



研究生用书

现代微生物 研究技术

MODERN TECHNIQUES OF
MICROBIOLOGY

● 文莹 李颖 主编



中国农业大学出版社
CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



研究生用书

现代微生物 研究技术

MODERN TECHNIQUES OF
MICROBIOLOGY

● 文莹 李颖 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

现代微生物研究技术/文莹,李颖主编. —北京:中国农业大学出版社,2008.10
ISBN 978-7-81117-539-4

I. 现… II. ①文… ②李… III. 微生物学-研究方法 IV. Q93-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 111846 号

书 名 现代微生物研究技术

作 者 文 莹 李 颖 主 编

策划编辑	梁爱荣	责任编辑	梁爱荣
封面设计	郑 川	责任校对	王晓凤 陈 莹
出版发行	中国农业大学出版社		
社 址	北京市海淀区圆明园西路 2 号	邮政编码	100193
电 话	发行部 010-62731190,2620	读者服务部	010-62732336
	编辑部 010-62732617,2618	出 版 部	010-62733440
网 址	http://www.cau.edu.cn/caup	e-mail	cbsszs @ cau.edu.cn
经 销	新华书店		
印 刷	北京时代华都印刷有限公司		
版 次	2008 年 10 月第 1 版	2008 年 10 月第 1 次印刷	
规 格	787×980 16 开本	10.5 印张	187 千字
印 数	1~2 500		
定 价	16.00 元		

图书如有质量问题本社发行部负责调换

主 编 文 莹 李 颖

参编人员 (以姓氏笔画为序)

文 莹	田杰生	刘庆洪	关国华
李 颖	李大伟	何 群	张永亮
陈 芝	陈文峰	姜 伟	胥 慧
隋新华			

出版说明

我国的研究生教育正处于迅速发展、深化改革时期,研究生教育要在研究生规模和结构协调发展的同时,加快教学改革步伐,以培养高质量的创新人才。为加强和改进研究生培养工作,改革教学内容和教学方法,充实高层次人才培养的基本条件和手段,建设研究生培养质量基准平台,促进研究生教育整体水平的提高,中国农业大学通过一系列的改革、建设工作,形成了一批特色鲜明的研究生教学用书,本书是其中之一。特别值得提出的是,本书得到了“北京市教育委员会共建项目”专项资助。

建设一批研究生教学用书,是研究生教育教学改革的一次尝试,这批研究生教学用书,以突出研究生能力培养为出发点,引进和补充了最新的学科前沿进展内容,强化了研究生用书在引导学生扩充知识面、采用研究型学习方式、提高综合素质方面的作用,必将对提高研究生教育教学质量产生积极的促进作用。

中国农业大学研究生院

2008年1月

前 言

微生物学在生命科学领域中占有重要地位,它的先进技术已经渗透到农学、医学、工业等领域,在转基因生物、生物制药、生物化工、环境保护、动植物病虫害防治和提高土壤肥力等方面均具有重要作用。《现代微生物研究技术》就是为适应微生物学科发展和研究生教学需要而编写的研究生实验教材,目的是使研究生在了解本学科国内外发展动态的同时,掌握必要的实验设计思路和实验技能,培养其科研创新能力。

《现代微生物研究技术》将微生物学基本实验技术和近年来发展起来的新技术、新方法有机融合,全书共分 18 个实验,按实验指导的形式编写,每个实验分实验目的、实验原理、实验材料、实验步骤和问题讨论 5 个部分。实验内容全面,涉及微生物分类、微生物生理、微生物遗传、发酵工程等多个分支领域;操作对象广泛,涵盖了细菌(包括链霉菌)、真菌(包括食用菌)和病毒及其相关的研究手段。实验设计完整并系统化,每个实验为一个独立的操作单元,大多数实验需要连续几天才能完成。我们希望本实验教材的出版不仅能够激发学生的科研兴趣,还可促使学生开阔视野、勇于实践,通过实验掌握微生物学的研究思路及研究手段,提高科研能力。

本书是中国农业大学微生物学与免疫学系教师多年教学和科研实践经验的积累,具有很强的实用性,它既可作为微生物专业研究生的实验教学用书,也可供从事微生物相关研究的科研和技术人员参考。

本书的实验一、二由隋新华编写,实验三由陈文峰编写,实验四、五由陈芝编写,实验六由关国华编写,实验七、八、十六由何群和胥慧编写,实验九由李大伟和张永亮编写,实验十、十三由姜伟编写,实验十一由刘庆洪编写,实验十二由田杰生编写,实验十四、十五由文莹编写,实验十七、十八由李颖编写。

本书的出版得到“中国农业大学研究生教材建设项目”的资助,谨致感谢!

由于我们的能力和水平有限,书中可能会有一些不妥或错误之处,敬请同行和读者批评指正,以便再版时修改。

编 者

2008 年 6 月

目 录

实验一	细菌 DNA G+C 摩尔百分含量的测定	1
实验二	细菌 DNA 同源性测定	8
实验三	细菌的 LMW RNA 指纹图谱分析及其在分类上的应用	12
实验四	大肠杆菌质粒的提取、转化及重组质粒的检测	21
实验五	链霉菌原生质体的转化及转化子的鉴定	30
实验六	丝状真菌原生质体制备、融合及再生	39
实验七	粗糙脉孢菌基因转化及鉴定	45
实验八	粗糙脉孢菌特定基因缺失突变体的构建	55
实验九	病毒的侵染性及其分子检测	63
实验十	大肠杆菌 β -半乳糖苷酶诱导合成、分离纯化及动力学研究	76
实验十一	茶树菇凝集素的纯化	89
实验十二	聚羟基烷酸的发酵和提取	97
实验十三	表达外源蛋白的大肠杆菌工程菌的高密度培养	105
实验十四	利用脉冲场凝胶电泳技术检测链霉菌染色体的遗传不稳定性	112
实验十五	利用染色质免疫共沉淀技术检测蛋白质和 DNA 在体内的相互作用	124
实验十六	利用免疫共沉淀和质谱分析确定相互作用的蛋白	133
实验十七	mRNA 差异显示技术在分析真菌致病力中的应用	142
实验十八	丝状真菌线粒体 DNA 的提取及差异分析	151

实验一 细菌DNA G+C 摩尔百分含量的测定

一、实验目的

学习采用热变性法测定细菌 DNA G+C 摩尔百分含量的技术。

二、实验原理

细菌 DNA G+C 摩尔百分含量是细菌分类中一个能反映属、种间亲缘关系的遗传型特征。在《伯杰氏细菌鉴定手册》第 8 版中, DNA G+C 摩尔百分含量测定已成为细菌属、种的常规鉴定方法。

每种生物都有特定的 DNA G+C 摩尔百分含量。动植物的 DNA G+C 摩尔百分含量变化范围较小,主要集中在 30%~50%,而细菌的 DNA G+C 摩尔百分含量变化较大,在 25%~75%,说明不同的细菌类群,其 G+C 摩尔百分含量不同,因此, DNA G+C 摩尔百分含量在细菌鉴定方面更有价值。一般认为同种内不同菌株的 DNA G+C 摩尔百分含量的差异不大于 5%,而同属不同种的差异不大于 10%。如果两个菌株的 DNA G+C 摩尔百分含量差别大于 10%,那就表明它们的基因组(genomes)碱基序列显著不同,它们的亲缘关系较远;相反,如果两个菌株的 DNA G+C 摩尔百分含量相似(如 $\leq 5\%$),则分两种情况:如序列顺序也相似,则可能属于同一个种;如序列顺序不同,则不属于同一个种。所以,测定 DNA G+C 摩尔百分含量的重要意义在于否定的作用。在细菌鉴定和分类中,必须将 DNA G+C 摩尔百分含量与 DNA 同源性、表型特征等性状相结合来进行分析。

DNA 碱基组成的测定方法有直接法和间接法两种。直接法(又称化学法)包括纸色谱法、高效液相色谱法等,它们可直接测定 DNA 水解后各种碱基的含量。间接法(又称物理法)是利用 DNA 的各种物理、化学性质与碱基组成的相关性来测定其碱基组成,常用的方法有浮力密度法和热变性法。

(1)化学方法

从细菌细胞中提取 DNA,并水解为各种核苷酸,用层析法将它们分开,利用它们对波长 250~270 nm 的紫外光有吸收作用的特点,确定它们在层析纸上的位置,经洗脱液洗脱后,用分光光度计作定量测定,由此推算 DNA G+C 摩尔百分含

量。此法费时且误差大。

(2) 物理方法

热变性温度测定法(简称 T_m 法), 相对简单, 重复性好, 是现今应用的主要方法。本实验采用此法。

热变性温度测定法测定 DNA G+C 摩尔百分含量的原理如下: 当天然双链 DNA 分子在一定的离子强度和 pH 值条件下逐步加热使温度升高到一定值时, 碱基之间氢键不断打开, 互补的 DNA 双螺旋不断变成单链, 导致在 260 nm 处紫外吸收明显增加(即增色效应); 当双链 DNA 完全变成单链后, 紫外吸收值停止增加, 这种 DNA 热变性过程在一个较窄的温度范围内完成。在热变性过程中, 双链 DNA 解开一半时所对应的温度值, 为解链中点温度(T_m 值), T_m 值随 G+C 摩尔百分含量的增加而增加, 因为在 G≡C 碱基对中含 3 个氢键, 在 A=T 碱基对中含有 2 个氢键, 破坏 3 个氢键比破坏 2 个氢键需要更高的温度。这样, T_m 值可反映不同细菌的 DNA G+C 摩尔百分含量。利用具有加热功能的紫外分光光度计可以测出 T_m 值, 通过理论推导的公式即可算出 DNA G+C 摩尔百分含量。

(3) DNA G+C 摩尔百分含量计算

DNA G+C 摩尔百分含量在 25%~75% 的范围内, T_m 值与 G+C 摩尔百分含量间呈线性关系。总 DNA 溶解在 $0.1 \times \text{SSC}$ 溶液中, 其 G+C 摩尔百分含量的计算公式为:

$$\text{G+C 摩尔百分含量} = 51.2 + 2.08 \times [T_{m(x)} - T_{m(K)}] \text{ 或:}$$

$$\text{G+C 摩尔百分含量} = 2.08 T_{m(x)} - 106.4$$

其中, $T_{m(x)}$ 为待测菌株的 T_m 值, $T_{m(K)}$ 为 *E. coli* K-12 的 T_m 值。

三、实验材料

1. 实验菌株

根瘤菌(*Rhizobium* sp.), *E. coli* K-12。

2. 培养基及试剂

(1) YMA 固体培养基

酵母粉	3 g	甘露醇	10.0 g
NaCl	0.10 g	K ₂ HPO ₄	0.25 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20 g
Agar	18.0 g	H ₂ O	1 000 mL

pH 值 6.8~7.0

(2) TY 液体培养基

胰蛋白胨	5 g	酵母粉	3 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.7 g	H_2O	1 000 mL
pH 值	6.8~7.2		

(3) 1×TES

50 mmol · L⁻¹ NaCl, 5 mmol · L⁻¹ EDTA-Na₂, 50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0~8.2。

(4) 1×SSC

0.15 mol · L⁻¹ NaCl, 0.015 mol · L⁻¹ 柠檬酸钠, pH 7.0。

(5) 3 mol · L⁻¹ NaAc, 1 mmol · L⁻¹ EDTA-Na₂, pH 7.0

(6) 20% SDS(W/V)

(7) P : C : I (苯酚 : 氯仿 : 异戊醇) = 25 : 24 : 1 (V/V)

(8) C : I (氯仿 : 异戊醇) = 24 : 1 (V/V)

(9) 蛋白酶 K

以 20 mg · mL⁻¹ 的浓度溶于 SE (0.05 mol · L⁻¹ NaCl, 0.1 mol · L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 中, 37℃ 保温自消化 1 h, -20℃ 下保存备用。

(10) RNase

10 mg · mL⁻¹ (用 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 15 mmol · L⁻¹ NaCl, pH 7.5 溶液配制) 100℃ 加热 15 min, 缓慢冷却至室温, 小量分装后 -20℃ 下保存。

(11) 5 mol · L⁻¹ NaClO₄

3. 主要仪器

恒温培养箱, 恒温摇床, 台式冷冻离心机, 超声波破碎仪, Lambda Bio 20 型紫外分光光度计, 琼脂糖凝胶电泳装置等。

四、实验步骤

1. 菌体培养

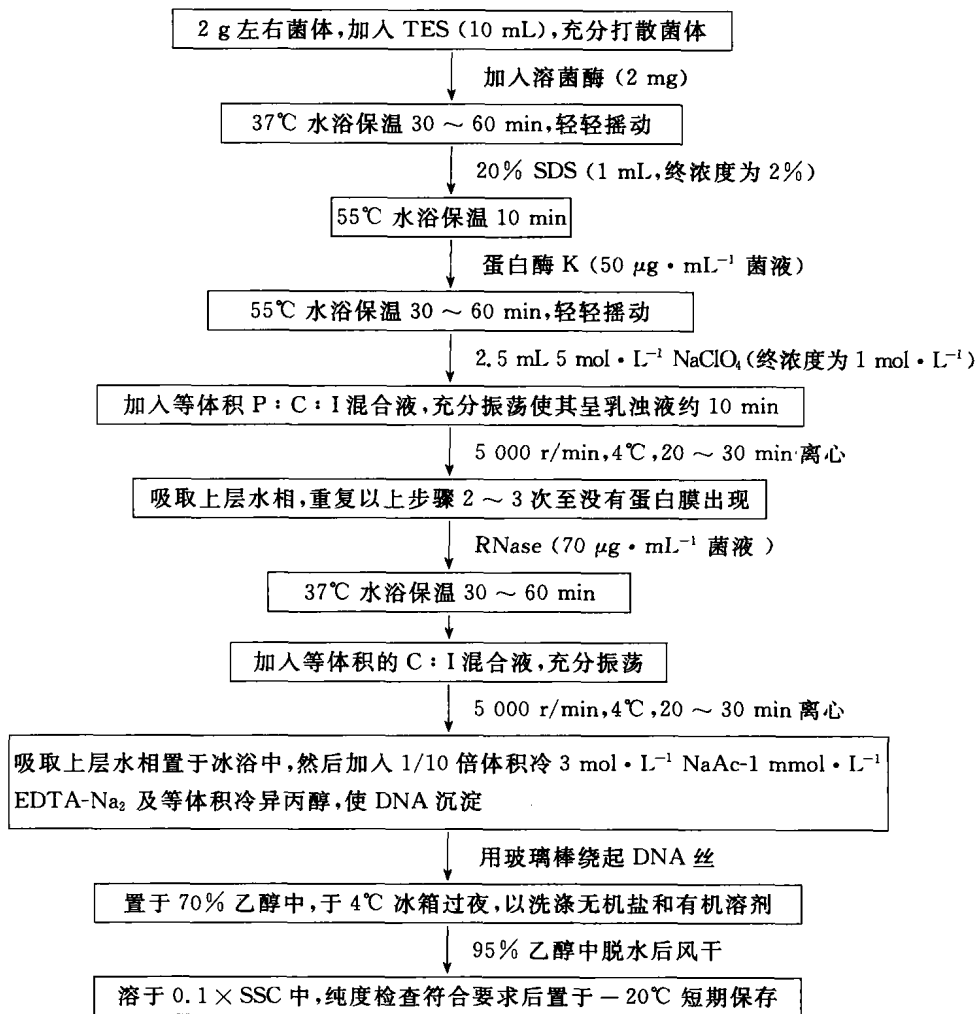
实验菌株经 YMA 斜面活化后, 镜检, 确定无杂菌污染后, 接种于 TY 液体培养液中振荡培养。28℃ 下培养至对数生长中期后 (约 40 h), 收集菌体。

2. 菌体收集

将菌液加入干净的 50 mL 离心管中, 5 000 r/min, 15 min, 4℃ 离心收集。用

1×TES 悬浮菌体,同样条件下离心、洗涤 3 次。

3. DNA 提取及溶解



4. DNA 纯度检测

将提取到的 DNA 样品,分别测其 260 nm、280 nm、230 nm 的吸光度,如果 $A_{260\text{ nm}} : A_{280\text{ nm}} : A_{230\text{ nm}} = 1.0 : 0.515 : 0.450$,则其纯度符合实验要求。如果 $A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{230\text{ nm}}$ 与 $A_{260\text{ nm}}$ 的比值分别大于 0.515 和 0.450,需重复提取 DNA 步骤中去蛋白质和 RNA 步骤,直至符合上面比例。

5. DNA 浓度检查

提取的总 DNA 浓度应该大于 $A_{260\text{ nm}}=2.0$ (约 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

6. DNA 浓度调整

测定 G+C 摩尔百分含量的 DNA 浓度应稀释为 $A_{260\text{ nm}}=0.2\sim 0.5$ (溶于 $0.1\times\text{SSC}$ 中), DNA 溶液的离子强度对 T_m 影响明显,全部供试菌株 DNA 样品的溶解及 T_m 值测定中所需 SSC 缓冲液均需来自同一瓶 $10\times\text{SSC}$ 母液。

7. 热变性法测定菌株 DNA G+C 摩尔百分含量

以 *E. coli* K-12 菌株的 T_m 值作参比,以消除温度及其他实验误差, *E. coli* K-12 菌株的 DNA 准备和要求同前。测定方法如下:

(1) 开机

- ① 打开紫外分光光度计电源(预热 20 min);
- ② 打开循环水浴电源;
- ③ 打开温度控制器 (PTP-1) 电源;
- ④ 打开计算机。

(2) 设置参数

① 打开 **UV Winlab** 软件: 双击桌面图标 **UV Winlab 快捷方式**, 计算机即顺序安装服务系统 (Graph Sever, Instrument Sever, Report Builder) 并出现其方法窗口;

② 单击时间驱动 **Td** 方法: 出现其窗口, 双击窗口内 **DNA DEF. MTD** 应用软件, 出现其界面, 通过 **Timed**, **Inst**, **Sample** 参数设置页来设定合适的测定参数;

③ 检查无误后, 单击 **Setup** 键 (注意: 绝不能按 **Start** 键), 将仪器调整到所设定的状态; 当仪器达到状态时, **Setup** 键消失, 同时工具条件中的 **Start** 变成绿色, 指示分光光度计已准备好运行;

④ 将 **UV Winlab** 的窗口最小化 (绝对不能关闭);

⑤ 从程序中选 **Templab** 方法: 单击开始 → 光标点到程序 → 再点到 **PE Application** → 再点到 **Templab** 双击, 出现其窗口, 通过 **Steup**, **Controller**, **Goto**, **Instrument** 设定合适参数, 检查无误后击 **Start** 键, 出现对话框。

(3) 测定

① 仪器调零: 将两个石英比色杯中各加入 1 mL 参比液, 然后放入两个比色架内, 击对话框中 **是 Y**, 仪器进行调零;

② T_m 值测定: 调零结束后出现对话框, 此时将靠近操作者的比色杯换上 DNA 样品, 插上温度传感器探头, 击对话框中 , 仪器开始升温, 当达到设定温度时, 屏幕则显示吸光值/温度曲线;

③ 测定结束: 仪器已自动结束, 按 键停止该方法 (此时请注意 PTP-1 中的 灯应灭), 将该窗口最小化。

(4) 数据处理

① 将 窗口最大化;

② 击 , 再击 , 出现其窗口, 在 中选 ;

③ 在 方格中, 选择原始数据名称, 屏幕出现所测定的吸光值/温度曲线;

④ 在 选 1, 表示一阶导数;

⑤ 在 调到 50 左右, 使导数光谱图平滑;

⑥ 在 输入结果文件名;

⑦ 击 , 出现一阶导数谱图;

⑧ 击光标功能键 , 在导数光谱图中出现绿色光标, 移动光标到吸光值最高峰, 其对应的温度即 T_m 值。

(5) 输出结果

① 建立报告: 按报告图标 可建立报告;

② 转存软盘: 按存盘图标 ;

③ 打印结果: 按打印图标 。

(6) 根据公式计算 DNA G+C 摩尔百分含量。

五、问题及讨论

(1) 计算所测菌株的 G+C 摩尔百分含量 (要求附上计算机所绘的吸光值/温度曲线图)。

(2) 菌株的 DNA 提取中应注意哪些问题?

(3) 如果 DNA 纯度达不到要求, 会出现什么问题?

(4)影响本实验结果的关键问题有哪些?为什么?

参 考 文 献

- [1] De ley J. DNA base composition and hybridization in the taxonomy of phyto-pathogenic bacteria. *A Rev Phytopath.* 1968(6): 63-90.
- [2] De Ley J. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 1970(101):737-754.
- [3] De ley J. , Cattoir H. , and Reynaert S. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 1970(12):133-142.
- [4] Johnson J. L. Determination of DNA base composition, DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acid. //Cottschalk, en. *Methods in Microbiology.* 1985(18):1-74.
- [5] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism. *J. Mol. Biol.* 1961(3):208-218.
- [6] 林万明. 细菌 DNA 中 G+C 含量测定和核酸分子杂交技术及其在细菌分类鉴定中的应用. //程广胜, 朱厚础, 周方. *分析微生物学专集.* 北京:科学技术出版社,1988:88-98.
- [7] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海:上海科学技术出版社,1990.

实验二 细菌DNA 同源性测定

一、实验目的

学习液相复性速率法测定细菌间 DNA-DNA 的同源性。

二、实验原理

不同生物 DNA 碱基排列顺序差异越大,它们的亲缘关系就越远,反之亦然。对不同细菌 DNA 碱基排列顺序的分析比较,可以探讨细菌之间的亲缘关系,有助于细菌的分类鉴定。DNA 同源性测定(DNA-DNA 杂交)是比较 DNA 碱基排列顺序相似性的方法之一。

双链结构的 DNA 分子在一定条件下(加热或变性剂处理),两条互补的链可以解开,分解成两条单链,即 DNA 变性,导致在 260 nm 的紫外吸收明显增加(即增色效应);去除变性因素后,在适宜的条件下,变性 DNA 两条互补的单链又可以重新组合成双链分子,这一过程叫 DNA 复性,导致在 260 nm 的紫外吸收明显减少(即减色效应)。不仅同一菌株的 DNA 单链可以复性成双链,来自不同菌株的 DNA 单链,只要二者 DNA 分子的碱基序列具有同源性,它们也会在其同源序列之间互补形成双链(即杂交)。细菌 DNA 同源程度越高,杂交率也越高,反之亦然。

核酸分子杂交的方法很多,按杂交反应环境可大致分为液相和固相杂交两个基本类型,前者杂交反应在液体中进行,后者杂交反应在固体(通常是硝酸纤维素膜)上进行。固相杂交需要同位素标记 DNA,而 DNA 标记的方法又分体内(活体)标记和体外标记两种。复性速率法是一种不需要同位素标记的液相杂交方法。本实验采用液相复性速率法。

液相复性速率法的依据是细菌等原核生物的 DNA 通常不包含重复序列,在液体中复性(或杂交)时,同源 DNA 比异源 DNA 复性速度快,同源性越高,复性速度就越快。DNA 的复性速度可以用紫外分光光度计来测定,根据复性速率和理论推导的公式,可以计算出不同细菌的 DNA 杂交率。

DNA 同源性(H)的计算:据 Deley 等(1970)公式计算。

$$H = \frac{4v_m - (v_a + v_b)}{\sqrt{v_a \times v_b}} \times 100\%$$

其中, v_a 为样品 A 的自身复性速率;

v_b 为样品 B 的自身复性速率;

v_m 为样品 A 与样品 B 等量混合后的复性速率。

一般情况下, v_a 或 $v_b > v_m > (v_a + v_b)/4$ 。

三、实验材料

实验材料同实验一。

四、实验步骤

1. 菌体培养、DNA 提取

菌体培养、DNA 提取等要求同实验一。

2. DNA 样品的纯度, 离子强度要求

同实验一 G+C 摩尔百分含量测定方法, DNA 片段的大小一般要求在 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ Da (300~800 bp) (1 Da=1 u, 以下同)。DNA 样品的剪切采用超声波法 (2 mL 样品, 超声功率 40 W, 超声 3 s, 间隔 4 s, 循环 90 次, 重复 4 次, 每次重复之间将样品上下颠倒几次), 剪切片段的合适大小需用琼脂糖凝胶电泳进行观察, 剪切后的 DNA 浓度应在 $A_{260\text{ nm}} = 1.5 \sim 2.0$ (溶于 $2 \times \text{SSC}$ 中), 不能高于 2.3。剪切后的样品每毫升中加入 0.24 mL $10 \times \text{SSC}$ 缓冲液, 调节缓冲液为 $2 \times \text{SSC}$ 体系, 杂交前, 先用 $2 \times \text{SSC}$ 对仪器调零。

3. DNA 复性速率的测定

(1) 开机

① 打开分光光度计的电源 (预热 20 min);

② 打开循环水浴电源;

③ 打开 PTP-1 温控器电源;

④ 打开计算机电源。

(2) 打开 UV Winlab 应用软件

在桌面上双击 UV Winlab 图标, 出现其方法窗口, 此时仪器已准备好。

(3) 在方法窗口中选择时间驱动 TD 方法, 通过 Timed, Inst, Sample 设置页来设定合适的测定参数。

① Setup: 当所需的各参数都已在参数页中设定好后, 用鼠标按 **Setup** 键, 将仪器调整到所设定的状态; 当仪器达到状态时, **Setup** 消失, 同时工具条中的 **Start** 变成绿色, 指示分光光度计已准备好运行;

② 仪器调零: 鼠标按 **TD** 方法中的 **Autozero** 键, 出现对话框, 放入参比液仪器调零;

③ DNA 变性: 将剪切好的 DNA 样品 1.0 mL 装入石英比色杯中, 将比色杯放入可加热的比色架内, 然后插入温度传感器探头; 将 PTP-1 温控器温度设定为 95℃ (注意温控器此时作为 controller 使用, 故 **CTRL/PROG** 灯不亮); 按下 **Func** 键, 出现 SP 参数状态, 通过 **▲** 和 **▼** 键储存该温度值, 当温控器显示屏的上层温度显示达到所设定的温度 (95℃) 时, 开始计时并维持 10~15 min;

④ 设定复性温度 ($T_{or} = 0.51 \times G + C$ 摩尔百分含量 + 47): 上述 DNA 样品变性结束后, 立刻将 PTP-1 温控器的温度设定为最适复性温度 (本实验设为 76℃); 几分钟后, 当温控器显示屏的上层温度稳定达到设定最适复性温度后, 即开始测定复性速率 (注意: 两菌的自身复性和杂交尽量连续进行, 两菌的 DNA 浓度尽量一致, 杂交样品由 A、B 等量混合);

⑤ 复性速率的测定: 鼠标按 **UV Winlab** 时间驱动 TD 方法窗口内对话框中的 **Start** 键, 分光光度计即开始运行, 同时计算机屏幕出现图形窗口, 将结果显示出来;

⑥ 数据处理: 测定完成后, 在 **UV Winlab** 方法窗口的任务栏中选 **Data handling**, 再选 **Data calculator**, 在其中的 **Algorithm** 栏中选择 **Slope**, 然后在 **Dataset** 中调出要处理的数据, 选择计算范围, 最后按 **Calculate** 键, 计算机将按程序计算所测直线的斜率 (Slope)。即样品的复性速率。

(4) 根据公式计算 DNA 同源性 (H%)。

五、问题及讨论

(1) 计算所测菌株的 DNA 同源性 (要求附上计算机所绘的杂交曲线并求出斜率)。

(2) 说明哪些因素会影响本实验结果的准确性?

(3) 分析自身不复性可能由哪些原因造成?

(4) 复性温度设定好后, 仪器在温度下降中会向下俯冲, 然后再升高到复性温