

海洋学院实习总结报告（教师版）



指导教师： 章春芳、林璐

年级： 2015 级本科生

专业： 海洋生物

课程名称： 生产实习

时 间： 2017 年 7 月

目录

1. 实习的组织与安排.....	3
1.1 实习组织概况.....	3
1.2 实习总体安排.....	3
2. 实习管理.....	4
2.1 实习单位和联系人.....	4
3. 实习过程管理.....	4
3.1 各实习单位实习内容与过程管理.....	4
3.2 成绩构成和评定方式.....	6
4. 实习取得的成果.....	6
4.1 总体情况.....	6
4.2 心得体会.....	7
4.3 指导教师评价.....	7
4.4 优秀实习周记.....	8
4.5 优秀实习总结.....	8
5. 问题和建议.....	8
5.1 存在的问题.....	8
5.2 建议.....	8
6. 附件.....	9
附件 01: 实习计划与安排.....	9
附件 02: 实习要求.....	9
附件 03: 优秀实习周记.....	10
附件 04: 优秀实习总结.....	11

1.实习的组织与安排

1.1 实习组织概况

今年的2015级海洋生物本科生生产实习安排在浙江大学海洋学院。学生们根据研究兴趣进入海洋生物所的各位指导教师实验室，依托研究所现有仪器设备和试剂材料，进入指导教师课题组进行科研实习过程。学生在暑期实习前，集中进行实验室的安全规范培训，了解各项基本实验操作规范及其原理，熟悉所涉及到的实验仪器的操作步骤，并要求在实验过程中统一穿白大褂，一次性手套等。

在实习过程中，需结合理论知识、了解一些实验设计思路，掌握所实习的实验技能。还应进行一些必要的文献阅读，提高科研素养。实习期间学生应定期主动向指导教师汇报实习情况。实习期间学生应严格遵守实习实验室的规章制度和工作纪律，不迟到早退。

1.2 实习总体安排

实习安排在2017年7月份。为期3周。

第1天，海洋生物研究所各位老师进行研究课题的介绍，让学生了解海洋生物专业不同研究方向的特点，并根据导师提供的实习课题进行选题。

第2天，介绍实验安排及要求，并进行实验室安全规范常识讲座。让学生了解基本实验室安全操作规范，化学试剂使用与安全规范、仪器操作规范、气体钢瓶安全使用、实验室防护知识等。

学生进入指导教师的实验室，进行实验操作培训。了解基本实验室安全操作规范，化学试剂使用与安全规范、仪器操作规范、气体钢瓶安全使用、实验室防护知识等。此外、熟悉实习实验室的人员、仪器，督促写好实验计划。

第3-21天，学生正式进入实验室实习。指导教师对每个学生的课题计划进行修改完善，让学生与对应课题高年级研究生对接，保证学生顺利进入实习。同时、每天进行试验进展汇报。并与学生讨论修正实验实习内容。

第22天，进行实验结果整理与总结，写好实习汇报。

2. 实习管理

2.1 实习单位和联系人

实习单位：浙江大学海洋学院 海洋生物所

联系人：章春芳 海洋生物所

林璐 海洋生物所

3. 实习过程管理

3.1 各实习单位实习内容与过程管理

实习内容（22个研究方向，选列了6个）

1、海洋微生物来源的化合物抗肿瘤机制研究

本项目从舟山近海采集海洋沉积物等样品中分离培养的放线菌次级代谢产物进行抗肿瘤活性筛选，希望发现具有抗肿瘤活性的新型化合物。我们进一步对化合物进行抗肿瘤作用机制研究，主要包括化合物对肿瘤细胞的细胞周期，细胞凋亡的影响，探索其可能影响的细胞信号转导通路，有助于发现它们抗肿瘤的新机制和新靶点，也为开发舟山海洋微生物及其天然产物资源提供基础。

2、海洋沉积物腐殖质的提取与特征表征

海洋沉积物中的腐殖质包含三类：胡敏素、胡敏酸、富里酸。其中我们主要研究的是胡敏素和胡敏酸。本次实习主要就是将胡敏素和胡敏酸从不同采集点采集的沉积物样品中提取出来，分别分析它们的 CV、元素组成、结构与官能团以及氧化还原性质。

3、联苯和原油降解菌筛选

从克拉玛依的三种污泥（湿地污泥、含油污泥、废液池污泥）的混泥中筛选能够降解联苯或者原油的菌种。

4、海洋荧光细菌的筛选与培养

从海洋生物体表或体内分离出细菌，通过平板划线法和稀释涂布法对生长出

的多种细菌进一步进行分离，直至分离出单菌落，对其生理生化指标进行检测。提取单种细菌的DNA并用荧光基因 lux A 的引物对细菌DNA进行扩增、凝胶电泳，根据电泳的结果判断扩增出的条带大小，与资料和文献比对，初步确定该种细菌是否含有 lux A 基因。若比对结果一致，则将电泳的条带送至专业的公司进行测序，确定该基因是否是 lux A 基因。若测序结果与 lux A 基因序列一致，则该细菌为我们筛选出的海洋荧光细菌。

5、海洋微生物疑似新种的筛选与鉴定

对在舟山枸杞岛采样的两个海水样本进行海洋微生物疑似新种的筛选与鉴定。分别取两个海水样品在寡营养 2216 固体培养基上进行 10 倍、100 倍和 1000 倍的稀释涂布，在 28℃下培养 9 日，共筛选出 29 个不同的菌落。取各菌落在富营养 2216 固体培养基上进行划线纯化，28℃下培养若干天后挑取单菌落接种至富营养 2216 液体培养基，在 28℃下振荡培养。当菌落生长到足够数量后取部分与甘油混合在零下 80℃保藏，另取部分用细菌 DNA 快速提取试剂盒提取 DNA 后进行 PCR 扩增 16SrDNA 片段，利用琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物。将成功扩增的 16SrDNA 样本寄往公司测序，测序结果与 Ezbiocloud 的菌种基因数据库进行比对判定是否是新种。

6. 枸杞岛贻贝微塑料实验——微塑料认识、分类及操作思考

以枸杞岛贻贝为原料进行实践操作。一方面希望能在实验过程中对微塑料及其提取操作形成一个初步的认识，为之后的实验打下基础。另一方面则希望能在操作过程中完善相关步骤并提出改进思路，为后来者提供参考意见。

过程管理

- 1、在实习过程中每天打卡实习，确保学生的实习时间。
- 2、每天进行实习日志整理，保证学生的实习进度。
- 3、每次做完实验，做好实验台面整理，并对实验产生的废液、废渣进行处理，不把有毒有害物品带出实验室。
- 4、实行“师徒制”，给每个学生安排对应课题的研究生，使学生尽快进入实习内容，同时使学生的实习能得到实时快速的指导。另外，老师每天与学生交

流沟通，及时解决实习中出现的问题。这样通过老师和学长的两重管理，保证学生的实习质量。

3.2 成绩构成和评定方式

项目及分值	内容要求	评定方式
实习态度 (20)	自觉遵守实习实验室的各项规章制度，不迟到、早退；服从实习指导教师和领导安排，积极主动，责任心强，谦虚谨慎，能处理好团队关系。	实验室组员评分
实习报告和实习日志 (50)	实习报告与实习日志是实习的重要成果之一。是实习生的实习体会、心得与感悟。因此，实习报告内容应当具体，规范，严谨，理论与实践应结合密切。实习报告撰写应符合学院要求规范。	根据上交实习报告和实习日志，教师评定结合组员互评。
实验技能和科研思维 (30)	对于实验室实习，因其一定的特殊性。实验基本技能的熟练掌握，以及科研思维的培养显得尤为重要。要求学生拥有基本的科研思维，学会科研中思考问题，解决问题。	教师评分

4. 实习取得的成果

4.1 总体情况

学生都能遵守实验室的规范和制度，不迟到不早退，按时完成实习内容，熟练掌握要求的各项实验技能。

更可贵的是，这次实习培养了学生团队合作精神。此次实习学生通过阅读文献资料，提出问题解决问题，积极讨论，将理论联系实践，培养了学生基本的科研素养和能力。

另外，此次实习过程中，不断出现实验中的问题，解决问题。学生的表现获

得了认可，增强了自信，产生了内在的动力，感受到科研实习的魅力，增加了学生学习科研的兴趣。

4.2 心得体会

转眼间3周的实习不知不觉就结束了，回首实习过程，亦有颇多感悟。

第一，提前安排和准备尤其重要。实习时间非常紧凑，如何让学生尽快有序的进入实习过程非常重要。这就需要老师做好提前的准备，把每项工作安排到天，方便学生尽快进入实习状态。

第二，严格要求，俗话说严师出高徒，对学生的严格要求能让学生更有效的完成实习内容。每天要求学生汇报讨论，积极思考，虽然刚开始学生们有点不适应，但到后来学生们真正学习到了知识和技能，便都感觉付出的都是值得的。

第三，开放的讨论环境。在刚进入实习期间有些学生会存在不好意思询问讨论的情况。在实习期间安排制定研究生对接每一个学生，让学生更好更快的融入环境，并能积极的和学长老师们进行讨论。

4.3 指导教师评价

此次实习过程中几位同学的表现都很好。

赵承稷同学谦虚谨慎，勤奋好学。注重理论和实践相结合，将大学所学的课堂知识能有效地运用于实际实验中，对于别人提出的工作建议，可以虚心听取。表现出较强的求知欲，并能够仔细观察、切身体验、独立思考、综合分析，灵活运用自己的知识解决工作中遇到的实际困难。

黄尹佳同学在实习前就主动了解实习内容，提前采样分菌，到分离鉴定的内容，积极性非常高。做事踏实，严谨。知其然还要知其所以然，探知精神可嘉。

唐志杰学待人诚恳，作风朴实。实习期间，能与实验室成员相处，交流融洽，善于取长补短，虚心好学，注重团队合作。

郑智兴同学在实习期间遇到问题，能主动查找文献解决问题。积极参与组内的讨论。有很好的科研素养。

刘希丹同学综合素质较好，能在实习过程中积极交流，取长补短。在实习实验遇到问题或者瓶颈时，能冷静分析，提取解决方案，逐个排除实物原因。非常仔细负责。

4.4 优秀实习周记

本次实习选列了一篇来黄尹佳同学的实习日记。见附件03。

4.5 优秀实习总结

本次实习共选出2篇优秀实习总结，一篇来自赵承稷同学，一篇来自唐志杰同学。具体见附件04。

5.问题和建议

5.1 存在的问题

此次海洋生物专业的实习是进入各个老师的实验室完成一个小科研项目，而由于对各位导师及其研究方向的不了解，同学们在选择实习项目时会对实际要做什么存在较大的困惑，因而可能会出现盲目、片面选择实习项目，跟风选择导师的情况。希望在日后实习的开展中，每位老师可以给实习学生提供更丰富的了解导师情况的途径和更详实的关于实习项目的介绍。

5.2 建议

科研实习是本科生第一次进入导师的实验室，这将对大家今后的实验习惯产生很大的影响，因而我建议应在正式实验前首先开展对学生的实验室安全教育，加强学生的安全意识和自我保护意识。

6.附件

附件 01：实习计划与安排

授课内容	教学目标	授课模式
海生方向各位老师进行研究课题的介绍	了解海洋生物专业不同研究方向的特点	讲授、实习
实验室安全规范常识	了解基本实验室安全操作规范,化学试剂使用与安全规范、仪器操作规范、气体钢瓶安全使用、实验室防护知识等	讲授、实习
进入指导教师实验室进行培训	了解基本实验操作技术,实验室安全规范;对整个实验课题的选题、方案确定、实验展开、实验技巧、数据分析、结果讨论等实验流程	实验室实习
讨论、总结	完成实习报告	学生自行撰写报告

附件 02：实习要求

实习方式与要求

由专业老师进行各研究方向的认识入门讲解;

进入实习部门的专业实验室进行实验室安全规范培训、仪器操作培训、实验技能培训;

通过撰写专题研究报告、实习总结等形式强化学生的实习效果。

课程要求:

1、通过实习了解海洋生物专业不同研究方向的特点;了解某些实验操作技

术、试剂配制、生物学技术、化学分析方法等。丰富和扩大学生的专业知识领域。

2、通过进入实验室进行专业实验操作培训，了解基本实验操作技术，实验室安全规范；对整个实验课题的选题、方案确定、实验展开、实验技巧、数据分析、结果讨论等实验流程有所了解。

3、参加实际科研实验操作，灵活运用已学的理论知识解决实际问题，培养学生独立分析问题和解决问题的能力。

考试评分与建议

最终考核成绩根据科研实习期间的实验室安全规范常识考试成绩、日常实验操作规范程度、实验日记、科研实习总结四部分综合评定。

附件 03：优秀实习周记

姓名	黄伊佳	学号	3150100208	班级	海科 1502
时间	2017.7.10	周次	二	星期	一
地点	舟山校区海科楼 242				
实习内容： 1、将实验室从舟山枸杞岛取的两个海水样品，分别稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 倍，涂布在前晚制作的 2216 寡营养培养基上，每个梯度做 3 个平行实验，放在 30 摄氏度恒温箱培养。 2、细菌基因组 DNA 的提取（具体步骤较多，不一一列出）。					
收获与感想：（250-300 字） 今天是我开启项目的第四天，一早上我就来到实验室进行稀释涂布，微生物实验一如既往地要注意杂菌的污染，这也是我第一次亲历了全部流程。昨天我们对今天实验要用的器材（如玻璃涂布器、枪头、离心管等）进行 121 摄氏度高压灭菌，今早将实验要用的器材放入超净工作室进行紫外消毒 30 分钟，通风 15 分钟（为了实验者的安全考虑）……涂布一个平板之后，要在酒精灯上利用火焰杀死涂布器上的微生物……第一次做完了一系列准备工作和实验，我深深体会到了微生物实验的严谨和科学，“一着不慎，满盘皆输”绝不是一句空话。下午我还帮忙实验室的学姐做细菌基因组 DNA 的提取，按照给定的步骤我顺利完成了提取，等待明天进一步得到 16SrDNA，对此我充满期待与好奇。					

建议与意见：（200 字左右）

- 1、对实验室常用的仪器的功能和用法要多去了解，多去学习，并且珍惜使用的机会，自己试一试，如此用时才可顺手拈来，避免使用上的错误。
- 2、自己能解决的事就该自己解决，凡事不论大小都请教学长学姐，一是耽搁他人时间，二是使自己生了惰性，懒于思考，无法锻炼自己解决问题的能力。
- 3、经过几日的实验室生活，我发现实验室的安全问题还是较为令人堪忧的。如今日，紫外灭菌后，实验室的学姐说他们以前灭完菌之后便会立刻进去做实验，而我上网查阅了资料，得知氧气在紫外的作用下生成臭氧，臭氧对于灭菌是高效的，而对于人体有不容小觑的危害。我认为进实验室的第一天应开展安全教育。

附件 04：优秀实习总结

第一篇

细胞色素 P450 介导的底物生物转化体系的构建及催化机制研究

浙江大学海洋学院，赵承稷

摘要：

细胞色素 P450 单加氧酶（P450s）是底物宽泛的生物催化剂，能在温和条件下催化非活性碳氢化合物发生区域和立体氧化，这对其他化学催化剂来说是一个具有挑战性的任务。在过去的十年通过蛋白质工程 P450s 酶的活性、稳定性、特异性都有显著的提升。另外，大量新解析的 P450 族酶蛋白作为新型氧化生物催化剂的可能性吸引来了大量的关注。最近 P450 工程技术应用上的成果包括全细胞中工程重组酶生物催化作用。此外，我们专注于借助新型生物技术来确定 P450s 酶有关性质。

P450 CYP105D7 能以氧气为氧供体，以 NAD(P)H 为电子供体，分别在三对还原伴侣蛋白（Pdx/Pdr, seFdx/seFdr 和 RhFRED）支撑下，体外催化底物羟基化，反应体系具有最优转化条件。

采用重组构建融合蛋白 CYP105D7-RhFRED, 缩短 P450 酶与还原伴侣距离，形成单蛋白还原体系，提高电子传递速率，进而提高生物催化反应速率。

关键词：蛋白工程，CYP105D7，羟基化反应，还原伴侣，融合蛋白

Research on the substrate biotransformation system mediated by a cytochrome P450 enzyme and the P450 catalytic mechanism

Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China;

Chengji Zhao

Abstract:

Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) are versatile biocatalysts that catalyze the regio- and stereospecific oxidation of non-activated hydrocarbons under mild conditions, which is a challenging task for chemical catalysts. Over the past decade impressive advances have been achieved via protein engineering with regard to activity, stability and specificity of P450s. In addition, a large pool of newly annotated P450s has attracted much attention as a source for novel biocatalysts for oxidation. Recently results on P450 engineering for technical applications including aspects of whole-cell biocatalysis with engineered recombinant enzymes. Furthermore, we focus on recently identified P450s with novel biotechnologically relevant properties.

P450 CYP105D7 can use O₂ and NAD(P)H as the oxygen and electron donor, respectively. By establishing the optimal transformation condition and catalyzing substrate hydroxylation in the presence of three redox partners (Pdx/Pdr, seFdx/seFdR and RhFRED), the catalytic mechanism has the optimal transformation conditions.

The fusion protein CYP105D7-RhFRED was successfully constructed to shorten the distance between P450 and redox partner, and to improve the electron transfer and catalytic rate.

Key words: protein engineering, CYP105D7, hydroxylation, redox partners, fusion protein

1. 实习内容概述

一、文献研读

1、研究背景及意义

细胞色素 P450 (以下简称 CYP 或 P450) 是一类亚铁血红素-硫醇盐卟啉蛋白的超家族, 广泛存在于动植物、古生菌、细菌和真核生物等生物体内。自 1940 年 P450 在小鼠肝脏中被发

现到现在，对 P450 的研究长达 50 多年。P450 具有特定的索瑞吸收，引起还原状态与一氧化碳 (CO) 结合后在 450nm 处有最强特征吸收峰而得名，其中 P 代表天然色素 (pigment)。P450 可催化一系列天然产物 (如：大环内酯类、多烯类、糖肽类、生物碱类、脂肪酸类、芳香酮化合物等) 发生区域或立体的羟基化、环氧化、脱烷基、脱卤素灯氧化催化反应。正是由于 P450 底物结构识别和催化反应类型的多样性，大量的 P450 生物催化剂被逐渐应用于制药领域。

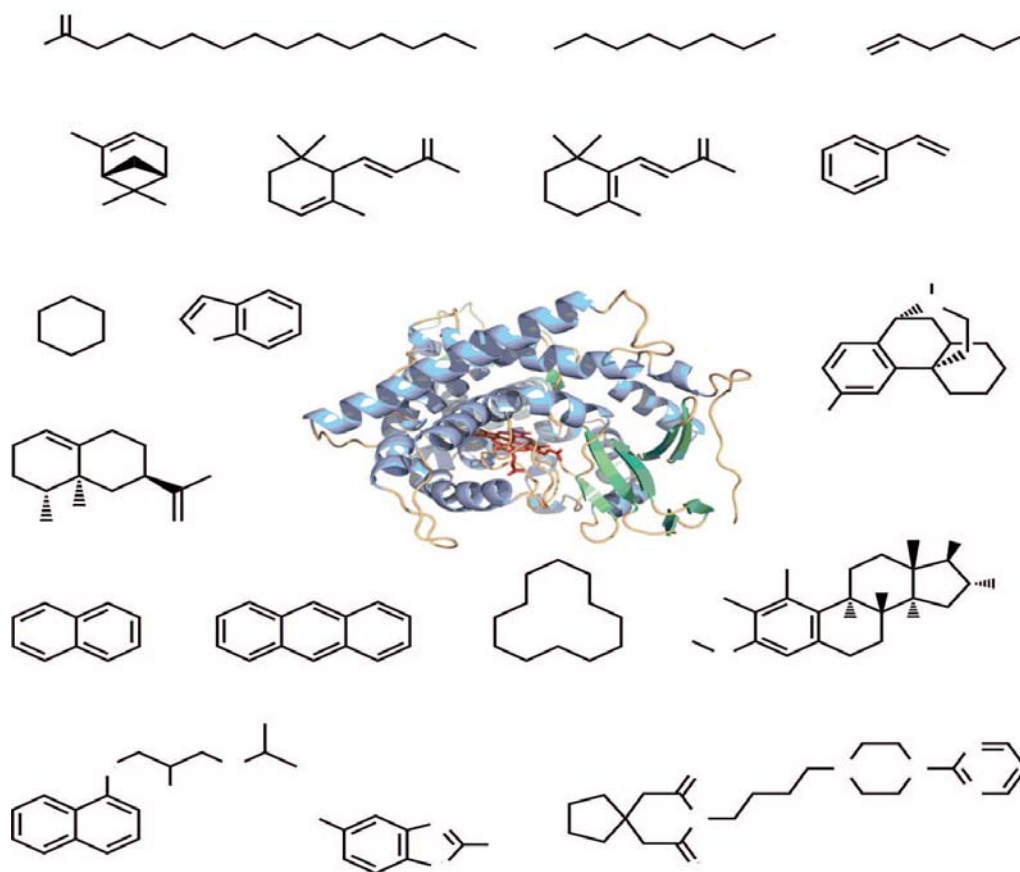


Figure 1. 工程化细胞色素 P450 BM3 变种的底物

2、作用机理

P450 酶在温和条件下催化非活性碳氢化合物区域或立体的氧化，实现化学转化是合成化学中的一个重大挑战。尽管有一些非典型的 P450 酶，例如鞘氨醇单胞菌，枯草芽孢杆菌和丙酮丁醇梭菌中的 CYP152 过氧合酶，利用过氧化物中的一个氧原子进行氧化反应，大多数 P450 酶催化氧分子还原性断裂，从而将一个氧原子引入底物，而第二个氧原子被还原成水，几乎所有 P450 酶是外部单加氧酶，利用吡啶辅因子 NADPH 或 NADH 派生的一个电子。P450 酶催化活性的表达依赖于还原伴侣将电子从 NAD(P)H 运到 P450 血红素中心。

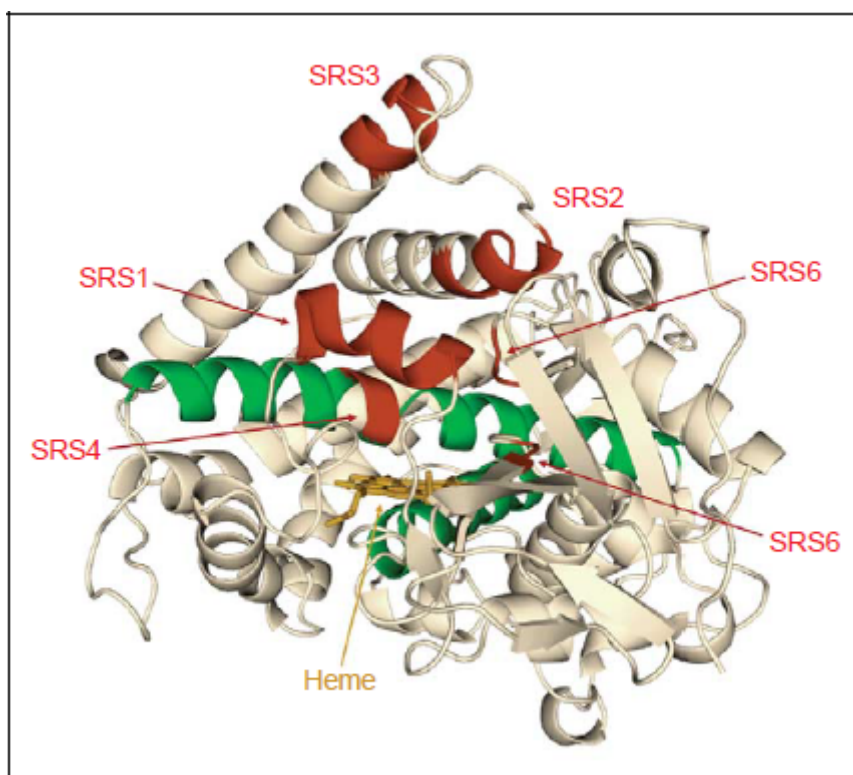
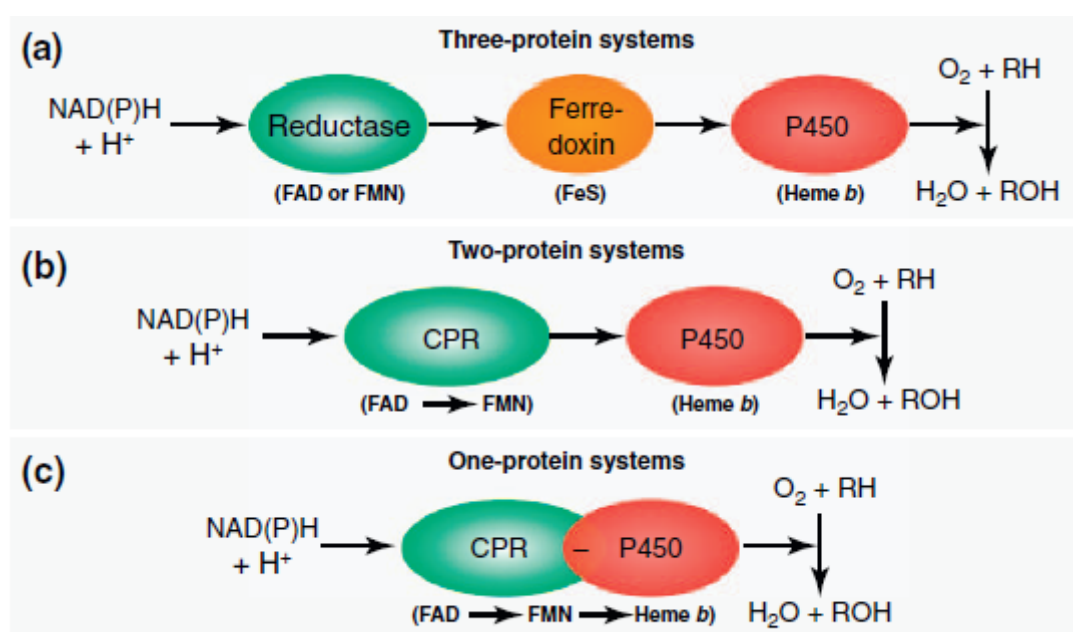


Figure 2. P450 单加氧酶保守三级结构模型

根据参与电子转运的还原伴侣种类划分 P450 酶。很长一段时间只有两族 P450 酶得到描述，I 族 P450 酶包括一个小铁硫铁氧还蛋白和一个包含有还原酶的黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）。II 族电子通过一个 FAD-和包含细胞色素 P450 还原酶（CPR）黄素单核苷酸（FMN）传递。然而，随着 P450 酶特征的增多，另一种既不属于 I 型也不属于 II 型的新型电子传递链被确定。



TRENDS in Biotechnology

Figure 3. 典型P450酶催化反应的通常步骤(a)三蛋白系统: P450酶和还原剂是可溶的或膜结合的(b)两蛋白系统: CPR和P450酶是膜结合的(c)单蛋白系统: 可溶的或膜结合的可类CPR还原酶和P450酶融合物

3、详细催化机制

底物RH进到P450酶的活性位点中心，还原伴侣蛋白提供给血红素的 Fe^{3+} 一个电子，使其被还原为 Fe^{2+} ，呈现亚铁血红素状态，随之与 O_2 结合形成 $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$ 复合物；接着，还原伴侣蛋白提供给该复合物第二个电子，再得到一个质子形成 $\text{Fe}^{3+}-\text{OOH}$ 复合物，将其称之为Compound 0；该复合物再被给予一个质子，则O-O键断裂生成一分子水，得到高价铁与O的 $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ 复合物，并将其称之为Compound I， Fe^{4+} 与卟啉环形成肩并肩相互重叠的 π 键体系；因此，真正意义上的催化剂 $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ 复合物将底物RH上的H原子脱去，重排后生成羟基化产物 $\text{R}-\text{OH}$ ；最后，羟基化产物从P450酶的活性位点中心脱离，新的底物取而代之，再次启动新一轮的催化循环。此外，有研究表明，双氧水（ H_2O_2 ）等过氧化物可以替代 O_2 以缩短催化步骤。以该催化机制为根据，可为进一步研究不同类型底物与P450酶之间的生物转化反应机制探究提供理论基础与支持。

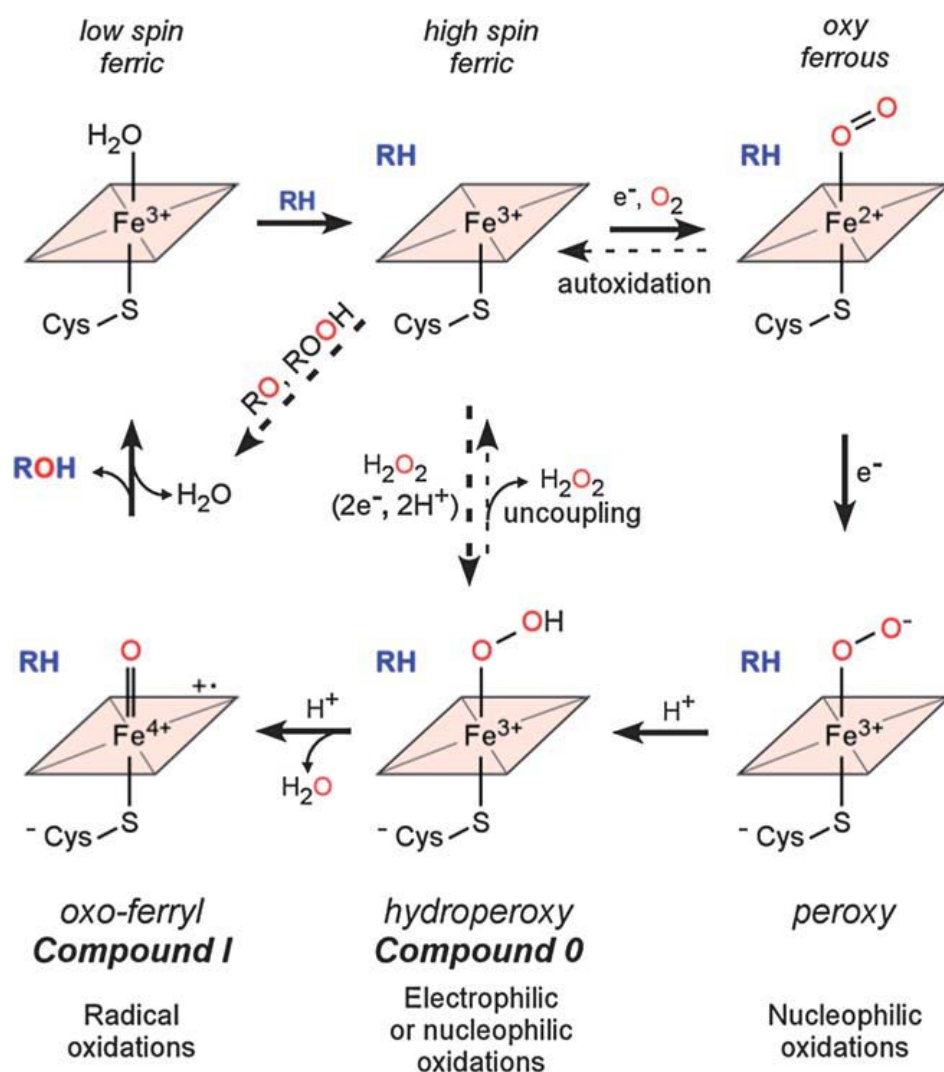


Figure.4 常规P450催化循环 RH代表底物ROH是单加氧结果产物,RO和ROOH描述了单个氧原子供体,分别是氧转移媒介和有机过氧化物，合成和脱去其他分路用虚线箭头表示

二、 实验操作（CYP105D7,Pdx/Pdr,seFdx/seFdR,RhFRED,GDH蛋白表达和纯化）

1、培养基

1) 种子液的培养采用普通的LB培养基，蛋白（CYP105D7）的表达采用TB培养基，具体配方如下：

表 5.1 TB培养基配方 1
Table 5.1 The component of TB media 1

试剂名称	称取量
<i>Tryptone</i>	12g
<i>Yeast Extract</i>	24g
<i>Peptone</i>	2g
<i>Glycerol</i>	4mL
0.89 磷酸钾缓冲溶液	100mL
<i>ddH₂O</i>	定容至1L

培养基配制完后，121℃，20min高压灭菌。

0.89 M磷酸钾缓冲液配制如下：

表 5.2 0.89 M磷酸钾缓冲液组成
Table 5.2 The component of 0.89 M potassium phosphate buffer

试剂名称	称取量
<i>KH₂PO₄</i>	23.1g
<i>K₂HPO₄</i>	125.4g
<i>ddH₂O</i>	定容至1L

配制完后，121℃，20min高压灭菌。

2) 还原伴侣蛋白及GDH蛋白的表达采用TB培养基，具体配方如下：

表 5.3 TB培养基配方 2
Table 5.3 The component of TB media 2

试剂名称	称取量
<i>Tryptone</i>	12g
<i>Yeast Extract</i>	24g
<i>Glycerol</i>	40mL
<i>KH₂PO₄</i>	2.31g
<i>K₂HPO₄</i>	12.54g
<i>ddH₂O</i>	定容至1L

培养基配制完后，121℃，20min高压灭菌。

3) 培养基添加物

表 5.4培养基添加物组成
Table 5.4 The component of medium additives

试剂名称	类别	母液浓度	保存
------	----	------	----

氯霉素 (Chloramphenicol,Chl)	抗生素	100mg/mL,ddH ₂ O溶解	-20℃
卡那霉素 (Kanamycin,Kana)	抗生素	34mg/mL,无水乙醇溶解	-20℃
氨苄青霉素 (Ampicilin,Amp)	抗生素	100mg/mL,ddH ₂ O溶解	-20℃
IPTG	诱导剂	1 M,ddH ₂ O溶解	-20℃

配置完的溶液，用0.22 Mm无菌滤头过滤除菌。



Picture 1 配制的TB培养基

2、蛋白表达

- 1) 取-80℃冻存的E.coli BL21codon plus(DE3)转化菌株（CYP105D7-C-His₄）和E.coli BL21(DE3)转化菌株（Pdx/Pdr,seFdx/seFdR,RhFRED,GDH）于相应抗性的平板上划线复苏，CYP105D7的基因（*cyp105D7*）载体上过表达。
- 2) 挑取一个单菌落，接种到LB液体培养基中，37℃，220rpm过夜培养14-16h活化；
- 3) 按1: 100接种到含1L TB培养基的2L大三角瓶中，在培养之前；于CYP105D7，需向培养基中添加100mL 0.89M磷酸钾缓冲液，终浓度为0.475mM的FeCl₃·6H₂O溶液，终浓度为0.2mM的5-ALA，添加比例为0.025（v/v）%的微量元素（250 μL）,终浓度为100 μg/mL 的Amp,终浓度为34 μg/ mL 的Chl，终浓度为1mM的维生素B1.于Pdx/Pdr,seFdx/seFdR,RhFRED,GDH这些蛋白，需在培养基中添加终浓度为100 μg/ mL 的Kana或者终浓度为100 μg/ mL 的Kana和终浓度为100 μg/ mL的Amp，然后再37℃，220rpm条件下培养至OD₆₀₀≈0.6-0.8；
- 4) 向上述培养基中加入终浓度为0.2mM 的IPTG，同时，与CYP105D7，温度降至22℃，

- 对于Pdx/Pdr,seFdx/seFdR,RhFRED,GDH,温度降至16-18℃, 220rpm, 诱导20-24h;
- 5) 收菌, 离心条件: 4℃, 7000rpm, 10min; 收集完后弃上清, 合并菌体, 标记后-80℃冻存。

3、蛋白纯化

- 1) 裂解缓冲液 (Lysis Buffer) (pH=PI±2, pH=8.0)

表 5.5裂解缓冲液组成

Table 5.5 The component of Lysis buffer

试剂名称	终浓度	称取量 (1 L)
<i>NaH₂PO₄ • 2H₂O</i>	50mM	6g
<i>NaCl</i>	300mM	17.532g
<i>Glycerol</i>	10%	100g
<i>Imidazole</i>	10mM	0.6808g

裂解缓冲液配制完后, 4℃保存。

- 2) 洗涤缓冲液 (Wash Buffer) (pH=PI±2, pH=8.0)

表 5.6洗涤缓冲液组成

Table 5.5 The component of Wash buffer

试剂名称	终浓度	称取量 (1 L)
<i>NaH₂PO₄ • 2H₂O</i>	50mM	6g
<i>NaCl</i>	300mM	17.532g
<i>Glycerol</i>	10%	100g
<i>Imidazole</i>	20mM	1.3616g

洗涤缓冲液配制完后, 4℃保存。

- 3) 洗脱缓冲液 (Elution Buffer) (pH=PI±2, pH=8.0)

表 5.7洗脱缓冲液组成

Table 5.7 The component of Elution buffer

试剂名称	终浓度	称取量 (1 L)
<i>NaH₂PO₄ • 2H₂O</i>	50mM	6g
<i>NaCl</i>	300mM	17.532g
<i>Glycerol</i>	10%	100g
<i>Imidazole</i>	250mM	17.02g

洗脱缓冲液配置完后, 4℃保存。

- 4) 脱盐缓冲液 (Desalting Buffer) (pH=7.4)

表 5.8脱盐缓冲液组成

Table 5.8 The component of desalting buffer

试剂名称	终浓度	称取量 (1 L)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50mM	6g
Glycerol	10%	100g

脱盐缓冲液配制完后。4℃保存。

采用蛋白分离柱纯化蛋白的步骤如下：

- 1) 将收集后的菌体置于冰上（或者从-80℃取出后于冰上融化），加入一定体积的裂解缓冲液（一般1L菌体加入50mL 裂解缓冲液）悬浮菌体，在振荡器上振荡均匀后行超声破碎，超声破碎条件：Φ6，超声40min，超5s，停5s，30℃，功率35%；
- 2) 将澄清破碎的菌液10000rpm，4℃离心50min，收集上清至预冷的50mL离心管，加入相对应量的Ni-NTA（一般1L菌体加入1mL 镍柱），混匀后于4℃冷室孵育1-2h；
- 3) 孵育后的菌浆液加入至事先用100mL 洗涤缓冲液冲洗的蛋白分离柱中，加入400-600mL洗涤缓冲液进行洗涤，直到通路里没有杂蛋白（用G250染色液进行检测）；
- 4) 用一定量的洗脱缓冲液洗脱目的蛋白（一般1L菌体加入10-15mL洗脱缓冲液，CYP105D7与镍柱结合呈血红色），收集含有目的蛋白的洗脱液；
- 5) 收集的各类洗脱液装入含对应相对分子量（kDa）的超滤管进行浓缩，5000-6000rpm，4℃离心一定时间，间歇吹打，直至浓缩至体积为1.5-2mL；
- 6) 将浓缩后的溶液装载至PD-10脱盐柱中进行脱盐（提前用25mL脱盐缓冲液预平衡），随后用脱盐缓冲液进行脱盐；
- 7) 分装脱盐后的目的蛋白，每管100 μL，液氮瞬间冷冻，-80℃保存。



Picture 2 Ni-NTA柱置于冰上洗涤缓冲液、蛋白溶液、洗脱缓冲液依次过柱

4、聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测CYP105D7表达实验

采用非连续变性电泳（SDS-PAGE垂直电泳），同时采用FlexiRun™10Min. Premix PAGE solution[IG020]预混液，配制12.5%浓度的分离胶，5%浓度的浓缩胶。其中，所需溶液配方具体如下：

1) 5*SDS-PAGE电泳缓冲液

表 5.95*SDS-PAGE电泳缓冲液组成

Table 5.9 The component of 5*SDS-PAGE electrophoretic buffer

试剂名称	称取量
Tris	15.1g
Glycine	94g
SDS	5g
ddH ₂ O	定容至1 L

2) 考马斯亮蓝染色液

表 6.0考马斯亮蓝染色液组成

Table 6.0 The component of Coomassie brilliant blue staining fluid

试剂名称	称取量或体积
甲醇	45mL
醋酸	10 mL
考马斯亮蓝R250	0.25g
ddH ₂ O	定容至100 mL

3) 脱色液

表 6.1脱色液组成

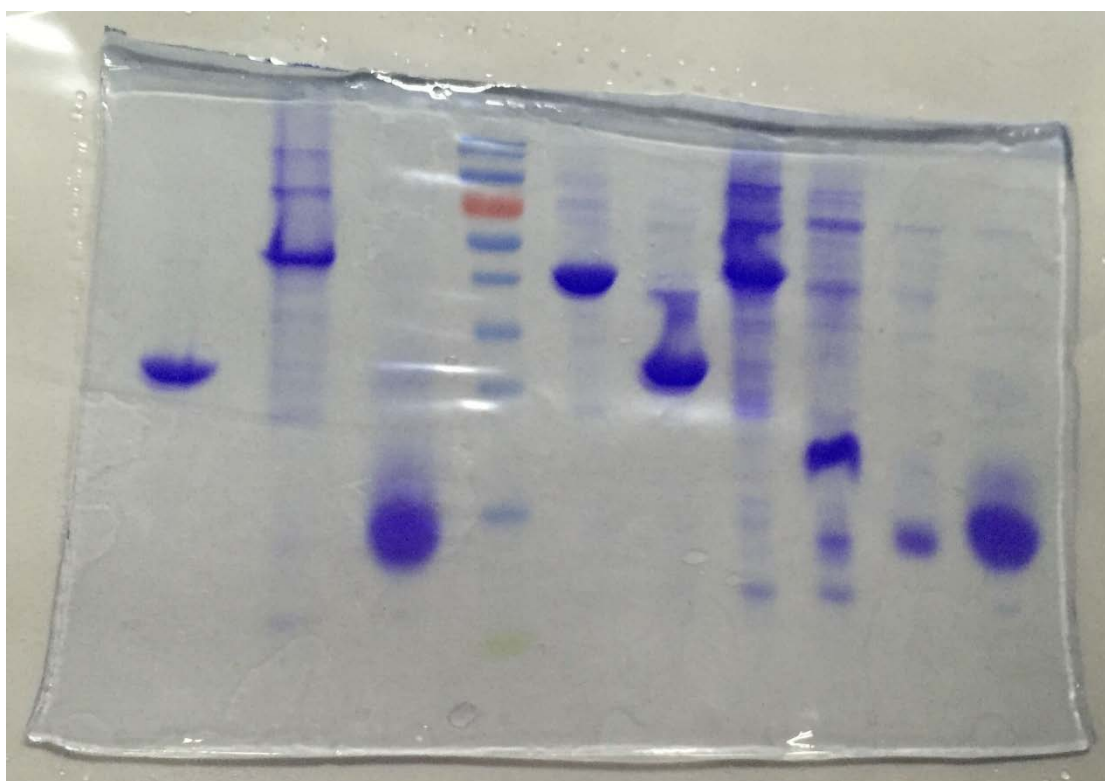
Table 5.9 The component of destaining solution

试剂名称	称取量或体积
甲醇	30mL
醋酸	7mL
ddH ₂ O	63mL

整体实验操作步骤如下：

- 1) 安装两块洗干净晾干的玻璃板（一片磨边厚板，一片薄板）、两个夹板条，并将两块玻璃板固定在电泳槽中；
- 2) 配制12.5%的PAGE，制备10mL分离胶，取6.25mL FlexiRun™，加3.75mL蒸馏水，并加入10 μL 蒸馏水，并加入10 μL TEMED，再往挤压瓶里加入100 μL APS，将挤压瓶轻轻颠倒混匀后，迅速在两块玻璃板间隙中灌注到胶板里面70-80%高度（给浓缩胶预留出1cm的位置），用移液枪往胶上覆盖一薄层纯水，以压平基线；
- 3) 在分离胶聚合过程中，配制5%的浓缩胶，取2.5mL FlexiRun™，加7.5mL 蒸馏水，并加入10 μL TEMED；

- 4) 若在水合分离胶的界面上出现清晰的分界线，则说明分离胶已聚合，此过程约为20min（室温25℃）；
- 5) 弃纯水，并用滤纸将残留的纯水吸干，往浓缩胶挤压瓶里加入100 μ LAPS，灌满胶板厚，立即插入干净的梳子（梳子型号需与玻璃板对应），插入过程中避免产生气泡；
- 6) 待浓缩胶聚合完全后（此过程约为20min），双手小心拔出梳子；
- 7) 装好电泳装置，浅玻璃板朝内，固定在电泳架上，将整个电泳架放入电泳槽，在内外槽中倒入足够的SDS-PAGE电泳缓冲液，对电泳内槽进行检漏，确保电泳缓冲液不外漏；
- 8) 在蛋白溶液中加入等体积的2 $\times$ 样品溶解液，沸水浴煮5-6min，静置冷却后10000rpm，离心1min，吸取上清，用微量进样器进行上样，于空白上样孔加入等体积的样品缓冲液；
- 9) 连接电泳仪，先以稳压120V（两块板）开始电泳，当溴酚蓝迁移至浓缩胶与分离胶的分解处时，加大电压至200V（两块板），待溴酚蓝迁移至分离胶底部时关闭电源，大约需要2h；
- 10) 从电泳装置上卸下玻璃板，用镊子小心从玻璃板上头撬开，剔除浓缩胶部分，放置于盛有考马斯亮蓝溶液的脱色皿中染色，室温摇床摇晃20min，将染色液回收备下次使用；
- 11) 倒入脱色液（没过胶），放入少量脱脂棉，于微波炉加热，中高火2-3min（分3次加热）后去除，室温摇床摇晃20min，每20min更换脱脂棉及脱色液，重复2-3次；
- 12) 脱色完毕后，进行观察和拍照，观察目的蛋白的表达量及表达质量。



Picture 3 纯化浓缩蛋白SDS-PAGE电泳图

三、结果与讨论

1、CYP105D7, Pdx/Pdr,seFdx/seFdR,RhFRED,GDH蛋白表达SDS-PAGE分析

将构建好的CYP105D7-C-His₄（宿主为BL21codon plus(DE3)）、三对还原伴侣蛋白（宿主为BL21(DE3)）及NADPH再生系统GDH（宿主为BL21(DE3)）进行表达纯化，洗脱得到的目的蛋白溶液（Figure 7）：

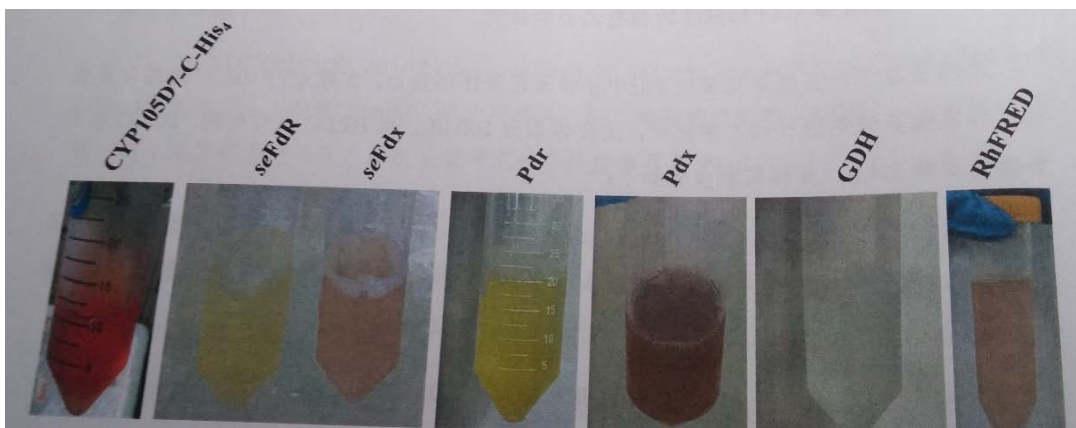


图7 洗脱缓冲液洗脱后得到的目的蛋白溶液示意图

Figure 7 Schematic of the target protein solution obtained by elution buffer

注：从左到右依次为CYP105D7、seFdxR、seFdx、Pdr、Pdx、GDH和RhFRED。

将上述洗脱缓冲液洗脱得到的蛋白溶液进行超滤浓缩和脱盐，最终得到纯化后蛋白，SDS-PAGE上的各个条带（Figure 8）：

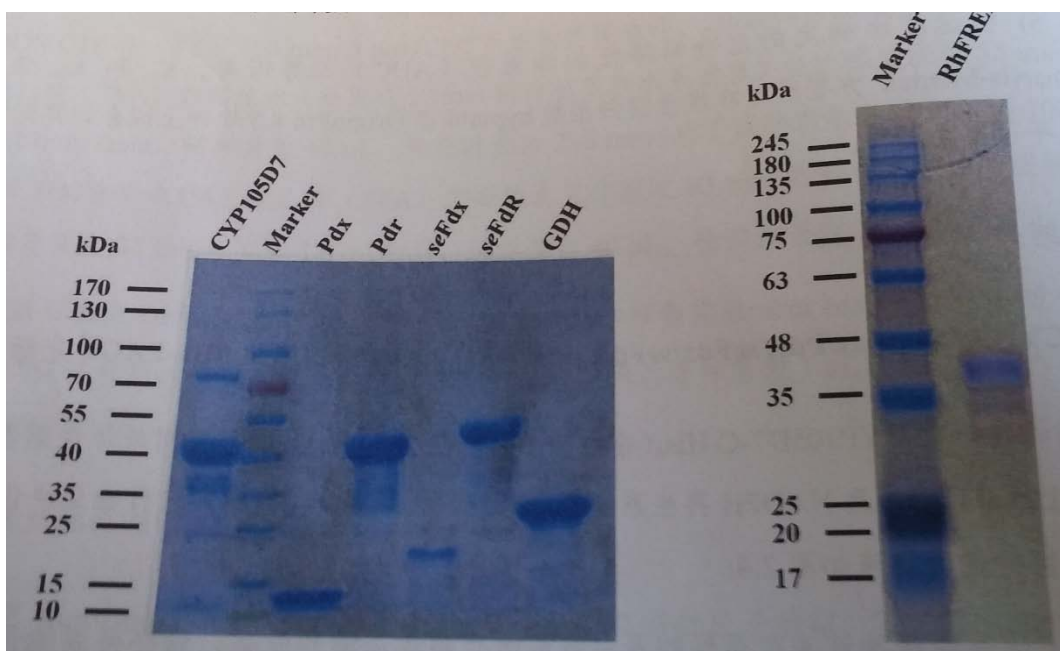


图 8蛋白表达纯化SDS-PAGE结果图

Figure 8 SDS-PAGE results of protein expression and purification

注：左边使用的Marker为双色预染宽分子量蛋白质Marker（10-170kDa），右边使用的Marker为彩虹245plus广谱蛋白Marker（5-245kDa）。

聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）结果显示，CYP105D7分子量为45kDa，还原伴侣蛋白Pdx/Pdr,seFdx/seFdxR 和 GDH 显示的单独条带分子量为12kDa,46 kDa,20 kDa,50 kDa,30kDa,RhFRED显示的单独条带分子量为35.7 kDa.条带纯度较好，说明杂蛋白去除较为干净，利于体外反应。

2、CYP105D7紫外吸收光谱分析

细胞色素P450蛋白是P450酶系中的关键组分，在整个P450中起着末端氧化酶的作用。细胞色素P450有两种类型：即氧化型和还原型。典型氧化型的绝对光谱有三个主峰，在570nm、535nm和416nm，分别相当于 α 峰、 β 峰、 γ 峰。

处于氧化状态的P450蛋白，其吸收光谱的索瑞峰在420nm左右，当P450蛋白处于还原状态时（即原卟啉铁由三价转为二价），血红素才能与O₂和CO结合，原来位于416nm处的索瑞峰将消失，产生一个位于450nm处的吸收峰。若P450酶已经变性，则与CO结合后的复合物其索瑞峰仍将在420nm，而非450nm，因此避免P450酶变性在实验过程中显得至关重要。纯化得到的新鲜CYP105D7-C-His₄蛋白的吸收光谱（图 10）：

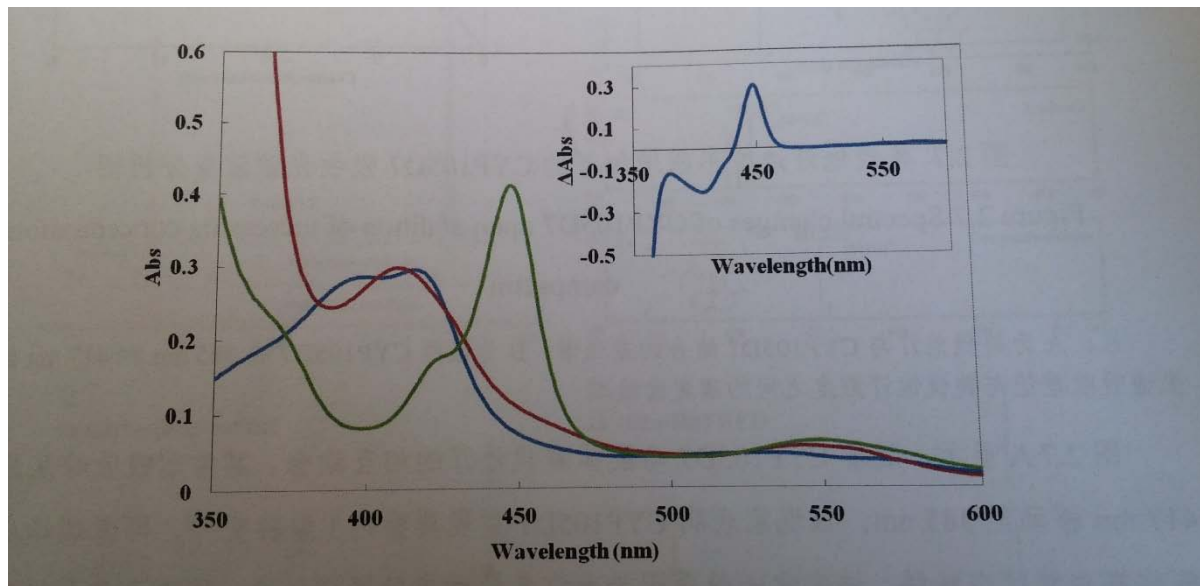


图 10 CYP105D7的紫外吸收光谱图

Figure 10 UV absorption spectrogram of CYP105D7

注：蓝色实线表示氧化状态的CYP105D7；深红色实线表示加入连二亚硫酸钠后还原状态的CYP105D7；黄色实线表示与CO结合后的蛋白吸收光谱。插图为还原状态下P450与CO结合的差光谱。

结果表明，CYP105D7-C-His₄蛋白在氧化状态时位于415nm处有较高的吸收峰（如图 10 中蓝色实线），加入还原剂连二亚硫酸钠后索瑞峰位于409nm，同CO后，产生一个位于447nm处的特征吸收峰，蛋白从高自旋到低自旋。该结果证明CYP105D7-C-His₄折叠正常，可用来进行体外生物转化实验。

四、 实验仪器学习

1、灭菌



Picture 3 高温高压灭菌锅



Picture 4 超净台紫外灭菌

2、细菌培养



Picture 5 恒温振荡摇床



Picture 6 全温振荡器

3、蛋白结晶



Picture 7 晶体培养箱

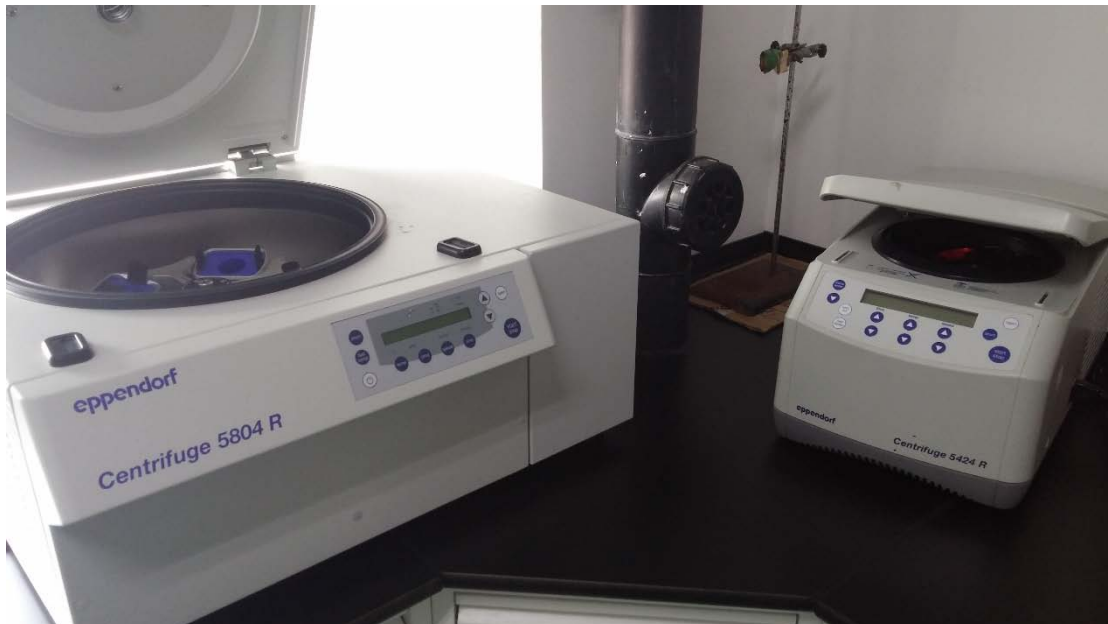


Picture 8 超声细胞破碎仪

4、溶液组分分离（适配器大小）

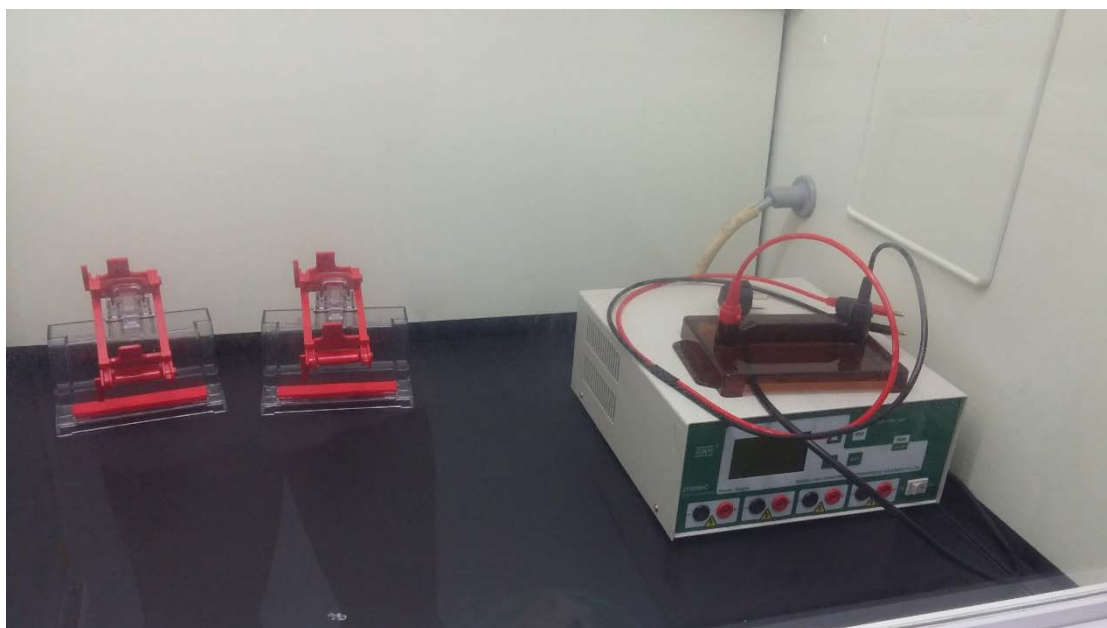


Picture 9落地冷冻离心机



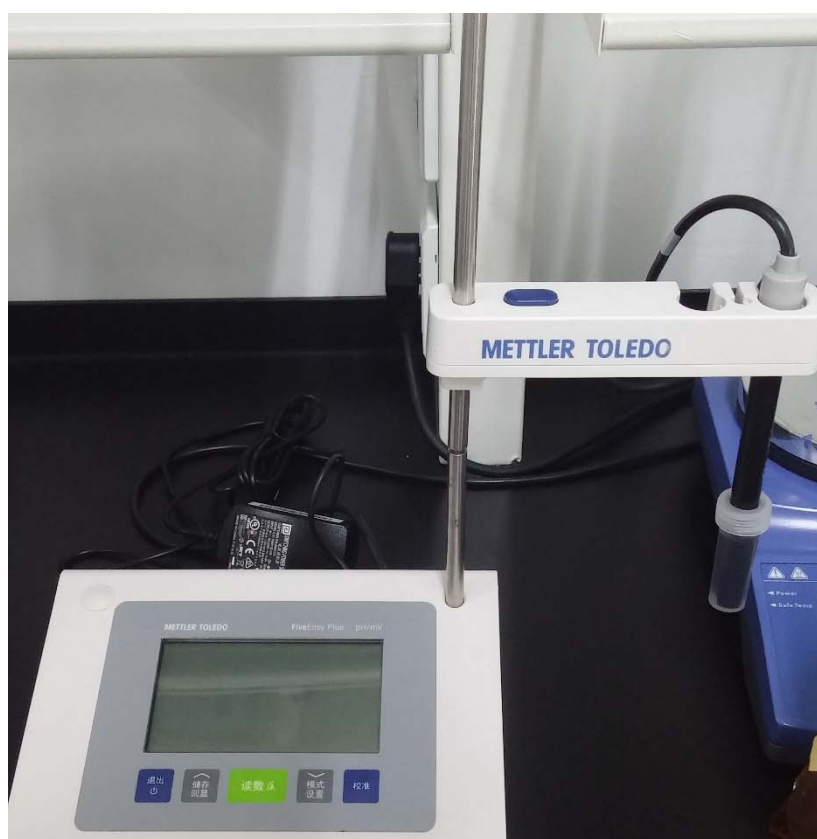
Picture 10 塞默飞超速离心机

5、蛋白相对分子质量测定



Picture 11电泳仪（JY600D）

6、调控溶液pH值



Picture 12 梅特勒-托利多实验室PH计

7、紫外分光光度浓度测定



Picture 13 紫外可见分光光度计 (DU800UV/VIS)

2. 就某个或事情进行描述

亲自在超净台中向培养基接菌前，学姐向我演示了两遍如何操作，并在操作过程中询问我对操作有什么疑问，两次我的回答都是‘没有问题’，但在自己操作时，一开始怀着让学姐看看我完美的操作，却屡屡犯错。学姐很严厉地指出了我的错误，质疑我前两次在观看她操作时没有用心，认为我这次实验非常失败，学姐生气失望的语气令我既生气又伤心。

我跟学姐在超净台操作的前几天里建立了深厚的友谊，我一开始认为是我跟学姐之间关系熟了，学姐觉得跟我比较亲近态度就严苛了，差点因为难过而放下实验仪器不干了，实验越做越心烦，心想，“凭什么其他人的学长学姐在他们做实验的时候态度温和，我跟学姐关系这么好反而还要被骂”，难过委屈了一段时间之后，我鼓起勇气跟学姐说出了我心里的想法，才发现是我误会了学姐。

学姐沉浸在之前的气恼中依旧有些生气地回答我：“你平时人聪明，爱问问题，勤思考爱动脑，又看过我操作了两遍，在我操作的时候我问你有没有问题，你说没有，那我就认为你已经学会了，本来以为你一遍可以很轻松地完成的，没想到出现这么多的错误，我就很生气，而且我不是那种脾气好的人，有问题我严厉地指出能让你印象更加深刻”。“而且在最初几天里，你态度还是挺好的，但感觉最近几天动脑没那么主动了，上几次操作你都是照做也没有问什么问题”。

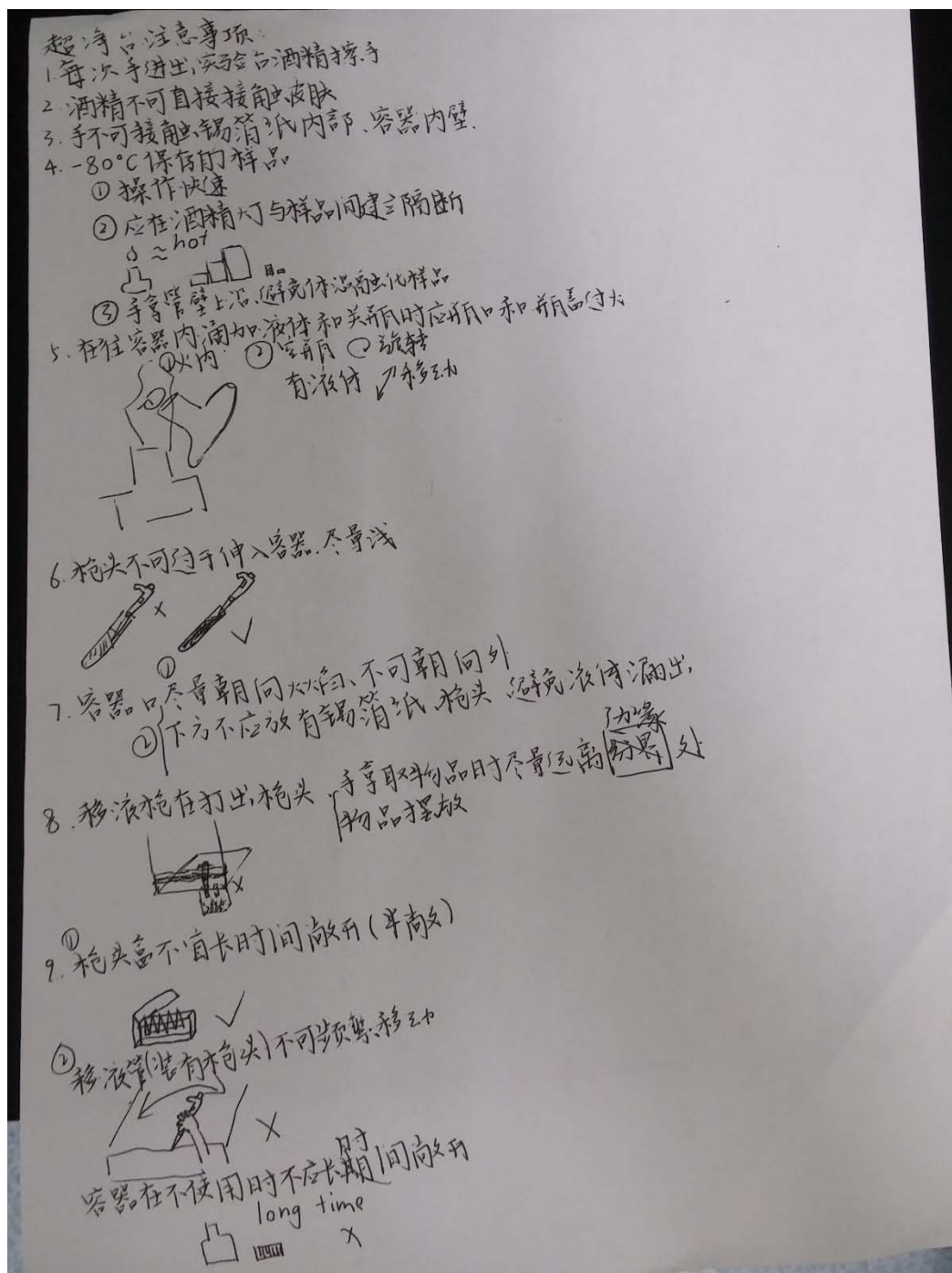
听罢，我才意识到学姐对我是抱有很高的期望的，是打心眼里为我好替我着想。而且我反思自己那几天的实验态度，确实较刚开始实验的那几天相比少了许多踏实研究实验的沉着，对操作精益求精的态度。回望过去的许多经历，很多事情也都是万事开头稳扎稳打，取得一些成绩之后就渐渐放松，呈现高开低走的态势，结局最后都不甚圆满。

于是我意识到，我需要在做事情的中间阶段持之以恒，将开头时的热情一以贯之，最好办法是每天自己都有一个对当天事情进展的目标，来激励自己不断向前。

失败操作后，我想“不要轻易地否定失败，失败也是有它的意义”，便静静地坐在实验台的一角，在一张纸上记下了这次超净台操作中学到的注意事项。

在当晚学姐给了我第二次超净台操作的机会，我小心翼翼地，几乎没有任何差错的完成了操作，学姐说“这次操作比较完美”，我笑着回答道“或许有一些你我都不知道的操作错

误呢？”两人相视而笑。



Picture 14 超净台操作注意事项

3. 收获与体会

因为我是跟学姐一起做学姐的研究生课题, 不像其他同学一样是研究生学长学姐带着他们做一个独立的小课题, 因此我与学姐的时间安排是几乎一致的, 除了我早上和下午会稍晚到一些。

- 1) 体验到了做生物研究的研究生的大概生活模式, 实验室——食堂——寝室三点一线的生活, 一天绝大部分时间花费在实验室中, 实验要反复做, 不同的蛋白表达要培养不同质

粒的细菌，养菌就要来来回回做好几次，一次就是三天，之前在实验课里老师说，生物实验通常会出现长时间等待的情况，要提前做好实验规划，经过这次科研实习，真切有了一天“闲”一天“忙”的体验。

- 2) 跟学姐和她的其他“实验狗”小伙伴们朝夕相处，周末一起出去玩，每天一起唠嗑，了解到了许多生活和学业上的经验，也感受到了学姐们实验过程中的喜怒哀乐，就像是有一个导师，在她那，不仅学到了知识，更学到了生活的方式和态度。
- 3) 不同于在课堂学习中有一个老师作为知识权威，在真正实验的时候遇到的很多问题需要我和学姐自己通过回顾实验操作，上网查资料来解决问题。
- 4) 校内实验课教学上，通常都有明确的实验步骤和时间限制，但在实际实验时，通常为完成一个实验目的，通常要多个实验连着一一起做，每项实验的进度由自己来把握。实验操作步骤和时间安排也需要自己去优化调整。
- 5) 分析实验结果和解释实验现象时基础理论知识很重要，仪器原理有关的分析化学，蛋白质反应活性与生化反应活性中心知识密切相关。
- 6) 具体的实验操作细节很重要，但更重要的是为了实现一个实验目的，探究一个原理在宏观上顶层设计一系列的实验去实现它的一种“建筑设计师”思维。

4. 对专业实习的建议

在具体的实验过程中通常会有很空闲的时段，而且会出现需要重复操作的时候，在 20 天的实习过程中往往就是只针对一个课题进行学习，生物方向这么多，我们学校生物老师课题组又多，固定在一个课题中能够学到的往往比较有限，我建议：每个课题组设计一些精炼短小重复性比较低，又能够涉及相关课题研究基本知识操作大约持续一周的实验，每个学生从众多课题组小实验中选择 3 个课题，在 20 天的时间里变换三个课题组依次完成实验，这样既能够充实 20 天的实习时间，也能够最大化学到知识，了解不同老师具体在研究些什么。

第二篇优秀实习报告

枸杞岛贻贝微塑料实验——微塑料认识、分类及操作思考

浙江大学海洋学院，唐志杰

摘要：

微塑料是粒径或长度小于 5mm 的塑料碎片、纤维、薄膜和小球等的统称。近些年来，随着微塑料概念的提出及其危害不断被发现，关于微塑料的研究也逐渐成为当下的一个热门课题。而在中国，关于微塑料的研究起于近五年，不仅微塑料在全国的含量分布以及影响机制尚在研究中，关于微塑料的采集、预处理、定性定量分析等也都处于一个“百家争鸣”的阶段。

因此，基于现有文献，我组切实选择某一方案，并以枸杞岛贻贝为原料进行实践操作。一方面希望能在实验过程中对微塑料及其提取操作形成一个初步的认识，为之后的实验打下基础。另一方面则希望能在操作过程中完善相关步骤并提出改进思路，为后来者提供参考意见。

关键词：

微塑料，样品质量，提取过程，目检法，微塑料分类，微塑料标准图

The experiment of micro plastics in Gouqi Island——Reflect on cognition, classification and operation of micro plastics

Ocean College, Zhejiang University, Zhoushan316021,China;

TANG Zhijie

Abstract:

Microplastics are general description for fragment, fiber, film ,pellet of plastics with the maximum diameter less than 5mm. In recent years, with the put forward of concept and micro plastic's harm were found, research on micro plastic has gradually become a hot topic at the moment. And, the research of micro plastic in China began in nearly five years. Not only the content distribution of the micro plastic and the influence mechanism is still in the study, the collection, pretreatment, qualitative and quantitative analysis of micro plastic are also contending.

Therefore, based on the existing literature, I set to choose a scheme with GouQi Island mussel as raw material to carry on the practice operation. On the one hand the hope in the experimental process of micro plastic and extraction operations is to form a preliminary understanding and to lay the foundation for later experiments. On the other hand, hoping to improve the relevant steps in the process of operation and put forward improvement ideas, provide a reference for the later.

Key words:

Micro plastic, sample quality, process, visual inspection method, classification,

5. 实习内容概述

一、认识仪器并学习操作

1) 恒温振荡器

操作步骤：开启-参数设置及查阅-放置样品-加水-启动-隔时添水-取样

注意事项：水烧干之后会鸣响、冒烟且可能影响样品加温，因此注意定期加水

2) 电动移液器（电动助吸器）

操作步骤：安装移液管（10/25mL）-长按“ $\wedge$ ”-定量吸取-长按“ $\vee$ ”放液-更换移液管

注意事项：

- ①移液前：确保移液管与仪器连接紧密；移液管管口注意伸入液面下，避免大量气泡；
- ②移液中：注意观察刻度线；吸取液体后仪器禁止平放、倒放；移液管即取即用
- ③移液后：注意及时更换移液管；二次使用前仪器应该平放并避免管口污染

3) 光学显微镜

操作步骤：电脑开机-显微镜开启-相机开机-打开软件-观察（关机相反）

注意事项：

- ①观察前应以典型微塑料为基准确定大致物象所在平面；
- ②镜检图上应注有比例尺，并对应相应的物镜倍数；
- ③结束后应将光源调到最暗，载物台最低，物镜倍数最小。

二、了解实验内容，理解实验原理，设立实验目标

1) 实验内容:

①配置 10%KOH 溶液 1L

②取贻贝肉解冻 1h 后, 各称量 50g 并加入 50mLKOH

溶液

③150rpm, 60℃下震荡 24h

④将样品转移至分液漏斗中静置 4h

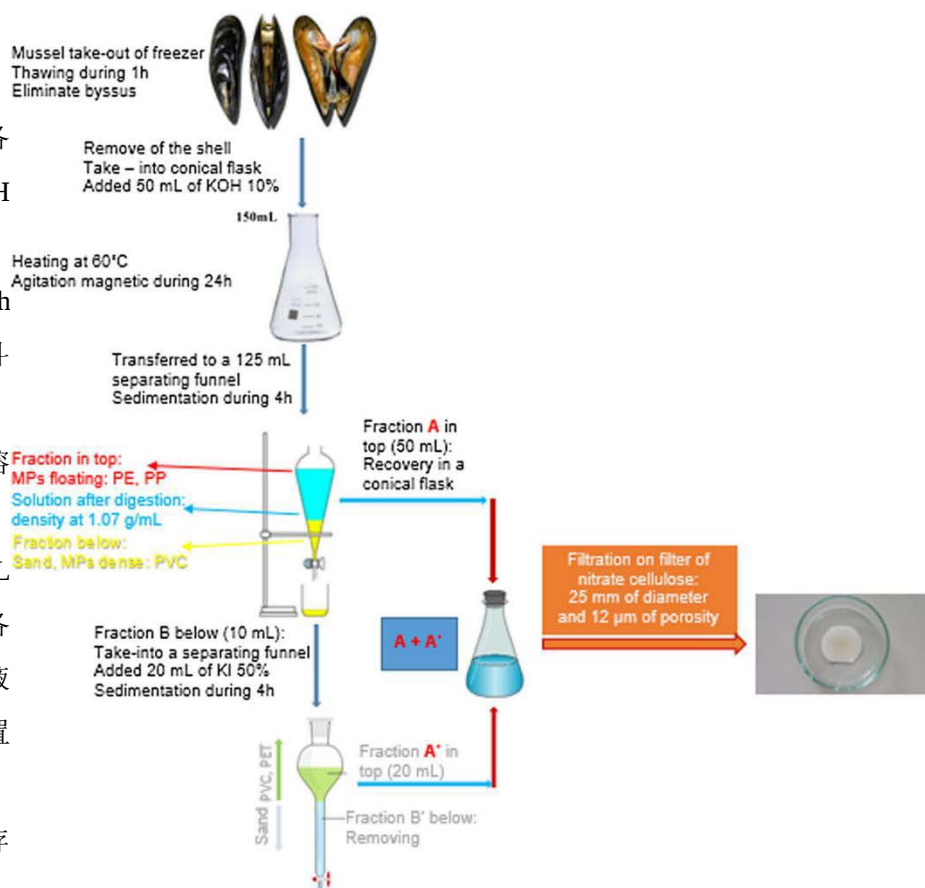
⑤配置 80-90mL50%KI 溶液

⑥移取上清液 A 各 50mL 保存; 移取下层液体各 10mL, 并加入 20mLKI 溶液混匀, 于分液漏斗中静置 4h

⑦取上清液 A'20mL, 保存于 A

⑧过滤上清液 (8μm 滤膜)

⑨显微镜观察滤膜



2) 实验原理:

①50mL10%KOH 溶液, 加热震荡 24h

Reagents	Experimental conditions					Remaining mussel soft tissues after digestion step % mean ± standard deviation (n=3)
	Volume	Contact (h)	Heating (h)	Agitation	Porosity (μm)	
HNO ₃	20	24	2	No	5	0.455 ± 0.010
	50	24	2	No	5	0.425 ± 0.025
	50	0	24	Yes	5	0.768 ± 0.126
KOH	20	24	2	No	5	0.225 ± 0.009
	50	24	2	No	5	0.092 ± 0.026
	50	0	24	Yes	5	0.064 ± 0.015

在研究微塑料含量时, 我们应当有效的排除所有生物、有机成分存在的可能。因此, 在分离提取贻贝微塑料之前, 我们应当将贻贝组织进行消化处理, 排除生物组分。而根据文献实验研究 (Quantification and characterization of microplastics in blue

mussels(*Mytilus edulis*); protocol setup and preliminary data

on the contamination of the French Atlantic coast), 10% 的 KOH 溶液, 震荡加热 24h 为最佳消化条件 (对于三份贻贝)。

②静置 4h (第一次)

由于混合物的各组分的密度差异, 因此在静置一段时间后, 大量的 PP、PE 将含于上清液中, 而 PVC 含于下层液体中。

③加入 50%KI 溶液, 静置 4h

20ml of a KI 50% solution (m/v; density = 1.55 g cm⁻³), 可有效地利用密度差, 将 PVC 从下层液体中提取出来

3) 设立实验目标

考虑到当下中国乃至世界对于微塑料的研究都还不够成熟, 很多提取、辨别、分类等的标准都还未统一。对于初次接触微塑料这个课题的我们应当在该阶段沉下心, 先对微塑料以及微塑料的提取实验等形成一个初步的认识。同时翻阅大量关于微塑料的现有文献, 一方面了解当前已有方式方法以及研究成果, 另一方面吸收其实验经验, 为自己的实验操作提供思路。

三、预实验——熟悉流程、发现 (提出) 问题、解决问题

1) 预实验-前期处理

①取枸杞岛贻贝多余样品*2 (-80 冰柜), 1h 融化处理;

②捏碎样品并称重各 50g 于贴有标签的锥形瓶 (GX1; GX3), 各加入 50ml KOH 溶液;

③置于 150rpm, 60 的震荡器中, 震荡 24h;

④放回样品。

问题: 两个样品中有一个样品在解冻后水分含量很大 (GX3)

原因: 解冻时水渗入 (封口袋破损); 样品保存时引入外界水

解决方式: 严格避免解冻过程中外界水的引入; 内部中出现明显水时可沥去

2) 预实验-分液

①从振荡器中取出振荡完全样品 (观察到基本混匀, 但仍需考虑是否要调高振荡速度);

②转移至 125ml 分液漏斗, 置于铁架台上静置 4h;

③观察样品 1、2 的分层情况

GX1: 2 层, 且下层溶液多于上清液, 上清液颜色较深;

GX3: 4 层(上清液-浊液-上清液[较少]-浊液), 上清液较澄清, 下层颜色比另一样品深;

④转移样品下层溶液至锥形瓶, 并贴好标签。两个样品下层溶液均约为 50ml;

⑤转移上清液至其余干净干燥锥形瓶, 贴好标签, 盖上小烧杯保存在 4 冰箱;

⑥配置 50%KI 溶液 (100g, 200ml 水), 加入下层溶液中后继续分液操作 4h;

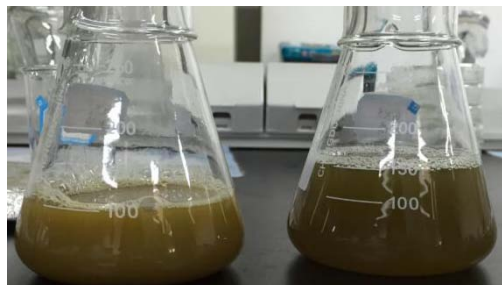
⑦观察样品 1'、3'的分层情况

GX1: 2 层, 上清液较少, 分层不明显, 上清液颜色较深;

GX3: 2 层，分层明显，上清液较多且多于 1'，上清液颜色较通透；

⑧分液收集于锥形瓶

⑨不同于分液漏斗中上清液颜色的现象，收集于锥形瓶后可明显观察到 GX3（图右）颜色较深于 GX1（图左）。



问题：

①样品溶液颜色差异较大；

②样品分液过程中上下组分体积及体积比与文献中差异较大；两组样品间差异较大；

原因：

①样品受季节因素及生长环境影响，自身组织颜色存在差异；生物组织未消化完全；

②GX3 样品中某种疑似“水”物体含量过多，导致分层现象差异（包括层数和体积）；

③样品质量过多，震荡速度不够快，静置时间不够等，导致样品中生物组织未完全被消化，以及分层不彻底，造成下层体积偏大；

解决方式：后期进行质量梯度实验、震荡速度探究实验、静置时间探究性实验等

3) 过滤-观察

问题：

①自然过滤容易使样品从空隙中渗入；抽滤将引入较大人为因素，且滤膜上容易残存杂质

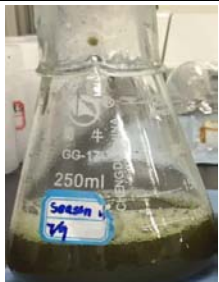
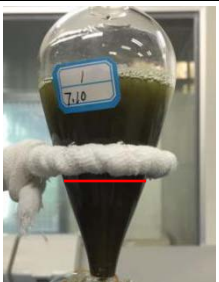
②过滤体积较大时将引起滤膜破损以及透光度差不易观察等结果

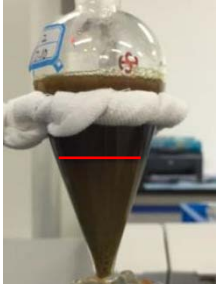
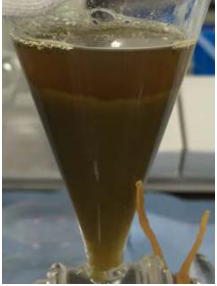
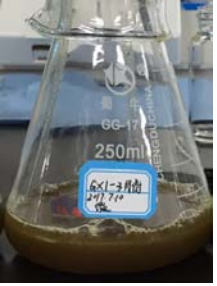
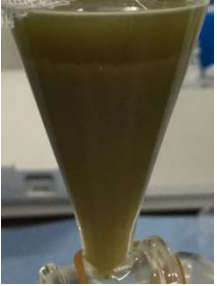
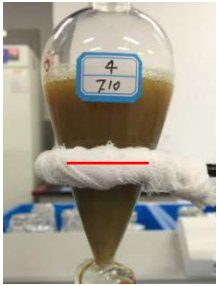
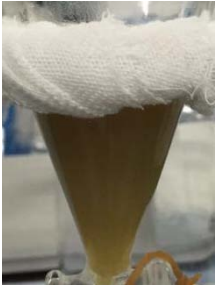
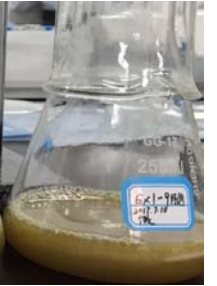
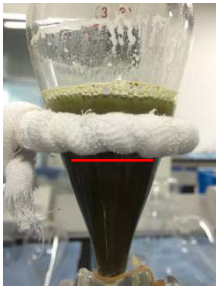
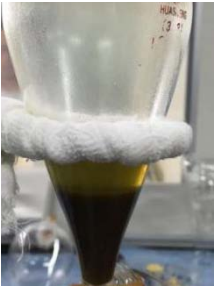
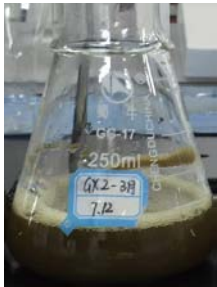
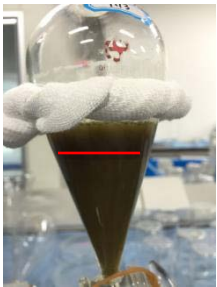
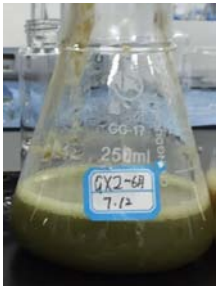
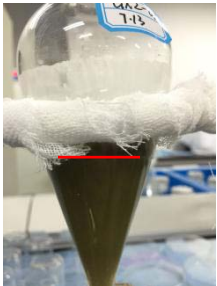
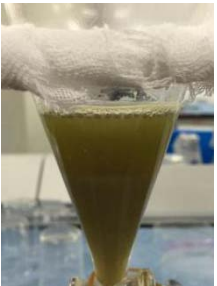
解决方式：

①最终决定使用自然过滤，之后可选购优质滤器；对于已抽滤的样品，将利用抽滤-自然过滤滤膜的对比观察辅助探究。

②利用剩余上清液样品，通过体积梯度得出较适宜的体积量（10-20mL）

四、正式试验——GX1，GX2，GX3

样品		震荡后	第一次分液	第二次分液	上清液样品
GX1	GX1-1				

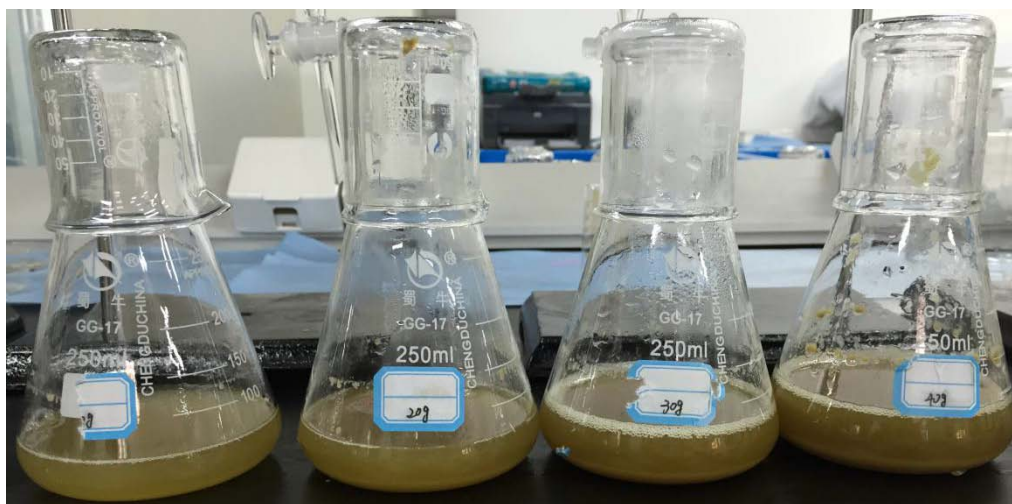
	GX1-3				
	GX1-6				
	GX1-9				
	GX2-1				
	GX2-3				
	GX2-6				

	GX2-9				
GX3	GX3-1				
	GX3-3				
	GX3-6				
	GX3-9				

五、探究性实验——质量密度实验、过滤方式的影响实验

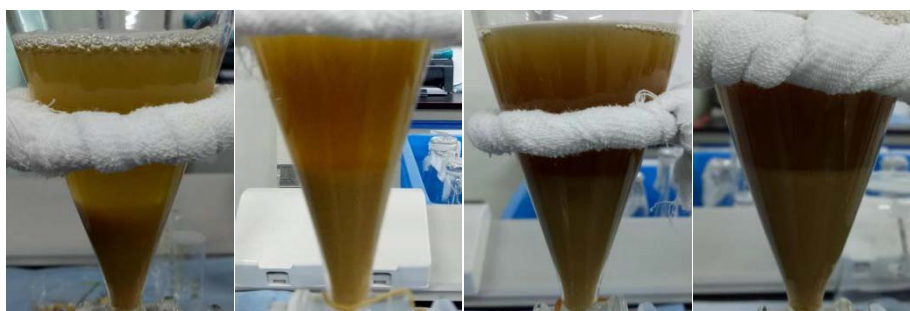
1) 质量梯度实验（取样品质量：10g,20g,30g,40g 重复实验操作）

①观察震荡后样品：



②转移至分液漏斗中，静置 4h；

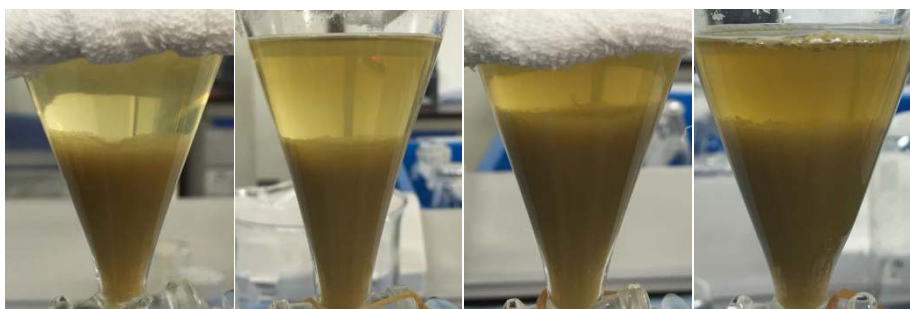
③观察样品分层情况（从左到右依次是：10g,20g,30g,40g）：



④吸取上清液 50mL 保存于锥形瓶中；

⑤吸取下层液体 10mL，配置 80mL50%KI（40gKI,80mL 水），分别加入 20mL 试剂后混匀静置于锥形瓶中 4h（其中 10g 样品下层液体不够 10mL，剩余由上清液补足）；

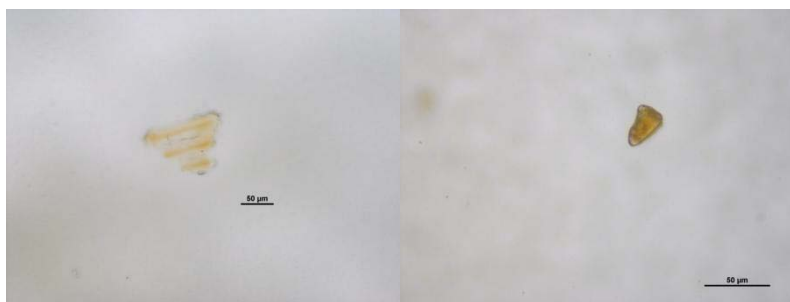
⑥观察样品分层情况（从左到右依次是：10g,20g,30g,40g）：



⑦根据上清液体积最少样品决定吸取 10mL 上清液，与之前的上清液混合；

⑧观察最终液体样品的澄清程度（从左到右依次是：10g,20g,30g,40g）：





八、操作探究

1) 适宜的样品质量

在质量梯度的探究性实验中，可以看到在第一次分液时不同质量的样品颜色差异显著，透光度以 10g 最佳。第二次分液时，除 40g 样品外，其余样品的透光性均较好，尤其是 10g 和 20g 样品透光度十分不错。根据第二次分液时现象，动物组织应该已经较少存于上清液中，这证明第二次分液中所用的 KI 用量以及静置时间基本适用于 10g, 20g, 30g 样品。但第一次分液时，除 10g 样品外，其余样品透光性均不佳，这表明还有大量的动物组织遗留在上层液体中。这有两种可能：1. 质量与 KOH 量不适宜；2. 4h 不是最佳静置时间。但根据最终的液体样品，10g 样品十分澄清，20g 样品较好，30g 样品与 40g 样品则显得透光度不佳。因此，在当前实验结果下，能够大概估计出较适合的贻贝质量应该在 20g 左右。

2) 适用的提取方式（过程中避免使用塑料制品；仪器使用前需用 10%HCl 浸洗，软水冲洗）

- ①称取贻贝肉样品20g（解冻 1h后，手工揉碎、混匀）
- ②10%KOH溶液50mL混匀，在150rpm，60℃下震荡24h
- ③第一次分液：125mL 液漏斗中静置 4h
- ④上清液 A 约 50mL；下层液体 B 约 10mL
- ⑤第二次分液：50%KI 溶液+10mLB 静置 4h
- ⑥上清液 A 约 20mL
- ⑦上清液可保存于试管中，过滤前需要混匀
- ⑧自然过滤：20mL/次
- ⑨滤膜样品保存：密封、避光保存于 4℃冰箱

3) 目检法

①分类

描述微塑料的常用参数		
参数	检测方法	常见描述
颗粒粒径	筛分、过滤法、目检法	
腐蚀程度	目检法、SEM等	全新的、未被风化、被风化、轻微腐蚀、严重腐蚀、贝壳状

		裂痕、锯齿状碎片
形状	目检法	不规则外形、细长形、棱角磨损、片状、小球状、圆柱形
颜色	目检法	透明、半透明、白色、黑色、红色、橘黄色、蓝色、紫色、黑色、棕色、绿色、粉色等
类型	目检法	微型塑料碎片、微纤维、塑料颗粒、泡沫塑料、薄膜、塑料小球
高聚物组分	红外光谱法等	聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚酰胺（尼龙）、聚氯乙烯、聚对苯二甲酸乙二酯、聚四氟乙烯

②操作

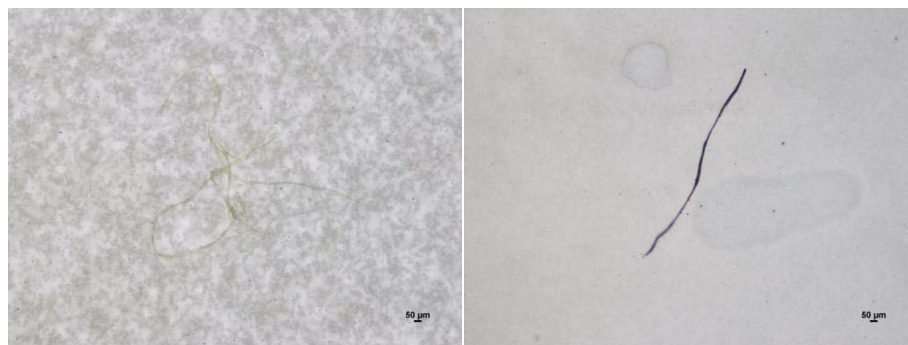
由于微塑料颜色、形态和结构等特性以及操作人员的视觉差异会严重影响目检结果，因此，也有科研人员利用亲脂类着色剂（尼罗红等）对微塑料染色来辅助识别。同时由于误判、遗漏等现象在目检法中时有发生，目检法操作时需注意以下事项：

- ①排除所有生物、有机组分存在的可能；
- ②若观察到的纤维为线状，并未发生弯曲、缠绕，则可能是生物源纤维，应予以剔除；
- ③测量纤维长度时，须确保各纤维厚度均一；
- ④颗粒边界必须清晰，整体色泽均匀，若颗粒为白色或透明则需利用更大的放大倍数或选用荧光标记显微镜。

由于环境中绿色素广泛存在，在鉴定时需更加谨慎小心，需反复判断再下结论。

4) 抽滤与自然过滤的差异

①背景



在相等物镜倍数下，抽滤滤膜（图左）背景明显驳杂于自然过滤滤膜（图右），对于观察影响较大

②微塑料类型、数量

在同一样品、相同过滤体积条件下（如10g样品，20mL），微塑料类型差异不大，不过抽滤滤膜中整体数量较多，且碎片状微塑料数量明显多于自然过滤滤膜。

九、实验问题

- 1) 最适宜的震荡速度；
- 2) 最适宜的分液静置时间；

- 3) 分液后上清液的提取方式（使用移液管-成型塑料制品，是否会对微塑料含量造成较大影响？）
- 4) 分液后分别取 50mL 上清液 A，10mL 下层液体 B，20mL 上清液 A'，是否能够代替原样品中微塑料总量？差别多大？
- 5) 镜检过程中如何有效地避免生物源及其它杂质影响，方便微塑料鉴别及统计

6. 就某个环节或事情进行描述

在实验过程中，给我留下印象最深的应当是 7 月 15 日邸老师的那一场报告。这场报告没有告诉我太多关于实验操作的那些事儿，却让我知道了科研对于一个国家的重要性，即使只是在一个看似并不那么重要的方面上。而且，这次的报告也让我重新静下来心，审视我所在进行的这份实验，应当具备如何的一个定位。

过去在学习中国的近现代史时，我们常常会讲一句话“弱国无外交”，而在当今的世界里，这句话依然有着其存在的道理。虽然如今我国的军事实力、经济实力都在蓬勃发展甚至名列世界前茅，但在其它方面我们也仍然需要不断进步才能保证我们一直拥有强有力的话语权。邸老师的报告中，说着这样一件事儿。故事的背景是当今世界塑料污染不断扩大，中国与日韩海域相邻。由于在世界塑料产量中，中国一直“独占鳌头”，因此在日韩发现自己家的小海洋里出现了大量垃圾后便“不由分说”地指责是中国的塑料垃圾漂到了他们家，并要求中国负责收拾这一片垃圾残局。但是，他们有什么证据说这些垃圾就是中国的呀，就算上面写着“Made in China”就是中国漂过来的么？那小偷买了刀去杀了人，被害者家属还得去问制刀的工厂要求赔偿？那据传日本人是徐福的后代，古代韩国的“金”姓王族来源于中国，所以日韩还算是中国的属地了？

当然，在这个科学文明的现代，一切“污蔑”以及“反污蔑”都得讲究证据。你说这些垃圾不是你的？那你就拿出调查数据、拿出你的研究成果来证明呀。我们研究过，你们没有研究过那就没有发言权。拿出你的科研成果来，让你能够和那些流氓讲道理；提高你的军事实力，让那些不想讲道理的流氓乖乖和你讲道理。这或许是科研某个不太“高大上”的使用方式吧，哈哈。

再次当然，在听完这场关于微塑料的报告之后，我也充分认识到了当下世界各国对于微塑料的研究都还处于一个并未成熟但在快速发展的阶段。在有限的条件下，我们的实验目标绝不应该是过于“假大空”，而应该在适合的阶段做适合的事儿，一步一步踏踏实实地利用已有的文献资料，先认识微塑料，先学会模仿他人，先足够科学地、有效地提供出一份关于微塑料含量的研究等等，认清自己当下实验的目标。

这场报告对我的启发很多，而且在听过这样一次的报告之后，我由衷地觉得在大学之中，埋头苦干并不是一切，开拓的思维，身临其境的感受，最新的科研资讯都应该是大学知识重

要的组成成分。像类似的学术报告啊，国际研究热点啊，环境问题啊之类的报告都可以多开展，而且允许并且鼓励本科生参与。在这些报告中，学生们能够学到很多。虽然专业能力不一定会得到提升，但是你的国际视野，你的社会责任心等等都会慢慢地得到培养。这些从短了说可能会帮助本科生增进见闻，提升科研兴趣；往远了说则会鼓励更多的本科生之后将会选择研究方向，为相关的课题研究做一份贡献。而且老师们时常能够为同学们带来一些最新的科研报告，也能促进师生关系呀，哈哈。

7. 收获与体会

实践出真知，由自己设计、全权负责的实践过程更能锻炼一个的能力。这是我对于今年暑假科研实习最大的感受。不同于课内老师指导下的纯理论知识以及按部就班的实验操作，自己参与设计、实践的实验无疑在增添了整体实验操作难度的同时，提前让学生们感受了较高级实验的实验方式以及锻炼了他们的能力、开拓了他们的思路。

而在这次的科研实习过程中，我所选择的课题又尤为新颖。在面对“实验操作指南”少之又少的前提下，很多实验的步骤都需要自己的体会，自己去发现问题并想办法解决问题。因为没有人可以告诉你这些试剂你放多少最合适，那一步操作你应该持续多久并如何避免失误。在这种情况下，虽然我们的实验总体操作并不难，但对于人的心灵折磨还是很大的。因为在没有操作之前，你永远不知道这一步对不对也不知道什么才是对的。而在这种环境之下，自己不断地积累实验中的问题，去查阅文献，去设计简单的探究性实验验证结果或者寻找答案，都是十分有趣而且开拓实验者思维的过程。

能够在这种环境之下，不断地突破自己，而且自己监督着自己，发挥着主观能动性，对我来说真的是一次莫大的宝贵体验。

8. 对专业实习的建议

我觉得自己选择课题，自己像一个“正儿八经”的科研人员一样“正儿八经”地尝试实验是一种很不错的专业实习方式。好处当然不必多说，需要补足的当然也有。譬若说在正经开始实验之前，我觉得可以提早一段时间让大家进行实验的设想、实验的设计及安排以及相关实验内容的文献翻阅等等，给大家一段足够的预备期。当然，在正式的实验中，通过实际的操作以及失败的教训也是一种很不错的方式用以加深同学们对于实验的认识。除此之外的话，我觉得实验过程中的实验用具一定要同学们提前准备好哈，而且还要买最贵最好的。这点真的在这次的实验中深有体会（详见实验日记）。一个做工粗糙的滤器，能够给你平添许多的烦恼。

当然对于实验的最终报告，也应当采取多元化的处理。有些实验只是记录藻类等的生长

曲线，探究影响繁殖的因素，那么重点应该放在生长曲线的绘制、限定因素的影响机制以及实验不成功的分析；有些实验重点应该放在文献的综述，那么应该给出一份综述报告；有些为 DNA 序列的测定提供帮助，应当注重结果；有些强调过程中的探究，应当事无巨细地记录实验过程，探究实验操作的优化。每一种实验类型都应该对应不同的实验报告，而不应该限定一个模板。