

# 离心技术

## 课程安排&考核方式



对期末考题的猜测: 看授课老师照片猜名字

## 授课内容

离心机无处不在

$\begin{cases} \text{工业用离心机} \\ \text{实验用离心机} \end{cases}$

什么是离心技术？

$\begin{cases} \text{沉降现象} \\ \text{离心运动} \end{cases}$

**沉降现象：** 地球引力场里任何物体受地球引力作用都具有下沉现象  $\$ (质量 \uparrow \text{重力} \uparrow \text{沉降速度} \uparrow) \$$ 。

自然沉降： 耗时、效率低 自然搁置状态无法分离

**离心技术：** 用离心机对样品进行分离、纯化和提取的操作统称为离心 分离操作，其技术为离心分离技术，简称离心技术。

是根据颗粒在匀速圆周运动时受到一个外向的离心力的行为发展起来的一种分离分析技术

不是哥们！ 没懂受到离心力是啥意思，先这么背着吧...等会邮件问老师

1.1离心技术发展史

$\begin{cases} \text{19世纪：手摇离心机（用于食品制作：提纯、分离杂质）} \\ \text{16世纪：最早的显微镜} \end{cases}$

年份	事件
1912	电动低速台式离心机的商品化 (3,000rpm 以下)
1923-1926	第一台试验型超速离心机 (45,000rpm 具有光学系统的分析超速离心机)
1932-1934	细胞核、线粒体、黄热病病毒用离心设备 成功分离或纯化
1940	Svedberg 等撰写出版世界上第一本有关离心技术的专著《The Ultracentrifugation》。Svedberg 被公认为实验离心技术的奠基人，因这方面的成就而获得诺贝尔奖
1947	全球首台商用离心机问世 (Beckman coulter Model E )
1955	开始了超高速、低速大容量离心机以及分析用超速离心机的商品化生产
1957-1958	Meselson和Stahl开发了等密度离心法并用该法首次证明DNA双螺旋结构半保留复制的假说（米西尔逊-斯塔尔实验， Meselson-Stahl experiment）
1984	由 D.Rickwood 等编著《Centrifugation》一书出版，对离心技术的各方面作了比较全面的论述
1992	《Centrifugation》再版，增加了制备超速离心的计算机模拟计算并对生物大分子的最新离心方法作了总结
1998	全球首台超过一百万离心力的台式超速离心机 (Beckman Optima™ MAX)

中国超速离心机的发展

年份	事件
1958-1966	初步探索阶段

1974-20世纪80年代初	离心机研发的黄金时期
20世纪80年代后期	离心机制造产业化发展
2015	首台国内自主生产的超速离心机问世

1.2 离心技术的基本原理

离心力（centrifugal force）



定义：质量为m的一个粒子在高速旋转下受到一个向外的离心力，这种力的大小取决于角速度（ $\omega$ ，以弧度/s表示）和旋转半径（ $r$ ）。此离心力（ $F$ ）由下式定义，即：  $[F=mG=mr\omega^2=mr(\frac{2\pi N}{60})^2]$  式中， $m$ 表示沉降粒子的有效质量（g）； $G$ 为离心加速度； $\omega$ 表示粒子旋转的角速度； $r$ 表示粒子的旋转半径（cm）； $N$ 表示离心机每分钟的转数（r/min）

离心力与该物质：  $\begin{cases} \text{质量（体积、密度）} \\ \text{离心角速度平方} \\ \text{旋转半径} \end{cases}$  **成正比**

假设颗粒在离心场中做匀速圆周运动：（离心力=浮力+粘滞阻力）  $\begin{cases} F=mx\omega^2 \\ F_f=6\pi\eta r\frac{dx}{dt} \end{cases}$   $\rightarrow v=\frac{dx}{dt}=\frac{(\rho_p-\rho_m)V_p}{6\pi\eta r}\omega^2x$

$s=\frac{v}{\omega^2x}=\frac{(\rho_p-\rho_m)V_p}{6\pi\eta r}$

$s$  :沉降系数 物理意义：颗粒在单位离心力作用下的沉降速度，以时间表示，用 $s$ (斜体)表示，**度量单位为秒(s)**。沉降系数越大，颗粒沉降越快，反之亦然。

是生物大分子的特征常数，与离心速度无关 与颗粒（ $p$ ）密度、形状、大小有关 介质（ $m$ ）密度、粘度，温度、浓度有关

多数生物大分子的沉降系数：  $(1\sim500)\times10^{-13}$ 秒（水中的20℃时）。  $1\times10^{-13}$ 秒为一个沉降单位，称1S（Svedberg）。

- 单纯的蛋白质在1~20S之间 • 较大核酸分子在5~100S之间 • 更大的亚细胞结构在几百-几千S之间
- 常用沉降系数表示一些详细结构及分子质量还不清楚的生物大分子的大小
- 如核糖体，根据沉降系数的大小可分为：55S核糖体、70S核糖体及80S核糖体等，其中S表示沉降系数。

密度差与沉降速度

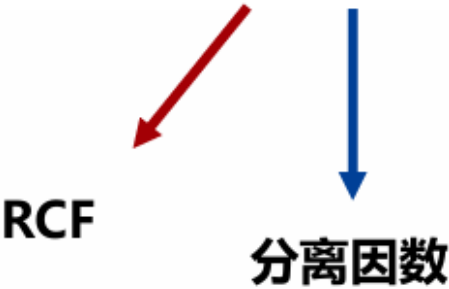
$\rightarrow$  **密度差关系**： •  $\rho_p>\rho_m$ ，下沉 •  $\rho_p=\rho_m$ ，不定向运动 •  $\rho_p<\rho_m$ ，上浮

基本原理---相对离心力和相对离心加速度

• **相对离心力relative centrifugal force** 在离心力场的作用下，颗粒所受离心力相当于地球重力的倍数，用RCF表示，单位是重力加速度（9.8m/s<sup>2</sup>）。不同离心机转子的半径或者离心管至旋转轴中心的距离不同，所受离心力也不同，为便于度量，文献中常用“相对离心力”或“数字\*g”表示离心力 • **相对离心加速度（有些文献会用此表述）** 离心加速度对重力加速度的倍数。表示某转速下所产生的离心力场的强度，用RCF表示。

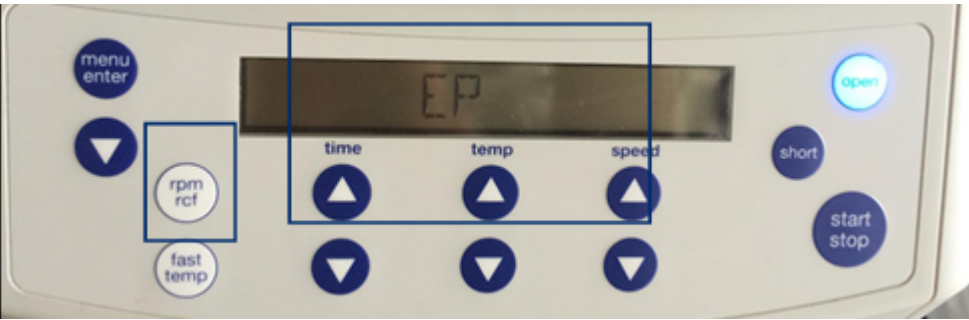
相对离心力	相对离心加速度
$RCF=F/G=m\omega^2r/mg=\omega^2r/g$	$RCF=G/g=\omega^2r/g$

Harvest bacterial culture by centrifuging at 6000 x g for 15 min at 4°C.



[ $RCF = G/g=(4\pi^2N^2r/3600)/980=1.118\times 10^{-5}N^2r$ ] [ $RPM= N=1000(RCF/11.18r)^{1/2}$ ]

N为转速r/min； r为旋转半径，即离心机转轴中心与离心管中心的距离，单位为cm。



**RPM(revolution per minute, r/min):** 表示离心机每分钟的转数 r: 由转子（rotor）决定，因此r必须查阅相关转子的参数而得

RCF和RPM的换算

- 公式计算
- 离心力列线图↔转速和半径相对应

离心机使用涉及到的参数

- RPM: 指离心机的每分钟转速
- RCF: 指离心机产生的相对离心力/相对离心加速度
- g: 离心机的分离因数

在线计算器[点击链接: RPM/RCF Calculator](#)

1.3 常用离心机简介

1. 定义：离心机是一种**机械**，可借由电动机或其他机械的带动而高速转动，产生数千倍于重力的离心力，以加快液体中颗粒的沉降速度，把样品中不同沉降系数和密度质量的**物质分离**。

离心机的分类：按离心机的速度

离心机类型	转速
低速离心机	一般6000r/min，个别机型可达12000r/min
高速离心机	30,000 r/min
超速离心机	不低于30000rpm，典型值50,000 r/min

离心机的分类：按离心机的用途

离心机类型	用途
小型离心机	小量快速离心
制备型大容量低速离心机	$V_{max} = 6000r/min$ ，最大容量500ml×6
高速冷冻离心机	$V_{max} = 18000 - 21000r/min$ ，最大离心力在 $50000\times g$ ，适用于细胞和亚细胞的分离。
制备型超速离心机	最大离心力可达800, 000×g，可进行小量制 备，适用于蛋白质、核酸和多糖等生物大分子的制备
分析型超速离心机	用于生物大分子定性、定量分析

离心机的基本结构



转子/头:

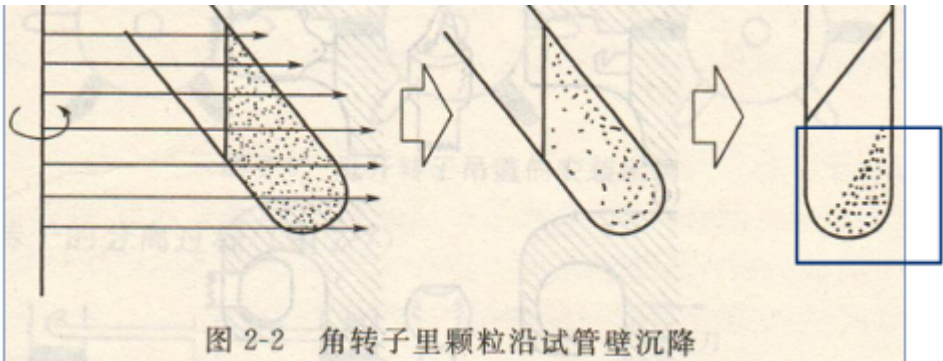
- 离心机核心部件
- 离心机中的主要受力部件
- 直接影响分离效果

转子的分类

\$制备转子\begin{cases} 分批型转子\begin{cases} 角转子\ 水平转子\ 垂直转子\ 区带转子\end{cases}\ 连续转子\ 特殊或专用转子 \end{cases}\$

角转子

定义:装放溶液的离心管与转轴间的角度固定，固定角度转子 特点：具有最大强度，转头内容纳的离心管多，故离心容量大 应用：适用于沉淀离心、差速离心、等密度离心



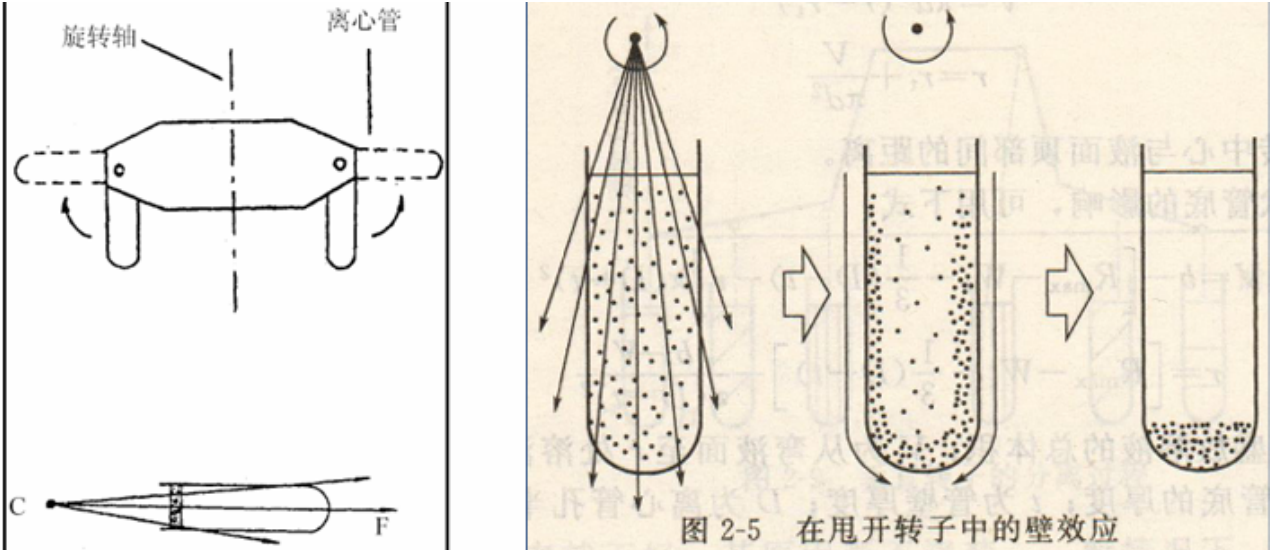


壁效应：颗粒在角转子中沉降时，沿离心力方向先撞到管壁，然后沿管壁再滑向管底，因此，在离心管一侧会出现颗粒的沉积 影响：使颗粒受突然变速而产生对流干扰而影响沉降效果，影响沉淀收集的效率

水平转子

定义：离心管组装在转子的吊桶内，离心机静止状态时离心管平行于转轴垂直于地面。离心时，吊篮受离心力而由垂直位置甩到水平位置，也称为（甩开）吊篮转子或摆平转子等 应用：适合于速率区带离心和等密度离心

壁效应小于角转子



常用离心机转子配置

- Ti：角转子
- SW：水平转子

转子名称	离心管体积	最大转速(rpm)
Ti90	13.5ml	90,000
SW32 Ti	17ml	32,000
Type45 Ti	70ml	45,000
SW28	28ml	28,000
SW55	5ml	55,000

离心管/离心瓶

- 常用材质：塑料、不锈钢、玻璃（很少）
- 区别：机械强度、耐腐蚀性、耐热耐压性

分类

聚丙烯（PP） 聚丙烯和聚乙烯的聚合物（PA） 聚碳酸酯（PC） 聚乙烯（PE） 聚丙烯（PS） 聚氟（PF） 纤维素酯、聚乙烯对苯二酸盐（PET） 醋酸丁酯纤维素（CAB）

性能 名称	是否透明	硬度	最大RCF	耐腐蚀性	是否灭菌
PP	半透明	适中	6000	良好	高温高压
PA	半透明	适中		良好	高压
PC	是	大	50000rpm 以上离心	不耐强酸碱 及某些有机 溶剂如酒精、 油、MDSO	高温高压
PS	是	大		不耐大多有 机物	紫外
PET	是		6000+	不耐有机溶 剂	紫外

1.4 常用离心方法分类

- 1. 沉淀离心
- 2. 差速离心
- 3. 密度梯度离心
- 4. 速率区带离心
- 5. 等密度离心

沉淀离心

指介质密度约1g/ml，选用一种离心速度，使悬浮液中的悬浮颗粒在离心的作用下完全沉淀下来的离心方法

**影响沉降速度的因素** 离心力、离心时间、颗粒大小

提问：这里给出的公式是沿着（等效的）离心力方向的瞬时速度，看起来是是适用于单个颗粒的速度公式，是如何推断沉降用时的？既然加速度正比于速度，不难推出速度应当是时间的e指数式，加速度亦然，那么时间



这一变量与加速度应当成对数关系呀！希望期末考不到这题

沉淀离心：影响因素

离心力&离心时间

颗粒大小

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{(\rho_p - \rho_m)V_p \omega^2 x}{6\pi r \eta}$$

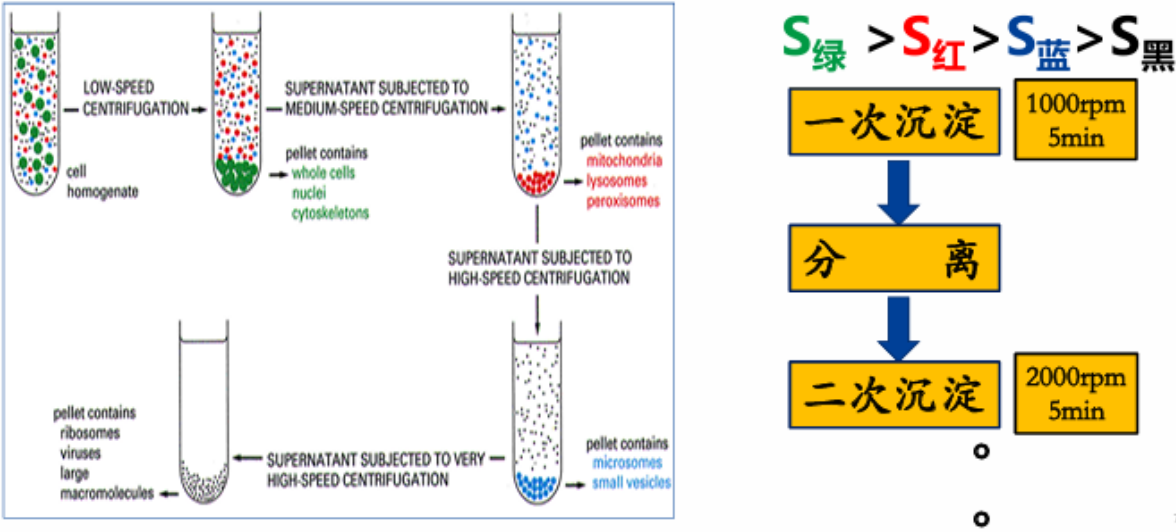
沉降某颗粒需1000g\* 10min

10,000g	离心	1min
100g		100min
1000g		10min
2000g		5min

67

差速离心

$v = s\omega^2x$  定义：利用颗粒在离心场中的沉降系数差异进行逐级分离的离心方法



70

- 分离基础：颗粒的大小、密度和形状明显不同，沉降系数差异较大时
- 用于粗级分离：分辨能力较差，不用于精细分离，沉降系数相差10倍以上；
- 操作繁琐
- 若沉降系数差异较小，可选用速率区带离心（属密度梯度离心）

密度梯度离心density gradient centrifugation

定义：使用密度梯度介质（缓冲液、培养基等）离心的方法

基本过程：

1. 将样品加在惰性梯度介质中进行离心沉降或沉降平衡

2. 在一定的离心力下把颗粒分配到梯度中某些特定位置上
3. 形成不同区带

分类： $\begin{cases} \text{速率区带离心法} \\ \text{等密度区带离心法} \end{cases}$

### 速率区带离心Rate zonal density gradient centrifugation

定义：根据样品中颗粒的沉降速度差异，在预形成密度梯度中进行沉降的方法 特点：与颗粒的密度无关，分离效果只与分离物质的沉降速度有关 适用：**密度相近但质量不同、沉降系数差异不大的颗粒**（相对差速离心而言）

*速率区带离心：因颗粒的不同沉降速度而分层*

方法：把样品铺在一个密度变化范围较小、梯度斜率变化较平缓的密度梯度顶部，在离心力场作用下，样品中的颗粒按照各自的沉降速度移动到梯度中不同位置而形成区带，使不同沉降速度的颗粒得以分离 **密度梯度：抵抗对流的干扰，稳定液柱中的颗粒区带**

#### 密度梯度的选择

- 密度变化范围小，梯度斜率变化较平缓：减小颗粒在梯度介质运动过程中的阻力变化梯度，颗粒不会由于阻力的突然增大而影响其沉降，保证颗粒受到的浮力和粘滞阻力最小，以尽快分离
- 梯度的最小密度（顶端密度）>样品悬浮液的密度：防止悬浮液进入梯度中对颗粒产生流动干扰
- 梯度的最大密度（底端密度）<被分离颗粒密度

#### 离心时间的控制

- 最快颗粒到达管底前或转子壁**形成沉淀前，应停止离心**  $\rightarrow$  否则无从判断沉淀的成分是否单一

#### 速率区带离心成功的准则

- 颗粒**悬浮液**的密度**小于**梯度介质的**最小密度**
- 样品**颗粒密度**大于梯度介质的**最大密度**
- 梯度的**路径长度**必须使颗粒充分分离
- 在**沉降最快的颗粒到达梯度底部前**停止离心

#### 速率区带离心优劣势

- 优点（相对差速离心） 避免反复操作，一次获得； 分辨率高，沉降系数相差20% S的颗粒； 部分收集，分开检测
- 缺点 分离样品量较少

#### 等密度区带离心：因颗粒的不同密度而分层

1. 用介质产生一种密度梯度；
2. 这种密度梯度覆盖了待分离物质所有组分的密度；
3. 通过离心使不同密度的颗粒悬浮到相应的介质密度区

**密度梯度的选择** •  $\rho_p > \rho_m$ ：颗粒在介质中往下沉 •  $\rho_p = \rho_m$ ：在介质处停留  $\rightarrow$  密度差决定颗粒运动方向

颗粒密度和介质密度达到平衡时，所形成的颗粒区带就停止运动，延长离心时间对离心效果无明显影响，即此时与离心时间无关

速率区带离心与等密度区带离心的比较

相同点

- 离心操作均在密度梯度介质中进行
- 形成区带
- 可同时分离多种物质

不同点

- 依据的**原理不同**：（1）速率区带离心：依据颗粒的沉降速率进行分离（2）等密度区带离心：依据颗粒的密度差异进行分离
- 介质的**梯度范围不同**：（1）速率区带离心：介质密度小于样品中各种颗粒的密度（2）等密度区带离心：介质最大密度大于样品中各种颗粒的密度
- **时间效应不同**：（1）速率区带离心不能长时间离心（2）等密度区带离心效果与离心时间无关

梯度介质的选择

1. 化学惰性及低毒性
2. 可以形成明确的密度梯度
3. 可以精确的测定梯度介质的浓度
4. 对渗透压敏感的颗粒应该是等渗的
5. 介质黏度尽可能低
6. 不干扰检测
7. 方便从分离的颗粒中清除
8. 成本

常用的梯度介质

- 亲水性小分子有机物：单糖、双糖、甘油等
- 高分子有机物：多糖、蛋白质等
- 碱金属盐：铯、钾、钠盐等
- 胶态二氧化硅
- 有机三碘苯甲酸衍生物

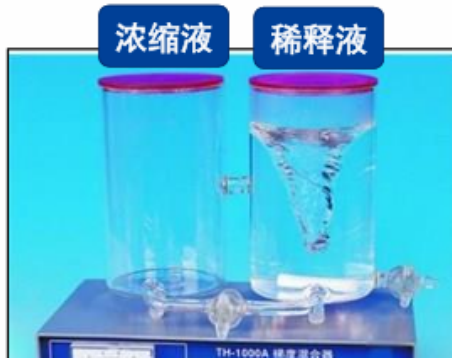
表 4-1 各种类型等密度梯度介质的应用 <sup>①</sup>							
介 质	DNA	RNA	核蛋白	膜	亚细胞器	细胞	病毒
单糖(例蔗糖)	—	—	+	++	++	+	++
多糖(例 Ficoll)	—	—	—	+	+	+++	++
碱金属盐(例 CsCl)	+++	++	+	—	—	—	++
胶态 SiO <sub>2</sub> (例 Percoll)	—	—	—	+	++	++	+
非离子碘化物(例 Nycodenz)	++	++	+++	+++	+++	++	++

① 等级如下：理想，+++；符合要求，++；有限的应用，+；不能使用，—。

梯度介质的制备

- 不连续梯度：通过手工制作，梯度界面不能破坏

- 连续梯度：梯度混合器



两杯液位保持平衡,两杯溶液混合速度以及输出流量均可调节,且可做出各种不同斜率的线形梯度

## 1.5 离心技术的应用

### 离心机的应用领域

离心机广泛运用于科学研究、化学工程、石油、食品加工、制药、选矿工程、炭、水处理、核能工业和船舶等部门。

- 日常生活 • 烹饪时的食物处理，离心机是很方便实用的厨房用品 • 衣物脱水（洗衣机、脱水机）
- 实验用 • 遗传工程学、酶工程学、细胞生物学、生物化学等 • 分离混合物中各成分，如细胞内胞器如线粒体、微粒体、溶酶体等之分离，或各种蛋白质及核酸之分离。 • 航空技术：以离心力模拟重力加速度，以探求生物在极端状况下体内物件位移
- 工业用 因为离心机的高效率及便利性，已被广泛运用于机械研磨加工、玻璃研磨、IC载板研磨、汽机车来令片研磨等产业
- 农业用 蜂蜜采集：将蜂巢箱内的蜂巢置入离心机之中，经转动，蜂巢中的蜂蜜会甩出而流入收集器之中

### 不同离心机在生物实验室的应用范围

- 低速离心机：细胞培养；血浆、血清分离；简单的沉淀离心
- 高速离心机：分子生物学中的核酸分离；细胞、无机物溶液、悬浮液及胶体溶液的分离、浓缩、提纯
- 超速离心机：亚细胞器的分级分离；病毒、核酸、蛋白质、多糖的分离；生物大分子的检测

### 生物医药、化学等研究领域

1. 细胞组分的分级分离
2. DNA的半保留复制假说的证明

### 细胞组分的分级分离

#### 基本方法和策略

利用颗粒大小的不同粗分离: 差速离心法 交替使用低速和高速离心分离细胞匀浆

利用颗粒密度的不同继续分离纯化: 等密度离心法 分离大小差别不显著的组分

#### 实验策略

- 初步分离（如，差速离心）→分离纯化（如，密度梯度离心）
- 常见细胞器的沉降顺序（大到小）：核→线粒体→溶酶体与过氧化物酶体→内质网与高基体→核蛋白体

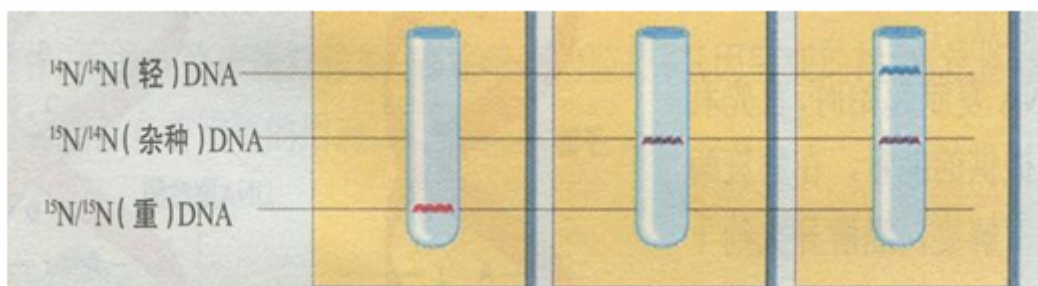
## 半保留复制

一种双链脱氧核糖核酸（DNA）的复制模型。其中亲代双链分离后，每条单链均作为新链合成的模板。因此，复制完成时将有两个子代DNA分子，每个分子的核苷酸序列均与亲代分子相同。子代DNA分子中，一条链来自亲代，另一条链为新合成的链。这是1953年沃森（J.D.Watson）和克里克（F.H.C.Crick）在DNA双螺旋结构基础上提出的假说，1958年得到实验证实。

### 实验方法：等密度区带离心法

- 常将样品通过高浓度的蔗糖或氯化铯的密度梯度沉降在达到与自身密度相等的位置就停滞不再向下沉降
- 此方法直接证明了DNA的不保留复制

### 氯化铯（CsCl）密度梯度离心



## 老师联系方式

- 邮箱: kangyj@shanghaitech.edu.cn
- 地址: 生命学院L楼A414