

生命科学实验指南系列

现代分子生物学实验 原理与技术

陈德富 陈喜文 主编

南开大学教材建设资助立项著作

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书图文并茂、格式新颖、通俗易懂,是适应 21 世纪生命科学发展需要的现代分子生物学实验技术教材和参考书。全书共五篇三十章,包括分子生物学实验基本操作、DNA 相关实验、RNA 相关实验、基因表达及附录,介绍了广泛使用的现代分子生物学实验技术的基本原理、实验流程和注意事项。原理介绍在先,随后是详细的实验流程,最后是为巩固所学内容提出的思考题。在介绍原理和流程过程中,穿插一些实用的重点提示、试剂作用及可能出现的现象。本书所列流程都是作者研究室正在使用的、在教学中进行过实践的、切实可行的方法,符合国内条件。

本书可作为综合性大学和师范、医学、药学、农学等院校生物类专业本科生和研究生的分子生物学实验教学用书,也可作为生物类相关领域研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代分子生物学实验原理与技术/陈德富,陈喜文主编. —北京:科学出版社, 2006

(生命科学实验指南系列)

ISBN 7-03-016433-4

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 130383 号

责任编辑:莫结胜 彭克里 席 慧 /责任校对:刘小梅

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>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社编务公司排版制作

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2006 年 2 月第一次印刷 印张:20

印数:1—3 000 字数:452 000

定价:40.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

序

分子生物学是生命科学领域最重要的、发展最为迅速的学科之一，已成为推动生命科学持续发展的主要动力，有力地推动着复杂生命现象的研究与探索。同时，分子生物学中的实验技术对生物制药、生物制品、生物材料以及生物改良等相关产业的发展也产生了巨大的推动力。

教育是科学发展的基础，分子生物学实验技术的重要性决定了 21 世纪生命科学类青年学子必须掌握这一新兴技术。为适应这一要求，各高等院校先后为本科生和研究生开设了“分子生物学实验”这门课程。南开大学是最早开设“生物化学与分子生物学技术”、“基因操作原理与技术”、“分子生物学实验”等课程的院校之一。1997 年又增加了“分子生物学实验”的课时，扩大了授课对象，重新制定了新的课程体系，设置了新的教学内容，编写了与之相适应的新教材。教学实践证明，陈德富教授等结合自身多年教学与科研经验编写的《现代分子生物学实验原理与技术》是成功的，受到了学校的肯定和学生的欢迎，与国内有关书籍相比有许多独特性，尤其是以下两点：

第一，选材恰当。本书分五篇三十章，包括分子生物学基本操作、DNA 相关实验、RNA 相关实验、基因表达及附录，概括了广泛使用的现代分子生物学实验新技术。

第二，图文并茂。全书使用了近 300 幅插图，将分子生物学基本原理和技术流程形象地反映出来，使得本书通俗易懂。

该书是南开大学教材建设资助立项著作，相信本书的出版必将推动我国生物学、医学、药学、农学及其他相关学科的发展，必将为生命科学领域各相关专业本科生与研究生的学习提供帮助，该书也可作为相关领域研究人员的参考书。在此，我真诚推荐此书给广大读者。

耿运琪

南开大学副校长、教授

国务院学位委员会学科评议组成员

教育部生物科学与工程教学指导委员会委员

2005 年 8 月 3 日

主 编 陈德富 陈喜文

参加编写人员 (以姓氏汉语拼音为序)

陈飞雪 贾向东 马丽娜 钱文成

王绘砖 王维兰 杨 鹏 张宝珠

前言

分子生物学是在分子水平上研究生命结构与功能的科学,实验性强,其理论知识需要通过实验才能去验证、巩固与扩充。因此,分子生物学实验技术是一门重要的基础课,是新世纪高素质生物类人才必备技能之一,这一点从国内外各高校将“分子生物学实验”课程列为生物类专业重要基础课这一教学计划可以看出。

分子生物学实验技术的主要特点是:① 涉及面广,随着人类基因组计划的开展与深入,新技术层出不穷;② 实验过程看不见、摸不着;③ 所用仪器种类多、相对昂贵、操作复杂;④ 试剂种类多(大多为有活性的酶试剂)、用量少、价格昂贵。因此,选择重要且实用的、适应新世纪生物类人才培养特点的实验内容;制定一套既与国际接轨,又具特色、培养创新型学生的课程体系是我们高校“分子生物学实验”任课教师应尽的义务之一。同时,编写一本与之配套的实验指导教材也是我们高校有关教师义不容辞的责任。

目前国内外出版了许多以分子生物学技术为唯一内容的参考书,读者群非常大,经典著作隔几年就再版一次,如 *Molecular Cloning* 早已到了第三版,这些巨著主要是针对研究工作者编写的,不适合初学者使用。然而,针对教学编写的分子生物学实验教材很少,有些出版年代已久、技术陈旧,有些则因选材不恰当,也很少被高校选作教学用书。为了紧跟生命科学的发展,适应新时期高教改革的需要,围绕“高素质、宽口径、厚基础”的人才培养目标,提高教学水平和教学质量,我们尝试了一系列教学改革,提出了“分子生物学实验”应包括目的基因克隆和表达、目的蛋白质分离或酶学分析等一系列现代分子生物学实验技术的课程体系。在此课程体系基础上,编写了与之配套的讲义,编写的讲义在南开大学本科生和研究生教学中经过了多年试用,取得了满意的效果。本书即是在原讲义的基础上重新编写而成,新的编写参考了分子生物学实验技术的最新发展,也考虑了研究人员的需要。

全书共分五篇三十章,包括分子生物学基本操作、DNA 相关实验、RNA 相关实验、基因表达及附录。考虑到各层次、各专业学时数的不同,也考虑到初学者预习的需要,每个实验分别阐述其基本原理、实验流程、注意事项和思考题。原理介绍在先,采用图文并茂的方式详细叙述常见分子生物学研究技术的基本原理和操作;随后是详细的实验流程,中间穿插实验中的重点提示、试剂作用或可能出现的现象,初学者依此即可开展工作,并将获得满意结果;最后是为巩固所学内容提出的思考题。

本书所用的实验流程主要来自本研究室所用的方案,而且大多在教学中进行过实践,因此是可行的。本研究室所用实验流程参考了国内外有关著作、期刊论文及产品说明书,并根据需要经过一定的修改。本书在撰写时,使用了大量插图,这些插图或为本书原作,或参考了有关资料。考虑到实验流程和插图来源广泛,也考虑到修改后的流程或插图不完全忠实于原文,因此本书不一一列出文献出处。

本书由陈德富教授、陈喜文副教授主编,贾向东硕士、张宝珠工程师协助编写,陈

飞雪、马丽娜、郭少影、杨鹏、王维兰、王绘砖、钱文成等同志参与了部分章节的编写。耿运琪教授、刘方教授、刁虎欣教授为本书的编写提出过许多有益的建议，耿运琪教授还欣然为本书作序。在教材立项中，白艳玲副教授给予了很大帮助。本书的出版得到了南开大学教材建设项目的资助，得到了科学出版社莫结胜编辑的大力帮助。此一并表示衷心感谢。

在本书撰写过程中，我们力求不出或少出错误，但分子生物学实验技术的发展是迅速的，作者的学识和经验是有限的，加之科研工作繁重和时间紧迫，本书的疏漏和错误之处在所难免，恳请同行专家和读者批评指正。

陈德富 陈喜文

南开大学分子遗传学研究室

2005年7月8日

目 录

序
前言

第一篇 基本操作篇

第一章 绪论	2
第一节 基因操作技术	2
第二节 实验室规则与安全	5
第二章 仪器操作与溶液配制	8
第一节 常用器皿与仪器	8
第二节 溶液	11
第三章 大肠杆菌培养与保存	14
第一节 培养前准备	14
第二节 大肠杆菌培养	20
第三节 大肠杆菌菌株保存	24
第四章 基因操作中的酶学反应	27
第一节 常用酶的选购与保存	27
第二节 限制性内切核酸酶	28
第三节 限制性内切核酸酶消化 DNA 实验	31
第四节 DNA 作图	36
第五节 连接酶	37
第六节 其他核酸酶	39
第五章 电泳技术	43
第一节 基本原理	43
第二节 琼脂糖凝胶电泳	45
第三节 从琼脂糖凝胶中回收 DNA	49
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳	53
第五节 从聚丙烯酰胺凝胶中回收 DNA	56

第二篇 DNA 篇

第六章 DNA 基本操作	60
第一节 DNA 保存	60
第二节 DNA 检测	61
第三节 DNA 浓缩	62
第四节 DNA 纯化	64

第七章 扩增与提取质粒 DNA	70
第一节 质粒有关基本知识	70
第二节 质粒 DNA 提取	71
第三节 质粒 DNA 纯化	79
第八章 DNA 转化	83
第一节 制备感受态细胞	83
第二节 转化	87
第九章 扩增与提取噬菌体 DNA	90
第一节 噬菌体生活史	90
第二节 感染力测定	90
第三节 噬菌体回收与繁殖	91
第四节 提取噬菌体 DNA	93
第十章 提取真核生物基因组 DNA 与构建基因组文库	95
第一节 SDS/酚法提取基因组 DNA	96
第二节 试剂盒法提取基因组 DNA	98
第三节 CTAB 法提取基因组 DNA	100
第四节 构建基因组 DNA 文库	101
第十一章 PCR 基本操作	103
第一节 PCR 基本原理	103
第二节 引物设计	104
第三节 耐热 DNA 聚合酶	106
第四节 PCR 仪	109
第五节 PCR 基本操作	110
第六节 PCR 实例	113
第七节 预防污染	114
第八节 热启动	115
第十二章 DNA 重组	119
第一节 重组流程	119
第二节 插入 DNA 的准备	120
第三节 载体的准备	120
第四节 连接	123
第五节 插入 DNA 的修饰与改造	123
第六节 转化	132
第七节 重组子筛选	133
第十三章 探针制备	137
第一节 探针标记法	137
第二节 随机引物法	138
第三节 末端标记法	139
第四节 探针纯化	143

第十四章 PCR 产物克隆.....	146
第一节 PCR 产物重组策略.....	146
第二节 PCR 产物的纯化.....	146
第三节 末端平齐.....	147
第四节 TA 克隆.....	149
第五节 添加限制性内切核酸酶识别序列.....	151
第十五章 PCR 应用.....	154
第一节 菌落 PCR.....	154
第二节 简并引物 PCR.....	156
第十六章 Southern 印迹.....	158
第一节 DNA 酶切.....	158
第二节 琼脂糖凝胶电泳.....	159
第三节 变性、转膜与固定.....	161
第四节 杂交.....	165
第十七章 分子标记.....	170
第一节 微卫星标记.....	170
第二节 RFLP 与 RAPD.....	172
第十八章 DNA 序列测定与比对.....	176
第一节 测序原理.....	176
第二节 自动测序仪.....	177
第三节 DNA 序列的同源比对.....	180

第三篇 RNA 篇

第十九章 RNA 提取.....	188
第一节 RNA 实验前的准备.....	188
第二节 实验材料.....	190
第三节 用 AGPC 法提取 RNA.....	195
第四节 用 NP-40 法提取 RNA.....	197
第五节 使用试剂盒提取 RNA.....	200
第二十章 纯化 poly(A) ⁺ RNA.....	203
第一节 利用 oligo(dT)纯化 poly(A) ⁺ mRNA.....	204
第二节 用 oligo(dT)·纤维素进行柱层析.....	206
第二十一章 构建 cDNA 文库.....	210
第一节 以质粒为载体构建 cDNA 文库.....	210
第二节 以 λ 噬菌体为载体构建 cDNA 文库.....	215
第二十二章 RT-PCR.....	222
第二十三章 RACE.....	225
第一节 5' RACE.....	225
第二节 3' RACE.....	230

第二十四章	转录分析	231
第一节	Northern 印迹	231
第二节	RNase 保护分析	235

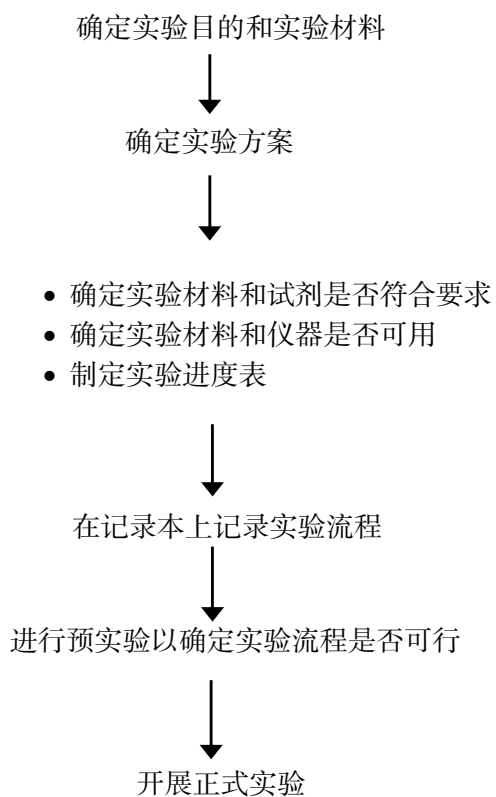
第四篇 表 达 篇

第二十五章	无细胞蛋白质合成	242
第一节	概述	242
第二节	大肠杆菌无细胞蛋白质合成系统	243
第三节	小麦胚芽无细胞蛋白质合成系统	247
第二十六章	大肠杆菌表达系统	254
第一节	表达载体结构	254
第二节	表达中的问题	256
第三节	表达实例与 SDS-PAGE 检测	257
第二十七章	枯草杆菌表达系统	261
第一节	菌株与载体	261
第二节	转化	261
第三节	蛋白质的提取	263
第二十八章	放线菌表达系统	264
第一节	菌株与载体	264
第二节	放线菌培养	264
第三节	转化	264
第四节	蛋白质的提取	265
第二十九章	酿酒酵母表达系统	267
第一节	酿酒酵母表达系统概述	267
第二节	外源基因在酿酒酵母表达系统中的表达	269
第三十章	毕赤酵母表达系统	274
第一节	宿主	274
第二节	重组	274
第三节	重组基因的表达	279

第五篇 附 录

附录一	储液配制	284
附录二	核酸及蛋白质数据	291
附录三	各种识别位点的限制性内切核酸酶分类表	294
附录四	部分限制性内切核酸酶需要的保护碱基	295
附录五	筛选重组子用的平板标签贴纸($\Phi = 9\text{cm}$)	296
附录六	常用 DNA 相对分子质量标准物的琼脂糖凝胶电泳图像示意图	297
附录七	本书作为教材的使用方法	298

第一篇 基本操作篇



第一章 绪 论

第一节 基因操作技术

1. 基因操作技术

基因操作技术是在 DNA 水平上阐明生命现象的技术，又叫重组 DNA 技术、基因工程，包括 DNA 的“切”、“连”、“扩”等(图 1-1)。“切”指用限制性内切核酸酶切割 DNA，“连”指用 DNA 连接酶连接两个 DNA 片段，“扩”是指目的 DNA 在宿主/载体系统中进行扩增。

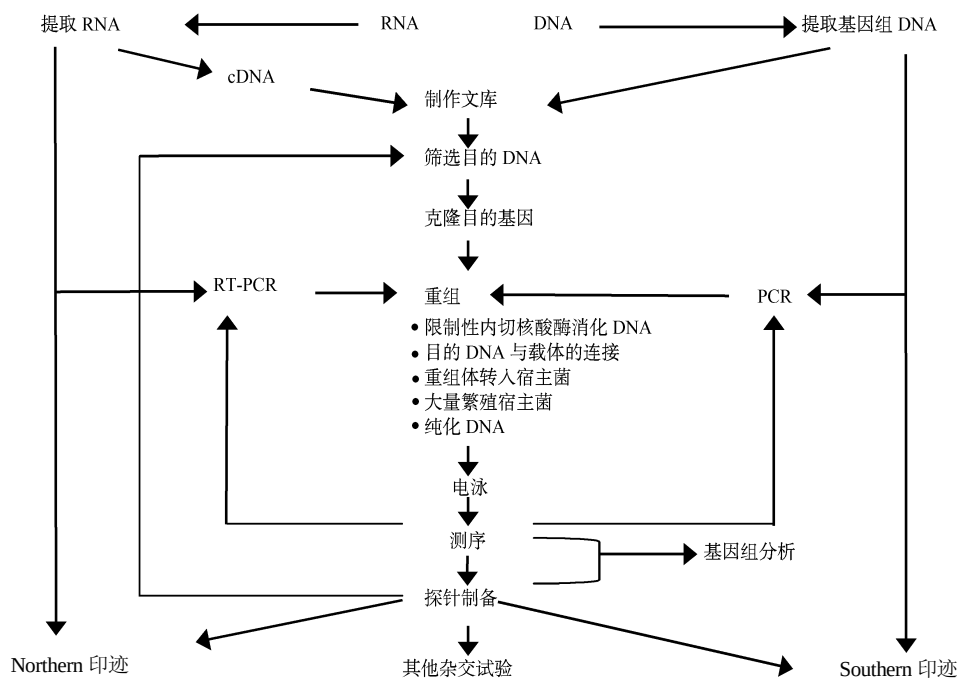


图 1-1 基因操作实验流程

2. 实验方案

基因操作实验的主要目的有 3 个：①分离目的基因，获取 DNA 信息；②分析基因结构；③分析基因功能。为达到这些目的，实验人员每天在实验室进行着许多不同的实验，然后根据实验结果进行总结，得出一个结论后本实验即告结束。由于实验目的的不同，对于类似的反应(如酶切反应)，也应设计不同的实验流程。首先，应确定使用怎样的研究方案；其次，根据实验规模和研究室情况，应确定怎样的实验流程；最后，根据研究人员的生活规律确定实验时间。这些基本方案在实验过程中可能会出现意想不到的

问题，因此有重新修改的可能。

3. 实验方法

有许多实验方案可完成设计的实验时，如何选择最合适的？应考虑以下几点(图 1-2)：①能否达到实验目的；②是否符合实验室的现状；③是否符合自己的喜好。

基因操作实验中使用的酶、同位素等试剂比较昂贵，若有性能相当的廉价商品，首先应选择廉价的商品，当然也可根据实验目的和经费状况考虑使用试剂盒，试剂盒在保证实验准确性方面有独特的优越性。

有些实验非常费时，如何安排时间就显得非常重要。在确定自己能用于实验的时间的基础上，也应在实验流程中注明可以暂停的步骤。例如，限制性内切核酸酶消化的 DNA 可以保存在乙醇中，也可以干燥保存。本书中的“过夜反应”步骤用“O/N”(over night)标记。

本书列举的实验仪器、设备和材料等有可能与你的情况不完全符合，或本书列举了多个实验方案，你可以根据自己的具体情况或个人爱好做适当选择或修改，这也是在你确定具体实验方案时应予以注意的。

在确定详细实验计划后，还必须进行预实验，以确定实验材料、试剂、仪器、时间等是否符合你的设计。当一切就绪后，即可开展正式实验。

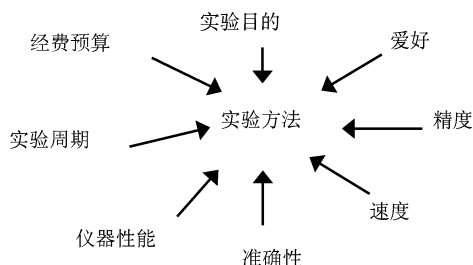


图 1-2 确定实验方法时应考虑的因素

4. 如何成为实验高手

有些人每天工作很忙，但实验总是失败，怎么也得不到漂亮的结果。如何成为高手？概括起来，应注意以下几点：①忠于实验流程；②关注实验要点；③准备充足的实验材料；④设平行对照实验；⑤准确的试剂用量；⑥数据整理。

(1) 第一次实验成功，但第二次实验马虎。第一次实验时，严格按照实验流程开展实验，但接下来总认为“我知道了”，“我会了”，而马虎行事，不再严格按实验流程进行实验，甚至更改实验流程，这些往往是实验失败的主要原因。标准的实验流程是经过许多实验者探索出来的，没有充足的理由，尽量不要更改。

(2) 实验精度。实验精度有 4 个层次：①必须严格按实验流程进行的操作；②较严格的操作流程、允许 5% 的变动；③允许 20% 变动的实验操作；④不需要特别注意的实验操作。在一系列实验过程中，要求按第 2 层次操作的实验流程只能按其规程开展实验(若按第 1 标准则更好)，不能放宽到第 3 层次，更不能放宽到第 4 层次。

(3) 酶促反应不顺利时，若加入更多的酶或 DNA，结果会愈来愈糟糕。这时有必要考虑实验材料或试剂中是否混入了反应抑制剂。商品酶或试剂中的稳定剂(如酶液中的甘油、TE 中的 EDTA 等)是酶促反应的抑制剂，应尽量减少它们的用量。

(4) 不设平行对照往往是实验失败的原因。在实验开始时，应有实验失败的忧虑。设平行对照可以发现实验失败的原因，如果实验准备得充足，马上就有保存的材料或试

剂进行第二次实验。

(5) 样品标记的零乱也往往是实验失败的重要原因。添加有样品或试剂的试管或其他器皿应工整地标明其内含物种类、日期等重要信息，而且这些信息应与实验记录本一致，这样，一段时间后能方便地找到你需要的样品。若标记零乱，错拿其他样品进行实验，肯定会失败。

5. 实验材料的准备

1) 购买

培养基、酶、DNA 及相关试剂盒等可方便地从商家那里购买到。对于昂贵的商品应慎重地了解情况后再决定购买。在购买试剂时，若发现与商品目录不符的产品应及时告知商家。

2) 利用公共服务机构

克隆 DNA 的载体或宿主菌(或细胞)，可以利用下列公共服务机构获取：

- (1) 中国普通微生物保藏管理中心(CCGMC) (micronet.im.ac.cn/cgmcc/jianjie.html)。
中国科学院北京微生物研究所(www.ctccas.ac.cn/junzhong)：真菌、细菌。
中国科学院武汉病毒研究所(www.whiov.ac.cn)：病毒。
- (2) 中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)(www.accc.org.cn)：农业微生物。
- (3) 林业微生物菌种保藏管理中心(CAF)(www.forestry.ac.cn/shs/wsw/wsw.html)。
- (4) 中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)(www.china-cicc.org)。
- (5) 抗菌素菌种保藏管理中心(CACC)。
- (6) 医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)。
- (7) 兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)。
- (8) 美国标准菌种保藏所(ATCC)(www.atcc.org)。
- (9) 荷兰真菌中心收藏所(CBS) (www.cbs.knaw.nl)。
- (10) 英国国立标准菌种保藏所(NCTC) (www.hpa.org.uk/srmd/div_cdmssd_nctc)。
- (11) 法国里昂巴斯德研究所(IPL) (www.pasteur.fr)。
- (12) 日本大阪发酵研究所(IFO)(www.jhsf.or.jp)。

3) 接受馈赠

实验材料尚未产业化，或自己不能制备时，也可通过信函寻求外单位馈赠(最近大多数人喜欢使用 E-mail，但垃圾邮件的泛滥，可能造成你的求助信被误删)。在求助信中，应清楚地告诉对方：你需要什么？发表相关材料信息的出处。若对方提出与你签订合同，应及时、真实地将有关信息告知对方，不能隐瞒什么，因为这种合同往往仅是为了督促个人的信誉，不存在商业行为。通常是向论文通信作者寻求帮助。图 1-3 是一封求助信的样式，供参考。写信的稿纸应是印有单位标志、名称、电话号码等信息的公函纸。若没有，则可以使用计算机自制。

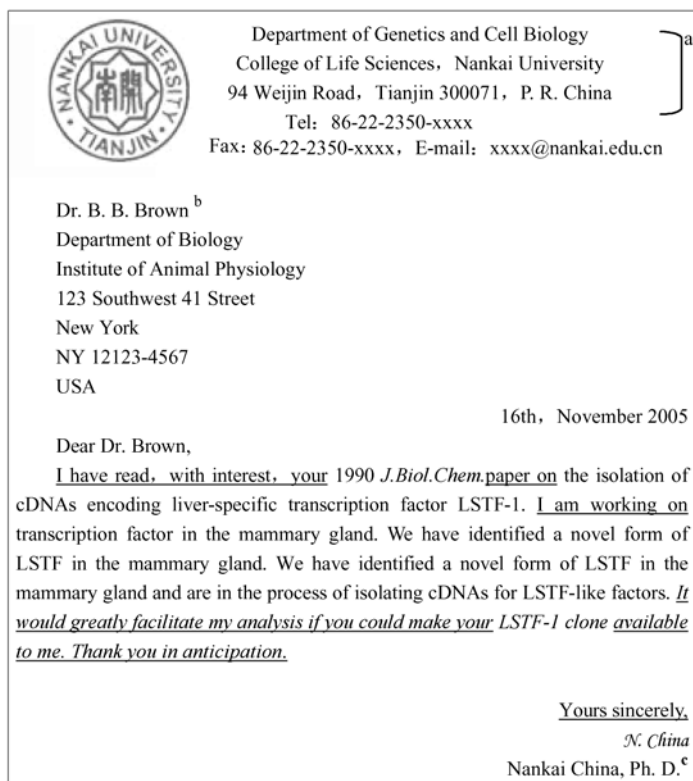


图 1-3 求助信样式

斜体部分的另一种写法①^d

I therefore would very much appreciate if I could obtain a plasmid containing LSTF-1. The most suitable one for my purpose would be pBRLSTF-1 in your JBC paper. Of course, I would very much appreciate hearing from you soon and thank you very much in anticipation of your help.

斜体部分的另一种写法②^e

It would be most helpful to have a LSTF-containing plasmid. Please do not hesitate to contact me if you would like more information. My fax number is (86)-22-3456-1234^f. Thank you for your time.

a. 通讯地址按照单位的惯常写法。

b. 应写上对方的称呼, 若知道对方是教授, 最好写成 Prof. 或 Professor。

c. 注明学位或其他。

d. 注明更详细的内容及表达不强迫的语气, 下画线部分为通用语句。

e. 希望对方尽快给予回复。

f. 自己的传真号码可以不写国家代码。不要写城市区号前的 0。

第二节 实验室规则与安全

1. 实验室规则

- (1) 保持肃静。不许喧哗、打闹, 创造整洁、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, 不许随地吐痰。实验结束后, 清洁器材和工作台, 彻底清洗试管、烧杯等实验用品, 物归原处, 实验废品(如火柴棍、滤纸等)丢到指定地方, 不得随意乱丢。
- (3) 严格操作。认真预习, 切忌盲目, 做好准备, 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。枪尖、滴管专用专放，以防交叉污染。使用仪器必须在教员指导下进行，不得随意乱动。使用微量移液器时，必须先熟读使用方法。玻璃器皿轻拿轻放。

(4) 注意节约。爱护标本、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。用试管加热时，管口不能对着人。使用危险、有毒物品时严格按照要求操作，使用同位素时应注意防护和防止污染。如有意外立即报告实验室管理人员。实验完毕，做好地面清洁卫生，关好门、窗、水、电等。

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，应十分谨慎，加倍爱护，使用前，应熟知使用方法。若有问题随时请示指导教员。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，告知实验室管理人员，不得擅自拆修。

(2) 凡挥发性、有烟雾、有毒和有异味气体的实验，均应在通风柜内进行。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，应用棕色瓶储存，或用黑纸包裹，或每次少量配制。

(3) 配制试剂时，应对试剂纯度、结构式、分子质量等特性熟悉，做到“有的放矢”。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) 量瓶是量器，不要用量瓶作容器。称量试剂，应用硫酸纸，不可用滤纸。标签纸的大小应与容器相称，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) 洗净器皿应倒置架上，使其自然干燥，不能用抹布擦拭。

3. 实验室安全

生物实验室里，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病毒、细菌等直接接触，必须十分重视安全工作。

(1) 严格执行 2004 年 4 月 5 日审定通过、2004 年 10 月 1 日正式实施的，由中华人民共和国科学技术部和国家认证认可监督管理委员会提出、中国实验室国家认可委员会负责起草的《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2004)。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若干规定，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、水阀门、煤气总阀门所在处，离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水电、煤气等关好，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开关电闸或电器开关。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) 使用高温高压锅灭菌时，不得离人。易燃、易爆、腐蚀、有毒等试剂，绝不能

放在高温高压锅内灭菌，以防爆炸发生，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。如果不慎溅出相当量的易燃液体，应按下法处理：①立即关闭室内所有的电源和电加热器；②关门，打开窗户；③用毛巾或抹布擦拭溅出的液体，并将回收的液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃缸里。

(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柜内操作，同时应在下面放一大盘子，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) 废液特别是强酸和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。

(8) 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。

4. 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。①关闭电源；②用干木棍将导线与被害者分开；③将被害者移至木板上，与地面分离；④急救者应做好防触电安全措施，手或脚必须绝缘。

(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、灭水水龙头等灭火。但应注意，起火之物能与水混合者(如乙醇)方可用水灭火；不能与水混合者(如汽油、乙醚)因能浮于水面，更易扩大燃烧面积，因而不能用水灭火。衣服着火，切勿奔跑，以免火势加剧，可就地打滚压住着火部位，再以水浇灭。

(3) 烫伤。一般用乙醇消毒，然后涂 2%苦味酸或 5%鞣酸。若皮肤起泡，不要弄破水泡，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，然后用硼酸水洗净，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时，应迅速采取止血措施，同时送医院急救。

(5) 灼伤皮肤。①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。②强酸、溴：先用大量自来水冲洗，再用 5% NaHCO_3 溶液或 5%氨水溶液洗涤。③苯酚：用乙醇洗涤。

(6) 煤气中毒。到户外呼吸新鲜空气，严重时送医院处理。



...Questions.....

1. 什么是 DNA 重组技术？其实验的主要目的是什么？
2. 试分析有些人工作很辛苦但总得不出理想实验结果的原因。
3. 如何获取你需要的实验材料(特别是未商品化的材料)？
4. 什么是《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2004)？据此生物学实验室可分几级？
5. 实验室发生火灾时该如何处理？烫伤、灼伤时该如何处理？
6. 在你所设计的实验方案中哪些试剂对环境有污染？如何处理这些试剂？

第二章 仪器操作与溶液配制

第一节 常用器皿与仪器

1. 塑料制品

DNA 操作中常用 1.5 mL 或 0.5 mL 的 Eppendorf 管等塑料制品, 购买时应根据实验目的选择合适的产品, 主要考虑其材质、透明度、强度、化学稳定性及耐热性等。半透明的聚丙烯产品是最常用的。不能选用那些易变色、难写字或盖不严的产品^a。Eppendorf 管等小塑料制品可盛于铝饭盒或 1 L 玻璃瓶(用铝箔纸封口)中进行高温高压灭菌。

2. 微量移液器(枪)

生物学实验中通常使用移液管或头部呈毛细管式的微量注射器来移取溶液, 但分子生物学实验中常用手动或电动微量移液器来移取溶液。

微量移液器^{b, c}, 俗称枪, 与枪尖联合使用。其最大量程从 2 μL 到 10 mL 不等。不同量程微量移液器的使用方法大体相同, 先将枪尖装在吸液杆上, 再调节其刻度到量程范围内的某一个值, 然后将推动按钮推到第 1 档后缓慢吸取溶液, 若想排出枪尖里的溶液, 则推到第 2 档^d(注意不要从第 2 档吸取溶液)(图 2-1)。购买的枪尖一般是大袋包装, 应戴上干净手套将其装入枪尖盒中高温高压灭菌后使用。

3. 恒温水浴锅

酶促反应大多在恒温水浴锅^e中进行, 常用温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 超过或低于该温度, 可能需要使用更高温度量程的水浴锅或附加有制冷设备的水浴锅。反应时常将 Eppendorf 管插入到带有小孔的海绵或泡沫材料制成的浮漂中(右图), 使 Eppendorf 管漂浮于水面上进行酶促反应。

4. 小型离心机

在分子生物学实验中, 每天反复使用 Eppendorf 离心管进行离心操作, 因此应购买

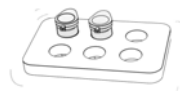
a. 用于冰箱中保存的塑料制品应避免选用那些易自动开盖及易被有机溶剂腐蚀的塑料制品。

b. 使用注意事项: ①改变移液量程时应自大调到小。由小值调大时应先多调 1/3 圈再反调至设定值。移液器使用完毕宜将量程调到最大值。②更换的新枪尖应进行预洗, 用于有机溶液时最好预洗 2~3 次。③操作移液器要平稳、缓慢。释放按钮时不可过快, 以免液体吸入吸液杆内。④吸嘴内尚存液体时切勿将移液器平放或倒置, 防止液体流进吸液杆内。⑤使用了强酸或其他腐蚀性溶剂后, 应将移液器拆开, 用蒸馏水清洗活塞和密封圈, 完全干燥后再组装。⑥若刻度与实际取液量相差甚大, 可以用精密天平检测其精度。若精度差别很大, 则应送专业维修点去修理。

c. 微量移液器有不同的移液范围, 超过其量程极易损坏其精度, 而且不能再回复到原来位置, 这点应特别注意。

d. 漏液时, 可能是因为微量移液器内部润滑油已耗尽, 或吸液杆头部破损所致, 自己可以修复。

e. 水浴锅里的水应使用蒸馏水, 并在使用前检查水浴锅中的水是否充足和干净。



好的小型离心机。离心机一般能到 15 000 r/min。回收乙醇沉淀物时通常在低温下进行，因此离心机最好带有制冷装置。简单的离心甩干^f等操作也是经常遇到的，因此也应备上更小的机型(如掌中型台式离心机)。台式离心机的溶液量可以用目测来平衡，但使用有盖子的转头进行离心时一定不要忘记给转头盖上盖子。离心机的转头有水平、吊式、角式三种类型，角式是最常用的(图 2-2)。

f. 甩干，即短时间(1~3 s)的离心操作，是为了使附着于管壁上的液体沉入管底。

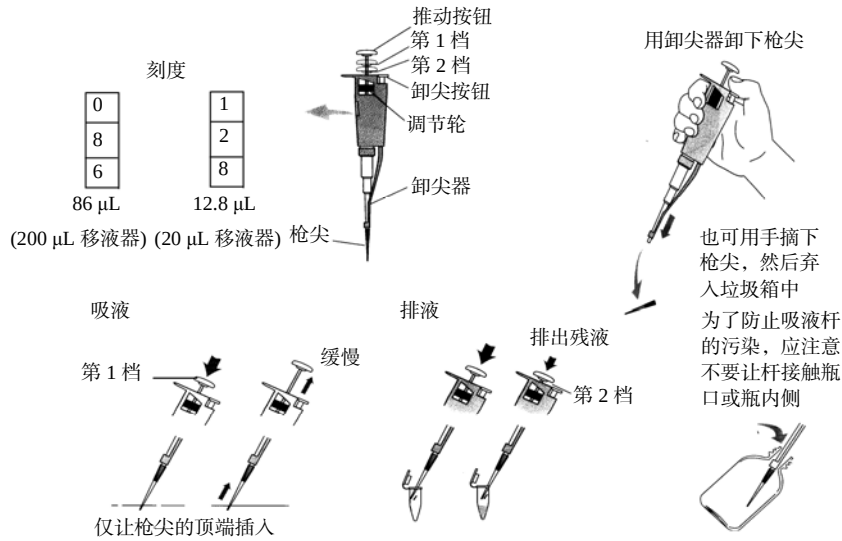


图 2-1 微量移液器的结构及使用方法

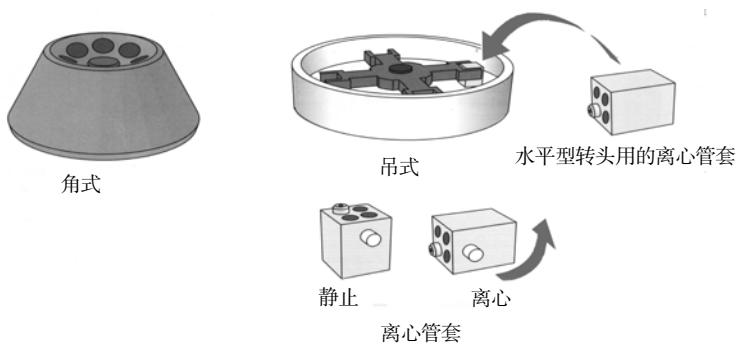


图 2-2 各种离心机的转头

5. 离心干燥机

乙醇沉淀后，为了使 Eppendorf 管内的 DNA 干燥，常用真空泵。此外，也可用小型离心干燥机等仪器使 DNA 样品快速干燥。

6. 旋涡混合器

不对称的旋转可以混匀管内的溶液，根据这个原理制成的装置叫旋涡混合器。目前市场上销售的旋涡混合器有多种类型，大多为接触式。Eppendorf 管底部一旦接触混合器

的橡胶头就产生旋涡转动，带动 Eppendorf 管内的溶液产生振荡，从而使溶液混合均匀。旋涡振荡频率能调节的机型也有销售，此外还有多个 Eppendorf 离心管同时旋转混合的多孔旋涡混合器(图 2-3)。



图 2-3 各种旋涡混合器

7. 振荡器

搅拌离心管内的溶液、加速难溶物的溶解、清洗浸泡于溶液中的不洁器皿等操作常使用振荡器。根据振荡方式，有摇摆式、水平旋转式、水平往复式、多角度旋转式等多种类型(图 2-4)。

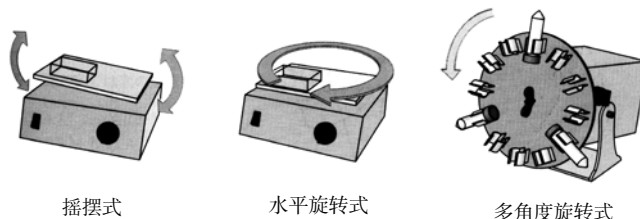


图 2-4 各种类型的振荡器

8. 真空泵

真空泵是利用真空吸走液体的装置。在乙醇沉淀后经常用它吸走残留的乙醇，其作用与离心干燥机或凝胶干燥机类似。机械式装置带有漏水阀，可防止溶液直接流向机器内。一般来说，简单的真空泵装置已足够用于分子生物学操作，甚至可以用水流泵来代替机械式装置。

9. 紫外发光装置

紫外发光装置内的紫外灯所发射的紫外线，通过特殊的过滤板过滤出特定的波长。此装置有封闭式(从装置下面发射紫外线)和简易手持式两种类型(图 2-5)。根据过滤板种类紫外线可分为短波(254 nm)、中波(312 nm 或 302 nm)和长波(366 nm)等类型。短波光线强，对 DNA 损伤大；长波对 DNA 损伤小，光线弱。实验中一般使用中波，此时能清

楚地看见染上溴化乙锭的 DNA。防护板上方贴有一层起保护作用的保鲜膜，凝胶放于其上。用眼睛直接观察紫外线是非常危险的，应戴上防护眼镜，并使用防护板。灯管及过滤板有使用寿命，使用完毕后应尽快关闭电源(图 2-5)。

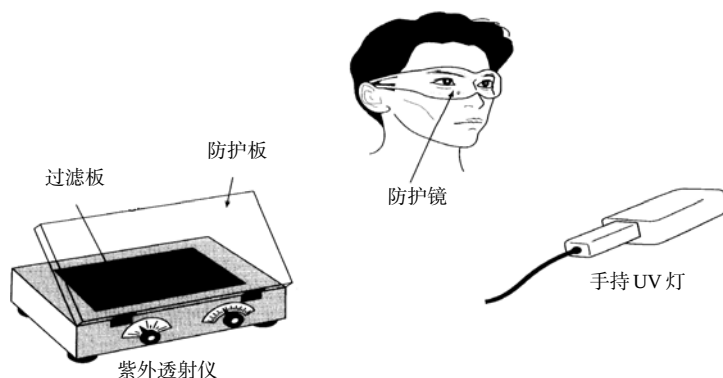


图 2-5 紫外发光装置

10. 一次性手套

一次性手套有多种类型。塑料薄膜制的一次性手套最便宜，但容易掉落和破损；橡胶制的一次性手套结实，但手感不好。为了增加橡胶手套内侧的柔滑性，也有在内侧表层涂有滑石粉的产品销售。一次性手套的应用：①防止危险试剂沾到手上；②防止试剂受到污染。

11. 纸巾

实验中使用到各种各样的纸巾。吸走残留液体时，使用市售卫生纸足够了，但擦拭实验用品(如玻璃板)时需要专用的、不带毛屑的面巾纸。为了隔离一个干燥的空间，可以用大的滤纸(最好是 Whatman 公司的 No.1)或铝箔纸。

第二节 溶 液

1. 实验用水

过去常用蒸馏水，但随着净化水装置的开发，最近多用结合反渗透膜、离子交换、活性炭吸附等技术的纯水装置(如 Milli-Q 纯水器)制成的纯净水。

1) 一蒸水

与离子交换蒸馏水差不多，多用于大肠杆菌培养基的制备、电泳缓冲液的配制、器皿的漂洗等实验。

2) 双蒸水

一蒸水再次蒸馏而成，与纯净水的纯度差不多，用于生物化学及组织培养实验。

2. 储液

实验中使用的溶液分为储液和工作液。储液是保存用的溶液，配制后一般分装成小瓶，供配制工作液用。常用储液见附录一。下面以 500 mL、0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 储液的制备为例说明溶液的配制。

Materials

- (1) Na_2EDTA 盐
- (2) NaOH 溶液(pH10.0)
- (3) NaOH 颗粒

Protocols

Time : 20 min

- ① 称取 94 g Na_2EDTA ，倒入烧杯。
↓
- ② 加 450 mL 双蒸水，搅拌均匀。
↓
- ③ 边搅拌边缓缓加入 NaOH 颗粒，调 pH。
↓
- ④ 随着 pH 上升，EDTA 逐渐溶解。
↓
- ⑤ EDTA 溶解后，改用 NaOH 溶液(pH10.0)微调 pH 至 8.0，用双蒸水定容至 500 mL。

3. 试剂称量精度

基因操作实验中，一般的称量精度有 3 位有效数字就足够了。如配制 500 mL 浓度为 0.5 mol/L 的相对分子质量为 121 的试剂，称重 30.3 g，用 500 mL 量筒(最小刻度为 5 mL)定容即可，不必称取精度达 30.250 g。因为不是分析化学实验，不必使用容量瓶来定容。

4. 试剂灭菌

为防止试剂在保存过程中产生杂菌，试剂配制后应高温高压灭菌，并存放于暗处。有些试剂不可采用高温高压方式灭菌，而采用过滤灭菌，这些试剂有：①遇热易分解的试剂；②易挥发的试剂；③有机溶剂；④腐蚀性、刺激性强的试剂。

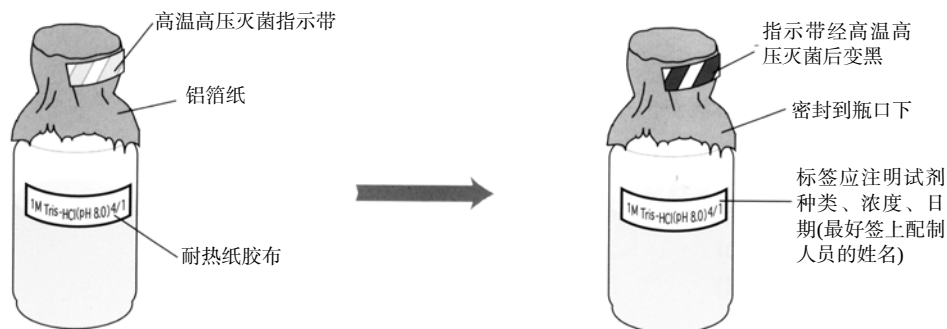


图 2-6 用高温高压灭菌指示带明确溶液是否已灭菌

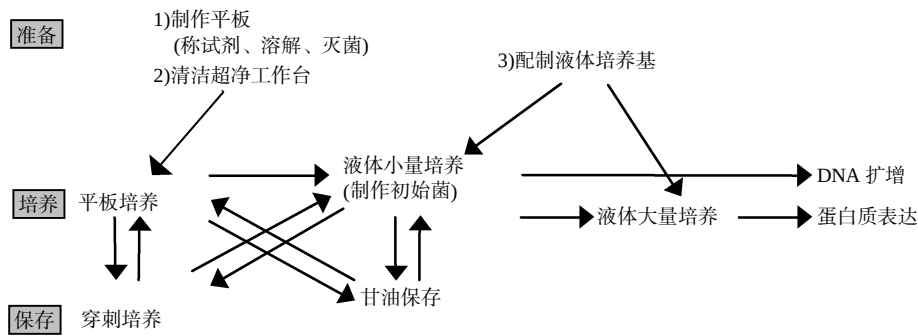
磨口瓶盛装的试剂在高温高压灭菌时，应注意加液量不能超过规定刻度，瓶口与瓶盖间夹一铝箔纸，以利于通气，瓶口还应使用铝箔纸裹上，并贴上高温高压灭菌指示带。指示带在灭菌后会变黑(或变蓝)(图 2-6)。灭菌完成后应戴上线手套取出试剂瓶，以防止烫伤手。试剂瓶取出后应使之自然冷却。



...Questions.....

1. 如何正确使用微量移液器？使用中应特别注意哪些事项？
2. 如何改变微量移液器的移液量？应自大调到小，还是自小调到大？为什么？
3. 哪些试剂需要高温高压灭菌？哪些试剂不能采用高温高压方式灭菌？对于不能采用高温高压方式灭菌的试剂如何灭菌？灭菌后的试剂如何保存？是否需要分装？
4. 分子生物学实验中，哪些简易仪器或装置可以代替真空泵的作用？
5. 分子生物学实验中，哪些溶液可以用旋涡混合器混匀？哪些不可用旋涡混合器混匀？为什么？
6. 配制培养基时，通常使用哪种级别的水？为什么？

第三章 大肠杆菌培养与保存



大量扩增目的 DNA 或使目的基因表达出目的蛋白质，常以大肠杆菌为宿主菌。将重组的环状 DNA(质粒)或噬菌体 DNA 导入大肠杆菌细胞内，在适当培养基中培养大肠杆菌以扩增出目的 DNA。扩增质粒 DNA 的过程见图 3-1。

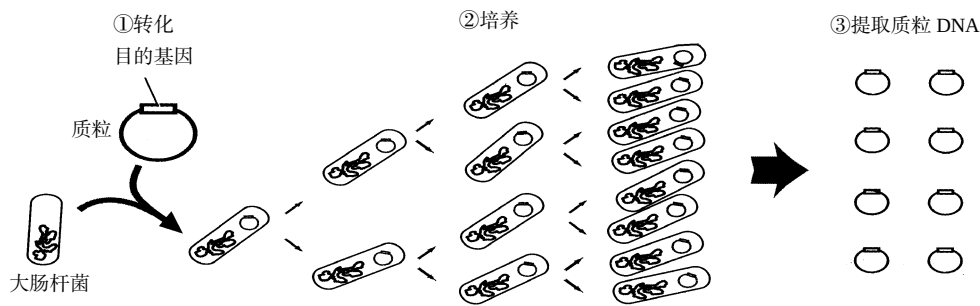


图 3-1 利用大肠杆菌扩增质粒 DNA

第一节 培养前准备

1. 大肠杆菌菌株

用于分子生物学实验的大肠杆菌菌株主要来自 K12^a，常用菌株名称及其主要基因见表 3-1，根据试验目的及载体种类选择相应菌株^b。

a. 根据菌体表面糖蛋白成分(O 抗原、H 抗原、K 抗原等)进行分类。
b. HB101、JM109、DH5α、BL21 (DE3)的感受态细胞自制或可从生物公司购买。

表 3-1 常用大肠杆菌菌株及特征

菌株	<i>recA</i>	F'	<i>sup</i>	<i>mcrA</i>	<i>mcrBC</i>	<i>EcoK</i>	<i>rps</i>	<i>gyr</i>	特征
HB101	-	-	<i>supE</i>	+	-	r ⁻ m ⁻	Str ^r	+	用于一般的转化实验
JM109	-	+	<i>supE</i>	-	+	r ⁻ m ⁺	+	Nal ^r	能对 pBlueScript、pUC 重组体进行蓝白筛选
DH5α	-	-	<i>supE</i>	-	+	r ⁻ m ⁺	+	Nal ^r	能进行蓝白筛选，转化率高

续表

菌株	<i>recA</i>	F'	<i>sup</i>	<i>mcrA</i>	<i>mcrBC</i>	<i>EcoK</i>	<i>rps</i>	<i>gyr</i>	特征
BL21(DE3)	+	-	+	+	+	r ⁻ m ⁻	+	+	来自 B 菌株, 蛋白酶活性低。具有 T7 RNA 聚合酶基因, 能使重组于 pET21b(+)-多克隆位点的目的基因诱导出目的蛋白质

注: 各基因特征:

- *recA*: ATP 依赖型 DNA 重组酶基因缺失, 能稳定插入 50 bp 以上重复 DNA 序列, 对 DNA 转化有利。
- F': 具有重组的 F 因子, 可作 M13 噬菌体的宿主菌。
- *supE*: 表达的阻遏蛋白与终止密码子 UAG 结合, 使蛋白质合成终止。其缺失体不能表达阻遏蛋白, 即使遇到 UAG 终止子, 蛋白质仍能继续合成, 并将 UAG 编码成谷氨酰胺, 因此称 *supE* 为琥珀突变抑制因子。
- *mcrA*、*mcrBC*: 特异性地切割外源 DNA 甲基化序列的限制性内切核酸酶基因, 进行高等动植物基因组 DNA 操作时使用其缺失体菌株。
- *EcoK*: 参与限制与修饰系统。若想避免限制反应, 使用其突变株。
- *rps*(Str^r): 耐 50 µg/mL 链霉素。
- *gyr*(Nal^r): 耐 100 µg/mL 奈啶酮酸。

2. 培养大肠杆菌所需的物品

1) 大肠杆菌接种用操作台

如图 3-2 所示。

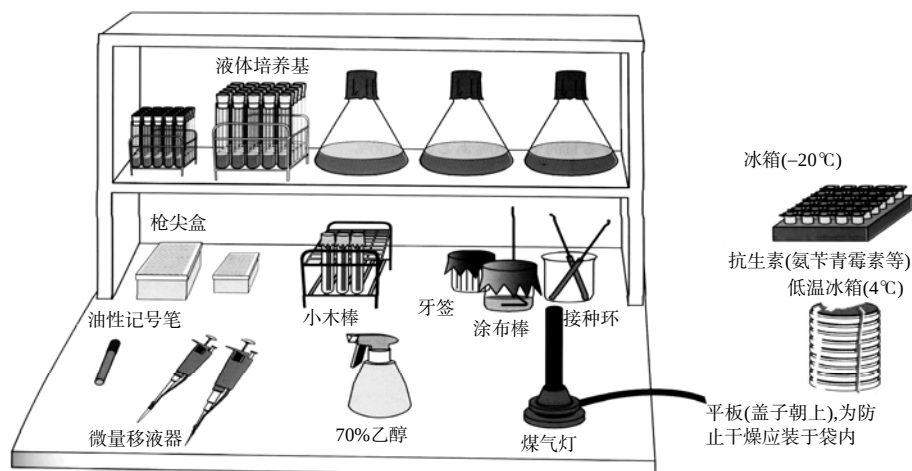


图 3-2 大肠杆菌实验中所用物品

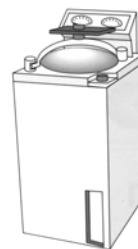
2) 灭菌方法

大肠杆菌生长的环境也适合杂菌的生长, 因此培养大肠杆菌的所有试剂及器皿等均应灭菌, 防止杂菌^a的生长。灭菌的方法有:

a. 杂有与实验无关菌(霉菌或细菌), 称之为污染。

A) 高温高压灭菌(右图)

用于培养基、试剂、枪尖、小木棒、牙签等物品的灭菌，加热至 121℃、15 ppsi(1 ppsi=6.894 76×10³ Pa)条件下灭菌 20 min。待灭菌的物品应贴上高温高压灭菌指示带^b。



B) 干热灭菌

烧杯等玻璃器皿^c及药匙等金属器具在 180℃烤箱中加热 1~2 h。玻璃管等小物品盛于金属容器内灭菌。

C) 火焰灭菌

试管的瓶口、接种环等常用火焰灭菌(煤气灯或酒精灯)。火焰产生上升气流，对空气中漂浮的杂菌也有杀灭作用，因此也可净化空气、防止污染。

b. 灭菌完毕的物品用红线或黑线标记，以指示其是否已灭菌。

c. 湿的玻璃器皿干热灭菌易爆裂，应干燥后再进行干热灭菌。

D) 紫外线灭菌

器械及培养基可用超净台里的紫外灯照射 10 min 来达到灭菌的目的。

E) 乙醇灭菌

实验人员的手、器械、操作台面可用 70%乙醇灭菌。

3) 接种工具

A) 接种环

头部为圆形铂金丝^d。用于液体培养基的接种及平板划线。也有直接使用较硬的线形铂金丝进行高浓度琼脂平板接种。

d. 铂金丝比较昂贵，可用镍铬合金代替。

B) 小木棒

装于试管内或裹于铝箔纸内进行高温高压灭菌，用于从平板向液体转接细菌。

C) 牙签

盛于 100 mL 烧杯内或裹于铝箔纸内进行高温高压灭菌，用于从菌落^e中挑选需要的单菌落。

e. 所谓菌落是固体培养基中众多菌的集合体。各菌落之间或许连接非常紧密。一个菌落来自同一菌体，挑选单菌落培养可获得单一的菌株。

D) 涂布棒

玻璃在煤气喷灯上烧制而成(图 3-3)。存放于装有 100%乙醇的烧杯内，用时在酒精灯上灼烧片刻，冷却后用于向平板上涂布液体菌体。

3. 培养基种类

1) 液体培养基

盛于试管或三角瓶的液体状的培养基，用于大量繁殖菌株以提取质粒 DNA 或表达的目的蛋白质等。

2) 固体培养基

在液体培养基内添加琼脂，使之具有固定形状的培养基平板。用于平板培养、穿刺培养等，目的是使菌落增殖到一定大小，以获取噬菌斑或分离出单菌落。

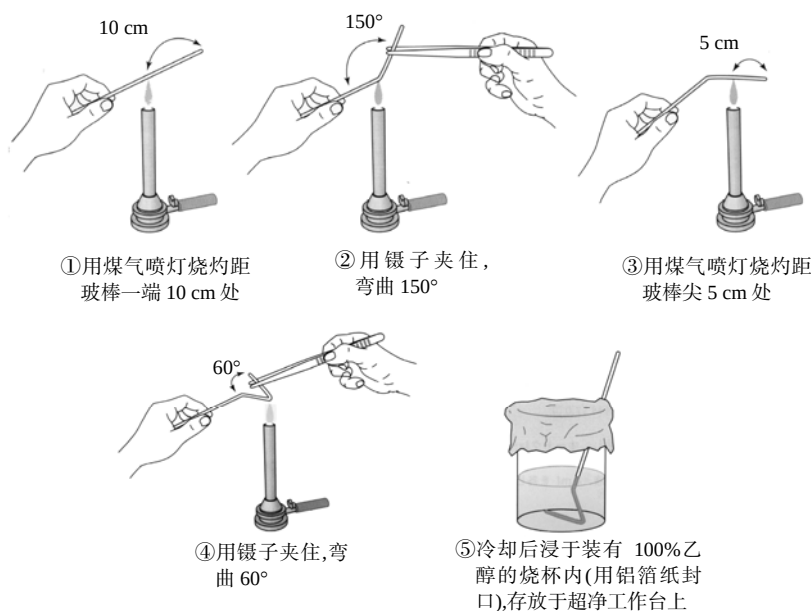


图 3-3 涂布棒制作方法

3) 抗生素

质粒中通常含有抗药基因，因此可作选择标记，也可在培养基中添加抗生素，防止杂菌生长。各种抗生素储液浓度及工作浓度见附录一。

A) 抗生素储液的配制

根据储液浓度配制到无菌烧杯或无菌离心管中，分装成每份 1 mL 于 Eppendorf 管中，保存于 -20℃。用无菌水为溶剂的抗生素，配制后用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌后再分装。

● Protocols Time : 20 min

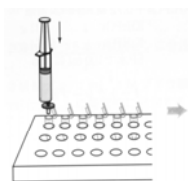
① 无菌水溶解抗生素后，吸入注射器的针筒内。



② 在注射器嘴上安装微量过滤器。



③ 按每份 1 mL 量分装到 Eppendorf 管中，保存于 -20℃ 冰箱。



转至 -20℃ 冰箱保存

B) 抗生素的使用

在接菌前将需要量的抗生素加入到液体培养基^a中。在配制固体培养基时，待高温高压灭菌后冷却至一定温度时再加入抗生素。

a. 氨苄青霉素是最常用的抗生素，添加氨苄青霉素的 LB 培养基叫 LA 培养基。

4. 培养基的配制

1) 液体培养基的配制

配制后可立即分装成小份，每份量为实验需要的量，如 2 mL、10 mL、20 mL 等。

A) 小体积 LB 培养基的配制(以 2 mL 量为例)

Materials

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| (1) 试管及配套瓶塞(棉塞或胶塞,要求通气性好) | (4) 搅拌器及搅拌转子 |
| (2) 药匙 | (5) 连续式分装器 |
| (3) 1 L 烧杯 | (6) LB 培养基所需要的试剂(附录一) |

Protocols

Time : 2 h

- | | |
|-----------------------------|------|
| ① 胰蛋白胍(Bacto) | 10 g |
| 酵母提取物(Bacto) | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| 移至 1 L 烧杯中(右图) ^a | |

- ② 加双蒸水至刻度，用搅拌器混合均匀。

- ③ 用分装器分装至试管中，每试管 2 mL，盖上瓶塞^b。

- ④ 高温高压灭菌，室温保存。

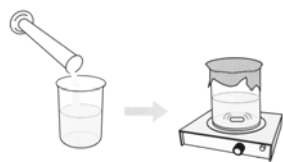
...Tips.....

1) 长颈玻璃瓶棉塞的制作

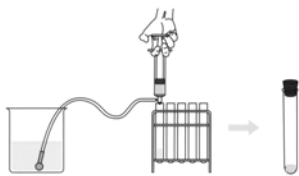
- ① 假设玻璃瓶的直径为 K cm，将 5 mm 厚的脱脂棉撕成 4K cm、K cm、(<K) cm 的正方形，将 1 cm 厚的脱脂棉撕成边长为 2K cm 的正方形。



- ② 将 4 份脱脂棉按大小顺序叠加起来，以“×”印为中心，用最大的脱脂棉包裹起来，长的一边反折回去。

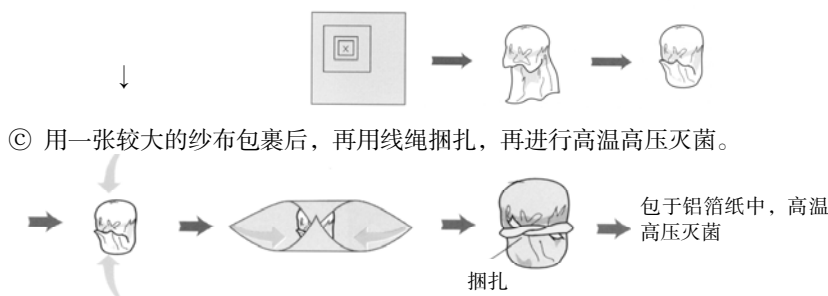


小数点后一位即可



a. 粉末状试剂易飞散，应尽量将其放至烧杯底部。药匙应干燥后使用。试剂称取完毕后，应清洁天平及附近台面。

b. 瓶塞应盖严，否则可能污染。



③ 用一张较大的纱布包裹后, 再用线绳捆扎, 再进行高温高压灭菌。

2) 试管用棉塞的制作

将 1 cm 厚的脱脂棉用手指捻成试管口大小, 高温高压灭菌。



B) 大体积 LB 培养基的配制(以 800 mL 为例)

Materials

- | | |
|-------------|---------------------|
| (1) 药匙 | (4) 电动搅拌器及搅拌转子 |
| (2) 2 L 三角瓶 | (5) LB 培养基所需试剂(附录一) |
| (3) 铝箔纸 | |

Protocols

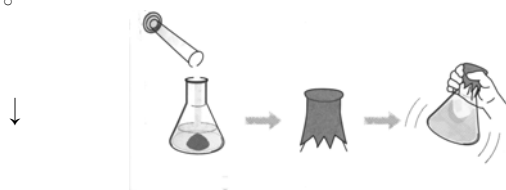
Time : 2 h

①

胰蛋白胨(Bacto)	8 g
酵母提取物(Bacto)	4 g
NaCl	8 g
用药匙取药至三角瓶中称重(右图)	



② 加双蒸水至 800 mL, 用铝箔纸封口后^c, 手持三角瓶振荡混匀。



c. 铝箔纸易破, 所以最好封两层。铝箔纸应远远大于瓶口, 过小则易导致污染。高温高压灭菌过程中, 试剂将溶解掉, 所以轻轻晃匀即可, 晃动时注意不要将培养液晃至瓶口, 这样将可能致污染。

③ 高温高压灭菌, 室温保存。

2) 制作平板

Materials

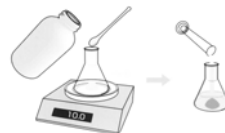
- | | |
|-------------|----------|
| (1) 煤气灯或酒精灯 | (2) 水平台面 |
|-------------|----------|

- (3) 1 L 三角瓶
- (4) 铝箔纸
- (5) $\Phi=9$ cm 培养皿

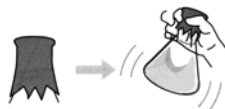
- (6) 药匙
- (7) LB 培养基所需试剂(附录一)
- (8) 琼脂粉(DIFCO 公司产品)

● Protocols Time : 4 h

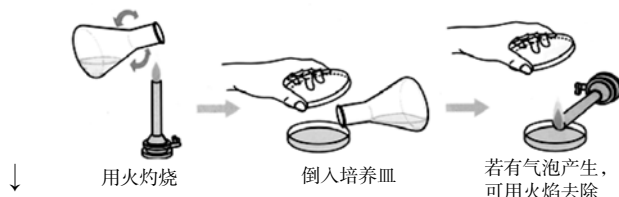
- ① 胰蛋白胨(Bacto) 8 g
 酵母提取物(Bacto) 4 g
 NaCl 8 g
 用药匙取试剂至三角瓶中称重(右图), 加双蒸水至 1 L



- ② 铝箔纸封口, 用手振动混匀后高温高压灭菌。



- ③ 待培养基冷却至手能触摸的温度(60℃左右)时^d, 分装至培养皿中^{e, f}。

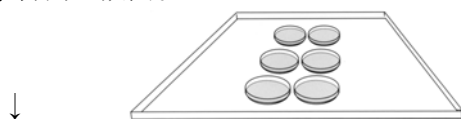


d. 培养基中若需要添加抗生素, 此时添加。

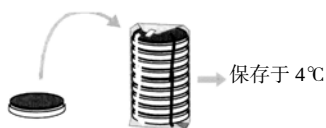
e. $\Phi=9$ cm 平皿, 每皿 25 mL 最适, 因此 1 L 培养基可制作 40 皿平板。

f. 平皿开盖时间尽量短。分装出来的培养基将很快凝固(特别是在冬季), 因此操作上尽量快。

- ④ 在水平台面上凝固。



- ⑤ 凝固后, 反转过来, 装入塑料袋, 4℃ 保存^{g, h}。



g. 凝结在盖上的水珠可能导致污染, 因此应倒转存放。

h. 氨苄青霉素易失活, 因此添加抗生素的平板应在数周内使用。

第二节 大肠杆菌培养

1. 大肠杆菌培养的注意事项

- (1) 无菌操作前用 70%乙醇消毒台面。
- (2) 在离酒精灯或煤气灯较近区域内进行无菌操作。因为煤气灯产生上升气流, 能防止空气中飘落下来的细菌所带来的污染。使用煤气灯或酒精灯时应防火灾发生。
- (3) 在开盖前和开盖后用煤气灯灼烧试管或三角瓶的瓶口 2~3 次。
- (4) 开盖的试管或三角瓶的瓶口不能垂直向上, 而应倾斜, 以防止飘落下来的杂菌导致污染(右图)。