



清华大学教材
(非生物学类专业本科生用)

吴庆余 刘进元 常智杰
谢莉萍 段明星 陈金春

LABORATORY MANUAL FOR INTRODUCTION
TO MODERN BIOLOGY

现代生物学导论 实验指导

清华大学出版社
<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

(京)新登字 158 号

内 容 简 介

生命科学突飞猛进的发展,对社会的经济、科学技术等各方面产生了巨大而深远的影响,使人们认识到,生命科学与数学、物理、化学一样,是最重要、最基本的自然科学,并将成为下一个世纪的带头学科。世界上一些知名的大学都将生命科学列为全校学生的必修课。

清华大学在国内率先为全校学生开设了“现代生物学导论”课程,引起了社会上强烈的反响,受到学生们的欢迎。本书即为该课程的实验指导教材。

全书包括 10 个基本的生物学实验,涉及生物化学、分子生物学、细胞学、微生物学和形态解剖学等方面的内容。每个实验包括了相关的基础知识、实验操作和问题讨论。

读者对象:大专院校师生。

书 名: 现代生物学导论 实验指导

作 者: 吴庆余 等

出版者: 清华大学出版社(北京清华大学校内,邮编 100084)

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

印刷者: 北京市清华园胶印厂

发行者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 850×1168 1/32 **印张:** 3.125 **字数:** 79 千字

版 次: 1999 年 10 月第 1 版 1999 年 10 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-03756-6/Q·7

印 数: 0001~3000

定 价: 5.50 元

绪 论

——关于现代生物学导论课程和实验

20 世纪后叶分子生物学的突破性成就,使生命科学在自然科学中的位置起了革命性的变化,现已聚集起更大的力量,酝酿着更大的突破走向 21 世纪。

世纪之交,美国时代周刊评选 20 世纪 100 件大事,在包括政治、经济、文化、历史和战争等的 100 件大事中,几件涉及自然科学的大事大部分都属于生命科学领域:

(1) 1928—1942 年,Fleming 发明青霉素,在第二次世界大战中拯救了几百万人的生命。

(2) 1953 年,Watson 和 Crick 首次提出了 DNA 双螺旋结构模型。有学者高度评价 DNA 双螺旋结构模型的确定是“诺贝尔奖中的诺贝尔奖”。

(3) 1973 年,美国斯坦福大学教授 Cohn 和美国加州大学教授 Boyer 带领各自的研究组,几乎在同时分别完成了 DNA 体外重组,一举打开了基因工程学的大门,他们被誉为重组 DNA 技术之父,成为诺贝尔奖得主。

(4) 1997 年 2 月苏格兰生物学家完成了首例哺乳动物——绵羊“多利”的克隆,这个神奇的故事立刻上了各传播媒介的首页和头条,一夜之间,全球大多数生物技术公司的股票价值成倍地上升。

生命科学的发展和进步也向数学、物理学、化学、信息、材料及许多工程科学提出了很多新问题、新思路和新挑战,带动了其他学科的发展和提高。生命科学将成为 21 世纪的带头学科。当今人类

社会面临的最重大的问题和挑战包括：人口膨胀、粮食短缺、疾病危害、环境污染、能源危机、资源匮乏、生态平衡破坏以及生物物种大量消亡。解决人类生存与发展所面临的一系列重大问题，在很大程度上将依赖于生命科学的发展。生命科学对人类经济、科技、政治和社会发展的作用是全方位的。生命科学全方位的发展呼唤着培养更多高水平复合型的科技人才。

当今生命科学正处于实验和理论大发展的时期。生命现象研究不断深入，从分子、细胞、个体、种群等生命的不同结构层次进行探索，新的现象不断发现，新的边缘学科不断形成。基因工程、蛋白质工程、细胞工程、生态工程等技术的发展和出现，已经开始形成经济效益，它将使工农业和医药业发生根本的变革。发育生物学和神经生物学的发展和突破也必将导致信息科学等高科技领域的革命性变化。

生命科学对社会产生了重大影响，它和物理、化学、数学等学科一样，已经成为自然科学乃至社会科学发展的基础。世界上许多一流大学如美国的麻省理工学院(MIT)已经把生物学列为全校学生的公共基础学科必修课。在我国许多有识之士也呼吁应将它作为一门本科学生的基础课。如果大学生毕业时不懂得什么是DNA，什么叫克隆，不了解生物技术与人类社会与经济的关系，就不能说是具有现代科学与文化素质的毕业生。为了弥补目前我国中学生生物学基础差，不适应跨世纪人才知识结构水平的需要，清华大学从1994年起已把“现代生物学导论”课程作为面向全校的必修课程，相应的“现代生物学导论实验”课程自1999年起，作为面向全校学生的选修课程。这样的安排受到大学生们的欢迎。

生命科学既是一门理论性学科，又是一门实验性极强的学科。不懂得生物学的实验技术，就很难深入懂得生命科学。生物学教学实验也就自然成为整个生物学教学中不可缺少的重要环节。为了培养面向21世纪，掌握现代化知识的建设人才，我们制订了面

向全校本科生的《现代生物学导论教学大纲》(见附录),同时制订了面向全校本科生的现代生物学导论实验课的教学方案,为此,我们初步编写了这本用于非生物学类专业本科生的现代生物学导论实验教材。

考虑到非生物学类专业学生的生物学基础相对较弱,实验课时较少,对这一部分学生开实验课,除了要求实验简单易行,也应考虑提高同学们对生物学基本实验的兴趣。为此,我们初步选择了一些适合于非生物学类专业学生操作的10个基本实验,每个实验为3~4学时,有的还可以交叉或穿插进行。这10个实验涉及到生物化学、分子生物学、细胞学、微生物学和形态解剖学等基本内容,分别由几个不同的实验室来协助完成。作为独立的一门实验课程,每一个实验指导的第一部分特别介绍了相关的基础知识,这些知识的介绍,对于非生物学类专业同学可能是非常有益的。

担任本实验指导教材编写的都是具体组织和承担该课程的教师,每一个实验都不同程度地融入了这些教师的部分科研经验和成果。本教材编写的分工如下:绪论、实验1、实验2、附录等部分由吴庆余执笔,实验3、实验4由刘进元执笔,实验5、实验6由常智杰执笔,实验7由谢莉萍执笔,实验8由段明星执笔,实验9、实验10由陈金春执笔,最后由吴庆余负责统编全稿。

由于课时限制,该实验指导不可能面面俱到,它只是生物学实验的入门向导。面向全校学生开设现代生物学导论必修课和实验课在国内尚属首次试点,我们还需要积累经验和提高水平,欢迎有关老师和选课的同学提出宝贵的建议和修改意见,以便再版时进一步改进。

目 录

绪论	关于现代生物学导论课程和实验	Ⅲ
实验 1	叶绿素 a 的提取和叶绿素 a 的特征光谱分析	1
实验 2	藻类细胞的培养实验	9
实验 3	质粒 DNA 的制备及其浓度测定	16
实验 4	质粒 DNA 的限制性内切酶酶切与琼脂糖凝胶 电泳的分离鉴定	24
实验 5	细胞的显微与亚显微结构观察	34
实验 6	小鼠腹腔巨噬细胞的制备和培养	40
实验 7	家兔的解剖及其内脏主要器官、系统的观察	46
实验 8	凝胶层析法分离生物大分子	60
实验 9	周围环境中微生物的观察及从土壤中 分离纯化微生物	69
实验 10	固定化酵母细胞发酵啤酒试验	77
附录	现代生物学导论教学大纲	83
参考文献	91

实验 1 叶绿素 a 的提取和叶绿素 a 的特征光谱分析

1.1 相关基础知识

为什么正常植物的叶片基本都是绿色的?答案很简单,因为植物叶片中有许多叶绿素。为什么有了叶绿素植物叶片就呈现绿色呢?答案就不是很简单了。我们有必要进一步了解叶绿素分子的作用、结构、光学特征和测定方法。

植物进行光合作用必须具有光合色素,叶绿素普遍存在于高等植物、藻类和光合细菌中,主要起吸收和传递光能的作用,在植物光反应过程中,被叶绿素吸收和传递的光能最终转化为化学能,光合作用的光反应过程可以包括以下 4 方面:

(1) 叶绿素吸收光能并将光能转化为电能,即造成从叶绿素分子起始驱动的电子流动。

(2) 在电子流动过程中,通过氢离子的化学渗透,形成了 ATP,电能被转化为化学能。

(3) 一些由叶绿素捕获的光能还用于水的裂解,又称为水的光解,氧气从水中被释放出来。

(4) 电子沿传递链最终达到电子受体 NADP^+ ,同时,一个来源于水的氢质子被结合,形成了还原型的 NADPH ,电能又再一次被转化为化学能,并储存于 NADPH 中。

叶绿素分子是一种可以被可见光激发的色素分子,在光子驱动下发生的得失电子反应是光合作用过程中最基本的反应,因此,叶绿素是植物光合作用反应中最重要的物质。

光合作用的色素主要包括叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、藻胆素等。虽然不同的植物,如不同门类的藻类和高等植物等,都有一系列不相同的色素,但它们都具有一种共同的色素,就是叶绿素 a。叶绿素 a 是启动光反应(图 1.1)的最关键的分子,在光能的激发下,光反应中心的叶绿素 a 从水分子中夺取电子,同时驱动光化学反应的进行。光系统 I (PS I) 光反应中心含有被称为“P700”的高度特化的叶绿素 a 分子,光系统 II (PS II) 光反应中心含有另一种被称为“P680”的高度特化的叶绿素 a 分子。在两个光系统中的其他色素如叶绿素 b、胡萝卜素和藻类细胞中的藻胆素等都作为天线色素吸收或捕获太阳能,并将太阳能传递给 P700 和 P680。

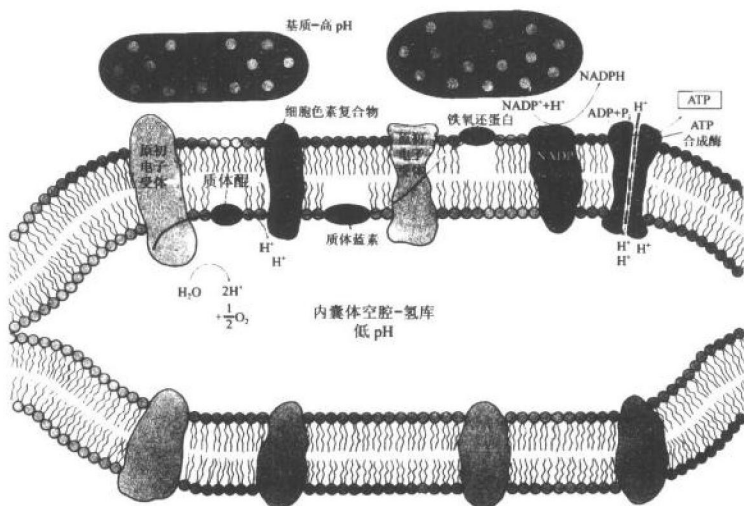


图 1.1 类囊体膜上光反应示意图

叶绿素分子是由碳、氢、氮和镁原子组成的镁卟啉环与叶醇侧链相联结形成的复杂分子。日光经过棱镜折射,形成连续波长的光,即可见光谱。当日光照射到植物叶绿素分子时,大部分位于可

见光谱红光区和蓝光区波长的光被叶绿素分子所吸收，而绿光区波长的光不被叶绿素吸收，这些绿光经反射后，被我们的肉眼所观察，因此植物叶片是绿色的。

光是一种电磁波，具有不同的波长，可被分子结构不同的物质选择性地吸收而形成特征光谱，因此，物质对不同波长光线的吸收能力，反映了分子内部结构的差异。用分光光度计对色素溶液进行测量，可以得知植物色素对不同波长的光吸收能力的强弱。通过分光光度计产生的连续波长的光对色素分子进行照射扫描。以波长为横坐标，吸光度为纵坐标作图所获得的图像被称为该色素的特征吸收光谱。分光光度法是鉴定植物色素种类与纯度，测定色素浓度和认识植物色素性质最有效的方法，也是科学研究中对植物色素变化进行动力学分析的常用方法。

分光光度计是一种由光源、单色器、样品室、检测器及显示器等部分组成的测定物质光学特性的仪器(图 1.2)。调节分光光度计可设置测定的波长范围、灵敏度等测量参数，现代制造的高级分光光度计可借助于计算机控制，完成对色素的测定和吸收光谱图绘制的全过程。

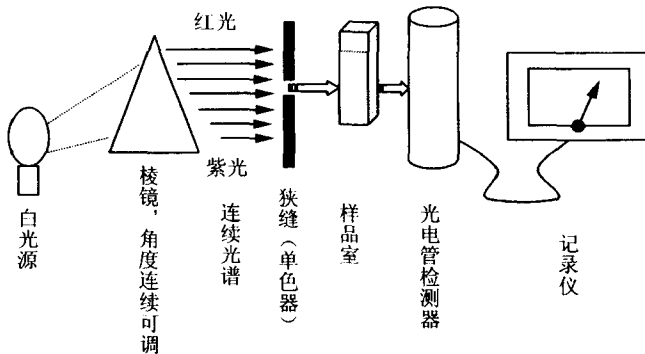


图 1.2 分光光度计工作原理示意图

叶绿素是脂类化合物,不溶于水,溶于甲醇、丙酮、乙醚等有机溶剂,可以借助于这些溶剂处理植物细胞,分离提取高等植物和藻类等细胞中的叶绿素。

叶绿素是一种极不稳定的化合物、在光照、高温和叶绿素酶存在等条件下,叶绿素分子很容易降解。因此,提取、分离和分析测定叶绿素的过程要尽量在弱光、低温条件下进行,最好能在较短的时间内完成全部实验。

1.2 实验目的和要求

(1) 了解叶绿素的化学性质,掌握用有机溶剂提取、分离叶绿素的方法。

(2) 认识和了解紫外-可见分光光度计,了解其工作原理,掌握其使用方法。

(3) 学会用紫外-可见分光光度计测定叶绿素 a 的实验方法,认识叶绿素 a 的吸收光谱特征。

(4) 学习和了解叶绿素分子在光反应中的作用和有关光合作用机理。

1.3 实验材料和仪器

1.3.1 实验材料

(1) 螺旋藻细胞干粉

螺旋藻是一种螺旋丝状的蓝藻生物(又称为蓝细菌)。蓝藻细胞内的光合色素以叶绿素 a 为主,不含有叶绿素 b,而且蓝藻细胞中的藻胆素是水溶性的,用有机溶剂提取叶绿素时得到的色素化合物主要为叶绿素 a。使用蓝藻细胞为实验材料,可以免除用层析法对光合色素,包括叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素等的分离与

提纯的复杂过程,使实验更加简单,结果更加明确,比较适用于非生物学类专业的现代生物学导论实验课程。可用市售的螺旋藻细胞干粉或自己培养的新鲜螺旋藻细胞(培养方法见实验 2)。

(2) 菠菜

市售的或刚收获的新鲜菠菜,如果实验不在菠菜销售季节进行,也可用其他植物的叶片代替。一般高等植物细胞中脂溶性的色素化合物包括叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素等,要想获得较纯的叶绿素 a,则需要借助层析等方法对有机溶剂提取物做进一步的分离和纯化。本实验直接分析未经层析法分离和纯化的粗提物,一方面了解粗提物的光谱特征,也可与蓝藻细胞做对比。

1.3.2 设备和器材

- (1) 高分辨率自动扫描紫外-可见分光光度计;
- (2) 研钵;
- (3) 离心机;
- (4) 微量天平;
- (5) 离心管、吸管等。

1.3.3 试剂

- (1) 无水甲醇;
- (2) 乙醚;
- (3) 90%丙酮;
- (4) 碳酸镁。

1.4 实验方法和步骤

1.4.1 叶绿素的提取

弱光下称取螺旋藻藻粉 3 份,每份 0.1 g,分别放入 3 个研钵

中,每个研钵都加入少许 MgCO_3 ,第一个研钵加入 10 mL 无水甲醇,第二个研钵加入 10 mL 乙醚,第三个研钵加入 10 mL 90% 丙酮。研磨抽提 5 min,离心(6 000 r/min,10 min),取上清液,

取干净的菠菜或其他叶片少许,剪碎后放入 3 个研钵中,参考上述螺旋藻的步骤提取叶绿素。

1.4.2 吸收光谱分析

各提取液分别加入到光径为 1 cm 的比色皿中,立即在紫外-可见分光光度计上测定各色素提取液的吸收光谱,设定扫描波长为 400~700 nm,仪器灵敏度设置为自动,绘制或打印吸收光谱曲线,同时记录各色素吸收峰的波长。

1.4.3 蓝藻细胞中叶绿素 a 浓度分析

另测定螺旋藻色素溶液在 663 nm 处的光吸收值(OD_{663}),溶液中叶绿素 a 浓度可参考以下经验公式计算:

$$\text{叶绿素 a 浓度}/\mu\text{g}/\text{mL}=13.9\times\text{OD}_{663}$$

1.5 问题讨论

(1) 比较从螺旋藻细胞和菠菜叶片中提取的光合色素吸收光谱的差异,分析引起差异的可能原因。

(2) 叶绿素浓度的测定和计算的主要理论根据是什么?

(3) 植物细胞中一般没有游离的叶绿素分子,为什么?

1.6 实验记录和报告

1.6.1 实验名称

1.6.2 实验日期

1.6.3 指导教师姓名

1.6.4 学生姓名

1.6.5 原始记录

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

实验 2 藻类细胞的培养实验

2.1 相关基础知识

近 10 年来,生物技术的快速发展推动了生物技术的商品化,许多实验室生物学研究的重要发现与成果逐步转化为有商业价值的产品,藻类学领域里也是如此,特别是微体藻类可提供如化工产品、医药、食品、燃料与能源等方面重要的再生资源,微藻细胞培养和生物技术的发展和成果引人注目。

微藻生物工程是生物工程技术的一个分枝学科,是以微体藻类为主要对象的生物工程技术,其主要优势在于微体藻类本身的优点与特征。

微体藻类生物有哪些不同于其他生物的优点和特征呢?

(1) 没有根、茎、叶的分化,微体藻类的整个植物体都具有营养价值,只有极少的细胞部分难以消化。

(2) 有些单细胞微藻含有大量的蛋白质,有的高达 65% 或 70%,是微管植物种子和叶的 2~4 倍。

(3) 微藻具有很高的单位时间、单位面积的光合作用效率,具有高产潜力,可通过调节种群密度、搅拌使细胞运动,以获得高效的单位面积上的太阳能利用与转化。

(4) 生活史可控制,生产周期短。

(5) 不需要土壤,不与农业争土地。可利用海水进行大规模培养和生产,开发海洋。

(6) 可连续培养,每天收获,生产过程易自动化。

因此,微藻细胞培养和生物工程技术前景广阔,特别是近 10

年来,人们对蓝藻中的螺旋藻的开发产生了进一步的兴趣,螺旋藻的大量培养和应用也被列入我国的“七五”、“八五”科技攻关项目。

微藻生物工程的基础是微藻的培养技术,因此,有必要学习一些最简单的藻类细胞培养实验方法。

2.2 实验目的和要求

- (1) 了解生物技术和微藻生物技术的定义和基本内容。
- (2) 掌握藻类细胞培养的一些基本方法。
- (3) 了解藻类细胞生长和繁殖的基本条件。
- (4) 掌握藻类细胞生长测定和生长曲线的绘制。

2.3 实验材料和仪器

2.3.1 实验材料

极大螺旋藻(*Spirulina maxima*),该藻种被清华大学生物科学与技术系长期保存。

2.3.2 实验器材

- (1) 恒温光照培养箱或恒温光照摇床;
- (2) 通气泵(提供空气搅拌);
- (3) 500 mL 锥型瓶;
- (4) 天平;
- (5) 烧杯、量筒等其他常规玻璃器皿;

2.3.3 试剂

- (1) NaCl;

- (2) MgSO_4 ;
- (3) NaNO_3 ;
- (4) K_2SO_4 ;
- (5) NaHCO_3 ;
- (6) EDTA;
- (7) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- (8) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- (9) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$;
- (10) A₅ 微量元素混合液;
- (11) B₆ 微量元素混合液。

2.4 实验方法和步骤

2.4.1 培养液制备

藻类细胞的生长需要消耗无机营养盐,藻类细胞的液体培养首先应配制相应的无机培养液。培养液加入哪几种无盐类,浓度为多少,是根据不同微藻的生理研究的培养试验结果来决定的,要经过多次试养,得到一个最佳配方。

螺旋藻的培养一般采用 Zarrouk 培养基,具体配方见表 2.1。

表 2.1 Zarrouk 培养基的配方

药品	用量/g/L	药品	用量/g/L
NaCl	1.0	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04
MgSO_4	0.1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaNO_3	2.5	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.5
K_2SO_4	1.0	A ₅ 微量元素混合液	1mL
NaHCO_3	16.8	B ₆ 微量元素混合液	1mL
EDTA	0.08	蒸馏水	加至 1L