



生命科学实验指南系列

生物工程实验指南

——基本技术实验原理与实践

主 编 胡 兴 宋松泉
副主编 曾军英 付 明 邹 娟



科学出版社

生命科学实验指南系列

生物工程实验指南

——基本技术实验原理与实践

主 编 胡 兴 宋松泉
副主编 曾军英 付 明 邹 娟



科学出版社

北京

内 容 简 介

本书打破以理论课程体系与知识体系设置实验课程和实验内容的传统,突出以生物工程技术为主线,建立了全新的按专业整体性设置生物工程实验教学的新体系。全书分为基本技术与原理和基本技术实验两部分。基本技术与原理包括离心技术、分光光度技术、色谱技术、电泳技术、显微摄影技术、染色体制备技术、荧光染色技术、PCR 技术、微生物菌种保藏技术等基本技术;基本技术实验由 26 个实验组成。书后附有实验室要求与规范、常用仪器的使用、器皿的洗涤、溶液的配制及常用试剂。

本书可作为高等院校生物工程及其他生物学相关专业的本科生教材,也可供相关专业技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程实验指南:基本技术实验原理与实践/胡兴,宋松泉主编. —
北京:科学出版社,2019.6

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-061527-5

I. ①生… II. ①胡… ②宋… III. ①生物工程-实验-指南
IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 108661 号

责任编辑:王海光 王 好 / 责任校对:张怡君

责任印制:吴兆东 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京虎彩文化传播有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019 年 6 月第 一 版 开本:720×1000 B5

2019 年 6 月第一次印刷 印张:14 3/4

字数:297 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物工程实验指南——基本技术实验原理与实践》 编委会

主 编 胡 兴 宋松泉

副主编 曾军英 付 明 邹 娟

编 委 (以姓氏汉语拼音为序)

付 明 胡 兴 李洪波

刘胜贵 宋松泉 谭 娟

魏 麟 向小亮 曾军英

赵丽娟 邹 娟

前 言

生物工程专业是一个培养生物技术与工程应用型人才的专业，要求学生掌握生物学与生物工程方面的基本理论、基本知识和基本技能，能在生物技术与生物工程相关领域从事产品的设计、生产、管理及新技术和新产品的研发。实验教学是落实生物工程专业应用型高素质人才培养的关键，是培养学生实践创新能力的有效途径。

目前，大部分高等院校生物工程本科教学都是以理论课程为核心设置实验课程的传统教学模式，即“一门理论课程加一门实验课程”，实验教学一直辅助理论教学，从属于各门理论课程。这种情况导致实验课程门数多，实验课程之间存在不同程度的重复现象。此外，实验课程注重以知识体系为主线构建，造成实验课程的知识点相对分散、孤立，不能串联在一起，实验环节缺乏连贯性、完整性和系统性；开设的实验大多数以基础验证性实验居多，综合性、研究性、创新性实验较少，导致学生独立设计、工程技术运用等能力无法得到充分锻炼，极大地制约了学生创新、创造能力的提升；实验课程考核门数多，考核方式单一，考核评价不够科学合理等问题，也使得目前的生物工程专业实验教学体系难以满足应用型人才培养的需求，不利于学生实践、创新能力的培养。因此，我们紧扣生物工程专业的内涵与要求，围绕专业核心内容，以实验项目为载体，采用递进式的设计模式，建立了全新的按专业整体性设置生物工程实验教学的体系。该体系着重培养生物工程专业学生熟练掌握本专业实验基本技术能力，综合运用实验技术能力及创造性开展设计实验能力。我们将整个生物工程专业实验课程设置为“生物工程实验指南——基本技术实验原理与实践”“生物工程实验指南——综合实验原理与实践”和“生物工程实验指南——设计创新实验原理与实践”3门实验课程。

本书是3门课程教材之一，是编者结合多年来教学和研究工作，在广泛收集国内外文献的基础上编写而成。全书分为基本技术与原理和基本技术实验两部分，书后附有实验室规则与要求、常用仪器的使用、器皿的洗涤、溶液的配制及常用试剂。本书的第一部分由胡兴、邹娟、赵丽娟和宋松泉（怀化学院/中国科学院植物研究所）共同执笔；第二部分的实验一至实验八由付明执笔，实验九至实验十三由刘胜贵和邹娟执笔，实验十四至实验十六由谭娟执笔，实验十七和实验十八由李洪波执笔，实验十九和实验二十由赵丽娟和向小亮执

笔，实验二十一至二十三由曾军英执笔，实验二十四至实验二十六由李洪波和魏麟执笔；附录部分由胡兴、付明和邹娟整理。全书由胡兴和宋松泉负责统稿。

本书在编写过程中得到了怀化学院民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室、湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室、湖南省“双一流”应用特色学科建设项目（生物工程）和怀化学院教材出版基金的资助，在此一并表示衷心的感谢。

由于作者水平有限，书中难免有不足之处，敬请读者批评指正。

作 者

2018年12月于怀化学院

目 录

第一部分 基本技术与原理

第一章 离心技术	3
一、离心技术的基本原理	3
二、离心装置	3
三、离心方法	3
第二章 分光光度技术	7
一、仪器的类型与组成	7
二、仪器的工作原理	7
三、仪器的工作环境	8
四、注意事项	8
第三章 色谱技术	9
一、纸色谱法	9
二、薄层色谱法	9
三、聚酰胺薄膜色谱法	10
四、凝胶色谱法	10
五、离子交换色谱法	11
六、亲和色谱法	11
七、气相色谱法	12
八、高效液相色谱法	13
第四章 电泳技术	14
一、电泳技术的基本原理	14
二、影响电泳的因素	15
三、琼脂糖凝胶电泳技术	18
四、聚丙烯酰胺电泳技术	21
五、其他电泳技术	23
第五章 显微摄影技术	26
一、显微摄影技术的基本原理	26

二、显微摄影的基本装置	26
三、显微摄影的操作步骤	27
四、注意事项	28
第六章 染色体制备技术	29
一、染色体制备技术的基本原理	29
二、植物细胞染色体制备	30
三、人类细胞染色体制备	30
第七章 荧光染色技术	32
一、荧光染色技术的基本原理	32
二、荧光染色技术的应用	34
三、注意事项	37
第八章 PCR 技术	39
一、PCR 技术的基本原理	39
二、PCR 结果异常分析	41
三、PCR 的类型	43
第九章 微生物菌种保藏技术	47
一、菌种保藏的原理	47
二、常用的几种菌种保藏方法	47

第二部分 基本技术实验

实验一 脂肪碘值和过氧化值的测定	55
实验二 植物组织中维生素 C 含量的测定	59
实验三 丙二醛含量的测定	62
实验四 植物组织中蛋白质含量的测定	67
实验五 还原糖和总糖含量的测定	70
实验六 温度、pH、激活剂和抑制剂对酶活力的影响	74
实验七 种子萌发前后淀粉酶酶活力的比较	79
实验八 过氧化氢酶米氏常数的测定	82
实验九 微生物培养基的制备及灭菌	86

实验十 革兰氏染色和芽胞染色	92
实验十一 显微镜的使用和细菌形态的观察	96
实验十二 放线菌、酵母菌和霉菌形态的观察	99
实验十三 微生物显微计数和大小测量	102
实验十四 特殊显微镜的使用和显微摄影	107
实验十五 细胞核和细胞器的分离与鉴定	117
实验十六 叶绿体的分离和荧光观察	120
实验十七 小鼠肾原代细胞的分离及细胞计数	122
实验十八 细胞的消化、传代和冻存	125
实验十九 细胞早熟凝集染色体的制备及观察	128
实验二十 染色体端粒的显示与观察	132
实验二十一 海拉细胞凋亡的诱导与检测	137
实验二十二 植物细胞骨架的显示与观察	140
实验二十三 动物细胞骨架的显示与观察	143
实验二十四 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳技术	146
实验二十五 RNA 的提取与检测	152
实验二十六 PCR 扩增 DNA 技术	157
参考文献	160
附录 1 实验室要求与规范	162
附录 2 常用仪器的使用	170
附录 3 器皿的洗涤	181
附录 4 溶液的配制	183
附录 5 常用试剂	186

第一部分

基本技术与原理

第一章 离心技术

离心技术是蛋白质(酶)、核酸和细胞亚组分分离最常用的方法之一,也是生物工程实验室中常用的分离和纯化的方法。

一、离心技术的基本原理

将样品放入离心机转头的离心管内,离心机驱动时,样品液就随离心管做匀速圆周运动,于是就产生了一个向外的离心力。由于不同颗粒的质量、密度、大小和形状等彼此各不相同,在同一固定大小的离心场中沉降速度也就不相同,由此便可以使其相互分离。

二、离心装置

离心机是实施离心技术的装置,一般由主机、转头、离心管三部分组成。根据转速或者离心力的大小,离心机可分为三种类型,即低速离心机[转速在 2000~6000 r/min,最大相对离心力(relative centrifugal force, RCF)可达 6000 g]、高速离心机(转速在 18 000~25 000 r/min,最大 RCF 达 60 000 g)、超速离心机(转速在 40 000~100 000 r/min,最大 RCF 达 803 000 g)。超速离心机按性能又分为分析型、制备型和分析制备型三类。作为生物工程实验室的分离手段,最常使用的是制备型高速离心机和超速离心机。

三、离心方法

制备型超速离心法可用来分离细胞、亚细胞或生物大分子。根据分离的原理不同,制备型超速离心又可分为差速离心法(differential centrifugation)和密度梯度离心法(density gradient centrifugation)两种。

1. 差速离心法

差速离心法又叫分级分离法(fractionation method)。装有不均一粒子的离心管在离心机中高速旋转时,大小、密度不同的粒子将以各自的沉降速率移向离心管底部。如果设计一定的转速和离心时间,沉降速率最大的组分将首先沉淀在离

离心管底部，沉降速率中等及较小的组分继续留在上清液中。将上清液转移至另一离心管中，提高转速并设计一定的离心时间，就可获得沉降速率中等的组分。如此分次操作，就可不同转速与时间组合条件下，实现沉降速率不同的各个组分的分离（图 1-1）。

用差速离心法分离到的某一组分，其实并不十分均一，沉淀中往往混有部分沉降速率稍小一些的组分。此时，可在沉淀中添加相同介质令沉淀悬浮，再用较低转速离心，获得较纯的沉淀而洗去大部分杂质。如此反复采用高速、低速离心操作，即可获得较纯的组分。

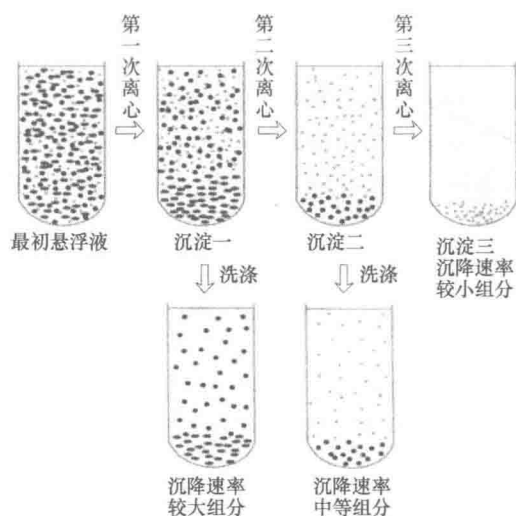


图 1-1 差速离心法示意图

差速离心法是基于不同组分沉降速率不同而实现混合物分离的方法，操作比较简单；但差速离心法的效率低、费时间，得到的组分不太均一，悬浮洗涤虽然可以提高分离组分的纯度，但会降低其回收率，当组分差异过小时，多次洗涤、分离也将无济于事。此时，就需要考虑换用分辨率更高的离心方法。

2. 密度梯度离心法

如果离心操作在一种连续密度梯度介质中进行，这类离心方法就称为密度梯度离心。它比差速离心法复杂，但具有很好的分辨能力。密度梯度离心可以同时使样品中几个或全部组分分离，这更是差速离心法所不及的。根据操作方法的不同，密度梯度离心法又可分为速率区带离心（rate zonal centrifugation）和等密度离心（isodensity centrifugation）两种。

(1) 速率区带离心

首先在离心管中灌装好预制的一种正密度梯度介质溶液，在其表面小心铺上一层样品溶液（图 1-2）。离心期间，样品中各组分将按照它们各自的沉降速率沉降，被分离成一系列的样品组分区带，故称速率区带离心。

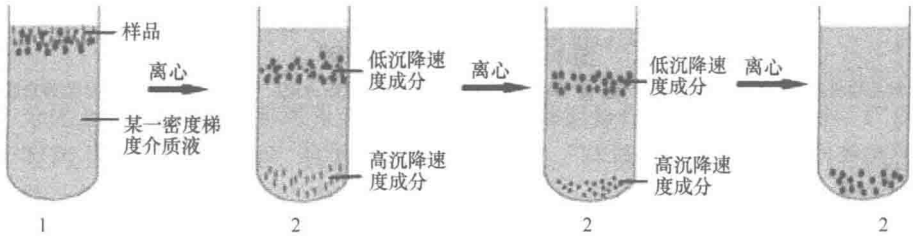


图 1-2 速率区带离心示意图

1. 装满密度梯度液的离心管，把样品加在梯度液的顶部；
2. 在离心力的作用下颗粒根据各自的质量按不同的速度移动

预制密度梯度介质的作用有两个，一是支撑样品，二是防止离心过程中产生的对流对已形成区带的破坏作用。但是样品液的密度一定要大于密度梯度介质的最大密度，否则就不能使样品各组分得到有效的分离。也正因为如此，速率区带离心的时间不能过长，必须在沉降速率最大的组分区带沉降到离心管底部之前就停止离心。不然，样品中所有的组分都将共同沉淀下来，不能达到分离的目的。

速率区带离心依据样品中各组分沉降速率的差别而使其相互分离。离心过程中，各组分的移动是相互独立的。因此，沉降系数（sedimentation coefficient, S ）值相差很小的组分也能得到很好的分离，这是差速离心做不到的；但速率区带离心不适于大量制备实验。

(2) 等密度离心

如果离心管中介质的密度梯度范围包含待分离样品中所有组分的密度，离心过程中各组分将逐步移至与它本身密度相同的地方形成区带（图 1-3），这种分离方法称为等密度离心。

在等密度离心中，各组分的分离完全取决于组分之间的密度差。离心时间的延长或转速的提高不会破坏已经形成的样品区带，也不会发生共沉淀现象。

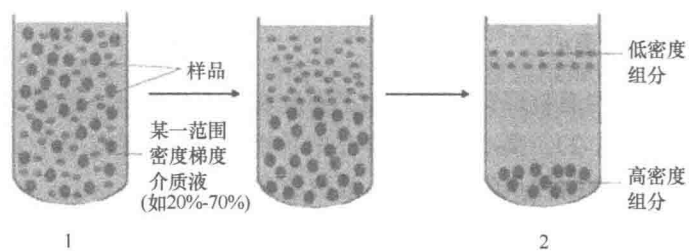


图 1-3 等密度离心示意图

1. 样品和密度梯度溶液的统一混合液；2. 在离心力作用下，梯度重新分配，样品区带呈现在各自的等密度处

第二章 分光光度技术

一、仪器的类型与组成

分光光度计能在紫外-可见光谱区域内对样品组分作定性和定量分析，广泛应用于医药卫生、临床检验、生物化学、石油化工、环境保护、质量控制等领域，是生物工程和理化实验室常用的分析仪器之一。分光光度计种类很多，按光路系统可分为单光束和双光束分光光度计；按测量方式可分为单波长和双波长分光光度计；按绘制光谱图的检测方式可分为分光扫描检测与二极管阵列全谱检测。

紫外-可见分光光度计是由光源、单色器、吸收池、检测器和信号处理器等部件组成。光源的功能是提供足够强度的、稳定的连续光谱。紫外光通常用氢灯或氘灯，可见光通常用钨灯或卤钨灯。单色器的功能是将光源发出的混合光分解，从中分出所需波长的单色光。色散元件有棱镜和光栅两种。可见光的测量用玻璃吸收池，紫外光的测量须用石英吸收池。检测器的功能是通过光电转换元件检测透过光的强度，将光信号转变成电信号。常用的光电转换元件有光电管、光电倍增管和光二极管阵列检测器。

二、仪器的工作原理

分子的紫外或者可见吸收光谱是由于分子中的某些基团吸收了紫外或者可见辐射光后，发生了电子能级跃迁而产生的吸收光谱。由于各种物质具有不同的原子、分子和不同的空间结构，其吸收光能量的情况也就有所不同；因此，每种物质就有其特有的、固定的吸收光谱曲线。可根据吸收光谱上的某些特征波长处的吸光度的高低来判别或测定该物质的浓度，这就是分光光度技术定性和定量分析的基础。

分光光度计的基本原理是溶液中的物质在光的照射下，发生了对光的特定吸收效应。各种不同的物质具有其各自的吸收光谱，因此当某种波长的光通过溶液时，其能量就会被吸收而减弱；光能减弱的程度与物质的浓度有一定的比例关系，即符合 Lambert-Beer 定律：

$$A = \epsilon bc$$

式中， A 为吸光度， ϵ 为摩尔吸光系数， b 为液池厚度， c 为溶液浓度。

一定物质在一定波长下，其摩尔吸光系数是一个定值。因此，可以根据摩尔吸光系数作定性分析。另外，同一物质在不同波长下测得的吸光系数不同，吸光系数值越大，表示该物质对该波长的光吸收能力越强，测定分析的灵敏度也就越高。因此，在定量分析中，尽量采用吸光系数最大的单色光。

根据 Lambert-Beer 定律，当 ϵ 、 b 一定时，溶液的吸光度 (A) 与浓度 (c) 成正比。因此，通过测定已知浓度的标准溶液和待测样品溶液的吸光度，就可以求出待测样品溶液的浓度。

三、仪器的工作环境

- 1) 仪器应安放在干燥的房间内，工作温度为 $5\sim 35^{\circ}\text{C}$ 。
- 2) 使用时放置在坚固的工作台上，且避免强烈震动或持续震动。
- 3) 室内照明不宜太强，且避免直射日光的照射。
- 4) 电扇不宜直接吹向仪器，以免影响仪器的正常使用。
- 5) 尽量远离高强度的磁场、电场及发生高频波的电器设备。
- 6) 避免在硫化氢、亚硫酸、氟化氢等腐蚀性气体的场所使用。

四、注意事项

- 1) 开机前将样品室内的干燥剂取出，仪器自检过程中禁止打开样品室盖。
- 2) 比色皿内的溶液以皿高的 $2/3\sim 4/5$ 为宜，不可过满以防液体溢出腐蚀仪器。测定时应保持比色皿清洁，池壁上的液滴应用擦镜纸擦干，切勿用手捏透光面。测定紫外波长时，需选用石英比色皿。
- 3) 测定时，禁止将试剂或液体物质放在仪器的表面上，如有溶液溢出或其他原因将样品槽弄脏，要及时清理干净。
- 4) 实验结束后将比色皿中的溶液倒尽，然后用蒸馏水或 70%乙醇冲洗比色皿至干净，倒立晾干。
- 5) 关闭电源后，将干燥剂放入样品室内，盖上防尘罩，做好使用登记。