

EXPERIMENTAL GUIDANCE
OF BIOENGINEERING

生物工程实验指导

王祎玲 段江燕◎主编



科学出版社

生物工程实验指导

Experimental Guidance of Bioengineering

主 编 王祎玲 段江燕

副主编 郜 刚 张秀红 罗永平

编 者 (按姓氏笔画顺序)

王祎玲

李永锋

张秀红

陈 伟

罗永平

胡青平

郜 刚

段江燕

高丽美

梁丽琴

藏书

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书系统介绍了生物工程专业基础性、综合性及设计性实验方法和技术,在编写过程中注重培养学生综合开发设计实验和独立从事实验操作的能力,使学生在掌握基本实验方法的基础上,提升学生的综合能力,增强对书本知识的综合应用及分析能力。全书分为发酵工程、细胞工程、酶工程、基因工程四部分,每部分都由若干个实验组成。另外有部分实验放在二维码中,可扫描下载。

本书可以作为高等院校生物科学、生物技术、生物工程等专业本专科生的教材,也可作为相关学科科技人员和研究生的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程实验指导/王玮玲,段江燕主编. —北京:科学出版社,2017.12

ISBN 978-7-03-052665-6

I. ①生… II. ①王…②段… III. ①生物工程-实验-高等学校-教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 075567 号

责任编辑:席慧文 茜/责任校对:王瑞

责任印制:张伟/封面设计:铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年12月第一版 开本:787×1092 1/16

2018年1月第二次印刷 印张:13 1/4

字数:416 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

谨以此书献给山西师范大学六十周年校庆

前 言

生物工程与技术是当今六大高新技术之一，是全世界普遍关注和研究的热点。“十三五”期间，国家正在积极研究制订生物工程技术发展专项规划，目的是逐步实现生物技术强国的中国梦。为了更好地适应时代的发展需求，培养具备创新意识和创新能力的高素质生物工程人才，本书将本科教学和科学研究中常用的生物工程实验及技术原理有机整合，在保留经典传统实验的基础上，增加了综合设计性实验，全面系统布局生物工程实验和技术。

本书对生物工程实验教学中涉及的实验技术、反应原理、流程安排等问题进行了较为详细的阐述。全书近 100 个实验，包括 4 部分：发酵工程、细胞工程、酶工程和基因工程。每部分由基础实验和综合设计实验组成，每个实验包含实验目的、实验原理、实验仪器（仪器调试）、试材准备、试剂配制、操作步骤、注意事项、实验后分析及新实验设计。书中选取了生物科学、生物技术、生物工程专业四大工程中代表性的实验方法与技术，并结合教学实践和科学研究进行了比较分析，和其他教材相比，特别增加了仪器调试、实验后分析及新实验设计板块，具有很强的实用性和指导性，可以很好地培养和锻炼学生的实验技能及科研素养，对培养学生的综合应用能力和创新能力具有一定帮助。其中发酵工程部分由张秀红、胡青平编写，细胞工程部分由高丽美、李永锋编写，酶工程部分由段江燕、梁丽琴编写，基因工程部分由王祎玲、郜刚、罗永平、陈伟编写。本书可供生物科学、生物技术、生物工程及相关领域本科生、研究生及研究人员学习和参考。

对本书的实验，不同学校、不同专业可根据具体条件选做。部分实验可扫描书中对应二维码获取。

本书得到山西省重点教学质量工程项目(J2013042)及校优势专业项目(011001050101)的资助，在此一并感谢。

全体编委虽然在编撰过程中力求全面、准确，但因生物学科的飞速发展，编委本身水平和能力有限，对于书中疏漏及不足之处，殷切希望读者批评指正！

山西师范大学生命科学学院

王祎玲

2017 年 6 月

目 录

前言

第一部分 发酵工程实验	1
I. 基础实验	1
实验一 产淀粉酶芽孢杆菌的分离	1
实验二 产蛋白酶菌株的分离	1
实验三 乳酸菌素产生菌的筛选	4
实验四 紫外线诱变选育 α -淀粉酶高产菌株	11
实验五 酸性异淀粉酶产生菌的复合诱变育种	11
实验六 细菌原生质体融合实验	14
实验七 微生物菌种的保藏	18
实验八 微生物培养基的优化——单因素实验	22
实验九 微生物培养基的优化——正交试验	22
实验十 霉菌孢子数及发芽率的测定	26
实验十一 细菌生长曲线测定	28
实验十二 细菌淀粉酶酶活曲线的测定	30
实验十三 机械通风搅拌发酵罐的结构认识及操作	30
实验十四 酵母细胞中蔗糖酶粗产物的提取	34
实验十五 枯草芽孢杆菌发酵液中 α -淀粉酶粗产物的提取	34
实验十六 厌氧菌的分离及培养技术	34
II. 综合设计实验	37
实验十七 生物杀虫剂苏云金芽孢杆菌生产实验	37
实验十八 柠檬酸发酵	39
实验十九 固体发酵生产纤维素酶	43
实验二十 酸奶的发酵	47
第二部分 细胞工程实验	50
I. 基础实验	50
实验一 MS 培养基母液和培养基的配制	50
实验二 植物组织培养技术	53
实验三 植物细胞的悬浮培养技术	58
实验四 植物原生质体分离鉴定和培养	58
实验五 植物细胞融合	62
实验六 动物细胞融合	62

实验七 动物细胞微丝束的光学显微镜观察	62
实验八 线粒体和液泡系的超活染色与观察	65
实验九 叶绿体的分离与荧光观察	67
实验十 细胞凝集反应	69
实验十一 细胞膜的渗透性测定	70
实验十二 细胞活力检测	72
实验十三 细胞的冻存与复苏	72
II. 综合设计实验	73
实验十四 细胞周期检测与同步化	73
实验十五 细胞凋亡观察	76
实验十六 显微注射技术	76
实验十七 杂交瘤技术	77
实验十八 植物细胞的有丝分裂观察及染色体标本制备	83
实验十九 扫描电子显微镜的原理及操作使用	85
实验二十 透射电子显微镜的原理和操作使用	85
第三部分 酶工程实验	87
I. 基础实验	87
实验一 酵母蔗糖酶的纯化	87
实验二 圆盘电泳法鉴定酵母蔗糖酶的纯度	89
实验三 酵母蔗糖酶的结晶	90
实验四 酵母蔗糖酶的化学修饰	90
实验五 SDS-PAGE 检测蔗糖酶分子质量	92
实验六 酵母蔗糖酶的酶促动力学研究	92
实验七 固定化酵母细胞及蔗糖酶的检测	95
实验八 木瓜蛋白酶消除啤酒中蛋白质浑浊	97
实验九 尼龙固定化木瓜蛋白酶	98
实验十 几丁载体上酶的吸附固定	98
实验十一 β -半乳糖苷酶菌体细胞的固定化	99
实验十二 淀粉酶的提取及活力测定	102
实验十三 大豆肽的制备	102
实验十四 苯丙氨酸解氨酶的纯化及活性测定	103
实验十五 结晶乳酸脱氢酶(LDH)的制备	103
实验十六 辣根过氧化物酶的制备及酶比活力的测定	105
实验十七 凝胶层析柱装填及柱效测定	106
实验十八 模拟过氧化物酶的制备、固定化及应用	112
实验十九 植物组织中蔗糖酶活力的测定	112
实验二十 正交法测定几种因素对酶活力的影响	113

II. 综合设计实验	117
实验二十一 酸性磷酸酶的分离纯化及活性测定	117
实验二十二 碱性磷酸酶的分离、纯化及活性测定	131
实验二十三 胰蛋白酶的制备、活力测定及动力学研究	131
实验二十四 重组氯霉素酰基转移酶蛋白的表达、分离、纯化和鉴定	139
第四部分 基因工程实验	145
I. 基础实验	145
实验一 植物基因组 DNA 的提取	145
实验二 细菌基因组 DNA 的制备	145
实验三 质粒 DNA 的提取及酶切	145
实验四 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	149
实验五 从低熔点胶琼脂糖凝胶中分离回收 DNA 片段	150
实验六 目的基因的 PCR 扩增和克隆	153
实验七 目的基因的酶切和连接	159
实验八 感受态细胞的制备及转化	163
实验九 转化子的筛选和鉴定	168
实验十 目的基因的原核表达	173
实验十一 植物总 RNA 的提取	179
实验十二 RNA 质量检测	179
II. 综合设计实验	180
实验十三 目的基因的 RT-PCR 检测	180
实验十四 目的基因表达的实时荧光定量 PCR 检测	187
实验十五 目的基因的 Southern 印迹杂交检测	190
实验十六 目的基因表达的 Northern 印迹杂交检测	195
实验十七 目的基因表达的 Western 印迹杂交检测	197
实验十八 根瘤农杆菌介导的植物基因转化技术	200
主要参考文献	203

第一部分 发酵工程实验

Part I Fermentation Engineering Experiments

I. 基础实验

实验一 产淀粉酶芽孢杆菌的分离

Isolation of bacillus strains producing amylase

本实验扫描二维码获取相关内容!



实验二 产蛋白酶菌株的分离

Isolation of protease producing bacterium

【实验目的】

1. 学习用选择平板从自然界中分离胞外蛋白酶产生菌的方法。
2. 理解选择培养基的应用原理和方法。
3. 掌握蛋白酶活力测定的原理与基本方法。

【实验原理】

产生胞外蛋白酶的菌株在牛奶平板上生长后,其菌落周围可形成明显的蛋白水解圈。水解圈与菌落直径的比值常作为判断该菌株蛋白酶产生能力的初筛依据。不同类型的蛋白酶都能在牛奶平板上形成蛋白水解圈,细菌在平板上的生长情况和在液体环境中生长的情况相差很大。因此,在平板上产圈能力较大的菌株不一定是蛋白酶的高产菌株。

碱性蛋白酶的活力测定按中华人民共和国颁布的标准《蛋白酶活力测定法》(SB/T 10317—1999)进行,其原理是:Folin 试剂与酚类化合物(如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸)在碱性条件下发生反应形成蓝色化合物,用蛋白酶分解酪蛋白生成含酚基的氨基酸与 Folin 试剂呈蓝色

反应,通过分光光度计测定酶活大小。

【仪器调试】

紫外分光光度计在生物实验中被广泛应用,使用过程中应根据相应的说明书严格规范操作,一般应注意以下几方面。

(1)使用过程中比色皿的4个面在槽中保持一定的位置,取用比色皿时允许持拿毛玻璃面的两侧,建议拿捏4个棱而不是面,尤其不能持拿光洁面即透光面。

(2)盛装样品以比色皿容积的4/5为度,使用挥发性溶液时应加盖,透光面要用擦镜纸由上而下擦拭干净,必须把外表面擦干,确保无溶剂残留。

(3)比色皿应该避免磨损透光面。用后用溶剂或水冲洗干净,晾干防尘保存。

(4)保持仪器清洁,所有溶液的配制、倾倒都不要在仪器附近操作,避免溶液洒落对仪器造成腐蚀。

(5)使用过程中不得打开盖子,当操作者错误操作或其他干扰引起计算机错误时,应该立即关掉主机电源,重新启动,但无需关掉灯源电源。

(6)光学器件和仪器运行环境需保持清洁。清洁仪器外表时,请勿使用乙醇、乙醚等有机溶剂,请勿在工作中清洁,不使用时请加盖防尘罩。

【试剂配制】

1)培养基的配制

(1)牛奶平板:在普通肉汤蛋白胨固体培养基中添加终质量浓度为1.5%的牛奶。

(2)发酵培养基(g/L):玉米粉4%,黄豆饼粉3%, Na_2HPO_4 0.4%, KH_2PO_4 0.03%,3mol/L NaOH 调节pH到9.0,0.1MPa灭菌20min,250mL锥形瓶的装瓶量为50mL。

(3)肉汤琼脂培养基(1000mL):牛肉浸液(1:3),蛋白胨10g,NaCl 5g,琼脂15~20g,pH7.4。

2)Folin 试剂

(1)试剂甲:(A)称取10g Na_2CO_3 、2g NaOH 和0.25g 酒石酸钾钠,溶解后定容至500mL。

(B)称取0.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,溶解后用蒸馏水定容至100mL。每次使用前取(A)液50份与(B)液1份,即为试剂甲,其有效期为1d,过期失效。

(2)试剂乙:在1.5L容积的磨口回流器中加入100g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和700mL 蒸馏水,再加50mL 85%磷酸和100mL 浓盐酸充分混匀,接上回流冷凝管,以小火回流10h。回流结束后,加入150g 硫酸锂和50mL 蒸馏水及数滴液体溴,开口继续沸腾15min,去除过量的溴,冷却后溶液呈黄色(如仍呈绿色,再滴加数滴液体溴,继续沸腾15min)。然后稀释至1L,过滤,滤液置于棕色试剂瓶中保存,使用前加水大约1倍,使最终浓度相当于1mol/L。

3)pH11的硼砂-氢氧化钠缓冲液 硼砂19.08g溶于1000mL水中;NaOH 4g溶于1000mL水中,二液等量混合。

4)2%酪蛋白 称取2g干酪素,用少量0.5mol/L NaOH润湿后加入适量pH11的硼砂-氢氧化钠缓冲液,加热溶解,定容至100mL,4℃冰箱中保存,使用期不超过一周。

5)0.4mol/L 三氯乙酸 称取三氯乙酸65.4g,定容至1000mL。

6)100μg/mL 酪氨酸溶液 精确称取在105℃烘箱中烘至恒重的酪氨酸0.1g,逐步加入

6mL 1mol/L 盐酸使之溶解,用 0.2mol/L 盐酸定容至 100mL,其浓度为 1000 μ g/mL,再吸取此液 10mL,以 0.2mol/L 盐酸定容至 100mL,即配成 100 μ g/mL 的酪氨酸溶液。此溶液配成后应及时使用或放入冰箱内保存,以免繁殖细菌而变质。

【操作步骤】

1. 酶活标准曲线的制作

(1)用酪氨酸配制 0 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL 的标准溶液,取不同浓度的酪氨酸 1mL 与 5mL 0.4mol/L Na_2CO_3 、1mL Folin 试剂混合,40 $^\circ\text{C}$ 水浴显色 30min。

(2)680nm 测定吸收值并绘制标准曲线。

(3)求出光密度为 1 时相应的酪氨酸质量(μ g),即 K 值。

2. 用选择平板分离产蛋白酶菌株

取少量土样混于无菌水中,梯度稀释后涂布到牛奶平板上,37 $^\circ\text{C}$ 培养 30h 左右观察,可以用地衣芽孢杆菌作为对照菌株。

3. 产蛋白酶菌株的观察与转接

(1)对牛奶平板上的总菌数和产蛋白酶的菌数进行记录。

(2)选择蛋白水解圈最大的 5 个菌株进行测量,记录菌落和透明圈的直径。

(3)转接到肉汤琼脂斜面上,37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜。

4. 碱性蛋白酶粗酶液的获得

将初筛获得的 5 株蛋白酶菌株接种到发酵培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 下 200r/min 摇床培养 48h,即获得粗酶液。

5. 酶活力的测定

空白对照	样品
预热 2min 的发酵液或其稀释液 1mL	预热 2min 的发酵液或其稀释液 1mL
预热 2min 的 2%酪蛋白 1mL	0.4mol/L 三氯乙酸 3mL
40 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 10min	40 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 10min
0.4mol/L 三氯乙酸 3mL	预热 2min 的 2%酪蛋白 1mL
继续置于水浴中保温 20min 使残余蛋白质沉淀,然后用滤纸过滤,滤纸应清亮无絮状物	
滤液 1mL	
0.4mol/L Na_2CO_3 5mL	
Folin 试剂 1mL	
40 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 20min,于 680nm 处测定 OD 值	

碱性蛋白酶活力单位 U,以每毫升样品在 40 $^\circ\text{C}$ 、pH11 条件下,每分钟水解酪蛋白所产生的酪氨酸质量来表示。

$$U=K \times A \times N \times 5/10$$

式中, K 表示由标准曲线求出光密度为 1 时相应的酪氨酸质量; A 表示样品 OD 值与空白对照 OD 值之差; N 表示稀释倍数;5/10 表示测定中吸取的滤液是全部滤液的 1/5,而酶反应时

间为 10min。

【注意事项】

1. 菌株要从土壤中筛选，最好是蛋白质含量较高的土壤，可以选择河岸附近的土壤。
2. Folin 试剂的配制比较复杂，因此需要小心配制。
3. 在进行酶活力测定时选用对照组，可以更好地判断酶活力的大小。
4. 产蛋白酶菌株受温度、pH 等各种条件的影响，因此需要严格控制条件。

【实验后分析】

1. 在选择平板上分离获得蛋白酶产生菌的比例如何？试结合采样地点进行分析。
2. 在选择平板上形成的蛋白水解圈的大小，为什么不能作为判断菌株产蛋白酶能力的直接证据？试结合初筛和复筛的结果分析。

【新实验设计】

1. 能否通过本实验的方法和思路，设计另外一种微生物的筛选，如分解尿素的微生物的分离？
2. 对筛选到的菌株进行验证，确定其可以产生几种蛋白酶。

实验三 乳酸菌素产生菌的筛选

Isolation of lactic acid bacteria producing lactein

【实验目的】

1. 掌握产细菌素等抑菌物质的菌株的筛选方法。
2. 了解细菌素效价测定的方法。

【实验原理】

1925 年，Gratia 发现 1 株大肠杆菌对其他的大肠杆菌有抑菌活性，这种活性物质被称为大肠杆菌素(colicine)。1953 年，Jacob 等将由细菌产生的对同源细菌具有高度专一性的抗菌蛋白质统称为细菌素(bacteriocin)。1978 年，Konisky 提出细菌素是某些细菌通过核糖体合成机制产生的分泌释放到环境中的一类具有抑菌活性的蛋白质或多肽，其抑菌范围不仅仅局限于亲缘关系较近的种。细菌素以生产菌而命名。

乳酸菌产生的细菌素就叫做乳酸菌素，到目前为止普遍接受的观点是：乳酸菌素是一类由质粒 DNA 编码形成的，在细胞溶解时释放并通过专一位点结合而对近缘相关种有致死作用的活性蛋白类物质，产生菌对其乳酸菌素具有自身免疫性。根据细菌素分子质量大小、热稳定性和修饰氨基酸种类，可分为 3 类：①热稳定的小分子细菌素；②热敏感的大分子细菌素，它们的分子质量一般大于 30kDa，通常在 100℃或更低的温度下 30s 内即失活，这类细菌素抑菌谱较窄；③羊毛硫抗生素，它在核糖体中合成，最主要的特点是在分子的活性部位具

有大量稀有氨基酸,如羊毛硫氨酸、 β -甲基羊毛硫氨酸和脱氢丙氨酸等。这些非编码氨基酸的存在,说明它的形成必然有原始翻译产物的修饰和构象变化。据羊毛硫抗生素的分子特征,又可分为线型肽和球型肽两类,其中线型肽中的 Nisin 是目前国际上研究最深、应用最广的乳酸菌素,它是由乳酸链球菌产生的。Nisin 的抗菌谱包括抑制链球菌、葡萄球菌、芽孢菌属的一些种、梭菌及其他乳杆菌,可抑制芽孢的形成,而对人未发现有毒性。1969 年,FAO/WHO(联合国粮食及农业组织/世界卫生组织)食品添加剂联合专家委员会批准 Nisin 可作为一种食品添加剂;1970 年,WHO 的微生物标准委员会制定 Nisin 国际标准计量单位为 IU。1980 年,Nisin 在啤酒、葡萄酒及乳酸菌的防腐方面表现出了巨大潜力;1990 年,我国卫生部食品监督部门签发了 Nisin 在国内使用的合格证明书,同时被列入 GB 2760—1986 的 1990 年增补品种中,可用于罐头食品、植物蛋白食品、乳制品和肉制品中。目前,已经有 60 多个国家和地区批准 Nisin 可作为一种纯天然食品防腐剂、保鲜剂使用。

乳酸菌素可以改善肠道微生态平衡,提高机体免疫力,促进营养物质吸收,而且由于乳酸菌素能在人体消化道内被消化液中的酶所分解,因此,被认为是一种高效、安全的天然食品防腐剂。但乳酸菌素也存在自身的缺点:效价低、用量大、抗代谢性能差、抗菌时效短、抗菌谱窄等。不同的乳酸菌所产生的乳酸菌素是不同的,不同的乳酸菌素具有不同的抑菌谱和抑菌活性,有的乳酸菌素不具有抑菌活性。从不同地域、不同环境样品中分离具有广谱高效抑菌活性且作用条件简单的乳酸菌素产生菌具有重要意义。

细菌素产生菌的筛选方法很多,如点种法、交叉划线法和打孔扩散法等。点种法是把敏感指示菌 20h 培养物接种在琼脂平板的表面,然后将待测菌株或其代谢产物点种在琼脂表面上,37℃培养 24h 后观察点种处有无透明圈,有则说明有细菌素产生,否则没有细菌素产生。交叉划线法是把培养 20h 的待测菌划线接种在琼脂培养基的表面,线条粗 3~5mm,37℃培养 24h 后,划线处有均匀连续的菌苔,不能出现断线或杂菌污染的情况,用无菌白纸将菌苔擦去,尽量擦除完全。然后用氯仿杀死活菌,再将敏感指示菌与待测菌垂直交叉划线接种在琼脂表面,37℃继续培养 24h 后,观察划线交叉处敏感菌的生长情况,在划线交叉处没有细菌生长,呈“断线”状的为细菌素产生菌,否则为细菌素阴性。在打孔扩散法中,将受试菌的液体培养的上清液置于已预先接种指示菌的固体培养基中。在受试菌的孔或菌落周围出现有透明的指示菌抑菌圈的阳性结果即可以认为是细菌素产生的标志。然而,细菌素并不是唯一能导致产生透明抑菌圈的抑菌物质,也有可能是有机酸(主要是乳酸)、过氧化氢等。有时候,噬菌体也是一个可能导致产生抑菌圈的因素。pH 中和、接触酶处理产生菌的培养上清液可以相应地排除由乳酸和过氧化氢引起的可能的抑菌作用。

抗生素的生物测定方法有三大类:扩散法、稀释法和比浊法。扩散法中的管碟法是利用细菌素在琼脂平板内的扩散作用从而抑制敏感菌的直接测定方法,符合临床使用的实际情况,且灵敏度高,不需特殊的设备,被世界各国所公认,作为国际通用的方法被列入各国药典法规中。它是将已知浓度的标准抗生素溶液与未知浓度的样品溶液分别加到一种标准的不锈钢小管(即牛津杯)中,在含有敏感指示菌的琼脂表面进行扩散渗透,比较两者对敏感试验菌的抑制作用,测量出抑菌圈的大小,以计算抗生素的浓度。在一定浓度范围内,抗生素的浓度与抑菌圈直径在双周半对数表上(浓度的对数值为纵坐标,抑菌圈直径为横坐标)呈直线函数关系,据样品的抑菌圈直径可在标准曲线上求得其效价。

【仪器调试】

1. pH计

1) 配制 3mol/L KCl 溶液 在电极初次使用或保存较长时间后重新使用前,重新更换电极填充液,并将电极浸泡于 3mol/L KCl 溶液中 2h 以上,以活化电极。注意事项:电极头应浸泡于 3mol/L KCl 溶液中 2cm,浸泡的尖端过短,不能活化电极。

2) 电极填充液的更换 每 1~2 月更换 1 次,先用注射器将填充液吸出,然后再注入少许新鲜填充液润洗电极腔,再吸出,然后注入新鲜填充液至距填充孔 1.5cm 处。在测量强酸性、强碱性、含有有机溶剂或污染严重的样品时,电极填充液至少应 2 周更换 1 次。在更换新鲜电极填充液后,将电极浸泡于 3mol/L KCl 溶液中 2h 以上再使用。

3) 电极 pH 的校正 在正常情况下,每天使用前校正电极 1 次。在电极的使用频率高时,可对电极进行 pH 校正 2~3 次。校正所用的 pH 缓冲液必须新鲜配制,所用的 pH 校正缓冲液应避免校正时的污染,重复应用的次数不应超过 5 次。样品和 pH 校正缓冲液的温差不应大于 5℃,建议样品和 pH 校正缓冲液置于同一室温下。电极 pH 校正采用二点自动校正。

4) 样品的测量 先将活化的电极用重蒸水冲洗,然后用纸巾吸附电极头的水滴,但不应用纸巾擦拭电极头,以防止产生静电造成不稳定和误差。注意事项:在定标和测量时,应采用磁力搅拌器,特别是对于悬浮液体。为防止搅拌器将热量传递给样品溶液,在样品烧杯和搅拌器之间应置一隔热纸板。在电极的使用过程中,电极的填充孔必须打开。

5) 电极的保养和维护 在每次使用后,均应用重蒸水彻底冲洗干净。如果每天均使用,可将电极浸泡于 3mol/L KCl 溶液中。如果长期不用,应将电极填充孔封闭,并在电极保护套中填塞一小块浸润过 3mol/L KCl 溶液的海绵,然后将电极轻轻装入电极套中,以防止电极头干燥。

6) 主机自检 在第一次使用和平时操作出现故障时运行主机自检。

(1) 电极与主机不连接,用电极通路上的短路盖封闭电极通道。

(2) 将电源变压器与电源插座相连接,但不与主机相连接。

(3) 按住“YES”键不动,将电源变压器与主机电源接口相连接,直至屏幕出现 2.6 字样,松开“YES”键,仪器将自动进行电路和硬件自检,屏幕依次出现:TEST1、TEST2、TEST3、TEST4、TEST5、TEST6、TEST7。

(4) 稍后屏幕出现 0 字样,即刻按压主机上每一个功能键,每压一个键,屏幕将显示一个数字,按压每一个键的时间间隔不能超过 4s,否则将出现错误提示:E-07。如果屏幕出现 E-07,则关机重新自检。在进入最后一个自检程序时,屏幕显示 TEST8,然后仪器自动进入测量状态,屏幕显示 7.000 ± 0.002 ,其右上方并有 MEASURE 字样。

7) pH 二点自动校正 在自动校正过程中,不能对仪器进行数据改动,可通过按压“YES”键退至测量模式。

(1) 将活化电极与主机相连接,按“POWER”键通电开机,仪器自动进入 pH 测量状态,使屏幕下缘的“▽”符号指向主机 pH 标示。按压“MODE”键,“▽”符号可发生移动,以进行测量模式的选择。

(2) 用重蒸水冲洗电极并拭干后,将电极插入第 1 点 pH7.00 的定标缓冲液中,并用磁力

搅拌器搅拌。

(3) 先按压绿色的“2nd”键，屏幕右侧出现 2nd 的字符，再按压“MODE/CAL”键，开始定标，屏幕上方显示 CALIBRATE 字样。

(4) 在电信号稳定后，屏幕右侧显示 READY 字样、下方显示 P1 字样，中间位置闪烁当前定标缓冲液的 pH，然后按压“YES”键确认，屏幕下方将显示 P2 字样，提示将电极插入定标第 2 点缓冲液(pH4.01 或 pH10.01)。

(5) 在第 2 点定标缓冲液的电信号稳定后，屏幕右侧也显示 READY 字样，按压“YES”键，屏幕下方将显示 P3，此时按压“MEASURE/PRINT”键，电极斜率值将在屏幕上显示数秒钟，然后自动返回测量状态，即定标完成。

8) pH 计使用三步骤

pH 计是测量 pH 的精密仪器，也可用来测量电动势。要得到测量的最后数值，就需要按照如下的三步骤进行操作：安装、校正、测量。

(1) 安装。

a. 电源的电压与频率必须符合仪器铭牌上所指明的数据，同时必须接地良好，否则在测量时可能指针不稳。

b. 仪器配有玻璃电极和甘汞电极。将玻璃电极的胶木帽夹在电极夹的小夹子上。将甘汞电极的金属帽夹在电极夹的大夹子上。可利用电极夹上的支头螺丝调节两个电极的高度。

c. 玻璃电极在初次使用前，必须在蒸馏水中浸泡 24h 以上。平常不用时也应浸泡在蒸馏水中。

d. 甘汞电极在初次使用前，应浸泡在饱和氯化钾溶液内，不要与玻璃电极同泡在蒸馏水中。不使用时应浸泡在饱和氯化钾溶液中或用橡胶帽套住甘汞电极的下端毛细孔。

(2) 校正。

a. 将“pH-mV”开关拨到 pH 位置。

b. 打开电源开关，指示灯亮，预热 30min。

c. 取下放蒸馏水的小烧杯，并用滤纸轻轻吸去玻璃电极上的多余水珠。在小烧杯内加入选择好的、已知 pH 的标准缓冲液。将电极浸入。注意使玻璃电极端部小球和甘汞电极的毛细孔浸在溶液中。轻轻摇动小烧杯使电极所接触的溶液均匀。

d. 根据标准缓冲液的 pH，将量程开关拧到 0~7 或 7~14 处。

e. 调节控温钮，使旋钮指示的温度与室温相同。

f. 调节零点，使指针指在 pH7 处。

g. 轻轻按下或稍许转动读数开关使开关卡住。调节定位旋钮，使指针恰好指在标准缓冲液的 pH 数值处。放开读数开关，重复操作，直至数值稳定为止。

h. 校正后，切勿再旋动定位旋钮，否则需重新校正。取下标准液小烧杯，用蒸馏水冲洗电极。

pH 计所用的标准缓冲液的试剂容易提纯，也比较稳定。常用的配制方法如下：① pH=4.00 的标准缓冲液。称取在 105℃干燥 1h 的邻苯二甲酸氢钾 5.07g，加重蒸水溶解，并定容至 500mL。② pH=6.88 的标准缓冲液。称取在 130℃干燥 2h 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 3.401g，磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 8.95g 或无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 3.549g，加重蒸水溶解并定容至

500mL。③pH=9.18 的标准缓冲液。称取硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 3.8144g 或无水硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 2.02g 加重蒸水溶解并定容至 100mL。

(3) 测量。

a. 将电极上多余的水珠吸干或用被测溶液冲洗两次, 然后将电极浸入被测溶液中, 并轻轻转动或摇动小烧杯, 使溶液均匀接触电极。

b. 被测溶液的温度应与标准缓冲溶液的温度相同。

c. 校正零位, 按下读数开关, 指针所指的数值即是待测液的 pH。若在量程 pH0~7 内测量时指针读数超过刻度, 则应将量程开关置于 pH7~14 处再测量。

d. 测量完毕, 放开读数开关后, 指针必须指在 pH7 处, 否则重新调整。

e. 关闭电源, 冲洗电极, 并按照前述方法浸泡。

(4) 使用 pH 计的注意事项。

a. 防止仪器与潮湿气体接触。潮气的侵入会降低仪器的绝缘性, 使其灵敏度、精确度、稳定性都降低。

b. 玻璃电极小球的玻璃膜极薄, 容易破损, 切忌与硬物接触。

c. 玻璃电极的玻璃膜不要沾上油污, 如不慎沾上油污可先用四氯化碳或乙醚冲洗, 再用乙醇冲洗, 最后用蒸馏水洗净。

d. 甘汞电极的氯化钾溶液中不允许有气泡存在, 其中有极少结晶, 以保持饱和状态。如结晶过多, 毛细孔堵塞, 最好重新灌入新的饱和氯化钾溶液。

e. 如 pH 计指针抖动严重, 应更换玻璃电极。

2. 高速冷冻离心机

高速冷冻离心机是一种常用的离心机产品, 主要用于对混合液体进行快速分离。离心机是利用离心力使需要分离的不同物料得以加速分离的机器。主要分为过滤式离心机和沉降式离心机两大类。过滤式离心机的主要原理是通过高速运转的离心转鼓产生的离心力 (配合适当的滤材), 将固液混合液中的液相加速甩出转鼓, 而将固相留在转鼓内, 达到分离固体和液体的效果, 或者俗称脱水的效果。沉降式离心机的主要原理是通过转子高速旋转产生的强大的离心力, 加快混合液中不同相对密度成分 (固相或液相) 的沉降速度, 把样品中不同沉降系数和浮力密度的物质分离开。

高速冷冻离心机是指转速在 10 000r/min 以上, 同时具有冷冻功能的离心机。除具有冷冻离心机的性能和结构外, 高速冷冻离心机所用角式转头也与普通离心机不同, 多采用钛合金或铝合金制成, 离心管则为具盖聚乙烯硬塑料制品。高速冷冻离心机能够对样品溶液中悬浮物质进行高纯度的分离、浓缩、精制和提取, 多用于血液、细胞、蛋白质、酶、病毒、激素等的分离制备和收集。

高速冷冻离心机操作规程如下。

(1) 离心样品密度要一样, 样品体积保持为离试管口 3mm 处。

(2) 将密度相同、已配平、管壁干燥的离心管以对称状态置入吊桶内, 拧紧对应的吊桶帽, 悬挂到对应的吊桶架上, 空吊桶也要悬挂。

(3) 将仪器电源开关打开。

(4) 用手按住指定位置, 同时用脚踏住踏板, 门盖将自动打开。

(5) 将悬挂吊桶的转头笔直向下轻轻放置在驱动轴套上, 保证其牢固。

(6) 拧紧转头盖。

(7) 手按住指定位置将门盖压下去。

(8) 离心参数设置：转速、时间、转头型号、温度、升降速度频率。

(9) 确认参数设置无误，按 ENTER 键，离心机达到设定转速 5min 后，使用者方可离开。离心途中要观察仪器是否运转正常。

(10) 离心结束(或按“STOP”结束运行)，转头停止运转后，打开门盖，拧松转头盖，将转头取出放到专用架上，取出吊桶，旋松吊桶帽，取出样品。

(11) 吊桶帽及吊桶敞开放在指定位置，如有漏液，取出密封圈，洗净后再倒置放在桌布上。

(12) 将仪器电源关闭。

(13) 将离心机腔体内冷凝水擦净，腔体温度与室温相同时关闭门盖。注意事项：冷冻离心需要预冷时，离心机在所需温度下 2000r/min 离心 3~5min。

3. 其他器材

高压灭菌锅、恒温培养箱、电子天平、牛津杯(内径 $6\text{mm}\pm 0.1\text{mm}$ ，外径 $8\text{mm}\pm 0.1\text{mm}$ ，高 10mm)、培养皿(直径 90mm，深 20mm，大小一致，皿底平坦)、微量移液器、微量移液器枪头(1000 μL 、200 μL)、游标卡尺、镊子、无菌滴管、无菌试管和吸管等。

【试材准备】

1) 菌种 大肠杆菌(*Escherichia coli*)斜面菌种、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)斜面菌种、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)斜面菌种。

2) 样品 酸牛奶；发酵型酸牛奶。

【试剂配制】

(1) 乳酸细菌(MRS)固体培养基的配制。

(2) 乳酸细菌(MRS)液体培养基的配制。

(3) 牛肉膏蛋白胨液体培养基的制备。

(4) 牛肉膏蛋白胨固体培养基的制备。

(5) 牛肉膏蛋白胨半固体培养基的制备。

(6) 磷酸缓冲盐溶液(PBS)的配制。

(7) Nisin 标准液的配制。取 0.5mg Nisin 标准品(10^6IU/g)溶于 10mL PBS 中，配成 500IU/mL 的 Nisin 标准液备用。

【操作步骤】

1. 指示菌株的活化

将大肠杆菌、金黄色葡萄球菌接种到牛肉膏蛋白胨液体试管培养基中，酿酒酵母接种到马铃薯葡萄糖(PDA)液体试管中，分别于 37℃和 28℃下培养 24~48h，活化两次。

2. 乳酸菌的分离纯化

固体样品按无菌操作方式称取 10g，加入 90mL 无菌水中，振荡培养 30min。用微量移液器吸取 1mL 加入 9mL 无菌水中，得 10^{-2} 稀释液，再继续稀释至 10^{-4} 和 10^{-5} 。液体样品直接稀释即可。分别取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液各 0.2mL，置于无菌培养皿中，放置 15min，等