

第一章 生物化学实验样品 制备技术

生物化学实验中常常涉及生物样品的制备。生物样品包括植物样品（如植株组织样品、子粒样品、瓜果样品等）、动物样品（如血液样品、组织样品、尿液样品等）及微生物样品，它们的采取、制备方法是否得当对生物化学分析的准确性起着至关重要的作用。以下将分别说明各类样品的采集和处理的一般原则和方法。

1.1 植物样品的制备

1.1.1 植株组织样品的采集、制备和保存

植株组织样品多用于诊断分析。采集植株组织样品首先要选定样株，样株必须有充分的代表性，通常按照一定路线多点采取，组成平均样品。样株数目须视作物种类、种植密度、株形大小、株龄或生育期以及要求的准确度而定。样株选定后还要决定取样的部位和组织器官，原则是所选部位的组织器官要具有最大的指示意义，也就是植株在该生育期对该养分的丰歉最敏感的组织器官，如大田作物在生殖生长开始时期常采取主茎或主枝顶部新成熟的健壮叶或功能叶，幼嫩组织的养分组成变化很快，一般不宜采样。分期采样时，取样的时间应当一致，通常以上午 8:00~10:00 为宜，因为这时植物的生理活动已趋活跃，地下部的根系吸收速率与地上部正趋于上升的光合作用强度接近动态平衡。此时，植物组织中的养料贮量最能反映根系养料吸收与植物同化需要的相对关系，因此最具有营养诊断的意义。另外，诊断作物氮、磷、钾、钙、镁等元素营养状况的采样还应考虑各元素在植物营养中的特殊性。

采集的植株样品如需要分不同器官（例如叶片、叶鞘或叶柄、茎、果实等部分）测定，需立即将其剪开，以免养分运转。剪碎的样品太多时，可在混匀后用四分法缩分至所需的量。

植株组织样品一般需要洗涤，但应在尚未萎蔫时洗涤，洗涤方法一般可用

湿布仔细擦净表面的沾污物；微量元素分析用的样品须用 0.1%~0.3% 洗衣粉之类的去垢剂溶液洗涤，再用纯水淋净，但不能用过多的水长时间浸洗。

测定易起变化的成分（如硝态氮、氨基态氮、水溶性糖、维生素等）必须用新鲜样品。鲜样如需短期保存，必须在冰箱中冷藏，以抑制其变化。分析时将洗净的鲜样剪碎混匀后立即用称量瓶或铝盒等称样，放在研钵中与适当溶剂（或再加石英）共研磨，取浸提液测定。

测定不易变化的成分则常用干燥样品。洗净的鲜样必须尽快干燥，以减少化学和生物学变化。一般分析用的植物鲜样要分两步干燥，通常先将鲜样在 80~90℃ 烘箱（最好有鼓风箱）中烘 15~30min（松软组织烘 15min，致密坚实的组织烘 30min），然后降温至 65℃，除尽水分，时间视鲜样水分含量而定，大约 12~24h。

干燥后的样品可用研钵或带刀片的（用于茎叶样品）或齿状的（用于种子样品）粉碎机粉碎，并全部过筛，分析样品的细度视称样的大小而定，通常可用圆孔直径为 1mm 的筛；如称样仅 1~2g 者，宜用 0.5mm 筛；称样小于 1g 者，须用 0.25mm 或 0.1mm 筛。磨样和过筛都必须考虑到样品沾污的可能性，特别是微量元素分析时。测定铁锰用的样品不能接触铁器，测定铜、锌用的样品不能接触黄铜器械。样品过筛后需充分混匀，保存于磨口的广口瓶中，内外各贴放一样品标签。

样品在粉碎和贮存过程中又将吸收一些空气中的水分，所以在精密分析工作中，称样前还需将粉状样品在 65℃（12~24h）或 90℃（2h）再次烘干；一般常规分析则不必。干燥的磨细样品必须保存在密封的玻璃瓶内，称样时应充分混匀多点匀取。

1.1.2 子粒样品的采集、制备和保存

子粒样品多用于品质分析。子粒样品有的采自个别植株，有的采自试验小区或大田地块，有的采自大批收获物。从试验区或大田采样时，可按组织样品的采法，选定样株后脱粒。也可用混合取样法，即将全区或地块脱粒的种子混匀、铺平，再按对角线把样品分成四个三角形，取两个相对的三角形的样品，而将另外两个三角形的样品淘汰。如此操作，一直淘汰到所要求的数量为止，这种取样法称四分法。从成批粮食取样时，在保证样品有代表性的原则下，可在散装堆中设点取样，或可从包装中扦取原始样品，再用四分法或分析器缩分至所要求的数量。

样品风干后，除去杂质和不完整粒，用电动样品粉碎机粉碎。事先要把机器内收拾干净，最初粉碎出的少量样品可弃去不用，然后正式粉碎，使全部样

品通过一定筛孔的筛子，混合均匀，按四分法取出一定数量的样品细粉作为分析样品，贮存于干燥的磨口广口瓶中，同时贴上标签，注明样品的名称、编号、采取地点、处理方式、采样日期及采样人姓名等。长期保存时，标签应涂石蜡，并在样品中加适当的防腐剂。蓖麻、芝麻等油料种子应取少量样品在研钵内研碎，以免脂类损失。

1.1.3 瓜果样品的采集、制备和保存

瓜果样品多用于品质分析。瓜果蔬菜类的成熟期延续很短，一般在主要成熟期采样，必要时也可在成熟过程中采二、三次样。每次应在试验区或地块中不少于 10 个样株上采取簇位相同、成熟度一致的果实（或块根茎）若干个组成平均样品。果树的果实采样要选品种特征典型的样株才能比较各品种的品质。样株要注意挑选树龄、株型、生长势、载果量等一致的正常株，幼、老和旺长的都缺乏代表性。

采得的瓜果样品要刷洗、擦干。瓜果和蔬菜分析通常都用新鲜样品，有的分析样品全部，有的只分析可食部分，随分析目的要求而定。大的瓜果或数量多时，可均匀地切取其中一部分，但要使所取部分中各种组织的比例与全部样品的相当。分析用的样品切碎后用高速植物组织粉碎机或研钵打碎成浆状，从混匀的材料中多点匀取称样。如果所测物质不稳定（如某些维生素和酶等），则上述操作均应在低温下进行，样品匀浆如来不及测定，可暂存冰箱内，或灭菌后密封保存。

瓜果样品如需干燥，则必须力求快速，以保存样品的成分不变。加速干燥的主要方法是样品磨碎后高温通风干燥；打碎的鲜样先在 110~120℃ 鼓风烘箱中经 100~105℃ 烘 20~30min，然后降温，在 60~70℃ 烘至变脆易压成粉末为止。烘的时间不宜太长，一般短则 4~5h 长则 8~10h。如无鼓风烘箱，可用普通烘箱代替，初期把门打开，以利水分逸出。如能真空干燥则更好。

1.1.4 丙酮干粉的制备

在分离、提纯或测定某种酶的活力时，丙酮干粉法是常用的有效方法之一。将新鲜材料打成匀浆，放入布氏漏斗，按匀浆重量缓缓加入 10 倍在低温冰箱内冷却到 -15~-20℃ 的丙酮，迅速抽气过滤，再用 5 倍冷丙酮洗 3 次，在室温下通风处放置 1h 左右至无丙酮气味，然后移至盛五氧化二磷的真空干燥器内干燥。丙酮干粉的制备在低温下完成，所得丙酮干粉可长期保存于低温冰箱。用这种方法能有效地抽提出细胞中的物质，还能除掉脂类物质，免除脂类干扰，而且使得某些原先难溶的酶变得易溶解于水。

1.2 动物样品的制备

1.2.1 血液样品

1.2.1.1 血液标本的采取 各种实验动物的采血部位和方法需视动物的种类、检验项目、试验方法及所需血量而定。一般较大动物如马、牛、猪等多由颈静脉采取，小动物如兔常由耳静脉采取，也可从颈静脉采血。必须把采血部位的毛拔掉或剪掉，用手指压迫颈静脉使其怒张，然后用细针尖刺入；穿刺心脏可采集到多量的血液，穿刺部位在左侧第三肋间距胸骨 4mm 处。鼠则由心脏采取。鸡采少量血液可用针穿刺内冠部或用剪刀剪去肉冠的尖顶部采取；需要多量的血液，可由肘关节内侧的翅静脉采取。

严格控制血液样品的变异因素，是使检测结果尽可能符合客观情况的重要环节。因此，在采血过程中应注意下列问题：

(1) 规定动物的采血时间。因为有些血液化学成分有明显的昼夜波动，如血浆皮质醇在早晨高而傍晚低，至午夜降到最低水平；血清铁也有类似的波动。对于单胃动物，应在禁食 12h 后采血，这样可以将食物对血液各种成分浓度的影响减少到最低程度。

(2) 血液样品来源应一致。动脉血和静脉血的化学成分略有差异，除血氧饱和度、二氧化碳分压等有明显不同以外，静脉血中乳酸的浓度比动脉血中的略高，在饥饿时，毛细血管血中的葡萄糖比静脉血每 10mL 血中高 5mg。为此，整个试验期间，采取的血液样品必须一致。

(3) 防止分解。血液内若干化学成分，离体后由于氧化酶或细菌的作用，极易分解，因此血液样品被采集后应立即按规定处理，及时检测或加入适当的保存剂按规定保存。

(4) 防止污染。采血器皿及样品容器都必须清洁，尤其是测定蛋白结合碘、血氨及血清中微量元素如铜、铁等，均需用化学法处理并用重蒸馏水冲洗过的器材，以防污染而影响结果。

(5) 防止溶血。由于红细胞内和血浆中有许多成分的浓度是不一样的，因此，溶血可以影响许多生化检测项目的结果，应予防止。防止溶血的方法如下：采血用的注射器、针头、试管等器具必须清洁干燥；采血后卸下针头再将血液沿管壁徐徐注入试管内，轻轻倒转试管使血液与抗凝剂混合，切忌强力振摇；不要过多过早剥动血凝块；低温能使红细胞脆性增大，应将血液放于 37℃ 中预温 0.5h 后再用竹签将血凝块从管壁剥离，并继续加温，使血清析出；如果不能及时检测，血液应放于 4℃ 保存。

1.2.1.2 血液样品的制备

(1) 全血。全血是指抗凝的血液，即在取出血液后必须立即与适量的抗凝剂充分混合，以免血液凝固。抗凝剂预加于准备承接血液的容器中。每毫升血液中加入抗凝剂的种类可以根据实验的需要进行选择，但是用量不宜过大，否则将影响实验的结果。常用剂量如下：草酸钾或草酸钠 1~2mg；柠檬酸钠 5mg；氟化钠 5~10mg；肝素 0.01~0.2mg。

通常先将抗凝剂配成水溶液，按所取血量的需要加于试管或其他合适的容器中，转动试管或容器使成一薄层，在 100℃ 以下烘干（肝素干燥温度应在 30℃ 以内）。烘干时要转动容器使抗凝剂形成薄层，利于血液与抗凝剂的均匀接触。取得的全血如不立即使用，应贮存于 4℃ 冰箱中。

(2) 血浆。血浆是指抗凝血浆。游离血红蛋白、变性血红蛋白、纤维蛋白原的测定须用血浆。制备方法是抗凝全血在离心机中离心，使血细胞下沉，如此所得之上清液即为血浆。分离较好的血浆应为淡黄色。为避免产生溶血，必须采用干燥清洁的采血器具和容器，尽量少振荡。

(3) 血清。不加抗凝剂的血液在室温下自行凝固，所析出的淡黄色液体即为血清。血清成分更接近于组织液的化学组成，测定血清成分的含量，比用全血样品更能反映机体的客观情况；另外，血清中葡萄糖、多数酶比较稳定；血清中无机离子在室温下至少可稳定 8h，在冰箱中可稳定若干天；血清电泳分析，可不受纤维蛋白原的干扰，比血浆作电泳更易掌握。为使血清尽快析出，可以采用离心法缩短分离时间，但离心转速不宜过高。制备血清也要防止溶血，故所用设备必须干燥，且在血块收缩后及早分出血清。

(4) 无蛋白血滤液的制备。在测定某些血液化学成分时，标本内蛋白质的存在，常与试剂发生浑浊或沉淀，往往可影响若干化学成分的测定。因此，必须先除去血液标本中的蛋白质，且保留应测的化学成分，这个操作过程，称无蛋白血滤液制备。制备方法甚多，常用的方法有：

钨酸钠-硫酸法：取全血（加抗凝剂）1mL 于 20mL 三角瓶中，加蒸馏水 7mL，摇匀后使溶血，加入 10% 钨酸钠 1mL 并摇匀，然后加入 0.4 mol/L H_2SO_4 溶液 1mL，随加随摇，加完后充分振荡，放置 5~15min，当沉淀变为暗棕色时，用干滤纸过滤，每毫升滤液相当于 1/10 全血。

硫酸锌法：

a. 0.45% ZnSO_4 溶液 5mL 和 0.1mol/L NaOH 溶液 1mL 混合成胶体溶液，然后加入血液 0.1mL，在沸水浴中加热 4min，冷却后用棉花过滤，滤液可直接用于测定糖含量，尤其是滴定法。

b. 向试管中加入 0.3mol/L $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液 1mL，蒸馏水 7.5mL，混匀后

加 0.5mL 全血、血清或血浆，混合后放置 0.5min，再加入 5% ZnSO_4 溶液 1mL，混匀后放置 2min，过滤或离心，滤液为 1:20 的无蛋白血滤液。

硫酸钠－硫酸锌试剂法：此法用于制备不溶血的无蛋白血滤液。取血液 0.1mL，加 1.8mL 硫酸钠－硫酸锌试剂和 0.5mol/L NaOH 溶液 0.1mL，混匀后离心，上清液为 1/20 全血浓度。

1.2.2 组织样品

在生化实验中，常利用动物离体组织研究各种物质代谢途径和酶系的作用，或者从组织中分离、纯化核酸、酶以及对某些具有生物活性的代谢物质进行研究。离体组织的采集必须在低温条件下进行，并且尽快完成测定。否则其所含物质的量和生物活性物质的活性都将发生变化。

一般采用断头法处死动物，放出血液，立即取出所需脏器或组织，除去脂肪和结缔组织之后，用预冷的生理盐水洗去血液，按实验要求制成匀浆或者组织糜。

(1) 组织糜制备：迅速将组织剪碎，用组织捣碎机绞成糜状，或者加入少量石英砂于研钵中，研磨至糊状。

(2) 组织匀浆：取新鲜的组织迅速剪碎，加入适量匀浆制备液（如生理盐水、缓冲液和 0.25mol/L 的蔗糖溶液等），用高速电动匀浆器或者玻璃匀浆器磨碎组织。由于匀浆器杵头在高速运转中会产生热量，因此在制备匀浆时，需将匀浆器置于冰浴中。

(3) 组织浸出液：组织匀浆液再经过离心分离出的上清液即为组织浸出液。

1.2.3 尿液样品

尿液中化学物质含量随食物、饮水和昼夜生理变化的影响而有很大差异，因此应根据实验的不同需要采集尿液。一般定性实验只收集一次尿即可，若立即用于分析不必加防腐剂。若作定量测定，则需收集 24h 尿液。通常晨起后第一次尿不收集，以后每次排出的尿均收集于清洁的大玻璃瓶中，直到第二天早晨同一时间收集最后一次尿，随即混匀，用量筒量出 24h 尿的总量。收集 24h 尿必须防腐，常用的防腐剂有甲苯 5mL/L 尿 或 盐酸 浓盐酸 5mL/L 尿。有的实验需要采集晨起第一次尿，此尿一般较浓，称为晨尿。也有采集定时尿的。

1.3 微生物样品的制备

研究微生物的生理生化或代谢活动，需要收集完整的细胞，有时还要对细

胞进行适当的处理，如将细胞破碎抽取其内含物，制备无细胞制剂等。

1.3.1 微生物细胞的收集方法

1.3.1.1 固体培养刮取法 从大号培养皿和克氏瓶的固体培养基上收集细胞时，需采用刮取法。首先用少量的无菌生理盐水，倾注到固体培养物的表面，把琼脂盖起来，然后以无菌的玻璃刮刀（弯玻璃棒）由琼脂表面上刮取培养物，以获得浓的菌细胞悬浮液。刮取时尽量不要把培养基带入菌悬液中，必要时可用粗布过滤除去琼脂小凝块。

1.3.1.2 液体培养离心沉淀法 从微生物的液体培养液中收集微生物细胞，常用离心沉淀法。根据微生物细胞的大小范围，可以选用不同类型的离心机。一般情况下用4 000r/min 离心沉淀 10min，就可从培养液中收集得到细菌、放线菌和酵母菌的细胞。

此外，还可采用过滤（如用板框压滤机）等方法收集。

1.3.2 干细胞制剂

干细胞制剂通常有两种类型：一种是丙酮细胞干粉法；另一种是真空干燥细胞制剂。

1.3.2.1 丙酮细胞干粉的制备 培养收集微生物菌体细胞，经离心洗涤，制成较浓的菌体细胞悬浮液，逐滴加入约为细胞悬浮液 10倍体积的冰冷丙酮，使之脱水，剧烈搅拌。当出现细胞沉淀时，过滤，取其细胞滤饼，干燥粉碎，即得丙酮细胞干粉，装入密封瓶内，置 4℃ 冰箱中保存，其有效期为 6个月。

1.3.2.2 真空干燥细胞制剂 这是另一种类型的干细胞制剂。先将细胞制成较浓的细菌悬浮液，此悬浮液应含有足量的水能使细胞自由活动。然后，把悬浮液放至一扁平皿中，将皿置于装有干燥剂（ P_2O_5 或 $CaCl_2$ 等）的真空干燥器中，接真空油泵抽气，水分则迅速逸出。经 5~10min 细胞即行冻结，接着由冰冻状态变成干燥的细胞制剂。

1.3.3 破碎细胞的方法

在微生物生理代谢机制的研究中，为了除去细胞壁的影响，研究单一酶系统的作用，提取、分析菌体细胞内的化学成分，研究某一细胞器或生物大分子的结构与功能等，就要把细胞破碎，制成无细胞制剂。破碎细胞的方法很多，常用的主要有以下几种：

1.3.3.1 研磨法 利用机械的方法，使细胞破碎。常用的是由硬质玻璃制造的组织细胞研磨器，使用方法是將微生物细胞和磨料颗粒（如氧化铝、玻璃

粉或石英砂等)混合,加入套管内,然后用研棒置套管内研磨,使微生物细胞破裂,内容物释放出来,如果研磨操作是在很低的温度下进行的(如用液态氮冷冻后进行研磨),往往不必另加入磨料,因为在低温下(-100°C 以下)水的晶体(即冰晶)非常坚硬,起着磨料的作用。细胞研碎后用离心法除去磨料。也可用电动细菌磨,转速一般采用 120r/s ,细菌细胞与玻璃粉混合后进行研磨。大肠杆菌采用细菌磨研磨 20s后,99.9%的细胞可被磨碎,所制得的无细胞制剂具有理想的酶活力。

1.3.3.2 超声波振荡法 是利用能引起液体内部发生激烈流动的超声波使细胞碎裂的方法。50W 超声波发生器,频率 $9\,000\text{Hz}$,容量 60mL ,处理乳酸菌和葡萄球菌等细胞悬浮液 $25\sim 30\text{mL}$,经过 3h 左右,90% 以上的细胞可碎裂。200W 超声波发生器,频率 $10\,000\text{Hz}$,容量 150mL ,处理革兰氏阴性杆菌细胞悬浮液 $60\sim 100\text{mL}$,经过 $10\sim 15\text{min}$,有 90% 以上的细胞破碎;处理乳酸菌和葡萄球菌等,则需处理 60min。

1.3.3.3 酶解法 利用一些能分解微生物细胞支持结构(细胞壁)的酶类,将这些细胞进行酶解。目前,应用较多的是溶菌酶。

溶菌酶能分解细菌细胞壁里由 N-乙酰胞壁酸肽和 N-乙酰葡萄糖胺构成的 β -1,4 糖苷键。将溶菌酶制剂加到巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)或小球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)的细胞悬液中,很快地就会发生溶菌作用。对于其他的一些细菌(如肠道细菌),除了加入溶菌酶制剂外,还需要配合附加的处理(如采取冰冻复融处理或加 EDTA 处理)才能获得理想的效果。

利用我国海南岛出产的褐云玛瑙螺(*Achatina fulica*)制备的蜗牛消化道酶冷冻干粉,可有效地用于破坏酵母菌的细胞壁。纤维素酶也常用来破坏真菌微生物的细胞壁。

此外,破碎细胞的方法还有压挤法、渗透压碎裂法、冷冻复融法和细胞与磨料颗粒搅动法等。

第二章 离心技术

要进行某种生物大分子物质（如蛋白质、核酸、酶）和细胞器的分离、提纯，或测定某些纯品的部分性质，离心是最常用的方法之一。随着离心技术的进步和离心设备的不断完善，尤其是高速和超速冷冻离心机相继问世，离心分离已成为生命科学研究中一项最基本的技术。

2.1 基本原理

2.1.1 离心力

离心是利用旋转运动的离心力，以及物质的沉降系数或浮力密度的差别进行分离的一项实验技术。当质量为 m 的粒子以一定角速度做圆周运动时要受到一个外向的离心力 F 。这种力的大小取决于角速度（ ω ，以弧度/s表示）和旋转半径，方程式为：

$$F = m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot \left(\frac{2\pi N}{60} \right)^2$$

式中 m 为沉降固体颗粒的有效质量（g）；

r 为离心半径，即转子中心轴到沉降颗粒之间的距离；

N 为离心机每分钟的转数（r/min）。目前， F 通常以相对离心力（ R_{CF} ）来表示。即离心力 F 的大小相当于地球引力（ g ）的多少倍，因而称相对离心力。可表示如下：

$$R_{CF} = \left[\frac{2\pi N}{60} \right]^2 \cdot r \cdot m / (m \cdot g) \\ = 1.119 \times 10^{-5} N^2 \cdot r$$

R_{CF} 为相对离心力，单位以重力加速度 g 的倍数表示；此公式描述了相对离心力与转速之间的关系。由于转头的形状及结构的差异，每台离心机的离心管从管口到管底各点与旋转中心的距离是不同的（图 2-1），因此旋转半径用 $r_{平均}$ 代替 $r_{平均} =$

$\frac{1}{2}(r_{最大} + r_{最小})$ 。为了方便，Dole 和 Contzias

制作了转头速度（r/min）和半径相对应的测算图，

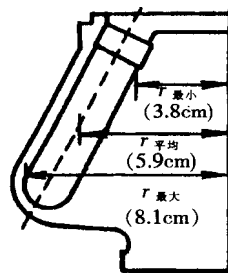


图 2-1 角度转头的剖面图
(Spincor L 型，408号转头)

见图 2-2，可以方便地将离心机转速换算成相对离心力 R_{CF} 。首先在半径 r 标尺上取已知的半径和转速， V_R 标尺上取已知转数，然后，将这两点划一条直线，与图中间 R_{CF} 标尺上的交叉点即为相应的 R_{CF} 。注意，若已知的转数值处于 V_R 标尺的右边，则应读取 R_{CF} 标尺右边的数值。同样，转数处于 V_R 标尺的左边，则读取 R_{CF} 标尺左边的数值。因此，为了准确表示离心条件，应该注明离心机的型号和采取的离心速度（ r/min ）或者用 R_{CF} 表示。

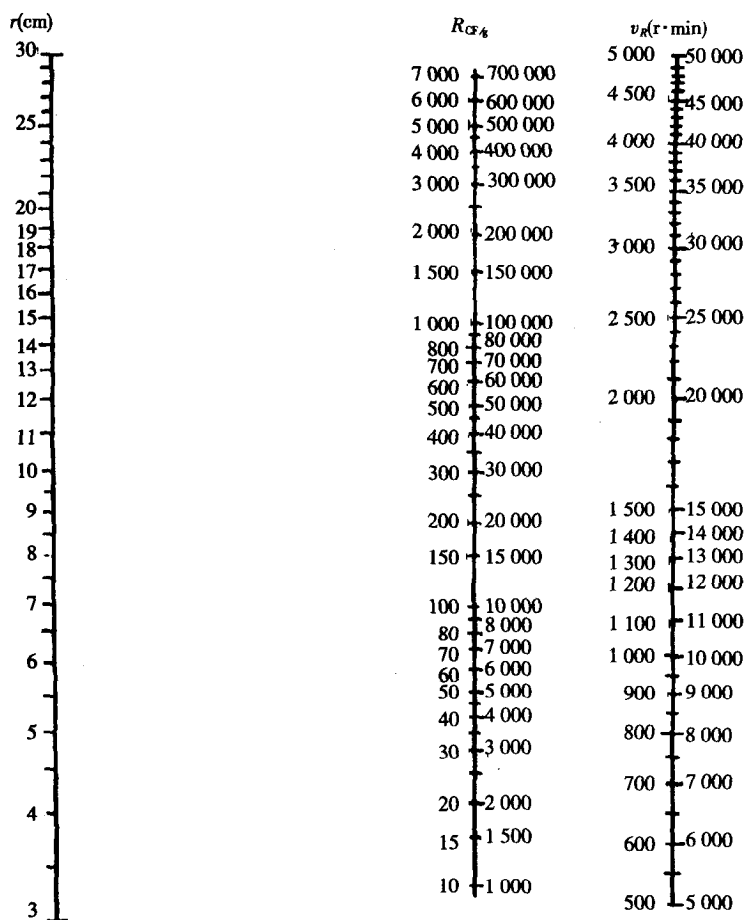


图 2-2 离心机转速与相对离心力的测算图

2.1.2 沉降系数

受离心力作用的分子或颗粒，单位时间内运动的距离称沉降速度。而单位离心力作用下的沉降速度称沉降系数，其单位用 Svedberg 表示，简称 S，量纲

为秒。1S单位等于 1×10^{-13} s。常用 S 表示某些生物大分子、亚细胞及亚细胞器的大小，如 16SRNA 等。

$$S = 2.303 \frac{\lg(r_2/r_1)}{\omega^2(t_2 - t_1)}$$

式中 r_1 、 r_2 为测定起始与结束时颗粒距转轴中心距离； t_1 、 t_2 为沉降起始与结束时间。

2.2 离心机的种类和基本结构

2.2.1 种类

离心机的种类可以按转速、用途、结构进行分类如下表 2-1。

表 2-1 离心机分类

	分 离 依 据		
	转速	使用温度	用途
离心机类型	普通 (<6 000r/min)	常温	制备型
	高速 (6 000~25 000r/min)	冷冻	分析型
	超速 (>25 000r/min)		

随着离心技术的发展，离心机已趋向于多种效应性。如制备型离心机也配备了分析型转子和光学检测系统，可作某些分析研究工作，而分析型离心机有些也附有制备用转子。

2.2.2 基本结构

离心机的结构主要包括转头、驱动和速度控制系统、温控系统、真空系统四个部分。

制备型离心机广泛用于各种细胞器、病毒以及生物大分子的分离、纯化，是实验室不可缺少的离心设备。制备型超速离心机具有超过 $500\,000 \times g$ 的离心力，是制备型离心机发展的最高形式。现以这种离心机为例介绍离心机的结构。

2.2.2.1 转头在制备型超速离心机中所采用的转头种类繁多，一般可分为五类：角式转头、水平式转头、垂直式转头、区带转头、连续转头。角式转头和水平式转头是常见的两种。

角式转头 其名称来源是因为离心管放到转头中和旋转轴始终保持着一定的角度。这类转头的优点是具有较大的容量，速度可升得较高。

水平式转头 则由一个转头悬吊着 3~6 个自由活动的吊桶（离心管套）构成。当转头静止时，这些吊桶垂直悬挂，随着转头升速，吊桶外用至水平位置。这类转头主要用于密度梯度离心，其主要优点是梯度物质放在垂直的离心管中，而离心时管子保持水平状态，不同组分物质沉降到离心管不同区域，呈现出横过离心管的带状，而不像角式转头中那样成角度。其缺点是，形成区带所需的时间较长。

2.2.2.2 驱动和速度控制系统 大多数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变速，或直接用变频马达连接到转头轴构成。由于驱动轴的直径仅仅 0.48cm，这样，在旋转中细轴可有一事实上的弹性弯曲，以便适应转头不平衡，而不至于引起震动或转轴损伤。但是，离心管及其内含物必须精密地被平衡到相互之差不超过 0.1g。除速度控制系统以外，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。如果出现转速超过转头最大规定转速的情况，会引起转头的撕裂或爆炸。因此离心腔总是用能承受此种爆炸的装甲钢板密闭。

2.2.2.3 温度控制系统 超速离心机的温度控制是由安置在转头下面的红外线射量感受器直接并连续监测转头的温度，以保证更准确更灵敏地温度调控。

2.2.2.4 真空系统 当转速超过 40 000r/min 时，空气与旋转的转轴以及转头之间的摩擦生热成为严重的问题，因此，超速离心机增添了真空系统。

普通制备型离心机和高速制备型离心机的结构较简单，其转子多是角式和水平式转子两种，没有真空系统。普通制备型离心机多数室温下操作，速度不能严格控制。高速制备型离心机有消除空气和转子间摩擦热的制冷装置，速度和温度控制较严格。

分析型超速离心机主要是为了研究生物大分子物质的沉降特征和结构。因此，它使用了特殊设计的转头和检测系统，以便连续地监测物质在离心场中的沉降过程。其转头是椭圆形的，此转头通过一个有柔性的轴连接到一个超速的驱动装置上，转头在一个冷冻的和真空的腔中旋转。转头上有 2~6 个离心杯小室，离心杯是扇形的，可以上下透光。离心机中装有光学系统，在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，在预定的时间可以拍摄沉降物质的照片。物质沉降时，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相底板上产生一个峰，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得到有关物质沉降速度的指标。

2.3 常用离心技术

2.3.1 差速离心法

差速离心 (Differential centrifugation) 是指逐渐增加离心速度或低速离心与高速离心交替进行, 用大小不同的离心力使具有不同沉降系数的分子分批分离的方法。它适用于沉降系数差别较大 (一般在一个到几个数量级) 的混合样品的分离。沉降系数 S 差别越大, 分离效果越好。

进行差速离心时, 首先要选择好颗粒沉降所需的离心力和离心时间。离心力过大或离心时间过长, 容易导致大部分或全部颗粒沉降及颗粒被挤压损伤。当以一定离心力在一定的离心时间内进行离心时, 在离心管底部就会得到最大和最重颗粒的“沉淀”, 分出的“上清液”在加大转速下再进行离心, 又得到第二部分较大、较重颗粒的“沉淀”及含小和轻颗粒的“上清液”。如此多次离心处理, 即能把液体中的不同颗粒较好地分离开。此法所得沉淀是不均一的, 仍混杂有其他成分, 需经再悬浮和再离心 (2~3 次), 才能得到较纯颗粒。

差速离心法主要用于分离细胞器和病毒。一般过程如图 2-3。其优点是: 操作简单。缺点是: 分离效果差, 不能一次得到纯颗粒。壁效应严重。特

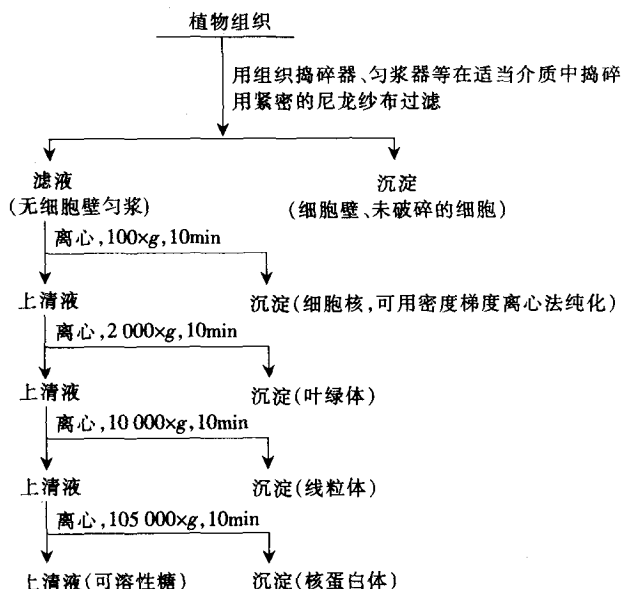


图 2-3 植物细胞组分差速离心一般流程

别当颗粒很大或浓度很高时，在离心管壁一侧会出现沉淀。颗粒被挤压。离心力过大、离心时间过长会使颗粒变形、聚集而失活。

2.3.2 密度梯度离心法

密度梯度离心 (Dichtegradienten centrifugation) 是一种带状分离法，其特点是离心管中液相介质密度是不均一的，自上而下密度逐渐增大，形成一定的梯度。经常使用的液相介质成分为甘油、蔗糖及某些盐类，如氯化钠、氯化铯溶液等。这些液相介质成分不能与样品发生化学反应，不至于影响生物样品的天然结构和生物学活性，在介质溶剂中有较大的溶解度。密度梯度离心技术有两种方法，一种是速率区带离心，另一种为等密度梯度离心。

2.3.2.1 速率区带离心 在离心管或样品池内预先注入一定密度梯度的液相介质，介质密度自上而下逐渐增大，样品物质轻轻铺在密度梯度介质的液面上，如图 2-4。起动离心机，在离心力的作用下，一定时间后，粒子在梯度介质中成分离的区带状沉降，每一条区带内的粒子具有相同的沉降速度。根据不同的实验目的可以设计不同的连续或不连续梯度。如进行亚细胞组分分离实验时，常采用不连续蔗糖密度梯度法。一般配置的蔗糖梯度是 25%、35%、45%、55%。这种离心的特点是物质的分离取决于样品物质颗粒的质量，也就是取决于样品物质的沉降系数 S ，而不是取决于样品

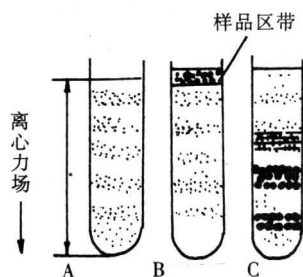


图 2-4 在水平转头中进行速率区带离心

A. 充满密度梯度溶液的离心管
B. 样品加于梯度顶部 C. 离心力作用下粒子按照它们的质量以不同的速度移动

物质的密度，因而适宜于分离密度相近而大小不同的固相物质。从离心结果来看，这一离心技术有两个特点：一个特点是区带内的液相介质密度不等于而且小于样品物质颗粒的密度，另一个特点是即使样品物质颗粒密度相同，但大小不同，离心后也位于不同的区带。这是因为它们虽然密度相近甚至相同，但大小不同，质量也就不同，沉降系数各不相同，所以分布在不同的区带内。

蔗糖是对生物大分子及颗粒进行密度梯度区带离心时最常用的材料。它很易溶于水，而且对核酸及蛋白质具有化学惰性。常用的梯度范围是从 5% ~ 25% 至 10% ~ 60%。

2.3.2.2 等密度梯度离心法 等密度梯度离心或称平衡密度梯度离心是依据氯化铯、硫酸铯等物质密度较大，能在强离心场内自行形成连续的密度梯度溶液。开始离心前，把样品和氯化铯溶液混合在一起，经一定离心后，不同密

度的分子便向与其密度相当的区带集中，从而达到分离的目的。沉降在（或是悬浮在）与其自身密度相等的液相介质区域内形成区带，如图 2-5。其特点是沉降分离与样品物质的大小和形状无关，而取决于样品物质的浮力密度。为此要选择介质的密度梯度范围包括所有待分离物质的密度。不同大小但同一密度的样品物质分布在同一区带，同一区带内的样品物质密度和介质密度相等。



图 2-5 “自生”梯度等密度离心

A. 样品与梯度物质混合的均匀溶液 B. 离心力作用下，梯度物质重新分布，样品区带保留在等密度处

梯度溶液可通过机械和手工操作两种方法制备成连续的密度梯度和不连续的密度梯度。密度梯度形成仪可形成连续的密度梯度。当实验室不具备制作连续性密度梯度溶液的时候，也可制作不连续性密度梯度溶液进行分离。其方法是：首先在密度梯度范围内，配制几个不同密度的溶液。用移液管小心地将密度逐渐降低的溶液一层覆盖着一层铺到离心管中。要分离的样品就可以以一个很窄的带直接铺到这个不连续的梯度系列的顶层（即密度最低一层）。然后，在适当的实验条件下离心，通过离心场的作用，不连续的密度梯度即可形成连续密度梯度，但离心的时间要相对延长。

离心后离心管中各分离物质一般用三种方法进行分部收集，即虹吸法、取代法及底部穿刺法。

虹吸法不需损伤离心管，尤其适用于不锈钢离心管中物质的分部收集，因为虹吸时要严防已分离物被扰动，需要专用的虹吸装置。

取代法是在离心管的底部穿刺，把一种很稠密的介质（如 60%~70% 蔗糖溶液）慢慢地注入离心管底部，以使梯度溶液从上面被顶出来，然后用注射器或移液管逐一移出各部分，或在离心管颈部加一个塞子，塞子经一根导管通向分部收集器来进行分部收集。

穿刺法是从离心管底部穿刺，使梯度自由流出。为此可制作一种简单的固定器，其底部装一个垂直向上的针头（22 号注射器针头），这样，当装入离心管时，其底部正好被刺穿。1~2s 钟后，开始缓慢地流出第一滴，从而可以从容地进行分部收集。

综上所述，差速离心是一种动力学的方法，关键在于选择适合于各分离物的离心力。等密度梯度离心是一种测定颗粒浮力密度的静力学方法，关键在于选择氯化铯浓度使之处于待分离物的密度范围内。速率区带离心兼有以上两种方法的特点，关键在于制备优质的密度梯度溶液。

2.4 离心技术在生物学研究中的应用

制备性离心和分析性离心是依据不同的目的来划分，制备性离心其最终目的是对生物来源的样品物质进行分离纯化和制备。分析性离心的最终目的是利用已分离纯化了的单一物质组分作各方面性质的分析研究。最常用的分析研究是测量物质的分子量、沉降系数、密度和纯度等。分析性离心，一般用超速冷冻离心机，使用的离心技术主要是差速离心或密度梯度离心。其主要应用是：

2.4.1 分子量的测定

由沉降系数根据 Svedberg 公式可以计算出物质的分子量。

2.4.2 DNA 样品密度的测定

借助于已知密度的 DNA 样品，通过作图的方法，可以求出未知 DNA 样品的密度。

2.4.3 从密度推算 DNA 的 G-C 碱基含量

DNA 的 G-C 含量就是双链 DNA 的碱基商，DNA 的 G-C 含量与其浮力密度呈直线相关，即 G-C 含量越高，浮力密度越大，所以用测得的浮力密度计算其 G-C 含量。

2.4.4 检测生物大分子中构象的变化

分析性超速离心已成功地用于检测大分子构象的变化。在某些因素影响下，DNA 分子可能发生一些构象的变化，构象上的变化可通过检查样品在沉降速度中的差异来证实。分子越是紧密，那么它在溶剂中的摩擦阻力越小；分子越是不规则，摩擦阻力就越大，沉降就越慢。因此，通过样品处理前后沉降速度的差异就可以检测它在构象上的变化。

第三章 层析技术

1903年,俄国植物学家 Tswett 发现植物叶子中各种颜色的色素可以在吸附柱上流动后排列成色谱,故称这种混合物分离的方法为色谱法(chromatography),又称色层分析法或层析法,随后被广泛用于无色物质的分离与层析。近半个多世纪以来,层析技术发展很快,由于这一技术具有分离效率高、应用范围广、分析速度快、样品用量少、易于自动化及能够与其他方法配合使用等优点,因此近年来在各类分析化学方法中占有十分重要的地位,已成为生物化学、分子生物学、生物工程等学科的重要研究手段。

3.1 基本原理

层析法各种各样,但基本原理是一致的。它是利用混合物中各组分理化性质(分子形状和大小、带电状态、溶解度、吸附能力、分配系数、分子极性以及分子的亲和力等)的差别,使各组分以不同程度分布在两相中,其中一相为固定的(称为固定相),另一相则流过此固定相(称为流动相),造成流动相对固定相作单向相对运动,流动相推动样品中各组分经固定相向前迁移,使各组分迁移速度不同,而对物质进行分离的方法。固定相可以是固体、液体或一种固体和一种液体的混合物,而流动相可以是一种液体或一种气体。

层析方法有许多种,根据两相的状态和分离依据的原理的不同进行分类如表 3-1。

表 3-1 层析法的一般分类

固定相	流动相	装置	依据原理	名 称
固相吸附剂	液体	柱	吸附	吸附层析
固相离子交换剂	液体	柱	酸碱度, 极性	离子交换层析
固体	液体	薄层	分配系数, 吸附	吸附薄层层析
液体	液体	柱	分配系数	分配层析
液体	液体	薄层	分配系数	分配薄层层析
液体	液体	纸	分配系数	纸层析
固体	液体	柱	分子大小	凝胶层析
固相配基	液体	柱	分子亲和力	亲和层析
固体	气体	柱	吸附	气体吸附层析
固体	气体	柱	分配系数	气体分配层析