



高等学校创新型实验教材

高等学校生物类“十三五”规划教材

# 生物工程专业实验指导

SHENGWUGONGCHENG  
ZHUANYE SHIYAN ZHIDAO

李加友 主 编

尤忠毓 朱长俊 副主编

化学工业出版社



高等学校创新型实验教材

高等学校生物类“十三五”规划教材

# 生物工程专业实验指导

SHENGWUGONGCHENG  
ZHUANYE SHIYAN ZHIDAO

李加友 主 编

尤忠毓 朱长俊 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

《生物工程专业实验指导》根据生物工程人才培养方案,将相关核心课程实验内容编写在一起,力求结构更紧凑,内容更合理,实用性更强,更好体现人才培养方案的意图。内容主要包括生物工程实验室管理和要求、生物化学实验、微生物学实验、分子生物学与基因工程实验、发酵工程实验、分离工程实验共38个实验。使专业学生一本在手,可以解决专业上很多问题。既培养学生分析问题和解决问题的能力,增强创新意识和创新能力;又大大提高了指导书的使用效率。本书同时也进行了专业特色融入实验内容探索,使用者可以根据实际情况开展相关实验。

本书可供高等学校生物工程、生物技术、食品工程、制药工程等专业作为实验指导书使用,也可供相关专业科研工作者作为参考书使用。

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程专业实验指导/李加友主编. —北京:化学工业出版社, 2018.12

高等学校创新型实验教材 高等学校生物类“十三五”规划教材  
ISBN 978-7-122-33119-9

I. ①生… II. ①李… III. ①生物工程-实验-高等学校-教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 228955 号

---

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| 责任编辑: 陆雄鹰 杨 菁 闫 敏 | 文字编辑: 焦欣渝 |
| 责任校对: 边 涛         | 装帧设计: 张 辉 |

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)  
印 刷: 三河市航远印刷有限公司  
装 订: 三河市宇新装订厂  
787mm×1092mm 1/16 印张 7¼ 字数 163 千字 2019 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 售后服务: 010-64518899  
网 址: <http://www.cip.com.cn>  
凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

# 前言

一般来说,工科学生大学期间需要多门实验课程的训练,每门课程都有相应的实验指导书。但是我们也发现,由于每门实验课程指导书都追求全面,所以导致很多重复;同时对于一个专业来说,知识系统显得割裂,不能很好体现人才培养方案的意图。在这种情况下,我们根据普通本科院校生物工程专业所设置核心课程对实验项目及内容的要求,进行了创新和尝试,把生物工程专业几门核心课程实验编写到一起,成为这本《生物工程专业实验指导》,力求结构更紧凑,内容更合理,实用性更强,使专业学生一本在手,可以解决专业上很多问题,大大提高指导书的使用效率;同时本书对如何将专业特色体现在实验课中,也进行了深入的探索。本书是生物工程专业一线教师通过几年的教学改革和实践获得的成果,目的是帮助学生巩固专业理论知识,掌握基本的实验方法和操作技能,培养学生分析问题和解决问题的能力,增强创新意识和创新能力。

全书共分六章,第一章为生物工程实验室管理和要求,主要是生物工程专业学生进入实验室需要了解和掌握的相关要求,包括实验室管理总则、实验室人员行为规范、实验设备及耗材管理、实验室药品管理、微生物实验室菌种管理制度及实验室安全卫生管理。通过学习教育,使学生掌握生物工程专业实验室基本要求,学会使用常见的仪器设备,获得实验的基本技能,养成良好的实验习惯。第二章为生物化学实验,生物化学作为专业基础课程,具有重要的地位。本章共有 9 个实验,旨在让学生逐步掌握生物化学(简称生化)技术、接受生化思维,对生化作为基础学科有更深入的理解。本章内容主要包括色谱、离心、电泳、滴定、分光光度、酶学、简单分子生物学等相关实验。第三章为微生物学实验,共安排了 12 个实验,包括光学显微镜使用、微生物形态观察、微生物染色及大小测定等基本技能实验和培养基配制、平板分离技术、细菌总数测定等综合实验技术,另外设置了环境因素对微生物的影响、酸奶制作、微生物诱变及生理生化反应等探索性实验,通过实验,学生可掌握微生物的观察、测量及培养的基本操作方法,并加强对微生物在实践中应用的理解。第四章为分子生物学与基因工程实验,包括 9 个实验,让学生在生化和微生物实验的基础上开展一些前沿实验内容,主要以系列实验方式呈现,包括基因组提取、PCR 扩增、酶切、感受态细胞制备、重组子构建、质粒转化与鉴定、外源基因的表达检

测等，是学生提高生物工程能力的重要举措。第五章为发酵工程实验，包括 5 个实验，分别为菌种制备与保藏、发酵过程控制、活性干酵母制备、酵母固定化技术以及灵菌红素制备等，学生通过实验能够对专业知识有更好的理解，并能掌握设备的工作原理，为将来继续深造和就业奠定基础。第六章为分离工程实验，包括 3 个综合性实验，涉及提取、分离纯化、结构鉴定等，是生物工程专业学生掌握相关技能的重要途径。

本书所编写的实验项目均在编者所在学校经过多年实践和应用，也历经多次修改。相信成书后一定会对普通高校生物工程专业学生开展实验、理解实验目的具有较好的指导作用。

本书由李加友担任主编，尤忠毓、朱长俊担任副主编；由嘉兴学院生物与化学工程学院生物工程专业李加友、尤忠毓、朱长俊、刘晓侠、于建兴、王玉洁、孙诗清等教师编写；朱长俊进行了统稿工作。

本书的出版得到了嘉兴学院教务处、生物与化学工程学院领导的大力支持，在此表示衷心感谢。

由于时间仓促、作者水平有限，书中的疏漏之处敬请读者指正。

编 者

# 目 录

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 第一章 生物工程实验室管理和要求 .....          | 1  |
| 第一节 实验室管理总则 .....               | 1  |
| 第二节 实验室人员行为规范 .....             | 2  |
| 第三节 实验设备及耗材管理 .....             | 3  |
| 第四节 实验室药品管理 .....               | 4  |
| 第五节 微生物实验室菌种管理制度 .....          | 5  |
| 第六节 实验室安全卫生管理 .....             | 6  |
| 第二章 生物化学实验 .....                | 8  |
| 实验一 氨基酸纸色谱 .....                | 8  |
| 实验二 蛋白质浓度测定(凯氏定氮法) .....        | 11 |
| 实验三 福林-酚试剂法测定蛋白质的浓度 .....       | 15 |
| 实验四 酵母 RNA 的提取及组分鉴定 .....       | 18 |
| 实验五 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质 .....      | 20 |
| 实验六 酶促反应的影响因素 .....             | 23 |
| 实验七 碱法提取质粒 DNA .....            | 26 |
| 实验八 VC 含量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法 ..... | 29 |
| 实验九 过氧化氢酶米氏常数( $K_m$ )的测定 ..... | 31 |
| 第三章 微生物学实验 .....                | 34 |
| 实验十 普通光学显微镜的使用及微生物形态观察 .....    | 34 |
| 实验十一 细菌的革兰氏染色 .....             | 38 |
| 实验十二 放线菌、霉菌的形态观察 .....          | 41 |
| 实验十三 微生物大小测定和显微计数 .....         | 43 |
| 实验十四 培养基的配制 .....               | 47 |
| 实验十五 微生物的平板分离技术 .....           | 50 |
| 实验十六 环境因素对微生物生长的影响 .....        | 53 |
| 实验十七 水中细菌总数的测定 .....            | 56 |

|                                             |            |
|---------------------------------------------|------------|
| 实验十八 酸奶的制作 .....                            | 59         |
| 实验十九 空气中微生物数量测定 .....                       | 61         |
| 实验二十 微生物的诱发突变 .....                         | 63         |
| 实验二十一 微生物的生理生化反应 .....                      | 65         |
| <b>第四章 分子生物学与基因工程实验 .....</b>               | <b>68</b>  |
| 实验二十二 细菌基因组 DNA 的提取 .....                   | 68         |
| 实验二十三 动物基因组 DNA 的提取 .....                   | 70         |
| 实验二十四 植物基因组 DNA 的提取 .....                   | 72         |
| 实验二十五 PCR 扩增目的 DNA .....                    | 74         |
| 实验二十六 DNA 分子的酶切反应 .....                     | 77         |
| 实验二十七 感受态细胞的制备 .....                        | 79         |
| 实验二十八 重组子的构建 .....                          | 81         |
| 实验二十九 质粒的转化与鉴定 .....                        | 83         |
| 实验三十 外源基因的表达检测 .....                        | 85         |
| <b>第五章 发酵工程实验 .....</b>                     | <b>87</b>  |
| 实验三十一 菌种的制备与保藏 .....                        | 87         |
| 实验三十二 酵母菌的发酵过程控制 .....                      | 89         |
| 实验三十三 活性干酵母的制备 .....                        | 94         |
| 实验三十四 酵母固定化技术 .....                         | 97         |
| 实验三十五 灵菌红素的发酵制备 .....                       | 98         |
| <b>第六章 分离工程实验 .....</b>                     | <b>100</b> |
| 实验三十六 灵菌红素的分离纯化与结构鉴定 .....                  | 100        |
| 实验三十七 Ni-NTA 金属螯合法纯化重组 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ..... | 103        |
| 实验三十八 酵母蔗糖酶的提取与分离纯化 .....                   | 106        |
| <b>参考文献 .....</b>                           | <b>110</b> |

## 試賦成計員大室實案耗荷二第

1. 實驗設備管理 (1) 實驗設備管理是指對實驗室內各種儀器、設備、器材、藥品等的管理。

# 第一章 生物工程實驗室管理和要求

圖1-1 實驗室內各種儀器、設備、器材、藥品等的管理 (2)

## 第一节 实验室管理总则

(1) 实验室管理是所有实验人员共同的责任，每一位实验人员都应对实验室的正常、高效运转尽自己的义务和责任，自觉遵守实验室的规章制度和管理办法。

(2) 本章程为实验人员的行为规范，目的是使大家在一个有组织、有秩序的环境下工作，为大家提供一个能充分开展实验教学的空间，使大家养成良好的工作习惯，为获得良好的实验结果奠定基础。

(3) 实验室的管理原则如下。

① 岗位责任制原则 实验室的每一项管理工作都有明确的责任要求，并有专人负责。

② 规范化原则 管理制度化，从设备、器材、药品等的使用到实验方法、安全卫生都制定标准化的规范，大家都按照规范执行，以确保管理工作的有效性和连续性。

③ 记录监督原则 实验室管理的各方面都要求有及时、准确的记录，以保证实验室所有工作的可追溯性。

## 第二节 实验室人员行为规范

- (1) 严格遵守本单位对于实验室管理相关的各项规章制度。
- (2) 每位实验室成员都应以主人翁精神参与实验室的建设与管理，积极参加实验室的各种活动（包括公益劳动），自觉维护本实验室的声誉。
- (3) 对所有违规人员和行为，管理员将进行登记，屡教不改者，从重处理。
- (4) 实验室内严禁吸烟、喝酒和吃零食。
- (5) 不准在实验室大声喧哗、随地吐痰、打闹。
- (6) 未经许可，不得随意把其他无关人员带入实验室。
- (7) 爱护仪器设备，节约用水、电及实验材料等，注意安全。
- (8) 室内设备仪器不得擅自拆卸、挪动，与本人实验无关的设备不可随意开启。
- (9) 实验仪器的使用要严格遵守操作规程，并认真填写设备使用记录，设备存放应做到整洁有序，便于检查使用。
- (10) 必须注意实验安全，加强安全防范意识。
- (11) 注意公共卫生，不准随意丢弃杂物废纸等，影响实验室环境卫生。
- (12) 高温、高压及易燃易爆实验，需要特别注意安全防范。
- (13) 最后离室者，做好安全检查，检查仪器电源、空调、水、气瓶、门、窗等是否关好，并在最后离室登记簿上签名。

## 第三节 实验设备及耗材管理

### 1. 实验设备管理

(1) 实验设备按指定位置摆放,不得擅自改变仪器设备及其附件的存放位置。确需移动位置时,必须经管理人员同意,使用后应及时整理复原。

(2) 精密仪器须专人负责管理,使用者经过培训合格后方能使用,对于没有按规定操作导致设备故障者,要追究其责任。

(3) 严格遵守各种仪器的操作规程和登记制度,凡对拟使用的仪器的操作不熟悉者,务必先学习使用方法。发现仪器故障者,有义务立即向管理人员报告,以便及时维修。凡属违反操作规程而损坏仪器者,视情况进行处罚。

(4) 各通电设备在使用完毕后,应切断电源,以保证安全。

(5) 必须严格执行仪器设备运行记录制度,记录仪器运行状况、开关机时间。

(6) 使用前,首先检查仪器清洁卫生,仪器是否有损坏,接通电源后,检查是否运转正常。发现问题及时报告管理人员,并找上一次使用者问明情况,知情不报者追查当次使用者责任。

(7) 显微镜的目镜在使用前后必须用浸有乙醇(酒精)的透镜纸擦净。

(8) 微生物实验后,实验室须立即收拾整洁、干净。如有菌液污染须用 3% 来苏尔液或 5% 石炭酸液覆盖污染区半小时后擦去(含芽孢类菌液污染应延长消毒时间)。带菌工具(如吸管、玻璃棒等)在洗涤前须用 3% 来苏尔液浸泡消毒。

### 2. 玻璃器材的存放、洗涤

(1) 使用玻璃器材应轻拿轻放,严格按照其使用条件来使用。

(2) 实验所用的玻璃仪器应按照标签存放于指定位置,使用后应及时洗涤干净并放回原处。

## 第四节 实验室药品管理

### 1. 药品试剂的使用、存放及购买

(1) 对实验室内易燃、易爆、腐蚀性和剧毒性药品应分类管理并有相应的药品目录,使用时应做好领用记录(领用人、领用量、领用日期及用途)。

(2) 所有药品必须有明显的标志。对字迹不清的标签要及时更换,对过期失效和没有标签的药品不准使用,并要进行妥善处理。

(3) 使用强酸强碱等化学试剂时,应按规定要求操作和储存;使用有机溶剂和挥发性强的试剂时应在通风良好的地方或在通风橱内进行。

(4) 同种药品或试剂使用完后再开启新瓶,药品使用完后放回原处。

(5) 采购药品前应先盘查药品柜内库存,然后按需购买。

### 2. 公用溶液的配制、存放及标记

(1) 因实验需要而自行配制的公用溶液存放于指定位置的实验台面上。

(2) 试验药剂容器都要有标签,标签上要注明溶液名称、浓度、配制者姓名、配制日期等信息;无标签或标签无法辨认的试剂都要当成危险物品重新鉴别后小心处理,不可随便乱扔,以免引起严重后果。

(3) 实验室中摆放的药品如长期不用,应放到药品储藏室,统一管理。

## 第五节 微生物实验室菌种管理制度

### 1. 菌种保存

(1) 实验室全部菌种都应由菌种负责人记录在册并妥善保存,菌种上应贴上明显的标签,标明名称、编号、购买日期等。

(2) 每天检查一次保存菌种的冰箱温度,并作记录,每周检查菌种管的棉塞是否松动,菌种外观及干燥状态,如有异常应及时处理,并填写菌种检查记录。

(3) 每次移植培养后,要与原种的编号、名称逐一核对,确认培养特征和温度无误后,再继续保存。

### 2. 菌种的传代、接种和使用

(1) 实验室正在使用的菌种由各使用者自行纯化和更新斜面。使用者结束该菌种的使用后要将自己使用的菌株纯化后交负责人保存,并填写使用记录。

(2) 每株菌种应建立菌种使用及传代记录,斜面菌种应根据其特性决定传代时间间隔。

(3) 实验人员传代时使用须核对名称、编号,传代数及日期,所用培养基。

(4) 任何人未经领导允许,不得私自将菌种带出实验室或给他人。

## 第六节 实验室安全卫生管理

### 1. 安全

(1) 实验室规定在进行任何实验操作时都应穿着实验服(白大褂),若因违反此规定而导致的衣物损伤甚至人身伤害应自己负责。

(2) 实验时小心仔细,全部操作应严格按照操作规程进行,禁止用嘴吸取菌液或试剂。万一遇有盛菌试管或瓶不慎打破、皮肤灼伤等意外情况发生时,应立即报告实验室管理人员,及时处理,切勿隐瞒。

(3) 涉及挥发性、刺激性及有毒试剂的操作必须在通风橱内进行,对违规者追究其责任。进行有毒、有害、有刺激性物质或有腐蚀性物质操作时,应戴好防护手套,在特定实验台上操作,不要污染其他工作台。

(4) 实验过程中,切勿使乙醇(酒精)、乙醚、丙酮等易燃药品接近火焰。如遇火险,应先关掉电源,再用湿布或沙土掩盖灭火,必要时用灭火器。

(5) 消防器材要定时检测,放置在便于使用的地方,保证随时可用,且其周围不可堆放其他物品、杂物。

(6) 实验人员都必须熟悉实验室内水、电、气开关的分布情况,在遇到紧急情况的时候应立刻关闭相应的开关。还应该熟悉大楼的各种应急措施,包括灭火器和火情警铃按钮。

(7) 火情紧急对策。若发现火情,应立即呼叫,并拨 119 报火警。

(8) 实验室内严禁吸烟,加强对室内易燃品、易爆品、腐蚀性物品等的管理,严格按实验规程操作。

(9) 实验室产生的工作废液,应妥善处理。

(10) 工作结束后,清理工作过的台面及区域,保持整洁。

(11) 实验完毕后和下班离开实验室时,应切断电源(必须通电的除外)、水源、气源、清理实验场所、关好门窗后方能离开。所有实验需过夜的,应安排人员值守。

(12) 钥匙为实验室工作人员进入实验室的通行证,不得转借。钥匙的持有者应对实验室的安全负责。

### 2. 卫生

实验室管理人员应定期彻底打扫实验室、无菌室,擦拭窗户、桌面、仪器、水池及地面。每日安排值日生,负责垃圾和水池的清理。

(1) 实验台 保持实验台的清洁卫生。用完的试剂应立即放归原处。养成良好的工作习惯,及时处理实验过程中使用过的器皿、废液、废物等。

(2) 无菌室和超净台 使用无菌室和超净台的人员,在用完后,需及时使用 84 消毒液清洁无菌室和超净工作台。

(3) 仪器设备 仪器使用完后,要及时清理,盖上仪器罩。保持仪器设备干净,无尘。

(4) 水池及水池柜体内面和地面 每日值日生要负责清洁水池及水池柜体内面和地面。固体物(如固态培养基等)严禁倒入水池。

(5) 办公区 办公区应保持整洁。各种杂物和废弃物应及时清理。大家有责任保持环境整洁。合理使用办公区的仪器,节省耗材,自觉遵守其相关的规定。

## 第二章 生物化学实验

### 实验一 氨基酸纸色谱

#### 一、实验目的

1. 通过对氨基酸的分离和鉴定，掌握纸色谱的基本原理及操作方法。
2. 通过实验，理解氨基酸与茚三酮的显色反应原理，掌握显色反应现象。

#### 二、实验原理

色谱法又称层析法，是一项重要的分离分析技术，利用混合物中各组分理化性质的不同，使各组分以不同程度分配在两相中。

根据色谱的工作原理可分为：分配色谱、吸附色谱、亲和色谱、离子交换色谱。根据色谱支持物的不同可分为：纸色谱、柱色谱、薄层色谱、凝胶过滤色谱。氨基酸的纸色谱属于分配色谱，其原理是利用各种物质在两种互不溶解的溶剂中分配系数的不同，从而达到分离的目的。分配色谱一般用于分离在水和有机溶剂中都有一定溶解度的混合物。

纸色谱的分配过程是一部分溶质随有机相（展层溶剂）移动，离开原点进入无溶质

区，并进行重新分配，不断向前移动。随着有机相不断向前移动，溶质不断地在两相间进行可逆的分配（图 2-1）。一种物质在两相中达到平衡时，在两相中的浓度之比是一个常数，称为分配系数（ $K_D$ ）。

$$K_D = \frac{\text{物质在流动相中的浓度}}{\text{物质在固定相中的浓度}}$$

由于各种物质的分配系数（ $K_D$ ）不同，随展层溶剂移动的速率也不同，从而达到分离的目的。移动速度可用比移值（ $R_f$ ）或迁移率表示：

$$R_f = \frac{\text{色斑中心至上样原点中心的距离}}{\text{溶剂前缘至上样原点中心的距离}}$$

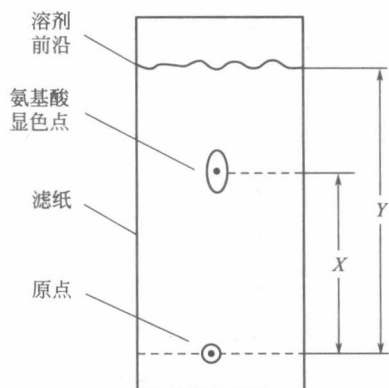


图 2-1 氨基酸纸色谱示意图

对于水-正丁醇的溶剂体系, 氨基酸极性越小,  $K_D$  值越大,  $R_f$  值也越大, 一定时间内随流动相迁移的距离越大, 反之迁移距离越小。

### 三、器材和试剂

#### 1. 器材

展开槽, 色谱滤纸 (约  $15\text{cm} \times 15\text{cm}$ ), 电吹风机, 喷雾器, 毛细管, 铅笔, 针线, 烘箱等。

#### 2. 试剂

(1) 氨基酸标准液  $6\text{mg/mL}$ 。

(2) 未知氨基酸溶液  $6\text{mg/mL}$ 。

(3) 展层剂 水饱和的正丁醇 (或苯酚) 溶液, 即 4 份水饱和的正丁醇和 1 份醋酸的混合物。将  $20\text{mL}$  正丁醇和  $5\text{mL}$  醋酸放入分液漏斗中, 与  $15\text{mL}$  水混合, 充分振荡, 静置后分层, 放出下层水层。取扩展剂倒入培养皿中备用。

(4) 显色剂  $0.3\%$  茚三酮丙酮溶液。

### 四、实验内容

#### 1. 色谱滤纸的准备

用铅笔在色谱滤纸上距离一端  $2\sim 3\text{cm}$  处划直线 (记为色谱底边点样线), 在直线上标记标准氨基酸和未知氨基酸点样位置, 并作上记号。

#### 2. 点样 (少量多次)

用毛细管平口端蘸取少量样品溶液, 点样于滤纸的相应位置, 要求样品斑点直径不超过  $0.3\text{cm}$ , 干燥后再点样, 重复 3 次。注意样品点不要吹得太干燥, 否则, 样品物质的分子会牢牢吸附在色谱滤纸的纤维上, 出现拖尾现象。

#### 3. 缝合成圆柱体 (依据展开槽类型, 选做)

小心将色谱滤纸沿垂直底边的两条边, 以针线缝合, 制成圆柱体 (图 2-2)。注意, 缝合针线应靠近边缘, 不可出现在氨基酸色谱点可能色谱经过的区域。

#### 4. 展层

将滤纸放入展开槽, 使滤纸底边以下部分浸入液面, 但不要使液面没过点样线。展层  $50\sim 60\text{min}$ , 取出滤纸, 用铅笔绘出溶剂前沿线 (图 2-1)。

#### 5. 显色

将滤纸吹干, 用喷雾器把茚三酮溶液均匀细致地喷洒在滤纸点样线和溶剂前沿有效面上, 吹干后放在  $80^\circ\text{C}$  烘箱中烘干显色。

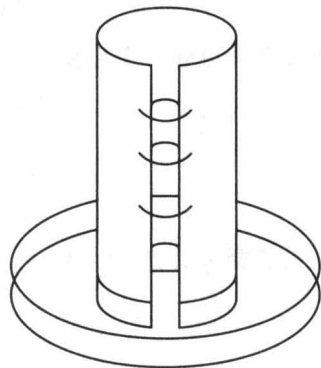


图 2-2 缝合成圆柱体

## 五、结果与分析

用铅笔描出色斑轮廓，找出中心点。如果斑点形状不规则或出现明显的“拖尾”，则圈出颜色集中均匀的部分。

观察记录标准品和样品氨基酸与茚三酮溶液反应后的颜色，测量色谱点和溶剂前沿距离，并计算各色斑的  $R_f$  值，对照氨基酸标准品，确定未知样品中氨基酸种类。

## 六、思考题

1.  $R_f$  值的概念。
2. 如何计算  $R_f$  值？影响该值的因素有哪些？
3. 纸色谱分离氨基酸的原理是什么？
4. 分析造成色斑拖尾现象的原因。

## 七、注意事项

1. 点样量要适当，点样要均匀。
2. 尽可能不要用手去触摸滤纸有效面。
3. 色谱分离时间根据色谱系统的具体情况而定，使分配系数相近的氨基酸分开。
4. 喷茚三酮溶液时要均匀、适量，不可过多。