

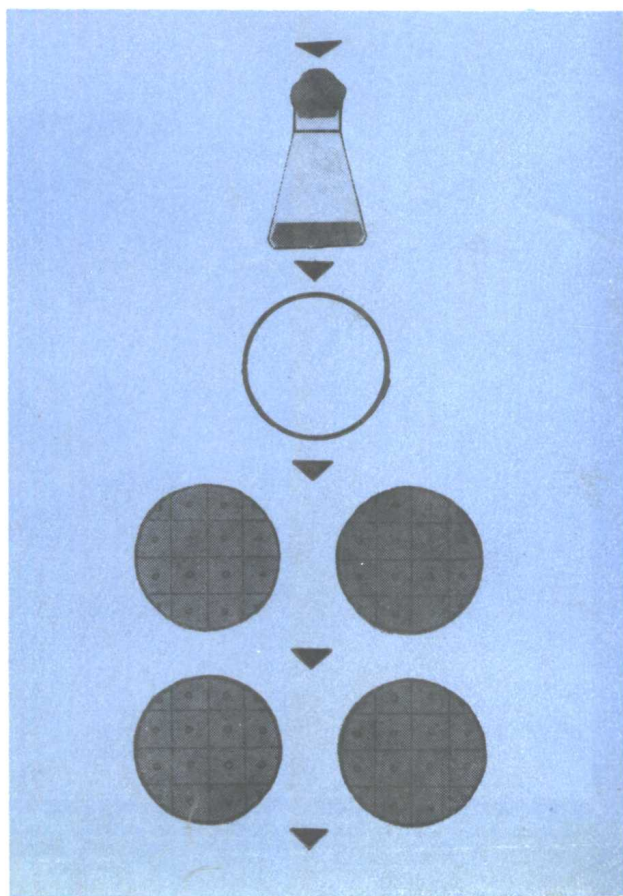
微生物学技术丛书

微生物生理代谢 实验技术

焦瑞身 主编
周德庆

Q93-33
JRS
120523

科学出版社



微生物学技术丛书

微生物生理代谢实验技术

焦瑞身 周德庆 主编

科学出版社

1990

内 容 简 介

《微生物生理代谢实验技术》是微生物学技术丛书的一个分册。它是由国内从事微生物生理代谢研究的专家根据各自经验编写而成，实验条件适合于国内。全书内容共分五部分：微生物高分子组分的分离、纯化与鉴定；生长；独特生理代谢类型；代谢调节以及遗传育种技术。本书可供微生物学、生物工程等专业高年级学生和研究生，以及科研人员实验参考之用。

微生物学技术丛书 微生物生理代谢实验技术

焦瑞身 周德庆 主编

责任编辑 范淑琴

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1990年5月第一版 开本：787×1092 1/32

1990年5月第一次印刷 印张：10 1/8

印数：0001—8 300 字数：227 000

ISBN 7-03-001597-5/Q·240

定价：10.50 元

丛书编辑委员会名单

主 编 张树政

副主编 余茂效

编 委 王大耜 王祖农 王 岳

刘 肃 余茂效 李季伦

张树政 张启先 焦瑞身

前 言

中国微生物学会编辑出版工作委员会于1983年11月4—6日在苏州召开了第一次工作会议。会议决定组织编辑出版一套“微生物学技术丛书”，后经微生物学会常务理事会通过正式成立了编辑委员会。

本丛书主要目的是为了适应“四化”需要，为广大微生物学工作者提供适用的工具书，以便提高技术水平和实验手段。主要对象为具有大专程度的微生物学科技工作者以及大专院校师生及研究生等。丛书由编委会邀请有实践经验的微生物学专家编写。内容力求新颖，但也考虑到国内条件，要便于使用，易见实效。要求作者本人有亲身经验，简要叙述原理，着重介绍具体操作、实验结果及本人心得体会，便于读者应用。

会议并初步确定了一些分册的选题，如：普通微生物学操作技术、微生物分类学技术、微生物菌种保藏技术、微生物生理和代谢实验技术、酶学实验技术、微生物遗传学实验技术、微生物细胞学实验技术、免疫学实验技术、病毒及噬菌体实验技术、抗生素实验技术等。这是微生物学会组织编写的第一套技术丛书，由于缺乏经验，缺点错误在所难免，希望读者批评指正。

另外，由于要求作者具有亲身经验，故在选题及内容方面，就有一定的局限性，涉及的方面可能不够广，或者方法不够先进，也希望读者提出改进意见。随着学科的发展和技术的进步，新的分册和新的内容将不断增加，继续出版下去，使

• i •

这套丛书成为微生物学工作者的得力助手，更好地为“四化”建设服务。

张树政

1985年10月

编 者 的 话

当前，随着微生物在生命科学研究和生产实践发展中重要性的日益突出，加速培养一大批既有现代微生物学理论基础，又能掌握和运用现代微生物学实验技术的新型专业人才，已成为我国社会主义“四化”建设中的一项迫切任务。

微生物学是生命科学中的一门具有一套自己独特研究方法和技术的学科，也是一门实践性极强的学科。近年来，我国出版界虽陆续出版了一些实验工具书，但种类甚少，其中适合大学高年级学生和研究生等参考使用的高层次的书籍尤感缺乏。为填补这项空白，科学出版社曾于1984年制订了有关计划，并随即得到中国微生物学会的积极支持，迅速组织了一批有关专家来编写这套立足国内、颇具特色、水平较高的实验技术书，以满足学术界和教育界培养年轻专业人才的客观需要。

参加本书编写的同志，都是在当前微生物学不同领域中开展研究的专家，所选内容基本上反映了国内的实验技术水平和取得的科研成果，这就保证了本书内容的先进性和方法的实用性。

由于微生物的生理、代谢和育种技术所涉及的范围很广，在选题过程中，我们未去求全；有些实验也有待进一步充实。其次，由于执笔的人数较多，各人在内容的处理、叙述的方式以及编写的规格等方面有些差异，但这都不影响本书的科学性和使用。

最后，我们真诚希望广大读者和有关专家在使用过程中，

不断向我们提供宝贵的批评和建议,以臻逐趋完善。

焦瑞身 周德庆

1987年4月

目 录

前言

编者的话

第一部分 微生物高分子组分的分离、纯化和鉴定

细菌细胞壁的分离和纯化	1
实验 1-1 革兰氏阳性细菌细胞壁的分离、纯化和鉴定	5
实验 1-2 革兰氏阴性细菌细胞壁外膜层的分离和纯化	10
II. 核染色体 DNA	13
实验 1-3 核染色体 DNA	13
III. 质粒 DNA	21
实验 1-4 质粒 DNA 的提取和纯化(一)氯化铯-溴化乙锭密度梯度法	22
实验 1-5 质粒 DNA 的提取和纯化(二)碱变性法	26
实验 1-6 质粒 DNA 的提取和纯化(三)热变性法	27
实验 1-7 质粒 DNA 的提取和纯化(四)酚法	29
实验 1-8 质粒 DNA 的提取和纯化(五)柱层析法纯化质粒 DNA	32
实验 1-9 质粒 DNA 的鉴定(一)琼脂糖凝胶电泳	35

实验 1-10	质粒 DNA 的鉴定(二)分子量的测定 (附:质粒 DNA 含量的测定).....	40
实验 1-11	质粒 DNA 的鉴定(三)质粒 DNA 的电 镜观察	44
实验 1-12	质粒 DNA 的鉴定(四)质粒 DNA 生物 学活性的测定	46
实验 1-13	质粒 DNA 的鉴定(五)质粒 DNA 克隆 外源基因	47
IV.	RNA 的分离和纯化	49
实验 1-14	mRNA 的分离和纯化	50
实验 1-15	tRNA 的分离和纯化.....	53
实验 1-16	16 S 和 23 S rRNA 的分离和纯化	57
实验 1-17	RNA 含量的测定	58

第二部分 微生物的生长

实验 2-1	连续培养技术	61
实验 2-2	微生物细胞的同步培养	65

第三部分 独特生理代谢类型微生物的研究方法

I.	光合细菌	71
实验 3-1	紫色非硫细菌的分离纯化	71
实验 3-2	光合细菌的培养	75
实验 3-3	光合细菌的菌种保藏	77
实验 3-4	光合细菌的色素缺陷型诱变	79
II.	化能自养细菌	83
实验 3-5	用氧电极法测定细菌呼吸链的组成和被 氧化底物的电子进入呼吸链的部位	83
实验 3-6	氧电极的标定, 细菌呼吸速率和硫杆菌	

	氧化硫代硫酸的化学计量学的测定	91
实验 3-7	用差示光谱法检测硫杆菌的呼吸链组分	97
实验 3-8	用连续培养(恒化)法测定硫杆菌的生长得率和最大生长得率	105
III.	产甲烷菌	119
实验 3-9	分离产甲烷菌前的准备工作	123
实验 3-10	产甲烷菌的分离、转移和纯化	133
实验 3-11	产甲烷菌的荧光检测	141
实验 3-12	沼气的相相色谱分析	144
实验 3-13	挥发酸的气相色谱分析	151
IV.	嗜盐菌	158
实验 3-14	嗜盐菌的培养、分离和菌种保藏	159
实验 3-15	紫膜的分离和提取	164
实验 3-16	BR 分子的光化学反应及其测量方法	168
实验 3-17	光驱动的 BR 质子泵在不同体系中效率的检测	174

第四部分 微生物的代谢调节

实验 4-1	大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的诱导合成和分解代谢产物阻遏	185
实验 4-2	天冬氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸对赖氨酸生物合成的代谢调节	190
实验 4-3	地中海诺卡氏菌的谷氨酰胺合成酶	199
实验 4-4	吸水链霉菌井冈变种谷氨酰胺合成酶的共价键调节	205
实验 4-5	无机磷对力复霉素合成的调节	210
实验 4-6	硝酸盐对力复霉素产生菌菌体脂肪含量	

的调节作用	218
实验 4-7 共合成方法在抗生素生物合成中的应用	222
实验 4-8 抗生素生物合成中间产物的定量生物测定方法	226

第五部分 微生物的遗传育种技术

I. 标记菌种的分离	231
实验 5-1 大肠杆菌营养缺陷型的筛选	232
实验 5-2 利用转座子的插入筛选大肠杆菌的营养缺陷型	236
实验 5-3 枯草杆菌抗药性标记(抗利福平突变型)的筛选	239
实验 5-4 红霉素链霉菌无活性突变型的筛选	244
实验 5-5 酵母菌营养缺陷型的筛选	247
实验 5-6 青霉菌营养缺陷型菌株的筛选	251
II. 氨基酸产生菌的遗传育种	257
实验 5-7 氨基酸缺陷型的筛选	258
实验 5-8 产氨基酸抗反馈调节突变株的选育	268
III. 原生质体融合技术	277
实验 5-9 芽孢杆菌属种间原生质体的融合	277
实验 5-10 芽孢杆菌属种间原生质体的转化	281
实验 5-11 链霉菌原生质体制备、再生和融合	284
实验 5-12 酵母细胞的原生质体融合	291
实验 5-13 霉菌原生质体的分离、再生和融合	296

第 一 部 分

微生物高分子组分的分离、 纯化和鉴定

I. 细菌细胞壁的分离和纯化

细胞壁是包围在细胞外层的一层质地坚韧略有弹性的高分子化合物。细胞壁是细胞的功能单位，它不仅保护细胞而且能维持细胞的形状。细菌的细胞壁不仅能维持细胞的形状，同时它的化学成分还与细胞的抗原性、致病性等都有密切的关系。因此，细胞壁是大多数微生物细胞的重要结构之一。

就化学成分而言，原核生物和真核生物的细胞壁有着明显的不同。高等植物细胞壁的主要成分是纤维素；霉菌和酵母菌细胞壁的主要成分是甘露聚糖类及甲壳质；细菌细胞壁的主要成分则是肽聚糖 (peptidoglycan)。有些细菌如嗜盐细菌、嗜热嗜酸菌、产甲烷细菌等古细菌以及支原体不具有一般细菌所具有的细胞壁结构。从细胞壁的角度看，这类细菌的细胞壁是非典型的，或者说是过渡类型的。这并不难理解，因为细胞壁是细胞直接与外界接触的部分，细胞壁的组分直接受到环境的影响，有递变的生态环境，也必定会有过渡类型的细胞壁。

在细胞壁的研究中常常以细菌为材料。细菌又被分成革

兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类。这两类菌细胞壁的化学

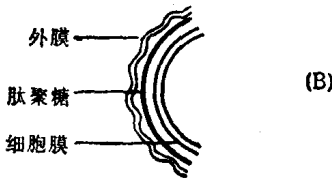


图 1-1 细菌细胞壁的超薄切片观察示意图

(A) 革兰氏阳性菌；(B) 革兰氏阴性菌。

组分和结构都有所不同。从结构上讲，革兰氏阳性菌细胞壁主要是由一层厚厚的肽聚糖所构成，其厚度大约有 200—800 Å，革兰氏阴性菌的细胞壁仅具有一层薄薄的肽聚糖层，其厚度仅为 140—155 Å，在壁的外面还包围一层由脂蛋白和脂多糖组成的外膜。用电子显微镜观察的结果见图 1-1。从化学组

分来看，革兰氏阳性菌细胞壁的主要组分是肽聚糖和磷壁酸 (teichoic acid)，而革兰氏阴性菌的壁中只含少量的肽聚糖，不含磷壁酸，而含有大量的脂多糖和脂蛋白(表 1-1)。

表 1-1 细菌细胞壁的主要化学组分

组 分	革兰氏阳性菌	革 兰 氏 阴 性 菌	
		硬壁层	外壁层(外膜)
肽聚糖	+(30—70%)	+(少于10%)	-
磷壁酸	+(可达50%)	-	-
多 糖	+	-	-
蛋白质	+ 或 -	-	+
脂多糖	-	-	+
脂蛋白	-	+ 或 -	+

肽聚糖是细胞壁的重要化学组分之一，它是由多糖链和短肽链相互交联而构成的三维多层网状结构(图 1-2)。多糖

链是由 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 和 N-乙酰胞壁酸 (N-acetylmuramic acid) 残基由 β -1,4 糖苷键相互交

联而成, 链的长度一般可由 10—65 个二糖单位组成。短肽链部分一般由四个氨基酸组成, 即第一位的 L-丙氨酸, 第二位的 D-谷氨酸, 第三位的 D-丙氨酸, 第四位的 D-丙氨酸组成的肽的亚单位。第一位的丙氨酸通过氨基与 N-乙酰胞壁酸的羧基相连(图 1-3), 这样使多糖链和短肽链相连。两个肽的亚单位之间一般由第四位的丙氨酸的羧基与另一个亚单位的第三位上的二氨基酸的氨基相连(图 1-4)。但是在不同的细菌中短肽链的四个氨基酸的组成并不完全一样, 尤其在革兰氏阳性菌中变化更多, 甚至两个短肽链很少直接

交联, 一般是通过几个氨基酸把两个亚单位连起来, 这几个氨基酸就称为肽间桥。例如, 金黄色葡萄球菌的细胞壁中, 两个肽的亚单位之间就有由五个甘氨酸组成的肽间桥相连。

细胞壁中多糖链的长度往往与细菌的形态间呈现一定的关系, 而氨基酸的组成又是分类学中的一项重要指标, 在革兰氏阳性菌的分类研究中尤其如此。

此外, 在革兰氏阴性细菌细胞壁的肽聚糖层外还具有有一

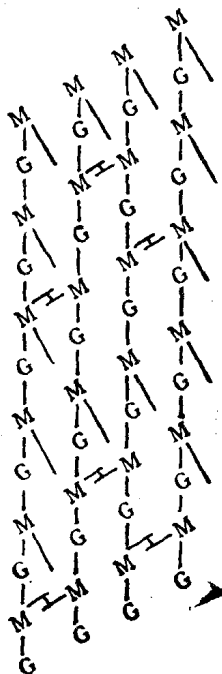


图 1-2 大肠杆菌肽聚糖结构示意图

M. N-乙酰胞壁酸; G. N-乙酰葡萄糖胺; 交联的短肽链。

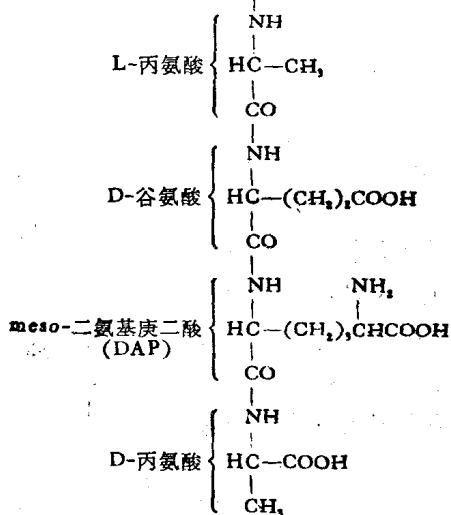
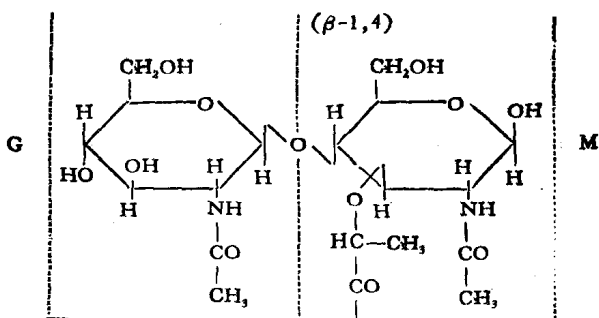


图 1-3 肽聚糖的一般结构图: 氨基糖与短肽链的连接方式

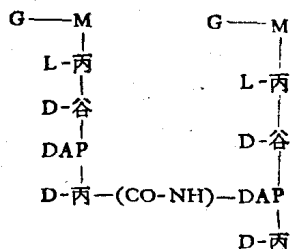


图 1-4 肽聚糖的一般结构: 两个肽的亚单位间的连接方式

层以类脂蛋白和脂多糖为主要组分的外膜(图 1-5), 它不仅具有免疫学特征, 而且对细胞的通透作用的调节也有一定的关系。这层膜与细胞壁之间无共价键相连, 易于与细胞壁分开, 因此, 已成为许多研究者争相研究的对象。

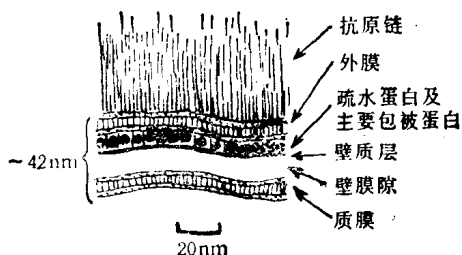


图 1-5 革兰氏阴性细菌细胞壁的剖面图

实验 1-1 革兰氏阳性细菌细胞壁的分、 纯化和鉴定

一、目的要求

了解细菌细胞壁的基本结构和化学组成, 并以革兰氏阳性细菌为材料, 经过实际操作, 掌握细菌细胞壁分离、纯化技术, 制备出纯的细胞壁, 为其他化学的或物理的分析提供样品。

二、原理

细菌细胞壁分离纯化的基本原理是通过机械方法使细胞壁破裂, 再采用酶处理和差速离心的方法使细胞壁从原生质中分离出来, 并去掉壁上粘连的质膜, 从而得到纯的壁制备物。纯的细胞壁呈无色。本实验使用溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 做实验材料, 是因为它是革兰氏阳性菌, 具有