

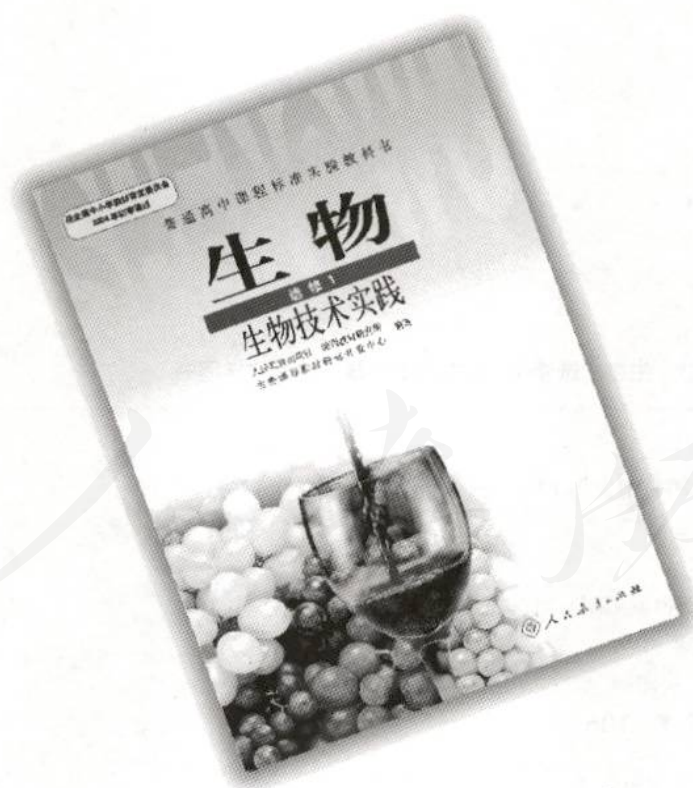
普通高中课程标准实验教科书

# 生物 选修1

## 生物技术实践

# 教师教学用书

人民教育出版社 课程教材研究所 编著  
生物课程教材研究中心



人民教育出版社

主 编：朱正威 孙万儒 赵占良  
副 主 编：王真真  
编写人员：朱正威 孙万儒 鲍平秋 吴成军 吴兢勤 石家骥  
杨 柳 王建军 刘启宪 董 莉 张 慧 韩玉平  
责任编辑：吴兢勤  
插图绘制：刘 菊

图书在版编目(CIP)数据

普通高中课程标准实验教科书教师教学用书. 生物. 1, 生物技术实践：选修 / 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. —2 版. —北京：人民教育出版社, 2017. 1(2019. 7 重印)  
ISBN 978-7-107-18084-2

I. ①普… II. ①人… ②课… III. ①生物课—高中—教学参考资料 IV. ①G633

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 024467 号

普通高中课程标准实验教科书 生物 选修 1 生物技术实践 教师教学用书

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 山东临沂新华印刷物流集团有限责任公司

版 次 2007 年 1 月第 2 版

印 次 2019 年 7 月第 27 次印刷

开 本 890 毫米×1240 毫米 1/16

印 张 3.75

字 数 81 千字

定 价 19.10 元

版权所有·未经许可不得采用任何方式擅自复制或盗用本产品任何部分·违者必究  
如发现内容质量问题、印装质量问题, 请与本社联系。电话: 400-810-5788

# 目 录

|           |   |
|-----------|---|
| 致教师 ..... | 1 |
|-----------|---|

## 专题 1 传统发酵技术的应用 6

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 专题分析 .....               | 6  |
| 课题 1 果酒和果醋的制作 .....      | 7  |
| 课题 2 腐乳的制作 .....         | 10 |
| 课题 3 制作泡菜并检测亚硝酸盐含量 ..... | 12 |

## 专题 2 微生物的培养与应用 14

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 专题分析 .....                  | 14 |
| 课题 1 微生物的实验室培养 .....        | 15 |
| 课题 2 土壤中分解尿素的细菌的分离与计数 ..... | 17 |
| 课题 3 分解纤维素的微生物的分离 .....     | 19 |

## 专题 3 植物的组织培养技术 22

|                    |    |
|--------------------|----|
| 专题分析 .....         | 22 |
| 课题 1 菊花的组织培养 ..... | 23 |
| 课题 2 月季的花药培养 ..... | 25 |

## 专题 4 酶的研究与应用 27

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 专题分析 .....              | 27 |
| 课题 1 果胶酶在果汁生产中的作用 ..... | 28 |
| 课题 2 探讨加酶洗衣粉的洗涤效果 ..... | 30 |
| 课题 3 酵母细胞的固定化 .....     | 33 |

## 专题 5 DNA 和蛋白质技术 37

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 专题分析 .....                  | 37 |
| 课题 1 DNA 的粗提取与鉴定 .....      | 38 |
| 课题 2 多聚酶链式反应扩增 DNA 片段 ..... | 41 |
| 课题 3 血红蛋白的提取和分离 .....       | 44 |

专题 6 植物有效成分的提取

50

|                     |    |
|---------------------|----|
| 专题分析 .....          | 50 |
| 课题 1 植物芳香油的提取 ..... | 50 |
| 课题 2 胡萝卜素的提取 .....  | 54 |

人教版®

## 致教师

《普通高中生物课程标准（实验）》内容标准部分，在对本选修模块的说明中指出：“本模块是实验课，所说的生物技术，是指广义的生物技术，而不同于（甚至主要不是）现代生物技术。内容包括微生物的利用、酶的应用、生物技术在食品加工中的应用和生物技术在其他方面的应用四部分。”这就是说，这是一门以学生为主体，通过实验设计和操作实践，学习科学探究的选修课程。

《标准》在课程思路中指出：“生物技术实践模块重在培养学生设计实验、动手操作、收集证据等科学探究的能力，增进学生对生物技术应用的了解。本模块适于继续学习理工类专业或对实验操作感兴趣的学生学习。”这就是说，本模块并非只要学生埋头于实验操作，还要求学生了解生物技术在社会生活、生产、发展中的应用，对学生进行 STS 教育，并对选择学业（或职业）方向提供帮助。因为“继续学习理工类专业或对实验操作感兴趣的学生”这一群体，其学业志向和职业选择还将经历复杂的分化。

《标准》还说：“教师应根据本校的条件，指导学生选做本模块中的 5~7 个实验。”这就是说本选修模块的学习还存在着模块内部的选择性。

简而言之，本选修模块既是一门学习科学探究的实践课程，又是一门生物科学技术应用于社会的 STS 课程，还是一门在教师指导下尊重学生各取所需、各展其长的特色课程。

### 一、学习本模块的意义和价值

本模块的教材内容以“专题——课题”形式展开，共分 6 个专题，依次是：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 和蛋白质技术以及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 2~3 个课题，大体上也相对独立，以利于师生选择 5~7 个课题，完成本模块的学习，获得 2 个学分。由于所选课题的不同，其学习意义和价值也会有所差异。下面就共同的意义和价值作简要的说明。

#### 1. 较全面、真实地培养学生的科学探究能力

“倡导科学探究”作为课程理念是贯穿于全部必修和选修模块之中的。然而比之其他模块中的科学探究活动，课题展现的是更加真实、丰富和完整的科学探究情景，学生拥有从选择课题，了解、分析背景知识，理顺研究思路，设计实验流程，规范操作到评价结果的独立自主权，且由于最终需要获取某项“产品”，而具有实战演练的性质。概括地说，学生的自主性将在以下方面得到发挥。

- 学生自主选择（在教师指导下）课题，有利于调动学生的学习兴趣 and 特长。

- 学生自主研习和设计出可行的实验操作方案，并精心操作，这将全面培养学生的科学探究能力（课标规定有 11 项科学探究能力，见课标第 8~9 页）。

- 在很多情况下，学生需要获取某种成果或产品，并拥有改进成果或产品的机会，而不是理论认识或简单的数据整理。这种真实性，给他们带来了压力和挑战。

- 自我评价、相互评价，合作协调、小结反思等，将自然地贯穿于完成课题的全过程。

总之，这是在经学生选择后的任务驱动下的真实的科学探究实践，对提升科学探究能力，作

用巨大。

## 2. 较严格地、多方位地培养学生的实际操作能力

本模块教材中课题的出色完成,既依赖于实验方案设计的正确,还需一丝不苟的、精确而细致的操作。在我们的生物学课程中,过去对操作技能的要求相对狭窄,要求的精确性也不高,而本模块各课题,操作对象、方法技能多种多样,有许多都会因操作上的差之毫厘,导致结果的失之千里;有些还会因操作的失误而引发安全问题。

在以下方面,教师对学生应严格要求,这将有利于提升学生的实际操作能力,并保证课题的完成。

- 认清操作的目的是原理
- 了解操作对象和工具的性质
- 熟悉操作的顺序和要领
- 观察和分析操作的效果
- 多次练习操作的要领,熟能生巧
- 杜绝操作中的安全事故

教师应充分发挥指导和示范作用,并把操作能力细化为形成性评价的一部分。

## 3. 拓展和加深对生物科学技术知识的理解

探究需要相关的背景知识,这些背景知识常常是跨学科的。操作需要了解相关的原理,不应该是“照方抓药”。对于过程和结果的总结和反思,形成一份科学的、有价值的课题报告,更反映了撰写者的科学知识水准和思维的严密。

本模块的教学内容,并非实验指导手册那样简单。例如,微生物的培养、纯化、分离和应用,对于中学生来说,完全是新的知识内容;组织培养中的花药培养,涉及被子植物花粉发育和单倍体育种的专门知识;酵母细胞的固定化,DNA的粗提取和PCR技术,血红蛋白的提取和分离等包含着现代生物科学技术的基础知识;植物有效成分的提取中有许多物理和化学知识的应用;即使是与生活密切相关的传统发酵技术和酶制剂的应用,也需要复习有关的基础知识。因此,本模块仍具有获取知识的教育价值。即使是技术操作,本质上也是知识、原理的应用。

拓展和加深对生物科学技术知识的理解,其教育价值仍不应忽视。与其他必修、选修模块不同,本模块的学习是为了应用去获取知识,在实践过程中理解知识,目的性更强,也因此会理解得更透彻,掌握得更牢固。

## 4. 领悟科学、技术、社会的相互关系,凸显科技价值观的教育

本模块教材的专题和课题的选定,并非仅仅考虑到它们可以让学生学到某项生物技术,还考虑了它们的可行性,尤为重要是考虑了它们与社会生活、经济发展、科学研究需要的相关性。

在专题的引言中和课题的课题背景中都用简洁或富有情趣的文字指出了专题和课题与社会需求的关系,可大致归纳如下。

● 指向生活:如“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……无论果酒还是果醋都具有一定的保健养生的功效。”——课题:果酒和果醋的制作。

● 指向生产:如“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。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。”——课题:分解纤维素的微生物的分离。此外,酶的固定化技术,指向节约成本,提高产品质量;胡萝卜素的提取指向提高产品的附加值;植物组织培养指向快速繁育和单倍体育种;等等。

● 指向发展新兴科技:如“汇涓流而成江河,积跬步而致千里。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……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。”——专题:DNA和蛋白质技术。

这些都说明教材从社会的需求出发,引导学生积极参与到生物技术实践的学习中来,使学生认识到自己的科学探究活动对推动社会的进步是有意义的。学生既领悟科学、技术、社会的相互关系,又增强了对科学、技术与社会价值的认识,并提高了社会责任感。

#### 5. 砥砺科学精神,端正科学态度,鼓励创新

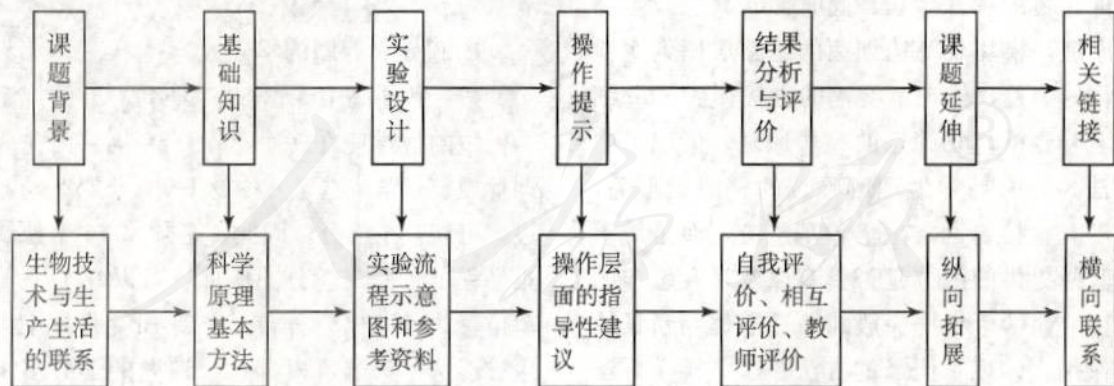
这是一个以科学探究实践为主的学习模块,在“做”科学中,需要一丝不苟,百折不回,埋头苦干的精神,需要求真务实,谦虚谨慎,严格要求的态度。对学生来说,是砥砺科学精神,端正科学态度的难得的锤炼机会。

本模块的大部分课题只是给出了基础知识和实验设计以及操作提示的简略框架,给学生留有创造的空间,学生完全可以遵循基本的原则和要求,对实验方法或予以改进,或独辟蹊径,可谓“条条大路通罗马”。此外课题延伸,也给学生以创造的机遇。因此,这也是一门鼓励创新的课。

## 二、教学内容的设计思路和呈现方式

### 1. 确定和安排好科学探究实践的专题和课题

课标中这部分的具体内容标准,为保证所有模块的表述形式的统一,仍分成“具体内容标准”



教材的课题结构体现了科学研究的过程,实际是对科研领域研究工作的借鉴。学生完成5~7个课题之后,不仅能掌握若干具体的生物技术,而且实践了科学研究的一般过程,能够达到课标中关于科学探究能力的11项要求,并训练了科学思维、实际操作和一定的实践创新能力。

和“活动建议”并列的两栏。据此编写教科书时,不能如其他模块那样以“具体内容标准”各条来分章或节,因为本模块称为“生物技术实践”,应以“活动建议”中的学生探究活动来分章或节。

此外,还必须对这些探究实践活动,进行比较科学的、便于学生选择学习的方式进行归类,于是归类为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。大体上遵循这样一个系统:从传统到现代,从微生物到植物,从培养技术到生化分析和提取。这也克服了课标中某些归类的不妥之处。

每一专题下设2~3个课题。顾名思义,课题是必须动手动脑去实践,去解决的问题,由此导入了科学探究实践过程。设2~3个课题,是因为同属一个专题范围的不同课题,完成过程中存在着内容、方法的相似性和教育价值的类同,便于学生从中挑选。

### 2. 构建便于教师教、学生学的课题结构

本模块中的大多数课题都采取了下图所示的结构,这也是课题在教科书中的呈现方式,部分课题结构略有调整。

从上图还可以看出呈现方式具有好教、好学的特点。

- 课题背景突出了与学生生活经验的联系,并高度注意某项生物技术与社会生活、或生产、或发展的关系,以调动学生探究的积极性。

- 融基础知识、实验设计和操作提示于一

体,实际上提示学习过程(或教学过程)应关注知识和能力的统一,思维和实践的统一,学科学、做科学、用科学的统一。

● 以评价为杠杆,引导学生总结和反思,倾听不同意见,不断进取。评价又以学生自我评价和教师评价相结合,最终确定是否获得了该课题应得的学分,使考核落到实处。

● 课题延伸和相关链接体现了学习的开放性,鼓励有兴趣、有相应潜质的学生,得到进一步的发展。

### 3. 渗透科学思维、科学方法方面的训练

科学探究需要也锻炼科学思维和科学方法的运用,这是不言而喻的。这里说“渗透”,是因为学生已经学习过三个必修模块,在那里,科学方法是以显性方式凸现的。于是,基本的科学方法已经有了较好的基础。本模块的特点是实践,许多内容的组织都围绕着完成实践活动来展现,因此,科学思维和科学方法,常常是隐在其中。

举例来说,课题——土壤中分解尿素的细菌的分离与计数,教材在介绍分离细菌的原理时,有意识地运用类比、归纳和演绎等思维方法。教材没有直接讲述筛选菌株的原理,而是从热泉高温条件筛选 *Taq* 细菌的实例过渡到实验室中提供有利条件让目的菌株生长、同时抑制其他微生物生长的原理,将热泉筛选细菌的思路应用到实验室微生物的筛选,体现了类比的方法;从 *Taq* 细菌筛选上升到微生物筛选的一般原理,体现了归纳的方法。在引导学生理解筛选的一般原理后,教材并没有直接告诉学生培养基配方,而是请学生分析旁栏提供的配方是否具有以及具有怎样的选择作用,让学生根据一般的筛选原理判断具体配方的作用,体现了演绎的方法。这些科学方法的训练,并没有标注于文字或凸显于栏目,是自然而然地渗透的。

同样,在土壤中分解尿素的细菌的分离与计数的操作中,重复和对照的设置是基本的和重要的方法。教材没有直接去讲这些方法,而是列举学生的实际做法。其一是统计菌落的数目。一位同学是涂布一个平板,获菌落数 230,另一位同学

则涂布了三个平板,获菌落数分别为 21、212、256,取平均值为 163。请学生自己来区别谁的结果更接近真实值;其二是一位同学筛选出的菌落数远比其他同学多。该同学坚持自己的操作无误,是缘于所选土壤样品不同而造成的。但该同学并未设置对照,难以说服人。教材这样处理,是以生动的实例让学生领悟实验中重复和对照的重要性。

教材中还有大量的旁栏问题,大多是引导学生科学地思维,选择适当的科学方法。

### 4. 图文结合,化解技术操作的困难

本模块技术操作内容多,有些仅依靠文字叙述,不易掌握要领,因此配有较多的图片和图解。特别是难点部分,如微生物的培养与应用、DNA 和蛋白质技术,图示更多。

### 5. 实验室工作的有关规定或指导,集于附录

本模块的各课题都必须在实验室中完成,为方便实验的进行和保证实验操作的安全,在教科书的附录中,载有生物学实验室的基本安全规则,生物学实验中常用的国际单位,常用培养基配方,常用的消毒灭菌操作方法,常用化学抑菌剂。这几个附录,也可供学校添置实验设备时参考。

## 三、教学建议

### 1. 确定各课题的学分数

按《普通高中课程方案(实验)》的规定,每个模块的教学应在一个学段(10周)内完成。按课标规定,学生选学其中的 5~7 个课题,考核通过,可获 2 个学分。因此,必须将 16 个课题,按难易程度,厘定学分。例如,可以 0.1 个学分为单位,20 个 0.1 学分,分布到 16 个课题中去,学生方能选学。还可根据每个课题的学分多少,决定选 5 或 6 或 7 个课题。至于是否能够选 7 个以上的课题,并没有硬性规定。若有条件应鼓励多选多做。具体实施方案,可由各校厘定。

### 2. 从实际出发选择课题

《生物技术实践》中的课题从传统发酵技术到现代分子生物技术都有所涉及,可谓“基础”与“现代”并重。但应明确,无论课题针对的是哪项

具体技术，它都同样能够培养学生的科学探究能力。课题的教育价值并不因为技术是现代技术或是传统技术而提升或降低。教师在选择课题时，不要追求时髦，应该结合本地教学资源的实际情况做出合理取舍。

### 3. “学”围绕“做”

《生物技术实践》与所有其他生物课程的一大区别在于，几乎每个课题都要求制作产品。除个别情况外，产品均为物质实体，如葡萄酒、提纯的血红蛋白等。每个课题应围绕怎样做、怎样做得更好进行，即使是科学原理和实验技术的学习，也应围绕着“做”进行。教师在教学中要摆脱传统教学习惯的影响，将“做”摆在核心位置，让“学”围绕“做”。

### 4. 自学为主，指导为辅

《生物技术实践》强调学生的自主性，提倡自学和探究。教师在教学过程中需要保证学生的主

体地位，在基础知识、实验设计、实验操作等各环节都要让学生动起来，同时又要发挥好指导作用，注意进程控制，及时给予提示和指导，避免学生陷入无助或盲动的困境。

### 5. 确定有效评价体系

《生物技术实践》要求学生积极参与探究的全过程，包括实验设计、实验操作、结果分析、方法改进等多个环节。如何对学生的学习情况进行合理评价是一个值得深入研究的问题，教材中提供的评价标准仅供教师参考。在教学实践中，教师应根据实际情形确定准确和可操作的评价体系。

《生物技术实践》，是我国普通高中首次开设的一门生物课程。本模块教材的编写，既是尝试，也是创新。期盼在教学实践中，能得到老师们的认可，更欢迎老师们提出宝贵的意见，共同建设好这门课程。

# 专题 1

## 传统发酵技术的应用

早在数千年前,人类还不了解微生物的时候,就已经能够将微生物利用于酿酒和制酱等生产过程。19 世纪中期,法国科学家巴斯德证明食品发酵是由于微生物的作用。如今,形形色色的发酵食品在食品业中占有重要的地位。本专题的学习是让学生在实验室条件下制作若干种传统发酵食品,学习相关的加工方法和基本的操作技能,并理解其科学原理。此外,还引导学生学习食品加工中某些有害物质的检测方法。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题的三个课题均依照课程标准制定的具体内容标准编排,其对应关系如下表。

| 具体内容标准           | 对应课题           |
|------------------|----------------|
| 运用发酵食品加工的基本方法    | 课题 1、课题 2、课题 3 |
| 测定食品加工中可能产生的有害物质 | 课题 3           |

在本专题的学习中,学生需要了解传统发酵食品的制作工艺,并能够动手实践。学生应当学会设计简易的实验装置,应当掌握发酵食品加工的基本原理和方法,学会摸索发酵的最佳条件,初步了解食品加工中产生的某些有害物质的检测方法。

#### 二、技术要项

本专题围绕传统发酵食品的制作展开,主要操作技术归纳如下。

1. 果酒与果醋的制作技术。

2. 腐乳的制作技术。

3. 泡菜的腌制与亚硝酸盐含量的测定。

#### 三、设备条件

本专题并不需要特殊的实验用具或器材,有条件的学校可以配置恒温培养箱,以便有效地控制发酵温度。

#### 四、教学安排

本专题的 3 个课题相对独立,没有严格的先后顺序。值得注意的是,发酵过程需要较长的时间,有些长达一个月左右,因此教师要提前做好教学计划。本专题中的实验操作本身需要的时间并不长,但要求学生跟踪发酵过程,进行及时监测和记录。因此教师需要安排学生利用好课余时间,完成观察和记录的工作,并在实验结束的时候,安排实验结果的汇报、总结和讨论。

### 参考书目

1. 中国腐乳酿造。王瑞芝著,北京:中国轻工业出版社,1998。
2. 食品发酵与酿造工艺学。何国庆著,北京:中国农业出版社,2001。

3. 食品分析。《食品分析》编写组编,北京:中国轻工业出版社,1990。
4. 酱腌菜加工工艺与配方。牟增荣等著,北京:科学技术文献出版社,2002。

## 课题1 果酒和果醋的制作

### 一、课题目标

说明果酒和果醋制作的原理,设计制作果酒和果醋的装置,完成果酒和果醋的制作。

### 二、课题重点与难点

课题重点:说明果酒和果醋的制作原理,设计制作装置,制作出果酒和果醋。

课题难点:制作过程中发酵条件的控制。

### 三、课题背景分析

课题背景从人类酿酒制醋的历史切入,说明酒与醋的制作不仅仅是发酵食品的制作加工,还是一种文化现象,反映了人类文明发展的足迹。教师可以充分利用这一素材,渗透 STS 教育。在此基础上,教材简述了果酒和果醋的特点及其在日常生活中的作用,以激发学生动手制作的兴趣。

### 四、基础知识分析与教学建议

#### (一) 果酒制作的原理

知识要点:1. 酵母菌的兼性厌氧生活方式;2. 发酵需要的适宜条件;3. 传统发酵技术所使用的酵母菌的来源。

教学建议:教师在介绍传统发酵酿酒时,首先应让学生了解酵母菌的兼性厌氧生活方式,理解发酵需要一定的条件,然后再介绍传统发酵方法,分析传统发酵技术中所使用的酵母菌的来源。最后,教师可以组织学生讨论,在发酵过程中,怎样才能保证发酵液不受污染、如何控制好温度。

#### (二) 果醋制作的原理

知识要点:1. 酒变醋的原理;2. 控制发酵条件的作用;3. 制醋所利用的醋酸菌的来源。

教学建议:教师可采用多种形式让学生了解由酒变醋的原理以及在制醋过程中醋酸菌的作用。例如,教师可以组织学生在查找资料的基础上进行讨论和交流。通过学生的自主活动,让学生了解传统制醋的流程、醋酸菌的生活特点、醋酸菌在自然界的分布以及使果酒变为果醋的方法等基础知识。

### 五、实验案例

#### 制作葡萄酒和葡萄醋

建议将实验安排在秋季的9月或10月进行。在这段时间内进行实验,有如下优点:(1)正值收获季节,葡萄的价格便宜,品种多样;(2)此时葡萄上的酵母菌数量多且生活力强,发酵酿酒的效果好;(3)温度适宜,发酵现象非常明显。实验的具体操作步骤如下。

1. 对发酵瓶、纱布、榨汁机、盛葡萄汁的器皿等实验用具进行清洗并消毒。先用温水反复冲洗几次,再用体积分数为70%的酒精擦拭消毒,晾干待用。

2. 取葡萄500g,去除枝梗和腐烂的子粒。

3. 用清水冲洗葡萄1~2遍除去污物,注意不要反复多次冲洗。

4. 用榨汁机榨取葡萄汁后,将其装入发酵瓶中(装置参见教材图1-4b),或将葡萄打成浆后,用洁净的纱布过滤至发酵瓶中,盖好瓶盖。如果没有合适的发酵装置,可以用500mL的塑料瓶替代,但注入的果汁量不要超过塑料瓶总体积的2/3。

5. 将发酵瓶置于适宜的温度下发酵。

6. 由于发酵旺盛期 $\text{CO}_2$ 的产量非常大,因此需要及时排气,以防止发酵瓶爆裂。如果使用简

易的发酵装置,如瓶子(最好选用塑料瓶),每天要拧松瓶盖2~4次,进行排气。

7. 10 d以后,可以开始进行取样检验工作。例如,可以检验酒味、酒精的含量、进行酵母菌的镜检等工作。

8. 当果酒制成以后,可以在发酵液中加入醋酸菌或醋曲,然后将装置转移至30~35℃的条件下发酵,适时向发酵液中充气。如果找不到醋酸菌种或醋曲,可尝试自然接种,但效果不是很好。如果没有充气装置,可以将瓶盖打开,在瓶口盖上纱布,以减少空气中尘土等的污染。

## 六、课题成果评价

### (一) 果酒的制作是否成功

发酵后取样,通过嗅味和品尝进行初步鉴定。此外,还可用显微镜观察酵母菌,并用重铬酸钾检验酒精的存在与否。如果实验结果不理想,请学生分析失败原因,然后重新制作。

### (二) 果醋的制作是否成功

首先通过观察菌膜的形成、嗅味和品尝进行初步鉴定,再通过检测和比较醋酸发酵前后的pH作进一步的鉴定。此外,还可以通过在显微镜下观察发酵液中是否有醋酸菌,并统计其数量作进一步鉴定。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 你认为应该先冲洗葡萄还是先除去枝梗?为什么?

答:应该先冲洗,然后再除去枝梗,以避免除去枝梗时引起葡萄破损,增加被杂菌污染的机会。

2. 你认为应该从哪些方面防止发酵液被污染?

提示:需要从发酵制作的过程进行全面的考虑。例如,榨汁机、发酵装置要清洗干净;每次排气时只需拧松瓶盖、不要完全揭开瓶盖等。

3. 制葡萄酒时,为什么要将温度控制在18~25℃?制葡萄醋时,为什么要将温度控制在30~35℃?

答: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,因此需要将温度控制在其最适温度范围内。而醋酸菌是嗜温菌,最适生长温度为30~35℃,因此要将温度控制在30~35℃。

4. 制葡萄醋时,为什么要适时通过充气口充气?

答:醋酸菌是好氧菌,在将酒精变为醋酸时需要氧的参与,因此要适时向发酵液中充气。

### (二) [资料] 发酵装置的设计讨论题

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?

答:充气口是在醋酸发酵时连接充气泵进行充气用的;排气口是在酒精发酵时用来排出CO<sub>2</sub>的;出料口是用来取样的。排气口要通过一个长而弯曲的胶管与瓶身连接,其目的是防止空气中微生物的污染,其作用类似巴斯德的鹅颈瓶。使用该装置制酒时,应该关闭充气口;制醋时,应将充气口连接气泵,输入氧气。

### (三) 练习

2. 提示:大规模生产时需要进行更为全面周详的考虑,如原料的来源与选择、菌种的培育与选择、发酵的设备、发酵条件的自动化控制,以及如何严格控制杂菌污染;等等。此外,无论是葡萄酒或葡萄醋,实验时所检测的发酵液,并非商品意义上的产品。在实际生产中还需沉淀过滤、灭菌装瓶等获得成品酒或醋。葡萄酒还需在一定设施和条件下(如橡木桶和地窖)进行后续发酵,以获得特定的风味和色泽。

3. 提示:需考虑厂房、设备投资、原材料采购、工人人数及工资、产品种类、生产周期、销售渠道、利润等问题。

## 八、参考资料

### 1. 葡萄酒的酿造

传统的葡萄酒酿造,都是采用自然发酵的工艺。所谓自然发酵,就是葡萄破碎入罐以后,不

去人为地添加任何菌种,靠葡萄本身携带的自然界的酵母菌,在葡萄浆或分离后的葡萄汁里自发地繁殖,最终发酵成葡萄酒。

**温度对发酵的影响** 酵母菌只能在一定温度下生活。温度低于 $10^{\circ}\text{C}$ ,酵母菌发育很缓慢。随着温度的升高,繁殖速度加快, $20^{\circ}\text{C}$ 时为最佳繁殖温度,此时酵母菌生殖速度快、生活力强。超过 $35^{\circ}\text{C}$ ,酵母菌生长受到抑制,繁殖速度迅速下降,到 $40^{\circ}\text{C}$ 酵母菌停止出芽,开始出现死亡。如果想要获得高酒精浓度的发酵液、减少酒精的损耗,必须控制好发酵温度。

**空气对发酵的影响** 酵母菌繁殖需要空气。在完全隔绝空气的情况下,酵母菌繁殖几代就停止了。稍微与空气接触,酵母菌又能继续繁殖。如果长时间得不到空气,大部分的酵母菌就会死亡。要维持酵母菌长时间发酵,必须供给微量的氧气。

**葡萄汁中酵母菌的种类** 葡萄汁中酵母菌的种类大致可以分为以下三类。第一类是在发酵中起主要作用的酵母,即葡萄酒酵母或叫啤酒酵母。这种酵母发酵力强,产酒的风味好,生成有益的副产物多。在葡萄汁还没发酵之前,这种酵母占的比例很小;在发酵的过程中,这种酵母很快地繁殖起来,由它完成主要的发酵任务。第二类在葡萄汁中数量很大,但发酵力很弱,其代表是尖端酵母。在新压榨的葡萄汁中,尖端酵母和葡萄酒酵母的比例约为 $1\,000:1$ 。在发酵开始时,这种发酵力弱的酵母先引起发酵。在以后的发酵过程中,它的作用逐渐被葡萄酒酵母所代替。第三类是一种产膜的好气性酵母菌。当发酵容器未灌满时,产膜酵母便会在葡萄汁液面生长繁殖,使葡萄汁变质。

发酵是酿造葡萄酒最重要的过程。葡萄汁变成葡萄酒的过程就是酵母菌的酒精发酵过程。发酵过程非常复杂,其主要产物是乙醇和二氧化碳,此外还有其他的副产物。不难设想,如果发酵的最终产物只是乙醇和二氧化碳,而不产生有香味和有口味的物质,那么发酵而成的酒,口味就太单调了。

## 2. 对葡萄酒有害的微生物

**产膜酵母** 由于产膜酵母是好气性真菌,所以在卫生条件差的情况下,如贮酒容器不满、暴露在空气中的表面积很大时,很容易产生产膜酵母。产膜酵母又叫酒花菌,最初在酒面繁殖时,形成雪花状的斑片,然后连成灰色薄膜,时间长了,就会在酒的液面上形成一个膜盖。产膜酵母能把乙醇分子氧化成乙醛,又把乙醛分子氧化成水和二氧化碳,从而使葡萄酒的酒精含量降低,酒味变淡薄。

**乳酸菌** 葡萄酒里的糖,为大多数细菌的繁殖提供了良好的营养物质,所以含糖的葡萄酒是最容易被细菌感染的。葡萄酒中有一种有害的乳酸菌,它不分解苹果酸,专门分解葡萄酒中的糖、甘油、酒石酸,使优质的葡萄酒完全变质。

**醋酸菌** 是一种好气性细菌,在有氧的条件下才能进行旺盛的代谢活动。葡萄汁中的糖,是醋酸菌重要的碳源和能源。在有氧的情况下,醋酸菌能把葡萄汁中的糖分解成醋酸。在葡萄酒中缺少糖源的情况下,酒精便是醋酸菌的碳源和能源,它将乙醇变为乙醛,再变为醋酸。

## 3. 果醋的生产制作过程

**清洗** 将水果或果皮、果核等投入池中,用清水冲洗干净,拣去腐烂部分与杂质等,取出沥干。

**蒸煮** 将上述洗净的果物放入蒸气锅内,在常压下蒸煮 $1\sim 2\text{ h}$ 。在蒸煮过程中,可上下翻动二三次,使其均匀熟透。然后降温至 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ ,加入为原料总重量 $10\%$ 的用黑曲霉制成的麸曲,或加入适量的果胶酶,在 $40\sim 50^{\circ}\text{C}$ 下,糖化 $2\text{ h}$ 。

**榨汁** 糖化后,用压榨机榨出糖化液,然后泵入发酵用的木桶或大缸,并调整浓度。

**发酵** 糖化液温度保持在 $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ ,加入酒母液进行酒精发酵,接种量(酒母液量)为糖化液的 $5\%\sim 8\%$ 。发酵初的 $5\sim 10\text{ d}$ ,需用塑料布密封容器。当果汁含酸度为 $1\%\sim 1.5\%$ 、酒精度为 $5\sim 8$ 度时,酒精发酵已基本完成。接着将果汁的酒精浓度稀释至 $5\sim 6$ 度,然后接入 $5\%\sim 10\%$ 的

醋酸菌液,搅匀,将温度保持在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,进行醋酸静置发酵。经过 $2\sim 3\text{ d}$ ,液面有薄膜出现,说明醋酸菌膜形成,一般1度酒精能产生1%的醋酸,发酵结束时的总酸度可达 $3.5\%\sim 6\%$ 。

**过滤灭菌** 在醋液中加入适量的硅藻土作为助滤剂,用泵打入压滤机进行过滤,得到清醋。滤渣加清水洗涤1次,将洗涤液并入清醋,调节其酸度为 $3.5\%\sim 5\%$ 。然后将清醋经蒸气间接加

热至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,趁热入坛包装或灌入瓶内包装,即为成品果醋。

上述液体发酵工艺,能保持水果原有香气。但应注意,酒精发酵完毕后,应立即投入醋酸菌,最好保持 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温进行醋酸发酵,温度高低相差太大,会使发酵不正常。如果在糖化液中加入适量饴糖或糖类混合发酵,效果更好。

## 课题2 腐乳的制作

### 一、课题目标

以制作腐乳为例了解传统发酵技术的应用,说明腐乳制作过程的科学原理,设计并完成腐乳的制作,分析影响腐乳品质的条件。

### 二、课题重点与难点

**课题重点:**说明腐乳制作过程的科学原理,设计并完成腐乳的制作。

**课题难点:**在实践中摸索影响腐乳品质的条件。

### 三、课题背景分析

课题背景首先介绍了腐乳是一种发酵的大豆制品,其制作在我国已有悠久的历史。豆腐中的蛋白质和脂肪经微生物分解为小分子肽、氨基酸和甘油、脂肪酸等,再经加工腌制成为腐乳,其主要生产过程离不开微生物的发酵。教师教学时可从学生熟悉的腐乳类型入手,逐步引入制作腐乳需经一定种类微生物的发酵。有条件的学校还可以组织学生到腐乳生产厂家进行参观,了解腐乳的制作过程,然后自己动手制作腐乳。教师还可以发动学生在课外查阅资料,了解更多的有关腐乳生产的背景知识。

### 四、基础知识分析与教学建议

**知识要点:**相关的微生物,如毛霉等在腐乳

制作中的作用。

**教学建议:**教师可以利用关于腐乳制作方法的传说,结合旁栏思考题,组织学生讨论,认识微生物的发酵作用,总结腐乳制作的大致过程。

### 五、实验案例

#### 制作腐乳

实验的具体操作步骤如下。

1. 将豆腐切成 $3\text{ cm}\times 3\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 的若干块。所用豆腐的含水量为 $70\%$ 左右,水分过多则腐乳不易成形。水分测定方法如下。

精确称取经研钵研磨成糊状的样品 $5\sim 10\text{ g}$ (精确到 $0.02\text{ g}$ ),置于已知重量的蒸发皿中,均匀摊平后,在 $100\sim 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 电热干燥箱内干燥 $4\text{ h}$ ,取出后置于干燥器内冷却至室温后称重,然后再烘 $30\text{ min}$ ,直至所称重量不变为止。

样品水分含量(%)计算公式如下。

$$\frac{\text{烘干前容器和样品质量}-\text{烘干后容器和样品质量}}{\text{烘干前样品质量}} \times 100\%$$

2. 将豆腐块平放在铺有干粽叶的盘内,粽叶可以提供菌种、吸收水分,并能起到保温的作用。每块豆腐等距离排放,周围留有一定的空隙。豆腐上面再铺上干净的粽叶。气候干燥时,将平盘用保鲜膜包裹,但不要封严,以免缺乏氧气和湿度太高,不利于毛霉的生长。

3. 将平盘放入温度保持在 $15\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的地方。毛

霉逐渐生长,大约5 d后豆腐表面丛生着直立菌丝。

4. 当毛霉生长旺盛,并呈淡黄色时,去除包裹平盘的保鲜膜以及铺在上面的粽叶,使豆腐块的热量和水分能够迅速散失,同时散去霉味。这一过程一般持续36 h以上。

5. 当豆腐凉透后,将豆腐块间连接在一起的菌丝拉断,并整齐排列在容器内,准备腌制。

6. 长满毛霉的豆腐块(以下称毛坯)与盐的质量分数比为5:1。将培养毛坯时靠近平盘没长直立菌丝的一面统一朝向玻璃瓶边,将毛坯分层摆放在容器中。分层加盐,并随着层数的加高而增加盐量,在瓶口表面盐要铺厚些,以防止杂菌从瓶口进入。腌制约8 d。

7. 将黄酒、米酒和糖,按口味不同而配以各种香辛料(如胡椒、花椒、八角茴香、桂皮、姜、辣椒等)混合制成卤汤。卤汤酒精含量以控制在12%左右为宜<sup>[注]</sup>。

[注] 酒精含量的高低与腐乳后期发酵时间的长短有很大关系。酒精含量越高,对蛋白酶的抑制作用也越大,使腐乳成熟期延长;酒精含量过低,蛋白酶的活性高,加快蛋白质的水解,杂菌繁殖快,豆腐易腐败,难以成块。

8. 将广口玻璃瓶刷干净后,用高压锅在100℃蒸汽灭菌30 min。将腐乳咸坯摆入瓶中,加入卤汤和辅料后,将瓶口用酒精灯加热灭菌,用胶条密封。在常温情况下,一般六个月可以成熟。

## 六、课题成果评价

### (一) 是否完成腐乳的制作

学生是否完成腐乳的制作依据是:能够合理地选择实验材料与用具;前期发酵后豆腐的表面长有菌丝,后期发酵制作基本没有杂菌的污染。

### (二) 腐乳质量的评价

制作成功的腐乳应该具有以下特点:色泽基本一致、味道鲜美、咸淡适口、无异味、块形整齐、厚薄均匀、质地细腻、无杂质。

(三) 能否总结不同条件对腐乳风味和质量的影响

学生能从盐、酒的用量、发酵的温度、发酵时间的长短,以及香辛料等因素中的某一因素来

说明其对腐乳风味或质量的影响。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 你能利用所学的生物学知识,解释豆腐长白毛是怎么回事?

答:豆腐上生长的白毛是毛霉的白色菌丝。严格地说是直立菌丝,在豆腐中还有匍匐菌丝。

2. 王致和为什么要撒许多盐,将长毛的豆腐腌起来?

答:盐能抑制毛霉的生长,同时防止杂菌污染,避免豆腐腐败。

3. 我们平常吃的豆腐,哪种适合用来做腐乳?

答:含水量为70%左右的豆腐适于做腐乳。用含水量过高的豆腐制腐乳,不易成形。

4. 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?

答:“皮”是前期发酵时在豆腐表面上生长的菌丝(匍匐菌丝),它能形成腐乳的“体”,使腐乳成形。“皮”对人体无害。

### (二) 练习

1. 答:越接近瓶口,杂菌污染的可能性越大,因此要随着豆腐层的加高增加盐的用量,在接近瓶口的表面,盐要铺厚一些,以有效防止杂菌污染。

## 八、参考资料

### 1. 豆腐的营养成分

大豆是一种富含蛋白质的植物性食物资源,其蛋白质含量达到36%~40%。经常食用大豆或大豆制品,可有效补充食物中的蛋白质。同时,大豆中含有约18%的脂肪,还含有硫胺素、尼克酸、维生素A等多种维生素以及钙、磷、铁等矿物质,对人体具有良好的保健作用。

### 2. 毛霉菌

毛霉是一种低等丝状真菌,属接合菌亚门、接合菌纲、毛霉目、毛霉科。毛霉的种类很多,在自然界广泛分布。毛霉生长迅速,能产生发达

的白色菌丝。毛霉菌丝呈棉絮状，无隔膜，有多个细胞核，可以通过孢囊孢子进行无性繁殖。毛霉是食品加工业中的重要微生物，它可以产生能够分解大豆蛋白的蛋白酶，常用于制作腐乳和豆豉。

### 3. 腐乳的生产工序及发酵机理

以大豆为原料酿制腐乳的过程主要是豆腐所含蛋白质发生生物化学反应的过程。研究这一过程所涉及的学科，除了生物化学之外，还包括物理化学、胶体化学和高分子物理学等。

酿造腐乳的主要生产工序是将豆腐进行前期

发酵和后期发酵。前期发酵所发生的主要变化是毛霉在豆腐（白坯）上的生长。发酵的温度为 $15\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，此温度不适于细菌、酵母菌和曲霉的生长，而适于毛霉慢慢生长。毛霉生长大约5 d后使白坯变成毛坯。前期发酵的作用，一是使豆腐表面有一层菌膜包住，形成腐乳的“体”；二是毛霉分泌以蛋白酶为主的各种酶，有利于豆腐所含有的蛋白质水解为各种氨基酸。后期发酵主要是酶与微生物协同参与生化反应的过程。通过腌制并配入各种辅料（红曲、面曲、酒酿），使蛋白酶作用缓慢，促进其他生化反应，生成腐乳的香气。

## 课题3 制作泡菜并检测亚硝酸盐含量

### 一、课题目标

尝试制作泡菜，并尝试用比色法测定泡菜中亚硝酸盐含量的变化。讨论与此相关的食品安全问题。

### 二、课题重点与难点

课题重点：制作泡菜并测定泡菜中亚硝酸盐含量。

课题难点：泡菜中亚硝酸盐含量的测定。

### 三、课题背景分析

课题背景通过日常生活中人们喜爱的泡菜食品，引入主题——制作泡菜并测定泡菜中亚硝酸盐含量，引导学生关注食品安全，维护身体健康。教师教学时，可以让学生列举一些自己喜欢的泡菜，以充分调动学生的兴趣，激发学生的求知欲，从而顺利进入本课题的研究。

### 四、基础知识分析与教学建议

#### （一）乳酸菌发酵

知识要点：1. 乳酸菌在自然界的分布；2. 乳酸菌发酵的原理。

教学建议：教师在介绍乳酸菌的相关知识时，

可以利用教材上的图片，也可以发动学生搜集资料，以增进学生对乳酸菌的感性认识，使学生能够有效地将生物学知识与日常生活相联系。

#### （二）亚硝酸盐

知识要点：1. 亚硝酸盐的有关知识；2. 我国食品卫生标准规定的亚硝酸盐含量标准；3. 亚硝酸盐的危害。

教学建议：讲解亚硝酸盐的知识时，教师可引导学生将生物学内容与有关化学知识结合起来思考，引导学生认识亚硝酸盐的危害，启发学生利用已有知识寻求简单而有效的鉴定亚硝酸盐的方法。

### 五、实验安排及注意事项

#### 氢氧化铝乳液的配制

将125 g 硫酸铝 $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}]$ 溶解在1 000 mL 蒸馏水中，形成氢氧化铝胶状物（为促进胶状物的形成，可适当加入氨水溶液，使pH为4）。利用真空抽滤瓶对胶状物进行真空抽滤，并用蒸馏水反复洗涤沉淀，直至洗涤液分别用氯化钡或硝酸银溶液检验不发生混浊为止。取沉淀物，加适量蒸馏水，将胶状物沉淀调至稀浆糊状，捣匀备用。制备的氢氧化铝胶体能吸附泡菜汁液

中的杂质,使泡菜汁透明澄清,以便进行后续的显色反应。

## 六、课题成果评价

### (一) 泡菜腌制的质量如何

泡菜质量可以根据泡菜的色泽和风味进行初步的评定,还可以通过在显微镜下观察乳酸菌,比较不同时期泡菜坛中乳酸菌的含量来评定。

### (二) 亚硝酸盐含量的测定

配制的亚硝酸盐标准显色液与样品液显色后,目测比色效果如何,以确定样品液是否与标准显色液的浓度相吻合。如果不吻合,还应在已知浓度范围内,改变浓度梯度,进一步配制标准显色液。

### (三) 是否进行了及时细致的观察与记录

在实验进行过程中,应及时对泡菜中亚硝酸盐含量进行鉴定,比较不同时期亚硝酸盐含量的变化及其对泡菜质量的影响。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

#### 1. 为什么含有抗生素的牛奶不能发酵成酸奶?

答:酸奶的制作依靠的是乳酸菌的发酵作用。抗生素能够杀死或抑制乳酸菌的生长,因此含有抗生素的牛奶不能发酵成酸奶。

#### 2. 为什么日常生活中要多吃新鲜蔬菜,不宜多吃腌制蔬菜?

答:在腌制过程中,蔬菜中的硝酸盐会被微生物还原成亚硝酸盐,危害人体健康。

#### 3. 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?

答:形成白膜是由于产膜酵母的繁殖。酵母菌是兼性厌氧微生物,泡菜发酵液营养丰富,其表面氧气含量也很丰富,适合酵母菌繁殖。

### (二) 练习

2. 答:果酒的制作主要利用的是酵母菌的酒精发酵,果醋的制作利用的是醋酸菌将酒精转变为醋酸的代谢,腐乳的制作利用的主要是毛霉分

泌的蛋白酶等酶类,泡菜的制作利用的是乳酸菌的乳酸发酵。

传统发酵技术都巧妙地利用了天然菌种,都为特定的菌种提供了良好的生存条件,最终的发酵产物不是单一的组分,而是成分复杂的混合物。

## 八、参考资料

### 泡菜发酵的阶段

泡菜在发酵期间,由于乳酸菌的发酵作用,发酵产物乳酸不断累积,因此可以根据微生物的活动情况和乳酸积累量,将泡菜发酵过程分为三个阶段。

**发酵初期** 蔬菜刚入坛时,其表面带入的微生物,主要以不抗酸的大肠杆菌和酵母菌等较为活跃,它们进行异型乳酸发酵和微弱的酒精发酵,发酵产物为乳酸、乙醇、醋酸和二氧化碳等。由于有较多的二氧化碳产生,气泡会从坛沿水槽内的水中间歇性地放出,使坛内逐渐形成嫌气状态。此时泡菜液的含酸量约为0.3%~0.4%,是泡菜初熟阶段,其菜质咸而不酸、有生味。

**发酵中期** 由于初期乳酸发酵使乳酸不断积累,pH下降,嫌气状态形成,乳酸杆菌开始活跃,并进行同型乳酸发酵。这时乳酸的积累量可达到0.6%~0.8%,pH为3.5~3.8。大肠杆菌、酵母菌和霉菌等其他微生物的活动受到抑制。这一期间为泡菜完全成熟阶段,泡菜有酸味而且清香。

**发酵后期** 在此期间继续进行的是同型乳酸发酵,乳酸含量继续增加,可达1.0%以上。当乳酸含量达到1.2%以上时,乳酸杆菌的活性受到抑制,发酵速度逐渐变缓甚至停止。此阶段泡菜酸度过高、口感差。

从乳酸的含量、泡菜的品质来看,在初期发酵的末期和发酵中期阶段,泡菜的乳酸含量为0.4%~0.8%,品质较好,因此,常以这个阶段作为泡菜的成熟期。

# 专题2

## 微生物的培养与应用

微生物与人类的关系极为密切。目前,微生物已经在医疗、环保、工农业生产等许多领域得到了广泛的应用,形成了大规模的发酵工程,为人类创造出了巨大的财富。本专题在必修课基础上,引导学生学习微生物培养的基本技术,以增进学生对微生物的了解。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题的三个课题均依照课程标准制定的具体内容标准编排,其对应关系如下表。

| 具体内容标准         | 对应课题        |
|----------------|-------------|
| 进行微生物的分离和培养    | 课题1、课题2、课题3 |
| 测定某种微生物的数量     | 课题2         |
| 研究培养基对微生物的选择作用 | 课题2、课题3     |
| 探讨微生物的利用       | 课题1、课题2、课题3 |

学生通过本专题的学习,应当掌握培养基、消毒灭菌等有关微生物培养的基础知识,应当掌握培养基的制备、高压蒸汽灭菌和平板划线法等基本操作技术,并可以运用相关技术解决生产生活中有关微生物计数、微生物的分离与培养等实际问题。

#### 二、技术要项

本专题围绕微生物技术展开,主要技术归纳如下。

1. 培养基的制备。
2. 高压蒸汽灭菌和干热灭菌。
3. 倒平板操作。
4. 平板划线操作和稀释涂布平板法。

5. 应用选择培养基分离某种特定的微生物(课题2和课题3)。

#### 三、设备条件

完成本专题需要配置高压蒸汽灭菌锅、干热灭菌箱以及培养微生物的常规材料用具,如培养皿、接种环、涂布器等。

#### 四、教学安排

在本专题的3个课题中,课题1介绍了最基本的微生物技术,是开展其他两个课题的基础。学生只有掌握了课题1所介绍的基本技术,才可能完成本专题的其他课题。课题2和课题3要求分离某种特定的微生物,难度较大、探究性也更强。此外,本专题中所强调的无菌操作技术,将有助于专题3“植物组织培养技术”的顺利完成。

培养微生物的实验,操作本身所需时间并不长,但是,由于操作前通常需要制备培养基、对培养基和其他材料用具进行灭菌,操作后通常需要几天的培养时间和对微生物进行观察,因此,教师在安排教学的时候,要注意将课上与课下的时间统筹安排。此外,微生物技术的掌握需要一定的实践经验,建议教师先通过预实验进行摸索,积累经验后,再安排教学。

## 参考书目

1. 微生物实验。沈萍编著，北京：高等教育出版社，1991年。
2. 微生物学基础知识与实验指导。钱存柔、董碧虹编著，北京：科学出版社，1979年。

## 课题1 微生物的实验室培养

### 一、课题目标

了解有关培养基的基础知识，进行无菌技术的操作，进行微生物的培养。

### 二、课题重点与难点

课题重点：无菌技术的操作。

课题难点：无菌技术的操作。

### 三、课题背景分析

课题背景通过生产中的实例，首先引导学生认识在微生物的培养过程中，保持培养物纯净的重要性。教师不必拘泥于教材中列举的实例，可以充分发挥学生的主动性，让学生搜集列举更多的生产生活中的实例，从中体会培养物纯净对于微生物培养的重要性。在此基础上，教材让学生进一步明确培养微生物的要领，是为所需要的微生物提供良好的生存环境，同时阻止或抑制其他微生物的生长。

### 四、基础知识分析与教学建议

#### （一）培养基

知识要点：1. 培养基的用途和种类，指出培养基可分为液体和固体两大类；2. 不同的微生物往往需要采用不同的培养基配方；3. 尽管培养基的配方各不相同，但是其基本成分都包括水、碳源、氮源和无机盐。

教学建议：教师在介绍液体和固体培养基时，宜结合教材提供的图片进行讲解，以增进学生的

感性认识。教材以表格的形式提供了一个培养基配方的实例。教师可以采用资料分析的形式，让学生通过主动的分析，认识培养基的基本组成成分，并结合必修模块“分子与细胞”中的知识，让学生从生物体构成的基本元素这一角度理解培养基中为什么都需要具备这些基本成分。

#### （二）无菌技术

知识要点：1. 无菌技术的概念；2. 消毒与灭菌的概念及两者的区别；3. 常用的消毒与灭菌的方法，接种环灼烧灭菌的方法。

教学建议：教师可以首先结合学生的生活经验，让学生意识到在日常的生活环境中，每时每刻每处都存在着微生物，任何一个不经意的动作都可能将某种微生物引入到培养物中，然后再强调无菌操作的重要性。无菌操作泛指在培养微生物的操作中，所有防止杂菌污染的方法。无论是随后将要学到的倒平板、平板划线操作，还是平板稀释涂布法，其操作中的每一步都需要做到“无菌”，即防止杂菌污染。只有熟练、规范地进行无菌操作，才可能成功地培养微生物。

教材中提供了阅读材料“实验室常用的消毒和灭菌方法”，教师可以让学生通过阅读了解这些常用方法，并回答旁栏中的两道思考题，根据回答的情况，检查学生是否真正理解了上述内容。在此基础上，教师再介绍无菌操作的具体内容，让学生进一步熟悉培养微生物的规范操作，以及实验中将要用到的材料与器具。

## 五、实验安排及注意事项

(一) 从菌种保藏中心购买菌种后,教师首先需要用平板划线法纯化培养所得菌种,并根据学生小组的数目,准备好数个平板。

(二) 第1课时完成基础知识的教学,学习各种操作方法,并制备培养基。高压蒸汽灭菌所需要的时间较长,因此需要利用课下时间完成。课下完成后,再于第2课时完成大肠杆菌的纯化培养。此后安排学生连续观察记录3~4 d。

(三) 配制培养基时,教师需要提示学生按照每个培养基消耗15~20 mL的量来估算总用量。全班同学的培养基可以集中起来,分批灭菌。

(四) 灭菌后,培养基冷却到55℃后应及时进行倒平板操作。如果不能及时操作,需要将培养基放到55℃左右的电热箱中保温,以防止琼脂凝固。

(五) 如果打算做本专题的第2或第3课题,建议此课题不仅要练习平板划线操作,还要练习稀释涂布平板法操作。为此,教师需要提前1天用液体培养基培养大肠杆菌,培养一夜后,于第2天将培养液分发到各小组。

(六) 实验后,所有用过的培养基、培养液等都需要统一进行高压蒸汽灭菌后再丢弃,否则将会造成环境污染。

## 六、课题成果评价

### (一) 培养基的制作是否合格

如果未接种的培养基在恒温箱中保温1~2 d后无菌落生长,说明培养基的制备是成功的,否则需要重新制备。

### (二) 接种操作是否符合无菌要求

如果培养基上生长的菌落的颜色、形状、大小基本一致,并符合大肠杆菌菌落的特点,则说明接种操作是符合要求的;如果培养基上出现了其他菌落,则说明在接种过程中,无菌操作还未达到要求,需要分析原因,再次练习。

### (三) 是否进行了及时细致的观察与记录

培养12 h与24 h后的大肠杆菌菌落的大小会

有明显不同,及时观察记录的同学会发现这一点,并能观察到其他一些细微的变化,这一步主要是为了培养学生良好的科学态度与习惯。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 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?

答:无菌技术还能有效避免操作者自身被微生物感染。

2. 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

答:(1)、(2)需要灭菌;(3)需要消毒。

### (二) 倒平板操作的讨论

1. 培养基灭菌后,需要冷却到50℃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?

提示:可以用手触摸盛有培养基的锥形瓶,感觉锥形瓶的温度下降到刚刚不烫手时,就可以进行倒平板了。

2. 为什么需要使锥形瓶的瓶口通过火焰?

答:通过灼烧灭菌,防止瓶口的微生物污染培养基。

3. 平板冷凝后,为什么要将平板倒置?

答:平板冷凝后,皿盖上会凝结水珠。将平板倒置,既可以防止皿盖上的水珠落入培养基,又可以避免培养基中的水分过快地挥发。

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?

答:空气中的微生物可能在皿盖与皿底之间的培养基上滋生,因此最好不要用这个平板培养微生物。

### (三) 平板划线操作的讨论

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？

答：操作的第一步灼烧接种环是为了避免接种环上可能存在的微生物污染培养物；每次划线前灼烧接种环是为了杀死上次划线结束后，接种环上残留的菌种，使下一次划线时，接种环上的菌种直接来源于上次划线的末端，从而通过划线次数的增加，使每次划线时菌种的数目逐渐减少，以便得到单个菌落。划线结束后灼烧接种环，能及时杀死接种环上残留的菌种，避免细菌污染环境 and 感染操作者。

2. 在灼烧接种环之后，为什么要等其冷却后再进行划线？

答：以免接种环温度太高，杀死菌种。

3. 在作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？

答：划线后，线条末端细菌的数目比线条起始处要少。每次从上一次划线的末端开始，能使细菌的数目随着划线次数的增加而逐渐减少，最终能得到由单个细菌繁殖而成的菌落。

#### (四) 涂布平板操作的讨论

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？

提示：应从操作的各个细节保证“无菌”。例如，酒精灯与培养皿的距离要合适、吸管头不要接触任何其他物体、吸管要在酒精灯火焰周围，等等。

#### (五) 练习

1. 提示：可以从微生物生长需要哪些条件的角度来思考。例如，微生物的生长需要水、空气、适宜的温度，食品保存可以通过保持干燥、真空的条件，以及冷藏等方法来阻止微生物的生长。

2. 提示：可以从这三种培养技术的原理、操作步骤等方面分别进行总结归纳。例如，这三种培养技术都需要为培养物提供充足的营养，但无土栽培技术的操作并不需要保证无菌的条件，而其他两种技术都要求严格的无菌条件。

3. 提示：这是一道开放性的问题，答案并不唯一，重点在于鼓励学生积极参与，从不同的角度思考问题。例如，正是由于证明了微生物不是自发产生的，微生物学才可能发展成为一门独立的学科；巴斯德实验中用到的加热灭菌的方法导致了有效的灭菌方法的出现，而这一灭菌原理也适用于食品的保存等。

## 课题2 土壤中分解尿素的细菌的分离与计数

### 一、课题目标

研究培养基对微生物的选择作用，进行微生物数量的测定。

### 二、课题重点与难点

课题重点：对土样的选取和选择培养基的配制。

课题难点：对分解尿素的细菌的计数。

### 三、课题背景分析

教材从尿素在农业上的重要用途切入，介绍了土壤中能分解尿素的细菌，进而说明这种细菌

的作用是能够合成分解尿素的酶。教学中，教师可以联系生产生活实际，使学生对尿素以及分解尿素的细菌形成一定的感性认识。教材还简要地介绍了尿素的发现过程以及尿素合成的历史，这些都是“科学、技术、社会”教育的丰富素材。最后，教材明确指出了本课题的目的，有助于学生准确把握课题的方向。

### 四、研究思路

#### (一) 筛选菌株

微生物的选择培养，是指利用培养基的组成使适宜生长的特定微生物得到较快繁殖的技术，

也称为微生物的“选择培养”。在本课题提供的选择培养基的配方中,尿素是培养基中的唯一氮源,因此,原则上只有能够利用尿素的微生物才能够生长。但实际上,微生物的培养是一个非常复杂的问题,有些微生物可以利用其他微生物的代谢产物生长繁殖,因此能够在选择培养基上生长的微生物不一定是所需要的微生物,还需要进一步的验证。

## (二) 统计菌落数目

统计菌落数目的理论依据是: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。因此,恰当的稀释度是成功地统计菌落数目的关键。为了保证结果准确,通常将几个稀释度下的菌液都涂布在平板上,培养后再选择菌落数在30~300的平板进行计数。

教材中用楷体字编排的实例是为了说明设置重复组的重要性。第一位同学只涂布了一个平板,没有设置重复组,因此结果不具有说服力。第二位同学考虑到设置重复组的问题,涂布了3个平板,但是,其中1个平板的计数结果与另2个相差太远,说明在操作过程中可能出现了错误,因此,不能简单地将3个平板的计数值用来求平均值。这个实例启示学生,在设计实验时,一定要涂布至少3个平板作为重复组,才能增强实验的说服力与准确性。在分析实验结果时,一定要考虑所设置的重复组的结果是否一致,结果不一致,意味着操作有误,需要重新实验。

## (三) 设置对照

A同学的结果与其他同学不同,可能的解释有两种。一是由于土样不同,二是由于培养基污染或操作失误。究竟是哪个原因,可以通过实验来证明。实验方案有两种。一种方案是可以由其他同学用与A同学一样的土样进行实验,如果结果与A同学一致,则证明A无误;如果结果不同,则证明A同学的操作或培养基的配制有问题。另一种方案是将A同学配制的培养基在不加土样的情况下进行培养,作为空白对照,以证明培养基是否受到污染。通过这个事例可以看出,

实验结果要有说服力,对照的设置是必不可少的。

## 五、实验案例

### 土壤中某样品细菌的分离与计数

实验的具体操作步骤如下。

1. 土壤取样 从肥沃、湿润的土壤中取样。先铲去表层土3 cm左右,再取样,将样品装入事先准备好的信封中。

2. 制备培养基: 准备牛肉膏蛋白胨培养基和选择培养基 将菌液稀释相同的倍数,在牛肉膏蛋白胨培养基上生长的菌落数目应明显多于选择培养基上的数目,因此,牛肉膏蛋白胨培养基可以作为对照,用来判断选择培养基是否起到了选择作用。由于初次实验,对于稀释的范围没有把握,因此选择了一个较为宽泛的范围:稀释倍数为 $10^3 \sim 10^7$ 。每个稀释度下需要3个选择培养基,1个牛肉膏蛋白胨培养基,因此共需要15个选择培养基,5个牛肉膏蛋白胨培养基。此外,还需要准备8个灭菌的试管和1个灭菌的移液管。

3. 微生物的培养与观察 参考课本中图2-7的实验流程示意图,将10 g土样加入盛有90 mL无菌生理盐水的锥形瓶中(锥形瓶体积为250 mL),充分摇匀,吸取上清液1 mL,转移至盛有9 mL水的无菌大试管中,依次等比稀释至 $10^7$ 稀释度,并按照由 $10^7$ 至 $10^3$ 稀释度的顺序分别吸取0.1 mL进行平板涂布操作。按照浓度从低到高的顺序涂布平板,不必更换移液管。

将涂布好的培养皿放在30℃下培养。随着培养时间的延长,会有不同的菌落产生。比较牛肉膏培养基和选择培养基中菌落的数量、形态等,并做好记录。

挑选选择培养基中不同形态的菌落接入含酚红培养基的斜面中,观察能否产生如课本中图2-10的颜色反应。

4. 细菌的计数 当菌落数目稳定时,选取菌落数在30~300的平板进行计数。在同一稀释度下,至少对3个平板进行重复计数,然后求出平均值,并根据平板所对应的稀释度计算出样品中

细菌的数目。

## 六、课题成果评价

(一) 培养物中是否有杂菌污染以及选择培养基是否筛选出菌落

对照的培养皿在培养过程中没有菌落生长,说明培养基没有被杂菌污染。牛肉膏蛋白胨培养基的菌落数目明显大于选择培养基的数目,说明选择培养基已筛选出一些菌落。

(二) 样品的稀释操作是否成功

如果得到了2个或2个以上菌落数目在30~300的平板,则说明稀释操作比较成功,并能够进行菌落的计数。

(三) 重复组的结果是否一致

如果学生选取的是同一种土样,统计的结果应该接近。如果结果相差太远,教师需要引导学生一起分析产生差异的原因。

## 七、答案和提示

(一) 旁栏思考题

1. 想一想,如何从平板上的菌落数推测出每

克样品中的菌落数?

答:统计某一稀释度下平板上的菌落数,最好能统计3个平板,计算出平板上的菌落数的平均值,然后按课本旁栏的公式进行计算。

2. 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?

答:这是因为土壤中各类微生物的数量(单位:株/g)是不同的,例如在干旱土壤中的上层样本中:好氧及兼性厌氧细菌数约为2185万,放线菌数约为477万,霉菌数约为23.1万。因此,为获得不同类型的微生物,就需要按不同的稀释度进行分离,同时还应当有针对性地提供选择培养的条件。

(二) 练习

2. 提示:反刍动物的瘤胃中含有大量的微生物,其中也包括分解尿素的微生物。由于瘤胃中的微生物多为厌氧菌,接触空气后会死亡,因此分离其中能分解尿素的微生物除了需要准备选择培养基外,还应参照厌氧菌的培养方法进行实验设计。

## 课题3 分解纤维素的微生物的分离

### 一、课题目标

简述纤维素酶的种类及作用,从土壤中分离出分解纤维素的微生物,讨论这类微生物的应用价值。

### 二、课题重点与难点

课题重点:从土壤中分离分解纤维素的微生物。

课题难点:从土壤中分离分解纤维素的微生物。

### 三、课题背景分析

教材首先说明了纤维素的化学组成以及纤维

素在生物圈的广泛分布,由此转入到如何对纤维素进行有效利用的问题。接着,教材介绍了产纤维素酶的微生物能够分解纤维素,因此,对纤维素的利用离不开对分解纤维素的微生物的研究。最后,教材点明了本课题的研究主题,即从土壤中分离能够分解纤维素的微生物。

### 四、基础知识分析与教学建议

(一) 纤维素与纤维素酶

知识要点:1. 纤维素在生物圈的分布;2. 纤维素酶的作用。

教学建议:有关纤维素的知识,教师可以联系必修模块《分子与细胞》中多糖的知识并安排

学生通过阅读进行自学,学生自学后应该能够说出纤维素的化学组成以及在生物圈中的分布状况。关于纤维素酶的作用,教师可以参照课本的楷体字部分做演示实验。该实验的现象明显,能使学生对纤维素酶的作用留下深刻的印象。如果不做实验,也可以参照课本中图2-12来了解纤维素酶的作用。

## (二) 纤维素分解菌的筛选

知识要点:1. 刚果红染色法;2. 刚果红染色法的原理。

教学建议:教材在介绍刚果红染色法之前,首先用“筛子筛沙”这一形象的比喻来说明筛选微生物的基本思想方法。教师还可以结合本专题课题2介绍选择培养基的有关内容,进一步引导学生深入认识分离微生物的基本思想。刚果红染色法的知识难度并不大,学生通过自学就能够理解。

## 五、实验案例

### 土壤中纤维素分解菌的分离

实验的具体操作步骤如下。

1. 土样采集 土样采集的方法与本专题课题2类似。土样的采集要在富含纤维素的环境中进行,这是因为在纤维素含量丰富的环境中,通常会聚集较多的分解纤维素的微生物。如果找不到合适的环境,可以将滤纸埋在土壤中,过一个月左右也会有能分解纤维素的微生物生长。

2. 选择培养 选择培养需要的仪器有:250 mL锥形瓶、无菌称量瓶、药匙、1 mL和10 mL的移液管、天平、摇床、温度计等。

培养基的制备参照课本旁栏中的比例配制。在250 mL锥形瓶中装入30 mL培养基,用8层纱布做成瓶塞,将瓶口塞紧,再在瓶塞外包裹两层包装纸(或报纸),用线绳扎紧,在121 °C下高压蒸汽灭菌20 min。

选择培养的操作:称取土样20 g,在无菌条件下加入装有30 mL培养基的摇瓶中。将摇瓶置于摇床上,在30 °C下振荡培养1~2 d,至培养基变混浊。此时可以吸取0.1 mL培养液进行梯度稀

释和涂布平板,也可以按课本中所述,重复选择培养的步骤一次,然后再进行梯度稀释和涂布平板。

3. 刚果红染色法分离纤维素分解菌 这一步所需要的仪器有:无菌培养皿、涂布器、1 mL移液管,装有9 mL无菌水的20 mL大试管,温箱等。

培养基的制备参照课本旁栏中的比例配制。在500 mL三角瓶中装入200 mL培养基,在121 °C下高压蒸汽灭菌20 min。

倒平板操作:将灭菌后的固体培养基熔化,按无菌操作的要求,在无菌的培养皿中倒入15~20 mL培养基,凝固后待用。

制备菌悬液:按照本专题课题1的稀释操作方法,将选择培养后的培养基进行等比稀释,稀释最大倍数至 $10^6$ 。

涂布平板:将稀释度为 $10^4 \sim 10^6$ 的菌悬液各取0.1 mL,滴加在平板培养基上,用涂布器将菌液涂布均匀,在30 °C倒置培养,至菌落长出。每个稀释度下需涂布3个平板,并注意设置对照。刚果红染色的具体操作步骤参照课本[资料三]。

## 六、课题成果评价

(一) 培养基的制作是否合格以及选择培养基是否筛选出菌落:对照的培养基在培养过程中没有菌落生长则说明培养基制作合格。如果观察到产生透明圈的菌落,则说明可能获得了分解纤维素的微生物。

(二) 分离的结果是否一致:由于在土壤中细菌的数量远远高于真菌和放线菌的数量,因此最容易分离得到的是细菌。但由于所取土样的环境不同,学生也可能得到真菌和放线菌等不同的分离结果。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 本实验的流程与课题2中的实验流程有哪些异同?

答:本实验流程与课题2的流程的区别如下。

课题2是将土样制成的菌悬液直接涂布在以尿素为唯一氮源的选择性培养基上,直接分离得到菌落。本课题通过选择培养,使纤维素分解菌得到增殖后,再将菌液涂布在选择培养基上。其他步骤基本一致。

2. 为什么要在富含纤维素的环境中寻找纤维素分解菌?

答:由于生物与环境的相互依存关系,在富含纤维素的环境中,纤维素分解菌的含量相对提高,因此从这种土样中获得目的微生物的几率要高于普通环境。

3. 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?

答:将滤纸埋在土壤中能使纤维素分解菌相对聚集,实际上是人工设置纤维素分解菌生存的适宜环境。一般应将纸埋于深约10 cm左右的腐殖土壤中。

4. 想一想,这两种方法各有哪些优点与不足?你打算选用哪一种方法?

提示:参看本课题参考资料的内容。

5. 为什么选择培养能够“浓缩”所需的微生物?

答:在选择培养的条件下,可以使那些能够适应这种营养条件的微生物得到迅速繁殖,而那些不适应这种营养条件的微生物的繁殖被抑制,因此可以起到“浓缩”的作用。

## (二) 练习

2. 答:流程图表示如下。

土壤取样→选择培养(此步是否需要,应根据样品中目的菌株数量的多少来确定)→梯度稀释→将菌悬液涂布到有特定选择作用的培养基上→挑选单菌落→发酵培养

## 八、参考资料

### 1. 纤维素与纤维素酶

纤维素与淀粉都是由葡萄糖组成的,但组成两者的葡萄糖的连接方式不同,因而使两者的形态完全不同。纤维素是由葡萄糖分子按 $\beta$ -1,4糖苷键连接而成的,淀粉是由葡萄糖分子按 $\alpha$ -1,4糖

苷键连接而成的。

人类以淀粉为主要能量来源,完全不能消化纤维素,而反刍动物和大量的微生物则主要以纤维素为能量来源。这是因为,在反刍动物的瘤胃中生活着大量的可以分解纤维素的微生物。微生物产生的纤维素酶是一种复合酶,包括内切酶( $C_x$ 酶)、外切酶( $C_1$ 酶)和葡萄糖苷酶。内切酶作用于无定型的纤维素区域,使纤维素断裂成片段;外切酶又叫纤维二糖水解酶,它可以作用于纤维素的结晶区或小片段纤维素,从糖链末端开始切掉两个葡萄糖分子,产生纤维二糖;葡萄糖苷酶则将纤维二糖分解成葡萄糖(图2-1)。

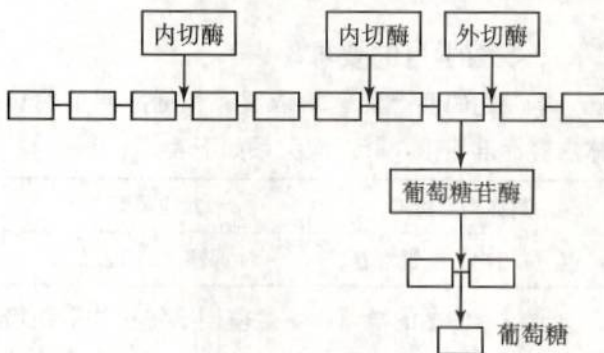


图2-1 纤维素酶分解纤维素示意图

### 2. 两种刚果红染色法的比较

刚果红在筛选纤维素分解菌上的应用已经有超过20年的历史,在本课题中我们给出了两种方法。方法一是传统的方法,缺点是操作繁琐,加入刚果红溶液会使菌落之间发生混杂;其优点是显示出的颜色反应基本上是纤维素分解菌的作用。方法二的优点是操作简便,不存在菌落混杂问题,缺点是由于在纤维素粉和琼脂、土豆汁中都含有淀粉类物质,可以使能够产生淀粉酶的微生物出现假阳性反应。但这种只产生淀粉酶的微生物产生的透明圈较为模糊,因为培养基中纤维素占主要地位,因此可以与纤维素酶产生的透明圈相区分。方法二的另一缺点是:有些微生物具有降解色素的能力,它们在长时间培养过程中会降解刚果红而形成明显的透明圈,与纤维素分解菌不易区分。

## 植物的组织培养技术

植物组织培养技术应用广泛。利用植物组织培养技术,可以实现优良品种的快速繁殖,培养出大量不含病毒的幼苗,实现花卉的连续生产,缩短育种周期等。本专题是在必修课基础上,引导学生尝试植物的组织培养,使学生初步掌握植物组织培养的基本技术。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题的两个课题均依照课程标准制定的具体内容标准编排,其对应关系如下表。

| 具体内容标准    | 对应课题    |
|-----------|---------|
| 尝试植物的组织培养 | 课题1、课题2 |

通过本专题的学习,学生应当了解植物组织培养技术在生产中的应用,熟悉植物组织培养或花药培养的基本过程,了解影响植物组织培养或花药培养的各种因素,掌握培养基制备、外植体消毒、接种、培养、移栽以及栽培等基本操作技术。

#### 二、技术要项

本专题围绕植物组织培养的基本技术展开,主要技术归纳如下。

1. 培养基的制备。
2. 外植体消毒。
3. 接种。
4. 培养。
5. 移栽。

6. 栽培。

#### 三、设备条件

完成本专题需要配备无菌室、超净工作台或接种箱,此外还需配置常规植物组培用具,如高压锅、酒精灯、枪状镊、解剖剪、培养皿等。

#### 四、教学安排

本专题的课题1以菊花的组织培养为例,介绍了有关植物组织培养的知识背景及操作技术,也是开展课题2的基础。课题2难度较大,教师可以根据实际情况选做。

植物组织培养的实验周期较长,需要一定实践经验的积累。建议教师先摸索出一套行之有效的办法,然后再安排学生实践。对于学生实践的安排,也可以课上课下结合进行。例如完成一个植物组培的实验室操作至少需要3课时,因此,有些过程教师可以安排在课外提前做,课上集中让学生进行某些关键步骤的操作。

### 参考书目

1. 实用植物组织培养技术教程。曹孜义、刘国民主编,兰州:甘肃科学技术出版社,1999。
2. 植物细胞工程原理与技术。周维燕主编,北京:中国农业大学出版社,2001。

## 课题1 菊花的组织培养

### 一、课题目标

说明植物组织培养的基本原理，学习植物组织培养的基本技术，进行菊花或其他植物的组织培养。

### 二、课题重点与难点

课题重点：植物组织培养过程中使用的无菌技术。

课题难点：植物组织培养过程中使用的无菌技术。

### 三、课题背景分析

课题背景介绍了植物细胞的全能性，说明离体的植物器官或组织在一定的条件下能够发育成完整的植株。在教学中，教师可以从植物组织培养的发展历史（参见下文的参考资料）引入，激发学生的学习兴趣。

### 四、基础知识分析与教学建议

#### （一）植物组织培养的基本过程

知识要点：1. 细胞分化的概念；2. 离体植物细胞的脱分化和再分化。

教学建议：植物组织培养的基础知识对于学生来说还是有一定难度的。教师最好在课前准备已脱分化的愈伤组织和再分化的丛芽等材料，让学生在课堂上观察，以增进学生的感性认识，帮助学生理解植物组织培养的基本原理。

#### （二）影响植物组织培养的因素

知识要点：影响植物组织培养的因素有培养基配制、外植体的选取、消毒、接种、培养、移栽和栽培等。

教学建议：影响植物组织培养的因素有很多。关于培养基，可以利用旁栏思考题，让学生通过与微生物培养基配方的对比来认识用于植物组织

培养的培养基的特点。关于植物激素的使用，可以引导学生阅读课本旁栏有关植物激素的介绍，还可以回顾高中必修教材《稳态与环境》模块中有关植物激素调节的内容。

### 五、实验安排及注意事项

#### （一）课时安排的问题

本课题耗时较长，需要提前做好计划。有关培养基母液的配制、培养基高压灭菌、组培苗的培养和继代以及栽培管理等工作，可在课下进行。如果课时紧张，外植体的消毒和接种也可以在课下进行。课上学生只需做一些关键步骤的操作，如愈伤组织的继代、分化转瓶、丛芽继代、生根转瓶等。建议第一课时完成基础知识教学，学习操作方法并使用各种母液配制培养基。第二课时学习外植体接种或继代转瓶。此后学生可以利用课下时间做观察记录。第三课时做生根组培苗的移栽。大田栽培或盆栽管理工作可以在课外组织同学来做。

#### （二）无菌技术是植物组织培养能否获得成功的关键

植物组织培养不同于扦插、分根、叶插等常规无性繁殖。由于植物组织培养所利用的植物材料体积小、抗性差，所以对培养条件的要求较高，对无菌操作的要求非常严格。如果不小心引起污染，将可能造成培养工作的前功尽弃。

无菌技术包括培养基消毒灭菌和植物材料（外植体）的消毒灭菌。对培养材料进行表面灭菌时，一方面要考虑药剂的消毒效果；另一方面还要考虑植物材料的耐受能力。不同药剂、不同植物材料，甚至不同器官要区别对待。建议教师课前积极摸索成功经验，或先组织部分学生做外植体的接种，以培养实验骨干。课上让骨干学生介绍经验，帮助大部分同学完成任务。有条件的学

校还可以将植物组织培养的全部过程拍摄成录像,供其他学生参考。

### (三) 妥善处理被污染的培养物

即使对于有经验的操作人员,操作后出现培养物被污染的情况也常有。一般情况下,细菌污染可能是由接种人员造成的,如未戴口罩,接种时说话,或手及器械消毒不严格等。真菌污染可能是植物材料消毒不当。需要特别注意的是,一旦发现培养材料被污染,特别是真菌性污染,一定不要打开培养瓶。应先将所有被污染的培养瓶统一放在高压蒸汽锅内进行高压蒸汽灭菌,然后再打开培养瓶,进行清洗。

### (四) 有毒药品的用后处理

外植体消毒用过的有毒药品要妥善处理(如氯化汞等),以免引起环境污染。一般应收集后统一交给有关专业部门处理。

## 六、课题成果评价

### (一) 对接种操作中污染情况的分析

接种3~4 d后,在接种操作中被杂菌污染的培养物会表现出被污染的现象。请学生适时统计污染率,分析接种操作是否符合无菌要求。

### (二) 是否完成了对植物组织的脱分化和再分化

观察实验结果,看看是否培养出了愈伤组织,记录多长时间长出愈伤组织。统计更换培养基后愈伤组织进一步分化成根和芽的比例和时间。

### (三) 是否进行了统计、对照与记录

做好统计和对照,填好结果记录表,培养严谨的科学态度。从实验的第一步开始就要求学生做好实验记录,可以让学生分组配制不同培养基,如诱导愈伤或直接分化丛芽的培养基,然后做不同配方的比较。

### (四) 生根苗的移栽是否合格

生根苗移栽技术的关键是既要充分清洗根系表面的培养基,又不能伤及根系。一般使用无土栽培的办法。培养基质要提前消毒,可以向培养基质喷洒质量分数为5%的高锰酸钾,并用塑料薄膜覆盖12 h。掀开塑料薄膜后24 h才能移栽。新

移栽的组培苗要在温室过渡几天,等壮苗后再移植到大田或进行盆栽。学生可以在课后统计自己移栽的成活率,看看移栽是否合格。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 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?

答:微量元素和大量元素提供植物细胞生活所必需的无机盐;蔗糖提供碳源,同时能够维持细胞的渗透压;甘氨酸、维生素等物质主要是为了满足离体植物细胞在正常代谢途径受到一定影响后所产生的特殊营养需求。微生物培养基以有机营养为主,MS培养基则需提供大量无机营养。无机盐混合物包括植物生长必需的大量元素和微量元素两大类。

2. 你打算做几组重复?你打算设置对照实验吗?

答:教师可以安排学生分组,做不同的材料或配方,最后分别汇报成果。但每种材料或配方至少要做一组以上的重复。设置对照实验可以取用一个经过灭菌的装有培养基的锥形瓶,与接种操作后的锥形瓶一同培养,用以说明培养基制作合格,没有被杂菌污染。

### (二) 练习

1. 答:植物组织培养所利用的植物材料体积小、抗性差,对培养条件的要求较高。用于植物组织培养的培养基同样适合于某些微生物的生长,如一些细菌、真菌等的生长。而培养物一旦受到微生物的污染,就会导致实验前功尽弃,因此要进行严格的无菌操作。

2. 答:外植体的生理状态是成功进行组织培养的重要条件之一。生长旺盛的嫩枝生理状况好,容易诱导脱分化和再分化。

## 八、参考资料

植物组织培养技术的发展

大自然中存在着许多有趣的植物无性生殖现

象。例如,马铃薯的块茎能够发芽生根,秋海棠的叶片能够长成新植株。这些现象促使科学家去思考、解释。1902年,有一位德国的植物学家大胆地预言:“植物的体细胞在一定条件下,可以如同受精卵一样,具有潜在的发育成植株的能力。”

1958年,美国科学家斯图尔德(F. C. Steward)将胡萝卜韧皮部的一些细胞进行培养,由于细胞分化而最终发育成完整的新植株。这个实验结果在生物学界引起了很大的震动,它表明已经高度

分化的植物细胞仍然具有发育成完整植株的能力。已经分化的细胞所具有的这种潜在发育能力称作细胞全能性。

既然胡萝卜的单个细胞能发育为完整植株,小块的植物组织就更不应该有什么问题。此后很多年,科学家和技术人员将许多植物进行了组织培养,并获得了成功。如今,植物组织培养已不再神秘莫测,而发展成为常规技术。

## 课题2 月季的花药培养

### 一、课题目标

说出被子植物花粉发育的过程及花药培养产生花粉植株的两种途径,说出影响花药培养的因素,学习花药培养的基本技术,尝试用月季或其他植物的花药进行培养。

### 二、课题重点与难点

课题重点:选取适宜的培养材料和培养基。

课题难点:选取适宜的培养材料和培养基。

### 三、课题背景分析

课题背景介绍了花药培养的历史以及花药培养在育种工作上的意义。有条件的学校可以引导学生尝试某种植物的花药培养。

### 四、基础知识分析与教学建议

#### (一) 被子植物的花粉发育

知识要点:1. 花粉是单倍体生殖细胞;2. 花粉的发育要经历不同的时期。

教学建议:可以利用教材给出的“被子植物花粉的发育过程”的插图,帮助学生了解花粉发育所经历的不同时期,为后面实验材料的选取打下基础。

#### (二) 产生花粉植株的两种途径

知识要点:花药培养产生花粉植株的两种

途径。

教学建议:体细胞胚的概念是第一次出现,可以让学生重点阅读教材的楷体字部分,并结合流程图来认识花粉植株产生的两种不同途径。

#### (三) 影响花药培养的因素

知识要点:选取适宜的材料和培养基组成是花粉植株诱导成功的关键。

教学建议:教师可以补充一些不同植物和不同花粉发育时期的花药培养的资料,帮助学生认识材料选择和培养基配方的重要性。

### 五、实验安排及注意事项

(一) 本课题有一定难度,成功率较低。全部完成课题不仅耗时较长,又有季节限制。最好提前做好时间规划,以提高工作效率。建议教师提前一年摸索经验、总结教训,如花蕾的选择、培养基配方等。建议第一课时完成基础知识的教学,学习操作方法并制备培养基(或课后制作培养基)。第二课时学习花粉发育时期的鉴定。第三课时做花蕾的选择和灭菌、接种。花药培养的周期较长,成功的接种也要在培养20~30 d后才能见到愈伤组织或胚状体,且进一步的实验必须非常及时,因此,本课题的有些过程教师可以安排同学在课外做。

(二) 最适宜的花药发育时期会因植物种类和

品种的不同而不同,但对大多数植物而言,适宜进行花药培养的时期是单核居中期或单核靠边期。在花药培养中,要使所选材料的发育时期完全一致是很困难的。不仅不同花序在培养时期的进程并不完全同步,即使在同一花序上,不同花朵也有很大差异。这些需要不断实践,以积累经验。

(三)一定将事前设计好的培养基做好标号和记录。实验时不仅要有书面记录,还要用记号笔在三角瓶上标明标号。接种后要及时标明月季品种代号、操作者代号及接种日期等。可以几个同学合作,轮流做观察记录并及时沟通和交流。

## 六、课题成果评价

### (一)选材是否恰当

选材是否成功是花药培养成功的关键。学生应学会通过显微镜观察处于适宜发育期的花粉。

### (二)无菌技术是否过关

如果出现了污染现象,说明某些操作步骤,如培养基灭菌、花蕾消毒或接种等有问题。

### (三)接种是否成功

如果接种的花药长出愈伤组织或释放出胚状体,花药培养的第一步就成功了。要适时转换培养基,以便愈伤组织或胚状体进一步分化成再生植株。

## 七、答案和提示

### (一)旁栏思考题

为什么花瓣松动会给材料的消毒带来困难?

答:花瓣松动后,微生物就可能侵入到花药,给材料的消毒带来困难。

### (二)练习

1. 答:  $F_2$  紫色甜玉米的基因型组成可能为 Aasusu 或 AAsusu。如果运用常规育种方法,将  $F_2$  中的紫色甜玉米与白色甜玉米 (aasusu) 进行测交,可以选择出基因型为 AAsusu 纯种紫色甜玉米。但这种方法比较繁琐,耗时也较长,需要至少三年的选种和育种时间。如果利用花药培养的技术,在  $F_1$  产生的花粉中就可能含有 Asu 的组合,再将花粉植株进行染色体加倍,就可以直接得到紫色甜玉米的纯合体 (AAsusu)。这种方法可以大大缩短育种周期。

2. 答:植物组织培养技术与花药培养技术的相同之处是:培养基配制方法、无菌技术及接种操作等基本相同。两者的不同之处在于:花药培养的选材非常重要,需事先摸索时期适宜的花蕾;花药裂开后释放出的愈伤组织或胚状体也要及时更换培养基;花药培养对培养基配方的要求更为严格。这些都使花药培养的难度大为增加。

# 专题4

## 酶的研究与应用

酶是生物催化剂,具有高效、专一和所需反应条件温和的优点。目前,酶已广泛应用于食品、医疗、环保和化工等各个行业,取得了良好的经济效益。本专题是在必修课的基础上,通过实验研究影响酶活性的因素以及酶在日常生活和工业生产上的应用。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题的三个课题均依照课程标准制定的具体内容标准编排,其对应关系如下表。

| 具体内容标准                             | 对应课题    |
|------------------------------------|---------|
| 研究酶的存在和简单制作方法<br>尝试利用酶活力测定的一般原理和方法 | 课题1     |
| 探讨酶在食品制造和洗涤等方面的应用                  | 课题1、课题2 |
| 尝试制备和应用固相化酶                        | 课题3     |

通过本专题的学习,学生应该掌握测定酶活力的简单方法;能够研究影响酶活性的因素;理解固定化酶和固定化细胞的原理和方法;探讨酶在生产生活中的应用。

#### 二、技术要项

本专题的技术操作难度不高,涉及的主要技术归纳如下。

1. 制备果泥的技术。
2. 海藻酸钠溶液的制备。
3. 固定化酵母细胞的制备。

#### 三、设备条件

完成本专题需要配置果汁搅拌机、水浴锅、注射器等。

#### 四、教学安排

本专题从食品制造(课题1)、日常洗涤用品(课题2)和工业生产(课题3)三个不同的角度分别展开有关酶的研究和应用的实验,三个课题之间没有严格的先后顺序。课题1和课题2的内容与学生的日常生活联系紧密,并且又有必修模块“探究影响酶活性的条件”作基础,因此对于学生来说并不困难。课题3在技术操作上有一些难度,但操作过程比较有趣,实验现象比较明显,容易激发学生的学习兴趣。从总体上看,本专题的三个课题难度适中。

课题1和课题2比较偏重实验方案的设计,因此,给学生用于讨论的时间要多一些。此外,这两个课题考虑的变量相对较多,还涉及实验变量的梯度设计,因此,要想获得理想的结果,必须花费一定的时间,进行反复多次的实验和摸索。课题3的技术操作要求相对严格,要想一次做成功,就需要严格按照教材提供的实验步骤进行操作。课题1和课题2可各用3~4课时,课题3可用2课时。

### 参考书目

1. 生物化学技术原理及其应用。赵永芳编,武汉:武汉大学出版社,1994。
2. 微生物学实验。赵斌、何绍江主编,北京:科学出版社,2002。

## 课题1 果胶酶在果汁生产中的作用

## 一、课题目标

简述果胶酶的作用；检测果胶酶的活性；探究温度和 pH 对果胶酶活性的影响以及果胶酶的最适用量；搜集有关果胶酶应用的资料。

## 二、课题重点与难点

课题重点：温度和 pH 对果胶酶活性的影响。

课题难点：果胶酶的最适用量。

## 三、课题背景分析

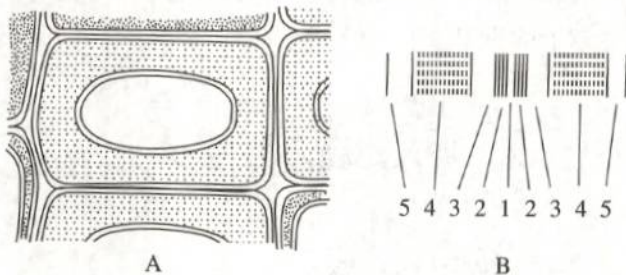
随着生活水平的提高，水果几乎成为人们生活中的必需品，果汁饮料也深受人们的喜爱。将水果制成果汁，不仅有利于解决水果丰收季节的产、销、运输和保存等多方面的问题，而且提高了水果的附加值，满足了人们不同层次的需要。课题背景从与社会的联系、与学生生活的联系入手，引入课题研究。教师在教学过程中，可以以本地某种水果的生产、贮存、加工和运输为素材，让学生做一个简单的估算，从而认识到果汁加工的经济效益。例如，可以让学生计算生产一升苹果汁大约需要多少斤苹果，苹果与苹果汁的价格相差多少；等等。此外，教师还可以联系学生已有的关于酶的知识，引导学生认识果胶酶的特性及其作用。

## 四、基础知识分析与教学建议

知识要点：1. 果胶酶的作用；2. 酶的活性的

定义；3. 影响酶活性的因素；4. 果胶酶的用量。

教学建议：关于果胶酶作用的教学，教师可以先展示图 4-1，介绍植物细胞壁的成分和细胞与细胞之间的胞间层成分，说明这些成分对果汁制作的影响，从而引出果胶酶在果汁生产过程中的作用。



A. 几个纤维细胞的横切面（其中一个细胞是完整的）

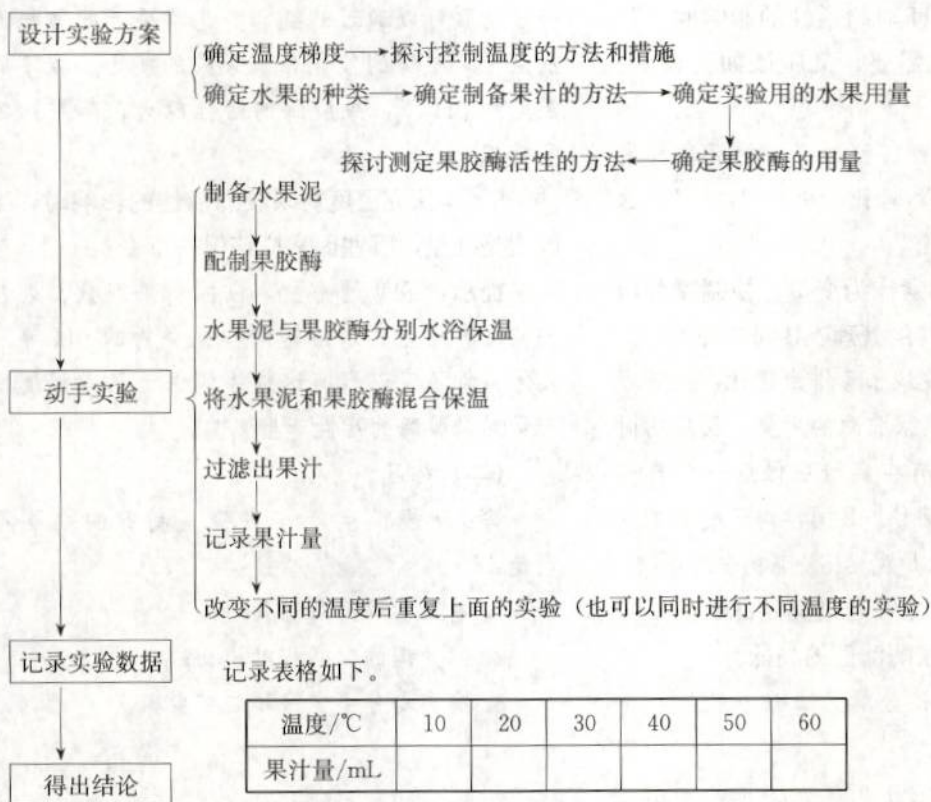
B. 为A图的一部分纵切面放大

1. 中胶层 2. 初生壁 3.4.5. 次生壁的内、中、外层

图 4-1 植物细胞壁及细胞之间胞间层的成分

## 五、实验安排及注意事项

本课题的研究建立在必修模块“探究影响酶活性的条件”的基础之上，与必修模块的探究的不同之处主要体现在两个方面：一是酶的活性不是通过定性分析而是通过定量分析来进行探究的；二是本课题并不仅仅满足于探究温度和 pH 对酶活性的影响，还探究了果胶酶的最适用量，对生产实践具有指导意义。本课题可用 3~4 课时，其中，探究温度对果胶酶活性的影响的实验可以参考下面的教学思路进行。



在实际的操作过程中，还需要注意下列事项。

1. 与其他工业用酶基本相同，果胶酶的适宜温度范围也比较宽泛，因此，可以选用 10℃ 作为温度梯度，设置的具体温度为 10℃、20℃、30℃、40℃、50℃ 和 60℃ 等，也可以尝试以 5℃ 作为温度梯度。

2. 苹果、橙子和葡萄等水果都可以作为反应物，水果不用去皮。如用苹果为原材料，一般可按每个中等大小的苹果加水 100~200 mL 的比例进行搅拌，获得稀的苹果泥。

3. 果泥的用量可以采用 5 mL 左右，果胶酶的用量可采用质量浓度为 2% 的果胶酶溶液 2 mL。

4. 水浴时间可以为 20~30 min。

5. 过滤果汁时，漏斗中应放置滤纸。

6. 探究 pH 对果胶酶活性的影响，只须将温度梯度改成 pH 梯度，并选定一个适宜的温度进行水浴加热。反应液中的 pH 可以通过质量分数为 0.1% 的 NaOH 或 HCl 溶液进行调节。

探究果胶酶的用量是建立在探究最适温度和 pH 对果胶酶活性影响的基础之上的。此时，研究的变量是果胶酶的用量，其他因素都应保持不变。

实验时可以配制不同浓度的果胶酶溶液，也可以只配制一种浓度的果胶酶溶液，然后使用不同的体积即可。需要注意的是，反应液的 pH 必须相同，否则将影响实验结果的准确性。

## 六、课题成果评价

本课题评价的重点应放在对学生探究报告的评价上。报告的主要内容应该包括：根据实验数据绘制出的温度和 pH 对果胶酶活性影响的曲线图；不同果胶酶用量对出汁量影响的曲线图（在浓度和体积相同的条件下）；并最终得到果胶酶最适温度、pH 以及果胶酶的最适用量。

## 七、答案和提示

### （一）旁栏思考题

1. 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？

提示：将果泥和果胶酶分装在不同的试管中恒温处理，可以保证底物和酶在混合时的温度是相同的，避免了果泥和果胶酶混合时影响混合物的温度，从而影响果胶酶活性的问题。

2. 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?

提示: 需要设置对照实验, 不同的温度梯度之间或不同的 pH 梯度之间就可以作为对照, 这种对照称为相互对照。

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

提示: A 同学将温度或 pH 作为变量, 控制不变的量有苹果泥的用量、果胶酶的用量、反应的时间和过滤的时间等。只有在实验中保证一个自变量, 实验结果才能说明问题。B 同学对于变量的处理应该与 A 同学相同, 只是观察因变量的角度不同。

4. 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?

提示: 果胶酶将果胶分解为小分子物质, 小

分子物质可以通过滤纸, 因此苹果汁的体积大小反应了果胶酶的催化分解果胶的能力。在不同的温度和 pH 下, 果胶酶的活性越大, 苹果汁的体积就越大。

5. 当探究温度对果胶酶活性的影响时, 哪个因素是变量, 哪些因素应该保持不变?

提示: 温度是变量, 应控制果泥量、果胶酶的浓度和用量、水浴时间和混合物的 pH 等所有其他条件不变。只有这样才能保证只有温度一个变量对果胶酶的活性产生影响。

## (二) 练习

答: 大规模生产与实验室制备的主要不同点是:

1. 有两次瞬间高温灭菌;
2. 酶处理的时间相对较长;
3. 有离心分离步骤和浓缩步骤。

## 课题 2 探讨加酶洗衣粉的洗涤效果

### 一、课题目标

说出加酶洗衣粉的洗涤原理; 探讨温度对加酶洗衣粉洗涤效果的影响; 探讨不同种类的加酶洗衣粉对同一污物 and 不同污物洗涤效果的区别。

### 二、课题重点与难点

课题重点: 区别不同种类的加酶洗衣粉对同一污物 and 不同污物的洗涤效果。

课题难点: 实验过程中各种变量的控制。

### 三、课题背景分析

本课题探究的是加酶洗衣粉与普通洗衣粉洗涤效果的差别, 以及不同的加酶洗衣粉对不同污渍洗涤效果的差别。本课题与学生的生活比较接近, 因此, 具有较强的现实意义, 同时, 因为探究的结果可用于指导日常生活中衣物的洗涤, 所以很容易激发学生的学习兴趣。教师在引导学生开展本课题的研究时, 不要只注重基本原理, 而

忽视了本课题在现实生活中的作用。

### 四、基础知识分析与教学建议

知识要点: 1. 蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶的作用; 2. 影响酶活性的因素。

教学建议: 在教学过程中, 教师可以引导学生回顾初中和高中生物课已经学习过的有关消化酶作用的知识, 以加深学生对加酶洗衣粉中酶作用的理解。下面是添加在洗衣粉中的几种酶的作用示意图 (图 4-2)。

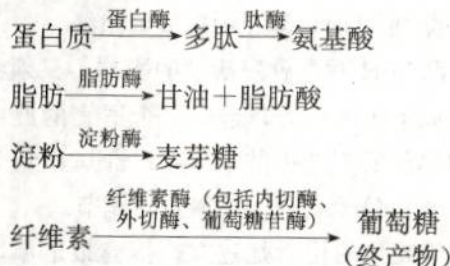
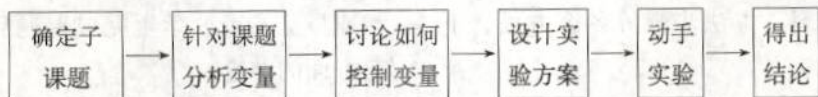


图 4-2 加酶洗衣粉中的几种酶的作用示意图

### 五、实验安排及注意事项

本实验可以安排3课时，第1课时完成课题背景和基础知识的学习，并进行初步的实验方案的讨论、设计和确定；第2课时进一步对实验方案进行修订，完成“不同温度对加酶洗衣粉洗涤效果的影响”的探讨；第3课时在第2课时的基础上进一步修订和完善实验方案，并探讨“不同



本课题有两个子课题。第1个子课题是探究“不同温度对加酶洗衣粉的洗涤效果的影响”；第2个子课题是探讨“不同种类的加酶洗衣粉对同一污渍或不同污渍的洗涤效果的比较”。这两个子课题并非相互并列，而具有递进关系。其中，第1个子课题是第2个子课题的基础，它所获得的有关温度的数据可以为第2个子课题的研究提供参考。下面是有关两个子课题的一些具体教学建议。

**子课题一 探究不同温度对加酶洗衣粉洗涤效果的影响**

#### 1. 变量的分析和控制

阅读课本资料一、资料二，结合已有的生活经验可以知道，影响加酶洗衣粉洗涤效果的因素有水温、水量、水质、洗衣粉的用量，衣物的质料、大小及浸泡时间和洗涤的时间等。在这些因素中，水温是我们研究的对象，而其他因素应在实验中保持不变。

选择什么样的水温进行实验最符合实际情况呢？这就需要实验者根据当地一年中的实际气温变化来确定水温，这既是确定实验变量的基本原则，也可以引导学生将课堂学习与现实生活相联系。通常情况下，冬季、春季、秋季和夏季可分别选取5℃、15℃、25℃和35℃的水温，因为这4个水温是比较符合实际情况的，对现实也有指导意义。教师可以引导学生通过实验分析：“在自然条件下，什么季节适合使用加酶洗衣粉”，“在什么样的水温下不适合使用加酶洗衣粉”，等等。

第二个问题是洗涤方式和材料的选择。在洗

种类的加酶洗衣粉对不同污物的洗涤效果的比较”。

本课题可进一步划分为不同的子课题，其中涉及的变量较多，如果思路不清晰，是难以顺利完成的。因此，教师应该引导学生理清思路，设计课题进展的流程图，并根据流程图一步一步地完成实验。以下流程图供教师教学时参考。

涤方式中有机洗和手洗两种方式，应考虑其中哪一种比较科学？哪一种更有利于控制变量？再有，洗衣机又可以分为半自动和全自动两种，相比之下，采用全自动洗衣机比较好，并且应该尽量使用同一型号小容量的洗衣机，其机械搅拌作用相同。关于洗涤材料的选择也有一些讲究。用衣物作实验材料并不理想，这是因为作为实验材料的衣物，其大小、颜色、洁净程度等应该完全一致，而这并不容易做到；此外，人为地在衣物上增加污物，如血渍、油渍等，也令人难以接受。因此，选用布料作为实验材料比较可行。在作对照实验时，可以控制布料的大小、颜色以及污物的量，使其相同；同时，也便于洗涤效果的比较。

第三个问题是水量、水质和洗衣粉用量的问题。水的用量和布料的大小是成正比的。做实验用的布料不宜过大，水量不易过多，但应该让布料充分浸泡在水中。水量和洗衣粉的用量可以参考表4-1。实验时可根据表中的数据换算出实际用量。如果在实验中使用手洗的方法，如课本中图4-4所示，使用1 000 mL的烧杯作为容器，可以用500 mL的水，洗衣粉的用量可以用1 g或1.5 g。

表4-1 水量和洗衣粉用量的参考表

| 洗涤方式 | 机洗    | 手洗          |
|------|-------|-------------|
| 水量   | 0.5 L | 0.5 L       |
| 洗衣粉量 | 0.5 g | 1 g 或 1.5 g |

其他相关问题简述如下。实验中可以用滴管控制污物的量,待污物干燥后再进行实验;布料应放在洗衣粉溶液中浸泡相同的时间;采用玻璃棒或筷子搅拌的方式模拟洗衣过程;模拟搅拌的时间、次数和力量应基本相同。

## 2. 实验方案的设计

教师应该要求学生写出完整的实验方案,方案中应包括实验材料、方法步骤等各个方面。下面的实验方案供参考。

实验材料:添加了复合酶的洗衣粉,大小相同的白棉布4块(在上面分别滴加4滴同种的植物油,放置至干燥)。

水温、水质及水量:水温为5℃、15℃、25℃和35℃(其中5℃可以通过冰箱冷藏室来控制,其他温度可以通过水浴控制);水质为自来水;水量为500 mL。

实验仪器:1 000 mL的烧杯、玻璃棒等。

子课题二 不同类型的洗衣粉对同一污渍或不同污渍洗涤效果的比较

比较子课题一与子课题二:在子课题一中,水温是变量,其他因素在实验中保持不变;而在子课题二中,水温则应保持不变。在实施子课题二时,通常应采用当地的常温,如果是冬季水温过低,就应采用水浴的方法,使温度达到25~35℃。

市场中的洗衣粉有多种类型,应选择不同类型的加酶洗衣粉和普通洗衣粉。污物的选择也应该多样化,只有这样才具有实践指导意义。表4-2的选择供参考,表中的“√”号表示可以进行实验。此外,学生也可以针对污渍、布料(如化纤或棉布)的不同情况,探究不同种类洗衣粉的洗涤效果。

表4-2 不同种类的洗衣粉对同一污渍或不同污渍洗涤效果的列表比较

| 污染物 | 蛋白酶洗衣粉 | 复合酶洗衣粉 | 普通洗衣粉 |
|-----|--------|--------|-------|
| 油渍  |        | √      | √     |
| 血渍  | √      | √      | √     |
| 奶渍  | √      | √      | √     |
| 果汁渍 | √      | √      | √     |

## 六、课题成果评价

本课题的评价可以分为三个方面:一是设计的实验方案是否思路清晰、科学性和操作性强;二是实验报告是否全面,是否涵盖了本课题所要求达到的目标;三是能否根据自己的探究成果,结合生活中的实际情况,设计一份宣传板报或有关加酶洗衣粉的使用说明材料,供家人或本校的教职员参考。学生完成课题后,应该得出以下三方面的结论。

1. 加酶洗衣粉与普通洗衣粉洗涤效果的比较分析。

2. 各种不同品牌的加酶洗衣粉对油渍、血渍和奶渍等污物的不同的洗涤效果分析。

3. 使用加酶洗衣粉时应注意的一些事项。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

1. 查阅资料,看看普通洗衣粉中包含哪些化学成分?

提示:普通洗衣粉中通常包含有:表面活性剂、水软化剂、碱剂、漂白剂等成分,有的洗衣粉中还含有增白剂、香精和色素,以及填充剂等。

2. 在本课题中你打算使用什么方法和标准判断洗涤效果?

提示:可在洗涤后比较污物的残留状况,如:已消失、颜色变浅、面积缩小等,最好能进行定量的比较。

### (二) 练习

1. 答:列表比较如下。

|     | 普通洗衣粉                                    | 加酶洗衣粉 |
|-----|------------------------------------------|-------|
| 相同点 | 表面活性剂可以产生泡沫,可以将油脂分子分散开;水软化剂可以分散污垢;等等。    |       |
| 不同点 | 酶可以将大分子有机物分解为小分子有机物,小分子有机物易于溶于水,从而与纤维分开。 |       |

2. 答:不合适。因为丝绸的主要成分是蛋白质,它会被加酶洗衣粉中的蛋白酶分解,损坏衣物。

## 八、参考资料

### 1. 家用洗衣粉的成分及作用

家用洗衣粉和其他各种家用洗涤剂的成分基本相同,主要含有表面活性剂、水软化剂、碱剂、漂白剂和香精等成分。

**表面活性剂** 表面活性剂是洗衣粉的主要成分。表面活性剂有阴离子、阳离子、非离子和两性离子等四大类,但用于洗涤的表面活性剂则以阴离子和非离子为主。最普通、最传统的阴离子表面活性剂就是人类使用了几百年的肥皂(高级脂肪酸钠)。合成洗涤工业问世之后,使用最普遍的是十二烷基苯磺酸钠,非离子表面活性剂应用最广泛的是聚氧乙烯醚类。

**水软化剂** 水软化剂可防止水中的钙、镁离子造成的阴离子表面活性剂失活,提高表面活性剂利用率。三聚磷酸钠是最为常用的一种水软化剂,它具有软化水质、分散污垢、缓冲碱剂及抗结块性能等特点,三聚磷酸钠广泛应用于各种洗衣粉中,无磷洗衣粉中不含有三聚磷酸钠。

**碱剂** 在适当的碱度下,纤维和污垢可被最大限度地离子化,更易于污垢的水解和分散。一般洗衣粉配方中都含有纯碱和硅酸钠,其中硅酸钠还具有使污垢颗粒悬浮、防止再沉积的作用。

**漂白剂** 某些洗衣粉中含有过硼酸钠一类的漂白剂,可以延缓衣物的泛黄程度,但对衣物有一定的损伤。

**酶** 洗衣粉中一般添加了蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶等。酶是一种专一性的生物催化剂,蛋白酶可以催化水解肉、蛋和奶渍,淀粉酶可以催化水解酱、粥等污渍,脂肪酶可以催化水解各类动植物油脂和人体皮脂腺分泌物及化妆品污垢,纤维素酶可使织物增艳(新)、去除颗粒

性污垢,但过量使用,也能损伤棉、麻等天然纤维织物。

**增白剂** 丝、棉、毛类等天然纤维的浅色衣物容易变黄,加入增白剂后,它能够留存在衣物上,吸收阳光中的紫外线,反射出与黄光互补的蓝色光线,从而掩盖了衣物上的黄色。

**香精和色素** 改善洗衣粉的气味和外观,给人清新愉悦的感受,并掩盖某些化学成分的异味。

### 2. 加酶洗衣粉

加酶洗衣粉就是在合成洗衣粉中,加入0.2%~0.5%的酶制剂制成的。在洗衣粉中添加的酶的种类很多,如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和纤维素酶等。我国在洗衣粉中添加的酶最主要的是碱性蛋白酶。这种酶能耐碱性条件,而且耐贮存,对皮肤、衣物没有刺激和损伤作用。碱性蛋白酶能使蛋白质水解成可溶于水的多肽和氨基酸。衣物上附着的血渍、汗渍、奶渍、酱油渍等污物,都会在碱性蛋白酶的作用下,结构松弛、膨胀解体,稍加搓洗,污迹就会从衣物上脱落。

使用加酶洗衣粉时必须注意以下几点:

(1) 碱性蛋白酶能使蛋白质水解,因此,蛋白质类纤维(羊毛、蚕丝等)织物就不能用加酶洗衣粉来洗涤,以免使纤维受到破坏;(2) 使用加酶洗衣粉时,必须注意洗涤用水的温度。碱性蛋白酶在35~50℃时活性最强,在低温下或70℃以上就会失效;(3) 加酶洗衣粉也不宜长期存放,存放时间过长会导致酶活力损失;(4) 加酶洗衣粉不宜与三聚磷酸盐共存,否则酶的活性将会丧失;(5) 添加了碱性蛋白酶的洗衣粉可以分解人体皮肤表面蛋白质,而使人患过敏性皮炎、湿疹等,因此,应避免与这类洗衣粉长时间地接触。

## 课题3 酵母细胞的固定化

### 一、课题目标

1. 说出固定化酶和固定化细胞的作用和

原理。

2. 尝试制备固定化酵母细胞,并利用固定化

酵母细胞进行酒精发酵。

## 二、课题重点与难点

1. 课题重点：制备固定化酵母细胞。
2. 课题难点：制备固定化酵母细胞。

## 三、课题背景分析

课题背景简单介绍了从酶到固定化酶、再到固定化细胞的发展过程，概括如图4-3。这一过

程体现了科学技术的发展是不断地提出问题和解决问题的动态过程。教师在教学中，可以参考课题背景提供的素材，联系生产实践和学生已有的认识，引导学生认同上述观点，并进而认识到：科学知识既来源于科学实验，也来源于生产生活实践，知识的学习应该与生产实践相联系；人们在生产实践中所发现的问题能够促进科学技术的发展。

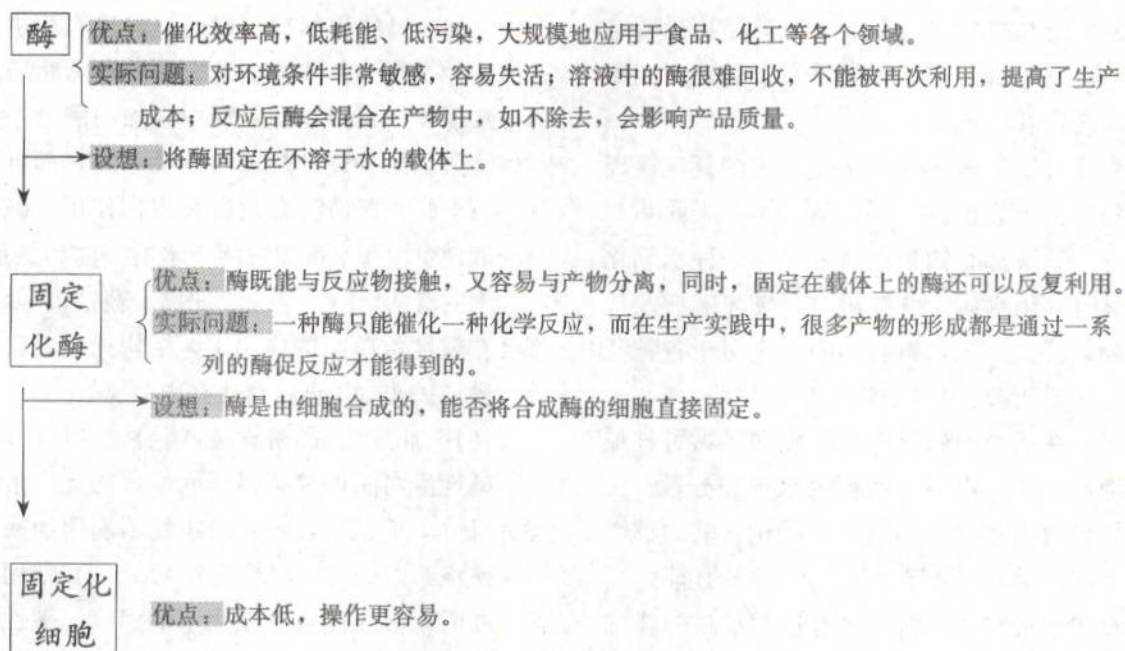


图4-3 从酶到固定化酶、再到固定化细胞的发展过程

## 四、基础知识分析与教学建议

### （一）固定化酶的应用实例

知识要点：1. 利用固定化酶技术生产高果糖浆的实例；2. 固定化酶的反应柱示意图；3. 固定化酶在生产实践中的优点。

教学建议：课程标准中要求学生尝试制备和应用固定化酶，但考虑到制作固定化酶的技术要求比较高，中学生难以掌握，因此只要求学生制作技术难度较低的固定化酵母细胞，对于固定化酶的作用、原理及其在生产中的应用，主要是让学生通过生产实例来了解。教师在教学中可以采用让学生阅读自学的方式，并在阅读之前，布置一些思考题让学生思考。例如，在葡萄糖的异构

反应中，如果不将葡萄糖异构酶固定化，而是直接使用葡萄糖异构酶，会对生产过程产生哪些影响？

### （二）固定化细胞技术

知识要点：1. 将酶或细胞固定化的方法；2. 固定化酶和固定化细胞的联系与区别；3. 固定化酶和固定化细胞常用的载体材料。

教学建议：固定化酶和固定化细胞通常采用包埋法、化学结合法和物理吸附法。教师在教学过程中，可以通过提问的方式，引导学生认识这三种方法的特点与适用范围。此外，教师还可以引导学生思考课本中提出的问题，引导学生理解固定化细胞和固定化酶这两种技术的区别与联系，

辩证地认识这两种技术的优势与不足。例如,固定化细胞操作容易、对酶活性的影响更小、可以催化一系列的反应、容易回收等,但由于大分子物质难以自由通过细胞膜,因此固定化细胞的应用也受到限制。

### 五、实验安排及注意事项

本课题可以安排2课时。第1课时完成课题背景和基础知识的学习,准备好基本的实验仪器,同时还可以组织学生提前配制好 $\text{CaCl}_2$ 溶液和用于发酵的葡萄糖溶液。第2课时进行酵母细胞的固定化操作。在具体的操作过程中,还应该注意下列问题。

(一)在缺水的状态下,微生物会处于休眠状态。活化就是让处于休眠状态的微生物重新恢复正常的生活状态。酵母细胞所需要的活化时间较短,一般需要0.5~1 h,教师需要提前做好准备。此外,酵母细胞活化时体积会变大,因此活化前应该选择体积足够大的容器,以避免酵母细胞的活化液溢出容器外。

(二)加热使海藻酸钠溶化是操作中最重要的一环,决定实验的成败,教师一定要提醒学生按照教材的提示进行操作。海藻酸钠的浓度涉及固定化细胞的质量。如果海藻酸钠浓度过高,将很难形成凝胶珠;如果浓度过低,形成的凝胶珠所包埋的酵母细胞的数目少,影响实验效果。

(三)刚形成的凝胶珠应在 $\text{CaCl}_2$ 溶液中浸泡一段时间,以便形成稳定的结构。检验凝胶珠的质量是否合格,可以使用下列方法。一是用镊子夹起一个凝胶珠放在实验桌上用手挤压,如果凝胶珠不容易破裂,没有液体流出,就表明凝胶珠的制作成功。二是在实验桌上用力摔打凝胶珠,如果凝胶珠很容易弹起,也能表明制备的凝胶珠是成功的。

### 六、课题成果评价

#### (一)观察凝胶珠的颜色和形状

如果制作的凝胶珠颜色过浅、呈白色,说明海藻酸钠的浓度偏低,固定的酵母细胞数目较少;

如果形成的凝胶珠不是圆形或椭圆形,则说明海藻酸钠的浓度偏高,制作失败,需要再作尝试。

#### (二)观察发酵的葡萄糖溶液

利用固定的酵母细胞发酵产生酒精,可以看到产生了很多气泡,同时会闻到酒味。

教师不仅要对学生制作的固定化酵母细胞进行评价,还要对学生的操作过程进行评价。此外,对酵母细胞固定化原理和实验操作方法的理解,也应是评价的有机组成部分。

### 七、答案和提示

#### 练习

1. 答:直接使用酶、固定化酶和固定化细胞催化的优缺点如下表所示。

| 类型    | 优点                                       | 不足                                                                 |
|-------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 直接使用酶 | 催化效率高, 低耗能、低污染等                          | 对环境条件非常敏感, 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 |
| 固定化酶  | 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 | 一种酶只能催化一种化学反应, 而在生产实践中, 很多产物的形成需要通过一系列的酶促反应才能得到                    |
| 固定化细胞 | 成本低, 操作更容易                               | 固定后的细胞与反应物不容易接近, 可能导致反应效果下降等                                       |

3. 提示: 可以从酶的结构的多样性, 对理化条件的敏感程度等角度思考。

### 八、参考资料

利用固定化微生物细胞来生产酶具有生产成本低、周期短、产量大等优点。微生物产生的酶, 可以分为分泌在细胞外的胞外酶和包含在细胞内的胞内酶。利用胞内酶时, 需要将细胞破碎后, 将酶分离纯化, 但提取后酶的活性和稳定性往往都会受到很大的影响。

将微生物细胞限制或定位于特定空间位置, 即将微生物制成固定化细胞后, 既能避免复杂的

细胞破碎、酶的提取和纯化过程,又能使酶的活性和稳定性得到较大提高。固定后的微生物细胞可以作为固体催化剂在多步酶促反应中发挥连续催化作用,同时,催化反应结束后又能被回收和重复利用。例如,人们将含有青霉素酰化酶的大

肠杆菌细胞进行固定化,用于大规模地生产青霉素母核(青霉素的主体化学结构部分,即6-氨基青霉烷酸),然后再对青霉素母核的侧链进行化学修饰,可以生产半合成青霉素,如氨苄青霉素。

人教版®

## DNA 和蛋白质技术

DNA 和蛋白质技术,包括 DNA 的提取、蛋白质的提取、DNA 片段的扩增等,是开展分子生物学研究的基本技术。本专题将从基础入手,学习 DNA 的粗提取、PCR 技术和血红蛋白的提纯。学习这些技术,不仅能够帮助学生初步了解分子生物学的基本实验方法,而且能够巩固必修课中学习的有关 DNA 和蛋白质的理论知识。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题三个课题均依照课程标准中的具体内容标准编排,其对应关系如下表。其中,课题 1 “DNA 的粗提取与鉴定”在课程标准中没有明确要求,但考虑到不少学校都曾做过 DNA 的粗提取的实验,并且 DNA 的提取与蛋白质的提取相比,难度较低、成功率较高,因此安排了课题 1 “DNA 的粗提取与鉴定”。

| 具体内容标准                          | 对应课题 |
|---------------------------------|------|
| 尝试蛋白质的提取和分离                     | 课题 3 |
| 尝试 PCR (DNA 多聚酶链式反应) 技术的基本操作和应用 | 课题 2 |

在本专题的学习中,学生需要了解提取生物大分子的基本思路和方法,尝试 DNA 和蛋白质的提取。学生应当理解 PCR 扩增 DNA 片段的原理,尝试 PCR 技术的基本操作和应用。

#### 二、技术要项

本专题围绕 DNA 和蛋白质技术展开,主要操作技术归纳如下。

1. DNA 的粗提取和鉴定。

2. PCR 技术。

3. 血红蛋白的提取和分离技术。

#### 三、设备条件

本专题课题 1 并不需要特殊的实验用具或器材。课题 2 需要 PCR 仪及 PCR 试剂盒,PCR 仪也可以用 3 个恒温水浴锅代替。课题 3 需要色谱柱、交联葡聚糖凝胶 G-75、离心机、缓冲液等提取蛋白质的常规设备和材料用具。

#### 四、教学安排

本专题的 3 个课题相对独立,没有严格的先后顺序。课题 1 的操作难度不高,学生比较容易获得结果,2 课时就能够完成。课题 2 的操作难度也不高,但对 PCR 原理的理解是教学中的难点。教学中,教师要充分利用教材的图文资料,化解这一难点,然后再引导学生进行实验操作。课题 3 的操作难度比较大,建议教师做好预实验,摸索成功的经验,然后再进行教学。由于蛋白质的分离需要一定的时间,因此教师还要调动学生,充分利用课余时间。

### 参考书目

1. 分子克隆实验指南 (第三版)。[美] J. 萨姆布鲁克、D. W. 拉塞尔著。北京:科学出版社,2002。
2. 生物化学实验原理和方法。李建武等编写。北京:北京大学出版社,1994。
3. 生化技术导论。中山大学生物系微生物学教研室编写。北京:人民教育出版社,1978。

## 课题1 DNA的粗提取与鉴定

### 一、课题目标

本课题通过尝试对植物或动物组织中的DNA进行粗提取,了解DNA的物理化学性质,理解DNA粗提取以及DNA鉴定的原理。

### 二、课题重点与难点

课题重点:DNA的粗提取和鉴定方法。

课题难点:DNA的粗提取和鉴定方法。

### 三、课题背景分析

生物体的性状之所以能够遗传给后代,是由于生物体内具有DNA或RNA这些遗传物质。通过必修2《遗传与进化》的学习,学生已经了解了证明DNA是主要的遗传物质的实验证据。那么DNA究竟是什么样的呢?本课题通过实验操作,使学生对DNA有一定的感性认识。

### 四、基础知识分析与教学建议

知识要点:1. DNA的物理化学性质,尤其是DNA的溶解性;2. 二苯胺法鉴定DNA的方法和原理。

#### 教学建议

1. 在教学过程中,教师要引导学生分析教科书中的插图5-1“DNA在NaCl溶液中的溶解度曲线”,使学生理解:在NaCl溶液浓度低于0.14 mol/L时,DNA的溶解度随NaCl溶液浓度的增加而逐渐降低;在0.14 mol/L时,DNA溶解度最小;当NaCl溶液浓度继续增加时,DNA的溶解度又逐渐增大。利用上述原理,可以将DNA溶于高浓度的NaCl溶液中,使其与其他物质分开。

2. 教师要注意引导学生认识DNA和蛋白质对酶、高温和洗涤剂的耐受性的不同。教材在实验设计中关于去除滤液中杂质的第二、第三个方

案,正是利用了上述不同的特性,从而达到分离DNA和蛋白质的目的。

3. 教材中介绍了用二苯胺法鉴定DNA的方法,教师可以引导学生结合教材中的资料,利用所学的知识,采用其他的方法鉴定DNA,如电泳法、紫外灯照射法等。

### 五、实验案例

案例一 以鸡血为实验材料进行DNA的粗提取

#### 课前准备

本实验用鸡血细胞做实验材料有两个原因。一是因为鸡血细胞核的DNA含量丰富,材料易得;二是鸡血细胞极易吸水涨破,而用动物肝脏细胞作实验材料常常需要匀浆和离心,对设备要求较高,操作繁琐,历时较长。

教师可以到市场售活鸡处索取鸡血,所带烧杯中必须提前放入抗凝剂柠檬酸钠溶液。具体制备方法如下。取质量浓度为0.1 g/mL的柠檬酸钠溶液100 mL,置于500 mL烧杯中,注入新鲜的鸡血(约180 mL),同时用玻璃棒搅拌,使血液与柠檬酸钠溶液充分混合,以免血液凝结。将烧杯中的血液置于冰箱内,静置1 d,使血细胞自行沉淀。有条件的学校也可以将血液倒入离心管内进行离心,用2 000 r/min或3 000 r/min的转速,离心2 min,使血细胞沉淀于离心管底部,这样可以使血细胞沉淀更完全。用吸管除去上部的澄清液,就可以得到鸡血细胞液。值得注意的是鸡血细胞破碎以后释放出的DNA,容易被玻璃容器吸附,所以在提取过程中为了减少DNA的损失,最好使用塑料的烧杯和试管盛放鸡血细胞液。

#### 提取DNA的具体步骤

1. 破碎细胞,释放DNA

鸡血细胞中的DNA与核蛋白结合,位于鸡血细胞的细胞核中,正常情况下是不会释放出来的。为了使DNA从细胞核中释放出来,需要向鸡血细胞液中加入蒸馏水,并且搅拌,使血细胞膜和核膜涨破。用玻璃棒搅拌可以加速细胞的破裂。注意应沿一个方向快速搅拌,但也不能太快太猛,以防止打碎DNA。一般5~10 mL的鸡血细胞液加入20 mL蒸馏水搅拌5 min。释放出来的大量DNA和RNA往往与蛋白质结合在一起,应用3~4层纱布进行过滤,除去一些颗粒较大的杂质。

## 2. 溶解细胞核内的DNA

在浓度较高的NaCl溶液中核蛋白容易解聚,游离出的DNA溶解在溶液中。在溶液中加入两倍体积的浓度为2 mol/L的NaCl溶液,搅拌1 min。注意应沿一个方向搅拌,使DNA充分溶解。

## 3. DNA的析出

将溶液中的DNA与其他杂质分离,这一步骤是实验成败的关键。教材中列举了提取DNA的三种方案,本案例选取方案一。加蒸馏水降低NaCl溶液浓度,使DNA析出。实验中应该缓慢贴壁加入蒸馏水,并轻轻地沿一个方向不停地均匀搅拌,以利于DNA分子的附着和缠绕。同时应注意控制加水量,使NaCl溶液的终浓度为0.1~0.2 mol/L。加水过程一般分三次进行,当总加水量为300 mL左右时,DNA已基本析出。加水太多、溶液过稀,会使DNA分子又重新溶解。

用3~4层纱布对DNA稀释液进行过滤,滤去蛋白质,收集DNA的黏稠物。如果采用离心法,效果更好。用4 000 r/min的转速,离心15 min,除去上清液(含有蛋白质),留下的沉淀物中含有DNA。此时注意观察DNA黏稠物的颜色。

## 4. DNA的初步纯化

如果提取的DNA量不够多且其中含有较多杂质,或者加入溶液和搅拌等操作过程不规范,都会导致实验现象不明显,常常使制取的DNA粗制品不能显示出DNA的本色——白色。为了增进实验效果,需要对DNA粗制品进行简单的提纯,下面的方案可供参考。

将DNA黏稠物再溶解,继续用2 mol/L的NaCl溶液20 mL溶解DNA黏稠物,仍旧沿一个方向不停搅拌3 min,使DNA充分溶解,以免损失。用3~4层纱布进行过滤(或离心),滤去杂质,收集含有DNA的滤液。向滤液中贴壁缓慢加入50 mL预冷的体积分数为95%的乙醇,并用玻璃棒朝一个方向缓慢、均匀地搅拌,溶液中会出现DNA丝状物。

实验一般要求采用预冷的95%的乙醇,但对比结果显示,常温下的乙醇溶液也可产生明显效果。从理论上分析,预冷的乙醇溶液具有以下优点。一是抑制核酸水解酶活性,防止DNA降解;二是降低分子运动,易于形成沉淀析出;三是低温有利于增加DNA分子柔韧性,减少断裂。此时悬浮于溶液中的DNA丝状物相对含杂质较少,如果出现的丝状物较少,可以将此混合液再放入冰箱中冷却几分钟。浓缩后的DNA丝状物,可以用缓缓旋转玻璃棒的方法卷起(因为玻璃棒有吸附DNA的作用)。如果DNA丝状物较少,不易吸附在玻璃棒上,也可以用筷子等表面粗糙的用具来帮助DNA分子缠绕。

DNA的纯化还有许多其他方法。例如,添加质量分数为25%的十二烷基磺酸钠(SDS)溶液,使蛋白质变性后与DNA分开。随后,加入氯仿-异丙醇混合液(体积比为24:1),通过离心将蛋白质及其他杂质除去,取上清液。可重复上述操作几次,直至上清液变成透明的黏稠液体。此外苯酚可以迅速使蛋白质变性,抑制核酸酶的活性。利用苯酚处理后,离心分层,DNA溶于上层水相,蛋白质变性存在于酚层中,这时可用分液漏斗或吸管等仪器将二者分开。教师可以根据学校的条件让学生自己设计实验方案,比较实验结果。

## 5. DNA的鉴定

**二苯胺法** 二苯胺试剂的配制及鉴定DNA的方法参见教科书。需要注意的是,二苯胺试剂在冰箱内可保存6个月,使用前需摇匀。

**紫外灯照射法** 用蒸馏水配制质量分数为0.05%的溴化乙锭(EB)溶液,将玻璃棒上缠绕的白色絮状物抹到蜡纸上,再滴1滴EB溶液染

色。将蜡纸放在紫外灯(260 nm)下照射(暗室中),可呈现橙红色的荧光(DNA的紫外吸收高峰在260 nm处)。

**电泳法** 此方法适合鉴定纯度较高的DNA。有条件的学校可以参考本专题课题2的实验案例和参考资料部分。

**案例二** 以菜花为实验材料进行DNA的粗提取

**课前准备** 将新鲜菜花和体积分数为95%的酒精溶液放入冰箱冷冻室24 h。

**提取DNA的具体步骤**

1. 取材 称取30 g菜花,去梗取花,切碎。

2. 研磨 将碎菜花放入研钵中,倒入10 mL研磨液,充分研磨10 min。

研磨液的配制方法如下。将10.1 g Tris(三羟甲基氨基甲烷)加入到50 mL蒸馏水中,使其溶解,然后,用2 mol/L的HCl溶液调节pH至8.0,再加入8.76 g NaCl、37.2 g EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、20 g SDS。待上述药品全部溶解后,再用蒸馏水定容至1 000 mL。

教材中建议采用洗发香波、洗涤剂等一些去污剂,使植物细胞膜破碎,释放DNA。学生可以设置对照实验,比较哪一种方法可以提取到纯度更高的DNA。一般实验室提取高纯度的DNA都采用一种阳离子去污剂——十六烷三甲基溴化铵分离缓冲液,使细胞膜破碎,同时将DNA与植物中多糖等杂质分开,再用氯仿-异丙醇混合液(体积比为24:1)抽提去除杂质蛋白,得到高纯度的DNA。

3. 过滤 在漏斗中垫上尼龙纱布,将菜花研磨液过滤到烧杯中(有条件的学校可将滤液倒入塑料离心管中进行离心,用1 000 r/min的转速,离心2~5 min,取上清液放入烧杯中)。在4℃冰箱中放置几分钟后,再取上清液。

4. 沉淀 将一倍体积的上清液倒入两倍体积的体积分数为95%的预冷酒精溶液中,并用玻璃棒缓缓、轻轻地搅拌溶液(玻璃棒不要直插到烧杯底部)。沉淀3~5 min后,可见白色的DNA絮状物出现。用玻璃棒缓缓旋转,将絮状物缠绕在

玻璃棒上。

## 六、课题成果评价

(一) 是否提取出了DNA

观察你提取的DNA颜色,如果不是白色丝状物,说明DNA中的杂质较多;二苯胺鉴定出现蓝色说明实验基本成功,如果不呈现蓝色,可能所提取的DNA含量低,或是实验操作中出现错误,需要重新制备。

(二) 分析DNA中的杂质

本实验提取的DNA粗制品有可能仍然含有核蛋白、多糖等杂质。

(三) 不同实验方法的比较

对于不同的实验方法,本课题可以采用分组的方法进行研究。首先选取不同的实验材料,其次同种材料还可以采用不同方法,从多方面比较实验结果,如DNA的纯度、DNA的颜色、二苯胺显色的深浅等,看看哪种实验材料、哪种提取方法的效果更好。

## 七、答案和提示

(一) 旁栏思考题

1. 为什么加入蒸馏水能使鸡血细胞破裂?

答:蒸馏水对于鸡血细胞来说是一种低渗液体,水分可以大量进入血细胞内,使血细胞涨裂,再加上搅拌的机械作用,就加速了鸡血细胞的破裂(细胞膜和核膜的破裂),从而释放出DNA。

2. 加入洗涤剂和食盐的作用分别是什么?

答:洗涤剂是一些离子去污剂,能溶解细胞膜,有利于DNA的释放;食盐的主要成分是NaCl,有利于DNA的溶解。

3. 如果研磨不充分,会对实验结果产生怎样的影响?

答:研磨不充分会使细胞核内的DNA释放不完全,提取的DNA量变少,影响实验结果,导致看不到丝状沉淀物、用二苯胺鉴定不显示蓝色等。

4. 此步骤获得的滤液中可能含有哪些细胞成分?

答:可能含有核蛋白、多糖和RNA等杂质。

5. 为什么反复地溶解与析出 DNA, 能够去除杂质?

答: 用高浓度的盐溶液溶解 DNA, 能除去在高盐中不能溶解的杂质; 用低盐浓度使 DNA 析出, 能除去溶解在低盐溶液中的杂质。因此, 通过反复溶解与析出 DNA, 就能够除去与 DNA 溶解度不同的多种杂质。

6. 方案二与方案三的原理有什么不同?

答: 方案二是利用蛋白酶分解杂质蛋白, 从而使提取的 DNA 与蛋白质分开; 方案三利用的是 DNA 和蛋白质对高温耐受性的不同, 从而使蛋白质变性, 与 DNA 分离。

### (二) 练习

1. 答: 提取 DNA 的第一步是材料的选取, 其目的是要选取 DNA 含量较高的生物材料, 否则会由于实验过程中或多或少的损失而造成检测的困难; 第二步是 DNA 的释放和溶解, 这一步是实验成功与否的关键, 要尽可能使细胞内的 DNA 全部溶解; 第三步是 DNA 的纯化, 即根据 DNA 的溶解特性、对酶及高温的耐受性的不同等特性, 最大限度地使 DNA 与杂质分开; 最后一步是对 DNA 进行鉴定, 这是对实验的结果的检测。

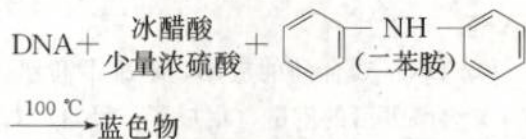
2. 答: 提取蛋白质比提取 DNA 的难度大。

这是因为, 与 DNA 相比, 蛋白质对温度、盐浓度、pH 等条件要敏感得多, 很容易失活; 并且蛋白质的空间结构多种多样, 理化性质各不相同, 使得蛋白质的提取没有一种统一的方法, 只能根据特定蛋白质的特性摸索提取的条件, 设计特定的方法。

### 八、参考资料

#### 1. 二苯胺鉴定 DNA 的化学原理

DNA 中嘌呤核苷酸上的脱氧核糖遇酸生成  $\omega$ -羟基- $\gamma$  酮基戊醛, 它再和二苯胺作用而呈现蓝色 (溶液呈浅蓝色)。鉴定时溶液蓝色的深浅, 与溶液中 DNA 含量的多少有关。



#### 2. 研磨液中几种药品的作用

Tris-HCl: 提供缓冲体系, DNA 在这一体系中呈稳定态。

EDTA: 是 DNA 酶的抑制剂, 可以防止细胞破碎后 DNA 酶降解 DNA。

SDS: 可以使蛋白质变性, 与 DNA 分离。

## 课题2 多聚酶链式反应扩增 DNA 片段

### 一、课题目标

本课题通过尝试 PCR (DNA 多聚酶链式反应) 技术的基本操作, 使学生体验 PCR 这一常规的分子生物学实验方法, 理解 PCR 的原理, 讨论 PCR 的应用。

### 二、课题重点与难点

课题重点: PCR 的原理和 PCR 的基本操作。

课题难点: PCR 的原理。

### 三、课题背景分析

课题背景首先介绍了 PCR 是一种在体外迅速扩增 DNA 片段的技术, 然后说明这一技术在遗传疾病的诊断、刑侦破案、古生物学、基因克隆等方面都有着广泛的应用, 最后指出本课题的目标是了解 PCR 技术的基本原理, 并尝试用 PCR 技术扩增 DNA 片段。教师在导入本课题的学习时, 可以先让学生谈一谈对 PCR 的认识以及 PCR 的应用, 以激发学生的学习兴趣, 然后再说明本课题的目标。

#### 四、基础知识分析与教学建议

##### (一) PCR 原理

知识要点：1. 细胞内参与 DNA 复制的各种组成成分与反应条件；2. DNA 的合成方向；3. *Taq* DNA 聚合酶的应用。

教学建议：理解 PCR 的原理，需要首先了解细胞内参与 DNA 复制的各种组成成分与反应条件。教师在教学过程中，可以首先引导学生回忆必修2《遗传与进化》中的有关 DNA 复制的知识。在此基础上，学生需要进一步了解 DNA 双链的方向，能够区分 DNA 的 3' 端和 5' 端。此外，学生还需要了解 DNA 聚合酶的特性，如只能从 DNA 的 3' 端开始延伸 DNA 链、而不能从头合成 DNA 等。

*Taq* DNA 聚合酶的应用，解决了高温导致 DNA 聚合酶失活的问题，促成了 PCR 技术的自动化，是一个重要的知识点。教师可以结合专题2中课题2“土壤中分解尿素的细菌的分离与计数”*Taq* 细菌的发现过程，帮助学生加深理解。

##### (二) PCR 的反应过程

知识要点：PCR 的基本步骤及每个步骤所发生的变化。

教学建议：这部分内容的教学应以读图识图为主。教科书中图5-9“PCR 反应过程图解”详细地描绘了参与 PCR 的各组成成分；每一轮反应的三个基本步骤——变性、复性和延伸；每一轮中每一个步骤所发生的变化，即每个步骤所具有的作用。教师在教学中可以请学生在读图的同时，结合教科书中的文字说明来加深理解。当学生遇到难以理解的地方时，教师要及时给予解答。

#### 五、实验案例

##### PCR 扩增双歧杆菌编码 16S rRNA 的 DNA 片段

1. 双歧杆菌的培养。本实验用双歧杆菌作为实验材料，需要在实验前一天培养双歧杆菌。双歧杆菌的培养基配方如下。

大豆蛋白胨 5.0 g 胰胨 5.0 g 酵母提取物 10 g  
葡萄糖 10 g 微量盐溶液 40 mL 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g

0.1% (0.1 g/100 mL) 刃天青 1 mL

将上述物质溶解后，用蒸馏水定容至 1 000 mL，调节 pH 至 7.0。

其中，微量盐溶液的配方如下(1 000 mL)。

CaCl<sub>2</sub> 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.48 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g NaHCO<sub>3</sub> 10 g NaCl 2 g

培养双歧杆菌 24 h 后，将菌液进行离心，双歧杆菌将沉淀在试管底部。

2. PCR 操作。往双歧杆菌的沉淀中加入 0.2 mL 裂解液（裂解液配方为 50 mmol/L 的 Tris-HCl，0.5 % 的 Tween 20，1 mg/mL 的蛋白酶 K，pH 为 8.0），使细胞裂解，释放出 DNA。将裂解液在 55 °C 下加热孵育 3 h 后，再在 95 °C 下加热 10 min，然后立即放入冰水中冷却。冷却后离心，将 10 μL 上清液转移到 0.5 mL 的离心管中，然后依次加入 10 倍浓缩的扩增缓冲液 5 μL、25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 溶液 3 μL、20 mmol/L 的 4 种脱氧核苷酸的等量混合液 1 μL，*Taq* DNA 聚合酶 1 μL (2 U/μL)，蒸馏水 29 μL，两种引物 (25 μmol/L) 各 0.5 μL。混匀后按教科书表格中的数据设定 PCR 程序，进行反应。

需要说明的是，进行本实验可以直接购买试剂盒，试剂盒的价格比单独购买试剂的价格要低，并且包括了 PCR 所需的所有试剂。但是，试剂盒上往往只标出了试剂号，而没有标明试剂的名称，因此购买时要进行详细的咨询。如果单独购买试剂，PCR 所需的引物必须委托相关的试剂公司来合成，合成后必须低温保存，否则引物容易发生降解。本实验所用引物的碱基序列如下。

引物 I 5' GGATTCTGGCTCAGGAT-GAACGG 3'

引物 II 5' CCGGGTGCTICCCACTTTTCAT-GG 3' (I 代表碱基次黄嘌呤，它可以与 A、G、C、T 中的任何 1 个碱基配对)。

3. PCR 产物的检测。产物的检测除了可以采用教科书中提供的方法外，还可以采用琼脂糖凝胶电泳的方法。琼脂糖凝胶电泳的有关介绍可参见本专题中课题3《血红蛋白的提取和分离》以及本课题的参考资料，具体操作步骤如下。

(1) 用蒸馏水将电泳槽和梳子冲洗干净,放在水平桌面上,并架好梳子。

(2) 配制浓度为1% (1 g/100 mL) 的琼脂糖凝胶。在锥形瓶中,称取一定量的琼脂糖粉,加入适量蒸馏水,在微波炉内加热,使琼脂糖粉熔化,然后冷却至 60 °C,倒入电泳槽中,待其凝固。

(3) 配制 0.5 倍的 Tris-硼酸 (TBE) 电泳缓冲液 100 mL。配制方法见本课题的参考资料部分。

(4) 向电泳槽中缓缓倒入配制好的电泳缓冲液,以没过胶面 2 mm 为宜。小心移去梳子,注意不要破坏加样孔。如果样品孔内有气泡,应设法除去。

(5) 在 DNA 样品中加入相当于样品 0.2 倍体积的载样缓冲液 (载样缓冲液的成分参见本课题中参考资料),混匀后,加入样品孔内。

(6) 接通电源。一般红色代表正极,黑色代表负极。DNA 样品是由负极向正极移动,因此要保证靠近加样孔一端的电极为负极。电压为 1~50 V/cm (长度以两个电极之间的距离计算)。

(7) 当指示剂移动到凝胶边缘时,断开电源,终止电泳。一般 200~400 个核苷酸长度的 PCR 产物,在 50 V 电压下,电泳 20~40 min 即可。

(8) 将凝胶放入 EB 溶液中染色后,在紫外仪上观察电泳带及其位置,判断扩增产物的情况。

## 六、课题成果评价

DNA 片段的扩增是否成功

检测 DNA 片段的扩增情况,既可以采用教科书中提供的方法,也可以采用教师用书中实验案例提供的方法。对于教科书中的方法,可以通过计算 DNA 含量来评价扩增的效果;对于电泳检测的方法,可以通过在紫外线下直接观察 DNA 带的分布及粗细程度来评价扩增的效果。如果扩增不成功,则要分析失败原因。可能的原因有:漏加了 PCR 的反应成分,各反应成分的用量不当,PCR 程序设置不当等。

## 七、答案和提示

### 练习

1. 提示:绘图可参考教科书中图 5-9。PCR 反应中的目的片段一般以  $2^n$  的方式积累,其中  $n$  为反应循环次数。一个 DNA 片段在 30 次循环后反应物中大约有 10 亿个这样的片段 ( $2^n = 2^{30} = 1\,073\,741\,824$ )。

2. 提示:PCR 引物是根据需要扩增的目标 DNA 的碱基序列来设计的。引物的设计需要丰富的分子生物学实验经验,感兴趣的学生可以参考《分子克隆实验指南》(见本专题参考书目),书中有详尽的论述。

## 八、参考资料

### 1. 琼脂糖凝胶浓度与 DNA 分离范围的关系

凝胶浓度要依据 DNA 分子的大小来确定。编码双歧杆菌 16S rRNA 的 DNA 片段大小约为 1 500 个核苷酸的长度,因此根据表 5-1 选用 1% (1 g/100 mL,下同) 的凝胶浓度。

表 5-1 琼脂糖凝胶浓度与 DNA 分离范围的关系

| 琼脂糖凝胶浓度 (%) | 线型 DNA 分子的分离范围<br>(千碱基, kb) |
|-------------|-----------------------------|
| 0.3         | 5~60                        |
| 0.6         | 1~20                        |
| 0.7         | 0.8~10                      |
| 0.9         | 0.5~7                       |
| 1.2         | 0.9~6                       |
| 1.5         | 0.2~3                       |
| 12.0        | 0.1~2                       |

### 2. 核酸电泳缓冲液

核酸电泳缓冲液有三种,分别是 TBE、Tris-乙酸 (TAE) 和 Tris-磷酸 (TPE)。在上述三种缓冲液中:TBE 与 TPE 缓冲液容量高,对 DNA 的分离效果好,但 TPE 液中含磷酸盐的浓度偏高,容易使 DNA 沉淀。TAE 的缓冲容量低,价格较便宜。本实验选用的是 TBE 缓冲液。缓冲液

中的 EDTA 可螯合正价阳离子,从而抑制 DNA 酶的活性,防止 PCR 产物被降解。

10 倍浓缩的 TBE 缓冲液配方如下。

Tris 108 g EDTA 9.3 g 硼酸 55 g

将上述物质溶解后,用蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 为 8.0~8.2 备用,使用时需稀释 10 倍。

### 3. 核酸电泳的指示剂与染色剂

核酸电泳常用的指示剂是溴酚蓝,溴酚蓝在碱性条件下呈蓝紫色。指示剂一般与蔗糖、甘油或聚蔗糖 400 组成载样缓冲液。载样缓冲液的作用是:能够增加样品密度,确保 DNA 均匀沉入加样孔内;能够在电泳中形成肉眼可见的蓝紫色指示带,从而帮助预测核酸电泳的速度和位置;能够使样品呈现蓝紫色,使加样操作更方便。

核酸电泳后,需要染色才能在紫外线下观察到带型。最常用的染色方法是 EB 染色法。EB 是一种荧光染料,有剧毒,因此操作时要非常小心。EB 可嵌入 DNA 双链的碱基对之间,在紫外线激发下,能发出红色荧光。染色的方法有两种。一种是在凝胶电泳液中加入 EB,使其终浓度为  $0.5 \mu\text{g/mL}$ ;一种是在电泳后,将凝胶浸入  $0.5 \mu\text{g/mL}$  的 EB 溶液中,染色 10~15 min。当凝胶染色过深时,可以将凝胶放入蒸馏水中浸泡 30 min 后再观察。

### 4. PCR 的常见问题

PCR 实验很容易出现假阳性或假阴性的结果。出现假阴性结果的常见原因有: *Taq* DNA 聚合酶活力不够或其活性受到抑制;引物设计不合理;提取的模板质量或数量不过关以及 PCR 系统的建立欠妥当;循环次数不够;等等。当实验中出现假阴性的情况时,应首先在原来扩增的产物中再加入 *Taq* DNA 聚合酶,并增加 5~10 次循环。为了防止假阴性结果的出现,在选用 *Taq* DNA 聚合酶时,要注意用活力高、质量好的酶。同时,在提取 DNA 模板时,应特别注意避免提取物中含有抑制酶活性的污染物,如酚、氯仿等的存在。尽管 *Taq* DNA 聚合酶对模板纯度的要求不高,但也不允许有机试剂的污染。PCR 扩增的先决条件以及特异性的高低,很大程度上取决于引物与靶 DNA 的互补情况,尤其需要保证引物的 3' 端与靶基因互补。

PCR 技术高度灵敏,极其微量的靶基因污染都会造成非目标 DNA 片段的大量扩增,因此模板 DNA 的污染是 PCR 假阳性结果的主要原因。此外,样品中存在靶基因的同源序列也可能造成假阳性结果。为了避免因污染而造成的假阳性结果,PCR 操作时要注意做到:隔离操作区,分装试剂,简化操作程序,使用一次性吸头等。

## 课题 3 血红蛋白的提取和分离

### 一、课题目标

本课题通过尝试对血液中血红蛋白的提取和分离,使学生能够体验从复杂体系中提取生物大分子的基本过程和方法,并了解色谱法、电泳法等分离生物大分子的基本原理,为今后学习运用这些技术打下基础。

### 二、课题重点与难点

课题重点:凝胶色谱法的原理和方法。

课题难点:样品的预处理;色谱柱填料的处理和色谱柱的装填。

### 三、课题背景分析

课题背景通过当今生物科学在蛋白质研究领域的进展,说明提取、分离高纯度的蛋白质的重要性和必要性,进而明确地提出课题目的: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。教师可以发挥学生的主动性,让学

生介绍当前有关蛋白质研究的新进展,激发学生的学习兴趣,然后指出本课题的学习意义,让学生初步体会分离纯化蛋白质的过程和方法。

#### 四、基础知识分析与教学建议

##### (一) 凝胶色谱法

知识要点: 1. 凝胶色谱法的用途; 2. 凝胶色谱法分离蛋白质的原理。

教学建议: 教师在介绍凝胶色谱法的基本原理时,可以结合教科书提供的插图,让学生对凝胶色谱法分离蛋白质的过程有一个直观的认识。教师可以通过发动学生查阅资料,让学生了解有关凝胶色谱法的知识,如凝胶的种类、理化性质及凝胶的选择和保存,并结合实验操作,让学生分析实验中的注意事项。教师还可以向学生介绍凝胶色谱法的其他用途,如测定生物大分子的分子量、蛋白质的脱盐等。

##### (二) 缓冲溶液

知识要点: 1. 缓冲溶液的组成和作用机理; 2. 熟悉一般缓冲溶液的配制方法; 3. 缓冲溶液广泛应用于生化实验、微生物的培养、组织切片和细菌染色以及酶的研究等方面。

教学建议: 教师首先可以结合生活中的一些缓冲现象,让学生充分理解缓冲溶液的重要性。在进行本课题的实验操作之前,可以让学生查阅相关资料,练习一些常用缓冲液的配制。

##### (三) 电泳

知识要点: 1. 电泳的基本原理; 2. 不同类型的电泳。

教学建议: 电泳技术广泛应用于生化实验,在分离分析酶、蛋白质、核酸等生物大分子方面具有较高的分辨率。教师可以通过一个简单的实验使学生理解电泳现象,比如在盛有红褐色  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  胶体的 U 形管的两个管口,各插入一个电极。通直流电后,发现阴极附近的颜色逐渐变深,阳极附近的颜色逐渐变浅。这表明  $\text{Fe}(\text{OH})_3$

胶体粒子带正电荷,在电场作用下向阴极移动。这种在外加电场作用下,带电粒子发生迁移的现象就叫做电泳。

教科书中用楷体字简单地介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳的基本原理,教师可以结合资料,开拓学生的知识面,围绕聚丙烯酰胺凝胶电泳,介绍其他类型的电泳原理及应用。本实验的选做部分是通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对血红蛋白进行纯度的鉴定,同时也可以测定血红蛋白亚基的分子量。此外,还可以通过聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳来测定天然蛋白的分子量;通过聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳来测定蛋白的等电点;等等。相关原理可以查阅生物化学技术的有关书籍。

使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子量时,可选用一组已知分子量的标准蛋白同时进行电泳,根据已知分子量的标准蛋白的电泳区带位置,用电泳迁移率和分子量的对数作标准曲线,可以测出未知蛋白的分子量。市场上有高分子量、次高分子量及低分子量的标准蛋白试剂出售。

#### 五、实验安排及注意事项

(一) 第1课时完成基础知识的教学。教师需要用简单直观、通俗易懂的方式讲解凝胶色谱法和电泳的基本原理。教师可以根据学生的接受情况,适当增加一些相关知识的教学,加深对本课题的理解。第1课时还要学习缓冲溶液的配制。本课题所用的缓冲液是 20 mmol/L 的 pH 为 7.0 的磷酸缓冲液。

在 pH 为 5.8~8.0 的缓冲范围内,磷酸缓冲液的配制方法见下页表。配制前需要准备 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液和 0.2 mol/L 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液。 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液的配制方法: 将 71.64 g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  溶解在 1 000 mL 的蒸馏水中。 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液的配制方法: 将 31.21 g 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶解在 1 000 mL 的蒸馏水中。

| pH  | 0.2 mol/L<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL | 0.2 mol/L<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL | pH  | 0.2 mol/L<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /mL | 0.2 mol/L<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /mL |
|-----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 5.8 | 8.0                                               | 92.0                                              | 7.0 | 61.0                                              | 39.0                                              |
| 6.0 | 12.3                                              | 87.7                                              | 7.2 | 72.0                                              | 28.0                                              |
| 6.2 | 18.5                                              | 81.5                                              | 7.4 | 81.0                                              | 19.0                                              |
| 6.4 | 26.5                                              | 73.5                                              | 7.6 | 87.0                                              | 13.0                                              |
| 6.6 | 37.5                                              | 62.5                                              | 7.8 | 91.5                                              | 8.5                                               |
| 6.8 | 49.0                                              | 51.0                                              | 8.0 | 94.7                                              | 5.3                                               |

(二) 第2课时进行凝胶色谱柱的制备。教材中已经详细地介绍了凝胶色谱柱的制作, 教师可根据学生小组的数目, 课前准备好所需的材料。值得一提的是, 凝胶色谱柱直径的大小不影响分离的效果, 但是直径过大会造成洗脱液体积增大, 样品的稀释度过大, 因此应选择直径不超过2 cm的色谱柱。凝胶色谱柱的高度与分离度有关, 一般不超过1 m。在装填凝胶前, 一定要按教材描述的方法将凝胶充分溶胀, 溶胀时可以用蒸馏水, 也可以用洗脱缓冲液。如果发现凝胶的表面不平, 可以用玻璃棒将表面的凝胶轻轻搅起, 让其自然沉淀至表面平整。凝胶装填完毕一定要充分洗涤平衡, 可以平衡过夜, 但切记不得发生洗脱液流干、露出凝胶颗粒的现象, 否则凝胶色谱柱需要重新装填。

(三) 第3课时进行样品的处理。教师可以在课前从学校附近的屠宰场索取新鲜的猪血, 切记要在采血容器中预先加入抗凝血剂柠檬酸钠。取血回来后, 马上进行离心。血红蛋白溶液在透析袋中可以透析过夜。建议教师第2课时和第3课时在同一天进行, 这样可使凝胶色谱柱的平衡和血红蛋白溶液的透析同时进行。

(四) 第4课时进行血红蛋白的提取。此步骤是本课题的关键, 每一步操作都要按照教科书的要求进行。加样前可以在样品中加入质量分数为1%的葡萄糖或蔗糖(糖不会干扰分离效果), 以调节样品的比重, 使之稍大于洗脱液, 从而缩短加样时间。如果样品出现浑浊、有沉淀, 可以离心或过滤后再加样。在实验过程中, 洗脱液的流速也是影响分离效果的重要因素之一, 因此, 洗脱时应维持流速的恒定, 即维持洗脱液加在色谱

柱上的压力恒定。有条件的学校, 可以在洗脱液瓶与凝胶色谱柱之间加一个蠕动泵来控制洗脱液的流速, 以保持恒定。

(五) 由于血红蛋白呈现红色, 因此分离过程中能够观察到一条红色的带向下移动的现象, 实验结果也一目了然。收集到红色的流出液就可以确定提取到了血红蛋白。有条件的学校, 可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法鉴定血红蛋白的纯度。具体操作参见本课题参考资料。

(六) 实验结果如果不理想, 需要重做时, 必须进行凝胶色谱柱的再生。一般情况下, 凝胶不会与其他溶质发生任何作用, 因此, 在一次分离以后, 稍加平衡就可以进行下一次的实验。平衡时, 需用3倍柱体积的洗脱液过柱。如果实验操作中有一些杂质污染了色谱柱, 可以用物质的量浓度为0.2 mol/L的氢氧化钠和物质的量浓度为0.5 mol/L的氯化钠混合液处理交联葡聚糖凝胶。如果凝胶长期不用, 可以加入质量分数为0.02%的叠氮化钠、0.01%的三氯丁醇和物质的量浓度为0.1 mol/L的氢氧化钠等抑菌剂低温保存, 使用时再进行充分的平衡。

## 六、课题成果评价

### (一) 是否完成对血液样品的处理

观察你处理的血液样品离心后是否分层(见教科书图5-18), 如果分层不明显, 可能是洗涤次数少、未能除去血浆蛋白的原因。此外, 离心速度过高和时间过长, 会使白细胞和淋巴细胞一同沉淀, 也得不到纯净的红细胞, 影响后续血红蛋白的提取纯度。

### (二) 凝胶色谱柱的装填是否成功

由于凝胶是一种半透明的介质,因此可以在凝胶柱旁放一支与凝胶柱垂直的日光灯,检查凝胶是否装填得均匀。此外,还可以加入大分子的有色物质,例如蓝色葡聚糖-2 000或红色葡聚糖,观察色带移动的情况。如果色带均匀、狭窄、平整,说明凝胶色谱柱的性能良好。如果色谱柱出现纹路或是气泡,轻轻敲打柱体以消除气泡,消除不了时要重新装柱。

### (三) 血红蛋白的分离是否成功

如果凝胶色谱柱装填得很成功、分离操作也正确的话,能清楚地看到血红蛋白的红色区带均匀、狭窄、平整,随着洗脱液缓慢流出;如果红色区带歪曲、散乱、变宽,说明分离的效果不好,这与凝胶色谱柱的装填有关。

## 七、答案和提示

### (一) 旁栏思考题

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?

答:凝胶实际上是一些微小的多孔球体,小球体内部有许多贯穿的通道。相对分子质量较大的蛋白质分子不能进入凝胶颗粒内部,只能分布在颗粒之间,通过的路程较短,移动速度较快;相对分子质量较小的蛋白质分子比较容易进入凝胶内的通道,通过的路程较长,移动速度较慢。因此,样品中相对分子质量较大的蛋白质先流出,相对分子质量中等的分子后流出,相对分子质量最小的分子最后流出,从而使各种相对分子质量不同的分子得以分离。如果凝胶装填得不够紧密、均匀,就会在色谱柱内形成无效的空隙,使本该进入凝胶内部的样品分子从这些空隙中通过,扰乱洗脱液的流动次序,影响分离的效果。

### (二) 练习

1. 答:凝胶色谱法也称为分配色谱法,它是根据分子量大小分离蛋白质的方法之一。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,小球体内部有许多贯穿的通道,当一个含有各种分子的样品溶液缓慢流经时,各分子在色谱柱内进行两种不同

的运动,即垂直向下的运动和无规则的扩散运动。相对分子质量较大的蛋白质分子不能进入凝胶颗粒内部,只能分布在颗粒之间,通过的路程较短,移动速度较快;相对分子质量较小的蛋白质分子比较容易进入凝胶内的通道,通过的路程较长,移动速度较慢。因此,样品中相对分子质量较大的蛋白质先流出,相对分子质量中等的分子后流出,相对分子质量最小的分子最后流出,这种现象又叫分子筛现象。此外,凝胶本身具有三维网状结构,相对分子质量大的分子通过这种网状结构上的空隙时阻力大,而相对分子质量小的分子通过时阻力小,因此不同分子量的蛋白质分子可以获得分离。

2. 答:在一定范围内,能对抗外来少量强酸、强碱或稍加稀释不引起溶液pH发生明显变化的作用叫做缓冲作用,具有缓冲作用的溶液叫做缓冲溶液。缓冲溶液通常是由一或两种化合物(缓冲剂)溶解于水中制得的,调节缓冲剂的配比就可制得不同pH范围的缓冲液。

缓冲溶液的作用是维持反应体系的pH不变。在生物体内进行的各种生物化学过程都是在精确的pH下进行的,受到氢离子浓度的严格调控。为了在实验室条件下准确地模拟生物体内的天然环境,就必须保持体外生物化学反应过程有与体内过程完全相同的pH。

3. 答: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、蛋白质、核酸等都具有可解离基团,它们在某个特定的pH下会带上正电或负电;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极方向移动。电泳技术就是在电场的作用下,利用待分离样品中各种分子带电性质以及分子本身大小、形状等性质的差异,使带电分子产生不同的迁移速度,从而达到对样品进行分离、鉴定或提纯的目的。

4. 答:血红蛋白提取和分离的程序可分为四大步,包括:样品处理、粗分离、纯化和纯度鉴定。首先通过洗涤红细胞、血红蛋白的释放、离心等操作收集到血红蛋白溶液,即样品的处理;

再经过透析去除分子量较小的杂质,即样品的粗分离;然后通过凝胶色谱法将相对分子质量大的杂质蛋白除去,即样品的纯化;最后经聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度鉴定。

5. 答:血红蛋白是有色蛋白,因此在凝胶色谱分离时可以通过观察颜色来判断什么时候应该收集洗脱液。这使血红蛋白的分离过程非常直观,大大简化了实验操作。

## 八、参考资料

### 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定血红蛋白纯度

#### 1. 试剂的配制

(1) 丙烯酰胺和 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 用去离子水配制 29% (29 g/100 mL, 下同) 的丙烯酰胺和 1% 的 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的贮存液。由于丙烯酰胺和双丙烯酰胺在贮存过程中会分别缓慢转变为丙烯酸和双丙烯酸,这一反应是由光或碱催化的。因此在每次使用前,应核实溶液的 pH 不超过 7.0;并且应将配制好的溶液置于棕色瓶中,室温贮存,每隔几个月须重新配制。

(2) SDS 用去离子水配成 10% 的贮存液,于室温保存。

(3) 用于制备分离胶和浓缩胶的 Tris 缓冲液 1.5 mol/L、pH 8.8 的 Tris 缓冲液(分离胶缓冲液);1 mol/L、pH 6.8 的 Tris 缓冲液(浓缩胶缓冲液)。

(4) TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺) TEMED 通过催化过硫酸铵形成自由基而加速丙烯酰胺与双丙烯酰胺的聚合。

(5) 过硫酸铵 用去离子水配制 10% 的过硫酸铵溶液。过硫酸铵提供驱动丙烯酰胺和双丙烯酰胺聚合所必需的自由基。此溶液须配制新鲜液。

(6) Tris-甘氨酸电泳缓冲液 25 mmol/L Tris, 250 mmol/L 甘氨酸 (pH 8.3), 0.1% 的 SDS。

(7) 样品处理液 50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 100 mmol/L DTT (巯基苏糖醇) 或用 5% 的巯基乙醇, 2% 的 SDS, 0.1% 的溴酚蓝, 10% 的甘油。

(8) 染色液 0.1% 的考马斯亮蓝 R250, 40% 的甲醇, 10% 的冰醋酸。

(9) 脱色液 10% 的甲醇和 10% 的冰醋酸。

由于制备凝胶的丙烯酰胺和双丙烯酰胺具有很强的神经毒性,并且容易被皮肤吸收,因此操作必须在通风橱内或通风处进行。TEMED 和过硫酸铵对黏膜和上呼吸道组织、眼睛、皮肤等有很大的破坏作用,吞服可致命。因此在进行电泳操作时一定要按照实验要求和步骤,在老师的指导下完成。操作时要戴好一次性手套。

#### 2. 电泳

(1) 根据厂家说明书安装电泳用的玻璃板。

(2) 配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶溶液。用去离子水 4.6 mL, 30% 的丙烯酰胺 2.7 mL, 1.5 mol/L、pH 8.8 的 Tris 缓冲液 2.5 mL, 10% 的 SDS 0.1 mL, 10% 的过硫酸铵 0.1 mL, TEMED 0.006 mL, 混合均匀,迅速灌注在两玻璃板的间隙中间,要留出灌注浓缩胶所需空间(梳子的齿长再加 0.5 cm),再在胶液面上小心注入一层水(高 2~3 mm),以阻止氧气进入凝胶溶液。

(3) 分离胶聚合完全后(约 30 min),倾出覆盖水层,再用滤纸吸净残留水。

(4) 配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳浓缩胶溶液。用去离子水 2.7 mL, 30% 的丙烯酰胺 0.67 mL, 1.0 mol/L、pH 6.8 的 Tris 缓冲液 0.5 mL, 10% 的 SDS 0.041 mL, 10% 的过硫酸铵 0.04 mL, TEMED 0.004 mL, 混合均匀,直接灌注在聚合的分离胶上,并立即在浓缩胶溶液中插入干净的梳子。整个操作过程应注意避免气泡的产生。然后再补加浓缩胶溶液,使其充满梳子之间的空隙,将凝胶垂直放置于室温下聚合。

(5) 在等待浓缩胶聚合时,可对样品进行处理。在电泳样品中按 1:1 体积比加入样品处理液,在 100 °C 温度下加热 3 min,以使蛋白质变性。

(6) 浓缩胶聚合完全后(约 30 min),小心移出梳子。把凝胶固定于电泳装置上,上下槽各加入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液。必须设法排出凝胶底

部两玻璃板之间的气泡。

(7) 按顺序加样, 加样量通常为  $10\sim 25\ \mu\text{L}$ 。样品可以多加几个, 例如, 血浆样品红细胞破碎后 (即进行凝胶色谱分离之前) 的样品和凝胶色谱分离之后的样品。

(8) 将电泳装置与电源相接, 凝胶上所加电压为  $8\ \text{V}/\text{cm}$ 。当染料前沿进入分离胶后, 把电压提高到  $15\ \text{V}/\text{cm}$ , 继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部上方约  $1\ \text{cm}$  处, 关闭电源。

(9) 从电泳装置上卸下玻璃板, 用刮刀撬开

玻璃板。将紧靠最左边一孔 (第一槽) 凝胶下部切去一角, 以标注凝胶的方位。

(10) 将电泳凝胶片放在考马斯亮蓝染色液中染色  $1\sim 2\ \text{h}$ 。换脱色液脱色  $3\sim 10\ \text{h}$ , 其间需多次更换脱色液至背景清楚。脱色后, 可将凝胶浸于水中, 长期封装在塑料袋内使其不会降低染色强度。为保存永久性记录, 可对凝胶进行拍照, 或将凝胶干燥成胶片。通过本实验的电泳图谱, 可以看见提取的血红蛋白的纯度并不是很高。

人教版®

## 植物有效成分的提取

植物有效成分的提取，是一个专门的研究领域，涉及的技术十分广泛。本专题的两个课题涵盖了提取植物有效成分的三种最基本的技术：蒸馏、压榨和萃取。实践这些技术，不仅能够加深学生对植物有效成分的认识、增进对实验原理的理解，而且能够锻炼学生设计和安装实验装置的能力。

### 专题分析

#### 一、教学目的要求

本专题中两个课题均依照课程标准中的具体内容标准编排，其对应关系如下表。

| 具体内容标准           | 对应课题    |
|------------------|---------|
| 研究从生物材料中提取某些特定成分 | 课题1、课题2 |

在本专题的学习中，学生应当学会设计简易的实验装置，应当了解提取植物有效成分的基本原理和方法，并学习摸索提取有效成分的最佳条件。

#### 二、技术要项

本专题围绕植物有效成分的提取展开，主要操作技术归纳如下。

1. 蒸馏法。
2. 压榨法。
3. 萃取法。

#### 三、设备条件

在本专题中，玫瑰精油和胡萝卜素的提取都需要用到蒸馏装置，其中胡萝卜素的提取还需要冷凝回流装置。如果没有现成的仪器用具，可以根据实验原理，自己设计简易的装置。橘皮精油的提取需要家用搅拌机或自制的手动压榨装置。

#### 四、教学安排

本专题的两个课题相对独立，没有严格的先后顺序。在课题1中，学生可以从“玫瑰精油的提取”和“橘皮精油的提取”中选做1个。做橘皮精油的提取，教师需要事先准备好橘皮，洗净后摊开晾干。做玫瑰精油的提取，教师最好能通过预实验摸索蒸馏装置的使用方法。如果课时紧张，教师可以在实验前一天完成橘皮的浸泡和清洗，再由学生完成后续步骤。课题2需要用到冷凝回流装置和蒸馏装置，教师需要事先熟悉这两种装置的安装、拆卸和使用。如果课时紧张，教师可以事先将胡萝卜粉碎、干燥，学生在课堂上就可以直接进入萃取步骤的操作。

### 课题1 植物芳香油的提取

#### 一、课题目标

本课题通过设计简易的实验装置来提取植物芳香油，使学生了解提取植物芳香油的基本原理，

研究从生物材料中提取特定成分的方法，初步学会某些植物芳香油的提取技术。

## 二、课题重点与难点

课题重点：植物芳香油的提取技术；针对原料的不同特点，采用适宜的提取方法。

课题难点：植物芳香油的提取技术；针对原料的不同特点，采用适宜的提取方法。

## 三、课题背景分析

课题背景从古代人类将芳香植物或花卉制成干品，当作药物和香料使用谈起，引入到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，反映了社会生活的需要对科学技术的推动。随着有机化学的发展，人造香料日益普及，但人们对天然植物芳香油仍情有独钟，它一方面说明了科学技术的发展赋予了人类更多的自由，同时也反映了人造物依旧很难取代自然产物的事实。在充分体现了植物芳香油与人类社会生产生活的紧密联系后，教材说明了本课题的目标：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。教师在教学中可充分利用上述素材，对学生进行生动的科学、技术、社会的教育，并激发学生动手实践的兴趣。

## 四、基础知识分析与教学建议

### （一）植物芳香油的来源

知识要点：1. 植物芳香油的来源和发展历史；  
2. 植物芳香油的主要化学成分。

教学建议：教师在介绍植物芳香油的来源时，宜结合教材提供的旁栏资料进行讲解，让学生对植物芳香油的广泛来源有一个初步的了解。教师还可以采取学生查阅资料 and 介绍相关的小故事等方式，使学生大致了解植物芳香油的发展历史。

### （二）植物芳香油的提取方法

知识要点：提取植物芳香油的三种基本方法：蒸馏、压榨和萃取。

教学建议：教师可以通过列举日常生活中的一些具体事例，帮助学生熟悉提取植物芳香油的三种基本方法，并理解其原理。例如，实验室制备蒸馏水就用到了蒸馏的方法；超市出售的手动榨汁器，其原理与教材介绍的压榨法是类似的；

等等。此外，教师还应引导学生分析这三种方法的优点与不足，让学生尝试根据不同的原料，选用适宜的提取方法。

## 五、实验案例

### 案例一 玫瑰精油的提取

5月上、中旬是玫瑰的盛开期，最好是选用当天采摘的鲜玫瑰花。将花瓣用清水冲洗，去掉上面的灰尘等杂质，沥干水分。由于玫瑰精油化学性质稳定，从玫瑰花中提取玫瑰精油可采取水中蒸馏法。本实验的具体操作步骤如下。

1. 称取 50 g 玫瑰花瓣，放入容量为 500 mL 的圆底烧瓶中，加入 200 mL 蒸馏水。按教科书图 6-2 所示安装蒸馏装置。蒸馏装置包括：铁架台两个、酒精灯、石棉网、蒸馏瓶、橡胶塞、蒸馏头、温度计、直型冷凝管、接液管、锥形瓶，以及连接进水口和出水口的橡皮管。所有仪器必须事先干燥，保证无水。整套蒸馏装置可分为左、中、右三部分，其中左边的部分通过加热进行蒸馏，中部将蒸馏物冷凝，右边的部分用来接收。安装仪器一般都按照自下而上、从左到右的顺序。拆卸仪器的顺序与安装时相反。具体安装顺序和方法如下。

（1）固定热源——酒精灯。

（2）固定蒸馏瓶，使其离热源的距离如教科书中图 6-2 所示，并且保持蒸馏瓶轴心与铁架台的水平面垂直。

（3）安装蒸馏头，使蒸馏头的横截面与铁架台平行。

（4）连接冷凝管。保证上端出水口向上，通过橡皮管与水池相连；下端进水口向下，通过橡皮管与水龙头相连。

（5）连接接液管（或称尾接管）。

（6）将接收瓶瓶口对准尾接管的出口。常压蒸馏一般用锥形瓶而不用烧杯作接受器，接收瓶应在实验前称重，并做好记录。

（7）将温度计固定在蒸馏头上，使温度计水银球的上限与蒸馏头侧管的下限处在同一水平线上。

2. 蒸馏装置安装完毕后,可以在蒸馏瓶中加入几粒沸石,防止液体过度沸腾。打开水龙头,缓缓通入冷水,然后开始加热。加热时可以观察到,蒸馏瓶中的液体逐渐沸腾,水蒸气逐渐上升,温度计读数也略有上升。当蒸气的顶端达到温度计水银球部位时,温度计读数急剧上升。在整个蒸馏过程中,应保证温度计的水银球上常有因冷凝作用而形成的液滴。控制蒸馏的时间和速度,通常以每秒1~2滴为宜。蒸馏完毕,应先撤出热源,然后停止通水,最后拆卸蒸馏装置,拆卸的顺序与安装时相反。

3. 收集锥形瓶中的乳白色的乳浊液,向锥形瓶中加入质量浓度为0.1 g/mL的氯化钠溶液,使乳化液分层。然后将其倒入分液漏斗中,用分液漏斗将油层和水层完全分开。打开顶塞,再将活塞缓缓旋开,倒出上层的玫瑰精油,用接收瓶收集。向接收瓶中加入无水硫酸钠,吸去油层中含有的水分,放置过夜。

为了更好地将油、水两层液体分离,操作时应注意正确使用分液漏斗。分液漏斗的使用方法如下。

(1) 首先把活塞擦干,为活塞均匀涂上一层润滑脂,注意切勿将润滑脂涂得太厚或使润滑脂进入活塞孔中,以免污染萃取液。

(2) 塞好活塞后,把活塞旋转几圈,使润滑脂分布均匀。并用水检查分液漏斗的顶塞与活塞处是否渗漏,确认不漏水后再使用。

(3) 将分液漏斗放置在大小合适的、并已固定在铁架台上的铁圈中,关好活塞。将待分离的液体从上部开口处倒入漏斗中,塞紧顶塞,注意顶塞不能涂润滑脂。

(4) 取下分液漏斗,用右手手掌顶住漏斗顶塞并握住漏斗颈,左手握住漏斗活塞处,大拇指压紧活塞,将分液漏斗略倾斜,前后振荡(开始振荡时要慢)。

(5) 振荡后,使漏斗口仍保持原倾斜状态,左手仍握在漏斗活塞处,下部管口指向无人处,用拇指和食指旋开活塞,使其释放出漏斗内的蒸气或产生的气体,以使内外压力平衡,这一步操

作也称做“放气”。

(6) 重复上述操作,直至分液漏斗中只放出很少的气体时为止。再将分液漏斗剧烈振荡2~3 min,然后将漏斗放回铁圈中,待液体静置分层。

## 案例二 橘皮精油的提取

### 课前准备

在实验前一天,教师需要准备新鲜的、没有霉烂的橘皮,用量可根据实验人数来决定。用清水冲洗橘皮,去掉灰尘等杂质,沥干水分后,将橘皮摊放在干燥通风处。将晾干的橘皮浸泡在pH大于12、饱和的石灰水中,时间为16~24 h,中间翻动2~3次。浸泡好的橘皮呈黄色、无白芯、稍硬、脆而不断、具有弹性。这样的橘皮在压榨时不易打滑,橘油的喷射力强;压榨后的残渣呈颗粒状,残渣中的含水量低,黏稠度不太高,过滤时比较顺利,不易堵塞筛孔。

提取橘皮精油的具体步骤如下。

1. 将浸泡后的橘皮,用流动的水漂洗,洗净后捞起、沥干。切记一定要将橘皮彻底冲洗干净。然后将橘皮粉碎至3 mm大小,放入家用榨汁机或手动压榨机中粉碎。粉碎时加入相当于橘皮质量0.25%的 $\text{NaHCO}_3$ 和5%的硫酸钠,并调节pH为7~8。

2. 在榨出的油水混合液中加入明矾,使之沉淀并变澄清,然后用布袋过滤,除去糊状残渣。再将得到的混合物,用6 000~8 000 r/min的转速进行高速离心。在正常情况下,离心后获得的香精油将是澄清透明的。

3. 分离出的香精油往往带有少量水分和蜡质等杂质,为了进一步除去杂质,可以将分离的产品放在5~10℃的冰箱中,静置5~7 d,让杂质与水下沉。然后用吸管吸出上层澄清的油层,再通过垫有滤纸或石棉纸的漏斗进行减压抽滤,得到黄色油状的橘皮精油。

## 六、课题成果评价

### (一) 是否提取出了植物精油

观察学生提取出的玫瑰精油或橘皮精油,从

颜色、气味等方面来评价所提取的精油的纯度和质量。从玫瑰花提取的芳香油是浅黄色至黄色的液体,并带有甜韵的玫瑰香;从橘皮提取的橘皮精油无色透明,具有诱人的橘香味。本课题只是对两种精油进行了初步的提取,其中仍然含有大量的杂质。

## (二) 出油率的计算

根据教科书提供的公式计算出油率。如果出油率高,说明实验方案设计合理;如果出油率低,教师可以帮助学生从实验方法的选择、实验过程的操作等各方面分析原因,改进后再作尝试。

## 七、答案和提示

### 练习

1. 答:植物芳香油一般都是由两三种芳香油混合调配而成的,其中的基底油常取自植物的种子或果实,比如胡桃油、甜杏油。基底油与其他芳香油调配在一起,能够加强功效。

从玫瑰花中提取出的玫瑰油称为“液体黄金”,是世界香料工业不可取代的原料,多用于制造高级香水等化妆品。提取出的玫瑰油不含有任何添加剂或化学原料,是纯天然的护肤品,具有极好的抗衰老和止痒作用,能够促进细胞再生、防止肌肤老化、平抚肌肤细纹,还具有使人放松、愉悦心情的功效。

杏仁油富含矿物质和维生素,是一种质地轻柔、高渗透性的保湿剂。

薰衣草精油取自薰衣草花,具有怡神、助睡眠、舒缓压力的作用,此外它还具有降压、止痛、促进细胞再生的功能,可以用于治疗烫伤和蚊虫叮咬、预防和改善脱发。

柠檬精油取自柠檬果皮,具有消除紧张、焦虑、振奋精神的作用,可用于治疗神经衰弱、关节炎,还具有促进血液循环、杀菌止痛、平衡油脂分泌、舒缓肌肤老化、滋养头发的功效。

茶树精油具有新鲜、强烈的药草香味,能改善毛孔阻塞,净化肌肤,抗感染,对治疗青春痘有奇效。它也能消除疲劳、缓解压力。

天竺葵精油能收敛皮肤,平衡、调理、润滑

中干性皮肤和敏感性皮肤,改善橘皮样表皮,还有助于恢复精力,平缓心情。

茉莉精油能防止肌肤老化,对中干性皮肤和敏感性皮肤具有良好的保湿和滋润作用,尤其对女性的妊娠纹和内分泌有独特的改善效果。

橙花精油具有清新的水果香味,不但能使人镇静,还能防止中干性肌肤的老化现象发生,给肌肤赋予青春活力,促进皮肤再生。

2. 建议:教师可以组织学生进行一次社会调查,并要求学生写出详细的调查报告。

## 八、参考资料

### 1. 植物芳香油的用途

植物芳香油是植物有效成分的提取液,其特点是有特殊的植物香味和分子结构。芳香油种类繁多,如玫瑰花油、玉兰树油、八角油、桂油、薄荷油等。目前已开发利用的植物芳香油有近百种。

芳香油是贵重的工业原料。食品工业,造酒工业、香水工业、制药工业都离不开芳香油。我国是芳香油出口大国,每年出口的桂油、八角油、樟油、玫瑰花油、薄荷油等,创汇超过数亿美元。植物芳香油散发出的芬芳气味,使人身心爽快,有助于消除疲劳,恢复精力;植物芳香油还可以不同程度地提高人体神经系统、内分泌系统的功能,帮助人体提高免疫力,具有保健、美容、治疗的作用。在今日崇尚回归自然、预防污染的风气下,人们对来自植物本体的芳香油越来越青睐。

### 2. 植物芳香油的来历

最早,人们是通过加工植物和动物体来获取香料的。古代贵妇人所用的化妆品,很多都加有芳香植物的粉末,但涂抹起来并不方便,芳香油比植物干品好用多了。14世纪,药剂师便开始尝试从芳香植物中蒸馏芳香油,用来治病。后来,芳香油的用途不断扩大,又被人们用作香皂和食品的香料添加剂。于是,人们栽培了大量芳香作物,建立了许多芳香油的加工作坊。目前风行全世界的芳香疗法也是以植物芳香油为中心载体的一类技术。

### 3. 提取植物芳香油的方法

植物芳香油具有较强的挥发性,还能随水蒸气蒸发,因此可以利用蒸馏法提取植物芳香油。法国香水业作为一种工业生产,最初就是通过蒸馏法来获得芳香油的。玫瑰油、薄荷油、肉桂油、薰衣草油、檀香油等主要由蒸馏法获得。后来,人们又利用压榨法和萃取法来提取芳香油。压榨法是利用机械压力榨出芳香油。橘子油、柠檬油、甜橙油等都是用压榨法制得的。萃取法的大致过程是,将新鲜的植物材料浸泡在低沸点的有机溶剂中,如乙醚、苯、石油醚等,几小时后,取出

残渣,蒸去溶剂,留下蜡质的膏状物。茉莉浸膏、桂花浸膏、白兰花浸膏、玳玳花浸膏等都是用萃取法制成的。除了上述方法以外,植物芳香油的提取还有吸香法、浸泡法。吸香法利用的是油脂可以吸附油剂的原理。所选用的脂肪要经过特别处理,以防止变质变臭。吸香法采用的脂肪一般都含有猪油和牛油的成分。浸泡法与吸香法类似,但改用液体的油脂而不是吸香法中用到的膏状油脂。浸泡法通常用来提炼树脂、树胶及花瓣中的芳香精油。

## 课题2 胡萝卜素的提取

### 一、课题目标

本课题通过从胡萝卜中提取胡萝卜素,了解有关胡萝卜素的基础知识和提取胡萝卜素的基本原理,初步学会胡萝卜素的提取技术和纸层析的操作方法,并初步了解有机溶剂的相关知识。

### 二、课题重点与难点

课题重点:胡萝卜素的提取,纸层析的操作。

课题难点:胡萝卜素的提取。

### 三、课题背景分析

课题背景不仅介绍了有关胡萝卜素的基础知识,而且提供了丰富的有关科学、技术、社会教育的素材。教师在引导学生了解胡萝卜素的化学结构和分类的基础上,要着重引导学生认识胡萝卜素在医药、食品加工等方面的广泛应用,以及胡萝卜素的提取在提高产品附加值方面所具有的重要经济意义,以激发学生的学习兴趣。值得注意的是,本课题只是对胡萝卜素进行粗提取,要获得某一类特定的胡萝卜素,还需要进一步的分离。

### 四、基础知识分析与教学建议

知识要点:1. 胡萝卜素的性状;2. 胡萝卜素

的提取方法。

教学建议:教师在介绍胡萝卜素的性状时,应该结合胡萝卜素的作用进行讲解,使学生充分理解提取胡萝卜素的原理。教师还可以补充一些资料,让学生了解胡萝卜素提取的各种方法。

### 五、实验案例

#### 胡萝卜素的提取

提取胡萝卜素的主要步骤如下。

1. 选取 500 g 新鲜的胡萝卜,用清水洗净,沥干、切碎,然后在 60~70 °C 的烘箱中烘干,时间约需 1~2 h,将干燥后的胡萝卜进一步粉碎过筛。注意胡萝卜的粉碎一定要彻底。

2. 将样品放入容量为 500 mL 圆底烧瓶中,加入 200 mL 石油醚混匀,按教科书中图 6-7 所示安装萃取回流装置,萃取 30 min,然后过滤萃取液,除去固体物质。

3. 按教科书中图 6-2 所示安装蒸馏装置,对萃取的样品进行浓缩。具体的操作步骤及注意事项见本专题课题 1 的案例 1。

4. 收集接受器中的样品,观察样品的颜色和气味,并通过纸层析进行鉴定。层析时注意选择干净的滤纸,为了防止操作时对滤纸的污染,应

尽量避免用手直接接触滤纸,可以带手套进行操作。点样时应注意点样斑点不能太大(直径应小于0.5 cm),如果用吹风机吹干,温度不宜过高,否则斑点会变黄。将点好样的滤纸卷成筒状,卷纸时注意滤纸的两边不能相互接触,避免因毛细管现象导致溶剂沿滤纸两边的移动加快,溶剂前沿不齐,影响结果。

## 六、课题成果评价

### (一) 确定提取胡萝卜素的最佳方案

在进行本实验时,教师可以将学生分组,每组可以采用不同的有机溶剂和时间进行萃取,比较各组的实验结果,确定提取胡萝卜素的最佳方案。

### (二) 是否出现对应的层析带

如果萃取样品中出现了和标准样品一样的层析带,说明提取胡萝卜素的实验成功。由于提取物中含有杂质,萃取样品的颜色可能比标准样品

的颜色浅,我们也可以通过颜色的比较,初步确定提取的胡萝卜素的量。

## 七、答案和提示

### (一) [资料一] 萃取剂的选择讨论题

1. 乙醇和丙酮能够用于胡萝卜素的萃取吗?为什么?

答:胡萝卜素可溶于乙醇和丙酮,但它们是水溶性有机溶剂,因萃取中能与水混溶而影响萃取效果,所以不用它们作萃取剂。

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?

答:在这五种有机溶剂中,石油醚的沸点最高,在加热萃取时不易挥发,所以石油醚最适宜用作萃取剂。

### (二) 练习

1. 答:列表分析如下。

| 提取方法   | 实验原理                      | 方法步骤                                  | 适用范围                            |
|--------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 水蒸气蒸馏  | 利用水蒸气将挥发性较强的芳香油携带出来       | 1. 水蒸气蒸馏<br>2. 分离油层<br>3. 除水过滤        | 适用于提取玫瑰油、薄荷油等挥发性强的芳香油           |
| 压榨法    | 通过机械加压,压榨出果皮中的芳香油         | 1. 石灰水浸泡、漂洗<br>2. 压榨、过滤、静置<br>3. 再次过滤 | 适用于柑橘、柠檬等易焦糊原料的提取               |
| 有机溶剂萃取 | 使芳香油溶解在有机溶剂中,蒸发溶剂后就可获得芳香油 | 1. 粉碎、干燥<br>2. 萃取、过滤<br>3. 浓缩         | 适用范围广,要求原料的颗粒要尽可能细小,能充分浸泡在有机溶液中 |

## 八、参考资料

### 1. $\beta$ -胡萝卜素的应用

1831年,瓦坎罗德(Wackenroder)从胡萝卜中分离到了胡萝卜素,但直到20世纪30年代,胡萝卜素的化学结构才得以确定。植物中的胡萝卜素经人体吸收后,可以在体内转变为有生理活性的维生素A。通常,我们把能在体内转变为维生素的物质称为维生素原,胡萝卜素就是维生素A原,其中起主要作用的是 $\beta$ -胡萝卜素。胡

萝卜素能够治疗因维生素A缺乏所引起的各种疾病。此外,胡萝卜素还能够有效清除体内的自由基,预防和修复细胞损伤,抑制DNA的氧化,预防癌症的发生。

$\beta$ -胡萝卜素还可以作为禽畜饲料添加剂,能提高鸡的产蛋率,还可以提高牛的生殖能力。 $\beta$ -胡萝卜素具有优良的着色性能,着色范围是黄色、橙红,着色能力强,色泽稳定均匀,能与K、Zn、Ca等元素并存而不变色,尤其适合添加在儿

童食品中。因此,被广泛作为食品、饮料及饲料的添加剂使用。 $\beta$ -胡萝卜素本身是脂溶性的,非常适合油性产品或蛋白质类产品的开发,如人造奶油、胶囊、鱼浆制品、素食产品、速食面、调理包,等等。因此, $\beta$ -胡萝卜素是联合国粮农组织和世界卫生组织食品添加剂联合委员会认可的无毒、有营养的食品添加剂。研究还表明,将抗氧化维生素涂抹在皮肤上,不仅能防止紫外线对皮肤的伤害,还能促进对已被伤害皮肤的修复,使皮肤保持弹性, $\beta$ -胡萝卜素因而也逐渐应用于化妆品等新兴市场。

## 2. 胡萝卜素的理化性质

胡萝卜素为紫红色或暗红色结晶粉末,稍有臭味,不溶于水和甘油,溶于石油醚,在橄榄油和苯中的溶解度为 0.1 g/100 mL,在氯仿中溶解度为 4.3 g/100 mL。胡萝卜素在弱碱条件下比较稳定,在酸中不稳定,在光照和含氧条件下也不稳定。胡萝卜素低浓度时为黄色,高浓度时为橙红色。重金属离子,特别是铁离子,可促使胡萝卜素褪色。除胡萝卜外,绿色蔬菜和黄玉米、小米等粮食中也含有一定量的胡萝卜素。

人教版®