



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

分子生物学实验 (第二版)

Molecular Biology Experiments

李 峰 陈姿暄 主编



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

内 容 提 要

本教材分为三部分,共13章:第一部分分为4章,介绍分子生物学实验基础知识,包括实验室规则、实验室安全知识、常用仪器及其使用、常用培养基和抗生素溶液的配制,以及 GenBank 数据库;第二部分介绍分子生物学常用实验技术,从第5章到第10章,含13个实验,分别介绍质粒DNA的提取、酶切、电泳、转化、重组及鉴定、PCR技术、核酸杂交技术、外源基因的表达及分离纯化技术;第三部分为分子生物学综合性、研究性实验,从第11章到第13章,含6个实验。

本教材可供生物类、农学类、食品类、药学类等专业的本科院校师生,科研院所科研人员和企业单位技术人员等使用,也可供其他相关专业的学生选修或自学时参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学实验/李峰,陈姿喧主编.—2版.—武汉:华中科技大学出版社,2022.6
ISBN 978-7-5680-8289-1

I. ①分… II. ①李… ②陈… III. ①分子生物学-实验 IV. ①Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2022)第 082064 号

分子生物学实验(第二版)

Fenzi Shengwuxue Shiyān(Di-er Ban)

李 峰 陈姿喧 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:原色设计

责任校对:刘小雨

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园

邮编:430223

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉科源印刷设计有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10.5

字 数:269千字

版 次:2022年6月第2版第1次印刷

定 价:33.00元



华中大版

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



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

编委会



主任委员

陈向东 武汉大学教授,2018—2022年教育部高等学校大学生物学课程教学指导委员会秘书长,中国微生物学会教学工作委员会主任

副主任委员(排名不分先后)

胡永红 南京工业大学教授,食品与轻工学院院长

李 钰 哈尔滨工业大学教授,生命科学与技术学院院长

卢群伟 华中科技大学教授,生命科学与技术学院副院长

王宜磊 菏泽学院教授,牡丹研究院执行院长

委员(排名不分先后)

| | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 陈大清 | 郭晓农 | 李 宁 | 陆 胤 | 宋运贤 | 王元秀 | 张 明 |
| 陈其新 | 何玉池 | 李先文 | 罗 充 | 孙志宏 | 王 云 | 张 成 |
| 陈姿暄 | 胡仁火 | 李晓莉 | 马三梅 | 涂俊铭 | 卫亚红 | 张向前 |
| 程水明 | 胡位荣 | 李忠芳 | 马 尧 | 王端好 | 吴春红 | 张兴桃 |
| 仇雪梅 | 金松恒 | 梁士楚 | 聂呈荣 | 王锋尖 | 肖厚荣 | 郑永良 |
| 崔韶晖 | 金文闻 | 刘秉儒 | 聂 桓 | 王金亭 | 谢永芳 | 周 浓 |
| 段永红 | 雷 忻 | 刘 虹 | 彭明春 | 王 晶 | 熊 强 | 朱宝长 |
| 范永山 | 李朝霞 | 刘建福 | 屈长青 | 王文强 | 徐建伟 | 朱德艳 |
| 方 俊 | 李充璧 | 刘 杰 | 权春善 | 王文彬 | 闫春财 | 朱长俊 |
| 方尚玲 | 李 峰 | 刘良国 | 邵 晨 | 王秀康 | 曾绍校 | 宗宪春 |
| 冯自立 | 李桂萍 | 刘长海 | 施树良 | 王秀利 | 张 峰 | |
| 耿丽晶 | 李 华 | 刘忠虎 | 施文正 | 王永飞 | 张建新 | |
| 郭立忠 | 李 梅 | 刘宗柱 | 舒坤贤 | 王有武 | 张 龙 | |



普通高等学校“十四五”规划生命科学类创新型特色教材

作者所在院校

(排名不分先后)

- | | | | |
|-----------|----------|------------|----------|
| 北京理工大学 | 华中科技大学 | 云南大学 | 辽宁大学 |
| 广西大学 | 南京工业大学 | 西北农林科技大学 | 燕山大学 |
| 广州大学 | 暨南大学 | 中央民族大学 | 临沂大学 |
| 哈尔滨工业大学 | 首都师范大学 | 郑州大学 | 山西医科大学 |
| 华东师范大学 | 湖北大学 | 新疆大学 | 宁夏大学 |
| 重庆邮电大学 | 湖北工业大学 | 青岛科技大学 | 重庆第二师范学院 |
| 滨州学院 | 湖北第二师范学院 | 青岛农业大学 | 齐鲁理工学院 |
| 河南师范大学 | 湖北工程学院 | 青岛农业大学海都学院 | 六盘水师范学院 |
| 嘉兴学院 | 湖北科技学院 | 山西农业大学 | 河西学院 |
| 武汉轻工大学 | 湖北师范大学 | 陕西科技大学 | 广西贵港工业学院 |
| 长春工业大学 | 汉江师范学院 | 陕西理工大学 | |
| 长治学院 | 湖南农业大学 | 上海海洋大学 | |
| 常熟理工学院 | 湖南文理学院 | 塔里木大学 | |
| 大连大学 | 华侨大学 | 唐山师范学院 | |
| 大连工业大学 | 武昌首义学院 | 天津师范大学 | |
| 大连海洋大学 | 淮北师范大学 | 天津医科大学 | |
| 大连民族大学 | 淮阴工学院 | 西北民族大学 | |
| 大庆师范学院 | 黄冈师范学院 | 北方民族大学 | |
| 佛山科学技术学院 | 惠州学院 | 西南交通大学 | |
| 阜阳师范大学 | 吉林农业科技学院 | 新乡医学院 | |
| 广东第二师范学院 | 集美大学 | 信阳师范学院 | |
| 广东石油化工学院 | 济南大学 | 延安大学 | |
| 广西师范大学 | 佳木斯大学 | 盐城工学院 | |
| 贵州师范大学 | 江汉大学 | 云南农业大学 | |
| 哈尔滨师范大学 | 江苏大学 | 肇庆学院 | |
| 合肥学院 | 江西科技师范大学 | 福建农林大学 | |
| 河北大学 | 荆楚理工学院 | 浙江农林大学 | |
| 河北经贸大学 | 南京晓庄学院 | 浙江师范大学 | |
| 河北科技大学 | 辽东学院 | 浙江树人学院 | |
| 河南科技大学 | 锦州医科大学 | 浙江中医药大学 | |
| 河南科技学院 | 聊城大学 | 郑州轻工业大学 | |
| 河南农业大学 | 聊城大学东昌学院 | 中国海洋大学 | |
| 石河子大学 | 牡丹江师范学院 | 中南民族大学 | |
| 菏泽学院 | 内蒙古民族大学 | 重庆工商大学 | |
| 贺州学院 | 仲恺农业工程学院 | 重庆三峡学院 | |
| 黑龙江八一农垦大学 | 宿州学院 | 重庆文理学院 | |

第二版前言

随着分子生物学实验技术的迅速发展,生命科学在理论与应用上都取得了惊人的进展。分子生物学实验技术逐渐系统化,现已成为生命科学各领域研究的常规技术。

在十几所本科院校和华中科技大学出版社的大力支持和帮助下,我们编写了这本《分子生物学实验》。为适应创新人才培养要求,我们在实验教学中进行了大量的改革,并体现在教材中。本教材第一版出版后,被全国多所高校选为实验教材,得到任课教师和读者的好评。同时,他们对不足之处也提出了很多宝贵意见。在第一版的基础上,我们对部分内容进行了更新和完善,并新增了一些实验项目。

本教材分三部分,共 13 章:第一部分分为 4 章,介绍分子生物学实验基础知识,包括实验室规则、实验室安全知识、常用仪器及其使用、常用培养基和抗生素溶液的配制,以及 Gen-Bank 数据库;第二部分介绍分子生物学常用实验技术,从第 5 章到第 10 章,含 13 个实验,分别介绍质粒 DNA 的提取、酶切、电泳、转化、重组及鉴定、PCR 技术、核酸杂交技术、外源基因的表达及分离纯化技术;第三部分为分子生物学综合性、研究性实验,从第 11 章到第 13 章,含 6 个实验。本教材部分实验项目的设置体现了编者所在高校开设的分子生物学实验特色。通过分子生物学实验,系统培养学生在分子生物学方面的基本技术和技能;通过学生的独立实验设计和实践,培养学生的创新思维和独立分析问题、解决问题的能力。

参加本次教材编写的有:湖南文理学院的李峰、李荣、张运生、郝小花,北京理工大学陈姿喧,大连海洋大学王秀丽,哈尔滨工业大学刘川鹏,宁夏大学罗仍卓么、王兴平,长治学院雷海英,宿州学院冯凡,辽宁大学杨哲,塔里木大学王有武,山西农业大学段永红。另外,淮阴工学院贾建波、孙金凤,唐山师范学院范永山、张运峰,北京理工大学马宏,河南科技大学侯典云,重庆邮电大学何晓红,陕西科技大学李红心,嘉兴学院朱长俊参与了第一版的编写工作,在此表示衷心的感谢。

本教材可供生物类、农学类、食品类、药学类等专业的本科院校师生,科研院所科研人员和企事业单位技术人员等使用,也可供其他相关专业的学生选修或自学时参考。

第二版教材虽然经编者认真勘校,还是会存在某些不妥之处,敬请同行及广大读者批评指正。

编者

2022 年 2 月

目 录

第一部分 分子生物学实验基础知识 /1

第1章 分子生物学实验室规则和安全 /2

- 1.1 实验室一般规则 /2
- 1.2 实验室常识 /2
- 1.3 实验室安全基础知识 /3
- 1.4 实验室合理设计和布局 /4
- 1.5 实验室急救 /4
- 1.6 废弃物、放射性物质及有毒物质的处理 /5

第2章 分子生物学实验常用仪器设备及其操作 /7

- 2.1 分子生物学实验常用仪器设备 /7
- 2.2 冷冻离心机 /8
- 2.3 电泳仪 /9
- 2.4 分析天平 /10
- 2.5 分光光度计 /10
- 2.6 数字式酸度计 /11
- 2.7 普通 PCR 仪 /12
- 2.8 实时荧光定量 PCR 仪 /13
- 2.9 凝胶成像系统 /14
- 2.10 多功能微孔板酶标仪 /15
- 2.11 摇床 /16
- 2.12 水的净化装置 /16
- 2.13 消毒设备 /17

第3章 细菌培养常用培养基和抗生素溶液的配制方法 /19

- 3.1 常用培养基的配制方法 /19
- 3.2 常用抗生素溶液的配制方法 /20

第4章 GenBank 数据库简介 /22

- 4.1 概述 /22
- 4.2 GenBank 的建立与发展 /23

- 4.3 GenBank 数据库结构 /25
- 4.4 基因基本信息检索 /29
- 4.5 GenBank 在分子生物学中的应用 /30

第二部分 分子生物学常用实验技术 /35

第5章 核酸的制备 /36

- 5.1 核酸制备的原理与方法 /36
- 5.2 质粒的生物学特性 /39
- 5.3 常用克隆载体的特征 /41
- 实验1 真核生物基因组 DNA 提取 /42
- 实验2 总 RNA 的提取及鉴定 /44
- 实验3 质粒 DNA 的微量提取和鉴定 /48

第6章 DNA 的酶切和凝胶电泳 /51

- 6.1 限制性核酸内切酶的特性及应用 /51
- 6.2 琼脂糖凝胶电泳 /53
- 6.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 /55
- 实验4 DNA 的限制性核酸内切酶酶切及凝胶电泳 /57

第7章 DNA 转化 /61

- 7.1 感受态细胞的制备 /61
- 7.2 转化 /61
- 实验5 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化 /63

第8章 DNA 重组的基本流程和方法 /68

- 8.1 目的基因的获取 /68
- 8.2 DNA 分子的体外重组 /69
- 8.3 DNA 重组体的导入 /70
- 8.4 受体细胞的筛选 /72
- 8.5 基因表达 /73
- 实验6 DNA 片段的黏性末端连接法 /74
- 实验7 DNA 片段的黏-平端连接法 /75
- 实验8 重组子的筛选与鉴定 /77

第9章 聚合酶链式反应技术 /80

- 9.1 常规 PCR 技术的原理及操作 /80
- 9.2 引物设计原则及合成 /84
- 9.3 PCR 产物的纯化与鉴定 /85
- 9.4 PCR 技术的延伸及应用 /87

实验 9 PCR 扩增特异性 DNA 片段及扩增产物的纯化与鉴定 /91

实验 10 实时荧光定量 PCR 技术检测基因的表达量 /93

第 10 章 核酸杂交技术 /98

10.1 几种核酸探针标记方法 /98

10.2 核酸探针制备和纯化技术 /101

实验 11 核酸探针制备和纯化 /109

实验 12 菌落原位杂交法 /112

实验 13 miRNA 原位杂交 /114

第三部分 分子生物学综合性、研究性实验 /117

第 11 章 外源基因的表达 /118

11.1 外源基因在原核生物中的表达 /118

11.2 外源基因在酵母细胞中的表达 /125

实验 14 外源基因在大肠杆菌中的诱导表达 /130

实验 15 SDS-PAGE 电泳检测表达的外源蛋白 /131

实验 16 脂肪酶基因在枯草杆菌中表达及表达产物的研究 /133

实验 17 外源基因在酵母细胞中表达及表达产物的研究 /135

第 12 章 利用分子生物学技术进行细菌的种属鉴定 /137

12.1 微生物分类鉴定方法的发展 /137

12.2 16S rDNA 分类鉴定技术的原理 /138

实验 18 利用 16S rDNA 序列分析技术进行细菌种属的鉴定 /139

第 13 章 基因表达差异的分析 /144

13.1 差减杂交 /144

13.2 mRNA 差异显示反转录 PCR /145

13.3 cDNA 代表性差异分析 /145

13.4 抑制消减杂交方法 /146

实验 19 半定量 RT-PCR 技术检测基因的表达差异 /147

附录 /152

附录 A 常用单位及换算方法 /152

附录 B 常用核酸、蛋白质换算数据 /152

附录 C 核酸的单位及有关数据 /153

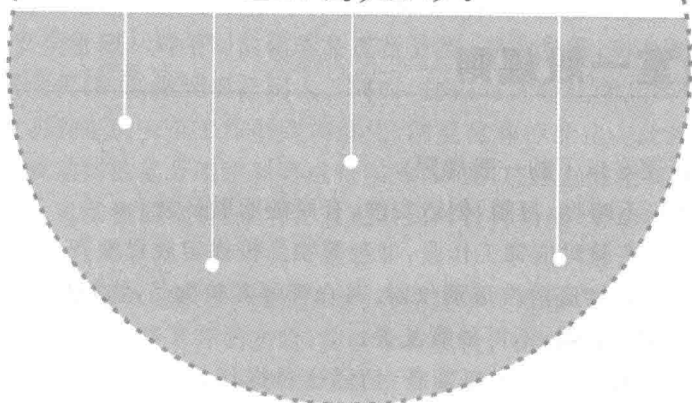
附录 D 常见核酸分子的长度和相对分子质量 /153

附录 E 色素在聚丙烯酰胺凝胶中的移动参数 /154

参考文献 /155

第一部分

分子生物学实验 基础知识



分子生物学飞速发展,分子生物学相关的理论和技术已深入生命科学的各个领域,一些常用的技术,如基因组 DNA 的分离纯化、质粒 DNA 的抽提及纯化、RNA 的提取、PCR 扩增、Southern 杂交等成为分子生物学研究的强有力工具,对分子生物学的发展起了巨大的推动作用。然而,这些实验操作技术涉及氯仿、DEPC(diethylprocarbonate,二乙基焦碳酸酯、焦碳酸二乙酯)、同位素等有毒有害或具放射性的物质,对环境和人身安全造成威胁。因此,有必要弄清这些有害有毒或具放射性的物质的危害,加强实验室安全管理,建立良好的制度和处理方案,以保证分子生物学实验室良好运行。

1.1 实验室一般规则

在实验室内应遵守以下的一般规则:

- (1) 保持肃静。不喧哗、打闹,创造安静、有序的实验环境。
- (2) 保持整洁。实验时应穿工作服,书包等物品按规定放置整齐,不随地吐痰。实验结束后,清洁器材和工作台,彻底清洗玻璃仪器、离心管等实验物品,物归原处,实验废弃物(如火柴棒、滤纸等)应放入指定容器,不得随意乱丢。
- (3) 严格操作。认真预习,做好准备,切忌盲目操作,以提高效率。实验时严格遵守操作规程,仔细观察,做好记录,认真书写实验报告,不合格者必须重写。吸头、滴管等专用专放,以防交叉污染。使用仪器时必须在教师指导下进行,不得随意乱动。使用微量移液器前,必须熟读其使用方法。玻璃仪器应轻拿轻放。
- (4) 注意节约。爱护器材,节约试剂、水电,防止浪费。无故损坏酌情赔偿。
- (5) 保证安全。室内严禁吸烟。加热时,管口不能对着人。使用危险有毒物品时严格要求操作,使用放射性物质时应注意防护和防止污染。如有意外,立即报告实验指导教师和管理人员。实验完毕,做好实验台面和地面的清洁卫生,关好门、窗、水、电等。

1.2 实验室常识

(1) 使用贵重仪器如分析天平、分光光度计、离心机、微量移液器等,应十分谨慎,备加爱护,使用前应熟知其使用方法。若有问题随时请教指导教师。使用时,要严格遵守操作规程,如遇试剂溅污仪器应及时用洁净纱布擦拭。发生故障时,应立即关机,告知实验管理人员,不

得擅自拆修。

(2) 凡有挥发性物质、烟雾、有毒和有异味气体产生的实验,均应在通风橱内进行。用后试剂严密封口,尽量缩短操作时间,减少外泄,操作者最好戴口罩、手套。凡见光易变质的试剂,应用棕色瓶贮存,或用黑纸包裹,或每次少量配制。

(3) 配制试剂时,应了解试剂纯度、相对分子质量等特性。用过的器皿应及时用自来水浸泡,以便于清洗和减少对器皿的侵蚀。取用试剂或溶液后,需立即将瓶盖盖严,并放回原处。取出的试剂或溶液,如未用尽,切勿倒回瓶内,以免掺混。

(4) 称量试剂时,应用称量纸,不可用滤纸,标签上要写明试剂名称、规格、浓度、配制日期及配制人,标签应贴在试剂瓶 2/3 高度处。

(5) 洗净的器皿应倒置在架上,让其自然干燥,不能用抹布擦拭。

1.3 实验室安全基础知识

分子生物学实验室里,化学试剂种类繁多且成分复杂,实验人员经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧或有爆炸性的化学药品及传染性细菌或病毒等接触,如果处理不好、管理不善,就会对实验人员和环境造成危害。因此,必须十分重视安全工作。应完善实验室安全制度,加强分子生物学实验室的安全管理。对不同的化学品进行分类,专人专管,对易燃、剧毒物品应有领用管理办法,签订安全责任书,做到责任到人。同时,加强对危险化学品的购买、运输、贮存和使用的监督管理,使实验室的安全工作做到规范化、制度化和标准化。此外,分子生物学实验中,经常用整只动物或动物的部分组织器官进行实验,因此,应建立健全实验动物的临时饲喂、管理和死后处理制度,对动物的食物、排泄物及毛发及时进行处理,对动物的抓咬、逃逸等也应有严格的管理规定。

进入同位素室前先穿铅衣,戴上一次性手套,再用盖革计数器将可能污染的物品全部检查一遍,在确保没有放射源的情况下开始实验;实验中有氯仿、四氯化碳等有毒的挥发性气体时,必须在通风橱里进行操作等。设计实验时要尽量选择无公害、低毒品做实验,实验残液、残渣要少,要可回收,以减少污染,保护环境。

(1) 严格执行《实验室生物安全通用要求》(GB 19489—2008)。该国家标准对生物安全分级、实验室设施设备的配置、个人防护和实验室安全行为等方面进行了规定,要求生物工作者严格按不同等级水平和评价标准进行操作。

(2) 了解电闸、水阀等所在处,离开实验室时,一定要将室内检查一遍,将水、电等关好,将门、窗锁好。

(3) 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴锅、离心机、电泳仪等)时,严防触电,绝不可用湿手或在眼睛旁视时操作电闸或电器开关。检查电器设备是否漏电时,应将手背轻轻触及仪器表面,凡是漏电的仪器,一律不能使用。

(4) 使用高压灭菌锅时,不得离人。易燃易爆、腐蚀有毒的试剂绝不能放在高压灭菌锅内灭菌,以防爆炸,造成人身伤亡。

(5) 使用可燃物,特别是易燃物(如乙醚、丙酮、乙醇等)时,应特别小心。如果不慎溅出少量的易燃液体,应按如下法处理:立即关闭室内所有的电源和电加热器;打开门和窗户;用毛巾或抹布擦拭溅出的液体,并将回收的液体拧入大口的容器中,然后倒入带塞的玻璃缸内。在超净

工作台操作时,手用乙醇擦拭后,须晾干后,才能点燃酒精灯,防止烧伤。

(6) 凡使用腐蚀性试剂(如浓酸、浓碱等),必须谨慎操作,防止溅出。对于挥发性酸,应在通风橱内操作,同时在下面放一托盘,一旦洒出,立即用大量自来水冲洗。若溅在实验台上或地面上,必须及时用湿抹布或拖布反复擦洗干净,不得留痕迹。

(7) 紫外光可损伤眼视网膜,紫外光也是诱变剂和致癌的。因此,切勿用裸眼观察紫外光和使用没有防护装置的紫外光源。在紫外光下操作时要戴合适的防护手套。

(8) 氨苄青霉素可因吸入、咽下或皮肤吸收而危害健康。操作时戴合适的手套和安全眼镜,并在通风橱内操作。

(9) 废液,特别是强酸、强碱,不能直接倒在水池中。应先稀释,然后倒入水池,再用大量自来水冲洗水池及下水道。

(10) 有毒物品应按实验室的规定办理审批手续后方可领取,使用时严格操作,用后妥善处理。

(11) 所有微生物培养物均不可以以活菌形式直接倒入下水道排放,须经灭活处理。

1.4 实验室合理设计和布局

实验室的布局是实验室安全的一个重要环节。因此,对实验室应进行合理布局,划分专用的功能区,规定人员物品移动路线,控制进、出通道等。同时,确保实验动物不能逃逸,非实验室动物(野鼠、昆虫等)不能进入,实验室内仪器的摆放要既合理又方便操作。对实验室废液应根据其性质选择适宜的有明显标记的容器和存放地点,密闭保存。同位素室设于人员活动较少、较偏的房间,并由专人负责管理。核酸电泳时要用到溴化乙锭(ethidium bromide, EB)进行染色,因此,电泳室要设于相对偏僻且方便的单间。进行电泳操作时,要防止 EB 扩散,一只手戴一次性手套,接触 EB 区,另一只手接触无 EB 的器皿(如微波炉、电泳仪、冰箱等)。

1.5 实验室急救

在实验过程中不慎发生意外事故时,不要惊慌,应立即采取急救措施。

(1) 触电。立即关闭电源;用干木棍将导线与被害者分开;将被害者移至木板上,与地面分离;急救者应做好防触电安全措施,手和脚必须有绝缘保护。

(2) 火灾。先将电源关闭,移走一切易燃物品,并迅速将火扑灭。根据火势大小,可采用湿抹布、湿工作服、沙土、灭火器、消防水龙头等灭火。但应注意,起火之物不能与水混合者(如汽油、乙醚等)因能浮于水面,扩大燃烧面积,故不能用水灭火。即便是能与水混合者(如乙醇),能否用水灭火,要视其量的多少而定。酒精灯倾倒是着火时,可用湿抹布覆盖阻隔氧气灭火。衣服着火时,切勿奔跑,以免火势加剧,可就地打滚压住着火部位,再用水浇灭。

(3) 烫伤。一般用乙醇消毒,然后涂 2% 苦味酸溶液或 5% 鞣酸溶液,用冰袋敷。若皮肤起泡,不要弄破水疱,防止感染。对于烧伤严重者,应用无菌纱布敷好伤口后,急送医院处理。

(4) 玻璃割伤或其他器械损伤。首先必须检查伤口内有无玻璃或金属碎片,然后用硼酸溶液洗净,再涂上碘酒,必要时用无菌纱布包扎。若伤口较大或较深而大量出血,应迅速采取

止血措施,同时送医院急救。

(5) 灼伤皮肤。强碱:先用大量自来水冲洗,再用5%硼酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。强酸、溴:先用大量自来水冲洗,再用5%碳酸氢钠溶液、5%氨水洗涤。苯酚:创面用75%乙醇擦洗至无酚味,再用浸过甘油、聚乙二醇、聚乙二醇和乙醇混合液的棉花擦洗10~15 min,用硫酸钠饱和溶液、5%碳酸氢钠溶液湿敷1 h,然后用水冲洗。严重者需送医院处理。

1.6 废弃物、放射性物质及有毒物质的处理

1.6.1 实验耗材和生物材料的处理

实验中废弃的吸头、离心管、手套、试管等定期灭菌后,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。实验中废弃的活性生物材料,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。

1.6.2 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,在分子生物学实验室应用普遍,但由于放射性物质的辐射会给人体造成损伤,如果使用不当或操作不规范,会造成环境污染,甚至损害人员健康。在进行放射性同位素操作时一定要注意个人防护,包括使用专用衣帽手套及防护背心、挡板等。针对放射性物质的污染进行安全性教育,实行责任到人,对放射性物质实行统一保管、集中存放、集中处理。在订购放射性物质时,根据需要量安排。 α - ^{31}P 半衰期为14.5天,在Southern杂交中应用较广,是危害较大的放射性物质。DNA杂交时,在探针标记、洗膜等几个阶段都涉及放射性物质。对含 α - ^{31}P 的固体废物,放入铁皮箱10个半衰期(约半年)后埋到指定的地点;对于 α - ^{31}P 浓度较高的液体废物(如首次洗膜液),在厚实的塑料桶放置8个半衰期后倒入专用的下水道; α - ^{31}P 浓度较低的液体废物(如二、三次洗膜液),则直接倒入专用的下水道。

1.6.3 常见的有毒物质的处理

对于溴化乙锭、Trizol、DEPC、氯仿、丙烯酰胺、二甲亚砷、十二烷基硫酸钠等毒性高、环境危害大的物质,分类收集后统一处理。

(1) 溴化乙锭(EB):EB是一种强烈诱变剂并有中度毒性,应戴手套操作。对于含有EB的溶液,不应直接倒入下水道,用后应妥善净化处理。对EB含量大于 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,先用水稀释至EB浓度在 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下,每100 mL溶液加入100 mg活性炭,不时轻轻摇荡混匀,室温下放置1 h,用滤纸过滤,将活性炭与滤纸密封在塑料袋中作为有害废物丢弃。或用专用一次性染料清除袋吸附过夜,再焚烧袋子即可。EB接触物,如抹布、吸头等应埋入地下。

(2) Trizol:提取组织和细胞RNA的一种重要试剂。在提取RNA时一定要在通风橱进行。如皮肤接触Trizol,应立即用大量去垢剂和水冲洗,将废液埋入地下。

(3) DEPC:RNA 酶的强抑制剂,一种潜在的致癌物质。操作时戴口罩,在通风橱中进行。沾到手上时立即冲洗,废液通过废液道排放。

(4) 氯仿(chloroform, CHCl_3):常用于 DNA 和 RNA 提取,对皮肤、眼睛、黏膜和呼吸道有强烈的刺激作用和腐蚀性,易损害肝和肾。操作时戴手套在通风橱里进行,废液收集后埋入地下。

(5) 丙烯酰胺(acrylamide):DNA 测序、SSR 及蛋白质分离等技术中作为电泳支持物,具神经毒性,聚合后毒性消失。操作时戴手套在通风橱内进行。聚丙烯酰胺凝胶没有毒性,可随普通垃圾一起扔掉,千万不要倒入下水道。

(6) 二甲亚砜(DMSO):一种既溶于水又溶于有机溶剂的非质子极性溶剂,常用作细胞的冻存液和用于配制 AS。皮肤沾上之后用大量的水洗及 1%~5%氨水洗涤。

(7) 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS):有毒,易损害眼睛。质粒提取时作为裂解液破坏细胞膜,Southern 杂交时用作洗膜液中的去垢剂。操作时戴合适的手套和安全护目镜,不要吸入其粉末。

2.1 分子生物学实验常用仪器设备

分子生物学实验常用仪器设备如下：

- (1) 超声波破碎仪；
- (2) 垂直混合仪；
- (3) 紫外光灯(BIO-RAD,或类似的简易验钞灯)；
- (4) 小型高速离心机、冷冻离心机；
- (5) 电泳仪；
- (6) 水平板电泳系统(电泳槽、梳子、灌胶盒等)；
- (7) 垂直板电泳系统(电泳槽、梳子、灌胶架等)；
- (8) 凝胶转印系统(凝胶转移夹、海绵垫等)；
- (9) 紫外分析仪或凝胶成像系统；
- (10) 摇床；
- (11) 微波炉；
- (12) 高压灭菌锅；
- (13) 恒温水浴锅；
- (14) 恒温培养箱；
- (15) 旋涡混合器；
- (16) 恒温振荡培养箱；
- (17) 冰箱；
- (18) 制冰机；
- (19) 可调式移液管(10 μL 、200 μL 、1000 μL ,每组 1 套)；
- (20) 带盖小塑料盒；
- (21) 搪瓷盘；
- (22) 分析天平；
- (23) 分光光度计；
- (24) 数字式酸度计；
- (25) PCR 仪；
- (26) 水的净化装置。

2.2 冷冻离心机

低温离心技术是分子生物学研究中必不可少的手段。基因片段的分离、蛋白质的沉淀和回收以及其他生物样品的分离制备实验中都离不开低温离心技术,因此冷冻离心机成为分子生物学研究中必备的重要仪器。在国内,有多个厂家生产冷冻离心机。

1. 安装与调试

离心机应放置在水平、坚固的地面上,四周留空至少 10 cm 且处于良好的通风环境中,周围空气应呈中性,且无导电性灰尘、易燃气体和腐蚀性气体,环境温度应在 0~30 ℃,相对湿度小于 80%。试转前应先打开门盖,用手盘动转轴,确认轻巧灵活、无异常现象方可装上所用的转子。转子准确到位后打开电源开关,然后用手按住门盖开关,再按运转键,转动后立即停止,并观察转轴的转向,若逆时针旋转即为正确,机器可投入使用。

2. 操作程序

(1) 插上电源,待机指示灯亮;打开电源开关,调速与定时系统的数码管显示的闪烁数字为机器工作转速的出厂设定值,温控系统的数码管显示此时离心腔的温度。

(2) 设定机器的工作参数,如工作温度、运转时间、工作转速等。

(3) 将预先平衡好的样品放置于转头样品架上,关闭门盖。

(4) 按控制面板的运转键,离心机开始运转。在预先设定的加速时间内,其转速升至预先设定的值。

(5) 在预先设定的运转时间(不包括减速时间)内,离心机开始减速,其转速在预先设定的减速时间内降至零。

(6) 按控制面板上的停止键,数码管显示“dedT”,数秒钟后即显示闪烁的转速值,这时机器已准备好下一次工作。

3. 注意事项

(1) 离心机应始终处于水平位置,外接电源系统的电压要匹配,并要求接地良好。机器不使用时,要拔掉电源插头。

(2) 开机前应检查转头安装是否牢固,机腔中是否有异物掉入。

(3) 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。

(4) 挥发性或腐蚀性液体离心时,应使用带盖的离心管,并确保液体不外漏,以免腐蚀机腔或造成事故。

(5) 除工作温度、运转速度和运转时间外,不要随意更改机器的工作参数,以免影响机器性能。转速设定值不得超过最高转速,以确保机器安全运转。

(6) 使用中如出现 0.00 或其他数字,机器不运转,应关机断电,10 s 后重新开机,待显示所设转速后,再按运转键,机器将照常运转。

(7) 不得在机器运转过程中或转子未停稳的情况下打开门盖,以免发生事故。

(8) 每次操作完毕,应打开盖子,擦干冷凝水滴后再关上盖子。做好使用情况记录,并定期对机器各项性能进行测试。

2.3 电泳仪

电泳技术是分子生物学研究不可缺少的重要手段。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,如等速电泳、密度梯度电泳及显微电泳等,这类电泳目前已很少使用。区带电泳需用各种类型的物质作为支持物,常用的支持物有滤纸、乙酸钠纤维素薄膜、非凝胶性支持物、凝胶性支持物及硅胶-G薄层等,分子生物学实验中最常用的是琼脂糖凝胶电泳。应用电泳法可以对不同物质进行定性或半定量分析,将一定混合物进行组分分析或提取制备单个组分。下面以DYY-12型电脑三恒多用电泳仪为例介绍其使用方法。

1. 使用方法

(1) 按电源开关,显示屏出现“欢迎使用DYY-12型电脑三恒多用电泳仪”等字样,同时系统初始化,蜂鸣4声,屏幕转换成参数设置状态:

| | | | | | | |
|----|-------|----|-------|--|-------|-----|
| U: | 0 V | U= | 100 V | | Mode: | STD |
| I: | 0 mA | I= | 50 mA | | | |
| P: | 0 W | P= | 50 W | | | |
| T: | 00:00 | T= | 01:00 | | | |

其中:左侧部分为电泳时实际值;中间部分显示程序的常设值(预置值)。Mode(模式)选项为:STD(标准);TIME(定时);VH(伏时);STEP(分步)。

(2) 设置工作程序。用键盘输入新的工作程序。例如,要求工作电压 $U=1000$ V,电流 I 限制在 200 mA以下,功率 P 限制在 100 W以下,时间 T 为3小时20分,并且到时间自动停止输出。操作步骤如下:

①按模式(Mode)键,将工作模式由标准(STD)转为定时(TIME)模式。每按一下模式键,其工作方式按下列顺序改变:STD→TIME→VH→STEP→STD。

②先设置电压 U ,按“选择”键,先使“U”反显,然后输入数字键即可设置该参数的数值。按数字“1000”,电压即设置完成。

③设置电流 I ,按“选择”键,先使“I”反显,然后输入数字“200”。

④设置功率 P ,按“选择”键,先使“P”反显,然后输入数字“100”。

⑤设置时间 T ,按“选择”键,先使“T”反显,然后输入数字“320”。如果输入错误,可以按“清除”键,再重新输入。

⑥确认各参数无误后,按“启动”键,启动电泳仪输出程序。在显示屏状态栏中显示“Start!”并蜂鸣4声,提醒操作者电泳仪将输出高电压,注意安全。之后逐渐将输出电压升至设置值。同时在状态栏中显示“Run”,并有两个不断闪烁的高压符号,表示端口已有电压输出。在状态栏最下方,显示实际的工作时间(精确到秒)。

⑦每次启动输出时,仪器自动将此时的设置数值存入“MO”号存储单元。以后需要调用时,可以按“读取”键,再按“0”键、“确定”键,即可将上次设置的工作程序取出执行。

⑧电泳结束,仪器显示“END”,并连续蜂鸣提醒。此时按任一键可止鸣。

2. 注意事项

(1) U 、 I 、 P 三个参数的有效输入范围如下: U 为 $5\sim 3000$ V; I 为 $4\sim 400$ mA; P 为 $4\sim 400$ W。