



普通高等教育“十二五”规划教材  
微生物学实验教程系列

# 微生物生理学实验教程

关国华 主 编 陈冠军 主 审

MICROBIAL PHYSIOLOGY  
EXPERIMENTATION



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材  
微生物学实验教程系列

# 微生物生理学实验教程

关国华 主编  
陈冠军 主审

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本教程共4章,30个实验。主要介绍研究微生物细胞化学成分、微生物细胞结构、微生物代谢与微生物代谢调控的实验技术和方法。本教程选取的实验材料包括细菌、古菌、丝状真菌和酵母菌,生理类型包括自养型、异养型及光能营养型,实验技术则融合了微生物学、生物化学、遗传学、生物物理学、分子生物学、生物信息学等学科的研究技术和方法,力求综合分析和探讨微生物生命活动规律。本教程选编的实验力求体现教材的基础性、代表性、实用性和先进性。本教程对每个实验的实验原理都作了较详细的论述,实验步骤清晰,每个实验都有思考题和参考文献。

本教程可作为高等院校微生物及相关专业的本科生和研究生的实验课教材,也可供相关教师及科研工作者参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

微生物生理学实验教程/张国立主编. —北京:科学出版社,2015.5  
普通高等教育“十二五”规划教材 微生物学实验教程系列

ISBN 978-7-03-044336-6

I. ①微… II. ①张… III. ①微生物学-生理学-实验-高等学校-教材  
IV. ①Q933.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第105632号

责任编辑:刘 畅/责任校对:郑金红  
责任印制:赵 博/封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

大厂书文印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2015年6月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2015年6月第一次印刷 印张:13 1/4 插页:2

字数:251 000

定价:35.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 微生物学实验教程系列编委会

|        |   |     |        |
|--------|---|-----|--------|
| 主<br>委 | 任 | 李季伦 | 中国农业大学 |
|        | 员 | 李季伦 | 中国农业大学 |
|        |   | 陈文新 | 中国农业大学 |
|        |   | 邢来君 | 南开大学   |
|        |   | 陈冠军 | 山东大学   |
|        |   | 赵良启 | 山西大学   |
|        |   | 顾桂芬 | 中国农业大学 |
|        |   | 楼慧强 | 中国农业大学 |
|        |   | 何 群 | 中国农业大学 |
|        |   | 李 颖 | 中国农业大学 |
|        |   | 李大伟 | 中国农业大学 |
|        |   | 王贺祥 | 中国农业大学 |
|        |   | 封文海 | 中国农业大学 |
|        |   | 宋 渊 | 中国农业大学 |
|        |   | 袁红莉 | 中国农业大学 |
|        |   | 文 莹 | 中国农业大学 |

# 《微生物生理学实验教程》编委会

主 编 关国华

主 审 陈冠军

编委名单 (按姓氏汉语拼音排序)

陈文峰 (中国农业大学生物学院)

关国华 (中国农业大学生物学院)

刘世武 (潍坊学院生物与农业工程学院)

孟 霞 (扬州大学兽医学院)

苗莉莉 (中国科学院微生物研究所)

彭 晴 (中国农业科学院饲料研究所)

孙纳新 (济南大学生物科学与技术学院)

田杰生 (中国农业大学生物学院)

王 磊 (中国农业大学生物学院)

杨 靖 (扬州大学生物科学与技术学院)

# 总 序

中国农业大学生物学院微生物学科创建于 1958 年, 由原北京农业大学植保系和土化系的微生物学教研组合并组建而成, 是我国高等院校第一个农业微生物学专业。1981 年被国务院学位委员会列为第一批博士点, 1993 年被评为农业部重点学科, 2001 年被评为国家级重点学科。

本学科的特色是研究、挖掘和利用丰富的微生物资源, 为农业生产服务。研究方向包括根瘤菌资源调查和系统发育学、固氮酶的生化机制及遗传调控、真菌生理及遗传学、药用及食用真菌学、微生物发酵工程、土壤和环境微生物学, 并在此基础上, 加强了微生物分子遗传, 增加了病毒学、免疫学和生物质能源等研究方向。1985 年, 原在植保系的微生物专业参与了中国农业大学生物学院的组建, 建立了微生物系, 于 2003 年更名为“微生物及免疫学系”。目前本系开设的本科课程包括微生物生物学、原核生物进化与系统分类学、真菌生物学、微生物生理学、微生物遗传学、微生物发酵工程、食用菌学、资源与环境微生物学、病毒学及免疫学, 每门课程均有理论课和实验课。

本系俞大绂教授等老一代学者及多位已经退休的老师在微生物学教学思想、课程设置及团队建设等方面, 为学科发展做出了巨大的贡献, 也为后人的工作奠定了良好的基础。在教学中突出的特色是理论课程与实验课程的紧密结合, 特别是对于本专业入门的实验课程, 积极推进将“死标本”的观察转变为学生自行分离和观察活体标本, 使学生从被动地接受知识转变为主动地参与学习, 有利于促进学生掌握实验技能, 并锻炼思考和分析能力。这种教学理念和模式一直沿用至今。目前本系担任教学工作的是一支中青年教师结合的队伍, 他们责任心强、思想活跃、虚心进取, 不断进行教学改革, 积极探讨在新的形势下, 如何正确解决“基础与创新”、“理论与实践”、“教学与科研”的关系, 认真履行教师的职责。

本套实验教程的基本资料均来自教师多年的积累。本系历来坚持教学与科研并重的原则, 在多年的发展过程中, 逐步规划, 将教师的科研方向与所承担的课程内容紧密相关, 保证教学内容中基础知识与前沿知识相结合, 很多实验设计出自任课教师的科研积累。大家齐心协力, 勇于创新, 不断更新实验教学内容, 使各门实验课程的教学工作一直受到学生的好评。

本系承担的 9 门本科生微生物学实验课程一直没有编写正式出版的教材。最近, 在大家的努力和领导的支持下, 各位主编在完成实验课教学大纲修订的前提下, 汇集了来自其他兄弟院校教师的智慧, 终于完成 9 本实验教程的编写, 这是大家共同努

力的结果。

衷心感谢南开大学邢来君教授、山东大学陈冠军教授、山西大学赵良启教授欣然接受我们的邀请，不仅为本套教材的审稿付出辛勤劳动，同时作为本套实验教程编委会成员，为保证教材的质量献计献策。感谢中国农业大学生物学院领导的支持和“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助，感谢来自兄弟院校全体参编教师的认真合作。感谢科学出版社为编辑和出版本套教材所付出的努力。希望这套实验教程的出版，为本学科和相关学科读者的学习和工作带来有益的参考，也希望广大读者提出批评和建议，以便我们今后做出修改。

李季伦

2014年1月

# 前 言

正如微生物生理学的创始人、法国科学巨匠巴斯德对微生物的描述：“自然界中极小之物作用极大”。微生物的巨大作用是通过其生理活动实现的。通过微生物生理学实验，探究微生物生命活动的奥妙，可以更好地造福人类。

本教程按照高等院校微生物生理学实验课的要求，总结了中国农业大学长期开设微生物生理学实验课的经验和科学研究中的部分工作经验，并融合了国内兄弟院校编写的有关教材及国外资料。编写原则着眼于加强基础，侧重于微生物生理学研究的基本实验技能的训练，以加深学生对相关理论课的理解。在实验材料上选择了细菌、古菌、丝状真菌及酵母菌，这些微生物的生理代谢类型包括自养与异养、自生与共生、化能营养型与光能营养型、好氧型与厌氧型，它们的生理过程涵盖呼吸与发酵、硝化与反硝化、固氮、产氢、产色素等。在实验内容上，选择了微生物细胞的收集和处理、微生物细胞化学成分的提取与测定、微生物亚细胞结构的提取与检测、微生物代谢的分析和微生物代谢调控的分析等既经典又具代表性的实验；为适应学科发展的现状，还编写了基因的克隆及表达、基因的敲除、宏基因组文库的构建、qPCR 分析基因转录水平的差异及代谢途径数据库的检索等实验，目的是以微生物为实验材料，为现代生物学技术（基因工程、细胞工程、酶工程及发酵工程）相关研究提供理论基础和基本技术。为了促使学生不仅学会实验技能，而且对实验的技术原理有深入了解，能融会贯通、举一反三、灵活运用，本教程对实验原理部分作了较详细的论述。

在本教程中，陈文峰编写实验十二、实验十三，关国华编写实验一、实验七、实验二十一、实验二十二、实验二十四、实验二十六、实验二十七及 8 个附录，刘世武编写实验十、实验十八、实验十九和附录 7，孟霞编写实验二十、实验二十九、实验三十，苗莉莉编写实验四、实验二十三，彭晴编写实验二十五，孙纳新编写实验三、实验五、实验六、实验八、实验九、实验十四、实验十五、实验十六、实验十七和附录 5，田杰生编写实验二十八，王磊编写实验十一，杨靖编写实验二。全书由关国华统稿，陈冠军主审。

本教程的出版得到了中国农业大学各级领导的支持，在准备资料和撰写过程中，分别得到中国农业大学“2012 年本科教材校级立项”和中国农业大学生物学院“教育部高等学校专业综合改革试点”项目的资助。中国农业大学生物学院李颖教授对本教程部分实验提出了一些建议。山东大学陈冠军教授对本教程进行了严格、认真的审阅，并提出了科学、全面的修改意见和建议。科学出版社为本教程的后期编辑



加工及出版做了大量的工作。在此一并表示感谢。

尽管参加本教程编写的人员都是在微生物教学或科研工作中有多年经验的教师或科研工作者，但书中难免有不足之处，诚恳希望读者批评、指正，我们将不断改进与完善。

编 者

2015 年 5 月

# 目 录

## 总序

## 前言

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 第一章 微生物细胞化学成分的分析 .....                | 1   |
| 实验一 细菌细胞含水量与蛋白质含量的测定 .....            | 1   |
| 实验二 细菌胞内辅酶 I 和辅酶 II 浓度水平的检测 .....     | 10  |
| 实验三 酵母菌细胞 RNA 提取与地衣酚测定法 .....         | 15  |
| 实验四 法夫酵母菌细胞虾青素的提取及测定 .....            | 20  |
| 实验五 极端嗜盐菌甘油二醚类衍生物的检测 .....            | 26  |
| 实验六 真菌细胞中多糖成分的提取及单糖组分的测定 .....        | 32  |
| 第二章 微生物细胞结构的分析 .....                  | 39  |
| 实验七 丝状真菌线粒体的提取及检测 .....               | 39  |
| 实验八 酵母菌细胞壁的制备及多糖组分的检测 .....           | 44  |
| 实验九 极端嗜盐菌紫膜的分离和提取 .....               | 51  |
| 实验十 革兰氏阴性菌细胞壁外膜的分离和纯化 .....           | 58  |
| 第三章 微生物代谢的分析 .....                    | 61  |
| 实验十一 翻转膜法测定细菌中的单价阳离子逆向转运蛋白活性 .....    | 61  |
| 实验十二 根瘤菌接种豆科植物实验 .....                | 67  |
| 实验十三 豆科植物-根瘤菌共生体有效性测定 .....           | 71  |
| 实验十四 反硝化细菌的培养及异化型硝酸盐还原作用的检测 .....     | 74  |
| 实验十五 光合细菌的分离与纯化 .....                 | 81  |
| 实验十六 化能自养菌的分离与纯化 .....                | 88  |
| 实验十七 微生物呼吸的测定 .....                   | 96  |
| 实验十八 乳酸发酵与乳酸菌饮料 .....                 | 102 |
| 实验十九 酒精发酵 .....                       | 107 |
| 实验二十 大肠杆菌细胞各组分中铁还原酶活性的检测 .....        | 109 |
| 实验二十一 丝状真菌原生质体制备、融合及再生 .....          | 114 |
| 实验二十二 细菌细胞内金属离子动态平衡的检测 .....          | 119 |
| 实验二十三 葡萄糖苷酶 BglB 在大肠杆菌中的异源表达、纯化 ..... | 124 |
| 实验二十四 长侧翼同源区-PCR 法敲除枯草芽孢杆菌的目的基因 ..... | 133 |
| 实验二十五 环境样品宏基因组文库构建及功能基因的筛选 .....      | 139 |

|                                              |     |
|----------------------------------------------|-----|
| 实验二十六 易错 PCR 致突变的反应体系设计与实验 .....             | 149 |
| 第四章 微生物代谢调控的分析 .....                         | 156 |
| 实验二十七 深红红螺菌固氮酶合成和活性的调控及测定 .....              | 156 |
| 实验二十八 培养条件对重组大肠杆菌生长及聚羟基烷酸产量和组成的影响 .....      | 163 |
| 实验二十九 大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶的诱导合成和分解代谢物阻遏 ..... | 169 |
| 实验三十 不同培养条件下细菌目的基因转录水平差异的分析 .....            | 174 |
| 附录 1 微生物细胞的收集和处理方法 .....                     | 180 |
| 附录 2 利用 KEGG 数据库查询代谢途径信息简介 .....             | 182 |
| 附录 3 常见的市售酸碱的浓度 .....                        | 188 |
| 附录 4 微生物生理学实验中常用的缓冲液和储存液的配制 .....            | 189 |
| 附录 5 极端嗜盐菌的种类及生理特征 .....                     | 192 |
| 附录 6 离心机的转速、相对离心力和半径之间的换算关系 .....            | 194 |
| 附录 7 酸奶的检查指标 .....                           | 195 |
| 附录 8 网筛的目数与孔径的关系 .....                       | 196 |
| 附录 9 微生物的平板菌落计数法 .....                       | 197 |
| 附录 10 微生物显微镜直接计数法 .....                      | 198 |
| 图版                                           |     |

# 第一章 微生物细胞化学成分的分析

微生物细胞化学成分的分析是研究微生物生命活动的基础。本章介绍分析微生物细胞化学组成的方法,包括微生物细胞含水量、蛋白质、核糖核酸、糖类含量的测定方法,反映细菌细胞内氧化还原水平的辅酶 I 和辅酶 II 浓度的检测方法,极端嗜盐菌细胞膜的独特成分甘油二醚类的分析技术和次级代谢产物虾青素的提取及测定。

## 实验一 细菌细胞含水量与蛋白质含量的测定

### 一、实验目的

1. 掌握测定细菌细胞干重及含水量的原理及方法。
2. 了解几种常用的测定蛋白质含量的方法,掌握福林-酚法和考马斯亮蓝染色法测定细菌细胞蛋白质含量的原理及实验技术。

### 二、实验原理

#### (一) 细菌细胞干重和含水量的测定

在液体培养基中培养的微生物细胞,经过滤或离心收集后,洗涤除去附在细胞表面的培养基,再离心收集细胞,并尽量除去细胞所附着的水分,称得的质量为细胞的鲜重(wet weight),常以 g/L 表示。为了防止细胞吸水涨裂,洗涤细胞常用与细胞基本等渗的缓冲液。由于细胞在收集过程中会聚集成团,细胞之间的水分难以除去,因此,用上述方法测得的细胞鲜重常常比实际的鲜重要高(一般高出 10%左右)。细胞之间的水分可用加入同位素标记蛋白质的方法测定,由于蛋白质不能进入细胞,只能溶于细胞外围的水中,因此测定细胞团的放射活性,可推算出细胞外围的水量。

取一定量的鲜细胞,105~110℃干燥 16~24 h 后称量,再重复几次,称至恒重,即得到细胞的干重(dry weight)。微生物细胞的干重就是微生物的生物量(biomass),是测量微生物生长的重要指标,常用每升含有微生物的质量(单位 g/L)表示。105~110℃足以挥发掉大分子通过水合作用所结合的水,更高的温度会引起某些大分子的破坏并导致一些细胞其他成分的挥发。此外,高温也会引起细胞悬液沸腾,将物质溅出容器,而使结果偏低。

用上述方法测干重的细胞，其中的生物大分子已失去了生物活性，如需保持细胞大分子的生物活性，可采用真空冷冻干燥的方法。真空冷冻干燥 (lyophilization) 是将待干燥的制品冷冻成固态，再将冻结的制品经真空升华逐渐脱水而留下干物的过程，包括冻结、升华和再干燥。冷冻干燥由冷冻干燥机来完成，冷冻干燥的制品是在低温、高真空中制成的，由于微小冰晶体的升华呈现多孔结构，这样获得的细胞物质其生物活性不变。真空冷冻干燥的原理、特点、过程及真空冷冻干燥机的工作原理见实验五。

微生物细胞中含有大量的水，一般占细胞鲜重的 70%~90%。细胞含水量 (water content) 的计算公式如下：

$$\text{细胞含水量(100\%)} = \frac{\text{鲜重} - \text{干重}}{\text{鲜重}} \times 100\%$$

## (二) 细菌细胞蛋白质含量的测定

蛋白质含量的测定可根据其物理化学性质，采用物理方法如折射率、密度、紫外吸收等来测定，或用化学方法如凯氏定氮、双缩脲反应、福林 (Folin) -酚反应等方法来测定；还可染色法如氨基黑、考马斯亮蓝染色来测定。其中紫外吸收法、双缩脲法、福林-酚试剂法、考马斯亮蓝染色法等最为常用，并且操作简便，不需复杂和昂贵的设备，又能符合一般实验室的要求。

### 1. 双缩脲法

两分子尿素在高温 (180℃) 下，释放一分子氨，缩合形成双缩脲 (biuret)  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 。双缩脲在碱性溶液中与  $\text{Cu}^{2+}$  结合，生成复杂的紫红色化合物。由于蛋白质或二肽以上的多肽分子中含多个与双缩脲结构相似的肽键，因此也具有双缩脲反应。双缩脲反应仅与蛋白质的肽键结构有关，与蛋白质的氨基酸组成无关，不受蛋白质氨基酸组成差异的影响，反应所形成的紫红色化合物的颜色深浅与蛋白质浓度成正比，而与蛋白质的种类无关。

双缩脲的常量法测定蛋白质的浓度为 1~10 mg/mL，选用 540 nm 比色。含有一个  $-\text{CS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{RHS}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$  等基团的物质，含有氨基酸和多肽的缓冲液、Tris、蔗糖、甘油等物质干扰此反应。该法测定试剂简单，操作方便，适合蛋白质浓度的快速测定。硫酸铵不干扰显色反应，有利于蛋白质纯化早期步骤的测定。

### 2. 福林-酚法

福林 (Folin) -酚法 (也称为 Lowry 法) 是常用的蛋白质定量测定方法之一。其显色原理包括两步反应：第一步是蛋白质发生双缩脲反应，第二步是酚试剂反应。福林-酚试剂由试剂甲和试剂乙组成。试剂甲由碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜和酒石酸钾钠组成，蛋白质中的肽键在碱性条件下与酒石酸钾钠-铜盐溶液作用，生成紫色的铜-蛋白质络合物；试剂乙由磷钼酸、磷钨酸、盐酸、溴等组成，在碱性条件下被第

一步反应形成的铜-蛋白质络合物中的酪氨酸的酚基还原而呈蓝色,在一定条件下,蓝色度与蛋白质含量成比例,此方法测定的是 25~250  $\mu\text{g/mL}$  的蛋白质。

由于酚试剂依赖于酪氨酸、色氨酸等特定的氨基酸残基,因此蛋白质的氨基酸组成不同会引起显色偏差,但双缩脲反应的加入使这种偏差相对减小,这是由于双缩脲反应仅与蛋白质中的肽键结构有关,不受蛋白质氨基酸组成的影响。这两种试剂的配合使用使其优势互补,达到最佳效果。该法测定蛋白质含量的优点是操作简便、迅速,不需要特殊的仪器、设备,灵敏度比双缩脲法灵敏 100 倍。

由于福林-酚法包括双缩脲反应,因此,干扰双缩脲反应的试剂均可干扰福林-酚反应。此外,样品中的酚类及柠檬酸也对此反应有干扰作用;而含量较低的尿素(0.5%左右)、胍(0.5%左右)、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1%)、 $\text{NaNO}_3$  (1%)、三氯乙酸(0.5%)、乙醇(5%)、乙醚(5%)、丙酮(0.5%)对显色无影响;这些物质的含量较高时,需作校正曲线。如果样品中含硫酸铵,需增加  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaOH}$  浓度即可显色测定。如果样品酸度较高,也需提高  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaOH}$  浓度 1~2 倍,可纠正显色浅的弊病。

值得注意的是,福林-酚试剂乙在酸性 pH 条件下较稳定,而福林-酚试剂甲是在碱性条件下与蛋白质作用生成碱性的铜-蛋白质络合物溶液。当福林-酚试剂乙加入后,应立即混匀,以便在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前,使其与酪氨酸发生还原反应。

### 3. 考马斯亮蓝染色法

考马斯亮蓝染色法(又称 Bradford 法)测定蛋白质浓度,是利用蛋白质与染料结合的原理。

考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色,当它与蛋白质通过疏水作用结合后,颜色由红色变为蓝色,最大光吸收波长由 465 nm 变为 595 nm。在一定蛋白质浓度范围内,蛋白质和染料结合符合比尔定律(Beer's law),通过测定 595 nm 处光吸收的增加量可知与其结合的蛋白质的量。

蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 的结合是一个快速的过程,2 min 左右就可反应完全,呈现最大光吸收,并可稳定 1 h,之后,蛋白质-染料复合物会发生聚合而沉淀。由于蛋白质-染料复合物具有很高的消光系数,因此,该法的灵敏度很高,比福林-酚法灵敏 4 倍,测定浓度为 10~100  $\mu\text{g/mL}$  蛋白质,微量测定法为 1~10  $\mu\text{g/mL}$  蛋白质。此方法重复性好,精确度高。

该方法干扰物少, $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  均无干扰。强碱缓冲液的一些颜色干扰可通过适当的缓冲液的对照扣除。 $\text{Tris}$ 、乙酸、巯基乙醇、蔗糖、甘油、EDTA 及微量的去污剂(Triton X-100、SDS、玻璃去污剂)有少量颜色干扰,用适当的缓冲液对照可以扣除,但大量去污剂的存在对颜色影响较大。

### 4. BCA 法

BCA [bicinchoninic acid, 4, 4'-二羧酸-2, 2'-二喹啉, 又名双辛丹宁(金鸡宁)]是对一价铜离子敏感和高特异性的试剂。

在碱性溶液中, 蛋白质分子中的肽键与二价铜离子生成络合物, 同时将二价铜离子还原成一价铜离子。BCA 可以特异地与一价铜离子结合, 生成一个在 562 nm 处有最大光吸收的紫色复合物。在一定范围内, 复合物的光吸收强度与蛋白质浓度成正比。此法测定 10~1200  $\mu\text{g/mL}$  蛋白质。

BCA 法操作简单, 灵敏度与福林-酚法相似, 但它与一价铜离子生成的化合物十分稳定, 因此, 对反应时间的控制不需要太严格。蛋白质氨基酸组成的不同不会引起显色偏差。试剂抗干扰能力强, SDS、Triton X-100、4 mol/L 盐酸胍、3 mol/L 尿素均无影响。

### 5. 紫外吸收法

由于蛋白质分子中酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的芳香环结构中含有共轭双键, 因此蛋白质具有吸收紫外线的性质, 吸收峰在 280 nm 处。在此波长下, 蛋白质溶液的吸光值与其含量成正比关系, 可用作定量测定。测定范围 0.1~1.0 mg。

利用紫外吸收法测定蛋白质含量的优点是迅速、简便、不消耗样品。此法的缺点是: ①对于测定那些与标准蛋白质中酪氨酸、色氨酸或苯丙氨酸含量差异较大的蛋白质, 有一定的误差; ②若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外线的物质(如核苷酸、核酸), 会出现较大干扰。

虽然蛋白质含量测定的方法很多, 但各方法均有它的可用性, 又有它的局限性。因此, 要根据实验的需求来选择。例如, 柱层析要求随时、快速检测蛋白质的分离情况, 不丢失样品, 但准确度要求不高, 所以用紫外分光光度法。双缩脲法线性关系好, 但灵敏度差, 测量范围窄。福林-酚法弥补了双缩脲法的缺点, 应用广泛, 但它的干扰因素多, 因而出现了考马斯亮蓝染色法。BCA 法干扰因素少, 试剂稳定, 灵敏度与福林-酚法相似。

总之, 在微生物生理学实验中, 经常要测定蛋白质的浓度, 了解每种测定方法的原理及特点, 有助于选择出合适的测定方法。

## 三、实验材料、仪器及试剂

### 1. 实验材料

(1) 菌种: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

(2) 培养基配制如下。

Luria-Bertani (LB) 液体培养基 (1 L): 950 mL 去离子水中加入 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物和 10 g NaCl, 溶解后调节 pH 至 7.0, 加水定容至 1 L, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基 (1 L): 1 L LB 液体培养基中加入琼脂 20 g, 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

### 2. 仪器及器皿

(1) 收集细胞、计数及测细胞干重: 试管、移液器、量筒、离心管、坩埚、血

球计数板、分析天平、离心机、烘箱、干燥器等。

(2) 测定细胞蛋白质含量：试管、比色管、移液器、离心管、离心机、量筒、水浴锅、721 (或 722) 分光光度计等。

### 3. 试剂

(1) 收集细胞、计数、测定细胞干重：甲醛、生理盐水、去离子水。

(2) 细胞蛋白质含量测定——福林-酚法：1 mol/L NaOH、2 mol/L NaOH、生理盐水、10 mg/mL 牛血清白蛋白溶液、福林-酚试剂甲、福林-酚试剂乙。

福林-酚试剂的配制 (均用分析纯试剂) 如下。

试剂甲：①4%  $\text{NaCO}_3$ ；②0.2 mol/L NaOH；③1%  $\text{CuSO}_4$ ；④2% 酒石酸钾钠溶液。在使用前，将①与②等体积混合配成  $\text{NaCO}_3$ -NaOH 溶液，将③与④等体积混合配成  $\text{CuSO}_4$ -酒石酸钾钠溶液，然后将这两种溶液按 50:1 的比例混合，即为福林-酚试剂甲，该试剂只能用一天，过期无效。

试剂乙：在 2 L 的磨口回流装置内加入 100 g  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，25 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，700 mL 去离子水，再加入 50 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  及 100 mL 浓 HCl，充分混匀使其溶解后，以小火回流 10 h (烧瓶内加数颗小玻璃珠，以防溶液溢出)；再加入 150 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ，50 mL 去离子水及数滴液溴；然后在通风橱中开口继续沸腾 15 min，以便除去过量的溴；冷却后定容到 1 L；过滤，滤液黄色，置棕色试剂瓶中冰箱保存。若此储存液放置时间过长，颜色由黄变绿，可加几滴液溴，煮沸数分钟，即可恢复原来颜色，仍可继续使用。

乙试剂储存液在使用前应确定其酸度。用它滴定 1 mol/L 标准 NaOH 溶液，以酚酞为指示剂，当溶液颜色由红→紫红→紫灰→墨绿时，即为滴定终点。该储存液的酸度应为 2 mol/L 左右，将其稀释为约 1 mol/L 酸度，即为福林-酚试剂乙液。

(3) 蛋白质含量测定——考马斯亮蓝染色法：100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 95% 乙醇中，加入 100 mL 85% 磷酸，用去离子水稀释至 1000 mL，滤纸过滤。考马斯亮蓝 G-250 的终浓度为 0.01% (m/V)，乙醇的终浓度为 4.7% (m/V)，磷酸的终浓度为 8.5% (m/V)。

## 四、操作步骤

### (一) 测定细胞干重

#### 1. 活化菌株，收集细胞

(1) 将 *E. coli* 接种于 LB 斜面上，37℃ 培养 18~24 h。

(2) 取一环 *E. coli* 菌苔接种于 LB 液体培养基中，37℃ 振荡培养 16~18 h (每组 2 瓶)。

(3) 每组的 300 mL 细胞培养液，取出 5.0 mL，加入一个含 0.5 mL 甲醛溶液的具塞试管中，留作计数用。将剩余培养物测量总体积后，4000 r/min 离心 15 min，小



心弃去上清液。

(4) 用 60 mL 左右生理盐水悬浮细胞, 均分至两个离心管中, 再用少量生理盐水将原离心管洗净, 将清洗液也均分至两个离心管中, 以避免损失。充分悬浮细胞。

(5) 将细胞悬液 4000 r/min 离心 15 min。弃去上清液, 取其中一个贴上标签, 写明组别和姓名, 封口后留作蛋白质测定用 (如若暂时不用, 需将细菌细胞存放于冰箱冷冻室  $-20\sim-15^{\circ}\text{C}$ )。另一管用来测定细胞干重。

(6) 在离心的同时, 用先前取出的 5 mL 培养物进行计数, 计算出每毫升培养液中的含菌数 (注意: 把培养物稀释到合适的稀释度, 避免计数时细胞堆积和重叠)。

## 2. 测细胞干重

(1) 取一个坩埚置  $105^{\circ}\text{C}$  烘箱中, 12 h 后将其移入干燥器中, 冷却后称重。

(2) 将一个含有细胞沉淀的离心管加入 1.0 mL 去离子水, 使细胞悬浮起来, 移入已称重的坩埚内, 用 0.5 mL 去离子水洗涤离心管, 将剩余细胞转入同一坩埚内, 称重。

(3) 将装有细胞悬液的坩埚置  $105^{\circ}\text{C}$  烘箱 12~24 h, 在干燥器中冷却后称重, 直至恒重。

(4) 计算每毫升原始培养物中细胞干重及每个细胞干重。

(5) 计算细胞的含水量。

## (二) 细菌细胞蛋白质含量测定——福林-酚法

(1) 用生理盐水将离心管中的冰冻细胞制备成菌悬液, 生理盐水的用量最好为原始培养物体积的 1/20。按一定倍数稀释, 使其  $\text{OD}_{600}$  在 0.6~1.0, 测量细胞悬液总体积并作记录。

(2) 取 5.0 mL 细胞悬液, 4000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 加入 1.0 mL 1 mol/L NaOH 重新悬浮细胞。

(3) 取 1.0 mL 10 mg/mL 的牛血清白蛋白标准溶液, 加入 1.0 mL 2 mol/L NaOH。此时浓度为 5.0 mg/mL。

(4) 将标准蛋白液和细胞悬液置  $80^{\circ}\text{C}$  水浴中加热 30 min, 溶解细胞蛋白质, 注意定时摇匀。

(5) 加 4.0 mL 蒸馏水于处理过的细胞悬液中, 此试管标记为 A, 其体积为 5.0 mL, 与原始悬液体积相同。

(6) 取 1.0 mL 处理过的标准蛋白质溶液, 加入 4.0 mL 蒸馏水, 此管标记为 B, 此时标准蛋白质溶液浓度为 1.0 mg/mL。

(7) 按表 1-1 配制标准蛋白质溶液 (B 管)。