

前 言

为对标新时代国家战略需求，落实科教兴国、人才强国、创新驱动发展战略，本校生物工程专业历经多年改革探索，围绕“区域性高水平应用型人才培养”定位，创新性构建了“三维进阶”实验教学体系。该体系以“基础夯基、综合提质、创新突破”的分层递进模式，实现了实验教学与学生阶梯式成长环节的有机衔接。

为完善阶梯化、系统化的实验教学育人架构，本校生物工程专业教研团队通过系统梳理核心能力培养要素、优化课程内容与教学资源，形成了以“生物工程实验指南”为核心的实验课程体系，并以此为基础构建了三大教学工程。一是筑基工程，聚焦基础技术能力培养，依托《生物工程实验指南——基本技术实验原理与实践》（2019年出版），通过标准化实验流程与规范化操作训练，筑牢学生专业基本功；二是融通工程，聚焦综合应用能力培养，依托《生物工程实验指南——综合实验原理与实践》（2021年出版），开展跨模块项目化教学，通过多技术联用与系统集成训练，培育学生解决复杂工程问题的综合素养；三是创新工程，聚焦创新能力培养，以本书，即《生物工程实验指南——创新实验设计原理与实践》为载体，构建“科研反哺+双创孵化+产教协同”的三维驱动机制，将教师纵向课题、学生双创项目、企业横向课题转化为开放性实验项目库，形成“真题真做、实岗实练”的教学特色。

本书创新探索了“四维融合”培养路径。一是科教融汇，将科研项目转化为创新实验案例库，实现科研平台与教学资源的双向贯通；二是产教协同，联合国内生物工程龙头企业共建“项目工场”，将行业技术标准转化为教学评价指标；三是赛教互促，建立学科竞赛成果转化机制，形成“实验教学-双创训练-竞赛提升”的能力进阶通道；四是跨域整合，构建“生物+信息+工程”跨学科实验模块，对接合成生物学等新质生产力发展需求。通过系统性教学改革，形成“基础实验标准化、综合实验项目化、创新实验产业化”的特色育人模式，有效实现了学生从技术操作者到方案设计者再到创新引领者的能力跃升，为生物医药战略性新兴产业输送了具备工程实践能力和技术创新能力的复合型人才。

全书分科教融汇实验和产教融合实验两篇，共50个实验，第一篇为实验一至实验三十四，第二篇为实验三十五至实验五十。其中，实验一至实验四、实验十二、实验三十五由付明执笔，实验五由姚元枝执笔，实验六和实验七由黄小波执笔，实验八和实验九由黄荟执笔，实验十和实验十一由王登宇与邱小燕执笔，实

验十三至实验十六由李俊执笔，实验十七由刘圣林执笔，实验十八和实验十九由曾汉元执笔，实验二十和实验二十一由吴黎明执笔，实验二十二和实验二十三由梁娟执笔，实验二十四和实验二十五由李昌灵执笔，实验二十六至实验三十一由李洪波执笔，实验三十二和实验三十三由徐君飞与张居作执笔，实验三十四由邹娟执笔，实验三十六至实验四十五由瞿朝霞执笔，实验四十六由张海龙与邱小燕执笔，实验四十七由邱小燕执笔，实验四十八至实验五十由徐君飞与张居作执笔，全书由胡兴、李洪波和瞿朝霞负责统稿。本书在编写过程中得到了怀化学院民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室、湖南省“双一流”应用特色学科建设项目（生物工程）、湖南省一流专业（生物工程）和怀化学院教材出版基金的资助，在此一并表示衷心的感谢。由于作者水平有限，书中不足之处敬请读者批评指正。

编 者

2025 年 2 月于怀化学院

目 录

第一篇 科教融汇实验

实验一	大齿牛果藤总黄酮的提取	3
实验二	大齿牛果藤总黄酮的纯化	8
实验三	大齿牛果藤总黄酮的含量测定	13
实验四	大齿牛果藤总黄酮的抗氧化活性研究	19
实验五	接骨草熊果酸的提取	24
实验六	木姜叶柯甜茶苷的提取	28
实验七	木姜叶柯黄酮类化合物的提取	31
实验八	植物叶绿体 DNA 的提取	35
实验九	植物叶绿体基因组的组装和注释	40
实验十	皂荚植物胶的提取及其在鲜切果蔬中的应用	44
实验十一	仙人掌果红色素的提取及稳定性研究	49
实验十二	南瓜子油的萃取及理化性质分析	53
实验十三	中华倒刺鲃肾总 RNA 的提取	58
实验十四	反转录 PCR 扩增中华倒刺鲃 β -actin 基因	62
实验十五	中华倒刺鲃 <i>IRF7</i> 基因的 PCR 扩增及纯化	66
实验十六	外源基因与载体的连接	70
实验十七	IRES 序列介导 CircGFP 翻译的研究	73
实验十八	金线兰组培育苗研究	84
实验十九	草莓脱毒苗培养	89
实验二十	金背鲤原代肝细胞的分离和培养	94
实验二十一	重组质粒 pcDNA3.1-EGFP 构建与转染 HEK293T 细胞	99
实验二十二	不同供氮水平对天门冬生长和品质的影响	106
实验二十三	水分胁迫对七叶一枝花光合特性及有效成分皂苷含量的影响	111
实验二十四	茯苓多糖摇瓶发酵培养基的优化	116
实验二十五	茯苓多糖摇瓶发酵条件的优化	122
实验二十六	茯苓菌丝体总 RNA 的提取	127

实验二十七	茯苓 β -葡萄糖苷酶-1 基因的克隆	131
实验二十八	茯苓 β -葡萄糖苷酶-1 大肠杆菌表达条件的优化	135
实验二十九	可溶性茯苓 β -葡萄糖苷酶-1 的镍亲和纯化	140
实验三十	重组茯苓 β -葡萄糖苷酶-1 酶活的测定	145
实验三十一	重组茯苓 β -葡萄糖苷酶-1 底物特异性的薄层层析检测	149
实验三十二	降胆固醇乳酸菌 DC2 的筛选分离与应用	153
实验三十三	腐乳中产碱性蛋白酶菌株的筛选及诱变育种	159
实验三十四	水和饮料的细菌学检查	166

第二篇 产教融合实验

实验三十五	大齿牛果藤黄酮保肝解酒含片的研制	173
实验三十六	茯苓葡萄酒产品的研制	177
实验三十七	茯苓酸肉产品的研制	183
实验三十八	湘西风味酸鱼产品的研制	188
实验三十九	湘西风味香肠产品的研制	193
实验四十	风味酱油产品的研制	199
实验四十一	湘西风味腐乳产品的研制	205
实验四十二	湘西风味腊八豆产品的研制	210
实验四十三	果蔬酵素产品的研制	216
实验四十四	蓝莓枳椇醋产品的研制	221
实验四十五	小型啤酒生产线酿造木姜叶柯黄啤	226
实验四十六	木姜叶柯低糖酸奶的制作	231
实验四十七	秸秆发酵 TMR 的制作及感官评价	236
实验四十八	复合酶解制备豆渣可溶性膳食纤维	240
实验四十九	金花菌 JH-1 木姜叶柯发酵茶的制备	245
实验五十	霉豆渣的研制	250

第一篇 科教融汇实验

实验一 大齿牛果藤总黄酮的提取

一、实验背景与意义

大齿牛果藤 (*Nekemias grossedentata*) 为葡萄科牛果藤属植物，俗名显齿蛇葡萄，一般生长在海拔 200~1500 m 的沟谷林中或山坡灌木丛中，分布于湘、鄂、赣、粤、桂、黔等地区 (张佩玲等, 2025)。大齿牛果藤味甘、淡，性凉，能清热解毒，具有抑菌、抗氧化、降血压、降血糖、降血脂、保肝护肝、抗肿瘤等作用。

湖南地区将大齿牛果藤嫩叶制成茶叶，称为藤茶。2013 年 12 月 24 日，国家卫生健康委员会根据《中华人民共和国食品安全法》和《新食品原料安全性审查管理办法》有关规定，宣布大齿牛果藤叶为新食品原料，其正式成为药食两用植物，进一步吸引了学者开展深入研究，以充分挖掘其药用和食用价值，意义重大。

二、实验目的

在掌握超声波辅助提取法（或回流提取法）提取大齿牛果藤黄酮原理和操作方法的基础上，比较和评价超声波辅助法和回流提取法的提取效果与适用性，进而提出可提高提取效率和黄酮纯度的创新方法。

三、实验原理

植物光合作用所固定的碳约 2% 转变为黄酮类化合物，后者是自然界中酚类化合物的最大类别之一，是以 2-苯基色原酮 (flavone) 为基本母体的一大类天然化合物及其衍生物，广泛存在于植物活细胞内，根据结构可分为二氢黄酮醇、异黄酮、二氢异黄酮、查耳酮、橙酮、花色素等不同类型，是植物界广泛存在的还原性次生代谢组分 (Carneiro et al., 2021)。

大齿牛果藤中主要的黄酮类化合物为二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DMY)，化学名为 (2R,3R)-3,5,7-三羟基-2-(3,4,5-三羟基苯基) 苯并二氢吡喃-4-酮，白色针状结晶，分子式为 $C_{15}H_{12}O_8$ ，熔点 (mp) 为 245~246℃，在酸性至中性条件下稳定，易溶于热水、热乙醇、丙酮，溶于甲醇、乙醇，微溶于水、乙酸乙酯，难溶于氯仿、石油醚 (Gao et al., 2009)。

黄酮类化合物存在于细胞质内，采用合适的方法将细胞破坏可使有效成分从生物组织中溶出。天然有机化合物的提取方法有超声波辅助提取、回流提取、加热煮提、酶法提取、微波提取等。提取方法和溶剂可根据有效成分及共存杂质的性质来决定，需综合考虑提取溶剂的安全性、提取物的易得性、杂质的易分离性、对环境的污染小等方面。

1. 超声波辅助提取法

超声波辅助提取是利用超声波的机械效应、空化效应和热效应，通过增大介质分子的运动速度和介质的穿透力来提取生物的有效成分。超声波在传播过程中会产生一种辐射压强并沿声波方向传播，对物料有很强的破坏作用，可使细胞组织变形，同时赋予介质和悬浮体不同的加速度，且介质分子的运动速度远大于悬浮体分子，两者之间的摩擦导致生物分子解聚，从而使细胞内的有效成分更快溶解于溶剂中。此外，超声波是一种弹性波，振动时能产生强大能量，赋予质点很大的速度和加速度，使浸提剂和提取物不断振荡，有助于溶质扩散，加速植物的有效成分进入溶剂，增加有效成分的提取率。本方法具有简单快捷、提取率高、效果好等特点。

2. 回流提取法

回流提取法是用乙醇等易挥发性有机溶剂提取原料中的有效成分，即将挥发性有机溶剂反复加热蒸馏，冷却后又流回到浸提容器中浸提原料，周而复始，直至有效成分在有机溶剂回流过程中被提取完全。回流提取液在蒸发器中受热时间较长，故不适用于提取受热易破坏的原料成分。尽管本方法提取效率较冷渗法高，但因溶剂消耗量大，操作烦琐，且不适用于提取受热易破坏的成分，实际生产中较少采用。

四、仪器、试剂与材料

1. 仪器

粉碎机、干燥箱、恒温水浴锅、超声波循环提取仪（或超声波细胞破碎仪、回流装置、电煮锅）、旋转蒸发仪、减压过滤装置、电热套、烧瓶、量筒、烧杯、分液漏斗、40 目筛。

2. 试剂

95%乙醇、氯仿。

3. 材料

大齿牛果藤叶。

五、实验设计方案和实验内容

1. 实验设计

(1) 研读文献

以学习小组（一般 2 人）为单位，搜索关键词“大齿牛果藤”或“藤茶”和“黄酮提取”，查阅近年来的中英文文献资料，下载、研读具有参考价值的文献。

(2) 设计方案

1) 方案制定。各学习小组在阅读文献资料的基础上，讨论参考文献，筛选、比较并优化出适合实验室条件的方法，制定初步的实验方案。

2) 交流评价。各学习小组派代表用 PPT 介绍实验设计方案，教师和全班同学共同参与，对实验设计方案质疑并给出建议，并对实验设计方案的原理是否正确、实验方法是否合理、实验步骤是否可行等逐一作出评价。

3) 完善方案。根据质疑、建议和评价，学习小组进一步修改和完善实验设计方案，经教师同意后开展实验。

2. 实验流程

大齿牛果藤总黄酮的提取实验流程如图 1-1 所示。

3. 参考实验方案

(1) 材料处理

采集新鲜材料，擦净、晾干、杀青、自然冷却，于 65℃ 左右干燥，粉碎机粉碎，过 40 目筛，密封保存待用。

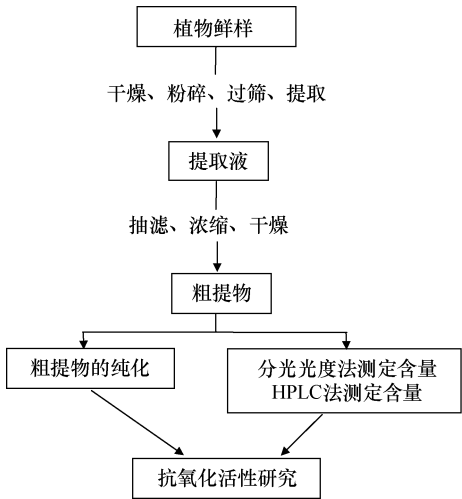


图 1-1 大齿牛果藤总黄酮的提取实验流程

HPLC 法：高效液相色谱法（high performance liquid chromatography）

（2）回流提取法

1) 称取材料 5~10 g 放入烧瓶，加入 15 倍体积的 65%~70%乙醇（总体积不超过烧瓶容积的 2/3），80℃水浴或电热套加热，乙醇沸腾后变成蒸汽上升，在冷凝管中冷凝为液体后流回烧瓶，循环回流 2 h 后减压抽滤。滤渣用 15 倍体积的 65%~70%乙醇回流提取 2 h，减压抽滤后合并滤液。

2) 将滤液在 55℃左右旋转蒸发浓缩，直至溶液无乙醇味（除去乙醇）。

3) 将烧瓶内的溶液倒入分液漏斗，用 150 mL 热水分 3 次洗涤烧瓶，洗液一并倒入分液漏斗。用 375 mL 氯仿（相对密度 1.48）分 3 次萃取脱脂，待溶液完全分层后，去掉下层氯仿层，收集上层水溶液。

4) 将脱脂后的水溶液用旋转蒸发器于 70℃左右浓缩至一定体积后倒出，称量体积并记录相应数据（以每毫升提取物含 0.2~0.5 g 原材料为宜），于 65℃烘干，得到大齿牛果藤总黄酮，装入封口袋，保存于 4℃冰箱备用。

（3）超声波辅助提取法

按固液比 1:20 (w:V, mg:mL) 分别加入样品材料和溶剂（水或 65%~70%乙醇），用薄膜封口，浸泡 4~12 h。

1) 超声波细胞破碎仪提取：根据溶液体积选择合适的变幅杆。一般 10 mL 溶液用直径 3 mm 的变幅杆，50 mL 溶液用直径 6 mm 的变幅杆，150 mL 溶液用直径 13 mm 的变幅杆，50~1000 mL 溶液用直径 20 mm 的变幅杆。

将盛装样品溶液的烧杯固定在冰浴的座架上；安装好变幅杆，插入样品液面深度 10~15 mm，末端离烧杯底部大于 30 mm；设置好超声参数（20 kHz，1 s/1 s，20 min）和温度保护（乙醇 65℃，水 85℃）。提取完毕后，减压抽滤，滤渣重复提取 1~2 次并抽滤，合并滤液。

2) 超声波循环提取仪提取：将样品溶液于 40℃、40 kHz 提取 20 min，减压抽滤，滤渣重复提取 1~2 次并抽滤，合并滤液。

滤液用旋转蒸发仪于 55℃左右蒸发浓缩至一定体积后倒出，回收溶剂，并用 80℃蒸馏水清洗烧瓶残留物，洗液一并倒入量筒，量取体积并记录相应数据（总体积以每毫升提取物含 0.2~0.5 g 原材料为宜），也可于 65℃烘干，得到大齿牛果藤总黄酮，装入封口袋，保存于 4℃冰箱备用。

六、实验结果及分析

计算大齿牛果藤叶总黄酮的提取率。

七、实验讨论

黄酮类化合物的提取率与哪些因素有关？

八、思考题

- 1) 实验选用的总黄酮提取方法的选择依据是什么？并简述该方法的原理。
- 2) 分析操作过程中应该注意的事项。
- 3) 比较超声波辅助提取法和回流提取法，提出可能的改进措施，以提高提取效率和黄酮纯度。

九、参考文献

- 张佩玲, 姚志, 吴复雯, 等. 2025. 气候变化对大齿牛果藤适生区的影响. 中药材, 48(1): 58-63.
- Carneiro RCV, Ye L, Baek N, et al. 2021. Vine tea (*Ampelopsis grossedentata*): A review of chemical composition, functional properties, and potential food applications. Journal of Functional Foods, 76: 104317.
- Gao J, Liu B, Ning Z, et al. 2009. Characterization and antioxidant activity of flavonoid-rich extracts from leaves of *Ampelopsis grossedentata*. Journal of Food Biochemistry, 33(6): 808-820.

实验二 大齿牛果藤总黄酮的纯化

一、实验背景与意义

20 世纪 70 年代以来，人们对保健品的需求逐年上涨，如复合维生素、维生素 E、磷脂类保健品等年消费量都在 10 万 t 以上。而黄酮类化合物具有防病、抗衰老等诸多生物活性，保健价值较高。

大齿牛果藤是目前已知总黄酮含量最高的植物之一，被称为植物“黄酮之王”，其总黄酮含量高达 45%，其中二氢杨梅素（DMY）的含量高达 33.03%，具有很大的开发潜力，因此高效率提取高纯度黄酮具有重要的经济意义。

二、实验目的

在掌握重结晶或大孔树脂吸附纯化黄酮类化合物原理和实验操作的基础上，分析不同纯化方法对黄酮类化合物纯度的影响；比较两种纯化方法的优缺点，评价其在不同条件下的效果和适用性；改进纯化方法，提出优化措施，提高黄酮类化合物的纯度和纯化效率。

三、实验原理

物质的纯化方法有多种，按照纯化时所依据的理化性质差异可分为：①基于溶解度（或分配系数）差异的纯化方法；②基于酸碱性（或解离度）差异的纯化方法；③基于吸附性差异的纯化方法；④基于分子量差异的纯化方法。

1. 重结晶法

重结晶法利用不同物质在同一溶剂中的溶解度差异，即溶剂对被提纯物质和杂质的溶解度不同来纯化被提纯物质，且晶体化合物在溶剂中的溶解度一般随温度升高而增大。即使被提纯物质在热溶剂中达到饱和，但在冷却后也会因溶解度降低而从溶剂中结晶析出，进而使全部或大部分杂质留在溶剂中（不溶于热溶剂的杂质趁热过滤除去），达到纯化目的。重结晶是纯化固体化合物的一种重要方法，当第一次结晶（或沉淀）所得晶体产品的纯度不合要求时，可进

行重结晶除杂。

重结晶的溶剂选择主要考虑被提纯物质的溶解度。有机化合物多数是极性不大或非极性的共价化合物，分子结构千差万别，但绝大多数不溶于水而溶于有机溶剂。大齿牛果藤中黄酮类化合物主要是 DMY，其在不同溶剂中的溶解度见表 2-1。

表 2-1 DMY 在不同溶剂中的溶解度

指标	正己烷	水	沸水	甲醇	乙醇	丙二醇
溶解度 (g/100 g)	0.0003	0.05	1.6	8.6	12.1	30.6

从重结晶溶剂的安全性及廉价易获方面考虑，水为首选。

2. 大孔树脂吸附法

大孔树脂是一种功能高分子材料，为 20 世纪 70 年代末发展起来的一类具有较好吸附性能的有机高聚物吸附剂，内部具有三维空间孔状结构，孔径与比表面积都较大，不溶于酸、碱及乙醇、丙酮和烃类等有机溶剂，对氧、热和化学试剂稳定。

大孔树脂通常分为非极性和极性两大类。根据相似相溶原则，一般非极性吸附剂适合从极性溶液中吸附非极性有机物；高极性吸附剂适合从非极性溶液中吸附极性物质；中等极性吸附剂不但能够从非极性溶液中吸附极性物质，还能从极性溶液中吸附非极性物质。

大孔树脂对黄酮化合物具有较好的纯化效果，且具有操作简便、再生容易、耗费少、回收率高等优点。鉴于中药成分极其复杂，应根据有效成分的类别和性质选择合适的大孔树脂来达到较好的纯化效果。

四、仪器、试剂与材料

1. 仪器

电炉、层析柱、旋转蒸发仪、烧杯。

2. 试剂

HPD100 或其他类型大孔树脂、95%乙醇、4% HCl、4% NaOH。

3. 材料

实验一提取的大齿牛果藤总黄酮。

五、实验设计方案和实验内容

1. 实验设计

(1) 研读文献

以学习小组（一般 2 人）为单位，搜索关键词“黄酮”和“纯化”，查阅近 5 年的中英文文献资料，下载、研读具有参考价值的文献。

(2) 设计方案

1) 方案制定。各学习小组在阅读文献资料的基础上，讨论参考文献，筛选、比较并优化出适合实验室条件的方法，制定初步的实验方案。

2) 交流评价。各学习小组派代表用 PPT 介绍实验设计方案，教师 and 全班同学共同参与，对实验设计方案质疑并给出建议，并对实验设计方案的原理是否正确、实验方法是否合理、实验步骤是否可行等逐一作出评价。

3) 完善方案。根据质疑、建议和评价，学习小组进一步修改和完善实验设计方案，经教师同意后开展实验。

2. 实验流程

大齿牛果藤总黄酮的纯化实验流程如图 2-1 所示。

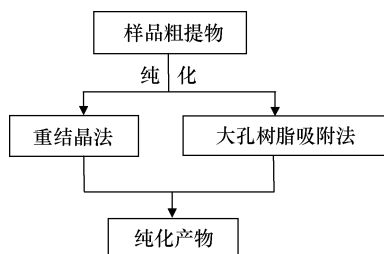


图 2-1 大齿牛果藤总黄酮的纯化实验流程