



生命科学实验指南系列



Microbial Biotechnology
— A Laboratory Manual for Bacterial Systems

微生物生物技术

——细菌系统实验室指南

〔印〕S. 待仕 H.R. 达什 主编

朱必凤 廖 益 杨旭夫 许崇波 周 迪 柯 野 译



科学出版社

生命科学实验指南系列

微生物生物技术——细菌系统 实验室指南

**Microbial Biotechnology – A Laboratory Manual for
Bacterial Systems**

[印] S. 待仕 H.R. 达什 主编

朱必凤 廖 益 杨旭夫 许崇波 周 迪 柯 野 译

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-217-1525 号

内 容 简 介

细菌是生命科学研究，特别是生物技术及其产业研发的重要材料。本指南介绍了微生物生物技术系列实验原理、反应试剂的作用、操作步骤、操作流程、操作要点，以及如何观察实验结果、如何记录结果和对结果进行分析对比、实验中出现问题原因和解决问题的方法及注意事项，将复杂的生物技术研究方法，通俗易懂地介绍给读者，便于本科生、硕士研究生、博士研究生、科学工作者和技术人员理解和建立成功的信心。内容涉及细菌基础分子微生物学、克隆和转化、先进的分子微生物学、分子微生物学计算机辅助研究和分子微生物学的应用。本书既有常规的生物技术实验，也融入了先进生物技术实验；既有理论研究实验，又有应用型研究实验。

本指南可作为生命科学、农业、食品、环境工程、预防医学等专业学生的教材，也可供相关专业科学研究人员和技术人员参考。

Translation from the English language edition:
Microbial Biotechnology - A Laboratory Manual for Bacterial Systems
by Surajit Das and Hirak Ranjan Dash
Copyright©Springer India 2015
This imprint is published by Springer Nature
The registered company is Springer (India) Private Ltd.
All Rights Reserved

图书在版编目(CIP)数据

微生物生物技术：细菌系统实验室指南 / (印)S.待仕(Surajit Das), (印)H.R.达什(Hirak Ranjan Dash)主编；朱必凤等译. —北京：科学出版社，2018.8

(生命科学实验指南系列)

书名原文：Microbial Biotechnology – A Laboratory Manual for Bacterial Systems

ISBN 978-7-03-057656-9

I. ①微… II. ①S… ②H… ③朱… III. ①微生物-生物工程-实验-指南 IV. ①TQ92-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 121650 号

责任编辑：岳漫宇 侯彩霞 / 责任校对：王晓茜
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

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>

北京虎彩文化传播有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 8 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2018 年 8 月第一次印刷 印张：16 1/4

字数：385 000

定价：118.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

作者简介

Surajit Das 于 2009 年以来在印度奥里萨邦鲁尔克拉市国家技术学院生命科学部任助理教授。此前，他曾在印度友好大学北方邦诺伊达友好生物技术研究所以工作。他获得了印度泰米尔纳德邦阿米提大学海洋生物学高级研究中心海洋生物学(微生物学)博士学位。他作为澳大利亚政府博士后奖学金获得者在塔斯马尼亚大学进行海洋微生物技术研究，并对海洋微生物学与核心研究程序等多项研究感兴趣。目前他作为研究组组长正带领着环境微生物学实验室和生态学实验室(LEnME)开展基于生物膜的海洋细菌对多环芳烃和重金属的生物修复，将宏基因组方法应用于海洋微生物药物的发现，以及基于纳米颗粒的药物传递和生物修复研究，并用宏基因组方法探索研究印度主要鲤鱼的分解代谢基因和免疫球蛋白多样性，获得了印度政府科技部生物技术部(DBT)和农业研究印度理事会(ICAR)资助。新德里国家环境科学学院认可了他的工作，授予他 2007 年海洋微生物多样性青年科学家年度奖。他是 2009 年印度微生物学家协会环境微生物学青年科学家奖的获得者。Das 博士也是泰米尔纳德邦政府奖励安马来大学 2002~2003 年度 Ramasamy Padayatchiar 基金会优秀奖获得者。他还是世界自然保护联盟委员会南亚生态系统管理(CEM)委员会委员，印度微生物学家协会、印度科学大会协会、国家生物科学院和新德里国家环境科学学院委员，也是生态国际协会的成员，还是很多著名出版商出版的科学期刊的审稿人。他已经出版了 3 本书，在国家 and 国际期刊发表 40 多篇微生物学方面的论文。

Hirak Ranjan Dash 是印度奥里萨邦鲁尔克拉市国家技术学院生命科学部环境微生物学实验室和生态学实验室(LEnME)的高级研究员。他是印度奥里布巴内斯瓦尔奥里萨邦农业和技术大学微生物学的硕士(2010 年)。目前，他继续进行耐汞海洋细菌多样性和遗传方面的研究，可应用于增强汞的生物修复。他还曾在抗生素耐药与致病性弧菌和金黄色葡萄球菌基因分型领域进行过研究。期间他从孟加拉湾(奥里萨邦)分离了许多强有力的耐汞海洋细菌并应用于汞生物修复中；并开发了许多微生物技术用于监测海洋环境中汞污染的水平。他在海洋细菌分离株的研究中提出了耐汞新机制，即细胞内生物吸附，并构建了具有汞生物吸收和发散能力的转基因海洋细菌应用于汞生物修复。他发表科研论文 14 篇，参与了 7 本书部分章节和 10 篇会议论文集的编写。

原 书 前 言

尽管细菌非常微小,但它对于维护地球上生态系统的可持续发展具有非常多的益处。在进化世系中,它们是第一个出现的,有足够的时间适应环境条件,随后增加了无数的后代形式。从热喷泉到冷渗泉,它们无处不在,数量巨大且多样。这些微小的单细胞生物有许多有用的功能,随着科学的进步,它们已大量应用于食品工业、农业、临床医学领域和许多其他领域。生物技术产业利用细菌细胞生产对人类有用的生物物质(包括食物、药物、激素、酶、蛋白质和核酸)。尽管人类从这些微生物中获得了巨大的利益,但却较少关注和研究这些微小的生物。虽然研究细菌实体有了一些动力,但据估计到目前为止发现的微生物只是自然界中的1%。然而,分子生物学的飞速发展彻底改变了对环境中细菌的研究,对于它们的构成、发展史和生理学提供了新的视野。生物技术的新发展和环境微生物学研究表明微生物未来仍将是一个激动人心和新兴的研究领域。

对细菌的研究可以追溯到公元1900年,当时已经出现方法学的实质性进步和实践应用。已有很多教材涉及微生物分子生物学技术发展水平各个方面的研究及各种评论文章。然而,用户通常由于缺乏简单合适的方案而在开始实验时就失去了信心。在这方面,各种实验室指南不仅激发了研究人员和学生的积极性,也强化了科学知识的获取及提高了需要时间积累的科学素养。《微生物生物技术——细菌系统实验室指南》是为了克服大多数实验室固有的烦琐实践,尽一切努力提供非常简单的实验方案,便于本科生、硕士研究生、博士研究生、活跃的科学家和研究人员理解。此外,也可作为大多数本科生和研究生的微生物学和生物技术教材,以便于他们在实验室开展实验。

研究人员和技术人员之间较大的不同。技术人员可以添加适当的试剂获得合适的结果。然而,研究者应该关注“如何”和“为什么”。盲目地追随实验步骤而不知道试剂的原理和作用,从长远来说是无益的。因此,必须努力让初学者熟悉每个实验装置的原理和用于实验的每种试剂的有效作用。因此,本书将有利于读者修改方案及变更他们需要的试剂。无论读者的资历和研究技能如何,每个实验的说明性描述将使他们非常容易理解。在本指南的最后部分包含了环境微生物学领域一些先进的专一性实验,它将提高学生对这些微小微生物在生态系统中发挥可持续性巨大作用的认识。

我们一直努力把我们的经验和专业知识编入本指南。在本指南的整个写作过程中遇到了很多问题和障碍,但在周围人的帮助下我们克服了一切困难。我们非常感谢在这一过程中每一个人对我们的支持和鼓励。我们希望本指南能对读者在学术和研究工作中有所帮助。期望所有读者的研究取得优异成绩!

Surajit Das
Hirak R. Dash

目 录

第 1 章 细菌分子微生物学基础	1
实验 1.1 基因组 DNA 的分离	1
导言	1
原理	1
所需试剂及其作用	2
操作步骤	3
观察	4
结果表格	4
疑难问题和解决方案	4
注意事项	5
操作流程	5
实验 1.2 细菌裂解物的制备	6
导言	6
原理	7
操作步骤	8
观察	9
结果表格	10
疑难问题和解决方案	10
注意事项	10
操作流程	11
实验 1.3 质粒的分离	13
导言	13
原理	14
所需试剂及其作用	15
操作步骤	16
观察	17
结果表格	17
疑难问题和解决方案	17
注意事项	17
操作流程	18
实验 1.4 细菌总 RNA 的分离	19
导言	19
原理	19
所需试剂及其作用	20
操作步骤	21
观察	22
结果表格	22
疑难问题和解决方案	23

注意事项	23
操作流程	23
实验 1.5 16S rRNA 基因的扩增	24
导言	24
原理	26
所需试剂及其作用	27
操作步骤	28
观察	30
疑难问题和解决方案	30
注意事项	30
操作流程	31
实验 1.6 琼脂糖凝胶电泳	31
导言	31
原理	32
所需试剂及其作用	33
操作步骤	35
观察	36
疑难问题和解决方案	37
注意事项	37
操作流程	37
第 2 章 克隆与转化	39
实验 2.1 感受态细胞制备和热激转化	39
导言	39
原理	40
所需试剂及其作用	41
操作步骤	41
观察	43
疑难问题和解决方案	43
注意事项	43
操作流程	44
实验 2.2 电穿孔	45
导言	45
原理	46
所需试剂及其作用	47
操作步骤	48
观察	49
结果表格	49
疑难问题和解决方案	49
注意事项	50
操作流程	50
实验 2.3 限制性内切核酸酶消化和连接	51
导言	51
原理	51

所需试剂及其作用	55
操作步骤	56
观察	57
疑难问题和解决方案	58
注意事项	58
操作流程	58
实验 2.4 克隆所需合适载体系统的选择	59
导言	59
克隆载体的不同类型	62
选择合适克隆载体的标准	66
结论	68
实验 2.5 蓝-白斑筛选验证转化	69
导言	69
原理	69
所需试剂及其作用	70
操作步骤	71
观察	72
疑难问题和解决方案	72
注意事项	73
操作流程	73
实验 2.6 PCR 验证克隆	74
导言	74
原理	74
所需试剂及其作用	76
操作步骤	77
观察	78
疑难问题和解决方案	78
注意事项	78
操作流程	79
第 3 章 分子微生物学先进技术	80
实验 3.1 cDNA 的合成	80
导言	80
原理	80
所需试剂及其作用	82
操作步骤	83
观察	85
疑难问题和解决方案	85
注意事项	85
操作流程	86
实验 3.2 qRT-PCR 分析基因表达	86
导言	86
原理	87
所需试剂及其作用	89

操作步骤	90
疑难问题和解决方案	92
注意事项	93
操作流程	93
实验 3.3 用报道基因方法进行基因表达分析	93
导言	94
原理	94
所需试剂及其作用	95
操作步骤	96
观察	97
疑难问题和解决方案	97
注意事项	97
操作流程	97
实验 3.4 基因表达半定量分析	98
导言	98
原理	99
所需试剂及其作用	100
操作步骤	101
观察	103
观察表格	103
疑难问题和解决方案	104
注意事项	104
操作流程	105
实验 3.5 Northern 印迹	105
导言	105
原理	106
所需试剂及其作用	108
操作步骤	109
观察	111
疑难问题和解决方案	111
注意事项	111
操作流程	111
实验 3.6 宏基因组 DNA 的分离	113
导言	113
原理	113
所需试剂及其作用	115
操作步骤	116
观察	116
结果表格	117
疑难问题和解决方案	117
注意事项	117
操作流程	117
实验 3.7 细菌细胞质粒消除	118

导言	118
原理	119
所需试剂及其作用	120
操作步骤	121
观察	121
结果表格	121
疑难问题和解决方案	121
注意事项	121
操作流程	122
实验 3.8 细菌接合	122
导言	122
原理	123
所需试剂及其作用	124
操作步骤	125
观察	125
结果表格	126
疑难问题和解决方案	126
注意事项	126
操作流程	126
实验 3.9 细菌转导	127
导言	127
原理	128
所需试剂及其作用	129
操作步骤	130
观察	131
结果表格	131
疑难问题和解决方案	131
注意事项	131
操作流程	131
第 4 章 分子微生物多样性	133
实验 4.1 质粒图谱分析	133
导言	133
原理	133
所需试剂及其作用	134
操作步骤	136
观察	139
结果表格	139
疑难问题和解决方案	140
注意事项	140
操作流程	140
实验 4.2 扩增核糖体 DNA 限制性分析研究细菌相关性	142
导言	142
原理	142

所需试剂及其作用	143
操作步骤	145
观察	149
结果表格	149
疑难问题和解决方案	150
注意事项	150
操作流程	150
实验 4.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析对宏基因组细菌多态性研究	152
导言	152
原理	152
所需试剂及其作用	153
操作步骤	154
观察	158
结果表格	158
疑难问题和解决方案	158
操作流程	159
实验 4.4 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析	159
导言	160
原理	161
所需试剂及其作用	162
操作步骤	163
观察	165
结果表格	165
疑难问题和解决方案	165
注意事项	166
操作流程	166
实验 4.5 细菌多重 PCR 快速检测	168
导言	168
原理	169
所需试剂及其作用	169
操作步骤	171
观察	171
结果表格	171
疑难问题和解决方案	172
注意事项	172
操作流程	172
实验 4.6 肠杆菌基因间重复共有序列和细菌基因外重复回文序列 PCR 技术	173
导言	173
原理	174
所需试剂及其作用	175
操作步骤	177
观察	179
结果表格	179

疑难问题和解决方案	179
注意事项	180
操作流程	180
第 5 章 分子微生物学计算机辅助研究	181
实验 5.1 基因序列分析	181
导言	181
样品序列分析工具	181
原理	181
操作步骤	182
操作流程	187
实验 5.2 基因库序列的递交	188
导言	188
原理	188
操作步骤	189
操作流程	194
实验 5.3 系统发育树	194
导言	194
解读树	195
系统发育树软件	195
原理	195
操作步骤	197
操作流程	201
实验 5.4 引物设计	201
导言	201
用软件设计引物	202
引物设计指南	203
使用 NetPrimer 软件设计引物程序	203
操作流程	206
第 6 章 分子微生物学的应用	207
实验 6.1 细菌生物膜在玻璃管中的形成	207
导言	207
原理	208
所需试剂及其作用	209
操作步骤	209
观察	209
结果表格	210
疑难问题和解决方案	210
注意事项	211
操作流程	211
实验 6.2 微孔板中细菌生物膜形成的筛选	212
导言	212
原理	213

所需试剂及其作用	213
操作步骤	214
观察	214
结果表格	214
疑难问题和解决方法	215
注意事项	215
操作流程	216
实验 6.3 生物膜共聚焦激光扫描显微镜分析	217
导言	217
原理	218
所需试剂及其作用	219
操作步骤	220
观察	221
结果表格	221
注意事项	222
疑难问题和解决方案	222
操作流程	222
实验 6.4 细菌生物膜荧光显微镜和图像分析	223
导言	223
原理	223
所需试剂及其作用	224
操作步骤	225
结果表格	228
注意事项	228
操作流程	228
实验 6.5 生物表面活性剂的筛选	229
导言	229
原理	230
所需试剂及其作用	231
操作步骤	231
观察	232
结果表格	232
操作流程	232
实验 6.6 多环芳烃细菌生物治理的光谱光度分析	233
导言	233
原理	233
所需试剂及其作用	234
操作步骤	235
观察	235
结果表格	236
注意事项	236
操作流程	236
实验 6.7 筛选金属富集细菌的硫化氢实验	237

引言	237
原理	237
所需试剂及其作用	238
操作步骤	239
观察	239
结果表格	240
疑难问题和解决方案	240
注意事项	240
操作流程	240
参考文献	243
进一步读物	244

第 1 章 细菌分子微生物学基础

实验 1.1 基因组 DNA 的分离

目的：从细菌细胞中分离基因组 DNA。

导 言

不同于真核生物，细菌具有紧密的基因组结构。基因组的大小和功能基因的数量之间显示了很强的相关性，基因由反映多顺反子转录的操纵子构成。在不同种类的细菌中，基因组大小有一些变化，但比许多真核生物小。

1869 年，Friedrich Miescher 首次从人白细胞中分离出 DNA，当时他称为核蛋白。由于细菌比真核细胞小得多，它们的基因组也更小。大部分的细菌基因组由单一 DNA 分子组成，在营养、pH 和温度有利的条件下，细菌复制 DNA。细菌细胞分裂的过程比真核细胞简单得多，因此，细菌能够快速生长和分裂。各自的基因组大小在细菌的生活方式中扮演着不可或缺的角色，如游离的活细菌有最大的基因组，兼性病原菌基因组为中等大小，共生细菌或病原菌基因组最小。

游离生活的细菌有最大的基因组，兼性病原菌基因组为中等大小，共生菌或病原菌有最小的基因组。就此而论，对于确定选择什么细菌或其重组基因，从细菌中分离基因组 DNA 是有用的方法。通过测定大小和性质也可能揭示基因型的多样性。

从细胞中分离和纯化 DNA 是当代分子生物学研究最常见的一个基础实验，反映了从细胞生物学到分子生物学，从体内到体外的变迁。

原 理

许多不同的技术可用于分离细菌细胞基因组 DNA；然而，所有技术都有破碎细胞、去除蛋白质、释放遗传物质的共同步骤。本实验的主要目的是获得高质量的 DNA，在适当的条件下可储存多年。DNA 分离常见的步骤包括裂解细胞，随后去除蛋白质、糖类、RNA 等。细胞壁和细胞膜裂解通常是通过一个适当的结合酶（通常是溶菌酶）和洗涤剂消化细胞壁和破坏细胞膜。

在裂解步骤中最常见的离子洗涤剂是十二烷基硫酸钠 (SDS)。RNA 通常是通过添加无脱氧核糖核酸酶 (DNA 酶，DNase) 的核糖核酸酶 (RNA 酶，RNase) 进行降解。利用它

们在非极性溶剂(通常为乙醇/水)中的高溶解度,从高分子量 DNA 中分离出寡核苷酸。蛋白质通过化学变性和(或)添加蛋白酶 K 进行降解。最常见去除蛋白质的技术包括在有机相即苯酚和氯仿中变性和萃取(图 1.1)。

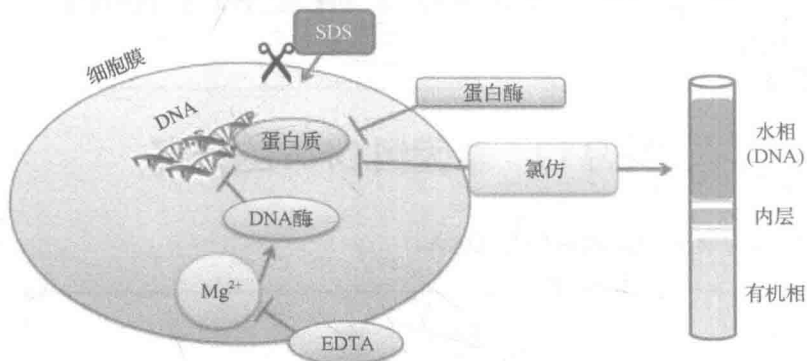


图 1.1 从细菌细胞分离基因组 DNA 的示意图(彩图请扫描封底二维码)

所需试剂及其作用

LB 肉汤培养基

LB 肉汤培养基是一种营养丰富的培养基,它能使许多种类的细菌包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)快速生长并获得良好的培养物。多数大肠杆菌菌株具有快速生长、容易获得和组分简单等优点,为 LB 肉汤培养基的普及做出了贡献。大肠杆菌在 LB 肉汤培养基摇瓶培养 24h,生长的光密度可达到 $2 \sim 3 \text{ OD}_{600}$ 。

Tris EDTA 缓冲液

在水中加入 50mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)和 50mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)并保持 pH 8.0 制备缓冲液。Tris EDTA (TE) 是缓冲液的主要成分,三羟甲基氨基甲烷的作用为缓冲控制常见酸碱,而 EDTA 螯合阳离子(如 Mg^{2+})。因此,TE 缓冲液有助于溶解 DNA 和保护 DNA 并避免其裂解。

十二烷基硫酸钠

10%的十二烷基硫酸钠(SDS)主要用于基因组 DNA 的分离。SDS 是溶解膜蛋白和脂质的一种强离子洗涤剂。它可以帮助细胞膜裂解并暴露染色体释放 DNA。

蛋白酶 K

20mg/ml 的蛋白酶 K 是溶解大部分杂蛋白而获得纯 DNA 产品的良好溶剂。同时它可能具有抑制核酸酶的活性,防止分离的 DNA 被破坏的作用。

氯化钠溶液

5mol/L 氯化钠(NaCl)溶液为封闭 DNA 磷酸负电荷提供 Na^+ 。DNA 中的磷酸负电荷引起分子间的互相排斥。 Na^+ 与磷酸的负电荷形成离子键,中和了负电荷,因此,使 DNA 分子聚在了一起。

十六烷基三甲基溴化铵

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)是一种帮助细胞膜裂解的阳离子去污剂。CTAB-NaCl 溶液与消化的细胞产物中的蛋白质结合,帮助 DNA 从蛋白质环绕的中间体中分离出来。因为阳离子去污剂 CTAB 很容易溶解于水及乙醇,可以与多糖和残留蛋白形成复合物。

酚:氯仿:异戊醇

这是一个液-液萃取的方法。它基于各分子在两种不相溶液体中的不同溶解度而分离混合物。氯仿与酚混合使蛋白质变性比只有洗涤剂更有效。氯仿-异戊醇是与细胞膜蛋白质和脂类结合并溶解它们的典型洗涤剂。用这种方法扰乱细胞膜相互间的结合和稳定。细胞膜溶解后,氯仿-异戊醇形成蛋白质-脂质复合物凝块;因此,形成沉淀。沉淀之后的原理是脂质-蛋白质复合物变成非亲水化合物而 DNA 是一种亲水化合物。因而,亲水上层含有核酸,中层含有脂质,底层有机层含有蛋白质。

异丙醇

DNA 高度不溶于异丙醇,因此,溶于水的异丙醇形成溶液,异丙醇使溶液中的 DNA 聚集和沉淀。选择异丙醇比乙醇效果更好,因为异丙醇能使低浓度的 DNA 沉淀潜力更大。除此之外,需要的蒸发时间更少。

操作步骤

1. 将 5ml 细菌培养到饱和,取 1.5ml 培养物离心(6000r/min)2min 或直到形成紧密的沉淀。
2. 弃上清液后用 567 μl TE 缓冲液重新悬浮颗粒。
3. 加入 30 μl 10% SDS 和 3 μl 20mg/ml 蛋白酶 K,彻底混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温孵化 1h。
4. 添加 100 μl 5mol/L 氯化钠溶液并完全混合。如果氯化钠浓度 $<0.5\text{mol/L}$,则核酸也沉淀。
5. 添加 80 μl NaCl 溶液并彻底混合。
6. 加 1 倍体积(0.7~0.8ml) 24:1 氯仿:异戊醇混合溶液彻底混合,6000r/min 离心 4~5min,上清液转移到新管中。
7. 上清液中加入 1 倍体积的 25:24:1 酚:氯仿:异戊醇混合溶液重新悬浮,完全提取,并在 6000r/min 离心 5min。上清液转移到新管中。
8. 上清液中添加 0.6 倍体积异丙醇并轻轻混合直至有 DNA 纤维状白色沉淀出现。