

化学生物学实验的教学实践及其安全管理

刘 扬*

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要: 作为化学领域的新兴二级学科, 化学生物学利用化学的原理、方法和具有生物活性的化合物来研究生命过程中的问题。本文主要介绍了清华大学为“学堂人才计划”学生培养建立的实验课程平台——“化学生物学实验”课程的教学实践、体会和安全管理。

关键词: 化学生物学实验; 教学实验; 安全管理

中图分类号: G64; O6

Curriculum Implementation and Safety Construction of Chemical Biology Laboratory

LIU Yang*

(Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China)

Abstract: Chemical biology is one cutting-edge interdisciplinary subject, which utilizes chemical tools or compounds to answer biological questions. In this paper, we mainly introduce the laboratory course platform of the chemical biology laboratory course, which is designed for top-notch chemistry-majored students in Tsinghua University, including its curriculum implementation, teaching experience and safety management.

Key Words: Chemical biology laboratory; Teaching experiment; Safety management

实验室是国家高等教育发展必不可少的重要组成部分^[1]。面向培养学生综合素质和创新能力的教学实验室建设, 不仅要有前沿的实验教材, 同时也要让学生在实验开始前就了解所涉及的生物、化学样品的性质、各种仪器的安全使用规则以及它们对环境的影响^[2-4], 从而让学生真正体会到“做中学”的道理。化学生物学实验课^[5]的主要授课对象是高年级化学专业本科生。实验课程强调了对知识体系的拓宽及相关实验技术能力方面的培养。实验安全的重要性在第一堂课上进行重点的强调, 这包括学生已经耳熟能详的实验室要求, 如进入实验室必穿实验服、操作时戴手套、处理较危险样品时戴护目镜、进行刺激性气味实验时在通风橱内操作并戴口罩等。医药箱、洗眼器、灭火器等也都设立在实验室内, 以应对突发情况的发生^[6,7]。本文重点介绍了清华大学化学系化学生物学实验课程的主要内容、实验中所涉及的相关仪器设备、试剂药品等的安全使用, 并分享了笔者在实验教学过程中的心得体会。

1 化学生物学实验

作为一门强调实验技术的学科, 化学生物学实验课程内容涵盖了合成化学、生物化学、分子生物

*通讯作者, Email: yliu442@tsinghua.edu.cn

基金资助: 清华大学实验室创新基金; 清华大学基础学科拔尖学生培养实验计划(学堂班)

学、生物医药等前沿研究在学科各方向的代表性工作, 诸如生物大分子的固相合成及质谱分析, 天然及非天然蛋白质的表达与活性表征, DNA 及蛋白质的点击化学反应, 小分子与蛋白及蛋白质组之间的相互作用等^[9]。每个实验内容都包括背景知识、实验设计、实验操作、分析讨论及总结与思考五部分。举例来说, 在“生物大分子的固相合成与质谱分析”实验中, 学生会首先简要了解生物大分子如核酸、多肽、蛋白质、脂类以及多聚糖的合成方法, 之后再以多肽的固相合成为例, 具体了解合成的原理、表征方式以及作为鉴定方式之一的质谱分析技术。实验内容上, 选取具有生理意义的胸腺五肽(TP-5)为代表进行手工固相合成^[8]。TP-5 是基本序列为 H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH 的氨基酸片段。它具有免疫调节作用, 对恶性肿瘤及自身免疫性疾病等有着较好的疗效。TP-5 合成后的处理及质谱鉴定完成后, 会引导学生对在实验中遇到的问题, 如氨基酸偶联对产率的影响等予以讨论。实验中, 使用哌啶和主要成分为三氟乙酸的切割试剂时, 需要在通风橱内进行操作并佩戴护目镜、口罩, 做好防护。三氟乙酸与 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)放热也可能会导致多肽变质, 因此 DMF 需要在处理过程中完全除去。沉淀多肽所需的冷却乙醚, 要在冰水浴中而非冰箱中冷却, 防止由于冰箱启动时闪烁起火而造成危险。多肽固相合成的其他方法以及固相合成技术在其他生物大分子中的应用也会留给学生做进一步的思考。通过完成这个实验, 学生能够理解多肽固相合成的原理、多肽/蛋白质药物及生物大分子的检测与鉴定技术, 为进一步了解蛋白质的半合成技术打下铺垫。

“蛋白质连接反应与蛋白质半合成技术”实验讲述了表达蛋白连接技术、内含肽(Intein)蛋白的自剪切原理及蛋白质翻译后修饰的重要生理意义。有了前面蛋白质全合成实验的铺垫, 蛋白质半合成的实验教学进展较为顺利。学习过生物化学课程的学生对蛋白质翻译后的修饰并不陌生, 体内各种各样的信号通路研究与修饰蛋白都密切相关。然而翻译后修饰的蛋白由于稳定性等方面的原因并非都可以从蛋白生物表达中直接获取, 而化学全合成则在合成分子量大的蛋白时存在困难, 因此, 蛋白质半合成就利用生物表达的方法得到自然化学连接中分子量较大的构建单元, 然后将化学合成的多肽与重组表达的蛋白质片段进行连接, 从而得到目标蛋白质。学生在实验中运用基于内含肽的蛋白质半合成技术完成泛素蛋白(Ubiquitin)的荧光标记, 并运用泛素水解酶及酶标仪来对产物的活性进行鉴定。实验操作中, 根据实验目的不同会使用到三种不同 pH 的 PBS 缓冲液。学生需要理解每一步当中使用不同 pH 的目的。在荧光标记泛素蛋白的步骤中, 我们发现问题最多的是将 pH 从 3 调节到 6.8 的实验细节。这个步骤需要一直在冰盐浴上操作以防止蛋白质的降解。前期实验结果表明, pH 高于 7 会导致泛素酰肼蛋白水解而最终无法完成蛋白质的半合成。在实验进行中, 我们注意到在调节 pH 步骤上耗费较长时间、且没有注意控制温度的学生未能得到目的蛋白。但是, 积极地探索、思考问题的来源并寻求解决办法, 教会学生面对不理想的实验结果时如何进行分析并总结, 也正是课程教师想要传递给学生的, 因为这也是科学研究能够不断进步的动力。

“非天然氨基酸的定点嵌入与标记”实验包含了非天然氨基酸定点引入的原理及应用, 生物正交反应、点击化学的机理等。非天然氨基酸(UAA)上带有不同荧光、特定反应活性或光操纵性质的基团, 当通过遗传重组技术把它们引入到特定蛋白质(如抗酸伴侣蛋白 HdeA)的特定位点后, 蛋白质就被赋予了新的性质, 从而可以研究它们与其他蛋白或蛋白质组的互作。本实验课程设计是在抗酸伴侣蛋白 HdeA 中定点引入带有炔烃的非天然氨基酸, 然后通过 Click 化学将它与带有叠氮基团的荧光分子 Alexa Fluor 488 相连, 再通过凝胶成像以及考马斯亮蓝染色检测连接反应。蛋白 SDS-PAGE 结果显示, 体系中有较多游离的 Alexa Fluor 488 存在, 而且由于信号较强, 影响目标产物的检测。这时, 我们将会引导学生讨论可能的原因是什么, 是反应效率较低, 还是荧光分子加入过量, 以及与之对应的解决办法。感兴趣的学生还可以在接下来的实验中进行探索, 尝试是否能真正解决问题。如若不能的话, 可能的原因又是什么等等。

同时, 我们在教材现有实验设计的基础上, 根据情况适时地调整相关试剂药品的使用, 优化实验

操作。如在“以DNA模板控制的点击化学”实验中,利用Gel Red替代溴化乙锭的使用。Gel Red是一种高灵敏、低毒性,并且稳定的荧光核酸凝胶染色试剂。其特殊化学结构难以穿透细胞膜进入细胞,从而降低了染料的细胞毒性。同时,经过相关环境安全测试,其废弃物也可按照常规试剂处理。在合成DNA后的纯化步骤中,耗时、低回收率的乙醇-乙酸钠-糖原纯化产物体系以Amicon过滤管代替,取得了良好的实验效果。在“非天然氨基酸的定点嵌入与标记”实验中,以离心式脱盐柱多次离心的方法取代过夜透析蛋白,保留蛋白活性的同时更有效地利用了时间。传统的考马斯亮蓝染色、乙酸乙醇脱色的方法被快速蛋白液染色、去离子水脱色替代,从而尽量减少与刺激性气体的接触。六氟异丙醇(HFIP)溶解多肽的操作也必须在通风橱内进行,以减少对呼吸道以及皮肤的刺激作用。

2 化学生物学实验教学的思考

在实验课上,我们会首先提醒本次实验要注意的安全问题,比如试剂的选择,药品的不同处理方式等,确定学生清楚了之后再开始实验操作。实验要点也会提前给予说明。但是在实验过程中,我们发现不同组学生在实验过程中碰到的问题不尽相同,学生处理问题的方式也不同。有的学生会注意课上所列出的实验要点,实验过程中不清楚的地方主动询问老师,这样的学生一般都能顺利完成实验,达到实验课程的目的。有的学生,他们会对在实验过程中观察到的现象产生好奇心,对同一个实验步骤采用不同的操作,希望能够在实验中寻找答案。此时,只要是在安全性得到保障的情况下,我们会尽可能地给学生留出尝试的空间,在实验中解决他们感兴趣的问题。“小分子抑制蛋白质聚集”实验涵盖了蛋白质构象与某些人类疾病的关系^[9]。实验中,首先将胰岛淀粉样肽(Amylin)固体溶解在六氟异丙醇(HFIP)中,真空干燥完成后,再通过DMSO溶解得到Amylin DMSO溶液。而作为抑制剂的酚红试剂是利用去离子水dH₂O溶解配成储液。酚红在dH₂O中溶解度不高,使用前超声可以帮助溶解,但仍有一部分不能完全溶解。对于一个定性实验来说,这其实并不会影响下游的操作及实验结果。但在实验过程中,有的学生发现酚红在DMSO中溶解度很好,那么如果用DMSO取代dH₂O溶解酚红,是否会对后续研究Amylin的聚集有影响?在安全操作DMSO的情况下,这种探索性的问题可以通过配制不同比例的dH₂O和DMSO的混合溶剂来回答。因此,并不急于干涉学生的想法,鼓励并支持他们在安全条件允许下探索实验课程相关内容也是化学生物学实验课的课程特色。

随着化学及生命科学领域的快速发展,如何将研究热点继续融入到化学生物学实验教学体系当中,将研究成果转化为实验教学内容也给我们提出了新的挑战。一方面我们积极地探讨在已有实验设计的基础上,将相关方向的新发展融入到实验中,让学生不仅仅是完成一个实验,更重要的是通过这个实验,了解相关方向代表性工作的进展。另一方面,要考虑新设计的实验是否适应于本科教学,实验试剂药品的安全性是否满足,实验室现有的仪器设备是否可以支持项目的开展等方面。如开展RNA相关的实验就要求实验室及周边环境洁净度较高,学生实验操作比较娴熟等。化学生物学实验都属于综合类实验,实验内容覆盖面较宽,如何让学生在有限的实验课上达到实验教学的目的,实验的可操作性也非常重要。在设计课程中,我们会注重把相关的内容放到整个框架中去,选择哪些是在实验准备期完成,哪些又是需要学生独立完成,而且特别欢迎感兴趣的学生参与到实验准备过程中。

3 实验相关设备安全操作

在开展实验教学等工作中,需要大量培养细菌、进行蛋白表达和纯化、凝胶成像、DNA合成与表征等方面的工作。实验中所涉及到的仪器设备,诸如属于特种设备的高压蒸汽灭菌器、离心机、细胞破碎仪等的安全使用也是实验室安全建设的重要组成部分。因此,需要严格划分实验区域,对运行温度、实验环境有要求的精密仪器,要做到布局合理,保持相对的洁净环境,及时通风换气,清洁桌面、地面等。

作为湿热灭菌方法之一的高压蒸汽灭菌,是利用饱和压力蒸汽对物品进行迅速而可靠的消毒灭

菌。根据《特种设备安全监察条例》，高压蒸汽灭菌器使用前须首先办理特种设备注册登记，并按照规定要求进行年度检查和定期检验。年度检查每年一次，定期检验则须由检验机构进行，一般为6年一次。在使用高压蒸汽灭菌器时，确保正确灭菌的最高温度和时间通常为121℃，15–20分钟。使用时，要注意往灭菌锅内补充水、排水罐中的水位要保持在水线之下。灭菌器腔内装载要松散，以便蒸汽作用均匀。在高压灭菌液体时，如果使用有盖容器应旋松盖子，防止产生爆裂。灭菌完成后须待温度下降到80℃后再开盖，防止烫伤。

离心机的工作原理是利用高速旋转产生的离心力，把样品中不同沉降系数和浮力密度的物质分离开。立式高速离心机在转子加速过程中是利用自动识别转子和动态惯量检查来确认设备的使用安全。操作者在使用前，应检查所有盖子、转头密封圈等是否有磨损，如冷冻型离心机，气密性的受损有可能导致腔体内产生冷凝水和结冰。同时，还要特别注意离心管的对称平衡，否则会导致转子失衡，很容易产生危险。台式离心机操作时不要忘记盖转头盖。

超声波细胞破碎仪的工作原理是利用超声波在液体中的空化作用，将电能量通过变幅杆在液体中产生高强度剪切力，将细胞击碎。使用过程中，超声波发生器产生出高频高压电能，因此破碎一般在冰浴下进行，从而防止大量产热导致的样品降解。利用超声波细胞破碎仪处理不同体积、不同蛋白表达的样品时，需要选择相应的探头、功率和工作时间。

凝胶成像系统是通过紫外或白光光源对样品进行光激发，由CCD相机和大光圈镜头对样品所发射的光通过特定波长滤光片后进行捕捉，从而进行成像。主要用于蛋白、核酸凝胶成像及分析、免疫印迹分析等。成像仪进行开门操作时，要注意佩戴护目镜，防止被紫外光辐射眼睛并造成对皮肤的伤害。

除此之外，实验过程中做好个人的安全防护也非常重要，因为即使是很常见的混匀后的开盖动作，如果EP管中的液体过多，也有可能靠着管盖的弹性飞溅出来；进行凝胶电泳操作时，一个将凝胶中梳子取出的动作，都有可能将电泳槽中的缓冲液溅到脸上。所以操作不要过于剧烈、佩戴护目镜等都是很重要的保护方式。尤其是对那些戴隐形眼镜的学生，如果腐蚀性的液体溅入眼中，伤害更大。在超净台带着丁腈手套使用酒精喷壶时，喷壶一定要远离酒精灯，防止酒精沾到手套引发燃烧。大容量全温摇床在使用前须开紫外灯灭菌以尽量减少噬菌体的污染。使用液氮冻存细胞、蛋白时，要戴好棉手套防止被液氮冻伤。接触过细菌的枪头、固体含菌培养基需要先通过84消毒液灭活消毒后再丢弃。实验中也会尽量采用一些无毒或微毒试剂替代有毒有害的试剂，以减少污染源^[9]。

实验安全是保障教学、科研顺利进行的重要工作，它不仅需要加大对实验室安全及其他软硬件建设的投入，同时更需要我们大家积极树立实验主体的安全意识，相互监督、相互提醒，共同努力完成。

致谢：感谢清华大学化学系刘冬生、刘磊教授的讨论与建议。

参 考 文 献

- [1] 冯建跃,金海萍,阮 俊,张银珠,俞欢军. 实验技术与管理, **2015**, 32 (2), 1.
- [2] 韩 燕,王淑红,雷 莉. 西北医学教育, **2011**, 19 (1), 118.
- [3] 严新纲. 实验室研究与探索, **2014**, 33 (4), 286.
- [4] 张丽霞. 高校实验室工作研究, **2013**, No. 2, 80.
- [5] 刘 磊,陈 鹏,李宜明,田长麟,赵 劲,石 景,李笑宇,陈永湘,向 宇,刘冬生. 化学生物学实验. 合肥: 中国科技大学出版社, 2015: 1–70.
- [6] 韩方珍,曹 咏,冯蜀茗,肖媚燕,徐东风. 实验室研究与探索, **2012**, 198 (8), 463.
- [7] 关洪斌,王晓兰. 实验技术与管理, **2005**, 22 (10), 152.
- [8] 王昱佳,刘欣宇,陈永湘. 大学化学, **2014**, 29 (2), 54.
- [9] 兰景凤,俞 娥. 大学化学, **2016**, 31 (8), 71.