



国家理科基地教材

化学生物学实验

浙江大学化学系 编
曾秀琼 吴 起 主编



科学出版社

第 2 版

化学生物学实验

主编：王 强
副主编：李 明

化学工业出版社



ISBN 7-122-00000-0

国家理科基地教材

化学生物学实验

浙江大学化学系 编
曾秀琼 吴 起 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书共8章,第1、2章介绍了化学生物学实验基本知识和基本操作。第3~7章是实验部分,共编写41个实验,包括生化分离分析实验技术、生物材料制备实验技术、化学中基因工程实验技术、化学中蛋白质工程实验技术和化学中细胞工程实验技术。第8章附录介绍了15类化学生物学实验常用仪器的使用方法,特殊试剂的配制,Linux操作系统以及生物信息数据库等重要资料。希望学生通过本课程的学习,掌握必要的化学生物学实验的基本知识和基本技能。

本书可作为高等学校化学、化工、材料、药学、生物和医学等相关专业本科生、研究生的实验教材,也可作为相关领域科技工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

化学生物学实验 / 曾秀琼, 吴起主编. — 北京: 科学出版社, 2013. 1
国家理科基地教材

ISBN 978-7-03-036552-1

I. ①化… II. ①曾… ②吴… 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(2013)第 016013 号

责任编辑: 丁 里 / 责任校对: 张凤琴
责任印制: 阎 磊 / 封面设计: 迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013年1月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013年1月第一次印刷 印张: 13 1/4

字数: 330 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《化学生物学实验》编写人员

主 编 曾秀琼 吴 起

编 者 (按姓氏笔画排序)

王 琦 方 芳 邬建敏 汤谷平 李浩然

吴 起 陈恒武 周 峻 赵 旋 胡秀荣

姚 波 徐旭荣 徐锦仙 傅春玲 曾秀琼

前 言

当今的化学与生物学、医学等学科日益融合渗透,对许多生命现象的研究已经进入分子水平,化学研究的手段和方法已经成为处于分子水平的生命科学的必不可少的重要工具。研究解决生命和医学等现象中的化学问题,是化学学科未来发展的主要动力,因此化学生物学这一交叉学科应运而生,并快速发展。

化学生物学是利用化学的理论、研究方法和手段来研究探索生命、医学等问题的科学。化学生物学研究领域的各个方向非常活跃。例如,以外源性天然活性小分子或合成化合物为模板设计创造新颖探针分子,探讨生物体中的分子间相互作用与分子调控作用;阐明病理过程的发生、发展与调控机制;发展新的医学诊断和治疗方法等。化学生物学的实验方法和研究手段将成为推动化学生物学乃至整个化学领域不断发展的重要技术。

为了给学生提供必要的化学生物学基本知识和实验技能,我们于 2005 年开始筹建化学生物学实验课程。化学生物学实验是一门组合了传统的化学实验技能和相关的基因工程、细胞工程、酶工程、计算化学、蛋白质化学等众多领域的实验技术而形成的新兴交叉课程。由于当时化学生物学实验教材非常缺乏,我们组织了一批在该领域研究的教师设计实验内容、编写实验讲义,并于当年 9 月开设了化学生物学实验课程。目前该课程已成为化学实验教学中心实验课程体系中的一门重要课程,共 128 学时,主要面向化学和化工等专业的高年级本科生以及研究生开设。经过连续 8 年的教学实践,我们逐年对实验讲义进行修改和完善,每一次都得到了较好的提高和丰富,形成了现在的《化学生物学实验》教材。

本书共编写 41 个实验,包括生化分离分析实验技术、生物材料制备实验技术、化学中基因工程实验技术、化学中蛋白质工程实验技术和化学中细胞工程实验技术。每个实验都精心编写了实验导读,提供了一定的背景材料,使学生能更好地了解这一交叉领域发展的基本状况和最新进展。41 个实验既可单独安排教学,也可相互联系组合成较系统和深入的实验系列,以满足不同学时数的教学要求。

参加本书编写工作的教师(按姓氏笔画排序)有:王琦、方芳、邬建敏、汤谷平、李浩然、吴起、陈恒武、周峻、赵旋、胡秀荣、姚波、徐旭荣、徐锦仙、傅春玲和曾秀琼,具体编者在每个实验内容中均有注明。全书由曾秀琼和吴起统稿,林贤福教授和方文军教授主审。

在化学生物学实验室、化学生物学实验课程及教材的建设中,得到了浙江大学、浙江大学化学系、浙江大学国家级化学实验教学示范中心的大力支持,得到了在此领域研究的教师们的大力支持。在编写过程中参考了国内外许多化学实验教材和文献资料。在此,向所有提供帮助的教师、作者们表示衷心的感谢!

由于编者的水平和经验有限,书中难免有疏漏和不妥之处,恳请广大读者批评和指正,以便改进!

编 者

2012 年 10 月于浙江大学紫金港校区

目 录

前言

第 1 章 化学生物学实验基本知识	1
1.1 实验室规则及须知	1
1.2 实验室安全及防护知识	1
1.2.1 防生物源性危害的基本措施	2
1.2.2 放射性和紫外线辐射的危害和防护	2
1.2.3 特殊化学生物学试剂的安全使用与储存	2
1.2.4 化学生物学实验室废弃物的处理	3
第 2 章 化学生物学实验基本操作	6
2.1 常用仪器的洗涤与清洁	6
2.1.1 玻璃器皿的清洗	6
2.1.2 其他材质器皿的清洗	6
2.1.3 铬酸洗液的配制方法和使用注意事项	7
2.1.4 其他常用的洗液	7
2.2 常用消毒灭菌方法	7
2.2.1 物理消毒灭菌方法	7
2.2.2 化学消毒灭菌方法	8
2.3 离心技术	9
2.3.1 离心技术的原理	9
2.3.2 离心机的类型和转头的分类	11
2.3.3 常用离心方法	12
2.4 常用层析技术.....	13
2.4.1 凝胶层析.....	13
2.4.2 离子交换层析	14
2.4.3 亲和层析.....	15
2.4.4 疏水层析.....	15
2.5 电泳技术.....	16
2.5.1 基本原理.....	16
2.5.2 琼脂糖凝胶电泳	16
2.5.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳	16
2.5.4 等电聚焦电泳	17
2.5.5 二维电泳.....	18
2.5.6 毛细管电泳	18
2.5.7 凝胶成像技术	19

2.6 PCR 技术	19
2.6.1 PCR 技术简介	19
2.6.2 PCR 技术的基本原理和过程	19
2.6.3 PCR 反应的五个元素	21
2.7 DNA 测序技术	22
2.8 细胞培养技术	23
2.8.1 体外培养细胞的分类	23
2.8.2 培养细胞的生长和增殖过程	24
2.8.3 原代培养	25
2.8.4 传代培养	25
2.8.5 细胞的冻存与复苏	26
2.9 化学生物学样品制备、纯化、浓缩和干燥	26
2.9.1 材料的选取和前处理	26
2.9.2 细胞的破碎	27
2.9.3 蛋白质的提取和纯化	27
2.9.4 核酸的提取和纯化	28
2.9.5 样品的浓缩和干燥	29
第3章 生化分离分析实验技术	31
实验1 疏水作用色谱分离纯化 α -淀粉酶	31
实验2 亲和层析树脂的制备及溶菌酶的提取纯化	36
实验3 香菇多糖的提取、纯化及总糖含量测定	40
实验4 青霉素酰化酶米氏常数和反应活性的测定	44
实验5 静电自组装构筑 HRP 多层膜电极检测酚类物质研究	47
实验6 表面等离子光谱生物传感器研究抗原与抗体的相互作用	50
实验7 FRET 法及荧光猝灭法测定蛋白酶的活性	54
第4章 生物材料制备实验技术	60
实验8 生物矿物和生物矿化——碳酸钙多形的控制与制备	60
实验9 无定形碳酸钙的制备和转化	62
实验10 硫酸链霉素肺靶向明胶微球的制备及含量测定	64
实验11 聚乙烯亚胺-DNA 复合物粒径的测定	67
实验12 聚乙烯亚胺-阿霉素共聚物的合成	70
实验13 复凝聚法制备阿霉素微囊及细胞毒性评价	72
实验14 盐酸左氧氟沙星不同晶形的制备及其表征	76
第5章 化学中基因工程实验技术	80
实验15 质粒 DNA 的提取与纯化	80
实验16 大肠杆菌感受态细胞制备与质粒 DNA 的转化	84
实验17 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段	87
实验18 PCR 基因扩增获取毛囊 DNA 及其分离	90
实验19 植物组织中基因组 DNA 的提取与扩增	91

实验 20	PCR-RFLP 法检测单核苷酸多态性	95
实验 21	基于连接反应的滚环扩增技术检测单核苷酸多态性	100
实验 22	枯草杆菌脂肪酶 A 的基因克隆	104
第 6 章	化学中蛋白质工程实验技术	112
实验 23	酰化酶催化 4-硝基咪唑的 Markovnikov 加成反应	112
实验 24	2'-脱氧尿苷衍生物的酶促合成的选择性调控	114
实验 25	酶催化 Michael 加成反应	117
实验 26	Novozym 435 催化的 1-位芳基取代的末端炔丙醇动力学拆分反应	120
实验 27	金属卟啉模拟的生物氧化过程	122
实验 28	泛素蛋白的操控式分子动力学模拟	125
实验 29	纤连蛋白在羟磷灰石上吸附-脱附过程的分子模拟	136
第 7 章	化学中细胞工程实验技术	144
实验 30	动物细胞的培养	144
实验 31	MTT 法测定聚乙烯亚胺的细胞毒性	148
实验 32	抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶对肿瘤细胞的抑制及细胞形态观察	150
实验 33	ATP 生物荧光药敏检测技术检测 5-氟尿嘧啶对卵巢癌细胞的药敏实验	153
实验 34	抗肿瘤药物 5-氟尿嘧啶对肿瘤细胞迁移的影响	156
实验 35	聚乙烯亚胺-DNA 复合物的制备和体外细胞转染实验	158
实验 36	聚乙烯亚胺携带基因在细胞中的荧光染色实验	160
实验 37	聚乙烯亚胺作为基因载体材料携带 TRAIL 基因对细胞凋亡的影响	163
实验 38	聚乙烯亚胺-阿霉素聚合物的细胞摄取实验	166
实验 39	硫酸氢氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 增殖影响	168
实验 40	喹诺酮类药物盐酸左氧氟沙星的抑菌实验	170
实验 41	聚乙烯亚胺-阿霉素皮下注射体内滞留实验	172
第 8 章	附录	175
8.1	常用仪器的使用说明	175
8.1.1	移液枪	175
8.1.2	气相色谱仪	177
8.1.3	液相色谱仪	178
8.1.4	紫外-可见分光光度计	179
8.1.5	红外光谱仪	181
8.1.6	荧光分光光度计	182
8.1.7	PCR 仪	183
8.1.8	表面等离子共振生物传感实验仪	184
8.1.9	蛋白质分离纯化系统	187
8.1.10	CHI 电化学分析仪	188
8.1.11	高速冷冻离心机	189
8.1.12	CO ₂ 培养箱	191
8.1.13	倒置相差显微镜	192

8.1.14 酶标仪	193
8.1.15 活体荧光成像系统	194
8.2 常用缓冲溶液的配制	195
8.3 常用特殊化学生物学试剂的配制	197
8.3.1 细胞培养液的配制	197
8.3.2 MTT 溶液的配制方法	198
8.3.3 HE 染色液的配制	198
8.4 Linux 操作系统的基本操作	199
8.5 生物信息数据库	200

第1章 化学生物学实验基本知识

1.1 实验室规则及须知

化学生物学是利用化学的理论、研究方法和手段来探索生物、医药学等问题的一门科学。它通过从天然化合物中分离,或者利用现代化学合成技术来制备各种对生命体系代谢过程具有调控作用的物质,研究这些化学物质在生物体中的化学功能、生物功能和医药学作用。化学生物学实验是学习化学生物学专业知识,训练并掌握化学生物学实验技术和基本技能,培养学生良好的学习态度和工作作风的重要课程。

学生应高度重视化学生物学实验课程的学习,严格遵守化学生物学实验室的规章制度,并将其贯彻于每次实验过程中。只有经过严格的训练和要求,才能不断提高运用化学生物学知识的能力,形成良好的研究和学习习惯,成为具有扎实理论基础和熟练操作技能的化学生物学专业人才。学生必须遵守以下实验室规则:

(1) 严格遵守实验室的各项安全制度及防护知识。进入实验室必须穿实验服,不允许穿露出脚趾和带钉的鞋子,过肩长发必须扎起。禁止在实验室内吸烟、饮水和进食。

(2) 注意生化药品和动植物样品,以及易燃、易爆等危险化学品的使用,杜绝实验事故的发生。爱护实验仪器,节约使用药品、试剂和耗材。所有实验室内的物品均不能私自带离。

(3) 配制的试剂和实验过程中的样品,尤其是保存在冰箱中的样品,必须贴上标签,标明样品名称、浓度、姓名和日期等。放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液必须密封好。

(4) 进行动物实验时,禁止戏弄动物。进行杀死或解剖等操作时,应按规定方法进行,绝对不能把动物、手术器械或药物挪作他用。

(5) 有毒、有害废液要倒入专门的废液桶,不可直接倒入水槽内。强腐蚀性废弃试剂药品、废纸、电泳废胶及其他固体废物或带有渣滓沉淀的废液均应倒入专门的垃圾桶内。

(6) 实验前应认真作好预习,明确实验目的和要求、基本原理和操作步骤,了解所用仪器、药品、试剂的使用及注意事项等。没有按要求完成预习报告的学生不能进入实验室。

(7) 实验过程中要严肃认真、有条不紊地按照操作规程进行实验。仔细观察,详细、准确地将实验结果及原始数据记录在专用的实验记录本上。

(8) 完成实验后经教师检查同意,方可离开实验室。值日生完成全部卫生清理工作后,应关闭水、电、气、门窗等。离开实验室前,应用肥皂或洗手液彻底清洗双手及手臂。

(9) 根据原始记录进行整理,积极思考、分析实验结果,重视总结实验中的经验和教训,对实验中出现的一切反常现象展开分析和讨论,认真完成实验报告,严禁相互抄袭。

1.2 实验室安全及防护知识

实验过程中使用的化学药品、试剂、仪器设备种类繁多,因此在实验工作中要求实验人员必须遵守操作规程,加强安全意识,小心仔细,避免电、水、火、毒、伤等可能事故的发生。同时化学生物学实验还存在一些与常规实验室不同的安全隐患,必须熟悉有关事故的应急处理措施。

1.2.1 防生物源性危害的基本措施

化学生物学实验中使用的部分生物材料,如微生物、动物的组织,细胞培养液,血液和分泌物,都可能存在细菌或病毒感染的潜伏性危险。处理这些生物材料时必须小心、谨慎,严格做好自身的安全防护。做完实验后必须用肥皂、洗涤剂或消毒液充分洗净双手。另外,被污染的物品必须进行高压消毒或烧成灰烬,被污染的实验桌面应用 $0.3\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚溶液擦洗消毒,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。进行细胞实验、遗传重组实验时,更应根据有关规定加强生物伤害的有效防范。

1.2.2 放射性和紫外线辐射的危害和防护

放射性同位素的使用必须在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或存放有放射性同位素的材料和器具。实验后应及时淋浴,定期进行体检。

紫外线辐射的危害和防护:在实验中经常用手提式紫外灯、紫外透射仪和凝胶成像系统等观察胶体或薄层层析板,也经常用紫外线对细胞房和超净工作台进行消毒。紫外线的有害效应主要是由紫外线对脱氧核糖核酸(DNA)的损伤作用造成的。最有害的效应是细胞致死,其他的效应则包括致突、致癌、干扰DNA、核糖核酸(RNA)和蛋白质的合成、细胞分裂的延迟以及在通透性和能动性上的变化等。紫外线对眼睛具有较大的损伤,过量紫外线辐射被认为是导致白内障的主要原因。紫外线对皮肤的损伤有积累作用,急性作用表现为红斑效应,水肿脱皮和全身有寒战、发烧、恶心等;慢性作用有致皮肤老化,色素沉着甚至引起肿瘤的危险。紫外线辐射对免疫系统也有一定影响,紫外线辐射的免疫抑制作用可导致皮肤癌。

预防紫外线伤害的主要措施:

(1) 在紫外线下操作时要戴合适的预防性手套,佩戴具有紫外线防护功能的护目镜或防护面罩,并遮蔽暴露的皮肤。

(2) 紫外照射消毒后由于空气中臭氧富集,不宜立即开始工作,应在停止紫外照射 30min 后开始工作。有条件的实验室,可安装无臭氧紫外灯。

1.2.3 特殊化学生物学试剂的安全使用与储存

1. 试剂的储存

化学生物学实验中需要用到各种化学、生化试剂,必须根据试剂的不同性质,分别采取相应的措施妥善保存。另外,对于具有一定毒性或者易燃易爆的危险品,必须由专人按国家规定负责保管,使用者必须充分了解它们安全使用的注意事项。试剂的储存方法需视具体情况而定,一般应注意以下细节:

(1) 易挥发试剂可以采用油封、水封、蜡封等保存方法。

氨水、浓盐酸等易挥发无机液体,在液面上滴 10~20 滴矿物油(不可用植物油);二硫化碳、汞等可以用水封防止挥发。

(2) 易吸潮的试剂可以用不同方法防潮处理。

漂白粉、过氧化钠等试剂应进行蜡封,防止吸水分解或吸水爆炸;氢氧化钠、硝酸铵、硫酸钠、碳化钙、无水硫酸铜、五氧化二磷、硅胶、红磷等易吸水潮解或结块变质等,必须密封防潮,然后存放在干燥器中。

(3) 易变质的试剂可以用不同方法保存。

易氧化的试剂须在瓶口涂蜡防氧化;易吸收二氧化碳从而碳酸化的试剂须涂蜡防碳酸化;

易风化的试剂应进行蜡封,存放在阴凉处或冰箱中;受热易分解的试剂应涂蜡后存放在地下室。活性炭能吸附多种气体而变质,应放在干燥器中。黄磷遇空气易自燃,应保存在水中。钾、钠等活泼金属应保存在煤油中。葡萄糖溶液容易霉变,稍加几滴甲醛保存即可。

(4) 对光敏感的试剂需要避光保存。

双氧水、硝酸银、浓硝酸及大部分有机药品应该放在棕色瓶中。一些荧光染料,如溴乙锭(EB)、异硫氰酸荧光素(FITC)等,需要在存放试剂管外面包上铝箔纸避光保存。

(5) 具有一定毒性的试剂应置于保险柜中,严格遵守双人保管、双人收发、双人使用、双人运输、双人双锁的“五双”制度。

氰化物和砷盐、汞盐等自身剧毒物,磷化钙、磷化铝等易放出剧毒性磷化氢的试剂,浓酸、浓碱、溴、酚等腐蚀性药物都应该严格管理和存放。

(6) 对于震动敏感的试剂(如硝酸铵等),需要在存放位置用软纸垫包、泡沫材料等进行缓冲,加以保管。

(7) 对于易燃易爆的试剂,存放时需要在就近或者醒目的位置放置水缸、消防桶、砂缸、泡沫灭火器及四氯化碳灭火器等。

(8) 不相容的化学试剂存放需要特别注意。例如,氧化剂和还原剂要分开存放;叠氮化物不能与铜接触(如污水管及管道设施),因为生成的叠氮化铜轻微碰撞就可能造成爆炸。

2. 生物样品的存放

生物样品大多需要低温保存。例如,大多数酶试剂、蛋白质、DNA等样品都可以在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 进行冷藏,或者 $-20\sim -18^{\circ}\text{C}$ 进行冷冻保存。

微生物菌种的保存方法:通常将微生物菌种保存在终浓度为 $10\%\sim 30\%$ 甘油溶液中(菌种和甘油按 $1:1$ 的比例),置于 -80°C 低温冰箱保存。

细胞的冻存与注意事项:取生长良好且存活率较高状态下的细胞进行冷冻保存,冷冻前最好检测细胞是否仍保持其特有性质。冷冻保护剂一般选择高纯度的二甲基亚砜(DMSO)或甘油。冷冻保存的细胞浓度通常为 $1\times 10^6\sim 7\times 10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$,具体浓度因细胞种类不同而有所差别。冷冻保护剂浓度为 5% 或 10% 。

传统降温冷冻方法:先将冻存管放入 4°C 冰箱约 40min ,然后置于 -20°C 冰箱 $30\sim 60\text{min}$,再置于 -80°C 超低温冰箱中放置过夜,最后置于液氮罐中长期保存。

程序降温冷冻方法:利用等速降温机以 $-3\sim -1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率由室温降至 -120°C ,放在液氮槽中长期保存。

1.2.4 化学生物学实验室废弃物的处理

实验过程中产生的废弃物大多是有毒有害物质,若任意排放,对环境污染、人类健康影响很大,产生的累积破坏效应不容忽视。

通常从实验室排出的废液种类较多,而且组成复杂、经常变化,因此最好不要把它们集中处理,而是由各个实验室根据废弃物的性质,分别加以处理。根据实验室的废弃物种类不同,常见的处理方法有以下几种。

1. 常见废液的处理方法

常见废液可分为无机废液和有机废液两大类。因为废液的组成不同,处理过程中往往伴随着有毒气体的产生、发热和爆炸等危险,所以处理前必须充分了解废液的性质。然后针对性地加以处理,必须边操作边观察,以避免任何可能的危险。

下列废液不能混合:①过氧化物与有机物;②氰化物、硫化物、次氯酸盐与酸;③盐酸、氢氟酸等挥发性酸与不挥发性酸;④浓硫酸、磺酸、羧基酸、聚磷酸等酸类与其他酸;⑤铵盐、挥发性胺与碱。

对硫醇、胺等有臭味的废液和会产生氰、磷化氢等有毒气体的废液,以及易燃的二硫化碳、乙醚等易挥发有机废液,要加以适当处理,严防泄漏。

含有过氧化物、硝化甘油之类爆炸性物质的废液,要谨慎地操作,并尽快处理。

含有放射性物质的废弃物,必须严格按照有关规定进行收集和处理。

沾有有害物质的滤纸、包药纸、棉纸、废活性炭及塑料容器等物品,禁止直接丢入垃圾箱,应该加以焚烧或进行其他适当的处理。

常见废液的处理方法如下。

(1) 一般性废液的处理:对实验中产生的酸、碱废液,可相互混合中和处理。有些特定废液则可以加以利用,如 KMnO_4 或 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液等。

(2) 含锌、镉、锰等重金属离子的废液处理:对含锌、镉、锰等没有剧毒性重金属离子的废液,可合并成综合性废液后,再采用碱液沉淀法或离子交换法进行处理。

(3) 汞及含汞废液的处理与回收:主要采用硫化物共沉淀法;也可以采用还原法,用铜屑、铁屑、锌粒、硼氢化钠等还原剂直接回收金属汞。

(4) 含铬废液的处理:先在酸性条件下向含铬废液中加入还原剂,将高价铬离子转变成毒性较小的 Cr^{3+} ,然后调节溶液 pH 至 7 左右,此时 Cr^{3+} 转变成低毒的 $\text{Cr}(\text{OH})_3$ 沉淀,分离出沉淀后的清液即可直接排放,滤渣经脱水干燥后可综合利用。

(5) 含铅废液的处理与回收:废液调节至 pH 大于 11,生成 $\text{Pb}(\text{OH})_2$ 沉淀,后者再转化成溶解度更小的 PbCO_3 沉淀;也可以采用加入凝聚剂 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 的方法。

(6) 含砷废液的处理:在含砷废液中加入 FeCl_3 ,使铁:砷(物质的量比)达到 1:1,然后用石灰乳将废液的 pH 控制在 8~10,即可生成铁和砷的氢氧化物共沉淀,从而除去废液中的砷。静置分离后,清液可达标排放。

(7) 含酚废液的处理:酚属剧毒类细胞原浆毒物。如果是高浓度的含酚废液(废液中酚质量浓度为 $400\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上),可通过乙酸丁酯萃取,再加少量的氢氧化钠溶液反萃取,经调节 pH 后进行蒸馏回收。对低浓度(废液中酚质量浓度为 $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下)的含酚废液,可加入次氯酸或漂白粉煮一下,使其中的酚氧化分解为 CO_2 和 H_2O 。

2. 常见废渣的处理方法

常见废渣的处理方法有焙烧法和掩埋法。有机废渣主要用焙烧法,无机废渣主要用掩埋法。无毒害的废渣可直接堆置地下掩埋,掩埋地点应做好记录;有毒的废渣必须先进行化学处理,再利用水泥等固化后深埋在远离居民区的指定地点。

3. 生物类实验废物的处理方法

生物类废物应根据其物理化学特性、病源特性来选择合适的容器和方式,专人分类收集,进行消毒、烧毁处理,日产日清。液体废物一般可加漂白粉进行氯化消毒处理。固体可燃性废物分类收集、处理、及时焚烧。固体非可燃性废物分类收集后,可加漂白粉进行氯化消毒处理后作最终处置。具体如下:

(1) 一次性使用的制品如手套、帽子、工作服、口罩、移液枪枪头等使用后放入污物袋内集中烧毁。

(2) 可重复使用的玻璃仪器等用 $1000 \sim 3000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有效氯溶液,或者朗索消毒片溶液

(每 1000mL 水 3 片)浸泡 2~6h,然后清洗,再经高压蒸汽灭菌后重新使用,或者废弃。

(3) 盛过标本的玻璃、塑料、搪瓷容器可煮沸 15min,或者用 $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有效氯溶液浸泡 2~6h,消毒后用洗涤剂及流水刷洗、沥干;用于微生物培养的,用高压蒸汽灭菌后使用。

(4) 含有大肠杆菌等微生物的液体或固体废弃物的处理:大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是人和许多动物肠道中最主要且数量最多的一种细菌,主要寄生在大肠内。液体含菌培养物可以加朗索消毒片处理(每 1000mL 水 5 片,浸泡 3h 以上,根据菌液浓度可酌情增加消毒片剂量或延长浸泡时间),或者高压灭菌 30min 后,方可倒入下水道,切勿直接将未处理的含菌废液排入下水道。接种培养过的琼脂平板固体培养基应高压灭菌 30min,趁热将琼脂倒弃处理。

(5) 含有 PCR 产物的所有液体及废弃物应放入含有 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液的容器中浸泡,浸泡时间不宜少于 6h;采用 PCR-ELISA 方法检测时,洗板机洗板所产生的废液应收集至 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液中。

(6) 尿、唾液、血液等生物样品,加漂白粉搅拌后作用 2~4h,倒入化粪池或厕所,或者进行焚烧处理。

(7) 含有 EB 废弃物的处理方法。

EB 含量大于 $0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液用水稀释至浓度低于 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;加入一倍体积的 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KMnO_4 ,再加入等量的 $2.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl,置室温数小时;加入一倍体积的 $2.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH,混匀并废弃。

EB 含量小于 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液可进行以下处理:小于 $10\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以直接倒入水槽;大于 $10\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,按 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的量加入活性炭,不时轻摇混匀,室温放置 1h,用滤纸过滤,并将活性炭与滤纸密封后丢弃。

废 EB 接触物,如抹布、枪头,一般回收至黑色的玻璃瓶中,定期进行焚烧处理。对于含 EB 的电泳胶,如果 EB 含量小于 0.1%,可以直接扔掉。如果胶发红,即表明 EB 含量大于等于 0.1%,应该放在生物危害柜中焚烧处理。

实验动物尸体(包括内脏器官)、粪便及其分泌物等的处理办法如下:

(1) 饲养的正常动物每次排放的无害污秽垫料,必须用塑料袋包装,放置指定的地点,按垃圾处理;每次清除出来的有潜在危害及感染性的污秽垫料,必须用专用塑料袋包装,交专门部门,集中进行无害化处理。

(2) 无潜在危害的实验动物尸体、脏器,必须用塑料袋包装,进行掩埋或者焚烧等无害化处理。

(3) 有潜在危害及感染性的动物尸体和废弃物,消毒后用专用塑料袋严格包装,放置于专用冰柜,交专门部门集中处理。

参考文献

陈俊平,吴翠霞,周开梅,等. 2004. 工科分析化学基础实验中常见废液的处理与回收. 实验教学与仪器, (1): 48-50.

黄凯,张志强,李恩敬. 2012. 大学实验室安全基础. 北京:北京大学出版社.

黄晓玫. 2011. 高等学校实验室技术安全与环保教育手册. 武汉:华中师范大学出版社.

王国清,赵翔. 2012. 实验室化学安全手册. 北京:人民卫生出版社.

(吴 起、曾秀琼)

第2章 化学生物学实验基本操作

2.1 常用仪器的洗涤与清洁

化学生物学实验对仪器清洁程度的要求比一般化学实验更高。这是因为化学生物学实验中经常用到蛋白质、酶、核酸等生化试剂,以及细胞、菌液等生物样品,它们对许多常见的污染杂质如金属离子、去污剂和残余有机物等都十分敏感,“微升”和“微克”级的微量杂质影响都很大。因此,在进行化学生物学实验时,必须使用干净的仪器。玻璃器皿、金属器皿、塑料、橡胶制品、布类、纸类等不同材质的仪器耗材,它们的洗涤和清洁方式略有不同,下面进行简单介绍。

2.1.1 玻璃器皿的清洗

玻璃器皿的洗涤一般经过浸泡、刷洗、浸酸和清洗四个步骤。通常要求洗涤后玻璃器皿内壁可以被水完全润湿,不挂水珠。

新购置的玻璃仪器,应先置于1%~2%稀盐酸溶液中浸泡过夜,以除去附着的碱性物质,再用自来水冲洗干净,最后用去离子水冲洗2~3次,自然控干或在100~130℃烘箱内烘干备用。使用去离子水的目的是洗去附着在玻璃仪器壁上的自来水。

一般玻璃仪器如烧杯、锥形瓶、试管等可用毛刷蘸肥皂液、合成洗涤剂仔细刷洗。用自来水冲洗干净后,再用去离子水冲洗2~3次,烘干或倒置在清洁处备用。若发现内壁有难以去掉的污迹,应分别试用其他洗涤剂予以清除,再重新冲洗。容量仪器如吸量管、容量瓶、滴定管等,用后应及时用自来水多次冲洗,勿使物质干涸,最后用去离子水冲洗2~4次,风干备用。

石英和玻璃比色皿清洗时绝不可用强碱,因为强碱会侵蚀抛光的比色皿。只能用洗液或1%~2%的去污剂浸泡,然后用一支绸布包裹的小棒或棉花球棒刷洗,再用去离子水清洗至内外壁不挂水珠。

其他接触微生物样品的容器,应先进行高压消毒后再进行清洗。接触过血浆的容器可以用45%尿素溶液(或1%氨水)浸泡,使血浆溶解,然后按常规方法洗涤。

2.1.2 其他材质器皿的清洗

聚乙烯、聚丙烯等制成的塑料器皿在化学生物学实验中使用比较多,这些材料通常耐腐蚀能力强、不耐热。现用的塑料制品多是采用无毒并经特殊处理的包装,打开包装即可用,多为一次性物品。若需自己清洗的塑料制品,第一次使用时,可先用 $8\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素(用浓盐酸调 $\text{pH}=1$)清洗,然后依次用去离子水、 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 和去离子水清洗,再用 $1 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 除去金属离子的污染,最后用去离子水彻底清洗。每次使用时,可只用0.5%的去污剂清洗,然后用自来水和去离子水洗净,晾干备用。

化学生物学实验中所用的橡胶制品主要是瓶塞。新购置的瓶塞带有大量滑石粉及杂质,应先用自来水冲洗,再做常规处理。常规清洗方法是:每次用后立即置入水中浸泡,然后用2% NaOH 或洗衣粉煮沸10~20min,以除掉黏附的蛋白质。自来水冲洗后,再用1%稀盐酸

浸泡 30min 或去离子水冲洗后煮沸 10~20min, 晾干备用。

2.1.3 铬酸洗液的配制方法和使用注意事项

铬酸洗液是浓硫酸和饱和重铬酸钾溶液的混合液, 具有很强的氧化性、腐蚀性、酸性和去污能力, 是实验室最常用的洗涤液。

配制方法: 称取 5g 重铬酸钾粉末, 置于 250mL 烧杯中, 加 5mL 水使其溶解, 然后慢慢加入 100mL 浓硫酸, 溶液温度将达 80℃, 待其冷却后储存。为防止容器破裂, 应选用耐酸的搪瓷缸或耐高温的玻璃器皿, 切忌使用量筒及试剂瓶配制。为防止洗液吸收空气中的水分而稀释变质, 洗液应储存于带盖的容器中。当清洁效力降低时, 再加入少量重铬酸钾及浓硫酸就可继续使用。

铬有致癌作用, 因此配制和使用铬酸洗液时要极为小心, 应注意以下几点:

- (1) 在配制铬酸洗液时, 必须把浓硫酸缓慢加到重铬酸钾溶液中, 不可颠倒。
- (2) 洗液用后要收回, 可反复使用。洗液颜色由深棕色变为绿色时, 说明重铬酸钾已经变成硫酸铬, 不再具有氧化性, 不能继续使用。
- (3) 容器上附有大量油类、有机物, 或接触过 Hg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 等离子时应先将其除去, 否则会使洗液失效。

2.1.4 其他常用的洗液

其他还有一些具有特别洗涤用途和效果的洗液可供选用。例如, 水垢或某些无机盐沉淀可以用工业浓盐酸洗去; 残留的高锰酸钾可以用酸化的 5% 草酸溶液洗去; 盛过蛋白质制剂及血样的容器可用尿素洗涤液洗涤; 铝和搪瓷器皿中的污垢可用 5%~10% 硝酸溶液洗涤; 油脂、脂溶性染料、油漆污痕等可针对性选用一些有机溶剂, 如丙酮、乙醚、乙醇、二甲苯等洗涤; 乙醇与浓硝酸混合液最适合洗涤滴定管, 在滴定管中加入 3mL 乙醇, 然后沿管壁慢慢加入 4mL 浓硝酸, 盖住滴定管管口, 利用所产生的氧化氮洗净滴定管; 而氢氧化钾的乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液都是清洗玻璃仪器内壁顽固性污垢的有效方法。

2.2 常用消毒灭菌方法

化学生物学实验经常要进行生物培养和生化反应操作, 这些操作必须排除其他生物因素的干扰, 因此实验前必须对实验中用到的材料、器械、无菌室、超净工作台等进行消毒灭菌处理, 否则很容易导致实验失败。常用的灭菌方法可分为物理法和化学法。其中物理法主要有加热灭菌、紫外线照射灭菌和过滤除菌等; 化学法主要是利用各种消毒液、抗生素溶液进行擦拭和浸泡消毒灭菌。

2.2.1 物理消毒灭菌方法

1. 高温干热灭菌

干热法可分为热空气灭菌和火焰灼烧灭菌。

热空气灭菌是将电热烤箱内物品加热到 160℃ 以上, 并保持 90~120min, 高温加热后使蛋白质变性, 从而杀死细菌和芽孢, 达到灭菌目的。主要用于玻璃器皿(如体积较大的烧杯、培养瓶)、金属器皿以及不能与蒸汽接触的物品(如粉剂、油剂)等的消毒灭菌。灭菌后要关闭电源,