

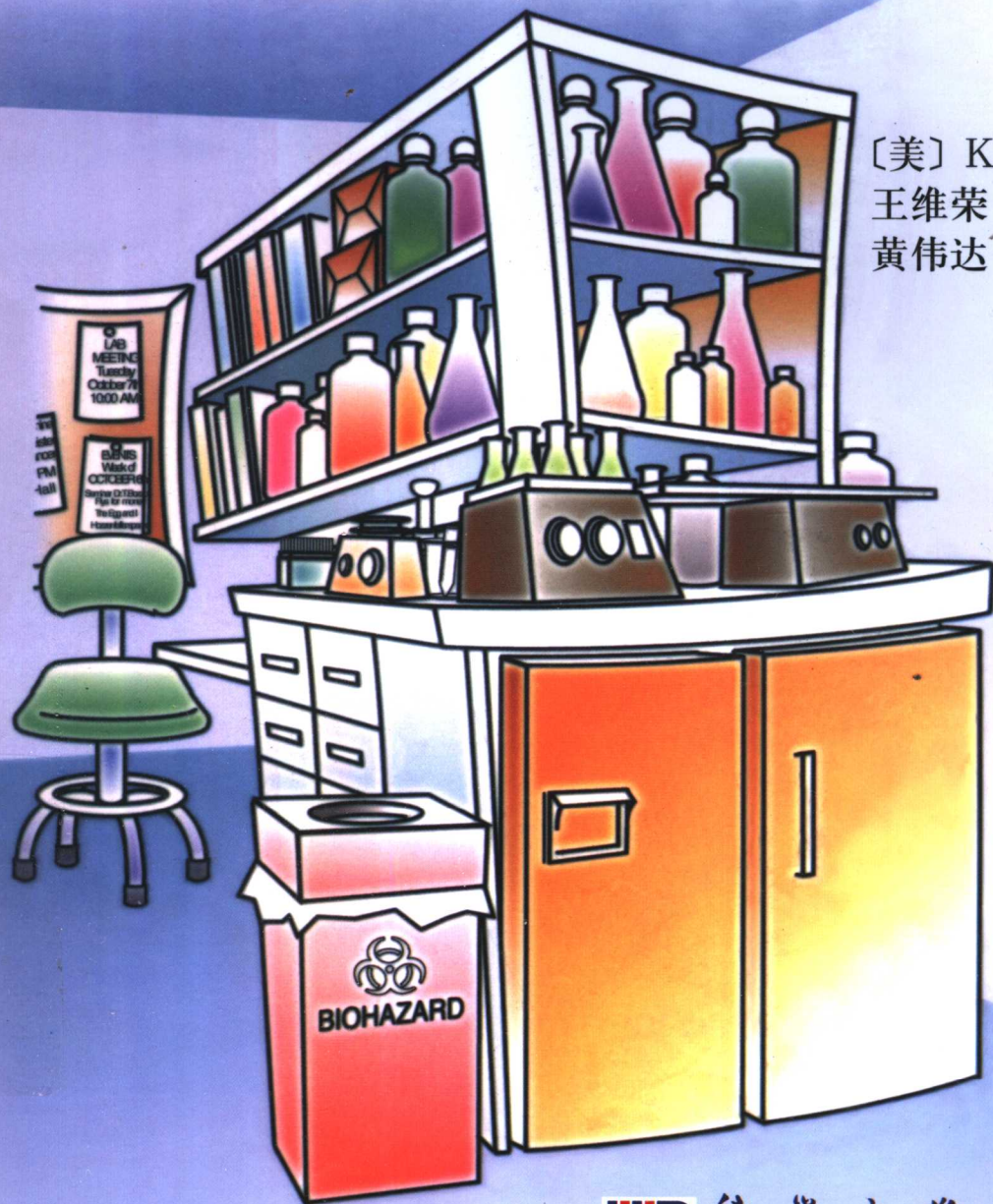
生命科学实验指南系列


分子生物学实验室工作手册

At the Bench

A LABORATORY NAVIGATOR

[美] K. 巴克 著
王维荣 等 译
黄伟达



 科学出版社
www.sciencep.com

3

生命科学实验指南系列

分子生物学实验室工作手册

[美] K.巴克 著

王维荣 黄伟达 等译

科学出版社

北京

图字：01-2004-4053

内 容 简 介

本书是对分子生物学实验室工作的全面论述，内容涵盖实验室机构运作、软硬件配置以及实验操作过程、结果记录、数据提呈等方面，是实验室工作的指导性手册。为加强实验室的建设与管理，帮助实验室人员独立熟悉工作环境，更好地完成对实验室工作信息的收集、整理、统计与交流等方面发挥积极的作用。

本书忠实于原文，最大限度地反映了原书的风格与韵味。可作为高等院校高年级学生、研究生、实验室管理者以及分子生物学实验室工作人员的参考用书。

At the Bench: A Laboratory Navigator. Translation rights arranged with the permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press. Copyright ©2004.
All rights reserved.

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学实验室工作手册/ (美) 巴克 (Barker, K.) 著; 王维荣, 黄伟达等译. —北京: 科学出版社, 2005

(生命科学实验指南系列)

ISBN 7-03-015277-8

I. 分… II. ①巴…②王…③黄… III. 分子生物学-实验-手册 IV. Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 040380 号

责任编辑: 李 悦/责任校对: 李奕莹

责任印制: 钱玉芬/封面设计: 王 浩

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>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2005年8月第一次印刷 印张: 21 1/4

印数: 1—4 000 字数: 479 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈环伟〉)

译者序

2004年科学出版社的马学海博士带来了K.巴克的两本新书：*At The Bench—A Laboratory Navigator* 和 *At The Helm—A Laboratory Navigator*，希望我们能够翻译为中文，介绍给中国的读者，尤其是从事分子生物学和医学研究的工作者。

At The Bench—A Laboratory Navigator 一书全面系统地描述了一个实验室工作者——无论是初进实验室的“新手”或已有一定实验经验的“老手”——应该如何正确面对你的实验室、实验台、实验室主管研究人、实验同事及如何应对实验仪器设备的使用和故障处理，如何计划和进行实验并解释和陈述实验及如何面对危险与危害处理。该书指导你如何正确处理与实验室及实验相关的几乎一切事物的关系，并告诉你如何判断、处理和避免错误的发生以及所有的实验室生活和工作应该如何合理、规范、正确地进行有序计划和执行。

原书作者K.巴克十分熟悉实验室的生活，她曾经是实验室技术员，在马塞诸塞州大学获得生物学学士学位和英语学士学位，后又获得微生物学的硕士和博士学位。在洛克菲勒大学的博士后期间从事病毒肿瘤学研究，并在同一所学校的细胞生理学和免疫学实验室任助理教授。她做过研究生、培训医师、技术员和研究护士的指导教师等工作，丰富的实验室经历使她得以完成该书，这是至今惟一的一本描写实验室生活和工作的手册。本书并不是一本简单的实验室手册，对于重点理解以下问题具有极大帮助：研究人员如何开展工作并如何适应？什么设备是必需的且应该如何正确使用？如何建立一个实验？如何开始实验和组织实验？如何处理和使用数据及参考文献？如何介绍实验工作及实验结果？

本书分为三篇。第一篇确定方向，指导一个实验室新人，应该从哪些方面使自己尽快成为实验室的真正一员以及从工作、安全和功能上进行实验室的常规设施的布置，重点介绍实验室、功能实验台和各类仪器设备的作用。第二篇着重讲述从哪些角度考虑建立一个实验，并对实验中碰到的各种结果如何解释、如何对待以及如何记录实验过程和处理实验结果，同时详细介绍了如何向别人陈述你自己，尤其是如何陈述你的实验结果，包括口头报告和书面的投递论文及基金申请。第三篇是本书的重点——分子生物学实验室的常规实验部分：溶液的配制、灭菌、分装、储存、使用和废弃物品的处理；无菌操作技术；细菌和细胞的培养；传代和冻存；分子生物学三大支柱物质DNA、RNA和蛋白质的实验技能；放射性物质的特性、使用和防护；离心机的使用和梯度离心的制备；电泳及印迹转移；各种显微镜的使用及摄影。此篇重点并不是介绍专业化实验细节，而是介绍所有实验技术和实验操作的规则以及容易出错的细节和规避危险、危害的方法。

你可能在本书中找不到你需要的某一个具体实验的操作步骤，但本书可贵之处在于你一定能找到你所正在进行的实验的实验规则和哪些方面可能会犯错误以及如何做你才能避免错误或少犯甚至不犯错误。本书将为你节省大量的时间和避免不必要的物质浪费。拥有本书，就像拥有了宝贵的财富，拥有了可以随时找到的经验丰富的老师！

王维荣

2005年5月于上海复旦大学

原 著 序

作为一名研究生在实验室度过的第一周是我这一生中度过最困惑的一周。除了专门的实验外，没有任何关于其他方面的书面指导。实验室的常规知识一般只通过口头交流而流传下来，但是什么时机问、问谁、以什么理由问，这些都需要花费大量的时间。问题总是没完没了，我不知道如何区分哪些是琐碎的，哪些是关键。当然，像别人一样经过一段时间的努力，我找到了自己的途径，然后我就变成了新人来时所要面对的“前辈”中的一员，被他们坦率地询问：“你怎么知道应该转得多快？你怎么知道哪个污染起的作用？你怎么知道？你怎么知道？你怎么知道???”是的，我就是知道。某天你会注意到：在问题消失前你可能问了三四次，也可能将某些部分记录在了你的实验记录本上，或者记在了一张被你扔在抽屉里的餐巾纸上，以便下次重复时作为参考，但是大部分通过艰苦努力获得的专业知识被深深埋藏在你的脑海中，而这些知识通常是不能被随时利用的。

有些事情似乎是这样的，如果有人获得了能够解释新奇环境中的社会学和科学分支的某些知识，那么开始时的困难对于他来说可能是有益的。在星期五晚上的快乐时光中，大家谈论着实验室的生活，但同样的困难和问题依然出现着，通过长时间的口头传授还是没有办法获得这些知识。写这本手册的动力来自于帮助实验室人员从第一天开始就能够独立地熟悉环境，知道问何种问题和为何提出问题，并能像科学家一样发挥作用。

这本手册并不是提问的替代品，我从未放弃口头交流的传统，一对一的交流仍然是实验室的心声交流。向一个懂行的人咨询问题几乎总是比向书本学习来得好，但我希望，这本手册能使你了解一个实验室运行的全貌，不管你是请教人还是被人请教！

这本手册的最主要读者是实验室科研的初学者，他们已经具备一定的理论知识，但是没有实际操作背景，这些人包括医师、研究护士、技术员和毕业生。新来的人可能是在大学课程中甚至在进修过程中获得的实验室经历，但他们没有负责过自己实验室的建设和向别人介绍自己的实验。

本书遵循了大多数人了解实验室的实际顺序，分为三篇。第一篇为确定方向，描述了如何处理实验室硬件和软件的配备问题。第二篇为策划实验教程，主要介绍在确定实验、结果记录及数据提呈等方面的合理分析与组织。第三篇为实验部分，是最集中的部分，包括通常情况下隐藏在实验操作指导后的一些细节，你可以通过此篇看到配制缓冲液时水的运用、冷冻细胞、清洗离心机转子等主题！

为了提供宽泛的基础知识，许多信息被省略了，但是仍有覆盖各种主题的优秀专业手册可供参考，其中的大部分在相关章节后面的参考文献中已经列出便于读者查找。

他和她，他的和她的相互交换，并且被随机选择。对于一个特别的工作，他与她的对抗联合并没有任何的暗示，当然当中存在一些幻想……在一个理想的世界里，某些规则可能起作用，但在真实的实验室中，可能经常会失败。每个人都必须参加学术讨论会

而不能打盹，都应该补上遗失的反应试剂，都应该每天记录实验操作。虽然生活太忙，但我们应尽力做好。

感谢阅读本书并对某些章节提出意见的人们，他们是：华盛顿大学的 Alan Aderem，阿尔伯塔大学的 Joho Aitchison，新泽西大学的 Jeanne Barker 和 Merck, Rahway，西亚图大学的 Linneabrodey 和 Pathogenesis 以及冷泉港实验室的 Kim Gavin，纽约大学的 Peggy Hampstead，杜克大学的 Sally Kornbluth 和 Danny Lew，哈佛医学院的 Bruce J. Maye，洛克菲勒大学的 Esmeralda Party。

我还要感谢洛克菲勒大学的 Hidesaboro Hanafusa 和马塞诸塞医学中心的 Peter Newburger，在他们的实验室中我学会了研究和实验操作。洛克菲勒大学的 Ralph Stainman，他为我开始这本手册的编写提供了帮助。许多同事耐心地提供建议和相关技术以及许多优秀实验图书的作者和参考文献中的网站等。Alan, Zoe, Petai 和 Sasha 翻阅了大量论文。最后，还有支持我的家人和朋友 Teruko Hanafusa, Ray Barker, Zan Cohn，感谢他们的鼓励。

与来自冷泉港实验室出版社的朋友一起工作是一件很惬意的事情，John Inglis 支持本书的出版，并负责整个项目的进行。Linda Rodgers 知识渊博，令科学资料变得生动有趣。Jim Duffy 的构图，既提供了图例又起到很好的鼓励作用，任何实验人员都将会认识到其构图的现实性。Mary Cozza, Pat Barker, Susan Schaefer 工作时相当幽默、有效且轻松。令我遗憾的是本书已经完成，不能继续与他们一起分享快乐的时光！

Kathy Barker

缩 写

这些缩写不仅是出现在本书中的词汇，还有一些你在实验室常常听到的词汇。

alkphos	碱性磷酸酶
amp	氨苄青霉素
AMV RT	鸟类粒细胞病毒反转录酶
ANOVA	方差分析
BAC	细菌人工染色体
BBS	公告板系统
β-gal	β -半乳糖苷酶
Bis	<i>N, N'</i> -亚甲双丙烯酰胺
BL 1, 2, 3 or 4	生物安全水平 1、2、3 或 4 级
bp	碱基对
BPB	溴酚蓝
BSA	牛血清清蛋白
CAT	氯霉素乙酰转移酶
CDC	疾(病)控(制)中心
cDNA	互补 DNA
cfu	菌落形成单位
CMC	临界微囊浓度
CMV	巨细胞病毒
cpm	每分钟计数
CS	小牛血清
CsCl	氯化铯
DEPC	焦碳酸二乙酯
DMSO	二甲(基)亚砜
dNTP	4种脱氧核糖核苷三磷酸(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)中的任何一种
DOC	脱氧胆酸 [盐]
DOS	退化寡核苷酸序列或电脑操作系统
DOT	运输系
dpm	每分钟衰变数
DTT	二硫苏糖醇
EHS	环境健康与安全部门
ELISA	酶联免疫吸附试验

EPA	环(境)保(护)处
EtBr	溴化乙锭
EtOH	乙醇
FACS	荧光激活细胞分离器
FAQ	常见问题
FCS	胎牛血清
FISH	荧光原位杂交
FPLC	加压液相色谱(层析)
FS	过滤灭菌
FTP	文档传送程序
g	世代时间
g	相对离心力
G₀, G_m, G₁, G₂	生长阶段
GLC	气相液相色谱(层析)
GMT	好的微生物学技术
HEPA	高效微粒空气(过滤器)
HEPES	<i>N</i> -2-羟乙基哌嗪- <i>N'</i> -2-乙烷-磺酸
HI	热灭活
HPLC	高效液相色谱
HRP	辣根过氧化物酶
IDLH	对生命和健康的直接危险
IEF	等电聚焦
IPTG	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
kan	卡那霉素
kb	千碱基
K_D	解离常数
LB	Luria-Bertani(路里亚-伯特尼), LB 培养基
LPS	脂多糖
M phase	有丝分裂期
MeOH	甲醇
MHC	主要组织相容性复合物
ml	毫升
MoMLV or MMLV	Moloney 鼠白血病病毒
MOPS	3-(<i>N</i> -吗啉代)丙磺酸
MSDS	材料安全性数据表
MW	分子质量
N. A.	数字(空)光圈
NaCl	氯化钠
NIH	(美国)全国卫生研究所

NFPA	(美)国家防火协会
NK	自然杀手
OD	光密度
OHSA	职业安全健康管理
ORF	可读框
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBL	外周血淋巴细胞
PBMC	外周血单核细胞
PBS	磷酸缓冲盐溶液
PCR	聚合酶链式反应
PEG	聚乙二醇
pfu	噬菌斑形成单位
P. I.	主管研究人
pI	等电点
PIPES	哌嗪- <i>N, N'</i> -双(2-乙烷-磺酸)
pK	平衡常数
PKC	蛋白激酶 C
PMA	佛波醇肉豆蔻酸
PMN	多形态核白细胞
psi	每平方英寸磅(磅/平方英寸)
PVC	聚氯乙烯
q. s.	定量、足(够)量、适量
RAM	随机存储器
RBC	红血细胞
RCF	相对离心力
RDA	代表性差异分析
RFLP	限制性片段长度多态性
RIA	放射免疫测定
rpm	每分钟转数
RSO	限制性位点寡核苷酸
RT	反转录酶
S phase	合成期
SDS	十二烷基硫酸钠
S. I.	标准单位
SSC	柠檬酸钠
TAE	Tris(三羟甲基氨基甲烷)-乙酸-EDTA(乙二胺四乙酸)缓冲液
Taq	噬热菌
TBS	Tris(三羟甲基氨基甲烷)-硼酸-EDTA(乙二胺四乙酸)缓

	冲液
TCA	三氯乙酸
TD	投放、给予
TE	Tris·EDTA 缓冲液
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -四甲基乙基二胺
tet	四环素
TLC	薄层层析
Tm	熔解(解链)温度
Tris	三羟甲基氨基甲烷
URL	网络服务程序上用于表示信息位置的表示方法
UV	紫外线
WBC	白细胞
W/V	单位体积的重量
X-gal	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷
YAC	酵母人工染色体

目 录

译者序
原著序
缩写

第一篇 确定方向

第 1 章 普通实验室的组织进程	3
大图片	3
实验室人员	4
实验室日常事务	5
第一周计划做什么	8
第一周做什么	9
第一周不应做的事	10
生存常识和礼节	10
必须遵守的安全规则	13
参考文献	13
第 2 章 实验室的建立与设备	16
选址	16
设备的使用	30
如何购置新设备	31
参考文献	32
第 3 章 开始与组织	34
建立一个功能性的实验台	34
建立一个指挥中心	43
参考文献	50

第二篇 策划实验教程

第 4 章 如何建立实验	55
综合考虑	55
计划实验	56
解释结果	66
参考文献	68
第 5 章 实验室记录本	71
类型和格式	71
内容	72
维护	74
准则	74

	参考文献	78
第 6 章	陈述你自己和你的数据	80
	交流技巧	80
	口头表述	86
	科学论文写作	95
	参考文献	98

第三篇 实验部分

第 7 章	配制试剂和缓冲液	101
	确定所需之物	101
	计算所需之物	106
	称量和混合	113
	测定 pH 值	115
	溶液灭菌	119
	缓冲液和溶液的储存	121
	参考文献	122
第 8 章	贮藏和处理	124
	紧急贮藏	124
	储存试剂	125
	分装	128
	冰箱和冷库	130
	实验室废物的处理	131
	参考文献	136
第 9 章	无菌技术操作	138
	什么时候使用无菌技术	138
	无菌技术	139
	保护实验人员	145
	II 级生物安全橱的无菌技术	147
	参考文献	150
第 10 章	真核细胞的培养	152
	培养类型和细胞株	152
	观察细胞	155
	获得细胞	155
	细胞的维护	159
	冷冻和储存细胞	169
	污染	171
	CO ₂ 培养箱和储气罐	174
	参考文献	178
第 11 章	细菌	181
	建立实验	181
	操作规则	182
	获得细菌	183

	培养和维护	184
	复苏培养	187
	抗生素	189
	获得分离的克隆	190
	细菌计数	194
	贮藏	200
	冷冻细菌	201
	污染	202
	参考文献	202
第 12 章	DNA、RNA 和蛋白质	204
	分子生物学技巧	204
	DNA	205
	将 DNA 导入细胞和微生物	214
	RNA	216
	蛋白质	217
	参考文献	224
第 13 章	放射性	227
	放射性元素的特性	227
	怎样获得放射性同位素	228
	做放射性实验	231
	放射性的实验检测	238
	储存	244
	废弃处理	244
	放射性物质的替代品	246
	参考文献	249
第 14 章	离心	251
	背景	251
	工作规则	256
	如何离心	258
	梯度	266
	离心机与转子的维护	267
	参考文献	268
第 15 章	电泳	271
	基本规则	271
	普通电泳	271
	特殊电泳	275
	将胶内物质转移到膜上	286
	参考文献	287
第 16 章	光学显微镜	290
	背景	290
	光学显微镜的使用	293
	制片和染色	299

摄影	300
荧光显微镜	303
公共仪器设备	304
清洁玻片和盖玻片	305
参考文献	305
词汇和解释	307

第一篇 确定方向

第 1 章

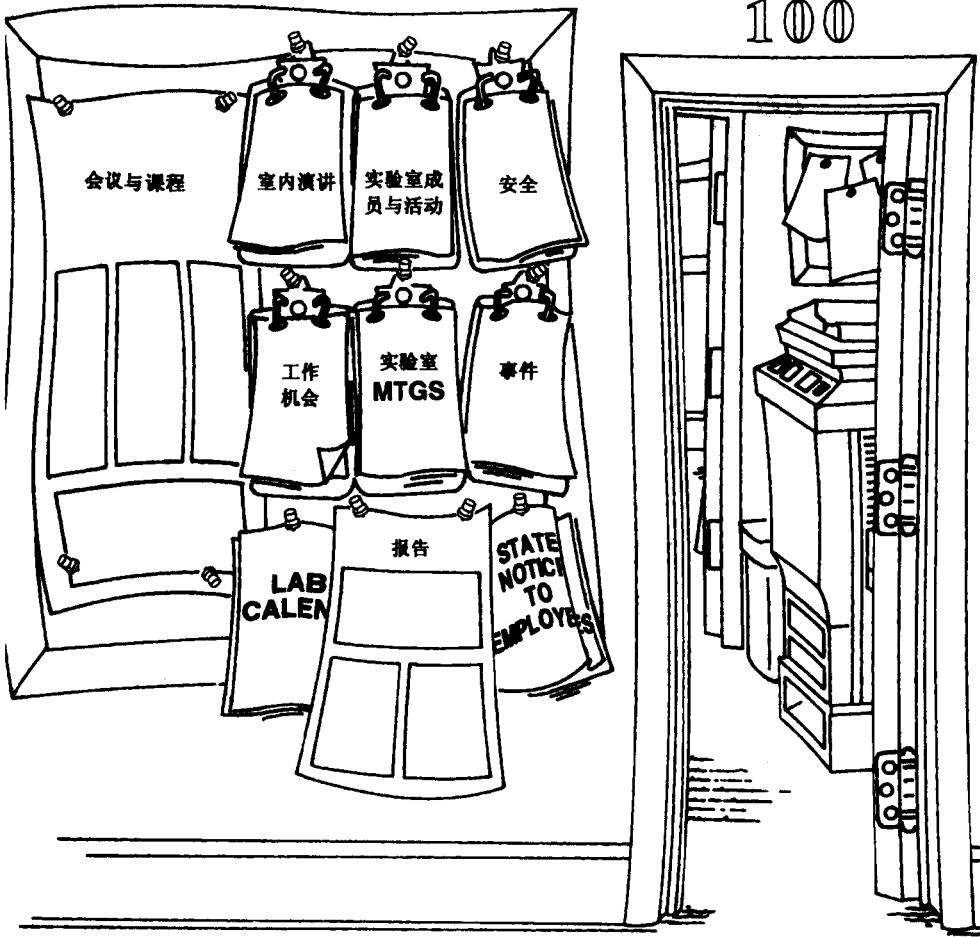
普通实验室的组织进程

第 2 章

实验室的建立与设备

第 3 章

开始与组织



第1章 普通实验室的组织进程

对生物实验室工作间的要求在不断地变化。在这里操作实验有一个令人惊讶的概念：你通过做实验来获得工资及荣誉，这几乎是一件不光彩的获得谋生的方式。工作是有意义的，你的衣着方式是随意的，工作时间常常根据实验的需要而由自己决定。实验室或部门中到处都是开朗而有趣的人们，你可以与他们讨论激酶实验所需要的盐浓度或最近国会开支的深刻含义。这里能给你带来家庭般的全部心理慰藉！

如同所有的复杂社会组织一样，实验室有自己的习惯与规则，问题是不常听到这些规则。你需要分析很多杂乱无章的线索，成为守法的成员，在这个体系中，个人主义被高度赞扬。虽然没有人期望你懂得如何安装设备，但你应该考虑如何安装！数据交流是职业过程中的目标，也是研究的回报，并不是所有人都能与你清晰而愉快地交流，但是不要着急，你会处理好的！一段时间后，与同事工作的乐趣会取代一开始时的混乱感觉。但是要做好你的工作，首先必须弄清楚时而出现的模糊混淆的信号，并学会如何使自己的实验室协调运作。

大 图 片

“实验室”可以由许多相互交叠的术语来定义，这取决于向哪些听众介绍实验室。实验室可以以它的基础研究领域名称来界定，如免疫学实验室、生理学实验室、生物物理学实验室等，这种定义更多的是一种管理上的界定而不是功能上的界定。实验模型（即常用来解决问题的有机体）也常常被用于扩展研究领域的描述，如：某个人可能是微生物生态学实验室、酵母遗传学实验室或人类神经解剖学实验室的成员。

研究领域是一种更有效的描述实验室的用语，因为它能告诉你实验室实际上所做的事情，可能某实验室是细胞周期实验室，或者称信号传导实验室。实验室可能是个聚焦点，一个问题将所有成员联系在一起，实验室所有人员可能致力于神经细胞分泌的研究，或试图了解与发育相关的特异转录蛋白质为什么作用和如何作用。实验室的每个成员都有自己的问题，他们试图通过实验的方式来解决这个特定的问题。

定义实验室的另一个方式是通过实验室从事的是基础科学还是应用科学来界定。基础科学是指纯科学，做科学的目的是为了获取知识；应用科学则被认为是通过基础科学理论的运用来推动一种产品的发展，如抗生素。基础科学常被认为是学术研究之子，由软资金（研究性支持和/或竞争性授予的薪水支持）资助；应用科学则被认为是由公司运作，由硬资金（研究所和公司支付的薪水和研究支持）资助。这种区分不是很有效，大学和制药公司也从事基础研究和应用研究，学术机构和公司所做的研究也可能有硬资金和软资金的资助。对于在实验室工作的人来说，实践上的相同点比不同点更明显。

有些实验室从事临床研究，在那里病人或病人的细胞被用来检查疾病，工作多数由医生而不是博士来做。临床研究实验室通常仅出现在医学院或医院的附属机构，那里便