

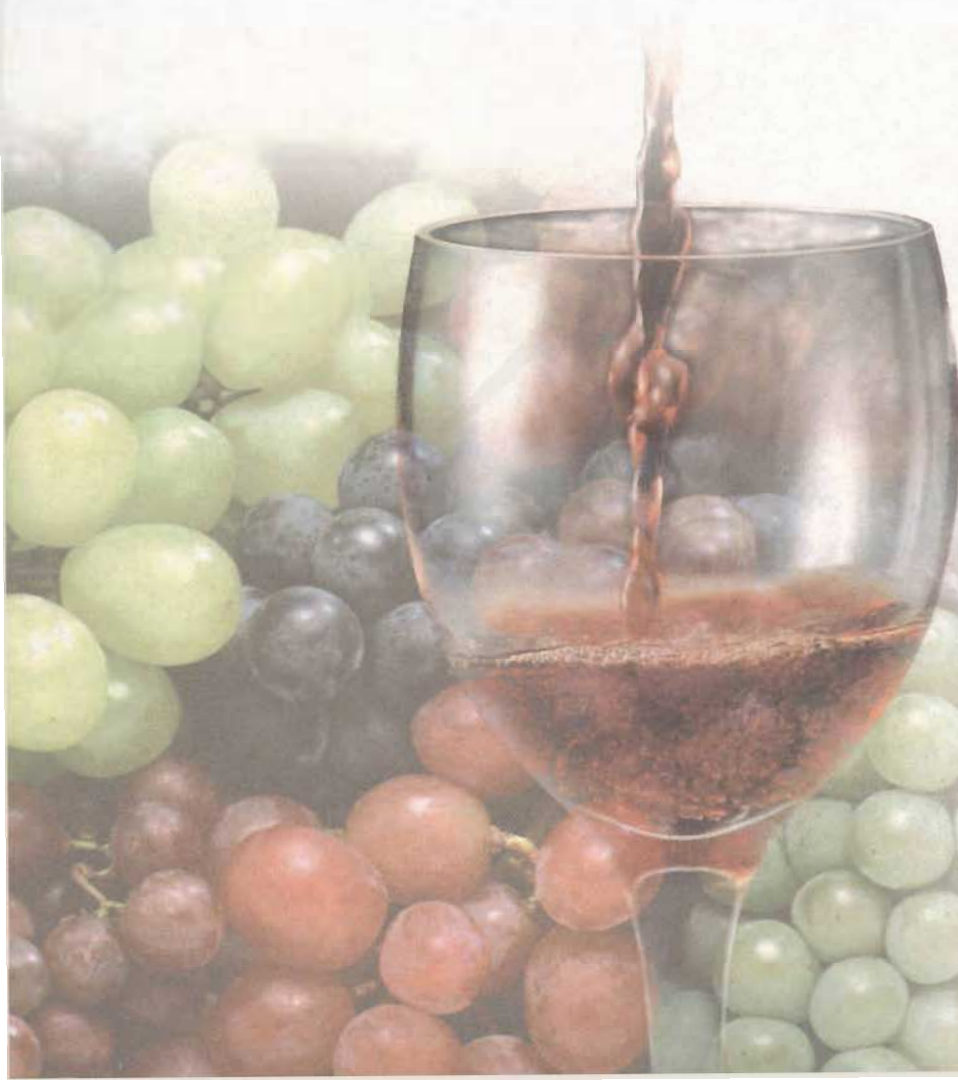
普通高中课程标准实验教科书

生物

选修 1

生物技术实践

人民教育出版社 课程教材研究所
生物课程教材研究开发中心 编著



 人民教育出版社

普通高中课程标准实验教科书 生物 选修1 生物技术实践

人民教育出版社 课程教材研究所 编著
生物课程教材研究开发中心

出版发行 人民教育出版社

(北京市海淀区中关村南大街17号院1号楼 邮编:100081)

网 址 <http://www.pep.com.cn>

经 销 全国新华书店

印 刷 人民教育出版社印刷厂

版 次 2007年1月第2版

印 次 2019年7月第50次印刷

开 本 890毫米×1240毫米 1/16

印 张 5.75

字 数 130千字

书 号 ISBN 978-7-107-20281-0

定 价 6.90元

价格依据文件号:京发改规[2016]13号

版权所有·未经许可不得采用任何方式擅自复制或本产品任何部分·违者必究

如发现内容质量问题,请登录中小学教材意见反馈平台:jcyjfk.pep.com.cn

如发现印、装质量问题,影响阅读,请与本社联系。电话:400-810-5788

绿色印刷 保护环境 爱护健康

亲爱的同学们:

你们手中的这本教科书采用绿色印刷标准印制,在它的封底印有“绿色印刷产品”标志。从2013年秋季学期起,北京地区出版并使用的义务教育阶段中小学教科书全部采用绿色印刷。

按照国家环境标准(HJ2503-2011)《环境标志产品技术要求 印刷 第一部分:平版印刷》,绿色印刷选用环保型纸张、油墨、胶水等原辅材料,生产过程注重节能减排,印刷产品符合人体健康要求。

让我们携起手来,支持绿色印刷,选择绿色印刷产品,共同关爱环境,一起健康成长!

北京市绿色印刷工程

主 编

朱正威 孙万儒 赵占良

编写人员

孙万儒	鲍平秋	吴成军	吴兢勤	石家骥	杨 柳
王建军	王重力	刘启宪	董 莉	张 慧	韩玉平

责任编辑

吴兢勤

美术编辑

林荣桓

插图绘制

林荣桓 刘 菊

设计排版

北京大洋立恒设计有限公司

摄影或提供照片

朱 京 孙万儒 鲍平秋 吴成军 石家骥等

目 录

走近生物技术

专题1 传统发酵技术的应用..... 1



课题1 果酒和果醋的制作..... 2

课题2 腐乳的制作..... 6

课题3 制作泡菜并检测亚硝酸盐含量..... 9

专题2 微生物的培养与应用..... 13



课题1 微生物的实验室培养..... 14

课题2 土壤中分解尿素的细菌的分离与计数..... 21

课题3 分解纤维素的微生物的分离..... 27

专题3 植物的组织培养技术..... 31



课题1 菊花的组织培养..... 32

课题2 月季的花药培养..... 37

专题4 酶的研究与应用..... 41



课题1 果胶酶在果汁生产中的作用..... 42

课题2 探讨加酶洗衣粉的洗涤效果..... 46

课题3 酵母细胞的固定化..... 49

专题 5 DNA 和蛋白质技术	53
课题 1 DNA 的粗提取与鉴定	54
课题 2 多聚酶链式反应扩增 DNA 片段	58
课题 3 血红蛋白的提取和分离	64



专题 6 植物有效成分的提取	71
课题 1 植物芳香油的提取	72
课题 2 胡萝卜素的提取	77



附录 1 生物学实验室的基本安全规则	80
附录 2 生物学实验中常用的国际单位	81
附录 3 常用培养基配方	83
附录 4 常用的消毒灭菌操作方法	85
附录 5 常用化学抑菌剂	86



走近生物技术

翻开《生物技术实践》的课本，你可能立即被其中丰富多彩的活动所吸引：酿葡萄酒、制作腐乳和泡菜……你会发现传统生物技术与我们的日常生活是如此贴近；细胞的固定化、PCR技术……你会发现现代生物技术其实并不神秘。从远古到现代，从传统发酵到分子生物学实验，生物技术一直与我们的生活息息相关。走近生物技术、体验和运用生物技术、感受生物技术给人类生活带来的变化，正是学习本模块的目的。

《生物技术实践》共有6个专题：传统发酵技术的应用、微生物的培养与应用、植物的组织培养技术、酶的研究与应用、DNA和蛋白质技术、植物有效成分的提取。各个专题之间相对独立，没有严格的顺序关系。每个专题下设有2~3个课题，除非特别说明，课题之间也相对独立。在这门课的学习中，你可以选择完成5~7个课题。

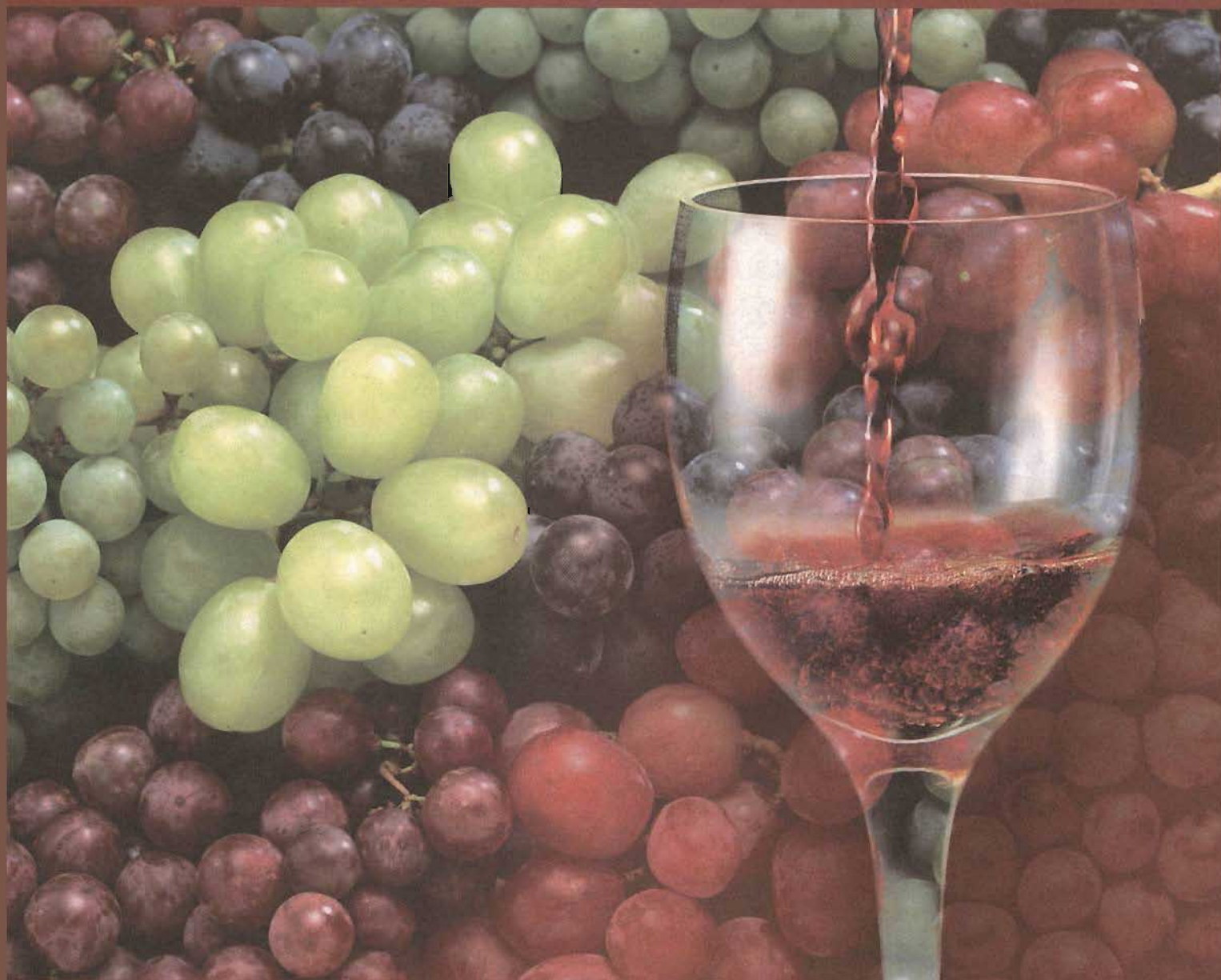
实践是动手和动脑的过程，也是解决实际问题的过程。为了帮助你进行探究与实践，本书提供了一些供你参考的资料和线索，同时也为你发挥自己的聪明才智提供了充分的空间。在各个课题中，“课题背景”阐明了生物技术与生产生活的联系，“基础知识”介绍了基本方法与原理，“研究思路”提示你从哪个方面入手来解决问题，“实验设计”提供了实验流程示意图和参考资料，“操作提示”则从操作层面给出指导性建议。

在进行每个课题的研究时，你首先需要分析本书提供的资料，理清研究思路，然后设计实验方案，动手探究。在探究的过程中，你可能会遇到一些困难。有时候，实验的辛苦和结果的不如人意可能会让你感到灰心。但是，生物技术的掌握需要经过一个不断实践、反思和改进的过程，要对自己有信心。

从传统发酵到现代大规模生产的发酵工程，从杂交育种到基因工程，我们看到，生物技术拥有巨大的发展空间。虽然现在你只是通过一个个课题来接触生物技术，但将来你有可能成为生物技术的研发人员，发明或者完善某项生物技术，为祖国的经济建设做出自己的贡献。

“千里之行，始于足下”。相信伴随着一个个课题的完成，你收获的不仅是某些操作技能，还有实践与创新的成功和乐趣！

专题 1 传统发酵技术的应用



“葡萄美酒夜光杯，欲饮琵琶马上催。醉卧沙场君莫笑，古来征战几人回。”这是唐诗中提及的葡萄酒。其实人类用不同原料酿酒的历史约有5 000年了。但直到19世纪，法国的巴斯德才发现葡萄汁变酒是酵母菌的发酵作用。利用不同微生物的发酵作用制作食品，历史悠久，遍布民间，一般称做传统发酵技术。

在这个专题中，你将亲手制作果酒、果醋、腐乳、泡菜，学习传统发酵技术。相信你收获的不仅仅是美酒等食品，还有难以忘怀的种种乐趣。

课题 1 果酒和果醋的制作

课题背景

人类利用微生物发酵制作果酒、果醋的历史，源远流长。与这悠久的历史一同沉淀的，是有关酒与醋的各种传说与文化。你品尝过果酒吗？果酒中，葡萄酒醇厚、浓郁，耐人寻味，苹果酒清香、明快，风味清爽。如果将果酒进一步发酵，还能获得果醋。酸度较高的果醋可用于烹调，酸度较低的果醋是一种新兴的饮料。无论是果酒还是果醋，都具有一定的保健养生的功效。

在享用果酒、果醋的时候，你是否想过自己动手来做一做？本课题将向你介绍果酒、果醋的制作原理，在此基础上，你将进行装置的设计，然后完成果酒、果醋的制作。

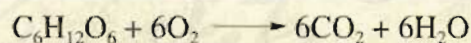


基础知识

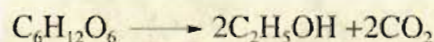
在本课题中，我们以制作葡萄酒和葡萄醋为例，学习果酒和果醋的制作方法。

（一）果酒制作的原理

果酒的制作离不开酵母菌（图1-1）。酵母菌是兼性厌氧微生物，在有氧条件下，酵母菌进行有氧呼吸（反应式如下），大量繁殖。



在无氧条件下，酵母菌能进行酒精发酵（反应式如下）。



温度是酵母菌生长和发酵的重要条件。20℃左右最适合酵母菌繁殖，酒精发酵时一般将温度控制在18~25℃。在葡萄酒的自然发酵过程中，起主要作用的是附着在葡萄皮上的野生型酵母菌。在发酵过程中，随着酒精度数的提高，红葡萄皮的色素也进入发酵液，使葡萄酒呈现深红色。在缺氧、呈酸性的发酵液中，酵母菌可以生长繁殖，而绝大多数其他微生物都因无法适应这一环境而受到抑制。



图 1-1 电子显微镜下的酵母菌

在自然界中,酵母菌分布广泛,“喜欢”葡萄汁等含糖量高的果汁。葡萄在秋季成熟落地,会流出果汁,果汁周围的土壤中就会有大量的酵母菌生长繁殖。到了冬天,酵母菌形成孢子,进入休眠状态。由春至夏,土壤的温度逐渐升高,酵母菌便又进入了旺盛的生长和繁殖时期。一年四季,土壤始终是酵母菌的大本营。土壤中的酵母菌可以通过各种途径传播到葡萄上:一阵轻风,可能将酵母菌吹到葡萄上;飞溅的雨水,可能将酵母菌溅到葡萄上;昆虫吸食葡萄汁的同时,也传播了酵母菌。



(二) 果醋制作的原理

醋酸菌(图1-2)是一种好氧细菌,只有当氧气充足时,才能进行旺盛的生理活动。在变酸的酒的表面观察到的菌膜就是醋酸菌在液面大量繁殖而形成的。实验表明,醋酸菌对氧气的含量特别敏感,当进行深层发酵时,即使只是短时间中断通入氧气,也会引起醋酸菌死亡。当氧气、糖源都充足时,醋酸菌将葡萄汁中的糖分解成醋酸;当缺少糖源时,醋酸菌将乙醇变为乙醛,再将乙醛变为醋酸(反应简式如下)。醋酸菌的最适生长温度为30~35℃。



图1-2 电子显微镜下的醋酸菌

实验设计

请你根据实验流程示意图(图1-3)和提供的资料,思考有关问题,然后进行实验设计,并写出详细的实验方案。



图1-3 制作果酒和果醋的实验流程示意图

【资料】 发酵装置的设计

图1-4是两位同学所使用的发酵装置。你认为他们的方法有哪些可取之处,哪些地方还需要改进?你将如何设计发酵装置。进行实验呢?



图 1-4 a 用带盖的瓶子制葡萄酒



图 1-4 b 果酒和果醋的发酵装置示意图

你认为应该先冲洗葡萄还是先除去枝梗？为什么？

你认为应该从哪些方面防止发酵液被污染？

制葡萄酒时，为什么要将温度控制在 $18\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ？制葡萄醋时，为什么要将温度控制在 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ？

制葡萄醋时，为什么要适时通过充气口充气？

A 同学用带盖的瓶子制葡萄酒（图 1-4 a）。在发酵过程中，每隔 12 h 左右将瓶盖拧松一次（注意，不是打开瓶盖），以放出 CO_2 ，此后再将瓶盖拧紧。当发酵产生酒精后，再将瓶盖打开，盖上一层纱布，进行制葡萄醋的发酵。

B 同学设计了如图 1-4 b 所示的发酵装置，请分析此装置中的充气口、排气口和出料口分别有哪些作用。为什么排气口要通过一个长而弯曲的胶管与瓶身连接？结合果酒、果醋的制作原理，你认为应该如何使用这个发酵装置？

操作提示

（一）材料的选择与处理

选择新鲜的葡萄，榨汁前先将葡萄冲洗，并除去枝梗。

（二）防止发酵液被污染

1. 榨汁机要清洗干净，并晾干。
2. 发酵瓶要清洗干净，用体积分数为 70% 的酒精消毒，或用洗洁精洗涤。
3. 装入葡萄汁后，封闭充气口。

（三）控制好发酵的条件

1. 葡萄汁装入发酵瓶时，要留有大约 $1/3$ 的空间。
2. 在制葡萄酒的过程中，要将温度严格控制在 $18\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，时间控制在 $10\sim 12\text{ d}$ 左右，可通过出料口对发酵的情况进行及时的监测。
3. 在制葡萄醋的过程中，要将温度严格控制在 $30\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，时间控制在 $7\sim 8\text{ d}$ 左右，并注意适时通过充气口充气。

结果分析与评价

1. 在制葡萄酒和葡萄醋的过程中，发酵液分别有哪些变化？其中最明显的变化发生在发酵后多少天？你能分析引起变化的原因吗？

2. 你如何证实葡萄汁转化成葡萄酒，是由于酵母菌的发酵作用？你能想出什么简单易行的方法，证明葡萄醋中的确有醋酸生成吗？

3. 你制作的葡萄酒与葡萄醋的口味如何？如果你对结果不满意，你认为应该如何改进？

课题延伸

果汁发酵后是否有酒精产生，可以用重铬酸钾来检验。在酸性条件下，重铬酸钾与酒精反应呈现灰绿色（图

1-5)。检测时,先在试管中加入发酵液2 mL,再滴入物质的量浓度为3 mol/L的 H_2SO_4 3滴,振荡混匀,最后滴加常温下饱和的重铬酸钾溶液3滴,振荡试管,观察颜色的变化。想一想,如果要使检验的结果更有说服力,应该如何设计对照?

相关链接

1. 为提高果酒的品质,更好地抑制其他微生物的生长,可以直接在果汁中加入人工培养的酵母菌。而人工培养酵母菌,首先需要获得纯净的酵母菌菌种。如何将葡萄上附着的酵母菌分离出来,获得纯净的菌种呢?你可以在参考“专题2 微生物的培养与应用”的基础上,进一步查阅资料,再作尝试。

2. 制作果醋时,也可以直接在果酒中加入醋酸菌。醋酸菌的菌种可以到当地生产食醋的工厂或菌种保藏中心购买。你也可以尝试从食醋中分离醋酸菌,分离的方法参见专题2。

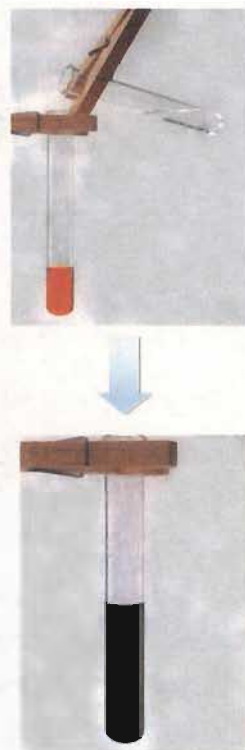


图1-5 酒精与重铬酸钾的颜色反应



练习

1. 请你查阅资料,了解果酒、果醋在人类健康、社会经济生产等方面所具有的意义。

2. 比较自己制作果酒、果醋的方法与当今果酒、果醋生产厂家的工艺流程有哪些异同。在此基础上,总结少量制作转化为大规模生产时,需要解决哪些实际问题。你能从中体会到科学技术是如何转化为生产力的吗?

3. 分析右栏有关果醋生产的经济效益的资料,如果请你投资建厂,你会考虑哪些问题?

生产果醋的经济效益(按适用于家庭式的小规模生产来核算):1 kg苹果可以生产标准苹果醋4~5 kg,每月投料4次,以每次投料(苹果)300 kg计,每月可生产标准苹果醋4 800~5 700 kg。原、辅材料1 180元,煤、电、杂项开支150元,总成本1 330元。每公斤苹果醋成本0.23~0.28元。成品散醋每公斤0.8元(批发0.6元,零售1元),每月可获利润2 500~3 200元。中、高档瓶装苹果醋利润更高。

课题2 腐乳的制作

课题背景

你喜欢吃腐乳吗？腐乳是我国古代劳动人民创造出的一种经过微生物发酵的大豆食品。早在公元5世纪的北魏古籍中，就有关于腐乳生产工艺的记载。千百年来，腐乳一直受到人们的喜爱。这是因为经过微生物的发酵，豆腐中的蛋白质被分解成小分子的肽和氨基酸，味道鲜美，易于消化吸收，而腐乳本身又便于保存。在本课题中，你将首先学习制作腐乳的原理，然后自己动手实践，并在此基础上探究影响腐乳品质的条件。



基础知识

腐乳制作的原理

下面是一则关于腐乳制作方法的传说故事，请你阅读后，讨论旁栏中的问题。

相传，清康熙八年（公元1669年），安徽省一进京举子王致和，京考未中，为了生存和准备下一次的考试，便做起了卖豆腐的生意。一天，他发现没卖出的豆腐长了白毛，深感苦恼，但又舍不得丢弃，便将豆腐装入坛内，撒上许多盐腌了，然后密封起来。他继续苦读，到了秋末他才想起此事。打开坛子，一股臭味散发出来，豆腐也变成了青色。他试着尝了一块，没想到“闻着臭，吃着香”。街坊邻居们品尝后也很爱吃。于是，王致和开始专营臭豆腐和酱豆腐的生意。

现代科学研究表明，多种微生物参与了豆腐的发酵，如毛霉、曲霉、根霉、酵母菌等，其中起主要作用的是毛霉。毛霉是一种丝状真菌，分布广泛，常见于土壤、水果、蔬菜、谷物上。毛霉生长迅速，具有发达的白色菌丝（图1-6）。毛霉等微生物产生的蛋白酶能将豆腐中的蛋白质分解成小分子的肽和氨基酸；脂肪酶可将脂肪水解为甘油和脂肪酸。在多种微生物的协同作用下，普通的豆腐转变成风味独特的腐乳。

你能利用所学的生物学知识，解释豆腐长白毛是怎么回事吗？

王致和为什么要撒许多盐，将长毛的豆腐腌起来？

你能总结王致和做腐乳的方法吗？



图1-6 a 长满毛霉白色菌丝的培养基



图1-6 b 显微镜下毛霉菌的菌丝

实验设计

请结合腐乳制作的流程示意图(图1-7)与提供的资料,设计实验,制作腐乳。

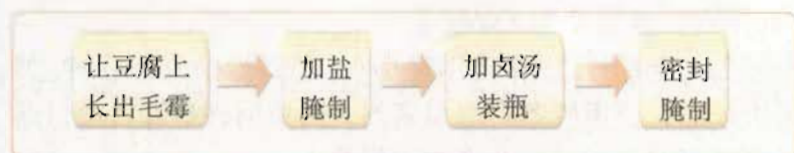


图1-7 腐乳制作的实验流程示意图

〔资料一〕 毛霉的生长

将豆腐块平放在笼屉内,将笼屉中的温度控制在15~18℃,并保持一定的湿度。约48 h后,毛霉开始生长,3 d之后菌丝生长旺盛,5 d后豆腐块表面布满菌丝。豆腐块上生长的毛霉来自空气中的毛霉孢子,而现代的腐乳生产是在严格无菌的条件下,将优良毛霉菌种直接接种在豆腐上,这样可以避免其他菌种的污染,保证产品的质量。

〔资料二〕 加盐腌制

将长满毛霉的豆腐块分层整齐地摆放在瓶中,同时逐层加盐,随着层数的加高而增加盐量,接近瓶口表面的盐要铺厚一些。加盐腌制的时间约为8d。加盐可以析出豆腐中的水分,使豆腐块变硬,在后期的制作过程中不会过早酥烂。同时,盐能抑制微生物的生长,避免豆腐块腐败变质。

〔资料三〕 配制卤汤

卤汤直接关系到腐乳的色、香、味。卤汤是由酒及各种香辛料配制而成的。卤汤中的酒可以选用料酒、黄酒、米酒、高粱酒等,含量一般控制在12%左右。加酒可以抑制微生物的生长,同时能使腐乳具有独特的香味。香辛料种类很多,如胡椒、花椒、八角、桂皮、姜、辣椒等(图1-8)。香辛料可以调制腐乳的风味,也具有防腐杀菌的作用。你

? 我们平常吃的豆腐,哪种适合用来做腐乳? 为什么?

? 吃腐乳时,你会发现腐乳外部有一层致密的“皮”。这层“皮”是怎样形成的呢? 它对人体有害吗? 它的作用是什么?

i 你可以同时进行多组实验,分别探究盐的用量、酒的种类和用量、发酵温度和发酵时间等因素对腐乳风味和质量的影响。



图1-8 香辛料

可以根据自己的口味来配制卤汤。

操作提示

请你根据自己设计的实验方案进行操作。在操作过程中，应特别注意以下一些问题。

(一) 控制好材料的用量

1. 用盐腌制时，注意控制盐的用量。盐的浓度过低，不足以抑制微生物生长，可能导致豆腐腐败变质；盐的浓度过高，会影响腐乳的口味。

2. 卤汤中酒的含量应控制在12%左右。酒精含量过高，腐乳成熟的时间将会延长；酒精含量过低，不足以抑制微生物生长，可能导致豆腐腐败。

(二) 防止杂菌污染

1. 用来腌制腐乳的玻璃瓶，洗刷干净后要用沸水消毒（有关资料参见专题2课题1）。

2. 装瓶时，操作要迅速小心。整齐地摆放好豆腐、加入卤汤后，要用胶条将瓶口密封。封瓶时，最好将瓶口通过酒精灯的火焰，防止瓶口被污染。

结果分析与评价

1. 你完成了腐乳的制作吗？你对腐乳的口味满意吗？
2. 通过探究，你能说明盐的用量、发酵温度、发酵时间等因素是如何影响腐乳的风味和质量的吗？

相关链接

我国幅员辽阔，各地的环境条件和人们的生活习惯也很不相同，腐乳的生产工艺多种多样。请调查你所在的地方制作腐乳的方法，分析该方法的优缺点。

i 因豆腐含水量的不同，发酵条件的不同以及装罐时加入的辅料的不同，可以制成近百种不同风味的腐乳。例如，红方因加入了红曲而呈深红色，味厚醇香；糟方因加入了酒糟而糟香扑鼻；青方因不加辅料，用豆腐本身渗出的水加盐腌制而成，绵软油滑，异臭奇香。



练习

1. 腌制腐乳时，为什么要随着豆腐层的加高而增加盐的用量？为什么在接近瓶口的表面要将盐铺厚一些？
2. 怎样用同样的原料制作出不同风味的腐乳？

课题3 制作泡菜并检测亚硝酸盐含量

课题背景

你对泡萝卜、酸黄瓜、酸豆角一定不陌生吧？一碟酸甜香脆的泡菜，能令人胃口大开。尽管泡菜的味道不错，为健康着想，还是应该多吃新鲜蔬菜，少吃腌制食品。你知道这是为什么吗？在本课题中，我们将自己动手制作泡菜。在泡菜的腌制过程中，我们还要跟踪检测

泡菜腌制过程中产生的亚硝酸盐的含量，并探索腌制方法、时间长短、温度高低等条件对泡菜口味和亚硝酸盐含量的影响，寻求提高泡菜质量的措施。



基础知识

（一）乳酸菌发酵

泡菜的制作离不开乳酸菌。乳酸菌种类很多，在自然界中分布广泛，空气、土壤、植物体表、人或动物的肠道内都有乳酸菌分布。乳酸菌是厌氧细菌，在无氧的情况下，将葡萄糖分解成乳酸。常见的乳酸菌有乳酸链球菌和乳酸杆菌（图1-9）。乳酸杆菌常用于生产酸奶。

（二）亚硝酸盐

亚硝酸盐为白色粉末，易溶于水，在食品生产中用作食品添加剂。自然界中，亚硝酸盐分布广泛。据统计，蔬菜中亚硝酸盐的平均含量约为4 mg/kg，咸菜中亚硝酸盐的平均含量在7 mg/kg以上，而豆粉中的平均含量可达10 mg/kg。

膳食中的亚硝酸盐一般不会危害人体健康，但是，当人体摄入的亚硝酸盐总量达到0.3~0.5 g时，会引起中毒；当摄入总量达到3 g时，会引起死亡。我国卫生标准规定，亚硝酸盐的残留量在肉制品中不得超过30 mg/kg，酱腌菜中不超过20 mg/kg，而婴儿奶粉中不得超过2 mg/kg。

膳食中的绝大部分亚硝酸盐在人体内以“过客”的形

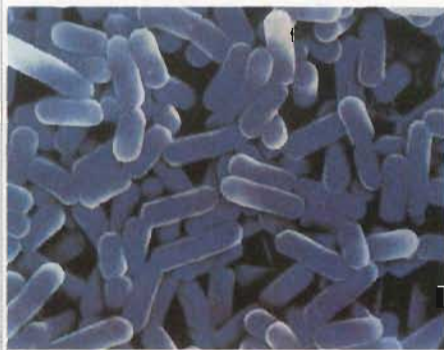


图1-9 电子显微镜下的乳酸杆菌

为什么含有抗生素的牛奶不能发酵成酸奶？

为什么日常生活中要多吃新鲜蔬菜，不宜多吃腌制蔬菜？

式随尿排出，只有在特定的条件下（适宜的pH、温度和一定的微生物作用），才会转变成致癌物——亚硝胺。大量的动物实验表明，亚硝胺具有致癌作用，同时对动物具有致畸和致突变作用。研究表明，人类的某些癌症可能与亚硝胺有关。

实验设计

请你根据实验流程示意图（图1-10）和提供的资料，思考有关问题，然后进行实验设计，并写出详细的实验方案。

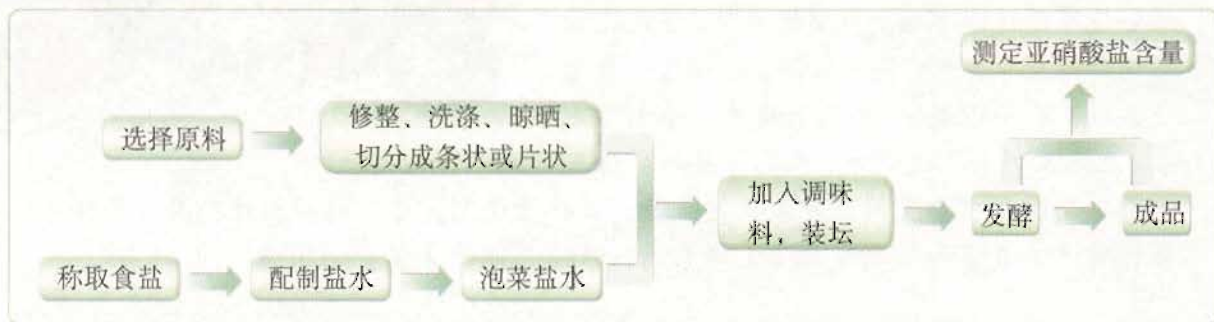


图1-10 泡菜的制作及测定亚硝酸盐含量的实验流程示意图

为什么泡菜坛内有时会长一层白膜？你认为这层白膜是怎么形成的？

【资料一】泡菜的制作

按照清水与盐的质量比为4:1的比例配制盐水，将盐水煮沸冷却。将经过预处理的新鲜蔬菜混合均匀，装入泡菜坛内，装至半坛时，放入蒜瓣、生姜及其他香辛料，继续装至八成满，再徐徐注入配制好的盐水，使盐水没过全部菜料，盖好坛盖。向坛盖边沿的水槽中注满水，以保证坛内乳酸菌发酵所需的无氧环境。在发酵过程中要注意经常向水槽中补充水。发酵时间长短受室内温度的影响。

【资料二】测定亚硝酸盐含量的原理

在盐酸酸化条件下，亚硝酸盐与对氨基苯磺酸发生重氮化反应后，与N-1-萘基乙二胺盐酸盐结合形成玫瑰红色染料。将显色反应后的样品与已知浓度的标准显色液进行目测比较，可以大致估算出泡菜中亚硝酸盐的含量。

操作提示

（一）泡菜坛的选择

应选火候好、无裂纹、无砂眼、坛沿深、盖子吻合好的泡菜坛（图1-11）。不合格的泡菜坛容易引起蔬菜腐烂。检查时，可将坛口向上压入水中，看坛内有无渗水现象。也可使用玻璃制作的泡菜坛。



图1-11 泡菜坛

(二) 腌制的条件

在泡菜的腌制过程中,要注意控制腌制的时间、温度和食盐的用量。温度过高、食盐用量过低、腌制时间过短,容易造成细菌大量繁殖,亚硝酸盐含量增加。一般在腌制10 d后,亚硝酸盐的含量开始下降。

(三) 测定亚硝酸盐含量的操作

1. 配制溶液 质量浓度为4 mg/mL的对氨基苯磺酸溶液:称取0.4 g对氨基苯磺酸,溶解于100 mL质量分数为20%的盐酸中,避光保存。质量浓度为2 mg/mL的N-1-萘基乙二胺盐酸盐溶液:称取0.2 g N-1-萘基乙二胺盐酸盐,溶解于100 mL水中,避光保存。质量浓度为5 μ g/mL的亚硝酸钠溶液:称取0.10 g于硅胶干燥器中干燥24 h的亚硝酸钠,用水溶解并定容至500 mL,再转移5 mL溶液至200 mL容量瓶中,定容至200 mL。提取剂:称取50 g氯化镉与50 g氯化钡,溶解于1 000 mL蒸馏水中,用浓盐酸调节pH至1。氢氧化铝乳液和物质的量浓度为2.5 mol/L的氢氧化钠溶液。

2. 制备标准显色液 用刻度移液管(图1-12)吸取0.20 mL、0.40 mL、0.60 mL、0.80 mL、1.00 mL和1.50 mL亚硝酸钠溶液(相当于1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g、5 μ g和7.5 μ g亚硝酸钠),分别置于50 mL比色管中,再另取1支比色管作为空白对照。在各管中分别加入2.0 mL对氨基苯磺酸溶液,混匀,静置3~5 min后,各加入1.0 mL的N-1-萘基乙二胺盐酸盐溶液,添加蒸馏水,使各比色管内总体积为50 mL,混匀,观察亚硝酸钠溶液颜色的梯度变化(图1-13)。

3. 制备样品处理液 将3坛泡菜做好标记后,分别作如下处理。称取0.4 kg泡菜,用榨汁机粉碎,过滤后得到大约200 mL汁液。将其中的100 mL转移到500 mL容量瓶中,加200 mL蒸馏水、100 mL提取剂,在摇床上振荡提取1 h,再加入40 mL氢氧化钠溶液,用蒸馏水定容至500 mL后,立即过滤。将60 mL滤液转移至100 mL容量瓶中,加入氢氧化铝乳液,定容至100 mL,过滤。此时,滤液变得无色透明。

4. 比色 吸取40 mL透明澄清的滤液,转移到50 mL比色管中,将比色管做好标记。按步骤2的方法分别加入对氨基苯磺酸溶液和N-1-萘基乙二胺盐酸盐溶液,并定容至50 mL,混匀,静置15 min后,观察样品颜色的变化,并与标准显色液比较,找出与标准液最相近的颜色,记录对应的亚硝酸钠含量,并按照旁栏的公式进行计算。每

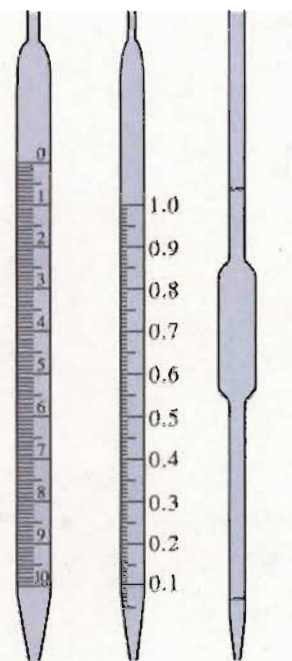


图1-12 刻度移液管(左、中)与单标记移液管(右)

② 每次取样要用洗净的筷子、小匙,专人专用,专人清洗。取样后迅速封坛,防止泡菜被污染。

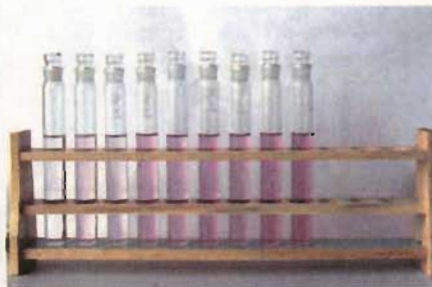


图1-13 亚硝酸钠标准显色液

亚硝酸盐含量计算方法:

$$\frac{\text{样品中亚硝酸盐含量 (mg)}}{\text{取样量}}$$

注:取样量是指样品所对应泡菜的质量(kg)

隔 2 d 测一次, 将结果记录在下表中。

泡菜腌制过程中亚硝酸盐含量变化 (mg/kg)

腌制天数	1 号坛	2 号坛	3 号坛
.....			



你能根据实验数据, 绘制亚硝酸盐含量随腌制时间而变化的曲线图吗?

结果分析与评价

1. 你能否用显微镜观察到腌制泡菜的盐水中乳酸菌的形态结构特征?
2. 你腌制的泡菜成功吗? 色泽如何? 口味如何? 亚硝酸盐的含量是否符合卫生标准?
3. 随着泡制时间的延长, 三只泡菜坛中亚硝酸盐含量的变化趋势如何? 你能分析形成这种趋势的原因吗?
4. 结合亚硝酸盐含量的变化趋势, 分析在泡菜的腌制过程中, 什么时候食用最好? 为什么?
5. 制作方法有需要改进的地方吗?

课题延伸

1. 你能否在查阅资料的基础上, 设计利用乳酸菌发酵制作酸奶的实验?
2. 制作酸奶的过程中是否会产生亚硝酸盐? 请设计出实验方案, 用来检验自己的假设。



练 习

1. 请你查阅相关资料, 了解蔬菜腌制过程中降低亚硝酸盐含量的办法。
2. 你能总结果酒、果醋、腐乳、泡菜这几种

发酵食品在利用微生物的种类和制作原理方面的不同吗? 你能总结出传统发酵技术的共同特点吗?

专题 2 微生物的培养与应用



在缤纷纷呈的生物世界，微生物似乎显得过于微小与沉寂。然而，它们在自然界却作用非凡！

生物学发展的历史表明，诸多革命性地改变人类对生命的认识的事件，都与微生物有着千丝万缕的联系。例如，自然发生说的破灭，酶的原始概念“酵素”的提出，肺炎双球菌转化实验证明 DNA 是遗传物质，青霉素的发现，第一个杂合 DNA 分子的体外构建……

在借助显微镜第一次直面微生物之后，一代又一代科学家建立、发展和完善了微生物技术。课题 1 将带领我们学习这些技术中最基本、最核心的微生物培养技术。在此基础上，我们不妨也尝试一下本专题中的其他课题。相信在逐步深入的探索中，你能充分体会到动手动脑做科学的乐趣。

课题 1 微生物的实验室培养

课题背景

19世纪中期,关系到法国经济命脉的酿造业曾一度遭受毁灭性的打击。在生产过程中,出现了葡萄酒变酸、变味的怪事。经过一番研究,法国科学家巴斯德发现,导致生产失败的根源在于发酵物中混入了杂菌。由此人们认识到保持培养物纯净的重要性。

防止杂菌入侵,获得纯净的培养物,是研究和应用微生物的前提。在实验室培养微生物,一方面需要为培养的微生物提供合适的营养和环境条件,另一方面需要确保无处不在的其他微生物无法混入。在本课题中,我们将通过培养大肠杆菌(*Escherichia coli*)的实验,学习微生物培养的基本技术。

基础知识

(一) 培养基

人们按照微生物对营养物质的不同需求,配制出供其生长繁殖的营养基质——培养基(culture media)。其中,配制成的液体状态的基质称为液体培养基,配制成的固体状态的基质称为固体培养基。在液体培养基中加入凝固剂琼脂后,制成琼脂固体培养基,它是实验室中最常用的培养基之一。微生物在固体培养基表面生长,可以形成肉眼可见的菌落(图2-1)。

虽然各种培养基的具体配方不同,但一般都含有水、碳源(提供碳元素的物质)、氮源(提供氮元素的物质)和无机盐。回忆有关活细胞中元素组成的知识,想一想为什么大多数培养基都含有这四类物质。下面让我们一起来看一看某种细菌培养基的营养构成。

i 琼脂(agar)是一种从红藻中提取的多糖。琼脂在98℃以上熔化,在44℃以下凝固,在常规培养条件下呈现固态。



图2-1 盛有液体培养基的锥形瓶和长有菌落的琼脂固体培养基

1 000 mL 牛肉膏蛋白胨培养基的营养构成

培养基组分	提供的主要营养
牛肉膏 5 g	碳源、氮源、磷酸盐和维生素
蛋白胨 10 g	碳源、氮源和维生素
NaCl 5 g	无机盐
H ₂ O 定容至 1 000 mL	氢元素、氧元素

在提供上述几种主要营养物质的基础上,培养基还需要满足微生物生长对pH、特殊营养物质以及氧气的要求。例如,培养乳酸杆菌时需要在培养基中添加维生素,培养霉菌时需将培养基的pH调至酸性,培养细菌时需将pH调至中性或微碱性,培养厌氧微生物时则需要提供无氧的条件。

(二) 无菌技术

获得纯净培养物的关键是防止外来杂菌的入侵。无菌技术围绕着如何避免杂菌的污染展开,主要包括以下几个方面。

1. 对实验操作的空间、操作者的衣着和手,进行清洁和消毒(disinfection)。
2. 将用于微生物培养的器皿、接种用具和培养基等进行灭菌(sterilization)。
3. 为避免周围环境中微生物的污染,实验操作应在酒精灯火焰附近进行。
4. 实验操作时应避免已经灭菌处理的材料用具与周围的物品相接触。

消毒是指使用较为温和的物理或化学方法杀死物体表面或内部的部分微生物(不包括芽孢和孢子)。灭菌则是指使用强烈的理化因素杀死物体内外所有的微生物,包括芽孢和孢子。下面,我们重点学习消毒和灭菌的方法。

实验室常用的消毒和灭菌方法

消毒方法 日常生活中经常用到煮沸消毒法。在100℃煮沸5~6 min可以杀死微生物细胞和一部分芽孢。对于一些不耐高温的液体,如牛奶,则使用巴氏消毒法,在70~75℃煮30 min或在80℃煮15 min,可以杀死牛奶中的微生物,并且使牛奶的营养成分不被破坏。此外,人们也常使用化学药剂进行消毒,如用酒精擦拭双手、用氯气消毒水源等。

灼烧灭菌 将微生物的接种工具,如接种环、接种针

i 牛肉膏和蛋白胨来源于动物原料,含有糖、维生素和有机氮等营养物质。

i 你想知道固体培养基的来历吗? 请点击人教网 www.pep.com.cn 查询。

? 无菌技术除了用来防止实验室的培养物被其他外来微生物污染外,还有什么目的?

! 在实验室中,切不可吃东西、喝水,离开实验室时一定要洗手,以防止被微生物感染。使用后的培养基丢弃前一定要进行灭菌处理,以免污染环境。



请你判断以下材料或用具是否需要消毒或灭菌。如果需要,请选择合适的方法。

1. 培养细菌用的培养基与培养皿。
2. 玻棒、试管、烧瓶和吸管。
3. 实验操作者的双手。



图 2-3 干热灭菌箱



图 2-4 高压蒸汽灭菌锅



教学用的大肠杆菌,可以到国家指定的菌种保藏中心购买。

或其他金属用具,直接在酒精灯火焰的充分燃烧层灼烧,可以迅速彻底地灭菌(图2-2)。此外,在接种过程中,试管口或瓶口等容易被污染的部位,也可以通过火焰灼烧来灭菌。



图 2-2 接种环的灼烧灭菌(1、2、3表示先后顺序)

干热灭菌 将灭菌物品放入干热灭菌箱(图2-3)内,在 $160\sim 170\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $1\sim 2\text{ h}$ 可达到灭菌的目的。能耐高温的、需要保持干燥的物品,如玻璃器皿(吸管、培养皿)和金属用具等,可以采用这种方法灭菌。干热灭菌的具体操作步骤参见附录4。

高压蒸汽灭菌 将灭菌物品放置在盛有适量水的高压蒸汽灭菌锅(图2-4)内。把锅内的水加热煮沸,将其中原有的冷空气彻底排除后,将锅密闭,继续加热使锅内的气压逐步上升,温度也随之升到 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上。为达到良好的灭菌效果,一般在压力为 100 kPa 、温度为 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下,维持 $15\sim 30\text{ min}$ 。高压蒸汽灭菌的具体操作步骤参见附录4。

除了以上方法外,实验室里还用紫外线或化学药物进行消毒。例如,接种室、接种箱或超净工作台在使用前,可以用紫外线照射 30 min ,以杀死物体表面或空气中的微生物。在照射前,适量喷洒石炭酸或煤酚皂溶液等消毒液,可以加强消毒效果。实验室中常用的其他化学消毒剂,参见附录5。

实验操作

本实验用牛肉膏蛋白胨固体培养基进行大肠杆菌的纯化培养,可分成制备培养基和纯化大肠杆菌两个阶段进行。

(一) 制备牛肉膏蛋白胨固体培养基

1. 计算 根据牛肉膏蛋白胨培养基配方的比例,计算配制 100 mL 的培养基时,各种成分的用量。

2. 称量 准确地称取各种成分。牛肉膏比较黏稠,可以用玻棒挑取,放在称量纸上称量。牛肉膏和蛋白胨都容易吸潮,称取时动作要迅速,称后要及时盖上瓶盖。

3. 溶化 将称好的牛肉膏连同称量纸一同放入烧杯,加入少量的水,加热。当牛肉膏溶化并与称量纸分离后,用玻棒取出称量纸。往烧杯中加入称量好的蛋白胨和氯化钠,用玻棒搅拌,使其溶解。加入琼脂,加热使其熔化。在此过程中,不断用玻棒搅拌,防止琼脂糊底而导致烧杯破裂。当琼脂完全熔化后,补加蒸馏水至 100 mL。

4. 灭菌 将配制好的培养基转移到锥形瓶中,加棉塞,包上牛皮纸,并用皮筋勒紧,再放入高压灭菌锅,在压力为 100 kPa、温度为 121 °C 条件下,灭菌 15~30 min。将培养皿用几层旧报纸包紧,5~8 套培养皿作一包,包好后放入干热灭菌箱内,在 160~170 °C 下灭菌 2 h。

5. 倒平板 待培养基冷却至 50 °C 左右时,在酒精灯火焰附近倒平板。倒平板的具体操作描述如下。

牛肉膏蛋白胨固体培养基配方

牛肉膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
NaCl	5.0 g
琼脂	20.0 g
将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至 1 000 mL。	

倒平板操作

1. 将灭过菌的培养皿放在火焰旁的桌面上,右手拿装有培养基的锥形瓶,左手拔出棉塞。



2. 右手拿锥形瓶,使瓶口迅速通过火焰。



3. 用左手将培养皿打开一条稍大于瓶口的缝隙,右手将锥形瓶中的培养基(约 10~20 mL)倒入培养皿,左手立即盖上培养皿的皿盖。



4. 等待平板冷却凝固(大约需 5~10 min)后,将平板倒过来放置,使皿盖在下、皿底在上。



讨论

1. 培养基灭菌后,需要冷却到 50 °C 左右时,才能用来倒平板。你用什么办法来估计培养基的温度?

2. 为什么需要使锥形瓶的瓶口通过火焰?

3. 平板冷凝后,为什么要将平板倒置?

4. 在倒平板的过程中,如果不小心将培养基溅在皿盖与皿底之间的部位,这个平板还能用来培养微生物吗?为什么?

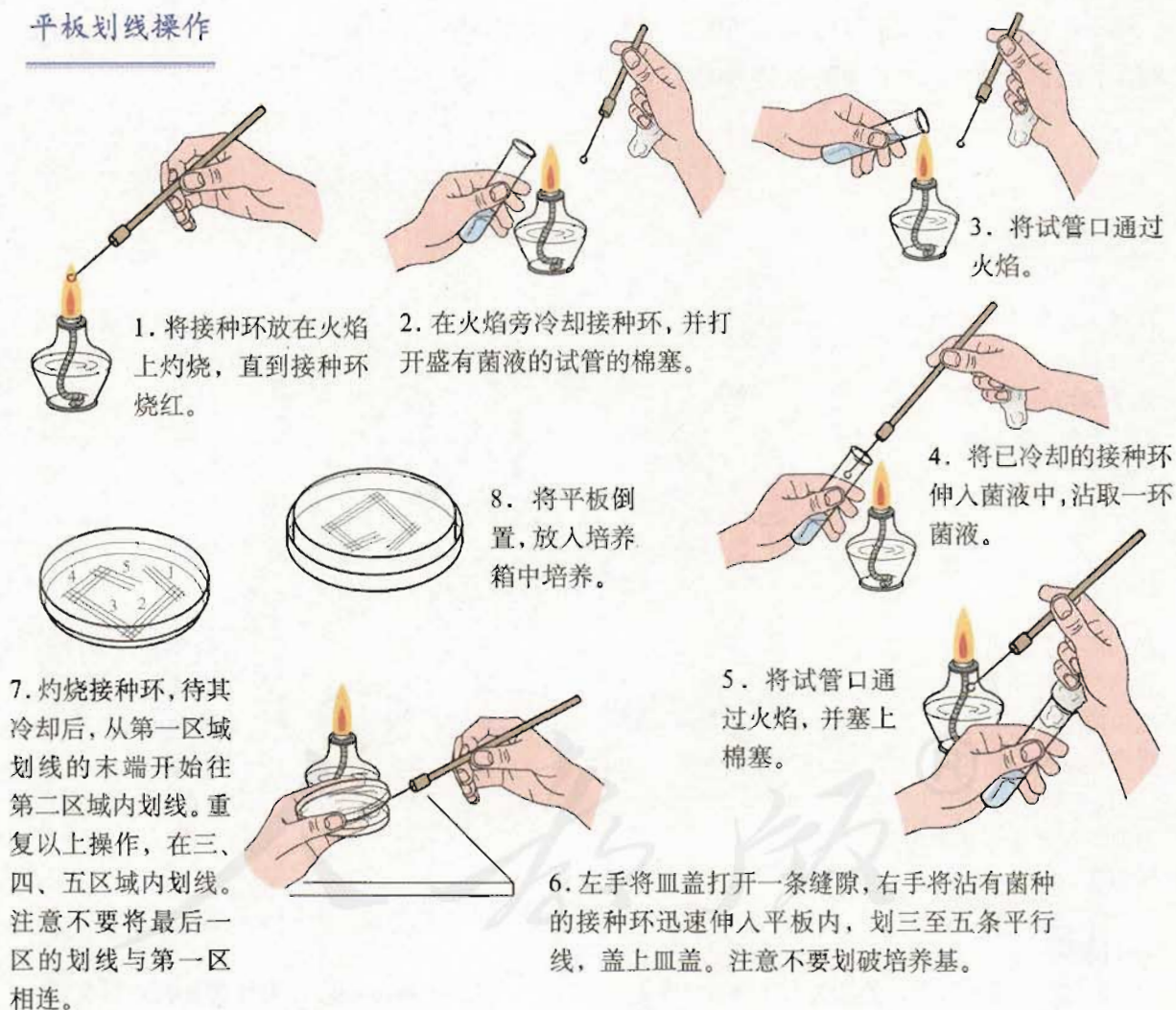
② 微生物的接种技术还包括斜面接种、穿刺接种等方法。虽然这些技术的操作方法各不相同，但是，其核心都是要防止杂菌的污染，保证培养物的纯度。

(二) 纯化大肠杆菌

微生物接种的方法很多，最常用的是平板划线法和稀释涂布平板法。请你选用其中的一种方法，在牛肉膏蛋白胨固体培养基上纯化大肠杆菌。

平板划线法是通过接种环在琼脂固体培养基表面连续划线的操作，将聚集的菌种逐步稀释分散到培养基的表面。在数次划线后培养，可以分离到由一个细胞繁殖而来的肉眼可见的子细胞群体，这就是菌落 (colony)。

平板划线操作



讨论

1. 为什么在操作的第一步以及每次划线之前都要灼烧接种环？在划线操作结束时，仍然需要灼烧接种环吗？为什么？

2. 在灼烧接种环之后，为什么要等其冷却

后再进行划线？

3. 在做第二次以及其后的划线操作时，为什么总是从上一次划线的末端开始划线？

稀释涂布平板法则是将菌液进行一系列的梯度稀释，然后将不同稀释度的菌液分别涂布到琼脂固体培养基的表面，进行培养。在稀释度足够高的菌液里，聚集在一起的微生物将被分散成单个细胞，从而能在培养基表面形成单个的菌落。

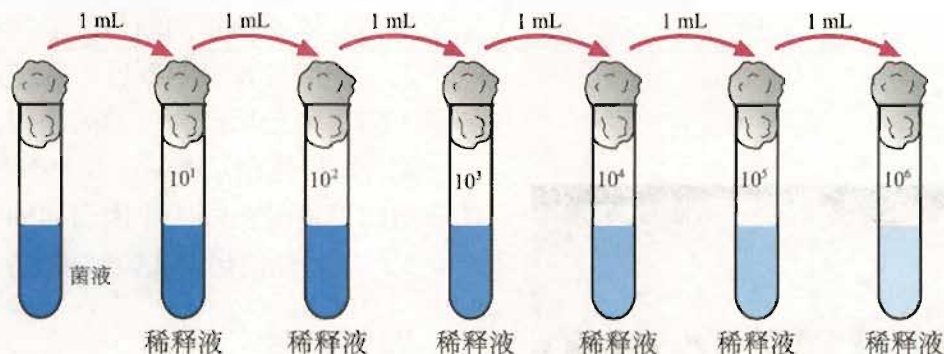
系列稀释操作

1. 将分别盛有 9 mL 水的 6 支试管灭菌，并按 $10^1 \sim 10^6$ 的顺序编号。

2. 用移液管吸取 1 mL 培养的菌液，注入 10^1 倍稀释的试管中。用手指轻压移液管上的橡皮头，吹吸三次，使菌液与水充分混匀。

3. 从 10^1 倍稀释的试管中吸取 1 mL 稀释液，注入 10^2 倍稀释的试管中，重复第 2 步的混匀操作。依次类推，直到完成最后一支试管的稀释。

注意：移液管需要经过灭菌。操作时，试管口和移液管应在离火焰 1~2 cm 处。



涂布平板操作

1. 将涂布器浸在盛有酒精的烧杯中。

2. 取少量菌液（不超过 0.1 mL），滴加到培养基表面。

3. 将沾有少量酒精的涂布器在火焰上引燃，待酒精燃尽后，冷却 8~10 s。

4. 用涂布器将菌液均匀地涂布在培养基表面。涂布时可转动培养皿，使菌液分布均匀。

注意：1. 将涂布器末端浸在盛有体积分数为 70% 的酒精的烧杯中。取出时，要让多余的酒精在烧杯中滴尽，然后将沾有少量酒精的涂布器在火焰上引燃。

2. 操作中一定要注意防火！不要将过热的涂布器放在盛放酒精的烧杯中，以免引燃其中的酒精。

讨论

涂布平板的所有操作都应在火焰附近进行。结合平板划线与系列稀释的无菌操作要求，想一想，第 2 步应如何进行无菌操作？



将接种后的培养基和一个未接种的培养基都放入37℃恒温箱中,培养12h和24h后,分别观察并记录结果。

结果分析与评价

1. 未接种的培养基表面是否有菌落生长?如果有菌落生长,说明了什么?
2. 在接种大肠杆菌的培养基上,你是否观察到了独立的菌落?这些菌落的颜色、形状和大小相似吗?
3. 培养12h和24h后,观察到的实验结果相同吗?如果不同,请分析产生差异的原因。
4. 如果你在培养基上观察到了不同形态的菌落,你能分析出可能是由哪些原因引起的吗?
5. 你是如何记录实验结果的?与其他同学交流互评。

课题延伸

为了保持菌种的纯净,需要进行菌种的保藏。对于频繁使用的菌种,我们可以采用临时保藏的方法。首先,将菌种接种到试管的固体斜面培养基上,在合适的温度下培养。当菌落长成后,将试管放入4℃的冰箱中保藏(图2-5)。以后每3~6个月,都要重新将菌种从旧的培养基上转移到新鲜的培养基上。但是,这种方法保存的时间不长,菌种容易被污染或产生变异。

对于需要长期保存的菌种,可以采用甘油管藏的方法。在3mL的甘油瓶中,装入1mL甘油后灭菌。将1mL培养的菌液转移到甘油瓶中,与甘油充分混匀后,放在-20℃的冷冻箱中保存。



图2-5 菌种的斜面保藏



练习

1. 请你想一想、日常生活中保存食品的方法有哪些?这些方法是如何阻止或抑制微生物生长的?

2. 无土栽培技术是用人工配制成的培养液来栽培植物;植物组织培养技术则是将植物体的组织接种在培养基上进行离体培养;而在本课题中,我们着重学习了微生物的培养技术。请你比较

这三种培养技术在设计思路和具体操作上的异同。

3. 巴斯德设计的鹅颈瓶实验有力地驳斥了“自然发生论”,证明微生物只能由微生物产生,不能从没有生命的物质自然产生。请你解释其实验原理,并分析这个实验对于微生物学的进步、微生物学的研究方法以及食品保存等方面所产生的影响。

课题2

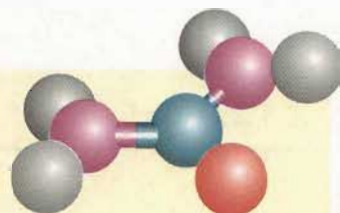
土壤中分解尿素的细菌的分离与计数

课题背景

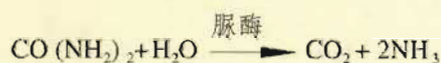
尿素 $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ 是一种重要的农业氮肥。但是, 尿素并不能直接被农作物吸收。只有当土壤中的细菌将尿素分解成氨之后, 才能被植物利用。土壤中的细菌之所以能分解尿素, 是因为它们能合成脲酶。

尿素最初是从人的尿液中发现的。当时, 人们普遍相信有机物只能由有生命活力的生物产生, 而无法通过化学方法合成。但是, 1828年, 德国化学家维勒 (F. Wöhler) 成功地通过无机物的化学反应合成了尿素, 揭开了历史上人工合成有机物的新篇章。此后, 尿素的生产走向了工业化, 尿素也逐步成为农业生产中重要的氮肥。

本课题以土壤中能分解尿素的细菌为研究对象, 要达到两个主要目的: (1) 从土壤中分离出能够分解尿素的细菌; (2) 统计每克土壤样品中究竟含有多少这样的细菌。



尿素分子的立体结构



研究思路

(一) 筛选菌株

DNA 多聚酶链式反应 (PCR) 是一种在体外将少量 DNA 大量复制的技术 (参见专题5 课题2)。此项技术的自动化, 要求使用耐高温的 DNA 聚合酶。这种酶要能忍受 93°C 左右的高温。如果请你来寻找这种耐高温的酶, 你会去哪里寻找?

科学家是从水生耐热细菌 *Taq* (*Thermus aquaticus*) 中分离到耐高温的 *Taq* DNA 聚合酶的。*Taq* 细菌是美国微生物学家布鲁克 (T. Brock) 于1966年在美国黄石国家公园的一个热泉 (图2-6) 中发现的。这说明, 在寻找目的菌株时, 要根据它对生存环境的要求, 到相应的环境中去寻找。

为什么 *Taq* 细菌能从热泉中被筛选出来呢? 这是因为热泉 $70\sim 80^\circ\text{C}$ 的高温条件淘汰了绝大多数微生物, 而使耐热的 *Taq* 细菌脱颖而出。实验室中微生物的筛选, 也应用了同样的原理, 即人为提供有利于目的菌株生长的条件



图2-6 美国黄石国家公园的一个热泉

① 本课题使用的培养基配方

KH_2PO_4	1.4 g
Na_2HPO_4	2.1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
葡萄糖	10.0 g
尿素	1.0 g
琼脂	15.0 g
将上述物质溶解后,用蒸馏水定容到 1 000 mL。	

想一想,如何根据平板上的菌落数推测出每克样品中的菌落数?

② 每克样品中的菌株数

$$= (C \div V) \times M$$

其中,C代表某一稀释度下平板上生长的平均菌落数,V代表涂布平板时所用的稀释液的体积(mL),M代表稀释倍数。

(包括营养、温度、pH等),同时抑制或阻止其他微生物生长。

请你根据这一思路,分析旁栏中本课题将用到的培养基配方,回答下面的问题。

1. 在该培养基的配方中,为微生物的生长提供碳源和氮源的分别是什么物质?

2. 绝大多数微生物都能利用葡萄糖,但是,只有能合成脲酶的微生物才能分解尿素。请你分析该培养基的配方,想一想这种培养基对微生物是否具有选择作用?如果具有,是如何进行选择的?

在微生物学中,将允许特定种类的微生物生长,同时抑制或阻止其他种类微生物生长的培养基,称做选择培养基(selective media)。

(二) 统计菌落数目

在课题1中,我们学习了稀释涂布平板法。这一方法常用来统计样品中活菌的数目。当样品的稀释度足够高时,培养基表面生长的一个菌落,来源于样品稀释液中的一个活菌。通过统计平板上的菌落数,就能推测出样品中大约含有多少活菌。为了保证结果准确,一般选择菌落数在30~300的平板进行计数。

两位同学用稀释涂布平板法测定同一土壤样品中的细菌数。在对应稀释倍数为 10^6 的培养基中,得到以下两种统计结果。

1. 第一位同学在该浓度下涂布了一个平板,统计的菌落数为230。

2. 第二位同学在该浓度下涂布了三个平板,统计的菌落数分别为21、212和256,该同学以这三个平板上菌落数的平均值163作为统计结果。

你认为哪位同学的结果更接近真实值?你认为这两位同学的实验需要改进吗?如果需要,如何改进?

值得注意的是,统计的菌落数往往比活菌的实际数目低。这是因为当两个或多个细胞连在一起时,平板上观察到的只是一个菌落。因此,统计结果一般用菌落数而不是用活菌数来表示。除了上述的活菌计数法外,显微镜直接计数也是测定微生物数量的常用方法。

(三) 设置对照

设置对照的主要目的是排除实验组中非测试因素对实验结果的影响,提高实验结果的可信度。请你分析下面的实例,想一想如何设置本实验的对照。

在做本课题的实验时,A同学从对应 10^6 倍稀释的培

培养基中筛选出大约 150 个菌落。但是，其他同学在同样的稀释度下只选择出大约 50 个菌落。

其他同学认为 A 同学的结果有问题。他们分析可能是 A 同学的培养基被杂菌污染了，或者培养基中混入了其他含氮物质，因而导致不能分解尿素的细菌也能在该培养基上生长。

但是，A 同学确信自己的实验操作准确无误，与其他同学的结果之所以不相同，是因为自己所选用的土壤样品不同。但是，A 同学在设计实验的时候并没有设置对照，因而此时也拿不出令同学们信服的证据。

你能通过设置对照，帮助 A 同学排除上述两个可能影响实验结果的因素吗？

实验设计

实验设计包括对实验方案，所需仪器、材料、用具和药品，具体的实施步骤以及时间安排等的综合考虑和安排。一般来说，实验设计做得周密细致，做实验时就能有条不紊，将精力集中在具体的操作上。

请你根据实验流程示意图（图 2-7）和提供的三个资料，思考有关问题，然后进行实验设计，并写出详细的实验方案。

② 对照实验是指除了被测试的条件以外，其他条件都相同的实验，其作用是比照实验组，排除任何其他可能原因的干扰，证明确实是所测试的条件引起相应的结果。

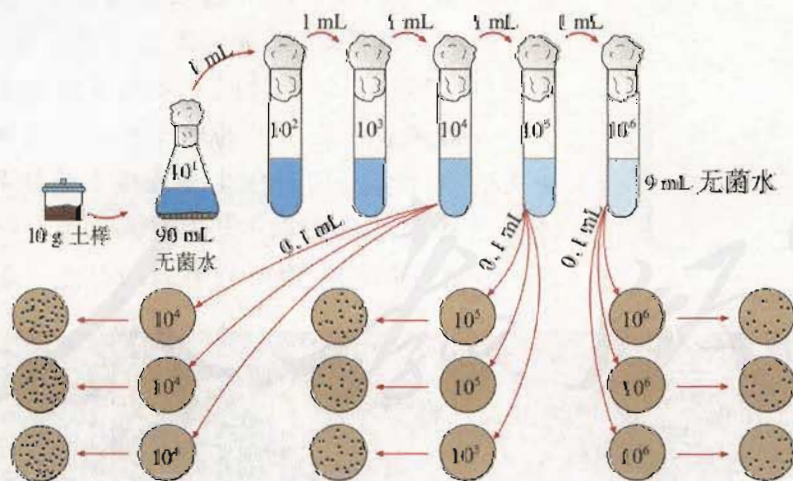


图 2-7 样品的稀释和稀释液的取样培养流程示意图

【资料一】土壤取样

土壤有“微生物的天然培养基”之称。同其他生物环境相比，土壤中的微生物，数量最大，种类最多。在富含有机质的土壤表层，有更多的微生物生长。



为什么分离不同的微生物要采用不同的稀释度?

测定土壤中细菌的总量和测定土壤中能分解尿素的细菌的数量,选用的稀释范围相同吗?如果不同,你打算选用多大的稀释范围?



观察是科学研究的基本功。敏锐的观察力来源于实践中一点一滴的积累。

土壤中的微生物,大约70%~90%是细菌。细菌适宜在酸碱度接近中性的潮湿土壤中生长,绝大多数分布在距地表约3~8 cm的土壤层。因此,土壤取样时,一般要铲去表层土。在城市,常见的是公园里、街道旁、花盆中的土壤;在农村,则容易收集到农田或菜园的土壤。你打算选择什么样的土壤做实验呢?

[资料二] 样品的稀释

样品的稀释程度将直接影响平板上生长的菌落数目。在实际操作中,通常选用一定稀释范围的样品液进行培养,以保证获得菌落数在30~300之间、适于计数的平板。

测定土壤中细菌的数量,一般选用 10^4 、 10^5 和 10^6 倍的稀释液进行平板培养;测定放线菌的数量,一般选用 10^3 、 10^4 和 10^5 倍稀释;测定真菌的数量,一般选用 10^2 、 10^3 和 10^4 倍稀释。根据这些数据,请你思考旁栏中的问题。

当你第一次做这个实验的时候,可以将稀释的范围放宽一点。例如,可以将 10^3 ~ 10^7 倍的稀释液分别涂布到平板上培养,以保证能从中选择出菌落数在30~300间的平板进行计数。

[资料三] 微生物的培养与观察

不同种类的微生物,往往需要不同的培养温度和培养时间。细菌一般在30~37℃的温度下培养1~2 d;放线菌一般在25~28℃的温度下培养5~7 d;而霉菌一般在25~28℃的温度下培养3~4 d。在本实验中,我们可以每隔24 h统计一次菌落数目,选取菌落数目稳定时的记录作为结果,这样可以防止因培养时间不足而导致遗漏菌落的数目。

一般来说,在一定的培养条件下(相同的培养基、温度及培养时间),同种微生物表现出稳定的菌落特征。这些特征包括菌落的形状、大小、隆起程度和颜色等方面(图2-8)。请仔细观察你所分离到的菌落,最好以表格的形式

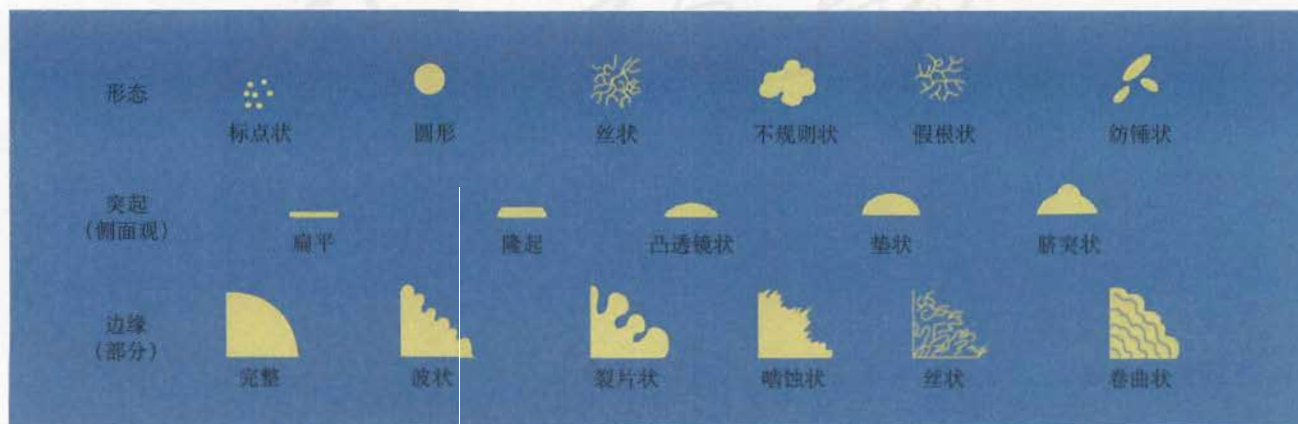


图2-8 菌落的特征示意图

将不同菌落的特征记录下来。

操作提示

请你根据自己设计的实验方案进行操作。操作中,应特别注意以下一些问题。

(一) 无菌操作

做这个实验前,请你先复习课题1中学习过的无菌操作方法。此外,本课题中的无菌操作还须注意以下几点。

1. 取土样用的小铁铲和盛土样的信封在使用前都需要灭菌。
2. 应在火焰旁称取土壤。在火焰附近将称好的土样倒入锥形瓶中,塞好棉塞。
3. 在稀释土壤溶液的过程中,每一步都要在火焰旁操作。

(二) 做好标记

本实验使用的平板和试管比较多。为避免混淆,最好在使用前就做好标记。例如,在标记培养皿时(图2-9),应注明培养基种类、培养日期以及平板上培养样品的稀释度等。

在进行系列稀释的时候,为避免试管相互混淆,可以将已经进行过稀释操作的试管,按稀释度递增的顺序,依次放置在试管架的另一行。这样,试管的位置就能清楚地表示出稀释进行到哪一步。

(三) 制定计划

对于耗时较长的生物实验,需要事先制定计划,以提高工作效率,在操作时做到有条不紊。例如,在本实验中,可以在第一天进行实验器材的灭菌以及制备培养基的工作,第二天进行稀释涂布平板的操作,第三、四、五天进行实验结果的观察与记录。

结果分析与评价

1. 结合对照,分析培养物中是否有杂菌污染以及选择培养基是否筛选出一些菌落。
2. 是否获得了某一稀释度下,菌落数目在30~300的平板。在这一稀释度下,是否至少有两个平板的菌落数相接近?
3. 你统计的每克土壤中含有能分解尿素的细菌的菌落数是多少?与其他同学的结果接近吗?如果差异很大,

② 研究未知的微生物,一定要注意进行规范的无菌操作,以防被致病的微生物感染。实验后,一定要洗手。



图2-9 培养皿的标记



图 2-10 脲酶的检测

② 细菌的数目还可以通过滤膜法来测定（以测定饮用水中大肠杆菌的数目为例）。将已知体积的水过滤后，将滤膜放在伊红美蓝培养基（参见附录3）上培养。在该培养基上，大肠杆菌的菌落呈现黑色。可以根据培养基上黑色菌落的数目，计算出水样中大肠杆菌的数量。

可能是什么原因引起的？

课题延伸

本课题对能分解尿素的细菌进行了初步的筛选。但是，这只是分离纯化菌种的第一步。对分离的菌种作进一步的鉴定，还需要借助生物化学的方法。

在细菌分解尿素的化学反应中，细菌合成的脲酶将尿素分解成了氨。氨会使培养基的碱性增强，pH升高。因此，我们可以通过检测培养基pH的变化来判断该化学反应是否发生。

在以尿素为唯一氮源的培养基中加入酚红指示剂，培养某种细菌后，如果pH升高，指示剂将变红（图2-10）。这样，我们就可以初步鉴定该种细菌能够分解尿素。

相关链接

活菌计数技术广泛应用于土壤含菌量的测定、食品卫生和水源污染度的检验等方面。如果你感兴趣，可以从下列项目中选做一个。

- （一）空气中微生物总数的检测
- （二）水中细菌总数的检测
- （三）牛奶中细菌的分离与计数
- （四）土壤中真菌（或放线菌）的分离与计数



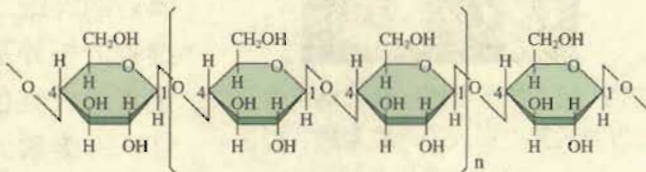
练习

1. 请你描述一个细菌在琼脂平板上形成一个肉眼可见的菌落的过程，并描述活菌计数的原理与方法。
2. 反刍动物，如牛和山羊，具有特殊的器官——瘤胃。在瘤胃中生活着多种微生物，其中许多微生物能以尿素作唯一氮源。请你设计一个实验，从瘤胃中分离出能够分解尿素的微生物。

课题3 分解纤维素的微生物的分离

课题背景

纤维素,一种由葡萄糖首尾相连而成的高分子化合物,是地球上含量最丰富的多糖类物质。植物的根、茎、叶等器官都含有大量的纤维素。地球上的植物每年产生的纤维素超过70亿吨,其中40%~60%能被土壤中某些微生物分解利用,这是因为它们能够产生纤维素酶。



纤维素的结构式

对这些微生物的研究与应用,使人们能够利用秸秆等废弃物生产酒精,用纤维素酶处理服装面料等。而要研究这些微生物,首先要将它们从土壤中种类众多的微生物中分离出来。在本课题中,我们将探讨如何分离土壤中能够分解纤维素的微生物。

基础知识

(一) 纤维素与纤维素酶

棉花是自然界中纤维素含量最高的天然产物(图2-11),此外,木材、作物秸秆等也富含纤维素。许多商品纤维素都是由天然纤维素制得的,如水溶性的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、不溶于水的微晶纤维素(Avicel)等。

纤维素酶是一种复合酶,一般认为它至少包括三种组分,即 C_1 酶、 C_x 酶和葡萄糖苷酶,前两种酶使纤维素分解成纤维二糖,第三种酶将纤维二糖分解成葡萄糖。正是在这三种酶的协同作用下,纤维素最终被水解成葡萄糖,为微生物的生长提供营养,同样,也可以为人类所利用。下面我们通过一个小实验来体会纤维素酶的作用。

在2支20 mL的试管中,分别放入1 cm × 6 cm的滤纸条,再分别加入pH为4.8、物质的量浓度为0.1 mol/L的醋酸—醋酸钠缓冲液10 mL、11 mL。在加入10 mL缓冲液的试管中加入1 mL纤维素酶(70~80 U/mL)。将2支试管固定在50 mL的锥形瓶中,在摇床上以140 r/min的转速振荡反应1 h,观察结果。你也可以用报纸、复印纸做这个实验。如果没有摇床,你可以采用定时人工振荡的方法。时



图2-11 成熟的棉株

② 1 U表示1个酶活力单位,是指在温度为25℃,其他反应条件,如pH等,均为最适的情况下,在1 min内转化1 mmol的底物所需的酶量。

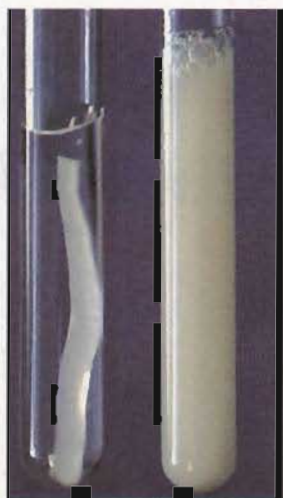


图 2-12 纤维素酶水解滤纸试验，右边的试管中加入了纤维素酶，而左边的没有加入

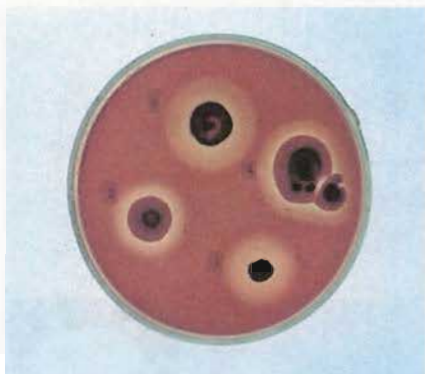


图 2-13 四种纤维素分解菌在刚果红培养基上形成的透明圈

❓ 本实验流程与课题 2 中的实验流程有哪些异同？

❓ 为什么要在富含纤维素的环境中寻找纤维素分解菌？

❓ 将滤纸埋在土壤中有何作用？你认为滤纸应该埋进土壤多深？

间足够长时，你会观察到滤纸被完全分解（图 2-12）。

（二）纤维素分解菌的筛选

在寻找微生物的过程中，人们希望能用一些简便直接的方法，找到所需要的微生物，同时筛掉不需要的微生物，就好像用筛子筛沙一样。在筛选纤维素分解菌的过程中，人们发明了刚果红染色法，这种方法能够通过颜色反应直接对微生物进行筛选。

刚果红（Congo Red，简称 CR）是一种染料，它可以与像纤维素这样的多糖物质形成红色复合物，但并不和水解后的纤维二糖和葡萄糖发生这种反应。当我们在含有纤维素的培养基中加入刚果红时，刚果红能与培养基中的纤维素形成红色复合物。当纤维素被纤维素酶分解后，刚果红—纤维素的复合物就无法形成，培养基中会出现以纤维素分解菌为中心的透明圈（图 2-13）。这样，我们就可以通过是否产生透明圈来筛选纤维素分解菌。

实验设计

请你根据实验流程图（图 2-14）和提供的三个资料，思考有关问题，然后进行实验设计，并写出详细的实验方案。



图 2-14 分离分解纤维素的微生物的实验流程示意图

〔资料一〕 土壤取样

根据经验，纤维素分解菌大多分布在富含纤维素的环境中，因此，采集土样时，可以选择纤维素丰富的环境，如树林中多年落叶形成的腐殖土，多年积累的枯枝败叶，等等。你还可以将富含纤维素的物质，如滤纸等，埋在土壤中。经过 30 d 左右，再从已腐烂的滤纸上筛选纤维素分解菌。

[资料二] 选择培养

在将样品稀释涂布到鉴别纤维素分解菌的培养基之前,可以通过选择培养增加纤维素分解菌的浓度,以确保能够从样品中分离到所需要的微生物。请分析旁栏中的培养基配方,回答下面的问题。

1. 旁栏给出的配方是液体培养基还是固体培养基?为什么?
2. 这个培养基对微生物是否具有选择作用?如果具有,又是如何进行选择的?
3. 你能否设计一个对照实验,说明选择培养的作用?

[资料三] 刚果红染色法

常用的刚果红染色法有两种,一种是先培养微生物,再加入刚果红进行颜色反应,另一种是在倒平板时就加入刚果红。

方法一 在长出菌落的培养基上,覆盖质量浓度为1 mg/mL的CR溶液,10~15 min后,倒去CR溶液,加入物质的量浓度为1 mol/L的NaCl溶液,15 min后倒掉NaCl溶液,此时,产生纤维素酶的菌落周围将会出现透明圈。

方法二 配制质量浓度为10 mg/mL的CR溶液,灭菌后,按照每200 mL培养基加入1 mL的比例加入CR溶液,混匀后倒平板。等培养基上长出菌落后,产生纤维素酶的菌落周围将会出现明显的透明圈。

操作提示

(一) 复习微生物技术

做这个实验前,请你先复习课题1和2中学习过的方法,主要包括培养基的配制、无菌操作技术、稀释涂布平板法、选择培养基的作用、土壤取样等。

(二) 选择培养的操作方法

将土样加入装有30 mL选择培养基的锥形瓶中,将锥形瓶固定在摇床上,在一定温度下振荡培养1~2 d,直至培养液变混浊。吸取一定的培养液(如5 mL),转移至另一瓶新鲜的选择培养基中,以同样的方法培养到培养液变混浊。吸取适量的培养液,稀释涂布到鉴别纤维素分解菌的培养基上。

结果分析与评价

1. 你选用了哪种实验样品来分离纤维素分解菌?取样的环境有哪些特点?作出这种选择的理由是什么?

② 纤维素分解菌的选择培养基

配方

纤维素粉	5 g
NaNO ₃	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.2 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
酵母膏	0.5 g
水解酪素	0.5 g
将上述物质溶解后,用蒸馏水定容到1 000 mL。	

② 鉴别纤维素分解菌的培养基

配方

CMC-Na	5~10 g
酵母膏	1 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
琼脂	15 g
土豆汁	100 mL
将上述物质溶解后,用蒸馏水定容到1 000 mL。	

想一想,这两种方法各有哪些优点与不足?你打算选用哪一种?

为什么选择培养能够“浓缩”所需的微生物?

如果没有摇床,可以采用定时人为摇晃锥形瓶的办法。

2. 培养基中有杂菌污染吗？你是否分离到了能够产生透明圈的微生物？它们是纤维素分解菌吗？

3. 比较你的分离结果与其他同学的有什么不同。分析产生不同结果的原因。

课题延伸

本课题对分解纤维素的微生物进行了初步的筛选。但是，这只是分离纯化的第一步。为确定得到的是纤维素分解菌，还需要进行发酵产纤维素酶的实验，纤维素酶的发酵方法有液体发酵和固体发酵两种。纤维素酶的测定方法，一般是采用对纤维素酶分解滤纸等纤维素后所产生的葡萄糖进行定量的测定。



练习

1. 请在查阅资料的基础上，写一篇科普短文，介绍分解纤维素的微生物在生产和生活中的应用。

2. 学完这个专题后，你能否总结出分离培养微生物的一般方法？请用流程图表示。

人教版®

专题 3

植物的组织培养技术



利用植物的一块组织，甚至一个细胞，就能培养出完整的植株，靠的就是植物组织培养技术。运用这种技术，可以实现优良品种的快速繁殖，保持遗传性状的一致；可以培育出大量不含病毒的幼苗，提高作物的产量；可以实现花卉的连续生产，不受开花季节的限制……然而这一技术从设想到成熟，却经历了半个世纪。这项富有挑战性的工作，不仅会使你学到新的技术，还会带给你丰富的体验，宝贵的启迪。

课题 1 菊花的组织培养

课题背景

科学研究表明,当植物细胞脱离了原来所在植物体的器官或组织而处于离体状态时,在一定的营养物质、激素和其他外界条件的作用下,就可能表现出全能性,发育成完整的植株。科学家用植物组织培养的方法,已经把许多种植物的离体的组织或细胞,培养成了完整的植物体。在本课题中,我们将通过菊花组织培养的实验来学习这一技术。



基础知识

(一) 植物组织培养的基本过程

在植物的个体发育过程中,细胞在形态、结构和生理功能上都会出现稳定性的差异,形成这些差异的过程叫做细胞分化。已经分化了的细胞在结构和功能上都比较专一,要在离体条件下发育成完整的植株,并不容易。

离体的植物组织或细胞,在培养了一段时间以后,会通过细胞分裂,形成愈伤组织(图3-1)。愈伤组织的细胞排列疏松而无规则,是一种高度液泡化的呈无定形状态的薄壁细胞。由高度分化的植物组织或细胞产生愈伤组织的过程,称为植物细胞的脱分化,或者叫做去分化。脱分化产生的愈伤组织继续进行培养,又可以重新分化成根或芽等器官,这个过程叫做再分



图 3-1 植物组织培养的流程图

化。再分化形成的试管苗，移栽到地里，可以发育成完整的植物体。图3-1简要地归纳了植物组织培养的过程。在这个过程中，往往需要使用植物激素，人为地控制细胞的脱分化与再分化。

（二）影响植物组织培养的因素

不同的植物组织，培养的难易程度差别很大。例如，烟草和胡萝卜的组织培养较为容易，而枸杞愈伤组织的芽诱导就比较难。因此，植物材料的选择直接关系到实验的成败。对于同一种植物材料，材料的年龄、保存时间的长短等也会影响实验结果。菊花的组织培养，一般选择未开花植株的茎上部新萌生的侧枝（图3-2）。

离体的植物组织和细胞，对营养、环境等条件的要求相对特殊，需要配制适宜的培养基。常用的一种培养基是MS培养基，其主要成分包括：大量元素，如N、P、K、Ca、Mg、S；微量元素，如B、Mn、Cu、Zn、Fe、Mo、I、Co；有机物，如甘氨酸、烟酸、肌醇、维生素，以及蔗糖等。在配制好的MS培养基中，常常需要添加植物激素。

植物激素中生长素和细胞分裂素是启动细胞分裂、脱分化和再分化的关键性激素。在生长素存在的情况下，细胞分裂素的作用呈现加强的趋势。按照不同的顺序使用这两类激素，会得到不同的实验结果。

使用顺序	实验结果
先使用生长素，后使用细胞分裂素	有利于细胞分裂，但细胞不分化
先使用细胞分裂素，后使用生长素	细胞既分裂也分化
同时使用	分化频率提高

当同时使用这两类激素时，两者用量的比例影响植物细胞的发育方向（参见旁栏）。可见，植物激素的浓度、使用的先后顺序以及用量的比例等，都会影响实验结果。植物激素的应用要做到得心应手，还得靠大量实践。

除了上述因素外，pH、温度、光照等条件也很重要。不同的植物对各种条件的要求往往不同。进行菊花的组织培养，一般将pH控制在5.8左右，温度控制在18~22℃，并且每日用日光灯照射12h。



图3-2 未开花的菊花植株

你能说出各种营养物质的作用吗？
同专题2中微生物培养基的配方相比，MS培养基的配方有哪些明显的不同？

常用的植物激素有：生长素、细胞分裂素和赤霉素等。生长素类有：2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)等。细胞分裂素类有：激动素(KT)、6-苄基嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)等。赤霉素类有赤霉酸(GA₃)等。

生长素用量比细胞分裂素用量，比值高时，有利于根的分化、抑制芽的形成；比值低时，有利于芽的分化、抑制根的形成。比值适中时，促进愈伤组织的形成。

② 为了避免每次配制培养基时都要称量几十种成分，可以将各种成分按比例配制成浓缩液，即培养基母液，使用时，根据浓缩比例计算用量、加水稀释。

② 用于离体培养的植物器官或组织片段，叫做外植体。

② 对外植体进行表面消毒时，既要考虑药剂的消毒效果，又要考虑植物的耐受能力。

实验操作

（一）制备 MS 固体培养基

MS 培养基含有 20 多种营养成分，实验室一般使用 4℃ 保存的配制好的培养基母液来制备。具体操作如下。

1. 配制各种母液 配制母液时，无机物中大量元素浓缩 10 倍，微量元素浓缩 100 倍（MS 培养基的配方参见附录 3），常温保存。激素类、维生素类以及用量较小的有机物一般可按 1 mg/mL 的质量浓度单独配制成母液。用母液配制培养基时，需要根据各种母液的浓缩倍数，计算用量。

2. 配制培养基 配制 1 L MS 培养基时，先将称好的琼脂加入 800 mL 蒸馏水，加热使琼脂熔化，然后加入蔗糖 30 g，取配制好的大量元素、微量元素、有机物和植物激素的母液，依次加入，加蒸馏水定容至 1 000 mL，调节 pH，最后分装到锥形瓶中，每瓶分装 50 mL 或 100 mL。由于菊花茎段的组织培养比较容易，因此不必添加植物激素。如果有兴趣，你也可以试着添加一些激素。

3. 灭菌 将分装好的培养基连同其他器械一起进行高压蒸汽灭菌。

（二）外植体消毒

选取菊花茎段时，要取生长旺盛的嫩枝。菊花茎段用流水冲洗后可加少许洗衣粉，用软刷轻轻刷洗，刷洗后在流水下冲洗 20 min 左右。用无菌吸水纸吸干外植体表面的水分，放入体积分数为 70% 的酒精中摇动 2~3 次，持续 6~7 s，立即将外植体取出，在无菌水中清洗。取出后仍用无菌吸水纸吸干外植体表面水分，放入质量分数为 0.1% 的氯化汞溶液中 1~2 min。取出后，在无菌水中至少清洗 3 次，漂净消毒液。

（三）接种

接种前用体积分数为 70% 的酒精将工作台擦拭一遍。工作台消毒后，首先点燃酒精灯。此后，所有的接种操作都必须在酒精灯旁进行，并且每次使用器械后，都需要用火焰灼烧灭菌。

将装有培养基的锥形瓶整齐地排列在酒精灯左侧。将消过毒的菊花茎段在无菌培养皿中切成小段（长约 0.5~1 cm）。左手持锥形瓶，右手拉开捆扎锥形瓶的绳子，并将封口膜攥于右手手心，以避免封口膜接触瓶口的一面被污染。左手持瓶，使瓶口旋转通过火焰；右手用镊子夹取菊

花茎段，插入培养基中（图3-3）。插入时应注意方向，不要倒插。每瓶接种6~8块外植体。接种后，将封口膜重新扎好。



图3-3 接种操作

（四）培养

接种后的锥形瓶最好放在无菌箱中培养，培养期间应定期消毒。培养温度控制在18~22℃，并且每日用日光灯光照12h。

（五）移栽

在移栽生根的菊花试管苗之前，应先打开培养瓶的封口膜，让试管苗在培养间生长几日。然后用流水清洗根部的培养基，将幼苗移植到消过毒的蛭石或珍珠岩等环境下生活一段时间，等幼苗长壮后再移栽到土壤中（图3-4）。

（六）栽培

将幼苗移栽后，每天观察并记录幼苗生长情况（图3-5），适时浇水、施肥，直至开花。

结果分析与评价

1. 接种3~4d后，观察外植体的生长情况，统计有多少外植体被污染，有多少能正常生长。分析外植体被污染的原因。

2. 你培养出愈伤组织了吗？从接种到长出愈伤组织经历了多少天？你培养出的愈伤组织进一步分化出根和芽了吗？

3. 两周后观察茎段的分化情况，填好结果记录表，并及时分析结果。

4. 幼苗移栽到露地后，能够正常生长吗？

你打算做几个重复组？你打算设置对照实验吗？



图3-4 幼苗的移栽



图3-5 移栽后的幼苗

① 以下配方可供你参考。

诱导菊花愈伤组织:

在MS培养基中加入BA和NAA, 质量浓度均为 0.5mg/L。

诱导菊花丛芽:

在MS培养基中加入BA和NAA, 质量浓度分别为 2~3 mg/L 和 0.02~0.3 mg/L。

诱导菊花生根:

MS 培养基各成分用量减半, 并添加 NAA 或 IAA, 质量浓度均为 0.1 mg/L。

课题延伸

一般来说, 容易进行无性繁殖的植物, 也容易进行组织培养, 如芦荟、豆瓣绿、秋海棠、月季等。你可以从中挑选一种你喜欢的植物, 进行组织培养。

如果你对植物激素的作用感兴趣的话, 可以在查阅资料的基础上, 探究生长素与细胞分裂素的使用比例对植物组织培养的影响。例如, 你可以设计一组对照实验, 分别探究不加任何植物激素、生长素用量与细胞分裂素用量的比值为1、比值大于1以及比值小于1时, 对实验结果的影响。



练习

1. 在植物组织培养的过程中, 为什么要进行一系列的消毒、灭菌, 并且要求无菌操作?

2. 在选取菊花茎段的时候, 为什么要选取生长旺盛的嫩枝?

人教版®

课题2 月季的花药培养

课题背景

1964年,科学家在培养毛叶曼陀罗的花药时,首次获得了由花药中的花粉粒发育而来的单倍体植株。这个实验说明生殖细胞和体细胞一样,在离体条件下也具有发育成完整植株的潜能。1972年,我国科学家开始进行花药离体培养育种研究,目前已在约300种高等植物中获得了成功,其中包括烟草、苹果、玉米、荔枝、龙眼、桃、梨、大豆等经济作物。在以水稻和小麦为代表的花药离体培养育种的研究与应用中,与常规杂交育种、转基因技术育种等相结合,形成了一套较完整的育种技术体系,处于世界领先地位。

植物的花药培养在育种上有特殊的意义。育种工作者可以采用花药培养的方法,使花粉粒发育为单倍体植株,再经过人工诱导使染色体数目加倍,重新恢复到正常植株的染色体数目。这样的植株不仅能够正常生殖,而且每对染色体上的成对的基因都是纯合的,自交产生的后代不会产生性状分离。单倍体育种不仅缩短了育种周期,也为新品种的培育开辟了新途径。在本课题中,我们将尝试月季的花药培养。



基础知识

(一) 被子植物的花粉发育

被子植物的雄蕊通常包含花丝、花药两部分。花药为囊状结构,内部含有许多花粉。花粉是由花粉母细胞经过减数分裂而形成的,因此,花粉是单倍体的生殖细胞。被子植物花粉的发育要经历小孢子四分体时期、单核期和双核期等阶段(图3-6)。在小孢子四分体时期,4个单倍体

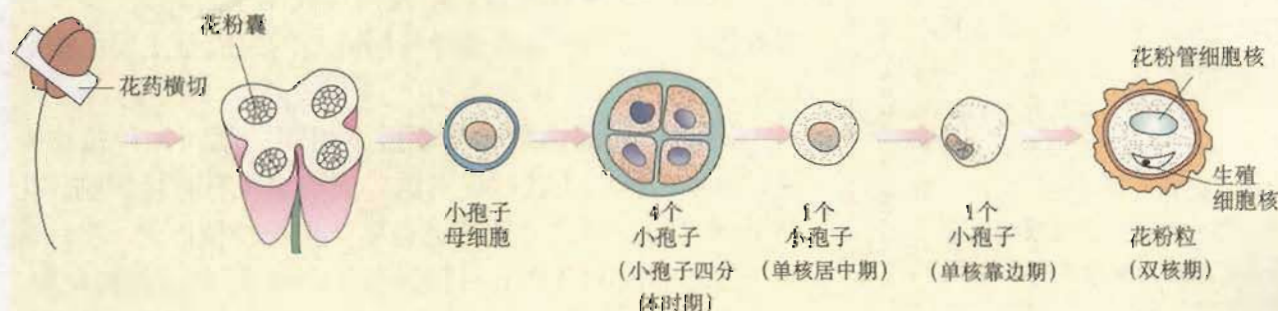


图3-6 被子植物花粉的发育过程

细胞连在一起，进入单核期时，四分体的4个单倍体细胞彼此分离，形成4个具有单细胞核的花粉粒。这时的细胞含浓厚的原生质，核位于细胞的中央（单核居中期）。随着细胞不断长大，细胞核由中央移向细胞一侧（单核靠边期），并分裂成1个生殖细胞核和1个花粉管细胞核，进而形成两个细胞，一个是生殖细胞，一个是营养细胞。生殖细胞将再分裂一次，形成两个精子。

（二）产生花粉植株的两种途径

通过花药培养产生花粉植株（即单倍体植株）一般有两种途径（图3-7），一种是花粉通过胚状体阶段发育为植株，另一种是花粉在诱导培养基上先形成愈伤组织，再将其诱导分化成植株。这两种途径之间并没有绝对的界限，主要取决于培养基中激素的种类及其浓度配比。



图3-7 花药培养产生花粉植株的两种途径

人们一直以为，植物细胞的离体培养只能通过分别诱导芽和根等器官再发育成植株。20世纪50年代末，科学家在胡萝卜根组织的单细胞悬浮培养液中发现，某些体细胞在形态上转变为与合子发育成的胚非常相似的结构，它的发育过程也与合子胚类似，胚芽、胚根、胚轴等结构完整，就像一颗种子。科学家将这种结构称做体细胞胚（somatic embryo）或胚状体（embryoid）。除了植物的体细胞外，由单倍体性细胞产生的花粉胚，也可发育成为单倍体植株。

（三）影响花药培养的因素

诱导花粉植株能否成功及诱导成功率的高低，受多种因素影响，其中材料的选择与培养基的组成是主要的影响因素。

不同植物的诱导成功率很不相同。就同一种植物来说，亲本植株的生理状况对诱导成功率也有直接影响。花期早期时的花药比后期的更容易产生花粉植株。一般月季的花药培养时间选在五月初到五月中旬，即月季的初花期。选择合适的花粉发育时期也是提高诱导成功率的重要因素。这是因为并不是任何时期的花粉都可以经过培养产生愈伤

i 花期一般指在一个生长季内植株开花的时间段。比如某些种类的月季，从5月初一直到11月都连续开花。那么5月初就叫做该种月季的初花期或花期早期。花期早期的花蕾营养状态及生理状态会比较好，能提高花粉诱导成功率。

组织或胚状体,在花粉发育的过程中,只有某一个时期对离体刺激敏感。一般来说,在单核期,细胞核由中央移向细胞一侧的时期,花药培养成功率最高。选择单核期以前的花药接种,质地幼嫩,极易破碎;选择单核期以后的花药接种,花瓣已有些松动,又给材料的消毒带来困难。为了挑选到单核期的花药,通常选择完全未开放的花蕾(图3-8)。盛开的或略微开放的花(图3-9),都不宜选作实验材料。此外,亲本植株的生长条件、材料的低温预处理以及接种密度等对诱导成功率都有一定影响。

实验操作

(一) 材料的选取

选择花药时,一般要通过镜检来确定其中的花粉是否处于适宜的发育期。确定花粉发育时期的最常用的方法有醋酸洋红法。但是,某些植物的花粉细胞核不易着色,需采用焙花青-铬矾法,这种方法能将花粉细胞核染成蓝黑色。

醋酸洋红法 将花药放在载玻片上,加一滴质量分数为1%的醋酸洋红,用镊柄将花药捣碎,盖上盖玻片后在显微镜下检查。醋酸洋红的配制方法是:将体积分数为45%的醋酸100 mL煮沸,缓缓加入1 g洋红,再加热回流(回流装置参见专题6课题2)8 h,冷却至50℃,过滤即可。

焙花青-铬矾法 花药应先在卡诺氏固定液中固定20 min,然后取出放在载玻片上,加焙花青-铬矾溶液染色,盖上盖玻片后在显微镜下检查。卡诺氏固定液的配制方法是:将无水酒精与冰醋酸按体积比为3:1的比例混匀。焙花青-铬矾溶液的配制方法是:将5 g铬钾矾 $[K_2SO_4Cr_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O]$ 加入90 mL蒸馏水中,溶解后加入0.1 g焙花青,混匀并加热至沸腾,煮沸5 min后冷却至室温,过滤,加蒸馏水定容至100 mL。

(二) 材料的消毒

通常先将花蕾用体积分数为70%的酒精浸泡大约30 s,立即取出,在无菌水中清洗。取出后再用无菌吸水纸吸干花蕾表面的水分,放入质量分数为0.1%的氯化汞溶液中2~4 min(也可用质量分数为1%的次氯酸钙溶液或饱和漂白粉溶液),取出后再用无菌水冲洗3~5次。

(三) 接种和培养

消毒后的花蕾,要在无菌条件下除去萼片和花瓣,并立即将花药接种到培养基上。在剥离花药时,要尽量不损



为什么花瓣松动会给材料的消毒带来困难?



图3-8 完全未开放的月季花蕾



图3-9 略微开放的月季花蕾

② 月季花药培养基配方

在1000 mL MS培养基配方中添加

2,4-D	0.4 mg
KT	0.2 mg
IAA	4 mg

调节pH至5.8。

② 诱导丛芽或胚状体的培养基配方

MS 培养基中添加 GA、IBA 和 BA, 质量浓度分别为 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L。

② 诱导生根的培养基配方

MS 培养基各成分用量减半, 添加 IAA, 质量浓度为 1.5 mg/L。

伤花药 (否则接种后容易从受伤部位产生愈伤组织), 同时还要彻底去除花丝, 因为与花丝相连的花药不利于愈伤组织或胚状体的形成。

通常每瓶接种花药 7~10 个, 培养温度控制在 25℃ 左右, 不需要光照。幼小植株形成后才需要光照。

一般经过 20~30 d 培养后, 会发现花药开裂, 长出愈伤组织或形成胚状体。将愈伤组织及时转移到分化培养基上, 以便进一步分化出再生植株。如果花药开裂释放出胚状体, 则一个花药内就会产生大量幼小植株, 必须在花药开裂后尽快将幼小植株分开, 分别移植到新的培养基上, 否则这些植株将很难分开。

在花药培养中, 特别是通过愈伤组织形成的花粉植株, 染色体组的数目常常会发生变化。因此还需要对培养出来的植株作进一步的鉴定和筛选。

结果分析与评价

1. 你能够通过镜检找到处于适宜的发育期的花粉吗?
2. 你的花药培养出现了被污染的现象吗? 如果有, 请分析产生污染的原因。
3. 你接种的花药是否长出了花粉愈伤组织或胚状体?



练习

1. 紫色、不甜的玉米 (基因型为 AASuSu) 和白色、甜玉米 (基因型为 aasusu) 杂交 (Su 和 su 代表一对等位基因), 得到的 F_1 (AaSusu) 再进行自交, F_2 会有紫色甜玉米的表现型产生。如果运用常规育种方法, 应该如何筛选出纯合的紫色甜玉米?

如果利用花药培养的技术, 又应该怎样做呢?

2. 学完这个专题后, 你能说出植物组织培养技术与花药培养技术的异同吗? 你能举例说明组织培养技术在生产中的实际应用吗?

专题 4 酶的研究与应用



酶是细胞合成的生物催化剂，几乎所有的生命活动都离不开酶。随着生物科学技术的发展，酶已经走出实验室，走进人们的生产和生活。成吨的葡萄糖靠酶来生产；加酶洗衣粉、加酶牙膏在商店货架上比比皆是；药店里有助消化的多酶片；医院里有用于诊断检测的酶传感器……然而，酶的商品化生产和应用并非易事。在本专题中，我们将重点研究酶在生产生活中的实际应用，包括制作果汁、洗涤衣物以及通过细胞的固定化技术应用酶。

课题 1 果胶酶在果汁生产中的作用

课题背景

我国水果生产发展迅速，每年上市的新鲜水果品种多、数量大。但由于收获的季节性强，易造成积压滞销，腐烂变质。水果的加工技术，不仅可以缓解产销矛盾，而且能够提高产品的附加值，满足人们不同层次的需求。水果的加工包括制作果汁、果干、果粉和果酒等。在本课题中，我们将探究果胶酶在果汁生产中的应用。

制作果汁要解决两个主要问题：一是果肉的出汁率低，耗时长；二是榨取的果汁浑浊、黏度高，容易发生沉淀。在生产上，人们使用果胶酶、纤维素酶等来解决上述问题。在本课题中，我们将探究利用果胶酶制作苹果汁的适宜条件，自己动手制作苹果汁。

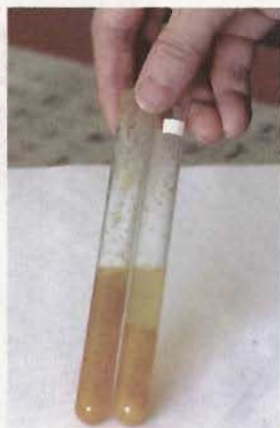


图 4-1 两个装有果汁的试管，右边的试管中加入了果胶酶，而左边的没有加入



图 4-2 果胶酶试剂

基础知识

（一）果胶酶的作用

果胶酶有什么作用？观察图 4-1，不难找到答案。果胶酶为什么能够提高水果的出汁率并使果汁变得澄清呢？回答这个问题，需要了解植物细胞壁和胞间层的组成成分——果胶。

果胶是植物细胞壁以及胞间层的主要组成成分之一，它是由半乳糖醛酸聚合而成的一种高分子化合物，不溶于水。在果汁加工中，果胶不仅会影响出汁率，还会使果汁浑浊。果胶酶（图 4-2）能够分解果胶，瓦解植物的细胞壁及胞间层，使榨取果汁变得更容易，而果胶分解成可溶性的半乳糖醛酸，也使得浑浊的果汁变得澄清。果胶酶并不特指某一种酶，而是分解果胶的一类酶的总称，包括多聚半乳糖醛酸酶、果胶分解酶和果胶酯酶等。

（二）酶的活性与影响酶活性的因素

酶的活性是指酶催化一定化学反应的能力。酶活性的高低可以用在一定条件下，酶所催化的某一化学反应的反应速度来表示。在科学研究与工业生产中，酶反应速度用单位时间内、单位体积中反应物的减少量或产物的增加量

来表示。

温度、pH和酶的抑制剂等条件会影响酶的活性,果胶酶也是这样。在本课题中,我们首先要探究温度、pH对果胶酶活性的影响。

(三) 果胶酶的用量

生产果汁时,为了使果胶酶得到充分的利用,节约成本,需要控制好酶的用量。在本课题中,我们在探究了果胶酶催化反应的最适pH和最适温度的基础上,还要进一步探究对于一定量的苹果泥,使用多少果胶酶最合适。

实验设计

请你根据下面提供的两个资料进行实验设计,写出详细的实验方案。

[资料一] 探究温度和pH对酶活性的影响

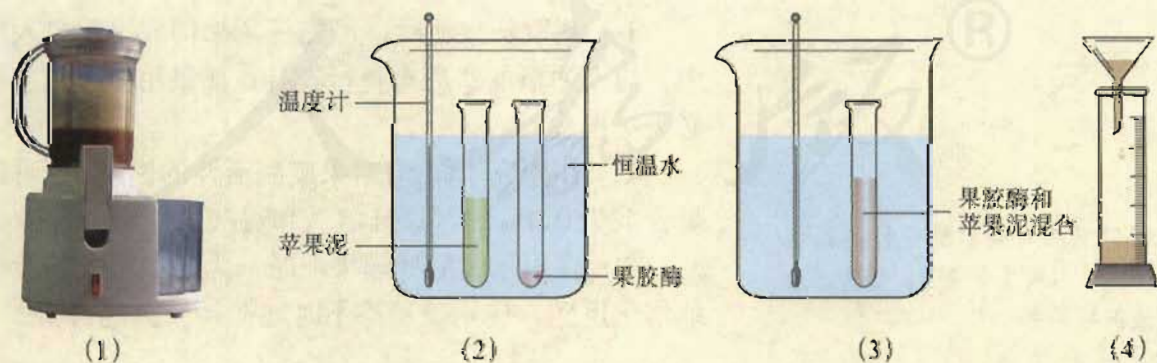
你已经研究过温度和pH对唾液淀粉酶活性的影响,掌握了在一恒定温度下通过设置pH梯度来确定酶催化反应的最适pH,在一恒定的pH下通过设置温度梯度来确定酶催化反应的最适温度的方法。在本课题的研究中,你将如何设置温度梯度和pH梯度呢?在此基础上,你能设计出具体的实验操作方法吗?下面提供了一位同学设计的实验方案及实验流程示意图(图4-3),请你结合有关问题评价他的实验方案,然后确定自己的方案。

选取的温度系列为:30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃和70℃。

选取的pH系列为:5、6、7、8、9。

植物、霉菌、酵母菌和细菌均能产生果胶酶。由霉菌发酵生产的果胶酶是食品加工业中使用量最大的酶制剂之一,被广泛地应用于果汁加工业。

虽然实验的变量发生了变化,但通过设置梯度来确定最适值的思想方法是不变的。



(1) 搅拌器搅拌制苹果泥;(2) 将分别装有苹果泥和果胶酶的试管在恒温水浴中保温(探究最适温度时,准备一组烧杯,分别盛有不同温度的水;探究最适pH时,准备一组试管,将每个试管中的反应混合物调节至不同的pH);(3) 加入果胶酶反应一段时间;(4) 过滤果汁。

图4-3 探究温度和pH对果胶酶活性影响的实验流程示意图

为什么在混合苹果泥和果胶酶之前，要将果泥和果胶酶分装在不同的试管中恒温处理？

在探究温度或pH对酶活性的影响时，是否需要设置对照？如果需要，又应该如何设置？为什么？

A同学将哪个因素作为自变量，控制哪些因素不变？为什么要作这样的处理？B同学呢？

想一想，为什么能够通过测定滤出的苹果汁的体积大小来判断果胶酶活性的高低？

当探究温度对果胶酶活性的影响时，哪个因素是自变量，哪些因素应该保持不变？

在研究温度和pH对唾液淀粉酶活性的影响时，通过用碘液检测反应后的溶液是否变蓝来判断酶是否具有活性。本课题的要求更进一步，需要定量测定果胶酶的活性。下面是两位同学设计的测定果胶酶活性的实验，你认为他们的方法是否正确、可行。你打算如何测定果胶酶的活性呢？

A同学的操作方法是：在不同温度或pH下，将一定量的果胶酶加入一定量的苹果泥中，反应同样长时间，再将反应液过滤同样长时间，用量筒测量滤出的苹果汁的体积，比较获得的苹果汁的体积。获得的苹果汁越多，说明果胶酶的活性越高。

B同学认为可以通过比较果汁的澄清度来判断果胶酶活性的高低。果汁越澄清，表明果胶酶的活性越高。

[资料二] 探究果胶酶的用量

在探究了果胶酶的最适温度和最适pH之后，可以进一步研究果胶酶的最适用量。此时，实验的变量不再是pH或温度，而变为酶的用量。你打算如何设置酶用量的梯度呢？

某位同学打算通过苹果泥出汁的多少来判断果胶酶的用量是否合适，他的想法是：如果随着酶的用量增加，过滤到的果汁的体积也增加，说明酶的用量不足；当酶的用量增加到某个值后，再增加酶的用量，过滤到的果汁的体积不再改变，说明酶的用量已经足够，那么，这个值就是酶的最适用量。你同意他的想法吗？在这个实验中，除了酶的用量以外，影响果汁产量的因素还有：pH、温度、酶催化反应的时间、苹果泥的用量，你打算如何控制上述因素的影响？

操作提示

1. 制取苹果泥时，可先将苹果切成小块放入榨汁机中，加入适量的水后再进行搅拌；如果用橙子做实验，不必去掉橙皮。

2. 在探究不同pH对果胶酶活性的影响时，可以用质量分数为0.1%的NaOH溶液和盐酸进行调节。

3. 在用果胶酶处理果泥时，为了使果胶酶能够充分地催化反应，应用玻璃棒不时地搅拌反应混合物。

结果分析与评价

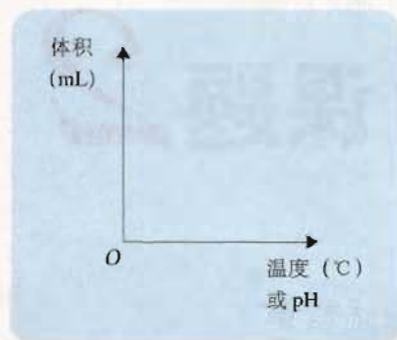
1. 温度、pH是如何影响果胶酶的活性的？请将你的实验数据转换成曲线图（参见下页旁栏），与同学交流。

2. 在最适温度和pH条件下制作1L苹果汁，使用多

少果胶酶最合适？为什么？

3. 你做出了澄清的苹果汁吗？粗略地估算你制作1 L 苹果汁的成本，其价格接近于市场价吗？如果有明显不同，你能分析出产生差异的原因吗？

4. 如果从你绘制的曲线图中无法判断出果胶酶的最适 pH 或温度，你将如何改进实验方法？



练习

比较本实验中制作果汁的方法与工业制作流程(下图)，总结大规模生产与实验室制备的主要不同点。



课题2

探讨加酶洗衣粉的洗涤效果

课题背景

当你自己动手洗衣服的时候，会发现油渍、汗渍或血渍的衣服很难彻底洗干净，你是如何解决这个问题的？你是否尝试过加酶洗衣粉？与普通洗衣粉相比，加酶洗衣粉能更有效地清除顽渍。在本课题中，我们将了解加酶洗衣粉的作用，探讨加酶洗衣粉使用的最适条件。



查阅资料，看看普通洗衣粉中包含哪些化学成分。



普通洗衣粉中含有磷。含磷污水的排放可能导致微生物和藻类的大量繁殖，造成水体的污染。加酶洗衣粉可以降低表面活性剂和三聚磷酸钠的用量，使洗涤剂朝低磷无磷的方向发展，减少对环境的污染。

基础知识

加酶洗衣粉是指含有酶制剂的洗衣粉，目前常用的酶制剂有四类：蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶。其中，应用最广泛、效果最明显的是碱性蛋白酶和碱性脂肪酶。碱性蛋白酶能将血渍、奶渍等含有的大分子蛋白质水解成可溶性的氨基酸或小分子的肽，使污迹容易从衣物上脱落。这是普通洗衣粉难以做到的。同样的道理，脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶也能分别将大分子的脂肪、淀粉和纤维素水解为小分子物质，使洗衣粉具有更好的去污能力。

温度、酸碱度和表面活性剂都会影响酶的活性。如果将酶直接添加到洗衣粉中，过不了多久，酶就会失活。为了解决这个难题，科学家通过基因工程生产出了能够耐酸、耐碱、忍受表面活性剂和较高温度的酶，并且通过特殊的化学物质将酶层层包裹，与洗衣粉的其他成分隔离。这些隔离层遇到水后，就会很快溶解，包裹在其中的酶就能迅速发挥催化作用了。

实验设计

在本课题中，我们主要探究有关加酶洗衣粉的三个问题：一是普通洗衣粉和加酶洗衣粉对衣物污渍的洗涤效果有什么不同；二是在什么样的温度下使用加酶洗衣粉效果最好；三是添加不同种类的酶的洗衣粉，其洗涤效果有哪些区别。下面提供了三个相关资料，请你思考有关问题，针

对要探究的三个方面写出具体的设计方案。

[资料一] 如何有效地控制变量

在本课题中,控制变量的思路与课题1类似,只是研究的具体问题发生了变化。你能借鉴课题1的方法,分析本课题的研究思路吗?

下面是两位同学设计的实验方案,请你分析这两个方案,思考相关问题。

A同学的方案:实验中使用大烧杯和固定的水量,洗涤材料使用固定大小的新布,洗涤过程通过玻璃棒搅拌来实现(图4-4),洗衣粉的用量可以通过天平称量来控制,污渍的污染程度要保持一致,这可以通过滴加在布料上的污染物的量来控制。

B同学认为洗衣粉的洗涤效果是显而易见的事情。平时用洗衣机洗衣服,如果加普通洗衣粉,衣领部分的污渍总会有些残留,如果使用加酶洗衣粉,就能完全洗干净,这就已经说明加酶洗衣粉的洗涤效果更好,A同学的方案是将简单问题复杂化了。请结合两位同学的方案,思考下面的问题。

1.你同意B同学的观点吗?请说明你的理由。

2.你认为他们的方案是否存在问题?如果有问题,有哪些问题?你能提出一个更好的方案吗?

3.你能就此例谈一谈科学实验与日常生活经验的联系与区别吗?

[资料二] 考虑实际生活中的具体情况

本课题不仅要用科学探究的方法研究日常生活中的问题,还需要将研究的结果应用到实际生活中去。因此,在探究的过程中,不仅要从理论层面去思考问题,还要充分考虑日常生活中的具体情况。某同学探究温度对加酶洗衣粉洗涤效果的影响,选择10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃和70℃来进行实验。请你分析这个方案是否完善、妥当,并提出改进建议。

[资料三] 不同类型的加酶洗衣粉的洗涤效果

下表是某位同学设计的实验表格,用来探究不同类型的加酶洗衣粉的洗涤效果。你同意他的设计方案吗?需要做怎样的改进?请拿出你的实验方案。

污染物	蛋白酶洗衣粉	复合酶洗衣粉	普通洗衣粉
油渍			
汗渍			
血渍			

i 科学探究中,研究变量的思路是一致的,只是在不同的问题情境下,具体做法不同。



图4-4 探究加酶洗衣粉的洗涤效果

? 你打算选用什么洗涤材料?

i 衣物的洗涤,不仅要考虑洗涤效果,还要考虑衣物的承受能力、洗涤成本等因素。

? 评判实验结果必须有一个客观标准。在本课题中,你打算使用什么方法和标准判断洗涤效果?请仔细考虑后确定一个方案。



常见的去污产品

结果分析与评价

请将你的结果写成研究报告，说明：

1. 加酶洗衣粉与普通洗衣粉洗涤效果的比较分析；
2. 使用加酶洗衣粉的最适条件；
3. 各种不同品牌的加酶洗衣粉对油渍、汗渍和血渍等的洗涤效果。

相关链接

1. 衣服的袖口和领口往往有较多污渍，用一般的洗衣粉很难清洗，但“衣领净”却能有效地去除这些顽渍。请你分析其中的原因。
2. 超市中有不少针对厨房油垢、马桶污垢、地面污渍的去污产品，它们是否含有酶？你能根据这些产品的去污原理，将它们进行分类吗？使用这些产品会造成环境污染吗？



练习

1. 请比较普通洗衣粉和加酶洗衣粉去污原理的异同。
2. 有位同学打算用丝绸作为实验材料，探讨含有蛋白酶的洗衣粉的洗涤效果，你认为他这样做

合适吗？为什么？

3. 请为加酶洗衣粉设计一份既科学而又吸引人的广告。

课题 3 酵母细胞的固定化

课题背景

如今,酶已经大规模地应用于食品、化工、轻纺、医药等各个领域。在应用酶的过程中,人们发现了一些实际问题:酶通常对强酸、强碱、高温和有机溶剂等条件非常敏感,容易失活;溶液中的酶很难回收,不能被再次利用,提高了生产成本;反应后酶会混在产物中,可能影响产品质量。

于是,有人设想,将酶固定在不溶于水的载体上,使酶既能与反应物接触,又能与产物分离,同时,固定在载体上的酶还可以被反复利用。现代的固定化酶技术已完全实现了这一设想。高果糖浆的生产就是固定化酶技术成功地应用于工业生产的实例。

酶是由细胞合成的,于是,又有人设想,能否将合成酶的细胞直接固定?自20世纪70年代,在固定化酶技术的基础上,又发展出了细胞固定化技术。与固定化酶技术相比,固定化细胞制备的成本更低,操作更容易。在本课题中,我们将动手制备固定化酵母细胞,体会固定化酶的作用。



基础知识

(一) 固定化酶的应用实例

我们以高果糖浆的生产为例来了解固定化酶技术在生产实践中的应用。高果糖浆的生产需要使用葡萄糖异构酶,它能将葡萄糖转化成果糖。这种酶的稳定性好,可以持续发挥作用。但是,酶溶解于葡萄糖溶液后,就无法从糖浆中回收,造成很大的浪费。

使用固定化酶技术,将这种酶固定在一一种颗粒状的载体上,再将这些酶颗粒装到一个反应柱内(图4-5),柱子底端装上分布着许多小孔的筛板。酶颗粒无法通过筛板上的小孔,而反应溶液却可以自由出入。生产过程中,将葡萄糖溶液从反应柱的上端注入,使葡萄糖溶液流过反应柱,与固定化葡萄糖异构酶接触,转化成果糖。从反应柱的下端流出。反应柱能连续使用半年,大大降低了生产成本,提高了果糖的产量和质量。目前,用固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆的规模已经超过了每年1 000万吨。

① 高果糖浆是指果糖含量为42%左右的糖浆。作为蔗糖的替代品,高果糖浆不会像蔗糖那样诱发肥胖、糖尿病、龋齿和心血管病,对人类的健康更有益。

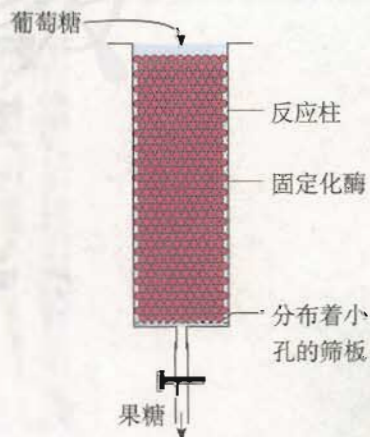
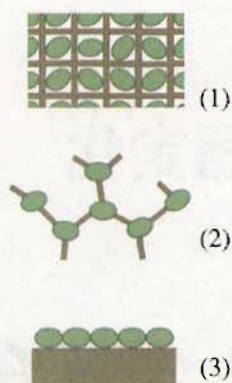


图4-5 固定化酶的反应柱示意图



- (1) 将酶包埋在细微网格里;
- (2) 将酶相互连接起来;
- (3) 将酶吸附在载体表面上。

图 4-6 酶的几种固定方式示意图



图 4-7 化学试剂海藻酸钠

i 在缺水状态下, 微生物处于休眠状态。活化就是让处于休眠状态的微生物重新恢复正常的的生活状态。

(二) 固定化细胞技术

固定化酶和固定化细胞技术是利用物理或化学方法将酶或细胞固定在一定空间内的技术, 包括包埋法、化学结合法(将酶分子或细胞相互结合, 或将其结合到载体上)和物理吸附法(图 4-6)。一般来说, 酶更适合采用化学结合和物理吸附法固定化, 而细胞多采用包埋法固定化。这是因为细胞体积大, 而酶分子很小; 体积大的细胞难以被吸附或结合, 而体积小的酶容易从包埋材料中漏出。

从操作角度来考虑, 你认为哪一种方法更容易? 哪一种方法对酶活性的影响更小? 固定化细胞固定的是一种酶还是一系列酶? 如果想将微生物的发酵过程变成连续的酶反应, 应该选择哪种方法? 如果反应物是大分子物质, 又应该采用哪种方法?

本课题使用包埋法来固定细胞, 即将微生物细胞均匀地包埋在不溶于水的多孔性载体中。常用的载体有明胶、琼脂糖、海藻酸钠、醋酸纤维素和聚丙烯酰胺等。本实验选用海藻酸钠作载体包埋酵母细胞(图 4-7)。

实验操作

(一) 制备固定化酵母细胞

1. 酵母细胞的活化

称取 1 g 干酵母(图 4-8), 放入 50 mL 的小烧杯中, 加入蒸馏水 10 mL, 用玻璃棒搅拌, 使酵母细胞混合均匀, 成糊状, 放置 1 h 左右, 使其活化(图 4-9)。

2. 配制物质的量浓度为 0.05 mol/L 的 CaCl_2 溶液

称取无水 CaCl_2 0.83 g, 放入 200 mL 的烧杯中, 加入 150 mL 蒸馏水, 使其充分溶解, 待用。



图 4-8 袋装干酵母



图 4-9 活化的酵母

3. 配制海藻酸钠溶液

称取0.7 g海藻酸钠,放入50 mL小烧杯中,加入10 mL水,用酒精灯加热,边加热边搅拌(图4-10),将海藻酸钠调成糊状,直至完全溶化,用蒸馏水定容至10 mL。注意,加热时要用小火,或者间断加热,反复几次,直到海藻酸钠溶化为止。

4. 海藻酸钠溶液与酵母细胞混合

将溶化好的海藻酸钠溶液冷却至室温,加入已活化的酵母细胞,进行充分搅拌,使其混合均匀(图4-11),再转移至注射器中。

5. 固定化酵母细胞

以恒定的速度缓慢地将注射器中的溶液滴加到配制好的 CaCl_2 溶液中,观察液滴在 CaCl_2 溶液中形成凝胶珠的情形(图4-12)。将这些凝胶珠在 CaCl_2 溶液中浸泡30 min左右。如果没有注射器,可以在小塑料瓶上安装一个孔径为2 mm的喷嘴来使用。

(二) 用固定化酵母细胞发酵

1. 将固定好的酵母细胞(凝胶珠)用蒸馏水冲洗2~3次。

2. 将150 mL质量分数为10%的葡萄糖溶液转移到200 mL的锥形瓶中,再加入固定好的酵母细胞,置于25℃下发酵24 h(图4-13)。

操作提示

海藻酸钠在水中溶解的速度较慢,需要通过加热促进其溶解。溶解海藻酸钠,最好采用小火间断加热的方法。例如,加热几分钟后,从石棉网上取下烧杯冷却片刻,并不断搅拌,再将烧杯放回石棉网继续加热,如此重复数次,直至海藻酸钠完全溶化。如果加热太快,海藻酸钠会发生焦糊。

结果分析与评价

1. 观察并描述形成的凝胶珠的颜色和形状。
2. 观察利用固定化酵母细胞发酵的葡萄糖溶液,看看是否有气泡产生,闻闻是否有酒味。

课题延伸

如果希望反复使用固定化酵母细胞,就需要避免其他微生物的污染。在工业生产中,细胞的固定化是在严格无



图4-10 溶化海藻酸钠的过程



图4-11 海藻酸钠溶液与酵母细胞混合



图4-12 酵母细胞的固定化



图4-13 用固定化酵母细胞发酵葡萄糖溶液

菌的条件下进行的。

结合专题2的无菌操作技术,想一想如果要求制作反复使用的固定化酵母细胞,应该在实验过程中注意哪些问题?

相关链接

结合专题1中的课题1,想一想,是否可以利用固定化细胞发酵制果酒和果醋,使用固定化细胞能否达到连续生产的目的?有兴趣的同学不妨试一试。



练习

1. 直接使用酶、使用固定化酶和使用固定化细胞催化反应,各有哪些优点与不足?

2. 你能写一篇短文,描述葡萄糖分子通过固定化酵母细胞转变成酒精的过程吗?

3. 目前,还没有一种固定化技术能普遍适用于所有的酶。在实际应用中,需要根据各种酶的特性,探索最佳的固定化途径。你能解释为什么很难找出一种普遍适用的固定酶的方法吗?

专题 5 DNA 和蛋白质技术



汇涓流而成江河，积跬步而至千里。在分子生物学领域，如果没有一项项分子生物学技术的成熟与积累，就没有分子生物学高速发展的今天。从单项技术来看，提取DNA的技术可能平淡无奇，PCR技术也只是重复地扩增某个DNA片段，分离某种蛋白质的工作难免繁琐。但是，正是通过一项项技术上的突破，人类才能完成像人类基因组计划这样恢宏庞大的工程。在本专题中，我们将从基础入手，学习有关DNA和蛋白质的一些技术，或许这就是你迈向分子生物学研究的第一步。

课题 1 DNA 的粗提取与鉴定

课题背景

当你制作DNA的双螺旋结构模型，模拟DNA的复制，绘制DNA指导蛋白质的合成过程图之后，对DNA的结构与功能一定有了不少的了解。但是，仅仅从课本上了解DNA，就像“雾里看花、水中望月”，总隔着一层。本课题为你提供了从生物体内直接提取DNA的机会。

基础知识

提取生物大分子的基本思路是选用一定的物理或化学方法分离具有不同物理或化学性质的生物大分子。对于DNA的粗提取而言，就是要利用DNA与RNA、蛋白质和脂质等在物理和化学性质方面的差异，提取DNA，去除其他成分。首先，让我们来了解这些大分子的物理化学性质。

（一）DNA的溶解性

DNA和蛋白质等其他成分在不同浓度的NaCl溶液中溶解度不同，利用这一特点，选择适当的盐浓度就能使DNA充分溶解，而使杂质沉淀，或者相反，以达到分离目的。图5-1是DNA在NaCl溶液中的溶解度曲线，请根据曲线图，思考下面的问题。

1. 在什么浓度下，DNA的溶解度最小？DNA在NaCl溶液中的溶解度是如何变化的？

2. 如何通过控制NaCl溶液的浓度使DNA在盐溶液中溶解或析出？

此外，DNA不溶于酒精溶液，但是细胞中的某些蛋白质则溶于酒精。利用这一原理，可以将DNA与蛋白质进一步地分离。

（二）DNA对酶、高温和洗涤剂的耐受性

蛋白酶能水解蛋白质，但是对DNA没有影响。大多数蛋白质不能忍受60~80℃的高温，而DNA在80℃以

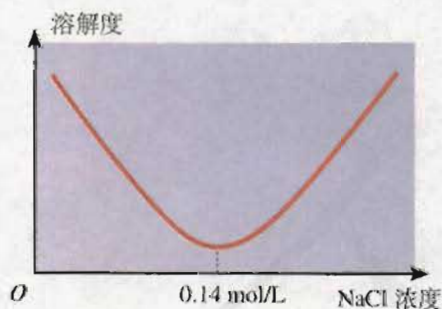


图 5-1 DNA 在 NaCl 溶液中的溶解度曲线

上才会变性。洗涤剂能够瓦解细胞膜(图5-2),但对DNA没有影响。

(三) DNA 的鉴定

在沸水浴的条件下,DNA与二苯胺反应呈现蓝色,因此,二苯胺可以作为鉴定DNA的试剂。

实验设计

(一) 实验材料的选取

什么样的实验材料适合提取DNA?原则上,凡是含有DNA的生物材料都可以考虑,但是,选用DNA含量相对较高的生物组织,成功的可能性更大。下面的生物材料适合做DNA的提取吗?为什么?你打算选用什么实验材料?你也可以同时用2~3种实验材料,最后比较哪种材料中DNA的含量更高。

鱼卵、猪肝、菜花(花椰菜)、香蕉、鸡血、哺乳动物的红细胞、猕猴桃、洋葱、豌豆、菠菜、在液体培养基中培养的大肠杆菌。

(二) 破碎细胞,获取含DNA的滤液

动物细胞的破碎比较容易,以鸡血为例,在鸡血细胞液中加入一定量的蒸馏水,同时用玻璃棒搅拌,过滤后收集滤液即可。如果实验材料是植物细胞,需要先用洗涤剂溶解细胞膜。例如,提取洋葱的DNA时,在切碎的洋葱中加入一定的洗涤剂和食盐,进行充分地搅拌和研磨,过滤后收集研磨液。

在这一步的设计中,你可以通过设置对照实验来探究生物材料与洗涤剂、食盐用量的最佳比例,看看不同的用量比对结果会产生怎样的影响;你也可以探究用不同的洗涤剂,如洗发香波、沐浴液、洗洁精来提取DNA时,会产生什么不同的效果。

(三) 去除滤液中的杂质

为了纯化提取的DNA,需要将滤液作进一步处理。下面是去除杂质的三个方案,你可以根据实际情况选用一种,或者自己设计一个方案。

方案一 利用DNA在不同浓度的NaCl溶液中溶解度的不同,通过控制NaCl溶液的浓度去除杂质。具体做法是:在滤液中加入NaCl,使NaCl溶液物质的量浓度为2 mol/L,过滤除去不溶的杂质,再调节NaCl溶液物质的量浓度为0.14 mol/L,析出DNA,过滤去除溶液中的杂质,再用物质的量浓度为2 mol/L的NaCl溶液溶解DNA。

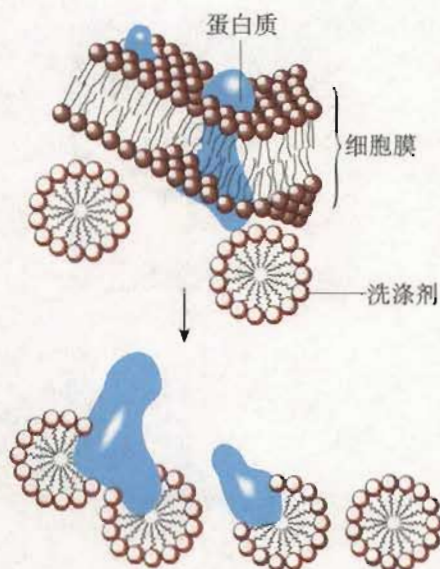


图5-2 洗涤剂瓦解细胞膜的示意图

取材时要注意安全问题,并注意保护环境,不要将珍稀濒危的生物作为实验材料。

为什么加入蒸馏水能使鸡血细胞破裂?

加入洗涤剂和食盐的作用分别是什么?

如果研磨不充分,会对实验结果产生怎样的影响?

有条件的话,可以用家用搅拌机代替手工研磨。

此步骤获得的滤液中可能含有哪些细胞成分?

为什么反复地溶解与析出DNA,能够去除杂质?



图 5-3 嫩肉粉

方案二与方案三的原理有什么不同？

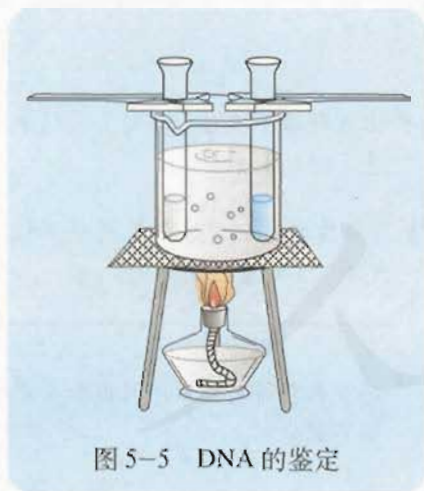


图 5-5 DNA 的鉴定

方案二 直接在滤液中加入嫩肉粉 (图 5-3), 反应 10~15 min, 嫩肉粉中的木瓜蛋白酶能够分解蛋白质。

方案三 将滤液放在 60~75 °C 的恒温水浴箱中保温 10~15 min, 注意严格控制温度范围。

(四) DNA 的析出与鉴定

将处理后的溶液过滤, 加入与滤液体积相等的、冷却的酒精溶液 (体积分数为 95%), 静置 2~3 min, 溶液中会出现白色丝状物, 这就是粗提取的 DNA。用玻璃棒沿一个方向搅拌, 卷起丝状物 (图 5-4), 并用滤纸吸去上面的水分。

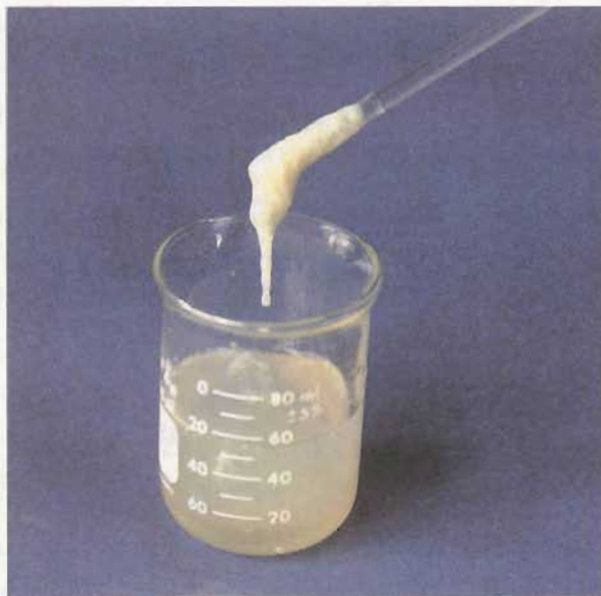


图 5-4 用冷却的酒精析出 DNA

取两支 20 mL 的试管, 各加入物质的量浓度为 2 mol/L 的 NaCl 溶液 5 mL, 将丝状物放入其中一支试管中, 用玻璃棒搅拌, 使丝状物溶解。然后, 向两支试管中各加入 4 mL 的二苯胺试剂。混合均匀后, 将试管置于沸水中加热 5 min, 待试管冷却后, 比较两支试管中溶液颜色的变化, 看看溶解有 DNA 的溶液是否变蓝 (图 5-5)。

操作提示

1. 以血液为实验材料时, 每 100 mL 血液中需要加入 3 g 柠檬酸钠, 防止血液凝固。
2. 加入洗涤剂后, 动作要轻缓、柔和, 否则容易产生太量的泡沫, 不利于后续步骤的操作。加入酒精和用玻璃棒搅拌时, 动作要轻缓, 以免加剧 DNA 分子的断裂, 导致 DNA 分子不能形成絮状沉淀。
3. 二苯胺试剂要现配现用, 否则会影响鉴定的效果。

结果分析与评价

1. 你选用了什么实验材料？你采用了怎样的方法步骤？
2. 你提取出了白色丝状物吗？用二苯胺鉴定的结果如何？
3. 你能分析出粗提取的DNA中可能含有哪些杂质吗？
4. 与其他同学提取的DNA进行比较，看看实验结果有什么不同，分析产生差异的原因。

课题延伸

本课题使用的洗涤剂是多组分的混合物，在严格的科学实验中很少使用。实验室提取高纯度的DNA时，通常使用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、十二烷基硫酸钠（SDS）或吐温等化学试剂。请查阅资料，了解实验室提取纯度较高的DNA的一种方法，与本课题中所使用的方法进行比较，总结两种方法的异同。

② 二苯胺试剂的配制：称取1.5 g 二苯胺，溶于100 mL 冰醋酸中，再加1.5 mL 浓硫酸，用棕色瓶保存。临用前，在10 mL 的上述溶液中再加入0.1 mL 体积分数为0.2%的乙醚溶液。



练习

1. 请解释提取DNA的实验操作中主要步骤的目的。
2. 你认为从细胞中提取某种特定的蛋白质与提取DNA一样容易吗？为什么？

课题2

多聚酶链式反应扩增DNA片段

课题背景

多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种体外迅速扩增 DNA 片段的技术, 它能以极少量的 DNA 为模板, 在几小时内复制出上百万份的 DNA 拷贝。这项技术有效地解决了因为样品中 DNA 含量太低而难以对样品进行分析研究的问题, 被广泛地应用于遗传疾病的诊断、刑侦破案、古生物学、基因克隆和 DNA 序列测定等各方面。在本课题中, 我们将了解 PCR 技术的基本原理, 并尝试用 PCR 技术扩增 DNA 片段。



基础知识

(一) PCR 原理

在用 PCR 技术扩增 DNA 时, DNA 的复制过程与细胞内 DNA 的复制类似, 因此, 要了解 PCR 原理, 首先要分析细胞内参与 DNA 复制的各种组成成分与反应条件。下表列出了 DNA 复制所需要的基本条件, 想一想, 如何在体外设置一个类似的 DNA 复制环境。

参与的组分	在 DNA 复制中的作用
解旋酶	打开 DNA 双链
DNA 母链	提供 DNA 复制的模板
4 种脱氧核苷酸	合成子链的原料
DNA 聚合酶	催化合成 DNA 子链
引物	使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸

② 引物是一小段 DNA 或 RNA, 它能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对。用于 PCR 的引物长度通常为 20~30 个核苷酸。

DNA 复制的具体过程涉及到 DNA 双链的方向。你已经知道, DNA 的两条链是反向平行的, 为了明确地表示 DNA 的方向, 通常将 DNA 的羟基 ($-OH$) 末端称为 3' 端, 而磷酸基团的末端称为 5' 端。DNA 聚合酶不能从头开始合成 DNA, 而只能从 3' 端延伸 DNA 链, 因此, DNA 复制需要引物。当引物与 DNA 母链通过碱基互补

配对结合后，DNA 聚合酶就能从引物的 3' 端开始延伸 DNA 链，因此 DNA 的合成方向总是从子链的 5' 端向 3' 端延伸（图 5-6）。

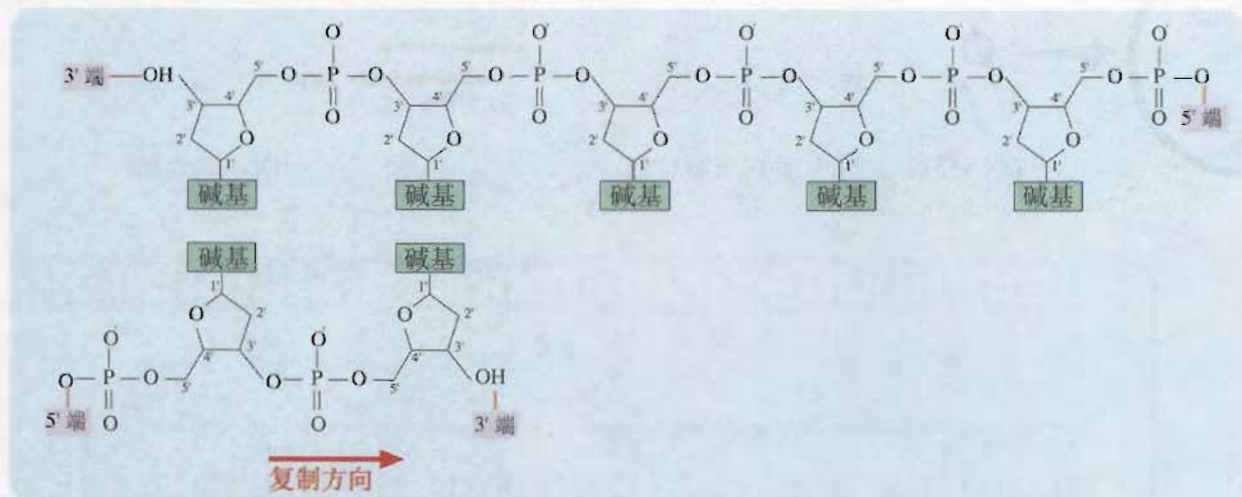


图 5-6 DNA 复制方向的示意图

在 DNA 的复制过程中，双链的解开是进行 DNA 复制的前提。如何在体外将双螺旋打开呢？这个过程可以通过控制温度来实现。在 80~100℃ 的温度范围内，DNA 的双螺旋结构将解体，双链分开，这个过程称为变性。当温度缓慢降低后，两条彼此分离的 DNA 链又会重新结合成双链（图 5-7）。PCR 利用了 DNA 的热变性原理，通过控制温度来控制双链的解聚与结合，现在使用的 PCR 仪实质上也是一台能够自动调控温度的仪器（图 5-8）。

高温虽然解决了如何打开 DNA 双链的问题，但是，又导致了 DNA 聚合酶失活的新问题。在解决这个新问题之前，PCR 还并非一种实用的实验方法。到 20 世纪 80 年代，耐高温的 *Taq* DNA 聚合酶的发现和应用（专题 2 课题 2），解决了上述矛盾，大大增加了 PCR 的效率，使 PCR 技术趋向自动化，而最终成为现代分子生物学实验工作的基本方法之一。

综合以上分析可以看出，PCR 反应需要在一定的缓冲溶液（参见专题 5 课题 3）中才能进行，需提供：DNA 模板，分别与两条模板链相结合的两种引物，四种脱氧核苷酸，耐热的 DNA 聚合酶，同时通过控制温度使 DNA 复制在体外反复进行。

（二）PCR 的反应过程

PCR 一般要经历三十多次循环，每次循环可以分为变性、复性和延伸三步（图 5-9）。在循环之前，常要进行一次预变性，以便增加大分子模板 DNA 彻底变性的概率。从

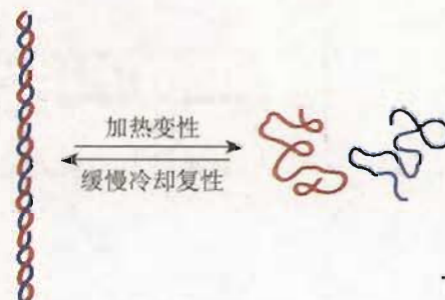


图 5-7 DNA 变性与复性的示意图



图 5-8 PCR 仪、微量移液器和微量离心管

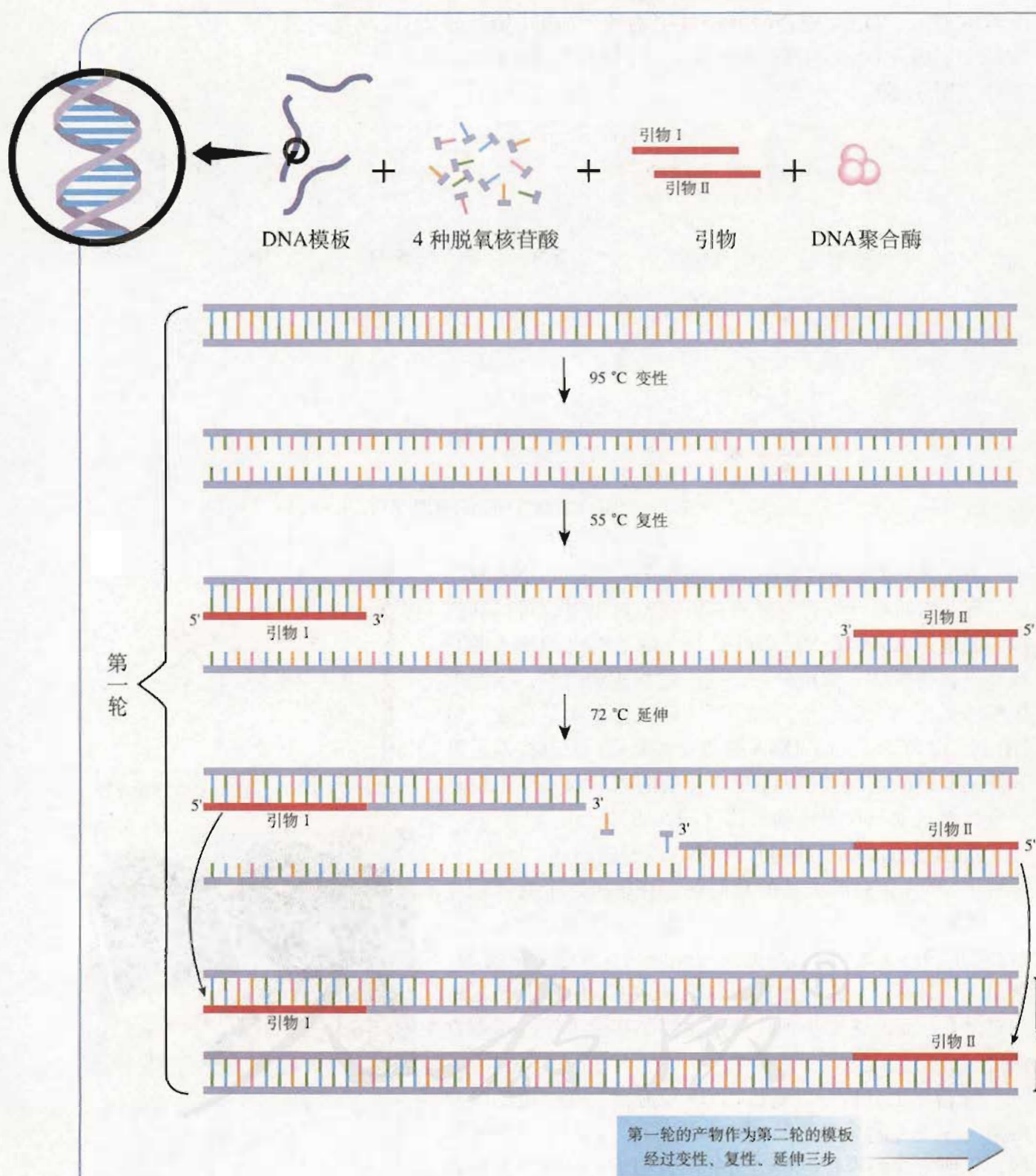
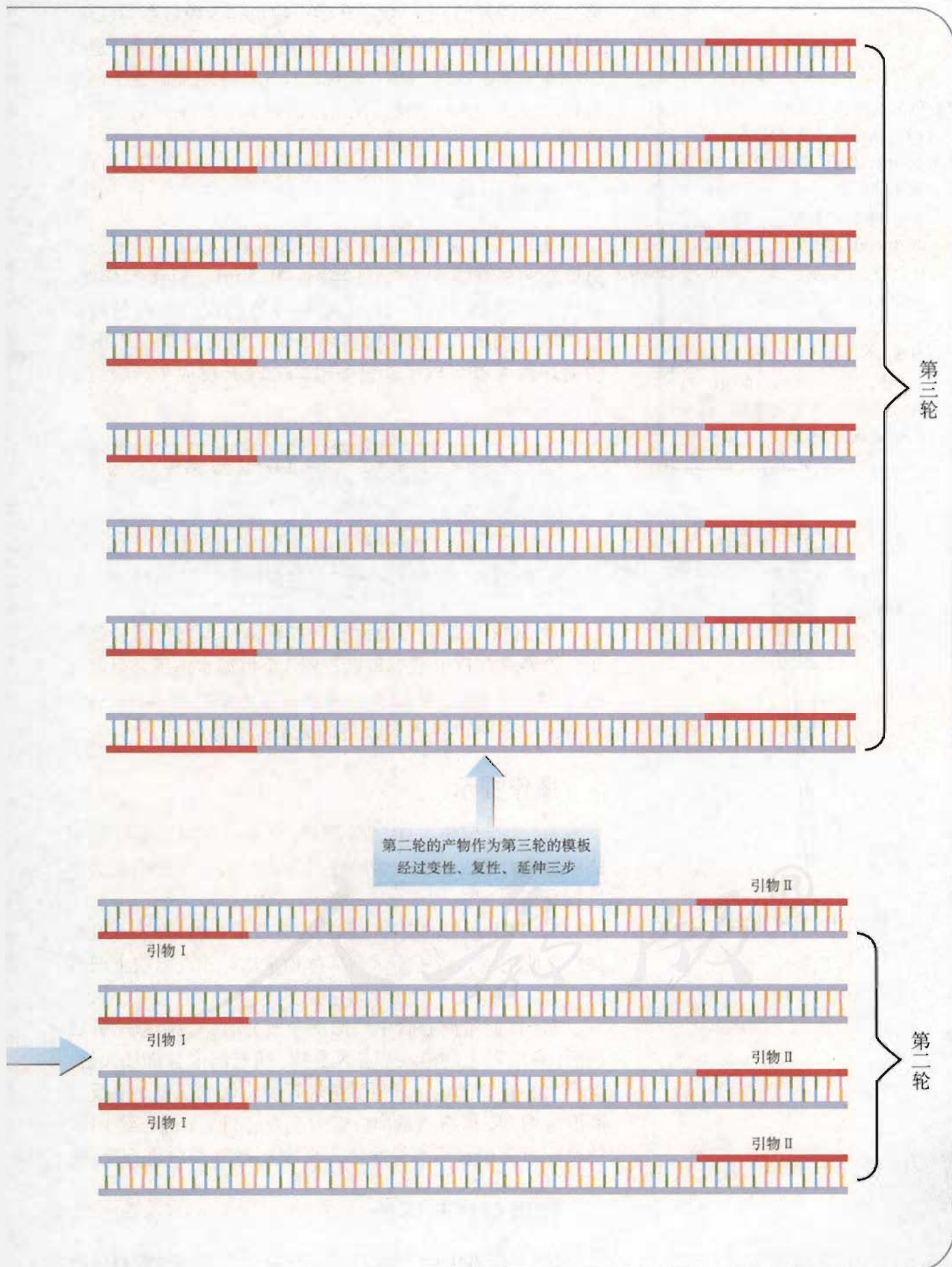


图 5-9 PCR 过程图解 (图中表示前 3 次循环)

变性 当温度上升到 90 °C 以上时, 双链 DNA 解聚为单链。

复性 温度下降到 50 °C 左右, 两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合。

延伸 温度上升到 72 °C 左右, 溶液中的四种脱氧核苷酸 (A, T, C, G) 在 DNA 聚合酶的作用下, 根据碱基互补配对原则合成新的 DNA 链。



- i PCR 反应体系的配方**
- | | |
|---|---------------------|
| 10 倍浓缩的扩增缓冲液 | 5 μL |
| 20 mmol/L 的 4 种脱氧核苷酸的等量混合液 | 1 μL |
| 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 I | 2.5 μL |
| 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 II | 2.5 μL |
| H_2O | 28~33 μL |
| 1~5 U/ μL 的 <i>Taq</i> DNA 聚合酶 | 1~2 U |
| 模板 DNA | 5~10 μL |
| 总体积 | 50 μL |
- 注：模板 DNA 的用量在 1 pg~1 mg 之间。

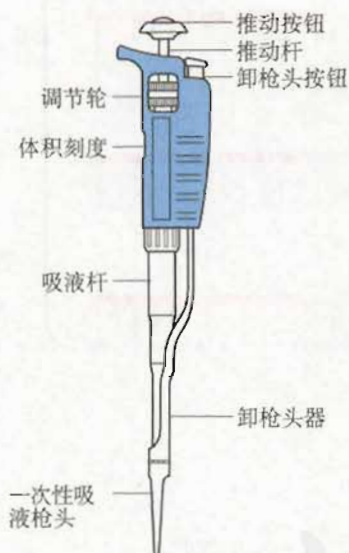


图 5-10 微量移液器

第二轮循环开始,上一次循环的产物也作为模板参与反应,并且由引物 I 延伸而成的 DNA 单链会与引物 II 结合,进行 DNA 的延伸,这样, DNA 聚合酶只能特异地复制处于两个引物之间的 DNA 序列,使这段固定长度的序列呈指数扩增。

实验操作

在 PCR 实验中,通常要用到微量离心管,它是一种薄壁塑料管(图 5-8),总容积为 0.5 mL。具体操作时,用微量移液器(图 5-10),按照旁栏的配方在微量离心管中依次加入各组分,再参照下表的设置设计好 PCR 仪的循环程序就可以了。想一想,在 PCR 反应中,如何设置对照实验?

	变性	复性	延伸
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	—	—
30 次	94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min
最后 1 次	94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min	55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min

做 PCR 所需的实验材料可以直接从生物技术公司购买。如果没有 PCR 仪,可以设置 3 个恒温水浴锅,温度分别为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 和 72 $^{\circ}\text{C}$,然后按照上表的要求,在 3 个水浴锅中来回转移 PCR 反应的微量离心管即可。

操作提示

1. 为避免外源 DNA 等因素的污染,PCR 实验中使用的微量离心管、枪头、缓冲液以及蒸馏水等在使用前必须进行高压灭菌。
2. PCR 所用的缓冲液和酶应分装成小份,并在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。使用前,将所需试剂从冰箱拿出,放在冰块上缓慢融化。
3. 在微量离心管中添加反应成分时,每吸取一种试剂后,移液器上的枪头都必须更换。所有的成分都加入后,盖严离心管口的盖子,用手指轻轻弹击管的侧壁,使反应液混合均匀,再将微量离心管放在离心机上,离心约 10 s,使反应液集中在离心管底部,再放入 PCR 仪中进行反应。

结果分析与评价

DNA 在 260 nm 的紫外线波段有一强烈的吸收峰(图

5-11)。可以利用DNA的这一特点进行DNA含量的测定,具体方法如下。

1. 将样品进行50倍稀释:取2 μL PCR反应液,加入98 μL 蒸馏水。

2. 以蒸馏水作为空白对照,在波长260 nm处,将紫外分光光度计(图5-12)的读数调节至零。

3. 加入步骤1中的DNA稀释液100 μL 至比色杯中,测定260 nm处的光吸收值。

4. 根据下面的公式计算DNA含量。

DNA含量($\mu\text{g/mL}$) = $50 \times (260 \text{ nm 的读数}) \times \text{稀释倍数}$

通过上述方法,你能估算出DNA片段的含量比扩增前增加了多少倍吗?

课题延伸

完成本课题后,你也许会觉得PCR的原理虽然复杂,但操作却十分简单。快速、高效、灵活和易于操作正是PCR的突出优点。到目前为止,人们已从基本的PCR方法中衍生出许许多多的新方法,许多科普杂志和专著致力于介绍这些新方法。请你查阅相关资料,了解这些方法的具体应用。

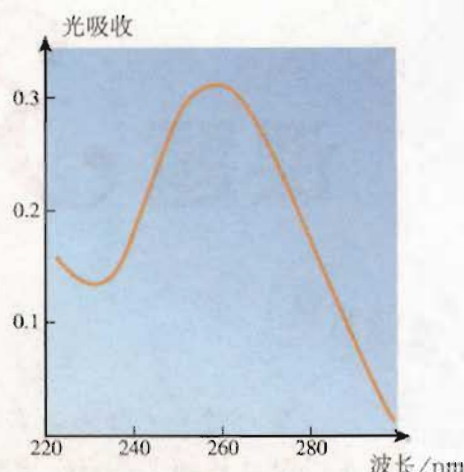


图5-11 DNA的紫外吸收光谱



图5-12 紫外分光光度计



练习

1. 请绘图表示PCR反应的前三个循环步骤。假设在PCR反应中,只有一个DNA片段作为模板,请计算在30次循环后,反应物中大约有多少个这样的DNA片段。

2. 如果要使用PCR扩增一段已知的DNA序列,你打算如何设计引物?请查阅资料,了解设计引物的方法。

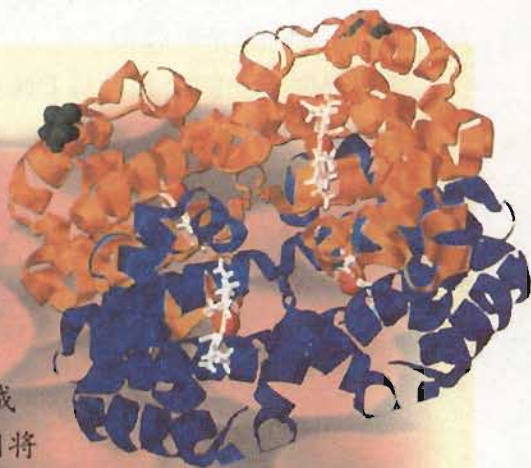
* 公式中50的含义:在标准厚度为1 cm的比色杯中, OD_{260} 为1相当于50 $\mu\text{g/mL}$ 的双链DNA。

课题3 血红蛋白的提取和分离

课题背景

蛋白质是生命活动不可缺少的物质。随着人类基因组计划的进展以及多种生物基因组测序工作的完成,人类跨入了后基因组和蛋白质组时代。对蛋白质的研究与应用,首先需要获得纯度较高的蛋白质。因此,从复杂的细胞混合物中提取、分离高纯度的蛋白质是生物科学研究中经常要做的工作。

血红蛋白是人和其他脊椎动物红细胞的主要组成成分,负责血液中 O_2 和 CO_2 的运输。在本课题中,我们将以血红蛋白为实验材料,学习蛋白质提取和分离的一些基本技术。



血红蛋白分子的立体结构

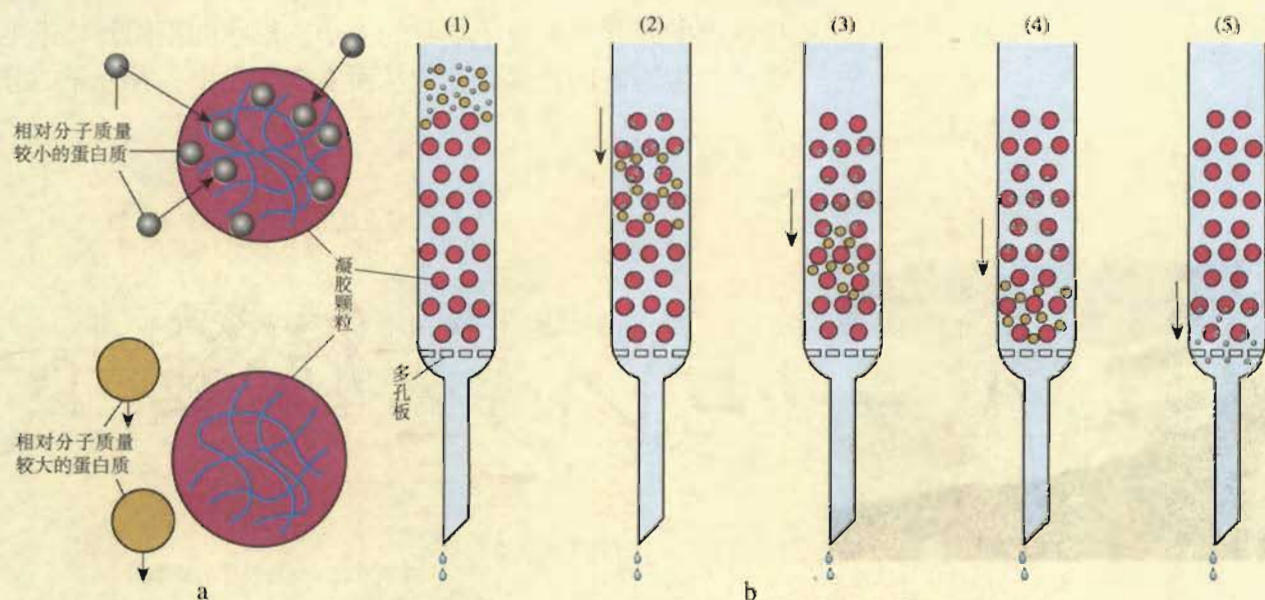
基础知识

蛋白质各种特性的差异,如分子的形状和大小、所带电荷的性质和多少、溶解度、吸附性质和对其他分子的亲和力,等等,可以用来分离不同种类的蛋白质。在本课题中,我们将学习蛋白质分离方法中的凝胶色谱法。

(一) 凝胶色谱法

凝胶色谱法也称做分配色谱法,是根据相对分子质量的大小分离蛋白质的有效方法。所用的凝胶实际上是一些微小的多孔球体,这些小球体大多数是由多糖类化合物构成的,如葡聚糖或琼脂糖。在小球体内部有许多贯穿的通道,当相对分子质量不同的蛋白质通过凝胶时,相对分子质量较小的蛋白质容易进入凝胶内部的通道,路程较长,移动速度较慢;而相对分子质量较大的蛋白质无法进入凝胶内部的通道,只能在凝胶外部移动,路程较短,移动速度较快。相对分子质量不同的蛋白质分子因此得以分离(图5-13)。

i 凝胶颗粒在色谱柱中装填得十分紧密。图5-13为了清楚地表示分离过程,有意将凝胶颗粒画得稀疏。



- a. 相对分子质量较小的蛋白质由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留；相对分子质量较大的蛋白质被排阻在凝胶颗粒外面，在颗粒之间迅速通过。
- b. (1) 蛋白质混合物上柱；(2) 洗脱开始，相对分子质量较小的蛋白质扩散进入凝胶颗粒内；相对分子质量较大的蛋白质则被排阻于颗粒之外；(3) 相对分子质量较小的蛋白质被滞留，相对分子质量较大的蛋白质向下移动；(4) 相对分子质量不同的分子完全分开；(5) 相对分子质量较大的蛋白质行程较短，已从层析柱中洗脱出来，相对分子质量较小的蛋白质还在行进中。

图 5-13 凝胶色谱法分离蛋白质的原理

(二) 缓冲溶液

缓冲作用在日常生活中并不少见。例如，运动鞋的鞋底富有弹性，能够缓冲外力，减少运动员受伤的几率（图 5-14）。那么，缓冲溶液的缓冲作用体现在哪里呢？在一定范围内，缓冲溶液能够抵制外界的酸和碱对溶液 pH 的影响，维持 pH 基本不变。缓冲溶液通常由 1~2 种缓冲剂溶解于水中配制而成。调节缓冲剂的使用比例就可以制得在不同 pH 范围内使用的缓冲液。

生物体内进行的各种生物化学反应都是在一定的 pH 下进行的，为了能够在实验室条件下准确模拟生物体内的过程，就必须保持体外溶液的 pH 与体内环境中的 pH 基本一致。因此，缓冲溶液的正确配制和 pH 的准确测定，在生物化学的研究工作中有着极其重要的意义。

(三) 电泳

电泳是指带电粒子在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物大分子，如多肽、核酸等都具有可解离的基团，在一定的 pH 下，这些基团会带上正电或负电。在电场的作用下，这些带电分子会向着与其所带电荷相反的电



图 5-14 运动鞋的鞋底具有缓冲作用

极移动（图 5-15）。电泳利用了待分离样品中各种分子带电性质的差异以及分子本身的大小、形状的不同，使带电分子产生不同的迁移速度，从而实现样品中各种分子的分离。

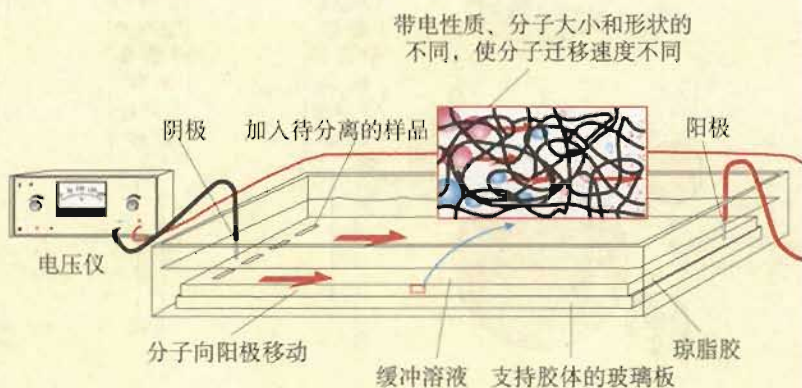


图 5-15 正在进行的电泳（左）和凝胶电泳原理示意图（右）

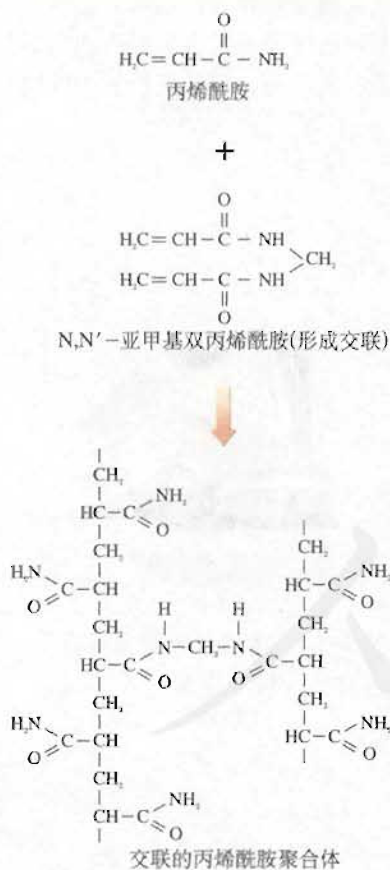


图 5-16 丙烯酸酰胺和交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酸酰胺的交联共聚反应

琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳是两种常用的电泳方法，在测定蛋白质分子量时通常使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酸酰胺和交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酸酰胺在引发剂和催化剂的作用下聚合交联成的具有三维网状结构的凝胶（图 5-16）。蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率取决于它所带净电荷的多少以及分子的大小等因素。为了消除净电荷对迁移率的影响，可以在凝胶中加入 SDS。SDS 能使蛋白质发生完全变性。由几条肽链组成的蛋白质复合体在 SDS 的作用下会解聚成单条肽链，因此测定的结果只是单条肽链的分子量。SDS 能与各种蛋白质形成蛋白质-SDS 复合物，SDS 所带负电荷的量大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，因而掩盖了不同种蛋白质间的电荷差别，使电泳迁移率完全取决于分子的大小。

实验操作

蛋白质的提取和分离一般分为四步：样品处理、粗分离、纯化和纯度鉴定。每一种蛋白质的分离纯化方法因其来源和性质的不同会有很大差异。在本课题中，我们以哺乳动物红细胞为材料，学习初步分离血红蛋白的方法。

（一）样品处理及粗分离

血液由血浆和各种血细胞组成，其中红细胞最多。在红细胞的组成中，除水分以外，约 90% 是血红蛋白。血红蛋

白由四条肽链组成(图5-17),包括两条 α -肽链和两条 β -肽链。其中每条肽链环绕一个亚铁血红素基团,此基团可携带一分子氧或一分子二氧化碳。血红蛋白因含有血红素而呈现红色。本课题可以选用猪、牛、羊或其他哺乳动物的血液来分离血红蛋白。

1. 红细胞的洗涤 洗涤红细胞的目的是去除杂蛋白,以利于后续步骤的分离纯化。采集的血样要及时分离红细胞,分离时采用低速短时间离心,如500 r/min离心2 min,然后用胶头吸管吸出上层透明的黄色血浆,将下层暗红色的红细胞液体倒入烧杯,再加入五倍体积的生理盐水(质量分数为0.9%的NaCl溶液),缓慢搅拌10 min,低速短时间离心,如此重复洗涤三次,直至上清液不再呈现黄色,表明红细胞已洗涤干净。

2. 血红蛋白的释放 将洗涤好的红细胞倒入烧杯中,加蒸馏水到原血液的体积,再加40%体积的甲苯,置于磁力搅拌器上充分搅拌10 min。在蒸馏水和甲苯的作用下,红细胞破裂,释放出血红蛋白。

3. 分离血红蛋白溶液 将搅拌好的混合液转移到离心管中,以2 000 r/min的速度离心10 min后,可以明显看到试管中的溶液分为4层(图5-18)。从上往下数,第1层为无色透明的甲苯层,第2层为白色薄层固体,是脂溶性物质的沉淀层,第3层是红色透明液体,这是血红蛋白的水溶液,第4层是其他杂质的暗红色沉淀物。将试管中的液体用滤纸过滤,除去脂溶性沉淀层,于分液漏斗中静置片刻后,分出下层的红色透明液体。

4. 透析 取1 mL的血红蛋白溶液装入透析袋中,将透析袋放入盛有300 mL的物质的量浓度为20 mmol/L的磷酸缓冲液中(pH为7.0),透析12 h。

(二) 凝胶色谱操作

可以自己制作色谱柱,有条件的学校也可以直接购买商品色谱柱。

1. 凝胶色谱柱的制作 取长40 cm,内径为1.6 cm的玻璃管,两端磨平。柱底部的制作方法如下(图5-19)。首先选择适合封堵玻璃管口的橡皮塞,中间打孔,孔径大小要能够紧密插入0.5 mL的移液管。将橡皮塞上部用刀切出锅底状的凹穴,将0.5 mL的移液管头部切下5 cm长的一段,插入橡皮塞孔内,插入的玻璃管的上部不得超出橡皮塞的凹穴底面。将尼龙网剪成与橡皮塞上部一样大小的圆片,覆盖在橡皮塞的凹穴上,再用大小合适的100目的尼龙纱将橡皮塞上部包好,插到玻璃管的一端。在色谱柱



图5-17 血红蛋白的组成

i 为防止血液凝固,在采血容器中要预先加入抗凝血剂柠檬酸钠,比例是每100 mL血液加入3.0 g柠檬酸钠。



图5-18 离心后分层示意图

i 透析袋一般是用硝酸纤维素(又称玻璃纸)制成的。透析袋能使小分子自由进出,而将大分子保留在袋内。透析可以去除样品中分子量较小的杂质,或用于更换样品的缓冲液。

下端用移液管头部作出口部位，连接一细的尼龙管，并用螺旋夹控制尼龙管的打开与关闭，尼龙管的另一端放入收集色谱流出液的收集器内。柱顶部的制作只需在色谱柱的另一端插入安装了玻璃管的橡皮塞即可。

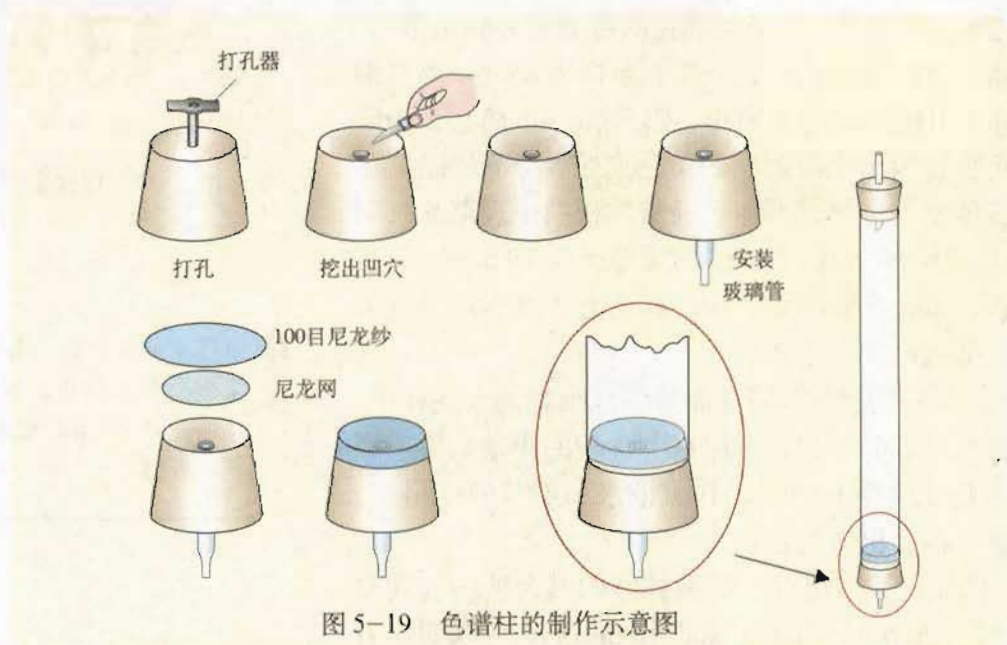


图 5-19 色谱柱的制作示意图



图 5-20 交联葡聚糖凝胶

2. 凝胶色谱柱的装填 装柱前要将色谱柱垂直固定在支架上。因为干的凝胶和用缓冲液平衡好的凝胶的体积差别很大，因此装柱前需要根据色谱柱的内体积计算所需要的凝胶量。本实验使用的是交联葡聚糖凝胶 (Sephadex G-75, 图 5-20)。“G”表示凝胶的交联程度，膨胀程度及分离范围，75 表示凝胶得水值，即每克凝胶膨胀时吸水 7.5 g。凝胶用蒸馏水充分溶胀后，配成凝胶悬浮液，在与色谱柱下端连接的尼龙管打开的情况下，一次性缓慢倒入色谱柱内，装填时可轻轻敲动色谱柱，使凝胶装填均匀。注意色谱柱内不能有气泡存在，一旦发现有气泡，必须重装。装填完后，立即连接缓冲液洗脱瓶，在约 50 cm 高的操作压下(图 5-21)，用 300 mL 的物质的量浓度为 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.0) 充分洗涤平衡凝胶 12 h，使凝胶装填紧密。

3. 样品的加入和洗脱 加样前，打开色谱柱下端的流出口，使柱内凝胶面上的缓冲液缓慢下降到与凝胶面平齐，关闭出口。用吸管小心地将 1 mL 透析后的样品加到色谱柱的顶端 (图 5-22)，注意不要破坏凝胶面。加样后，打开下端出口，使样品渗入凝胶床内。等样品完全进入凝胶层后，关闭下端出口。小心加入物质的量浓度为 20 mmol/L 的

磷酸缓冲液 (pH 为 7.0) 到适当高度, 连接缓冲液洗脱瓶, 打开下端出口, 进行洗脱。待红色的蛋白质接近色谱柱底端时, 用试管收集流出液, 每 5 mL 收集一管, 连续收集 (图 5-21)。

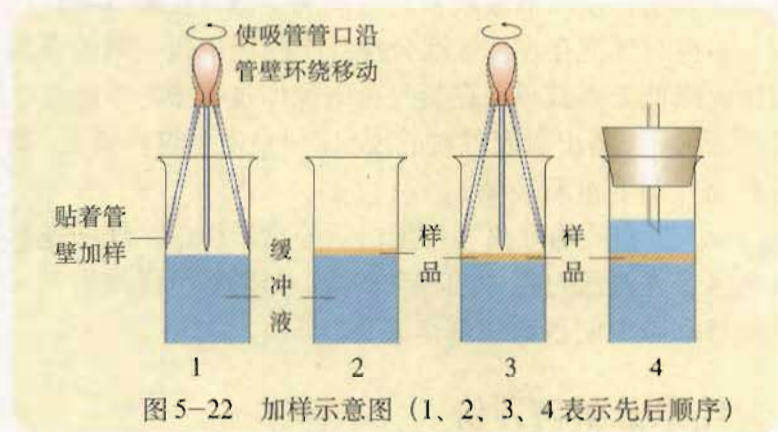


图 5-22 加样示意图 (1、2、3、4 表示先后顺序)

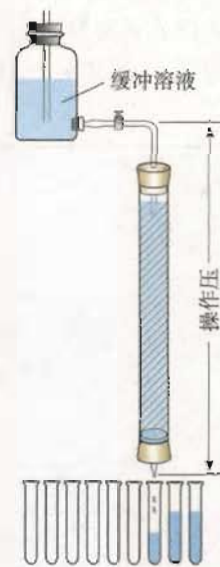


图 5-21 凝胶色谱柱的装置示意图

(三) SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (选做)

判断纯化的蛋白质是否达到要求, 需要进行蛋白质纯度的鉴定。在鉴定的方法中, 使用最多的是 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳。有条件的学校, 可以参考生物化学实验的有关书籍, 尝试 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳的操作。下图是聚丙烯酰胺凝胶电泳的装置及其原理示意图 (图 5-23)。

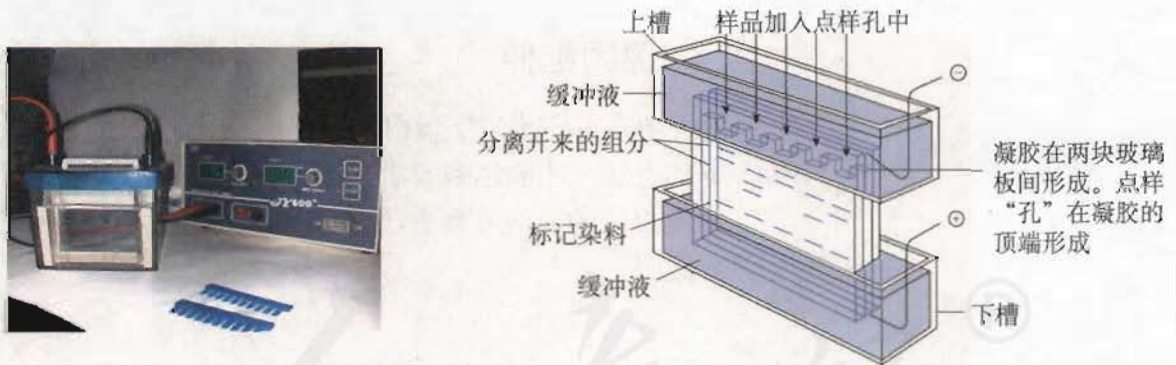


图 5-23 聚丙烯酰胺凝胶电泳装置 (左) 及其原理示意图 (右)

操作提示

1. 红细胞的洗涤 洗涤次数、离心速度与离心时间十分重要。洗涤次数过少, 无法除去血浆蛋白; 离心速度过高和时间过长会使白细胞等一同沉淀, 达不到分离的效果。有兴趣的同学可以尝试不同的洗涤次数、离心速度和离心时间, 探索最佳处理条件。

2. 色谱柱填料的处理 商品凝胶是干燥的颗粒, 使用前需直接放在洗脱液中膨胀。为了加速膨胀, 可以将加

i 你能从凝胶色谱的分离原理分析为什么凝胶的装填要紧密、均匀吗?

入洗脱液的湿凝胶用沸水浴加热,逐渐升温至接近沸腾,通常只需1~2 h。这种方法不但节约时间,而且可以除去凝胶中可能带有的微生物,排除胶粒内的空气。

3. 凝胶色谱柱的装填 在色谱柱中装填凝胶的时候要尽量紧密,以降低凝胶颗粒之间的空隙。在装填凝胶柱时,不得有气泡存在。气泡会搅乱洗脱液中蛋白质的洗脱次序,降低分离效果。在凝胶色谱操作过程中,不能发生洗脱液流干,露出凝胶颗粒的现象。一旦发生这种情况,凝胶色谱柱需要重新装填。

4. 蛋白质的分离 在蛋白质分离过程中,仔细观察红色区带在洗脱过程中的移动情况。如果红色区带均匀一致地移动,说明色谱柱制作成功。

结果分析与评价

1. 你是否完成了对血液样品的处理?你能描述处理后的样品发生了哪些变化吗?

2. 你装填的凝胶色谱柱中是否有气泡产生?你的色谱柱装填得成功吗?你是如何判断的?

3. 在蛋白质的分离过程中,你能观察到红色区带的移动吗?请描述红色区带的移动情况,并据此判断分离效果。

课题延伸

在实际工作中,蛋白质的提纯往往需要联合使用几种分离方法,才能达到要求。你能在查阅资料的基础上,了解蛋白质的其他分离方法,设计出进一步纯化血红蛋白的方案吗?



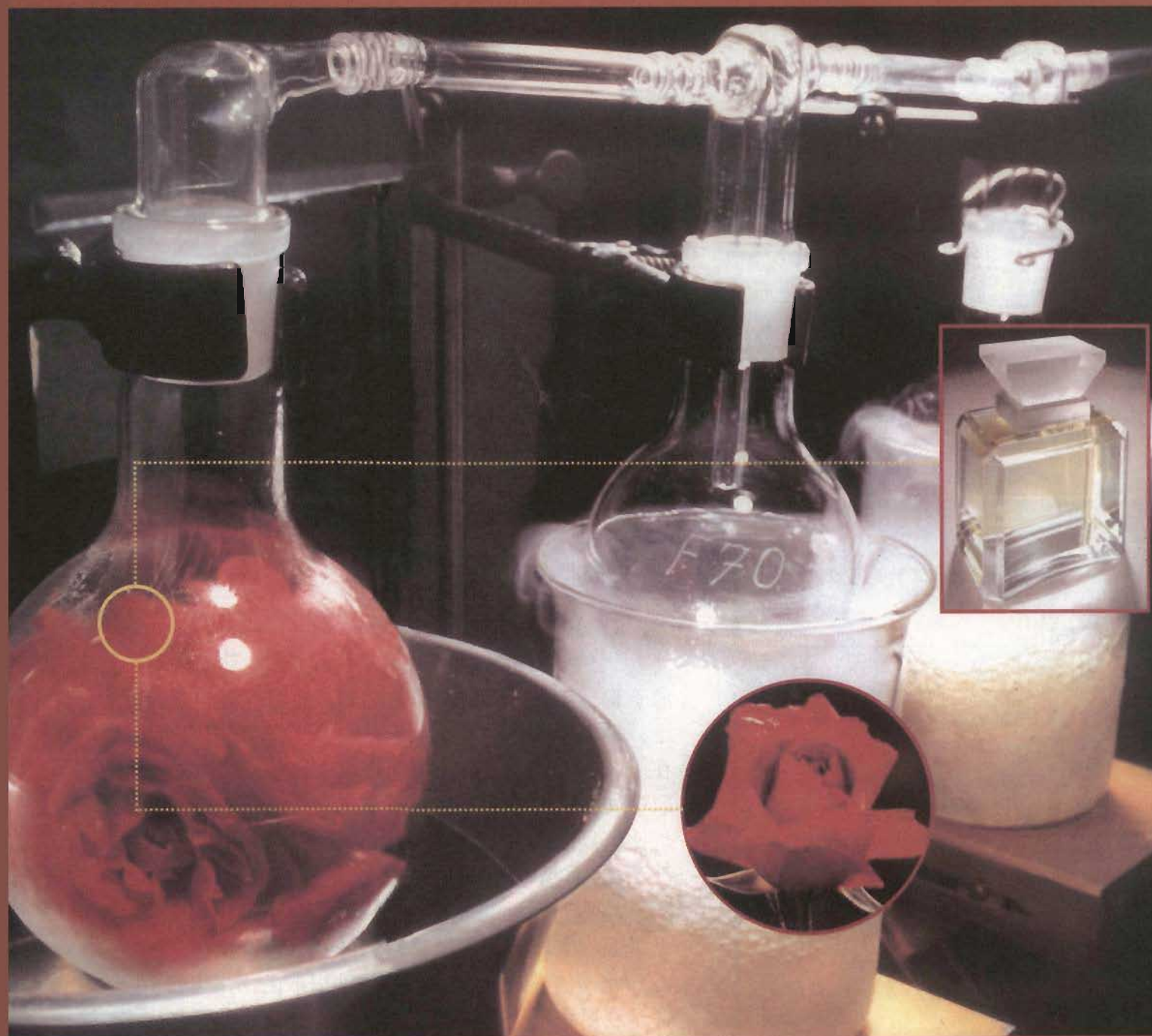
练习

1. 凝胶色谱法分离蛋白质的原理是怎样的?
2. 什么是缓冲溶液?它的作用是什么?
3. 电泳的作用及其原理是什么?

4. 你能描述血红蛋白分离的完整过程吗?
5. 与其他真核细胞相比,红细胞有什么特点?这一特点对你进行蛋白质的分离有什么意义?

专题 6

植物有效成分的提取



从蛮荒的远古时期开始,人类就与植物结下了不解之缘。从广为流传的神农尝百草的故事到当今国内外许多企业和研究机构正忙于对各种植物有效成分的研究,反映了人类对植物资源开发和应用逐步深入的历程。科学技术的发展,使人类从依靠经验利用植物发展到对植物中的有效成分进行化学分析与分离提纯。在本专题中,我们将学习提取植物有效成分的基本方法,体验从植物中提取芳香油、从胡萝卜中提取胡萝卜素的过程。

课题

1

植物芳香油的提取

课题背景

早在古代,人类就已发现具有芳香气味的植株或花卉能使人神清气爽,将这些植物制成干品后,可当做药物和香料使用。但是,植物香料易挥发,不易储存。欧洲中世纪香料贸易的发展,促成了植物芳香油提取技术的诞生。16世纪,制备植物芳香油的技术已相当成熟。19世纪,有机化学迅速发展,人们通过分析植物芳香油的化学成分,找到了芳香的根源,进而合成了人造香料。但是,人们对天然植物芳香油的独特品质,依然情有独钟。如今,植物芳香油广泛地应用于轻工、化妆品、饮料和食品制造等方面。在本课题中,我们将了解提取植物芳香油的原理,设计简单的实验装置,从橘皮或玫瑰花中提取芳香油。

① 微生物中的真菌也可以产生芳香化合物。

② 下面的资料列举了用于提取植物芳香油的植物器官。

花:玫瑰油、橙花油、素馨油、依兰油、香堇油、金合欢油等。

茎、叶:香草油、香叶油、广藿香油、风茅油、薄荷油、薰衣草油、桉树油等。

树干:樟油、芳樟油、柏木油、檀香油等。

树皮:桂皮油、玉桂皮油、橘皮油等。

根、地下茎:鸢尾油、生姜油、岩兰草油、菖蒲油等。

果实、种子:山苍子油、杏仁油、茴香油等。

基础知识

(一) 植物芳香油的来源

天然香料的主要来源是动物和植物。动物香料主要来源于麝、灵猫、海狸和抹香鲸等,植物香料的来源更为广泛。植物芳香油可以从大约50多个科的植物中提取。例如,在工业生产中,玫瑰花用于提取玫瑰油,樟树树干用于提取樟油。提取出的植物芳香油具有很强的挥发性,其组成也比较复杂,主要包括萜类化合物及其衍生物。

(二) 植物芳香油的提取方法

植物芳香油的提取方法有蒸馏、压榨和萃取等。具体采用哪种方法要根据植物原料的特点来决定。

水蒸气蒸馏法是植物芳香油提取的常用方法,它的原理是利用水蒸气将挥发性较强的植物芳香油携带出来,形成油水混合物,冷却后,混合物又会重新分出油层和水层。根据蒸馏过程中原料放置的位置,可以将水蒸气蒸馏法划分为水中蒸馏、水上蒸馏和水气蒸馏。其中,水中蒸馏的方法对于有些原料不适用,如柑橘和柠檬。这是因为水中蒸馏会导致原料焦糊和有效成分水解等问题。因此,柑橘、

柠檬芳香油的制备通常使用压榨法。

植物芳香油不仅挥发性强,而且易溶于有机溶剂,如石油醚、酒精、乙醚和戊烷等。不适于用水蒸气蒸馏的原料,可以考虑使用萃取法。萃取法是将粉碎、干燥的植物原料用有机溶剂浸泡,使芳香油溶解在有机溶剂中的方法。芳香油溶解于有机溶剂后,只需蒸发出有机溶剂,就可以获得纯净的植物芳香油了。但是,用于萃取的有机溶剂必须事先精制,除去杂质,否则会影响芳香油的质量。

实验设计

下面给出了提取玫瑰精油和橘皮精油的相关资料,请选择一个实验,思考有关问题,然后进行实验设计,写出详细的实验方案。

(一) 玫瑰精油的提取

玫瑰精油是制作高级香水的主要成分,能使人产生愉悦感。玫瑰精油的价格非常昂贵,工业上大约需要5 kg 玫瑰花瓣才能提取出1滴纯正的玫瑰精油。本实验只是对玫瑰精油进行粗提取,玫瑰花瓣与清水的质量比为1:4,旁栏中绘出了操作流程图(图6-1)。

[资料一] 根据玫瑰精油的性质选择提取方法

玫瑰精油的化学性质稳定,难溶于水,易溶于有机溶剂,能随水蒸气一同蒸馏。请根据这些性质,思考有关玫瑰精油提取方法的问题。

1. 如果使用水蒸气蒸馏法,你认为在水中蒸馏、水上蒸馏和水气蒸馏的方法中,哪一种更简便易行?

2. 可以使用有机溶剂萃取吗? 使用萃取的方法有哪些优点和不足?

[资料二] 水蒸气蒸馏的原理和装置

不知你是否注意过,家里烧菜的时候,当烧肉或者熬汤时,锅盖的内表面往往会出现许多乳白色的液滴,当锅盖冷却下来后,这些乳白色的液滴会分离成油滴和水滴。乳白色液滴是油随着水一同蒸发而形成的,冷凝后,油与水又会重新分离。水蒸气蒸馏植物芳香油应用了同样的原理。但是,提取玫瑰精油时,能够只用锅和锅盖吗? 这恐怕不行,至少我们会担心蒸馏出的玫瑰油因不能及时收集,会重新落回锅里。那么,应该使用怎样的装置呢? 图6-2是化学实验中常用的蒸馏装置,请分析装置中每一部分分别有哪些作用。如果没有现成的仪器用具,你能自己设计一套蒸馏装置吗?

② 用于提炼玫瑰精油的玫瑰花要在花开的盛期采收,大约是每年的5月上、中旬。在此阶段,花朵含油量最高。



图6-1 提取玫瑰精油的实验流程示意图

想一想，图中的装置应该按照怎样的顺序来安装？



图 6-3 分液漏斗



橘味饮料

② $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液的俗名是石灰水，pH 为 12，强碱性。能够破坏细胞结构，分解果胶，防止橘皮压榨时滑脱，提高出油率。

① 实验中要注意避免石灰水与皮肤接触。橘皮可以放入家用榨汁机中粉碎压榨，但要注意安全。

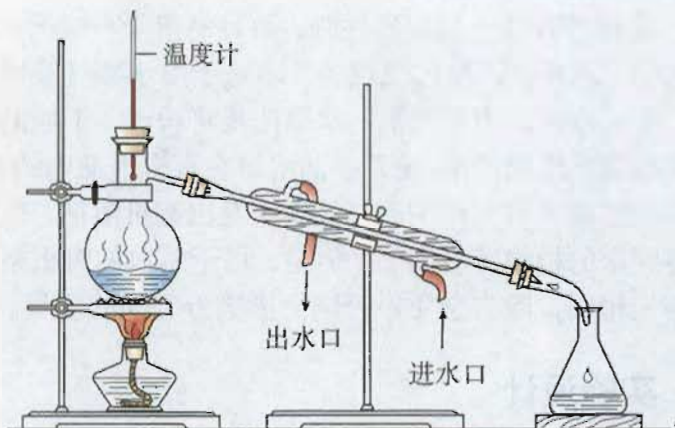


图 6-2 蒸馏装置

〔资料三〕 乳浊液的处理和玫瑰液的回收

水蒸气蒸馏后，锥形瓶中将收集到乳白色的乳浊液，这是玫瑰油与水的混合物。下一步，我们希望能将玫瑰油与水分开。这时，只需向乳化液中加入 NaCl ，增加盐的浓度，就会出现明显的分层。然后再用分液漏斗（图 6-3）将这两层分开。分离的油层还会含有一定的水分，一般可以加入一些无水 Na_2SO_4 吸水，放置过夜，再过滤除去固体 Na_2SO_4 就可以得到玫瑰油了。

（二）橘皮精油的提取

从橘皮中提取的橘皮油，无色透明，具有诱人的橘香味，主要成分为柠檬烯，是食品、化妆品和香水配料的优质原料，具有很高的经济价值。橘皮精油主要贮藏在橘皮部分，由于橘皮精油的有效成分在用水蒸气蒸馏时会发生部分水解，使用水中蒸馏法又会产生原料焦糊的问题，所以一般采用压榨法。图 6-4 绘出了具体的操作流程。



图 6-4 提取橘皮精油的实验流程示意图

〔资料一〕 橘皮的处理

新鲜的柑橘皮中含有大量的果蜡、果胶和水分，如果

直接压榨,出油率较低。为了提高出油率,需要将柑橘皮干燥去水,并用石灰水浸泡。为了能将柑橘皮均匀地浸泡在石灰水中,想一想,可以采取哪些措施?你不妨将未经浸泡的样品作为对照,探究浸泡时间对出油率的影响。

〔资料二〕 橘皮的压榨

压榨之前,首先要用流水漂洗橘皮,捞起橘皮后,沥干水分。压榨是个机械加压过程,既要使原料压紧,防止原料滑脱,又要将油分挤压出来。你可以参考图示的手动压榨的原理(图6-5),自己设计压榨的方案。设计时要考虑容器能够承受的压力范围,防止将容器压破,导致实验失败和发生安全事故。

为了使橘皮油易于与水分离,还要分别加入相当于橘皮质量0.25%的 NaHCO_3 和5%的 Na_2SO_4 ,并调节pH至7~8。

〔资料三〕 压榨液的处理

压榨液中含有橘皮精油和大量的水分,还有一些糊状残渣等杂质。可以先用普通布袋过滤除去固体物和残渣,然后离心进一步除去质量较小的残留固体物,再用分液漏斗或吸管将上层的橘皮油分离出来。此时的橘皮油还含有少量的水和果蜡,需在5~10℃下静置5~7d,使杂质沉淀,用吸管吸出上层澄清橘皮油,其余部分通过滤纸过滤,滤液与吸出的上层橘油合并,成为最终的橘皮精油。

操作提示

(一) 玫瑰精油的提取

1. 蒸馏时许多因素都会影响产品的品质。例如,蒸馏温度太高、时间太短,产品品质就比较差。如果要提高品质,就需要延长蒸馏的时间。

2. 蒸馏操作时的注意事项请查阅相关的有机化学实验手册。

(二) 橘皮精油的提取

橘皮在石灰水中的浸泡时间为10h以上。橘皮要浸透,这样压榨时不会滑脱,出油率高,并且压榨液的黏稠度不会太高,过滤时不会堵塞筛眼。

结果分析与评价

1. 你是否提取出了玫瑰精油或橘皮精油?你能描述提取出的精油的特点吗?

2. 请根据你的实验结果,计算出油率,分析成功的经验或失败的教训,提出改进的建议。

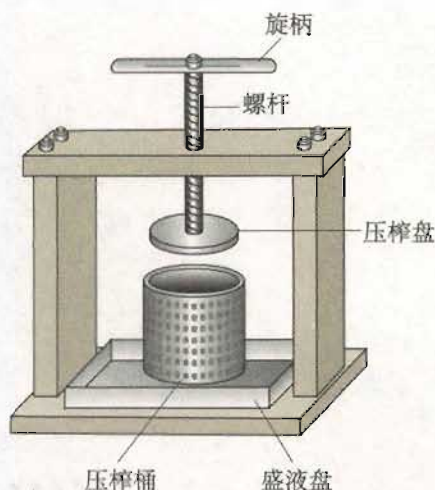


图6-5 手动压榨原理示意图

$$\text{出油率} = \frac{\text{芳香油质量}}{\text{原料质量}}$$

课题延伸

本实验提取的玫瑰精油和橘皮精油中仍然含有大量的杂质,你可以在查阅资料的基础上,进一步提纯芳香油,使芳香油的纯度更高、香气更浓厚。

如果你有兴趣的话,可以在提取玫瑰精油或橘皮精油的基础上,查阅资料,设计提取其他植物芳香油的实验方案,如薄荷油、茉莉油和桉叶油等。



练习

1. 不同植物的芳香油具有不同的气味,并不是所有的芳香油闻起来都香。此外,使用芳香油时往往还要添加其他成分,或其他几种芳香油混合使用。请你查阅资料,了解不同植物芳香油的特点、用途及使用方法。

2. 请进行一次社会调查,了解周围地区是否有厂家生产芳香油,生产哪些芳香油,这些芳香油在人们日常生活中的作用以及生产芳香油的经济效益与发展前景。

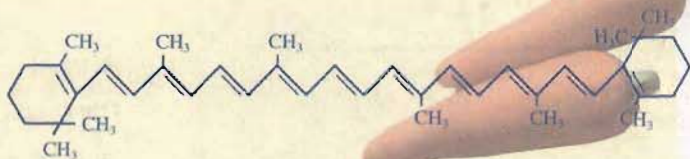
课题2 胡萝卜素的提取

课题背景

从胡萝卜中提取出的橘黄色物质包括多种结构类似物,统称为胡萝卜素(carotene)。胡萝卜素的化学分子式中包含多个碳碳双键,根据双键的数目可以将胡萝卜素划分为 α 、 β 、 γ

三类, β -胡萝卜素是其中最主要的组成成分。一分子的 β -胡萝卜素在人或动物的小肠、肝脏等器官被氧化成两分子的维生素A,因此,胡萝卜素可以用来治疗因缺乏维生素A而引起的各种疾病,如夜盲症、幼儿生长发育不良、干皮症等。胡萝卜素还是常用的食品色素,广泛地用作食品、饮料、饲料的添加剂。最近发现天然胡萝卜素还具有使癌变细胞恢复成正常细胞的作用。

2003年,国内市场上 β -胡萝卜素的价格不菲,人工合成的 β -胡萝卜素约为每千克1.1万元,天然 β -胡萝卜素的价格约为每千克1.8万元。国际上天然 β -胡萝卜素的价格更高。世界上 β -胡萝卜素的年需求量在1500t以上,年销售额约为3亿美元,并以每年7%~10%的速度递增。在本课题中,我们将尝试从胡萝卜中提取胡萝卜素。



β -胡萝卜素的结构式

基础知识

胡萝卜素是橘黄色结晶,化学性质比较稳定,不溶于水,微溶于乙醇,易溶于石油醚等有机溶剂。与 β -胡萝卜素化学结构类似的胡萝卜素大约有100多种,它们大多存在于蔬菜中。胡萝卜等蔬菜是提取天然 β -胡萝卜素的原料。

工业生产上,提取天然 β -胡萝卜素的方法主要有三种,一是从植物中提取,二是从大面积养殖的岩藻中获得,三是利用微生物的发酵生产。本课题所提供的方法只能提取胡萝卜素的混合物,如果要获得 β -胡萝卜素,还必须对产物进行进一步分离。

实验设计

根据胡萝卜素易溶于有机溶剂的特点,可以考虑有机溶剂萃取的方法。具体选择哪一种有机溶剂作萃取剂,实验中还需要考虑哪些因素,请你参考实验流程(图6-6)及

② 在用胡萝卜做菜时,菜中的浮油会呈现橘黄色,这种颜色是由胡萝卜素溶解在油中产生的。溶解的胡萝卜素容易被人体吸收,因此,炒胡萝卜时要多加些油。

② 美国、日本、英国等国已研究培育出 β -胡萝卜素含量高,并且能够抗病虫害的胡萝卜新品种,为天然 β -胡萝卜素的生产提供了优质的原料。一般每吨胡萝卜可以提取胡萝卜产品 50~100 kg,其中胡萝卜素的含量占产品总量的 10% 左右。

③ 石油醚、乙酸乙酯、乙醚、苯和四氯化碳的沸点分别为 90~120 $^{\circ}\text{C}$ 、77 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 和 76 $^{\circ}\text{C}$ 。

④ 石油醚并不是醚类化合物,而与汽油、煤油类似,是具有一定碳链长度的烷烃混合物。

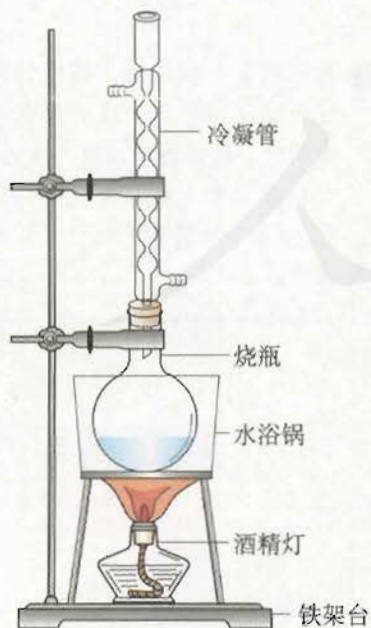


图 6-7 提取胡萝卜素的装置

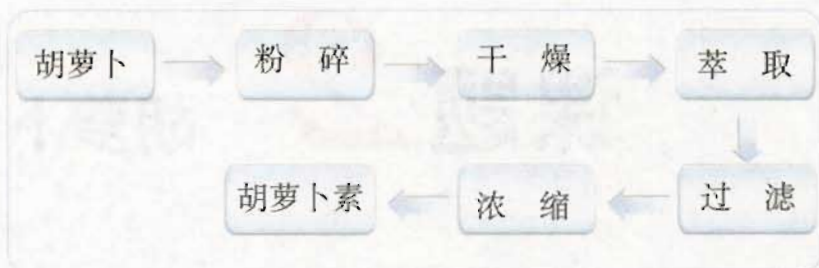


图 6-6 提取胡萝卜素的实验流程图

下面的资料,进行设计。

〔资料一〕 萃取剂的选择

用做溶剂的有机物分为水溶性和水不溶性两种。乙醇和丙酮能够与水混溶,是水溶性有机溶剂;石油醚、乙酸乙酯、乙醚、苯、四氯化碳等不能与水混溶,称为水不溶性有机溶剂。

萃取胡萝卜素的有机溶剂应该具有较高的沸点,能够充分溶解胡萝卜素,并且不与水混溶。此外,还需要考虑萃取效率、对人的毒性、是否易燃、有机溶剂是否能从产品中完全除去、会不会影响产品质量等问题。综合考虑以上因素,回答下面的问题。

1. 乙醇和丙酮能够用于胡萝卜素的萃取吗?为什么?

2. 在石油醚、醋酸乙酯、乙醚、苯和四氯化碳这几种有机溶剂中,哪种最适宜用来提取胡萝卜素?如果不能确定,请先选出两三种有机溶剂进行萃取实验,再从中选择出萃取效果最好的有机溶剂。

〔资料二〕 影响萃取的因素

萃取的效率主要取决于萃取剂的性质和使用量,同时还受到原料颗粒的大小、紧密程度、含水量、萃取的温度和时间等条件的影响。一般来说,原料颗粒小,萃取温度高,时间长,需要提取的物质就能够充分溶解,萃取效果就好。因此,萃取前,要将胡萝卜进行粉碎和干燥。萃取的最佳温度和时间可以通过设置对照实验来摸索。需要注意的是,在探究一种因素对萃取效率的影响时,其他因素要保持不变。

〔资料三〕 胡萝卜素提取装置的设计

萃取过程应该避免明火加热,采用水浴加热,这是因为有机溶剂一般是易燃物,直接使用明火加热容易引起燃烧、爆炸。为了防止加热时有机溶剂挥发,还要在加热瓶口安装回流冷凝装置(图 6-7)。萃取液的浓缩可直接使用蒸馏装置(参见本专题课题 1)。在浓缩之前,还要进行过滤,除去萃取液中的不溶物。

操作提示

1. 新鲜的胡萝卜含有大量的水分, 在干燥时要注意控制温度, 温度太高、干燥时间太长会导致胡萝卜素分解。

2. 胡萝卜干燥的速度和效果与破碎程度、干燥方式有关。如果有条件, 可以使用烘箱烘干, 也可以用热风吹干。

结果分析与评价

1. 将获得的实验数据进行整理, 绘制图表, 分析数据, 确定最佳萃取条件, 并进行验证。

2. 将提取的胡萝卜素粗品通过纸层析进行鉴定, 鉴定方法如下。在 $18\text{ cm} \times 30\text{ cm}$ 滤纸下端距底边 2 cm 处做一基线, 在基线上取 A、B、C、D 四点, 用最细的注射器针头分别吸取 $0.1 \sim 0.4\text{ mL}$ 溶解在石油醚中的标准样品和提取样品, 在 A、D 和 B、C 点上点样。点样应该快速细致, 在基线上形成直径为 2 mm 左右的圆点, 每次点样后, 可用吹风机将溶剂吹干, 注意保持滤纸干燥。等滤纸上的点样液自然挥发干后, 将滤纸卷成圆筒状, 置于装有 1 cm 深的石油醚的密封玻璃瓶中 (图 6-8)。等各种色素完全分开后, 取出滤纸, 让石油醚自然挥发后, 观察标准样品中位于展开剂前沿的胡萝卜素层析带 (图 6-9)。看看萃取样品中是否也出现了对应的层析带, 与标准样品的有什么区别, 并分析产生区别的原因。

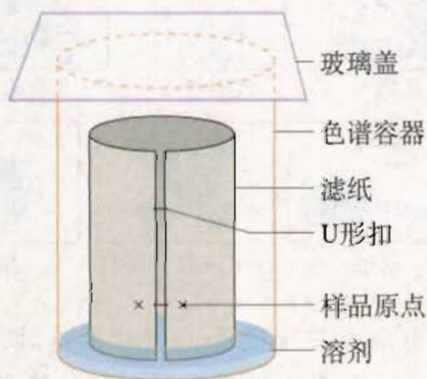


图 6-8 纸层析装置示意图

! 萃取回流和浓缩蒸馏时要注意操作安全。

i 标准样品可以在化学试剂商店购买。

i 点样应该快速细致, 点样后会在基线上形成细小的圆点, 注意保持滤纸干燥。

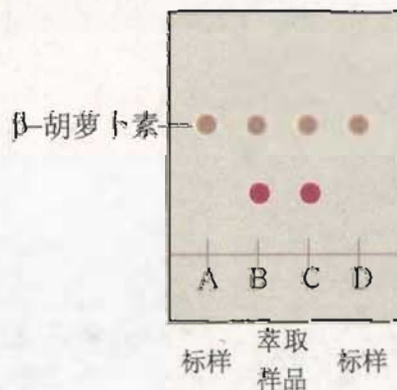


图 6-9 胡萝卜素的纸层析结果示意图



练习

1. 请你比较水蒸气蒸馏、压榨法和有机溶剂萃取在实验原理、方法步骤及适用范围方面的异同, 并分析这三种方法的优点和局限性。

2. 有机溶剂萃取法广泛应用于动植物有效成分的分离。请你查阅相关资料, 了解一种动植物有效成分的萃取方案, 并将这一内容写成一篇科普短文。

安全工作，人人有责。确保实验室不发生安全事故不仅是教师和实验室管理员的责任，也是每一位上实验课的学生们的责任。与化学实验室相似，生物学实验室也存在如使用易燃、易爆化学物品以及用水、用电、用火等安全问题。除此以外，生物实验室还可能接触有害生物、被有害生物感染等安全问题。为了确保实验室中所有人员的安全与健康，请遵守以下基本安全规则。

- 严禁在实验室吃喝任何东西，以免误食和吸入有毒物质。
- 不要穿拖鞋进实验室，以避免溅落的腐蚀性药物等对皮肤的伤害。
- 使用实验室里的仪器时应先掌握正确的操作方法，不知道时，先阅读说明书或请教老师，掌握使用方法后再使用，否则很可能损坏仪器设备或引发安全事故。
- 了解下图中危险化学品药品的警告标志。请与其他同学讨论，在使用标有下列警告标志的化学药品时，应该注意哪些安全问题。



- 在进行有潜在安全隐患的实验操作时，必须穿上实验服，戴上防护手套，有时还需要戴上口罩和防护镜。使用危险化学品一般要在通风橱中操作。操作时要考虑周密，操作要细致认真，尽可能避免事故发生。
- 在处理生物材料时，如发生皮肤破损等事故，应及时进行消毒处理，并尽快到医院就诊，以防止发生严重的感染。
- 处理微生物材料时，要严格遵守无菌操作的规程。微生物样品要在火焰附近操作，与操作者保持一定距离。实验后一定要洗手，微生物实验材料在丢弃前一定要进行灭菌处理，以免污染环境。
- 了解玻璃器皿的安全使用方法，使用时要小心。
- 了解电器的安全使用方法并严格遵守。
- 注意用火安全，不要用燃着的酒精灯去点燃另一个酒精灯。掌握火灾应急处理常识，了解安全出口的位置，知道怎样关闭电源和报警。

统一的单位对于有效的交流和沟通是十分必要的。国际单位制(SI)是国际上承认的测定物理量的常规表示方法,下面列出了生物学实验中常用的SI单位。

长度

长度的SI单位是米(m),生物学中常用厘米(cm)和纳米(nm)。

$$1 \text{ 厘米 (cm)} = 10^{-2} \text{ 米 (m)}$$

$$1 \text{ 毫米 (mm)} = 10^{-3} \text{ 米 (m)}$$

$$1 \text{ 微米 (}\mu\text{m)} = 10^{-6} \text{ 米 (m)}$$

$$1 \text{ 纳米 (nm)} = 10^{-9} \text{ 米 (m)}$$

体积

体积的SI单位是立方米(m^3),升(L)和毫升(mL)为国家选定的非SI单位。玻璃器皿上多用升和毫升来标示刻度。各种体积单位的换算关系如下。

$$1 \text{ 升 (L)} = 10^{-3} \text{ 立方米 (m}^3\text{)}$$

$$1 \text{ 毫升 (mL)} = 10^{-6} \text{ 立方米 (m}^3\text{)}$$

质量

质量的SI单位是千克(kg)。在生物学上常用的质量单位有千克(kg)、克(g)和毫克(mg)。

$$1 \text{ 克 (g)} = 10^{-3} \text{ 千克 (kg)}$$

$$1 \text{ 毫克 (mg)} = 10^{-3} \text{ 克 (g)}$$

物质的量

物质的量的SI单位是摩尔(mol)。

浓度

浓度的SI单位是摩尔每立方米(mol/m^3),相当于非SI单位毫摩尔每升(mmol/L)。实验室常用的单位摩尔每升(mol/L),相当于SI单位的千摩尔每立方米(kmol/m^3)。此外,质量浓度、质量分数和体积分数等也常用来表示溶液浓度。

温度

温度的SI单位是开尔文(K),常用的单位是摄氏温度($^{\circ}\text{C}$)。

在一个标准大气压下,摄氏温度计上的0℃对应水的凝固点,100℃对应水的沸点。摄氏温度加273.15就换算为以开尔文为单位的温度。

时 间

一般来说,含有时间的物理量用秒(s)做单位。当用秒做单位不合适时,则用分(min)、小时(h)、天(d)或年(y)。

下表是对上述 SI 单位的总结。

量的名称	单位名称	英文名称	单位符号
长度	米	meter	m
体积	立方米	cubic meter	m ³
质量	千克	kilogram	kg
物质的量	摩(尔)	mole	mol
浓度	摩尔每立方米	mole per cubic meter	mol/ m ³
热力学温度	开(尔文)	Kelvin	K
时间	秒	second	s

在 SI 单位前,经常加上表示倍数的词头。下表列出了常用的词头。

倍数	词头名称	英文名称	词头符号
10 ⁻³	毫	milli	m
10 ⁻⁶	微	micro	μ
10 ⁻⁹	纳	nano	n
10 ⁻¹²	皮	pico	p
10 ³	千	kilo	k
10 ⁶	兆	mega	M

如果你还希望学习更多的国际单位的知识,请查阅相关书籍。

一、牛肉膏蛋白胨培养基(又称肉汤培养基,培养细菌)

牛肉膏	5 g
蛋白胨	10 g
NaCl	5 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至1 000 mL,调节pH为7.0~7.2。在肉汤培养基中加入15~20 g的琼脂,即制成牛肉膏蛋白胨固体培养基。

二、LB培养基(培养大肠杆菌)

蛋白胨	10 g
酵母膏	5 g
NaCl	10 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至1 000 mL,调节pH为7。

三、麦芽汁琼脂培养基(培养酵母菌)

麦芽汁	20 g
蛋白胨	1 g
葡萄糖	20 g
琼脂	20 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至1 000 mL。

麦芽汁的制备:普通大麦在20℃左右用水浸泡4 h,并在大麦表面覆盖一层湿布,每天冲水1~2次,至麦芽长到与麦粒长度相同时,将大麦风干、捣碎,制成大麦粉。1 kg大麦粉加水4 kg,在55℃的水浴锅中糖化6~7 h,至加碘后不变蓝色。用纱布过滤麦芽汁,放置一段时间,使杂质沉淀,测定糖度,然后将麦芽汁稀释到5~6波美度即可。

波美度是表示溶液浓度的一种方法,把波美比重计浸入所测溶液中,得到的度数叫波美度。当测得波美度后,从相应化学手册的对照表中可以方便地查出溶液的质量分数。

四、马铃薯琼脂培养基(培养真菌)

将200 g马铃薯去皮,切成小薄片,加水1 000 mL,加热到80℃,保温1 h,或煮沸20 min后,用纱布过滤。滤液中加入20 g蔗糖或葡萄糖、15~20 g琼脂,用蒸馏水定容至1 000 mL。

五、查氏培养基(培养霉菌)

蔗糖	15 g
硝酸钠(NaNO_3)	3 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.5 g
氯化钾(KCl)	0.5 g
硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
琼脂	15~20 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至1 000 mL。

六、MY培养基(霉菌和酵母菌的传代保藏)

酵母膏	3 g
麦芽汁	3 g
蛋白胨	5 g
葡萄糖	10 g
琼脂	20 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至1 000 mL。

七、伊红美蓝培养基（可用于检测水中大肠杆菌的含量）

首先按以下组成配制基础培养基。

蛋白胨	10 g
NaCl	5 g
琼脂	15~20 g

将上述物质溶解后，用蒸馏水定容至 1 000 mL，调节 pH 为 7.6。灭菌后，冷却至 60 ℃ 左右，再按下面的比例，在无菌操作条件下加入灭菌的乳糖溶液、伊红水溶液及美蓝水溶液。摇匀后，立即倒平板。溶液中的乳糖在高温下会破坏，因此一般使用压力为 70 kPa、温度为 115 ℃ 的条件灭菌 20 min。

基础培养基	100 mL
20% 乳糖溶液	2 mL
2% 伊红水溶液	2 mL
0.5% 美蓝水溶液	1 mL

八、MS 培养基（配制 1 000 mL 的培养基的用量，用于植物组织培养）

NH ₄ NO ₃ (硝酸铵)	1 650 mg
KNO ₃ (硝酸钾)	1 900 mg
KH ₂ PO ₄ (磷酸二氢钾)	170 mg

MgSO ₄ · 7H ₂ O (硫酸镁)	370 mg
CaCl ₂ (氯化钙)	440 mg
*FeSO ₄ · 7H ₂ O (硫酸亚铁)	27.8 mg
*Na ₂ EDTA (乙二胺四乙酸二钠)	37.3 mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O (硫酸锰)	22.3 mg
ZnSO ₄ · 4H ₂ O (硫酸锌)	8.6 mg
H ₃ BO ₃ (硼酸)	6.2 mg
KI (碘化钾)	0.83 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (钼酸钠)	0.25 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O (硫酸铜)	0.025 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O (氯化钴)	0.025 mg
甘氨酸	2 mg
盐酸硫胺素(维生素 B ₁)	0.4 mg
盐酸吡哆醇(维生素 B ₆)	0.5 mg
烟酸	0.5 mg
肌醇	100 mg
蔗糖	30 000 mg
琼脂	10 000 mg

* 螯合铁盐的配制方法：称取 5.57 g FeSO₄ · 7H₂O 和 7.45 g Na₂EDTA，溶于 1 L 蒸馏水中，制成铁盐母液。配制 1 L 培养基，取螯合铁盐母液 5 mL。

一、干热灭菌的操作方法

1. 装入待灭菌的物品

将待灭菌的物品，如塞上棉塞的试管、锥形瓶、培养皿、吸管等玻璃仪器，用牛皮纸或干净的报纸包裹严密后，放入干热灭菌箱。注意，物品不要摆得太挤，以免妨碍热空气流通。同时，灭菌物品也不要与干热灭菌箱内壁的铁板接触，以防包装纸烤焦起火。

2. 灭菌

关好干热灭菌箱的箱门，旋动恒温调节器，设定温度为160~170℃。当温度升到150℃左右时，保持此温度3~4h。由于干热灭菌温度较高，操作时要注意防止烫伤。

3. 降温

关掉电源，自然降温。

4. 开箱取物

等温度降到70℃以下后，打开箱门，取出灭菌物品。注意温度未降到70℃以前，切勿打开箱门，以免玻璃器皿炸裂。

二、高压灭菌的操作方法

1. 首先将内层灭菌桶取出，再向外层锅内加入适量的水，使水面与三角搁架平齐。

2. 放回灭菌桶，并装入待灭菌物品。注意不要装得太挤，以免妨碍蒸汽流通而影响灭菌效果。锥形瓶与试管口不要与桶壁接触，以免冷凝水淋湿包裹瓶口的纸而透入棉塞。

3. 加盖，并将盖上的排气软管插入内层灭菌桶的排气槽内。拧紧固定盖子的螺栓，注意要同时旋紧相对的两个螺栓，使螺栓松紧一致，不漏气。

4. 加热灭菌锅，打开排气阀，使水沸腾，排除锅内的冷空气。等冷空气完全排尽后，关上排气阀，让锅内的温度随蒸汽压力增加而逐步上升。当锅内压力升到所需压力时，控制热源，按照灭菌所要求的时间，维持压力。

5. 到灭菌时间后，切断热源，让灭菌锅内温度自然下降，当压力表的压力降到零时，打开排气阀，旋松螺栓，打开盖子，取出灭菌物品。如果提前打开排气阀，锅内压力突然下降，灭菌容器内的液体会冲出容器，造成污染。

三、紫外线灭菌的操作方法

紫外线只适用于表面灭菌和空气灭菌。以面积为10m²的普通小型接种室为例，在工作台上方距地面2m处悬挂1~2只30W紫外灯，每次开灯照射30min，就能达到室内空气灭菌的目的。照射前，适量喷洒石炭酸等化学抑菌剂，可以加强灭菌效果。

所属类别	抑菌剂名称	常用浓度	应用举例
醇类	乙醇	体积分数为 50%~70% 的溶液	皮肤及器械消毒
酸类	乳酸	0.33~1 mol/L	空气消毒 (喷雾或熏蒸)
	食醋	3~5 mL/m ³	熏蒸消毒空气
碱类	石灰水	1%~3%	地面消毒
酚类	苯酚 (石炭酸)	5%	空气消毒 (喷雾)
	煤酚皂	2%~5%	空气消毒、皮肤消毒
醛类	甲醛 (福尔马林)	体积分数为 40% 的溶液, 用量为 2~6 mL/m ³	接种室、接种箱等熏蒸消毒
重金属离子	升汞	0.1%	植物组织表面消毒
	硝酸银	0.1%~1%	皮肤消毒
氧化剂	高锰酸钾	0.1%~3%	皮肤消毒
	过氧化氢	3%	清洗伤口
	漂白粉	1%~5%	洗刷培养皿、饮水消毒
去污剂	新洁尔灭	用水稀释 20 倍	皮肤、不能遇热的器皿消毒
染料	结晶紫	2%~4%	外用紫药水, 浅创伤口消毒

注: 除标明为体积分数者外, 表中的百分数表示的是质量分数。