

全国高等医药院校药学类实验教材

QUANGUO GAODENG YIYAO YUANXIAN

YAOXUELEI SHIYAN JIAOCAI

生物制药工艺学 实验与指导

〔主编 高向东 主审 吴梧桐〕

SHENGWU ZHIYAO
GONGYIXUE
SHIYAN YU ZHIDAO



中国医药科技出版社

全国高等医药院校药理学类实验教材

生物制药工艺学实验与指导

主 编 高向东

主 审 吴梧桐

副主编 何书英

编 者 (以姓氏笔画为序)

吕炜锋 李泰明 何书英

劳兴珍 高向东

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是供高等医药院校生物制药专业、生物技术及生物工程专业、海洋药学等专业使用的生物制药工艺实验课程教材,分基础实验、综合性实验和设计性实验三部分,共有43个实验。基础实验部分重点介绍了微生物发酵技术、动物细胞培养技术、酶工程技术、基因工程技术和生物大分子分离纯化技术等实验;综合性实验涉及氨基酸及其衍生物、多肽及蛋白质药物、核酸类药物、酶类药物、糖类药物、生物制品等代表品种的制备和分析;设计性实验有利于培养学生的设计、综合能力。本书也可供从事相关专业教学与科研的实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物制药工艺学实验与指导/高向东主编. —北京:中国医药科技出版社, 2008.3

全国高等医药院校药理学类实验教材

ISBN 978-7-5067-3827-9

I. 生… II. 高… III. 生物制品: 药物-生产工艺-实验-医学院校-教学参考资料 IV. TQ464-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第019143号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 责编: 010-62278402 发行: 010-62244206

网址 www.cspyp.cn www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm^{1/16}

印张 12

字数 279千字

印数 1—5000

版次 2008年3月第1版

印次 2008年3月第1次印刷

印刷 北京市朝阳区小红门印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-3827-9

定价 22.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校药学类规划教材常务编委会

名誉主任委员 吴阶平 蒋正华 卢嘉锡

名誉副主任委员 邵明立 林蕙青

主任委员 吴晓明 (中国药科大学)

副主任委员 吴春福 (沈阳药科大学)

姚文兵 (中国药科大学)

王温正 (中国医药科技出版社)

刘俊义 (北京大学药学院)

朱依淳 (复旦大学药学院)

张志荣 (四川大学华西药学院)

朱家勇 (广东药学院)

委 员 (按姓氏笔画排列)

王应泉 (中国医药科技出版社)

叶德泳 (复旦大学药学院)

毕开顺 (沈阳药科大学)

吴 勇 (四川大学华西药学院)

吴继洲 (华中科技大学同济药学院)

李元建 (中南大学药学院)

杨世民 (西安交通大学药学院)

陈思东 (广东药学院)

姜远英 (第二军医大学药学院)

娄红祥 (山东大学药学院)

曾 苏 (浙江大学药学院)

秘 书 罗向红 (沈阳药科大学)

徐晓媛 (中国药科大学)

浩云涛 (中国医药科技出版社)

高鹏来 (中国医药科技出版社)

编写说明

经教育部和全国高等医学教育学会批准，全国高等医学教育学会药学教育研究会于2004年4月正式成立，全国高等医药院校药学类规划教材编委会归属于药学教育研究会。为适应我国高等医药教育的改革和发展、满足市场竞争和医药管理体制对药学教育的要求，教材编委会组织编写了“全国高等医药院校药学类规划教材”。

本系列教材是在充分向各医药院校调研、总结归纳当前药学教育迫切需要补充一些教学内容的基础上提出编写宗旨的。本系列教材的编写宗旨是：药学特色鲜明、具有前瞻性、能体现现代医药科技水平的高质量的药学教材。也希望通过教材的编写帮助各院校培养和推出一批优秀的中青年业务骨干，促进药学院校之间的校际间的业务交流。

参加本系列教材的编写单位有：中国药科大学、沈阳药科大学、北京大学药学院、广东药学院、四川大学华西药学院、山西医科大学、华中科技大学同济药学院、复旦大学药学院、西安交通大学药学院、山东大学药学院、浙江大学药学院、北京中医药大学等几十所药学院校。

教材的编写尚存在一些不足，请各院校师生提出指正。

全国高等医药院校药学类

规划教材编写办公室

2004年4月16日

前 言

生物制药工艺学实验是将生物制药的理论和技術融为一体并付诸实践的重要课程。随着生物技术和生物分离工程技术的迅速发展，生物制药工业已成为现代制药工业的重要发展领域，有关生物制药工艺的新理论、新工艺、新技术层出不穷，为此，我们在校自编实验教材的基础上，结合长期以来在教学实践中所积累的经验以及本院的科研工作，编写了这本《生物制药工艺学实验与指导》。

本书共分为三部分：第一部分生物制药工艺技术基础实验，包括微生物发酵技术、动物细胞培养技术、酶工程技术、基因工程技术和生物大分子分离纯化技术等基础实验；第二部分生物药物制备综合性实验，涉及氨基酸及其衍生物、多肽及蛋白质药物、核酸类药物、酶类药物、糖类药物、生物制品等代表品种的制备与分析；第三部分设计性实验。全书共包括 43 个实验，每个实验都按实验目的、实验原理、实验材料及思考题进行阐述。

本课程在生物技术、生物工程、海洋药学等专业学生的学习中具有重要地位，是培养高级生物制药技术人才的重要专业课程。本书除可作为专业教材外，对生物制药科技人员也具有参考价值。

本书由吴梧桐教授主审，在全书的编写过程中，吴教授给予了大量指导性建议，谨此表示衷心的感谢！同时，对我校生物制药教研室和微生物制药教研室多年来积累有关生物制药工艺学实验课教学资料的老师们一并表示感谢！

由于编者水平有限，本书存在不足之处在所难免，敬请使用本教材的广大师生与读者批评指正。

编 者

2008 年 1 月

目 录

第一部分 生物制药工艺技术基础实验	(1)
第一节 微生物发酵技术基础实验	(1)
实验一 土壤中细菌、放线菌、酵母菌及霉菌的分离与纯化	(2)
实验二 菌种保藏实验	(6)
实验三 大肠杆菌营养缺陷型菌株的筛选	(11)
实验四 细菌生长曲线的测定	(16)
第二节 动物细胞培养技术基础实验	(18)
实验五 牛主动脉内皮细胞的培养与鉴定	(19)
实验六 刀豆球蛋白对小鼠脾淋巴细胞的增殖作用	(22)
实验七 干扰素生物学活性的测定	(25)
第三节 固定化酶技术基础实验	(29)
实验八 共价偶联法制备固定化胰蛋白酶	(31)
实验九 包埋法制备固定化延胡索酸酶产生菌	(35)
实验十 吸附法制备固定化脂肪酶	(38)
第四节 基因工程技术基础实验	(41)
实验十一 碱裂解法制备质粒 DNA	(43)
实验十二 大肠杆菌染色体 DNA 制备及限制性内切酶酶切	(49)
实验十三 PCR 扩增目的基因、酶切与鉴定	(53)
实验十四 氯化钙法制备感受态细胞、DNA 片段连接及转化	(57)
实验十五 重组克隆的筛选鉴定与 SDS - PAGE 电泳检测	(60)
第五节 生物大分子分离纯化技术基础实验	(67)
实验十六 盐析法制备免疫球蛋白	(68)
实验十七 溶菌酶结晶的制备及活力测定	(71)
实验十八 细胞色素 C 的制备和测定	(75)
实验十九 凝胶层析法测定蛋白质的分子量	(78)
实验二十 亲和层析法制备胰蛋白酶抑制剂	(81)
实验二十一 超滤法制备胸腺肽	(85)
第二部分 生物药物制备实验	(87)
第一节 氨基酸及其衍生物类药物	(87)
实验二十二 固定化细胞法生产 L - 天冬氨酸和 L - 丙氨酸	(87)
第二节 多肽及蛋白质类药物	(92)
实验二十三 重组水蛭素 III 的制备	(92)
实验二十四 酸醇提取法制备猪胰岛素	(97)

实验二十五 多肽缩宫素的 Fmoc 固相合成	(100)
第三节 核酸类药物	(104)
实验二十六 酵母 RNA 的制备和单核苷酸的离子交换柱层析分析	(104)
实验二十七 单核苷酸衍生物制备	(108)
第四节 酶类药物	(110)
实验二十八 胰弹性蛋白酶的制备及活力测定	(110)
实验二十九 超氧化物歧化酶的分离纯化及活力测定	(114)
实验三十 重组门冬酰胺酶 II 的纯化与分析	(118)
第五节 糖类药物	(122)
实验三十一 1, 6-二磷酸果糖 (FDP) 的制备	(122)
实验三十二 银耳多糖的制备及分析	(126)
实验三十三 低分子量肝素制备	(129)
第六节 脂类药物	(132)
实验三十四 氯化血红素的制备及含量测定	(132)
实验三十五 鱼油中不饱和脂肪酸 EPA 和 DHA 的制备	(135)
第七节 维生素与辅酶类药物	(138)
实验三十六 维生素 B ₂ (核黄素) 的制备	(138)
实验三十七 微生物发酵法制备辅酶 Q ₁₀	(141)
第八节 生物制品	(145)
实验三十八 抗人 CD3 改形单链抗体的制备	(145)
第九节 抗生素药物	(152)
实验三十九 青霉素钾盐的制备	(152)
实验四十 螺旋霉素的制备	(157)
第三部分 设计性实验	(160)
实验四十一 天然生物活性物质的发现研究	(160)
实验四十二 重组蛋白类药物的表达、制备及分析	(168)
实验四十三 生物药物中试放大研究	(173)
参考文献	(176)

第一部分 生物制药工艺技术基础实验

第一节 微生物发酵技术基础实验

微生物发酵 (microbiology fermentation) 亦称微生物工程, 是生物工程的重要组成和基础, 它利用微生物的作用并通过近代工程技术来实现有用物质向工业化生产或其他产业过程转化的科学技术体系。它以微生物学、生物化学、遗传学的理论为基础, 开发自然界微生物资源及其所有的潜在功能, 使之应用于生产实践。其主要包括原料的处理, 有用微生物的筛选和诱变, 菌种工业应用的最适培养条件的选择, 代谢的调节和控制, 生物反应等的研究和设计, 发酵工艺中各种参数的测试与自控, 产物的分离和提取等。微生物发酵技术与基因工程、细胞工程、酶工程相互密切结合、相互渗透和相互促进, 是科研成果从实验室向商业化转移的重要课题。总的来说, 微生物发酵既是开发生物资源的关键技术, 也是生物技术产业化的重要环节。

在本节中, 主要总结了生物制药工艺学理论和实验课以及科学研究中的部分工作经验, 并在参考国内外有关教材和资料的基础上, 兼顾了微生物实验的基本操作和技能训练与专题实验相结合, 着重介绍微生物的菌种的分离、纯化、培养、选育和保藏技术等内容。

微生物发酵技术的研究开发内容之一的菌种筛选和诱变技术, 为人类社会创造了巨大财富。在这方面, 介绍了微生物的菌种的分离、纯化、培养、选育。学生学习后可以从各种环境中分离出不同类型微生物, 还可以通过诱变 (包括物理诱变和化学诱变) 和其他手段进行菌种的遗传改造, 并从中筛选出性状优良的突变株和重组体。同时还介绍了微生物菌种保藏技术, 使得从自然界直接分离的野生型菌株以及经人工方法选育出来的优良变异菌株被保藏后不死亡、不变异、不被杂菌污染, 并保持其优良性状, 以利于生产和科研使用。

在微生物发酵技术中考察环境因素对微生物生长的影响, 测定微生物的生长曲线也很重要, 为此介绍了微生物生长曲线测定实验。

微生物发酵技术还包括发酵产物的分离和提取, 这方面的内容将在本书第二部分的抗生素药物中以专题形式进行介绍。

实验一 土壤中细菌、放线菌、酵母菌 及霉菌的分离与纯化

【实验目的】

1. 学习正确使用微生物学实验室中常用的接种工具和各种接种技术。
2. 了解培养细菌、放线菌、酵母菌及霉菌等四大类微生物的培养条件和培养时间。
3. 掌握获得微生物纯培养物的分离方法。

【实验原理】

自然界的微生物资源十分丰富，如广泛分布于土壤、水、空气、人体表面及与外界相通的腔道中。由于微生物通常以混居的群体形式存在，因此首先要分离出各种微生物的纯培养物。纯培养物是来自某种微生物的一个细胞分裂、繁殖而产生的后代。菌种分离与纯化技术是微生物学中重要的基本技术之一。

菌种分离与纯化一般包括采集菌样、富集培养、纯种分离和性能测定等四个步骤。采集菌样首先要依据欲筛选的微生物生态及分布情况来选择采集地点。由于在土壤中几乎可以找到任何微生物，所以土壤往往是首选的采集目标。富集培养，又称增殖培养，就是利用选择性培养基的原理，限制不需要的微生物的生长，使所需的微生物大量繁殖。纯种分离的方法有：稀释平板分离法、涂布法、划线分离法、单细胞分离法等。通过纯种分离，掌握微生物的接种和分离技术。在整个试验中，无菌操作技术是微生物实验成功的前提，需要严格掌握。

【实验材料】

1. 器材

- | | |
|-----------|------|
| (1) 无菌培养皿 | 18 只 |
| (2) 无菌移液管 | 10 支 |
| (3) 涂布棒 | 1 支 |
| (4) 玻璃珠 | 1 瓶 |
| (5) 接种针 | 1 支 |
| (6) 接种环 | 1 支 |
| (7) 无菌试管 | 8 支 |
| (8) 培养箱 | |

(9) 250ml 锥形瓶 1 只

(10) 酒精灯

2. 试剂

(1) 土壤菌样;

(2) 马丁琼脂培养基;

葡萄糖	1.0g
蛋白胨	0.5g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.1g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g
孟加拉红 (1mg/ml)	0.33ml
琼脂	1.5 ~ 2g
水	100ml
自然 pH	

(3) 高氏合成 1 号琼脂培养基;

可溶性淀粉	2.0g
KNO_3	0.1g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.05g
NaCl	0.05g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g
琼脂	1.5 ~ 2g
水	100ml
pH	7.2 ~ 7.4

(4) 马铃薯葡萄糖培养基;

马铃薯浸汁 (20%)	100ml
葡萄糖	2g
琼脂	1.5 ~ 2g

具体配制方法如下: 将马铃薯去皮, 切成小块, 放入 200ml 的烧杯中煮沸 30min, 注意用玻棒搅拌以防糊底, 然后用双层纱布过滤, 得到的滤液加葡萄糖, 补足体积至 100ml, 自然 pH。

(5) 50 000U/ml 的链霉素;

标准链霉素制品为 10 000 000U/瓶, 先准备 20ml 无菌水, 在无菌条件下反复用无菌水将瓶中的链霉素溶解、转移、再溶解、再转移。最终得到的链霉素溶液为 50 000U/ml, 临用时每毫升培养基加 1 μ l 即可。

(6) 肉膏蛋白胨培养基;

蛋白胨	1.0g
牛肉膏	0.5g
NaCl	0.5g
pH	7.2

水

100ml

固体培养基则加入 1.5% ~ 2% 琼脂。

(7) 10% 酚液；

(8) 无菌水。

【实验方法】

1. 分离土壤菌样

(1) 土壤稀释液的制备

① 土壤的采集：采集离地面 5 ~ 20cm 处的土壤几十克，盛入事先灭过菌的防水纸袋内，置于 4℃ 冰箱中，待分离。

② 制备土壤悬液：称取土壤 1g，经无菌操作，迅速倒入一个带玻璃珠并盛有 99ml 无菌水的锥形瓶中，振荡 10 ~ 20min，这就是 10^{-2} 的土壤悬液。

③ 制备土壤稀释液：利用 10 倍稀释法来制备土壤稀释液：用无菌移液管吸取 0.5ml 10^{-2} 的土壤悬液，放入装有 4.5ml 无菌水的试管中，即得 10^{-3} 的土壤悬液；依此类推，可得系列稀释度的土壤悬液。

(2) 分离细菌（稀释平板倾注法）取 4 个无菌培养皿，将 10^{-6} 、 10^{-7} 的土壤悬液各取 1ml，接入平皿中，每个稀释度接 2 个平皿，做好标记。再将熔化并冷却至约 50℃ 的肉膏蛋白胨琼脂培养基倾入平皿中，立即将平皿轻轻的作旋转晃动，使菌液与培养基充分混匀，平置待凝固。最后将平板倒置于 30℃ 的培养箱中，培养 1 ~ 2d，观察结果。

(3) 分离霉菌（稀释平板倾注法）取 4 个无菌培养皿，将 10^{-2} 、 10^{-3} 的土壤悬液各取 1ml，接入平皿中，每个稀释度接 2 个平皿，做好标记。再将熔化并冷却至约 50℃ 的马丁琼脂培养基（为了抑制细菌的生长，加入终浓度为 50U/ml 的链霉素）倾入平皿中，立即将平皿轻轻的作旋转晃动，使菌液与培养基充分混匀，平置待凝固。最后将平板倒置于 30℃ 的培养箱中，培养 3 ~ 5d，观察结果。

(4) 分离放线菌（稀释平板倾注法）取 4 个无菌培养皿，将 10^{-4} 、 10^{-5} 的土壤悬液，每管加入 10% 酚液 4 ~ 5 滴（以抑制细菌和霉菌的生长），摇匀后各取 1ml，接入平皿中，每个稀释度接 2 个平皿，做好标记。再将熔化并冷却至约 50℃ 的高氏合成 1 号琼脂培养基倾入平皿中，立即将平皿轻轻的作旋转晃动，使菌液与培养基充分混匀，平置待凝固。最后将平板倒置于 30℃ 的培养箱中，培养 5 ~ 7d，观察结果。

(5) 分离酵母菌（稀释平板涂布法）取 4 个无菌培养皿，将熔化并冷却至约 50℃ 的马铃薯葡萄糖培养基倾入平皿中，平置待凝固。将 10^{-4} 、 10^{-5} 的土壤悬液各取 1ml，接入平皿中，每个稀释度接 2 个平皿，做好标记。用无菌玻璃涂棒将菌液自平板中央均匀向四周涂布扩散，平置待吸收完全。最后将平板倒置于 30℃ 的培养箱中，培养 2 ~ 3d，观察结果。

2. 平板划线法分离微生物

混合菌悬液或当菌种不纯时通常用平板划线法进行纯种分离。

(1) 制备平板 无菌操作，在火焰旁将熔化并冷却至约 50℃ 的琼脂培养基倾入平皿中，平置待凝固。

(2) 划线分离

① 连续划线法：将接种环灭菌后，从待纯化的菌落或菌液沾取少许菌种，点种在平板边缘处，再将接种环灭菌，以杀死过多的菌体，然后从涂有菌的部位在平板上做往返平行划线。注意划动要利用手腕力量在平板表面轻轻滑动，不要将培养基划破，所划线条平行密集而不重叠。

② 分区划线法：分区划线法划线时一般将平板分为4个区，故也称四分区划线法。将接种环灭菌后，从待纯化的菌落或菌液沾取少许菌种，在平板上的第1区做往返平行划线。将接种环灭菌后，从1区将菌划出至第2区，做往返平行划线。接种环再次灭菌，从第2区划出至第3区。依此类推，从第3区划出至第4区。

(3) 培养 将平板倒置于培养箱中培养适宜时间，观察结果。

3. 将分离纯化菌株进行斜面培养基接种、液体培养基接种和穿刺接种

(1) 斜面培养基接种 将接种环灭菌后，从待纯化的菌落或菌液沾取少许菌种，然后轻轻在新鲜斜面上以“之”字形从斜面的下部划至上部，注意不要划破培养基。

(2) 液体培养基接种 将接种环灭菌后，从待纯化的菌落或菌液沾取少许菌种，液体培养基管斜放，将菌液涂于液面处管壁上，使得当试管直立以后菌种就在液体中。

(3) 穿刺接种 先制备半固体培养基，盛入小试管或带螺口的穿刺培养小瓶内，高度约为总高度的2/3，高压灭菌后备用。可用针形接种针挑取分离良好的单菌落，刺入培养基总高度的1/2处，接种针沿原路抽出。盖上塞子或旋紧瓶盖，做好标记，进行培养。

【思考题】

1. 如何从平板菌落的形态、与基质结合的紧密程度等来区分细菌、放线菌、酵母菌及霉菌？

2. 微生物移种有哪些方式？

实验二 菌种保藏实验

【实验目的】

1. 了解几种常用的菌种简易保藏法原理。
2. 掌握几种常用菌种简易保藏法及其优缺点。

【实验原理】

微生物菌种的来源很广，大体上说，一类是从各种自然条件中分离的原始菌种，另一类是人工选育出来的优良选育种或用基因重组技术得来的重组菌，这些都是重要的资源。微生物的生长周期短、易于工业生产，但是人为的不断传代容易引起遗传变异，从而带来不必要的损失。菌种保藏（preservation of microorganism）的目的非常明确，在基础研究工作中，同一菌种在不同的时间，都应获得重复的实验结果。对于有经济价值的生产菌株，要求保持其高产的性能；对于重组菌，要求保持菌株本身遗传特性的稳定性。

由于菌种的变异主要发生于微生物旺盛生长繁殖过程，所以菌种保藏的原理是使微生物的新陈代谢处于最低水平或相对静止的状态，从而在一定的时间内菌种不发生变异并保持相应活力。低温、干燥、隔绝空气、无营养和添加保护剂是使微生物代谢能力降低或休眠的重要方法，因此大多数的菌种保藏都是根据上述五种原理设计的。

常用的简易菌种保藏法主要有以下几大类。一是斜面低温保藏法，该方法为实验室和工厂菌种室常用的保藏法；主要措施是低温，适用于保藏各大类菌种，保藏期限为3~6个月，优点是操作简便，缺点是保藏时间短，菌种经多次转接之后，容易发生变异。二是半固体穿刺保藏法，主要措施是低温，适用于保藏细菌和酵母，保藏期限为6~12个月，优点是操作简单易行，缺点是保藏时间较短，使用范围较窄。三是液体石蜡保藏法，主要措施是低温和隔绝空气，适用于保藏各大类菌种，保藏期限为1~2年，优点是操作简便，不需特殊设备，也不需经常移种，缺点是保存时必须直立放置，不方便携带。四是砂土管保藏法，主要措施是干燥和缺乏营养，适用于产孢微生物，保藏期限为1~10年，优点是保藏期较长，对于产孢微生物保藏效果好，在抗生素工业生产中应用最广，缺点是对于营养细胞的保藏效果不佳。五是含甘油培养物保藏法，主要措施是超低温和利用作为保护剂的甘油渗入细胞后，强烈降低细胞的脱水作用，适用于在基因工程中保存含质粒载体的大肠杆菌，保藏期限为0.5~1年，优点是操作简便，缺点是需要-30℃或-70℃冷冻冰箱。六是冷冻真空干燥法，主要措施是低温、缺乏营养、干燥和添加保护剂，适用于保藏各大类菌种，保藏期限为5~15年，优点是保藏期限长达数年乃至十几年，并且保藏效果好，缺点是保存操作繁琐，设备昂贵。

【实验材料】

1. 器材

- | | |
|-------------------|-------|
| (1) 无菌试管 | 12 支 |
| (2) 无菌移液管 | 2 支 |
| (3) 1ml 无菌的枪头 | 1 盒 |
| (4) 1ml 移液枪 | 1 支 |
| (5) 接种环、接种针 | 各 1 支 |
| (6) 40 目及 100 目筛子 | 1 个 |
| (7) 干燥器 | 1 个 |
| (8) 安瓿管 | 2~3 个 |
| (9) 真空泵 | |
| (10) 冷冻干燥装置 | |
| (11) 酒精灯 | |
| (12) 灭菌锅 | |

2. 试剂

- | | |
|---------------------------|------|
| (1) 待保藏的菌种； | |
| (2) 无菌液体石蜡； | |
| (3) 无菌甘油； | |
| (4) 五氧化二磷或无水氯化钙； | |
| (5) 黄土、河沙等； | |
| (6) 适于培养待保藏菌种的各种斜面培养基； | |
| (7) 适于培养待保藏菌种的各种半固体深层培养基； | |
| (8) LB 培养基； | |
| 胰蛋白胨 | 1g |
| 酵母提取物 | 0.5g |
| NaCl | 1g |
| pH | 7.2 |
| (9) 脱脂牛奶； | |
| (10) 2% HCl。 | |

【实验方法】

下列方法可根据实验室的具体条件与需要选做。

1. 斜面低温保藏法

- (1) 接种 将不同菌种无菌操作接种在适宜的固体斜面培养基上。在距试管口 2~3cm 处，试管斜面的正上方贴上标签，注明菌株名称和接种日期。
- (2) 培养 在菌株相应适宜的温度下培养，使其充分生长。如果有芽孢的细菌或生

孢子的放线菌及霉菌等，都要等到孢子生成后再行保存。

(3) 保藏 将斜面管口棉塞端用油纸包扎好，移至 2~8℃ 冰箱中进行保藏。

(4) 移种 保藏时间依微生物的种类不同而不同，到期后需另行转接至新配的斜面培养基上，经适当培养后，再行保藏。不产芽孢的细菌最好 1 个月移种 1 次；酵母菌 2 个月移种 1 次；而有芽孢的细菌、霉菌、放线菌可保存 2~4 个月，然后再进行移种。

2. 半固体穿刺保藏法

(1) 接种 先制备半固体培养基，盛入小试管或带螺口的穿刺培养小瓶内，高度约为总高度的 2/3，高压灭菌后备用。可用针形接种针挑取分离良好的单菌落，刺入培养基的 1/2 处。盖上塞子或旋紧瓶盖，做好标记。

(2) 培养 在适宜的温度下培养，培养后的微生物在穿刺处和琼脂表面均可生长。

(3) 保藏 将培养好的菌种直立置于 2~8℃ 冰箱中保藏。

(4) 移种 一般在保藏半年或一年后，需进行移种。使菌种转接到新鲜的半固体培养基中，依据上述步骤进行保藏。

3. 液体石蜡保藏法

(1) 液体石蜡灭菌 将液体石蜡（亦称石蜡油）分装后，高压蒸汽灭菌，121℃ 灭菌 30min。保险起见，可进行二次灭菌。灭菌后要将液体石蜡中的水分除去，通常的办法是在 40℃ 温箱中放置两个星期或置于 105~110℃ 的烘箱内约 1h。

(2) 接种和培养 将需要保藏的菌种接种至适宜的斜面培养基上，使生长良好。

(3) 加液体石蜡 用无菌吸管吸取已灭菌的液体石蜡，注入到已长好菌的斜面上，液体石蜡的用量以高出斜面顶端 1cm 左右为准，使菌种与空气隔绝。

(4) 保藏 将已注入液体石蜡的斜面试管管口用牛皮纸包好，直立置于 2~8℃ 冰箱保存。在保藏期间如果发现液体石蜡减少应及时补充。

(5) 移种 到保藏期后，需将菌种转接至新的斜面培养基上，依据上述步骤进行保藏。值得注意的是从液体石蜡覆盖层下移种时，接种环在火焰上灼烧时菌体会随着液蜡四溅，如果培养物是病原体时，应予以注意。另外，第一代的培养物会因液蜡的残余而导致生长缓慢且有黏性，通常进行第二次转接才适合于菌种保藏。

4. 含甘油培养物保藏法

(1) 甘油灭菌 用去离子水把甘油稀释至 60%，分装后，塞上棉塞，外包牛皮纸，高压蒸汽灭菌，121℃ 灭菌 20min。

(2) 接种与培养 将需要保藏的菌种接种至适宜的液体培养基上，过夜活化；以 1% 的接种量转接到新鲜的液体培养基中，使生长良好，达到对数生长期，一般需要 4~6h。

(3) 培养物与灭菌甘油混合 在 1.5ml 培养物中加 0.5ml 灭菌的 60% 甘油，用涡旋器混合，使培养液与甘油充分混匀。然后将含甘油的培养液置于乙醇-干冰或液氮中速冻。

(4) 保藏 将已冰冻含甘油培养物置于 -70℃（或 -20℃）冰箱中保存。

(5) 转接 菌种复苏时，用接种环刮拭冻结的培养物表面，立即将黏附在接种环上的细菌划在含有适当抗生素的 LB 琼脂平板表面，然后在 37℃ 培养过夜。冻结的培养物放回原处保藏。

5. 沙土管保藏法

(1) 制备无菌沙土管

① 处理河沙：取河沙若干，用 40 目筛子过筛。加 10% 的 HCl 溶液浸泡（浸没沙面即可），除去有机杂质，约浸 2~4h，倒去盐酸，用自来水冲洗至中性，烘干。

② 筛土：取非耕作层瘦黄土或红土（不含腐殖质）若干，加自来水浸泡洗涤多次至中性，烘干，磨细，用 100 目筛子过筛。

③ 混合沙和土：取 1 份土加 4 份沙混合均匀，装入小试管中（10mm × 100mm）。装量约 1cm 即可，塞上棉塞。

④ 灭菌：高压蒸汽灭菌，121℃ 灭菌 1h。每天 1 次，连续 3d。

⑤ 抽样进行无菌检查：取灭菌后的沙土少许，接入肉汤培养基中，37℃ 培养 48h，如有杂菌生长，则需重新灭菌。

(2) 制备菌悬液 选择有芽孢的细菌或有孢子的菌种，等产生孢子或芽孢之后，吸取 3~5ml 无菌水至已培养好待保藏的菌种斜面中，用接种环轻轻搅动培养物，使成菌悬液。

(3) 加样和干燥 用无菌吸管吸取菌悬液，在每支沙土管中滴加 0.5ml 菌悬液（大体上目测沙土刚润湿即可），用接种针拌匀，塞上沙土管棉塞。小试管放入真空干燥器或在干燥器中加五氧化二磷或无水氯化钙用于吸水，然后用真空泵抽干水分，通常不应超过 12h。

(4) 抽样检查 每 10 支抽干的沙土管从中抽取 1 支进行检查。用接种环取少许沙土，接种到适合于所保藏菌种生长的斜面上培养。观察生长情况和有无杂菌生长。

(5) 保藏及复苏 若经检查没有发现问题，可存放于冰箱或室内干燥处进行保藏，也可将管口烧熔再置于冰箱中保存。恢复培养时，只需将少量的沙土倾撒在斜面上培养，等生长良好后再移种 1 次就可以使用。

6. 冷冻真空干燥法

(1) 准备安瓿管和无菌脱脂牛奶 安瓿管一般用中性硬质玻璃制成，为长颈、球形底的小玻璃管。先用 2% HCl 浸泡过夜，然后用自来水冲洗至中性，分别用蒸馏水和去离子水各冲 3 次，烘干备用。高压蒸汽灭菌，121℃ 灭菌 30min。将脱脂奶粉配成 40% 的乳液，121℃ 灭菌 30min，并作无菌检验。

(2) 制备菌悬液

① 培养菌种斜面：作为长期保藏的菌种，须用最适培养基在最适温度下培养菌种斜面，以便获得良好的培养物。培养时间掌握在生长后期，这是由于对数生长期的细菌对冷冻干燥的抵抗力较弱，如能形成芽孢或孢子进行保藏最好。一般来说，细菌可培养 24~48h，酵母菌培养 72h 左右，放线菌与霉菌则可培养 7~10d。

② 制备菌悬液：吸取 1~2ml 已灭菌的脱脂牛奶至待保藏已培养好的新鲜菌种斜面中，轻轻刮下菌苔或孢子（操作时注意尽量不带入培养基），制成悬液，浓度以 $10^9 \sim 10^{10}$ 个/ml 为宜。

③ 分装菌悬液：用无菌长滴管吸取 0.1~0.2ml 的菌悬液，通常加入 3~4 滴即可，要滴加在安瓿瓶内的底部，注意不要使菌悬液粘在管壁上。

(3) 冷冻真空干燥操作步骤

① 预冻：装入菌悬液的安瓿瓶应立即冷冻。直接放在低温冰箱中（-30℃ 以下）或放在干冰无水乙醇浴中进行预冻。

② 真空干燥：将装有已冻结菌悬液的安瓿管置于真空干燥箱中，真空干燥。并应在