

□ 全国高等学校“十三五”农林规划教材

Biochemical  
Techniques

# 生物化学 实验技术

(第2版)

主编 陈鹏 郭蔼光

高等教育出版社



■ 全国高等学校“十三五”农林规划教材

# 生物化学实验技术

(第2版)

主 编 陈 鹏 郭嵩光

副 主 编 张 大 鹏 刘 香 利 倪 志 勇

参 编 (按姓氏笔画顺序)

刘 华 伟 文 建 雷 刘 香 利 肖 亮

张 劲 张 斌 张 大 鹏 张 新 梅

陈 鹏 易 晓 华 武 永 军 金 维 环

倪 志 勇 徐 全 乐 郭 嵩 光 韩 召 奋

谢 长 根

主 审 张 林 生

高等教育出版社

## 内容简介

本书是根据近些年来生物化学实验技术教学的发展和教学实践,在普通高等教育“十一五”国家级规划教材《生物化学实验技术》第1版的基础上修订而成的,是生物类专业及农科各专业本科生生物化学等实验课教材。教材分为实验技术理论、基础性实验和综合性实验三部分。实验技术理论部分主要介绍了生物化学常用的离心技术、层析技术、电泳技术以及生物大分子制备技术。基础性实验部分适用于生物类和农科各专业生物化学实验基本技能的训练;综合性实验部分适用于相关专业本科生生物化学综合设计性实验技能与素质训练,也可用于研究生教学参考。本书附录列举了生物化学实验室安全与防护、常用试剂和溶液的配制以及常用的基础数据等内容。

本书内容全面、实用性强,在强化基础训练的基础上,延伸综合性和设计实验的教学内容,内容上兼具广度和深度,符合高等教育对能力和素质培养的需求。本书主要作为高等农林院校本科生的教材,也可供综合性大学、师范院校本科生使用,还可作为相关教学和科研人员的参考书。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验技术 / 陈鹏, 郭蔼光主编. --2 版  
-- 北京: 高等教育出版社, 2018. 4  
ISBN 978-7-04-048874-6

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

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第280851号

## Shengwuhuaxue Shiyán Jishu

策划编辑 孟丽 责任编辑 孟丽 特约编辑 郝真真 封面设计 赵阳  
版式设计 范晓红 责任校对 刁丽丽 责任印制 韩刚

出版发行	高等教育出版社	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
社 址	北京市西城区德外大街4号		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
邮政编码	100120	网上订购	<a href="http://www.hepmall.com.cn">http://www.hepmall.com.cn</a>
印 刷	北京东君印刷有限公司		<a href="http://www.hepmall.com">http://www.hepmall.com</a>
开 本	787mm×1092mm 1/16		<a href="http://www.hepmall.cn">http://www.hepmall.cn</a>
印 张	12.5	版 次	2007年8月第1版
字 数	390千字		2018年4月第2版
购书热线	010-58581118	印 次	2018年4月第1次印刷
咨询电话	400-810-0598	定 价	26.50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 48874-00

数字课程 (基础版)

# 生物化学 实验技术 (第2版)

主编 陈鹏 郭蔼光

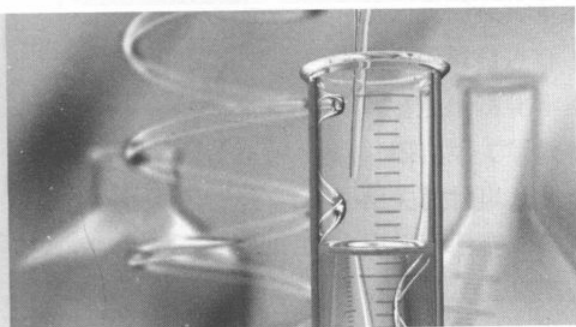


## 登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/48874>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:

[lifescience@pub.hep.cn](mailto:lifescience@pub.hep.cn)



## 生物化学实验技术 (第2版)

本数字课程是生物化学实验技术 (第2版) 的配套资源, 是利用现代信息技术整合优质教学资源的出版形式。本数字课程所列资源与教材内容相呼应, 设有实验讲解视频、教学课件、思考题与答案、参考资料等。读者可将教材与数字课程两者相结合进行拓展学习, 更好地掌握生物化学实验相关知识与技能。

用户名:

密码:

验证码:

5360 忘记密码?

登录

注册

<http://abook.hep.com.cn/48874>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



## ▶ 前言

生物化学实验技术在培养生物科学类、农林类相关专业学生科研、思维和创新能力方面有着重要的基础性地位。郭嵩光、郭泽坤主编的《生物化学实验技术》(第1版, 2007)在总结多年实验教学经验的基础上形成, 内容简明扼要, 知识系统, 重点突出。第1版教材经过多年的教学实践应用, 在多所院校生物化学实验教学中发挥了重要作用, 受到师生的普遍好评。近年来, 生物化学发展迅速, 同时我国高等教育改革也逐步深入, 各个学校实验教学软、硬件环境也不断提升, 客观上对学生生物化学实验技术的培养和综合素质提升提出了更高的要求。为此, 我们在传承第1版教材特色的基础上, 结合各校的教学实践需求, 对第1版教材进行了修订。

鉴于生物化学实验技术课程的重要性、综合性以及知识更新快的特点, 综合第1版教材使用中各方面的反馈意见和需求, 我们参考了国内外相关教材以及科研文献, 明确了本次修订的总体思路: 一是保持基本结构体系不变, 仅根据学科发展对体系进行微调, 力求结构更合理, 特色更突出; 二是结合学科发展对实验理论和技术进行更新, 力求更好地适应新时期复合型创新人才培养的需求。

本次修订按照实验技术理论、基础性实验、综合性实验的结构主线, 在第1版教材突出基本知识、基本能力培养的基础上, 强化了对生物大分子纯化理论的阐述, 较大幅度地增加了综合性、设计性实验的内容。在实验材料和内容的选择上, 充分考虑能力培养与教学学时匹配的关系, 在大量预实验的基础上形成了较为稳定的可操作性的综合性实验内容体系, 着力融入“学思结合”的教学理念, 以求改变传统生物化学实验教学中学生“照方抓药”的操作习惯。同时为促进教学资源的共享和协同提升, 本教材涉及的所有菌株、质粒等实验材料均可共享(可联系主编邮件 [chenpengnwsuaf@nwafu.edu.cn](mailto:chenpengnwsuaf@nwafu.edu.cn) 索取), 以求在共同的教学实践中对教学内容不断优化提升。

在教材修订过程中, 各章节内容由编委交叉审稿, 最后由主编陈鹏统稿定稿。本教材编写过程中, 参阅了许多学者的教材、著作以及研究

## ■ 前言

文献，在此向他们对知识传播的贡献表示最衷心的感谢。感谢西北农林科技大学教务处和生命科学学院在综合性实验教学内容的建立和实施中给予的大力支持。特别感谢高等教育出版社孟丽和郝真真两位老师在修订过程中给予了热忱帮助。

本教材从实验理论到实验教学实践，内容涉及面广，加之编者的专业范围和知识水平有限，教材中的疏漏或不妥之处在所难免，诚请广大师生和读者提出宝贵的意见，以便及时更正。

编者

2017年11月于陕西杨凌

# 目 录

## 第一部分 实验技术理论

1.1 离心技术 .....	3
1.1.1 离心沉降速率影响因素 .....	3
1.1.2 沉降系数 .....	5
1.1.3 离心设备 .....	5
1.1.4 离心分离方法 .....	7
1.1.5 离心操作的注意事项 .....	10
1.2 层析技术 .....	12
1.2.1 层析的基本概念 .....	12
1.2.2 层析的基本原理 .....	12
1.2.3 层析技术的分类 .....	13
1.2.4 柱层析简介 .....	14
1.2.5 常用的层析方法 .....	16
1.3 电泳技术 .....	21
1.3.1 电泳的基本原理 .....	21
1.3.2 影响电泳的主要因素 .....	21
1.3.3 电泳的类型 .....	22
1.3.4 醋酸纤维素薄膜电泳 .....	23
1.3.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	23
1.3.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	25
1.3.7 连续梯度电泳 .....	25
1.3.8 等电点聚焦电泳 .....	26

1.3.9 双向电泳 .....	27
1.3.10 琼脂糖凝胶电泳 .....	27
1.3.11 毛细管电泳 .....	27
1.4 生物大分子的制备技术 .....	29
1.4.1 生物大分子制备的样品前处理 .....	29
1.4.2 生物大分子的分离纯化 .....	32
1.4.3 生物大分子的保存 .....	37

## 第二部分 基础性实验

2.1 基础训练 .....	41
2.1.1 生物化学实验要求 .....	41
2.1.2 生物样品的采取、处理与保存 .....	42
2.1.3 高等植物材料丙酮粉的制备 .....	45
2.1.4 缓冲液的配制和氨基酸两性性质测定 .....	46
2.2 蛋白质和氨基酸实验 .....	50
2.2.1 蛋白质的两性性质及等电点的测定 .....	50
2.2.2 氨基酸的薄层层析 .....	52
2.2.3 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量 .....	53
2.2.4 紫外吸收法测定蛋白质含量 .....	55
2.2.5 双缩脲法测定蛋白质含量 .....	56
2.2.6 Folin- 酚法测定蛋白质含量 .....	58
2.2.7 蛋白质的沉淀与变性反应 .....	60
2.2.8 蛋白质脱盐 (透析和凝胶过滤) .....	62
2.2.9 用 DNS 法鉴定蛋白质或多肽的 N 端氨基酸 .....	65
2.2.10 等电点聚焦电泳法测定蛋白质的等电点 .....	66
2.3 酶学实验 .....	71
2.3.1 酶的基本性质 .....	71
2.3.2 过氧化氢酶活力的测定 .....	74
2.3.3 脲酶 $K_m$ 值简易测定法 .....	76
2.3.4 淀粉酶活力测定 .....	79
2.3.5 转氨酶活性鉴定 (纸层析法) .....	81

2.3.6	植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的提取及活性测定	84
2.3.7	同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	86
2.4	分子生物学基础实验	90
2.4.1	质粒 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳检测	90
2.4.2	聚合酶链反应 (PCR) 技术体外扩增 DNA	93
2.4.3	大肠杆菌感受态的制备和转化实验	95
2.4.4	PCR 产物的 T-A 克隆及重组子的蓝白斑筛选	98
2.4.5	植物基因组 DNA 提取、酶切及电泳分析	102
2.5	糖类、脂质和维生素实验	105
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	105
2.5.2	还原糖含量测定——砷钼酸比色法	107
2.5.3	糖的薄层层析	109
2.5.4	维生素 A 含量测定	111
2.5.5	维生素 C 含量测定——2,6-二氯酚靛酚法	114
2.5.6	粗脂肪含量的测定——索氏抽提法	116

### 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	121
3.1.1	蔗糖酶的提取与部分纯化	122
3.1.2	离子交换层析纯化蔗糖酶	124
3.1.3	蔗糖酶各级分活力及蛋白质含量的测定	126
3.1.4	分离产物的 SDS-PAGE 电泳检测	130
3.1.5	反应时间对产物浓度的影响	131
3.1.6	pH 对蔗糖酶活力的影响	133
3.1.7	温度对蔗糖酶活力的影响和反应活化能的测定	134
3.1.8	底物浓度对催化反应速率的影响及米氏常数 $K_m$ 和最大反应速率 $V_{max}$ 的测定	135
3.1.9	尿素 (脲) 抑制蔗糖酶的实验	137
3.2	溶菌酶的分离纯化与结晶	140
3.2.1	溶菌酶粗提液的制备	140
3.2.2	离子交换层析纯化溶菌酶	141

3.2.3	溶菌酶的透析与浓缩 .....	143
3.2.4	凝胶过滤层析纯化溶菌酶 .....	145
3.2.5	溶菌酶比活力测定 .....	146
3.2.6	溶菌酶纯度的鉴定与结晶 .....	147
3.3	猪血超氧化物歧化酶的分离纯化、活力测定及同工酶鉴定 .....	152
3.3.1	猪血 SOD 的提取纯化 .....	153
3.3.2	超氧化物歧化酶活力测定 .....	154
3.3.3	SOD 同工酶鉴定 .....	156
3.4	种子蛋白质系统分析 .....	159
3.4.1	种子蛋白质含量测定 (凯氏定氮法) .....	159
3.4.2	种子蛋白质氨基酸组分分析 (氨基酸自动分析仪法) .....	161
3.4.3	种子蛋白质组分分析 (连续累进提取法) .....	162
3.4.4	种子蛋白质亚基分析 (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法) .....	164
3.5	绿色荧光蛋白的重组表达与纯化 .....	167
附录	.....	173
附录一	实验室安全及防护知识 .....	173
附录二	常用缓冲溶液的配制方法 .....	174
附录三	硫酸铵饱和度的常用表 .....	182
附录四	相对离心力与离心机转速测算表 .....	184
附录五	常用酸碱试剂浓度信息 .....	185
附录六	透析袋的前处理 .....	185
附录七	常用蛋白酶抑制剂 .....	186

# 第一部分

# 实验技术理论



生物体内生化物质不仅组成复杂，而且在体外条件下很容易受到内外理化因素的影响而造成降解或活性丧失。因此要对生物体内特定生化物质的分子结构、理化特性及功能进行研究，首先要从生物体复杂的物质组成中分离纯化目标分子，建立在生物分子理化性质或结构差异基础上的分离技术是生物化学研究的基础。离心、层析和电泳技术被誉为生物化学研究的三大核心基础技术，本部分主要介绍这几种常用分离技术的基本原理。



# 1.1

## 离心技术

离心技术 (centrifugal technique) 是根据物质颗粒在做匀速圆周运动时受到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做高速水平旋转, 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

盛有某种悬浮物液体的容器静置时, 在重力场作用下悬浮颗粒会逐渐沉降下来。假设悬浮颗粒为刚性球状, 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;  
 $dr/dt$ ——悬浮颗粒的沉降速率;  
 $\rho_p$ ——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，则用颗粒受到的离心加速度  $\omega^2 r$  代替式 (1-5) 中的  $g$ ，其沉降速率：

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

式 (1-6) 仅适用于球形颗粒。对于非球形颗粒，沉降过程中沉降运动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  $f_0$ ，式 (1-6) 经校正可得一般状况下的沉降速率：

$$\frac{dr}{dt} = \frac{2r_p^2 (\rho_p - \rho_m) \cdot \omega^2 r}{9\eta (ff_0)} \quad (1-7)$$

从式 (1-7) 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，沉降速率  $\frac{dr}{dt}$  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  $\omega^2$  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（relative centrifugal force, 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：

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

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

式 (1-8) 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：

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

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，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，因此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型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，其  $r_p$ 、 $\rho_p$ 、 $\rho_m$ 、 $\eta$  和  $ff_0$  将是定值，式 (1-7) 表示的沉降速率  $\frac{dr}{dt}$  将与  $\omega^2 r$  成正比，可改写成：

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

式 (1-9) 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、生物大分子常用  $S$  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；

$\omega$  ——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，实验用离心机又可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)，可推断物质的纯度、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 离心机的分类

根据离心机的性能，可分为三类。

(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 mL 至几 L，分离形式为固液沉降分离，转子有角式和水平式，其转速不能严格控制，通常不带冷冻系统，在室温下操作，用于收集易沉降的大颗粒物质，如红细胞、酵母细胞等。

(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，分离形式也为固液沉降分离，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 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ，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，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 $50\,000\sim 80\,000\text{ r/min}$ ，相对离心力最大可达 $510\,000\times g$ ，离心容量由几十 mL 至 2 L，分离形式为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，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与速度控制、温度控制、真空系统和转头四部分组成。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，并由微机进行控制，由于驱动轴的直径较细，因而在旋转时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，超速离心机还有一个过速保护系统，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，这是其与高速离心机的主要区别。离心机转速在 $2\,000\text{ r/min}$ 以下时，空气与旋转转头之间的摩擦只产生少量的热；转速超过 $20\,000\text{ r/min}$ 时，由摩擦产生的热量显著增大；当转速在 $40\,000\text{ r/min}$ 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) 角式转头：角式转头是指离心管腔与转轴成一定倾角的转头。这种转头是由一块完整的金属制成的，其上有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。该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：水平转头是由吊着的 4 或 6 个自由活动的吊桶（离心管套）构成的。当转头静止时，吊桶垂直悬挂，当转头转速达到 $200\sim 800\text{ r/min}$ 时，吊桶甩至水平位置。这种转头最适合作密度梯度区带离心，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，转子桶中装有十字形隔板装置，将桶内分隔成 4 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：垂直转头其离心管垂直放置，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：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 管性能最好。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。

### 1.1.3.4 分析型离心机

分析型离心机使用特殊设计的转头和光学检测系统，以便连续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。此转头通过一个柔性的轴连接到一个高速的驱动装置上，转头在一个冷冻和真空的腔中旋转，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，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相底板上产生了一个“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 离心分离方法

离心技术可用来分离细胞、亚细胞结构或生物大分子。根据分离原理不同，离心分离方法可分为差速离心法和密度梯度离心法两类。

### 1.1.4.1 差速离心法

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