

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学生物学综合实验

主编 戴建威 苏晓波 章喜明

非
外
借



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学生物学综合实验

主 编 戴建威 苏晓波 章喜明

副主编 黄 炜 欧阳永长 张锦宏

编 者 (以姓氏笔画为序)

苏晓波 李 靖 余利红 张铁军

张锦宏 欧阳永长 赵 青 黄 炜

龚 青 章喜明 路 蕾 戴 婷

戴建威

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材着重突出“基础理论、基本技能、基本技术”和“学生创新能力”的培养。在此基础上,针对生物技术专业的特点,主要进行了“以提高科研技能为重点、以创新为目的”的实践技能教学改革。本教材汇集优质师资力量,融合生物化学、分子生物学、蛋白质工程、酶学的理论和一些实验技术的优势,较全面地介绍了各种技能的原理,更重要的是,可使学生通过大实验较好地掌握分子生物学、基因工程、蛋白质工程、酶学等技术,为学生掌握基础研究和临床研究的重要技术打下很好的基础。

本教材可供医学院校师生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物学综合实验 / 戴建威, 苏晓波, 章喜明主编. -- 北京: 科学出版社, 2018.11

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-058289-8

I. ①医… II. ①戴… ②苏… ③章… III. ①医学—

生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①R318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 161040 号

责任编辑: 胡治国 张天佐 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 张欣秀 / 封面设计: 陈 敬

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 11 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2018 年 11 月第一次印刷 印张: 13 1/4

字数: 305 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

随着生命科学与医学的迅速发展, 生物科学向多学科和多领域综合发展, 且学科交叉越来越紧密。因此, 对于生物科学类尤其是医学院校生物科学类相关专业学生的培养, 应由“专业教育”转变为“综合素质教育”。我们开展的医学生物学综合实验课是学生掌握医学、生物学基本理论知识和实践技能的重要手段, 而且有助于培养学生的创新能力和科学作风, 使其掌握研究问题的科学方法, 培养学生的科研兴趣, 为培养医学生物学综合型人才奠定基础。

本教材根据“学科内纵向综合, 学科间横向交叉综合”和“基础—综合—探究三个层次循序渐进”的原则确立医学生物学实验课程整合的总体思路, 尝试“课内与课外结合、教学与科研结合、优生优培”的创新人才培养机制, 实施以学生为中心的开放研究式实验教学, 吸引学生主动参与实践活动, 培养学生对“提出问题、研究问题、解决问题”的兴趣, 培养学生的思维能力、辨析能力和探索求知精神, 发展学生的个性和潜质, 致力于培养学生的创新能力、实践能力和解决实际问题的能力, 以及促进个性发展。

本教材强化学科和课程融合, 将原有的生物化学与分子生物学实验、生理学实验、微生物学实验、遗传与细胞生物学实验及生物技术相关实验等课程横向整合为医学生物学科综合实验课程, 构建了基础性实验、综合性实验、设计性实验和虚拟仿真实验四个模块, 并提升了自主设计性实验比例, 部分学生可以通过自主查阅资料, 在教师指导下设计课题, 独立完成实验过程、实验报告并总结实验结果, 撰写论文。

本教材着重突出“基础理论、基本技能、基本技术”和“学生创新能力”的培养。在此基础上, 针对生物技术专业的特点, 主要进行了“以提高科研技能为重点、以创新为目的”的实践技能教学改革。本教材汇集优质师资力量, 融合生物化学、分子生物学、蛋白质工程、酶学的理论和一些实验技术的优势, 较全面地介绍了各种技能的原理, 更重要的是, 可使学生通过大量实验较好地掌握分子生物学、基因工程、蛋白质工程、酶学等技术, 为学生掌握基础研究和临床研究的重要技术打下很好的基础。

现阶段, 生物学综合实验指导教材甚少, 现有教材的实验内容缺乏系统性和创新性, 本教材优化了实验课程体系, 将多个课程实验进行系统性地合并, 解决了实验重复和课程结构无完整性的矛盾; 在实验内容上, 既有基本技术, 又精选了生物学较新的实验技术, 使学生能够掌握生物学的前沿技术; 教材的实验设计严谨, 实验技术成熟, 每个实验都由教师们亲自设计、反复验证并且有明确的实验结果与数据, 应用性强。

限于编者水平, 书中不足之处在所难免, 竭诚希望广大读者批评指正!

戴建威

2018年4月

目 录

第一篇 绪 论

第一章 常用仪器设备及基本实验技术	1
第一节 显微镜的结构和使用方法	1
第二节 离心机的基本原理与使用方法	6
第三节 分光光度计与酶标仪	10
第四节 电泳仪	15
第五节 PCR 仪	26
第六节 发酵罐	29

第二篇 基础性实验

第二章 细胞生物学实验	32
实验一 细胞培养常用器皿的清洗及消毒	32
实验二 细胞的形态结构	36
实验三 细胞化学	39
实验四 细胞吞噬活动的观察	42
实验五 细胞的亚显微结构	43
实验六 细胞的无丝分裂与有丝分裂	45
实验七 细胞的减数分裂	47
第三章 生物化学实验	51
实验八 Folin-酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质浓度	51
实验九 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	52
实验十 过氧化氢酶 K_m 的测定	55
实验十一 血清清蛋白的分离及电泳鉴定	58
实验十二 激素对血糖浓度的影响	61
实验十三 细胞 DNA 的分离提取、成分鉴定及含量测定	64
实验十四 消化三大营养物质的酶活性测定设计与试验	71
第四章 生物技术实验	74
实验十五 哺乳动物细胞 RNA 提取及电泳鉴定	74
实验十六 反转录 PCR (RT-PCR)	78
实验十七 质粒 DNA 提取及鉴定	81
实验十八 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	84
实验十九 Western blot 蛋白质印迹法	87
实验二十 MTT 法检测细胞活性	94
实验二十一 真核细胞转染	95
实验二十二 免疫荧光染色	98
实验二十三 免疫组织化学染色	99

第三篇 综合性实验

实验二十四	胶体金验孕诊断试剂盒制备及效果评价	102
实验二十五	口腔上皮细胞基因组 DNA 提取及 beta-actin 基因扩增	105
实验二十六	细胞培养技术	108
实验二十七	细胞凋亡的形态学观察	115
实验二十八	流式细胞仪检测细胞凋亡——Annexin V/PI 双染色法	117
实验二十九	细胞凋亡过程中染色体 DNA 片段的测定 (DNA ladder 测定)	119
实验三十	ELISA 法对癌症标志物-甲胎蛋白 (AFP) 的含量测定	121
实验三十一	实时定量 PCR 检测细胞中 miR-21 表达	123
实验三十二	双转染报告系统检测	126
实验三十三	石蜡包埋切片免疫组化检测 TIMP3 蛋白定位及表达	128
实验三十四	免疫荧光染色检测 miR-21 高表达对上皮细胞间质化的影响	130
实验三十五	彗星实验检测细胞 DNA 损伤	131
实验三十六	离子交换层析分离混合氨基酸	133
实验三十七	凝胶过滤分离蛋白质	135
实验三十八	亲和层析法分离豌豆凝集素	137
实验三十九	苯丙氨酸解氨酶的纯化及活性测定	138
实验四十	增强型绿色荧光蛋白真核表达载体的构建和表达	141
实验四十一	脂肪酶的重组表达及纯化	144
实验四十二	固定化酵母细胞蔗糖酶活力测定	146
实验四十三	噬菌体的分离及效价测定	148
实验四十四	细菌营养缺陷型菌株的诱变和筛选鉴定	150
实验四十五	微生物培养、保种	153
实验四十六	培养基的配制与灭菌	159
实验四十七	斑马鱼胚胎红细胞活体染色	160
实验四十八	斑马鱼软骨染色观察	162
实验四十九	斑马鱼中囊胚转换前后胰岛素蛋白的表达差异	163
实验五十	绿色荧光蛋白 mRNA 的体外转录与显微注射	164

第四篇 设计性试验

范例一	葵瓜子壳和花生壳制备活性炭及其吸附性能的比较	172
范例二	大蒜素的提取及探究其抗凝血作用	179
范例三	探究油菜籽中原花青素提取的最佳条件及对自由基的清除效果	185

第五篇 虚拟仿真实验

参考文献	206
------------	-----

第一篇 绪 论

第一章 常用仪器设备及基本实验技术

第一节 显微镜的结构和使用方法

一、普通光学显微镜的结构和使用方法

(一) 实验目的

1. 了解普通光学显微镜的基本结构和工作原理。
2. 掌握低倍镜和高倍镜的正确使用方法。
3. 了解普通光学显微镜维护的注意事项。

(二) 实验物品

普通光学显微镜，标本，擦镜纸，擦镜液，香柏油。

(三) 实验原理

普通光学显微镜包括正置和倒置光学显微镜，二者的结构类似，仅是物镜与照明系统颠倒，下面以正置光学显微镜为例说明。

正置光学显微镜包括机械和光学两个重要的部分（图 1-1-1）。

1. 机械部分

(1) 镜座：是显微镜的底座，常由一马蹄形铁构成，用以支持和稳定显微镜。

(2) 镜臂（执手）：是移动显微镜时的执手处，呈弓形，与镜柱相连处有一倾斜关节，可使显微镜向后倾斜至 90° 以内的任何角度，但一般不宜超过 40° ，以免显微镜倾倒（注意：观察能流动的液体材料时则不宜倾斜）。

(3) 镜柱：连接镜座和镜臂的直立短柱，对镜臂起支持作用。

(4) 大螺旋（粗调节器）：位于镜臂上，转动它时，可使镜筒作较大距离升降，能调节物镜与标本间的距离，得到清晰的物像（注意：转动螺旋时，不能太快太急，必须慢慢地旋转）。

(5) 小螺旋（细调节器）：位于镜臂上，转动它时，可使镜筒缓慢地上下升降，能更精细地调节物镜与标本间的距离，显示更清晰的物像。

(6) 标本移动器：位于载物台侧面，通过旋转可使标本作左右、前后方向的移动。

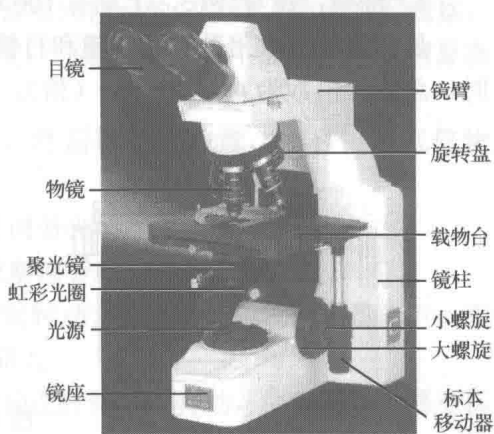


图 1-1-1 正置光学显微镜结构图

(7) 旋转盘：圆盘形，一般具有螺纹形圆孔 2~4 个，用于放置几个不同放大倍数的物镜，旋转盘可旋转，可随意调换各个不同倍数的物镜（注意：转换物镜时必须用手转动旋转盘而不能用手拿着物镜来旋转，否则镜头易松脱，转动时亦不能过急过快）。

(8) 载物台：呈圆形或方形的平台，中心有通光孔（供光线通过），镜台上装有标本移动器，既可固定玻片标本，又可前后左右移动。移动器上有标尺，可利用标尺上的刻度作标记，记认要观察的标本。

2. 光学部分

(1) 光源：电光源显微镜以可见光为光源，通过调节旋钮的转动，即可连续地增加或减少光线的强度（注意：电光源不能长期处于高亮状态！在不观察标本的时候必须把光源调暗）。

(2) 聚光镜：位于载物台通光孔的下方，由一片或数片透镜组成，可把反光镜反射来的光线聚合成光束，使有较强的光线照于标本上，以便于观察。

(3) 虹彩光圈：装在聚光镜下方，可调节光线的强弱。虹彩光圈由十几张金属薄片组成，外侧有一个细柄，推动它可调节光圈开孔的大小，从而调节光线强弱。

(4) 目镜：圆筒形，安装于镜筒的上端，由两个透镜组成，上面刻有此镜的放大率如 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $10\times$ 等符号，即放大 5 倍、6 倍、10 倍等，一般实验中用 $10\times$ 的目镜。

(5) 物镜：圆筒形，装在旋转盘下，生物学显微镜一般有两种或三种物镜（图 1-1-2）：

1) 低倍镜：镜身较短，上刻有 $5\times$ 、 $10\times$ 的符号，即放大 5 倍、10 倍的物镜。

2) 高倍镜：镜身较长，上刻有 $40\times$ 、 $45\times$ 、 $65\times$ 的符号，即放大 40 倍、45 倍、65 倍的物镜。

3) 油镜：镜身较长，上刻有 $100\times$ 的符号，即放大 100 倍的物镜。

显微镜的放大倍数等于物镜和目镜放大倍数的乘积。例如，物镜为 $45\times$ ，目镜为 $10\times$ 时，总放大倍数为 $45\times 10=450$ （倍）。



图 1-1-2 显微镜物镜

注意：透镜不能用手去摸，以免损坏或弄脏镜头，只能用擦镜纸揩拭。

大多数显微镜，通常在物镜上都标有表示主要性能的参数，如 10 倍物镜标有 10/0.25 和 160/0.17，此处 10 为物镜的放大倍数，0.25 为数值孔径（有的写成 N.A.0.25），160 为镜筒长度（单位：mm），0.17 为所要求的盖玻片厚度（单位：mm）。以上各主要参数的推算、物理意义和显微镜的放大原理，将在物理学的课程中学习。现将使用显微镜时要注意的相互间有影响的几个主要性能参数简述如下。

1. 分辨率（鉴别率、分辨力和分辨本领） 显微镜的分辨率主要由物镜的分辨率决定，它是指可以分辨被检物体微细结构的能力，也就是分辨两个物点之间最短距离的能力。因

此,分辨率和最小分辨距离是成反比的。

2. 放大率(放大倍数) 显微镜适合的放大率决定于物镜的数值孔径,所以有效的放大率一般应为数值孔径的 500~1000 倍。在选择总放大率时,要考虑物镜与目镜的匹配,并不是越大越好。超过了上述限度,物像反而会越来越模糊。

3. 清晰度 所谓清晰度是指使物像轮廓清晰的能力,它除了主要与物镜的性能有关外,亦与其他性能有关。如前述,物镜与目镜的组合超出了有效的放大率时亦影响清晰度。

4. 焦点深度(场深) 在显微镜中形成一个清晰物像的物体层厚度称为焦点深度(或场深),也就是说,当焦点与某一物点一致时,这一点及其上下两侧都能看得清楚,这时清晰部位的厚度就是焦点深度。焦点深度与物镜的数值孔径或显微镜的总放大率成反比,所以在使用高倍数物镜时,必须不断地、轻微地反复转动小螺旋,才能观察到被检物不同深度的各层结构。

5. 镜像亮度 镜像亮度与数值孔径的平方成正比,与显微镜的总放大率的平方成反比。在其他条件相同时,数值孔径越大,则镜像越亮。

镜像亮度和视野亮度不同,视野亮度不仅与物镜和目镜有关,而且还与聚光器、虹彩光圈、反光镜和光源有关。

(四) 实验步骤

使用显微镜时,除要注意视野亮度及焦距的调节外,还要注意显微镜各主要性能相互间的关系,才能达到最好的观察效果。在使用显微镜时要按不同检视法要求的步骤进行。

1. 低倍镜的检视法

(1) 将显微镜正放在距离桌边 3~6cm 处;镜臂对向自己的左胸前,便于左眼观察,右眼画图。调节倾斜关节,使载物台保持适宜的角度,注意倾斜角度不能过大,否则显微镜易失去重心而倾覆。

(2) 将大螺旋逆时针方向转动,降低载物台,然后转动旋转盘,使目镜与低倍物镜对准。

(3) 将光源打开,从目镜中观察,并旋转按钮调节光源使光线亮度合适。

(4) 将玻片标本置于载物台上,把标本需要观察部分移至通光孔中央处。

(5) 观察者一边从旁边查看,一边按顺时针方向转动大螺旋,使载物台徐徐上升,直至物镜与玻片将要接触为止(切勿使物镜与玻片相碰)。

(6) 用双眼从目镜向下看,同时将大螺旋徐徐按逆时针方向转动,使载物台下降至标本的物像出现为止。

(7) 旋动小螺旋,使载物台稍向上或向下移动,至物像清晰为止。

(8) 可一边观察,一边移动玻片,寻找需要观察的部分,并把它置于视野中央。

2. 高倍镜的检视法 高倍镜的放大率较大,适合观察物体的细微结构,但必须在低倍镜下找到物像后,才能转换高倍镜,具体步骤是:

(1) 如上法,先用低倍镜找到标本,并把已调清晰的物像移到视野中央。

(2) 直接转动旋转盘换上高倍镜。

(3) 一边观察,一边调节小螺旋(注意此时不能用大螺旋调节)直到物像清晰为止,若视野亮度不够,可把光线亮度增大(普通光源显微镜可调亮光源或放大虹彩光圈),使视

野的亮度合适。

(4) 观察完毕后, 必须先转回低倍物镜, 再取下标本, 以免高倍物镜镜头被碰坏或沾污。

3. 油镜检视法 在低倍镜下把要观察的部位移到视野中央, 转动旋转盘换上高倍镜, 把观察的物像调清晰后移到视野中央, 转动旋转盘移开高倍镜, 在玻片的观察部位滴一滴香柏油(注意此时不能移动大螺旋), 再换上油镜, 使油镜镜头与香柏油油滴接触, 调节小螺旋直到物像清晰。

油镜使用完毕, 必须把镜头和玻片标本上的香柏油擦净。油镜的正确擦拭方法如下。

(1) 镜头的擦拭: 先用擦镜纸把镜头的油抹去, 再用擦镜纸蘸少许擦镜液把镜头上的香柏油去掉, 然后用干净擦镜纸擦拭干净。擦拭时用力要轻, 要顺着镜头的直径方向, 不要沿镜头的圆周涂擦。

(2) 玻片标本的擦拭: 先用一张擦镜纸把标本玻片上的香柏油擦去, 再滴一滴擦镜液在擦镜纸上, 轻轻放在载玻片上向外拉, 如此反复几次便可擦净(注意: 镜头和载玻片的擦拭均不能来回涂抹, 且擦镜液不能加得太多)。

(五) 实验报告

1. 比较低倍镜和高倍镜下观察物像有什么区别。

2. 简述使用油镜的注意事项。

(六) 注意事项

1. 取镜时, 必须右手握镜臂, 左手托镜座, 使镜身保持平稳和直立, 以免目镜、反光镜等滑出。

2. 实验前后, 应详细检查显微镜的零件, 如有损坏或丢失, 应立即报告老师, 切勿自行修理。严禁自行拆卸任何零件。

3. 实验前, 应将显微镜擦干净, 光学及照明部分的镜面只能用擦镜纸擦净, 不能用手指、毛巾、纸等来涂擦, 以免损坏镜面。其他部分可用纱布擦净。

4. 使用显微镜的过程中切忌急躁, 观察时, 必须先在低倍镜下找到物像才能转用高倍镜观察, 高倍镜找到物像后才能转油镜观察。

5. 显微镜不能在日光直射下使用。

6. 显微镜使用完毕, 转动大螺旋上升镜筒或下降载物台, 取下标本, 转动旋转盘使物镜离开通光孔, 再下降镜筒或上升载物台使之接近物镜。

7. 画图时, 要学会双眼睁开, 用左眼观察, 右眼画图, 以减少眼睛的疲劳。

(张锦宏)

二、荧光显微镜

(一) 实验目的

1. 了解荧光显微镜的工作原理。

2. 熟悉荧光显微镜的操作步骤与注意事项。

(二) 实验原理

荧光显微镜利用一个高发光效率的点光源, 经过滤色系统发出一定波长的光作为激发光, 在激发标本内的荧光物质发射出各种不同颜色的荧光后, 再通过物镜和目镜的放大进行观察(图 1-1-3)。这样, 在强烈的对衬背景下, 即使荧光很微弱也易辨认。荧光显微镜敏感性高, 主要用于细胞结构、功能及化学成分等研究(图 1-1-3)。

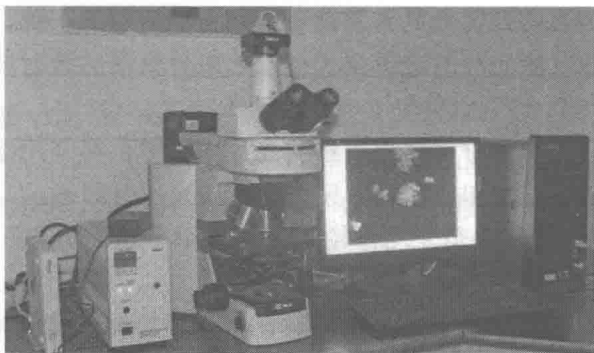


图 1-1-3 荧光显微镜

(三) 实验步骤

荧光显微镜使用方法和荧光显微镜操作规程如下:

1. 用窗帘遮蔽光线, 关闭房间内的灯, 除去显微镜的防尘罩, 确保显微镜灯室通风良好、无遮盖, 装上汞灯灯箱, 并转动灯箱卡圈上的拨杆, 将灯箱与镜臂连接。

2. 将汞灯灯箱的电源插头插入荧光电源箱后的插座, 再将荧光电源箱的插头插入 220V 外接电源。

3. 打开电源开关, 电压表显示出电源电压, 如电源电压波动不超过额定电压值的 $\pm 5\%$, 即可按下启动开关点燃汞灯, 如因天气太冷或电压不稳定等原因, 一次启动未点燃汞灯, 可以多揿动几次。待超高压汞灯弧光达到稳定状态并达到最大发光效率, 即可开始工作。

4. 荧光显微镜的调试

(1) 任选一张标本放在载物台上。

(2) 转动镜臂上的聚光镜旋钮使聚光镜移出光路, 转动滤光片组转换拨轮, 将紫光(V)或蓝光(B)或绿光(G)激发滤光片组转入光路, 并将 $10\times$ 荧光物镜转入光路。

(3) 调节大、小螺旋, 将标本像调焦清晰。

(4) 前后推动垂直照明器右边的聚光镜调焦推杆, 使视场光阑成像清晰, 转动视场光阑拨杆将视场光阑收小, 调节视场光阑调中螺钉使视场光阑居中, 然后再将视场光阑开至最大。

(5) 转动镜臂上的聚光镜旋钮使聚光镜移入光路, 前后调节灯箱上的聚光镜拨杆, 使汞灯的弧光在视场内成像清晰。

(6) 调整灯箱上的灯泡水平调节螺钉和垂直调节螺钉, 使汞灯的弧光居中。

(7) 调整反光镜水平调节螺钉和垂直调节螺钉, 使光源的反射像与汞灯的弧光分开。

(8) 转动聚光镜旋钮把聚光镜移出光路, 此时视场照明均匀。

5. 荧光观察

(1) 将荧光染色标本放到载物台上。

(2) 将 $10\times$ 平场物镜或 $40\times$ 荧光物镜转入光路, 调节载物台纵横移动手轮, 将标本移入光路。

(3) 转动滤光片转换拨轮, 将荧光染色标本所需要的激发滤光片组转入光路。激发滤光片组编号刻在滤光片组转换拨轮上。

滤光片选择正确与否, 是荧光显微镜能否得到正确应用的关键。选用滤光片时, 必须遵守斯托克斯定律: 激发滤光片的透射波长 $<$ 双色束分离器的透射波长 $<$ 阻断滤光片的透射波长。

由于激发滤光片、双色束分离器和阻断滤光片出厂时已按其用途和本身的光学特性进行了严格的组合匹配, 在观察和摄影时, 只需选择滤光片组即可。

(4) 调节大螺旋, 当看清荧光图像轮廓后, 再用小螺旋调焦, 直至看到清晰的荧光图像。

(5) 当需要得到较强的荧光图像时, 可转动聚光镜旋钮把聚光镜移入光路, 可获得较明亮的荧光图像。

(6) 当需要使用 $40\times$ 或 $100\times$ 荧光物镜观察时, 应在标本和物镜间加上甘油, 油中不能有影响观察的小泡或杂质。使用时可使甘油慢慢浸润一会儿, 然后轻轻左右来回转动物镜转换器以排除气泡。

6. 荧光显微摄影——显微镜摄像头 由于荧光图像一般均较明场观察的暗得多, 所以进行荧光显微摄影需要较长的曝光时间, 在曝光时应注意避免仪器震动。

荧光显微摄影技术对于记录荧光图像十分必要, 由于荧光很容易褪色减弱, 要即时摄影记录结果, 其方法与普通显微摄影技术基本相同。

(四) 注意事项

1. 因观察荧光使用的光源为高压汞灯, 其发出的光中含紫外光, 对人眼有损害作用, 故必须安装紫外防护罩。

2. 为延长汞灯寿命, 打开汞灯后不可立即关闭, 以免汞蒸发不完全而损坏电极, 一般需要等 15min 后才能关闭。

3. 汞灯熄灭后应待其完全冷却才能重新启动, 否则灯内汞蒸气尚未恢复到液态, 内阻极小, 再次施加电压, 会引起短路, 导致汞灯爆炸。这样不仅损坏电器, 更重要的是汞蒸气溢出, 将导致工作室污染。故关闭汞灯之后, 不能马上再次打开, 必须等待至少 30min。

(戴 婷)

第二节 离心机的基本原理与使用方法

离心机基本技术

离心机 (centrifuge) 是借助其内部转子的高速旋转所产生的离心力, 将离心管内固液混合体系中的物质根据它们颗粒的沉降系数、质量、密度及浮力等因素的不同而彼此分离

的仪器，能用于物质的分离、纯化或浓缩。目前，离心机在生物学、医学、制药工业等领域中广泛应用。

(一) 实验目的

1. 了解离心机的基本工作原理。
2. 掌握离心机的使用方法与注意事项。

(二) 基本原理

1. 离心力与相对离心力

(1) 离心力：一个固体物质颗粒，在一定角速度下的液相介质中做圆周运动时，会受到一个向外的离心力的作用。当离心机转子以一定的角速度 ω (弧度/秒) 旋转，颗粒的旋转半径为 r (cm) 时，离心力 (F_c) 等于离心加速度 ($\omega^2 r$) 与颗粒质量的乘积，即

$$F_c = m\omega^2 r$$

其中 ω 是旋转角速度； r 表示离心力场中某一点到转轴间的水平距离； m 是质量，以克为单位。

旋转角速度 ω 也可以用离心机每分钟的转速 (revolutions per min, r/min) 表示，每转一周的弧度为 2π ，即

$$\omega = \frac{2\pi \times r/\min}{60}$$

则

$$F_c = m \times \frac{(2\pi \times r/\min)^2 \times r}{3600} = \frac{4\pi^2 (r/\min)^2 r}{3600}$$

(2) 相对离心力：由于各种离心机转子的半径或离心管至旋转轴中心的距离不同，物质颗粒所受离心力会发生变化，因此常用“相对离心力”或“数字 $\times g$ ”表示离心力。相对离心力 (relative centrifugal force, RCF) 是指在离心力场，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，单位是重力加速度常数 g (980cm/s^2) 或 $\times g$ ，即

$$\text{RCF}(g) = \frac{\omega^2 r}{980}$$

$$\therefore \omega = \frac{2\pi \times r/\min}{60}$$

$$\therefore \text{RCF}(g) = \frac{4\pi^2 (r/\min)^2 r}{3600 \times 980} = 1.119 \times 10^{-5} \times (r/\min)^2 \times r$$

2. 沉降系数 沉降系数 (sedimentation coefficient, S) 指在单位离心力作用下，物质颗粒沉降的速度。

$$S = \frac{\text{沉降速度}}{\text{单位离心力}} = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$$

其中 t 表示时间 (s)，变化的时间用时间的微分 dt 表示； r 表示运动粒子到离心机转轴中心的距离 (cm)。

沉降系数 (S) 的单位应该是： $\frac{\text{cm/s}}{\text{cm/s}^2} = \text{s}$ ，即单位是秒 (s)。

沉降系数(S)实际上时常在 $10^{-13}s$ 左右,实用中这个单位太大了,为了纪念 Svedberg 对离心技术所做出的贡献,把 $10^{-13}s$ 作为一个 Svedberg 单位(用 S 来表示),即 $1S=10^{-13}s$ 。

沉降系数常用来描述生物大分子的大小,如 18SrRNA, 23SrRNA。

(三) 离心方法

离心技术一般分为制备离心和分析离心两类。制备离心常用的方法有沉淀离心、差速沉淀离心、密度梯度离心和连续流离心等。制备离心法主要用来分离细胞、亚细胞结构或生物大分子。常用的分析用超速离心方法有沉降速度法、沉降平衡法及等密度区带离心法。分析离心法主要用于样品的定性定量分析,下面介绍制备离心法中最常用的方法。

1. 沉淀离心 沉淀离心(pelleting)技术是目前应用最广的一种离心方法。一般是指介质密度约 $1g/ml$ 时,选择一种离心速度,使悬浮溶液中的悬浮颗粒在离心力的作用下完全沉淀下来,这种离心方式称为沉淀离心。根据颗粒大小来确定沉降所需要的离心力。对于细菌等微生物、细胞和细胞器等生物材料,离心密度在 $1.08\sim 1.12g/ml$;对于病毒和染色体 DNA 等,离心密度在 $1.18\sim 1.31g/ml$ 。

2. 密度梯度离心 密度梯度离心(density gradient centrifugation)需要使用密度梯度介质,其具有很好的分辨能力,可以使混合样品中沉降系数相差在 $10\%\sim 20\%$ 的几个组分分开,得到的组分纯度也较高。在密度梯度离心中,由于梯度的存在,沉淀的样品会被压实,对物质样品的结构和形状起到了保护作用。

常用的密度梯度介质有高浓度盐溶液和甲泛葡胺(metrizamide),多用于核酸分子的分离纯化。氯化铯密度梯度主要用于 DNA 的分级分离,硫酸铯密度梯度主要用于 RNA 的分级分离,三氟乙酸铯密度梯度用来分离单、双链 RNA,并能把 RNA 与 DNA 和蛋白质分开。三氟乙酸铯和碘化钾密度梯度都能把 DNA-RNA 杂交体从 DNA 和 RNA 中分离出来。三氯乙酸铷和碘化钠密度梯度均可用来分离蛋白质,特别是核蛋白。

(四) 离心机的类型

1. 按转速分类 离心机根据转速的大小分为低速、高速和超速离心机。由于转速太高会产生大量的热量,因此高速及超速离心机都附有制冷装置,以降低转子室温度;同时为减少摩擦,还附有抽真空装置,使转子在真空条件下运转。

低速离心机: 转速为 $8000r/min$ 以下,相对离心力为 $10\,000g$ 以下;主要用于分离细胞、细胞碎片及培养基残渣等颗粒物,也用于粗结晶的较大颗粒的分离。

高速离心机: 转速为 $10\,000\sim 25\,000r/min$,相对离心力为 $10\,000\sim 100\,000g$;主要用于分离各种沉淀物、生物大分子、细胞碎片和较大的细胞器等。为了防止高速离心过程中温度升高而使酶等生物分子变性失活,有些高速离心机设有冷冻装置,所以称为冷冻离心机。

超速离心机: 转速为 $25\,000\sim 80\,000r/min$,最大相对离心力为 $500\,000g$;为了防止温度升高和降低空气阻力及摩擦,超速离心机设有冷冻和真空系统;主要用于生物大分子、细胞器和病毒等的分离、纯化、鉴定及分析。

2. 按离心机的用途分类

小型离心机：一般是指体积较小的台式离心机，转速可以从每分钟数千转到每分钟数万转，相对离心力由数千到数十万，离心管的容量由数百微升到数十毫升。小型离心机多用于小量快速的离心。

制备型大容量低速离心机：一般是离心的体积较多，机型体积较大的落地式离心机。最大转速为 6000r/min 左右，最大离心力在 6000g 左右，最大容量可达数千毫升。大多数此类离心机均设有制冷系统。

高速冷冻离心机：与大容量低速离心机相近，二者之间的主要差异在于前者的离心速度比后者高，并设有制冷系统。高速冷冻离心机的最大速度在 18 000~21 000r/min，最大离心力在 50 000g 左右，可以更换转头调整离心容量。

超速离心机：具有很大的离心力，最大速度可达 100 000r/min，最大离心力可达 800 000g。超速离心机可以进行小量制备，最大容量可达数百毫升，适用于蛋白质、核酸和多糖等生物大分子的制备。

（五）离心机的主要构造

此处主要介绍常用的低速和高速离心机的主要构造。

1. 离心机外壳 离心机外壳必须具有有效的装甲防护，以防转头破碎时碎片飞出。若是低温离心机还应在壳内层安装给离心室制冷的蒸发管。

2. 离心室和转子 离心机内部称为离心室，离心室内是转子进行高速运转的地方。

3. 驱动系统 驱动离心机转子旋转的装置一般是电动机，并有调节变速的装置。

4. 转子 转子是离心机中能够高速旋转的部件，在转子的外围环绕一圈安放离心管的圆孔。转子有多种多样的规格，但每一种转子都有一定的使用限度，一般分为角式转子和甩平式转子两大类。角式转子是指转子的离心管腔与转轴之间的角度为 20°~45°，其特点是容量大、转速高。甩平式转子是可活动的离心管套用钉鞘固定于主体上，静止时垂直悬挂，当转子在离心力的作用下转速达到约 600r/min 时达到 90°水平位置，适用于密度梯度离心，主要优点是离心管始终处于重力和离心力两者合力的作用下，不管转头加速还是减速都不产生样品扰动的现象。

5. 操作系统 离心机操作系统由开关、旋钮、指示灯、指示仪表或显示器等组成，各系统控制均由操作系统完成。

（六）离心机的操作

1. 选择合适的离心管和转子 根据待离心的溶液性质及体积选择合适的离心管，再根据离心管选择配备的转子（这类离心机可更换转子）或相应的离心机。

2. 通电及调参数 打开电源开关通道，然后调节所需转速、时间，甚至制冷温度。

3. 平衡离心管，对称放入转子两侧 离心管及其内容物若重量超过 2g，必须事先在天平上平衡，再对称放入转子两侧。若不平衡好，离心机会发生震动，这不仅可能损坏离心机，甚至可能带来安全威胁。若离心管及其内容物重量小于 2g，则一般不需要在天平上平衡，只要对称放入转子两侧即可。

4. 关紧离心机盖子 当离心管全部放入转子后，将离心机盖子关好。

5. 启动并观察工作状态 启动离心机离心, 同时观察离心机运转是否稳定, 声音是否平稳。若出现异常现象要立刻关机, 开盖检查, 进行重新平衡等处理。

(黄 炜)

第三节 分光光度计与酶标仪

一、分光光度计

分光光度计是将不同波长的混合光分成单一波长光谱, 再测量某物质对这特定波长光的吸收度 (absorbance, A), 从而对该物质进行定性和定量分析。利用这类仪器测量的技术也称分光光度法 (spectrophotometry)。

(一) 实验目的

1. 了解分光光度计的基本原理。
2. 掌握分光光度计的使用方法与注意事项。

(二) 基本原理

物质的吸收光谱与其本身的分子结构有关, 不同物质由于其分子结构不同, 对不同波长光线的吸收能力也不同。每种物质都具有特异的吸收光谱, 即某物质对此单一波长光谱的吸收量最多, 称为特征性吸收光谱 (或最大吸收波长); 在一定条件下, 其吸收程度与该物质浓度成正比, 因此可利用各种物质不同的吸收光谱及其强度, 对不同物质进行定性和定量的分析。

该仪器主要用于测量溶液中可溶性物质的浓度。大多数物质本身具有一定的颜色, 也有一些物质本身虽是无色的, 但加入适当的试剂后可生成有色的物质; 溶液的浓度越大, 其颜色越深, 且对光的吸收越大。这样, 可通过测定比较溶液在某一波长下的吸光度值来确定溶液的浓度; 若直接测量物质的浓度, 则需要选用波长短、能量大的紫外光测量物质吸光度值来确定溶液的浓度, 其灵敏度略低于有色物质。这类方法称为比色分析法。比色分析法又分为光电比色法和分光光度法, 本章只讨论分光光度法。

分光光度法具有灵敏度强、精确度高、操作简便快速, 对于复杂的组分系统无需分离即可检测出其中所含的微量组分的特点, 因此, 分光光度计目前已成为生物化学研究和医院的检验部门广泛使用的仪器之一。

分光光度计只是测量溶液中物质的吸光度, 而溶液的浓度是要将吸光度值代入 Lambert-Beer 定律计算出来。该定律阐明了溶液对单色光吸收的多少与溶液浓度及溶液厚度之间的关系。

1. Lambert 定律 当一束单色光垂直通过一均匀的溶液时, 一部分光会被溶液吸收, 因此光线的强度会减弱。设: 入射光强度为 I_0 , 溶液的厚度为 L , 出射光即透过光强度为 I , 则 I/I_0 表示光线透过溶液的程度, 称为透光度 (transmittance, T)。若溶液的浓度不变, 则透过溶液的厚度越大, 光线强度的减弱越显著, 即光吸收的量与溶液的厚度成比例关系, Lambert 定律证明:

$$\lg I_0/I = K_1 L \quad (1)$$

式中, K_1 为常数, L 为溶液的厚度 (光径)。

2. Beer 定律 当一束单色光通过溶液介质时, 若溶液的厚度不变而浓度不同时, 溶液的浓度越大, 则光吸收越大, 透过光的强度越弱, 即溶液对光的吸收与溶液的浓度成比例关系, Beer 定律可用下式表示:

$$\lg I_0/I = K_2 C \quad (2)$$

式中, K_2 为常数, C 为溶液的浓度。

3. Lambert-Beer 定律 如果同时考虑液层厚度和溶液浓度对光吸收的影响, 将 (1) 式与 (2) 式合并, 则:

$$\lg I_0/I = KCL$$

此公式为 Lambert-Beer 定律的数学形式。

因 $T = I/I_0$,

$$-\lg T = \lg I_0/I$$

令 $A = \lg I_0/I$, 则

$$A = -\lg T = KCL, \text{ 即 } A = KCL$$

式中, T 为透光度; A 为吸光度 (光密度、消光度); K 为常数 (消光系数), 表示物质对光线吸收的能力, 常用表示方法有百分浓度消光系数和摩尔浓度消光系数两种。

百分浓度消光系数: 即以百分浓度来表示的消光系数, 它在数值上等于溶液浓度为 1%、液层厚度为 1cm 时的光密度值。

摩尔浓度消光系数: 即以摩尔浓度来表示的消光系数, 它在数值上等于溶液浓度为 1mol/L、液层厚度为 1cm 时的光密度值。

消光系数是物质的重要特性, 它与入射光的波长以及溶液的性质和温度有关, 也与仪器的质量有关。在入射光波长、溶液种类和温度一定的条件下, 消光系数是一个定值, 通过实验可以测得。消光系数值越大, 该物质吸收光的能力越强, 测定的灵敏度越高。

(三) 分光光度法求浓度的方法

1. 用标准管法计算待测液浓度 实际测量过程中, 用一已知浓度的标准液和一未知浓度的待测液经同样处理显色, 读取吸光度, 就可以得出下列算式:

$$A_{\text{标}} = KC_{\text{标}}L, \quad A_{\text{测}} = KC_{\text{测}}L$$

由于两种溶液的液层厚度相等, 即 L 值相等, 另外温度相同, 而且是同一物质的两种不同浓度, 在测定时所用波长也相同, 所以 K 值相等, 故通过下列公式推导, 就能够计算出待测液的浓度。

$$\frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{测}}L}{KC_{\text{标}}L}$$

分子与分母约去 K 和 L , 得

$$C_{\text{测}} = \frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{标}}} \times C_{\text{标}}$$