

高等学校生命科学系列教材

基因工程原理 ⑤ 技术

韦宇拓 ©编著



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

基因工程原理与技术

韦宇拓 编著



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

基因工程原理与技术/韦宇拓编著. —北京: 北京大学出版社, 2017.5
ISBN 978-7-301-28283-0

I. ①基… II. ①韦… III. ①基因工程—高等学校—教材 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 078563 号

书 名	基因工程原理与技术 JIYIN GONGCHENG YUANLI YU JISHU
著作责任者	韦宇拓 编著
责任编辑	黄 炜
标准书号	ISBN 978-7-301-28283-0
出版发行	北京大学出版社
地 址	北京市海淀区成府路 205 号 100871
网 址	http://www.pup.cn 新浪微博: @北京大学出版社
电子信箱	zpup@pup.cn
电 话	邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62754271
印 刷 者	北京宏伟双华印刷有限公司
经 销 者	新华书店 787 毫米 × 1092 毫米 16 开本 14.5 印张 380 千字 2017 年 5 月第 1 版 2017 年 5 月第 1 次印刷
定 价	39.00 元

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有, 侵权必究

举报电话: 010-62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

图书如有印装质量问题, 请与出版部联系, 电话: 010-62756370

开 卷 语

基因工程是 20 世纪 70 年代发展起来的一门综合学科,又称体外 DNA 重组技术。它是在基因分子水平上的人为的遗传工程。既然称为一门工程学科,就注定了它的诞生是多学科交叉、综合和积累的产物,因而更多地表现为应用型技术手段。这种技术手段有助于促进人们对生命起源和本质过程等重大生物科学问题的更深层次的探索,也使人类大幅度改善生活质量和延长寿命成为可能,并为解决人类面临的环境和资源等一系列问题提供新的手段。

20 世纪 70 年代出现的基因工程和单克隆抗体技术孕育并开启了现代生物技术的发展进程,以基因工程为核心,结合新兴的蛋白质工程、细胞工程、酶工程和发酵工程,共同形成的现代生物技术,有力地推动了生物技术及其产业的发展。目前,生物技术是全球发展最快的高新技术之一。从 20 世纪 80 年代以来,生物技术产业化经历了医药生物技术、农业生物技术和工业生物技术发展的三次浪潮,并作为高新技术广泛应用于农业、医药、环保、轻化工等重要领域,对提高人类健康水平、农牧业和工业产量与质量,解决资源、能源与环境问题,以及人类的可持续发展发挥着越来越重要的作用。

2000 年 6 月 26 日,美、英、德、日、法、中六国科学家同时向全世界宣布,人类基因组工作草图绘制完毕,这意味着生命科学的研究实现了历史性的“阿波罗登月”,这是达尔文时代以来生物学领域最重大的突破之一,它给人类带来吉祥的福音,也拉动了以基因为载体的新型经济——生物经济的发展。生物经济是以生命科学与生物技术研究开发与应用为基础的、建立在生物技术产品和产业之上的经济,是一个与农业经济、工业经济、信息经济相对应的新的经济形态。随着生命科学和生物技术的持续创新与重大突破,具有先导性、战略性地位的生物产业蓬勃发展,将催生生物经济时代的来临。生物产业在经济社会的可持续发展和人类健康上的重大作用,已经成为人们的共识,并被全世界各国政府所重视。

基因工程作为一种 DNA 重组技术,是现代生物技术的上游核心技术,已经与生物学、医学、农学和林学等相关学科密切融合,成为这些领域非常重要的技术和基本知识,因此全国许多高校的相关本科专业都开设了《基因工程原理》课程,并将此作为生物技术和生物工程专业学生的专业必修课,同时配套了相关的实验课。

自 20 世纪 90 年代以来,国内不少的分子生物学研究领域的前辈和知名学者先后出版或者翻译了不少基因工程原理或相关的书籍和教材,为我国高校的《基因工程原理》这一课程教学和发展作出了巨大的贡献。

《基因工程原理》是一门理论性和实验性都较强的基础课程,更是一门综合性很强的课程,理论知识具有前沿性、抽象度高、跨度大和整体性强的特点,其涉及的很多实验技术和方法具有高、精、尖的特点。基因工程实验是以操作技术为主的实验,但是这些操作技术是在基因工程的基本原理指导下进行的,涉及生化、遗传、分子生物学、医学、物理化学、

计算机等领域的理论知识。

正是由于《基因工程原理》课程具有包含的理论知识多、层次多、跨领域等特点,加上开设的实验课程,多是采用“喂食”式教学方法,教师对实验过程和结果的控制过强,学生容易走过场,因此,希望通过实验过程加强学生对基因工程原理的理解和掌握效果不够理想。

本书作者长期从事本科《基因工程原理》的课程教学,对这门课程进行了一定教学改革和探索,在总结长期教学经验的过程中特地编著了本书。书中增加了基因工程原理中的基础操作技术原理方面的内容,希望通过本书的教学,能够提高学生对基因工程各种理论知识的理解,能在实验过程知道为什么要这样做,如何去做。

由于作者水平和时间有限,书中可能存在错误和不足的地方,敬请广大读者批评和指正。希望能和广大同仁共同努力,为本科《基因工程原理》的课程教学作出绵薄的贡献。本书在编著过程参考了大量前人的书籍、教材和文献,不能一一列出,笔者在此表示衷心的感谢!

韦宇拓

2016年10月于广西南宁

目 录

第一章 基因工程实验室基本要求和常规仪器设备	(1)
第一节 实验室安全和基本环境要求	(1)
第二节 实验室常规仪器和设备	(7)
第三节 实验室灭菌、消毒技术	(23)
第二章 核酸电泳技术	(29)
第一节 核酸电泳的原理	(29)
第二节 影响核酸电泳的因素	(32)
第三节 核酸的检测方法	(37)
第四节 核酸琼脂糖凝胶电泳	(41)
第五节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	(51)
第三章 核酸工具酶	(54)
第一节 限制性核酸内切酶	(54)
第二节 连接酶	(67)
第三节 DNA 聚合酶	(73)
第四节 DNA 修饰酶	(79)
第五节 核酸酶	(80)
第四章 核酸的分离纯化	(84)
第一节 核酸分离纯化的基本知识	(84)
第二节 核酸分离纯化的基本原则	(91)
第五章 PCR 的原理和应用	(102)
第一节 PCR 技术的原理	(102)
第二节 PCR 反应系统	(105)
第三节 PCR 常规技术及其延伸技术	(113)
第四节 实时荧光定量 PCR	(117)
第六章 基因工程常用载体	(125)
第一节 基因工程载体的概述	(125)
第二节 质粒载体	(128)
第三节 λ 噬菌体载体	(136)
第四节 噬菌粒载体	(139)
第五节 柯斯质粒载体	(140)
第七章 目的基因的克隆	(142)
第一节 目的基因的克隆策略	(142)
第二节 基因组文库的构建	(150)

第三节	cDNA 文库的构建	(154)
第四节	核酸探针的制备	(162)
第八章	重组子的构建、转化和筛选	(167)
第一节	连接方式	(167)
第二节	重组子的构建策略	(171)
第三节	重组子导入受体细胞	(178)
第四节	重组子的筛选方法	(182)
第九章	大肠杆菌表达系统	(186)
第一节	基因表达系统概述	(186)
第二节	大肠杆菌表达系统的主要表达元件	(188)
第三节	常见的大肠杆菌表达系统	(191)
第四节	外源基因在大肠杆菌中表达的主要影响因素	(194)
第十章	酵母表达系统	(207)
第一节	酵母表达系统的发展	(207)
第二节	酵母的克隆载体类型	(209)
第三节	酵母表达系统主要构成要素	(212)
第四节	常用的酵母表达系统	(216)
第五节	外源基因在酵母中表达的基本策略	(221)
主要参考文献		(225)

第一章 基因工程实验室基本要求和常规仪器设备

第一节 实验室安全和基本环境要求

第三节 实验室灭菌、消毒技术

第二节 实验室常规仪器和设备

基因工程又称 DNA 重组技术,其发展得益于分子生物学研究的迅速发展,分子生物学研究要想获得突破性研究成果,同样不仅要有先进的科学理念和良好的实验设计,也要依赖先进的技术和高、精、尖的仪器设备以及良好的实验环境。分子生物学实验特点是:涉及的实验对象很多是微观和微量的,容易受到外来微量物质的干扰和污染;操作程序多,容易产生交叉污染;使用的试剂有的具有易燃、有毒、有腐蚀性或易产生污染等特点;使用的仪器和设备有很多是精密的分析、控制仪器,因此对实验室环境清洁度的要求很高,对水、电和药品的使用安全性也有很高的要求。本章就所涉及的分子生物学实验室对环境的基本要求和常规的仪器设备的使用方法进行简单的概述。

第一节 实验室安全和基本环境要求

以分子生物学为基础的基因工程实验会涉及微生物和具有生物活性的生物因子,有些是可使人、动物和植物致病的生物因子;还会涉及一些有潜在生物危险、可燃、易燃、具有腐蚀性、有毒、放射和起破坏作用的、对人和环境有害的危险废弃物。中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局制定《实验室生物安全通用要求》标准,该标准规定了实验室生物安全管理和实验室的建设原则,同时,还规定了生物安全分级、实验室设施设备的配置、个人防护和实验室安全行为的要求等。

一、实验室生物安全

1. 生物安全

生物安全(biosafety)是为了避免危险生物因子造成实验室人员暴露,向实验室外扩散并导致危害的综合措施。根据生物安全性水平,实验室可分为:基础实验室,一级生物安全水平;基础实验室,二级生物安全水平;防护实验室,三级生物安全水平;最高防护实验室,四级生物安全水平。不同的实验室对实验室环境有不同的要求,一、二级实验室对环境要求较低,实验室可以开窗,不需要空气过滤系统,但必须要有相应的防火、防漏电和污染防护设施,实验台面应该防火和耐一定的高温、耐酸碱和耐腐蚀,还要有通风橱等基础防护设施,生物实验室的通风设备设计不完善或实验过程个人安全保护存在漏洞会使生物细菌毒素扩散传播,带来污染,甚至带来严重不良后果。

对于生物安全等级为三、四级的实验室,需要执行更为严格的安全防范措施,并建立相关的责任追究制度。三、四级实验室对环境的控制要求是非常严格的,除了要求实验室

具有严格安全操作程序以外,还要进行物理上的隔离,并且能够进行密封消毒,必须具有特殊的空气双过滤系统、生物安全柜和排放液体消毒系统,甚至还要具有人员安全监控条件。这类实验室也必须由专门的机构按照世界卫生组织(WHO)生物安全性要求来建造。

实验室的生物安全性要符合中华人民共和国国家标准(GB 19489—2004)《实验室生物安全通用要求》(Laboratories-General Requirements for Biosafety)规定。标准规定了实验室生物安全管理和实验室的建设原则,同时,还规定了生物安全分级、实验室设施设备的配置、个人防护和实验室安全行为的要求,该标准为最低要求,实验室还应同时符合国家其他相关规定的要求。例如,2003年SARS流行后,许多生物实验室加强对SARS病毒的研究,之后报道的SARS感染病例多是因管理不善,致使科研工作者在实验室研究时被感染所致。

2. 生物性污染

生物性污染包括生物废弃物污染和生物细菌毒素的污染,如一些带致病因子的实验用生物材料废弃物(如血液、尿、粪便、痰液和呕吐物等)。开展生物性实验的实验室会产生大量含高浓度有害微生物的培养液、培养基、使用过的实验用品和器材以及细菌阳性标本等,如未经适当的灭菌处理而直接外排,就有可能造成严重的后果。

3. 生物性污染防止措施

生物类废物应根据其病源特性、物理特性选择合适的容器和地点,专人分类收集进行消毒、烧毁处理,遵循日产日清的原则。

固体可燃性废物分类收集、处理,一律及时焚烧;固体非可燃性废物分类收集,可加漂白粉进行氯化消毒处理,满足消毒条件后作最终处置。一次性使用的制品如手套、帽子、工作物、口罩等使用后放入污物袋内集中烧毁;可重复利用的玻璃器材如玻片、吸管、玻璃瓶等可以用1000~3000 mg/L有效氯溶液浸泡2~6 h,然后清洗重新使用或者废弃;盛标本的玻璃、塑料、搪瓷容器可煮沸15 min,或者用1000 mg/L有效氯漂白粉澄清液浸泡2~6 h,消毒后用洗涤剂及流水刷洗、沥干;用于微生物培养的容器,用高压蒸汽灭菌后使用。微生物检验时接种培养过的琼脂平板应高压蒸汽灭菌30 min,趁热将琼脂废弃处理。尿、唾液、血液等生物样品,加漂白粉搅拌作用2~4 h后,倒入化粪池或厕所,或者进行焚烧处理。

二、实验室试剂安全

1. 试剂安全

大多数分子生物学实验室的生物安全性级别都处于一级和二级,对生物安全的要求较低,但是分子生物学实验室都经常会使用到一些有毒、有害的化学试剂,如核酸实验中使用的苯酚和溴化乙锭(ethidium bromide, EB),如果使用不当会造成自身伤害和环境污染。从某种程度上可以说,实验室实际上是一类典型的小型污染源,建设越多,污染越大,因此有必要对实验室中化学试剂的安全性有充分的了解,在实验工作中应该严格遵守安全规范,保护自己的健康。在实验操作前,应该着重了解哪些物质有害健康?是如何危害健康的?应该如何防范和后处理?其实了解了这些物质危害原理就能有的放矢地防范它。此外,在实验室可能会使用到易燃、易爆试剂,如易燃的气体(氢气)和液体(酒精和乙

醚)等。可以说,在整个实验过程中潜伏着可产生各种意外的因素,实验人员在思想上应有足够的重视,需具备必要的实验室化学试剂使用的安全知识,掌握防范措施及急救方法。

分子生物学实验室一般的试剂污染可以分为化学物质污染和放射性物质污染两大类。按污染物形态可分为废水、废气和固体废物三种类型,废水如含 EB 的电泳液、培养物;废气如挥发性的酸、醛、醇、苯酚、汞等;固体废物如手套、吸头等。

2. 化学物质污染

化学物质污染包括实验过程中使用的各种有毒、有腐蚀性的化学试剂的污染,如,有机物污染、无机物污染、重金属及有毒化学物质污染等。

分子生物学实验室中的有机物污染主要是指有机试剂的污染,它们大多并不直接参与化学反应,而仅仅起到溶剂的作用,不过也包括反应过程中的中间产物。常见溶剂如三氯乙烷、苯酚;载体,如乙腈、丙烯酰胺等。

无机物污染有强酸、强碱的污染,包括酸类、酸酐及与水汽产生酸的物质,例如硫酸、氟氢酸、硝酸、盐酸、五氧化二磷、醋酸、醋酸酐、酰氯化合物等;碱类,如氢氧化钠、氢氧化钾、氨水(氨气)、有机胺类及水解生成氨的化合物,前三者对眼睛的危害较大。

重金属对人的毒性极大,而且在人体中的毒性具有累积性,重金属特别是汞、镉、铅、铬等具有显著的生物毒性,长期接触可致癌,它们在水体中不能被微生物降解,而只能发生各种形态的转化或分散、富集过程(即迁移)。重金属污染能因吸附沉淀作用而富集于排污口附近的底泥中,成为长期的次生污染源;能与水中各种无机配位体(氯离子、硫酸离子、氢氧根离子等)或有机配位体(腐蚀质等)形成有更大溶解度的重金属络合物或螯合物;重金属离子的价态不同,活性与毒性也不同,其形态又随 pH 和氧化还原状况的改变而改变;在微生物作用下,有的会转化为毒性更强的有机金属化合物(如洋-甲基汞);这些重金属可被生物富集,通过食物链进入人体,造成人体慢性中毒。

有毒化学药品是指那些吸入微量即能致死的化学药品,或者是大量接触可能对健康产生危害的化学物质,包括剧毒化学物质和致癌化学物质。在生物学实验中常用的有毒化学药品,如水银及汞盐、氰化物(氰氢酸、氰化钾等)、硫化氢、砷化物、叠氮钠、氟化钠、马钱子碱等都是属于剧毒化学药品,致死剂量很低。有些化学药品是致癌性药物,如 EB,具有强诱变致癌性;焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)闻起来有香甜味,却是一种强有力的蛋白质变性剂,而且是致癌剂。在使用这些药物时一定要戴一次性手套,实验过程中注意操作规范,不要随便触摸别的物品。有些化学物质虽然毒性不如剧毒化学药品,但过量接触或者长期接触也会对健康产生巨大的危害,甚至危及生命。如苯能深入骨髓,损害造血器官,引起患者全身无力、贫血、白细胞降低等;卤代烷能使肝、肾及神经受损害,钡盐损害骨骼,汞盐损害大脑中枢神经等。有些化学药品如乙醚、氯仿等对人会有麻醉作用,有些会引起一些人的过敏反应,最常见的是接触性皮炎。苯甲基磺酰氟(PMSF)具有神经毒性,是一种高强度的胆碱酯酶抑制剂,它对呼吸道黏膜、眼睛和皮肤有非常大的破坏性,使用者可因吸入、吞下或皮肤吸收而致命。放线菌素 D 是一种致畸剂和致癌剂。 α -鹅膏蕈毒环肽具有强毒性,可能致命。N,N'-亚甲双丙烯酰胺有毒,影响中枢神经系统。甲醛毒性较大且易挥发,也是一种致癌剂,易通过皮肤吸收,对眼睛、黏膜和上呼吸道有刺激和损伤作用。 β -巯基乙醇可致命,对呼吸道、皮肤和眼睛有伤害作用。甲醇有毒,能

引起失明。乙腈是一种刺激物和化学窒息剂,易挥发易燃,在通风橱中操作时应远离高温和明火。浓乙酸可能因为吸入或皮肤吸收而使实验人员受到伤害,因此,操作时应戴手套和护目镜,最好在化学通风橱中进行。过硫酸铵对黏膜和上呼吸道、眼睛和皮肤有较大危害性,吸入可致命,操作时戴手套、护目镜,始终在通风橱中操作。

还有一些其他有毒化学物质也是很危险的,如一氧化碳可与红细胞结合,氰化物可阻断血液中氧的利用,硫化氢能使呼吸中枢和血管中枢神经的麻痹。硫化氢的毒性不比氰化氢低,吸入高浓度的硫化氢气体会导致气喘,脸色苍白,肌肉痉挛,长时间在低浓度硫化氢条件下工作,也可能造成人员窒息死亡。当硫化氢浓度大于 700 ppm^①时,人很快失去知觉,几秒钟后就会窒息,呼吸和心脏停止工作,如果未及时抢救,会迅速死亡;而当硫化氢浓度大于 2000 ppm 时,人只需吸一口气,就可能立即死亡。

生物化学实验中有些较为激烈的反应和操作还具有一定的危险性,因此如要使用到一些有毒的化学药品和有一定危险性的操作,一定要参照生物实验室安全性常识(化学药品篇)进行。

3. 减少实验室化学物质污染的措施

实验室只宜存放少量短期内需用的药品。化学药品建议按无机物、有机物、生物培养剂分类存放。无机物按酸、碱、盐分类存放,盐类按金属活跃性顺序分类存放;生物培养剂按培养菌群不同分类存放。属于危险化学药品中的剧毒品应放在专门的毒品柜中,由专人加锁保管,实行领用经申请、审批、双人登记签字的化学试剂的使用管理制度,要遵循既有利于使用,又要保证安全的原则,管好、用好化学药品,加强安全教育。

为防止实验室的污染扩散,应遵循的污染物一般处理原则为:分类收集、存放,分别集中处理。尽可能采用废物回收以及固化、焚烧处理等方式,在实际工作中选择合适的方法进行处理,尽可能减少废物量,减少污染,废弃物排放应符合国家有关排放标准的要求。

减少实验室化学物质污染的措施如下:

- ① 提高认识,制订技术规范,加强管理,积极减少化学污染。
- ② 改进实验条件,使操作者得到有效防护,实验废弃物得到有效处理。
- ③ 改进实验方法,在保证实验效果的前提下,减小实验规模;用较温和的反应和安全操作代替剧烈反应和有危险的操作;使用无污染或者低污染、低毒试剂来替换高污染和高毒试剂。例如,在选用溶剂方面,优先考虑毒性较小的乙醇、丙酮、石油醚;用较安全的二氯甲烷、乙醇代替剧毒的苯、氯仿、四氯化碳等。

4. 放射物质污染

放射物质是指放射性比活度大于 7.4×10^4 Bq/kg 的物品,按其放射性大小细分为一级放射性物品、二级放射性物品和三级放射性物品。实验室常用的放射性同位素诸如 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{32}P (可产生高能量之 β -射线)、 ^{35}S 、 ^{133}Xe 、 ^{67}Ga 等属于一级低放射性物质,对于二级放射性物品和三级放射性物品等高放射性物品如金属铀、六氟化铀、金属钷等,未经辐射物质管理部门批准,不得存放和使用。详细要求参照《放射性物品分类和目录》。

放射性物质具有放射性,能自发、不断地放出人们感觉器官不能觉察到的射线,放射

^① ppm 为 parts per million 的缩写,表示百万分之一。

性物质放出的射线可分为四种： α 射线，也叫甲种射线； β 射线，也叫乙种射线； γ 射线，也叫丙种射线；还有中子流，但是各种放射性物品放出的射线种类和强度不尽一致。各种射线对人体的危害都很大，许多放射性物品毒性很大。放射性物质的放射性不能用化学方法中和，只能设法把放射性物质清除或者用适当的材料予以吸收或将其屏蔽。

一般实验室的放射性废弃物为中低水平放射性废弃物，主要有放射性标记物、放射性标准溶液等。放射性废弃物的处理方法是将实验过程中产生的放射性废弃物收集在专门的容器中，外部标明醒目的标志，根据放射性同位素的半衰期长短，分别采用贮存一定时间使其衰变和化学沉淀浓缩或焚烧后掩埋处理。半衰期短的放射性同位素（如： ^{131}I 、 ^{32}P 等）废弃物，用专门的容器密闭后，放置于专门的贮存室，放置 10 个半衰期后排放或者焚烧处理。放射性同位素的半衰期较长（如： ^{59}Fe 、 ^{60}Co 等）的废弃物，液体可用蒸发、离子交换、混凝剂共沉淀等方法浓缩，装入容器集中埋于放射性废物坑内。对于高放射性物质的废弃物处置要遵循国家的《放射性废物安全管理条例》。

5. 放射性物质安全防护措施

与放射性相关的实验必须要在专门的放射性实验室内进行，实验室要有严格的放射性实验室的工作规则，并定期接受相关管理部门的检查。

放射性物质安全防护的基本原则：避免放射性物质进入体内和污染身体；减少人体接受来自外部辐射的剂量；尽量减少以致杜绝放射性物质扩散造成的危害；放射性废弃物要储存在专用容器中。

6. 对来自体外辐射的防护措施

① 在实验中尽量减少放射性物质的用量，选择放射性同位素时，应在满足实验要求的情况下，尽量选用危险性小的种类。

② 实验时力求迅速，操作力求简便熟练。实验前最好预做模拟或空白试验。有条件时，可以几个人共同分担一定任务。不要在有放射性物质（特别是 β 、 γ 射线）的附近做不必要的停留，尽量减少被辐射的时间。

③ 由于人体所受的辐射剂量大小与接触放射性物质的距离的平方成反比。因此在操作时，可利用各种夹具，增大接触距离，减少被辐射量。

④ 创造条件设置隔离屏障。一般密度较大的金属材料如铅、铁等对 γ 射线的遮挡性能较好，密度较轻的材料如石蜡、硼砂等对中子的遮挡性能较好； β 射线、x射线较容易被遮挡，一般可用铅玻璃或塑料遮挡。隔离屏蔽可以是全隔离，可以是部分隔离；可以做成固定的，也可做成活动的，依各自的需要选择设置。

7. 防止放射性物质进入体内的预防措施

① 防止放射性物质由消化系统进入体内。禁止在实验室吃、喝、吸烟，工作时必须戴防护手套、口罩，实验中绝对禁止用口吸取溶液或口腔接触任何物品，工作完毕立即洗手漱口。

② 防止放射性物质由呼吸系统进入体内。实验室应有良好的通风条件，实验中煮沸、烘干、蒸发等均应在通风橱中进行，处理粉末物应在防护箱中进行，必要时还应戴过滤型呼吸器。实验室应用吸尘器或拖把经常清扫，以保持高度清洁，遇有污染物应慎重妥善处理。

③ 防止放射性物质通过皮肤进入体内。实验中应小心仔细,不要让仪器物品,特别是沾有放射性物质的部分割破皮肤。操作应戴手套,遇有小伤口时,一定要妥善包扎好,戴好手套再工作,伤口较大时,应停止工作。

④ 所有使用放射物质的操作过程,应在铺有可弃式吸收材料的托盘或实验桌上进行。

三、实验室的环境条件要求

实验的仪器设备和环境条件对实验结果的准确性和有效性将产生重要影响,一个好的实验环境,会给实验带来更为精确的结果。实验室根据不同的仪器设备要求和不同的实验要求,设置相应的实验环境并加以控制,确保实验结果准确有效。

1. 实验室环境条件基本要求

实验室的标准温度为 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$, 实验室内的相对湿度一般应保持在 $50\%\sim 70\%$ 。除了特殊实验室外,温、湿度对大多数理化实验影响不大,但是对一些对环境要求很高的仪器设备或者检测方法,特别要注意实验室的环境条件出现的异常,例如,环境的温度和湿度不能满足某些仪器对温度、湿度的要求,超过仪器规定范围且明显影响检测结果时,要注意是否会对设备造成损坏或者影响到实验结果。实验室的防噪音、防震、防尘、防腐蚀、防火、防磁与屏蔽等方面的环境条件应符合仪器设备以及在室内开展的实验项目对环境条件的要求,如天平室和精密仪器室对温、湿度的控制较为严格。对一些对环境要求很高的仪器设备还要对实验室开门和进入人数进行控制,以免引起室内温度、湿度的波动变化。由于无菌操作的要求,实验过程中经常使用酒精灯,因此,微生物学实验室不能安装吊扇。

实验室应保持整齐洁净,每天工作结束后要进行必要的清理,定期擦拭仪器设备,仪器设备使用完后应将器具及其附件摆放整齐,盖上仪器罩或防尘布,一切用电的仪器设备使用完毕后均应切断电源。

电力是实验室的重要动力,一般的用电和实验用电必须分开,实验室对电源的首要要求是电源的安全性、可靠性及连续性,要求提供稳压、恒频的电源。对一些精密、贵重仪器设备,要求提供稳压、恒流、稳频、抗干扰的电源;根据仪器设备的特殊要求,必要时须建立不中断供电系统,还要配备专用电源,如不间断电源(UPS)等。

水源是实验室重要的配置,因此操作区内必须设置有水源,用于标本处理(如细菌染色)的水槽与工作人员洗手用的水槽不能混用。水槽最好选用进口 PP 水槽,注塑模压制一体成型,可装盛强酸、强碱,并配一个 PP 落水口片和 PP 提笼以方便维护。实验室水槽、下水管道应耐酸、碱及有机溶剂,并采取防堵塞、防渗漏措施。水槽安装处应有上、下水,水槽安装两个低位水龙头,一个高位水龙头。清理微生物或者有有毒物质的实验室的洗手水嘴宜使用非触摸式红外感应水龙头,存在生物危险因素的微生物实验室等不得设置地漏。理化实验区内易受化学物质灼伤处,应设置洗眼器及紧急冲淋装置。严禁在实验室水槽中排放腐蚀及剧毒溶液,倾倒少量废液必须用大量水冲洗。每个实验室应设洗手池,且宜设置在靠近出口处。

2. 实验室的管理要求

实验室的水电和易燃物品的存放和使用都要符合消防安全要求;大型仪器设备要有

停水、停电保护,防止因电压波动或突然停电、停水造成仪器设备损坏;对于一些设备和仪器如高速离心机,如果操作不当会带来设备损坏甚至人身安全的,需要严格规范管理;实验室内严禁吸烟、吃零食、喝水和存放食物等,避免因误食引起的中毒事件发生。

此外,基因工程实验中的一些化学反应十分激烈,特别是存在易燃、易爆的条件时,因此,在整个实验过程中潜藏着发生各种意外的因素,实验人员在思想上要重视,需具备必要的化学试剂安全知识,掌握防范措施和基本的急救方法。

一个完整的标准的分子生物学实验室要求配备:实验室、仪器分析室、离心机室、细胞培养室、消毒和洗涤室。实验室可以细分为DNA实验室、RNA实验室、蛋白质实验室等;仪器分析室也可以细分为暗室、电泳室、冷室、精密仪器室、放射性实验室等。不同的实验室根据实验具体情况进行合理的布置和严格的规范化管理,以达到良好的实验环境。

第二节 实验室常规仪器和设备

一个标准的分子生物学基础实验室要具有一般生物学实验室的常规仪器设备,还有一些特殊用途的仪器设备,有些仪器一般较为精密,价格昂贵,需要遵守一定的使用规则,如果使用不当不仅得不到准确的实验结果,甚至会造成设备仪器的彻底损坏。常规仪器使用频率很高,正确的使用不仅可以获得更精确的实验结果,而且可以延长仪器设备的使用寿命,因此有必要对实验室主要常规仪器或者设备的功能和使用方法进行了解。本节主要是对基础的分子生物学实验使用到的常规仪器和设备的一般原理和使用注意事项进行概述。

一、离心机

1. 离心机的原理

根据物质的沉降系数、质量、密度等的不同,应用强大的离心力使物质分离、浓缩和提纯的方法称为离心。离心机(centrifuge)是实施离心技术的装置,离心机工作原理是通过旋转产生离心力使液相非均一系混合物(包括液-液系统,是由两种或几种互不相溶的液体所组成的乳浊液)、液-固系统(在液体中含有悬浮固体的悬浮液)、液-液-固系统等非均一系的混合物得以分开。

离心技术,特别是低温离心技术是分子生物学研究中必不可少的手段,是蛋白质、酶、核酸、病毒及细胞亚组分分离的最常用的方法之一,也是生化实验室中常用的分离、纯化或澄清的方法,尤其是超速冷冻离心已经成为研究生物大分子实验室中的常用技术方法,因此低温冷冻离心机是分子生物学研究中必备的重要仪器。

2. 离心机的种类

目前离心机已经发展出很多的种类,离心机根据不同特点分类也不一样,按照使用领域,离心机可分为工业用离心机和实验用离心机。工业离心机大量应用于化工、石油、食品、制药、选矿、煤炭、水处理和船舶等领域,包括三足式离心机、卧式螺旋推料离心机、盘片式分离机、管式分离机等。本节只重点介绍科研及分析中常用离心机的种类。

(1) 按照使用目的分类。

实验用离心机按照使用目的可分为制备型离心机和分析型离心机两大类,它们由于用途不同,故其主要结构也有差异。制备型离心机主要用于分离,每次分离样品的容量比较大,可以用于获得目的产物。分析型离心机使用了特殊设计的转头和光学检测系统,以便连续地监视物质在一个离心场中的沉降过程,从而确定其物理性质。分析型超速离心机的转头是椭圆形的,以避免应力集中于孔处;此类转头通过一个有柔性的轴连接到一个高速的驱动装置上;转头在冷冻、真空的腔中旋转;转头上有2~6个装离心杯的小室,离心杯为扇形,由石英制成,可以上下透光;离心机中装有光学系统,在整个离心期间都能通过紫外吸收或折射率的变化监测离心杯中物质的沉降,在预定的期间可以拍摄沉降物质的照片。在分析离心杯中物质沉降情况时,在重颗粒和轻颗粒之间形成的界面就像一个折射的透镜,结果在检测系统的照相底板上产生了一个“峰”,由于沉降不断进行,界面向前推进,因此“峰”也移动,从“峰”移动的速度可以计算出样品颗粒的沉降速度。

分析型超速离心机的主要特点就是能在短时间内,用少量样品就可以得到一些重要信息,能够确定生物大分子是否存在、其大致的含量和沉降系数,结合界面扩散估计分子的大小,测定生物大分子的相对分子质量,检测生物大分子的构象变化,还能检测分子的不均一性及混合物中各组分的比例等。分析型离心机所配备的完善的柱面透镜光学系统、干涉光系统和紫外吸收扫描光学系统,结合特别配制的数据处理微机能自动计算沉降系数和相对分子质量等物理参数,也可以在离心过程中用离心机中的光学系统连续地监测样品的变化,达到分析样品纯度、形状和相对分子质量等性质的目的。不过,分析型离心机都是超速离心机,价格也较昂贵,不如制备型离心机那么常见,本节下文主要介绍的都是制备型离心机。

(2) 按照转速大小分类。

离心机根据转子转速大小的不同可分为普通离心机、高速离心机和超速离心机三类。低速离心机一般转速在4000 r/min以下,台式小型低速离心机一般最大转速在10 000 r/min以下,最大相对离心力小于 $10\ 000\times g$,主要是用于固、液相的沉降分离,转子有角式和外摆式。落地式低速离心机一般容量较大,一次能处理6~12 L样品,有些不带冷冻系统,于室温下操作,用于样品的初期日常处理,如细胞和较大细胞器的沉降等;有些带制冷系统的落地式低速离心机,即低速大容量冷冻离心机,可以用于收集需要低温条件的样品,如血液收集。

高速离心机的最大转速一般在20 000~30 000 r/min以下,最大相对离心力为 $90\ 000\times g$ 左右,用于固、液相的沉降分离和互不相溶的液液分离,转头配有各种角式转头、荡平式转头、区带转头、垂直转头和大容量连续流动式转头。大型高速离心机一般都有制冷系统,有些离心机还有抽真空系统,目的都是为了消除高速旋转时转头与空气之间摩擦产生的热量,离心室的温度可以调节和维持在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。高速冷冻离心机通常用于微生物菌体、细胞碎片、大细胞器、硫酸铵沉淀物和免疫沉淀物等的分离与纯化,但不能有效地沉降病毒、小细胞器(如核蛋白体)或单个分子。

超高速离心机的最高转速一般在30 000 r/min以上,最高可以达到50 000~80 000 r/min以上,相对离心力最大可达 $510\ 000\times g$ 左右,目前微量超速离心机最高转速

可达 150 000 r/min。超速离心机的转头具有角式、水平式、垂直式等多种类型,还有区带转头。超速离心机的出现,主要用于核酸、蛋白质和多糖等生物大分子、细胞器和病毒等的分离纯化,使生物科学的研究领域有了新的扩展。

超速离心机主要由温度控制、真空系统、转头以及驱动和速度控制系统组成,与普通离心机相比,其有消除转子与空气摩擦热的真空和冷却系统,有更为精确的温度和速度控制、监测系统,有保证转子正常运转的传动和制动装置等,此外还有一系列安全保护系统、制动系统及各种指示仪表等。与高速离心机的主要区别是,超速离心机装有真空系统,真空度可达到 1.33~3.99 kPa,这样就大大地减少了空气的摩擦阻力和摩擦所产生的高温。离心机的速度在 2000 r/min 以下时,空气与旋转转头之间的摩擦只产生少量的热,速度超过 20 000 r/min 时,由摩擦产生的热量明显增大,当速度在 40 000 r/min 以上时摩擦产生的热量就成为严重的问题,为此,将离心机的腔体密封,并由机械泵和扩散泵串联工作的真空泵系统将腔体抽成真空,这样使温度的变化小,易控制,摩擦力也会大大地降低,从而使得转子达到所需的超高转速。

超速离心机转速很高,产生的离心力极大,如果操作不当会造成机器损坏甚至可能会发生转头爆炸的严重事故(如超速和转头不平衡),所以超速离心机的离心腔是用能承受转头爆炸的装甲钢板密闭。为此使用超速离心机时,对转头和离心管的选用、操作步骤以及对使用后的保养维护都是极为严格的,应由受过专门培训的专人进行管理使用,不允许自行独立操作,使用前一定要认真仔细阅读手册。

离心机按是否具有温度控制系统可以分为普通离心机和冷冻离心机;按照转头的容量可以分为大型离心机(5 L 以上)和小型离心机(2 mL 以下),因此冷冻离心机有大型冷冻和小型冷冻离心机。小型冷冻离心机使用方便适合小量样品的离心。

3. 离心机的基本概念

(1) 离心机的最高转速。

离心机的最高转速是离心机可以达到的最高转速,也就是指可以用于该离心机的转头中,转速最高的数值。离心机必须是在离心机的最高转速以下使用。

(2) 转头的最高转速。

转头的最高转速是指转头盖上标明的转速。使用某一离心机转头时,必须要在该转头标定的转速以下使用。但是要特别注意,同一转头在不同型号的离心机中使用,不一定都能达到转头的最高转速,所以要考虑转头的最高允许转速。

(3) 转头的最高允许转速。

转头的最高允许转速是指转头在某一特定的条件下允许使用的最高转速。在实际使用中,转头的最高允许转速低于转头的最高转速。转头的最高允许转速和离心机型号、离心管帽的材质、离心管是否装满、离心样品的密度及是否用适配器等有关。样品密度不超过 1.2 g/mL 时,转头的最高允许转速和离心管形状、材料、厚度有关,注意,同样的离心管在不同转头中使用,最高允许转速也可能不同。样品密度超过了 1.2 g/mL 时

$$\text{转头的允许转速} = \frac{\text{转头的最高允许转速} \times 1.2}{\text{样品的平均密度} \times 2}$$

但此公式不适用于密度梯度离心。选择最高转速应仔细阅读离心机使用说明书、转头说明书,根据转头的参数结合实际使用情况确定转头的最高允许转速。

(4) 转头 K 系数。

转头 K 系数是转头的一个特性指标,它取决于转头的形状,由离心管腔的最大离心半径和最小离心半径决定。K 系数是表征转头沉降效率高低的直观参数,K 值越小,离心效率越高,离心实验所需的时间越短。

$$K = \frac{2.53 \times 10^{11} \times \ln\left(\frac{R_{\max}}{R_{\min}}\right)}{n}$$

R_{\max} : 转头的最大半径,cm; R_{\min} : 转头的最小半径,cm; n : 转头的转速,r/min。

在离心时,特别是需要长时间离心时,可以通过 K 系数估算离心的沉降时间。

$$t = K/S$$

t : 离心时间,h; K : 实际转速下的转头 K 值; S : 粒子的沉降系数。

转头的 K 值可以查表得到,选择合适的转头,在离心管允许不加满的条件下,可以通过减少各个管内样品,降低 K 值,缩短离心时间。

利用已知转头的实验条件,使用另一个离心机或者另一个转头分离同样样品时,可以查到转头的 K 系数,利用公式 $T_1/T_2 = K_1/K_2$ 来估算离心时间。这样就可以根据文献资料提供的离心条件,使用现有的转头马上建立相应实验条件。

(5) 转速。

转速的定义有两种表示方法: n ,单位为 r/min,即 rpm;角速度,即每秒转过的弧度数(ω)。

弧度即为弧长等于半径的圆弧所对的圆心角, $1\omega = 2\pi \times v / 60 = 0.10472 \text{ r/min}$ 。

(6) 离心力。

离心力不仅为转速的函数,也是离心半径的函数,转速相同时,离心半径越长,离心力越大,故仅以转速表示离心力是不科学的。 n 是指每分钟转数(revolutions per minute),单位为 r/min;RCF(relative centrifugal force)是指在离心场中作用于颗粒的离心力相当于地球重力的倍数,单位是重力加速度“g”,例如 $5000 \times g$,则表示相对离心力为 5000。

n 与 RCF 的换算公式为:

$$\text{RCF} = 11.18 \times (n/1000)^2 \times R \times g$$

例如:水平离心机半径 $R = 16 \text{ cm}$, $n = 3500 \text{ r/min}$ 时,其 $\text{RCF} = 2200 \times g$ 。

水平离心机半径 $R = 8 \text{ cm}$, $n = 15000 \text{ r/min}$ 时,其 $\text{RCF} = 20\,000 \times g$ 。

R : 半径,即离心机轴中央到水平离心机试管底部的距离,或到垂直式离心机试管中央的距离,cm; n : 转速,r/min; g : 重力加速度。

可见 RCF 值是转数值的平方的函数,增加 41% 的转数就可使 RCF 提高 2 倍,所以一般情况下,低速离心时常以转数“ n ”来表示,高速离心时则以 RCF 来表示更为科学。RCF 值在离心管内并不是处处相等,靠近转子外侧处的值最大(R_{\max}),靠近中心轴处的值最小(R_{\min})。计算颗粒的相对离心力时,应注意离心管与旋转轴中心的距离“ R ”不同,即沉降颗粒在离心管中所处位置不同,则所受离心力也不同,因此在报告超离心条件时,通常总是用地心引力的倍数“ $\times g$ ”代替每分钟转数 n ,因为它可以真实地反映颗粒在离心管内不同位置的离心力及其动态变化。科技文献中离心力的数据通常是指其平均值(RCF_{av}),即离心管中点的离心力,应用中,习惯上所说的 RCF 值都是指旋转的平均半径(R_{av})。