

面向21世纪高等院校教材·生物工程系列

Biological and Pharmaceutical
Engineering Experiment

生物与制药工程实验

■ 主 编 万海同
副主编 余 勤 赵伟春



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

面向 21 世纪高等院校教材·生物工程系列

生物与制药工程实验

主 编 万海同

副主编 余 勤 赵伟春



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大學出版社

图书在版编目(CIP)数据

生物与制药工程实验 / 万海同主编; 余勤, 赵伟春编. —杭州: 浙江大学出版社, 2008. 1
全国高等医药教育规划教材
ISBN 978-7-308-05749-3

I. 生… II. ①万…②余…③赵… III. ①生物工程—实验—医学院校—教材②制药工业—化学工程—实验—医学院校—教材 IV. Q81-33 TQ46-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 204513 号

生物与制药工程实验

主编 万海同 副主编 余 勤 赵伟春

责任编辑 张 明

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>

<http://www.press.zju.edu.cn>)

电话: 0571—88925592, 88273066(传真)

排 版 浙江大学出版社电脑排版中心

印 刷 杭州余杭人民印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 27.75

字 数 711 千

版 印 次 2008 年 1 月第 1 版 2008 年 1 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-05749-3

定 价 39.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88072522

编委会

主 编 万海同
副主编 余 勤 赵伟春

编 委 万海同 余 勤 赵伟春
葛立军 刘文洪 何 洁
郭 莹 朱振洪 丁兴红
陈 京 孙国金 梁泽华
韩 进 王 玉

前 言

生物工程与制药工程是奠定在生物学、药学、生物技术、化学和工程学等基础上形成的新兴交叉学科,它不仅涉及宽广的专业知识,而且需要丰富的工程实践经验。生物工程和制药工程专业的学生要求掌握生物技术及其产业化的科学原理、工艺技术过程的基础理论和工程设计的基本技能,能在医药、精细化工和生物化工等部门从事医药产品的生产、科技开发、应用研究和经营管理等工作。因此,通过实践教学培养学生的理论联系实际、实事求是的学风,掌握基本的专业实验技术和操作技能,提高学生的自学能力、独立思考和创新能力显得尤为重要。然而,由于相关实验技能方面的教科书还相当匮乏,限制了对学生动手能力和实际操作能力的培养。为了更好地与生物工程和制药工程专业实践教学相配合,我们编写了本书,力求让读者真正掌握现有的和最新的生物与制药工程的规范实验技能,提高读者综合动手能力和实验素质。

本书主要是在浙江中医药大学生物工程学院的生物工程与制药工程专业教师自编教材《生物与制药工程专业实验指导》的基础上,又重新完善、增补而完成。全书分两部分:专业实验和附录。专业实验部分主要依据生物工程和制药工程专业本科生课程设置的要求按课程进行编排,内容包括工业微生物、生物工程设备、酶工程、生化制药学、制药工艺学、药物合成反应、应用光谱解析、实验仪器分析、生物工艺学、细胞工程、基因工程、中药药动学、药剂学、生化分离工程和化工原理等课程的实验。全书共有145个实验。考虑到各院校实际情况不同,可从中选取部分实验使用。

为了使生物工程与制药工程的理论教学内容与工程实践结合得更加密切,使学生能学以致用,作者根据多年从事生物工程与制药工程领域的教学与科研工作的经验,编著了这本教材,该教材在内容上具有以下特点:①注重生物与制药工程基本技能培养,增补近年来生物与制药工程学的新成果,反映中药制药的特点。②注重生物与制药工程学各相关课程在知识上的互补和相溶,注重生物与制药工程学的理论教学内容与工程实践相结合,注重生物与制药工程学基本原理与实验方法的衔接和内涵性。③较为系统地介绍了生物工程学与制药工程学的实验,内容全面,深入浅出,便于根据学生的具体情况进行教学和学生自学。④注重设计方法的介绍与应用,有具体实例,图文并茂,实用性较强。

⑤内容丰富,文字通俗易懂,可供生物工程与制药工程及其相关专业和不同学历层次选择应用。此书不但适合初学者使用,对于有多年研究经验的学者也有相当的参考价值。同时,在编写过程中,本书除了重点介绍生物工程和制药工程的经典工艺流程,使读者能够获得较为系统的生物与制药工程的基本操作技术和理论知识外,作者还充分结合了自己的研究经验,以扩大本书的实用性和前沿性,并充分利用学校在长期办学过程中形成的中医药学这一优势学科,在各章中均编排了与中医药相关的实验,以扩大适用范围。

本书可作为高等院校生物工程、制药工程、微生物学、发酵工程、食品工程、基因工程、细胞工程、药物制剂及中医药学等专业的本科生教学用书,也可作为上述专业及其相关专业的研究生、教师、科研人员及生物制品公司的职员的参考书。

本书由浙江中医院大学万海同教授主编,余勤、赵伟春任副主编。各章节的编写人员如下:前言:万海同;第1章:刘文洪、丁兴红;第2章:朱振洪、葛立军;第3章:葛立军、赵伟春、万海同;第4章:赵伟春、朱振洪、丁兴红;第5章:郭莹、陈京;第6章:何洁;第7章:何洁;第8章:何洁、陈京;第9章:葛立军、丁兴红;第10章:余勤、赵伟春、刘文洪;第11章:赵伟春;第12章:郭莹、韩进、王玉、万海同;第13章:梁泽华;第14章:陈京、郭莹、万海同;第15章:孙国金。

本书在编写过程中参考了国内外同行、专家和学者的科研成果与著作,许多老师和同学也对教材提出了很多宝贵意见。本书也受到国家自然科学基金项目、浙江省自然科学基金重点项目、浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目的资助,在此一并表示感谢。限于编者的学识水平,书中难免存在不妥之处,竭诚希望读者给予批评指正。

万海同

2008年1月18日于杭州

目 录

第 1 章 工业微生物实验	(1)
1.1 培养基的制备与灭菌	(1)
1.2 微生物菌种保藏	(3)
1.3 土壤中微生物分离与纯化	(7)
1.4 药用植物内生菌分离与纯化	(11)
1.5 微生物的形态观察	(15)
1.6 细菌特殊结构的观察	(17)
1.7 革兰氏染色法	(19)
1.8 微生物的大小测定与计数	(21)
1.9 微生物的理化性能鉴定	(24)
1.10 药用植物内生菌的分子鉴定	(27)
1.11 利用紫外线诱变筛选营养缺陷型突变株	(30)
1.12 苏云金杆菌的复壮	(33)
1.13 温度对微生物的影响	(35)
1.14 紫外线对微生物的影响	(36)
1.15 渗透压对微生物的影响	(38)
1.16 氢离子浓度对微生物生长的影响	(39)
1.17 化学药剂对微生物的影响	(41)
1.18 食品中霉菌计数法	(42)
1.19 食品中金黄色葡萄球菌检测	(47)
1.20 光电比浊计数法	(49)
参考文献	(50)
第 2 章 生物工程设备实验	(52)
2.1 认识发酵罐的基本结构与演示实验	(52)
2.2 发酵罐的清洗与灭菌	(55)
2.3 发酵罐溶解氧速率测定实验	(57)
2.4 摇瓶溶氧系数 $K_L a$ 的测定	(60)
2.5 发酵设备空气过滤系统的结构、性质及无菌检验	(61)
2.6 细胞生物反应器的结构与操作	(64)
2.7 常用柱层析设备的基本结构与演示实验	(69)

2.8 冷冻干燥设备的基本结构、功能与使用	(72)
参考文献	(76)
第3章 酶工程实验	(77)
3.1 酸性磷酸酯酶及标准曲线制备实验	(77)
3.2 酶促反应动力学参数的测定实验	(79)
3.3 酸性磷酸酯酶最适 pH 和温度测定实验	(82)
3.4 固定化枯草芽孢杆菌连续生产 α -淀粉酶实验	(86)
3.5 溶菌酶的提取实验	(89)
3.6 溶菌酶活力、蛋白浓度测定	(92)
3.7 过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶标记的抗体	(94)
3.8 间接酶联免疫吸附试验测定单克隆抗体的效价	(96)
3.9 纤维素酶活力的测定方法	(99)
3.10 超氧化物歧化酶的活性测定	(102)
参考文献	(105)
第4章 生化制药学实验	(106)
4.1 酸水解法提取和分离胱氨酸	(106)
4.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质的相对分子质量	(110)
4.3 动物血中超氧化物歧化酶的粗提	(114)
4.4 离子交换层析法纯化超氧化物歧化酶	(116)
4.5 总糖和还原糖的测定:3,5-二硝基水杨酸法	(118)
4.6 从大豆中制备卵磷脂	(121)
4.7 从姜黄中制备姜黄色素	(123)
4.8 从红辣椒中分离红色素	(125)
4.9 利用大肠杆菌制备基因工程药物	(126)
4.10 利用毕赤酵母制备基因工程药物	(129)
参考文献	(132)
第5章 制药工艺学实验	(134)
5.1 薄荷油/ β -环糊精包合物的制备和检查	(134)
5.2 黄芪注射液的制备	(137)
5.3 微型胶囊的制备	(140)
5.4 维生素 C 注射液的制备	(143)
5.5 维生素 C 溶液稳定性影响因素的考察	(149)
5.6 脂质体的制备及包封率的测定	(152)
5.7 茶碱缓释制剂的制备及释放度测定	(157)
参考文献	(160)

第 6 章 药物合成反应实验	(161)
6.1 蒸 馏	(161)
6.2 重结晶	(163)
6.3 正溴丁烷	(165)
6.4 阿司匹林(乙酰水杨酸)	(167)
6.5 乙酰苯胺	(170)
6.6 对氨基苯磺酰胺	(172)
6.7 对氨基苯甲酸	(176)
6.8 对氨基苯甲酸乙酯	(178)
参考文献.....	(180)
第 7 章 应用光谱解析实验	(181)
7.1 互变异构现象的紫外吸收光谱研究	(181)
7.2 红外分光光度法固体样品定性分析	(182)
7.3 气相色谱-质谱联用定性分析	(184)
7.4 未知化合物的结构测定	(188)
参考文献.....	(189)
第 8 章 实用仪器分析实验	(191)
8.1 紫外示差分光光度法测定苯酚	(191)
8.2 GC-14B 气相色谱仪及微量注射器的使用	(192)
8.3 环己烷、苯和甲苯的气相色谱分析.....	(195)
8.4 高效液相色谱实验——色谱柱的评价	(198)
8.5 高效液相色谱实验——固相萃取水样中的多核芳烃并以内标法测定其含量	(199)
8.6 当归苦参丸制剂的色谱鉴别	(201)
8.7 原子发射光谱定性分析	(204)
8.8 原子吸收分光光度法测定水样中铜	(207)
参考文献.....	(209)
第 9 章 生物工艺学实验	(210)
9.1 巴斯德效应	(210)
9.2 酿酒酵母细胞生产酒精	(215)
9.3 固定化酿酒酵母细胞发酵生产酒精	(216)
9.4 乳酸发酵与乳酸菌饮料	(218)
9.5 啤酒品质和啤酒中双乙酰的测定	(221)
9.6 白酒总酯、总醛的测定.....	(223)
9.7 固体发酵法生产柠檬酸	(226)
9.8 柠檬酸的提取与测定	(228)

9.9	液体发酵法生产链霉素	(230)
9.10	抗生素抗菌谱测定实验	(233)
9.11	单细胞蛋白的生产实验	(236)
9.12	灵芝液体发酵生产胞外多糖实验	(237)
9.13	金针菇的栽培与工业化生产	(240)
9.14	冬虫夏草菌液体深层发酵实验	(243)
9.15	药用菌茯苓的补料分批培养	(245)
9.16	多管发酵法测定水中总大肠菌群	(248)
9.17	苏云金芽孢杆菌的发酵生产	(252)
9.18	啤酒工厂发酵生产工艺流程	(255)
	参考文献	(258)
第 10 章 细胞工程实验		
10.1	细胞培养用品的清洗与消毒	(260)
10.2	胡萝卜愈伤组织的诱导	(264)
10.3	浙贝母组织培养	(269)
10.4	动物细胞原代培养	(273)
10.5	贴附型细胞的传代培养	(277)
10.6	悬浮型细胞的传代培养	(280)
10.7	动物细胞的融合及杂交瘤细胞的筛选	(281)
	参考文献	(285)
第 11 章 基因工程实验		
11.1	质粒 DNA 的碱法快速提取	(286)
11.2	DNA 琼脂糖凝胶电泳	(289)
11.3	DNA 的酶切分析	(291)
11.4	大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	(294)
11.5	血液基因组 DNA 的抽提	(297)
11.6	浙贝总 RNA 的提取及浓度测定	(299)
11.7	RAPD 技术	(302)
11.8	Southern 杂交	(305)
11.9	Western blot 测定抗体结合蛋白的相对分子质量	(308)
	参考文献	(311)
第 12 章 中药药代动力学		
12.1	中药复方中葛根素的药动学研究	(312)
12.2	茶碱体内动力学参数的测定(血药浓度法)	(315)
12.3	微透析-HPLC 技术检测脑缺血诱导的脑内氨基酸水平的动态变化	(319)
12.4	三维 HPLC 和四谱研究川芎伍用丹参煎剂对川芎嗪药物动力学的影响	(323)

12.5	双黄连粉针中黄芩苷的药动学(反相高效液相法)·····	(325)
12.6	兔血浆中丹皮酚的高效液相色谱法测定·····	(327)
	参考文献·····	(330)
第 13 章	药剂学实验 ·····	(331)
13.1	碘酊的制备·····	(331)
13.2	黄芪精口服液的制备·····	(333)
13.3	金银花糖浆剂的制备·····	(335)
13.4	炉甘石洗剂的制备·····	(337)
13.5	麻仁丸的制备·····	(340)
13.6	双黄连颗粒的制备·····	(342)
13.7	大黄苏打片的制备·····	(345)
	参考文献·····	(346)
第 14 章	生化分离工程实验 ·····	(348)
14.1	酵母细胞的破碎及破碎率的测定·····	(348)
14.2	碳酸钙混悬液的膜分离演示实验·····	(350)
14.3	牛奶中酪蛋白和乳蛋白素粗品的制备·····	(351)
14.4	葛根素的提取分离与精制·····	(353)
14.5	青霉素的萃取与萃取率的计算·····	(355)
14.6	双水相萃取分离酿酒酵母中延胡索酸酶·····	(357)
14.7	细胞核与线粒体的分级分离·····	(360)
14.8	吸附法制备细胞色素 c 粗品·····	(362)
14.9	分配柱色谱法测定吐根中吐根碱和吐根酚碱·····	(364)
14.10	薄层色谱法鉴定果汁中的糖·····	(366)
14.11	纸层析法分离鉴定氨基酸·····	(368)
14.12	血清白蛋白的分离与纯化·····	(369)
14.13	凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量·····	(372)
14.14	凝胶层析法分离纯化蛋白质·····	(374)
14.15	亲和层析纯化胰蛋白酶·····	(376)
14.16	离子交换法提取 L-精氨酸·····	(380)
	参考文献·····	(382)
第 15 章	化工原理实验 ·····	(383)
15.1	流体流动阻力的测定·····	(383)
15.2	离心泵特性曲线测定·····	(386)
15.3	恒压过滤实验·····	(388)
15.4	传热综合实验·····	(390)
15.5	填料吸收塔的操作及吸收传质系数的测定·····	(394)

15.6	筛板式精馏塔的操作及塔板效率的测定	(398)
15.7	液-液萃取塔的操作	(401)
15.8	高速离心喷雾干燥实验	(404)
15.9	伯努利方程实验	(406)
15.10	雷诺实验	(407)
15.11	中药颗粒的粉碎与筛分	(408)
15.12	挥发油类药物提取纯化及工艺过程比较	(409)
	参考文献	(411)
	附录	(412)

第 1 章 工业微生物实验

工业微生物是微生物学的一个重要分支,它的研究对象是那些通过工业规模培养能够获得特定产物的微生物。研究这些微生物的形态、营养及生长规律,研究它们的代谢及其调节和控制,研究改变微生物的遗传和代谢特性的方法,达到强化特定产物或特定功能的目的。

本章工业微生物实验主要结合微生物发展前沿领域和当前工业微生物发展的现状,介绍了常见工业微生物实验基础理论和应用技术。具体内容涉及常用培养基的配制;不同环境中微生物菌种的分离;诱变筛选营养缺陷型突变株;利用形态、理化及分子生物学等技术对菌种进行鉴定;菌种的保藏与复壮;不同生长因素对微生物生长的影响和食品中微生物的检测等内容。中药微生物实验是本章一大特色,在实验设计过程中特别结合中药发展的特点,单独介绍了有关中药微生物的分离与鉴定。

本章适合于理工科大学生物工程专业、制药工程专业、食品工程专业和环境工程专业的本科生和大专生作为工业微生物学实验课程教材,也可供从事工业微生物发酵生产和研究的科技人员参考使用。

1.1 培养基的制备与灭菌

1.1.1 实验目的

1. 了解培养基配置原理,掌握其制备过程。
2. 了解高压蒸汽灭菌锅的原理,掌握其使用方法。

1.1.2 实验原理

培养基是按照微生物生长繁殖所需要的各种营养物质,采用人工方法配置而成的营养物质。其中含有碳源、氮源、无机盐、生长因子以及水分等。微生物在培养基上生长繁殖还必须在最适酸碱度范围内才能表现其最大生命力,因此对于不同种类的微生物,应将培养基调到一定 pH 值范围。培养基种类很多,不同种类的微生物所需培养基不同。按其组成可分合成培养基和天然培养基。按其物理状态可分固体培养基、液体培养基和半固体培养基。按其特殊用途可分加富培养基、选择培养基和鉴别培养基。

培养基配置后必须进行灭菌。灭菌和消毒是两个不同含义的名词。消毒是指消灭病原菌或有害微生物,而灭菌则是杀死或消灭一定环境中的所有微生物。

消毒与灭菌的方法很多,但总体可分为物理法和化学法两大类。物理法包括加热灭菌(干热灭菌与湿热灭菌)、过滤灭菌、紫外灭菌等。化学方法主要是利用有机或无机的化学药

品对实验室用具和其他物体表面进行灭菌与消毒。

1.1.3 仪器、材料及试剂

(一) 仪器

1. 真空泵。
2. 超净工作台。
3. 高压蒸汽灭菌锅。
4. 培养箱。
5. 干燥器。

(二) 材料及试剂

1. pH 试纸、试管、三角瓶、烧杯、量筒、漏斗、电炉、天平、纱布、牛皮纸、细绳纸及消毒灭菌用高压蒸汽灭菌锅。

2. 马铃薯培养基 PDA: 马铃薯 200g, 蔗糖或葡萄糖(霉菌用蔗糖, 酵母菌用葡萄糖) 20g, 水 1000mL。配置方法如下: 将马铃薯去皮, 切成约 2cm^3 的小块, 放入 1500mL 的烧杯中加适量水煮沸 30min, 注意用玻棒搅拌以防糊底, 然后用双层纱布过滤, 取其滤液, 加糖, 再补充水至 1000mL, 自然 pH。

3. 1mol/L NaOH, 1mol/L HCl。

1.1.4 实验步骤

(一) 称量

按配方准确称量并放入烧杯中(有些药品需按配方说明先后加入)。

(二) 溶化

在量杯中先加入少量的水(一般用自来水, 特殊的需用蒸馏水), 搅拌, 加热溶解。

(三) 调 pH 值

用 pH 试纸或 pH 计测 pH, 并用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调节至所需范围, 再按配方定容至所需体积。

(四) 过滤

一般不过滤, 特殊情况下需要过滤, 可用滤纸、纱布或脱脂棉等过滤。

(五) 分装

根据不同的需要, 可将制好的培养基分装入试管内或三角瓶内, 管瓶口塞上棉塞。棉塞的大小和松紧适中。棉塞的总长度的 $3/5$ 应在口内, $2/5$ 口外。注意不要使培养基沾染在管瓶口上, 以免浸湿棉塞引起污染。如果培养基是液体, 分装高度以试管高度的 $1/4$ 左右为宜; 如果培养基是固体, 分装试管, 其量为管高的 $1/5$, 灭菌后制成斜面。分装三角瓶的容量以不超过三角瓶容积之 $1/2$ 为宜。

1. 液体: 分装高度以试管高度的 $1/4$ 左右为宜。

2. 固体: 分装试管, 其量为管高的 $1/5$, 灭菌后制成斜面。分装三角瓶的容量以不超过三角瓶容积之 $1/2$ 为宜。

3. 半固体: 分装试管一般以试管高度的 $1/3$ 为宜, 灭菌后, 垂直凝成半固体深层琼脂。

(六) 灭菌

利用高压蒸汽来达到灭菌目的,其温度在 100 °C 以上,有较大的杀菌能力。灭菌在高压蒸汽灭菌锅内进行。

先打开灭菌锅盖,加入适量的水,然后放待灭菌物入内锅中。加盖旋紧螺旋,使蒸汽锅密封。关闭两个阀门,加热,当压力表指针指示 0.05MPa 时,打开放气阀(此时蒸汽将锅内冷空气由排气孔排出)直至压指针回到“0”,再关闭放气阀,继续加热,待压力逐渐上升至所需压力时,控制热源,维持所需时间(一般培养基的器皿控制在 121°C 保温 30min,含糖培养基 111°C 保温 30min。然后停止加热,压力随之降到“0”,可打开锅盖。放温箱作灭菌试验后,放入冰箱备用。(如是斜面培养基灭菌后趁热放成斜面。)

表 1.1-1 高压蒸汽锅压力计读数 and 温度的关系

压力计读数	纯水蒸气(无空气时)	混入 50%空气	只有空气时
0.05MPa	108°C	94°C	72°C
0.10MPa	115°C	105°C	90°C
0.15MPa	121°C	112°C	100°C
0.20MPa	126°C	118°C	109°C
0.25MPa	130°C	124°C	115°C
0.30MPa	134°C	128°C	121°C

1.1.5 思考题

1. 在一般情况下为什么试管或三角瓶培养基要用棉花塞而不用软木塞或橡皮塞?
2. 加热蒸汽灭菌为什么比干热灭菌所要求的温度低、时间短?
3. 干热灭菌完毕后,在什么情况下才可以开箱取物?为什么?

1.2 微生物菌种保藏

1.2.1 实验目的

了解并掌握菌种保藏的常用方法及其优缺点,掌握几种常见的微生物保存方法。

1.2.2 实验原理

菌种保藏的方法很多,其原理却大同小异,不外乎为优良菌株创造一个适合长期休眠的环境,即干燥、低温、缺乏氧气和养料等环境,使微生物的代谢活动处于最低的状态,但又不至于死亡,从而达到保藏的目的。依据不同的菌种或不同的需求,应该选用不同的保藏方法。一般情况下,斜面保藏、半固体穿刺、石蜡油封存和沙土管保藏法较为常用,也比较容易制作。

1.2.3 仪器、材料及试剂

(一) 仪器

1. 真空泵。
2. 超净工作台。
3. 高压蒸汽灭菌锅。
4. 培养箱。
5. 干燥器。

(二) 材料及试剂

1. 细菌、酵母菌、放线菌和霉菌等培养基

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基斜面(培养细菌): 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 水 1000mL, pH7.4~7.6, 装入锥形瓶中, 加棉花塞后高压蒸汽灭菌。

(2) 麦芽汁培养基斜面(培养酵母菌): 将从啤酒厂买来加有啤酒花的麦芽汁, 装入锥形瓶中, 加棉花塞后高压蒸汽灭菌。

(3) 高氏 1 号培养基斜面(培养放线菌): 可溶性淀粉 2g、 K_2HPO_4 0.05g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g、 KNO_3 0.1g、NaCl 0.05g、 $FeSO_4$ 0.001g、琼脂 2g、水 100mL。在烧杯中加水 95mL, 加热至沸腾, 称取可溶性淀粉 2g, 用 5mL 水调成糊状, 倒入沸水中混合均匀。再称取除可溶性淀粉以外的其他药品, 陆续加入烧杯内。待全部药品溶解后, 停止加热, 补足失水, 调 pH 值至 7.2~7.4。分装后, 高压蒸汽灭菌。

(4) 马铃薯蔗糖培养基斜面(培养丝状真菌): 马铃薯 200g、蔗糖 10g、琼脂 20g、水 1000mL、自然 pH。称取 200g 马铃薯片, 加水 1000mL, 煮沸半小时, 用纱布过滤, 补足失水。在上述滤液中加入 10g 蔗糖、20g 琼脂, 加热使琼脂熔化。分装后, 高压蒸汽灭菌。

2. 无菌水、液体石蜡、 P_2O_5 、脱脂奶粉、10% HCl、干冰、95% 乙醇、食盐、河沙、瘦黄土(有机物含量少的黄土)。

3. 无菌试管、无菌吸管(1mL 及 5mL)、无菌滴管、接种环、40 目及 100 目筛子、干燥器、安瓿管、冰箱、冷冻真空干燥装置、酒精喷灯、三角烧瓶(250mL)。

1.2.4 操作步骤

下列各方法可根据实验室具体条件与需要选做。

(一) 斜面传代保藏法

1. 贴标签。取各种无菌斜面试管数支, 将注有菌株名称和接种日期的标签贴上, 贴在试管斜面的正上方, 标签距离试管口 2~3cm 处。

2. 斜面接种。将待保藏的菌种用接种环以无菌操作法移接至相应的试管斜面上, 细菌和酵母菌宜采用对数生长期的细胞, 而放线菌和丝状真菌宜采用成熟的孢子。

3. 培养。细菌 37℃ 恒温培养 18~24h, 酵母菌于 28~30℃ 培养 36~60h, 放线菌和丝状真菌置于 28℃ 培养 4~7d。

4. 保藏。斜面长好后, 可直接放入 4℃ 冰箱保藏。为防止棉塞受潮滋生杂菌, 管口棉花应用牛皮纸包扎, 或换上无菌胶塞, 亦可用熔化的固体石蜡熔封棉塞或胶塞。

保藏时间依微生物种类而不同, 酵母菌、霉菌、放线菌及有芽孢的细菌可保存 2~6 个

月,移种一次;而不产芽孢的细菌最好每月移种一次。此法的缺点是容易变异,污染杂菌的机会较多。

(二)液体石蜡保藏法

1. 液体石蜡灭菌。在 250mL 三角烧瓶中装入 100mL 液体石蜡,塞上棉塞,并用牛皮纸包扎,121℃ 湿热灭菌 30min,然后于 40℃ 温箱中放置 14h(或置于 105~110℃ 烘箱中 1h),以除去石蜡中的水分,备用。

2. 接种培养。同斜面传代保藏法。

3. 加液体石蜡。用无菌滴管吸取液体石蜡,以无菌操作加到已长好的菌种斜面上,加入量以高出斜面顶端约 1cm 为宜。

4. 保藏。棉塞后外包牛皮纸,将试管直立放置于 4℃ 冰箱中保存。

利用这种保藏方法,霉菌、放线菌、有芽孢细菌可保藏 2 年左右,酵母菌可保藏 1~2 年,一般无芽孢细菌也可保藏 1 年左右。

5. 恢复培养。用接种环在液体石蜡以下挑取少量菌种,接种环在试管壁上轻靠几下,尽量使油滴干净,再接种于新鲜培养基中培养。由于菌体表面粘有液体石蜡,生长较慢且有黏性,故一般需转接 2 次才能获得良好菌种。

(三)沙土管保藏法

1. 沙土处理。

(1)沙处理。取河沙过 40 目筛,去除大颗粒,加 10% HCl 浸泡(用量以浸没沙面为宜)2~4h(或煮沸 30min),以除去有机杂质,然后倒去盐酸,用清水冲洗至中性,烘干或晒干,备用。

(2)土处理。取非耕作层瘦黄土(不含有机质),加自来水浸泡洗涤数次,直至中性,然后烘干,粉碎,用 100 目过筛,去除粗颗粒后备用。

2. 装管。将沙与土按 2:1,3:1 或 4:1(W/W) 比例混合均匀装入试管中(10mm×100mm),装置约 7cm 高,加棉塞,并外包牛皮纸,121℃ 湿热灭菌 30min,然后烘干。

3. 无菌试验。从每 10 支装有沙土的试管任意抽取其中一支,取少许沙土接入牛肉膏蛋白胨或麦芽汁培养液中,在最适的温度下培养 2~4d,确定无菌生长时才可使用。若发现有杂菌,经重新灭菌后,再做无菌试验,直到合格。

4. 制备菌液。用 5mL 无菌吸管分别吸取 3mL 无菌水至保藏的菌种斜面上,用接种环轻轻搅动,制成悬液。

5. 加样。用 1mL 吸管吸取上述菌悬液 0.1~0.5mL,加入沙土管中,用接种环拌匀。加入菌液量以湿润沙土达 2/3 高度为宜。

6. 干燥。将含菌的沙土管放入干燥器中,干燥器内用培养皿盛 P_2O_5 作为干燥剂,可再用真空泵连续抽气 3~4h,加速干燥。将沙土管轻轻一拍,沙土呈分散状即达到充分干燥。

7. 保藏。沙土管可选择下列方法之一来保藏:

(1)保存于干燥器中;

(2)用石蜡封住棉花塞后放入冰箱保存;

(3)将沙土管取出,管口用火焰熔封后放入冰箱保存;

(4)将沙土管装入有 $CaCl_2$ 等干燥剂的大试管中,塞上橡皮塞或木塞,再用蜡封口,放入冰箱中或室温下保存。