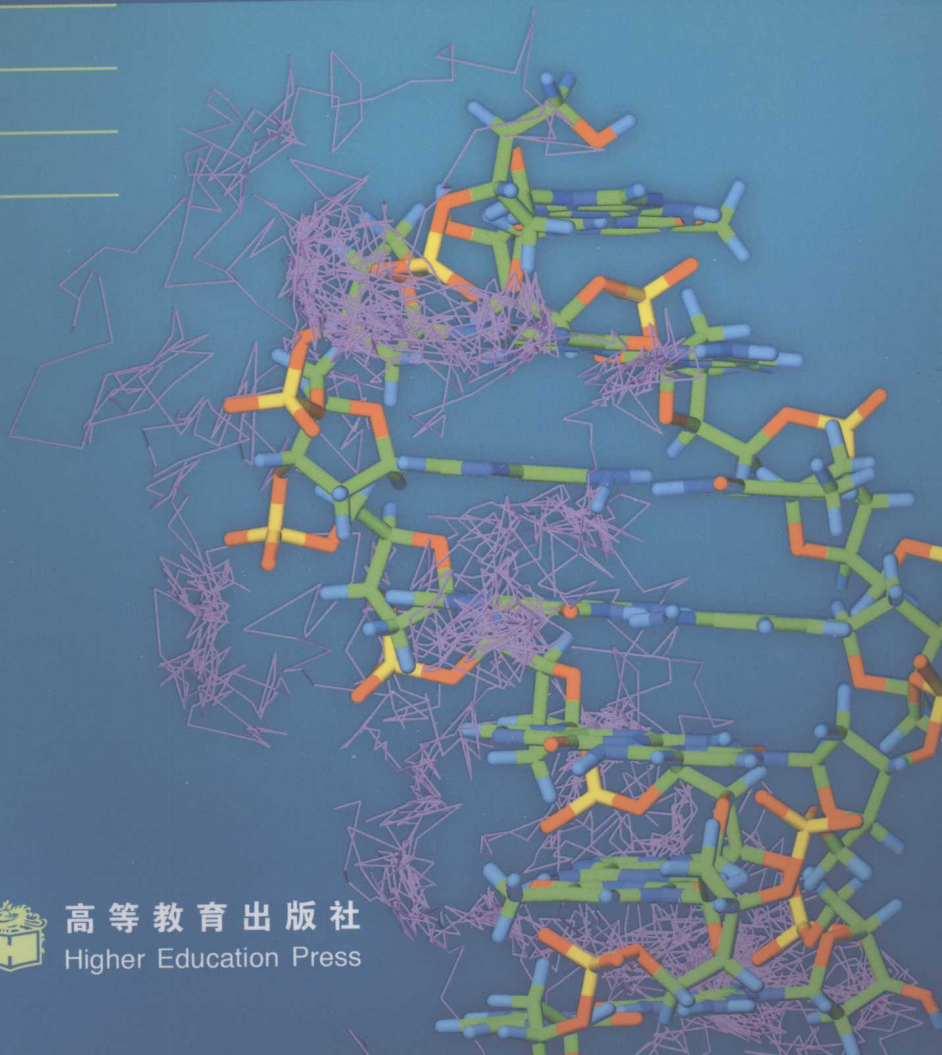




普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 生物化学 实验技术

▶ 郭蔼光 郭泽坤 主编



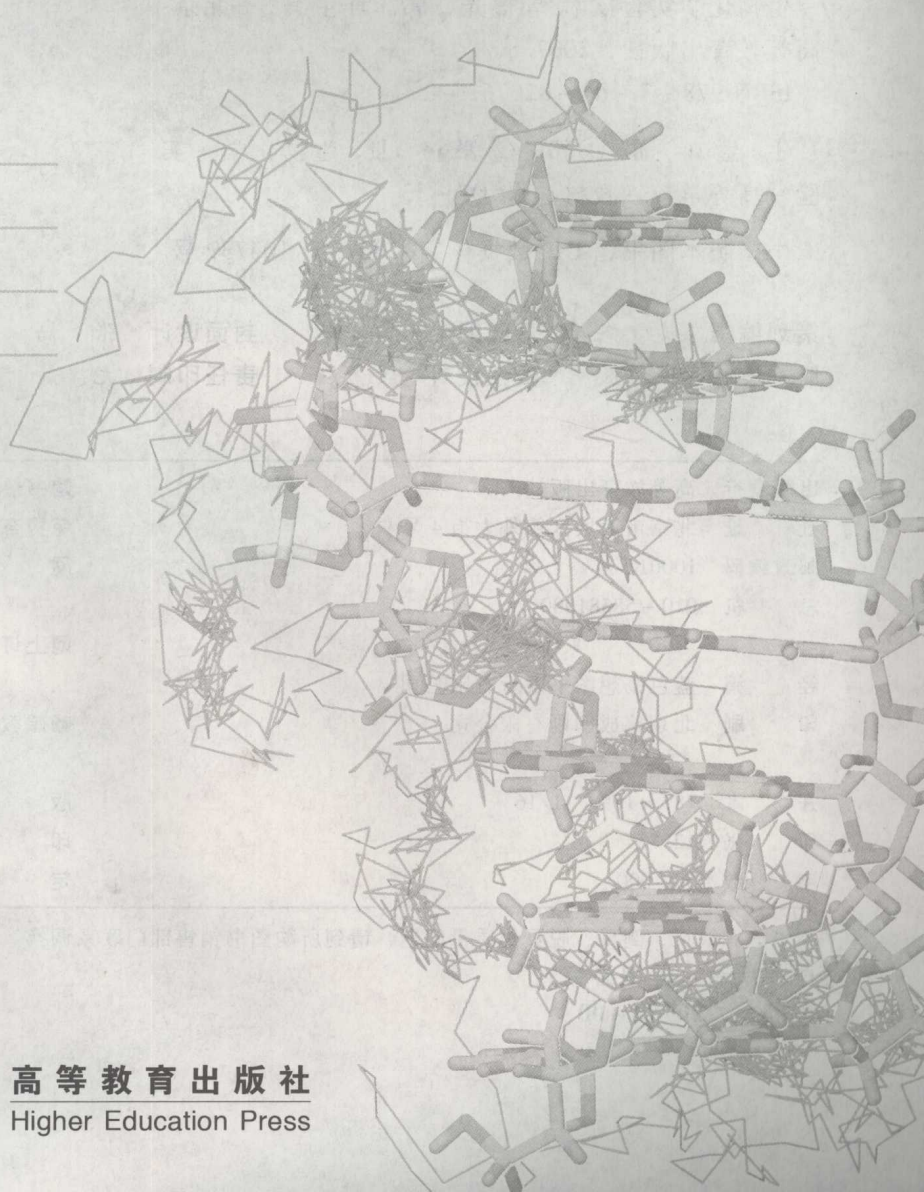
高等教育出版社  
Higher Education Press



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 生物化学 实验技术

▶ 郭蔼光 郭泽坤 主编



高等教育出版社  
Higher Education Press

## 内容简介

本书是普通高等教育“十一五”国家级规划教材，是编者在多年生物化学实验教学基础上，为生物类及农科各专业本科生生物化学实验课编写的教材。教材理论部分介绍了离心技术、层析技术、电泳技术及生物大分子制备技术。实验部分包括生物化学基本实验和生物化学综合性实验两大部分。基本实验适用于生物类和农科各专业生物化学实验的基本训练；综合性实验可用于生物技术等专业进行科研模拟训练，也可用于研究生“生物化学研究技术”课程。书末附录包括了生物化学常规仪器设备操作注意事项、常用试剂、溶液配制及常用数据列表等内容。

本书内容全面，实用性强，重视设计性和综合性实验，兼具广度和深度，主要作为高等农林院校本科生教材，也可供综合性大学、师范学院本科生使用，还可作为相关教学和研究人员的参考书。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术/郭蔼光, 郭泽坤主编. —北京:  
高等教育出版社, 2007. 8

ISBN 978 - 7 - 04 - 020762 - 0

I. 生… II. ①郭…②郭… III. 生物化学 - 实  
验 - 高等学校 - 教材 IV. Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 104739 号

策划编辑 吴雪梅 责任编辑 田 军 封面设计 张 楠 责任绘图 尹 莉  
版式设计 张 岚 责任校对 殷 然 责任印制 尤 静

---

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010 - 58581118
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800 - 810 - 0598
邮政编码	100011	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
总 机	010 - 58581000		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
经 销	蓝色畅想图书发行有限公司	网上订购	<a href="http://www.landaco.com">http://www.landaco.com</a>
印 刷	北京铭成印刷有限公司		<a href="http://www.landaco.com.cn">http://www.landaco.com.cn</a>
		畅想教育	<a href="http://www.widedu.com">http://www.widedu.com</a>
开 本	787 × 1092 1/16	版 次	2007 年 8 月第 1 版
印 张	12.75	印 次	2007 年 8 月第 1 次印刷
字 数	300 000	定 价	16.40 元

---

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题，请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 20762 - 00

## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

## 编 审 人 员

主编 郭蔼光 郭泽坤

主审 张林生

参编(按姓氏笔画排序)

王道杰 文建雷 石庆华 刘华伟 刘香利 张 劲 张 斌

张大鹏 张新梅 陈 惠 陈 鹏 肖 亮 肖红利 武永军

罗淑萍 洪玉枝 郭泽坤 郭蔼光 韩召奋



# 前 言

二十多年来, 生命科学以惊人的速度突飞猛进地发展, 许多新的边缘学科、新的研究领域、新技术和新理论应运而生, 深刻地影响着医药、环保、食品和工、农业生产, 以及人们日常生活的诸多方面, 成为人类在新世纪科学发展的重要标志。作为一门基础学科和带头学科, 生物化学对生命科学的腾飞所作出的贡献及其重要性有目共睹。因此, 国家教育部及有关部委早在 1997 年就启动了“面向 21 世纪高等农林院校本科教育生物系列课程教学内容和课程体制改革”, 要求加强包括生物化学等基础学科和带头学科的课程建设、教材建设和实验室硬件建设。随着国家对教育的投入不断加大, 高等教育的面貌日新月异, 教育领域充满生机。同时, 学科的发展、社会对高素质人才的要求, 家长和学生对高等教育的期望, 也在不断提高, 作为入围国家“211”工程和“985”工程重点高校, 我们深切地认识到与国内外先进水平的差距和肩负责任的重大, 正在急起直追, 以期不负重托。

我们一直比较重视实验课教学, 认为生物化学本来就是一门实验性学科, 实验课不仅是整个教学工作重要的环节, 而且在培养学生严谨务实的学科作风、协作共事的团队精神、创造性思维以及分析和解决问题的能力等方面有着不可替代的作用。原有的教材已不能满足新的需要, 因而在已有教材的基础上推出这部实验教材, 与面向 21 世纪课程教材《基础生物化学》(第二版)配套使用。

这本教材的内容主要包括三部分: 首先, 重点介绍了常用生化实验技术的基本原理, 包括层析技术、电泳技术等。把实验原理集中起来, 一方面使这些涉及生物大分子分离、纯化、检查的常规技术系统化, 有利于学生理解实验操作, 尽快掌握有关的基本技能; 另一方面也可避免不必要的重复。第二部分设置了 32 个普通生化实验, 适合于对生物学相关专业学生进行基本的生化实验技能训练, 以便增加学生的感性认识, 与理论课教学相辅相成。第三部分安排了 4 个综合性大实验, 这是本书的特色和本科生实验教学的重要突破。通过这部分的实验, 不但可以把前面的有关知识和技能系统化、集成化, 而且更贴近现代生化科研实践, 对于学生进一步学习其他相关课程或从事科研有直接的帮助和更为久远的影响。本书适合于生物技术、生物科学、生物工程等专业学生使用, 也可以选取其中部分内容用于其他专业。

本教材的编写首先得益于多年来兄弟院校同行的大力支持, 华中农业大学洪玉枝老师、四川农业大学陈惠老师、新疆农业大学罗淑萍老师、山东农业大学王宪泽老师、宁夏大学张慧茹老师等为我们提供了所在院校的实验教学资料。直接参加本教材编写工作的人员大都是我校生物化学教研室的中青年教学骨干

## II 前言

和参编院校的资深教师，具有深厚的专业功底和高度的敬业精神，长期奋战在教学、科研第一线，思想活跃，勤于学习，善于总结，博采众长，并融入多年在实验课教学和科学研究中的实践经验，分头执笔编写了本书初稿，最后由郭蔼光和郭泽坤完成全书的统稿和附录的编辑。因而，本书是集体劳动的成果。西北农林科技大学和生命科学学院有关领导十分关心生物化学与分子生物学的学科建设，给予我们莫大的鼓舞。编者们所在的系、教研室和实验室的其他同仁不断完善这些实验，付出了长期艰辛的劳动，并对编写工作提出了许多宝贵的意见和建议，在此一并表示诚挚的谢意。

编者  
2007年1月

# 目 录

## 第一部分 理论部分

1.1 离心技术 .....	3	1.3.3 电泳的分类 .....	23
1.1.1 离心沉降速率影响 因素 .....	3	1.3.4 电泳系统 .....	23
1.1.2 沉降系数 .....	4	1.3.5 醋酸纤维素 薄膜电泳 .....	24
1.1.3 离心设备 .....	5	1.3.6 聚丙烯酰胺 凝胶电泳 .....	25
1.1.4 制备超离心法 .....	7	1.3.7 SDS-聚丙烯酰胺 凝胶电泳 .....	27
1.1.5 离心操作的 注意事项 .....	9	1.3.8 连续梯度电泳 .....	27
参考文献 .....	10	1.3.9 等电点聚焦电泳 .....	28
1.2 层析技术 .....	11	1.3.10 双向电泳 .....	29
1.2.1 层析的基本概念 .....	11	1.3.11 琼脂糖凝胶电泳 .....	29
1.2.2 层析的基本理论 .....	12	1.3.12 毛细管电泳 .....	29
1.2.3 层析法的分类 .....	13	参考文献 .....	30
1.2.4 柱层析的基本 装置及操作 .....	14	1.4 生物大分子的制备 .....	31
1.2.5 常用的层析方法 .....	16	1.4.1 生物大分子制备的 前处理 .....	31
参考文献 .....	20	1.4.2 生物大分子的 分离纯化 .....	33
1.3 电泳技术 .....	21	参考文献 .....	40
1.3.1 电泳的基本原理 .....	21		
1.3.2 影响电泳的 主要因素 .....	21		

## 第二部分 基本实验

2.1 基础训练 .....	43	粉的制备 .....	47
2.1.1 生物化学实验要求 .....	43	2.1.4 缓冲溶液的配制和 氨基酸两性 性质测定 .....	48
2.1.2 生物样品的采取、 处理与保存 .....	44	参考文献 .....	51
2.1.3 高等植物材料丙酮			



## II 目录

2.2 蛋白质和氨基酸实验	52	2.3.6 植物苯丙氨酸解氨酶(PAL) 的提取及活性测定	86
2.2.1 蛋白质的两性性质及 等电点的测定	52	2.3.7 同工酶聚丙烯酰胺凝胶 电泳	88
2.2.2 氨基酸的薄层层析	54	参考文献	92
2.2.3 考马斯亮蓝 G-250 法 测定蛋白质含量	55	2.4 分子生物学基础实验	93
2.2.4 紫外吸收法测定 蛋白质含量	57	2.4.1 质粒 DNA 的提取及琼脂糖 凝胶电泳检测	93
2.2.5 双缩脲法测定 蛋白质含量	58	2.4.2 聚合酶链反应(PCR)技术 体外扩增 DNA	97
2.2.6 Folin-酚法测定 蛋白质含量	60	2.4.3 大肠杆菌感受态的制备和 转化实验	99
2.2.7 蛋白质的沉淀与 变性反应	62	2.4.4 PCR 产物的 T-A 克隆及 重组子的蓝白斑筛选	103
2.2.8 蛋白质脱盐(透析和 凝胶过滤)	64	2.4.5 植物基因组 DNA 提取、 酶切及电泳分析	106
2.2.9 用 DNS 法鉴定蛋白质或 多肽的 N 端氨基酸	67	参考文献	108
2.2.10 等电点聚焦电泳法测定 蛋白质的等电点	69	2.5 糖、脂、维生素实验	109
参考文献	72	2.5.1 蒽酮比色法测定植物组织中 总糖和可溶性糖的含量	109
2.3 酶学实验	74	2.5.2 还原糖含量测定——砷钼酸 比色法	111
2.3.1 酶的基本性质	74	2.5.3 糖的薄层层析	113
2.3.2 过氧化氢酶活力的测定	77	2.5.4 维生素 A 的含量测定	115
2.3.3 脲酶(urease) $K_m$ 值简易 测定法	79	2.5.5 维生素 C 含量测定—— 2,6-二氯酚靛酚法	118
2.3.4 淀粉酶活力测定	81	2.5.6 粗脂肪含量的测定—— 索氏抽提法	120
2.3.5 转氨酶活性鉴定 (纸层析法)	84	参考文献	122

## 第三部分 综合性实验

3.1 酵母蔗糖酶的提取及其 性质的研究	125	3.1.3 蔗糖酶各级分活性及蛋白质 含量的测定	130
3.1.1 蔗糖酶的提取与 部分纯化	126	3.1.4 分离产物的 SDS-PAGE 电泳检测	133
3.1.2 离子交换柱层析纯化 蔗糖酶	128	3.1.5 反应时间对产物 浓度的影响	135

3.1.6	pH 对蔗糖酶活性的影响	136	参考文献	154	
3.1.7	温度对蔗糖酶活性的影响和反应活化能的测定	138	3.3	猪血超氧化物歧化酶的分离纯化、活性测定及同工酶鉴定	155
3.1.8	底物浓度对催化反应速度的影响及米氏常数 $K_m$ 和最大反应速度 $V_{max}$ 的测定	139	3.3.1	猪血 SOD 的提取纯化	156
3.1.9	尿素(脲)抑制蔗糖酶的实验	140	3.3.2	超氧化物歧化酶活性测定	157
	参考文献	143	3.3.3	SOD 同工酶鉴定	159
3.2	溶菌酶的分离纯化	144		参考文献	161
3.2.1	溶菌酶的粗提液的制备	144	3.4	种子蛋白质系统分析	163
3.2.2	离子交换柱层析纯化溶菌酶	145	3.4.1	种子蛋白质含量测定(凯氏定氮法)	163
3.2.3	溶菌酶的透析与浓缩	147	3.4.2	种子蛋白质氨基酸组分分析(氨基酸自动分析仪法)	165
3.2.4	凝胶过滤层析纯化溶菌酶	149	3.4.3	种子蛋白质组分分析(连续累进提取法)	166
3.2.5	溶菌酶的活性测定	150	3.4.4	种子蛋白质亚基分析(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法)	168
3.2.6	溶菌酶纯度的鉴定	152		参考文献	170

## 第四部分 附录

一、实验室安全及防护知识	175	四、常用缓冲溶液的配制方法	184
二、各种仪器的使用注意事项	177	五、硫酸铵饱和度的常用表	189
三、凝胶数据表	181	六、离心力与离心机转速测算表	191

# 第一部分

## 理论部分

生物体内生化物质种类繁多，要对各种生化物质的分子结构、功能和各种特性进行研究，首先要从生物体的组织、器官、细胞中把它们提取出来，再进行分离纯化。常用的生物化学分离技术有离心、层析、电泳、沉淀等。本部分主要介绍这几种常用分离技术。



# 1.1

## 离心技术

离心技术 (centrifugal technique) 是根据颗粒在作匀速圆周运动时受到一个外向的离心力的行为而发展起来的一种分离技术。当物体围绕一中心轴做圆周运动时, 运动物体就受到离心力的作用。旋转速度越高, 运动物体所受到的离心力越大。如果装有悬浮液或高分子溶液的容器进行高速水平旋转, 强大的离心力作用于溶剂中的悬浮颗粒或高分子, 会使其沿着离心力的方向运动而逐渐背离中心轴。在相同转速条件下, 容器中不同大小的悬浮颗粒或高分子溶质会以不同的速率沉降。经过一定时间的离心操作, 就有可能实现不同悬浮颗粒或高分子溶质的有效分离。在生命科学研究中广泛使用的离心机, 就是基于上述基本原理设计的。这项技术应用很广, 诸如分离出化学反应后的沉淀物、天然的生物大分子以及细胞、细胞器等。

### 1.1.1 离心沉降速率影响因素

盛有某种悬浮液体的容器静置时, 在重力场作用下悬浮颗粒会逐渐沉降下来。假设悬浮颗粒具有刚性球状, 在其自然沉降过程中同时受到摩擦力  $F$ 、浮力  $P$  和重力  $G$  作用。

$$G = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_p g \quad (1-1)$$

$$P = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_m g \quad (1-2)$$

$$F = 6 \pi \eta r_p \frac{dr}{dt} \quad (1-3)$$

(斯托克斯定律: 物体在溶液里所受摩擦力随运动速度增加而增加, 其方向与运动方向相反)

式中,  $\eta$ : 溶剂的黏度系数;

$r_p$ : 悬浮颗粒的半径;

$dr/dt$ : 悬浮颗粒沉降速率;

$\rho_p$ : 悬浮颗粒的密度;

$\rho_m$ : 溶剂的密度;

$g$ : 重力加速度。

当悬浮颗粒呈匀速沉降时,  $F + P = G$ , 因此,

$$6\pi\eta r_p \frac{dr}{dt} + \frac{4}{3}\pi r_p^3 \rho_m g = \frac{4}{3}\pi r_p^3 \rho_p g \quad (1-4)$$

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m)g}{9\eta} \quad (1-5)$$

以上讨论的是悬浮颗粒在重力场中的自然沉降现象。如果该颗粒的沉降是在强大的离心力场中发生，颗粒受到的离心加速度  $\omega^2 r$  代替(1-5)式中的  $g$ ，其沉降速率

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta} \quad (1-6)$$

(1-6)式仅适用于球形颗粒。对非球形颗粒来说，沉降过程中沉降运动的颗粒与悬浮介质之间的摩擦系数  $f$  不同于球状颗粒状况下的摩擦系数  $f_0$ ，(1-6)式经校正可得一般状况下的沉降速率：

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2(\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta(f/f_0)} \quad (1-7)$$

从(1-7)式可以看出，悬浮液中颗粒在离心力场中的沉降速率  $\frac{dr}{dt}$  主要受以下因素影响：颗粒半径  $r_p$  的大小、颗粒形状(影响摩擦系数  $f$ )、颗粒与悬浮介质的密度差  $(\rho_p - \rho_m)$ 、一定温度条件下悬浮介质的黏度系数及离心加速度  $\omega^2 r$ 。在确定的离心操作中，沉降速度  $\frac{dr}{dt}$  实际上主要取决于悬浮颗粒所受到的离心力大小，即与离心机旋转的角速度平方值  $\omega^2$  及颗粒距转轴中心线的距离  $r$  成正比。

习惯上以相对离心力  $RCF$  即离心加速度  $\omega^2 r$  与重力加速度  $g$  的比值表示沉降颗粒在离心力场中所受到的离心作用：

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{g} \quad (1-8)$$

其大小用重力加速度  $g$  值的倍数来表示，如  $10\,000 \times g$ ， $50\,000 \times g$  等。

(1-8)式中的角速度  $\omega$  不便测量，而角速度  $\omega$  与离心机转速  $n$ (单位： $r/min$ )之间有如下关系：

$$\begin{aligned} \omega &= \frac{2\pi \cdot n}{60} = \frac{\pi \cdot n}{30} \\ RCF &= \frac{\omega^2 r}{g} = \frac{(\pi \cdot n/30)^2 \cdot r}{g} \\ &= \frac{\pi^2 \cdot n^2 \cdot r}{900g} = 1.119 \times 10^{-5} n^2 \cdot r \end{aligned}$$

由上式可见，只要给出旋转半径  $r$ ，则  $RCF$  和  $n$  之间可以相互换算。但由于离心机形状及结构的差异，使每台离心机的离心管从管口至管底的各点与旋转轴间的距离是不同的，在计算时常使用平均离心力，即离心管中溶液中心位点到旋转轴之间的离心力。

### 1.1.2 沉降系数

沉降系数测定是分析离心机最主要的用途。当一个已知大小和密度的颗粒悬浮在一种已知

密度和黏度系数的液体中进行离心沉降时, 它的  $r_p$ 、 $\rho_p$ 、 $\rho_m$ 、 $\eta$  和  $f/f_0$  将是个定值, (1-7)式表示的沉降速率  $\frac{dr}{dt}$  将与  $\omega^2 r$  成正比, 可改写成:

$$\frac{dr}{dt} = S\omega^2 r \quad (1-9)$$

(1-9)式中比例常数  $S$  称为沉降系数, 表示单位离心力场下的沉降速率, 即通过单位离心力场所需要的时间, 因此其单位为秒(s)。1S 单位等于  $1 \times 10^{-13}$  s。质量未知的细胞器、亚细胞器、生物高分子常用  $S$  值粗略表示其大小, 如 70S 核糖体、80S 核糖体、5S rRNA、16S rRNA 等。

生物大分子的沉降系数可通过离心技术进行测定。对于沉降系数已知的物质, 可预计沉降时间(颗粒从样品液面完全沉降到离心管底所需时间)。

$$t = \frac{\ln(r_2/r_1)}{S\omega^2}$$

式中,  $t$ : 沉降时间(s);

$S$ : 颗粒的沉降系数(S);

$\omega$ : 转子角速度(rad/s);

$r_1, r_2$ : 分别为旋转轴中心到样品液面和离心管底的距离。

### 1.1.3 离心设备

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型离心机和分析型离心机。制备型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; 分析型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、形状和相对分子质量等。分析型离心机都是超速离心机。

#### 1.1.3.1 制备型离心机

(1) 普通离心机: 最大转速 6 000 r/min(转/分钟)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, 起动电流大, 速度升降不均匀, 一般转头是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 ~ 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, 转头配有各种角式转头、荡平式转头、区带转头、垂直转头和大容量连续流动式转头, 一般都有制冷系统, 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和维持在  $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 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、硫酸铵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(如核糖体)或单个分子。



(3) 超速离心机：转速可达 50 000 ~ 80 000 r/min，相对离心力最大可达  $510\,000 \times g$ ，最著名的生产厂商有美国的贝克曼公司和日本的日立公司等，离心容量由几十毫升至 2 L，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要小于 0.1 g。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、真空系统和转头四部分组成。超速离心机的驱动装置是由水冷或风冷电动机通过精密齿轮箱或皮带变速，或直接用变频感应电机驱动，并由微机进行控制，由于驱动轴的直径较细，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，还有一个超速保护系统，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。

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 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 r/min 时，由摩擦产生的热量显著增大，当速度在 40 000 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。

### 1.1.3.2 转头

(1) 角转头：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 ~ 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、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，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受突然变速所产生的对流扰乱，影响分离效果。

(2) 水平转头：这种转头是由吊着的 4 或 6 个自由活动的吊桶(离心管套)构成。当转头静止时，吊桶垂直悬挂，当转头转速达到 200 ~ 800 r/min 时，吊桶甩平至水平位置，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。

(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，转子桶中装有十字型隔板装置，把桶内分隔成四个或多个扇形小室，隔板内有导管，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，而且还有转速高，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。

(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 $90^\circ$ 转向，因而沉降速度要慢。

(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，转头与区带转头类似，由转子桶和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。

### 1.1.3.3 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。

### 1.1.3.4 分析型离心机

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

分析型超速离心机的转头有圆形或椭圆形，以避免应力集中于孔处。此转头通过一个有柔性的轴连接到一个高速的驱动装置上，转头在一个冷冻的和真空的腔中旋转，转头上有2~6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，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，在预定的期间可以通过扫描记录或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像底板上产生了一个“峰”，由于沉降不断进行，界面向前推进，因此峰也移动，从峰移动的速度可以计算出样品颗粒的沉降速度。

分析型超速离心机的主要特点是能在短时间内，用少量样品就可以得到一些重要信息，能够确定生物大分子是否存在，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，测定生物大分子的相对分子质量，还可以检测生物大分子的构象变化等。

## 1.1.4 制备超离心法

制备超离心法可用来分离细胞、亚细胞结构或生物高分子。根据分离的原理不同，制备超离心法又可分为差速离心法和密度梯度离心法两类操作方法。

### 1.1.4.1 差速离心法

差速离心法又叫分级分离法。装有不均一粒子的离心管在离心机中高速旋转时，大小、密