**生物技术专业**

**实验指导书汇编**

**食品与生物工程学院**

**2018.09**

目 录

[**《基础生物学综合与野外实验》实验指导书 1**](#_Toc525046336)

[**实验一 常见植物的识别与分类 2**](#_Toc525046337)

[**实验二 常见动物的识别与分类 4**](#_Toc525046338)

[**实验三 小型动物解剖及其内脏器官的分布与构造 6**](#_Toc525046339)

[**实验四 鸟类标本的制作与保存 12**](#_Toc525046340)

[**实验五 植物腊叶标本及浸制标本的制作与保存 19**](#_Toc525046341)

[**实验六 叶脉书签制作 26**](#_Toc525046342)

[**《生物化学》实验指导书 28**](#_Toc525046343)

[**实验1 葡聚糖凝胶过滤层析分离蛋白质 31**](#_Toc525046344)

[**实验2 葡聚糖凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量 33**](#_Toc525046345)

[**实验3 唾液淀粉酶的性质、活力和米氏常数测定 37**](#_Toc525046346)

[**实验4 唾液淀粉酶的活力和米氏常数测定 41**](#_Toc525046347)

[**实验5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量 44**](#_Toc525046348)

[**实验6 DNA的琼脂糖凝胶电泳 51**](#_Toc525046349)

[**实验7 植物体内的转氨基作用 54**](#_Toc525046350)

[**《生物化学综合实验》实验指导书 56**](#_Toc525046351)

[**实验1. 不同植物总DNA的提取及亲缘关系的研究 58**](#_Toc525046352)

[**实验2. 植物中SOD的分离提取及性质研究 59**](#_Toc525046353)

[**实验3. 核酸的分离提取及性质研究 60**](#_Toc525046354)

[**实验3. 核酸的分离提取及性质研究 60**](#_Toc525046355)

[**实验4. 蛋白质的分离纯化及性质研究 61**](#_Toc525046356)

[**实验5. 糖蛋白的分离纯化及性质研究 62**](#_Toc525046357)

[**实验6. 脂的分离纯化及性质研究 63**](#_Toc525046358)

[**《微生物学综合实验》实验指导书 65**](#_Toc525046359)

[**实验一 不同碳源对黑曲霉产纤维素酶的影响 67**](#_Toc525046360)

[**实验二 黄酒糖化剂的筛选 68**](#_Toc525046361)

[**实验三 富铬米曲霉性质的研究 75**](#_Toc525046362)

[**《生理学》实验指导书 91**](#_Toc525046363)

[**实验一 刺激强度与肌肉收缩反应的关系 95**](#_Toc525046364)

[**实验二 蛙心脏的期前收缩和代偿间歇 97**](#_Toc525046365)

[**实验三 红细胞的渗透脆性观察 99**](#_Toc525046366)

[**实验四 离体心脏灌流 100**](#_Toc525046367)

[**《遗传学》实验指导书 101**](#_Toc525046368)

[**实验一 植物多倍体诱导及鉴定 102**](#_Toc525046369)

[**实验二 用逆转录-聚合酶链反应方法检测基因表达 104**](#_Toc525046370)

[**《生物化工原理》实验指导书 107**](#_Toc525046371)

[**实验1 流体阻力测定 108**](#_Toc525046372)

[**实验2 离心泵特性测定 112**](#_Toc525046373)

[**实验3 总传热系数测定实验 115**](#_Toc525046374)

[**实验4 流化速度的测定及颗粒物料干燥 118**](#_Toc525046375)

[**实验5 过滤常数的测定 122**](#_Toc525046376)

[**《生化分离工程》实验指导书 125**](#_Toc525046377)

[**实验一 超滤浓缩蛋白质 126**](#_Toc525046378)

[**实验二 双水相萃取牛血清白蛋白（BSA） 131**](#_Toc525046379)

[**实验三 液相层析分离蛋白质 133**](#_Toc525046380)

[**《细胞工程》实验指导书 136**](#_Toc525046381)

[**实验1 胡萝卜愈伤组织的培养 137**](#_Toc525046382)

[**实验2 植物原生质体融合 139**](#_Toc525046383)

[**《生物技术制药》实验指导书 141**](#_Toc525046384)

[**实验一 甲壳质、壳聚糖的制备 144**](#_Toc525046385)

[**实验二 液体发酵法生产链霉素（选做） 146**](#_Toc525046386)

[**实验三 抗生素的分离和鉴别（薄层层析法） 149**](#_Toc525046387)

[**实验四 植物细胞/组织培养（略）与细胞活性的鉴定 151**](#_Toc525046388)

[**《营养化学》实验指导书 153**](#_Toc525046389)

[**实验1-1豆类淀粉或薯类淀粉的老化 ——粉皮的制备与质量感官评价 154**](#_Toc525046390)

[**实验1-2 蛋白质的盐析和透析 155**](#_Toc525046391)

[**实验2-1 脂肪氧化、过氧化值及酸价的测定（滴定法） 156**](#_Toc525046392)

[**实验2-2 维生素C含量的测定 (2,6-二氯酚靛酚法) 158**](#_Toc525046393)

[**《植物生理学》实验指导书 160**](#_Toc525046394)

[**实验 1 植物细胞渗透势的测定（质壁分离法） 161**](#_Toc525046395)

[**实验2 植物激素的提取、初步纯化及酶联免疫检测 163**](#_Toc525046396)

[**《细胞与免疫学》实验指导书 165**](#_Toc525046397)

[**实验一 细胞的基本形态观察和显微测量 167**](#_Toc525046398)

[**实验二 细胞线粒体的制备及超活染色与观察 169**](#_Toc525046399)

[**实验三 细胞原生质体的制备 171**](#_Toc525046400)

[**实验四 细胞骨架的微丝染色实验与显微观察 173**](#_Toc525046401)

[**实验五 细胞有丝分裂形态观察 175**](#_Toc525046402)

[**实验六 免疫沉淀反应 177**](#_Toc525046403)

[**实验七、酶联免疫与免疫反应试验 180**](#_Toc525046404)

[**实验八 细胞电泳 182**](#_Toc525046405)

[**实验九、细胞组分的化学染色与定位分析 185**](#_Toc525046406)

[**实验十 石蜡组织切片 188**](#_Toc525046407)

[**《分子生物学与基因工程原理实验》指导书 193**](#_Toc525046408)

[**实验1 总RNA的分离鉴定 194**](#_Toc525046409)

[**实验2 PCR法扩增基因DNA片段 198**](#_Toc525046410)

[**实验3 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化 202**](#_Toc525046411)

[**实验4 质粒DNA提取 205**](#_Toc525046412)

[**实验5 质粒DNA酶切及回收DNA 208**](#_Toc525046413)

[**《生物技术综合实验》实验指导书 210**](#_Toc525046414)

[**实验一 目的基因克隆 216**](#_Toc525046415)

[**实验二 构建表达载体 218**](#_Toc525046416)

[**实验三 C基因的原核表达 224**](#_Toc525046417)

**《基础生物学综合与野外实验》实验指导书**

实验一 常见植物的识别与分类

一、实验目的与要求

1. 在校园内，校园周围，大蜀山，植物园等场所观察各种植物的形态特征，运用所学的知识进行分类，给出学名，科名，属名，描述性状。
2. 对不认识的植物运用检索表进行检索，掌握熟练运用检索表。
3. 掌握植物野外调查的基本方法。

二、实验原理

地球上生活若数十万种植物，每种植物都有自己的形态特征。同一种植物受遗传和环境两方面的影响，其形态也会有不同幅度的变化，每一株植物可能各有不同。即便是同一株植物上的器官（如叶、茎），处于不同的部位时也有较大的差异。这就是植物形态的多样性。但是，同一类群在形态上总是有相同或相似之处，而不同类群的植物之间总是可以找到形态上的区别，就整个植物界而言，从藻类植物到被子植物，由于在进化史上的不同地位，形态上发生了巨大演变。由于被子植物是植物界中演化水平最高的类群，也是物种数目最多的类群，因此，研究植物形态、结构、系统演化和生态，更多地要面对的是被子植物。

被子随物是日前地球上种类最多，分类最广的植物，也是与人类关系最为密切的植物类群。在长期的系统演化过程中，被子植物分化形成了许多不同的种类，它们形态各异，并有各自特定的分布区。因此在本实验中，可根据不同地区的环境特点以及学校所在地区的植被类型，选择些常见的代表进行观察，并尽可能考虑到被子植物中一些主要的科、属，如:木兰科、毛茛科、蔷薇科、豆科、菊科、百合科、禾本科等。

每种植物都有不同的形态特征，根据植物的形态特征特点，微小差异，加以区分各类植物；检索表收录不同植物，使用检索方法检索。

三、试剂与材料

材料：校园等地各常见植物

用具：笔记本、小刀、放大镜、镊子、铅笔、检索表及相关工具书四、实验步骤

于上课前10分钟内到指定地点集合，宣讲注意事项及安全要点；由老师带领开始实验，分配小组。

到地点由同学自由观察记录植物，再一小组为单位进行植物的识别与分类，做好记录。

对于无法确定的植物，取不同植物的新鲜材料，对照检索表或植物志等工具书进行观察，了解不同植物的外部形态特点，并记录下来。

植物生活型的观察  
植物的生活型是指植物长期适应综合环境条件形成的外貌类型。观察植物，区分乔木、灌木、草本和藤本植物。本本植物茎的木质化程度较高，而且地上部分不会枯死，草本植物则相反。区分乔木与灌木要考察其成株有无明显的主干：有明显主干者为乔木，如毛白杨、垂柳等，无明显主十则为灌木，如月季。木本植物还有常绿与落叶之分：落叶乔木或灌木在冬季落叶，如桃; 而常绿植物每年的任何季节枝条上都有绿叶，如油松。草本植物中，一年内完成生活史而后死亡的为一年生草本，如蚕豆; 第一年进行营养生长，第二年开花结实而后死亡的为二年生草本，如白菜；连续生活多年，每年冬季地上部分开花结实后枯死而地下部分存活的为多年生草本，如鸢尾。藤本植物也可分为两类：一类为本质藤本，如葡萄; 另一类为草质藤本，如牵牛花。

5、 植物营养器官形态的观察  
(1) 根和根系  
(2) 枝条和芽  
(3) 叶序和叶型  
6、植物繁殖器官形态的观察  
(1) 花和花序  
(2) 果实和种子   
五、实验结果与作业

1、每人实验报告一份；

2、每人递交至少10种实验常见植物简介(学名、科属种、形态特征等）

实验二 常见动物的识别与分类

一、实验目的及原理

在校园内，校园周围，动物园等场所认真观察不同动物的形态特征，运用所学的知识进行分类，给出学名，，科名，属名，描述性状；

对不认识的动物运用检索表进行检索，掌握熟练运用检索表。

掌握动物野外调查的基本方法。

原理：动物的分类方法:动物学根据自然界动物的形态，身体内部构造，胚胎发疗的特点，生理习性，生活的地理环境等特徵将特微相同或相似的动物归为同一类。  
动物界可分为两大门类:在动物界中，根据动物身体中有没有脊索而分成为脊索动物和无脊索动物两大主要门类.

动物经过亿万年的进化，由于所处环境不同、猎食和躲避等原因，故进化出不同的形态特征，迄今形态学特征尤其是外部形态仍然是最直观而常用的依据；这主要以动物形态或解剖的相似性和差异性的总和为基础。

二、实验材料及用具

材料：校园等地各常见动物

用具：笔记本、小刀、放大镜、镊子、铅笔、铲子、检索表及相关工具书

三、实验内容

1、于上课前10分钟内到指定地点集合，宣讲注意事项及安全要点；由老师带领开始实验，分配小组。

2、到地点由同学自由观察记录动物，再一小组为单位进行动物的识别与分类，做好记录。

3、对于无法确定的植动物，活体捕捉或照片留档，对照检索表等工具书进行观察，了解不同动物的外部形态特点，并记录下来。

4、通过到野外直接捕捉野外动物，运用所学知识进行分类鉴定，熟悉运用专业图片—比如图片对照、动物分类检索表、主要特性鉴别等分类进行动物分类鉴定 。

5、动物观察：

1、动物生活环境观察

2、动物形态特征观察：

（1）外表整体观察

（2）动物爪、翅、羽、壳、头、花纹等观察

3、动物行为特征观察

四、实验结果与作业

1、每人实验报告一份；

2、每人递交至少10种实验常见动物简介(学名、科属种、形态特征等）

实验三 小型动物解剖及其内脏器官的分布与构造

一、实验目的及原理

1.学习小型哺乳动物的外部测量法，掌握哺乳动物的一般解剖方法。

2.了解小脑对躯体运动的调节机能。

二、实验用品

（一）材料

小白鼠

（二）器材

显微镜，天平，解剖器具，大头针，腊牌，鼠笼，25ml小烧杯，载玻片，盖玻片，棉花。

（三）试剂

乙醚，0.9%生理盐水，碘酒，75％乙醇，自来水。

三、试验操作

（一）外形观察

小白鼠身体分为头、颈、躯干、四肢和尾五个部分。

1.头部

观察其外耳、口鼻吻的特征。

2.颈

有明显的颈部、活动自由。

3.躯干

观察体毛的分布特征，注意腹面末端的外生殖器和肛门，区分鼠的性别（此外，雌鼠的胸，腹部有较明显的乳头）。

4.四肢

前肢肘部向后弯曲，具5指;后肢膝部向前弯曲，具5趾；指（趾）端除第一指（趾）外，都具有坚硬的爪。

5.尾

尾长约与体长相等，观察其外部特征。

（二）外部测量

小白鼠外部测量如图3-3所示。

1.体长

由头的吻端至尾基。

2.尾长

由尾基至尾的尖端，不记毛长。

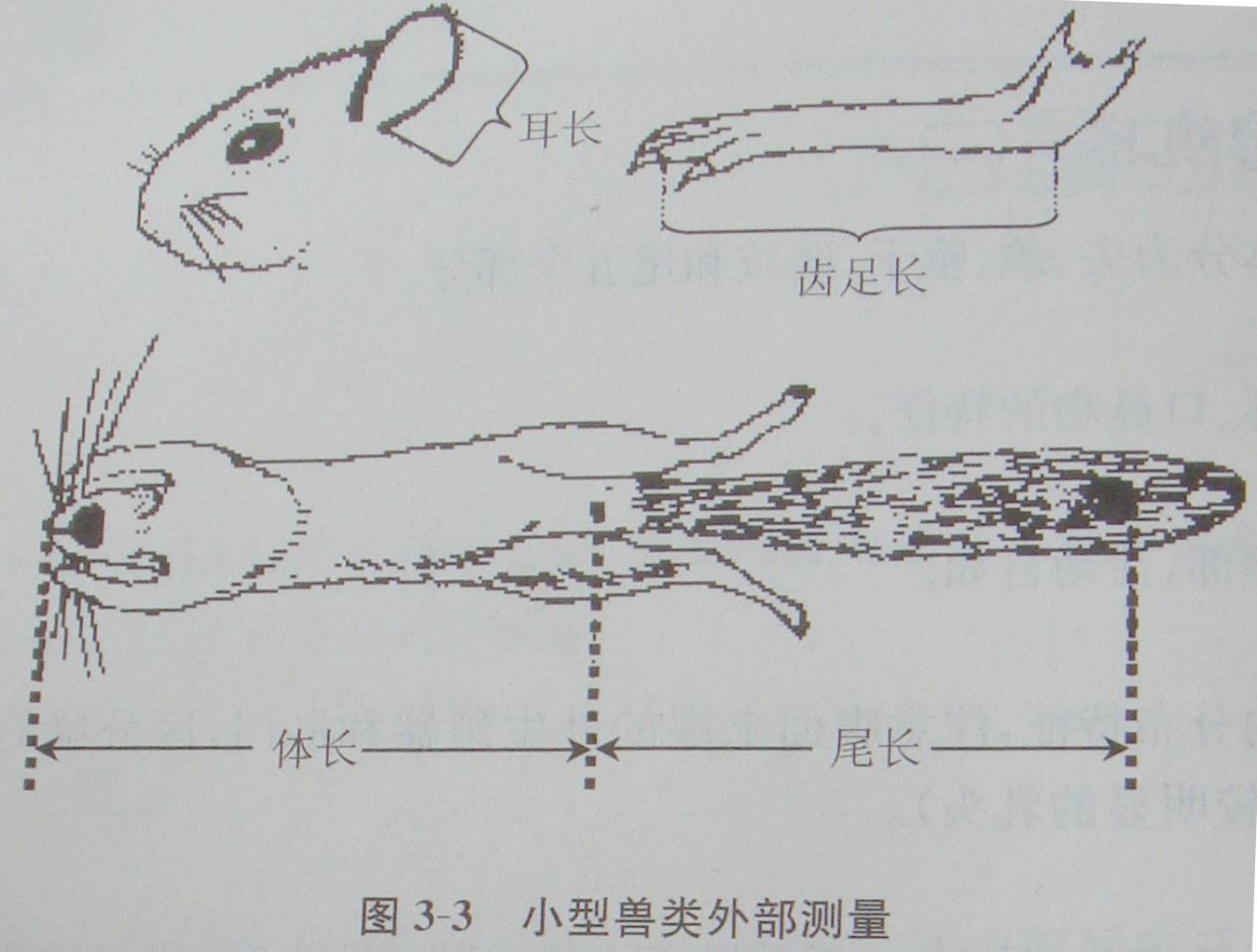
3.后足长

后肢跗跖部连趾的全长（不计爪）.

4.耳长

由耳尖至耳的内面基部（耳毛除外）.此外，还有称量体重，观察毛的色泽，长短，厚薄及粗细等，都一一记录。

注：接触小白鼠时需戴手套，操作要小心，避免被其咬伤！



（三）损毁小脑的效应

小脑具有维持身体平衡、调节肌肉紧张和协调肌肉运动等机能。随着小脑损毁程度的不同，可表现出不同程度的肌肉紧张失调及平衡失调。

1.观察正常小白鼠的动作

手持小白鼠尾部，观察小白鼠在桌面上向前爬行时四肢动作协调程度、姿势平衡状况。

2.麻醉

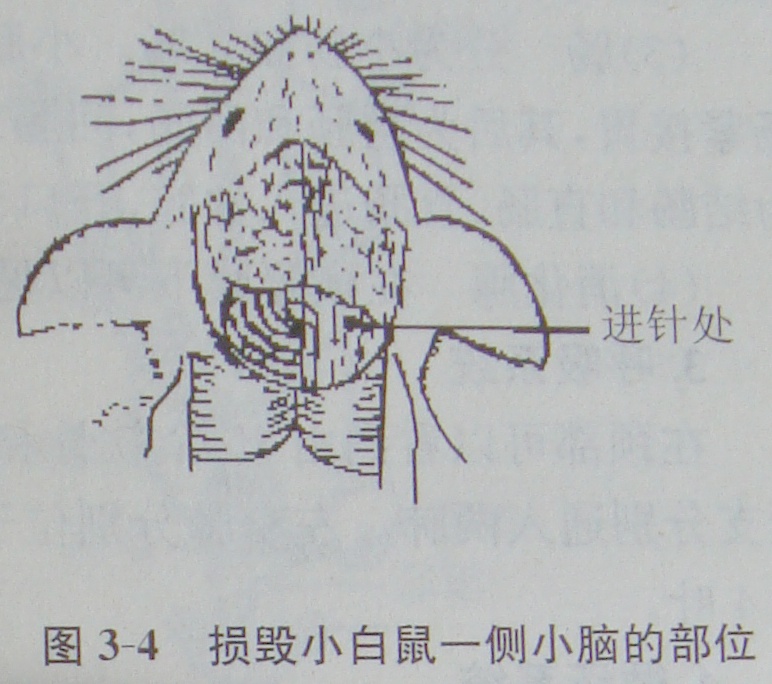
将小白鼠罩于放有浸透乙醚棉球的烧杯中，注意观察小白鼠的呼吸变化，若呼吸变慢则说明已麻痹。若小白鼠仍就挣扎，可随时用乙醚追加麻痹。

3.损伤小白鼠一侧小脑

（1）以左手小指挟持小白鼠尾部，食指和拇指从小白鼠尾部，食指和拇指从小白鼠背部捏住其颈部皮肤，右手持手术剪，沿小白鼠头部正中线自顶部直达耳后剪开头皮。

注：左手捏住小白鼠头部时，用力适度，防止将其眼球挤出。分离肌肉时也不能用力过大，以免损伤肌肉。

（2）以左手拇指，食指捏住头部两侧，用棉花将其顶间骨表面一层薄薄的肌肉轻轻向



思考：门齿、臼齿各有何功能？它们与哺乳动物的适应性有何关系？

（2）食管和胃 将肝脏掀至右边，可以观察到胃，胃可分为半透明的贲门部和不透明的幽门部。而扁管状的食管位于气管背面，后行穿过横隔与胃小弯处相接。

（3）肠 分为小肠和大肠。小肠长约50cm，分为十二指肠、空肠和回肠。十二指肠紧接胃，其后为空肠和回肠，回肠末端与大肠和盲肠连接，盲肠盲端为蚓突；大肠分为结肠和直肠，直肠进入盆腔，开口于肛门。

(4）消化腺 在横隔膜下可以见到4叶肝脏，在十二指肠附近有粉红色的胰脏。

3、呼吸系统

在颈部可以看到由15个软骨和软骨间膜构成的气管，气管后行进入胸腔后分为两支分别通入两肺。左右肺分别位于胸腔两侧，海绵状，其中左肺仅为1叶，而右肺分为4叶。

4、循环系统

在胸腔中可以见到略呈倒圆锥形的心脏，位于两肺之间的围心腔内，心尖偏左，幼鼠心脏上半部被淡肉色的胸腔覆盖。

将胃泼到右侧，在其左侧可以见到红褐色、长椭圆形的脾脏。

5、泄殖系统

（1）排泄器官 将肠泼到一侧，再行观察。可见在腹腔背臂左右两侧各有一豆形的肾脏，右肾比左肾的位置略高，肾脏上方有淡红色的肾上腺。由各肾内缘凹陷处（即肾门）发出一输尿管，通入膀胱，膀胱开口于尿道。雌性尿道开口于阴道前庭；雄性尿道通入阴茎开口于体外，兼有输精功能。

（2）雄性生殖器官 睾丸（精巢）一对，椭圆形，成熟后坠入阴囊。附睾一对，附睾可分为附睾头、附睾体和附睾尾，头部紧附于睾丸上部，体部沿睾丸的一侧下行，尾部与输精管相接。输精管一对，开口于尿道。还有精囊和精囊腺、凝固腺、前列腺等副性腺。阴茎为交配器官。如图3-5（a）所示。

(3)雌性生殖器官 在腹腔背臂两侧肾脏后方各有一个卵巢，近似蚕豆形。一对输卵管，盘着卵巢。输卵管后端膨大部分为子宫角，子宫角和子宫体呈Y字型。开口于体外。在阴道口的腹面稍前方有一隆起部，围殴阴蒂。如图3-5（b）所示。（

（4）精子的观察 取小白鼠的附睾组织放入盛有生理盐水的小烧杯中，剪碎，用吸管吸取一滴组织悬液于载玻片上，轻轻盖上盖玻片，至于低倍镜下观察，可见精子的头部呈镰刀形，尾部呈细丝状。

思考：精子是如何运动的？



四、实验作业

（1）依据实验观察结果说明小脑的生理功能。

（2）依据观察结果，归纳小白鼠有哪些形态结构表现出哺乳类的进步特征。

实验四 鸟类标本的制作与保存

1. 实验目的和要求

1.了解标本对于生命科学研究及生物日常教学的意义；

2.了解鸟类标本的剥制步骤以及四肢的肌肉与骨骼走向，掌握鸽子标本的剥制方法。

1. 实验原理

剥制标本是将已死亡的动物[尸体](http://niaolei.org.cn/tag/%e5%b0%b8%e4%bd%93)，经过剥皮、去肉、脱脂、防腐、装架、填充或假体、整形、安装义眼、固定、梳理羽毛或毛等工序后，复原成该动物生活状况时最美观、最生动的瞬间形象。

标本是在进行分类学研究，举办陈列展览，开展科普教育及学校教学必不可少的实物，也是自然文化的遗产，是研究自然变迁的物证。

1. 试剂与材料

解剖器、骨剪、钉锤、铁丝钳、铁丝、大号搪瓷盘、棉花、纱布、竹绒、针线、毛笔、笔记本、义眼、标签、台板、清水漆、石膏粉、家鸽等。

药物配比：肥皂：三氧化二砷：樟脑：明矾=5:4:1:1

1. 实验步骤

1.标本的选择和处理

不论死体或活体，都必须羽毛完好，四肢、喙、足完整无损，尽量用湿棉花揩去体表污迹。如是活体，在剥制前1~2小时内处死，使血液凝固，避免制作时血液外流，污染羽毛。处死的方法主要是麻醉或窒息而死，不留外伤。死鸟标本，要严格检查，如已腐败不能使用。

2.标本的测量和记录

鸟类进行剥制前进行的测量和记录，主要是为后期整形提供依据。常规测量的数据有：

体长：自嘴端以至尾端（此项量度应就采得的标本未剥之前，加以测定）。

嘴峰长：自嘴基生羽处至上嘴先端的直线距离。

翼长：自翼角（即腕关节）乃至最长飞羽至先端的距离。

尾长：自尾的羽基部以至最长尾羽至尖端的直线距离。

跗趾长：自胫骨与跗趾关节后面的中点，至跗趾与中关节前面最下方之整片鳞的下缘。

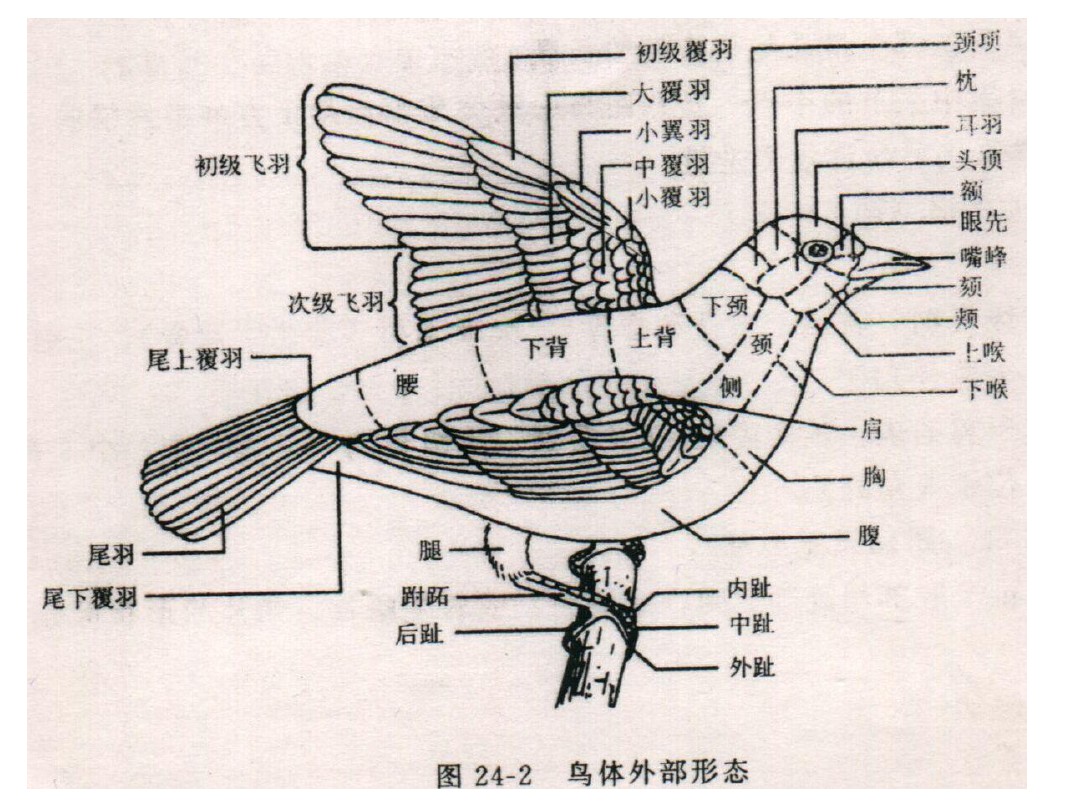
另外还有腿长、胸高、胸宽、颈长、颈围粗细等。

记录（具体形式见表1。）

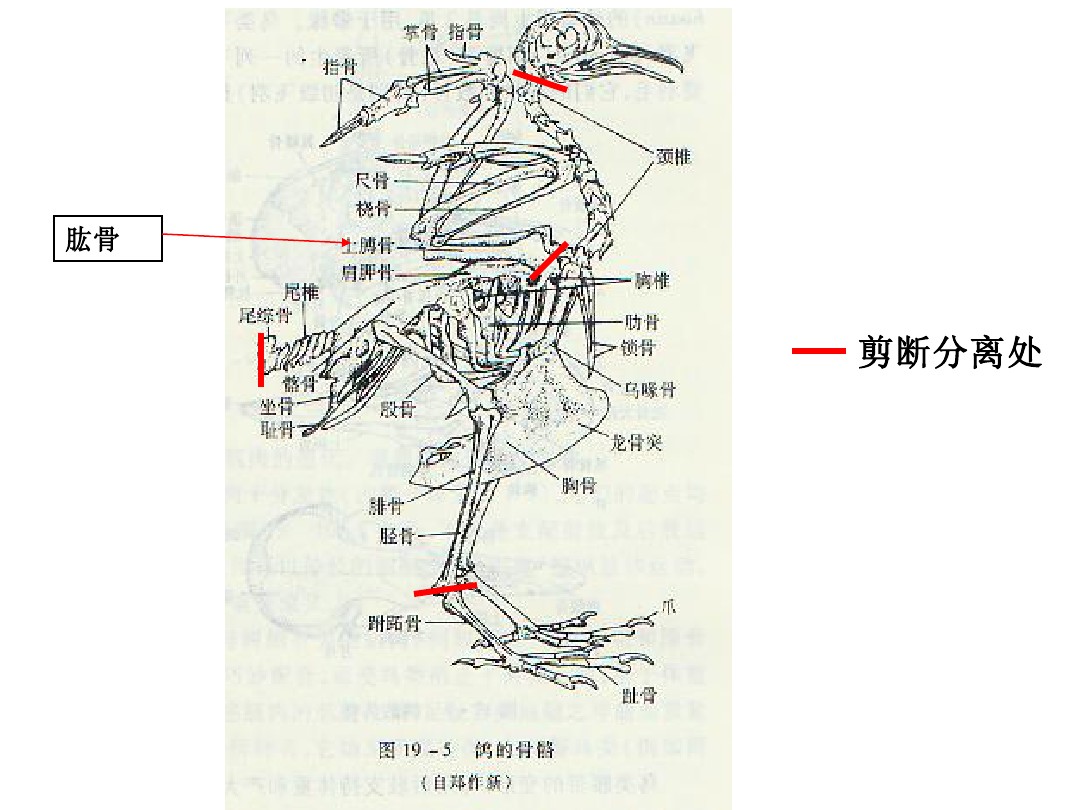
表1 鸟类标本的记录表格

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 鸟类登记卡 年 月 日 | | | | | | |
| 学名 |  | | | 采集时间 |  | |
| 中名 |  | | | 采集地点 |  | |
| 俗名 |  | | 特征与习性 | |  | |
| 性别 |  | 嘴峰长 |  | 脚颜色 |  |  |
| 体重 |  | 嘴裂长 |  | 嘴颜色 |  |  |
| 总长 |  | 跗蟅长 |  | 采集者 |  |  |
| 翼长 |  | 趾长 |  | 制作者 |  |  |
| 翼展度 |  | 抓长 |  |  |  |  |
| 尾长 |  | 虹膜颜色 |  |  |  |  |

3.鸟类皮肤的剥离



4-1鸟体外部形状



4-2 鸽的骨骼（图片via 网络）

（1）胸部剖口。 先用棉花把嘴、鼻孔、肛门以及伤口堵塞好，避免粘液、血液及排泄物污染标本的羽毛。用湿棉球打湿腹部羽毛，挑出中缝，从嗉囊至龙骨突后缘沿中线切开、把皮肤切口向左、右剥离至两助。

(2)剪颈。在切口前端嗉囊前方，拉出颈椎，剪断颈椎。左手拎起连接躯体的颈椎，右手按着皮缘慢慢剥离肱骨和肩部之间的皮肤。

(3) 剪四肢。肩部皮肤扶剥离至两翼基部时，从肱骨中间连骨带肉剪断，翼内肌肉等整个躯体制离后再处理。继续剥背部和腰部，腰背部皮肤紧贴骨骼，剥腰时要特别小心。剥至后肢时褪出大腿，翻剥至胫骨，并在股骨和轻骨之间关节处剪断 (附着在胫骨上的肌肉则在胫跗关节处剪断)。

(4)剪尾。继续向尾部剥离，剥至尾的腹面泄殖孔时，用刀在直肠基部割断，背部剥至尾基部。尾脂腺露出后，用刀在尾部骨末端前断，如剪得正确，剪断后的尾部内侧皮肤呈“V”形。

(5)剔除肌肉。鸟类皮肤剥离后，取出鸟的胴体，进行皮肤上残留肌肉的剔除。

①头部肌肉的剔除:剥到枕部，两侧出现灰色耳道，即用刀紧贴眼眶，剥离眼睑边缘的薄膜(镊子从眼眶边沿伸入，取出眼球)，最后剥至喙基部为止。枕骨大孔处剪下颈椎，取出脑组织。

②翼部肌肉的剔除:用刀剥离肱骨上残留的肌肉，用手指甲(或刀柄)紧靠尺骨，慢慢剥附在尺骨上的羽根，剔去桡骨与尺骨间的肌肉。若做展翅的标本，应从翼下切开，剔去肌肉切勿将羽根刮离尺骨，否则飞羽下垂，无法做成展翅标本。

③腿部肌肉的剔除:胫骨上肌肉的剔除与肱骨相同，在脚掌中心的脚垫位置，剪开一小口，以备铁丝穿过。

④尾部肌肉的剔除:用刀刮或用剪刀剪去在尾综骨和尾羽根周围的骨肉、脂肪及尾脂腺，在尾羽根部，不要像剔牙那样逐个别除羽根间的肉，防止羽根分离，尾羽脱落。

(6)剔除脂肪。全部剥褪工作完成后，剥除皮内的残脂碎肉，否则以后油脂必然渗出，污染羽毛，致使腐烂和虫害。

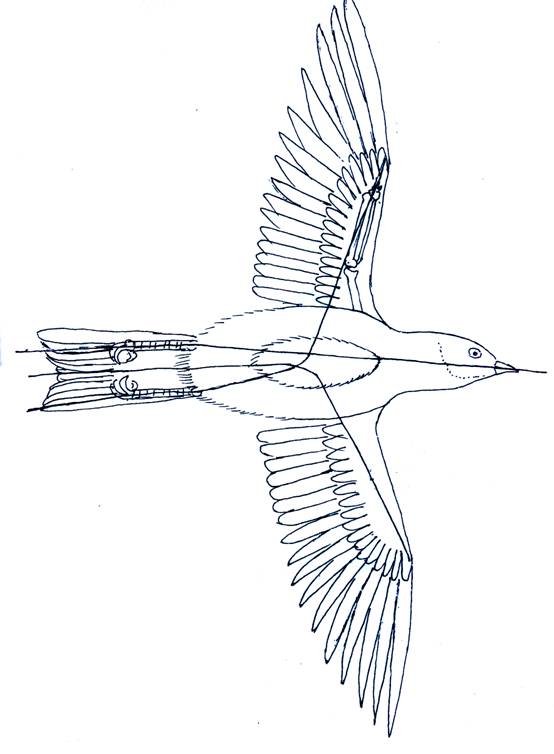
4.涂防腐剂

皮内依次均匀涂擦防属药膏，尾部肌肉难以全部剔除，可分多次涂擦，另外眼窝、脑颅腔内也要除药。

5.充填

(1)支架制作

剪1长1短两根铁丝， 短铁丝的长度是鸟头顶至脚的长度再加3~ 4cm， 长铁丝的长度比短铁丝再增加4cm。 两根铁丝一端并齐，用钳子在短铁丝的2/3处扭绞5~6转，先将一端不齐的 2根铁丝 前后拉直成一直线，长的一-端做头颈支架， 短的一端做尾部支架。然后将一端并齐的两根铁丝向左右分开与扭绞线在同一平面上垂直，再视鸟的大小，将两根铁丝垂直折向前方做脚的支架。如做展翅标本还要剪取1根铁丝做翼部支架，长度是(翼长十3~4cm) X2，把展翅铁丝的中央部分与原支架的扭绞处再次扭绞。支架的安装顺序:头颈→两腿→两翼→尾部。



4-3支架示意图

(2)充填

①充填的原则是嗉囊部要少填，胸部要丰满，腹部要填起，背脊部要显示，腿部要丰满，形态要逼真。一次充填得不要过多要少填多次，显出细微，松紧，虚实要适量。  
②充填顺序是鸟尾部、腰部、支架背面的充填、腹部、两腿外则的充填、头颈部支架背面的充填、胸部两侧充填、下面、颈部、腹面充填、开口缝合。

6.整形、上台板

常态标本造型:把鸟的翅膀收拢起来，将两腿摆正伸直，略有弯曲；折窝颈部使头抬起，若躯体过宽过肥，则将两侧向中间挤压， 羽毛进行大致梳理。  
 展翅标本造型:应将两翼拉开，两翼在背部上举，头颈前伸。  
 标本整形完成后，调整好鸟的重心，量出两脚间距，在台板上打孔将腿端铁丝穿过，从台板下拉紧，绞扭后剪断。将断头弯向台板即可，钉上标签。最后用3~6cm宽的纱布条依鸟体轮廓进行缠绕，并将标本放在通风干操处晾干。一周后用清漆在喙的角质部、腿的跗趾部、脚趾部及蹼进行涂刷，以起保护作用。  
五、实验结果与作业

每4人上交剥制标本1份。

实验五 植物腊叶标本及浸制标本的制作与保存

1. 实验目的和要求

1．了解并掌握蕨类与种子植物标本的采集、记录方法；

2．掌握腊叶标本的制作方法；

3．通过解剖与观察，熟练掌握利用工具书鉴定植物标本的方法。

二、实验原理

腊叶标本就是经过压榨和干燥处理的植物标本，也叫压制标本。压榨和干燥处理的目的，是在短时间内使植物体内的水分被纸吸尽和蒸发掉，使标本能长期保存，不致霉烂。

细菌生长、微生物繁殖需要营养、水、温度、合适的PH及气体。营养成分，温度，水活度值，PH值，化学抑制剂和气体都能用来控制细菌生长。植物标本正是限制了微生物与细菌生长必要的水分。

压制好的植物标本如果要进行长期保存，在装订前还要对标本进行消毒。如果不是永久保存的标本，仅是学生实验，可以省略消毒步骤，这样既可以避免汞的升华污染，又可以降低实验成本，缩短实验时间。植物标本的消毒主要是用升汞酒精溶液或紫外线杀死标本表面的微生物、虫卵或幼虫，常见消毒方法有以下两种：

（1）干制标本＋1%升汞酒精溶液消毒。

（2）紫外线灯光照消毒。

三、实验器具与试剂

1.器具

标本夹、草纸、枝剪、高枝剪、标本采集箱、号牌、植物标本采集记录本、植物标本采集记录签、定名标签、台纸、锉子、解剖镜、扩大镜、镊子、解剖针、烧杯、玻棒、瓷盘；中国高等植物图鉴、植物检索表（实验指导）

2.试剂

阿拉伯树胶、白乳胶、HgCl、酒精、福尔马林、醋酸铜、硫酸铜、亚硫酸、冰醋酸、亚硫酸、氧化锌、甘油、氯化钠、硼酸、氯化锌、蒸馏水等。

四、实验材料

植物新鲜标本

五、实验内容

（一）浸制标本制作法

浸制标本是用防腐剂和保色剂将植物标本浸泡到标本瓶中的标本，用以保持植物原有形状与色泽。这种方法保存果实和蔬菜标本时，应用较多。现将常用的几种方法介绍如下：

1．防腐保存法：

此法是将福尔马林以蒸馏水或冷开水稀释为5～10％的水溶液，其浓度高低视标本的含水量而定，含水量高的溶液浓度宜高。然后将标本洗净整形，投入该液中。如标本浮于液面而不下沉，可采用玻璃片或瓷器等重物压入液中。福尔马林为经济及应用最普遍的防腐剂，此法只适宜保存标本形状，但不能保存标本原有色泽。  
2．绿色标本保存法  
 1）将绿色标本洗净整形后，放入5％硫酸铜水溶液，浸1～3天，取出用清水漂洗数次，再保存于5％福尔马林水溶液中。   
 2）取醋酸铜(或硫酸铜)粉末，徐徐加入5％的冰醋酸内，用玻棒搅拌，直至饱和状态，即成原液。将原液用蒸馏水稀释四倍，把稀释液和标本同时放入烧杯加热，标本渐变黑色，继续加热，直至变为绿色，立即停止加热，取出标本，用清水漂洗数次后，再放入5％的福尔马林液中保存。此法手续较复杂，但所制标本良好可经久不变。该法适用于保存果蔬、叶子、幼苗、桃、梨、苹果等绿色植物以及具病毒的茎、叶等。  
 3）取硫酸铜饱和液700ml，福尔马林50ml，加水至1000ml。将植物标本浸入该液10天左右，取出用清水漂洗数次，再浸入5％的福尔马林液中保存。此法适用于体积较大，表面具蜡质且蜡质较多的果蔬、茎、叶标本。  
3．黄色或淡绿色标本保存法  
 1）将标本浸入0.1～0.15％亚硫酸水溶液中，如果实为淡绿色，可在1000ml的浸液中加入50ml的5％硫酸铜溶液。此法适用于桃、杏等果实。  
 2）将亚硫酸100ml与800ml的水混合，待澄清后再加入95％的酒精100ml，将标本投入此液保存。如果实为绿色，可在1000ml浸液中，加入50ml的5％硫酸铜溶液。此法适用于梨、葡萄和苹果等果实。  
 3）将亚硫酸1.5ml，氧化锌2g，水100ml配成浸液。或取亚硫酸3ml、甘油1ml、水100ml，配成浸液。此法适用于柿、柑桔等果实。  
4．黑色、紫色标本保存法  
 1）取福尔马林45ml、酒精280ml、蒸溜水2000ml混合，以澄清液保存标本。此法适用于保存深褐色的梨、黑紫色的葡萄、樱桃等果实。  
 2）取福尔马林50ml，氯化钠的饱和水溶液100ml，蒸馏水870ml，将三液混合，沉淀过滤，用滤液保存标本。此法适用于保存红色的樱桃、葡萄、苹果等果实。

5．红色标本保存法

材料先经固定液浸泡(一般1～3天)，待果皮颜色变为深褐色后，取出移入保存液中。固定液配方：水400ml、福尔马林4ml、硼酸3g。保存液配方：0.15～0.2％亚硫酸溶液中加入硼酸少许。

6．白色标本保存法  
 取氯化锌22.5g，溶于63ml水中，搅拌促其溶解，再加入85％酒精90ml，取澄清液保存。此法适用于保存白色桃、浅黄色梨和苹果等果实。  
 保存液配好后放入标本瓶中，把洗净的标本放入其中浸泡，加盖后用溶化的石蜡将瓶口严密封闭。贴上标签(注明标本的科名，学名、中名、产地、采集时间和制作人)。放置阴凉处妥善保存。

（二）腊叶标本的采压与制作

集全株植物或植物的一部分，经过压制待植物体完全干燥后，装订到台纸上的标本。该标本能够长期保存下来，是用于教学和科研的宝贵的科学资料。

采压与制作腊叶标本的常用用品包括平枝剪、高枝剪、小锄头、小锯、采集箱或采集袋、标本夹、扩大镜、望远镜、号牌、铅笔、野外记录本、台纸、胶水、草纸、小剪、镊子、瓷盘等。腊叶标本的好坏和价值，取决于标本本身的典型性、代表性、完整性和美观程度。因此在采集时要认真观察、选择，作好野外观察记录，采回后要细心压制，妥善保存。其步骤如下：

1．标本的选择：采集时应全面的观察，选择有代表性的无病虫的植株或部分。木本或藤本植物一般很大，可采适当长度(38～45cm)的带有花、果、叶的枝条(若同株植物有不同叶形的均应采集)；草本植物采花、果、根、茎、叶具备的全株；蕨类植物采带有孢子囊群的孢子叶；苔藓植物采带有颈卵器及精子器的植株或具有孢子体的植株。

2．野外记录：野外记录在标本的鉴定中有特殊重要作用，它可补充所采标本的不足，如采集地点、时间，植物的生活环境，植物体各部分的详细特征，如树木高度、胸高直径、树皮颜色、裂开情况、叶、花果的颜色，气味等。都应当场作好采集记录。

3．标本编号：在采集记录时应立即进行标本编号，挂上号牌(用硬纸制成)。其号数应与采集记录表上一致。同一标本，一般采集三份，应用同一采集号。  
4．标本的压制：标本的好坏及其在科学上的价值，亦取决于压制是否精细。采回的标本应立即进行压制，如停放过久，水分失去，叶、花卷缩，将无法保持原形而失去保存价值。压制前，首先要对标本进行初步的整理，剪去多余的枝叶，除掉根部污泥杂物，准备压制。

(1) 将标本夹中的一块作为底板，铺上5～6层草纸，把一份带有号牌的标本展平于草纸上，使标本的叶片展示出正面和反面，其它部分也尽量要有几个不同的观察面。盖上2～3层草纸，再放另一份标本。放标本时要注意逐个首尾互相交错摆入，以保持整夹标本的平整。这样一号一号按顺序压制。当标本压制到一定高度时，上面多放几层草纸．再盖上另一块夹板，用麻绳捆紧。放在日光下晒，如遇到阴雨天即放在通风处。

(2) 有些植物的营养器官肉质多汁，不易压干，需在压制前用沸水烫1～2分钟或用福尔马林液浸泡片刻，将细胞杀死后再进行压制；有些植物有很大的根、地上茎或果实，不宜入标本夹，可挂上号牌另行晒干或凉于，妥善保存或用浸液保存。

5．换纸：新压制的标本，每天至少要换一次纸，待标本含水量减少后，可每一、二天换一次纸，以保持标本不发霉和减少变色。一般来说，标本干的越快，原色就保存越好。为使标本尽快干燥，就必须勤换纸。每次换下来的潮湿纸，要及时晒干或烘干，以供继续使用。在最初两次换纸，要注意结合整形，将卷曲的叶片。花瓣展平。标本上脱落下来的部分，要及时收集装袋．并注上该标本号，与原标本放在一起。

6．消毒：标本压干后。用升汞酒精液消毒，以杀死标本上的虫和虫卵。升汞酒精液的配方是：用升汞1g，70％酒精1000ml配成。消毒方法是：将标本放入盛有消毒液的大型平底瓷盘中，约经10～30秒钟。升汞为剧毒药品，消毒时要特别注意安全。此外，亦可用DDV、二硫化碳或其它药剂消毒。消毒后的标本，要重新压干，再上台纸。

7．上台纸：台纸是承托腊叶标本的白色硬纸。台纸一般长约40cm，宽约30cm，以质密、坚韧、白色为宜。上台纸时，按下列步骤进行：

(1) 取一张台纸平放在桌子，将标本按自然状态摆在台纸上的适当位置，并进行最后一次整形，剪去过多的枝、叶、果，长了的可折曲成V形或N形。

(2) 装订标本时，在根、枝条和叶柄的两侧用扁锥穿通台纸，穿进坚韧的纸条，在台纸背面，将纸条两端用胶水紧贴于台纸上。

(3) 凡在压制中脱落下来而应保留的叶、花、果，可按自然着生情况装订在相应位置上或用透明纸装贴于台纸上的一角。  
(4) 在台纸的右下角贴上定名标签。按标本号，复写一份采集记录，贴于台纸的左上角，制成的标本如图四。

8．标本的保存：上好台纸的腊叶标本，必须妥善保存，方能长期不坏。一般应按科、属分别放人标本柜中。标本柜以樟木或苦楝为最好，柜中应保持干燥，并适当放入樟脑丸等驱虫剂。此外，还要定期(约2～3年)以“六六六”或灭害灵等喷射消毒，有消毒室的，也可用熏烟法消毒，无论采用哪种方法药物都是有毒的，应特别注意安全。

合肥工业大学植物标本采集记录

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 采集记录： | | | |
| 标本号： | | | |
| 采集人： | | 采集号数 | |
| 采集日期： | | | |
| 产地： | | | |
| 环境： | | 地形： | 海拔： |
| 土壤： | | | |
| 小环境： | | | |
| 生态： | | | |
| 性状： | | | |
| 高度： | | 胸高直径： | |
| 形态 | 树皮： | | |
| 根： | | |
| 茎： | | |
| 叶： | | |
| 花： | | |
| 果实： | | |
| 附记： | | | |
| 科名： | | | |
| 中名： | | | |
| 学名： | | | |

定名标签式样

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 合肥工业大学基础生物标本馆 | | | |
| 科 名： | | | |
| 学 名： | | | |
| 中 名： | | | |
| 采集人： |  | 采 集 地： |  |
| 鉴定人： |  | 采集日期： |  |
| 环 境： |  | 性 状： |  |
| 采集号码： |  | 标本号数： |  |

  （三）植物标本的鉴定

植物标本的鉴定方法很多，如标本核对法、细胞学鉴定法、化学鉴定法、分子生物学鉴定法等，但简洁而常用的是利用植物图鉴（如《中国高等植物图鉴》）、植物志（如《中国高等植物志》、《安徽植物志》）等工具书对植物标本进行定名。

植物图鉴和植物检索表一样，是鉴定植物所必须的工具书，它是运用简短文字和精细附图来鉴定植物的。它通常根据植物科、属的不同，按照一定的系统排列，并列出植物的中名、土名、学名、形态特征，以至植物的生境、产地和用途等都作了说明，其用法是：

1．运用检索表查出科名后，就在图鉴前的分科目录中，查到某科所在的页数，有些图鉴前面没有分科目录，而是在书后附有科名、属名、中名或学名等的汉字笔画表或拉丁文字母的索引。不管什么形式，总是可以查出科的所在页数。  
2．找到该科所在页数后，首先核对与被查植物的特征是否一致，如果符合，则证明植物确为该科、再在该科的种类中，细对图形和文字记述，如果所有特征都相符合，则证明鉴定无误，即得出种名。最好多查几本图鉴，以便彼此证实。出版较早的图鉴不及新近出版的图鉴准确。

3．对尚未开花结果的植物，一般鉴定较难．且易出差错。应待有花果时鉴定，较为可靠。

植物检索表和植物图鉴的种类很多，有全国性的；如《中国植物的科、属检索表》、《中国高等植物图鉴》、《中国植物志》；有地方性的：如一个省或一个市，有木本或草本植物的、有分科专著的等。在使用时应根据不同的需要，选择所需要的检索表和图鉴或植物志。最好是根据你要鉴定植物的产地，来确定检索表和图鉴的范围。如已知待鉴定的植物是从湖北省采来的，那么利用湖北植物检索表、图鉴或《湖北植物志》，或其周围省份（如湖南省）的植物志解决问题。

六、实验结果与作业

1． 压制10-20张蜡叶标本，并将其制作成小标本装订成册，利用图鉴正确定名。

2． 选取2份蜡叶标本上台纸装订，要求号牌、记录签、定名签完整，并正确定名。

实验六 叶脉书签制作

 一、实验目的和要求

1. 掌握叶脉书签的制作方法；

2.了解可以制作叶脉书签的植物。  
二、 实验原理

叶肉遇到腐蚀性液体就会发生腐烂。经过加热，它会腐烂得更快。叶脉比较坚韧，不容易被腐蚀。因此，可以将一些叶片坚硬、叶脉坚韧的树叶制成叶脉书签。选做书签的叶子要符合两大要求：1、叶脉为网状脉。横向脉如银杏叶、针形叶如松针均不可取。2、叶脉清晰完整，这样才能确保叶脉不会与叶肉一起被腐烂，也减少去除叶肉时叶脉被刷断的发生率。

由网状脉叶子做成的书签上可以看到中间一条较粗壮的叶脉称主脉，在主脉上分出许多较小的分支称侧脉；侧脉上又分出更细小的分支称细脉。这样一分再分，最后把整个叶脉系统联成网状结构。把这种网状叶脉染成各种颜色，系上丝带或流苏，即成漂亮的叶脉书签了。

叶片中含有半纤维素,木质素和纤维素（多存在于细胞的细胞壁中）,而氢氧化钠可以水解木质素和半纤维素（但这里请注意氢氧化钠不能水解纤维素）,将半纤维素和木质素水解后就可以达到腐蚀的效果,留下叶柄的部分,从而达到制作标本的目的.而硫酸会将整个叶片全部腐蚀（包括叶肉和叶柄）,而这样又怎么制作标本呢?所以在木材造纸时,要加上NAOH就是这个道理.  
三、试剂与材料

烧杯，三脚架，石棉网，酒精灯，火柴，天平，旧牙刷，镊子。

水彩颜料，彩色丝线，氢氧化钠，3%双氧水。

叶子。一般以常绿木本植物为好。如桂花叶、石楠叶、木瓜叶、桉枝叶、茶树叶、玉兰叶、珊瑚树叶等。

1. 实验步骤

1、把约100毫升水倒入烧杯，在水中加入4克氢氧化钠，把烧杯搁在石棉网上，用酒精灯加热，煮沸溶液。

2、把树叶浸没在溶液中，继续加热15分钟左右，用镊子轻轻搅动，使叶肉分离，腐蚀均匀。

3、当叶片变色、叶肉酥烂时，用镊子取出叶片，放在盛有清水的玻璃杯内。

4、从清水里取出叶片，放在玻璃上，用旧牙刷在流水中轻轻地刷叶片的正面和背面，刷去叶片的柔软部分，露出白色的叶脉。把叶脉片浸入3%的双氧水中24小时，使它们变成纯白色，再取出叶片，用清水洗净，沥去水滴。

5、把叶脉片放在旧书或旧报纸里压干。

6、取出压平的叶脉片，待叶脉干透后，用毛笔在叶脉两面涂上水彩颜料，稍干后再压平。

7、取出涂上颜料的叶脉片，在它的叶柄上系一条彩色丝线，就得到了一张精致美丽的叶脉书签了。

五、实验结果与作业

1.每人上交五片成品桂花树叶；

2.除了用氢氧化钠还有其他简单的方法腐蚀叶肉吗？与同学讨论并试验。

六、说明与延伸

1、加热时，烧杯必然搁在石棉网上，如直接加热，烧杯由于受热不匀会引起破碎。

2、用过的药液可保存在空容器中，以便下次再用，一般药液可循环使用4～5次。

3、如加工处理的叶子过多，可换大烧杯，水和氢氧化钠应按100∶4比例增加

**《生物化学》实验指导书**

**生物化学实验细则**

为了保证生物化学实验的顺利进行，培养同学们掌握良好、规范的生物化学基本实验技能，特制定以下实验细则，请同学们严格遵守。

1. 实验前应提前预习实验指导书并复习相关知识。
2. 严格按照生物化学实验分组，分批进入实验室，不得迟到。非本实验组的同学不准进入实验室。
3. 进入实验室必须穿实验服。各位同学进入各自实验小组实验台后，保持安静，不得大声喧哗和嬉戏，不得无故离开本实验台随便走动。绝对禁止用实验仪器或药物开玩笑。
4. 实验中应保持实验台的整洁，废液倒入废液桶中，用过的滤纸放入垃圾桶中，禁止直接倒入水槽中或随地乱丢。
5. 实验中要注意节约药品与试剂，爱护仪器，使用前应了解使用方法，使用时要严格遵守操作规程，不得擅自移动实验仪器。否则，因非实验性损坏，由损坏者赔还。
6. 使用水、火、电时，要做到人在使用，人走关水、断电、熄火。
7. 做完实验要清洗仪器、器皿，并放回原位，擦净桌面。
8. 实验后，要及时完成实验报告。

2017年3月

**目 录**

**实验1 葡聚糖凝胶过滤层析分离蛋白质（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**实验2 凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量（生物技术、生物工程专业）**

**实验3 唾液淀粉酶的性质、活力及米氏常数测定（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**实验4 唾液淀粉酶的活力和米氏常数的测定（生物技术、生物工程专业）**

**实验5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量**

**实验6 DNA的琼脂糖凝胶电泳**

**实验7 植物体内的转氨基作用（生物技术、生物工程专业）**

**实验1 葡聚糖凝胶过滤层析分离蛋白质**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**目的要求**

掌握凝胶层析法分离蛋白质的原理和方法。

**原 理**

凝胶是由胶体溶液凝结而成的固体，它们的内部有很细微的多孔网状结构。凝胶颗粒在合适的溶剂中浸泡，充分吸液膨胀，然后装入层析柱内，加入欲分离的混合物后，再以同一溶剂洗脱。在洗脱过程中，大分子不能进入凝胶内部而沿凝胶颗粒间的空隙最先流出柱外，而小分子可以进入凝胶颗粒内部的多孔网状结构，流速缓慢，以至最后流出柱外，从而使样品中分子大小不同的物质得到分离。对凝胶层析分离的简单过程可用图4-1表示。

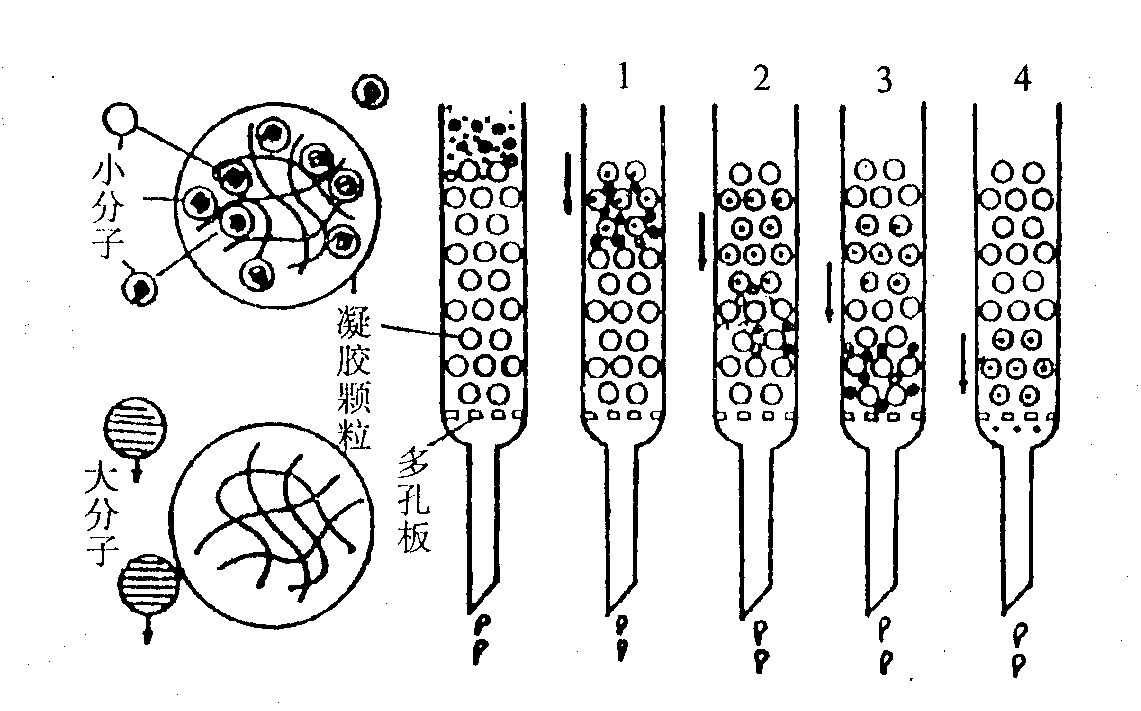


图4-1 小分子由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留，

大分子被排阻在凝胶颗粒外面，在颗粒之间迅速通过。

**试剂和器材**

一、试剂

1. 标准蛋白质混合液：1ml/组

3mg/ml蓝色葡聚糖，8mg/ml肌红蛋白。溶剂为含15%（V/V）甘油的洗脱缓冲液。

2. 洗脱液[0.05mol/LTris—盐酸溶液(pH7.5)，内含0.1mol/LNaCl]：

50ml 0.1mol/L Tris溶液与40.3ml 0.1mol/L盐酸混匀后，溶解0.585克NaCl，加水稀释至100ml，即得洗脱液

3. Sephadex G-75

二、器材

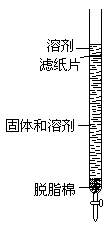
层析柱：柱管（直径1.0~1.3cm；管长50cm）1个/组，试管，玻璃棒，滤纸，移液管，（721分光光度计）试管架、铁架台

**操作方法**

1. 凝胶的处理（教师准备）

将称好的干粉倾入过量的洗脱液中，在室温下放置，使之充分溶胀。为了缩短时间，可在沸水浴中加热将近100℃，这样可缩短溶胀时间至几小时，而且可以杀死细菌和霉菌，并排除凝胶内气泡。

2. 装柱



装柱前将凝胶上面过多的溶液倾出，用真空干燥器抽尽凝胶中空气。关闭层析柱出水口，并向柱管内加入约1/3柱容积的洗脱液，然后在缓慢搅拌下，将浓浆状的凝胶连续地倾入柱中，使之自然沉降，待凝胶沉降约2—3cm后，打开柱的出口，调节合适的流速，使凝胶继续沉集，待沉集的胶面上升到离柱的顶端约5cm处时停止装柱，关闭出水口。接着通过2—3倍柱床容积的洗脱液使柱床稳定，然后在凝胶表面上放一张滤纸片或一团脱脂棉，以防将来在加样时凝胶被冲起，并始终保持凝胶上端有一段液体。

3. 加样

加紧上、下进出水口夹子，以防止操作压改变。用1ml移液管吸取1ml样品混合液，将移液管尖端小心插入柱中液面下方1cm处，小心释放样品，使其在脱脂棉上端形成一个层面，过程大约需要2分钟完成。看到样品层刚好完全流入凝胶床时，向柱上小心的添加缓冲液至合适高度（约5cm左右），以保证流速的稳定。（注意：不能使胶床上端无充裕的缓冲液，以防干裂）

4. 洗脱

洗脱时，打开上、下进出口夹子，先收集10ml流出液，用洗脱液以每管4ml/管流速洗脱，用试管收集流出液，并对每管编号。当所有有色物质洗脱下来后，关闭螺旋夹停止洗脱。然后在对应的波长下读各管的光吸收值。

**实验2 葡聚糖凝胶过滤层析法测定蛋白质分子量**

**（生物技术、生物工程专业）**

**目的要求**

1. 初步掌握利用凝胶层析法测定蛋白质分子量的原理。

2. 学习用标准蛋白质混合液制作Ve, Kav对的“选择曲线”以及测定未知蛋白质样品分子量的方法。

**原 理**

凝胶是由胶体溶液凝结而成的固体，它们的内部有很细微的多孔网状结构。目前关于凝胶层析的原理有许多假设和理论，普遍接受的是分子筛效应。凝胶颗粒在合适的溶剂中浸泡，充分吸液膨胀，然后装入层析柱内，加入欲分离的混合物后，再以同一溶剂洗脱。在洗脱过程中，大分子不能进入凝胶内部而沿凝胶颗粒间的空隙最先流出柱外，而小分子可以进入凝胶颗粒内部的多孔网状结构，流速缓慢，以至最后流出柱外，从而使样品中分子大小不同的物质得到分离。对凝胶层析分离的简单过程可用图4-1表示。

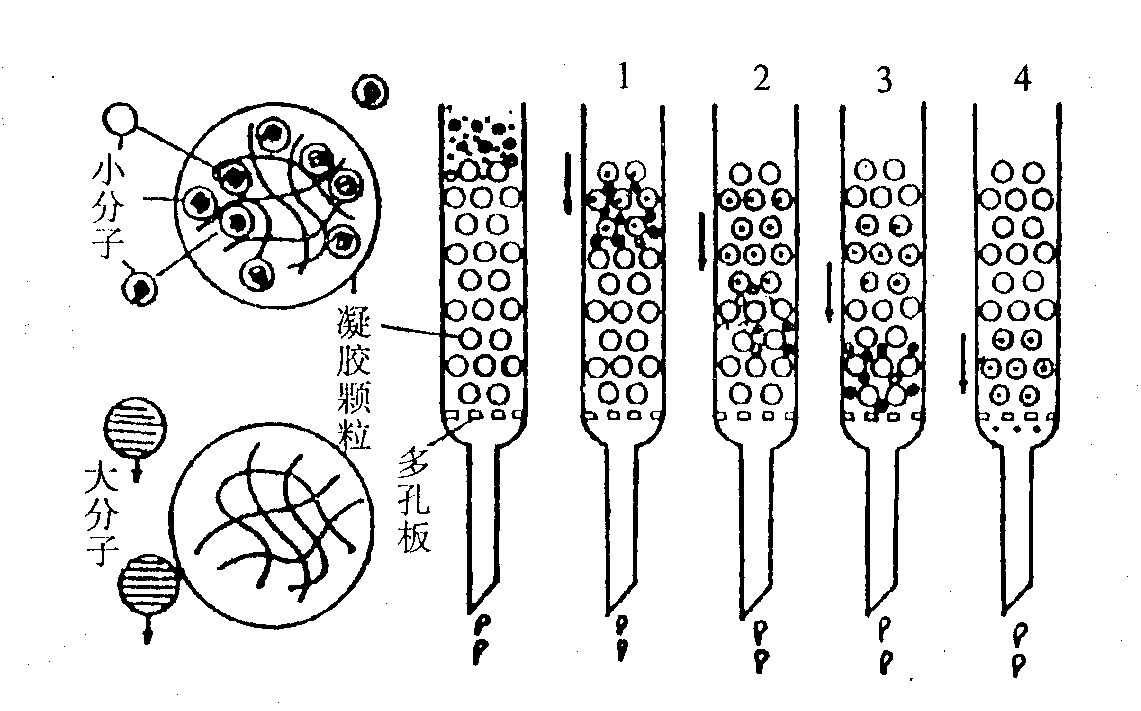
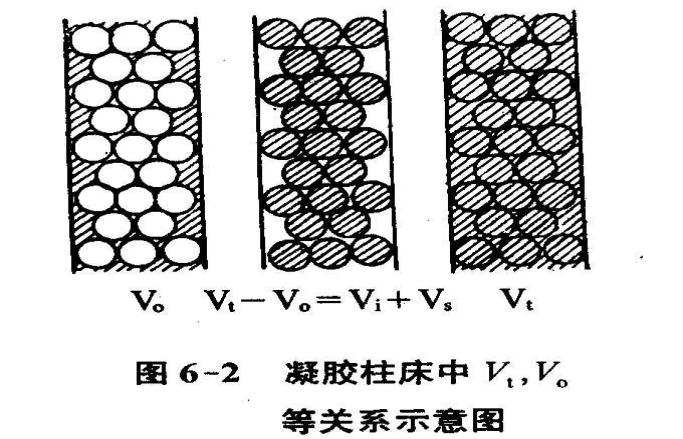


图4-1 小分子由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留，

大分子被排阻在凝胶颗粒外面，在颗粒之间迅速通过。



外水体积、内水体积、柱床体积 、洗脱体积

外水体积（*V*o）是指凝胶柱中凝胶颗粒周围空间的体积内水体积（*V*i）是指凝胶颗粒中孔穴的体积。柱床体积 是（*V*t）凝胶柱所能容纳的总体积

洗脱体积（*Ve*）是指将样品中某一组分洗脱下来所需洗脱液的体积。它包括自加入样品时算起，到组分最大浓度出现时所流出的体积。 *Ve*一般是介于*Vo* 和*Vt*之间的。

对于完全排阻的大分子由于其不进入凝胶颗粒内， 故其洗脱体积

*Ve* ＝ *Vo*

对于完全渗透的小分子由于它可以存在于凝胶柱整个体积内，故其洗脱体积

*Ve* ＝ *Vt*

分子量介于二者之间的分子，它们的洗脱体积也介于二者之间。

洗脱容积Ve是自加入样品时算起，到组分最大浓度峰出现时所流出的容积，它与V0,Vi的关系为：



式中Kd为分子量不同的溶质在凝胶内部和外部的分配系数，只与被分离物质分子的大小和凝胶颗粒空隙的大小分布有关。上式可改写成：



Kav是有效分配系数，对交联度小的凝胶Kav与Kd差别较小，而对交联度大的凝胶二者差别较大。Kav可用下式表示：



根据凝胶层析原理，对同一类型化合物的特征与组分的分子量有关。流过凝胶柱时，按分子大小顺序流出，分子量大的走在前面。洗脱容积Ve是该物质分子量对数的线性函数：



式中，为常数，为分子量。

也可以用（有效分配系数）代替，与分子量的关系同上式，只是常数不同。通常多以对分子量的对数作图得一曲线，称为“选择曲线”。如图4-2所示。选择曲线的斜率说明凝胶性质的一个很重要的特征。在允许的工作范围内，曲线愈陡，则分级愈好，而工作范围愈窄。凝胶层析主要决定于溶质分子量大小，每一类型的化合物如球蛋白类等都有自己特殊的选择曲线，可用于测定未知物的分子量，测定时以使用曲线的直线部分为宜。

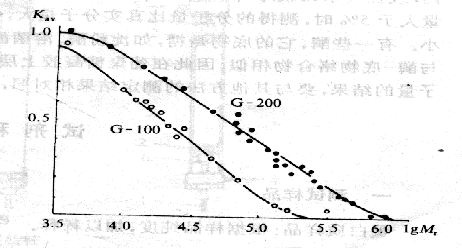


图4-2 球蛋白分子量选择曲线

为了测定分子量，就必须知道一根特定柱的Vt，V0和Vi，从而计算出Kd，Kav等。V0可用不被凝胶滞留的大分子物质的溶液，如血红蛋白，印度黑墨水，分子量约200万的蓝色葡聚糖—2000等有颜色的溶液，通过测定大分子物质的洗脱曲线，洗脱峰峰顶洗出的体积就是该柱的V0值。选一种分子量小于凝胶工作范围下限的化合物，测出其洗脱体积Ve，减去V0就是Vi，常用硫酸铵来测定。Vt可用下式计算：



为常数3.14，为柱直径，为凝胶床的高度。

**试剂和器材**

一、试剂

1. 标准蛋白质混合液：1ml/组

3mg/ml蓝色葡聚糖，8mg/ml肌红蛋白。溶剂为含15%（V/V）甘油的洗脱缓冲液。

2. 洗脱液[0.05mol/LTris—盐酸溶液(pH7.5)，内含0.1mol/LNaCl]：

50ml 0.1mol/L Tris溶液与40.3ml 0.1mol/L盐酸混匀后，溶解0.585克NaCl，加水稀释至100ml，即得洗脱液

3. Sephadex G-75

二、器材

层析柱：柱管（直径1.0~1.3cm；管长50cm）1个/组，试管，玻璃棒，滤纸，移液管，（721分光光度计）试管架、铁架台

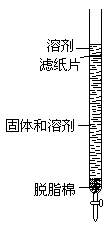
**操作方法**

一、一般操作方法

1. 凝胶的处理（教师准备）

将称好的干粉倾入过量的洗脱液中，在室温下放置，使之充分溶胀。为了缩短时间，可在沸水浴中加热将近100℃，这样可缩短溶胀时间至几小时，而且可以杀死细菌和霉菌，并排除凝胶内气泡。

2. 装柱



装柱前将凝胶上面过多的溶液倾出，用真空干燥器抽尽凝胶中空气。关闭层析柱出水口，并向柱管内加入约1/3柱容积的洗脱液，然后在缓慢搅拌下，将浓浆状的凝胶连续地倾入柱中，使之自然沉降，待凝胶沉降约2—3cm后，打开柱的出口，调节合适的流速，使凝胶继续沉集，待沉集的胶面上升到离柱的顶端约5cm处时停止装柱，关闭出水口。接着通过2—3倍柱床容积的洗脱液使柱床稳定，然后在凝胶表面上放一张滤纸片或一团脱脂棉，以防将来在加样时凝胶被冲起，并始终保持凝胶上端有一段液体。

3. 加样

加紧上、下进出水口夹子，以防止操作压改变。用1ml移液管吸取1ml样品混合液，将移液管尖端小心插入柱中液面下方1cm处，小心释放样品，使其在脱脂棉上端形成一个层面，过程大约需要2分钟完成。看到样品层刚好完全流入凝胶床时，向柱上小心的添加缓冲液至合适高度（约5cm左右），以保证流速的稳定。（注意：不能使胶床上端无充裕的缓冲液，以防干裂）

4. 洗脱

洗脱时，打开上、下进出口夹子，先收集10ml流出液，用洗脱液以每管4ml/管流速洗脱，用试管收集流出液，并对每管编号。当所有有色物质洗脱下来后，关闭螺旋夹停止洗脱。然后在对应的波长下读各管的光吸收值。

二、蛋白质分子量的测定

1. 测定V0和Vi

将0.5ml蓝色葡聚糖—2000和硫酸铵混合液（2mg/ml）上柱、洗脱，分别测出蓝色葡聚糖的洗脱体积Ve即为该柱的V0，硫酸铵的洗脱体积Ve即为该柱的Vi。蓝色葡聚糖的洗脱峰可根据颜色判断，硫酸铵的洗脱峰用Ba(Ac)2判断。

2. 标准曲线的制作

按上述方法将1ml标准蛋白质混合液上柱、洗脱，用试管收集。`收集后，于以下对应波长下读各管的光吸收值：

蓝色葡聚糖（蓝色）：650nm

肌红蛋白（琥珀色）：500nm

以洗脱体积为横坐标，光吸收值为纵坐标作洗脱曲线。根据洗脱峰位置，量出每种蛋白质的洗脱体积（Ve），然后以蛋白质分子量的对数lgMr为纵坐标，Ve为横坐标，作出标准曲线。同时根据已测出的V0和Vi以及计算出的Vt，求出Kav。也可以Kav为横坐标，lgMr为纵坐标作出标准曲线。

3. 未知样品分子量的测定

将未知样品按标准曲线的条件操作。根据洗脱峰的位置，量出洗脱体积，也可以计算出Kav，分别由标准曲线查得样品的分子量。

**思 考 题**

1. 根据实验中遇到的各种问题，概述做好本实验的经验与教训。
2. 凝胶过滤的介质有哪些，各过滤介质的异同是什么？

通过本次实验学习，讨论SDS—PAGE和凝胶过滤法测定蛋白质分子量的异同。

**实验3 唾液淀粉酶的性质、活力和米氏常数测定**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**实验目的**

1. 通过唾液淀粉酶性质的测定，了解多种因素（底物浓度、温度、pH值、激活剂和抑制剂等）

对酶促反应速度的影响；

2. 学习酶活力，酶活力单位，比活力以及米氏常数的测定，加深对概念的理解；

3. 学会用考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量，学会用3,5-二硝基水杨酸测定还原糖的含量，熟

练操作分光光度计。

**实验试剂和器材**

一、试剂

可溶性淀粉， NaoH，标准牛血清白蛋白，蒸馏水，95%乙醇，85%磷，0.15mol/LNaCl，0.15mol/L硫酸铜溶液，碘化钾–碘溶液，醋酸，醋酸钠

（1）考马斯亮蓝试剂G-250：考马斯亮蓝试剂G-250 100mg溶于50ml 95%乙醇中，加入100ml 85%磷酸，加水稀释至1000ml，过滤即可。:

（2）3,5-二硝基水杨酸：以称取3,5-二硝基水杨酸6.3 g，氢氧化钠 21.0 g充分溶解于500ml蒸馏水中（水先煮沸10分钟后冷却），加入酒石酸钾钠182.0g，苯酚（在50℃水中融化） 5.0 ml，偏重亚硫酸钠5.0g，搅拌至全溶，定容至1000 ml。充分溶解后盛于棕色瓶中，放置10天后便可使用。平时盛一小瓶放在外面使用，其它储于冰箱中。此溶液每月配制一次。注意：DNS一定要在配制结束后立即转移到小棕色瓶中，同时，使用过程中尽量减少与空气接触。

（3）标准牛血清白蛋白溶液：结晶牛血清白蛋白用0.15mol/L NaCl配置成0.1mg/mL的蛋白液

（4）0.1%葡萄糖：准确称取100mg葡萄糖，溶于蒸馏水中，定容于100ml的容量瓶中，配成1.0mg/L的溶液。

二、器材

可见光分光光度计，试管，移液管，恒温水浴锅，pH试纸

**操作方法**

一 、底物浓度、温度、PH、激活剂和抑制剂对酶反应速度的影响

1. 底物浓度对酶促反应的影响

取6支试管并编号，分别加入0.01%, 0.1%，0.5%, 1%, 2%, 3%的可溶性淀粉溶液2ml.，各管加入2ml稀释唾液，于37°C下反应3-5分钟后，每支试管加入2-3滴碘液，观察颜色变化。

2. 温度对酶促反应的影响

取5支试管并编号，温度依次设定为0, 20, 37, 60, 80°C。每只试管加入2ml淀粉溶液和2ml稀唾液，反应3-5分钟后，每支试管加入2-3滴碘液，观察颜色变化。

3. PH对酶促反应的影响

取3支试管并编号，分别加入等量的PH 4.0，6.8, 8.0醋酸-醋酸钠缓冲溶液，加入2ml淀粉溶液和2ml稀释唾液，37°C下反应3-5分钟，加入2-3滴碘液，观察颜色变化。

4. 激活剂和抑制剂对酶促反应的影响

取3支试管并编号，各管均加入2ml pH6.8的缓冲液、2ml淀粉溶液和2ml稀释唾液，再向3支试管中分别加入1ml的蒸馏水、0.15mol/LNacl、0.15mol/L硫酸铜，振荡摇匀，37°C下反应3-5分钟，加入2-3滴碘液，观察颜色变化。

二、葡萄糖标准曲线的制定

取8支试管编号后，按下表顺序向各管中加入0.1%葡萄糖标准溶液和蒸馏水，配制成一系列不同浓度的葡萄糖溶液。然后向各管中加入3,5-二硝基水杨酸（DNS试剂）1.5毫升，混匀，放入沸水浴加热5min，迅速取出用自来水冷却至室温，在向每管加入蒸馏水稀释至25毫升，充分混匀。在分光光度计上与540nm处测吸光度；以葡萄糖含量为横坐标，OD540nm值为纵坐标，绘制标准曲线。表如下：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂处理 试管编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0.1%葡萄糖标准液/ml | — | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |
| 蒸馏水/ml | 2.0 | 1.8 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 0.6 |
| 3,5-二硝基水杨酸/ml | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | | | | | | |
| 以0号为对照，540nm比色 |  |  |  |  |  |  |  |  |

三、蛋白质标准曲线的测定（考马斯亮蓝染色法）

取6支试管，编号，按下表加样操作（单位/ml）

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试管编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.1mg/ml标准蛋白质溶液 | --- | 0. 1 | 0. 3 | 0. 5 | 0. 7 | 0. 9 |
| 蒸馏水 | 1.0 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | 0.1 |
| 考马斯亮蓝试剂 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 以0号为对照，在595nm比色A595nm |  |  |  |  |  |  |

用标准蛋白质质量为横坐标，吸光度为纵坐标做标准曲线。

四、酶活力和比活力测定

1. 酶活力测定及计算

取3支试管，按下表加样操作（单位/ml）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂 | 空白 | 待测1 | 待测2 |
| 酶液 | 0 | 2.0 | 2.0 |
| 0.15mol/L NaCl | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 1%淀粉 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| 37°C保温10min后，沸水浴加热5min终止反应 | | | |
| 蒸馏水 | 2.0 | — | — |
| 3,5-二硝基水杨酸 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | |
| 540nm比色 |  |  |  |

用3,5-二硝基水杨酸试剂测定酶促反应后所生成的还原糖量，由葡萄糖标准曲线求出酶活力单位数，计算酶活力。

2. 比活力测定及计算

取3支试管，按下表加样操作（单位/ml）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂 | 0 | 1 | 2 |
| 稀释的酶液 | --- | 2.0 | 2.0 |
| 蒸馏水 | 2.0 | — | — |
| 考马斯亮蓝试剂 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 以0号为对照，在595nm比色A595nm |  |  |  |

由蛋白质标准曲线求出稀释的酶液中的蛋白质含量，计算唾液淀粉酶的比活力。

五、米氏常数测定

取5支试管

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试管编号（ml） | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1%淀粉 | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| 37℃水浴保温10min | | | | | |
| 每间隔1min逐管加入已在37℃水浴中保温10min的酶液 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 加入酶液后立即混匀，37℃保温10min后 | | | | | |
| 每间隔1min逐管加入0.5mol/L NaOH | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 混匀后逐管取出 **反应物1ml** | | | | | |
| 反应物 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 蒸馏水 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3,5-二硝基水杨酸 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | | | |
| 以0号为对照，在540nm比色A |  |  |  |  |  |

在葡萄糖标准曲线中找出A值对应的葡萄糖量为相对反应速度，1/[S]为横坐标，1/v为纵坐标作图，由图求出Km值。

**实验4 唾液淀粉酶的活力和米氏常数测定**

**（生物技术、生物工程专业）**

**实验目的**

1. 学习酶活力，酶活力单位，比活力以及米氏常数的测定，加深对概念的理解；
2. 学会用考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量，学会用3,5-二硝基水杨酸测定还原糖的含量，熟练操作分光光度计。

**实验试剂和器材**

一、试剂

可溶性淀粉， NaoH，标准牛血清白蛋白，蒸馏水，95%乙醇，85%磷，0.15molNaCl/ml

（1）考马斯亮蓝试剂G-250：考马斯亮蓝试剂G-250 100mg溶于50ml 95%乙醇中，加入100ml 85%磷酸，加水稀释至1000ml，过滤即可。:

（2）3,5-二硝基水杨酸：以称取3,5-二硝基水杨酸6.3 g，氢氧化钠 21.0 g充分溶解于500ml蒸馏水中（水先煮沸10分钟后冷却），加入酒石酸钾钠182.0g，苯酚（在50℃水中融化） 5.0 ml，偏重亚硫酸钠5.0g，搅拌至全溶，定容至1000 ml。充分溶解后盛于棕色瓶中，放置10天后便可使用。平时盛一小瓶放在外面使用，其它储于冰箱中。此溶液每月配制一次。注意：DNS一定要在配制结束后立即转移到小棕色瓶中，同时，使用过程中尽量减少与空气接触。

（3）标准牛血清白蛋白溶液：结晶牛血清白蛋白用0.15mol/L NaCl配置成0.1mg/mL的蛋白液

（4）0.1%葡萄糖：准确称取100mg葡萄糖，溶于蒸馏水中，定容于100ml的容量瓶中，配成1.0mg/L的溶液。

二、器材

可见光分光光度计，试管，移液管，恒温水浴锅，pH试纸

**操作方法**

一、葡萄糖标准曲线的制定

取8支试管编号后，按下表顺序向各管中加入0.1%葡萄糖标准溶液和蒸馏水，配制成一系列不同浓度的葡萄糖溶液。然后向各管中加入3,5-二硝基水杨酸（DNS试剂）1.5毫升，混匀，放入沸水浴加热5min，迅速取出用自来水冷却至室温，在向每管加入蒸馏水稀释至25毫升，充分混匀。在分光光度计上与540nm处测吸光度；以葡萄糖含量为横坐标，OD540nm值为纵坐标，绘制标准曲线。表如下：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂处理 试管编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0.1%葡萄糖标准液/ml | — | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 1.4 |
| 蒸馏水/ml | 2.0 | 1.8 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 0.6 |
| 3,5-二硝基水杨酸/ml | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | | | | | | |
| 以0号为对照，在540nm比色A |  |  |  |  |  |  |  |  |

二、蛋白质标准曲线的测定（考马斯亮蓝染色法）

取六支试管，编号，按下表加样操作（单位/ml）

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试管编号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0.1mg/ml标准蛋白质溶液 | --- | 0. 1 | 0. 3 | 0. 5 | 0. 7 | 0. 9 |
| 稀释的酶液 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.15mol/L NaCl | 1.0 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | 0.1 |
| 考马斯亮蓝试剂 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| 以0号为对照，在595nm比色A595nm |  |  |  |  |  |  |

用标准蛋白质质量为横坐标，吸光度为纵坐标做标准曲线

三、计算酶活力和酶比活力；

取3支试管，如下表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 葡糖糖量检测 | 单位ml | 空白 | 待测1 | 待测2 |
| 酶液 | 2 | 2 | 2 |
| 0.5mol/LNaOH | 0.5 | --- | --- |
| 1%淀粉 | 2 | 2 | 2 |
| 保温10min后，沸水浴加热5min终止反应 | | | |
| 蒸馏水 | --- | 0.5 | 0.5 |
| 3,5-二硝基水杨酸 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | |
| 以0号为对照，在540nm比色A |  |  |  |

用3,5-二硝基水杨酸试剂测定酶促反应后所生成的还原糖量，由葡萄糖标准曲线求出酶活力单位数。

四、米氏常数计算

1、取五支试管

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试管编号（ml） | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1%淀粉 | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| 37℃水浴保温10min | | | | | |
| 每间隔1min逐管加入已在37℃水浴中保温10min的酶液 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 加入酶液后立即混匀，37℃保温10min后 | | | | | |
| 每间隔1min逐管加入0.5mol/L NaOH | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 混匀后逐管取出 **反应物1ml** | | | | | |
| 反应物 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 蒸馏水 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3,5-二硝基水杨酸 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| 混匀，**沸水浴**加热5min，冷却后，加入蒸馏水定容25ml. | | | | | |
| 以0号为对照，在540nm比色A |  |  |  |  |  |

在葡萄糖标准曲线中找出A值对应的葡萄糖量为相对反应速度，1/[S]为横坐标，1/v为纵坐标作图，由图求出Km值

**实验5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业、生物技术、生物工程专业）**

**目的要求**

1．学习SDS—PAGE测定蛋白质分子量的原理。

2．掌握SDS—PAGE测定蛋白质分子量的操作方法。

**原 理**

聚丙烯酰胺凝胶是由单体—丙烯酰胺（acrylamide,简称Acr）和交联剂—N,N-甲叉双丙烯酰胺（methylene-bisacrylamide,简称Bis）在加速剂和催化剂的作用下聚合而成的高分子物质，具有三维网状结构和分子筛性质。以此凝胶为支持物的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis, 简称PAGE）。

由于各种蛋白质所带的净电荷、分子量大小和形状不同，在电泳中会产生不同的电荷效应和分子筛效应，不连续电泳还有浓缩效应，因而有不同的迁移率。

聚丙烯酰胺凝胶由于富含酰胺基，故它是稳定的亲水凝胶。结构中不带电荷，因而在电场中电泳电渗现象极为微小。网状结构能限制蛋白质大分子的扩散运动，具有良好的抗对流作用。在合适浓度范围内还具有较好的透明度，一定的机械强度，以及化学上惰性、吸附作用很小等许多优点。

十二烷基硫酸钠（简称SDS）是阴离子表面活性剂，它在水溶液中，以单体和分子团的混合形式存在。单体SDS能与蛋白质结合生成蛋白质—SDS复合物。由于SDS带有大量负电荷，所以生成的蛋白质—SDS复合物所带的负电荷大大超过了天然蛋白质原有的电荷，因而消除或掩盖了不同种类蛋白质所带净电荷的差异，均带有相同密度的负电荷，在蛋白质溶液中，加入SDS和巯基乙醇，巯基乙醇可使蛋白质分子中的二硫键还原，使多肽组分分成单个亚单位，SDS可使蛋白质亚单位中的氢键、疏水键打开，因此SDS与蛋白质结合后，还引起蛋白质构象的改变，蛋白质—SDS复合物形状近似雪茄形的长椭圆棒，不同复合物的短轴相同，约1.8nm，而长轴改变则与蛋白质的分子量成正比。基于上述两种情况，蛋白质—SDS复合物在凝胶电泳中的迁移率不再受原有电荷和形状的影响，而只是与椭圆棒的长度有关，也就是只与蛋白质分子量有关。在电泳体系中加入十二烷基硫酸钠（简称SDS），则电泳迁移率主要依赖于蛋白质分子量，而与所带的净电荷和形状无关，这种电泳方法称为SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS—PAGE）。

蛋白质分子量在10，000—200，000之间时，电泳迁移率与分子量的对数呈线性关系，可用下列公式表示：



上式中，为蛋白质分子量；为常数；为斜率；为相对迁移率（即蛋白质的电泳迁移距离除以示踪染料迁移距离）。

根据上述方程将已知分子量的标准蛋白质电泳迁移率与分子量的对数作图，可制作出一条标准曲线。在相同条件下只要测得未知分子量的蛋白质的电泳迁移率，即可从标准曲线求得其近似分子量。

不同的凝胶浓度适用于不同的分子量范围（见表3-1），可根据所测分子量的范围选择最适凝聚浓度，并尽可能选择分子量范围和性质与待测样品相近的蛋白质作标准蛋白。

表3-1 分子量范围与凝胶浓度的关系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 凝胶浓度 | 交联度 | 分子量范围 |
| 5% | 2.6% | 25,000—200,000 |
| 10% | 2.6% | 10,000—70,000 |
| 15% | 2.6% | 10,000—50,000 |

由于SDS—PAGE具有设备简单、快速，分辨率和灵敏度高等优点，广泛应用于生物化学、分子生物学、基因工程、医学及免疫学等方面。

SDS—PAGE作为一种测定蛋白质分子量的方法，尽管对于大部分蛋白质来说，在比较广泛的分子量范围内，蛋白质的迁移率与其分子量的对数确实存在着线性关系，但是有许多蛋白质是由亚基或两条以上肽链组成的（如血红蛋白、胰凝乳蛋白酶等），他们在变性剂和强还原剂的作用下，解离成亚基或单条肽链。因此，对于这一类的蛋白质，SDS—PAGE测定的只是它们的亚基或单条肽链的分子量，而不是完整蛋白质的分子量。为此，对这类样品分子量的测定，还必须采用其他测定方法作参照。当然这也使得SDS—PAGE特别适用于寡聚蛋白及其亚基的分析鉴定和分子量的测定。

另外，还有一些电荷异常和构象特殊的蛋白质（如组蛋白F1），含有较大辅基的糖蛋白和含有二硫键较多的蛋白质，以及一些结构蛋白（如胶原蛋白）等，它们在SDS—凝胶系统中，电泳的迁移率与分子量的对数不呈线性关系。因此，为了测得真实和完整的蛋白质分子量，通常可采用多种方法进行测定和相互验证。

SDS-PAGE有连续系统和不连续系统两种，这两种系统有不同的样品溶解液及缓冲液，不连续系统需要分别制备分离胶和浓缩胶，操作方法与连续系统完全相同。由于SDS-不连续系统对样品具有较强的浓缩效应，因而它的分辨率比SDS-连续系统要高得多，虽然制胶操作较麻烦，但是它具有连续系统不可比拟的优越性，尤其是在分离比较复杂的特殊的样品时，人们更喜欢采用不连续系统。SDS-PAGE广泛用于蛋白质亚基相对分子质量及纯度的测定。

**试剂与器材**

一、试剂

**1. 标准蛋白质试剂盒**（20次/支）：按照国内厂商上产低相对分子质量（14400-97400）标准蛋白质成套试剂盒。

**2. 未知蛋白**：胰蛋白酶，或牛血清白蛋白。

**3. 不连续体系SDS-PAGE试剂**

1）10%SDS贮液：称取5g SDS，加重蒸水至50ml，微热使其溶解，4℃贮存。低温下SDS析出结晶，用前微热，使其完全溶解。必须选用高纯度的SDS（电泳级），否则会影响电泳条带的分辨效果。

2) 1% N,N,N’,N’-四甲基乙二胺（TEMED）：称取TEMED 1ml，加重蒸水至100ml，置棕瓶内，4℃贮存。

3）10%过硫酸铵（AP）： 称AP10g，加重蒸水100ml，置棕色瓶内4℃贮存。临用前配制。

4）样品溶解液（上样液）：含有1%SDS，1%巯基乙醇（或100mmol/L DTT）,20%甘油或40%蔗糖，0.02%的溴酚蓝，, 50mmol/L pH8.0的Tris-HCl缓冲液。

·先配制0.05mol/L pH8.0Tris-HCl缓冲液：称取三羟甲基氨基甲烷（Tris）0.6g，加入50ml重蒸水，再加入1mol/L盐酸约3ml，调pH值至8.0，最后用重蒸水定容至100ml。

·按表1配制样品溶解液

表1 不连续体系样品溶剂溶液配制

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SDS | 巯基乙醇 | 溴酚蓝 | 蔗糖 | 0.05mol/LTris-HCl | 加水至最后总体积 |
| 100mg | 0.1ml | 2ml | 4mg | 2ml | 10ml |

注：如样品为液体，则应用浓1倍的样品溶解液，然后等体积混合。

3) 凝胶贮液：

·30%分离胶贮液：配制方法与连续体系相同。称丙烯酰胺（Acr）30g，甲叉双丙烯酰胺（Bis）0.8g，加重蒸水至100ml，过滤后置棕色瓶内，4℃贮存可用1—2个月。

·10%浓缩胶贮液：称取丙烯酰胺（Acr）10g，甲叉双丙烯酰胺（Bis）0.5g，加重蒸水至100ml，过滤后置棕色瓶内，4℃贮存可用1—2个月。

4) 凝胶缓冲液：

·分离胶缓冲液（30mol/L pH8.9 Tris-HCl缓冲液）：称取Tris 36.3g加少许重蒸水使其溶解，再加1mol/L HCl约48ml，调pH值至8.9，最后加重蒸水定容至100ml，4℃贮存。

·浓缩胶缓冲液（0.5mol/L pH6.7 Tris-HCl缓冲液）：称取Tris 6.0g加少许重蒸水使其溶解，再加1mol/L HCl约48ml，调pH值至6.7，最后加重蒸水定容至100ml，4℃贮存。

5）电极缓冲也（内含0.1%SDS，0.05mol/L Tris，0.384mol/L甘氨酸缓冲液pH8.3）：称取Tris 6.0 g，甘氨酸28.8g，加入SDS 1g，加蒸馏水使其溶解后定容1000ml。

6) 1%琼脂（糖）粉：（老式电泳槽用） 称琼脂（糖）1g，加100ml上述电极缓冲液，4℃贮存。

1. **连续连续体系SDS-PAGE试剂**

1）0.2mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液：取25.63g二水磷酸氢二钠或者十二水磷酸氢二钠51.58g，再称7.73g一水磷酸二氢钠或者二水磷酸二氢钠8.74g，溶于重蒸水中并定容至1000ml。

2）样品 ：0.01mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液，内含1%SDS，1%巯基乙醇，10%甘油或40%蔗糖及0.02%溴酚蓝。用来溶解标准蛋白质及待测固体蛋白质样品。配方见表2

表2 连续体系样品溶解液配制

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| SDS | 巯基乙醇 | 甘油 | 溴酚蓝 | 0.2mol/L磷酸盐缓冲液 | 加水最后总体积 |
| 100mg | 0.1ml | 1ml | 2mg | 0.5ml | 10ml |

注：如样品为液体，则应用浓1倍的样品溶解液，然后等体积混合。

3）凝胶贮液：称取丙烯酰胺（Acr）30g，甲叉双丙烯酰胺（Bis）0.8g，加重蒸水定容至100ml，过滤后棕瓶，4℃贮存1-2个月。

4）凝胶缓冲液：称取SDS 0.2g，加0.2mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液至100ml，4℃贮存，用前稍加温使SDS溶解。

5）N,N,N’,N’-四甲基乙二胺（TEMED）：称取TEMED 1ml，加重蒸水至100ml，置棕瓶内，4℃贮存。

6）10%过硫酸铵（AP）溶液：称取AP 1g，加重蒸水至10ml，此液应临用前配制，置棕色瓶内，4℃贮存。

7）电极缓冲液：（0.1%SDS。0.1mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液）：称取SDS 1g，加500ml 0.2mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液，再用蒸馏水定容至1000ml。

8）1%琼脂糖：称取琼脂糖1g，加100ml上述电极缓冲液使其溶解，4℃贮存。

**4. 考马斯亮蓝R-250染色剂**

1) 固定液：取50%甲醇454ml，冰乙酸46ml混匀。

2) 染色液： 考马斯亮蓝R250 0. 25g，加上述固定液100ml，过滤后应用。

3) 脱色液：冰乙酸75ml，甲醇50ml，加蒸馏水定容至1L。

二、器材

夹心式垂直板电泳槽或者DYCZ-240D垂直板电泳槽（1台/组），直流稳压电源（电压300—600V，电流50—100mA），移液管，烧杯，细长头的滴管，微量注射器，移液器，大培养皿，洗瓶，滤纸，移液管架

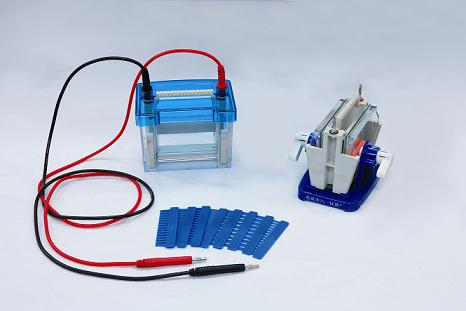
**操作方法**

一、安装电泳槽

* 安装夹心式垂直板电泳槽（左图为老式电泳槽）

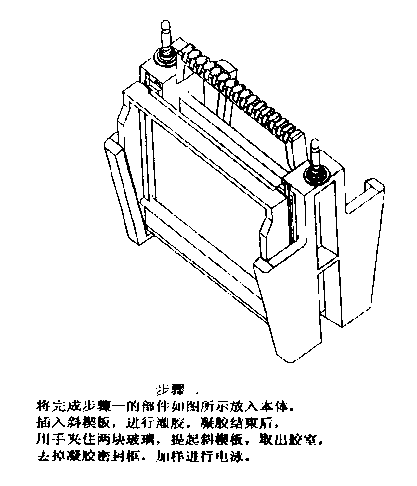
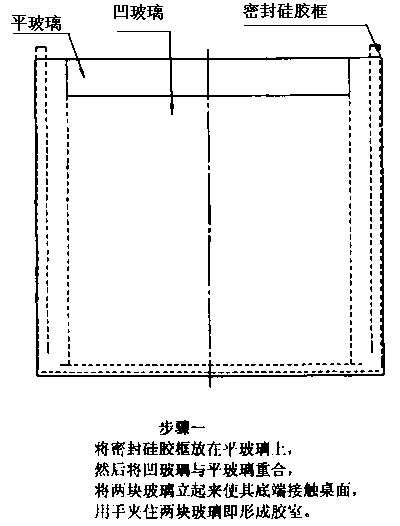
夹心式垂直板电泳槽操作较新式电泳槽烦琐些，不易渗漏。这种电泳槽两侧为有机玻璃制成的电极槽，两个电极槽中间夹有一个凝胶模，该模由1个凵形硅胶框、长与短玻璃板及样品槽模板（梳子）所组成。电泳槽由上贮槽（白金电极在上或面对短玻璃板），下贮槽（白金电极在下或面对长玻璃板）和回纹冷凝管组成。两个电极槽与凝胶模间靠贮液槽螺丝固定。各部分按下列顺序组装：

* 1. 装上贮槽和固定螺丝销钉，仰放在桌面上。
  2. 将长、短玻璃板分别插到凵形硅胶框的凹形槽中。注意勿用手接触灌胶面的玻璃。
  3. 将已插好玻璃板的凝胶模平放在上贮槽上，短玻璃板应面对上贮槽。
  4. 将下贮槽的销孔对准已装好螺丝销钉的上贮槽，双手以对角线的方式旋紧螺丝帽。
  5. 竖直电泳槽，用细长头滴管吸取已熔化的2%琼脂（糖）加在长玻璃板下端与硅胶框交界的缝隙内，其目的是封住空隙，加琼脂（糖）溶液时中应避免有气泡。



* DYCZ-240D型垂直板电泳槽（右图为新式电泳槽）

电泳前禁止将电泳槽附带电泳导线连接到电泳仪上。如图将电泳槽安装好。将凝胶密封框放在平玻璃上，然后将凹型玻璃与平玻璃重叠，将两块玻璃立起来使其底端接触桌面，用手将两块玻璃板夹住放入电泳槽内，然后插入斜楔板到适中程度，即可灌胶。



二、配胶及凝胶板的制备

1. 配胶

根据所测蛋白质分子量范围，选择适宜的分离胶浓度。由于SDS-PAGE有连续及不连续系统两种，两者间有不同的缓冲系统，因而有不同的制方法。见表3和表4

**表3 SDS-PAGE电泳不连续体系凝胶配制**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 配制20ml不同浓度分离胶所需各种试剂用量 | | | | 配制10ml浓缩胶所需试剂用量 |
| 5% | 7.5% | 10% | 15% |
| 分离胶贮液30%Acr-0.8%Bis | 3.33 | 5.00 | 6.66 | 10.00 | – |
| 分离胶缓冲液pH8.9Tris-HCl | 2.50 | 2.50 | 2.50 | 2.50 | – |
| 浓缩胶贮液10%Acr-0.5%Bis | – | – | – | – | 3.00 |
| 浓缩胶缓冲液pH6.7Tris-HCl | – | – | – | – | 1.25 |
| 10%SDS | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.10 |
| 1%TEMED | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 1.00 |
| 重蒸水 | 11.87 | 10.20 | 8.54 | 5.20 | 4.60 |
| 10%AP | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.05 |

**表4 SDS-PAGE电泳连续体系凝胶配制**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 凝  胶  浓  度  试  剂 | 5% | **7.5%** | 10% |
| 凝胶贮液30%Acr—0.8%Bis | 3.33 | **5.00** | 6.66 |
| 0.2mol/LpH7.2磷酸缓冲液内含0.2%SDS | 10.00 | **10.00** | 10.00 |
| 1%TEMED | 2.00 | **2.00** | 2.00 |
| 蒸馏水 | 4.57 | **2.90** | 1.13 |
| 10%AP | 0.10 | **0.10** | 0.20 |

2. 凝胶板的制备

（1）SDS-不连续体系凝胶板的制备

①分离胶的制备：按表3配制20ml 10%的分离胶，混匀后用细长头滴管将凝胶液加至长、短玻璃板间的缝隙内，注胶过程中应防止气泡产生，胶加到距玻璃板顶部2cm处，用1ml注射器取少许蒸馏水，沿长玻璃板板壁缓慢注入，约3-4mm高，以进行水封。约30min后，凝胶与水封层出现折射率不同的界线，则表示凝胶完全聚合。倾去水封层的蒸馏水。在用滤纸条吸去多余水分。

②浓缩胶的制备：按表3配制10ml 3%的浓缩胶，混匀后用细长头滴管将浓缩胶加到已聚合的分离胶上方，直至距离短玻璃板上缘约0.5cm处，轻轻将样品槽模板梳插入浓缩胶内，约30min后凝胶聚合，再放置20-30min。使凝胶“老化”。小心拔去样品槽模板梳，用窄条滤纸吸去样品凹槽中多余的水分，将pH8.3电极缓冲液倒入上、下贮槽中，应没过短板约0.5cm以上，即可准备加样。

（2）SDS-连续体系凝胶板的制备 按表4配制10ml~20ml7.5%浓度的胶，将分离胶混合液直接倒入或用胶头滴管将分离胶混合液加入两块玻璃板的缝隙内直至距离短玻璃板上缘0.5cm处，插入样品槽模板。凝胶聚合约需30min，20—30min后，小心拔出梳形样品槽模板，用窄条滤纸吸去残余水分，注意不要弄破凹形加样槽的底面。这里特别说明：新式电泳槽在凝胶聚集后，轻轻取下梳子，用手夹住两块玻璃板，上提斜楔板，使其松开，然后取下玻璃胶室去掉凝胶密封框，注意，在上述过程中手始终给玻璃胶室一个夹紧力，再将玻璃胶室凹面朝里置入电泳槽。插入斜楔板，将缓冲液加至内槽玻璃凹口以上，外槽缓冲液加到距平玻璃上沿3mm处即可电泳。

三、加样

* 蛋白质样品的处理

1）标准蛋白质样品的处理

低分子量标准蛋白试剂盒:兔磷酸化酶B MW=97,400   
 牛血清白蛋白 MW=66,200   
 牛碳酸酐酶 MW=31,000  
 胰蛋白酶抑制剂 MW=20,100  
 鸡蛋清溶菌酶 MW=14,400  
 开封后溶于200µl样品溶解液中，沸水浴中加热3-5min后上样。

2) 称制备样品1mg，按1mg/mL溶液比例加样品溶解 液，将其转移到带塞的小离心管中，轻轻盖上盖子在沸水浴中加热3min，取出冷却后加样。

* 加样体积要根据凝胶厚度及样品浓度灵活掌握，一般加样体积为10—15μL。如果样品槽中有气泡，可用微量注射器针头挑除。加样时，将移液器（或微量注射器的针头）通过电极缓冲液伸入加样槽内，尽量接近底部，轻轻推动移液器（或微量注射器），注意枪头（或针头）勿碰破凹形槽胶面。

四、电泳

上槽（黑色电极端）接负极，下槽（红色电极端）接正极，**这里注意负极端水槽里的电极缓冲液要没过玻璃板上端**，而正极端的电极缓冲液只需没过电阻丝即可。（若用的是迷你垂直板电泳槽，而且只做一块分离胶跑电泳，另一边需用厚玻板阻隔。）打开电源，保持电压不变状态下，将电流调至20mA，待样品进入分离胶后，将电流调至60mA，待染料前沿迁移至距硅胶框底边1—1.5cm处，停止电泳。

五、凝胶板剥离

电泳结束后，取下凝胶模，卸下硅胶框，用不锈钢药铲撬开玻璃板，在凝胶板切下一角作为前沿标记。

六、染色与脱色

将染色液倒入培养皿内，染色40min左右，用蒸馏水漂洗数次，再用脱色液脱色，直到蛋白质区带清晰，即可计算相对迁移率。

七、绘制标准曲线

将大培养皿放在一张坐标纸上，量出加样端距细铜丝间的距离（cm）（即染料迁移距离）以及各蛋白质样品区带中心与加样端的距离（cm）（即样品迁移距离），如图所示。按下式计算相对迁移率mR：



以标准蛋白质的分子量为纵坐标，对应的相对迁移率为横坐标在半对数坐标纸上作图，可得到一条标准曲线，根据待测样品相对迁移率可直接在标准曲线上查出其分子量。

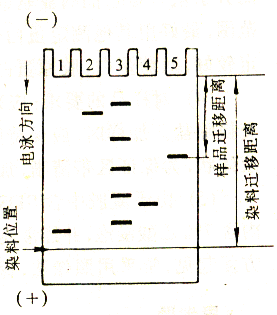


图3-1 样品及标准蛋白在连续SDS-PAGE分离示意图

样品槽1,2,4,5,为待测样品，样品槽3为标准蛋白

**思 考 题**

1. 名词解释：

聚丙烯酰胺凝胶电泳中浓缩效应、电荷效应、分子筛效应；

2. 根据实验结果绘出标准蛋白质的标准曲线，并计算出待测蛋白的分子量。

3. 通过本次实验学习，讨论下列问题：

1）SDS—PAGE用于蛋白质分子量测定的基础是什么？

2）对于由多条肽链组成的蛋白质，SDS—PAGE能否测定出它的分子量，如何测定出？

3）在样品溶解液中SDS、巯基乙醇、甘油及溴酚兰的作用分别是什么？

4）有些用tris-HCl加一定量的甘氨酸做电极缓冲液，这里甘氨酸的作用?

5）在SDS-PAGE中, TEMED和AP,试述其作用?

**实验6 DNA的琼脂糖凝胶电泳**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业、生物技术、生物工程专业）**

**目的要求**

1. 掌握琼脂糖凝胶电泳分离DNA的原理和方法。

2. 学习利用琼脂糖电泳方法测定DNA片段大小。

3. 学习有关建立DNA限制性内切酶图谱的基本技术。

**原 理**

DNA分子在碱性环境中（pH8.3缓冲液）带负电荷，外加电场作用下，向正极泳动。不同的DNA片段由于其电荷、分子量大小及构型的不同，在电泳时的泳动速率就不同，从而可以区分出不同的区带，电泳后经溴乙锭染色，在波长254nm紫外光照射下，DNA显橙红色荧光。

琼脂糖凝胶电泳对DNA的分离作用主要依据DNA的分子量及分子构型，同时与凝胶的浓度也有密切关系。一定大小的DNA 片段在不同浓度的琼脂糖凝胶中，电泳迁移率不相同。不同浓度的琼脂糖凝胶适宜分离DNA片段大小范围见表1。因而要有效分离大小不同的DNA片段，主要是选用适当的琼脂糖凝胶浓度。不同构型的DNA在琼脂糖凝胶中的电泳速度差别较大。在分子量相当的情况下，不同构型的DNA移动速度次序如下：共价闭环DNA＞直线DNA＞开环的双链环状DNA。在同一浓度的凝胶中，分子量较小的DNA片段比较大的片段快。DNA片段的迁移距离（迁移率）与它的大小（分子量）的对数成反比。将未知DNA的迁移距离与已知分子大小的DNA标准物的电泳迁移距离进行比较，即可计算出未知DNA片段的大小。

表1 DNA大小范围与琼脂糖凝胶浓度的关系

|  |  |
| --- | --- |
| 琼脂糖凝胶浓度/% | 可分辨的线性DNA大小范围/kb |
| 0.3 | 60—5 |
| 0.6 | 20—1 |
| 0.7 | 10—0.8 |
| 0.9 | 7—0.5 |
| 1.2 | 6—0.4 |
| 1.5 | 4—0.2 |
| 2.0 | 3—0.1 |

本实验采用限制性内切酶HindⅢ或EcoRⅠ酶解λDNA的片段为标准物，建立其酶切图谱，同时以酶解各片段的分子量为纵坐标，以它们对应的迁移率为横坐标，在半对数坐标纸上，连接各点绘制出测定DNA分子量的标准曲线。共价闭环质粒pBR322DNA只有一个EcoRⅠ酶切位点，酶解后成为一条线状DNA，通过琼脂糖凝胶电泳，测量酶解后线型DNA的迁移距离，可以直接在分子量标准曲线上得出其分子大小。

**试剂和器材**

一、试剂

1. 标准100bpλDNA
2. 电极缓冲液（5×TBE）：用前稀释10倍

称取10.88克Tris，5.52克硼酸，0.74克EDTA·Na2·2H2O，溶解后用蒸馏水定容至200ml。**使用前用蒸馏水稀释10倍，称为TBE稀释缓冲液（0.5×TBE）**。

1. 溴乙锭（EB）染色贮存液（1mg/ml）或者gold view溶液：

将100mg溴乙锭溶于蒸馏水或电极缓冲液100ml，棕色瓶内封好，避光保存。EB是诱变剂，配制和使用时应戴手套，并且不要将该溶液洒在地面或桌面上。**凡是沾污过EB的器皿或物品，必须经专门处理后，才能进行清洗或弃去**。

gold view溶液按照说明书配制

1. 1.5%琼脂糖

二、器材

Eppendorf离心管，电泳槽，电泳仪，凝胶塑料托盘，小烧杯，移液器，一次性塑料手套，胶头滴管，紫外反射投射仪，洗瓶，大烧杯，量筒。

**操作方法**

一、DNA的酶解（参考）

取2只清洁、干燥、无菌的Eppendorf管，编号，按照限制性内切酶HindⅢ、EcoRⅠ试剂盒说明书用量，用微量注射器加入各种试剂\质粒λDNA和pBR322，最后用双蒸水补足至20μL，小心混匀。37℃水浴保温1—2h，然后各小管内加入2μL的酶反应终止液，混匀，终止酶促反应，冰箱内保存备用。**操作前各试剂用量要反复核对，保证准确无误，所加试剂用量很少，必须认真操作。**实验中有DNA标样做对照

二、1.5%琼脂糖凝胶板的制备

1. 用配套挡板将凝胶塑料托盘短边缺口封住，置水平玻板或水平工作台面上，将样品槽模板（梳子）插进托盘长边上的凹槽内（距一端约1.5cm），梳齿底边与托盘表面保持0.5—1mm的间隙，安置好后保持静置状态。（挡板与托盘缝隙处可用胶带或者琼脂糖溶液封住）。
2. 称取0.3克琼脂糖置于小锥形瓶中，加入30mlTBE稀释缓冲液，在电炉上加热融化，一定要煮沸两次排尽气泡。
3. 待琼脂糖冷却至放在手背不觉太烫手（约60℃）后，滴一滴EB或gold view，然后将琼脂糖溶液在靠近挡板一侧连续地倒入托盘内（注意中间不要间断），使凝胶缓慢而连续地展开直至在托盘表面形成一层约3mm厚均匀胶层（7.1×9.0cm）。胶内不要存有气泡，室温下静置约20分钟。
4. 待凝固完全后，用小滴管在梳齿附近加入少量TBE稀释液润湿凝胶，双手均匀用力轻轻拔出样品槽模板（注意勿使样品槽破裂），则在胶板上形成相互隔开的样品槽。
5. 取下封边的挡板，将凝胶连同托盘放入电泳槽平台上，倒入大量TBE稀释缓冲液直至浸没过凝胶面2—3mm，要防止样品槽内窝存气泡，可以用微量注射器挑除。

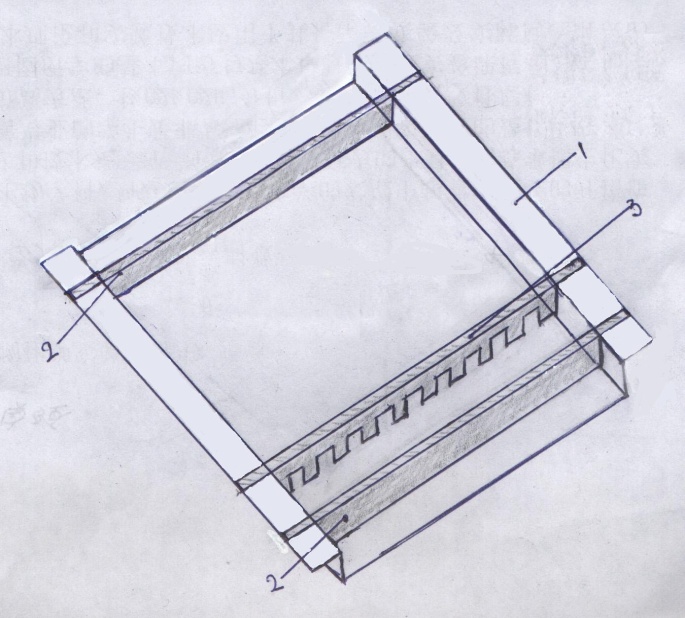


图5-1 凝胶托盘的组装

1. 托盘 2. 挡板 3. 梳子

三、加样

用微量注射器或移液枪将经酶切的样品液和未经酶切的样品液（要加2μL的酶反应终止液）分别加入到胶板的不同加样槽内，每个槽（5×2×2.5mm）容积约为25μL，因此加样量5-10μL，避免因样品过多而溢出，污染邻近样品。加样时，注射器针头或枪头穿过缓冲液小心靠近加样槽底部，但不要损坏凝胶槽，然后缓慢地将样品推进槽内，让其集中沉于槽底部。**加完一个样品后的微量注射器应反复洗净后才能用以加下一个样品，加完一个样品后移液器需要更换枪头。**

四、电泳

加样完毕，将靠近样品槽一端连接负极，另一端连接正极（千万不要搞错），接通电源，开始电泳。在样品进胶前可用略高电压，防止样品扩散，样品进胶后，应控制电压降不高于5V/cm。当染料带移动到距离凝胶前沿约1cm时，停止电泳。

五、观察

小心地取出凝胶置托盘上，将胶板推至预先浸湿并铺在紫外灯观察台上的玻璃纸内，在波长308nm紫外灯下进行观察。DNA存在的位置呈现橘红色或绿色荧光，可观察到清晰的条带。**观察时应带上防护眼镜，避免紫外灯对眼睛的伤害。**

**注 意 事 项**

溴乙锭（EB）是诱变剂，配制和使用时应带乳胶手套，并且不要将该溶液洒在桌面或地面上。凡是沾污过EB的器皿或物品，必须经过专门处理后，才能进行清洗或弃去。

**思考题**

1. 根据实验结果，解释琼脂糖凝胶电泳测定DNA片段大小的根据。

2. SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳能否测定DNA分子的大小，它们的区别是什么？

**实验7 植物体内的转氨基作用**

**（生物技术、生物工程专业）**

**目的要求**

1. 掌握转氨基作用的特点，了解转氨酶的作用；

2. 学习纸层析基本技术。

**原 理**

植物体内通过转氨酶的作用，α-氨基酸上氨基可转移到α-酮酸原来酮基的位置上，结果形成一种新的α-酮酸和一种新的α-氨基酸，所生成的氨基酸可用纸上层析法检出。

**试剂和器材**

一、试剂

绿豆芽子叶及胚轴，0.1mol/L丙氨酸溶液，0.1mol/Lα-酮戊二酸溶液（用NaOH中和至pH7），含有0.4mol/L蔗糖的0.1mol/L磷酸缓冲液（pH8.0），磷酸缓冲液（pH7.5），正丁醇，甲酸，0.1mol/L谷氨酸溶液，0.1%～0.25%茚三酮丙酮溶液。

二、器材

研钵，10ml量筒，离心机，试管，移液管，恒温箱，漏斗，层析缸，层析纸，毛细管，吹风机。

**操作方法**

一、酶液的提取

取发芽2～3天的绿豆芽7g，放入研钵中，加2ml磷酸缓冲液（pH8.0）研磨成匀浆，转入离心管。研钵再用该1ml缓冲溶液冲洗，并入离心管中，以8000r/min的转速离心10min，取上清液备用。

二、酶促反应

取3支试管编号，按下表分别加入试剂和酶液（单位ml）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 0.1mol/Lα-酮戊二酸溶液 | 0.1mol/L丙氨酸溶液 | 酶液 | 磷酸缓冲液（pH7.5） |
| 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1.5 |
| 2 | 0.5 | — | 0.5 | 2.0 |
| 3 | — | 0.5 | 0.5 | 2.0 |

将试管摇匀后置于37℃恒温箱中保温30min。取出后各加3滴30%三氯乙酸溶液终止酶反应，于沸水浴中加热10min，使蛋白质完全沉淀，冷却后离心或过滤，取上清液或滤液备用。

三、层析

取层析纸一张（手尽量不接触滤纸），在距底线2cm处用铅笔划一水平线，在线上等距离确定5个点，作为点样位置，相邻各点间距2.5cm。取上述上清液或滤液及谷氨酸、丙氨酸标准液分别点样，反应液点3～4滴，标准液点2滴。每点一次用吹风机吹干后再点下一次。最后沿垂直于基线的方向将滤纸卷成圆筒，以线缝合，注意纸边不能叠在一起或接触。

在层析缸中放入40ml推动剂，推动剂的成分是正丁醇、95%乙醇、冰醋酸、水四种溶液按（4:1:1:2）的比例混合。其中先用95%乙醇和水混合溶解茚三酮使推动剂中茚三酮含量在0.1%～0.25%。待缸内蒸气饱和后，将滤纸筒垂直放入，注意滤纸筒不能贴层析缸壁，展层，待溶剂前沿上升至距滤纸前沿约2cm取出，用铅笔标出前沿位置。吹干，剪断缝线置烘箱（60℃）内或用吹风机烘干后显色。

**思 考 题**

1. 名词解释：

联合脱氨基作用；转氨基作用；氧化脱氨基作用；生糖氨基酸；生酮氨基酸

2. 图示或张贴层析图，鉴定丙氨酸和α-酮戊二酸是否进行了转氨基作用，并写出相关的反应式。

3. 实验操作过程中，为何不能用手接触滤纸？

**《生物化学综合实验》**

**实验指导书**

**生物化学综合实验基本情况**

**一、实验题目**

1. 不同植物总DNA的提取及亲缘关系的研究（食品科学与工程、食品质量与安全专业）

2. 植物中SOD的分离提取及性质研究（食品科学与工程、食品质量与安全专业）

3. 核酸的分离纯化及性质研究（生物技术、生物工程专业）

4. 蛋白质的分离纯化及性质研究（生物技术、生物工程专业）

5. 糖蛋白的分离纯化及性质研究（生物技术、生物工程专业）

6. 脂的分离纯化及性质研究（生物技术、生物工程专业）

**二、选题要求**

1. 每小组（4人组成一个小组）选一个实验题目；
2. 实验中所需生物材料自选，可选用多种生物材料；
3. 实验内容的安排要有一定工作量，**必须包括指导书中要求运用的实验技术**。

**三、学生准备的要求**

学生选定实验内容后，要写出实验方案，包括：实验目的和意义；实验方法及操作过程（至少准备两种方案）；各种方法所需仪器（包括设备和玻璃器皿）、药品及其数量。实验方案必须在综合实验开始前完成，并做成电子版，交于指导教师审阅。

**四、实验时间安排**

学生于周一进入实验室开始实验，周四结束实验。周五撰写并提交实验报告。

**五、综合实验的评分标准**

学生综合实验成绩由指导教师评定，分为优秀、良好、中等、及格和不及格几类。评定依据是学生的态度、出勤率、实验准备情况、实验动手能力、实验结果、以及实验的创新性上进行评分。

**六、实验报告要求**

综合实验完成后，必须提供一份每日的实验记录和一份实验报告。实验报告形式附后。

**实验1. 不同植物总DNA的提取及亲缘关系的研究**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**实验目的**

核酸的分离纯化是核酸制备及分析的前提和基础，通过本实验将学会和掌握核酸制备的一些基本操作和方法，并通过分光光度法和电泳等实验技术研究核酸的性质，同时掌握用限制性内切酶酶解技术分析不同材料之间亲缘关系的方法。

**实验仪器与试剂**

主要仪器器材：研钵、纱布、高速离心机、紫外分光光度计、涡旋仪、水浴锅、微量加样器、电泳仪、紫外透射反射分析仪、试管、烧杯、试剂瓶、冰箱等。

主要试剂：液氮、SDS、CTAB、Tris、乙醇、巯基乙醇、EDTA、氯仿、异丙醇、HCl、蔗糖、NaCl、苯酚、限制性内切酶试剂盒等。

**基本步骤**

1. DNA提取：一定量的样品→液氮研磨→提取→沉淀→TE缓冲液溶解。

2. DNA浓度（纯度）测定：用紫外分光光度计于260nm、280nm波长测定。

3. DNA的限制性内切酶酶解性质研究：按照限制性内切酶试剂盒说明书，对提取的不同材料DNA作酶解处理。

4. DNA电泳：安装电泳仪→制备凝胶→点样（包括总DNA 和酶解后的DNA片段）→电泳→用紫外透射反射仪观察

**要求运用的实验技术**

紫外分光光度技术、琼脂糖凝胶电泳技术、高速离心技术、限制性内切酶酶解技术等。

**参考书目 （仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1. 分子生物学实验指导，刘进元等 编著，清华大学出版社

2. 生物化学与分子生物学实验技术，杨安钢等编，高等教育出版社

3. 生物化学实验原理和方法，李建武等编，北京大学出版社

**实验2. 植物中SOD的分离提取及性质研究**

**（食品科学与工程、食品质量与安全专业）**

**实验目的**

SOD广泛存在于生物界，是防御氧毒害的关键酶。SOD主要有CuZn-、Mn-、Fe-SOD三种类型同工酶，它们共同的生物学作用是专一地清除生物氧化中产生的超氧阴离子自由基（对细胞组分及细胞器，尤其是生物膜有严重的损伤作用），具有抗衰老、抗辐射、抗癌等生理作用。在医药中，SOD可用于治疗辐射病、自身免疫性疾病、炎症等；在食品中，可用于保健食品添加剂；在化妆品中，可防止皮肤衰老、抗炎、防晒等作用。植物中大蒜的SOD含量丰富，所以，本实验研究大蒜中SOD的性质，并确定SOD同工酶类型。

**实验仪器与试剂**

主要仪器：研钵、纱布、离心机、分光光度计、试剂瓶、冰箱等。

主要试剂：pH试纸、NaOH、HCl、H2O2、磷酸盐、丙烯酰胺等。

**实验步骤**

1.酶液的提取和初步纯化（植物材料还可以选用大蒜、菜心、萝卜、猕猴桃等。）

2.SOD性质的研究

（1）温度对酶活性的影响

（2）pH对酶活性的影响

（3）抑制剂（H2O2）对酶活性的影响

3.PAGE定位染色法鉴定同工酶类型

用不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

**要求运用的实验技术**

高速离心技术、有机溶剂沉淀技术、分光光度技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术等。

**参考书目（仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1. 生物化学实验，陈曾燮等编，中国科学技术大学出版社

2. 生化实验方法和技巧（第二版），张龙翔等主编，高等教育出版社

3. 蛋白质电泳实验技术，郭尧君编，科学出版社

4. 生物化学实验指导，余冰宾主编，清华大学出版社

5. 现代酶学，袁勤生主编，华东理工大学出版社

**实验3. 核酸的分离提取及性质研究**

**（生物技术、生物工程专业）**

**实验目的**

核酸的分离纯化是核酸制备及分析的前提和基础，通过本实验将学会和掌握核酸制备的一些基本操作和方法，通过分光光度法和电泳等实验技术研究核酸的性质，同时掌握用RFLP技术分析不同材料之间亲缘关系的方法。

**实验仪器与试剂**

主要仪器：研钵、高速离心机、紫外分光光度计、涡旋仪、水浴锅、微量加样器、电泳仪、紫外透射反射分析仪、PCR仪、试管、烧杯、试剂瓶、冰箱。

主要试剂：液氮、SDS、CTAB、Tris、乙醇、巯基乙醇、EDTA、氯仿、异丙醇、HCl、蔗糖、NaCl、苯、PCR试剂盒等。

**要求运用的实验技术**

紫外分光光度技术、琼脂糖凝胶电泳技术、高速离心技术、限制性内切酶酶解技术、PCR技术等。

**参考书目 （仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1. 生物化学实验，武汉大学出版

2. 生物化学实验，中国科学技术大学出版社

3. 生物化学实验原理和方法，北京大学出版社

**实验4. 蛋白质的分离纯化及性质研究**

**（生物技术、生物工程专业）**

**实验目的**

蛋白质（包括酶）的性质、结构和功能的研究，以及生物体内物质代谢途径的阐明等都是建立在蛋白质和酶的分离纯化基础上的。在蛋白质的分离过程中，必须通过浓度、纯度和活性的测定来决定分离步骤的取舍。酶促反应动力学，尤其是抑制剂酶促反应动力学是研究酶的结构与功能关系的一个重要方面。本实验通过对蛋白质（或酶）的分离纯化、浓度、纯度和活性的测定、动力学进行研究，从而掌握蛋白质和酶的系列研究方法和操作。

**实验仪器与试剂**

主要仪器：研钵、纱布、离心机、紫外分光光度计、试管、烧杯、试剂瓶、冰箱、真空泵、透析、层析柱、自动收集器、漏斗等。

主要试剂：pH试纸、乙酸、硫酸、NaOH、HCl、硼酸、Tris、硫酸铵、胰蛋白酶等

**要求运用的实验技术**

盐析技术、离心技术、柱层析技术、紫外分光光度技术、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术、透析技术等。

**参考书目（仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1.蛋白质技术手册，科学出版社

2. 现代酶学，华东理工大学出版社

3. 蛋白质电泳实验技术，科学出版社

**实验5. 糖蛋白的分离纯化及性质研究**

**（生物技术、生物工程专业）**

**实验目的**

糖蛋白在功能性食品功效中有着重要作用，研究糖蛋白的性质、功能都是建立在糖蛋白质分离纯化基础上的。在糖蛋白质的分离过程中，必须掌握分级柱层析技术，进一步理解生物化学中有关成分分离提纯的基本理论。本实验通过对糖蛋白质进行分离纯化、相对分子质量测定、简单理化性质测定等，从而掌握和理解糖蛋白研究方法和操作。

**实验仪器与试剂**

主要仪器：研钵、纱布、离心机、层析柱、微量加样器、水浴锅、可见与紫外分光光度计、试管、烧杯、试剂瓶、冰箱、旋转蒸发仪等。

主要试剂：苯酚、硫酸、双缩脲试剂、Folin-酚试剂、HCl、Tris、NaOH、乙醇、丙酮、乙醚、牛血清、硫酸、葡萄糖、DEAE-52纤维素、SephadexG-100、透析袋等

**要求运用的实验技术**

柱层析技术、透析技术、离心技术、分光光度技术等。

**参考书目（仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1. 生物化学实验，武汉大学出版

2. 生物化学技术原理及其应用（第二版），武汉大学出版社

3. 生物化学实验方法和技术，科学出版社

**实验6. 脂的分离纯化及性质研究**

**（生物技术、生物工程专业）**

**实验目的**

研究作为一重要的生物大分子脂的基本性质。脂类物质的研究也是基于分离纯化的基础上的。通过对脂的分离，使学生掌握非极性物质的柱层析技术，进一步理解生物化学中有关成分分离提纯的基本理论。本实验通过对脂类物质进行分离纯化、皂化脂与非皂化脂的分离、脂的简单理化性质测定等，从而掌握和理解脂的研究方法和操作。

**实验仪器与试剂**

主要仪器：研钵、纱布、离心机、层析柱、索氏抽提仪、冰箱等。

主要试剂：硅胶H、石油醚、乙酸乙酯、KOH、甲醇、乙醇、硫酸钠、磷钼酸、硅胶板、β-谷甾醇等

**要求运用的实验技术**

索氏抽提技术、薄层层析技术、萃取技术、柱层析技术等。

**参考书目（仅供参考，另外可以查阅期刊杂志）**

1. 生物化学与分子生物学实验技术，高等教育出版社

2. 生物化学实验，武汉大学出版

3．生化实验方法和技术（第二版），高等教育出版社

**实验报告形式**

题目：

姓名 学号 班级

摘要：

关键词：

Abstract:

Key words:

前言：简要介绍本实验研究的意义与目的。

材料与方法：详细说明实验使用的材料及实验方法，**注明各方法的出处**。

结果：准确描述实验结果，并**进行分析**。

讨论： 根据实验结果，运用所学知识在结果分析的基础上，对实验进行理论上的探讨，并得出科学、合理的结论。

参考文献：列出所使用的参考文献。

**《微生物学综合实验》**

**实验指导书**

目 录

实验一 不同碳源对黑曲霉产纤维素酶的影响

实验二 黄酒糖化剂的筛选

实验三 富铬米曲霉性质的研究

附件一 羧甲基纤维素钠法测定纤维素酶酶活（QB 2583-2003）

附件二 综合实验报告格式

实验一 不同碳源对黑曲霉产纤维素酶的影响

实验原理

1、纤维素酶是一种重要的工业用酶，广泛地应用于纺织、饲料、制药、食品、化工等行业。纤维素酶是降解纤维素生成葡萄糖的一组酶的总称，它不是单体酶，而是起协同作用的多组分酶系，主要由外切β-葡聚糖酶、内切β-葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶等组成。

2、细菌、真菌、动物体内等都能产生纤维素酶，一般用于生产的纤维素酶来自于真菌，比较典型的有木霉属（*Trichoderma*）、曲霉属（*Aspergillus*）和青霉属（*Penicillium*）。

3、纤维素酶是一种诱导酶，需要外界环境中的纤维素类底物诱导激发，微生物才在体内合成纤维素酶并分泌到外界环境中；当环境中不存在纤维素类底物时，微生物体内纤维素酶相关基因表达保持“沉默”。

实验内容：

1、每组同学测定3种碳源底物对黑曲霉产纤维素酶活的影响，3种底物包括2种必做底物（葡萄糖，麸皮）和1种选做底物（竹笋壳粉、羧甲基纤维素钠、淀粉、低聚果糖、蔗糖、米糠）。

2、配制培养基，培养基组成：碳源 1 g，NaCl 0.5 g，KH2PO4 0.1 g，MgSO4•7H2O 0.05 g，（NH4)2SO4 0.2 g，水 100 mL。

3、培养基灭菌、冷却至室温，接入黑曲霉孢子悬液，置于30℃摇床振荡培养，每隔24 h取样，测上清液中的纤维素酶活。

发酵液中纤维素酶酶活的测定，采用轻工行业标准：羧甲基纤维素钠法测定纤维素酶酶活（QB 2583-2003），具体测定方法见附件。以羧甲基纤维素钠（CMC-Na）为底物，根据单位体积酶液在单位时间内催化产生的还原糖的量来判断酶活，该酶活称为CMCase酶活。（注：本实验中以1 mL发酵液在1 h催化CMC-Na产生1 mg还原糖的酶量定义为1 U。）

4、最后以时间为横轴，酶活为纵轴，作图反映在不同碳源底物条件下，黑曲霉产纤维素酶酶活的变化，并对结果进行分析讨论。

实验报告：实验报告以标准论文格式书写提交，具体格式见附件。

实验二 黄酒糖化剂的筛选

**一、实验目的**

1. 掌握微生物实验中的基础实验操作；

2. 掌握黄酒糖化剂的筛选方法；

3. 熟悉黄酒制备工艺流程及过程控制。

**二、实验原理**

黄酒是以谷物和水为原料，以酒药、麦曲、酒母等糖化发酵剂酿制而成。黄酒的质量和风格不仅取决于酿酒工艺，而且与所用酿酒原料和微生物密不可分。糖化剂将淀粉水解淀粉生成葡萄糖等可发酵糖，发酵菌种将可发酵糖转化为乙醇等物质。

1956年方心芳先生确定根霉是酒曲的主要糖化菌，酵母菌是主要发酵菌。在糖化阶段，主要是根霉、毛霉的生长，分泌出淀粉酶及蛋白酶等多种酶类，将淀粉及蛋白质等分解为糖类及氨基酸等成分，将糖化液加水稀释后，酵母菌才大量繁殖，醪液的酒精含量逐渐上升。在微生物发酵原料转化为产品过程中，α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、异淀粉酶、转移葡萄糖苷酶、纤维素酶、蛋白水解酶、酯化酶等发挥着重要的作用。对于黄酒生产来说，多菌种糖化发酵有利于提高产品中风味物质。

本实验研究背景：从一黄酒厂的酒曲中分离得到3株霉菌和3株酵母，编号为1（根霉）、2（曲霉）、3（毛霉）、4、5和6（酵母）。目的：（1）比较3株霉菌的糖化力，选择适合黄酒酿造的霉菌及如何组合；（2）那一株酵母更适合黄酒发酵或者需要共同添加效果更好？

**三、材料与分析方法**

**1.菌种** 霉菌1（根霉）、霉菌2（曲霉）、霉菌3（毛霉）、黄酒酵母4、5、6

**2.试剂**（如无特别说明，试剂用蒸馏水配制）

(1) 淀粉水解实验用碘液（定性检查）：I2 1g，KI 2g，蒸馏水300mL，KI溶于少量水中，再将I2溶解于KI溶液中，补足水分即可。

(2) 3，5-二硝基水杨酸（简称DNS）试剂 称取6.3gDNS和262ml 2mol/L NaOH，加到含有182g酒石酸钾钠的500ml热溶液中，再加5g重蒸酚和5g Na2SO3，搅拌使其溶解，冷却后加蒸馏水定容至1000ml，贮于棕色瓶中保存备用。

（3）蒽酮试剂：取2g蒽酮溶解到80%H2SO4（取77mL 98%浓硫酸加入到23mL水中）中，以80%H2SO4定容到1000ml，当日配制使用。

（4）标准葡萄糖溶液（0.1mg/mL）：100mg葡萄糖溶解到蒸馏水中，定容到1000ml备用。

**3.培养基**

**（1）淀粉琼脂（检测淀粉酶活）** 0.5%酵母粉，2%淀粉，2%琼脂粉。称取各组分于三角瓶中摇匀后，包扎灭菌。灭菌后，摇匀后倒入灭过菌的培养皿中。

**（2）酪蛋白培养基（g/L）（检测蛋白酶活）**：干酪素0.4g， KH2PO4 0.036g， Na2HPO4 0.107g， ZnCl3 0.0014g， CaCl2 0.0002g， 0.5gMgSO4·7H2O，0.016gNaCl，琼脂粉2g，定容到100mL，pH6.5-7。

**（3）麦芽汁发酵培养基：**将干麦芽磨碎，一份麦芽加四份水（一般称50 g麦芽粉其体积为100 ml，加水400ml），在50-60℃水浴锅中保温糖化，不断搅拌，经3~4h后，用8层纱布过滤，除去残渣，煮沸后再过滤一次，即得澄清的麦芽汁（每100g麦芽粉能制得15-18︒Brix麦芽汁350-400mL），加水稀释成10-12︒Brix的麦芽汁。固体麦芽汁培养基需要加2%琼脂，pH自然。

（4）TTC上层培养基：葡萄糖0.5g，琼脂1.5g，TTC（三苯基四氮唑盐酸盐或红四氮唑）0.05g，水100mL。注：培养基灭菌后，冷却至60℃左右时，加入一定量的TTC溶液后，立即倾于底层平板上。底层平板用麦芽汁平板

**四、实验方法**

（1）**还原糖的测定**：DNS比色法。

测定步骤：向试管中加入2 ml待测液，然后加入3，5-二硝基水杨酸试剂1.5ml，混匀，放入沸水浴中加热5min，取出立即用自来水冷却至室温，加蒸馏水稀释至25ml, 充分混匀。在分光光度计上于波长540nm处测定各管OD值。

（2）**总可溶性糖测定**

原理：蒽酮可以与游离的已糖或多糖中的已糖基、戊糖基及已糖醛酸起反应，反应后溶液呈蓝绿色，在620nm处有最大吸收。

葡萄糖标准曲线测定：取7支干燥洁净的试管，按表2顺序加入试剂，进行测定。以吸光度值为纵坐标，各标准溶液浓度（mg/ml）为横坐标作图得标准曲线。

**表1 葡萄糖标准曲线绘制加样** 单位：mL

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 标准葡萄糖溶液 | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0.8 |
| 蒸馏水 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.4 | 0.2 |
|  | 置冰水浴中5min | | | | | | |
| 蒽酮试剂 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
|  | 沸水浴中准确煮沸10min，取出用流水冷却，室温放10min,于620nm处比色 | | | | | | |
| 葡萄糖浓度（mg/ml） |  |  |  |  |  |  |  |
| A620nm |  |  |  |  |  |  |  |

发酵液中总糖测定：取稀释后的发酵液1mL，加入蒽酮试剂4mL（注意冰浴），加样冷却完成后置沸水中煮沸10min，取出流水冷却放置10min，620nm处比色测量各管OD值。空白试验中将稀释样液换为水，其它测定方法同上。

（**3）酒精度的测定** 蒸馏法或气相色谱法

**（4）不同真菌的十字交叉培养实验**

在虎红琼脂上接种一种真菌的孢子于垂直方向，然后在水平方向上接种其它真菌的孢子，30℃倒置培养 2~3 d，观察生长情况和相互影响。每个平板可接种多种霉菌。每个平板两个平行。

**（5）真菌产酶定性检查**

淀粉酶：将各菌点接于淀粉平板上（每个平板可接种1-2株菌），30℃倒置培养 2~3天后，观察。向菌落周围加入碘液，观察现象。若菌丝发达，可将菌丝除去后加碘液**立刻**观察。

蛋白酶：将各菌点接于酪素平板上（每个平板可接种1-2株菌），30℃倒置培养 2~3天，期间观察是否有透明圈的产生。

**（6）试饭糖化力的测定**

试饭：选择无霉变、砂石的大米，称取40g大米，装入三角瓶中，加水60g，扎上两层封口膜（或一层封口膜加一层牛皮纸），常温蒸煮40min，或置于灭菌锅中，在0.05MPa下蒸煮20min，要求饭粒熟而不烂。用干净消过毒的玻璃棒将饭粒打散，待凉至35℃时，接入等量的霉菌孢子液。30℃培养 2~3 d。

取样：取经试饭的5g饭样于三角瓶中，用干净药匙研烂后，加入5g水浸泡0.5h，在浸泡至15min时搅拌1次。用6层纱布过滤或脱脂棉过滤或离心机4000r/min离心10min（每次处理方法需统一），得滤液或离心上清液。

还原糖的测定：上述液体适当稀释后，按DNS法测定。根据标准曲线，计算出菌种的试饭糖化力。试饭糖化力是指菌种发酵米饭产生糖分的能力。

总糖的测定：上述液体适当稀释后，按硫酸-蒽酮法测定。

试饭中微生物检查：取经试饭的5g饭样于三角瓶中，用干净药匙研烂后，加入45g水浸泡0.5h，在浸泡至15min时搅拌1次。取溶液0.1ml涂布于虎红琼脂上或适当稀释后涂布于营养琼脂上，30℃倒置培养 2-3天后，记录菌落形态，比较相对含量。

**（7）酒精度对霉菌糖化力的影响（试饭法）**

米饭蒸完后，接入等量孢子悬液，28-30℃静置培养，24-36h后加入相同体积的不同浓度的乙醇溶液，使乙醇终浓度为0, 3, 7 ,11%（v/m），继续静置培养48-72h，测试饭中还原糖的含量（24h，48h，72h，96h）。

**（8）酵母发酵性能定性观察**

**产酒精性能测定**：用 TTC 显色培养基进行筛选。将菌株点种于豆芽汁-蔗糖 培养基（或麦芽汁固体培养基）上，28 ℃培养48 h，注意观察酿酒酵母形态。融化TTC上层培养基冷却至45℃，轻轻由平皿一边注入已培养好的平板上。置于30 ℃恒温培养箱中避光培养2~4 h，由菌落呈色的强弱来判断酵母菌株的产酒精能力，颜色愈红的菌株产酒精能力愈强。

**起发酵性能测定**：接1ml菌悬液的接入15°P 麦芽汁发酵培养基中（100mL三角瓶装培养基80mL），置于28 ℃的恒温培养箱中培养，每隔12 h（或一定时间）进行称重，并记录失重情况，待失重小于0.2 g 时，可认为发酵基本完成，停止培养。比较各菌株的逐日失重和总失重情况，筛选出失重快和总失重量大的酵母菌，并对发酵液的残还原糖含量含量、酒精浓度进行测定分析（本次实验只需测残还原糖含量）。

**酒精含量对酵母生长的影响：**分装有不同体积的灭菌豆芽汁培养基数只试管，内置杜氏小管，以无菌操作按下表添加95%乙醇，摇匀，接种待测菌，每一乙醇浓度平行2支，留未接种试管为空白对照， 28℃培养2d观察现象,并测定其浊度（若气泡过多，可加入少量碱液）。若气泡产生的时间越早，产气量越大，说明酵母的耐酒精能力越强。

**表2 乙醇配制浓度**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号  项目 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 5 | 6 | 7 |
| 乙醇（mL） | 0 | 0.84 | 1.05 | 1.26 | 1.47 | 1.68 | 1.89 | 2.11 |
| 培养基（mL） | 10 | 9.16 | 8.75 | 8.74 | 8.53 | 8.32 | 8.17 | 7.89 |
| 酒精含量（%） | 0 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 |

**（9）平板插片法观察菌丝**

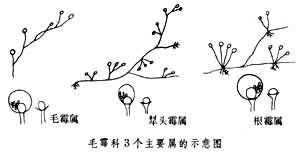
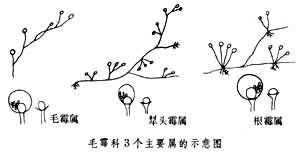
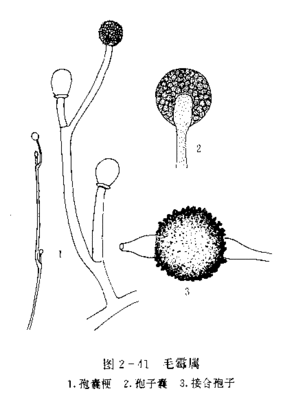
利用平板插片法，可观察到较为清晰的分生孢子穗、分生孢子等。平板接种后待菌落长出时斜插上灭菌盖片（角度为30-45。）。注意盖片位置应插在菌落的稍前侧，经培养后盖片内侧可见到长有一薄层菌丝体，用镊子取下轻轻盖在滴有乳酸石炭酸溶液的载片上，即可观察。

曲霉，注意观察菌丝体有无横隔、足细胞、注意分生孢子梗、顶囊、小梗及分生孢子着生状况及形状。

根霉，注意观察无隔菌丝（菌丝内常有气泡，不是横隔）、假根、匍匐枝、孢子囊柄、孢子囊及孢囊孢子。孢囊破裂后能观察到囊托及囊轴。

毛霉，孢囊梗直接由菌丝体生出，一般单生或分枝。分枝顶端生孢子囊，孢子囊呈球形。大多数的孢子囊成熟后，其壁易消失或破裂，留有残疾，称为囊领。孢子囊内具有囊轴，形状不一。孢囊孢子有球形、椭圆形或其他形状，孢子壁薄而光滑。

犁头霉，菌丝近似根霉，也产生弓形的匍匐菌丝，向四周蔓延，并且在同基物接触点上生出一些带有分枝的假根。与根霉又有差异，它们的孢子囊梗散生在匍匐菌丝中间，同假根并不对生。孢子梗大多数是2-5根，很少单生。孢子囊多呈洋梨形，囊壁薄，成熟后易消失，有残留的囊领。囊轴顶端有时可以有乳头突起。孢子囊基部有明显的囊托，孢囊孢子较小，大多数无色。



毛霉 犁头霉属 根霉属

**五、实验步骤**

1. 计孢子数量：用血球计数板计数霉菌孢子悬浮液中的孢子数量（数量级），和酵母的数量，必要时可用无菌水调整孢子浓度。

2. 试饭：称取一定数量的米，加水蒸煮后，接入霉菌或和酵母（若需同时接入酵母和霉菌，勿忘加入水，否则糖度和酒精度过高，发酵难以持续）。每隔一定时间观察发酵现象，并取样检测一定指标。

3. 菌种鉴定：平板观察结合镜检。

4. 菌种性能测定：霉菌主要测定酒精度对其生长和试饭糖化力的影响，酵母菌主要测定起发酵能力和产酒精能力。

**实验安排**

周一 配制培养基、灭菌、倒平板、接种；制饭，用血球计数板计数孢子悬液中孢子数量、接种（注意每瓶接孢子数量级一致，如果接入的是多菌种，按总和计）、培养；

周二 配制试剂、绘制标准曲线，测定试饭糖化力、还原糖含量和总糖含量；

周三 测定试饭糖化力、还原糖含量和总糖含量，取样涂布平板。然后向每瓶加入无菌水60mL，接入酵母悬液2ml，取样测定发酵醪中的还原糖、氨基氮和淀粉酶活性（若时间较晚，可低温放置，次日测定）；

周四 观察菌丝生长生长情况并记录，镜检。观察发酵瓶情况，测定发酵醪中的还原糖和总糖含量。取样涂布平板。

周五 观察发酵瓶情况，测定发酵醪中的还原糖、总糖和酒精度。

**实验内容分组建议如下（每个实验需至少2个平行）：（也可自行设计）**

1. 比较三株霉菌的产酶情况、糖化力及酒精度对糖化的影响。（注：培养48h后，不加酵母菌；指标中不需测定氨基氮含量）；（\*3）

2. 不同霉菌对发酵的影响（\*2）

菌种组合：1+4、2+4、3+4；米饭蒸后，加水60mL后接霉菌的同时接入酵母；4的菌数总量分别是根霉孢子的2、5倍（两组同学）；

3. 不同酵母对发酵的影响（\*2）

菌种组合：1+4、1+5、1+6；米饭蒸后，加水60mL后接霉菌的同时接入酵母，测定发酵过程的还原糖含量和氨基氮含量，发酵结束时测定酒精度；酵母菌数总量是根霉孢子的2、5倍；需测酵母的发酵性能观察。

4. 不同霉菌混合培养对发酵的影响（\*2）

菌种组合：1+2+4、1+3+4、2+3+4、1+2+3+4；接种试饭时，只接入霉菌孢子，且菌株1与菌株2或3的孢子总量比例为1：2-5；培养48h后，加水60mL和酵母菌4 2毫升。测定发酵过程还原糖、氨基氮含量的变化，发酵结束时测定酒精度。加入酵母前测定发酵醪中菌种数量和种类。

5.不同酵母组合对发酵的影响（\*2）

菌种组合：1+4+5、1+4+6、1+5+6、1+4+5+6；米饭蒸后，加水60mL后接霉菌的同时接入酵母；酵母菌数总量是根霉孢子的2、5倍；观察发酵醪的变化，并测定发酵过程还原糖、氨基氮含量的变化，发酵结束时测定酒精度，注意风味。

实验三 富铬米曲霉性质的研究

**一、实验目的**

1. 学会用分光光度计法测定三价铬离子；
2. 了解环境中各种因素对米曲霉富集三价铬的影响；
3. 学习胞内多糖的提取方法以及定量测定的方法；
4. 掌握菌体内CAT、SOD酶活和谷胱甘肽含量的测定方法。

**二、实验原理**

铬是“中国环境优先污染物黑名单”上优先监测的重金属之一。铬的化合物中Cr6+、Cr3+毒性依次减小，金属铬可以认为无毒。用微生物方法清除环境中的铬是当前研究的热点。但微生物在环境中吸收重金属是其生理功能的一种表现，微生物在自然环境中的生长受到各种因素的影响。同样每一种微生物对各种金属元素的吸收功能受到环境因素的影响也是比较大的。为了更好地利用微生物来富集金属离子，就要深入的研究微生物吸附重金属效率的影响因素。溶液中Cr3+的去除过程大致为：价键作用结合到微生物细胞表面、转移到细胞内部。

谷胱甘肽广泛存在于动、植物中，在生物体内有着重要的作用。在面包酵母、小麦胚芽和动物肝脏中的含量很高，机体新陈代谢产生的过多自由基会损伤生物膜，侵袭生命大分子，谷胱甘肽具有多方面的生理功能，它的主要生理作用是能够清除掉自由基，Cr3+对米曲霉有毒性，主要表现在对生物膜的损伤，谷胱甘肽可以有效减少生物膜的损伤。

真菌多糖是一种特殊的生物活性物质，它可以与金属离子结合从而降低金属离子对生物体的损伤。多糖是极性大分子化合物，溶于水，不溶于乙醇。常用的提取方法有热水浸提、稀碱液浸提法、稀酸液浸提法、超声抽提法、酶提法，以及超临界流体萃取法。

抗氧化酶是超氧化物歧化酶、硫氧还蛋白过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶等的统称。一旦在机体内形成过氧化物，它们即刻发挥作用，利用氧化还原作用将过氧化物转换为毒害较低或无害的物质。因此抗氧化酶活的指标是衡量米曲霉抗氧化损伤的重要指标之一。

**三、材料与方法**

1. **菌种 米曲霉（*Aspergillus oryzae*）**
2. **试剂**
   1. 铬溶液（CrCl3 40g/L）：称取三氯化铬4g，溶于水并定容至100mL。
   2. 磷酸溶液（1：1）：取分析纯磷酸30mL加入30mL蒸馏水。
   3. 高锰酸钾溶液（40g/L）：取4克高锰酸钾固体，溶于蒸馏水并定容至100mL。
   4. 浓硝酸（分析纯）
   5. 氢氧化钠溶液：过饱和、0.5mol/L 、1mol/L、2mol/L
   6. 盐酸溶液：0.5mol/L 、1mol/L、2mol/L
   7. 尿素（200g/L）：取20g尿素固体，溶于水并定容至100mL。
   8. 亚硝酸钠（20g/L）：取2g亚硝酸钠固体溶于水定容至100mL。
   9. 显色剂：取二苯碳酰二肼0.1g，溶于25ml丙酮，加水定容至50ml，于棕色瓶中避光低温保存，现用现配。
   10. 80%浓硫酸（分析纯）：取77mL 98%浓硫酸加入到23mL水中。
   11. 蒽酮试剂：称取0.1g蒽酮，溶解于50mL80%硫酸中即得。
   12. 葡萄糖标准液（200mg/L）：准确称取110℃烘干至恒重的葡萄糖20.0mg，用水溶解，定容至100m1。
   13. 邻苯三酚（焦性没食子酸）：用10mmol/L HCl配置成50mmol/L的溶液，新鲜配制。
   14. 50mmol/L、pH 7.5磷酸钠盐缓冲液
   15. 20mmol/L H2O2溶液：取227μL的30% H2O2溶液，用50mmol、pH 7.5磷酸缓冲液稀释至100mL，现用现配，低温避光保存。
   16. pH 8.3，50mmol/L的磷酸钠缓冲液。
   17. 0.25mol/L pH 8.0 Tris-HCl缓冲溶液：称取Tris 30.2g，加入蒸馏水800mL搅拌溶解，加入浓盐酸10mL，室温下调节pH至8.0，定容至1L。
   18. 磷酸盐缓冲溶液：取磷酸二氢钠6.8g，庚烷磺酸钠2.2g，用磷酸调pH 至3.0，加超纯水定容至1L。
   19. DTNB溶液：用DTNB加0.05mol/L pH 3.0的磷酸盐缓冲溶液配成0.01moL/L的溶液，存在于棕色瓶中低温暗处备用，使用时用0.25moL/L的Tris-HCl缓冲溶液配成0.1mmoL/L的DTNB溶液。
3. **培养基**

液体培养基： 3% 蔗糖，1.5%酵母膏，pH 6左右，装液量为250mL三角瓶装60ml 121℃20min灭菌。

固体培养基：2%琼脂，3% 蔗糖，1.5%酵母膏，pH 6左右，121℃20min灭菌，倒平板。

1. **仪器**

（1）容量瓶：100mL、50mL；（2）试管；（3）三角烧瓶：100mL、250mL；（4）电炉；（5）分光光度计；（6）水浴锅；（7）pH计

1. **铬含量的测定**

**原理**：Cr3+与显色剂不发生显色反应，需先将Cr3+氧化成Cr6+，与二苯碳酰二肼发生显色反应，溶液呈紫红色。为了排除其他金属离子的影响，实验用水应用蒸馏水。

（1）标准曲线的测定

将配制好的铬标准液进行梯度稀释后，获得20 mg/L， 40 mg/L，60 mg/L，80 mg/L ，100 mg/L ，120 mg/L ，140 mg/L，160 mg/L， 180 mg/L，200 mg/L，取1.0mL液体加入1.5mL磷酸溶液，后加蒸馏水至25mL，转移液体到三角瓶中并加入0.2mL高锰酸钾溶液，加热蒸发至原有体积的一半左右，冷却后加水定容至25ml。（若氧化过程中溶液褪色，补加高锰酸钾溶液使溶液保持始终紫红色）

向定容后的液体中加入1mL尿素溶液，然后滴加亚硝酸钠溶液使其褪为无色（同时产生气体），静置使沉淀下沉。取5 mL无气泡上清液加入0. 5mL显色剂显色（紫红色），在540nm波长处用分光光度计测量读数。

（2）三价铬含量的测定

胞内铬的测定：将培养液抽滤，得菌体，洗涤，85℃干燥至恒重。取菌体0.5g，加入10ml浓硝酸放置在电炉上加热消化，消化直至溶液呈清亮色，消化过程中若溶液量减少，为了防止蒸干可续加硝酸直至消化结束。（消化过程要注意安全，需在做好防护措施的情况下在通风橱内进行）

消化结束后先用过饱和的氢氧化钠溶液进行粗中和，再调pH至5~9之间。将中和后的溶液定容至25mL，剩下步骤同标准曲线的测定步骤。

培养液中的铬测定：将培养液离心或过滤，取上清液或滤液，按标准曲线中的测定方法进行测定。

1. **多糖含量的测定（**蒽酮-硫酸法）

**原理：**糖在浓硫酸作用下，脱水生成的糠醛或羟甲基糠醛能与蒽酮缩合成一种蓝绿色化合物，在10－100mg范围内其颜色深浅与糖的含量成正比，且在620nm波长下有最大吸收峰。

（1）标准曲线的测定

精密吸取葡萄糖标准液2.0，4.0，6.0，8.0，10.0 ml分别置于100ml量瓶中加水定容至刻度，摇匀得葡萄糖稀释液。

分别取各浓度葡萄糖溶液和蒸馏水1mL注入干洁的试管中，加蒽酮试剂5ml混合之，于沸水浴中煮沸10分钟，取出冷却至室温，以上述1mL水所制得的空白溶液做参比，于波长620nm处测定各溶液吸收度，以葡萄糖稀释液的浓度（μg/ml）为横坐标，吸收度为纵坐标，绘制标准曲线。

（2）样品的测定

发酵液抽滤得菌丝体，用蒸馏水清洗三遍后烘干至恒重，粉碎成粉末后备用。称取菌丝体粉末0.1g，于具塞试管中，加6ml 水，85℃热水法提取2-3h，补水至6ml，5000rpm离心10min后,上清液加入3 倍量95%乙醇，静置过夜，离心，沉淀用蒸馏水复溶，得样品溶液

取适当稀释的样品溶液1mL注入干洁的试管中，加蒽酮试剂5ml混合之，于沸水浴中煮沸10分钟，取出冷却至室温，以水代替样品溶液反应制备参比溶液，测定OD620。

1. **SOD的测定**

**原理：** 在碱性条件下,邻苯三酚发生自氧化反应,生成有色物质红碚酚,同时产生O2- ,利用SOD能分解O2-的特性,阻止中间产物的积累,通过测定在特定波长下的光吸收速率计算酶的活力.(可通过调节邻苯三酚浓度调节自氧化速率)。以每分钟对邻苯三酚的光化还原的抑制50%为1个SOD活性单位。

（1）邻苯三酚自氧化速率的测定

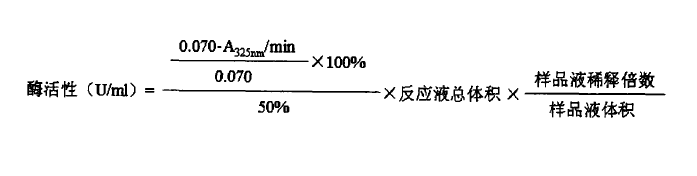
在25℃，4.5ml 50mmol/L，pH 8.3的磷酸缓冲液中加入100μL 5mmol/L的邻苯三酚，迅速摇匀，倒入石英比色皿中，在325nm波长下，每隔30s测吸光度A值一次，要求自氧化速率在0.070 OD/min左右。

（2）酶活力测定

酶液制备：称取菌体样品，加入5.0ml提取缓冲液，在冰水浴中研磨成匀浆，9000rpm离心5min，收集上清液，即为酶提取液。低温保存。

酶活测定方法与测邻苯三酚自氧化速率相同，在加入邻苯三酚前加入待测SOD样液（4.4ml 50mmol/L，pH 8.3的磷酸缓冲液，加入100μl酶液，加入100μl 5mmol/L的邻苯三酚溶液启动反应）中，测得数据按下列公式计算酶活性。

酶活（U/mL）=(0.070- A325/min)\*2\*样品提取液总体积/(0.07\*测定时所取样品提取液体积\*菌体质量)



1. **CAT的测定**

**原理：**过氧化氢酶属于血红蛋白酶，含有铁，他能催化植物体内累积的过氧化氢分解为水和分子氧，从而减少H2O2对组织造成的氧化性伤害。因此，可根据反应过程中过氧化氢的消耗量来测定该酶活的活性。

（1）酶液制备

称取菌体样品，置于研钵中，加入5.0ml提取缓冲液，在冰水浴中研磨成匀浆，12000 g离心30min，收集上清液，即为酶提取液。低温保存。

（2）活性测定

酶促反应体系由2.9mL 20mmol/LH2O2溶液和100μL酶提取液组成。以蒸馏水为参比空白，在反应15s时开始记录反应体系在波长240nm处吸光度值，作为初始值，然后每隔30s记录一次，连续测定，至少获取6个点的数据。重复3次。

（3）酶活计算

记录反应体系在波长240nm处的吸光度值，制作OD240值随时间变化曲线，根据曲线的初始线性部分（从时间I到时间F）计算每分钟吸光度变化值

△OD240=（OD240F-OD240I）/tF-tI。

式中 △OD240-----每分钟反应混合物吸光度变化值

OD240F -----反应混合液吸光度终止值

OD240I -----反应混合液吸光度初始值

tF -----反应终止时间，min

tI -----反应初始时间。

然后以每克样品每分钟吸光度变化值减少0.01为1个过氧化氢酶活性单位，单位是0.01△OD240/min·g。计算公式为

U= （△OD240 x V）/（0.01 x Vs x m）

式中 V-----样品提取液总体积，mL Vs -----测定时所取样品提取液体积，mL

m-----样品质量，g。

1. **谷胱甘肽含量的测定**

**原理：**含巯基化合物可以与DTNB反应，断裂DTNB的二硫键产生2-硝基-5-硫代苯甲酸（NTB-），若在中性或碱性pH条件下的水中可以离子化，生成NTB2-二价阴离子。这种NTB2-离子呈现黄色。

（1）GSH提取

采用冻融法。精确称取湿菌体1g，加入超纯水3mL混匀，于-20℃冰箱中冷冻过夜，第二天沸水浴10min，取出混匀，5000r/min离心2min，取上清，即得GSH提取液。

（2）DT NB 衍生-光度法测定GSH 含量

(a) 标准曲线的绘制

取还原型GSH 标准品50 mg 定容至50mL，得到1 g /L GSH 标准溶液, 取0.0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5，0.6，0.8，1.0 mL 标准溶液, 加水至1. 0 mL, 加入Tris-HCl 缓冲溶液3 mL, 混匀后取1. 0 mL 加到DT NB 溶液5 mL 中, 混匀反应5 min, 于412 nm 波长处测定吸光度, 以对照品质量浓度( g /L ) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。

（b）GSH 含量测定

取待测样品溶液1. 0 mL, 按上述DTNB 衍生-光度法的试验方法测定吸光度, 在标准曲线上查得GSH 质量浓度( g /L ) 。

10. **生物量的测定（重量法）**

湿重：取定量滤纸两张，分别在分析天平上称重（m1、m2）。取其中一张滤纸，将培养液进行过滤，收集菌体，沥干后称重（m3），取另一张滤纸，用滤液润湿，沥干后称重m4。计算细胞的湿重。

干重：将前部分湿菌体转移至已知重量的培养皿中，85℃烘干至恒重，计算菌体干重。

**11.丙二醛的测定**

实验原理：丙二醛（MDA）是膜质过氧化的最终产物之一,其含量高低反映了细胞膜质过氧化水平,MDA可与蛋白质结合引起蛋白质分子内和分子间的交联,使膜系统变性,进而影响细胞膜透性。在高温、酸性条件下，MDA能与硫代巴比妥酸（TBA）形成红棕色的三甲基复合物，该复合物在532nm处有最大吸收。然而，样品中存在的可溶性糖类对该反应有干扰作用。糖与TBA显色反应产物的最大吸收波长在450nm、532nm处也有光吸收。为消除干扰，可用下列经验公司消除由蔗糖引起的误差, C(umol/L) = 6.45 \*(OD532-OD600)- 0.56\*OD450

（1） 实验试剂

100g/L三氯乙酸（TCA）溶液、6.7g/L硫代巴比妥酸（TBA）溶液

（2）测定过程

称取湿重菌体1g，加入5.0mL100g/L TCA溶液，研磨匀浆后，于4℃、10000×g离心20min，收集上清液，低温保存备用。取3.0mL上清液，加入3.0mL 6.7g/L TBA溶液，混合后在沸水浴中煮沸20min，取出冷却后再离心一次。分别测定上清液在450nm、532nm和600nm波长处的吸光度值。重复三次。 计算样品中丙二醛含量。

**四、实验内容**

**实验过程**

（1）菌种活化：在无菌条件下自斜面菌种挑取一环菌体，接入平板中，在30±1℃下恒温培养3d。

（2）发酵培养：将活化后的菌体接种到发酵培养基中，振荡培养48-72h。

**实验（一）探究不同铬浓度对米曲霉生长的影响**

（1）培养基的配制

分别配制CrCl3浓度为0g/L，0.5 g/L，1.0 g/L，1.5 g/L的液体培养基，pH 6.0左右，每个浓度做2组平行。

（2）实验步骤

a、在培养菌体期间测定并绘制出三价铬标准曲线。

b、液体培养基

在无菌条件下自平板菌种挑取一环菌体，接入含不同铬浓度的液体培养基中，在30±1℃下振荡培养60h。分别在12h、24h、36h、48h、60h取出培养液2mL,若有菌体，可离心获得上清液。抽测发酵液中铬的含量和总糖含量，同时测量60h培养液中的生物量和以及菌体内铬含量。

**实验（二）铬浓度对米曲霉胞内多糖含量以及谷胱甘肽含量的影响**

（1）培养基的配制

配制CrCl3浓度为0g/L，0.8 g/L，1.5 g/L的液体培养基，pH 6.0左右，每个浓度做2组平行。

（2）实验步骤

在无菌条件下自平板菌种挑取一环菌体，接入液体培养基中，在30±1℃下振荡培养3d，在此期间，测定并绘制出总糖和谷胱甘肽的标准曲线。在60h后取出摇瓶，抽滤，洗涤得菌体，测定生物量。

1. 胞内多糖

干燥称重测生物量，而后经研磨，热水抽提，醇沉复溶后制得样液，用蒽酮硫酸法测多糖含量。

1. 谷胱甘肽

测湿重，采用冻融法提取谷胱甘肽，用DTNB 衍生-光度法测谷胱甘肽含量。

**实验（三）加铬时间对米曲霉富铬的影响情况**

在无菌条件下自平板菌种挑取一环菌体，接入液体培养基中，于30±1℃下振荡培养3d，在此期间绘制出标准曲线。

分别在0h、12h、24h、36h分别取两瓶加入铬溶液，使培养基中铬浓度为1.0g/L，余下两瓶为空白独照，振荡培养。60h后测所有摇瓶中的生物量并测定发酵液与菌体内的铬含量。

**实验（四）铬浓度对米曲霉胞内CAT、SOD酶活力及丙二醛含量的影响**

在无菌条件下自平板菌种挑取一环菌体，接入液体培养基中，于30±1℃下振荡培养3d，在此期间绘制出标准曲线。

配制8瓶液体培养基，4瓶培养基中铬浓度为1.0g/L，4瓶不含铬。培养36h、60h后培养液中总糖含量、胞外铬离子含量、生物量及胞内丙二醛含量、CAT、SOD酶活力。

**五、结果与分析**

实验（一）：以时间为横坐标，生物量为纵坐标，绘制出不同铬浓度下米曲霉在液体培养基中的生长曲线；收集数据整理出在72h后在各个铬浓度下米曲霉的富集情况。

实验（二）：整理数据，作图分析铬浓度与米曲霉中胞内多糖和谷胱甘肽之间的关系，以及对米曲霉生长情况的影响。

实验（三）：整理数据，作图分析在米曲霉不同生长阶段加铬对其生长情况的影响以及其富集铬能力的关系，测定酶活确定铬对米曲霉的损伤关系。

实验（四）：培养过程中碳源浓度、铬离子浓度的变化、测定铬存在条件下米曲霉的防御体系变化。

**实验报告 写作格式见附件**

附件一 羧甲基纤维素钠法测定纤维素酶酶活（QB 2583-2003）

**1. 原理**

纤维素酶在一定温度和pH条件下，将纤维素底物（羧甲基纤维素钠）水解，释放出还原糖。在碱性、煮沸条件下，3,5-二硝基水杨酸（DNS试剂）与还原糖发生显色反应，其颜色的深浅与还原糖（以葡萄糖计）含量成正比。通过在540nm测其吸光度，可得到产生还原糖的量，计算出纤维素酶的CMCA-DNS酶活力，以此代表纤维素酶的酶活力。

**2. 试剂和溶液**

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

**2.1 羧甲基纤维素钠（CMC-Na）**

化学纯（上海光华化学试剂厂）在25℃，2%水溶液，粘度800 mPa·S ~1200 mPa·S。（每批羧甲基纤维素钠使用前用标准酶加以校正）。

**2.2 柠檬酸钠缓冲液 0.05mol/L pH 4.8（适用于酸性纤维素酶）**

称取一水柠檬酸4.83g，溶于约750mL水中，在搅拌情况下，加入柠檬酸三钠7.94g，用水定容至1000mL，调节溶液的pH到4.8±0.5备用。

注：也可采用pH4.8乙酸缓冲液：称取三水乙酸钠8.16g，溶于约750mL水中，加入乙酸2.31mL，用水定容至1000mL，调节溶液的pH到4.8±0.5备用。

**2.3 磷酸缓冲液 0.1mol/L pH6.0（适用于中性纤维素酶）**

分别称取一水磷酸二氢钠121.0g和二水磷酸氢二钠21.89g，将其溶解在10L去离子水中，调节溶液的pH到6.0±0.5。溶液在室温下可保存一个月。

**2.4 CMC-Na溶液**

称取2g CMC-Na，精确至1 mg，缓缓加入相应的缓冲液（2.2或2.3）约200mL并加热至80-90℃，边加热边磁力搅拌，直至CMC-Na全部溶解，冷却后用相应的缓冲液稀释至300mL，用2mol/L盐酸或NaOH调节溶液的pH到4.8±0.5（酸性纤维素酶）或6.0±0.5（中性纤维素酶），最后定容到300mL，搅拌均匀，贮存于冰箱中备用。

**2.5 DNS试剂**

称取3,5-二硝基水杨酸10±0.1g，置于约600mL 水中，逐渐加入NaOH 10g，在50℃水浴中（磁力）搅拌溶解后，再依次加入酒石酸钾钠200g、苯酚（重蒸）2g和无水亚硫酸钠5g，待全部溶解并澄清后，冷却至室温，用水定容至1000mL，过滤。贮存于棕色试剂瓶中，于暗处放置7天后使用。

**2.6 葡萄糖标准贮备溶液（10mg/mL）**

称取于103±2℃下烘干至恒重的无水葡萄糖1g，精确至0.1mg，用水定容至100mL。

**2.7 葡萄糖标准使用溶液**

分别吸取葡萄糖标准贮备溶液0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50mL于10mL容量瓶中，用水定容至10mL，塞盖，摇匀备用。

上述系列浓度应根据需要自行调整。

**3. 仪器**

3.1 自动连续多档分配器

3.2 旋涡混合器

3.3 试管、水浴锅等仪器

**4. 分析步骤**

**4.1 绘制标准曲线**

按表1规定的量，分别吸取葡萄糖标准使用溶液（2.7）、缓冲溶液（2.2或2.3）和DNS试剂（2.5）于各管中（每管号平行作3个样），混匀。

将标准管同时置于沸水浴中，反应10min。取出，迅速冷却至室温，用水定容至25mL，盖塞，混匀。用10mm比色杯，在分光光度计波长540nm处测量吸光度。以葡萄糖量为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，获得线性回归方程，线性回归系数应在0.9990以上时方可使用（否则须重做）。

**表1 葡萄糖标准曲线**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 葡萄糖标准使用溶液 | | 缓冲液吸取量  mL | DNS试剂吸取量  mL |
| 浓度（mg/mL） | 吸取量（mL） |
| 0 | 0.0 | 0.00 | 2.5 | 3.0 |
| 1 | 1.0 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |
| 2 | 1.5 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |
| 3 | 2.0 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |
| 4 | 2.5 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |
| 5 | 3.0 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |
| 6 | 3.5 | 0.50 | 2.0 | 3.0 |

**4.2 样品的测定**

4.2.1 待测酶液的制备

称取固体酶样1.0g，精确至0.1mg（或吸取液体酶样1.0mL，精确至0.01mL），用水溶解，准确稀释定容（使试样液与空白液的吸光度之差恰好落在0.33-0.35范围内），混匀放置10min，待测。

4.2.2 操作程序

——取四支25mL刻度具塞试管（一支空白管，三支样品管）。

——分别向四支管中，准确加入用相应pH缓冲液配制的CMC-Na溶液（2.4）2.00mL。

——分别准确加入稀释好的待测溶液（4.2.1）0.50mL于三支样品管中（空白管不加），用漩涡混匀器混匀，盖塞。

——将四支试管同时置于50±0.1℃水浴中，准确计时，反应30min，取出。

——迅速、准确地向各管中加入DNS试剂（2.5）3.0mL，于空白管中准确加入稀释好的待测酶液（4.2.1）0.50mL，摇匀。将四支管同时放入沸水浴中，准确计时，加热10min，取出，迅速冷却至室温，用水定容至25mL。

——以空白管（对照液）调仪器零点，在分光光度计波长540nm下，用10mm比色杯，分别测量三支样品管中样液的吸光度，取平均值。通过查标准曲线或用线性回归方程求出还原糖的含量。

**5. CMCA-DNS酶活力计算**

CMCA-DNS酶活力，按以下公式计算：

*X1*= *A* × 1/0.5 × *n* × 2

式中：

*X1* —— 羧甲基纤维素（还原糖法）酶活力（CMCA-DNS），u/g（或u/mL）；

*A* —— 吸光度在标准曲线上查得（或计算出）的还原糖量，mg；

1/0.5 —— 换算成酶液1mL；

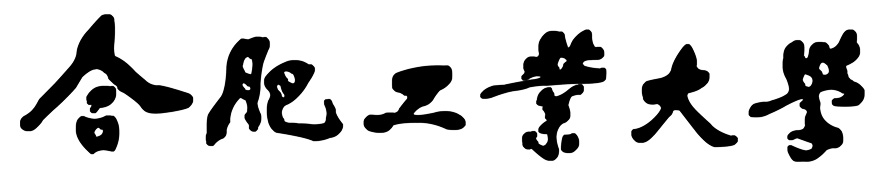
n —— 酶样的稀释倍数；

2 —— 时间换算系数。

**6. 允许差**

同一试样两次测试结果的绝对差值，不得超过算术平均值的10%，变异系数不超过5%。

附件二 实验报告写作格式



综合实验报告书

（20XX ~20XX学年）

实 验 题 目

学院名称

专 业 （班 级）

姓 名 （学 号）

起 讫 日 期

指 导 教 师

20 年 月 日

实验报告内容与要求

实验报告内容按照发表论文的格式书写，完整的发表论文包括：标题、作者、作者单位、通讯地址、摘要、关键词（前述6个部分用中英文两种形式书写），前言、材料与方法、结果与分析、讨论、致谢、参考文献。

1. 标题 论文的题目，如“不同碳源对黑曲霉产纤维素酶的影响”

Effect of carbon resources on production of cellulase in *Aspergillus niger*

Production of cellulase in *Aspergillus niger* induced by various carbon resources

2. 作者 实验的参与人员。

3. 单位和通讯地址 作者的单位和单位的地址、邮编。

4. 摘要（Abstract）：实验目的，实验内容、结果及结论（用最精炼的文字写出你的实验梗概，大约200字左右即可，使后来的读者只需阅读摘要即可了解本论文的核心内容）。

5. 关键词（Keywords）：论文的核心内容词，一般3-5个，使后来者只需通过这几个词就可在浩瀚的文献书海中检索到你的论文。

6. 前言：简要介绍与本实验相关的既有的研究进展，本实验的目的与研究意义。

如 纤维素酶的知识、黑曲霉的知识、黑曲霉降解纤维素的知识，前人已经发表的黑曲霉产纤维素酶的论文；本实验的目的，实验结果的意义。

7. 材料与方法：详细说明实验使用的材料的名称、来源和主要特点、实验操作方法、步骤及注意的问题。

8. 结果与分析：描述每一项实验操作获得的数据，并对这些数据进行比较、评价、分析之间的关联性。最好能标注出数据的**误差线**。

9. 讨论：在结果分析的基础上，逐条归纳实验成果，对存在的问题或失败原因进行分析，得出科学的结论或对后续实验进行展望。

10. 致谢：感谢在实验过程中所获得的资助和帮助。

11. 参考文献：列出主要的参考文献。

期刊格式：[序号] 作者。论文标题 [J]。期刊名称，出版年，期（卷）号，起止页码。

专著格式：[序号] 作者。书名。出版地 [M]：出版社，出版年。

技术标准格式：[序号] 标准编号，标准名称 [S]。

学位论文格式：[序号] 作者名。论文题目 [D]。保存地点：保存单位。

专利格式：[序号] 专利所有者。专利名称 [P]。专利国别：专利号，授权日期。

**《生理学》实验指导书**

**生 理 学 实 验 须 知**

**一、生理学实验的重要性**

生理学是一门实验性的科学。从发展上看，它应归功于17世纪的英国著名医生威廉·哈维（Willian Harvey）。哈维采用活体解剖法和动物实验法在多种动物体上进行研究，并在人身上进行观察，才得出血液循环的正确结论，于1628年出版了《心血运动论》。所以，生理学是建立在实验和观察的基础上，这充分说明了生理学实验对生理学创立和发展的重要作用。因此国内外的生理学家无不重视实验课教学，它是临床医学的重要基础。

**二、生理学实验课的目的**

1．通过实验使学生逐步掌握人体的基本构造和生理学实验的基本操作技术，了解生理学实验设计的基本原则，进一步了解获得生理学知识的方法，验证和巩固生理学的某些基本理论。

2．通过实验使学生逐步提高对人体中各种生理现象的观察能力、分析能力、独立思考和独立解决问题的能力。

3．在实验过程中，逐步培养学生在科学工作中的严肃的态度、严格的要求、严格的方法和严谨的作风。

**三、生理学实验课的要求**

提高实验课的教学质量，需教师和学生的共同努力。因此，实验课的要求包括对教师和学生两个方面。

**（一）实验前**

1．集体备课 生理学实验是在生命机体上进行的，易受各方面因素的制约和影响，实验前进行集体备课是保证实验顺利完成的基本条件。集体备课应在主管教师的统一指导下进行，负责实验的人员（包括教师、实验技术人员）全部参加。在备课中，明确实验的目的要求、统一实验的方法步骤、规定实验的项目和内容。并要求教师熟练掌握。

2．学生必须仔细预习实验指导，了解实验的目的要求、基本原理以及简要的操作步骤。实验课开始后，教师如发现学生未预习，应令其停止实验，待预习后再进行。

3．学生应复习有关理论，以便提高实验过程中的主动性和效率，并进一步巩固有关理论知识。

**（二）实验过程中**

1．教师应严格要求学生，对必须学会的基本操作技术应一丝不苟，培养学生的科学素养和分析问题、解决问题的能力。

2．学生应认真、仔细地进行各项操作，观察实验中出现的各种现象，如实、随时加以记录，并对引起各种生理现象的原因、意义进行分析与思考。

3．实验器材要安放整齐，布局合理，便于操作。要保持清洁卫生，随时清除污物。实验桌上不得放置与实验无关的物品。

4．爱护仪器与实验动物，注意节约各种实验材料。公用物品在使用完毕后应放回原处，以免影响别人使用。

5．保持实验室安静，不得嬉笑与高声谈话，以免影响别人实验。

6．遵守实验室规则，注意实验小组内的团结、配合与分工协作。

**（三）实验后**

1．学生应将实验用具整理就绪，放回原处。所用手术器械必须擦洗干净。实验用具如有损坏或缺少，应即报告指导教师。作好实验室的清洁卫生工作。

2．妥善处理实验动物，如实验结束后动物尚未死亡，应在教师指导下处死，而后放于指定地点。

3．整理实验记录，认真书写、及时交实验报告。

4．教师应认真批改实验报告。如发现不符合要求的实验报告，应指明问题，退回重写。

**四、实验报告的书写**

写实验报告是生理学实验课的基本训练之一，应以科学态度，认真、严肃地对待，以便为日后撰写科学论文打下良好的基础。为帮助学生书写报告，现将其格式、内容和要求作一简要说明。

（一）实验结束后，均需根据指导教师的要求，每人写一份实验报告，并按时完成，及对送交指导教师评阅。

（二）书写实验报告要求文字简练、通顺，书写清楚、整洁，正确使用标点符号。

（三）在书写实验报告时，提倡学生间的相互讨论和争辩，但必须自己独立完成。否则，应重写。

（四）实验报告的格式与内容

1．注明姓名、专业、组别、日期。

2．实验序号及题目。

3．实验目的要求。

4．实验方法应根据教师的具体要求写。一般情况下或重复使用的方法，可作简要说明。

5．实验结果是实验报告的重要部分，应将实验过程中所观察或记录到的生理效应忠实地、正确地记述和说明。结果部分常需用实验记录，这就需要将实验记录进行合理地加工与剪贴，并加图号、图注及必要的文字说明。不得将原始记录原封不动地附在报告上。凡属定量的测量资料，例如快慢、轻重、长短、多少等，均应以正确的单位和数值严格地写在报告上。为了说明实验的可靠性，有些实验结果需要作统计学处理，求出均数、标准差以及显著性检验。为了便于说明和比较，有些实验结果可以列表或绘图表示。绘制柱状图和坐标图的方法、要求、注意事项参看附录四。

6．讨论与结论讨论是根据所学的理论知识，对实验结果进行科学地分析和解释，并判断实验结果是否是预期的。如果出现非预期的结果，应分析其可能的原因。讨论是实验报告的核心部分，可以帮助学生提高独立思考和分析问题的能力。不应盲目抄袭书本，应提倡学生根据自己的实验结果提出创造性的见解和认识，但必须是严肃认真、有科学依据的。结论是从实验结果和讨论中归纳出一般的概括性的判断，也就是这一实验所验证的基本概念、原则或理论的简明总结。结论的书写应该是简明扼要的。

**五、实验室规则**

1．遵守学习纪律，准时上、下课。实验期间不得借故外出或早退。特殊情况下，应向教师请假。

2．必须严肃认真地进行实验操作、观察实验结果。实验期间要保持安静，不得进行任何与实验无关的活动。

3．实验所得数据及实验记录，需经教师审核，否则不得结束实验。

4．各组的仪器和用品，由本组使用，不得与别组调换，以免混乱。如遇仪器损坏或丢失，应报请教师处理。

5．爱护公共财物，注意节约各种实验用品。实验动物按组发给，如需补充使用，须经教师同意才能补领。

6．保持实验室清洁整齐，随时清除污物。实验完毕后，应将实验器材、用品收拾妥当；将手术器械擦洗干净，清点数量，放回原处。经教师检查后才能离开实验室。

**实验一 刺激强度与肌肉收缩反应的关系**

**[实验目的]**

通过观察刺激强度与骨骼肌收缩的关系，加深理解刺激与反应以及阈刺激的概念。

**[基本原理]**

腓肠肌由许多肌纤维组成，当刺激支配腓肠肌的坐骨神经时，不同的刺激强度会引起肌肉的不同反应。当刺激强度过小时，不引起肌肉收缩反应，此时的刺激为**阈下刺激**。当刺激强度逐渐增强时，可引起少数肌纤维发生收缩反应，这种引起最小收缩反应的有效刺激的强度称为**阈强度**。具有阈强度的刺激为**阈刺激**。随着刺激强度的加大，参与收缩反应的肌纤维数量增多，收缩力量也加大，此为**阈上刺激**。当全部肌纤维同时收缩时，即出现最大的收缩反应，这时，即使再增大刺激强度，肌肉收缩的力量也不再随之加大。可以引起肌肉发生最大收缩反应

的最小刺激强度为**最适（大）刺激强度**。

**[实验对象]**

蟾蜍或蛙。

**[器材与试剂]**

蛙类手术器械、探针、培养皿、记号笔等。

不同浓度的盐酸（0.01%、0.1%、1%），不同浓度的硫酸（0.01%、0.1%、1%），任氏液等。

**[实验步骤]**

1、制备坐骨神经-腓肠肌标本，放置任氏液中浸泡10-20分钟。

（1）破坏脑、脊髓

左手持蛙，使其头部朝上，用食指下压头端，使蛙头和躯干成直角。用右手食指的指甲由头端沿正中线向下滑动，在耳鼓膜后缘连线前约3mm处可以感到有一横沟，其中点相当于枕骨大孔。用探针由此垂直刺入椎管，将探针折向头端颅腔，左右捻动将蛙脑破坏。然后将探针退至枕骨大孔处后插入椎管捣毁脊髓。当蛙四肢肌肉表现松弛下垂、眼睛闭合且无自发运动时，即表示脑和脊髓已完全破坏。

（2）剪除躯干上部及内脏

在骶髂关节水平以上1cm处用粗剪刀插入体腔，横断脊柱，将头、前肢、内脏一并剪去，仅保留一段腰背部脊柱及后肢。

（3）剥皮及分离两腿

先剪去肛周一圈皮肤，然后左手捏住脊柱断端，右手捏住断缘皮肤，向下剥掉全部后肢皮肤。标本放于盛有任氏液的小烧杯中。再用粗剪刀沿正中线将脊柱和耻骨联合平分为二，并剪开两侧大腿。

（4）游离坐骨神经

将下半身腹侧向上用大头针固定于蛙板上，沿脊柱两侧用玻璃针分离坐骨神经。

2、用不同浓度的盐酸刺激肌肉，观察肌肉对刺激的收缩反应。

3、用不同浓度的硫酸刺激肌肉，观察肌肉对刺激的收缩反应。

[**观察项目**]

表 刺激强度与肌肉收缩反应的关系

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 次数 | 刺激强度（V） | 收缩幅度（mm） |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**[注意事项]**

1、每次刺激神经后，应间隔0.5—1.0分钟，使肌肉得以适当恢复。

2、经常用任氏液湿标本，使之维持良好功能状态。

**[问题与思考]**

1、在阈刺激和最大刺激之间，肌肉收缩曲线随刺激强度增加而增高的现象如何解释？

2、名词解释：阈强度、阈刺激、阈上刺激、最适（大）刺激。

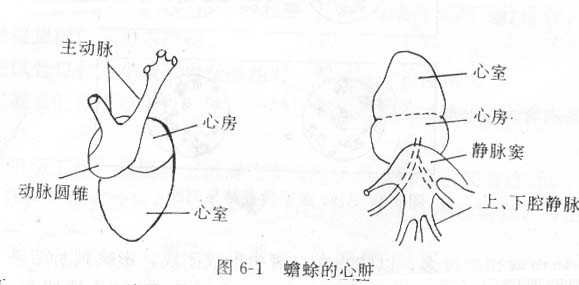
**实验二 蛙心脏的期前收缩和代偿间歇**

**[实验目的]**

观察蛙心脏的期前收缩和代偿间歇。

**[实验原理]**

心肌每兴奋一次，其兴奋性就发生一次周期性的变化。心肌兴奋性的特点在于其有效不应期特别长，约相当于整个收缩期和舒张早期。因此，在心脏的收缩期和舒张早期内，任何刺激均不能引起心肌兴奋而收缩，但在舒张早期以后，给予一次较强的阈上刺激就可以在正常节律性兴奋到达以前，产生一次提前出现的兴奋和收缩，称之为**期前收缩**。同理，期前收缩亦有不应期，因此，如果下一次正常的窦性节律性兴奋到达时正好落在期前收缩的有效不应期内，便不能引起心肌兴奋而收缩，这样在期前收缩之后就会出现一个较长的舒张期，这就是**代偿间歇**。本实验通过观察在心脏活动的不同时期给予刺激，以验证心肌兴奋性阶段性变化的特征。



**[实验对象]**

蟾蜍或蛙。

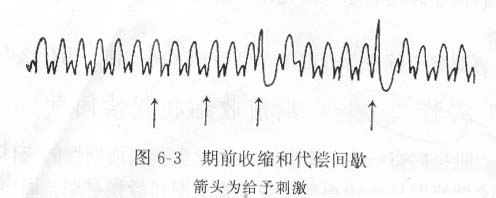
**[器材与试剂]**

蛙类手术器械、探针、培养皿、任氏液等。

**[实验步骤]**

1、标本制备：取蛙，毁其大脑、脊髓，将蛙仰卧固定，从剑突下将胸部皮肤向上剪开，然后剪去胸骨，打开心包，暴露心脏。

2、观察心脏活动，在给予适当的刺激后，再观察其活动情况。



**[注意事项]**

1、破坏蛙的脑和脊髓要完全。

2、注意滴加任氏液，以保持蛙心适宜的环境。

**[问题与思考]**

1、在心脏的收缩期和舒张早期分别给予心室一中等强度的阈上刺激，能否引起期前收缩？为什么？

2、若用同等强度的刺激在心室的舒张早期之后刺激心室，结果又将如何？为什么？

3、在期前收缩之后，为什么会出现代偿间歇？

4、在什么情况下期前收缩之后，可以不出现代偿间歇？

**实验三 红细胞的渗透脆性观察**

**[实验目的]**

考察红细胞的渗透脆性。

**[实验原理]**

在正常情况下，哺乳动物的红细胞内的渗透压与血浆的渗透压相等，相当于0.9%的NaCl溶液的渗透压（蛙血浆渗透压约与0.65%的NaCl溶液的渗透压相当）。因此，将红细胞悬浮于等渗的NaCl溶液中，其形态和容积可以保持不变，若将红细胞悬浮于低渗的NaCl溶液中，则水分进入红细胞使之膨胀，甚至破裂溶血。临床上常用不同浓度的的低渗NaCl溶液来测定红细胞的渗透脆性。

渗透脆性大的红细胞对低渗NaCl溶液的抵抗力小，NaCl溶液的渗透压稍有降低，此类红细胞便发生破裂而溶血。反之，渗透脆性小的红细胞对低渗NaCl溶液的抵抗力大，故红细胞的渗透脆性与其对低渗溶液的抵抗力成反比关系。

**[器材与试剂]**

记号笔、试管架、10ml试管、蛙抗凝血、不同浓度的NaCl溶液、蒸馏水、任氏液等。

**[实验步骤]**

蛙抗凝血的制备：将0.1-0.2ml的抗凝血剂加入1.5ml的离心管中，使用一次性注射器朝心脏跳动部位刺入（此时用力避免过大，以免刺穿蛙心），吸取蛙血，并将蛙血加入到离心管中。

取12支小试管，分别编号，按顺序排列于试管架上，按下表加入1%的NaCl溶液、蒸馏水，使每试管2ml。随后用注射器每试管加入蛙抗凝血一滴，轻轻混匀，细心观察结果，记录。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号  溶液 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1%的NaCl(ml) | 1.8 | 1.6 | 1.4 | 1.3 | 1.2 | 1.1 | 1.0 | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 0.5 |
| 蒸馏水 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 1.5 |
| NaCl浓度(%) | 0.9 | 0.8 | 0.7 | 0.65 | 0.60 | 0.55 | 0.50 | 0.45 | 0.40 | 0.35 | 0.30 | 0.25 |

**[问题与思考]**

4、理解并掌握渗透压的概念及其与红细胞脆性的关系。

**实验四 离体心脏灌流**

**[实验目的]**

1、观察离体心脏保持在适宜的环境中，在一定时间内仍能保持节律性兴奋，产生节律性收缩。

2、观察内环境中的理化因素对心脏的正常的节律性活动的影响。

**[实验要求]**

根据循环系统及内环境方面的知识，设计两种实验方案，用离体心脏灌流的方法，观察各种因素对心脏活动的影响。（学生自己拟订方案）

**[实验报告]**

根据实验的情况，分析对离体心脏的影响因素有哪些。

**《遗传学》实验指导书**

**实验一 植物多倍体诱导及鉴定**

**(一)实验目的与要求**

1.了解人工诱导多倍体的原理。

2.初步掌握用秋水仙碱诱导多倍体的一般方法。

**(二) 实验原理**

秋水仙碱的作用在于阻止分裂细胞过程中纺锤丝的形成，而对染色体的结构和复制无显著影响。若浓度合适，药剂在细胞中扩散后，不致发生严重的毒害，细胞经一定时期后仍可恢复常态，继续分裂，只有染色体数目加倍成多倍性细胞，并在此基础上进一步发育成多倍体植株。

**(三)试剂与材料**

1．材料：各种花卉茎尖生长点、幼苗、种子。

2. 试剂、仪器：0.2－0.4%秋水仙碱水溶液，45%醋酸，醋酸洋红染液，70%酒精，0.1－0.2升汞，蒸馏水等；显微镜、烧杯、量筒、酒精灯、广口瓶、培养皿、镊子、剪子、刀片、脱脂棉、载玻片、盖玻片等。。

**(四)实验步骤**

1.0.4%秋水仙碱水溶液的配制：取秋水仙碱0.5克，先用少许95%酒精助溶，然后溶入125ml蒸馏水中，配成0.4%秋水仙碱溶液。

2.处理种子：将种子用清水浸泡一天或直接将干燥种子用0.1－0.2%升汞溶液消毒8－10分钟，再用清水洗净，然后散放在底铺有滤纸的培养皿中，一个培养皿作对照，用清水培养。将另一个培养皿徐徐注入0.2－0.4%秋水仙碱溶液。为了避免蒸发可加盖，之后将它们都置于培养箱中保持25℃左右，使种子发芽。种子萌发后，应继续处理24小时。在处理过程中，仍注意随时向药物处理的培养皿中添加清水，以保持药液原处理时的浓度。处理后，用清水冲洗种子上的残液，再播种或砂培。处理适度的种子比对照发芽稍慢，种芽胀大，从形态上可初步分出加倍是否成功。

3.处理幼苗或幼苗：对发芽迟缓的种子或幼苗，在其苗期处理效果更好。由于秋水仙碱只对正在分裂的细胞发生作用，因此处理部位大多在茎尖或秆顶端的生长点或新发育的侧芽。处理时，将蘸有0.2－0.4%秋水仙碱溶液的棉球，置于生长点处，并且经常滴加清水保持药液浓度。处理时间24－48小时，处理后，将残存药液充分清洗，待幼苗进一步生长后，进行观察和鉴定。

4.观察与鉴定：常采用的方法是观察和比较两者气孔的大小。将叶面表皮撕下一小块，在显微镜下观察，经加倍的多倍体，叶面气孔比二倍体大很多，从外部形态上观察，加倍后的植株比二倍体高大，叶片肥厚。

**(五)实验结果与作业**

1.认真操作，在培养皿上标注对照和处理。

2.在发芽的整个阶段要认真观察，详细记载。

3.实验报告要求写出全部实验过程的实验结果。

**实验二 用逆转录-聚合酶链反应方法检测基因表达**

**(一)实验目的与要求**

1. 了解逆转录-聚合酶链反应(**RT-PCR)**的基本原理和方法。
2. 学习**用RT-PCR方法检测基因表达**的方法。
3. 本实验综合了RNA的提取、cDNA合成及PCR扩增**等知识点。**

**(二) 实验原理**

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction，RT-PCR)的原理是：提取组织或细胞中的总RNA，以其中的mRNA作为模板，采用Oligo（dT）或随机引物利用逆转录酶反转录成cDNA。再以cDNA为模板进行PCR扩增，而获得目的基因或检测基因表达。RT-PCR使RNA检测的灵敏性提高了几个数量级，使一些极为微量RNA样品分析成为可能。该技术主要用于：分析基因的转录产物、获取目的基因、合成cDNA探针、构建RNA高效转录系统。

**(三)试剂与材料**

1.材料:　植物材料。   
2.试剂：RMA提取试剂、一步法RT-PCR试剂盒、目的基因引物、DEPC处理水、DL2000、 GoldViewTM核酸染料、溴酚蓝

3.主要设备: PCR仪、离心机、低温冰箱、 恒温水浴锅、 制冰机、分光光度计、微量移液枪、电泳槽、凝胶成像系统以及其他常规仪器。

**(四)实验步骤**

1. 总RNA的提取：见试剂盒说明书。  
2.cDNA第一链的合成：按试剂盒说明书进行。   
3．PCR：

（1）取0.5ml PCR管，依次加入下列试剂：

|  |  |
| --- | --- |
| 第一链cDNA | 2μl |
| 上游引物（10pM） | 2μl |
| 下游引物（10pM） | 2μl |
| dNTP(2mM) | 4μl |
| 10×PCR buffer | 5μl |
| Taq酶（2u/μl） | 1μl |

（2） 加入适量的ddH2O，使总体积达50μl。轻轻混匀，离心。

（3） 设定PCR程序。在适当的温度参数下扩增28-32个循环。为了保证实验结果的可靠与准确，可在PCR扩增目的基因时，加入一对内参（如G3PD）的特异性引物，同时扩增内参DNA，作为对照。

（4） 电泳鉴定：进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

1. 密度扫描、结果分析：采用凝胶图像分析系统，对电泳条带进行密度扫描。
2. 注意事项
3. 在实验过程中要防止RNA的降解，保持RNA的完整性。在总RNA的提取过程中，注意避免mRNA的断裂。
4. 为了防止非特异性扩增，必须设阴性对照。
5. 内参的设定：主要为了用于靶RNA的定量。常用的内参有G3PD（甘油醛-3-磷酸脱氢酶）、β-Actin（β-肌动蛋白）等。其目的在于避免RNA定量误差、加样误差以及各PCR反应体系中扩增效率不均一各孔间的温度差等所造成的误差。
6. PCR不能进入平台期，出现平台效应与所扩增的目的基因的长度、序列、二级结构以及目标DNA起始的数量有关。故对于每一个目标序列出现平台效应的循环数，均应通过单独实验来确定。
7. 防止DNA的污染：(a) 采用DNA酶处理RNA样品；(b)在可能的情况下，将PCR引物置于基因的不同外显子，以消除基因和mRNA的共线性。

**(五)实验结果与作业**

1.认真操作，完成每一步实验，并仔细观察实验结果；

2. 撰写实验报告，对实验结果进行分析讨论。

**《生物化工原理》**

**实验指导书**

关于《生物化工原理》课程实验的说明

《生物化工原理》课程是生物工程、食品科学与工程、生物技术等专业的重要基础技术课，课程中涉及的理论和计算方法是与实验研究密切相关的，生物化工原理是建立在实验基础上的学科，课程实验在这门学科中占有重要地位。生物工程的飞速发展，要求研制新材料、寻找新能源，开发高科技产品，对生物化工过程与设备的研究提出了更高要求。为适应新形势的需要，加强学生实践环节的教育，以培养有创造性和有独立工作能力的科技人才，是高校的培养目标。

《生物化工原理》实验指导书是针对生物工程、食品科学与工程、生物技术专业编写的，课程中所讲的理论、概念或公式，学生的理解往往是肤浅的，做了实验以后，有助于对基本原理的理解，对公式中各种参数的来源和使用范围会有更深入的认识，同时可以培养学生从事实验研究的能力，包括：设计实验方案的能力；进行实验，观察和分析实验现象的能力；正确选择和使用测量仪表的能力；利用实验的原始数据进行数据处理以获得实验结果的能力；运用文字表达技术报告的能力。这些能力是进行科学研究的基础，学生只有通过一定数量的基础实验和综合实验练习，经过反复训练才能掌握各种实验能力，通过实验课打下一定的基础，将来参加实际工作就可以独立地设计新实验和从事科研与开发。

《生物化工原理》实验课要求学生具有一丝不苟的工作作风和严肃认真的工作态度，从实验操作、现象观察到数据处理等各环节都不能丝毫马虎。

为了收到切实的教学效果，要求学生必须做到以下几点：

1．实验前要预习实验指导书及相关章节的必要知识，了解实验目的、要求、原理及实验步骤；

2．实验中严格按操作规程进行，调试细心，观察仔细，记录详细；爱护仪器设备，注意人身安全；

3．严格遵守实验室纪律，保持相对安静，养成良好的工作习惯；

4．做好实验设备的使用登记；

5．实验操作完成后，及时清理、清洗设备，整理现场，打扫室内卫生；

6．按时完成实验报告。

实验1 流体阻力测定

**一．实验目的：**

1. 熟悉流体在管内流动阻力的测定方法及实验数据的处理。

2. 测定一定条件下（ε/d）直管磨擦系数λ与Re的关系。

**二**．**实验原理：**

化工管路由直管部分和管件部分组成。流体在管路中流动时，由于粘性剪应力和涡流的存在，因此不可避免地要消耗一定的机械能。

直管部分损失的流体机械能称为直管阻力损失（或称沿程阻力损失）；管件部分损失的称为局部阻力损失。工程上必须对这种机械能的损失作出定量计算。

分析流体流动过程可知它是一个多参数过程，h f = f (d、1、u、μ、ρ、ε)。通过因次分析，从诸多影响流体流动的因素中组合流体流经管件时的阻力损失为如下的函数关系式：



； 

寻找出λ、ξ，就可计算出流体在管道内流动时的能量损失：

， 及 

式中：λ——直管摩擦系数；

d——直管的内径m；

l——直管的长度m；

μ——流体流速m / s；

ξ——管件的阻力系数；

△P1——直管的沿程压力降N/m2；

△P2——管件的局部压力降N/m2，△P1、△P2由水银压差计读出；

△P = h(ρHg-ρ)g N/m2

流速由涡轮流量计及MMD智能流量仪算出：u = VS /

式中：g——重力加速度m/s2；

ρ——流体的密度kg/m3；

Vs——平均流量m3/s。

**三．实验装置及流程**

实验装置如图1所示。该装置的主体部分为离心泵、流量计、各种阀门、不同管径和材质的管子等组合而成。水由泵从水池中抽出后，经过流量计送到管道中，水流经管道后返回水池。



图1. 实验装置及流程示意图

1—水箱，2—控制阀，3—放空阀，4—直管阻力测量U形压差计，5—平衡阀，6—放空阀

7—排液阀，8—温度计，9—泵，10—涡轮流量计，11—直管段取压孔

12—局部阻力测量U形压差计，13—闸阀，14—局部阻力取压孔

装置：

1．被测元件：1). 不锈钢管Dg=3/4″（内径20mm）,长2m

2). 闸阀Dg=3/4″

2．测量仪表：1). U形压差计，指示液(水银)。

2). MMD智能流量仪

3). 涡轮流量计LW-15。精度：0.5级，量程：0.4～4.0 m3/h。

3．循环水箱

4．循环水泵

5．仪表箱 1). 按钮开关 2). 交流接触器 3). 锁定开关

6．数显温度表

**四．实验方法**

1．水箱充水至80%；

2．仪表调整、MMD智能流量仪及LW-15型按说明书调节；

3．打开压差计上平衡阀，关闭各放气阀；

4．启动循环水泵；

5．排气：1). 管路排气；

2). 测压导管排气；

3). 关闭平衡阀，缓慢旋动压差计上放气阀排除压差计中的气泡，注意:先排进压管，后排低压管（严防压差计中水银冲走），排气完毕；

6．读取压差计零位读数；

7．开启调节阀至最大，确定流量范围，确定实验终点，测定直管部份和测定局部阻力（闸阀全开时）；

8．测定读数：改变管道中的流量读出一系列流量（VS），压差（△P1或△P2）；

9．记录(附表)：编号，流量系数；

10．实验装置恢复原状，打开压差计上的平衡阀，并清理实验场地。

**五．实验数据处理：**

1．计算结果表

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | Q（m3/sec） | U（m/sec） | H左(cm) | H右(cm) | Re(×104) | Hf(J/Kg) | λ |
| 1 |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |  |  |  |

**六．实验注意事项**

1．实验前必须打开压差计上平衡阀，以防水银冲出压差计。

2．管路排气时，须在平衡阀打开状态下进行。测定数据时，须在平衡阀关闭状态下进行。注意须待流量达稳定后方可记下读数。

3．当进行管道切换时，一定要先打开待测管道的阀门，再关当前测量管道的阀门，否则会造成事故。

4．实验结束后，须打开平衡阀。

**七．实验报告**

1. 绘制实验结果λ-Re曲线图。

2．以水为工作流体所测得的λ-Re曲线能否应用于空气？如何应用？

实验2 离心泵特性测定

**一．实验目的：**

1．熟悉离心泵的操作；

2．测出单级离心泵固定转速下的特性曲线Q－He、Q－Ne、Q－η。

**二．实验原理：**

离心泵是一种液体输送机械，它籍助于泵的叶轮高速旋转，使充满在泵体内的液体在离心力的作用下，从叶轮中心被甩至边缘，在此过程中液体获得能量，提高了静压能和动能，液体离开叶轮进入壳体。部份动能变成静压能，进一步提高了静压能。流体获得能量的多少，不仅取决于离心泵的结构和转速。而且与流体的密度有关。

离心泵的主要性能是扬程、流量、功率和转速，在一定的转速下，离心泵的扬程、功率、效率均随流量的大小改变。即扬程和流量的特性曲线H e= f (Q e )功率消耗和流量的特性曲线N轴= f (Q e )，及效率和流量的特性曲线η= f ( Q e )为离心泵的三条特性曲线。它们与离心泵的设计、加工情况有关，必须由实验测定。根据曲线可找出离心泵的最佳操作条件，这是选择离心泵的依据。

三条特性曲线中的Q e 和N轴由实验直接测定。H e 和η通过以下公式计算，由伯努利方程：



式中：H e——泵的扬程（m液柱）

H压强表——压强表测得的表压（m液柱）

H真空表——真空表测得的真空度（m液柱）

h0——压强表和真空表中心的垂直距离（m）

u0——泵的出口管内流体的速度（m / sec）

u1——泵的进口管内流体的速度（m / sec）

泵的有效功率：Ne = QHeρg

泵的效率：η = Ne/ N轴，这里用η总 = Ne /N电。

**三．实验装置及流程：**

本实验装置由被测的型离心泵及涡轮流量计、压力表、真空表及控制阀组成一个循环回路。实验装置如图3所示。

装置：

1．被测元件：型离心泵

2．测量仪表：1). 真空表：精度1.5级，量程0 ~ -0.1 MPa；

2). 压力表：精度1.5级，量程0 ~ 0.4 MPa；

3). 流量计(涡轮流量计LW-25)：精度0.5级，量程1.6 ~ 10 m3/h；

4). 二次仪表：MDD智能流量仪，精度0.2级；

5). 功率表：DP3(1)-W1100(单相)，精度:±0.5 ％F.S；

3．循环水箱

1——离心泵

2——真空表

3——压力表

4——流量计

5——水箱

6——引水阀

7——上水阀

8——调节阀

9——排水阀

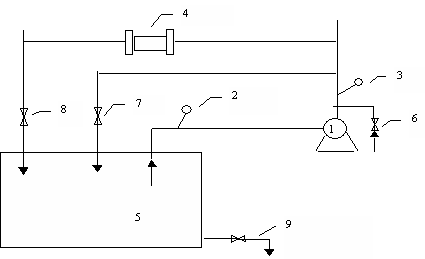


图2 实验装置及流程图

**四．实验方法**

1．打开上水阀门，水箱充水至80 %；

2．关闭功率表及调节阀；

3．开启引水阀，反复开启和关闭放气阀，尽可能排除泵体内的空气，排气结束，关闭引水阀；

4．启动离心泵，判断是否正常运转（有无异常声音、不转、反转等）正常后打开功率表开关；

5．开启调节阀至最大开启度，由最大流量范围合理分割流量，进行实验布点；

6．由调节阀调节流量，每次流量调节稳定后，读取各组实验数据；

7．实验装置恢复至初始状态，并清理实验场地。

**五．原始数据及处理：**

1．原始数据

水温 ℃， ho 米， 进口管径 mm，出口管径 mm

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | Q（m3/sec） | P真（mm Hg） | P压(kg f/cm2) | N电 (W) |
| 1 |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |

2．计算结果表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | Q（m3/sec） | He(m-H2O) | Ne(KW) | NW(KW) | η（%） |
| 1 |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |  |

**六．注意事项**

1．尽可能将泵内的空气排尽；

2．离心泵启动时要关闭出口阀和功率表的开关；

3．泵内无水时，严禁启动离心泵。

**七．思考题**

1．为什么启动离心泵前要引水灌泵？如果灌水排气后，离心泵仍启动不了，你认为可能是什么原因？

2．什么情况下会出现“气蚀”现象？

3．管路特性曲线的形状与泵的性能有关吗？它取决于哪些因素？改变管路特性曲线的方法有哪些？

实验3 总传热系数测定实验

**一**．**实验目的**

1．掌握传热系数K的测定方法；

2．了解传热系数的影响因素；

3．掌握传热速率的测定方法。

**二**．**实验原理**

根据传热基本方程，已知换热器的结构尺寸， 只要测得传热速率*Q*，以及有关的温度，即可算出*K*。

传热方程式： ）





换热器保温良好，，则 

由于存在随机误差，换热器的传热量取：

由 ， 得 

式中：*A*——传热面积，m2；

—冷热流体的平均温差，℃；

，是传热平均温差修正系数，全逆流时为1，对于单壳程、双管程或二管程以上的，可从文献中查得；

Q——传热速率，w；下标h，c，损，分别表示热流体，冷流体和热损失速率；

T进，T出——分别表示热流体进出口温度，℃；

t进，t出 ——分别表示冷流体进出口温度，℃。

**三**．**实验装置及流程**

该装置主体设备为列管式换热器，与风机、加热器、流量计等构成整个测试系统。如图4所示。

工艺流程：本实验冷流体是水，热流体是空气。冷流体自冷流体源来，经转子流量计测量流量，温度计测量进口温度后，进入换热器壳程，换热后在出口处测量其出口温度; 热流体自风源来，经转子流量计测量后，进入加热到120 ℃流入换热器的管程，并在入口处测量其进口温度，在出口处测量其出口温度。

1．装 置：1）测试元件：列管换热器，型号为GLC-0.4；

2）单壳程双管程：壳程采用圆缺型档板，传热管为低肋铜管，管径：φ10×1 mm；

有效管长：290 mm，管数：14根，管外侧传热面积：0.4 m2

2．测量仪：1）温度测量：测量冷热流体进出口温度

一次仪表：Pt100电阻：每套4支，共8支；量程：0—210 ℃

二次仪表：数显仪表AI-708J，精度：0.2级，每套一台共二台

温控仪表：人工智能温度调节仪表AI-708，精度：0.2级；每套一台共二台

2）流量测量：冷热流体转子流量计

型号：LZB-25，量程1-10，精度1.5级；

范围：气体2.5-25 Nm3/h， 液体100-1000 NL/h。

1——风机

2——加热器

3——调节阀

4——底阀

5——调节阀

6——换热器

7——转子流量计

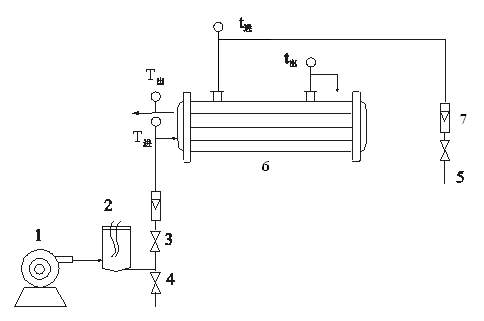


图3 实验装置及流程示意图

**四**．**实验方法**

1．开通冷流体源，由调节阀调节冷流体流量；

2．开通风源，打开底阀4，由调节阀3调节空气流量，接通电源，在智能温度调节仪表AI-708上设定控制温度为100—120 ℃；

3．维持冷流体流量不变，热空气进口温度在一定时间内（约10分钟）基本不变时，可记录有关数据；

4．测定传热系数K时，在维持冷流体（或热空气）流量不变情况下，根据实验步骤要求，改变热空气（或冷流体）流量若干次；

5．实验结束，关闭加热电源，待热空气温度降到50 ℃以下，关闭冷流体源。

**五**．**数据处理**

1. 原始数据记录

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编 号 | 热流体 | | | 冷流体 | | |
| 流量Gh  m3/h | 温 度 ℃ | | 流量Gc  m3/h | 温度℃ | |
| T进 | T出 | t进 | t出 |
| 1 |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |  |

2．计算结果表

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | Qc/W | Qh/W | Q/W | εΔt | Δtm逆  ℃ | Δtm  ℃ | K  W/m2·℃ |
| 1 |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |  |  |

**六．注意事项**

1．电源220 V，双色线（黄绿）为接地线；

2．加热温度设定为200 ℃，过高会加大热损失；不得随意调整设置值，以免引起仪表故障；

3．气源不可在零流量下工作，应实验中采用旁路阀来调节气体的流量；

4．在计算实验结果时，εΔt = 1。

**七．思考题**

1．在测定传热系数K时，按现实实验流程，用管内冷凝液测定传热速率与管外冷水测定传热速率那种方法更准确？为什么？

2．若将汽−水套管的冷却水出口、入口调换前后Δtm值是否相同？

3．在实验中，有哪些因数影响实验的稳定性？

4．影响传热系数的因数有哪些？

5．在传热中，有哪些工程因数可以调节？你在操作中主要调节哪些因数？

实验4 流化速度的测定及颗粒物料干燥

**一．实验目的**

1. 本实验综合固体流态化、物料干燥理论，测定颗粒物料的起始流化速度及流化干燥特性；

2. 测定颗粒物料的起始流化速度，不同流化速度时的床层压降；

3. 选择一种颗粒物料，测定其流化干燥特性。

**二．实验原理**

**A. 颗粒物料的流化速度**

当一种流体从低速连续增大向上通过颗粒床层时，可能出现以下几种情况：固定床→临界流化床→流化床→输送床。

流化形式有两种形式，即：散式流化和聚式流化。散式流化状态的特点为固体颗粒均匀的分散在流化介质中，故亦称均匀流化。通常两相密度差小的系统趋向散式流化，故大多数液-固流化属于“散式流化”。对于密度差较大的系统，则趋向于另一种流化形式——聚式流化。

理想情况下，克服流体阻力的压强降与空压气速ｕ的关系，如图5-1所示。在流化床阶段整个床层压强降却保持不变，其值等于单位面积的床层净重力。

流态化阶段的Δp与u关系如图中的CE段所示。流化阶段中床层的压强降，可根据颗粒与流体间的摩擦力恰与其净重力平衡关系式求出，即：

Δp = Lmf ( 1-εmf )( ρs-ρ ) g

式中：Lmf、εmf——分别为开始流化时床层高度与空隙率；

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 图4-1 理想情况下的Δp−u的关系图 | 图4-2 实际情况下的Δ*p*−*u*的关系图 |

随着流速的增大，床层高度和空隙率ε都增加，而使Δp维持不变。整个流化床阶段的压强降为 Δp = L (1－ε)( ρs－ρ ) g

然而，实际流化床的情况比较复杂，其Δ*p*−*u*的关系如图5-2所示，与理想流化床的Δ*p*−*u*曲线有显著区别。

要使固体颗粒床层在流化状态下操作，必须使气速高于临界速度*umf*，而最大气速又不得超过颗粒的沉降速度（带出速度），以免颗粒被气流带走。

（一）临界流化速度*umf*

确定临界流化速度有实测和计算两种方法。其中实测法是获取物料临界流化速度的最有力而可靠的手段。临界流化速度的测定受很多因素的影响，在给定固体颗粒与流化介质条件下，还必须有良好的气体分布装置。

本实验目的之一就是测取小米(或芝麻)在空气中的临界流化速度*umfa*。如果实际生产中使用的流体介质不是空气，则该条件下的*umf*，可按下式推算：



式中：*ρ*——实际流化介质的密度，kg/m3；

*ρa*——空气的密度，kg/m3；

*μ*——实际流化介质的粘度，Pa·s；

*μa*——空气的粘度，Pa·s。

**B. 颗粒物料的干燥**

颗粒物料在受到外部加热时，内部水分会产生汽化。当内部水蒸汽的分压力***p***i大于干燥热空气中的水蒸汽分压力***p***0时，物料内部水分就会向周围的热空气中传递。在干燥装置中，热空气的水蒸汽分压力***p***0可看作是恒定的，物料中的水分不断降低的同时，其内部水蒸汽的分压力***p***i也会不断减小。直到***p***i＝ ***p***0时，干燥过程终止，物料中的剩余水分称为该条件下的平衡水分。

当热空气的温度与湿度恒定时，物料的干燥过程通常可分为三个阶段：

|  |  |
| --- | --- |
| 1. 加速干燥阶段：干燥速率dX/dτ 不断增大，物料温度上升； 2. 等速干燥阶段：干燥速率dX/dτ，物料温度基本不变； 3. 降速干燥阶段：干燥速率dX/dτ 迅速减小，物料温度急剧上升；此时应及时终止干燥过程，否则物料会因为温度过高发生焦糊、碳化。 | 图4-3 恒定条件下的物料干燥曲线  时间τ  干燥速率dX/dτ  ①  ③  ② |

**三．实验装置及流程**

实验装置如图5-4所示。主要有鼓风机、流量计、压差计、料仓、加热器及一些阀门组成。

1. 装置

1）除尘器（袋滤器）：Φ130×120 mm；

2）干燥塔塔体：优质高温玻璃，Φ146×8 mm；

3）电热恒温干燥箱

2. 测量仪器

1）流量测量：风速仪，风速测量处管道内径Φ42mm；

2）温度测量：数显仪表：智能数显温度表，精度0.5级；测温元件：Pt100；

温度控制：AI-708人工智能温度调节仪表，精度0.2级，能有效控制设定点温度（±0.2℃）；

3）压差测量：U形管水银压差计

4）电子分析天平

3. 实验材料：小米、面粉或其他食品颗粒物料。

1——袋式除尘器

2——料仓

3——加水斗

4——风速仪

5——流量调节阀

6——温度计

7——温度计

8——取样器

9——实验原料

10——水银压差计

11——电加热器

12——鼓风机

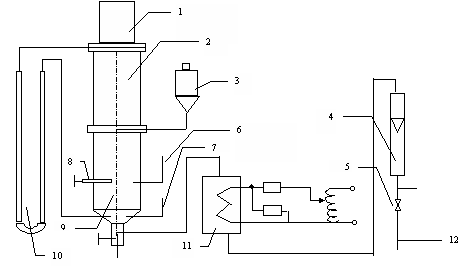


图4-4 流化速度测定实验装置及流程图

**四．实验步骤**

1．接通气源并缓慢调节风量，观察料仓中颗粒物料的运动状态；

2．开通风源，打开阀5，调节空气流量至最大，记录风速范围，合理布置实验点；

3．调节气体流速至设定值，记录在该流速下压差计的读数。

4．调节风量使料仓中颗粒物料处于良好的流化状态；

5．通过加水斗向料仓加入适量的水（30-50ml），并让物料中的水分混合均匀；

6．取样，测物料的初始水分；

7．接通电源，在智能温度调节仪AI-708上设定控制温度95～100℃；

8．按规定时间取样，测定物料水分；

9．实验停止步骤：切断加热电源，待气体温度下降至45℃以下，才可停止送风；

10．实验装置恢复初始状态，清理实验场地。

**五．实验报告**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1．流化速度测定：   |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | | 序号 | 气速(m/s) | 压强降Δ*p* (mmHg) | | | 左读数 | 右读数 | | 1 |  |  |  | | 2 |  |  |  | | 3 |  |  |  | | 4 |  |  |  | | 5 |  |  |  | | 6 |  |  |  | | 7 |  |  |  | | 8 |  |  |  | | 9 |  |  |  | | 10 |  |  |  | | 2．流化干燥：   |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | | 取样号 | 取样时间（min） | 初始质量（g） | 恒重质量（g） | 湿基水分（％） | | 0 | 0 |  |  |  | | 1 | 6 |  |  |  | | 2 | 12 |  |  |  | | 3 | 18 |  |  |  | | 4 | 24 |  |  |  | | 5 | 30 |  |  |  | | 6 | 36 |  |  |  | | 7 | 42 |  |  |  | | 8 | 48 |  |  |  | | …… |  |  |  |  |   物料名称： ；  空气状况：温度 ℃， 相对湿度 ％；  热空气入塔设定温度 ℃；  空塔气速 m/s |

3．绘制实际情况下的Δp−u的关系图；

4．绘制实验条件下的物料干燥曲线

5．流化床操作中，存在沸腾和沟流两种不正常现象，如何利用床层压降对其进行判断？怎样避免它们的发生？

6．流化床干燥与热风干燥有何异同点，在操作中需要注意哪些事项？

**六．实验注意事项**

1．注意采取适宜的床层高度、适宜的气速；

2．实验一开始，确定装置可提供的空塔气速最大值，使空塔气速实测点分布尽量合理；

3．停止实验时千万不可一次性切断所有电源，这样会因温度高而损坏仪器、设备；

4．风速仪每次使用前应按照规定要求调校。

实验5 过滤常数的测定

**一．实验目的**

1．掌握过滤问题的简化及工程处理方法，及过滤常数测定。

2．了解过滤设备的构造和操作方法。

二．**基本原理**

过滤是借助能将固体物截留而让流体通过的多孔介质，将固体物从液体或气体中分离出来的过程。随着过滤的进行，滤饼不断增厚，阻力不断增大，所以，即使操作压差保持不变，单位时间通过滤介质的液体量也在不断下降，即过滤速度不断降低；过滤速度u的定义是单位时间内单位过滤面积的过滤量，即：



式中：A——过滤面积，m2；

θ——过滤时间，s；

V——通过过滤介质的液体量，m3。

影响过滤速率的主要因素除操作压差(△P），滤饼厚度外，尚有滤饼悬浮液（含有固体粒子的流体）性质，悬浮液温度，过滤介质的阻力等，故难以用严格流体力学方法处理。并且，过滤速率即为流体经过固定床的表观速率u.。液体在由细小颗粒构成的滤饼空隙中的流动属于低雷诺数范围，因此，q与θ关系：

 ——过虑基本方程式

其中， 

在恒压过滤时，上述微分方程为，其中；

积分后，可得：*q 2* + *2q qe* = *K θ*， qe2 =*K θ*e

利用上述方程计算时，需要知道*K，qe*等常数，而*K，qe*常数只有通过实验才能测定，在利用实验方法测定过滤常数时，需将上述方程变换成如下形式：实验时，只要维持操作压强恒定，记取滤液增量ΔV（换算成Δq）及相应的过滤时间Δθ，以~*q*作图得一直线，读取直线斜率2/K和截距2qe/K求取常数K和qe，或者用最小二乘法求取2/K和2qe/K值，进而计算K和qe。

若在恒压过滤之前的θ1时间内已通过单位过滤面的滤液q1，则θ1至θ及q1至q范围内得：



上式表明q－q1和为线性关系，从而能方便地求出过滤常数K和qe值。

三．**实验装置及流程**

实验装置如图6所示，本实验装置系由配料桶、供料泵、卧式圆形过滤机（或立式板框过滤机）、阀门及管路等组成。

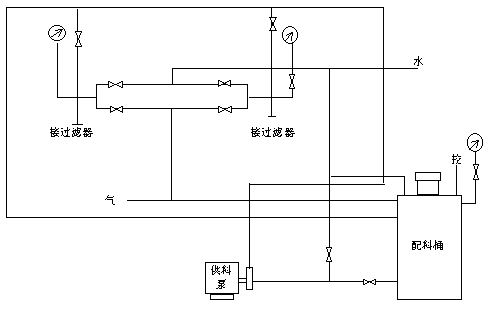


图5 过滤常数测定实验装置及流程图

装置：

过滤器：园盘式单板框，内径φ150mm，框厚L=20 mm。

过滤物系：轻质碳酸钙，浓度： 10  0B

**四．实验步骤**

1) 开动压缩机，将配制好的悬浮液送入贮浆罐中，使滤液均匀搅拌；

2) 将滤布浸湿，装好滤布，排好板框，然后压紧板框；

3) 检查阀门，将悬浮液进入过滤机的进口旋塞关闭；

4) 将计量筒中的液面调整到零点；

5) 打开管线最底部的旋塞，放出管内积水；

6) 启动后打开悬浮液的进口阀，将压力调至指定的工作压力；

7) 待滤渣装满框时即可停止过滤；

8) 实验结束后，关闭供料泵，拆开过滤机，取出滤饼，并将滤布洗净；

9) 恢复阀门至初始状态，擦拭设备，清理现场。

**五．数据处理**

恒压前：No.1 θ1= (s) V1= ×10-3 m3

恒压后：Δp= (kPa)

数据记录及计算结果（恒压过滤阶段）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| ΔV（ml） | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| Δθ（s） |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Δq（m3/m2×10-2） |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

表中，ΔV——恒压过滤阶段每次得到的滤液体积，

Δθ——得到每个ΔV对应的过滤时间。

**六．实验注意事项**

1．实验可选用CaCO3粉未配制成滤浆，其量约占料桶的2／3左右，配制浓度在8.0 B0左右；

2．料桶内滤浆可用压缩空气和循环泵进行搅拌，桶内压力控制在0.1MPa以内；

3．滤布在装上之前要先用水浸湿；

4．实验操作前，应先让供料泵通过循环管路，循环操作一段时间，过滤结束后，应关闭料桶上的出料阀，打开旁路上清水管路清洗供料泵，以防止CaCO3在泵体内沉积；

5．实验初始阶段不是恒压操作。因此可采用二只秒表交替计时，记下时间和滤液量，并确定恒压开始时间τ0和相应的滤液量q 1；

6．当滤液量很少时，滤渣已充满滤框后，过滤阶段可结束。

**七．思考题**

1．为什么过滤开始时，滤液常有点混浊，过一段时间才能澄清？

2．滤浆浓度和过滤压强对K有何影响？

3．过滤压强增加一倍后，得到同样滤液量所需的时间是否也减少一半？

**《生化分离工程》**

**实验指导书**

**实验一 超滤浓缩蛋白质**

1. **目的和要求**

学习超滤法的原理，掌握超滤法精致、浓缩酶制剂的操作工艺及要领，学会中空纤维膜的清洗、保养方法。

1. **原理**

超滤以多孔细小薄膜为过滤介质，压力为推动力，选择分离溶液中所含微粒和大分子的膜分离操作，孔径分布范围在0.0015~0.2μm之间，适合于分离酶、蛋白质等生物大分子物质。

本实验是采用中空纤维超滤装置，以外(或内)压式开路间歇操作方式，将α-淀粉酶液进行浓缩和纯化。实验所用膜的截留分子量为l0000u，可将α淀粉酶液(50000u)作为截留渡浓缩，同时透过液中除大部分成分为水外还有一些小分子杂质，从而达到对酶液的浓缩作用。

1. **仪器和试剂**

(1)试剂与材料：α-淀粉酶液，可溶性淀粉（以平均分子量5万道尔顿计算），3，5-二硝基水杨酸，苯酚，亚硫酸钠，氢氧化钠，甲醛。

(2)器材：中空纤维超滤柱(MMCO：10000)，柱式蠕动泵，压力表，水浴锅**（以一个班45人计算，需配置4-5台）**，分光光度计，量筒，烧杯，移液管，比色皿，等。

**4．分析方法**

**(1) α-淀粉酶的酶活力测定**

①原理：酶促反应速度大小可以作为酶活性的大小，也可以作为酶量多少的衡量标准，故可以从单位时间内一定条件酶促反应中底物的消耗量或产物的生成量来测定。

淀粉酶活力的大小与产生的还原糖的量成正比。用标准浓度的麦芽糖溶液制作标准曲线，用比色法测定淀粉酶作用于淀粉后生成的还原糖的量，以单位重量样品在一定时间内生成的麦芽糖的量表示酶活力。

②试剂配制：

A.DNS试剂:

将6.3g 3,5-二硝基水杨酸和262 ml 2mol/L NaOH溶液，加到500 ml含有185 g酒石酸钾钠的热水溶液中，再加5 g结晶酚和5 g亚硫酸钠，搅拌溶解。冷却后加蒸馏水定容至1000 ml，贮于棕色瓶中备用。

B.1％可溶性淀粉溶液：

称取10g可溶性淀粉，缓缓倒入煮沸的去离子水中，加热煮沸至溶液透明为止，冷却后定容至1000mL。

1.3.2.1 标准曲线的绘制

取7支25 ml刻度试管，编号0～6，分别量取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml葡萄糖标准溶液于7支试管中，并用蒸馏水补至2.0 ml，然后各加入DNS试剂1.5 ml。将各管摇匀，在沸水浴中加热5 min，取出后立即冷却至室温，再以蒸馏水定容至25 ml，混匀。在540 nm波长下，用0号管调零，分别读取1～6号管的吸光度。以吸光度为纵坐标，葡萄糖毫克数为横坐标，绘制标准曲线。得到回归方程。**（已给出y＝1.569x+0.0257，其相关系数R2＝0.998）**

1.3.2.2 样品酶活力测定

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **反应顺序** | **样品** | **标准空白** |
| 样品液（mL） | 0.5 | ­— |
| 蒸馏水（mL） | — | 0.5 |
| 50℃预热5min | √ | √ |
| 依次加入淀粉溶液（mL） | 1.5 | 1.5 |
| 混合 | √ | √ |
| 50℃保温30min | √ | ― |
| 依次加入DNS试剂（mL） | 3.0 | 3.0 |
| 混合 | √ | √ |
| 100℃煮沸7min | √ | √ |
| 冷却 | √ | √ |
| 蒸馏水（mL） | 10 | 10 |
| 混合均匀 | √ | √ |
| 总体积（mL） | 15.0 | 15.0 |

反应后的试样在室温下静置，如出现混浊需在离心机上以4000rpm离心10min，上清液以标准空白调零，在分光光度计540nm波长处测定样品溶液（A）的吸光值。用直线回归方程计算样品淀粉酶的活性。

酶活力单位定义：在60℃、PH6.0条件下，每小时从1％的可溶性淀粉溶液中释放出1微摩尔葡萄糖的酶量定义为1个酶活力单位（U）

淀粉酶活性U按下式计算：

U = [K×A×F]/[S×（30÷60）×180]

其中：U——样品淀粉酶活性，U/ml；

K——标准曲线斜率；

F——样品溶液反应前的总量，ml；

S——样品测试量；表1中S＝0.5ml；

60——1小时为60min；

30——反应时间，min。

180——葡萄糖的分子量。

两个平行样品的测定结果用算术平均值表示，保留整数。

**(2)超滤法精制浓缩酶的检测指标：**

① 浓缩比：包括体积浓缩比和酶活浓缩比：

A 体积浓缩比：用2O0OmL量筒测量超滤前贮槽1中加入的酶液体积，记录为V0(mL)。再记录超滤后贮槽l中酶液的体积V1(mL)。计算两者的比值(V0/V1)，即为体积浓缩比。

B 酶活浓缩比：先测定原酶液的酶活性(u0)，待超滤完后，测定贮槽l中浓缩酶液的酶活性(u1)。计算两者的比值(u0/u1)，即为酶活浓缩比。

② 其他各项指标：只要记录原酶液(待浓缩的)的体积V0和酶活性u0，再记录超滤结束后贮槽1和贮槽4中各自液体的体积V1和V4以及各自的酶活性u1和u4，即可通过计算得到相关指标，包括：酶活回收率、酶液失活率以及酶活性损失率。

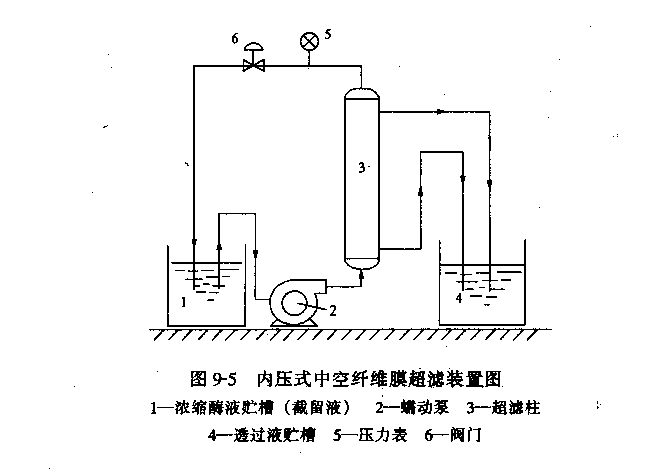
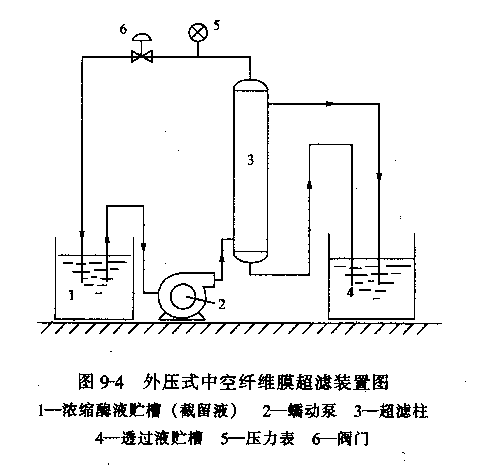
A酶活回收率：是表示经过超滤浓缩后得到的浓缩酶液的总酶活性占原酶液的总活性的百分率。

B．酶液失活率：是衡量酶液经过超滤处理后是否有失活现象发生，即分别测定截留液、透过液以及原酶液各自的总活性，计算截留液和透过液的总酶活性之和与原酶液总活性的百分比值是否为100％，若小于100％则表示有酶液失活现象发生。

C．酶活性损失率：是衡量超滤后保留的酶活性，是否被完全收集在浓缩酶液中，若透过液中有酶活性，则表明有酶活性的损失。

**5．实验装置图**

图9-4为外压式中空纤维膜超滤装置圈(间歇开环系统)，图9-5为内压式中空纤维膜(间歇开环系统)



**6实验步骤**

（1）系统连接：将超滤柱中的1％甲醛保存液倒空。用自来水冲洗干净。按照图9-4或图9-5(据所选超滤柱的类型而定)将实验装置连接起来。先在贮槽中加入大量去离子水，进一步冲洗柱子及整个系统。然后，升压至0.04MPa，检查系统是否有泄漏，一切正常后，排空柱中及系统中的去离子水，备用。

（2）超滤：在贮槽l中加人澄清的α淀粉酶原液。记录原始酶液体积V0(mL)并取样测酶活u0[mol／(mL·min)]，先启动蠕动泵，不升压，待排除柱及系统中气泡后，再升压至一定压力。收集的截留液再循环回流至贮槽1中，而透过液则流人贮槽4，周而复始。达到一定浓缩比时可停止超滤。分别记录贮槽1和贮槽4中液体的体积V1和V4(mL)，并分别取样测定其各自的酶活性u1和u4[mol/(ml.min)]。

（3）本实验要求8位同学一组，考察内压式超滤操作下压力的变化（四个梯度，如由2000 mL浓缩至1700、1400、1100、800mL）、外压式超滤操作下压力的变化（四个梯度，如由2000 mL浓缩至1700、1400、1100、800mL），组内每位同学完成一项的体积浓缩比、酶活浓缩比的检测。检测和分析方法可按上述“比色法”进行。

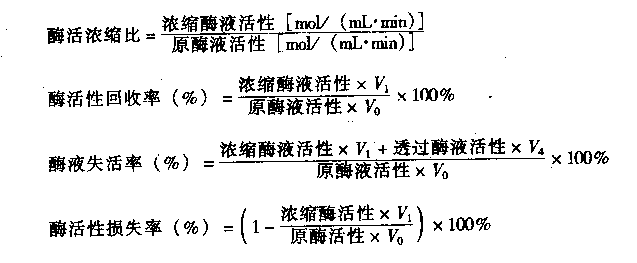
（4）中空纤维超滤柱的后处理、再生及保养（演示）：先将大量自来水倒人贮槽l中，反复正洗、反洗；常压、加压冲洗中空纤维柱．若柱子污染不严重，这样反复用水冲洗即可将柱冲洗干净。但若柱子污染严重(内服可见杂质残留柱中及通量变小)，考虑到酶液及菌体均属蛋白质类物质，可用0 1mol/L氢氧化钠溶液(或1％蛋白酶液)采用上述水清洗方法处理中空纤维柱。最后。再用去离子水将清洗液冲洗干净，至流出液澄清透明为止。

在贮槽1中加人1％甲醛溶液，用蠕动泵使甲醛液在柱内循环，待无气泡，柱中全部充满甲醛液后，停止操作。迅速用橡胶塞将中空纤维柱的所有进出口密封，以防甲醛液泄漏，从而保障中空纤维柱不发生霉变。此外在柱子保存过程中，时刻注意柱中盼保存液不能流失。若有泄漏，应随时补加，否则。一旦柱子干燥，将无法再生使用。

**7．作业**

**（1）实验数据记录：**

**计算公式为：**



**实验二 双水相萃取牛血清白蛋白（BSA）**

**一 实验目的**

1、通过本实验学会双水相萃取分离蛋白质的方法；

2、了解双水相萃取的原理及影响因素。

**二 实验原理**

双水相萃取法是利用物质在互不相容的两水相间分配系数的差异来进行萃取的方法。当两种高聚物水溶液相互混合时，如果它们互不相容，则形成两个水相，两种高聚物分别富集于上、下两相。蛋白质在这两相中分配系数受粒子大小 、疏水性、表面电荷、粒子或打分子的构象等因素决定，因此可用来分离蛋白质。双水相萃取法具有操作简便,易于放大,处理量大,对生物活性物质无损害,有时还有某些稳定和保护作用.

**三 试剂与材料**

试剂：

PEG 6000 ，牛血清清蛋白，考马斯亮蓝 G250，乙醇(95%)，(NH4)2SO4，磷酸(85%)，磷酸二氢钾,磷酸氢二钾,氢氧化钠，盐酸，氯化钠。

设备：

电子天平，可见光分光光度计，电热恒温振荡水槽

**四 实验步骤**

1.双水相体系的制备

首先配制以下原液: PEG6000（400g/L）；(NH4)2SO4（400g/L）； BSA（1000mg/L）对所采用的双水相系统,按计算移取一定体积的PEG原液和(NH4)2SO4原液于5mL的离心试管中,再加入一定量的BSA(1000mg/L)原液。当需要调pH值时,可用HCl或NaOH调至要求的pH值；当需加盐时,可加一定量的固体NaCl。所有试剂加完后,再用去离子水稀释至5mL,混匀后,置于室温下一定时间，然后用1500r/min离心机离心10min，制得两相。

1. 分配系数的测定

将所制得的两相,用微型取样器取一定量的上、下相液,用考马斯亮蓝G250染色法测得上、下相BSA浓度,分配系数为上相BSA浓度与下相浓度之比,实验过程中可同时读取分相后上、下相的成相体积,由此可计算出下相BSA量与BSA总量之比值。

3.成相浓度对BSA 分配特性的影响

保持(NH4)2SO4 浓度140g/ L 不变，移取BSA 原液1mL，温度20 ℃，改变PEG 浓度由60g/ L 增至160g/ L（60g/ L、80g/ L、100g/ L、120g/ L、140g/ L、160g/ L）,加入1000mg/L的BSA充分振荡均匀，用3000r/ min 离心机离心5min。用微型取样器取一定量的上、下相液100μL，用考马斯亮蓝G250 染色法测得上、下相BSA 浓度，分配系数为上相BSA 浓度与下相浓度之比，实验过程中可同时读取分相后上、下相的成相体积，由此可计算出下相BSA 量与BSA 总量之比Lb 值。

保持PEG 浓度100g/ L 不变，移取BSA 原液1mL，温度20 ℃，改变(NH4)2SO4浓度由80g/ L 增至180g/ L（80g/ L、100g/ L、120g/ L、140g/ L、160g/ L、180g/ L）,加入1000mg/L的BSA充分振荡均匀，用3000r/ min 离心机离心5min。用微型取样器取一定量的上、下相液100μL，用考马斯亮蓝G250 染色法测得上、下相BSA 浓度，分配系数为上相BSA 浓度与下相浓度之比，实验过程中可同时读取分相后上、下相的成相体积，由此可计算出下相BSA 量与BSA 总量之比Lb 值。

4.外加盐NaCl 对BSA 分配特性的影响

实验中,采用PEG(100g/L)/(NH4)2SO4(120g/L)体系,分别向6支刻度离心试管中加入0，0.1，0.2，0.3，0.4，0.5g 固体NaCl,加入BSA原液1mL,试验外加盐浓度对BSA 在双水相体系中分配特性的影响。具体实验方法同上。

5. pH值对BSA在双水相体系中分配特性的影响

BSA 的等电点PI = 4.9，实验采用1mol/L的HCl和1mol/L的NaOH调节相溶液的pH值,使之分别处于等电点上、下,即使BSA 分别带正、负电荷,研究BSA在不同pH 值下的分配特性。具体实验方法同上。

**五．作业：**

1.记录实验数据

2．分析各个因素对BSA分离的影响（y=1.5781x+0.0461）

**实验三 液相层析分离蛋白质**

**一、实验目的**

1、通过本实验学会离子交换柱层析分离蛋白质的方法；

2、掌握层析柱装填方法。

二、**实验原理**

离于交换层析是以离子交换剂为固定相，利用适宜的溶剂作为流动相，根据荷电溶质与离子交换剂之间静电作用力的差别进行溶质分离的洗脱层析法。

蛋白质、多肽、核酸、聚核苷酸和其他带电生物分子可以通过离子交换树脂得到分离纯化。带负电荷的溶质可被阴离子交换剂交换；带正电荷的溶质可被阳离子交换剂交换。与一般溶液中的置换反应相似，离子交换树脂在水溶液中溶胀的过程中，位于树脂骨架上的功能基所带的可交换离子会发生解离。解离出的离子可在树脂网状结构较大的范围内自由迁移。如果这时溶液中存在着同种类型的其它离子，它也可能从溶液中扩散到树脂的网状结构内。当这两种离子的浓度差较大时，就会产生一种推动力使树脂与溶液主体之间发生等当量的离子交换。上述交换过程为可 逆过程，经过一段时间后离子交换就达到平衡，而在整个离子变换过程中树脂和溶液始终保持电性中和。通过这种可逆交换作用以及树脂骨架上功能基与不同离子间静电作用力的差异，可以达到对水溶液中带电溶质分离、置换、浓缩等目的。在蛋白质、酶等生物大分子物质的分离过程中，除了静电作用以外，蛋白质与树脂表面的疏水作用，树脂的空间作用、氢键以及蛋白质表面的电荷分布等电对离子变换层析具有很大的影响。因此离子变换层析过程中，蛋白质、核酸等生物大分子物质的保留行为是一个十分复杂的过程。

作为离于交换层析的固定相，离于交换树脂除了需具有较好的机械强度、化学和热稳定性、抗摩擦性能以及均匀规整的外形等条件以外，还应当具备稳定的功能基，较高的交换容量和较快的离子交换速度等特点。离子交换剂由不溶性骨架和结合在上面的离子交换基团(结台带相反电荷的化学物质)组成。常用的不溶性骨架有：树脂、纤维素、葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺、琼脂糖凝胶等。这些骨架在交换过程中不发生任何改变。常用的离子交换基有阴离子交换基有DEAE(二乙胺乙基)、QAE(季铵乙基)；阳离子交换剂为CM(羧甲基)、P(磷酸基)和SP(磺丙基)。

由于分配系数主要受pH和离于强度的影响，所以洗脱是通过改变pH及增加离子强度来实现的，通常可采用pH或离子强度梯度洗脱法。改变离子强度进行洗脱时一般采用流动相离子强度线性增大的线形梯度洗脱法或离子强度阶跃增大的逐次洗脱法。

用离子交换层析制备、纯化电荷量不同的生命物质时，不但被分离物的活性可以保存，而且分辨毕较高。蛋白质是两性分子，其带电性质随pH的变化而变化。在低于等电点(pI)的pH范围内蛋白质稳定，带正电荷，可与阳离子交换剂进行反应；在高于等电点的pH范围内蛋白质稳定，带负电荷，可与阴离子交换剂进行反应。本实验是以阴离子交换剂DEAE-Cellulose为固定相，0.01mol/L\_Tris-HCl缓冲液(pH 7.6)为流动相，待分离物系是以牛血清白蛋白(BSA)和溶菌酶(Lys)为双组分的模拟混合蛋自质。由于BSA的pI≈4.8，而Lys的pI≈11.0，那么在pH 7.6的环境条件下，BSA带负电荷，Lys带正电荷，所以，当它们流经阴离子交换层析柱时，BSA吸附在介质上，溶菌酶则不吸附，穿透流出而被先收集，层析柱再经pH 7.6，0.5mol/L的NaCl溶液恒定洗脱，即可将BSA洗脱下来进行收集，从而达到分离双组分混合蛋白质的目的。

**三、试剂和器材**

(1) 试剂：牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶、DEAE-Cellulose离子交换剂，氯化钠。

(2) 仪器：核酸蛋白检测仪、电子天平、色谱柱、pH计。

**四、操作步骤**

(1) 试剂的配制：①平衡/清洗缓冲液的配制：使用pH 7.6，0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液，其配制方法为：精确称取12.11g Tris，溶解于约900mL 蒸馏水中，用pH计监测溶液的pH，先用浓盐酸滴加，接近终点时换用0.1 mol/L 稀HCl调整至溶液pH 7.6，移入到容量瓶中，用蒸馏水定容至1000mL。然后稀释10倍即得到pH 7.6，0.01 mol/L Tris~HCl缓冲液。然后利用醋酸纤维膜过滤，低温保藏。

②料液：以pH 7.6，10 mg/mL BSA和溶菌酶混合溶液为待纯化样品。称取BSA和溶菌酶各1g。分别用上述平衡缓冲液溶解。容量瓶定容至1000mL，分别得到10 mg/mL BSA和溶菌酶溶液，4℃保存(最好是现用现配)。待上柱前取两种蛋白液各5m1棍匀，得到10m1混合蛋白料液上样（具体应依据柱床的大小定，一般为1/20床体积）。

③洗脱液：1 mol/L NaC Tris-HCl缓冲液(0.01 mol/L，pH 7.6)的配制：称取58.5 g的NaCl，用pH 7.6，0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液溶解，定容至1000 mL。然后利用醋酸纤维膜过滤，低温保藏。

(2)层析操作：

①预处理：新购置的DEAE-Cellulose阴离子交换树脂为固体颗粒，需用pH 7.6，0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液溶胀，即4℃过夜浸泡。

②装柱：将处理后的介质用G3玻璃漏斗抽滤，称取湿树脂8g置于50mL烧杯中，加入0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.6)，超声脱气15min，采用重力沉降法，用玻璃棒边搅匀边注入层析柱中，连接层析分离纯化系统。

③柱平衡：将平衡缓冲液置于超声波清洗仪中脱气20min，再作为流动相通过所装填充的层析柱，直到紫外(UV)检测器在280nm下示数为零，即基线平衡。

④进样：层析柱平衡后，将料液添加到层析柱固定相顶端，进样总体积为10mL。

⑤清洗：当料液没过层析柱固定相顶端，迅速切换到清洗缓冲液，维持相同的流速进行清洗，直至UV检测器在280 nm下示数为零。开始加清洗缓冲液时记录紫外(UV)检测器数值变化（出现蛋白峰），对应记录时间及流出液体积。

⑥洗脱：层析柱清洗后，持续280nm下示数为零，迅速切换到洗脱液进行盐洗脱，仍以lmL/min恒速进行。直到出现蛋白峰。记录各洗脱峰（以分离为目的时，收集洗脱峰）。

(3)实验分组：4-5位同学一组。

**五 作业：**1.记录实验数据，绘制洗脱曲线。

**《细胞工程》实验指导书**

实验1 **胡萝卜愈伤组织的培养**

**一、实验目的**

    胡萝卜是细胞和组织培养中常用的经典材料，是教学实验的良好材料。通过本实验，要求学生熟悉胡萝卜离体根培养的基本方法和步骤，掌握愈伤组织诱导的基本技能。

**二、实验原理**

植物细胞具有该植物体全部遗传的可能性，具有发育成一个完整植物体的潜在能力。

**三、实验仪器和试剂**

1.器具

超净工作台、灭菌锅、解剖刀、刮皮刀、长镊子、烧杯、培养皿、容量瓶、移液管、三角瓶等

2.试剂

**A、配制几种母液**

（1）配制100倍1L MS大量元素母液

NH4NO3  165g KH3PO4 17g

KNO3 190g   CaCl2·2H2O  44g

MgSO4·7H2O  37g

（2）配制MS微量元素母液

KI 0.083g Na2MoO4·2H2O 0.025g

H3BO3 0.62g CuSO4·5H2O  0.0025g

MnSO4·H2O  1.69g  CoCl2·6H2O  0.0025g

ZnSO4·7H2O 0.86g

（3）配制MS有机母液

一般配制成100倍1L MS有机母液。依次称取

肌醇    10.0g  盐酸硫胺素  0.01g

烟酸    0.05g   甘氨酸    0.20g

盐酸吡哆醇   0.05g

（4）配制MS铁盐母液

一般配制成100倍lL MS铁盐母液。依次称取

EDTA二钠 3.73g  FeSO4·7H2O   2.78g

**B．植物激素的配制**

0.1mg/mL 的6-苄基腺嘌呤(6-BA)溶液：取50mg的6-BA，用少量1N的盐酸溶解，再加蒸馏水定容至500mL。

0.1mg/mL萘乙酸(NAA)：取50mg的NAA可溶于热水中或用少量95%乙醇或少量1N的NOH溶解后，再加水定容至500mL。

**C．培养基的配制**

分别吸取母液各10mL及6-BA 和NAA 母液各20mL，混合后，再加蔗糖至终浓度3%，用NaOH调节pH至6.0；加入琼脂6g。最后加蒸馏水定容至于1L。然后用组织培养用封口膜封上，扎紧后灭菌 。

**D．培养基灭菌和分装**

将分装好的培养基放在高压灭菌锅中，加热，待压力上升到0.5kg/cm2时，排净冷空气，关闭放气阀继续加热使压力稳定在1.2kg/cm2，温度为121℃的条件下，维持15-20分钟。灭菌后的培养基冷却至65℃左右，分装，每100mL三角瓶装40mL，共装25瓶。

**E．消毒液的配制**

次氯酸纳消毒液：取30mL次氯酸纳溶液，用蒸馏水定容至100mL。现配现用。

75%的酒精：75mL的95%的酒精加水定容至95mL。

**四、实验步骤**

1. 选择无伤、无病、形状较规则的胡萝卜，用小刷子在流动的自来水下洗刷胡萝卜，除净表面所有的泥屑。可以根据实验的时期，选用其它的实验材料。

2. 将胡萝卜切成大约 40 mm厚的片段,放入100或500 ml的烧杯中，倒入消毒液，将植物材料覆盖、浸泡10-30 min。在灭菌过程中，在每个材料上做好标记，并对应地放在预接种的培养基边上。接种后在培养瓶上标明培养物名称和培养日期。

3. 在超净工作台上，倒掉消毒液，用无菌水冲洗3-5次，以便去除残留的消毒液。

4. 取消毒过的胡萝卜放入已灭菌的带有滤纸的培养皿中，用无菌解剖刀从两端各切去10毫米，再将留下的胡萝卜直根切成一系列一毫米厚的横切片。取其中的一片转到另一个已灭菌的带有吸水纸的培养皿中，再将每一片切成小块，使其每个小块上均包含木质部、形成层和韧皮部，外植体的大小要尽量一致。

5. 接种 取下培养瓶的塞子（或锡铂纸），用火灼烧瓶口2 cm处，手持培养瓶呈45º角，用消毒镊子把4-8块外植体转到琼脂培养基的表面，注意把靠近根尖的一面接触培养基。然后立即将烧过的封口棉塞或锡铂纸封住瓶口。每两次转移之间都要用酒精灯灼烧镊子，防止带菌。

6. 培养 接种好的外植体在25℃的培养箱中，黑暗条件下培养四周左右就会形成一块较大的愈伤组织。

实验2 植物原生质体融合

**一、实验目的**

了解植物原生质体制备及融合的基本原理及其过程。

**二、基本原理**

许多化学、物理学和生物学方法可诱导原生质体融合。现在被广泛采用并证明行之有效的融合方法是聚乙二烯（PEG）法、高Ca高pH法和电融合法。

PEG作为一种高分子化合物，20-50％的浓度能对原生质体产生瞬间冲击效应，原生质体很快发生收缩与粘连，随后用高Ca高pH法进行清洗，使原生质体融合得以完成。

PEG诱导融合的机理：PEG由于含有醚键而具负极性，与水、蛋白质和碳水化合物等一些正极化集团能形成氢键。当PEG分子足够长时，可作为邻近原生质表面之间的分子桥而使之粘连。PEG也能连接Ca2＋等阳离子。Ca2＋可在一些负极化基才和PEG之间形成桥，因而促进粘连。在洗涤过程中，连接在原生质体膜上的PEG分子可被洗脱，这样将引起电荷的紊乱和再分布，从而引起原生质体融合。高Ca高pH由于增加了质膜的流动性，因而也大大提高了融合频率。洗涤时的渗透压冲击对融合也可能起作用。

**三、实验仪器和试剂**

显微镜、离心机、天平、离心管、注射器、细滴管、200目滤网、200μl的移液器、载片、盖片等

纤维素酶 、果胶酶、甘露醇 、磷酸二氢钾、氯化钙、聚乙二醇（PEG）、蔗糖等

**四、实验步骤**

1.溶液的配制

（1）酶液

1％纤维素酶

1％果胶酶

0.7mol甘露醇

0.7m mol磷酸二氢钾

10m mol二水合氯化钙

pH6.8-7.0

（2）聚乙二醇（PEG）融合液

40% PEG (MW1500－6000)

0.3 mol 葡萄糖

3.5m mol 二水合氯化钙

0.7mol 磷酸二氢钾

(3) 13% CPW （cell protoplast wash ）洗液

27.2 mg/L 磷酸二氢钾

101.0 mg/L 硝酸钾

1480.0 mg/L 二水合氯化钙

246.0 mg/L 七水合硫酸镁

0.16mg/L 碘化钾

0.025mg/L 五水合硫酸铜

13% W/V甘露醇

pH 6.0

（4）20％蔗糖溶液

2.原生质体的分离

将撕去表皮的植物(小青菜)叶片置于酶液（去表皮面接触酶液），在25℃黑暗条件下，酶解1-2小时。用200目网过滤除去未完全消化的叶片等残渣。在1000rpm条件下离心5分钟，弃上清液。加入3-4ml 13%CPW洗液，相同条件下离心2分钟，弃上清，留1ml洗液。用滴管将混有原生质体的1ml洗液吸出，轻轻铺于20％蔗糖溶液上（5ml离心管装3ml20％蔗糖溶液），在1000rpm条件下离心5-10分钟，由于密度梯度离心的作用，生活力强状态好的原生质体悬浮在20％蔗糖溶液与13％CPW溶液之间，破碎的细胞残渣沉于管底。

用200μl的移液器轻轻将状态好的原生质体吸出（注意尽可能不要吸入下层的蔗糖溶液），放入另一干净的离心管中，加入4ml 13％CPW洗液，1000rpm离心2分钟，弃上清，用血球计数板调整原生质体密度为105－106之间。

3. 原生质体融合

将1-2滴原生质体混和物（密度为105－106之间）滴入小培养皿（或载玻片上），静置8-10分钟，相对方向加入2滴40％的PEG溶液，静置10分钟，依次间隔5分钟加入0.5ml、1ml和2ml含13％甘露醇的CPW洗液洗涤，注意在第二、第三次洗液加入前，用移液器轻轻吸走部分溶液，但不能洗干，否则原生质体破碎死亡。

4. 显微镜下观察原生质体融合

两种原生质体加入PEG融合液后，只发生粘连，在洗涤过程中才发生膜融合，核融合通常于融合体第一次有一次分裂过程中发生。

# 《生物技术制药》

# 实验指导书

**一、学时学分**

总学时：32 学分：2 实验学时：8

**二、实验目的**

本课程实验的目的是使学生掌握生物技术制药中的基因工程制药、抗体制药、细胞工程制药、酶工程制药、微生物工程制药的基本原理、主要方法和技术，从而使学生能够将理性知识与感性认识有机地结合起来，在实验中更深地理解基础理论，提高学生的综合能力与创新意识以及分析问题和解决问题的能力。同时通过实验，培养学生观察、思考、分析问题和解决问题的能力，实事求是，严肃认真的科学态度，以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

**三、实验基本原理**

纯培养技术、无菌操作技术、分子生物学基本原理及技术、免疫学原理及技术、细胞工程原理及技术、蛋白质工程原理。

**四、实验基本要求**

在实验内容的安排上，注意使学生加深对生物制药工艺基本理论的理解。实验的难易程度适中，严谨全面。根据实验指导书完成课内实验任务，客观认真填写实验数据并进行结果分析、每次实验及时上交实验报告。

**五、考核与报告**

实验考核成绩以平时实验预习报告、实验态度、实验操作及实验处理几部分组成，占该门课程成绩15％，实验报告按实验指导书提供的统一格式进行书写。

**六、主要仪器设备**

CO2培养箱、20W紫外灯、红灯、血球记数板、搅拌器、高速冷冻离心机、冷冻干燥箱、真空干燥箱、高压灭菌装置、超净工作台、倒置显微镜、冰箱、液氮罐、精密天平、微量加样器、烤箱、细菌过滤器、10L气升式发酵罐、摇床、显微镜（带油镜）、紫外及可见光分光光度计、电泳仪、pH计等。

**七、实验项目与内容提要**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 实 验  名 称 | 内 容  提 要 | 每组人数 | 实验时数 | 实验要求 | 实验类别 | 备注 |
| 01 | 甲甲壳质、壳聚糖的制备 | 采用虾壳做原料，制备甲壳质和壳聚糖 | 3 | 4 | 选开 | 验证 |  |
| 02 | 液体深层发酵生产抗生素 | 学习微生物制药的液体深层发酵技术，掌握抗生素效价的检测及发酵产物的鉴定 | 3 | 4 | 选开 | 综合 |  |
| 03 | 抗生素的分离和鉴定（薄层层析法） | 采用薄层层析法分离各种抗生素（如链霉素、卡那霉素等），以枯草芽孢杆菌作为生物显影菌株确定斑点位置，求得Rf值，进行鉴定。 | 3 | 4 | 必开 | 综合 |  |
| 04 | 植物细胞/组织培养与细胞活性鉴定 | 采用无菌操作的方法，培养植物愈伤组织（MS培养基），和采用液体悬浮培养的方法培养植物悬浮细胞，掌握鉴定细胞死活的方法。 | 3 | 4 | 选开 | 验证 |  |

**八、适用专业**

生物技术

**九、实验地点**

生物与食品工程学院实验室

**实验一 甲壳质、壳聚糖的制备**

**【实验目的】**

了解制备甲壳质、壳聚糖的工艺流程；

掌握甲壳质的提取、制备原理及壳聚糖的检测方法。

**【实验原理】**

甲壳质存在于甲壳类动物(如虾、蟹)的外壳，昆虫表皮，软体动物(如贝类、乌贼)的器官、菌类(如菇类、霉菌)的细胞壁。自然界每年合成量高达100亿吨，仅次于植物纤维素。甲壳质是1823年法国科学家Odier首次从蟹壳中提取出来的，由于甲壳质的性质非常稳定，溶解性很差，限制了它的应用。经一个多世纪世界各地科学家对它在结构上进行改良、修饰，并开发应用研究，它的衍生物壳聚糖在工业、农业、畜产、渔业、食品、化妆品及医药行业上得到广泛应用，尤其是近十多年来，壳聚糖的动物试验及临床观察得到科学家们的肯定，誉为人类第六生活要素(蛋白质、脂肪、维生素、矿物质和壳聚糖)。是一种功能性食品。

从虾壳提取甲壳质，工艺主要是将虾壳的成份分离，虾壳中含有无机盐(主要为碳酸钙)蛋白质和甲壳质。利用碳酸钙能溶于盐酸的机理，将其离析。蛋白质在碱性条件下能被水解生成短肽及氨基酸，它们能溶于水，与甲壳质分离。本实验首先采用盐酸浸泡虾壳除去钙质，接着利用氢氧化钠煮沸除去蛋白，之后水洗；用高锰酸钾与硝酸氧化脱色干燥得白色制品为甲壳质。

甲壳质在碱性条件下脱去乙酰基，生成聚胺糖。工业上很难100％脱去乙酰基，所以工业制得的实际上是甲壳质和聚葡胺糖两个结构单元的结合，称为壳聚糖。壳聚糖结构中有胺基(－NH2)，具碱性，因此，它能溶于很多酸，如硫酸、盐酸、胃酸等，可以用游离氨基含量的来检测乙酰基的脱去程度。

**【仪器、材料与试剂】**

**1实验材料与试剂**

虾壳；

3％~4%的氢氧化钠；50％的氢氧化钠；5％~6%的盐酸；5%的高锰酸钾；1%的硝酸；1mol/L的盐酸；0.1mol/L的氢氧化钠；溴酚兰指示剂。

**2仪器设备**

烧杯1000mL；三角瓶500mL；三角瓶100mL；大试管夹；水浴锅；烘箱；碱式滴定管；铁架台；磁力搅拌器；电炉等。

**【实验步骤】**

1虾壳处理：将虾壳洗净，粉碎，称重。

2甲壳质制备：

用5％~6%的盐酸于室温（20℃）浸泡虾壳24小时，不断搅拌。盐酸体积（ml）与虾克重量（g）比为10（V/W=10）；

取沉淀水洗3次后加入3％~4%的氢氧化钠（V/W=10）煮沸1~2小时，取沉淀水洗；

加0.5%的高锰酸钾搅拌反应约1小时，沉淀水洗;

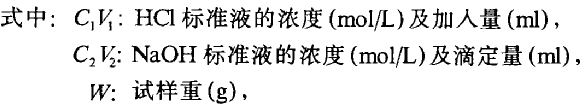
再加入1%的硝酸于60℃~70℃反应30~40分钟，产物水洗、干燥、称重。

3壳聚糖的制备：

于烧瓶中加入上述甲壳质10克再加入90-100ml的浓度为10％的NaOH，沸水浴反应30-40分钟后，停止反应干燥称重。

4 游离氨基含量的测定：

方法1：精确称取壳聚糖0.30克，置于20ml的锥瓶中，移取30ml0.1mol/L的盐酸溶液，室温下溶解（若粘度太大可加少许蒸馏水）。加入2滴溴酚兰指示剂，以0.1mol/L的氢氧化钠溶液滴定至紫色，平行滴定三份，按下式计算游离氨基含量：



方法2：采用分光光度法检测壳聚糖的含量，检测壳聚糖的含量/纯度**（选做）**。

**【结果与分析】**

计算甲壳质的提取率和游离氨基含量并分析与理论值之间的差异。

**【思考题】**

甲壳质的提取过程中用了哪些试剂，各起到了什么作用？

**实验二 液体发酵法生产链霉素（选做）**

**【实验目的】**

1. 学习液体发酵的方法；
2. 学习链霉素的发酵方法及抗生素的检测和鉴定方法。

**【实验原理】**

瓦克斯曼（Selman A. Waksman）于1943年分离到一株灰色链霉菌（Streptomyces griseus），能产生对革蓝氏阳性细菌和蓝氏阴性细菌都有抗菌作用的一种新的抗生素－链霉素。链霉素和其它抗生素一样氏微生物的次级代谢产物。链霉素属于氨基糖苷类抗生素。

灰色链霉菌在下述条件下产生链霉素。对细胞足够的供氧；存在低浓度无机磷酸盐；足够的葡萄糖和足够高浓度的含氮物质。

在发酵培养基上，链霉素的发酵分3个阶段：生长阶段，菌丝形成，需氧量极大，在两天内形成链霉素不多；成熟阶段，菌丝及重量保持稳定，葡萄糖及其他碳源在培养基中消失，形成链霉素；老化阶段，有许多链霉素形成，然后链霉素产生停止，浓度下降，pH上升，菌丝自溶，需氧量减少，此时停止发酵。

在中性溶液中，链霉素成为3价阳离子故可用阳离子交换树脂吸附，然后进行洗脱和收集。二次洗脱液要通过高交联度的氢型树脂，以除去阳离子、无机杂质和小分子的有机杂质。精制液用硫酸或氢氧化钡调至pH4.5～5.0，再加入适量的活性碳，常温下脱色，可得到链霉素精制液。

纸层析是鉴别抗生素的方法之一，常用8个溶剂系统进行纸层析，层析后进行生物显色并绘制层析图谱，根据层析图谱对未知抗生素进行鉴定。本实验采用其中一个溶剂系统，并用标准链霉素溶液作为对照对发酵液进行鉴定。

**【仪器、材料与试剂】**

1. 仪器
   1. 5L发酵罐
   2. 恒温摇床
   3. 冷冻离心机
   4. 高压灭菌锅等
2. 材料
   1. 灰色链霉菌Streptomyces griseus AS 4.1095（链霉素产生菌，中国菌种保藏中心）
   2. 大肠杆菌E.coli K12S（用于生物显色）
   3. 金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus,用于生物显色）
   4. 豌豆
   5. 正丁醇
   6. 三角瓶（50Ml）
   7. 新华3号滤纸
   8. 层析缸（30cm×10cm）
   9. 搪瓷盘（25cm×15cm×5cm）
   10. 毛细管
   11. 培养皿
3. 试剂
   1. 牛肉膏蛋白胨固体培养基：牛肉膏3g，蛋白胨10g，NaCl 5g，琼脂20g，水1000mL，pH7.4～7.6，121℃高压蒸汽灭菌30min
   2. 豌豆培养基：葡萄糖10g，蛋白胨5g，豌豆提取液1L（以NH2计，100mL含12～14mg），pH7.0～7.2。高压蒸汽灭菌（105℃，30min）
   3. 查氏培养基
   4. 链霉素标准溶液（10mg/mL）：将链霉素溶于去离子水中，无菌滤膜过滤后备用
   5. 展层溶剂系统：水饱和的正丁醇

**【实验步骤】**

1. 斜面孢子的制备

用接种环挑取冰箱中保藏的菌种接种于豌豆培养基斜面培养基上，于27℃恒温培养箱中培养6～7d，即可得到斜面孢子。

1. 母瓶培养液的制备

用接种环挑取斜面培养基表面上的孢子接种于灭菌的含有50mL豌豆培养基的三角瓶中，于27℃摇瓶200r/min培养72h即成母瓶培养液。

1. 种子培养液的制备

无菌操作取2mL母瓶培养液接种于含有100mL豌豆培养基的三角瓶中，于27℃恒温摇床200r/min培养3～4d。

1. 发酵培养
   1. 三角瓶发酵培养：

取4mL种子培养液接种于含有200mL豌豆培养基的500mL大三角瓶中，于28℃恒温摇床200r/min培养12～15d进行链霉素发酵。

* 1. 发酵罐发酵培养：

在5L发酵罐中装入3L豌豆培养基，灭菌后接入60mL种子培养液，在控制条件下进行链霉素发酵。

1. 发酵液预处理

发酵结束后，将发酵液在低温条件下12000r/min离心，上清即为含有链霉素的样品，如果不进行链霉素的分离纯化，可直接对发酵液进行抗生素抑菌实验和纸层析生物显色分析鉴定。

1. 发酵液抑菌实验

在牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上均匀涂布大肠杆菌或金黄色葡萄球菌，待其表面干燥后将小钢管垂直置于平板表面，取发酵液0.1mL注入小钢管中，于37℃恒温培养24h后观察结果。

1. 链霉素的纸层析鉴定
   1. 点样：在距新华滤纸（25cm×19cm）底端2.5cm处划一道横线，用毛细管将发酵清液和标准链霉素溶液（10mg/mL）点在滤纸的横线上。每个样品之间距离2cm。
   2. 层析：将点好样的滤纸做成圆筒状，置于含有展层溶剂系统的层析缸中，于20～25℃上行扩展20～25cm后取出，挥发除净溶剂。
   3. 显影（生物显影法）：将滤纸贴在接种有大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的琼脂平板上，置冰箱中(10℃，4h)，使滤纸上的抗生素渗透到平板上，然后于30～35℃培养16～20h，根据平板上样品抑菌区的位置判断抗生素的类型。

**【结果与分析】**

观察链霉素发酵液对细菌的抑制作用及链霉素纸层析生物显色图谱。

发酵液离心上清抑菌结果，可观察到明显的抑菌圈，说明发酵液中含有抗菌物质。发酵液和标准链霉素纸层析后经生物显色结果，可观察到抑菌圈的位置在相同的位置，初步说明发酵液中的抗菌物质为链霉素。

**【实验安排】**

第一天：配制试剂、灭菌，接种斜面孢子

（斜面孢子的制备、母瓶培养液的制备、种子培养液的制备、发酵培养液的接种：在教师指导下由学生利用课余时间完成。全过程大约需要26～28d）。

第二天：发酵液预处理、发酵液抑菌实验（24h后观察记录结果）和链霉素的纸层析及观察记录结果。

**实验三 抗生素的分离和鉴别（薄层层析法）**

**【实验目的】**

掌握薄层层析法分离抗生素的原理与方法；

了解生物显影法在抗生素鉴定中的应用。

**【实验原理】**

薄层层析是一种微量而快速的层析方法。把吸附剂或支持剂均匀的涂布于玻璃板（或涤纶片基）上成一薄层，把要分析的样品加到薄层上，然后用合适的展层剂进行展开而达到分离、鉴定和定量的目的。

为了使要分析的样品中的各组分得到分离，必须选择合适的吸附剂。硅胶、氧化铝和聚酰胺由于它们的吸附性能良好，是应用最广泛的吸附剂，硅藻土和纤维素则是分配层析中最常用的支持剂。在吸附剂或支持剂中添加合适的粘合剂后再涂布，可使薄层粘牢在玻璃板上。

在吸附层析中，虽用相同的吸附剂和溶剂系统，但不同性质的抗生素由于其吸附能力的差异，比移植（Rf）也不同。因此，即使是性质极为接近的同组抗生素的各个组分，在合适的溶剂系统中展开，也能达到分离的目的。

通过薄层色谱分离后的化合物经生物显迹确定斑点的位置后，可求得其Rf值，将该Rf与同一薄层上标准品的Rf作比较就可初步鉴别样品中的抗生素。

**【实验用品】**

1. 器材
   1. 硅胶GF254
   2. 玻璃板（100mm×200mm）
   3. 层析缸（20个）
   4. 测度盘（19.5cm×34cm的玻璃板筐）
   5. 微量注射器、滤纸、玻璃等
   6. 烘箱（2台）、培养箱（2台）、灭菌锅（1台）、超净工作台（1台）
2. 试剂配制
   1. 展层溶剂系统：正丁醇：乙酸：水（3：1：1）
   2. 生物显影用培养基：蛋白胨6g，酵母膏3g，牛肉膏1.5g，琼脂20g，水1000mL，pH6.5（灭菌后）。

生物显影时，测度盘内培养基分上下两层，上层培养基须另加0.5%的葡萄糖。

* 1. 生物显影用枯草杆菌芽孢悬浮液 将枯草杆菌（Bacillus subtilis 1 ATTC 6633）接种在肉汤琼脂大斜面培养基上（2支），37℃培养7d。用0.85％生理盐水将枯草杆菌芽孢洗下，再用灭菌玻璃珠将芽孢分散，用0.85％生理盐水稀释成12×108/mL芽孢悬液。将此悬液于65℃水液中保温30min，冷却后保存于冰箱内，可使用一个月。使用前，最好先作抑菌试验，以确定每100mL上层培养基需加入芽孢悬液的量。

1. 材料

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*TATTC 6633)；链霉素、卡那霉素等抗生素纯品及粗制抗生素样品若干种（链霉素或卡那霉素粗制品）。

**【实验步骤】**

1. 薄层的制备

制薄层用的玻板预先用洗液洗净并烘干，玻板表面要求光滑。将硅胶GF254和双蒸水（硅胶：双蒸水＝10：25）于烧杯中搅拌均匀后用玻棒迅速涂布铺平，轻轻振动玻板，使其分布均匀，铺成厚度0.25mm的薄层板，在空气中凉干（或在60℃烘箱中烘干）后移至110℃烘箱中活化1h，取出置干燥器中备用。

1. 点样

距薄板一端2cm处每隔2cm作一记号(用铅笔轻轻点一下，切不可将薄层刺破)，用50uL微量注射器取抗生素纯品或粗制品（分别溶于少量的甲醇中，浓度为0.5mg/mL）溶液在记号处点样，点样量为20uL。注意控制样点扩散直径不超过3mm。

1. 展开

将薄板点样一端放入盛有展开剂的层析缸中（注意样点不可直接与展开剂相接触），展层至溶剂前沿距顶端1～2cm处时取出薄板，在溶剂前沿处作记号。空气中凉干，除尽溶剂。

1. 生物显影

往测定盘内倒入生物测定培养基150mL，放平。待凝固后再倒入60mL带枯草杆菌的上层培养基，完全凝固后，将层析过的层析板（点样的一面）直接贴在琼脂表面，放置15min，取下层析板，将盘置于37℃恒温培养箱中培养，约16h后取出观察实验结果。

1. 结果处理

用笔描下抑制圈所在的位置和形状，计算各抗生素样品的Rf值。

**【思考题】**

1. 薄层色谱的Rf值是鉴别化合物的主要参数，请指出再薄层色谱过程中影响化合物Rf值的主要因素有哪些？
2. 假设某试样的Rf值与标准品相同，请问能否据此确定该试样与标准抗生素同质？

**实验四 植物细胞/组织培养（略）与细胞活性的鉴定**

**一、目的**

练习以碱性染料中性红和荧光染料（FDA，FM 4-64）进行活体染色的方法。通过活体染色及质壁分离，进行细胞死活的鉴定。

**二、原理**

用某种对植物无害的染料稀溶液对活细胞进行染色称活体染色。中性红是常用的活体染料之一。在中性或微碱性环境下，植物的活细胞能大量吸收中性红并向液泡排泄，液泡一般呈酸性，进入液泡的中性红解离出大量阳离子而呈樱桃红色, 原生质及壁不染色。死细胞的液泡已消失因而不产生液泡着色现象，中性红阳离子却与带一定负电荷的原生质及细胞核结合而使原生质及细胞核染色。

细胞的荧光染色是目前细胞生物学常用的方法，FDA与FM4-64在酯酶的作用下水解释放出荧光素，从而发出荧光。活细胞细胞膜酯酶活性较高，能水解FDA释放荧光素，从而显示出荧光；而死细胞的酯酶丧失活性，不能水解FDA，不能显示出荧光。FM4-64在荧光显微镜下红色，经酯酶水解后，显示无色。因而，活细胞红色消失或较暗，死细胞红色较强，以区分细胞的死活。

成长的细胞是一个渗透系统，活的原生质具有选择透性，原生质内部包含着一个大液泡，具有一定的溶质势。当细胞与外界低水势溶液接触时，细胞内的水分外渗，原生质随着液泡一起收缩而发生质壁分离；其后，当与清水（或高水势溶液）接触，细胞又因液泡的吸水膨胀而发生质壁分离复原。死细胞因其原生质的选择透性已遭破坏，故与低水势溶液接触时不产生质壁分离。

三**、材料、仪器设备及试剂**

**1. 材料：**洋葱鳞茎；大麦种子。

**2. 仪器设备：**刀片；镊子；吸水纸；酒精灯；载玻片；盖玻片；胶头滴管；显微镜；荧光显微镜或荧光灯。

**3. 试剂：**0.8mol/L 蔗糖液；0.03％中性红溶液；荧光素二乙酸酯（fluorescein diacetate，FDA）；

N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-[4-(diethylamino) phenyl] hexatrienyl) pyridinium dibromide (缩写FM 4-64)

**四、实验步骤**

1. 制片染色

用尖头镊子撕取洋葱（玉葱）鳞片内表皮薄片，浸到0.03％中性红溶液或FDA溶液中10～15min 进行染色。

2. 观察

2.1 将染色后的植物材料放到载玻片上，盖好盖玻片，在盖玻片的一侧滴加无离子水（或pH 略高于7.0 的自来水），另一侧放吸水纸吸干，以洗净撕片外粘附的中性红溶液或FDA/FM4-64溶液，然后在显微镜下观察，可以看出液泡染成樱桃红色或发出荧光；原生质层（细胞质和细胞）则无色透明紧贴细胞壁（在细胞的角隅上可以看见）。

2.2 在第1 项观察后，接着从盖玻片的一边滴2 滴0.8mol/L蔗糖液, 在盖玻片的另一边用吸水纸吸盖玻片下的水，将蔗糖液引入盖玻片下浸渍植物材料，并立即镜检，可以看到细胞很快发生质壁分离。先是凹形质壁分离，而后变为凸形质壁分离。

2.3 在第2 项观察后，接着在盖玻片的一边加入2～3 滴无离子水，在另一边用吸水纸吸去糖液，将无离子水引入盖玻片底，立即镜检可以看到带有液泡的原生质体重新吸水膨大，最后充满整个细胞腔，即质壁分离复原（复原缓慢进行时，细胞仍可正常存活；如果进行很快，则会因原生质机械破坏而死亡）。

2.4 将一片经中性红染色的植物材料放在载玻片上，加一滴无离子水后加盖玻片，在酒精灯火焰上微微加热，然后在显微镜下观察，可以看到细胞质凝结成不均匀的凝胶状，与细胞核一起染成红色。然后按(2.2)法加0.8 mol/L蔗糖液也不发生质壁分离。

# 《营养化学》实验指导书

**实验1-1豆类淀粉或薯类淀粉的老化 ——粉皮的制备与质量感官评价**

**一、引言**

淀粉加入适量水，加热搅拌糊化成淀粉糊（α-淀粉），冷却或冷冻后，会变得不透明甚至凝结而沉淀，这种现象称为淀粉的老化。将淀粉拌水制成糊状物平铺于盘中，然后在沸水中煮沸片刻，令其糊化，捞出水冷（老化），干燥即得粉皮。粉皮的生产就是利用淀粉老化这一特性。至今，对粉皮的物性测定暂无标准方法，也尚无统一的质量标准，一般是采用感官的方法评价粉丝外观，诸如颜色、气味、光泽、透明度、韧性、折碎度等。消费者要求粉皮晶莹洁白、透明光亮、口感爽滑，价格低廉。

**二、实验材料和仪器**

绿豆淀粉、甘薯淀粉、水浴锅/电磁炉、铁盘、保鲜膜等。

**三、实验步骤**

（一）粉丝的制备

将10g绿豆淀粉或薯类淀粉加入适量开水使用其糊化，然后再加剩余生绿豆淀粉或薯类淀粉（配制30%、40%、50%、的淀粉溶液）在33-42度水温下搅拌均匀至无块不沾手的淀粉糊，将淀粉糊状物平铺于白瓷盘中，将白瓷盘蒸煮1-3分钟，使其糊化（由白色变成灰白色半透明时），捞出水冷10分钟（或捞出置于-20℃冰箱中冷冻处理）。再拿出置于盘中，于烘箱中干燥，即得粉皮。

（二）粉皮质量感官评价

将实验制得的粉皮，用加权平均法对3个产品进行感官质量评价，填于表6-1中，计算排列名次。

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 项目  得分  样品 | 颜色  10分 | 气味  10分 | 光泽  10分 | 透明度  20分 | 韧性  20分 | 不易折碎  20分 | 评价  100分 |
| 20% |  |  |  |  |  |  |  |
| 30% |  |  |  |  |  |  |  |
| 40% |  |  |  |  |  |  |  |
| 50% |  |  |  |  |  |  |  |
| 60% |  |  |  |  |  |  |  |

**四、思考题：**

（1）通过本实验，你认为可以采取哪些措施提高粉皮的质量？

（2）通过本实验，再结合食品化学的知识，请谈谈淀粉的老化机理，以及在制备粉皮的过程中该如何充分利用其老化的特性？

**实验1-2 蛋白质的盐析和透析**

**一、引言**

在蛋白质溶液中加入一定浓度的中性盐，蛋白质即从溶液中沉淀析出，这种作用称为盐析。盐析法常用的盐类有硫酸铵、硫酸钠等。

蛋白质用盐析法沉淀分离后，需脱盐才能获得纯品，脱盐最常用的方法为透析法。蛋白质在溶液中因其胶体质点直径较大，不能透过半透膜，而无机盐及其它低分子物质可以透过，故利用透析法可以把经盐析法所得的蛋白质提纯，即把蛋白质溶液装入透析袋内，将袋口用线扎紧，然后把它放进蒸馏水或缓冲液中，蛋白质分子量大，不能透过透析袋而被保留在袋内，通过不断更换袋外蒸馏水或缓冲液，直至袋内盐分透析完为止。透析常需较长时间，宜在低温下进行。

**二、实验材料和试剂**

10%鸡蛋白溶液：选新鲜鸡蛋轻轻在蛋壳上击破一小洞，让蛋清从小孔流出，然后按一份鸡蛋清，加9份0.9%氯化钠溶液的比例稀释。

含鸡蛋清的氯化钠蛋白溶液：取鸡蛋一个除去蛋黄取蛋白，加320ml蒸馏水和100ml饱和氯化钠溶液，通过数层纱布过滤，取滤液。

饱和硫酸铵溶液，硫酸铵晶体，1%硝酸银溶液，1%硫酸铜溶液，10%氢氧化钠溶液

**三、实验步骤**

（一）蛋白质盐析

取10%鸡蛋白溶液5ml于试管中，加入等量饱和硫酸铵溶液，微微摇动试管，使溶液混合后静置数分钟，蛋白即析出，如无沉淀可再加少许饱和硫酸铵溶液，观察蛋白质的析出。

取少量沉淀混合物，加水稀释，观察沉淀是否会再溶解，另取剩余的混合物，加入过量的硫酸铵粉末，使其成为硫酸铵的饱和溶液，观察沉淀的产生。

（二）蛋白质的透析

注入含鸡蛋清的氯化钠蛋白溶液5ml于透析袋中，将袋的开口端用线扎紧，然后悬挂在盛有蒸馏水的烧杯中，使其开口端位于水面之上。经过10分钟后，自烧杯中取出1ml溶液于试管中，加1%硝酸银溶液一滴，如有白色氯化银沉淀生成，即证明蒸馏水中有Cl-存在。再自烧杯中取出1ml溶液于另一试管中，加入1ml 10%的氢氧化钠溶液，然后滴加1-2滴1%的硫酸铜溶液进行双缩脲反应，观察有无蓝紫色出现。

每隔20分钟更换蒸馏水一次，经过数小时，则可观察到火棉胶袋内出现轻微混浊，此即为蛋白质沉淀。继续透析至蒸馏水中不再生成氯化银沉淀为止。

实验报告记录透析完毕所需的时间。

**实验2-1 脂肪氧化、过氧化值及酸价的测定（滴定法）**

**一、原理**

脂肪氧化的初级产物是氢过氧化物ROOH，因此通过测定脂肪中氢过氧化物的量，可以评价脂肪的氧化程度。同时脂肪氧化的初级产物ROOH可进一步分解，产生小分子的醛、酮、酸等，因此酸价也是评价脂肪变质程度的一个重要指标。本实验通过油脂在不同条件下贮藏，并定期测定其过氧化值和酸价，了解影响油脂氧化的主要因素。与空白和添加抗氧化剂的油样品进行比较，观察抗氧化剂的性能。

实验中过氧化值的测定采用碘量法，即在酸性条件下，脂肪中的过氧化值与过量的KI反应生成I2，用Na2S2O3滴定生成的I2，求出每千克油中所含过氧化物的毫摩尔数，称为脂肪的过氧化值（POV）。

酸价的测定是利用酸碱中和反应，测出脂肪中游离酸的含量。油脂的酸价以中和1克脂肪中游离酸所需消耗的氢氧化钾的毫克数表示。

**二、材料、仪器与试剂**

（一）材料：油脂。

（二）仪器：小广口瓶（40ml）6个，应保证规格一致，并干燥。恒温箱（控温60℃）。

（三）试剂：

1．丁基羟基甲苯（BHT）。

2．0.01mol/L Na2S2O3：用标定的0.1mol/L Na2S2O3稀释而成。

3．氯仿一冰乙酸混合液：取氯仿40ml加冰乙酸60ml，混匀。

4．饱和碘化钾溶液：取碘化钾10g，加水5ml，贮于棕色瓶中，如发现溶液变黄，应重新配制。

5．0.5%淀粉指示剂：500mg淀粉加少量冷水调匀，再加一定量沸水（最后体积约为100ml）。

6．0.1mol/L氢氧化钾（或氢氧化钠）标准溶液。

7．中性乙醚—95%乙醇（2：1）混合溶剂：临用前用0.1mol/L碱液滴定至中性。

8．1%酚酞乙醇溶液。

**三、操作步骤**

（一）油脂的氧化：在干燥的小烧杯中，将120g油分为二等分，向其中一份中加入0.012g BHT，两份油脂作同样程度的搅拌至加入的BHT完全溶解。向三个广口瓶中各装入20g未添加BHT的油脂，另三个中各装入20g已添加BHT的油脂，按下表所列编号存放，一星期后测定过氧化值和酸价。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 室温光照 | 1 | 未添加BHT的油脂 |
| 2 | 添加BHT的油脂 |
| 室温避光 | 3 | 未添加BHT的油脂 |
| 4 | 添加BHT的油脂 |
| 60℃ | 5 | 未添加BHT的油脂 |
| 6 | 添加BHT的油脂 |

（二）过氧化值的测定：称取2g（准至0.01g）油脂置于干燥的250ml碘量瓶底部，加入20ml氯仿一冰乙酸混合液，轻轻摇动使油溶解，加入1ml饱和碘化钾溶液，摇匀，加塞，置暗处放置5min。取出立即加水50ml，充分摇匀，用0.01mol/L Na2S2O3滴定至水层呈淡黄，加入1ml淀粉指示剂，继续滴定至蓝色消失，记下体积V。

（三）酸价的测定：称取油脂4g（准确至0.01g）于250ml的锥形瓶中，加入中性乙醚—乙醇混合液50ml，小心旋转摇动烧瓶使试样溶解，加三滴酚酞指示剂，用0.1mol/L碱液滴定至出现微红色在30s不消失，记下消耗碱液毫升数（V）。

**四、计算**

（一）过氧化值（POV）

           N×V×1000

POV=——————（mmol/kg油）

W

  式中：N——Na2S2O3溶液摩尔浓度（mol/L）

V——消耗Na2S2O3溶液体积（ml）

W——称取油脂重量（g）

  （二）酸价

N×V×56.1

酸价（mg KOH/g 油）= ————————

                                 W

  式中：N——氢氧化钾的摩尔浓度

V——消耗氢氧化钾溶液的体积（ml）

56.1——氢氧化钾的毫摩尔

W——称取油脂重量（g）

**五、注意事项**

（一）本实验需在两个单元时间进行，第一次做操作步骤之一，并熟悉过氧化值、酸价测定方法，测定实验油脂的起始过氧化值和酸价。

（二）气温低时，第二次的实验可在油脂贮放两星期后进行。

（三）滴定过氧化值时，应充分摇匀溶液，以保证I2被萃取至水相中。

**实验2-2 维生素C含量的测定 (2,6-二氯酚靛酚法)**

**一、原理**

抗坏血酸分子中存在烯醇式结构（—C═C—），因而具有很强的还原性，氧化失去两个

OHOH

氢原子而转变成脱氢抗坏血酸。其余2,6—二氯酚靛酚钠盐（C12H6O2NCl2Na）染料氧化抗坏血酸而其本身被还原为无色的衍生物，可作为维生素C含量测定的滴定剂和指示剂。

在酸性溶液中氧化型2,6—二氯酚靛酚呈红色，在中性或碱性溶液中呈蓝色。因此，当用2,6—二氯酚靛酚滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时，在抗坏血酸尚未全部被氧化时，滴下的2,6—二氯酚靛酚立即被还原为无色，抗坏血酸全部被氧化时，则滴下的2,6—二氯酚靛酚溶液呈红色。所以，在测定过程中当溶液从无色转变成微红色时，表示抗坏血酸全部被氧化，此时即为滴定终点。根据滴定消耗染料标准溶液的体积，可以计算出被测定样品中抗坏血酸的含量。

**二、材料、仪器与试剂**

（一）材料：水果苹果或市售果汁饮料。

（二）仪器：三角瓶（50ml）、研钵、移液管（10ml）、漏斗、滤纸、

容量瓶（100ml）、微量滴定管（5ml）、分析天平、离心机。

（三）试剂

1．标准抗坏血酸溶液：精确称取抗坏血酸100mg，用适量2%草酸溶液溶解后移入500ml容量瓶中，并以2%草酸溶液定容，振摇混匀，1ml含0.2mg抗坏血酸。

2．0.02% 2,6—二氯酚靛酚溶液：称取2,6—二氯酚靛酚钠盐50mg溶于200ml含52mg碳酸氢钠热水中。冷后加水稀释至250ml，过滤后装入棕色瓶于冰箱中保存，临用前按下法标定：取5ml标准抗坏血酸溶液于三角瓶中，加5ml 2%草酸，用2,6—二氯酚靛酚溶液滴定至微红色，15s，不褪色即为终点，并计算出每1ml染料溶液相当的抗坏血酸毫克数。

**三、操作步骤**

（一）称取捣碎的水果样品20g，放在研钵中，加2%草酸溶液少许研碎，再转入200ml容量瓶中，加2%草酸稀释至刻度，过滤备用。如果滤液有颜色，可用白陶土脱色。

（二）吸取样品滤液10ml于烧杯中，用已标定的2,6—二氯酚靛酚溶液滴定至出现微红色，且15s不褪色为止，记下染料用量。同时，以10ml2%草酸溶液作为空白按同上方法进行滴定，作三个重复。

**四、计算**

（Y-Y1）×A b

W=———————×—×100(mg/100g)

B a

式中：W——100g样品中含有的抗坏血酸毫克数

Y1——空白滴定消耗的染料毫升数

Y——样品滴定消耗的染料毫升数

A——1ml染料溶液相当于抗坏血酸的毫克数

B——滴定时吸取的样品溶液毫升数（10ml）

b——样品定容毫升数

a——样品的克数

**五、注意事项**

a)        标准抗血酸溶液临时配制。

b)        2，6—二氯酚靛酚染料不稳定，每周重新配制，临用前标定。

c)        抗坏血酸溶液很不稳定，易氧化，故操作过程要迅速，夏季应置于冰浴中研磨。

**《植物生理学》**

**实验指导书**

**实验 1 植物细胞渗透势的测定（质壁分离法）**

植物细胞的渗透势主要取决于液泡的溶质浓度，因此又称溶质势。渗透势与植物水分代谢、生长及抗逆性等有密切关系。已知在干旱、盐渍等条件下，一些植物常在细胞内主动积累溶质，以降低其渗透势，增加吸水能力，而在一定程度上维持细胞膨压，保障细胞的生长和气孔的开放，这种现象叫做渗透调节作用。渗透调节能力的大小可以用逆境条件下细胞的渗透势的降低值来表示，在水分生理与抗逆性生理研究中经常需要测定。

**一、实验目的**

观察植物组织在不同浓度溶液中细胞质壁分离的产生过程及其用于测定植物组织渗透势的方法。

**二、实验原理**

将植物组织放入一系列不同浓度的蔗糖溶液中，经过一段时间，植物细胞与蔗糖溶液间将达到渗透平衡状态。如果在某一溶液中细胞脱水达到平衡时刚好处于临界质壁分离状态，则细胞的压力势（Ψ p） 将下降为零。此时细胞液的渗透势（Ψ s）等于外液的渗透势Ψ s 0。此溶液称为该组织的等渗溶液，其浓度称为该组织的等渗浓度，即可计算出细胞液的渗透势（Ψ s）。实际测定时，因为临界质壁分离状态难以在显微镜下直接观察到，所以一般均以初始质壁分离作为判断等渗浓度的标准。处于初始质壁分离状态的细胞体积，比吸水饱和时略小，故细胞液浓缩而渗透势略低于吸水饱和状态时的渗透势称基态渗透势。

**二、实验材料、试剂与仪器设备**

（一）实验材料

洋葱鳞茎、紫鸭跖草、苔藓、红甘蓝或黑藻、丝状藻等。

（二）试剂

1．1 mol/kg 蔗糖水溶液：称取预先在60～80 ℃下烘干的蔗糖34.2 g溶于100 g蒸馏水中，即为1质量摩尔浓度的蔗糖溶液。

2．0.03％中性红溶液。

3．蔗糖系列标准液：取干燥洁净的小试剂瓶 9支编号，用1 mol/kg蔗糖水溶液依据 C1V1 =C2V2公式配制0.30 mol/kg、0.35 mol/kg、0.40 mol/kg、 0.45 mol/kg、0.50 mol/kg、0.55 mol/kg、0.60 mol/kg、0.65 mol/kg、0.70 mol/kg 等一系列不同浓度的蔗糖水溶液（具体范围可根据材料不同而加以调整），贮于试剂瓶中，瓶口加塞以防蒸发浓缩。

（三）仪器设备

显微镜，载玻片，盖玻片，温度计，尖头镊子，刀片，小培养皿（直径为6 cm），试剂瓶，烧杯，容量瓶，量筒，吸管，吸水纸等。

**三、实验步骤**

1. 取干燥、洁净的培养皿9套编号，将配制好的不同浓度的蔗糖溶液按顺序加入各培养皿，使之成一薄层，盖好皿盖备用。

2. 用镊子撕取（或用刀片刮取）供试材料的表皮，大小以0.5 cm为宜，迅速分别投入各种浓度的蔗糖溶液中，使其完全浸入，每一浓度4-5片。同时记录室温。为了便于观察，可先将切片于0.03%中性红内染色5min 左右，吸去水分，再浸入蔗糖溶液中，但如不染色即能区别质壁分离时，仍以不染色为宜。

3. 5-10 min后，取出表皮薄片放在滴有同样溶液的载玻片上，盖上盖玻片，于低倍显微镜下观察，如果所有细胞都产生质壁分离 的现象，则取低浓度溶液中的制片作同样观察，并记录质壁分离的相对程度。如果在两个相邻浓度的切片中，一个切片没有发生质壁分离，另一个切片发生质壁分离的细胞数超过50％，则这两个浓度的平均值为其等渗浓度。每一制片观察的细胞不应少于100个。检查时可先从中间浓度开始。

在找到上述浓度极限时，用新的溶液和新鲜的叶片重复进行几次，直至有把握确定为止。在此条件下，细胞的渗透势与两个极限溶液浓度之平均值的渗透势相等。

将结果记录于表 1中。

表1 植物细胞渗透势测定记载表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 蔗糖浓度（mol/kg） | 渗透势（Mpa） | 质壁分离的相对程度（作图表示） |
| 0.30 |  |  |
| 0.35 |  |  |
| 0.40 |  |  |
| 0.45 |  |  |
| 0.50 |  |  |
| 0.55 |  |  |
| 0.60 |  |  |
| 0.65 |  |  |
| 0.70 |  |  |

**四、结果计算**

由所得到的等渗浓度和测定的室温，用下式计算供试溶液的渗透势（Ψ s 0），即为细胞的渗透势（Ψ s）。

Ψ s（MPa）= Ψ s 0＝－iCRT

式中， Ψ s 0 ——供试溶液的渗透势, MPa 。

i ——解离系数, 蔗糖=1 。

C ——供试溶液的浓度, mol/kg（以水作溶剂）。

R ——气体常数, 0.008314[L·MPa/(mol·K)] 。

T ——绝对温度, ( 273 + t ℃), K 。

**实验2 植物激素的提取、初步纯化及酶联免疫检测**

**------植物吲哚乙酸ELISA试剂盒**

**一、实验目的**

学习植物激素酶联免疫（ELISA）的原理，掌握实验操作方法及其浓度计算方法。

**二、实验原理**

植物激素免疫定量主要有放射免疫分析（RIA）和酶联吸附免疫分析（enzyme-linked immunosorbent assay，简称为ELISA），由于前者操作上欠安全等原因，目前常采用后一种类型。ELISA 是在免疫酶技术的基础上发展起来的一种新型的免疫测定技术。ELISA操作方便，易重复，灵敏度可高达ng（10 -9 g）至pg（10 -12 g）。在ELISA 中，抗原抗体反应的检测依靠酶标记物来实现，常用的酶有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酯酶。酶可以直接标记激素分子，称为酶标植物激素，也可标记于第二抗体（识别抗激素抗体Fc片段的抗体或金黄色葡萄球菌A蛋白），称为酶标二抗。这两类标记物分别用于固相抗体型和固相抗原型ELISA。

植物吲哚乙酸（IAA）应用双抗体夹心法测定标本中植物吲哚乙酸（IAA）水平。用纯化的植物吲哚乙酸（IAA）抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入植物吲哚乙酸（IAA），再用生物素标记标记的植物吲哚乙酸（IAA）抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物。随后加入过氧化物酶标记的亲和素反应，经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的植物吲哚乙酸（IAA）呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度（OD值），通过标准曲线计算样品中植物吲哚乙酸（IAA）浓度。 三**、实验材料、试剂与仪器设备**

（一）实验材料

高等植物、真菌、藻类等组织或器官。

（二）试剂

植物IAA抗体包被板；植物IAA标准品；浓缩生物素化植物IAA抗体；浓缩酶结合物（ABC）；浓缩酶结合物（ABC）稀释液；抗体稀释液；标准品稀释液；浓缩洗涤液；显色剂A；显色剂B；终止液

（三）仪器设备

酶联免疫检测仪，恒温箱，试管等。

**四、实验步骤**

1. 植物IAA抗体包被板：需提前20分钟从冰箱中取出，平衡至室温后方可进行实验；

2. 将浓缩洗涤液用双蒸水稀释，1:25。

3. 制备植物IAA标准品：冻干粉末，实验开始前加入标准品稀释液1.0ml至冻干标准品中，静置10分钟，待充分溶解后，轻轻混匀，浓度为200ng/ml；

4. 植物IAA标准品稀释：将植物IAA标准品等比例稀释至100、50、25、12.5ng/ml。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 100 ng/ml | （5号标准品） | 100ul的原倍标准品加入100ul的标准品稀释液 |
| 50 ng/ml | （4号标准品） | 100ul的5号标准品加入100ul的标准品稀释液 |
| 25 ng/ml | （3号标准品） | 100ul的4号标准品加入100ul的标准品稀释液 |
| 12.5 ng/ml | （2号标准品） | 100ul的3号标准品加入100ul的标准品稀释液 |
| 0 ng/ml | （空白对照） | 标准品稀释液 |

5. 分别将待测样和稀释好后的标准品加入相应孔中，每反应孔100ul。37℃温育90分钟。

6.提前30分钟制备生物素化植物IAA抗体工作液，用抗体稀释液稀释浓缩生物素化植物IAA抗体，1:100，配置成生物素化抗体工作液。

7. 洗板3次，每次每孔加入洗涤液350 ul，静置20秒后甩尽孔内液体。

8. 加入 生物素化植物IAA抗体工作液，每反应孔100ul。37℃温育60分钟。

9. 提前30分钟制备酶结合物工作液，用酶结合物稀释液稀释浓缩酶结合物，1:100，配置成酶结合物工作液。室温避光放置。

10.洗板3次，同7.

11.除空白孔外，加入酶结合物工作液，每反应孔100ul。37℃温育30分钟。

12.提前30分钟配置TMB显色工作液，按显色液A9份加显色液B1份（A:B=9：1）比例配置。

13.洗板5次，同7.

14.加入TMB显色液（包括空白孔），每反应孔100ul，37℃温育，避免光照，当标准曲线高浓度的颜色较深，有明显颜色梯度时，即可终止。试验显色反应不超过30分钟。

15．加入100ul终止液（包括空白孔），加入终止液后应立即测定结果（10分钟

内）。

16．  在450nm波长处测定各孔的OD值。

**五、结果计算**

以吸光度OD值为纵坐标（Y）（每个标准品和待测样的OD值应减去零孔值），相应的IAA标准品浓度为横坐标（X），做得相应的曲线，样品的IAA含量根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的OD值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

**《细胞与免疫学》**

**实验指导书**

**细胞生物学实验绘图方法与要求**

一、在仔细观察的基础上，选择典型结构进行描绘，要求真实、准确(注意各部结构的比例关系)。

二、用铅笔绘图，线条要明确清晰，图的深浅明暗一律以点的疏密来表示，点要圆而一致，不得涂暗影或进行其它美术加工。

三、各部结构名称要在一侧引直线注明。各引线要平行不得交叉。

四、每幅图的大小、位置在纸面上必须安排得当并注意纸面的整洁。

**实验一 细胞的基本形态观察和显微测量**

**一、实验目的和要求**

制备不同细胞的临时制片，观察、了解细胞的基本形态，学会使用测微尺，通过测量对红细胞的进化进行分析。

**二、实验原理**

细胞的形态结构与功能相关是很多细胞的共同特点，在分化程度较高的细胞更为明显，这种合理性是生物漫长进化过程所形成的。例如：具有收缩机能的肌细胞伸展为细长形；具有感受刺激和传导冲动机能的神经细胞有长短不一的树枝状突起；游离的血细胞为圆形、椭圆形或圆饼形。

不论细胞的形状如何，细胞的结构一般分为三大部分：细胞膜、细胞质和细胞核。但也有例外。例如：哺乳类红细胞成熟时细胞核消失。

**三、试剂与材料**

1、材料和标本 牛蛙一只

2、器材和仪器 配有目镜测微尺的显微镜一台、载玻片、盖玻片、吸水纸、镜台测微尺一个、牙签、手术器材一套、解剖盘一个、小平皿一个。

3、试剂 1％甲苯胺兰、1％甲基兰、Ringer氏液(两栖类用)。

**四、实验步骤**

1、细胞的基本形态观察

①．制备牛蛙脊髓压片观察脊髓前角运动神经细胞

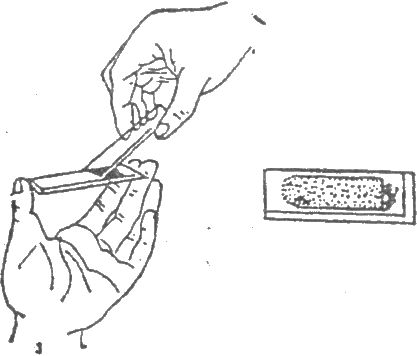


图 1血涂片的制备

取牛蛙一只，破坏脑和脊髓，在口裂处剪去头部，除去延脑，剪开椎管，可见乳白色脊髓，取下脊髓放在平皿内，用Ringer氏液洗去血液后放在载片上，剪碎。将另一载片压在脊髓碎块上，用力挤压。将上面的载片取下即可得到压片。在压片上滴一滴甲苯胺兰染液，染色10分钟，盖上盖片，吸去多余染液。在显微镜下观察，染色较深的小细胞是神经胶质细胞。染成兰紫色的、大的、有多个突起的细胞是脊髓前角运动神经细胞，胞体呈三角形或星形，中央有一个圆形细胞核，内有一个核仁。

②．牛蛙骨骼肌细胞的剥离与观察

剪开牛蛙腿部皮肤，剪下一小块肌肉，放在载片上，用镊子和解剖针剥离肌肉块成为肌束，继续剥离，可得到很细的肌纤维(肌细胞)。尽可能拉直肌纤维。在显微镜下观察，肌细胞为细长形，可见折光不同的横纹，每个肌细胞有多个核，分布于细胞的周边(参照照片)。

③．牛蛙血涂片的制备与观察

取一滴牛蛙血液，靠近一端滴在载片上．将另一载片的一端呈45°角紧贴在血滴的前缘，均匀用力向前推，使血液在载片上形成均匀的薄层(图l)。晾干。显微镜观察可见牛蛙红细胞为椭球形，有核。白细胞数目少，为圆形。

④．人口腔上皮细胞标本的制备与观察

用牙签刮取口腔上皮细胞均匀地涂在载片上(不可反复涂沫)，滴1滴1％甲苯胺兰染液，染色5分钟，盖上盖片，吸去多余染液。显微镜下观察可见覆盖口腔表面的上皮细胞为扁平椭圆形，中央有椭圆形核，染成兰色。

2、测微尺的使用

(1)原理

测微尺分目镜测微尺和镜台测微尺，两尺配合使用。目镜测微尺是一个放在目镜像平面上的玻璃圆片。圆片中央刻有一条直线，此线被分为若干格，每格代表的长度随不同物镜的放大倍数而异。因此，用前必须测定。镜台测微尺是在一个载片中央封固的尺，长1毫米(1000μm)，被分为100格，每格长度是10微米。

(2)方法

① 将镜台测微尺放在显微镜的载物台上夹好，小心转动目镜测微尺和移动镜台测微尺使两尺平行，记录镜台测微尺若干格所对应的目镜测微尺的格数。

② 按下式求出目镜测微尺每格代表的长度



目镜测微尺每格代表的长度(μm)= ×10

3、测量人口腔上皮细胞

从显微镜载物台上取下镜台测微尺，换上人口腔上皮细胞标本，测量细胞、细胞核的长短径。

**五、实验结果与作业**

1、分别求出使用低倍镜(10X)，高倍镜(40X)时目镜测微尺每格代表的长度：

低倍镜：目镜测微尺每格代表的长度= XlO(μm)= μm

高倍镜：目镜测微尺每格代表的长度= XlO(μm)= μm

2、绘制所观察的细胞并注明基本结构。

3、计算红细胞的体积、口腔上皮细胞的核质比例。

计算细胞、细胞核体积的公式：

圆 形 V=4/3πr 3(r为半径)

椭圆形 V=4/3πab2(a、b为长、短半径)

核质比 N／D=Vn／(Vc-Vn) (Vn为核的体积，Vc是细胞质的体积)

**实验二 细胞线粒体的制备及超活染色与观察**

**一、实验目的和要求**

掌握一种活体染色方法, 加深对离心技术的认识，掌握差速离心法分离亚细胞颗粒的原理和方法，分离植物组织线粒体并初步纯化，了解光学显微镜下线粒体基本形态结构。

**二、实验原理**

线粒体是细胞内一种重要细胞器，是细胞进行呼吸作用的场所。细胞的各项活动所需要的能量，主要是通过线粒体呼吸作用来提供的。活体染色是应用无毒或毒性较小的染色剂真实地显示活细胞内某些结构而又很少影响细胞生命活动的一种染色方法。詹纳斯绿 B是线粒体的专一性活体染色剂。线粒体中细胞色素氧化酶使染料保持氧化状态呈蓝绿色，而在周围的细胞质中染料被还原，成为无色状态。

**三、试剂与材料**

1、材料和标本 黄化生长的绿豆幼苗、黄豆幼苗或玉米幼苗等材料。

2、器材和仪器 显微镜、手术器材一套、解剖盘、小平皿、载片、盖片、吸水纸、10ml注射器、吸管。

3、 ① 分离介质0.25mol/L蔗糖，50mmol/L的Tris-盐酸缓冲液(pH 7.4)，3mmol/L EDTA，0.75mg/ml牛血清白蛋白(BSA) ；

② 保存液：0.3mol/L甘露醇(pH 7.4)；

③ 1%詹纳斯绿B染液，用Ringe氏液配制。（100mlRinger氏液：Nacl0.85g、 Kcl0.25g、 Cacl20.03g）。

**四、实验步骤**

**细胞线粒体的制备及超活染色与观察**

1、剪取黄化生长的绿豆幼苗、黄豆幼苗约10g，放0~4℃下1h。

2、加3倍体积分离介质(4℃)，在研钵内(冰水浴)快速研磨成匀浆。

3、用多层纱布过滤，滤液4℃下5000r/min离心15min，除去核和杂质沉淀。

4、取上清液4℃下12000r/min离心10min，沉淀为线粒体。再加同上分离介质离心洗涤一次。

5、沉淀为线粒体，可存于0.3mol/L甘露醇中放在冰水中。

6、取线粒体沉淀在清洁载玻片上，立即滴加1/5000詹纳斯绿B染液染色20min，放上盖玻片，用显微镜观察。

**五、实验结果与作业**

显微镜观察，细胞质中许多线粒体被染成蓝绿色。

不同细胞中线粒体的形态和数目不同。线粒体的外形多样，如圆形、椭圆形、哑铃形和杆状。线粒体的数目与细胞类型和细胞的生理状态有关，线粒体多聚集在细胞生理功能旺盛的区域。

**作业：**

1、线粒体的分离提取为什么要在0～4℃条件下进行？

2、绘制光镜下细胞活体染色所见的线粒体形态结构。

**实验三 细胞原生质体的制备**

**一、实验目的和要求**

1、学习植物细胞原生质体分离纯化的方法。

2、了解原生质体活性鉴定的原理。

**二、实验原理**

植物原生质体是指植物细胞去掉细胞壁的裸露部分。它在培养条件下，①具有再生细胞壁，进行连续的细胞分裂并再生成完整植株的能力；②具有摄取外源大分子、细胞器以及细菌、病毒的能力，因此是进行遗传操作、基因转移的好材料；③通过同种和异种植物的原生质体融合，可产生异核体，实现体细胞杂交，培育出新品种。

去掉植物细胞壁的方法可以是机械的人工操作，也可以利用酶解法。较早利用机械法制备原生质体的首推Klercker（1892），直到1960年英国科学家Cocking才第一次用酶法大量制备原生质体。本实验以植物的叶肉组织为材料，利用纤维素酶和果胶酶来消化细胞壁，分离细胞。 由于原生质体内部与外界环境之间仅隔一层薄薄的细胞膜，必须保持在渗透压平衡的溶液中才能保持其完整性。其次还应考虑取材、酶的种类和纯度、酶液的渗透压、酶解时间及温度等因素对分离原生质体的影响。

测定原生质体的活性有多种方法。荧光素双醋酸酯（FDA）染色是常用的一种方法，FDA本身无荧光，无极性，可透过完整的原生质膜。一旦进入原生质体后，由于受到酯酶分解而产生具有荧光的极性物质荧光素。它不能自由出入原生质膜，因此有活力的细胞能产生荧光，无活力的原生质体不能分解FDA，无荧光产生。

**三、试剂与材料**

器具：显微镜、离心机、离心管、剪刀、镊子、吸管、小培养皿、载片、盖片。

试剂：0.16mol/LCaCl2﹒H2O溶液，用pH 6.0的0.1%Tris水溶液配制。

20%蔗糖溶液：用pH 6.0的0.1%Tris水溶液配制。

酶解液：2%纤维素酶、1%果胶酶、0.05 mmol/L CaCl2、、0.6mol/L甘露醇、0.1%Tris,pH 6.0。

0.02%FDA稀释液:5 mgFDA溶于1mL丙酮中，4℃避光保存。使用时取0.22mL贮存液加入5mL 0.6mol/L甘露醇中得0.02%FDA溶液。

台盼蓝染液。

材料：小白菜、油菜、菠菜或烟草

**四、实验步骤**

1、取材 根据实验目的和条件选取不同的材料

2、分离原生质体

① 用自来水充分洗净叶片，撕去叶片下表皮 ；

② 酶解 将撕去下表皮的叶片剪成小块，放在盛有10mL酶解液的小培养皿中，让去除下表皮的一面充分接触酶液，铺满一层，在25~28℃下酶解60~90分钟。

3、收集纯化

①用吸管将酶解液吸至5mL离心管中，以1000rpm离心5分钟以上，使原生质体沉降 。

②用吸管将上清（酶解液）去除，剩下原生质体及残渣于管底 。

③加氯化钙液约2mL，轻轻吹打均匀 。

④用注射器向离心管底部缓缓注入蔗糖液约2～3mL，出现下部蔗糖液，上部原生质体悬浮液 。

⑤以1000rpm离心10分钟，在两液相之间出现一条绿色带，便是纯净的原生质体。

⑥用滴管吸取原生质体转入1.5mL离心管中待用。

4、观察

取少许原生质体于载片上，加入同体积的0.02%FDA稀释液，静置5min后，于荧光显微镜下观察，发绿色荧光的为有活力的原生质体，没有产生荧光的原生质体无活力。

用滴管吸取1滴原生质体于载玻片上，滴一滴台盼蓝染液，染色3-5分钟后，盖上盖玻片，显微镜下观察，呈蓝色的为原生质体活体。

**五、实验结果与作业**

1、简述植物原生质体制备的方法步骤；

2、按镜下观察绘制原生质体。

**实验四 细胞骨架的微丝染色实验与显微观察**

**一、实验目的和要求**

掌握微丝的显示方法，了解光镜下细胞骨架的基本形态结构。

**二、实验原理**

真核细胞胞质中有错综复杂的纤维网，称为细胞骨架（cytoskeleton）。根据纤维的直径分为微丝（microfilament，简称MF，7nm）、微管（microtubule，简称MT，25nm）、中间纤维（intermediated filament，简称 IF，10nm）。此外还散布着一些比微丝还细的纤维（3～6nm）。真核细胞中的细胞骨架可通过电镜来观察，但由于设备条件和操作技术比较复杂，难于普遍应用。S.D.Pone曾用考马斯亮兰染液培养人皮肤成纤维细胞的细胞骨架获得成功。1982年上海植物生理所陈梓卿采用植物细胞为材料也获成功，实践证明这是一种简单易行的方法。

微丝是由肌动蛋白构成的纤维，称作F-actin。单根微丝直径约7nm，在光学显微镜下看不到。本实验观察到的是由微丝平行排列组成的纤维束。

当细胞用适当浓度的triton X-100溶液（聚乙二醇辛基苯基醚，是一种非离子去垢剂）处理，能够溶解质膜结构中及细胞内许多蛋白质，而细胞骨架中的蛋白质却不被破坏，经固定和考马斯亮兰（非特异性蛋白质染料）染色后，胞质背景着色弱，有利微丝的显示，可在光镜下观察到由微丝组成的纤维束。

**三、试剂与材料**

材料：盖片培养的成纤维细胞或洋葱内表皮细胞、

器材：光学显微镜、镊子、小平皿、载玻片、吸水纸、37℃恒温箱。

试剂：0.01mol/LPBS液（PH7.2-7.4）、1%tritonX-100液、M-缓冲液、3%戊二醛液、0.2%考马斯亮兰(R250)染液

M-缓冲液：咪唑50mmol/L、氯化钾50mmol/L、氯化镁0.5mmol/L、EGTA乙二醇（2-氨基乙基）四乙酸1mmol/L、EDTA0.1mmol/L、巯基乙醇1mmol/L、甘油4mmol/L,用1mol/L盐酸调PH至7.2。

1%tritonX-100液：用M-缓冲液配制。

3%戊二醛液：用0.01mol/LPBS液（PH7.2-7.4）配制。

0.2%考马斯亮兰(R250)染液：0.2克R250、甲醇46.5 mL、冰醋酸7 mL、蒸馏水46.5 mL。

**四、实验步骤**

1、方法

①将1.0×1.5cm大小左右洋葱内表皮细胞置于含磷酸缓冲液（PBS）的载玻片上，充分湿润后，用滤纸吸去PBS液。

②滴加1%triton“X”-100/ M-缓冲液几滴至洋葱表皮细胞上充分覆盖，放培养皿中置于37℃恒温箱处理20~30分钟。在M-缓冲液的低钙条件下，骨架纤维保持聚合状态并较为舒张。

③取出立即滴加M-缓冲液轻轻地洗涤3次，每次3分钟，使细胞骨架稳定。

④吸干后滴加3%戊二醛液，固定20分钟，再滴加PBS液洗2次，每次3分钟，吸去多余液体。

⑤滴加0.2%考马斯亮兰染液染色20分钟，吸干，滴加 PBS液洗涤至液体基本无蓝色，吸干镜检。

2、结果

在光镜下可见一些充分伸展的成纤维细胞中，分布着被染成深兰色的细直纤维，这就是由许多微丝聚集成的最大的微丝束，也称张力纤维，它们多沿细胞长轴方向、细胞突起而分布，在有些细胞（多角形）中则一组组纤维沿不同方向交叉分布，在洋葱表皮细胞中可见交织成网状结构。

**五、实验结果与作业**

1、解释染色的实验原理。

2、绘出光镜下观察的细胞网状微丝的细胞骨架图。

3、M-缓冲液、tritonX-100、戊二醛溶液在本实验中的作用。

**实验五 细胞有丝分裂形态观察**

**一、实验目的和要求**

通过标本观察掌握生物体细胞有丝分裂的形态特征。

**二、实验原理**

细胞以分裂的方式进行增殖，而有丝分裂是真核生物进行细胞分裂的主要方式。为了研究方便，人为的把分裂期分为四个时期，即前期、中期、后期、末期。下面以植物细胞为例简单介绍各个时期细胞所发生的变化及特点。

间期：主要特征是完成DNA的合成、复制，以及RNA和蛋白质的合成，为分裂期的细胞提供物质准备。同时，细胞也有适度的生长。

分裂期（M期）：

前期：染色质浓缩形成显微镜下可见的、有特定结构的、并有一定数目的染色体（呈无序、散乱地分布在纺锤体的中央），每条染色体由两条并列的姐妹染色单体构成，由一个共同的着丝点相连。特点：两消失一形成，即核仁逐渐解体（分散在细胞质中）、核膜逐渐消失；细胞两极发出纺锤丝，形成一个梭形的纺锤体。

中期：在纺锤丝的牵引下，各染色体都排列到纺锤体的中央，它们的着丝粒都位于细胞中央的一个平面上，即赤道板。此时，染色体有序排列在赤道板上，其形态稳定、数目比较清晰、在显微镜下易观察。

后期：姐妹染色单体消失，成为两条独立的染色体位于细胞的两极。即每个着丝点分裂成两个，姐妹染色单体分开，成为两条子染色体，染色体数目加倍。在纺锤丝的牵引下，子染色体向细胞的两极移动。此时，染色体就平均分配到细胞的两极，两极各有一套形态、数目完全相同的染色体。

末期：染色体伸展延长，最后成为染色质。特点：两形成一消失，即核膜重新形成，核仁也开始出现、细胞核恢复了间期的形态；纺锤丝逐渐消失。赤道板的位置出现了一个细胞板，细胞板由细胞的中央向四周扩展，逐渐形成新的细胞壁。此时，一个植物细胞分裂为两个子细胞。

**三、试剂与材料**

1、材料：洋葱根尖、大蒜根尖

2、器材和仪器：显微镜、擦镜纸、载玻片、盖玻片、吸水纸、镊子、单面刀片

3、试剂和药品：冰醋酸、无水乙醇、盐酸、洋红、铁锈钉、甲苯胺蓝、龙胆紫

（1）：固定液：卡诺氏固定剂（无水乙醇：冰醋酸=3：1）

（2）：解离液：1N盐酸

（3）1%龙胆紫染液：1g龙胆紫+少量10%醋酸+100ml蒸馏水保存在棕色瓶中，呈亮紫色。

（4）醋酸洋红：取45毫升冰醋酸，加蒸馏水55毫升，煮沸后徐徐加入洋红1克，搅拌均匀后加入1颗铁锈钉，煮沸10分钟，冷却后过滤，贮存于棕色瓶内。

（5）0.5%甲苯胺蓝染液：取0.5克甲苯胺蓝，溶解在100毫升蒸馏水中，即成0.5%甲苯胺蓝水溶液。

**四、实验步骤**

1、根尖的培养

洋葱根尖的培养 在室温为15～25℃条件下，实验前3～5天将洋葱鳞茎剥去一层外皮，用刀片切去鳞茎底部陈根或削去一薄层，露出新的细胞有利于洋葱鳞茎尽早生根。将鳞茎放在盛满水的烧杯上，使其底部接触水面，放在温暖、向阳处，每天换水，以免氧气不足导致根尖腐烂，细胞生长缓慢，影响细胞有丝分裂的观察。

洋葱的生根与周围环境温度关系密切。在室温15～25℃范围内洋葱鳞茎易生根，且数目多，生长速度快。在低温和高温条件下洋葱生根少且缓慢，特别是经冷藏处理过，处于休眠期的洋葱鳞茎更是不易生根。近几年来市场上供应的洋葱多数是经冷藏处理过的，如果先用刀片切去这些处于休眠状态下的洋葱鳞茎陈根后，让它们在15～25度的室温下放置几周，待根部周围长出许多白色小突起后再培养就能提高生根率。此外，洋葱的生根率还与它们的形状有关，体形扁圆、底部面积较大的洋葱鳞茎生根数较多。

大蒜根尖的培养 选取比较饱满的大蒜，剥去外皮和底部的老根，然后用竹签串联，放在盛满水的烧杯上，使其底部接触水面，置于温暖向阳处，注意每天换水，以免因氧气不足等而造成根尖生长缓慢或腐烂。当根长到1—1.5厘米时（约2-3天）就可以进行试验，因为此时根分生区生命活动比较旺盛，更易观察到分裂相。

2、取下约1cm根尖放入固定液浸泡3~5小时，固定后可置于70%酒精4℃保存备用。

3、将固定后的根尖用自来水洗涤3~5次，置于解离液解离8-10 min，至根尖变白透明。若解离时间太短，细胞不易完全分散开，解离时间太长根尖完全酥软，无法进行观察。

4、用刀片截取尖端2mm-5mm的根尖，用镊子将圆柱状的根尖轻轻压扁，加2滴染色液进行染色，染色时间3～5min。

5、制片观察 染色完毕，盖上盖玻片，再盖以2层吸水纸，用拇指轻压一下(也可用铅笔的橡皮头在盖玻片上轻轻敲几下)，即可使根尖细胞均匀地扩散成云雾状，吸取四周多余水分，在显微镜下进行观察。

**五、实验结果与作业**

显微镜下镜检，用低倍镜在生长点附近可观察到已被染成淡红色或淡蓝色的、单层、排列紧密的呈正方形的细胞。换上高倍镜进行观察，即可找到处于细胞分裂间期和有丝分裂前期、中期、后期、末期的细胞，可清晰地辨认出有丝分裂各时期染色体行为的变化。

**作业：**

将你观察到的细胞有丝分裂前期、中期、后期、末期的细胞作一草图。

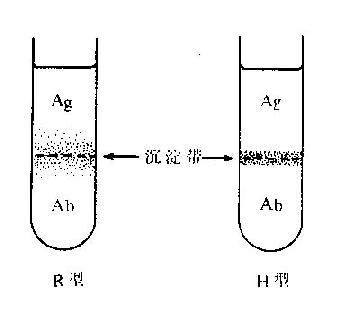
**实验六 免疫沉淀反应**

**一、实验目的和要求**

了解免疫沉淀反应的原理，掌握免疫沉淀试验的几种方法。

**二、实验原理**

根据抗原和抗体性质的不同和反应条件的差别，抗原抗体反应表现为不同的形式。颗粒性抗原表现为凝集反应；可溶性抗原表现为沉淀反应；补体参与下细菌抗原表现为溶菌反应，红细胞抗原表现为溶血反应；毒素抗原表现为中和反应等。可溶性抗原(如血清蛋白、细菌培养滤过液、细菌浸出液，组织浸出液等)与相应抗体在一定条件下特异性结合形成肉眼可见的沉淀物或沉淀线，称此反应为沉淀反应。参与沉淀反应的可溶性抗原称为沉淀原，抗体称为沉淀素。沉淀反应的试验方法有环状法，絮状法和琼脂扩散法三种基本类型。



**三、实验内容**

**（一）环状沉淀试验**

　　该方法由Oudin于1946年报道。将血清或纯化抗体混入约56℃的1.0％琼脂糖溶液中，注入小口径试管内，待凝固后，在凝胶中面加入抗原溶液，让抗原自由扩散入凝胶内，在抗原与抗体比例恰当位置形成沉淀环。在黑色背景斜射光处，极易观察这种白色不透明沉淀带。

沉淀环的数目和形态受抗原和抗体性质的影响。溶液内含有多种抗原，在凝胶中含有各自的抗体，扩散后形成相应的抗原抗体复合物，出现多条区带。试管上部的沉淀带表示抗原量少或者抗体量多；反之，下面的沉淀带则是抗原量大，抗体量少。另外，抗体类型也有很大区别，如用兔抗血清（R型抗体），抗体过量亦可形成复合物，因而沉淀带宽而界线不清；如用马抗血清（H型抗体），抗原或抗体过量皆不形成复合物，因而只在比例合适处形成界线清晰的沉淀物。

分别量取温浴至56℃的0.16mg/mL羊抗人IgG生理盐水溶液和1.0％琼脂糖生理盐水溶液, 等体积混合均匀，将混合液缓缓注入小试管中，竖放，待凝固后，沿试管壁缓慢加入一定浓度的抗原溶液或生理盐水2毫升，让抗原自由扩散入凝胶内，置于37℃恒温箱过夜，在抗原与抗体比例恰当位置形成沉淀环，在黑色背景斜射光处，极易观察白色不透明沉淀带。

每组制作三支凝胶试管，两支用于加两种浓度的抗原，一支用于加生理盐水作为对照。

**（二）单相琼脂扩散试验**

一种定量试验，将一定量的抗体混合于琼脂内，倾注于玻片上，凝固后，在琼脂层上打孔，再将抗原加入孔中，使其向四周扩散。抗原抗体复合物形成的沉淀环直径与抗原的浓度成正比。如事先用不同浓度的标准抗原制成标准曲线，则未知标本中的抗原含量即可从标准曲线中求出。本试验主要用于检查标本中各种免疫球蛋白和血清IgG含量。

**1、试剂与材料**

抗体：羊抗人IgG单价抗血清

抗原：待检血清、标准血清

３％生理盐水琼脂、生理盐水、载玻片、直径３mm打孔器、小三角烧瓶、移液器、湿盒

**2、实验步骤**

（1）制备含抗体的琼脂板

取羊抗人IgG单价抗血清一瓶（效价1：100），加生理盐水50倍稀释混匀（效价1：2），置56℃水浴中恒温2~3分钟。

取3%生理盐水琼脂一管，隔水加热使溶，然后置56℃水浴中，待琼脂温度降至56℃时，立即加入等量50倍稀释抗血清，迅速轻轻混匀，勿使产生气泡，迅速倾入载玻片上，每片约3.5ml，待凝固后打孔。如下图所示。

（2）稀释待检血清

将待检血清用生理盐水作50倍稀释，

（3）打孔、加样

每份检样加两孔，加满（但不要溢出），加样时毛细滴管尖端不要划破琼脂。

（4）温育

将琼脂板置搪瓷盒，垫湿纱布或海绵以防干燥，37℃恒温箱24h。

**3、实验结果与作业**

测量并求出每份检样两孔的沉淀环平均直径，按照标准曲线求出IgG含量。

标准抗原

待检抗原

**标准曲线图**

**沉淀环直径（mm）**

7

5

3

50 100 200 500

**标准抗原浓度（mg/100ml）**

**作业：**

简述实验原理及用途，绘制试管上弧形沉淀线图，绘制单项扩散试验标准曲线图并求出未知抗原浓度。

**实验七 酶联免疫与免疫反应试验**

**一、实验目的和要求**

了解实验方法原理及结果观察与判断；

免疫酶技术是免疫标记技术的一种，是把抗原体反应和酶的高效催化作用原理有机的结合起来，具有免疫荧光技术和放射免疫测定的优点，克服了上述二种方法的缺点的一种新的免疫测定方法。酶标试剂制备容易、稳定、有效期长，敏感性接近放射免疫试验。可肉眼观察也可借助仪器作定量测定。所得结果比较客观。目前，酶标记技术广泛地应用于微生物学、寄生虫学等基础免疫试验及临床免疫实验中。其中，尤以1971年Engvall和Van Weeman建立的酶联免疫吸附试验（ELISA）最为常用，ELISA有间接法（测抗体）、双抗体夹心法（测大分子抗原）及竞争法（测小分子抗原）三种，以前二法较为常用。

**二、实验原理**

这是已知抗体测定未知抗原的一种方法。将纯化的抗体结合到固相载体上。加待检血清(欲测抗原)然后加辣根过氧比物酶（HRP）·使之与被固相抗体结合的待检抗原体起反应，最后结合在免疫复合物上的酶遇到相应底物时，使其氧化，从而产生颜色。颜色的深浅与待检血清中抗原量成正比。

**三、试剂与材料**

（一）器材：洗板机、37℃温箱、96孔聚苯乙烯酶标板、微量加液器

（二）试剂：

1、抗原：人血清抗原

2、抗原包被液：0.05M PH9.6碳酸缓冲液（碳酸钠0.7493g，碳酸氢钠1.4625g，去离子水500 ml）。

3、封闭液：0.01M PBS pH7.2+1.0%BSA

4、一抗：兔抗人抗体 稀释4000倍为250ng/ml（1：1）。

5、二抗：辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidanse,HRP) 标记羊抗兔免疫球蛋白(IgG)，二抗稀释2000倍。

6、抗体稀释液：0.01M PBS pH7.2+0.5‰吐温-20+0.1%BSA。

7、洗涤液：0.01M PBS pH7.2+0.5‰吐温-20。

8、0.01M PBS pH7.2（十二水磷酸氢二钠7.1626g，氯化钠15.9966g，氯化钾0.3997g，磷酸二氢钾0.4003g，去离子水500 ml）。

9、底物溶液：柠檬酸3.99g，磷酸氢二钠14.325g，邻苯二胺121.6g，定容至390 ml，加双氧水486.4μl，现配现用。

10、反应终止液：2NH2SO4（1mol/L H2SO4)。

**四、实验步骤**

1、包被：将200μl/孔人血清抗原（用包被液稀释了100倍）加入酶标板反应孔，具体如图1，于37℃恒温箱保温2h，转至4℃冰箱过夜。次日，弃去孔内溶液，用洗涤液冲洗3次。

2、封闭：每孔加200μl封闭液，37℃保温40min, 弃去孔内溶液，用洗涤液冲洗3次。

3、加一抗（按图加）：一抗（兔抗人抗体）稀释4000倍为250ng/ml（1：1），稀释浓度为1：2、1：4、1：8、1：16、1：32、1：64、1：128，其中阳性对照为稀释抗体，阴性对照为空白不加一抗的，即只加稀释液，点样如图2。37℃保温1h, 弃去孔内溶液, 用洗涤液冲洗3次。



图1



图 2

4、加二抗：二抗稀释2000倍，各孔加200μl（辣根过氧化物酶羊抗兔抗体）37℃保温30～40 min弃去残液，洗涤3次。

5、加显色底物：各孔加100μl显色底物，37℃保温20min。

6、反应终止液：各孔加100μl反应终止液，室温下待颜色稳定。

7、测值：酶联检测仪读取492nm的OD值，可直接作为ELISA结果报告。

**五、实验结果与作业**

简述实验原理、实验材料、实验方法步骤和实验结果并绘出标准曲线图。

**实验八 细胞电泳**

**一、**[**实验目的**](http://sky.scnu.edu.cn/life/class/cellbiologylab/experim/bexp/exp14.asp#01)**和要求**

学习细胞电泳的方法。

**二、实验原理**

在电场作用于多相系统时，可使该系统产生相位移效应，称为电动现象，属于该电动现象的包括电泳和电渗透。 在电场作用下，液体介质中带电悬浮质点与介质间的相对运动，称为电泳。 将细胞制备成悬浮溶液，使其单个游离的细胞分散于等渗的介质中，在电场作用下，细胞在电泳室内发生运动，这种现象称为细胞电泳。 细胞表面具有一定的电荷(通常为负电荷)，其表面吸附着被极化的水分子层，它与介质间存在着电位差，此电位差称为≮电位。每种细胞在恒定的条件下(如温度、电压、电流、介质浓度、pH值等)其电泳速度和≮电位十分稳定，但在各种有害因子或病理状态的影响下，可降低其表面电荷，所以细胞的电泳速度和≮电位值产生变化(降低)。因此，利用细胞电泳手段研究生命结构的表面性质，鉴定细胞或单细胞有机体的功能和病理状态具有重要的意义。

**三、试剂与材料**

材料：红细胞，白细胞，血小板，巨噬细胞，瘤细胞或植物的原生质体，叶绿体等。

用品：

1、试剂：巴比妥、巴比妥钠、蔗糖。

(1)巴比妥缓冲液：巴比妥 3.86g

巴比妥钠 1.67g

蒸馏水 1000毫升

此溶液可在4℃冰箱中长期保存，用前需温至实验所需温度。

(2)稀释液： 蔗糖 10g

巴比妥缓冲液 100毫升

此溶液可在冰箱中保存一周，用前需温至实验所需温度。

此溶液适用人红细胞，若样品为其它细胞，请根据细胞比重适当调整蔗糖浓度。

2、样品的准备

(1) 取稀释液3毫升，加血液5微升，混匀。

(2) 1000转/分，离心5分钟。

(3) 弃去上清液。

(4) 加稀释液5毫升，混匀。

3、器具：显微（细胞）电泳系统， 5mL注射器，50mL烧杯，离心管、胶头滴管

**四、实验步骤**

1、固定与加样：安装玻璃小室时应先将其中一端对准一侧的胶块中间，用适当的力压下，将另一端的4/5留在胶块里，1/5露出在外。然后用注射器针头插入玻璃小室内部加样，加样时不应有液体渗漏，加样完毕不应有气泡存留，加样完毕将玻璃小室压平。

2、观察电泳样品

(1)把显微镜电泳槽平放于显微镜载物台上，尽量将其观察窗对准显微镜镜头的中心，两边用压板固定好。

(2)显微电泳槽腔内的两个表面均刻有永久性的光学标记，因此寻找腔内的任意深度都很方便。

3、观测层的选择

从理论上来讲，本系统的显微观察电泳槽的两个静止层分别在小室深度的0.211和0.789处。将总深度数值乘以0.211即是静止层的位置，将微调手轮旋至此位置。此时在监视器屏幕上能清楚看见微粒即是处在静止层处。按下[左移] 键，观察微粒是否移动，如果方向相反可以改按[右移]键。观察微粒移动距离，可从监视器两条竖直标志线确定。

观测层由下式求出：

Dg=D×W

式中，Dg—确定观察的深度，D—电泳槽的总深度，W—欲选定的观察深度比率。

单纯的电泳通常使各层微粒以同一速度移向正极，电渗的情况却比较复杂。在外加电场的作用下，沿管壁的一层，以较高的速度流向负极，越是远离管壁，液层的流速越低。管的两端是封闭的，管内的流体流动总量为零。因此在同一时间内，有多少液体沿管壁附近流向负极，就必然有同量液体流向正极。流速是逐层变化的，在两种流向之间，存在流速为零的一层，即为静止层。

处在静止层上的微粒，其移动速率才等于电泳率。在静止层附近，深度—速度曲线的陡度很大，深度的微小偏离，将引起测定速度的较大误差。因此，准确地确定静止层，是显微电泳中一项最精细、最重要的工作。

断面长方形观察电泳槽的静止层在距电泳槽内腔上壁的0.211和0.789处。

4、电渗值的求出及实际应用

由于电渗的影响，腔内各深度层上的微粒的移动速度是不同的（移动速度=电泳+电渗）。静止层上虽无电渗影响，但那里的曲线斜率很大，深度选择上的微小偏差也能引起速度上的很大误差。为了避免这种误差，可以把观测层选在0.5D（D为内腔的高度）深度处。这里的电渗速率虽然最大，但是曲线的斜率最小，因而可以避免因选择深度引起的测量的误差。电渗引起的移动速率可以用下面的方法纠正：

重复观测0.211和0.5深度上10个微粒的速率，分别求出0.211和0.5深度上速率的平均值，用下式计算电渗值。

Ys=0.5处的移动速率-0.202处移动速率

以后的实际测量均在0.5深度处。用下式计算电泳率：

EMP=0.5D深度处的移动速率-Ys

5、电泳率

电泳率定义为：在1V/cm电势梯度下，每秒钟涌动1微米为一个电泳单位。这个定义可以用下式表达：

EMP=（S/T）/（U/L）

S为带电粒子涌动距离，T为涌动时间，U为涌动时的电压，L为电泳槽的长度。

6、主机操作

监视器屏幕标有5条竖直等分的刻度线（85微米），如图所示。彼此两条之间的距离在随机的标定记录表上已给出具体数值。调节显微镜到欲观测的深度。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |

监视屏刻度线

从主机监视器上找到最清晰的微粒，如果微粒不在标线上，则先按下“暂停”键，按鼠标左或右键，将微粒移到某一标线上，在“暂停”期间仪器不计时。再按“暂停”键，此时左移或右移微粒至另一标线然后再返回原标线（一个来回为一次微粒移动时间）。

松开鼠标，刚才的时间及个数被记录。另选一在标线的微粒重复以上步骤，直到测完全部微粒，此时仪器蜂鸣报警，表示计数完毕。按一下“暂停”键，蜂鸣器停止鸣响。此时将总时间和微粒数记录下来，然后可以按“清除”键，重新开始新的测量。

**五、实验结果与作业**

1、计算Ys。

2、实测两个微粒的电泳率。

**实验九 细胞组分的化学染色与定位分析**

**一、实验目的和要求**

了解核酸、蛋白质、糖及酶的细胞化学反应原理，掌握Brachet反应及碱性蛋白、酸性蛋白、糖原和过氧化物酶的细胞化学染色方法。

**二、实验原理**

细胞经甲基绿一呱咯宁混合液处理后，其中的DNA和RNA出现不同的呈色反应，一般认为这是由于带有负电荷的核酸对碱性染料呱咯宁和甲基绿具有亲和力，且这两种染料的作用有选择性，甲基绿染高聚分子的DNA呈蓝绿色，呱咯宁染低聚分子的RNA呈红色。由此对细胞中的DNA和RNA进行定位、定性、和定量分析；

由于不同的蛋白质分子所带的碱性和酸性基团的数目不同，在pH值不同的溶液中，蛋白质分子所带的净电荷多少不同。如在生理条件下，整个蛋白质所带负电荷多，则为酸性蛋白质；带正电荷多，则为碱性蛋白质。据此，可将标本经三氯醋酸处理提出核酸后，用不同pH值的固绿染液分别染色，细胞内的酸性蛋白和碱性蛋白质显示出来；

过氧化物酶能把许多胺类氧化为有色化合物，用联苯胺处理标本，细胞内的过氧化物酶能把联苯胺氧化为蓝色的联苯胺蓝，进而变为棕色产物，因而可以根据颜色反应来判定过氧化物酶的有无或多少；

组织、细胞的多糖、粘多糖及粘蛋白等都可用PAS法来显示，其化学基础是利用过碘酸的氧化作用，打开碳链形成醛，生成的醛基与Schiff试剂中的无色品红反应形成紫红色化合物。

**三、试剂与材料**

1、材料和标本 牛蛙、小白鼠各一只、肝脏石腊切片、培养的Hela细胞。

2、器材和仪器 光学显微镜、解剖器材、蜡盘、载玻片、吸水纸、染色缸、盖玻片、水浴箱。

3、试剂PBS缓冲液(pH7.2)、甲基绿一呱咯宁醋酸缓冲液、纯丙酮、l/2丙酮+1/2二甲苯、纯二甲苯、70％乙醇、5％三氯醋酸、0.1％碱性固绿、0.1％酸性固绿、0.5％硫酸铜、联苯胺混合液、1％番红、无水乙醇、过碘酸酒精液、Schiff氏酒精液、亚硫酸水、Ehrlieh苏木精、95％乙醇、Carnoy固定液(甲醇：冰醋酸=3:1，体积比)

**四、实验步骤**

细胞的组织化学方法，是研究细胞成分常用的方法之一。它是利用化学试剂与细胞内的某些物质进行化学反应，从而在细胞局部形成有色沉淀物，再通过显微镜对组织内的生物化学成分进行定性、定位、定量研究。

㈠、Brachet反应一显示细胞内的DNA和RNA

l．接种Hela细胞于盖片上并培养24～48小时，使长成单层。

2．取出盖片，用PBS(pH7.2)轻轻冲洗盖片表面去除残渣。

3．放入Carnoy固定液中固定l小时。

4．浸入甲基绿一呱咯宁醋酸缓冲液中30分钟染色。

5．取出盖片放入蒸馏水中轻轻漂洗2～3次(2～3秒钟左右)，吸去水分。放入纯丙酮中分色2～3秒钟。

6. 放入l／2丙酮+1／2二甲苯中5秒钟。

7．放入纯二甲苯中透明5分钟。

8．滴一滴中性树胶于载玻片上，将盖片标本面朝下封片。

9．镜下观察

10．结果：细胞质被染成浅红色，细胞核被染成蓝绿色，而其中核仁被染成紫红色（参照照片）。

㈡、细胞内碱性蛋白和酸性蛋白的显示

1．以破坏脊髓法处死牛蛙，将其腹面向上放人蜡盘中，剪开胸腔，打开心包。小心将心脏剪一小口，取心脏血一滴滴在干净载玻片一端，推片，按此法制备二张血涂片，室温晾干。

2. 将涂片作好标记放在70％乙醇中固定5分钟，室温晾干。

3．放入5％三氯醋酸中60℃30分钟，抽提出核酸。

4．清水冲洗多次（3分钟以上），以冲去痕迹的三氯醋酸。

5．滤纸吸干玻片上水分。

6. 一张片放入0.1％碱性固绿(pH8.0～8.5)中染色10～15分钟,另一张片放入0.1％酸性固绿(pH2.0～2.5)染色5～10分钟。

7．清水冲洗，盖上盖片镜检。

8．结果：经碱性固绿染色片中，胞质、核仁不着色，细胞核大部分被染成绿色，是为碱性蛋白质存在处（参照照片）。经酸性固绿染色片中，因胞质和核仁中有酸性蛋白，被染成绿色。

㈢、细胞内过氧化物酶的显示

1．取小鼠一只，以颈椎脱位法将其处死，迅速剖开其后肢暴露出股骨，将股骨一端斜向剪断，用PBS缓冲液湿润过的注射器针头吸出骨髓一滴滴到载玻片上。

2．推片，室温晾干。

3．将涂片放入0.5％硫酸铜中浸30秒~1分钟。

4．取出涂片直接放入联苯胺混合液中反应6分钟。

5．清水冲洗，放入1％番红溶液中复染2分钟。

6．清水冲洗，室温晾干。

7．镜检或封片后镜检。

8．结果：涂片中可见一些细胞中存在着蓝色或棕色颗粒，为过氧化物酶所在位置。

㈣、过碘酸雪夫反应(PAS)—显示细胞内糖原

l．取l~2mm厚的肝组织块，用Carnoy氏液4℃固定4～6小时。

2．乙醇脱水、二甲苯透明。石蜡包埋，切片。

3．用70％乙醇展片。

4．脱蜡：二甲苯(1)5分钟→二甲苯(2)5分钟→100％乙醇5分钟→含1％火棉胶的乙醇液1分钟→70％乙醇1分钟。

5．直接浸入过碘酸酒精液反应5～15分钟，经70％乙醇洗片刻。

6．浸入Schiff氏酒精液反应15分钟。

7．亚硫酸水洗三次，以洗去多余的非特异性结合的色素，以及扩散的染料。

8．流水冲洗3～5分钟。

9．蒸馏水洗。

10．浸入Ehrlich苏木精复染20~30秒，使细胞核着色。

11．脱水：95％乙醇3分钟二次→100％乙醇3分钟二次→二甲苯透明10分钟二次。

12．加盖片镜检或树胶封固后镜检。

13．结果：细胞中呈紫红的颗粒即为糖原。

**五、实验结果与作业**

1．每组可以从上述试验内容种选择两组实验

2．写出操作过程和染色、显色观测对象

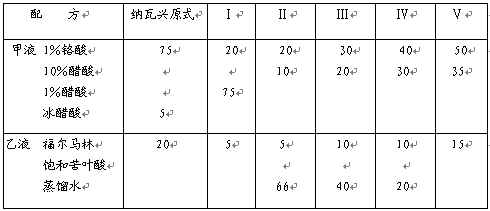
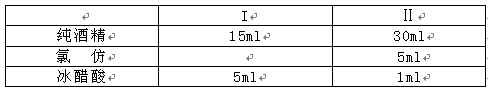
3．绘出观测的形状结构

**实验十 石蜡组织切片**

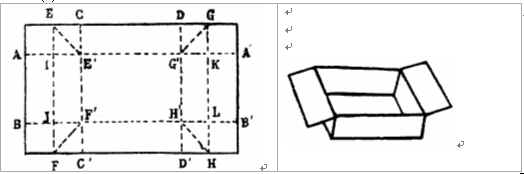
**一、实验目的和要求**  
熟练掌握石蜡切片的方法；掌握永久制片的制作过程，为研究植物的内部结构奠定基础；学会植物内部结构的比较研究方法。  
**二、实验原理**

切片玻片标本的一种。供光学显微镜或电子显微镜观察的动植物组织薄片。因要求不同，可用刀片进行徒手切片，也可将组织块包埋于石蜡或火棉胶中或以低温冰冻，用切片机切片。切成5～10微米薄片，供光学显微镜观察。用环氧树脂或甲基丙烯酸包埋组织块切制的超薄切片，其厚度在20～50纳米，专供在电子显微镜下观察。一般教学用的如根尖、茎的切片通称石蜡切片。

**三、实验器具与试剂**  
1．器具  
石蜡切片机、烘箱、显微镜、染色缸、小培养皿、镊子、毛笔、吸水纸、纱布、载玻片、盖玻片等。w  
2．试剂  
10%番红水溶液、0.5%固绿（用95%的酒精配制）、酒精（100%、95%、80%、70%、50%）、二甲苯、蒸馏水、甘油、中性树胶等。  
3．实验材料  
幼嫩植物各部分，根据季节选择材料。  
**四、实验步骤**  
石蜡切片法是显微技术上最重要、最常用的一种方法。它是把材料封埋在石蜡里面，用旋转切片机切片，可以切出很薄的切片。凡是精细的工结构，大都用石蜡切片。全都过程如下：  
1．固定 2．洗涤 3．脱水与硬化 4．脱酒精 2．封埋 6．切片7．粘片 8．脱蜡 9．染色 10．脱水 11. 透明 12．胶封  
（一）固定  
1．固定的意义：固定就是用药品把细胞杀死，使细胞的原生质凝固，死后不发生变化，尽可能保持原来的结构以供我们观察。良好的固定剂，应是穿透力强，使细胞立刻致死，原生质全部凝固；不发生任何变形，增强折光率，并且不妨碍染色。  
2．固定液的种类：固定液的种类很多，根据配制成分可划分为：  
(1) 简单固定液：以一种化学药品配制的固定液。常用的简单固定液有：  
A．酒精即乙醇，用作固定液，常用纯酒精或95％酒精。酒精穿透力强，固定时间常在1小时以内。高浓度酒精有使材料收缩的作用。70％的酒精可作保存液。配制低度酒精必需要用普通酒精即95％的酒精，绝不可用纯酒精。酒精为还原剂，不能与铬酸、锇酸、重铬酸钾等氧化剂配合。酒精可使核酸，蛋白质及肝醣等发生沉淀，但能溶解脂肪及拟脂。  
B．福尔马林即甲醛，具强烈刺激性的气味，纯净的甲醛，为无色透明液体。固定用的浓度为4-10％甲醛也是强还原剂。不能与铬酸、锇酸等氧化剂配合。经固定后，材料变硬，通常不引起皱缩，但随后经过他种药剂处理时，就每每出现皱缩。所以甲醛一般不单独作固定，而与其他液体混合使用。  
C．醋酸：为无色透明的液体，刺激性极强，冷则凝结成冰，故又叫冰醋酸。醋酸以与水和酒精配成各种比例的溶液，所用浓度为0.2～5％，也常与其他固定剂配合使用。醋酸穿透性很强，单独使用，有使原生质膨胀的作用，故常与酒精，甲醛等合用，醋酸为固定染色体的优良固定液，因此固定染色体的固定液中，几乎都含有醋酸。  
(2) 混合固定液：由几种药剂，适量配制而成。常用的有下列几种：  
A、F.A.A固定液(又称万能固定液)：  
[用途]这个固定液在植物研究上，应用最多，为植物组织最常用的固定液。固定时间，不受限制，短为24小时，长可延至数月或数年。野外工作，非常便利。并且固定的材料，不妨碍染色，但对染色体的固定不佳。材料固定后，用50％酒精洗涤数次。  
[配法]  
50％或70％酒精 90毫升、冰醋酸 5毫升、福尔马林 5毫升、柔软材料用50％酒精，坚硬材料用70％酒精配制。  
B、卡尔诺氏(Carnoy's)固定液  
[用途]此液作组织细胞的固定，有极快的渗透力，固定根尖和花药只需40-60分钟。固定后用95％酒精冲洗，在组织不能立即处理时，需转入70％酒精中保存。配法有两种：   
C．纳瓦兴(Navaschjn's)固定液  
[用途]此液在植物制片上应用甚广，是细胞学及组织学上一种优良的固定液。此液原来的配方已很少应用，现所用的都是改良液，且种类很多，如材料较柔嫩，含水量较多，可用配方I、Ⅱ；材料较坚硬，含水量较少，可用Ⅳ、V 配方，其中配方Ⅱ对植物胚胎学制片特别适用。为了使用方便，常分别配成甲、乙两种基液，用时临时等量配合。固定时间为12-24小时，固定后用70％酒精洗涤数次。  
(二)洗涤  
材料固定后，药剂继续留在组织中，易使组织破坏，必须用水或酒精洗去。用什么去洗，可根据三条原则：   
1．凡用水溶液配制的固定液，特别是含有铬酸、重铬酸钾的固定液，一律用水洗。  
2．凡用酒精配制的固定液，一律用同浓度的酒清洗。  
3．如固定液中含有苦味酸．在70％酒清中停留稍久时，可除去黄色。如用升汞固定的材料，在洗涤时，须加碘液，可除去汞的结晶。

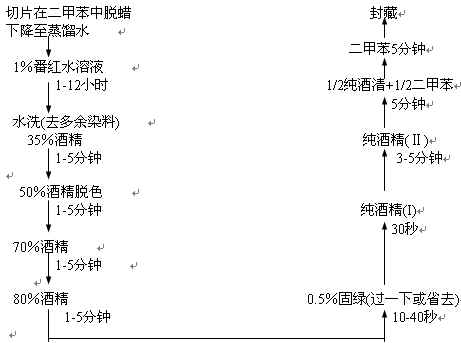


（三）脱水与硬化  
材料洗涤后，其中含水，水与石蜡不能混合，必须洗去。去水用酒精，材料由水入酒精中，不能操之过急，须由低度酒精渐至高度酒精。通常由30％、50％、70％、80％、90％，每次须经半小时，材料大的，时间须延长。若暂时不能埋蜡、材料可放在70％酒精中保存，经久不坏。在高度酒精中，不能过久．因酒精能使材料硬化，过久则材料由硬而脆，切时易于粉碎。  
（四）脱酒精;  
材料脱水后，材料中全含酒精，酒精与蜡也不能混合，仍须除去。脱酒精通常用二甲苯，材料由酒精入二甲苯，最好也渐次进行，先经纯酒精二甲苯混合液，再入纯二甲苯中，纯二甲苯须换一、二次才行。时间每次约半小时。二甲苯不仅脱去酒精，并且透明，所以又叫透明剂。  
（五）埋蜡   
埋蜡是把材料封埋在石蜡里面，便于切片。一方面材料太小太软封在石蜡中，石蜡硬度适中，靠石蜡支持，才能切成薄片。另一方面，材料封埋后，不仅材料外面包着蜡，材料内面所有空隙也都充满着蜡。这样，材料的各部分都能保持原来的结构与位置，切片不致发生破裂或其他变形。  
所用石蜡，质地必须纯净，溶点通常在48～56℃这个范围内，以52℃的石蜡用得更多。在材料不硬，天气不热时，宜用较低熔点的蜡。材料硬，天气热的情形下，宜用高溶点的蜡。  
石蜡选定后，将石蜡切成小块，置瓷皿中加热溶蜡，待石蜡近于全部熔化时，置于温箱中。在进行封埋的全部过程中，石蜡的温度，总以高于溶点2℃为宜，过低石蜡凝固，过高伤害材料。  
材料脱酒精后，要进行浸蜡，再进行埋蜡。浸蜡也宜于渐次进行，一般先用石蜡和二甲苯的混合液浸蜡，再用纯石蜡换一、二次，每次的时间，视材料大小而定，通常每次半小时，材料大，时间必须加长。在浸蜡的过程中，须注意温度，不能超过2℃以上。浸蜡后，须将材料封埋在蜡块中，通常以磅纸折成纸盒(如图所示)。在盒内底上，用软铅笔反书材料及日期等，然后把蜡倒入盒内，将材料移入纸盒中，依将所要切的方向，妥善排列，再以两手平持纸盒，移至冷水中，用口在蜡面上吹气，促其凝结，待蜡面凝成簿层时，将纸盒全部沉入。水冷凝后，将纸撕去，即获蜡块，至此埋蜡完成。  
折纸盒按下列顺序折叠：  
(1) 折AA'及BB'；  
(2) 折CC'及DD'；  
(3) 折CE'与AE'、向外夹出EE'。同样折出FF'，GG'及HH'；  
(4) 使CE'E与E'IE两三角形相叠，并沿E'C和EI重叠的折痕向后转折。同样折其余三只角；  
(5)折RIJF向外，同样折出GKLH，即折成所需的纸盒。  
（六）切片  
石蜡切片，用旋转切片机。一个旋转切片机，可分三个部分，一个是安装切片刀的部分，有调节刀片斜度和固着刀片的螺旋。一个是安装材料的部分，也有螺旋可以调节材料的位置。另一个是操纵在旋转中向前推进的部分，控制着切片的厚薄，是比较重要而复杂的部分。  
切片步骤：



1．先将冷凝的蜡块，切成小块，粘固在小木头上。

2．安装切片刀，刀的斜度，非常重要，最好先切除的蜡块试刀，以确定刀的斜度，一经调度适合后，就不要随便变动，以免每次试刀的麻烦。  
3．修整蜡块，刀片斜度调好后，将刀片移近蜡块，使小蜡块的下边与刀锋平行，然后把它固定，再转下蜡块．呈矩形才行。只有平整的蜡块，才能切出平整的蜡带。  
4．最后根据需要，调整控制切片厚度的机制。调度后，把它固定下来。上述四步骤完成后，就可进行切片，将切出的蜡带，平展于盒内以供粘片。  
（七）粘片  
材料切成薄片后，须将切片粘在玻璃片上，加热展开，这叫粘片。所用载玻片必须清洁才能使用。粘片时，需把胶液(或称粘贴剂)置簿玻片上，再取切片，浮置胶液上，然后置烘片台上，使切片展开烫平，材料不现皱纹为度。最后将切片依次排好，用滤纸吸去多余水分，同时以记号笔在玻片上编号，放入温箱中烘干，温度30～40℃约1小时即干。常用的胶液有下列三种：   
(1) 明胶液：这是粘片最常用的胶液，简便优良，配法是100毫升纯水中，加明胶4毫克，加热熔化，过滤即得。  
(2) 梅氏蛋白质：   
鸡蛋清、甘 油、水杨酸纳  
用蛋白与甘油搅拌，同时加入水杨酸纳，调匀过滤，应用时以滤液15滴，放入纯水50毫升中即得。  
(3) Land氏液：   
阿拉伯胶 1克、重铬酸钾 0.2克、纯 水 100毫升  
（八）脱蜡  
玻片烘干后，须将蜡脱去，才能染色，脱蜡用二甲苯，再经酒精入水中，而后染色，其顺序如下：  
二甲苯→1/2 二甲苯十1/2纯酒精→100%酒精→95％酒精→85％酒精→70％酒精→50％酒精→30％酒精→水→染色  
以上各级约需5～10分钟。  
（九）染色  
染色的方法很多，视研究目的加以选择。现就研究植物组织和研究细胞分裂常用的两种染色方法介绍如下：  
1．番红与固绿色法  
番红用l％的水溶液，固绿用0.5％的酒精液(用95％的酒精配制)，染色步骤如下：   
讨论和注意点：  
(1) 用番红和固绿这个组合染成的切片，木化、栓化和角质的细胞壁，被番红染成鲜红色，纤维素的细胞璧，被固绿成绿色。就维管束来讲，木质部染红，韧皮部染绿，区别极清楚。  
(2) 在50％酒精中脱色，需经实践，如脱色不够，绿色难得染好，脱色太过分，做出来的切片，红色太淡，甚至于全是绿色，失掉了二色染法的用意。   
(3) 染色时间，不是绝对的，常因材料种类，切片的厚簿而不同，在没有把握时，最好选用少数材料试染试染成功后，再依次大批染色。  
2．海氏铁矾—苏木精染色法：  
海氏铁矾—苏木精染色法的特点，是在染苏木精以前，用铁明矾做媒染剂，在染苏木精以后，又用铁明矾液鉴定(脱色或分色)。  
所用铁明矾液，为2～4％的水溶液，此液须在用前数日临时配制。配成后不能见光，须置暗处，或用有色玻瓶装。也不能保存太久，大约二月内可用，用时，每次更换。  
所用苏木精液，为0.5％的水溶液。此液配成后，须经1～2月，待它氧化成熟以后才能应用，故必须先配制。苏木精在水中溶解很慢，约需10日才能完全溶解，若需用不急，可直接用蒸馏水配制。若想加速溶解，可先用酒精溶解，再加入蒸馏水。  
苏木精 0.5克、酒 精 10毫升  
蒸馏水 90毫升  
染色步骤如下：  
此染色法在细胞学及胚胎学制片上应用很广，是显示细胞一般结构及细胞分裂的优良染色液，染色结果可使染色体呈兰黑一—紫色，细胞质染成浅兰色或浅灰色。在染色过程中所需注意的是：① 分色后，用水洗净铁矾液，最好用流水，如无流水，须多更换水。若冲洗不净，将来继续褪色。② 在铁矾液中分色，须时常取出在显微镜下检查，到细胞质的染色很淡即止。  
（十）脱水、透明、胶封  
脱水用酒精，由低浓度酒精至高浓度酒精依次进行，最后入纯酒精更换一次，用二甲苯透明，用树胶封片，其步骤与前面所述永久制片相同。



**五、实验结果与作业**

1．将制作完成的切片样上交给实验指导教师；

2．记录是否制得完整的组织器官切片，你对上述步骤操作的体会如何？

**《分子生物学与基因工程原理实验》指导书**

**实验1 总RNA的分离鉴定**

**（4学时）**

**一、目的要求**

1. 学习总 RNA分离和鉴定的原理和方法。

2. 掌握总 RNA分离和鉴定的操作技术。

3．本实验综合了RNA的分离、分光光度法及琼脂糖凝胶电泳法鉴定RNA等知识点。

**二、原理**

RNA 是基因表达的中间产物, 同时也是RNA病毒的遗传物质,对RNA进行操作在分子生物学中占有重要地位。很多分子生物学实验如 Northern 杂交、 cDNA 合成及体外翻译等的成败,在很大程度上取决于RNA的质量。完整和均一是评价 RNA质量的两个最关键标准。要获得完整 RNA 取决于能否最低限度地避免操作 过程中内源及外源性 RNase〈核糖核酸酶〉对RNA的降解。要获得均一的 RNA 取决于能否有效去除 RNA 提取中的 DNA 和蛋白质。因为 RNase 非常稳定 , 因此 提取过程中必须在无RNase的环境中进行,可使用RNase抑制剂,操作时要戴口 罩和手套, 尽量避免 RNase 的污染。

二乙基焦碳酸酶 (DEPC) 是 RNase 的强抑制剂, 常用来抑制外源的 RNase活性。所有玻璃器皿要高温(160℃~180℃ )长时间烘烤, 所有试剂及塑料器皿 须用 DEPC处理,以除去外源RNase。提取缓冲液中一般含SDS、酚、氯仿、胍盐等蛋白质变性剂,也能抑制RNase活性,并有助于除去非核酸成分。并且要求操作在4℃低温下进行。

Trizol法适用于人类、动物、植物、微生物的组织或培养细菌,样品量从几十毫克至几克。用Trizol法提取的总RNA绝无蛋白和DNA污染。RNA可直接用于Northern斑点分析,斑点杂交, Poly(A)+分离,体外翻译,RNase封阻分析和分子克隆。

**三、试剂和器材**

1、材料   
小鼠肝组织。

2、仪器设备   
研磨器,冷冻台式高速离心机,低温冰箱,冷冻真空干燥器,紫外检测仪,电泳仪,电泳槽。

3、试剂

1. Trizol
2. 氯仿
3. 异丙醇
4. 75%乙醇：用DEPC处理水配制75%乙醇,（用高温灭菌器皿配制）,然后装入高温烘烤的玻璃瓶中,存放于低温冰箱。
5. 0.1% DEPC水

100Oml蒸馏水加1mlDEPC混匀,37 ℃温育过夜后高压灭菌20分钟。配制试剂均用焦碳酸二乙酶(DEPC)处理过的去离子水,配制后4℃ 保存。

1. TE Buffer

0.121g Tris,0.0372g EDTA-Na2 溶于80ml水中, 定容至l00ml 。

1. PBS

在 80Oml 蒸馏水中溶解 8g NaC1 、 0.2g kC1 、 1.44g Na2HP04 和 0.24g KH2P04, 用HCl调节溶液是PH值至7.4,加水定容至1L, 在151bf/in2(1.034x105Pa) 的高压下蒸气灭菌 20 分钟,保存于室温。

1. 1.2% 琼脂糖
2. TAE凝胶电泳缓冲液
3. 上样缓冲液
4. 溴乙锭 (EB 〉染色贮存液(1mg/ml)

**五、操作步骤**

1．RNA的分离

1. 取50-100mg的组织，加入1ml Trizol液研磨。
2. 研磨液室温放置5分钟,然后以每1mlTrizol液加入0.2ml的比例加入氯仿,盖紧离心管,用手剧烈摇荡离心管15秒。
3. 12000g 4℃离心10分钟，取上层水相于一新的离心管,按每ml Trizol液加0.5ml异丙醇的比例加入异丙醇。冰上放置10分钟,12000g 4℃离心10分钟。
4. 弃去上清液,按每ml Trizol液加入至少1ml的比例加入75%乙醇,涡旋混匀,4℃下7500g离心5分钟。
5. 小心弃去上清液,然后室温或真空干燥5-10分钟,注意不要干燥过分,否则会降低RNA的溶解度。然后将RNA溶于水中,必要时可55℃-60℃水溶 10分钟。RNA可进行mRNA分离,或贮存于70%乙醇并保存于-70℃。

2、分光光度法测定 RNA 浓度

1. 开启紫外分光光度计,预热稳定30分钟。
2. 用TE对RNA作30倍－50倍的稀释,进行比色。
3. 读取260mn,280mn的OD值。
4. 计算出浓度和OD比值。

RNA 浓度 (μg/ml)=OD260×40×稀释倍数

OD260/280 应为1.7－2.1。低于1.7,说明有蛋白或胍污染。

3、琼脂糖凝胶电泳检测

* 1. 凝胶制备(1.2% )。称取0.6g琼脂糖,加50 ml 0.1% DEPC水,加热熔化。冷却 至60℃, 在通风橱中加入两滴 EB, 混 匀后倒胶。以上为50毫升体系，可以按照比例进行相应调整。
  2. 样品制备。在15 ml离心管中,将RNA样品与上样缓冲液以5:l比例混匀。65℃温育 5分钟~10分钟,迅速在冰上冷却5分钟,瞬时离心数秒。
  3. 将样品加入上样孔。以 5-10V/cm 的电压电泳 0.5小时。
  4. 在紫外透射反射分析仪中观察结果。

**六、注意事项**

l. 二乙基焦碳酸酶有剧毒且具挥发性 , 带上手套在通风橱中才可开始操作。

2. 氯仿对皮肤、眼睛、粘膜以及呼吸道有剌激作用,应在通风橱中使用,戴上手 套和护自镜。氯仿是致癌物,对肝和肾有损伤作用。

3. 苯酚为强腐蚀剂,可导致严重灼伤,使用时必须穿戴防护衣和护目镜,所有操 作必须在通风橱中进行,所有与盼接触过的皮肤必须用大量水或聚乙二醇400冲 洗,也可用香皂水冲洗,禁用乙醇。

4. 澳化乙绽是诱变剂, 配制和使用时应戴乳胶手套,并且不要将该溶液洒在地面或 桌面上。凡是沾染过 EB 的器皿或物品, 必须经专门处理后 , 才能进行清洗或弃去。

5．整个操作要带口罩及一次性手套,并尽可能在低温下操作。加氯仿前的匀浆液可在-70℃保存一个月以上,RNA沉淀在70%乙醇中可在4℃保存一周,-20℃保存一年。

1. **实验记录和报告**

实验名称; 实验日期; 实验学生; 指导教师; 实验记录；实验结果与讨论

**实验2 PCR法扩增基因DNA片段**

**（4学时）**

**一、实验目的和要求**

1. 学习聚合酶链式反应(PCR)扩增的原理和方法。

2. 掌握聚合酶链式反应(PCR)扩增的操作技术。

**二、实验原理**

1． PCR的原理

多聚酶链式反应（polymerase chain reaction , PCR）的原理类似于DNA的天然复制过程。在待扩增的DNA片段两侧和与其两侧互补的两个寡核苷酸引物，经变性、退火和延伸若干个循环后，DNA扩增2n倍。

**(1) 变性**：加热使模板DNA在高温下（94℃）变性，双链间的氢键断裂而形成两条单链，即变性阶段。

**(2) 退火**：使溶液温度降至50~60℃，模板DNA与引物按碱基配对原则互补结合，即退火阶段。

**(3) 延伸**：溶液反应温度升至72℃，耐热DNA聚合酶以单链DNA为模板，在引物的引导下，利用反应混合物中的4种脱氧核苷三磷酸（dNTP），按5′→3′方向复制出互补DNA，即引物的延伸阶段。

上述3步为一个循环，即高温变性、低温退火、中温延伸3个阶段。从理论上讲，每经过一个循环，样本中的DNA量应该增加一倍，新形成的链又可成为新一轮循环的模板，经过25~30个循环后DNA可扩增106~109倍。

2、PCR反应体系的主要成份

典型的PCR反应体系由如下组分组成：DNA模板、反应缓冲液、dNTP、Mg2+、两个合成的DNA引物、耐热Taq聚合酶。

（1）DNA引物

PCR反应产物的特异性由一对上下游引物所决定。引物的好坏往往是PCR成败的关键。引物设计和选择目的DNA序列区域时可遵循下列原则：(1) 引物长度约为16-30bp, 太短会降低退火温度影响引物与模板配对,从而使非特异性增高。太长则比较浪费,且难以合成。(2) 引物中G+C含量通常为40%-60%,可按下式粗略估计引物的解链温度 Tm＝4(G+C)+2(A+T)。(3) 四种碱基应随机分布,在3'端不存在连续3个G或C,因这样易导致错误引发。(4) 引物3'端最好与目的序列阅读框架中密码子第一或第二位核苷酸对应, 以减少由于密码子摆动产生的不配对。(5) 在引物内, 尤其在3'端应不存在二级结构。(6) 两引物之间尤其在3'端不能互补, 以防出现引物二聚体, 减少产量。两引物间最好不存在4个连续碱基的同源性或互补性。(7) 引物5'端对扩增特异性影响不大, 可在引物设计时加上限制酶位点、核糖 体结合位点、起始密码子、缺失或插入突变位点以及标记生物素、荧光素、地高辛等. 通常应在5'端限制酶位点外再加1-2个保护碱基。(8) 引物不与模板结合位点以外的序列互补。所扩增产物本身无稳定的二级结构, 以免产生非特异性扩增,影响产量。 (9) 简并引物应选用简并程度低的密码子, 例如选用只有一种密码子的Met, 3'端应不存在简并性。否则可能由于产量低而看不见扩增产物。

一般PCR反应中的引物终浓度为0.2-1.0μmol/L。引物过多会产生错误引导或产生引物二聚体, 过低则降低产量。

（2） Mg2+：

Mg2+浓度对Taq DNA聚合酶影响很大,它可影响酶的活性和真实性,影响引物退火和解链温度, 影响产物的特异性以及引物二聚体的形成等。通常Mg2+ 浓度范围为0.5-2mmol/L.对于一种新的PCR反应,可以用0.1-5mmol/L的递增浓度的Mg2+ 进行预备实验,选出最适的Mg2+浓度。在PCR反应混合物中, 应尽量减少有高浓度的带负电荷的基团, 例如磷酸基团或EDTA等可能影响Mg2+ 离子浓度的物质,以保证最适Mg2+ 浓度。

（3） 模板：

PCR反应必须以DNA为模板进行扩增, 模板DNA可以是单链分子,也可以是双链分子,可以是线状分子,也可以是环状分子(线状分子比环状分子的扩增效果稍好).就模板DNA而言,影响PCR的主要因素是模板的数量和纯度.一般反应中的模板数量为102 -105 个拷贝,对于单拷贝基因,这需要0.1μg的人基因组DNA,10ng的酵母DNA,1ng的大肠杆菌DNA.扩增多拷贝序列时,用量更少.灵敏的PCR可从一个细胞,一根头发,一个孢子或一个精子提取的DNA中分析目的序列.模板量过多则可能增加非特异性产物.DNA中的杂质也会影响PCR的效率。

（4） Taq聚合酶

一般Taq DNA聚合酶活性半衰期为92.5℃ 130min,95℃ 40min, 97℃ 5min.现在人们又发现许多新的耐热的DNA聚合酶,这些酶的活性在高温下活性可维持更长时间。Taq DNA聚合酶的酶活性单位定义为74℃下,30min,掺入10nmol/L dNTP到核酸中所需的酶量。Taq DNA聚合酶的一个致命弱点是它的出错率,一般PCR中出错率为2×10-4 核苷酸/每轮循环,在利用PCR克隆和进行序列分析时尤应注意.在100μl PCR反应中,1.5-2单位的Taq DNA聚合酶就足以进行30轮循环.所用的酶量可根据DNA、引物及其它因素的变化进行适当的增减。酶量过多会使产物非特异性增加,过少则使产量降低。

（5） 反应缓冲液：

反应缓冲液一般含10-50mmol/L Tris·Cl (20℃下pH8.3-8.8), 50mmol/L KCl和适当浓度的Mg2+ . Tris·Cl在20℃时pH为8.3-8.8,但在实际PCR反应中,pH为6.8-7.8. 50mmol/L的KCl有利于引物的退火.另外,反应液可加入5mmol/L的二硫苏糖醇(DDT)或100μg/ml的牛血清白蛋白(BSA),它们可稳定酶活性,另外加入T4噬菌体的基因32蛋白则对扩增较长的DNA片段有利.各种Taq DNA聚合酶商品都有自己特定的一些缓冲液。

**三、材料、设备及试剂**

* 1. **仪器**

1. PCR热循环仪
2. 琼脂糖凝胶电泳系统
3. 凝胶成像系统
   1. **材料**
4. DNA模板
5. 4种dNTP
6. 引物1、引物2
7. Taq酶
8. 琼脂糖
9. DNA相对分子质量标准物
10. 吸头、小指管
    1. **试剂**
11. 10×缓冲液

500mmol/l KCl

100mmol/l Tris·HCl(pH8.3 ,室温)

15mmol/l MgCl2

0.1% 明胶

2、 4×dNTP

2.5 mmol/l dATP

2.5 mmol/l dCTP

2.5 mmol/l dGTP

2.5 mmol/l dTTP

3、 Taq酶 1U/μL

4、 DNA模板 1ng/μL

5、 引物1和引物2，引物溶液浓度 10pmol/μl

6、 TAE: 50×:242g Tris 碱

57.1ml 冰乙酸

100ml 0.5mol/L EDTA(PH8.0)

**四、实验步骤**

1. 在0.5ml Eppendorf管内配制25μL反应体系：

10×buffer 2.5μL

dNTP（2.5mM） 2.0μL

引物1（10uM） 1.0μL

引物2（10uM） 1.0μL

Taq酶（2U/ul） 0.3μL

Template DNA 1.0μL

ddH2O 17.2μL

总体积 25μL

若PCR仪具有热盖，则不需要添加矿物油；若PCR仪不具有热盖，则需要添加矿物油，保证反应体系的体积不会因为蒸发而改变。

1. 按下列程序进行扩增：

①、94℃预变性 5min

②、94℃变性 1min

③、55℃退火 1min

④、72℃延伸 1.5 min

⑤、重复步骤②~④共30循环；

⑥、72℃延伸 10min

降温至室温或4℃保存

1. 琼脂糖凝胶电泳分析PCR结果

配制1%琼脂糖凝胶，取5μL扩增产物电泳。保持电流40mA。电泳结束后，紫外灯下观察结果。

**五 实验安排**

本实验半天内可完成，3小时进行PCR反应，1小时进行电泳检测。

**六 实验记录和报告**

实验名称; 实验日期; 实验学生; 指导教师; 实验记录；实验结果与讨论

**实验3 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化**

**（8学时）**

**一、实验目的和要求**

1 通过本实验，掌握大肠杆菌感受态细胞的制备原理与方法

2 掌握DNA转化的方法及技术

3 初步学习阳性克隆鉴定方法

**二、实验原理**

细菌处于容易吸收外源DNA的状态称作感受态。细菌的转化是指质粒DNA或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。检测感受态细胞制备的效率的方法是进行DNA转化，根据DNA量（比如1ug）与阳性克隆的数量（比如103个克隆）进行计算，得出转化效率值（比如103/ug）；效率值越高，说明感受态的制备效果越好。商业上可以购买的化学转化法大肠杆菌超级感受态与高级感受态的转化效率可以高达108/ug~109/ug，而我们日常使用的化学转化法感受态效率约为105~106/ug。

常用的细菌转化方法有电激转化法和热激转化法。电激转化法的原理是利用高的电压脉冲（比如2500V 25uF），导致细菌的细胞壁与细胞膜被电流击穿，使质粒DNA能够进入细菌内部。电激转化法简单高效，但需要昂贵的仪器与耗材，所以一般情况下使用不多。热激转化法的原理是细菌处于0℃，CaCl2低渗溶液中，菌细胞膨胀成球形。转化混合物中的DNA形成抗DNA酶的羟基-钙磷酸复合物粘附于细胞表面，经42℃短时间热击处理，促进细胞吸收DNA复合物。将细菌放置在非选择性培养基中保温一段时间，促使在转化过程中获得的新的表型（如Ampr等）得到表达，然后将此细菌培养物涂在含有氨苄青霉素的选择性培养基上进行筛选。

**三、材料、设备及试剂**

* 1. **仪器**

1. 超净工作台
2. 低温离心机
3. 恒温摇床
4. 恒温箱
5. 恒温水浴器
   1. **材料**
6. 氯化钙（CaCl2）
7. 胰蛋白胨
8. 酵母提取液
9. 氯化钠（NaCl）
10. 氨苄青霉素
11. 大肠杆菌DH5α
12. pUC19质粒
13. Eppendorf管
14. 吸头、小指管

10、试管、培养皿、锥形瓶等

* 1. **试剂**
     1. 1mol/l CaCl2溶液（高压灭菌）
     2. LB液体培养基

配制每升培养基，应在950ml去离子水中加入：

胰蛋白胨（bacto-typtone） 10g

酵母提取液（bacto-yeast extract） 5g

NaCl 10g

摇动容器直至溶质完全溶解，用NaOH调节pH至7.0，加入去离子水至总体积为1L，121℃湿热灭菌20 min。

* + 1. 氨苄青霉素（Amp），用无菌水配制成100mg/ml溶液，置-20℃冰箱保存。
    2. LB固体培养基1000ml加15g琼脂。

**四、实验步骤**

1. 从大肠杆菌DH5α平板上挑取一个单菌落接于2mL LB液体培养基的试管中，37℃振荡培养过夜。

2. 取0.5ml菌液转接到一个含有50ml LB液体培养基锥形瓶中，37℃振荡培养2~3 h。（此时，*OD*600≤0.4~0.5，细胞数务必<108/ml，此为实验成功的关键）。

3. 吸菌液1.5 ml加入Eppendorf 管，4℃，10,000rpm离心15sec回收细胞。

4.用冰预冷的0.1mol/l CaCl2 500μL悬浮沉淀。

5.再4℃，离心15 sec（10000rpm），回收细胞。

6.再用冰预冷的0.1mol/l CaCl2 60μL重悬沉淀。

7. 此细胞为感受态细胞。在4℃下可保存2周（2~4 d时，转化效率最高）。

8.同时做两个对照管：

受体菌对照：60μL 感受态细胞 + 2μL 无菌水

质粒对照： 60μL 感受态细胞 + 2μL 质粒DNA溶液

9. 将管放到42℃循环水浴60秒。

10. 冰浴2min。

11. 每管加800μL LB液体培养基，37℃培养1 h（慢摇，约为100-150转/分钟）。

12. 将适当体积（200μL）已转化的感受态细胞，涂在含有氨苄青霉素的培养皿中。

13.倒置平皿37℃培养12~16 h，观察细菌生长情况，统计阳性克隆数量，计算感受态的转化效率。

**五 实验安排**

本实验第一天制备感受态细胞和转化，第二天来观察结果。

**六 实验记录和报告**

实验名称; 实验日期; 实验学生; 指导教师; 实验记录；实验结果与讨论

**实验4 质粒DNA提取**

**（4学时）**

**一、实验目的和要求**

**1 掌握质粒DNA提取的原理**

**2 掌握质粒DNA提取的具体方法**

**二、实验原理**

质粒DNA是细菌[细胞](http://www.seekbio.com/search1.asp?k=细胞)中小的共价闭合环状双链DNA。由于[基因](http://www.seekbio.com/search1.asp?k=基因)工程中使用的载体主要是质粒，因此，质粒DNA的提取和纯化是进行[基因](http://www.seekbio.com/search1.asp?k=基因)工程的重要前提。提取质粒DNA的方法很多，下面介绍几种有代表性的程序。碱提取法： 其基本原理是在溶菌酶和SDS破壁释放DNA后，在强碱条件下，DNA变性成单链，当加醋酸钠(NaAc)适当中和pH时，质粒DNA复性；而染色体DNA和大分子RNA仍为单链并与蛋白质-SDS复合物被高盐沉淀，质粒DNA留在溶液中。不需经酚氯仿抽提，即可直接用乙醇沉淀上请中的质粒DNA)。煮沸提取法： 此法快速简便，既可小规模检验也可大规模制备质粒DNA。其基本原理是在溶菌酶和Triton破壁释放DNA后，迅速煮沸，使Ch-DNA和蛋白质沉淀，质粒DNA留在溶液中。

琼脂糖凝胶电泳是分离，鉴定和纯化 DNA 片段的常规方法。利用低浓度的荧光嵌入染料 - 溴化乙锭进行染色，可确定 DNA 在凝胶中的位置。如有必要，还可以从凝胶中 回收 DNA 条带，用于各种克隆操作。琼脂糖凝胶的分辨能力要比聚丙烯酰胺凝胶低，但其分离范围较广。用各种浓度的琼脂糖凝胶可以分离长度为 200bp 至近 50kbp 的 DNA 。长度 100kb 或更大的 DNA ，可以通过电场方向呈周期性变化的脉冲电场凝胶电泳进行分离。

在基因工程的常规操作中，琼脂糖凝胶电泳应用最为广泛。它通常采用水平电泳装置，在强度和方向恒定的电场下进行电泳。 DNA 分子在凝胶缓冲液（一般为碱性）中带负电荷，在电场中由负极向正极迁移。 DNA 分子迁移的速率受分子大小，构象。电场强度和方向，碱基组成，温度和嵌入染料等因素的影响

**三、材料、设备及试剂**

**（1）仪器**

台式离心机、超净工作台、高压灭菌锅、恒温振荡培养箱、恒温水浴箱等。

Eppendorf 离心管， Tip 头，三角瓶等灭菌备用。

电泳仪，电泳槽，样品梳，微波炉，水浴锅，移液器（ 20ul, 200ul 和 1000ul ），离心管， Tips(200ul,1000ul)。

**（2）材料**

菌种：含 质粒DNA的大肠杆菌 JM109 菌株。

70% 乙醇（ -20 ℃）及无水乙醇（ -20 ℃）

样品缓冲液（ 6X ）

溴化乙锭 10mg/ml

琼脂糖（电泳级）

**（3）试剂**

溶液I（试剂盒自带）

50mM 葡萄糖， 10mM EDTA， 25mM Tris-HCl， pH=8.0

溶液II（试剂盒自带）

0.2M NaOH， 1% SDS

溶液III（试剂盒自带）

3M 醋酸钾， 2M 醋酸

LB培养基：配制每升培养基应在950ml去离子水中加入：

细菌培养用胰化蛋白胨 10g

细菌培养用酵母提取物 5g

NaCL 10g

摇动容器直到溶质完全溶解，用5mol/L(约0.2ml)调节pH值至7.0，加入去离子水至总体积为1L，在151bf/in2(1.034×105Pa)高压下蒸气灭菌20min。

**四、实验步骤**

1. 接单菌落到3ml LB培养基中，摇过夜
2. 取1.5ml菌液,12000g离心30s
3. 倒出菌液，将残余的液体吸净
4. 加250 μl 溶液1重悬均匀
5. 加250 μl溶液2，轻柔地颠倒混匀，静置1分钟，直到菌液由浑浊变澄清
6. 加350 μl溶液3，充分颠倒混匀，会出现白色絮状沉淀
7. 12000g，离心10min
8. 收集管与吸附柱配套装好，加入500微升平衡缓冲液，12000rpm离心1min
9. 将步骤7中上清液600微升转移至吸附柱中，静置1min后12000rpm离心1min
10. 加入蛋白溶解缓冲液500微升，静置1 min后12000rpm离心1min
11. 加入清洗缓冲液600微升，静置1 min后12000rpm离心1min；重复，共两次；去除收集管溶液后，12000rpm离心2min
12. 将吸附柱转移至干净的EP管中，打开盖子干燥5min，直到没有任何酒精
13. 加入20 到60μl ddH2O溶解
14. 取5μl电泳检测。

**五 实验安排**

本实验半天内可完成，3.5小时抽提质粒DNA，0.5小时电泳检测。

* 1. **实验记录和报告**

实验名称; 实验日期; 实验学生; 指导教师; 实验记录；实验结果与讨论

**实验5 质粒DNA酶切及回收DNA**

**（4学时）**

**一、实验目的和要求**

**1 掌握质粒DNA酶切原理和方法**

**2 掌握酶切产物回收DNA回收DNA**

**二、实验原理**

限制性内切酶是DNA操作过程中所使用的基本工具。限制酶特异性地结合于一段被称为限制酶识别序列的特殊DNA序列之内或其附近的特异位点上，并在此切割双链DNA。分子克隆中常用的为II类限制酶，其识别位点长度为4、5或6个核苷酸的反向重复序列。限制酶的切割点因酶而异，有些产生带平端的DNA片段，而另一些产生带有粘性末端的DNA。

在基因工程中， DNA分子的切割是由限制性内切酶来完成的。限制性内切酶能识别特定的 DNA 序列，在一定的条件下切断双链 DNA 。限制性内切酶的作用效率是受多方面因素影响的，如反应温度，缓冲体系，离子种类与浓度， DNA 的纯度和甲基化程度等。对 DNA 进行酶切时，首先要选择适合的缓冲液。对于单酶切，应选用该酶的最适缓冲液；对于双酶切或三酶切，应选用一种能使所有酶都充分作用的缓冲液。 DNA 的纯度对于酶切的效果的影响也很大，因为蛋白质。酚。氯仿。 SDS 等杂质都会抑制限制性内切酶的活性。因为以上原因的影响，质粒DNA的浓度与纯度，对基因工程载体构建具有非常大的影响。

**三、材料、设备及试剂**

**（1）仪器**

台式离心机、超净工作台、高压灭菌锅、恒温振荡培养箱、恒温水浴箱等。

Eppendorf 离心管， Tip 头，三角瓶等灭菌备用。

电泳仪，电泳槽，样品梳，微波炉，水浴锅，移液器（ 20ul, 200ul 和 1000ul ），离心管， Tips(200ul,1000ul) 。

**（2）材料**

微量移液器

离心机

恒温水浴箱

DNA回收柱

限制性内切酶

ddH2O

样品缓冲液（ 6X ）

溴化乙锭 10mg/ml

琼脂糖（电泳级）

**四、实验步骤**

1 按照下面配置反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×缓冲液 | . . 4 µl |
| 限制性内切酶 | .. 2µl |
| 质粒DNA | .. . 5 µl |
| 蒸馏水 | 29µl |
| 总量 | 40µl |

2 37 oC反应1.5 h；

3 1％琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。

4 在紫外灯下切下含有目的DNA片段的琼脂糖凝胶，放进1.5mlEP管里。

5 在EP管内加入400μl的凝胶融化剂混合后于50℃下加热，间断颠倒混合（每2～3分钟）直至胶完全融化。

6 将吸附柱加入平衡液500微升，12000rpm离心1min

7 将溶液降温至室温，吸取混合物，转移到吸附柱中，静置1min，12000rpm离心1min,弃滤液。

8 将吸附柱放回离心管中，加入洗脱液，12000rpm离心，30秒，弃滤液。重复操作，共两次。

9 将吸附柱置于洁净的1.5ml离心管中，在DNA制备膜中央加25－30μl 蒸馏水，静置1min，12000rpm离心1min，洗脱DNA。

10 制备1％琼脂糖凝胶电泳分析。

**五 实验安排**

本实验半天内可完成，2小时做酶切及电泳检测，2小时回收及电泳检测。

* 1. **实验记录和报告**

实验名称; 实验日期; 实验学生; 指导教师; 实验记录；实验结果与讨论

**《生物技术综合实验》**

**实验指导书**

**瞬时表达系统检测报告基因表达水平**

1. **实验目的**

了解瞬时表达系统的实验原理；熟悉并掌握烟草瞬时表达系统的实验操作环节；运用烟草瞬时表达系统，对某种程度上未知的实验材料进行研究判定。

1. **实验原理**

在生物学研究中经常需要将某种蛋白质进行表达，从而对其生物学功能进行研究。常用的方法有体内转基因方法（例如转基因小鼠与转基因水稻）和体外基因转录&蛋白质翻译方法（例如爪蟾卵母细胞体外翻译系统、麦芽胚体外翻译系统）。这两种方法各有优缺点，其中前一种方法耗时长、工作量大，后一种方法相对较为昂贵，于是科学家们建立了第三种方法：瞬时表达方法。

瞬时表达方法在动物中最常见的是利用各种细胞系（如hela细胞系）在PEG诱导下获取质粒DNA，进行目的基因快速短暂的表达；在植物中最为常见的是利用烟草注射、原生质体转染或者基因枪轰击，实现目的基因在植物中的瞬时表达，从而研究目的基因的生物学功能。瞬时表达方法的原理是使实验材料在短时间内获得大量的目的DNA，这些目的DNA里往往带有增强子/启动子、mRNA转录区和转录终止区。利用这些DNA作为转录模板，实现目的基因mRNA的高水平转录与蛋白质的高水平翻译。由于目的基因片段存在于细胞质中，不会进行后续的DNA复制，这些目的基因的表达水平会随着时间的延长而降低，所以该方法被称作瞬时表达。瞬时表达方法的优点是简便易行、费用低廉，缺点是实验结果的可靠性略低。瞬时表达条件下目的基因的检测，需要在短时间内进行；在烟草瞬时表达系统中，一般在根瘤农杆菌注射后24-72小时内进行目的基因表达水平检测。

1. **实验设计**

本次生物技术大实验一共分为三个小组。第一小组的实验目的是通过GFP融合蛋白分析某种蛋白质的亚细胞定位，实验材料为A与B，其中一种融合蛋白定位于细胞核内；另一种蛋白质定位于细胞核与细胞质内。第一小组的任务是通过烟草瞬时表达，分析实验材料A与实验材料B的亚细胞定位，从而根据它们亚细胞定位的不同，判断A与B究竟各编码哪一种蛋白质。

第二小组的实验目的是在表达C转录因子的同时，转化D或E启动子驱动下的GUS报告基因，通过GUS染色分析报告基因是否表达，从而判定C转录因子在烟草中是否能够启动D或E启动子下游基因的转录活性。

第三小组的实验目的是通过对注射根瘤农杆菌后烟草的生长情况，判断F报告基因DTa是否表达。目前已经知道F报告基因表达后抑制烟草的生长，如果F报告基因表达，会导致烟草部分叶片死亡；如果F报告基因不表达或者表达水平低，烟草叶片不会死亡。第三小组共有两种实验材料，分别为F报告基因和G报告基因（G报告基因对烟草生长没有明显影响）。第三小组通过实验来判断究竟哪种材料为F报告基因。

1. **实验步骤**
2. 利用大肠杆菌感受态，对A-G共7种报告质粒进行转化扩增（热激转化法）；转化成功后挑选阳性克隆，并扩增、提取相应质粒；
3. 制备根瘤农杆菌（GV3101）感受态（电击转化法，制备感受态共需要4天时间，具体操作步骤自行查询）；
4. 将目的质粒转化根瘤农杆菌（电击转化法，转化目的质粒共需要3天）；
5. 挑选目的质粒转化根瘤农杆菌的阳性克隆，转接带有相应抗生素的液体培养基，28℃培养过夜；
6. 带有目的质粒的根瘤农杆菌菌液转接带有相应抗生素的液体培养基，28℃培养至OD600在0.6-0.8；
7. 配制根瘤农杆菌注射缓冲液：

每50ml注射缓冲液内成分如下：

D-Glucose 250 mg

MES（0.5M母液） 5 ml

Na3PO4（20mM母液） 5 ml

乙酰丁香酮（1M母液，-20℃储存） 5 μL

去离子水 至总体积50ml

注：乙酰丁香酮药品应溶于N,N-二甲基甲酰胺；注射缓冲液需要现配现用；

1. 分别取一定体积的菌液，4000rpm离心10分钟，去上清，收集农杆菌菌体；
2. 吸取预先配制好的注射缓冲液各1ml，重悬菌体，4000rpm离心5分钟，去上清；共重复清洗两次；
3. 利用注射缓冲液将菌液终浓度调整至OD600为0.2；某些菌液进行组合，得到混合菌液；
4. 使用1ml无菌注射器，除去针头，将菌液注射入预先选好的烟草叶片背面，对注射区域进行标记；吸水纸吸除烟草叶片表面多余的菌液；
5. 待烟草继续生长一定时间，检测目的基因的表达；
6. 第一组：在注射烟草后36-60小时内，取烟草叶片，直接在荧光显微镜下观察并拍照；或者撕取烟草叶片的表皮，在荧光显微镜下观察并拍照；对不同的实验材料进行比较，判断何种实验材料为35S::ZAT6:GFP，何种实验材料为35S:: GFP；
7. 第二组：
8. 在注射烟草后36-60小时内，取烟草叶片，撕去烟草叶片的表皮，将烟草叶肉用90%丙酮固定10分钟；蒸馏水清洗两次；
9. 配制GUS染色缓冲液，每毫升染色缓冲液内含有以下成分：

NaPO4（Na2HPO4 0.057M；NaH2PO4，0.043M） 500μL

10% triton-X100 20μL

蒸馏水 260μL

Ferro（20mM母液） 100μL

Ferri（20mM母液） 100μL

X-Gluc（0.1M母液） 20μL

（X-Gluc母液溶于N,N-二甲基甲酰胺，-20℃保存）

1. 将烟草叶片用GUS染色液进行染色，37℃数小时或者过夜；
2. 70%乙醇脱色，观察是否有明显的蓝色着色，判定报告基因是否表达；

（13）第三组：在注射烟草后第二天开始到第七天，跟踪观察注射区域的叶片生长情况并拍照，根据叶片的生长情况，判断报告基因是否表达，判断究竟为何种报告基因。

1. **实验材料：**

X-Gluc 上海生工（BB0085-100mg） 100mg 一支

大肠杆菌感受态 全式金（CD201-01） 共20支

N,N-二甲基甲酰胺

Na2HPO4

NaH2PO4

Na3PO4

Triton-X100

Ferro

Ferri

塑料一次性注射器（1ml） 50支

乙醇

尖镊子 数把

LB培养基的试剂（NaCl，酪蛋白，酵母抽提物）

试管 20支

锥形瓶 5个

D-glucose

MES

乙酰丁香酮 上海生工（AB1111-1g） 1g

1. 实验仪器

荧光显微镜、离心机、37℃黑暗培养箱、25℃光照培养箱、28℃摇床、灭菌锅

7.

1）记录实验数据；

2）撰写实验报告

**目的基因克隆及蛋白的诱导表达**

**目的：**主要是通过本课程的学习，使学生受到严格的基因工程和分子生物学等技术实验技能的训练，熟悉现代生物技术仪器的基本操作使用和应用范围，加深对生物技术系列相关课程基本理论、基本技术原理的理解认识。

原理：基因克隆技术是指把来自不同生物的基因同有自主复制能力的载体DNA在体外人工连接，构建成新的重组DNA，然后送入受体生物中去表达，从而产生[遗传物质](http://baike.baidu.com/item/%E9%81%97%E4%BC%A0%E7%89%A9%E8%B4%A8)和状态的转移和重新组合。因此[基因](http://baike.baidu.com/item/%E5%9F%BA%E5%9B%A0)[克隆技术](http://baike.baidu.com/item/%E5%85%8B%E9%9A%86%E6%8A%80%E6%9C%AF)又称为[分子克隆](http://baike.baidu.com/item/%E5%88%86%E5%AD%90%E5%85%8B%E9%9A%86)、基因的[无性繁殖](http://baike.baidu.com/item/%E6%97%A0%E6%80%A7%E7%B9%81%E6%AE%96)、[基因操作](http://baike.baidu.com/item/%E5%9F%BA%E5%9B%A0%E6%93%8D%E4%BD%9C)、重组DNA技术以及基因工程等。采用重组DNA技术，将不同来源的DNA分子在体外进行特异切割，重新连接，组装成一个新的杂合DNA分子。在此基础上，这个杂合分子能够在一定的[宿主细胞](http://baike.baidu.com/item/%E5%AE%BF%E4%B8%BB%E7%BB%86%E8%83%9E)中进行扩增，形成大量的[子代](http://baike.baidu.com/item/%E5%AD%90%E4%BB%A3)分子，此过程叫基因克隆。

在各种表达系统中，最早被用来研究的是原核表达系统，这也是目前掌握最为成熟的表达系统。这项技术的主要方法是，将已经克隆入目的基因DNA片段的载体（一般是质粒）转化细菌（主要是大肠杆菌），通过IPTG诱导并最终纯化获得所需的目的蛋白。其优点在于在短时间内能够获得基因表达产物，而且所需成本比较低廉。原核表达系统为诱导表达系统，是将已经克隆入目的基因DNA片段的载体（PET32a质粒，含有氨苄青霉素抗性）转化大肠杆菌表达菌株BL21（DE）3,然后用诱导物IPTG（异丙基-β-D-巯基半乳糖甘）诱导目的蛋白的表达。

其中，大肠杆菌表达菌株BL21（DE）3的基因组DNA当中，已经整合了病毒基因片段LacUV5强启动子及其下游紧邻的T7 RNA聚合酶基因。当在大肠杆菌BL21（DE）3的培养体系中加入诱导物IPTG（一种非消化性乳糖类似物）后，由于IPTG不能被消化，但却能够和LacUV5强启动子产生持久而强烈的作用，从而使得其下游的T7 RNA聚合酶基因得以持久大量的表达，产生大量的T7 RNA聚合酶。而大量的T7 RNA聚合酶和PET32a质粒上的T7启动子充分结合，从而使位于其起始位点下游多克隆位点上的C基因得以大量表达，使细胞产生大量的目的蛋白。

**实验一 目的基因克隆**

**一、实验材料及试剂**

1、实验材料

番茄叶片

2、实验试剂与耗材

CTAB 国药 1瓶（100g）

氯仿

异戊醇

95%乙醇或无水乙醇

Trans fast Pfu 高保真聚合酶 全式金（AP 221-02） 1支

1.5mL 离心管 1袋

0.2mL PCR管 1袋

**二、实验步骤**

**（一）CTAB法提取DNA**

1. 采集适量幼嫩叶片，用液N2研成粉末，0.4 g装入1.5ml离心管中（-20℃预冷）。

2. 预热1.5×CTAB到95℃，加1ml到装有叶片粉末的离心管中，混匀（防止冻融）。

3. 立即置于65℃水浴30min，每5分钟，上下颠倒1次。

4. 12000g离心5分钟。

5. 吸取上清液约600μl，加入等体积（600μl）氯仿/异戊醇(24:1)，上下颠倒数次，至下层液相呈深绿色为止。

6. 12000g离心5分钟。

7. 取450μl上清于一新1.5ml离心管，加入1ml 95%乙醇和45μl 10M NH4AC），混匀，室温放置10min。

8. 12000 g离心10min，去上清，用75% EtOH浸洗沉淀，自然干燥约30 min。

9. 加入50μl 1/10 TE或无菌水，置于4℃过夜，待DNA溶解后，

检测DNA浓度及质量。

**（二）DNA质量的检测**

1、紫外分光光度计检测DNA的OD260/280比值

2、取3-4ul DNA样品在1%的琼脂糖凝胶上点样电泳；紫外观察。

**（三）PCR扩增目的基因**

1. 调整模板浓度至10 ng/μl；

2. 按下列体系配制反应混合液，混匀，加一滴矿物油，离心5秒

Template DNA 2 .0μl （20 ng）

5× buffer 4.0 μl

Primers (10μM) 0.5 μl

dNTPs（2mM） 1.6 μl

Taq（5U/μl） 0.2 μl

Add ddH2O to 20 μl

3．PCR反应循环条件设置：

95℃ 5' 1 cycle

94℃ 30" 58℃ 30" 72℃ 30" 34 cycles

72℃ 10' 1 cycle

4℃ forever

4．检测：加2μl溴酚蓝（含有GelRed染料），混匀，短暂离心，取10μl反应产物点样电泳；

5．在1%的琼脂糖凝胶上点样电泳；紫外观察。

**三、作业**

1）记录实验数据；

2）撰写实验报告

**实验二 构建表达载体**

**一、实验试剂**

质粒小提试剂盒 Omega（D6943-01）1盒

胶回收试剂盒 Omega（D2500-01） 1盒

T4连接酶 全式金 （FL101-02） 1支

FastDigest EcoRI Thermo（FD0275） 1支

FastDigest XhoI Thermo（FD0695） 1支

Trans5a感受态细胞 全式金（CD201-02） 1包

**二、操作步骤**

**（一）质粒DNA提取**

1）培养细菌：将带有质粒的单菌落，接种到LB液体培养基中，37oC，200r/min,过夜震荡培养；

2）柱平衡步骤：向吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）加入500ul的平衡液BL，12000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

3）取过夜培养的细菌培养液3mL于Eppendorf管中，转速12000r/min离心1min，去掉上清夜，用滤纸吸干；

4）向留有菌体沉淀的离心管中加入250ul溶液P1（确保已加入RNaseA），用枪头混匀；

5）向离心管中加入250μl溶液P2，温和上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

6）向离心管中加入350μl溶液P3，立即温和上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12000rpm离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀。

7）将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）尽量不要吸出沉淀。12000rmp离心30-60s,倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

8）向吸附柱CP3中加入600ul漂洗液PW(加入无水乙醇)，12000rmp离心30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

9）重复步骤8。

10）将吸附柱CP3放入收集管中，12000rmp离心2分钟，目的是将吸附柱中的残留的漂洗液去除。

11）将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜中间部位滴加50-100ul洗脱缓冲液EB，温室放置2分钟，12000rmp离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中。

12）质粒检测：

电泳检测：质粒电泳一般有三条带，分别为质粒的超螺旋、开环、线型三种构型。

吸光值检测：采用分光光度计检测260nm、280nm波长吸光值，若吸光值260nm/280nm的比值介于1.7－1.9之间，说明质粒质量较好，1.8为最佳，低于1.8说明有蛋白质污染，大于1.8说明有RNA污染。

**（二）酶切回收**

双酶切反应体系（50μL）

|  |  |
| --- | --- |
| FD buffer（10x） | 5μL |
| EcoR I | 2 μL |
| Xho I | 2 μL |
| DNA | 15 or 20μL |
| ddH2O | 26 or 21μL |
| Total | 50μL |

1) 将清洁干燥并经灭菌的eppendorf管编号，用微量移液枪按照体积由大到小的顺序加入上述溶液，再加入重蒸水使总体积为50μl。

此步操作是整个实验成败的关键，要防止错加，漏加。使用限制性内切酶时应尽量减少其离开冰箱的时间，以免活性降低。

2) 混匀反应体系后，将eppendorf管置于适当的支持物上（如插在泡沫塑料板上），37℃水浴保温2-3小时，使酶切反应完全。

3) 每管加入5μl 10\* loading buffer，混匀，以停止反应，置于冰箱中保存备用。

4）琼脂糖凝胶的制备：

将洗净的电泳槽洗净，置于平整的台面上，并调节水平；用1×TAE 电泳缓冲液配制0.8%的琼脂糖，微波炉加热使其溶解；待琼脂糖溶液冷却至60°C左右时，缓缓将琼脂糖倒入胶模中，厚度约5至7mm；插入梳子，静待琼脂糖凝固；将胶模放进电泳槽中，向电泳槽倒入1×TAE电泳缓冲液，没过胶约5mm；小心拔掉梳子，用20 ul移液器吸取DNA溶液（20 ul DNA 加 2～3ul 10×loading buffer），缓缓加入点样孔；并在最右边的点样孔加6 ul DNA Maker；接通电源，（注意电源的正负极！）电泳至条带前缘到达胶的2/3左右，约20～30分钟；电泳完毕，关闭电源。从胶模中取出琼脂糖凝胶，放入EB染色液中，染色6-8min，然后置于紫外灯下观察。

5）酶切产物凝胶回收：

A．在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶，计算凝胶重量。

B．加入3个凝胶体积的Buffer A（600 ul），混合均匀后，于65°C 加热，直至凝胶完全熔化。

C．加0.5个Buffer A 体积的Buffer B（300 ul）,混合均匀，当分离的DNA片段小于400 bp时，加入1个凝胶体积的异丙醇。

D．吸取3中的混合液，转移到DNA制备管（置于2 ml 离心管中），12000r/min离心1 min，弃滤液。

E．将制备管置回2 ml离心管中，加500 ul Buffer W1，12000r/min离心30 sec，弃滤液。

F．将制备管置回2 ml离心管中，加700 ul Buffer W2, 12000r/min离心30 sec，弃滤液。重复一次。

G．将制备管置回2 ml离心管中，12000r/min离心1 min。彻底去除残余的液体。

H．将制备管置于1.5 ml离心管中，在制备膜中央，加25～30 ul 65°C Elution buffer或去离子水，室温静置1 min。12000r/min离心1 min洗脱DNA。

**（三）连接转化**

1）酶连体系

|  |  |
| --- | --- |
| 5xT4 Buffer | 2.0μL |
| 目的DNA片段 | 4.5μL |
| 载体 | 2.5μL |
| T­4 DNA ligase | 1.0μL |
| Total | 10μL |

将加好的反应体系混匀后，放入16℃金属浴中连接3h，或者室温（25℃）半小时。

2）大肠杆菌转化

A．从-80 ℃冰箱中取出感受态细胞，置于冰上解冻。

B．加入10 μL质粒或连接DNA，与感受态细胞小心混匀，冰浴30 min。

C．将EP管放到42 ℃水浴中热冲击90 s，不要摇动。

D．快速将管转移至冰浴中，使细胞冷却2 ～ 3 min。

E．加入800 μL的SOC，混匀置于37 ℃ 摇床中振摇培养1 h使细菌复苏。

F．将培养后的细菌置于室温下6,000 rpm，离心5 min。

G．吸取约800 μL上清液，弃掉，留约100-200 μL上清液，用枪头吹吸混匀，然后均匀涂布在含Amp的SOB平板上。

H．将平板置于室温下直至液体被吸收，倒置平板，于37 ℃培养箱中培养12～16 h。

**（四）PCR鉴定阳性克隆**

A．用200μL的枪头活无菌牙签从平板上挑取菌落，选取直径大于1mm的菌落；

B．将菌落转至装有700μL LB+Amp液体培养基的EP管中，37℃ 培养3-4小时；

C．菌落PCR反应体系（20μL）

|  |  |
| --- | --- |
| 5Xbuffer | **4**μL |
| d NTP | **1.6**μL |
| Primers | **1.0**μL |
| TaqE | **0.2**μL |
| 模板 | **1**μL |
| ddH2O | 12.2μL |

D．PCR反应条件为：94 °C 5 min，27 cycles (94 °C 30 s；60 °C 30 s；72 °C 30s)，72 °C 10 min。反应结束后，取5 μL产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**（五）质粒DNA提取**

1）培养细菌：将带有质粒的单菌落，接种到LB液体培养基中，37oC，200r/min,过夜震荡培养；

2）柱平衡步骤：向吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）加入500ul的平衡液BL，12000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

3）取过夜培养的细菌培养液3mL于Eppendorf管中，转速12000r/min离心1min，去掉上清夜，用滤纸吸干；

4）向留有菌体沉淀的离心管中加入250ul溶液P1（确保已加入RNaseA），用枪头混匀；

5）向离心管中加入250μl溶液P2，温和上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

6）向离心管中加入350μl溶液P3，立即温和上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12000rpm离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀。

7）将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）尽量不要吸出沉淀。12000rmp离心30-60s,倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

8）向吸附柱CP3中加入600ul漂洗液PW(加入无水乙醇)，12000rmp离心30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

9）重复步骤8。

10）将吸附柱CP3放入收集管中，12000rmp离心2分钟，目的是将吸附柱中的残留的漂洗液去除。

11）将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜中间部位滴加50-100ul洗脱缓冲液EB，温室放置2分钟，12000rmp离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中。

12）质粒检测：

电泳检测：质粒电泳一般有三条带，分别为质粒的超螺旋、开环、线型三种构型。

吸光值检测：采用分光光度计检测260nm、280nm波长吸光值，若吸光值260nm/280nm的比值介于1.7－1.9之间，说明质粒质量较好，1.8为最佳，低于1.8说明有蛋白质污染，大于1.8说明有RNA污染。

**（六）酶切回收**

双酶切反应体系（20μL）

|  |  |
| --- | --- |
| FD buffer（10x） | 2μL |
| EcoR I | 1μL |
| Xho I | 1μL |
| DNA | 8μL |
| ddH2O | 12μL |
| Total | 20μL |

1) 将清洁干燥并经灭菌的eppendorf管编号，用微量移液枪按照体积由大到小的顺序加入上述溶液，再加入重蒸水使总体积为20μl。

此步操作是整个实验成败的关键，要防止错加，漏加。使用限制性内切酶时应尽量减少其离开冰箱的时间，以免活性降低。

2) 混匀反应体系后，将eppendorf管置于适当的支持物上（如插在泡沫塑料板上），37℃水浴保温2-3小时，使酶切反应完全。

3) 每管加入5μl 10\* loading buffer，混匀，以停止反应，置于冰箱中保存备用。

4）琼脂糖凝胶的制备：

将洗净的电泳槽洗净，置于平整的台面上，并调节水平；用1×TAE 电泳缓冲液配制0.8%的琼脂糖，微波炉加热使其溶解；待琼脂糖溶液冷却至60°C左右时，缓缓将琼脂糖倒入胶模中，厚度约5至7mm；插入梳子，静待琼脂糖凝固；将胶模放进电泳槽中，向电泳槽倒入1×TAE电泳缓冲液，没过胶约5mm；小心拔掉梳子，用20 ul移液器吸取DNA溶液（20 ul DNA 加 2～3ul 10×loading buffer），缓缓加入点样孔；并在最右边的点样孔加6 ul DNA Maker；接通电源，（注意电源的正负极！）电泳至条带前缘到达胶的2/3左右，约20～30分钟；电泳完毕，关闭电源。从胶模中取出琼脂糖凝胶，放入EB染色液中，染色6-8min，然后置于紫外灯下观察。

**三、作业**

1）记录实验数据；

2）撰写实验报告

**实验三 C基因的原核表达**

**一、实验材料**

（一）试剂

　　1、Tris

2、IPTG Solarbio （I8070） 5g

3、蛋白质Marker（分子量标志物） Thermo（26619）

4、BL21感受态 全式金（CD601-02）

（二）实验试剂的配制

1、30%丙烯酰胺混合液（Acr:Bis 为29:1） 称取丙烯酰胺（Acr）29g及甲叉丙烯酰胺（Bis）1.0g，用去离子水溶解并稀释至100ml，贮棕色瓶中于4℃保存，可用一个月。

2、1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl缓冲液 取1mol/L HCL溶液48ml、三羟甲基甲烷（Tris）36.6g，加双蒸馏水至80ml使其溶解，调pH至8.8，然后用双蒸馏水稀释至100ml，置棕色瓶中，4℃ 贮存。

3、1.0mol/LpH6.8Tris-HCl缓冲液 取1mol/L HCL溶液48ml，Tris5.98g，加双蒸馏水至80ml，调pH6.8，用双蒸馏水稀释至100ml，置棕色瓶中，4℃贮存。

　4、Tris-甘氨酸电泳缓冲液 称取Tris 6g、甘氨酸28.8g，加蒸馏水850ml，调pH至8.3，加蒸馏水到1000ml，4℃贮存。用时可做10倍稀释。

5、10% 过硫酸铵（AP）

6、10%SDS（十二烷基磺酸钠） 称取SDS 10g，加蒸馏水100ml使其溶解。

7、四甲基乙二胺（TEMED）

8、上样缓冲液 取1.0mol/L pH6.8 Tris-HCl缓冲液6.25ml，蔗糖10g，SDS 2.3g，1g/L溴酚蓝10ml，加蒸馏水溶解，混合至100ml。

9、考马斯亮蓝染色试剂 考马斯亮蓝R250染色液：浓度为2.5g/L，用甲醇∶醋酸∶蒸馏水=5∶1∶5的溶液配制（V/V）。

10、脱色液：取冰醋酸7.5ml、甲醇5ml，加蒸馏水至100ml。

**二、实验步骤**

**（一）质粒DNA提取**

1）培养细菌：将带有质粒的单菌落，接种到LB液体培养基中，37oC，200r/min,过夜震荡培养；

2）柱平衡步骤：向吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）加入500ul的平衡液BL，12000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）

3）取过夜培养的细菌培养液3mL于Eppendorf管中，转速12000r/min离心1min，去掉上清夜，用滤纸吸干；

4）向留有菌体沉淀的离心管中加入250ul溶液P1（确保已加入RNaseA），用枪头混匀；

5）向离心管中加入250μl溶液P2，温和上下翻转6-8次使菌体充分裂解。

6）向离心管中加入350μl溶液P3，立即温和上下翻转6-8次，充分混匀，此时将出现白色絮状沉淀。12000rpm离心10分钟，此时在离心管底部形成沉淀。

7）将上一步收集的上清液用移液器转移到吸附柱CP3中（吸附柱放入收集管中）尽量不要吸出沉淀。12000rmp离心30-60s,倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

8）向吸附柱CP3中加入600ul漂洗液PW(加入无水乙醇)，12000rmp离心30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱CP3放入收集管中。

9）重复步骤8。

10）将吸附柱CP3放入收集管中，12000rmp离心2分钟，目的是将吸附柱中的残留的漂洗液去除。

11）将吸附柱CP3置于一个干净的离心管中，向吸附膜中间部位滴加50-100ul洗脱缓冲液EB，温室放置2分钟，12000rmp离心2分钟将质粒溶液收集到离心管中。

12）质粒检测：

电泳检测：质粒电泳一般有三条带，分别为质粒的超螺旋、开环、线型三种构型。

吸光值检测：采用分光光度计检测260nm、280nm波长吸光值，若吸光值260nm/280nm的比值介于1.7－1.9之间，说明质粒质量较好，1.8为最佳，低于1.8说明有蛋白质污染，大于1.8说明有RNA污染。

二）大肠杆菌转化

A．从-80 ℃冰箱中取出感受态细胞BL21，置于冰上解冻。

B．加入10 μL质粒或连接DNA，与感受态细胞小心混匀，冰浴30 min。

C．将EP管放到42 ℃水浴中热冲击90 s，不要摇动。

D．快速将管转移至冰浴中，使细胞冷却2 ～ 3 min。

E．加入800 μL的SOC，混匀置于37 ℃ 摇床中振摇培养1 h使细菌复苏。

F．将培养后的细菌置于室温下6,000 rpm，离心5 min。

G．吸取约800 μL上清液，弃掉，留约100-200 μL上清液，用枪头吹吸混匀，然后均匀涂布在含Amp的SOB平板上。

H．将平板置于室温下直至液体被吸收，倒置平板，于37 ℃培养箱中培养12～16 h。

**三）PCR鉴定阳性克隆**

A．用200μL的枪头活无菌牙签从平板上挑取菌落，选取直径大于1mm的菌落；

B．将菌落转至装有700μL LB+Amp液体培养基的EP管中，37℃ 培养3-4小时；

C．菌落PCR反应体系（20μL）

|  |  |
| --- | --- |
| 5Xbuffer | **4**μL |
| d NTP | **1.6**μL |
| Primers | **1.0**μL |
| TaqE | **0.2**μL |
| 模板 | **1**μL |
| ddH2O | 12.2μL |

D．PCR反应条件为：94 °C 5 min，27 cycles (94 °C 30 s；60 °C 30 s；72 °C 30s)，72 °C 10 min。反应结束后，取5 μL产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**四）IPTG诱导C基因的表达**

（1）从筛选平板上挑取阳性克隆子，接种到加有Amp的3ml LB液体培养基中，37℃，200r/min过夜培养；取2900ul培养液做诱前样品。

（2）余下100ul培养液接种至3ml LB液体培养基（含卡那霉素）中，再加0.1M IPTG 30ul，37℃，300r/min诱导4小时，测OD值为0.5~0.9之间时停止培养；

（3）取诱前和诱后各1ml培养液，置于离心管中6000r/min，离心6min，弃上清，收集菌体；

（4）加200ul水溶菌体再加入100ulMix煮沸5min，-20℃保存备用。

**2）聚丙烯凝胶电泳检测蛋白表达情况**

（1）凝胶制备

按下表分别配制分离胶和浓缩胶

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 分离胶(12% 5ml) | 浓缩胶(5% 2ml) |
| ddH2O | 1.6ml | 1.4ml |
| 30% Acr | 2.0ml | 0.33ml |
| 1.5mol/L pH8.8 Tris-HCl | 1.3ml | — |
| 1.0mol/L pH6.8 Tris-HCl | — | 0.25ml |
| 10%SDS | 50μL | 20μL |
| 10%Ap | 50μL | 20μL |
| TEMED | 4μL | 4μL |

　　（2）灌胶

　　A、先将胶管（5х90mm）封好底，将配制好的分离胶液灌注入胶管内，约70mm高度（掌握分离胶的高度），在凝胶表面轻轻加一层正丁醇液（约3～4mm）。用于隔绝空气，使胶面平整。室温下静置约30～60min。观察胶和异丙醇之间的界面，判断胶是否凝固。要在确认分离胶彻底凝固后才开始配制浓缩胶。

　　B、分离胶凝固好后，倒掉覆盖在分离胶表面的异丙醇，并用去离子水冲洗一次，倒置吸净残留的水。将配制好的浓缩胶液灌注入胶管内（约15mm），在凝胶表面轻轻加一层异丙醇液（约3～4mm），用于隔绝空气，使胶面平整。室温下静置约30～60min。观察胶和异丙醇之间的界面，判断胶是否凝固。胶凝固好后，倒掉覆盖在胶表面的异丙醇，并用去离子水冲洗一次，倒置吸净残留的水，准备加样。

　　（3）样品预处理和加样

　　A、取菌液0.1ml、上样缓冲液0.9ml，混匀，在沸水中煮沸5min。

　　B、将胶管封底去掉，放入圆盘电泳槽中，套紧，不能有空的孔，将Tris-甘氨酸电泳缓冲液加入圆盘电泳上、下槽中，电泳缓冲液要盖过胶管口，然后用微量加样器（或注射器）将样品10μl加到胶管胶面内。

　　（4）电泳 上槽接负极，下槽接正极，先调电压为120v/浓缩胶，开始电泳，当指示染料进入分离胶后，将电压增加到80v/分离胶胶，继续电泳直至染料抵达距分离胶下端约1cm处，停止电泳，断开电源。电泳时间约1.0~1.5h。

　　（5）考马斯亮蓝染色

　　电泳结束后，取出电泳胶管，用长注射器针剥胶，一边注水一边推胶，直至胶出。将胶移至大培养皿中，精确量取并记录凝胶长度和指示染料的迁移距离（分离胶上缘到染料条带中心距离），然后将凝胶板浸入考马斯亮蓝染色液中0.5-1h，再用脱色液脱色1~2天，至背景无色为止。

**三、作业**

1）记录实验数据；

2）撰写实验报告