



生物化学实验技术丛书

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著

科学出版社

离心沉降分析技术

科学出版社

生物化学实验技术丛书

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著

科学出版社

1983

内 容 简 介

超离心沉降分析是一门测定生物高分子分子量和物理性质的技术。本书着重于叙述这项技术的具体实验操作方法,对沉降分析理论背景只作简略的说明。除概述了沉降分析实验的一般考虑和注意之点外,还着重介绍了与实验设计直接有关的分析超离心机各部件。书中阐述的各种测定方法都举例详细地说明实验条件和数据计算方法。在最后的附录中扼要地叙述了制备超离心技术的原理和方法,以及选择实验条件的依据,为制备超离心沉降实验设计提供了方便。

本书可供生物化学、生物物理工作者以及有关大学的教师、研究生、大学生参考。

生物化学实验技术丛书

离心沉降分析技术

陶宗晋 编著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1983年10月第一版 开本:787×1092 1/16

1983年10月第一次印刷 印张:6 1/4

印数:0001—4,150 字数:142,000

统一书号:13031·2394

本社书号:3272·13—10

定价:1.00元

目 录

第一章 引言	1
第二章 超离心分析技术概述	2
第三章 仪器	7
一、分析超离心机	7
二、分析转头	7
三、分析离心池	8
四、光学检测方法	11
第四章 实验的一般考虑和注意	16
一、样品制备	16
二、离心机的使用及转头、离心池的选择	16
三、光学系统的选择	17
四、沉降图谱的分析	18
五、离心分析实验应考虑的现象	23
第五章 沉降速度的测定	28
一、移动界面法测定沉降系数	28
二、特殊情况沉降系数的测定	34
三、样品均一性的鉴定和不均一性的分析	36
四、区带沉降法	38
五、沉降系数和分子量	39
六、从沉降系数计算 DNA 分子量	39
第六章 沉降-扩散法测定分子量	43
一、沉降-扩散法原理	43
二、离心池中测定扩散系数	44
第七章 沉降平衡法	47
一、低速沉降平衡法测定分子量	47
二、高速沉降平衡法测定分子量	59
三、短液柱沉降平衡法(中点法)测定分子量	66
四、有关用特殊溶剂做的实验	68
第八章 Archibald 方法	69
第九章 密度梯度平衡法测定分子量	72
第十章 离心分析技术必须的辅助测定	79
一、密度	79
二、粘度	81
三、偏微比容	82

附录 制备超离心技术	86
一、分级离心法.....	86
二、密度梯度离心法.....	86
三、密度梯度分离法的实验方法.....	89
四、实验设计的一些参考.....	93
参考文献	96

第一章 引言

1924年 Svedberg 和 Rinde^[1] 首先设计制造了超(速)离心机,实现了在强大离心力作用下沉降微小颗粒。他们开始设计的目的是研究金属胶体粒子,但是很快发现这是研究高分子化合物的重要工具。用超离心机研究的第一个高分子化合物是蛋白质。1926年 Svedberg 和 Fåhræus^[2] 测定了马血红蛋白的分子量,为 68,000。以后不断地对各种蛋白质进行分子量测定,结果得到重复的高分子量,因此证实了蛋白质确实是一个真正的高分子化合物,而不是一些低分子单元的任意排列或聚合。

以后超离心机有了改进,特别是五十年代市上出售的商品超离心机,性能有了很大提高,与此同时发展了各种超离心分析技术。现在超离心机几乎已成为实验室,尤其是蛋白质研究实验室不可缺少的重要工具。

超离心沉降分析作为一种研究手段,它具有许多优点。例如可在低温下进行测定,并且相当快速,这就比较适宜研究娇嫩的和不稳定产物的纯度和均匀度。另一优点是样品需要量很少。离心池的容量不到一毫升,还可采用浓度较稀的样品,从而避免了对溶液的非理想性作校正。用折射率方法检测时约需一毫克样品,而用光吸收法检测时,消光系数大的样品检测极限在微克水平。

从超离心沉降实验结果很容易计算沉降系数 S 、分子量 M 、扩散系数 D 和沉降物质的浓度。同时也可观察到溶液中是否存在几种不同的组分,还可以研究沉降物质的不均一性。

超离心沉降分析最重要的应用当然是分子量测定。值得指出的是,现在超离心沉降分析测定的分子量范围已从数百直至几百万,仅有百分之几的误差。研究多组分体系或不均一物质时,视样品的性质可以有相当高的精确度。对一个典型蛋白质来讲,如果含有百分之几杂质并且杂质的大小相当于该蛋白质分子大小的一半左右,则一般要检出这个杂质是不困难的。由于存在 Johnston-Ogston 效应,检出和蛋白质相对来讲分子量较小的杂质是容易的。对于分子量广泛分布的样品,虽然结果处理有些困难,但是把沉降曲线经过一系列数学分析,得到相当满意的关于非均一度的信息。

现在超离心分析技术已能够测定样品之间非常小的密度差和沉降系数差 ($0.005S$)。

和已知的典型流体力学模型——如椭圆等的相应有关数据比较, S 、 M 和 D 的值可以提供样品分子大小和形状的信息。通常所得结果是半定量的,并且需要知道不同模型的大量参数才能区别。为此,应该和其他由分子形状决定的物理量,如粘度、光散射、流动双折射等进行比较。通过这种方法可以发现非常小的流体力学行为上的差别。不过和不同的分子形状联系常常是很困难的。

沉降平衡离心可以得到热力学数据,因此,这个方法也是详细研究高分子溶液性质的一个有力工具。

在这里要全面概括目前超离心技术所能解决的问题显然是不现实的。早期超离心沉降分析所做的工作(1940年以前) Svedberg 和 Pederson^[3] 已作了全面总结。在此以后也曾有过很好的综述和评论^[4,5]。本书仅就超离心技术最基本的实验方法作一介绍,读者如需进一步了解超离心沉降分析技术,请参阅有关著作。

第二章 超离心分析技术概述

当一个悬浊液放置时,由于重力场的作用,可以看到悬浮的粒子逐渐沉降。从沉降的速度可以计算悬浮粒子的质量。高分子溶液里的分散质点(高分子)的质量很小,所以要用超离心机,在很大的离心力场里才能观察到它们的沉降。超离心机的转速可以达到每秒 1000 转以上,产生几十万倍于重力的离心力。

在分析超离心机中进行沉降分析,利用超离心机高速运转产生的强大离心力,用光学检测装置检测溶液中溶质的移动速度;或者在较低转速使高分子溶质在较小离心力场内沉降(产生浓度梯度)和扩散(减小浓度梯度),这两种相反的作用经过一段时间达到平衡,测量溶质在离心池中的分布。在超离心沉降分析技术中,前者称为沉降速率法,后者称为沉降平衡法。

分析超离心机的标准离心池如图 2-1 所示。盛放溶液的槽是四棱柱,柱的端面呈扇形。离心池放入分析转头(图 2-2)的孔中,扇形的尖顶正对着旋转中心,这样可以避免旋转时离心池内溶液对流。离心池上下分别安装一块石英窗(图 2-1W),允许光线通过,运转过程中可以利用光学方法检测。转头旋转产生离心力,样品溶液中溶质比重大于溶剂时,溶质从液面沿着旋转半径向转头边缘沉降下去。反之,若溶质轻于溶剂,则出现溶质“上浮”现象。离心池内溶液槽扇形狭的一边叫池顶,另一边叫池底。转头上距旋转轴的距离以 r 表示,液面的位置是 r_m ,液底的位置是 r_b 。因此溶液的液柱高 $h = r_b - r_m$ 。离心池的厚度 l 是指离心池溶液槽棱柱的高度,也就是两片石英窗之间的距离。

超离心沉降分析的分辨能力正比于液柱高度 h 和离心力 $\omega^2 r$,其中 ω 是角速度。从

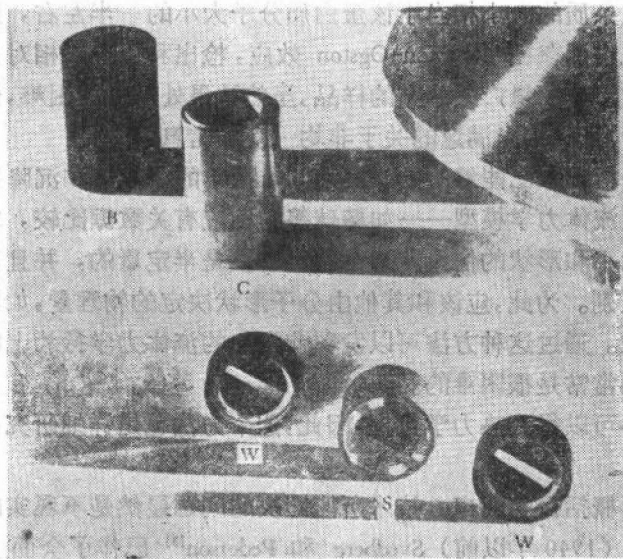


图 2-1 分析离心池。C—外形; B—抗重离心池; W—石英窗;

S—池芯,中有一四棱柱液槽。

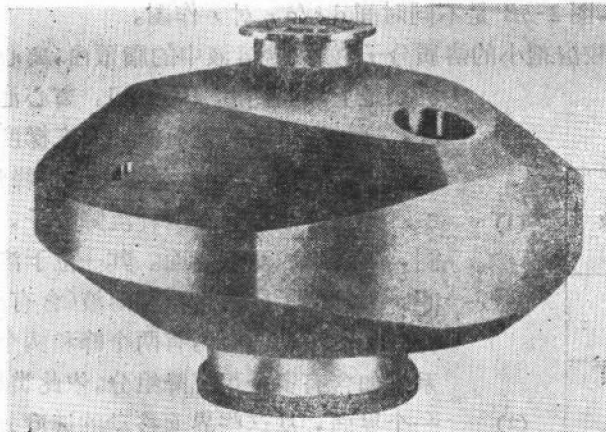


图 2-2 分析转头

实验和理论的角度来考虑, r 约为 7cm 和 h 约为 2cm 最为合适^[3]。

离心过程中离心池内样品溶液浓度 (c) 的变化用光学方法跟踪, 或者测定溶液的折射率 (n), 或者测定溶液的光吸收值。用 Schlieren 光学方法得到的是折射率梯度 (dn/dr) 对距轴心距离 (r) 的曲线 (图 2-3B)。干涉光方法得到的是折射率 (n) 作为距轴心距离 (r) 的函数 (图 2-3A)。在通常实验样品浓度范围内折射率和浓度成正比, 因此得到的曲线图分别对应于 dc/dr 、 r 或 c 、 r , 其中 c 是浓度。用光吸收法检测时, 光密度和浓度成正比, 得到的是 (c , r) 类型的曲线 (图 2-3A)。

目前使用的分析超离心机几乎都是现成定型的产品, 比较容易操纵, 相对来讲运转费用也比较低。

沉降速率法实验时, 超离心机内转头以高速运转, 如果溶液中只有一种溶质组分在离心力作用下沉降, 可以观察到原先在离心池中均匀分布的溶质分子以一定速度向转头边缘移去, 经过一定时间离心池中形成一个纯溶剂的区域和一个浓度均一的区域 (图 2-3A)。这个浓度均一区域称为坪区。坪区和溶剂区之间出现一个界面, 通常界面是很陡峭的, 这是因为界面后半部由扩散而尾随的溶质分子是在较低的浓度中沉降, 具有较高的沉降速度, 从而赶上前面的分子。坪区浓度随界面外移而连续地逐步变稀, 这是因为离心池中溶液槽的端面是扇形, 溶液不断稀释, 浓度减小。从界面移动速度可以计算沉降系数。沉降系数和沉降粒子的大小和形状有关。沉降系数结合另外一些独立测定的数据可以计算沉降分子的分子量。图 2-3 是沉降速率法示意图, 图 2-3A 是

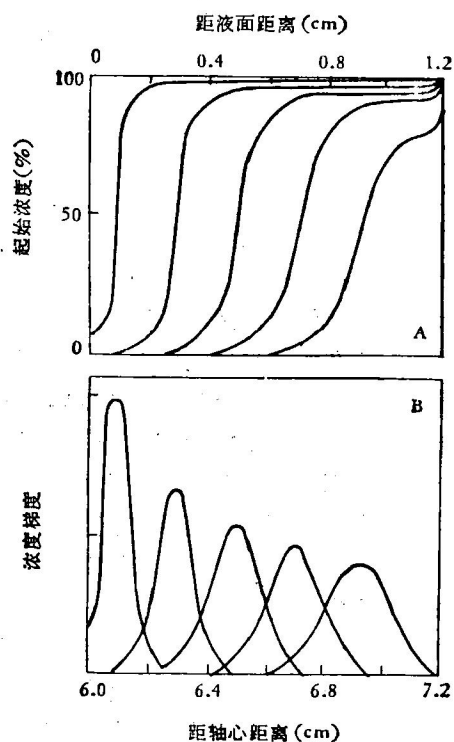
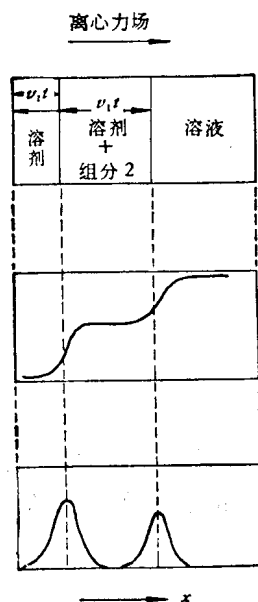


图 2-3 沉降速率法实验时, 浓度 (A) 和浓度梯度 (B) 与离心池距离的函数关系示意图。

同时间 c 对 r 作图,图 2-3B 是不同时间 dc/dr 对 r 作图。

至于那些比重较溶剂小的溶质分子,如浓盐溶液中的脂蛋白,离心过程中溶质不是下沉而是上浮。经过一段时间,离心池底部形成一纯溶剂区,这时沉降系数是负值。浓度梯度(也即折射率梯度)跨越界面时也是负值,沉降图谱上峰形是倒的。



- (1) 如果溶液中存在两种沉降分子,它们的沉降系数不同,则会形成两个界面。其一位于溶剂和较慢移动组分间,另一位于较慢组分和溶液(含有两种组分)间。结果得到如图2-4的图形,有两个峰和两个阶梯。一个待分析系统如含有多个可沉降组分,依此类推,每一新组分产生一个界面,从这些界面移动的速度分别计算各个组分的沉降系数。

如果系统中包含有一大批不同的分子,它们不同的沉降系数在界面上形成连续的分布,可以计算沉降系数的分布函数,当然也可以计算分子量的分布函数。

溶液在相对较低转速时离心沉降[譬如说分子量为60,000的蛋白质在8,000rpm(转/分)离心],这时的情况和上述沉降速率法很不一样。离心开始阶段液面处浓度下降,离心池底部浓度增高。由于扩散作用,离心池内不

像沉降速率法会形成一个无溶质区,相反液面处始终存在溶质,即使浓度是很低的。离心池中间有一浓度不变的区域,叫做坪区(图2-5)。

随着实验的进行,这个坪区消失,最后沉降速度完全被扩散抵消两者达成平衡,离心池中没有任何物质的纯转移,浓度不再随时间而变化。沉降平衡实验在还没有建立平衡以前,不同时间的距轴心距离和浓度的变化见图2-6A,相应的浓度梯度变化见图2-6B。实验时每一点的浓度利用光学方法测定。和沉降速率法不同,测定离心池中的浓度分布可以直接计算沉降分子的分子量(沉降速率法和沉降平衡法计算中都需要知道沉降粒子的偏微比容)。除去这一明显的优点外,沉降平衡理论基础也比较扎实。它的缺点是达到平衡需要很长时间,往往要按天计,许多样品,例如

蛋白质,不能耐受如此长久的离心。不过目前超离心机已经能够使转头在低温下长时期运转,并且从理论上证明,在实验操作上予以变通可以大大缩短达到平衡所需的时间。

另一种不同的方法,即等密度梯度沉降法,是让溶质在一密度梯度介质中沉降,直至周围介质的密度和溶质密度相等时为止。从溶质停留在离心池中的位置来计算分子量。

总之,几种超离心分析技术的区别主要是从操作的观点着眼,很难清楚地说明它们之间的截然不同界限。事实上有可能仔细选择实验条件,从一个实验的数据按照这些技术

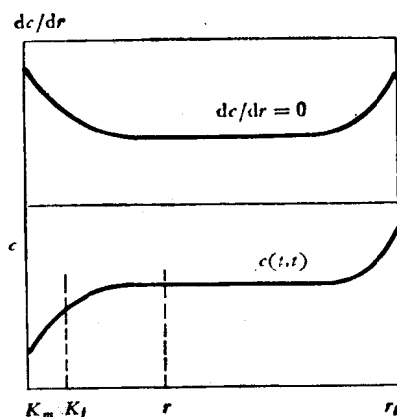


图 2-5 沉降平衡离心图。此图中坪区依然存在,表示尚未到达平衡。

不同的要求进行处理。不同的超离心分析技术可以进一步用热力学方程式统一起来。

几乎所有超离心分析技术实验的数学基础是 Lamm 导出的微分方程^[4]。试考虑旋转的扇形离心池中一个单位四棱柱体积 (图 2-7)，它的两个面分别距轴心 r 和 $r + dr$ 。一个面上通过的沉降粒子数量 $J_s(r, t)$ 取决于该面上的溶液浓度 c 、面积、粒子沉降速度。由于沉降速度可以用单位离心力场沉降速度 (即沉降系数 S) 和离心力 $\omega^2 r$ 的乘积来表示, 因此

$$J_s(r, t) = c\phi r l s \omega^2 r \quad (2-1)$$

其中 ϕ 是扇形的角度, 以弧度表示; l 是光径, 即离心池溶液槽棱柱的高度; r 是距轴心的距离; $\phi r l$ 是柱面积; ω 是离心池的角速度 (弧度/秒), S 是沉降系数

$$S = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \quad (2-2)$$

其中 t 是时间。沉降系数 S 单位的因次是 cm/秒/达因/克, 现在定为 Svedberg (S)。 $1S = 10^{-13}$ 秒。

由于存在扩散作用, 粒子也有反向流动。根据 Fick 第一定律, 向轴心运动的粒子数量 $J_D(r, t)$

$$J_D(r, t) = -D\phi r l \frac{\partial c}{\partial r} \quad (2-3)$$

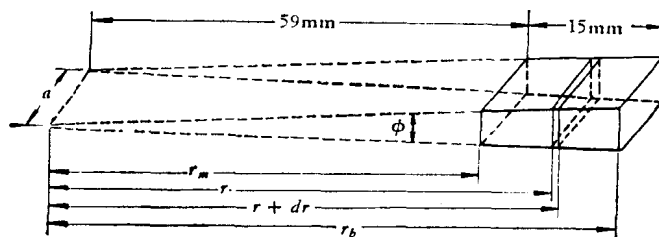


图 2-7

其中 D 是扩散系数, $\frac{\partial c}{\partial r}$ 是距轴心 r 处一个面的浓度梯度。因此在此 r 面上沉降粒子的净转移数量 $J(r, t)$ 为上述两项之和

$$J(r, t) = J_s(r, t) + J_D(r, t) = \phi r l \left[c s \omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r} \right] \quad (2-4)$$

过 $r + dr$ 面的粒子转移数量也可写成类似的式子。在 dt 时间内, r 和 $r + dr$ 之间增加粒子的数量是

$$[J(r, t) - J(r + dr, t)]dt = -\frac{\partial J(r, t)}{\partial r} dr dt \quad (2-5)$$

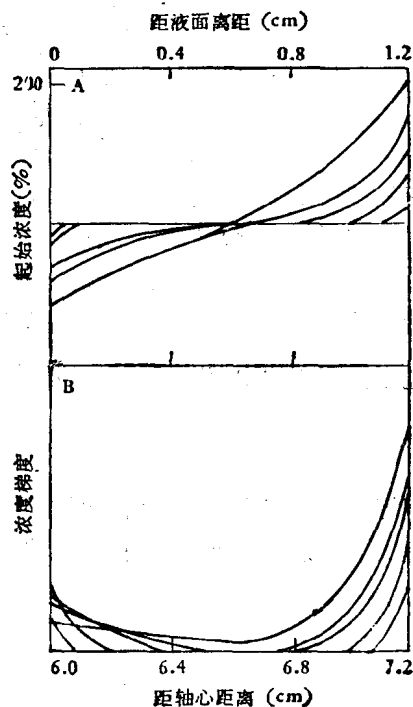


图 2-6



北林图 A00061093

320830

• 5 •

这相等于相应的浓度增加 $(\partial c / \partial t) dt$ 乘以体积 $\phi r l dr$, 因此

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[\left(D \frac{\partial c}{\partial r} - cs\omega^2 r \right) r \right] \quad (2-6)$$

假定 s 和 D 与 r 无关, 则式 (2-6) 可写成

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} - \frac{1}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right] - S\omega^2 \left[r \frac{\partial c}{\partial r} + 2c \right] \quad (2-7)$$

必须强调式 2-7 仅限于 D 和 S 均与浓度无关的系统。实际上许多系统并不符合这个假设。Fujita^[5] 曾对 S 与浓度成线性关系的系统作了详细的讨论。

在这里所以要推导式 2-7, 因为这是超离心分析技术的基础。例如沉降速率法, 液面附近粒子浓度基本上等于零, 将式 (2-7) 解微分方程说明了所形成界面的性状。又例如沉降速率法离心池中存在坪区时, 该处 $\partial c / \partial r = 0$, $\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = 0$, 代入式 (2-7), 得

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -2S\omega^2 c \quad (2-8)$$

说明坪区浓度随实验进行而降低。沉降平衡实验时, $\partial c / \partial t = 0$, 代入式 (2-7) 得到 Svedberg 方程式, 反应了沉降系数和扩散系数与分子量的关系。

第三章 仪 器

一、分析超离心机

超离心机和普通离心机的差别是超离心机的转速高得多。超离心机分为分析超离心机和制备超离心机,前者能精确控制离心力,并且用照相方法或者电子技术记录沉降粒子在离心过程中的行为。对这些记录进行分析可以测定粒子的物理性质。

虽然 1924 年开始出现了超离心分析技术,但是直到五十年代电动超离心机成为商品出售以后,才促使超离心分析技术迅速发展。有意思的是,尽管分析超离心机外形、驱动部件、控制部件等有所不同,但是和离心分析实验直接有关的部件,如转头、离心池等的基本设计更动极少,甚至如离心池中心至轴心的距离(65.0mm)也保持不变。

分析超离心机应该具有下列功能:

- (1) 高速旋转;
- (2) 速度的选择和控制;
- (3) 温度的选择和控制;
- (4) 离心过程中检测(光学摄影或扫描)。

现在世界上各实验室装备的分析超离心机大多数是美国 Beckman 公司出品的 Spinco E 型分析超离心机。它用电动机经齿轮变速带动转头旋转。新的机型最高转速为 80,000 rpm,但是由于离心池上透光材料石英窗强度的限制,实际上只用到 60,000rpm(宝石窗离心池为 68,000rpm);平均转速恒定在 $\pm 0.15\%$ 以内。温度维持在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 内,读数精确至 0.02°C 。机内装有光学系统和自动摄影,摄影间隔自 2 分至 12 小时 48 分。

分析超离心机的结构和操作具体部分因机而异,请参阅有关仪器的说明书。

二、分析转头

分析超离心机的分析转头如图 3-1 所示。转头所用材料的强度仍是限制离心力的决定因素之一。现在主要用铝合金或钛合金来制造转头。分析转头有双孔、四孔、六孔之分,分别可放入相应数量的离心池。最高转速较高的转头外形铸成卵形,以免应力集中于

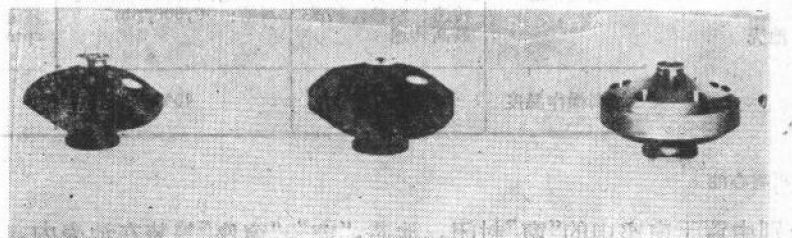


图 3-1 分析转头

表 3-1 Beckman Spinco E 型分析离心机中使用的各种分析转头的特性

型 号	最高转速 (rpm)	离心池中心 最大离心力 (g)	同时可放离 心池数量	主 要 用 途	
双孔				基本转头 最高转速转头,小分子测定,高温测定 稀浓度样品	} 沉降速率法, 沉降平衡法常 规使用
An-D	60,000	261,000	2		
An-H	68,000	336,000	2		
An-E	52,000	196,500	2		
四孔				最高转速多孔转头	} 同时测定多个 样品
An-F	52,000	196,500	4		
An-F, Ti	60,000	261,000	4		
An-K	44,000	140,600	4		
An-J	18,000	23,500	4	基本低速转头	
六孔				干涉光学系统平衡实验	
An-G	40,000	116,300	5		
AnG, Ti	48,000	170,000	5		

两孔处。根据不同的实验目的设计了各种转头,它们的特性和用途见表 3-1。

三、分析离心池

分析离心池的结构见图 3-2。 各种分析离心池的差别主要在盛放样品溶液的池芯。

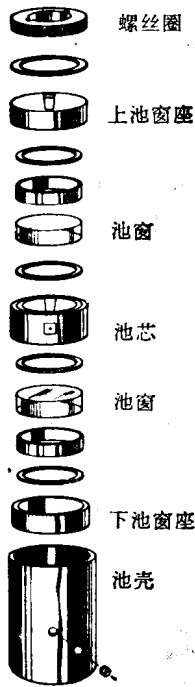


表 3-2 池芯的性能

材 料	铝 合 金	充填环氧树脂	Kcl-F
pH 使用范围	pH7	pH3—10	全 pH 值
化学性能	不能用于腐蚀性溶液(强酸,强碱,重金属盐溶液,如铁、铜、铅、银、汞等) 对有机溶剂抗性强,机械性能好。	在下列试剂中溶胀或溶解:冰乙酸,氢氧化铵(27%),三氯甲烷,乙二胺,二甲亚砜,四氢呋喃,二乙基三胺,甲醛(40%),m-甲酚,N,N-二甲基甲酰胺,硝酸(10%),磷酸(85%),硫酸(70%)	下列溶剂中略为肿胀,不能长时间使用:氯,二乙胺,甲基或乙基乙酸乙酯,甲基或乙基醚,甲基或乙基丙酮,Freon 113,呋喃,三氯乙烯
最高转速	单槽: 转头最高转速; 双槽: 转头最高转速	单槽: 转头最高转速 双槽: 50,000rpm	单槽: 转头最高转速; 双槽: 60,000 rpm
最高操作温度	125℃	40℃	40℃

图 3-2 分析离心池

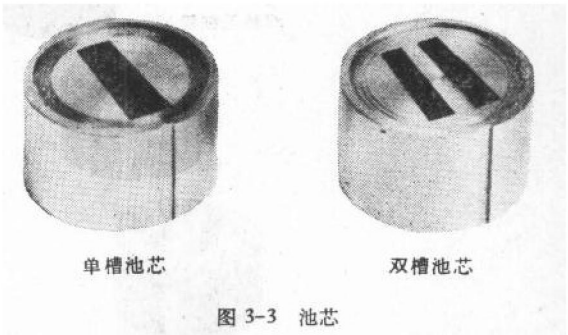
池芯两端分别由置于窗座中的“窗”封闭。池芯,“窗”、“窗座”等装在池壳内,将螺丝圈拧紧后放入转头的孔中。

分析离心池的池芯由不同的材料制造，设计成不同的形式以满足不同的实验目的和要求。制作池芯的材料有铝合金、铝粉或碳粉填充的环氧树脂或三氟氯乙烯树脂 (KclF)，此外也有用聚酰胺的。各种材料池芯的性能见表 3-2。在实验中根据允许使用的最高转速、化学稳定性(不为溶剂溶解或腐蚀)、样品的浓度等来选择合适的池芯。一般分析用树脂池芯，高温测定或特种溶剂时用铝合金或铝粉充填树脂池芯。

各种不同的分析离心池芯的构造和用途分述于下：

(一) 单槽池

适用于一般沉降实验。池芯形状见图 3-3。池芯中有一扇形端面四棱柱槽。扇形角度有 2° 和 4° 两种。扇形角度愈小，离心池放入转头时愈要小心，务使针对轴心。此外还要增加摄影时曝光时间，不过需要的样品数量少并且界面、液面更近似直线。池芯厚度最小 1.5mm，最大 30mm，以厚 12mm 者最为常用。池芯的厚度和样品的浓度两者的乘积决定 Schlieren 光学系统所得图象内峰的面积或者干涉光学系统所得图象的干涉条纹的位移。例如用 30mm 厚池芯时，Schlieren 光学系统所得图象内峰的面积，较用 12mm 厚池芯时大 2.5 倍。因此选择不同厚度的池芯和样品溶液浓度组合，将允许有一相当大的样品浓度测定范围。



(二) 双槽池

用于沉降速率法、沉降平衡法测定。池芯的形状见图 3-3。池芯上有两个扇形端面四棱柱槽，扇形角度均为 2.5° 。通常一槽置溶剂，另一槽置溶液。用双槽池得到的 Schlieren 图形中峰的下面有基线，可以校正由于离心池变形、介质中盐类化合物或其他物质部分沉降引起的浓度梯度。干涉光学系统或光电扫描系统检测必须用双槽池。池芯厚度有

表 3-3 双槽池 (12mm 厚池芯, 2.5°) 每一槽的容量

至轴心距离 (cm)	液柱高度 (cm)	容量 (ml)
6.20	1.00	0.35
6.30	0.90	0.32
6.40	0.80	0.29
6.50	0.70	0.25
6.60	0.60	0.22
6.70	0.50	0.18
6.80	0.40	0.15
6.90	0.30	0.11
7.00	0.20	0.07
7.10	0.10	0.04
7.20	0 (底)	0

12mm、18mm 和 30mm 三种。表 3-3 是 12mm 厚池芯双槽离心池 (2.5°) 每一槽中不同高度液体的容积。

(三) 合成界面离心池

分单槽(阀型、毛细管型)和双槽(毛细管型)三种(图 3-4)。在离心开始后,借助于离



图 3-4 池芯

心力溶剂流向溶液表面(或者溶液流向溶剂的底部)人为地合成一个界面。合成界面离心池可用来测定样品的起始浓度或者界面移动非常慢,甚至在常规操作下不能形成界面的物质,例如蔗糖的沉降系数。

(四) 多槽离心池

因为沉降平衡时间和溶液液柱高度成反比,实验常常采用短液柱来做,这就使池芯上有足够地方挖几个槽,同时进行几个样品的沉降平衡分析,节约了时间、费用,并且条件一致便于比较。一种六槽池芯见图 3-4。

(五) 机械分离离心池

它的池芯装有隔离片,分固定隔离片和移动隔离片两种(图 3-5),用于分离样品中两个不同的沉降组分。配合某种专一的分析方法,例如酶分析,可以在极粗的制剂中测定该酶的沉降速度。

(六) 区带沉降离心池

离心过程中密度较小的样品溶液借助于离心力铺在密度较大的溶液液面上,形成一薄层。样品以区带形式沉降。有三种形状的池芯(图 3-5)。专用于分析有紫外吸收的巨大高分子样品,如脱氧核糖核酸(DNA)。

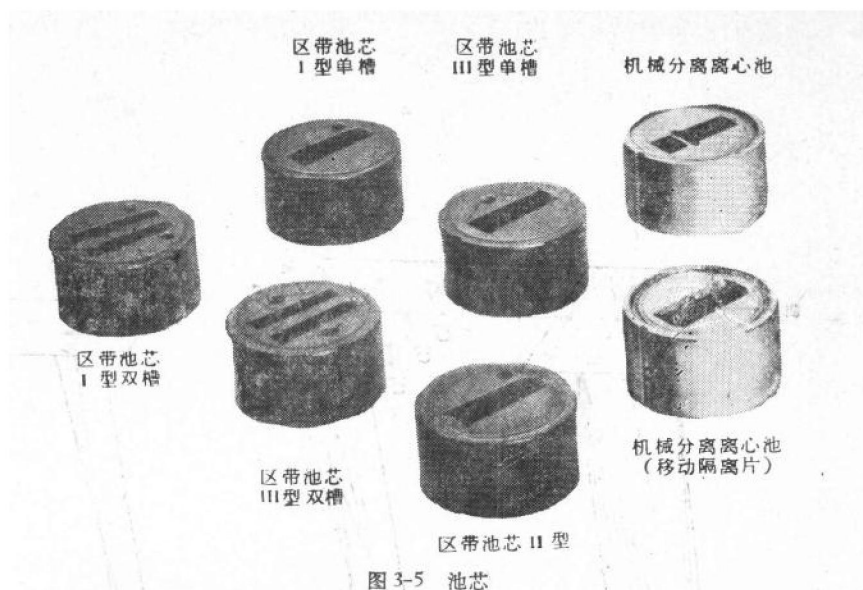


图 3-5 池芯

分析离心池池窗的材料有两种：石英和兰宝石(天然氧化铝)，常用的是石英。高速运转时 ($> 40,000\text{rpm}$)，使用干涉光学系统或光电扫描装置检测时应该用兰宝石窗的离心池。池窗的两个面是平行的，也有磨成一面倾斜、成楔形的。使用楔形窗的主要目的是运转一次可同时分析两个或两个以上样品，但是精度较差，有时也用于补偿密度梯度介质引起的光偏折。

为了使旋转时转头平衡，分析离心池装入转头后在转头另一侧与分析离心池对称的孔中还要放入抗重离心池。抗重离心池不仅平衡分析离心池的重量，也作为光学检测装置所得图象计算离心池中距轴心距离的基准。有两种类型的抗重离心池：一种用于 Schlieren 光学系统和光吸收法检测装置，另一种用于干涉光学系统和光电扫描检测装置。后者也可用于 Schlieren 光学系统。

四、光学检测方法

分析超离心机主要装备有三种光学系统，用来检测离心过程中离心池中样品的浓度及其变化。它们是 Schlieren 法、Rayleigh 干涉光法和光吸收法。前两种方法检测原理基于溶质和介质对光线有不同的折射这一性质，第三种方法是基于溶液的消光性质。根据记录方法又可分为摄影法和光电扫描法两种。

(一) Schlieren 光学系统

Schlieren 光学系统的检测原理是基于十九世纪法国物理学家 J. Foucault 发现的光学效应。Schlieren 是一个德文单词，其含义是条纹与阴影。超离心机上安装的主要是 Philpot 和 Svensson 设计的光学系统^[6-8]，用摄影方法记录由界面产生的光偏折。Schlieren 光学系统的基本装置由下列部件组成：光源，两个 Schlieren 透镜：准直镜和聚焦镜，一个光阑和成像屏(照相底片)。其中光阑可以是一根杆子、一条狭缝或相差片。Schlieren

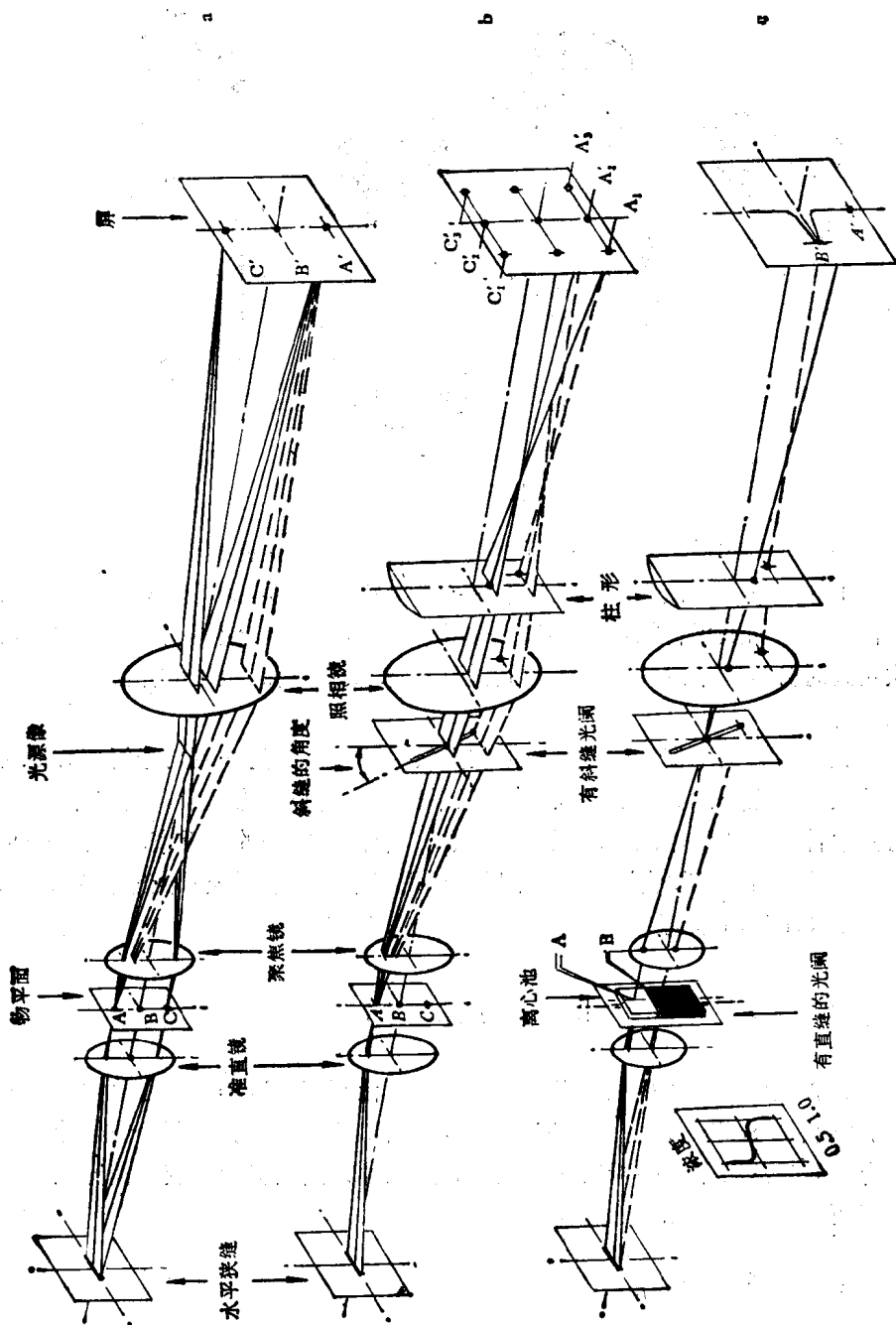


图 3-6 Schlieren 光学系统工作原理