

# Z

## 基本操作



### 基本操作：

- Z1 自動吸管
- Z2 天平及酸鹼度計
- Z3 離心機
- Z4 光度計及 ELISA 計
- Z5 透析及濃縮
- Z6 電腦及軟體



## Z 基本操作

本實驗課程排有六種最基本的實驗操作 (Z1~Z6)，是所有純化與分析方法的基石；因此在正式進行純化流程之前，先在第○週前兩天的講習課程內，完成這些基本操作訓練。其目的是要養成正確的操作習慣，以便在未來的各週實驗中，能夠有效地執行複雜的實驗。基本操作訓練分成六項，每項依序輪流進行，請注意每一操作單元的目標。

基本操作的訓練目標及地點：

	基本操作	目標	地點
Z1	自動吸管	正確使用自動吸管 自動吸管的校正與維護 對 $\mu\text{L}$ 及 $\text{mL}$ 微量體積的感覺	實驗桌
Z2	天平及酸鹼度計	正確使用天平及 pH 計 天平及 pH 計的校正方法 使用天平及 pH 計的習慣及禮儀	準備室
Z3	離心機	正確使用高速離心機 安全問題 (一定要平衡好) 使用離心機的習慣及禮儀	離心機
Z4	光度計及 ELISA 計	正確使用光度計的方法 正確使用 ELISA reader 各種光度計的校正方法	光度計
Z5	透析及濃縮	透析膜處理法 透析袋使用方法 超微膜離心濃縮法	細胞離心機
Z6	電腦及軟體	重要軟體介紹 (MS Word, SigmaPlot) 網路使用 (Reference Manager) 電腦使用方法及規則	電腦室

基本操作訓練方式建議：

1. 在第○週的基本訓練中，將上述 Z1-Z6 分成兩天訓練；通常第一天 Z1, Z3, Z5，第二天 Z2, Z4, Z6；Z1 與 Z2 必須安排在不同日，因為兩者都要用到天平。
2. 每天的三項操作訓練設立為三站，由三位助教分別擔任各站主持人；同學分成三組，輪流到每一站聽取講解；每站的講解時間為 20 min，時間一到馬上移動到下站。
3. 如此輪完三站的講解後解散，但同學必須到每一站去接受操作檢定，操作正確無誤者過關，由主持助教簽名，完成當天的三項科目後才能離去。
4. 助教請就各項操作的注意要點監督，若同學操作不夠正確，必須排隊重來一次，並在旁觀看其他同學操作，一直到完全正確為止。

# Z1 自動吸管

自動吸管 (autopipet) 是所有實驗最基本的配備，有如步兵的步槍一樣，若一支步槍的射擊校正不夠準確，就打不到目標。請一定要先小心校正你的自動吸管，以免往後整個實驗過程的取量都有問題。

## 儀器用具：

自動吸管 Pipetman P-20, P-200, P-1000, P-5000 各一支  
各種容量的吸管頭 (tip)：黃色 (20, 200  $\mu\text{L}$ )，藍色 (1000  $\mu\text{L}$ )，無色 (5 mL)，  
天平 (9.999) 及秤量船 (要多借用幾台天平，以免同學久候)  
純水及燒杯

## 操作項目：

1. 要試用過每一種大小的自動吸管。
2. 用自動吸管吸取定量的水到天平上秤量，看體積與重量間的關係。
3. 拆開自動吸管，熟悉內部構造；裝回去以後，再次確定取量是否精確。

## 注意事項：

1. 當吸管接上 tip 後，一定要確定有緊密接上，否則取量會不準。
2. 吸取溶液時，一定要小心吸上或放出，速度太快就會吸入空氣。
3. 用 1 mL 以上的自動吸管時，在吸取溶液後 tip 尖端不要馬上離開液面；尤其在吸取密度或黏滯度很高的液體時，尤其要等候更長久的時間 (3~5 s)。
4. 要練習一看到 tip 內液體的高度，即可猜出有若干體積。
5. 吸有液體的自動吸管，不得放下平躺或倒置，溶液會流入吸管中。
6. 拆開自動吸管後，小心其中各個零件，不要遺失或沾上灰塵；內部不可塗抹凡士林。
7. 若自動吸管本體不小心吸入液體，要馬上拆開清理後擦乾。
8. 千萬不可把自動吸管掉到地上！自動吸管不可用火烤！

## 問題檢討：

1. 如何發現你的 tip 並沒有裝得很緊密？
2. 如何確定你的自動吸管是準確的？
3. 儘量節省 tip，當你吸取同一溶液的系列濃度時，需不需要每次都換 tip？
4. 某生匆匆取了一支自動吸管，轉到刻度 50 後，急忙吸取 50  $\mu\text{L}$ ，可能有何差錯？
5. 你如何以自動吸管取用 0.5 mL 50% 甘油？

## Z2 天平及酸鹼度計

天平及酸鹼度計都是實驗室中常用且重要的儀器；像自動吸管一樣，若沒有操作或校正好，所有的實驗將都會有問題。Tris 可以作為良好的緩衝液分子，Sigma 售有 Tris 的 acid 及 base 兩種形態，以不同的重量比例混合，可配製出不同 pH 的溶液；本操作將指定一個 pH，讓同學查表秤取兩種 Tris，配製出來的溶液，可用酸鹼度計測量其 pH 是否正確。另外，測量 Tris 的 pH 需使用特定的酸鹼度計，其酸鹼度探針 (probe) 上的透膜可以耐 Tris。

### 儀器用具：

天平 (9.999) 及秤量船 (最好能借到五台天平，以免同學久候)  
酸鹼度計及標準酸鹼度溶液 (使用耐 Tris 的探針，兩台即可)  
Tris HCl 及 Tris base (Sigma 各種 pH 的 Tris 緩衝液配製表)  
純水及燒杯  
攪拌器及攪拌子

### 操作項目：

1. 校正電動天平。
2. 校正酸鹼度計。
3. 配製 100 mL Tris 緩衝液 (50 mM, pH 由助教指定)。

### 注意事項：

1. 使用前先檢查天平的位置是否水平，可能的話還要校正天平。
2. 小心酸鹼度計的探針很容易被打破，也不能長久暴露於空氣中。
3. Tris 緩衝液的 pH 受溫度影響很大，要注意當日的室溫如何。
4. 使用天平及酸鹼度計最容易弄髒實驗桌，使用後桌面一定要清理乾淨。
5. 許多有害的物質，在秤量時要注意勿吸入肺部。也小心處理使用後的秤量紙，要小心輕輕包好後，才置入垃圾桶中；毒劇藥的用紙不能隨便丟到垃圾桶中。

### 問題檢討：

1. 若你所配製出來 Tris 緩衝液的 pH 不對，可能有哪些地方出了問題？
2. 為何校正酸鹼度計要使用兩種標準 pH 液？而且其中一個必須是 pH 7.0？
3. 為什麼有些緩衝液在室溫或空氣中久置後，酸鹼度會改變？
4. 如何經由觀察即可得知某一台天平或酸鹼度計準不準確？

## Z3 離心機

離心機是實驗室極常見的分離工具，通常依其使用目的可分成數種：低速離心機、高速冷凍離心機、超高速真空離心機等；低速又有細胞離心機，以及常見的微量離心機等。使用離心機首重安全，因為離心力失控可能造成很大的破壞；因此要注意離心管是否有平衡，離心轉速是否超過極限，離心陀是否有腐蝕或過荷。

### 儀器用具：

高速冷凍離心機

離心陀及離心管

微量離心機 (microfuge)

懸臂式粗天平

### 操作項目：

1. 平衡離心管。
2. 離心機操作方法。
3. 離心機及離心陀的保養方法。

### 注意事項：

1. 通常離心機都會有登記表，請在使用前確實登記 (使用者、轉陀、轉速、時間)。
2. 離心管一定要平衡好，放入離心陀時也要注意位置平衡。絕對不要超過離心機或離心陀的最高限轉速。
3. 一定要在達到預設轉速後，才能離開離心機；若有任何異狀，要立刻停機。
4. 通常聽聲音即可得知離心狀況是否正常，也可注意離心機的震動情形。
5. 使用硫酸銨等高鹽溶液樣本後，一定要把離心陀洗乾淨，也要清理離心機轉盤。
6. 超高速離心機則因轉速極高，也更加複雜，需要另外的專門訓練才可使用。

### 問題檢討：

1. 高速以上的離心機為何要冷凍或者抽真空？
2. 你已經很小心地把兩隻樣本離心管平衡好，但開動離心機後，還是發生不平衡狀況，停機後取出再秤一次，發現兩隻離心管還是平衡的；請問為何會發生不平衡？
3. 離心陀一般分成懸籃式 (swing bucket) 及角型 (angular) 兩大類，使用上有何差別？
4. 一般論文中記載的離心條件，有人記錄轉速 (如 8,000 rpm)，有人記錄離心重力 (如 10,000g)；二者有何不同？何者較為適當？

以下用日立 20PR-5 機型為範例，詳細說明離心機的操作步驟。

### 使用步驟：

1. 設定使用溫度 (通常為 4°C) 後，先把離心陀放入離心艙中，注意離心陀要卡好軸心；關上艙門，離心艙的溫度開始下降，預冷時間要充足。
2. 把樣本裝入適當的離心管，雙雙用天平平衡重量，蓋上離心管蓋子並旋緊。
  - ◆ 注意離心管只裝七成滿，雖然加有蓋子，但也可能因離心力太強而外洩。
  - ◆ 大部分離心管都附有蓋子，注意離心管的蓋子也要一起平衡。
  - ◆ 離心管通常都會放在碎冰上，注意取出平衡時，要把碎冰的液體擦拭乾淨。
  - ◆ 落單的離心管要用另一隻裝有清水的離心管平衡。
3. 把平衡好的離心管對稱地放入離心陀中，蓋上離心陀的蓋子，注意有無旋緊。
  - ◆ 若離心陀的蓋子沒旋緊，離心時會掉出來，造成很大的傷害！
4. 關上離心機艙門，在儀表板上調好所要的轉速與時間 (例如 8,000 rpm, 30 min)。
  - ◆ 注意所用轉速絕對不能超過離心陀的限定，最高轉速通常寫在離心陀上面，例如 RPR20 的最高轉速為 20,000 rpm，但若離心機太老舊，必須往下調降。
  - ◆ 轉速與時間設定儘量不要太高，例如能使用 7,000 rpm 者就不要用 8,000 rpm。
5. 確定所有步驟無誤後，按 Start 鈕開動，離心機漸漸加速，此時要密切監控。
  - ◆ 有些老式的時間轉鈕，設定 5 min 以下時，要先轉過 10 min 再轉回 5 min。
  - ◆ 按 Start 的按鈕時，按住時間不能太短，請持續按約一兩秒鐘後才鬆開。
  - ◆ 開始加速的時候最危險，若發現聲音不對，或產生大震動，請立刻按 Stop。
6. 等到離心達到所要的轉速後，確定一切正常才可離去。
7. 完成離心時，要等離心陀完全靜止後，才能打開艙門；請儘快取出離心管，先觀察離心是否完全，以及沈澱的位置，儘速把上清倒出，小心不要把沈澱弄混濁。
  - ◆ 不管所要的是上清或沈澱，請取用乾淨的燒杯收集上清，以免有失誤。
  - ◆ 傾倒上清要很小心，以免把沈澱一起倒出來；若不慎混在一起，就要重來一次。
  - ◆ 若離心管有漏，要找出原因，並且立刻清理離心陀或離心艙。
8. 在兩次離心之間的空檔，不需取出離心陀，但蓋上艙門，勿讓熱空氣流入離心艙。
9. 全部使用完畢後，取出離心陀清理，可以用自來水沖洗，並且倒放晾乾之。離心艙門要打開，等結冰融化後，再稍加擦拭及清理，若有液體漏出，要用清水洗之。也要回頭檢查平衡離心管的天平以及桌面，很容易弄髒，要仔細清理乾淨才離開。

# Z4 光度計及 ELISA 計

光度計是實驗室最基本的測量儀器，通常以光源區分為可視光及紫外線兩種，機型有簡單的，也有很複雜的形式；另可分為使用測光管的傳統機型，以及近年來流行使用微量滴定盤的 ELISA 光度計，後者一般只能讀可視光，只有少數貴重機型可以讀紫外光。

## 儀器用具：

- 普通光度計及測光管 (cuvette)
- ELISA 光度計 (Dynatech 或其他廠牌)
- 微量滴定盤 (microtiter plate)

## 操作項目：

1. 普通光度計的使用及校正方法。
2. 測光管的維護及保養。
3. 微量滴定盤的使用。
4. ELISA 光度計的使用方法。

## 注意事項：

1. 通常光度計都有登記表，請在使用前確實登記 (使用者、波長、樣本、時間)。
2. 光度計最忌忽開忽關，供應電源不穩，或者不使用而長時間開著燈泡；回家前應當檢查光度計是否已經關掉，並且把光度計清潔乾淨。
3. 使用紫外光時，測光管一定要用石英材質者，其他材質者無法透光；同時，測有色物質的溶液時，要避免使用石英測光管。
4. 新型光度計都有複雜的電腦系統，不會使用者經常會搞得當機，請先請問他人。
5. 微量滴定盤的底部請保持乾淨，且滴定槽內不能有氣泡，以免干擾測光。
6. 每次測吸光前，要注意使用的波長對不對，空白組是否有做好。

## 問題檢討：

1. 請描述光度計的測光原理，樣本的吸光度大小與樣本的哪些性質有關？
2. 蛋白質、核酸在多少波長會有吸光？為何它們會吸光？
3. 有些反應的生成物會有顏色，就可以利用微量滴定盤進行測定；但若此反應過程要加熱，而微量滴定盤無法耐熱，則如何使用 ELISA 光度計來測光？
4. 光度計可靠的吸光值範圍多少？若超過最高可靠值，應當如何處理？



## Z5 透析及濃縮

透析與濃縮也是極為基本而且重要的實驗步驟。兩者都是利用薄膜的通透性，來區別分子大小，而達到透析或濃縮的目的。本實驗課程則使用最傳統的透析袋進行透析，另以離心式的薄膜濃縮器進行濃縮，主要是因為其方便性，且可供多數樣本同時進行。

### 儀器用具：

透析膜 (前處理方法如下)：

1. 戴手套把透析膜剪成適當長度，浸在蒸餾水中 15 min 泡軟。
2. 浸入 10 mM sodium bicarbonate 中，並加熱至 80°C，一邊攪拌至少 30 min。
3. 換到 10 mM Na<sub>2</sub>·EDTA 中浸泡 30 min，以新鮮的 EDTA 同樣方法處理三次。
4. 再用 80°C 蒸餾水洗 30 min，然後換到 20% 酒精中，放在 4°C 冰箱中保存。

透析夾、攪拌子、攪拌器及 5 L 塑膠燒杯 (裝蒸餾水 4 L)

細胞離心機 (懸藍式 3,000 rpm)

離心濃縮管 (Centriplus, Amicon)

樣本：Blue Dextran + FMN (濃度不拘，看得到顏色即可，每人約 10 mL)

### 操作項目：

1. 綁一個透析袋，裝約 5 mL 樣本，使其浮於大燒杯內的水面上，透析過夜。
2. 觀察 Centriplus 的構造與其濃縮的原理，注意所要收集的部位為何。
3. 試以離心濃縮管處理 5 mL 樣本；注意控制好離心速度，一般離心機都不超過 3,000 rpm，而離心時間不用太久，看到顏色變化即可。

### 注意事項：

1. 取出透析袋要先用蒸餾水清洗乾淨，綁透析袋前要先試裝蒸餾水，看透析袋有沒有蛀孔，會不會有水噴出。綁透析袋不要太用力拉扯，否則透析袋可能會裂開。
2. 一般透析至少要 3 h，至少要換兩次透析液 (100~1000 倍樣本體積) 才能完全。
3. 注意離心濃縮管的離心轉速不能太快，否則薄膜很容易破裂。
4. 每次離心濃縮後，暫時不要丟掉外濾液 (filtrate)，收集起來以防薄膜破裂流失。

### 問題檢討：

1. 記下透析與薄膜濃縮的結果比較，樣本的顏色有無變化？
2. 透析後常常發現透析袋內產生大量沈澱，是何原因？
3. 如何察覺或檢定你的離心濃縮管有無破裂？

## Z6 電腦及軟體

電腦是極為強大的工具，如運用得當，可使你的研究或做事能力倍增；下面列出一些常用的軟體及其應用時機，請自行學習使用。資訊網路則是另一個世界，在資訊的獲取上非常重要，千萬不可忽視。

### 儀器用具：

個人電腦及印表機

網路連線

電腦套裝軟體 (如下表)

Package	Company	實驗上用途	未來用途
★ Word	Microsoft	撰寫實驗報告	撰寫論文主體
★ SigmaPlot	SPSS	製作結果圖表	撰寫論文：製作圖表
★ Reference Manager	RIS	整理資料庫	撰寫論文：參考文獻
★ PowerPoint	Microsoft	實驗成果報告	報告論文製作幻燈片
★ 序列分析軟體*	(網路)	蛋白質序列分析	巨分子序列分析
● CorelDRAW	Corel	製作流程圖及繪圖	撰寫論文：製作流程圖
● Visio	Microsoft	製作實驗流程圖	撰寫論文：製作流程圖
● Access	Microsoft	整理所有實驗用具	個人資料庫建立
Excel	Microsoft	數據整理與作圖	科學作圖儘量用 SigmaPlot
Project	Microsoft	規劃實驗課程進度	專案管理
Organizer	Lotus	排定每日實驗進度	個人日常生活行程管理

★一定要純熟使用 ●推薦使用

\* 網路上的基因或蛋白質資料庫，以及序列分析軟體很多，例如GCG (Genetics Computer Group) 巨分子序列分析，可由國家衛生研究院網站 (<http://bioinfo.nhri.org.tw/>) 進入，正式使用GCG需申請使用者帳戶。

### 操作項目：

1. 啟動電腦，嘗試進入以上各套裝軟體，並進行簡單操作及應用。
2. 進入本校計算機中心網路及圖書館資料庫，試著找尋一些資料庫 (如 PubMed)。
3. 練習好幾個指定的基本操作，然後在上課期間自行熟悉使用各種進階操作。

### 注意事項：

1. 禁止在公用電腦灌入任何軟體，也不要更動電腦上的任何設定，務必確實遵守。
2. 禁止從網路下載任何軟體及執行檔，若發現有中毒現象，請立即通報管理員。
3. 使用頻率高的軟體，各實驗室應當自行採購原版軟體，大部分軟體都有教育版。