



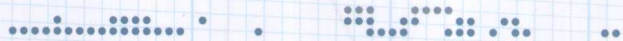
全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

伊正君 张红艳 ◆ 主编



临床分子诊断学实验

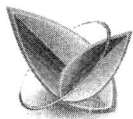


LINCHUANG FENZI ZHENDUANXUE SHIYAN



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

临床分子诊断学实验

主 编 伊正君 张红艳

副主编 刘忠民 张效云 时东彦 杨清玲

编 者 (以姓氏笔画为序)

马 佳 蚌埠医学院
王会岩 吉林医药学院
王秀青 宁夏医科大学
方 莉 川北医学院
庄文越 北华大学
邢少姬 包头医学院
伊正君 潍坊医学院
刘忠民 广州医科大学
宋 瑛 成都中医药大学
李 聪 武汉大学医学院
时东彦 河北医科大学
张 红 成都医学院
张红艳 河北工程大学医学院
张效云 河北北方学院
杨清玲 蚌埠医学院
郑 芳 武汉大学医学院
姜 勇 吉林医药学院
熊陈岭 武汉大学医学院



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。

本书共三章。第一章绪论,主要介绍临床分子诊断学实验的基础知识。第二章临床分子诊断学基本技术,主要阐述临床分子诊断学基本操作技术和程序,对各种临床分子诊断技术的原理及其相关知识进行铺垫和描述。第三章临床分子诊断学综合性实验,内容设计密切针对临床需求进行安排,如 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测、乙肝 P 区耐药检测等。

本书密切结合现代医院及临床教学的特点,以临床应用为导向,密切结合临床需求,突出临床特点,使教材具有广泛的适用性,使之既成为学生在实验室进行分子诊断学实验的指导教材,又可作为学生进入医院见习、实习后继续深造的参考书。

本书可供医学检验等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床分子诊断学实验/伊正君,张红艳 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.6
ISBN 978-7-5609-9208-2

I. ①临… II. ①伊… ②张… III. ①分子生物学-实验室诊断-高等学校-教材 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 145149 号

临床分子诊断学实验

伊正君 张红艳 主编

策划编辑:荣 静

责任编辑:荣 静

封面设计:范翠璇

责任校对:周 娟

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10 插页:2

字 数:247 千字

版 次:2014 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:28.00 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国高等医药院校医学检验专业 “十二五”规划教材

编委会

主任委员 尹一兵 徐克前

委员(按姓氏笔画排序)

王庆林	湖南师范大学医学院	陈育民	河北工程大学医学院
王晓娟	佛山科学技术学院医学院	郑芳	武汉大学医学院
尹一兵	重庆医科大学	姜傥	中山大学中山医学院
刘永华	包头医学院	胡志坚	九江学院临床医学院
刘晓斌	延安大学医学院	赵建宏	河北医科大学
权志博	陕西中医学院	夏薇	北华大学
邢艳	川北医学院	徐克前	中南大学湘雅医学院
阮萍	绍兴文理学院医学院	贾天军	河北北方学院
吴俊英	蚌埠医学院	陶元勇	潍坊医学院
吴晓蔓	广州医科大学	陶华林	泸州医学院
张展	郑州大学第三附属医院	高荣升	佳木斯大学检验医学院
李艳	吉林医药学院	梁统	广东医学院
肖露露	南方医科大学附属南方医院	曾照芳	重庆医科大学
陈昌杰	蚌埠医学院		

总序

ZONGXU

2011年《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》的颁发宣告新一轮医学教育改革的到来。教育部要求全面提高高等教育水平和人才培养质量,以更好满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要。近年来,随着科学技术的进步,大量先进仪器和技术的采用,医学检验也得到飞速发展。医学检验利用现代物理的、化学的、生物的技术和方法,为人类疾病的预防、诊断、治疗以及预后提供重要的信息。它在临床医学中发挥着越来越重要的作用。据统计,临床实验室提供的医学检验信息占患者全部诊疗信息的60%以上,因此医学检验已成为医疗的重要组成部分,被称为临床医学中的“侦察兵”。基于此,国家教育部2012年颁布的专业目录将医学检验专业人才培养定位于高水平医学检验技术人才的培养。

这些转变都要求教材的及时更新,以适应新形势下的教学要求和临床实践。但是已经出版的医学检验教材缺乏多样性、个性和特色,不适应新的教学计划、教学理念,与临床实践联系不够紧密。已出版的相关教材与新形势下的教学要求和人才培养不相适应的矛盾日益突出,因此,加强相关教材建设已成为各相关院校的目标和要求,新一轮教材建设迫在眉睫。

为了更好地适应医学检验专业的教学发展和需求,体现最新的教学理念,突出医学检验的特色,在认真、广泛调研的基础上,在医学检验专业教学指导委员会相关领导和专家的指导和支持下,华中科技大学出版社组织了全国40所医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。本套教材由国家级重点学科的教学团队引领,副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占70%。教材编写过程中,全体参编人员进行了充分的研讨,各参编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,各主编及参编人员付出了辛勤的劳动,这确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各院校的教学改革成果和研究成果,教材编写体系和内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材定位准确,体现最新教学理念,反映最新教学成果,紧密联系最新的教学大纲和临床实践,注重基础理论和临床实践相结合,体现高素质复合型人才培养的要求。

(2) 适应新世纪医学教育模式的要求,注重学生的临床实践技能、初步科研能力和创新能力的培养。突出实用性和针对性,以临床应用为导向,同时反映相关学科的前沿知识和发展趋势。

(3) 实验课程教材内容包括基础实验(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究创新型实验(以问题为导向性的实验)等,所选实验项目内容新、代表性好、实用性强,反映新技术和新方法。



(4) 实现立体化建设,在推出传统纸质教材的同时,很多教程立体化开发各类配套电子出版物,打造为教学服务的共享资源包,为学校的课程建设服务。

本套教材得到了医学检验专业教学指导委员会相关领导专家和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校医学检验教学及人才培养作出应有的贡献。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材
编写委员会

前言

QIANYAN

临床分子诊断学是利用分子生物学的技术和方法来研究人体内源性或外源性生物大分子的存在、结构或表达调控的变化,从而为临床疾病的预防、诊断、治疗和转归提供信息和决策依据的一门新兴学科,具有广阔的应用前景。

临床分子诊断学是一门实践性很强的学科,在本教材编写过程中,既要体现本学科的发展趋势,又要紧密联系临床,使教材具有实用性、规范性、兼容性和延展性。充分考虑各个院校教学的实际情况,分层次进行编写,使之可满足具有不同实验室条件院校的使用要求。使用时,教师可以根据具体情况选择。

教材编写过程中,密切结合现代医院及临床教学特点,以临床应用为导向,密切结合临床需求,突出临床特点,使教材具有广泛的适用性,使之既成为学生在实验室进行分子诊断学实验的指导教材,又可作为学生进入医院见习、实习后继续深造的参考书。

本教材着重于临床应用,在掌握基础理论和基础知识的同时,重点强调临床技术和临床应用案例,侧重培养学生综合分析问题和解决临床实际问题的能力,使学生能够更好地理解和掌握分子诊断学的临床特点,为今后的临床工作打下良好的基础。

教材共三章。第一章绪论,主要介绍临床分子诊断学实验的基础知识。第二章临床分子诊断学基本技术,主要阐述临床分子诊断学基本操作技术和程序,对各种临床分子诊断技术的原理及其相关知识进行铺垫和描述。第三章临床分子诊断学综合性实验,内容设计密切针对临床需求进行安排,如 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测、乙肝 P 区耐药检测等,同时注重对综合性、设计性、科研性实验的介绍,以加强学生综合能力、创新能力和临床实践能力的培养。

临床分子诊断学的发展日新月异,加之编者水平有限,疏漏、不足甚至错误之处在所难免,敬请同行专家及读者给予批评指正。

伊正君

目录

MULU

第一章 绪论	/ 1
第一节 临床分子诊断学实验须知	/ 1
第二节 临床分子诊断学实验常用仪器介绍	/ 5
第二章 临床分子诊断学基本技术	/ 10
第一节 核酸的分离与纯化	/ 10
实验一 人体外周血细胞基因组 DNA 的分离与纯化	/ 10
实验二 细菌基因组 DNA 的分离与纯化	/ 13
实验三 质粒 DNA 的提取与纯化	/ 15
实验四 人体外周血细胞 RNA 的分离与纯化	/ 19
第二节 核酸的鉴定与分析	/ 25
实验五 紫外吸收法鉴定核酸的纯度和浓度	/ 25
实验六 荧光法检测核酸的浓度	/ 27
实验七 核酸片段的琼脂糖凝胶电泳	/ 29
实验八 核酸片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳	/ 34
第三节 聚合酶链反应	/ 37
实验九 常规 PCR 检测方法	/ 38
实验十 RT-PCR 检测方法	/ 42
实验十一 实时荧光定量 PCR	/ 45
第四节 核酸分子杂交技术	/ 50
实验十二 核酸标记探针的制备	/ 50
实验十三 Southern 印迹杂交	/ 57
实验十四 Northern 杂交技术	/ 60
实验十五 荧光原位杂交技术	/ 65
第五节 核酸测序技术	/ 69
实验十六 双脱氧链终止测序法	/ 70
实验十七 焦磷酸测序法	/ 75
第六节 分子克隆技术	/ 78
实验十八 感受态细胞的制备	/ 78
实验十九 DNA 重组与转化	/ 81
实验二十 重组子的筛选与鉴定	/ 84
实验二十一 重组基因的诱导表达与检测	/ 87



实验二十二	Western-blot 技术	/ 91
实验二十三	二维蛋白电泳技术	/ 95
第三章	临床分子诊断学综合性实验	/ 102
第一节	感染性疾病的临床分子诊断	/ 102
实验二十四	HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测	/ 102
实验二十五	HCV RNA 实时荧光定量 PCR 检测	/ 106
实验二十六	结核分枝杆菌的检测与耐药分析	/ 109
实验二十七	乙肝 P 区耐药检测	/ 113
实验二十八	人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测	/ 116
第二节	单基因遗传病的临床分子诊断	/ 120
实验二十九	地中海贫血的分子诊断	/ 120
实验三十	DMD 的分子诊断	/ 124
第三节	肿瘤疾病的临床分子诊断	/ 128
实验三十一	PCR-SSCP 检测 <i>p53</i> 抑癌基因突变	/ 128
实验三十二	PCR-RFLP 检测 <i>K-ras</i> 癌基因突变	/ 133
第四节	个体遗传标记的临床分子诊断	/ 137
实验三十三	荧光标记复合 STR 分型	/ 138
实验三十四	HLA 基因分型	/ 141
附录 A	临床分子诊断学实验常用试剂与缓冲液的配制	/ 145
彩图		/ 151

第一章 绪 论



第一节 临床分子诊断学实验须知

临床分子诊断学是利用分子生物学的技术和方法来研究人体内源性或外源性生物大分子的存在、结构或表达调控的变化,从而为临床疾病的预防、诊断、治疗和转归提供信息和决策依据的一门新兴学科。

近年来,随着分子生物学理论和技术不断应用于临床,分子诊断技术朝着更加高效、准确、灵敏的方向发展,在临床疾病的预防、诊断、疗效评价等方面发挥着越来越重要的作用,已经成为生命科学最具有活力的前沿学科。临床分子诊断学的发展极大地推动了现代检验医学的进步,并在更深层次上揭示了临床疾病的微观本质和变化特点,弥补了传统诊断方法的不足,给医学诊断领域带来了全新的变化,在许多临床疾病(如一些病毒感染性疾病)的诊断中,分子诊断已经成为极其重要甚至唯一的检验手段。

作为一名检验医师,要想充分掌握和运用临床分子诊断学技术,为临床医师提供一份高质量、高诊断价值的检验报告单,就必须在充分理解分子诊断学理论知识的基础上,学会娴熟地利用各种临床分子诊断学实验技术,解决临床问题。在临床分子诊断学实验技术的学习过程中,要注意以下几个方面。

一、严格遵守实验操作规程

由于临床分子诊断学实验通常操作过程较为复杂,实验涉及的试剂、器材较多,实验耗时长,容易污染,因此要求同学们在实验过程中一定要严格按照操作规程进行操作。规范化的实验室,应有完整的标准操作规程(SOP文件),初学者进入实验室后,先要认真熟悉相关文件规定,然后严格按照实验规程进行实验操作,如此才能循序渐进,有效规避风险,不断发现问题,积累经验,实现学习目标。

二、建立和适应微量操作的理念

在其他医学检验课程的实验中,同学们使用到的计量单位如重量、体积等多数是克(g)、升(L)、毫升(mL)等,许多小于克和毫升的微小计量单位如毫克(mg)、微克(μg)、微升(μL)等极少用到。然而在临床分子诊断学实验中,许多实验试剂的用量往往很少,固体物质有时会需要深入到 ng 级,液体试剂常常会遇到吸取 $0.1 \mu\text{L}$,因此,我们必须建立和适应微量操作的理念。



这种量级变化所带来的操作要求和挑战性,往往使同学们感到很不适应,总是会不自觉地加过量,这就需要一个由熟悉到熟练的过程。同时,许多微观实验的结果很难用肉眼直接观察到,需要使用染色技术、分子标记技术等进行显现,这些过程中使用的许多试剂是具有生物毒性的,极少量就会污染环境,因此要严格控制加样计量,做到“精、准、净、少、快”,切忌拖泥带水。另外,为了保证实验的顺序进行,在临床分子诊断学实验过程中,每一步微观实验的结果都必须利用相关的检测方法进行鉴定,正确后方可进行下一步反应。

三、正确使用试剂

临床分子诊断学实验中所用到的试剂较多,而且对试剂的要求非常严格,有些实验不成功往往就是由于试剂使用不正确造成的,具体如下。

1. 试剂配制不当,有的化学试剂自身含有水分子,如称量时不扣除会造成所配试剂浓度偏低。
2. 选用试剂等级不够,我国化学试剂级别主要分为优级纯(GR)、分析纯(AR)、化学纯(CP)等级别,应严格按照实验要求选用。
3. 试剂污染,在取用时混入其他物质。
4. 除菌条件不对,对于不耐受高温的试剂,应选用过滤器除菌。
5. 试剂保存不当或时间过长,试剂常用的保存条件有室温、4℃、-20℃,实验人员应严格按照要求存放并了解保存期限。

四、建立和适应无菌观念

无菌技术是指实验过程中,防止一切微生物侵入机体和保持无菌物品及无菌区域不被污染的操作技术和管理方法,是实验过程中预防和控制交叉污染的一项重要基本操作。在分子实验中经常涉及无菌操作技术,尤其是微生物的纯培养、细胞的培养,更需要严格的无菌操作技术。在无菌操作过程中,任何一个环节都不得违反操作原则,否则就可能造成实验失败。因此,实验人员必须加强无菌观念,准确、熟练地掌握无菌技术,严格遵守无菌操作规程。

五、防止实验室污染

临床分子诊断学实验的对象主要是核酸,PCR是分子诊断最常用的技术,其产物可以把一个基因片段扩大到 $2^{35} \sim 2^{40}$ 倍,一旦造成实验室污染,极难根除;另外,也要注意避免外源病原体的污染,实验所用的试剂、器材等都需要消毒灭菌处理;实验人员需戴口罩和手套,穿隔离衣操作,避免自身体液污染实验器皿或试剂;要有专门的分子诊断学实验室,分区操作,以防交叉污染;实验后台面及时消毒处理;严格按照要求取用试剂,贵重、剧毒试剂应先分装。

六、注意实验安全保障

临床分子诊断学实验中用到的实验试剂多数对人体有害,有的可能诱发基因突变甚至癌症,或者对人神经系统产生累积毒害,如丙烯酰胺、苯酚、溴化乙锭、放射性同位素等。因此,实验人员必须严格按照实验安全要求进行操作,佩戴合适的手套、安全眼镜和面罩,试

剂配制要在化学通风橱(通风柜)里进行,切勿吸入试剂蒸气,尽量减少气溶胶的产生,否则会给实验者带来巨大的危害。

七、注意生物安全保障

实验室生物安全保障就是在实验研究过程中,为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而采取的综合措施,达到对人、环境生态和社会的安全防护。根据对所操作生物因子采取的防护措施,将实验室生物安全防护水平分为一级、二级、三级和四级,一级防护水平最低,四级防护水平最高。国家相关规定如下。

1. 一级生物安全实验室,英文缩写为BSL-1,俄文缩写为P1,可称为基础实验室。适用于操作已知其特征的,在健康人群中不引起疾病的,对实验室工作人员和环境危害较小的生物因子的工作。

2. 二级生物安全实验室,英文缩写为BSL-2,俄文缩写为P2,可称为安全实验室。适用于操作能够引起人类或者动物疾病,但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害,传播风险有限,实验室感染后很少引起严重疾病,并且具备有效治疗和预防措施的微生物。

3. 三级生物安全实验室,英文缩写为BSL-3,俄文缩写为P3,可称为高度安全实验室。适用于操作能够引起人类或者动物严重疾病,比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物。

4. 四级生物安全实验室,英文缩写为BSL-4,俄文缩写为P4,可称为最(高度)安全实验室。适用于操作对人体、动植物或环境具有高度的危险性,通过气溶胶途径传播或传播途径不明,目前尚无有效疫苗或治疗方法的致病性微生物或未知传播风险的有关病原体及其毒素能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物。分子诊断学实验室必须设计成二级或二级以上生物安全水平。

实验室最常用的生物安全设备是生物安全柜,它可以保护操作者、实验室环境、实验材料,使其避免暴露于感染性气溶胶,以及操作含有传染性实验材料时可能产生的飞溅污物所带来的危害,是生物安全保障的核心仪器。当操作病人血液、体液、分泌物、排泄物时,要求实验人员采用标准预防的理念,即将该类物质均认定为具有传染性,需进行隔离,不论是否有明显的血迹污染或是否接触非完整的皮肤与黏膜。接触上述物质者必须根据传播途径采取有效的预防措施。

在体外进行基因重组实验时,要选择生物安全性高的载体和受体细胞。有些细菌或病毒经过基因重组后,可能伴有高度的传染性、侵袭性、毒性和抗药性,会引起意想不到的疾病的流行。即使有些重组体不直接给人畜带来危害,但有可能影响其他生物,使地球生态平衡受到破坏。因此,实验人员必须采取一定的安全监督和防护措施,杜绝可能造成的生物安全危害。

八、有毒有害物质的无害化处理

随着现代生物学的发展,生物实验室产生越来越多的废弃物。目前,大多数有毒有害物质的废弃物常常未加任何处理,便直接排入下水道或是扔进垃圾箱。这些有毒有害物质最后流入江河,在大自然的循环过程中,一部分最终进入人体,对人类健康造成严重的影响。而活性生物废弃物也会造成生物污染,对环境和人类构成极大的危害,有些生物的遗



传物质可能被人改变,成为“新”的生物,形成不确定性的危害。因此,生物实验室应制订切实有效的措施,阻断污染源,防范这些有害物质造成环境污染。常用有毒有害物质处理如下:

1. 溴化乙锭(EB)的净化处理 由于溴化乙锭具有一定的毒性,实验结束后,应对含溴化乙锭的溶液进行净化处理再行弃置,以避免污染环境和危害人体健康。对于溴化乙锭含量大于 0.5 mg/mL 的溶液,可如下处理:①将溴化乙锭溶液用水稀释至浓度低于 0.5 mg/mL;②加入等体积的 0.5 mol/L KMnO_4 ,混匀,再加入等体积的 25 mol/L HCl ,混匀,置室温下数小时;③加入等体积的 2.5 mol/L NaOH ,混匀并废弃。如果溴化乙锭含量小于 0.5 mg/mL 的溶液可如下处理:①按 1 mg/mL 的量加入活性炭,不时轻摇混匀,室温下放置 1 h;②用滤纸过滤并将活性炭与滤纸密封后丢弃。

2. 废洗液的处理 废洗液是指经多次使用后变为绿褐色不能再使用的铬酸洗液。其对环境有害,如对水体污染,可在肉类、贝类等人类重要食物链中发生蓄积。铬酸洗液每次使用完之后,切不可倒入下水道,应放回原瓶重复使用,直至失效变绿。失效之后,可浓缩、冷却,加入高锰酸钾粉末氧化,用砂芯漏斗滤去 MnO_2 沉淀后再用。

3. 放射性物质的处理 放射性同位素技术具有灵敏、简便和廉价等优点,在分子诊断学实验室应用普遍。但放射性辐射会给人体造成损伤,如使用不当或操作不规范,会造成环境污染甚至人员损伤。在进行同位素操作时一定要注意个人防护,包括使用隔离挡板、专用衣帽、手套及防护背心等。实验完毕的废弃物(如铅罐、试剂、耗材及生物材料)不能随意乱放,应使用专用容器分类收集,统一处理。

4. 病原微生物的处理 对所有潜在感染危险物品的处理,先是被污染,未经消毒不能拿出实验室。液体废弃物经离心后的上清液、感染细胞培养的营养液及洗涤液等必须在防漏、未破损的容器内,经高浓度的化学消毒剂作用。对于剩余标本,接种过的培养基、菌种等,在丢弃之前均需采用适当方法消毒,特别是分枝杆菌、真菌和病毒等样本。对于任何有污染的锐器处理前不要用手接触,这些物器应置于盛有消毒液的硬壁容器内,经高压蒸汽灭菌后丢弃。

5. 实验耗材和废弃生物材料的处理 实验中作废的吸头、手套、试管等应定期灭菌后深埋;废弃的玻璃制品和金属物品应使用专用容器分类收集,统一回收处理。实验废弃的生物活性实验材料特别是细胞和微生物必须及时灭活和消毒处理。实验动物尸体或器官必须及时进行妥善处置,按要求消毒,统一送有关部门集中焚烧处理。实验内容设计过程中要尽量选择无公害、低毒性药品做实验,实验残液、残渣要少,以便于回收,减少污染。

九、实验操作的质量控制

临床分子诊断必须高度重视实验流程和实验结果的质量控制(质控),质量控制至少应涵盖以下内容:

1. 通过室内质量控制评价检测系统是否稳定。
2. 对新的分析方法进行比对实验。
3. 室间质量评价,通过使用未知样本将本实验室的结果与同组其他实验室结果和参考实验结果进行比对。
4. 仪器维护、校准和功能检查。

5. 技术文件、技术标准的实施和记录。

(伊正君)

第二节 临床分子诊断学实验常用仪器介绍

一、微量移液器

微量移液器是一种在一定容量范围内可随意调节的精密取液装置,基本原理是依靠装置内活塞的上下移动,推动按钮带动推动杆使活塞向下移动,排除活塞腔内的气体;松手后,活塞在复位弹簧的作用下恢复原位,从而完成一次吸液过程。常用的有 Eppendorf 公司各种规格的微量移液器,其他还有美国 TOMOS 公司、德国 BRAND 公司产品。目前使用的移液器有整支可消毒移液器、半支可消毒移液器、电动移液器、PCR 专用移液器。此外还有大容量移液器、电子连续移液器、瓶口移液器、电子滴定器等不同类型的移液器。

微量移液器的标准操作适用的液体有水、缓冲液、稀释的盐溶液和酸碱溶液,其操作步骤:第一步,按到第一挡,垂直进入液面几毫米;第二步,缓慢松开控制按钮,否则液体进入吸头过速会导致液体倒吸入移液器内部而使吸入体积减小;第三步,打出液体时贴壁并有一定角度,先按到第一挡,稍微停顿几秒后,待剩余液体聚集后,再按到第二挡将剩余液体全部压出。

在使用移液器的过程中,应注意以下几个方面:

1. 移液器应放在专用的架子上,不得随意放置。
2. 移液时选用适当型号的移液器,不得用大量程的移液器移取小体积样品。
3. 吸不同的液体时应更换吸头,防止交叉污染而影响实验结果。
4. 新吸头在使用前可吸排溶液几次,浸渍吸头以消除测量误差。
5. 移液器吸液后严禁倒置、平放,以免液体倒流损坏活塞。
6. 长时间不用或刚取出的新移液器应轻轻按压按钮数次,再进行正常使用。

二、离心机

离心机是分子诊断学实验中最常用的一类仪器,主要用于细胞的收集和分离、基因片段的分离以及其他生物样品的分离制备。离心机依据转速不同,可分为低速离心机、高速离心机和超速离心机。转速小于 6000 r/min 的为低速离心机,小于 25000 r/min 的为高速离心机,大于 30000 r/min 的为超速离心机。依据温度控制不同,离心机又可分为冷冻离心机和普通离心机,冷冻离心机带有制冷系统,能够控制温度最低至 -20°C ,普通离心机不带制冷系统。

离心机在每次接通电源前,应仔细检查所用的转头及离心管有无裂纹或严重腐蚀现象,如有应立即更换;保持离心机腔体内清洁,防积水,防有颗粒状杂物;配转头系统时,必须在仪器断电条件下操作;仪器加速或减速过程中,出现短时振动属正常现象,不必关断电源开关;若出现中途断电,切勿马上开门,必须等电机停转后方可开门;离心时样品应预先



平衡,使用离心筒离心时离心筒与样品应同时平衡,离心挥发性液体或腐蚀性液体时,应使用带盖的离心管,并确保液体不外漏,以免腐蚀机腔。

三、电泳装置

电泳技术是临床分子诊断学实验中不可缺少的重要分析手段。所谓电泳,是指带电粒子在电场中的运动,不同物质由于所带电荷及相对分子质量的不同,因此在电场中运动速度不同,根据这一特征,应用电泳法便可以对不同物质进行定性分析或定量分析,或将一定混合物进行组分分析或单个组分提取制备,这在临床检验或实验研究中具有极其重要的意义。

电泳一般分为自由界面电泳和区带电泳两大类,自由界面电泳不需支持物,而区带电泳则需用各种类型的物质作为支持物,常用的支持物有滤纸、醋酸纤维素薄膜、非凝胶性支持物、凝胶性支持物及硅胶薄层等,分子生物学领域中最常用的是琼脂糖凝胶电泳。

电泳装置是实现电泳分析的仪器,一般由电泳仪、电泳槽、检测单元等组成。它主要用于检测、鉴定各种生物大分子的纯度、含量及描述它们的特征,还可以用于样品的分离、纯化、回收和浓缩。

电泳仪作为电泳时的外加电源设备,既能输出稳定的电流,又能输出稳定的电压,起到在被分离样品两端加外接电场的作用;电泳槽是电泳的主要部件,是样品分离的场所;电泳仪在通电进入工作状态后,禁止人体接触电极、电泳物,也不能到电泳槽内取放东西,如需要应先断电,以免触电。同时要求仪器必须有良好接地端,以防漏电;在通电后,不要临时增加或拔除输出导线插头,以防短路现象发生,使用过程中发现异常现象,如较大噪音、放电或异常气味,须立即切断电源,进行检修,以免发生意外事故。

四、生物安全柜

生物安全柜是为操作具有感染性的实验材料时,用来保护操作者本人、实验室环境以及实验材料,使其避免暴露于可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的。

根据生物安全防护水平的差异,生物安全柜也可以分为Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级三种类型。Ⅰ级生物安全柜可保护工作人员和环境而不保护样品。气流原理和实验室通风橱一样,不同之处在于排气口安装有 HEPA 过滤器。所有类型的生物安全柜都在排气和进气口使用 HEPA 过滤器。Ⅱ级生物安全柜是目前临床分子诊断实验室应用最为广泛的柜型,Ⅱ级生物安全柜的一个独特之处在于经过 HEPA 过滤器过滤的垂直层流气流从安全柜顶部吹下,被称作“下沉气流”,下沉气流不断吹过安全柜工作区域,以保护柜中的试验品不被外界尘埃或细菌污染。按照中华人民共和国医药行业标准《生物安全柜》(YY0569—2005)中的规定,Ⅱ级生物安全柜依照入口气流风速、排气方式和循环方式可分为 4 个级别:A1 型、A2 型、B1 型、B2 型。所有的Ⅱ级生物安全柜都可提供工作人员、环境和样品的三重保护。

Ⅲ级生物安全柜柜体完全气密,100%全排式,工作人员通过连接在柜体的手套进行操作,适用于高风险的病原生物研究,如进行 SARS、埃博拉病毒相关的实验等。

另外,需要了解生物安全柜与通风橱和超净工作台的区别。通风橱和超净工作台不属于生物安全柜,不可使用于涉及微生物材料的实验或生产过程中。通风橱是为在化学实验过程中清除腐蚀性化学气体和有毒烟雾而设计的,不能有效清除微生物介质;放置在通风

橱内的微生物样品会散播到柜外,污染实验室环境。

超净工作台是为了保护试验品或样品而设计的,通过吹过工作区域的空气防止试验品或样品受到工作区域外粉尘或细菌的污染。一旦微生物样品放置于工作区域,层流空气将把带有微生物介质的空气吹向前台工作人员而产生危险。

在临床分子诊断学实验中,被分类为可能涉及或者产生有害生物物质的操作过程都应该在生物安全柜内进行,一般使用Ⅱ级生物安全柜。

五、消毒灭菌设备

临床分子诊断学实验中所用的培养基、试剂、器皿、实验用具等,应严格灭菌。常用的灭菌设备主要包括滤膜过滤器和高压蒸汽灭菌器等。

滤膜过滤器的过滤原理主要是分子筛作用,大于膜孔的颗粒被截留(筛除)在膜的表面,小于膜孔的颗粒通过膜孔。在分子诊断学实验中常用来制备抗生素滤液。

高压蒸汽灭菌器是利用饱和蒸汽对物品进行迅速而可靠的消毒,适用于对医疗器械、敷料、玻璃器皿、培养基等进行消毒灭菌。在使用过程中应注意:灭菌前应先完全排除锅内冷空气,使锅内全部充满水蒸气时,灭菌才能彻底;灭菌后当压力降到零后,才能开盖;培养基要严格遵守保压时间,既要保压彻底,又要防止培养基中的成分变质或效力降低,不能随意延长延长时间。

六、水纯化设备

临床分子诊断学实验中对实验用水的质量要求非常高,器皿经洗净后都需用双蒸水漂洗数次,试剂的配制要求用三蒸水甚至超纯水,这就要求实验室必须配备纯水装置。目前较常用的水纯化装置有石英玻璃双蒸馏器、离子交换器以及超纯水系统等。

石英玻璃双蒸馏器是采用优质石英玻璃制成的,所蒸蒸馏水不与任何金属相接触,经过二次蒸馏所获得的水纯度高,称为双蒸水。使用过程中应注意避免干烧,长时间使用后会产生水垢,这时可用 20% HNO_3 灌进卧式烧瓶内结垢处,浸泡 4 h 后由排水口排出,用自来水冲洗三次,再用去离子水冲三次,即可重新使用。

离子交换器是通过离子的交换实现对水的纯化的。钠离子交换器是用于去除水中钙离子、镁离子,制取软化水的离子交换器。混合床是将阴阳离子交换树脂按一定比例混合装填在离子交换器内,由于混合离子交换后进入水中的 H^+ 与 OH^- 立即生成解离度很低的水分子,可以使交换反应进行得十分彻底。

超纯水系统是采用预处理、反渗透技术、超纯化处理等方法,将水中的导电介质几乎完全去除,又将水中不解离的胶体物质、气体及有机物均去除至很低程度的水处理设备。所得水可用于高效液相色谱(HPLC)、原子吸收及发射光谱、质谱分析等。

七、PCR 仪

简单地说,PCR 就是利用耐热 DNA 聚合酶对特定基因在体外的大量合成。PCR 仪是体外扩增基因最常用的设备,主要由机械自动装置、温度循环系统及附属设备等构成。根据 DNA 扩增的目的和检测的标准,可以将 PCR 仪分为普通 PCR 仪、梯度 PCR 仪、原位 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪等种类。



普通 PCR 仪用于做定性分析和扩增基因片段, 荧光定量 PCR 仪比普通 PCR 仪多了荧光信号采集系统和计算机分析处理系统, 其不仅可对核酸进行扩增, 而且可通过 Taq Man 荧光探针、SYBR Green I 荧光染料等方法对扩增后的样品进行定量测定, 且一次可同时检测数百个样品量, 样品到达阈值水平所经历的循环数称为 Ct 值(限制点的循环数), 可以用来计算未知样品的浓度。

八、紫外观察仪及凝胶成像分析系统

紫外观察仪及凝胶成像分析系统主要用于琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶电泳后结果的观察和记录。

(一) 紫外观察仪

DNA 片段经电泳后肉眼是观察不到的, 经由与溴化乙锭等荧光染料结合, 在紫外灯的照射下会产生荧光, 从而可以利用紫外观察仪进行定性和半定量观察。用于核酸分析的紫外观察仪常采用 254 nm、300 nm、365 nm 等几个波长, 在此波长范围内, DNA 与溴化乙锭结合物对紫外光吸收较强, 从而诱导产生 590 nm 波长的橙红色荧光。产生的荧光强度与 DNA 的数量相关。

(二) 凝胶成像分析系统

通过紫外观察仪只能对凝胶电泳图谱进行观察, 如果需要记录结果, 可以借助凝胶成像分析系统拍摄成像。该系统具有强大的图像采集、检测和分析能力, 可以对 DNA、RNA、蛋白质等电泳凝胶以及各类杂交、放射自显影结果进行拍摄、处理、分析和保存。

九、其他常用仪器设备

(一) 紫外-可见分光光度计

紫外-可见分光光度计广泛应用于临床检验等领域的教学和科研工作中, 特别适合对各种液态物质进行定量及定性分析。其应用于波长范围为 200~400 nm 的紫外光区、400~850 nm 的可见光区。主要由辐射源(光源)、色散系统、检测系统、吸收池、数据处理机、自动记录器及显示器等部件组成。临床分子诊断学实验中常用紫外波长 260 nm、280 nm 检测核酸的含量及纯度。

(二) CO₂ 培养箱

CO₂ 培养箱是通过在培养箱箱体内部模拟形成一个类似细胞或组织在生物体内的生长环境, 如稳定的温度(37 ℃)、稳定的 CO₂ 水平(5%)、恒定的酸碱度(pH7.2~7.4)、较高的相对饱和湿度(95%), 来对细胞或组织进行体外培养的一种装置。其广泛应用于细胞、组织培养和某些特殊微生物的培养。

(三) 分析天平

分析天平是分子诊断学实验中不可缺少的重要仪器, 充分了解仪器性能及熟练掌握其使用方法, 是获得可靠实验结果的保证。分析天平的种类很多, 有普通分析天平、阻尼分析天平及电子分析天平等, 需要根据实验精确度和量程要求的不同进行选择。在使用天平的过程中, 要注意以下几个方面: