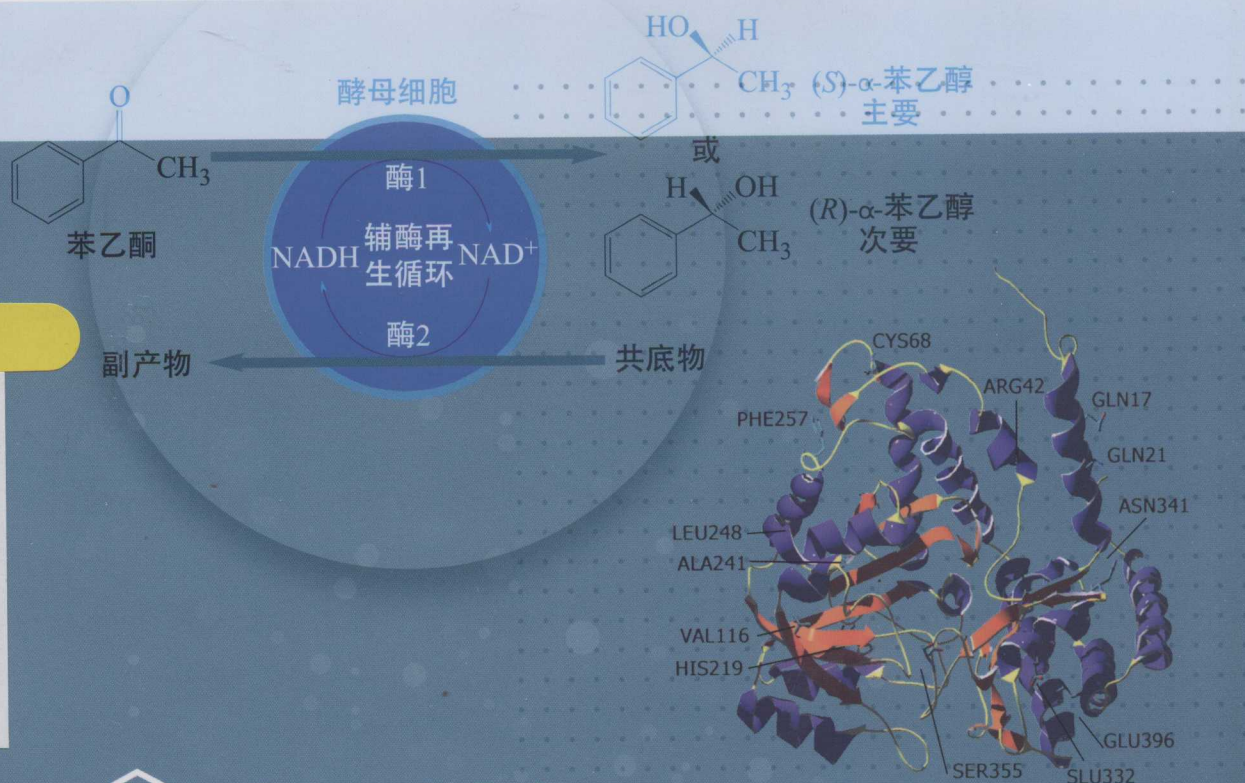


高等学校“十二五”规划教材

Experiments of Bioengineering

生物工程专业实验

杨忠华 左振宇 主编



化学工业出版社

014013031

Q81-33
22

高等学校“十二五”规划教材

生物工程专业实验

杨忠华 左振宇 主 编



中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第280817号

文字编辑：张春芳
美术设计：李洪平

责任编辑：朱林青
责任校对：顾云云

出版发行：化学工业出版社（北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011）

787mm×1092mm 1/16 印张8.5 字数194千字 2014年3月北京第1版第1次印刷

定价：22.00元 邮购：22.00元 电话：010-64218888 传真：010-64218889 网址：http://www.cip.com.cn



化学工业出版社

· 北 京 ·

定价：22.00元

定价：22.00元



北航

C1699846

014013031

本书打破了原各单独课程的界限,以知识工艺的内在联系出发安排实验项目,以培养学生系统掌握生物工程专业的基础知识。该教材按照生物产品的生产特性与规律,依据生物产品生产的上、中、下游顺序的主要特性与共性问题组织设计实验。选定一种典型的工程蛋白,从基因克隆、表达载体的构建、工程菌的培养以及工程蛋白的高效表达设置实验,使学生对整个生物产品的生产过程得到全局、全面、系统的理解和锻炼,革新了当前生物工程专业实验的教学思想。同时把偏向于工业生物技术的“生物化学实验”与“微生物学实验”也纳入该实验指导书,以增强该指导书的综合性与实用性。

本书可作为生物工程、生物技术专业本科生的教材,也可供相关专业技术人员参考。

生物工程实验指导书

主编 宋林青 副主编 左振宇

图书在版编目(CIP)数据

生物工程专业实验/杨忠华,左振宇主编. —北京:
化学工业出版社, 2014. 1
高等学校“十二五”规划教材
ISBN 978-7-122-19207-3

I. ①生… II. ①杨…②左… 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 (2013) 第 290617 号

责任编辑: 宋林青

文字编辑: 张春娥

责任校对: 顾淑云

装帧设计: 史利平

出版发行: 化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张 8½ 字数 194 千字 2014 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 18.00 元

版权所有 违者必究

《生物工程专业实验》编写人员名单

主 编：杨忠华 左振宇

编写人员(以姓名拼音为序)：

黄 皓 李凌凌 刘健忠 秦晓蓉

杨忠华 周 卫 左振宇

在此，我们首先向参与本书编写工作的各位同仁致以诚挚的谢意。本书是在生物工程专业培养计划的要求下，编写的一本以工业生物技术为专业方向的生物工程专业实验指导书。该教材所建立的实验教学体系，在注重基本实验技能培养的基础上，强调学生综合实验能力的培养。通过“生物化学实验”与“微生物学实验”培养学生的基本实验技能，通过专业综合实验，培养与强化学生的综合实验能力。在专业实验中设置以谷氨酸脱氢酶甲基转移酶(SHMT)为对象，依据从生物产品生产的上游、中游、下游的主要技术与共性知识设计综合实验，涵盖功能基因的克隆、表达载体与工程菌的构建、工程蛋白的表达与调控等专业内容，使学生的生物工程专业知识得以全面培养。

本教材分为“生物工程常用实验技术及原理”以及“实验部分”两篇，后有“附录”。具体编写分工为：刘健忠编写第1篇第1章、第2篇第8章，李凌凌编写第1篇第2章、第2篇第9章，周卫编写第1篇第3章、第2篇第10章，杨忠华编写第1篇第4章与第7章、第2篇第11章与第14章，秦晓蓉编写第1篇第5章、第2篇第12章，黄皓编写第1篇第6章、第2篇第13章，左振宇编写附录部分。鉴于时间、精力与水平的限制，该教材存在的疏漏与不足之处，敬请读者谅解，也欢迎大家批评指正。

本书在编辑、出版过程中得到了武汉科技大学、化学工业出版社各级领导的支持与帮助，在此表示衷心的感谢。

由于时间和水平所限，疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正。

编者

2013年10月于武汉科技大学

前 言

生物工程是一门实践性很强的专业，要求学生具有很强的实验操作、实验设计以及实验数据分析能力。因此，实验教学对培养合格的生物工程专业学生至关重要。对学生实验能力的要求，除了具备简单的生物分子检测分析、PCR、电泳、微生物接种、微生物培养等基本实验技能外，更需要具备功能基因的克隆、表达载体与工程菌的构建、功能蛋白的表达与调控、目的蛋白的分离纯化及应用等综合实验能力。这些能力贯穿于生物工程所涉及的上游、中游、下游各方面。

对此，我们在综合分析生物工程专业知识体系特点的基础上，结合生物工程专业培养计划的要求，编写了这本以工业生物技术为专业方向的生物工程专业实验指导书。该教材所建立的实验教学体系，在注重基本实验技能培养的基础上，强调学生综合实验能力的培养。通过“生物化学实验”与“微生物学实验”培养学生的基本实验技能。通过专业综合实验，培养与强化学生的综合实验能力。在专业实验中设置以丝氨酸羟甲基转移酶(SHMT)为对象，依据从生物产品生产的上游、中游、下游的主要技术与共性知识设计综合实验，涵盖功能基因的克隆、表达载体与工程菌的构建、工程蛋白的表达与调控等专业内容，使学生的生物工程专业知识得以全面培养。

本教材分为“生物工程常用实验技术及原理”以及“实验部分”两篇，后有“附录”。具体编写分工为：刘健忠编写第1篇第1章、第2篇第8章，李凌凌编写第1篇第2章、第2篇第9章，周卫编写第1篇第3章、第2篇第10章，杨忠华编写第1篇第4章与第7章、第2篇第11章与第14章，秦晓蓉编写第1篇第5章、第2篇第12章，黄皓编写第1篇第6章、第2篇第13章，左振宇编写附录部分。鉴于时间、精力与水平的限制，该教材存在的疏漏与不足之处，敬请读者谅解，也欢迎大家批评指正。

本书在编辑、出版过程中得到了武汉科技大学、化学工业出版社各级领导的支持与鼓励，在此表示衷心的感谢。

由于时间和水平所限，疏漏之处在所难免，敬请读者批评指正。

编者

2013年10月于武汉科技大学

5.4 萃取	19
5.5 膜分离	20
5.6 色谱	20
第6章 生物反应工程实验原理	22
6.1 均相酶催化反应动力学	23
6.2 生物反应器中氧的传递特性	25
第7章 细胞固定化及生物催化原理	30
7.1 细胞固定化概述	30
7.2 细胞固定化方法	30
7.3 生物催化概述	31

第2篇 实验部分

第8章 生物化学实验	32
------------	----

目 录

第1篇 生物工程常用实验技术及原理

第1章 生物化学实验基本理论	1
1.1 电泳技术	1
1.2 PCR技术	2
1.3 糖、核酸、蛋白质等生物分子浓度的测定	3
第2章 微生物学实验基本理论	4
2.1 微生物学实验的意义	4
2.2 微生物的显微观察及染色原理	4
2.3 微生物的培养及分离纯化	7
2.4 微生物的生理生化鉴定	8
2.5 微生物的生长繁殖	9
第3章 重组DNA技术	10
3.1 目的基因的获取	10
3.2 基因与载体的连接（以质粒载体为例）	11
3.3 重组基因导入受体细胞构建工程菌	11
3.4 筛选含有目的基因的受体细胞	12
第4章 发酵工程实验原理	14
4.1 发酵的基本内容	14
4.2 发酵过程的组成	14
4.3 发酵罐的类型	15
4.4 发酵罐及培养基的灭菌	15
4.5 发酵培养基的配制	17
4.6 发酵过程的控制	17
第5章 常用生物分离实验技术及原理	18
5.1 细胞破碎	18
5.2 过滤和离心	18
5.3 沉淀	18
5.4 萃取	19
5.5 膜分离	20
5.6 色谱	20
第6章 生物反应工程实验原理	22
6.1 均相酶催化反应动力学	22
6.2 生物反应器中氧的传递特性	25
第7章 细胞固定化及生物催化原理	30
7.1 细胞固定化概述	30
7.2 细胞固定化方法	30
7.3 生物催化概述	31

第2篇 实验部分

第8章 生物化学实验	32
------------------	----

实验 8.1	部分药品试剂的配制及高压灭菌	32
实验 8.2	还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法	34
实验 8.3	基因组 DNA 的分离提取及电泳检测	36
实验 8.4	DNA 浓度及纯度的测定	38
实验 8.5	蛋白质的 SDS-PAGE 检测	39
实验 8.6	牛乳球蛋白基因的 PCR 扩增及电泳检测	40
第 9 章	微生物学实验	41
实验 9.1	显微镜的使用及微生物形态的观察	41
实验 9.2	细菌的革兰染色法	44
实验 9.3	牛肉膏蛋白胨培养基的制备	47
实验 9.4	微生物分离、纯化及培养特征观察	52
实验 9.5	空气中微生物的检测	58
实验 9.6	淀粉水解实验	61
实验 9.7	大肠杆菌生长曲线的测定	63
第 10 章	基因工程实验	65
实验 10.1	<i>E. coli</i> 基因组 DNA 的提取及电泳检测	65
实验 10.2	<i>glaA</i> 基因 PCR 扩增、检测和纯化	67
实验 10.3	质粒 pET28a 的提取及检测	69
实验 10.4	质粒 pET28a- <i>glaA</i> 的构建	71
实验 10.5	感受态细胞的制备和转化	73
第 11 章	发酵工程实验	76
实验 11.1	实验室常用发酵罐的基本结构与功能	76
实验 11.2	发酵罐及培养基的灭菌与接种培养技术	78
实验 11.3	利用大肠杆菌 <i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pET28a- <i>glaA</i>) 工程菌表达丝氨酸羟甲基转移酶	81
实验 11.4	固态发酵法生产柠檬酸	85
第 12 章	生物分离工程实验	89
实验 12.1	植物细胞的破碎及超氧化物歧化酶的浸提	89
实验 12.2	考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白质含量	91
实验 12.3	联大茴香胺盐酸盐法测定超氧化物歧化酶活力	93
实验 12.4	双水相系统萃取超氧化物歧化酶	95
实验 12.5	热激和盐析法提取超氧化物歧化酶	97
实验 12.6	纤维素离子交换柱色谱纯化超氧化物歧化酶	99
第 13 章	生化反应工程实验	101
实验 13.1	Lineweaver-Burk 法测定胰蛋白酶米氏常数	101
实验 13.2	动态法测定溶氧的体积传质系数	104
第 14 章	酶工程实验	107
实验 14.1	α -淀粉酶的提取与活力测定	107
实验 14.2	酵母细胞固定化及催化前手性苯乙酮不对称还原合成手性醇	110
附录		112
附录 1	生物工程实验室安全和规则	112
附录 2	常用缓冲液的配制	118
附录 3	常用抗生素和酶的配制	121
附录 4	常用培养基的配制	121
附录 5	实验室常用贮存液的配制	122
附录 6	实验室常用技术参数	126
参考文献		128

第1篇 生物工程常用实验技术及原理

第1章 生物化学实验基本理论

生物化学实验是生物化学课程教学的重要组成部分,是巩固和加深学生对所学知识理解的重要辅佐手段。生物化学实验的教学目的可以概括如下:一,深化学生对课堂所学知识的理解和掌握,拓宽知识面;二,掌握基础性的生化分析和测试的技术手段,为以后从事相关的科学研究和产品开发构筑扎实的基础;三,锤炼学生的动手能力和分析实验结果以及自行设计实验的能力;四,培养学生严谨的工作态度和缜密的思维方式以及独立思考问题的能力。

基于常用的生物化学实验内容,将相关的基本理论概述如下。

1.1 电泳技术

电泳是带电颗粒在电场的作用下,向着与所带电荷电性相反的电极迁移的现象。电泳技术起源于19世纪,20世纪40年代后,电泳技术发展十分迅速,先后派生出纸电泳、醋酸膜电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。尽管电泳的类别形形色色,但其原理是相近的。这就是带电颗粒在电场作用下,朝与所带电荷电性相反的电极迁移。由于不同颗粒所带电荷以及颗粒本身的形状和大小上的差异,加上电泳支持物的分子筛作用,使电泳技术成为分离不同分子极为常用和有效的手段。

一般地讲,带电颗粒在电场中的迁移率受以下因素影响。

(1) 颗粒的性质

颗粒所带净电荷越多,粒子越小且呈球形者,在电场中的迁移率就越高。

(2) 电场强度

电场强度越高,带电颗粒在电场中迁移的速度就越快。在生化实验中,电泳的目的往往是分离不同的生物分子,电场越强,带电分子在电场中的迁移率越高,但分辨率会下降,分离效果变差。所以,在实验中需选择适当的电压,以实现良好的分离效果。

(3) 溶液的性质

影响电泳的溶液的性质主要是溶液的pH值、溶液的离子强度、溶液的黏度等。

溶液的pH值决定带电颗粒所带电荷的电负性及所带电荷的多少。对于蛋白质和氨基酸而言,溶液的pH值距离等电点越远,其所带的净电荷的数量就越大,在电场中的迁移率就越高,反之则越低。为了使电泳过程中溶液的pH值保持稳定,在蛋白质电泳中多采用具有较强缓冲作用的电泳液。溶液的离子强度代表着溶液中所有离子所产生的静电力,取决于离子电荷的总数。若电泳缓冲液的离子强度较高时,待分离的带电颗粒将溶液中与

其所带电荷电负性相反的离子吸引在自己的周围,形成离子扩散层,使颗粒所带的净电荷数量减少,颗粒在相同电场中的迁移率降低。带电颗粒在电场中的迁移率与电泳缓冲液的黏度呈反比,溶液的黏度越大,带电颗粒在电场中迁移的速率越慢。

尽管电泳的种类很多,但对于相关专业的本科生而言,较常用到的电泳是琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。对这两种电泳的特征简述如下。

(1) 琼脂糖凝胶电泳

以琼脂糖凝胶作为支持物,是分离核酸较常采用的电泳方法。其操作起来十分便捷,分离核酸的效果一般比较稳定而可靠。琼脂糖凝胶本身是一种分子筛,从而使得分子量较小的分子在电场的作用下以较快的迁移率向着与所带电荷电负性相反的电极迁移。琼脂糖凝胶中琼脂糖的浓度决定分子筛筛孔的大小,浓度越高,分子筛的筛孔越小,分子在其中迁移的速率越低。基于此,应根据所分离的分子的大小确定琼脂糖的浓度。待分离物质的分子量较小时,应考虑适当提高凝胶的浓度,相反,则应该适当降低琼脂糖凝胶的浓度。做分子杂交时,因为要提高分离的效果,也应该适当提高凝胶的浓度。较常采用的琼脂糖凝胶的含量在 1% (m/V) 左右。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

以聚丙烯酰胺凝胶作为支持物,多用于分离蛋白质,也用于分离分子量极小的核酸片段。蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳主要包括电泳、染色和脱色三个阶段。聚丙烯酰胺凝胶电泳属于不连续电泳,凝胶的制作分两个阶段完成,即分离胶和浓缩胶。从理论上讲,可以根据不同的需要制作任何浓度的分离胶和浓缩胶。多数的聚丙烯酰胺凝胶电泳中所使用的分离胶的含量为 12%,所使用的浓缩胶的含量为 5%。

1.2 PCR 技术

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是 20 世纪 80 年代诞生的一项极具革命性的实验技术,由美国科学家 Kary Mullis 发明,并因此而荣获 1993 年诺贝尔生理和医学奖。该技术成为目前实验室获取目标基因和对目标基因进行改造的最常使用的方法。该技术的问世将基因工程向着实用化的方向推动了一大步,是一项里程碑式的技术。

PCR 技术的发明是基于对原核生物和真核生物 DNA 复制机理的成功破译,即在 DNA 聚合酶的作用下,能够以已有的 DNA 单链为模板,延伸业已存在的核苷酸链。DNA 在生物体内复制时,在 RNA 聚合酶的作用下,形成一小段 RNA 作为延伸的“引子”,而在体外复制时的引物则是通过人工合成的。DNA 聚合酶的另一重要特性是,迄今所发现的 DNA 聚合酶都只具有从 5' 到 3' 的聚合酶活性。体外扩增 DNA 时所使用的 *Taq* DNA 聚合酶是一种分离自嗜热真细菌的热稳定 DNA 聚合酶。利用 PCR 技术体外扩增 DNA 是对生物体 DNA 复制的再现。在生物机体内复制 DNA 时,首先在引发酶的作用下,合成与模板 DNA 互补配对的一小段 RNA,之后在 DNA 聚合酶的作用下利用碱基互补配对的原则,通过磷酸二酯键合成一条新链。在体外扩增基因片段时,利用人工合成的引物与靶标序列结合,在 *Taq* DNA 聚合酶的催化作用下延伸与模板链结合的寡核苷酸片段。

1.3 糖、核酸、蛋白质等生物分子浓度的测定

许多物质是有颜色的，其颜色的深浅与其溶液的浓度呈正相关，这是采用比色法测定物质浓度的基础。对于不能直接用比色法测定的物质，可通过这些物质与某些试剂反应，形成有色产物来测定。对于很多生物分子的测定正是基于这样一种现象而完成的，这样一种测定分子浓度的方法称之为比色法，所使用的仪器设备为分光光度计。

比色法测定物质浓度的定量依据是比尔-朗伯定律，即溶液的吸光度与溶液的浓度和液层厚度的乘积成正比。比色法可广泛地应用于还原糖、总糖、核酸、蛋白质等分子的定量测定。通过比色法测定糖的原理是还原糖在碱性溶液中变为烯二醇，烯二醇溶液被一些弱氧化剂如 3,4-二硝基水杨酸、 Cu^{2+} 等氧化。还原糖和碱性二硝基水杨酸共热，产生一种棕红色的氨基氧化物，在一定的浓度范围内，棕红色物质颜色的深浅与还原糖的量成正比。测定总糖的原理和测定还原糖的原理是相同的，只是测定总糖时需首先将淀粉水解为单糖。通过比色法测定核酸及蛋白质依据的是其不同波长处的光吸收（核酸 260nm，蛋白质 280nm）。

其所带电荷电负性相反的离子吸引在自己的周围,形成离子扩散层,使颗粒所带的净电荷数量减少,颗粒在相互靠近时受到斥力减小,容易聚集而沉淀。颗粒的聚集速度与颗粒的电荷量、颗粒的大小、溶液的黏度呈反比。溶液的黏度越大,颗粒的聚集速度越慢。

第2章 微生物学实验基本理论

2.1 微生物学实验的意义

微生物学实验是微生物学教学的重要环节。实验课质量的好坏,直接关系到学生的学习质量和兴趣。学习和掌握微生物学实验的基本方法和研究技术,必将加深学生对微生物学基本理论的理解,并促进微生物学在工业、农业和医药卫生等方面的应用研究。同时,在微生物实验授课过程中,可以培养学生观察、思考、分析问题、解决问题和提出问题的能力;养成实事求是、严肃认真的科学态度,以及敢于创新的开拓精神;树立勤俭节约、爱护公物的良好作风。

微生物是一类个体微小、肉眼看不见的生物群体,包括有细菌、病毒、真菌以及一些小型的原生动物等,广泛应用于健康、医药、工农业、环保等诸多领域。对于生物工程的学生来说,学会从环境中分离、纯化并鉴定有工业价值的菌株,是非常重要的。

2.2 微生物的显微观察及染色原理

微生物的最显著特点就是个体微小,必须借助显微镜才能观察到它们的个体形态和细胞结构,熟悉显微镜和掌握其操作技术是研究微生物不可缺少的手段。

2.2.1 显微镜的结构和光学原理

显微镜分机械装置和光学系统两部分,结构如图 2-1 所示。

(1) 机械装置

① 镜筒 上端装目镜,下端接转换器。镜筒有单筒和双筒两种。单筒有直立式和后倾斜式。双筒全是倾斜式的。两筒之间可调距离,以适应两眼宽度不同者调节使用。

② 转换器 装在镜筒的下方,其上有 3 个、4 个或 5 个孔。在各孔上,会分别安装不同规格的物镜。

③ 载物台 方形或圆形的平台,中央有一光孔,孔的两侧各装 1 个夹片。载物台上还装有移动器(其上有刻度标尺),可纵向和横向移动,用于夹住和移动标本用。

④ 镜臂 用于支撑镜筒、载物台、聚光器和调节器,有固定式和活动式两种。

⑤ 镜座 马蹄形,支撑整台显微镜,其上有反光镜。

⑥ 调节器 包括大、小螺旋调节器(调焦

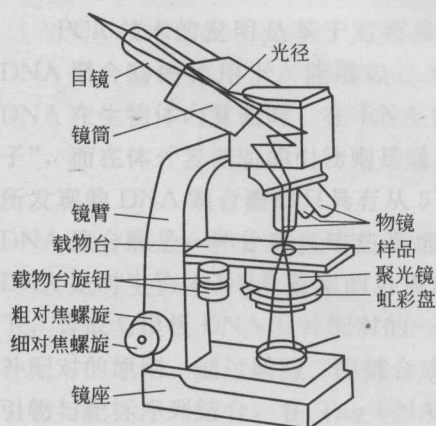


图 2-1 显微镜的结构

距)各一个。可调节物镜和所需观察的物体之间的距离。调节器有装在镜臂上方或下方的两种,装在镜臂上方的是通过升降镜臂来调焦距,装在镜臂下方的是通过升降载物台来调焦距,新式显微镜的调节器大多数装在镜臂的下方。

(2) 光学系统及其光学原理

① 目镜 每台显微镜备有3个不同规格的目镜,如5倍、10倍和15倍,而在高级显微镜上,除了上述三种规格的目镜以外,还有20倍的。

② 物镜 装在转换器的孔上,物镜有低倍(8×、10×、20×三种)、高倍(40×或45×)及油镜(100×)。物镜的性能由数值孔径(numerical aperture, N. A.)决定,如式(2-1)所示。

$$N. A. = n \times \sin \frac{\alpha}{2} \quad (2-1)$$

其意为玻片和物镜之间的折射率乘上光线投射到物镜上的最大夹角的一半的正弦。

根据这一公式,光线投射到物镜的角度越大,显微镜的效能越大,该角度的大小决定于物镜的直径和焦距。 n 是影响数值孔径的因素,空气的折射率 $n=1$,水的折射率 $n=1.33$,香柏油的折射率 $n=1.52$,用油镜使光线入射 $\alpha/2$ 为 60° ,则 $\sin 60^\circ=0.87$ 。另外,以空气为介质时, $N. A.=1 \times 0.87=0.87$;以水为介质时, $N. A.=1.33 \times 0.87=1.16$;以香柏油为介质时, $N. A.=1.52 \times 0.87=1.32$ (如图2-2所示)。

显微镜的性能还依赖于物镜的分辨率,所谓分辨率,就是能分辨两点之间最小距离的能力,如式(2-2)所示,分辨率与数值孔径成正比、与波长成反比。显微镜的分辨率,可通过增大数值孔径、缩短波长来提高,使目标物的细微结构更加清晰可见。由于可见光的波长($0.38 \sim 0.7 \mu\text{m}$)是不可能缩短的,因此,只能靠增大数值孔径来提高分辨率。

$$\text{分辨率}(\delta)=0.61 \times \lambda / N. A. \quad (2-2)$$

式中, λ 为波长。

物镜上标有N. A. 1.25、100×、“OI”、160/0.17、0.16等字样,其中N. A. 1.25为数值孔径,

100×为放大倍数,“OI”表示油镜,“160/0.17”中160表示镜筒长、0.17表示要求盖玻片的厚度,0.16为工作距离。显微镜的总放大倍数为物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积。

③ 聚光器 安装在载物台的下面,反光镜反射来的光线,通过聚光器被聚集成光锥照射到标本上。增强照明度可提高物镜的分辨率。聚光器可上下调节,其中间装有光圈可调节光亮度,在看高倍镜和油镜时需调节聚光器。合理调节聚光器的高度和光圈的大小,可得到适当的光照和清晰的图像。

④ 反光镜 装在镜座上,可反射光线到聚光器上,可自由转动方向,有平、凹两面,光源为自然光时,用平面镜,光源为灯光时,用凹面镜。

⑤ 滤光片 自然光由各种波长的光组成,如只需某一波长的光线,可选用合适的滤

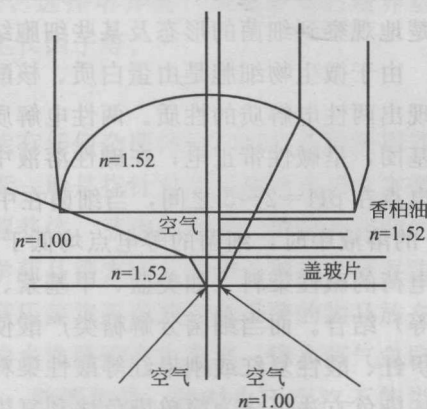


图2-2 油镜的作用

光片,以提高分辨率,增加反差和清晰度。滤光片有紫、青、蓝、绿、黄、橙、红等颜色。根据标本颜色,在聚光器下加相应的滤光片。

(3) 油镜的原理

油镜的使用,需要在载玻片与镜片之间加滴镜油,原因如下。

① 增加照明亮度 油镜的放大倍数为 $100\times$,放大倍数这样大的镜头,焦距很短,直径很小,但所需要的光照强度却最大。从载玻片投过来的光线,因介质密度不同,有些光线会因折射或全反射不能进入镜头,致使在使用油镜时,会因射入的光线较少,物像显现不清。所以为了不使通过的光线有损失,在使用油镜时,须在油镜与载玻片之间加入与玻璃的折射率($n=1.55$)相仿的镜油(即香柏油, $n=1.52$)。

② 增加显微镜的分辨率 由于香柏油的折射率比空气及水的折射率要高,所以以香柏油作为镜头与玻片之间介质的油镜所能达到的数值孔径值要高于低倍镜、高倍镜等物镜。若以可见光的平均波长为 $0.55\mu\text{m}$ 计算,数值孔径通常在 0.65 左右的高倍镜只能分辨出距离不少于 $0.4\mu\text{m}$ 的物体,而油镜的分辨率却可达到 $0.2\mu\text{m}$ 左右。

2.2.2 细菌染色原理

由于微生物(尤其是细菌)细胞小而透明,当把细菌悬浮于水滴内,用光学显微镜观察时,菌体和背景没有显著的明暗差,难以看清它们的形态,更不易识别其结构。所以,用普通光学显微镜观察细菌时,往往要先将细菌进行染色,借助于颜色反衬作用,可以更清楚地观察到细菌的形态及某些细胞结构。

由于微生物细胞是由蛋白质、核酸等两性电解质及其他化合物组成,所以微生物细胞表现出两性电解质的性质。两性电解质兼有碱性基团和酸性基团,在酸性溶液中离解出碱性基团,呈碱性带正电;在碱性溶液中离解出酸性基团,呈酸性带负电。经测定,细菌的等电点在 $\text{pH}=2\sim 5$ 之间,当细菌在中性($\text{pH}=7$)、碱性($\text{pH}>7$)或偏酸性($\text{pH}=6\sim 7$)的溶液中时,细菌的等电点均低于上述溶液的 pH 值,所以细菌带负电荷,容易与带正电荷的碱性染料(如美蓝、甲基紫、结晶紫、龙胆紫、碱性品红、中性红、孔雀绿和番红等)结合。而当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料染色。

染色方法可分为简单染色法和复染色法。简单染色法又叫普通染色法,只用一种染料使细菌染上颜色,如果仅为了在显微镜下看清细菌的形态,用简单染色即可。复染色法即用两种或多种染料染细菌,目的是为了鉴别不同性质的细菌,所以又叫鉴别染色法。主要的复染色法有革兰染色法和抗酸性染色法。革兰染色法是1884年由丹麦病理学家Christain Gram创立的,而后一些学者在此基础上做了某些改进。本实验中介绍被普遍采用的Hucker氏改良的革兰染色法。革兰染色法是细菌学中最重要鉴别染色法。革兰染色法的基本步骤是:先用初染剂结晶紫进行染色,再用碘液媒染,然后用乙醇(或丙酮)脱色,最后用复染剂(如番红)复染。经此方法染色后,细胞保留初染剂蓝紫色的细菌为革兰阳性菌;如果细菌被染上复染剂的颜色(红色),则该菌属于革兰阴性菌。

革兰染色法将细菌分为革兰阳性和革兰阴性,是由这两类细菌细胞壁的结构和组成不同决定的。事实上,当用结晶紫初染后,像简单染色法一样,所有细菌都被染成初染剂的蓝紫色。碘作为媒染剂,它能与结晶紫结合成结晶紫-碘的复合物,从而增强了染料与细菌的结合力。当用脱色剂处理时,两类细菌的脱色效果是不同的。革兰阳性细菌的细胞壁

主要由肽聚糖形成的网状结构组成,壁厚、类脂质含量低,用乙醇(或丙酮)脱色时细胞壁脱水,使肽聚糖层的网状结构孔径缩小、透性降低,从而使结晶紫-碘的复合物不易被洗脱而保留在细胞内,经脱色和复染后,仍保留初染剂的蓝紫色。革兰阴性菌则不同,由于其细胞壁肽聚糖层较薄、类脂含量高,所以当脱色处理时,类脂质被乙醇(或丙酮)溶解,细胞壁透性增大,使结晶紫-碘的复合物比较容易被洗脱出来,用复染剂复染后,细胞被染上复染剂的红色。

2.3 微生物的培养及分离纯化

2.3.1 培养基

在自然界中,微生物种类繁多,营养类型多样。为了人工培养、分离、鉴定和保存各种不同种类的微生物或积累其代谢产物,需要配制适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,即培养基。培养基是人工配制的适合微生物生长繁殖或积累代谢产物的营养基质,用于培养、分离、鉴定和保存各种微生物或积累代谢产物。根据微生物的种类和实验目的不同,培养基按照成分的不同分为天然培养基、合成培养基、半合成培养基;按照培养基物理状态又分为固体培养基、半固体培养基和液体培养基;按照培养基用途分为基础培养基、营养培养基(又称加富培养基)、鉴别培养基、选择培养基。不同种类的培养基中,一般均含有水分、碳源、氮源、能源、无机盐、生长因子等。

2.3.2 消毒和灭菌

在微生物实验中,需要对微生物进行纯培养,不能有任何杂菌污染,因此要对所用器材、培养基和工作场所,进行严格的消毒和灭菌。消毒一般是指针对消灭病原菌和有害微生物的营养体而言,而灭菌则是指杀灭一切微生物的营养体、芽孢和孢子。消毒和灭菌的方法有很多,一般可分为加热、过滤、照射和使用化学药品等方法。其中,加热灭菌方法是最主要的,分为两种:干热灭菌和高压蒸汽灭菌。高压蒸汽灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内,通过加热使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽,然后关闭排气阀,继续加热,此时由于蒸汽不能溢出,而增加了灭菌器内的压力,从而使沸点增高,得到高于 100°C 的温度,导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。通常,湿热灭菌一般是在 0.1MPa 、 121.5°C 灭菌 $15\sim 30\text{min}$ 。微生物实验所需的一切器皿、器具、培养基(不耐高温者除外)等都可用此法灭菌;而干热灭菌则是 160°C 灭菌 2h ,才能达到湿热灭菌 121°C 的同样效果,培养皿、移液管及其他玻璃器皿可用干热灭菌。在同一温度下,湿热的杀菌效力比干热大,其原因如下:一是湿热灭菌过程中细菌菌体吸收水分,蛋白质较易凝固,因蛋白质含水量增加,所需凝固温度降低;二是湿热的穿透力比干热大;三是湿热的蒸汽有潜热存在, 1g 水在 100°C 时,由气态变为液态时可放出 2.26kJ 的热量。这种潜热,能迅速提高被灭菌物体的温度,从而增加灭菌效力。

另外,在使用高压蒸汽灭菌锅灭菌时,灭菌锅内冷空气的排除是否完全极为重要,因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压,所以当水蒸气中含有空气时,在同一压力下,含空气蒸汽的温度低于饱和蒸汽的温度。

2.3.3 平板分离法

土壤是微生物生活的大本营,在这里生活的微生物无论是数量还是种类都是极其丰富的。因此,土壤是微生物多样性的重要场所,也是发掘微生物资源的重要基地,可以从土壤中分离、纯化得到许多有价值的菌株。从混杂的微生物群体中获得只含有某一种或某一株微生物的过程称为微生物的分离与纯化。常用的是单细胞挑取法和平板分离法。虽然使用显微镜操作器单细胞挑取法可以直接得到微生物的纯培养,但平板分离法操作简单,普遍用于微生物的分离与纯化。为了获得某种微生物的纯培养,平板分离法一般可以根据该微生物对营养、酸碱度、浓度和氧等条件要求不同,而供给适合于待分离微生物的培养条件,或加入某些抑制剂抑制其他菌生长,而利于此菌生长,从而淘汰其他一些不需要的微生物。另外,微生物在固体培养基上生长形成的单个菌落,可以认为是由一个细胞繁殖而成的集合体,因此可通过挑起单菌落,再用稀释涂布平板法或稀释后平板划线分离纯化该微生物,而获得微生物的纯培养。

2.3.4 微生物的培养特征

微生物的培养特征是指微生物在固体培养基上、半固体和液体培养基中,生长后所表现出的群体形态特征。不同的微生物有其固有的培养特征,这些特征一般用固体、半固体和液体培养基来进行检测。固体培养基又分平板与斜面两种形式。平板培养基含有细菌等微生物生长所需要的营养成分,当取自不同来源的样品接种于培养基上,在适宜温度下培养,1~2d内,每一菌体能通过很多次细胞分裂而进行繁殖,形成一个可见的细胞群体的集落,称为菌落。每一种微生物所形成的菌落都有它自己的特点,例如菌落的大小、表面干燥或湿润、隆起或扁平、粗糙或光滑、边缘整齐或不整齐、菌落透明或半透明或不透明、颜色、质地疏松或紧密以及基质是否产生水溶性色素等。因此,可通过平板培养的菌落表面结构、形态及边缘等状况,来检查环境中细菌等微生物的数量和类型。另外,当微生物培养在斜面培养基上时,可以呈丝线状、刺毛状、念珠状、疏展状、树枝状或假根状;生长在液体培养基上,可以呈混浊、絮状、黏液状、形成菌膜、上层清晰而底部显沉淀状;穿刺培养在半固体培养基中,可以沿接种线向四周蔓延或仅沿线生长,也可上层生长很好,甚至连成一片,底部很少生长或底中部长得好、上层甚至不生长。培养特征可以作为微生物分类鉴定的指征之一,并且可以作为识别纯培养是否被污染的参考。

2.4 微生物的生理生化鉴定

微生物代谢类型的多样性,具体表现在生化反应的多样性,因此人们在微生物的分类鉴定工作中,常利用其生化反应作为重要依据。各种微生物在代谢类型上表现出很大的差异,而且分解代谢的最终产物不同,反映出它们具有不同的酶系。微生物产生的酶,可能是在胞内,也可能是在胞外。譬如,微生物对淀粉这种大分子物质不能直接利用,必须靠产生的胞外酶将大分子物质分解,才能被微生物吸收利用。胞外酶主要为水解酶,通过加水裂解大的物质为较小的化合物,使其能被运输至细胞内。由于淀粉遇碘液会产生蓝色,因此能产生淀粉酶的微生物,如在淀粉培养基上培养时,用碘处理会产生无色区域,据此可以分辨微生物能否产生淀粉酶。

2.5 微生物的生长繁殖

一定量的微生物，接种在适合的新鲜液体培养基中，在适宜的温度下培养，以培养时间为横坐标，以细胞数目的对数或生长速率为纵坐标，作图所绘制的曲线称为该细菌的生长曲线，一般可分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期四个时期。不同的微生物有不同的生长曲线，同一种微生物在不同的培养条件下，其生长曲线也不一样，因此，测定微生物的生长曲线，对于了解和掌握微生物的生长规律是很有帮助的。大多数细菌的繁殖速率很快，在合适的条件下，大肠杆菌细胞每 20min 分裂一次。

当光线通过微生物菌悬液时，由于菌体的散射及吸收作用使得光线的透过量降低。在一定的范围内，微生物细胞浓度与透光度成反比、与光密度成正比，而光密度或透光度可以由光电比色计精确测出。所以，可用分光光度计进行光电比浊测定不同培养时间细菌悬浮液的 OD 值，而绘制生长曲线。

(2) 目的基因与载体的连接

用一定的限制性核酸内切酶切割质粒，使其产生相同的黏性末端。通过碱基互补配对，将目的基因片段插入质粒的切口处。加入 DNA 连接酶，连接生成重组 DNA 分子，即重组质粒。

将重组质粒导入受体细胞，使目的基因在受体细胞中表达。将重组质粒导入受体细胞的方法有多种，如电穿孔法、显微注射法等。电穿孔法是将受体细胞置于高压电场中，使细胞膜暂时形成孔隙，重组质粒通过孔隙进入细胞。显微注射法是用显微注射器将重组质粒直接注入受体细胞。将重组质粒导入受体细胞后，需要对细胞进行筛选，以鉴定哪些细胞成功导入了重组质粒。常用的筛选方法有抗生素抗性筛选、荧光筛选等。如果受体细胞含有某种抗生素抗性基因，而重组质粒含有另一种抗生素抗性基因，那么只有成功导入了重组质粒的细胞才能在含有第二种抗生素的培养基上生长。此外，还可以通过检测细胞是否发出荧光来筛选成功导入重组质粒的细胞。筛选出的阳性细胞可以进行扩大培养，并进一步验证目的基因的表达情况。

第3章 重组DNA技术

基因工程和蛋白质工程的核心技术是重组DNA技术，重组DNA技术也称为分子克隆，是20世纪70年代在现代分子生物学的基础上发展起来的一个生物技术手段。重组DNA技术即利用供体生物的遗传物质或人工合成的基因，经过体外或离体的限制酶切割后与适当的载体连接起来形成重组DNA分子，然后再将重组DNA分子导入到受体细胞或受体生物构建转基因生物，该种生物就可以按人类事先设计好的蓝图表达某种产物或表现出某种性状，供体、受体、载体是重组DNA技术的三大基本元件。

1972年，美国斯坦福大学的学者首先在体外进行了DNA改造的研究，他们把SV40（一种猴病毒）的DNA分别切割，又将两者连接在一起，成功构建了第一个体外重组的人工DNA分子。1973年，Cohen等人首次在体外将重组的DNA分子导入大肠杆菌中，成功地进行了无性繁殖，从而首次完成了DNA体外重组和扩增的全过程。

重组DNA技术的第一次商业化应用是在1982年，美国食品及药物管理局（FDA）批准工程菌产生的人胰岛素商业化运营，这是一个生物技术工业发展史上的里程碑。目前，重组DNA技术已被用于生产药品、疫苗、工业化学品、遗传改良农产品等，创造了巨大的社会效益和经济效益。

重组DNA技术一般分为以下几个步骤。

3.1 目的基因的获取

通过人工方法分离、改造、扩增并表达生物的特定基因，从而深入开展核酸遗传研究或者获取有价值的基因产物是重组DNA技术的主要目的。通常我们把插入到载体内的那个特定的片段基因称为“外源基因”，而将那些已被或者准备要被分离、改造、扩增或表达的特定基因或DNA片段称为“目的基因”。

来源于真核细胞的产生基因工程药物的基因是不能直接进行分离的。真核细胞中单拷贝基因只是染色体DNA中很小的一部分，为其 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ ，即使多拷贝基因也只有其 10^{-5} ，因此，从染色体中直接分离纯化目的基因极为困难。另外，真核基因内一般都有内含子，如果以原核细胞作为表达系统，即便分离出真核基因，由于原核细胞缺乏mRNA的转录后加工系统，真核基因转录的mRNA也不能加工、拼接成为成熟的mRNA，因此不能直接克隆真核基因，必须采用特殊方法分离目的基因。

目的基因的获取大致可以分为三类：一是利用PCR技术体外扩增目的基因，然后将之克隆、表达；二是构建感兴趣的生物个体的基因组文库或者cDNA文库，即将某生物体的全基因组分段克隆，然后建立合适的筛选模型从文库中挑出含有目的基因的重组克隆；三是采用化学合成法在体外直接合成目的基因，该方法主要适用于核苷酸序列已知且