



动物生物化学 实验基本知识 第1章

第1节 动物生物化学实验室规则及安全防护常识

一、实验室规则

1. 实验课必须提前 5min 到达实验室，不迟到，不早退。
2. 自觉遵守实验室纪律，维护实验室秩序，保持室内安静，不得大声喧哗或说笑。
3. 使用药品、试剂和各种物品时应注意节约。应特别注意保持药品和试剂的纯净，防止混杂污染。试剂用完后应及时放回试剂架，便于他人使用，试剂瓶塞不得混用。
4. 使用和洗涤仪器时，应小心谨慎，防止损坏仪器；使用精密仪器时，应严格遵守操作规程，出现故障时应立即报告老师，不要随意动手检修。
5. 实验台、试剂药品架必须保持整洁，仪器药品摆放有序。实验结束后，须将药品、试剂排列整齐，仪器洗净倒置放好，实验台面抹拭干净，经老师验收合格后，方可离开实验室。
6. 使用洗液时，注意不要滴到桌面和地面上，要将洗涤仪器放在搪瓷盆中进行洗涤。
7. 注意安全。实验室内严禁吸烟，煤气灯应随用随关，必须严格做到：火在人在，人走火灭。不能直接加热乙醇、丙酮、乙醚等易燃品，需要时应远离火源操作和放置，实验完毕，应立即关闭煤气阀，拉下电闸。离开实验室以前，应仔细检查，严防安全事故发生。
8. 在实验过程中要听从老师指导，认真按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上，实验完成后经老师检查同意，方可离开，课后写出实验报告。
9. 废弃液体（强酸、强碱溶液须用水稀释后）应倒入专用废液桶内。废纸、火柴头及其他固体废弃物和带有渣滓沉淀的废弃物都应倒入废品缸内，不能倒入水槽或随处乱扔。
10. 仪器损坏时，应如实向老师报告，认真填写损坏仪器登记表。
11. 实验室内一切物品，未经负责老师批准，严禁带出室外，借物须办理登记手续。
12. 每次实验课安排学生轮流值日。

二、安全防护常识

在生物化学实验室里，失火、触电、中毒、爆炸、外伤、生物伤害的危险时刻存在，因此，每一位工作人员及学生都必须有高度的安全意识、严格的防范措施和丰富的防护救治知识。一旦发生意外能够迅速进行正确的处置，以防事故进一步扩大。

（一）失火

生物化学实验室经常使用一些有机溶剂，如甲醇、乙醇、丙酮、氯仿等。而实验室又经常使用电炉、酒精灯等火源，因此容易发生失火事故。常用有机溶剂及其易燃特性见表 1-1。

表 1-1 常用有机溶剂及其易燃特性

℃

名 称	沸点	闪点	自燃点
乙醇（95%）	78	12	400
乙醚	34.5	-40	180
苯	80	-11	550
丙酮	56	-17	538
二硫化碳	46	-30	100

注：闪点指液体表面的蒸汽和空气混合物遇到明火或火花时着火的最低温度；自燃点指液体蒸汽在空气中自燃的温度。

由表 1-1 可以看出，乙醚、二硫化碳、丙酮和苯的闪点都很低，因此不能存放于可能会产生电火花的普通冰箱内。低闪点液体的蒸汽只需接触红热物体的表面便会起火，其中二硫化碳尤其危险。预防火灾必须严格遵守以下操作规程：

（1）不得在烘箱内存放、烘焙有机物。

（2）废弃有机溶剂不得倒入废物桶，只能倒入回收瓶，以便集中处理；量少时用水稀释后排入下水道。

（3）严禁在密闭体系和开口容器中用明火或微波炉加热有机溶剂，只能使用加热套或水浴加热。

（4）在有明火的实验台面上，严禁放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

实验室一旦发生火灾切不可惊慌失措，要保持冷静，根据具体情况采取正确的灭火措施，情况严重时，需立即拨打火警电话 119。常用的灭火方法如下：

（1）乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时，可以用水灭火；乙醚、汽油、甲苯等有机溶剂着火时，不能用水灭火，只能用沙土或灭火毯盖灭。

（2）容器中的易燃物起火时，用灭火毯盖灭。因石棉有致癌性，故常用玻璃纤维布做灭火毯。

（3）导线、电器和仪器着火时，不能用水和二氧化碳灭火器灭火，应先切断电源，然后用 1211 灭火器（内装二氟一氯一溴甲烷）灭火。

（4）个人衣物着火时，切勿慌张奔跑，以免火势变大，应迅速脱掉着火衣物，用水龙头浇水灭火，火势过大时可就地打滚压灭火焰。

（二）触电

当 50Hz 的电流通过人体，电流强度达到 25mA 时，会使人体发生呼吸困难，电流强度

达到 100mA 以上时会使人致死。生化实验室经常使用烘箱和电炉等大功率用电设备，因此每位实验人员都必须熟练掌握安全用电常识，避免发生用电事故。

1. 防止触电 ① 不能用湿手接触电器；② 电源裸露部分都应绝缘处理；③ 仪器使用前先要检查外壳是否带电；④ 破损的接头、插头、插座和不良导线应及时更换；⑤ 先接好线路再插接电源，反之先关电源再拆线路；⑥ 如有人触电，先要切断电源再救人。

2. 防止电器着火 ① 电源线、保险丝的截面积、插头和插座都要与使用的额定电流相匹配；② 3 条相线要平均用电；③ 生锈的电器、接触不良的导线要及时处理；④ 电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用；⑤ 仪器长时间不用时，须拔下插头并及时拉闸；⑥ 电器电线着火时，不可用泡沫灭火器灭火。

(三) 爆炸

生化实验室防止爆炸事故发生是极其重要的，因为一旦爆炸，后果十分严重。常见的易燃物质蒸汽在空气中的爆炸极限见表 1-2。

表 1-2 易燃物质蒸汽在空气中的爆炸极限

名 称	爆炸极限（体积分数）（%）	名 称	爆炸极限（体积分数）（%）
丙酮	2.6~13	乙醚	1.9~36.5
乙醇	3.3~19	甲醇	6.7~36.5
乙炔	3.0~82	氢气	4.1~74.2

加热时会发生爆炸的混合物：浓硫酸和高锰酸钾、有机化合物和氧化铜、三氯甲烷和丙酮等。

引起爆炸事故的常见原因：① 随意混合化学药品，并使其受热、摩擦和撞击；② 在密闭体系中进行蒸馏、回流等加热操作；③ 易燃易爆气体大量溢入室内；④ 在加压或减压实验中使用不耐压的玻璃仪器，或反应过于激烈而失去控制；⑤ 高压气瓶减压阀摔坏或失灵；⑥ 使用微波炉加热金属物品。

(四) 外伤

1. 化学灼伤

- (1) 酸灼伤：先用大量水冲洗，再用稀碱液或稀氨水浸洗，最后再用水冲洗。
- (2) 碱灼伤：先用大量水冲洗，再用 1% 硼酸或 2% 醋酸浸洗，最后再用水冲洗。
- (3) 溴灼伤：这种灼伤的伤口不易愈合，须立即用 20% 的硫代硫酸钠冲洗，再用大量水冲洗，包上消毒纱布后就医。
- (4) 眼睛灼伤：眼内若溅入任何化学药品，应立即用大量清水冲洗 15min，不可用稀酸或稀碱冲洗。

2. 割伤 这是生化实验室中常见的伤害，要特别注意预防，尤其是在向橡皮塞中插入温度计或玻璃管时一定要用甘油或水润滑，用布包住玻璃管轻轻旋入，切不可用力过猛，若发生严重割伤时应立即包扎止血，并迅速就医处理。

3. 烫伤 使用蒸汽、火焰、红热的玻璃和金属时易发生烫伤，应立即用大量水冲洗和浸泡，若已起水泡，不可挑破，包上纱布后就医，轻度烫伤可涂抹鱼肝油和烫伤膏等。

4. 眼睛掉入异物 若有玻璃碎片进入眼内，必须十分小心谨慎，不可自取，不可转动眼

球，可任其流泪，若碎片不能排出，则用纱布轻轻包住眼睛，急送医院处理。若有木屑、尘粒等异物进入眼中，可由他人翻开眼睑，用消毒棉签轻轻取出或任其流泪，待异物排出后再滴几滴鱼肝油。

实验室应准备一个小药箱，专供急救时使用。药箱内需备物品：医用酒精、紫药水、红药水、创可贴、止血粉、鱼肝油、烫伤油膏（或万花油）、1%硼酸溶液或2%醋酸溶液、1%碳酸氢钠溶液、20%硫代硫酸钠溶液、纱布、医用镊子和剪刀、棉签、药棉、绷带等。

（五）中毒

生化实验室常见的有毒物：砷化物、氰化物、甲醇、乙腈、氯化氢、汞及其化合物等。常见的致癌物质：砷化物、石棉、溴化乙锭、铬酸盐、丙烯酰胺和芳香化合物等。中毒主要由不慎吸入、误食或由皮肤渗入等原因造成。

中毒的预防：①使用有毒或有刺激性气体时，必须戴防护眼镜，并应在通风橱内进行；②取用有毒物品时必须戴橡皮手套；③严禁在实验室内饮水、进食、吸烟，严禁用嘴吸移液管，禁止赤膊和穿拖鞋；④不能用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

中毒急救的主要方法：①误食酸或碱，不要催吐，可立即大量饮水。误食酸者，饮水后再服氢氧化镁乳剂，最后喝些牛奶；误食碱者饮水后再喝些牛奶；②误吸入毒气后，应立即转移到室外，对休克者应施以人工呼吸，但不要对口法；③砷和汞中毒者应立即送医院急救。

（六）生物伤害

生物材料如微生物或动物的组织、细胞培养液、血液、分泌物都可能存在细菌和病毒感染的潜在危险，这虽不如上述伤害明显，但也绝不可忽视。如通过血液感染的多种传染性疾病就是常见的生物伤害，感染途径除通过血液外，也能通过其他体液传播，因此在处理各种生物材料时必须谨慎、小心，做完实验后须用肥皂、洗涤剂或消毒液充分清洗双手。

使用微生物作为实验材料，特别是使用和接触含病原的生物材料时，尤其要注意安全和清洁卫生。被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬，被污染的玻璃用具应在清洗和高压灭菌之前立即浸泡在适当的消毒液中。

（七）放射性伤害

放射性核素在生化实验中应用越来越普遍，放射性伤害也应引起实验者的高度警惕。放射性核素的使用须在指定的具有放射性标志的专用实验室中进行，切忌在普通实验室中操作和存放带有放射性核素的材料。

第2节 动物生物化学实验基本操作技术

一、玻璃仪器的洗涤

生物化学实验中所用玻璃仪器清洁与否，是获取准确结果的重要环节。因为玻璃仪器不清洁或被污染，会造成实验误差，得不到正确的实验结果。因此，在实验之前，将玻璃仪器



清洗干净（以倒置时玻璃管壁不挂水珠为准）是非常重要的准备工作。

1. 一般玻璃仪器的洗涤 凡能用毛刷刷洗的仪器（如烧杯、试管、量筒等），先用自来水刷洗，再用毛刷蘸取洗衣粉或去污粉，将仪器内外（特别是内壁）仔细刷洗，用自来水冲洗干净后，再用蒸馏水刷洗2~3次，倒置于仪器架上晾干备用。

2. 不能用毛刷刷洗的量器的洗涤 如容量瓶、刻度吸管等，应先用自来水冲洗、沥干，再用重铬酸钾清洗液浸泡4~6h（或过夜），从清洗液中取出并沥干后，用自来水冲洗干净，再用蒸馏水刷洗2~3次，倒置于仪器架上晾干备用。

3. 新购量器的洗涤 新购量器表面常附有碱性物质及油污，可先用洗衣粉洗刷再用自来水洗净，然后浸泡在1%~2%的盐酸溶液中过夜（不少于4h），再进一步洗涤，最后再用蒸馏水刷洗2~3次，倒置于仪器架上晾干备用。

二、吸量管的选择使用

吸量管是生物化学实验中常用的量取液体的仪器，分为奥氏吸量管、移液管和刻度吸量管3种。常用的是刻度吸量管，有不同的规格，如0.1ml、0.5ml、1ml、2ml、5ml、10ml等几种，可任意量取0.01~10ml的液体。其选择和使用方法具体如下。

1. 选择 使用前根据需选择合适的吸量管，其总容量最好等于或稍大于取液量。临用前看清容量和刻度。

2. 持管 用右手拇指及中指（辅以无名指）拿住吸量管上部，用示指堵住上管口控制液流，刻度数字要向着自己，切忌用大拇指堵住管口控制液流。

3. 取液 左手捏压洗耳球，将吸量管的尖端插入所取试剂液面下，将洗耳球的下端出口对准吸量管上口，将液体轻轻吸上，至最高刻度上端1~2cm处，迅速用示指按紧管上口，使液体不会从管下口流出。

4. 调准刻度 将吸量管从溶液中取出后，如果是取黏性较大的液体，必须先用滤纸擦干管尖外壁，然后用示指控制液流使之缓慢降至所需刻度（此时液体凹面底部、视线和刻度应在同一水平线上），右手示指立即按紧吸量管上口，使液体不再流出。

5. 放液 将吸量管转移至盛有所取溶液的容器内，让吸量管尖端接触容器内壁，但不能插入容器原有液体中，以免污染吸量管及试剂。放松示指让液体自然流出。放液后吸量管尖端残留的液体吹出与否，视所选用的吸量管种类要求而定。需要吹的则将其吹出；如要求不吹出的，则让吸量管尖端停靠内壁约15s，同时转动吸管，重复1次。

6. 洗涤 吸取血液、尿、组织样品及黏稠样品的吸量管，用后应及时用自来水冲洗干净；吸一般试剂的吸量管可不必马上冲洗，待实验结束后再仔细清洗。

三、可调式微量加样器的使用

在生化实验中，常用可调式微量加样器来精确量取实验所需试剂，其规格有2.5 μ l、10 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l、1000 μ l及5000 μ l等，选择相应规格的吸头，在规定的容量范围内可根据需要随意调节取液量。可调式微量加样器的具体使用方法如下。

1. 吸液 根据需要吸取的试剂量调准加样器容量，用右手握住加样器外壳，套上吸头，旋紧。用拇指按下推动按钮至第1段行程，将吸头尖口插入试剂液面下几毫米处，缓缓松开拇指，让推动按钮复原。在吸取液体时要注意避免形成气泡，以保证取液的精确度。

2. 放液 重新将拇指按下推动按钮至第2段行程,完成放液,反复1次。如果发现吸头尖口处仍残留有液滴时,应将吸头接触容器内壁,使液滴沿壁流下,同时拇指不能松开,以免液滴倒流。

四、试管中液体的混匀法

容器中先后加入的几种试剂能否充分混匀常常是实验成败的关键环节。常用于试管中液体混匀的方法有下列几种。

1. 弹敲法 右手持管上部,将试管的下部在左手掌心弹敲。此法适用于液体较少时。
2. 甩动法 右手持管上部,将试管轻轻甩动振摇即可混匀。此法适用于液体较少时。
3. 吸管混匀法 用清洁吸管将溶液反复吸放数次,使溶液充分混匀。成倍稀释某种液体时往往采用此法。
4. 旋转法 右手掌心顶住试管上口,五指捏紧试管,利用腕力使管向一个方向作圆周运动,使管内液体造成旋涡而混匀。该法适用于试管中液体较多或小口器皿,如锥形瓶等。
5. 振荡器混匀 将需要混合的液体装入容器内(液体约占容器的1/3),手持容器放在振荡器的工作台上(或用附件固定)即可混匀。混匀速度视需要可进行调整。如用烧杯或三角烧瓶配制溶液时,一般可用玻璃棒搅拌或用磁力搅拌器搅拌混匀。

第3节 常规实验样品的处理

在动物生物化学实验中,无论是分析组织中各种物质的含量,还是研究组织中物质代谢的过程,皆需利用特定的生物样品。为了达到一定的实验目的,往往需要将获得的样品预先进行适当的处理。掌握实验样品的正确处理方法是做好动物生物化学实验的先决条件。

最常用的动物样品有全血、血清、血浆及无蛋白血滤液等。组织样品则常用肝、肾、胰、胃黏膜或肌肉等,实验时可制成组织匀浆、组织糜、组织切片或组织浸出液等形式。有关这些血液或组织样品的制备方法,扼要介绍如下。

一、血液样品的制备

血液是生化分析中重要的样品之一。血液中各成分的分析结果是了解机体代谢变化的重要指标,因此必须掌握正确的血液样品的采集、处理及其制备方法。

(一) 采血前的准备工作

1. 实验动物的准备 血液中有些化学成分有明显的昼夜波动,如血浆皮质醇的含量在早晨较高而在傍晚较低,至午夜降到最低水平;血清中铁的含量也有类似的波动;有些成分在动物进食前后有所改变,且进食后血清容易出现浑浊,影响和干扰结果的准确性,如血糖、血脂、总胆固醇、肝功能指标等。因此采血应在空腹或禁食一定时间后进行,这样可以将食物对血液中各种成分浓度的影响减小到最低限度。

2. 采血器具的准备 采血器皿及容器都必须清洁,充分干燥和冷却后才能使用。抽取血液时,动作不宜太快,采出的血液要沿管壁缓缓注入盛血容器内。若用注射器取血时,采血

后应先取下针头，再慢慢注入容器内。推动注射器时速度也不可太快，以免吹起气泡造成溶血。盛血的容器不能用力摇动以免溶血。为防止传染性疾病的产生和蔓延，尽量使用一次性消毒采血针头。

3. 对采血操作人员的要求 实验动物在出现兴奋、恐惧等状态时，某些生化指标会发生变化，进而影响实验结果的准确性。例如，实验操作过程中动作简单粗暴，会使实验动物体内血液循环加快，糖消耗加快，使血糖结果偏低，因此要求实验操作人员对待实验动物要有爱心，动作要轻柔。

(二) 常用实验动物的采血部位及采血量

各种实验动物的采血部位与方法，与动物种类、检测目的、实验方法以及所需血量有关。常用的采血部位有眼眶静脉丛采血、尾静脉采血、断头采血、心脏采血、腋下静脉采血、颈静脉（动脉）采血、腹主动脉采血、股动脉采血、耳静脉采血、后肢外侧皮下小隐静脉和前肢内侧皮下头静脉采血等。

采血时要注意采血场所要有充足的光线，夏季室温最好保持在 25~28℃，冬季 20~25℃ 为宜，采血用具和采血部位要消毒。若需抗凝血，应在注射器或试管内预先加入抗凝剂。所需采血量应控制在动物的最大安全采血量范围内。不同动物采血部位和采血量的关系见表 1-3。

表 1-3 不同动物的采血部位和采血量

采 血 量	采 血 部 位	动 物 品 种
取少量血	尾静脉	大鼠、小鼠
	耳静脉	兔、犬、猫、猪、山羊、绵羊
	眼眶静脉丛	兔、大鼠、小鼠
	舌下静脉	犬
	腹壁静脉	青蛙、蟾蜍
取中量血	后肢外侧皮下小隐静脉	犬、猴、猫
	前肢内侧皮下头静脉	犬、猴、猫
	耳中央动脉	兔
	颈静脉	犬、猫、兔
	心脏	豚鼠、大鼠、小鼠
	断头	大鼠、小鼠
	翼下静脉	鸡、鸭、鹅、鸽
	颈动脉	鸡、鸭、鹅、鸽
	股动脉、颈动脉	犬、猴、猫、兔
取大量血	心脏	犬、猴、猫、兔
	颈动脉	马、牛、山羊、绵羊
	摘眼球	大鼠、小鼠

实验动物的采血量、血量占体重的百分比、血浆量、最大安全采血量和最小致死采血量见表 1-4。

表 1-4 常用实验动物的血容量和采血量

动 物	全血量 (ml/kg)	血量占体重 (%)	血浆量 (ml/kg)	常规采血量 (ml)	最大安全采血量 (ml/kg 或 ml)	最小致死采血量 (ml)
小鼠	74.5±17.0	6.0~7.0	48.8±17.0	0.10	7.7 0.1	>0.3
大鼠	58.0±14.0	6.0~7.0	31.3±12.0	0.50	5.5 1.0	>2.0
豚鼠	74.0±7.0	6.0~7.0	38.8±4.5	1.0	7.7 5.0	>10.0
家兔	69.4±12.0	6.0~7.0	43.5±9.1	1.0	7.7 10.0	>4.0
猫	84.6±14.5	6.0~7.0	47.7±12.0	1.0	7.7	
鸡	95.5±24.0	8.8~10.0	65.6±12.5	1.0	9.9 15.0	>30.0
犬	92.6±24.0	8.0~9.0	53.8±20.1	3.00~5.00	9.9 50.0	200
猴	75.0±14.0	6.0~7.0	47.7±13.0	2.00	6.6 15.0	>60.0
猪	69.4±11.5	5.0~6.0	41.9±8.9	5.00~10.00	6.6	
绵羊	58.0±8.5	6.0~7.0	41.9±12.0	5.00~20.00	6.6 300.0	>1500
乳牛	57.4±5.5	6.0~7.0	38.8±2.51	0.00~20.00	7.7	
马	72.0±15.0	6.0~11.0	51.5±12.0	10.0~20.00	8.8	

(三) 血液采集时的注意事项

1. 在采血时要避免溶血 溶血将造成成分混杂，引起测量误差。
2. 静脉血和动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外，静脉血中乳酸含量比动脉血中略高。
3. 整个试验期间，采取的血液样品须保持时间一致 在昼夜之间，或动物在饥饿与饱食的不同状态下，血液成分往往有较大不同。因此整个试验期间，选择采取血液样品的时间必须一致。另外，也应注意多次采血检测结果时，采血后测定时间、室温、试剂盒批号（或用主要试剂）等也应尽可能一致。
4. 采血时应注意不宜一次采血量过多或采血过于频繁 采血量过多或过于频繁会影响动物健康，造成贫血，甚至死亡。

(四) 血清的制备

血清是全血中不加抗凝剂自然凝固后析出的淡黄色清亮液体。其所含成分接近于组织间液，代表着机体内环境的理化性状，比全血更能反映机体的状态，是常用的血液样品。

血清制备过程：将采集的血液直接注入试管，将试管倾斜放置，使血液形成一斜面。夏季于室温下放置，待血液凝固后，即有血清析出；冬季室温较低，不易析出血清，需将血液置于 37℃ 水浴或温箱中保温，以促进血清析出。另外，也可将采集的血液注入洁净的离心管中，待血液凝固后，以钝头玻璃棒将血块与管壁轻轻剥离，2000~2500r/min 离心 15min 使血清析出。析出的血清应及时用吸管吸出备用，若不清亮或带有血细胞，应再次离心；制备



好的血清，应及时进行实验测定，否则应加盖冷藏备用。

（五）全血及血浆的制备

若要用血浆或全血样品，须在血液凝固前用抗凝剂处理。

1. 抗凝剂的种类 实验室常用的抗凝剂有如下几种，可根据情况选择使用。

（1）肝素：最佳抗凝剂，主要抑制凝血酶原转变为凝血酶，从而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白而抗凝。0.1~0.2mg 或 20IU 可抗凝 1ml 血液。

配成 10mg/ml 的水溶液。每管加 0.1ml 于 37~56℃ 烘干，可抗凝 5~10ml 血液（市售肝素钠溶液中每毫升含 12 500IU，相当于 100mg，故每 125IU 相当于 1mg）。

（2）乙二胺四乙酸二钠盐（简称 EDTA_{Na2}）：EDTA_{Na2} 易与钙离子络合而使血液不凝。0.8g 该钠盐可抗凝 1ml 血液。

配成 4% EDTA_{Na2} 水溶液。每管装 0.1ml，80℃ 烘干。可抗凝 5ml 血液。此抗凝血液常用于多种生化分析。但不能用于血浆中含氮物质、钙及钠的测定。

（3）草酸钾（钠）：此抗凝剂优点是溶解度大，可迅速与血中钙离子结合，形成不溶性草酸钙，使血液不凝固。每毫升血液用 1~2mg 即可。

配制 10% 草酸钾（钠）水溶液。吸取此液 0.1ml 放入试管中，缓慢转动试管，使溶液尽量分散在试管壁上，置 80℃ 烘箱烤干（若超过 150℃ 则分解），管壁即呈一薄层白色粉末，加塞备用。可抗凝血液 5ml。此抗凝血剂常用于非蛋白氮等多种测定项目。不适用于钾、钙的测定。

（4）草酸钾-氟化钠：氟化钠是一种弱抗凝剂。但浓度为 2mg/ml 时能抑制血液内葡萄糖的分解，因此在测定血糖时常与草酸钾混合使用。

取草酸钾 6g、氟化钠 3g，溶于 100ml 蒸馏水中。每支试管加入 0.25ml，于 80℃ 烘干备用，每管可抗凝 5ml 血液。因氟化钠抑制脲酶活性，所以此抗凝血剂不能用于脲酶法中尿素氮的测定，也不能用于淀粉酶及磷酸酶的测定。

除上述抗凝剂外，还有柠檬酸钠（枸橼酸钠）、草酸铵等，这些抗凝剂不常用于生化分析。

注意：抗凝剂用量不可过多，如草酸盐过多，将造成钨酸法制备血滤液时，蛋白质沉淀不完全，测氯时加奈氏试剂后易产生浑浊等现象。

2. 全血的制备 全血是指抗凝的血液，即在血液取出后立即与适量的抗凝剂充分混合，以免血液凝固。将刚采取的血液注入预先加有适合要求的抗凝剂试管中，轻轻摇动，使抗凝剂完全溶解并分布于血液中。

3. 血浆的制备 将已抗凝的全血放置一段时间或于 3000r/min 离心 10min，沉降血细胞，上层清液即为血浆。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，尽量减少振荡。血浆比血清分离的快而且量多。两者的差别主要是血浆比血清多含一种纤维蛋白原，其他成分基本相同。

（六）无蛋白血滤液的制备

测定血液或其他体液的化学成分时，样品内蛋白质的存在常常干扰测定。因此，需要先做成无蛋白血滤液再行测定。无蛋白血滤液制备的基本原理是以蛋白质沉淀剂沉淀蛋白，用过滤法或离心法除去沉淀的蛋白。常用的方法如下。



1. 三氯醋酸法

(1) 原理：三氯醋酸为有机强酸，能使蛋白质变性而沉淀。

(2) 试剂：10%三氯醋酸溶液。

(3) 操作：取10%三氯醋酸9份置于锥形瓶或大试管中，加1份已充分混匀的抗凝血。加时要不断摇动，使其均匀。静置5min，过滤或2500r/min离心10min。即得10倍稀释的清明透亮无蛋白血滤液。

2. 福林-吴宪法（钨酸法）

(1) 原理：钨酸钠与硫酸混合，生成钨酸。血液中的蛋白质在pH小于其等电点的溶液中时，可被钨酸沉淀。沉淀液过滤或离心，上清液即为无色、透明、pH约为6的无蛋白血滤液。可供非蛋白氮、血糖、氨基酸、尿素、尿酸及氯化物等项目测定使用。

(2) 试剂：10%钨酸钠溶液：称取钨酸钠100g溶于少量蒸馏水中，最后加蒸馏水至1000ml。此液以1%酚酞为指示剂试之应为中性（无色）或微碱性（呈粉红色）；1/3mol/L硫酸溶液。

(3) 操作：取50ml锥形瓶或大试管1支；吸取充分混匀的抗凝血1份，擦净管外血液，缓慢放入锥形瓶或试管底部；准确加入蒸馏水7份，混匀，使之完全溶血；加入1/3mol/L硫酸溶液1份，随加随摇；加入10%钨酸钠1份，随加随摇；放置约5min后，若振摇亦不再发生泡沫，说明蛋白质已完全变性沉淀。过滤或离心（2500r/min，10min）即得完全澄清无色的无蛋白血滤液。

制备血浆或血清的无蛋白血滤液与上述方法相似。不同点是加水8份，而钨酸钠和硫酸溶液各加1/2份。

3. 氢氧化锌法

(1) 原理：血液中蛋白质在pH值大于等电点的溶液中可用 Zn^{2+} 来沉淀，生成的氢氧化锌本身为胶体，可将血中葡萄糖以外的许多还原性物质吸附沉淀。所以，此法所得滤液适合血液中葡萄糖的测定。但测定尿酸和非蛋白氮时含量降低，不宜使用此滤液。

(2) 试剂：10%硫酸锌溶液；0.5mol/L氢氧化钠溶液。

(3) 操作：取干燥洁净50ml锥形瓶或大试管1支，准确加入7份水；准确加入混匀的抗凝血1份，摇匀；加入10%硫酸锌溶液1份，摇匀；慢慢加入0.5mol/L氢氧化钠溶液1份，边加边摇。放置5min，用定量滤纸过滤或离心（2500r/min，10min）。即得10倍稀释的清明透亮滤液。

4. 黑登改良法 取血液1份加入锥形瓶或大试管中，加入8份1/24 mol/L硫酸溶液，此时血细胞迅速破裂，颜色变黑（若反应进行较慢，可振摇容器以加速反应进行），再加入10%钨酸钠溶液1份。摇匀，过滤或离心即可。此方法的优点是产生的滤液较多。

二、组织样品的制备

离体组织在适宜的温度和pH等条件下，可以进行一定程度的物质代谢。因此，在动物生物化学实验中，常利用离体组织研究各种物质代谢的途径与酶系的作用，也可从组织中提取各种代谢物质或酶进行实验研究。

但各种组织离体时间过长后，组织内部要发生相应变化。如组织中的某些酶在久置后发生变性而失活。有些组织成分如糖原、ATP等在动物死亡数分钟至十几分钟内，其含量即有明显降低。因此，利用离体组织进行代谢研究或作为实验材料时，必须迅速将其取出，并尽



快进行提取或测定。一般采用断头法处死动物，放出血液后立即取出所需的脏器或相应组织，去除外层脂肪及结缔组织后，用冰冷生理盐水洗去血液，必要时也可用冰冷生理盐水灌注脏器以洗去血液，再用滤纸吸干，则可作为实验材料。取出的脏器或组织，可根据不同目的，用以下方法分别制成不同的组织样品。

(1) 组织糜：将组织用剪刀迅速剪碎，或用绞肉机绞成糜状即可。

(2) 组织匀浆：新鲜组织称取重量后剪碎，加入适当的匀浆制备液，用高速电动匀浆器将组织研磨成匀浆。为了降低研磨产生的热量，使组织及酶不致变性，制备匀浆时一般应将玻璃匀浆管插入冰水浴中，适当控制研磨的速度。常用的玻璃匀浆管由一种特制的厚壁毛玻璃管和一个一端带有磨砂玻璃杵头的研磨杆组成。规格大小不一，使用时可根据需要进行选择。

三、生物高分子的制备

研究酶、蛋白质和核酸等生物高分子的结构与功能，须首先解决生物高分子的制备问题，而生物高分子的分离、纯化与制备是一件十分细致的工作。生物高分子的制备主要有以下特点：生物材料的组成十分复杂，常包含数百种甚至数千种物质；多数生物高分子在组织样品中的含量极少，分离纯化的步骤烦琐，流程长；多数生物高分子一旦离开了生物体内的环境就容易失活，分离过程中如何防止生物高分子物质失活是提取制备的关键；制备过程几乎都是在溶液中进行的，pH 值、温度、离子强度等参数对溶液中各种物质的综合影响有时很难准确估计和判断。

(一) 生物材料的前处理

1. 生物材料的选择 制备生物高分子，首先要选择适宜的生物材料。选择的材料应来源丰富、目的物质含量高、制备工艺简单、成本低等。另外，材料应尽可能新鲜，尽快提取处理。如暂不提取，材料则需低温冷冻保存。动物组织要先去除结缔组织、脂肪等成分。如果所要提取的物质在细胞内，则须先破碎细胞，然后用适当的溶剂提取。

2. 细胞破碎 对于细胞中大多数成分，如 DNA、RNA、酶和蛋白质等都需首先破碎细胞，做成组织匀浆后再进行分离和提取。因此动物生化实验中，破碎组织细胞是重要的操作之一。不同生物体或同一生物体不同部位的组织，其细胞破碎的难易程度不一，使用的方法也不相同。常用的方法具体介绍如下。

(1) 研磨法：将新鲜的组织器官去除血污和其他组织后，加入适当的溶液，直接用玻璃匀浆器磨成匀浆，或加入石英砂研磨成匀浆。此法多用于肝脏、肾脏等组织的处理。组织匀浆需在低温下进行。组织离体后应置于冰冷溶液中，匀浆时匀浆器相互摩擦会产生大量热量，易使酶或蛋白质变性，所以在匀浆器的中空部要放入冰盐溶液，匀浆器外套管也应用冰盐溶液冷却。

(2) 组织捣碎法：这是一种用组织捣碎机破碎细胞的方法，该法的优点是快速，但应注意由于瞬间高温可能引起蛋白质变性。多用于心脏等坚实组织的提取。操作时亦可用组织捣碎机捣成组织糜，然后再用玻璃匀浆器研磨。

(3) 溶胀法：细胞膜为天然的半透膜，在低渗溶液中，由于存在渗透压差，溶剂分子大量进入细胞内，将细胞膜胀破释放出细胞内容物。

(4) 超声波法：此法是借助超声波的振动使细胞膜和细胞器破碎。破碎细菌和酵母菌时，



操作时间要长一些。

(5) 反复冻融法：将待破碎的细胞冷至 $-15\sim-20^{\circ}\text{C}$ ，然后置于室温（或 40°C ）迅速融化，如此反复多次，由于细胞内形成冰粒使剩余胞液的盐浓度增高，而引起细胞溶胀破碎。多用于红细胞的破碎。

(6) 有机溶剂处理法：利用甲苯、氯仿、丙酮等脂溶性溶剂或 SDS（十二烷基硫酸钠）等表面活性剂处理细胞，可将细胞膜溶解而使细胞破裂，此法可与研磨法联合使用。

3. 生物高分子的抽提 抽提是在分离纯化之前，将经过预处理或破碎的细胞置于溶剂中，使被分离的生物高分子充分释放到溶剂中，并尽可能使其保持原来的天然状态、保持其生物活性的过程。抽提效果的好坏，关键在于溶剂的选择。选择溶剂的原则：目的物质在所选溶剂中溶解度大，既能保持其生物活性，又能使多数杂质蛋白变性沉淀。

蛋白质和酶常可采用稀酸或稀碱、稀盐溶液、缓冲液、有机溶剂等方法进行抽提。

(1) 稀酸或稀碱：蛋白质、酶的溶解度和稳定性与溶液的 pH 值有关。在适宜的酸碱环境中，蛋白质或酶的溶解度会增加，但过酸、过碱都易引起蛋白质变性。一般提取溶剂的 pH 值应在蛋白质和酶的稳定范围内，常常将 pH 值控制在 $6\sim 8$ 之间，在等电点的两侧。

(2) 稀盐溶液：离子强度对生物高分子的溶解度有很大的影响，绝大多数蛋白质在低离子强度溶液中都有较大的溶解度，如在纯水中加入少量中性盐，蛋白质的溶解度比在纯水中大大增加，这种现象称为“盐溶”。该现象的产生主要是少量离子的活动，减少了偶极分子之间极性基团的静电吸引，增加了溶质和溶剂分子间相互作用力的结果。

(3) 有机溶剂：一些和脂类结合比较牢固，或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶难溶于水、稀盐、稀酸或稀碱中，常用不同比例的有机溶剂进行提取。常用的有机溶剂有丙酮、乙醇、异丙醇等，这些溶剂可与水互溶或部分互溶，同时具有亲水性和亲脂性。有些蛋白质和酶既溶于稀酸、稀碱，又溶于含有一定比例有机溶剂的水溶液。在这种情况下，采用稀的有机溶剂提取常常可以防止酶被破坏，并兼有去除杂质提高纯化效果的作用。

提取时为防止蛋白质等生物高分子变性或降解，需要注意以下几点：一般应在 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 的低温下操作；必要时可加入降解酶的抑制剂；搅拌时要温和，速度太快易产生大量泡沫，增大与空气的接触面，会引起酶等物质的变性失活。

（二）生物高分子的分离纯化

生物高分子的分离纯化方法多种多样。根据生物分子大小和形态的不同，方法有差速离心、分子筛、超滤、透析等；根据生物分子溶解度的不同，方法有盐析、有机溶剂沉淀、萃取、分配层析和结晶等；根据生物分子所带电荷的不同，方法有等电聚焦电泳、离子交换层析等；根据生物分子生物功能专一性的不同，方法有亲和层析等。

生物体的组成成分非常复杂，不可能有一种适合于各类分子的共同分离程序，但多数关键分离步骤的操作手段是相同的。常用的分离纯化方法和技术：透析、超滤、沉淀、离心、层析、色谱以及电泳等。以下主要介绍透析、超滤、沉淀等分离纯化方法。

1. 透析 该法是利用蛋白质等生物高分子不能透过半透膜而进行分离纯化的一种方法。先将含一定盐浓度的生物高分子溶液装入透析袋内，将袋口扎好放入装有蒸馏水的容器中，用搅拌方法使蒸馏水不断流动，经过一段时间后，透析袋内除高分子外，低分子盐类物质透过半透膜进入蒸馏水中，最终膜内外盐浓度达到平衡（图 1-1）。在透析过程中，通常要更换



几次容器中的液体,使透析袋内的溶液达到脱盐的目的。脱盐透析是应用最广泛的一种透析方法。

如将透析袋放入高浓度吸水性强的多聚物溶液中,透析袋内溶液中的水便迅速被袋外多聚物所吸收,从而达到袋内液体浓缩的目的。这种方法称为“反透析”。常用作“反透析”的多聚物有聚乙二醇、右旋糖、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖等。透析用的半透膜很多,如玻璃纸、棉胶、皮纸等都用来制作半透膜。

2. 超滤 超滤是利用一定孔径大小的微孔滤膜,对生物高分子溶液进行过滤(常压、加压或减压),使高分子截留在超滤膜上面的溶液中,低分子物质及水过滤出去,进而达到浓缩或脱盐的目的。这种利用超滤膜过滤分离高分子和低分子物质的方法称为超滤法(图1-2)。

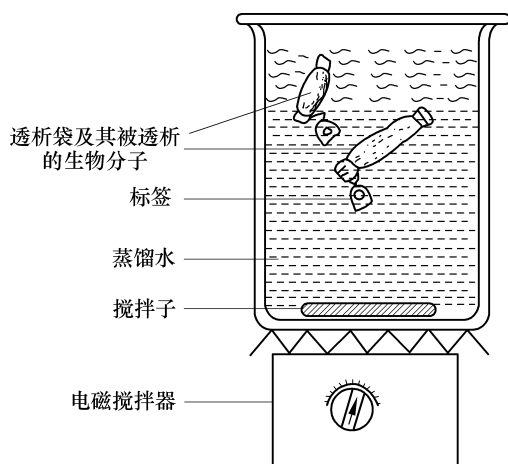


图 1-1 透析法示意图

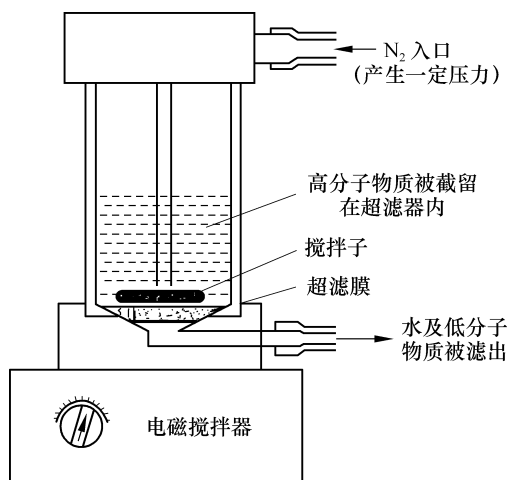


图 1-2 超滤法示意图

超滤现已成为一种重要的生化实验技术,主要用于生物高分子的脱盐、脱水和浓缩等。超滤技术的关键是膜。常用的膜是由硝酸纤维或乙酸纤维或此二者的混合物制成。近年来出现了非纤维型的各类异性膜,如聚砜膜、聚砜酰胺膜和聚丙烯腈膜等。这种膜在 pH 1~14 间都是稳定的,且在较高温度下也能正常工作。

超滤技术的优点是操作简便,实验条件温和,与蒸发、冰冻干燥相比没有相的变化,且不引起温度、pH 值的变化,因而可以防止生物高分子的变性、失活和自溶等。另外,成本相对低廉,无须添加任何化学试剂。

超滤法也有一定的局限性,它不能直接得到干粉制剂。对于蛋白质溶液,一般只能达到 10%~50% 的纯度。另外,由于超滤法处理的液体多数含有水溶性生物高分子、有机胶体、多糖及微生物等。这些物质极易黏附于膜表面上,造成严重的堵塞,这是超滤法常出现的问题,通常可通过加大液体流量,加强搅拌和加强湍流等方法解决。

3. 沉淀 溶液中的溶质由液相变成固相析出的过程称为沉淀。沉淀法是分离纯化高分子物质,特别是制备蛋白质或酶时的常用方法。该法操作简便,成本较低。该法依据不同物质在同一溶剂中的溶解度不同而进行分离。物质溶解度的大小与溶质和溶剂的化学结构及性质有关,改变溶液的 pH 值、溶剂的组分或加入某些沉淀剂,以及改变溶液的离子强度和极性等都会使溶质的溶解度发生改变。不同溶解度的产生是由于溶质分子间及溶质与溶剂分子之间亲和力不同而引起的。常用的几种沉淀方法如下。



(1) 盐析法：该法多用于多种蛋白质和酶的分离纯化。在高浓度盐溶液中，蛋白质由于表面的水化膜被破坏、溶解度下降而从溶液中沉淀出来。各种蛋白质的溶解度不同，因而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀分离各种蛋白质。盐析法提纯蛋白质时应考虑以下几个条件。

1) 盐的种类：盐析时常用的中性盐有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最广泛的是硫酸铵，该盐具有溶解度大，且溶解度受温度影响不大，不易引起蛋白质变性等优点，该盐的缺点是其中的铵离子常干扰二缩脲反应，为蛋白质的定性分析带来了一定困难。

2) 盐的浓度：分段盐析法是通过改变盐浓度达到分离的目的，即将盐的浓度准确地分步提高到各种蛋白质所需的浓度。盐的浓度常用饱和度表示，饱和溶液定为 100%。

3) pH 值：溶解度与溶液的 pH 值有密切关系。当溶液的 pH 值达到蛋白质等电点时，蛋白质的溶解度最低，易从溶液中析出，因此在盐析时，应控制溶液的 pH 值使之等于或接近蛋白质的等电点。

4) 温度：温度对蛋白质溶解度的影响不如 pH 值影响显著。因此，盐析法对温度的要求不严格，低温盐析主要是为了防止蛋白质变性。

5) 蛋白质浓度：溶液中蛋白质浓度越高，盐析所需的盐饱和度越低。所以，盐析时蛋白质浓度不宜过低。但过高的蛋白质浓度也不适合，会和其他蛋白产生共沉淀作用而影响分离蛋白的纯度。

(2) 有机溶剂沉淀法：有机溶剂能使许多蛋白质（酶）、核酸、多糖和低分子物质发生沉淀作用，是较早使用的沉淀方法之一。其主要原理：通过向溶液中加入有机溶剂降低溶液的介电常数，减小溶剂的极性，从而削弱溶剂分子与蛋白质分子间的相互作用，导致蛋白质溶解度降低而沉淀；由于使用的有机溶剂与水互溶，它们在溶解于水的同时从蛋白质分子周围的水化层中夺走了水分子，破坏了蛋白质分子的水膜，因而使蛋白质沉淀。

有机溶剂沉淀法具有分辨能力高、沉淀物不用脱盐、过滤比较容易等优点。其缺点是容易引起某些生物高分子变性失活，操作需在低温下进行。

有机溶剂沉淀法的影响因素主要有以下几个方面：

1) 温度：多数生物高分子，如蛋白质、酶和核酸在有机溶剂中对温度特别敏感，温度稍高就会引起变性，且有机溶剂与水混合时常产生放热反应，因此该法操作时要在冰浴中进行，加入有机溶剂时必须缓慢且不断搅拌以免局部浓度过大。通常情况下，温度越低得到的蛋白质活性越高。

2) 样品浓度：低浓度样品回收率低，高浓度样品可以节省有机溶剂，减少变性的危险，但杂蛋白的共沉淀作用大。通常使用 5~20mg/ml 的蛋白质初浓度较为适宜。

3) pH 值：应选择样品稳定的 pH 值范围，通常选在等电点附近，从而提高分辨能力。

沉淀所得的固体样品，如果不立即溶解进行下一步分离，则应尽可能抽干沉淀，减少其中有机溶剂的含量，如若必要可以透析脱去有机溶剂，以免影响样品的生物活性。

(3) 选择性变性沉淀法：该法包括热变性沉淀、表面活性剂变性沉淀和有机溶剂变性沉淀、选择性酸碱变性沉淀等几种，多用于除去某些不耐热和在一定 pH 值下易变性的杂蛋白。

1) 热变性沉淀：利用生物高分子对热的稳定性不同，提高温度使杂蛋白变性沉淀而使目的蛋白保留在溶液中。

2) 表面活性剂变性沉淀和有机溶剂变性沉淀：使那些对表面活性剂和有机溶剂敏感性强的杂蛋白变性沉淀。该法通常在冰浴或冷室中进行。



3) 选择性酸碱变性沉淀: 利用对 pH 值的稳定性不同而使杂蛋白变性沉淀。通常是在分离纯化流程中附带进行的分离纯化步骤。

(4) 等电点沉淀法: 利用两性电解质在达到电中性时溶解度最低、易发生沉淀的性质, 进行蛋白质的纯化分离。氨基酸、蛋白质、酶和核酸都是两性电解质, 可以利用此法进行初步的沉淀分离。由于许多蛋白质的等电点十分接近, 而且带有水化膜的蛋白质等生物高分子仍有一定的溶解度, 不能完全沉淀析出, 因此, 单独使用此法分辨率较低, 常与盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀剂一起配合使用, 以提高沉淀能力和分离效果。

第4节 实验报告的撰写要求

动物生物化学实验是在生化理论指导下的实践活动。实验目的在于经过实践训练掌握科学观察的基本方法和技能, 培养学生科学思维、分析判断及解决实际问题的能力, 培养学生尊重科学事实和真理的学风。反过来, 通过实验还可加深和扩大学生对生化理论的认识。

为达到实验目的, 要求学生应在实验前进行预习, 使学生对实验内容、目的要求、基本原理、基本操作及注意事项有初步的了解; 要求学生在实验中合理组织安排时间, 严肃认真地进行操作, 细致观察各种变化并如实做好实验结果的记录; 还要求学生在操作结束后认真进行计算或分析, 写出实验报告。

一、实验记录

实验记录应及时、如实、准确、详尽、清楚。回顾性的记录容易造成有意或无意的失真。实验中应将观察到的现象、结果、数据及时记录在记录本上。实验结果的记录不可掺杂任何主观因素, 不能受现成资料及他人实验结果的影响。若出现“不正常”的现象, 更应如实详尽记录。

表格式的记录方式简练而清楚, 值得提倡使用。如无专用的记录本, 可分项记录于《实验指导》中相应的操作项目之下。记录时字迹必须清楚, 不提倡使用易于涂改及消退的笔、墨作原始记录。

完整的实验记录应包括实验日期、内容、目的、操作、现象及结果(含计算结果及各种图表)。使用精密仪器进行实验时还应记录仪器的型号及编号。实验结束后, 应及时整理和总结实验结果, 写出实验报告。按照实验内容的不同, 实验可分为定性实验和定量实验两大类, 下面分别列举两类实验报告的书写格式, 以供参考。

二、定性实验报告的书写格式

实验编号

实验名称

1. 实验目的和要求
2. 实验原理
3. 实验的操作方法(或步骤)
4. 结果与讨论

在写实验报告时, 可按照实验内容分别写出实验原理、操作过程、结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法(或步骤)可以用工艺流程图的方法或自行设计的表格来表示。某些实验的操作方法可以和结果讨论的部分合并, 自行设计各种表格综合书写。结果与



讨论包括实验结果及观察现象的小结、对实验中遇到的问题和思考题进行探讨，以及对实验的改进意见等。

三、定量实验报告的书写格式

实验编号

实验名称

1. 实验目的和要求
2. 实验原理
3. 实验的试剂配制及仪器
4. 实验的操作方法（或步骤）
5. 实验的数据处理
6. 结果与讨论

在实验报告中，应简明扼要地叙述实验的目的和要求、原理及操作方法部分，但对实验条件（主要试剂与所用仪器型号）和操作的关键环节也须书写清楚。对于实验结果部分，应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的结果和数据进行整理、归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表、标准曲线图以及比较实验组与对照实验结果的图表等。

另外，还应针对实验结果进行必要的分析说明。讨论部分一般包括：对实验方法或操作技术及有关实验中遇到的其他问题，如对实验的正常结果和异常现象以及思考问题进行探讨；对于实验设计的认识、体会和建议；对实验课改进的建议等。每个实验报告都应按照上述要求书写。实验报告的书写水平是衡量学生实验成绩的一个重要方面。实验报告必须独立完成，严禁抄袭。



动物生物化学

常用实验技术原理 第2章

第1节 离心技术

离心技术在生命科学，特别是在生物化学和分子生物学研究领域已得到广泛的应用，每个生物化学实验室都要配置各种型号的离心机。离心技术主要用于多种生物样品的分离和制备，生物样品悬浮液在高速旋转下，由于强大的离心力作用使悬浮的微小颗粒（细胞器、生物高分子等）以一定的速度沉降，从而与溶液分离，其沉降速度取决于分子的质量、大小和密度。

一、离心技术的基本原理

当一个粒子（生物高分子或细胞器）受到离心力作用时，离心力 F 的大小可由下式表示：

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

式中， m 代表沉降粒子的有效质量； ω 代表粒子旋转的角速度； r 表示粒子的旋转半径（cm）。

通常离心力常用地球引力的倍数来表示，因而称为相对离心力（RCF），即在离心场中，作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数，常用字母“ g ”来表示。相对离心力 RCF 可用下式计算：

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times (r/\text{min})^2 \times r$$

式中的 r/min 表示转子每分钟的转数，由上式可见，只要给出旋转半径 r ，则 RCF 和 r/min 之间可以相互换算。由于转头形状及结构的差异，使每台离心机的离心管，从管口至管底的各点与旋转轴之间的距离是不一样的。科技文献中离心力的数据通常是指其平均值，即离心管中点的离心力。

一般情况下，低速离心时常以转速“ r/min ”来表示，高速离心时则以“ g ”来表示。“ g ”代替每分钟转数“ r/min ”，因为它可以真实反映颗粒在离心管内不同位置的离心力及其



动态变化。

二、离心机的主要类型和构造

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性离心机和分析性离心机,制备性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;分析性离心机一般都带有光学系统,主要用于研究生物高分子和颗粒的理化性质,推断物质的纯度、形状和分子质量等。分析性离心机大多是超速离心机。

(一) 制备性离心机

1. 普通离心机 最大转速 6000r/min 左右,最大相对离心力近 6000g,容量为几十毫升至几升,分离形式是固液沉降分离,转头有角式和外摆式之分,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,电动机的碳刷易磨损,转速是用电压调压器调节,启动电流大,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显得尤为重要,否则会损坏离心机。

2. 高速冷冻离心机 最大转速为 2000~25 000r/min,最大相对离心力为 89 000g,最大容量可达 3L,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等,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 0~40℃,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方面的分离纯化工作,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 转速可达 50 000~80 000r/min,相对离心力最大可达 510 000g,离心容量由几十毫升至 2L,分离形式有差速沉降分离和密度梯度区带分离之分,离心管平衡允许的误差 $<0.1g$ 。超速离心机的出现,使生物科学的研究领域得以不断扩展,它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。

超速离心机主要由精密齿轮箱或皮带变速,或直接用变频感应电动机驱动,并由计算机进行控制,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,而不致引起震动或转轴损伤,除速度控制系统外,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冷冻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,这是它与高速冷冻离心机的主要区别。离心机的速度在 2000r/min 以下时,空气与旋转转头之间的摩擦只产生少量的热量,速度超过 20 000r/min 时,由摩擦产生的热量显著增大,当速度在 40 000r/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,摩擦力减小,这样才能达到所需的超高转速。



(二) 分析性离心机

分析性离心机使用了特殊设计的转头和光学检测系统,以便连续地监视物质在一个离心场中的沉降过程,从而确定其物理性质。分析性离心机的转头呈椭圆形的,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,转头在一个冷冻和真空的腔中旋转,转头上有2~6个装有离心杯的小室,离心杯由扇形石英材料制成,可以上下透光,离心机中装有一个光学系统,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的物质,在预定的期间可以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。

分析性离心机的主要特点就是能在短时间内,用少量样品就可以得到一些重要信息,能够确定生物高分子是否存在,其大致的含量,计算生物高分子的沉降系数,结合界面扩散结果估计分子的大小,检测分子的不均一性及混合物中各组分的比例,测定生物高分子的分子质量,还可检测生物高分子的构象变化等。

(三) 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。它是由一块完整的金属制成,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,角度越大沉降越结实,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. 荡平式转头 这种转头是由吊着的4个或6个自由活动的吊桶(离心套管)构成。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,吊桶荡至水平位置,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,因而利于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 区带转头无离心管腔,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,把桶内分隔成4个或多个小室,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转头和外摆式转头,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混乱,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,使超速离心用于工业生产成为可能。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,适合于密度梯度区带离心,离心结束后液面和样品区带要作 90° 转向,因而降速要慢。

5. 连续流动式转头 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。

(四) 离心管

离心管主要用塑料或不锈钢材料制成，塑料离心管常用的材料有聚乙烯 (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。管盖有 3 种作用：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；防止样品挥发；支持离心管，防止离心管变形。

三、常用的离心方法

(一) 差速沉降离心法

差速沉降离心法是最普通的离心法。即采用逐渐增加离心速度或低速和高速交替进行离心，使沉降速度不同的颗粒，在不同的离心速度及不同离心时间下分批分离的方法 (图 2-1)。此法一般用于分离沉降系数相差较大的颗粒。差速沉降离心首先要选择好颗粒沉降所需的离心力和离心时间。当以一定的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 2 部分较大较重颗粒的沉淀及含较小和较轻颗粒的上清液，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。此法所得的沉淀是不均一的，仍掺杂有其他成分，需经过 2~3 次的再悬浮和再离心，才能得到较纯的颗粒。

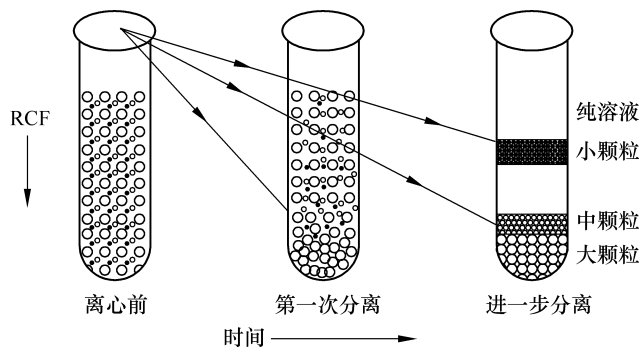


图 2-1 差速沉降离心示意图

此法主要用于从组织匀浆液中分离细胞器和病毒，其优点：操作简易，离心后用倾倒数即可将上清液与沉淀分开，并可使用容量较大的角式转头。缺点：须多次离心，沉淀中有夹带，分离效果差，不能一次得到纯颗粒，沉淀于管底的颗粒受挤压，容易变性失活。

(二) 密度梯度区带离心法

密度梯度区带离心法又称区带离心法，即将样品加在惰性梯度介质中进行离心沉降或沉降平衡，在一定的离心力下把颗粒分配到梯度中某些特定位置上，形成不同区带的分离方法。