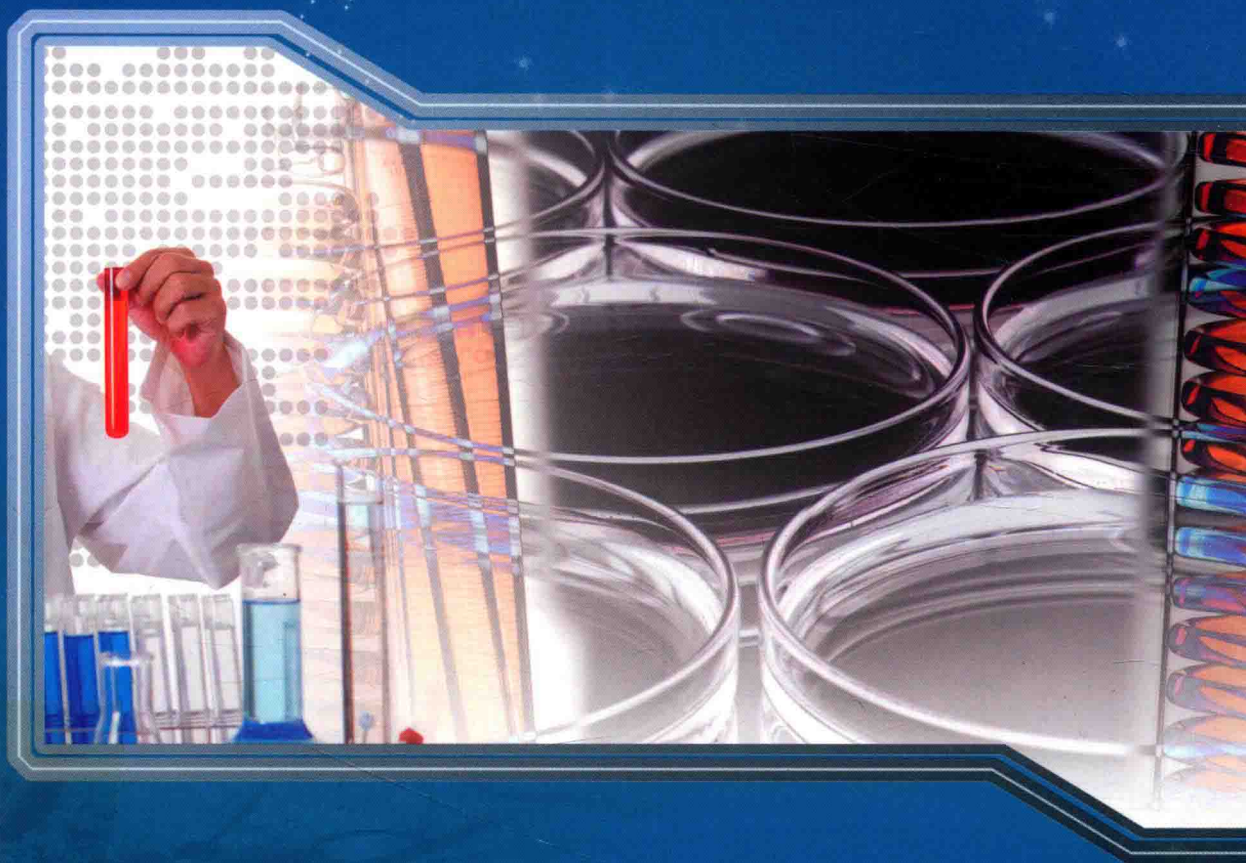


高等医学院校实验系列规划教材

分子生物学实验指导

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 杨清玲 吕静竹



中国科学技术大学出版社

高等医学院校实验系列规划教材

分子生物学实验指导

FENZI SHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主 编 杨清玲 吕静竹

副主编 周继红 夏 俊 郭 侯

编委会 (按姓氏笔画排序)

马 佳 王文锐 吕静竹 杨 湛
杨清玲 张 丹 张玉心 张皓皓
陈昌杰 陈素莲 周继红 夏 俊
郭 侯



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

实验教学是高等院校培养高素质、高层次和综合性人才的必要环节,其目的不仅在于加深学生对已学理论知识的理解,更重要的是培养学生的实践动手能力。分子生物学是从分子水平阐述生物体生命现象和规律的学科,是生物医学的前沿和生长点。本书在自编《分子生物学实验指导讲义》的基础上,结合教师们多年教学经验编写而成,共分七个部分:基础知识、核酸技术、分子克隆、蛋白技术、生物信息学在分子生物学实验中的应用、综合性实验和附录。

本书可供高等院校生物、医药等专业教学和参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验指导/杨清玲,吕静竹主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2016. 12
ISBN 978-7-312-04042-9

I. 分… II. ①杨… ②吕… III. 分子生物学—实验 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 309373 号

出版 中国科学技术大学出版社
安徽省合肥市金寨路 96 号,230026
<http://press.ustc.edu.cn>
印刷 安徽联众印刷有限公司
发行 中国科学技术大学出版社
经销 全国新华书店
开本 787 mm×1092 mm 1/16
印张 14.25
字数 356 千
版次 2016 年 12 月第 1 版
印次 2016 年 12 月第 1 次印刷
定价 30.00 元

前言

现代生物科技的发展日新月异,分子生物学作为生命科学领域的带头学科,其理论与实验技术也在飞速进步,为了解生命现象的本质、揭示生命活动的规律提供了有力的工具。为此,我们在自编《分子生物学实验指导讲义》的基础上,结合多年教学经验,同时参考国内外分子生物学的实验教材,组织编写了《分子生物学实验指导》。本教材可供高等院校生物、医药等专业的学生使用。

本教材共分为基础知识、核酸技术、分子克隆、蛋白技术、生物信息学在分子生物学实验中的应用、综合性实验和附录七个部分。基础知识主要介绍分子生物学实验室的基本要求 and 分子生物学实验技术原理的相关知识。核酸技术、分子克隆和蛋白技术主要依据基因工程技术路线,核酸技术涉及核酸分离纯化、鉴定、PCR 和核酸分子杂交等基本操作和技能;分子克隆涉及 DNA 的酶切、连接、感受态细胞制备及转化和重组子鉴定等实验操作;蛋白技术涉及外源基因的原核表达,目的蛋白的提取与纯化、定性和定量检测,以及基因工程菌的大规模培养和高密度发酵技术。同时,本教材融入生物信息学技术的应用,主要介绍如何利用软件进行核酸和蛋白质序列数据库的查询以及核酸与蛋白质序列的相似性分析,如多序列比对软件(Clustal、DAMBE)、系统发育树构建软件(MEGA、PHYLP)和引物设计软件(Primer Premier 5.0)等。为加强学生科研思维能力的培养达到对知识、仪器与技能的综合运用与融汇贯通,本教材在基于教师科研方向的基础上设计了综合性实验,包含 5 个实验案例,涉及内容涵盖疾病的分子诊断、疾病耐药基因的筛选和病毒核酸的实验室检测等方面,并拓展介绍了一些新技术,充分体现了现代分子生物学技术在医药领域中的重要作用,力求满足应用型生物、医学人才培养的需要。附录部分主要介绍分子生物学实验中的常用数据、试剂及相关的实验资料。

本教材在以下省级质量工程资助下完成:省级教学团队(2014jxtd022)、省级专业综合改革试点(2012zy048)、安徽省重大教学改革研究项目(2015zdjy099)、教学研究重点项目(2013jyxm118; 2012jyxm302)和一般项目(2015jyxm197)、省级精品资源共享课程(2013gxk057)。

由于编者水平及经验有限,书中难免存在不足及疏漏之处,衷心期待广大读者批评指正。

陈昌杰

2016 年 5 月

目 录

前言	(i)
----------	-------

第 1 篇 基础知识

第 1 章 分子生物学实验室的基本要求	(2)
1.1 实验室规则	(2)
1.2 实验室安全防护	(2)
1.3 放射性同位素防护	(4)
1.4 危险化学品试剂防护	(4)
1.5 生物安全防护	(6)
1.6 实验室物品与仪器的管理	(8)
第 2 章 实验记录与实验报告	(9)
2.1 实验记录	(9)
2.2 实验报告	(10)
第 3 章 仪器使用与溶液配制	(11)
3.1 常用仪器设备	(11)
3.2 溶液配制	(16)
第 4 章 常用实验用品的处理	(17)
4.1 清洗	(17)
4.2 消毒灭菌	(18)
4.3 液氮的安全使用	(19)
第 5 章 分子生物学实验技术原理	(22)
5.1 细胞培养技术	(22)
5.2 大肠杆菌的培养与保存	(25)

第 2 篇 核酸技术

第 6 章 核酸电泳	(30)
6.1 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA	(31)
6.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 DNA	(36)
第 7 章 核酸的分离纯化和鉴定	(40)
7.1 质粒 DNA 的提取与纯化	(40)
7.2 蛋白酶 K 和苯酚从哺乳动物细胞中分离高分子质量 DNA	(44)
7.3 其他 DNA 提取方案	(49)
7.4 RNA 的提取	(49)
第 8 章 聚合酶链反应(PCR)	(61)
8.1 普通 PCR	(61)

8.2	RT-PCR	(65)
8.3	荧光定量 PCR	(69)
第9章	核酸分子杂交	(76)
9.1	斑点杂交	(76)
9.2	原位杂交	(80)
9.3	Southern 印迹杂交	(85)
9.4	Northern 印迹杂交	(90)

第3篇 分子克隆

第10章	DNA 的酶切	(96)
10.1	实验目的	(96)
10.2	实验原理	(96)
10.3	仪器、材料与试剂	(97)
10.4	实验流程	(97)
10.5	实验步骤	(97)
10.6	结果分析	(98)
10.7	注意事项	(99)
10.8	应用	(99)
第11章	DNA 的连接	(101)
11.1	实验目的	(101)
11.2	实验原理	(101)
11.3	仪器、材料与试剂	(102)
11.4	实验流程	(102)
11.5	实验步骤	(102)
11.6	结果分析	(102)
11.7	注意事项	(102)
11.8	应用	(103)
第12章	大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	(104)
12.1	实验目的	(104)
12.2	实验原理	(104)
12.3	仪器、材料与试剂	(104)
12.4	实验流程	(105)
12.5	实验步骤	(105)
12.6	结果分析	(106)
12.7	注意事项	(106)
12.8	应用	(107)
第13章	重组子的鉴定	(110)
13.1	实验目的	(110)
13.2	实验原理	(110)
13.3	仪器、材料与试剂	(110)

13.4	实验流程	(110)
13.5	实验步骤	(110)
13.6	结果分析	(111)
13.7	注意事项	(111)
13.8	应用	(112)

第4篇 蛋白技术

第14章	外源基因在大肠杆菌中的诱导表达	(118)
14.1	实验目的	(118)
14.2	实验原理	(118)
14.3	仪器、材料与试剂	(119)
14.4	实验流程	(120)
14.5	实验步骤	(120)
14.6	结果分析	(121)
14.7	注意事项	(121)
14.8	应用	(121)
14.9	真核细胞表达外源基因操作步骤	(122)
第15章	蛋白质的提取与纯化	(123)
15.1	实验目的	(123)
15.2	实验原理	(123)
15.3	仪器与试剂	(124)
15.4	实验流程	(125)
15.5	实验步骤	(125)
15.6	结果分析	(126)
15.7	注意事项	(126)
15.8	应用	(127)
第16章	蛋白质的定量检测	(130)
16.1	Lowry 法测定蛋白质含量	(130)
16.2	BCA 法测定蛋白质含量	(132)
16.3	Bradford 法测定蛋白质含量	(134)
第17章	目标蛋白质的测定	(137)
17.1	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(137)
17.2	蛋白质的免疫印迹技术(Western-Blot)	(141)
17.3	免疫共沉淀	(146)
17.4	双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	(150)
第18章	基因工程菌的大规模培养及高密度发酵技术	(154)
18.1	实验目的	(154)
18.2	实验原理	(154)
18.3	仪器与试剂	(155)
18.4	实验流程	(156)

18.5 实验步骤	(156)
18.6 结果分析	(158)
18.7 注意事项	(158)
18.8 应用	(158)

第5篇 生物信息学在分子生物学实验中的应用

第19章 核酸和蛋白质序列的查询和分析	(162)
19.1 核酸与蛋白质序列的数据库查询	(162)
19.2 核酸与蛋白质序列的相似性分析	(169)
第20章 常用的分子生物学分析软件	(175)
20.1 多序列比对软件	(175)
20.2 构建系统发育树软件	(181)
20.3 引物设计软件	(188)

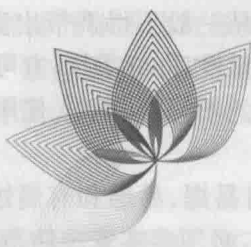
第6篇 综合性实验

第21章 综合性实验概述	(194)
21.1 实验要求	(194)
21.2 综合实验报告	(194)
21.3 实验目的	(195)
21.4 实验安排	(195)
21.5 实验材料	(195)
21.6 实验流程	(195)
21.7 实验步骤	(195)
第22章 综合性实验案例	(196)
22.1 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)	(196)
22.2 katG 基因全部缺失和点突变等引起结核菌产生对异烟肼(INH)的耐药研究	(198)
22.3 亨廷顿舞蹈病(Huntington disease, HD)	(201)
22.4 H7N9 禽流感病	(203)
22.5 神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)	(204)
附录	(207)
附录A 分子生物学实验中的常用数据及换算关系	(207)
附录B 分子生物学实验中的常用试剂	(208)
附录C 常用细菌培养基和抗生素溶液	(213)
附录D 与分子生物学实验相关的实验资料	(214)
参考文献	(216)

第 1 篇

第 1 篇

基础知识



第1章 分子生物学实验室的基本要求

1.1 实验室规则

1. 实验室是开展实验教学、科学研究和科技开发的场所。所有实验室工作人员和进入实验室的人员必须遵守实验室的各项规章制度,爱护公物,保持室内安静,严禁大声喧哗、打闹,严禁吸烟、吃东西、乱抛纸屑杂物、随地吐痰。

2. 实验室的仪器设备应由专人负责保管维护,登记建账。实行管理责任制,做到账、卡、物相符。物品存放应做到整洁有序,便于检查使用。注意防尘、防潮、防震、防冻等。不准存放任何与实验无关的物资。严禁随意搬动、拆卸、改装仪器设备。仪器设备需报废时,按有关规定办理。

3. 实验室工作人员必须对学生进行遵守实验室规章制度的教育。学生在做实验前要进行认真预习,进入实验室后必须听从实验室工作人员的安排。实验结束后,认真如实填写使用记录,由指导教师检查仪器设备有无损坏等情况,经教师签字后,方可清理桌面,整理好仪器设备。

4. 实验室的仪器设备及各种物品一般不得携带出实验室。若学院内实验室之间需调配使用,须经实验室主任报经系主任批准,办好手续,方可外借,用后及时归还。外单位借用时,须经系领导及学院相关部门批准。不得借给私人使用。损坏、丢失仪器设备须按有关规定处理及赔偿。

5. 重视实验室安全工作,加强对易爆、易燃和有腐蚀、有毒危险物品的管理,做到领用有手续、使用有记录。凡危险性实验,必须落实安全防范措施,严防一切事故的发生。多余的危险品要及时上交或妥善保管,不得过量存放。实验中丢弃的污废物或废液要倾倒在指定地点。

6. 实验室需建立安全值班制度,每次实验完毕或下班前,要做好整理工作,关闭电源、水源、气源和门窗。实验指导教师要配合值班人员进行安全检查。

7. 对违反本规则和有关规章制度所造成的事故和损失,要追究当事人的责任,并视情节给予严肃处理。

1.2 实验室安全防护

实验室的安全防护主要有防止中毒,防止爆炸和燃烧,防止腐蚀、化学灼烧、烫伤和割伤。

1.2.1 防毒

大多数化学药品都有不同程度的毒性。有毒化学药品可通过呼吸道、消化道和皮肤进入人体而发生中毒现象。如 HF 侵入人体,将会损伤牙齿、骨骼、造血和神经系统;烃、醇、醚

等有机物对人体有不同程度的麻醉作用;三氧化二砷、氰化物、氯化高汞等是剧毒品,吸入少量会致死。

防毒注意事项:实验前应了解所用药品的毒性、性能和防护措施;使用有毒气体(如 H_2S , Cl_2 , Br_2 , NO_2 , HCl , HF)应在通风橱中进行操作;苯、四氯化碳、乙醚、硝基苯等蒸气久吸会使人嗅觉减弱,必须高度警惕;有机溶剂能穿过皮肤进入人体,应避免直接与皮肤接触;剧毒药品如汞盐、镉盐、铅盐等应妥善保管;实验操作要规范,离开实验室要洗手。

1.2.2 防火

防止煤气管、煤气灯漏气,使用煤气后一定要把阀门关好;乙醚、酒精、丙酮、二硫化碳、苯等有机溶剂易燃,实验室不得存放过多,切不可倒入下水道,以免集聚引起火灾;金属钠、钾、铝粉、电石、黄磷以及金属氢化物要注意使用和存放,尤其不宜与水直接接触;万一出现着火现象,应冷静判断情况,采取适当措施灭火;可根据不同情况,选用水、沙、泡沫、 CO_2 或 CCl_4 灭火器灭火。

1.2.3 防爆

化学药品的爆炸分为支链爆炸和热爆炸。氢、乙烯、乙炔、苯、乙醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、一氧化碳、水煤气和氨气等可燃性气体与空气混合至爆炸极限,一旦有热源诱发,极易发生支链爆炸;过氧化物、高氯酸盐、叠氮铅、乙炔铜、三硝基甲苯等易爆物质,受震或受热可能发生热爆炸。

对于支链爆炸,主要是防止可燃性气体或蒸气散失在室内空气中,须保持室内通风良好。当大量使用可燃性气体时,应严禁使用明火和可能产生电火花的电器。对于防止热爆炸,强氧化剂和强还原剂必须分开存放,使用时轻拿轻放,远离热源。

1.2.4 防灼伤

除了高温以外,液氮、强酸、强碱、强氧化剂、溴、磷、钠、钾、苯酚、醋酸等物质都会灼伤皮肤,应注意不要让皮肤与之接触,尤其防止溅入眼中。

1.2.5 安全用电

人身安全防护:实验室常用电为频率 50 Hz、电压 200 V 的交流电。人体通过 1 mA 的电流便有发麻或针刺的感觉,10 mA 以上人体肌肉会强烈收缩,25 mA 以上则呼吸困难,就有生命危险;直流电对人体也有类似的危害。

为防止触电,应做到如下几点:

1. 修理或安装电器时,应先切断电源;
2. 使用电器时,手要干燥;
3. 电源裸露部分应有绝缘装置,电器外壳应接地线;
4. 不能用试电笔去试高压电;
5. 不应用双手同时触及电器,防止触电时电流通过心脏;
6. 一旦有人触电,应首先切断电源,然后抢救。

对于仪器设备的安全用电,应做到如下几点:

1. 一切仪器应按说明书装接适当的电源,需要接地的一定要接地;

2. 若是直流电器设备,应注意电源的正负极,不要接错;
3. 若电源为三相,则三相电源的中性点要接地,这样万一触电时可降低接触电压,接三相电动机时要注意正转方向是否符合,否则,要切断电源,对调相线;
4. 接线时应注意接头要牢,并根据电器的额定电流选用适当的连接导线;
5. 接好电路后应仔细检查,无误后方可通电使用;
6. 仪器发生故障时应及时切断电源。

1.3 放射性同位素防护

1. 放射性同位素与射线装置使用场所必须设置防护设施。其入口处必须设置放射性标志和必要的防护安全连锁、报警装置或工作信号。

2. 单位必须设专人对放射源和射线装置进行管理,定期检查、维修并做书面记录。放射源和仪器、设备发生故障时,应由专人处理。

3. 放射性同位素与射线装置的使用单位必须严格按照安全操作规程进行操作,严格控制照射剂量,防止对人体造成伤害,避免放射事故的发生。

4. 放射性同位素和放射源的使用单位须设置专用源库,严格管理,防止泄漏、丢失。建立健全保管、领用、返还登记制度;配备必要的防护检测仪表及防护用品;建立应急处理方案。

5. 从事放射性相关工作的人员应在上岗前体检和定期体检,由市、区卫生防疫站负责统一安排,各有关单位的主管领导应督促从事放射性相关工作的人员参加体检,并给予经费及各方面的保障。

6. 发生放射源丢失、泄漏事故的单位,必须立即采取防护措施,控制事故的影响,保护事故现场,并向学校主管部门以及省市公安、卫生防疫部门报告。

7. 各单位必须按省卫生厅管理规定办理年检和换证手续。注销、变更放射性同位素与射线装置,需持许可登记证到原审批部门办理注销、变更手续。

8. 放射性同位素的使用单位停止使用放射性同位素时,须将放射性同位素、辐射源妥善处理,并将处理报告交到学校治安及技安部门,以便及时上报市卫生防疫站、市公安局及市环保局。经审查同意后,由市卫生防疫站、市公安局注销其许可证。

9. 凡违反本规定造成事故的,学校将按卫生部、公安部颁发的《放射线事故管理规定》的条款,对有关单位和责任人进行处罚。对造成严重后果,构成犯罪的,由司法机关依法追究刑事责任。

1.4 危险化学品试剂防护

危险性试剂或化学危险品,具有燃烧、爆炸、毒害、腐蚀或放射性等危险性质。在受到摩擦、震动、撞击、接触火源、遇水或受潮、强光照射、高温、跟其他物质接触等外界因素影响时,能引起强烈的燃烧、爆炸、中毒、灼伤、致命等灾害性事故。在采购、保管和使用各种化学危险品的过程中,必须严格遵照国家的有关规定和产品说明书的条文办理。

1.4.1 易燃液体

特性:易挥发,遇明火易燃烧;蒸气与空气的混合物达到爆炸极限范围,遇明火、火星、电火花均能发生猛烈的爆炸。

实例:汽油、苯、甲苯、乙醇、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、乙醛、氯乙烷、二硫化碳等。

保管及使用时的注意事项:要密封(如塞紧瓶塞),防止倾倒和外溢,存放在阴凉通风的专用橱中,要远离火种(包括易产生火花的器物)和氧化剂。

1.4.2 易燃固体

特性:着火点低,易点燃,其蒸气或粉尘与空气混合达到一定程度后,遇明火、火星或电火花能激烈燃烧或爆炸;跟氧化剂接触易燃烧或爆炸。

实例:硝化棉、萘、樟脑、硫黄、红磷、镁粉、锌粉、铝粉等。

保管及使用时的注意事项:跟氧化剂分开存放于阴凉处,远离火种。

1.4.3 自燃品

特性:跟空气接触易因缓慢氧化而引起自燃。

实例:白磷(白磷同时又是剧毒品)。

保管及使用时的注意事项:放在盛水的瓶中,白磷全部浸没在水下,加塞,保存于阴凉处。使用时注意不要与皮肤接触,防止体温引起其自燃而造成难以愈合的烧伤。

1.4.4 遇水燃烧物

特性:与水激烈反应,产生可燃性气体并放出大量热。

实例:钾、钠、碳化钙、磷化钙、硅化镁、氢化钠等。

保管及使用时的注意事项:放在坚固的密闭容器中,存放于阴凉干燥处。少量钾、钠应放在盛煤油的瓶中,使钾、钠全部浸没在煤油里,加塞存放。

1.4.5 爆炸品

特性:摩擦、震动、撞击、碰到火源、高温能引起强烈的爆炸。

实例:三硝基甲苯、硝酸甘油、硝化纤维、苦味酸、雷汞等。

保管及使用时的注意事项:装瓶单独存放在安全处。使用时要避免摩擦、震动、撞击、接触火源。为避免造成有危险性的爆炸,实验中的用量要尽可能少些。

1.4.6 强氧化剂

特性:与还原剂接触易发生爆炸。

实例:过氧化钠、过氧化钡、过硫酸盐、硝酸盐、高锰酸盐、重铬酸盐、氯酸盐等。

保管及使用时的注意事项:跟酸类、易燃物、还原剂分开,存放于阴凉通风处。使用时要注意,其中切勿混入木屑、炭粉、金属粉、硫、硫化物、磷、油脂、塑料等易燃物。

1.4.7 强腐蚀性物质

特性:对衣物、人体等有强腐蚀性。

实例:浓酸(包括有机酸中的甲酸、乙酸等)、固态强碱或浓碱溶液、液溴、苯酚等。

保管及使用时的注意事项:盛于带盖(塞)的玻璃或塑料容器中,存放在低温阴凉处。使用时勿接触衣服、皮肤,严防溅入眼睛中造成失明。

1.4.8 毒品

特性:摄入人体造成致命的毒害。

实例:氰化钾、氰化钠等氰化物,三氧化二砷、硫化砷等砷化物,升汞及其他汞盐。汞和白磷等均为剧毒品,人体摄入极少量即能中毒致死。可溶性或酸溶性重金属盐以及苯胺、硝基苯等也为毒品。

保管及使用时的注意事项:剧毒品必须锁在固定的铁橱中,由专人保管,购进和支用都要有明白无误的记录,一般毒品也要妥善保管。使用时要严防摄入和接触身体。

危险化学品试剂应储存在专用储存室(柜)内,根据试剂的分类、分项、容器类型、储存方式和消防的要求,设置相应的安全防护设施,并设专人管理。专用储存室(柜)存放电器设备和照明装置应符合防爆要求。储存室应有相应的安全标志。危险化学品试剂出入库时,应进行检查、验收、登记,对散落的化学试剂应及时分类清除、处理,不得将散落的不同试剂混合。对性质不稳定,容易分解、变质和引起燃烧、爆炸的化学试剂,应定期进行检查。爆炸性试剂的储存应遵循先进先出的原则,以免储存时间过长,导致试剂变质。爆炸性试剂、剧毒化学试剂的储存做到双人管理、双锁、双人收发、双人使用、双账。不同品种的氧化剂应分别存放,不应和与其性质相抵触的物品共同储存。自燃性试剂应单独储存,储存处应通风、阴凉、干燥,远离明火及热源,防止太阳直射。

1.5 生物安全防护

1.5.1 一级生物安全水平及防护

该级别适用于已经确定不会对成年人立即造成疾病,以及对实验人员及实验室工作人员存在的潜在危害性最小。这类实验室可以处理较多种类的普通病原体,例如犬传染性肝炎、非感染性的埃西里氏大肠杆菌,以及对于非传染性的病菌与组织进行培养。在该级别中需要防范的生物危害性是相对微弱的,仅需穿工作服,配戴手套和一些面部防护措施。不像其他种类的特殊实验室那样严格。这类实验室并不一定需与大众交通分隔出来,在这类实验室中仅需在开放实验台上依循微生物学操作技术规范(GMT)即可。在一般情况下,被污染的材料都留在开放(但分别注明)废弃物容器内。除此之外,这类型的实验后的洗净程序与我们在现代日常生活中对于微生物的预防措施类似(例如:用抗菌肥皂洗双手,用消毒剂清洗实验室的所有暴露表面等)。实验室环境中使用的所有细胞、细菌,以及所使用的材料都必须经过高压灭菌消毒处理。实验室人员在实验室中进行的程序必须由受过普通微生物学或相关科学训练的科学家进行监督且须经事先训练。

1.5.2 二级生物安全水平及防护

二级生物安全水平与一级生物安全水平类似,但其病原体具有中等程度危险性,对于人员和环境具有潜在危险。这类实验室能处理较多种类的病菌,且该病菌仅能让人类产生轻

微的疾病,或者是难以在实验室环境中的气溶胶中生存。适合它的病原体包括各种细菌和病毒,如艰难梭菌、大部分的衣原体、A/B/C型肝炎、A型流感、莱姆病、沙门氏菌、腮腺炎病毒、麻疹病毒、艾滋病毒、羊搔痒症、抗药性金黄色葡萄球菌。与一级安全防护方法的不同之处在于:① 实验人员与处理病原体人员需为经特定培训和高级培训的科学家。② 实验时限制特定人员的出入。③ 采取极端的防治污染物品预防措施,在生物安全柜或其他物理遏制装置中进行。④ 在可能造成传染性气溶胶或喷雾被制造时必须在二级生物安全柜中进行。

1.5.3 三级生物安全水平及防护

该级别适用于临床、诊断、教学、科研或生产药物设施,这类实验室专门处理本地或外来的病原体且这些病原体可能会借由吸入而导致严重的或潜在的致命疾病。这些病原体(包括各种细菌、寄生虫和病毒)可能导致人类严重的致命性疾病,但目前已经有治疗方法。包含炭疽杆菌、结核杆菌、利什曼原虫、鹦鹉热衣原体、西尼罗河病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒、SARS冠状病毒、伤寒杆菌、贝纳氏立克次体、裂谷热病毒、立克次氏体与黄热病毒等。

实验室工作人员必须受过相关致病性和潜在的致命性或致病性病原体的知识培训。所有涉及感染性材料的操作需在生物安全柜中进行,当这类操作不得不在生物安全柜外进行时,必须采用个体防护以及使用物理抑制设备的综合防护措施。该类实验室应具有特殊的工程设计特点,然而,一些实验室现有的设施可能未完全符合生物安全三级(例如:双门进入区和密封零渗透力配备)的标准。在这种情况下,在可供接受的安全水平下进行例行程序的行为(例如:涉及鉴定病原体与人传播的诊断程序、分类、药物过敏试验等)可在生物安全二级设施中实施,将实验室里过滤的废气排放到室外,为实验室的通风平衡提供定向气流进入室内,工作正在进行时限制进入实验室的人员,应严格遵循推荐的标准微生物的实践与特别的做法,并配有生物安全三级安全设备。

1.5.4 四级生物安全水平及防护(最高防护实验室)

该级别需要处理危险且未知的病原体,并且该病原体可能造成高度个人风险且至今无任何已知的疫苗或治疗法,如阿根廷出血热与刚果出血热、埃博拉病毒、马尔堡病毒、拉萨热、克里米亚-刚果出血热、天花以及其他各种出血性疾病。当处理这类生物危害病原体时必须强制性地使用独立供氧的正压防护衣。生物实验室的四个出入口将配置多个淋浴设备、真空室与紫外线光室及其他旨在摧毁所有的生物危害痕迹的安全防范措施。多个气密锁将被广泛应用并被电子保护,以防止在同一时间打开两个门。所有的空气和水的服务,将与实验室进行类似的消毒程序,以消除意外释放的可能性。

当病原体被怀疑可致病或可能有抗药性时,都必须在四级生物安全防护实验室进行处理,直到有足够的证据得到确认后,方可移交至较低水平实验室。实验室工作人员必须对他们工作对象的危险性和传染性有具体、深入的认识,且必须受过严格的培训,通常还需要有处理过这些病原体的科学家的监督,出入实验室也需要受到严格的控制。这类实验室一般单独建立或设立在建筑物的某个单独控制区域内,实验室内部须有详细的操作手册。

1.6 实验室物品与仪器的管理

1. 教学实验室的各种物品,包括仪器设备、家具和实验药品等,均为中心用于实验教学的国有资产,由专门的实验室管理人员进行管理,并根据实验教学的实际需要经中心主任审核,统一调配使用。

2. 未经管理人员同意,不得随意搬动实验室的各种物品(包括室内物品的搬动和拿出);物品调配时,必须有中心负责人签字并由管理人员做好调配交接记录,修改实验室信息管理数据库相关信息,并提交到相关管理人员和档案室备案。

3. 实验室物品发生损坏或丢失时,要及时报告实验室管理人员,管理人员负责追查损坏或丢失的原因,确定责任人,并按管理规定提出处理意见报中心负责人审批;损失较大时,需报学校实验室管理部门,如未及时报告或无法查清损坏或丢失原因的,应由管理人员负责。

4. 大型仪器必须有专人保管,须配有稳压电源,使用前须先检查仪器间各电路连接情况,再开稳压电源,然后再启动仪器开关。

5. 必须严格执行仪器设备运行记录制度,记录仪器运行状况、开关机时间。凡不及时记录者,一经发现,停止使用一周。

6. 使用仪器必须熟悉本仪器的性能和操作方法,本科生做毕业论文设计需使用仪器时应有教师在场,熟悉操作使用方法后,必须经有关教师和实验人员同意方可进行独立操作。

7. 仪器使用完毕后,必须将各使用器件擦洗干净归还原处,盖上防尘罩,关闭电源,打扫完室内后,方可离开。

8. 下次使用者,在开机前,首先应检查仪器清洁卫生情况、仪器是否有损坏,接通电源后,检查是否运转正常。发现问题应及时报告管理员,并找上一次使用者问明情况,知情不报者追查当次使用者责任。

9. 若在操作使用期间出现故障,应及时关闭电源,并向有关管理人员报告,严禁擅自处理、拆卸、调整仪器的主要部件,凡自行拆卸者,一经发现将给予严重处罚。用后应切断电源、水源,将按钮调回原位,并做好清洁工作,锁好门窗。

10. 所有仪器设备的操作手册及技术资料原件一律建档保存,随仪器使用的只能是复印件。

11. 保持仪器清洁,仪器的放置要远离强酸、强碱等腐蚀性物品,远离水源、火源、气源等不安全源。

12. 各仪器要根据其保养、维护要求,进行及时或定期的干燥处理、充电、维护、校验等,确保仪器正常运转。每学期进行一次仪器使用检查,发现有损坏应及时请有关部门维修。

13. 仪器不能随意搬动,更不能外借;校内人员经中心主任批准后可在实验室按上述规定使用。

(张晓洁)

第2章 实验记录与实验报告

2.1 实验记录

科学研究是以诚实守信为基础的事业,它自诞生就把追求真理、揭示客观规律作为崇高目标。对于一个科研工作者来说,实验记录就是科学研究的生命线。

实验记录是研究论文的源泉,做好实验记录和及时总结归纳实验数据,对研究者保持清醒的实验思路、抓住重要的实验现象、得到创新的结果和提高工作效率是十分重要的,也是日后追溯实验数据的直接证据。因此,从实验课开始应养成认真做好实验记录的良好习惯。

实验记录是科学实验工作的原始资料,应直接写在实验记录本上,严禁用零散纸片记录。实验记录本应保持完整,不得缺页或挖补;如有缺、漏页情况,应详细说明原因。记录应做到条理分明、文字简练、字迹清晰;使用蓝色或黑色钢笔、碳素笔记录,不得使用铅笔或易褪色的笔记录。实验记录需修改时,采用划线方式去掉原书写内容,但须保证仍可辨认,然后在修改处签字,避免随意涂抹或完全涂黑。空白处可标记“废”字或打叉。实验结果、表格、图片和照片均应直接记录或订在实验记录本中,成为永久性记录。实验记录应使用规范的专业术语,计量单位应采用国际标准计量单位,有效数字的取舍应符合实验要求。常用的外文缩写(包括实验试剂的外文缩写)应符合规范,首次出现时必须用中文加以注释。实验记录中属译文的应注明其外文名称。

实验记录的统一标准格式应包含下列主要内容:项目(课题)名称、实验目的、研究内容、实验设计原理、研究方法、实验日期、实验条件、实验材料、实验过程、实验结果、实验讨论、参考文献及记录者签名。

1. 项目(课题)名称:写明本项目的全称、课题来源、资助单位和项目编号。
2. 实验目的:写明本次实验的具体目的。
3. 研究内容:本次实验具体要研究的内容及所要解决的问题。
4. 实验设计原理:根据实验的目的和内容,采用何种原理设计实验。
5. 研究方法:根据实验设计确定本次实验的研究方法,详细记录本次实验所要采取的具体技术路线、实验方法等。常规实验方法应在首次实验记录时注明方法来源,并简述主要步骤。改进、创新的实验方法应详细记录实验步骤和操作细节。
6. 实验日期:本次实验的年、月、日、时,在记录本的每一页右上角填写。
7. 实验条件:实验室的温度、湿度,动物实验室的级别,合格证书号及发证单位。
8. 实验材料:详细记录标本、样品的来源、取材的时间,实验原料的来源、特性,购买时的相关票据复印件(动物合格证要贴在实验记录本上)。记录所用试剂、标准品、对照品等的名称、来源、厂家、批号、规格及配制方法等,应保留称量的原始记录纸并贴在实验记录本上。记录所使用的仪器、设备的名称、厂家、出厂日期、生产批号、规格型号。自制试剂要记录配制方法、配制时间和保存条件等。实验材料如有变化,应在相应的实验记录中加以说明。