

微生物学 实验技术教程

宋太新 范长胜 徐德强 陆妙康
主编

33
复旦大学出版社

微生物学实验技术教程

YK 111/16

宋大新 范长胜 主编
徐德强 陆妙康

复旦大学出版社

内 容 提 要

本书是以微生物生理、遗传、分类、免疫和基因克隆等领域的主要实验方法为基本内容的实验技术教程,共安排43个实验。它注重实验方法和技能的训练,同时引用了国内外新近发展起来的一些实验技术,具有涉及面广,重复性好、实用性强等特色。本书可作为高等院校微生物学专业本科生的教材,也可供有关专业的研究生选用,以及供从事微生物学研究的科技工作者参考。

(沪)新登字202号

微生物学实验技术教程

宋大新 范长胜 主编
徐德强 陆妙康

复旦大学出版社出版

(上海国权路 579 号)

新华书店上海发行所发行 复旦大学印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 11.5 字数 284,000

1993 年 12 月第 1 版 1993 年 12 月第 1 次印刷

印数 1—9000

ISBN7-309-01102-3/Q·39

定价:10.00 元

序

开设微生物学实验技术课程（原称“大实验”），在我系已有30余年的历史。该课程的主要任务在于培养微生物学专业的学生以获得较强的实验室工作能力，并为日后从事有关科研工作或进一步深造打下较扎实的实践基础。由于该课程具有内容丰富、实践性强、应用面广和技术较综合等诸多特点，因而倍受学生欢迎。

微生物学是一门典型的实验性科学。微生物学实验技术对每一个微生物学工作者来说，其重要性决不亚于理论课程，两者的关系犹如大鹏的一对强劲翅膀，没有它们间的协同，就无法在广阔的蓝天中自由翱翔。

本书编者宋大新等老师长期耕耘在微生物学大实验这块园地里，有着丰富的工作经验和良好的教学效果。为使学习该课程的学生有一本质量较高的教材，为使同行们有一册国人自编的参考书，为使我系的教材建设在新形势下能更前进一步，我们积极鼓励有关教师奋力协作，发挥集体的力量，及早编写一本有一定特色的微生物学实验技术教程。今天，在编者们的共同努力下，这一愿望终于得到了实现。

书中安排的43个实验、不但包括微生物生理、遗传、基因克隆、分类鉴定和免疫等领域的基本内容，而且为适应学科的发展还增添了不少较新的实验。本书不仅适合微生物学专业本科生学习实验技术的需要，也可供有关专业研究生或科技人员选用。

由于微生物学实验技术的涉及面很广和发展速度极快，加上篇幅和编者水平的限制，书中不足之处自知难免。这些，均望广大学生和同行专家随时赐教，以期在再版时加以改进并日臻完善。

周德庆

于复旦大学微生物学和微生物工程系

1992年11月10日

作者的话

微生物学是当前生命科学中发展最迅速、影响最广泛的学科之一。近年来微生物学实验技术的不断创新和发展,使科学工作者得以从分子水平上深入探索微生物的生命活动规律,它与分子生物学技术和生物工程技术的相结合极大地推动了生命科学的基础理论研究,并在工、农、医等实践中得到应用。我们编写本教程的着眼点,正是为了使我们的教学工作适应这种形势的发展。

《微生物学实验技术教程》是以微生物生理、遗传、分类、免疫和基因克隆等领域的主要实验方法为其基本内容,全书介绍了43个实验。第一章微生物生理学实验涉及生物合成途径分析、代谢调控研究、酶促反应及其产物测定、原生质体融合、厌氧菌的生物转化及固定化的细胞技术、发酵培养基的正交试验等内容。第二章微生物遗传学实验全部采用大肠杆菌突变型菌株,内容包括转座子引起的基因突变、突变型的互补测验、无义抑制基因的作用机制、F'因子对 *dna A* 突变的整合抑制以及通过接合和转导进行基因定位等。在第三章基因克隆实验中,分别介绍了常用的鸟枪法技术和近年来出现的PCR技术,内容涉及DNA的制备和纯化、酶切、连接、转化和检测等一整套重组DNA技术。第四章微生物分类学实验的内容包括细菌和真菌两大部分:前者主要参考《伯杰氏系统细菌学手册》第二卷(1986年)的方法,介绍芽孢杆菌的分离纯化和鉴定,另外,还介绍了通过分析甘油二醚类衍生物快速鉴别嗜盐菌的技术;后者采用G.C.Ainsworth等(1973年)的真菌分类系统,介绍了工农医实践中常见常用的真菌鉴定方法。第五章微生物免疫学实验的内容涉及抗血清的制备、免疫血清技术和细胞免疫测定技术等。总之,本教程注重实验方法和技能的训练,并在多处引用了国内外新近发展起来的一些实验技

术，所列的实验具有涉及面广、重复性好、实用性强等特色。

本教程可作为微生物学专业高年级学生的实验课教材，要求修读这门课程的学生必须具备一定的微生物学基础知识和基本实验操作技能，在学完这本教材后，学生应能熟练掌握微生物学常用的实验技术和方法，并能胜任有关的科学研究工作。

本教程的实验大体上可安排一个学年的时间完成，各教学单位可根据自己的实验室条件和规定的学时数，对实验内容有所取舍。

由于我们的实验条件和见识水平的限制，教程中难免会有不足之处，甚至错误，我们真诚地欢迎读者批评指正。

本教程所列的部分实验是在本系的科研工作的基础上，按教学实验的要求设立的，在编写过程中曾得到本系教师们的支持、帮助和审阅。其中，严建孙、程皆能，胡宝龙、周德庆、林勇、陈文、李永福、郭杰炎、魏淦、陈永青、郑善良、郑兆鑫、黄静娟、张纪忠、刘启鼎等分别参加某些实验的编写。此外，复旦大学遗传学研究所等单位也曾给予很大的帮助，在此一并致谢。

宋大新 范长胜 徐德强 陆妙康

1992年11月于复旦大学

目 录

第一章 微生物生理学实验

实验 1-1	大肠杆菌中色氨酸生物合成途径·····	3
实验 1-2	大肠杆菌中 β - 半乳糖苷酶的诱导合成及其调控·····	9
实验 1-3	棒杆菌的赖氨酸合成代谢控制·····	17
实验 1-4	苯乙酸对产黄青霉合成青霉素的调节·····	24
实验 1-5	短杆菌原生质体融合·····	30
实验 1-6	厌氧菌的培养及其转化产物的分离与定量测定·····	39
实验 1-7	固定化活细胞的制备·····	48
实验 1-8	乳糖酶对牛乳乳糖的水解作用·····	55
实验 1-9	微生物发酵培养基配方的正交试验·····	61
实验 1-10	微生物摇瓶发酵条件的选择·····	72
实验 1-11	小型自控发酵罐的操作及其应用·····	79

第二章 微生物遗传学实验

实验 2-1	转座子 Tn 5 的遗传学效应·····	89
实验 2-2	噬菌体 MuC _{ts} dl(Ap ^r lac)引起的插入突变 ·····	95
实验 2-3	Lac ⁻ 突变型的互补测验 ·····	103
实验 2-4	无义抑制基因对 lac ⁻ 无义突变型的抑制·····	111
实验 2-5	F' 因子对 E. coli dnaA 46 突变的整合抑制 ·····	117
实验 2-6	非中断杂交与基因定位·····	125
实验 2-7	噬菌体 P1 的普遍性转导与共转导基因定位 ·····	131
附 A	几种培养基、缓冲液和试剂的配制方法·····	140

第三章 基因克隆实验

实验 3-1	λ 噬菌体的制备 ·····	147
--------	------------------------	-----

实验 3-2	DNA 分子量标记物的制备·····	155
实验 3-3	枯草芽孢杆菌 <i>bgl S</i> 基因的克隆·····	163
实验 3-4	聚合酶链式反应扩增棒杆菌的预苯酸脱水酶基因·····	182
实验 3-5	棒杆菌的预苯酸脱水酶基因克隆·····	194

第四章 微生物分类学实验

实验 4-1	芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)常见种的分离和鉴定·····	209
附 B-1	芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)常见种的检索表·····	217
附 B-2	芽孢杆菌属种的形态学特征·····	219
附 B-3	芽孢杆菌属各种的比较表·····	221
附 B-4	芽孢杆菌属常见种鉴定用的各种染色方法·····	236
附 B-5	芽孢杆菌属常见种鉴定用的各种生理生化测试·····	
	方法及有关培养基·····	240
实验 4-2	细菌 DNA 中 G+C mol% 的测定·····	253
实验 4-3	嗜盐细菌甘油二醚类衍生物的测定·····	262
实验 4-4	毛霉科(<i>Mucoraceae</i>)常见种的鉴定·····	266
附 B-6	根霉属(<i>Rhizopus</i>)常见种的检索表·····	270
附 B-7	毛霉属(<i>Mucor</i>)常见种的检索表·····	271
实验 4-5	散囊菌目(<i>Eurotiales</i>)常见代表种的鉴定·····	271
实验 4-6	球壳菌目(<i>Sphaeriales</i>)常见代表种的鉴定·····	276
附 B-8	毛壳菌属(<i>Chaetomium</i>)常见种的检索表·····	280
实验 4-7	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)群的分离与鉴定·····	281
附 B-9	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)分群检索表·····	287
实验 4-8	青霉属(<i>Penicillium</i>)系的鉴定·····	289
附 B-10	青霉属(<i>Penicillium</i>)分系检索表·····	293
实验 4-9	半知菌亚门(<i>Deuteromycotina</i>)常见种的鉴定·····	296

第五章 微生物免疫学实验

实验 5-1	抗血清的制备·····	303
实验 5-2	双向琼脂扩散试验·····	312

实验 5-3	火箭免疫电泳·····	315
实验 5-4	免疫球蛋白的硫酸铵盐析法提取·····	318
实验 5-5	琼脂免疫电泳·····	323
实验 5-6	酶标记抗体的制备·····	327
实验 5-7	酶联免疫吸附试验·····	331
实验 5-8	小白鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬试验·····	336
实验 5-9	抗体分泌细胞的分光光度法测定·····	339
实验 5-10	淋巴细胞增殖功能的四甲基偶氮唑盐(<i>MTT</i>)比色法 测定·····	343
实验 5-11	白细胞移动抑制试验(直接毛细管法)·····	348
附 C	几种营养液、缓冲液和试剂的配制·····	353

第一章

微生物生理学实验

实验1-1 大肠杆菌中色氨酸生物合成途径

一、目的

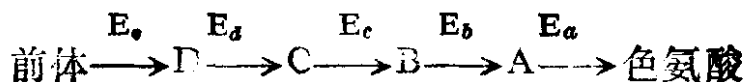
了解大肠杆菌中色氨酸的生物合成途径，掌握研究生物合成途径的一般方法。

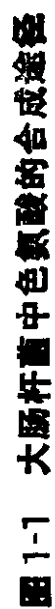
二、概述

大肠杆菌中色氨酸的生物合成途径如图 1-1 所示。在色氨酸操纵子中，有 5 个结构基因编码相应的酶，催化从分支酸到色氨酸的各步合成反应。由 *trpE* 编码的组分 1 (ASase I) 蛋白没有活性，除非与 *trpD* 编码的组分 2 蛋白 (ASase II，也叫磷酸核糖转移酶) 结合并形成邻氨基苯甲酸合成酶 (ASase)。反应的第 1 步是由结构复杂的 ASase 催化的，而第 2 步反应仅由 ASase II 催化。第 3、4 步反应都由 *trpC* 编码的复合酶催化。第 5 步反应由 *trpB* 和 *trpA* 共同编码的色氨酸合成酶 (TSase) 催化，其中 TSase α 蛋白又可单独催化反应 6，TSase β 蛋白可单独催化反应 7。

如果在色氨酸生物合成的某一中间代谢产物存在下能进行生长，而在该代谢产物不存在时就不能生长，那么这一菌株一定具有转化该代谢产物为色氨酸的酶。同理可以断定该突变株所缺失的酶一定在这一代谢产物之前。反之，若在这一代谢产物存在下还不能生长，则可以断定该突变株所缺失的酶一定在这一代谢产物之后。

本实验应用分别缺失这 5 个基因的突变株，它们分别缺失色氨酸生物合成途径中的不同酶。为简化起见，将色氨酸生物合成途径以下列简式表示（式中 A、B、C、D 分别表示生物合成途径中的中间物， E_a 、 E_b 、 E_c 、 E_d 、 E_e 分别表示不同的酶）：





对缺失 E_e 的突变株，在补加 D、C、B、A 或色氨酸的基本培养基上都能生长。对缺失 E_d 的突变株，在补加 D 的基本培养基上则不能生长，只有在补加 C、B、A 或色氨酸的基本培养基上才能生长，如此类推。这就是营养缺陷型鉴别法。

微生物通过培养基相互提供养料而生长的现象称为互养。在上例中，缺失 E_a 的突变株因 $A \xrightarrow{E_a}$ 色氨酸这步反应受阻，其结果一方面表现需要色氨酸，另一方面在细胞中积累中间代谢产物 A，并分泌到培养基中被分别缺失 E_b 、 E_c 、 E_d 、 E_e 的突变株利用而生长。后者的生长又反过来为前者提供代谢终产物色氨酸，使其得以生长。如果把它们划线接种到最低生长的基本培养基上，会出现先后生长的互养现象。根据它们生长的先后顺序，可以推测出它们产生的突变位点顺序和酶促反应顺序。

根据营养缺陷型和互养实验的结果，可以推测出许多氨基酸、核苷酸、维生素等的生物合成途径，而且对于更为复杂的生理过程的探索也有帮助。

三、材料和器皿

1. 菌种

(1) 野生型大肠杆菌： *E. coli* W。

(2) 营养缺陷型大肠杆菌： *E. coli* trpA, *E. coli* trpB, *E. coli* trpC, *E. coli* trpD, *E. coli* trpE。

2. 培养基，缓冲液和试剂

(1) 斜面培养基：蛋白胨 10g，牛肉膏 5g，酵母膏 5g，氯化钠 5g，琼脂 15g，加水定容至 1000ml，用 1mol/L NaOH 调至 pH7.0—7.2，0.1MPa(15 lbf/in²) 灭菌 15min。

(2) 基本培养基 (MM)：葡萄糖 3g，NH₄Cl 3g，NaCl 3g，K₂HPO₄·3 H₂O 1.8g，MgSO₄·7 H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.03g，琼脂 9g，蒸馏水 600ml，用 1 mol/L NaOH 调至 pH 7.0—7.2，0.1 MPa(15 lbf/in²) 灭菌 15 min。配 600ml 分装于 6 只 250 ml 三角瓶，每瓶 100 ml。其中 5 瓶用于下述的补充培养基。

(3) 补充培养基(SM): 在上述 5 瓶MM 中, 分别补加下列成分, 0.1 MPa(15 lbf/in²) 灭菌 15min。

SM₁: 补加 4mmol/L 对氨基苯甲酸 1ml;

SM₂: 补加 4mmol/L 邻氨基苯甲酸 1ml;

SM₃: 补加 4mmol/L 吡啶 1 ml;

SM₄: 补加 4mmol/L 色氨酸 1ml;

SM₅: 补加 0.01% 蛋白胨溶液 1 ml。

(4) 0.85% NaCl; 6ml, 分装于 6 支试管中, 每管 1ml, 0.1 MPa (15lbf/in²) 灭菌 15min。

3. 主要器材

无菌培养皿(×24)。

四、操作步骤

1. 色氨酸营养缺陷型试验

(1) 倒平板: 取无菌 SM₁、SM₂、SM₃、SM₄、MM 各 1 瓶, 沸水浴融化。待冷却至不烫手时, 用无菌操作分别倒平板 4 只。皿底预先写上相应的培养基编号。

(2) 准备菌液: 取 37℃ 培养 18h 的 *E. coli* W, *E. coli* trp A, *E. coli* trpB, *E. coli* trpC, *E. coli* trpD, *E. coli* trpE 新鲜菌斜面各 1 支, 分别用接种环挑 1 环菌苔(注意不要把培养基带出), 接于 1ml 无菌生理盐水(0.85%NaCl)试管中, 振荡使成菌悬液。

(3) 划线接种: 待平板凝固后, 在皿底用记号笔划为六个区域, 并分别标上 W、A、B、C、D、E 记号。用接种环分别沾取菌悬液, 在平板的相应区域划线接种, 重复划线 4 只平板。37℃ 培养 24 h 后观察结果。

2. 色氨酸突变株互养试验

(1) 倒平板: 取无菌 SM₅ 1 瓶, 沸水浴融化。待冷却至不烫手时, 用无菌操作倒平板 4 只。

(2) 划线接种: 待平板凝固后, 在皿底按图 1-2 做好记号(两条平行线间距离掌握在 4 mm 左右)。取 1 (2) 准备的 *E. coli* trpA, *E. coli*

trp E, colit rpC, E. coli trp D, E. coli trpE 五株菌悬液, 按图背的图示分别划线接种, 重复划线 2 只平板。37℃ 培养 18 h, 24h, 36h、48h, 各观察 1 次生长情况 (生长的先后、生长量的多少)。

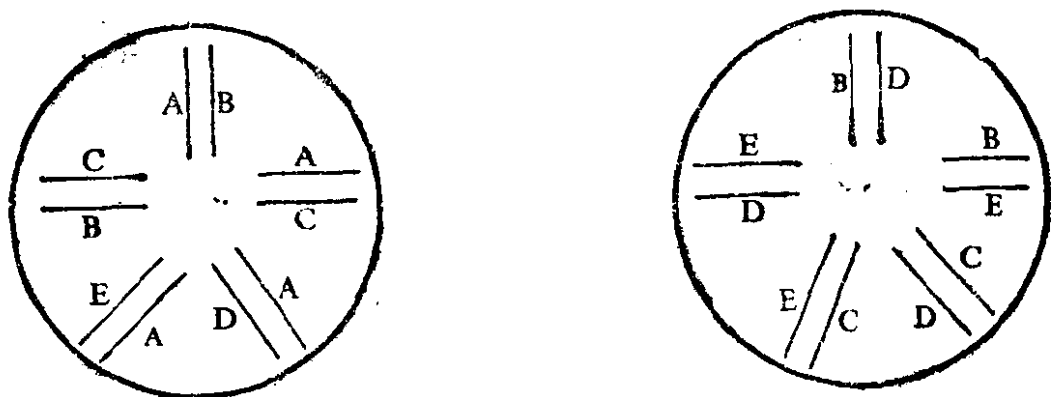


图 1-2 互养试验划线图

五、结果记录

1. 色氨酸营养缺陷型试验结果

将色氨酸营养缺陷型试验结果填于表 1-1 中, 生长用 “+” 表示, 不长用 “-” 表示。

表 1-1 不同色氨酸突变株对代谢中间物生长的反应

生长情况 突变株	中 间 物	MM	SM ₁	SM ₂	SM ₃	SM ₄
		未加	加对氨基 苯甲酸	加邻氨基 苯甲酸	加吲哚	加色氨酸
E. coli W						
E. coli trpA						
E. coli trpB						
E. coli trpC						
E. coli trpD						
E. coli trpE						

2. 色氨酸突变株互养试验结果

trp B，将色氨酸突变株互养试验结果填于表 1-2 中，用“卅、廿、十、一”分别表示“生长好、中度生长、生长差、不生长”。

3. 根据上述试验结果，排列出 *E. coli* trp A、*E. coli* trp B、*E. coli* trp C、*E. coli* trp D、*E. coli* trp E 各突变株所缺失的酶及其生物合成反应的顺序。

表 1-2 色氨酸突变株互养试验结果

培 养 时 间(h)	生 长 情 况	组 别	A B		A C		A D		A E		B C		B D	
			trpA	trpB	trpA	trpC	trpA	trpD	trpA	trpE	trpB	trpC	trpB	trpD
18														
24														
36														
48														

续表

培 养 时 间(h)	生 长 情 况	组 别	B E		C D		C E		D E	
			trpB	trpE	trp C	trpD	trpC	trpE	trpD	trpE
18										
24										
36										
48										

六、注意事项

- 1. 本实验所使用的平板表面不能有冷凝水。
- 2. 沾取菌悬液不可过多，以免菌液在平板上流淌，但接种量也不能太少。
- 3 在互养实验中，要严格控制实验条件，观察生长情况要及时。如果蛋白胨加量过多或培养时间过长，可能使本来不应生长的突变株表现为生长。此外，各菌株的接种量也应保持一致。