

## 超声波破碎细胞仪使用时的常见问题

### 1.用超声波细胞破碎仪破碎细胞时怎么有泡沫出现？

解析：超声功率：不宜太大，以免样品飞溅或起泡沫，如小于 10ml 样品容量，功率应在 200w 以内,选用 2mm 超声探头，另将面板后面的变幅杆选择开关打到相应挡；10-200ml 样品容量的功率在 200—400w，选用 6mm 超声探头，另将面板后面的变幅杆打到相应挡；200ml 以上的样品容量功率在 300-600w 之间，选用 10mm 超声探头，另将面板后面的变幅杆打到相应挡；(2MM 的小探头功率严禁超过 350W)

**2.100g 大肠杆菌溶于 1L 破碎液里（破碎液：50mMTris-Cl(PH8.5)5mMEDTA0.14MNaCl），搅拌，发现菌液发粘，菌体不能够很好分散，用高压匀质机破碎，加压后，菌液不能进入匀质机，速度很慢，请问是何原因？**

解析：将破碎液的量加大，不能很好分散可能是量太大；超声处理 5—10 分钟，菌液粘度即可大大降低，也可促进菌体分散。

### 3.为什么用塑料大试管,玻璃的不可以吗？

解析：不可以的，如果使用玻璃管，可能会碎裂，而通常使用的是塑料试管。超声波是物质介质中的一种弹性机械波，它既是一种波动形式,又是一种能量形式。超声波破碎仪对细胞的作用主要有热效应，空化效应和机械效应。热效应是当超声在介质中传播时，摩擦力阻碍了由超声引起的分子震动，使部分能量转化为局部高热(42—43℃)。空化效应是在超声照射下，生物体内形成空泡，随着空泡震动和其猛烈的聚爆而产生出机械剪切压力和动荡。另外，空化泡破裂时产生瞬时高温(约 5000℃)、高压(可达  $500 \times 10^4 \text{Pa}$ )，可使水蒸气热解离产生.OH 自由基和.H 原子，由.OH 自由基和.H 原子引起的氧化还原反应可导致多聚物降解、酶失活、脂质过氧化和细胞杀伤。机械效应是超声的原发效应，超声波在传播过程中介质质点交替地压缩与伸张构成了压力变化，引起细胞结构损伤。损伤作用的强弱与超声的频率和强度密切相关。

### 4.从细胞中提取酶，超声波破碎仪破碎时间长会影响到酶的活性，怎么办？

解析：如果需要的是胞内酶，细胞破碎程度和需要的酶获得之间基本上有正比关系。破碎时间长的确会影响到酶的活性。这就需要在最佳的破碎时间和酶活性之间做出判

断，最直接的办法是先绘制相关曲线(酶活性和时间的关系曲线)。如果实验中超声波破碎仪破碎的是棒状杆菌(也是很难破壁的 G+菌)，破碎时间控制在 30min 左右，酶活较好。如果是基质菌丝的话,好可以考虑用溶菌酶处理一下。

**5.大肠杆菌表达外源蛋白，在超声破碎的时候，用含有 1%triton-X-100 的 PBS 悬浮，然后超声的效果较好，1%triton-X-100 的作用还是很明显的，对其他的一些细菌同样起作用，比如链霉菌。在表达重组蛋白后用超声波细胞破碎仪破碎细胞，采用冰浴，400w，破碎 2s 停 1s，但是不一会就产生大量泡沫，影响了破碎功率，pbs 和 tris 缓冲液都是这样，最后都是破碎不完全，而目的蛋白就在这些未破碎的细胞中，怎么办？**

解析：会产生气泡是因为探头位置没放好；探头一定要接近底部，约 0.5-1cm；功率根据仪器不同会有所不同，但可以观察液面，有波动但不要太剧烈；可以选择超声波细胞破碎仪破碎 3s 停 10s，破碎 20-30 次；变幅杆位置摆放也要注意，听声音如果不对的话就要及时调整；从菌浓度方面考虑。在破碎时试着加大体积，强度最好不要超过 60%；尝试破碎 8s 停 8s，对有些菌体蛋白来说，难散热导致蛋白变性产生气泡，可以停顿时间稍长一些，这种情况多见于包涵体形式的蛋白。

#### **6. 链霉菌（放线菌）超声破碎条件是什么？**

解析：放线菌属于原核生物系统进化树上的（G+C）摩尔百分含量（mol%）高的革兰氏阳性菌（Eubacteria）分枝类群，它虽然具有原核生物特有的分子生物学特性，但在其不同类群中，细胞壁的化学组分变化很大。在做大肠杆菌超声时，采用的是 400W，破碎 5s 停 5s 的方法，效果不错，但是用在链霉菌上，由于细胞壁组成差异一般没什么效果。链霉菌（放线菌）超声破碎前处理一般是配置成一定浓度的菌悬液。使用超声波细胞破碎仪破碎时采用的具体条件是：取细菌的 24 h 培养液于 5 000 r / min 下离心 5 min 收集菌体；用 pH 7. 5 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液洗涤 3 次，再用该缓冲液将菌体配成 1: 3 的菌悬液。置于 40 mL 大塑料试管内；将大塑料试管置于冰浴中，采用超声波细胞破碎仪破碎(功率 200W，1 / 2”探头，破碎 30s，间歇 30s)；破碎液于 12 000 r / min 下高速冷冻离心 30 min，收集细胞碎片和上清液。洗涤菌体也可以用预冷的生理盐水或 pH8 的 Tris-HCl，洗涤一次就可以。另外，超声剂量随样品量、菌体改变比较大，功率可以到 400—600w，破碎 5s，停 5s，冰浴，要加终浓度 1 mM 的 PMSF。为确定合适的超声强度和次数，有必要随时镜检观察菌体是否完全破碎。

**7.我最近在做一个异源表达蛋白的纯化，在进行超声波破碎时，总是破碎的不好，破碎离心后还是会有很多的细胞沉淀，不知道超声波破碎有什么具体的要求吗？我用的是中等功率 400w，90 次，每次超 5 秒，停 5 秒。细胞是 BL21。另外，我超的时候老是有泡沫出现，怎样才能很好的防止泡沫出现？听有的人说泡沫一出现蛋白就变性了，不能做后期的酶活实验了，是这样吗？**

解析：超声后有点沉淀是可以理解的，异源蛋白在 BL21 表达时由于表达量比较高，很可能是一部分以可溶形式存在，还有一部分是包涵体的形式存在，超声后细胞碎片以及包涵体经离心后会沉下。如果你的包涵体比较多，这个沉淀的量还是很可观的。

你的破壁条件是很常用的，一般为了保护机器都是要间歇性的超声，5/5 用的很多。100 次（16.7min）也足够了，但不同的菌株可能有不同，我以前做的几个菌株从 10min 到 25min 都有，但一般而言，如果你的蛋白不是包涵体，建议超声时间不宜太长，机械剪切力的影响必须考虑进去。给你举个例子，我在做一个蛋白时超声时间设定在 25min，吵完后 12000rpm×10min 结果什么东西都离不下来，但 PAGE 发现其实很多蛋白都已经降解了，整个条带像火箭电泳一样。

超声时注意的因素也就那么几个：（1）首先是必须低温，可以采用冰浴的方法控制温度。（2）超声量不要太多，这个要自己去摸索，一定功率下的超声体积太大很容易破壁不完全。（3）菌体浓度不要太高，沉淀后的菌体重悬时控制好比例。

超声时有泡沫出现的确不是件好事，很可能部分蛋白已经变性失活，但也并不像你想象的那样蛋白酶活就全没有了，可以测定一下还剩多少。超声时出现泡沫的控制方法我没有专门试过，但我想两个条件控制好应该会减轻这个现象。（1）控制超声时间，不要无意义的延长时间；（2）变幅杆下端深入液面以下多少要合适，太多太少都不行。

**8.我要做的是 LDH（乳酸脱氢酶）的释放率即上清/细胞+上清，但测细胞中的 LDH 时需要破碎细胞，请问破碎时需要注意哪些呢？**

解析：1.超声时要在冰浴下进行；

2.超声功率与容器的内径有很大关系：内径小，所需功率也小，不易引起气泡，反之则可能致使蛋白变性；

3.超声前加些蛋白酶抑制剂有利于保护目的蛋白的活性；

4.超声时间 5',间隙 15-20', 总时间 20min 左右。