

普通高等教育“十一五”精品课程建设教材

钟 鸣 马 慧 主编

# 生物技术 实验指导

Sheng Wu Ji Shu Shi Yan Zhi Dao



中国农业大学出版社

ZHONGGUONONGYEDAXUE CHUBANSHE

普通高等教育“十一五”精品课程建设教材

# 生物技术实验指导

钟 鸣 马 慧 主编

中国农业大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

生物技术实验指导/钟鸣,马慧主编. —北京:中国农业大学出版社,2008.6  
普通高等教育“十一五”精品课程建设教材  
ISBN 978-7-81117-276-8

I. 生… II. ①钟… ②马… III. 生物技术-实验-高等学校-教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 048498 号



书 名 生物技术实验指导

作 者 钟 鸣 马 慧 主 编

策划编辑 张秀环

责任编辑 张秀环

封面设计 郑 川

责任校对 陈 莹 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62731190,2620

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出 版 部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail cbsszs @ cau.edu.cn

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2008 年 6 月第 1 版 2008 年 6 月第 1 次印刷

规 格 787×980 16 开本 8 印张 143 千字

印 数 1~1 500

定 价 15.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 钟 鸣 马 慧

副主编 陈丽静 郭志富 张 丽

编 者 马 慧 李浩戈 刘少霞 陈 贵  
陈丽静 张 丽 钟 鸣 郭志富

主 审 钟文田 王学英

## 前 言

建立在分子生物学、分子遗传学、生物化学、微生物学、细胞学,以及工程、计算技术等基础之上的现代生物技术,在医药、农业、环境和海洋生物等领域催生的一批高技术产业,因其巨大的潜在效益和发展前景,已成为各国竞相抢占的制高点,必将成为 21 世纪的主导产业。

生物技术是以实验为基础的科学,实验方法和研究技术的不断进步,推动着学科理论与应用的发展。为了满足生物技术产业发展对人才的需求,在加强专业基础课教学的同时,必须注重培养专业人才的实验技能。为此,我们根据全国高等农业院校生物技术专业教学要求,总结近年来实验教学及科研实践经验,并参考国内外相关著作、教材及文献,汲取实验教学改进的新成果,以现行《生物技术专业实验》讲义为蓝本,重新编写了《生物技术实验指导》。

全书共分三章,第一章简要介绍了实验室规则、实验记录与报告的撰写要求,常用仪器的使用方法及注意事项,培养学生安全操作、整洁卫生、记录翔实、工作从容有序等良好的实验习惯。第二章主要以植物为研究对象,设计了在农业生物技术中广泛应用的有关基因工程、细胞工程等 19 个实验项目,包括植物愈伤组织的诱导、继代与分化,植物单细胞培养,原生质体分离,植物核酸的提取与电泳检测,以及 PCR 技术等基础操作实验,还包括植物组织脱毒快繁、原生质体融合、农杆菌介导转化及随机扩增多态性 DNA 分析等综合实验。第三章为实验项目中思考题的参考答案,帮助读者正确理解实验理论。

参加本书编写的人员是沈阳农业大学一批多年从事生物技术教学与科研的骨干教师,书中精选了本教研室认为学生必须掌握的教学实验项目,或在今后科研工作中经常遇到的实验操作,具有基础性、实用性和系统性;实验原理简明扼要,通俗易懂;操作方法具体详尽,并附有流程图,清晰明了,有利于初学者循序渐进、独立系统地掌握现代生物技术的基本操作技能。本书适用于高等农业院校生物技术、生物科学、农学、园艺、植保、林学等专业本科、研究生使用,亦可供相关专业人员参考。

本书承蒙沈阳农业大学生物技术专业的资深专家钟文田教授、王学英教授认真审阅,并提出了宝贵意见,特此感谢。

限于我们的经验和水平,不当之处在所难免,诚挚地欢迎广大读者提出批评和指正。

编 者

2008.1

# 目 录

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| <b>第一章 生物技术实验常识</b> .....          | ( 1 )   |
| 第一节 实验室规则.....                     | ( 1 )   |
| 第二节 实验记录及实验报告的书写.....              | ( 2 )   |
| 第三节 常用仪器的使用方法及注意事项.....            | ( 4 )   |
| <b>第二章 实验内容</b> .....              | ( 11 )  |
| 实验一 培养基的配制与灭菌.....                 | ( 11 )  |
| 实验二 植物胚愈伤组织的诱导.....                | ( 17 )  |
| 实验三 愈伤组织的继代与分化.....                | ( 20 )  |
| 实验四 植物分生组织培养快速繁殖.....              | ( 23 )  |
| 实验五 植物脱毒培养技术.....                  | ( 27 )  |
| 实验六 植物单细胞的分离和培养.....               | ( 32 )  |
| 实验七 植物原生质体的分离和培养.....              | ( 37 )  |
| 实验八 植物原生质体的融合.....                 | ( 42 )  |
| 实验九 植物基因组 DNA 的提取 .....            | ( 46 )  |
| 实验十 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 .....            | ( 51 )  |
| 实验十一 碱解法提取质粒 DNA .....             | ( 56 )  |
| 实验十二 DNA 纯度、浓度与相对分子质量测定.....       | ( 61 )  |
| 实验十三 植物组织 RNA 的提取 .....            | ( 65 )  |
| 实验十四 PCR 技术扩增 DNA 片段 .....         | ( 70 )  |
| 实验十五 DNA 的体外连接 .....               | ( 74 )  |
| 实验十六 大肠杆菌感受态细胞的制备和重组 DNA 的转化 ..... | ( 77 )  |
| 实验十七 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染检测技术.....        | ( 82 )  |
| 实验十八 农杆菌叶盘法转化目的基因.....             | ( 88 )  |
| 实验十九 随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD) .....    | ( 92 )  |
| <b>第三章 思考题参考答案</b> .....           | ( 95 )  |
| <b>附录</b> .....                    | ( 109 ) |
| <b>参考文献</b> .....                  | ( 118 ) |

# 第一章 生物技术实验常识

## 第一节 实验室规则

进入实验室的每一个人都必须遵守实验室有关安全的各项规定,以避免给自己和他人造成危害。生物技术专业实验室具有普通化学实验室常见的安全隐患,如易燃、易爆、化学毒害性物质,仪器伤人事故,水、电事故,还有接触生物毒害物质,发生生物感染等潜在安全因素。确保实验室不发生安全事故是教师和实验室管理人员及每位上实验课学生的责任。以下是必须注意的生物技术实验室基本安全规程。

(1)熟悉所有易燃、易爆、有毒、腐蚀、生物毒害等有害物质的标识(教师和实验室管理人员必须保证这些物质有标识,并存放于安全的地方)(图 1-1),实验操作中必须小心谨慎,穿工作服,戴工作手套,有的还必须戴安全眼镜,一般要求在通风橱中进行操作。



图 1-1 有害物质标识



(2)对具有放射性的物质必须在教师指导下,严格限制在规定的放射化学实验室内使用,不可在普通实验室内使用。

(3)严禁在实验室吸烟、饮食,以免误食和吸入有毒物质。

(4)自觉地遵守课堂纪律,维护课堂秩序,不迟到,不早退,不大声喧哗,保持室内安静。

(5)在实验过程中要听从教师的指导,严肃认真地按操作规程进行实验,并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。

(6)环境和仪器的清洁整齐是搞好实验的重要条件。实验台面、试剂药品架上必须保持整洁,仪器药品要井然有序。公用试剂用毕应立即盖严放回原处。勿使试剂药品洒在实验台面和地面上。实验完毕,须将药品试剂排列整齐,仪器要洗净倒置放好,将实验台面抹拭干净,经教师验收仪器后,方可离开实验室。

(7)使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约,不要使用过量的药品和试剂。应特别注意保持药品和试剂的纯净,严防混杂。不要将滤纸和称量纸做其他用途。使用和洗涤仪器时,应小心仔细,防止损坏仪器。使用贵重精密仪器时,应严格遵守操作规程,发现故障立即报告教师,不要自己动手检修。

(8)实验完毕,应立即关好煤气开关和水龙头,断开电闸,各种玻璃器皿应放置稳妥。离开实验室前应认真负责地进行检查,严防事故。

(9)废弃液体(强酸、强碱溶液必须先用水稀释)可倒入水槽内,同时放水冲走。废纸、火柴头等固体废物及带有渣浮沉淀的废液都应倒入废品缸内,不得倒入水槽或到处乱扔。

(10)实验室内一切物品,未经本室负责教师批准严禁携出室外,借物必须办理登记手续。

(11)对实验内容和安排不合理的地方可提出改进意见。对实验中出现的一切反常现象应进行讨论,并大胆提出自己的看法,做到生动、活泼、主动地学习。

## 第二节 实验记录及实验报告的书写

### 一、实验记录

每次实验前应认真预习,将实验名称、目的和要求、原理、内容、操作方法或步骤等简单扼要地写在记录本上。实验记录本应标上页码,不要撕去任何一页,更不要擦抹及涂改,写错时可以划去重写。记录时必须使用钢笔或圆珠笔。实验中观察到的现象、结果和数据,应及时地直接记在记录本上,绝对不可以用纸片做记录

或写在草稿纸上。原始记录必须准确、详尽、清楚。从实验开始就应养成这种良好的习惯。在实验条件下观察到的现象,应如实仔细地记录下来,做到正确记录实验结果、切忌夹杂主观因素,这是十分重要的。在定量实验中观测的数据,如称量物的质量、滴定管的读数、分光光度计的读数等,都应设计表格准确记下读数,并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如,光密度值为 0.050 不应写成 0.05。每一项结果最少要重复观测 2 次以上,当符合实验要求并确知仪器工作正常后再写在记录本上。实验记录的每一个数字,都反映 1 次测量结果,重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本的另一页上,一般写在正式记录的左侧。总之,实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。实验中使用仪器的类型、编号及试剂的规格、化学式、分子质量、准确的浓度等,都应记录清楚,以便总结实验时进行核对和作为查找成败原因的参考依据。如果发现记录的结果有可疑、遗漏、丢失等,都必须重做实验。将不可靠的结果当做正确的记录,在实际工作中可能造成难以估量的损失。因此,在学习期间应一丝不苟,努力培养严谨的科学作风。

## 二、实验报告的书写

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。实验报告一般包括以下几个部分:

- (一)目的和要求
- (二)内容
- (三)原理
- (四)试剂和仪器
- (五)操作步骤
- (六)结果与讨论

在写实验报告时,可以按照实验内容分别写原理、操作方法、结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法(或步骤)可以采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示。某些实验的操作方法可以与结果或讨论部分合并,自行设计各种表格综合书写。结果与讨论包括实验结果及观察现象的小结、对实验遇到的问题和思考题进行探讨,以及对实验的改进意见等。

### 第三节 常用仪器的使用方法及注意事项

#### 一、可调式微量移液器(图1-2,图1-3)



图 1-2 可调式微量移液器的结构

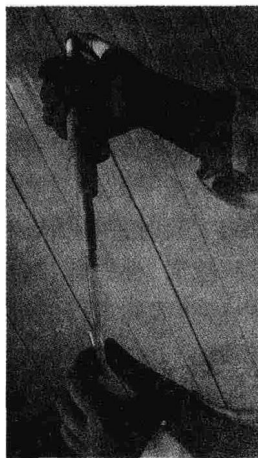


图 1-3 标准手持姿势

活塞移动的距离是由调节轮控制螺杆机构来实现的。推动按钮带动推杆使活塞向下移动,排出了活塞腔内的气体,松手后,活塞在复位弹簧的作用下恢复到原位,从而完成一次吸液过程。移液器内部柱塞分 2 档行程,第 1 档为吸液,第 2 档为放液,手感十分清楚。

#### (一)操作方法

1. 准备 将移液器吸头(枪头)套在移液器杆上,稍加旋转压紧枪头使之与枪杆间无空气间隙。转动调节轮至所需体积,按图 1-4a 所示手握移液器。

2. 吸液 轻轻按下推动按钮,使按钮由位置“0”推到位置“1”,将枪头垂直浸入液体内 2~4 mm 处,缓慢松开按钮,即使按钮由位置“1”复位到位置“0”,完成吸液过程,停 1~2 s 后将移液器下端枪头移出液面。

3. 排液 将枪头尖部以  $10^{\circ}\sim 45^{\circ}$  倾斜于容器内壁,缓慢按下推动按钮至位置“1”,继续按至位置“2”处,排放所有液体。停 1~2 s 后移走移液器,松开推动按钮,按下卸尖按钮,压下枪头,即全部完成一次吸、排液过程。

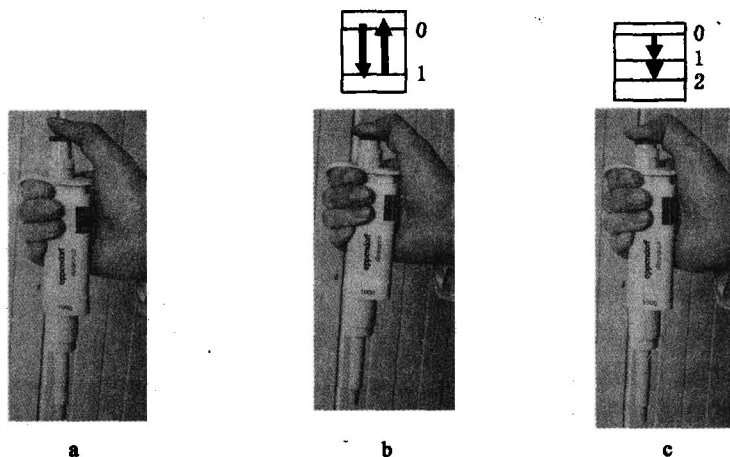


图 1-4 可调式移液器的使用

a. 准备 b. 吸入 c. 排出

## (二) 使用注意事项

(1) 应看准移液器的最大量程, 切勿拧过头, 否则易导致调节轮失灵甚至报废, 造成不必要的经济损失; 移液器是实验必备量液精密仪器, 请不要用移液器敲打桌面等物体, 并严防摔落。

(2) 排液时要按到二档位置至图 1-4c 所示位置“2”, 以便排净液体。

(3) 移液过程中每步操作一致可获得最佳重复性, 请注意移液速度、平稳性及进入试样的深度, 并应垂直握持移液器。

(4) 为了避免液体进入移液器套筒内, 压放按钮时要慢且稳, 放液时应保持移液器垂直, 吸头中有液体时绝不倒放。

(5) 为获得较高的精度, 再取液时应先用吸液的方法浸润吸头尖, 以消除误差。当所吸液体是血清蛋白质及有机溶剂时, 吸头内壁会明显残留一层“液膜”, 如果吸头只用一次, 误差可能会超出规定的误差范围, 因为这个值对同一个吸头是一个常数, 如果用这个吸头再吸一次, 则精度是可以保证的。

(6) 浓度大的液体其消除误差的补偿量由试验确定, 其取液量可通过增加或减少容量计上的读数加以补偿。

## 二、高压灭菌锅(也称蒸汽消毒器)(图 1-5)

### (一)操作方法(LDZX-40CI)

- (1)按“POWER”键打开仪器电源。
- (2)按“MODE”键选择消毒模式(琼脂、普通液体、固体模式)。
- (3)按“SET/ENT”键,消毒温度开始闪动,用“▲”或“▼”将数字改为所需要的数值。
- (4)按“NEXT”键消毒时间开始闪动,用“▲”或“▼”将数字改为所需要的消毒时间。
- (5)按“NEXT”键排气速率开始闪动,用“▲”或“▼”将排气改为所需要的数值(在固体模式中没有此项)。
- (6)按“NEXT”键保温温度值开始闪动,用“▲”或“▼”将数字改为所需要的保温数值(在普通液体和固体模式中没有此项),按“SET/ENT”键保存所设定的参数。



图 1-5 高压灭菌锅

### (二)使用注意事项

- (1)每次使用前必须检查灭菌腔内是否有足够的水。
- (2)消毒完毕,必须等压力表指示压力回到零位后方可开盖。
- (3)每次使用前必须检查手动排气旋钮是否关闭。
- (4)如果长期不使用必须将灭菌腔内的水排干。
- (5)要经常检查排气壶内的水位是否在安全线内。
- (6)建议使用专用电源。
- (7)灭菌程序运行完毕后,蜂鸣器发出信号,但此时且不可立即打开高压锅盖,要等待自然冷却,锅内压力下降后才可启盖,过早开启会引起锅内水再沸腾造成烫伤,特别是内有灭菌的液体时更应注意,最好等到温度下降至 80℃ 以下再启盖为安全。在没有液体灭菌情况下,可打开压力锅的“EXAUST”进行放气,以缩短锅内降温时间。
- (8)为了安全和保证灭菌的效果,高压灭菌锅应定期进行内侧的清洗和各部的检修。

### 三、分光光度计(751)

#### (一)操作方法

1. 预热仪器 为使测定稳定,将电源开关打开,使仪器预热 20 min,为了防止光电管疲劳,不要连续光照。预热仪器时和在不测定时应将比色皿暗箱盖打开,使光路切断。

2. 选定波长 根据实验要求,转动波长调节器,使指针指示所需要的单色光波长。

3. 固定灵敏度档 根据有色溶液对光的吸收情况,为使吸光度读数为 0.2~0.7,选择合适的灵敏度。为此,旋动灵敏度档,使其固定于某一档,在实验过程中不再变动。一般测量固定在“1”档。

4. 调节“0”点 轻轻旋动调“0”电位器,使读数表头指针恰好位于透光度为“0”处(此时,比色皿暗箱盖是打开的,光路被切断,光电管不受光照)。

5. 调节  $T=100\%$  将盛蒸馏水(或空白溶液或纯溶剂)的比色皿放入比色皿座架中的第一格内,有色溶液放在其他格内,把比色皿暗箱盖子轻轻盖上,转动光量调节器,使透光度  $T=100\%$ ,即表头指针恰好指在  $T=100\%$  处。

6. 测定 轻轻拉动比色皿座架拉杆,使有色溶液进入光路,此时表头指针所示为该有色溶液的吸光度  $A$ 。读数后,打开比色皿暗箱盖。

7. 关机 实验完毕,切断电源,将比色皿取出洗净,并将比色皿座架及暗箱用软纸擦净。

#### (二)使用注意事项

1. 要防止光电管疲劳 不测定时必须将比色皿暗箱盖打开,使光路切断,以延长光电管使用寿命。

##### 2. 比色皿的使用方法

(1)拿比色皿时,手指只能捏住比色皿的毛玻璃面,不要碰比色皿的透光面,以免沾污。

(2)清洗比色皿时,一般先用水冲洗,再用蒸馏水洗净。如比色皿被有机物沾污,可用盐酸—乙醇混合洗涤液(1:2)浸泡片刻,再用水冲洗。不能用碱溶液或氧化性强的洗涤液洗比色皿,以免损坏。也不能用毛刷清洗比色皿,以免损伤它的透光面。每次做完实验时,应立即洗净比色皿。

(3)比色皿外壁的水用擦镜纸或细软的吸水纸吸干,以保护透光面。

(4)测定有色溶液吸光度时,一定要用有色溶液润洗比色皿内壁几次,以免改变有色溶液的浓度。另外,在测定一系列溶液的吸光度时,通常都按由稀到浓的顺

序测定,以减小测量误差。

(5)在实际分析工作中,通常根据溶液浓度的不同,选用液槽厚度不同的比色皿,使溶液的吸光度控制在 0.2~0.7 之间。

#### 四、垂直板电泳系统(BIO RAD 3000)(图 1-6)

所需器材:凝胶模、长短玻璃板、夹心式垂直板电泳槽和直流稳压电泳仪等。

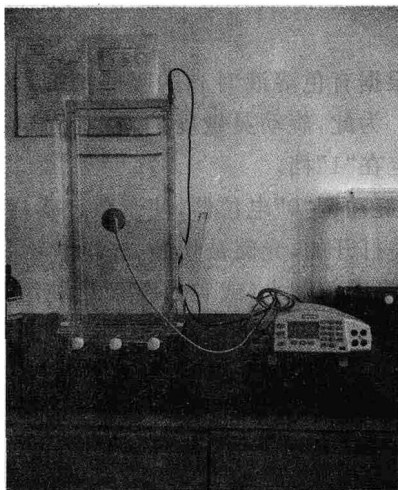


图 1-6 垂直板电泳系统(BIO RAD 3000)

##### (一)操作程序

- (1)安装夹心式垂直板电泳槽。
- (2)将装好胶的长短玻璃板分别插到凹形槽中,将凹形槽放入电泳槽中。
- (3)在电泳槽中加入电极缓冲液,点样品。
- (4)将直流稳压电泳仪与电泳槽连接,打开电泳仪开关,调节电流和电压。
- (5)当蓝色染料迁移至凝胶下缘 1 cm 时,停止电泳,关电源。
- (6)将实验器材严格地清洗,阴干。

##### (二)使用注意事项

- (1)安装电泳槽和镶有长短玻璃板的凹形槽时,位置要端正,均匀用力,以免缓冲液渗漏或玻璃板压裂。
- (2)电泳时,电泳仪与电泳槽间正负极不能接错,选用合适的电流、电压。

## 五、高速冷冻离心机

### (一) 操作程序

(1) 打开离心机盖,将离心管放入转子体内,离心管必须成偶数对称放入(离心管试液应称量加入),注意把转子体上的螺钉旋紧,并重新检查试管是否对称放入,螺钉是否旋紧。

(2) 关上离心机盖后,用手检查门盖是否关紧。

(3) 设置转子号、转速、温度、时间。

在停止状态下时,用户可以设置转子号、转速、温度、时间,按设置(SET)键,此时离心机处于设置状态,停止灯亮、运行灯闪烁;在运行状态下时,用户只能设置转速、温度、时间,按设置(SET)键,此时离心机处于设置状态,此时运行灯亮、停止灯闪烁(停止状态下按“SET”键可以在时间、温度、转速和转子号之间循环选择;运行状态下按“SET”键可以在时间、温度和转速之间循环选择)。

### (二) 使用注意事项

(1) 离心机在运转时,不得移动离心机,不要打开门盖。

(2) 安放离心机的台面应坚实平整,四只橡胶机脚都应与台面接触和均匀受力,以免产生振动。

(3) 离心管加液尽可能目测均匀,若加液差异过大运转时会产生大的振动,此时应停机检查,使加液符合要求,离心试管必须成偶数对称放入。

(4) 若运转时有离心试管破裂,会引起较大振动,应立即停机处理。

(5) 电源必须接地线。

## 六、PCR 仪(PTC-200)(图 1-7)

### (一) 操作程序

(1) 打开主机电源,进入主菜单。

(2) 按箭头键←↑→↓选择文件子菜单,对原有程序进行编辑,或新建新程序。

(3) 新建扩增程序:在文件菜单 Enter 中,分步设置温度和反应时间等参数。

(4) 返回主菜单中,调出所设计的扩增程序,按 Run,运行程序。

(5) 运行程序结束后,取出扩增管,冷却热盖



图 1-7 PCR 仪(PTC-200)



装置,关闭电源。

(6)清理台面,认真做好仪器使用记录。

## (二)使用注意事项

### 1. 电源

(1)本机对电源无特殊要求,运用范围宽,交流 100~240 V,但电源电压波动不能太大,以免损坏机内器件,否则应考虑加装稳压电源。

(2)本机在运行程序过程中,禁止用切断电源的方法结束实验,原因有二:其一、对执行程序不利;其二、电源切断后,风机停转,元件散热不畅,易积热损坏。

2. 样品温度探头 样品温度探头在使用过程中,应加有少许矿物油等不易挥发液体。加油要适量,浸没电极头即可,禁止加水及其他易挥发液体;禁止不加油使用,以免电极头受热不均,积热损坏。平时应注意探头有无破裂,及探头内油是否外漏。

3. LED 显示屏 本机应避免使用紫外线消毒,以防止破坏 LCD 液晶显示屏,使用过程中,应避免硬性物体磕碰、划伤,以免损坏。

4. 清洗注意事项 清洗本机基座时,应避免液体进入仪器内部。实验过程中加有放射性物质时,清洗应格外当心。

5. 程序结束后,产物要及时取出 如需保存应在 10℃而不要在 4℃长期保存。