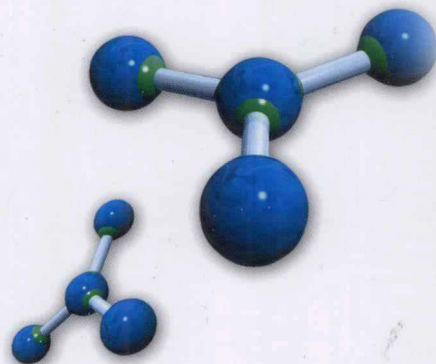


“十一五”国家重点图书出版规划项目



应用生物技术大系

Comprehensive Series of Applied Biotechnology



生物工程上游技术 实验手册

田长恩 主编



科学出版社

www.sciencep.com

“十一五”国家重点图书出版规划项目

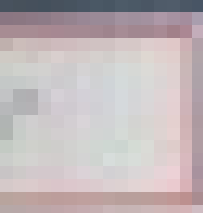
教育部生物医学工程类重点教材

教育部生物医学工程类重点教材



生物工程上游技术 实验手册

第二版 王德



清华大学出版社
Tsinghua University Press

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

生物工程上游技术实验手册

田长恩 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书将分子生物学实验、基因工程实验以及微生物遗传育种实验等多门实验课程有机地统一成一体,整合出若干个不同层次的实验,形成了一个较为完整的实验技术体系,既能节约教学成本,又能使学生更加系统地掌握实验的基本技术和理解基本原理,还能使本实验技术更加接近本学科的前沿。内容包括菌种的理化诱变、工程菌的培养和保藏、基因组 DNA 和 RNA 的分离纯化、质粒 DNA 的制备、基因克隆、表达载体构建、遗传转化和转化子的筛选、表达蛋白的检测等。所开设的实验主要为基础性实验,学生通过实验熟悉实验的基本原理,掌握实验的基本技术。在此基础上,再开设综合性实验,侧重于培养学生的综合能力和创新能力。

本书可以作为大专院校开设生物工程上游技术实验、分子生物学实验或基因工程实验等课程的教材或参考用书,也可以作为研究生和初级科研工作者分子生物学实验技术的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程上游技术实验手册/田长恩主编. —北京:科学出版社,2010
(应用生物技术大系)
ISBN 978-7-03-029405-0

I. ①生… II. ①田… III. ①生物工程-实验-手册 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 213048 号

责任编辑:夏 梁 王 玥/责任校对:赵桂芬
责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

装 订 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 11 月第 一 版 开本:B5 (720×1000)

2010 年 11 月第一次印刷 印张:8

印数:1—3 000 字数:159 000

定价:30.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

目 录

生物工程上游技术实验目的、要求与安全守则.....	1
---------------------------	---

第一部分 基 本 知 识

1 生物工程上游技术实验室安全防护知识	7
2 生物工程上游技术实验室常用仪器设备	11
3 生物工程上游技术实验室常用的玻璃器皿	20
4 生物工程上游技术实验基本操作技术	27

第二部分 学 生 实 验

实验一 大肠杆菌的紫外线诱变	41
实验二 酵母菌的化学诱变	44
实验三 含质粒的大肠杆菌的接种、培养与保藏	47
实验四 质粒 DNA 的制备与质量鉴定	53
实验五 琼脂糖凝胶电泳	58
实验六 大分子 DNA 的制备和质量鉴定	61
实验七 质粒 DNA 的片段化与分离	72
实验八 PCR 反应	76
实验九 PCR 产品纯化及定向克隆	81
实验十 感受态细胞的制备和转化	85
实验十一 利用不同的方法筛选和鉴定转化子	90
实验十二 RNA 的制备和质量鉴定	93
实验十三 利用 RT-PCR 分析基因表达	97
实验十四 蛋白质的异源表达、纯化与 SDS-PAGE 鉴定	101
实验十五 表达蛋白的印迹鉴定	106
参考文献	112
附录 常用试剂和溶液的配制	113

生物工程上游技术实验目的、要求与安全守则

一、实验目的

“生物工程上游技术实验”将“分子生物学实验”、“基因工程实验”以及“微生物遗传育种实验”等多门实验课程有机地统一成一体。实验内容包括细菌和酵母的理化诱变、目的工程菌的培养和保藏、DNA 和 RNA 的分离纯化、质粒 DNA 的制备、克隆及表达载体构建、遗传转化、转化子的筛选与鉴定、PCR、RT-PCR 蛋白质异源表达与检测等，其目的是使学生对现代生物工程的上游技术实验有一个较为系统的了解，以培养学生分子生物学、基因工程和微生物遗传育种等实验的基本操作能力和一定的综合创新能力。使学生牢固地建立有关概念，更好地掌握生物工程上游技术的基本知识，加深对某些重要理论的理解。通过实验课，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的综合能力以及树立严谨、求实的科学研究态度，养成团结协作、勤俭节约、爱护公物、绿色环保的工作作风。

二、实验要求

为了上好生物工程上游技术实验课，确保实验顺利进行和实验安全，特作如下要求，务请遵照执行。

(1) 严格遵守实验室的安全守则；爱护实验室的设备、设施和器材，严格按照操作规程使用设备、设施和器材，要做到轻拿、轻放，以免损坏器材、出现差错或发生意外；若不慎损坏了器材、出现差错或发生意外，应立即报告指导老师，及时处理，切勿隐瞒或自作主张处理；严禁在实验室内吸烟、饮水和进食；节约使用实验材料与消耗品；未经教师许可，不得将实验室内的物品带出实验室。

(2) 每次实验之前，必须对实验内容进行充分预习，明确目的与要求、掌握原理、了解方法与步骤，做到心中有数，并按要求写好有关预习或设计报告。

(3) 实验操作前，必须认真听取老师的讲解和演示，有问题要及时提出。

(4) 实验操作中，必须认真、细心、谨慎，做到观察仔细，记录准确、翔实；不随意走动和高声谈话，保持室内安静；遇到问题要及时向老师提出；需要培养或统一处理（如灭菌、保温等）的材料，必须注明班级、组别、日期、实验项目等的名称，用指定的设备设施进行培养或处理。

(5) 实验结束后, 必须及时整理数据, 以实事求是的科学态度认真写出实验报告并按时提交; 将实验器材洗净放妥, 整理台面, 按实验室安全守则的规定进行废弃物处理; 认真清点所用的仪器、工具和标本等, 如有短缺、损坏, 需填写赔偿报告单; 值日生离开实验室前, 必须将实验室打扫干净, 根据需要用消毒液擦拭桌面, 并检查水、电、门窗是否关好。

(6) 贵重仪器必须先仔细阅读说明书并确认明白无误后方可使用; 危险品等在安全守则有规定的物品、设备、设施或器材等的使用, 必须严格按照有关操作规程和安全守则进行; 特别是在进行高压蒸汽灭菌时, 负责灭菌的同学不得离开, 并要随时观察灭菌锅的工作情况, 以免发生意外。

三、安全守则

生物工程上游技术实验需要使用易燃、易爆、有毒、腐蚀和致癌等化学品, 以及高压电、压力容器、辐射源、锐器以及有害生物等。因此, 进行实验的人员必须遵守以下安全守则:

(1) 使用有毒或致畸、致癌等物品时应戴防护手套; 使用易挥发、蒸发或升发的强酸、氨或易发生恶臭的有毒物品必须在排气良好的地方或通风橱中进行; 使用浓酸和浓碱, 以及其他一些有强烈反应性能的物质时, 应戴防护面具和手套; 对易爆物品不得轻易加热, 必须经测试其中无过氧化物后方可操作; 易燃、易爆物品应远离火源、火花和热源, 在通风处使用, 并避免猛力冲击和振荡; 不得以口吸的方式用移液管吸取有毒、浓酸及浓碱等液体。

(2) 危险品必须由专人按照有关规定进行保管和储存。有毒或易爆物品应封闭在铁箱或铁柜中, 由专人保管, 并建立进货和使用明细账册。

(3) 遵照有关规章, 做到安全用电和燃气。

(4) 进行高压蒸汽灭菌时, 负责灭菌的人员不得离开, 应随时观察灭菌锅的工作情况, 以免发生意外。

(5) 严格按照相关条例和使用规程, 使用和存放辐射源, 使用中应采取正确的防护措施。

(6) 安全使用和存放注射器针头、手术刀片等锐利器具。

(7) 注意有害生物使用和存放时的安全, 避免伤害人和破坏环境。

(8) 废弃物处置: 实验后的废物和用过的化学药品分别倾入污物桶或瓷缸内, 不得丢入水槽以免堵塞下水道或腐蚀水管; 有毒废弃物必须回收, 存放到指定地点或按有关要求处理后进行排放; 带菌或转基因成分的器材或培养物、废弃液体等须经浸泡消毒或高温灭菌后才能清洗或排放; 需在实验室外临近处进行消毒处理的物品, 必须存放在耐用、防扩散的密闭容器中, 且必须依据国家及当地

的相关规定进行包装后才能从实验室移出。

(9) 保证实验室的安全，防护器材必须处于完善待用状态。

(10) 切实做好实验室的防火、防盗工作，离开实验室时要仔细检查水、电、气、门窗是否关好、锁好。

第一部分 基本知识

- 1 生物工程上游技术实验室安全防护知识
- 2 生物工程上游技术实验室常用仪器设备
- 3 生物工程上游技术实验室常用的玻璃器皿
- 4 生物工程上游技术实验基本操作技术

1 生物工程上游技术实验室安全防护知识

生物工程上游技术实验室存在着爆炸、着火、中毒、触电等危险。因此，进行实验的师生必须具有较强的安全意识，掌握有关的防护救治知识尤其是防范措施，以保证在意外发生时，能及时正确处理，防止事故进一步扩大。

1.1 用电安全

生物工程上游技术实验室常用电为 50Hz、220V 的交流电，在此电压下，若让 1mA 的交流电通过，人体便有发麻或针刺的感觉；若让 10mA 以上的交流电通过，人体肌肉会强烈收缩；若让 25mA 以上的交流电通过，则使人呼吸困难，具有生命危险；如果使用的电压更高如 380V，人体能承受的电流则更小；直流电对人体也有类似的危险。因此，安全用电十分重要。

为保证安全用电，必须做到：实验室内的所有电路由专业技术人员根据用电要求设计和安装施工，不得私接或改动电路；必须保持实验室在超负荷、短路等紧急情况下自动断电装置处于完好无损的状态；电源裸露部分应有绝缘装置，电器、仪器外壳应接地线；不得超负荷使用电器；安装或修理电器时，应先切断电源；使用电器时，手要干燥；不能用试电笔去试高压电；先接好线路再插接电源，反之先关电源再拆线路；不得用双手同时触及电器，防止触电时电流通过心脏；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；损坏的接头、插头、插座和不良导线应及时更换；接好电路后应仔细检查无误后，方可通电使用；电炉、烘箱等电热设备不得在无人监管的情况下使用尤其是过夜使用；仪器长时间不用要拔下插头，并及时拉闸；电器、电线着火不可用泡沫灭火器灭火；仪器发生故障时应及时切断电源。一旦有人触电，应首先切断电源，然后抢救。

1.2 仪器设备安全

正确使用各种仪器设备，必须保证大型精密仪器设备的安全。使用仪器前，应仔细阅读说明书，向老师或熟悉该仪器使用方法的人员请教，接受必要的培训。在使用过程中，一般不得长时间离开正在运转的仪器。

1.3 环 境 安 全

不得将微生物尤其是转基因微生物、有害微生物带出实验室，丢弃前必须经灭菌处理，以避免对人和其他动物以及生态环境造成危害。有放射性、腐蚀性和剧毒性等的化学试剂不得倒入下水道中，应放入专门的回收容器，经处理后按规定排放或填埋，以避免污染或危害空气、水源和土壤。

1.4 试 剂 安 全

在使用试剂之前，必须了解其安全性能，包括放射性、易燃易爆性、腐蚀性、氧化性和毒性等，以便在使用时能针对性地采取防范措施，避免因操作不当而造成危害和安全事故。如果试剂具有上述安全问题，在其包装上一定有醒目的标记和使用注意事项，使用之前必须仔细阅读，不明之处要向老师或其他熟悉的人员请教。现根据安全性能，简单介绍各类试剂使用中的注意事项。

1.4.1 放射性试剂

生物工程上游技术实验所用到的放射性试剂主要是作为探针标记物的生化试剂，如 ^{32}P 标记的dNTP和 ^{35}S 标记的甲硫氨酸分别用于核酸探针和蛋白质探针的标记。使用时，一定要按放射性物质使用规定，采取保护措施，在指定场所进行，设置放射性废物专用储存室，储存室建造结构应符合放射卫生防护要求，且具有自然通风条件或安装通风设备，出入口设电离辐射标志。从事放射工作的人员，应具备放射安全防护基本知识，在工作前后做好个人卫生防护，工作时必须按规定穿戴好防护用具，如工作服、铅围裙、铅手套、铅眼镜、口罩、胶皮手套等，工作结束后做好个人清洁工作。要养成良好习惯，不在工作场所进食、饮水，不用嘴吹、吸放射性物质。放射性试剂的使用有严格的规定，使用人员必须经过严格的培训，具体实验时必须遵照有关规定。

1.4.2 易燃易爆试剂

易燃试剂是指闪点在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下的试剂。易燃试剂多是极易挥发的液体，遇明火即燃烧。一般地讲，闪点越低，越易燃烧。常用的三氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯等试剂的闪点在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下，因此，使用时绝对不能有明火。易燃试剂在激烈燃烧时也可能引发爆炸。一些固体试剂，如叠氮化合物、三硝基甲苯、三硝基

苯、苦味酸等，遇热或明火，极易燃烧或分解，发生爆炸。因此，在使用这些试剂时绝不能直接加热，同时不能有明火。当使用易燃易爆试剂时，实验人员应穿戴好必要的防护用具。

1.4.3 有毒试剂

通常许多试剂对人体都有毒。实验中，这些试剂主要通过皮肤和呼吸道，偶尔也通过消化道进入人体，从而导致中毒事件发生。一些剧毒试剂若被吸入或食入，仅少量就会中毒致死（生物实验中致死量 $LD_{50} < 50\text{mg/kg}$ ），如常用的二氯化汞等。在使用性能不清楚的试剂时，实验人员一定要先了解它的 LD_{50} ，尤其应该掌握常用的有毒试剂中毒时的急救处理方法。剧毒试剂必须专人保管，控量使用。

生物工程上游技术实验常用有毒试剂使用注意事项有：实验前应充分了解所用药品的性能和防护措施；实验操作要规范，离开实验室时要洗手；使用有毒气体（如 HCl 、 HF ）应在通风橱中进行操作；四氯化碳、乙醚、硝基苯等蒸气经常久吸会使人嗅觉减弱，必须高度警惕；有机溶剂能透过皮肤进入人体，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，限量使用；二乙基焦碳酸酯（DEPC）可使各种蛋白质失活，是 RNA 酶的强抑制剂，是一种潜在的致癌物质，在 RNA 操作中所用的水和器皿往往都用 DEPC 处理，涉及 DEPC 的操作应在通风良好的环境下进行，并避免接触皮肤；溴化乙锭（EB）主要用于凝胶中核酸的可视化，是一种强诱变剂和致癌物质，具有中度毒性，易挥发，危害较大，在涉及 EB 的操作中，务必戴上手套，实验完毕，手套严禁随便丢弃，须进行净化处理。

1.4.4 腐蚀性试剂

腐蚀性试剂是指因腐蚀作用而破坏人体、金属和其他物品，甚至引起燃烧、爆炸和伤亡的试剂。在生物工程上游技术实验中常用的有苯酚、发烟硝酸、发烟硫酸、过氯酸、盐酸、氯化亚砷、醋酐、冰醋酸、三氯乙酸、甲醛、过氧化氢等。腐蚀性试剂应密封保存，有条件的实验室应该另设储藏室存放。皮肤、黏膜、眼、呼吸器官接触到任何强腐蚀性试剂时都应及时清洗。在使用前应充分了解接触到这些腐蚀性化学试剂的急救处理方法，如酸溅到皮肤上要用稀碱液清洗，苯酚沾在皮肤上应用酒精冲洗，等等。

1.4.5 强氧化性试剂

指过氧化物或是具有强氧化能力的含氧酸及其盐，如在生物工程上游技术实验中常用的硝酸铵、硝酸钾、高氯酸及其盐、重铬酸及其盐、高锰酸及其盐、过氧化苯甲酸、五氧化二磷等。强氧化性试剂在适当条件下可放出氧发生爆炸，这类试剂应该在温度低于 30℃、通风良好的环境条件下使用，并且不得与有机物或还原性物质共同使用，切忌一起加热。

生物工程上游技术实验中的防火、防爆注意事项：防止煤气炉、煤气灯和煤气管漏气，煤气使用后必须关好阀门；不得在实验室存放过多甲醇、乙醚、酒精、丙酮、苯等易燃有机溶剂，使用过的溶剂切不可倒入下水道，以免积聚引起火灾。万一着火，应冷静判断情况，根据不同情况，选用水、沙、泡沫、CO₂ 或 CCl₄ 灭火器进行灭火。

2 生物工程上游技术实验室常用仪器设备

生物工程上游技术实验室必须用到大量的仪器设备，其种类繁多、功能各异，且不同实验室所有的仪器设备的种类或规格型号不尽相同，所以本章仅就主要的、通用的仪器设备及其使用方法加以简要介绍。各种仪器设备都有相应的使用说明书，每一位操作者尤其是初学者在使用过程中务必严格按照说明书进行操作使用，部分贵重精密仪器在上机使用前必须经过严格培训。

2.1 灭菌设备

虽然生物工程上游技术实验对无菌的要求并不十分严格，但是实验中所使用的直接或间接与核酸或蛋白质接触的塑料和玻璃器皿（如塑料吸头、牙签和微量离心管等）都必须进行灭菌处理，以避免杂核酸和杂蛋白质的污染，以及核酸酶和蛋白酶对核酸和蛋白质的降解作用。在细菌的培养和感受态细胞的制备过程中所使用的所有物品，也都必须经过严格的无菌处理。因此，实验室配备各种灭菌设备十分必要。

生物工程上游技术实验常用的灭菌器械有：高压蒸汽灭菌锅、干烤箱、过（超）滤器、紫外线灯、酒精灯等。此外，消毒剂浸泡法也是常用的灭菌方法。现就实验室用得最多、效果最好的高压蒸汽灭菌锅的使用与注意事项作简要介绍。在细菌培养以及核酸操作等有关实验中，凡能耐高温和潮湿的物品（如常用玻璃器材、实验器械、培养基、衣服、纱布等）都可以进行高压灭菌。高压灭菌器有许多种类，现在一般都是使用加压蒸汽或电热式灭菌器。常用的灭菌方法，一般以 101.33kPa 处理 15~20min，可达到对物品进行灭菌的目的。现以日本 TOMY ss-325 为例介绍高压灭菌器的使用方法和注意事项。

2.1.1 高压蒸汽灭菌锅的使用方法

- (1) 在灭菌锅内加入 3L 蒸馏水，并确认液位覆盖底部的加热管。
- (2) 同时在右下方的蓝色塑料收集瓶内注入水，液位必须超过收集瓶上所标注的最低液位，并塞入塑料蒸汽排放管后放回原位。
- (3) 把手动放蒸汽旋钮（在操作面板的右侧）顺时针旋到底（CLOSE）。
- (4) 打开电源，设定灭菌温度、时间后按 SET 键确认。

(5) 按 START 键, 开始高压灭菌。

(6) 灭菌结束, 蜂鸣器响, 排气灯亮, 慢慢地逆时针转动放蒸汽旋钮排气降压。确保锅内压力为 $0\text{kg}/\text{cm}^2$ 时, 再将所灭菌物品取出。放蒸汽旋钮转动角度与被灭菌物品有关, 液体灭菌应当取小角度以降低降压速度, 固体灭菌可以取大角度。

(7) 温度降至 97°C 以下时, 排气灯灭, 可以开门。

(8) 另外, 灭菌后可打开前面的面板, 并旋开底部的排水开关, 用于排放废液和清洗灭菌腔。

(9) 若右下角的收集瓶满, 需将水倒掉。

2.1.2 高压蒸汽灭菌锅使用的注意事项

(1) 为确保安全, 尽量避免直接光照、高湿、通风不畅、不洁静的环境。由于灭菌过程中散发热量, 应在该仪器背后空出不少于 100mm 的距离。

(2) 不要弄湿控制面板 (包括开关、旋钮、压力计)。

(3) 不可用于腐蚀性、易燃、易爆和热压不稳定等物品的灭菌。

(4) 待灭菌的包裹不宜过大、过紧, 应有空隙, 以使蒸汽对流。

(5) 液体灭菌时, 应将液体灌装在硬制的耐热玻璃瓶中, 以不超过玻璃瓶体积的 $3/4$ 为宜, 瓶口选用棉花纱塞, 切勿使用未打孔的橡胶或软木塞。需要特别注意的是, 在液体灭菌结束时不要立即释放蒸汽, 必须待压力表指针回零位方可排放其余的蒸汽。

(6) 布类物品应放在金属物品上, 否则蒸汽遇冷凝聚成水珠, 使布潮湿。灭菌后的无菌包、容器有效期为 1 周。

(7) 灭菌器盖子仅当仪器通电且温度下降、压力表读数为 0 时方可开启, 不可强行用力打开, 以免仪器损坏和发生意外伤害事故。

(8) 高压蒸汽灭菌锅较长时间不用, 务必将灭菌腔的水排空, 并保证腔体清洁干燥。

(9) 为了确保灭菌效果, 应定期检查灭菌效果。常用的检查方法有以下几种: ①工艺检测 (程序检测): 即根据安装在灭菌器上的量器 (压力表、温度表、计时表)、图表、指示针、报警器等来检测; ②化学指示监测: 利用化学指示剂如苯甲酸 (熔点 $121\sim 123^\circ\text{C}$) 在一定温度与作用时间条件下受热变色或变形特点判断; ③3M 压力灭菌指示胶带: 此胶带上印有斜形白色指示线条, 是一种贴在待灭菌包裹外的特制变色胶纸 (121°C 经 20min 、 130°C 经 4min 后变成为黑色); ④生物指示剂监测: 利用耐热的非致病性细菌芽孢作指示剂。