



微生物化学分类的实验方法

【日】驹形和男编 方爽译



微生物化学分类 的实验方法

〔日〕驹形和男 编

方 爽 译

贵州人民出版社

本书受贵州省科技图书出版基金委员会资助

责任编辑 施福根

封面设计 邹 刚

技术设计 夏顺利

微生物化学分类的实验方法

〔日〕驹形和男 编

方 爽 译

贵州人民出版社出版发行

（贵阳市延安中路9号）

贵州新华印刷厂印刷 贵州省新华书店经销

850×1168毫米 32开本 14.875印张 340千字

1989年4月第1版 1989年4月第1次印刷

印数1——1,000

ISBN 7-221-00956-2/O·05 定价5.80元

目 录

序论 微生物化学分类学的背景	(1)
1. 细胞壁	(7)
I 细菌的细胞壁	(8)
1. 细胞壁和细菌分类	(8)
2. 作为对象物的细胞壁构成成分	(11)
1) 肽聚糖	(11)
a. 肽部分的结构	(11)
b. 糖部分的结构	(14)
2) 其他高分子化合物	(15)
a. 脂多糖 (lipopolysaccharide; LPS)	(15)
b. 磷壁酸类	(16)
c. 细胞壁多糖	(18)
3. 细胞壁的制备方法	(18)
1) 菌体的准备	(19)
2) 破坏菌体的方法	(21)
a. 机械破坏法	(21)
b. 化学处理法	(25)
3) 差示离心分离	(28)
a. 低速离心分离 (未破坏菌的去除)	(29)
b. 中速离心分离 (其他可溶成分的去除)	(29)

4)细胞壁的精制方法.....	(30)
a.蛋白酶处理.....	(30)
b.化学处理.....	(31)
5)细胞壁的含量及纯度.....	(33)
4.细胞壁类型的确定方法.....	(35)
1)特异氨基酸类型的确定法.....	(35)
2)氨基酸组成比的确定.....	(36)
a.用氨基酸自动分析仪对细胞壁氨基酸的分析	(37)
b.氨基酸(糖)的鉴定.....	(38)
c.氨基酸立体配置的确定.....	(41)
d.氨基酸量比的确定.....	(42)
3)肽类型的确定方法.....	(43)
a.利用“化学法”确定肽结构.....	(43)
b.肽类型的命名.....	(45)
4)糖部分的N-酰基型的确定方法.....	(46)
a. Glycolate test的实施方法.....	(51)
b.羟乙酰基的含量及酰型的菌种间分布.....	(53)
5.其他细胞壁成分的分析方法.....	(56)
1)脂多糖(LPS)的制取与分析.....	(56)
a.脂多糖的制取.....	(56)
b.脂多糖的分析.....	(57)
2)磷壁酸的制取与分析.....	(58)
3)多糖的制取与分析.....	(59)
6.特殊细菌的细胞壁.....	(60)
I 放线菌的细胞壁.....	(62)

1. 分析用试料的制备	(65)
1) 培养及分析用菌体的制备方法	(65)
2) 细胞壁的制备方法	(66)
2. 细胞壁组成成分的分析	(67)
1) 用全菌体进行二氨基庚二酸 (A_{2pm}) 及糖的 分析	(67)
a. 二氨基庚二酸的分析实例	(67)
b. 糖的分析实例	(69)
2) 细胞壁氨基酸及糖	(70)
a. 氨基酸的分析实例	(70)
b. 糖的分析实例	(72)
3. 以细胞壁组成成分作为主要指标的属的检索	(72)
II 酵母的细胞壁	(79)
1. 培养	(86)
2. 多糖类的制取	(87)
1) 甘露聚糖的制取	(87)
2) 可溶性多糖类的制取	(89)
3. 结构糖分析	(90)
1) 水解法	(91)
2) 利用薄层光谱分析法分析结构糖	(91)
3) 利用气相色谱分析结构糖	(93)
4. 1H -NMR 光谱的测定	(95)
文献	(101)
 2. 脂 类	(116)
I 复合脂	(116)

1. 磷脂	(116)
1) 细菌磷脂的结构与一般性质	(116)
a. 细菌磷脂的结构	(117)
b. 磷脂组成对环境的适应及变化	(123)
2) 细菌磷脂的分析方法	(124)
a. 磷脂的提取方法	(124)
b. 磷脂的分离和鉴定	(125)
c. 细菌磷脂及其组成成分的定量	(129)
d. 利用标记化合物对磷脂进行定性和定量 (Kaufer和Kennedy, 1963)	(131)
e. 细菌磷脂的仪器分析及结构确定	(132)
3) 细菌磷脂的分布	(133)
a. <i>Pseudomonadales</i>	(133)
b. <i>Eubacteriales</i> (真细菌)	(142)
c. <i>Actinomycetales</i>	(143)
d. <i>Mycoplasmatales</i>	(143)
e. <i>Archaeobacteria</i>	(145)
2. 糖脂	(145)
1) 甘油糖脂的分离·鉴定方法	(146)
a. 萃取·精制	(146)
b. 糖及脂肪酸的鉴定	(146)
c. 脱酰基化合物的分析	(147)
d. 糖的结合部位的解析	(148)
e. 糖的异头物的配位分析	(148)
f. 其他种类结构的分析方法	(149)
2) 微生物糖脂的种类与分布	(149)

a. 甘油糖脂	(149)
b. 磷酸脂	(153)
c. 糖醛酸含有的糖脂	(155)
d. 硫糖脂	(155)
e. 脂肪酸糖	(157)
3. 脂氨基酸	(158)
1) 鸟氨酸脂的分离与鉴定	(158)
a. 萃取、精制	(158)
b. 红外光谱	(159)
c. 氨基酸的鉴定	(160)
d. 脂肪酸的鉴定	(160)
e. 游离氨基的鉴定	(160)
f. 游离羧基的鉴定	(161)
g. 其他分析	(161)
2) 脂氨基酸的种类与分布	(161)
a. 鸟氨酸脂	(161)
b. 牛磺鸟氨酸脂	(163)
c. 赖氨酸脂	(165)
d. 磷脂酰甘油的 O-氨基酸酯	(165)
4. 鞘脂类	(166)
1) 鞘脂的分离	(169)
I 单纯脂	(171)
1. 霉菌酸	(171)
1) 霉菌酸的一般结构	(172)
2) 霉菌酸的结构分析方法	(172)
a. 霉菌酸的薄层色谱法 (TLC)	(175)

b. 霉菌酸的气相色谱法(GLC).....	(177)
c. 霉菌酸的质谱分析GC/MS.....	(178)
d. 霉菌酸的高速液体色谱法(HPLC)	(181)
3) 霉菌酸的分布和Actinomycetales的化学分类学	(182)
4) 霉菌酸分子组成因环境条件而引致的变化	(185)
2. 泛醌和甲萘醌	(185)
1) 微生物的培养	(188)
2) 细菌的泛醌和甲萘醌的提取	(188)
3) 酵母及真菌的泛醌提取	(189)
4) 泛醌和甲萘醌的精制	(190)
5) 泛醌和甲萘醌分子种类的鉴定	(191)
6) 有关泛醌系和甲萘醌系的表示方法	(198)
3. 脂肪酸	(200)
1) 脂肪酸组成的确定方法	(201)
a. 培养	(202)
b. 脂肪酸甲基酯的制备	(202)
c. 气相色谱分析	(205)
d. 菌体脂肪酸组成的表示方法	(216)
2) 分类群与菌体脂肪酸	(219)
3) 分析数据的数量处理	(220)
文 献	(221)

3. 蛋白质 (247)

I 电泳类型 (248)

1. 试料的制备方法 (249)

1) 微生物的培养	(249)
2) 菌体的破碎	(250)
2. 电泳法	(251)
1) 电泳装置	(252)
2) 平板凝胶的制作	(253)
3) 电泳	(259)
4) 染色	(260)
a. 蛋白质的染色	(260)
b. 酶的活性染色	(261)
3. 数据处理与电泳类型在分类上的应用实例	(266)
1) 测光密度法	(267)
2) 相对移动度与数值分类	(268)
4. 酶的电泳类型的分类学意义	(276)
II 细胞色素	(277)
1. 细胞色素的种类和微生物的电子传递体系	(277)
2. 细菌的生育条件和细胞色素	(280)
3. 细胞色素的吸光度测定	(281)
1) <i>Pseudomonas</i> 的细胞色素测定	(281)
2) 全细胞色素的 (还原型) - (氧化型) 的差示 光谱	(282)
3) (还原型 + CO) - (还原型) 的差示光谱	(287)
4) 低温光谱	(288)
5) 细胞色素的个别 (还原型) - (氧化型) 表示 光谱	(289)
4. 微生物分类与细胞色素	(289)

4. 核酸	(299)
1. DNA 的分离精制	(302)
1) 概况	(302)
2) 使用试剂	(304)
a. SSC	(304)
b. EDTA	(305)
c. 酚	(305)
d. SDS	(305)
e. 链霉蛋白酶	(306)
3) 培养	(306)
4) 溶菌	(307)
5) 蛋白质的变性	(311)
6) 离心分离	(312)
7) 粗 DNA 的卷绕	(313)
8) 精制	(314)
9) 后处理与保存	(316)
10) DNA 的测定	(317)
2. GC 含量的测定	(318)
1) 概况	(318)
2) 融解温度的测定	(319)
3. DNA-DNA 杂交	(323)
1) 概况	(323)
2) 方法分类	(328)
3) 利用 UV 吸收测定反应速度的方法	(329)
4) 使用核酸酶对无标记 DNA 的双链形成速度进行测定的方法	(331)

5)有关放射性同位素的利用方法	(335)
a.概况	(335)
b.回收标记法	(337)
c.利用放射性碘进行标记	(340)
d.切口转移标记法	(341)
e.放射能的测定	(344)
6)标记 DNA 与核酸酶的使用方法	(346)
7)使用羟磷灰石 (HA) 的方法	(349)
8)使用滤膜的方法	(354)
4. DNA-RNA 杂交	(359)
1)基本情况	(359)
2)有关RNase的注意事项	(362)
3) RNA 的标记方法	(362)
4)rRNA 的制备	(364)
5)杂交实验	(367)
文 献	(369)
5.免疫学的方法	(376)
1.抗原	(377)
2.免疫血清的制备	(378)
3.凝胶内沉降反应	(380)
4.中和反应	(383)
5.补体结合反应	(385)
文 献	(387)
6.热分解法	(388)

1.使用仪器	(389)
2.试料的制备	(392)
3.热分解	(395)
1)条件的设立	(395)
2)焦油问题	(396)
3)操作	(397)
4.气相色谱分析	(398)
1)条件的设立	(398)
2)操作	(398)
5.数据分析	(399)
1)视觉鉴定	(401)
2)峰的测定	(402)
3)根据少数峰加以判断	(404)
文 献	(407)
 7.数据分析	 (410)
1.数值分类	(412)
1)代码化	(414)
a.简易识别和代码化	(414)
b. RKC代码系统	(416)
c.数值分类与代码化	(417)
2)相似度	(420)
a. 0-1型数据	(421)
b.数值型数据	(424)
3)树状图(数值分类)	(430)
2.多元分析	(439)

1)何谓多元分析	(439)
a.树状图批判	(440)
b.推算统计学和多元分析	(441)
c.维数的减少和存在问题	(444)
d.有关程序等情况	(446)
2)应用于分类的多元分析	(447)
a.主成分分析	(448)
b.典型相关分析	(450)
c.多维尺度法	(452)
d.判别分析	(454)
文 献	(458)
索引 (略)	

微生物化学分类学的背景

从历史上看，人类很早即已认识到世界上存在有多种的植物和动物。而识别哪些植物可以作为食物，哪些植物则是有毒的；以及在通过狩猎手段以获取作为食物的猎获物应在什么时间、什么地点进行最好等等认识，无一不是从实际经验中取得的。在这一过程中，利用生物的形态加以区分常常是很有效的。也可以说这种识别能力作为人类的一种智慧只能伴随其亲身实践才能得到。因此可以认为人类自古以来，为了自身的生存已经知道将生物进行分类了。然而具体的称谓则因部落、部族乃至使用语言的区别而迥异，这点应该是不难想象的。

18世纪中叶，林奈提出了给生物种命名的双名法。这一命名法的应用，使得有关生物种的情报能够较为方便地加以传递。1756年，Brisson给狮子的命名为“尾部末端有一丛毛的猫”，而给老虎的命名则为“具有长条斑纹的黄色的猫”。根据林奈的双名法，它们应分别称之为“*Felis leo*”和“*Felis tigris*”。就这样，对植物和动物种的认识，随着以其形态为基础的林奈的种的

概念的扩展，逐步建立为一门学科的体系。

另一方面，17世纪初叶，荷兰的Antonie van Leeuwenhoek用自制的显微镜观察到在积水中蠕动的“animalcules”（微小动物），据说是微生物的最早发现。然而这些“animalcules”在自然界中的作用却不能不等到大约200年后，才由L. Pasteur和R. Koch这两位微生物学的先驱者搞清楚。众所周知，L. Pasteur弄清了乳酸发酵、乙醇发酵、丁酸发酵等现象均系微生物生命活动的结果，而R. Koch通过对炭疽病的研究证明了微生物是致病的原因，从而迎来了微生物学的曙光。但当时对有关细菌性状的认识知之甚少，而根据对引致发酵和导致病害发生生物体的认识，当时的所谓分类事实上是将重点置于微生物的区分上的鉴定学。这种观点在应用微生物学、病原微生物学的领域内，尤为根深蒂固；而从微生物究竟是一种什么生物这样一种角度出发进行的研究则很少。

在这种状况下，从地球上物质循环的角度出发，对微生物的多样性给予了广泛研究的荷兰德福特学派的贡献是不应该忘记的。即，1888年，M. W. Beijerinck从豆科植物的根瘤中分离到可以固定空气中氮的根瘤菌；1890年，S. N. Winogradsky成功地分离到可将氨氧化，并利用其能量固定二氧化碳的硝化菌。以此为背景，1936年，Kluyver和van Niel建议，应把细菌的形态学性质和能量获取形式等生物化学性质结合起来进行分类。当然，也不应忘记在他们的文章发表之前，即已成为细菌分类学先驱的F. Cohn及W. Migula等人的名字。在这里之所以引用了Kluyver和van Niel的观点，正是由于他们最早指出了生物化学性质长期以来在对形态简单的细菌进行分类时所表现的引人注目的作用。

生物的分类，除去形态学的性质之外，自古以来即为人们所瞩目的性状，还有诸如植物花的颜色、气味等等。随着化学的发展，其成分可被提取，化学结构也能加以确定，于是形成了一个独立的体系。这一过程是人类对美好的事物及芳香的东西具有兴趣，而渴望了解其本质的好奇心的一种表露。如果从人类发展史的角度看，这也是极其自然的。迄今为止，人们对复杂的植物成分进行着广泛的研究，也逐渐搞清楚其生物合成途径。可以说，这些研究成果与在形态学基础上发展起来的植物分类学相结合，开创了新的分类学的领域，这就是化学分类学的诞生。在微生物分类学的领域内，自20世纪30年代起就存在着如下两类具有代表性的研究派别：一派是研究菌类色素的结构与分类关系的H. Raistrick派别，另一派是研究地衣成分的朝比奈派。

到50年代，人们搞清了主管遗传的遗传基因的物质基础是DNA，该领域内的生物学研究变得极其活跃，分子生物学以其夺目的光彩出现在人们面前。由于分子生物学有时也以微生物作为研究材料，故该领域内的研究成果很快地渗透进微生物学中，有关DNA的碱基组成，以DNA的相似性为基础的微生物的类缘的研究均有大量报导。可以说出现了与过去的化学分类迥然不同的另一股潮流。和色素之类的二次代谢产物不同的，对维系微生物生命不可或缺的细胞构成成分，进而至于生物合成途径与微生物分类间的关系被大量论及，化学分类学作为微生物分类学的一个分支终于出现了。如前所述，微生物的化学分类学在很大程度上要依赖于分子生物学的发展，但另一个重要因素是随着仪器分析技术的发展，以往分析困难的微量成分已经可以方便地进行定量了、分光光度计、气相色谱法、质谱仪、高速液相色谱法、同位素技术、电泳等手段，现已广为应用。加之分类学的研究可以说命定地必