

生物学实验指导丛书



★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

生物学综合

实验指导

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

主编 许维岸

 苏州大学出版社

生物学实验指导丛书



生物学综合

实验指导

（第二版）

生物学实验指导丛书

生物学综合实验指导

主 编 许维岸

副主编 张焕相 韩宏岩

苏州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物学综合实验指导/许维岸主编. —苏州: 苏州大学出版社, 2010. 11
(生物学实验指导丛书)
ISBN 978-7-81137-597-8

I. ①生… II. ①许… III. ①生物学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 222809 号

生物学综合实验指导

许维岸 主编

责任编辑 陈林华

苏州大学出版社出版发行

(地址: 苏州市十梓街 1 号 邮编: 215006)

金坛市教学印刷有限公司印装

(地址: 金坛市金城镇江南路 1 号 邮编: 213200)

开本 787 mm×1 092mm 1/16 印张 17.5 字数 362 千

2010 年 11 月第 1 版 2010 年 11 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-81137-597-8 定价: 34.00 元

苏州大学版图书若有印装错误, 本社负责调换

苏州大学出版社营销部 电话: 0512-65225020

苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>

生物学实验指导丛书

编委会

主 任 贡成良

副主任 戈志强 孟祥勋 张焕相

许维岸

编 委 戈志强 贡成良 韩宏岩

孟祥勋 曲春香 司马杨虎

孙丙耀 卫功元 许维岸

叶 荣 张焕相

《生物学综合实验指导》

编写人员

主 编 许维岸

副 主 编 张焕相 韩宏岩

编写人员 (以姓氏笔画为序)

王大慧 车 轶 叶 荣 成中芹

曲春香 朱子玉 许维岸 孙丙耀

苏国兴 沈颂东 陆 挺 张焕相

赵林川 韩宏岩

前言

随着生物科学的迅猛发展,特别是生物化学与分子生物学技术在生物科学的微观研究领域和生产实践中发挥巨大作用,使得生物科学研究向多学科多领域综合发展,这不仅进一步推动了生命科学研究的迅猛发展,同时也为工业、农业、食品、医药、环保等科学的发展提供了重要的理论基础和实验手段。因此,生物科学类相关专业学生,除了掌握生物科学各分支学科的实验技术外,了解和掌握生物学综合实验技术是培养和提高实验技能的重要内容之一,这也是生物科学工作者必须掌握的知识与技能。

本教材是为配合生物科学课程教学的改革和进一步提高学生运用各学科基础理论知识,增强综合分析问题和解决问题的能力而编写的生物综合性实验课教材。全书分为上、下两篇,上篇共分三章,包括生物综合实验设计原理与方法,实验过程中观察和思维能力的培养;实验材料处理、实验试剂和器材选择;生物学实验常用方法与技术策略。下篇共分五章,包括动物生物学、植物生物学、微生物学、生物化学与分子生物学和细胞生物学等方面的综合实验设计与实践操作,选编了 24 个综合性实验课题,主要根据生物化学、生理学、酶学、分子生物学、细胞学以及酶工程、基因工程等研究内容设计综合系列实验,每个大实验又根据具体实验内容分为若干小实验。实验项目是根据生物科学和生物技术专业的教学计划,安排在连续 6 周内完成,使用者可根据专业性质和教学条件选择适当的内容参考安排。

本教材与以往的生物学实验教材相比,突出了以下几点:

(1) 本教材分为实验设计原理和综合实验操作两部分,理论部分比较系统地介绍了目前开展生物微观研究的基本技术原理及其最新进展,以加强学生对生物学综合实验设计操作的宏观理解;实验操作部分又针对具体实验题目分若干小实验进行详细的介绍,便于操作。

(2) 鉴于目前大多数院校的实验设备条件已有较大更新,因此实验操作部分着重强调运用多种实验技术和设备探索某一实验课题,增添了实验设计流程图和相关思考题,从而培养学生的综合实验分析能力。

(3) 本着面向 21 世纪课程体系改革精神,培养学生的创新思维和综合分析能力,为了与学生所学的生物学基础理论教材配套,实验材料与内容覆盖动物、植物、微生物三大类别.

(4) 本教材所选的实验均系编者所在单位近年来在实验教学改革和科研中反复验证的比较成熟的实验方法.

由于编写水平有限,不足及错误之处在所难免,竭诚希望读者不吝赐教.

编 者

目
录**上篇 生物综合实验设计原理**

第一章 生物学实验设计	3
第一节 生物科学研究的实验类型	3
第二节 生物实验设计中科学思维能力的培养	4
第三节 生物实验过程中科学观察能力的训练	7
第四节 生物实验分析过程中创新思维能力的提高	11
第五节 生物实验设计的原则与方法	14
第二章 生物实验材料、试剂与器材	21
第一节 实验材料的选择与处理	21
第二节 化学试剂的选择	23
第三节 实验仪器的选择	30
第三章 生物实验常用方法与技术	35
第一节 生物材料处理的常用方法	35
第二节 亚细胞组分的分离提取	39
第三节 实验常用技术	41
第四节 生物大分子实验设计技术	51
第五节 生物大分子检测与理化性质分析技术	72

下篇 生物综合实验设计模块与实践

第四章 动物生物学综合实验	77
实验一 动物不同组织器官胰蛋白酶性质的比较	77
实验二 环境因素对胚胎发育及子代高级认知功能的影响	99

实验三	不同月龄小鼠心脏谷胱甘肽代谢的变化	105
第五章	植物生物学综合实验	112
实验四	植物体氮代谢部分生理生化指标的测定	112
实验五	植物组织内源性多胺、多胺氧化酶活性及部分产物检测	117
实验六	农杆菌介导的烟草遗传转化	125
第六章	微生物工程综合实验	132
实验七	环境条件对分批发酵的影响及其控制	132
实验八	发酵类食品的制作与分析	142
实验九	工业微生物菌种的选育	147
第七章	生物化学与分子生物学综合实验	150
实验十	TAIL-PCR 技术扩增侧翼于 T-DNA 插入的基因组序列	150
实验十一	虾精氨酸激酶基因的全长 cDNA 克隆和序列分析	157
实验十二	绿豆超氧化物歧化酶的分离、纯化和纯度鉴定	177
实验十三	葡萄糖氧化酶固定化	190
实验十四	α -淀粉酶的分离纯化及特性分析	199
实验十五	双水相萃取技术及其应用	212
实验十六	趋化因子受体 CCR5 的真核表达	215
第八章	细胞生物学综合实验	240
实验十七	哺乳动物细胞的培养、冻存和融合	240
实验十八	小鼠卵母细胞减数分裂及微管动态的分析	244
实验十九	新生大鼠大脑皮层混合细胞的培养与鉴定	248
实验二十	间充质干细胞的培养、诱导分化与鉴定	251
实验二十一	神经元的培养与鉴定	257
实验二十二	神经球的培养	261
实验二十三	活细胞拍摄跟踪及细胞迁移	264
实验二十四	海藻原生质体的提取与细胞融合	266
	参考文献	270

生物学实验指导丛书

生物学综合实验指导

上 篇

生物综合实验设计原理

第一章

生物学实验设计

第一节 生物科学研究的实验类型

随着生物科学技术的飞速发展,生物学已成为当今最令人感兴趣的学科之一。生命的一切现象都要通过科学实验进行探究。科学实验是指根据研究目的,运用一定的技术手段,通过干预和控制科研对象而观察和探索其相关规律和机制的一种研究方法。科学研究方法是在贝坎(Francis Bacon)提出科学研究模型的基础上发展起来的,主要包括“发现问题,收集相关资料,提出假设,验证假设,根据新发现进一步证实、修订或否定假设”。生物科学研究也要经过如下步骤:观察现象,发现问题;提出假设,预测结果;设计实验,验证假设,证实、修改或否定假设;经反复验证,对科学假说进行检验,逐步形成科学理论。

尽管生命现象错综复杂,但也是能被感官感知和理解的。生物科学实验是人类认识和了解自然中生命活动现象的必要手段,有着其独特的认识功能。在生物实验中要运用多学科知识和理论,通过各种先进仪器和设备,使获得的感性材料更丰富、更精确,以揭示生命现象的基本规律。此外,还能发挥人的主观能动性和对自然条件的控制力,揭示出在特殊条件下生命的物质运动规律,提供更多的发现新事物、新现象的机会。

生物科学研究的实验类型包括以下三个方面。

一、定性实验与定量实验

(1) 定性实验 指判定某种因素是否存在,某些因素之间是否存在一定相关性的实验,通常是判定是什么物质,具有什么性质,一般与量的关系不大。如对生物大分子及其组成成分的检测。然而,定性实验并非绝对不研究量的问题,实质上某种实验现象从无到有,本身就含有量的意义。

(2) 定量实验 指用于测定某种因素的数值多少,研究某些因素之间的数量关系的实验。如生物样品中某种有效成分含量、酶的比活、目的物回收率及纯化倍

数测定等测量实验都属于定量实验。

二、探索性、验证性和判决性实验

(1) 探索性实验 人们为探寻未知自然事物或现象的性质以及规律所进行的实践活动,是实验前人们对研究对象不了解而设立的实验,通常是指从事开创性研究工作。如操纵子学说的证明、遗传密码的解读、DNA 全序列的测定等都属于探索性实验。

(2) 验证性实验 当人们对研究对象有了一定认识以后,根据已知的理论对一些生命现象的存在、原因或规律作出推测猜想、提出假说或形成新的理论时,为了检验其正确与否而设计的实验。验证性实验可分为两类:一类是直接验证,如蛋白质的检测可通过检测某些氨基酸颜色反应而确定其是否为蛋白质;另一类是间接验证,即不去验证理论本身,而是验证其推论。如对真核生物转导机制的验证不需像对原核生物那样从头至尾去做,只要检测反应系统中存在的某些物质即可。

(3) 判决性实验 人们为了验证科学假说、理论或设计方案的正确与否而设计的予以最后判决的实验。如在生物氧化磷酸化的机制研究中,化学偶联说终因未找到任何一种活泼的高能中间物而至今未被学术界所承认。

三、对比实验和模拟实验

(1) 对比实验 通过对照比较分析研究的方法,达到异中求同或同中求异,以揭示所研究事物的某种性质或规律的实验。对比实验包括横向对比和纵向对比。横向对比实验是把研究对象分为两个或两个以上的组,一个是作为比较的标准,即对照组;另一个是实验组,通过某种实验步骤以便确定有关因素对实验组的影响。例如,通过不同物质的颜色对比研究该物质是否存在。纵向对比实验是对同一实验组进行施加影响前后的对比,即通过时间前后的对比以确定该物质存在的量。

(2) 模拟实验 在生物学的研究中,有时受客观条件的限制,不能对某些自然现象进行直接实验,这时就要人为地创造一定的条件或环境,在模拟条件下进行相关实验。

第二节 生物实验设计中科学思维能力的培养

实验设计的基本思路首先是明确实验目的、实验原理及实验要求的基本条件;其次是精心策划实验方法、严格设计实验过程、合理设置对照或变量,并引入科学的测量方法;最后应能够做到有效预测实验结果,并予以科学描述得出科学的实验结论。

生物实验思维能力的培养与训练是一项比较复杂而综合的过程,这种思维是

在长期的学习过程中,通过生物学科科研实践以及与其他相关学科交叉实践中逐步形成的.实验思维能力主要包括选择合适实验课题的能力、实验构思与设计能力、实验实施能力、实验观测与记录能力、实验数据处理和实验结果的解释与分析能力等.

一、培养选择实验课题的能力

实验课题需根据实际需要、主客观条件和实验目的等因素来确定.实验前要明确为什么要进行实验、重点要解决什么问题.是探索性地研究某些量的关系进而总结规律,还是要验证某一推测或某一假设的正确与否.

实验课题关系到确定研究主攻方向,在选择过程中,要充分了解这一研究领域的历史、现状及存在的问题,学会善于发现生物学各个学科发展的每个阶段上出现的中心课题,这是一个科研工作者应具备的素质.只有这样,才能选择突破口,开辟新方向.例如,20世纪初,人们采用离体实验将有效的物质提取出来然后测定.20世纪末,针对离体测定与活细胞内生理环境有着很大的差异和变化,人们开始在细胞整体水平上设计单细胞微控系统,通过弹性激光的散射,研究细胞内的亚细胞结构单位和大分子运动变化.运用弹性激光散射还能在整体细胞水平上探索核糖体形态结构的变化,能够证实细胞在遭受胁迫环境的作用时其蛋白质合成被终止.

正确的选题要求实验要有目的性和计划性,同时还要有灵活性,注意追踪有成功希望的线索.在生物学各学科某一方向一旦出现了新现象、新事物、新发展时,有远见的科技工作者立刻会从各个角度进行跟踪观察、实验,去取得重大突破.

二、掌握生物实验的构思与设计方法

实验的构思与设计是整个生物实验的关键环节,正如英国科学家贝弗里奇所指出,“最有成就的实验家常常是这样的人:他们事先对课题加以周密思考,并将课题分成若干关键的问题,然后精心设计为这些问题提供答案的实验”.在生物学发展史上,有一些实验设计与构思非常巧妙,堪称实验构思与设计的典范.例如,德尔布吕克认为物理上的方法同样适用于生物学研究,他是量子力学奠基人玻尔的学生,基于这种想法,他1937年到加利福尼亚从事遗传学研究.以摩尔根为代表的细胞遗传学事业在当时美国正值登峰造极之势,摩尔根研究的材料是果蝇.德尔布吕克则独辟蹊径,把目标投向结构更为简单的噬菌体,因其只有蛋白质和核酸而且易于繁殖.这种对实验材料选择的简单性与他导师玻尔选择氢原子并作出量子论假设方法如出一辙,这使得德尔布吕克对噬菌体的研究从模型的经验转变为精确的科学.为此德尔布吕克分析和鉴定了生物学效应的精确测量条件,制定了定量的方法,建立了统计标准,使得后来的精细深入研究成为可能.可以说现代科学的研究传统依然是逻辑实验的方式,从诺贝尔生理医学奖来看,物理学与生物学方法论具有相同性,通过少量事实构建模型假说,根据背景知识作出一系列推论而后实

验论证。从德尔布吕克生物科学研究方法论看出,生物实验构思与设计要从以下几个方面着手:

(一) 深入分析研究实验对象

就是运用已有的知识和科学思维方法,对实验对象进行分析,明确实验对象的待揭之谜,找准主攻方向,预计可能会出现的情况,形成初步设想。此外,还要根据所要研究的问题、所要揭示的规律、所要验证的理论或假说来明确实验的指导思想和方向,通过实验获得将要呈现出的需验证或探索的有关量值,从而达到实验目的。

(二) 精心构思实验原理

实验是在一定科学理论指导下进行的,对于现代生物学来说这一点更为突出。这些科学理论一般有两个方面的含义,一是实验所探索的原理或设想;二是实验仪器所应用的科学原理。这两方面原理构成了实验构思与设计的理论基础。

(三) 巧妙设计实验技术

实验技术包括实验仪器和技术手段,而巧妙的实验技术不仅能把实验原理物化其中,而且能在最有利的条件下获得准确的科学事实。因此,运用什么样的实验方法和技术手段对解决问题也非常重要。

(四) 掌握生物实验常用的设计方法

(1) 放大法 在生物学的实验过程中,有些量太小而不能直接观测时,就要将待测量放大后再去观测。如游标卡尺、放大镜、显微镜、电子显微镜、圆二色谱仪、X射线晶体仪、显微多道分光光度系统等仪器的设计都源于放大的思想。某些微小量的测量,如测 5 mL 血液中某激素的含量、测某蛋白质中某一氨基酸含量、测一段头发的质量等,常采用叠加放大法。

(2) 转换法 也称间接测量法,常有一些生命现象因不明显而不易被观察或者不易被直接观察,这就要借助于热、光、电、机械等方法之间的转换,以实现可观察、容易观察或观察效果明显的目的。

(3) 平衡法 平衡就是矛盾双方的平衡,在一个平衡系统中,总有偏离平衡的因素,平衡就是这种偏离平衡因素的抵消效应。在生物实验中运用平衡法就是用已知的生物量的特征常数去检测未知的常数。许多测量仪器就是根据平衡的原理设计的,如天平、比重计、压强计、温度计等。

(4) 比较法 通过对一些生命现象的比较,达到异中求同或同中求异的目的。如隧道电子显微镜、光谱分析、气相色谱、液相色谱、气相色谱与质谱联用(GC-MS)测定等都是运用比较法设计的。

三、掌握实验数据的处理方法

生物学实验中许多重大发现都是通过对实验数据的分析,从中寻找出某些内在规律得出的。实验结果的数据处理包括技术处理和理论分析,是运用数据揭示事物和现象的本质联系。为此,必须运用数学思维方法,对记录的实验结果加以整理

分析,主要包括实验误差的分析、有效数字的运算和实验数据的处理.下面介绍几种常用的数据处理方法.

(一) 列表法

列表法处理数据是把实验测得的数据和计算结果,以表格的形式一一对应地排列起来,以便分析各量之间的关系,从中找出规律性的联系.

(二) 解析法

此法是根据实验数据把两个或多个变量之间的函数关系直接用一个(或多个)数学关系式来表示,并注明其适用条件,也叫公式法.运用解析式表达生物学概念或规律,可以更加准确、简洁地从本质上反映某些变量之间的依存制约关系.

(三) 作图法

假设某一变量 y 随另一变量 x 而变,从实验和观测中测出一系列与 x 对应的 y 值后,在直角坐标系上将各组测量结果分别找出一系列对应的点,再用光滑的曲线将各点连接起来构成图像.当然,曲线不一定要通过每一个点,但要使曲线尽可能靠近各个点.这样曲线可直观地反映这些变量的变化规律,便于进一步研究实验结果以求出某些变量、建立关系式.作图法的最大特点是它的直观性,它把生物变量之间的相互依赖关系,形象地反映在图像上,简化研究过程,并从中发现规律.作图法处理实验数据要注意如下几点:

(1) 正确选择坐标,尽量使图像“线性化”.因为线性化图像既给作图带来方便,又便于分析实验数据结果.在难于判断实验数据之间的关系时,一般可绘出变量之间关系的图像,根据所作图像的特点,来确定实验之间的关系,如平方正反比关系、立方正反比关系、平方根或立方根的正反比关系等.

(2) 合理选择坐标原点,恰当选择单位.图像是表示生物量之间的变化规律的,横轴和纵轴坐标原点不一定都取零,单位要选择恰当,要根据实验数据的分布范围确定坐标轴的起始值、终点值及单位,要尽量使曲线位于坐标的中部,以利于观察和找出规律.

(3) 准确地描绘曲线.一般生物量的连续变化会引起与其相关的另一生物量的连续变化.但在实验中只能测出有限的几组数据,再加测量误差,就会使数据描点作图时,每一个数据点不一定落在一条光滑的曲线上.这就要求根据大多数测量数据点的分布画出一条平滑的曲线,使数据点在曲线两边均匀分布.

(4) 正确解释曲线的代表意义.当曲线作出后,就要观测其斜率、截距、极值以及曲线下面积等,并能理解其生物学意义,做出正确的解释.

第三节 生物实验过程中科学观察能力的训练

尽管观察是最基本、最古老、最直接的科学方法,但也是现代生物学研究最常用的方法之一,是进行生物实验设计的思维基础.通过观察发现问题是形成生物学