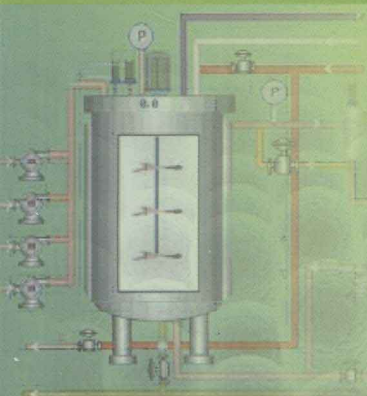


刘平怀 主 编

生物工艺实验



BIOTECHNOLOGY
EXPERIMENTS

生物工艺实验

主 编 刘平怀
副主编 杨东升
编 委 王新广 唐 敏 时 杰



南京大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物工艺实验 / 刘平怀主编. —南京: 南京大学出版社, 2012. 3

ISBN 978 - 7 - 305 - 09690 - 7

I. ①生… II. ①刘… III. ①生物工程学—实验
IV. ①Q81 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 029686 号

出版发行 南京大学出版社
社 址 南京市汉口路 22 号 邮编 210093
网 址 <http://www.NjupCo.com>
出 版 人 左 健

书 名 生物工艺实验
主 编 刘平怀
责任编辑 倪 琦 蔡文彬 编辑热线 025 - 83686531

照 排 江苏南京大学印刷厂
印 刷 南京人文印刷厂
开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 17.25 字数 417 千
版 次 2012 年 3 月第 1 版 2012 年 3 月第 1 次印刷
ISBN 978 - 7 - 305 - 09690 - 7
定 价 33.00 元

发行热线 025 - 83594756
电子邮箱 Press@NjupCo.com
Sales@NjupCo.com (市场部)

* 版权所有, 侵权必究

* 凡购买南大版图书, 如有印装质量问题, 请与所购
图书销售部门联系调换

前 言

气候变化、环境危机、能源和资源短缺正在引起世界范围内产业格局的深刻变革。生物产业因具有高效、绿色、低碳、可持续等特征,已经成为全球性的战略性新兴产业,呈现出高速增长的态势。加快调整经济结构、转变经济发展方式,节约发展、清洁发展、安全发展,是我国现阶段的历史使命,大力发展生物产业是我国经济社会发展的战略选择。2010年9月通过的《国务院关于加快培育和发展战略性新兴产业的决定》已将生物产业列为我国七大战略性新兴产业之一。

生物工艺是综合运用生物学、化学和工程学手段,利用生物体、组织、细胞、细胞器或酶,对物料进行加工以提供产品或为社会服务的技术,是发展生物产业的关键技术。

生物工艺学是生物工程专业的专业必修课,研究内容涉及生物产业从原料到最终产品的整个过程,即菌种(包括藻种、细胞株等)选育和扩培、培养基选择和制备、发酵及细胞培养过程中间控制、杂菌防治、产品分离提纯等,是一门实践性和应用性很强的学科,它要求学生在系统学习基础理论知识的基础上,掌握相应的实验技术和方法。编写本《生物工艺实验》一书的目的便是使学生将理性知识与感性认识有机地结合,将书本知识用于实验,在实验中更深刻地理解基础理论,提高学生的综合能力与创新意识,以及分析和解决问题的能力。

本书基本按照生物工艺全过程的顺序依次编排,涵盖了菌种(包括藻种、细胞株等)选育、发酵及细胞培养、生物分离等生物工艺环节的实验项目。内容较为丰富,既有基础性实验,又有综合性实验,还有研究、设计性实验。部分实验项目是编者在开展“973”前期研究专项、国家科技支撑计划课题等研究工作中提炼出来的局部阶段性成果。因此,本书应该是生物工程等相关专业本科学生开展专业实验的合适指导书,也是生物化工等相关专业研究生开展实验研究的合适参考书。

本书的出版得到了国家“973”前期研究专项、国家科技支撑计划以及海南省特色专业建设专项等的资助,编写过程中得到了南京大学出版社及有关同行的热情鼓励和支持,研究生陈德力、杨勋、郝宗娣、张森、汪春牛、许琼情、孙玉婉等在资料收集、文字校对等过程中做了许多工作,在此一并致谢!

尽管我们做了许多努力,但因编者水平和编写能力有限,不当及错漏之处,恳请广大师生和读者予以指正。

编 者

2012年1月

目 录

第一章 生物工艺实验基础知识.....	(1)
第一节 生物工艺实验规则与安全守则.....	(1)
第二节 实验方案的设计与实施.....	(6)
第三节 实验数据的记录和处理	(10)
第四节 生物工艺实验基本操作	(15)
实验一 常用玻璃仪器及其清洗干燥	(15)
实验二 培养基的配制及灭菌	(20)
第二章 菌/藻种选育及保藏工艺实验.....	(28)
第一节 自然选育实验	(28)
实验一 螺旋藻藻种的分离筛选	(29)
实验二 α -淀粉酶产生菌的分离筛选	(31)
实验三 高产淀粉酶菌株复筛	(34)
实验四 富油微藻的分离筛选	(37)
第二节 诱变育种实验	(41)
实验五 紫外线诱变育种	(42)
实验六 亚硝基胍诱变育种	(45)
实验七 抗结构类似物菌株的筛选	(46)
实验八 营养缺陷型菌株的筛选	(48)
第三节 基因工程育种实验	(51)
实验九 质粒 DNA 的小量制备	(53)
实验十 细菌的局限性转导	(55)
实验十一 基因工程菌株的培养与观察	(58)
第四节 菌种保藏实验	(60)
实验十二 菌种常规保藏	(62)
实验十三 菌种冷冻干燥保藏	(64)
第三章 发酵工艺实验	(66)
第一节 液体静置发酵	(66)
实验一 啤酒酵母的质量检查	(71)
实验二 啤酒酵母的计数	(74)
实验三 糖度测定	(76)

实验四	啤酒酸度和 pH 的测定	(80)
实验五	α -氨基氮的测定	(81)
实验六	双乙酰含量的测定	(84)
实验七	苦味质含量的测定	(86)
实验八	啤酒酵母的扩大培养及干酵母活化实验	(88)
实验九	100 L 小型啤酒酿造设备介绍及酿造设备 CIP 消毒	(91)
实验十	100 L 小型啤酒酿造实验——麦汁制备	(96)
实验十一	100 L 小型啤酒酿造实验——主发酵	(99)
实验十二	100 L 小型啤酒酿造实验——后发酵	(103)
实验十三	酒精度的测量及原麦汁浓度	(105)
实验十四	啤酒质量品评	(110)
实验十五	啤酒固定化发酵	(113)
实验十六	啤酒加压发酵	(115)
实验十七	固定化酵母发酵纤维素制酒精	(118)
第二节	深层液体通风发酵实验	(121)
实验十八	谷氨酸及还原糖含量测定	(124)
实验十九	镜检及 OD 检测实验	(126)
实验二十	发酵罐的构造及灭菌	(129)
实验二十一	谷氨酸生产菌种的扩大培养	(132)
实验二十二	谷氨酸的中糖发酵	(134)
实验二十三	谷氨酸的等电回收	(137)
第三节	固态发酵	(140)
实验二十四	白酒中总酸、挥发酸、非挥发酸的测定	(144)
实验二十五	白酒中总酯的测定	(147)
实验二十六	白酒中甲醇的含量分析	(149)
实验二十七	小曲酒发酵实验	(151)
实验二十八	半固态白酒蒸馏	(154)
实验二十九	固体曲的制备	(156)
第四章	细胞培养工艺实验	(160)
第一节	动物细胞培养	(160)
实验一	小鼠肺组织细胞原代培养	(164)
实验二	小鼠肺组织细胞传代培养	(166)
实验三	人外周血淋巴细胞悬浮培养及染色体制片	(169)
实验四	Marc 145 细胞的微载体培养	(172)
第二节	植物细胞培养	(174)
实验五	胡萝卜储藏根愈伤组织培养	(176)
实验六	香蕉吸芽组织培养	(178)
实验七	胡萝卜愈伤组织细胞悬浮培养	(180)

实验八 柴胡细胞的固定化培养·····	(182)
实验九 紫草细胞悬浮培养生产紫草素·····	(184)
实验十 甘蓝型油菜原生质体培养·····	(188)
第三节 微藻细胞培养·····	(190)
实验十一 叉鞭金藻培养·····	(190)
实验十二 产油微藻自养培养·····	(191)
实验十三 产油微藻异养培养·····	(194)
第五章 生物分离工艺实验·····	(197)
第一节 蛋白质分离纯化·····	(197)
实验一 紫甘薯组织中多酚氧化酶的分离纯化·····	(201)
实验二 生物药品凝血酶的提取纯化·····	(204)
第二节 核酸提取分离·····	(206)
实验三 菠萝总 DNA 的制备·····	(207)
实验四 鱼肝总 RNA 的制备·····	(209)
第三节 多糖的提取分离·····	(212)
实验五 芦荟多糖的提取分离·····	(213)
实验六 微波辅助提取琼榄植物多糖·····	(215)
实验七 超声提取芦荟多糖的单因素实验·····	(218)
第四节 其他提取分离实验·····	(220)
实验八 穿心莲内酯的提取分离及其亚硫酸氢钠加成物的制备·····	(220)
实验九 微藻油脂的提取分离·····	(223)
实验十 天然药物化学成分提取分离预实验·····	(225)
实验十一 青霉素发酵液的产品分离纯化·····	(232)
实验十二 加速溶剂萃取法分离提取海南萝芙木活性成分·····	(235)
实验十三 从废弃虾蟹壳中提取虾青素·····	(238)
实验十四 HPLC 法测定废弃虾蟹壳提取物中虾青素的浓度·····	(244)
实验十五 HPLC 法分离废弃虾蟹壳提取物中的虾青素·····	(248)
实验十六 从废弃虾蟹壳中提取甲壳素·····	(252)
附 录·····	(256)
附录一 INFORS Labfors-3 光照发酵罐使用说明·····	(256)
附录二 Elite HPLC 仪使用说明·····	(259)
参考文献·····	(265)

第一章 生物工艺实验基础知识

第一节 生物工艺实验规则与安全守则

一、生物工艺实验规则

为培养学生良好实验习惯,维持良好的实验秩序,确保实验室人员及财产安全,最终达到实验目的,应全程遵守以下实验规则。

(1) 实验前必须做好预习,明确实验目的、理解实验原理和流程、熟悉实验步骤及操作,了解仪器设备的操作规程、实验物品的特性以及操作中应注意的问题和有关安全注意事项,预测实验中出现的问题和解决办法,写好预习报告,接受指导教师的提问和检查,经检查认可后,方可进行实验。

(2) 实验过程中不仅要规范操作、仔细观察、积极思考,将实验中使用试剂材料等的规格、生产厂家、批号、浓度、用量、加料次序等如实记录,还应将观察到的实验现象(如发热情况、颜色变化、pH 的改变、沉淀、气泡等)和数据(如 pH、熔点、沸点、反应温度、基质浓度、溶解氧及 CO_2 的浓度等)即时记录下来,不允许写回忆笔记。实验记录应实事求是、简明扼要、字迹清楚、完整。实验完毕需将原始记录交给指导教师检查、签字后方可离开实验室。

(3) 实验结束后,应根据实验原始记录整理有关的数据和材料,对实验现象进行分析、归纳和总结,并讨论实验结果,总结自己的实验体会和经验教训,对存在的问题提出改进的意见或解决的办法,及时写出实验报告。实验报告要求条理清楚,书写工整,图表清晰。

(4) 实验过程中,要时刻保持实验环境的整洁。火柴梗、纸张、废品、废液等严禁丢入或倒入水槽,以免堵塞水槽和腐蚀下水管道。实验中的废弃物应按规定处置。

(5) 爱护公共财物。严格按照操作规程使用实验室和仪器设备,如发现仪器有故障,应立即停止使用,报告教师,及时排除故障。各种仪器设备使用后应放回原处,不得携带出室外或作他用。由于违反操作规程而造成的损坏,要按照规定赔偿。

(6) 鼓励学生对实验内容和安排提出改进,对实验现象进行讨论;倡导在教学计划外做探索性、研究性实验,但需事先提出申请,经批准同意后方可进行。

(7) 节约使用试剂、药品、材料、水、电等。实验用品一律不得擅自带出实验室。

(8) 实验完毕,应将使用过的仪器洗净,并整齐地放回实验柜内,清理好实验台,关好电闸、水和煤气龙头,经指导老师检查合格后才能离开实验室。

(9) 每次实验结束后由学生轮流值勤、负责打扫和整理实验室,并检查水龙头、煤气开关、门、窗是否关紧,电闸是否拉掉,以保持实验室的整洁和安全。

二、生物工艺实验安全守则

在生物工艺实验室,经常使用各种试剂药品、仪器设备和生物材料,以及水、电、煤气,还会经常遇到高温、低温、高压、真空的实验条件和仪器,若缺乏必要的安全防护知识,会造成生命和财产的巨大损失。

1. 物理安全

使用电器时,应先检查实验装置或设置的金属外壳是否接好地线,插头接线是否完好,电线是否磨损;使用时先插上插头,接通电源,再开启仪器开关;电器内外要保持干燥,实验过程中应防止人体与电器导电部分直接接触,不能用湿手或手拿湿的物品接触带电体。实验室应由专业人员定期检修电力设备、接地线、插座、电线等,以使实验室的潜在危险降到最低程度;应在生物反应设备的适当位置安装剩余电流或接地泄漏断路器。

高压气瓶的安全使用:气瓶应专瓶专用,不能随意改装;气瓶应存放在阴凉、干燥、远离热源的地方,易燃气体气瓶与明火距离不小于 5 m;氢气瓶最好隔离;气瓶搬运要轻要稳,放置要牢靠;各种气压表一般不得混用;气瓶内气体不可用尽,以防倒灌;开启气门时应站在气压表的一侧,不准将头或身体对准气瓶总阀,以防阀门或气压表冲出伤人。

处理和使用易燃物时,应远离明火,注意室内通风,及时将蒸气排出;点燃的火柴用后立即熄灭,不得乱扔;水、电、煤气使用完毕,应立即关闭水龙头、煤气开关,拉掉电闸;实验室排放的液体温度必须低于 80 ℃,有机溶剂必须集中回收处理;离开实验室前,应检查确保拉下电闸,关闭水、煤气总阀门和门窗。

2. 化学安全

生物工艺实验所用药品及溶剂种类繁多,涉及各种易燃、易爆、有毒或有腐蚀性的药品,若保管、使用不当或违章操作,都会发生着火、烧伤、中毒、爆炸等事故。

一般有机试剂要求存放于阴凉、干燥、通风、避光处,适宜温度在 25 ℃ 以下。所有易燃易爆试剂都应放置在通风良好、阴凉的专用橱中,并在专用橱明显位置贴上写有“易燃”字样的醒目标识;易自燃试剂如黄磷(自燃点为 34 ℃)、白磷等,在常温下可与空气中的氧发生氧化反应,放出大量的热,极易自燃,故应放在水中保存;遇水燃烧试剂如:钾、钠等,必须浸没在装有煤油或石蜡油的试剂瓶中保存;碳化钙、过氧化物等必须密封贮存,否则吸湿后会造意外;强氧化性试剂应存放在阴凉、干燥、通风处,温度不超过 30 ℃,应与酸、炭粉、木屑、硫化物、糖类等易燃物、可燃物或还原剂隔离,最好分库或同库分区存放;盛放有毒试剂的容器除密封外,容器表面应贴有“有毒”、“剧毒”等字样的标签,存放在阴凉、干燥处,与爆炸性、氧化性、易燃性、酸类试剂隔离,应置于加锁的专柜保存并详细记录领用人及领用数量;剧毒试剂如氰化钾、三氧化二砷等,必须锁在保险柜中,由专人负责保管,严格遵循领用制度。

绝对不允许随意混合各种化学药品,以免发生意外事故;切勿直接俯视容器中的化学反应或正在加热的液体;一切涉及有毒和有刺激性气味气体的实验,都要在通风橱内进行;不能用敞口容器加热或放置易燃、易挥发的化学药品,如对沸点低于 80 ℃ 的液体,在蒸馏时,应采用水浴等间接加热方式,不能直接加热;使用强酸、强碱、溴等具有强腐蚀性的试剂时,要更加当心,切勿溅在皮肤上或衣服上,特别要注意保护眼睛,取用时戴胶皮手套和防护眼镜;使用有毒试剂,不得接触皮肤和伤口;实验后废液应倒入指定的容器内集中处理,易燃、易挥发的废物不得倒入废液缸和垃圾桶中,可倒入水池用水冲走,但与水发生猛烈反应者除外。

3. 生物安全

我国《实验室生物安全通用要求》(GB 19489—2004)于2004年10月1日起正式实施,这标志着我国实验室生物安全管理和实验室生物安全认可工作步入了科学、规范和新发展的新阶段。开展生物工艺实验时,应该了解并严格遵守生物安全管理规则和防护知识,保护自身,关爱他人,防止生物安全事故的发生。

该标准根据生物因子对个体和群体的危害程度将其分为四级。

(1) 危害等级Ⅰ(低个体危害,低群体危害):不会导致健康工作者和动物致病的细菌、真菌、病毒和寄生虫等生物因子。

(2) 危害等级Ⅱ(中等个体危害,有限群体危害):能引起人或动物发病,但一般情况下对健康工作者、群体、家畜或环境不会引起严重危害的病原体。实验室感染不导致严重疾病,具备有效治疗和预防措施,并且传播风险有限。

(3) 危害等级Ⅲ(高个体危害,低群体危害):能引起人或动物严重疾病,或造成严重经济损失,但通常不因偶然接触而在个体间传播,或能用抗生素抗寄生虫药治疗的病原体。

(4) 危害等级Ⅳ(高个体危害,高群体危害):能引起人或动物非常严重的疾病,一般不能治愈,容易直接、间接或因偶然接触在人与人,或动物与人,或人与动物,或动物与动物之间传播的病原体。

根据所操作的生物因子的危害程度和采取的防护措施,将生物安全的防护水平(BSL)分为四级,Ⅰ级防护水平最低,Ⅳ级防护水平最高。以BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4表示相应的生物安全防护水平,见表1-1。

表 1-1 生物实验室安全水平比较

生物安全水平	病原特征	操作要求	一级屏障	二级屏障
BSL-1	不会经常引发健康成人疾病	标准的微生物操作	不要求	开放实验台、洗手池
BSL-2	人类病原菌,因皮肤伤口、吸入、黏膜暴露而发生危险	BSL-1操作加: ① 限制进入;② 有生命危险警告标志;③ “锐器”安全措施;④ 生物安全手册,其中规定废物消毒和医疗观察	一级生物安全柜、二级生物安全柜;实验服、手套,若需要则采取面部保护措施	BSL-1加: 高压灭菌锅
BSL-3	内源性和外源性病原,可通过气溶胶传播,能导致严重后果或生命危险	BSL-2操作加: ① 控制进入;② 所有废物消毒;③ 洗涤前,实验服消毒;④ 有基础血清	一级、二级生物安全柜;保护性实验服、手套,若需要则采取呼吸保护措施	BSL-2加: ① 和进入走廊隔开; ② 双门进入,门自动关闭;③ 排出的空气不循环;④ 实验室内负压
BSL-4	对生命有高度危险的危险性病原或外源性病原;致命,可通过气溶胶而导致实验室感染;或未知传染风险的有关病原	BSL-3操作加: ① 进入前换衣服;② 出实验室前淋浴;③ 带出设施的所有材料应消毒	三级生物安全柜或一级、二级生物安全柜加全身、供应空气的正压防护服	BSL-3加: ① 单独建筑或隔离区域;② 有供气系统、排气系统,真空系统、消毒系统;③ 其他有关要求

三、生物工艺实验事故的处理

(1) 生物工艺实验室应备有急救药品,如生理盐水、医用酒精、红药水、烫伤膏、1%~2%的乙酸或硼酸溶液、1%碳酸氢钠溶液、2%硫代硫酸钠溶液、甘油、止血粉、凡士林等,还应备用镊子、剪刀、纱布、药棉、绷带等急救用具。

(2) 实验过程中一旦发生火灾,应沉着、冷静、不要惊慌失措;应立即切断电源,熄灭附近所有火源,迅速移开着火现场周围的易燃物,特别是有机溶剂着火,一般不能用水扑灭,否则会使火焰蔓延,无异于“火上烧油”;小火可用湿布或石棉布盖熄,若火势较大时应根据具体情况采用相应的灭火器材。

(3) 实验过程中万一发生中毒事故,宜根据具体情况具体分析。

① 皮肤接触:宜用酒精擦洗,然后用肥皂和大量水冲洗。

② 吞下强酸:先饮大量水,然后服用氢氧化铝膏、鸡蛋白、牛奶。

③ 吞下强碱:先饮大量水,然后服用醋酸果汁、鸡蛋白、牛奶。无论酸、碱中毒,都不要吃呕吐剂。

④ 气体中毒:吸入少量 Br_2 蒸气、 Cl_2 、 HCl 等气体时,可吸入少量乙醇和乙醚的混合蒸气来解毒,也可用稀的碳酸氢钠溶液漱口;吸入少量 H_2S 、 NO_2 或 CO 等有毒气体而感到不适时,立即到室外呼吸新鲜空气。

(4) 实验过程中万一被强酸、强碱或溴烧伤,应立即用大量水冲洗,然后再根据不同情况分别处理。

① 浓酸烧伤:先用大量的水冲洗,然后用 3%~5%碳酸氢钠溶液洗涤,必要时涂烫伤膏。

② 烧碱烧伤:先用大量的水冲洗,再用 1%~2%硼酸或醋酸溶液洗涤,最后再用水洗,必要时涂上烫伤膏。

③ 溴烧伤:用酒精擦至没有溴液为止,然后涂上甘油或烫伤油膏加以按摩。

以上物质一旦溅入眼睛中,应立即用大量的水冲洗,并及时去医院治疗。

四、生物工艺实验室“四废”的处理

实验中经常会使用或产生某些有毒的气体、液体和固体,都需要及时排弃。特别是某些剧毒物质,如果直接排放就可能污染周围空气和水源,损害人体健康。因此,对废液、废气、废渣和生物废弃物要经过一定的处理后,才能排弃。

1. 废气

(1) 产生少量有毒气体的实验应在通风橱内进行。通过排风设备将少量毒气排到室外,使排出的气体在外面大量空气中稀释,以免污染室内。

(2) 产生毒气量大的实验必须备有吸收或处理装置。如二氧化氮、二氧化硫、氯气、硫化氢、氟化氢等可用导管通入碱液中,使其大部分吸收后排出;一氧化碳可点燃转成二氧化碳。

2. 废液

(1) 废液缸中废液酸可先用耐酸塑料网纱或玻璃纤维过滤,滤液加碱中和,调节 pH 至 6~8 后就可排出,少量滤渣可埋于地下。

(2) 废铬酸洗液可以用高锰酸钾氧化法使其再生,重复使用。氧化方法:先在 110~130 °C 下将其不断搅拌、加热、浓缩,除去水分后,冷却至室温,缓缓加入高锰酸钾粉末。每 1 000 mL 加入 10 g 左右,边加边搅拌直至溶液呈深褐色或微紫色,不要过量。然后直接加热至有三氧化硫出现,停止加热。稍冷,通过玻璃砂芯漏斗过滤,除去沉淀;冷却后析出红色三氧化铬沉淀,再加适量硫酸使其溶解即可使用。少量的废铬酸洗液可加入废碱液或石灰使其生成氢氧化铬(Ⅲ)沉淀,将此废渣埋于地下。

(3) 氰化物是剧毒物质,含氰废液必须认真处理。对于少量含氰废液,可先加氢氧化钠调至 $\text{pH} > 10$,再加入几克高锰酸钾使 CN^- 氧化分解。大量的含氰废液可用碱性氯化法处理。先用碱将废液调至 $\text{pH} > 10$,再加入漂白粉,使 CN^- 氧化成氰酸盐,并进一步分解为二氧化碳和氧气。

(4) 含汞盐废液应先调节 pH 至 8~10,然后加适当过量的硫化钠生成硫化汞沉淀,并加硫酸亚铁生成硫化亚铁沉淀,从而吸附硫化汞沉淀下来。静置后分离,再离心,过滤。清液汞含量降到 0.02 mg/L 以下可排放。少量残渣可埋于地下,大量残渣可用焙烧法回收汞,但注意一定要在通风橱内进行。

(5) 含重金属离子的废液,最有效和最经济的处理方法是加入碱或硫化钠,将重金属离子变成难溶性的氢氧化物或硫化物沉积下来,然后过滤分离,少量残渣可埋于地下。

3. 废渣

有回收价值的废渣应收集起来统一处理,回收利用,少量无回收价值的有毒废渣也应集中起来分别处理或深埋于离水源远的指定地点。

(1) 钠、钾屑及碱金属、碱土金属氢化物、氮化物

悬浮于四氢呋喃中,在搅拌下慢慢滴加乙醇或异丙醇至不再放出氢气为止,再慢慢加水,溶液澄清后冲入下水道。

(2) 硼氢化钠(钾)

用甲醇溶解后,用水充分稀释,再加酸并放置,此时有剧毒硼烷产生。所以操作应在通风橱内进行,其废液用水稀释后冲入下水道。

(3) 酰氯、酸酐、三氯化磷、五氯化二磷、氧化亚砷

在搅拌下加大量水冲走。五氧化二磷加水,用碱中和后冲走。

(4) 沾有铁、钴、镍、铜催化剂的废纸、废塑料

这些物体变干后易燃,不能随便丢入废纸篓内,应趁未干时,深埋于地下。

(5) 重金属及难溶盐

尽量回收,不能回收的集中起来深埋于远离水源的地下。

4. 生物废弃物

生物废弃物包括所有不再需要的样本、培养物和其他生物性材料,可以分为非感染性废弃物和感染性废弃物两大类。非感染性废弃物可按生活垃圾进行处理,可重复使用的物品经清洗后即可再使用。感染性废弃物则必须在实验室内通过高压灭菌或焚烧等清除污染,在处理过程中不能造成人员感染和环境污染。

第二节 实验方案的设计与实施

实验设计是科学安排实验方案,正确地处理和尽快得到实验结果的一种有效的科学研究手段。

一、实验设计的基本原则

1. 重复性原则

重复就是将一基本实验重复多做几次,因为根据一次实验的结果就下结论往往不一定准确。实验条件在每次实验时都存在波动,而总体平均值波动较小,所以重复有助于减弱因波动而产生的误差,主要表现在:① 估计实验误差,要能判断处理之间差异的显著性,就要有误差估计值,而误差估计值可以从重复实验中得到;② 更精确地估计处理效应,减少实验误差。例如比较两种不同药物对害虫的毒性药效,每种药物只做一次实验,A 药物 120 h 后对害虫的致死率达到 68%,B 药物 140 h 后对害虫的致死率达到 68%。这时我们难以正确判断两种药效有无差异。因为造成这种差异的原因可能是源于药效的不同也有可能是实验误差,所以就不能轻易下结论。如果多做几次实验求得平均值,由于平均数方差只是样本方差的 $1/n$,当 n 足够大时,两种药物处理效果之间的差异就可以认为是药物效应间的差异。

2. 随机化原则

所谓随机化是指实验材料的分配和各实验点的实验次序都要随机确定。随机化常能使各次实验结果相互独立,而这是实验设计中正确使用统计方法分析实验结果的基石。随机化还可以使不可控因子的影响“抵消”部分,不致积累。而顺序排列在误差估计时,不是过高就是过低。

3. 局部控制原则

局部控制是指在实验时采取一定的技术措施或方法来控制或降低非实验因素对实验结果的影响。实验时,当实验环境或单位差异较大时,仅根据重复和随机化两原则进行设计,不能将实验环境或单位差异所引起的变异从误差中分离出来,因而实验误差大,实验的精确性与检验的灵敏度低。为了解决这一问题,在实验环境或单位差异大的情况下,根据局部控制的原则,可将整个实验环境或单位分成若干个小环境或小组,在小环境或小组内使非处理因素尽量一致。每个比较一致的小环境或小组,称为区组。例如,一项农田实验中要用到 20 块实验田,但每块实验田的肥沃程度、日照强度、水分多少很难达到完全相同或近似相同。若把 20 个田块分成几个区组,使区组内差异小,而区组间允许差异大一些,这时区组之间的差异可在方差分析时从实验误差中分离出来,能较好地降低实验误差。

以上所述重复、随机化和局部控制三个基本原则称为费雪原则,是实验设计中必须遵循的原则,再采用相应的统计分析方法就能够最大程度地降低误差,提高实验精度,从而作出可靠的结论。

二、实验内容的确定

实验方案是指导实验工作有序开展的一个纲要,是在对研究对象、实验内容进行充分了

解的基础上所做的完整规划。实验方案的主要内容包括：实验目的、实验原理、技术路线和方法、实验结果的分析和总结。

生物具有的多样性,为我们提供了丰富的研究对象。技术的积累,又为我们提供了多种可供选择的研究方法。在这种条件下,正确选择研究对象和研究方法,就成为研究能否成功,判断研究水平高低的关键。另外,生物学实验方案的设计还应符合人类社会的可持续发展,研究内容应有利于保护生态环境,提高资源利用率,节约能源等。

实验内容是研究的主体。对于同一实验目的往往会有多种研究内容可供选择,因此要求研究者要对研究对象进行认真分析,抓住主要矛盾。实验内容的具体化就是实验指标。实验指标是指为达到实验目的而必须通过实验来获取的一些表征实验内容的特征性参数。如细胞的生长速率、产物的生成速率、产品的得率等。为达到实验指标需要确定各种实验因子,实验因子包括:温度、湿度、压力、流量、原料组成、酸碱度、搅拌强度等。在确定实验因子时必须注意两点:

- (1) 测定实验因子必须有可控制性和可检测性,并有足够的准确度。
- (2) 实验因子和实验指标应具有明确的相关性。

三、实验设计

实验设计是在已确定实验内容的基础上,拟定一个具体的实验安排表,指导实验的进程。生物学实验通常涉及多变量、多水平的设计内容,不同变量、不同水平所构成的实验点在操作可行域中的位置不同,对实验结果的影响也不一样。因此,如何安排和组织实验,用最少的实验获取最有价值的实验结果,成为实验设计的核心内容。

实验设计的基本方法如下。

1. 网格法

网格法又称析因法,特点是以各因子各水平的全面搭配来组织实验,逐一考察各因子的影响规律。通常采用单因子变更法,即每次实验只改变一个因子的水平,其他因子保持不变,以考察该因子的影响。当实验次数为 n , 因子数为 N , 因子水平数为 K 时,有 $n = K^N$ 。对一个四因子三水平的实验,实验次数为 $3^4 = 81$ 。

2. 正交设计法

正交设计法是为了避免网格法在实验点设计上的盲目性而提出的一种比较科学的实验设计方法。它是根据正交配置的原则,从各因子各水平的可行域中选择最有代表性的搭配来组织实验,综合考察各因子的影响。

正交实验设计是研究多因素、多水平的一种设计方法,它是根据正交性从全面实验中挑选出部分有代表性的点进行实验,这些有代表性的点具备了“均匀分散,齐整可比”的特点。正交实验设计是分式析因设计的主要方法,是一种高效率、快速、经济的实验设计方法。日本著名的统计学家田口玄一将正交实验选择的水平组合列成表格,称为正交表。例如做一个三因子三水平的实验,按全面实验要求,需进行 $3^3 = 27$ 种组合的实验,且尚未考虑每一组合的重复数。若按 $L_9(3)^3$ 正交表安排实验,只需作 9 次,按 $L_{18}(3)^7$ 正交表需进行 18 次实验,显然大大减少了工作量。因而正交实验设计在很多领域的研究中已经得到广泛应用。

正交表是一整套规则的设计表格。 $L_n(K^N)$ 中 L 表示正交表, n 表示实验次数, K 表示因子水平数, N 表示实验因子数。正交表具有以下性质。

(1) 每一列中,不同的数字出现的次数相等。例如在两水平正交表中,任何一列都有数码“1”与“2”,且任何一列中它们出现的次数是相等的;在三水平正交表中,任何一列都有“1”、“2”、“3”,且在任一列的出现数均相等。

(2) 任意两列中数字的排列方式齐全而且均衡。例如在两水平正交表中,任何两列(同一横行内)有序对共有4种:(1,1),(1,2),(2,1),(2,2),每种对数出现次数均相等。在三水平情况下,任何两列(同一横行内)有序对共有9种:(1,1),(1,2),(1,3),(2,1),(2,2),(2,3),(3,1),(3,2),(3,3),且每对出现次数也都均相等。

正交实验的表头设计是正交设计的关键,它承担着将各因素及交互作用合理安排到正交表的各列中的重要任务,因此一个表头设计就是一个设计方案。表头设计的主要步骤如下。

(1) 确定列数。根据实验目的,选择处理因素与不可忽略的交互作用,明确其个数。如果与研究中的某些问题尚不太了解,可多列一些,但一般不宜过多。当每个实验号无重复,只有1个实验数据时,可设2个或多个空白列,作为计算误差项之用。

(2) 确定各因素的水平数。根据研究目的,一般二水平(有、无)可作因素筛选用,也适用于实验次数少、分批进行的研究。三水平可观察变化趋势,选择最佳搭配。多水平能以一次实验满足实验要求。

(3) 选定正交表。根据确定的列数(c)与水平数(t)选择相应的正交表。例如观察5个因素和8个一级交互作用,留两个空白列,且每个因素取两水平,则适宜选 $L_{16}(2^{15})$ 表。由于同水平的正交表有多个,如 $L_8(2^7)$, $L_{12}(2^{11})$, $L_{16}(2^{15})$,一般只要表中列数比考虑需要观察的个数稍多一点即可,这样可省工省时。

(4) 表头安排。应优先考虑交互作用不可忽略的处理因素,按照不可混杂的原则,将它们及交互作用首先在表头排妥,而后再将剩余各因素任意安排在各列上。例如某项目考察4个因素A,B,C,D及 $A \times B$ 交互作用,各因素均为两水平。现选取 $L_8(2^7)$ 表,由于A,B两因素需要观察其交互作用,故将二者优先安排在第1,2列;根据交互作用表查得 $A \times B$ 应排在第3列,于是C排在第4列;由于 $A \times C$ 交互在第5列, $B \times C$ 交互作用在第6列,虽然未考查 $A \times C$ 与 $B \times C$,但为避免混杂之嫌,D就排在第7列。

(5) 组织实施方案。根据选定正交表中各因素占有列的水平数列,构成实施方案表,按实验号依次进行,共做 n 次实验,每次实验按表中横行的各水平组合进行。例如 $L_9(3^4)$ 表,若安排四个因素,第一次实验A,B,C,D四因素均取一水平,第二次实验A因素一水平,B,C,D取二水平……第九次实验A,B因素取三水平,C因素取二水平,D因素取一水平。实验数据记录在该行的末尾。因此整个设计过程可用一句话归纳为:“因素顺序上列,水平对号入座,实验横着做。”

3. 均匀设计法

每一个方法都有其局限性,正交实验也不例外,它只适用于水平数不多的实验中。若在一项实验中有 s 个因素,每个因素各有 q 水平,用正交实验安排实验,则至少要做 q^s 个实验。当 q 较大时, q^s 将更大,实验强度往往会使人望而生畏。例如,当 $q=12$ 时, $q^2=144$,对大多数实际问题,要求做144次实验是太多了。对这一类实验,均匀设计是非常有用的。

所有的实验设计方法本质上就是在实验的范围内给出挑选代表点的方法。正交设计是根据正交性准则来挑选代表点,使得这些点能反映实验范围内各因素和实验指标的关系。

前面提及的正交设计在挑选代表点时有两个特点：均匀分散，整齐可比。“均匀分散”使实验点有代表性；“整齐可比”便于实验数据的分析。为了保证“整齐可比”的特点，正交设计必须至少要求做 q^2 次实验。若要减少实验的次数，只有去掉整齐可比的要求。

均匀设计就是只考虑实验点在实验范围内均匀散布的一种实验设计方法。均匀设计和正交设计相似，也是通过一套精心设计的表来进行实验设计的，如表 1-2。每一个均匀设计表都有一个代号 $U_n(q^s)$ 或 $U_n^*(q^s)$ 其中“U”表示均匀设计，“n”表示要做 n 次实验，“q”表示每个因素有 q 个水平，“s”表示该表有 s 列。右上角加“*”和不加“*”代表两种不同类型的均匀设计表。通常加“*”的均匀设计表有更好的均匀性，应优先选用。例如 $U_6^*(6^4)$ 表示要做 6 次实验，每个因素有 6 个水平，该表有 4 列。

每个均匀设计表都附有一个使用表，它指示我们如何从设计表中选用适当的列，以及由这些列所组成的实验方案的均匀度。表 1-3 是 $U_6^*(6^4)$ 的使用表。它告诉我们，若有两个因素，应选用 1, 3 两列来安排实验；若有三个因素，应选用 1, 2, 3 三列……最后 1 列 D 表示刻画均匀度的偏差，偏差值越小，表示均匀度越好。

表 1-2 $U_6^*(6^4)$ 表

	1	2	3	4
1	1	2	3	6
2	2	4	6	5
3	3	6	2	4
4	4	1	5	3
5	5	3	1	2
6	6	5	4	1

表 1-3 $U_6^*(6^4)$ 的使用表

S	列号				D
2	1	3	—	—	0.187 5
3	1	2	3	—	0.265 6
4	1	2	3	4	0.299 0

均匀设计有其独特的布(实验)点方式，其特点表现在：

- (1) 每个因素的每个水平做一次且仅做一次实验。
- (2) 任两个因素的实验点都在平面的格子点上，每行每列有且仅有一个实验点。
- (3) 均匀设计表任两列组成的实验方案一般并不等价。
- (4) 当因素的水平数增加时，实验数按水平数的增加量增加。

实验设计是一门指导科学实验的科学和方法，有关实验设计的方法远不止以上三种，例如像属于优化实验设计内容的信噪比实验设计、调优设计等。各种实验设计的基本原理、设计步骤以及结果分析等内容限于篇幅要求，就不在此论述，详细论述请读者查阅实验设计与数据分析等相关书籍。

第三节 实验数据的记录和处理

在实验过程中往往会观察到或测得一系列与被研究对象相关的各种数据,如重量、发酵时的糖度、搅拌速度、培养基的 pH、温度、生物量、生物体中某种成分的含量等各种物理、化学和生物数值。如何通过这些数据得出正确的结论有时显得比实验本身更为重要。因此,学会科学地记录、整理和处理所得实验数据,并以合理的形式报告出定性定量分析的结果,是一个实验者必备的素质,也是科学实验研究的重要任务之一。

一、实验数据的记录

实验中直接观察或测量得到的数据称为原始数据,这些数据应及时、准确而清楚地记录在实验记录本或原始记录纸上。记录实验数据时,要有严谨的科学态度,要实事求是,不能随意更改或增删,切忌夹杂主观因素,决不能随意拼凑或伪造数据。一般地,实验记录的内容除了实验原始数据外,还包括中间结果或现象、实验条件、实验日期、实验顺序、实验过程中涉及的各种特殊仪器的型号和标准溶液浓度等。数据记录的表格通常在实验前已设计好,实验过程中按格式逐项填好,一般没有固定格式,只求记录的详实可靠,简洁明了,且要妥善保存。

二、实验数据的误差分析

1. 误差种类

根据误差的性质,可把测量误差分为系统误差、偶然误差和过失误差。

(1) 系统误差:系统误差是指在相同条件下,多次测量同一物理量时,误差的绝对值和符号保持恒定,或在条件改变时,按某一确定规律变化的误差。系统误差根据产生的原因可分为方法误差、仪器误差、试剂误差、操作误差。

(2) 偶然误差:指由于某些偶然因素(如测定时的环境温度、湿度、气压等的微小波动,仪器性能的微小变化等)所引起的误差。偶然误差难以察觉,也难以控制,但在消除了系统误差后,在同样条件下进行多次测试,则可发现偶然误差完全服从一般的统计规律。即大小相等的正负误差出现的几率相等;小误差出现的机会多,大误差出现的机会少。随着测试次数的增多,偶然误差的算数平均值趋近于零。

(3) 过失误差:过失误差是由于实验者犯了某种不应犯的错误所引起的,如标度看错、记录写错等。实验者只要细心,增强责任心,可避免此类误差。

2. 误差的表示方法

(1) 准确度与误差

误差可分为绝对误差和相对误差 2 种。

$$\text{绝对误差}(\Delta N) = \text{测定值}(N) - \text{真实值}(N')$$

$$\text{相对误差}(\%) = \Delta N / N' \times 100\%$$

例:用天平称两种蛋白质的质量各为 2.175 0 g 和 0.217 5 g,假定两者的真实值各为 2.175 1 g 和 0.217 6 g,则称量的绝对误差和相对误差分别为: