

分子生物学实验技术

分子生物学实验安全准则及基础知识

任课教师：郝军莉

生物技术实验教学中心

内容介绍



- 1. 分子生物学发展史简介**
- 2. 分子生物学实验安全常识**
 - 2.1 实验室电、气、水、火
 - 2.2 化学试剂的安全使用
 - 2.3 放射性物质的安全使用
 - 2.4 紫外线辐射的危害及防护
- 3. 分子生物学实验安排**
- 4. 常见仪器使用方法**

分子生物学实验技术发展简史

- 20年代** 微量分析技术发现了维生素、激酶和辅酶。
- 30年代** 电子显微镜的发明使我们能够看到细胞的内部结果和生物大分子的内部结构。
- 40年代** 层析技术大发展，“电泳技术”由瑞典著名科学家 **Tisellius** 所奠基，开创了电泳技术新时代。
- 50年代** “放射性同位素示踪技术”阐明了生物化学代谢过程，**1953年DNA双螺旋**的发现开创分子生物学新时代。
- 60年代** 各种仪器分析方法用于生物化学研究，取得了很大进展。
- 70年代** 限制性内切酶的发现和纯化实现了**DNA**分子的重组。
- 80-90年代** **Sanger**和美国哈佛大学的**Gilbert**分别设计了两种**DNA**分子内核苷酸序列的测定方法，而与**Berg**共获诺贝尔化学奖。

分子生物学实验安全常识



❖ 2.1 实验室电、气、水、火



➤ **维修**：仪器出现故障时，应切断电源，立即向实验室负责人报告。维修仪器时必须切断电源，方可拆机修理。

➤ **电灯**：进入实验室，有需要时打开电源开关、排气扇；离开实验室时若无人请关闭电灯及排气扇。

➤ **空调**：进入实验室，有需要时可打开空调，温度不得低于27℃；每天下班时实验室负责人将关闭空调。若在非上班时间内打开空调，离开时请关闭！

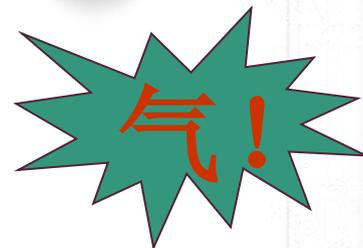
危险

节约

分子生物学实验安全常识



❖ 2.1 实验室电、气、水、火



- **搬运**：搬运或转动钢瓶时，不得用手执着开关阀移动。
- **使用**：按气瓶的类别选用减压器，安装时螺扣应拧紧，并检漏。
开启钢瓶：逆时针方向为开；先开总阀，后开减压阀。
关闭钢瓶：顺时针方向为关；先关总阀，后关减压阀。
气嘴保护：用死扳手夹紧气嘴后再开总阀。
- **安全**：气瓶内的气体不可用尽。
惰性气体：应剩余**0.05MPa**以上压力的气体。
可燃气体：应剩余**0.2Mpa**以上压力的气体。
氢气：应剩余**2.0MPa**以上压力的气体。
- **存放**：分类分处存放
直立放置时要稳妥；气瓶要远离热源；避免曝晒和强烈振动；
一般实验室内存放气瓶量不得超过两瓶。
氢气瓶和氧气瓶不能同存一处。

分子生物学实验安全常识



❖ 2.1 实验室电、气、水、火

- 上 水：水龙头或水管漏水时，应及时向实验室负责人报告，以便及时维修。
- 下 水：水池内不得倒入培养基、琼脂糖胶等凝胶物质；清洗废液缸时请注意将其中的固体物质倒入到垃圾桶后才能冲洗，特别是tip和eppendorf管。下水道排水不畅时，应及时向实验室负责人报告，以便及时疏通。
- 纯净水：应按照“操作规程”进行操作；取水时应注意及时地关闭取水开关，防止溢流。

分子生物学实验安全常识



❖ 2.1 实验室电、气、水、火

报警：119（说明火源、火情、单位名称、地理位置，或明显标志）

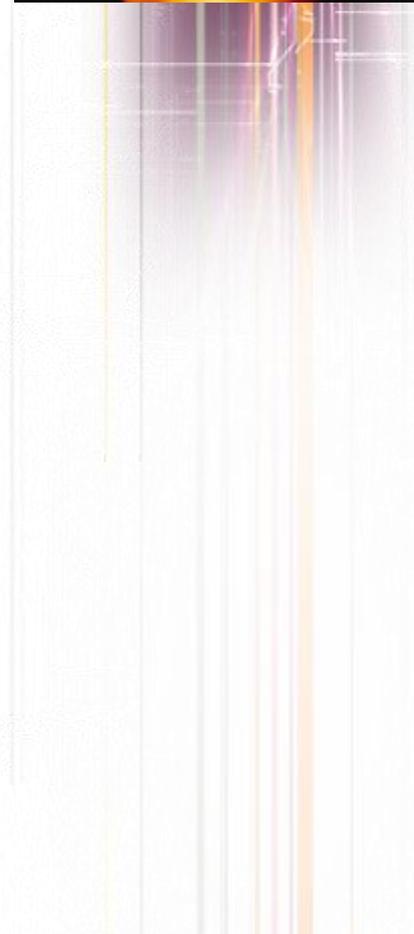
π 措施：早发现、早处理、早报告

π 灭火：● 学会使用灭火器（一拔、二握、三瞄、四扫）

- 沉着、冷静
- 易燃固体、易燃气体、易燃液体和带电物体着火时，可用干粉灭火器灭火；
- 导线或电器着火时，应先断电，再用干粉灭火器灭火。切不可用泡沫灭火器，此灭火器导电。
- 衣服着火时，应尽快地脱掉衣服，并用水灭火。或就地滚动，切忌外跑。

防火：火灾不能预期、不能杜绝、只能预防

- 消除火灾隐患（电、火、气、试剂）
- 备逃生四件宝（灭火器、绳、手电筒、防毒面具）





❖ 2.2 化学试剂的安全使用

总原则：

药品状态定口径，瓶塞取决酸碱性；
受热见光易分解，存放低温棕色瓶；
特殊试剂特殊放，互不反应要记清。

- 标识：自配试剂应贴标签，并注明化合物名称、浓度、配制日期，以及配制人姓名。



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

- **易燃易爆 化学试剂**：一般将闪点在 25°C 以下的化学试剂列入易燃化学试剂，它们多是极易挥发的液体，遇明火即可燃烧。
- **有毒 化学试剂**：以较小剂量进入人体而导致疾病或死亡的才被划为有毒物质。
- **腐蚀性 化学试剂**：化学试剂碰到皮肤、粘膜、眼、呼吸器官都有及时清洗，如各种酸和碱、溴、苯酚等。
- **强氧化性 化学试剂**：包括过氧化物和含有强氧化能力的含氧酸及其盐，如硝酸铵、高氯酸及其盐、重铬酸及其盐等。
- **放射性 化学试剂**：同位素示踪技术的发展，广泛应用于生物化学与分子生物学。由于其特殊性，**该种试剂不得带入公共实验室，在各自实验室进行专项管理或者由学院进行统一管理。**
- **不相容 化学试剂**：一些化学试剂在储存和操作过程中不能与其他物质接触，否则就发生爆炸，这些化学试剂称为不相容化学试剂。如：叠氮化物通常用作溶液中的抗菌剂，由于轻微碰撞就可能造成叠氮化铜的爆炸，因此不能与铜接触（如污水管及管道设施）。



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

EB

EB是一种强诱变剂（可能造成遗传性危害），直接接触有中等毒性。**EB**可以通过皮肤吸收，因此应当避免一切与**EB**的直接接触。**EB**对皮肤，眼睛，口腔和上呼吸道系统有刺激性作用。应将**EB**安全密封，并密闭存放于干燥避光处。

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**，请立即用大量去垢剂和水冲洗，废液埋入地下。



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

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。沾到手上立即冲洗，废液通过废液道排泄。

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。

DNA、蛋白质分离等技术中作**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，聚合后的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。

DEPC
(Diethylprocarbonate)
(二乙基焦碳酸酯)

CHCl₃
(Chloroform, 氯仿)

Acrylamide
(丙烯酰胺)



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

DMSO (二甲亚砜)

是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。皮肤沾上之后用大量的水洗及1%~5%稀氨水洗涤。

十二烷基硫酸钠(SDS)

有毒，易损害眼睛。质粒提取时作裂解液破坏细胞膜和Southern杂交时的洗膜液中的去垢剂。戴合适的手套和安全护目镜，不要吸入其粉末。

TEMED

强神经毒性，防止误吸，操作时快速，存放时密封。



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

很强的还原剂，散发难闻的气味。可因吸入、咽下或皮肤吸收而危害健康。当使用固体或高浓度储存液时，戴手套和护目镜，在通风橱中操作。

一种高强度毒性的胆碱酯酶抑制剂。它对呼吸道黏膜、眼睛和皮肤有非常大的破坏性。可因吸入、咽下或皮肤吸收而致命。戴合适的手套和安全眼镜，始终在化学通风橱里使用。在接触到的情况下，要立即用大量的水冲洗眼睛或皮肤，已污染的工作服作为有害废物处理

引起严重的眼睛刺激和灼伤。可因吸入、咽下或皮肤吸收而受害。戴合适的手套和护目镜。

DTT
二硫苏糖醇

PMSF
苯甲基磺酰氟

Triton X-100



❖ 2.2 化学试剂的安全使用

对黏膜和上呼吸道组织、眼睛和皮肤有极大危害性。吸入可致命。操作时戴合适的手套、安全眼镜和防护服。始终在通风橱里操作，操作完后彻底洗手。

毒性非常大。它阻断细胞色素电子运送系统。含有叠氮钠的溶液要标记清楚。可因吸入、咽下或皮肤吸收而损害健康。戴合适的手套和安全护目镜，操作时要格外小心。

染料咽下可致命或引起眼睛失明，通过吸入和皮肤吸收是有毒的。其可能的危险是不可逆的效应。戴合适的手套和安全护目镜。在化学通风橱里操作，不要吸入其粉末。

过硫酸铵
(NH_4)₂S₂O₈

叠氮钠
(NaN_3)

吉姆萨
(Giemsa)



❖ 2.3 放射性物质的安全使用

■ 使用同位素，防护先行！

基本任务和目的：按照辐射防护的三项基本原则，即**辐射事业的正当化、防护水平的最优化和个人剂量的限额化**。

放射性药品使用后残留和剩余部分被称为放射性废物。放射性废物处理不当会造成环境的放射性污染,影响工作人员和周围居民的健康。

❖ 固体废物的处理

主要采用放置法，被放射性药物污染的固体废物应存在固定的指定地点并采用适当的屏蔽物加以防护,待其自然衰变后,当作非放射性废物处理即可。如为过期的发生器吸附柱应标明日期并用塑料袋包装后置于贮源室,待其自然衰变后再处理。

分子生物学实验安全常识



❖ 2.3 放射性物质的安全使用

❖ 液体废物的处理

应根据放射性物质的最大容许浓度、化学性质、放射性强度、废液的容积以及下水道的排水设备等情况进行不同的处理。一般采用放置法,半衰期短的也可用稀释法达到容许排放水平。放射性强度低的废水也可直接排入下水道,但其放射性浓度不得超过露天水源中限制尝试的**100**倍。不能直接排入下水道的放射性废液,可采用衰变池贮存十个半衰后排入下水道。

注意:

未经固化处理的放射性废液和浓缩物以及尚未选定最终处置方案的固化体等放射性废物,都应在**固定地点贮存在专用的容器**中,贮存过程中注意安全,不能使放射性废物泄漏。不同的比活度的废物要求使用不同的贮罐。

❖ 放射性废物的转运:

放射性废物转运的关键是废物的包装容器,事先要做好安全检验,对容器的强度、屏蔽防护、密封系统、包装的标志等都有严格的规定。要求做到安全运输,防止发生火灾、容器颠覆及包装破损而使放射性废物泄漏,污染环境。



❖ 2.4 紫外线辐射的危害和防护

紫外辐射是指波长范围在100nm—400nm的光辐射，一般把100nm—280nm称作UVC，把280nm—315nm称作UVB，把315nm—400nm称作UVA。其中我们**观察胶体**用的最多的就是**280nm—315nm的紫外线**。

紫外线的有害效应主要是由于紫外线对脱氧核糖核酸（DNA）的作用造成的。最**有害**的效应是细胞致死，其它的效应则包括**致突、致癌、干扰DNA、核糖核酸（RNA）和蛋白质的合成、细胞分裂的延迟、以及在通透性和能动性上的变化**等。

1. 紫外光对眼睛的损伤

白内障被认为过量紫外光辐射的主要原因，经紫外光照射后，射线大部分被角膜上皮细胞核蛋白吸收，导致细胞核膨胀，碎裂和细胞死亡，以至损伤眼角膜和晶状体，导致浑浊。总的说来，紫外光辐射增加，人类的白内障患者增加。



❖ 2.4 紫外线辐射的危害和防护

2、紫外光对人皮肤的损伤

紫外光的影响有积累作用，它的主要机理：蛋白质受紫外光照射后，形成光解产物，此外，其溶解度和粘度，对热变性的敏感性及荧光等物理化学和光学性质均有显著的改变。紫外光对皮肤的作用分为**急性作用和慢性作用**。急性作用表现为**红斑效应**其症状为**水肿脱皮**，全身症状有寒战，发烧，恶心，罕见循环衰竭。慢性作用如致**皮肤老化**，**色素沉着**，**加速老化**，**甚至引起肿瘤**。轻者皮肤出现水肿性红斑，重者会出现水疱或大疱，还可伴有休克，发热，畏寒，恶心，心悸和头昏等症状。

3、紫外光对其他部位的损伤

紫外光辐射对免疫系统的影响，免疫系统的一些成分存在于皮肤中，皮肤暴露在紫外光下，使得免疫系统受紫外光辐射，使其功能受到干扰。研究表明，紫外光辐射的**免疫抑制作用可导致皮肤癌**，同时引起一些传染病和其他一些疾病。

分子生物学实验安全常识



❖ 2.4 紫外线辐射的危害和防护

在实验室里常用的紫外光源包括**手提式紫外灯**和**紫外透射仪、凝胶成像系统**。只能通过吸收有害波长的滤片或安全玻璃片才能观察。在紫外光下操作时要戴合适的预防性手套。应佩戴具有紫外线防护功能的护目镜和/或防护面罩，并遮蔽暴露的皮肤。

建议：**使用荧光染料，切胶在Dark reader上操作。**

Dark Reader 荧光透射仪(Transilluminators)的特点: 1.Dark Reader使用新的无毒DNA染料: SYBR Green, SYBR Gold等, 避免了Ethidium Bromide (EB) 染料对人体的伤害。 2.Dark Reader使用可见光 (400-500 nm), 没有UV (紫外线), 将其对人体的伤害降低至零。同时, 大大降低了对DNA样本的损伤, 克隆DNA的效率将成百倍的提高。 3.灵敏度高, 远远高于UV检测仪。 4.适用染料范围广; 荧光素 (fluorescein), AttoPhos, GelStar, Vistra Green, SYPRO Orange, red-shifted GFP variants等都可使用。对于Rhodamines, Ethidium Bromide(EB)等激发光大于500 nm的染料亦可适用; 可以广泛用于DNA、RNA 以及蛋白质的检测。 5.Dark Reader同时提供琥珀色镜片的观察眼镜 (AG16), 供切割凝胶时使用。

紫外照射消毒后由于空气中臭氧富集, 不宜立即开始工作, 应在停止紫外照射30 min后开始工作, 有条件的实验室, 可安装无臭氧紫外灯。

超净工作台中进行紫外照射消毒后, 也应用强风进行吹扫后再进行工作, 以免臭氧危害身体健康。

移液枪



- 1、将移液枪装上吸头（不同规格的移液器用不同的吸头）
- 2、将移液枪按钮轻轻压至第一停点；
- 3、垂直握持微量移液器，使吸嘴浸入液样面下几毫米，千万不要将吸嘴直接插到液体底部，容易造成移液枪污染，若瓶内液体太少，可将瓶子倾斜。
- 4、缓慢、平稳地松开控制按钮，吸上样液。否则液体进入吸嘴太快，导致液体倒吸入移液器内部，或吸入体积减少。
- 5、等一秒钟后将吸嘴提离液面
- 6、沿管壁平稳地把按钮压到第一停点，再把按钮压至第二停点以排出剩余液体；
- 7、提起移液枪，然后按吸嘴弹射器除去吸嘴，调回至最大量程，放进枪架。

离心机



- 1、把离心机放置于平面桌或平面台上，目测使之平衡，用手轻摇一下离心机，检查离心机是否放置平衡。**
- 2、插上电源插座，按下电源开关，设置转子号、转速、时间。
注意：对应的转子一定要设置在相应的转速范围内，不可超速使用，否则对试管或转子有损坏。**
- 3、打开门盖，将离心管放入转子内，离心管必须成偶数对称放入，且要事先平衡，完毕用手轻轻旋转一下转子体，使离心管架运转灵活。**
- 4、关上门盖，注意一定要使门盖锁紧，完毕用手检查门盖是否关紧。**
- 5、离心机时间倒计时到“0”时，离心机将自动停止，当转子停转后，打开门盖取出离心管，关断电源开关。**

超净工作台



- ❖ **1**、使用工作台时，先经过清洁液浸泡的纱布擦拭台面，然后用消毒剂擦拭消毒。
- ❖ **2**、接通电源，提前**15**分钟打开紫外灯照射消毒。
- ❖ **3**、工作台上，不要存放不必要的物品，以保持工作区内的洁净气流不受干扰。
- ❖ **4**、操作结束后，清理工作台面，收集各废弃物，关闭风机及照明开关，用清洁剂及消毒剂擦拭消毒。
- ❖ **5**、最后开启工作台紫外灯，照射消毒**15**分钟后，关闭紫外灯，切断电源。

灭菌锅



- 1、开盖：**转动手轮，使锅盖离开密封圈，添
刚没至板上
- 2、通电：**将控制面板上电源开关按至**ON**处，
LOW) 红灯亮
- 3、堆放物品：**需包扎的灭菌物品，各包装之间留有间隙，
堆放在金属框内，这样有利于蒸汽的穿透，提高灭菌效果
，灭菌时间：**121℃，20min**，如为液体，液体必须
装在可耐高温的玻璃器皿中，且不可装满，**2/3**即可。
- 4、密封高压锅：**推横梁入立柱内，旋转手轮，使锅盖下压
，充分压紧
- 5、设定时间和温度，开始灭菌**
- 6、灭菌结束，**排出空气，打开锅盖，温度下降后，所有东
西放入干燥箱干燥，排尽水气

实验安排（36学时）



- | | |
|--------------------|-----|
| 1. 分子生物实验安全准则及实验安排 | 值日组 |
| 2. 质粒DNA提取 | 3组 |
| 3. 细胞中RNA提取 | 3组 |
| 4. PCR 和琼脂糖凝胶电泳 | 2组 |
| 5. 质粒的酶切和连接 | 2组 |
| 6. 感受态制备 | 2组 |
| 7. 转化 | 2组 |
| 8. 重组载体鉴定 | 2组 |
| 9. 重组载体的原核诱导表达 | 2组 |
| 10. SDS-PAGE电泳 | 3组 |
| 11. 定量PCR仪的使用和数据分析 | |
| 12. 实验设计 | |

分组、值日、试剂准备



- 1. 分组、全班43个人，分为2人一 组，共21组（最后一组3人）**
- 2. 分组要求：自由安排分组，最好每组男女生搭配，由班长或者课代表统计**
- 3. 试剂准备、值日安排**

实验考核（满分**100**）



❖ 理论考试	40分
❖ 实验成绩	60分
实验报告	20%
试剂准备、值日	5%
出席	5%
操作	10%
实验设计	20%

实验设计



设计内容

- 1、自己根据**NCBI**数据库查找一种基因，通过引物设计、基因克隆技术等构建重组载体。
- 2、设计实验验证目的基因功能。

要求

- 1、选择目的基因名称不能有重复。
- 2、实验设计符合规则（阴性对照、阳性对照）。
- 3、实验设计字体、写作要规范。

实验报告要求



- ❖ **1**、一旦发现完全雷同，只能算作**及格分**
- ❖ **2**、实验结果部分不单要写检测结果（有图要附图，最好不要手画），更要**标明实验中重要试剂的作用**。
- ❖ **3**、实验讨论内容要思考，查找资料，结合实验现象分析原因，回答问题好的有加分。
- ❖ **4**、一律用**黑色**签字笔写。