

职业教育规划教材

# 基因工程操作基础

JIYIN GONGCHENG CAOZUO JICHU

主 编 覃鸿妮 谢钰珍 吴 凡



苏州大学出版社  
Soochow University Press

职业教育规划教材

# 基因工程操作基础

主 编 覃鸿妮 谢钰珍 吴 凡  
副主编 梅 啸 钱莉春 薛高旭

苏州大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

基因工程操作基础 / 覃鸿妮, 谢钰珍, 吴凡主编.  
—苏州: 苏州大学出版社, 2018. 12  
职业教育规划教材  
ISBN 978-7-5672-2551-0

I. ①基… II. ①覃…②谢…③吴… III. ①基因工程—高等职业教育—教材 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 213524 号

## 基因工程操作基础

覃鸿妮 谢钰珍 吴凡 主编  
责任编辑 徐来

---

苏州大学出版社出版发行  
(地址: 苏州市十梓街1号 邮编: 215006)  
虎彩印艺股份有限公司  
(地址: 东莞市虎门镇陈黄村工业区石鼓岗 邮编: 523925)

---

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 15.25 字数 353 千  
2018 年 12 月第 1 版 2018 年 12 月第 1 次印刷  
ISBN 978-7-5672-2551-0 定价: 39.00 元

---

苏州大学版图书若有印装错误, 本社负责调换  
苏州大学出版社营销部 电话: 0512-67481020  
苏州大学出版社网址 <http://www.sudapress.com>  
苏州大学出版社邮箱 [sdcb@suda.edu.cn](mailto:sdcb@suda.edu.cn)

# · 前言 ·

随着基因组研究向各学科的不断蔓延,分子生物学技术已渗透到生命科学的各个领域。分子生物学一线技术员以及高一级的研发人员已成为各大相关行业、生产企业和经营单位的紧缺人才。高等学校培养的人才是否真正符合企业的需要,课程体系的设置和课程内容的选择显得尤为重要。为了实现高层次、复合型、创新型技术技能人才的培养目标,我们以校企合作为契机,综合基因服务、生物技术、生物制药等相关企业的分子生物学业务,以企业真实项目为蓝本,校企联合编写了这本分子生物学实训指导教材,供生物工程、生物技术、生物制药、生物信息等专业的高职学生和企业一线的工作人员选用。

本书采用项目式编写方法,以项目描述、项目分析、项目实施、结果呈现来组织教学内容,项目的相关理论知识附在每个项目最后。每个项目从项目描述引入并下达任务,通过项目分析弄清项目的基本原理、待解决的问题以及需要的各种设备、试剂和耗材,可以有效地培养学生分析问题的能力,养成良好的科研素养。每个项目绝非简单实验步骤的罗列,而是设计了多个环环相扣的任务,让学生在完成这些任务的过程中,对相关理论知识能有一个整体的认识,有助于培养学生的细心、耐心和责任心。

全书分为6个项目,具体内容包括:培养基的制备、接种和培养;动物、植物、微生物DNA和RNA的提取和检测;聚合酶链式反应(PCR)克隆和从头合成目的基因;目的基因的转化和原核表达;基因的定点突变;cDNA文库和高通量测序(NGS)文库的构建。前面的四个项目环环相扣,项目1培养的大肠杆菌可作为项目2中质粒提取的来源,项目4中基因转化的载体和目的基因可分别来源于项目2提取的质粒、动植物DNA或项目3中利用PCR合成的基因。分子生物学技术相关企业岗位中的基因合成、基因测序等项目往往也是环环相扣的,需要不同岗位和部门紧密合作,仅仅懂得一个实验的原理和步骤是不能胜任不同工作任务的调配的。

本书的特点是深入浅出、实用性强,注重不同实验间的内在联系。除了NGS文库的构建外,其他项目都无须购买昂贵的仪器和试剂,学生可以在一般的分子生物学实验室根据项目信息,在老师的指导下进行试剂配制和实验。所有的基因序列、载体信息都提供得很详

细,学生可采用本书中的原始序列,也可以根据需要自行选用不同的基因、载体和引物。NGS文库的构建是高通量测序前必要的样品制备技术,由于试剂盒价格偏贵,不适合大批量学生实验,可供部分学生选做或作为基因测序相关知识的理论教学参考。

本书由覃鸿妮、谢钰珍、吴凡主编,梅啸、钱莉春、薛高旭任副主编,其中覃鸿妮、钱莉春、薛高旭联合编写项目1和项目4,覃鸿妮和吴凡联合编写项目3和项目5,覃鸿妮和谢钰珍联合编写项目2,吴凡和梅啸联合编写项目6。本教材编写过程中,苏州金唯智生物科技有限公司在技术上给予了大力支持,并提供了项目来源,在此表示感谢。

由于编者水平有限,书中难免存在不足之处,恳请读者批评指正。

编者

2018年5月

# · 目 录 ·

## 项目 1 大肠杆菌的培养与分离 / 1

---

- 任务 1 培养基的制备 / 3
- 任务 2 大肠杆菌的接种 / 3
- 任务 3 大肠杆菌的培养 / 4

## 项目 2 核酸的分离与纯化 / 21

---

### 子项目 1 大肠杆菌质粒 DNA 的提取及定性、定量检测 / 21

- 任务 1 试剂的配制 / 24
- 任务 2 质粒的抽提 / 24
- 任务 3 质粒的定性检测 / 26
- 任务 4 质粒的定量和纯度检测 / 26

### 子项目 2 植物基因组 DNA 和总 RNA 的提取 / 27

- 任务 1 试剂的配制 / 30
- 任务 2 植物基因组 DNA 的提取 / 31
- 任务 3 植物总 RNA 的提取 / 32
- 任务 4 DNA(RNA)的定性、定量检测 / 33

### 子项目 3 动物基因组 DNA 和总 RNA 的提取 / 35

#### 子项目 3-1 动物基因组 DNA 的提取 / 35

- 任务 1 标本的采集与保存 / 37
- 任务 2 试剂的配制 / 37
- 任务 3 DNA 的提取 / 38
- 任务 4 DNA 的纯度和浓度检测 / 39

- 子项目 3-2 动物总 RNA 的提取 / 40
    - 任务 1 标本的采集与保存 / 41
    - 任务 2 试剂的配制 / 42
    - 任务 3 总 RNA 的提取 / 42
    - 任务 4 RNA 的纯度和浓度检测 / 43
  - 子项目 4 酿酒酵母 DNA 及总 RNA 的提取 / 44
    - 任务 1 试剂的配制 / 46
    - 任务 2 酵母菌染色体 DNA 的提取(珠磨法) / 47
    - 任务 3 酵母菌总 RNA 的提取(热酚法) / 47
    - 任务 4 DNA(RNA)的浓度和纯度检测 / 48
- 
- 项目 3 利用聚合酶链式反应(PCR)获取基因 / 123**
- 
- 子项目 1 目的基因的体外扩增 / 123
    - 任务 1 引物的设计和合成 / 126
    - 任务 2 PCR 扩增目的基因 / 127
    - 任务 3 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 / 127
    - 任务 4 目的 PCR 产物的回收 / 127
  - 子项目 2 引物拼接 PCR 技术合成目的基因 / 129
    - 任务 1 目的基因的合成 / 132
    - 任务 2 PCR 产物的检测和回收 / 133
- 
- 项目 4 目的基因的克隆、转化与表达 / 142**
- 
- 任务 1 目的基因 Mlu I 与克隆载体 pUC19 的连接 / 145
  - 任务 2 TOP10 感受态的制备 / 145
  - 任务 3 连接产物 pUC19-Mlu I 的转化和筛选(化学转化法) / 146
  - 任务 4 重组质粒 pUC19-Mlu I 和表达载体 pET30a 的酶切 / 147
  - 任务 5 酶切后载体 pET30a 和目的基因 Mlu I 的连接 / 147
  - 任务 6 连接产物 pET30a-Mlu I 的转化 / 148
  - 任务 7 转化菌株的培养和筛选 / 148
  - 任务 8 目的基因的蛋白表达 / 149

---

**项目 5 DNA 序列的定点突变** / 172

---

- 任务 1 突变基因的合成 / 173
- 任务 2 重组质粒的构建 / 174
- 任务 3 重组质粒的转化和检测 / 175

---

**项目 6 cDNA 文库的构建** / 184

---

- 子项目 1 cDNA 文库的构建 / 185
    - 任务 1 mRNA 的制备 / 187
    - 任务 2 cDNA 第一链的合成 / 188
    - 任务 3 cDNA 第二链的合成 / 188
    - 任务 4 cDNA 加接头 / 189
    - 任务 5 cDNA 与载体连接 / 190
    - 任务 6 重组 cDNA 导入宿主菌 / 195
    - 任务 7 cDNA 文库的扩增与鉴定 / 197
  - 子项目 2 NGS 文库的构建 / 198
- 附录 主要实验仪器的使用** / 221

# 项目 1

## 大肠杆菌的培养与分离

大肠杆菌(学名:*Escherichia coli*,简写:*E. coli*)是人和动物肠道中最著名的一种细菌,主要寄生于大肠内,约占肠道菌中的1%,经常作为细菌的模式生物广泛用于科学研究。大肠杆菌是一种两端钝圆、能运动、无芽孢的革兰阴性短杆菌(图 1-1)。除某些特殊血清型的大肠杆菌对人和动物有病原性,常引起严重腹泻和败血症外,大部分菌型不致病,能合成维生素 B 和维生素 K,对人体有益。

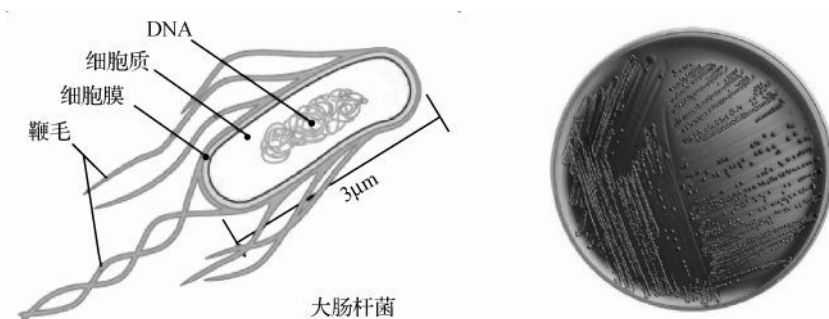


图 1-1 大肠杆菌细胞结构及体外培养的大肠杆菌菌群

大肠杆菌遗传背景清楚,培养条件简单,常作为外源基因表达的宿主。目前,大肠杆菌是应用最广泛、最成功的原核表达体系,常作为基因高效表达的首选体系。经过人工处理后带上了人工给予的新的遗传性状的细菌称为基因工程菌。从生物安全方面考虑,基因工程菌是在不断筛选后被挑选出的菌株,这些菌株由于失去了细胞壁的重要组分,所以在自然条件下已无法生长,甚至普通的清洁剂都可以轻易地杀灭这类菌株。这样,即便由于操作不慎导致活菌从实验室流出,也不易导致生化危机。此外,生物工程用的菌株基因组都被优化过,使之带有不同基因型(如 $\beta$ -半乳糖苷酶缺陷型),可以更好地用于分子克隆实验。

### 【项目描述】

培养材料为一个给定的大肠杆菌工程菌菌液,该工程菌人工添加了抗氨苄青霉素(AMP)的基因,可以在添加了 AMP 的培养基上生长。本项目的菌液由苏州金唯智生物科技有限公司提供。具体要求如下:

## 1 大肠杆菌的培养

利用液体培养基使大肠杆菌大量繁殖。

## 2 大肠杆菌的分离与保存

(1) 利用固体斜面、固体平板培养基进行划线培养,得到单个细菌繁殖的单菌落。

(2) 利用固体穿刺培养基保存菌种。

## 【项目分析】

### 1 基本原理

培养基是通过人工加入大肠杆菌生长所必需的各种成分,包括水、碳源、氮源、无机盐和生长因子等各种营养物质配制而成的养料。给定的大肠杆菌经过基因工程处理过,其对氨苄青霉素(AMP)具有抗性,而其他杂菌对AMP没有抗性,因此在培养基中添加适量的AMP,在无菌条件下使用合适的接种方法接种后培养,有利于获得生长良好的纯种大肠杆菌。

### 2 需要解决的问题

(1) 配制适宜大肠杆菌生长的培养基,包括液体培养基、固体平板培养基、固体斜面培养基、固体穿刺培养基。

(2) 对培养基进行灭菌,并加入抗性AMP,在无菌条件下将大肠杆菌接种到培养基上。

(3) 选择适宜的外界环境,使其生长繁殖。

### 3 主要仪器设备、耗材、试剂

(1) 仪器设备:电子天平、恒温水浴锅、微量移液器、高压灭菌锅、超净工作台、恒温培养箱、通风柜、纯水机等。

(2) 耗材:试管、培养皿、三角瓶、量筒、烧杯、玻璃棒、封口膜、绳子、接种工具、酒精灯、移液器吸头等。

(3) 试剂:蛋白胨、牛肉膏、NaCl、NaOH、琼脂粉、AMP、ddH<sub>2</sub>O等。

## 【项目实施】

本项目分3个任务,分别是培养基的制备、大肠杆菌的接种和大肠杆菌的培养,前一个任务完成的好坏会直接影响后续任务的实施,同时本项目培养的大肠杆菌又可作为项目2中质粒DNA提取的材料来源。

## 任务 1 培养基的制备

### 1 试剂用量的计算、称量及溶解

配制蛋白胨、NaCl、牛肉膏浓度分别为 10g/L、5g/L、3g/L 的培养基 500mL。按配方准确称取蛋白胨、NaCl 于大烧杯中。牛肉膏用玻璃棒挑取,放在小烧杯中称量,加适量水放在 65℃ 水浴锅中溶化后倒入装有蛋白胨和 NaCl 的大烧杯中,加水溶解并定容到 500mL。

**注意:** 蛋白胨极易吸潮,故称量时要迅速。为了避免药品间混杂,一把药匙用于一种药品(可在药匙上贴上标签),勿将瓶盖盖错。将小烧杯中溶解的牛肉膏倒入大烧杯时,须用蒸馏水多次冲洗小烧杯,以保证牛肉膏完全倒入大烧杯中。

### 2 调节 pH

在未调 pH 之前,先用精密 pH 试纸测量培养基的初始 pH,如果偏酸,则用滴管或微量移液器向培养基中加少量 1mol/L 的 NaOH 溶液,如果偏碱,则加入少量 1mol/L 的 HCl 溶液,边加边搅拌,并随时用 pH 试纸测其 pH,直至 pH 为 7.0~7.6。

### 3 分装及灭菌

(1) 分装。将配制好的 500mL 培养基分装入 2 个 500mL 的三角瓶中。其中一个三角瓶中分装液体培养基,直接将 250mL 培养基倒入三角瓶中;另外一个三角瓶中分装固体培养基,将剩下的 250mL 培养基转入另一三角瓶中,并向其中加入 4g 琼脂,混匀后密封。

(2) 灭菌。将上述培养基于高压灭菌锅中 121℃ 条件下灭菌 30min。

(3) 分装及加入 AMP 纯化。灭菌后,液体培养基不用分装,冷却后加入 250μL AMP 即可;固体培养基冷却到 50℃ 左右,加入 250μL AMP 后在未凝固前分别分装到试管和平板内,冷却凝固,制成斜面、平板和穿刺培养基各 2 个,平板培养基凝固后将平板倒置于桌面上。

**注意:** 分装前,试管、平板及各种封口膜均须灭菌,分装在超净工作台中进行,不开酒精灯火焰以保证无菌环境。斜面培养基分装高度不宜超过试管的 1/5,平板培养基分装厚度不宜超过培养皿的 1/3,穿刺培养基分装高度以试管高度的 1/3 为宜。

## 任务 2 大肠杆菌的接种

### 1 消毒

接种前,先将超净工作台用酒精擦干净后紫外线灭菌 30min,然后用 75% 的酒精擦手,待酒精挥发后点燃酒精灯。

### 2 接种

(1) 斜面试种。左手拿着斜面管,使斜面向上,并尽量放平,用右手将封口膜取下,同时

将管口在火焰上燃烧一圈,右手拿住接种针,将针头在火焰上烧红,待其冷却后马上蘸取菌液,立即转入斜面管底部,沿斜面画“Z”字形曲线,完成后用无菌封口膜封口。

(2) 穿刺接种。无菌操作同斜面接种,用接种针蘸取菌液后,垂直插入固体培养基 2/3 处,再垂直拔出,封口。

(3) 平板接种。左手托住培养皿底部,食指扶住上盖,微开培养皿,右手拿起接种环在酒精灯上消毒,待其冷却后马上蘸取菌液,在培养皿的四个区域分别以不同方向画“Z”字形曲线,将培养皿合上,倒置培养。

(4) 液体接种。用移液枪吸取适量菌液,左手将三角瓶微倾,用微量移液器吸头靠近液体,注入菌液,封口,摇匀。

### 任务3 大肠杆菌的培养

- (1) 将接种好的培养基放在 37℃ 的环境下进行过夜培养。
- (2) 第 2 天,观察培养基中大肠杆菌的生长状况,并记录结果。

#### 【结果呈现】

培养后,可以分离出由一个细胞繁殖而来的肉眼可见的单菌落(图 1-2)。



图 1-2 斜面、平板、穿刺培养基中生长的大肠杆菌

#### 【思考题】

- (1) 平板在接种前和接种后为什么要倒置?
- (2) 为什么接种第一步要灼烧接种针? 每次画完线到下一个点画线前都要灼烧接种针吗? 在画线操作结束时,仍需要灼烧接种针吗? 为什么?

#### 【时间安排】

- (1) 第 1 天:准备相关试剂、耗材,并检查所需设备是否都能正常运转,进行培养基制备及大肠杆菌接种并放于培养箱过夜培养。
- (2) 第 2 天:观察培养基中大肠杆菌的生长状况并记录结果。



## 相关知识

### 1 大肠杆菌

#### 1.1 概述

大肠杆菌在自然界分布很广,是人和动物肠道中的正常菌群。大肠杆菌是我们了解最清楚的原核生物,属于单细胞原核生物,具有原核生物的主要特征:细胞核为拟核,无核膜,细胞质中缺乏像高等动植物细胞中所含有的线粒体、叶绿体等具有膜结构的细胞器,核糖体为70S,以二分分裂繁殖。大肠杆菌正常情况下一般不致病,属于条件致病菌。大肠杆菌染色呈革兰阴性,为两端钝圆的短杆菌,大小为 $(0.5 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 3.0) \mu\text{m}$ 。大肠杆菌有周身鞭毛,可运动,具有致育因子的菌株还有性菌毛(图1-3)。

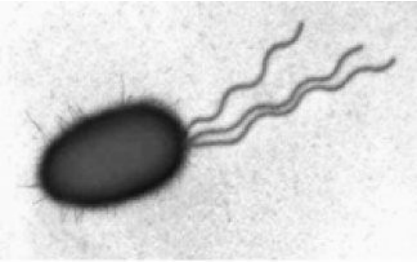
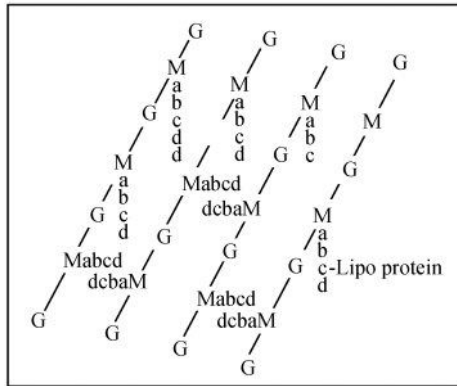


图1-3 大肠杆菌示意图

#### 1.2 大肠杆菌的形态结构

(1) 细胞壁。细胞壁位于大肠杆菌的最外层,厚约11nm,分为两层,即外膜和肽聚糖层。外膜是大肠杆菌细胞壁的主要成分,占细胞壁干重的80%,厚约8nm,位于肽聚糖层的外侧,主要由磷脂、蛋白质和脂多糖组成。脂多糖是革兰阴性细菌的内毒素,也是革兰阴性细菌细胞壁的特有成分,主要与其抗原性、致病性及对噬菌体的敏感性有关。肽聚糖层由1~2层网状的肽聚糖组成,占细胞壁干重的10%,厚2~3nm,是细菌等原核生物所特有的成分。大肠杆菌的肽聚糖由聚糖链、短肽和肽桥三部分组成。聚糖链由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸分子通过 $\beta-1,4$ 糖苷键连接而成。短肽由L-丙氨酸、D-谷氨酸、内消旋二氨基庚二酸、D-丙氨酸组成,并由L-丙氨酸与胞壁酸相连。一条聚糖链短肽的D-丙氨酸与另一条聚糖链短肽的内消旋二氨基庚二酸直接形成肽键(肽桥),从而使肽聚糖形成网状的整體结构(图1-4)。由脂蛋白将外膜和肽聚糖层连接起来,从而使大肠杆菌的细胞壁形成一个整体结构。



M: N-乙酰胞壁酸; G: N-乙酰葡萄糖胺;  
a: L-丙氨酸; b: D-谷氨酸; c: 二氨基庚二酸;  
d: D-丙氨酸

图1-4 大肠杆菌肽聚糖的交联结构

(2) 细胞膜。大肠杆菌细胞膜的结构与其他生物细胞膜的结构相似,但其细胞膜中蛋白质的含量高且种类多。其细胞膜具选择透性,从而可控制营养物质进出细胞。大肠杆菌细胞的生物活性非常强,含有丰富的酶系,如各种脱氢酶系、氧化磷酸化酶系、电子传递系统、透性酶等。因此,细胞膜是原核生物能量转化的场所,并能通过它对外界环境的各种刺激做出反应,并可传递信息,参与细胞壁的合成等。

(3) 细胞质。细胞质是细菌的内环境,是蛋白质、各种酶类和核酸生物合成的场所,也是吸收营养物质后进行物质合成和分解代谢的场所。大肠杆菌的细胞质中含有糖原颗粒、核糖体和质粒等结构。

(4) 核糖体。核糖体是细胞质中一种核糖核蛋白颗粒,是蛋白质合成的场所。大肠杆菌的核糖体呈椭圆球形,体积为  $13.5\text{nm} \times 20\text{nm} \times 40\text{nm}$ ,由 65% 的核糖核酸和 35% 的蛋白质组成。大肠杆菌的核糖体分散在细胞质中,完整核糖体的沉降系数为 70S,由 30S 和 50S 两个大小不同的亚基组成。

(5) 质粒。在大肠杆菌中,除遗传物质的主要载体染色体之外,还有一种闭合环状的双链 DNA 遗传因子,即质粒。质粒具有自我复制的特性,不同质粒的基因及质粒和染色体基因均可发生基因重组。质粒可通过细菌的接合而转移,也可随细胞的分裂而传递或丢失。由于质粒具有这些特性,所以在分子生物学和遗传工程中质粒经常作为外源基因的载体。大肠杆菌中已发现的质粒有 F 因子、R 因子和 Col 因子等。

① F 因子。F 因子又称致育因子,是最早发现的质粒,可以表达性菌毛。其相对分子质量为  $6.3 \times 10^7$ ,长 94.5kb,约为大肠杆菌染色体的 2%。F 因子的基因含有 3 个主要基因群,分别负责插入、复制和转移功能(图 1-5)。其中,含有 F 因子的可以类比为“雄性菌”,没有 F 因子的可以类比为“雌性菌”。“雄性菌”可以通过其上的性菌毛与“雌性菌”发生短暂的接合作用。在这一短暂的接合过程中,“雄性菌”会把这个 F 因子的质粒复制并转移给“雌性菌”,从而使之也变成“雄性菌”。这一现象的发现也为我们进行不同菌种之间的遗传物质交流等分子生物学及微生物遗传学的研究提供了一个非常好的方法。

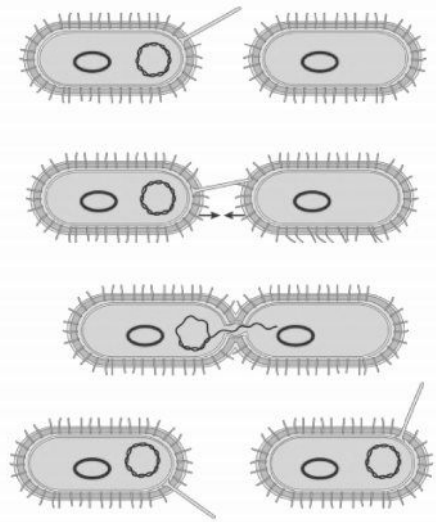


图 1-5 大肠杆菌的 F 因子

② R 因子。R 因子是抗药因子或抗多药剂因子的简称。它是一种细胞质性的质粒,这种质粒具有使寄主菌对链霉素、氯霉素、四环素等抗生素或磺胺剂产生抗药性的基因群。和 F 因子一样,R 因子通过接合进行转移,获得该因子的细菌同时获得对多种药剂的抗性。R 因子最早于 20 世纪 50 年代从痢疾志贺菌中发现,后来发现大肠杆菌中也含有这种质粒。R 因子中的 R 是 resistance 一词的首字母。R 因子常由相连的两个 DNA 区段组成。这类质粒中,可通过接合转移者除有决定耐药性的 R 区段 DNA 外,还有传递区段(RTF, resistance transfer factor)。RTF 决定性菌毛的形成,通过接合而传递。如果只有 R 区段而无 RTF 区段,则不能通过接合传递。非接合性质粒必须经传递性质粒带动、噬菌体转导或以转化方式转入受体菌。

③ Col 因子(Col 质粒)。Col 因子即产大肠杆菌素因子。它编码有控制大肠杆菌素合成的基因。大肠杆菌素的化学成分为脂多糖和蛋白质的复合物,它能通过抑制复制、转录、转

译或能量代谢而专一性地杀死不含 Col 因子的其他肠道细菌。Col 质粒的种类很多,主要可分为两类:第一类以 ColE1 为代表,特点是相对分子质量小,无接合作用,属松弛型控制,多拷贝;第二类以 ColIb 为代表,特点是相对分子质量大,与 F 因子相似,具有通过接合而转移的功能,属严紧型控制,只有 1~2 个拷贝。凡带 Col 质粒的菌株,因质粒本身可编码免疫蛋白,故对大肠杆菌素有免疫作用,不受其伤害。

(6) 拟核。大肠杆菌的细胞核无核膜和核仁,没有固定的形态,结构简单,称为拟核,又称细菌染色体。拟核具有高度紧密的结构,由 RNA、蛋白质和超螺旋环状 DNA 组成。大肠杆菌的全部基因都包含在这条 DNA 上。环状 DNA 的总长度可达 1300 $\mu\text{m}$ ,相对分子质量为  $2.8 \times 10^9$ ,含有 3000~4000 个基因,目前已经确定了 1400 多个基因的结构、功能及其在基因图上的位置。通过研究大肠杆菌基因的结构、功能及表达调控可揭示其他生物的遗传现象和规律。

### 1.3 大肠杆菌的特殊结构

(1) 荚膜。荚膜是某些细菌向细胞壁外分泌的并位于细胞壁外侧的一层厚度不定的胶状物质。大肠杆菌的荚膜主要由多糖组成,具有抗原性,构成了大肠杆菌的表面抗原,即 K 抗原。

(2) 鞭毛。鞭毛是某些细菌长在细胞表面的长丝状、波曲状的附属物,其数目为一至数根,长为菌体的若干倍,最长可达 70 $\mu\text{m}$ ,直径一般为 10~20nm。鞭毛由鞭毛蛋白组成,构成了细菌的鞭毛抗原。大肠杆菌有周身鞭毛,和其运动有关。若将大肠杆菌穿刺接种于半固体培养基上,它将沿穿刺线向周围扩散生长。大肠杆菌的细胞表面还含有一种比鞭毛更细、较短且直硬的丝状体,称为菌毛,可分为普通菌毛和性菌毛。普通菌毛主要用于吸附于动植物、真菌以及各种细胞的表面,有的是噬菌体吸附的位点。性菌毛是在 F 因子的控制下形成的,它是细菌接合的“工具”。通过性菌毛的接合,可在细菌之间传递质粒或染色体基因等。

### 1.4 大肠杆菌的生理生化特性

#### 1.4.1 产能代谢

大肠杆菌为兼性厌氧菌,其营养类型为化能异养。其呼吸类型为:在有氧条件下进行有氧呼吸产能,在无氧条件下进行无氧呼吸和发酵产能。

(1) 有氧呼吸。有氧呼吸是指以分子氧作为最终电子受体的生物氧化过程。大肠杆菌可以利用葡萄糖等作为碳源和能源。葡萄糖经糖酵解(EMP)途径分解为丙酮酸,丙酮酸再经三羧酸循环(TCA)彻底氧化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ ,并从中获得大量能量。在此过程中,底物氧化释放的电子通过电子传递链最后交给氧。电子传递链又称呼吸链,其功能之一是传递电子,功能之二是将电子传递过程中释放的能量合成 ATP,即电子传递磷酸化作用。大肠杆菌呼吸链的组分与线粒体呼吸链的组分有所不同,但详细组分还不是十分清楚。大肠杆菌的呼吸链上有 2 个部位释放质子(线粒体呼吸链上有 3 个部位释放质子)。因此,大肠杆菌呼吸链的 P:O 为 2,即 1 对电子经呼吸链的电子传递可得到 2 个分子的 ATP。

(2) 无氧呼吸。无氧呼吸是在无氧条件下,底物脱下的氢经部分呼吸链传递,最后交给氧化态的无机物(个别为有机氧化物)的呼吸类型。大肠杆菌含有硝酸盐还原酶,在无氧条

件下以硝酸盐作为最终电子受体而将硝酸盐还原为亚硝酸盐。

(3) 发酵。发酵是厌氧或兼性厌氧微生物获取能量的一种方式。在此过程中,有机质氧化释放的电子不经电子传递链而直接交给另一内源性有机物。基质在发酵过程中氧化不彻底,发酵的结果仍积累某些有机物。大肠杆菌在无氧条件下进行混合酸发酵,通过发酵将葡萄糖转变成琥珀酸、乳酸、甲酸、乙醇、乙酸、 $H_2$  和  $CO_2$  等多种产物。大肠杆菌将丙酮酸分解成乙酰辅酶 A 与甲酸。甲酸在酸性条件下 ( $pH$  6.2 以下) 经甲酸氢酶进一步分解为  $CO_2$  和  $H_2$ , 因此大肠杆菌发酵葡萄糖既产酸又产气。

#### 1.4.2 生化反应

由于上述大肠杆菌进行混合酸发酵产生较多有机酸,使发酵液  $pH$  下降到 4.2 以下,加入甲基红指示剂呈红色,故大肠杆菌甲基红反应阳性。产气杆菌发酵葡萄糖形成的丙酮酸经缩合脱羧转变为乙酰甲基甲醇,进一步还原为 2,3-丁二醇。乙酰甲基甲醇在碱性条件下氧化生成二乙酰,二乙酰与精氨酸中的胍基反应生成红色化合物,此反应为 V. P. 反应。产气杆菌发酵葡萄糖的 V. P. 反应呈阳性。由于大肠杆菌发酵葡萄糖不产生 2,3-丁二醇,故大肠杆菌的 V. P. 反应呈阴性。V. P. 试验、甲基红试验对大肠杆菌的检测具有重要意义。大肠杆菌还具有氧化酶阴性、不液化明胶、产生吲哚、不利用柠檬酸盐以及在三糖铁琼脂培养基中不产生  $H_2S$  等生化反应特性。

### 1.5 大肠杆菌的分裂繁殖

#### 1.5.1 染色体复制与分裂的关系

大肠杆菌以分裂的方式进行繁殖,它的分裂是从染色体的复制开始的。为了使遗传物质能均等地传给两个子代,染色体的复制必须与细胞的分裂保持一致。染色体复制不完成,细胞就不能分裂;复制一旦完成,即开始分裂。大肠杆菌 DNA 复制从起始到完成需 40min。在染色体复制完成约 20min 后,细胞进行分裂。在生长缓慢时,每一个大肠杆菌内只有一条染色体,染色体复制完成后细胞进行分裂,然后才开始下一次复制。在快速生长时,染色体一次复制尚未结束,在尚不分开染色体上又开始了新的复制,导致染色体复制的时间大为缩短,细胞分裂的代时(细菌繁殖一代所需时间)也相应缩短。由此可知,抑制 DNA 的复制即可抑制细胞的分裂。例如,用丝裂霉素 C 处理对数生长期的大肠杆菌,由于抑制了 DNA 的合成,虽然细菌能继续生长,但却不能分裂。

#### 1.5.2 大肠杆菌的分裂过程

接种到新鲜培养基中的大肠杆菌细胞从周围环境中选择性地吸收营养物质,在细胞内合成所需的 RNA、DNA、蛋白质及酶等大分子物质,细胞体积不断增大,随后开始分裂过程。首先是拟核开始分裂,同时细胞中央的细胞膜也开始对称地向中心凹陷生长,使拟核均等地分配到凹陷两侧。随着细胞膜向内凹陷,母细胞的肽聚糖层也跟着由四周向中心生长,把细胞膜分为两层,每层分别成为子细胞的细胞膜。肽聚糖层也分为两层,直至中央会合,形成由细胞质膜和肽聚糖组成的隔膜。隔膜完全形成后,两个子细胞分开,完成了一次细胞分裂。

## 1.6 大肠杆菌 DNA 的复制方式

遗传信息通过亲代 DNA 分子的复制,从亲代传递给子代,从而保证了遗传的稳定性。因此,DNA 的复制对生物的遗传具有重要的意义。

### 1.6.1 双链 DNA 的半保留复制

DNA 双链在复制时分开,作为合成子链的模板。复制后,双链 DNA 分子中的一条链为亲代的 DNA,而另一条链则为新合成的 DNA。这种方式的复制称为半保留复制。半保留复制首先是在大肠杆菌中得到证明的。1958 年,梅塞尔森和斯塔尔首先将大肠杆菌在重同位素<sup>15</sup>N 的培养基上培养十几个小时,以保证全部 DNA 都被<sup>15</sup>N 所标记,然后再将大肠杆菌转入<sup>14</sup>N 培养液,间隔一定时间取样,提取菌体 DNA 并经氯化铯密度梯度离心,进行紫外线吸收光谱分析。从不同代期的光谱分析中可以看出:在代期为 0 时(亲代 DNA)为<sup>15</sup>N 构成的重密度带。复制一代以后为<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N 组成的中间密度带(没有得到<sup>15</sup>N 构成的重密度带,表明在复制过程中亲代 DNA 不能作为完整的单位保留下来;也未得到<sup>14</sup>N 轻密度带,表明子代 DNA 分子不能重新合成)。复制两代以后出现两条带,一条为轻密度带<sup>14</sup>N,另一条为<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N 的中间密度带。随后,随着代期的延长,中间密度带被稀释,从而说明大肠杆菌 DNA 的复制为半保留复制。后来证明这是生物界 DNA 复制的普遍方式。

### 1.6.2 染色体环状复制

大肠杆菌的染色体为双链环形 DNA,总长度为  $4.6 \times 10^6$  bp, DNA 总长度可达 1100 ~ 1400 μm。凯恩斯通过精辟的实验证明了大肠杆菌 DNA 是以环状方式复制的。首先将大肠杆菌生长在含<sup>3</sup>H 胸腺嘧啶的培养基中,这样在放射性培养基上生长时所合成的全部 DNA 都是具有放射性的。培养接近两代时,分离出菌体的完整 DNA,可以从其放射自显影图上看到分枝的环状图式。后来在有些病毒中也发现了环状复制。因为复制环的图式像希腊字母 θ,故称这种复制为 θ 复制。

### 1.6.3 DNA 复制的酶学

DNA 的复制过程十分复杂,是在多种酶的参与下完成的。

(1) 拓扑异构酶 I。首先在大肠杆菌中发现,当其与 DNA 结合时,可形成稳定的复合物。在此复合物中,DNA 的一条链断裂,然后再重新连接,从而改变 DNA 的连环数和超螺旋数。此过程不需要 ATP。

(2) 旋转酶。属 II 型拓扑异构酶。大肠杆菌的旋转酶由两个 A 亚基和两个 B 亚基组成。旋转酶可连续引入负超螺旋到同一个双链闭环 DNA 分子中,从而消除复制过程中所产生的正超螺旋。此酶的活性需要 ATP。

(3) 解螺旋酶。大肠杆菌的解螺旋酶是由 rep 基因编码的蛋白质或酶,称为 Rep 蛋白。Rep 蛋白利用 ATP 水解的能量松开双螺旋。

(4) DNA 聚合酶。1956 年,科恩伯格等首先在大肠杆菌提取液中发现了 DNA 聚合酶 I,后来又相继发现了 DNA 聚合酶 II 和 DNA 聚合酶 III。

DNA 聚合酶 I 由 1 条多肽链组成,其活性主要有:① 5'→3'聚合酶活性,即使脱氧核糖核苷酸逐个加到 3'-OH 末端的核苷酸链上,使 DNA 链沿 5'→3'方向延长,其聚合活性只能