

高等医学院校实践实验系列教材

生物医学综合实验指导

扈瑞平 郑明霞 © 主编



北京大学医学出版社

生物医学综合实验指导

主 审 李存保

主 编 扈瑞平 郑明霞

副主编 杨宏新 周好乐 邓秀玲

编 者 (按姓名汉语拼音排序)

布仁其其格 (内蒙古医科大学)

邓秀玲 (内蒙古医科大学) 扈瑞平 (内蒙古医科大学)

李 薇 (内蒙古医科大学) 李晓丹 (内蒙古医科大学)

刘秀兰 (内蒙古医科大学) 马艳华 (内蒙古医科大学)

娜 琴 (内蒙古医科大学) 孙计桃 (内蒙古医科大学)

王 妍 (内蒙古医科大学) 王海生 (内蒙古医科大学)

王鹏翔 (内蒙古医科大学) 武瑞兵 (内蒙古医科大学)

薛 昕 (内蒙古医科大学) 杨宏新 (内蒙古医科大学)

叶纪诚 (内蒙古医科大学) 叶书梅 (内蒙古医科大学)

苑 红 (内蒙古医科大学) 张建宇 (内蒙古医科大学)

张三润 (内蒙古医科大学) 郑明霞 (内蒙古医科大学)

周好乐 (内蒙古医科大学)

图书在版编目 (CIP) 数据

生物医学综合实验指导 / 扈瑞平, 郑明霞主编.
—北京: 北京大学医学出版社, 2016.8
高等医学院校实践实验系列教材
ISBN 978-7-5659-1316-7

I . ①生 … II . ①扈 … ②郑 … III . ①生物工程—
医学工程—实验—医学院校—教材 IV . ① R318-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 322181 号

生物医学综合实验指导

主 编: 扈瑞平 郑明霞

出版发行: 北京大学医学出版社

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

电 话: 发行部 010-82802230; 图书邮购 010-82802495

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京大学印刷厂

经 销: 新华书店

责任编辑: 畅晓燕 袁帅军 责任校对: 金彤文 责任印制: 李 啸

开 本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 18 字数: 472 千字

版 次: 2016 年 8 月第 1 版 2016 年 8 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5659-1316-7

定 价: 35.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

序

为了落实《国家中长期教育改革和发展规划纲要（2010—2020年）》，教育部、国家卫生和计划生育委员会在2011年12月联合召开的“全国医学教育改革工作会议”及此前提出的《关于加强医学教育工作，提高医学教育质量的若干意见》中，都强调实践教学是保证和提高医学人才培养质量的重要环节和必要手段。高等学校要积极创新医学实践教学体系，加强实践能力培养平台的建设。积极推进实验内容和实验模式的改革，提高学生分析问题和解决问题的能力。结合我校实践教学工作中存在的问题和不足，在教务处和北京大学医学出版社的协调下，学校启动了我校第一批实践教学教材的编写工作。《生物医学综合实验指导》由我校生物化学与分子生物学、医学遗传学和细胞生物学三个教研室组成编写团队共同编写。

本教材的编写是依据临床医学的培养需求，同时也兼顾了其他医学专业的教学需求，教材中具体细节在实践教学实施过程中可适当调整。

尽管本教材在编写过程中经过了多次的审校，但由于编者的水平有限，疏漏、不当之处在所难免，恳请同行专家、广大师生给予批评指正，以期再版时修正。

李存保

2016年8月

前言

《生物医学综合实验指导》主要针对5年制本科生的实验教学而编写,其中部分内容也适合8年制学生、研究生和专科学学生实验使用,能适应医学院校基础学科生物化学、分子生物学、医学遗传学和细胞生物学实验教学的需要,既具有广泛的适应性,又尽量与实际实验学时相符。各院校教师在使用过程中可根据自己的实际情况做选择或调整。

《生物医学综合实验指导》由3篇内容组成,第一篇为生物医学综合实验基本操作、基本技术及原理,包括第一章到第六章,概括介绍了生物医学综合实验的常规操作与实验室规则,生物化学、分子生物学、医学遗传学和细胞生物学实验的常用技术,生物医学实验常用样品的制备,生物医学综合实验室安全及应急措施。第二篇为生物医学综合实验。此篇又分为第七、八、九3章。第七章共编入生物化学与分子生物学实验项目23个,第八章共编入医学遗传学实验项目10个,第九章共编入医学细胞生物学实验项目11个。教材对每个实验项目的实验目的、实验原理、实验器材、实验步骤、注意事项等进行了充分的阐述,还列出了问题与讨论,便于理解和操作,有助于启发和培养学生的创新思维能力。第三篇为生物医学综合性、设计性实验模块与实践,包括第十章和第十一章。第十章包括4个生物医学综合性、设计性实验项目,体现了学科之间的交叉、联系和综合运用;第十一章是基于病例分析的生物医学综合性实验设计、讨论和示例,共4个实验项目,反映了4个医学基础学科与临床的结合和应用。此篇内容为本实验教材的创新和特色,可在课外和假期时间,利用学生实验教学平台和研究生、教师科研平台,在学校大学生创新性实验项目的资助下,结合指导教师科研方向,完成实验并撰写实验报告或论文。

本实验指导书由长期工作在教学一线、一直从事相关专业实验教学、并有一定编写经验的多名教师担任主编、副主编和编委。教材中有大量的插图和表格,附录中列入了实验常用试剂、缓冲液和储存液的配制方法、常用培养基和抗生素的配制方法、蛋白质和核酸常用数据和换算等内容,方便实验者对实验数据和资料的查找和引用。本实验教材编写图文并茂,相互配合,帮助学生更加直观地认识和理解实验的内容,尽量体现内容新颖、概念清晰、叙述流畅、简明扼要的特点。适用于高等医药院校、综合性大学本科生的生物化学与分子生物学、医学细胞生物学、医学遗传学实验教学,也可作为从事本领域教学和科研人员的参考用书。

扈瑞平

目 录

第一篇 生物医学综合实验基本操作、基本技术及原理

第一章 生物医学综合实验基本操作与实验室规则..... 3

第一节 器皿的洗涤和无菌环境的准备.....3

第二节 常用仪器的基本操作.....8

第二章 生物化学实验常用技术..... 17

第一节 分光分析定量技术.....17

第二节 层析技术.....20

第三节 电泳技术.....29

第四节 离心技术.....33

第三章 分子生物学和医学遗传学实验常用技术..... 37

第一节 分子生物学实验常用技术...37

第二节 医学遗传学实验常用技术...46

第四章 细胞生物学实验常用技术..... 52

第一节 显微镜技术.....52

第二节 组织学制片及常规染色技术..... 55

第三节 细胞器的分离及相关染色技术.....55

第四节 细胞生理学实验技术.....58

第五节 细胞培养及相关技术.....59

第六节 干细胞培养及诱导分化技术.....62

第七节 细胞工程的常规技术.....63

第八节 细胞周期的分析.....64

第九节 细胞凋亡的检测技术.....65

第五章 生物医学实验常用样品的制备..... 67

第一节 血液和尿液样品的制备.....67

第二节 组织样品的制备.....71

第三节 生物大分子的制备.....72

第六章 生物医学综合实验室安全及应急措施..... 79

第一节 实验室基本规则.....79

第二节 危险化学品试剂、毒麻药品及生物材料使用安全注意事项...81

第三节 废气、废液、固体废物和生物废弃物的处置.....83

第四节 实验室安全及应急措施.....84

第二篇 生物医学综合实验

第七章 医学生物化学与分子

生物学实验 88

实验一 血清清蛋白的分离、纯化
与鉴定 88

实验二 血清蛋白醋酸纤维素薄膜
电泳 92

实验三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离
血清蛋白质 95

实验四 牛乳中酪蛋白的提取、
纯化与含量测定 100

实验五 SDS-PAGE 电泳法测定
蛋白质分子量 104

实验六 动物组织中核酸的提取
和鉴定 108

实验七 核酸含量的测定 112

实验八 影响酶活性的因素 115

实验九 琥珀酸脱氢酶的竞争性
抑制 119

实验十 乳酸脱氢酶及辅酶 I 121

实验十一 乳酸脱氢酶同工酶琼
脂糖电泳法测定 123

实验十二 碱性磷酸酶的分离纯化、比
活性及米氏常数的测定 126

实验十三 琥珀酸的生成与氧化 133

实验十四 维生素 C 含量的测定 135

实验十五 柱层析法分离胡萝卜素 137

实验十六 血糖的测定及激素对
血糖浓度的影响 139

实验十七 肝糖原的提取、测定及
激素对肝糖原的影响 144

实验十八 血清脂蛋白电泳 149

实验十九 酮体的生成和利用 151

实验二十 血清总胆固醇测定 153

实验二十一 纸层析法鉴定转氨基
作用 155

实验二十二 聚合酶链式反应及
产物鉴定 157

实验二十三 目的基因的克隆 161

第八章 医学遗传学实验 173

实验一 人体外周血淋巴细胞培养
及染色体标本制备 173

实验二 姐妹染色单体交换 178

实验三 人类染色体 G 显带技术 181

实验四 人类染色体 G 显带核型
分析 183

实验五 人体外周血 DNA 提取与
鉴定 187

实验六 ABO 血型的测定及其基因频
率的计算 189

实验七 苯硫脲尝味实验及其基因
频率的计算 192

实验八 遗传病的群体调查 193

实验九 小鼠骨髓细胞染色体标本
的制备 196

实验十 荧光原位杂交实验 197

第九章 医学细胞生物学实验 201

实验一 活细胞中线粒体的染色 201

实验二 细胞中 DNA 和 RNA 的
显示 203

实验三 细胞中过氧化物酶的
显示 207

实验四 高碘酸希夫反应显示
细胞内糖原 209

实验五 脂类染色 211

实验六 细胞中微丝的染色及
形态观察 213

实验七 微管的间接免疫荧光
显示 216

实验八 细胞的原代培养 218

实验九	培养细胞的形态观察和计数.....	221
实验十	药物诱导 HL ₆₀ 细胞凋亡的实验观察.....	223

实验十一	差速离心法分离细胞和细胞器.....	228
------	--------------------	-----

第三篇 生物医学综合性、设计性实验模块与实践

第十章 生物医学综合性、设计性实验 234

实验一	肉苁蓉对疲劳小鼠肝糖原合成激酶的影响.....	234
实验二	单细胞凝胶电泳.....	239
实验三	人体肺癌细胞 p53 基因点突变研究.....	242
实验四	从孕妇外周血中提取胎儿 DNA 进行 α -地中海贫血的产前诊断.....	245

第十一章 基于病例分析的生物医学综合性实验设计、讨论和示例 251

示例一	糖尿病病案分析实验.....	251
-----	----------------	-----

示例二	基于聚合酶链式反应 - 扩增片段长度多态性分析法的人乙醛脱氢酶 2 基因多态性的分析.....	254
示例三	GJB2 基因在遗传性耳聋中的突变分析.....	258
示例四	遗传咨询中的病例分析....	262

附 录 267

附录一	常用缓冲液和储存液的配制.....	267
附录二	常用抗生素和培养基的配制.....	273
附录三	蛋白质、核酸常用数据及换算.....	274
附录四	常用试剂的配制及常用酸、碱的密度与浓度.....	276

第一篇

生物医学综合实验基本操作、 基本技术及原理

引 言

本篇内容共分为 6 章, 包括生物化学、分子生物学、医学遗传学和细胞生物学实验的基本操作和常用仪器的使用规范。基本操作涵盖了生物化学实验常用技术、分子生物学实验常用技术、医学遗传学实验常用技术和细胞生物学实验常用技术四大块内容。生物化学实验常用技术列举了分光分析定量、层析(色谱)、电泳、离心等技术及原理; 分子生物学实验常用技术主要介绍了聚合酶链式反应(PCR)技术、分子杂交技术、重组 DNA 技术; 医学遗传学实验常用技术从医学细胞遗传学和医学分子遗传学两方面分别介绍了各自应用的技术和原理; 细胞生物学常用技术详细介绍了显微镜技术、组织学制片及常规染色技术、细胞器的分离和染色技术、细胞生理学实验技术、细胞培养及相关技术、干细胞培养及诱导分化技术、细胞工程的常规技术、细胞周期分析和细胞凋亡检测技术等细胞生物学的常规及前沿技术。本篇还简要介绍了生物医学综合实验室的规则和基本操作规范, 以及实验室的安全注意事项和对一些突发事件的应急处理措施。

(扈瑞平)

第一章 生物医学综合实验基本操作与实验室规则

第一节 器皿的洗涤和无菌环境的准备

由于实验目的不一样,实验所需的器皿、设备及环境的要求也不一样。有些实验环境和实验物品需要达到无菌要求。常用的消毒方法有很多,比如:紫外线消毒实验室、操作台、培养板等,高压蒸汽消毒金属器械、玻璃器皿等,微孔滤膜滤器过滤培养液、血清等方法。本节主要介绍一些常用实验物品和环境的处理方法。

一、器皿的洗涤

(一) 玻璃器皿的洗涤

实验常用各种玻璃器皿,其清洁程度将直接影响实验结果的可靠性。因此,玻璃器皿的清洁是实验前的一项重要准备工作。清洗方法根据实验目的、器皿的种类、所盛放的物品、洗涤剂类别和沾污程度等的不同而有所不同,现简述如下。

1. 新购玻璃器皿的洗涤 新购仪器表面附着油污和灰尘,特别是附着有可游离的金属离子。因此,新购仪器需要用肥皂水刷洗,流水冲净后,浸于 10% Na_2CO_3 溶液中煮沸。用流水冲净后,再浸泡于 1%~2% HCl 溶液中过夜。流水洗净酸液,用蒸馏水少量多次冲洗后,干燥备用。

2. 使用过玻璃器皿的洗涤

(1) 一般非计量玻璃器皿或粗容量仪器,如试管、烧杯、量筒等先用肥皂水刷洗,再用自来水冲洗干净,最后用蒸馏水冲洗 2~3 次后,倒置于清洁处晾干。

(2) 容量分析仪器,如吸量管、滴定管、容量瓶等,先用自来水冲洗,沥干后,浸于铬酸洗液浸泡数小时。然后用自来水和蒸馏水冲洗干净,干燥备用。

(3) 比色杯,用完立即用自来水反复冲洗,如有污物黏附于杯壁,宜用盐酸或适当溶剂清洗。然后用自来水、蒸馏水冲洗干净。切忌用刷子、粗糙的布或滤纸等擦拭。洗净后,倒置晾干备用。

3. 常用铬酸溶液的配制及使用原理

(1) 铬酸的配制: 120 g 重铬酸钾, 1000 ml 蒸馏水, 缓慢加入 200 ml 浓硫酸, 并用玻璃棒不断搅拌, 让其散热。

(2) 铬酸使用原理: 重铬酸钠或重铬酸钾与硫酸作用后形成铬酸 (chromic acid), 铬酸的氧化能力极强, 因而此溶液具有极强的去污作用。

(3) 铬酸使用注意事项: ① 铬酸洗涤液中的硫酸具有强腐蚀作用, 玻璃器皿浸泡时间太长, 会使玻璃变质, 不要忘记及时将器皿取出冲洗; ② 洗涤液若沾污衣服和皮肤, 应立即用水冲洗, 再用苏打水 (NaHCO_3 水溶液) 或氨水洗。如果溅在桌椅上, 应立即用水洗去或湿

布抹去；③玻璃器皿投入前，应尽量干燥，避免洗涤液稀释；④此洗涤液的使用仅限于玻璃和瓷质器皿，不适用于金属和塑料器皿；⑤有大量有机物的器皿应先行擦洗，然后再用洗涤液，这是因为有机物过多，会加快洗涤液失效；⑥装洗涤液的容器应始终加盖，以防氧化变质；⑦洗涤液可反复使用，但当其变为墨绿色时即已失效，不能再用。

4. 玻璃器皿的干燥 实验中经常使用的器皿应在每次实验完毕之后洗净、干燥后备用。由于不同实验的仪器对干燥有不同的要求，有的仪器要求干燥，有的要求无水迹，有的要求无水。一般定量分析所使用的烧杯、锥形瓶等仪器洗净即可使用。

(1) 晾干不急用的，要求一般干燥。可在纯水涮洗后，在无尘处倒置晾干水分，然后自然干燥。可在安有斜木钉的架子和带有透气孔的玻璃柜放置玻璃器皿。

(2) 电烘箱中烘干。将玻璃器皿洗净后控去水分，于温度为 $105 \sim 120^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中烘 1 h 左右。也可放在红外灯干燥箱中烘干。此法适用于一般仪器。称量用的称量瓶等烘干后要放在干燥器中冷却和保存。带实心玻璃塞的及厚壁的仪器在烘干时要注意慢慢升温并且温度不可过高，以免烘裂。量器不可放于烘箱中烘干。硬质试管可用酒精灯烘干，要从底部烘起，把试管口向下，以免水珠倒流把试管炸裂，烘到无水珠时，把试管口向上赶净水汽。

(3) 热(冷)风吹干。对于急于干燥的仪器或不适合放入烘箱的较大仪器，可用吹干的办法。通常用少量乙醇、丙酮(或最后再用乙醚)倒入已控去水分的器皿中摇洗，控净溶剂(溶剂要回收)，然后用电吹风吹，开始用冷风吹 $1 \sim 2 \text{ min}$ ，当大部分溶剂挥发后吹入热风至完全干燥，再用冷风吹残余的蒸气，使其不再冷凝在容器内。此法要求通风好，防止中毒，不可接触明火，以防止有机溶剂爆炸。

5. 玻璃器皿的保管 在储藏室内要将玻璃器皿分门别类地存放，以便取用。经常使用的玻璃器皿应在实验柜内放置稳妥，高、大的器皿放在里面，小的放在外面。

(1) 移液管洗净后置于防尘盒中。

(2) 滴定管用后，洗去内装的溶液，洗净后装满纯水，上盖玻璃短试管或塑料套管，也可倒置夹于滴定管架上。

(3) 比色皿用毕洗净后，放在瓷盘或塑料盘中，下垫滤纸，倒置晾干后装入比色皿盒或清洁的器皿中。

(4) 带磨口塞的仪器(如容量瓶或比色管)最好在洗净前就用橡皮筋或小线绳把瓶塞和管口拴好，以免打破塞子或弄混。需长期保存的磨口仪器要在塞间垫一张纸片，以免日久粘连。

(5) 成套器皿(如索氏萃取器)、气体分析器等用完要立即洗净，放在专门的纸盒里保存。

(二) 金属器皿的洗涤

金属器皿不能泡酸。洗涤时可用洗涤剂刷洗，再用自来水冲净，然后用 75% 乙醇擦拭，再用蒸馏水冲洗，烘干或空气晾干。

(三) 橡胶和塑料制品的洗涤

橡胶和塑料制品先用洗涤剂洗涤干净，然后分别用自来水和蒸馏水冲洗干净，再用烤箱烘干。对于不同类别的橡胶和塑料制品要进行不同的处理。

1. 针式滤器帽 不能过酸，用 2% NaOH 溶液浸泡 $6 \sim 12 \text{ h}$ ，或者煮沸 20 min，包装前要装好 2 张滤膜，安装滤膜时要将光面朝上，然后将螺旋稍微拧松一些。

2. 胶塞 烘干后用 2% NaOH 溶液煮沸 30 min (用过的胶塞在水中煮沸 30 min 即可)，

用自来水冲洗, 烘干。再泡入盐酸中 30 min, 用自来水, 蒸馏水冲洗干净, 烘干。

3. 胶帽 离心管胶帽洗涤干净, 经烘干后, 用 2% NaOH 溶液浸泡 6~12 h (时间不能过长), 自来水冲洗, 烘干。再泡入盐酸中 30 min, 用自来水, 蒸馏水冲洗干净, 烘干, 放入铝制盒。

4. 胶头 以 75% 乙醇浸泡 5 min, 晾干后在紫外线灯下消毒即可。

5. 塑料制品 用 75% 乙醇浸泡, 也可打开塑料培养皿在紫外线灯下直接照射消毒。

(四) 洗涤程序的注意事项

1. 安装滤膜时, 光面一定朝上, 否则起不到滤菌效果。

2. 使用酸液浸泡时要注意人的防护和将器皿酸液中完全浸泡。一定要戴耐酸手套, 防止酸液溅伤人体。也要防止酸液滴在地上, 腐蚀地面。器皿一定要浸泡完全, 否则泡酸不彻底, 影响洗涤效果。

二、无菌环境的准备

(一) 实验器皿的灭菌

1. 将干净玻璃器皿放入高压蒸汽锅内, 盖好盖子, 打开开关和安全阀, 当蒸汽直线上升时, 关闭安全阀, 当指针指向 15 磅时, 维持 30 min。一般玻璃器皿灭菌后再在烤箱内烘干, 放在清洁干燥处保存。

2. 干净金属器皿一般放入铝制盒内, 15 磅、20~30 min 高压灭菌, 然后烘干备用。

3. 橡胶和塑料制品, 如针式滤器帽、胶塞和胶帽等清洁干燥后放入铝制盒中, 15 磅、30 min 高压灭菌, 再烘干备用。注意针式滤器帽高压灭菌后, 要在超净台内将螺旋拧紧。

(二) 无菌室的准备

无菌室要保持清洁卫生, 防止闲杂人员随意进入, 室内无人方可开启紫外线灯杀菌。实验完毕要保证做好清洁整理工作。

1. 超净工作台的使用 超净工作台 (clean bench) (图 1-1-1) 是为了保证局部工作区域无菌的工作需求而设计的。其工作原理是通过风机将空气吸入, 经由静压箱通过高效过滤器过滤, 将过滤后的洁净空气以垂直或水平气流的状态送出, 使操作区域持续在洁净空气的控制下达到洁净程度。使用方法如下:



图 1-1-1 超净工作台

- (1) 打开紫外线灯, 处理净化区空气及表面积累的微生物 30 min。
- (2) 关闭紫外线灯, 并启动送风机, 清除尘粒, 10~20 min 后即可于工作区进行操作。
- (3) 工作完毕停止运行送风机, 并放下防尘窗。

此外使用超净工作台要注意以下事项: ①新安装或长期不使用时, 使用前必须对工作台及其周围环境进行清洁处理, 先用吸尘器或不产生纤维的工具, 再用药物或紫外线灭菌法进行灭菌; ②定期(2~3个月)将粗滤布拆下清洗或更换, 定期(1周)对环境进行灭菌工作, 同时经常用75%乙醇擦拭紫外线灯, 保持表面洁净, 以免影响灭菌效果; ③每次使用超净工作台前, 应先用75%乙醇擦洗台面, 并提前用紫外线灭菌灯照射30~50 min处理净化工作区内积存的微生物, 关闭灭菌灯后应启动风机使之运转2 min后再进行培养操作; ④操作区内不允许放不必要的物品, 以免干扰操作区洁净气流; ⑤在操作区内应尽量避免做明显扰乱气流的动作。注意净化区内气流的变化, 一旦感到气流变弱, 如酒精灯火焰不动, 加大电机电压仍未见情况改变, 则说明滤器已被阻塞, 应及时调换; ⑥操作区的使用温度不得高于60℃; ⑦照明灯和紫外线灯到使用寿命后要要及时更换; ⑧净化工作台使用完毕应及时清理工作台面上的物品, 并用75%乙醇擦洗台面, 使之保持洁净。

2. 生物安全柜的使用 生物安全柜(图1-1-2)是为操作原代培养物、菌株及诊断性标本等具有感染性的实验材料时, 用来保护操作者本人、实验室环境及实验材料, 使其避免暴露于上述操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的。使用方法如下:

(1) 操作前应将本次操作所需的全部物品移入安全柜, 避免双臂频繁进出安全柜, 导致安全气流破坏; 同时在移入前宜用75%乙醇擦拭物品表面, 以去除污染。

(2) 打开风机5~10 min, 待柜内空气净化并气流稳定后再进行实验操作。将双臂缓缓伸入安全柜内, 至少静止1 min, 使柜内气流稳定后再进行操作。

(3) 实验物品应尽量靠后放置, 但不得挡住气道口, 以免干扰气流正常流动。安全柜内不放与本次实验无关的物品。柜内物品摆放应做到清洁区、半污染区与污染区基本分开, 操作过程中物品取用方便, 且3区之间无交叉。

(4) 操作时应按照从清洁区到污染区的顺序进行, 以避免物品间的交叉污染。

(5) 柜内操作期间, 严禁使用酒精灯等明火, 以避免热量产生气流, 干扰柜内气流稳定; 而且明火产生的微小颗粒可能会损坏HEPA滤器, 影响无菌效果。

(6) 操作过程中应尽量减少室内人员的走动, 以防止安全柜内气流不稳定。

(7) 在实验操作时, 不可打开工作玻璃视窗, 应保证操作者面部在工作窗口之上。在柜内操作时动作应轻柔、舒缓, 防止影响柜内气流。

(8) 对安全柜应定期进行检测与保养, 以保证其正常工作。工作中, 一旦发现安全柜工作异常, 应立即停止工作, 采取相应处理措施, 并通知相关人员。

(9) 工作完成后, 关闭玻璃窗, 保持风机继续运转10~15 min, 同时打开紫外线灯, 照射30 min。(在紫外线灭菌时要关闭通风; 紫外线对人体有损害, 注意个人保护。)

(10) 对安全柜应定期进行清洁消毒。柜内台面污染物可在工作完成且紫外线灯消毒后用2%的84消毒液(有效成份为次氯酸钠)擦拭。柜体外表面则应每天用1%的84消毒液擦拭。

(11) 柜内使用的物品应在消毒后再取出, 以防止将病原微生物带出而污染环境。



图 1-1-2 生物安全柜

使用生物安全柜要注意以下事项：①为避免影响正常的风路状态，柜内操作时手应该尽量平缓移动。②为了避免物品和物品之间的交叉污染现象发生，在柜内摆放的物品应该尽量呈横向一字摆开，避免回风过程中造成交叉污染。同时避免堵塞背部回风隔栅影响正常风路。③柜内尽量避免震动仪器（例如离心机、漩涡振荡器等）的使用，因为震动会使得积留在滤膜上的颗粒物抖落，导致操作室内部洁净度降低，同时如果在前操作面平衡失败还会引起安全柜对操作者的污染。④柜内 2 种及以上物品需要移动时，一定遵循低污染性物品向高污染性物品方向移动原则，避免污染性高的物品在移动过程中产生对柜体内部的大面积污染。⑤柜内尽量不要使用明火。因为在明火使用过程中产生的细小颗粒杂质将被带入滤膜区域，这些高温杂质会损伤滤膜。无法避免但一定需要使用的時候，宜使用低火苗的本生灯。

（三）培养箱的准备

1. 每周用 0.1% 苯扎溴铵（新洁尔灭）或 75% 乙醇擦拭箱内或可能的卫生死角，每个月更换灭菌剂，并菌检 1 次（图 1-1-3）。

2. 放入培养瓶时，要注意无菌操作，以防污染。

3. 校正温度。每个月应该校准温度 1 次，应该校对测温仪表指针是否位于零点或指满量程，否则应该调整。

4. 箱内放置物品不应过挤，否则影响温度均匀。

5. 接通电源、调好温度后，不应随便调节温度按钮，否则会影响压缩机的工作寿命。

6. 严禁用手或其他物品碰撞、拉动控温控头，以免造成失控。

7. 取出样品或调整托盘位置时，应将门打开 180°，防止碰到控头，影响灵敏度。

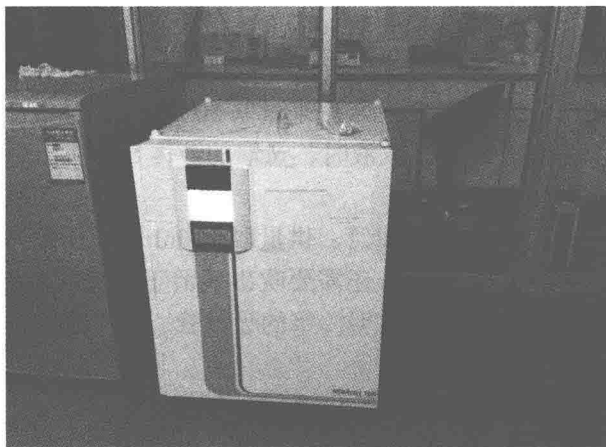


图 1-1-3 细胞培养箱

(四) 无 RNA 酶环境的准备

RNA 极不稳定, 易于降解, 而核糖核酸酶 (RNA 酶) 几乎无处不在, 且特别稳定, 故提取 RNA 时的关键因素是最大限度地避免外源 RNA 酶的污染和抑制内源 RNA 酶的活力。因此, 创造一个无 RNA 酶的环境, 严格防止 RNA 酶污染是成功提取 RNA 的关键。异硫氰酸胍法制备真核细胞总 RNA, 是将已知最强的 RNA 酶抑制剂异硫氰酸胍、 β -巯基乙醇和去污剂 N-十二烷基肌氨酸钠联合使用, 抑制了 RNA 的降解, 增强了核蛋白复合物的解离, 使 RNA 和蛋白质分离并进入溶液, RNA 选择性地进入无 DNA 和蛋白质的水相, 容易被异丙醇沉淀浓缩。

1. 实验室用的普通玻璃制品和塑料制品经常有 RNA 酶污染, 使用前必须于 180 °C 干烤 3 h 以上 (玻璃制品) 或用氯仿冲洗 (塑料制品)。

2. 另一种方法是用 0.1% 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 的水溶液浸泡玻璃制品和其他用品 2 h, 然后用灭菌水淋洗数次, 并于 100 °C 干烤 15 min。

3. RNA 电泳槽需用去污剂洗涤, 用水冲洗, 乙醇干燥, 再浸泡于 3% 过氧化氢 (H_2O_2) 溶液 10 min, 然后用 0.1% DEPC 水彻底冲洗电泳槽。灭菌的一次性使用的塑料制品基本上无 RNA 酶, 可以不需要处理。

4. 在 RNA 提取过程中, 应该戴一次性手套, 对接触可能污染的器皿时, 应勤换手套。

5. 配制的溶液应尽可能用 0.1% DEPC 水在 37 °C 处理 1 h 以上, 然后高压灭菌除去残留的 DEPC。对不能高压灭菌的试剂, 用经 DEPC 水处理过的无菌蒸馏水配制, 然后用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

第二节 常用仪器的基本操作

一、液体量取基本操作

(一) 吸量管的种类和使用

吸量管是生化实验最常用的仪器之一, 测定的准确度和吸量管的正确选择与使用有密切关系。

1. 吸量管的分类 常用的吸量管可以分为 3 类 (图 1-2-1):

(1) 奥氏吸量管: 供准确量取 0.5 ml、1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml 液体所用。此种吸量管只有一个刻度, 当放出所量取的液体时, 管尖余留的液体必须吹入容器内。

(2) 移液管: 常用来量取 50 ml、25 ml、10 ml、5 ml、2 ml、1 ml 的液体, 这种吸量管只有一个刻度, 放液时, 量取的液体自然流出后, 管尖需在盛器内壁停留 15 s, 注意管尖残留液体不要吹出。

(3) 刻度吸量管: 供量取 10 ml 以下任意体积的溶液。一般刻度包括尖端部分。将所量液体全部放出后, 还需要吹出残留于管尖的溶液。此类吸量管为“吹出式”, 吸量管上端标有“吹”字。未标“吹”字的吸量管, 则不必吹出管尖的残留液体。

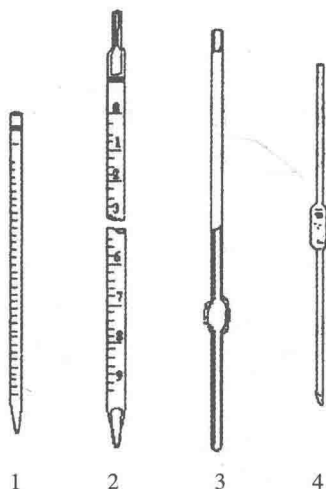


图 1-2-1 3 类吸量管

1 和 2. 刻度吸量管 ; 3. 奥氏吸量管 ; 4. 移液管

2. 吸量管的使用

(1) 选用原则: 准确量取整数量液体, 应选用奥氏吸量管。量取大体积时要用移液管。量取任意体积的液体时, 应选用取液量最接近的吸量管。如欲取 0.15 ml 液体, 应选用 0.2 ml 的刻度吸量管。同一定量试验中, 如欲加同种试剂于不同管中, 并且取量不同时, 应选择 1 支与最大取液量接近的刻度吸量管。如各试管应加的试剂量为 0.30 ml、0.50 ml、0.70 ml、0.90 ml 时, 应选用 1 支 1.0 ml 刻度吸量管。

(2) 吸量管的使用: 使用吸量管时, 用拇指和中指夹近顶端部分, 将管的下端插入液体, 用吸耳球吸入液体到需要刻度标线上 1~2 cm 处 (插入液面下的部分不可太深, 也不可太浅, 防止空气突然进入管内, 将溶液吸入吸耳球内), 用示指封闭上口, 将已充满液体的吸量管提出液面, 把吸量管提到与眼睛同一水平线上, 然后小心松开上口, 调节液面至需要的刻度处。将吸量管移到另一容器, 松开上口, 使液体自由流出 (图 1-2-2)。最后再根据规定吹出或不吹出尖端的液体。

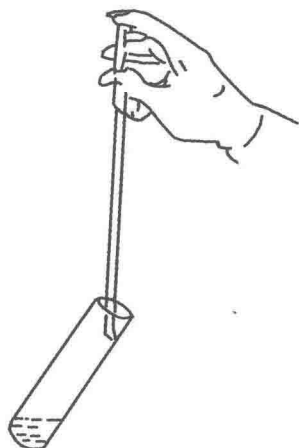


图 1-2-2 放液体时的姿势