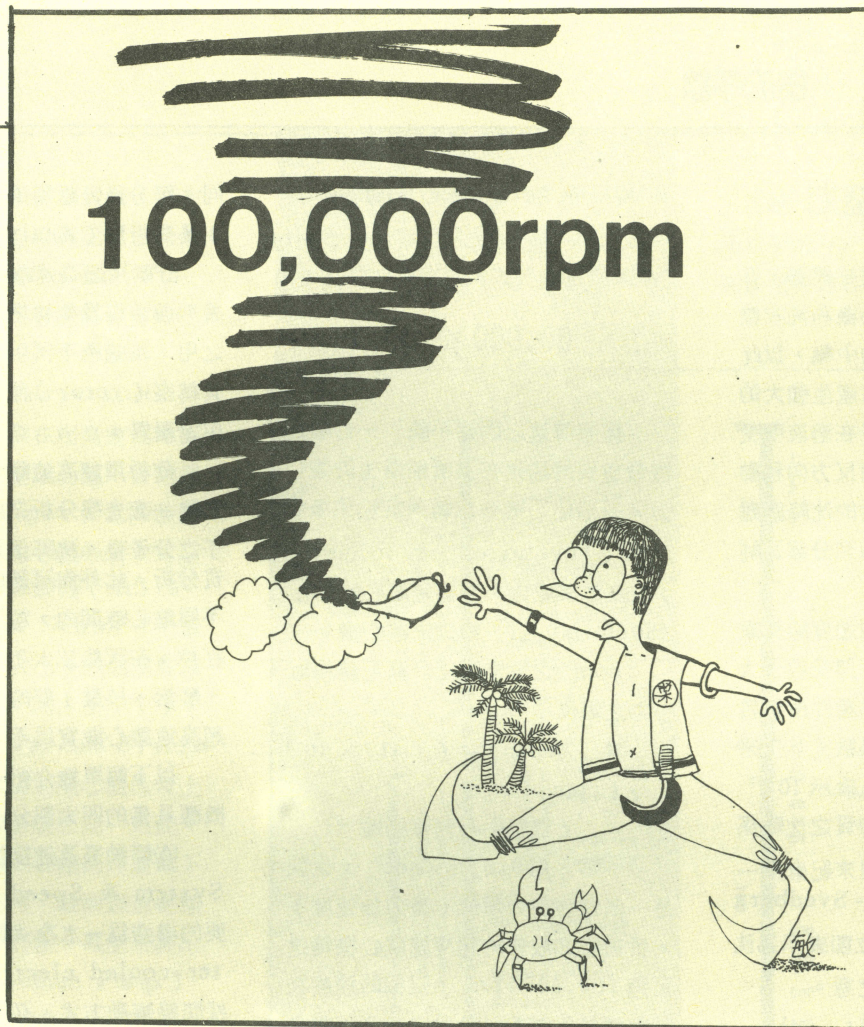




超高速的魅力

執筆 蔡振寧

前言

去年（73年）年底，本校醫技系在杏春樓舉辦一場演講，題目為「超高速離心機在遺傳工程上的應用」，由美商「貝克曼儀器公司」（Beckman Instruments）Dr. Mitch 主講，事後並在新的醫技實驗室中，示範操作超高速離心機之使用，吸引了各界人士前往參觀。超高速離心機為尖端科技之精密儀器，在分離物質上，有超水準的效果，本文將詳細介紹超高速離心機之構成與分離技術、應用。



醫技學系

超高速的魅力

將離心機視為一種簡單儀器，其實並不為過，說穿了離心機和洗衣機差不多，含有一個旋轉的中軸，以此中軸作持續的圓周運動來產生強大的離心力，密度不同的粒子在溶液中受離心力作用後，便會往相反方向移動，隨著時間之延長，產生的沈降距離也會有所差異，依此來達到分離及純化之目的。

粒子在溶液中沈降的速度除受離心力及離心時間影響外，還受粒子大小、密度、溶液密度、黏滯性所影響，這種觀念可以用沈降係數（S）來表達，單位是秒。一個S表示 10^{-13} 秒，因為許多生物活性物質之沈降係數均大於 10^{-13} 秒（S用來紀念第一個提出此種概念的人——Svedberg）。20 S的核糖次單位即表示為沈降係數 20×10^{-13} 秒之意。

$$\text{※ } S = \phi \frac{(\rho_p - \rho_m)}{f} = \frac{dr}{dt} \times \frac{1}{\omega^2 r}$$

r —— the distance (cm) from the axis of rotation to the sedimenting particle or molecule

ϕ —— the volume of the particle (cm^3)

ρ_p —— the density of the particle (g/cm^3)

ρ_m —— the density of the medium (g/cm^3)

f —— the frictional coefficient (g/sec)

v —— the radial velocity of sedimentation of the particle (cm/sec)

$$= \frac{dr}{dt}$$

ω —— the angular velocity in radians

$$= \frac{\pi (\text{rpm})}{30}$$

$$60,000 \times g$$

拋開前述之因素不談，一台離心機最重要的還是在其所能產生的離心力。一般離心機多以轉速能達到多少 rpm (revolution per minute) 來表達其威力，超高速離心機即指 25000 rpm 以上轉速之離心機。

rpm 之單位經過計算可變為離心力之單位：

$$\text{離心力 (g)} = (1.119 \times 10^{-5}) (\text{rpm})^2 \times r$$

r 為距中心轉軸距離

一個 g 為 $9.81 \text{m}/\text{sec}^2$ ，也就是一個地心引力單位（重力加速度）。目前已知最快的超高速離心機轉速可達 100,000 rpm，這樣的速度在一台轉軸半徑 5.4 公分之超高速離心機上，能生成 $604,260 \times g$ 的威力，到底有多大呢？一架 F-16 戰鬥機作緊急轉彎時，可以生成 $7 \times g$ 的過載力，這時候駕駛員動脈血壓會急速下降至 40 mmHg 以下，視覺模糊、眼瞼下垂。很難想像像人這樣裝滿柔軟內臟的生物，經過超高速離心機的純化後還會剩下什麼？

超高速離心機的四大結構

超高速離心機依構造、用途之不

同，可分為分離用 (preparative) 及分析用 (Analytical)。

分離用超高速離心機應用範圍較廣，通常作為生物物質的分離、純化之用。為適應不同生物物質之分離，其轉座 (rotor) 種類甚為繁多，依用途而異。

分析用超高速離心機是在主機上加裝一套光學分析系統，測試生物粒子之分子量、沈降係數……等物理性質分析。此外尚可經由照相裝置，將不同離心時間內，粒子變動狀態拍照存檔。在天然或人工高分子（蛋白質、酵素、核酸）等的研究上，分析用超高速離心機實為不可或缺之儀器。

以下簡單地介紹一台超高速離心機應具備的四大部分：

(A) 驅動系及速度控制 (Drive System & Speed Control) 主要的構造為一水冷式電動馬達 (water-cooled electric motor)，採間接驅動方式，必須使用驅動油 (Drive Oil)。令人訝異的是，馬達半徑只有大約 3/16 英吋，這是為了使馬達在旋轉時能適應小規模的重量不平衡，防止振動及損傷轉軸。最近新型機種，改用高週波頻率馬達 (High frequency Motor) 直接帶動轉座旋轉，不必加用驅動油，相當方便。

速度控制方面除有一套數位轉速計監視外，另含一套超速系統，防止馬達失速，如圖 C₂、C₃。

如圖所示，光源所射出之光線經速度控制盤反射至光電池內，在一定

轉速下會產生一定頻率之信號（附在轉座底部），信號隨時與記憶參考值比較（Normal Reference Value）。一旦有誤，馬達便會自動停止轉動。

(B)溫度控制 (Temperature control) 溫度控制在超高速旋轉下特別重要，一般高速離心機只需將熱偶極 (Thermocouple) 置於驅動腔內即可，超高速離心機必須在馬達內裝置一種紅外線探測器 (Infrared Radiometric Sensor)，直接監視機器的溫度狀況。控制溫度範圍通常是 $0^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 間 ($\pm 1^{\circ}\text{C}$)。

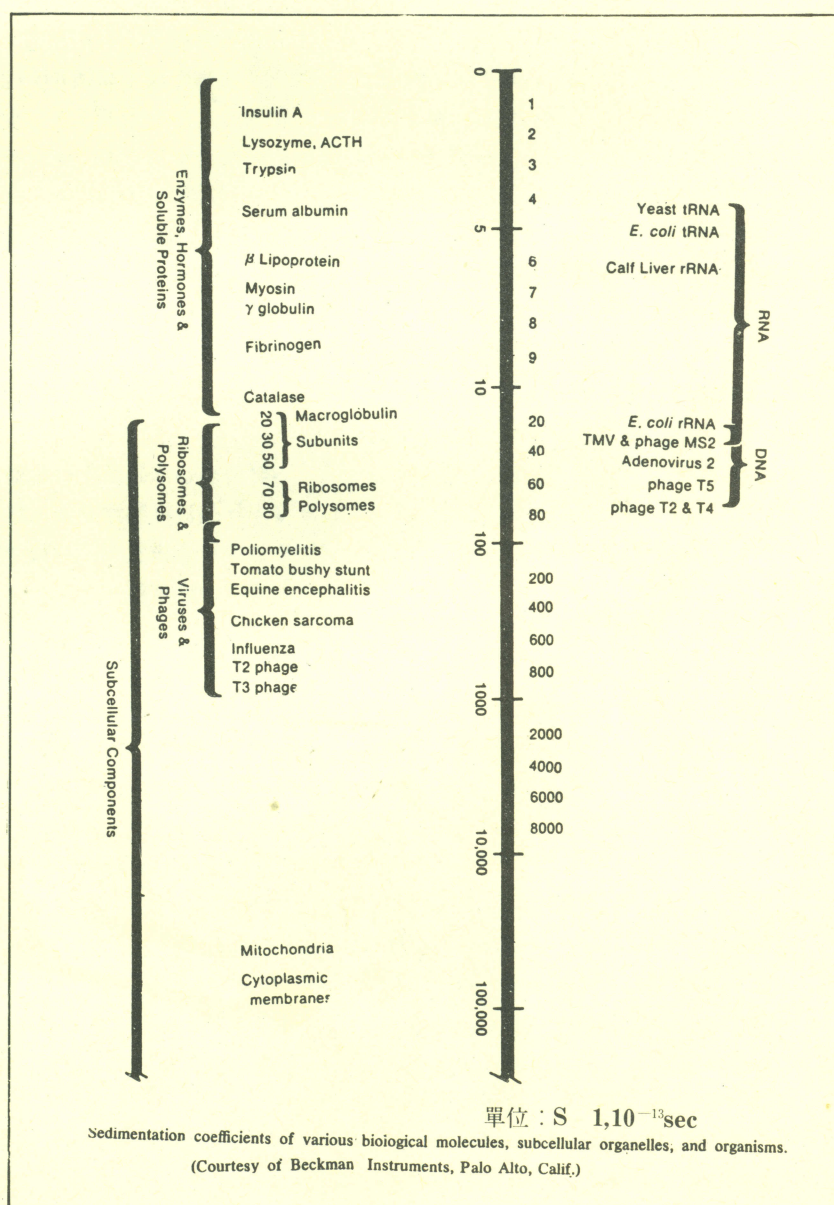
(C)真空系統 (Vacuum System) 超高速離心機與高速離心機性質上最大不同，乃是後者缺乏此一系統。為了避免馬達及轉座在超高速旋轉下與空氣摩擦生成高熱，這兩個重要部位都必須維持真空狀態。真空系統由一套真空幫浦 (Vacuum Pump) 及水冷式擴散幫浦 (Water-Cooled diffusion Pump) 構成，可維持 $1 \sim 2 \mu\text{Hg}$ 以下的高度真空。

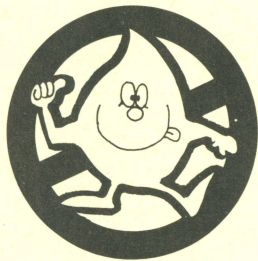
(D)轉座可依不同用途而分為斜角轉座 (fixed angle rotor) 及水平轉座 (swinging bucket rotor)。二種轉座均採用特殊鋁合金製成，以對抗強大的離心力，最近新開發出鈦合金的轉座，效果似乎不錯。

斜角轉座（見圖 4），通常含有 6 到 12 個管槽，與中心轉軸呈固定的角度 (20° , 45° ……等)。在交替離心時最常用，優點是容量特大。

水平轉座（見圖 4）與斜角轉座最大的不同點，就在前者的管槽並非固定在轉座上，而是垂直懸掛著

。在離心力影響下，管槽會拋向外，呈水平的 90° ，所以稱為水平轉座。在使用密度梯度離心時最為便利，當





醫技學系

密度梯度管置於轉座離心時，分離物質會沈降到不同的梯度區，而形成帶狀區；若使用斜角轉座，則物質沈降的方向也呈固定角度，分離後的結果一定不漂亮。

(E)操作台 (Operating System)，為控制鈕、儀表、警示燈之所在，為便利操作者的使用，較新機種設計上均採用連動式，以減少操作程序，並導入電腦記憶系統，以重複同樣離心狀況。儀表採數位 (Digital) 閱讀式，避免人為視差所產生的錯誤。

值得一提的是由於離心機旋轉時產生的威力頗大，因此轉座周圍有二層鋼板鑄成的保護腔，來保障使用者的安全。

超高速離心技術

在一般傳統實驗課程內，說到離心機的分離，似乎脫離不了所謂「交替離心」 (Differential Centrifugation) ——先用低速離心力除去大分子雜質，取上清液，作高速離心除去小分子雜質，取沈澱再離心純化。

其實除了交替離心外，還有很多效果不錯的離心法。最常見的便是密度梯度離心法。此離心法，程序較為複雜，但是它有許多交替離心法無法向背的優點，不但可以將混合物中各成分完全分離出來，也可以同時作分析測試 (Analytical Measurements) 的工作，尤其對於病毒的

研究最有幫助。

密度梯度離心法最大的特點便是密度梯度液的構成，試管內的支持液 (Supporting Liquid) 密度由管口向管底漸增，如此管口之密度最小，管底密度最大。支持液由低分子溶質溶於溶劑組成 (如鉀 Rb、銨 Cs 的鹵化物、蔗糖溶液等)，以便使樣品能夠懸浮於支持液面上。密度梯度離心法可分為層差離心法 (Rate Zonal Centrifugation)、等密度離心法 (Isopycnic Centrifugation)。

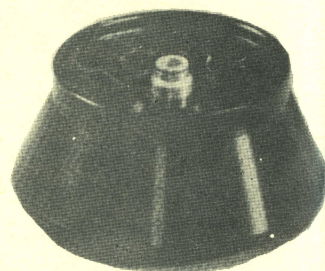
層差離心

層差離心法必須先行配製密度梯度液，樣品液再懸浮其上。離心時，樣品液中沈降係數不同的粒子便會以不同沈降速度移動，最後分出不同層次來。

這種分離方式對於分子大小不同的粒子 (非密度不同) 有特別顯著的效果。為了達成完全的分離，樣品液中密度最小的粒子也必須比梯度液中最大的密度要來得大，沈降運動才不會中斷。分離的過程要在最下一層接觸管底前完成。

分離小型的巨分子 (Small Macromolecules) (如酵素、激素) 時，儘量採用高速、高黏滯性梯度液才能防止擴散情形發生。

等密度離心

圖 C₁

①

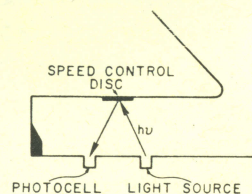
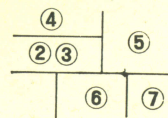
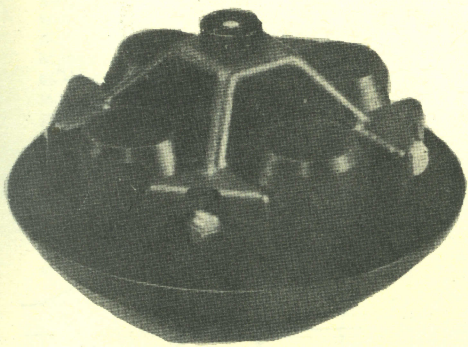


Diagram of the path followed by the light beam of an optical speed control system.

圖 C₂



②

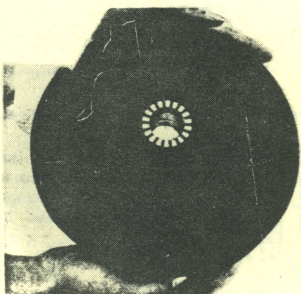


圖 C₃

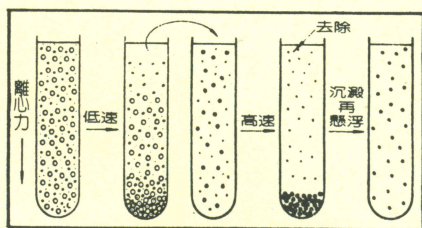
Rotor bottom showing the speed control ring consisting of alternating reflecting and nonreflecting surfaces. (Courtesy of Beckman Instruments, Palo Alto, Calif.)

超速系統不平衡偵測器

真空驅動系統

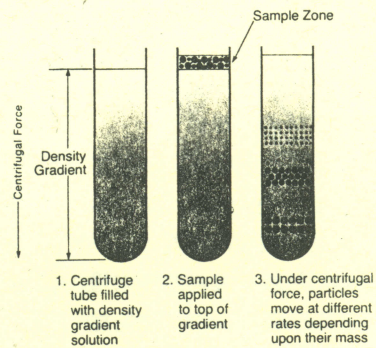
真空系統

圖 C₅



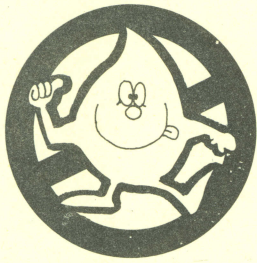
交替離心分離原理

圖 C₆



Rate Zonal Separation in a Swinging Bucket Rotor

圖 C₇



醫技學系

此法中的樣品粒子密度必須介於所配製密度梯度液之密度範圍內。離心時，樣品粒子便會沈降到和它本身密度相等的梯度層次內，所以叫做等密度離心法。由於分離時完全倚靠密度的差異，因此理論上來說，離心時間長短不影響結果。

實際應用上，為了方便起見，有時直接將樣品粒子與自生性梯度液 (Self-generating Gradient) 混合均勻後，便開始離心。這樣的技術就要長時間的離心，才能得到漂亮的結果。譬如說分離等密度帶狀DNA時 (Isopycnicly Banding DNA)，便至少要在CsCl 溶液中離心2天左右。

值得注意的是，加大離心機的轉速，並不能縮短離心時間，只會使各層次下移而更接近管底。

梯度液的配製

梯度液的選擇對於密度梯度離心法是相當重要的，理想的梯度液應該使粒子沈降速度不受梯度管長的影響。「等動能」(Isokinetic) 梯度液的概念因而提出，5~20%蔗糖液是說明這種性質的最好例子。

在分離大型巨分子時 (如核糖體次單位、聚合體 polysome、某些植物病毒)，需要較劇烈的梯度 (Steep gradient) 及較長梯度管來增加分離效果，然而即使採用等動能梯度液來分離構成的梯度會顯得相當平緩，離心後的層次也相當寬，這時候

改用「線性——對數」(Linear-Log) 梯度液最理想不過了。在這種梯度液內，梯度管長的對數值與沈降係數之對數值成正比。

「線性——對數」梯度液可由人工配製梯度液 (用蔗糖溶液) 靜置一夜，使之自行擴散而獲得。

一般常用的梯度液原料為CsCl及蔗糖溶液，前者常用於等密度離心法，具有梯度自生性 (Self-generating Gradient)，後者適於層差離心法。

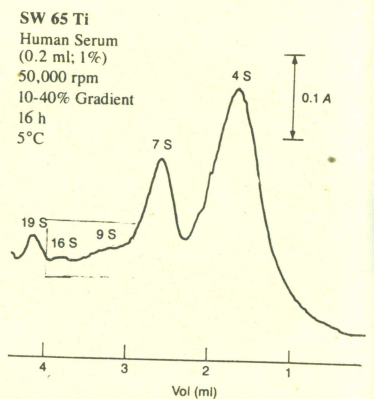
分離後的處理與分析

離心後，假設離子分佈的層次可以用肉眼觀察的話，以 Pasteur Pipette 或皮下注射針筒慢慢抽出，或使用試管切斷器 (tube slicer) 將分離層次精確地切離，然後加以分析。

分離後的各層次樣品用紫外光來偵測其純度，如圖C 16 所示，為一套完整的自動分析記錄監視系統。

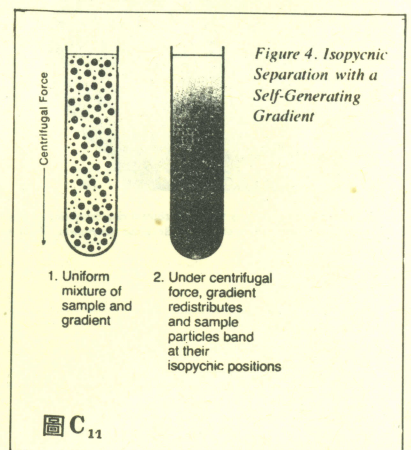
超高速離心之應用

質體 (plasmid) 在基因工程學扮演非常重要的角色，是一種DNA片斷，在原核細胞內與基因同時獨立存在。基因工程學上將其它的基因組合，使質體增殖作為純系培養的工具 (Cloning Vehicles)。由於質體的廣泛運用，使得質體的萃取與純化技術已有長足的發展。



圖C₈ Diffusion Caused by Reducing Gradient Viscosity and Lowering Rotor Speed

分離人類的血清時，16 S至 9 S間)，見圖C 8與變大。見圖C 9與C 10。



圖C₁₁

8	9	10	14
11	12	13	15

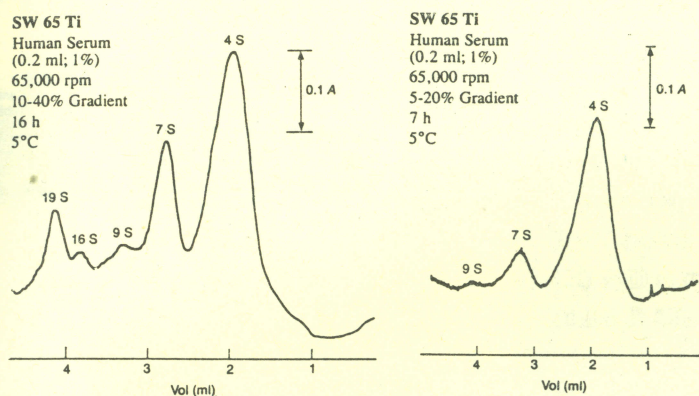


圖 C₉

圖 C₁₀

60,000 rpm 下的解析力 (Resolution) 便比 50,000 rpm 好 (例如：
與 9。低黏滯性梯度液 (5~20%) 會使離心出來的樣品層次範圍

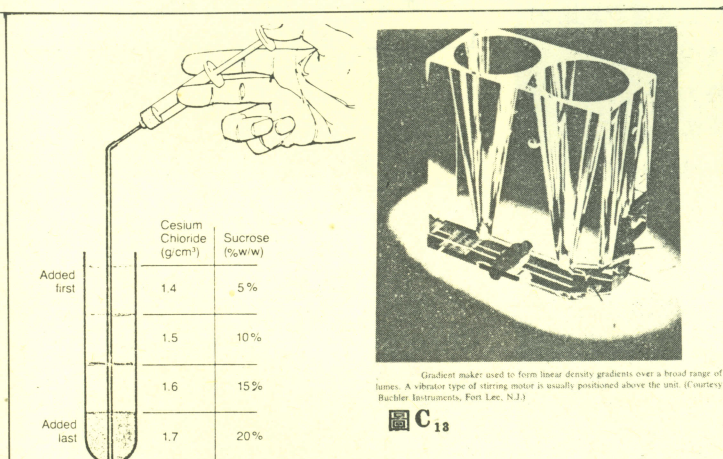
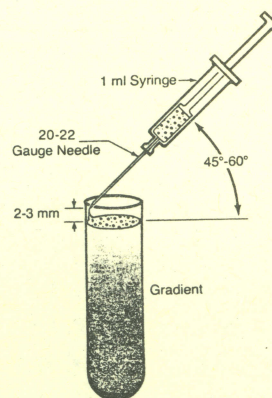


圖 C₁₃

Hand-Layering a Step Gradient

圖 C₁₂ 人工配製梯度液之配製法：先加入適當量的低比率溶液，再除去針頭與注射器，更換較高比率溶液，反覆數次即成。除了人工配製外，尚有機械性梯度液生成器，可配製密度梯度液。



Applying the Sample to the Gradient

圖 C₁₄

將樣品注入梯度液也需要有高度技巧，如圖 C₁₄ 所示，針頭注入處必須高於液面 2 至 3 mm，使樣品液緩緩流下，當樣本液為具脆性物質 (如 DNA) 時，最好將注射器改為 pipette。

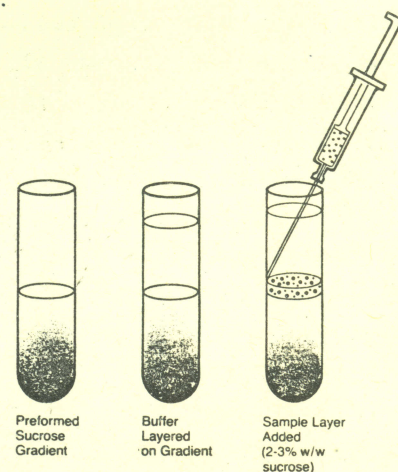
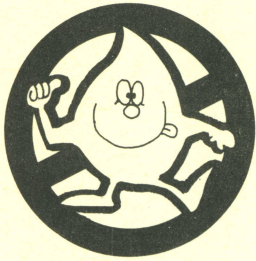


圖 C₁₅ Sample Layering for Short-Column Technique with in-Wall Cellulose Nitrate and Polyallomer Tubes

短距離密度離心時，也必須將試管填滿，防止離心時，試管破裂，樣品液的注入位置在梯度液與緩衝液的中央介面上。



醫技學系

傳統的平衡梯度分離法 (Equilibrium Gradient Methods) 通常要離心 24 ~ 60 個小時，不但曠日費時，也會降低離心機使用的壽命。

經過改良的方式，採用超高速離心技術，藉著二階 CsCl-ethidium bromide 梯度離心法 (Two Step CsCl-ethidium bromide gradient centrifugation)，只需離心 3 ~ 5 個小時，便可得到理想的效果。

離心後，質體 DNA 聚集 (pellet) 於梯度管中間地帶，高分子量 RNA 則沈降於管底。

圖 F - 1 所示為傳統離心分析與改良法之比較，(I) 5 ug 樣品離心前之膠體電泳 (Gel Electrophoresis) 情形。(II) 2 ug 樣品純化後之電泳情形。(III) 250 ng 樣品之電泳情形。④為利用傳統方式，40,000 rpm，48 小時處理後的結果。⑤至⑪均為改良法的結果：⑤與⑥ 50,000 rpm，17 小時離心後小管與大管的分別結果。⑦ 70,000 rpm，3 小時離心後的結果。⑧及⑨ 65,000 rpm，5 小時離心後小管與大管的分別結果。⑩與⑪ 60,000 rpm，5 小時離心後小管和大管之分別結果。⑫與⑬ 65,000 rpm，4 小時離心後小管和大管之結果。

註：大管 (Large Tube) 指 Beckman Quick-Seal Polyallomer Tube 5/8 × 3 inch。
小管 (Small Tube)：Beckman Quick Polyallomer

Tube 5/8 × 1 ~ 3/4 inch.

圖 F - 2 所示為 5' 端以 ^{32}P 標示後的質體 DNA (^{32}P -5'-end-labeled)，藉離心純化後的自動放射攝影術 (Autoradiograph) 結果 (每行 60,000 count per minute)。(I) 離心前。(II) 傳統離心方式 48 小時，40,000 rpm。(III) 至 (XI) 為利用表 I 上所列各項改良方法的結果。

表 I 右側所列數字為利用自動放射攝影術，測出 ^{32}P 之比率，我們可以發現，利用改良法 65,000 rpm，5 小時離心後 (Beckman Type 80 or 75 ultracentrifuge) 所得質體比率最高，低分子量 RNA 的污染也最少。傳統離心法所得 ^{32}P 比率和 65,000 rpm，4 小時離心或 60,000 rpm，5 小時，50,000 rpm，17 小時離心後結果相似 (Type 80 or 75, Beckman Ultracentrifuge)。另外一點，由資料顯示，離心時間愈久，低分子量 RNA 的污染也愈多。

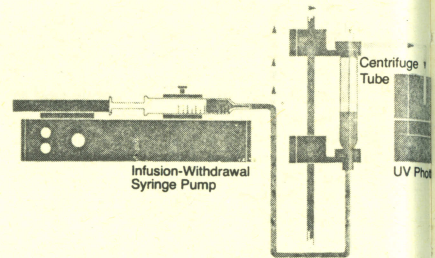
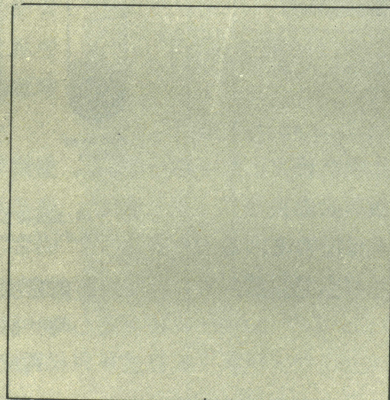
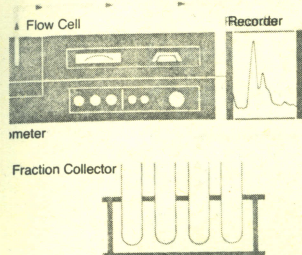


圖 C₁₆ Automated Monitoring System for Fraction Recovery using a UV Photometer with Flow Cell and Recorder

首先在離心後的梯度管內插入長針，注入液體被取出，送至紫外線光譜儀之循環器 (flow cell)，再送到分量收集器 (Fraction Collector)。

分析分量收集器內的樣品為相當重要的步驟。試管內，也可能含有兩種成分。

⑩ Fig 1
Fig 2



the Beckman Fraction Recovery System

交重的取代液，而樣品層次同時
cell) 內，加以測試記錄分析
r) 內，分析純度。

，即使在同個分量 Fraction

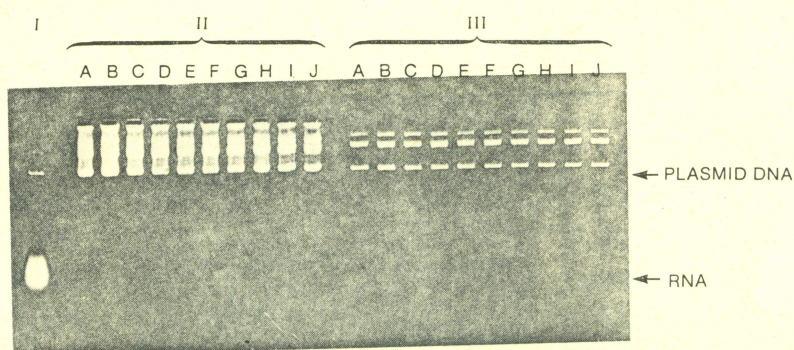


Fig 1 Analysis of CsCl-gradient purified plasmid DNA and total nucleic acid extract by agarose gel electrophoresis. (I) 5 μ g of total nucleic acid extract before centrifugation; (II) 2 μ g of purified nucleic acids per lane; (III) 250 ng of purified nucleic acids per lane. (A) 48 hr, 40,000 rpm, equilibrium gradient, large tube. Samples shown in lanes (B)-(J) were prepared by two-step gradients run as follows: (B) and (C) 17-hr, 50,000 rpm, small and large tube, respectively; (D) 3 hr, 70,000 rpm, small tube; (E) and (F) 5 hr, 65,000 rpm, small and large tube, respectively; (G) and (H) 5 hr, 60,000 rpm, small and large tube, respectively; (I) and (J) 4 hr, 65,000 rpm, small and large tube, respectively. Rotors used and electrophoresis conditions are described in Materials and Methods.

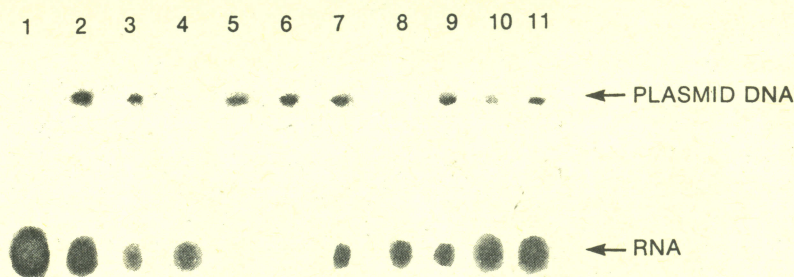
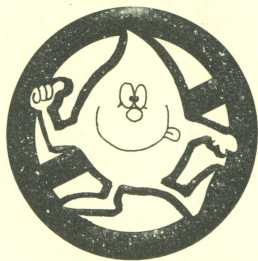


Fig 2 Autoradiograph of ^{32}P -5'-end-labeled plasmid DNA preparations (approximately 60,000 cpm of labeled nucleic acids per lane). (1) Total nucleic acid extract before centrifugation; (2) 48 hr, equilibrium gradient, 40,000 rpm. Samples in lanes (3)-(11) were prepared in two-step gradients using centrifugation conditions as shown in Table 1, lanes (3)-(11). See Materials and Methods for 5'-end-labeling, electrophoresis, and autoradiography conditions.



醫技學系

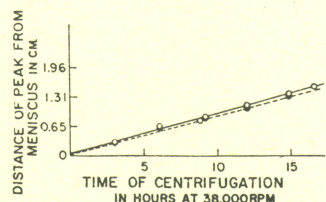
分離用超高速離心機的沉降分析

樣品粒子的沉降係數分析，通常需要加裝特殊光學系統的分析用超高速離心機來完成，然而某些情況下是行不通的，例如當樣品無法純化為均質（Homogeneity）時，這時候就必須借助分離用超高速離心機來作粗略的估計。由Martin & Ames 所發展出來的這套技術認為：多數生物物質在密度梯度液中的移動為離心時間的線性函數（見附圖），也就是說二種粒子由液面上開始沉降的距離比值應該一直相同。因此利用一已知沉降係數，一未知沉降係數的粒子及其比值R，便可求得未知數：

$$R = \frac{\text{未知移動距離}}{\text{已知移動距離}} \\ = \frac{S_{20,w}(\text{未知})}{S_{20,w}(\text{已知})}$$

* $S_{20,w}$ 指在水中作medium, 20°C 時所得的沉降係數。

其中未知物、已知物之移動距離均可測出而得到R。要強調的是在同一種密度梯度液中，才會有這種關係。

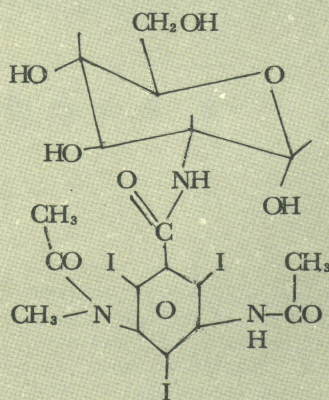


Sedimentation of histidinal dehydrogenase (O) and imidazoleacetol phosphate transaminase (●) as a function of time. [From R. G. Martin and B. N. Ames, *J. Biol. Chem.*, 236: 1372 (1961).]

鼠腦下腺前葉 細胞型之分離

將腦下腺前葉各類型細胞分離完全，對於其功能研究有莫大助益。傳統分離方式利用螢光活化細胞分類法（fluorescence-activated cell sorting）、離心篩洗法（centrifugal elutriation）、重力沉降法（unit gravity sedimentation）、速度沉降法（velocity sedimentation; albumin gradient）等方式。

採用超高速離心技術，使用Metrizamide 密度梯度離心法，可以得到相當濃度的細胞群，其中富含 thyrotroph, Somatotroph, mammotroph, gonadotroph 等類型。



Metrizamide 之結構圖：具有低黏

滯性、低毒性，高水溶性的優點

密度梯度離心法的分類依據，乃在於分離細胞的密度差異。在甲狀腺功能減退症（Hypothyroidism）的動物腦下腺前葉內，thyrotroph 型細胞的高基氏體（Golgi Body）與內質網（ER）會有相當程度的擴張，這些細胞的胞器由脂膜（lipid memb.）構成。因此甲狀腺功能減退鼠身上的 thyrotroph 細胞密度會低於其它腦下腺，如此便可用密度離心法分離出來。分離出來的 thyrotroph 型細胞群可作短期培養或以RIA，免疫螢光法、電子顯微鏡分析研究 thyrotroph 可作荷爾蒙反應測試（Hormone Responsiveness）。

人類巨核細胞之分離

長久以來研究巨核細胞（Megakaryocyte）的學者們，常因無法分離完全這類細胞，而感到頭痛，一方面由於其在有核骨髓細胞中的比例過小（0.03%~0.6%），另一方面其特有的脆性（fragility）更為分離過程增加了許多難度。密度梯度離心法及速度沉降法不但耗費時間，而且在沖洗過程可能會細胞本身造成相當程度的傷害。利用抗流離心篩洗法（counter-flow centrifugal elutriation）加上原來的密度梯度

離心法可以克服上述的缺點。

抗流離心篩洗法包含一個特殊設計的分離腔（架在篩洗轉座上），分離粒子在分離腔內原到二種力：離心力及溶液的向心力，各種粒子會移動至適宜本身流速的區域內，不斷降低轉速就可分離出不同的粒子來。原始樣品中含 63 % 的巨核細胞，最後分離出的結果為 18.7 %，比率相當不錯。

結語

愈來愈多的報告顯示，超高速離心技術已成為分離細胞物質所不可或缺的工具。隨著不同轉座的開發，更多更新的技術不斷地發展出來，超高速離心的威力更超過了 $600000 \times g$ ，使得分離時間大量縮短。雖然超高速離心機稍嫌昂貴（一台造價在新台幣百萬元左右），然而在不久的將來，相信超高速離心機必能廣泛地在實驗室中出現，成為儀器分析界中的一朵奇葩。

後記

本篇文稿的完成，特別要感謝陳建和老師在百忙中抽空提供資料、審稿，葉思輝學弟提供 Dr. Mitch 的演講資料及文慧的辛勤騰稿，衷心感謝。

Centrifugation Conditions	Percent ³² P Label	
	Plasmid DNA	RNA
(1) Total nucleic acid extract before centrifugation	<1	≈100
(2) 48 hr, equilibrium gradient, Type 50 Ti, 40,000 rpm, large tube	29-45	55-71
(3) 17 hr, two-step gradient, Type 70.1 Ti, 50,000 rpm, large tube	37-45	55-63
(4) same as lane 3, small tube	25-40	60-75
(5) 5 hr, two-step gradient, Type 80 Ti or Type 75 Ti, 65,000 rpm, large tube	68-75	25-32
(6) same as lane 5, small tube	60-66	34-40
(7) 3 hr, two-step gradient, Type 80 Ti, 70,000 rpm, small tube	35-40	60-65
(8) 5 hr, two-step gradient, Type 70.1 Ti, 60,000 rpm, small tube	30-35	65-70
(9) same as lane 8, large tube	35-45	55-65
(10) 4 hr, two-step gradient, Type 80 Ti or Type 75 Ti, 65,000 rpm, small tube	25-35	65-75
(11) same as lane 10, large tube	30-40	60-70

Table 1

Reference :

1. 盧耀村, "超高速離心機及其應用簡介"——科儀產品新知, Vol : V, No : 1, p43-p48 .
2. Owen. M. Griffith, "Techniques of Preparative, Zonal & continuons Flow Ultracentrifugation." Beckman Instruments (1979)
3. Terrance G. C., "The Tools of Biochemistry", Wiley-Interscience (1977)
4. S. J. Garger, O. M. Griffith & L. K. Grill, "Rapid Purification of Plasmid DNA By A single Centrifugation in A Two-step. Cscl-Ethidium Bromide gradient",
5. Arthur C. Guyton, "Textbook of Medical Physiology", NBC 6th edition.
6. Ronald J. K. & Ann. Y. W. "Enrichment of Rat Anterior Pituitary Cell Types by Metrizamide Density Gradient Centrifugation". Endocrinology, 115 : 317 (1984)
7. Roger. L. B., John E. S., E. D. B., etc. "Isolation of human megakaryocyte by density centrifugation & counter flow centrifugal elutriation". J. Lab (lin Med. 103 : 811, (1984)