



**ZHANG'S LAB**  
**REFERENCE MANUAL**

**安全 规范**

**高效 自律**

目 录

<b>第一部分：实验室安全注意事项</b> .....	<b>1</b>
一、实验室区域行为规范.....	2
二、化学品的储存保管.....	3
三、有机溶剂的使用.....	4
四、电的使用.....	6
五、水的使用.....	7
六、液氮的使用.....	8
七、洗液的使用.....	9
八、配制硫酸溶液、氢氧化钠.....	10
九、生物安全注意事项.....	11
<b>第二部分：实验室仪器使用与操作规范</b> .....	<b>12</b>
一、HPLC 使用操作方法及注意事项.....	13
二、旋转蒸发器使用操作方法及注意事项.....	23
三、大旋转蒸发器使用说明.....	27
四、真空冷冻干燥机的使用方法及注意事项.....	29
五、高压蒸汽灭菌锅使用操作方法及注意事项.....	30
六、金属浴及水浴锅的使用及保存方法和注意事项.....	31
七、电转化仪操作，电转杯使用及保存方法和注意事项.....	33
八、超声破碎仪，高压破碎仪操作方法及注意事项.....	34
九、蛋白纯化仪操作、维护及注意事项.....	37
十、蛋白质电泳（PAGE）-变性凝胶电泳（SDS-PAGE）.....	41
十一、PCR 仪操作方法及注意事项.....	45
十二、超净台操作、维护及注意事项.....	48

## 目 录

十三、离心机（小型常温，小型冷冻，大型台式）操作、维护方法及注意事项 .....	51
十四、Five Easy Plus™ pH 计使用说明 .....	55
十五、凝胶电泳仪操作方法及注意事项 .....	57
十六、凝胶成像仪操作、维护及注意事项 .....	59
十七、切胶仪操作、维护及注意事项 .....	61
十八、移液枪使用、保管注意事项 .....	62
十九、三角瓶使用高效原则、注意事项 .....	65
二十、样品柜分类、使用注意事项 .....	68
二十一、摇床预约使用注意事项 .....	71
二十二、凝胶使用规则 .....	75
二十三、GelDoc XR+系统的清洁与维护 .....	76
二十四、纯水仪使用注意事项 .....	77
<b>第三部分：实验室卫生与行为规范 .....</b>	<b>78</b>
一、实验室卫生与行为规范 .....	79
二、实验室晚间离室确认制度 .....	82
<b>第四部分：实验室文献阅读制度 .....</b>	<b>87</b>
一、每月文献阅读 .....	88
二、每月文献阅读及管理制度考核制度 .....	89
三、文献阅读公众号运行管理制度 .....	90
<b>第五部分：实验室技术培训 .....</b>	<b>91</b>
一、Cas9 基因敲除的载体构建和接合转移 .....	92
二、三维结构分析和绘图基础：pymol 软件的使用 .....	98
三、色谱柱的活化、保养、再生 .....	104
四、质粒构建软件 SnapGene 的使用 .....	106

# 第一部分：实验室安全注意事项

张庆波 张海波 张光涛编

## 一、实验室区域行为规范

1. 实验室内禁止饮食、储存食品、饮料及其他个人生活物品。
2. 实验区域内不穿拖鞋、露趾凉鞋，不披头散发。
3. 不在实验室内做与实验与研究无关的事情。
4. 整个实验室区域禁止吸烟（包括室内、走廊、电梯间等）。
5. 外人进入实验室，须事先与组内人员进行联系，并在行政管理人员处登记备案。
6. 牢记紧急情况下的消防逃生路线及紧急应对措施，了解急救箱、灭火器材及紧急洗眼装置位置，并熟悉使用方法。紧急联系电话为：119（火警）/120（急救）/110（报警）。
7. 保持实验室门和走道畅通，最小化存放实验室的试剂数量，未经允许严禁储存剧毒药品。
8. 离开实验室前须洗手，不可穿实验服、戴手套进入餐厅、图书馆、会议室、办公室等公共场所。
9. 保持实验室干净整洁，实验结束后将实验用具、器皿等及时洗净、烘干、入柜，室内和台面均无大量物品堆积，每天至少清理一次实验台，物品摆放须整齐。
10. 实验工作中碰到任何疑问须及时向仪器设备责任人、带教老师或其他相关人员询问，不可盲目操作。
11. 实验进行期间严禁长时间离开实验现场，如确有要事，须将工作暂停。不建议交由其他人代为操作。
12. 非正常工作时间内做危险实验时，室内须有两人以上同时在场，以保实验安全。
13. 遇到任何安全隐患，在不能确认自己可以妥善处置的情况下，须第一时间通知室内资深老师，不建议擅自处理，造成人身伤害。遇到任何危险，以生命安全及身体健康为第一优先。

## 二、化学品的储存保管

1. 所有化学药品的容器都要贴上永久标签，详细标记内容物的名称、特性及其潜在危险。
2. 所有化学药品应具备物品安全数据清单。
3. 熟悉所使用的化学药品的特性与潜在危害。
4. 对在储存过程中不稳定或容易变性形成过氧化物的化学药品需加注特别标记。
5. 化学药品应储存在合适的高度，通风橱内不得储存化学药品。
6. 装有腐蚀性液体容器的储存位置应当尽可能低，并加垫收集盘，以防倾洒引起安全事故。
7. 将不稳定的化学品分开储存，标签上标明购买日期。将有可能发生化学反应的药品试剂分开储存，以防相互作用产生有毒烟雾、火灾，甚至爆炸。
8. 挥发性和毒性物品需要特殊储存条件，未经允许不得在实验室储存剧毒药品。
9. 在实验室内不得储存大量易燃溶剂，用多少领多少。未使用的整瓶试剂须放置在远离光照、热源的地方。
10. 接触危险化学品时必须穿工作服，戴防护镜，穿不露脚趾的满口鞋，长发必须束起。
11. 不得将腐蚀性化学品、毒性化学品、有机过氧化物、易自燃品和放射性物质保存在一起，特别是漂白剂、硝酸、高氯酸和过氧化氢。

### 三、有机溶剂的使用

#### (一) 易燃有机溶剂

有机溶剂具有易燃易爆危险的递增性。易燃性大部分有机溶剂闪点在常温以下，其气体密度大于空气密度，并易积聚在不易通风的低洼区域，不但会增加发生火灾的可能性，还会增加发生火灾时灾害扩散的可能性。应用最多的有机溶剂如二甲苯、甲苯、正丁醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸丁酯等爆炸危险性较高。

许多有机溶剂如果处理不当会引起火灾甚至爆炸。溶剂和空气的混合物一旦燃烧便迅速蔓延，火力之大可以在瞬间点燃易燃物体，在氧气充足（如氧气钢瓶漏气引起）的地方着火，火力更猛，可使一些不易燃物质燃烧。当易燃有机溶剂蒸气与空气混合并达到一定的浓度范围时，甚至会发生爆炸。

#### **使用易燃有机溶剂时，需注意以下事项：**

1. 将易燃液体的容器置于较低的试剂架上。
2. 保持容器密闭，需要倾倒液体时，方可打开密闭容器的盖子。
3. 应在没有火源并且通风良好(如通风橱)地方使用易燃有机溶剂，但注意用量不要过大。
4. 储存易燃溶剂时，应该尽可能减少存储量，以免引起危险。
5. 加热易燃液体时，最好使用油浴或水浴，不得用明火加热。
6. 使用易燃有机溶剂时应特别注意使用温度和实验条件，表 1 为常用易燃有机溶剂的燃点、自燃温度、燃烧浓度范围。
7. 化学气体和空气的混合物燃烧会引起爆炸(如 3.25 克丙酮气体燃烧释放的能量相当于 10g 炸药)，因此燃烧实验需谨慎操作。
8. 使用过程中，需警惕以下常见火源：明火(本生灯、焊枪、油灯、壁炉、点火苗、火柴)、火星(电源开关、磨擦)、热源(电热板、灯丝、电热套、烘箱、散热器、可移动加热器、香烟)、静电电荷。

## （二）有毒有机溶剂

人若长时间吸入有机溶剂的挥发物将会引起慢性中毒的现象，但短时间暴露在高浓度有机溶剂的挥发物之下也会有急性中毒致命的危险。有机溶剂的挥发物可以经由皮肤接触、呼吸器官、消化器官对人体内部其他器官同时造成伤害。有机溶剂中毒一般症状为头痛、疲惫、食欲不振、头晕等。高浓度的急性中毒抑制中枢神经系统，使人丧失意识。低浓度引起的慢性中毒会引起皮下组织出血，造成贫血。有机溶剂会对神经系统、肝脏机能、肾脏机能、造血系统、粘膜及皮肤产生破坏性影响。

比如：伯醇类(甲醇除外)、醚类、醛类、酮类、部分酯类、苄醇类溶剂易损害神经系统；羧酸甲酯类、甲酸酯类会引起肺中毒；苯及其衍生物、乙二醇类等会发生血液中毒；卤代烃类会导致肝脏及新陈代谢中毒；四氯乙烷及乙二醇类会引起严重肾脏中毒等。

### 使用有毒有机溶剂时，需注意以下事项：

1. 尽量不要将皮肤与有机溶剂直接接触，务必做好个人防护，详见：三实验室个人防护知识。
2. 注意保持实验场所通风。
3. 在使用过程中如果有毒有机溶剂溢出，应根据溢出的量，移开所有火源，提醒实验室现场人员，用灭火器喷洒，再用吸收剂清扫、装袋、封口，作为废溶剂处理。

## （三）有机溶剂使用后的处理注意事项

1. 氯仿、甲醇、丙酮、乙酸乙酯等常用溶液的废液，倒入废液桶，请注意分类（废液桶贴明标签）。
2. 乙腈废液需值日生及时回收，勿存贮过多造成威胁。
3. 发酵液用丁酮或乙酸乙酯萃取后的水相须回收丁酮或乙酸乙酯后再倒入废液桶，在1楼处理。

## 四、电的使用

1. 实验室内严禁私拉电线。
2. 使用插座前需了解额定电压和功率，不得超负荷使用电插座。
3. 插线板上禁止再串接插线板。同一插线板上不得长期同时使用多种电器。
4. 大型仪器设备需使用独立插座。
5. 不得长期使用临时接线板。
6. 工作时间时，如果人不在办公位置上，请关闭显示屏，保护个人信息。下班时关闭主机及显示屏。
7. 节约用电。下班前和节假日放假离开实验室前应关闭空调、照明灯具、计算机（主机及显示屏）等用电器。即使在工作日，这些用电器没有必要开启时，也要随时将其关闭。

## 五、水的使用

实验室用水分为自来水、纯水及超纯水三类。其中纯水指 E-POD 的水或怡宝桶装水，超纯水指 Q-POD 的水（分类详见“P81 纯水仪使用注意事项”）。

**在使用时应注意如下要点：**

1. 节约用水，按需求量取水。
2. 根据实验所需水的质量要求选择合适的水。
  - 1) 洗刷玻璃器皿应先使用自来水，后用桶装纯水冲洗。
  - 2) 微生物培养基制备使用桶装纯水。
  - 3) HPLC 流动相配制，细胞实验、生化实验缓冲液的配制选用超纯水。
3. 超纯水和桶装纯水都不要存储，随用随取。若长期不用，在重新启用之前，要打开取水开关，使超纯水或桶装纯水流出约几分钟时间后再接用。
4. 用毕切记关好水龙头。

## 六、液氮的使用

液氮（Liquid nitrogen）经常作为制冷剂来使用。制冷剂会引起冻伤，少量制冷剂接触眼睛会导致失明，液氮产生的气体快速蒸发可能会造成现场空气缺氧。使用和处理液氮时应注意：

1. 戴上绝缘防护手套。
2. 穿上长度过膝的长袖实验服。
3. 穿上过脚踝不露脚面的鞋，戴好防护眼镜，必要时戴防护面罩。
4. 保持环境空气流畅。

## 七、洗液的使用

洗液分为酸性洗液(重铬酸钠或重铬酸钾的硫酸溶液)、碱性洗液(氢氧化钠-乙醇溶液)及中性洗液(常用洗涤剂)。

1. 酸性洗液放于玻璃缸内，碱性洗液可放于塑料桶内。
2. 使用碱性洗液时，玻璃仪器的磨口件应拆开后再放入洗液缸内，以免磨口被碱性液腐蚀而发生粘合。放入碱液前玻璃仪器要用丙酮和水预洗。

## 八、配制硫酸溶液、氢氧化钠

1. 配制硫酸溶液时要戴好防腐蚀乳胶手套和防护眼镜，使用玻璃容器盛装。
2. 将酸加入水中而不是将水加入酸中，边加入边搅拌，待冷却后装入试剂瓶中。
3. 若硫酸溅到皮肤上则用抹布擦拭干净后再用大量水冲洗。
4. 氢氧化钠溶液配制时先称好氢氧化钠后加入水，加水里须边加入边搅拌，待冷却后装入试剂瓶。
5. 使用腐蚀性的溶液会对我们的实验台、实验仪器腐蚀。那么在使用这些溶液的时候我们的防护措施就要做好，若溶液滴在实验台、实验仪器上要及时用抹布擦拭干净。使用后的废液要用容器进行回收而不是乱排乱放。

## 九、生物安全注意事项

微生物实验室管理上的疏漏和意外事故不仅可以导致实验室工作人员的感染，也可造成环境污染和大量人群感染；生物实验室产生的废物甚至比化学实验室的更危险，生物废弃物含有传染性的病菌、病毒、化学污染物及放射性有害物质，对人类健康和环境污染都可能构成极大的危害。生物实验中产物的废物如病原微生物、实验微生物、微生物接种用具等，废弃前均需高温灭菌。

## **第二部分：实验室仪器使用与操作规范**

## 一、HPLC 使用操作方法及注意事项

刘智文编

### (一) HPLC 使用操作方法及注意事项

#### 1. 流动相配制

- 1) A 相为 10% 乙腈，B 相为 90% 乙腈，仅 A 相加 **0.08%** 的色谱级甲酸。
- 2) 为防止颗粒性物质对泵组件的磨损和堵塞色谱柱，流动相需用“Nylon”材料的滤膜过滤。
- 3) 上机前对流动相进行**超声脱气(95 Hz, 30 min)**。

#### 2. 样品准备

- 1) 进样样品先用甲醇溶解，**高速离心 14000rpm10 分钟**后取上清或离心 2 次。
- 2) 粗样品以及易堵样品，考虑进一步稀释或换溶剂，最好用微孔滤膜过滤一次，酶反应样品则考虑萃取后进样。
- 3) 能进 HPLC 的溶剂有甲醇、乙醇、水、丙酮、吡啶、DMSO，以甲醇、乙醇、DMSO 为主，其他溶剂尽量少用。**绝不能使用**极性小于丙酮的有机溶剂如乙酸乙酯、氯仿等。

#### 3. 开机前检查

开机前须检查流动相是否足够，废液瓶是否已经装满了，须及时处理及更换空瓶。

#### 4. 开机

- 1) 开机时先打开机器电源，再启动软件，选择模块界面的开始键 ，打开各个模块，四个模块变绿色的“空闲”状态则为正常。
- 2) 先打开 A 泵排气阀排气泡，将流速设为 5mL/min，记录压力，如果 A 相泵压超过 10 bar，则说明过滤白头需要更换了。如果更换了流动性，A、B 相需依次排气泡 5 分钟以上(流速 5 mL/min，打开排气阀)，观察管道无气泡后才能让流动性进入色谱柱。
- 3) 用 100%B 相冲洗色谱柱 20 min 以上再运行自己的样品。

#### 5. 运行设置注意

- 1) 在使用过程中请**不要更改他人的方法和序列表**，凡是提示有是否改变某某方法或序列的提示对话框时，一律选择否。

- 2) 使用方法时先调用该**方法检查**是否正确。
- 3) **可见光灯、氙灯**请勿设置自动开启，以免程序难启动。
- 4) **进样针取样高度**请统一设置于 2.5mm，以免损坏针头。
- 5) **进样量**最好小于 70 $\mu$ L。
- 6) 注意**样品瓶放置**的位置与序列表中的序号相一致。
- 7) 注意**样品瓶盖的垫圈**是否破损，请及时更换，避免垫圈屑堵塞进样针。
- 8) 请勿在样品瓶上**贴标签纸**，以防取样机械手抓不紧。
- 9) 1 号瓶默认为**甲醇洗针瓶**，注意更换和补充洗针瓶中的溶剂。
- 10) HPLC 白天运行，多个人进样时序列参数不必设关灯程序，只**关泵(pump off)**，夜晚运行时请设**关灯关泵程序(standby)**，以提高灯的使用寿命。
- 11) 每个人在自己 HPLC 分析序列后面都要加一针**梯度洗柱 30 min**的方法，使用完需要关机的请再增加一个 **100%B 相洗柱 30 min** 的方法。
- 12) 有用**缓冲盐**做流动相，请先拆下色谱柱，用完后请用 100%水相冲洗系统 30min 后以除系统中的盐，再接上色谱柱用 **100%B 相洗色谱柱**。
- 13) **检查填充瓶**设置，避免因填充瓶溶剂不足而停止运行。
- 14) 含有**三氟乙酸的液相废液**请单独收集回收。

## 6. 关机

用 100%A 相冲洗柱子和系统 10 min，流量 1mL/min，再用 100%的 B 相冲洗 30min，然后依次关泵、退出化学工作站及其它窗口，关闭计算机及电源开关。

7. 机器发生故障时，记录故障原因，使用人等信息，并及时在群里告知大家。

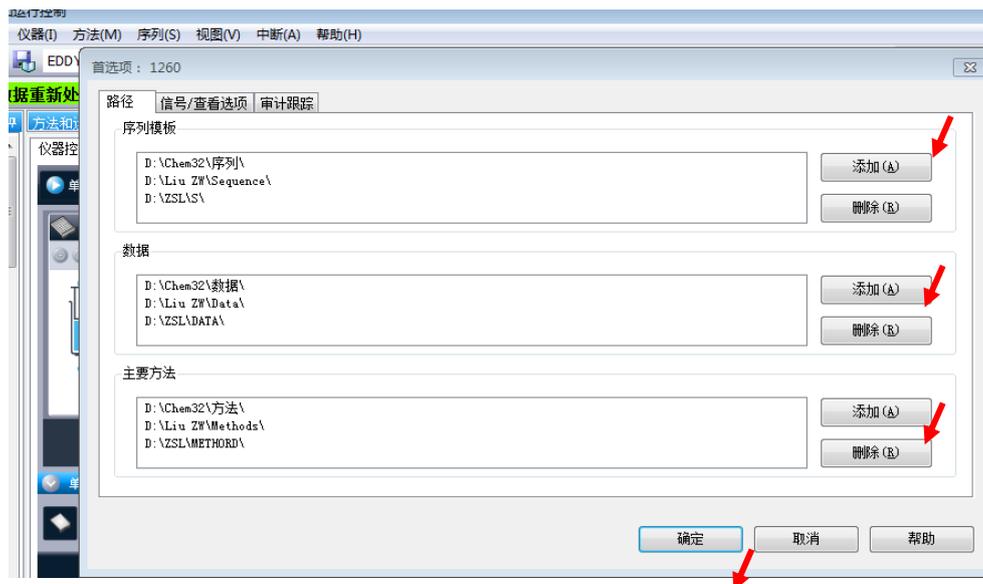
## 8. 制备 HPLC 使用注意

- 1) 回收后的流动相必须用“Nylon”材料的**滤膜过滤**后才能使用。
- 2) 在制备前必须用注射器吸取甲醇，**清洗六通进样阀 2 次以上**(在 load 状态)，避免进样器堵塞和污染自己的样品。每个人在制备使用后也要用注射器吸取甲醇，清洗进样阀 2 次，保证进样器干净，避免残余样品堵塞进样器。
- 3) 开始使用先以 **100% B 相冲洗柱子**，并记录柱压，压力大了就是堵了，压力小了就是漏了，特别是在制备过程中，发现每一针压力都在上升，要考虑你的样品可能添堵了；制备柱用完后用 100% B 相冲洗柱子 30min，并记录压力。

## (二) Agilent 1260 HPLC 软件操作细则

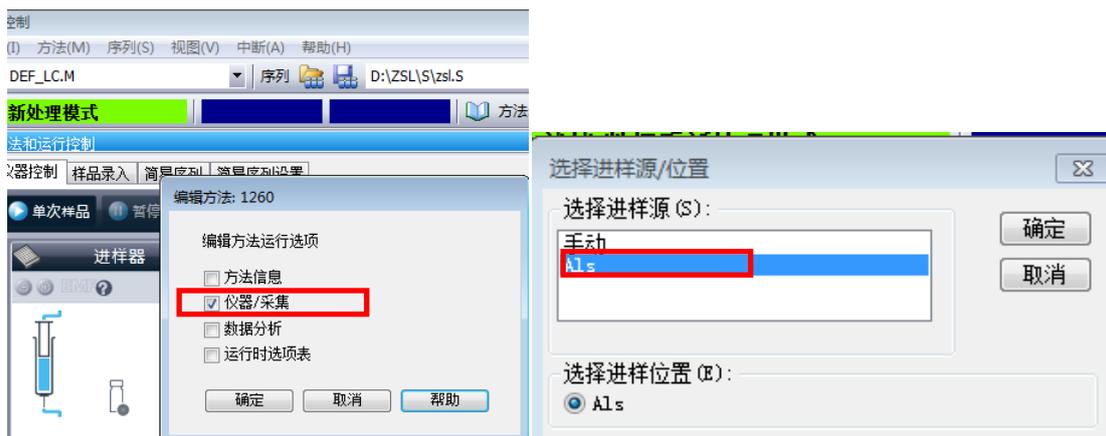
### 1. 设置数据路径

- 1) 在数据盘中新建个人文件夹,如“LiuZW”,在文件夹中新建“Sequence”、“Data”、“Methods”文件夹。
- 2) 打开联机软件,在“视图”菜单中选择—“首选项”项,分别单击“添加”,以添加自己新建的文件夹,作为序列、数据和方法的存放路径,单击“确定”。



### 2. 新建个人方法(在联机或脱机中操作均可)

- 1) “方法”菜单中选择—“编辑完整方法”,只选择“仪器/采集”一项,点“确定”,再选择“AIs”并点“确定”入下一画面“设置方法”进行参数设定。

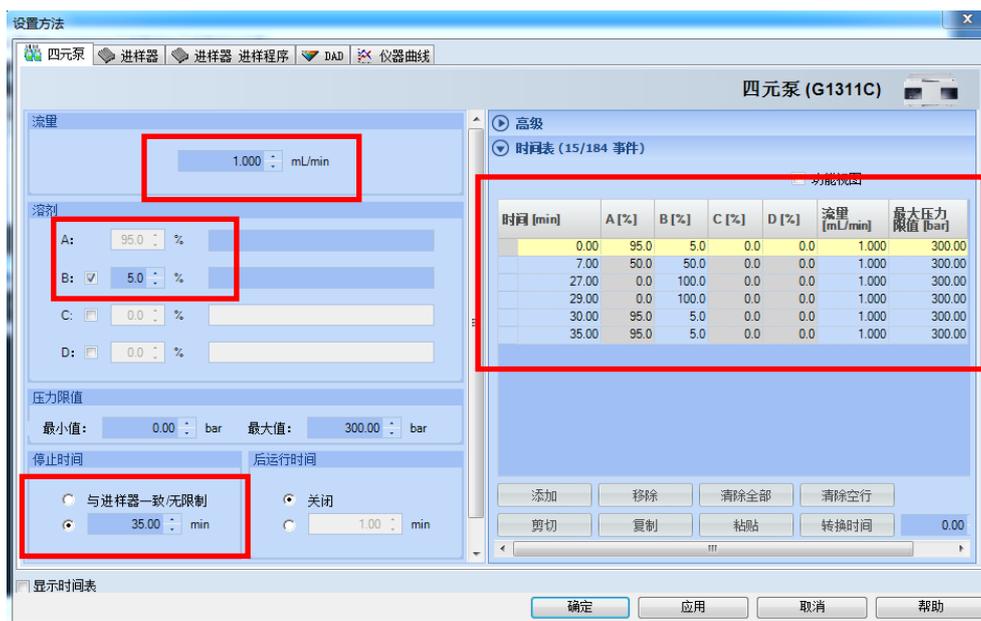


- 2) 在“设置方法”中设置相关参数:

“二(四)元泵”参数设定:

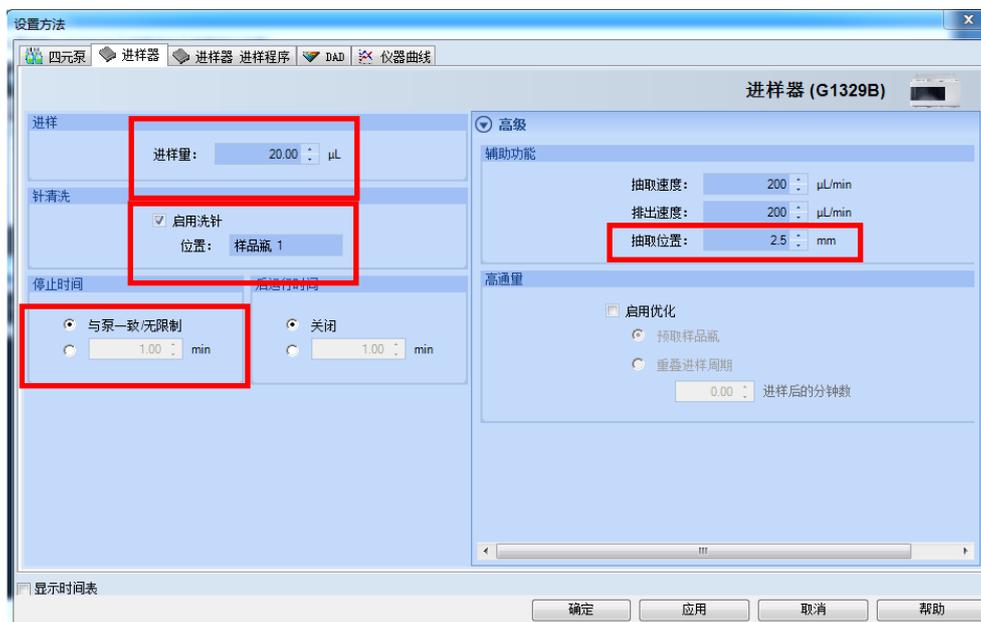
如流量 1 mL/min; 在“溶剂”处选中 B 输入流动相组成; 设置“停止时间”; 在“时间表”添加编辑梯度。

## 第二部分：实验室仪器使用与操作规范



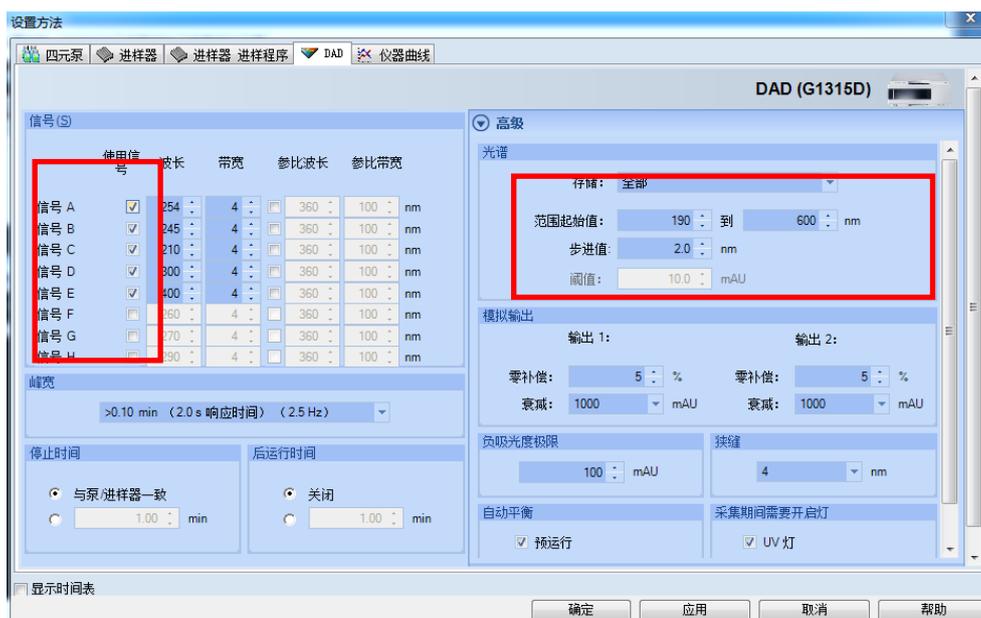
### “进样器”参数设定:

- 选择“启用洗针”项，位置为“样品瓶 1”
- “停止时间”选择“与泵一致/无限制”
- 进样针取样高度请统一设置于“2.5”mm，以免损坏针头。



### “DAD”参数设定:

选择自己需要的波长，“光谱”的“储存”一栏选择全部，“范围起始值”选“190”到“600”nm，其他设置默认即可。



### 3. 保存方法

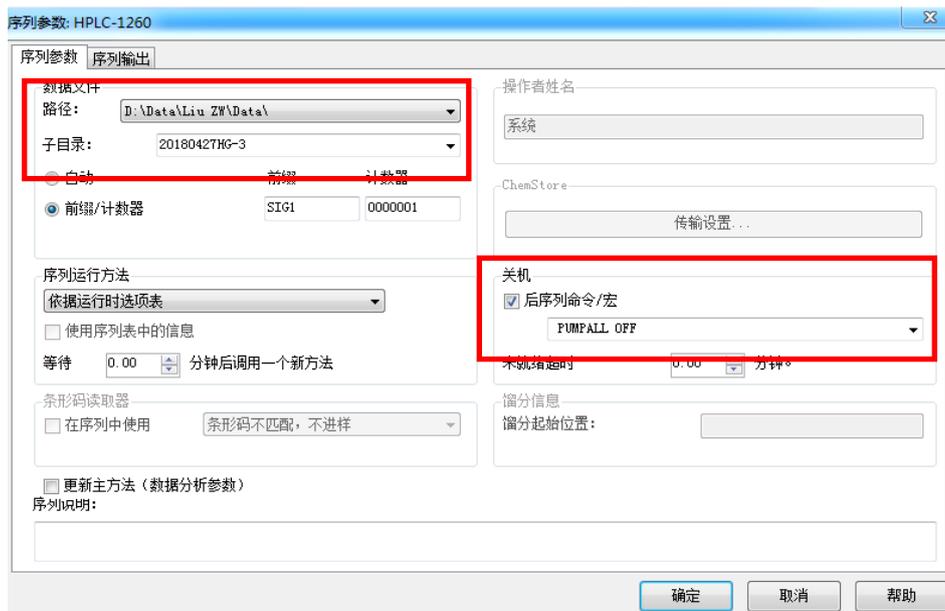
点“确定”完成方法。随后在“方法”菜单中选择—“方法另存为”，保存在自己的“Methods”文件夹中，并命名。需修改方法，可以在“方法”菜单中选择—“调用方法”，再进行上述操作修改方法。

### 4. 新建个人序列列表(在联机界面中操作)

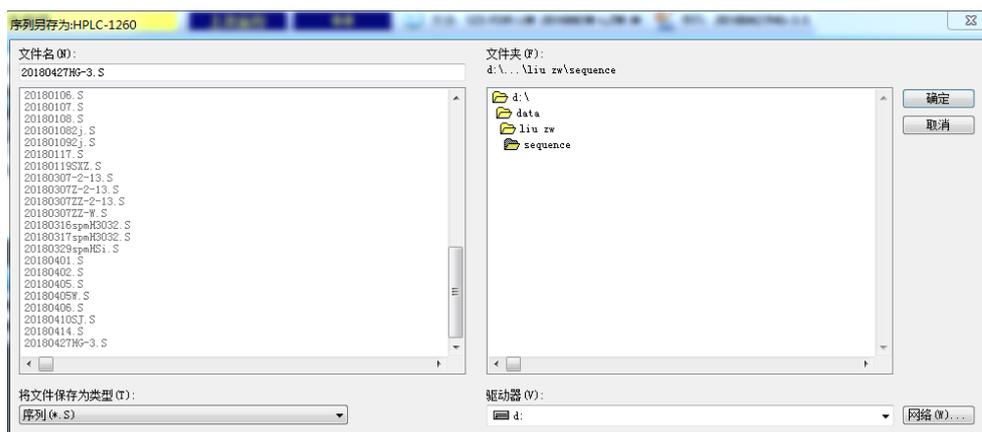
- 1) 在“序列”菜单中选择—“序列列表”，在弹出的序列列表中设置“样品位置”、“样品名称”、“方法名称”(选择自己的方法)、“进样量”和“数据文件”(数据保存的名称)。再点“确定”完成序列列表。



- 2) 在“序列”菜单中选择—“序列参数”，选择数据文件“路径”，编辑“子目录名称”；白天运行,“后序列命令/宏”设关泵程序“PUMP OFF”，夜晚运行时请设关泵关灯程序“STANDBY”。



- 3) 在“序列”菜单中选择—“序列模版另存为”，并命名。需修改序列，可以在“序列”菜单中选择—“调用序列模版”，选择需要的序列，再进行上述操作修改序列列表。



5. 运行序

## 列

在各个模块显示绿色“空闲”状态后，在“序列”菜单中选择—“调用序列模版”，选择需要运行的序列，在“运行控制”菜单中选择—“运行序列”即可，或者在模块界面中

选择“ 序列”。



### (三) 2018 新制备柱使用规范

新制备柱（配预柱）由张文军老师、张海波老师、张庆波老师、刘智文、刘威各负责一根制备柱，每根制备柱做好标记且配一个记录本，负责人负责柱子的管理和维护。其他做化学实验的学生分配到 5 名制备柱管理人员组，做生物的老师或学生需要使用可提前联系任何负责人，使用时必须遵守使用规范并做好记录。

#### 1. 新制备柱预处理推荐

90% ACN/H<sub>2</sub>O 2.5 mL/min, 冲洗 30 min; 10 % ACN/H<sub>2</sub>O ~ 90% ACN/H<sub>2</sub>O, 梯度冲洗 1 h; 90% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 30 min。

#### 2. 使用规范

- 1) 必须分别记录新柱子接预柱和不接预柱(90% ACN/H<sub>2</sub>O, 2.5 mL/min)的压力，每次使用者必须记录柱子(接预柱)使用前后，90% ACN/H<sub>2</sub>O, 2.5 mL/min 的状态的柱压，与上一次使用进行比较，压力大了，超过 10 bar (140 psi)，要考虑是不是柱子脏了。

#### 2) 柱子冲洗方法

(1) 如果缓冲盐堵柱子，用 10% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 1 h 除盐后，再用 90% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 30 min 以上。

(2) 如果样品堵柱子，考用梯度流动相和 90% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 1 h 后，再用 90% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 30 min 以上。

(3) 如还不能解决，可以把预柱的柱芯取出来用甲醇冲洗，再把预柱单独用 90% ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 10 min，再连上柱子用 90 % ACN/H<sub>2</sub>O 冲洗 30 min 以上。

- 3) 使用者请温柔对待制备柱，轻拿轻放，避免剧烈震动和重摔。

#### 3. 使用交接

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

柱子领用人在离开实验室时，应将色谱柱交回。

制备柱编号	制备柱类型	领用时间	负责人
K1	PhenomenexKinetex C <sub>18</sub>	2018.6.1	张文军

#### （四）液相使用注意事项

1. 登记使用。
2. 及时更换流动相。
3. 流动相瓶、废液瓶使用不同标签纸（流动相瓶绿色、废液红色）。
4. 流动相及时更换，勿倾斜使用。
5. 及时取走进样瓶。
6. 废液回收。废液回收强调两点，一、及时，每隔 10 天到 15 天回收一次，原则：不堆积，因为天气热，有挥发对实验人员健康不好，也有安全隐患。二、回收时撕下原帐号有标签，接废液和配制流动相时贴上相应标签。
7. 半制备液相须预约使用。

附件：液相预约表

**Booking rules of preparative HPLC**

1. Everyone can only book **one preparative HPLC** for use of **two days** every week. Write the user's name in the table below.
2. Book on **Friday** for next one week (Mon. to Sun.).
3. Who book the instrument, who use it.
4. Keep the instrument and desk clean when you finished.
5. Please contact Dr. Wenjun Zhang if you have some special needs for more time.

DATE	WEEK	Hitach 7	Hitach 8
	<b>Fri</b>		
	Sat		
	Sun		
	Mon		
	Tus		
	Wed		
	Thu		
	<b>Fri</b>		
	Sat		
	Sun		
	Mon		
	Tus		
	Wed		
	Thu		
	<b>Fri</b>		
	Sat		
	Sun		
	Mon		
	Tus		
	Wed		
	Thu		
	<b>Fri</b>		
	Sat		
	Sun		
	Mon		
	Tus		
	Wed		

11.8	Thu		
11.9	<b>Fri</b>		
11.10	Sat		
11.11	Sun		
11.12	Mon		
11.13	Tus		
11.14	Wed		
11.15	Thu		
11.16	<b>Fri</b>		
11.17	Sat		
11.18	Sun		
11.19	Mon		
11.20	Tus		
11.21	Wed		
11.22	Thu		
11.23	<b>Fri</b>		
11.24	Sat		
11.25	Sun		
11.26	Mon		
11.27	Tus		
11.28	Wed		
11.29	Thu		
11.30	<b>Fri</b>		
12.1	Sat		
12.7	Sun		
12.8	Mon		
12.9	Tus		
12.10	Wed		
12.11	Thu		
12.12	<b>Fri</b>		
12.13	Sat		
12.14	Sun		
12.15	Mon		
12.16	Tus		
12.17	Wed		
12.18	Thu		
12.19	<b>Fri</b>		
12.20	Sat		
12.21	Sun		
12.22	Mon		

## 二、旋转蒸发仪使用操作方法及注意事项

张海波编

### (一) 旋转蒸发仪操作步骤

1. 打开低温冷却循环泵电源开关，设定冷凝温度-10 关。
2. 打开水浴锅，设定蒸发温度，一般为 40℃（遇到高温易变化的化合物请使用冻干机）。
3. 开启隔膜真空泵和真空控制器（不用设定到零，隔膜真空泵的最小真空度为 7 mbar）电源，根据所用的溶剂设定真空度。如果蒸乙腈-水混合物可以先设定一个较大的真空度（120 mbar），蒸发一段时间以后，再设定一个较低的真空度（80mbar）以加快蒸发速度。
4. 装上盛有待浓缩液体的磨口烧瓶，关闭旋转蒸发仪上的放气旋钮。调整烧瓶在水浴锅中的高度。（注意：装上烧瓶后不要立即松手，观察真空控制器上面显示的真空度，待瓶内压力下降到 400 mbar 后再松手，避免旋转瓶掉进水浴锅中。调整烧瓶在水浴锅中的高度，使烧瓶的重力与其所受的浮力相平衡，避免玻璃旋转轴因承受过大的力而折断）
5. 当真空度下降到 400 mbar 后，打开旋转开关，调整转速至 150 rpm。继续观察真空控制器，当真空度下降到第 3 步的设定值时，冷凝塔中应该有液体流下。
6. 烧瓶中的待浓缩液体蒸发完毕后，关闭旋蒸仪上的旋转开关和连接在旋蒸仪上的真空抽气旋钮。从水浴锅中升高烧瓶，打开放气旋钮，待瓶内压力升高到 1000mbar 时拆下烧瓶。
7. 关闭旋蒸仪电源
8. 关闭低温冷却循环泵电源
9. 关闭真空泵及真空控制器电源
10. 低温冷却液循环泵  
开启 1. 打开“电源”开关 2. 打开“循环”开关 3. 打开“制冷”开关  
关闭 4. 关闭“制冷”开关 5. 关闭“循环”开关 6. 关闭“电源”开关

### (二) 注意事项

1. 安装烧瓶至旋蒸仪的玻璃旋转轴和冷凝塔的两个接口上时，注意对接的两个磨口部分都要保持清洁无颗粒物，否则会漏气真空度降不下来。真空度要求特别高时，对

## 第二部分：实验室仪器使用与操作规范

接的两个磨口部分可以加少量真空硅质油。不要用凡士林，普通的矾士林在真空度特别低时很容易黏结导致瓶子拆不下来!旋蒸仪使用过程中，瓶内的液面最好低于水浴加热的液面,以免玻璃旋转轴受损!

2. 茄形瓶内装溶剂一般不能超过 50%。
3. 使用时必须有人在场，防止液体蒸干后旋蒸仪还在空转。
4. 液体刚从冷凝塔流下时，气液未在平衡状态，此时易暴沸，必须及时进行减压操作。
5. 根据溶剂设定水浴锅加热温度，常用有机溶剂的沸点不超过 80 度，可以设定加热温度为 30-40 度。
6. 一般先开冷却装置，再加热防止溶剂挥发。
7. 回收较多溶剂时，特别是回收氯仿时，装回收溶剂的瓶子一定要用升降台支撑好，防止瓶子太重掉下来。

## Operation procedure of rotary evaporator

Edit by Zhang Haibo

1. Turn on the switch of low-temperature cooling cycle pump, set the condensation temperature at  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Turn on the switch of water bath and set the temperature at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Please use the freeze-dryer when your compound is labile at high temperature).
3. Turn on the switch of diaphragm vacuum pump and the controller (the minimum vacuum of our diaphragm vacuum pump is 7 mbar), set the vacuum value according to the boiling point of the solvent which you are using now. For example, if you are evaporating the acetonitrile-water mixture, you can set a higher vacuum (120 mbar) initially, when the acetonitrile concentration becomes low, reset the vacuum at a lower value (80mbar) that can accelerate the evaporation.
4. Install a flask containing solvent to the glass conductor of vapor and close the ventilation stopcock on the rotary evaporator. Adjust the height of the flask in the water bath. (attention: do not let the flask turn around immediately after the installation, observe the vacuum value shown on the vacuum controller, wait it falls to 400 mbar then turn on the rotation which can avoid the flask fall into the water bath. Pay attention to the height of the flask which was immersed in the water to keep the balance between the gravity of the flask and the buoyancy of the water. If you could not keep the force balance between the flask and the water, the glass conductor of vapor would break off.
5. When the vacuum falls to 400 mbar, turn on the rotary switch and adjust the rotation speed to 150rpm. Keep observing the vacuum value when it reaches to the value set on step 3, the condensed vapor should flow down into the receptor.
6. When the evaporation of the liquid in the flask has been finished, turn off the rotary switch and close the vacuum suction knob connecting to the evaporator. Raise the flask from the water bath and open the ventilation stopcock, and remove the flask when the pressure inside the flask rises to 1000mbar.
7. Turn off the switch of the evaporator.
8. Turn off the switch of low temperature cooling cycle pump.
9. Turn off the switch of vacuum pump and vacuum controller.

### Operation procedure of low-temperature cooling cycle pump

Start using: 1. Turn on the Power switch; 2. Turn on the Cycle switch; 3. Turn on the Refrigeration switch

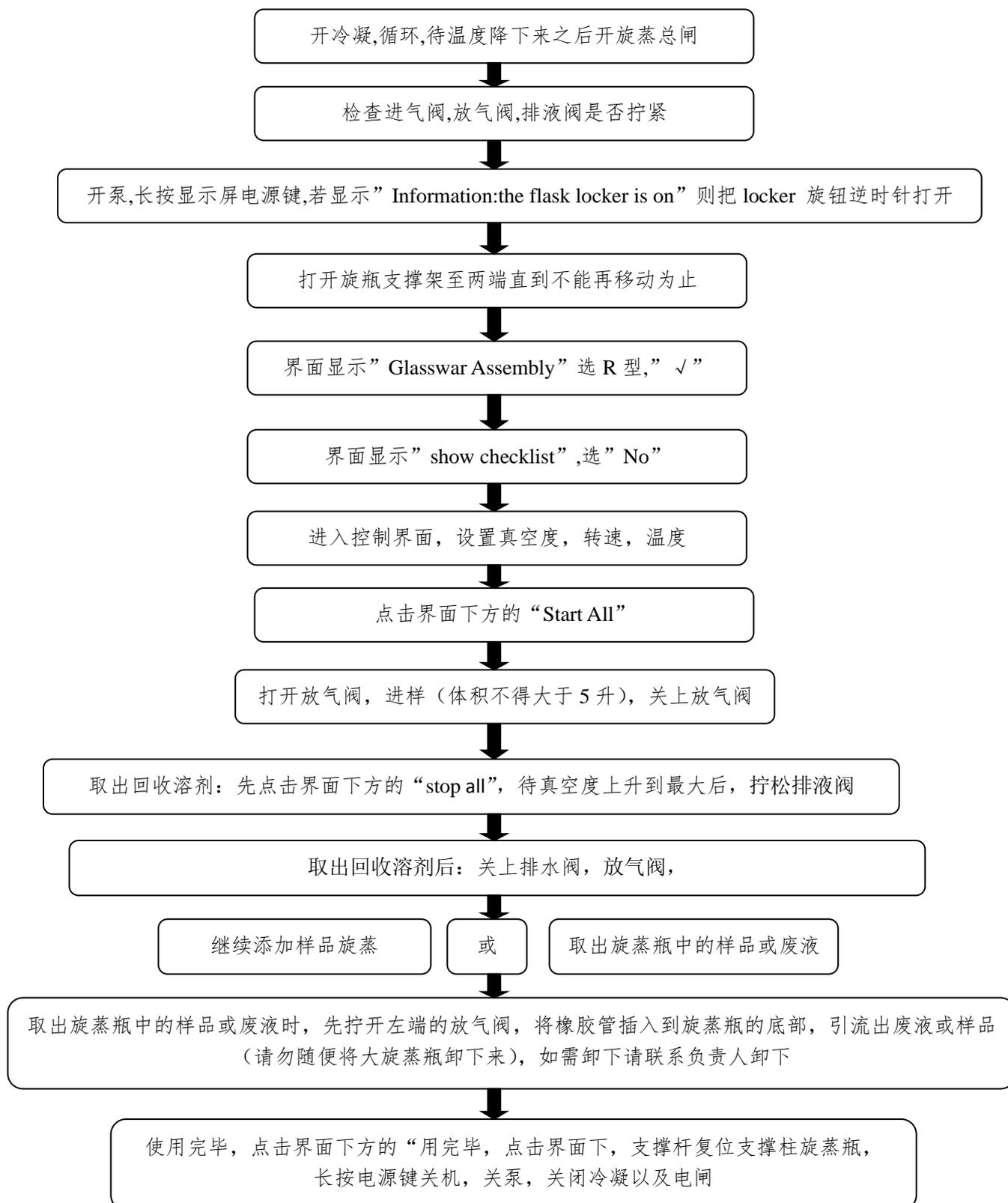
End using: 4. Turn off the Refrigeration switch; 5. Turn off the cycle switch 6. Turn off the power switch

### CAUTION

1. When you install the flasks to the glass conductor of vapor and the condensing tower of the rotary evaporator, you should pay attention to the interface between two parts. They should be clean and free of particles on the surface of two parts. Otherwise there is air leakage into the rotary evaporator. When you need a very small vacuum value inside of the system, a small amount of vacuum silicone oil can be added to the interface between two parts. Ordinary Vaseline is not allowed to spread on the interface because it will make the flask immovable from the joint.
2. The liquid level in the flask should be lower than water level in the bath. So that you can avoid the damage to the glass conductor of vapor!
3. Solvent volume containing in eggplant-shaped flask usually should be less than 50 percent of the total volume of the flask.
4. Users should be on site when you are using the rotary evaporator.
5. Bumping usually occurs in the initiation stage so that you should ventilate the system in time.
6. The boiling point of the common organic solvent is lower than 80°C, the evaporation temperature could be set at 30-40 °C.
7. It would be better to turn on the low-temperature cooling cycle pump at first step because this operation could prevent solvent volatilization.
8. When you cycle more organic solvent in the receptor, especially cycling the chloroform, the receptor flask must be supported by elevator-platform.

### 三、大旋转蒸发仪使用说明

刘威编





## 四、真空冷冻干燥机的使用方法及注意事项

张文军编

### （一）使用方法

1. 使用前先将准备干燥的物品置于低温冰箱，使物品完全冰冻结实，方可进行冷冻干燥。
2. 检查真空泵，确认真空泵油高于油镜中线。
3. 打开真空冷冻干燥机机箱左侧的总电源开关，气压数显为大气压 110pk。
4. 选择真空冷冻干燥机控制面板上的 Warm-up vacuum pump，预冷 20 分钟。
5. 预冷完毕后，将样品放入样品架，选择 yes 选项，机器将进入 Main Drying 模式。
6. 待真空冷冻干燥机的气压数显稳定后，记录温度和气压数值。
7. 停机。
8. 记录停机前的温度和气压数值。
9. 选择 Standby 选项，机器依程序设定关闭真空泵和制冷机。
10. 小心旋动玻璃罩上黑色旋钮，旋开“充气阀”向冷阱充气。
11. 气压数显为大气压时，打开有机玻璃罩，取出样品。
12. 关闭真空冷冻干燥机的总电源开关。
13. 冷阱中的冰完全化水后打开机箱左侧的出水阀放水，并用干布清洁冷阱内壁，盖上大张滤纸防尘。

### （二）注意事项

1. 制备样品时应尽可能扩大其表面积，其中不能含有酸碱物质和挥发性有机溶剂。
2. 样品必须完全冻结成冰，如有残留液体会造成气化喷射。
3. 启动真空泵以前，检查出水阀是否拧紧，充气阀是否关闭，有机玻璃罩与橡胶圈的接触面是否清洁无污物，良好密封。
4. 一般情况下，该真空冷冻干燥机不得连续使用超过 48 小时。
5. 操作过程中切勿频繁开关，如因操作失误造成制冷机停止运转，不能立即启动，至少等 20 分钟后方可再次启动，以免损坏制冷机。
6. 每次冷冻干燥后，冷阱盘管上的冰化成水后，用毛巾清除干净冻干结。
7. 旋开“充气阀”向冷阱充气时，一定要慢，以免冲坏真空计。开启真空泵前注意检查真空泵油的油位和颜色，真空泵油的更换在 500 小时左右。

## 五、高压蒸汽灭菌锅使用操作方法及注意事项

张光涛编

### （一）使用方法

1. 首先检查锅内水量是否充足。水面与三角搁架相平为宜，水位不能高于金属筐。
2. 将灭菌的物品放入金属筐内，再放入灭菌锅内进行灭菌，物与物之间一定要有空隙。
3. 盖好锅盖，螺母对称拧紧，打开放气阀，关闭安全阀。
4. 打开电源，检查参数设置是否正确（121 源，检查参数设，若培养基含糖则需设置 115 培养基含糖则需设），检查各个阀门及开关是否工作正常。
5. 升温过程中，放气阀开始冒气，待温度上升到 100 程时，及时关闭放气阀。
6. 灭菌结束后，待压力降到 0 MPa（新锅显示 EDN）时，关闭电源，打开放气阀以排除余气，然后打开锅盖让其自然冷却，取出物品，需烘干的物品及时放到三楼烘箱。

### （二）注意事项

1. 锅内必须使用桶装怡宝水或蒸馏水，不得加入自来水。
2. 待灭菌的物品放置不易过紧。
3. 锅盖螺母必须对称拧紧。
4. 必须将锅内冷空气充分排除，否则锅内温度达不到规定温度，影响灭菌效果。
5. 灭菌完毕后，必须让其自然冷却降压至 0 MPa，中途不可放气减压。
6. 因电压问题，两个灭菌锅不能同时使用，必须等待一个灭菌锅灭菌结束并关闭电源后，才能打开另外一台灭菌锅电源使用。
7. 污染的培养基和平板灭菌后，请及时清洗灭菌锅，更换锅内的水。
8. 灭菌过程中，灭菌锅温度较高，请勿碰触，避免烫伤。
9. 放置灭菌物品时，严禁堵塞安全阀和放气阀，必须留出空位保证其空气畅通。

## 六、金属浴及水浴锅的使用及保存方法和注意事项

杨春芳编

### （一）金属浴工作原理

ThermoStat plus 恒温孵育器结合了 Peltier 半导体温控技术,可以对所有实验室常用的样品管进行精确的温度调控,温控范围在 $-5^{\circ}\text{C}$ 至 $99^{\circ}\text{C}$ 。

#### 具体操作:

按金属浴背面的开关按钮,开启仪器,按“温度”设置键的“↑”,“↓”按钮分别进行升温和降温调节,待金属浴温度升高或降低到目标温度后,放入样品管,然后按下“↑”按钮分别进行升键,即开始正计时;调节温度的同时按“时间”设置键的“↑”,“↓”按钮进行时间设置,然后按下“↓”按钮进行时间设键,即开始倒计时。

#### 使用注意事项:

1. 金属浴一般用于(1)外源片段及载体的限制性酶切( $30^{\circ}\text{C}$ / $37^{\circ}\text{C}$ ), (2)生物合成后修饰酶的体外生化反应( $28-35^{\circ}\text{C}$ ), (3)DNA 胶回收、ddH<sub>2</sub>O 水预热( $55-65^{\circ}\text{C}$ )。
2. 使用前检查模块锥孔是否有异物,样品管外壁是否洁净,以保证样品管与模块锥孔充分接触,达到受热的均匀性。
3. 如果使用在 $4^{\circ}\text{C}$ 恒温4小时以上的实验操作以后,必须清除模块锥孔冷凝水。
4. 尽量避免长时间高温(超过 $90^{\circ}\text{C}$ )实验操作,用完后及时关闭金属浴。

### （二）水浴锅工作原理

DK-8AXX 型电热恒温水槽底部水平放置不锈钢管状加热器,水槽的内部放有不锈钢搁架。恒温水浴锅右侧是电气箱,电气箱前面板上装有温度控制仪表、电源开关,左前方下侧有放水管,电气箱内有电热管和传感器。其工作原理:Cu50 传感器将水槽内水的温度转换为电阻值,经过集成放大器的放大、比较后,输出控制信号,有效地控制电加热管的平均加热功率,使水槽内的水保持恒温。当被加热的物体要求受热均匀,温度不超过 $100^{\circ}\text{C}$ 时,可以用水浴加热。

#### 具体操作:

打开控制面板下方的电源开关,按 set 键后,分别按“↑”,“↓”按钮进行升温和降温设置,待调节到目标温度,重新按一下 set 键便完成温度的设置。待温度升高到目标温度(从高温降低到低温,可以通过更换纯净水进行快速降温)后可将样品放入水浴锅,开展相应实验。

### 使用注意事项

1. 水浴锅常用温度： $(30^{\circ}\text{C}, 37^{\circ}\text{C})$ —限制性酶切反应； $(28\sim 35^{\circ}\text{C})$ —酶的体外生化反应； $(42^{\circ}\text{C})$ —外源 DNA 片段或质粒的细胞转化； $(50^{\circ}\text{C})$ —结合转移实验的孢子热击处理； $(55^{\circ}\text{C})$ —基因组提取，加入 10% SDS 处理时的温度。在预热及使用水浴锅时最好能在水浴锅旁贴好标签，以免他人在不知情的情况下关闭水浴锅而影响自己实验。
2. 打开电源开关前，检查水浴锅水位是否够高（1/3 及以上），若不够需及时加水。若水位低于 1/3 高度，同时发现水浴锅锅底积聚明显污垢，请不辞辛苦将水浴锅搬至水池边用刷子刷洗干净后，加入超过 1/3 高度的纯净水，方可继续使用。
3. 若不小心将样品（尤其是含有有机溶剂的样品，分菌用的泥土样品等）漏入水浴锅，请及时清理水浴锅（将锅中水倒掉，清洗干净水浴后，重新加入纯净水）。
4. 不要把水浴锅烧干（影响水浴锅使用寿命，带来实验室的安全隐患），使用  $50^{\circ}\text{C}$  及以上温度完成实验后，请及时关闭水浴锅。

## 七、电转化仪操作，电转杯使用及保存方法和注意事项

杨春芳编

### 1. 电转化仪工作原理

电穿孔是功能强大的将核酸、蛋白及其它分子导入多种细胞的高效技术。通过高强度的电场作用，瞬时提高细胞膜的通透性，从而吸收周围介质中的外源分子。这种技术可以将 DNA, RNA 及病毒颗粒导入原核和真核细胞内。

### 2. 具体操作（仅限 Eppendorf Electroporator 2510）:

- 1) 用灭菌的 10% 的甘油洗涤细胞 2 次，每次于 4°C，3600~4000rpm 离心 5~10min。
- 2) 先用超纯水，后用 70% 乙醇，再用无水乙醇洗电转杯各 2~3 次，放入超净台中吹干并照紫外 20~30min，之后置于冰上或 -20°C 冰箱中预冷。
- 3) 将不超过 10% 体积的 DNA 连接产物或质粒加入到 100ul 的菌液中，吹吸混匀，再将其加到预冷的电转杯狭缝中。
- 4) 擦干电转杯表面，放入电转仪中，预设电压（1400V，BW 转化；1700V，ET 转化），快速按“paulse”键两下，之后按“time const”键，数字显示为 4.8~5.0 为佳。
- 5) 从右侧拉出电转槽，从中取出电转杯，迅速将 500ul 预冷的 LB 培养基加入电转杯中，吹吸混匀，将菌液转移至灭菌的 1.5mL EP 管中。
- 6) 于 37°C，175rpm 复苏培养 1h 后涂布相应抗性/营养筛选平板。

### 3. 使用注意事项

- 1) 电转化需要低温，菌液处于低温是制备电转感受态的关键，制备电转感受态的试剂要预冷，加液操作在冰浴中完成。
- 2) 电转杯用完后，先超纯水洗（移液枪吹洗）3 遍，再 70% 乙醇洗两遍，最后用无水乙醇浸泡于室温或 4°C 冰箱保存。

## 八、超声破碎仪，高压破碎仪操作方法及注意事项

张丽萍、谭彬编

### (一) 超声破碎仪（美国 SONICS，型号 VCX150，配国产新芝防护外罩）

#### 1. 工作原理

超声波细胞破碎仪的电源变换器把 50/60 赫兹的市电电压变换成高频电能,并把这种高频电能输送到变换器内的压电换能器中,在压电换能器中转换成机械振动,探头加强变换器发出的机械振动,并以超声波的形式传送到液体中,这个作用形成成千上万的微泡(空穴),这些微泡在负压程时膨胀,而在正压程时爆聚,这种现象称为空化作用。它在爆聚点释放大量的能量,并且在探头端上产生强大的剪切作用。探头的端头越大,可处理的容积越大,但是强度越小。简单概括为:电能—机械能—负压(膨胀)—正压(爆聚)。

#### 2. 操作方法

- 1) 根据样品的多少选择合适的探针,(两种规格的探针,大的探针用于 1L 左右的菌液收集得到的菌体,小的探针用于 5-50mL 左右菌液收集得到的菌体),用配套的扳手将探针和变换器拧紧,从超声仪上方插入箱内。
- 2) 按“I”键仪器将激活,控制面板显示:时间 Time,脉冲 Pulse 和振幅 Ampl。
- 3) 按“TIMER”键,输入要超声的时间,一般一升的菌体超声时间设定为 15-20min,5 毫升的菌体超声时间设定为 3min,超声时间以实际情况为准。
- 4) 按“AMPL”键设定超声时用的振幅,一般大肠杆菌设定为 45%,放线菌在超声前用溶菌酶预处理后,振幅设定为 50%。
- 5) 按“PULSE”键设定超声工作时间与暂停时间,为了防止超声时间太久,温度太高破坏样品,一般选择超声 5s,停 5s 的模式。
- 6) 设定每个参数时,按“模式 TER”键确定,按“确定,按“”键清除。
- 7) 设定好参数后,将样品放入箱内,调整样品与探针的高度,需将探针深入样品液面以下一半高度的位置。另外探针不可贴在管壁或管底。
- 8) 关闭箱门,按“START”键开始超声,中间可按“STOP”键手动停止超声。
- 9) 超声结束后,按“声结键关机,另外用纯水清洗探针,用纸巾擦拭干净。

#### 3. 使用注意事项

- 1) 探针与适配器一定要拧紧，超声时发出刺耳的声音有可能没有拧紧。
- 2) 探针一定要深入液面以下，不可在空气中振动 10 秒以上，位置不可太低，以免碰到管底，破坏管子；也不可太高，太高，容易产生气泡，破坏蛋白；最好是放在液面高度一半的位置。
- 3) 超声时，不可直接将探针取出或者打开箱门，一定要先按“STOP”键。
- 4) 探针在超声前后一定要注意清洗干净（把探头端头放在水里或酒精中并超声数秒），去除残留物。

## （二）高压破碎仪（品牌型号：广州聚能 mini）

### 1. 工作原理

低温超高压连续流细胞破碎机利用超高压能量使样品通过狭缝瞬间释放，在剪切效应、空穴效应、碰撞效应的作用下，使细胞破碎，使物质均质、分散、乳化、颗粒纳米化。全过程在 4°C-6°C 的低温循环水浴中进行，保持原有物质活性和性能。

### 2. 操作方法

- 1) 打开电源总开关（仪器后方），关闭排水阀，水浴槽中加入冰水混合物至与凹槽面平齐。
- 2) 旋转主机后方旋手，启动主机（指示绿灯亮），进样杯中的储存液为 75% 的乙醇，在进样之前首先要清洗进样杯，清洗的顺序为：75% 的乙醇洗一遍，纯水洗一到两遍，然后加入缓冲液洗一遍，在清洗的过程中，按钮“ON”开始，“OFF”键停止。一边清洗一边将往右旋转调压阀，将压力调到 700-800 bar 左右（若样品为大肠杆菌）。
- 3) 进样杯洗干净后，加入要破碎的已经均匀悬起来的样品，按“ON”键，开始破碎，若出样口没有液体流出，可用排气针在进样杯底部顶一下阀芯排气。出样口用离心管接住破碎的样品，一般菌体破碎 2-3 次即可，可观察到由黏稠（细胞壁破碎释放出核酸从而变黏稠）到不再黏稠（核酸被打断），视菌体状态而定。
- 4) 破碎完后清洗进样杯，加入缓冲液洗一遍，然后用超纯水洗一遍，最后用 75% 的乙醇洗一遍，最后加入 75% 的乙醇储存在进样杯中，盖上水浴槽盖子以及进样杯盖子。
- 5) 关闭液压泵启动及停止开关，首先逆时针旋转调压阀至最左，然后用力逆时针打开卸压阀，压力表指针立即回到 0 位，立即迅速顺时针关上卸压阀。打开排水阀，关闭总电源。

### 3. 操作注意事项

- 1) 最小样品处理量：JN-Mini(3ml)。
- 2) 白色部分为陶瓷杆，属易碎耗材，请注意清除陶瓷杆运行路径中的冰块等硬物。
- 3) 样品在破碎前注意一定要将其完全震荡均匀，不能存在成块现象，以免堵塞进样孔。
- 4) 当样品或者液体快要低于进样孔时应该马上按“OFF”停止或者马上加入样品，以免仪器进入气泡，高压空击，破坏仪器。
- 5) 仪器使用前后注意清洗干净，清洗的顺序为：使用时，乙醇（75%）-纯水-缓冲液；使用后，缓冲液-纯水-乙醇（75%）。另外在破碎多个不同的样品时，为避免样品间交叉污染，也要按照：缓冲液-纯水-75%乙醇，然后 75%乙醇-纯水-缓冲液的顺序进行清洗。

## 九、蛋白纯化仪操作、维护及注意事项

张丽萍、谭彬编

### (一) FPLC 快速蛋白制备液相

#### 1. 特别注意

GE AKTA, LMB 公用设备, 初次使用请联系熟悉人员进行培训。

#### 2. 工作原理

参照制备型 HPLC。FPLC 全称为快速蛋白液相色谱(Fast protein liquid chromatography), 其原理与高效液相色谱理论类似, 是由经典的液体柱层析引入气相色谱理论, 并且对相体进行了改革, 配用高压输液泵, 采用高灵敏检测器、梯度洗脱装置、自动收集装置和微机等发展起来的现代液相色谱。

#### 3. 操作方法(样品过镍柱)

##### 1) 清洗及管道准备

(1) 将 A 泵的进样管道(A1)和 B 泵的进样管道(B1)放入纯水中, 单击 pump A 的 pump wash 清洗 A 管道(20ml/ml 流速清洗 1ml), 单击 pump B 清洗 B 管道, 然后设定流速为 2mL/min 清洗系统 5min 以上至 UV 和电导值稳定且数值为 0。

(2) 将 A 泵的进样管道(A1)放入 buffer A (binding buffer) 和 B 泵的进样管道(B1)放入 buffer B (elution buffer), 单击 pump A 用缓冲液清洗 A 管道, 然后设定流速为 2mL/min 冲洗系统 5min 以上至 UV 和电导值稳定。

##### 2) 装柱

将 A 泵流速调为 0.5mL/min, 将 HisTrap HP (1mL 的镍柱) 连接到仪器上。用 buffer A 以 1mL/min 的流速去平衡柱子, 待基线平稳时, 可以进样。

##### 3) 样品处理

蛋白破碎后, 高速离心后取上清上样。

##### 4) 上样

将上样器连接在仪器上, 用注射器吸取 buffer A 冲洗上样环 5 个柱体积, 将样品注入上样器中, 样品进口阀状态设为“柱体积, 将样”, 待样品流过柱子后, 调回“待样品流”模式, 上样完毕。进行下一步的洗脱杂蛋白。

### 5) 洗脱梯度的设置

在“脱梯度的设置”，待样品流过柱子后中设置最终洗脱缓冲液 B 的最终浓度及时间，也即一段时间后缓冲液经过一个线性梯度达到 B 的浓度，如 buffer B 最终浓度设为“100%”，经过 20min 达到这个状态。

### 6) 目的蛋白的收集

收集方式有自动收集和手动收集两种：

(1) 自动收集需要在自己建立的方法（根据柱子的型号以及样品的性质等）中设置，在 Method Editor 界面选择 Sample Application 步骤进行编辑及更改。收集方式可分为“峰收集”和“固定体积收集”。如果是按峰收集，则需在“如果是按峰收集，则需在可分”中选择“选择是按峰收集，则需在可分”，设置每管收集体积；然后在“设 fractionation parameters”中设置 Start level 和 End level（出峰时和峰结束时 UV 的读值），即 UV 高于设置的数值时开始收集，UV 低于设置的数值时自动停止收集。如果是固定体积收集，则需设置收集开始的时间或体积和每管的收集量（注意在自动收集器中放置足够多的试管）。

(2) 手动收集需在 *System Control*（系统控制）模块的菜单栏中进行设置，选择 *Manual*（手动：执行手动指令...），选择 Execute Manual Instructions, Manual Instructions（手动指令）对话框随即打开。选择 Fraction collection，进一步选择 Fractionation（固定体积收集）或者 Peak fractionation（出峰收集），设置每管需要收集的体积，按“execute”执行操作。当需要停止收集时，选择 Stop fractionation 或者 Stop peak fractionation，点击“execute”执行操作即可。

### 7) 实验结束后处理

将进样管道 A1 和 B1 放入去离子水中分别 pump wash，然后用 2mL/min 的流速冲洗系统 5min，再将所有管路放入 20%乙醇中进行 pump wash，然后用 2mL/min 的流速冲洗系统 5min，即系统和管路处于 20%的乙醇当中。

## 3. 操作方法（样品过分子筛）

### 1) 清洗及管道准备

(1) 将 A 泵的进样管道（A1）放入纯水中，单击 pump A 清洗 A 管道，设定流速为 2mL/min 清洗系统 5min 至 UV 和电导值稳定且数值为 0。

(2) 将 A 泵的进样管道（A1）放入分子筛缓冲液（一般为 20mM HEPES, 200mM NaCl）中，单击 pump A 清洗用缓冲液冲洗 A 管道，设定流速为 2mL/min 用缓冲液清洗系统 5min 以上至 UV 和电导值稳定。

## 2) 装柱

将 A 泵流速调为 0.5mL/min，将分子筛柱连接到仪器上。用 buffer A 以 0.5 mL/min 的流速去平衡柱子，待基线平稳时（UV 一般接近 0，分子筛 buffer 中盐为 200mM NaCl 时电导接近 20），可以进样。

## 3) 样品处理

一般是过完镍柱的样品，将其浓缩到蛋白浓度约为 15-20mg/mL，高速离心样品后取上清上样，上样量可为每次 1mL 或者 0.5mL。

## 4) 上样

将上样环连接在仪器上，用注射器吸取分子筛缓冲液冲洗上样环 5 个柱体积，将样品注入上样环中，然后调用设置好的程序进行上样与洗脱（方法设定如下）。

## 5) 方法设定

由于已经手动平衡柱子，所以在方法界面中只需在“Sample Application”这一栏设定流速为 0.5mL/min, 设定上样环的类型；以及设置洗脱的柱体积一般 1.5CV。

## 6) 样品收集

设置样品收集方式，一般可按峰收集，或固定体积收集，如设置体积为 0.5mL，也即每管收集 0.5mL 后会自动跳到下一管进行收集。将收集到的蛋白跑胶检测，确定目的蛋白所在的组分以及纯度。

## 7) 实验结束后处理

样品收集完成后，需用缓冲液冲洗至少一个柱体积，确保柱子中不残留有杂蛋白（此步骤可在方法中进行设置）。拆下柱子，将进样管道 A1 放入去离子水中分别 pump wash，然后用 2mL/min 的流速冲洗系统 5min 以上至 UV 和电导值稳定且数值为 0，再将 A1 管路放入 20%乙醇中进行 pump wash，然后用 2mL/min 的流速冲洗系统 5min，也即系统和管路处于 20%的乙醇当中。注：对管道进行溶液置换时，程序是停止状态，防止空气进入管道。

## 4. 仪器维护及注意事项

1) 进样管道和系统储存在 20%的乙醇当中，所以在上样之前应该依次用双蒸水和缓冲液冲洗进样管道和系统。

2) 样品在进样前要高速离心，缓冲液在使用前要用 0.22uM 或者 0.45uM 的过滤器进行过滤，以免堵塞管路。

3) 上样时避免产生气泡。上样时，注射器将样品注入后不能将其马上拔出来，必须待

样品 inject 完毕再拔出。

4) 除了连续使用外，当实验完成系统使用结束后，应尽可能避免保存在装载缓冲液状态过夜。尤以高盐浓度洗脱缓冲液为甚！假如不能避免，则紧记次日尽早用 System Wash Method 完成以蒸馏水将系统彻底清洗，才予以保存或再更新使用其它缓冲液，再次投入使用进行实验操作。用蒸馏水将剩下的缓冲液彻底冲洗出系统，这步骤至关重要。此举不但可以避免缓冲液对系统造成腐蚀机会，或因使用高盐浓度缓冲液保存过久造成盐结晶等的堵塞，对系统构成不必要的损害和损耗。

5) 若数天或更长的时间不使用系统，除用蒸馏水彻底清洗系统外。取下柱。通过细管道替换柱。然后用 20%乙醇再冲洗所有使用的管件通道和所有的流动池一遍，然后并以此将系统保存。

6) 每月定期保养处理，或当发现假峰等问题出现时，可拆下柱子，并用适宜的毛细管道替换其位置，将所有的缓冲液入口管件置于 0.5M NaOH 中，对所有的入口管件通路运行 System Wash Method，以流速为 1ml/min，将整个系统充分冲洗若 20 分钟。然后立即用蒸馏水，以通条件将整个系统运行 System Wash Method 加以冲洗 20 分钟。

7) 当装配部分收集器出口管架时，应根据收集管的长度不同而使用不同的切换口。以免造成跳管或收集体积错误情况发生。

8) 一定要保持实验环境的清洁，当使用仪器时发现缓冲液的泄露或看见机器各部件外表有盐的结晶应即刻用清水浸湿的抹布擦拭去除，以免泄漏的液体等造成仪器光学及电子元件的损坏。

9) 每个 manual 程序跑完一定要尽快把结果另存了，不然会很快被后面的一大堆数据淹没。每个人建自己文件夹。每个蛋白另建文件夹。做好准备工作和清理工作，准备柱子，预约机器。纯化蛋白前一定要检查废液缸是否装满，再进行实验，否则废液会溢出，损坏桌面和电脑等铁制物品，更严重的可能会导致漏电短路，造成不可挽回的损失。实验结束倒掉废液，清洁仪器表面。

## 十、蛋白质电泳（PAGE）-变性凝胶电泳（SDS-PAGE）

张丽萍、谭彬编

### 1. 基础原理

目前，蛋白质电泳分离常采用聚丙烯酰胺凝胶作为电泳介质。蛋白质在电场力的牵引下，在凝胶形成的孔径内进行迁移。凝胶浓度越高，孔径越小。凝胶孔径的大小与蛋白质大小、电荷以及形状相结合，最终决定了蛋白质的迁移速度。根据凝胶中是否加入蛋白变性剂，蛋白电泳可分为变性电泳和非变性电泳。变性电泳（常添加有 0.1% 的 SDS）可用于估计多肽或蛋白质的纯度和分子量，而非变性电泳（常添加有 2-巯基乙醇或二硫苏糖醇的还原剂）则用来确定蛋白质的亚基数目和大小。非变性电泳用来检测和分离“天然”状态的蛋白。

### 2. 试剂（REAGENTS）

1.5 M bis-Tris(pH 6.8)；30% Acrylamide；10% SDS；10% APS；TEMED；超纯水；SDS-loading buffer；考马斯亮蓝 G250 染液等

### 3. 器械（EQUIPMENT）

电泳仪；电泳槽等

### 4. 实验步骤（PROCEDURE）:

#### 1) 配制梯度变性胶▶预计时间消耗：4 小时

梯度胶由两种组分混合而成，轻密度部分（light）和重密度部分（heavy）。我们一般使用的是 4-15% 梯度胶，因此轻密度部分是 4%，重密度部分是 15%。也就是用混匀器时，重密度部分会缓缓加入到轻密度的腔室中，胶由下而上灌制，因此胶的上层密度比下层密度小。

#### （1）SDS-PAGE 梯度胶的配方如下

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

各种组份名称	各种凝胶体积所对应的各种组份的取样量							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
<b>6% Gel</b>								
H <sub>2</sub> O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% Acrylamide	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
<b>8% Gel</b>								
H <sub>2</sub> O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% Acrylamide	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
<b>10% Gel</b>								
H <sub>2</sub> O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% Acrylamide	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>12% Gel</b>								
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% Acrylamide	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>15% Gel</b>								
H <sub>2</sub> O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30% Acrylamide	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% 过硫酸铵	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

**5% stacking gels for denaturing SDS-PAGE**

Components	Volume of components (ml) per gel mold volume of							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H <sub>2</sub> O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acryl-bisacrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(2) 30% acrylamide (for 1 L, 因毒性较大, 实验室直接采购配好的 30%混合液) :

成分	重量
acrylamide	292 g
bis-acrylamide	8 g
用蒸馏水定容至 1 L, 放在 4°C 避光保存	

(3) 10% 过硫酸铵 (APS, w/v): 配制 50 ml 时, 需加入 5 g APS, 加入 50 ml 蒸馏水, 溶解后 4°C 避光保存。

**(4) 10% SDS (w/v):** 配制 100 ml 时，需加入 10 g SDS，加入 100 ml 蒸馏水，溶解后常温保存即可。

## 2) 蛋白胶配置:

### (1) 配胶前准备

将配蛋白胶的玻璃板清洗干净，装在配胶槽上（短玻璃面朝内），配胶前加入纯水检漏。检测不漏水后，将水倒掉，加入下层胶。

### (2) 下层分离胶配置

根据 SDS-PAGE 分离胶配方表，依次加入 H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide, 1.5M Tri-HCl(pH 8.8),

10%SDS, 10%APS, TEMED。混合均匀，将配好的分离胶沿着边缘缓慢加入制胶槽中，加入分离胶的位置距前玻璃板顶端 1.5cm。然后在分离胶溶液上覆盖一层双蒸水（或者异丙醇）封胶，使凝胶表面平整，静置 45min 左右，凝胶聚合后，在分离胶和水层中间会有一个清晰的界面，可微斜模具，检测凝胶是否聚合。

### (3) 上层浓缩胶配置

将水层倒掉，开始配置上层胶，根据所用玻璃板的规格，配置不同体积的上层胶，也是依次加入 H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide, 1M Tri-HCl(pH 6.8), 10%SDS, 10%APS, TEMED。混合均匀，将浓缩胶添加到分离胶上面，将梳子插入凝胶内，至梳子的齿的底物与前玻璃板的顶端平齐。小心避免混入气泡，静置 30min，待凝胶聚合。凝胶聚合后可进行电泳，若不立即使用，可将整个胶片整合用保鲜袋包好，胶面加入一层水，放入 4°冰箱可保存一周。

## 3) 电泳:

将胶板放入电泳槽中，在里外电泳槽中加入 1X 电泳缓冲液大概 300mL 左右，使凝胶的上下端均能浸泡在缓冲液中。胶上梳子缓慢平行拔出，待点胶孔内渗入缓冲液，将提前煮好的蛋白样品加入孔中，用白色的小枪头，缓缓加入。样品加入体积一般在 5-7 ul 左右，如果样品较浓时 3 ul 足矣。如果上样量太大，会降低电泳分辨率。

用 80V 电压跑 30min，待样品在浓缩胶中压缩成一条线，然后调整电压到 120V，大概再跑 1.5h 左右。

#### 4) 染色和脱色:

电泳结束后，戴上手套将凝胶板从电泳槽中取出，用专用的铲子轻轻撬开玻璃板，小心从制胶板上将凝胶剥下，切去浓缩胶。将切下来的胶用清水漂洗一下，然后加入考马斯亮蓝染色液进行染色。染完色后将胶取出，加入清水漂洗后，将胶放入脱色液中进行脱色，脱色液 0.5-1h 更换一次，大概脱色 3-4 次即可。

#### 5. 注意事项

- 1) 配胶中的  $\beta$ -巯基乙醇，丙烯酰胺，甲叉双丙烯酰胺单体和 TEMED 均有毒，所以做实时一定要注意戴好口罩和手套。
- 2) 配置浓缩胶时，在加入 10%APS 和 TEMED 前，应将溶液混合均匀，一旦加入 APS 和 TEMED，应尽快混匀加入制胶层中，因为浓缩胶凝固的较快。
- 3) 制胶需要调节 TEMED 的加入量，以调节凝胶凝结的速度，添加量视气温而定。温度越高凝固速度越快。
- 4) 10%APS 最好现配现用，-20°可保存 2 个月，一旦解冻应尽快用完。
- 5) 配胶应尽量用专门的一套移液枪。

## 十一、PCR 仪操作方法及注意事项

马亮编

### 1. PCR 反应体系（以 FastPfu 高保真酶和 EasyTaq 聚合酶为例）

#### 1) FastPfu 高保真酶的 PCR 扩增体系（适用于需测序的基因）

总体积 试剂	20 $\mu$ L	加样顺序
ddH <sub>2</sub> O	约 11.5 $\mu$ L	最先加水
DMSO	1-2 $\mu$ L	
5X PFU Buffer	4 $\mu$ L	
10 X dNTP (2.5mM)	1 $\mu$ L	
Primer 上游 (10 uM)	1 $\mu$ L	
Primer 下游 (10 uM)	1 $\mu$ L	
DNA template	0.5-1 $\mu$ L	最后加 DNA 模板或 PFU 酶
PFU polymerase	0.2-0.5 $\mu$ L	

#### 2) EasyTaq 聚合酶的 PCR 扩增体系（适用于日常基因扩增验证）

总体积 试剂	20 $\mu$ L	加样顺序
ddH <sub>2</sub> O	约 13 $\mu$ L	最先加水
DMSO	2 $\mu$ L	
10X EasyTaq Buffer	2 $\mu$ L	
10 X dNTP (2.5mM)	1 $\mu$ L	
Primer 上游 (10 uM)	0.75-1 $\mu$ L	
Primer 下游 (10 uM)	0.75-1 $\mu$ L	
DNA template	0.5-1 $\mu$ L	最后加 DNA 模板或 PFU 酶
EasyTaq 聚合酶	0.2-0.4 $\mu$ L	

(1) 按上述体系，将上述物质依次加入混匀。

(2) 如果建立的体系体积较大，可将同一种 PCR 反应先建立大体积的 Mix，混匀后，低速离心，然后再分装到 PCR 管。

(3) 在配制大体积的 Mix 时可以多配制 1-2 管，避免分装至最后 1 管时剩余体积不够。或者每管分装时减少 0.5 uL 体积（不影响 PCR 扩增效果）

(4) PCR 体系加完之后，低速离心几秒，再放入 PCR 仪内按程序运行。

## 2. PCR 反应程序（分别以 FastPfu 高保真酶和 EasyTaq 聚合酶为例）

将 PCR 管置于 PCR 仪上，确保 PCR 仪四角有 4 个 PCR 管平衡，启动 PCR 仪。

### 1) FastPfu 高保真酶的 PCR 程序

预变性		95°C 5-10 min	
30-35 个循环	变性	95°C 20-30s	
	退火	60°C 20-30s	
	延伸	72°C 30-60 s	理论值 2-4 kb/min
再延伸		72°C 5-10min	
保温		16 °C	禁止设置低于 16°C 的温度

### 2) EasyTaq 聚合酶的 PCR 程序

预变性		94-95°C 5-10 min	
30-35 个循环	变性	94-95°C 30s	
	退火	60°C 30s	
	延伸	72°C 30-60 s	理论值 1-2 kb/min
再延伸		72°C 5-10min	
保温		16 °C	禁止设置低于 16°C 的温度

### 3. 注意事项：

- 1) 公司合成的引物（多为干粉状）按标注的加水数值乘以 10 后，进行稀释至工作浓度（10 $\mu$ M）：稀释前，10000rpm 离心 30 秒使 DNA 聚集至 Ep 管底部，小心打开管盖，以免管中粉末飞扬造成 DNA 损失，再加入适量的无菌 ddH<sub>2</sub>O,盖好管盖，在振荡器上漩涡震荡 30-60 秒，混匀并使其充分溶解，再离心使用。（也可以用 TE 缓冲液溶解，常用时置于 4 度，不用时冻存在-20，可保存 2 年）
- 2) PCR 反应通常最后加入酶，并冰上操作，请勿超量加酶，避免实验失败和浪费。
- 3) 要控制好反应体系中 DNA 模板的量，含量太高可能会导致实验失败，必要时需要稀释模板。
- 4) 退火温度问题：退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率，退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率；可以在正式 PCR 扩增前，设置温度梯度进行扩增预实验。
- 5) 在执行 PCR 扩增程序时，最好每管 20-50 $\mu$ l，过大的体积会使 PCR 仪中的反应溶液的温度变化的均一性降低，反应条件不准确。
- 6) 6、72 的的延伸时间是根据目的 PCR 产物大小设定的。如 **FastPfu** 高保真酶的聚合速度理论值是 2-4 kb/min；**EasyTaq** 聚合酶的理论值是 1-2 kb/min。
- 7) 不同聚合酶可能会要求不同的变性温度和变性时间，具体参数请参考具体使用说明书。
- 8) 如是菌落或菌液做模板，预变性时间应适当提高，可调至 8-10min。

## 十二、超净台操作、维护及注意事项

马亮编

超净台共 8 台，其中 **1-4 号**超净台接种**放线菌**专用，**5 号**超净台接种**真菌**专用，**6-7 号**超净台接种**大肠杆菌**专用，**8 号**超净台**抽提 RNA** 专用。超净台按照功能分类进行使用和预约。分菌使用 **4 号**超净台，活性测试及 **MIC 值测定**使用 **5 号**超净台

### 1. 预约规则

- 1) 使用前 1 天可预约，单次预约时间原则上不得超过 4 小时。
- 2) 口头预约无效。
- 3) 预约人，预约的时间未到不能阻止他人使用预约的超净台，但可以与当事人协商使用时间。
- 4) 同 1 人不能同时预约和使用多个超净台。
- 5) 预约人完成实验时，请在运行状况栏签字，如发现未记录运行状况的预约人则暂停预约权限 1 周。
- 6) 预约人因故不能按时使用超净台，可以在运行状况栏进行标注，或在在微信群内及时通知。如发现预约后一直不使用超净台者，暂停预约权限 1 周。
- 7) 仪器原则不对外开放，外组借用请提前 1 周预约，并手写情况说明表（不少于 100 字），附在预约表旁进行公示，预约时长不超过 2 小时，如与本组人员使用时间冲突则预约无效。

### 2. 使用规则

- 1) 超净台按功能划分进行使用和预约，原则上不能混用，其中**分菌**固定使用 **4 号**超净台，**活性测试及 MIC 值测定**固定使用 **5 号**超净台。
- 2) 真菌接种时，原则上不开通风，不产孢子的真菌可以开通风。
- 3) 超净台使用完成后请将超净台整理、擦拭干净，移走自己的物品，清理垃圾，补加适量酒精，并打开紫外灯 1 次。
- 4) **4、5 号**超净台接种完成后，需对超净台进行 2 次以上严格擦拭、灭菌。
- 5) 如发现超净台使用后未及时移走自己物品者，或用物品强制占超净台者，暂停超净台使用资格 1 天，并**惩罚清理超净台 3 天、打酒精 1 次**。

## 第二部分：实验室仪器使用与操作规范

- 6) 倒板未用完的一次性无菌平板，请包扎好，并自行保留，严禁浪费。如发现浪费者，**惩罚使用玻璃平板 1 周。**
- 7) 为保持仪器使用效率，请严格规范吹板时间，严禁吹板超过 1 小时（晚上 12 点后  
可自由吹板，但不能影响第 2 天的使用），严禁使用者吹板同时再使用另 1 个超净  
台。
- 8) **1-3 号超净台内严禁操作真菌污染平板及病原菌，一旦发现，惩罚使用者对超净台  
及培养箱进行高锰酸钾熏蒸 1 次。**
- 9) 责任人每日不定期巡查，与使用者一同监督卫生及使用情况，发现违规者及时通报  
批评，严重违规者需**手写检讨书在组会上进行检讨。**



## 十三、离心机（小型常温，小型冷冻，大型台式）操作、维护方法及注意事项

王利娟编

### （一）Eppendorf 5810R 大型高速冷冻离心机简要操作说明

1. 连接好电源线，打开仪器右边开关，仪器进入自检状态，屏幕上显示离心机型号，名称；
2. 平衡装载样品，用所配的六角扳手固定紧转子，并盖上机盖。Open 键的灯颜色会变为蓝色。假如屏幕显示“Press Open”或“Close Lid”，表示机盖尚未正确闭锁，按 open 键开盖并将机盖再次关紧即可；
3. 时间和速度设定，按 time/speed 键使设定值闪烁，然后用▲/▼箭头设定，在离心机运行或静止状态都可进行，假如要设定离心力，按动 speed 键至离心力符号（\*）出现在速度值的左边后用▲/▼箭头设定；
4. 温度设定为 temp 键，温度设定范围：-9°C—+40°C，功能键：按 Temp 键使设定值闪烁后用▲/▼箭头设定，在离心机运行或静止状态都可进行；
5. 设定参数完毕后，按 start 开始运行，按 stop 可随时停止运行，仪器自动降速停止；
6. 由于仪器具备转子识别和最高速度限制功能，由低速转子更换至高速转子后可能出现无法设定至最高速现象（限制在低速转子的最高速）。此时只需按 start 开始运行，仪器将自动进行转子识别，此时即可设定转子最高速度；
7. 程序设定：在参数设置完毕后，连续按 prog 键两次，用▲/▼箭头键设置程序名，然后按 prog 约两秒钟直至屏幕上出现：OK，则表示程序已存储成功；
8. 升降速率设置：重复按压 time 键至 (/) 出现，并使用▲/▼箭头进行加速/减速速率设置。速率范围：0—9（速率由低至高）；
9. Short 键，按住该键可进行 short spin，松开该键仪器即停止运行；
10. Fast temp 快速制冷键，按下该键仪器将以固定转速快速制冷至设定温度，在到达设定的温度时，制冷停止系统给出声音提示；也可通过 stop 键停止制冷，专门用于快速预冷转子。

### （二）Eppendorf 5810R 大型高速冷冻离心机注意事项

1. 本离心机旁边须预留 15cm，后部预留 10cm，保持环境通风并防止直接日照。
2. 请勿于易燃易爆环境使用本仪器，而且不能用于离心具有爆炸或剧烈反应的物质。
3. 转子须上到位并用正确工具充分旋紧，请勿在转子尚未确定上紧之前开始操作，运行期间不要搬动或敲击离心机。
4. 运用正确的方式上样，注意样品平衡，避免污染转子，适配器及机器腔体。
5. 请避免使用高浓度酸、碱和氯化物、高浓度盐水以及包含铜、汞等重金属离子的腐蚀性溶液，假如转子或仪器内腔粘上以上溶液，请立即使用中性清洁液清理。
6. 对于冷冻型离心机 5810R，离心结束后需将离心机盖子打开，让离心机腔体水气自然蒸发，并用抹布擦拭腔体，腔体恢复到室温后方可将盖子关闭。
7. 使用水平转子时，转子和吊篮应该对称安装，离心样品必须配平后对称装载，并使用匹配的适配器，水平转子必须采用同一类型的吊篮，并且四个吊篮都需要放上样品（没有样品可以用水代替）。如果转子没有满载，吊篮中离心管的位置按照图 1 方式放置，不可以只使用两个吊篮离心。

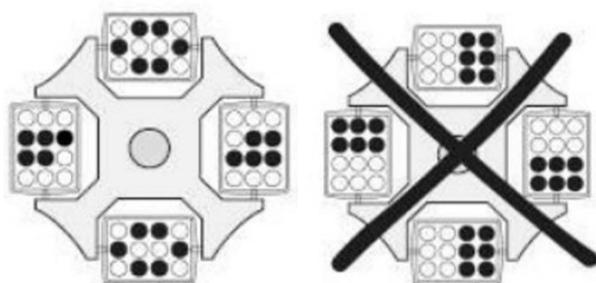


Figure 1. 转子对称装载图 2: 错误的装载，吊篮装载不对称，吊篮枢轴受力不均。

### （三）Eppendorf 5424R 小型冷冻离心机简要操作说明

1. 连接好电源线，打开电源开关（机身后面），离心机准备就绪并激活显示。
2. 对称地往转子内装入离心管，拧紧转子盖并盖上离心机盖（也可以不盖转子盖离心）。
3. 离心时间在 time 图标下用 ▲/▼ 箭头设定，在离心机运行或静止状态都可进行。
4. 离心速度在 speed 图标下用 ▲/▼ 箭头设定，在离心机运行或静止状态都可进行。
5. 离心温度在 temp 图标下用 ▲/▼ 箭头设定，在离心机运行或静止状态都可进行。
6. Fast temp 快速制冷键，按下该键仪器将以固定转速快速制冷至设定温度，在到达设定的温度时，制冷停止系统给出声音提示；也可通过 stop 键停止制冷，专门用

于快速预冷转子。

7. 使用 start/stop 键启动和停止离心机。
8. 瞬时离心使用 short 键，按住该键可进行，松开该键仪器即停止运行，在转子减速的过程中可按下 short 键再次启动离心机。
9. 使用 rpm/rcf 键切换转速和离心力。

#### **(四) Eppendorf 5424R 小型冷冻离心机注意事项**

1. 本离心机旁边须预留 15cm，后部预留 10cm，保持环境通风并防止直接日照。
2. 请勿于易燃易爆环境使用本仪器，而且不能用于离心具有爆炸或剧烈反应的物质。
3. 转子须上到位并用正确工具充分旋紧，请勿在转子尚未确定紧之前开始操作，运行期间不要搬动或敲击离心机。
4. 离心前必须盖紧离心管盖，运用正确的方式上样，注意样品平衡，避免污染转子，适配器及机器腔体。
5. 请避免使用高浓度酸、碱和氯化物、高浓度盐水以及包含铜、汞等重金属离子的腐蚀性溶液，假如转子或仪器内腔粘上以上溶液，请立即使用中性清洁液清理。
6. 对于冷冻型离心机 5424R，离心结束后需将离心机盖子打开，让离心机腔体水气自然蒸发，并用抹布擦拭腔体，腔体恢复到室温后方可将盖子关闭。

#### **(五) Eppendorf 5418 小型常温离心机简要操作说明**

1. 连接好电源线，打开电源开关（机身后面），离心机准备就绪并激活显示。
2. 对称地往转子内装入离心管，拧紧转子盖并盖上离心机盖（也可以不盖转子盖离心）。
3. 使用 time 旋钮调整离心时间，当超过 09:59 或者低于 30 秒时，时间显示 oo，表明已处于可连续离心操作模式下，计时以分钟为单位。
4. 使用 speed 设定离心转速，转速以 100rpm 为增加量，相对离心力(rcf)以 100 个 g 为增加量。
5. start/stop 键启动离心机，再次按下 start/stop 此键，停止离心。当离心结束，转子开始减速时，计时器闪烁并显示用去的时间。转子完全停止转动后将听到一声提示音，离心机盖自动打开。
6. 按下 rpm/rcf 此键，屏幕显示将在 rpm 和 rcf 之间切换。
7. 按住 short 键以最大转速/相对离心力开始快速离心。在整个快速离心过程中必须持

续按住 short 键。转子运转时屏幕显示上的■符号闪烁，同时开始逐秒计时。松开 short 键便停止离心，在转子减速过程中可重新按下 shor 键再次启动离心机。

#### **(六) Eppendorf 5418 小型常温离心机注意事项**

1. 本离心机旁边须预留 15cm，后部预留 10cm，保持环境通风并防止直接日照。
2. 请勿于易燃易爆环境使用本仪器，而且不能用于离心具有爆炸或剧烈反应的物质。
3. 转子须上到位并用正确工具充分旋紧，请勿在转子尚未确定紧之前开始操作，运行期间不要搬动或敲击离心机。
4. 离心前必须盖紧离心管盖，运用正确的方式上样，注意样品平衡，避免污染转子，适配器及机器腔体。气密性离心或离心 spin columns，请务必盖转子盖。放入转子的离心管型号相同,装液量相等，必须配平。
5. 请避免使用高浓度酸、碱和氯化物、高浓度盐水以及包含铜、汞等重金属离子的腐蚀性溶液，假如转子或仪器内腔粘上以上溶液，请立即使用中性清洁液清理。

## 十四、Five Easy Plus™ pH 计使用说明

王利娟编

### 1. 提示

FiveEasy Plus™ pH 计提供两种测量模式：pH 和 mV。按下 Mode 按钮,在 pH 和 mV 模式之间切换。

### 2. PH 测量模式

- 1) 确保电极已经与主机连接，按电源键打开仪器。
- 2) 取下电极保护套，如有结晶盐，是正常现象。使用去离子水将电极清洗干净，并用几滴待测样品漂洗一下。
- 3) 确保 pH 测量模式已选，将电极放入样品中，按 Read 开始测量，小数点将闪烁。
- 4) 显示屏上显示样品 pH 值，当信号稳定后显示屏将自动锁定，出现 $\sqrt{A}$ ，且小数点停止闪烁。
- 5) 为避免损坏电极，仪器关机前应将 PH 电极从溶液中取出，然后再关机。将电极用蒸馏水冲洗干净后套上保护套。

### 3. PH 计校准模式：

- 1) 为了获得更高准确性，应定期执行校准，以下情况，仪器必须进行 PH 校准。
- 2) 当更换 pH 电极或温度探头时；(B)至少一星期一次；(C)测量侵蚀性化学样品后；(D)需要高精度时。
- 3) PH 标准缓冲液有：PH 4.01 (酸性)、PH 7.0 (中性)、PH 9.21 (碱性)。确保电极连接到主机上将电极放入一种校准缓冲液中。
- 4) 按 cal，在测量过程中，仪器显示上次校准的 pH 值。当信号稳定时仪器停止测量，屏幕显示已识别缓冲液在当前温度下的 pH 值。
- 5) 用去离子水冲洗电极，将电极放入下一校准缓冲液中，按下 cal，等待仪器自动给出缓冲液当前 PH 值。
- 6) 用去离子水冲洗电极，将电极放入第三种校准缓冲液中，按下 cal，等待仪器自动给出缓冲液当前 PH 值。
- 7) 校准后斜率和偏移值均得以更新，并显示在显示屏的相应位置。

#### 4. 注意

测量结束后，必须清洗电极，并将电极放回盛有三分之一体积的 3 mol/L 的 KCl 溶液电极保护套中，切勿将电极存放在蒸馏水中。

## 十五、凝胶电泳仪操作方法及注意事项

金红波编

### 1. 基本原理

电泳指带电粒子在电场中的运动，不同物质由于所带电荷及分子量的不同，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或定量分析，或将一定混合物进行组份分析或单个组份提取制备，这在实验研究中具有极其重要的意义。

### 2. 操作方法

- 1) TAE 缓冲液的配制。工作浓度为 1X 的 TAE，储备浓度为 50X 的 TAE，储备液配制方法：
  - 2) 称量 Tris 242g，Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 37.2g，置于储备瓶中。
  - 3) 向烧杯中加入约 800ml 的去离子水，充分搅拌。
  - 4) 加入 57.1ml 的醋酸，充分搅拌，放置过夜至溶解。
  - 5) 加入去离子水定容至 1 升，室温保存。
- 6) 琼脂糖凝胶的制备。按需要的质量/体积分数称量琼脂糖粉和 1X 的 TAE（如 1% 的胶为 100ml 的 TAE 中加入 1g 的琼脂糖凝胶粉），置于锥形瓶中，微波炉高火加热 1~2 分钟至成均一液体状。按 2~3ul/100ml 的比例加入 Gelview 核酸染料，小心晃匀。准备好模具，将摇匀的液态琼脂糖凝胶倒入模具中，插上梳子，静止冷却。小胶约 20ml，中胶 40ml，大胶约需 80ml。
- 7) 上样。凝胶冷却后，小心拔掉梳子，检查有无穿孔、破裂，如正常则用移液枪按顺序点入 marker 和加入了 loading buffer 的样品，loading buffer 尽量用 6X，工作浓度为 1X。
- 8) 电泳。检查电泳槽中 1XTAE 是否足够或干净，如正常则正确连接电泳和电泳槽的正负极，将点好样的胶放置在电泳槽靠负极的一侧，点击电源上的 run 按钮。待 loading buffer 电泳至胶的中下部即可停止电泳。

### 3. 注意事项

- 1) 安全第一，核酸染料等实验材料有毒害，实验时切记戴手套。
- 2) 电源电压虽然不高，但是突然断电可能形成高压电容，因此操作完成时要按电源键断电，而不应拔掉连接线。

## 第二部分：实验室仪器使用与操作规范

- 3) 电泳槽加盖电泳。
- 4) 微波炉加热时，小心烫手。
- 5) 关闭电源时检查是否还有其他人在电泳。
- 6) 新鲜制备的胶，电泳效果最佳。
- 7) 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。

## 十六、凝胶成像仪操作、维护及注意事项

金红波编

### 1. 基本原理

凝胶成像仪一般用于观察琼脂糖凝胶中核酸的电泳结果，或者是观察 SDS-PAGE 中蛋白质电泳的结果。前者需要用到紫外灯，以便核酸染料发出荧光，后者只需在可见光中进行拍照。因此在使用时需要选择不同的胶类型对应的应用程序。

### 2. 操作流程

- 1) 打开成像仪及电脑电源键，将胶放置于工作台中央位置。
- 2) 关上工作台仓门后，打开电脑桌面的 image lab 程序。
- 3) 新建实验协议→选择对应的应用程序（区分核酸和蛋白质胶）以及对应的染色方法→自动曝光→去掉高亮显示饱和色素→放置凝胶→调整胶的摆放位置至屏幕正中央→运行试验协议→完成曝光后点击保存或截图快照→修改文件名，保存至自己的文件中。
- 4) 取出核酸或蛋白胶，擦拭工作台，保持干燥清洁。
- 5) 关好仓门，关闭程序。

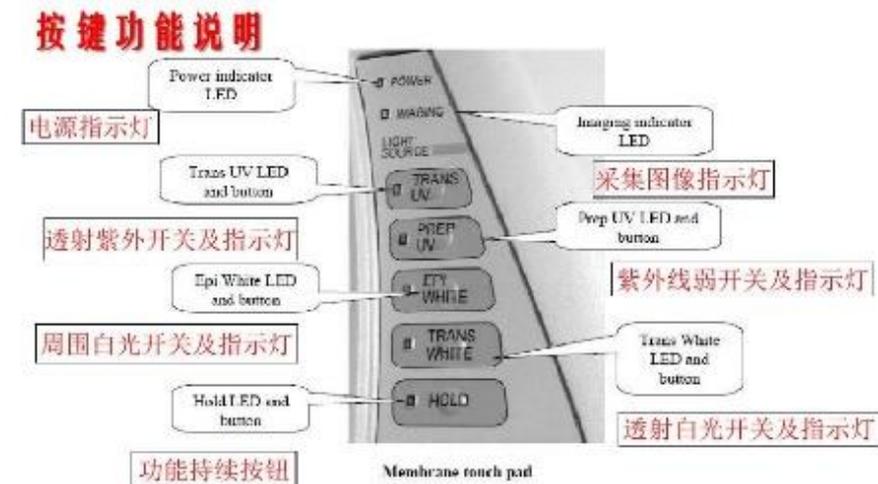
### 3. 仪器维护

- 1) 仪器应放置在室温在 15-30°C，相对湿度不大于 80%的环境中工作。
- 2) 放置仪器的工作台应平坦、牢固、结实，不应有振动或者其他影响仪器工作的现象。
- 3) 强烈电磁场、静电及其他电磁干扰，都可能影响仪器正常工作，放置仪器时应尽可能远离干扰源。
- 4) 仪器放置应避开有化学腐蚀气体的地方，如硫化氢、二氧化硫、氨气等。
- 5) 供电线路提供良好的接地，可进一步提高电气安全性和系统可靠性。
- 6) 仪器需保持干燥清洁，表面外周干净清洁。
- 7) 检查拍照面板是否清洁完好，紫外灯管是否正常发光。

### 4. 注意事项

- 1) 照相后应把废胶及时取出并用纸擦拭干净，否则耽误别人的实验，也可能腐蚀仪器。

- 2) 拍照时确保仓门关紧，否则紫外灯不工作。
- 3) 拍照时记录好样品的电泳情况。
- 4) 仓门要轻开轻关。



<b>Power light</b>	电源打开，开始工作
<b>Imaging LED</b>	指示灯闪烁，表示正在获取图像；也可能在电脑关闭的时候
<b>TransUV button</b>	控制紫外透射器打开与否，
<b>The Prep UV switch</b>	先开trans uv才能开PREP UV，其功能为减弱透射紫外线的强度
<b>Epi White button</b>	控制周围白光（两侧）打开与否，
<b>Trans White Light</b>	控制白光透射打开与否
<b>Hold key</b>	紫外和白光自动关闭的功能丧失。请当心紫外线对人体损伤。

## 十七、切胶仪操作、维护及注意事项

金红波编

### 1. 基本原理

切胶仪是利用核酸染料在蓝光（夹杂紫外线）中产生荧光，使得能看清核酸的位置，用刀片切下核酸，以便纯化、回收核酸的仪器。

### 2. 操作流程

- 1) 将电泳结束的核酸胶置于切胶仪平板上，胶下垫一只胶手套。
- 2) 切胶前称取好 EP 管重量，做好标记。
- 3) 打开蓝光，迅速切下含有核酸的部位，尽量少凝胶，动作迅速，避免核酸在紫外中发生变化。
- 4) 将切好的核酸置于 EP 管中，废胶连同手套一并扔进生物废料垃圾桶。
- 5) 后续操作详见胶回收试剂盒手册。

### 3. 仪器维护

保持切胶仪干净整洁，确保电源线正常连接。

### 4. 注意事项

- 1) 因为有紫外线及核酸染料，操作时注意戴手套。
- 2) 操作迅速，尽量减少曝光时间。

## 十八、移液枪使用、保管注意事项

蒋晓东编

### 1. 移液器领用及处置制度

移液器实施领用负责制，每个涉及分子生物学实验的老师和学生领用一套齐全的移液器并登记在册，每人分发一个移液器支架用于摆放移液器，各自领用后要妥善保管和保护移液器，使用期间如有损坏，各自及时保修或者做报废处理（切勿擅自丢弃），不得再私自挪用或借用他人移液器，学生毕业、博士后出站或者职工离职如数归还移液器，并由实验室负责人清点和登记。

### 2. 移液器使用注意事项

- 1) 防止移液器在使用过程中溶液倒吸入移液器腔体内部，造成腔室污染和腐蚀，导致移液器损坏和报废。（5000 微升和 1000 微升移液器使用注意事项，该规格移液器属于大量程，容易造成溶液倒吸，应当特别小心。为防止倒吸可以将枪头剪去一小部分，再吸取溶液）；
- 2) 所有移液器单次使用后，在短时间内不再使用的第一时间调回最大量程（注意：最大量程不是最大的弹簧限度）；
- 3) 取用枪头时移液器应当与枪头保持平行，切勿用力顿枪头，使用结束后应取下枪头。
- 4) 移液器的枪头中有溶液时，移液器的枪头一端要低于另一端，严禁倒置；
- 5) 每天实验结束后，清点自己的移液器，防止丢失影响第二天实验，同时检测移液器是否调回最大量程。
- 6) 移液器损坏后及时报修和维护，以免影响您的试验进展。

### 3. 实验室移液器数量及分配情况

- 1) Gilson 移液器统计结果如下：1000  $\mu\text{L}$  共计 10 支、200  $\mu\text{L}$  共计 1 支、100  $\mu\text{L}$  共计 10 支、20 $\mu\text{L}$  共计 10 支、10 $\mu\text{L}$  共计 2 支、2 $\mu\text{L}$  共计 4 支。

品牌		Gilson 移液器规格						情况
序号/领用人		规格						
序号	领用人	1000 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	核实
1	蒋晓东	1	1	1	1	1	1	已核实
2	马亮	1		1	1		1	已核实

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

3	翟诗岚	1		1	1			已核实
4	杨春芳	1		1	1			已核实
5	谭彬	1		1	1		1	已核实
6	张丽萍	1		1	1	1		已核实
7	陈含	1		1	1			已核实
8	徐慧欣	1		1	1			已核实
9	张庆波						1	已核实
10	余子全	1		1				已核实
11	诸瑄宁	1		1	1			已核实
12	孟振	1		1	1			已核实
14	公用				1			
15	合计	11	1	11	11	2	4	

**BIO-DL 移液器统计结果如下：1000 μL 共计 4 支、200 μL 共计 4 支、50 μL 共计 3 支；  
SOCOREX 移液器统计结果如下：5000μL 共计 2 支。**

品牌	BIO-DL			
领用人	1000μL	200μL	50μL	情况核实
刘威	1	1	1	已核实
	1	1	1	
	1	1	1	
	1	1		
合计	4	4	3	

品牌	SOCOREX	
领用人	5000μL	情况核实
孟振	1	已核实
公用	1	
合计	2	

**ependoff 移液器统计结果如下：1000 μL 共计 2 支、200 μL 共计 1 支、100 μL 共计 2 支、20μL 共计 1 支、10μL 共计 6 支、2μL 共计 2 支、5000μL 共计 4 支。**

ependoff 移液器									
领用人	100 μL	200μL	100μL	20 μ L	10 μ L	2.5 μ L	100μL 排枪	5000μL	
金红波	1		1	1	1	1		1	已核实
王利娟	1		1		1				已核实

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

张丽萍						1	1		已核实
公用	0	1	0	0	4	0		3	已核实
合计	2	1	2	1	6	2	1	4	

Thermo 移液器统计结果如下：1000 μL 共计 12 支、200 μL 共计 14 支、20μL 共计 1 支、2μL 共计 1 支、5000μL 共计 1 支（已坏）。

品牌		Thermo						核实情况
序号/领用人		规格						
序号	领用人	1000μL	200μL	50μL	20μL	2μL	5000μL	
1	杨春芳	1	1	1				已核实
2	黄春帅	1	1	1				已核实
3	张丽萍		1					已核实
4	刘智文	1	1	1				已核实
5	张海波	1	1	1				已核实
6	张文军	1	1	1				已核实
7	张庆波	1	1	1				已核实
8	蒋晓东	1	1	1				已核实
9		1	1	1				
10		1	1	1				
11		1	1	1				
12		1	1	1				
13		1	1	1				
14			1	1				
15			1	1	1	1		
	公用	5	7	7	1	1	1	
	合计	12	15	14	1	1	1	

## 十九、三角瓶使用高效原则、注意事项

徐慧欣编

正确的使用各种玻璃器皿对于减少人员伤害是非常重要的。实验室中不允许使用破损的玻璃器皿。对于不能修复的玻璃器皿，应当按照废物处理。在修复玻璃器皿前应清除其中所残留的化学药品。

### 1. 实验室人员在使用各种玻璃器皿时，应注意以下事项

- 1) 在橡皮塞或橡皮管上安装玻璃管时，应戴防护手套。先将玻璃管的两端用火烧光滑，并用水或油脂涂在接口处作润滑剂。对粘结在一起的玻璃器皿，不要试图用力拉，以免伤手。
- 2) 杜瓦瓶外面应该包上一层胶带或其他保护层以防破碎时玻璃屑飞溅。玻璃蒸馏柱也应有类似的保护层。使用玻璃器皿进行非常压(高于大气压或低于大气压)操作时，应当在保护挡板后进行。
- 3) 破碎玻璃应放入专门的垃圾桶。破碎玻璃在放入垃圾桶前，应用水冲洗干净。
- 4) 在进行减压蒸馏时，应当采用适当的保护措施(如有机玻璃挡板)，防止玻璃器皿发生爆炸或破裂而造成人员伤害。
- 5) 普通的玻璃器皿不适合做压力反应，即使是在较低的压力下也有较大危险，因而禁止用普通的玻璃器皿做压力反应。
- 6) 不要将加热的玻璃器皿放于过冷的台面上，以防止温度急剧变化而引起玻璃破碎。

### 2. 对实验室所有规格的瓶子进行数量统计并建立预约使用登记表

(效仿摇床管理方法)

每个月由专人查阅预约本中损坏情况进行再次登记。

如：(预约本的首页)。表 1

250mL 锥形瓶	200 个	2018 年 8 月 15 日登记
500mL 锥形瓶	80 个	2018 年 8 月 15 日登记
1000mL 锥形瓶	100 个	2018 年 8 月 15 日登记
2000mL 锥形瓶	50 个	2018 年 8 月 15 日登记
...	...	...

(预约本具体内容)。表 2

预约使用日期	预约人 (全名+缩写)	规格个数	归还日期	备注 (损坏情况)
2018 年 7 月 30 日	徐慧欣 XHX	1000mL 54 个	2018.8.6	损坏 1 个 归还 53 个
2018 年 8 月 1 日	张英莉。 ZYL	250mL 60 个	2018.8.10	无损 归还 60 个
2018 年 8 月 2 日	徐慧欣 XHX	无	无	踢坏 250mL 1 个
2018 年 8 月 3 日	丁文娟 DWJ (JU)	500mL 5 个	2018.8.5	刘威借出 无损归还 5 个
...	...	...	...	...

3. 购置双面滴水架或使用原有的橱柜 (可能放不下太多瓶子)



可以将滴水架放在水池边 (像 ImranKhan 在群里发的那样, 如下图) 或放在配置培养基的房间。



4. 每个人可提前 3~4 天预约锥形瓶，配置培养基放于自己的操作台架上，若配置的培养基超出 10 天未使用（以预约时间计算），别人可无需经过同意便能使用他人架上的“过期培养基”。
5. 在每次使用完瓶子后，每位使用者需及时将瓶子清洗干净（在 2 天内，瓶身上的标记也必须清洗掉），然后放于滴水架/收纳橱柜中，并进行归还登记。
6. 如果外借，借出者同样要及时追踪瓶子的去向，在预约本上备注中要写上借出者的名字，且必须全部清洗干净后归还，不允许有损坏。（如表 2）

**此法的优点：**

- 1) 不需像以前那样出现很多染菌培养基，同样也不需要值日生每周对染菌培养基再次灭菌。（减轻负担）
- 2) 使用预约方法后，大家都能保证用着较新鲜的培养基，也不会像以前那样（染菌培养基直接扔掉）从而白白浪费许多药品。（对个人的实验有好处，节省药品）
- 3) 无需太多格外的位置去放置配置好的培养。（节省空间）
- 4) 不需要花费时间在找瓶、洗瓶上。（节省每一位科研工作者的时间精力）

## 二十、样品柜分类、使用注意事项

刘威编

### 注意事项：

1. 使用前请登记使用人姓名，配制时间，要配的培养基的名称，用途,以及所需要配的体积。

Before preparing media, please fill in your information including your name and preparation time, media name, and volume.

2. 在称取药品过程中请用干净专用的取样勺取药品，避免交叉污染。

Use clean spoon to take sample and avoid cross contamination.

3. 药品柜中的不足时，请使用人及时从仓库补充，若仓库也不足时，及时通知负责人订购。

If sample in sample cabinet is not enough, please user timely add new one from warehouse.

4. 使用完药品请放回存放目录所标注的位置。

After finishing,Please return the sample to its right position according to the inventory of sample.

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

使用登记表

使用人姓名 (name)	使用时间 (Time)	培养基名称 (Medium name)	所配体积 Volume of your medium	用途 (use of media)	备注 (Comment)

药品存放目录 (Inventory of sample)

1	2	3	4	5	6	7	
蔗糖,	胰蛋白胨	琼脂粉	可溶性淀粉	细菌学蛋白胨	鱼蛋白胨	甘油	酵母提
葡萄糖	水解酪蛋白胨			TRYPTONE	麦芽提取粉		

几丁质	玉米粉	氯化钠	碳酸钙	海盐	TSB,MH	ISP4	2
	大豆粉				麦康培养基		221

3COONH4	NaI	Na2HPO4H4rof	Na2SO4	NaOH	KH2PO4	CH3COOK	K
COONH4	NaI	NaH2PO4H4rof	Na2CO3	NaB4O74H4rof	K2HPO44H4ro	KBr	K
碳酸氢铵	酒石酸钠		NaNO3	C6H5NaO74rof	KCl	KI	I
硫酸铵	硫酸氢钠		Na2S				K2
氯化铵	NaBr						

药品存放目录 (Inventory of sample)

1	2	3	4	5	6	7	8	
氨基酸类	Triton X-100	硼酸	Ni SO4	Mg SO4 X-10	(NH4)2 SO4	Fe Cl3 SO40	Zn Cl2 SO40	Mn
	聚乙二醇	高锰酸钾	Ni Cl2 SO40	Mg Cl2 SO40	钼酸铵	Fe 2 (SO4)3	Zn SO4SO4)3	
	苯甲酸	CuCl24SO4)			NH4HCO3	Fe SO43O4)3		

第二部分：实验室仪器使用与操作规范

		Cu SO43O4)3						
杨酸甲酯	苯酚	Acrylamide	SDS	EDTA			鱼粉	
Br(20g/L)	Ca(OH)2	MH 培养基	C12H25O4SNa	Trise base				
CH3CNa	Fe2 (SO4)3(8g/mL)	Chitin	Glycine					
			Imidazole					

## 二十一、摇床预约使用注意事项

蒋晓东、方壮杰编

### 1. 摇床分组

发酵摇床分组分为 A、B、C、D 四组，A 组共 57 个一升的摇瓶，包括 2#、3#、10#摇床；B 组共 54 个一升摇瓶，包括 11#、12#摇床；C 组共 48 个一升摇瓶，包括 11#、12#摇床。A 组和 B 组摇床固定用于发酵放线菌，C 摇床主要用于发酵真菌。

### 2. 预约规则

- 1) 预约分配：放线菌发酵，每人/月可预约 A 组、B 组的其中一组，特殊情况下可同时预约 A 组和 B 组摇床，但需向组里申请，协调发酵时间；真菌发酵每人/月可预约 C 组摇床一次。
- 2) 发酵人明确收菌时间，提前告知下一个发酵人，以便准备种子液；若取消发酵，提前告知下一个发酵人。
- 3) 上月发酵粗浸膏尚未开始分离鉴定，次月不得预约摇床发酵；
- 4) 同一人分离代谢产物，如需积累样品量可以发信息到课题组微信群说明原因，预约时间连续发酵，但不得两人或多人交替预约。
- 5) 发酵放线菌的摇床不得用于发酵真菌，发酵真菌的摇床在没有人发酵的情况下，可以申请用于发酵放线菌；
- 6) 1#小摇床主要用于真菌的发酵筛选和种子培养（不得占用）；4#主要用于放线菌发酵种子的培养（不得占用），5#、6#、7#、9#主要用放线菌的发酵筛选和发酵培养，8#固定用于大肠杆菌的培养。

附件：A 组摇床预约登记表

20\*\*年\*\*月

预约时间	A 组摇床	预约人	备注
	(2#、3#、10#摇床)		

注：请勿在表格以外另行预约

预约规则

- 1) 预约分配：放线菌发酵，每人/月可预约 A 组、B 组的其中一组，特殊情况下可同时预约 A 组和 B 组摇床，但需向组里申请，协调发酵时间；真菌发酵每人/月可预约 C 组摇床一次。
- 2) 发酵人明确收菌时间，提前告知下一个发酵人，以便准备种子液；若取消发酵，提前告知下一个发酵人。
- 3) 上月发酵粗浸膏尚未开始分离鉴定，次月不得预约摇床发酵；
- 4) 同一人分离代谢产物，如需积累样品量可以发信息到课题组微信群说明原因，预约时间连续发酵，但不得两人或多人交替预约。
- 5) 发酵放线菌的摇床不得用于发酵真菌，发酵真菌的摇床在没有人发酵的情况下，可以申请用于发酵放线菌；
- 6) 1#小摇床主要用于真菌的发酵筛选和种子培养（不得占用）；4#主要用于放线菌发酵种子的培养（不得占用），5#、6#、7#、9#主要用放线菌的发酵筛选和发酵培养，8#固定用于大肠杆菌的培养。

附件：B 组摇床预约登记表

20\*\*年\*\*月

预约时间	B 组摇床	预约人	备注
	11#、12#摇床		

注：请勿在表格以外另行预约

预约规则

- 1) 预约分配：放线菌发酵，每人/月可预约 A 组、B 组的其中一组，特殊情况下可同时预约 A 组和 B 组摇床，但需向组里申请，协调发酵时间；真菌发酵每人/月可预约 C 组摇床一次。
- 2) 发酵人明确收菌时间，提前告知下一个发酵人，以便准备种子液；若取消发酵，提前告知下一个发酵人。
- 3) 上月发酵粗浸膏尚未开始分离鉴定，次月不得预约摇床发酵。
- 4) 同一人分离代谢产物，如需积累样品量可以发信息到课题组微信群说明原因，预约时间连续发酵，但不得两人或多人交替预约。
- 5) 发酵放线菌的摇床不得用于发酵真菌，发酵真菌的摇床在没有人发酵的情况下，可以申请用于发酵放线菌。
- 6) 6、1#小摇床主要用于真菌的发酵筛选和种子培养（不得占用）；4#主要用于放线菌发酵种子的培养（不得占用），5#、6#、7#、9#主要用放线菌的发酵筛选和发酵培养，8#固定用于大肠杆菌的培养。

附件：C 组摇床预约登记表

20\*\*年\*\*月

预约时间	C 组摇床	预约人	备注
	(13#、14#、15#摇床)		

注：请勿在表格以外另行预约

预约规则

- 1) 预约分配：放线菌发酵，每人/月可预约 A 组、B 组的其中一组，特殊情况下可同时预约 A 组和 B 组摇床，但需向组里申请，协调发酵时间；真菌发酵每人/月可预约 C 组摇床一次。
- 2) 发酵人明确收菌时间，提前告知下一个发酵人，以便准备种子液；若取消发酵，提前告知下一个发酵人。
- 3) 上月发酵粗浸膏尚未开始分离鉴定，次月不得预约摇床发酵；
- 4) 同一人分离代谢产物，如需积累样品量可以发信息到课题组微信群说明原因，预约时间连续发酵，未说明原因前不得两人或多人交替预约。
- 5) 发酵放线菌的摇床不得用于发酵真菌，发酵真菌的摇床在没有人发酵的情况下，可以申请用于发酵放线菌；
- 6) 1#小摇床主要用于真菌的发酵筛选和种子培养（不得占用）；4#主要用于放线菌发酵种子的培养（不得占用），5#、6#、7#、9#主要用放线菌的发酵筛选和发酵培养，8#固定用于大肠杆菌的培养。

## 二十二、凝胶使用规则

方壮杰编

1. 根据需要挑选凝胶柱的长短，在上样到凝胶柱前，先观察凝胶柱用的什么溶剂，若需要置换溶剂，则需在完成过凝胶柱后重新置换回原来的溶剂；
2. 根据样品是否挂柱（自己所分的化合物）决定是否上样凝胶柱（建议挂柱的样品最好别上凝胶柱，不然得费很大劲去冲洗干净，这样别人也用不了那根柱子）。在对所分化合物不知情或样品非得过凝胶柱的情况下，若发生样品挂柱，则可加入千分之一的醋酸到所冲洗的溶剂里，并尽量冲洗干净，方便其他人继续使用。
3. 确保每根凝胶柱具有适量的溶剂，避免凝胶柱走干从而影响它的功能与寿命。若发现凝胶柱开关不紧导致溶剂漏，则要及时主动处理或告诉老师，防止溶剂漏导致凝胶柱走干。
4. 在接收每个凝胶柱馏分的过程中，防止接收小瓶子装满溢出（既会损失样品又会导致溶剂挥发，建议小瓶子下面垫个玻璃皿），同时要把接收的小瓶子及时放入通风橱或用盖子盖上，减少溶剂挥发。
5. 样品走完凝胶柱之后，要用一定的溶剂冲洗干净，方便下个人使用。

## 二十三、GelDoc XR+系统的清洁与维护

马亮编

### 1. 凝胶成像分析系统基本情况

可以应用在蛋白电泳凝胶，DNA 凝胶，样品进行图象采集并进行定性和定量分析，样品包括：EB、SYBR Green、SYBR Gold、Texas Red、GelStar、Fluoroscecin、Radiant Red 等染色的核酸监测；以及 Coomassie Blue、SYPRO Orange、各种染色的蛋白质凝胶如考染等。（或 UV,EB 和有色及可见样品成像）

### 2. 使用注意事项

- 1) 注意开机顺序，先开凝胶成像系统，再打开电脑进入软件；关机顺序相反。
- 2) 紫外凝胶照相时要防止 EB 污染仪器，凝胶成像系统的门不能用污染的手套接触，进行软件操作时同样不能被污染的手套接触。
- 3) 在使用紫外光源照相的过程中，不可以打开凝胶成像系统前面板。
- 4) 照相后把废胶取出，并用较软的纸擦拭干净。
- 5) 环境电压不稳定时，请使用稳压电源。使用过程中如遇断电，请及时将仪器电源关闭，直至重新来电。
- 6) 使用时，请先打开仪器的电源开关，再打开电脑开关并打开软件（ImageLab）。
- 7) 保持观测室内环境干燥，及时将遗留在观测板上的水或其他液体擦干（可使用软质纸，一般卷纸即可）。
- 8) 观测用 EB（溴乙锭）染色的凝胶时，注意不要污染仪器表面。千万不要用手直接接触凝胶，或戴着接触过凝胶的手套去接触仪器的门和观测台的把手。
- 9) 使用仪器时，要将门及观测台关紧，否则将无法正常使用紫外灯。
- 10) 尽可能不要将电脑连接到因特网或局域网上，同时在电脑上安装杀毒软件（推荐使用正版软件），做到专机专用。
- 11) 较长时间不用仪器时，请将仪器用防尘罩盖上。
- 12) 为延长灯管的使用寿命，请观测好凝胶后及时关闭光源（仪器自身有 15 分钟的自动保护程序）。

## 二十四、纯水仪使用注意事项

马亮编

1. E-POD 的水和大桶内的水一样，都是纯净水（与怡宝桶装水相同），用于日常使用，电阻率一般为 15.0。
2. Q-POD 的水为超纯水，用于 HPLC 液相配制、细胞培养等，电阻率一般为 18.2。
3. 大桶内水量为 60L，剩余水量低于 10%时仪器不出水。
4. E-POD 出水量达 25,000 L，Q-POD 出水量达 2,500 L 时（约 1 年半时间）需要更换 2 个过滤柱，约 15,000 RMB!!!
5. 请大家接水时尽量节省，能用怡宝桶装水时尽量用怡宝!!!
6. 做 HPLC 制备时视具体情况接水，不要每次都接 4 L，以免用不完浪费!!!
7. 进水的 2 个过滤柱平常用黑色塑料袋包裹，避光。
8. 大桶背后的窗帘保持关闭状态，避免阳光直射引起温度升高，导致大桶内微生物生长。
9. 日常维护时，RO 膜 86 天用 Cl2 药片（储存于大水桶下方）清洗一次，进水的 2 个过滤柱 45 天换 1 次滤芯（储存于冰箱上方）。更换时注意不要遗失密封圈。

## **第三部分：实验室卫生与行为规范**

## 一、实验室卫生与行为规范

张庆波编

(一) 实验室实行安全、卫生负责人制度，负责实验室的日常安全和卫生工作，督促实验室的工作人员按照实验室的安全、卫生规定开展工作，并对实验室的安全和卫生定期检查，消除隐患。

(二) 实验室内应保持严肃、安静、整齐、清洁和规范，进入实验室的工作人员，必须认真学习实验室的各项规定及实验仪器的操作规程，维护实验室的环境、安全和卫生。

(三) 实验室工作人员必须遵循“爱护节约，物尽其用”的原则，爱护实验仪器设备，节约使用实验材料，使用前详细检查，使用后整理归位，发生丢失或损坏的要立即上报。实验室的仪器设备和试剂不得私自外借，如有必要，应征得实验室相关管理人员的同意。公用的药品、仪器、图书和其他用具应定点存放，用完以后放回原处。

(四) 实验室仪器设备实行“专人负责制”：公用仪器由专人负责，包括仪器的日常维护，管理及使用情况的监督。每位工作人员使用完公用仪器后，都必须清理干净，恢复原样；负责人负责督促使用人的使用情况，督促不到位的由负责人承担。个人使用的仪器设备，领用要登记，领用以后做好标记，由个人负责，损坏后及时向相关管理人员报告更换，无故丢失的，追究领用人的相关责任；任何人不得未经同意随意取用他人的仪器设备，一经发现，通报批评，屡教不改的，酌情暂停进入实验室，认真学习实验室管理手册，并做出书面检查，在组会上宣读。

(五) 实验室公用的物品，包括旋蒸瓶、摇瓶、试剂、培养基、试剂盒，工具等必须遵循“放回原处”的原则。各种类型的旋蒸瓶和摇瓶，用完以后要清洗干净，放回原处；各种公用试剂、试剂盒、培养基和工具用完以后，要放回原处，按标签摆放，用完的及时向相关管理人员报告增补，用完的容器要及时清理。

(六) 实验室卫生实行“值日生负责制”。值日生由化学方向和生物方向的工作人员或学生各一名组成，值日时间为一周，值日内容包括实验室公共区域日常卫生的清洁及维护，每日必须更换垃圾袋，保持实验室的干净整洁。每周一上午为值日交接时间，交接情况必须通过邮件告知全组成员，由接收人检查确认后方可生效（交接范围包括公共区域的地面、台面及公用实验仪器等。公用仪器的清洁由使用人和值日生负责，仪器负责人监督。接收人确认接收后，一切后果由接收人承担）。每月最后一周周五为实验室大扫除时间，从 15:00 开始，所有在实验室工作的人员不得无故缺席。大扫除内容包括：个人实验台面、公用区域

### 第三部分：实验室卫生与行为规范

及仪器的清洁（由仪器负责人负责），过期样品及培养基的处理。

（七）实验室高效液相流动相的配制和废液的处理按值日表轮流负责，值日生两名，值日周期为一个月。每月1号为值日交接时间，交接情况必须通过邮件告知全组成员，由接收人检查确认后方可生效。交接时，必须保证所有的废液都已回收或处理干净。接收人确认接收后，所有事项归接收人负责。

（八）实验室的所有物品要求标签清晰，培养基和发酵摇瓶做好标记和日期，值日生有权随时处理没有标签或没有标注日期的培养基和发酵摇瓶，没有及时处理的，每月大扫除时必须集中处理。

（九）实验室所用试剂耗材由专人负责购买，购买以后要做好登记，并定点存放，不得随意摆放在公共区域。新购物品的归置由购买人和当日值日生负责。

（十）下班前必须做好安全检查，关闭水、电、门、窗及不需要通宵工作的仪器设备及电脑、显示器等。每天最后离开实验室的人员必须认真检查，并签名登记确认；每天第一个进入实验室的人员，也必须签名登记确认。

（十一）凡在本实验室工作的人员必须严格遵守本实验室的管理办法和其他相关规章制度。

（十二）实验室日常登记、个人物品标名。按规章登记各仪器使用记录，个人物品标清姓名。



## 二、实验室晚间离室确认制度

诸晗宁编

1. 每晚结束工作后确认自己所用设备已清理、关闭，个人物品已整理、个人因实验产生的垃圾已清洁。
2. 304 分子实验室、402 分子实验室、化学实验室、细胞房晚间最后离开的人员检查室内是否还有仪器设备无人操作运行，及时提醒到个人，消除安全隐患。确认无误后关闭点灯、空调（402 分子实验室不关空调）、锁门。
3. 细胞房由张丽萍博士负责管理，其他人员未经许可不建议随意进出。如需使用细胞房，须提前与张丽萍博或张英莉同学联系预约。
4. 最后离开人员完成各项确认后在实验室微信群中做好打卡确认，如该室已完成打卡，但有其他人员再次进入，需在完成工作离开后再做一次打卡确认。
5. 当晚遗忘打卡的人员须在第二天早上补打卡。

附件：Zhang's Lab 304 生物室晚间离室确认表（日期：            ）

序号	本人所用设备是否关闭	个人物品是否已经整理	是否清洁了自己所在部位的卫生	是否已经关闭了电灯、空调，是否已经锁门【最后一名离开实验室人员填写】	签名
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

主要在本室工作的人员有：张光涛副研究员，杨春芳副研究员，马亮助理研究员，王利娟博士后，谭彬博士生，金红波博士生，Bidhan Chandra De 博士生，朱梦奕博士生，孟振硕士，方春艳硕士生，徐慧欣硕士生，赵梦冉硕士生，严文思本科实习生；以及其他临时使用本室人员

附件：Zhang's Lab 401 化学室晚间离室确认表（日期：                    ）

序号	本人所用设备是否 关闭/溶剂是否已经 清理	个人物品是 否已经整理	是否清洁了自 己所在部位的 卫生	是否已经关闭了电灯、空调，是 否已经锁门【最后一名离开实验 室人员填写】	签名
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

主要在本室工作的人员有：张庆波副研究员，张文军副研究员，张海波副研究员，刘威博士生，Imran Khan 博士生，方壮杰博士生，陈思强直博生，吴晓珍硕士生，王璐硕士生，张鑫雅硕士生，谭瑛硕士生，叶伟霞硕士生，丁雪敏本科实习生，黎梓颖本科实习生，以及其他临时使用本室人员

附件：Zhang's Lab 402 生物室晚间离室确认表（日期：                    ）

序号	本人所用设备 是否关闭	个人物品是 否已经整理	是否清洁了自 己所在部位的 卫生	是否已经关闭了电灯、空调，是 否已经锁门【最后一名离开实验 室人员填写】	签名
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

主要在本室工作的人员有：朱义广副研究员（公派出国），蒋晓东博士生，翟诗岚硕士生，彭璟硕士生，诸晗宁，以及其他使用超净台的人员

附件：Zhang's Lab 细胞房晚间离室确认表（日期：                    ）

序号	本人所用设备是否关闭	个人物品是否已经整理	是否清洁了自己所在部位的卫生	是否已经关闭了电灯、空调，是否已经锁门【最后一名离开实验室人员填写】	签名
1					
2					

主要在本室工作的人员有：张丽萍助理研究员，张英莉硕士生，其他人员未经许可不建议随意进出、使用细胞房，必须使用时请与张丽萍老师、张英莉同学联系确认。

## **第四部分：实验室文献阅读制度**

## 一、每月文献阅读

诸晗宁编

### 1. 基本要求

每月每人（包括职工与学生）提交一篇文献阅读汇报，最迟于当月最后一天前发送至组内做汇总，由专人做好文献阅读记录台账。

- 1) 每月 10 日前提交拟阅读文献全文
- 2) 每月最后一天为截止日，提交文献阅读报告

### 2. 对学生的进一步要求

对象	范围	要求	负责
低年级学生（ <b>新进组人员</b> ）	硕士一年级、直博一年级、非硕博连读一年级	文献阅读以综述为主	相关阅读文献以综述为主，由各自带教老师协助选择，难度不宜过高，循序渐进锻炼文献阅读能力
	实习研究生	文献阅读以综述及专业性搭配阅读	由各自带教老师协助选择，以该同学所在研究专业的综合性或专业性为主，目的为加强专业性，并了解大概的领域前沿内容
<b>高年级学生</b>	硕士 2-3 年级、直博 2-5 年级、硕博连读 1-3 年级、非硕博连读博士 2-3 年级、延期研究生	精读高影响因子文章	由各人自行选择阅读篇目，带教老师做好审核及反馈

### 3. 文献阅读格式

- 1) 期刊名|文献中文名
- 2) 研究背景与意义：
- 3) 通讯作者介绍：
- 4) 文献研究内容【包括科学问题的发现、亮点成果的介绍等】：
- 5) 文献内的技术与方法以及可借鉴的方面：
- 6) 得到的启发与思考：
- 7) 文章来源【作者、文章名称、期刊名、年卷期页】：
- 8) 原文链接：
- 9) 文献阅读作者：

## 二、每月文献阅读及管理制度考核制度

诸晗宁编

### 1. 题库

- 1) 文献阅读题库：由职工组在组内发表的所有文章中选择重要论文，以本人为第一作者（共同第一作者）为主要出题人，每篇文章可出 3-5 题，最终形成题库，以开放性思考题为主要题型。
- 2) 以本规章制度内所有内容为题库内容，以单项选择、多项选择、填空、是非题为主要题型。
- 3) 考核从 2019 年 9 月开始，每月最后一天为考核日。

### 2. 考核

<b>考核对象</b>	本组硕、博一至二年级研究生（不包括实习生），旨在通过通读实验室发表的所有重要文章，了解实验室发展过程，找到研究兴趣点，同时培养独立思考能力
<b>考核方式</b>	职工组每月发布考核范围（2-3 篇文章），由张庆波博士负责在月初发送相关文章给所有学生（包括北京学习），月底集中一个时间（提前一天通知）进行考核
<b>考核反馈</b>	由文章出题人进行审阅，对每一位学生的“思考”进行评价，形成台账在组内公布

### 三、文献阅读公众号运行管理制度

诸晗宁编

**1. 公众号管理员**负责推送文献阅读、管理用户、回复留言。

**2. 文献阅读文稿整理由职工组负责**

1) 时效性：推送文献以近 3 个月为参考时间；发表在该文献领域的主要及顶尖期刊，注重影响力。

2) 每人从上一个月提交的所有文献阅读汇报中选择一篇进行修改，于当月 5 日前提交修改文稿。安排顺序后，由职工组逐一审核，由编辑进行公众号排版、格式优化及推送。

3) 按每 3 天推送 1 篇的频率，做好修改、审核以及编辑、推送工作，最少每月发布 10 篇文献阅读。有特别优秀的文献报告每人可推荐多篇。

## **第五部分：实验室技术培训**

## 一、Cas9 基因敲除的载体构建和接合转移

谭彬、金红波编

### 1. 主要内容概要

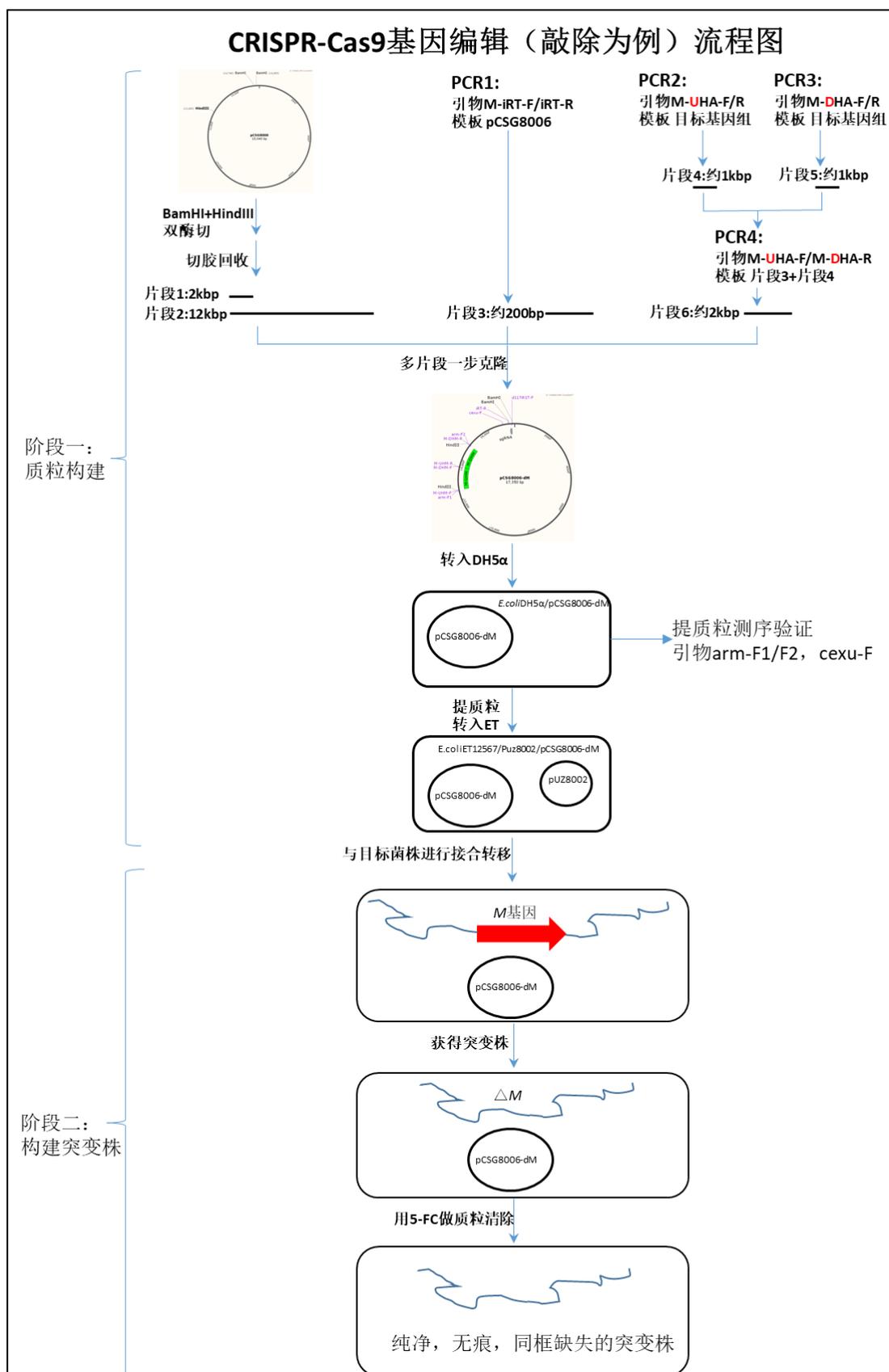
利用 CRISPR/Cas9 对放线菌进行遗传操作具有快速精准以及无痕的优点，通过介绍 CRISPR 系统的发现，Cas9 蛋白切割基因组的原理，载体 pCSG80006 (pCSGCas9) 原件功能，敲除质粒的构建，接合转移以及筛选过程，帮助大家熟悉如何设计引物，进行敲除、插入和点突变的遗传改造。

### 2. CRISPR-Cas9 基因编辑技术的原理与应用简介

CRISPR-Cas 系统是细菌中的“获得性免疫”系统，用来抵御病毒的侵染，且广泛存在于原核生物中。CRISPR-Cas 系统可根据参与蛋白的种类和数量分为 I 型、II 型和 III 型，由于 II 型系统只需要一个 Cas9 蛋白的参与，使得 CRISPR-Cas9 技术被迅速开发为基因编辑技术，应用到包括原核和真核细胞中。

CRISPR-Cas9 基因编辑技术的核心是 Cas9 和 sgRNA 形成复合体，由 sgRNA 上的 gRNA(20nt)部分引导靶向切割基因组，造成特定定位点的双链断裂。Cas9 在切割基因组时，还需要基因组上的 PAM 序列来进行锚定。PAM 是由 NGG 三个碱基的序列构成，N 代表任意碱基。

利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术来敲除、插入或者点突变，首先 1) 要构建一个基因编辑质粒，质粒上含有 Cas9 蛋白基因、sgRNA 基因以及一段和基因组进行同源重组的人工 DNA 序列；2) 然后利用质粒投送技术将质粒导入到受体细胞中，各基因表达后，靶向切割基因组，细胞本身启动 DNA 双链断裂后的基因组修复，从而利用人工 DNA 序列与基因组进行同源重组，替换基因组中原有的序列，最终达到我们在人工序列中设计的突变效果。



### 3. 引物设计

在要敲除基因中找到 NGG (PAM) 序列, 5'  
-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN(20bp)PAM-3'

作为 gRNA 序列 (位置习惯选在中间左右, 边上也可以)。5' 第一个 N 习惯为 G (序列 AT 含量稍微高点, 特异性会好点)。

两个同源臂长度习惯设成 1kb 左右, 同源臂中间的序列为要敲除的基因的序列 (注意不要移码)。以敲除 *totM* 所设引物为例, 如下图 1, 2, 3, 4, 5 分别为 M-UHM-F (M 上游同源臂 F), M-UHM-R (M 上游同源臂 R), M-DHM-F (M 下游同源臂 F), M-DHM-R (M 下游同源臂 R), M-iRT-F 和 iRT-R。



Figure 1. M-UHM-F

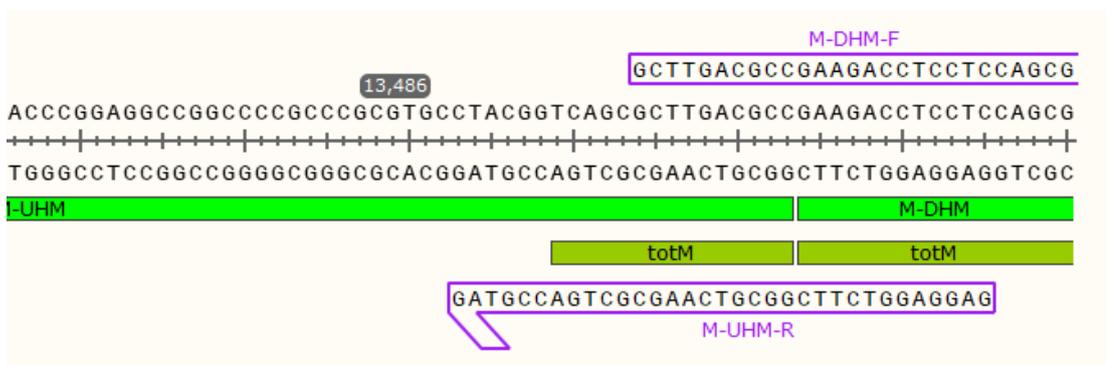


Figure 2. M-UHM-R 和 M-DHM-F

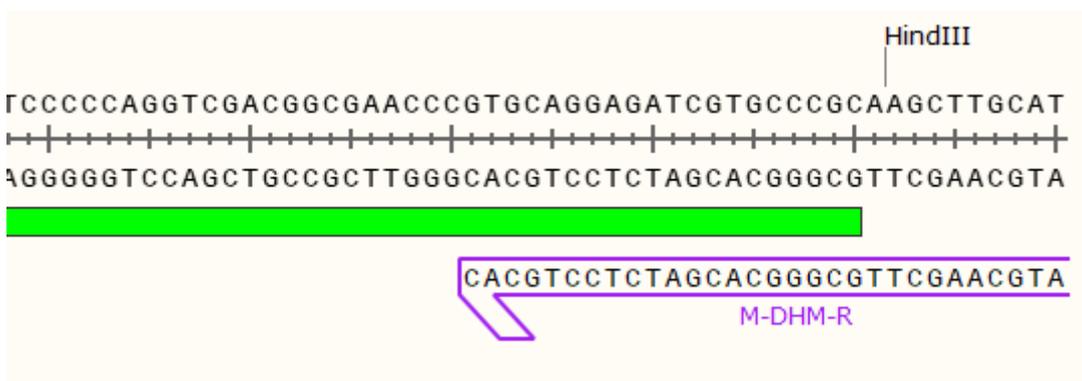


Figure 3 M-DHM-R

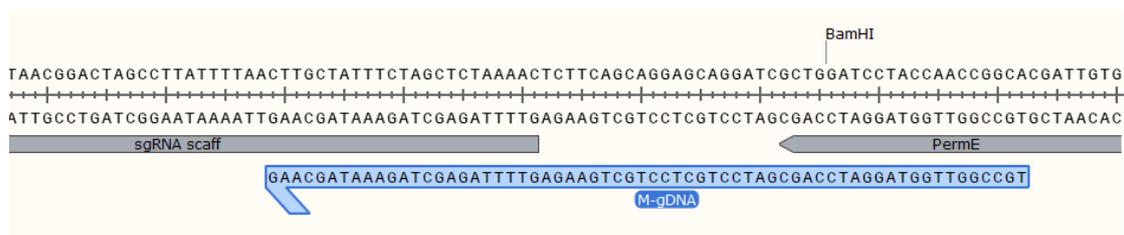


Figure 4. M-gDNA-F

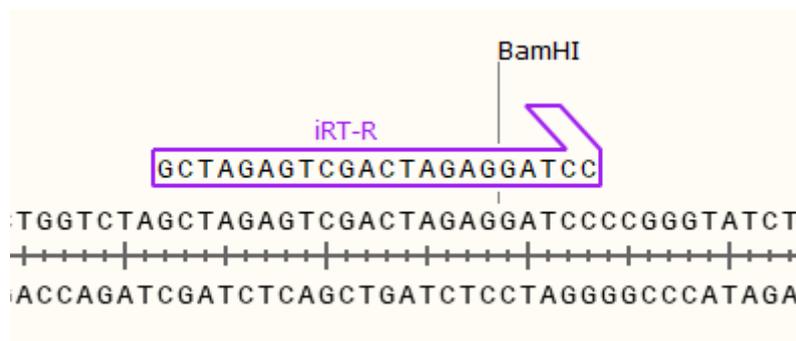


Figure 5. 为固定的与 g-DNA-F 相对的那条引物

#### 4. 载体构建

用 HindIII 和 BamHI 对载体 pCSG8006 (又名 pCSGCas9) 进行酶切，回收酶切下来的大小两个片段 (图 6 为没有酶切前的完整的质粒图)。用一步克隆的方法对扩增出来的两个同源臂，一个 gRNA 序列和大小两个载体片段进行连接，载体构建好后整体效果如图 7 所示。转 DH5a, 进行测序。

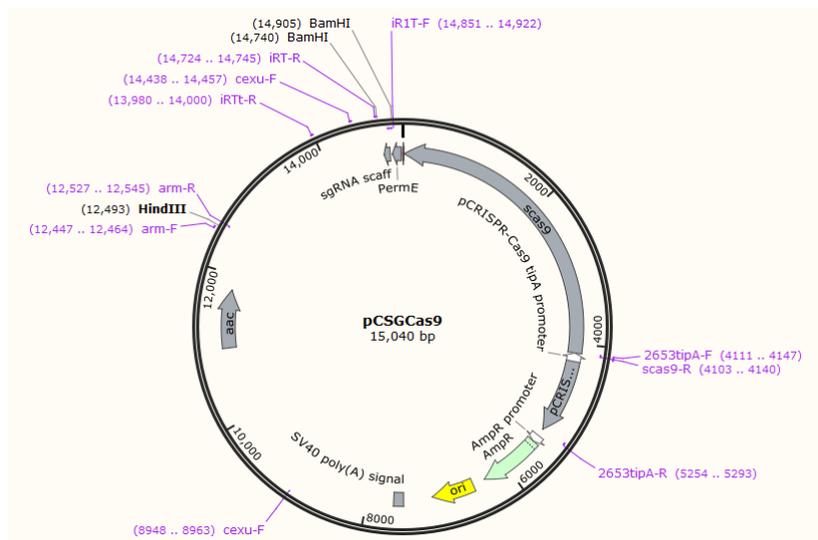


Figure 6. 完整的 pCSGCas9 质粒图谱

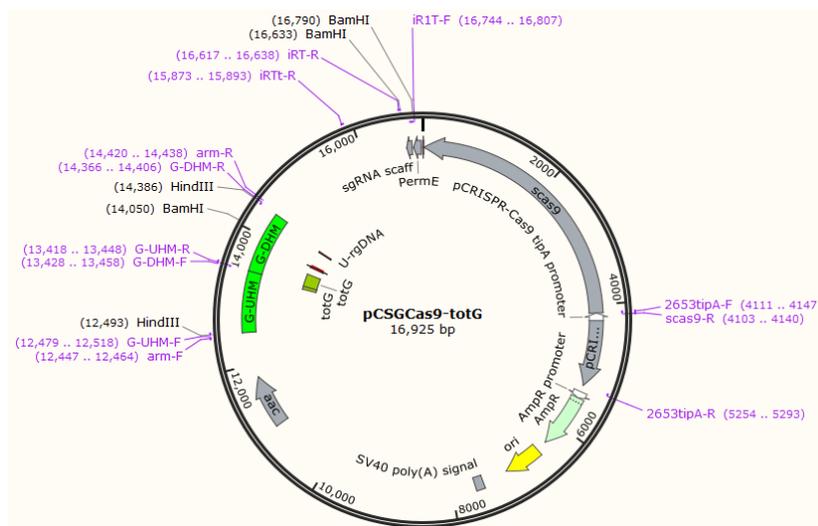


Figure 7. 完整的构建图

## 5. 接合转移

将测序正确的质粒转入 ET12567/PUZ8002 中，与受体链霉菌孢子进行接合转移，18-20h 左右进行覆盖，可选 Apr 或者 Thi 进行覆盖（对于长的快的菌株来说，无 Apr 抗性，则可以用 Apr 或者 Thi 抗性去覆盖；对于长得慢的菌株，建议用 Apr 覆盖，不用 Thi 覆盖，考虑到 Cas9 前面用到的 Thi 启动子，Thi 对其有诱导作用，表达太快可能生长不起来或者生长周期更长）。

## 6. 筛选

1) 阳性接合子的筛选：接合子长出来后，将其于无抗板划小方格，3 天左右用 Chelex 树脂处理，用 PCR 进行验证，筛选到含有阳性条带的接合子，如图 8 所示（红色标注的为阳性接合子）；

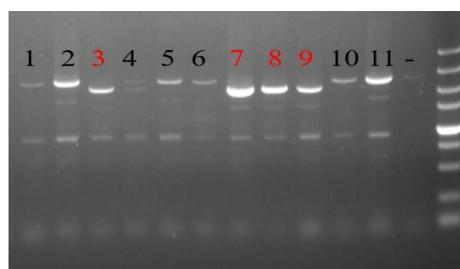


Figure 8. 接合子 PCR 验证

- 2) 无抗板上传代：将其划线于无抗平板，待其产孢；
- 3) 5FC 板上反筛： 后将其稀释涂布到含 5FC（15ug/mL 到 20ug/mL）的平板上（通过反筛保留质粒丢失的菌株）；

4) 对点再次验证：将在 5FC 板上长出来的单克隆对点到抗性板 (Thi or Apr) 和无抗板再次筛选看质粒是否丢失；对点后用 PCR 验证在无抗板上长出来而在抗性板上不长的菌。图 9 位对点后检测的结果。

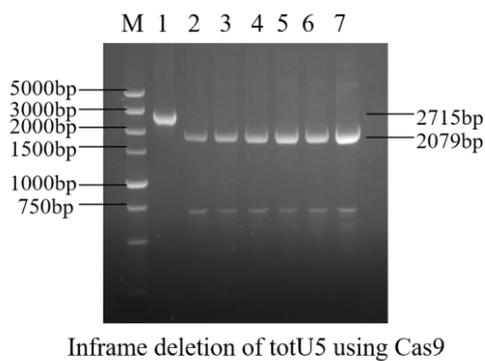


Figure 7. 点后单克隆的 PCR 验证

(注：在接合子长出来的那一代尽可能地获得含有阳性接合子进行下一步的操作)

## 二、三维结构分析和绘图基础：pymol 软件的使用

张丽萍编

### 1. 简介

PyMol 是一个被广泛使用的显示分子结构，给结构作图的软件。还可以做一些简单的测量，修改结构，移动等。此外，它还能做动画。支持 Windows 操作系统。PyMol 名字中的“Py”表示该软件基于 python 这个计算机语言，“Mol”则是英文分子“是英文分子”，的缩写，表示该软件用来显示分子结构。

### 2. PyMol 使用界面

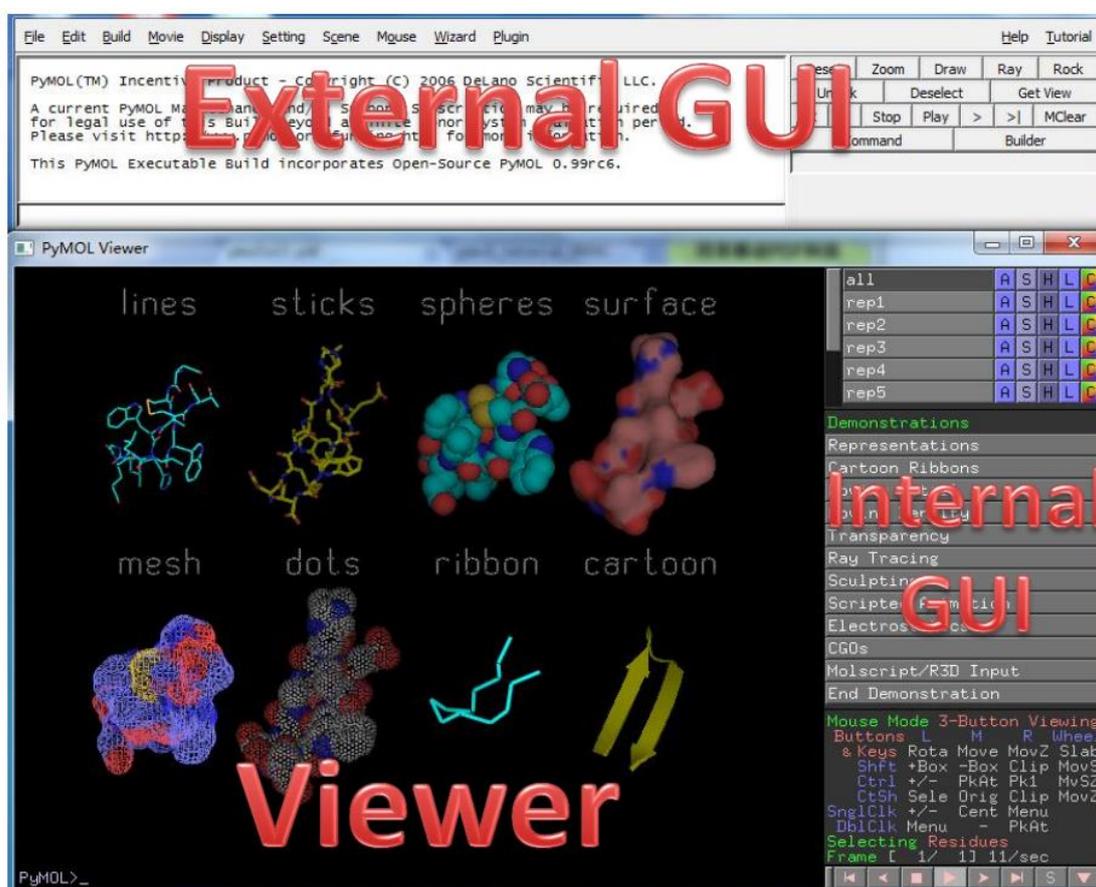
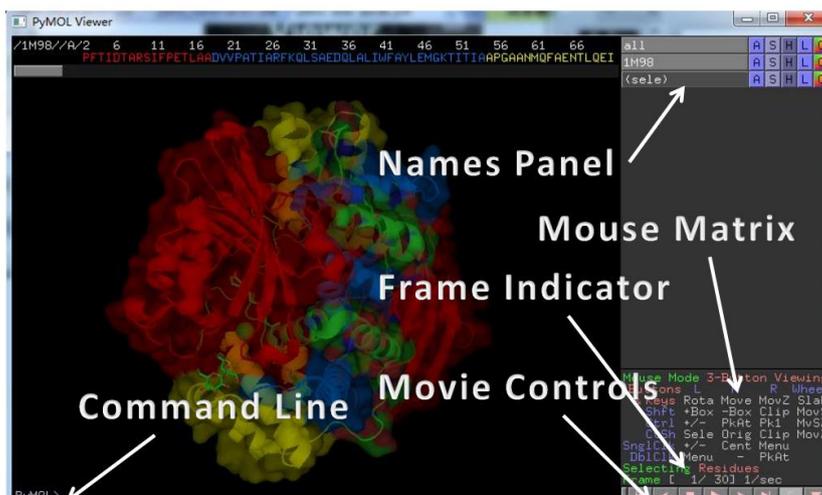


Figure 1. 界面介绍

使用界面包括一个图形显示窗口和两个 GUI (graphical user interface) 窗口。GUI 窗口有菜单、按钮、正文框和其他小工具。External GUI 和 Viewer 窗口下面可以输入命令行。

PyMol 可以同时打开多个 PDB 文件，或将某个 PDB 文件拆分成多个独立 objects. 每个 PDB 或独立 objects 可以通过“以通中的“的“过“ts.重新命名。



- A: Action
- S: Show
- H: Hide
- L: Label
- C: Color

Figure 2. Internal GUI 窗口功能介绍

## ASHLC menu

### • Action

Actions:
zoom
orient
center
origin
drag
preset
find
align
generate
assign sec. struc.
rename object
duplicate object
delete object
hydrogens
remove waters
state
masking
sequence
movement
compute

### Show

As:	Show:
lines	as
sticks	lines
ribbon	sticks
cartoon	ribbon
label	cartoon
cell	label
nonbonded	cell
dots	nonbonded
spheres	dots
nb_spheres	spheres
mesh	nb_spheres
surface	mesh
	surface
	organic
	main chain
	side chain
	disulfides

### Hide

Hide:
everything
lines
sticks
ribbon
cartoon
label
cell
nonbonded
dots
spheres
nb_spheres
mesh
surface
main chain
side chain
waters
hydrogens
unselected

### Label

Label:
clear
residues
chains
segments
atom name
element symbol
residue name
residue identifier
chain identifier
segment identifier
b-factor
occupancy
vdw radius
other properties
atom identifiers

### Color

Atoms	Color:
HNOS...	by element
CHNS...	by chain
CHNS...	by ss
CHNS...	spectrum
CHNS...	auto
CHNS...	reds
CHNS...	greens
CHNS...	blues
CHNS...	yellows
set 2	magentas
set 3	cyans
set 4	oranges
set 5	tints
	grays

Figure 3. Internal GUI 窗口功能介绍“口功能介绍”菜单功能, ASHLC 菜单是 Action、Show、Hide、Label、Color 的简称。

# The External GUI Window

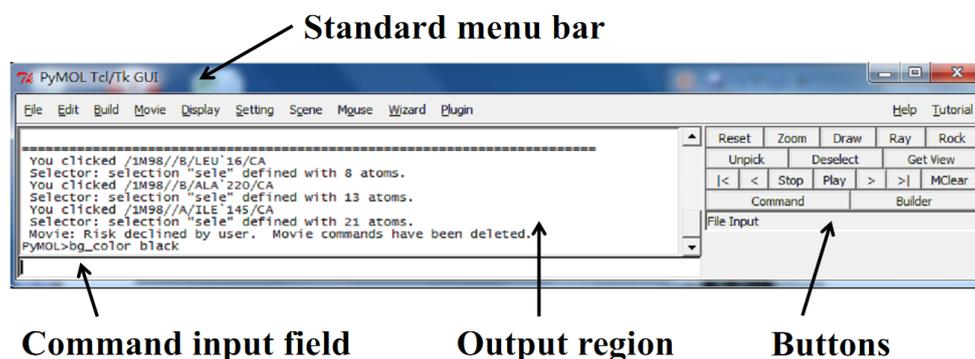


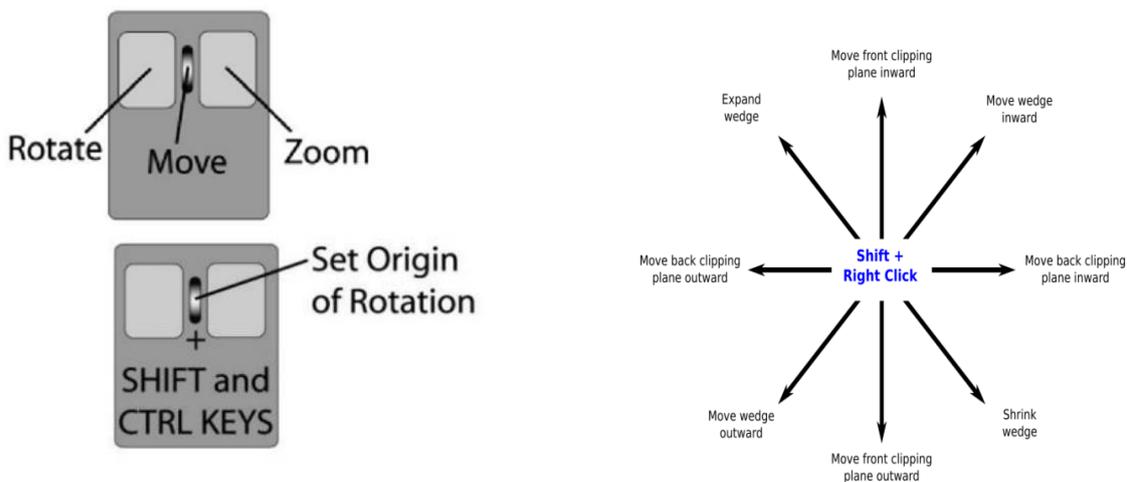
Figure 4. External GUI 窗口介绍。

External GUI 窗口的命令行可以使用 ctrl-X, ctrl-C, ctrl-V 等剪切、复制或黏贴命令文本。

### 3. 基本操作

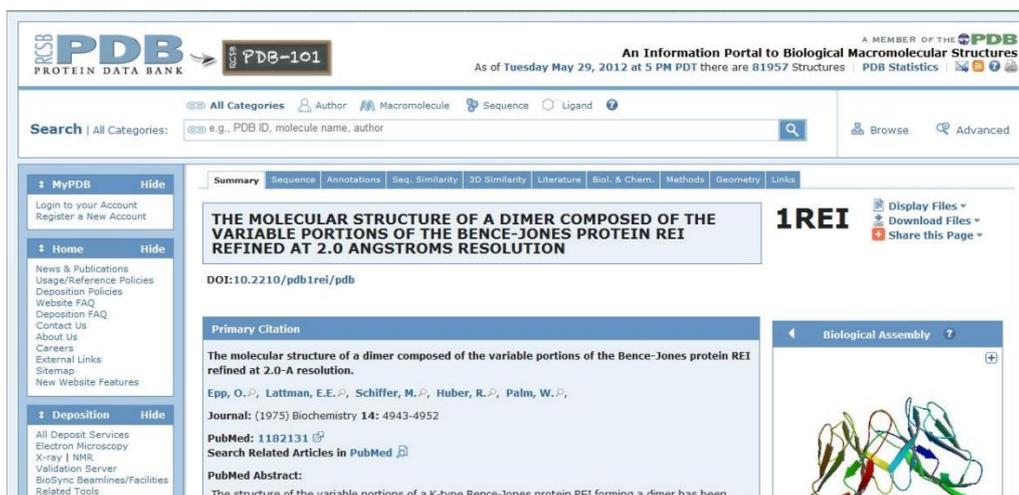
#### 1) 鼠标操作

- (1) 任意旋转图像： 对准图像的任意处点住鼠标左键然后移动鼠标。
- (2) 放大/缩小图像： 对准图像的任意处点住鼠标右键然后移动鼠标： 向上是缩小，向下则是放大。
- (3) 移动图像： 对准图像的任意处点住鼠标中键或者滚轮，然后移动鼠标。
- (4) 设定图像旋转中心： Ctrl+Shift+鼠标中键或滚轮。
- (5) 移动剪切平面： Shift+鼠标右键。鼠标上下移动： 调整前剪切平面（离你近的）；鼠标左右移动： 调整后剪切平面（离你远的）。

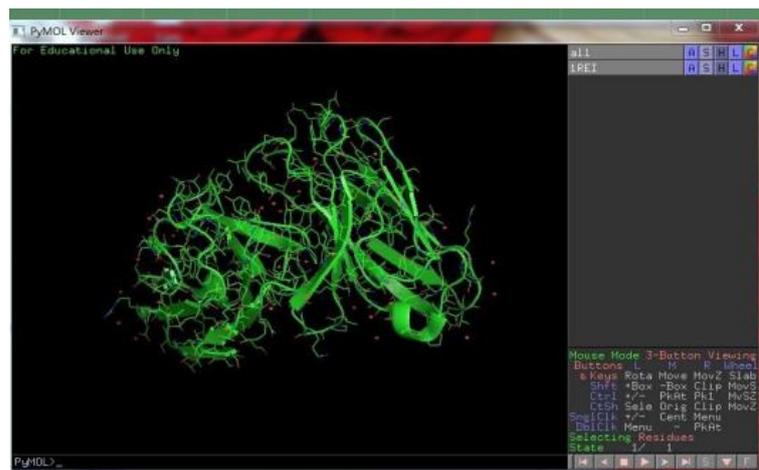


## 2) PyMOL 对蛋白质分析实例

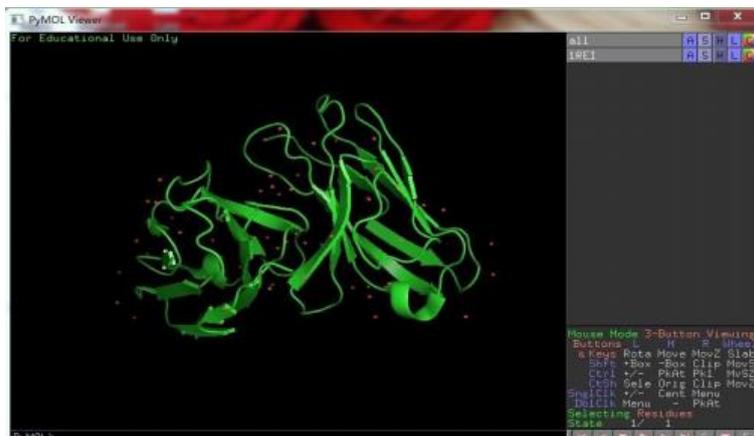
(1) 在 PDB 数据库 <http://rcsb.org> 中下载编号为 1REI、2QSQ 两蛋白 pdb 文件，并应用 PyMOL 软件进行分析。



(2) 演示 Cartoon 图像: 点击 S, 选择 cartoon。图像中显示出 cartoon 和线框。



(3) 去除线框: 点击 H, 选择 lines。

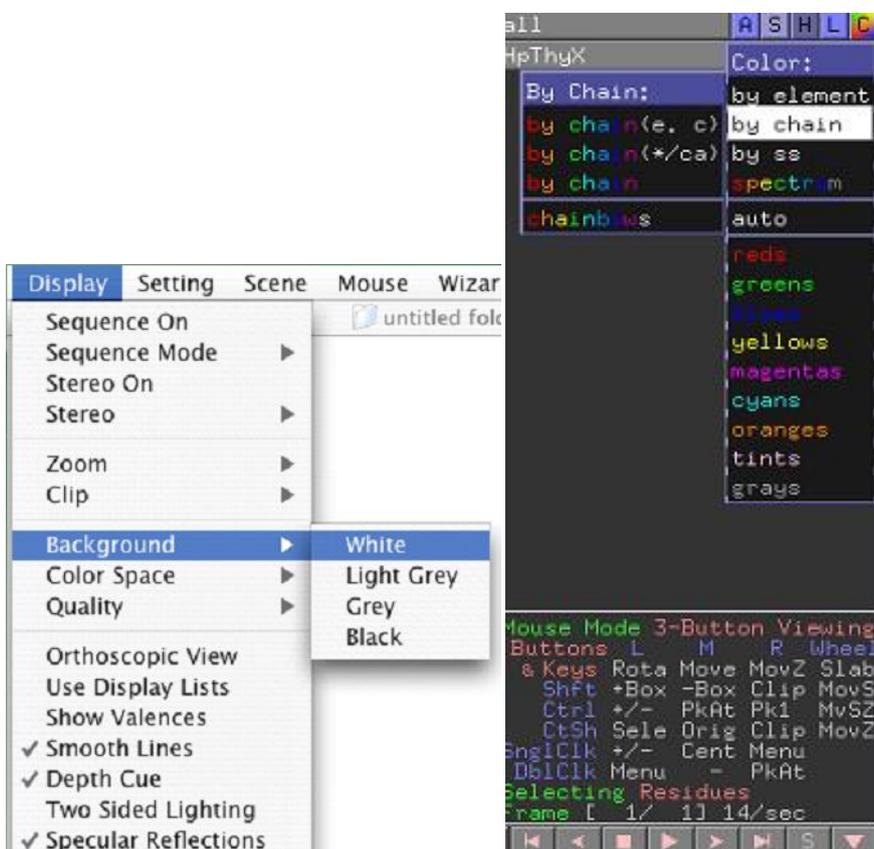


(4) 在外部 GUI 窗口 (External GUI) 中，我们可以点击“中，我们可以点击下拉菜单，选择“拉菜单，选择“击对其进行显示设置。其它许多选项也可通过该下拉菜单进行自定义设置。很容易对图像中的 alpha-helices、beta-sheets、loops 的显示样式进行更改。举例：使所有 alpha-helices 显示柱状；简化图像。点击“示柱状；简化图像，选择 Cartoon > Cylindrical Helices。重复该操作即可删除该显示效果。点击“重复该操作即可删，选择 Cartoon > Smooth Loops，即可简化图像。

(5) 黑色背景适于屏幕上观看图像，但并不适于打印出来作为文章打印图，将背景改为白色将更为适用些：在 External GUI 界面中，点击“面中，点击“1G 菜单，该菜单包含大部分 PyMol viewer 图像显示选项。改变背景色为白色的步骤: Display > Background > White

(6) 改变条带显示的颜色：在“变条带显示的 al GUI”中的 1REI 菜单框中的 C 菜单中进行如下操作：1REI> C > chain

(7) 然而此时获得的图像的分辨率和清晰度较粗糙；PyMOL 提供了“供了“L 得的图像的分辨率，可形成高质量的画面，适用于发表。其操作步骤： 点击“击“成高质量的画面，适用于发右上角的“上角的“按钮，或者在 PyMOL> line command 中输入“输入“OL> line com，即可得到最终的高质量的“即可得到最终的高质量的图像了。

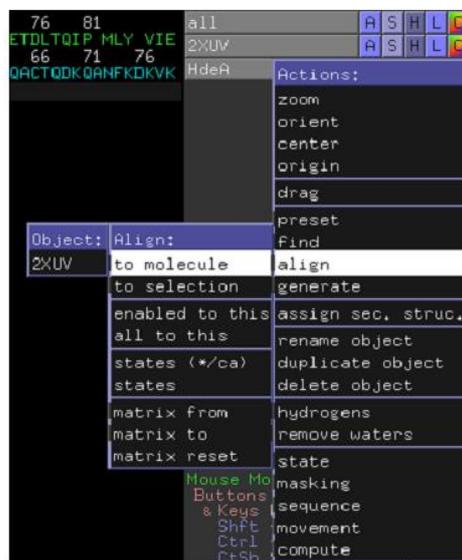
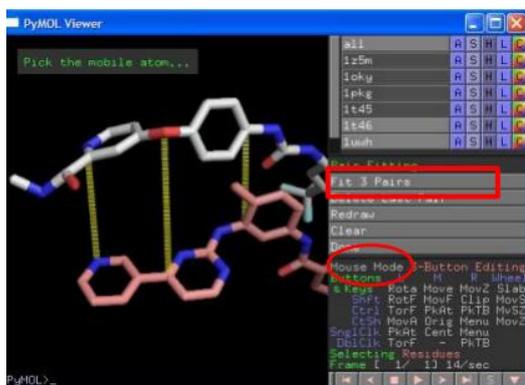


(8) 结构比较:

👉 比对

✓ 基于蛋白序列

- Action -> align
- Pymol> align (2xuv and n. CA ), (hdea and n. CA)

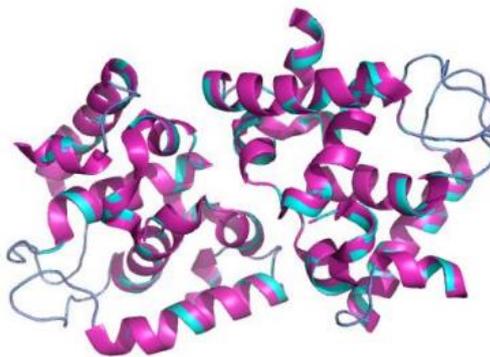
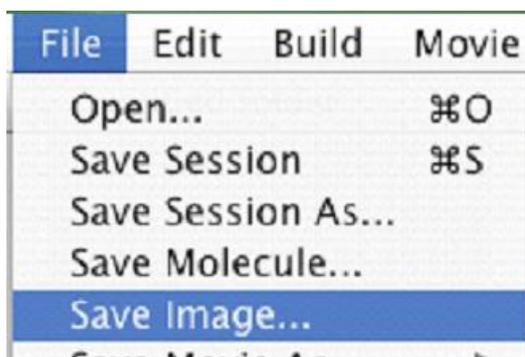


✓ 基于原子对

- Wizard-> Pair Fiting

(9) 图片最终保存，操作步骤 File > Save Image...

(10) 由于操作的状态在关闭软件后不可恢复，如果要保存操作状态，File > Save session as...



(11) Pymol 有很多强大功能，还可以做动画。更多指令和操作，可以参考 pymol wiki [http://pymolwiki.org/index.php/Main\\_Page](http://pymolwiki.org/index.php/Main_Page)

## 三、色谱柱的活化、保养、再生

### 1. 培训目标：

了解日立半制备液相色谱的使用注意事项，熟悉常用的 luna C18 柱、Kinetex C18 柱的活化、保养与再生的方法与技巧。

### 2. 新色谱柱活化

#### 1) 冲洗

- (1) 使用与保存液相同的流动相，低流速（0.2ml/min）冲洗，至基线平。
- (2) 调高流速至 1 ml/min 冲洗至基线平。
- (3) 换用使用的流动相，低流速（0.2ml/min）冲洗，至基线平。
- (4) 调高流速至 1 ml/min 冲洗至基线平。

#### 2) 正常使用

### 3. 色谱柱再生

- 1) 95%水，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积
- 2) 100%的异丙醇，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积。
- 3) 95%的乙腈，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积。

### 4. 色谱柱压力突然暴涨

可能样品未处理好，导致筛板堵了，反冲处理。

### 5. 检测样品时出现“鬼峰”

#### 检查 3 点

#### 1) HPLC 系统

如果总是存在“鬼峰”，建议冲洗 HPLC 系统，冲洗方法如下：

- (1) 95%水，1 ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗 2 小时。
- (2) 100%的异丙醇，1 ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗 2 小时。
- (3) 95%的乙腈，1 ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗 2 小时。

#### 2) 色谱柱

如果总是存在“鬼峰”，建议冲洗色谱柱，冲洗方法如下：

- (1) 95%水，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积。
- (2) 100%的异丙醇，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积。
- (3) 95%的乙腈，0.2ml/min 分钟的流速冲洗，冲洗体积不少于 10 个柱体积。

3) 改变运行样品方法。

改换运行样品的方法，如正在使用梯度方法，换为等度；正使用等度方法，换为梯度。

## 6. 氨基酸的分析方法

- 1) 衍生化。
- 2) 采用 HiLiC 色谱柱分析。
- 3) 如果氨基酸极性较大，且不宜衍生化，可采用 HiLiC 色谱柱进行分析。

## 7. 分析样品前处理方法

1) 液液萃取、离心。

注意：样品样品在萃取时避免吸入乳化层，发酵样品的粗样 14000rpm, 10 min 离心两次。

2) 采用固相萃取的方法。

使用固相小柱萃取，有机相洗脱，旋干溶解进样。

## 四、质粒构建软件 SnapGene 的使用

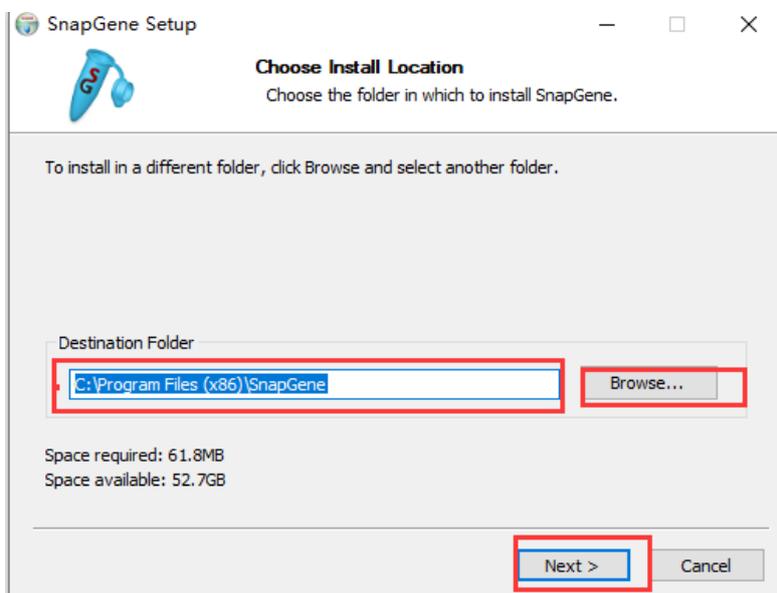
### (SnapGene 4.1.9 安装教程)

金红波编

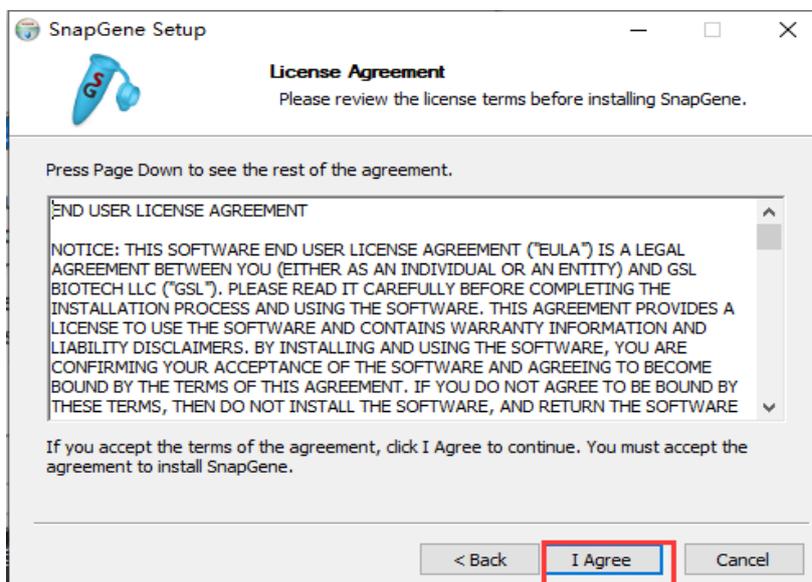
**培训目标：**通过对软件界面的介绍，常用功能的讲解以及质粒构建的实例，如 IkaB 的表达纯化质粒构建，即将 ikaB 基因嵌入到 pET28a 载体中，用于蛋白的诱导表达纯化。

**注意：**关闭安全软件（如360，腾讯电脑管家等）进行安装、软件安装后，请勿随意更新安装，否则会造成软件失效。

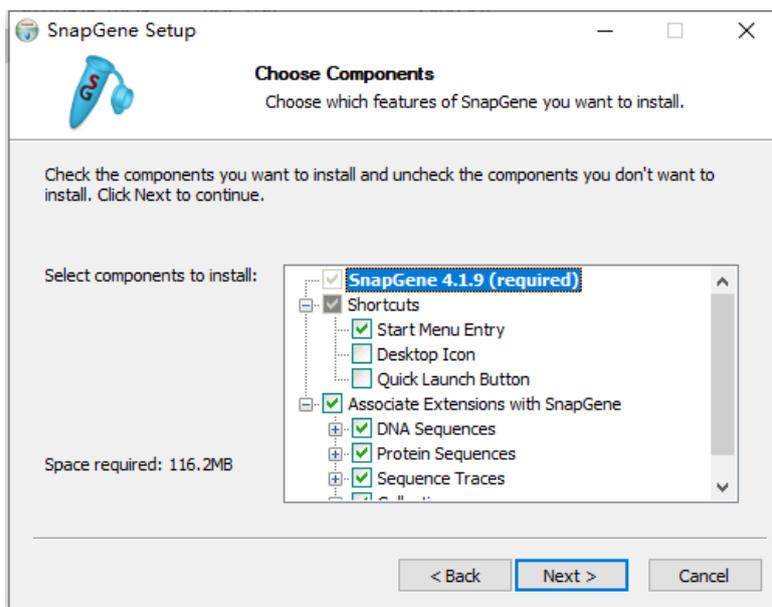
1. 下载并解压，双击snapgene\_4.1.9\_win.exe运行，点击浏览选择安装目录  
C:\SHANDIANXIAZAI\SnapGene，点击next



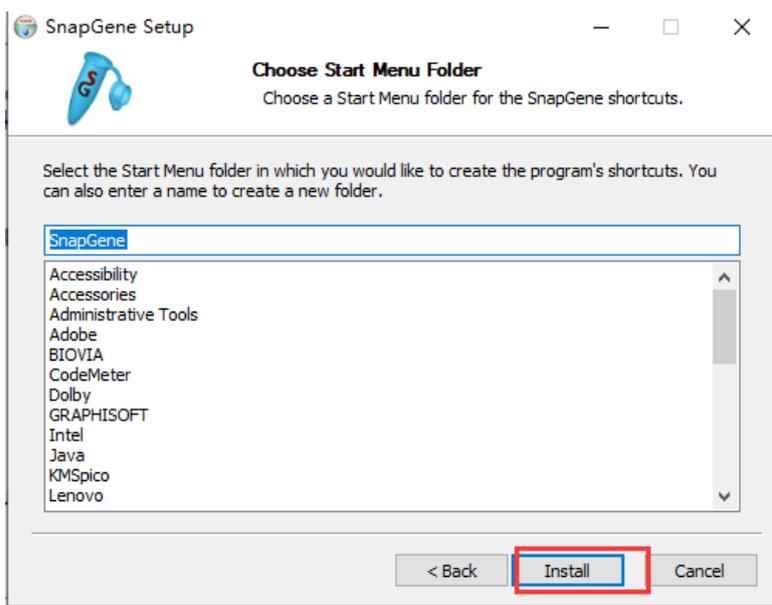
2. 点击 I Agree



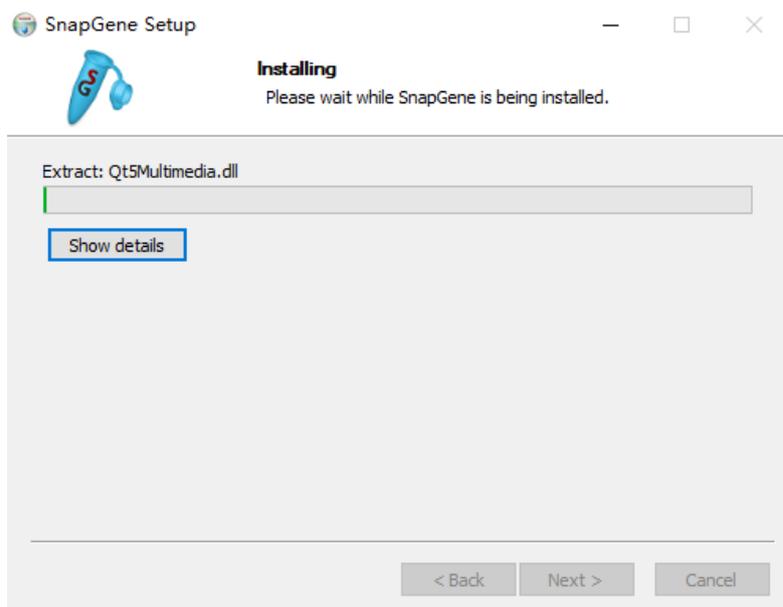
3. 检查您想要安装的组件，并取消选中您不想要的组件，选择完成后点击 next



4. 点击 install 安装



5. 安装中，稍等片刻即可

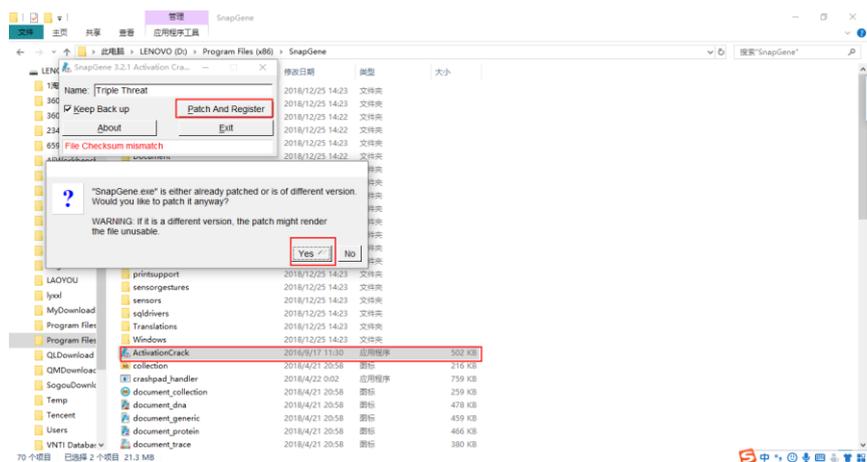


6. 点击 **finish** 退出向导



7. 安装完成后，将安装包中的 **crack** 文件夹下的 **ActivationCrack SnapGene** 复制到软件安装目录中，以管理员身份运行，输入用户名，点击 **patch**

## 第五部分：实验室技术培训



### 8. 以管理员身份运行 SnapGene , 破解完成.

