

微生物学 实验手册

周德庆主编



上海科学技术出版社

K
58.605073
359
C.2

微生物学实验手册

周德庆 主编

58.605073/15



上海科学技术出版社

微生物学实验手册

周德庆 主编

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路 450 号)

新华书店上海发行所发行 上海群众印刷厂印刷

开本 850×1156 1/32 印张 18.5 插页 4 字数 484,000

1986 年 12 月第 1 版 1986 年 12 月第 1 次印刷

印数 1—55,000

统一书号: 13119·1190 定价: 4.70 元

内 容 简 介

本书是一本内容较全面、选材较新、编写有一定特色的微生物学实验方法工具书。全书共 119 个实验，有基础实验、微生物的分离鉴定、生理生化、遗传变异和育种以及免疫学实验技术等五大部分，适合高等院校生物系和其他有关专业师生及从事微生物学研究和发酵、食品、医药、农林及环保等部门有关工作人员参考。

主编 周德庆

主要编写者

张纪忠 程皆能 杜润泮 刘启鼎 郑善良 黄静娟
祖若夫 盛宗斗 胡宝龙 郭杰炎等

39506

试读结束：需要全本请在线购买：www.ertongbook.com

前 言

众所周知,微生物学是生物科学中实践性最强的学科之一,它有一套自己独特的研究方法。纵观微生物学的发展历史,可以明显地看到,显微镜、消毒灭菌、纯种分离和培养等一系列基本实验技术的创建,为微生物学的发展奠定了坚实的基础。而现代化实验手段的广泛应用,又进一步促进了微生物学的纵深发展。今天,微生物学已成为生物科学中发展最快的学科之一,它的实验方法和技术,也在迅速地向现代生物学的各个领域发生横向扩展。

当前,微生物学在经济发展中的巨大作用,已为世人所瞩目。它在生物科学中,尤其在分子生物学和生物工程中的地位,也日趋重要。因此,不论作为一个微生物学工作者,或是一个现代生物科学工作者,都应受到良好的微生物学实验技术的基础训练。然而,长期以来,高校微生物学教学第一线的师生,都感到手头还缺少一本内容较全面,材料较充实,方法较新颖,比较适合国内实际情况的微生物学实验方法的工具书。为此,我们在实践的基础上,集体编写了本书。编写中,我们力求做到内容全面,叙述翔实,技术具体,既有基础实验和应用实验,又有现代技术及其应用实验,企望有广泛的实用性,适应于教学需要,同时适应科研和生产的需要。

本书取材广泛,内容是在较长时间的教学和科学研究实践中逐步累积起来的,它不仅凝聚着我校微生物学教研室内许多同志的劳动成果,而且还得到过我系兄弟教研室和我校遗传研究所等不少同志的帮助;在本书的编写过程中,我室的李君璵教授曾给予热情的支持;陆俊英同志为本书绘制了全部插图;张纪忠、程皆能、杜润洋、刘启鼎等同志对有关稿件的内容进行了审阅。在此,谨向他们致以深切的谢意!

由于微生物学实验方法涉及面广,学科发展又快,再则与其他学科相互渗透等特点,加上限于水平,内容不足之处在所难免,望有关专家、学者以及广大读者不断赐予宝贵的意见。

周德庆

于复旦大学生物系微生物学教研室

1983年12月25日

目 录

第一章 基础实验

I. 显微镜技术

1-1 普通光学显微镜的使用	1
1-2 暗视野显微镜的使用	6
1-3 相差显微镜的使用	8
1-4 显微测微计的使用	11

II. 微生物的形态构造

1-5 细菌的涂片及简单染色法	14
1-6 革兰氏染色法	16
1-7 抗酸性染色法	19
1-8 细胞壁染色法	21
1-9 荚膜染色法	23
1-10 鞭毛染色法	26
1-11 芽孢染色法	30
1-12 细胞内含物的染色法	32
1-13 放线菌形态特征的初步观察	34
1-14 酵母菌细胞核的染色	36
1-15 根霉假根的观察	37
1-16 根霉接合孢子的观察	39
1-17 载片培养及其观察方法	40
1-18 昆虫病毒多角体的观察	42

1-19	四大类微生物菌落形态的比较和识别	43
------	------------------	----

Ⅲ. 培养基的配制和灭菌

1-20	培养基的配制	46
1-21	加压蒸汽灭菌法	51
1-22	干热灭菌法	52
1-23	过滤除菌法	54

Ⅳ. 接种、分离和纯化

1-24	微生物的接种方法	56
1-25	稀释涂布和平板划线分离法	65
1-26	真菌的单孢子分离法	70
1-27	用厌氧袋法分离培养丙酮丁醇梭菌	73

V. 生长繁殖和若干生理生化反应的测定

1-28	微生物的计数	78
1-29	细菌生长曲线的测定	85
1-30	细菌的生理生化反应——试纸法	88

Ⅵ. 菌种保藏

1-31	简易常用保藏法	91
1-32	冷冻干燥保藏法	94
	参考文献	96

第二章 微生物的分离与鉴定

I. 细 菌

2-1	芽孢杆菌、肠道杆菌、假单胞菌及球菌的分离纯化	97
附 2-1	沙门氏和志贺氏菌(SS)琼脂培养基的成分、配制及结果观察	100

附 2-2 伊红美蓝(EMB)琼脂培养基的原理、成分、配制及结果 观察	101
2-2 芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)种的鉴定	101
附 2-3 芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)典型菌株的检索	108
2-3 肠杆菌科(<i>Enterobacteriaceae</i>)各属的鉴定	115
附 2-4 肠杆菌科四个族的特征比较表	120
2-4 假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)的鉴定	122
附 2-5 假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)检索表	126
2-5 革兰氏阳性球菌的鉴定	133
附 2-6 链球菌科各属的检索表	135
附 2-7 乳酸的纸层析分析法	136
附 2-8 细菌分类鉴定中的一些重要生理生化试验	137

I. 放 线 菌

2-6 放线菌的分离	164
2-7 放线菌菌体形态的观察	167
2-8 放线菌细胞化学组分的测定	174
2-9 放线菌抗菌谱的测定	178
2-10 放线菌分科、分属的鉴定	180
附 2-9 放线菌目常见科检索表	182
附 2-10 放线菌目主要科的分属检索表	183
2-11 链霉菌属的分群	187
附 2-11 链霉菌属分群检索表	189
2-12 放线菌种的鉴定	189
附 2-12 放线菌分类鉴定用培养基	194

III. 酵 母 菌

2-13 酵母菌的分离	197
2-14 酵母菌的分属鉴定	200
2-15 酵母菌种的鉴定	205
附 2-13 酵母各属检索表	215

附 2-14	酵母属分种的检索表	218
附 2-15	假丝酵母属分种检索表	222
附 2-16	酵母分离鉴定用培养基	228

IV. 丝状真菌

2-16	小型丝状真菌的分离	232
2-17	水霉科(Saprolegniaceae)常见属的分离与鉴定	236
附 2-17	水霉科常见属检索表	240
2-18	毛霉科(Mucoraceae)常见种的鉴定	241
附 2-18	根霉属常见种检索表	245
附 2-19	毛霉属常见种检索表	245
2-19	散囊菌目(Eurotiales)常见代表种的鉴定	246
2-20	球壳菌目(Sphaeriales)常见代表种的鉴定	249
2-21	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)的分群(种群)	253
附 2-20	曲霉属分群检索表	257
2-22	青霉属(<i>Penicillium</i>)的分系(种系)	258
附 2-21	青霉属分系的检索表	264
2-23	镰孢菌属(<i>Fusarium</i>)种的鉴定	267
附 2-22	毒性镰孢菌种的检索表	271
2-24	半知菌亚门(Deuteromycotina)常见种的鉴定	273
附 2-23	小型丝状真菌分离鉴定用的培养基	277
	参考文献	278

第三章 微生物的生理生化

I. 青霉素发酵

3-1	青霉素发酵	281
3-2	青霉素效价的生物测定	283
3-3	青霉素发酵过程中糖的利用	290
3-4	青霉素发酵过程中氨态氮的变化	294
3-5	前体物质对青霉素生物合成的影响	298

II. 微生物的代谢调节

- 3-6 天冬氨酸和苏氨酸对赖氨酸生物合成的代谢调节 302

III. 瓦勃氏定容呼吸测定仪的应用

- 3-7 瓦勃氏呼吸仪反应瓶常数的测定 308
- 3-8 应用瓦勃氏呼吸仪测定 NaHCO_3 释放 CO_2 的体积 312
- 3-9 大肠杆菌的呼吸作用——耗氧速度的测定及碘乙酸的影响 319
- 3-10 发酵液中 L-谷氨酸的定量测定 322
- 附 3-1 瓦勃氏定容呼吸测定仪简介 326
- 附 3-2 水银使用安全守则 333
- 附 3-3 瓦勃氏呼吸仪的清洗与保护 333
- 附 3-4 水银密度表 334
- 附 3-5 气体溶解度表 335

IV. 抗生素筛选中的早期鉴别

- 3-11 抗生素的一般筛选方法 335
- 3-12 用纸上 pH 层析法确定抗生素的离子特性 339
- 3-13 用捷克八溶剂系统纸层析法鉴别抗生素 342
- 3-14 用纸电泳法鉴别抗生素的离子特性 345
- 3-15 用薄层层析法分离和鉴别抗生素 348

V. 蛋白质、酶及核酸的测定

- 3-16 蛋白质含量的简易测定法 351
- 3-17 α 淀粉酶活力的测定 354
- 3-18 蛋白酶活力的测定 358
- 3-19 细菌细胞中大分子 DNA 的分离与提纯 363
- 3-20 细菌细胞核酸含量的测定 366
- 3-21 用二苯胺法作脱氧核糖核酸 (DNA) 的定量测定 369

3-22	细菌转移核糖核酸(tRNA)的分离纯化·····	373
3-23	细菌核糖体的分离与纯化·····	375
3-24	核糖核酸(RNA)的定量测定·····	379

VI. 大肠杆菌λ噬菌体及其DNA的制备与鉴定

3-25	λ噬菌体—— <i>E. coli</i> 225(λ)的制备及其效价测定·····	383
3-26	λ噬菌体—— <i>E. coli</i> 225(λ)的分离纯化·····	387
3-27	λ噬菌体DNA的制备及琼脂糖电泳鉴定·····	394
3-28	限制性内切核酸酶Eco RI的分离纯化及其对λ-DNA的酶切作用·····	398
3-29	λ-DNA生物学活性的测定——对大肠杆菌的转染作用·····	404
	参考文献·····	408

第四章 微生物的遗传变异和育种

I. 大肠杆菌(*E. coli*)lac-突变型的诱变、筛选和鉴定

4-1	在鉴别性培养基上检出大肠杆菌乳糖操纵子的各种突变型·····	412
4-2	用紫外线诱变大肠杆菌筛选乳糖调节基因突变型·····	415
4-3	用EMS诱变大肠杆菌筛选 <i>i</i> ⁻ 突变型·····	419
4-4	用转座子诱发的插入突变来筛选 <i>i</i> ⁻ 、 <i>z</i> ⁻ 和 <i>y</i> ⁻ 突变型·····	424
4-5	利用抑制基因来检测无义突变·····	428

II. 高产菌株的诱变育种

4-6	通过筛选抗反馈抑制突变型提高赖氨酸产量·····	433
4-7	用紫外线和氟乙酸选育酵母菌的柠檬酸高产菌株·····	436
4-8	耐高浓度自身代谢产物的抗反馈抑制突变型的选育·····	442
4-9	用快中子辐照选育抗生素高产菌株·····	448
4-10	应用快中子和多烯类抗生素选育霉菌蛋白酶的高产	

菌株·····	459
---------	-----

Ⅲ. 营养缺陷型突变株的筛选

4-11 酵母菌营养缺陷型的诱变、筛选和鉴定·····	463
-----------------------------	-----

Ⅳ. 诱变剂的检测

4-12 用 Ames 方法检测诱变剂和致癌剂·····	471
------------------------------	-----

Ⅴ. 基因定位

4-13 用中断杂交法进行基因定位·····	480
附 4-1 简易中断器的制作·····	484
4-14 通过梯度转移进行基因定位·····	485
4-15 lac z 基因内点突变的精细定位·····	488

Ⅵ. 基因重组

4-16 细菌蛋白酶产生菌的杂交育种·····	492
4-17 半乳糖基因的高频转导·····	495

Ⅶ. 基因工程技术

4-18 λ 噬菌体 DNA 和 Charon 4A DNA 的酶切图谱分 析·····	501
4-19 λ 噬菌体 DNA 的体外包装·····	505
4-20 大肠杆菌 pBR 322 质粒 DNA 的分离和纯化·····	511
参考文献·····	516

第五章 免疫学实验技术

I. 免疫血清学技术

5-1 免疫血清的制备·····	519
5-2 试管凝集反应·····	525

5-3	双向琼脂扩散试验	527
5-4	对流免疫电泳	530
5-5	琼脂免疫电泳	532
5-6	火箭免疫电泳	536
5-7	交叉免疫电泳和火箭-线形免疫电泳	539

II. 免疫荧光技术

5-8	免疫球蛋白的提取——盐析法	543
附 5-1	从不同血清中提取 Ig G 的盐析条件	547
附 5-2	血清中加入饱和硫酸铵溶液的计算	547
5-9	免疫球蛋白的纯化——离子交换层析法	547
附 5-3	DEAE-纤维素的再生与保存方法	551
5-10	免疫荧光标记及测定方法	551

III. 细胞免疫技术

5-11	白细胞移动抑制试验(LMIT)	557
5-12	免疫特异性玫瑰花结试验	560
5-13	抗体生成细胞的检测——溶血空斑试验	563
5-14	小鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬试验	566
附 5-4	几种营养液、缓冲液和试剂的配制	569
参考文献	573

第一章 基础实验

I. 显微镜技术

1-1 普通光学显微镜的使用

【目的】

了解普通光学显微镜的构造和原理，并正确掌握使用显微镜的方法。

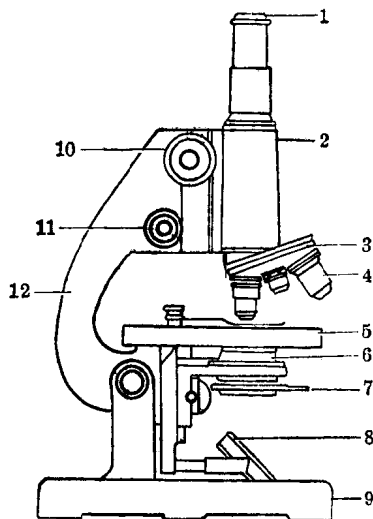


图 1-1 光学显微镜的构造

1.目镜；2.镜筒；3.物镜转换器；4.物镜；5.镜台；6.聚光器；7.可变光阑；8.反光镜；9.镜座；10.粗调节螺旋；11.细调节螺旋；12.镜臂

【光学显微镜的基本构造和原理】

光学显微镜由机械部分和光学部分组成(见图 1-1)。

在光学系统中物镜是较重要的部件。各种物镜上都刻有放大

倍数、数值孔径(numerical aperture 简称为 N. A)及所要求盖玻片厚度等主要参数(图 1-2)。物镜的性能可用数值孔径表示(图 1-3):

$$N.A = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

n 表示标本和物镜之间介质的折光率。

α 表示物镜光轴上的物点发出的光线投射到物镜前透镜边缘的最大夹角称镜口角。

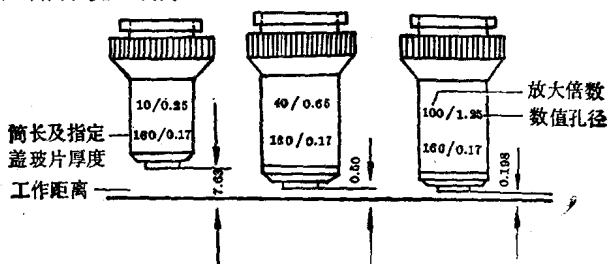


图 1-2 XSP-16 型显微物镜的主要参数

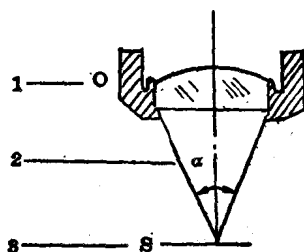


图 1-3 物镜的镜口角

1. 物镜; 2. 镜口角; 3. 标本面

显微镜的优劣主要是决定于分辨力(D)的大小。分辨力即物镜能判别某物体两点间的最小距离。因此就以分辨距离来衡量显微镜的分辨力:

$$D = \frac{\lambda}{N.A} \times 0.61$$

由上式可知, 分辨力是取决于入射光波波长(λ)和物镜数值孔径的大小。 D 值愈小, 表明分辨力愈高。当用普通光学显微镜时, 其