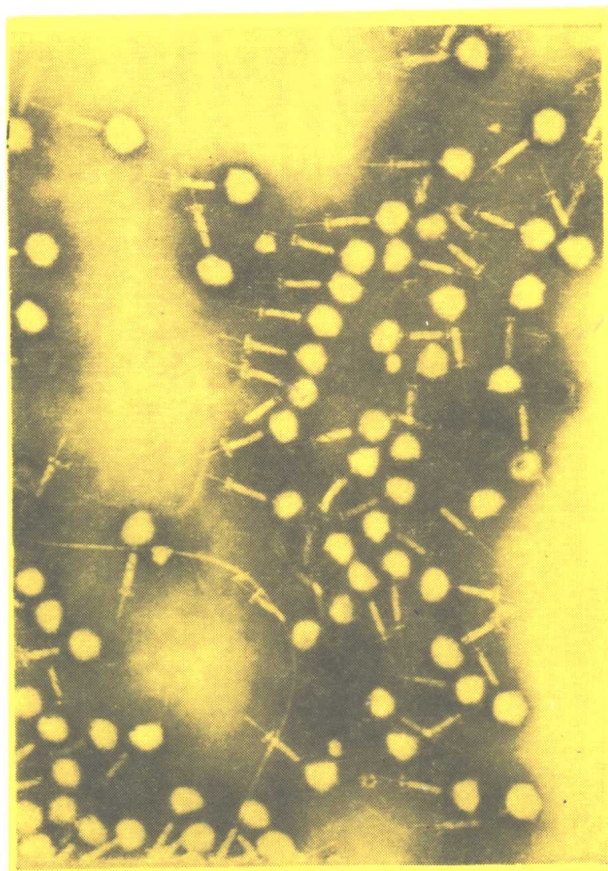


微生物学技术丛书

微生物遗传学 实验技术

贾盘兴
蔡金科
等 编 著



科学出版社

微生物学技术丛书

微生物遗传学实验技术

贾盘兴 蔡金科 等编著

科学出版社

1992

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书介绍了微生物遗传学中以细菌、噬菌体、链霉菌、酵母和丝状真菌等作研究对象的实验方法,还介绍了比较专门的实验技术,如基因定位诱变等。既反映了近年来发展起来的各项技术,也考虑到国内一般实验室的条件,使之具有较大的实用性。

本书可供从事微生物遗传学、分子生物学、基因工程研究和教学的人员以及研究生、大学生参考。

微生物学技术丛书 微生物遗传学实验技术

贾盘兴 蔡金科 等编著

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

*

1992 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/32

1992 年 9 月第一次印刷 印张:13 7/8

印数:1—2 500 字数:311 000

ISBN 7-03-002973-6/Q·396

定价:13.00 元

丛书编辑委员会名单

主 编 张树政

副主编 余茂効

编 委 王大耜 王祖农 王 岳

刘 肃 余茂効 李季伦

张树政 张启先 焦瑞身

本书编辑委员会名单

马德钦 王敖全 刘玉芳 余茂勋

陈玉梅 郭兴华 贾盘兴

董可宁 蔡金科

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

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

我们认为一本适用的微生物遗传实验方法书应能体现当今微生物遗传学的最新进展,同时又不脱离国内条件,尽可能满足在微生物遗传、分子生物学领域从事研究、教学的工作者和正在学习的研究生、大学生的需要。我们在实验内容的选择上,既力求反映最新进展,也不忽视一些基本的实验方法和技能,因为许多新方法都是在这些实验方法和原理的基础上发展起来的。微生物遗传学的研究对象种类繁多,本书除选用大家熟悉的大肠杆菌、芽孢杆菌外,还包括在工农医上越来越显示其重要应用价值的链霉菌、酵母菌、丝状真菌等。

本书的编写者都是活跃在科研第一线,具有丰富经验的微生物遗传工作者。尽管因执笔者人数较多,实验内容的处理和叙述方式上不尽统一,但这并不影响其可用性。我们诚挚期望有关专家和同行对书中不当之处提出宝贵意见,以便修改,使这本书日趋完善。

• • •

目 录

前言	iii
编者的话	v

第一部分 革兰氏阴性菌遗传实验技术

I. 大肠杆菌、沙门氏菌等	1
1-1 用转座子 Tn10 诱变分离大肠杆菌营养缺陷型	1
1-2 转座子 Tn5 诱变柠檬酸细菌	5
1-3 转座子 Tn1721 对硫细菌的诱变	7
1-4 Mini-Tn10 插入突变库的建立	10
1-5 把 Mini-Tn10 放到目的基因近旁	13
1-6 鼠伤寒沙门氏菌转座子 MudJ 插入突变体的分离	16
1-7 鼠伤寒沙门氏菌嘌呤生物合成途径的调节突变体的分离	19
1-8 重组缺陷菌株的构建	24
1-9 局部诱变法	27
1-10 四环素敏感株的正选择 (Bochner 选择法) ...	30
1-11 鼠伤寒沙门氏菌基因的 Hfr 杂交定位	32
1-12 鼠伤寒沙门氏菌 DNA 部分串性重复株的构建	37
1-13 用部分染色体 DNA 重复菌株进行基因定位	44

1-14	三点杂交试验	47
1-15	大肠杆菌基因缺失的转移	50
1-16	鼠伤寒沙门氏菌基因向大肠杆菌的转移	52
1-17	静止基因激活突变体的分离	55
1-18	插入突变体的缺失定位	59
1-19	大肠杆菌基因的体内克隆	61
1-20	宋内氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>) I 相大质粒的 Tn5 标记和诱动转移	66
1-21	宋内氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>) I 相大质粒的 Tn501 标记和共转移	69
1-22	广泛宿主范围的基因转移	72
1-23	电穿孔法在细菌质粒 DNA 转化中的应用 ...	78
II.	根癌农杆菌	83
1-24	Ti 质粒及其他大质粒的检测	83
1-25	Ti 质粒的大量制备和纯化	90
1-26	根癌农杆菌 Ti 质粒的接合转移和转化	94
1-27	三亲菌株接合	99
1-28	植物表达载体及表达框架的构建	101
1-29	中间载体向根癌农杆菌的转移和转化	108
1-30	用含有外源基因的根癌农杆菌转化植物组织	110
1-31	外源基因在转基因植株中的表达	113

第二部分 革兰氏阳性菌遗传实验技术

I.	枯草杆菌	123
2-1	枯草杆菌噬菌体普遍性转导	123
2-2	枯草杆菌原生质体的转化	127
2-3	枯草杆菌质粒 DNA 的提取	130

2-4	枯草杆菌感受态细胞的转化	134
2-5	枯草杆菌启动子的克隆	137
2-6	枯草杆菌中利用质粒克隆基因	140
2-7	利用 $\rho 11$ 噬菌体进行基因克隆	144
2-8	枯草杆菌特异转导噬菌体的构建	149
II.	棒状杆菌	157
2-9	氨基酸缺陷型的筛选	157
2-10	产氨基酸抗反馈调节突变株的选育	161
2-11	棒状杆菌质粒的提取	164
2-12	质粒 DNA 转化棒状杆菌原生质体	168

第三部分 链霉菌遗传实验技术

3-1	链霉菌总 DNA 的分离	173
3-2	链霉菌质粒 DNA 的分离	177
3-3	链霉菌原生质体的制备和再生	182
3-4	质粒 DNA 转化链霉菌原生质体	189
3-5	利用质粒作为载体的链霉菌基因克隆	196
3-6	链霉菌原生质体融合	204

第四部分 酵母菌遗传实验技术

I	酵母菌的遗传分析	209
4-1	酵母菌的遗传分析和基因定位	209
II.	酵母菌质粒载体的构建	214
4-2	酿酒酵母质粒 DNA 的分离	214
4-3	基因克隆载体的构建	218
4-4	酵母表达载体的构建	224
4-5	酵母分泌载体的构建	228
III.	酵母菌转化	234

4-6	酵母菌原生质体转化法	234
4-7	酵母菌完整细胞转化法	237
4-8	酵母菌转化子的鉴定	239
IV.	酵母菌外源基因的克隆和表达	244
4-9	酵母菌染色体 DNA 片段的分离	244
4-10	酵母菌基因文库的构建	248
4-11	转化子中目的基因的检测	253
4-12	TRP5 基因在酵母受体中的表达	255
V.	酵母菌原生质体融合	259
4-13	酵母菌原生质体的制备和再生	259
4-14	PEG 诱导酵母菌原生质体融合	262
4-15	电场诱导酵母菌原生质体融合	264
4-16	细胞核转入原生质体的操作技术	266
4-17	微小 (mini) 原生质体融合法	268
4-18	线粒体转入原生质体的操作技术	271
4-19	酵母菌原生质体的融合子鉴定方法	273
VI.	酵母细胞质遗传实验技术	277
4-20	酵母线粒体突变株 [ρ^0 , ρ^- , anz^R , 及 mit^-] 的分离	277
4-21	线粒体突变株的鉴定标准	285
4-22	线粒体基因重组	288
4-23	酵母菌杀伤因子 (killer factor) 的分离和 鉴定	297

第五部分 丝状真菌遗传实验技术

5-1	纤维素酶抗阻遏突变体的选育	303
5-2	玉米黑粉菌线粒体 DNA 的分离和纯化	308
5-3	麦角菌的原生质体诱变和营养缺陷型选择	311

5-4	草菇的原生质体诱变和营养缺陷型选择	317
5-5	曲霉属内原生质体融合后遗传重组	320
5-6	外源基因导入丝状真菌的一般方法	329
5-7	粟胡麻斑病菌 H1b-2 菌株的原生质体转化...	335
5-8	潮霉素 B 抗药性基因 hph 在洋葱灰霉病中的 转化	340

第六部分 在 λ 噬菌体中构建基因库

6-1	λ 噬菌体的生长和制备	345
6-2	噬菌体 DNA 的大量制备和提纯	349
6-3	在噬菌体中构建基因组 DNA 库	352
6-4	包装的文库效价测定及涂平板培养	357
6-5	λ 噬菌体包装抽提物的制备	360

第七部分 M13 克隆

7-1	M13 噬菌体原液的制备和测定	367
7-2	M13 噬菌体 DNA 的制备	370
7-3	克隆到 M13 载体和感受态细胞的转染	376
7-4	M13 重组子的分析和鉴定	380

第八部分 体外诱变

8-1	克隆 DNA 的体外定位诱变——含尿嘧啶 单链 DNA 模板法	385
8-2	克隆 DNA 的体外定位诱变——脱氧硫代核 苷酸保护法	392
8-3	聚合酶链反应 (PCR)——DNA 体外酶促扩 增法	398

第九部分 附 录

9-1	常用培养基	405
9-2	溶液和缓冲液的配制	410
9-3	限制酶	417
9-4	DNA 片段在琼脂糖和丙烯酰胺凝胶中有效 分离范围	422
9-5	DNA 分子量标记(kb)	423
9-6	抗生素	423
9-7	一些常用单位	425
9-8	常用仪器	426

第 一 部 分

革兰氏阴性菌遗传实验技术

I. 大肠杆菌、沙门氏菌等

i-1 用转座子 *Tn10* 诱变分离大肠 杆菌营养缺陷型

完整的 *Tn10* 长 9.3kb, 两端各有 1 400bp 的反向重复序列。已知编码 *Tn10* 转座功能的基因(转座酶基因)位于右端重复序列(IS10R)。在 *Tn10* 的 6 500bp 的非重复序列中, 有一个 2 300bp 的四环素抗性基因。*Tn10* 作为一个完整的单元可从一个复制子转座到另一个复制子, 不需 DNA 的同源重组功能。转座子插入某一基因造成该基因结构的破坏而发生突变。*Tn10* 引起的突变在遗传行为上有双重表型, 即对某一营养成分的需求(如插入某一生物合成酶基因时)和四环素抗性。由于四环素抗性基因和营养缺陷标记是完全连锁的, 这就为结构基因的转移或定位等遗传操作提供了可选择的标记。此外, *Tn10* 转座频率较高, 约 10^{-3} , 一般 *Tn10* 转座产生的突变是单基因突变。由于转座子诱变具有以上优点, 现已广泛应用于细菌遗传学的研究。本实验用人工构建的噬菌体 λ NK561 为载体, 将 *Tn10* 引入大肠杆菌 CSH64, 通过选择四环素抗性转导子获取 *Tn10* 插入突变体, 从中检出营养缺陷型。由于 λ NK561 带有整合和复制突变, 使 λ 进

入细胞后不可能通过溶原化或形成质粒授与受体四环素抗性。另外 λ NK561 与细菌染色体无任何同源性,排除了通过重组使受体获得 Tn10 的可能。因此在上述严格的选择条件下通过 λ NK561 感染适当受体所选择的四环素抗性转导子必定为 Tn10 的插入突变体(如受体细胞无任何质粒存在)。

一、材料

1. 菌株:大肠杆菌 CSH64 Hfr *thi*

NK561 *int⁻ rep⁻ b221 cl857::Tn10*

2. 培养基: TB 培养液; TB 固体平板; TB + 柠檬酸钠(终浓度为 40mmol/L) + Tet 平板; M9 基本培养基平板以及 TB 上层半固体培养基。

3. 化学药品: 1mol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液、蔗糖、氨基酸、碱基和维生素库、盐酸四环素。

4. λ 噬菌体缓冲液(λ dil)。

二、方法和步骤

1. CSH64 裂解液的制备

(1) 挑取 λ NK561 单菌落接种于 2ml TB 液, 32℃ 生长过夜。

(2) 取 5 支灭菌带帽离心管, 各加 1—2 滴过夜培养物。

(3) 向管 1 加 1 个新鲜的 λ NK561 噬菌斑; 向管 2 加 2 个新鲜的 λ NK561 噬菌斑; 向管 3 加 3 个新鲜的 λ NK561 噬菌斑; 向管 4 加 4 个新鲜的 λ NK561 噬菌斑; 管 5 不加噬菌体作对照。使噬菌体完全浸入过夜培养物, 室温下保温 5—10 分钟。

(4) 向每管加 2ml 10mmol/L MgSO_4 , 37—38℃ 快速振荡培养 5—8 小时或直至细胞完全裂解(培养液透亮)。

(5) 取管子,在每管中加几滴氯仿,振荡1分钟后放冰浴1小时。

(6) 5 000r/min 离心10分钟,去细胞碎片,留上清裂解液。

(7) 测定噬菌体效价,保留效价最高的一管,一般应在 10^{10} pfu/ml¹⁾。

2. λ NK561 裂解液的效价测定

(1) 接 CSH64 于 TB 培养液, 37℃ 培养过夜。

(2) 用 dil 稀释液将 λ NK561 裂解液稀释成 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 。

(3) 取 0.1ml 过夜培养物,分别与 0.1ml 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 的 λ NK561 在试管中混合,置室温10分钟。

(4) 每管各加 2.5ml 软琼脂培养基(温度以不烫手为宜),摇匀后倾入 LB 培养基平板,迅速铺平。

(5) 正向放置于 30℃ 培养过夜。

(6) 计算噬菌斑,折算每毫升裂解液的噬菌体效价(pfu/ml)。

3. 诱变

(1) 接 CSH64 单菌落于 2ml LB, 37℃ 培养过夜。

(2) 5 000r/min 离心10分钟,沉淀细胞。

(3) 去上清液,打匀沉淀,悬浮于 1ml 10mmol/L $MgSO_4$ 。

(4) 取 0.1ml 悬浮液接入 10ml LB 液, 30℃ 振荡培养至对数早期, OD_{660} 为 0.5。

(5) 吸取 1ml 上述培养细胞于无菌离心管,加 50—100 μ l NK561 裂解液,在 30℃ 吸附 20 分钟。

1) pfu/ml 为每毫升裂解液形成噬菌斑数。