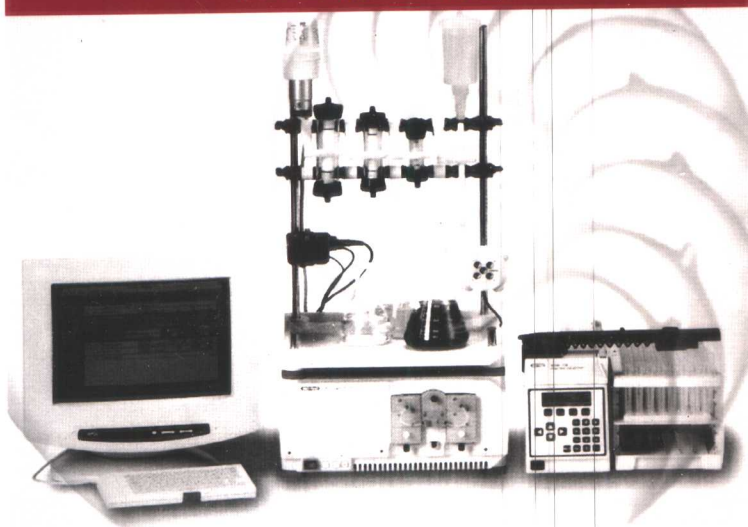


生物实验室系列

现代生物科学 仪器分析入门

徐金森 编著



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

现代生物科学仪器分析入门

徐金森 编著



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

现代生物科学仪器分析入门/徐金森编著. —北京:
化学工业出版社, 2004. 4

(生物实验室系列)

ISBN 7-5025-5477-7

I. 现… II. 徐… III. 生物学-仪器 IV. TH79

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 033191 号

生物实验室系列

现代生物科学仪器分析入门

徐金森 编著

责任编辑: 郎红旗 李 丽

责任校对: 顾淑云 边 涛

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 13¼ 字数 233 千字

2004 年 6 月第 1 版 2004 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5477-7/Q·95

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

出版者的话

21 世纪是生物科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。

而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

21 世纪被称为生命科学的世纪。多种动物的克隆成功、人类基因组计划 (HGP) 的提前完成、各种新型生物材料的出现等, 都标志着现代生物科学在宏观和微观水平及各个方向上正在取得日新月异的进步。科学的发展与技术的进步相辅相成、密不可分, 生命科学领域也莫不如此。毋庸置疑的是, 正是各种高新技术的出现、各种生物分析仪器的推陈出新, 为这些令人振奋的生命科学进展提供了坚定的技术平台和支撑。所谓“学者术之体, 术者学之用”, 大概正是此意。

可以说, 现代生物科学分析仪器的的发展具有下列趋势。

一、大型综合性仪器与小型专一性仪器并行不悖

大多数生物大分子的组成和结构本身就非常复杂, 在结构和功能的分析上存在不少困难。面对这种情况, 各种多功能综合性的分析仪器正不断推陈出新, 并获得了广泛的应用, 大大提高了分析的工作效率和可靠性。例如, 新型激光扫描共聚焦显微镜以及流式细胞仪等的出现, 已从过去单纯的外部形态结构观察层面提升到可以对活细胞内成分进行定位、定时、定性和定量的同时分析, 功能大为扩展, 分析结果的可靠性也得以大大提高。这对于提高大型分析仪器的投入产出比也有重要意义。另一方面, 功能较为单一的小型仪器也在不断获得开发和应用。例如, 生态学研究、环境保护工作中需要对果蔬等各种生物样品的有害元素、污染物等进行现场分析的仪器, 其市场需求量也很大; 根据生物反应器原理发展的各种快速测定的便携式仪器设备也在不断问世。这将是今后研究和技术开发的一个热点。

二、各领域技术交叉明显, 共同构筑高新技术平台

毫无疑问, 精密机电设备制造技术、激光技术、光学技术、数码转换技术、计算机技术、各种荧光标记技术、检测技术等交叉和综合应用, 共同构筑高新技术的平台, 是实现小型或大型分析仪器的技术基础, 使得设计、制造大型多功能的仪器设备成为可能。

三、计算机技术与自动化、智能化工作站的出现

这是现代生物科学分析仪器发展最明显的特点之一。计算机正以空前的速度广泛引入各种分析仪器中, 使得分析仪器如虎添翼。利用数码技术和各种专用软件, 在计算机提供的友好工作界面上实现人机对话, 大大提高了分析速度和测试结果的重现性和可靠性。从自动进样器开始, 整个分析过程中各种测试

参数的设定、对样品组分的流向、测试信息的自动收集、反馈、监控,以及分析数据的储存、加工和输出等都有赖于计算机技术的应用。越来越多的集这些功能于一身的工作站的出现,也使得自动化、智能化的日常分析工作成为可能。另外,适合各种生物样品预制备过程的自动化设备也将是今后开发和应用的方向之一。

四、联用技术的优势

生物样品中各种复杂体系,尤其是生物活性大分子的分离、鉴定、合成以及反应过程的追踪等研究,有必要将各种分离、分析仪器联合起来使用,以便各取所长,发挥各自的技术优势,才能获得比较理想的测试结果。例如,高压液相色谱-核磁共振波谱-质谱(LC-NMR-MS)技术的联用在新药的开发研究中,已经获得成功的应用,并正在发挥着重要的作用。

五、资源共享及网络化

借助于国际互联网的迅速发展,不同实验室内部或相互之间不同的仪器组成网络,进行并机或串联工作,进行测试信息的网上传递和交流,使得资源共享正在变为现实。当然,如何有效利用网上资源,并注意知识产权的保护等,将是分析工作者面临的新问题。

“工欲善其事,必先利其器”。在设计或进行某项科学研究课题时,必须根据研究目的、研究对象和技术路线,利用不同的分离、分析仪器设备。生命科学研究工作者对于当代各类分析仪器的原理、组成特点及其用途等方面应当具备基本的了解,才能在科学研究中有的放矢地善用这些“工具”,达到研究的目的。从这个意义上说,它也是研究工作者自身素质要求的内容之一。同时,承担新世纪生物科学专业人才培养的研究生教育,需要面向新世纪的从内容到形式的新型教材。本书主要面向生物系硕士研究生、本科生编写而成,并在实际授课过程中多次增删、改编,得到了肯定和鼓励。本书在介绍色谱、光谱和波谱技术设备外,还介绍了如激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪等细胞生物学新型研究设备,并根据生物样品分析的实际需要,专辟章节介绍生物样品的预制备以及分子生物学技术常用仪器设备等,以便满足学以致用实际需要。本书作者多年担任硕士研究生的现代生物科学仪器分析教学工作,对于生物系学生的背景知识结构和需要比较了解,兼顾大多数生物科学实验室的实际情况,删繁就简,从生物科学工作者的角度,简明扼要地讲授生物仪器的测定原理、基本结构及其用途。纵观全书构成,可以看出本书尽量避免一般仪器分析教程中常有的仪器发展沿革、冗长的公式推导、过细的操作步骤以及仪器运行维护等的介绍,而强调分析用生物样品的制备和测试结果的生物学意义的阐释等,是一本具有自己特点和风格的参考书。作者衷心希望本书可以成为生物系的本科生、研究生学习和科研活动的有益参考,同时对医学、农林及师范类等

相关学科的学生、科研人员和进修教师也将有所裨益。

在撰写本书过程中参考了若干国内外的教科书和最新相关文献，基本上已列入各章的文献目录之内。为了便于读者检索和掌握重点内容，在每一章后特设立“本章小结”和“关键词”，以供参考。

本书在计划及编写过程中，得到了化学工业出版社的鼎力支持和热情帮助。本学院的陈晋安高级工程师提供了部分生物质谱仪的资料；本研究室硕士研究生吴伟立、宋希坤和李华等在文字录入和文献目录整理中也提供了帮助。值此付梓之际，谨对他们表示深切谢意。

由于作者浅学菲才，虽数度易稿，谬误在所难免，概由本人负责。在此恳望读者不吝批评，以期日后改进，则不胜感激。

作者谨识

2004年4月10日

于厦门大学生命科学学院

内 容 提 要

本书从生物科学工作者的角度，兼顾大多数生物科学实验室的实际情况，简明扼要地讲授生物仪器的测定原理、基本结构及其用途。本书尽量避免一般仪器分析教程中常有的仪器发展沿革、冗长的公式推导、过细的操作步骤以及仪器运行等的介绍，而强调分析用生物样品的制备和测试结果的生物学意义阐释等，是一本特色鲜明的参考书。

本书在介绍色谱、光谱和波谱技术设备外，还介绍了如激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪等细胞生物学新型研究设备，并根据生物样品分析的实际需要，专辟章节介绍生物样品的预制备以及分子生物学技术常用仪器设备等。

本书可作为高校生物、农林及师范类硕士研究生、本科生和进修教师的参考书，也可作为相关研究领域科研人员的参考用书。

目 录

第一章 生物样品的预制备	1
第一节 组织匀浆机与破碎机.....	1
第二节 液相和固相萃取装置.....	3
一、索氏抽提装置.....	3
二、快速溶剂萃取仪.....	3
三、固相萃取.....	5
第三节 旋转浓缩仪.....	6
第四节 离心理论及超速离心机.....	7
一、离心机的主要参数.....	7
二、离心机分类	10
三、离心机的基本结构	10
四、离心机使用注意事项	11
第五节 低温及超低温冻干与冷藏	11
参考文献	13
第二章 细胞生物学新型研究技术与设备	15
第一节 激光扫描共聚焦显微镜系统	15
一、概述	15
二、共聚焦原理及扫描方法	15
三、LSCM 的基本结构组成	17
四、LSCM 的基本功能概述	19
五、荧光探针简介	23
六、LSCM 样品的制备与测定分析	25
第二节 流式细胞仪	27
一、流式细胞仪概述	27
二、流式细胞仪的基本结构	28
三、流式细胞仪的分析及分选原理	28
四、FCM 常用参数及其意义	29
五、FCM 测定结果的表示	31
六、FCM 样品制备的主要步骤	32
七、磁式细胞分选器简介	33

参考文献	35
第三章 色谱技术及其相关设备	37
第一节 色谱法原理	37
一、色谱法概念及分类	37
二、色谱图及其常用术语	39
三、色谱法基本理论	41
第二节 气相色谱仪	44
一、填充柱气相色谱仪	45
二、毛细管气相色谱仪	57
三、色谱条件的优化	59
四、GC测定方法及结果报告	61
第三节 高效液相色谱仪	62
一、HPLC的固定相和流动相	63
二、高效液相色谱仪	63
三、HPLC主要参数及操作条件优化	73
第四节 超临界流体色谱仪	74
一、超临界流体及其特性	74
二、SFC的原理及一般流程	76
三、SFC的仪器结构	77
四、SFC的应用简介	78
第五节 高效毛细管电泳仪	78
一、概述	78
二、毛细管电泳的电泳模式	79
三、毛细管电泳的基本理论与主要参数	80
四、毛细管电泳仪	82
五、毛细管电泳基本操作条件及其优化	84
参考文献	86
第四章 光谱技术与光谱仪	88
第一节 电磁辐射的基本理论	88
一、光的波粒二象性	88
二、电磁波谱	89
三、吸收光谱和发射光谱	90
第二节 紫外-可见光谱仪	90
一、紫外-可见光谱	91
二、UV-Vis光谱的特征与描述	92

三、紫外-可见光谱仪	94
四、UV-Vis 光谱仪操作条件优化	97
第三节 红外光谱仪	100
一、红外光谱法的基本原理	100
二、红外光谱仪	104
三、样品制备及 IR 分析	107
第四节 荧光光谱仪	109
一、荧光产生机理	109
二、激发光谱和发射光谱	110
三、荧光光谱仪的结构	110
四、荧光分析方法	111
第五节 原子发射光谱仪	112
一、基本原理	112
二、仪器结构	115
三、分析方法	118
第六节 原子吸收光谱仪	120
一、基本原理	120
二、仪器结构与工作原理	122
三、分析操作中的干扰及其消除	126
四、分析方法	126
参考文献	128
第五章 波谱技术及核磁共振仪	130
第一节 核磁共振波谱基本原理	130
一、核的自旋及其磁性性质	130
二、弛豫及其机制	133
三、化学位移及其表示法	134
第二节 核磁共振波谱仪	135
一、连续波 NMR 仪	135
二、傅里叶变换 NMR 仪	137
三、NMR 的测定	138
第三节 ^{13}C 的核磁共振波谱仪	140
参考文献	141
第六章 质谱技术与质谱仪	142
一、质谱技术的基本原理	142
二、质谱仪的基本结构	142

三、质谱仪主要性能指标	150
四、质谱图及其判读	151
五、生物质谱技术简介	154
参考文献	163
第七章 色谱-波谱联用技术	165
第一节 气相色谱-质谱联用	165
第二节 高压液相色谱-质谱联用	167
第三节 毛细管电泳色谱-质谱联用	169
第四节 气相色谱-核磁共振波谱联用	170
第五节 高压液相色谱-核磁共振波谱联用	171
第六节 MS-MS 联用技术	173
第七节 其他联用技术	174
参考文献	175
第八章 分子生物学技术常用仪器设备	177
第一节 电泳仪	177
一、凝胶电泳仪	177
二、等电聚焦电泳仪	179
三、制备型电泳仪	180
第二节 电泳仪的相关装置	182
一、灌胶模具	183
二、电源	183
三、恒温装置	184
四、干胶器	185
五、凝胶扫描和摄录装置	186
六、电泳印迹装置	187
七、电泳洗脱装置	188
第三节 PCR 仪	190
第四节 转基因仪	191
一、基因枪	191
二、氦气加速枪	192
三、电穿孔仪	193
第五节 基因差示系统	195
参考文献	196

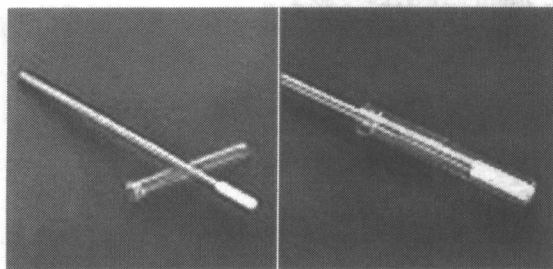
第一章 生物样品的预制备

生物样品的预制备至关重要，其目的是将原始样品预先适当处理成适合分析的状态。可以说，制备合适的分析用样品是后续研究工作成功的一半或一半以上。

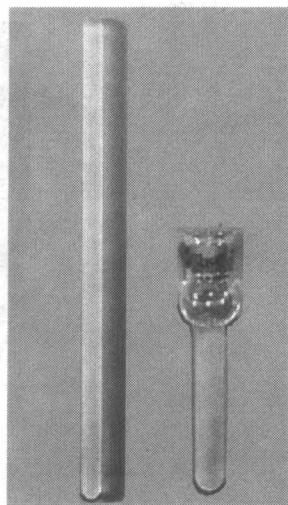
从生物大分子的预制备过程来说，一般包括材料选择和预处理（如洁净、切片、风干等）、破碎、提取纯化、浓缩、结晶、干燥和贮藏保存等步骤，应该根据各个步骤的具体要求和生物样品来源（动物、植物或微生物培养物）的不同而采用不同的方法和技术设备。

第一节 组织匀浆机与破碎机

一般实验室内最常用的是高速组织捣碎机和组织匀浆机。当然，也常采用高频振荡的超声波粉碎机等装置来破碎微生物培养物等样品。图 1-1 所示的是两种玻璃匀浆器。这类匀浆器由硅酸盐玻璃制成，适用于培养细胞或软组织（如动物肝脏等）的匀浆。匀浆器包括一个筒状套管和两根槌管。其中一根为松形槌（使用间隙 $0.089\sim0.14\text{mm}$ ，即 $0.0035\sim0.0055$ 英寸），另一根为紧形槌（使用间隙 $0.025\sim0.076\text{mm}$ ，即 $0.0010\sim0.0030$ 英寸）。在实际操作中，可先用松形槌一边上下抽挤一边搅动，而后再用紧形槌继续匀浆。



(a) Dounce 匀浆器



(b) Potter-Elvehjem 匀浆器

图 1-1 玻璃匀浆器示意

图 1-2 所示的是国产超声波细胞破碎机 (JY92-2D 型)。它是利用超声波在液体中产生的空化效应, 可用于各种动物、植物细胞, 细菌及组织的破碎和匀浆化。其功率为 450W, 频率 20Hz, 破碎容量在 0.5~500mL 之间。为了提高细胞破碎效率, 有时也配合添加一些细胞破碎珠。

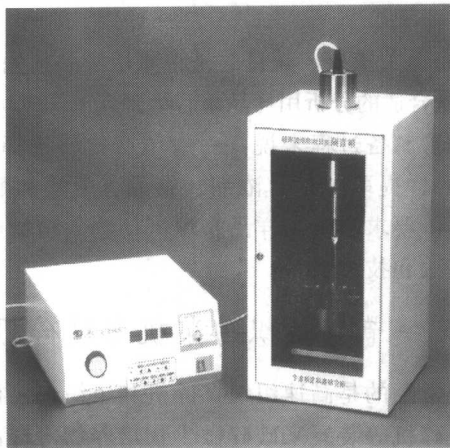


图 1-2 超声波细胞破碎机 (JY92-2D 型)

图 1-3 所示的是高压细胞破碎机。它利用高压产生的挤压作用使细胞等材料破碎, 适用于厚壁细胞、细菌和较浓样品的破碎, 具有快速、方便和无噪声等特点。处理容量为 1~50mL/次, 有的可达 20~150mL/次, 且可连续进样, 最大破碎压力为 300MPa, 使用电压 380V。



图 1-3 高压细胞破碎机

图 1-4 所示的是一种高速组织捣碎机。它装有叶片刀, 由电机驱动搅拌和匀浆。这类装置的转速因机型而异, 通常在 6 000~15 000r/min 之间, 高的可

达 20 000~30 000r/min 之间, 可视需要调节。一般低速时连续运转时间稍长, 而高速时运行时间则应短些, 以避免电机过热。组织捣碎机适用于较坚硬组织(如肌肉、心肌或果实等植物组织)的匀浆。实际上有些家用多功能搅拌器的转速可达 20 000r/min, 也可用于对干、湿样品进行粉碎或匀浆。但应注意的是, 有机溶剂如丙酮不能直接放入塑料容器内。



图 1-4 高速组织捣碎机

第二节 液相和固相萃取装置

一、索氏抽提装置

索氏抽提装置 (Soxhlet apparatus) 是典型的固体提取装置。它由索氏抽提器 (如图 1-5 所示)、冷凝器和收集瓶三部分组成, 是实验室中最常用的抽提装置之一。使用时将冷凝器与自来水管连接起来, 注意进水口在下、出水口在上, 以保持冷凝所需的水位。粉末状样品装进滤纸筒后放在抽提器内。预装在收集瓶内的有机溶剂在水浴锅内受到加热后, 经蒸汽通道上升至冷凝器内受到冷却, 冷凝成液滴, 直接滴落在样品上。有机溶剂在抽提器内积累的过程中与样品充分接触, 将可溶性的目的成分抽提出来。当溶剂体积达到虹吸管口部高度后, 将发生虹吸作用, 携带抽提物一起回流到收集瓶内。如此循环往复, 即可将目的成分充分抽提出来。提取速度可通过调节加热温度来控制, 一般应控制在冷凝液 1 滴/s 前后。

二、快速溶剂萃取仪

图 1-6 所示的是美国 Dionex 公司的 ASE300 快速溶剂萃取仪。它由 4 个溶剂瓶 (a)、炉体 [包括萃取池 (b) 及传送盘、泵、收



图 1-5 索氏抽提器

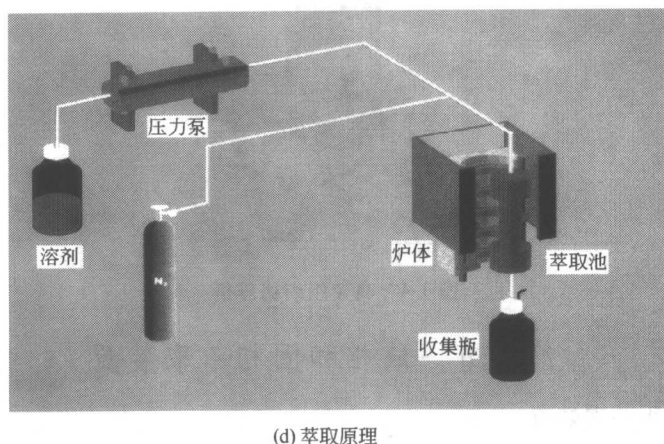
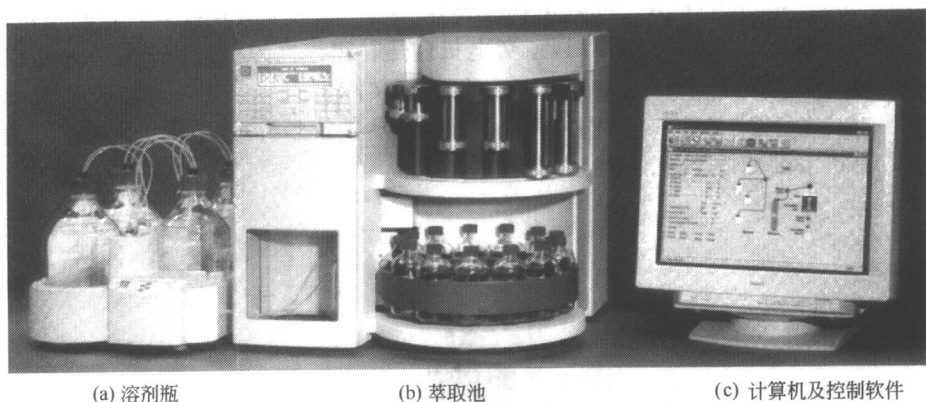


图 1-6 Dionex 公司 ASE300 快速溶剂萃取仪

集瓶转盘等] 和装有 AutoASE 计算机控制软件的控制系统 (c) 等组成。ASE 是利用液体 (有机溶剂或水溶剂) 对固体或半固体样品进行萃取的全自动系统, 它通过增加溶剂的温度和压力来提高萃取的速度和效率。ASE300 克服了索氏抽提器抽提时间过长 (4 ~ 48h) 的不足, 并可通过改变萃取温度、萃取时间和萃取溶剂以优化萃取操作方法, 使得萃取过程变得快速、高效和自动。在标准条件 (100℃、1MPa) 下, 大约 75% 的萃取可在 20min 内得以完成。ASE300 可自动完成 12 个样品的萃取和萃取液的过滤, 并将滤液用于进一步的分析。萃取池体积有 34mL、66mL、100 mL, 内径 28.3 mm, 空气瓶压力 0.4~8.3MPa, 氮气瓶压力 1.0~1.4MPa。

ASE300 的萃取原理如图 1-6 (d) 所示。将准备好的样品装入不锈钢萃取池, 拧紧池盖并放入圆盘式传送装置, 后者将萃取池送入加热炉腔, 萃取