	Bcl I, Mbo I	Alw I, Mbo I
(G/GATCC)	Bgl II, BstY I (R/GATCY) BstY I (G/GATCC)	Alw I, BstY I, Mbo I Alw I, BamH I, BstY I, Mbo I, Nla IV
Ban I		
(G/GTACC)	Acc65 I	Acc65 I, Ban I, Kpn I, Nla IV, Rsa I
(G/GCGCC)	Kas I	Ban I, BsaH I, Hae II, Hha I, Kas I, Nar I, Nla IV
(G/GTACC)	BsiW I, BsrG I	Rsa I
Ban II		
(GGGCC/C)	Apa I, Bsp1286 I (GGGCC/C)	Apa I, Ban II, Bsp1286 I, Hae III, Nla IV, Sau96 I
(GAGCT/C)	Bsp1286 I (GAGCT/C), Sac I	Alu I, Ban II, BsiHKA1, Bsp1286 I, Sac I
Bcl I	BamH I, BstY I (R/GATCY)	Alw I, Mbo I
(T/GATCA)	Bgl II, Mbo II	Mbo I
Bta I		
(C/TAG)	Ase I, Csp61, Mse I, Nde I	—
Bgl II	BamH I, BstY I (R/GATCY)	A/w I, BstY I, Mbo I
(A/GATCT)	Bcl I, Mbo I	Mbo I
BsaH I		
(GR/CGYC)	Acc I (GT/CGAC), Cla I, BstB I, Taq I	—
(GA/CGYC)	Aci I, HinP1 I	Hga I
(GG/CGUC)	Aci I, HinP1 I	Hha I
(GG/CGYC)	Hpa II	Aci I
(GA/CGYC)	Nar I	BsaH I, Hga I
(GG/CGYC)	Nar I	Ban I, BsaH I, Hae II, Hha I, Nar I, Nla IV
BsaW I	Age I, BsrF I (R/CCGGY)	Age I, BsaW I, BsrF I, Hpa II
(W/CCGGW)	Ava I (C/CCGGG), Xma I BspE I BsrF I (R/CCGGY), NgoM I	Hpa II, Nci I, ScrF I BsaW I, BspE I, Hpa II BsrF I, Hpa II

限制酶	连接的限制酶	可切割的限制酶
	NgoM 1	Hpa II
BsiE 1		
(CGAT/CG)	Pac 1	Mse 1
(CGAT/CG)	Pvu 1	BsiE 1, Mbo 1, Pvu 1
(CGGC/CG)	Sac II	Aci 1
BsiHKA 1	Bsp1286 1(GTGCA/C)	BsiHKA 1, Bsp1286 1
(GTGCA/C)	Bsp1286 1(GAGCA/C)	BsiHKA 1, Bsp1286 1
	Bsp1286 1(GAGCT/C), Sac 1	Alu 1, Ban II, BsiHKA 1, Bsp1286 1, Sac 1
	Nsi 1	—
	Pst 1	Bsg 1
BsiW 1		
(C/GTACG)	Acc65 1, Ban I(G/GTACC), BsrG 1	Rsa 1
Bsp120 1	Eae 1(Y/GGCCR), Eag 1	Hae III, Sau96 1
(G/GGCCC)	Not 1	Aci 1, BsoF 1, Hae III, Sau96 1
Bsp1286 1		
(GGGCC/C)	Apa 1, Ban II(GGGCC/C)	Apa 1, Ban II, Bsp1286 1, Hae III, Nla IV, Sau96 1
(GTGCA/C)	BsiHKA 1	ApaL 1, BsiHKA 1, Bsp1286 1
(GGGCC/C)	Ban II(GGGCC/C)	Ban II, Bsp1286 1
(GAGCT/C)	Ban II(GAGCT/C), BsiHKA 1, Sac 1	Alu 1, Ban II, BsiHKA 1, Bsp1286 1, Sac 1
(GWGCW/C)	BsiHKA 1	BsiHKA 1, Bsp1286 1
(GTGCA/C)	Nsi 1	—
(GTGCA/C)	Pst 1	Bsg 1
BspE 1	Age 1, BsaW 1, BsrF 1(R/CCGGY)	BsaW 1, Hpa II
(T/CCGGA)	Ava 1(C/CCGGG), Xma 1	Hpa II, Nci 1, ScrF 1
	BsaW 1	BsaW 1, BspE 1, Hpa II
	BsrF 1(R/CCGGY), NgoM 1	Hpa II
BspH 1		
(T/CATGA)	Afl III(A/CATGT), Nco 1, Sty 1(C/CATGG)	Nla III

表 22-14 补齐 5' 端突出单链连接构建限制酶新切割位点

举例: EcoR I 片段



限制酶	切割位点	反应后序列	可用于切割的限制酶
Acc65 I	G/GTACC	GGTACGTACC	BsaA I, Mae II, Rsa I, SnaB I
Aci I	C/CGC	CCGCGC	(Aci I), BstU I, Hha I
Afl II	C/TTAAG	CTTAATTAAG	Mse I, Pac I, Tsp509 I
Age I	A/CCGGT	ACCGGCCGGT	BsiE I, BsrF I, Eae I, Eag I, Hae III, Hpa II
ApaI I	G/TGCAC	GTGCATGCAC	Cac8 I, Nla III, Nsp I, Sph I
Ase I	GG/CGCGCC	GGCGCGCGCC	BssH II, BstU I, Cac8 I, Hha I
Avr II	C/CTAGG	CCTAGCTAGG	Alu I, Bfa I
BamH I	G/GATCC	GGATCGATCC	Afw I, Cla I, Mbo I, Taq I
Bcl I	T/GATCA	TGATCGATCA	Cla I, Mbo I, Taq I
Bfa I	C/TAG	CTATAG	Sfi I
Bgl II	A/GATCT	AGATCGATCT	Cla I, Mbo I, Taq I
BsiW I	C/GTACG	CGTACGTACG	BsaA I, (BsiW I), Mae II, Rsa I, SnaB I
Bsp120 I	G/GGCCC	GGGCCGGCCC	BsrF I, Cac8 I, Fse I, Hae III, Hpa II, Nae I, Sau96 I
BspD I/Cla I	AT/CGAT	ATCGCGAT	BstU I, Nru I
BspE I	T/CCGGA	TCCGGCCGGA	BsiE I, Eae I, Eag I, Hae III, Hpa II
BspH I	T/CATGA	TCATGCATGA	Nla III, Nsi I
BsrG I	T/GTACA	TGTACGTACA	BsaA I, Mae II, Rsa I, SnaB I
BssH II	G/CGCGC	GCGCGCGCGC	(BssH II), BstU I, Cac8 I, Hha I
BstB I	TT/CGAA	TTCGCGAA	BstU I, Nru I
Csp6 I	G/TAC	GTATAC	Acc I, Bst1107 I
Dpn II/MboI/ Sau3A I	/GATC	GATCGATC	Cla I, (Mbo I), Taq I
Eag I	C/GGCCG	CGGCCGGCCG	BsiE I, BsrF I, Cac8 I, Eae I, (Eag I), Fse I, Hae III, Hpa II, Nae I
EcoR I	G/AATTC	GAATTAATTC	Ase I, Mse I, Tsp509 I, Xmn I
HinP1 I	G/CGC	GCGCGC	BssH II, BstU I, Cac8 I, (Hha I)
Hind III	A/AGCTT	AAGCTAGCTT	Alu I, Bfa I, Cac8 I, Nhe I
Hpa II/Msp I	C/CGG	CCGCGG	Aci I, BsaI I, BstU I, Dsa I, MspA1 I, Sac II
Kas I	G/GCGCC	GGCGCGCGCC	BssH II, BstU I, Cac8 I, Hha I
Mae II	A/CGT	ACGCGT	Afl III, BstU I, Mlu I
Mlu I	A/CGCGT	ACGCGCGCGT	BssH II, BstU I, Cac8 I, Hha I
Mun I	C/AATTG	CAATTAATTG	Ase I, Mse I, Tsp509 I
Nar I	GG/CGCC	GGCGCGCC	Ase I, BssH II, BstU I, Cac8 I, Hha I
Nco I	C/CATGG	CCATGCATGG	Nla III, Nsi I

限制酶	切割位点	反应后序列	可用于切割的限制酶
NgoM I	G/CCGGC	GCCGGCCGGC	BsiE I, BsrF I, Cac8 I, Eae I, Eag I, Hae III, Hpa II, (NgoM I)
Nhe I	G/CTAGC	GCTAGCTAGC	Alu I, Bfa I, Cac8 I, (Nhe I)
Not I	GC/GGCCGC	GCGGCCGGCCGC	Aci I, BsiE I, BsoF I, BsrF I, Cac8 I, Eae I, Eag I, Fse I, Hae III, Hpa II, Nae I
PaeR7 I/Xho I	C/TCGAG	CTCGATCGAG	BsiE I, Mbo I, Pvu I, Taq I
Ppu10 I	A/TGCAT	ATGCATGCAT	Cac8 I, Nla III, (Nsi I), Nsp I, Sph I
Psp1406 I	AA/CGTT	AACGCGTT	Afl III, BstU I, Mlu I
SaI I	G/TCGAC	GTCGATCGAC	BsiE I, Mbo I, Pvu I, Taq I
Spc I	A/CTAGT	ACTAGCTAGT	Alu I, Bfa I
Taq I	T/CGA	TCGCGA	BsrU I, Nru I
Tsp509 I	/AATT	AA1TAA1T	Ase I, Mse I, (Tsp509 I)
Xba I	T/CTAGA	TCTAGCTAGA	Alu I, Bfa I
Xma I	C/CCGGG	CCCGGCCGGG	BsiE I, Eae I, Eag I, Hae III, Hpa II, Nci I, ScrF I

表 22-15 除去 3' 端突出单链连接构建限制酶新切割位点

举例: Bgl I 片段

限制酶	序列	反应后的序列	可用于切割的限制酶
	5'—GCCNNNN NGGC—3'		BsaI I 与 BseD I 位点
	3'—CGGN NNNNCCG—5'		除去与连接→ 5'—GCCNNGGC—3'
			3'—CGGNNCCG—5'
AccB7 I	CCANNNN ↓ NTGG	CCANNTGG	
Ahd I	GACNNN ↓ NNGTC	GACNNNNGTC	Pshp I
AlwN	CAGNNN ↓ CTG	CAGCTG	Alu I, CviJ I, MspA1 I, NspB II, Pvu II
AspE I	GACNNN ↓ NNGTC	GACNNNNGTC	PshA I
Bgl I	GCCNNNN ↓ NGGC	GCCNNGGC	BsaI I, BseD I
BsaO I	CGRY ↓ CG	CGCG	Acc II, Bsh1236 I, BstU I, Mvn I, Tha I
Bsh1285 I	CGRY ↓ CG	CGCG	Acc II, Bsh1236 I, BstU I, Mrn I, Tha I
BsiE I	CGRY ↓ CG	CGCG	Acc II, Bsh1236 I, BstU I, Mvnl, Tha I
BsiY I	CCNNNNN ↓ NNGG	CCNNNNGG	
Bsl I	CCNNNNN ↓ NNGG	CCNNNNGG	
BspO I	CGAT ↓ CG	CGCG	Acc II, Bsh1236 I, BstU I, Mvn I, Tha I
BstX I	CCANNNNN ↓ NTGG	CCANNTGG	
Cfr42 I	CCGC ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Dra III	CACNNN ↓ GTG	CACGTG	BbrP I, BsaA I, Eco72 I, Mae II, PmaC I, Pml I, Tai I
Dro I	GACNNNN ↓ NNGTC	GACNNNNGTC	PshA I
Eam1105 I	GACNNN ↓ NNGTC	GACNNNNGTC	PshA I
EclHK I	GACNNN ↓ NNGTC	GACNNNNGTC	PshA I
Esp1396 I	CCANNNN ↓ NTGG	CCANNTGG	
Fse I	GGCCCG ↓ CC	GGCC	(BsuR I), (CviJ I), (Hae III), (Pai I)

限制酶	序列	反应后的序列	可用于切割的限制酶
Ksp I	CCGC ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Mwo I	GCNNNNN ↓ NNGC	GCNNNNGC	
Pac I	TTAAT ↓ TAA	TTATAA	
PflM I	CCANNNN ↓ NTGG	CCANNTGG	
Ple19 I	CGAT ↓ CG	CGCG	Aco II, Bsh1236 I, BstU I, Mvn I, Tha I
Pvu I	CGAT ↓ CG	CGCG	Acc II, Bsh1236 I, BstU I, Mvn I, Tha I
Sac II	CCGC ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Sfi I	GGCCNNNN ↓ NGCCC	GGCCNNGGCC	BsaI I, BseD I, (BsuR I), (Cvij I), (Hae III), (Pai I)
Sfr303 I	CCGC ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Sgf I	GCGAT ↓ CGC	GCGCGC	Acc II, AspLEI, BsePI, Bsh1236 I, BssH II, BstU I, Cae8 I, Cfo I, Hha I, Hin6 I, HinPI I, HspA I, Mvn I, Pau I, Tha I
Sse8387 I	CCTGCA ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Sst II	CCGC ↓ GG	CCGG	BsiS I, Hap II, Hin2 I, Hpa II, Msp I
Van91 I	CCANNNN ↓ NTGG	CCANNTGG	
Xcm I	CCANNNNN ↓ NNNNTGG	CCANNNNNNNNTGG	

单字编码: R=G 或 A; H=A, C 或 T; Y=C 或 T; V=A, C 或 G; W=A 或 T; B=C, G 或 T;
 \hat{M} =A 或 C; D=A, G 或 T; K=G 或 T; N=G, A, T 或 C; S=C 或 G。

22.6. 甲基化酶

大肠杆菌的绝大多数菌株含有两种甲基化酶——dam 甲基化酶及 dcm 甲基化酶。dam 甲基化酶可使 5'GATC3' 序列中的腺嘌呤 N⁶ 甲基化, dcm 甲基化酶可使 5'CCAGG3' 或者 5'CCTGG3' 中的胞嘧啶 C⁵ 位置甲基化。一旦限制酶识别序列的碱基被甲基化后, 往往会使限制酶活力受抑制。同裂酶对他们识别序列中特定位置的甲基化所受影响并不一致。表 22-16 显示了一对同裂酶在同一位置甲基化, 一个受抑制, 另一个不受抑制。表 22-17 列出了限制酶识别序列甲基化后与酶活力的关系。

有许多 II 类限制酶的相应甲基化酶已经分离, 利用上述甲基化酶的特性在基因克隆中有下列用途:

(1) 甲基化作用可使限制酶识别序列受到保护, 免受限制酶的切割。

(2) 改变某些限制酶的表现特异性, 如 Hinc II 识别序列为 GTPyPuAC, 可以切割以下四种序列: GTCGAC, GTCAAC, GTTGAC, GTTAAC。而 M. Taq I 甲基化酶只识别 TCGA, 并使 A 甲基化。这样四种序列中只有这一种不受 Hinc II 切割, 而其他三种序列仍然对 Hinc II 敏感。表 22-18 列举了应用这一方法改变限制酶的表现特异性。

(3) 产生新的特异酶切位点, 某些腺嘌呤甲基化酶可与依赖于甲基化的限制酶 Dpn I 合并应用, 可产生新的酶切位点。如 Taq I 识别序列 TCGA 甲基化后就不能被 Taq I 切割而产生 Dpn I 酶切位点。表 22-19 列出了甲基化酶与限制酶识别序列边缘部分重叠时, 应用甲基化改变限制酶的切割特异性的其他例子。

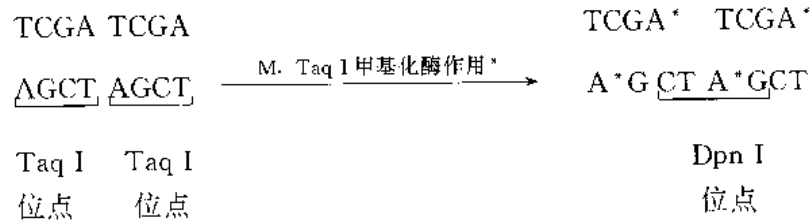


表 22-16 对序列特异甲基化作用敏感性不同的若干对同裂酶

甲基化序列	可切割的酶	不可切割的酶
m ⁵ CATG	CviA II	Nla III
m ⁵ CAN ₆ TGG	Esp1396 I	PflM I, VaN91 I
m ⁴ CCGG	Msp I	Hpa I
C ^{m5} CCG	Msp I	Hpa II, Hap II
C ^{m4} CCG	Msp I	Hpa II
CC ^{m5} CGGG	Cfr9 I, Xma I	Sma I
m ⁵ CCTNAGG	Mst II	Bsu36 I
C ^{m5} CSGG	Bcn I	EcoH I, Eco1831 I
C ^{m5} CWGG	Apy I, BstN I, Mva I	EcoR II
m ⁵ CCWGG	BstN I, EcoR II, Mva I	Apy I
CG ^{m5} ATCG	Pvu I	Xor II
GAAN ₄ TT ^{m5} C	Asp700 I	Xmn I
GAGCT ^{m5} C	Sac I	Ecl136 II
G ^{m5} A7C	Sau3A I, FnuE I	Mbo I, Nde II
GAT ^{m4} C	Mbo I	Sau3A I
GAT ^{m5} C	Mbo I	Sau3A I
GGC ^{m5} C	Hae III	Ngo II
GGNC ^{m5} C	Asu I	Sau96 I
GTG ^{m5} CAC	ApaL I	Alw44 I
GGTAC ^{m5} C	Kpn I	Acc65 I, Asp718 I
GGTA ^{m5} C ^{m5} C	Kpn I	Asp718 I
GGWC ^{m5} C	Afl I	Ava II, Eco47 I
RG ^{m5} ATCY	Xho II, BstY I	Mfl I
RGAT ^{m5} CY	BstY I	Mfl I, Xho II
T ^{m5} CCGGA	Acc III	BspM II, Kpn2 I, Mro I
TC ^{m5} CGGA	Acc III, BspE I	BspM II, Kpn2 I, Mro I
TCCGG ^{m5} A	BspM II, Kpn2 I, Mro I	Acc III
T ^{hm5} CGA	Taq I	CviS III
TCGCG ^{m5} A	Ama I, SalD I, Sbo13 I, Spo I	Nru I
TCC ^{m5} CGA	Nru I	Spo I
TT ^{m5} CGAA	Asu II, Sfu I	BstB I
TTCG ^{m5} AA	Cbi I	BstB I, Csp5 I, SspRF I
CGGWC ^{m5} CG	Csp I	Rsr II

本表引自 McClelland, M. *et al.* Nucleic Acid Research, 1994, 22(17): 3655.

表 22-17 限制酶识别序列甲基化后与酶活力的关系

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
Aac I	CCWGG	C ^{m5} CWGG	?
Aat I	AGGCCT	?	AGG ^{m5} CCT AGGC ^{m5} CT AGGC ^{m4} CT
Aat II	GACGTC	?	GACGT ^{m5} C
Acc I	GTMKAC	?	GTMK ^{m6} AC [±] GTMKA ^{m5} C ^b
Acc II	CGCG	?	^{m5} CGCG
Acc III	TCCGGA	T ^{m5} C ^{m5} GGA TC ^{m5} CGGA	TCCGG ^{m6} A
Afl I	GGWCC	GGWC ^{m5} C?? GGWC ^{m4} C ^b	?
Afl II	CTTAAG	?	^{m5} CTTAAG
Afl III	ACRYGT	?	A ^{m3} CRYGT
Aha II	GRCGYC ^b	?	GR ^{m5} CGYC GRCGY ^{m5} C
Alu I	AGCT	?	^{m6} AGCT AG ^{m4} CT AG ^{m5} CT ^{ff} AG ^{hm5} CT
Alw I	GGATC	?	GG ^{m6} ATC GGAT ^{m4} C
Aos II	GRCGYC	?	GR ^{m5} CGYC
Apa I	GGGCCC	?	GGG ^{m5} CCC [#] GGGCC ^{m6} C
ApaI. I	GTGCAC	GTGC ^{m6} AC	?
Apy I	CCWGG	C ^{m5} CWGG	^{m5} CCWGG
Aqu I	CYCGRG	?	^{m5} CYCGRG [#]
Asp700 I	GAAN ₄ TTC	GA ^{m6} AN ₄ TTC GAAN ₄ TT ^{m5} C	G ^{m6} AAN ₄ TTC
Asp718 I	GGTACC	GGT ^{m6} A ^{m5} CC	GGTAC ^{m5} C GGTA ^{m5} C ^{m5} C ^b
Asu II	TTCGAA	TT ^{m5} CGAA	?
AtuC I	TGATCA	?	TG ^{m6} ATCA
Ava I	CYCGRG	C ^{m5} CCGGG	^{m5} CYCGRG CY ^{m6} CGRG CTCG ^{m6} AG ^b
Ava II	GGWCC	GGWC ^{m4} C ^b	GGW ^{m5} CC GGWC ^{m6} C GGW ^{hm5} C ^{hm5} C

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
Avi II	AGCGCT	^{m6} AGCGCT	AG ^{m5} CGCT
Bal I	TGCCCA	?	TGG ^{m5} CCA [#] TGGC ^{m5} CA ^b
BamF I	GGATCC	GG ^{m5} ATCC	GGAT ^{m4} CC
BamH I	GGATCC	GGATC ^{m5} C GG ^{m6} ATCC GG ^{m6} ATC ^{m5} C GGATC ^{m4} C	GGAT ^{m4} CC [#] GGAT ^{m5} CC GGAT ^{hm5} C ^{lm5} C
BamK I	GGATCC	GG ^{m6} ATCC	GGAT ^{m4} CC
Ban I	GGYRCC ^b	GG ^{m5} CGCC GGYRC ^{m4} C	?
Ban II	GRGCYC	?	GRG ^{m5} CYC
Ban III	ATCGAT	?	ATCG ^{m6} AT
Bbc I	GGCGCC	GGCG ^{m5} CC GGCGC ^{m5} C	GG ^{m5} CGCC
Bbu I	GCATGC	GCATG ^{m5} C	GC ^{m6} ATGC
Bgl I	GCCN ₃ GGC	GC ^{m5} CN ₃ GGC ^b	G ^{m5} CCN ₃ GGC GCCN ₃ GG ^{m5} C ^b GC ^{m4} CN ₃ GGC ^b
Bgl II	AGATCT	AG ^{m6} ATCT	AGAT ^{m5} CT AGAT ^{hm5} CT
Bin I	GGATC	?	GG ^{m6} ATC
BmaDI	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	CGAT ^{m6} CG
Bme216 I	GGWCC	?	GGWC ^{m5} C
Bbv I	GCWGC	?	G ^{m5} CWGC [#]
Bcl I	TGATCA	TGAT ^{m5} CA	TG ^{m6} ATCA
Bcn I	CCSGG	^{m5} CCSGG	C ^{m4} CSGG [#]
Bsm I	GAATGC	?	G ^{m6} AATGC
BsmA I	GTCTC	?	GT ^{m5} CT ^{m5} C
Bsp106 I	ATCGAT	?	ATCG ^{m5} AT [#]
Bsp1286 I	GDGCHC	?	GDG ^{m5} CHC
BspH I	TCATGA	?	TC ^{m6} ATGA TCATG ^{m6} A
BspM I	ACCTGC	?	ACCTG ^{m5} C
BspM II	TCCGGA	TCCGG ^{m6} A	T ^{m5} CCGGA TC ^{m5} CGGA
BspN I	CCWGG	^{m5} CCWGG C ^{m5} CWGG	?

续表 22-17

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
BspX I	ATCGAT	?	ATCG ^{m6} AT
BssH II	GCGCGC ^b	?	G ^{m5} CGCGC
Bst I	GGATCC	GG ^{m6} ATCC GGATC ^{m5} C	GGAT ^{m4} CC GGAT ^{m5} CC GGATC ^{m4} C
BstB I	TTCGAA	?	TTCG ^{m6} AA
BstE II	GGTNACC	GGTNA ^{m5} C ^{m5} C ^b GGTNAC ^{m4} C	GGTNA ^{hm5} C ^{hm5} C
BstE III	GATC	?	G ^{m6} ATC
BstG I	TGATCA	?	TG ^{m3} ATCA
BstN I	CCWGG ^b	^{m5} CCWGG ^b C ^{m5} WGG ^{m5} C ^{m5} WGG ^b	^{hm5} C ^{hm5} WGG C ^{m4} WGG
BstU I	CGCG	?	^{m3} CGCG
BstX I	CCAN ₆ TGG	?	^{m5} CCAN ₆ TGG
BstY I	RGATCY	RG ^{m6} ATCY RGAT ^{m5} CY	RGAT ^{m4} CY
BsuE I	CGCG	?	^{m5} CGCG #
BsuF I	CCGG	?	^{m5} CCGG #
BsuM I	CTCGAG	?	CT ^{m5} CGAG #
BsuR I	GGCC	?	GG ^{m5} CC # ^b
Cfo I	GCGC	?	G ^{m5} CGC G ^{hm5} CG ^{hm5} C
Cfr I	YGGCCR	?	YGG ^{m5} CCR #
Cfr6 I	CAGCTG	?	CAG ^{m4} CTG # CAG ^{m5} CTG
Cfr9 I	CCCGGG	C ^{m5} CCGGG CC ^{m5} CGGG	^{m4} CCCGGG ^{m5} CCCGGG C ^{m4} CCCGG # CC ^{m4} CGGG
Cfr10 I	RCCGGY	?	R ^{m5} CCGGY #
Cfr13 I	GGNCC	?	GGN ^{m5} CC #
Cla I	ATCGAT	?	^{m6} ATCGAT AT ^{m3} CGAT ATCG ^{m6} AT #
Cpe I	TGATCA	?	TG ^{m6} ATCA
Csp I	CGGWCCG	CGGWC ^{m5} CG	CGGW ^{m5} CCG ^{m5} CGGWCCG
Csp45 I	TTCGAA	?	TTCG ^{m6} AA

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
CviA I	GATC	?	G ^{m6} ATC
CviB I	GANTC	?	G ^{m6} ANTC [#]
CviJ I	RGCY	?	RG ^{m5} CY [#]
Cvi I	CC	C ^{m5} C	^{m5} CC [#]
CviQ I	GTAC	GTA ^{m5} C	GT ^{m6} AC [#]
Dde I	CTNAG	?	^{m5} CTNAG [#] hm ⁵ C [#] CTNAG
Dpn I	G ^{m6} ATC ^b	G ^{m6} ATC G ^{m6} AT ^{m5} C ^b G ^{m6} AT ^{m4} C	GATC GAT ^{m4} C GAT ^{m5} C
Dra II	RGGNCCY	?	RGGNC ^{m5} CY
Eae I	YGGCCR	?	YGG ^{m5} CCR [#] YGGC ^{m5} CR
Eag I	CGGCCG	?	CGG ^{m5} CCG ^{m2} CGGC ^{m5} CG
Ear I	GAAGAG	?	G ^{m6} AAGAG GAAG ^{m6} AG ^{m5} CT ^{m5} CTT ^{m5} C
Eca I	GGTAN ^{m6} ACC	?	GGTA ^{m6} ACC [#]
EclX I	CGGCCG	?	^{m5} CGGC ^{m5} CG CGG ^{m5} CCG
Eco47 I	GGWCC	?	GGWC ^{m5} C
Eco47 III	AGCGCT	^{m6} AGCGCT	AG ^{m5} CGCT
EcoA	GAGN ₇ GTCA ^b	?	G ^{m6} AGN ₇ G ^m TCA ^{#h}
EcoB	TGAN ₈ TGCT ^b	?	TG ^{m6} AN ₈ ^m TGCT ^{#b}
EcoD XXI	?CAN ₇ AATC ^b	?	TCAN ₇ ^{m6} AA ^m TC ^{#h}
EcoE	GAGN ₇ ATGC	?	G ^{m6} AGN ₇ ATGC
EcoK	AACN ₆ GTGC ^b	?	A ^{m6} ACN ₆ G ^m TGC ^{#b}
EcoO109 I	RGGNCCY	?	RGGNC ^{m5} CY
EcoP I	AGACC ^b	AGA ^{hm5} C ^{hm5} C	AG ^{m6} ACC [#]
EcoR I	GAATTC	GAATT ^{hm5} C	G ^{m6} AATTC ^b GA ^{m6} AATTC [#] GAATT ^{m5} C ^b
EcoR II	CCWGG ^b	^{m5} CCWGG	^{m4} CCWGG C ^{m4} WGG C ^{m5} WGG [#] CC ^{m6} AGG hm ⁵ C ^{hm5} WGG
EcoR V	GATATC	GATAT ^{m5} C ^b	G ^{m6} ATATC [#]

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
			GAT ^{m6} ATC
Esp I	GCTNAGC	GCTNAG ^{m5} C	G ^{m5} CTNAGC
Fnu4H I	GCNGC	?	G ^{m5} CNGC GCNG ^{m5} C
FnuD II	CGCG	?	^{m6} CGCG CG ^{m5} CG
FnuE I	GATC	G ^{m6} ATC	?
Fok I	CATCC	CAT ^{m5} CC CATC ^{m5} C ^b CATC ^{m4} C	GG ^{m6} ATG C ^{m5} ATCC
Fse I	GGCCGGCC	?	GG ^{m5} CCGGCC GGC ^{m5} CCGGCC GGCCGG ^{m5} CC
Fsp I	TGCGCA	?	TG ^{m5} CGCA
Hae II	RGCGCY ^b	?	RG ^{m5} CGCY RG ^{hm5} CG ^{hm5} CY
Hae III	GGCC	GGC ^{m5} C	GG ^{m5} CC ^{#b} GG ^{hm5} C ^{hm5} C
Hap II	CCGG	?	C ^{m5} CCG [#]
Hga I	GACGC	?	GA ^{m5} CGC GACG ^{m5} C
HgiA I	GRGCYC	?	GRG ^{m5} CYC
HgiJ II	GGYRCC	?	GGYRC ^{m5} C
Hha I	GCGC	?	G ^{m5} CGC [#] GCG ^{m5} C G ^{hm5} CG ^{hm5} C
Hha II	GANTC	?	G ^{m6} ANTC [#]
Hinc II	GTYRAC	GTYRA ^{m5} C	GTYR ^{m6} AC GTYRA ^{hm5} C
Hind II	GTYRAC	?	GTYR ^{m6} AC [#]
Hind III	AAGCTT	?	^{m6} AAGCTT [#] AAG ^{m5} CTT AAG ^{hm5} CTT
Hinf I	GANTC	GANT ^{m5} C ^b	G ^{m5} ANTC GANT ^{hm5} C
HinP I	GCGC	?	G ^{m5} CGC
Hpa I	GTTAAC	GTTAA ^{m5} C	GTTA ^{m6} AC [#] GTTAA ^{hm5} C
Hpa II	CCGG	?	^{m4} CCGG

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
			m^5CCGG^b
			$C^{m^4}CGG^b$
			$C^{m^5}CGG^{\#}$
			$hm^5C^{hm^5}CGG$
Hph I	TCACC	?	$T^{m^5}CACC^{\#}$
			$GGTG^{m^6}A$
Kpn I	$GGTACC^b$	$GGTA^{m^5}CC$	$GGT^{m^6}A^{m^5}CC$
		$GGTAC^{m^5}C$	$GGTAC^{m^4}C$
		$GGTA^{m^5}C^{m^5}C^b$	
Kpn2 I	TCCGGA	$TCCGG^{m^6}A$	$T^{m^5}CCGGA$
			$TC^{m^5}CGGA$
Ksp I	CCGCGG	?	$m^5CCGCGG$
			$C^{m^5}CGCGG$
Mac II	ACGT	?	$A^{m^5}CGT^b$
Mbo I	GATC	$GAT^{m^4}C$	$G^{m^6}ATC^{\#b}$
		$GAT^{m^5}C$	$GAT^{hm^5}C$
Mbo II	GAAGA	$T^{m^5}CTT^{m^5}C^b$	$GAAG^{m^6}A^{\#}$
Mfl I	$RGATCY^b$?	$RG^{m^6}ATCY$
			$RGAT^{m^4}CY$
			$RGAT^{m^5}CY$
Mlu I	ACGCGT	$m^6ACGCGT$	$A^{m^5}CGCGT$
Mme II	GATC	?	$G^{m^6}ATC$
Mnl I	CCTC	?	m^5CCTC
			$m^5C^{m^5}CT^{m^5}C$
Mph I	CCWGG	?	$C^{m^5}CWGG$
Mro I	TCCGGA	$TCCGG^{m^6}A$	$T^{m^5}CCGGA$
			$TC^{m^5}CGGA$
Mse I	TTAA	$TT^{m^6}AA$?
Msp I	$CCGG^b$	m^4CCGG	$m^5CCGG^{\#}$
		$C^{m^4}CGG$	$hm^5C^{hm^5}CGG$
		$C^{m^5}CGG$	
Mst II	CCTNAGG	$m^5CCTNAGG$?
Mva I	CCWGG	$C^{m^5}CWGG^b$	$C^{m^4}CWGG^{\#}$
		m^5CCWGG	$CC^{m^6}AGG$
			m^4CCWGG^b
			$m^5C^{m^5}CWGG^b$
Mvn I	CGCG	?	m^5CGCG
Nac I	GCCGGC	?	$G^{m^5}CCGGC$
			$GC^{m^5}CGGC$

续表 22-17

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
			GCCGG ^{m5} C
Nan II	G ^{m6} ATC ^b	G ^{m6} ATC G ^{m6} AT ^{m5} C ^b	GATC GAT ^{m5} C
Nar I	GGCGCC	GGCGC ^{m5} C	GG ^{m5} CGCC GGCGC ^{m4} C
Nci I	CCSGG	^{m5} CCSGG	C ^{m4} CSGG C ^{m5} CSGG ^b
Neo I	CCATGG	CC ^{m6} ATGG	^{m4} CCATGG ^b ^{m5} CCATGG
Ner I	AGATCT	AG ^{m6} ATCT ^b	?
Neu I	GAAGA	GAAG ^{m6} A	?
Nde I	CATATG	^{m5} CATATG ^h	^{m5} A
Nde II	GATC	GAT ^{m5} C ^b	G ^{m6} ATC
Ngo I	RGCGCY	?	RG ^{m5} CGCY
Ngo II	GGCC	?	GG ^{m5} CC [#]
NgoB I	TCACC	?	T ^{m5} CACC
Nhe I	GCTAGC	?	GCTAG ^{m5} C
Nla III	CATG	?	C ^{m6} ATG
NmuD I	G ^{m6} ATC ^b	G ^{m6} ATC	GATC
NmuE I	G ^{m6} ATC ^b	G ^{m6} ATC	GATC
Not I	GCGGCCGC	GCGGCCG ^{m5} C	GCGG ^{m5} CCGC GCGGC ^{m5} CGC
Nru I	TCGCGA	?	T ^{m5} CGCGA TCGCG ^{m6} A
Nsi I	ATGCAT	?	ATGC ^{m6} AT
NspB II	CMGCKG	C ^{m5} CGCKG	?
PaeR7 I	CTCGAG		CTCC ^{m6} AG [#] CTGC ^{m6} AG [#]
Pfa I	GATC	G ^{m6} ATC	?
PflM I	CCAN ₅ TGG	?	C ^{m5} CAN ₅ TGG C ^{m5} CAN ₅ TGG
Pfu I	CGTACG	?	CGTA ^{m5} CG
Pst I	CTGCAG	?	^{m5} CTGCAG
Pvu I	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	CGAT ^{m4} CG CGAT ^{m5} CG
Pvu II	CAGCTG	?	CAG ^{m4} CTG [#] CAG ^{m5} CTG
Rsa I	GTAC ^b	GTA ^{m5} C ^b	GT ^{m6} A ^{m5} C
Rsh I	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	?

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
Rsr I	GAATTC	?	G ^{m6} AATTC GA ^{m6} ATTC ^{#1}
Rsr II	CGGWCCG	?	^{m5} CGGWCCG CGGW ^{m5} CCG CGGWC ^{m5} CG
Sac I	GAGCTC	G ^{m6} AGCTC	GAG ^{m5} CTC
Sac II	CCGCGG	?	^{m5} CCGCGG
Sal I	GTCGAC	GTCGA ^{m5} C	GT ^{m5} CGAC GTCG ^{m6} AC [#]
SalD I	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	T ^{m5} CGCGA
Sau3A I	GATC ^b	G ^{m6} ATC	GAT ^{m5} C ^b GAT ^{m4} C GAT ^{hm5} C
Sau96 I	GGNCC	?	GGN ^{m5} CC GGNC ^{m5} C GGN ^{hm5} C ^{hm5} C
Sbo13 I	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	T ^{m5} CGCGA
ScrF I	CCNGG	^{m5} CCNGG	C ^{m5} CNGG C ^{m4} CNGG
SfaN I	GATGC	GATG ^{m5} C	G ^{m6} ATGC
Sfi I	GGCCN ₅ GGCC	GG ^{m5} CCN ₅ GG ^{m5} CC ^b GGCCN ₅ GGC ^{m5} C	GGC ^{m5} CN ₅ GGCC
Sfl I	CTGCAG	?	CTGC ^{m6} AG
Sin I	GGWCC	?	GGW ^{m5} CC [#]
Sma I	CCCGGG	C ^{m5} CCGGG	^{m4} CCCGGG ^{m5} CCCGGG ^b C ^{m7} CCGGG ^b CC ^{m4} CGGG CC ^{m5} CGGG ^b
Spe I	ACTAGT	?	^{m6} ACTAGT
Sph I	GCATGC	GCATG ^{m5} C G ^{hm5} CATG ^{hm5} C	GC ^{m6} ATGC
Spl I	CGTACG	CGT ^{m6} ACG	?
Spo I	TCGCGA	TCGCG ^{m6} A	T ^{m5} CGCGA
Srf I	GCCC/GGGC	GCCC/GGG ^{m5} C	G ^{m5} CCC/GGGC GC ^{m5} CC/GGGC GCC ^{m5} C/GGGC
Sso II	CCNGG	?	C ^{m5} CNGG ^{m5} CCNGG

限制酶	识别序列	可切割位点	不可切割位点
Sco47 I	GAATTC	?	G ^{m6} AATTC [#]
Ssp I	AATATT	^{m6} AATATT	?
Sst I	GAGCTC	?	GAG ^{m5} CTC GAG ^{hm5} CT ^{hm5} C
Stu I	AGGCCT	?	AGG ^{m5} CCT AGGC ^{m5} CT AGGC ^{m4} CT
StySB I	GAGN ₆ RTAYG ^b	?	G ^{m6} AGN ₆ R ^m TAYG ^{#b}
StySP I	AACN ₆ GTRC ^b	?	A ^{m6} ACN ₆ G ^m TRC ^{#b}
Taq I	TCGA	T ^{m5} CGA ^b T ^{hm5} CGA ^b	TCG ^{m6} A [#]
TaqII	GACCGA CACCCA	?	G ^{m6} ACCGA
Taq XI	CCWGG	^{m5} CCWGG C ^{m5} CWGG	?
Tfi I	TCGA	?	TCG ^{m6} A
Tha I	CGCG	?	^{m5} CGCG ^{hm5} CG ^{hm5} CG
TthHB I	TCGA	T ^{m5} CGA	TCG ^{m6} A [#]
Xba I	TCTAGA	?	TCTAG ^{m6} A [#] T ^{m5} CTAGA ^b T ^{hm5} CTAGA
Xho I	CTCGAG	?	CT ^{m5} CGAG CTCG ^{m6} AG ^{m5} CTCGAG
Xho II	RGATCY	RG ^{m6} ATCY	RGAT ^{m5} CY ^b
Xma I	CCCGGG	CC ^{m5} CGGG ^b	^{m4} CCCGGG ^{m5} CCCGGG C ^{m4} CCCGG CC ^{m4} CGGG
Xma III	CGGCCG	?	CGG ^{m5} CCG
Xmn I	GAAN ₄ TTC	GA ^{m6} AN ₄ TTC	G ^{m6} AAN ₄ TTC GAAN ₄ TT ^{m5} C ^b
Xor II	CGATCG	CG ^{m6} ATCG	CGAT ^{m5} CG ^{hm5} CGAT ^{hm5} CG

a: #表示按规则修饰的甲基化酶特异性。R=G或A, Y=C或T, M=A或C, K=G或T, S=G或C, W=A或T, H=A或C或T, B=G或T或C, V=G或C或A, D=G或A或T, N=A或C或G或T。 ^{m4}C=N4-甲基胞嘧啶(N4-methylcytosine), ^{m5}C=C5-甲基胞嘧啶(N5-methylcytosine), ^{hm5}C=羟甲基胞嘧啶(hydroxymethylcytosine); ^mC=甲基胞嘧啶, N4或N5未明确, ^{m6}A=N6-methylcytosine。序列以5'→3'。

b. Acc I 可在半甲基化的 GTMKA^{m5}C 序列的未甲基化链上慢慢地产生切口。
 Afl I 缓慢切割 GGWC^{m4}C。
 Aha II 若 GRCGCC 序列在 GRCG^{m5}CC 上发生甲基化, Aha II 的切割会加快。但它不能切割 GRCGY^{m5}C 位点。
 Ava I 可在半甲基化的 CTCG^{m5}AG/CTCGAG 序列的未甲基化链上慢慢地产生切口。
 Ava II 缓慢切割 GGWC^{m4}C。
 Bal I 与 dam(TGGC^{m5}CAGG)重叠的位点,其切割速率仅为未甲基化的 1/50。
 Ban I 在识别序列^{m4}C 或不同的^{m5}C 位点发生甲基化其速率效应各不相同。
 Bgl I 在半甲基化的 GC^{m5}CN₅GGC、GC^{m4}CN₅GGC 和 GCCN₅GGm₅C 位点上切割非常缓慢, ^{m5}C 双甲基化的 M. Hae III-Bgl I 位点可完全抵抗 Bgl I 的切割。
 BssH II 不切割 M. Hha II 修饰的 DNA,其中有两个不同位点胞嘧啶可半甲基化即 G^{m5}CGCGC/GCG^{m5}CGC。
 M. Bst I 能甲基化 GGAT^{m5}C 序列内部的胞嘧啶,但不知是^{m4}C 或 ^{m5}C。
 BstE II 可切割完全被^{m5}C 取代的 XP12 噬菌体。
 BstN I 切割 C^{m5}CWGG, ^{m5}CCWGG 与^{m5}C^{m5}CWGG。BstN I 的同裂酶包括 Aor I, Apy I, BspN I, Mva I 与 Taq XI 对 C^{m5}CWCG 均不敏感。
 BsuR I 可在半甲基化的 GG^{m5}CC/GGCC 序列的未甲基化链上产生切口。
 M. Cre I 是从单细胞真核生物 *Chlamydomonas reinhardtii* 中分离的。
 Dpn I 要求两条链上的腺嘌呤同时被甲基化。其同裂酶包括 Cfu I, Nan II, NmuD I, 与 NmuE I。Dpn I 可切割 dam 修饰的 XP12 噬菌体 DNA。
 M. Eca I GGT^{m5}ACC 已经克隆。
 M. Eco dam 修饰 GAT^{m5}C 速率减慢。
 EcoA, EcoB, EcoD XXI 与 EcoK 均为 I 类限制酶, ^mT 表示互补链上的 6-甲基嘌呤。
 EcoP I 是 III 类限制酶。
 EcoR I 不能切割半甲基化的 G^{m5}AATTC/GAATTC, EcoR I 与 Rsr I 均不能切割双甲基化的 GA^{m5}ATTC/GA^{m5}ATTC 位点; EcoR I 在半甲基化的 GAATT^{m5}C/GAATTC 位点的切割速率减慢,不能切割两条链上均带有 GAATT^{m5}C 的寡核苷酸。
 EcoR II 的同裂酶包括 AtuB I, Atu II, BinS I, BstG II, Cfr5 I, Cfr11 I, Eca II, Ecl II, Eco27 I, Eco38 I 和 Mph I 对 C^{m5}CWGG 也敏感。EcoR II 切割半甲基化^{m5}CCWGG/CCWGG 位点速率减低。
 EcoR V 能切割完全被^{m5}C 取代的 XP12 噬菌体 DNA。
 FokI 切割 CAT^{m5}C 速率仅为未甲基化的 1/2~1/4。
 Hae II 对修饰的识别序列 RGCG^{m5}CY 表现切割速率减低。
 Hae III 可在半甲基化 GG^{m5}CC/GGCC 序列的未甲基化链上产生切口。
 Hinf I 可切割 GANT^{m5}C。然而在未甲基化,半甲基化(GANT^{m5}C/GANTC)和双甲基化(GANT^{m5}C/GANT^{m5}C)的靶序列之间反应速率有所不同。Hif I 切割未甲基化序列的速率快于半甲基化的序列,而后者又快于双甲基化序列,但对未甲基化和双甲基化切割速率相差仅约十倍。Hif I 确可切割 XP12 噬菌体 DNA,但切割速率有所降低。
 Hpa II 在半甲基化的 C^{m5}CGG/CCGG 序列的未甲基化链上产生切口。
 Kpn I 对半甲基化的 GGTA^{m5}CC/GGTACC 和 GGTAC^{m5}C/GGTACC 的敏感性尚有争论。
 Mae II 可在半甲基化的 A^{m5}CGT/ACGT 序列的未甲基化链缓慢产生切口。
 Mbo I 的同裂酶包括 Bsap I, BssG II, BstE III, Bst XII, Cpa I, Cty I, CviA I, Dpn II, FnuA II, FnuC I, Mme II, Mno III, Mos I, Nde II, Nfi I, Nla II, Nph I, Nsu I, Pfa I, SinM I 对 G^{m5}ATC 均敏感。
 Mbo II 能切割完全被^{m5}C 取代的 XP12 噬菌体 DNA。
 Mfi I 在^{m5}AGATCY 位点缓慢产生切口。
 M. Mnu I 是哺乳动物^{m5}CG 甲基转移酶,从 *Mus musculus*(小鼠)中分离得到。
 Msp I 可切割 C^{m5}CGG/CCGG 和 C^{m4}CGG/CCGG 双链体的未甲基化链与甲基化链。Msp I 在 GGC^{m5}CGG 位点上的切割速率很慢。
 Mva I 可在半甲基化的 C^{m4}CWGG/CCWGG 序列的未甲基化链产生切口。
 Nan II 要求两条链上的腺嘌呤同时被甲基化。Nan II 可切割 dam 修饰的 XP12 噬菌体 DNA, Nan II 是 Dpn I 的

同裂酶。

Nci I可切割^{m5}C^{m5}CSGG的甲基化DNA,二次甲基化可能削弱C^{m5}CSGG的影响。

Neo I的切割可被M. Sca I(CCNNGG)所阻断。

Nde I和Nde II可切割完全被m5C取代的XP12噬菌体DNA。

NmuD I和NmuE I要求两条链上的腺嘌呤均被甲基化。两者都是Dpn I的同裂酶。

Rsa I可切割完全被^{m5}C取代的XP12噬菌体DNA。

Rsr I不能切割半甲基化的G^{m6}AATTC/GAATTC或双甲基化的GA^{m6}ATTC/GA^{m6}ATTC位点。

Sau3A I可在半甲基化GAT^{m5}C/GATC序列的未甲基化链上产生切口。Sau3A I在^{m5}AGATC的切割速率下降。Sau3A I的同裂酶包括Bcc 243 I, Bsp67 I, BspA I, BsrP II, Cpe I, Cpf I, FnuE I, FnuEE I, MspB I, Mth I, NsiA I, Pfa I和SauC I对G^{m6}ATC不敏感。

Sfi I不能切割M. Bgl I修饰的DNA。

Sma I可在半甲基化CC^{m5}CGGG/CCCGGG序列的未甲基化链上产生切口。Sma I可切割C^{m5}C^{m5}CGGG的甲基化DNA,二次甲基化可能削弱CC^{m5}CGGG的效应。是否能切割^{m5}CCCGGG尚有不同结果。

Taq I在T^{m5}5CGA的切割速率很慢。Taq I可切割完全被m5C取代的XP12噬菌体DNA。

M. Taq I甲基化T^{m5}5CGA的速率仅为未甲基化的1/20。

Xho II可在半甲基化的RGAT^{m5}CY/RGATCY序列的未甲基化链上慢慢地产生切口。

Xmn I可切割完全被m5C取代的XP12噬菌体DNA。两条链在GAAN₄TT^{m5}C位置上均甲基化时,在一些位点上Xmn I切割缓慢。

本表主要材料引自Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991, 并经修改和补充。

表 22-18 应用甲基化改变限制酶的切割特异性

限制酶	甲基化酶	限制酶切割特异性
Acc I [GT(A/C)(G/T)AC]	M. Taq I [TCG ^m A]	GT(A/C)TAC
Aha II [GPuCGPyC]	M. Hha I [G ^m CGC]	GPuCGTC
Ava II [CPyCGPuG]	M. Taq I [TCG ^m A]	CPyCGGG
Ava I [CPyCGPuG]	M. Hpa II [C ^m CGG]	CPyCGAG
Ava I [CPyCGPuG]	M. Hpa II [C ^m CGG] + M. Taq I [TCG ^m A]	CCCGAG
Ban II [GPuGCPyC]	M. Alu I [AG ^m CT]	GPuGCCC
Ban II [GPuGCPyC]	M. Hae III [GG ^m CC]	GPuGCTC
Ban II [GPuGCPyC]	M. Hae III [GG ^m CC] + M. Alu I [AG ^m CT]	GGGCTC
Bsp1286 I [G(A/G/T)GC(A/C/T)C]	M. Alu I [AG ^m CT]	G(G/T)GC(A/C/T)C
Bsp1286 I [G(A/G/T)GC(A/C/T)C]	M. Hae III [GG ^m CC]	G(A/G/T)GC(A/T)C
Bsp1286 I [G(A/G/T)GC(A/C/T)C]	M. Hae III [GG ^m CC] + M. Alu I [AG ^m CT]	G(G/T)GC(A/T)C
HgiA I [G(A/T)GC(A/T)C]	M. Alu I [AG ^m CT]	G(A/T)GCAC
Hinc II [GTPyPuAC]	M. Taq I [TCG ^m A]	GTPyAAC
Sau96 I [GGNCC]	M. Hae III [GG ^m CC]	GGACC
ScrF I [CCNNGG]	M. Hpa II [C ^m CGG]	CCAGG

本表引自New England Bio Lab. 96/97目录。

表 22-19 应用甲基化改变限制酶的切割特异性
(甲基化酶与限制酶识别序列边缘部分重叠时)

限制酶	甲基化酶	被甲基化限制的序列 ^a
Acc I[GT(A/C)(G/T)AC]	M. Taq I[TCG ^m A]	GT(A/C)TAC
Aha II[GPuCGPyC]	M. Hpa II[C ^m CGG]	CCGGCGPyC
Alu I[AGCT]	M. Pst I[CTGC ^m AG]	AGCTGCAG
Ava II[GG(A/T)CC]	M. Hpa II[C ^m CGG]	CCGG(A/T)CC
BamH I[GGATCC]	M. Msp I[^m CCGG]	CCGGATCC
Bgl I[GCCN ₃ GGC]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCN ₃ GGC
BstU I[CGCG]	M. Hha I[G ^m CGC]	GCGCG
Bst XI[CCAN ₆ TGG]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCAN ₆ TGG
Cla I[ATCGAT]	dam[G ^m ATC]	GATCGAT
Cla I[ATCGAT]	M. Hha I[G ^m CGC]	GAATCGAT
Dde I[CTNAG]	M. Alu I[AG ^m CT]	AGCTNAG
EcoR V[GATATC]	M. Taq I[TCG ^m A]	TCGATATC
Hinf I[GANTC]	M. Hph I[T ^m CACC]	GANTCACC
Hinf I[GANTC]	M. Mbo II[GAAG ^m A]	GAAGANTC
Hinf I[GANTC]	M. Taq I[TCG ^m A]	TCGANTC
Hph I[GGTGA]	dam[G ^m ATC]	GGTGATC
Mbo I[GATC]	M. Cla I[ATCG ^m AT]	ATCGATC
Mbo I[GATC]	M. Taq I[TCG ^m A]	TCGATC
Mbo I[GATC]	M. Mbo II[GAAG ^m A]	GAAGATC
Mbo II[GAAGA]	dam[G ^m ATC]	GAAGATC
Msp I[CCGG]	BamH I[GGAT ^m CC]	CCGGATCC
Msp I[CCGG]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCGG
Mst I[TCGCGCA]	M. H1[GCNGC + GG ^m CC]	GCTGCGCA
Nae I[GCCGGC]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCGGC
Neo I[CCATGG]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCATGG
Nhe I[GCTAGC]	M. Alu I[AG ^m CT]	AGCTAGC
Not I[GCGGCCGC]	M. FnuD I[^m CGCG]	CGCGGCCGC
Nru I[TCGCGA]	dam[G ^m ATC]	GATCGCGA
Pst I[CTGCAG]	M. Alu I[AG ^m CT]	AGCTGCAG
Pst I[CTGCAG]	M. H1[GCNGC + GG ^m CC]	GCTGCAG
Pvu II[CAGCTG]	M. H1[GCNGC + GG ^m CC]	GCAGCTG
Sac II[CCGCGG]	M. Hae III[GG ^m CC]	GGCCGCGG
Sau3A I[GATC]	M. Hph I[T ^m CACC]	GATCACC
Taq I[TCGA]	M. Cla I[ATCG ^m AT]	ATCGAT
Taq I[TCGA]	dam[G ^m ATC]	GATCGA
Xba I[TCTAGA]	dam[G ^m ATC]	GATCTAGA
Xmn I[GAAN ₄ TC]	M. Taq I[TCG ^m A]	TCGAAN ₄ TC

a: 表中仅列出 5'→3'序列。

本表引自 New England Bio Lab96/97 目录。

表 22-20 DNA 甲基化转移酶及其特性^a

甲基化酶	特性	甲基化酶	特性
M. Acc I	GT ^{m6} AC	M. BsuP11 I	GG ^{m5} CC, G ^{m5} CNGC
M. Afl II	CTTAAG ^(m6A)	M. BsuP11s	GGCC, GDGCHC
M. AlaK21	GAT ^{m5} C	M. BsuQ I	^m CCGG
M. Alu I	AG ^{m5} CT	M. BsuR I	GG ^{m5} CC
M. Alw26 I	GT ^{m5} CTC, C ^{m6} AGAC	M. BsuR II	CT ^m CGAG
M. Apa I	GG ^{m5} CCC	M. BsuSPB	GG ^{m5} CC, G ^{m5} CNGC
M. Aqu I	^{m5} CYCGRG	M. BsuSPR I	GG ^{m5} CC, ^{m5} C ^{m5} CGG C ^{m5} CWGG
M. Bal I	TGG ^{m5} CCA	M. BsuSPR191	^{m5} C ^{m5} CGG, C ^m CWGG
M. BamH I	GGAT ^{m4} CC	M. BsuSPR33 I	GG ^{m5} CC, C ^{m5} CWGG
M. BamH II	G ^m CWGC	M. Cfr I	YGG ^{m5} CCR
M. Bbv I	G ^{m5} CWGC	M. Cfr6 I	CAG ^{m4} CTG
M. BbvS I	G ^m CWGC	M. Cfr9 I	C ^{m4} CCGGG
M. BbvS II	G ^{m5} AT	M. Cfr10 I	R ^{m5} CCGGY
M. BbvS III	A ^{m6} AG	M. Cfr13 I	GGN ^{m5} CC
M. Bcn I	C ^{m4} CSGG	M. Cla I	ATCG ^{m6} AT
M. Bcp I	^{m5} CCGG	M. Cre I ^b	T ^{m5} CR
M. Bme216 I	GGWC ^m C	M. CviB I	G ^{m6} ANTC
M. BspR I	GG ^{m5} CC	M. CviB III	TCG ^{m6} A
M. BspJL14 I	GGN ^m CC	M. CviJ I	RG ^{m5} CY
M. Bsp106 I	ATCG ^{m6} AT	M. CviNY I	^{m5} CC
M. Bst I ^b	GGAT ^m CC	M. CviQ I	GT ^{m6} AC
M. Bst VI	CTCG ^{m6} AG	M. Dde I	^{m5} CTNAG
M. BstY I	RGAT ^m CY	M. Dpn II	G ^{m6} ATC
M. BsuE I	^{m5} CGCG	M. Eae I	YGG ^{m5} CCR
N. BsuF I	^{m5} CCGG	M. Eca I ^b	GGT ^{m6} ACC
M. BsuM I	YT ^{m5} CGAR	M. Eco dam ^b	G ^{m6} ATC
M. BsuPhi3T	GG ^{m5} CC, G ^{m5} CNGC	M. Mbo II	GAAG ^{m6} A
M. Eco dem I	C ^m CWGG	M. Mmu I ^b	^{m5} CG
M. Eco dem II	R ^m CCGG	M. Msp I	^{m5} CCGG ^b
M. Eco dem III	^m CCWGG	M. Mva I	C ^{m4} CWGG
M. Eco dem VI	GGWC ^m C	M. Nco I	CCATGG ^(mC)
M. EcoA	G ^{m6} AGN ₇ G ^m TCA	M. Nde I	CATATG ^(m6A)
M. EcoB	G ^{m6} AN ₈ TGCT	M. Ngo II	GG ^{m5} CC
M. EcoE	G ^{m6} AGN ₇ ATGC	M. Ngo IV	G ^{m5} CCGGC
M. EcoK	A ^{m6} ACN ₆ C ^m TGC	M. Ngo V	GGNN ^{m5} CC
M. EcoP I	AG ^{m5} ACC	M. Ngo VI	G ^{m6} ATC
M. EcoP1 dam	G ^{m6} ATC	M. Ngo VII	G ^m CWGC
M. EcoP15	C ^{m6} AGCAG	M. NgoA I	GG ^{m5} CC
M. EcoR I	GA ^{m6} ATTC	M. NgoB I	T ^{m5} CACC
M. EcoR II	C ^{m5} CWGG		

甲基化酶	特性	甲基化酶	特性
M. EcoR V	G ^{m6} ATATC	M. NgoB II	GTAN ₃ ^{m5} CTC
M. EcoR124	GAAN ₆ RTCG(^{m6} A)	M. NgoP I	RG ^m CGCY
M. EcoR124/3	GAAN ₇ RTCG(^{m6} A)	M. NgoP II	GG ^{m5} CC
N. EcoRT1 dam	G ^{m6} ATC	M. Nla III	C ^{m6} ATC
M. EcoRT2 dam	G ^{m6} AT	M. PaeR7 I	CTCG ^{m6} AG
M. EcoRT4 dam	G ^{m6} ATC	M. Pst I	CTCG ^{m6} AG
M. EcoR31 I	GGT ^{m5} CTC, G ^{m6} AGACC	M. Pvu II	CAG ^{m4} CTG
M. EcoR57 I	CTGAAG(^{m6} A)	M. Rsr I	GA ^{m6} ATTC
M. EcoR72 I	CACGTG(^{m5} C)	M. Sal I	GTCG ^{m6} AC
M. FnuD II	^{m5} CGCG	M. Sau96 I	GGN ^m CC
M. Fok I	GG ^{m6} ATG, C ^{m6} ATCC	M. Sin I	GGW ^{m5} CC#
M. Hae II	RGCGCY	M. Sma I	CC ^m CGGG
M. Hae III	GG ^{m5} CC	M. Sso47 I	G ^{m5} AATTC
M. Hpa II	C ^m CGG	M. Sso47 II	C ^m CNGG
M. Hga I	GACGC(^m C)	M. SspMQ I	^{m5} CG
M. Hha I	G ^{m5} CGC	M. StySB I	G ^{m6} AGN ₆ R ^m TYG
M. Hha II	G ^{m6} ANTC	M. StySP I	A ^{m6} ACN ₆ R ^m TRC
M. Hinc II	GTYR ^{m6} AC	M. StySQ	A ^{m6} ACN ₆ R ^m TAYG
M. Hind II	GTYR ^{m6} AC	M. StySJ	G ^{m6} AGN ₆ G ^m TRC
M. Hind III	^{m6} AAGCTT	M. Taq I ^b	TCG ^{m6} A
M. Hinf I	G ^{m6} ANTC	M. TthHB8 I	TCG ^{m6} A
M. Hpa I	GTTA ^{m6} AC	M. Tfi I	TCG ^{m6} A
M. Hpa II	C ^{m5} CGG	M. Xba I	TCTAG ^{m6} A
M. Hph I	T ^{m5} CACC	M. Xma III	CGG ^m CCG
M. Mbo I	G ^{m6} ATC		

本表引自 Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991.
a, b: 见表 22-17.

(吴冠芸)

参 考 文 献

- 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 科学出版社, 1987
 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版). 科学出版社, 1992
 Brown T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991
 McClelland M, Nelson M and Raschke E. Nucleic Acid Res. 1994, 22: 3640
 Biochemicals Catalog. Boehringer Mannheim GmbH, 1996
 Promega Catalog, Biological Research Products, Promega Corporation, 1998
 Molecular Biology Catalog & Products Application Guide. MBI Fermentas AB, 1997
 New England Biolabs. 1996/97 Catalog. New England Biolabs Inc. 1996
 1995 Stratagene Catalog, Stratagene Cloning Systems, 1995
 The World of Pharmacia Biotech '95, Pharmacia Biotech Inc. 1995

23. 其他核酸研究工具酶

核酸研究中除限制性内切酶与甲基化酶外,常用的还有 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、核酸连接酶、末端修饰酶、拓朴异构酶及 DNA 结合蛋白等。

23.1. DNA 聚合酶

23.1.1. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)

DNA 聚合酶 I(DNA polymerase I)是 1956 年 Kornberg 等发现的第一个 DNA 聚合酶,故也称 Kornberg 酶。DNA 聚合酶 I 是由一条分子量为 109 kD 的肽链构成。它具有多种酶活性,5'→3' DNA 聚合酶活性,5'→3' 及 3'→5' 外切酶活性以及 RNA 酶 H 活性。DNA 聚合酶 I 要求单链 DNA 为模板,在引物的 3'OH 末端以脱氧核苷三磷酸(dNTP)为底物,按模板逐个加上脱氧核苷酸(见下图)。

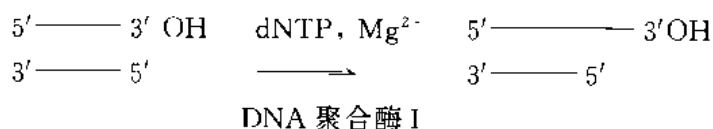


图 23-1 DNA 聚合酶 I 的作用方式

5'→3' 外切酶,从 5' 端降解双链 DNA 或 DNA-RNA 杂交体的 RNA 成分(DNA 聚合酶具有 RNA 酶 H 活性)主要产生 5' 单核苷酸。

3'→5' 外切酶活性,从 3' 羟基端降解双链或单链 DNA 产生 5' 单核苷酸。对双链 DNA 的外切酶活性可被 5'→3' DNA 聚合酶活性所封闭,也可为带 5' 磷酸的 dNMP 所抑制。在只有一种 dNTP 存在下,3'→5' 外切酶活性从 3'OH 端降解双链 DNA 直到露出与 dNTP 互补的碱基然后在该位置上发生一系列连续的合成和交换反应,利用这一性质可以标记 3' 末端(见下图)。

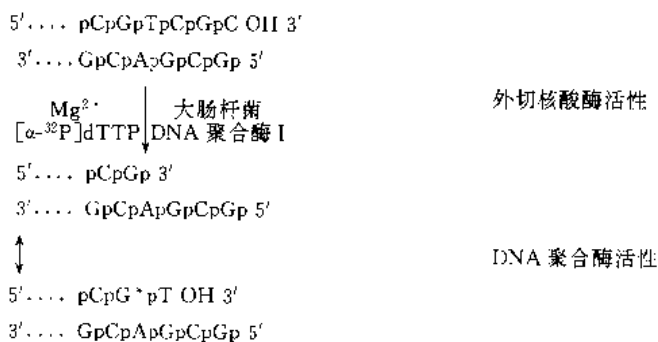


图 23-2 DNA 聚合酶的作用方式(交换反应)

DNA 聚合酶 I 可用于缺口翻译标记 DNA,也可与 RNase H 联合应用于 cDNA 克隆中合成第二链,目前已为逆转录酶或 Klenow 片段所代替。

23.1.2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段)

DNA 聚合酶 I 大片段或称 Klenow 片段,是 DNA 聚合酶的蛋白酶水解物,分子量为 76kD。大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 外切酶活性在使用时常引起一些麻烦,利用蛋白酶可从全酶中除去 5'→3' 外切酶活性而保持聚合酶及 3'→5' 外切酶活性均不变。

商品 DNA 聚合酶 Klenow 片段就是用枯草杆菌蛋白酶裂解完整的 DNA 聚合酶 I 获得或通过克隆技术生产。目前还有应用变异的方法去除 3'→5' 外切酶活性,只留聚合酶活性更适合于随机引物标记。类似于 Klenow 片段的尚有 AmpliTaq (Stoffel 片段和 Bst DNA 聚合酶,两者均无 5'→3' 外切酶活性而热稳定性增加,因此可以提高 PCR 的变性温度,测定 GC 含量高的 DNA 序列时优于 Klenow 片段。

DNA 聚合酶 Klenow 片段的特性除没有 5'→3' 外切酶活性外其他均与 DNA 聚合酶 I 同,可应用于以下几个方面:

- (1) 补平标记限制酶消化 DNA 后产生的 3' 凹端,也可用同位素标记的 dNTP 补平 3' 凹端进行末端标记。
- (2) 对带有 3' 突出端的分子进行末端标记。先利用 3'→5' 外切酶活性降解 DNA 的 3' 突出尾成 3' 凹端,然后再补平,这样可将放射性或非放射性标记物标记于 DNA 片段的 3' 末端。
- (3) 应用随机引物标记单链 DNA。
- (4) 在 cDNA 克隆中合成 cDNA 第二链。
- (5) 应用 Sanger 双脱氧末端终止法进行测序。
- (6) 在体外诱变中用于合成第二链。

23.1.3. T4 噬菌体 DNA 聚合酶

T4 噬菌体感染大肠杆菌诱生的 T4 噬菌体 DNA 聚合酶由单条多肽链构成,分子量为 11.4kD。他没有 5'→3' 外切酶活性,因此与 Klenow 片段相似。但其 3'→5' 外切酶活性要比 Klenow 片段强 200 倍,从 3' 羟基降解单链 DNA 的作用比双链 DNA 更强,可用于以下几个方面:

- (1) 补平限制酶消化 DNA 后产生的 3' 凹端。
- (2) 对带有 3' 突出端的分子进行末端标记优于 Klenow 片段,因其 3'→5' 外切酶活性很强,进行末端标记的首选酶。
- (3) 标记用作探针的 DNA 片段。
- (4) 制备单链缺失亚克隆。
- (5) 补平 5' 端或除去 3' 凸出端形成平端。
- (6) 在体外诱变中用于合成第二链。

23.1.4. T7 噬菌体 DNA 聚合酶

T7 噬菌体感染大肠杆菌诱生的 DNA 聚合酶是 T7 噬菌体 5 蛋白(84kD)与 *E. coli*

的硫氧还蛋白紧密结合的二聚体。T7 噬菌体 DNA 聚合酶也具有 3'→5' 外切酶活性,由噬菌体基因 5 所编码。*E. coli* 蛋白使复合体与模板紧密结合,防止合成的链早期与模板解离。他是已知 DNA 聚合酶中持续合成能力最强的一个,催化合成的 DNA 平均长度比其他 DNA 聚合酶催化的要大得多。其特性与 DNA 聚合酶 I 同。

T7 噬菌体 DNA 聚合酶用于末端终止法测序优于 Klenow。也可用于通过补平或交换进行末端标记和体外诱变中用于合成第二链。

23.1.5. Taq DNA 聚合酶

Taq DNA 聚合酶最初是从嗜热的栖热水菌 *Thermus aquaticus* 中分离出来的。它是一种依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶,最佳温度为 ~72°C、95°C 与 97.5°C,半寿期相应为 40 min 和 10 min。应用重组技术得到的 Taq DNA 聚合酶称为 Ampli Taq^R。目前已有多个公司生产,我国科学院遗传所、复旦大学等单位均有生产;并且各厂家从多种耐热菌中分离出耐热性更好的 DNA 聚合酶,如从 *Thermus thermophilus* 中分离出来的 Tth DNA 聚合酶, *Thermococcus litoralis* 中分离出来的“Vent”DNA 聚合酶, *Bacillus stermophilus* 中分离出来的 Bst DNA 聚合酶。Taq DNA 聚合酶广泛用于聚合酶链反应,也可以用与测序。有的耐热 DNA 聚合酶如 rTth 在 Mn²⁺ 存在下逆转录酶活性大大强于 DNA 聚合酶,故可用于 RT-PCR。表 23-1 和 23-2 列出了一些耐热 DNA 聚合酶的特性。

表 23-1 Perkin Elmer 公司的一些耐热 DNA 聚合酶的特性

酶	Ampli Taq ^R DNA 聚合酶	Ampli Taq ^R DNA 聚合酶 Stoffe 片段	r Tth DNA 聚合酶	r Tth DNA 聚合酶 XL	UI Tma DNA 聚合酶
菌株	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
重组酶	是	是	是	是	是
单链	是	是	是	是	是
分子量	94 kD	61 kD	94 kD	94 kD	70 kD
氨基酸数	832	544	832	—	610
最适延伸温度	72~80°C	72~80°C	72~80°C	72~80°C	72~80°C
延伸速度	2~4 kb/min	2~4 kb/min	2~4 kb/min	—	—
逆转录酶活性	低	低	依赖于 Mn ²⁺	—	—
半寿期:					
97.5°C	10 min	20 min	2 min	2 min	40 min
95°C	40 min	80 min	20 min	20 min	—
92.5°C	>130 min	—	—	—	—
PCR 反应:					
最适 Mg ²⁺ 浓度	1~4 mmol/L	2~10 mmol/L	1.5~2.5 mmol/L	1.5~2.5 mmol/L	1.5~2.0 mmol/L
最适 pH	7.0~7.5	7.0~7.5	7.0~7.5	7.0~7.5	8.3
dNTP 浓度	40~200 μmol/L	各 40~200 μmol/L	各 40~200 μmol/L	各 40~200 μmol/L	各 40 μmol/L

续表 23-1

酶	Ampli Taq ^R DNA 聚合酶	Ampli Taq ^R DNA 聚合酶 Stoffe 片段	r Tth DNA 聚合酶	r Tth DNA 聚合酶 XL	Ul Tma DNA 聚合酶
KCl 浓度	50 mmol/L	10 mmol/L	75~100 mmol/L	75~100 mmol/L	10~35 mmol/L
引物浓度	0.1~1.0 μmol/L	0.1~1.0 μmol/L	0.1~1.0 μmol/L	0.4 μmol/L	0.1~1.0 μmol/L
持续合成能力	50~60 碱基	5~10 碱基	30~40 碱基	30~40 碱基	—
最长 PCR 产物	~5kb	—	~5kb	>40kb	<3kb
测序数据	400 碱基	400 碱基	400 碱基	400 碱基	400 碱基
底物类似物:					
dUTP	可以	可以	可以	可以	可以
脱氮-dGTP	可以	可以	可以	可以	可以
生物素-11-dUTP	可以	—	可以	可以	可以
地高新-dUTP	可以	—	—	—	—
ddNTP	可以	可以	可以	可以	可以
荧光 ddNTP/dNTP	可以	可以	可以	可以	可以
5'→3' 外切酶	有	无	有	有	无
3'→5' 外切酶	无	无	无	有	有

表 23-2 其他公司的一些耐热 DNA 聚合酶的特性

DNA 聚合酶	VentDNA	Vent (exo-)	DeepVent (exo)	DeepVent	Tth	Pwo	Pfu	Tli
来源	<i>Archaea Thermococcus litoralis</i>	同 Vent DNA 聚合酶	<i>Pyrococcus Species GB-D</i>	同 DeepVent DNA 聚合酶	<i>Thermus thermo- philus HB8</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>	<i>Pyrococcus furius</i>	<i>Thermus flavus</i>
重组酶	—	+	—	+	—	+	+, —	—
分子量	—	—	—	—	93kD	90kD	—	90kD
5'→3' 聚合酶	+	+	+	+	+	+	+	+
3'→5' 外切酶	+	—	+	—	—	+	+	+
校正活力	—	—	—	—	—	—	—	—
5'→3' 外切酶	—	—	—	—	—	—	—	—
热稳定度	95°C 半寿期 6.7 小时, 100°C 为 1.8 小时	95°C 半寿期 6.7 小时, 100°C 为 1.8 小时	95°C 半寿期 23 小时, 100°C	95°C 半寿期 23 小时, 100°C 为 8 小时	耐 95°C	100°C 半寿期 2 小时	95°C 1 小时 保持 95% 活力	耐 95°C
最适温度 (°C)	72~80	72~80	72~80	72~80	~75	~75	~75	~75
错误率 (×10 ⁻⁶ 碱基)	57	190	无资料	无资料	无资料	为 Taq 的 1/10	为 Taq 的 1/12	无资料
生成的末端	>95% 平端	70% 平端; 30% 3' 凸端	>95% 平端	不详	不详	平端	平端	不详

续表 23-2

DNA 聚合酶	VentDNA	Vent (exo-)	DeepVent (exo-)	DeepVent	Tth	Pwo	Pfu	Tli
链置换	能,取决于 温度	能,取决于 温度	无资料	无资料	无资料	无资料	无资料	无资料
PCR 产物最长 长度	13.2 kb	15.0 kb	14.0 kb	15.0 kb	无资料	无资料	无资料	无资料

酶生产公司: Vent 系列, New Eng Biolabs; Pwo, Boehringer Mannheim;
Tth, Pharmacia Biotech; Pfu, Stragagene;
Tli, Promaga.

23.1.6. 逆转录酶

以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶称为逆转录酶(reverse transcriptase)。常用的两种逆转录酶分别来自禽成髓细胞瘤病毒(avian myeloblastosis virus, AMV)和 Moloney 鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus, Mo-MLV)。两种逆转录酶在许多方面有所差别,但均无 3'→5' 外切酶活性。AMV 逆转录酶是由两条多肽链组成的二聚体,分子量分别为 62kD 及 94kD,除拗口有聚合酶活性外还有很强的 RNA 酶 H 活性。鼠源逆转录酶为 84kD 单链多肽,其 RNA 酶 H 活性较弱,有利于合成较长的 cDNA。AMV 逆转录酶的最适温度为 42℃(鸡的正常体温),而 Mo-MLV 逆转录酶在 42℃ 时迅速失活。因此 AMV 逆转录酶可更有效地转录具有较强二级结构的 mRNA。二者反应时所要求的 pH 值也有一定差异。逆转录酶主要用于将 mRNA 转录为 cDNA,以便克隆,分析。还可用于补平突出的 DNA 片段(也可用此法标记 DNA 5'端)和进行双脱氧链终止法测序。表 23-3 为依赖于模板的 DNA 聚合酶的比较。

表 23-3 依赖于模板的 DNA 聚合酶的比较

	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow	T4 噬菌体 DNA 聚合酶	测序酶 ^a (T7 噬菌体 DNA 聚合酶)	Taq DNA 聚合酶	逆转录酶
反应:	+	+	+	+	-	+
DNA 聚合酶 5'→3'	+	+	+	+	-	+
外切核酸酶						
双链 DNA 5'→3	+	-	-	--	+	-
单链 DNA 3'→5	+	+	-	-	-	-
双链 DNA 3'→5	+	+	..	--	-	-
RNA 酶 H 活性	+	-	.	.	无资料 ^b	+
对双链模板进行链置换	+	+	-	-	无资料	无资料
切口平移	+	-	-	-	无资料	
交换	+	+	+	--	-	-

续表 23-3

	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (全酶)	大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow	T4 噬菌体 DNA 聚合酶	测序酶 ^a (T7 噬菌体 DNA 聚合酶)	Taq DNA 聚合酶	逆转录酶
模板						
完整的 dsDNA	-	-	-	-	-	-
带引物的 ssDNA	+	+	+	+	+	+
有缺口或带单链 5' 凸端的双链体	-	+	+	+	+	+
有切口的 dsDNA	+	-	-	-	无资料	-
无引物的 ssDNA (发夹)	+	+	无资料	无资料	无资料	+
单链 RNA	+ ^b	+ ^b	-	-	无资料	+
要求:						
二价阳离子	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺ ^c	Mg ²⁺	Mg ²⁺
最佳 pH 值	7.4	7.4(磷酸) 8.4(Tris)	8.0~9.0 7.5 有(50%) 活性	7.6~7.8	8.3(Tris) 7.0(磷酸) 有 50%活性	7.6(Mo- MLV) 8.3(AMV)
巯基试剂	+	+	+	+		+
结构:						
分子量(kD)	109	76	114	92	65	84(MO-MLV) 170(AMV)
亚基数	1	1	1	2(80, 基因 5 产 物; 12, 硫氧 还蛋白)	1	1(Mo-MLV) 2(AMV)

^a: 测序酶是经化学或基因工程方法处理的 T7 噬菌体 DNA 聚合酶, 无 3'→5' 外切酶活性, 不能用于交换反应。

^b: 用 Mn²⁺ 取代 Mg²⁺ 时活性会更高。

^c: Mn²⁺ 可以取代 Mg²⁺, 但反应速度降低且聚合酶特异性会发生变化。

本表引自 Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 分子克隆实验指南, 第二版, 中译本, 1992。

23.2. RNA 聚合酶

23.2.1. SP6 噬菌体 RNA 聚合酶

SP6 噬菌体 RNA 聚合酶(RNA polymerase)来源于噬菌体感染的鼠伤寒沙门氏杆菌 LT2 株, 是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶, 为一单链多肽, 从 5'→3' 合成 RNA, 分子量 96 kD, 对 SP6 启动子有高度的特异性。带有 SP6 启动子的载体可以在体外直接合成 μg 量 RNA 转录物, 并可用作底物进行 RNA 加工的研究, 也可作为体外翻译的模板及合成反义 RNA。

23.2.2. T3 与 T7 噬菌体 RNA 聚合酶

T3 与 T7 噬菌体 RNA 聚合酶来源于 T3 或 T7 噬菌体感染的大肠杆菌, 均为依赖于

DNA 的 RNA 聚合酶,对其相应的起动力有高度的特异性。他们均为单链多肽,分别约 100 kD 与 98 kD,并在大肠杆菌中克隆和表达。T7 还在酵母中克隆和表达。T3 与 T7 的应用与 SP6 RNA 聚合酶相同。

23.3. 核酸酶

核酸酶(nuclease)是一类能水解 RNA 也能水解 DNA 的酶,其水解特性类似于磷酸二酯酶,产物通常为单核苷酸。

23.3.1. BAL 31 核酸酶

BAL 31 核酸酶来源于 *Alteromonas espejiana* 31,主要具有 3' 外切酶活性。它可从 3' OH 端去除单核苷酸形成平端或粘性末端。BAL 31 同时具有高度特异于单链 DNA 的内切核酸酶活性,作用于切口,缺口,双链 DNA 的单链区和螺旋构象有所改变的区域。BAL 降解 DNA 依赖于钙离子,螯合剂 EGTA 可使反应终止在不同阶段。结合这两种酶的活性,可使双链 DNA 逐渐变短(见下图 23-3)。BAL 31 核酸酶也能消化 RNA,但活性很低。应用 BAL 31 可以有控制地逐渐缩短双链 DNA,生成一套缺失长度不同的 DNA 片段。此外,他还可以用于 DNA 限制酶切作图和确定 DNA 的二级结构。

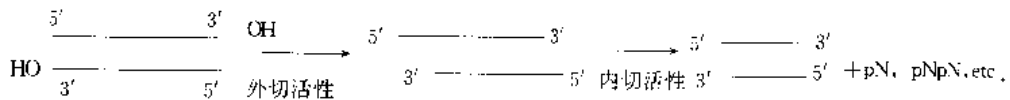


图 23-3 结合 BAL 31 核酸酶的外切活性与内切活性缩短 DNA 片段的示意图

23.3.2. S1 核酸酶

S1 核酸酶来源于米曲霉菌 (*Aspergillus oryzae*),是一种含锌蛋白质,32 kD,相对耐热。它是特异于单链的内切核酸酶,降解单链 DNA 或 RNA,产生带 5' 磷酸的单核苷酸或寡核苷酸;对双链 DNA,双链 RNA 及 DNA/RNA 杂交体相对不敏感。除在大量 S1 核酸酶存在下,他能将双链核酸完全降解。反应时需要 Zn^{2+} 和低 pH(4.0~4.5),可被 EDTA 所终止。S1 核酸酶有下列用途:

- (1) 分析 DNA/RNA 杂交体的结构;
- (2) 使 DNA 突出端变为平端;
- (3) 打开双链 DNA 合成中产生的发夹环;
- (4) 用 S1 核酸酶分析确定 RNA 转录物的边界。

23.3.3. 绿豆核酸酶

绿豆核酸酶(Mung bean nuclease)来源于绿豆芽,其作用与 S1 核酸酶相似,是特异于单链的内切核酸酶。对双链 DNA,双链 RNA 及 DNA/RNA 杂交体不敏感,较 S1 核酸酶更温和,不易造成 dsDNA 的切口或与切口相对处切割 DNA。绿豆核酸酶的用途与 S1 核酸酶相似,但在要防止双链被切割时,绿豆核酸酶优于 S1 核酸酶。反应条件也与 S1 核

酸酶相似,仅 pI 较高(5.0)。

23.3.4. S7 核酸酶

微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)从金黄色葡萄球菌培养液中制得,能降解 DNA,也能降解 RNA。降解单链 DNA 的活性大于双链 DNA,优先降解 AT 或 AU 富区,水解产物为 3'核苷酸和带 3'磷酸末端的寡核苷酸。反应时需要 Ca^{2+} 存在,如以镉代替 Ca^{2+} 则能水解 DNA 而不能水解 RNA。S7 核酸酶用于降解细胞粗抽提物中的核酸, RNA 测序及研究核小体结构。

23.4. 核糖核酸酶

核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)是一类水解 RNA 酶的通称,根据水解专一性, RNase 可分为碱基特异和非特异的 RNase。

23.4.1. 核糖核酸酶 A

来源于牛胰的核糖核酸酶 A(ribonuclease A, RNase A)具有碱基特异性,是一个稳定和具有高活性的酶(13.7 kD)。它特异地水解 RNA 链中的嘧啶核苷酸键,产生 3'嘧啶核苷酸和以 3'端为嘧啶核苷酸的寡核苷酸(见下图)。它水解胞苷酸的速度大于尿苷酸,也水解许多碱基上被修饰的核苷酸。RNase A 的水解专一性不是绝对的,高浓度的酶也水解聚腺苷酸,最适 pH 7.0~7.5。市售的一般 RNase A 常含有 DNase,可在 10 mmol/L Tris-HCl(pH7.5), 15 mmol/L NaCl 溶液中 100℃ 加热 15 min,以除去 DNase。

RNase A 常用于从 DNA 中除去 RNA,检测 DNA 与 RNA 中碱基突变的位置和从 DNA/RNA 杂交体或 RNA/RNA 中除去未杂交的 RNA 区域。

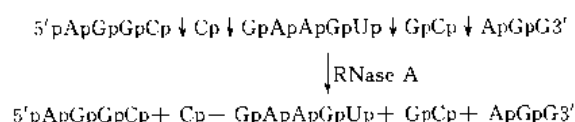


图 23-4 核糖核酸酶 A 的作用方式

23.4.2. 核糖核酸酶 T1

RNase T1 从米曲霉菌(*Aspergillus oryzae*)中制得,是一种内切核糖核酸酶,具有高度的碱基专一性。它特异地作用于鸟苷酸 3'端磷酸,产生 3'鸟苷酸和 3'端为鸟苷酸的寡核苷酸,其作用方式如下图:

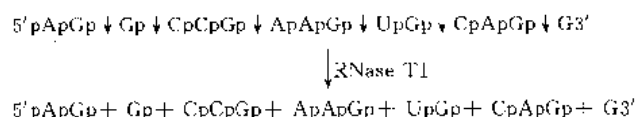


图 23-5 核糖核酸酶 T1 的作用方式

RNase T1 也能水解肌苷酸(Ip)和部分碱基上被修饰的鸟苷酸。该酶可用于去除

DNA/RNA 杂交体中的非杂交区域。

23.4.3. 核糖核酸酶 H

核糖核酸酶 H 是一种内切核糖核酸酶,特异作用于 DNA/RNA 杂交体的 RNA。反应时需要 Mg^{2+} , 37°C, pH 7.5~9.1, 对盐相对不敏感, 0.3 mol/L NaCl 中有 50% 活力。RNase H 用以在合成 cDNA 前除去 mRNA, 在 mRNA 与 oligo(dT) 杂交后除去 mRNA 的 poly(A) 尾可能改善凝胶电泳中条带的分离以及检测 DNA/RNA 杂交体。

23.5. 脱氧核糖核酸酶

23.5.1. 脱氧核糖核酸酶 I

脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 是从牛胰制得, 为一糖蛋白, 分子量 31kD。通常得到的是几种同工酶的混合物。它从嘧啶核苷酸 5' 端磷酸降解单链和双链 DNA, 产生 5' 端带磷酸基团的单核苷酸和寡核苷酸。在 Mg^{2+} 存在下, DNase I 可随机独立地切割每条 DNA 链。以 Mn^{2+} 代替 Mg^{2+} , 则酶可在两条链的大致同一位置上切割 DNA, 产生平端 DNA 片段。

DNase I 的用途有:

(1) 用切口平移法进行标记时, 可先用 DNase I 在双链上产生切口。

(2) 用于 DNase I 足迹法, 确定蛋白质与 DNA 结合的位置。

(3) 在制备 RNA 时用以除去 DNA。

(4) 测定染色体转录活性区域。

(5) 体外转录后可用以除去模板。

(6) DNA 测序时可用于产生部分重叠的亚克隆。在进行亚硫酸氢盐介导的诱变前, 可用 DNase I 在闭环 DNA 上引入切口, 以便将分子截短。

值得注意的是, 一般 DNase I 中常混有 RNase。需使用无 RNase 的 DNase I 时, 最好加入 RNase 抑制剂。无 RNase 污染 DNase I 可用下法制备: 将其溶于 0.1 mol/L 碘醋酸和 0.15 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 的溶液, 浓度为 1mg/ml。在 55°C 加热 45 min, 用冰冷却, 加入 $CaCl_2$ 至终浓度为 5 mmol/L。分装, 在 -20°C 可保存数月。

23.5.2. 外切核酸酶 III

外切核酸酶 III (Exonuclease III) 来源于大肠杆菌, 能从双链 DNA (或带切口或缺口的环状 DNA) 逐一除去单核苷酸, 在双链 DNA 上产生生长的单链区。它不降解单链 DNA 及带 3' 突出端 (>4 个核苷酸) 的双链 DNA。应用这一性质可以从 3' 突出端 (不能切割) 而另一端为 3' 凹端 (可以切割) 线性 DNA, 生成单向缺失的 DNA 分子。此外, 该酶还具有: (1) 3' 磷酸酶活性, 可去除 ssDNA 或 dsDNA 的 3' 末端磷酸; (2) 对无嘌呤 DNA 特异的内切酶活性; (3) RNA 酶 H 活性。

外切核酸酶 III 有以下主要用途:

(1) 与 DNA 聚合酶 I Klenow 片段联合应用标记双链 DNA 平整末端。

(2) 与特异于单链的内切酶 (如绿豆核酸酶, S1 核酸酶) 联合应用在双链 DNA 上产

生末端序列缺失的片段。

(3) 应用于体外诱变,采用 dNTP 的硫代磷酸酯衍生物,在诱变引物引导下合成第二链后,因外切核酸酶 III 不降解硫酸酯,故可用该酶降解底物。

应注意的是:外切核酸酶 III 活性部分受螺旋结构和序列的影响(C>A=T>G),温度、盐浓度和酶的比例对其活性也有很大影响。因此,反应条件需按不同应用进行设计。

23.5.3. λ 噬菌体外切核酸酶

λ 噬菌体外切核酸酶是一种 5'→3' 外切脱氧核糖核酸酶,优先作用于带 5' 磷酸末端的双链 DNA (平端或 3' 突出端) 产生 5' 单核苷酸。它切割单链的速率仅为双链的 1/100。双链 DNA 上的切口或缺口不能作为切割的起点。

该酶主要应用于从双链 DNA 片段制备单链 DNA 片段,如 PCR 的一条引物带 5' 磷酸末端,而另一条引物不带 5' 磷酸末端,PCR 扩增后,其中一条带 5' 磷酸末端的 DNA 片段可用此酶除去,留下单链可直接用于测序。

23.5.4. T7 核酸酶

T7 核酸酶来源于 T7 噬菌体感染的大肠杆菌或为基因工程产品,是唯一特异于单链 DNA,在中性与碱性 pH 中有活性的内切核酸酶,其产物为寡核苷酸。反应时需要镁离子的存在。它作用于具有支链的双链 DNA 时其效率仅为单链 DNA 的 1/100。该酶应用于足迹法及研究双链 DNA 的复杂结构。

23.6. 连接酶

催化将两段核酸片段拼接起来的酶叫连接酶(ligase),常用的 DNA 连接酶和 RNA 连接酶都是由 T4 噬菌体编码的。

23.6.1. T4 噬菌体 DNA 连接酶

常用的 T4 DNA 连接酶来源于 T4 噬菌体感染的大肠杆菌,分子量为 68kD。它催化

表 23-4 T4 噬菌体 DNA 连接酶的特性

核酸底物	粘端 DNA	对巯基的要求	—	
	平端 DNA			
	切口			
	RNA/DNA 杂交体			
Km	5' 粘端: 0.6 μ mol/L	对 Mg ²⁺	..	
	平端: 50 μ mol/L			
	切口: 1.5 μ mol/L			
最佳 pH	100%: 7.5~8.0	离子强度的影响	依赖于底物	
	40%: 6.9		抑制剂(50%抑制)	>150 mmol/L NaCl
	65%: 8.3			(按作用于切口而定)
		激活剂	10% PEG; 分子间连接 150~200 mol/L NaCl; 平端连接	

本表引自 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 第二版, 中译本, 1992.

5'磷酸与3'OH连接形成磷酸二酯键,3'OH可以是双链DNA或RNA。它催化带粘端、平端的双链DNA、RNA和DNA/RNA杂交体切口之间的连接。平端连接要比粘端慢得多,PEG有占据体积作用,可以增强水溶液中分子间的有效作用,因而在低浓度下,可促进DNA分子的连接。单价阳离子也有提高平端连接的效率。其特性总结于表23-4。

23.6.2. 大肠杆菌连接酶

大肠杆菌连接酶为一单分子,分子量74 kD,其作用类似于T4 DNA连接酶,但反应需要NAD参与,没有占体积剂存在时不能有效地连接平端,因此其应用不如T4 DNA连接酶广泛。

23.6.3. T4噬菌体RNA连接酶

T4噬菌体RNA连接酶可以催化单链RNA和单链DNA的5'磷酸和3'OH之间的连接形成磷酸二酯键,反应需要ATP的存在。该酶用于ssRNA及ssDNA分子的连接,增强T4噬菌体DNA连接酶平端连接活性和用于RNA分子3'的体外放射性标记。

23.6.4. Taq DNA连接酶

Taq DNA连接酶(Taq DNA ligase)从克隆有耐热连接酶基因的大肠杆菌中纯化而来,在45~65℃具有活性。它催化相邻的二个寡核苷酸的5'磷酸与3'OH连接形成磷酸二酯键,但它们必须与目的DNA完全互补,因此如有一个碱基被取代就可测出。

23.7. 末端修饰酶

23.7.1. T4噬菌体多核苷酸激酶

T4噬菌体多核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase)来源于T4噬菌体感染的大肠杆菌,由四个相同的亚单位(33 kD)组成。它具有激酶反应,能催化ATP的γ-磷酸基转移至ssDNA, dsDNA, ssRNA, dsDNA的5'OH末端。其作用方式如下图。

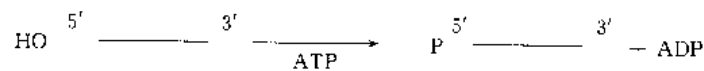


图 23-6 T4多核苷酸激酶的激酶反应

在过量的ADP存在下,该酶将磷酸化DNA的5'磷酸转给ADP,然后DNA从[γ-³²P]ATP中获得γ-³²P而重新磷酸化(图23-7)。

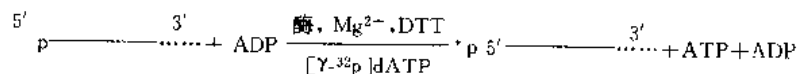


图 23-7 T4多核苷酸激酶的交流反应

T4噬菌体多核苷酸激酶除激酶活性外,还具有3'磷酸酶活性,其特性总结于表23-5。此酶用于标记DNA或RNA的5'末端,以供下一步DNA测序,亦用做凝胶电泳的标记物,PCR引物、杂交探针以及DNA与RNA连接酶的底物。值得注意的是:(1) NH₄⁺

强烈抑制 T4 多核苷酸激酶,因此用激酶处理前,DNA 不要溶于含铵离子的溶液或从含铵盐的缓冲液中沉淀出来。(2) 低浓度的磷酸也抑制 T4 多核苷酸激酶。所以,交换反应的首选缓冲液是咪唑缓冲液(pH 6.4),而 Tris 则是正向反应的首选缓冲液。

23.7.2. 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)常用的有小牛肠碱性磷酸酶(CIP)和大肠杆菌碱性磷酸酶(BAP)。BAP 是一种糖蛋白,由两个相同的 69 kD 亚单位组成,每个分子含有 4 个锌原子。BAP 的活性较高,对高温、酚和去污剂的耐受性强。因此,在去磷酸化反应后,欲完全抑制 BAP 的活性比较困难,可用蛋白酶消化或在 5 mmol/L EDTA (pH8) 存在下,于 65 C 加热 1 小时(或 75 C 加热 10 min)灭活,然后再用酚、氯仿抽提,纯化 DNA。BAP 和 CIP 能催化去除 DNA, RNA, rNTP 和 NTP 的 5'磷酸反应。用于去除 DNA 片段 5'磷酸以防止自身环化及用 ³²P 标记 5'前,去除 DNA 或 RNA 的 5'末端磷酸。

表 23-5 T4 噬菌体多核苷酸激酶的特性

	正向反应	交换反应
核酸底物	双链 DNA 单链 RNA 或 DNA 切口或缺口 寡核苷酸 3'dNMP	双链 DNA 单链 RNA 或 DNA 切口或缺口 寡核苷酸
K _m	双链 DNA: 7.6 μmol/L 5'dNMP: 22~143 μmol/L ATP: 14~140 μmol/L ^b	ADP: 300 μmol/L ^a ATP: 10 μmol/L ^a
最佳 pH	7.4~8.0 (Tris, Cl) (在磷酸盐缓冲液中, 5%活性)	6.4 (咪唑)
对巯基的要求	+	+
对 Mg ²⁺	+	+
离子强度的影响	NaCl 和 KCl 可提高其活性 过量 KCl 抑制所有底物 但单链 DNA 除外	无资料
抑制剂 (50%抑制)	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 7 mmol/L Pi: 20 mmol/L PPi: 5 mmol/L	Pi: 50 mmol/L
激活剂	多胺: 2 mmol/L, 300%	无资料

a: 这是 pH 6.4 对能使酶活性达最高的底物浓度,而并不是 K_m^s。

b: 对 ATP 的 K_m 因底物而不同。

本表引自 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南, 第二版, 中译本, 1992。

23.7.3. 末端脱氧核苷酸转移酶

末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)来源于小牛胸腺,也是一种不依赖于DNA模板的聚合酶。在二价阳离子存在下,催化重复的从dNTP上将脱氧核苷酸加于DNA分子的3'羟基端和释放焦磷酸的反应。该酶需要的寡核苷酸引物至少含有三个磷酸基团和一个3'OH。应注意的是合成效率依赖于DNA 3'OH的类型,3'OH凸出端效率大于平端或3'凹端。TdT有下列用途:

- (1) 合成同聚物或杂聚物;
- (2) 在线状双链DNA加同聚物尾;
- (3) 用一种³²P标记的dNTP或ddNTP或 γ -NTP标记DNA片段的3'端;
- (4) 用于快速扩增cDNA 5'末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)。

23.8. DNA结合蛋白

这类蛋白能使DNA双链变得易于解开,或者可以使超螺旋分子松弛。

23.8.1. 单链DNA结合蛋白

单链DNA结合蛋白(*E. coli* single-strand binding protein, SSB)来源于大肠杆菌的SSB是一个四聚体,由四个相同的18.9 kD组成。他能协同地与单链DNA结合而不与双链DNA结合(协同效应:如第一个SSB与DNA结合的能力为1,第二个SSB的结合能力高达103)。目前除大肠杆菌所编码的SSB外,另一种为T4噬菌体基因32编码的32蛋白。

SSB能刺激同源的DNA聚合酶活力,如大肠杆菌的SSB能刺激大肠杆菌DNA聚合酶而不能刺激T4 DNA聚合酶,反之亦然。SSB的用途有:

- (1) 用于DNA的电镜观察。
- (2) 联合应用SSB和RecA可进行D环法定点诱变。
- (3) 在DNA聚合酶作用于较长的模板时,SSB可增加合成产物的长度。
- (4) 在DNA测序反应中,SSB能刺激同源DNA聚合酶活力。
- (5) 与外切酶合用可研究解旋酶活性。

23.8.2. RecA蛋白

RecA蛋白(分子量为37 842 D)由大肠杆菌RecA基因编码。在体内与同源遗传重组有关;体外可促进DNA链的交换。RecA是一个单链结合蛋白,也可促进双链DNA对同源的单链DNA的吸收作用。此外,他还是一个依赖于DNA的ATP酶。RecA用于DNA电镜观察和进行D环法定点诱变。

23.8.3. DNA拓扑异构酶I和II

TOPO I (DNA topoisomerase I)来源于小牛胸腺,通过瞬时破坏并再生磷酸二酯键,将共加闭环状的超螺旋DNA变成松弛态。反应时需要Mg²⁺的存在,最适pH7.5。TOPO

I用于核小体,DNA 构象与拓扑结构的研究。

TOPO II 又称旋转酶(DNA gyrase),由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成。它在水解 ATP 的同时,通过同时切断两条链,穿过断口再将已切断的末端重新连接起来,使松弛态环状 DNA 转变为负螺旋 DNA。此酶用于将超螺旋引入共价结合的闭环 DNA。

23.9. 核酸工具酶的应用

现将以上一些工具酶的主要用途总结如下:

表 23-6 DNA 和 RNA 聚合酶的应用

用途	DNA 聚合酶					RNA 聚合酶		逆转录酶	
	<i>E. coli</i>	Klenow	T4	T7	Taq	<i>E. coli</i>	SP6,T3,T7	AMV	M-MuLV
体外标记									
5'									
3'补平		+	+	+					
3'交换			+	+					
切口平移	+								
置换合成			+						
随机引物		+							
RNA 探针							+		
测序									
DNA		+		+	-			-	
RNA								-	-
作图									
限制酶							+		
足迹法									
转录物									
变异									
错误修复								+	
寡核苷酸介导		+	+	+					
cDNA 合成									
第一链								+	+
第二链	+	+			+				
体外转录						+	+		
构建平端									
补平 5'端		+	+						
去 3'凸端			+	+					
PCR					-				

表 23-7 核酸酶的应用

用途	酶	底物							
		DNA/RNA			DNA			RNA	
		BAL 31	绿豆	S1	外切酶 III	λ -外切酶	DNase I	RNase H	RNase A
体外标记									
3'									
5'									
内部							+		
测序 DNA					-	+			
作图									
限制酶		+			+				
足迹法					+		+		
转录物			+	+					+
结构			+	+					
变异									
错误修复					+				
寡核苷酸介导					+				
cDNA 合成									
第一链									
第二链								+	
体外转录							+		
双链缩短		+		+	+				
生成平端		+	+	+					

表 23-8 连接酶及其他酶的应用

用途	酶	T4 连接酶		T4 多核苷酸激酶	碱性磷酸酶	32 蛋白	单链结合蛋白
		DNA	RNA				
体外标记							
DNA							
3'			+				
5'				+	+		
内部							
RNA							
3'			+				
5'				-	+		
内部							
测序							
DNA						+	+
RNA 酶							
化学			+	+			
连接							
单链			+				
DNA 平端 DS		+					

用途	酶	T4 连接酶		T4 多核苷酸激酶	碱性磷酸酶	32 蛋白	单链结合蛋白
		DNA	RNA				
连接							
粘端 DS		-					
切口							
RNA 单链			+				
变异							
错误修复		+					
寡核苷酸介导		+				-	+
磷酸化				+			
去磷酸化				+	+		

(吴冠芸)

参 考 文 献

- 金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版,科学出版社,1992
- 王德宝,祁国荣 主编. 核酸. 科学出版社,1986
- Brown T A. Molecular Biology LABFAX, Bios Scientific Publishers,1991
- Biodirectory. Pharmacia Biotech Inc. 1997
- Biochemicals Catalog. Boehringer Mannheim GmbH, 1996
- Catalog. New England Biolabs, 1996/1997,New England Biolabs Inc, 1996
- Promega.Catalog. Biochemical Research Products, Promega Corporation, 1998
- PCR Systems, Reagents & Consumables. Perkin Elmer Applied Biosystems, 1995~1996

24. 杂交分析

核酸杂交是分子生物学领域应用最广泛的技术之一。它主要用来对特定 DNA 和 RNA 顺序进行定性和定量检测,如测定特定 DNA 顺序的拷贝数;测定特定 DNA 区域的限制性内切酶图谱,以判断是否存在 DNA 顺序的缺失、插入等重排现象;特定 RNA 顺序的定量, RNA 结构的粗略分析;用寡聚核苷酸探针检测基因的点突变;基因克隆的筛选等。

核酸杂交是指具有一定互补顺序的核酸单链在液相或固液体系中按碱基互补原则合成异源双链的过程。DNA 与 DNA 链, DNA 与 RNA 链或 RNA 与 RNA 链,只要具有一定的互补顺序,均可在适当条件下发生杂交。杂交双方(即探针和被检测物)可都在溶液中(称为液相杂交或溶液杂交),也可以是一方在溶液中,而另一方在固相支持物上(称为滤膜杂交)。液相杂交与滤膜杂交有许多共同之处,但滤膜杂交更为复杂,应用也更广泛,本章主要讨论影响滤膜杂交的因素。

24.1. 核酸杂交滤膜

常被使用于核酸固定的滤膜有五种:即硝酸纤维膜,被支持的硝酸纤维膜(即把硝酸纤维素放到惰性支持物上以提高抗拉强度),尼龙膜,带正电荷的尼龙膜和活化纸[重氮苯氧化甲基酯(DBM)和重氮苯基硫醚 DPT]。这些滤膜的性质列于表 24-1 中,关于它们使用的建议列于表 24-2 中。

表 24-1 用于固定核酸的滤膜的性质

性质	硝酸纤维膜	受支持的硝酸纤维膜	尼龙膜	正电荷尼龙膜	活化纸(DBM, DTP)*
应用	单股 DNA, RNA, 蛋白质	单股及双股 DNA, RNA, 蛋白质	单股及双股 DNA, RNA, 蛋白质	单股及双股 DNA, RNA, 蛋白质	单股 DNA, RNA
结合能力 (μg 核酸/ cm^2)	80~100	80~100	400~600	400~600	2~40
抗拉强度	差	好	好	好	好
核酸连接模式	非共价连接(80°C 烘烤 2 小时)	非共价连接(可由 80°C 烘烤 2 小时导致)	共价连接(可由 312nm 紫外线处理 5 分钟导致)	共价连接(可由转移缓冲液中的 4mol/L NaOH 导致)	共价连接(可由与活化基团的化学反应导致)

续表 24-1

性质	硝酸纤维素膜	受支持的硝酸纤维素膜	尼龙膜	正电荷尼龙膜	活化纸(DBM,DTP)*
为充分保留核酸的最小长度限制	500nt	500nt	50nt/bp	50nt/bp	5nt
对重复杂交的适应性	因为脆性,可重复次数很少	因信号损失,可重复次数很少	好	好	好
对电转移的适应性	对核酸不适用(因固定需要高盐),对蛋白质适用	对核酸不适用(因固定需要高盐),对蛋白质适用	好	好	对 DBM 纸有一定适用性
典型的商品范例	* Schleicher and Schuell BA83, BA85 * Amersham Hybond-C * Gelman Biotrace NT * PACC Biodyne A	* Schleicher and Schuell Optibond * Amersham Hybond-C extra	* Amersham Hybond-N * stratagene Duralon-UV	* Schleicher and Schuell Nytran * Amersham Hybond-N+ * Gelman Biotrace RP * PALL Biodyne B * Bio Rad Zeta Probe	* Schleicher and Schuell ABM a and APT a papers

* DBM, diazobenzyloxymethyl (重氮苯氧化甲基酯); DTP, diazophenylthioether paper (重氮苯基硫醚)。

表 24-2 各种类型固定滤膜的推荐使用

应用	推荐的滤膜类型	理由
DNA/RNA 斑点固定	尼龙膜 > 硝酸纤维素膜	强度高, 共价连接, 可重复杂交
克隆/噬菌斑转移 DNA/RNA 探针	尼龙膜 > 硝酸纤维素膜	强度高, 共价连接, 可重复杂交
克隆/噬菌斑转移 抗体探针	硝酸纤维素膜 > 尼龙膜	本底低
Southern 转移	带电荷尼龙膜 > 尼龙膜 > 硝酸纤维素膜	碱转移对共价结合是一个方便的方法
Northern 转移	尼龙膜 > 硝酸纤维素膜	强度高, 共价连接, 可重复杂交
Western 转移	硝酸纤维素膜 > 尼龙膜	本底低
电转移	尼龙膜 >>> 硝酸纤维素膜	不需要高盐便能固定于尼龙膜上
短链核酸的固定	活化纸	适于 < 50nt 分子固定的唯一类型
非放射性探针	硝酸纤维素膜 > 尼龙膜	本底低

24.2. 影响杂交的因素

最关键的考虑是杂交体的热稳定性,其次是杂交发生的速率。核酸杂交体的热稳定性常以其溶解温度(T_m)来表示。影响该溶液中杂交体 T_m 的因素在滤膜杂交过程中也同样适用。杂交双链的长度,碱基组成,碱基错配程度,以及杂交溶液中的离子强度,去稳定剂均对核酸杂交体的 T_m 产生重要影响(见表 24-3)。人们也试图总结一些公式来计算杂交体的 T_m 值,部分比较有用的公式列于表 24-4 中。值得注意的是这些公式产生于对溶液杂交的研究,只能粗略地用于估测滤膜杂交的 T_m 。当核酸结合到滤膜上之后,与溶液中探针形成的杂交体的 T_m 值略低于以公式的计算值。

表 24-3 影响核酸杂交体 T_m 的因素

因素	对 T_m 的影响
离子强度	在 0.01 到 0.40mol/L NaCl 范围内,单价离子增加一倍, T_m 增加 16.6°C
碱基组成	在包含 NaCl 的溶液中,%GC 含量愈高, T_m 愈高,但在氯化四甲基氮溶液中,碱基组成的差别可以忽略不计
去稳定剂	每 1% 的甲酰胺可使 T_m 降低 0.6°C。6mol/L 尿素可使 T_m 降低 30°C
碱基错配	每 1% 的碱基错配可使 T_m 降低 1°C
杂交双链长度	当探针 > 500bp 时可忽略

表 24-4 T_m 计算公式*

系统	公式
DNA-DNA	$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.63(\% \text{甲酰胺}) - 600/L$
DNA-RNA	$T_m = 79.8^\circ\text{C} - 18.5(\log M) + 0.58(\%GC) + 11.8(\%GC)^2 - 0.50(\% \text{甲酰胺}) - 820/L$
RNA-RNA	$T_m = 79.8^\circ\text{C} + 18.5(\log M) + 0.58(\%GC) - 11.8(\%GC)^2 - 0.35(\% \text{甲酰胺}) - 820/L$
寡聚核苷酸探针	$T_m = 2(\text{AT 碱基对数}) + 4(\text{GC 碱基对数})$ (适用于 10~30nt) $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 600/L$ (适用于 14~70nt)

M, 单价阳离子(通常为 Na^+)浓度; %GC, 核酸中 G 和 C 碱基的百分数; L, 以碱基对为单位的杂交双链长度。

*: 这些公式适用于 Na^+ 浓度 0.01~0.4mol/L 及 30~75GC%。

影响液相杂交中杂交速率的因素列于表 24-5 中。在滤膜杂交中,情况更为复杂,多数因素可能同样适用,但可能不全相同。

表 24-5 影响核酸杂交速率的因素

因素	对杂交速率的影响
温度	最适的杂交发生在比 DNA-DNA 杂交体 T_m 低 20~25°C, 比 DNA-RNA 杂交体低 10~15°C
离子强度	最适杂交在 1.5mol/L Na^+
去稳定剂	50% 甲酰胺无影响, 但是更高或更低的甲酰胺浓度使杂交速率降低
杂交体长度	杂交速率和杂交体长度成正比例, 随着杂交体长度的增加而增加
粘稠度	在滤膜杂交中, 粘稠度增加时杂交速率增加, 10% 的葡聚糖硫酸酯使杂交速率增加 10 倍, 但在液相杂交中无此效应
探针的复杂性	重复顺序增加杂交速率
碱基组成	几乎无影响
pH	在 pH5.0~9.0 范围内几乎无影响

24.3. 试剂和杂交条件

最适的杂交需要相当高的盐浓度, 这种盐浓度由 SSC 或 SSPE (表 24-6) 提供。这些溶液构成了预杂交、杂交和杂交后冲洗的基础, 为了减少探针被非特异地吸附到滤膜上, 在预杂交和杂交溶液中常包含高浓度的阻塞剂。这些包括 Denhardt's 试剂, 肝素, 无脂肪奶粉, 鲑鱼精 DNA, 酵母 tRNA 等。几种不同的阻塞剂列于表 24-7 中, 对于它们被推荐的使用亦列于表 24-8 中。表 24-9、表 24-10 及表 24-11 分别列出了几种典型的预杂交/杂交溶液、相应的杂交温度及杂交后冲洗条件。

表 24-6 杂交分析中使用的高盐溶液

储液	组成
20×SSC	3.0 mol/L NaCl 0.3 mol/L 柠檬酸钠 (高温消毒后使用或用前滤膜除菌)
20×SSPE	3.6 mol/L NaCl 0.2 mol/L NaH_2PO_4 0.02 mol/L Na_2EDTA (pH7.7)

表 24-7 滤膜杂交常用的阻塞剂

阻塞剂	
50×Denhardt's 1% (w/v) 牛血清蛋白(组分 v) 1% (w/v) 葡聚糖 Ficoll 400 1% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮溶于水(最好能过滤除菌)	-20℃ 储存, 使用液为 5×(或 10×)
BLOTTO 5% (w/v) 无脂肪奶粉 0.02% (w/v) 叠氮钠	4℃ 储存, 使用终浓度为 4%
变性的鲑鱼精 DNA 用水溶解后, 加 NaCl 到终浓度 0.1 mol/L, 用酚及酚-氯仿先后各抽提一次。用注射器把该液抽进推出 15~20 次以使 DNA 变短(使 DNA 变短的另一方法是用超声波处理 DNA 溶液 20 分钟), DNA 用乙醇沉淀后重新溶解于水中(10 mg/ml), 煮沸 10 分钟后骤冷变性	-20℃ 储存, 用前于 95℃ 加热 5 分钟, 使用终浓度为 100 μg/ml
肝素 以 50 mg/ml 溶解于 4×SSC 或 4×SSPE 中	杂交液中有葡聚糖硫酸酯时用 500 μg/ml, 无葡聚糖硫酸酯时用 50 μg/ml
酵母 tRNA 10 mg/ml 溶于水	4℃ 储存, 使用终浓度为 100 μg/ml
同聚 DNA 1 mg/ml poly(A) 或 poly(C) 溶于水	4℃ 储存, 以 10 μg/ml 使用, 靶 DNA AT 丰富时用 poly(A), DNA GC 丰富时用 poly(C)

表 24-8 对阻塞剂选择的推荐

阻塞剂	推荐应用	也适用	不适用
5×Denhardt's	全部应用	-	-
10×Denhardt's	克隆/嗜菌斑	-	其他杂交
BLOTTO	克隆/嗜菌斑	DNA 斑点杂交	单拷贝基因 Southern, Northern, RNA 斑点杂交
肝素	Southern, DNA 斑点杂交	其他杂交	
鲑鱼精 DNA	Southern, DNA 斑点杂交	其他杂交	
酵母 tRNA	Northern, RNA 斑点杂交	Southern, DNA 斑点杂交	克隆/嗜菌斑
同聚 DNA	探测 AT 或 GC 丰富的靶 DNA 时	-	其他杂交

表 24-9 典型的预杂交/杂交溶液

溶液类型	组成	参考文献
水溶液	① 6×SSC(或 6×SSPE) 5×Denhardts 0.5%SDS 100 μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA	2
	② 5×SSC 5×Denhardts 1%SDS 10%葡聚糖硫酸酯(分子量 500 000) 0.3%焦磷酸四钠 100 μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA	
甲酰胺	① 6×SSC(6×SSPE) 5×Denhardts 0.5%SDS 100 μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA	
	② 5×SSC 5×Denhardts 50%甲酰胺 1%SDS 50 mol/L 磷酸钠(pH6.8) 10%葡聚糖硫酸酯 100 μg/ml 变性的鲑鱼精 DNA	

表 24 10 对于不同应用的预杂交/杂交溶液及杂交温度

应用	预杂交/杂交溶液	杂交温度(℃)
Southern, DNA 斑点杂交		
DNA 探针	水溶液	68
	甲酰胺溶液	42
RNA 探针	甲酰胺溶液	42
Northern, RNA 斑点杂交	甲酰胺溶液	37~42
克隆、噬菌斑转移膜		
DNA 探针	水溶液, 10×Denhardts, 无 SDS	68
RNA 探针	甲酰胺溶液, 10×Denhardts, 无 SDS	42 (有时需要提高)
寡聚核苷酸探针	水溶液, 不用葡聚糖硫酸酯	5~10

表 24-11 典型的杂交后冲洗条件

探针类型	冲洗条件
DNA 或 RNA ^a	① 2×SSC+0.2%SDS, 室温, 5 min×4 次
	0.1×SSC+0.2%SDS, (60~68 C) ^b , 15 min×2 次
	② 2×SSC+0.1%SDS, 室温, 5 min×2 次
	0.2×SSC+0.1%SDS, 室温, 5 min×2 次
	0.2×SSC+0.1%SDS, 42 C, 15 min×2 次
	0.1×SSC+0.1%SDS, (60~68 C) ^b , 15 min×2 次
寡聚核苷酸	5×SSC+0.1%SDS, 杂交温度, 10 min×4
	6×SSC+0.1%SDS+3 C, 10 min×4
	6×SSC+0.1%SDS, T _m ~T _m +5 C, 2 min×1

a: 对 RNA 探针, 在保温冲洗后, 用 2×SSC+25 μg/ml RNase A+10 单位 RNase T1 再冲洗 30 min 可降低本底。

b: 最后的保温冲洗温度很关键, 应根据具体情况增减。

24.4. 使用寡聚核苷酸探针的滤膜杂交

使用人工合成的寡聚核苷酸探针的滤膜杂交已被广泛应用, 如检测特定的 DNA 和 RNA 顺序、筛选基因文库、监测定点突变的成功性、检测 DNA 突变等。

寡聚核苷酸探针主要以单一的寡聚核苷酸和相关的寡聚核苷酸库两种方式被使用。

24.4.1. 单一的寡聚核苷酸探针杂交

寡聚核苷酸被末端标记作为探针。主要用于检测已知核苷酸顺序的基因(或 DNA)。寡聚核苷酸在杂交溶液中的使用浓度为 0.125 ng/ml。寡聚核苷酸储液的浓度需要被计算。表 24-12 列出了寡聚核苷酸浓度计算的资料。

使用寡聚核苷酸作为探针的最重要因素是 T_m 值的计算, 表 24-4 中的公式 T_m=2(AT 碱基对数)+4(GC 碱基对数)可适用于一定的核苷酸长度范围及碱基组成。表 24-13 列出了具有不同长度和碱基组成的寡聚核苷酸的 T_m。在实际应用中, 应根据从公式计算的或表 24-13 中列出的寡聚核苷酸的 T_m 值以及表 24-10 和表 24-11 中描述的杂交及冲洗条件设计实验。

表 24-12 寡聚核苷酸浓度计算资料

寡聚核苷酸长度(nt)	1OD=(nmol/ml) ^a	1nmol=(μg) ^b
10	10.000	3.30
11	9.091	3.63
12	8.333	3.96
13	7.692	4.29
14	7.143	4.62
15	6.667	4.95
16	6.250	5.28

续表 24 12

寡聚核苷酸长度(nt)	IOD=(nmol/ml) ^b	Inmol=(μ g) ^b
17	5.882	5.61
18	5.556	5.94
19	5.263	6.27
20	5.000	6.60
21	4.762	6.93
22	5.545	7.26
23	4.348	7.59
24	4.167	7.92
25	4.000	8.25
26	3.846	8.58
27	3.701	8.91
28	3.571	9.24
29	3.448	9.57
30	3.333	9.90
31	3.226	10.23
32	3.125	10.56
33	3.030	10.89
34	2.941	11.22
35	2.857	11.55
36	2.778	11.88
37	2.703	12.21
38	2.632	12.54
39	2.564	12.87
40	2.500	13.20
41	2.439	13.53
42	2.381	13.86
43	2.326	14.19
44	2.273	14.52
45	2.222	14.85
46	2.174	15.18
47	2.128	15.51
48	2.083	15.84
49	2.041	16.17
50	2.000	16.50

a. 基于 IOD=33 μ g/ml 寡聚核苷酸的近似值。

b. 基于一个核苷酸分子量=330 kD 的近似值。

表 24-13 不同长度及碱基组成的寡聚核苷酸的 T_m (°C)

寡聚核苷酸 长度(nt)	GC 核苷酸数																				
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	-	-	-	-	-	-	-	-
13	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	-	-	-	-	-	-	-
14	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	-	-	-	-	-	-
15	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	-	-	-	-	-
16	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	-	-	-	-
17	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	-	-	-
18	36	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	-	-
19	38	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	-
20	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80
21	42	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80	
22	44	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80		
23	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80			
24	48	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80				
25	50	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80					
26	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80						
27	54	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80							
28	56	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80								
29	58	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80									
30	60	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80										
31	62	64	66	68	70	72	74	76	78	80											
32	64	66	68	70	72	74	76	78	80												
33	66	68	70	72	74	76	78	80													
34	68	70	72	74	76	78	80														
35	70	72	74	76	78	80															
36	72	74	76	78	80																
37	74	76	78	80																	
38	76	78	80																		
39	78	80																			
40	80																				

* 图表这一部分及较长寡聚核苷酸的估计可参阅表 25-4 中有关公式

24.4.2. 混合的寡聚核苷酸探针杂交

当一个基因尚未克隆分离,但基因表达产物的氨基酸顺序已经清楚的时候,可根据对应的遗传密码推测基因编码区的顺序。由于密码的简并性(即一个氨基酸可由几个遗传密码所决定,见表 24-14),常设计一个相关的寡聚核苷酸库以测定基因。因为甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp)只各有一个密码,因此选择一个包含这两个氨基酸的区域是理想的。然而,这样的区域并非总是可利用的。由于次黄嘌呤碱基(I)对每个标准碱基均具有忠诚性,故常在四密码选择的第三位使用 I(如对丙氨酸 Ala 使用 GCI)。I 也可用于三密码选择的 Ile,但在二密码选择的情况下不宜使用。

使用混合的寡聚核苷酸探针时,对最适杂交条件是难以预测的,因为不同顺序的 T_m 可能相差很大。因此,最初的实验应用以最低 T_m 为依据的杂交及冲洗条件,在相继的实验中,逐步升高温度并观察杂交信号。根据不同的肽链区域设计两套寡聚核苷酸库是值得考虑的。

表 24-14 不同氨基酸的密码选择

密码数	氨基酸	密码 ^a	密码数	氨基酸	密码 ^{a,b}
1	Met	AU G	3	Ile	U AU C A
	Trp	UG G	4	Ala	GCN
2	Asn	AA ^U _C		Gly	GGN
	Asp	GA ^U _C	Pro	CCN	
	Cys	UG ^U _C	Thr	ACN	
	Glu	GA ^A _C	Val	GUN	
	Gln	CA ^A _C	6	Arg	CGN, AG ^A _C
	His	CA ^U _C		Leu	CUN, UU ^A _C
	Phe	UU ^U _C		Ser	UCN, AG ^U _C
	Tyr	UA ^U _C			

a, 根据通用密码。b, N=任何核苷酸。

(张俊武)

参 考 文 献

- 王琳芳,潘华珍主编. 张俊武. 见分子生物学实验技术. 北京生理科学出版社, 1991, 48~70
- Andrson M M. in Gene Probe & A Practical Approach. ed. by Hames B D and Higgins S J, Oxford University Press Inc, 1995, 1~29
- Browm T A. Molecular Biology LABFAX. Bios Scientific Publishers, 1991, 281~294
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

25. 核酸探针的非放射性标记与检测

25.1. 引言

作为一种分子生物学检测技术,非放射性检测系统同放射性检测系统一样,包括检测探针的标记、分子杂交和显示(检测)体系三个组成部分,所不同者,它不是采用同位素标记探针和放射性显示(自显影),而都是非放射性的。

非放射性指示系统是基于选用特异的互补探针的相互作用来检测各种生物靶分子。适宜的检测系统是与这些探针配对的,直接通过共价结合,或间接地通过附加的特异高亲和力的相互作用。新近发展起来的非放射性系统大多数是基于报告基因的酶学、光化学、或化学的结合。这些基因能被具有高灵敏的光学的、发光的、荧光的、或金属沉淀的检测系统检测出来。应用 pH 电极或传感器技术的电化学检测系统也曾有报道。另外,多功能的检测系统正在构建,它企图使特异标记和检测系统不仅能测定不同的靶分子特异性,而且也能检测各种各样不同种类的生物分子如蛋白质、聚糖(glycan)等。

不同的非放射性系统可以分为直接的和间接的两种类型,它们之间的差别在于检测反应的成分种类及其反应步骤的次数。直接系统大多是被用于检测标准化的靶生物分子,而间接系统常常被用于检测具有变异特性的不同靶生物分子。

用于直接系统的报告基因是直接地与探针结合,常使用的直接报告基因是荧光染料[如荧光素及碱性蕊香红(rhodamine)]和标志酶如碱性磷酸酶(AP),或辣根过氧化物酶(HRP)与化学发光检测结合或与银增强剂结合。

在间接系统中报告基因通过探针的修饰基团和被结合到修饰探针的特异的指示剂分子之间非共价键的相互作用,间接地结合在一起,因此,间接系统首先要求用于特异分析的探针需预先导入特殊修饰基团。用作修饰基团的已知系统有维生素(如生物素)或各种半抗原如地戈辛,荧光素,二硝基苯基(DNP),溴脱氧尿核苷,砷或免疫金(immunogold)。与各自修饰基团相互作用的另一种类型正在建立,它是通过与重金属离子选择性结合(如汞)或与核酸结构的选择性结合(如 DNA:RNA 杂种)而成。

非放射性标记和显示体系较之放射性法具有许多优越性:安全、对环境和人体无损害、其标记物可反复使用、不存在半衰期问题,其标记的 DNA 探针保存在 50%的甘油中,在 -20°C 可保存半年之久;生物素探针用于细胞或染色体原位杂交已取得满意的结果,而放射性探针在这方面的应用还存在一定困难(因 ^3H 标记的探针作染色体原位杂交要求比放射性达到 $10^7\sim 10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$,它需要同时用 3~4 种 ^3H dNTP 标记探针才能达到标记要求)。

一种方法的使用,有其优点也难免有其局限性,非放射性探针法也如此,生物素探针杂交过的硝酸纤维素膜很难处理后再重复杂交。尼龙膜需经蛋白酶 K,去污剂和变性剂处理后可以再杂交,但处理起来很麻烦。而 ^{32}P 探针杂交后的膜经简单变性处理即可再杂交,甚至可反复杂交 5 次之多;又如在标记 DNA 中,生物素的分子较大,酶分子就更大,掺入 DNA 或结合 DNA 的数量不宜过高,否则会影响杂交,而非放射性标记物掺入过低,

其灵敏度就会降低,如何掌握适度的掺入率是此类探针应用中的重要环节。

25.2. 标准指示剂系统

在间接的非放射性系统中最重要的是地高辛配基、生物素和荧光素系统(图 25-1)。

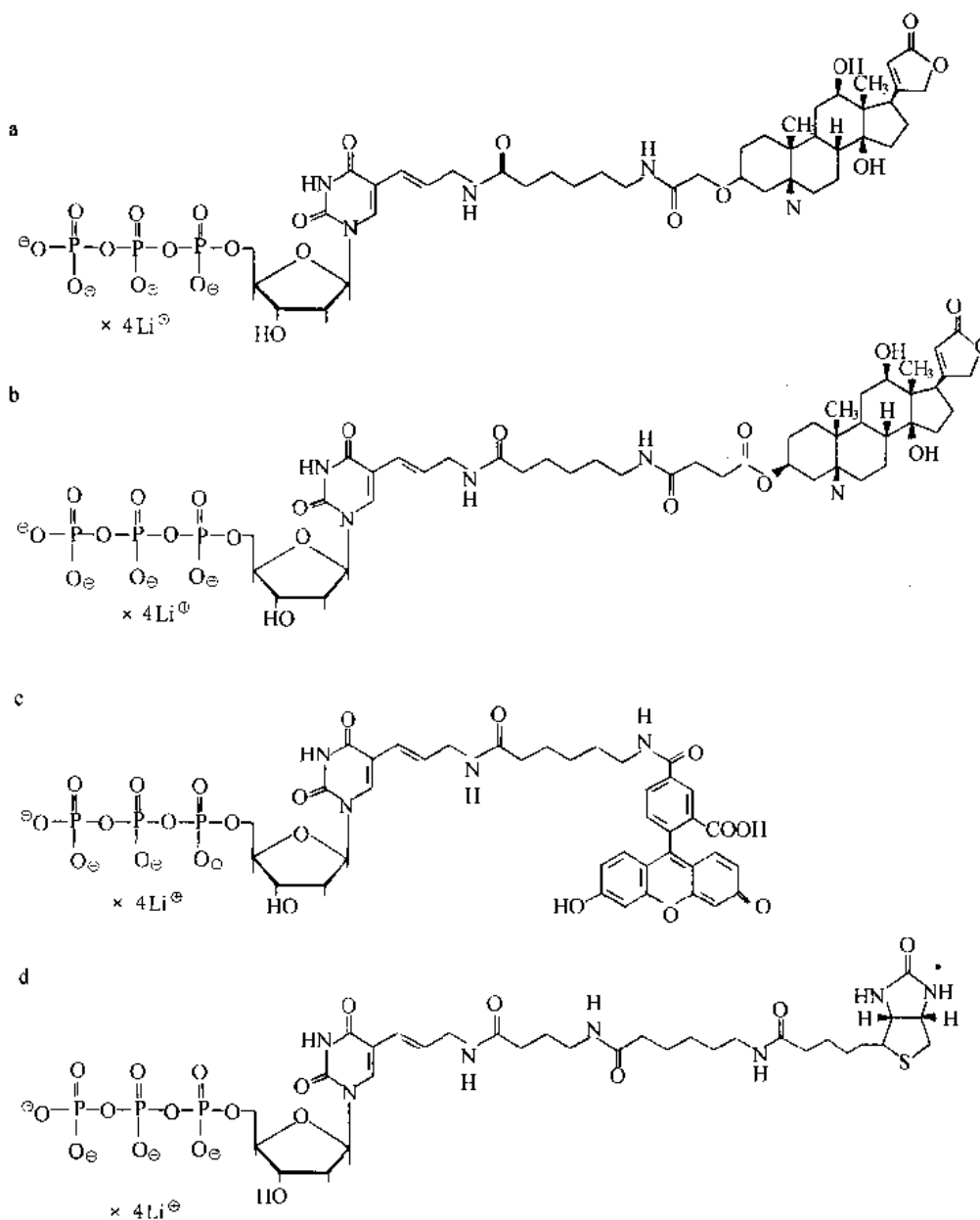


图 25-1 四种非放射性标记物的结构

(a)和(b)为碱稳定的 DIG-[11]-dUTP; (c) fluor-[12]-dUTP; (d) bio-[16]-dUTP。

25.2.1. 地高辛配基系统

异羟基毛地黄毒苷配基,简称地高辛配基(digoxigenin 或 DIG)是一种类固醇半抗原,自然界存在于毛地黄植物。DNA 通过 DIG 标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(dUTP)用随机引物法使 DIG-[11]-dUTP 随机掺入 DNA 而进行标记。dUTP 是通过间臂连接类固醇半抗原地高辛配基(DIG-dUTP)。杂交反应后,这杂交的靶 DNA 通过酶联免疫法与一个抗体复合物(抗地高辛配基碱性磷酸酶复合物(DIG-AP))结合,接着在 5-溴-4-氮-3-吡啶磷酸盐(X-磷酸盐)和硝基蓝四唑盐(NBT)存在下,由酶催化颜色反应。

随机插入 DNA 标记法能在每一次标准测定中有效地标记少量(10ng)和大量(3 μ g) DNA。DNA 在随机插入标记前必须线性化和热变性。从低熔点琼脂糖中分离的 DNA 片段也可有效地被标记。标记反应快速(1 小时即可)和使新合成的 DNA 链内每 20~25 个核苷酸中就结合一个 Dig-dUTP。标记 DNA 中的这个半抗原密度在检测反应中能发挥最高灵敏度。标记 DNA 片段的大小,取决于模板 DNA,例如 pBR322 DNA,其大小范围为 200~2000 bp。

25.2.2. 生物素系统

在生物素(biotin)系统中,结合的成分被加入的维生素生物素所修饰,而结合的生物素可用与它相粘合的指示剂蛋白即抗生物素蛋白(avidin)或链抗生物素蛋白(streptavidin)进行测定,抗生物素蛋白来自鸡蛋蛋白,链抗生物素蛋白分离自链霉菌属抗生物素蛋白(*Streptomyces avidinii*)。每种蛋白质有四个与生物素高亲和力的结合位点,结合常数为 $K=10^{15}/\text{mol}$ 。标记的生物素已广泛地被用于多种不同的检测,包括核酸、蛋白质和聚糖在印迹上、在溶液或原位中的检测,其检测类型包括直接或间接两种形式。

由于生物素被用作修饰基团,本底反应可以发生自内源生物素,尤其是在原位分析天然来源的物质时;生物素系统的另一特性是抗生物素蛋白和链抗生物素蛋白与印迹的膜非特异性本底结合倾向高,尤其是膜的表面预先用封闭剂处理时。但这些本底反应,可以用抗生物素蛋白的脱糖基(deglycosylation)使其降低,即将印迹的膜预先与高离子强度的缓冲液保温,或用乳蛋白(lactoprotein)封闭膜,或用抗生物素蛋白与溶菌酶之间形成复合物。

25.2.3. 荧光素系统

荧光素(fluorescein)是另一种基础抗体系统,在此系统中荧光素标签(fluorescein tag)被用作修饰基团,以其高亲和力抗体与标志酶(如碱性磷酸酶 A)相结合。检测核苷酸的灵敏度可达皮克(pg)以下。如同 DIG 系统一样,特殊的荧光素抗体的特异性是高的。荧光素修饰对光是敏感的,因此应用这种修饰基团标记的试剂应注意避免光照。联合使用 DIG 生物素和荧光素标记的探针可以达到同时对三种不同特异序列的多颜色检测。

25.2.4. 二硝基苯基系统

二硝基苯基(dinitrophenyl,DNP)指示剂系统的建立主要是为了用 DNP 作为修饰基团的原位方法和特异的 DNP 鼠单克隆 IgG 抗体,最终的荧光信号或酶的信号,被用合适

的抗鼠 IgG 结合而产生。

25.2.5. 碱性磷酸酶和辣根过氧化酶系统

除了直接的荧光标签如荧光素碱性蕊香红、香豆素(coumarin)或它们各自的衍生物外,最常使用的非放射性指示剂系统是用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)作为标志酶。在简单的一步反应中它与寡脱氧核苷酸直接结合,寡脱氧核苷酸的 5' 位置与 AP 的偶合是以双功能键作为媒介。用辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)直接标记寡核苷酸效率低,因此 HRP 主要是用于标记多核苷酸片段。直接标记的 AP 探针,能达到与放射性标记或间接地非放射性标记寡核苷酸同样高的特异性,这是因为 AP 虽然必须与每个寡核苷酸探针结合,但是它省略掉间接系统中特定的探针修饰基团与相结合成分之间的结合反应,用一般的 5' AP 标记测序引物进行酶促测序反应,就是用 AP 修饰具有确定序列的寡核苷酸的例子。被检测的样品经琼脂糖凝胶电泳和膜印迹后,所形成的序列梯状带能直接地被用 AP 催化的光学反应或发光反应观察到。

25.3. 标准的标记、杂交和检测方法

使用非放射性核酸探针的标准程序由三个连续步骤组成:标记、杂交和检测,在每一步骤中,许多供选择的方法可被用于标记探针的不同应用。这些方法归纳如下(见表 25-1)。

表 25-1 标准标记、杂交和检测方法的综合

反应类型	标记反应			杂交反应	检测反应	检测后重杂交
	DNA 的标记	RNA 的标记	寡脱氧核苷酸的标记			
随机引物合成		“失控”转录	3' 加尾	半抗原修饰	光学的检测	化学发光检测
切口平移	光标记		3' 末端标记	DNA/寡脱氧	光学的多颜	后, DNA/寡
PCR(3 步/2 步循环)			5' 末端标记 用烯丙基胺衍生碱	核苷酸探针 半抗原修饰寡脱	色检测 化学发光检	脱氧核苷酸 探针的重杂交
RNA 的反转录			基活化抗原	氧核苷酸探针	测	化学发光检测
光标记			(NHS 酯)	(独立序列)		后, RNA 的重
直接 HRP 标记			直接 AP 标记	半抗原修饰 RNA 探针		杂交

25.4. 核酸探针的非放射性标记

酶促、光化学或化学的方法均可促进各种修饰基团掺入探针。

(1) 酶促的结合产生最灵敏的核酸或寡核苷酸探针。

(2) 光标记结果形成完整的核酸探针,因此作为生成非放射性核酸分子量标志是特别有用的。

(3) 在寡核苷酸合成时,化学标记用以标记寡脱氧核苷酸优于其他方法,将非同位素修饰基团连接到 5' 末端或与修饰的磷酸基结合而达到标记寡脱氧核苷酸。

各种酶促标记方法包括用核苷酸类似物取代,或与它们的非修饰配对物的结合来标记单链或双链 DNA。单链的 RNA 和寡脱氧核苷酸作为靶分子时,最常使用的是用半抗原(如 DIG 生物素或荧光素)修饰的核苷酸类似物。在标记 DNA 片段和寡脱氧核苷酸时使用半抗原-dUTP、半抗原-dCTP 或半抗原-dATP,而标记 RNA 则用半抗原-UTP 或半抗原-CTP。

半抗原和核苷酸之间的分子间隔是重要的。当使用 DIG 系统时,连接臂在长度上必须是 11 个核苷酸(nt)(使用比较长的间隔并不增加灵敏性)。在生物素标记系统中具有较短的连接臂的生物素化核苷酸显示出比具有较长的连接臂者更容易通过 DNA 聚合酶掺入。但在生物素检测上连接长度的影响是与此相反的,用抗生物素蛋白或链抗生物素蛋白结合的检测灵敏性显示随连接长度的增长而增加。实际上,多数核酸的标记和检测已用商业上易得到的生物素-[11]-dUTP,生物素-[7]-dATP,生物素-[14]-dATP 或生物素-[14]-dCTP 作为底物进行,在检测灵敏度上没有重要差别。

各种非放射性标记所需的主要试剂见表 25-2。

25.4.1. DNA 标记

有多种方法可被使用

(1) 相同的标记可以用下列方法得到: *E. coli* DNA 聚合酶大片段(Klenow 酶)的随机引物法; *E. coli* DNA 聚合酶 I(Kornberg 酶)的缺口平移或 Taq DNA 聚合酶的 PCR 扩增。在后一种反应中,可以合成没有载体的双链或单链探针。

(2) DNA 末端标记可用下述方法进行:用末端脱氧核苷酸转移酶预先在突出的 3' 末端加尾反应;用 *E. coli* DNA 聚合酶(Klenow 酶)在突出的 5' 末端“补平(fill-in)”反应;或用 T4 DNA 聚合酶在各个核苷酸的存在或不存在的诱导下,在突出的 3' 末端发挥其 3'-5' 外切酶依次外切作用和 5'-3' 聚合酶作用的置换反应。

(3) 以 RNA 作为模板,用病毒反转录酶标记 DNA 探针,除了用非修饰的脱氧核苷酸外还可用半抗原修饰的脱氧核苷酸作底物,通过脱氧核苷酸引物根据 RNA 反转录合成探针 DNA。

1. 用随机引物标记 DNA 随机引物标记是 Feinberg 等提出的。该方法以 Klenow 酶来拷贝单链 DNA 模板,用的引物是从小牛胸腺 DNA 制备的寡核苷酸,或者是化学合成随机的六核苷酸混合物,虽然六核苷酸分子比较小,但是它的长度已足够引发 DNA 聚合酶反应,反应底物中非放射性标记的 dNTP 也可以掺入到新合成的链中去,引物的核苷酸顺序随机性使它有成为任何一条 DNA 链的引物的可能性,所以用这种方法对于 100bp 大小的 DNA 片段进行标记也可以获得满意的结果。模板 DNA 量低至 10~25ng 时仍可以得到稳定的高标记,在放射性标记中标记强度可达 10^8 cpm/ μ g。反应体系中琼脂糖的存在并不会干扰 Klenow 酶的聚合活性。据此,从低熔点琼脂糖电泳胶上切下含有所

表 25-2a 用于非放射性标记的主要试剂

	DNA 标记				RNA 标记			核苷酸标记	
	随机引物	切口平移	PCR	RNA 反转录	光标记	失活 (Run off) 转录	3' 端加尾	3' 末端标记	5' 末端标记
DNA 量	0.2~10 μ g 用内切酶直线化	1~10 μ g 溶于 TE 缓冲液	<2ng/L~40 μ l TE 缓冲液	RNA 0.5~1 μ g 溶于 DEPC- 灭菌的 DEPC (二乙基焦碳酸盐) TE 缓冲液中	10 μ g 溶于双蒸水中 (靶 DNA 必须溶于任何有机缓冲液中) DNA 必须溶于任何有机缓冲液中 分的及蒸水中)	100pmol 核苷酸必须具有游离的 3'OH 基	同 3' 端加尾		
dNTP 混合物	1mmol/L dATP 1mmol/L dGTP 1mmol/L dCTP 0.65mmol/L dTTP, 0.35 mmol/L DIG- [11]-dUTP(或 bio-[16]) dUTP 或 fluor -[12]-dUTP pH7.5, 4 $^{\circ}$ C	(1) 0.5mmol/L dATP, 0.5 mmol/L dGTP mmol/L dCTP 0.5mmol/L dTTP, dCTP, pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (2) 0.5mmol/L dGTP, 0.5 mmol/L dCTP, pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (3) 1mmol/L DIG-[11]- dUTP(或 bio -[16]) dUTP 或 fluor -[12]-dUTP pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (3)	1mmol/L dATP 1mmol/L dGTP 1mmol/L dCTP 0.65mmol/L dTTP, 0.35mmol/L DIG-[11]- dUTP(或 bio-[16]) dUTP 或 fluor [12]-dUTP	(1) 5mmol/L dATP 5mmol/L dGTP 5mmol/L dCTP pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (2) 0.65mmol/L dTTP, pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (3) 0.35mmol/L DIG-[11]- dUTP(或 bio -[16]) dUTP 或 fluor [12]-dUTP	10 μ g/1 μ l photo-DIG (或 photo- bio) 二甲酰胺 溶液, 在 4 $^{\circ}$ C 稳定	(1)10mmol/L dATP, pH7.5, 4 $^{\circ}$ C; (2)1mmol/L DIG-[11]- dUTP(bio- UTP 或 bio- dCTP), pH7.5, 4 $^{\circ}$ C	1mmol/L DIG-[11]- ddUTP(或 bio-[11]- ddUTP), pH7.5, 4 $^{\circ}$ C	DIG-3'-O-甲 基羧基乙酸 -NHS 酯(简 称 DIG-NHS (1mg DIG- NHS 溶于分 析级乙醇, 可供三次标 志用, 此溶 液短期稳定, 必须现用 现配)	

		DNA 标记			RNA 标记			寡核苷酸标记		
	随机引物	切口平移	PCR	RNA 反转录	光标记	失控(Run off)转录	3'端加尾	3'末端标记	5'末端标记	
酶类	<i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I (Klenow) 2U/ μ l	<i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I (Kornborg 酶) 10U/ μ l	Taq DNA 聚合酶 2U/ μ l	AMV 反转录酶 25U/ μ l		SP6 RNA 聚合酶 20U/ μ l(或 T7 RNA 聚合酶或 T3 RNA 聚合酶, 取决于所用的转录载体)	末端脱氧核糖苷酸转移酶 50U/ μ l	末端脱氧核糖苷酸转移酶 50U/ μ l	缓冲液 A: 0.1 mol/L 醋酸三乙基铵 pH6.8 缓冲液 B: 0.1mol/L 醋 酸三乙基铵 acetoni- trite, 1:1(v/v) pH6.8	
引物	六核苷酸混合物: 3mg/ml 随机引物 d(PN) ₆ , 溶于 10 \times 反应缓冲液中	DNase I 1mg/1ml (使用前按 1:1000 比例稀释至 1 μ g/ml)	PCR 引物溶液: 0.1~1.0 nmol/L 引物 1 和 0.1~1.0 nmol/L 引物 2, 混合物溶于 10 μ l 灭菌双蒸水	Oligo-5'-P-(dT) _n 引物溶液: 0.75 μ g/ μ l 溶于 DEPC 灭菌双蒸水中						
	EDTA 0.2mol/L pH 8.0 (Merck)	0.5mol/L pH 7.4 (Merck)		0.2mol/L pH 8.0	100mmol/L Tris-HCl 1mmol/L EDTA pH 8.0, 25 C	0.5mol/L pH 7.4	0.2mol/L pH 8.0	0.2mol/L pH 8.0		

DNA 标记			RNA 标记			寡核苷酸标记		
随机引物	切口平移	PCR	RNA 反转录	光标记	失控(Run off)转录	3'端加尾	3'末端标记	5'末端标记
10×反 应缓冲 液	0.5mmol/L Tris·HCl 50 mmol/L MgCl ₂ 1 mmol/L DTT, 2 mg/ml BSA pH7.8 另加 100 mmol/L DTT	100mmol/L Tris·HCl 0.5 mol/L KCl 15 mmol/L MgCl ₂ pH8.5	0.5mol/L Tris·HCl 80 mmol/L MgCl ₂ 300 mmol/L DTT(溶于 DEPC 灭菌双蒸 水中) pH8.0	0.4mol/L Tris· HCl 60 mmol/L MgCl ₂ 100 mmol/L NaCl 100 mmol/L DTT 2.5 μg/μl BSA pH6.6 1U/μl 人胎盘RNA 酶抑制剂 (溶于灭菌 DEPC 双蒸水中) pH7.5, 4 C	2mol/L 二甲 胍酸钾 0.25 mol/L Tris·HCl 2.5 μg/μl BSA pH6.6	2mol/L 二甲 胍酸钾 0.25 mol/L Tris·HCl 2.5 μg/μl BSA pH6.6	[N 三氟乙酰 胺(3-氧杂) -戊基·N,N -二异丙基 甲基]-非 磷酸胺	
LiCl (Merck)			4mol/L LiCl (Merck)	4mol/L LiCl (Merck)	4mol/L LiCl (Merck)	4mol/L LiCl (Merck)	4mol/L LiCl (Merck)	
其他	载体 DNA (如鲑鱼精 2μg/μl DNA) Sephadex G50 柱	PCR 仪和其 适合的 PCR 反应管及石蜡油	小离心管 (用灭菌的 DEPC 水处理) 25 U/μl 人胎盘 RNase 抑制剂	紫外灯 仲丁醇 (ACS 级) 5ml/L NaCl	焦碳酸二乙酯 (DEPC) (Sigma) 灭菌的 DEPC 小 离心管 CoCl ₂	20μg/μl 糖原 (分子生物 级) CoCl ₂ 25mmol/L CoCl ₂	20μg/μl 糖原 25mmol/L pH 8.5 0.1mol/L 磷酸钠	25% 氨水 3mol/L 醋 酸钠

表 25-2b 核酸探针的一些非放射性标记方法

DNA 标记					
方法	随机引物	切口平移	RNA 反转录	光标记	PCR
	线性化 DNA 0.2~10 μ g	DNA 1~10 μ g	5 \times 反应缓冲液 6 μ l	DNA 10 μ g	DNA \leq 1 μ g
	六核苷酸混合液 2 μ l	10 \times 反应缓冲液 5 μ l	RNase 抑制剂 (25U/ μ l)	photo-DIG 或 photo-bio	10 \times 反应缓冲液 10 μ l
	dNTP 标记混合物 2 μ l	100mmol/L DTT 5 μ l	2 μ l	的 二甲酰胺溶液 1 μ l	dNTP 混合液 10 μ l
	Klenow 酶 1 μ l(2U/ μ l)	0.5mmol/L dNTP 4 μ l	dNTP 溶液 3 μ l	dH ₂ O 加至 40 μ l	PCR 引物 10 μ l
反		0.5mmol/L dITP 1 μ l	cTTP(0.65mmol/L)	打开反应管盖,置冰	Taq DNA 聚合酶 1 μ l
		DIG-[11]-dUTP	pH7.5, 6 μ l	浴中,在紫外灯下,	(2U/ μ l)
应		1mmol/L 2 μ l	DIG-[11]-dUTP	10cm 处照射 15 min	dH ₂ O 加至 100 μ l
		加 dH ₂ O 至 48 μ l	(0.35 mmol/L) 6 μ l	加100 mmol/L Tris · HCl	
体		DNase 1 μ g/1 ml 1 μ l	5'- γ -(dT)15 引物 3 μ l	1 mmol EDTA/L,	
		Klenow 酶 1 μ l	热变性模板 RNA 0.5~	pH9.0 60 μ l	
系		(10U/ μ l)DNA	1 μ g	5 mol/L NaCl 15 μ l	
			DEPC 灭菌水加至 28 μ l	用异丁醇 100 μ l 抽提 2 次	
			AMV 反转录酶 25U/ μ l		
			2 μ l		
总体积	15	50	30	40	100
(μ l)					

DNA 标记				
方法	随机引物	切口平移	RNA 反转录	PCR
反应温度与时间	37°C, >60 min	15°C, 120 min	42°C, 90 min	二步 PCR: 变性 90~94°C 0.5~2 min 退火 40~60°C 0.5~2 min
终止反应	0.2 mol/L EDTA, pH 8.0, 2 μl	0.5 mol/L EDTA pH 7.4, 5 μl	0.2 mol/L EDTA, pH 8.0, 1 μl	引物延伸 70~75°C 1~2 min 30 个循环后, 72°C 延伸 5 min
沉淀	4 mol/L LiCl 2.5 μl	葡聚糖 G-50 柱纯化	4 mol/L LiCl 3 μl	4 mol/L LiCl 10 μl
纯化	无水酒精 (-20°C) 75 μl 置 -70°C 30 min 或 -20°C 120 min	标记的 DNA, 收集 高分子量的洗脱液 载体 DNA 10 μl	无水酒精 (-20°C) 90 μl 置 -70°C 30 min 或 -20°C 2h	无水酒精 (-20°C) 200 μl 置 70°C 30 min 或 -20°C 12 h
DNA	离心 13 000 g, 10 min, 4°C	3 mol/l. NaAc, pH 5.6, 60 μl	离心 13 000 g, 10 min, 4°C	离心 13 000 g 10 min, 4°C
	70% 酒精 (-20°C) 洗沉淀一次	无水酒精 (-20°C) 1.5 ml 置 0°C 30 min 离心 13 000 g, 30 min, 4°C	70% 酒精 (-20°C) 洗沉淀一次	70% 酒精 (-20°C) 洗沉淀一次
干燥	真空干燥后, 溶于 50 μl TE 缓冲液	真空干燥后, 溶于适当的杂交液, 使浓度为 10 ng/μl	真空干燥后, 溶于 50 μl TE 缓冲液	真空干燥后, 溶于 50 μl TE 缓冲液
溶解				二步 PCR 变性 92°C 0.5~1 min 退火和引物延伸 65~75°C 0.5~1 min 30 个循环后, 72°C 延伸 5 min

RNA 与寡核苷酸标记		寡核苷酸标记	5'末端标记	
方法	RNA 标记 失活 (run off) 转录	3'端加尾	3'末端标记	
反应体系	<p>线性模板 DNA 1~10 µg 10×转录缓冲液 2 µl NTP 标记混合物 2 µl 加 DEPC 灭菌水到 18 µl SP6, T7 或 T3 RNA 聚合酶 2 µl</p>	<p>5×反应缓冲液 4 µl 25 mmol/L CoCl₂ 4 µl 1 mmol/L DIG-[11]-dUTP 1 µl 100 pmol 3'-OH 寡脱氧核苷酸 1~9 µl 10 mmol/L dATP 1 µl 加 dH₂O 至 19 µl 末端脱氧核苷酸转移酶 (50 U/µl) 1 µl</p>	<p>5×反应缓冲液 4 µl 25 mmol/L CoCl₂ 4 µl 3'-OH 寡脱氧核苷酸 (100 pmol) 1~10 µl 1 mmol/L DIG-[11]-dUTP 1 µl 加 dH₂O 至 19 µl 末端脱氧核苷酸转移酶 (50 U/µl) 1 µl</p>	<p>A. 5'NH₂ 功能的引入 1. 按标准程序合成寡脱氧核苷酸。设置合成仪于 "trityl on", 将密封的 "linker-PA" 瓶置合适的位置。 2. 用 25% 氨水去除合成的寡脱氧核苷酸的保护基。 3. 通过蒸发或真空干燥去除氨。</p>
总体积	20 µl	20 µl	20 µl	
反应温度与时间	37°C, 120 min	37°C, 30 min	37°C, 30 min	
终止反应	0.5 mol/L EDTA 2.5 µl (pH 7.4)	糖原 20 µg/1 µl 0.2 mol/L EDTA 2 µl (pH 8.0)	同 3'加尾	
沉淀和纯化 RNA 或寡核苷酸	<p>4 mol/L LiCl 2.5 µl 无水酒精 (-20°C) 75 µl 置 -70°C 30 min 或 -20°C 120 min 离心 13 000 g, 15 min, 4°C 70% 酒精 (-20°C) 洗沉淀一次</p>	<p>4 mol/L LiCl 2.5 µl 无水酒精 (-20°C) 75 µl 置 -70°C 30 min 或 -20°C 120 min 离心 13 000 g, 15 min, 4°C 70% 酒精 (-20°C) 洗沉淀一次</p>	<p>C. 标记反应 1. 将 linRer PA 修饰的寡脱氧核苷酸沉淀 (约 A₂₆₀U), 溶于 200 µl 磷酸钠 (0.1 mol/L, pH 8.5) 2. 加 200 µl 新配制的 DIG-NHS 母液 3. 将反应混合液置室温振荡过夜</p>	
干燥溶解	真空干燥后溶于 100 µl DEPC 灭菌水和 1 µl RNase 抑制剂	真空干燥后溶于 20 µl 重蒸水	<p>D. 用反相 HPLC 纯化标记寡脱氧核苷酸 1. 真空浓缩反应混合液 2. 向浓缩混合物加 dH₂O 到 1 ml, 经 0.45 µm 滤膜过滤 3. 过 HPLCRP-18/5 µm 柱 4. 用反相 HPLC 去除未标记物质。洗脱顺序为: 100% 缓冲液 A, 80% 缓冲液 B, 20% 缓冲液 A 5. 真空浓缩所需部分, 脱盐</p>	

需要 DNA 片段的胶条,待胶溶化后就可以直接进行标记反应。

在此方法中,首先将标记的线性双链 DNA 变性,然后在冰浴中冷却,以稳定单链 DNA 为标记作好准备。标记超螺旋 DNA,能标记上的长度较短。因这种结构会造成较快的重退火速度。因此,为得到高标记密度,在标记之前,环状 DNA 分子必须预先线性化。

在随机引物合成期间,DNA 变性后,两个互补的靶 DNA 链都可作为模板。用低温和高引物浓度来稳定单链结构可阻止两模板链之间的重退火。引物和模板 DNA 之间的比率,也相反地控制合成标记探针的长度。高的引物浓度得到较短的合成探针。

标记密度取决于反应混合物中半抗原修饰的 dNTP 和非修饰的 dNTP 的比率。在用 DIG 标记中 35% DIG-dUTP 和 65% dTTP 的混合物标记的效果最好。Bio-dUTP 和 dTTP 最适宜的比率和 fluor-dUTP 与 dTTP 最适宜的比率也均是 35%,65%。应注意:在使用别的半抗原时其最适宜的比率可以是不同的。因此在使用每种新的标记系统时,这种比率必须预先测定。

随机引物标记最常用于标记从凝胶分离的 DNA 片段(可达 ng 数量级)。但是,达到几微克较大量的 DNA 也能用这种方法标记,掺入反应在 30~60 分钟后达到平稳,并在延长保温期间掺入标记保持稳定。用半抗原(如 DIG 或生物素)经随机引物标记的探针其灵敏度在 Southern 印迹杂交中可达检测 100fg 靶 DNA 水平。

2. 切口平移标记 DNA 切口平移法首先用于放射性同位素标记杂交探针的制备,以后才报道修饰基团(如 DIG 和生物素)也可通过切口平移掺入 DNA 用作非放射性探针。

切口平移包括胰脱氧核酸酶(DNase I)和 *E. coli* DNA 聚合酶 I 全酶(Kornberg 酶)在双链 DNA 的同时作用。

低浓度的 DNase I 被用在每条 DNA 链中产生少量“切口”。然后,每个切口的两旁侧末端都是 Kornberg 酶的 5'—3' 外切酶和 5'—3' 聚合酶的底物,5'—3' 外切酶从磷酸化的 5' 末端渐次地移去脱氧核苷酸而 5'—3' 聚合酶同步地加新的 dNTP 到每个切口的相对游离的羟基末端。结果是使双链分子中标记的核苷酸取代了非标记的核苷酸,因 DNase I 随机地切割,DNA 的双链都有切口,因此双链都被标记。

切口平移的临界参数是 DNase I 和 Kornberg 酶的活性之间的比率。理想的比率不是一固定值,但它取决于被标记 DNA 的量、长度和结构。因此,理想切口平移所需的两种酶实际量是根据每种酶对每种靶 DNA 作用的变化量和测定其标记效果而决定。

切口平移 DIG 探针片段长度可通过改变 DNase 浓度加以调整。对于原位杂交程序,理想的片段长度大约是 200~400 个核苷酸,若片段长度太大,标记的探针可用超声切短。

标记反应 1~2 小时后,掺入是最理想的。较长的保温时间可导致标记产物的量轻微的减少,这是由于被加入的 DNase I 和 Kornberg 酶的外切酶活性降解的结果。用切口平移的 DIG 探针靶序列得到的灵敏度,在印迹杂交中是 100~150fg 范围。

3. PCR 标记 DNA 标记无载体 DNA 探针 PCR 是一项重要的技术。扩增反应最多可连续进行 60 个循环,其原理见图 25-2。

假若 RNA 是原材料,反转录步骤应先于扩增反应,以产生必须的 DNA 模板,由于 PCR 的扩增特性,必须避免样品之间的污染,那怕很轻微的污染,也能产生异常的数据。

用 PCR 产生非放射性探针有两种方法。第一种方法,在引物的 5' 末端标记上生物素

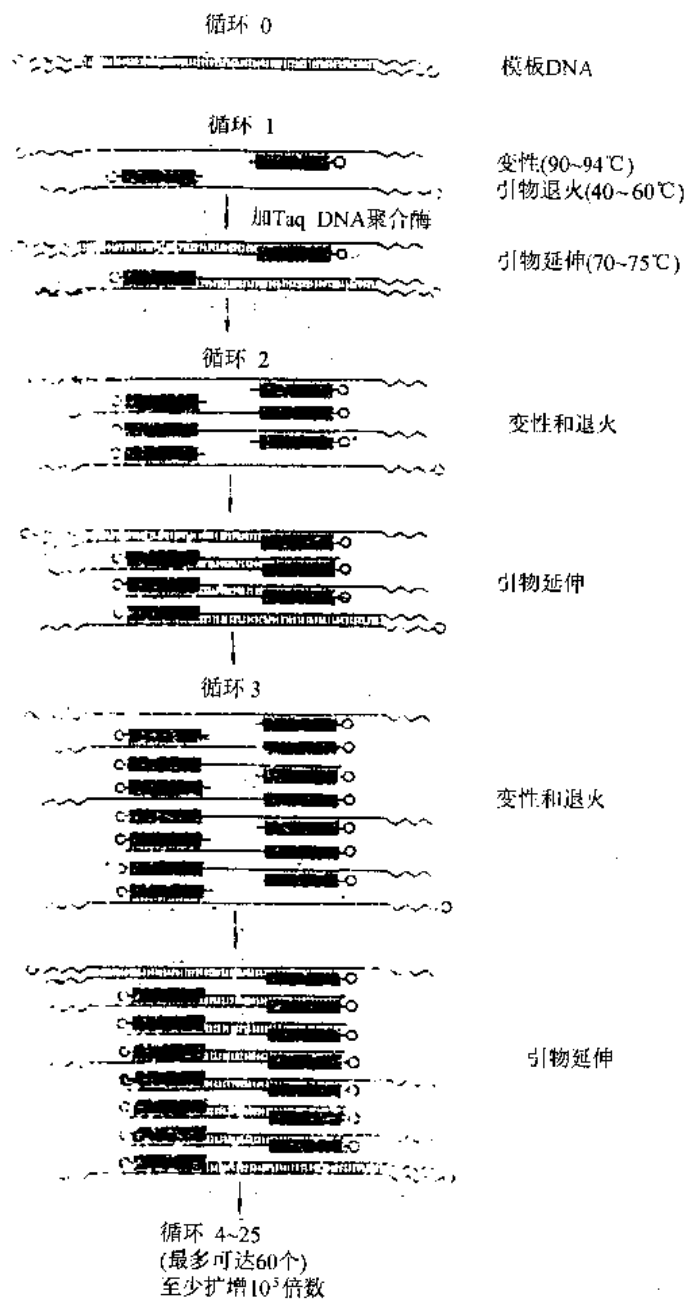


图 25-2 PCR 原理示意图

或各种荧光染料；另一种方法，使用修饰的脱氧核苷三磷酸如 DIG-[11]-dUTP 或 bio-[16]-dUTP 或 fluor-[12]-dUTP 参与 PCR 合成反应，使修饰基团掺入到 PCR 产物中。这可获得均一标记的无载体的杂交探针。在几小时内，就可合成微克量级的无载体探针。在 dTTP 与 DIG-dUTP 之间、dTTP 与 Biotin-dUTP 之间和 dTTP 与 fluor-dUTP 之间的理想比率都是 2 : 1。两种标记程序都能用于合成位于克隆中插入序列未知的探针。在这种情况下，被使用的引物必须直接地位于克隆位点的两旁侧。用 DIG 或生物素标记 PCR 探针，在印迹杂交中能检测到靶序列的 μg 量级。

4. RNA 的反转录标记 DNA 以 RNA 为模板,非放射性 DNA 探针能被用病毒反转录酶(如 AMV 或 MMLV)、合适的寡脱氧核苷酸引物和半抗原修饰的脱氧核苷酸(如 DIG-[11]-dUTP、bio-[16]-dUTP 或 fluor-[12]-dUTP)合成。实验方法是以 RNA 为模板,用 dNTP 延伸寡脱氧核苷酸引物(即第一链 cDNA 合成),产生 DNA:RNA 杂种的 RNA 链,在反应期间被反转录酶的内源 RNase H 活性所消化。同时,双链 cDNA 被这种酶的 5'-3'聚合酶活性所合成(第二链合成)。在第一和第二 DNA 链的合成期间,半抗原修饰的核苷酸被作为底物,因此双链探针都被标记上。

在用反转录酶合成带修饰基团的 cDNA 探针中,带修饰基团的 dUTP 的浓度太低会导致减少标记产物,而过高的浓度可以增加 cDNA 探针的本底。

5. 光标记 DNA 最常用的核酸光标记试剂是芳基叠氮化物。芳基叠氮化物(aryl azide)在黑暗中是稳定的,用紫外线($\lambda=320\text{nm}$)原位照射能被光激活,产生较高活性的芳基氮烯(aryl nitrenes)。它与 DNA 的芳香碱基结合,产生的修饰 DNA 探针是全长分子,因此它既能用于非放射性标记 DNA 分子量标志,也可用于常用的标记 DNA 杂交探针,产生的连接键在碱性 pH 下,提高温度或用紫外光进一步照射后,都是稳定的,因此,在典型的印迹条件下,所获得的标记没有损失。单链或双链 DNA 和 RNA 分子不管是小量或大量都能被标记,标记密度在每 200~400 个核苷酸有一个修饰基团的范围内。标记反应的典型时间是 2~3 分钟。

结合到 3-硝基-芳基叠氮化物的各种半抗原通过光标记制备非放射性探针。这些半抗原包括 DIG,生物素,二硝基苯酚和乙烷化合物;通常光激活的芳基叠氮化物通过 9~11 原子长度的线性间隔物与修饰基团相结合。无论是用 photoDIG 还是 photo-bio 进行 DNA 光标记,标记的核酸能被直接用作杂交探针,或被电泳并直接地印迹到膜上,作为分子量标志。

6. 用辣根过氧化物酶(HRP)直接标记 DNA 报告酶 HRP 直接交叉连接到探针 DNA 上是通过双功能的交叉连接试剂戊二醛(glutaraldehyde)联结到预先形成的聚乙烯亚胺-酶复合物。所以这一标记反应,变性的 DNA 必须在 1.25%戊二醛存在下,用 50 倍过剩的(超比率)聚乙烯亚胺修饰的 HRP 处理。HPLC 分析已显示三聚体 HRP 酶复合体优先结合到 DNA 探针上,标记的探针不必进一步纯化就能被用于杂交。

DNA 探针的大小范围从 50 到几千 bp 内(如 pBR322 DNA),用这种方法能优先和 HRP 交叉连接,大约每 50~100 bp 能与一个活性的过氧化物酶分子相连接。探针小于 50bp(如 20 聚体)与标记成分的反应很弱。

为了检测标记的杂种复合物,HRP 在光增强剂化合物(如 p-碘苯酚)的存在下使发光底物氧化发光。用这种检测类型,像 1pg 这么少的 DNA 在对蓝光敏感的 X 光片上,在 1 小时内能被检测出来。信号的敏感是与探针的长度成比例。在没有除去原来结合的探针下,用相同或不同序列的 HRP 标记探针可以重复应用,这可能是由于第一种探针被第二种探针取代所致。

25.4.2. RNA 的标记

1. 用“失控”转录(“run off” transcription)标记 RNA RNA 探针的合成通常是将感兴趣的 DNA 片段克隆进合适的转录载体如 pSPT 载体(它含有位于 5'方向到多克隆

位点间的噬菌体 SP6-, T7-或 T3-启动子)。重组 DNA 线性化后,它会被相应的噬菌体 RNA 聚合酶在体外转录产生标记的“失控”RNA 转录物,此方法经典地被用于制备放射性标记 RNA 探针,但也用于合成非放射性 RNA 探针。

RNA 聚合酶催化反应通常用嘌呤核糖核苷酸三磷酸盐,在启动子序列下游固定位点开始转录反应。将修饰的核糖核苷酸加到反应混合物中,增长的 RNA 链被掺入的修饰核糖核苷酸所标记。半抗原标记的 UTP(如 DIG-UTP, fluor-UTP, bio-UTP)是主要的标记试剂,用 $1\mu\text{g}$ 模板 DNA,可以得到 $20\mu\text{g}$ 标记转录物,因为转录在线性转录单元的末端终止,这些 RNA 转录物具有限定的长度和序列。

转录反应之后,若有必要,模板 DNA 能用无 RNase 的 DNase 消化除去,产生的标记 RNA 探针不含载体序列,因此避免了载体和靶序列之间被非特异的互相影响引起的交叉杂交。

合成标记 RNA 的量取决于模板 DNA 的数量、大小(线性化的位点)和纯度。每次实验用 $1\mu\text{g}$ 标准 pSPT18-neo 模板 DNA,在 SP6 或 T7 RNA 聚合酶的作用下“失控”转录出 760 个核苷酸,其合成量可达约 $10\mu\text{g}$ 的 DIG 标记 RNA。在保持模板 DNA 量的恒定下,增加反应体积和所有成分的量,能提高 DIG 标记 RNA 的产量。例如,用 $1\mu\text{g}$ 线性标准 pSPT18-neo DNA 作模板,在 5 倍较大的反应体积中 37°C 保温 2 小时后,能合成超过 $40\mu\text{g}$ 的 DIG 标记 RNA。

RNA 探针的优点(如单链性质,无自我互补,限定长度和 RNA:DNA 杂种的较高稳定性)已广泛地应用在不同杂交中。在印迹实验中,使用非放射性标记 RNA 探针,在点杂交、Southern、Northern 印迹中,能检测出 0.1pg 互补 DNA 或 RNA,其敏感性与放射性标记 RNA 探针类似。

2. 光标记 RNA 光标记 RNA 与光标记 DNA 相类似,所产生的完整的非放射性标记 RNA 分子既可用于探针标记,也可用于 RNA 分子量标志的标记,其方法除下列几点外与光标记 DNA 相同。

(1) 相同量的 RNA($10\mu\text{g}$)取代 DNA 作为模板。有机缓冲液成分如 Tris 必须接近于没有。

(2) RNA/photo DIG 混合物的光照时间不是 15min 而是 10min。

(3) 所有缓冲液必须用 DEPC(二乙基焦碳酸盐)灭菌。

25.4.3. 寡脱氧核苷酸的标记

寡脱氧核苷酸可被多种酶的和化学的反应所标记,这些方法均能把 DIG、生物素、二硝基苯酚、荧光素、碱性蕊香红、香豆素或别的分子掺入探针中。无论是作为半抗原供随后结合检测,还是供直接的荧光测定,这些方法加上与标记酶(如碱性磷酸酶)的结合均列在图 25-2 和表 25-3 中。反应类型的选择取决于希望标记的位置,以及它的性质(如半抗原,荧光标签,或直接地结合标志酶)。

1. 寡脱氧核苷酸的加尾法 根据末端脱氧核苷酸转移酶能将脱氧的或双脱氧的核糖核苷酸加到模板 DNA 的 3'末端上。特定核苷酸的反复酶促加入导致生成同聚物尾,它起到标记标签的作用。最适反应条件对于各种核苷酸的掺入是不同的。假若 DIG 被用作标记,按 DIG-dUTP : dATP 为 1 : 10 混合物进行加尾反应,若总尾长度为 40~50 个

表 25-3 寡脱氧核苷酸的标记反应

标记性质	反应类型	标记位置	标记成分(实例)
酶学的	3'加尾	3'末端	DIG-[11]-dUTP/ATP
	3'末端标记	3'末端	DIG-[11]-ddUTP
化学的	氨基连接	5'末端	氨基连接物 bDIG-NHS
	烯丙基胺连接	5'末端/内部的/3'末端	烯丙基胺衍生物/DIG/NHS
	化学合成	5'末端/内部的/3'末端	bio-A,G,C,U-亚磷酸胺
	标志酶结合	5'末端/内部的/3'末端	活化的亚磷酸胺/交叉连接物/NHS-AP

核苷酸,每 10~12 个核苷酸将标记上一个。用生物素标记脱氧核苷酸当用 bio-UTP : UTP 为 1 : 2 混合物或纯粹的 bio-dCTP 时,可获得标记的最高水平。

加尾寡脱氧核苷酸探针具有作为探针的相同特性,用单个修饰分子标记 3'末端,具有三点例外:

(1) 由于加入大量的半抗原分子,因此加尾探针的敏感性是较高的。

(2) 加尾探针的杂交动力学有轻微的不稳定,这是因随加尾长度而变化(即 3'末端标记的寡脱氧核苷酸具有较高特性)。

(3) 加尾探针在杂交反应中由于尾状物的存在能产生非特异背景。例如,用在加尾反应的非标记核苷酸若是 dATP,探针可以退火到复杂的核酸混合物中的富 T 部位。为此,可在加尾反应中加入不同的非标记核苷酸使非特异信号减弱,或用竞争序列进行预杂交和杂交[如在预杂交缓冲液和杂交缓冲液中加入 100 μ g/ml poly(A)和 5 μ g/ml poly(dA)],或通过改变严格条件。

寡脱氧核苷酸的加尾反应除加入 DIG-[11]-dUTP 外,也可用加入 dGTP 或 dCTP 或 dTTP 或所有非标记的 dNTP 混合物到标记反应中,在这种情况下,1 μ l dATP 溶液必须被 1 μ l dCTP、dGTP 或 dTTP 的任一种溶液替代,或被 1 μ l 含所有非标记 dNTP 的混合溶液所替代(10 mmol/L dGTP 或 10 mmol/L dCTP 或 10 mmol/L dTTP 或 4 种 dNTP 的每种各为 2.5 mmol/L),用这些混合物的平均加尾长度和掺入比率均列在表 25-4 中。

表 25-4 任一核苷酸混合物的平均加尾长度和掺入比率

	DIG-[11]- dUTP : dATP [1 : 10]	DIG-[11]- dUTP : dCTP [1 : 10]	DIG [11]- dUTP : dGTP [1 : 10]	DIG-[11]- dUTP : dTTP [1 : 10]	DIG-[11]- dUTP : dNTP [1 : 10]
平均加尾长度	50	25	15	10	5
加尾长度范围	10~100	10~40	10~25	1~20	1~10
每个加尾物中 DIG-dUTP 的数目	5	2.5	1.5	1.0	0.5

通常,加尾探针是适合用于需要最高灵敏度的操作,如 Southern 和 Northern 印迹杂交。

2. 寡脱氧核苷酸的 3' 末端标记 特殊的 3' 末端标记,可用末端脱氧核苷酸转移酶将单个半抗原-ddNTP(如 DIG-[11]-ddUTP)加到被合成的寡脱氧核苷酸的 3' 末端。每个寡脱氧核苷酸仅加单个残基,因链的延伸不能越过终止的双脱氧核苷酸,每个标记反应产生大约 100pmol 的标记探针(等于 1 μ g30 聚体)。用这种方法标记的探针保留它们的高度特异性,尽管加入双脱氧核苷酸,仍然能采用与非标记寡脱氧核苷酸相同的最适杂交和洗脱条件。经本方法标记的探针其检测灵敏度可达 10pgDNA,这些探针特别适用于那些要求探针特异性最高和中等探针灵敏度的实验(与寡脱氧核苷酸加尾法相比较)。

3. 寡脱氧核苷酸的 5' 末端标记 寡脱氧核苷酸能被用半抗原或荧光标签在 5' 末端经二步骤程序进行化学修饰。首先寡脱氧核苷酸在它的 5' 末端接上氨基连接物残基(aminolinker residue)并纯化后,将半抗原的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化酯或荧光素标签共价地连接到游离的 5' 氨基残基。上述探针可大剂量(每次反应 100nmol)产生。与 3' 末端标记的探针相比较,它们是特异的并有较高的敏感性(即在标准的斑点印迹中大约 10pgDNA 样品能被检测到)。探针也适用于文库筛查等。

5' 末端标记寡脱氧核苷酸另一种有用的特性是其 3' 末端对 DNA 合成反应是游离的,能起到引物的作用。因此当有非放射性标签物存在时,它能像 PCR 那样用标记物进行延伸反应。随后,标记的延伸产物能用特异的方法检测,或分别地被结合到用于标记物特异检测的固相上(如 DIG 的或生物素的标记产物与表面附着 DIG 特异抗体或链抗生物素蛋白亲和性基质的结合)。

4. 寡脱氧核苷酸与烯丙基胺衍生的核苷酸和活化的半抗原(NHS 酯)的连接 C-5-烯丙基胺(allylamine)取代的核苷酸能与携带一可检测的半抗原的 N-羟基琥珀酰亚胺酯起反应,这种缩合反应导致半抗原通过线性连接结合到胞嘧啶或尿嘧啶碱基的 C-5 位置上。嘧啶碱基的 C-5 位置不包括在氢键里,因此可很灵敏地检测双链杂种的形成。键的长度能被导入 γ -氨基丁酸和/或 ϵ -氨基乙酸残基作为附加键成分而增长。这些附加键减少探针和半抗原之间的非特异相互作用和在半抗原检测时抑制空间障碍效应。然而,缩合反应的产量仅为用 DIG 或生物素作为半抗原的 50%。用这种标记类型,必须有纯化步骤(如凝胶电泳或 HPLC)。

5. 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AP)直接标记寡脱氧核苷酸 双功能试剂能使 AP 报告酶共价地交叉连接到合成的寡脱氧核苷酸上。寡脱氧核苷酸首先被连接臂修饰。连接臂具有终止反应的伯胺(primary amine)功能,这种修饰在自动合成寡脱氧核苷酸时,可用带有保护连接臂的核苷酸 3' 氨基磷酸盐直接完成。将硫代基团接到标志酶的氨基酸侧链或将酶氨基基团经 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯的酰化作用均可得到结合酶。连接反应限制了酶:寡脱氧核苷酸复合物的组成,每个寡脱氧核苷酸只结合一个酶分子,其蛋白质与 DNA 的总比率约为 20。然后,经凝胶过滤和在 DEAE 柱层析纯化 AP:寡脱氧核苷酸复合物。AP 报告酶虽经历结合和纯化过程仍然保留全酶活性。

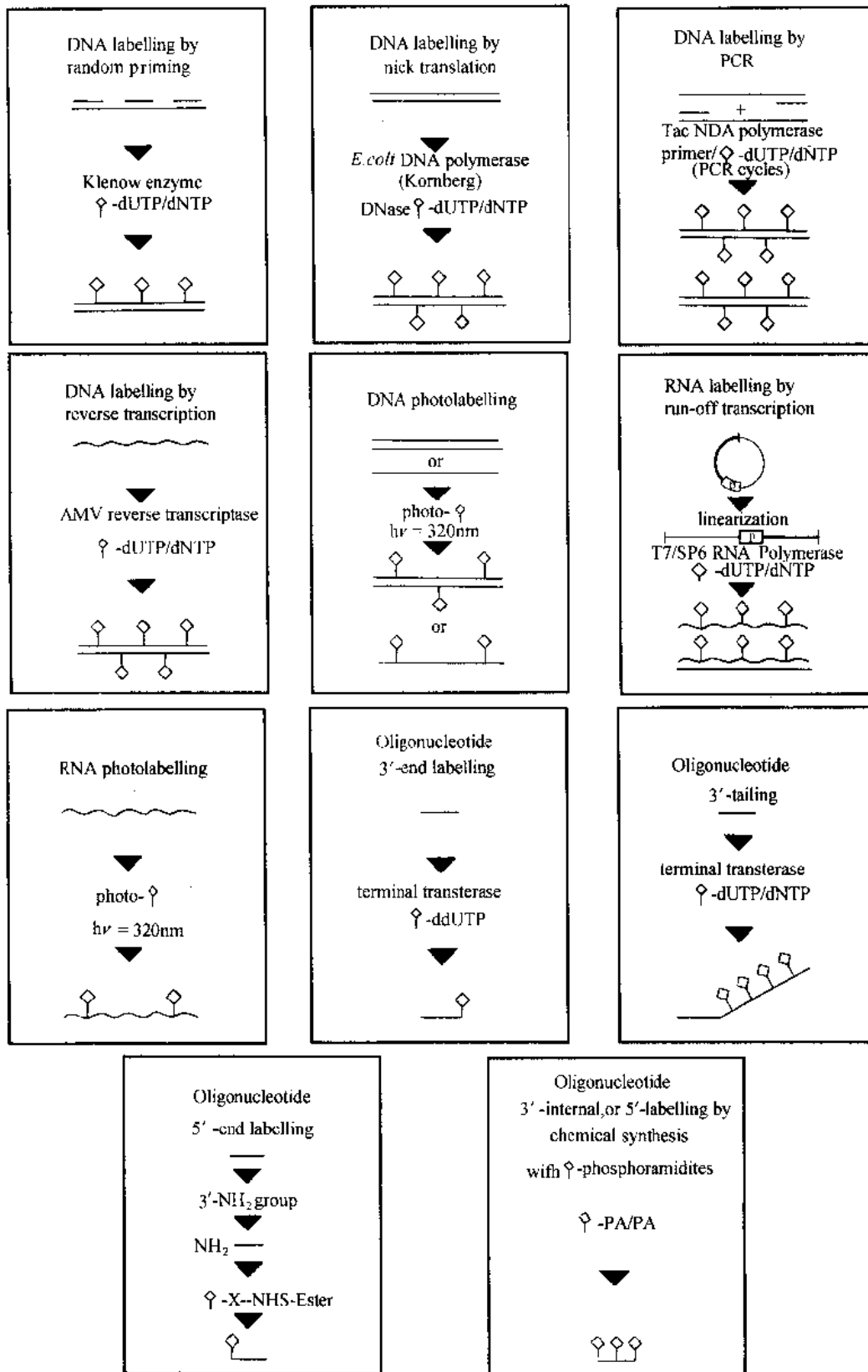


图 25-3 合成非放射性核酸探针的各种方法示意图

25.5. 印迹步骤

在体外最常用的印迹形式是斑点(dot)印迹, Southern, Northern 和 South-Western 印迹以及菌落和菌斑杂交, 无论是硝酸纤维素膜还是中性的或正电荷的尼龙膜均可被使用, 并可从许多供应商中得到(如 Amersham Boehringer Mannheim, NEN, Tall)。在膜的准备上硝酸纤维素膜需预先浸泡在水里, 然后浸于 $20\times$ SSC, 而尼龙膜不经任何处理即可使用。印迹步骤要点如下:

25.5.1. 斑点印迹(dot blot)

DNA 或 RNA 样品(溶于 TE 缓冲液)在沸腾的水浴中热变性 5min, 然后立即在冰浴中冷却, 将变性后的 DNA 或 RNA 点样于硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 每个斑点的加样量为 0.1 至 10 μ g。

25.5.2. Southern 印迹

将 DNA 样品(每个样品量为 1~5 μ g)加入琼脂糖凝胶的加样孔中, 经电泳分离 DNA 片段, 然后通过 Southern 转移将 DNA 印迹到硝酸纤维素膜或尼龙膜上。

25.5.3. Northern 印迹

将 RNA 样品加入琼脂糖凝胶的加样孔中, 每个样品的加样量为 1~5 μ g RNA(溶于经 DEPC 灭菌的 TE 缓冲液中), 经电泳分离 RNA 片段, 然后经 Northern 转移将 RNA 印迹到硝酸纤维素膜或尼龙膜上。

已制备好的印迹膜, 必须将 DNA 或 RNA 固定于膜上, 若是硝酸纤维素膜, 可置 80 $^{\circ}$ C 的真空烤箱烘烤 2 小时, 若是尼龙膜可在 120 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤 15~30min, 或在紫外灯下照射 3min, 通过紫外线交叉连接固定 RNA。

25.6. 用非放射性核酸探针进行杂交

形成的复合物的特性是受杂交条件的严格程度和其稳定性所决定。其重结合率及杂种稳定性直接与 T_m 相关, 而 T_m 值又受下列因素影响: 碱基组成、盐浓度、甲酰胺的存在、片段长度、杂种内(DNA : DNA, RNA : DNA, RNA : RNA)核苷酸的种类特性及错配形式。

关于前四个参数对 DNA : DNA 杂种的 T_m 值的影响可用下列方程式表示:

$$T_m = 81.5 C + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\%甲酰胺) - 500/L$$

方程式中 M 是单价正离子的摩尔浓度, L 是杂交的序列长度(bp)。

考虑到形成的杂种性质, RNA : DNA 或 RNA : RNA 杂种的 T_m 值比 DNA 杂交的较高。错配比正常碱基对不够稳定, 因此错配的存在也减少 T_m 值(每 1% 错配约降低 1 $^{\circ}$ C)。

杂种复合物的特性, 最明显地受杂交后的最终洗脱步骤的严格程度的影响, 其严格程度通常随着洗脱温度的增加和盐浓度的降低而增加。洗脱温度一般在低于 T_m 值 5~

15℃,低盐浓度从 $5\times\text{SSC}$ (0.75mol Na^+)到 $0.1\times\text{SSC}$ (0.015mol Na^+)。这特别适用于寡脱氧核苷酸,其洗脱温度通常是低 T_m 值 5°C 。然而,最理想的洗脱温度必须根据实验结果来决定。

25.6.1. 用DIG标记的探针进行杂交

下面叙述了用DIG标记DNA或寡脱氧核苷酸探针进行预杂交和杂交的条件,若用核苷酸成分很不同的几种寡脱氧核苷酸作为探针,常用的缓冲系统应含有 3mol/L 氯化四甲铵(TAMCL)。因在这种试剂中寡脱氧核苷酸的杂交行为不取决于寡脱氧核苷酸中的核苷酸成分, T_m 值仅仅是核苷酸长度的函数。当杂交液中含甲酰胺时,杂交温度被降到 37°C 与 42°C 之间。因此,在这种杂交系统中探针将以较少严格的杂交条件进行杂交,并特地用TAMCL洗脱进行调节。要注意硝酸纤维素膜在TAMCL溶液中可因延伸时间而不稳定,因此应用尼龙膜代替。

表 25-5 DIG 标记探针的杂交

探针	DNA 探针或寡脱氧核苷酸探针	RNA 探针
试 剂	承载有 DNA 或 RNA 样品的杂交膜 缓冲液 I: 0.1mol/L 顺丁烯二酸 0.15mol/L NaCl pH7.5 10%封闭试剂母液: 将 Boehringer Mannheim 公司产品封闭试剂按 10%浓度 溶于缓冲液 I 中 $20\times\text{SSC}$; 3mol/L NaCl, 0.3mol/L 柠檬酸三钠 pH7.0 杂交液: $5\times\text{SSC}$, 1% (w/v) 封闭 试剂, 0.1% N-十二烷 酰肌氨酸, 0.02% SDS (若加 50% 甲酰胺, 封闭 试剂浓度增加到 2%) $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS $0.1\times\text{SSC}$ 0.1% SDS DIG 标记的 DNA 或寡脱氧核苷酸探针 TAMCL 洗液: 3mol/L 氯化四甲铵(TAMCL) (Merck) 50mmol/L Tris- HCl 2mmol/L EDTA 0.1% SDS pH8.0	承载有 DNA 或 RNA 样品的杂交膜 杂交液: 50% 甲酰胺 $5\times\text{SSC}$ 2% 封闭试剂 0.1% N-十二烷 酰肌氨酸 0.02% SDS DIG 标记的 RNA 探针 其他试剂见 DIG 标记的 DNA 探针栏
	杂交液量 无甲酰胺 50% 甲酰胺 时间	$>20\text{ ml}/100\text{cm}^2$ 膜 DNA 探针 68°C 寡脱氧核苷酸探针 54°C (30 聚体, 不同长度及碱基组成其温度不同) DNA 探针 42°C

续表 25.5

探针	DNA 探针或寡脱氧核苷酸探针	RNA 探针	
杂交	杂交液量	2.5 ml/100 cm ² 膜	2.5 ml/100 cm ² 膜
	探针浓度 (终浓度)	5~25ng DNA/ml 0.1~2.0 pmol/ml 3'加尾 寡脱氧核苷酸 1~10pmol/ml 3'末端标记寡脱氧核苷酸	100 ng/ml (使用前 95℃变性 10 min)
	温度	DNA 探针 68℃ 寡脱氧核苷酸探针(30 聚体)54℃不同长度和碱基 组成不同,其温度不同	
		50% 甲酰胺	DNA 探针 42℃ 50℃
时间	DNA 探针 >6 h 寡脱氧核苷酸探针: 1~6 h	> 6h 比较高的 DIG 标记的 RNA 探针浓度 (200~500ng/ml)其杂交时间可 缩短至 2 小时,但可能增加本底 强度,DIG 标记的探针可贮存在 -20℃,可反复使用几次,使用 前必须 68℃热变性探针 10min	
洗	洗脱液量	> 50ml/100cm ² 膜	> 50ml/100cm ² 膜
	洗脱条件	2×SSC 0.1%SDS 室温 2×15min	2×SSC, 0.1% SDS 室温 2×5min
		0.1×SSC 0.1%SDS 68℃ 2×15min	0.1×SSC 0.1%SDS 68℃ 2×15min
		TMACl 洗脱	5×SSC 4℃漂洗
脱	寡脱氧核 苷酸探针	5×SSC 4℃ 2×30min TMACl 洗液 20min	
	杂交膜	洗脱温度取决于探针长度 50℃(16 聚体) 55℃(20 聚体) 68℃(30 聚体) 75℃(50 聚体)	

25.6.2. 其他非放射性探针的杂交

当用购买的生物素(Bio)荧光素(fluor),二硝基苯基(DNP)化合物辣根过氧化酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)标记寡脱氧核苷酸时,可使用本章节的其中一种操作程序。

尽管 HRP 的分子很大,但 HRP 标记的探针和靶序列之间形成的杂种的稳定性并不改变(如 T_m 测定所显示),这是以 AP 标记寡脱氧核苷酸为对照,降低 10℃时的观察结果,大概因为 AP 标记的密度(21~26 碱基/酶)比 HRP 标记密度显著地高。在用 HRP 标记探针杂交时,必须用 6mol/L 尿素作变性剂,杂交温度不能高于 42℃,因在比较高的温

度酶不稳定,因而杂交反应的严格性必须被通过改变盐浓度等措施加以控制。

AP: 寡脱氧核苷酸共轭物作为杂交探针,其特异性与放射性或半抗原标记的探针相似。正如上面所述 T_m 被降低 10°C ,在酶修饰的探针和靶 DNA 之间结合能仅显示轻微的降低,与 HRP 相反,当升高杂交温度时,AP 是稳定的(如在 50°C 杂交 30min,AP 的酶活性损失是微不足道的),其严格性不仅不被温度和盐浓度所控制,也不因 SDS 的存在受影响。因 AP 在高浓度去污剂时也是稳定的(在杂交混合物中也可有 0.5%PVP 存在)。

25.7. 检测

多种类型的检测洗脱可用于标记核酸的非放射性检测。这些检测方法分类如下:

(1) 光学系统:如 AP/BCIP, NPT 或 AP/萘酚-AS-磷酸盐,重氮盐(FAST 染料)生成一种偶氮染料。

(2) 化学发光系统:AP/CSPD, LumogenTM PPD, LumiphosTM 530, AMPPD 或选择性水解的吡啶酯。

(3) 生物发光系统:如 AP/D-荧光素-D-磷酸盐,荧光素酶。

(4) 荧光系统:如 AP/AttophosTM或荧光标签。

(5) 金属沉淀系统:如银增强免疫金(silver-enhanced immunogold)。

(6) 电化学系统:如尿素酶催化 pH 改变或电化学发光。

另外,信号增强的各种水平能与信号产生的最初方法相配合。

(7) 探针的交叉连接如“圣诞树”或“毛刷”结构。

(8) 多聚结合成分:如多聚链抗生物素蛋白,多聚半抗原,PAP 或 APAAP 复合体。

(9) 多酶体:如多聚 AP。

(10) 信号串联:如 $\text{NAD}^+/\text{NAPPH}+\text{H}^+$ 循环与氧化还原作用颜色反应相配合。

25.7.1. 光学检测

在间接系统中,认别修饰探针的结合基团被共价地结合到能产生信号以便测定的分子上,在大多数情况中这些共轭的分子是酶。它通过偶合催化底物反应产生颜色的、发光的、或荧光的反应产物。

1. 单色检测 众所周知的标志酶是 AP,HRP 和 β -半乳糖酶(B-Gal)。尿素酶、葡萄糖氧化酶(GOD)和微过氧化酶(microperoxidase)也在较少的范围被使用。酶催化反应无论是印迹和原位杂交用以产生不溶解的颜色沉淀,或供定量测定的可溶颜色产物,它取决于被使用的底物类型。产生不可溶沉淀的底物包括:

(1) 5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐(BCIP)/氮蓝四唑盐(NBT)供 AP 作底物。

(2) 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)供 HRP 作底物。

(3) 5-溴-4-氯-3-吡啶基-B-半乳糖苷(BCIG 或 X-gal)/NBT 供 B-Gal 作底物。

各种可溶的底物是 P-硝基苯酚磷酸盐(P-NPP),2,2-连氨基-二-[3-乙基-苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)和氯酚红-B-D-吡喃半乳糖(CPRG)。

用 DIG 标记的探针进行印迹杂交,是与结合到 AP 的多克隆抗 DIG 绵羊抗体 ($\langle \text{DIG} \rangle$: AP) 一起保温,含有 DIG 标记探针的杂种与抗体相结合。然后,通过 BCIP/

NBT 底物上结合的 AP 的作用形成蓝色沉淀进行测定。

颜色检测后,杂交膜可在室温干燥或在 80℃ 烘干并保存,假若想重检测它,就不必干燥或烘干。当膜干时,颜色消失,但用缓冲液 4 湿膜后颜色恢复,膜也可保存在含有缓冲液的密封塑料袋内。在这种情况下颜色保存不变。

2. 多种颜色检测 多色检测是近年来用 DIG、生物素和荧光素标记的探针,与三种不同的偶氮染料相结合,产生三种不同的颜色经连续的酶免实验后建立起来的。这种多标记的和彩虹检测方案允许不连续的核酸顺序在相同的印迹膜上用不同的颜色杂交进行检测。

用 DIG、荧光素或生物素标记的核酸,同时与固定的靶核酸杂交。然后,杂交的探针分子被 AP 衍合物(<DIG> : AP)(抗 DIG 抗体[Fab] : AP),<fluor> : AP(抗荧光抗体[Fab] : AP)或 SA : AP(链抗生物素蛋白:AP)所检测。AP 衍合物是用三种不同的萘并-AS-磷酸盐/偶氮盐结合体(FAST 染料)形成的,供作 AP 的底物。检测反应依顺序进行,在每一检测步骤之间必须用热 EDTA 溶液处理,以灭活前一步骤结合的 AP。从而,产生的偶氮染色和杂交信号是绿、红或蓝色,它们分别仅互补于一种探针的靶分子。假若靶 DNA 或 RNA 片段是互补于一种以上的探针,产生的信号是混合颜色。这种方法有广泛应用的优点,不同的杂种在同一印迹膜或标本上能被检测。

核酸探针能被用 DIG、荧光素或生物素通过下列中的一种方法标记:随机引物标记 DNA,PCR,体外 RNA 转录,寡脱氧核苷酸末端标记,或寡脱氧核苷酸加尾法。然后,这些探针被按不同的操作程序同时被杂交到印迹膜上或用于原位杂交。准确掌握所有三种供杂交的探针浓度是特别重要,为此,推荐用一张没有靶 DNA 或仅有对照的斑点印迹膜做一次模拟杂交。若在相同膜上进行多次检测,杂交洗脱后在检测前必须用紫外光(UV 254nm)照射 3min 以达到将杂种固定于膜上。这是必要的步骤,因热处理用于灭活前一步骤的 AP,除非杂种被固定在膜上,否则,探针将从膜上被释放,假若使用单个标记就不需要灭活和固定杂种。

多色检测在 2 小时内能检测出 0.3Pg 的靶 DNA,其敏感度能满足较低等的真核生物如酵母或果蝇的基因组印迹中单拷贝基因的检测。但有时它不能满足几种脊椎动物 DNA 基因组印迹所要求的敏感度。当需要高敏感度时,可用比色的 BCIP/NBT 底物或化学发光底物(如 CSPP, Lumigen™ PPD, 或 Lumiphos™ 530)替代。

25.7.2. 化学发光检测

除了光学系统,还发展了基于发光底物的许多供选择的检测系统。可溶的化学发光底物与 AP 或 B-Gal 一起使用,通过变换光学的 BCIP/NBT 或 BICG/NBT 底物,使其符合 1,2-dioxetane 发光底物 CSPD、Lumigen™ PPD、Lumiphos™ 530、AMPPD 或 AMPGD。在这些化学发光系统中,磷酸盐(如 CSPD, Lumigen™ PPD, Lumiphos™ 530, AMPPD)或 β-半乳糖苷残基的酶解形成一种不稳定的过渡性质的阴离子,它分解产生光。化学发光强度能被在胶态分子束中或在共价连接的多聚体中的 1,2-dioxetane 底物的内含物所增强,这种内含物含有荧光团,后者能被散发的光所激活,化学发光的检测仅在尼龙膜上而不能在硝酸纤维素膜上进行。

25.7.3. 检测试剂

1. 用 AP 和 BCIP/NBT 进行光学检测的试剂

(1) 10% (w/v) 封闭剂母液: 将封闭剂 (Boehringer Mannheim) 溶于缓冲液 1, 配成浓度为 10% (w/v) 的母液, 灭菌 4℃ 或 -20℃ 保存。

(2) 缓冲液 1: 100 mmol/L 马来酸, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5。

(3) 缓冲液 2: 1% (w/v) 封闭试剂 (用缓冲液 1 稀释 10% 封闭剂母液), 灭菌 4℃ 保存。

(4) 缓冲液 3: 100 mmol/L Tris. HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂, pH 9.5。

(5) 缓冲液 4: 10 mmol/L Tris. HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0。

(6) DIG: AP 母液: 750 U/ml 多克隆抗-DIG 绵羊抗体 [Fab]: AP 轭合物, 4℃ 保存 (Boehringer Mannheim)。

(7) DIG: AP 工作液: 用缓冲液 2 按 1: 5000 的比率稀释 DIG: AP 母液。使用前稀释, 稀释液在 4℃, 12 小时内稳定。

(8) BCIP 溶液: 50 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Boehringer Mannheim) 溶于二甲基酰胺。

(9) NBT 溶液: 75 mg/ml NBT (nitroblue tetrazolium salt) 溶于 70% 二甲基甲酰胺。

(10) 颜色检测液: 35 μl BCIP 液 + 45 μl NBT 液 + 10 ml 缓冲液 3, 使用前将上述三种溶液混合均匀, 立即使用。

2. 用 AP 和偶氮染料进行光学多色检测:

(1) 缓冲液 1 (见 24.7.3. 节 1)。

(2) 缓冲液 3 (见 24.7.3. 节 1)。

(3) 缓冲液 4 (见 24.7.3. 节 1)。

(4) 50 mmol/L EDTA, pH 8.0。

(5) 10% (w/v) 封闭剂母液 (见光学检测)。

(6) [DIG/fluor] 封闭液: 将 10% (w/v) 封闭液母液, 按 1: 10 比率用缓冲液 1 稀释。

(7) [Bio] 封闭液: 将 (w/v) 封闭剂母液按 1: 10 比率用缓冲液稀释。

(8) DIG: AP 工作液: 同光学检测试剂 7。

(9) fluor: AP 母液: 750 U/ml 多克隆抗荧光绵羊抗体 [Fab]: AP/轭合物 (Boehringer Mannheim)。

(10) fluor: AP 工作液: 按 1: 5000 比率用 [DIG/fluor] 封闭液稀释 fluor: AP 母液, 使用前配制。此溶液在 4℃ 可稳定 12 小时。

(11) SA: AP 母液: 750 U/ml, 链抗生物素蛋白: 碱性磷酸酶轭合物 (Boehringer Mannheim) 溶于 [bio] 封闭液。

(12) SA: AP 工作液: 按 1: 5000 比率, 用 [bio] 封闭液稀释 SA: AP 母液: 配制后立即使用, 在 4℃ 可稳定 12 小时。

(13) 底物溶液: 每种底物溶液的配制: 将适当的偶氮染料药片 (Boehringer Mannheim) 溶于 10 ml 缓冲液 3。

“绿色”AP 药片: 含 2 mg naphthol-AS-Gr-phosphate 和 3.5 mg fastblue B;

“红色”AP 药片:含 2mg naphthol-AS-phosphat 和 1mg fast red TR;

“蓝色”AP 药片:含 2mg naphthol-AS-phosphate 和 3mg fast blue B;

“绿色”AP 底物:几乎不完全溶解,但不影响应的结果。

3. 用 AP 和 diacetase 进行化学发光检测的试剂:

(1) 缓冲液 1(见光学检测试剂 2)。

(2) 洗脱缓冲液:往缓冲液 I 补加 0.3% Tween-20。

(3) 缓冲液 2(见光学检测试剂 3)。

(4) 缓冲液 3(见光学检测试剂 4)。

(5) DIG: AP 工作液。用缓冲液 2 按 1:1000 比率,稀释 DIG: AP 母液(见光学检测试剂 6)。配制后立即使用。4℃可稳定 12 小时。

(6) 化学发光底物溶液:溶液的组成取决于底物的选择和供应者。底物的差别在于信号产生的速度和强度。可能的底物有:CSPD, Lumigen™ PPD 或 Lumigen™ 530。

(7) 尼龙膜(带正电荷)。

(8) X(射)线胶卷或偏振片黑白胶卷。

(9) Whatman 3MM 纸。

(10) 杂交袋。

(11) 其他试剂,见化学发光试剂。

25.8. 非放射性探针膜的重新杂交

非放射性探针的重新杂交条件不同于用放射性标记探针,它取决于标记的类型,检测的性质,尤其是光学检测导致不溶性沉淀。因此,在这种情况下,从膜上溶解探针的条件应比化学发光检测后探针的溶解条件更严格。而且,经紫外光交叉连接固定在膜上供多色检测的探针,不能被去除。因此,假若需要重探测,化学发光检测应该作为首选探针系统。因化学发光检测后 DIG 标记的 DNA 或寡核苷酸探针较易被从膜上除去,DIG 标记的 RNA 探针在化学发光检测后也能被除去,但需用不同的洗脱液。

25.8.1. 化学发光检测后从膜上移去 DIG 标记 DNA 或寡核苷酸探针的试剂和方法

试剂:所需的试剂取决于所选择的从膜上移去探针的方法。

(1) 2×SSC: 0.3%mol/L NaCl, 30mmol/L 柠檬酸三钠, pH 7.0。

(2) 2×SSC, 50mmol/L EDTA, pH 8.0。

(3) 2×SSC, 0.1% SDS。

(4) 0.2mol/L NaOH, 0.1% SDS。

(5) 蛋白酶 K, 0.5~1 μg/μl, 0.1~0.2% SDS。

(6) 10mmol/L 磷酸钠缓冲液, 50%甲酰胺 pH 6.5。

方法 1:

(1) 膜用蒸馏水在室温彻底冲洗。

(2) 在 0.2mol/L NaOH, 0.1% SDS 中 37℃保温, 15min, 二次。

(3) 用 2×SSC 漂洗。

(4) 预杂交后再进行重新杂交。

方法 2:

- (1) 膜用溶液(2)在 85℃洗二次。
- (2) 膜在溶液(3)中,室温保温二次,每次 5min。
- (3) 膜在溶液(4)中,37℃保温二次,每次 15min。
- (4) 膜用 2×SSC 漂洗二次。
- (5) 预杂交后再进行重新杂交。

方法 3: 用于多次重新杂交。

- (1) 膜在溶液(5)中,68℃保温二次,每次 30min。
- (2) 膜在溶液(3)中,68℃保温二次,每次 5min。
- (3) 膜在溶液(6)中,68℃保温二次,每次 30min。
- (4) 膜用 2×SSC 冲洗二次。
- (5) 预杂交后再进行重新杂交。

25.8.2. 化学发光检测后从膜上移去 DIG 标记的 RNA 探针的试剂和方法

试剂:

- (1) 50mmol/L Tris. HCl, 50%二甲基甲酰胺, 1%SDS, pH 8.0, 68℃。
- (2) 2×SSC。

方法:

- (1) 膜用蒸馏水在室温澈底冲洗。
- (2) 膜在溶液(1)中,68℃保温二次,每次 30min。
- (3) 膜用灭菌蒸馏水在室温冲洗,然后用 2×SSC 漂洗。
- (4) 预杂交后再进行重新杂交。

25.9. 故障咨询

本节主要对出现检测灵敏度低和高背景情况下,应如何寻找原因及注意事项提供参考。每个问题则着重:1. 膜的选择;2. 探针的标记效率(或纯度);3. 预杂交和杂交过程;4. 检测等四方面加以论述。

25.9.1. 检测的灵敏度低

1. 膜的选择 当用非放射性探针进行斑点、Southern 或 Northern 印迹时,尼龙膜的质量影响检测的灵敏度和速度,某些类型的膜(如 Boehringer Mannheim 生产的,带正电荷的膜),厂家已进行过多种非放射性方法的功能试验。还有一些尼龙膜商品如 Bio-dyne A(Pall)或 Hybond N (Amesham)也是适用的,但对 X 光片需要较长的曝光时间。能引起强背景的某些类型的膜是不适用的。硝酸纤维素膜不能用于化学发光检测,但可以用另外特殊的封闭物质(如 Tropix 产的 Nitro-Block)并修改操作方案和较长的曝光时间。按照厂家提供的说明书使用这些膜。

2. 探针的标记效率 通过直接检测来测定特异探针的标记效率可分别与标准的

非放射性标记的 DNA 或 RNA 给出的信号作比较,若特异探针效率不高,从下列几点进行检查:

(1) 用酚/氯仿抽提和(或)用酒精沉淀重纯化模板 DNA。

(2) 在酒精沉淀标记的 DNA 或 RNA 时,不要使用铵盐,因为这些沉淀是难以重新溶解,可用 NaCl 或醋酸钠代替。

(3) 若在标记的 DNA 或 RNA 的溶解上发生问题,可将沉淀小团温热到 37℃,并偶尔涡旋之。也可加入 SDS,终浓度达到 1%以加速溶解。

(4) 若标记的 DNA 或 RNA 用酚抽提。要注意:将有 20%标记的 DNA 或 RNA 溶于有机相,因此是失策的。DNA 或 RNA 分溶于有机相的量,在高盐条件下随之增加。

(5) 当使用的模板 DNA 的量很少时,在酒精沉淀前加入 1 μ l(20 μ g/ μ l)糖原或 10 μ l tRNA(2 μ g/ μ l)作为载体,可减少 DNA 的损失。在沉淀 RNA 时,也可加入载体,但在体外大量合成 RNA 探针时通常不需要加入载体。

(6) 关于 DNA 标记反应:

① 加长标记反应保温的时间,可从 1 小时增加到 20 小时。

② 若模板 DNA 是特别长的 DNA 片段,它不容易完全变性,故在沸水浴中加热模板 DNA, 10min 后立即在冰/盐浴中冷却 1~2min。不要使用干热块,因它有效的温度交换较差,特别是在管的顶部(重冷凝)。

(7) 关于 RNA 标记反应:

① 用凝胶电泳检查 RNA 转录物是否达到预定的大小。有一些 DNA 顺序可以引起 RNA 聚合酶产生不完整的或短缺的转录本,遇到这些问题可将模板 DNA 重克隆到具有反向的多接头位点(如从 pSPT18 到 pSPT19)的载体上,用不同的 RNA 聚合酶转录相同的 DNA 链。若此链方向没发现问题,则转录模板 DNA 的另一链。

② 具有 3' 突出或钝端的 DNA 模板可能产生错误 DNA 链的多余转录物,除启动子驱动的转录物外,这可以被“连续”转录(“run on” transcription)所引起。用限制性酶线性化的 DNA 模板可能产生 5' 突出。

3. 杂交

(1) DNA 探针。在一般的操作中杂交条件和洗脱条件均比较严格。因此,要增加灵敏度和缩短形成信号所需的时间,可选择降低严格条件(如用 50%甲酰胺使杂交温度可降到 37℃)。最终洗脱步骤的盐浓度可以增加至 0.5 \times SSC,在多数情况下,在这些减少严格的条件下探针的非特异性结合将不会发生。

通过在杂交液中增加标记探针的浓度达到 200ng/ml,能得到比较强的杂交信号,特别是对基因组 Southern 印迹杂交更合适。

(2) RNA 探针。RNA 探针的一般杂交和洗脱条件也都是很严格的。最理想的条件可根据探针和靶 RNA 的序列和复杂性而变更,特别是关于 RNA:RNA 杂交。与 DNA:RNA 杂交相比, RNA:RNA 杂种有助于稳定性增高,使用甲酰胺和较高的温度避免非特异杂交。较低严格条件也可能增加信号,不能避免探针的非特异结合。

4. 检测过程

(1) DIG: AP, fluor: AP 和 SA: AP 贮存液第一次使用后,不必再冻存,因再冷冻将减少其活性。可在 4℃保存,新鲜配制稀释工作溶液。

(2) 比较高的轭合物浓度(如 1 : 500), 可导致较快的信号生成和比较强的信号, 但也可能引起增高背景。

(3) 在压 X 线片前增加预孵育的持续时间到 30min 或者甚至延至 12 h。

(4) 增加 X 线片曝光时间、胶卷的类型也影响灵敏度。

25.9.2. 高本底

1. 膜的选择 光学检测和化学发光检测, 虽然可使用带电荷的尼龙膜得到改善, 但某些类型的膜带过高的电荷或没有预先试验可能引起本底问题。

2. 探针的纯度

(1) 用酚/氯仿抽提和(或)酒精沉淀重纯化 DNA 或 RNA 探针。

(2) 关于特异杂交反应(特别菌落筛选)应保证标记的探针不含有质粒顺序(用凝胶电泳二次纯化插入片段)。

3. 在预杂交和杂交期间的问题

(1) DNA 探针。保证预杂交液的体积以足够让杂交膜自由地漂浮。减少杂交液中 DNA 探针的量。确保在预杂交和杂交之间膜不能变干。用单独的袋或盘供杂交和免疫学检测。

若封闭试剂在 30min 内不完全溶解, 可在微波炉中加热几分钟(但不要煮沸)。在 68℃ 水浴中保温并搅拌溶液, 该试剂将在 5min 内完全溶解。

关于菌落和噬菌体杂交, 执行二个预杂交步骤。在第一次预杂交之后, 将膜置于 2×SSC, 0.1% SDS, 100μg/ml 蛋白酶 K, 在 68℃ 保温 1 小时。然后, 在进行第二次预杂交前, 用 2×SSC, 0.1% SDS 在 68℃ 洗脱二次, 每次 15min。

(2) RNA 探针。杂交后应除去任何非杂交探针包括用 RNA 酶处理。另外, “DNA 探针”中所述建议也适用于 RNA 探针。

4. 检测

(1) 减少 DIG : AP, fluor : AP, SA : AP 轭合物在各自的工作溶液中的浓度。

(2) 增加洗脱液和封闭液的体积及洗脱和封闭的时间。

(3) 多污点的本底可能是轭合物中的沉淀所引起, 在使用之前可用短暂的离心除去这些沉淀。

(4) 缩短预保温时间。缩短发光团步骤(光学检测)或缩短对胶卷的曝光时间(光学发光检测)。必须注意: 信号的强度随时间迅速地增强。

(刘国仰)

参 考 文 献

- 王申五. 基因诊断技术——非放射性操作手册. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992
- Flickinger J L, Gebeyehu G, Buchman G et al. Nucl. Acids Res. , 1992, 20, 2382
- Hames B D and Higgins S J (ed). Gene Probe 1: A practical approach. Oxford University Press, Inc. , 1995
- Hames B D and Higgins S J (ed). Gene probes 2: A practical approach. IRL Press, Oxford, 1995
- Holtke H J, Eul L, Finken M et al. Anal. Biochem. , 1992, 207, 24
- Jablonski E, Mcmow E W, Tullis R H et al. Nucl. Acids Res. , 1986, 14, 6115
- Kessler C (ed). Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992
- Kricka L J (ed). Nonisotopic DNA Probe Techniques. Academic Press, San Diego, CA, 1992

- Kieg P A and Melton D A. *Methods in Enzymology* (ed. R. Wu). 1987, Academic Press, London. Vol. 155, 397~415
- Langer P R, Waldrop A A and Ward D C. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA*, 1981, 78, 6633
- Lichter P. T and C C. Call K et al. *Science*, 1990, 247,64
- Muhlegger K, Huber E, Eltz H et al. *Mol. Gen. Hoppe-Seyler*, 1990, 371,939
- Reischl U, Ruger R and Kessler C. In *PCR Protocols. Current Methods and Applications* (ed. B A White). Humana Press, Totowa, N J, 1993,51~62
- Ruth J L. In *Protocols for Oligonucleotide Conjugates* (ed. S. Agrawal) Humana Press, Totowa NJ, 1994,167~185

26. 核酸序列分析

核酸序列分析是分子克隆的重要技术之一。虽然近年来有了不用电泳分离方法的核苷酸探针芯片杂交测序法、质谱测序法、流动式单分子荧光测序法等,但它们仍处于完善和发展之中。而基于凝胶电泳原理的毛细管电泳激光荧光测序和超薄层凝胶激光荧光测序,包括 Pharmacia 和 ABI 等公司的 DNA 测序的自动化和测序反应的自动化、热循环测序以及应用计算机分析等除了不再应用同位素标记,改用非放射性物质标记而使用荧光或化学发光或银染读出核苷酸顺序外仍是采用了最基础的 DNA 顺序的酶学链延伸反应法和变性的聚丙烯酰胺电泳分离原理。酶学法测序的原理就是以 DNA 聚合酶延伸与待测模板杂交的引物,直到双脱氧核苷酸掺入为止。除了上述酶学法外,以末端标记的 DNA 分为四组进行四种碱基的特异的化学裂解反应,然后四组产物可根据大小在凝胶上得以分离,放射自显影后也可直接读出 DNA 的核苷酸顺序,此法称为化学法。DNA 的化学法测序目前在以足迹法测定蛋白与 DNA 的结合位点上仍起着重要的作用。

以下将相继介绍有关酶法,即末端终止法和化学法测定 DNA 核苷酸顺序的试剂、技术和方法的常用数据。

26.1. 末端终止法测序

26.1.1. 末端终止法测序有关缓冲液

Taq DNA 聚合酶 5×缓冲液: 250 mmol/L Tris-HCl, pH9.0(25℃)

50 mmol/L MgCl₂

多核苷酸激酶 10×缓冲液: 500 mmol/L Tris-HCl, pH7.5

100 mmol/L MgCl₂

50 mmol/L DTT

1.0 mmol/L 亚精胺

Klenow 酶 10×缓冲液: 70 mmol/L Tris-HCl, pH7.5

70 mmol/L MgCl₂

500 mmol/L NaCl

Klenow 酶稀释缓冲液: 100 mmol/L 磷酸钾 8.0 50% 甘油

测序酶 10×缓冲液: 400 mmol/L Tris-HCl, pH7.5

200 mmol/L MgCl₂

500 mmol/L NaCl

50 mmol/L DTT

测序酶稀释缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5

5 mmol/L DTT

0.5 mg/ml BSA

DNA 测序反应终止液: 95% 甲酰胺

10 mmol/L NaOH

0.1% 溴酚蓝
 0.1% 二甲苯氰
 TBE 10×缓冲液: 0.89 mol/L Tris-HCl, pH 8.0
 0.89 mol/L 硼酸
 20 mmol/L EDTA

26.1.2. 双脱氧核苷酸的结构图及其测序核苷酸混合液

双脱氧核苷酸的结构见图 20-1。

Taq DNA 聚合酶延伸及标记混合物: 7.5 mmol/L dGTP
 7.5 mmol/L dCTP
 8.5 mmol/L dTTP

表 26-1 Taq DNA 聚合酶常规测序核苷酸混合液成分

成分	G 反应组	A 反应组	T 反应组	C 反应组
	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)
ddGTP	25	—	—	—
ddATP	—	350	—	—
ddTTP	—	—	300	—
ddCTP	—	—	—	160
dGTP	25	250	250	250
dATP	250	25	250	250
dTTP	250	250	25	250
dCTP	250	250	250	25

表 26-2 Taq DNA 聚合酶 Deaza-GTP 测序核苷酸混合液成分

成分	G 反应组	A 反应组	T 反应组	C 反应组
	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)	混合液(μmol/L)
ddGTP	25	—	—	—
ddATP	—	350	—	—
ddTTP	—	—	300	—
ddCTP	—	—	—	160
deaza dGTP	25	250	250	250
dATP	250	25	250	250
dTTP	250	250	25	250
dCTP	250	250	250	25

表 26-3 银染法 DNA 测序核苷酸混合液成分

成分	G 反应组	A 反应组	T 反应组	C 反应组
	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)
ddGTP	45	—	—	—
ddATP	—	525	—	—
ddTTP	—	—	900	—
ddCTP	—	—	—	300
deaza dGTP	30	30	30	30
dATP	30	30	30	30
dTTP	30	30	30	30
dCTP	30	30	30	30

表 26-4 Sequenase 测序终止液成分

成分	G 反应组	A 反应组	T 反应组	C 反应组
	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)	混合液($\mu\text{mol/L}$)
ddGTP	8	—	—	—
ddATP	—	8	—	—
ddTTP	—	—	8	—
ddCTP	—	—	—	8
dGTP	80	80	80	80
dATP	80	80	80	80
dTTP	80	80	80	80
dCTP	80	80	80	80

以 160 $\mu\text{mol/L}$ dITP 替代 dGTP 时,G 终止液中用 1.6 $\mu\text{mol/L}$ ddGTP。

以 80 $\mu\text{mol/L}$ 7-deaza-dGTP 替代 dGTP 时,G 终止液中用 ddGTP 不变。

26.1.3. 模板的选择和制备

重组 M13 等的单链 DNA 是将待测的 DNA 片段体外重组入 RF 型 M13 载体,或噬菌体质粒如 pGEM-Zf 后,转化适当宿主细菌,而从培养基上清液中纯化出的适合测序的单链 DNA。而克隆入质粒、 λ 噬菌体 DNA 等载体的重组 DNA 及 PCR 的产物等的双链 DNA 作为模板,在末端终止法测序中也得到广泛的应用。

单链模板的制备:含噬菌体的培养基上清液中加入 1/4 体积的 20% PEG 6000,2.5 mol/L NaCl,室温放置 15 分钟后离心,沉淀混悬 TE 溶液后,用酚抽提、乙醇沉淀即可获得用于测序的单链 DNA。

双链模板的变性: 18 μl 2 μmol 的质粒 DNA 中加入
 2 μl 2 mol/L NaOH, 2 mmol/L EDTA
 室温 5 分钟后加入
 8 μl 5 mol/L NH_4AC , pH 7.5
 112 μl 100% 乙醇,混匀后离心
 1 ml 70% 乙醇漂洗后,干燥沉淀。

表 26-5 末端标记引物测序法模板 DNA 的用量

模板长度	模板 ng 量
200 bp 的 PCR 产物	0.5 (4 fmol)
3000~5000 bp 超螺旋质粒 DNA	100 (40 fmol)
48 000 bp λDNA	130 (4 fmol)

此时双链模板不需碱变性,在热循环测序前加一步 95℃2 分钟即可。

表 26-6 银染法所需 DNA 模板量

模板长度	模板 ng 量
200 bp 的 PCR 产物	16 (120 fmol)
3000~5000 bp 的超螺旋 DNA	2~4 μg (1~2 pmol)
48 000 bp 的 λDNA	1 μg (31 fmol)

表 26-7 ABI 公司荧光标记 ddNTP 热循环测序所需 DNA 模板量

DNA 性质	荧光引物热循环测序	荧光双脱氧终止子热循环测序	荧光引物测序	荧光双脱氧终止子测序
PCR DNA	20~200 ng	20~200 ng		0.3~1.0 μg
单链 DNA	0.6 μg	0.25~0.5 μg	2.0 μg	2.0 μg
双链 DNA	1.2~1.5 μg	1.0 μg		5 μg
粘粒 (cosmid)		0.5~2.0 μg		

热循环法测序是用 PCR 片段、单链 DNA、双链 DNA 或粘粒 DNA 等为模板,以四种(如美国 ABI 公司)或一种(如美国 Pharmacia 公司)荧光引物或荧光标记双脱氧三磷酸核糖核苷酸进行链的 PCR 延伸反应,以激光扫描和计算机记录并分析核酸顺序的方法。反应混合物中含有 1~10 μg 的质粒 DNA 或 1 μg 的基因组 DNA,10~20 pmol 引物,dNTP/ddNTP 的混合物,Taq DNA 聚合酶及反应缓冲液,在 PCR 仪上 98~99℃,5 分钟后进行 30 次循环:95℃1 分钟,55℃1 分钟,72℃2 分钟。

热循环法测序也可以同位素标记的方法进行。

26.1.4. 测序引物

测序引物在链的延伸上起着重要的作用,M13 系统中通用的 26 个碱基的测序引物的用量为 1.25 ng,但在应用末端标记的引物的 DNA 热循环测序系统中引物量需 10 pmol。

表 26-8 不同长度的引物相当于 10 pmol 的 ng 数

引物长度(核苷酸数)	相当于 10 pmol 的引物的 ng 数
15 mer	50
16 mer	53
17 mer	57
18 mer	60
19 mer	63
20 mer	67
24 mer	80
27 mer	90
31 mer	103

表 26-9 测序引物的种类及其顺序

引物名称		顺序
pBR322 引物		
EcoRI	16 核苷酸正向引物	5'-d(GTATCACGAGGCCCTT)-3'
HindIII	16 核苷酸反向引物	5'-d(GCAATTTAACTGTGAT)-3'
PstI	16 核苷酸正向引物	5'-d(GCTAGAGTAAGTAGTT)-3'
PstI	15 核苷酸反向引物	5'-d(AACGACGAGCGTGAC)-3'
SalI	15 核苷酸正向引物	5'-d(ATGCAGGAGTCGCAT)-3'
SalI	15 核苷酸反向引物	5'-d(AGTCATGCCCCGCGC)-3'
BamHI	20 核苷酸正向引物	5'-d(CACTATCGACTACGCGATCA)-3'
BamHI	16 核苷酸反向引物	5'-d(ATGCGTCCGGCGTAGA)-3'
SP6/T7 引物		
SP6 启动子	19 核苷酸引物	5'-d(GATTTAGGTGACACTATAG)-3'
T7 启动子	20 核苷酸引物	5'-d(TAATACGACTCACTATAGGG)-3'
T3 启动子	20 核苷酸引物	5'-d(ATTAAACCCTCACTAAAGGGA)-3'
pUC/M13 引物		
pUC/M13 正向	17 核苷酸	5'-d(GTTTTCACAGTCACGAC)-3'
pUC/M13 反向	17 核苷酸	5'-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3'
pUC/M13 正向	24 核苷酸	5'-d(CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC)-3'
pUC/M13 反向	22 核苷酸	5'-d(TCACACAGGAAACAGCTATGAC)-3'

26.1.5. 测序酶

下列各酶均有引物的延伸作用,但特点各异。

表 26-10 测序酶性质比较

测序酶名称	掺入速率	外切酶活性	模板	反应温度(°C)
大片段酶	每秒 10~12 个 dNTP	3'→5'	DNA	37
AMV 反转录酶	每秒 4 个 dNTP	无	DNA 或 RNA	42
Taq DNA 聚合酶	每秒大于 50 个 dNTP	3'→5'外切酶活性失活	DNA	70~80
T ₇ DNA 聚合酶	每秒大于 300 个 dNTP	3'→5'外切酶活性失活	DNA	37

26.1.6. 掺入放射性核素的有关性质

表 26-11 掺入放射性核素的有关性质

放射性核素名称	半衰期(d)	放射性比活 (mCi/mol·L)
³⁵ S-dNTP	87.4	1000
³² P dNTP	14.3	3000
γ- ³² P-ATP	14.3	3000

表 26-12 相当于 10 pmol 的不同放射性比活 γ - ^{32}P -ATP 的体积

[γ - ^{32}P]ATP	3.0 μl	3000 Ci/mol · L	10 mCi/ml
	5.0 μl	5000 Ci/mol · L	10 mCi/ml
[γ - ^{33}P]ATP	0.5 μl	6000 Ci/mol · L	135 mCi/ml
	1.0 μl	1000 Ci/mol · L	10 mCi/ml

该表供引物标记法测序参考。

26.1.7. 测序凝胶的组成

表 26-13 测序凝胶的组成(100 ml)

凝胶浓度	丙烯酰胺	甲叉丙烯酰胺 (g)	尿素 (g)	10×TBE 缓冲液 (ml)	H ₂ O (ml)	10%过硫酸铵 (μl)	TEMED (μl)
6%	5.7 g	0.3	42	10	加至 100	500	50
8%	7.6 g	0.4	42	10	加至 100	500	50
10%	9.5 g	0.5	42	10	加至 100	500	50
12%	11.4 g	0.6	42	10	加至 100	500	50
16%	15.2 g	0.8	42	10	加至 100	500	50
20%	19.0 g	1.0	42	10	加至 100	500	50

26.1.8. 测序凝胶中示踪染料相当 DNA 碱基对数

表 26-14 测序凝胶中示踪染料与 DNA 碱基对数的关系

测序凝胶浓度(%)	溴酚蓝(bp)	二甲苯蓝(bp)
5	35	130
6	26	106
8	19	70~80
10	12	55
20	8	28

26.1.9. 银染法 DNA 测序系统

银染法 DNA 测序系统是一种非放射性的酶学测序系统,它结合了热循环测序和敏感的银染程序去检测 DNA 测序胶中的带型。银染法与放射性标记法、荧光法及化学发光法等检测法相比既迅速,又经济,是一种有效的方法。

溶液

1. 固定/终止液:10%冰醋酸。
2. 染色液:0.1% 硝酸银,0.05% 甲醛。
3. 显影液:预冷的 3% 碳酸钠(10℃),用前于 2000 ml 内加入 3ml 37% 甲醛及 400 μl 1% 硫代硫酸钠,分为两份,第二份置于 0℃ 保存。

染色过程

1. 测序凝胶在固定/终止液中固定 20 分钟或过夜。
2. 超纯水漂洗凝胶三次,每次 2 分钟。
3. 染色液中染色 30 分钟。
4. 超纯水中漂洗 5~10 秒钟。
5. 1000ml 显影液中显影至第一条带出现,再以第二份显影液显影 2~3 分钟,到所有的带可见。
6. 加入 1L 固定/终止液至显影液中终止反应,再以超纯水漂洗两次,每次 2 分钟。
7. 读片。

26.2. 化学法测序

化学法测序的基本步骤为 DNA 末端的标记,单末端标记 DNA 片段的分离,碱基特异性化学降解反应,测序凝胶电泳后放射自显影和读片。

26.2.1. 用于 DNA 测序的³²P 末端标记反应

表 26-15 DNA 末端标记方法

标记的末端	标记所用酶	放射性核素原料	³² P 掺入物	DNA 单双链
5'端标记	T4 多核苷酸激酶	[γ - ³² P]-ATP 3000 Ci/mol · L	P	单、双链
3'端标记	小牛胸腺末端转移酶	[α - ³² P]-ATP 300 Ci/mol · L	(pA) _n	单、双链
3'端标记	T4 DNA 聚合酶, <i>E. coli</i> DNA 聚合酶 I	[α - ³² P]-dATP 300 Ci/mol · L	(pdN) _n	双链

26.2.2. 化学法 DNA 测序的碱基特异性裂解反应

表 26-16 碱基特异性裂解反应

反应	裂解	碱基修饰	修饰碱基的取代	链的断裂
1	G>A	硫酸二甲酯	pH7 加热	NaOH
2	A>G	硫酸二甲酯	酸	NaOH
3	C+T	胍	六氢吡啶	六氢吡啶
4	C	胍+盐	六氢吡啶	六氢吡啶
5	G	硫酸二甲酯	六氢吡啶	六氢吡啶
6	G+A	酸	酸	六氢吡啶
7	C-T	胍	六氢吡啶	六氢吡啶
8	C	胍+盐	六氢吡啶	六氢吡啶
9	A>C	NaOH	六氢吡啶	六氢吡啶
10	G>A	硫酸二甲酯	pH7, 加热	六氢吡啶
11	G	美蓝	六氢吡啶	六氢吡啶
12	T	四氧化钨	六氢吡啶	六氢吡啶

R1—R4、R5 R8、R9—R12 分别为三组反应,可任选一组进行测序。

26.2.3. 碱基特异性裂解反应过程

测定末端标记 DNA 核苷酸顺序的四种碱基特异性反应过程的小结如下表。

表 26-17 化学法测序特异碱基反应过程

G	G+A	C+T	C
200 μ l 甲基化缓冲液	2 μ l 吡啶缓冲液, pH 2	10 μ l H ₂ O	15 μ l 5mol/L NaCl
5 μ l [³² P]DNA	10 μ l H ₂ O	10 μ l [³² P]DNA	5 μ l [³² P]DNA
1 μ l DMS	10 μ l [³² P]DNA	30 μ l 胍	30 μ l 胍
206 μ l	22 μ l	50 μ l	50 μ l
20°C, 10±5 min	20°C, 60±20 min	20°C, 10±5 min	20°C, 10±5 min
50 μ l 甲基化反应终止液	冷冻	200 μ l 胍终止液	200 μ l 胍终止液
750 μ l 乙醇	冷冻干燥	750 μ l 乙醇	750 μ l 乙醇
冷冻 5 min	—	冷冻 5 min	冷冻 5 min
离心 5 min	20 μ l 水	离心 5 min	离心 5 min
沉淀物	冷冻干燥	沉淀物	沉淀物
250 μ l 0.3 mol/L NaAc	—	250 μ l 0.3 mol/L NaAc	250 μ l 0.3 mol/L NaAc
750 μ l 乙醇	—	750 μ l 乙醇	750 μ l 乙醇
冷冻 5 min	—	冷冻 5 min	冷冻 5 min
离心 5 min, 沉淀加	—	离心 5 min, 沉淀加	离心 5 min, 沉淀加
100 μ l 1.0 mol/L 六氢吡啶	100 μ l 1.0 mol/L 六氢吡啶	100 μ l 1.0 mol/L 六氢吡啶	100 μ l 1.0 mol/L 六氢吡啶
90°C, 30 min	90°C, 30 min	90°C, 30 min	90°C, 30 min
冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥
10 μ l 水	10 μ l 水	10 μ l 水	10 μ l 水
冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥
10 μ l 水	10 μ l 水	10 μ l 水	10 μ l 水
冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥	冷冻干燥
10 μ l 甲酰胺-NaOH-染料	10 μ l 甲酰胺-NaOH-染料	10 μ l 甲酰胺-NaOH-染料	10 μ l 甲酰胺-NaOH-染料
90°C, 1 min	90°C, 1 min	90°C, 1 min	90°C, 1 min
迅速冷却	迅速冷却	迅速冷却	迅速冷却
测序胶上样	测序胶上样	测序胶上样	测序胶上样

26.3. 核酸序列数据库

Internet 中有关核酸序列的资源很多,大至 Genbank 这样包括所有已知核酸序列的数据库,小至各种仅收录特定序列的数据库以及各种核酸序列分析软件。这里对部分常用的数据库作一介绍,主要介绍几个大型的核酸序列数据库如 Genbank、EMBL、DDBJ、GSDB 和一些有用的特定序列数据库以及有用的序列分析软件资源。这些数据库对全世界开放,提供无偿服务。使用者可以通过分布在世界各地的 Internet 网中的一些服务器(Server)查寻它们,这些服务器上装有各种查寻软件。许多数据库还提供 E-mail 服务,因此也可以通过 E-mail 查寻。这里,我们的主要目的是提供一些 WWW 地址或 E-mail 地址,供大家参考,至于具体的查寻方法可以通过这些地址方便地查到。对常用的查寻方法如在数据库中进行同源比较(Blast)和从数据库中获取序列(Retrieve)的方法在此作一简单介绍。此外还列出了一些其它有用的生物学资源的地址。

26.3.1. Genbank 等大型核酸序列数据库

1. Genbank、EMBL、DDBJ 和 GSDB Genbank、EMBL、DDBJ 和 GSDB 是四个大型序列数据库。Genbank 是由美国 NIH 国家医学实验室建立和维持的。它收集了所有已知的核酸序列,包括所有已发表的和许多未正式发表的序列,其内容每天更新。EMBL 由英国剑桥的欧洲生物信息研究所(European Bioinformatics Institute, EBI)建立和维持。DDBJ 为日本的 DNA 数据库。GSDB 由美国新墨西哥州的国家基因组资源中心(National Center for Genome Resources in Santa Fe, New Mexico)建立和维持。这四大数据库相互之间共享信息,因此它们的内容基本相同。一般情况下在 Genbank 中得到的某个序列也总可以在其他三个数据库中得到。另外,虽然这些数据库主要目的是储存 DNA 序列数据,通过它们还可以得到许多相关的分子生物学信息和文献信息。使用者可以通过 Internet 上的多个服务器查寻这些数据库,也可以通过 E-mail 查寻。表 26-18 列出了部分服务器的 E-mail 地址以及这些服务器所能实现的功能(其中还包含了一些蛋白序列分析的服务器和序列分析软件)。注意:有关这些服务器的使用方法,如 E-mail 内容的格式,用什么命令等等可以通过向这些地址发一封内容为 help 的 E-mail,回信将会给出详细的使用方法。有关这四大数据库的详细情况可以从以下 E-mail 地址和 WWW 地址得到。

Genbank	info@ncbi.nlm.nih.gov http://www.ncbi.nlm.nih.gov
EMBL	datalib@ebi.ac.uk http://www.ebi.ac.uk
DDBJ	ddbj@ddbj.nig.ac.jp http://www.nig.ac.jp
GSDB	gsdb@gsdb.ncgr.org http://www.ncgr.org

在 WWW 网上,通过上述主页(homepage)进入,也可以在网上直接进行查寻。

2. BLAST 和 RETRIEVE 最常用的查寻是源性比较和 DNA 序列的获取。比如在实验中克隆到一个 DNA 片段后,首先需要知道它是不是一个新序列,是否有同源序列存在。这就可以通过同 Genbank 等数据库进行同源比较得到回答。并且可以从数据库中获取其同源序列,以便作进一步的分析。进行同源比较最常用的软件是 Blast, DNA 序

列获取最常用的软件是 Retrieve。它们由美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)建立。在 WWW 网上,使用者可以通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 进入 Blast 和 Retrieve。但通常是采用 E-mail 方法做 Blast 和 Retrieve,通过给这两个服务器发一封带有特定格式和命令的 E-mail,很快就可以收到带有详细查寻结果的回信,短则数分钟,长则数天。下面简单介绍 Blast 和 Retrieve 的 E-mail 格式和命令。

(1) BLAST

E-mail 地址: blast@ncbi.nlm.nih.gov

E-mail 格式:

Program blastn

Datalib nr

Expect 0.75

Begin

>Clone1<

tcgataggttacgaaattcag.....

说明:

Program blastn	是一条必需有的命令。指明要比较的序列为核酸序列。蛋白序列比较时用 blastp。
Datalib nr	也是必需命令。指出比较的数据库名称。表 2 给出了可以通过 BLAST 查寻的数据库名称及其缩写名。使用者可以根据不同的目的选择一定的数据库。“nr”(non-redundant)为复合核酸数据库(the combined nucleic acids database)。注意:一个 E-mail 只能指定一个数据库。
Expect 0.75	非必需命令。数值决定同源性的域值,数值越小同源性越高,给出的同源序列越少。其缺省值为 10。
Begin	必需命令。指出命令已结束,其后为比较的序列。
>Clone1<	非必需命令。序列描述行,使用者可以在此给自己的序列取名或加注说明。
tcgataggttacgaaattcag.....	进行比较的序列。注意每行的字符数必须少于 80 个,并且每封 E-mail 只能有一个 DNA 序列。序列按 IUB/IUPAC 格式。

有关其他可供选择的非必需命令可以通过发一封内容为 help 的 E-mail 得到。另外还需要注意的是在发 E-mail 时两个 E-mail 间应该有 1~2 分钟的间隔时间,否则易出错。

比较的结果以 E-mail 形式自动发回,将给出同源序列的号码(accession number)以及同源程度,并给出同源区域的比较排列情况。

(2) RETRIEVE

E-mail 地址: retrieve@ncbi.nlm.nih.gov 或 retrieve@ebi.ac.uk

E-mail 格式:

Datalib Genbank

maxdocs 3

Begin

SHC

说明:

Datalib Genbank	必需命令。指定所要查寻的数据库。表 26-19 列出了可以通过 RETRIEVE 查寻的数据库名称及其缩写名。注意:一个 E-mail 只能指定一个数据库。
maxdocs 3	非必需命令。指定查寻后返回的序列数的最大值。其最大允许值为 2400,缺省值为 20。
Begin	必需命令。指明命令行已结束,其后为要查寻的内容。
SHC	所要查寻的内容。可以是 Genbank 号码(accession number)也可以是某个关键词(keyword)(如这里是 SHC 蛋白名)。同一个 E-mail 中可以同时有多个 accession number,相互间用空格分开;也可以有多个关键词,并可以使用 AND、OR、NOT 等逻辑词。

还可以在 E-mail 中设定其他一些参数,以便使返回的内容更符合自己的要求。有关这方面的内容可以通过发一封内容为 help 的 E-mail 得到。

比较的结果以 E-mail 形式自动发回。将给出查到的多个序列,已知基因还给出其蛋白序列。另外,还给出各序列的出处,已发表的序列将给出发表杂志,可以由此查到相关的文献。

26.3.2. 特定序列数据库和一些序列分析软件

虽然 Genbank 等数据库已经包括了所有已知的核酸序列,人们还另外建立了一些专门的核酸序列数据库,以满足特定核酸序列查寻的需要。如表达序列(EST)数据库、Motif 数据库、真核启动子序列数据库、分子生物学载体序列数据库等等。查寻这样的数据库得到的信息往往更加详细。实际上许多这样的数据库已不再仅仅是序列数据库,而是各种信息综合在一起的数据库。这里给出这类数据库的一些地址。另外还给出部分序列分析软件的地址,使用者可以将软件拷到自己的计算机上后进行序列分析,也可以直接在网进行分析。

1. dbEST 数据库

WWW 地址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>

dbEST 数据库包含大量的 cDNA 序列及其定位信息。实际上它是 Genbank 中的一个分库,但在 dbEST 数据库中注释更加详细。查寻结果中将给出联系地址,如果 EST 已经被定位还给出遗传定位,同时还会说明如何向 ATCC(American Type Culture Collection)以及其他一些地方索取某个 EST 克隆质粒等。dbEST 数据库可以通过 E-mail 进行 BLAST 和 RETRIEVE 查寻。

2. Motif 数据库和 DOMAIN 数据库

这里的 Motif 是指蛋白的功能域。Motif 数据库包含了所有已知的蛋白功能域,DOMAIN 数据库包含所有已知的结构域。如果克隆到一个 cDNA 序列或得到一个新的蛋白后,想进一步了解其功能,那么首先应该查寻这样的数据库,就可以很快知道得到的 cDNA 或蛋白中有没有已知的结构域或功能域。常用的 Motif 数据库有 BLOCKS 和 PROSITE/MotifDic。PROSITE/MotifDic 要求输入的序列为蛋白序列;BLOCKS 要求的输入序列为核酸序列,它自动将核酸序列在 6 个阅读框架上转换为蛋白序列,然后与数据库进行比较。常用的 Domain 数据库有 ProDom 和 SBASE。SBASE 还可用 FASTA 或 BLAST 查寻。

E-mail 地址:

BLOCKS blocks@howard.fhrc.org

PROSITE/MotifDic motif@genome.ad.jp
ProDom prodom@toulouse.inra.fr
http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html
SBASE sbase@icgeb.trieste.it
http://www.icgeb.trieste.it

有关的查寻方法可以通过向上述地址发一封内容为 help 的 E-mail 得到。

3. 转录因子及其顺式调控元件数据库和真核启动子数据库

真核启动子数据库 EPD(Eukaryotic Promoter Database)包括 EMBL 核酸序列数据库中的真核启动子序列,用于真核转录信号的分析。可以用 BLAST 和 RETRIEVE 进行查寻。转录因子数据库 TFP(Transcription Factor Database)包含大量转录因子及其识别位点,也可以用 BLAST 和 RETRIEVE 进行查寻。真核转录因子和识别位点数据库 TRANSFAC(Transcription Factors and Sites)包含大量真核顺式调控元件和反式作用因子。

地址:

EPD(Eukaryotic Promoter Database): gopher://gopher.gdb.org/77/.INDEX/epd
TFP(Transcription Factor Database): http://dapsas.weizmann.ac.il/bcd/bcdparent/databanks/tfd.html
tfdhelp@ncbi.nlm.nih.gov

TRANSFAC (Transcription Factors and Sites): http://transfac.gbf-braunschweig.de/welcome.html

4. 分子生物学载体序列数据库

地址: http://biology.queensu.ca/~miseners/vector.html

包含大量载体序列,并且同各大公司的载体序列库相连。

5. GRAIL

地址: http://avalon.epm.ornl.gov/gallery.html
grail@ornl.gov

GRAIL 是一个编码序列识别和基因结构预测软件。用它可以进行三类序列分析:编码序列识别(GRAIL 1),外显子预测(GRAIL 2)和基因整合(GAP 3)。GRAIL 1既可用于基因组序列也可用于 cDNA 的编码序列识别。GRAIL 2 和 GAP 3 只适用于基因组序列的分析。GAP 3 目前没有 E-mail 服务。

6. 基因检别(gene Identification)软件

如何从基因组序列中检别出整个基因或外显子有许多软件可供选择,往往每个软件都有其最适用的生物种类。作这类分析要求 DNA 序列有足够的长度。

BCM Genefinder System service@bchs.uh.edu
http://condor.bcm.tmc.edu/Genefinder/genefinder.html
适用于人类 DNA 序列。剪接位点预测(HSPL),内部外显子预测(HEXON),5'和 3'外显子预测(FEXH),基因结构预测(FGENEH)。

EcoParse ecoparse@cse.ucsc.edu
适用于大肠杆菌 DNA 编码蛋白的基因的识别。

GeneID geneid@bir.cedb.uwf.edu
http://www.imim.es/GeneIdentification/Geneid/geneid

	input.html
	适用于脊椎动物 DNA。
GeneParser	http://beagle.colorado.edu/~eesnyder/GeneParser.html
	适用于人类基因组编码蛋白的外显子的检别。
Grail	同 5
	适用于人类基因组。

7. PromoterScan

PromoterScan 为真核序列 Pol II 转录起始位点预测软件。该软件可以从 Dan Prestridge 处得到, E-mail 地址: danp@biosci.cbs.umn.edu

26.3.3. 其他有用的生物系资源

PIR

<http://www.gdb.org/Dan/proteins/pir.html>

Swiss-Prot

http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/swiss-prot-db/swisshome.html

OWL

<http://www.gdb.org/Dan/proteins/owl.html>

CAD(Chromosome Abnormality Database)

http://www.hgmp.mrc.ac.uk/local-data/Cad_Preamble.html

GDB(Genome Database)

<http://gdbwww.gdb.org/gdbhome.html>
 mailserv@gdb.org

MGD(Mouse Genome Database)

<http://www.informatics.jax.org/mgd.html>
 mgi-help@informatics.jax.org

OMIM

<http://gdbwww.gdb.org/gdhome.html>
 mailserv@gdb.org

TBASE(Transgenic Animals)

<http://www.gdb.org/bio/search-sfz/TBASE/tbase>

Tumor Gene Database

<http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu;8088/bio/bio.home.html>

PROSITE

<http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>

LIMB(Listing of Molecular Biology Database)

limb@life.lanl.gov

Pedro's Biomolecular Research Tools

http://www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html

Washington University EST(Merk)Database

http://genome.wustl.edu/est/est_general/est_project_intro.html

WWW Virtual Library: Yeast

<http://genome-www.stanford.edu/VL-yeast.html>

The C. elegans Genome Project WWW Site - Sanger Center

<http://www.sanger.ac.uk/>

FlyBase

<http://morgan.harvard.edu/>

Microbiology Virtual Library

<http://golgi.harvard.edu/biopages/micro.html>

The Plant Genome Data and Information Center (PGDIC)

<http://www.nalusda.gov/answers/info-centers/pgdic/pgdic.html>

Molecular Biology Protocols

<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols.html>

表 26-18 E-mail 服务器和地址以及其功能

服务器名称	E-mail 地址	功能
BLAST	blast@ncbi.nlm.nih.gov	Similarity
RETRIEVE	retrieve@ncbi.nlm.nih.gov retrieve@ebi.ac.uk	Retrieve Retrieve
RETRIEVE dbEST	retrieve@ncbi.nlm.nih.gov	Retrieve
RETRIEVE dbSTS	retrieve@ncbi.nlm.nih.gov	Retrieve
BICSERV	bicserv@sgbed.weizmann.ac.il	Similarity
BIOSERVE	bioserve@temin.lanl.gov	Retrieve
EBI NETWORK		
FILE SERVER	netserv@ebi.ac.uk	Retrieve
BLITZ	blitz@ebi.ac.uk	Similarity
GDB/OMM MAIL SERVER	mailserv@gdb.org	Retrieve
BIOSCAN	bioscan@cs.unc.edu	Similarity
DFLASH	dflash@watson.ibm.com	Similarity
GENQUEST	q@ornl.gov	Similarity
QUICK	quick@ebi.ac.uk	Similarity
FLAT DE EMAIL	flat-netserv@smlab.eg.	
NETWORK SERVER	gunma-u.ac.jp	Similarity&Retrieve
EBI MAIL-FASTA	fasta@ebi.ac.uk	Similarity
GENIUSNET MAIL-FASTA	mfasta@genius.embnet.dkfz- heidelberg.de	Similarity
GENIUSNET	netserv@genius.embnet.dkfz- heidelberg.de	Retrieve
PIR NETWORK		
REQUEST SERVER	fileserv@nbrf.georgetown.edu	Similarity&Retrieve
PDB EMAIL FILE SERVER	fileserv@pbl.pdb.bnl.gov	Retrieve
DOMAIN	domain@hubi.abc.hu	Similarity
MOTIF	motif@genome.ad.jp	Similarity
BLOCKS	blocks@howard.flere.org	Similarity
PRODOM	prodorn@toulouse.inra.fr	Similarity&Protein Analysis
SBASE	sbase@icgeb.trieste.it	Similarity
EBI MAIL-PROSITE	prosite@ebi.ac.uk	Similarity
GENEFINDER	service@bchs.uh.edu	Gene Prediction
GENEID	geneid@bir.cedb.uwf.edu	Gene Prediction
GRAIL	grail@ornl.gov	Gene Prediction&Protein Analysis
HUGEMAP	hugemap@genethon.fr	Gene Prediction
NETGENE	netgene@virus.fki.dth.dk	Gene Prediction
GENMARK	genmark@ford.gatech.edu	Protein Analysis
PREDICTPROTEIN	predictprotein@embl-heidelberg.de	Protein Analysis
MOWSE	mowse@dl.ac.uk	Protein Analysis
PSORT	psort@nibb.ac.jp	Protein Analysis

表 26-19 BLAST 和 RETRIEVE 可以查寻的数据库及其缩写名

服务器	数据库	缩写名	
BLAST	Genbank to last major release	gb	
	Genbank update to last major release	gbupdate	
	EMBL Data library to last update	emb	
	3D Brookhaven Protein Databank	pdb	
	Alu repeats from REPBASE	alu	
	Vector subset of Genebank. NCBI	vector	
	Kabat's database of sequences of immunological interest	kabat	
	Expressed Sequence tags (ESTS)	dbest	
	Sequence Tagged sites (STS)	dbsts	
	Eukaryotic Promoter database	ep	
	Swiss-Prot, PIR(R), GenPept and GenPept updates	nr	
	Swiss-Prot	sp	
	Last major release of NBRF PIR(r)	pir	
	Swiss-Prot update	sp	
	Translated Genbank and update	gp	
	Brookhaven PDB	pdb	
	Kabat's database	kabat	
	Transcription factors database	tfd	
	Ancient Conserved region subset of Swiss-Prot	acr	
	RETRIEVE	Genbank	gb
		Genbank update	gbu
		Genebank full release	gbonly
		EMBL DNA	embl or emb
		EMBL update	emblu
		EMBL full release	emblonly
		Swiss-Prot	sp
		Swiss-Prot update	spu
		PIR	pir
		Vector subset of Genbank	vector
		Vecbase	vecbase
		GenPept	gp
GenPept update		gpu	
Kabat's database		kabatnuc	
Kabat's database-protein		kabatpro	
Eukaryotic promoter database		epd	
Protein Data Bank (PDB)		pdb	
Transcription Factors		tfd	

(黄秉仁 陈雨亭)

参 考 文 献

- Doyle K, Miles J. *Protocols and Applications Guide*. Promega Corporation, 1996
- Frederick M A, Roger B, Robert E K, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1995
- Lloyd M S, Jane Z S, Robert J, et al. Fluorescence Detection in Automated DNA Sequence Analysis. *Nature*, 1986, 321:674
- Maxam A M, Gilbert W. A New Method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977, 74:560.
- Nucleic Acid Research*, 1996, Vol 24 No 1, 1~252
- Nucleic Acid Research*, 1997, Vol 25 No 1, 1~282
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1977, 74:5463
- Swindell S R, Miller R R and Myers G A eds. *Internet for the Molecular Biologists*. Horizon Scientific Press, England, 1996

27. 常用的克隆载体和宿主系统

27.1. 质粒载体

质粒是一种环状的双链 DNA 分子,可独立于细菌染色体之外进行复制和遗传,但需由宿主提供某些酶和蛋白质来完成复制和转录。用于克隆技术的质粒载体通常含有以下几个基本元素。

1. 复制子 宿主内质粒的拷贝数主要由其所含复制子的类型所决定。复制子即复制起始区,包含控制质粒拷贝数的基因及质粒 DNA 复制起点等遗传要素。

复制子主要分为松弛型复制子和严紧型复制子两类。松弛型复制子的复制不需要质粒自身所编码的蛋白质,完全依靠由宿主提供复制所需的酶,即使自身蛋白质合成受阻时,也可以继续进行复制,因此带有这类复制子的质粒在每个宿主细胞中的拷贝数可达几百甚至几千个。目前用于分子克隆的大多数质粒载体都为松弛型载体,因为它们可获得更高的 DNA 产率,并可增加由克隆基因所表达的蛋白质的产量。松弛型质粒载体所携带的复制子主要有 pMB1(如 pBR322 及其衍生质粒、pUC 系列等)和 ColE1 等。严紧型质粒载体的复制需要质粒自身编码蛋白质的参与,因此其复制较严格,通常在每个宿主细胞中的拷贝数仅为几个。严紧型质粒载体主要用来分离一些在多拷贝质粒中大量表达时可导致宿主死亡的功能性基因,这类载体所携带的复制子主要有 p15A 和 pSC101 等。

通常,一个质粒只含有一个复制子。只有在极少数的情况下,如通过融合所产生的质粒会有一个以上的复制子,但只有其中一个复制子具有活性。

2. 选择标记 主要用来鉴定经转化而带有质粒的宿主细菌。由质粒编码的这些选择标记可赋予其宿主某些新的表型,使其易于识别。

最常用的选择标记是抗生素抗性基因。所涉及的抗生素包括氨苄青霉素(Amp)、四环素(Tet)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Kan)和新霉素(Neo)等。这些抗生素的作用机制各异,但基本上是通过干扰和阻断正常的蛋白质合成及作用,导致细菌死亡。含有质粒的细菌由于被赋予了拮抗抗生素的表型,故能在含有抗生素的环境中生长,从而达到被分离鉴定的目的。目前几乎所有常用的质粒都带有一个或多个抗生素抗性基因。

在某些特殊用途中,偶尔也使用其他性质的选择标记。如琥珀抑制基因 *supF*,该基因负责编码细菌的抑制性 tRNA,可抑制由另一相容质粒所携带的四环素和氨苄青霉素抗性基因上的琥珀突变。这种抑制作用使同时带有这两种质粒的细胞能够产生四环素和氨苄青霉素抗性。

3. 多克隆位点(multiple cloning site, MCS) 质粒载体都含有人工合成的、由多个限制性内切酶所识别的位点密集排列而成的序列,称为多克隆位点。通常情况下,这些限制性酶切位点在载体内都是单一的。

在克隆操作中,可根据插入片段的特点灵活地使用多克隆位点上不同的酶切位点,从而大大方便了克隆、鉴定、亚克隆等一系列与克隆操作相关的工作。

以上是质粒载体所必需的三个基本元素。除此之外,不同的质粒载体还含有一些不同用途的辅助序列,如产生单链 DNA 分子、体外转录外源基因、促进外源基因的大量表达及通过组织化学方法鉴定重组质粒等的序列。

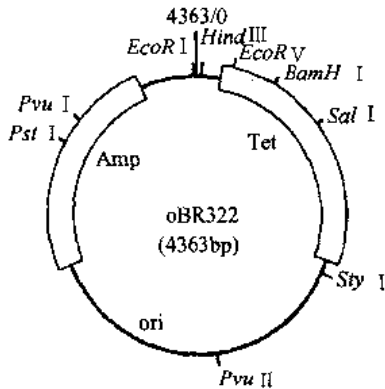


图 27-1 pBR322 的质粒图谱

27. 1. 1. 克隆载体

1. pBR322 载体及其衍生质粒

pBR322 是早期克隆载体的经典代表,目前已较少使用,多被用作构建新克隆载体的起始材料(图 27-1)。载体含有两个抗性基因——氨苄青霉素抗性基因(基因内有 Pst I 和 Pvu I 位点)和四环素抗性基因(基因内有 Hind III、BamH I 和 Sal I 等位点),外源片段插入任一抗性基因内都会造成此选择标记的失活,通过负筛选鉴定重组克隆。

定重组克隆。

pBR322 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
4. 36kb	无	Amp, Tet	无	无	无	M13

pBR328(boehringer mannheim 公司)由 pBR322 衍生而来,除去 pBR322 的特征外,还含有一个氯霉素抗性基因,基因内含 EcoR I、Pvu II 和 Bal I 的单一一切点,外源片段可在此插入而使基因失活,再通过负筛选鉴定重组克隆。

2. pUC 载体及其衍生质粒

这是一类可用组织化学方法鉴定重组克隆的质粒载体。pUC 载体由 pBR322 的氨苄青霉素抗性基因和复制子及大肠杆菌 β -半乳糖苷酶 α (lacZ α)基因融合而成。lacZ α 基因含有 lacZ 启动子,编码 β -半乳糖苷酶氨基端的 α 互补肽段,该肽段能与宿主编码的缺陷型 β -半乳糖苷酶实现基因内互补(α 互补)。在异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导下,含有 pUC 载体的宿主可同时合成这两种肽段,在铺有生色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)的培养基上,形成蓝色菌落。而当外源片段插入位于 lacZ α 基因内的多克隆位点时,会造成 lacZ α 基因的失活,破坏 α 互补作用,使带有重组克隆的宿主形成白色菌落。

此外,利用 pUC 载体还可进行外源片段的融合表达。由于在 lacZ α 基因内含有起始 ATG 及核糖体结合位点(RBS),故外源片段可以在 lacZ 启动子的控制和 IPTG 的诱导下,以 β -半乳糖苷酶 α 互补肽段融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。

常用的 pUC 载体及其衍生质粒的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
pUC18/19	2.7kb	13	Amp	有	无	无	M13
pUC118/119	3.2kb	13	Amp	有	M13	无	M13
pcDNA2.1	3.0kb	17	Amp	有	f1	T7	M13, T7
pGEM-Z	2.7kb	13	Amp	有	无	T7, SP6	M13, T7, SP6
pGEM-Zf	3.0kb 左右	依载体而定	Amp	有	f1	T7, SP6	M13, T7, SP6
pHellx1/2	3.0kb	13	Amp	有	f1	T3, T7	M13, T3, T7
pLITMUS	2.8kb	17~18	Amp	有	M13	T7	M13, T7
pSP64/65	3.0kb	11	Amp	有	无	SP6	M13, SP6
pSP70/71	2.4kb	7	Amp	有	无	T7, SP6	M13, T7, SP6
pBluescript II	3.0kb	21	Amp	有	f1	T3, T7	M13, T3, T7
pBC	3.4kb	21	Cm	有	f1	T3, T7	M13, T3, T7

pUC18/19

pUC18/19 是目前最常使用的 pUC 载体(图 27-2)。pUC18 与 pUC19 的差别在于多克隆位点方向相反。

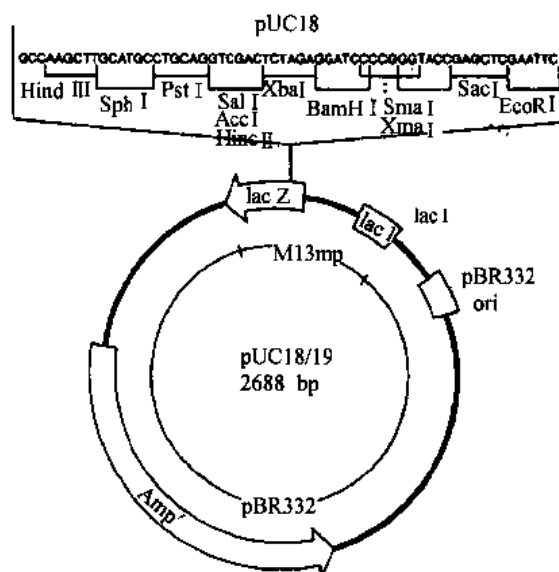


图 27-2 pUC18/19 的质粒图谱

pUC118/119

pUC118/119 是在 pUC18/19 的基础上,插入单链丝状噬菌体 M13 基因组复制起始与终止,及 DNA 包装进入噬菌体颗粒所必需的顺式序列。当宿主被适当的丝状噬菌体(辅助噬菌体, help phage)感染时,可合成质粒 DNA 的一条链,并包装进入子代噬菌体

颗粒。这样,可从噬菌体颗粒中得到大量的质粒单链 DNA,可作为测序、突变及制备探针的模板。pUC118/119 的多克隆位点与 pUC18/19 相同。

pcDNA2.1 (Invitrogen 公司)

pcDNA2.1 由 pUC19 衍生而来,除加入了单链丝状噬菌体 f1 复制子序列外,还增加了多克隆位点的数目。pcDNA2.1 的多克隆位点有: Apa I, Xba I, Nsi I, Sph I, Xho I, Xma III, Not I, BstX I, EcoR V, Pst I, EcoR I, Spe I, BamH I, Sac I, Kpn I, Hind III, Nsi I。

pGEM-Z, pGEM-Zf (Promega 公司)

pGEM-Z 是在 pUC 载体的基础上于多克隆位点的两侧分别加上来源于 T7 和 SP6 噬菌体的启动子。这样,在依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶和核糖核苷酸前体的存在下,外源片段可在体外得到转录。以这种方式产生的 RNA 可用作杂交探针,也可用于在无细胞蛋白质合成体系中进行翻译。pGEM-3Z/4Z 是 pGEM-Z 中两种常用的克隆载体,二者的差别仅在于 SP6 和 T7 启动子的方向不同。pGEM-3Z/4Z 的多克隆位点与 pUC18/19 相同。

pGEM-Zf 由一系列载体, pGEM-3Zf(+/-), pGEM-5Zf(+/-), pGEM-7Zf(+/-), pGEM-9Zf(-), pGEM-11Zf(+/-) 及 pGEM-13Zf(+) 组成。pGEM-Zf 是在 pGEM-Z 的基础上增加了线状噬菌体 f1 的复制子。这些载体的主要区别在于多克隆位点不同,而 pGEM-Zf(+) 与 pGEM-Zf(-) 的差别在于 f1 复制子的方向不同。pGEM-Zf 常用的多克隆位点有: EcoR I, Sac I, Kpn I, Ava I, Sam I, BamH I, Xba I, Sal I, Acc I, Hinc II, Pst I, Sph I, Hind III (pGEM-3Zf); Apa I, Aat II, Sph I, Nco I, Sac II, EcoR V, Spe I, Not I, Pst I, Sal I, Nde I, Sac I, BstX I, Nsi I (pGEM-5Zf); Apa I, Aat II, Sph I, Xba I, Xho I, EcoR I, Kpn I, Sma I, Csp45 I, Cla I, Hind III, BamH I, Sac I, BstX I, Nsi I (pGEM-7Zf); Nsi I, Spe I, Hind III, Xba I, EcoR I, Sal I, Sac I。此外,在 SP6 和 T7 启动子的两侧分别有 Not I 和 Sfi I 的位点,可将带有启动子的外源片段完整地切下 (pGEM-9Zf); Sfi I, Sac I, EcoR I, Sal I, Xho I, BamH I, Apa I, Xba I, Not I, Nsi I, Hind III (pGEM-11Zf); Not I, Sfi I, Hind III。主要用于由 λ gt11 Sfi I/Not I 所构建克隆的亚克隆 (pGEM-13Zf)。

pHellx1/2 (BOEHRINGER MANNHEIM 公司)

pHellx1/2 由 pUC19 衍生而来,增加了 f1 单链复制子和 T3、T7 启动子序列。此外,在多克隆位点附近有一段可形成三股螺旋的序列。当外源片段克隆后,利用多克隆位点两侧的 Swa I 或 Bss HII 酶切位点将外源片段连同三股螺旋序列完整地切下,再通过生物素化的探针捕获,即可纯化外源片段。pHellx1 和 pHellx2 的差别在于多克隆位点的方向不同。pHellx 的多克隆位点与 pUC19 相同。

pLITMUS (New England Biolabs 公司)

pLITMUS 由 pUC19 衍生而来,增加了 M13 单链复制子和 T7 启动子序列,并加入了一些新的多克隆位点,载体包括 pLITMUS28/29、pLITMUS38/39 等。pLITMUS 28/29 和 pLITMUS38/39 的差别在于多克隆位点内 SnaB 和 Stu I 间的序列不同,而 pLITMUS28、pLITMUS29 及 pLITMUS38、pLITMUS39 间的差别则在于多克隆位点的方向不同。pLITMUS 的多克隆位点有: Bgl II, Nsi I, BssH II, BsiW I, Xho I, EcoR I, Pst I, EcoR V, BamH I, Hind III, Nco I, Aat II, Age I, Xba I, Avr II, Sac I, Kpn I,

Stu I (pLITMUS28/29); Apa I, Mfe I, NgoM I, Kas I, Hind III, Pst I, EcoR V, BamH I, EcoR I, Nhe I, Eag I, Mlu I, BspE I, BsrG I, Sph I, Sal I, Stu I (pLITMUS38/39)。

pSP (Promega 公司)

pSP 由一系列载体, pSP70/71, pSP72/73, pSP64/65 及 pSP64 Poly(A) 组成。pSP64/65和 pSP64 Poly(A) 仅在多克隆位点的一侧加入了 SP6 启动子序列。pSP64 和 pSP65 的差别在于多克隆位点的方向不同, 而 pSP64 Poly(A) 则是在多克隆位点的 Sac I 和 EcoR I 间插入了一个 poly(A)₃₀ 序列, 利用它可体外转录出带有 poly(A) 的 RNA 序列。pSP64/65 和 pSP64 Poly(A) 的多克隆位点与 pUC19 相同。

pSP70/71 是在 pSP64/65 多克隆位点的无启动子一侧插入了 T7 启动子的序列, 而 pSP72/73 则主要是对 pSP70/71 的多克隆位点进行了改进, 增添了一些常用的位点。pSP70/71, pSP72/73 的多克隆位点有: Xho I, Pvu II, Hind III, EcoR I, Cla I, EcoR V, Bgl II (pSP70/71); Xho I, Pvu II, Hind III, Sph I, Pst I, Sal I, Acc I, Xba I, BamH I, Sma I, Kpn I, Sac I, EcoR I, Cla I, EcoR V, Bgl II (pSP72/73)。

pBluescript II (STRATAGENE 公司)

pBluescript II 是在以 pUC 为骨架的 pBluescript 的基础上改进而来, 主要是在 T3 和 T7 启动子的两侧各加入一个 BssH II 位点, 利用它可将外源片段连同启动子完整地切下。pBluescript II 包含多克隆位点相反的两个载体 pBluescript II SK 和 pBluescript II KS, 而每个载体又由 f1 方向相反的两个载体 pBluescript II SK +/- 和 pBluescript II KS +/- 组成。pBluescript II 的多克隆位点有: Sac I, BstX I, Sac II, Eag I, Not I, Xba I, Spe I, BamH I, Sma I, Pst I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Cla I, Sal I, Hinc II, Acc I, Xho I, Dra II, Apa I, Kpn I。

pBC (STRATAGENE 公司)

pBC 是用氯霉素抗性基因替代 pBluescript II 中的氨苄青霉素抗性基因而后得。当从含氨苄青霉素抗性基因的载体进行亚克隆时, 利用此载体可方便地进行筛选。pBC 也由 pBC SK +/- 和 pBC KS +/- 组成, 其它特征与 pBluescript II 相同。

3. pACYC 载体

pACYC 是一类含有 p15A 复制子的严紧型质粒载体, 可与以 ColE1, pMB1 为复制子的松弛型质粒载体共存于宿主细胞内, 主要是通过负筛选获得重组克隆。由于其拷贝数较低, 需用抗生素进行扩增。pACYC 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
4.0kb 左右	无	依载体而定	无	无	无	无

pACYC177 (New England Biolabs 公司)

pACYC177 含有氨苄青霉素抗性基因和卡那霉素抗性基因两个选择标记。外源片段可在氨苄青霉素抗性基因的 Hinc II 和 Pst I 位点或卡那霉素抗性基因的 Cla I, Hind III, Sma I 和 Nru I 位点插入而造成任一选择标记的失活。需用氯霉素进行扩增。

pACYC184 (New England Biolabs 公司)

pACYC184 含有氯霉素抗性基因和四环素抗性基因两个选择标记。外源片段可在氯霉素抗性基因的 Nco I 和 EcoR I 位点或四环素抗性基因的 EcoR V、BamH I、Sph I、Sal I 和 Nru I 位点插入而造成任一选择标记的失活。由于存在氯霉素抗性基因,需用壮观霉素进行扩增。

4. pZErO 载体

pZErO 是一种通过正选择筛选重组克隆的质粒载体。载体含有受 lac 启动子控制的致死基因 ccdB (control of cell death)。当用 IPTG 诱导时,载体所表达的 CcdB 蛋白会引起宿主细胞 DNA 的严重损伤,导致宿主死亡。而当外源片段插入后,会破坏 ccdB 基因的表达,使重组克隆得以在培养基上生长。pZErO 的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
pZErO-1.1	2.8kb	17	Zeo	有	f1	T7	M13, T7
pZErO-2.1	3.3kb	16	Kan	有	f1	SP6	M13, SP6

pZErO-1.1 (Invitrogen 公司)

pZErO-1.1 的多克隆位点有: Mlu I, Nsi I, Hind III, Asp718 I, Kpn I, Ecl136 II, Sac I, BamH I, Spe I, EcoR I, Pst I, EcoR V, Not I, Xho I, Sph I, Nsi I, Xba I, Dra II, Apa I。

pZErO-2.1 (Invitrogen 公司)

pZErO-2.1 主要是对 pZErO-1.1 的启动子和抗性选择标记进行了改变,其它特征与 pZErO-1.1 相同。

27.1.2. PCR 产物克隆及表达载体

克隆 PCR 产物的方法有很多种,包括 TA 克隆(TA Cloning)、限制性内切酶回切(restriction-cutback)、平端克隆(blunt-end cloning)、不依赖于连接反应的克隆(ligation-independent cloning, LIC)及尿嘧啶 DNA 糖基化酶克隆(uracil DNA glycosylase, UDG)等。

1. TA 克隆法

TA 克隆法主要用于克隆由 Taq 聚合酶所产生的 PCR 片段。Taq 聚合酶具有一种末端转移酶活性,可在 PCR 产物的 3' 端加上一个 A,而线性的 TA 克隆载体两端各有一个 T,因而可以直接对 PCR 产物进行克隆。与其他方法相比,TA 克隆法具有以下优点:不需合成带有酶切位点的引物;不需预知 PCR 产物的序列;不需 PCR 反应后的酶切处理;不需对 PCR 产物进行末端补平;PCR 产物无需纯化;不需在 PCR 产物两端加接头;操作简单快捷。

常用的 TA 克隆载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
pCR 2.1	3.9kb	13	Amp, Kan	有	无	T7	M13, T7
pGEM-T	3.0kb	15	Amp	有	f1	T7, SP6	M13, T7, SP6

pCR 2.1 (Invitrogen 公司)

pCR 2.1 在 PCR 片段插入位点两侧各有一个 EcoR I 及 BstX I 位点,可方便地切割下插入片段。pCR 2.1 的多克隆位点有: Hind III, Kpn I, Sac I, BamH I, Spe I, BstX I, EcoR I, 插入位点, EcoR I, BstX I, EcoR V, Not I, Xho I, Nsi I, Xba I, Apa I。

pGEM-T (Promega 公司)

pGEM-T 是将 pGEM-5Zf(+)用 EcoR V 切开,再在两端各加上一个 T 而得。pGEM-T 的其他特征与 pGEM-5Zf(+)相同。

pGEM-T Easy 是在 pGEM-T PCR 片段插入位点两侧的多克隆位点内加入了 EcoR I 和 Not I 的位点,利用任一位点都可将 PCR 产物从载体上切下。pGEM-T Easy 的主要特征与 pGEM-T 相同。

2. 平端克隆法

pCR-Blunt (Invitrogen 公司)

pCR-Blunt 主要用于高效克隆由具有校对功能的热稳定 DNA 聚合酶(如 Pfu DNA 聚合酶等)所产生的 PCR 片段。可通过对致死基因 ccdB 的失活作用来筛选重组质粒。在 PCR 片段插入位点的两侧各有一个 EcoR I 和 Nsi I 位点,可利用单酶切将 PCR 片段从载体上切下。pCR-Blunt 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	测序引物
3.5kb	17	Kan, Zeo	有	T7	M13, T7

MCS: Mlu I, Nsi I, Hind III, Kpn I, Sac I, BamH I, Spe I, EcoR I, 插入位点, EcoR I, Pst I, EcoR V, Not I, Xho I, Nsi I, Xba I, Apa。

pCR-Script SK(+) (Stratagene 公司)

pCR-Script SK(+)由 pBluescript II SK(+)衍生而来,主要是对多克隆位点进行了小的改动,增加了一个稀有的 8 碱基识别位点 Srf I(5'GCCCCGGGC3')并利用此位点进行连接。方法是 PCR 产物不经处理直接加入含有已用 Srf I 预切的线性载体、T4 DNA 连接酶和 Srf I 内切酶的连接体系中,由于存在 Srf I 内切酶,可将自连的载体重新切开,因而可大大降低背景,提高连接效率。若预先对 PCR 产物进行末端补平或使用 Pfu DNA 聚合酶扩增 PCR 产物,则可进一步提高重组率。pCR-Script SK(+)由 pCR-Script Amp SK(+), pCR-Script Cam SK(+)和 pCR-Script Direct SK(+)组成, pCR-Script Amp SK(+)和 pCR-Script Cam SK(+)的差别在于分别具有氨苄青霉素和氯霉素抗性,多克隆位点有: Sac I, Xma III, Not I, Srf I, BamH I, Pst I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Cla I, Acc I, Hinc II, Sal I, Sac II, BstX I, Xho I, Dra II, Apa I, Kpn I;而 pCR-Script Direct SK(+)则用于定向克隆具单磷酸末端的 PCR 产物,多克隆位点有: BssH II, Kpn I, Srf I, Sac I, Nde I, Asc I, Not I。

3. LIC 克隆法

pDIRECT (Promega 公司)

pDIRECT 为线状 PCR 产物克隆载体,载体两端分别有一 11 和 12 个核苷酸长的非

互补单链 PCR 指导序列,此序列同时需包含在 PCR 正反向引物之内,通过载体与 PCR 产物之间此段序列的碱基互补配对即可完成克隆。pDIRECT 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
3.0kb	14	Amp	有	有	T3, T7	M13, T3, T7

MCS: Apa I, BamH I, BstX I, Cla I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Kpn I, Not I, Sac I, Sac II, Sal I, Xba I, Xho I。

4. UDG 克隆法(GibcoBRL 公司)

UDG 克隆不需要常规克隆 PCR 所需的连接、纯化、酶切、补平等过程,具有简便快捷的特点。方法是用于 PCR 扩增的上下游引物中均有一特殊的含有由 dUMP(替代 dTMP)的 12 个核苷酸长的 5' 序列,因此扩增后的 PCR 产物的 5' 端均含有 dUMP 残基。UDG 专一作用于 dUMP,破坏其互补配对,使 PCR 产物形成 3' 突出末端。pAMP 为线状载体,载体两端含有与 PCR 产物 3' 突出末端相互补的单链序列,不需经连接酶的作用,仅通过退火即可与 PCR 产物相连而完成克隆。

pAMP 有 pAMP1/10 和 pAMP18/19 两个系列。pAMP1/10 为线状化的 pSPORT1, pAMP18/19 则为线状化的 pUC18/19。

5. PCR 产物克隆表达载体

常用的 PCR 产物克隆表达载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物
pCR 3.1	5.0 kb	14	Kan, Amp	有	f1	T7	T7, 自备
pCR Bac	4.8 kb	6	Amp	无	无	无	自备
pTARGET	5.7 kb	11	Amp	有	f1	T7	T7, M13

常用的 PCR 产物克隆表达载体的表达特征如下表。

载体名称	表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 poly(A)信号	宿主细胞
pCR 3.1	瞬时/稳定	neo	CMV I.E.	无	无	BGH	哺乳动物
pCR Bac	瞬时	β -galactosidase	PH	无	无	SV40	昆虫
pTARGET	瞬时/稳定	neo	CMV I.E.	无	嵌合	SV40 late	哺乳动物

pCR 3.1 (Invitrogen 公司)

pCR 3.1 采用 TA 法克隆 PCR 产物,并用于 PCR 产物在真核表达体系中正义、反义的转录研究。牛生长激素(Bovine Growth Hormone, BGH) polyA 信号可维持表达的外源 mRNA 的稳定。pCR 3.1 的多克隆位点有: Nhe I, Hind III, Kpn I, BamH I, BstX I, EcoR I, 插入位点有 EcoR I, Pst I, EcoR V, BstX I, Not I, Xho I, Xba I, Apa I。

pCR 3.1-Uni 由 pCR 3.1 衍生而来,并去除了 pCR 3.1 插入位点一侧的 Kpn I,

BamH I, BstX I 及 EcoR I 位点, 因此可进行定向克隆 PCR 产物, 并直接表达。

pCR Bac (Invitrogen 公司)

pCR Bac 由杆状病毒转移载体 pBlueBac4 衍生而来, 可克隆带有翻译起始位点的 PCR 产物, 并直接进行表达。pCR Bac 的多克隆位点有: Nhe I, BamH I; 插入位点有 EcoR I, BstB I, Hind III, Sal I。

pTARGET (Promega 公司)

利用 TA 法克隆 PCR 产物, 并直接使其在哺乳动物细胞中呈组成型表达。若利用 G-418 筛选转染细胞, 可获得稳定表达细胞。pTARGET 的多克隆位点有: EcoR I, BamH I, Nhe I, Xho I, Mlu I, 插入位点有 Sma I, Kpn I, Sal I, Acc I, Not I, EcoR I。

27. 1. 3. 表达载体

表达载体是指含有强启动子的质粒载体。外源基因可在启动子的控制下转录成 mRNA, 并最终在蛋白质的形式在宿主细胞中表达。表达载体分为原核表达载体和真核表达载体两大类。

1. 原核表达载体

原核表达载体分为两类。一类是可直接表达不含任何原核序列的外源蛋白的载体, 称为原核表达载体; 另一类则是以融合蛋白的形式进行表达的载体, 融合蛋白的一部分由载体编码, 而其余部分则由外源片段的开放阅读框所编码, 这类载体称为原核基因融合表达载体。

(1) 原核表达载体

可调控的强启动子和有效的核糖体结合位点(Ribosome Binding Site, RBS), 是原核表达载体表达完整的天然蛋白所必不可少的二个要素。对本身带有 RBS 的原核基因, 只须提供启动子即可; 而对于真核基因, 则必须同时提供启动子和 RBS。原核表达载体所含启动子大致有以下几种:

λ 噬菌体 P_L 启动子

P_L 启动子的转录受 λ 噬菌体 cI 阻遏蛋白的严密控制, 利用基因工程手段将 cI 阻遏基因整合到宿主细胞的染色体上, 即可通过控制 cI 阻遏蛋白的表达来控制 P_L 启动子的转录。因此此系统适用于表达那些对宿主具有毒性的外源蛋白质。

pLEX (Invitrogen 公司)

pLEX 的宿主菌 GI724 含有受 trp 启动子调控的 cI 阻遏基因, 当无色氨酸时, trp 启动子可进行转录, 宿主菌表达 cI 阻遏蛋白, 抑制载体 P_L 启动子的功能, 使外源基因不能表达; 反之, 当加入色氨酸后, trp 启动子的转录受到抑制, cI 阻遏蛋白不能表达, P_L 启动子即可进行转录, 表达外源蛋白质。pLEX 的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pLEX	2.9 kb	13	Amp	无	∅	无	自备	GI724

MCS: Nde I, Kpn I, Sac I, BamH I, Spe I, EcoR I, EcoR V, Not I, Xho I, Sph I, Nsi I, Xba I, Sal I。

pLEX 的表达特征如下表。

载体名称	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pLEX	P _h	Trp	无	有	aspA	无

T7 噬菌体启动子

T7 启动子只有在 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的作用下才能转录,因此可高水平地表达某些不能被大肠杆菌 RNA 聚合酶有效转录的基因。T7 噬菌体 RNA 聚合酶可通过两种途径产生:一是由整合有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶基因的溶源性宿主菌(如 BL21、DE3 等)提供;二是通过带有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶基因的辅助噬菌体感染含有表达载体的宿主菌而得。

tac 启动子

tac 启动子是一个 trp-lac 杂合启动子,受 lac 阻遏物所调控。在大量表达 lac I^c 的宿主菌中,其转录受到抑制,需加入 IPTG 进行诱导,才能表达。

pKK223-3 (Pharmacia Biotech 公司)

带有核糖体结合位点和起始 ATG 的外源片段可在任一多克隆位点插入表达;对自身无核糖体结合位点的外源片段,若其起始 ATG 在载体核糖体结合位点 5~13bp 内则可高效表达。pKK223-3 的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pKK223-3	4.6 kb	5	Amp	无	无	无	无	JM105

MCS: EcoR I, Sma I, Xma I, Pst I, Hind III。

pKK223-3 的表达特征如下:

载体名称	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pKK223-3	tac	IPTG	有	无	rrnB T ₂ T ₁	无

trc 启动子

trc 启动子也是一个 trp-lac 杂合启动子,含有 trp 启动子的 -35 区和 lac UV5 启动子的 -10 区,二者相隔 17bp。其功能与 tac 启动子相近。

常用的含 trc 启动子的原核表达载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pKK233-2	4.6 kb	3	Amp	无	无	无	无	JM109
pTrc 99A	4.2 kb	10	Amp	无	f1	无	无	JM105

常用的含 trc 启动子的原核表达载体的表达特征如下表。

pET 系列载体由 pBR322 衍生而来,含有一个编码 T7 基因 10 氨基端前 11 个氨基酸的区域,其后是外源片段的插入位点,起始 ATG 由 T7 基因 10 氨基端提供。当宿主菌中的 T7 RNA 聚合酶基因被诱导表达后,外源片段以 T7 基因 10 氨基端融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。若外源片段在起始 ATG 处的 Nde I 位点插入,则可直接表达。

pET-5 除直接表达的 Nde I 位点外,还有 2 个融合插入位点(BamH I 和 EcoR I),并提供了三种不同阅读框架的载体,pET-5a, b & c。

pET-9 较 pET-5 多一个 T7 转录终止子,但仅有一个 BamH I 融合插入位点。也提供三种不同阅读框架的载体,pET-9a, b & c。

pEZZ 18 (Pharmacia Biotech 公司)

pEZZ 18 含有蛋白 A 信号序列和两个按蛋白 A 的 IgG 结合域合成的“Z”结构域。蛋白 A 基因内含有 ATG 和核糖体结合位点。带有翻译终止子的外源片段可在 lacUV5 和蛋白 A 启动子的控制下,以“ZZ”肽段融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达,并在蛋白 A 信号序列的引导下分泌至胞外。利用“ZZ”肽段与 IgG 琼脂糖 6FF 紧密结合的特性,通过亲和层析可达到一步纯化的目的。pEZZ 18 的多克隆位点有 EcoR I, Sac I, Kpn I, Sma I, BamH I, Xba I, Sal I, Pst I, Sph I, Hind III。

pGEMEX-1/2 (Promega 公司)

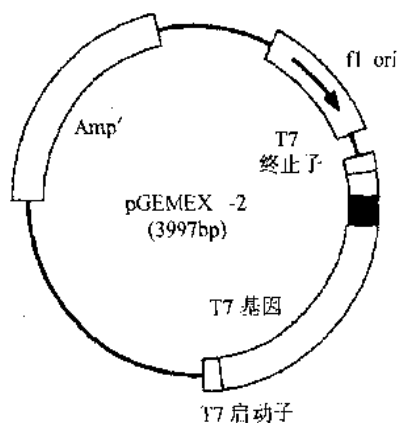


图 27-4 pGEMEX-1/2 的质粒图谱

pGEMEX-1/2 为 T7 表达载体,其核糖体结合位点和起始 ATG 均由 T7 基因 10 提供(图 27-4)。当宿主菌中的 T7 RNA 聚合酶基因被诱导表达后,外源基因在 T7 启动子的控制下,以 T7 基因 10 融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。pGEMEX-1 和 pGEMEX-2 的差别在于阅读框架不同。pGEMEX-1/2 的多克隆位点有:Sfi I, Sac I, EcoR I, Sal I, Xho I, BamH I, Apa I, Not I, Sph I, Nsi I, Hind III。

pRIT2T (Pharmacia Biotech 公司)

pRIT2T 含有编码葡萄球菌蛋白 A IgG 结合域的部分基因,由融合在 IgG 结合域前的部分 λ *cro* 基因提供起始 ATG,由蛋白 A 基因提供转录和翻译终止子。 λ 右启动子受含温度敏感型 cI857 阻遏因子的宿主菌 N4830-1 的控制,培养温度由 30℃ 提高到 42℃ 90 分钟,可诱导 λ 右启动子启动,使外源基因以葡萄球菌蛋白 A 的 IgG 结合域融合蛋白形式在大肠杆菌中表达。利用 IgG 琼脂糖 6FF 可实现一步纯化。pRIT2T 的多克隆位点有:EcoR I, Xcy I, Sma I, BamH I, Sal I, Pst I。

但在某些情况下,由上述载体所表达的外源蛋白没有活性,这可能是由于其折叠方式的不正确所造成;此外,由于表达蛋白的氨基端甲硫氨酸是由载体中的 ATG 编码,而在大肠杆菌中不同蛋白质氨基端甲硫氨酸会被不同程度地去除,因此这些表达蛋白往往缺少氨基端的甲硫氨酸。因此,近年来各公司纷纷推出可进行融合蛋白切割的表达载体,以求解决上述可能出现的问题。

硫氧还蛋白融合表达系统——pTrxFus (Thio Fusion Expression System, Invitrogen 公司)

硫氧还蛋白融合表达系统是以可溶性硫氧还蛋白融合蛋白形式在大肠杆菌中表达的体系。其优点为:在融合蛋白表达量占细胞总蛋白量的 40% 时,硫氧还蛋白仍保持可溶性;硫氧还蛋白在大肠杆菌的粘附区积累,可通过快速渗透压冲击而有选择地释放,从而大大简化纯化程序;硫氧还蛋白可在 80℃ 保持稳定,因而可利用高温培养进行纯化;硫氧还蛋白的活性位点可与亲和试剂 ThioBond 特异结合,故可快速纯化;在硫氧还蛋白和外源蛋白之间有一蛋白酶 enterokinase Max(EK Max)的酶切位点,可利用 EK Max 将硫氧还蛋白从融合蛋白上切割下来。

pTrxFus 的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pTrxFus	3.6 kb	8	Amp	有	无	无	自备	GI724, GI698

MCS:Kpn I, Xma I, Sma I, BamH I, Xba I, Acc I, Sal I, Pst I。

pTrxFus 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动了	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pTrxFus	thioredoxin	EK Max	P _L	tryptophan	无	有	aspA	无

His-Patch 硫氧还蛋白融合表达系统——pThioHis (His-Patch Thio Fusion Expression System, Invitrogen 公司)

His-Patch 硫氧还蛋白融合表达系统是在 ThioFusion Expression System 基础上改进而来。它去除了原系统对宿主菌和培养基的特殊要求,克隆基因和纯化蛋白更加简便。pThioHis 含有一经过改造的硫氧还蛋白基因,其方法是在基因前加入一编码组氨酸串的序列,因而外源片段在 trc 启动子的控制和 IPTG 的诱导下,可以 His-Patch-硫氧还蛋白融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。组氨酸串对二价阳离子(如镍)有很高的亲合力,故利用金属螯合剂 ProBond 可快捷地纯化融合蛋白。

pThioHis 提供了三种不同阅读框架的载体,pThioHis-A, B & C。pThioHis 的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pThioHis	4.4 kb	13	Amp	有	无	无	自备	TOP10

MCS:Kpn I, Sac I, Xho I, Bgl II, BstB I, EcoR I, Sac II, Nct I, Stu I, Xba I, Sal I, Pst I。

pThioHis 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pThioHis	His-Paich-thioredoxin	EK Max	trc	IPTG	g10	有	aspA	无

Xpress 表达系统(The Xpress System)

Xpress 表达系统可广泛用在细菌、哺乳动物和昆虫细胞等表达体系中,它以 Xpress 融合蛋白的形式表达外源蛋白。Xpress 是一短肽,其 N-端或 C-端肽段由 T7 基因 10 而来,内含一 6 聚组氨酸串,故用镍螯合剂 ProBond 即可快速纯化融合蛋白;短肽上具有 EK Max 酶切位点,可用于融合蛋白的切割;此外,短肽上的 Anti-Xpress 抗体抗原(N-端)或 myc 抗原(C-端)位点可用于抗体检测融合蛋白。

常用载体的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pRSET	2.9 kb	9	Amp	有	f1	T7	无	JM109
pTrcHis	4.4 kb	9	Amp	有	无	无	自备	TOP10

常用载体的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pRSET	Xpress N-terminal	EK Max	T7	T7 RNA 聚合酶	有	有	有	无
pTrcHis	Xpress N-terminal	EK Max	trc	IPTG	g10	有	aspA	无

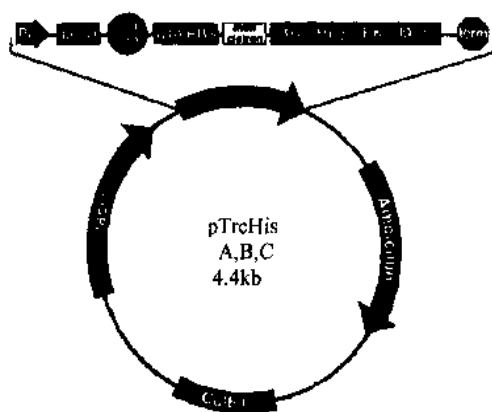


图 27-5 pTrcHis 的质粒图谱

pRSET (Invitrogen 公司)

pRSET 由 T7 启动子控制表达,获得 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的方式是通过 M13 辅助噬菌体感染宿主菌。pRSET 提供三种不同阅读框架的载体,pRSET A, B & C。pRSET 的多克隆位点有;BamH I, Xho I, Pst I, Pvu II, Kpn I, Nco I, EcoR I, BstB I, Hind III。

pTrcHis (Invitrogen 公司)

pTrcHis 以 Xpress N 端融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达,含有(His)₆和 EK Max 位点,可用于融合蛋白的纯化和切割(图 27-5)。此外,还对翻译起始序列进行了修改,

以利于更高效地表达真核基因。pTrcHis 提供了三种不同阅读框架的载体,pTrcHis-A, B & C。pTrcHis 的多克隆位点有;BamH I, Ava I, Xho I, Bgl II, Pst I, Kpn I, EcoR

I, BstB I, Hind III。

pTrcHis2 由 pTrcHis 衍生而来,是以 Xpress C 端融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达,并增加了 myc 抗原位点,用于抗体检测融合蛋白。pTrcHis2 也提供三种不同阅读框架的载体,pTrcHis2 A, B & C。pTrcHis2 的多克隆位点有:Nco I, BamH I, Xho I, Sac I, Bgl II, Pst I, Asp718 I, Kpn I, EcoR I, BstB I, Hind III。

pProEX-1 表达系统(GibcoBRL 公司)

pProEX-1 以六聚组氨酸串融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达,含有的 (His)₆ 和 rTEV 位点,用于蛋白的纯化和切割。pProEX-1 的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pProEX-1	4.7 kb	11	Amp	无	f1	无	无	DH5a

MCS: Ehe I, Nde I, EcoR I, Stu I, Sal I, Sst I, Spe I, Not I, Xba I, BamH I, Xho I, Kpn I, Hind III。

pProEX-1 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pProEX-1	(His) ₆	rTEV	trc	IPTG	有	有	有	无

PinPoint Xa 表达系统(Promega 公司)

PinPoint Xa 表达系统含有一段可在体内生物素化的肽段序列,利用其特性可方便地进行融合蛋白的纯化和检测。外源基因在 tac 启动子的控制下,以生物素化肽段融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。利用 Xa 因子可将生物素化肽段从融合蛋白上切下。PinPoint Xa 提供了三种不同阅读框架的载体,PinPoint Xa-1, 2 & 3。PinPoint Xa 的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
PinPoint Xa	3.4 kb	10	Amp	无	无	SP6	M13, SP6	JM109

MCS: Nru I, Hind III, Pvu II, BamH I, Acc65 I, Kpn I, EcoR V, Bgl II, Sma I, Not I。

PinPoint Xa 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
PinPoint Xa	biotinylated peptide	Xa factor	tac	无	有	有	无	有

PinPoint Xa-T 是将 PinPoint Xa 在 EcoR V 处切开,并在两端各加一个 T 所形成的载体,可利用 TA 法克隆 PCR 产物并使其直接在大肠杆菌中表达。PinPoint Xa-T 也提供了三种不同阅读框架的载体,PinPoint Xa-T1, 2 & 3。

pMAL 蛋白融合和纯化系统(New England Biolabs 公司)

pMAL 含有编码麦芽糖结合蛋白(maltose-binding protein, MBP)的 *malE* 基因,外源片段可在多克隆位点 *Xmn* I 处插入,以 MBP 融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。经一步 MBP 亲和层析,即可纯化融合蛋白;*Xa* 因子则可将 MAL 从融合蛋白上切下。pMAL 包括 pMAL-c2 和 pMAL-p2。pMAL-p2 带有 *malE* 基因的信号序列,可指导融合蛋白分泌至胞外;pMAL-c2 则缺失此信号序列,融合蛋白只能在胞内表达。

pMAL 的主要特征如下表。

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pMAL	6.7 kb	7	Amp	有	M13	无	M13	TB1

MCS:*Xmn* I, *Eco*R I, *Bam*H I, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Hind* III。

pMAL 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pMAL	MBP	<i>Xa</i> factor	<i>tac</i>	IPTG	有	有	<i>rrnB</i> T ₂ T ₁	无

GST 基因融合系统-pGEX (Pharmacia Biotech 公司)

GST 基因融合系统是一套集表达、纯化、检测于一体的原核基因融合表达系统。pGEX 系列载体提供了以 *Eco*R I 为起始的全部三种阅读框,每种阅读框后都有翻译终止子,在谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因内含有 ATG 和核糖体结合位点,外源片段在 *tac* 启动子的控制下,以 GST 融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。利用 GST 纯化模块可直接对融合蛋白进行纯化。

pGEX 由一系列载体构成,如 pGEX 1 λ T、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2 和 pGEX-5X-3 等。pGEX-1 λ T、pGEX-4T-1 和 pGEX-5X-1 可直接克隆和表达从 λ gt11 文库中筛选到的 cDNA 片段,pGEX-2TK 在 GST 和多克隆位点之间有一段依赖 cAMP 的蛋白激酶催化亚基的识别序列,可利用蛋白激酶和 [γ -³²P]ATP 直接体外标记融合蛋白。pGEX-1 λ T、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2 和 pGEX-4T-3 可利用凝血酶将 GST 载体蛋白从融合蛋白上切下,而 pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2 和 pGEX-5X-3 则利用 *Xa* 因子进行切割。pGEX 的主要特征如下:

质粒名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
pGEX	4.9 kb	依载体而定	Amp	无	无	无	自备	BL21

MCS:*Bam*H I, *Eco*R I (pGEX-1 λ T);*Bam*H I, *Sma* I, *Eco*R I (pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-3X);*Bam*H I, *Eco*R I, *Sma* I, *Sal* I, *Xho* I, *Not* I (pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2 和 pGEX-5X-3)。

pGEX 的表达特征如下表。

质粒名称	融合方式	蛋白切割位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
pGEX	GST	凝血酶/Xa factor	tac	IPTG	有	有	无	有

2. 真核表达载体

真核表达载体通常分为两大类:不带病毒复制子的真核表达载体和带病毒复制子的真核表达载体。

真核表达载体含有原核基因序列和真核转录单位,使其既能在大肠杆菌中自我增殖,又能在真核细胞中进行表达。通常,真核表达载体都包含原核基因序列和真核表达序列两种基本元件,前者包括在大肠杆菌中构建重组载体所必需的复制子、抗性基因和多克隆位点等序列;后者包括启动子/增强子序列、带有剪接信号的内含子序列、加 poly(A)信号及用于复制和选择的序列等。

调控转录的启动子/增强子具有细胞类型的特异性,因此必须根据表达重组基因的细胞类型来选择表达载体。目前常用的启动子/增强子序列主要来源于病毒,这是因为其宿主范围较广,在许多哺乳动物的不同类型细胞中都有较高的活性。如 SV40 早期/晚期基因启动子/增强子、人唾液腺病毒早期基因组(human cytomegalovirus immediate-early, CMV I.E.)启动子/增强子、小鼠乳腺癌病毒基因组长末端重复区(mouse mammary tumor virus long terminal repeat, MMTV LTR)启动子/增强子、劳氏肉瘤病毒基因组长末端重复区(Rous sarcoma virus long terminal repeat, RSV LTR)启动子/增强子等。

绝大多数真核基因内都含有内含子,因此必须通过剪接除去内含子,才能产生成熟的 mRNA。由于 mRNA 剪接所必需的保守序列位于内含子的 5' 和 3' 边界上,因此在载体中插入带有剪接信号的异源内含子序列,可大大提高基因的表达效率。目前常用的内含子序列多由 SV40 而来。

成熟 mRNA 的 3' 端是经过将转录后的 RNA 在特定位点切割并加上 poly(A)后形成的,它除依赖于 poly(A)加尾信号 AAUAAA 外,还必须含有位于 poly(A)位点下游的富含 GU 区或富含 U 区才能保证转录 RNA 准确而有效地加上 poly(A)。目前最常用的加 poly(A)信号来自 SV40,其中含有早期和/或晚期转录单位的切割与 poly(A)加尾信号,对杂合 mRNA 的加工十分有效。

除此之外,某些真核表达载体还带有可提高表达水平的病毒复制子及供筛选稳定表达重组子的真核选择标记基因。

带有病毒复制子的载体可分为两大类,一类是带有 SV40 或多瘤病毒等乳多空病毒复制子的载体,可在表达相应病毒 T 抗原的细胞中大量复制,达到极高的拷贝数而引起细胞死亡,这类载体适用于瞬时大量地表达转染基因;另一类是带有牛乳头瘤病毒和 EB 病毒等病毒复制子的载体,可在染色体外以较低的拷贝数进行自我增殖,一般不引起细胞死亡,这类载体适用于分离在较低水平上持续表达转染基因的稳定细胞系。

通常情况下,能够稳定表达转染基因的细胞系微乎其微,且难于识别,需要在同一细胞中引入另一种选择标记基因才能得到分离。这些基因编码的产物大多具有拮抗某些抗生素或其他药物的特性。目前常用的选择标记蛋白有:(1)氨基糖苷磷酸转移酶(APH)。卡那霉素、新霉素和 G418 等氨基糖苷类抗生素可抑制原核和真核细胞的蛋白质合成,而

由细菌转座子 Tn5 新霉素抗性基因编码的 APH 酶可对这类抗生素产生抗性。因此可利用新霉素抗性基因对 G418 的抗性作为选择标记,筛选出可在真核细胞中稳定表达的重组克隆。(2) 潮霉素 B 磷酸转移酶(Hyg)。由大肠杆菌 *hyg* 基因编码的 Hyg 对潮霉素(hygromycin)具有抗性,可与具新霉素抗性基因的载体共同转染同一细胞。(3) 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, XGPRT)。大肠杆菌的 *gpt* 基因可在 SV40 早期启动子的控制下在哺乳动物细胞中表达 XGPRT,含 *gpt* 基因的细胞具有拮抗霉酚酸(mycophenolic acid)的作用,因而可作为筛选稳定表达重组子的选择标记。

(1) 不带病毒复制子的真核表达载体

常用的不带病毒复制子的表达载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
pcDNA1	4.0 kb	8	无	无	M13	SP6, T7	T7	JM109
pSI	3.6 kb	10	Amp	无	f1	T7	T7, M13	JM109
pOPI3 CAT	6.3 kb	1	Amp	无	f1	无	无	XL1-Blue
pSG5	4.1 kb	3	Amp	无	f1	T7	T7	AG1
pTRE	3.1 kb	4	Amp	无	无	无	无	JM109
pBI	依载体而定	3~8	Amp	无	无	无	无	JM109

常用的不带病毒复制子的表达载体的表达特征如下表。

载体名称	表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 polyA 信号
pcDNA1	瞬时	无	CMV	无	SV40	SV40
pSI	瞬时	无	SV40 early	无	嵌合	SV40 late
pOPI3 CAT	瞬时	neo	RSV-LTR	IPTG	SV40	TK
pSG5	瞬时	无	SV40 early	无	β -globin intron II	SV40 early
pTRE	瞬时	无	TRE/minCMV	Tet/Dox	SV40	SV40
pBI	瞬时	无	TRE/minCMV	Tet/Dox	SV40/ β -globin	SV40/ β -globin

pSI (Promega 公司)

pSI 是以 pGEM 为骨架的真核表达载体,可在哺乳动物细胞中呈组成型高效表达。pSI 的多克隆位点有: Nhe I, Xho I, EcoR I, Mlu I, Xba I, Sal I, Acc I, Sma I, BstZ I, Not I。

pCI 的基本特征与 pSI 相同,差别仅在于使用的启动子不同,pCI 是利用人唾液腺病毒早期启动子进行表达。

pCI-neo 的基本特征与 pTARGET 相同,差别在于多克隆位点不同,并在多克隆位点的一端加入一 T3 启动子,用于体外转录。pCI-neo 的多克隆位点包括: Nhe I, Xho I, EcoR I, Mlu I, Xba I, Sal I, Acc I, Sma I, Not I。

pOPI3 CAT (STRATAGENE 公司)

pOPI3 CAT 的表达受乳糖操纵子的严密控制, IPTG 的诱导强度决定其表达量的高低, 外源片段在 Not I 位点插入。此外, 利用 BstX I 和 Bgl II 位点, 可用外源启动子序列替换 RSV-LTR 启动子, 来研究外源启动子的功能。

pOPRSVI CAT 与 pOPI3 CAT 特征相仿, 但无启动子的切割位点。

pSG5 (STRATAGENE 公司)

可在表达 T 抗原的宿主细胞中得到最大量的表达。pSG5 的多克隆位点有: EcoR I, BamH I, Bgl II。

pTRE (CLONTECH 公司)

Tet-Off & Tet-On 基因表达系统利用不同浓度的四环素或其衍生物 doxycycline (Dox) 来高效诱导表达外源基因。Tet-Off 系统在缺乏四环素时进行表达, 而 Tet-On 系统在 Dox 诱导下进行表达。

Tet 表达系统依赖于大肠杆菌 Tn10 转座子的四环素抗性操纵子中的两个调控因子——四环素阻遏蛋白 (TetR) 和结合 TetR 的四环素操纵基因 (tetO) 来发挥作用。启动子 hCMV⁻¹ 由含有 7 拷贝 tetO 的四环素响应因子 (TRE) 和缺失增强子的 CMV I. E. 启动子 (minCMV) 组成。

Tet 表达系统的另一关键成分是调控质粒 pTet-Off 和 pTet-On (图 27-6)。在 Tet-Off 表达系统中, pTet-Off 编码 Tc-控制反式激活因子 (Tc-controlled transactivator, tTA), tTA 是由野生型 TetR 的 1-207aa 和 HSV 病毒 VP16 激活结构域 (VP16 AD) 融合而成的杂蛋白。在缺少四环素时, tTA 可与 TRE 中的 tetO 结合, 使 VP16 AD 靠近启动子, 从而激活转录。而在 Tet-On 表达系统中, pTet-On 编码一个与野生型 TetR 相差四个氨基酸的逆 TetR (rtTetR), 与 VP16 AD 融合后, 产生一个逆 tTA (rtTA), 在 Dox 存在的情况下, 可激活转录。

通常, Tet 表达系统需要经两轮转染、筛选以建立“双稳”细胞系。首先对宿主细胞进行选择。即用 pTet-Off 或 pTet-On 与报告载体 pTRE-Luc 共转染细胞, 在四环素或 Dox 存在和缺乏的情况下检测荧光素酶的活力, 并利用 G418 分离和筛选出具有最佳诱导效果及最低背景的 Tet-Off 或 Tet-On 宿主细胞。接下来, 表达载体与 pTK-Hyg 选择质粒共转染 Tet-Off 或 Tet-On 宿主细胞, 利用潮霉素选择出可稳定表达的细胞系。

pTRE 的多克隆位点有: Sac II, EcoR I, BamH I, Xba I。

pBI (CLONTECH 公司)

pBI 由一系列载体构成, 如 pBI、pBI-L、pBI-G 和 pBI-EGFP 等。为一种双向 Tet 表达系统, 可同时表达两个基因。载体含有一在 TRE 两侧连有两个方向相反的 minCMV 的双向启动子, 这样, 两个 minCMV 启动子的表达同时受 TRE 的控制。pBI 用于同时表达两个外源基因, 多克隆位点有: Pvu II, Mlu I, Nhe I, EcoR V (MCS I); Acc I, Sal I, Not I, Pst I (MCS II)。pBI-L、pBI-G 和 pBI-EGFP 则是在一侧启动子后分别连有荧光素酶、β-半乳糖苷酶和增强的绿色荧光蛋白基因, 通过这些报告基因的表达强度来间接监测

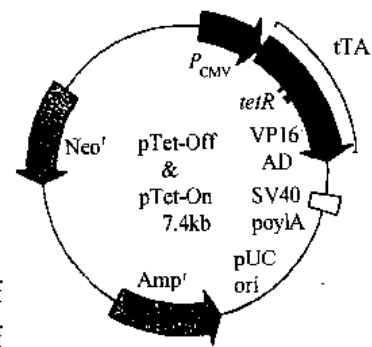


图 27-6 pTet-Off 和 pTet-On 的质粒图谱

外源基因的表达情况。这些载体的多克隆位点分别有: Pvu II, Mlu I, Nhe I, Cla I, Hind III, Acc I, Sal I, EcoR V (pBI-L); Sal I, Not I, Pst I (pBI-G); Pvu II, Mlu I, Nhe I (pBI-EGFP)。

(2) 带病毒复制子的真核表达载体

Epstein-Barr 病毒(EBV)载体

这类载体带有人疱疹病毒 EBV 复制子 oriP 和表达核抗原 EBNA-1 的 EBV DNA 序列,可在多种哺乳动物细胞中以附加体的形式进行表达。此外,载体通常具有抗性基因作为选择标记,用来筛选可稳定表达的、在染色体外带有多拷贝外源基因的细胞系。

常用的 EBV 载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
pEBVHis	10.3 kb	8	Amp	无	无	无	无	<i>E. coli</i>
pREP	10 kb 左右	7~9	Amp	无	无	无	无	<i>E. coli</i>

常用的 EBV 载体的表达特征如下表。

载体名称	表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	多聚腺苷化信号	宿主细胞
pEBVHis	瞬时/稳定	hyg	RSV LTR	无	无	SV40	哺乳动物
pREP	瞬时/稳定	依载体而定	RSV LTR	无	无	SV40	哺乳动物

pEBVHis (Invitrogen 公司)

可在 RSV LTR 启动子的控制下,以 Xpress N 端融合蛋白的形式在多种灵长类和犬类细胞中高效稳定地呈组成型表达。此外,载体含有(His)₆ 和 EK Max 位点,分别用于融合蛋白的纯化和切割,并提供三种不同阅读框架的载体— pEBVHis A, B & C。pEBVHis 的多克隆位点有: Cla I, Sfi I, Not I, Hind III, Kpn I, Bgl II, Xho I, BamH I。

pREP (Invitrogen 公司)

pREP 由三大类载体组成。第一类包括 pREP4、pREP8 和 pREP9,它们之间的差别在于选择标记不同:pREP4 为潮霉素抗性;pREP8 为组氨酸抗性;pREP9 为新霉素抗性。第二类包括 pREP4 和 pCEP4,它们之间的差别在于启动子/增强子不同:pREP4 为 RSV LTR,pCEP4 为 CMV I.E.。第三类包括 pREP7 和 pREP10,它们之间的差别在于多克隆位点的方向不同,可用于 RNA 的正义、反义转录研究。pREP 载体上的 EBNA-1 序列被截短,因而可在对 EBNA-1 敏感的细胞中生长。pREP 常用的多克隆位点有: BamH I, Sfi I, Xho I, Not I, Nhe I, Hind III, Kpn I, Pvu II。

SV40 载体

这类载体带有 SV40 的复制子 SV40 ori,SV40 大 T 抗原对其有激活作用。因此,当转染可表达 SV40 大 T 抗原的细胞(如 COS3 和 COS7)时,载体可以附加体的形式呈组成型高效表达外源基因。

常用的 SV40 载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
pCDM8	4.4 kb	9	supF	无	M13	T7	T7	MC1061/P3
pcDNA3.1	依载体而定	16	Amp	无	f1	T7	T7	<i>E. coli</i>
pRc	5.5 kb 左右	6	Amp	无	f1	(T7)	无	<i>E. coli</i>
pSecTag	5.2 kb	14	Amp	无	f1	T7	T7, 自备	<i>E. coli</i>
pZeoSV2	3.5 kb	17	Zeo	无	f1	T7	T7	<i>E. coli</i>
pSV · SPORT1	3.2 kb	16	Amp	无	无	SP6, T7	M13	DH5a
pBK	4.5 kb	17	Kan	有	f1	T3, T7	T3, T7, M13	XL1 Blue
pSVK3	3.9 kb	3	Amp	无	f1	T7	T7, M13	<i>E. coli</i>
pSVL	4.9 kb	6	Amp	无	无	无	无	JM109
pMSG	7.6 kb	5	Amp	无	无	无	无	HB101
pIRES1	5.3~5.7 kb	3~6	Amp	无	无	无	无	<i>E. coli</i>

常用的 SV40 载体的表达特征如下表。

载体名称	表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 polyA 信号	宿主细胞
pCDM8	瞬时	无	CMV I. E.	无	SV40	SV40	哺乳动物
pcDNA3.1	瞬时/稳定	neo/zeo	CMV I. E.	无	无	BGH	哺乳动物
pRc	瞬时/稳定	neo	依载体而定	无	无	BGH	哺乳动物
pSecTag	瞬时/稳定	zeo	CMV I. E.	无	无	BGH	哺乳动物
pZeoSV2	瞬时/稳定	zeo	SV40	无	无	SV40	哺乳动物
pSV · SPORT1	瞬时	无	SV40 car'y	无	SV40	SV40	哺乳动物
pBK	瞬时/稳定	nco	依载体而定	无	有	SV40	哺乳动物
pSVK3	瞬时	无	SV40 early	无	SV40	SV40 early	哺乳动物
pSVL	瞬时	无	SV40 late	无	SV40	SV40 VP1	哺乳动物
pMSG	瞬时/稳定	gpt	MMTV I. TR	地塞米松	SV40	SV40 early	哺乳动物
pIRES1	稳定	neo/hyg	CMV I. E.	无	合成	BGH	哺乳动物

pCDM8 (Invitrogen 公司)

pCDM8 同时含有 SV40 复制子和多瘤病毒 (polyoma virus) 复制子, 因此可在表达 SV40 大 T 抗原的细胞或经多瘤病毒 (WOP) 转染的细胞中以附加体的形式高效表达。若与带有选择标记的载体共转染细胞, 则可获得稳定表达的细胞系。pCDM8 的多克隆位点有: Hind III, Xba I, Xho I, BstX I, 置换区, BstX I, Xho I, Pst I, Not I, Xba I。

pcDNA3.1 (Invitrogen 公司)

pcDNA3.1 由一系列载体, pcDNA3.1 (+)&(-)、pcDNA3.1/Zeo (+)&(-)、pcDNA3.1/His 和 pcDNA3.1(-)/Myc-His 组成。其多克隆位点有(以 pcDNA3.1 为例):

Nhe I, Pme I, Afl II, Hind III, Asp781 I, Kpn I, BamH I, BstX I, EcoR I, EcoR V, BstX I, Not I, Xho I, Xba I, Apa I, Pme I。

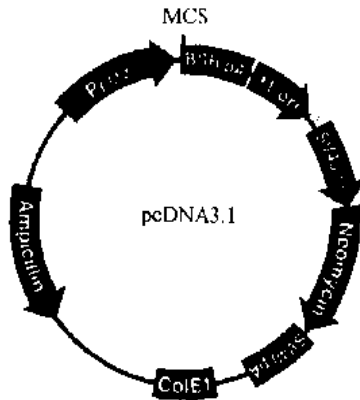


图 27-7 pcDNA 3.1 的质粒图谱

pcDNA3.1 为原始类型,以新霉素抗性基因作为真核表达的选择标记。pcDNA3.1(+)&(-)的差别在于多克隆位点的方向相反(图 27-7)。

pcDNA3.1/Zeo 则是利用 Zeocin 抗性基因作为选择标记,其他特征与 pcDNA3.1 相同。

pcDNA3.1/His 是在 pcDNA3.1(+)的基础上,去除了 Nhe I 至 Hind III 间的 4 个多克隆位点,并在此加入了 Xpress N 端序列,使外源基因可以 Xpress N 端融合蛋白的形式进行表达。Xpress N 端序列中的 myc 抗原、(His)₆ 和 EK Max 位点,分别用于融合蛋白的鉴定、纯化和切割。提供三种不同阅读框架的载体:pcDNA3.1/His A, B & C。

pcDNA3.1(-)/Myc-His 则是在 pcDNA3.1(-)的基础上,加入了 Xpress C 端序列,外源基因以 Xpress C 端融合蛋白的形式表达,也提供三种不同阅读框架的载体:pcDNA3.1(-)/Myc-His A, B & C。

pRc (Invitrogen 公司)

pRc 有 pRc/CMV2 和 pRc/RSV 二种载体。二者的差别在于启动子/增强子不同:pRc/CMV2 为 CMV;pRc/RSV 为 RSV LTR。此外,pRc/CMV2 在多克隆位点的一侧带有 T7 启动子,可进行体外转录。pRc 的多克隆位点有:Hind III, BstX I, Not I, Xba I, Apa I(pRc/CMV2), Spe I(pRc/RSV)。

pSecTag (Invitrogen 公司)

载体带有一段小鼠 Ig κ 链 V-J2-C 区段的分泌信号序列,可将以 Xpress C 端形式表达的融合蛋白分泌至细胞外。此外,载体含有(His)₆ 和 myc 抗原,分别用于融合蛋白的纯化和鉴定,并提供三种不同阅读框架的载体——pSecTag A, B & C。pSecTag 的多克隆位点有:Sfi I, Hind III, Asp718 I, Kpn I, BamH I, BstX I, EcoR I, Pst I, EcoR V, BstX I, Not I, Xba I, Apa I。

pZeoSV2 (Invitrogen 公司)

提供两种多克隆位点相反的载体:pZeoSV2(+)&(-)。多克隆位点有:Nhe I, Pme I, Afl II, Hind III, Asp718 I, Kpn I, BamH I, Spe I, BstX I, EcoR I, Pst I, EcoR V, BstX I, Not I, Xho I, Apa I, Pme I。

pSV · SPORT1 (GIBCOBRL 公司)

pSV · SPORT1 的多克隆位点有:Pst I, Kpn I, Rsr II, Kpn I, EcoR I, Sma I, Sal I, Sst I, Spe I, Xma III, Not I, Xba I, Hind III, SnaB I, Sun I, Mlu I。

pBK (STRATAGENE 公司)

pBK 由 pBK-CMV 和 pBK-RSV 组成,二者的差别在于启动子不同,pBK-CMV 为 CMV 1. E. 启动子,pBK-RSV 为 RSV-LTR 启动子。pBK 的多克隆位点有:Kpn I, BstX I, Sma I, Cla I, Apa I, Not I, Xba I, Sca I, Xho I, Hind III, EcoR I, BamH I,

Spe I, Sal I, Pst I, BssH II, Sac I。

pSVK 3 (Pharmacia Biotech 公司)

pSVK 3 通常在哺乳动物细胞(CV-1、COS 和 HeLa)中呈瞬时表达。若外源基因带有选择标记,也可进行稳定表达。pSVK 3 的多克隆位点有: EcoR I, Kpn I, Sma I, Xba I, Sal I, Pst I, Apa I, Xho I。

pSVL (Pharmacia Biotech 公司)

载体删除了 pBR322 的控制序列(poison sequence),因而在大肠杆菌中可获得更高的拷贝,在哺乳动物细胞(CV-1、COS、HeLa 和 3T3)中获得更高量的瞬时表达。若插入基因带有选择标记,可稳定表达。pSVL 的多克隆位点有: Xho I, Xba I, Sma I, Xma I, Sac I, BamH I。

pMSG (Pharmacia Biotech 公司)

pMSG 在 MMTV LTR 启动子的控制和地塞米松的诱导下,可在对激素应答的哺乳动物细胞(CHO、HeLa、Ltk⁺ 和 3T6)中瞬时表达。当细胞在含有霉酚酸的培养基上生长时,在霉酚酸的选择压力下,pMSG 可随机整合在宿主基因组内而呈稳定表达。pMSG 的多克隆位点有: Nhe I, Sma I, Xma I, Sal I, Xho I。

pIRES1 (CLONTECH 公司)

pIRES1 为一种双顺反子表达载体,目前有 pIRES1neo 和 pIRES1hyg 两种类型,分别含有新霉素和潮霉素抗性选择标记。pIRES1 含有一个由启动子、多克隆位点、合成内含子(IVS)、脑脊髓炎病毒(ECMV)链内核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)、选择标记基因及加 polyA 信号串联而成的表达盒。IVS 具有稳定 mRNA 的功能;而 IRES 可使核糖体在一条 mRNA 上同时翻译可能具有不同阅读框架的外源基因和选择标记基因。这样,经抗体筛选后,几乎所有存活的克隆均为稳定表达外源基因的细胞。pIRES1 的多克隆位点有: Cla I, EcoR V, Not I, EcoR I, BamH I, BstX I (pIRES1neo); BamH I, BstX I, Not I (pIRES1hyg)。

杆状病毒载体

和其他原核和真核表达系统相比,杆状病毒表达系统有如下特点:可进行表达蛋白的翻译后修饰,如磷酸化、糖基化等;可表达具有多种具有生物活性的胞质蛋白、分泌蛋白和细胞表面蛋白;表达量高,可达 500 mg/L;细胞培养简单,不需 CO₂。

常用的杆状病毒载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
pBlueBac4.5	4.9 kb	13	Amp	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>
pMclBac	4.8 kb	11	Amp	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>
pFastBac1	4.8 kb	16	Amp	有	f1	无	无	DH10Bac
pBacPAK8/9	5.5 kb	18	Amp	无	M13	无	自备	<i>E. coli</i>
pAcUW31	8.5 kb	3	Amp	无	M13	无	自备	<i>E. coli</i>

常用的杆状病毒载体的表达特征如下表。

载体名称	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 polyA 信号	宿主细胞
pBlueBac4.5	β -galactosidase	PH	无	无	SV40	昆虫
pMelBac	β -galactosidase	PH	无	无	无	昆虫
pFastBac1	Gm	Polh	无	无	SV40	昆虫
pBacPAK8/9	无	PH	无	无	PH	昆虫
pAcUW31	无	p10, PH	无	无	SV40, PH	昆虫

pBlueBac4.5 (Invitrogen 公司)

载体中有一段编码 β -半乳糖苷酶 5'端的序列,当与 Bac-N-Blue AcMNPV DNA 共转染细胞时,可诱导其表达 β -半乳糖苷酶,产生蓝色菌斑,从而便于筛选。此外,在外源基因下游有一段重组序列,当共转染细胞时,可与野生型 AcMNPV polyhedrin 基因发生同源重组,产生带有外源基因的重组病毒。pBlueBac4.5 的多克隆位点有: Nhe I, BamH I, Sac I, Xho I, Bgl II, Pst I, Kpn I, Sma I, Xba I, EcoR I, BstB I, Hind III, Sal I。

pBlueBacHis2 与 pBlueBac4.5 特征相近,但以 Xpress N 端融合蛋白形式表达。载体含有(His)₆ 和 EK Max 位点,分别用于融合蛋白的纯化和切割,并提供三种不同阅读框架的载体——pBlueBacHis2 A, B & C。

pMelBac (Invitrogen 公司)

pMelBac 与 pBlueBac4.5 特征相近,只是在起始 ATG 和多克隆位点间插入一段蜂毒肽(melittin)的分泌信号序列,从而可高效地将表达蛋白分泌至细胞外。载体提供三种不同阅读框架的载体——pMelBac A, B, C。

pMbac/pPbac (STRATAGENE 公司)

pMbac 与 pMelBac 相似,也含有蜂毒肽的分泌信号序列;pPbac 则含有人胎盘碱性磷酸酶的分泌信号序列。外源基因可通过 Sma I/BamH I 位点插入。

pFASTBac1 (GIBCOBRL 公司)

Bac-TO-Bac 表达系统适用于在大肠杆菌内通过位点专一转座来产生重组的杆状病毒。当重组克隆转化含有辅助质粒及杆状病毒穿梭载体 bacmid 的 DH10Bac 细胞后,载体上 Tn7 位点在辅助质粒的作用下,可将外源基因转移到 bacmid 上。利用此重组 bacmid 转染昆虫细胞,即可得到重组杆状病毒。再利用此病毒转染昆虫细胞进行外源蛋白的过量表达。pFASTBac1 的多克隆位点有:Hind III, Kpn I, Sph I, Xho I, Pst I, Xba I, Nsp V, Not I, Spe I, Sst I, Sal I, Stu I, EcoR I, BssH II, Rsr II, BamH I。

pBacPAK8/9 (CLONTECH 公司)

载体多克隆位点两端为两段 AcMNPV 序列,用于与病毒 DNA 发生重组,产生含有外源基因的重组病毒。多克隆位点末端的 Pac I 位点提供了三种阅读框架的终止密码子,因而可表达无终止子的外源片段。pBacPAK8/9 的多克隆位点有:BamH I, Sse8387 I, Pst I, Stu I, Xho I, BstB I, Xba I, Bgl II, Asp718 I, Kpn I, Ecl136 II, Sac I, EcoR I, Xma I, Sma I, Eag I, Not I, Pac I。

pBacPAK-His 在 pBacPAK8/9 的基础上进一步作了改进,除增加了几个多克隆位点外,在其一侧添加一个 Nco I 位点,为外源片段提供起始 ATG。在起始 ATG 后又加入

(His)₆ 串, 以便于表达蛋白的纯化。pBacPAK-His 提供三种不同阅读框架的载体, pBac-PAK-His 1/2/3。

pAcUW31 (CLONTECH 公司)

载体带有两个强的 Δ cmNPV 启动子—— p10 和 PH, 可在同一细胞内高效表达两种外源基因。共表达可用于制造异源二聚体蛋白及研究蛋白之间的组装、相互作用等。p10 启动子后的插入位点为 Bgl II 和 EcoR I, 而 PH 启动子后的插入位点为 BamH I。

(3) 酵母表达载体

酿酒酵母 *S. cerevisiae* 表达系统

载体通常由酿酒酵母 *GAL1* 基因的上游激活序列和启动子来控制转录, 而 *GAL1* 启动子的转录受半乳糖的严密调控。此外, 载体还含有 *URA3* 基因及 2μ 复制子, 使其在具有 *URA3* 基因型的宿主细胞内可进行筛选和维持高拷贝表达。

常用载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌	表达细胞
pYES2	5.9 kb	10	Amp	无	0	T7	T7	<i>E. coli</i>	yeast
pYEX	7.9~8.4 kb	1~5	Amp	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>	yeast

常用载体的表达特征如下表。

载体名称	表达方式	选择标记	启动子	诱导物	转录终止子	翻译终止子
pYES2	瞬时	URA3	GAL1	半乳糖	CYC1	无
pYEX	稳定	URA3, leu2-d	CUP1, PGK	Cu ²⁺	无	有

pYES2 (Invitrogen 公司)

pYES2 可以附加体的形式进行表达。多克隆位点有: Xba I, Sph I, Xho I, Not I, BstX I, EcoR I, BstX I, BamH I, Sac I, Kpn I, Hind III。

pYEX (CLONTECH 公司)

pYEX 系列载体由 pYEX 4T, pYEX-BX 和 pYEX-S1 组成。pYEX 4T 含有受 Cu²⁺ 诱导的 CUP1 启动子, 外源基因以谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 氨基端融合蛋白的形式表达。GST 可用于抗体检测和蛋白纯化。pYEX 4T 提供三种不同阅读框架的载体, pYEX 4T-1/2/3。pYEX 4T 的多克隆位点有: EcoR I, Sma I, Sal I, Xho I, Not I。

pYEX-BX 与 pYEX 4T 相似, 只是缺少 GST 序列, 故其表达为天然蛋白形式。pYEX-BX 的多克隆位点有: BamH I, Pvu II, Sal I, Pst I, EcoR I。

pYEX-S1 是以 PGK 为启动子, 并含有一段分泌信号序列, 可使于 Sac I 位点插入的呈组成型表达的重组蛋白分泌至胞外。

Pichia 表达系统 (The *Pichia* Expression System)

Pichia 表达系统可高效表达具功能活性的重组蛋白。它即具有原核表达系统的高表达量、可大规模培养和成品低廉的优点, 又具有真核表达系统可进行翻译后修饰、蛋白加

以及折叠等长处。

Pichia pastoris 是一种 methylotrophic 酵母。当缺少常规碳源时,可利用甲醇作为碳源。催化甲醇代谢第一步反应的是乙醇氧化酶,其表达受乙醇氧化酶启动子(AOX1)的控制。通常,在甲醇诱导细胞的可溶性总蛋白中 30%以上为乙醇氧化酶。*Pichia* 表达系统即利用此强 AOX1 启动子来高效表达外源蛋白。

常用载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌	表达细胞
pAO815	7.7 kb	1	Amp	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>	yeast
pPIC3.5K	9.0 kb	5	Amp	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>	yeast
pPICZ/ α	3.3 kb	11	Zeo	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>	yeast
pGAPZ/ α	2.9 kb	11	Zeo	无	无	无	自备	<i>E. coli</i>	yeast

常用载体的表达特征如下表。

载体名称	选择标记	启动子	诱导物	转录终止子	翻译终止子
pAO815	his4	AOX1	甲醇	3'AOX1	无
pPIC3.5K	kan	AOX1	甲醇	3'AOX1	无
pPICZ/ α	zeo	AOX1	甲醇	3'AOX1	无
pGAPZ/ α	zeo	GAP	无	AOX1	无

pAO815 (Invitrogen 公司)

在 5' AOX1 基因上游和 3' AOX1 转录终止子下游分别有一 Bgl II 和 BamH I 位点,用于形成多拷贝外源基因。方法是外源基因在 EcoR I 位点插入,用 Bgl II 和 BamH I 双酶切,得到含有 AOX1 启动子、外源基因和 3' AOX1 转录终止子的表达盒,再通过体外连接形成多拷贝表达盒,最后将其插回到载体中,即可进行多拷贝外源基因的表达。

pPIC9K/3.5K (Invitrogen 公司)

载体带有卡那霉素抗性基因,可拮抗 G418。在 *Pichia* 中可以 1~10% 的自发频率插入多个拷贝的外源基因,在组氨酸缺陷型培养基上,通过载体对 G418 拮抗程度的高低来检验所插入拷贝数的多寡。pPIC3.5K 为细胞内表达载体,其多克隆位点有: BamH I, SnaB I, EcoR I, Avr II, Not I。

pPIC9K 是在 pPIC3.5K 的 BamH I 位点处插入一段分泌信号,因而可进行分泌型表达。

pPICZ/ α (Invitrogen 公司)

pPICZ 和 pAO815 一样可形成多拷贝外源基因,但以 Xpress C 端融合蛋白的形式进行表达,并提供三种不同阅读框架的载体,pPICZ A, B & C。pPICZ 的多克隆位点有: BstB I, EcoR I, Pml I, Sfi I, BsmB I, Asp718 I, Kpn I, Xho I, Sac II, Not I, Xba I。

pPICZ α 是在 pPICZ 的 BstB I 位点上插入一段 α 因子分泌信号,因而可引导融合蛋白分泌至胞外。也提供三种不同阅读框架的载体,pPICZ α A, B & C。

pGAPZ/α (Invitrogen 公司)

pGAPZ/α 由 pPICZ/α 衍生而来,是用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAP)启动子替代 AOX1 启动子,因此不需甲醇的诱导,而以高于 pPICZ/α 的表达量在宿主细胞中呈组成型表达。

27.1.4. 突变载体——pALTER (Promega 公司)

pALTER 由 pALTER 1、pALTER-Ex1、pALTER-Ex2 和 pALTER-MAX 组成,通过对载体抗性的选择来达到筛选突变克隆的目的。

pALTER-1 对氨苄青霉素敏感,在对外源片段进行突变的同时,利用氨苄青霉素修复寡核苷酸来恢复载体的氨苄青霉素抗性,通过筛选具氨苄青霉素抗性的载体,来确定突变重组子。接下来,可通过对氯苄青霉素和四环素抗性的交替筛选来进一步鉴定突变克隆。此外,若外源片段含起始 ATG,可以 β-半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达(图 27-8)。pALTER-1 的主要特征如下表。

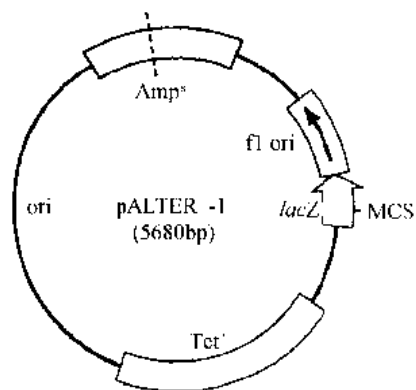


图 27-8 pALTER 的质粒图谱

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
5.7 kb	10	Amp, Tet	有	f1	T7, SP6	T7, SP6, M13	ES1301 mutS

MCS: EcoR I, Sac I, Kpn I, Sma I, BamH I, Xba I, Sal I, Pst I, Sph I, Hind III。

pALTER-Ex1 是一种原核突变表达载体,也是利用氨苄青霉素抗性来筛选突变重组子。在多克隆位点内的两个方向上都有核糖体结合位点和起始 ATG。因此,利用多克隆位点两侧的 T7 和 SP6 启动子可在体外进行转录和翻译,利用和 SP6 同向的 tac 启动子可进行表达。pALTER-Ex1 的主要特征如下:

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
5.9 kb	12	Amp, Tet	无	f1	T7, SP6	T7, SP6, M13	ES1301 mutS

MCS: EcoR I, Hpa I, Nco I, Stu I, Xba I, Pst I, Not I, Sph I, Nsi I, Nde I, BamH I, Hind III。

pALTER-Ex1 的表达特征如下表。

启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
tac	无	有	有	无	无

pALTER-Ex2 是一种利用卡那霉素抗性来筛选突变重组子的原核突变表达载体。含有 p15a 的部分复制子,因而可与以 ColE 为复制子的质粒共存于同一细胞中,适用于对琥珀突变的表达研究。pALTER-Ex2 的其他特征与 pALTER-Ex1 相同。

pALTER-MAX 是一种利用氨苄青霉素抗性来筛选突变重组子的真核突变表达载体。外源片段可在 CMV 启动子的控制下,在哺乳动物细胞中稳定表达。pALTER-MAX 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	宿主菌
5.5 kb	10	Amp, Cm.	无	f1	T3, T7	T3, T7	ES1301 mutS

MCS: Nhe I, Xho I, EcoR I, Mlu I, Kpn I, Xba I, Sal I, Acc I, Sma I, Not I。
pALTER-MAX 的表达特征如下表。

表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 polyA 信号	宿主细胞
稳定	无	CMV I.E.	无	嵌合	SV40 late	哺乳动物

27.1.5. 报告载体

报告载体是以一种易于用生化方法检测的基因作为报告基因,通过其表达强度的高低来研究外源调控因子(如启动子、增强子等)的功能的载体,通常由 p-Basic、p-Enhancer、p-Promoter 和 p-Control 组成(图 27-9)。

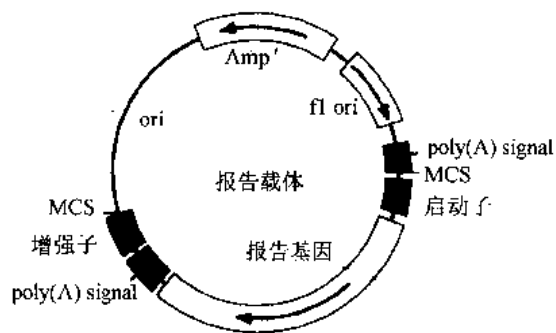


图 27-9 报告载体的质粒图谱
启动子/增强子依载体类型而异。

p-Basic 缺少真核启动子和增强子序列,可最大限度地克隆可能的调控元件,报告基因的表达活力依赖于其上游外源功能性启动子/增强子的正确插入;p-Enhancer 在报告基因的下流含有增强子,可帮助外源启动子高效转录报告基因;p-Promoter 在报告基因的上游含有启动子,可通过将外源增强子插

在启动子-报告基因的上游或下游来研究其功能。p-Control 在报告基因的上下游分别含有启动子和增强子,可保证报告基因在宿主细胞内高效表达,常作为启动子和增强子标准来衡量重组子的表达强度。

常用的报告载体的主要特征如下表。

载体名称	载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
pGL2	5.6~6.0 kb	7~8	Amp	无	f1	无	自备	JM109
pCAT	4.4~4.7 kb	4~6	Amp	无	无	无	自备	JM109
pSEAP	5.8~6.2 kb	6~8	Amp	无	f1	无	无	JM109

常用的报告载体的表达特征如下表。

载体名称	报告基因	启动子/增强子	内含子	加 polyA 信号	宿主细胞
pGL2	<i>luc</i>	SV40	SV40	SV40	哺乳动物
pCAT	<i>cat</i>	SV40	SV40	SV40	哺乳动物
pSEAP	<i>seap</i>	SV40	SV40	SV40	哺乳动物

pGL (Promega 公司)

pGL 是利用萤火虫荧光素酶(luciferase, *luc*)作为报告基因。pGL 的四种载体有一共同的 pUC19 骨架和 *luc* 基因,但含有不同组合的 SV40 早期启动子和增强子,*luc* 基因上游的多聚腺苷化信号在哺乳动物细胞中具有避免从 *luc* 基因上游开始转录的功能,从而起到降低背景的作用。pGL 有 pGL2 和 pGL3 两个系列。pGL2 的多克隆位点有:Kpn I, Sac I, Mlu I, Nhe I, Sma I, Xho I, Bgl II。

pGL3 是在 pGL2 的基础上经改造而成。这些改造包括:对 *luc* 基因进行了改造,使其可在胞液中表达(*luc*+) ,从而避免了外源蛋白对细胞正常功能的干扰;去除了一些保守调控位点和反向重复序列,减少了 *luc* 基因与宿主细胞内转录因子的非特异性反应;改造了真核起始序列并调整了密码子的使用频率,以保证 *luc* 基因在动植物细胞内高效表达;去除了 pGL2 *luc* 基因下游的 SV40 内含子和 3'非翻译区,在此加入一 SV40 晚期多聚腺苷化信号,以提高 RNA 的剪接效率;删除了 *luc* 基因内的常用酶切位点,并在其 5'端插入一 Nco I 位点,以便于在 *luc* 基因的起始 ATG 处构建融合基因。

pCAT (Promega 公司)

pCAT 是利用氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, *cat*)基因作为报告基因,pCAT 的四种载体有一共同的 pUC19 骨架和 *cat* 基因,但含有不同组合的 SV40 启动子和增强子,内含子和多聚腺苷化信号由 SV40 小 T 抗原提供。pCAT 有 pCAT 和 pCAT3 两个系列。pCAT 的多克隆位点有:Pst I, Acc I, Sal I, Xba I 等,此外在 *cat* 基因后有一供外源增强子插入的 BamH I 位点。

pCAT3 与 pGL3 基本相同,差别在于二者使用的报告基因不同。此外,在 pCAT3 的 *cat* 基因 5'端有一嵌合内含子,可提高 *cat* 基因的表达效率及载体在细胞内的稳定性。

pSEAP (CLONTECH 公司)

pSEAP 是利用分泌型人胎盘碱性磷酸酶(human placental alkaline phosphatase, *seap*)作为报告基因。*seap* 作为报告基因的优点在于:由于 SEAP 可分泌至胞外,使转染细胞保持完整,因而避免了因裂解细胞所造成的误差;由于内源碱性磷酸酶含量极微,因而背景很低;SEAP 具有极强的热稳定性,故利用加热手段(65℃)可去除由于内源碱性磷酸酶所造成的背景。pSEAP 的四种载体有一共同 pUC 骨架和 *seap* 基因,但含有不同组合的 SV40 早期启动子和增强子,*seap* 基因上游的 SV40 多聚腺苷化信号在哺乳动物细胞中具有避免 RNA 聚合酶从 *seap* 基因上游开始转录的功能,从而起到降低背景的作用。pSEAP 的多克隆位点有: Asp718, Kpn I, Mlu I, Nhe I, Xho I, Bgl II 等。

其他形式的报告载体

pGFP (CLONTECH 公司)

pGFP 系列载体由 pGFP、pGFP-1、pGFP-N1 和 pGFP-C1 组成,利用水母绿色荧光

蛋白(green fluorescent protein, gfp)作为报告基因来监测基因表达和蛋白定位。

pGFP 可作为 *gfp* 基因的来源,利用基因两端的多克隆位点,可将其完整地切下。*gfp* 基因以相同的阅读框架与 *lacZ* 的起始位点融合,外源片段可以 *lacZ/gfp* 融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。pGFP 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制起始区	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
3.3 kb	19	Amp	无	无	无	无	<i>E. coli</i>

MCS: Hind III, Sph I, Pst I, Sal I, Xba I, BamH I, Xma I, Sma I, Kpn I, Asp718 I, Age I (上游), Bsm I, EcoR I, Stu I, Spe I, Eag I, BsiW I, Bsp120 I, Apa I (下游)。

pGFP 的表达特征如下表。

融合方式	蛋白酶切位点	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
<i>lacZ/gfp</i>	无	<i>lac</i>	无	有	有	无	有

pGFP-1 可用来研究外源启动子的转录强度。外源启动子可由位于 *gfp* 基因上游的多克隆位点插入。*gfp* 基因起始 ATG 两侧的序列被改造为 Kozak 通用翻译起始位点,以提高翻译效率。pGFP-1 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制起始区	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
4.1 kb	18	Kan	无	fl	无	无	<i>E. coli</i>

MCS: Eco47 III, Bgl II, Xho I, Sac I, Ecl136 II, Hind III, EcoR I, Pst I, Sal I, Kpn I, Asp718 I, Sac II, Apa I, Bsp120 I, Xma I, Sma I, BamH I, Age I。

pGFP-1 的表达特征如下表。

表达方式	选择标记	启动子	诱导物	内含子	加 polyA 信号	宿主细胞
瞬时/稳定	nco	无	无	无	SV40	哺乳动物

pGFP-N 是经 pGFP-1 改造而来,方法是在 *gfp* 基因的上游加入了 CMV 启动子/增强子,外源可形成与 GFP 蛋白氨基端相融合的异源蛋白,因而是一种研究蛋白定位和 trafficking 的良好工具。pGFP-N 提供了三种不同阅读框架的载体,pGFP-N1、pGFP-N2 和 pGFP-N3。

pGFP-C 与 pGFP-N 的差别在于其多克隆位点位于 *gfp* 基因的下游,并在其中提供三个不同阅读框架的翻译终止子。因此,外源片段表达所形成的是与 GFP 蛋白羧基端相融合的异源蛋白。同样,pGFP-C 也提供了三种不同阅读框架的载体,pGFP-C1、pGFP-C2 和 pGFP-C3。

pKK232-8 (Pharmacia Biotech 公司)

pKK232-8 由 pBR322 衍生而来,含有一个缺失启动子的氯霉素乙酰转移酶(chlo-

ramphenicol acetyltransferase, cat) 基因。外源启动子在 *cat* 基因前的多克隆位点插入, 通过对 *cat* 基因转录水平的检测, 来评定外源启动子的强度。pKK232-8 的主要特征如下表。

载体大小	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	测序引物	扩增宿主菌
5094 bp	1	Amp	无	无	无	无	<i>E. coli</i>

MCS: Sma I, BamH I, Sal I, Hind III。

pKK232-8 的表达特征如下表。

启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
无	无	无	有	rrnB T ₂ T ₁	有

27.2. λ 噬菌体载体

λ 噬菌体载体是最早使用的克隆载体, 并一直在分子克隆中起着重要的作用, 常用于构建基因组文库和 cDNA 文库。这主要是由于 λ 噬菌体的克隆效率要远远高于质粒载体, 获得的文库大而完整。此外, λ 噬菌体文库还有易于筛选、扩增和保存的优点。λ 噬菌体载体的选择主要需考虑外源 DNA 片段的大小、载体的限制性酶切位点及是否需要进行表达等因素。λ 噬菌体载体通常分为两种类型: 一种为插入型载体, 即通过载体上的一个酶切位点插入外源 DNA 片段, 常用于构建 cDNA 文库, 插入片段在 0~12kb 之间; 另一种为置换型载体, 即在 λ 噬菌体载体非必需区两侧各有一或多个限制性酶切位点, 通过限制性酶切, 外源 DNA 片段可置换非必需区序列而插入载体, 故常用于构建基因组文库, 插入片段在 9~23kb 之间。

27.2.1. 插入型载体

λgt10

λgt10 的插入位点 EcoR I 位于 *cI* 基因内。外源片段的插入可导致 *cI* 基因失活, 故而在宿主菌 C600hfl 上成斑, 而非重组噬菌体呈溶源型生长, 不能成斑, 因此可减小背景。λgt10 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	扩增宿主菌
43.34 kb	7.6 kb	EcoR I	无	无	无	C600hfl

λgt11

λgt11 的插入位点 EcoR I 位于 *lacZ* 基因内, 翻译终止子的上游。外源片段可以在 *lacZ* 启动子的控制和 IPTG 的诱导下, 以 β-半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。因此, 除了用常规的核酸探针筛选外, 还可用抗体作探针进行筛选(图 27-10)。

λgt11 的主要特征如下表。

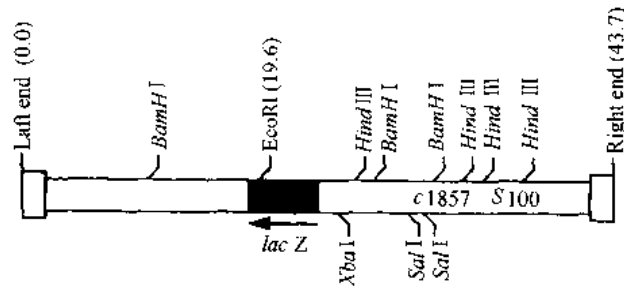


图 27-10 λ gt11 载体图谱

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
43.7 kb	7.2 kb	EcoR I	有	无	无	Y1089(r-), Y1090(r-)

λ gt11 的表达特征如下表。

融合方式	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
lac Z	lac	IPTG	有	有	无	有

λ gt22

λ gt22 是在 λ gt11 的基础上进一步改造而来,主要是增加了外源片段的插入容量,由 λ gt11 的 7.2kb 扩大到 8.2kb;此外,增加了多克隆位点,使克隆更加便利,其他的特征与 λ gt11 相同。 λ gt22 的多克隆位点有:Not I, Xba I, Sac I, Sal I, EcoR I。

λ TripIEx (CLONTECH 公司)

外源片段可插入位于 *lacZ* 基因内的 EcoR I 位点,还可利用 EcoR I/Xba I 为插入位点进行定向克隆。与 λ gt11 一样,外源片段可以 β -半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。因此,既可用核酸探针,也可用抗体,作探针进行筛选。与常规 λ 表达载体不同的是, λ TripIEx 的多克隆位点前有两个不同阅读框架的起始位点和一个 (dT)₁₃ 的滑移位点,此滑移位点位于第二个起始位点和多克隆位点之间,可引起核糖体的移位或 RNA 聚合酶转录中的滑移。因此,外源片段可同时以三种阅读框架进行表达,大大增加了抗体筛选的阳性率。此外,当在宿主 BM25.8 中生长时,通过插入片段两侧 loxP 位点的 cre-lox 专一重组,可简便而高效地环化出具有氨基青霉素抗性的质粒 pTripIEx (图 27-11)。

λ TripIEx 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
42.3 kb	8.0 kb	EcoR I	有	无	无	XL1-Blue

λ TripIEx 的表达特征如下表。

融合方式	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
lac Z	lac	IPTG	有	有	无	有

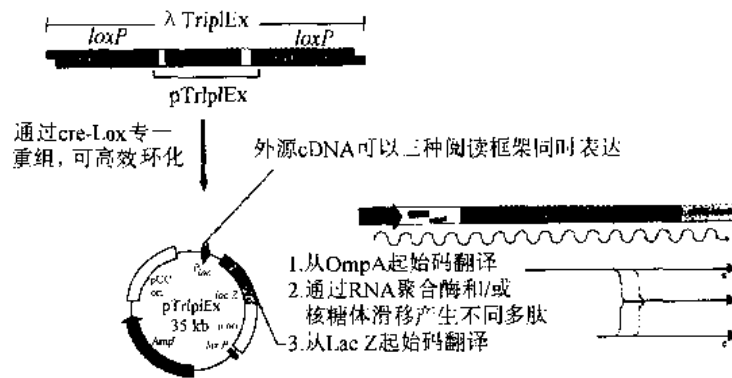


图 27-11 λ TripIEx 载体图谱

λ ExCell(Pharmacia 公司)

位于 *lacZ* 基因内的 *EcoR* I 或 *EcoR* I/*Xba* I 插入位点可分别用于双向或定向克隆,外源片段可以 β -半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。因此,既可用核酸探针,也可用抗体作探针,进行筛选。当 λ ExCell 在宿主 NP66 中生长时,通过插入片段两侧 *attL* 和 *attR* 的位点专一重组,可环化出具氨苄青霉素抗性的质粒 pExCell。 λ ExCell 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
45.5 kb	6.0 kb	7	有	f1	T7, SP6	NM522

MCS: *Sfi* I, *Xho* I, *Hind* III, *Mlu* I, *Not* I, *Bam*H I, *EcoR* I。

λ TripIEx 的表达特征如下表。

融合方式	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
<i>lac Z</i>	<i>lac</i>	IPTG	有	有	无	有

λ ZipLox(GIBCOBRL 公司)

位于 *lacZ* 基因内的 *EcoR* I 或 *Not* I/*Sal* I 插入位点可分别用于双向或定向克隆,外源片段可以 β -半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达。因此,既可用核酸探针,也可用抗体作探针,进行筛选。当 λ ExCell 在宿主 DH10B(双链)或 DH12S(单链)中生长时,通过插入片段两侧 *loxP* 位点的专一重组,可环化出具氨苄青霉素抗性的质粒 pZL 1。 λ ZipLox 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
43.9 kb	7.0 kb	19	有	f1	T7, SP6	Y1090

MCS(常用): *Pst* I, *Kpn* I, *EcoR* I, *Sma* I, *Sal* I, *Sst* I, *Spe* I, *Not* I, *Xba* I,

BamH I, Hind III, Mlu I, Sph I。

λ ZipLox 的表达特征如下表。

融合方式	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
lac Z	lac	IPTG	有	有	无	有

λ ZAP II (STRATAGENE 公司)

多克隆位点位于 *lacZ* 基因内, 外源片段可以 β -半乳糖苷酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中表达, 故可用核酸和抗体两种探针筛选。当 λ ZAP II 与辅助噬菌体 R408 共转染宿主 SOLR 细胞时, 可在 R408 的作用下通过自我切割、环化成具氨苄青霉素抗性的质粒 pBluescript SK⁻。 λ ZAP II 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
49.8 kb	10.0 kb	6	有	f1	T3, T7	XL1-Blue

MCS(常用): Sac I, Not I, Xba I, Spe I, EcoR I, Xho I。

λ ZAP II 的表达特征如下表。

融合方式	启动子	诱导物	RBS	起始 ATG	转录终止子	翻译终止子
lac Z	lac	IPTG	有	有	无	有

27.2.2. 置换型载体

λ GEM-11/12 (Promega 公司)

λ GEM-11/12 在置换区域的两端有两个方向相反的多克隆位点, 多克隆位点的两侧有 T7 和 SP6 启动子, 可通过体外转录产生特异末端的 RNA 探针, 用于染色体行走。此外, 启动子两端有 Sfi I 位点, 可将插入片段连同启动子完整地切下。 λ GEM-11 和 λ GEM-12 的差别在于 λ GEM-11 含有 Avr II 克隆位点, 而 λ GEM-12 则为 Not I 位点。 λ GEM-11/12 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
43.0 kb	9~23 kb	6	无	无	T7, SP6	LE392, NM538, NM539

MCS: Sac I, EcoR I, BamH I, Xho I, Xba I, Avr II (λ GEM-11), Not I (λ GEM-12)。

EMBL3 和 EMBL4

EMBL3/4 由 λ 1059 衍生而来。在置换区域的两端有两个方向相反的多克隆位点(图 27-12)。

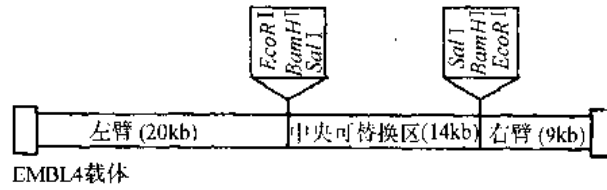


图 27-12 EMBL4 载体图谱

EMBL3/4 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制起始区	体外转录	宿主菌
43.0 kb	9~23 kb	3	Spi	无	无	无	LE392, NM538, NM539

MCS: Sac I, EcoR I, BamH I。

λ DR2(CLONTECH 公司)

λ DR2 为置换型克隆载体,用于构建 cDNA 文库。可利用 BamH I/Xba I 进行定向克隆,再通过 cre-lox 的位点专一重组环化出具氨苄青霉素抗性的质粒 pDR2。 λ DR2 的主要特征如下表。

载体大小	插入片段	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
45.7 kb	9 kb	BamH I /Xba I	Amp	无	无	无	K802, AM1

λ FIX II(STRATAGENE 公司)

λ FIX II 可通过部分填补的技术来大大降低非重组背景。方法是将载体用 Xho I 酶切,再用 dTTP 和 dCTP 部分填补粘性末端,产生 5'-TC 末端,这样载体不能发生自连;同时,用 dGTP 和 dATP 部分填补由 BamH I、Mbo I、Bgl II 或 Sau3A I 酶切的插入片段,所产生的 5'-GA 末端即可与载体连接。此外,在置换区域两端有两个方向相反的多克隆位点,其内分别含有 T3 和 T7 启动子,可通过体外转录产生特异末端的 RNA 探针,用于染色体行走。此外,启动子两端的 Not I 位点,可将插入片段连同启动子完整地切下。 λ FIX II 的主要特征如下:

载体大小	插入片段	MCS	选择标记	蓝白斑筛选	单链复制子	体外转录	宿主菌
41.9 kb	9~23 kb	8	Spi	无	无	T3, T7	XL1-Blue

MCS: Xba I, Sac I, Not I, Sac I, T3/T7, Sal I, Xho I, EcoR I, Xba I。

λ DASH II(STRATAGENE 公司)

λ DASH II 与 λ FIX II 的差别在于多克隆位点不同,其它特征基本相同。 λ DASH II 的

多克隆位点为: Xba I, Sal I, Not I, T3/T7, EcoR I, BamH I, Hind III, Sac I, Xho I, Xba I。

27.3. 宿主系统

27.3.1. 常用于分子克隆的宿主系统的基因型

分子克隆所常用的宿主系统的基因型如表 27-1。

表 27-1 分子克隆常用宿主系统的基因型

菌株	基因型
71/18	supE thi Δ(lac-proAB) F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
AG1	recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1
BB4	supF58 supE44 hsdR514 galK2 galT22 trpR55 metB1 tonA Δ(lac) U169 F'[proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)]
BHB2688	N205 recA (λimm434 cIts b2 red3 Eam4 Sam7)/λ
BHB2690	N205 recA (λimm434 cIts b2 red3 Dam15 Sam7)/λ
BL21(DE3)	hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)
BNN102	sup44E hsdR7 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21
C600	supE44 hsdR thi-1 leuB6 lacY1 tonA21
CES200	sbcB15 recB21 recC22 hsdR
CES201	recA sbcB15 recB21 recC22 hsdR
DH1	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
DH5	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
DH5α	supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1
ED8767	supE44 supF58 hsdS3 recA56 galK2 galT22 metB1
ER1647	scrB28 Δ(mrr-hsdRMS-mcrB) mcrA1272 recD
ER1648	scrB28 Δ(mrr-hsdRMS-mcrB) mcrA1272 recD
GM48	thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44
GM2163	hsdR dam dcm supE
HB101	supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1
HMS174	recA1 hsdR rif
JM101	supE thi-1 Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15]
JM103	supE thi-1 endA1 hsdR4 sbcB15 StrA Δ(lac-proAB) F'[traD36 proA3 ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
JM105	endA sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
JM107	supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15]
JM109(DE3)	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)
JM110	dam dcm supE44 thi leu rpsL lacY galK galT ara tonA thr tsx Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁻

菌株	基 因 型
	lacI ^q lacZ(M15]
K802	supE hsdR gal metB
LE392	supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1
M5219	lacZ trpA rpsL (λbio252 cIts857 H1)
MM294	supE44 hsdR endA1 thi
MV1184	ara Δ(lac-proAB) rpsL thi (φ80 lacZΔM15) Δ(srl-recA) 306; ; Tn10(tet ^r) F'[traD36 proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15]
MV1193	Δ(lac-proAB) rpsL thi endA sbcB15 hsdR4 Δ(srl-recA) 306; ; Tn10(tet ^r) F'[traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
MZ-1	galK 8attL BamN7N53 cIts857 H1 his ilv bio N ⁺
NM519	hsdR recB21 recC22 sbcA23
NM522	supE thi Δ(lac-proAB) hsd5 F'[proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15]
NM531	supE supF hsdR trpR lacY recA13 metB gal
NM538	supF hsdR trpR lacY
NM539	supF hsdR lacY (P2cox)
Q358	supE hsdR φ80 ^r
RR1	supE44 hsdS20 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl 5 mtl-1
SMR10	su (λcos2 ΔB xis1 red3 gamam210 cIts857 nin5 Sam7)/λ
SURE	recB recF sbcC201 uvrC umuC; ; Tn5(kan ^r) lac Δ(hsdRMS) endA1 gyrA96 thi relA1 supE44 F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)
TAP90	supE44 supF58 hsdR pro leuB6 thi 1 rpsL lacY1 tonA1 recD1903; ; mini-tet
TG1	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15]
TG2	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) Δ(srl-recA)306; ; Tn10(tet ^r) F'[traD36 proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15]
XI.1-Blue	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac F'[proAB ⁻ lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)]
XS101	recA1 hsdR rpoB331 F'[kan]
XS127	gyrA thi rpoB331 argE F'[proAB lacI ^q lacZΔM15]
Y1088	Δ(lac)U169 supE supF hsdR metB trpR tonA21 proC; ; Tn5 (pMC9)
Y1089	araD139 Δ(lac)U169Δ(lon) rpsL hflA150 chr; ; Tn10(tet ^r)] (pMC9)
Y1090r	araD139 Δ(lac)U169Δ(lon) rpsL supF hsdR trpC22; ; Tn10(tet ^r) (pMC9)

27.3.2. 常用宿主菌株的遗传标记

常用宿主菌株的遗传标记如表 27-2。

表 27-2 常用宿主菌株的遗传标记

遗传标记	说 明	作 用
ara-14	阿拉伯糖代谢突变	阻断阿拉伯糖分解代谢
b2	b 区域缺失突变	阻止溶源化
cIts857	cI 基因产物突变	使 cI 基因产物对热敏感
dam	腺嘌呤甲基化酶突变	阻断 GmATC 序列中 A 的甲基化
dcm	胞嘧啶甲基化酶突变	阻断 CmCA/TGG 序列中 C 的甲基化
Eam, gamam	琥珀突变	需在 supE 或 supF 宿主菌内增殖
endA1	核糖内切酶突变	改善质粒 DNA 的提取质量
galK	半乳糖激酶突变	阻断半乳糖分解代谢
gyrA96	DNA 旋转酶突变	具萘啶酮酸抗性
hflA	导致高频率溶源化的突变	大大提高溶源性噬菌体的溶源化频率
hsdR (rk ⁻ , mk ⁻)	限制性阴性, 修饰性阴性	防止 DNA 克隆被限制性内切酶切割, 从此菌株提取的 DNA 可用于转化限制性阳性的菌株
hsdS	限制性阴性, 修饰性阴性	防止 DNA 克隆被限制性内切酶切割和甲基化酶修饰
lacI ^q	lacI 抑制蛋白过量产生	产生大量 lac 抑制蛋白, 抑制 lac 启动子的转录
lacY	半乳糖苷通透酶突变	阻断半乳糖的利用
lacZΔM15	β-半乳糖苷酶部分缺失	允许 α 互补, 用于蓝白斑筛选
Δ(lon)	lon 蛋白类缺失	降低对表达的融合蛋白的酶解
mcrA	限制性体系突变	阻断 GmCGC 序列中甲基化 C 的限制性切割
mcrB	限制性体系突变	阻断 AgmCT 序列中甲基化 C 的限制性切割
merB	胱硫醚合成酶突变	需甲硫氨酸维持生长
mtl-1	甘露糖醇代谢突变	阻断甘露糖醇分解代谢
nin5	转录终止位点 tr ₂ 缺失突变	可使延迟早期转录不依赖于 N 基因产物
P2	存在于宿主中的 P2 噬菌体溶源体	抑制含 red 和 gam 基因的 λ 噬菌体的生长
proAB	脯氨酸代谢突变	需脯氨酸维持生长
recA	重组突变	防止外源 DNA 与宿主 DNA 之间的重组, 保持外源片段的稳定性
recB, recC	内切酶 V 突变	降低重组, 影响放射损伤的修复
relA	松弛型表型, 去除紧缩因子的突变	允许在无蛋白质合成的条件下合成 RNA
rpsL	30S 核糖体亚基 12S 突变	具链霉素抗性
Sam7	S 基因产物的琥珀突变	可使感染性噬菌体颗粒在细胞内积累
shcA	重组突变	促进 recB 突变体的生长

遗传标记	说 明	作 用
sbcB	内切酶 I 突变	允许在 recBC 突变株中的重组
supE, supF	抑制子突变	抑制琥珀(UAG)突变
thi-1	硫胺代谢突变	需硫胺(维生素 B ₁)维持生长
Tn5	转座子	编码卡那霉素抗性基因
Tn10	转座子	编码四环素抗性基因
tonA	外膜蛋白突变	具噬菌体 T1 抗性
traD36	转移因子突变	阻止 F' 附加体的转移
xyl-5	木糖代谢突变	阻断木糖代谢分解

27.3.3. 各种克隆载体的常用宿主系统

各种克隆载体的常用宿主系统如表 27-3。

表 27-3 各种克隆载体常用的宿主系统

宿 主	推荐使用菌株
质粒载体宿主	DH1, DH5, DH5 α , HB101, MM294, RR1, TG2
粘粒载体宿主	DH1, DH5, DH5 α , ED8767
噬菌粒载体宿主	MV1184, MV1193, XS101, XS127, XL1-Blue
λ 载体宿主	
通用型宿主	ED8767, K802, LE392, NM531, NM538, Q358
λ gt10 宿主	BNN102, C600
λ gt11 宿主	Y1088, Y1089, Y1090r ⁻
Spi ⁻ 选择和生长宿主	CES200, CES201, NM519, NM539, TAP90
λ ZAP 宿主	BB4, XLI-Blue
T7 启动子基因表达宿主	BL21(DE3), HMS174, JM109(DE3)
λ P1 启动子基因表达宿主	M5219, MZ-1
λ 包装蛋白制备菌株	BHB2688, BHB2690, SMR10
lacZ 筛选宿主	71/18, BB4, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, MV1184, NM522, TG1, TG2, XL1-Blue, XS127
用于克隆真核生物 DNA 的菌株	ER1647, ER1648, SURE
dam ⁻ dem ⁻ 菌株	GM48, GM2163, JM110
recA ⁻ 菌株	AG1, CES201, DH1, DH5, DH5 α , DH2767, HB101, HMS174, JM109, JM109(DE3), NM531, XL1-Blue
recBC ⁻ 菌株	CES200, CES201, NM519
recD ⁻ 菌株	ER1647

(胡松年 袁建刚)

参 考 文 献

- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. . John Wiley & Sons, Inc. , 1992
- Boehringer Mannheim Catalog (1996~1997)
- Clontech Catalog (1996~1997)
- Doyle K, Miles J. Promega: Protocols and Applications Guide (3rd ed.). Promega Corporation, 1996
- Gibcobl Catalog (1996~1997)
- Invitrogen Catalog (1996~1997)
- New England Biolabs Catalog (1996~1997)
- Pharmacia Biotech Catalog (1996~1997)
- Promega Catalog (1996~1997)
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning; a Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- STRATAGENE Catalog (1996~1997)

附 录

1. 国际原子量表*

中文名称	符 号	英文名称	原子序数	原 子 量
锕	Ac	actinium	89	(227)
镅	Es	einsteinium	99	(254)
砷	At	astatine	85	(210)
钯	Pd	palladium	46	106.42
钡	Ba	barium	56	137.33
铋	Bi	bismuth	83	208.9804
铂	Pt	platinum	78	195.08±3
钚	Pu	plutonium	94	(244)
氮	N	nitrogen	7	14.0067
锝	Tc	technetium	43	(98)
镝	Dy	dysprosium	66	162.50±3
碲	Te	tellurium	52	127.60±3
碘	I	iodine	53	126.9045
铊	Tm	thulium	69	168.9342
氡	Rn	radon	86	(222)
锇	Os	osmium	76	190.2
铒	Er	erbium	68	167.26±3
钒	V	vanadium	23	50.9415
钫	Fr	francium	87	(223)
镭	Fm	fermium	100	(257)
氟	F	fluorine	9	18.998403 ²
钆	Gd	gadolinium	64	157.25±3
钙	Ca	calcium	20	40.078±4
锆	Zr	zirconium	40	91.224±2
镉	Cd	cadmium	48	112.41
铬	Cr	chromium	24	51.9961±6
汞	Hg	mercury	80	200.59±3
钴	Co	cobalt	27	58.9332
硅	Si	silicon	14	28.0855±3
铪	Hf	hafnium	72	178.49±3
氦	He	helium	2	4.002602±2

续表

中文名称	符 号	英文名称	原子序数	原 子 量
铪	Db	dubnium	105* *	(262)
铥	Ho	holmium	67	164.9304
镓	Ga	gallium	31	69.723±4
钾	K	potassium	19	39.0983
金	Au	gold	79	196.9665
镭	Cm	curium	96	(247)
锎	Cf	californium	98	(251)
钪	Sc	scandium	21	44.95591
氪	Kr	krypton	36	83.80
铼	Re	rhenum	75	186.207
镧	La	lanthanum	57	138.9055±3
镥	Lr	lawrencium	103	(260)
铑	Rh	rhodium	45	102.9055
镭	Ra	radium	88	226.0254
锂	Li	lithium	3	6.941±2
钌	Ru	ruthenium	44	101.07±2
磷	P	phosphorus	15	30.97376
硫	S	sulfur	16	32.066±6
钆	Rf	rutherfordium	104* *	(261)
镱	Lu	lutetium	71	174.967
铝	Al	aluminum	13	26.98154
氯	Cl	chlorine	17	35.453
镅	Am	americium	95	(243)
镁	Mg	magnesium	12	24.305
钷	Md	mendelevium	101	(258)
锰	Mn	manganese	25	54.9380
钼	Mo	molybdenum	42	95.94
镎	Np	neptunium	93	237.0482
钠	Na	sodium	11	22.98977
氖	Ne	neon	10	20.179
铌	Nb	niobium	41	92.9064
镍	Ni	nickel	28	58.69
钕	Nd	neodymium	60	144.24±3
镎	No	nobelium	102	(259)
锫	Bk	berkelium	97	(247)
硼	B	boron	5	10.811±5
铍	Be	beryllium	4	9.01218
钋	Po	polonium	84	(209)
钷	Pm	promethium	61	(145)
镤	Pa	protactinium	91	231.0359

续表

中文名称	符 号	英文名称	原子序数	原 子 量
镨	Pr	praseodymium	59	140.9077
铅	Pb	lead	82	207.2
氢	H	hydrogen	1	1.00794±7
铷	Rb	rubidium	37	85.4678±3
铯	Cs	cesium	55	132.9054
钐	Sm	samarium	62	150.36±3
砷	As	arsenic	33	74.9216
铈	Ce	cerium	58	140.12
锶	Sr	strontium	38	87.62
铊	Tl	thallium	81	204.383
钛	Ti	titanium	22	47.88±3
钽	Ta	tantalum	73	180.9479
碳	C	carbon	6	12.011
铽	Tb	terbium	65	
锑	Sb	antimony	51	158.9254
铁	Fe	iron	26	121.75±3
铜	Cu	copper	29	55.847±3
钍	Th	thorium	90	63.546±3
钨	W	tungsten (Wolfram)	74	232.0381
硒	Se	selenium	34	183.85±3
锡	Sn	tin	50	78.96±3
氙	Xe	xenon	54	118.710±7
锌	Zn	zinc	30	131.29±3
溴	Br	bromine	35	65.39±2
氩	Ar	argon	18	79.904
氧	O	oxygen	8	39.948
铱	Ir	iridium	77	15.9994±3
钇	Y	yttrium	39	192.22±3
镱	Yb	ytterbium	70	88.9059
铟	In	indium	49	173.04±3
银	Ag	silver	47	114.82
铀	U	uranium	92	107.8682±3
铕	Eu	europium	63	238.0289
锗	Ge	germanium	32	151.96
镅	Sg	seaborgium	106**	72.59±3
錀	Bh	bohrium	107**	(263)
𨭈	Hs	hassium	108**	(262)
𨭉	Mt	meitnerium	109**	

* 本表根据1983年国际原子量表的原子量,以碳12等于12为基准 $A_r(^{12}\text{C}) = 12$ 。

** 根据全国科学技术名词审定委员会公布的名称(101~109),1998.1。

括号内的数字是寿命最长的放射性核素的质量数,见 Pure & Applied Chemistry, 1983,56, 652~674。

2. 系统国际单位制

系统国际单位制 (SI, System International Unites) 是在1960年为国际计量总会所承认的、以公制(即米制)为基础的系统单位制。SI 单位制统一了各学科计量单位的混乱用法, 简化了各种单位制的换算手续, 现已在各国的各个领域里普遍使用。计有: 国际单位制的基本单位、辅助单位和有专门名称的导出单位。

2.1. 国际单位制的基本单位

量的名称	单位名称	单位符号
长度	米	m
质量	千克[公斤]	kg
时间	秒	s
电流强度	安[培]	A
热力学温度	开[尔文]	K
物质的量	摩[尔]	mol
发光强度	坎[德拉]	cd

热力学温度通常使用摄氏温度(代号 $^{\circ}\text{C}$)表示

2.2. 国际单位制的辅助单位

量的名称	单位名称	单位符号
平面角	弧度	rad
立体角	球面度	sr

2.3. 国际单位制中具有专门名称的导出单位

量的名称	单位名称	单位符号	其它表示式例
频率	赫[兹]	Hz	s^{-1}
力、重力	牛[顿]	N	$\text{kg} \cdot \text{m}/\text{s}^2$
压力, 压强, 应力	帕[斯卡]	Pa	N/m^2
能量, 功, 热	焦[耳]	J	$\text{N} \cdot \text{m}$
功率, 辐射通量	瓦[特]	W	J/s
电荷量	库[仑]	C	$\text{A} \cdot \text{s}$
电位, 电压, 电动势	伏[特]	V	W/A
电容	法[拉]	F	C/V
电阻	欧[姆]	Ω	V/A
电导	西[门子]	S	A/V
磁通量	韦[伯]	Wb	$\text{V} \cdot \text{s}$
磁通量密度, 磁感应强度	特[斯拉]	T	Wb/m^2
电感	亨[利]	H	Wb/A
摄氏温度	摄氏度	$^{\circ}\text{C}$	
光通量	流[明]	lm	$\text{cd} \cdot \text{sr}$
光照度	勒[克斯]	lx	lm/m^2
放射性活度	贝可[勒尔]	Bq	s^{-1}
吸收剂量	戈[瑞]	Gy	J/kg
剂量当量	希[沃特]	Sv	J/kg

3. 用于化合物名词的数字前缀

数 字	前 缀	数 字	前 缀
1/2	hemi-	21	heneicosa
1	mono-	22	docosa
1½	sesqui-	23	tricoso-
2	di-, bi-	24	tetracoso-
3	tri-	25	pentaso-
4	tetra-	26	hexacoso-
5	penta-	27	heptacoso-
6	hexa-	28	octacoso-
7	hepta-	29	nonacoso-
8	octa-	30	tricono-
9	ennea-	40	tetracono-
10	deca-	50	pentacono-
11	hendeca-, undeca-	60	hexacono-
12	dodeca-	70	heptacono-
13	trideca-	80	octacono-
14	tetradeca-	90	nonacono-
15	pentadeca-	100	hecta-
16	hexadeca-	101	henhecta-
17	heptadeca-	102	dohecta-
18	octadeca-	110	decabecta-
19	nonadeca-	120	eicosahecta-
20	eicosa	200	dicto-

4. SI 单位的前缀

分 数				因 数			
因数	前缀	中文	符号	因数	前缀	中文	符号
10 ⁻¹⁸	atto	阿[托]	a	10	deca	十	da
10 ⁻¹⁵	femto	飞[毋托]	f	10 ²	hecta	百	h
10 ⁻¹²	pico	皮[可]	p	10 ³	kilo	千	k
10 ⁻⁹	nano	纳[诺]	n	10 ⁶	mega	兆	M
10 ⁻⁶	micro	微	μ	10 ⁹	giga	吉[咖]	G
10 ⁻³	milli	毫	m	10 ¹²	tera	太[拉]	T
10 ⁻²	centi	厘	c	10 ¹⁵	peta	拍[它]	P
10 ⁻¹	deci	分	d	10 ¹⁸	exa	艾[可萨]	E

5. 罗马数字表

数 字									
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
XX	XXX	XL	L	LX	LXX	LXXX	XC	XCIX	C
20	30	40	50	60	70	80	90	99	100
CC	CCC	CD	D	DC	DCC	DCCC	CM	CMXC	M
200	300	400	500	600	700	800	900	990	1000

6. 希腊字母表

希 腊 字 母						
大 写	小 写	英文读音	相当拉丁字母	国际音标注音	中文译音	
A	α	alpha	a	alfa	阿尔法	
B	β	beta	b	beta	贝塔	
Γ	γ	gamma	g	gamma	伽马	
Δ	δ	delta	d	delta	德尔塔	
E	ε	epsilon	e	epsilon	伊普西隆	
Z	ζ	zeta	z	zeta	截塔	
H	η	eta	ē	eta	艾塔	
Θ	θ	theta	th	θ ito	西塔	
I	ι	iota	i	iota	伊奥他	
K	κ	kappa	k,c	kappa	卡帕	
Λ	λ	lombda	l	lambda	兰姆达	
M	μ	mu	m	miu	缪	
N	ν	nu	n	niu	纽	
Ξ	ξ	xi	x(ks)	kis	可赛	
O	ο	omicron	o	omikron	奥密克戎	
Π	π	pi	p	pai	派	
P	ρ	rho	r	rou	柔	
Σ	σ	sigma	s	sigma	西格马	
T	τ	tau	t	tau	陶	
Υ	υ	upsilon	u	jupsilon	宇普西隆	
Φ	φ	phi	f,ph	fai	斐	
X	χ	chi	ch,kh	khai	喜	
Ψ	ψ	psi	ps	psai	普西	
Ω	ω	omiga	o	oumiga	奥米伽	

7. 常用实验动物的选择

动物类型	重要特点	曾用于以下研究工作
两栖纲 (如蛙与蟾蜍)	与人的关系较远, 体小, 易于饲养, 蛙具有薄的膜样皮肤	内分泌学, 生殖和胚胎学, 变态, 遗传, 膜生理和生化及放射医学研究
爬行纲 (如蛇)	与人的关系较远,	再生, 神经生理及毒素研究等(其中特别是对蛇毒的利用)
鸟纲 (如鸡胚)	易得到, 可大量人工繁殖, 是易于处理的生命形式, 对病毒敏感	病毒学, 肿瘤学, 内分泌学, 营养, 药理学, 组织移植, 胚胎学, 毒理学及畸胎学等
成年鸟类 (如鸡)	易得到, 饲养容易, 可大量人工繁殖。有几种代谢的特点, 和高代谢率	生理学, 维生素研究, 代谢及遗传研究等
哺乳纲 (多种类)	基础生物学与人类相似	在各项医学生物学及其相关的研究工作中是最常用的动物类型
啮齿目 (如大鼠, 小鼠)	价廉, 体小, 易于饲养和管理, 经广泛研究有了很多不同的纯系, 能大量应用, 妊娠期短, 繁殖迅速	医学, 生物学研究中广泛应用, 包括肿瘤学, 移植, 化疗, 毒理学, 畸胎学, 微生物学, 生物测定, 实验外科, 生物化学, 遗传, 生理学及行为研究等。
豚鼠	驯顺, 但饲养和繁殖较大鼠和小鼠困难, 食物中需要维生素 C。耳蜗敏感, 对青霉素毒性较小鼠敏感。并对人类传染病敏感	毒理学, 细菌学, 病毒学, 维生素研究, 耗氧, 听觉, 维生素 C 研究, 血清学及补体等
地鼠 (叙利亚的和中国的)	冬眠动物(叙利亚), 糖尿病株(中国的)	免疫学, 组织培养, 肿瘤学, 病毒学
兔目 (兔)	性情温顺, 饲养简易, 无白发排卵, 妊娠期短, 繁殖迅速。有好几种纯系可用, 耳大适于采血和注射	外科(包括血管显微外科), 制备抗血清, 生物测定, 生殖和胚胎学, 高血压研究, 微生物学及毒理学等

续表

动物类型	重要特点	曾用于以下研究工作
冬眠动物 (如蝙蝠、刺猬及地松鼠等)	异常的生理特征	同种移植耐受性研究(蝙蝠), 肌肉生理学(刺猬), 冬眠和内分泌学等
肉食目		
雪貂	比较容易管理, 能驯养, 可用以代替猫	病毒学, 生理学, 生殖,
猫	繁殖和管理会有些困难。循环, 消化和神经肌肉系统与人对比, 较啮齿动物为满意。有脑图可以利用。血压稳定	生理学, 神经系统(特别是中枢神经系统), 药理学及行为科学研究等
狗	大小中等或大型, 可训练, 与人比较有某些代谢差异。肠短, 胃小, 肝多叶, 胰腺分散。两侧胸腔不完全分开。血管系统易于利用	胃肠学、肝胆和胰脏研究, 血液化学, 外科(包括: 血管, 移植, 肝), 毒理学, 实验疾病(如肝和肾), 兽医学等
有蹄目		
牛	大型动物, 需要特殊动物房设备, 价昂。驯养, 反刍。特殊的营养和比较生理学及代谢。乳腺大可利用	哺乳, 营养, 农业及兽医学, 动物生物化学制药等
山羊与绵羊	同牛	营养, 妇科学, 胎儿研究, 肺和心血管研究, 外科学, 血清学等
猪	价廉, 易得到并比较容易饲养, 生长快, 驯养, 纯系。小猪(minipigs)可得到, 但价昂。成年猪体大, 难于管理。解剖学和某些生理学比其他动物(如狗)更类似人的。肠大(但不反刍。)	营养, 外科学, 肝、肾和血管研究, 皮肤病学, 移植, 免疫学, 矫形外科研究及牙科学等
灵长目		
有较多种类	价昂, 需特殊动物房饲养, 管理较困难, 是最近似于人类的理想实验动物, 可感染许多人类的疾病	有一般和广泛的潜能。妇产科学, 胚胎学, 微生物学(特别是病毒学), 病理学, 免疫学, 寄生虫学, 毒理学, 外科学, 移植, 心血管研究, 血液化学, 神经病学, 骨骼, 牙科, 营养, 行为科学的研究及生物制品学等

本表引自 Cuschieri A, Baker P R. Introduction to Research in Medical Sciences. 顾方舟等译, 人民卫生出版社, 1981, 编者作了一些修改。

8. 几种常用实验动物的总血液量

实验动物种类	总血液量/体重(%)
小鼠	5.4~8.2 (6.6)
大鼠	4.0~5.3 (4.3)
田鼠	5.0~5.8
豚鼠	4.5~8.3 (5.8)
兔	4.5~8.1 (5.0)

本表引自 井村伸正等編. 生化学ハンドブック. 丸善株式会社, 1984.

9. 几种常用实验动物的采血量和采血方法

实验动物种类	采血量	采血方法
小鼠	多量 (全血) 中量 (0.1~0.2ml) 少量 (数滴)	心脏穿刺, 断头 眼窝静脉丛穿刺 剪断一小截鼠尾
大鼠	多量 (全血) 中量 (1.0~1.5 ml) 少量 (0.3~0.5 ml)	心脏穿刺, 后大静脉穿刺 眼窝静脉丛穿刺 尾静脉剪断一截
田鼠	多量 (全血) 中量 (0.5~1.0 ml) 少量 (数滴)	心脏穿刺, 断头 眼窝静脉丛穿刺 足静脉穿刺
豚鼠	多量 (全血) 中量 (3~5 ml) 少量 (数滴)	心脏穿刺 心脏穿刺 足静脉穿刺
兔	多量 (全血) 中量 (10~15 ml) 少量 (3~5 ml)	颈动脉切断 心脏穿刺 耳静脉穿刺

* 括号内的数字是指成年小鼠。

本表引自 井村伸正等编, 生化学ハンドブック, 丸善株式会社, 1984.

10. 标准筛目与其直径尺寸对照表

标准筛目(目)	直径(μm)	标准筛目(目)	直径(μm)
2500	5	210	70
2000	10	200	74
1680	12	177	80
1410	14	149	100
1190	16	125	120
1000	18	120	125
841	20	105	140
707	25	100	150
595	30	88	170
500	35	74	200
420	40	70	210
400	37	63	230
354	45	53	270
297	50	44	325
270	53	37	400
250	60	20	625
230	63		

11. 各种铬酸洗液

重铬酸钾为氧化剂,它与硫酸所组成的铬酸洗液氧化力强,是实验室里最常用的强氧化洗液之一,一般称之为铬酸混合剂(chromic acid mixture)或洗液(clean mixture, clean solution),其配制方法虽十分简单,但在反应过程中能产生大量的热,并有迸溅的危险.所以在配制铬酸洗液时要特别注意.新配制的铬酸洗液应为深橙红色,配合比例中浓硫酸的含量高的洗涤效果好。

11.1. 一些铬酸洗液的配方

重铬酸钾 (g)	水 (ml)	浓硫酸 (ml)
10	100	30
10	100	75
10	100	100
12.7	100	900 (18)
12.7	100	100
2	5	65
15	—	500

重铬酸钾 (g)	水 (ml)	浓硫酸 (ml)
50	—	1000
50	5	1000
80	1000	100
200	500	500

引自北京大学生物化学教研室编的生物化学实验指导,高教出版社.

引自井川伸正等编.生化学ハンドブック.丸善株式会社,1984.

11.2. 铬酸洗液的配制方法

铬酸洗液的配制应视需要来选择,无论使用那种配合比例,只要是含水的,即使含水量很少,也要先将重铬酸钾溶于水。必要时可加热促溶,待溶液冷却后,在不停搅拌下将浓硫酸缓缓加入.注意不可使温度上升太快和不要出现铬酸结晶.配制铬酸洗液应使用耐热的容器,如酸缸等.在大量配制时需穿着必要的防护用品。

(吴 肇)

12. 生物化学和分子生物学研究中常用的部分专业性期刊

有关生物化学和分子生物学领域中的期刊很多,随着科学的迅速发展,学科之间的相互渗透,特别是许多学科均进入了分子水平的研究,生物化学、分子生物学中的许多课题与诸如生理学、遗传学、免疫学、生物工程学、生物物理学、生物技术、医学、微生物及毒素等各学科间的交叉日益密切,需要参考的文献更为广泛,但由于篇幅的关系,只能择要列出一些全国性的期刊供读者参考。

12.1. 中文期刊

癌症. 6期/年 中山医科大学肿瘤防治中心主办

动物学报. 4期/年 中国科学院动物研究所主办

国外医学:分子生物学分册. 6期/年 武汉同济医科大学主办

国外医学:老年医学分册. 6期/年 卫生部医学情报工作管理委员会主办

国外医学:临床生物化学与检验学分册. 6期/年 重庆市医学情报研究所主办

国外医学:免疫学分册. 6期/年 哈尔滨医科大学、黑龙江医学科学院主办

国外医学:内分泌学分册. 4期/年 天津医科大学国外医学内分泌学分册编辑部主办

国外医学:生物医学工程分册. 6期/年 中国医学科学院生物医学工程研究所主办

国外医学:输血及血液学分册. 6期/年 中国医学科学院输血研究所主办

国外医学:微生物学分册. 6期/年 上海医科大学主办

国外医学:药学分册. 6期/年 军事医学科学院毒物药物研究所主办

国外医学:遗传学分册. 6期/年 哈尔滨医科大学、黑龙江医学科学院主办

国外医学:肿瘤学分册. 6期/年 山东省医学科学院、山东省医学情报研究所主办

国外医药:合成药、生化药、制剂分册. 6期/年 国家医药管理局医药工业信息中心主办

化学学报. 12期/年 中国化学会化学学报编辑委员会主办

基础医学与临床. 6期/年 北京生理科学会主办

科学. 12期/年 国家科委西南信息中心主办

科学通报. 24期/年 中国科学院主办

生理科学进展. 6期/年 中国生理学会主办

生理学报. 6期/年 中国科学院上海生理研究所主办

生命的化学. 6期/年 中国生物化学与分子生物学会、上海生物化学与分子生物学会主办

生物工程学报. 4期/年 中国微生物学会主办

生物化学与生物物理进展. 6期/年 中国科学院生物物理所、中国生物物理学会主办

生物化学与生物物理学报. 6期/年 中国科学院上海生物化学研究所主办

生物技术通讯. 6期/年 中国农业科学院科技文献信息中心等单位主办

生物物理学报. 4期/年 生物物理学报编辑委员会主办

生物医学工程学杂志. 4期/年 四川省生物医学工程学会等单位主办

生物学通报. 12期/年 中国动物学会、中国植物学会主办

实验生物学报. 4期/年 中国细胞生物学学会主办

微生物学学报. 6期/年 中国科学院微生物研究所主办

细胞生物学杂志, 4期/年 中国细胞生物学会主办
药学报, 6期/年 军事医学科学院毒物药物研究所主办
遗传学报, 6期/年 中国科学院遗传学研究所、中国遗传学会主办
植物学报, 12期/年 中国科学院植物研究所、北京大学生命科学学院主办
中国癌症杂志, 4期/年 上海医科大学主办
中国抗生素杂志, 6期/年 国家医药管理局四川抗生素工业所等单位主办
中国科学C辑, 6期/年 中国科学院主办
中国免疫学杂志, 6期/年 中国免疫学会主办
中国生化药物杂志, 6期/年 全国生化制药情报中心站等单位主办
中国生物化学与分子生物学报, 6期/年 中国生物化学会与分子生物学会主办
中国生物制品学杂志, 4期/年 中华预防医学会主办
中国生物医学工程学报, 4期/年 中国生物医学工程学会主办
中国药理学与毒理学杂志,
中国药学杂志, 12期/年 中国药学会主办
中国应用生理杂志, 4期/年 中国生理学会主办
中国医学科学院学报, 6期/年 中国医学科学院主办
中国医药工业杂志, 12期/年 国家医药管理局医药工业信息中心主办
中国组织化学与细胞化学杂志, 6期/年 中国解剖学会主办
中华内分泌杂志, 6期/年 中华医学会主办
中华医学杂志, 12期/年 中华医学会主办
中华医学检验杂志, 6期/年 中华医学会主办
中华血液学杂志, 12期/年 中华医学会主办
中华肿瘤杂志, 6期/年 中华医学会主办

12.2. 日文期刊

癌の臨床, 15期/年 筱原出版
(癌的臨床)
癌と化学療法, 12期/年 癌と化学療法社
(癌与化学治療法)
比較生理生化学, 4期/年 比較生理生化学会
(比較生理生物化学)
ウイルス, 2期/年 日本病毒学会
(病毒)
蛋白質、核酸、酵素, 16期/年 共立出版株式会社
(蛋白質、核酸、酶)
ぶんせき, 12期/年 日本分析化学会
(分析)
分析化学, 12期/年 日本分析化学会
(分析化学)
化学(附化学増刊), 12/年 日本化学会

[化学 附化学増刊]

化学と生物. 12期/年 日本农芸化学会

(化学与生物)

呼吸と循環. 12期/年 医学書院

(呼吸与循环)

Genes & Genetic System(日文). 6期/年 日本遺伝学会

(基因和遗传系统)

科学. 12期/年 岩波書店

(科学)

科学朝日. 4期/年 朝日新聞社

(科学今日)

臨床電子顕微鏡学会誌. 2期/年 臨床電子顕微鏡学会

(臨床電子顕微鏡学会雑誌)

臨床検査. 12期/年 秀潤社

(臨床検査薬)

臨床薬理. 4期/年 臨床薬理学会

(臨床薬理学)

日本臨床細胞学会誌. 6期/年 日本臨床細胞学会

(日本臨床細胞学会雑誌)

ライフサイエンス. 36期/年 日本科学技術情報中心

(生命科学)

生物工学会志. 6期/年 日本生物工学会

(生物工程学会雑誌)

生化学. 12期/年 日本生化学会

(生物化学)

生物物理化学. 6期/年 日本電器泳動学会

(生物物理化学)

ビタミン. 12期/年 日本ビタミン学会

(維生素)

細胞工学. 12期/年 秀潤社

(細胞工学)

遺伝(生物の科学). 12期/年 遺伝学普及会,裳華堂

(遺伝)

12.3. 英文期刊

Advances in Enzyme Regulation. 1/yr. (Pergamon Press Ltd.)

(酶调节进展)

Amino Acids. 3/yr. (Springer-Verlag)

(氨基酸)

Analytical Biochemistry. 16/yr. (Academic Press, Inc.)

(分析生物化学)
 Annual Review of Biochemistry. 1/yr. (Annual Reviews, Inc.)
 (生物化学年评)

Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 1/yr. (Annual Reviews, Inc.)
 (生物物理与分子结构年评)

Annual Review of Genetics. 1/yr. (Annual Reviews, Inc.)
 (遗传学年评)

Applied Biochemistry & Microbiology. 6/yr. (Plenum Publishing Corp.)
 (应用生物化学与微生物学)

Archives of Biochemistry & Biophysics. 24/yr. (Academic Press, Inc.)
 (生物化学与生物物理学季刊)

BBA—Biochimica et Biophysica Acta:
 (生物化学与生物物理学报)

 Bioenergetics. (with “BBA Reviews on Bioenergetics”) 15/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (生物能学) (包括生物能学评论)

 Biomembranes. (with “BBA Reviews on Biomembranes”) 16/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (生物膜) [附:生物膜评论]

 General Subject. 9/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (一般论题)

 Gene structure and Expression. 15/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (基因结构与表达)

 Lipids & Lipid Metabolism. 18/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (类脂及其代谢)

 Molecular Cell Research. 15/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (分子细胞研究)

 Protein Structure & Molecular Enzymology 14/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (蛋白质结构与分子酶学)

 Reviews on Cancer. 6/yr. (Elsevier Science Publishers)
 (癌评论)

Biochemical and Biophysical Research Communication. 36/yr. (Academic Press, Inc.)
 (生物化学及生物物理研究通讯)

Biochemical Journal. 24/yr. (Company of Biologist Ltd.)
 (生物化学杂志)

Biochemical Society Transactions. 4/yr. (Protland Press Ltd.)
 (生物化学会刊)

Biochemistry. 52/yr. (American Chemical Society)

(生物化学)

Biochemistry and Molecular Biology International. 18/yr. (Harcourt Brace Jovanovich, Australia)

(国际生物化学和分子生物学)

Biochemistry. Supplementary Material. 1/yr. (American Chemical Society)

(生物化学. 补充材料)

Bioengineering Abstracts. 12/yr. (Engineering Information, Inc.)

(生物工程文摘)

Bioorganic Chemistry. 4/yr. (Academic Press, Inc.)

(生物有机化学)

Biotechnology and Applied Biochemistry. 6/yr. (Protland Press Ltd.)

(生物技术与应用生物化学)

Biotechnology & Bioengineering. 24/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)

(生物技术和生物工程)

Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 1/yr. (Intercept Ltd.)

(生物技术与遗传工程评论)

Blood (The Journal of the American Society of Hematology). 24/yr. (W. B. Saunders Co.)

(血液)

Cambridge Scientific Biochemistry Abstracts,

(剑桥科学生物化学文摘)

Part 1: Biological Membranes. 12/yr.

(第一部分: 生物膜)

Part 2: Nucleic Acid. 12/yr.

(第二部分: 核酸)

Part 3: Amino Acids, Peptides & Proteins. 12/yr. (Cambridge Scientific Abstracts)

(第三部分: 氨基酸, 肽与蛋白)

Cancer (A Journal of the American Cancer Society). 24/yr. (J. B. Lippincott Co.)

(癌)

Cancer Research. 24/yr. (The American Association for Cancer Research Inc.)

(癌研究)

CAS BioTech Updates;

(化学文摘社生物技术文献时报)

Genetic Engineering. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)

(遗传工程)

Antibody Conjugates. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)

(抗体结合)

Nucleic Acid & Protein Sequences. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)

- (核酸与蛋白质顺序)
DNA Formation & Repair. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(DNA 形成和修复)
Cell & Tissue Culture. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(细胞和组织培养)
DNA & RNA Probes. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(DNA 与 RNA 探查物)
Enzyme in Biotechnology. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(酶在生物技术中的应用)
Product Purification and Separation. 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(产物纯化与分离)
- Cell. 25/yr. (Cell Press)
(细胞)
- Cell Biochemistry and Function. 12/yr. (Wiley & Sons, Inc)
(细胞生物化学及功能)
- Cell Growth & Differentiation. 12/yr. (Waverly Press)
(细胞生长和分化)
- Chemical Abstracts; Biochemistry Sections 26/yr. (Chemical Abstracts Services)
(化学文摘:生物化学分册)
- Chemistry and Biology. 24/yr. (Current Biology Ltd)
(化学及生物学)
- Chemistry and Physics of Lipids. 15/yr. (Elsevier Science Publishing Co.)
(脂类化学与物理学)
- Chemtracts; Biochemistry and Molecular Biology. 6/yr. (Data Trace Medical Publishers, Inc.)
(化学文集:生物化学和分子生物学)
- Chromosomes. 12/yr. (Springer Verlag)
(染色体)
- Clinical & Experimental Immunology. 12/yr. (Blackwell Scientific Publications Ltd.)
(临床和实验免疫学)
- Comparative Biochemistry & Physiology, Part B: Comparative Biochemistry & Biology. 12/yr.
(Pergamon Press Ltd.)
(比较生物化学与生理学, B 辑:比较生物化学与分子生物学)
- CRC Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 6/yr. (CRC Press Inc.)
(CRC 生物化学和分子生物学评论)
- Current Opinion Ingenetics and Development. 12/yr. (Current Biology Ltd)
(遗传学及发育的现代观)
- Cyclic AMP. 24/ry. (Sheffield University Biomedical Information Service)

(环腺苷酸)

DNA and Cell Biology. 10/yr. (Mary Ann Liebert, Inc.)
(DNA 和细胞生物学)

DNA Sequence. 6/yr. (STBS Ltd.)
(DNA 顺序)

European Journal of Biochemistry. 24/yr. (Springer—Verlag)
(欧洲生物化学杂志)

Experimental Cell Research. 12/yr. (Academic Publishers)
(实验细胞研究)

Experimental Hematology. 13/yr. (Springer—Verlag)
(实验血液学)

Free Radical in Biology & Medicine. 12/yr. (Pergammon Press Ltd.)
(自由基生物学与医学)

Free Radical Research Communications. 12/yr. (STBS Ltd.)
(自由基研究通讯)

Gene. 26/yr. (Elsevier Science Publishers B. V.)
(基因)

Genetics. 12/yr. (Waverly Press)
(遗传学)

Genome Research. 12/yr. (Cold Spring Harbor Laboratory Press)
(基因组研究)

Genomics. (Academic Press)
(基因组)

Hormone Research (International Journal of Experimental & Clinical Endocrinology).
12/yr.
(S. Karger AG)
(激素研究)

Human Antibodies and Hybridomas. 4/yr. (Butterworth—Heinemann Publishers)
(人类抗体和杂交瘤)

Human Molecular Genetics. 12/yr. (Oxford University Publishers)
(人类分子遗传学)

Hybridoma. 6/yr. (Mary Ann Liebert Inc.)
(杂交瘤)

Immunology. 12/yr. (Blackwell Scientific Publications Ltd.)
(免疫学)

Insulin and Glucagon. 24/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)
(胰岛素与胰高血糖素)

International Biotechnology Laboratory. 6/yr. (International Scientific Communications
Inc.)

(国际生物技术实验室)
International Journal of Biochemistry. 12/yr. (Pergammon Press Ltd.)
(国际生物化学杂志)
International Journal of Peptide & Protein Research. 12/yr. (Munksgaard International Publishers Ltd.)
(国际肽和蛋白质研究杂志)
Journal of Biochemistry. 12/yr. (日本生化学会)
(日本生物化学杂志, 英文)
Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 6/yr. (Plenum Publishing Corp.)
(生物能学与生物膜学杂志)
Journal of Biological Chemistry. 52/yr. (American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc)
(生物化学杂志)
Journal of Carbohydrates. 8/yr. (Marcel Dekker, Inc.)
(碳水化合物化学杂志)
Journal of Cellular Physiology. 12/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)
(细胞生理学杂志)
Journal of Inorganic Biochemistry. 16/yr. (Elsevier Science Publishing Co.)
(无机生物化学杂志)
Journal of Lipid Research. 12/yr. (Lipid Research, Inc.)
(脂类研究杂志)
Journal of Molecular Biology. 24/yr. (Harcourt brace Jovanovich Ltd.)
(分子生物学杂志)
Journal of Protein Chemistry. 6/yr. (Plenum Publishing Corp.)
(蛋白质化学杂志)
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 24/yr. (Pergammon Press Ltd.)
(类固醇生化学与分子生物学杂志)
Laboratory Investigation. 12/yr. (Williams & Wilkins)
(实验研究)
Lectins. 12/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)
(外源凝集素)
Life Chemistry Reports 1/ry. (STBS Ltd.)
(生命化学报告)
Liposomes. 24/ry. (Sheffield University Biomedical Information Service)
(微脂粒)
Membrane Biochemistry. 4/yr. (Taylor & Francis)
(膜生物化学)
Membrane Proteins. 12/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)

(膜蛋白)

Methods in Molecular and Cellular Biology. 6/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)

(分子和细胞生物学方法)

Molecular and Cellular Biochemistry. 22/yr. (Kluwer Academic Publishers Group)

(分子生物学和细胞生物化学)

Molecular and Cellular Biology. 12/yr. (MCB, American Society for Microbiology)

(分子和细胞生物学)

Molecular Biology Reports. 6/yr. (Kluwer Academic Publishers)

(分子生物学报道)

Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 12/yr. (Allerton Press Inc.)

(分子遗传、微生物与病毒学)

Molecular Medicine Today. 12/yr. (Elsevier Sciences Ltd)

(今日分子医学)

Molecular Membrane Biology. 4/yr. (Taylor & Francis)

(分子膜生物学)

Nature. 52/yr. Macmillan Magazine Ltd.

(自然)

Nature Genetics. 12/yr. (Nature Publishing Co)

(自然遗传学)

Nucleic Acids Research. 25/yr. (Oxford University Press)

(核酸研究)

Nucleosides and Nucleotides. 10/yr. (Marcel Dekker, Inc.)

(核苷与核苷酸)

PCR Methods and Applications. 1/yr. (Cold Spring Harbor Laboratory Press)

(聚合酶链式反应方法和应用)

Peptides. 6/yr. (Pergammon Press Ltd)

(肽)

Plasmid. 6/yr. (Academic Press. Inc.)

(质粒)

Polypeptides. 12/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)

(多肽)

Preparative Biochemistry. 4/yr. (Marcel Dekker, Inc.)

(制备生物化学)

Proceeding of the National Academy Sciences Press USA. 24/yr. (National Academy

Sciences Press)

(美国国家科学院汇编)

Progress in Biophysics and Molecular Biology. 6/yr. (Pergammon Press Ltd.)

(生物物理学与分子生物学进展)

Protein Engineering. 8/yr. (Oxford University Press)

(蛋白质工程)

Protein Expression and Purification. 6/yr. (Academic Press, Inc.)

(蛋白质表达和纯化)

Protein Science. 12/yr. (Cambridge University Press)

(蛋白质科学)

Protein Sequences & Data Analysis. 6/yr. (Springer-Verlag)

(蛋白质序列和数据分析)

Proteins: Structure, Function and Genetics. 18/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)

(蛋白质: 结构、机能和遗传学)

Recombinant DNA. 24/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)

(重组 DNA)

Recombinant DNA Technical Bulletin. 4/yr. (Superintendent of Documents)

(重组基因技术通报)

Science. 52/yr. Cambridge Mass

(科学)

Science News. 52/yr. The Weekly Newsmagazine of Science

(科学新闻)

Second Messengers and Phosphoproteins. 3/yr. (Marcel Dekker, Inc.)

(第二信使和磷蛋白)

Steroid Receptors. 24/yr. (Sheffield University Biomedical Information Service)

(类固醇受体)

the Biochemical Journal. 24/yr. (Portland Place Ltd. on behalf of the Biochemical Society)

(生物化学杂志)

The Journal of Cell Biology. 24/yr. (Rockefeller University Press)

(细胞生物学杂志)

The Journal of Experimental Medicine. 12/yr. (Rockefeller University Press)

(实验医学杂志)

The Journal of Experimental Zoology. 18/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)

(实验动物学杂志)

The Journal of Heredity. 6/yr. (Oxford University Press)

(遗传学杂志)

The Journal of Laboratory & Clinical Medicine. 12/yr. (Mosby—Year Book)

(实验和临床医学杂志)

The Lancet. 52/yr. (The Lancet Ltd.)

(柳叶刀)

Trends in Biochemical Sciences (TIBS). 12/yr. (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)

(生物化学导向)

Trends in Biotechnology. 12/yr. (Elsevier Sciences Ltd)

(生物技术导向)

Trends in Cell Biology. 12/yr. (Elsevier Sciences Ltd)

(细胞生物学导向)

Trends in Genetics. 12/yr. (Elsevier Sciences Ltd)

(遗传学导向)

Trends in Neurosciences. 12/yr. (Elsevier Sciences Ltd)

(神经科学导向)

Yeast. 12/yr. (John Wiley & Sons, Inc.)

(酵母)