

生物科学
生物技术
系 列

普通高等教育规划教材

生物技术 综合实验教程

梁红 主编 梁雪莲 副主编



化学工业出版社

第 2 版

普通高等教育生物类规划教材

生物技术 综合实验教程

周 明 主编 周明刚 副主编

◎ 化学工业出版社

普通高等教育规划教材

生物技术综合实验教程

梁 红 主 编

梁雪莲 副主编



化学工业出版社

· 北 京 ·

本书以生物技术为理论基础,涵盖了细胞工程、发酵工程、酶工程、基因工程等内容。全书分为8章共38个实验,分别从植物细胞工程实验技术、微生物工程实验技术、蛋白质与核酸的提取分离、色谱及电泳技术、PCR反应、分子杂交技术、基因重组及基因文库的构建这几大方面来构建全书的知识构架,内容顾及生物技术的实验室研究与工业化应用两个方面,力求通过综合实验的训练来强化读者对生物技术的理解与认识。本书的附录收集了各实验所涉及的主要缓冲液配方和基本实验数据等,方便读者独立进行实验和自主性操作。

本书可以作为农林、综合、师范等高等院校生物及相关专业的教材或教学参考书,也可供生物技术领域的专业技术人员使用和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物技术综合实验教程/梁红主编. —北京:化学工业出版社, 2010.1
(普通高等教育规划教材)
ISBN 978-7-122-06979-5

I. 生… II. 梁… III. 生物技术-实验-教材
IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 196764 号

责任编辑:赵玉清 贺臣明

文字编辑:刘 畅

责任校对:蒋 宇

装帧设计:杨 北

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张11¼ 字数316千字 2010年1月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:25.00 元

版权所有 违者必究

前言

现代生物技术以分子生物学为基础，囊括了微生物学、植物生物学、动物生物学、细胞生物学、生物化学、遗传学等学科的技术成果，是当前生命科学中最活跃和最重要的技术领域。现代生物技术始于 20 世纪 70 年代的 DNA 重组技术，其迅猛发展使传统生物技术发生了日新月异的变化，在改进原有的技术方法的同时，也催生了一大批新的技术方法、技术产品并扩展了其应用领域。生物技术的发展，使人们在了解生命的奥秘和生命现象的本质、认识生物体的结构、功能与生命活动规律等方面有了高效精深的技术手段和前所未有的发展机遇。生物技术在工业、农业、医药卫生和商业服务的应用，孕育并催生了生物技术产业，已成为 21 世纪的高新技术产业和前景广阔的朝阳产业。

近 20 多年来，生物技术取得了日新月异的进展，继人类基因组计划之后，一批重要的植物、动物和微生物的基因组测序工作相继完成，生命科学进入了后基因组时代，各种组学、生物信息学和系统生物学已成为关注的热点和未来学科发展的新增长点。随着生物技术的发展，原有的研究方法和技术不断改进，新的技术、方法和仪器设备不断涌现，但最基本的实验技术和仪器设备仍然在大部分实验室中得以运用，具有很好的稳定性、可操作性和可延伸性，这就是我们编写本书的初衷和选取实验的基本原则。本书各章节除了介绍主要技术方法，还包括部分实际应用的案例，涉及细胞工程、微生物工程、DNA 扩增及分子杂交等基因工程方面的主要实验内容，力求针对本科院校应用型、复合型人才培养的要求，做到理论联系实际、重点突出、可操作性强。

本书的各章节分别由以下人员完成：第一章由梁红编写，第二章由周玲艳编写，第三章由冯飞编写，第四章由梁雪莲编写，第五章由张伟丽和梁雪莲编写，第六章由梁红、张伟丽和梁雪莲编写，第七章由梁红编写，第八章由梁雪莲、梁红和张伟丽编写，最后由主编负责统稿。在本书的编写过程中，得到作者所在单位仲恺农业工程学院教材出版计划的立项资助和仲恺农业工程学院特色专业建设点项目的支持，也是学院多位教师近年来实践教学和科学研究的经验总结。我们还要衷心感谢化学工业出版社的鼓励、督促和编辑们的辛勤劳动，使本书得以顺利出版。

由于现代生物技术的发展日新月异，内容繁多，我们虽然一直在致力于编写一本能基本反映现代生物技术核心内容、方便实验教学又符合教学要求的实用性教材，但由于水平所限，仍难免有疏漏和错误之处，希望同行和读者朋友批评指正。

编 者

2009 年 9 月

目 录

第一章 导言	1
一、生物技术主要概念及技术简介	1
二、生物技术实验室安全性、药品试剂配制及实验报告要求	3
三、生物技术常用实验仪器及其使用方法	7
参考文献	16
第二章 植物细胞工程实验技术	17
实验一 培养基的配制、消毒与接种	17
实验二 植物愈伤组织诱导及分化培养	24
实验三 花药培养	28
实验四 细胞悬浮培养	31
实验五 原生质体的游离、培养与融合	34
实验六 植物细胞的生长计量技术	39
实验七 植物快速无性繁殖	42
实验八 细胞大规模培养及人工种子制备	46
实验九 农杆菌介导的植物遗传转化	50
参考文献	53
第三章 微生物工程实验技术	54
实验一 培养基的配制及灭菌	54
实验二 菌种的分离纯化	60
实验三 微生物形态的观察和革兰染色法	62
实验四 稀释平板计数法和细菌生长曲线的测定	64
实验五 发酵罐的构造与实罐灭菌	67
实验六 谷氨酸发酵工程系列实验	71
I 谷氨酸菌种的制备	72
II 谷氨酸的中糖发酵及控制	74
III 谷氨酸发酵过程还原糖含量的测定	75
IV 谷氨酸含量的测定与等电回收	77
实验七 啤酒发酵工程系列实验	78
I 协定法糖化试验	79
II 啤酒酵母纯种分离	80
III 啤酒酵母的计数	81
IV 啤酒酵母的质量检查	83
V 啤酒酵母的扩大培养	85
VI 麦芽汁的制备	85

VII	糖度的测定	87
VIII	啤酒主发酵	88
IX	酸度和 pH 值的测定	89
X	酒精度的测定及原麦芽汁浓度的计算	90
XI	色度的测定	93
XII	苦味质的测定	94
XIII	啤酒质量品评	95
	参考文献	98
第四章	蛋白质、核酸的提取与分离	99
实验一	酪蛋白的分离提取	99
实验二	溶菌酶的提纯与结晶	101
实验三	植物基因组 DNA 提取	103
实验四	质粒 DNA 的分离提取	104
实验五	植物 RNA 提取	106
	参考文献	108
第五章	色谱及电泳技术	110
实验一	薄层层析法进行转氨酶活性鉴定	110
实验二	气相色谱内标法测定丁醇的含量	112
实验三	高效液相色谱法 (HPLC) 分析多维片或饮料中 V_C 和 V_B 的含量	114
实验四	DNA 琼脂糖凝胶电泳	116
实验五	SDS-PAGE 测定蛋白质的相对分子量	118
实验六	非同位素银染 DNA 测序技术	122
实验七	纤维素薄膜电泳分离血清蛋白及永久胶片制作	129
	参考文献	133
第六章	聚合酶链式反应 (PCR)	135
实验一	常规 PCR 法扩增目的潮霉素基因片段	135
实验二	PCR 法制备潮霉素基因探针	138
实验三	逆转录 PCR (RT-PCR)	139
实验四	随机引物 PCR	141
	参考文献	143
第七章	分子杂交技术	144
实验一	核酸分子杂交技术	144
实验二	Western 杂交	147
	参考文献	149
第八章	基因重组及基因文库构建	150
实验一	DNA 酶切、片段回收与重组连接	150
实验二	重组体 DNA 遗传转化与克隆筛选	153
实验三	真核生物基因组文库的构建	155

实验四 cDNA 文库的构建	158
参考文献	165

附录 167

附录一 常用激素的溶解	167
附录二 常用消毒剂的使用和效果	167
附录三 植物组织培养常用的培养基配方	168
附录四 Kao 和 Michayluk 的 KM8P 培养基	169
附录五 细胞筛孔径 (μm) 与目换算表	169
附录六 GUS 染色方法	169
附录七 主要溶液 (母液) 及缓冲液配制	170
附录八 常见市售酸碱的浓度	172
附录九 基因组文库载体的种类和特征	172
附录十 生命科学常用实验仪器名称中英文对照表	173
附录十一 几种主要的限制性核酸内切酶及其作用位点	174
附录十二 几种主要的质粒载体的酶切位点及其选择标记	175
附录十三 实验报告参考式样	178
附录十四 有关警告标志	181

第一章 导 言

一、生物技术主要概念及技术简介

生物技术 (biotechnique) 是研究生物大分子 (包括核酸、蛋白质、多糖) 结构、功能及其相互作用的重要手段。广义上讲, 生物技术是生物化学、遗传学、微生物学、分子生物学等生物学分支学科的原理、方法与技术 在工业、农业、医药卫生、环保和商业上的综合应用。生物技术学 (biotechnology, 也称生物工艺学) 是人们根据工农业生产、商业和服务业需要, 借助生物科学的原理和方法, 利用生物反应器或生物体本身对生物体的结构、功能、代谢等方面进行遗传改造以满足人类某方面需要的研究领域。

生物技术被世界各国视为一项高新技术, 它广泛应用于医药卫生、农林牧渔、轻工、食品、化工和能源等领域, 促进传统产业的技术改造和新兴产业的形成, 对人类社会生活将产生深远的、革命性的影响。生物技术领域的科学发展和技术进步也引发了一门新的高技术产业——生物技术产业的孕育、形成和高速发展。

1. 生物技术的主要内容

(1) 基因工程 基因工程是当前生物技术中影响最大、发展最迅速、最具突破性的领域。基因工程的基础是 DNA 重组技术, 它建立在对核酸的结构、功能与理化特性深刻认识的基础上。基因工程的技术内容和范围包括建立重组 DNA 文库和 cDNA 文库、基因克隆、用限制性内切酶剪切 DNA 和重组 DNA、基因转化、基因表达检测、分子杂交、DNA 测序, 基因敲除 (knocking-out)、基因敲入 (knocking-in) 等方面。另外, 基因工程还延伸到对基因表达的产物——蛋白质的修饰和改造研究方面, 以改变其结构功能使之符合人类需要, 这类工程又称为“蛋白质工程”。由于改变蛋白质的氨基酸序列需要经过基因工程来实现, 所以蛋白质工程可以包含在基因工程范畴之内, 或称之为第二代的基因工程。

(2) 细胞工程 细胞工程是建立在细胞生物学和遗传学基础上综合发展起来的, 其目的是在细胞水平上改造细胞遗传结构, 培育新的细胞群体用于次生代谢物生产, 或将遗传改变了的细胞再生出有新特性的生物个体并繁育成有商业应用价值的株系。细胞培养或组织培养是细胞工程之基础, 其利用的对象包括微生物和动植物。微生物细胞培养技术已十分成熟。相对而言, 高等动植物的细胞培养还有相当大的技术难度。

动物细胞工程包括细胞培养、细胞重组和体细胞杂交等方面。动物细胞培养是将单个细胞从动物器官中分离出来进行离体培养, 得到细胞系, 从细胞系中筛选出具有一定特征和标记的细胞株。细胞重组是将各种细胞部件重新组合。核移植就属于细胞重组技术, 可用于克隆动物, 对优良或珍稀动物进行无性繁殖, 以便扩大良种畜群或保护濒危物种。体细胞杂交 (如杂交瘤技术) 可以用于大量制备具有高度专一性或灵敏性的单克隆体, 在免疫学和临床上已有广泛应用。

植物细胞工程有应用于离体快繁、脱病毒健康种苗生产等的分生组织培养技术; 用于体细胞无性系变异、突变筛选、遗传转化等的愈伤组织培养技术; 用于双单倍体育种、花粉离体成熟、遗传转化等的花药和小孢子培养技术; 用于植物次生代谢物 (通常是药物、色素等) 生产、人工种子生产等的大规模细胞培养技术; 用于体细胞杂交、细胞质基因重组、遗

传转化等的原生质体培养技术等。

(3) 微生物工程 又称发酵工程,是最早实现产业化的生物技术。利用微生物可以用于生产对人类有用的许多产品。如食品饮料、乙醇、维生素、氨基酸、蛋白质、抗生素、酶制剂、免疫调节剂、心血管药物、核苷酸等。微生物工程还在开发可再生资源、废弃物资源化无害化的净化工程、清洁工艺、净化环境等方面有广阔用途。

(4) 酶工程和生化工程 酶工程是基于利用酶的催化作用,通过适当的反应器生产工业化应用的生物催化剂。其主要研究包括酶的固定化技术、酶结构的改造和酶反应器等。生化工程与酶工程关系紧密,它将生化反应与化学工程结合,使生化反应产物实现产业化生产。生化工程与微生物工程也关系密切,彼此相互渗透,如菌种选育、发酵培养过程的调控等属于微生物工程,而产品回收、纯化及应用则属于生化工程。

(5) 基因组计划引起的新兴生物技术 随着生物科学的迅猛发展,许多新理论、新概念、新技术不断涌现,生物技术的内容与领域不断扩展。其中影响最大最深远的是人类基因组计划及其后出现的其他基因组计划。基因组计划的实施已衍生出一系列崭新的生物技术。这些技术包括全自动核酸测序技术,结构和功能基因组技术,双向凝胶电泳和测序质谱,从整体水平上研究细胞蛋白质的组成及其活动的蛋白质组学技术,便携式生物化学分析器核心的生物芯片技术,用数理和信息科学的观点、理论和方法研究基因和其产物蛋白质的生物信息学技术等。这些技术在发现和鉴定新基因、分析基因功能表达谱、分析非编码区信息结构、设计蛋白质分子和药物、研究新药、基因诊断和基因治疗、动植物遗传改良、新品种培育等方面都有着重大意义和重要价值。

2. 当前生物技术研究的重点

21 世纪生物技术研究的重点有转基因技术、基因克隆技术、基因组学技术和生物信息技术,等等。

(1) 转基因技术 转基因技术是现在以及今后相当长时期内农业、食品、医药、能源、矿业、环境等众多领域的生物技术产业的核心技术。全球人口增长对生态环境和自然资源的需求压力越来越大,而地球上资源环境和生态系统承受能力有限,为了满足人类生存与发展的需要,人们希望科技进步能作出贡献。以农业而言,农业发展面临的农业生产结构调整、降低生产成本、减少化学农药和肥料的使用、提高单位面积产量、更好地利用太阳能进行更有效的光合作用、提高产品质量(特别是营养组成)、改进农业生态平衡、改善和增强农业生态服务功能等问题都是 21 世纪的重大问题。为此,要求大幅提高农作物对各种生物或非生物的逆境(病虫害、杂草、干旱、寒冷炎热、酸性或碱性土壤等)的抗性,向市场提供数量更多、品质更好、营养更丰富的“绿色”食品和饲料。转基因技术可为达到这些目标和要求做出关键性贡献。如果转基因技术能同生态农业结合起来,实现持续农业的目标,使土地持续性、生物多样性持续性、生态环境持续性、经营持续性巧妙地结合,形成以高新技术和生态学理论为基础的可持续农业,更好地支持社会经济的可持续发展。由于转基因技术正在将植物和动物转变成制造药品、塑料、强力纤维等的“生物反应器”,农业将越来越多地成为人类获取更多更好的食物、纤维、药物、化工原料、再生能源等的生产源泉。

(2) 克隆技术 克隆技术是当代生物技术领域研究的热点之一。动物克隆技术和动物转基因技术相结合,可望将目的基因以转染的方式导入能进行传代培养的动物细胞,再以这些细胞作为核供体进行动物克隆,可获得转基因动物。动物克隆技术大大降低了产生转基因动物的技术难度和成本,将可能成为 21 世纪培育遗传工程动物的主导性技术。转基因动物研究在农业和医学领域具有广阔的良好应用前景。如把转基因动物改造成医用器官移植供体,可望取代人体器官的直接移植;把转基因动物开发成活体生物反应器,可用于生产蛋白药物

等高附加值物质产品。

(3) 基因组学技术 在“人类基因组计划”带动下开拓和发展了基因组学技术。据预计,基因组学研究将成为 21 世纪生命科学发展的基石与新增长点,并将带动出一批新兴的学科和产业,诸如后基因组学、蛋白质组学及其相关的新兴产业。

在医疗方面,基因组学的研究成果不仅提供了用于研究开发基因工程药物的大量新基因,还扩展应用到研究和开发旨在增进人类健康、提高平均寿命的新医药产业。基因治疗是国际生物技术关注的热点,鉴定致病基因是基因治疗的基础。在人类基因组学研究中,已经并将继续不断发现和鉴定出许多致病基因。基因治疗的难点和关键是如何将基因安全地送达目标病灶,并使其在发生病变细胞中调控相关基因的表达。

在农业领域,欧美相继启动了猪、牛、羊、鸡等主要畜禽的基因组计划,其研究重点是重要经济性状基因的定位与分析。植物方面,在完成模式植物拟南芥和水稻基因组全序列测定的基础上,已启动对玉米、大麦、小麦、油菜、棉花、大豆、番茄等一大批农作物基因组学的研究。在基因组测序的基础上,把基因序列与基因功能对应与结合起来,将使功能基因组学研究全面展开。

生物基因组学在改良动植物方面起的作用将是革命性的,可望使动植物在品质和功能等诸多方面得到改进和提高。农业生物是维持人类生存与发展所必不可少的,而且还可以再生资源的方式支持未来的全球经济发展和全球生态环境改善。设计和创造众多重要生物分子及发展其相关产业可能是基因组学发展的必然结果。应用这些分子基因研究成果的每一项就可能创造一个新产业,使许多经济部门产生巨大的经济效益。

(4) 生物信息学技术 生物信息学是因人类基因组研究而引发并兴起的重要跨学科、多学科交叉的科学,可称之为基因组信息学。生物信息学技术以计算机为主要工具开发各种软件,对急速增加的大量 DNA 和蛋白质资料进行收集、整理、储存、提取、加工和分析研究,以便鉴定新基因,拼接测序片段,确定基因和蛋白质功能,了解生命的起源、进化,遗传和发育的本质。生物信息学技术的源头是生物基因组的 DNA 序列信息;其过程是在获得了蛋白质编码区的信息后,进行蛋白质空间结构模拟和预测,然后依据特定蛋白质的功能,进行天然大分子的改性和基于受体结构的药物分子设计,从而加速新药的发现。生物信息学技术的发展将为基因组和蛋白质组研究提供功能强大的计算机分析软件。该软件通过国际互联网集成世界各地有关蛋白质研究成果,并将其渗透到人类活动的各个方面。生物信息学的迅速发展,预示着一场新的技术革命正在孕育且不久即将发生,这场技术革命将对人类健康、农业和生态环境保护产生深远影响。生物技术产业群将成为新兴技术产业中的支柱。

二、生物技术实验室安全性、药品试剂配制及实验报告要求

生物技术实验室的仪器设备种类繁多、精密、贵重,其使用不当可能造成安全隐患和经济损失;生物技术实验所使用的试剂纯度要求也越来越高,且多数对人、畜有一定毒性并对环境造成一定危害,因此对实验室的环境质量、设备维护、用品用具的清洁、药品试剂的使用、废弃物和废液的回收处理、实验室安全防护以及实验操作安全等方面也提出了越来越严格的要求。

1. 生物技术实验室的安全要求

标准的生物技术实验室应包括实验仪器室、培养室、工作室、饲养(栽培)室、暗室、洗涤消毒室及相应的仪器设备及设施,并装备有控温系统、通风系统、水净化系统及废物(废液)回收装置。为了保证实验室的正常运转和安全操作,对实验室的安全的维护都有着严格的规定。

(1) 生物安全 生物安全是指实验室中所使用的生物材料或实验动物、植物及微生物不

应该对实验室人员、实验室内其他生物和实验室以外的生态环境造成危害或破坏。生物安全包括以下几个方面的要求：一是所使用的生物（包括动植物和微生物）不会感染人体或不会致病，如非致病性的大肠杆菌、经改造后的病毒、在自然条件下能存活的动植物细胞；二是实验生物的释放不会造成生态危害、或在自然条件下不能存活、或没有生存竞争力，如用营养缺陷型的微生物、有特殊营养要求的细胞株系；三是对有害生物有足够的防护措施使之不会对外释放或对外造成危害，如灭活、隔离、消毒等处理。

(2) 设施安全 设施安全是指实验室的仪器设备有足够的安全防护措施，实验室及实验室内仪器设备能够安全使用，并对实验工作人员的充分安全防护。包括安全操作规程，高压、高温、高速运转设备隔离，有毒有害试剂安全存放设施及消防报警装置等，但最重要的是对实验室内的工作人员的安全防护。实验室的工作台面或桌面应有防腐和防火性能，并注意经常性的清洁。要求实验室工作人员要定期检查安全设施，及时排除仪器的故障，消除隐患。

(3) 药品试剂安全存放 存放药品试剂的房间必须有通风和抽气装置。所有的实验药品和试剂均必须有明确的标签和进库日期。有毒或剧毒药品单独（室、柜）存放，专人管理，并有防止挥发、散发和防盗的设备；溶剂类药品试剂须专柜存放，最好放于木制柜或木质架上；有机药品试剂一般应放于冰箱或低温冰箱中；易燃易爆物品应单室存放或用单独的铁柜存放；腐蚀性药品试剂一般不能放于铁柜或铁架上。对于库存药品试剂特别是存放于冰箱或低温冰箱中的蛋白质类、核酸类和维生素类等试剂应定期清理。

(4) 废物（废液）回收处理 废弃品包括固体废物和废液，大多对人畜有毒、有害并可能对环境造成污染，必须妥善处理。一是对有毒有害的固体废物专袋收集，运送至特定地点专门处理或深埋；二是对废液分为可燃物和非可燃物用专门的容器收集，密封后运送至特定地点或部门处理；三是对生物类废弃物必须灭活（如高温高压处理）后再运出埋藏。

2. 急救措施

(1) 急性呼吸系统中毒 应使中毒者迅速离开现场，移到通风良好的地方，呼吸新鲜空气。如有休克、虚脱或心肺机能不全，必须先作抗休克处理，如人工呼吸、给予氧气、喝兴奋剂（如浓茶，咖啡）等。

(2) 经由口服而中毒 需立即用 3%~5% 小苏打溶液或 1:5000 高锰酸钾溶液洗胃，洗胃时要大量地喝，边喝边使之呕吐，最简单的催吐办法是用手指或筷子压舌根，或给中毒者喝少量（15~25mL）1% 硫酸铜或硫酸锌溶液（催吐剂）。使之迅速将毒物吐出。洗胃要反复进行多次，直至吐出物中基本无毒物为止。再服解毒剂，一般解毒剂有鸡蛋清、牛奶、淀粉糊、橘子汁等。另外有些特殊解毒剂专对某种中毒而用。如磷中毒时用硫酸铜，钡中毒时用硫酸钠，氰化物中毒时用硫代硫酸钠等。

(3) 皮肤、眼、鼻、咽喉受毒物侵害时，应立即用大量自来水冲洗，然后送医院请各专科医生处理。

(4) 一度烧伤 只损伤表皮，皮肤呈红斑，微痛，微肿，无水泡。如被化学药品烧伤，应立即用大量水冲洗，除去残留在创面上的化学物质，并用冷水浸沐伤处，可减轻疼痛，最后需要消毒，保护创面不受感染。

(5) 二度烧伤 损伤表皮及真皮层，皮肤起水泡，疼痛，水肿明显。创面如污染严重，先用清水或生理盐水冲洗，再以 1:1000 新洁尔灭消毒，不要挑破水泡，及时请医生治疗。

(6) 三度烧伤 损伤皮肤全层，包括皮下组织，肌肉，骨骼，创面呈灰白色或焦黄色，无水泡，不痛，感觉消失。在送医院前，主要防止感染和休克，可用消毒纱布轻轻包扎好，给伤者保暖和供氧，必要时注射吗啡止痛。

(7) 炸伤 其急救措施基本同烧伤处理。但炸伤后伤口往往大量出血,应立即将伤口上部扎紧,防止流血过多。如发生昏迷、休克等,应进行人工呼吸,给氧,并送医院治疗。

(8) 电击伤 急救时首先使触电者脱离电源,为此可拉下电闸或用木棍将触电者从电源上拨开。断开电源后,检查伤员呼吸和心跳情况,若呼吸停止,立即进行人工呼吸。对心跳亦停止者要同时进行心脏按压。电击伤比较轻微者,很快能恢复健康,重者必须请医生治疗。

3. 工具、用具的洗涤与存放

(1) 一般洗涤 一般洗涤的洗涤剂可用洗衣粉、洗洁精、漂白粉和肥皂等。对于织物可经洗涤剂泡洗后用自来水冲净,晾干备用,或根据需要消毒后使用。对于玻璃器具,可用洗涤剂刷洗后经自来水冲净,再用蒸馏水或去离子水涮洗3次,烘干备用。对于塑料和橡胶制品,用洗涤剂刷洗后经自来水冲洗干净,蒸馏水或去离子水涮洗3次,再用70%乙醇涮洗一次,50~60℃烘干备用。对于装核酸、蛋白质和酶制剂的容器或盛具,一般要求灭菌后再使用,或做特殊的处理。

(2) 严格洗涤 严格洗涤的器具主要用于装高纯度的溶液、酶试剂、蛋白质、核酸样品和其他有生物活性的试剂。操作时要求戴手套和穿着工作服,洗涤后的器具用专柜或专架放置。洗涤程序如下:丙酮——热水冲洗——热洗涤液浸泡——自来水涮洗——热水冲洗3~5次——倒挂晾干——重蒸水或经蒸馏的去离子水冲洗2~3次——高温烘干或灭菌后备用。

刷洗不掉的污垢或极微量杂质经过酸洗液的强氧化作用可被除掉。酸洗液对玻璃和塑料器皿无腐蚀作用,去污十分有效。洗液是由重铬酸钾、浓硫酸和水按一定比例配制而成,浸泡时,器皿要充满洗液。常用的洗液配方见附录。

(3) 与 RNA 有关的器具的处理

配置 DEPC 水:吸出 1mL DEPC 放在 1000mL 双蒸水中配成 1‰ DEPC 水,放在 1000mL 容量瓶中静置 4h 备用。

塑料制品:(包括枪头、EP 管、匀浆管等)先将 DEPC 水从容量瓶中倒入瓷缸中,将塑料制品逐个浸泡其中,其中小枪头需要用吸管打入 DEPC 水,过夜,然后高压灭菌,再烤干备用,实验前将枪头等放入吸头台,再高压灭菌一次(EP 管)。

玻璃制品:泡酸过夜,冲洗干净,蒙锡纸烤干备用(洗净后先浸泡于 1‰ DEPC 溶液过夜,再烤干)。

匀浆器:(包括剪刀、镊子)先洗净后,再高压灭菌(不需要泡 DEPC 水)。

4. 试剂的配制

分子生物学试剂的配制要求用称量纸在电子天平或分析天平上称量,每一种药品单用一个药勺,每种溶剂或液体单用一个量具。分子生物学实验所用的药品试剂均要求达到分析纯(AR)或以上等级,色谱试剂要求达到色谱纯或 HPLC 专用试剂所需纯度,溶解试剂的水要用重蒸水或蒸馏后的去离子水。配制试剂时要戴上手套,必要时还须戴上口罩。

(1) 生物试剂配制的一般步骤

① 配制前计算好各种药品和溶剂的用量,列出清单。

② 先加入所需一半或 2/3 体积的溶剂,按清单依次称量(或吸量)加入药品(每样药品完全溶解后再加下一种),每加完一种药品做好标记,最后定容至所需体积。注意两种易发生沉淀反应或挥发气体的药品不要加入。

③ 贴好标签,包括试剂名称、浓度、配制日期、注意事项(如易燃、挥发、腐蚀性、避光、低温等)。注明使用者或用途,置于冰箱或低温冰箱中备用。

④ 试剂配好后最好尽快使用,久藏可能会失效。因此,一次配药不要过量,最好能做

到随配随用,以免浪费。

(2) 实验操作 每一小组配一套试剂,如:植物 DNA 提取试剂、植物 RNA 提取试剂、质粒 DNA 提取试剂、琼脂糖电泳试剂、LB 培养基。

(3) 实验过程记录 包括试剂配制清单、实验步骤、各实验环节的过程记录、实验数据原始记录。

5. 生物技术实验的基本要求

(1) 预习要求

做好预习报告,有助于学生实验前对实验的内容、目的要求、基本原理、具体操作方法、数据记录格式及实验要点等有一定了解,减少盲目性,增强教学效果。实验指导教师应检查学生的预习情况,进行必要的提问,解答疑难。预习报告应包括实验原理、详细的实验操作步骤及做好实验的注意事项,并拟定好实验数据表格等。

(2) 实验记录要求

详细、准确、如实地作好实验记录是极为重要的,记录如果有误,有可能导致整个实验的失败,或实验报告可信度低。如实记录实验数据是培养学生实验能力和严谨的科学作风的一个重要方面。

① 每位同学须准备一个实验记录本,记录本上要编好页数,不得撕页和涂抹,写错时可以划去重写。不得用铅笔记录,只能用钢笔或圆珠笔记录。记录本的左半页作计算和草稿用,右半页用作实验记录。同组的两位同学合做同一实验时,两人必须都有相同、完整的记录。

② 实验中应及时准确地记录所观察到的现象和测量的数据,条理清楚,字迹端正,切不可潦草,以致以后无法辨认。实验记录必须公正客观,不可夹杂主观因素。

③ 实验中要记录的各种数据,都应事先在记录本上设计好各种记录格式和表格,以免实验中由于忙乱而遗漏测量和记录,造成不可挽回的损失。

④ 实验记录要注意有效数字,如吸光度值应为“0.050”,而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测二次以上,即使观测的数据相同或偏差很大,也都应如实记录,不得涂改。

⑤ 实验中要详细记录实验条件,如使用的仪器型号、编号、生产厂等;生物材料的来源、形态特征、健康状况、选用的组织及其重量等;试剂的规格、化学式、分子量、试剂的浓度等都应记录清楚。二人一组的实验,必须每人都作记录。

6. 实验报告的撰写

实验报告是实验的总结和汇报,通过实验报告的写作可以分析总结实验的经验和问题,学会处理各种实验数据的方法,加深对有关生物化学与分子生物学原理和实验技术的理解和掌握,同时也是学习撰写科学研究论文的过程。具体实验报告格式参照附录十三。

综合性大实验即设计性(探索性)实验的论文书写与一般的实验报告有所不同,要求按照正式论文格式。具体内容如下。

① 作者与班级,请用页眉的形式表示,例如生物技术 051 陈××第×组×号。

② 摘要:按照目的、方法、结果、结论四个部分进行表述,要求有重要的数据,能概括全文的主要内容与观点,字数不超过 350 字以内为宜。

③ 前言:在实验报告中不用写出前言字样,主要是要有这部分内容,简要说明有关领域的研究概况和本实验项目的立论与宗旨。

④ 材料与方法:包括实验材料、药品配置、仪器、实验过程、数据处理等。

⑤ 结果与分析:用文字及图表表示。

⑥ 讨论与结论：根据结果并结合有关理论和文献进行分析。

实验报告的写作水平也是衡量学生实验成绩的一个重要方面，实验报告必须准确、客观、简洁、明了，实验报告必须独立完成，严禁抄袭。为了使实验结果能够重复，必须详细记录实验现象的所有细节，例如，若实验中生成沉淀，那么沉淀的真实颜色是白色、淡黄色或是其他，沉淀的量是多还是少，是胶状还是颗粒状？什么时候形成沉淀，立即生成还是缓慢生成？热时生成还是冷却时生成？在科学研究中，仔细地观察，特别注意那些未料想到的实验现象是十分重要的，这些观察常常引起意外的发现，报告并注意分析实验中的真实发现，对学生将是非常重要的科学研究训练。

三、生物技术常用实验仪器及其使用方法

1. 生物技术实验常用器材

- (1) 灭菌消毒器材
- (2) 真空无菌操作箱
- (3) 超净工作台
- (4) 生物洁净安全柜
- (5) 薄层色谱仪及配套产品
- (6) 层析柱/层析仪/层析实验冷柜
- (7) 移液器
- (8) 制冰机
- (9) 超声波细胞破碎机
- (10) 细胞培养转瓶机
- (11) 电泳仪、电泳槽
- (12) 基因扩增仪（PCR 扩增仪）
- (13) 分子杂交仪
- (14) 基因枪/基因导入仪/细胞融合仪
- (15) 杂交箱
- (16) 干式恒温加热器
- (17) 紫外分析仪、核酸蛋白紫外检测仪
- (18) 自动液相色谱分离层析仪
- (19) 冷冻干燥机
- (20) 收集仪、收集器
- (21) 多头细胞样品收集器
- (22) 图像分析系统
- (23) 液氮罐
- (24) 净化设备
- (25) 渗透压仪
- (26) 生物化学发光测量仪

2. 常用实验仪器使用方法

(1) 电子顶载天平的使用方法

电子顶载天平的最大载荷 280g，感量 0.001g，对所使用的环境要求不太高。电子顶载天平采用压力传感器进行单盘称量，有称量范围选择开关，最大称量设为 280g（精度 0.01g）和 28g（精度 0.001g）两挡，自由变换即可。设有消除键（TARE），以方便除去容器质量，可连续称量。数字显示反应灵敏，一目了然。机器背面有打印机接口，面板上有打

印键 (PRINT), 对多个样品称量时可自动编号, 打印称量结果, 免去手工记录数据, 准确无误。称量盘上有防风罩, 能防止或减弱空气流动对称量造成的影响, 故可以在普通实验室内使用。面板上有水准仪, 能方便调整仪器的水平。电子顶载天平的使用方法如下。

① 首先检查称量盘和防风圈内有无撒落的药品, 必要时小心取下称量盘和防风圈, 清扫干净后重新装好。

② 观察仪器是否水平, 必要时进行调整。

③ 根据称样量和盛装容器的质量, 将称量范围选择开关拨至适当挡位 (280g 或 28g)。

④ 插上电源, 打开天平后部的电源开关, 显示屏闪烁几次之后出现 “0.00” 或 “00.000”, 如有读数, 按清除键使之回零, 初次称量时, 最好预热 10min。

⑤ 将称量瓶 (称量纸或小烧杯) 轻轻放在称量盘中央, 待数值显示稳定后, 按消除键扣除容器或称量纸质量, 使数字显示为 0; 小心加入被称量物, 待数字显示稳定后即可读数, 如不符合要求, 可酌情增减。记录称量结果或用打印机自动记录。

⑥ 称量完毕, 取下被称量物, 关闭电源开关, 拔下插头, 检查并做必要的清洁工作, 最后盖上防尘罩。

⑦ 每个使用者均应在天平使用记录本上登记, 记录天平的最终状况。

(2) 电子分析天平的使用方法

电子天平的型号不同, 称量范围、灵敏度等都不相同。使用前要仔细阅读各自型号的说明书。下面以 DT200 为例介绍操作方法。

① 接通 220V 电源 (应有良好地线), 打开电源开关。

② 在秤盘空时, 按一下 ON/OFF 键, 显示窗内绿色显示器全亮 8888 后, 接着依次显示 E-1 至 E-9, 表示微机正在检查天平各个部分, 然后显示 0.0g, 可进入正常的称量工作 (为保证称量稳定, 天平应开机预热 15min 后称量)。

③ 当秤盘上放载荷重时, 待天平显示稳定后按一下去载荷键 (T), 显示值为 0.0g 后再称量, 此时显示为净重。拿掉载荷后, 显示载荷的负值, 再按一下去载荷键, 显示回零值。

④ 称量完后, 关掉电源, 清洁天平。

(3) 微量进样器的使用方法

微量进样器常用作气相和液相色谱仪的进样器, 在生化实验中主要是用作电泳实验的加样器, 通常可分为无存液和有存液两种。

① 0.5~5 μ L 无存液微量进样器 进样器的不锈钢芯子直接通到针尖端处, 不会出现存液, 用于 5 μ L 以下的极微量液体进样。

② 10~100 μ L 有存液微量进样器 不锈钢的针尖管部分是空心管, 进样器柱塞不能到达, 因而管内会存有空气或液体。使用时应注意以下几点。

a. 不能吸取浓碱, 以免腐蚀玻璃和不锈钢零件;

b. 因有存液, 所以吸液时要来回多拉几次, 将针尖管内的气泡全部排尽;

c. 针尖管内孔极小, 使用后须立即清洗针尖管, 以防堵塞, 若针尖管堵塞, 不能用火烧, 只能用直径 0.1mm 的不锈钢丝内心串通;

d. 进样器未润湿时不可来回拉针芯, 以免磨损而漏气;

e. 若进样器内发黑, 有不锈钢氧化物, 可用针芯蘸少量肥皂水来回拉动清除。

(4) 自动取液器的使用方法

自动取液器用于多次重复的快速定量移液, 可只用一只手操作, 十分方便。移液准确度为 $\pm(0.5\% \sim 1.5\%)$ (体积分数), 移液的精密度 (重复性误差) 小于 0.5% (体积分数)。

自动取液器分两种: ① 固定容量型, 常用 100 μ L、200 μ L 和 1000 μ L 等几种。② 可调容

量型,常用 200 μ L、1000 μ L 和 5000 μ L 等多种规格。每种取液器都有其专用的聚丙烯塑料吸头。吸头通常是一次性使用,也可经超声清洗,120℃ 高压灭菌后重复使用。

可调式自动取液器操作方法如下。

- ① 用拇指和食指旋转取液器上部的旋钮,使数字窗口出现所需容量体积的数字。
- ② 在取液器下端插上塑料吸头,并旋紧以保证气密。
- ③ 然后四指并拢握住取液器上部,用拇指按住柱塞杆顶端的按钮,向下按到第一停点。
- ④ 将取液器的吸头插入待取的溶液中,缓慢松开按钮吸取液体并停留 1~2s (黏性大的溶液可加长停留时间)。
- ⑤ 将吸头沿器壁滑出容器,用吸水纸擦去吸头表面可能附着的液体。
- ⑥ 排液时吸头接触倾斜的器壁,先将按钮按到第一停点,停留 1s (黏性大的液体加长停留时间)。
- ⑦ 再按压到第二停点,吹出吸头尖部的剩余溶液。
- ⑧ 如果不使用手取下吸头,可按下除吸头推杆,将吸头推入废物缸。

自动取液器使用注意事项:

- ① 吸取液体时一定要缓慢平稳地松开拇指,绝不允许突然松开,以防将溶液吸入过快而冲入取液器内腐蚀柱塞而造成漏气。
- ② 为获得较高的精度,吸头须预先吸取一次目标溶液,然后再正式移液,因为吸取许多溶液,如蛋白溶液时吸头内壁会残留一层“液膜”,造成排液量偏小而产生误差。
- ③ 浓度和黏度大的液体,会产生误差,为消除其误差的补偿量可由试验确定,补偿量可用调节旋钮改变读数窗的读数进行设定。
- ④ 可用分析天平称量所取纯水的质量并进行计算的方法,校正取液器,1mL 蒸馏水在 20℃ 时的质量为 0.998g。
- ⑤ 为提高移液精度,应当在移液管、吸头和溶液的温度一致时才开始移液。

(5) 恒温箱的使用方法

恒温箱是实验室常用的一种加热设备。按最高使用温度分为干燥箱(又称烘箱、烤箱)、保温箱(又称培养箱)两类。干燥箱最高温度 300℃,用以烘干样品、药品、容器等的水分等其他热处理,功率 1000~4000W。保温箱最高使用温度 60℃,用以培养孵化细胞等,功率 500W。按照特殊用途,恒温箱又分为真空干燥箱、隔水式恒温箱、鼓风干燥箱及防爆干燥箱等。恒温箱一般由箱体、发热体(镍铬电热丝)、测温仪或温度计、控温机构和信号系统等组成。

恒温箱的使用方法如下。

- ① 使用前做好内、外检查。打开风顶(排气孔),插好温度计(干燥箱要用 250℃ 或 300℃ 的高温竹节温度计)。注意电源和铭牌上标的电压要相符,箱壳接好地线以防漏电。
- ② 通电后指示灯应亮,如加热指示红灯不亮应将调温旋钮顺时针方向转动至红灯发亮,恒温箱如有辅助加热丝及鼓风马达,应将开关都打开。
- ③ 当箱内温度接近所需温度,即将达到所需温度时,逆时针旋转调温旋钮使红灯刚灭,绿灯刚亮,待红绿灯自动交替明灭时,表示箱内温度已处恒温状态。由温度计读数确认是否为所需温度,如有偏离可稍调节调温旋钮。
- ④ 当箱内温度稳定在所需温度后放入待干燥或待培养(保温)样品。温度计指示最上层网架中心 2/3 面积的近似温度,所以样品尽量放在这一部位,其他层次和部位实际温度要偏高一些。
- ⑤ 使用完毕,关掉各个开关,并把调温旋钮逆时针退回零位,要等箱内温度不很高时