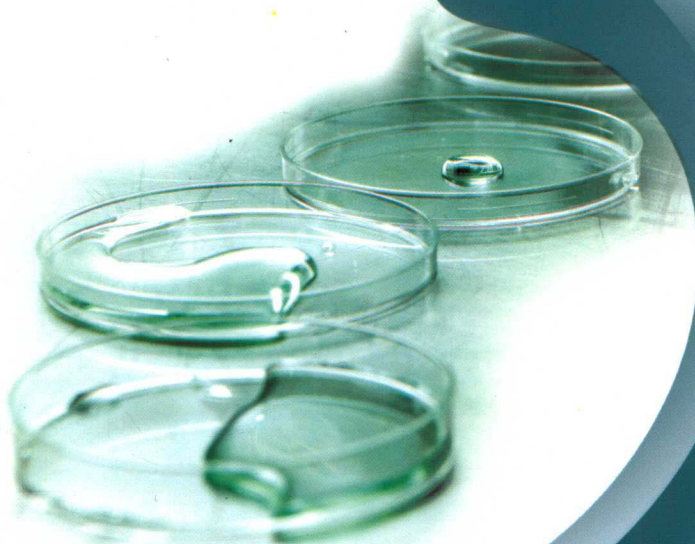


高等医学院校实验教程

生物化学与分子生物学 实验教程

(第2版)

主编 欧 芹 林雪松



北京大学医学出版社

高等医学院校实验教程

生物化学与分子生物学实验教程

(第2版)

主 编 欧 芹 林雪松

副主编 宋高臣

编 委 (按姓名汉语拼音排序)

崔荣军 (牡丹江医学院)

宋高臣 (牡丹江医学院)

林雪松 (哈尔滨医科大学)

袁丽杰 (哈尔滨医科大学)

欧 芹 (佳木斯大学)

张 涛 (佳木斯大学)

朴金花 (佳木斯大学)

张 悦 (哈尔滨医科大学)

申梅淑 (牡丹江医学院)

朱贵明 (贵州医科大学)

北京大学医学出版社

SHENGWU HUAXUE YU FENZI SHENGWUXUE SHIYAN JIAOCHENG

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学与分子生物学实验教程/欧芹, 林雪松主编. —2 版. —北京:
北京大学医学出版社, 2015. 8

ISBN 978-7-5659-1140-8

I. ①生… II. ①欧… ②林… III. ①生物化学—实
验—医学院校—教材②分子生物学—实验—医学院校—教
材 IV. ①Q5-33②Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 133275 号

生物化学与分子生物学实验教程 (第 2 版)

主 编: 欧 芹 林雪松

出版发行: 北京大学医学出版社

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

电 话: 发行部 010-82802230; 图书邮购 010-82802495

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 赵 爽 王孟通

责任校对: 金彤文

责任印刷: 李 啸

开 本: 787mm×1092mm 1/16

印张: 12.25

字数: 316 千字

版 次: 2015 年 8 月第 2 版 2015 年 8 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5659-1140-8

定 价: 25.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

高等医学院校基础课实验教材编委会

主任委员 程伯基

副主任委员 (按姓名汉语拼音排序)

崔光成 关利新 乔远东 魏晓东 毅 和

委 员 (按姓名汉语拼音排序)

卜晓波 陈志伟 李艳君 梁 军 林雪松
刘 星 刘伯阳 刘东璞 刘文忠 马淑霞
马小茹 沈晓玲 宋印利 孙宏丽 田国忠
新 燕 云长海 张 涛 张晓莉 张振涛
朱金玲

第 2 版前言

生物化学与分子生物学的实验方法和技术是生命科学诸学科的重要研究手段，也是临床医学、医学检验、药学、生物技术类本科学生必修的基础实验课程。它不仅是生物化学和分子生物学课程教学的重要组成部分，而且在培养学生分析和解决问题的能力、严谨的科学态度、独立的工作能力等方面有着不可替代的作用。为适应我国高等医学院校教学，尤其是五年制医学教育和部分学科研究生实验教学改革和发展的需要，我们根据多年的教学经验和生物化学学科的发展趋势，结合 2010 年以来使用本教材的体会，对本书进行了修订，保留了有利于实验课堂教学和学生课外科学实验有机结合的特点，为探索新的实验教学方法，不断改革实验教学方式，提高实验教学效果起到了积极的作用。

本书划分为四个部分，第一部分是基本操作及常用仪器使用：包括生物化学与分子生物学常用技术、基本实验操作、常用仪器、实验室规则及安全防护、实验报告的撰写等内容。第二部分为经典生物化学实验，根据参编院校及其他院校目前实验课程教学的实际情况，选择了 15 个经典的基础生物化学实验。第三部分为综合性实验，包括 7 个跨学科和跨越本学科知识体系的实验。第四部分是自主设计性实验，该部分突出学生自主学习能力、创新设计能力的培养，也是本书与其他教材的不同之处。自主设计实验内容既可以作为计划内教学实施，也可作为学生课外科技活动和竞赛题目，或实验室开放的参考内容，对学生能力的培养、创新实验教学的课堂形式等具有积极的作用。此外，本书附录中包含生物化学与分子生物学实验中常用试剂的配制方法，以方便教师和学生进行实验准备工作。

本书不仅较详细地阐述了有关实验技术的基本操作和程序，更着力于对各种技术的基本原理及其相关的基础理论进行剖析。因此，本书不仅可以作为本科实验教材使用，也可作为其他专业学生、研究生学习生物化学实验技术的参考书。

欧 芹

目 录

第一篇 基本操作及常用仪器使用

第一章 生物化学与分子生物学常用技术	1
第一节 离心技术	1
一、离心技术的基本原理	1
二、离心机的类型和主要构造	2
三、离心方法	6
第二节 核酸的分离与纯化	9
一、核酸分离的原则	9
二、核酸分离的主要步骤	10
三、核酸的浓度、纯度测定和完整性鉴定	13
四、核酸的保存	14
第三节 蛋白质和酶的纯化	15
一、蛋白质分离的原则	15
二、蛋白质分离的主要步骤	15
三、蛋白质的纯化	17
四、蛋白质浓度的测定	20
五、蛋白质的保存	21
第四节 分光光度技术	22
一、分光光度技术基本原理	22
二、分光光度计种类、结构和工作原理	25
第五节 电泳技术	26
一、电泳技术发展史	26
二、电泳技术的基本原理	27
三、影响电泳分离的主要因素	29
四、电泳的分类	31
五、常用电泳技术	33
第六节 层析(色谱)技术	48
一、层析(色谱)技术发展简史	48
二、层析方法的一般原理	49
三、层析的分类	49
四、常见的层析技术	50
第七节 聚合酶链反应	62
一、PCR 的基本原理	63
二、PCR 的反应条件	65

三、常见的 PCR 种类	68
四、PCR 技术的应用及其注意事项	72
第八节 印迹技术	74
一、DNA 印迹	75
二、RNA 印迹	75
三、蛋白质的印迹分析	75
第二章 基本实验操作	77
第一节 洗涤和干燥	77
一、玻璃仪器的洗涤清洁	77
二、玻璃仪器的干燥	78
三、沉淀的过滤和洗涤	79
第二节 常用的实验操作技术	80
一、吸量管的种类和使用	80
二、混匀	81
三、保温	81
四、过滤	82
五、离心沉淀法	82
六、实验样品的制备	82
第三章 常用仪器	84
第一节 分光光度计	84
一、仪器组成	84
二、使用和维护	85
三、注意事项	86
第二节 离心机	86
一、仪器组成	86
二、种类	86
三、使用和维护	87
第三节 电泳仪	88
一、使用方法	88
二、注意事项	89
第四节 PCR 仪	89
一、使用方法	89
二、注意事项	89
第五节 真空冷冻干燥机	90
一、使用方法	90
二、注意事项	90
第六节 高压蒸气灭菌锅	91
一、使用方法	91
二、注意事项	91
第七节 恒温培养箱	91

一、使用方法	91
二、注意事项	92
第八节 生物安全柜	92
一、使用方法	92
二、注意事项	92
第四章 实验室规则及安全防护	94
一、实验室规则	94
二、实验室的安全与防护	94
第五章 实验报告的撰写	97
一、实验报告书写的具体要求	97
二、书写实验报告的基本内容	97

第二篇 经典生物化学实验

第六章 蛋白质定量分析实验	98
实验一 双缩脲法测定血清蛋白质含量	98
实验二 Folin-酚试剂法测定蛋白质含量	101
实验三 紫外分光光度法测定蛋白质含量	105
实验四 考马斯亮蓝结合法测定蛋白质含量	107
第七章 层析实验	110
实验五 纸层析法观察转氨基作用	110
实验六 葡聚糖凝胶柱层析分离血红蛋白与鱼精蛋白	113
实验七 离子交换层析分离混合氨基酸	115
第八章 电泳实验	118
实验八 醋酸纤维素薄膜电泳	118
实验九 SDS-PAGE 测定蛋白质的分子量	122
第九章 酶学实验	126
实验十 血清丙氨酸氨基转移酶活性测定 (改良 Mohun 法)	126
实验十一 过氧化氢酶米氏常数的测定	129
第十章 分子生物学基础实验	132
实验十二 肝组织中核酸的提取和定量分析	132
实验十三 DNA 的提取及紫外吸收法测定含量 ——蛋白酶 K-酚抽提法	135
实验十四 总 RNA 的提取制备与检测 ——异硫氰酸胍-酚-三氯甲烷一步法	139
实验十五 Northern 印迹杂交	142

第三篇 综合性实验

实验一 肝糖原的提取和定量测定	147
实验二 BCA 法测定蛋白质含量	149

实验三 质粒 DNA 的提取	150
实验四 DNA 的限制性酶切与琼脂糖凝胶电泳	152
实验五 质粒 pUC18/GAPDH 基因的 PCR 扩增	155
实验六 DNA 连接实验	159
实验七 重组 DNA 转化与蓝白斑筛选	162

第四篇 自主设计性实验

概述	166
一、设计性实验的内涵	166
二、开展设计性实验的目的与意义	166
三、设计性实验的界定	167
四、设计性实验的教学实施	167
附 实验报告范例	168
实验一 酪蛋白等电点的测定	169
实验二 胰蛋白酶对蛋白质的消化和影响酶作用的因素	171
实验三 丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用	173
实验四 氨中毒实验	174
实验五 肾上腺素、胰岛素对血糖浓度的调节作用	175
附录一 常用缓冲溶液的配制	177
附录二 常用酸碱标准溶液的配制	183
附录三 常用酸碱指示剂的配制	184
附录四 RCF 与转速列线计算图	185

第一篇 基本操作及常用仪器使用

第一章 生物化学与分子生物学常用技术

第一节 离心技术

离心技术主要用于各种生物样品的分离和制备。生物样品悬浮液在高速旋转下，由于巨大的离心力作用，使悬浮的微小颗粒（细胞器、生物大分子的沉淀等）以一定的速度沉降，从而得以与溶液分离，而沉降速度取决于颗粒的质量、大小和密度。离心技术在生物科学，特别是在生物化学和分子生物学研究领域已得到十分广泛的应用。

一、离心技术的基本原理

当一个粒子（生物大分子或细胞器）在高速旋转下受到离心力作用时，此离心力“ F ”由下式定义，即：

$$F = ma = m\omega^2 r$$

式中： a 为粒子旋转的加速度； m 为沉降粒子的有效质量； ω 为粒子旋转的角速度； r 为粒子的旋转半径（cm）。

通常，离心力用相对离心力（relative centrifugal force, RCF）表示，相对离心力是指在离心场中，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，单位是重力加速度“ g ”。 980cm/s^2 ，此时“RCF”可用下式计算：

$$F_{rc} = \frac{\omega^2 r}{980} \qquad \omega = \frac{2\pi n}{60}$$

$$\text{故：} F_{rc} = 1.119 \times 10^{-5} n^2 r$$

式中： F_{rc} 为相对离心力； n 为转速，单位为转每分（r/min）。

由上式可见，只要给出旋转半径 r ，则 RCF 和转速之间就可以相互换算。但由于转头的形状及结构上的差异，使每台离心机的离心管从管口至管底的各点与旋转轴之间的距离不一样，所以在计算时规定旋转半径均用平均半径“ r_{av} ”代替： $r_{av} = (r_{min} + r_{max}) / 2$ ， r 的测量如图 1-1 所示。

一般情况下，低速离心时常以转速“r/min”来表示，高速离心时则以“ g ”表示。计算颗粒的 RCF 时，应注意离心管与旋转轴中心的距离“ r ”不同，即沉降颗粒在离心管中所处位置不同，则所受离心力也不同。因此，在报告超速离心条件时，通常用地心引力的倍数

“ $\times g$ ”代替每分钟转数“ r/min ”，因为它可以真实地反映颗粒在离心管内不同位置的离心力及其动态变化。科技文献中，离心力的数据通常是指其平均值，即离心管中点的离心力。

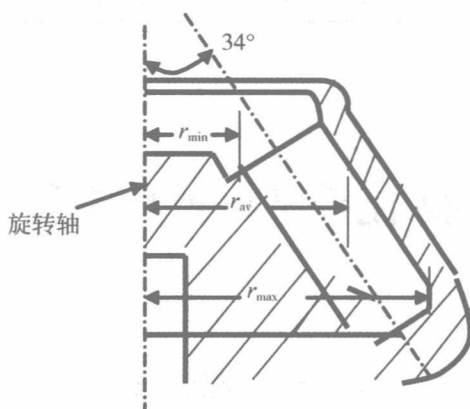


图 1-1 r 测量示意图

为便于进行转速和 RCF 之间的换算，Dole 和 Cotzias 利用 RCF 的计算公式，制作了转速、RCF 和离心半径三者关系的列线图，图式法比公式计算法方便（列线图参见附录四）。换算时，先在离心半径标尺上取已知的半径并在转速标尺上取已知的离心机转速，然后在这两点间划一条直线，其与图中 RCF 标尺上的交叉点即为相应的相对离心力数值。注意，若已知的转速值处于转速标尺的右边，则应读取 RCF 标尺右边的数值，转速值处于转速标尺左边，则应读取 RCF 标尺左边的数值。

二、离心机的类型和主要构造

离心机可分为工业用离心机和实验用离心机。实验用离心机又分为制备性离心机和分析性离心机。制备性离心机主要用于分离各种生物材料，每次分离的样品容量比较大。分析性离心机一般都带有光学系统，主要用于研究纯的生物大分子和颗粒的理化性质。依据待测物质在离心场中的行为（用离心机中的光学系统连续监测），能推断物质的纯度、形状和分子量等。分析性离心机都是超速离心机。

（一）制备性离心机分类

1. 普通离心机 最大转速 $6\,000\,r/min$ 左右，最大相对离心力近 $6\,000\times g$ ，容量为几十毫升至几升，分离形式是固液沉降分离；转子有角式和外摆式，其转速不能严格控制，通常不带冷冻系统，于室温下操作，用于收集易沉降的大颗粒物质，如红细胞、酵母细胞等。这种离心机多用交流整流子电动机驱动，电机的碳刷易磨损。转速是用电压调压器调节，启动电流大，速度升降不均匀。转头一般置于一个硬质钢轴上，因此精确地平衡离心管及内容物就极为重要，否则会损坏离心机。

2. 高速冷冻离心机 最大转速为 $20\,000\sim 25\,000\,r/min$ ，最大相对离心力为 $89\,000\times g$ ，最大容量可达 $3\,L$ ，分离形式也是固液沉降分离。配有各种角式转头、荡平式转头、区带转头、垂直转头和连续流动转头。一般配有制冷系统，以消除高速旋转转头与空气之间摩擦而产生的热量，离心室的温度可以调节并维持在 $0\sim 4^{\circ}C$ 。转速、温度和时间都可以严格准确地控制，并有指针或数字显示，通常用于微生物菌体、细胞碎片、大细胞器、硫酸沉淀和免

疫沉淀物等的分离纯化工作，但不能有效地沉降病毒、小细胞器（如核蛋白体）或单个分子。

3. 超速离心机 转速可达 $50\,000\sim 80\,000\text{r/min}$ ，相对离心力最大可达 $510\,000\times g$ ，离心容量由几十毫升至 2L ，分离的形式是差速沉降分离和密度梯度区带分离，离心管平衡允许的误差小于 $0.1g$ 。超速离心机的出现，使生物科学的研究领域有了新的扩展，它能使过去仅仅在电子显微镜下观察到的亚细胞器得到分级分离，还可以分离病毒、核酸、蛋白质和多糖等。

超速离心机主要由驱动和速度控制、温度控制、真空系统以及转头四部分组成。超速离心机的驱动装置是水冷或风冷电动机，通过精密齿轮箱或皮带变速，或者直接用变频感应电机驱动，并由微机进行控制。由于驱动轴较细，因而在旋转时，此细轴可有一定的弹性弯曲，以适应转头轻度的不平衡，而不至于引起震动或转轴损伤。除速度控制系统外，还有一个过速保护系统，以防止转速超过转头最大规定转速而引起转头的撕裂或爆炸，为此，离心腔用能承受此种爆炸的装甲钢板密闭。

超速离心机的温度控制是由安装在转头下面的红外线射量感受器直接并连续监测离心腔的温度，以保证更准确、更灵敏的温度调控。这种红外线温控比高速离心机的热电偶控制装置更敏感，更准确。

超速离心机装有真空系统，这是它与高速离心机的主要区别。离心机的速度在 $2\,000\text{r/min}$ 以下时，空气与旋转转头之间的摩擦只产生少量的热，速度超过 $20\,000\text{r/min}$ 时，由摩擦产生的热量显著增大；当速度在 $40\,000\text{r/min}$ 以上时，由摩擦产生的热量就成为严重问题。为此，将离心腔密封，并由机械泵和扩散泵串联工作的真空泵系统抽成真空，温度的变化容易控制。摩擦力很小，这样才能达到所需的超高转速。

（二）分析性离心机

分析性离心机使用了特殊设计的转头和光学检测系统，以便连续地监视物质在一个离心场中的沉降过程，从而确定其物理性质。

分析性超速离心机的转头是椭圆形的，以避免应力集中于孔处。此转头通过一个柔性的轴连接到一个高速的驱动装置上，在一个冷冻的真空腔中旋转。转头上有 $2\sim 6$ 个装离心杯的小室，离心杯是扇形石英的，可以上下透光。离心机中装有一个光学系统，在整个离心期间都能通过紫外吸收或折射率的变化监测离心杯中沉降着的物质，在预定的期间可以拍摄沉降物质的照片。在分析离心杯中物质沉降情况时，在重颗粒和轻颗粒之间形成的界面就像一个折射的透镜，结果在检测系统的照相底板上产生了一个“峰”。由于沉降不断进行，界面向前推进，因而峰也移动，从峰移动的速度可以计算出样品颗粒的沉降速度。

分析性超速离心机的主要特点就是能在短时间内，用少量样品得到一些重要信息：能够确定生物大分子是否存在及其大致的含量；计算生物大分子的沉降系数；结合界面扩散，估计分子的大小；检测分子的不均一性及混合物中各组分的比例；测定生物大分子的分子量；还可以检测生物大分子的构象变化等。

（三）离心机的主要构造

1. 转头

（1）角式转头：角式转头是指离心管腔与转轴成一定倾角的转头。它是由一块完整的金属制成的，其上有 $4\sim 12$ 个装离心管用的机制孔穴，即离心管腔，孔穴的中心轴与旋转轴之间的角度在 $20^\circ\sim 40^\circ$ 之间，角度越大沉降越结实，分离效果越好。这种转头的优点是具有较

大的容量，且重心低，运转平衡，寿命较长。颗粒在沉降时先沿离心力方向撞向离心管，然后再沿管壁滑向管底（图 1-2），因此管的一侧就会出现颗粒沉积，此现象称为“壁效应”。壁效应容易使沉降颗粒被突然变速所产生的对流扰乱，影响分离效果。

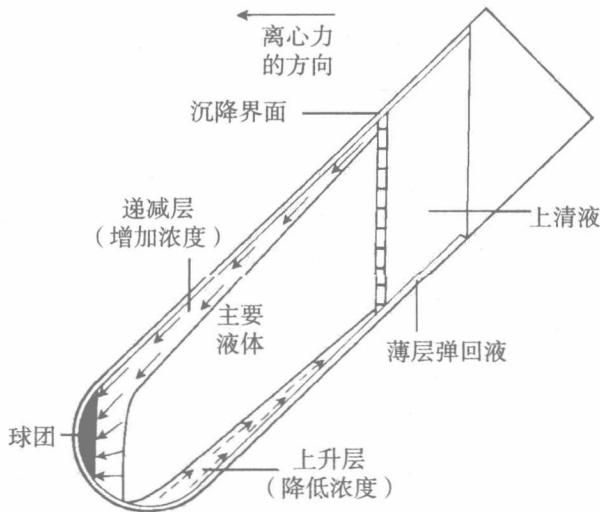


图 1-2 角式转头壁效应示意图

(2) 荡平式转头：这种转头是由吊着的 4 或 6 个自由活动的吊桶（离心套管）构成。如图 1-3，当转头静止时，吊桶垂直悬挂（图 1-3A）；当转头转速达到 200~800r/min 时，吊桶荡至水平位置（图 1-3B，图 1-3C）；当离心停止，吊桶垂直（图 1-3D）。这种转头最适合做密度梯度区带离心，其优点是梯度物质可放在保持垂直的离心管中，离心时被分离的样品带垂直于离心管纵轴，而不像角式转头中样品沉淀物的界面与离心管成一定角度，因而有利于离心结束后由管内分层取出已分离的各样品带。其缺点是颗粒沉降距离长，离心所需时间也长。

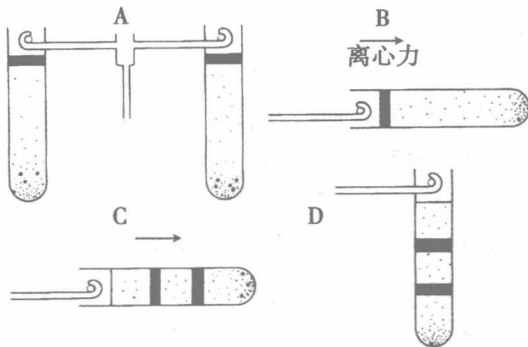


图 1-3 转头旋转与吊桶位置示意图

(3) 区带转头：区带转头无离心管，主要由一个转子桶和可旋开的顶盖组成，转子桶中装有十字形隔板装置，把桶内分隔成四个或多个扇形小室，隔板内有导管（图 1-4）。梯度液或样品液从转头中央的进液管泵入，通过这些导管分布到转子四周，转头内的隔板可保持

样品带和梯度介质的稳定。沉降的样品颗粒在区带转头中的沉降情况不同于角式和外摆式转头，在径向的散射离心力作用下，颗粒的沉降距离不变，因此区带转头的“壁效应”极小，可以避免区带和沉降颗粒的紊乱，分离效果好（图 1-5）。同时，兼有转速高、容量大、回收梯度容易和不影响分辨率的优点，使超离心用于制备和工业生产成为可能。区带转头的缺点是样品和介质直接接触转头，耐腐蚀要求高，操作复杂。

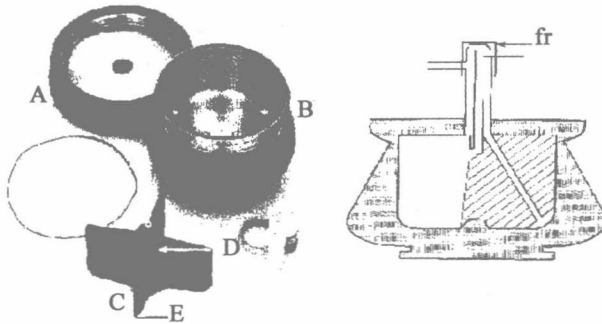


图 1-4 区带转头及其截面示意图

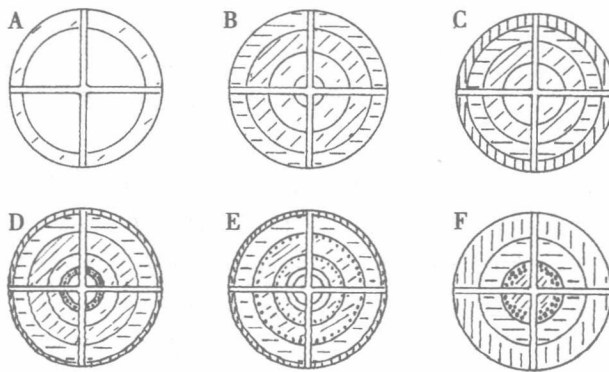


图 1-5 区带转头壁效应示意图

(4) 垂直转头：其离心管是垂直放置，样品颗粒的沉降距离最短，离心所需时间也短，适合用于密度梯度区带离心。离心结束后液面和样品区带要作 90° 转向，因而降速要慢。

(5) 连续流动转头：可用于大量培养液或提取液的浓缩与分离。该类转头与区带转头类似，由转子桶、有入口和出口的转头盖及附属装置组成。离心时，样品液由入口连续流入转头，在离心力作用下，悬浮颗粒沉降于转子桶壁，上清液由出口流出。

2. 离心管 离心管主要用塑料和不锈钢制成，塑料离心管常用材料有聚乙烯（PE）、聚碳酸酯（PC）、聚丙烯（PP）等，其中 PP 管性能较好。塑料离心管的优点是透明（或半透明），硬度小，可用穿刺法取出梯度。缺点是易变形、抗有机溶剂腐蚀性差、使用寿命短。不锈钢管强度大，不变形，能抗热、抗冻、抗化学腐蚀。但用时也应避免接触强腐蚀性的化学药品，如强酸、强碱等。塑料离心管都有管盖，离心前管盖必须盖严，倒置不漏液。管盖有三种作用：

- (1) 防止样品外泄。用于有放射性或强腐蚀性的样品时, 这点尤其重要。
- (2) 防止样品挥发。
- (3) 支持离心管, 防止离心管变形。

三、离心方法

(一) 差速沉降离心法

这是最普通的离心法。即采用逐渐增加离心速度或低速和高速交替进行离心, 使质量不同的颗粒在不同的离心速度及不同离心时间下分批分离的方法。此法一般用于分离沉降系数相差较大的颗粒。

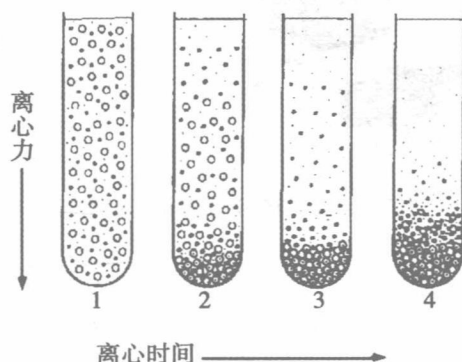


图 1-6 不同离心力与离心时间对离心效果影响的示意图

差速离心首先要选择好颗粒沉降所需的离心力和离心时间。当以一定的离心力在一定的离心时间内进行离心时, 在离心管底部就会得到最大和最重颗粒的沉淀, 分出的上清液在加大转速下再进行离心, 又得到第二部分较大较重颗粒的沉淀及含较小和较轻颗粒的上清液, 如此多次离心处理, 即能把液体中的不同颗粒较好地分离开 (图 1-6)。此法所得的沉淀是不均一的, 仍混有其他成分, 需经过 2~3 次的再悬浮和再离心, 才能得到较纯的颗粒。

此法主要用于组织匀浆液中分离细胞器和病毒分离, 其优点是操作简易, 离心后用倾倒法即可将上清液与沉淀分开, 并可使用容量较大的角式转子。缺点是: 须多次离心, 沉淀中有夹带, 分离效果差, 不能一次得到纯颗粒; 沉淀于管底的颗粒受挤压, 容易变性失活。

(二) 密度梯度区带离心法

密度梯度区带离心法简称区带离心法, 是将样品加在惰性梯度介质中进行离心沉降或沉降平衡, 在一定的离心力下, 把颗粒分配到某些特定位置形成不同区带的分离方法。

此法的优点是: ①分离效果好, 可一次获得较纯颗粒; ②适用范围广, 能像差速离心法一样分离具有沉降系数差的颗粒, 又能分离有一定浮力密度差的颗粒; ③颗粒不会挤压变性, 能保持颗粒活性, 并防止已形成的区带由于对流而引起混合。

此法的缺点是: ①离心时间较长; ②需要制备惰性梯度介质溶液; ③操作严格, 不易掌握。

密度梯度区带离心法又可分为两种:

1. 差速区带离心法 当不同的颗粒间存在沉降速度差时 (不需要像差速沉降离心法所要求的那样大的沉降系数差), 在一定的离心力作用下, 颗粒各自以一定的速度沉降, 在密

度梯度介质的不同区域上形成区带的方法，称为差速区带离心法（图 1-7）。此法仅用于分离有一定沉降系数差的颗粒（20% 的沉降系数差或更少）或分子量相差 3 倍的蛋白质，与颗粒的密度无关。大小相同，密度不同的颗粒（如线粒体，溶酶体等）不能用此法分离。

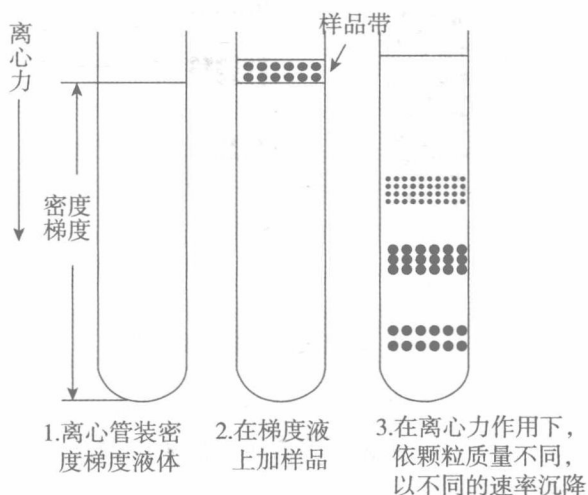


图 1-7 差速区带离心示意图

离心管先装好密度梯度介质溶液，样品液加在梯度介质的液面上，离心时，由于离心力的作用，颗粒离开原样品层，按不同沉降速度向管底沉降，离心一定时间后，沉降的颗粒逐渐分开，最后形成一系列界面清楚的不连续区带，沉降系数越大，往下沉降越快，所呈现的区带也越低，离心必须在沉降最快的大颗粒到达管底前结束，样品颗粒的密度要大于梯度介质的密度。梯度介质通常用蔗糖溶液，其最大密度和浓度（W/V）可达 $1.28\text{kg}/\text{cm}^3$ 和 60%。此离心法的关键是选择合适的离心转速和时间。

2. 等密度区带离心法 离心管中预先放置好梯度介质，样品加在梯度液面上，或样品预先与梯度介质溶液混合后装入离心管，通过离心形成梯度。这就是密度区带离心产生梯度的两种方式。

离心时，样品的不同颗粒向上浮起，一直移动到与它们的密度相等的等密度点的特定梯度位置上，形成几条不同的区带，这就是等密度离心法（图 1-8）。体系到达平衡状态后，再延长离心时间和提高转速已无意义，处于等密度点上的样品颗粒的区带形状和位置均不再受离心时间影响，而提高转速可以缩短达到平衡的时间，离心所需时间以最小颗粒到达等密度点（即平衡点）的时间为基准，有时长达数日。

等密度离心法的分离效率取决于样品颗粒的浮力密度差，密度差越大，分离效果越好，与颗粒大小和形状无关，但大小和形状决定着达到平衡的速度、时间和区带宽度。

等密度区带离心收集区带的方法有许多种，例如：

- (1) 用注射器和滴管由离心管上部吸出。
- (2) 用针刺穿离心管底部滴出。
- (3) 用针刺穿离心管区带部分的管壁，把样品区带抽出。
- (4) 用一根细管插入离心管底，泵入超过梯度介质最大密度的取代液，将样品和梯度介质压出，用自动部分收集器收集。

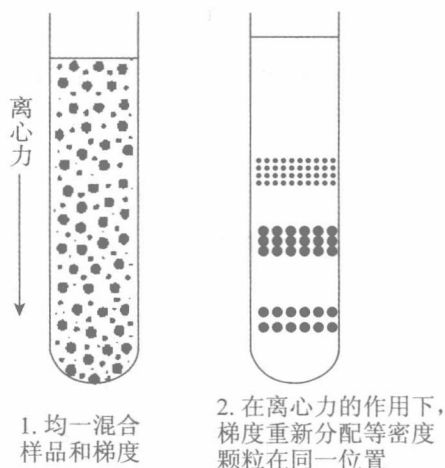


图 1-8 等密度区带离心示意图

等密度区带离心法所用的梯度介质通常为氯化铯 (CsCl), 其密度可达 1.7g/cm^3 。此法可分离核酸、亚细胞器等, 也可以分离复合蛋白质, 但简单蛋白质不适用。

(三) 离心操作的注意事项

高速与超速离心机是生化实验教学 and 生化科研的重要精密设备, 因其转速高, 产生的离心力大, 如使用不当或缺乏定期的检修和保养, 可能发生严重事故。因此, 使用离心机时都必须严格遵守操作规程。

1. 使用各种离心机时, 必须事先在天平上精密地平衡离心管及其内容物。平衡时重量之差不得超过各个离心机说明书上所规定的范围, 每个离心机不同的转头有各自的允许差值。转头中绝对不能装载单数的离心管, 当转头只是部分装载时, 离心管必须互相对称地放在转头中, 以便使负载均匀地分布在转头的周围。

2. 装载溶液时, 要根据各种离心机的具体操作说明进行, 根据待离心液体的性质及体积选用合适的离心管。有的离心管无盖, 液体不得装得过多, 以防离心时甩出, 造成转头不平衡、生锈或被腐蚀。而制备性超速离心机的离心管, 则常常要求必须将液体装满, 以免离心时塑料离心管的上部凹陷、变形。每次使用离心机后, 必须仔细检查转头, 及时清洗、擦干。转头是离心机中必须重点保护的部件, 搬动时要小心, 不能碰撞, 避免造成伤痕。转头长时间不用时, 要涂上一层上光蜡保护, 严禁使用显著变形、损伤或老化的离心管。

3. 若要在低于室温的温度下离心时, 转头在使用前应放置在冰箱或置于离心机的转头室内预冷。

4. 离心过程中不得随意离开, 应随时观察离心机上的仪表是否正常工作, 如有异常的声音应立即停机检查, 及时排除故障。

5. 每个转头各有其最高允许转速和使用累积限时, 使用转头时要查阅说明书, 不得超速使用。每一转头都要有一份使用档案, 记录累积的使用时间, 若超过了该转头的最高使用限时, 则须按规定降速使用。

(袁丽杰)