配人教版普通高中生物教材

生 物 学 实 验 讲 义

（供少年班使用）

班级 _____

姓名 _____

西安交通大学生命科学与技术学院

目　　录

实验室规则

实验室安全及防护

实验一　生物体维持 pH 稳定的机制及 ABO 血型的测定 …… 1

实验二　细胞凋亡的诱导与形态学观察 …… 4

实验三　大学校园生态系统调查 …… 7

实验四　胰岛素与肾上腺素对血糖浓度的影响 …… 9

实验五　质粒 DNA 的提取 …… 10

实验六　质粒 DNA 的酶切 …… 13

实验七　PCR 技术扩增 DNA 片段 …… 14

实验八　琼脂糖凝胶电泳 …… 17

实验室规则

1．实验前必须认真预习实验内容，明确本次实验的目的和要求，掌握实验的基本原理，否则不能进行实验。

2．实验时应自觉遵守实验室纪律，保持室内安静，不能大声说笑和喧哗。

3．实验过程中要听从教师指导，认真按照实验步骤和操作规程进行实验。若想改进和设计新的实验方法，必须取得实验指导教师的同意。实验时应认真进行实验记录，实验完毕后应及时整理数据，按时交实验报告。

4．实验台面、试剂架、水池以及各种实验仪器内外都必须保持清洁整齐，药品用完后立即盖好瓶盖放回原处，严禁瓶盖及药勺混杂，切勿使药品洒落在实验台面上。

5．所用试剂和去离子水要注意节省，按实验实际需求使用。

6．配制的试剂和实验过程中的样品，尤其是保存在冰箱和冷室中的样品，必须贴上标签、写上品名、浓度和日期等。存放在冰箱中的易挥发溶液和酸性溶液，必须严密封口。

7．实验完毕后必须及时清洗各种仪器物品并放好，保持实验台面和实验柜内的整洁。毛刷用后必须立即挂好，各种实验用品不得丢弃在水池内。

8．使用贵重精密仪器应严格遵守操作规程。使用分光光度计时不得将溶液洒在仪器内外和地面上。使用高速冷冻离心机、PCR 仪等贵重仪器必须经过考核。仪器发生故障应立即报告实验指导教师，未经许可不得自己随意检修。

9．实验室内严禁吸烟、进食，严禁用嘴吸移液管。易燃液体不得接近明火和电炉。

10．严禁使用其他组的仪器，不得将器皿遗弃在实验台面上，损坏玻璃仪器要及时向指导教师报告，并自觉登记，学期结束时按规定进行处理。

11．每位学生要熟悉实验室内水、电闸的位置，注意节约用水，烘箱和电炉用毕必须立即断电，要严格遵守实验室安全用电规则和其他安全规则。

12．每次实验完毕，值日生要认真做好实验室的卫生值日工作。最后离开实验室的实验人员，必须检查并关好水、电、门、窗。

实验室安全及防护

一．预防火灾必须严格遵守以下操作规程

1．严禁在开口容器和密闭体系中用明火加热有机溶剂，只能使用水浴加热。

2．废有机溶剂不得倒入废物桶,应倒入回收瓶,以后再集中处理。

3．不得在烘箱内存放、干燥、烘烤有机物。

4．在有明火的实验台面上不允许放置开口的有机溶剂或倾倒有机溶剂。

二．灭火方法

1．容器中的易燃物着火时,需用灭火毯盖灭。

2．乙醇、丙酮等可溶于水的有机溶剂着火时可以用水灭火。汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时不能用水灭火,只能用灭火毯和砂土盖灭。

3，导线、电器和仪器着火时不能用水和二氧化碳灭火器灭火,应先切断电源,然后用 1211 灭火器(内装二氟一氯一溴甲烷)灭火。

4．个人衣服着火时,切勿慌张奔跑,以免风助火势,应迅速脱衣,用水龙头浇水灭火,火势过大时可就地卧倒打滚压灭火焰。

三．中　毒

实验室常见的化学致癌物有：石棉、砷化物、铬酸盐、溴化乙锭等。剧毒物质有：氟化物、砷化物、乙腈、甲醇、氯化氢、汞及其化合物等。中毒的原因主要是不慎吸入、误食或由皮肤渗入。

中毒的预防：

1．保护好眼睛最重要,使用有毒或有刺激性气体时,应在通风橱内进行。

2．用有毒物品时必须戴橡皮手套。

3．严禁用嘴吸移液管,严禁在实验室内饮水、进食、吸烟,禁止赤膊和穿拖鞋。

4．不要用乙醇等有机溶剂擦洗溅洒在皮肤上的药品。

四．外　伤

1．防止触电 ①不能用湿手接触电器。②仪器使用前要先检查外壳是否带电。⑥如遇有人触电要先切断电源再救人。

2．防止电器着火：①电炉、烘箱等电热设备不可过夜使用。②仪器长时间不用要拔下插头,并及时拉闸。

实验一　生物体维持 pH 稳定的机制及 ABO 血型的测定

（一）生物体维持 pH 稳定的机制

一、实验目的

通过比较自来水、缓冲液和生物材料在加入酸或碱后的 pH 变化，推测生物体是如何维持 pH 稳定的。

二、实验原理

本实验采用对比实验的方法，通过向自来水、缓冲液、生物材料中加入酸或碱溶液引起的 pH 不同变化，定性说明人体内液体环境与缓冲液相似而不同于自来水，从而说明生物体 pH 相对稳定的机制。

三、实验内容和步骤

1. 将 25mL 自来水倒入 50mL 烧杯中，用 pH 试纸测试起始的 pH 并记录。

2. 一次加一滴 0.1mol/L HCl，然后用玻棒搅匀，加入 5 滴后再测 pH。重复这一步骤直到加入 30 滴为止。将结果记入表中。

3. 充分冲洗烧杯，倒入 25mL 自来水，测试起始的 pH 并记录，如步骤 2，一滴一滴加入 0.1mol/L NaOH，测定并记录 pH。

4. 充分冲洗烧杯，用缓冲液代替自来水，重复步骤 2-3，记录结果。

5. 充分冲洗烧杯，用两种生物材料分别代替自来水，重复步骤 2-3，记录结果。

表 1 不同实验材料 pH 变化记录表

	加入 0.1mol/L HCl							**加入 0.1mol/L NaOH**						
	加入不同数量液滴后的 pH							加入不同数量液滴后的 pH						
	0	5	10	15	20	25	30	0	5	10	15	20	25	30
自来水														
缓冲液														
生物材料 1														
生物材料 2														

6. 根据所得数据，以酸或碱的滴数为横轴，以 pH 为纵轴，画出 pH 变化曲线。注意用不同颜色或线型区分四种材料。

四、实验准备

1. 器材：镊子，滴管，剪刀，50ml 玻璃烧杯，50ml 量筒，pH 试纸 1 套，玻棒，塑料烧杯。

2. 材料：鸡蛋，黄瓜。

3. 试剂：蒸馏水，pH＝7 磷酸缓冲液(主要成分为 Na_2HPO_4、KH_2PO_4、NaCl 和 KCl)，鸡蛋清稀释液，黄瓜匀浆，0.1mol/L HCl，0.1mol/L NaOH。

五、注意事项

1. 用滴管吸取液体的正确操作：用中指和无名指夹住玻璃部分以保持稳定，用拇指和食指挤压胶头以控制试剂的吸入或滴加量。加液时，不能伸入容器，更不能接触容器，垂直悬空于容器上方 0.5 cm 处。不能倒置，也不能平放于桌面上。滴加有毒或有腐蚀性的液体时，该滴管尖端允许接触试管内壁。如果滴瓶上配有滴管，则这个滴管是滴瓶专用，不能吸取其他液体。

2. 用玻棒混匀液体的正确操作：混匀液体时玻棒不能碰触烧杯的侧壁和杯底，在溶液中混匀。

3. pH 试纸的正确使用方法。

取一小块试纸在表面皿或玻璃片上，用洁净的玻璃棒蘸取待测液点滴于试纸的中部，观察变化稳定后的颜色，与标准比色卡比较来确定溶液的 PH 值。

注意：1）试纸不可直接伸入溶液。2）试纸不可接触试管口、瓶口等。3）测定溶液的 PH 值时，试纸不可事先用蒸馏水润湿，因为润湿试纸相当于稀释被检验的溶液，这会导致测量不准确。4）实验做完后，将试纸密封保存放好。

4. 更换试剂时注意及时清洗玻棒、烧杯、量筒等实验器材，以免各试剂间相互影响，测定结果不准确。

5. 盐酸和氢氧化钠有腐蚀性，注意避免与皮肤和眼睛接触，若不慎有洒落或溅出，要立即用水冲洗 15 分钟，并告诉老师。

思考题

根据实验结果，说出不同实验材料 pH 变化的特点。尝试对生物材料维持 pH 稳定的机制进行解释。

（二） ABO 血型的测定

一、实验目的

学会用玻片法测定 ABO 血型，根据测定结果确定血型。

二、实验原理

1．血型：

通常所说的血型就是红细胞的血型，是根据红细胞表面的抗原特异性确定的。已知人类的红细胞有 15 个主要血型系统，其中最主要的是 ABO 血型系统，其次是 Rh 血型系统。

2．ABO 血型系统：

人类 ABO 血型系统是根据红细胞膜上有无特异性抗原（凝集原）A 或 B 来划分的血液类型系统，将血型分为 A、B、AB 和 O 型四种。A、B 抗原的特异性取决于糖蛋白上所含的糖链。在人类的血液里含有凝集原（又称抗原）A、B 和凝集素（又称抗体）A、B。凝集原附着在红细胞表面，凝集素存在于血浆（或血清）中。同名的凝集原和凝集素相遇（如凝集原 A 和凝集素 A）会发生红细胞凝集现象（凝血反应）。所谓 A 型指红细胞膜上只存在 A 抗原，其血清中存在抗 B 抗体（凝集素），B 型指红细胞膜上只存在 B 抗原，其血清中存在抗 A 抗体,AB 型指红细胞膜上同时存在 A 和 B 抗原，其血清中没有抗 A 或抗 B 抗体，O 型则红细胞膜上没有 A 和 B 抗原，血清中同时存在抗 A 抗 B 抗体。

3．ABO 血型的鉴定：

血型鉴定可用红细胞凝集实验，通过正、反定型准确确定 ABO 血型。所谓正定型：即血清试验，用已知抗 A、抗 B 分型血清来确定红细胞上有无相应的 A 抗原和 B 抗原；所谓反定型：即细胞试验，是用已知 A 细胞和 B 细胞来测定血清中有无相应的抗 A 或抗 B 抗体。见表 1

三、实验内容和步骤

1. 将载玻片洗干净，擦干，不能留有水分，以防溶血；

2. 用记号笔标记好“抗 A”“抗 B”，在载玻片上滴上抗 A 血清、抗 B 血清。旁边放置两个消毒牙签；

3. 用酒精棉球消毒无名指，等酒精挥发后，用采血针采血，将血液分别滴入血清中，再用牙签混合，室温下静置 3~5 分钟，观察凝集现象。

表 2　ABO 血型正反定型结果

分型血清+受检者红细胞		受检者	受检者血清+试剂红细胞	
抗 A	抗 B	血型	A 细胞	B 细胞
＋	－	A	－	＋
－	＋	B	＋	－
－	－	O	＋	＋
＋	＋	AB	－	－

4. 结果确定：阴性，红细胞均匀分散分布；阳性，红细胞呈絮状物凝集。

5. 实验记录

表 3　ABO 血型鉴定结果

分型血清+受检者红细胞		受检者
抗 A	抗 B	血型

四、实验准备

1. 器材：一次性采血针、消毒牙签、酒精棉球、载玻片、记号笔。
2. 材料：手指末梢血。
3. 试剂：标准抗 A 血清、标准抗 B 血清。

五、注意事项

1. 采血时必须严格消毒，以防感染。
2. 混匀用的竹签（2 根)应专用，搅动血清时切不可使抗 A、抗 B 两种血清发生混合。

实验二 细胞凋亡的诱导与形态学观察

一、实验目的

1. 了解细胞凋亡的原理；
2. 掌握体外诱导细胞凋亡的方法；
3. 掌握用普通光学显微镜和荧光显微镜观察凋亡细胞的形态学变化，并根据观察结果判断凋亡的具体阶段；
4. 了解细胞凋亡的常用检测方法。

二、实验原理

细胞凋亡（apoptosis）是多细胞生物在发育过程中，一种由基因控制的主动的细胞生理性自杀行为。典型动物细胞的凋亡过程在形态学上分为三个阶段。

1. 凋亡的起始

细胞体积缩小，表面特化结构如微绒毛等消失，细胞膜依然完整，仍具有选择通透性；细胞质中，内质网肿胀、积液形成液泡，线粒体大体完整；细胞核内染色质固缩，凝集成新月状，沿核膜分布。

2. 凋亡小体的形成

核染色质片段化，与细胞器聚集在一起被内陷的细胞膜包裹，形成球形的结构，成为凋亡小体（apoptotic body）。

3. 吞噬

凋亡小体被临近吞噬细胞吞噬，在溶酶体中被消化分解。

整个凋亡过程中细胞膜保持完整，内容物不会泄露，因而不会引发炎症反应。由于细胞凋亡过程中细胞核变化明显、特征突出，因此细胞核染色质的形态改变常用作判定细胞凋亡进展的指标。

细胞凋亡可以发生在机体正常发育和生理病理等过程中，也可通过人工诱导产生。引起凋亡的因子可分为 3 大类：（1）物理因子，包括射线、较温和的温度刺激等；（2）化学因子，包括重金属离子、活性氧基团等；（3）生物因子，包括生物毒素、肿瘤坏死因子、抗肿瘤药物、DNA 和蛋白质抑制剂等。

VP-16（etoposide，依托泊苷）是干扰细胞周期的抗肿瘤药物，为 DNA 拓扑异构酶II的抑制剂，临床上用于治疗白血病、恶性淋巴癌、小细胞肺癌等多种癌症，可用于体外诱导细胞凋亡。

目前，细胞凋亡的检测常基于凋亡细胞的形态学变化和生物化学特征，常用的方法有：

1. 形态学观察：光镜、电镜、荧光显微镜、倒置相差显微镜；
2. DNA 琼脂糖凝胶电泳；
3. 流式细胞分析；
4. 凋亡细胞的原位末端标记（TUNEL)；
5. 细胞膜磷脂酰丝氨酸（PS）荧光显示等。

本实验使用的 Giemsa 染料是一种复合染料，含有天青和伊红，适用于多种细胞的

染色质（体）染色。故凋亡细胞染色质的特征变化可被显示。DAPI 为一种荧光染料，既可进入活细胞也可进入死细胞，特异性结合 DNA，从而反映凋亡细胞核的形态学变化，凋亡细胞核可见致密浓染颗粒或块状荧光。

三、实验步骤：

1. 细胞培养：

   人宫颈癌 Hela 细胞为贴壁生长细胞。

   培养条件：DMEM(H)+10%胎牛血清，37℃，5%CO_2

2. 诱导凋亡：

   细胞处于对数生长期时（细胞丰度 50%-60%），VP-16 处理（终浓度 0.1mmol/L）24 小时，等体积 DMSO 做对照。

3. Giemsa 染色：

   1) 取出细胞爬片，PBS 溶液晃洗细胞一次，室温晾干后甲醇固定 3-5min；
   2) 滴加 Giemsa 工作液染色 10-15min；
   3) 自来水冲洗后蒸馏水稍洗；
   4) 风干后在酒精灯上烘一下，二甲苯透明 2min，普通光学显微镜镜检。

4. DAPI 染色（选做）：

   1) 弃培养基，PBS 溶液晃洗细胞一次；
   2) 加入适量-20℃冰预冷的甲醇溶液，-20℃或室温固定 10min；
   3) 弃固定液，PBS 溶液晃洗细胞一次；
   4) 在载玻片上放一小条 parafilm 膜，膜上滴加 70μl DAPI 染液，将细胞爬片有细胞的一面朝下放置于染液上，避光染色 5-10min；
   5) PBS 溶液晃洗细胞 3 次；
   6) 荧光显微镜下观察。

四、实验准备

1. 器材：CO_2 培养箱、超净工作台、荧光显微镜、载玻片、细胞爬片、24 孔板、微量移液器、胶头滴管、镊子、玻璃皿，暗盒、parafilm 膜

2. 试剂

   1. 甲醇，Giemsa 染液，PBS，培养基，血清
   2. VP-16：实验前用 DMSO 新鲜配制成 100mmol/L 的储存液，4℃保存。

3. DAPI 染色液：双蒸水配置成 1mg/mL 的储存液，-20℃保存。使用时用 PBS 或双蒸水稀释为 1μg/mL。

3. 材料：肿瘤细胞

五、注意事项

1. DAPI 染色的关键在于染液用量与染色时间的把握，这两个参数可以根据具体情况调整，以达到最佳实验效果；
2. VP-16 为有毒物质，在实验中要注意安全使用，配置过程中佩戴口罩、手套，不要触及皮肤；
3. 染色时各步骤操作要轻，加液时不要直接冲击细胞，以免细胞脱落；
4. DAPI 染色结果应迅速观察，以免时间过长荧光淬灭。

思考题：

1. 细胞凋亡的生物学意义是什么？
2. 鉴定细胞凋亡的常用方法有哪些？

实验三　大学校园生态系统调查

一、实验原理

校园生态系统是城市生态系统的一个子系统，通过校园生态系统的调查分析，理解城市生态系统组成的复杂性及各生态各要素之间相互的影响和可协调性。通过对校园生态系统的各组成要素的调查情况来分析、反映校园生态系统的结构及各生态要素之间相互的影响，从而理解城市生态系统。

二、仪器和用具

校园总体规划图，工程测量尺，计算器、实地采集调查记录本等。

三、实验内容和方法

（一）调查内容

定调查提纲，按城市校园生态系统的组成列出如下调查提纲。

1.校园基本概况及自然要素：绿地（以绿地率统计标准），生活区（学生宿舍区、教工宿舍区、食堂、银行等），教学办公区，运动区（操场，体育馆等），湿地（湖面表面），其他（诸如道路、停车区等）。

(二)调查方法

1.本实验的完成需要学生分组进行，每 4-5 人一组，完成分项的实验调查，做出分项实验的分析结果，然后全班集体讨论完成总实验的分析和结果。

2.按上述的内容设计问题，包括校园概况（占地面积、校区组成）和各组成部分或主要组成成分。主要调查系统是否完善和运行良好。采用实况调查的方法调查校园内各自然要素的实际情况，实地调查校园的绿地面积、绿化植物数量种类多少，分析自然系统在保证校园整体生态系统中所承载的功能。

3.参考调查表

组成要素	面积
生活区	
教学办公区	
运动区	
绿地面积	
湿地	
其他	
总面积	
乔木数量	

附：区域地图，测量值，不同功能区的标识（这一部分非常重要）

四、结果统计与分析

1.你所测量的区域的绿化效果如何？认为主要原因是？（参考：全校区绿地率约为 38%，共有乔木植物 7840 株，平均密度为 13600 ind/km^2）

注意：附饼状图

计算乔木植物的密度

2.校园自然生态要素对校园生态系统的贡献作用有多大，表现在哪里？

五、结论与建议

对校园自然生态系统建设的评价与建议

注意：一组只交一份报告，实验报告模板见附件 1

实验四　胰岛素与肾上腺素对血糖浓度的影响

血糖正常浓度比较恒定，空腹血糖为 3.9～5.6mmol/L 这是维持各种生理活动所必需，血糖浓度的恒定是通过多方因素调节的，激素就是其中重要的一环，胰岛素能使血糖浓度下降，肾上腺素能使血糖浓度上升。本实验目的在于验证这两种激素对血糖浓度的调节作用。

一、实验目的

通过对实验家兔在激素注射前、后血糖浓度的测定，了解激素对血糖浓度的影响。

二、实验原理

胰岛素是胰岛 β 细胞分泌的一种蛋白类激素，是调节血糖水平的重要激素之一。它能增加肌细胞和脂肪细胞膜对葡萄糖的通透性，促进葡萄糖进入这些细胞，加速葡萄糖的氧化分解，促进糖原合成和转变成其它物质，从而降低血糖；而肾上腺素、胰高血糖素、生长激素和促肾上腺皮质激素等可以加速肝糖原的分解和其他物质转变成葡萄糖，故为升糖激素。

通过测定家兔注射胰岛素、肾上腺素前后血糖浓度的变化，了解胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的调节作用。

三、实验内容和步骤

1．取饥饿 12h 以上家兔一只，记录体重。

2．采血标本　将血糖试纸插入血糖仪，仪器显示后，用采血针刺破家兔边缘耳静脉，将血液浸满血糖试纸，记录空腹血糖浓度，20 分钟后再记录一次。

3．按家兔体重，皮下或腹腔注射胰岛素 1.2～1.5 单位/kg，记录注射时间，20/40/60min 后，用同样方法取血，记录血糖浓度。

4．按家兔体重，皮下或腹腔注射肾上腺素 0.3～0.4mg/kg，记录注射时间，20/40/60min min 后，用同样方法取血，记录血糖浓度。

四、实验准备

1.仪器：血糖仪，采血针，注射器（1ml）。

2.试剂：胰岛素注射液，肾上腺素注射液，50%葡萄糖，医用脱脂棉。

五、注意事项

家兔饥饿后再注射胰岛素，可能使血糖过低引起痉挛，发生胰岛素性休克，因此取血

后，宜向家兔皮下注射 40%葡萄糖溶液 10ml。

六、思考题

1．胰岛素和肾上腺素调节血糖的机制是什么？

2．实验前为什么预先使家兔饥饿？

实验五 质粒 DNA 的提取

一、实验目的

1.初步学会用碱裂解法提取质粒 DNA。

2.复习 DNA 重组技术基本工具—质粒的概念和特性。

二、实验原理

细菌质粒是存在于细菌染色体之外，能够独立复制的环状双链 DNA。

质粒 DNA 小量制备是基因工程操作中的常用技术，提取的质粒可用于酶切、连接与转化等。目前常用的分离质粒 DNA 的方法是碱裂解法。碱裂解法抽提质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而达到分离的目的。在 pH 高达 12.6 的条件下，染色体 DNA 的氢键断裂，双螺旋结构解开变性。质粒 DNA 的大部分氢键也断裂，但它的超螺旋共价闭合环状的两条互补链不会完全分离，当以 pH4.8 的醋酸钾高盐缓冲液调其 pH 至中性时，变性的质粒 DNA 又恢复原来的构型，存在于溶液中。而染色体 DNA 不能复性而形成缠连的网状结构，通过离心，染色体 DNA 与不稳定的大分子 RNA、蛋白-SDS 复合物等一起沉淀而被除去。

再进一步用酚、氯仿使蛋白质变性去除蛋白杂质，用无水乙醇沉淀质粒 DNA，可得到纯化的质粒 DNA。

三、实验内容和步骤

挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中（含 amp）（3.5mL/管）

↓放入 37℃振荡培养箱内培养过夜

取 1mL 菌液倒入 1.5mL 离心管中，4000rpm 离心 30s（沉淀菌体）

↓可在原管中重复 1 次

倒掉上清扣干，加入 solution I 100uL

↓剧烈振荡打散菌体

加入新制备的 solution II 200uL，混匀室温放置 3-5min

↓

加入 solution III 150uL, 立即混匀室温放置 5min

↓离心 10000 rpm，5min

小心将含有质粒的 DNA 上清液移至另一离心管中（以下需轻微操作）

↓

加入等体积酚：氯仿，轻微振荡，5000rpm，离心 30s

↓转移上清液至新离心管

加入 2 倍体积冰冷无水乙醇，轻轻混匀室温放置 5min

↓离心 10000rpm，5min

弃上清液，加入 70%乙醇洗涤沉淀，离心 10000rpm，2min

↓（液体尽量倒净并晾干）

加入灭菌 ddH_2O 40uL 溶解质粒，取 5uL 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

四、实验准备

1.仪器：高速离心机，震荡仪，电泳仪、水平电泳槽。

2.器材：40ml 离心管，1.5ml epp 管，epp 管架，微量移液器（1ml、200ul、10ul），PE 手套，枪头及枪头盒（1ml、200ul），吸水纸。

3.试剂：

1）氨苄青霉素：200ug/uL，分装小管；

2）LB 液体培养基：

胰蛋白胨 10g
酵母提取物 5g
NaCl 10g

加 ddH_2O 至 800ml，搅匀，完全溶解，NaOH 调 pH=7.4，加 ddH_2O 至总体积 1L，灭菌 20 分钟，4℃保存。

3）LB 固体培养基：

LB 液体培养基中加入琼脂 15g/L，灭菌 20min

冷却至 50℃时，加入抗生素，铺板，4℃保存。

4）SolutionI：

50mmol/L Glucose
25mmol/L Tris.Cl(pH 8.0)
10mmol/L EDTA(pH 8.0)

灭菌 20min，4℃保存。

5）SolutionII：（现用现配）

0.2mol/L NaOH
1%(w:v) SDS

无需灭菌，室温保存

6）Solution III：（200ml）

5M KAc 120ml（58.884gKAc+60ml ddH_2O）
冰醋酸 23ml
ddH_2O 57ml

灭菌 20min，4℃保存。

7）酚：氯仿（V:V=1:1）

8）70%乙醇，无水乙醇

9）灭菌双蒸水

10）琼脂糖凝胶

11）6×loading buffer

4.材料：质粒 pUC19

五、注意事项

酚：氯仿为有毒试剂，使用时注意安全。不小心溅到皮肤上时立即打肥皂清洗，若溅到眼睛里立即用清水冲洗。

六、结果分析

1. 此质粒浓度可以达到约 30-40ng/μl，如果你的浓度较低，可能原因有哪些？你的质粒纯度如何？请分析你的 A260/A280 结果。

实验六 质粒 DNA 的酶切

一、实验目的

1.学会用限制性核酸内切酶切割质粒 DNA。

2.复习 DNA 重组技术基本工具—限制性核酸内切酶的概念和特性。

二、实验原理

限制性内切酶来源于细菌和真菌，作用是识别双链 DNA 分子中特异核苷酸序列并进行切割。

限制性内切酶特异识别、结合并切断一般 DNA 序列被称为限制性酶切位点，绝大多数限制性酶切位点的序列长度为 4～6 个核苷酸，切断 DNA 的位点因酶而异。一些酶恰在对称轴处同时切割 DNA 双链产生平端 DNA 片段，另一些酶在对称轴两侧相对的位置上分别切断两条链，生成黏末端 DNA 片段。

三、实验内容和步骤

将提取的质粒（pUC19）35ul

↓

加入 10×H Buffer 5ul，EcoRI 2ul，双蒸水 10ul

↓（终体积为 50ul）

37℃水浴 2h，用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果。

四、实验准备

1.仪器：恒温水浴锅 2 台，电泳仪 2 个、水平电泳槽 4 套，制冰机。

2.器材：1.5ml epp 管，epp 管架，微量移液器（1ml、200ul、10ul），PE 手套，枪头及枪头盒（1ml、200ul），吸水纸。

3.试剂：

1）EcoRI：2 支；

2）灭菌双蒸水；

3）琼脂糖凝胶；

4）6×loading buffer。

4.材料：质粒 pUC19

五、注意事项

加酶时注意冰上操作。

六、结果分析

1. 质粒酶切是否完全？条带大小是否正确？为什么？

附：

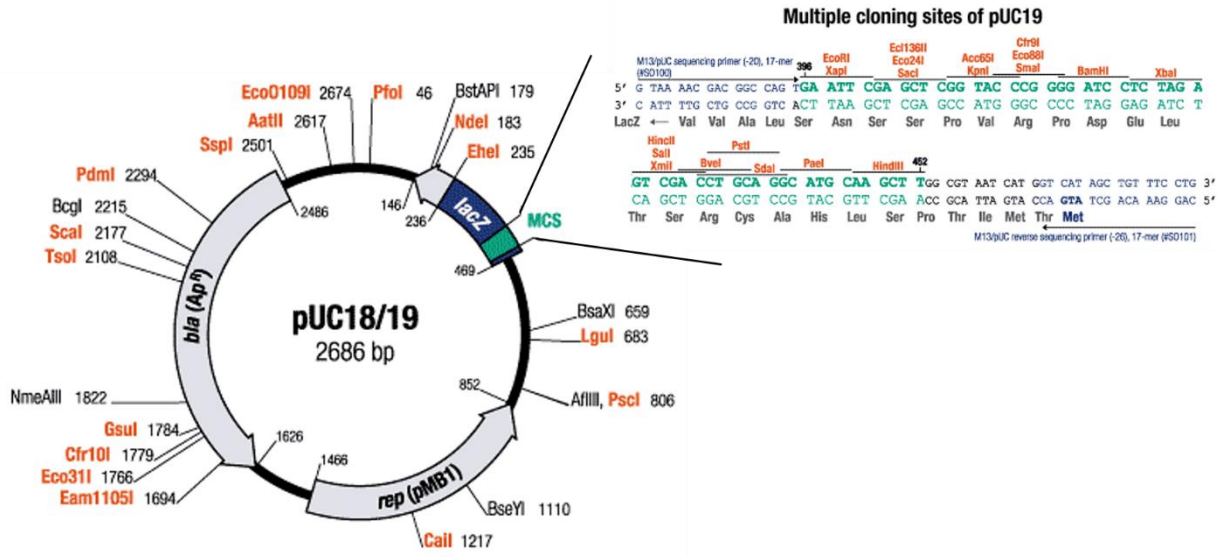


图 1　pUC18/19 载体图谱

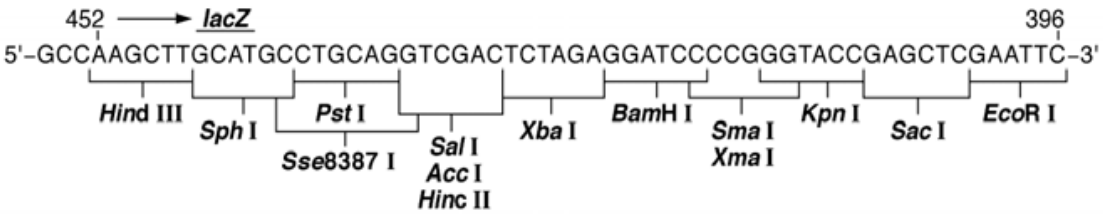


图 2　pUC19 多克隆位点图

实验七 PCR 技术扩增 DNA 片段

一、实验目的

1.学会用 PCR 技术从质粒 DNA 上扩增目的基因。

2.复习 PCR 技术基本原理及反应过程。

二、实验原理

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 序列测定等方面。

三、实验内容和步骤

在实验室中，做 PCR 通常使用微量离心管，它是一种薄壁塑料管，总容积有两种规格：0.2ml 和 0.5ml。具体操作时，用微量移液器按下表的配方在微量离心管中依次加入各组分，再参照后续的设置设计好 PCR 仪的循环程序就可以了。

试 剂（ul）	微量离心管
10×PCR buffer（含 Mg^{2+}）	5
dNTP(200μM)	4
上游引物(20μM)	0.5
上游引物(20μM)	0.5
Control Template	0.5
Taq(5u/μl)	0.25
灭菌双蒸水	39.25
总体积	50ul

按以下条件进行 PCR 反应：

【使用 Control Primer 1、2 时（扩增 6,012 bp DNA 片段）】

94°C	预变性	5 min	
94°C	变性	1 min	30 个循环
68°C	退火、延伸	4 min	
72°C	终延伸	5 min	

【使用 Control Primer 1、3 时（扩增 500 bp DNA 片段）】

94°C	预变性	5 min	
94°C	变性	30 sec	25 个循环
55°C	退火	30 sec	
72°C	延伸	30 sec	
72°C	终延伸	2 min	

反应结束后，5～10ul 反应液中加入 1/5 体积的 6×Loading buffer，进行 1%的琼脂糖凝胶电泳。

四、实验准备

1.仪器：恒温水浴锅 2 台，电泳仪 2 个、水平电泳槽 4 套，制冰机。

2.器材：1.5ml epp 管，epp 管架，微量移液器（1ml、200ul、10ul），PE 手套，枪头及枪头盒（1ml、200ul），吸水纸。

3.试剂：

1）PCR 扩增试剂盒：购自大连 Takara 生物工程有限公司

2）灭菌双蒸水；

3）琼脂糖凝胶；

4）6×loading buffer。

五、注意事项

加酶时注意冰上操作。

※附：

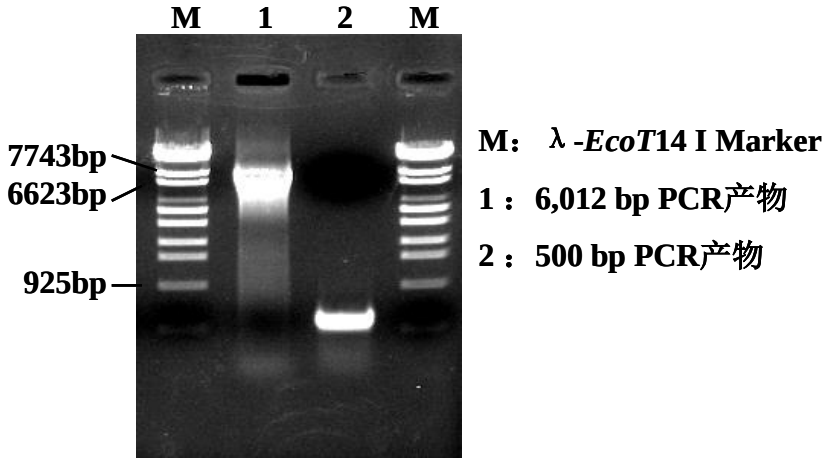


图 3 反应产物电泳结果示意图

六、结果分析

1．根据电泳结果预测，目的基因约为多少 bp？

2．1 个模板 DNA 分子，经过 25 个 PCR 循环之后，理论上可以得到多少个目的 DNA 片段？

3．分析电泳结果和实验过程中的具体操作。

实验八　琼脂糖凝胶电泳

一、实验目的

1. 掌握琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 的原理和方法。
2. 学习利用琼脂糖凝胶电泳方法测定 DNA 的片段大小。

二、实验原理

DNA 在碱性环境中（pH8.3）带负电荷，在外加电场作用下可以从负极向正极移动。不同的 DNA 片段由于其电荷、分子量大小以及构型的不同，在电泳时的泳动速率就不同，从而可以区分出不同的区带。

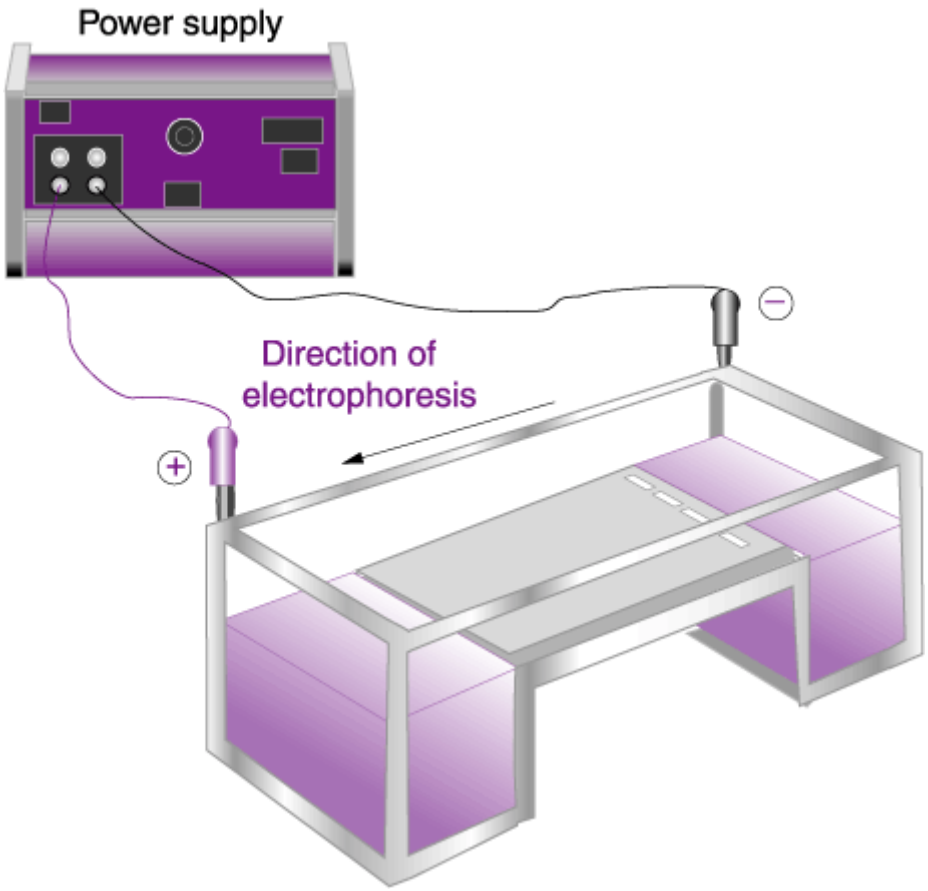


图 4　DNA 琼脂糖凝胶电泳装置示意图

DNA 在凝胶中的迁移距离（迁移率）与它的大小（分子量）的对数成反比。DNA 的相对分子量越小，迁移越快；相对分子量越大，迁移越慢。将未知 DNA 的迁移距离与已知分子大小的 DNA 标准物的电泳迁移距离进行比较，即可计算出未知 DNA 片段的大小（如图 5 所示）。

DNA 的构象对迁移速度也有一定的影响。向阳极迁移的速度，超螺旋闭环 DNA 大

于线状 DNA 大于开环双链 DNA。电压在一定的范围，线状 DNA 片段的迁移速率与所加的电压成正比。为了使分辨效果更好，凝胶上所加电压不应超过 5V/cm。电泳后经溴乙锭（Ethidium bromide，EB）染色，在波长 254nm 紫外灯照射下，DNA 显橙红色荧光。

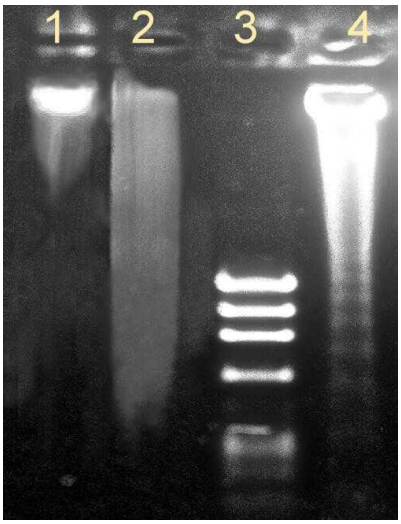


图 5　DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

三、样品、试剂与器材

1. 样品：

提取的质粒，酶切产物，PCR 产物，-20℃储存

2. 试剂：

电泳级琼脂糖，EB 替代物（贮存浓度 10mg/mL、使用浓度 0.5μg/mL），5×TBE（0.45M Tris，0.45M 硼酸，0.01M EDTA，pH8.3），10×点样缓冲液（0.42％溴酚蓝、0.42％二甲苯青 FF，67％蔗糖水溶液）（为减少污染， EB 替代物已经添加在琼脂糖凝胶中）。

3. 器材：

电泳仪，电泳槽，凝胶成像系统，移液枪，离心机，微波炉，电子天平，500ml 量筒，10ul 枪头，一次性手套，锥形瓶，铝箔，药匙。

四、操作步骤

1. 制备琼脂糖凝胶：

1) 琼脂糖凝胶的浓度为 1%，根据所需体积浓度称取一定量的琼脂糖于锥形瓶中（北京六一电泳设备厂的迷你型水平电泳槽，铺胶的胶板容积大约 30-40ml）。

2) 将 5×TBE 电泳缓冲液稀释成 0.5×，加入计算好体积的 0.5×TBE 电泳缓冲液于锥形瓶中，在锥形瓶口蒙上铝箔（加热容易丢失水分，注意用锡箔纸盖住锥形瓶口，防止溶液体积减少），微波炉加热使琼脂糖完全溶解，倒入制胶的塑料板中，塑料板预先要插好梳子，倒满为止（建议两组或三组一起配胶）。

3) 静置，待胶充分凝固后、拔出梳子备用。

2. 电泳：

1) 将制胶板连同凝胶一起放入电泳槽，加 0.5×TBE 电泳缓冲液浸没胶面 lmm 左右。**注意放置凝胶时应保证加样孔在电泳槽的负极端**。

2) 用移液枪吸取 20ul DNA 样品，混合 4-5μL 的点样缓冲液，混合均匀后打入凝胶的加样孔中。注意勿把不同的 DNA 样品混合，做好加样顺序记录。

3) 采用 1-5V/cm 的电压（长度以两个电极之间的距离计算），根据前沿指示剂溴酚蓝电泳至在凝胶的前缘时停止电泳。

3. 观察结果与分析：

电泳完毕后，佩戴一次性手套，用制胶板将凝胶取出，于凝胶成像系统紫外灯下观察电泳结果，拍照。

本次实验结果较多，请在实验报告中分析自己的实验结果，标注提取的质粒，酶切产物，PCR 产物。回答以下问题：

1) 你的 PCR 扩增的成功吗？如果不成功，有哪些因素可能会干扰 PCR 扩增？

2) 你的质粒酶切电泳条带完全吗？如果不全，请你分析原因。

五、本实验注意事项

1. 取出梳子之前，一定要耐心等待琼脂糖凝胶凝固。
2. 点样要细心，以免枪头刺破凝胶加样孔底部。
3. 电泳时，电极一定要连接正确。

六、思考题

1. 为什么 DNA 琼脂糖凝胶电泳可以使用 EB 染色？
2. 分析自己的电泳结果，有哪些因素会影响 DNA 电泳？

附件 1：实验报告模板——实验三 大学校园生态系统调查

西安交通大学实验报告

成绩	

课程： _____ 实验日期： 年 月 日

专业班号： _____

组号：____

组长：_____（学号：_____）

组员：_____（学号：_____），_____（学号：_____），_____（学号：_____），

_____（学号：_____），_____（学号：_____），_____（学号：_____）

成员分工：

1）

2）

3）

4）

5）

实验名称：

一、实验原理

校园生态系统是城市生态系统的一个子系统，通过校园生态系统的调查分析，理解城市生态系统组成的复杂性及各生态各要素之间相互的影响和可协调性。通过对校园生态系统的各组成要素的调查情况来分析、反映校园生态系统的结构及各生态要素之间相互的影响，从而理解城市生态系统。

二、仪器和用具

校园总体规划图，工程测量尺，计算器、实地采集调查记录本等。

三、实验内容和方法

（一）调查内容

定调查提纲，按城市校园生态系统的组成列出如下调查提纲。

校园基本概况及自然要素：绿地（以绿地率统计标准），生活区（学生宿舍区、教工宿舍区、食堂、银行等），教学办公区，运动区（操场，体育馆等），湿地（湖面表面），其他（诸如道路、停车区等）。

(二)调查方法

1.本实验的完成需要学生分组进行，每 6 人一组，完成各自分配区域的实验调查，做出实验的分析结果。

2.按上述的内容设计问题，包括校园概况（占地面积、校区组成）和各组成部分或主要组成成分。主要调查系统是否完善和运行良好。采用实况调查的方法调查校园内各自然要素的实际情况，实地调查校园的绿地面积、绿化植物数量种类多少，分析自然系统在保证校园整体生态系统中所承载的功能。

3.参考调查表

组成要素	面积
生活区	
教学办公区	
运动区	
绿地面积	
湿地	
其他	

总面积	
乔木数量	

后面结果需要附：区域地图，测量值，不同功能区的标识，比例尺，这一部分非常重要

要素	满意程度			不满意的原因
	很满意	一般满意	不满意	
绿化质量				
空气质量				
水体质量				
噪声环境质量				

四、结果统计与分析

1．你所测量的区域的调查表结果（附：表格测量数据），（附：区域地图，测量值，不同功能区的标识，比例尺，这一部分非常重要），（附：饼状图），（计算乔木植物的密度）。

2．调查结果统计表（填人数）（附饼状图，按百分比）

要求：调查对象数量≥300 人

要素	满意程度			不满意的原因
	很满意	一般满意	不满意	
绿化质量				
空气质量				
水体质量				
噪声环境质量				

3．你所测量的区域的绿化效果如何？认为主要原因是？（参考：去年统计结果为：全校区绿地率约为 38%，共有乔木植物 7840 株，平均密度为 13600 ind/km2）。

4．校园自然生态要素对校园生态系统的贡献作用有多大，表现在哪里？

五、结论与建议

对校园自然生态系统建设的评价与建议