

生物化学技术与实验

(试用版)

川北医学院生物化学教研室

二〇〇六年八月

内容简介

本教材是在 04 年简易版《生物化学技术与实验》——附生物化学导读与习题的基础上, 除去所附的生物化学导读与习题, 增加综合性大实验, 自主性小课题实验, 全本由(1)生物化学常规技术训练、(2)基本技术实验、(3)综合性实验、(4)自主性课题实验、(5)补充实验和参考资料五个板块所构成。前四大板块印制成书, 后一板块公诸于校园网上的精品课程——生物化学课程中。具体内容包括: 离心技术训练、比色技术训练、电泳技术训练、离子交换柱层析技术训练; 酪蛋白等电点的测定、蛋白质的(分段)盐析与透析、血清总蛋白的比色测定及其计量反应曲线的制作、血清蛋白醋酸纤维素膜电泳分离及定量实验、血浆脂蛋白凝胶电泳实验、硫铁磷法测定血浆总胆固醇、邻甲苯胺法测定血糖、血清 ALT 活性测定、唾液淀粉酶的专一性以及温度等因素对酶活性影响、乳酸脱氢酶的递氢作用、Van Slyke 酸碱滴定法测定血浆 CO_2 结合力、EDTA 配位滴定法测定血清(浆)钙、氧化还原滴定法测定水果蔬菜中 Vtc C 含量; 血清 γ 球蛋白的分离纯化、AKP 的分离制备及其动力学(K_m 值)测定、质粒的分离纯化与鉴定、急性肝损伤动物模型的建立及其检测; 维生素 C 测定方法的筛选与建立、血糖测定方法之探讨、动物血浆清蛋白与球蛋白的分离及其比值测定、——对——样品中维生素 C 含量影响的动态观察、肝素钠生产的最佳洗脱方式和条件的实验研究; PCR 技术训练、动物肝脏 RNA 的制备(苯酚法)和测定、细胞增殖与凋亡研究方法(细胞形态学鉴定——吖啶橙荧光染色法, DNA 片段鉴定——琼脂糖凝胶电泳法, DNA 片段鉴定——原位末端标记分析)、维生素 C 测定方法参考资料(2, 6-二氯酚靛酚法、比色法(2, 4-二硝基苯肼法、碘滴定法)、课题实验的申报、课题实验的选题与设计(科学研究方法简介)、课题实验(亦即科研)资料的整理与分析、课题实验报告与科研论文的写作。

目 录

实验须知	(001-006)
------------	-------------

I 生物化学常规技术训练	(007-040)
--------------------	-------------

I-01 离心技术训练	(007)
-------------------	---------

I-02 比色分析技术训练	(014)
---------------------	---------

I-03 薄膜电泳技术训练	(021)
---------------------	---------

I-04 离子交换柱层析技术训练报告	(033)
--------------------------	---------

II 生化基本技术实验与测试	(041-077)
----------------------	-------------

II-01 蛋白质的(分段)盐析与透析	(041)
---------------------------	---------

II-02 血清总蛋白的比色测定及其计量反应曲线制作	(043)
----------------------------------	---------

II-03 酪蛋白等电点的测定	(048)
-----------------------	---------

II-04 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳定量分析	(050)
-------------------------------	---------

II-05 唾液淀粉酶的专一性以及温度等因素对酶活性影响	(054)
------------------------------------	---------

II-06 邻甲苯胺法测定血糖	(058)
-----------------------	---------

II-07 乳酸脱氢酶的递氢作用	(060)
------------------------	---------

II-08 硫铁磷法测定血浆胆固醇总量	(062)
---------------------------	---------

II-09 血浆脂蛋白凝胶电泳	(064)
-----------------------	---------

II-10 血清 ALT 活性测定	(066)
-------------------------	---------

II-11 Van Slyke 酸碱滴定法测定血浆 CO ₂ 结合力	(071)
---	---------

II-12 EDTA 配位滴定法测定血清(浆)钙	(074)
--------------------------------	---------

II-13 氧化还原滴定法测定水果蔬菜中 V _C 含量	(076)
--	---------

III 综合实验	(078-095)
----------------	-------------

III-01 血清 γ 球蛋白的分离纯化	(078)
-----------------------------------	---------

III-02 ALP 的分离制备及其动力学(K _m 值)测定	(082)
---	---------

III-03 质粒的分离纯化与鉴定	(090)
-------------------------	---------

III-04 急性肝损伤动物模型的建立及其检测的实验报告	(094)
------------------------------------	---------

IV 课题实验	(096-105)
---------------	-------------

IV-01 ____对____样品中维生素 C 影响作用的动态观察	(096)
---	---------

IV-02 血糖测定方法之探讨	(099)
-----------------------	---------

IV-03 原料肝素钠生产的最佳洗脱方式和条件的探索	(101)
----------------------------------	---------

IV—04 FDP 测定对_____患者纤溶亢进的动态观察 (103)

V 补充实验与参考资料(见校园网:精品课程☆生物化学) (106-178)

★补充一 PCR 技术训练报告 ()

★补充二 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术训练 ()

★补充三 动物肝脏 RNA 的制备(苯酚法)和测定 ()

★补充四 肝素钠生产的最佳洗脱方式和条件的探索 ()

※参考资料一 维生素 C 的常用测定方法(2, 6-二氯酚靛酚法、比色法(2, 4-二硝基苯肼法、碘滴定法) ()

※参考资料二 细胞增殖与凋亡的研究方法(细胞形态学鉴定—吖啶橙荧光染色法, DNA 片段鉴定—琼脂糖凝胶电泳法, DNA 片段鉴定—原位末端标记分析) ()

※参考资料三 细胞核的分离 ()

※参考资料四 离子交换柱层析分离核苷酸 ()

※参考资料五 课题实验的申报 ()

※参考资料六 课题实验的选题与设计(科学研究方法简介) ()

※参考资料七 课题实验(亦即科研)资料的整理与分析 ()

※参考资料八 课题实验报告与科研论文的写作 ()

实 验 须 知

一、实验安排及考评

原定 04 级五年制学生以开设[自主性(小)课题实验]和[综合性(大)实验]为主, 现因条件尚未成熟, 仍以开设[基本技术实验]为主。实验教材和实验报告中的相关内容便做了相应调整。而[基本技术实验]报告仍保留了新的格式和要求。

二、实验过程的基本常识与要求

(一)实验前

学生必须进行预习, 以求:

1. 明确实验目的, 弄清实验原理, 复习有关理论。
2. 了解操作要点, 做好实施计划与安排, 以便有计划有步骤地按实验操作规程进行实验, 获得真正的技术技能训练。
3. 增强实验的主动性和提高实验的成功率。预习可收到“未出门先知天下三分”之效, 即未做实验便先知实验现象和结果, 从而能大大降低实验的难度, 减少实验的盲目性, 提高实验的成功率。由于实验现象和结果不再是分散心思和精力的未知数, 这就有利于把时间和精力放在为应证这些实验现象和结果的方法手段的学习训练上, 放在追问这些实验现象和结果发生的原因上, 以加强技术技能和实验思维的培养和锻炼。

(二)实验中

学生进入实验室和在整个实验过程中:

1. 不要用手指接触干净玻璃仪器的内部; 洗净的仪器应放在架上或干净纱布上晾干; 不要用量瓶作盛器, 不要盖错量瓶等带有磨口的玻璃塞子, 对暂时不用的这类容器, 要用纸条把瓶塞和瓶口隔开; 除微生物实验操作要求外, 不要用棉花堵塞瓶口或管口; 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。
2. 不要用滤纸称量药品、记录资料、充当标签; 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口。
3. 标签的大小应与容器相称, 标签上要写明物质的名称、规格、浓度、配制的日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的 2/3 处, 试管等细长形容器则贴在上部; 使用铅笔写标记时, 要在玻璃仪器的毛面, 如用玻璃蜡笔或水不溶性油漆笔, 则写在玻璃容器的光面。
4. 标准试剂不能直接从标准试剂瓶中随取随用, 只能根据总用量一次性取入另瓶中再用。取用试剂后, 需立即将瓶塞盖严, 放回原处。取出的试剂和标准溶液, 如未用完, 切勿倒回原瓶内。
5. 吸量管、注射器等取用血液或易凝标本或试剂后, 应立即冲洗, 以免阻塞; 一般容量仪器的容积都是在 20℃ 下校准的。使用时如温度差异在 5℃ 以内, 容积改变不大, 可以忽略不计。
6. 用实验动物进行实验时, 不许戏弄动物或无端伤害、解剖或处死动物。绝不能用动物、手术器械开玩笑。必须按照规定方法进行动物实验操作,
7. 公用吸量用具, 制备用具, 小心使用, 尽快使用, 不可污染, 用后放还原处。不得

随意挪动，更不得转移或抢先拿走、藏潜其零配件而影响别人使用。

8. 使用贵重精密仪器如分析天平、比色计、分光光度计、酸度计、冰冻离心机、层析设备等，应十分重视，加倍爱护。使用前，应熟知使用方法，若有问题，随时向实验老师或管理技师请教。使用中，要严格遵守操作规程，发生故障时，应立即停止使用，按程序关闭仪器，万不得已可直接关闭电源，并报告管理人员，不得擅自拆修。使用后，应按要求作好使用登记。

9. 爱护实验室内一切设备设施，节约试剂、水电等消耗品。使用玻璃仪器要大胆、细心，稳拿轻放。使用生疏仪器仪表，应先请教老师，学会后再用。损坏任何仪器、仪表、器材、器皿、设施都应立即报告老师，说明原因，填表登记，教师签署处理意见，交实验准备室或办公室。

10. 用过的滤纸、棉花、纱布条、火柴梗、棉杆丢入废纸篓，层淀物、浓酸、浓碱等倒入指定的废液缸中，切勿倒入水槽。

12. 实验中必须严肃认真，一丝不苟，按操作规程独立细心、井然有序地操作，仔细观察、记录和分析出现的现象和结果。合理安排布局实验工作空间和台面，始终保持实验室内的整齐、清爽、安静、安全和卫生。

(三)实验后

学生结束实验到离开实验室前，应：

- 1.及时清理和放好自己的实验资料，抓紧清洁仪器设备，清洗器械器皿，并放还原处，
- 2.做好大型贵重精密仪器，贵重试剂标本和剧毒药品的使用记录和登记，
- 3.对损坏的仪器、仪表、器材、器皿、设施，按指导教师签署的处理意见，即时办理赔偿、修理和调换手续，
- 4.离开实验室前，清点整理好自己的台面、抽屉、试剂架上的物品，
- 5.轮到做清洁的学生，必须将整个实验室的台面、地面、门窗、水槽、讲台、黑板打扫干净，仪器仪表、制备用具、吸量用具、试剂试药、清洁用具以及桌凳，必须清洁、整齐、到位，最后关好门窗水电，报告老师验收后，方可离开实验室。

三、玻璃仪器的洗涤及各种洗液的配制

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否，直接影响实验结果，往往由于仪器的不清洁或被污染而造成较大的实验误差，甚至会出现相反的实验结果。因此，玻璃仪器的洗涤清洁工作是非常重要的。

(一)新购玻璃仪器的清洗

新购买的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质，可先用洗涤灵稀释液、肥皂水或去污粉等洗刷，再用自来水洗净，然后浸泡在 1%~2% 盐酸溶液中过夜（不少于 4 小时），再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次，在 80~100℃ 烘箱内烤干备用。

(二)使用过的玻璃仪器的清洗

1. 一般玻璃仪器：如试管、烧杯、锥形瓶等（包括量筒），先用自来水洗刷至无污物，再选用大小合适的毛刷沾取洗涤灵稀释液或浸入洗涤灵稀释液内，将器皿内外（特别是内壁）

细心刷洗，用自来水冲洗干净后，蒸馏水冲洗 2~3 次，烘干或倒置在清洁处，干后备用。凡洗净的玻璃器皿，不应在器壁上带有水珠，否则表示尚未洗干净，应再按上述方法重新洗涤。若发现内壁有难以去掉的污迹，应分别试用下述各种洗涤方法予以清除，再重新冲洗。

2. 量器：如吸量管、滴定管、量瓶等。使用后应立即浸泡于凉水中，勿使物质干涸。工作完毕后用流水冲洗，以除去附着的试剂、蛋白质等物质，晾干后浸泡在铬酸洗液中 4~6 小时（或过夜），再用自来水充分冲洗、最后用蒸馏水冲洗 2~4 次，风干备用。

3. 其他：装过或沾污过传染性样品，如病毒、传染病患者的血清等的容器，应先进行高压（或其他方法）消毒后再进行清洗。盛过各种有毒药品，特别是剧毒药品和放射性同位素等物质的容器，必须经过专门处理（见有关专著），确知没有残余毒物存在方可进行清洗。

（三）洗涤液的种类和配制方法

1. 酸洗液（重铬酸钾-硫酸洗液，简称为洗液）广泛用于玻璃仪器的洗涤。常用的配制方法有下述四种：

（1）取 100ml 工业浓硫酸置于烧杯内，小心加热，然后小心慢慢加入 5g 重铬酸钾粉末，边加边搅拌，待全部溶解后冷却，贮于具玻璃塞的细口瓶内。

（2）称取 5g 重铬酸钾粉末置于 250ml 烧杯中，加水 5ml，尽量使其溶解。慢慢加入浓硫酸 100ml，随加随搅拌。冷却后贮存备用。

（3）称取 80g 重铬酸钾，溶于 1000ml 自来水中，慢慢加入工业硫酸 100ml（边加边搅动）。

（4）称取 200g 重铬酸钾、溶于 500ml 自来水中，慢慢加入工业硫酸 500ml（边加边搅动）。

2. 浓盐酸（工业用）：可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

3. 5%草酸溶液：用数滴硫酸酸化，可洗去高锰酸钾的痕迹

4. 5%~10%磷酸三钠（ $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）溶液：可洗涤油污物。

5. 30%硝酸溶液：洗涤 CO_2 测定仪器及微量滴管。

6. 5%~10%乙二胺四乙二钠（ EDTA-Na_2 ）溶液：加热煮沸可洗脱玻璃仪器内壁的白色沉淀物。

7. 尿素洗涤液：为蛋白质的良好溶剂，适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

8. 酒精与浓硝酸混合液：最适合于洗净滴定管，在滴定管中加入 3mL 酒精，然后沿管壁慢慢加入 4mL 浓硝酸（比重 1.4），盖住滴定管管口，利用所产生的氧化氮洗净滴定管。

9. 有机溶剂：如丙酮、乙醚等可用于洗脱油脂、脂溶性染料等，二甲苯可洗脱油漆的污垢。

10. 氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液：是两种强碱性的洗涤液，对玻璃仪器的侵蚀性很强，清除容器内壁污垢，洗涤时间不宜过长。使用时应小心慎重。

上述洗涤液可多次使用，但是使用前必须将待洗涤之玻璃仪器先用水冲洗多次，除去肥皂、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂时，应先用软纸擦去，然后用乙醇或乙醚擦净后才能使用洗液，否则会使洗涤液迅速失效。例如：肥皂水，有机溶剂（乙醇、甲醛等）

及少量油污皆会使重铬酸钾-硫酸洗液变绿，减低洗涤能力。

四、实验室的安全与防护

(一)实验室安全知识

生物化学实验室中，不安全的隐患因素很多，常依赖水、电、煤气工作，常使用高温、高压、高速旋转及强制冷仪器与设备，常接触有毒性、腐蚀性、放射性和易燃、易爆的化学药品，以及有易感性的血清、细菌等生物标本，常常使用易碎的玻璃和瓷质器皿，以及使用难于肯定的危害作用的进口试剂试药和生物产品…，因此，必须十分重视安全工作，具有安全意识和知识。

1.进入实验室开始工作前应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水、电、煤气的开关关好，门窗锁好。

2.使用煤气灯时，应先将火柴点燃，一手执火柴靠近灯口，一手慢开煤气门。不能先开煤气门，后燃火柴。灯焰大小和火力强弱，应根据实验的需要来调节。用火时，应做到火着人在，人走火灭。

3.使用电器设备（如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等）时，严防触电，绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。应该用试电笔检查电器设备是否漏电，凡是漏电的仪器，一律不能使用。

4.使用浓酸、浓碱，必须极为小心地操作，防止溅失。用吸量管量取这些试剂时，必须使用橡皮球，绝对不能用口吸取。若不慎溅在实验台或地面，必须及时用湿抹布擦洗干净。如果触及皮肤应立即治疗。

5.使用可燃物，特别是易燃物（如乙醚、丙酮、乙醇、苯、金属钠等）时，应特别小心。不要大量放在桌上，更不应放在靠近火焰处。只有在远离火源时，或将火焰熄灭后，才可大量倾倒易燃液体。低沸点的有机溶剂不准在火焰上直接加热，只能在水浴上利用回流冷凝管加热或蒸馏。

6.如果不慎倾出了相当量的易燃液体，则应按如下法处理：

(1)立即关闭室内所有的火源和电加热器。

(2)关门，开启小窗及窗户。

(3)用毛巾或抹布擦拭洒出的液体，并将液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

7.用油浴操作时，应小心加热，不断用温度计测量，不要使温度超过油的燃烧温度。

8.易燃和易爆炸物质的残渣（如金属钠、白磷、火柴头）不得倒入污物桶或水槽中，应收集在指定的容器内。

9.废液，特别是强酸和强碱不能直接倒在水槽，应先稀释，然后倒入水槽，再用大量自来水冲洗水槽及下水道。

10.毒物应按实验室的规定办理审批手续后领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

(二)实验室灭火法

实验中一旦发生了火灾切不可惊慌失措，应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电

源。然后根据具体情况积极正确地进行抢救和灭火，常用的方法有：

- 1.在可燃液体燃着时，应立即拿开着火区域内的一切可燃物质，关闭通风器，防止扩大燃烧。若着火面积较小，可用石棉布、湿布、铁片或沙土覆盖，隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻，避免碰坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃皿，导致更多的溶剂流出而再着火。
- 2.酒精及其他可溶于水的液体着火时，可用水灭火。
- 3.汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应用石棉或砂土扑灭。绝对不能用水，否则反而会扩大燃烧面积。
- 4.金属钠着火时，可把砂子倒在它的上面。
- 5.导线着火时不能用水及二氧化碳灭火器，应切断电源或用四氯化碳灭火器。
- 6.衣服被烧着时切忌奔走，可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动，以灭火。
- 7.发生火灾时应注意保护现场。较大的着火事故应立即报警。

附表 1 某些物质燃烧时应选用的灭火剂

燃 烧 物 质	应选用灭火剂	燃 烧 物 质	应选用灭火剂
苯胺	泡沫，二氧化碳	松节油	喷射水，泡沫
乙炔	水蒸气，二氧化碳	火漆	水，二氧化碳
丙酮	泡沫，二氧化碳，四氯化碳	磷	砂，二氧化碳，泡沫，水
硝基化合物	泡沫	赛路路	水
氯乙烷	泡沫，二氧化碳	纤维素	水
钾，钠，钙，镁	砂	橡胶	水
松 香	水，泡沫	煤油	泡沫，二氧化碳，四氯化碳
苯	泡沫，二氧化碳，四氯化碳	漆	泡沫
重 油		蜡	泡沫
润滑油/植物油	喷射水，泡沫	石蜡	喷射水，二氧化碳
石 油		二硫化碳	泡沫，二氧化碳
醚 类	水	醇类	水
醚 类	泡沫，二氧化碳	醇类	泡沫，二氧化碳

(三)实验室急救

在实验过程中不慎发生受伤事故，应立即采取适当的急救措施。

- 1.受玻璃割伤及其他机械操作：首先必须检查伤口内有无玻璃或金属等物碎片，然后用硼酸水洗净，再涂擦碘酒或紫药水，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血，立即到医院诊治。
- 2.烫伤：一般用浓的（90%~95%）酒精消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红痛或红肿（一级灼伤），可擦医用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处；若皮肤起泡（二级灼伤），不要弄破水泡，防止感染；若伤处皮肤呈棕色或黑色（三级灼伤），应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好，急送医院治疗。
- 3.强碱（如氢氧化钠、氢氧化钾）、钠、钾等触及皮肤而引起灼伤时，要先用大量自来水冲洗，再用 5%硼酸溶液或 2%乙酸溶液涂洗。
- 4.强酸、溴等触及皮肤而致灼伤时，应立即用大量自来水冲洗，再以 5%碳酸氢钠溶液或 5%氢氧化铵溶液洗涤。

5.如酚触及皮肤引起灼伤，应该用大量的水清洗，并用肥皂和水洗涤，忌用乙醇。

6.若煤气中毒时，应到室外呼吸新鲜空气，若严重时应立即到医院诊治。

7.水银容易由呼吸道进入人体，也可以经皮肤直接吸收而引起积累性中毒，严重中毒的征象是口中有金属味，呼出气体也有气味；流唾液，牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色；淋巴腺及唾液腺肿大。若不慎中毒时，应送医院急救。急性中毒时，通常用碳粉或呕吐剂彻底洗胃，或者食蛋白（如1升牛奶加3个鸡蛋清）或蓖麻油解毒并使之呕吐。

8.触电：解电时可按下述方法之一切断电路：

(1)关闭电源；(2)用干木棍使导线与被害者分开；(3)使被害者和土地分离，急救时急救者必须做好防止触电的安全措施，手或脚必须绝缘。

(陈华绪)

I.生化常规实验技术

I-01. 普通离心技术操作训练

【实验目的】

1. 掌握离心分离的原理及操作程序,
2. 熟悉普通离心机的安装调试、安全使用和日常保全,
3. 了解普通离心机主机的基本构件和工作原理。

【实验原理】

一、离心力及其作用

当悬浮液绕轴旋转时,悬浮中的微粒就同时受到背向转轴方向的离心力和正向转轴方向的介质浮力的双向作用,微粒的运动轨迹取决于所受合力的方向。根据物理学原理推导可知: $F_{\text{合}} = F_{\text{离}} - F_{\text{介}} = V\rho \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 - V\sigma \times 4\pi^2 N^2 r / 3600 = V4\pi^2 N^2 r / 3600 \times (\rho - \sigma)$, 式中 V 表示微粒的体积, N 表示每分钟的转数, r 表示微粒至转轴的距离, ρ 与 σ 分别表示微粒与其介质的密度。显然, 当 $\rho = \sigma$ 时, $F_{\text{合}} = 0$, 微粒受力平衡, 故将维持距转轴恒定的距离转动, 也就不可能被分离; 当 $\rho < \sigma$ 时, $F_{\text{合}} < 0$, 微粒主要受向心力作用, 故而将向转轴方向移动, 直至浮到介质表面; 而当 $\rho > \sigma$ 时, $F_{\text{合}} > 0$, 微粒主要受离心力作用而向远离转轴方向移动, 直至沉淀到容器底部。因此, $\rho > \sigma$ 是微粒从悬浮液中进行离心分离的基本条件。使用普通离心机的根本目的就在于使这样的微粒从悬浮液中分离出来。

从理论上讲, 凡是能通过离心分离的微粒在悬浮液静置时, 受重力与浮力的共同作用也能自动沉降而得以分离, 只是分离所需时间较长, 效果较差, 沉降本领较弱。一般常用相对离心力 (RCF) 的大小来表示离心分离的本领强弱。相对离心力是指微粒在离心分离时所受的合力 ($F_{\text{合}}$) 与在静置分离时所受合力 ($F'_{\text{合}}$) 的比值, 而 $F'_{\text{合}} = V\rho \times g - V\sigma \times g = Vg \times (\rho - \sigma)$, 式中 g 为重力加速度, 故 $RCF = F_{\text{合}} / F'_{\text{合}} = 4\pi^2 N^2 r / 3600g$, 由于 $4\pi^2 N^2 r / 3600$ 就是微粒处的角加速度, 所以相对离心力又是微粒在离心时的角加速度与在静置时的重力加速度之比。很明显, 只要调节 N 或/和 r 就可影响 RCF 的值, 从而改变其离心分离本领。实验中 RCF 的值常用多少倍于重力加速度表示, 如 $1000 \times g$ 。

二、离心力与作用时间的积累效应

微粒在悬浮液中被分离的速度快慢除与转动的转数大小有关外, 还与离心时间长短有关, 即离心力作用于微粒上具有时间积累效应。衡量时间积累效应高低的物理量常用冲量矩的大小来表示, 冲量矩 (Lt) 的值等于离心力的力矩 (L) 与离心时间 (t) 的乘积, 依物理学原理可推导出: $Lt = (2\pi Rn/60)^2 \times t$, 即冲量矩的大小与转速 (N) 的平方和时间的乘积成

正比。

由此可见，在同一离心转头的条件下 (N , r 一定)，转动时间越长，冲量矩越大，分离效果越好。对同一悬浮液，因转动的不同而有不同的冲量矩，若调节影响冲量矩的两个可变因子即转速 (N) 和时间 (t)，可以在较低转、速较长时间得到较高转速、较短时间同样的冲量矩，从而得到相同的分离效果。但是，若转速相差太大，则会受扩散作用影响而使较低转速离心的分离效果下降

三、普通离心机的组成

普通离心机分水平式和斜角式两种，其构造简单、功能单一，只适用于一般物质的离心分离。实验室常用的水平式离心机主要由驱动电机、变速箱与调速手柄、旋转盘(包括转轴及其支架)、离心筒、带盖的离心腔以及机座等部分组成。

【实验准备】

一、离心机的准备

在离心操作前必需首先准备好离心机。备机包括：1. 机型的选择：即根据具体的实验要求选择水平式离心机或斜角式离心机。2. 离心套筒的准备：检查离心套筒内是否有橡皮缓冲胶垫，胶垫上若附着碎玻璃等杂物应清除。3. 离心机检查：检查离心机安放是否平稳，转轴是否牢固，润滑是否良好，离心腔内有无异物，缸盖能否锁紧等。

二、电源的准备

电源应选择与离心机使用说明书相吻合的电源，电源插座必须有地线以保证离心安全。若实验室没有合适的电源，则应重新安装电源线，电源插座应靠近离心机以方便操作。

三、平衡附件的准备

平衡附件包括：1. 天平：普通离心机用 $1/1000$ 的台平进行离心平衡，台平上固定两个等重的烧杯，以备平衡之用。2. 离心管和配平管：离心管用于装离心液，配平管用于装配平液（注意：配平管的长度一般不宜超过离心管的长度，以避免水平离心时被转轴打碎）。3. 烧杯与皮头吸管：烧瓶用来盛配平液，皮头吸管用来吸配平液进行配平。

四、离心液的准备

离心液应根据具体的实验要求进行准备。

五、试机

在以上准备完成以后，应先让离心机进行空载运转，密切观察空载运转情况是否正常，在无异常时方可进行离心。

【实验操作】

1. 取离心管装上离心液放于一对重量相近的离心套筒的橡胶孔中，离心液面距离离心管口至少应留 2cm 的距离，以免离心时离心液溅出。

2. 调平称量天平。

3. 将置于离心机对称位置上的离心套筒、离心管及内盛物配平，相差不超过 0.1 克。
4. 将平衡好的离心套筒放于离心机支架对称位置的吊环中。
5. 检查离心机是否安放平稳，电源开关及调速杆是否位于“零位”，若不在则应复位。
6. 关上离心机缸盖，锁牢。
7. 插上电源插头，打开电门开关。
8. 用调速杆缓慢加速至所需速度，维持所需时间。
9. 离心完毕，将调速杆缓慢退回到“零位”，关掉电门，拔下电源插头，任离心机自停（切记：不能用手助停，以免沉淀物泛起、损坏离心转轴、碰伤人的肢体）。
10. 待离心机完全停止转动后，打开缸盖取出离心套筒及离心管。
11. 清洁离心套筒、离心管及离心腔，关闭缸盖。

【注意事项】

1. 离心前必需将放置于对称位置上的离心套筒、离心管及离心液进行精确平衡，重量差不超过 0.1 克。对于高速和超速离心机，不仅要求重量平衡，而且要求配平液的密度与离心液的密度相等，以达到力矩平衡。
2. 离心机安放要求水平、稳固，转轴上的支架要牢固，转轴润滑良好，吊栏应活动自如，保证离心机的正常运转。
3. 离心管盛液不宜过满，避免腐蚀性液体溅出腐蚀离心机，同时造成离心不平衡。
4. 离心开始前应检查转头是否拧紧。放入离心套筒后应紧盖、锁牢，防止意外事故的发生。离心完毕应关电门、拔掉电源插头任机自停，严禁用手助停，以免伤人损机，使沉淀泛起。
5. 注意离心机的保养和“四防”。离心机使用完毕，要及时清除离心机内水滴、污物及碎玻璃渣，擦净离心腔、转轴、吊环、套筒及机座。经常做好离心机的防潮、防过冷、防过热、防腐蚀药品污染，延长使用寿命。
6. 离心过程若发现异常情况应立即拔下电源插头，然后，再进行检查。如听到碎玻璃渣声响，可能是试管被打碎，应重新更换试管。若整个离心机座转动起来，则是严重不平衡所至。若离心机不转动，则可能是电机无电或保险丝烧断，应重新更换保险丝。若发生机械或电机故障，应报告指导教师请专门维修人员检修。

【思考题】

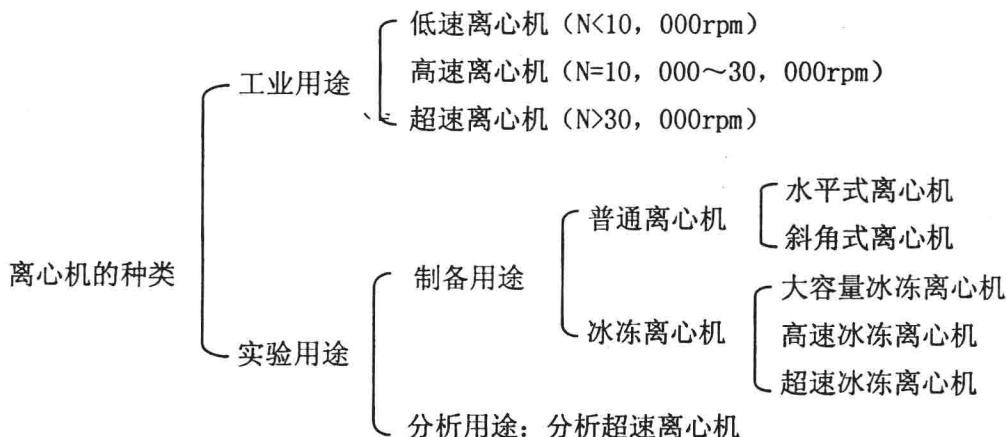
1. 使用离心机的目的是什么？
2. 离心机有哪些种类？
3. 在离心过程中，微粒所受离心力的大小如何计算？
4. 在离心过程中，若微粒的密度 ρ 小于介质的密度 σ 时，被离心微粒将作何运动？
5. 离心力与作用时间的积累效应可用冲量矩表示，其计算公式如何？
6. 普通离心机的保养应做到哪“四防”？

7. 普通离心机在使用前应先检查哪些项目?
8. 离心平衡的要点有哪些?
9. 普通离心机的操作全过程有哪些要点?
10. 离心过程中发现异常情况首先应如何处理?
11. 离心完毕为什么只能任机自停而不能用手或其它方法助停?
12. 离心机使用完毕, 还需做哪些善后工作?
13. 何为相对离心力?
14. 普通离心机的主要应用范围有哪些?
15. 超速离心机主要由哪些系统构成?
16. 普通离心机操作 I: 从盛液——平衡?
17. 普通离心机操作 II: 从入机——起动?
18. 普通离心机操作 III: 从盛液——停机?
20. 离心操作的注意事项有哪些?

附 离心技术概述

离心技术是利用离心力, 依据物质的沉降系数、扩散系数和浮力密度的差异而进行物质的分离、浓缩和分析的一种专门技术。各种离心机是实现其技术目的仪器保证。

离心技术就其原理来说属于一种物理的技术手段, 目前在农业、医药、食品卫生、生物制品、生物工程、细胞生物学、分子生物学和生物化学等诸多领域里得到了广泛的应用, 使离心机, 尤其是超速离心机已成为现代生物化学实验室中不可缺少的必备设备。为了满足生产、科研和教学的不同需要, 不同类型、不同规格和不同用途的离心机应运而生, 且随着整个科学技术的发展不断地得到改进、提高和更新。现将离心机分类如下:



(注: N—离心机每分钟的转数)

1. 不同类型的离心机不仅具有不同的构造,而且具有不同的应用范围。普通离心机的最大转速在 10000 rpm 以下,最大相对离心力小于 $10000\times g$,容量从几十毫升至几升,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。这种离心机多用交流整流电动机驱动,电机碳刷易磨损,转速由电压调压器调节,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,因此离心前精确平衡离心管及其内容物极为重要,否则易造成的离心机损坏。在现代实验室中,普通离心机通常在下列情况下用于物质的分离和提取:(1)沉淀有粘滞;(2)沉淀颗粒小,容易透过滤纸;(3)沉淀量过多而疏松;(4)沉淀量过少,而需要定量分析;(5)母液粘稠;(6)母液量很少,分离时需减少损失;(7)沉淀和母液需迅速分离;(8)一般胶体溶液。高速离心机能够对样品溶液中的悬浮物质进行高纯度的分离、浓缩、精制和提取,多用于血液、细胞、蛋白质、酶、病毒、激素等的分离制备。超速离心机目前主要用于:(1)测定生物大分子和高分子聚合物的沉降系数(S)、扩散系数(D)和分子量(M);(2)研究生物大分子的大小和形状;(3)研究生物大分子的缔合、离解和降解;(4)追随分离高分子的提纯过程,鉴定其均一程度,测定其组成和浓度;(5)分离提纯血清脂蛋白;(6)发现异常血清蛋白质成分等。

2. 高速冷冻离心机一般最大转速为 10000~30000rpm,最大相对离心力为 $90000\times g$ 左右,最大容量可达 3 升,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、一般都有制冷系统和真空系统,以消除高速旋转时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 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$,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、硫酸铵沉淀物和免疫沉淀物等的分离与纯化工作,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. 超速离心机一般转速可达 50000~80000 rpm,相对离心力最大可达 $510000\times g$ 左右,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 升,分离的形式为差速沉降分离和密度梯度区带分离。超速离心机的出现,使生物科学的研究领域有了新的扩展,它既可以分离细胞的亚细胞器结构,也可以分离病毒、核酸、蛋白质和多糖等生物大分子。

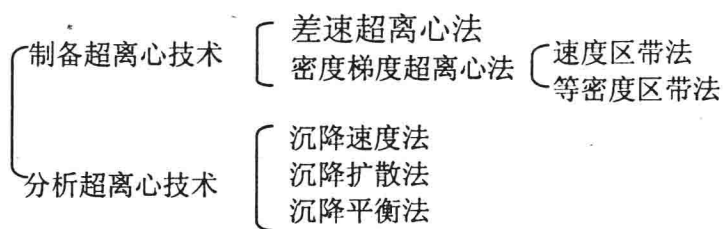
超速离心机主要由驱动系统、速度和温度控制系统、真空系统和转头四部分组成。超速离心机的驱动装置由水冷或风冷电动机通过精密齿轮箱或皮带变速,或直接用变频感应电机驱动,并由微机精确控制。驱动轴的直径较细,在旋转时有一定的弹性弯曲,以适应转头轻度的不平衡,而不致于引起震动或转轴损伤。除速度控制系统外,超速离心机还有过速保护系统,以防止转速超过转头最大规定转速时引起转头的撕裂或爆炸。离心腔一般抗爆炸装甲钢板密闭,以增加安全性能。温度控制由安装在转头下面的红外线感受器直接连续监测离心腔的温度,以保证准确灵敏的温度调控。超速离心机装有真空系统。一般离心速度在 2000 rpm

以下时，空气与转转头之间的磨擦产生的热量少，速度超过 20000 rpm 时，磨擦产生的热量显著增大，当速度在 40000 rpm 以上时，由磨擦产生的热量就成为严重问题。为此，将离心腔密封，并由真空泵系统抽成真空，减小磨擦力，这样才能保证超速离心机正常工作，达到所需的超高转速。

4. 分析性离心机使用了特殊设计的转头和光学检测系统，以便连续监视物质在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为椭圆形，以避免应力集中于孔处。转头通过一个柔性轴联接到一个高速驱动装置上，转头在冷冻真空腔中旋转，转头上有 2~6 个装离心杯的小室，离心杯为上下透光的扇形石英杯，离心机中装有光学系统，在整个离心过程中可通过紫外吸收或折射率的变化监测离心杯中的沉降物质，在预定期间可以拍摄沉降物质的照片，分析离心杯中物质的沉降情况，计算出样品颗粒的沉降速度。分析性超速离心机的主要优点就是在短时间内，用少量样品就可以得到被离心物质的许多重要信息，如某种生物大分子是否存在、大致含量、沉降系数、分子大小，是否均一、各组份的比例，以及测定生物大分子的分子量，检测生物大分子的构象变化等。

从离心机的分类不难看出离心机的研制历史经历了一个由低级到高级，由简单到复杂的发展过程。高速离心机的出现，使离心机的应用范围进一步扩大。它不仅可以进行简单的制备分离，而且能够进行沉降、差速离心、区带离心等研究分析。为了降低高速离心机高速旋转时产生的空气阻力、摩擦阻力、热量，以及噪声，保持被分离生物制品的天然性质，现代高速离心机都采用了制冷设备以降低温度，采用真空设备以降低空气阻力。此举进一步提高了离心机的转速，为超速离心机的诞生奠定了坚实的基础。超速离心机是二十世纪二十年代才发展起来的一种先进设备。1924 年瑞典科学家 Svedberg 首先设计制造了分析超速离心机，其转速可达 10,000~15,000rpm。1947 年应用 Svedberg 设计的油涡轮机超速离心机和 Beams-Pickels 的空气涡轮超速离心机商品相继问世。1959 年出现了电动超速离心机，二十世纪七十年代初研制出了制备型超速离心机，七十年代末至八十年代初，采用调频电机直接驱动、电子计算机程控和实验数据微机自动化处理的超速离心机面市，使超速离心机的控制功能和数据处理更加精确可靠，操作简便，转速不断提高。1979 年报道，实验用超速离心机的最高转速可达 120,000rpm。二十世纪八十年代中期，超速离心机的最高转速已高达 160,000rpm。

随着超速离心机的发展，与之配套的超速离心技术也日渐完善，形成了制备超离心和分析超离心两大类技术。



超速离心机不仅可以用于一般的物质分离、制备，而且可以用于生物大分子的鉴定以及分子性质的分析和分子量的测定，从而极大地扩大了离心机的应用范围。

从离心机的发展历史，我们不难预测它的未来。从转速来看将进一步提高，由超速发展成超高速，以满足分析一般低分子有机物的需要。调频电机的使用已经大大提高了超速离心机的转速，随着调频电机的进一步完善及更新，必将进一步提高超速离心机的转速，使超高速离心机及超超速离心机的诞生成为现实。从控制处理能力来看，由于电子计算机技术直接应用于离心机，使未来的离心机控制更加精确化、操作简便程控化、结果及数据处理完全自动化。同时，多种分析技术、多种保护装置、多种自检修系统应用于离心机，未来的离心机将是一种多功能的混合仪器。它不仅可以进行离心分析及制备，还可以进行其它非离心用途的分析。同时，它的使用更加安全可靠，可自我进行一般故障的检修，警示离心机使用过程的错误，保护离心机不被误用损坏，因而其使用寿命更长。总之，未来的离心机将朝着完全人工智能的方向发展。

(陈建业)