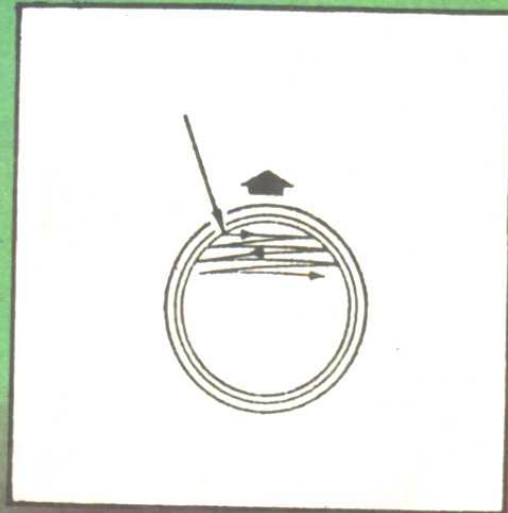
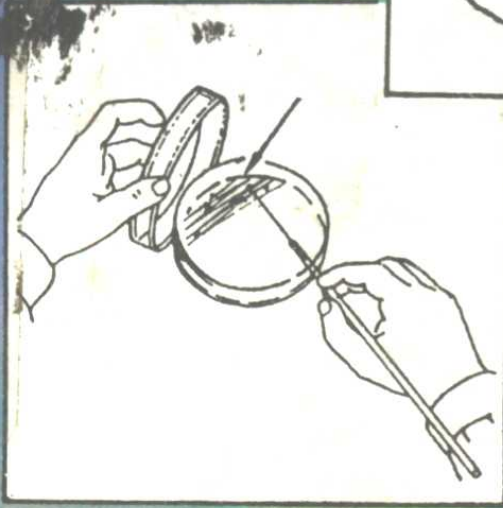
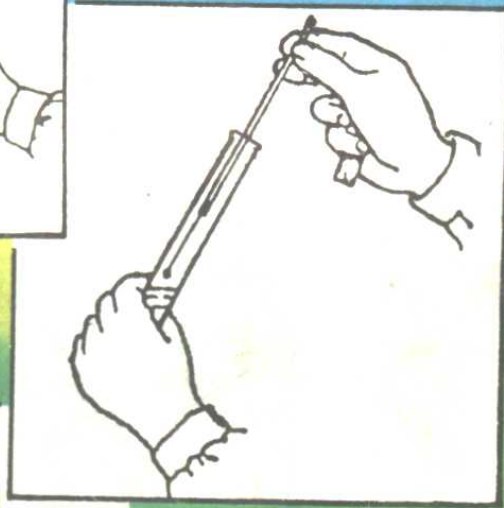
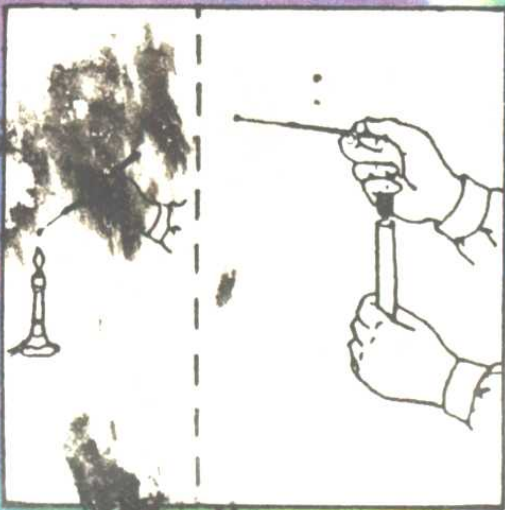


# 工业微生物 实验技术手册

● 诸葛健 王正祥 编著



中国轻工业出版社

# 工业微生物实验技术手册

诸葛健 王正祥 编著

中国轻工业出版社

**(京) 新登字034号**

### **内 容 简 介**

本手册是一部集作者及各有关专家长期教学、科研经验和成果编写而成的，实验条件适合于国内。全书共分十三章，202项实验内容。包括显微技术、工业微生物的形态学、纯培养技术、环境对工业微生物生长及发酵的影响、工业微生物的生理学、发酵过程及发酵食品中微生物的检测、选种与育种、工业微生物的保藏技术、固定化技术、工业微生物实验室的设计和实验数据的处理及常见单元操作和附录等，内容涉及工业微生物实验技术的各个主要方面，还附插图 166 幅和微生物单元规范实验操作套图 8 组 72 幅。内容广泛、先进，方法实用。

本手册可供微生物学、生物工程和食品工程等专业高年级学生和研究生，以及有关科研单位和工厂的科技人员实验参考使用。

### **工业微生物实验技术手册**

诸葛健 王正祥 编著  
责任编辑 唐是雯 李炳华

中国轻工业出版社出版  
(北京市东长安街 6 号)  
北京交通印务实业公司印刷  
新华书店北京发行所发行  
各地新华书店经售

850 × 1168 毫米 1/32，印张：22.875 字数：476 千字  
1994 年 6 月 第 1 版第 1 次印刷  
印数：1—5000 定价：39.00 元  
ISBN7-5019-1584-9/TS-1034

## 前 言

工业微生物学是一门实践性很强的应用学科。只有掌握扎实而广泛的基础知识和熟练的操作技能才能真正掌握好这门应用科学。特别是当今生物工程在生产实践发展中的重要性日益突出，编写一本适合国内需要的，跟得上时代步伐的理论与实验技术相结合的工业微生物实验技术手册已是一项迫切的任务。

本手册共分十三章，202项实验内容。包括显微技术、工业微生物的形态学、纯培养技术、环境对工业微生物生长及发酵的影响、工业微生物的生理学、发酵过程及发酵食品中微生物的检测、选种与育种、工业微生物的保藏技术、固定化技术、工业微生物实验室的设计和实验数据的处理及常见单元操作和附录等，内容已涉及到工业微生物实验技术的各个主要方面。为了便于各个层次的学生和科技人员参考使用，还附各类插图 166 幅和微生物单元规范实验操作套图 8 组 72 幅。

本手册在选材上注意了更新，除保留一些典型实用的基础单元实验项目外，特别对一些新概念、新技术作了介绍。内容主要取自于作者及有关专家多年的教学和科研的成果与经验，使本手册具有内容的先进性和方法的实用性。

在本手册编写过程中，方慧英女士给以众多帮助，特致谢意。

由于本手册内容广泛，在编写过程中仍有不少匆促之处，有些实验内容还有待进一步充实提高。我们真诚希望广大读者和有关专家在参考使用过程中不断向我们提供宝贵的批评和建议，以臻日趋完善。

诸葛健 王正祥

# 目 录

<b>第一章 显微技术</b> .....	1
<b>第一节 显微镜的种类、特点和使用</b> .....	1
<b>一、明视野光学显微镜</b> .....	1
〔实验1-1〕明视野显微镜的使用 .....	5
<b>二、其他光学显微镜</b> .....	7
〔实验1-2〕暗视野显微镜的使用 .....	8
〔实验1-3〕相差显微镜的使用 .....	9
〔实验1-4〕荧光显微镜的使用 .....	11
<b>三、电子显微镜</b> .....	11
〔实验1-5〕质粒DNA的透射电镜观察 .....	12
〔实验1-6〕酵母细胞的扫描电镜观察 .....	14
<b>第二节 显微摄影</b> .....	16
〔实验1-7〕显微摄影、菌落摄影和凝胶摄影 .....	17
<b>第三节 放射自显影</b> .....	22
〔实验1-8〕硝酸纤维素滤纸上标记DNA的放射自显影 .....	22
<b>第二章 工业微生物基本形态及观察</b> .....	24
<b>第一节 细菌</b> .....	24
〔实验2-1〕细菌形态的观察 .....	26
<b>第二节 放线菌</b> .....	30
〔实验2-2〕放线菌的形态观察 .....	31
<b>第三节 噬菌体</b> .....	32
〔实验2-3〕噬菌体的分离与纯化 .....	35
〔实验2-4〕高效价噬菌体原液的制备 .....	36
〔实验2-5〕溶源菌的鉴定 .....	37
<b>第四节 酵母菌</b> .....	39

〔实验2-6〕 酵母菌细胞形态观察 .....	42
〔实验2-7〕 酵母菌巨大菌落观察 .....	42
第五节 小型丝状真菌 (霉菌) .....	43
一、藻状菌 (主要指根霉、毛霉) .....	43
〔实验2-8〕 根霉、毛霉的形态观察 .....	45
二、曲霉 .....	46
三、青霉 .....	47
〔实验2-9〕 青霉、曲霉的形态观察 .....	47
四、其他霉菌 .....	49
第六节 食用真菌 .....	50
〔实验2-10〕 平菇的瓶栽 .....	51
<b>第三章 工业微生物细胞一般结构与特殊结构的观察</b> .....	53
第一节 染色技术 .....	53
一、染色的基本原理 .....	53
二、染料 .....	54
三、染色种类 .....	57
〔实验3-1〕 革兰氏鉴别染色法 .....	57
〔实验3-2〕 活体染色法 .....	62
〔实验3-3〕 单染色法 .....	63
〔实验3-4〕 假丝酵母负染色法 .....	63
〔实验3-5〕 枯草芽孢杆菌的抗酸性染色 .....	64
〔实验3-6〕 真菌的荧光染色与观察 .....	65
第二节 细胞各部结构成分的分离与观察 .....	67
〔实验3-7〕 革兰氏阳性细菌细胞壁的制备 .....	67
〔实验3-8〕 酵母细胞壁甘露聚糖的制备 .....	69
〔实验3-9〕 细胞壁的形态观察 .....	70
〔实验3-10〕 革兰氏阴性菌细胞外膜蛋白的分离 .....	71
〔实验3-11〕 细胞荚膜的观察 .....	72
〔实验3-12〕 细菌鞭毛的观察 .....	73
〔实验3-13〕 微生物细胞核的观察 .....	75
〔实验3-14〕 细菌染色体DNA的分离与观察 .....	77

〔实验3-15〕 异染颗粒的观察·····	79
〔实验3-16〕 酵母细胞内脂肪颗粒和肝糖颗粒的观察·····	81
〔实验3-17〕 酵母液泡及线粒体的提取·····	81
<b>第三节 芽孢、子囊孢子和假菌丝的观察</b> ·····	84
<b>一、芽孢</b> ·····	84
〔实验3-18〕 细菌芽孢形成及发芽的观察·····	87
<b>二、酵母子囊孢子</b> ·····	88
〔实验3-19〕 酵母子囊孢子的形成及观察·····	91
<b>三、酵母假菌丝</b> ·····	92
〔实验3-20〕 酵母假菌丝的观察·····	93
<b>第四章 工业微生物纯培养技术</b> ·····	94
<b>第一节 消毒与灭菌</b> ·····	94
<b>一、热杀菌</b> ·····	94
<b>二、化学消毒剂</b> ·····	97
<b>三、紫外线和射线</b> ·····	98
<b>四、接种室的空气灭菌</b> ·····	99
<b>五、过滤除菌</b> ·····	100
〔实验4-1〕 微孔滤膜滤器的使用·····	102
<b>六、防霉剂</b> ·····	106
〔实验4-2〕 防霉剂的选用·····	107
<b>第二节 培养基及其制备</b> ·····	109
<b>一、培养基</b> ·····	109
<b>二、培养基成分的说明</b> ·····	109
〔实验4-3〕 麦芽汁培养基的配制·····	112
<b>第三节 分离、接种和培养技术</b> ·····	112
<b>一、分离</b> ·····	112
〔实验4-4〕 试管倾倒培养皿分离法·····	112
〔实验4-5〕 平皿划线分离法·····	114
〔实验4-6〕 稀释分离平皿菌落计数·····	117
<b>二、显微操作技术用于单细胞分离</b> ·····	121

〔实验4-7〕 显微操纵器用于单细胞分离 .....	123
〔实验4-8〕 显微操纵器用于酵母子囊的解剖及子囊孢子单 孢化.....	124
三、接种 .....	126
〔实验4-9〕 接种技术 .....	126
四、摇瓶与发酵 .....	129
〔实验4-10〕 摇瓶发酵生产柠檬酸.....	133
〔实验4-11〕 小型连续发酵实验.....	137
〔实验4-12〕 酿酒酵母的同步培养.....	139
〔实验4-13〕 厌氧罐分离培养厌氧微生物.....	143
<b>第五章 培养条件对工业微生物生长与发酵的影响.....</b>	<b>145</b>
第一节 温度 .....	145
〔实验5-1〕 酵母营养细胞致死时间的测定 .....	148
第二节 水活度与渗透压 .....	148
〔实验5-2〕 培养基中糖和盐浓度对微生物生长的影响 .....	151
第三节 氧气和氧化还原电位 .....	151
〔实验5-3〕 微生物生长对氧的要求 .....	155
〔实验5-4〕 培养液氧化还原值 (rH) 的测定.....	155
第四节 酸碱度 .....	156
〔实验5-5〕 pH对微生物的影响.....	158
第五节 重金属和一些化合物对微生物的抑制作用.....	159
〔实验5-6〕 滤纸片法测定重金属对微生物的影响 .....	159
〔实验5-7〕 消毒剂杀菌力的测定 .....	160
第六节 表面张力 .....	162
〔实验5-8〕 表面张力对微生物的影响 .....	162
第七节 极端环境因素对微生物的影响 .....	163
<b>第六章 工业微生物的生理与发酵试验.....</b>	<b>164</b>
第一节 微生物对碳源的利用 .....	164
〔实验6-1〕 细菌对糖、醇及糖苷的利用 .....	166
〔实验6-2〕 酵母对糖类的发酵 .....	166



第二节 微生物对氮源的利用 .....	167
〔实验6-3〕 细菌对硝酸盐的还原作用 .....	168
〔实验6-4〕 酵母对氮素源的利用 .....	169
第三节 细菌鉴定中的某些特殊生理实验 .....	170
〔实验6-5〕 淀粉水解 .....	170
〔实验6-6〕 V-P试验 .....	171
〔实验6-7〕 硫化氢的生成 .....	172
〔实验6-8〕 吲哚试验 .....	172
〔实验6-9〕 过氧化氢酶的产生 .....	174
〔实验6-10〕 明胶液化试验 .....	175
〔实验6-11〕 石蕊牛乳试验 .....	175
〔实验6-12〕 甲基红试验(M-R) .....	176
〔实验6-13〕 乙醇的氧化 .....	177
〔实验6-14〕 乙酸的氧化 .....	178
〔实验6-15〕 脲酶的测定 .....	178
第四节 常用细菌的分离和检测 .....	179
〔实验6-16〕 枯草杆菌 .....	179
〔实验6-17〕 醋酸细菌 .....	180
〔实验6-18〕 乳酸菌 .....	182
〔实验6-19〕 德氏乳酸杆菌 .....	185
〔实验6-20〕 丙酸细菌 .....	186
〔实验6-21〕 丁酸细菌 .....	188
第五节 酵母应用特性的测定 .....	189
〔实验6-22〕 酵母发酵力的测定 .....	189
〔实验6-23〕 压榨酵母发酵力的测定 .....	191
〔实验6-24〕 面包酵母发面力的测定 .....	192
〔实验6-25〕 酵母忍耐酒精浓度的测定 .....	193
〔实验6-26〕 酵母抵抗防腐剂能力的测定 .....	194
〔实验6-27〕 啤酒酵母凝聚力的测定 .....	196
〔实验6-28〕 啤酒酵母产生双乙酰的测定 .....	198
第六节 发酵制品的试验 .....	200

〔实验6-29〕 细菌液化型淀粉酶的发酵及活力测定·····	200
附：液化型淀粉酶活力的测定方法（部颁标准）·····	200
〔实验6-30〕 曲霉的葡萄糖淀粉酶生成和活力测定·····	202
附：糖化型淀粉酶活力的测定方法（部颁标准）·····	202
〔实验6-31〕 米曲霉的蛋白酶生成及活力测定·····	205
附：蛋白酶活力的测定方法〔部颁标准〕·····	205
〔实验6-32〕 纤维素酶的发酵及其活力测定·····	209
〔实验6-33〕 乳酸发酵及测定·····	213
附：乳酸的比色测定法·····	213
〔实验6-34〕 乳酸菌饮料·····	214
〔实验6-35〕 葡萄酒饮料·····	215
〔实验6-36〕 发酵法酿制食醋·····	216
<b>第七章 发酵过程及发酵食品中微生物的检测</b> ·····	219
<b>第一节 微生物生长、大小和数量的检测方法</b> ·····	219
一、细胞质量测定·····	219
二、细胞菌数测定法·····	220
〔实验7-1〕 酵母细胞数的测定·····	220
〔实验7-2〕 酵母细胞大小的测定·····	222
〔实验7-3〕 细菌增殖曲线的测定·····	223
〔实验7-4〕 丝状真菌生长速率的测定·····	225
<b>第二节 发酵和食品工业中常见的微生物种类及其概测</b> ·····	226
一、发酵和食品工业中常见微生物的种类·····	227
二、发酵和食品工业中常见微生物类属检索表·····	228
三、发酵和食品工业中常见微生物类别的概测·····	232
<b>第三节 发酵和食品工业用水和发酵过程微生物数量的检测</b> ·····	238
一、发酵和食品工业用水微生物数量的测定·····	238
〔实验7-5〕 水中细菌数的测定·····	239
〔实验7-6〕 水中大肠菌群数量的测定·····	240
〔实验7-7〕 水中大肠杆菌数量的测定·····	242

〔实验7-8〕 大肠杆菌的简易检出法 .....	246
二、酒醅中微生物总数测定 .....	247
〔实验7-9〕 酒醅中微生物数量的测定 .....	247
〔实验7-10〕 固态发酵水浆厌氧微生物的分离 .....	248
第四节 培养皿或试管中菌落总数的确定 .....	249
第五节 免疫学技术 .....	250
一、免疫学中的基本概念及原理 .....	250
二、抗体的制备 .....	251
〔实验7-11〕 乳化抗原的制备 .....	252
〔实验7-12〕 动物的免疫 .....	254
〔实验7-13〕 兔抗血清的收集 .....	256
〔实验7-14〕 杂交瘤与单克隆抗体的制备 .....	257
三、抗体的纯化及标记 .....	263
〔实验7-15〕 抗血清中IgG抗体的纯化 .....	263
〔实验7-16〕 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体IgG的制备 .....	264
〔实验7-17〕 荧光抗体的制备 .....	266
四、凝集反应 .....	267
〔实验7-18〕 玻片凝集试验 .....	267
〔实验7-19〕 试管凝集试验 .....	267
〔实验7-20〕 反向间接血凝试验 .....	268
五、沉淀反应 .....	270
〔实验7-21〕 单相免疫扩散法 .....	270
〔实验7-22〕 双相免疫扩散法 .....	271
六、酶联免疫吸附技术 .....	272
〔实验7-23〕 夹心ELISA .....	273
七、免疫荧光试验 .....	275
〔实验7-24〕 间接免疫荧光试验 .....	275
八、免疫胶体金技术 .....	276
〔实验7-25〕 免疫胶体金试验 .....	276
九、免疫转移电泳 .....	277
〔实验7-26〕 免疫转移电泳法 .....	278

第六节 分子生物学技术	280
一、GC含量测定	280
〔实验7-27〕热变性温度法测定GC含量	281
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	283
〔实验7-28〕SDS-PAGE	284
〔实验7-29〕聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳	289
三、色谱技术	291
〔实验7-30〕离子交换色谱技术	293
〔实验7-31〕凝胶过滤色谱技术	298
〔实验7-32〕Sephacrose 4B溴化氰偶联技术	300
〔实验7-33〕Sephadex 过碘酸钠偶联技术	301
〔实验7-34〕亲和色谱技术	302
四、核酸分子杂交技术	304
(一) 同位素标记探针的制备	305
〔实验7-35〕缺口平移法制备DNA探针	306
〔实验7-36〕随机引物标记法	309
〔实验7-37〕RNA探针的制备	311
(二) 非同位素标记核酸探针的制备	314
〔实验7-38〕Dig-核酸探针的制备	314
〔实验7-39〕光敏生物素标记核酸探针的制备	316
(三) 待检样固相化	317
〔实验7-40〕凝胶中DNA转移至硝酸纤维膜 (Southern blot)	317
〔实验7-41〕菌落原位杂交	319
(四) 硝酸纤维膜上DNA 原位杂交	320
〔实验7-42〕放射性同位素标记核酸探针的杂交	321
〔实验7-43〕地高辛标记核酸探针的杂交及显色	323
〔实验7-44〕生物素标记核酸探针的杂交及显色	325
五、聚合酶链反应技术 (PCR)	326
〔实验7-45〕PCR技术	327
第七节 沙门氏菌和志贺氏菌的检测	329

〔实验7-46〕沙门氏菌和志贺氏菌的检验·····	330
<b>第八章 选种和育种</b> ·····	<b>335</b>
<b>第一节 工业菌种筛选程序</b> ·····	<b>335</b>
一、采样·····	335
二、增殖培养·····	336
三、培养分离·····	337
四、筛选·····	337
五、毒性试验·····	338
<b>第二节 培养分离</b> ·····	<b>338</b>
一、自然界中细菌的分离·····	340
(一) 采样和采集方法·····	340
(二) 生态学参数及培养基的组成原则·····	341
(三) 分离培养基及试液·····	342
(四) 土中细菌的分离·····	346
〔实验8-1〕土中细菌的直接分离·····	346
〔实验8-2〕土中细菌的富集培养与分离·····	347
(五) 植物体上细菌的分离·····	349
〔实验8-3〕植物体上细菌的直接分离·····	349
〔实验8-4〕植物体上细菌的富集培养及分离·····	349
(六) 水中细菌的分离·····	350
〔实验8-5〕水中细菌的直接分离·····	351
〔实验8-6〕水中细菌的滤膜压印分离法·····	351
(七) 次代培养及纯化·····	352
二、放线菌的分离·····	352
(一) 采样及采集方法·····	352
(二) 生态学参数和培养基的组成原则·····	352
(三) 放线菌分离培养基及试液·····	353
(四) 土样中放线菌的分离·····	359
〔实验8-7〕土样中放线菌的非选择性分离·····	360
(五) 植物及植物材料上放线菌的分离·····	361
〔实验8-8〕植物体上放线菌的分离·····	361

(六) 植物体上放线菌分离的饵诱法·····	362
〔实验8-9〕 饵诱法分离植物体上的放线菌·····	362
(七) 水中放线菌的分离·····	363
(八) 次代培养及纯化·····	363
三、真菌分离·····	364
(一) 采样及采集方法·····	364
(二) 生态学参数及培养基组成原则·····	364
(三) 真菌培养分离常用培养基及试液·····	366
(四) 土中真菌的分离·····	368
〔实验8-10〕 土样中真菌的压贴分离·····	369
(五) 植物材料中真菌的分离·····	369
(六) 水中真菌的分离·····	370
(七) 从子实体直接分离培养担子菌·····	370
〔实验8-11〕 担子菌组织分离法·····	371
〔实验8-12〕 担子菌孢子分离·····	371
(八) 植物组织中担子菌的分离·····	372
(九) 次代培养及纯化·····	372
四、目标菌株的分离、筛选及毒性试验·····	372
〔实验8-13〕 利用碱法纸浆废液的微生物的分离·····	372
〔实验8-14〕 葡萄酒酵母的筛选·····	373
〔实验8-15〕 生产选种·····	374
〔实验8-16〕 发酵废液COD测定·····	374
第三节 工业菌种的育种方针·····	376
第四节 富集培养技术在育种中的应用·····	377
一、去调节突变株的富集·····	378
二、营养缺陷型的富集·····	380
三、富集法在研究次级代谢的重组DNA技术中的应 用·····	383
第五节 诱变育种·····	383
一、诱变剂和诱变处理·····	384
二、诱变育种步骤·····	388

〔实验8-17〕 紫外线的诱变育种·····	391
〔实验8-18〕 亚硝基胍诱变曲霉菌(黑曲霉、米曲霉)·····	392
〔实验8-19〕 链霉菌菌丝体的诱变育种·····	393
第六节 营养缺陷型的选育·····	395
一、诱变方法·····	396
二、淘汰野生型·····	396
三、检出缺陷型·····	397
四、营养缺陷型生长谱的确定·····	398
〔实验8-20〕 大肠杆菌营养缺陷型的筛选·····	401
〔实验8-21〕 酵母营养缺陷型的筛选·····	403
〔实验8-22〕 青霉菌营养缺陷型菌株的筛选·····	405
第七节 呼吸缺陷型及代谢调节突变株的筛选·····	407
〔实验8-23〕 酵母呼吸缺陷型的筛选·····	407
〔实验8-24〕 氨基酸抗反馈调节突变株的选育·····	408
第八节 抗噬菌体菌株的选育·····	412
〔实验8-25〕 抗噬菌体产 $\alpha$ -淀粉酶菌株的选育·····	412
第九节 基因育种·····	413
一、质粒的提取与纯化·····	414
〔实验8-26〕 大肠杆菌质粒DNA的提取·····	414
〔实验8-27〕 链霉菌质粒DNA的分离与纯化·····	426
二、染色体DNA的提纯·····	428
〔实验8-28〕 链霉菌染色体DNA的分离与纯化·····	429
〔实验8-29〕 酿酒酵母染色体DNA的提取·····	431
三、DNA和RNA的定量测定·····	433
〔实验8-30〕 DNA的定量测定·····	433
四、遗传转化·····	435
〔实验8-31〕 质粒DNA转化感受态大肠杆菌·····	438
〔实验8-32〕 质粒DNA转化啤酒酵母·····	439
五、DNA的琼脂糖凝胶电泳·····	440
〔实验8-33〕 质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳·····	444

六、DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	446
【实验8-34】DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	448
【实验8-35】从凝胶中回收纯化DNA片段 .....	448
七、杂交育种 .....	451
(一) 细菌杂交 .....	451
【实验8-36】细菌的接合 .....	451
(二) 酵母杂交育种技术 .....	453
【实验8-37】酵母单倍体的分离与鉴定 .....	455
【实验8-38】罕见交配法转移酵母杀伤质粒 .....	457
第十节 原生质体育种 .....	460
一、原生质体融合育种的特点 .....	461
二、原生质体融合育种步骤 .....	466
三、原生质体融合育种的要点 .....	466
四、原生质体转化 .....	475
五、原生质体再生率和融合率计算 .....	476
【实验8-39】芽孢杆菌的原生质体融合 .....	477
【实验8-40】链霉菌属原生质体融合 .....	480
【实验8-41】小单胞菌的原生质体融合 .....	485
【实验8-42】酵母的原生质体融合 .....	487
【实验8-43】丝状真菌的原生质体融合 .....	491
【实验8-44】芽孢杆菌属间原生质体转化 .....	497
【实验8-45】质粒DNA转化链霉菌原生质体 .....	498
【实验8-46】真菌原生质体转化 .....	501
六、原生质体技术中的一些特殊技术 .....	603
(一) 供体原生质体的热灭活 .....	503
(二) 供体原生质体的紫外灭活 .....	503
(三) 遗传转移 .....	504
【实验8-47】原生质体融合法转移酵母线粒体及杀伤质粒 .....	504
(四) 原生质体诱变育种 .....	506
【实验8-48】紫外线诱变原生质体选育苏氨酸高产菌 .....	506
(五) 原生质体电融合技术 .....	507



〔实验8-49〕电诱导酵母原生质体融合·····	507
第十一节 基因工程技术用于工业菌种改良·····	509
〔实验8-50〕耐热 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆和表达·····	514
<b>第九章 工业微生物菌种保藏技术</b> ·····	<b>520</b>
第一节 冷冻保藏·····	520
一、普通冷冻保藏技术·····	521
二、超低温冷冻保藏技术·····	521
三、液氮冷冻保藏技术·····	521
〔实验9-1〕快速沙土管保藏法·····	523
第二节 冻干保藏·····	524
〔实验9-2〕菌种冷冻干燥保藏·····	525
第三节 其他保藏方法·····	528
一、传代保藏·····	528
二、矿物油中浸没保藏·····	528
〔实验9-3〕液体石蜡保藏菌种·····	529
三、干燥-载体保藏·····	530
第四节 基因工程菌的保藏·····	531
第五节 微生物活力和稳定性测定·····	532
第六节 常用菌种保藏培养基·····	532
第七节 菌种保藏机构·····	536
<b>第十章 微生物细胞固定化方法</b> ·····	<b>539</b>
第一节 载体结合法·····	539
第二节 交联法·····	541
第三节 包埋法·····	541
一、藻酸钙凝胶包埋法·····	542
〔实验10-1〕酿酒酵母的藻酸钙固定化·····	544
二、 $\kappa$ -角叉胶包埋法·····	545
〔实验10-2〕一步法 $\kappa$ -角叉胶细胞固定化·····	547
〔实验10-3〕二步法 $\kappa$ -角叉胶细胞固定化·····	549
〔实验10-4〕固定化细胞的回收与活细胞计数·····	550

三、聚丙烯酰胺凝胶包埋法 .....	550
〔实验10-5〕大肠杆菌的聚丙烯酰胺凝胶固定化.....	550
四、光交联树脂前聚体包埋法 .....	552
〔实验10-6〕光交联树脂固定化原生质体.....	552
五、其他包埋方法 .....	553
(一) 胶原包埋法.....	553
(二) 纤维素包埋法.....	553
第四节 其他固定化方法 .....	556
第五节 固定化微生物细胞的应用 .....	556
一、L-氨基酸生产 .....	556
二、抗生素生产 .....	559
三、有机酸生产 .....	561
四、酶类生产 .....	562
五、固定化细胞酿造啤酒 .....	564
六、食醋酿制 .....	564
〔实验10-7〕固定化酵母连续生产酒精.....	564
〔实验10-8〕固定化枯草杆菌连续生产耐热 $\alpha$ -淀粉酶.....	565
<b>第十一章 酶固定化技术</b> .....	568
第一节 概述 .....	568
第二节 吸附法 .....	569
一、几丁载体上酶的吸附固定 .....	570
〔实验11-1〕吸附法几个固定化酶的制备.....	570
二、疏水吸附法 .....	572
〔实验11-2〕疏水吸附法固定化酶的制备.....	573
三、亲和吸附法 .....	574
〔实验11-3〕亲和吸附法固定 L-维生素C氧化酶 .....	574
〔实验11-4〕亲和吸附交联法固定蔗糖酶.....	575
〔实验11-5〕葡萄糖氧化酶的免疫固定化.....	575
四、过渡金属介导法.....	576
〔实验11-6〕过渡金属介导葡萄糖淀粉酶固定于控孔玻璃.....	576

〔实验11-7〕 过渡金属介导葡萄糖淀粉酶固定化改良法·····	577
<b>第三节 包埋法</b> ·····	578
一、凝胶聚合包埋法·····	578
二、辐射聚合包埋法·····	579
〔实验11-8〕 辐射共聚合包埋法固定葡萄糖淀粉酶·····	580
三、酶蛋白共聚合包埋法·····	581
〔实验11-9〕 酰化共聚合包埋法固定 $\alpha$ -糜蛋白酶·····	581
四、交联多聚物凝胶包埋法·····	582
〔实验11-10〕 明胶交联包埋法·····	582
〔实验11-11〕 明胶交联法制备固定化双酶膜·····	583
〔实验11-12〕 聚乙烯醇交联包埋法·····	584
〔实验11-13〕 脱乙酰几丁质交联包埋法·····	584
五、移植共聚合包埋法·····	585
〔实验11-14〕 移植共聚合包埋法·····	585
六、物理定位法·····	586
<b>第四节 共价交联法</b> ·····	587
一、溴化氰交联法·····	588
〔实验11-15〕 溴化氰交联滴定法·····	588
〔实验11-16〕 三乙烯胺-溴化氰活化法·····	589
〔实验11-17〕 溴化氰活化法制备可溶性载体固定化酶·····	590
二、碳化二亚胺法·····	591
〔实验11-18〕 碳化二亚胺二步法固定巯基氧化酶·····	592
三、戊二醛交联法·····	593
〔实验11-19〕 戊二醛交联固定化葡萄糖氧化酶·····	594
四、交链聚乙烯亚胺法·····	594
〔实验11-20〕 PEI裱涂载体的制备及用于酶固定化·····	595
五、活性载体法·····	598
<b>第十二章 工业微生物实验室的设计和实验数据处理</b> ·····	598
第一节 工业微生物实验室范围与基本要求·····	598
第二节 实验室的仪器设备·····	599

第三节	实验室大小及布局 .....	604
第四节	实验数据处理 .....	607
一、	显著性检验法 .....	607
二、	回归分析法 .....	609
三、	方差分析 .....	611
四、	正交试验法 .....	615
五、	实验数据处理常用表格 .....	619
<b>第十三章</b>	<b>工业微生物实验室常见的一些单元</b>	
	<b>操作技术</b> .....	636
第一节	搅拌和振荡 .....	636
第二节	气体的计量和导入 .....	639
第三节	加热和冷却 .....	640
第四节	减压操作 .....	644
第五节	干燥 .....	649
第六节	过滤和离心 .....	651
第七节	简单蒸馏 .....	655
第八节	纸层析 .....	656
第九节	薄层层析 .....	659
第十节	溶液的脱色 .....	662
第十一节	密度的测定 .....	662
第十二节	折光率 .....	663
第十三节	比旋光度 .....	664
第十四节	硅化 .....	665
第十五节	透析袋的准备 .....	666
第十六节	天平的使用与维护 .....	667
第十七节	分光光度计波长的校正 .....	668
<b>附 录</b>	.....	669
一、	实验室安全及防护知识 .....	669
二、	实验室常识 .....	673

三、玻璃器皿的洗涤及各种洗液的配制 .....	676
四、缓冲液 .....	679
五、一些有机物质的性质 .....	689
六、指示剂 .....	692
七、冷却剂和吸水剂 .....	694
八、硫酸铵饱和度的常用表 .....	695
九、试剂的配制及一些常用数据表 .....	699
本书使用的英文缩写 .....	708
主要参考资料 .....	710

# 第一章 显微技术

显微技术是工业微生物试验与研究中的基本技术之一。由于微生物体积微小，常以微米( $\mu\text{m}$ )或纳米( $\text{nm}$ )来描述其大小，因此，要对它们进行观察则必须借助显微镜。显微镜种类很多，可以根据我们所要研究的对象和要求选用。为了及时记录观察到的现象，还可以用显微摄影的方法将其记录下来。

## 第一节 显微镜的种类、特点和使用

根据结构和原理不同，可将显微镜分为光学显微镜和电子显微镜。光学显微镜主要有明视野显微镜、暗视野显微镜、相差显微镜、荧光显微镜、偏光显微镜和立体显微镜等，以明视野显微镜最为常用。

### 一、明视野光学显微镜

图1-1系常见的光学显微镜，其他显微镜都是在此基础上发展起来的。光学显微镜的基本结构包括光学系统和机械系统两大部分，只有在光学和机械系统良好的配合下，才能充分发挥显微镜的显微性能。因此，要正确地掌握显微镜的用法，必须了解显微镜的结构与原理。

#### (一) 显微镜的机械系统部分

机械系统一般是由金属材料制成，目前也有用工程塑料代替的，外表大部分涂有黑色油漆，以避免反射光线妨碍对标本的观察并保护金属。

1. 镜座 也称镜脚，是显微镜的基本支架，由底座和镜臂

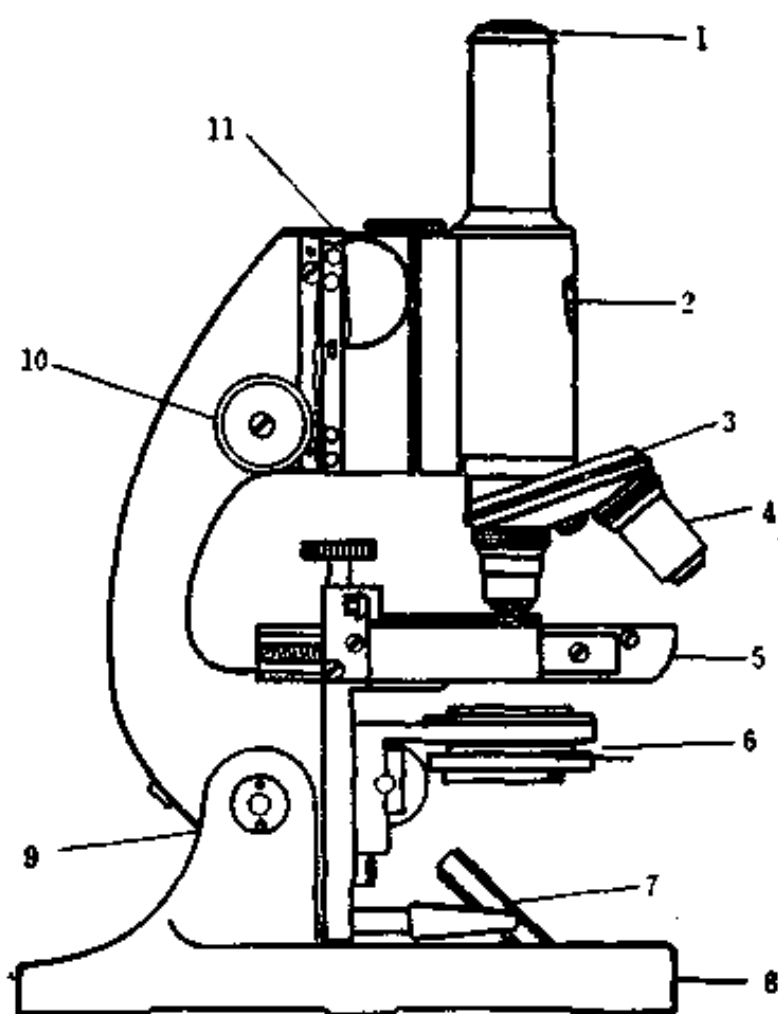


图 1-1 光学显微镜的机械构造

- 1—目镜 2—镜筒 3—物镜转换器 4—物镜 5—载物台  
 6—可变焦点聚光器 7—反光镜 8—镜脚 9—倾斜关节  
 10—微动调焦钮 11—粗动调焦钮

组成。底座通常呈马蹄形、三角形、圆形或丁字形，并且有一定的底面积和重量，使整体牢固地站立着，不至于因倾斜而失去平衡。镜臂是显微镜的脊梁。镜筒能上下升降的显微镜，镜臂是活动的；而镜台能上下活动的显微镜，底座和镜臂是固定的。

2. 载物台 也称显微镜台，是支持被检标本的平台，呈圆或正方形。一般圆形载物台可前后左右移动；方形载物台装有“十”字形动台，可直线前后左右移动，有的装有标尺，用于固定标本位置，以利于重复观察。

3. 镜筒 装置于镜壁上端，镜筒是空心的圆筒，上接目镜，下端接转换器。直筒式显微镜镜筒与载物台垂直，使目镜、镜筒

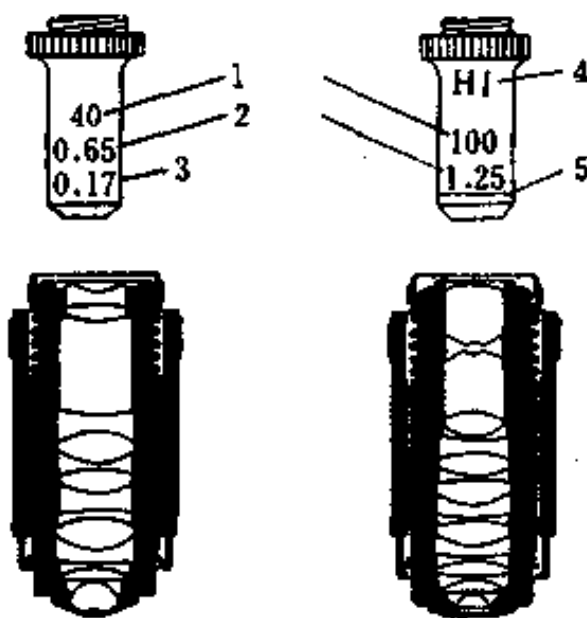
和物镜的光轴在一条直线上。镜筒的长度一般为160mm，以调整长度来调整总放大倍数。目前，显微镜多见斜筒式，特别是双镜斜筒的，使观察时眼睛不易疲劳，用起来方便，增加立体感。

4. 转换器 位于镜筒下端，是一个可以旋转的圆盘，用于装配物镜，一般可装配3~5个物镜。镜检时调换镜头很方便，由于物镜的长度配合，镜头转换后仅需稍加调节就可以观察清晰。也有的显微镜无转换器，一次仅能装一个物镜，调换时须把镜头拆下来，再装上另一个镜头。

5. 调焦装置 包括粗细调焦旋钮，是调节镜筒或载物台上、下移动的装置。调焦是获得清晰图象的关键。粗调焦旋钮只作粗略的调焦，对低倍观察仅用粗调就能获得清晰物象；在采用高倍镜和油镜时，粗调获得模糊物象后，还需细调才能看清物象。细调旋钮每转一周，镜筒上下0.1mm。初学者，切忌在观察物象时，就将粗调旋钮向下旋转，以免触及载玻片，损坏镜头，

## (二) 显微镜的光学系统

1. 物镜 物镜是显微镜最重要的部件，它是由金属圆筒里



装有许多透镜组成的，这些透镜用特殊的胶粘在一起，高级的物镜可由多达12块透镜组成（图1-2），根据使用方法不同，物镜可分两种：

(1) 干燥系物镜：一般指放大60倍以下的物镜，它们和标本之间的介质是空气。

(2) 油浸系物镜：为放大100倍的物镜。物镜与标本之间必须加入一种和玻璃折光率(1.52)几乎相等的香柏

图 1-2 物镜的标记和剖面

1—放大倍数 2—开口率 3—指定盖玻片的厚度 4—油镜标记 5—油镜标记圈



油(1.55)才能观察到清晰的物象,这种物镜即称油镜。

一般物镜筒上标以“HI”或“OI”的字样,加上香柏油,是为了消除光由一种介质进入到另一种介质时发生的折射现象(图1-3)。

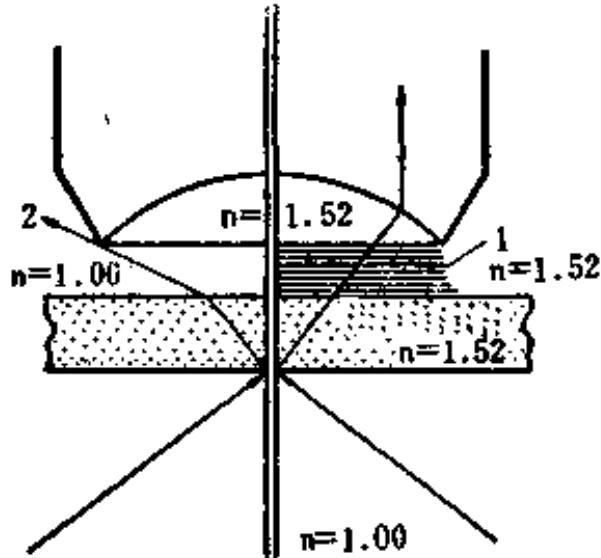


图 1-3 进入物镜的光路

1—香柏油 2—空气

物镜具有一定的放大率和一定的焦距。放大率越高,透镜的弯曲度越大,焦距就越短。由于放大率越高,物镜的镜筒就越长。所以油浸镜头观察时几乎触及标本。

物镜的放大倍数常有 $8\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ 、 $40\times$ 、 $60\times$ 、 $100\times$ 等数种,一般光学显微镜仅有其中的3~4种,放大率和开口率都在镜头上注

明。

物镜应具有消色差和消球差的性能,否则会造成物象的失真。

2. 目镜 插入镜筒上端,供眼睛观察物象用,它也是由透镜构成的,一般仅1~3片。目镜能放大由物镜造成的象,具有校正物象的功能,以使物象集中在目镜上。一般目镜筒越长,放大倍数越小。目镜放大倍数也标在镜头上,常有 $3\times$ 、 $5\times$ 、 $8\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 等数种。

3. 集光器 由一片或多片透镜组成。最上面的透镜嵌在载物台圆孔的下面,它可以聚集由反光镜反射上来的光线射入镜筒中。集光器可上下移动,以调节最适光度。集光器还附有虹彩光圈,用于调节光线的强弱。集光器在整个视野中生产的照度一般是很均匀的,使观察时获得较好的效果。一般当放大倍数小时,集光器下降,光圈缩小;而采用高倍镜时,集光器则上升,光圈放大。但光圈放得过大,观察时会产生光斑,若收拢光圈会使分辨力

下降,增加反差。一般物镜的开口直径以收拢在60~70%左右为准。

4. 反光镜 由凹、平两面镜子构成,它可以把光源光线送至集光器。利用集光器时,通常用平面镜,因为集光器的构造最适于利用平行光线,只有在照明条件较弱或用油镜时,才用凹面镜。但一些较近代的显微镜都采用装在底座内的光源,所以无需反光镜了。

#### 〔实验1-1〕明视野显微镜的使用

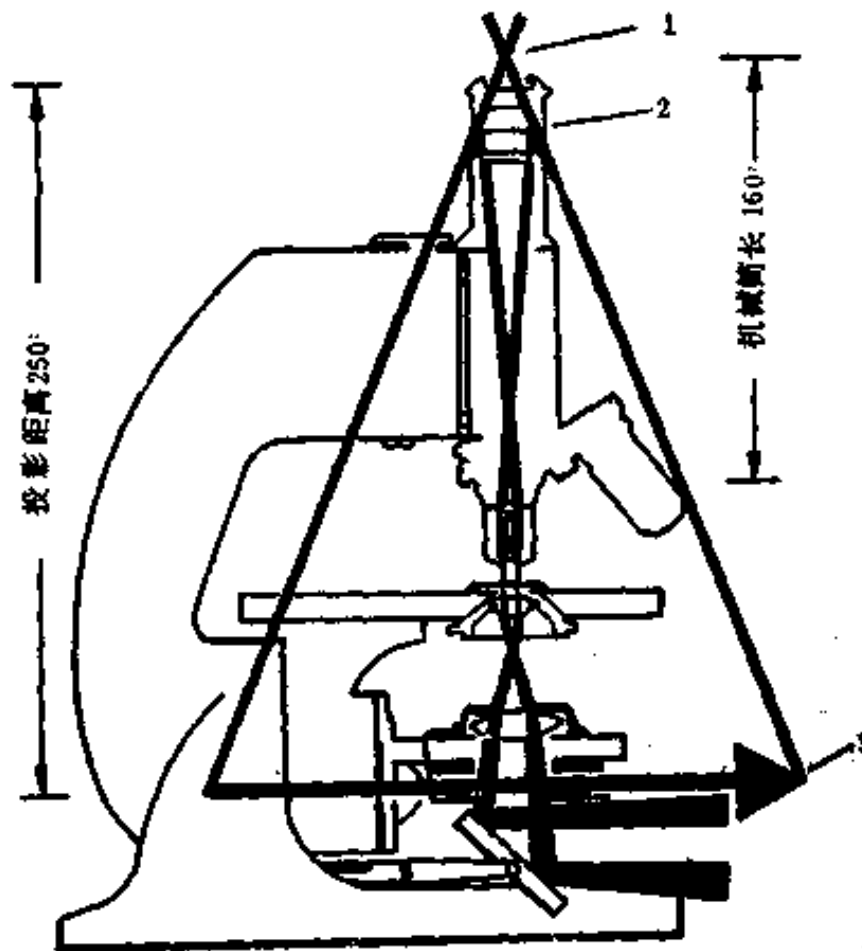


图 1-4 显微镜光路图

1—视点 2—实像 3—虚像

1. 放置位置 坐着观察时,显微镜放在左肩之前,镜臂向身体,镜身向前,镜与桌边相距约60mm左右,这样安置便于右手描绘物象。

2. 采光 镜检效果受采光影响很大,直射的阳光不是好的光源。白天,面对窗户的散射阳光是良好的光源,也可采用日光灯或显微镜灯作光源,但普通白炽灯泡并不理想。采光时,先将低倍物镜转至与镜筒成一直线,上升集光器,翻动反光镜,从侧面看集光器上部的透镜,使具有最大亮度,以后用左眼从目镜中观察,调集光器高度和光圈大小至最适亮度。

3. 观察 任何需要镜检的标本都可先用低倍观察，因为低倍镜视野较大，易于发现目的物和确定镜检物点。然后旋动转换器，改用高倍物镜，这时需将集光器上升，并放大光圈，以求得适当的亮度，再适度旋转细调焦旋钮，就能观察到目的物象。但此时切忌用粗调将旋钮下调，以防与标本相碰。

4. 油浸镜的使用 镜检细菌或放线菌菌体形态时必须采用放大90×或100×的油镜。采用油浸镜除需在标本与镜头之间滴加香柏油外，还应注意由于焦距极短，切勿因镜头触及载玻片而受损。在观察时为了获得强的采光，需将集光器上升和增大光圈。镜检完毕需先用擦镜纸将镜头上的香柏油擦去，再用擦镜纸沾少许二甲苯，将镜头上残留的香柏油擦去，并将二甲苯擦掉。

### (三) 明视野显微镜使用的注意事项

1. 显微镜总放大率 显微镜的总放大率是物镜和目镜放大倍数的乘积。但这是有条件的，这涉及到“分辨力”的概念，在能分辨的情况下，上述乘积是有效的。

(1) 分辨力：是指能够分辨出的两点之间最小距离的能力。例如正常视力的人从距离25cm处观察物体，能够分辨的最小距离为0.1cm。显微镜的分辨力与物镜的开口率（或称数值口径，简称 $N.A.$ ）和光波波长（ $\lambda$ ）有关：

$$\text{分辨力} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\lambda}{N.A.}$$

我们肉眼能感受到的光波平均波长为0.55 $\mu\text{m}$ ，所以可以认为是个常数。开口率是镜头与标本间介质的折射率（ $n$ ）和最大光的入射角 $\alpha$ 的半角正弦的乘积，即：

$$N.A. = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中  $n$ ——空气为1.00，水为1.33，石蜡油为1.46，香柏油为1.51。

$\alpha$ ——一般最大约为120°，所以 $\sin 60^\circ = 0.87$ 。

这样开口率最大也不过1.31左右。一般低倍物镜10×的

$N.A.$  为  $0.25 \sim 0.30$ ;  $45\times$  的  $N.A.$  为  $0.65$ ;  $90\times$  的  $N.A.$  为  $1.25$ 。可见物镜放大倍数越大,  $N.A.$  也越大, 当然分辨就越强。由于油浸物镜的分辨力也不能小于  $0.2\mu\text{m}$  左右, 所以不管总放大倍数多少, 用普通光学显微镜无法观察到小于  $0.2\mu\text{m}$  的物象的。

(2) 焦距和工作距离: 物镜与标本间的距离, 在观察得最清晰时称工作距离, 而每一物镜还有它自己的焦距。例如  $10\times$  物镜的焦距为  $16\text{mm}$ , 工作距离为  $6.5\text{mm}$ ;  $45\times$  物镜分别为  $4\text{mm}$  和  $0.6\text{mm}$ ,  $100\times$  物镜分别为  $2\text{mm}$  和  $0.2\text{mm}$ 。

2. 显微镜使用前的检查 显微镜使用前需检查各部分零件是否完整合用, 镜面是否清洁。使用后用绸布擦干净, 物镜偏于两旁, 避免与集光器碰及, 放入大箱中。

3. 正确取镜 取镜时应一手握镜臂, 一手托住底座, 不可斜提, 防止目镜从镜筒中滑出。

4. 避免镜头与被检物体直接接触 使用高倍镜和油镜时应尽可能用盖玻片, 以免腐蚀镜头。用毕应先移开镜头, 再除去标本, 以免触及镜头。

5. 镜检与绘图 镜检以左眼为宜, 两眼务必同时睁开, 如果右眼闭合, 则易疲劳, 不久会感到头眩。左眼观察时, 右眼睁开, 并同时观察和绘图。

## 二、其他光学显微镜

### (一) 暗视野显微镜

暗视野显微镜以丁达耳效应为基础, 利用特殊的集光器, 不使照射被检物体的光线直接射入物镜。因此可以利用被检物体表面散射的光线来观察普通明视野显微镜下所看不到的微粒子, 所以实际上是在暗视野中见到明亮的物象。这样, 活的透明微生物细胞用暗视野显微镜观察效果较好。

使用暗视野显微镜时, 要在聚光镜与载玻片之间滴加香柏油, 让其充满, 否则照明光线于聚光镜上面全面反射, 照射不到

被检物体，从而达不到暗视野照明的目的。另外要把聚光镜焦点对准物体，首先要使聚光镜的光轴与物镜的光轴严格调到一直线上，需要进行中心调节和调焦。第三是调节焦点时，要考虑载玻片与盖玻片的厚度，因为暗视野集光器的 $N.A.$ 大，焦距较短，过厚的被检物体无法调到集光器的焦点处。所以载玻片厚度不大于 $1.0\sim 2.0\text{mm}$ ，盖玻片厚度在 $0.1\text{mm}$ 以下。同时载玻片应特别清洁，无伤痕，以免散射光线。

### 〔实验1-2〕暗视野显微镜的使用

1. 将光源调至最亮，使用明视野集光器，开大光圈，用低倍观察，视野应均匀明亮，然后换暗视野集光器，提升集光器至距载物台 $0.5\text{cm}$ 处，仔细滴加一大滴香柏油。

2. 将待检载玻片标本放于载物台上，仔细上升聚光器，使油滴刚好与载玻片表面接触而不外溢。

3. 用 $10\times$ 物镜进行观察，视野中出现圆形光环，若集光器与物镜光轴不一致时，光环就偏离视野中心，此时应用两根中心调整螺杆调整合轴。若被检物体不在集光器焦点处，进行合轴调整后，圆形光环的中央仍然是黑暗的，这时要进行调焦，上下调动集光器，使视野心呈现圆形亮点而背景全黑。

4. 在盖玻片上滴加香柏油，换上油浸镜后，调焦至视野中发现发光的标本。

## （二）相差显微镜

人的眼睛能够分辨光波（颜色）和振幅（亮度）的差异。显微镜下观察的物体，大都是由于光波、振幅的改变，致使物体表面的明暗不同。微生物细胞的染色主要是改变了光波波长，因而易于观察。但染色的结果是使细胞的内部自然结构受到破坏，不利于对微生物的正确观察，透明的物体不能改变振幅和波长，只能使光波的相位发生改变，而人的肉眼却无法分辨光波相位的差异。相差显微镜就是将透过反差极小的标本的光分解成相位不同的直射光和衍射光，使这两种光相互干涉，即能观察到有明暗之分的物象的一种显微镜。它与普通光学显微镜外型相似。主要差别有

两点：即使用的物镜是相差物镜和具有环状光圈的集光器，相差物镜内安有相板，物镜镜筒上一般都刻有红色或绿色 ph 字样。相差集光器常见的是转盘集光器，上面装有不同的环状光圈，转盘前面有标记，表示位于集光器下面的光圈种类。如标记 10×，表示应与 10× 的相差物镜配合使用，40× 即与 40× 相差物镜配合使用等。另有标为 0 的，表示没有环状光圈，即作一般集光器使用。

使用相差显微镜重要的是将相板和光阑的光轴同轴，否则效果就差。

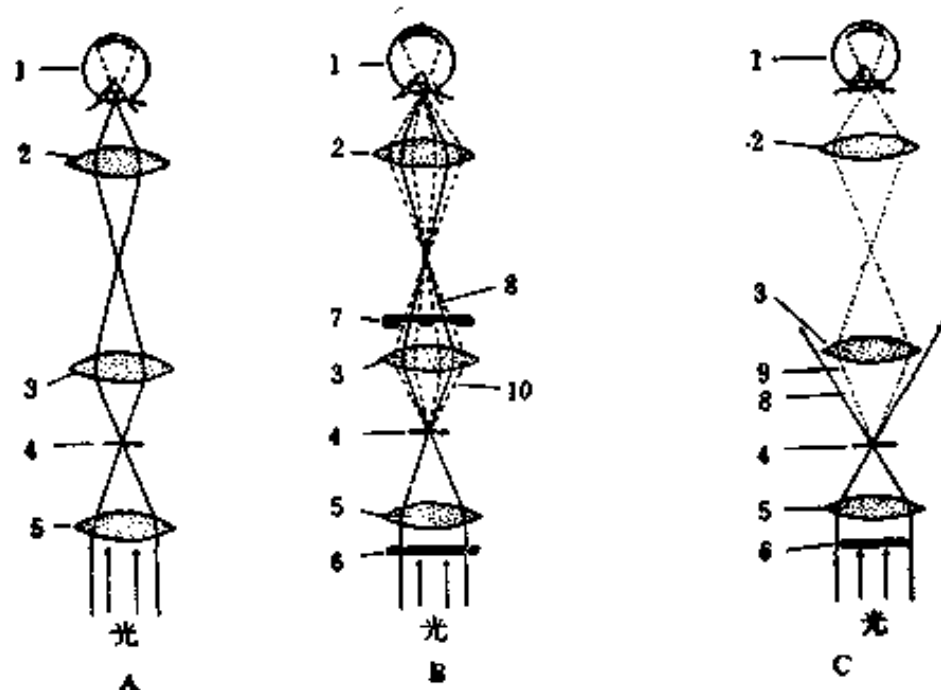


图 1-5 各种光学显微镜光路图的比较

A. 明视野 B. 相差 C. 暗视野

1—目镜 2—目镜 3—物镜 4—标本 5—集光器 6—暗视野光阑  
7—环状光阑 8—直光 9—散射光 10—受阻碍

### 〔实验1-3〕相差显微镜的使用

1. 装上转盘集光器，并安上相差物镜，在滤光片架上安放好滤色片，一般用绿色。
2. 配好相差物镜及相应光阑，将标本放在载物台上。
3. 按明视野显微镜的操作步骤，调光，调焦，看到清晰的物象。
4. 拔出普通目镜，换上合轴调整望远镜，一边看望远镜，一边旋转外筒使它升降，对准焦点就能看清亮环和圆环。用固定螺丝固定外筒，进



图 1-6 相环和环状光阑

图 1-7 合轴调整

A. 不合轴 B. 合轴

行中心调节。如果两个圆环不能完全重合而有误差，则使聚光器左右侧的两个调节螺栓进行精密的调节，使两者完全重合。若亮环与圆环还不重合，应上下移动集光器调节。

5. 拔出望远镜，插入普通目镜观察。注意每次更换标本或改变不同倍数的相差物镜时，都必须重新进行调节。

相差显微镜的使用与暗视野显微镜有一些相似处，如载玻片和盖玻片的厚度，使用油浸相差物镜时，要使集光器也浸油等。

### (三) 荧光显微镜

荧光显微镜与普通显微镜不同之处主要有(1)独特的光源系统。荧光显微镜的光源通常采用功率为150~200W的高压汞灯，经激发后发射丰富的紫外光和蓝紫光。(2)激发荧光滤光片。它安装在显微镜台下的聚光镜与光源之间，主要有两种：一种是紫外光滤板(UG)，主要透过275~400nm的波段光，按其透光范围又可分为UG<sub>1</sub>及UG<sub>2</sub>，后者透光范围又比UG<sub>1</sub>广，荧光强度也大。UG滤板常辅以蓝色滤板，以消除残余红光。另一种蓝紫光滤板(BG)，主要透过330~480nm的波段光。适用于观察细菌标本，但不适于观察有自发荧光的组织标本。此外尚有一套吸收滤板，放在接目镜的前面或后面，其作用是不让紫外线、蓝紫光通过而允许荧光通过，使标本在暗的背景上出现荧光。吸收滤板有OG(橙黄色)和GG(淡绿色)型，透光波段范围是410~650nm。(3)荧光显微镜具备明视野及暗视野两种集光器。明视野集光器透度大而背景较亮，对比较差，故主要适用于低放大倍数的组织

学切片；使用暗视野集光器则背景暗，反差大，高放大倍数的荧光物象清晰。因此放大倍数较高、荧光弱的标本也可观察。集光器又可分为干系和油浸系，干系不需滴油，使用方便。用于低倍及中倍放大标本的观察；油浸系用于细微结构高倍观察。

常用于荧光显微镜检验中的荧光染料有金胺、中性红、吖啶橙、阿的平、异硫氰基荧光黄（FITC）、罗丹明（RB200）等。

#### 〔实验1-4〕 荧光显微镜的使用

##### （一）实验材料

1. 荧光显微镜
2. 洁净载玻片
3. 0.01%吖啶橙水溶液
4. 待检细菌：如大肠杆菌

##### （二）操作步骤

1. 按实验2-1制备菌涂片（菌体量需很少，否则影响观察），干燥、固定，吖啶橙染色。
2. 打开荧光显微镜电源，标本片置载物台上。
3. 打开钨丝灯光源调焦距和位置。
4. 关闭普通光源，换上荧光源，插入滤光片，在视野中即可见到发射橙色荧光的菌体（使用油浸系时需光源与标本片之间滴上荧光显微镜专用油）。

### 三、电子显微镜

电子显微镜为非光学显微镜，但它的基本结构和光学显微镜却相似，其不同点是用高速的电子束代替了光束，以磁场10、11、12代替了透镜（6-目镜，4-物镜，2-集光器）。电子枪射出的高速电子束经过磁会聚透镜10，使电子束会聚照射在标本上，经过磁场物镜11形成放大像，再经过中间投像镜12进一步放大投射在荧光屏或照相底片上。

由于电子具有类似光波的波动特性，但波长极短，仅为可见光波长的十万分之一，所以电子显微镜的分辨率比光学显微镜要大得多。目前电镜放大倍数已达一百万倍以上，分辨力已达1Å



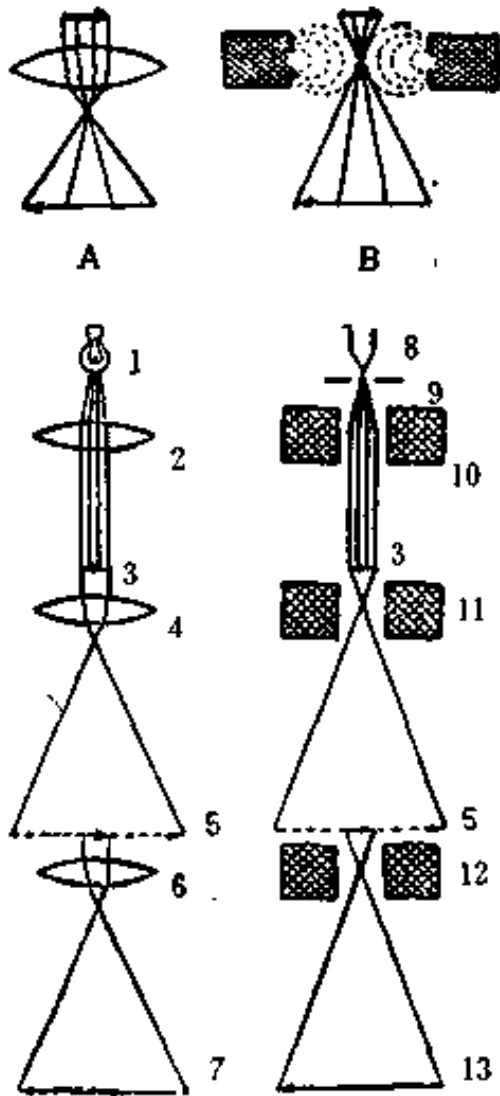


图 1-8 电子显微镜的基本结构(B)和光学显微镜(A)比较

1—照明灯 2—集光器 3—标本  
4—物镜 5—物像 6—目镜 7—眼睛  
8—阴极 9—阳极 10—磁合聚透镜  
11—磁场物镜 12—中间投像镜 13—荧光屏

支持膜的铜网上，再行旋转投影或负染色，【电镜观察。常用的支持膜有碳膜、火棉胶膜和聚乙烯醇缩甲醛膜等。

#### (一) 实验材料

1. 新鲜纯化的大肠杆菌质粒DNA，浓度大于 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 。
2. 细胞色素C母液在1ml双蒸水中溶解10mg细胞色素C，在 $4^{\circ}\text{C}$ 下放置数日，使其中杂质沉淀，以 $0.22\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤器过滤除菌，校正蛋白浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$  ( $A_{410}=10$ )。

3.  $0.25\text{mol}/\text{L}$ 乙酸铵溶液1.82g溶于80ml水中，定容至100ml。

以下，所以是分子水平的各项研究中的得力工具。

电子显微镜常有透射和扫描式两类，透射式电镜的放大倍数高，分辨力高。扫描式的特点是可以观察较厚的标本，且扫描出来的图象具有立体感。

#### (实验1-5) 质粒DNA的透射电镜观察

核酸电镜研究中最常用的方法是由Kleinschmidt于1968年提出的蛋白质展膜技术，其基本原理是利用许多碱性球蛋白（如细胞色素C）可以在低盐溶液或蒸馏水表面形成不溶性变性薄膜，在蛋白质浓度与所取蛋白质溶液的体积相配时，便可制成充分伸展的蛋白质分子网，使其表面的核酸分子也同时被拉开，伸展在蛋白质分子网的表面，使核酸的形态与结构保持一定的完整性。展膜之后，将核酸分子捞到

4. 5mol/L氯化铵溶液26.75g溶于80ml水中，定容至100ml。
5. 90%及无水乙醇。
6. 1~2%火棉胶乙酸异戊脂溶液。
7. 0.5%聚乙烯醇缩甲醛 (Formvar) 氯仿溶液。
8. 铂、铜网、烘箱、真空镀膜机、真空喷涂机、1~500V。
9. 透射电镜。

## (二) 操作步骤

1. 支持膜的制备 常用的质粒 DNA 分子支持膜主要有火棉胶膜、Formvar膜和碳膜，现分别介绍如下：

### (1) 火棉胶膜的制备

① 取干净铜网一张置直径10cm的圆筒形容器的底部，滴加蒸馏水于其表面；

② 加一滴1~2%火棉胶溶液，几分钟后用毛细管吸去蒸馏水后便得。

### (2) Formvar膜的制备

① 取干净载玻片插入0.5% Formvar氯仿溶液中5~10s；

② 镊子取出载玻片；

③ 吸去多余的液体，然后置空气中充分干燥；

④ 用刀片切去周边少许，将玻片缓缓插入蒸馏水中，使玻片两面的膜离散而浮于水面；

⑤ 将干净的铜网轻轻放于膜上捞出膜，再盖上一层滤纸；

⑥ 用镊子轻轻去掉滤纸，60℃烘箱烘干后便得。

### (3) 碳膜的制备

① 按火棉胶膜的制备步骤制备火棉胶膜；

② 用真空镀膜机在其上镀一层薄的碳膜；

③ 置乙酸异戊酯中溶去火棉胶；

④ 将干净的铜网轻轻放于膜上捞出碳膜；

⑤ 烘干便得。

## 2. DNA溶液展层及DNA分子固定

(1) 取一直径9cm的干净培养皿，斜放成25°角；

(2) 注满融化的石蜡，置室温中冷却；

(3) 放平培养皿，取一干净的载玻片置蜡表面；

(4) 加入10ml左右的0.25mol/L乙酸铵溶液，此液为下相；

(5) 取25ng纯化的质粒DNA, 加入5 $\mu$ l 5mol/L氯化铵、5 $\mu$ l 1mg/ml 细胞色素C, 用水补足到50 $\mu$ l, 混匀, 此为上层DNA溶液;

(6) 将此上层DNA溶液滴于载玻片上, 溶液沿载玻片缓缓地流到下层乙酸铵溶液的表面, 此时立即展开成一薄层;

(7) 用镊子持覆盖有支持膜的铜网与展开的质粒DNA溶液轻轻接触;

(8) 用滤纸轻轻吸去铜网上多余的液体;

(9) 将带有DNA的铜网用90%及无水乙醇脱水各10~30s, 60 $^{\circ}$ C烘干;

(10) 用真空喷涂机喷上一层铂微粒。

### 3. 透射电镜观察DNA分子

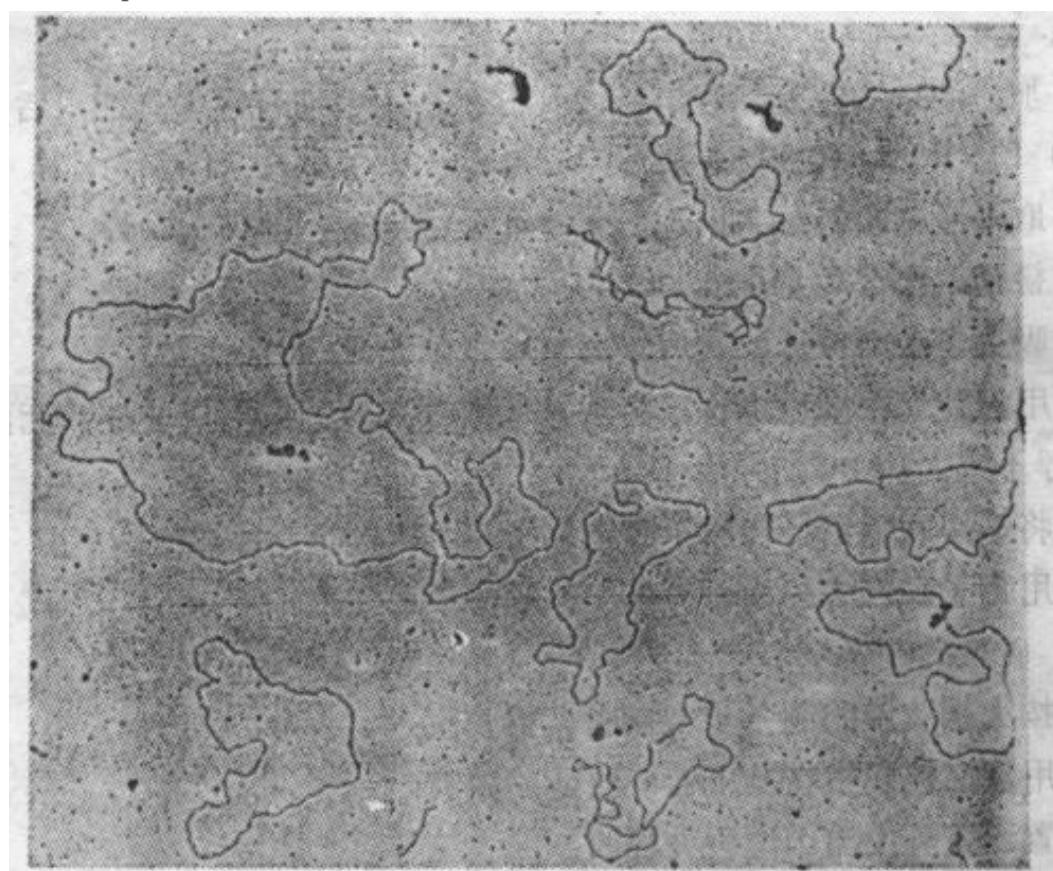


图 1-9 质粒DNA的透射电镜照片(照片中有两种不同分子量的质粒)

### 【实验1-6】酵母细胞的扫描电镜观察

#### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母斜面
2. YEPD

酵母膏

10g

蛋白胨	20 g
葡萄糖	20 g
水	1000ml
pH6.0	

25ml分装250ml三角烧瓶, 高压灭菌。

3. 无菌生理盐水 (0.9% NaCl)
4. 4% 锶酸固定液(用蒸馏水配制)
5. 恒温振荡器
6. 水平式离心机
7. 铜网 (已覆盖Formvar膜)
8. 封口胶 (Parafilm) 或蜡纸
9. 扫描电镜

### (二) 操作步骤

1. 取1环酿酒酵母培养物接入25mlYEPD中, 20℃, 150r/min 16~18h,
2. 取5ml培养液离心洗涤并用无菌生理盐水悬成 $10^8$ 个/ml.
3. 取1小滴菌悬液加于封口胶上.
4. 将铜网反扣在菌悬液上, 室温, 30min.
5. 取生理盐水加于封口胶上成一排液滴, 将铜网依次反扣以洗涤.

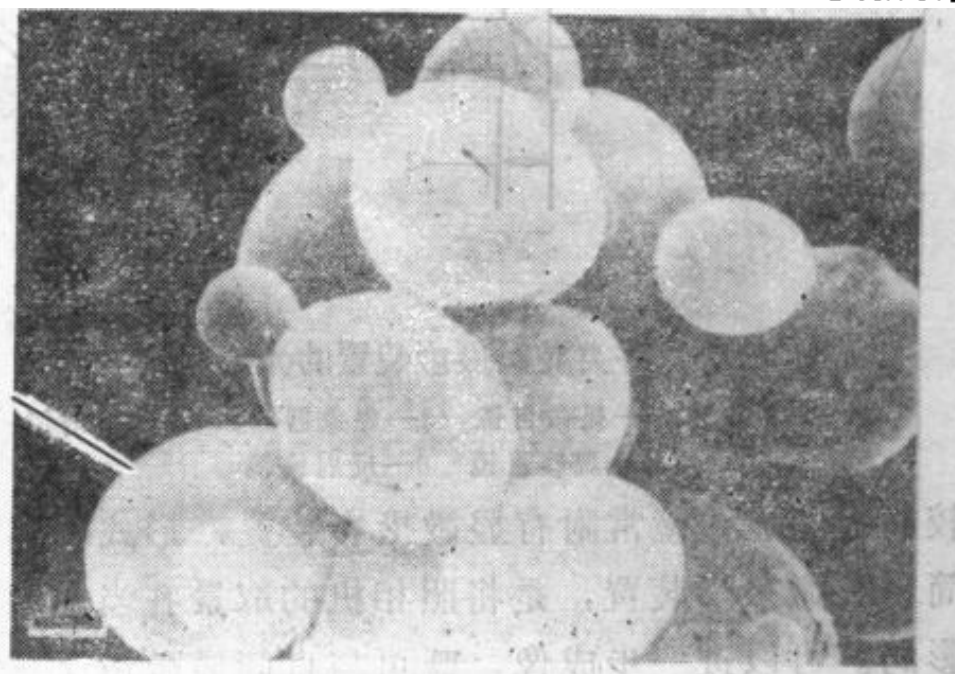


图 1-10 酿酒酵母扫描电镜照片 (10000×)

6. 凉干.

7. 取1小滴固定液于封口胶上，将铜网反扣其上，室温2h。
8. 同步骤5洗涤铜丝。
9. 凉干。
10. 扫描电镜观察。

## 第二节 显微摄影

显微镜摄影是以摄影方式记录显微镜中观察到的物象的一种方式。它的摄影原理与普通照相机类似，但摄影镜头是显微镜的目镜和物镜。也可以想象为显微摄影装置就是观察显微镜时的眼球，视网膜就是相机的底片。所以显微摄影必须包括显微镜和没有普通照相镜头、但有观象器的照相机。各类显微摄影装置简单的光路图如图1-11。

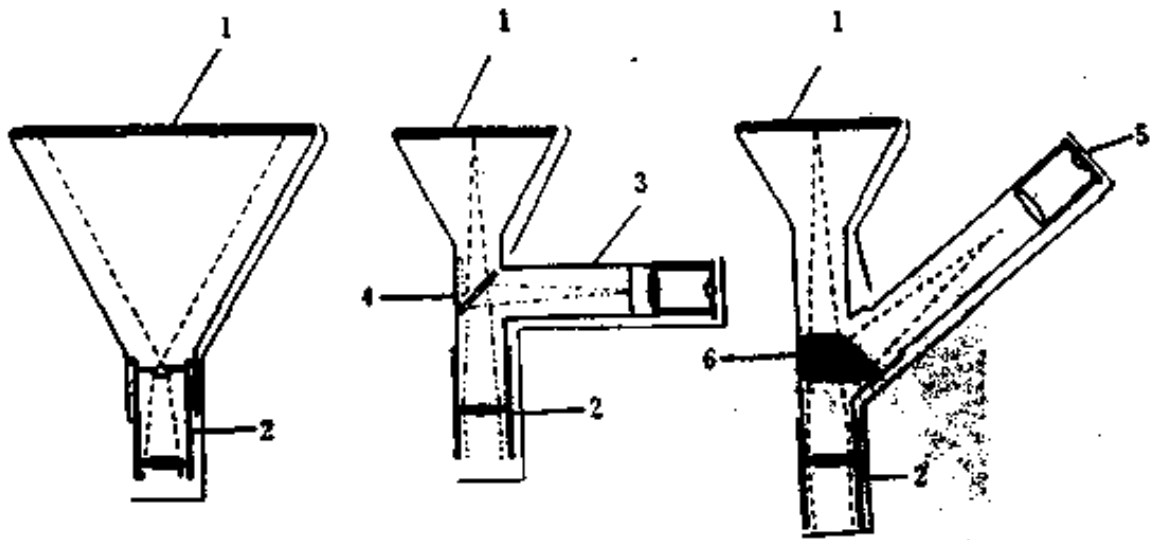


图 1-11 各类显微摄影装置的光路简图

1—感光底片 2—显微目镜 3—观象器 4—可动反射镜  
5—观察目镜 6—反射棱镜

比较高级的显微镜常附有显微摄影装置，形式各异，但原理类似。简易显微摄影装置，是将照相机的取景孔当作观像器进行显微摄影的。可以进一步成像，既可与直筒显微镜又可与斜筒显微镜配合使用。所谓进一步成像是指观像清晰后一按快门就拍成像，而具观像器的需经光路转换再按快门成像，所以称二步成

像。

物像拍摄完毕，以后的过程与一般摄影过程类似，即需将感光底片显影和定影，以及进一步印放成照片。

显微摄影比一般观察显微镜的操作和一般摄影要求要高。因为对采光、制片、清晰度、反差等都有相当要求。就是显微操作也有区别，因为显微摄影底片往往需要较高的反差。

在有关的微生物研究中还有菌落摄影，实际上就是我们日常摄影中的放大摄影。它可以用普通的照相机接上近摄接圈进行拍摄。但拍摄菌落时采光和调焦的要求很高。目前实际上带镜头和近摄接圈的简易显微摄影装置已兼有显微摄影和菌落摄影的双重功能，效果良好。

#### **〔实验1-7〕显微摄影、菌落摄影和凝胶摄影**

##### **(一) 实验材料**

1. 具有良好反差的染色菌体载玻片和长有巨大菌落的培养皿及已经染色的凝胶。

2. 100W乳白照明台灯2~3座。

3. 显微镜及具观像器显微摄影装置或简易显微摄影装置（附照相镜头和近摄接圈）。

4. 135mm 8定或21定胶片，3号或4号放大纸。

5. 显影和定影试剂

(1) 米吐尔(硫酸对甲氨基苯酚)：显影甚快，反差很弱，因此不能单独使用，常与几奴尼配合使用。

(2) 几奴尼(对苯二酚)：显影速度慢，反差强。若要求反差强时，该试剂用量可加大。

(3) 碳酸钠，硼砂：是显影作用的促进剂。

(4) 亚硫酸钠：又称硫养。是减少显影剂氧化的保护剂，又可防止大苏打被酸分解，它本身是一种还原剂。

(5) 溴化钾：它具有抑制显影作用，能防止未曝光的溴化银产生灰雾。

(6) 大苏打(硫代硫酸钠)：能除去感光不足或未感光的乳白色卤化

银，使底片透明，是定影的主要成分。

(7) 28%的醋酸：能使底片乳剂中的显影剂停止显影。

(8) 钾矾(硫酸钾铝)：在热天显影能防止底片药膜松胀，具有坚膜作用。

## (二) 操作步骤

1. 具观像器的显微摄影装置(例如Meopta显微摄影装置)操作步骤：

(1) 放置好显微镜，将要摄影的载片放在载物台上，对光，观察。

(2) 取下目镜，插入专用目镜，将观像器套在镜筒上，旋紧固定。

(3) 将装有底片的配套照相机壳插入观像器上端筒内，旋紧固定。

(4) 两根快门线分别装在观像器和机壳的规定孔内。

(5) 按动观像器快门，打开显微镜通向观像器光路，调节细调旋钮，使物像清晰。

(6) 关闭显微镜通观像器光路，即自行开启通往照相机壳光路。

(7) 按上照相机壳快门曝光。一般曝光时间应视所用底片感光度，标本染色方法和放大倍数等而定。用8定黑白片，放大100倍左右，用一般染色方法，约曝光8~60s，若采用油浸镜就要20~240min。

(8) 取下机壳(可以连续拍摄36张)，在暗室取出底片冲洗。

2. 简易显微摄影装置显微摄影

(1) 放置好显微镜，将要摄影的载玻片放于载物台上，对光，观察。

(2) 取下照相机镜头，装上外套筒，取出显微镜目镜，将外套筒套在镜筒上，将目镜插回镜筒。

(3) 将装有底片的照相机壳的外套筒套到外套筒上，旋紧固定。

(4) 将快门线装到机壳快门上，通过照相机取景器观察，调光，调焦。观察清楚满意之后，按快门一定时间，使底片曝光。

(5) 取下机壳(可以连续拍摄36张)，进暗室取出底片冲洗。

用带显微摄影装置的显微镜进行显微摄影更方便，这里就不加复述。

3. 菌落摄影和凝胶电泳摄影

(1) 将简易显微摄影仪的机壳或DF型机壳倒装在固定架上，将三盏照明灯分别放置在左、右、前方，要求被照物光照均匀。

(2) 将待照培养皿或已经染色的电泳凝胶放置中央，打开皿盖，将近摄接圈和镜头接上，一并安装到照相机壳上。

(3) 在取景器上观察，通过调节相机高度和近摄接圈长短等，使物像大小和清晰度都满意为止。

(4) 将镜头光圈调到11，速度快门调到B门，一般8定底片曝光约8~11s。

(5) 可连续拍摄36张，也可中途剪断，在暗室中取出底片冲洗。

若想拍摄的菌落具有立体感，可通过调节光线照射角度、亮度等获得。若需拍摄资料，也可仿此进行。

#### 4. 核酸电泳紫外摄影

(1) 将简易显微镜摄影仪的机壳倒装在固定架上，将照明灯打开。

(2) 将待照已电泳完并经溴化乙锭染色的凝胶置中央，将近摄接圈和镜头接上，并一并安装照相机壳上，相机配置一个红色滤光片。

(3) 在取景器观察，调节相机高度及近摄接圈长短，一直到物像大小和清晰满意为止。

(4) 关闭照明灯，打开紫外灯。

(5) 光圈位于5.6，快门为B门，一般8定底片曝光时约为10~30s。

溴化乙锭为强致癌剂，操作时需戴手套，核酸电泳紫外摄影装置见图

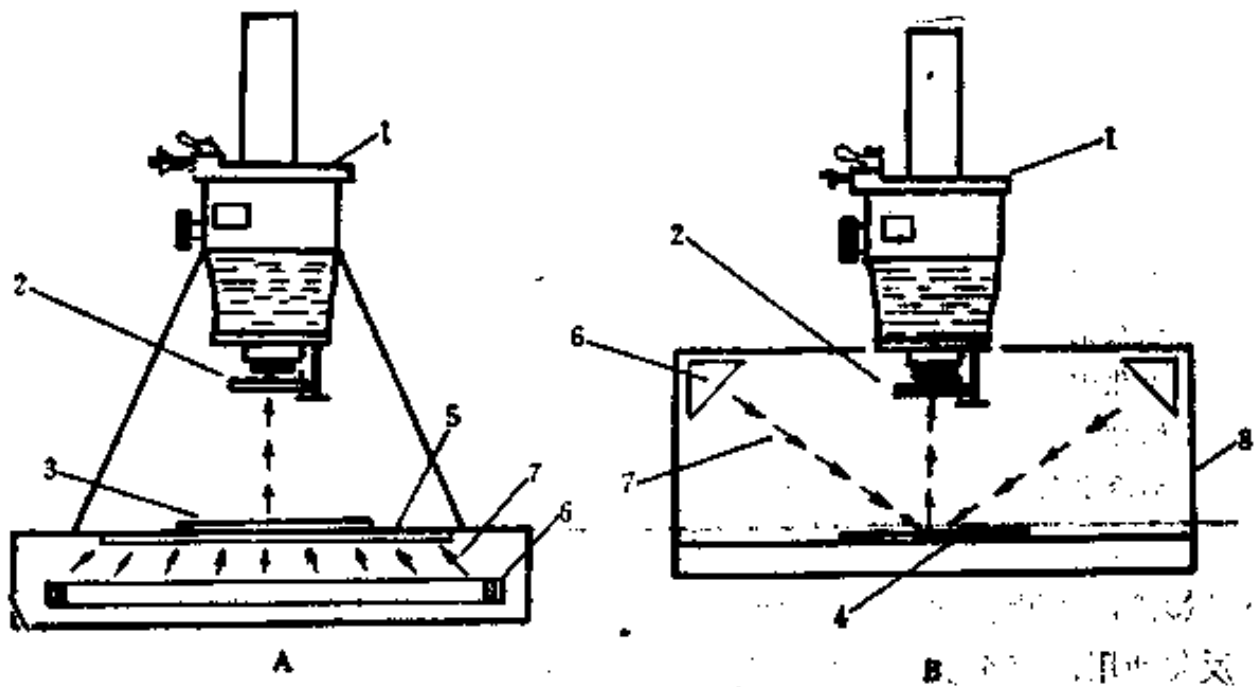


图 1-12 核酸电泳紫外线摄影示意图

A. 透射式 B. 反射式

1—照像机 2—红色滤光片 3—凝胶 4—凝胶(铺在黑纸上)

5—紫外线滤板 6—紫外灯 7—紫外线 8—箱壁



1-12.

5. 显影 底片拍摄完成, 应在暗室中冲洗。一般21定全色片需在暗绿色光下冲洗, 而8定黑白片则可在红光下进行。

(1) 显影液的配制: 一般D-76、D-72显影粉有市售, 也可自配。但特殊的显影液需自配。配制时应注意水温不能超过52℃, 以免发生化学反应。药剂要按次序加入, 待一种溶解后再加入下一种。这也是为了防止产生有害的化学反应。显影液的配方见表1-1。

(2) 显影: 将显影液温度保持在18~20℃, 可将显影液冲稀一倍后使用, 也可不冲稀, 但反差较大。冲洗正常反差片, 常用D-76显影, 若要加大反差可用强反差或D-72显影液。将显影液放入1000ml塑料杯中, 21定底片和8定底片可分别在暗绿色或红光下操作。先将底片用18~20℃的水浸润, 然后放入显影液中, 不断游动底片, 一般6~8min显影即完成。然后放于清水中冲漂片刻, 再放到定影液中定影。也可采用显影缸冲洗, 此时需将底片在暗室及暗袋中卷入显影片架, 放入显影缸内, 然后在亮处倒入

表 1-1 各种显影液的配方

药 剂	显影液名称及药剂用量(g)		
	强反差	D-76	D-72
水(52℃)	500ml	500ml	500ml
米吐尔	1.0	2.0	3.1
硫养	75.0	100.0	45.0
儿奴尼	9.0	5.0	12.0
碳酸钠	25.0	—	67.0
溴化钾	5.0	—	1.9
硼砂	—	2.0	—
加冷水至	1000ml	1000ml	1000ml

显影液, 不断转动, 待6~8min后, 显影完成。将显影液倒回棕色瓶内, 可反复使用, 直至颜色变深棕色, 即表示药效消失, 需重新配制。加入清水洗去剩余的显影液, 倾去。

6. 定影 显影后, 部分未见光显影的乳白色卤化银必须洗去成透明, 使显影部分保持下来, 这时的底片就是负片, 定影液一般都采用F-5酸性坚膜定影液, 药剂有市售, 也可自配。配方如表1-2所示。

表 1-2

定影液配方

药 剂	用 量 (g)
水(52°C)	600ml
大苏打	240.0
亚硫酸钠	15.0
28% 醋酸	48.0ml
硼酸	7.5
钾矾	15.0
加冷水至	1000ml

配制步骤如显影液。

定影时，定影液温度维持在18~20°C，放在大号塑料杯或盘中，将已显影，并用清水已冲洗过的底片放入，不断搅动，一般10~20min即可。此时乳白色的药膜已消失，成透明基底的底片。定影初期也应在显影灯光下工作，后期可见普通光。

7. 清水漂洗 清水漂洗约1~2h，凉干，即可印放照片。

8. 照片印放 照片的印放原则与底片同，但均在红光下操作。由于用135mm底片拍摄的底片很小，所以应进行照片放大，如底片图像已够大小，就可直接印相。但采用哪号放大纸(或印相纸)需依实际情况而定。印相或放大纸皆有各种反差，即谓软硬，其特性如下(表1-3)：

表 1-3

不同号码感光纸特性

感光纸号码	1	2	3	4
反差	极弱	弱	中常	强
显影速度	极高	高	中常	低
适用的底片	反差强	正常	平淡	很平淡

所以一般应用时可用2号纸，也可备用3号纸，但用于照相制版时，应采用3号或4号纸以增加反差。但反差一大有缺点，层次差了，所以有些时候得凭经验而定。

### 第三节 放射自显影

放射自显影主要用于微生物学中大分子物质的自显影检测，经标记有放射性同位素的大分子可使感光材料感光而留下痕迹。目前常用的标记同位素有 $^{32}\text{P}$ ， $^3\text{H}$ ， $^{35}\text{S}$ ， $^{14}\text{C}$ ， $^{131}\text{I}$ 等，标记方法有活体内掺入标记和体外的缺口平移法、转录法及末端标记法。自显影法不仅检测灵敏，分辨高，而且可在不损伤样品的前提下，产生自显影图像(图1-13)。自显影曝光法参见图1-14。

#### 〔实验1-8〕硝酸纤维素滤纸上标记DNA的放射自显影

##### (一) 实验材料

1. X-光胶片
2. 新华滤纸
3. 包装薄膜
4. X-暗盒
5. 已经杂交好的硝酸纤维素滤纸(带有标记DNA)

##### (二) 操作步骤

1. 将需进行放射自显影的硝酸纤维素薄膜放在一张干净的滤纸上，用包装薄膜包好，或用两张铝箔将其夹在中央，放入暗盒内。

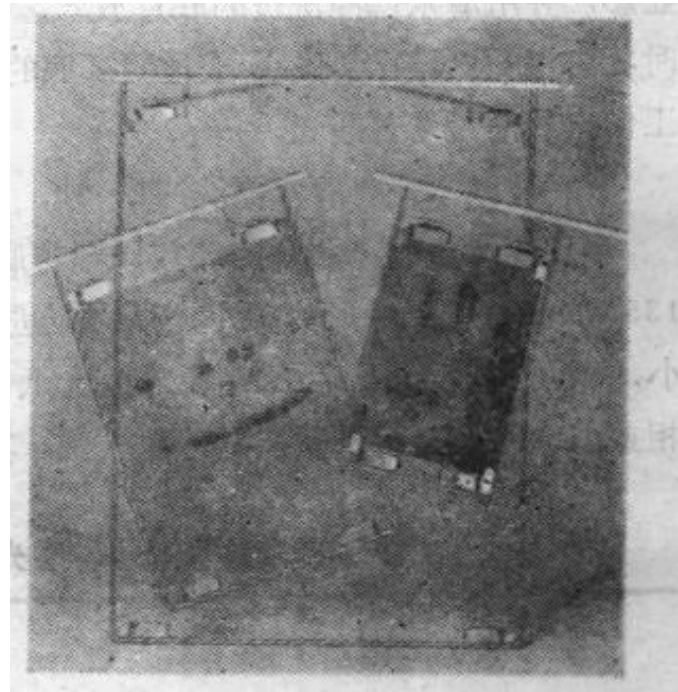


图1-13 自显影图像

2. 在暗室中取一张X-光胶片盖在NC上，固定。
3. 曝光数小时至数日。
4. 取出底片，冲洗过程参见显微摄影节。或在下述X光胶片显影液中显影2~4min；

---

水，50℃	800ml
米吐尔	2.2g

---

续表

亚硫酸钠	72 g
对苯二酚	3.8 g
无水碳酸钠	48 g
溴化钾	4 g
加水至	1000ml

5. 在1.5%醋酸中停显1min。
6. 在定影液中定影20min(配方见表1-2)。
7. 胶片用清水冲洗20~60min, 凉干。

注意事项: 要增加底片的感光程度, 可采用加增感屏的方法, 置 $-70^{\circ}\text{C}$ 曝光, 可使检测灵敏度增高。增感屏为磷钨酸钙板, 使用时光面须朝胶片。



图 1-14 同位素标记膜放射自显影曝光法

1—磷酸纤维膜 2—X-光胶片 3—增感屏

## 第二章 工业微生物基本形态及观察

在自然界，微生物到处存在，其数量之大，种类之多是非常惊人的。在食品和发酵工业中遇到的不仅有有益微生物，还有有害的微生物。有的微生物要利用，有的又要抑制，因此认识微生物是非常重要的。发酵和食品微生物主要涉及有细菌、放线菌、噬菌体、酵母、霉菌和食用真菌等。一般讲，它们的细胞、菌丝形态都很小，必须凭借显微镜的帮助才能看清，象噬菌体还得用电子显微镜才能看清楚。但它们的群体，如菌落、噬菌斑是肉眼可见的。本章将展示各种微生物的细胞形态的照片、模式图，以利实验和研究中对照。它们的观察方法也附于后。

### 第一节 细 菌

细菌是单细胞微生物，形体很小，大多直径或宽度小于 $1\mu\text{m}$ ，需要用油浸镜才能观察清楚。

细菌的基本形态有球状、杆状和螺旋状三种(见图2-1、2-2)。



图 2-1 球菌

1—双球菌 2—链球菌 3—葡萄球菌 4—八叠球菌  
5—四联球菌

典型细菌的细胞结构包括核质、细胞质、核糖体，内含颗粒、间质、细膜胞、细膜壁、纤毛、鞭毛和荚膜等细胞结构(图2-3)。

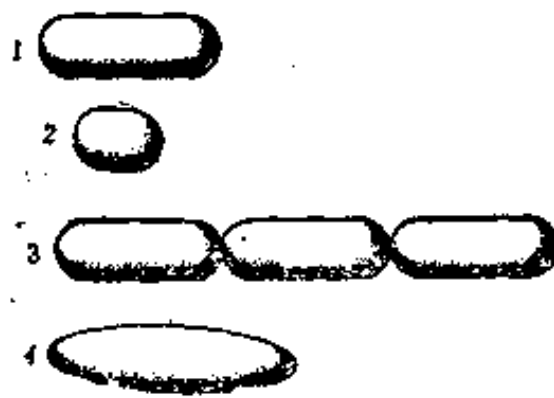


图 2-2 杆菌

1—长杆菌 2—短杆菌 3—链杆菌 4—尖端杆菌

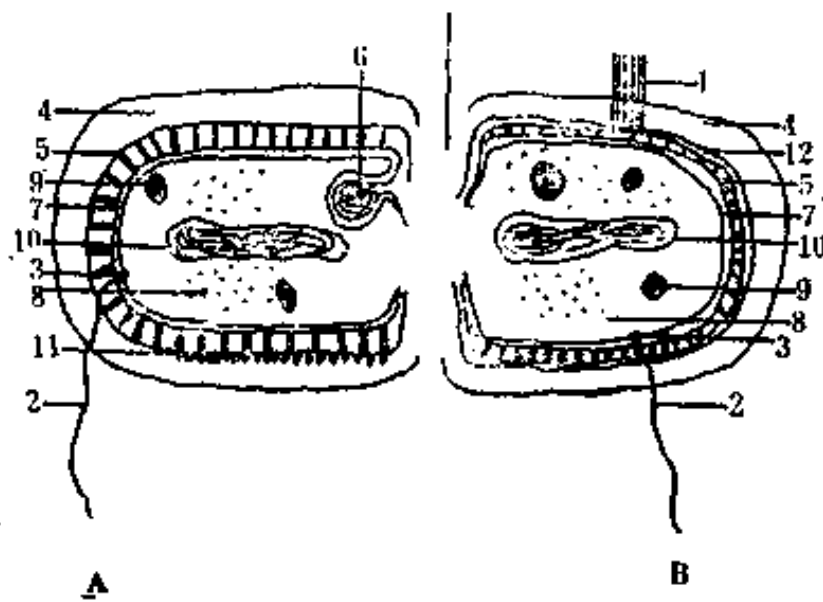


图 2-3 典型细菌细胞结构

A. 革兰氏阳性菌 B. 革兰氏阴性菌

1—纤毛 2—鞭毛 3—基粒 4—荚膜 5—肽聚糖层  
6—间质 7—细胞膜 8—核糖体 9—内含物 10—核  
区 11—表面蛋白 12—脂质双分子层

细菌的繁殖是典型的一分为二的繁殖。但革兰氏阴性菌和革兰氏阳性球菌的裂殖有所不同，特别是表现在细胞壁的合成上（图2-4）。

按照细胞分裂的方式及分裂集合方式不同，就形成了细菌细胞的多种形态。

细菌单以菌落形态分类是很困难的，因为同一形态的菌落可以是许多种不同的菌。但在平皿和斜面上，明胶穿刺培养和液体表面生长上还有一些差别。

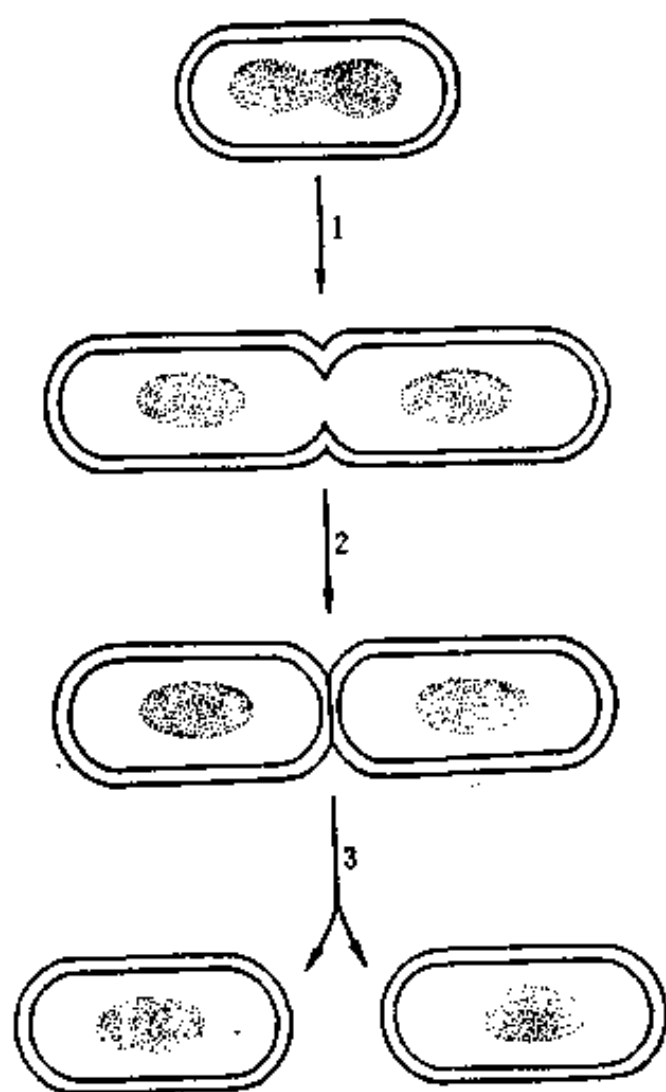


图 2-4 细菌的繁殖

1—核体延长并分裂，细胞鞘开始向内生长 2—二细胞间隔膜开始形成 3—细胞分开

### 〔实验2-1〕细菌形态的观察

由于细菌的个体形态很小，所以只有用油浸镜才能看清外形。但是用活细胞直接观察是有困难的，因为此时物像没有反差。为此观察细菌细胞形态就必须用简单染色。

进行简单染色首先得“固定”，所谓固定是对细胞进行适当加热或用化学药剂凝固细胞内蛋白质，这样细胞就被杀死了。进行染色后就能详细地观察研究它们。缺点是细胞的自然结构多少起了改变，不能完全如实反映其真实面貌，但就一般的试验而言，也无须过高要求。常用的染料是碱性染料，如结晶紫、次甲基蓝和蕃红等，它们常与性质上是酸性的细胞物质相结合。这些染料或溶于蒸馏水，或溶于乙醇；染的时间一般为30~60s。然后将涂片水洗、干燥和镜检。应说

明，这种染料通常是观察细胞的形状和排列状况，对于细胞、芽孢和荚膜等则不适用。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 肉汁培养基上培养48h的细菌。

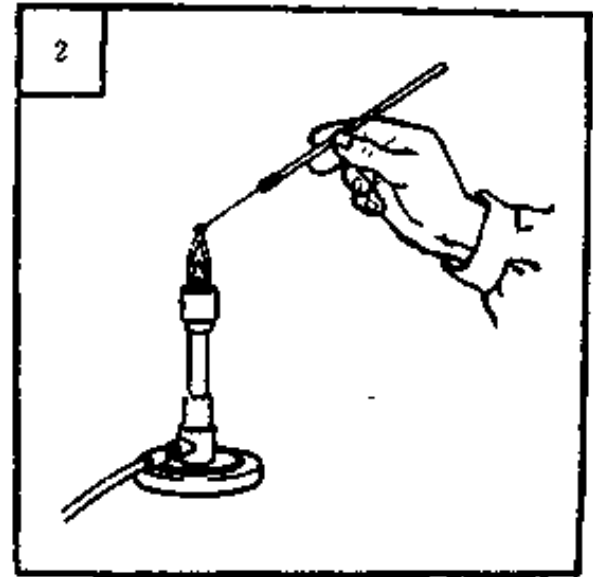
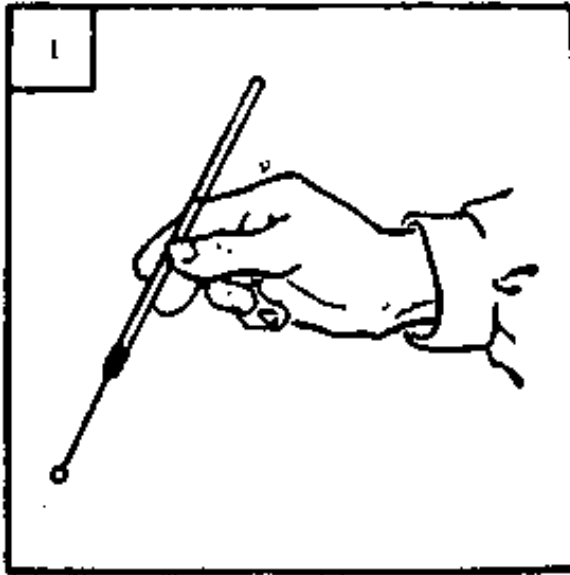
2. 染色液 常用的染色液有两种。

(1) 草酸铵结晶紫：结晶紫2g溶于20ml 95%酒精中，草酸铵0.8g溶于80ml蒸馏水中，两液混合，静置48h后使用。

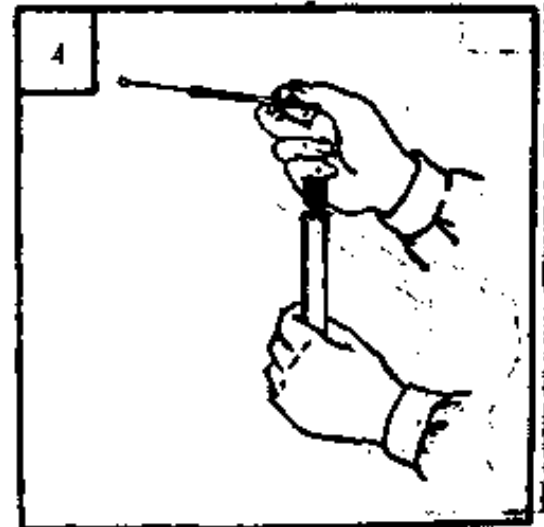
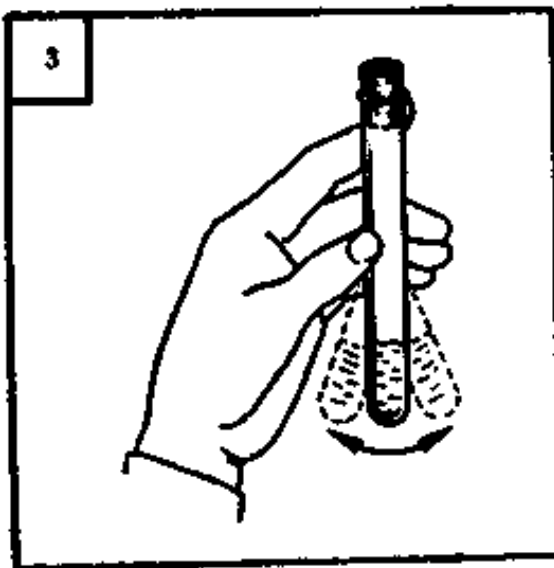
(2) 蕃红液：蕃红2.5g溶解在95%酒精100ml中。

3. 器具 显微镜，接种针，载玻片，盖玻片，吸水纸，擦镜纸，香柏油，二甲苯等。

## (二) 操作步骤

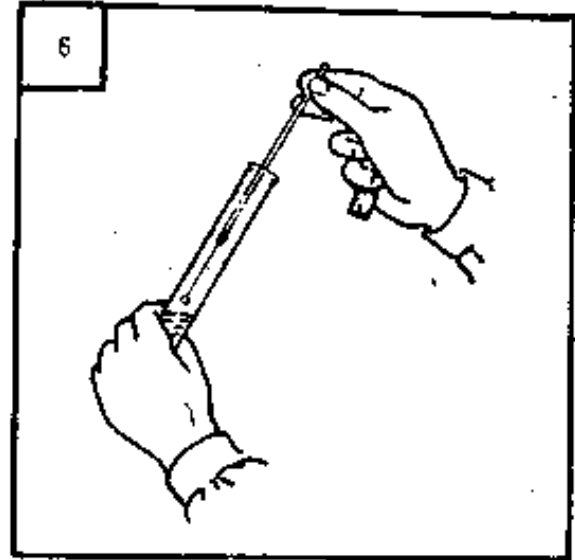
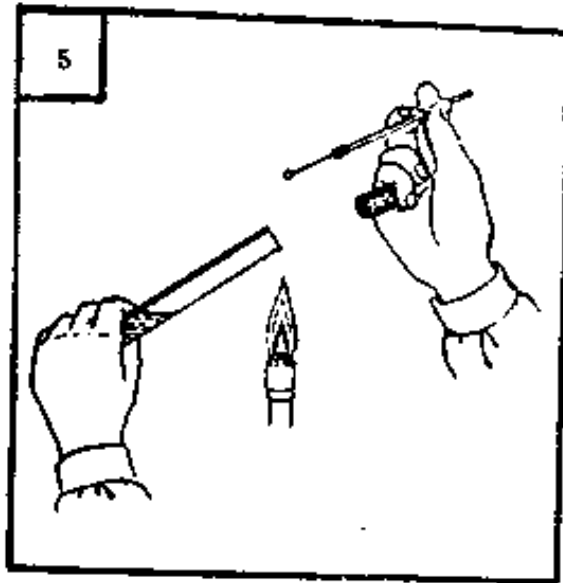


1. 用大拇指、食指和中指夹紧接种环。
2. 火焰加热，由环前端烧至末端进行杀菌，尤为针杆连接处。然后迅速将接种环前端金属部分加热，使进入培养试管部分处于无菌状态。

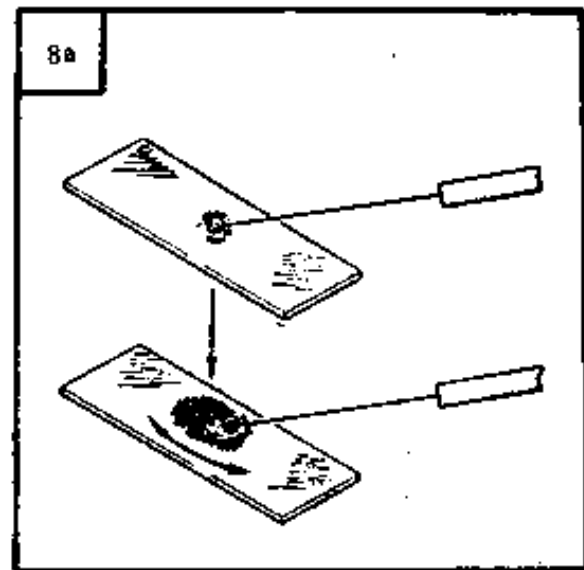
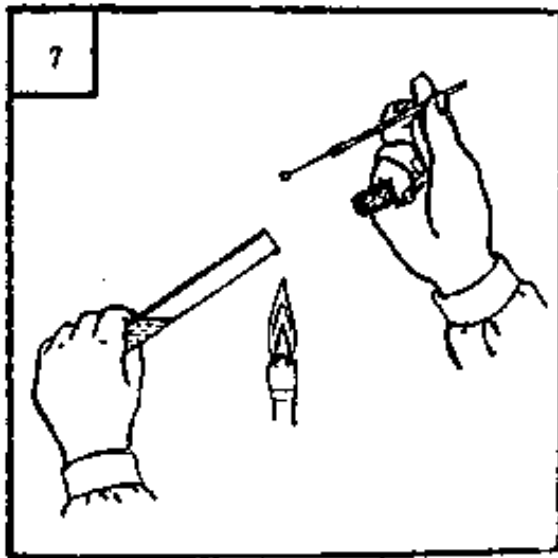


3. 左手取出培养试管，左右摇晃使菌体均匀。
4. 右手用无名指和小指夹出管塞。

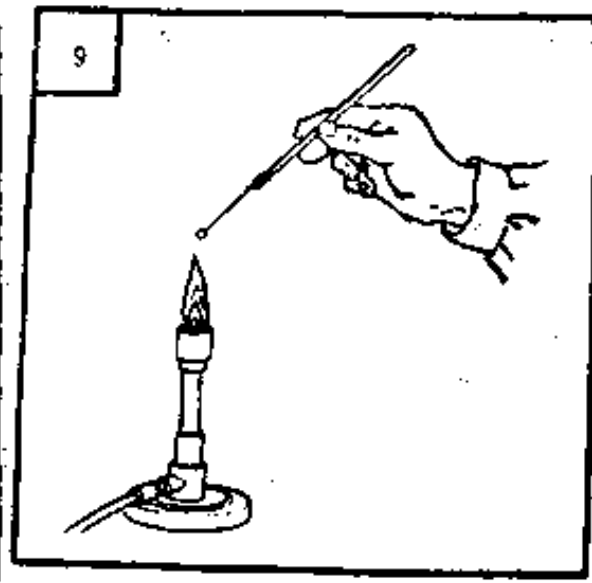
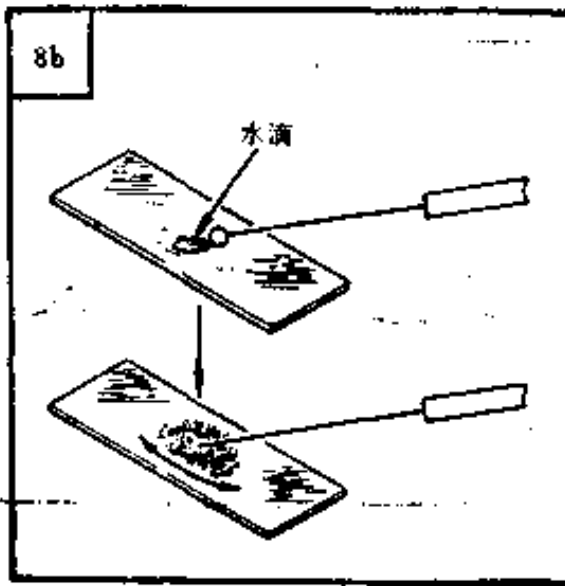




5. 在火焰边迅速通过，将试管口置于火焰无菌圈内。
6. 将无菌接种环插入，立即取出少量菌液。

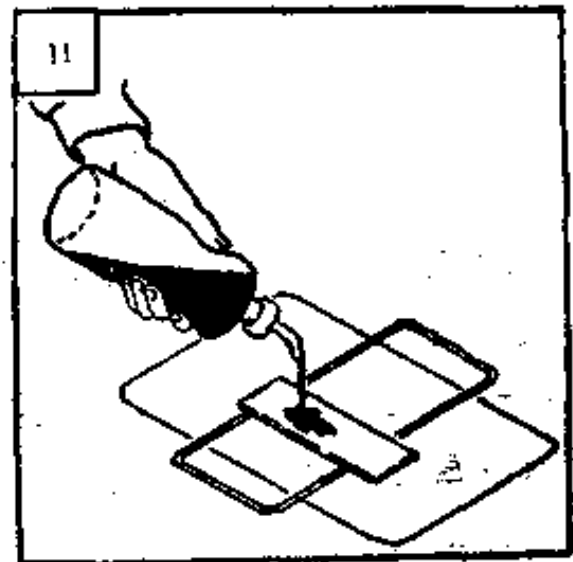
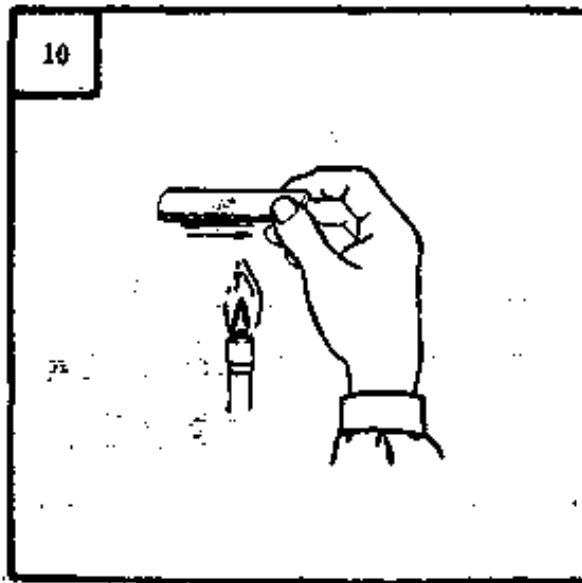


7. 试管接近火焰，塞入试管塞，并将试管放回原处。
- 8a. 自液体培养基取出菌液即可，用接种环在载玻片当中涂布，让其风干。



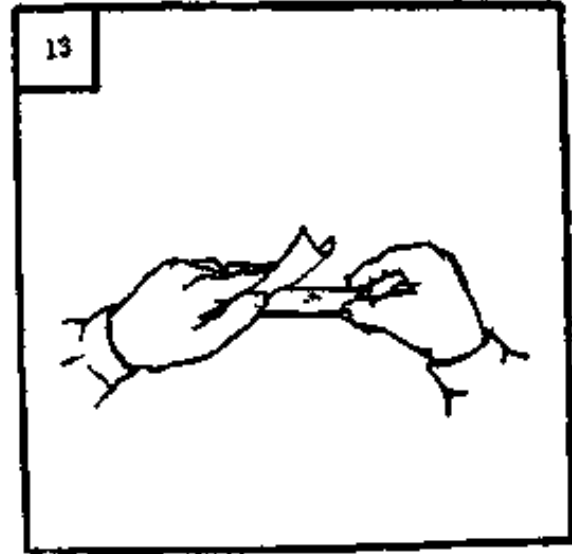
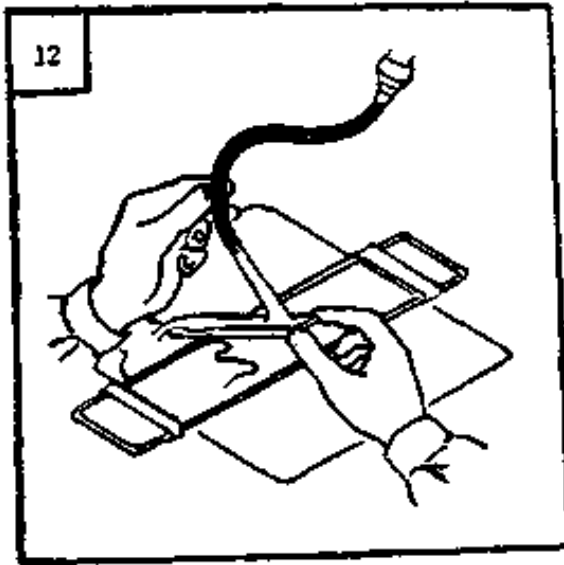
8b. 若自斜面挑出菌体，应在载玻片中央滴一滴无菌水，然后涂布让其风干。

9. 接种环在火焰上再加热，杀死所有剩余细胞。



10. 左手持载玻片，在火焰上方左右通过几次，让其固定。

11. 盖上染色液保持30~60s。



12. 用清水缓缓冲洗，洗去多余染色液。

13. 用吸水纸吸去多余水分，风干进行镜检。

14. 镜检 先用低倍镜对好光源，把要观察的部分置于视野中央，再旋转油镜头，左眼观察，右手作图。观察结束，用擦镜纸轻轻擦去油镜头上的香柏油，再用清洁擦镜纸沾少许二甲苯，擦油镜头，然后用擦镜纸将多余二甲苯擦去，将显微镜放回原处。载玻片可用一般滤纸擦去多余香柏油，然后滴上数滴二甲苯，将剩余香柏油溶解，再用吸水纸吸干，然后将此载玻片再用肥皂或去污粉洗净，备用。

## 第二节 放 线 菌

放线菌的菌体由菌丝体组成，菌丝体包括着生在培养基表面的气生菌丝和着生在培养基内部的营养菌丝。气生菌丝发育到一定阶段发展成孕育菌丝，以不同方法产生孢子。而营养菌丝一般以吸收营养为其职能。放线菌的菌丝很细，其宽度与细菌类似，也在 $1\mu\text{m}$ 以下，但其长度比细菌要长得多，所以在形态上有类似霉菌的地方。放线菌的菌丝体呈各种颜色，真菌落紧密也很小，表面呈绒毛粉状或颗粒状。

放线菌中最重要的一类是链霉菌，它们的生长发育过程如图2-5。

孢子丝进一步发育,在隔膜完全形成后,孢子就单独出来了。



图 2-5 链霉菌气生菌丝和孢子链形成过程

- 1—游离孢子 2—营养菌丝 3—气生菌丝生长 4—螺旋开始  
5—螺旋完成 6—孢子分隔形成 7—孢子连接处壁增厚变圆  
8—孢子成圆形 9—成熟释放

孢子丝的形状有直形、波曲、螺旋、轮生之分,螺旋有松、紧和大、小之分。这些都是放线菌分类的重要依据。

#### 〔实验2-2〕放线菌的形态观察

和细菌一样,放线菌也需单染色观察,但用埋片法有时不染色,用的染色液与材料和细菌相同,这里不复述。

操作步骤:

##### (一) 营养菌丝的观察

1. 用接种铲将长有菌落的培养基一并挑出,置于载玻片中央。
2. 用另一块载玻片将其压碎,弃去培养基制成涂片,干燥、固定。
3. 另用美蓝或结晶紫染色30~60s,水洗,干燥,油镜观察。

##### (二) 气生菌丝、孢子丝及孢子的观察

1. 将培养3~4天的链霉菌培养皿打开,在显微镜下用低倍镜观察菌落边缘,直接观察气生菌丝和孢子形态(分枝情况、卷曲情况等)。

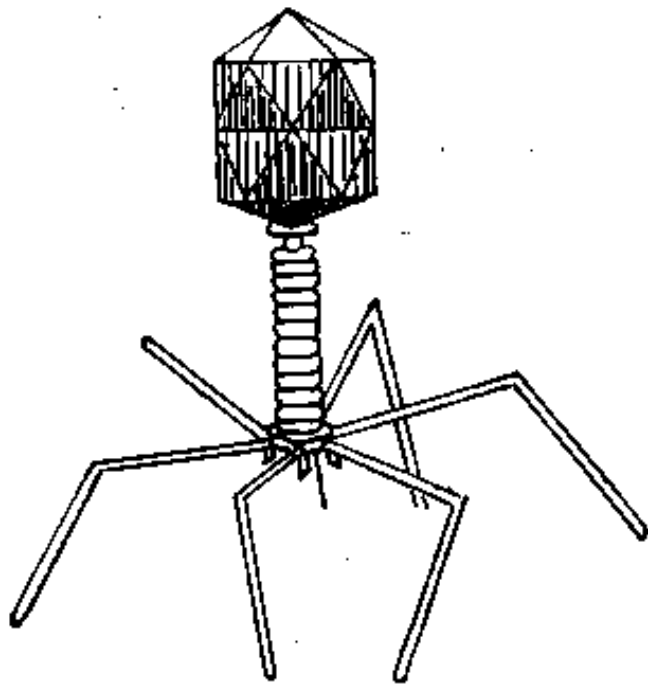


图 2-7 噬菌体的外型

没有完整的细胞结构，仅由蛋白质外壳和包含在头部的核酸组成，所以它非得与它的宿主并存时才能生长发育。但是一种噬菌体并不能感染所有的微生物，它们对宿主有专一性，有的甚至有很强的专一性。所以发酵工业上污染噬菌体后，常以换用菌株为其治理的重要措施之一。

噬菌体溶解宿主后在固体培养基上常形成透明的斑点，称噬菌斑（图2-8）。噬菌斑形状因噬菌体种类而异，图2-9是几种基本形状，其大小可自

菌斑形状因噬菌体种类而异，图2-9是几种基本形状，其大小可自

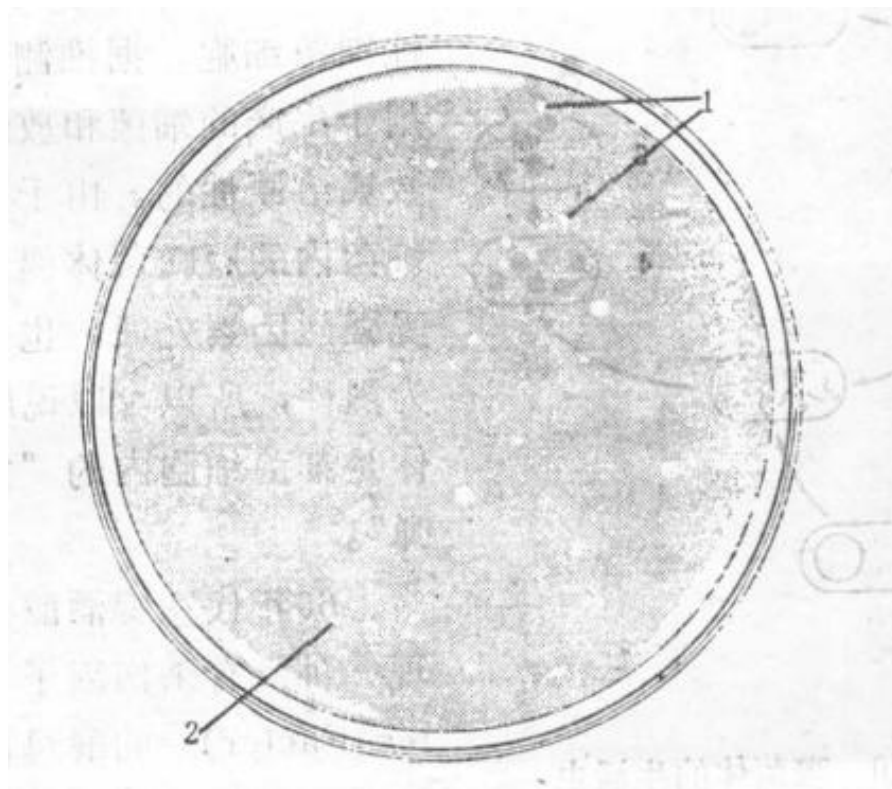


图 2-8 噬菌斑形成

1—噬菌斑 2—敏感菌株



图 2-9 噬菌斑的基本形态

白色部分表示因溶菌而透明，黑色部分表示菌体生长。无论何种形态，均有边缘清晰与否之分。1—透明 2—浑浊 3—浑浊的中心部位透明 4—有一圈菌生长的环 5—中心部位有菌生长点 6—为4和5的混合形式 7—在中心部位有针孔状菌落。

针头大小至直径10~15mm。和其他微生物一样，噬菌斑大小也和培养基组成、pH、琼脂浓度、菌龄、菌数和培养温度及时间有关。就是同一条件下也有差异。

噬菌体在宿主细胞中的生长繁殖可分为吸附、侵入、增殖、成熟和释放5个阶段，如图2-10。值得注意的是自然界的噬菌体有两大类：一类是烈性的，一类是温和性的。其中温和性噬菌体侵入细菌后可能会和宿主细胞“和平共处”，将自己的DNA嵌入

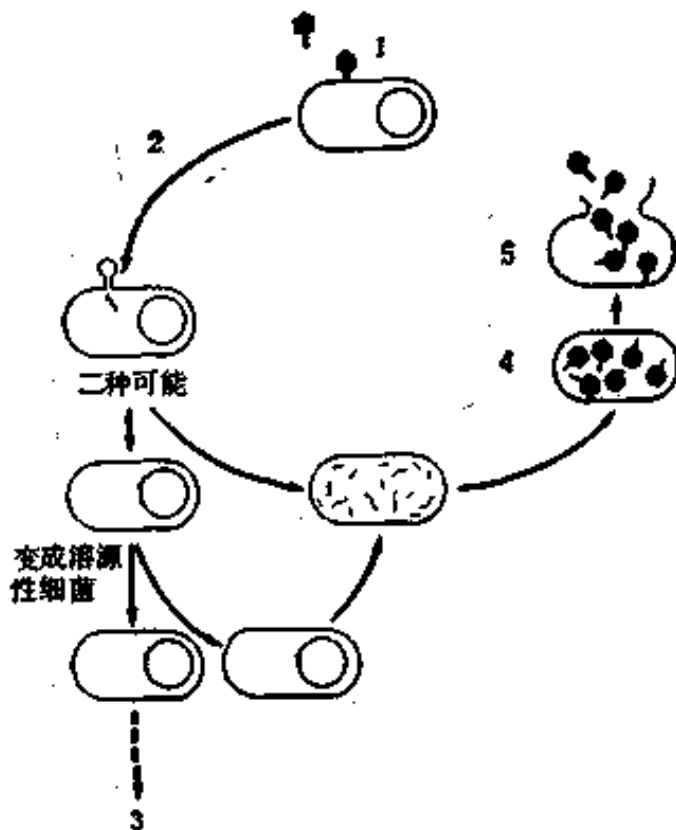


图 2-10 噬菌体的生活史

1—吸附 2—侵入 3—繁殖  
4—成熟 5—释放

宿主DNA中，而形成原噬菌体。这种细菌细胞就称溶源性细菌细胞。据推测，目前用于生产的细菌和放线菌多数属溶原性的。由于溶原性细菌内的原噬菌体偶尔特别受强烈因素处理，也会转变为烈性，所以说原噬菌体是细菌细胞内的“定时炸弹”。

60年代在啤酒酿造中发现一种具有杀伤因子 (Killer Factor) 的酵母能杀死培养的酵母，结果引起发酵时间延长，使啤酒产生怪味。

这种杀伤因子是双股RNA类病毒粒子(VLP),其直径约33~40nm。它能使寄主细胞具有产生和分泌一种对其他的敏感株有杀伤活力的多肽性毒素的能力。中性菌株既不能分泌毒素,又对毒素不敏感。具有杀伤因子的酵母株对同种毒素有免疫力。这类病毒的存在引起毒素分泌的特性属细胞质遗传。在发酵工业上可以选育一些具杀伤因子而发酵正常的酵母菌株,以这类酵母进行发酵,可以杀死污染的敏感型野生酵母。

### (实验2-3) 噬菌体的分离与纯化

#### (一) 分离的基本原理

1. 噬菌体对宿主的高度专一性,从而利用此宿主作为敏感菌株去培养和发现它们。

2. 根据噬菌体对其宿主的裂解可在含敏感菌株(宿主)的琼脂平板上出现肉眼可见的噬菌斑,而且一个噬菌体产生一个噬菌斑。

#### (二) 实验材料

以分离谷氨酸产生菌的噬菌体为例。

1. 宿主菌种 谷氨酸产生菌斜面30℃培养18~24h。

2. 培养基 肉汤蛋白胨培养基:牛肉膏0.5g,蛋白胨1g,葡萄糖1g,氯化钠0.5g,水100ml, pH7.0~7.2,上层培养基加琼脂0.6%,下层加琼脂2%, 103.4kPa, 灭菌20min。

3. 器具 吸管,培养皿,抽滤瓶,玻璃刮棒,三角瓶,恒温水浴,蔡氏细菌过滤器,真空泵。

#### (三) 操作步骤

##### 1. 分离

(1) 制备菌悬液:取宿主斜面,加入肉汤培养基5ml,将斜面菌体刮入,制成菌悬液。

(2) 噬菌体的增殖:取工厂阴沟污水20ml,加入100ml肉汤培养基及宿主菌悬液2ml,30℃下静置培养24h。

(3) 噬菌体裂解液的制备:将上述培养基在2500r/min下离心15min,上清液通过滤膜过滤器过滤,并将滤液倒入另一无菌三角瓶内,在30℃下培养过夜,以作无菌检查。

(4) 噬菌体分离:将0.5ml与下层融化的肉汤固体培养基(50℃左右)混

合均匀，让其冷却凝固，将其裂解液1滴涂布一小区，此平板在30℃下培养过夜。若有噬菌体，可看见涂布区有蚕食状透明空斑，而其他区长满了宿主菌落。

2. 纯化：最初分离出来的噬菌体往往不纯，主要表现噬菌体的大小形态不一致，所以应予纯化。纯化方法有稀释法和划线分离法。

稀释法：

(1) 将含有噬菌体的清滤液用肉汁培养基逐级稀释，使成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 等5个稀释度。

(2) 取内径9cm的培养皿5个，每个培养皿倒入下层肉汁固体培养基10ml，凝固标记。

(3) 将装有4ml 5支上层肉汁半固体培养基试管作标记，并融化。在50℃左右温度下，各管分别加入0.1ml的宿主菌液和依次稀释的噬菌体液0.1ml，混合，对号倒入上述培养皿。

(4) 在30℃下培养10~24h，观察噬菌体形态、大小，仍可进一步纯化。

划线分离法：

(1) 用接种针穿刺噬菌斑，然后在营养琼脂平板上，象求得单个细菌菌落一样，用接种环划线分离。

(2) 覆盖含有指示菌的营养软琼脂，覆盖时将琼脂由未划线区向主要接种区慢慢扩散，切勿旋摇顶层琼脂。

(3) 30℃培养10~24h，观察噬菌斑形态及大小。

#### 〔实验2-4〕高效价噬菌体原液的制备

##### (一) 实验材料

1. 经单噬菌斑纯化的链霉菌噬菌体原液。

2. 链霉菌指示菌株的孢子。

3. 培养基

(1) 营养肉汤(DNB)：营养肉汤粉(Difco) 8g，蒸馏水1000ml。

(2) 营养软琼脂及营养琼脂培养基：为在DNB基础上添加5g/L及15g/L琼脂粉。

4. 500g/L葡萄糖溶液。

5. 1mol/L  $MgSO_4$ 溶液。

6. 0.8mol/L  $Ca(NO_3)_2$ 溶液。



7. 无菌5ml旋盖小瓶。
8. 无菌注射式滤器，内装孔径为0.45 $\mu$ m的硝酸纤维素滤膜。
9. 无菌10ml注射器、吸管等。
10. 30 $^{\circ}$ C培养箱，45~50 $^{\circ}$ C水浴。

### (二) 操作步骤

1. 在融化的营养琼脂培养基中补加无菌葡萄糖溶液至终浓度为0.5%并补加适量二价阳离子，二价阳离子使用浓度参见表2-1。在研究新噬菌体时，第一次可试用4mmol/L  $Ca^{2+}$ 。倾注小平板( $\phi$ 50mm)。

表 2-1 噬菌体增殖所需的二价阳离子

噬 菌 体	最终浓度(mmol/L)	
	$MgSO_4$	$Ca(NO_3)_2$
$\phi C_{31}$	10	8
$R_4$	10	25
$VP_4$	3	4
$VP_7$	6	6
$\lambda$	8	0
$\phi 448$	0	8
$Si_4, Pa16$	0	4

2. 取0.1ml噬菌体悬液，用DNB作 $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ 稀释。
3. 取0.1ml未稀释噬菌体悬液及系列稀释悬液置营养琼脂平板，每个稀释度做两块。
4. 将营养软琼脂培养基融化并冷至45 $^{\circ}$ C，加入链霉菌指示菌株孢子，混匀，取此0.8ml加至每个平板上，旋摇平板，使其覆盖整个培养皿。
5. 待凝固后倒置平皿，30 $^{\circ}$ C培养过夜。
6. 次日在几乎形成汇合噬菌斑的平皿上加入2.5ml DNB，使其浸没培养基表面。
7. 室温放置2h。
8. 取获上层培养液。
9. 经注射式滤器滤入5ml旋盖小瓶内。
10. 测定噬菌体效价并置4 $^{\circ}$ C贮存。

### 〔实验2-5〕溶原菌的鉴定

有少数噬菌体在感染宿主细胞后，噬菌体基因组整合到宿主菌的基因组内，随宿主菌的增殖而复制，不使宿主菌裂解，这种菌株叫做溶源菌。裂解还是溶源化，取决于感染细胞内宿主和噬菌体众多因素间极为复杂的平衡。溶源菌的溶源状态可自发终止或经物理化学方法(如紫外线、自力霉素)诱导而终止，行裂解过程。以 $\lambda$ 噬菌体为例，要实现溶源化时，由cII和cIII基因(它们的转录分别由 $P_R$ 和 $P_L$ 控制)编码的蛋白激活 $P_E$ 和 $P_I$ 启动子启动左向转录，使cI基因和int基因得以表达。cI基因的产物是早期转录的阻遏蛋白，因此它能阻止晚期基因的表达。int蛋白能识别细菌和噬菌体基因组上的att位点，催化两者间的断裂和连接，从而使病毒DNA插入宿主染色体中。cI、cII或cIII基因发生突变的噬菌体不能溶源化，所以形成清亮的噬菌斑。cI基因突变产生的温度敏感突变噬菌体，增殖时如温度条件允许cI基因产物保留其对 $P_L$ 和 $P_R$ 转录启动的阻遏能力，也能产生并维持溶源化。含野生型cI阻遏蛋白基因的原噬菌体经诱导也可进入裂解生长。通常的方法是通过宿主recA基因产物对cI基因产物切割，继后用DNA损伤剂处理。如果阻遏蛋白的活性被破坏，则 $P_L$ 和 $P_R$ 的转录随即恢复，合成一种xis蛋白，由其通过重建att位点，使原噬菌体DNA脱离宿主染色体，随后进入通常的裂解途径(图2-11)。

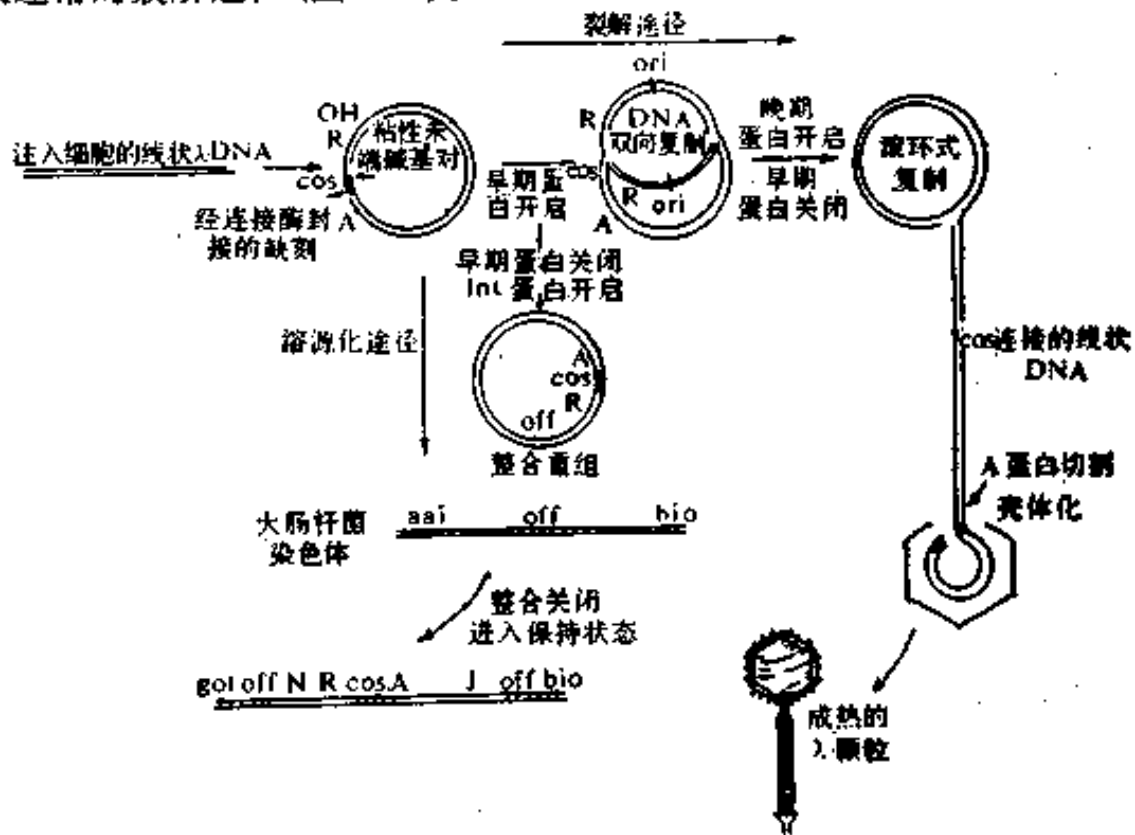


图 2-11  $\lambda$ 噬菌体的生活周期

双股线表示双链DNA，它们以线状双链形式进入宿主细胞

从自然界分离的或是保藏的菌种多半是溶源菌。溶源性的检查一般须有相应的敏感株。通过加热处理或抗体中和处理可分别去除溶源性芽孢杆菌和溶源性无芽孢杆菌培养物中混有的游离噬菌体。

#### (一) 实验材料

1. 苏云金杆菌指示菌株。
2. 待检菌株芽孢悬液
3. 肉汤培养基 牛肉膏0.5g, 蛋白胨1g, 氯化钠0.5g, 水100ml, pH7.2。固体培养基加20g/L的琼脂。
4. 80℃水浴, 紫外灯等。

#### (二) 操作步骤

1. 待检菌株芽孢悬液接入肉汤液体培养基中, 80℃处理10min。
2. 37℃培养18~24h。
3. 离心收获菌体, 用无菌生理盐水洗涤并悬浮成 $10^8$ /ml。
4. 倒入无菌空平皿中, 使成2mm厚的液层。
5. 打开皿盖, 在紫外灯下照射一定时间。
6. 将此作不同稀释度涂布于肉汤培养板上。
7. 覆盖含指示菌的软琼脂肉汤培养基(含琼脂0.5%)。
8. 培养过夜, 如有多量噬菌斑出现, 就证明该菌为溶源菌。

## 第四节 酵母菌

酵母菌是单细胞的微生物, 比细菌大得多, 宽度可在 $5\mu\text{m}$ 左右, 而长度有的可在 $10\mu\text{m}$ 以上。一些酵母菌自古就为人类造福, 最为人们熟悉的是酿酒、做馒头等。

酵母的细胞形态多样, 依种类不同而有差异, 通常有球形、椭圆形、卵圆形、柠檬形和腊肠形、菌丝形等(图2-12)。

酵母的细胞结构有细胞壁、细胞膜、细胞质, 内含颗粒, 但酵母有完整的核, 还有线粒体等, 它的内泡, 内含物更为明显(图2-13)。由于繁殖方法主要为芽殖, 所以还有出芽痕和诞生痕等。

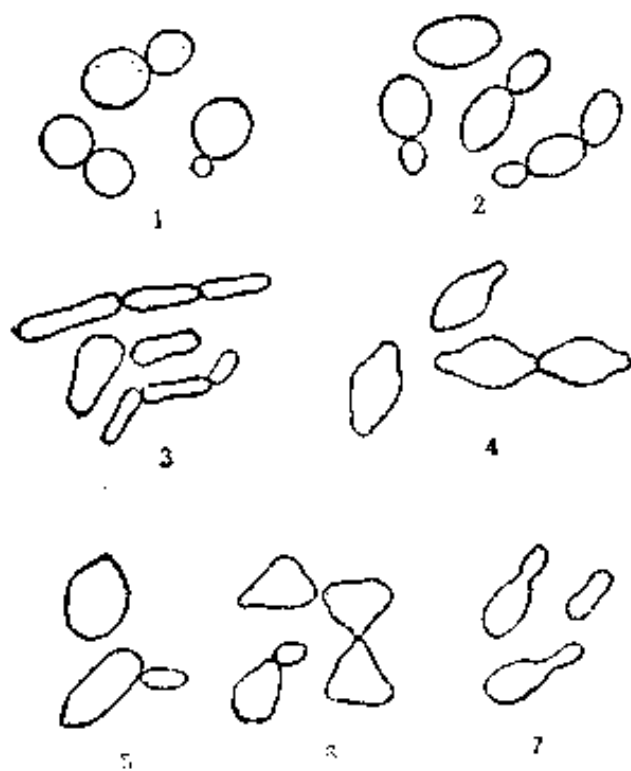


图 2-12 酵母细胞的形态

1—球形、卵形 2—椭圆形 3—梨形 4—柠檬形 5—尖  
头椭圆形 6—三角形 7—瓶子形

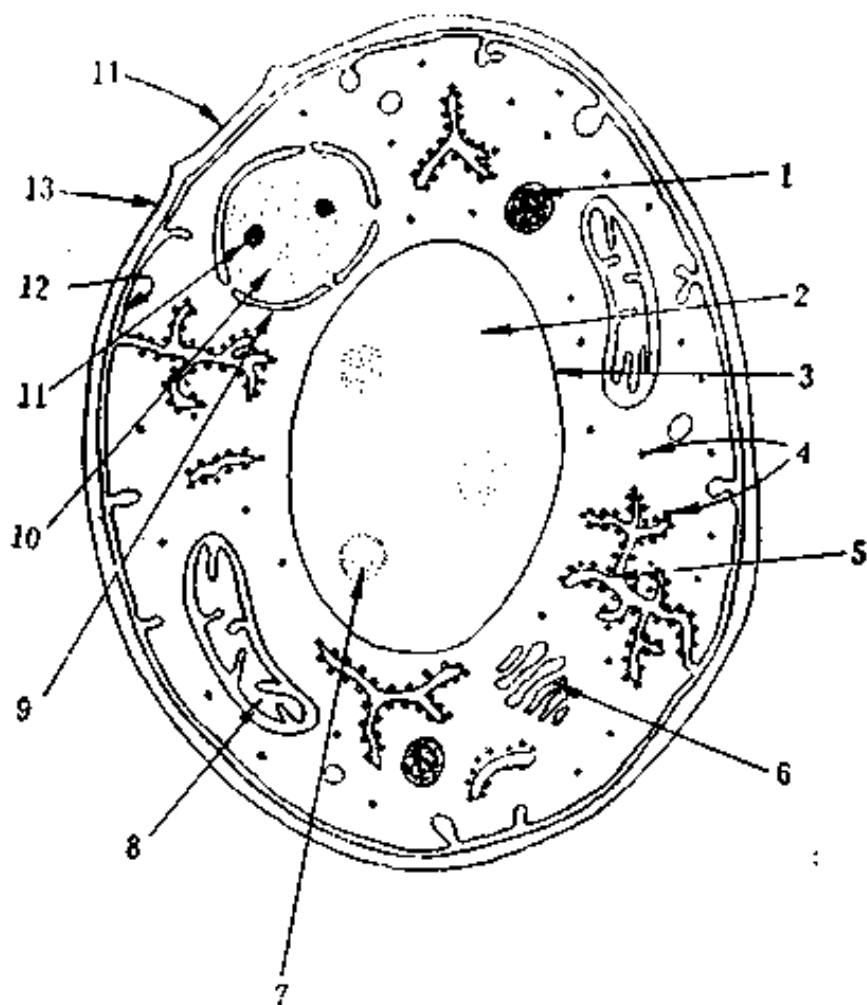


图 2-13 酵母的细胞内部结构

1—肝糖粒 2—液泡 3—液泡膜 4—核糖体 5—内质网 6—高  
尔基体 7—异染颗粒 8—线粒体 9—核膜 10—核质 11—核仁  
12—细胞质膜 13—细胞壁 14—芽生痕

酵母中不少酵母兼具有性和无性繁殖。酵母的无性繁殖有芽殖和裂殖两类，但主要的和典型的是芽殖；有性繁殖是产生子囊孢子，但并不为所有酵母所具有。

芽殖的特征是核的均等分裂。每个细胞产生的芽数并不相同，酿酒酵母每个细胞可产生40个芽，但以20个为多见(图2-14)。

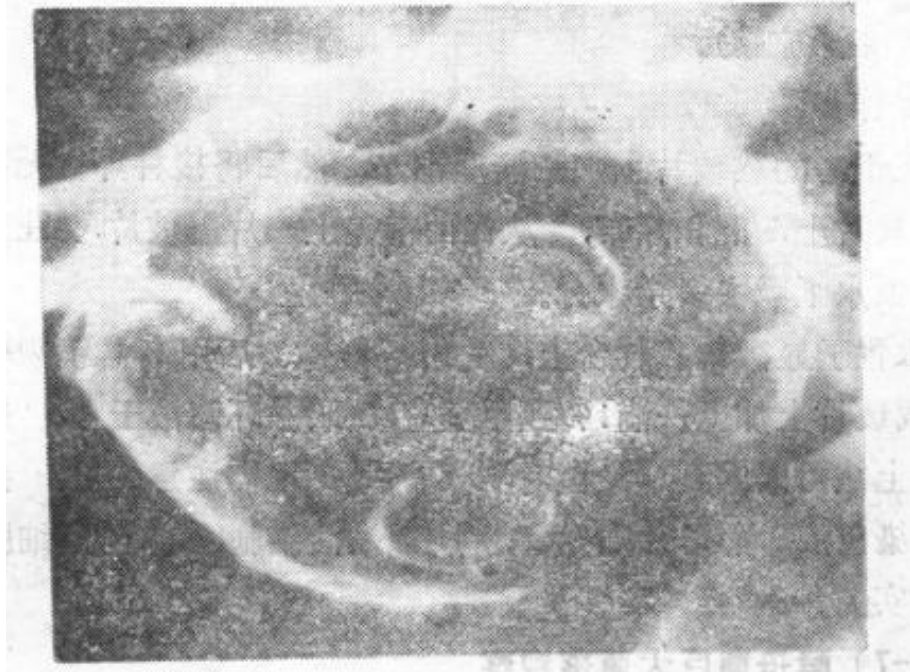


图 2-14 酵母细胞的出芽痕

裂殖酵母的裂殖过程与细菌类似，是以形成平的细胞壁(隔膜)完成的，所以细胞的两端比较平(图2-15)。

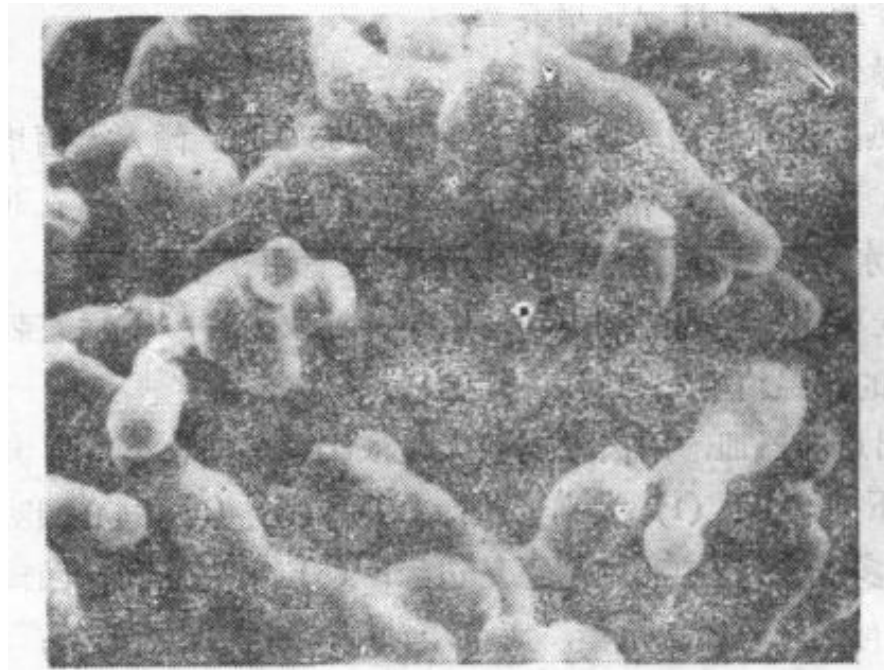


图 2-15 裂殖过程中的裂殖酵母

## 〔实验2-6〕酵母菌细胞形态观察

### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母, 裂殖酵母(麦芽汁试管培养24 h)。
2. 染色液 1%次甲基蓝(1g次甲基蓝溶于30ml 95%乙醇中, 加蒸馏水至100ml)。
3. 器具 载玻片, 盖玻片, 酒精灯, 接种环, 吸水纸, 蒸馏水, 培养皿(已倒入麦芽汁琼脂)。

### (二) 操作步骤

1. 先在干净的载玻片上加一滴蒸馏水, 然后将接种环行无菌操作, 取一环菌液于玻片上, 混和涂布, 从侧面滑盖上一片盖玻片, 注意不使产生气泡, 并用吸水纸吸去多余水分。
2. 标本置于显微镜载物台上, 先用低倍镜、后用高倍镜观察, 记录。
3. 在载玻片上加上一滴1%亚甲基蓝, 取一环菌液于上, 按上述方法观察。比较上法可以感到单染色对观察有利。但需注意的是: 此时因没有固定, 加的染色液对酵母细胞无害, 所以是活细胞, 这时的细胞形态和大小是比较真实的。

## 〔实验2-7〕酵母菌巨大菌落观察

### (一) 实验材料

1. 菌种 麦芽汁培养的酿酒酵母, 假丝酵母和汉逊酵母。
2. 器具 培养器皿, 酒精灯, 接种环, 放大镜。
3. 培养基 麦芽汁琼脂培养基

### (二) 操作步骤

1. 加热融化琼脂培养基, 待冷至50~55℃时, 倾入无菌培养皿内, 厚度约0.5cm, 水平放置, 待其凝固后, 倒置在培养箱中, 在30℃下培养过夜, 以去除水分和鉴定无菌程度。无菌生长者用于下列试验。
2. 将麦芽汁培养的菌液摇动, 用接种针取少许, 然后直刺培养中心, 倒置于25℃的保温箱中2~4周, 待巨大菌落形成。
3. 取出培养器皿, 用肉眼或放大镜依次观察其大小、形状、面饰、颜色等。记录下列情况: (1) 大小形状; (2) 厚薄; (3) 同心圈明显不明显; (4) 辐射线多或少, 在中心中部还是边缘; (5) 中央是凸、凹或平; (6) 表面: 光滑, 有光, 无光, 粗糙, 痣点, 针刺, 粉状, 折皱等; (7) 颜色: 灰白, 黄白, 黄褐, 黄, 橙红; (8) 其他。

## 第五节 小型丝状真菌（霉菌）

霉菌是对一些诸如根霉、毛霉、曲霉、青霉等长有菌丝的真菌的惯用语。霉菌具有菌丝，与放线菌一样，也有气生菌丝与营养菌丝之分，但菌丝较放线菌粗得多，直径达 $5\sim 10\mu\text{m}$ ，而且有的有隔膜，是多细胞形态的。不管如何，霉菌的细胞结构与酵母类似，都是真核生物细胞。

霉菌菌丝是由孢子遇适宜环境萌发而形成的，见图2-16左。2-16右是菌丝的扫描电镜照片。

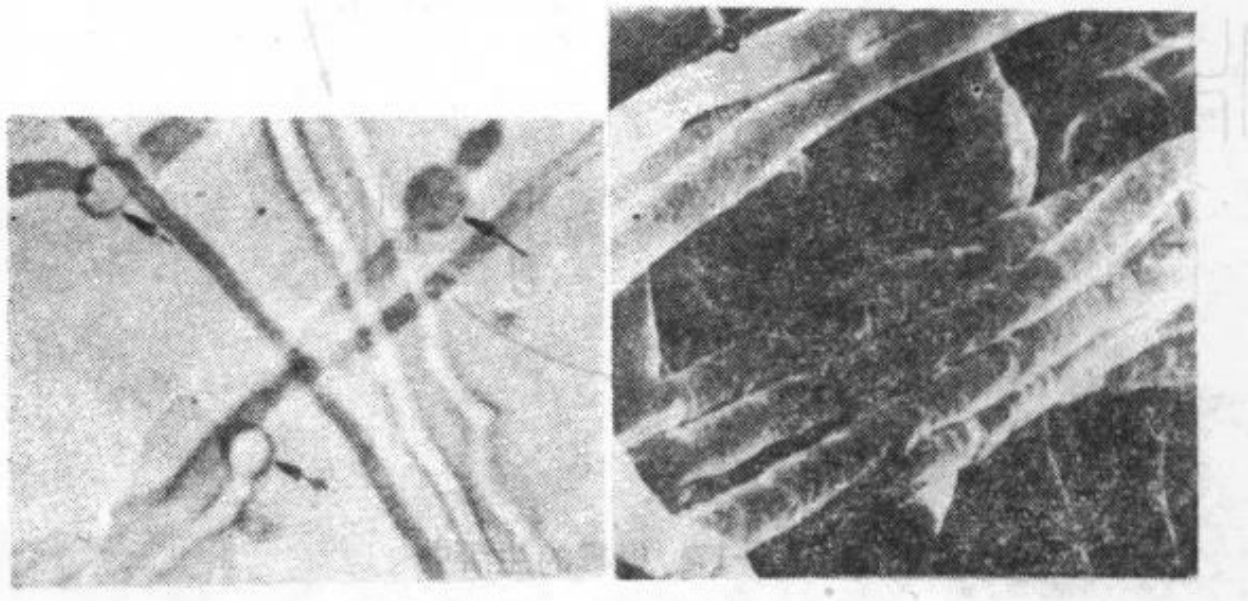


图 2-16 菌丝的形成  
(有箭头为发芽的孢子)

### 一、蕈状菌(主要指根霉、毛霉)

根霉、毛霉在发酵工业上用途很大，它们各具有丰富的淀粉酶和蛋白酶。根霉还含有酒化酶系，所以酒药中根霉是主要的菌类。

根霉、毛霉具有无性和有性生殖，所以它们的生活史中有两类循环（图2-17）。

根霉以其着生孢子囊柄的营养菌丝象根一样而得名。每根上一般长有3~4根孢子囊柄，在孢子囊柄上部长出球形的孢子囊，

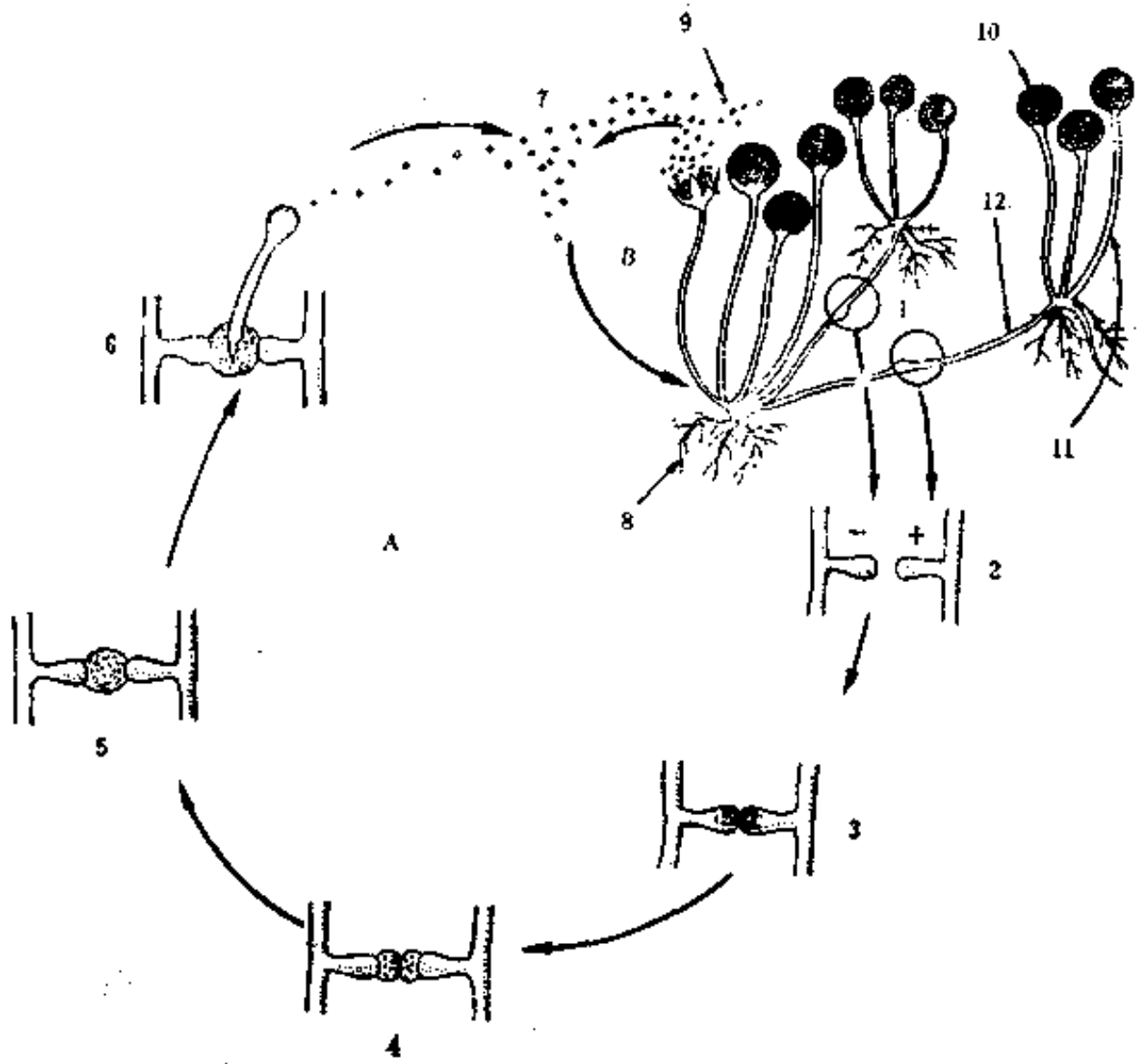


图 2-17 根霉的生活史

A. 有性循环 B. 无性循环

- 1—不同配偶型的性细胞 2—发育中的性细胞 3—配子囊 4—质配  
 5—成熟的接合孢子 6—接合孢子发育 7—孢子囊孢子 8—假根  
 9—孢子囊孢子 10—孢子囊 11—孢子囊柄 12—假枝

内含许多孢子囊孢子。这是一种无性繁殖孢子。也是生产过程中遇到的主要繁殖形式。当具有性亲和的菌丝经过质配和核配，会形成一种有性孢子(称作接合孢子，见图2-18)。它遇合适条件也会发芽，其结果是在形成的孢子囊内含有两种以上两种类型的孢子囊孢子。成熟的孢子囊很易破裂，将孢子囊孢子释放出来。孢子囊释放出孢子后，会露出囊轴，这也是藻状菌的特殊结构之一。

毛霉的孢子囊柄不着生于假根上，不具有假根状营养菌丝，柄的着生无一定规律，依种而异。



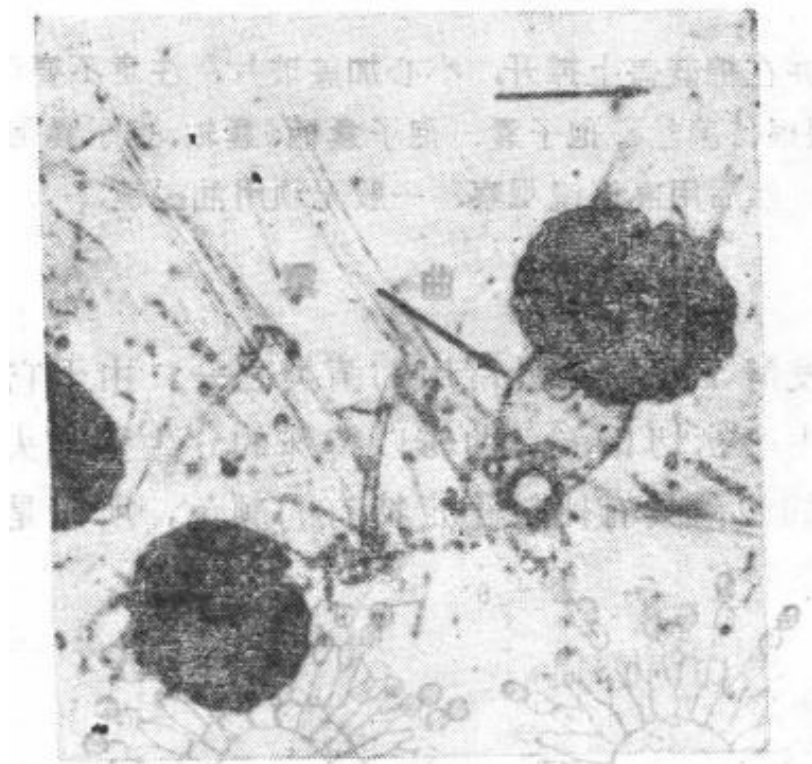


图 2-18 接合孢子的形成  
(箭头指的是配子囊)

### 〔实验2-8〕根霉、毛霉的形态观察

#### (一) 实验材料

1. 菌种 根霉、毛霉斜面。
2. 培养基 市售怡糖或麦芽汁或米曲汁，浓度为10%，2%琼脂，自然pH，103.4kPa灭菌20min。
3. 乳酸石炭酸棉蓝染色液 10g石炭酸加入蒸馏水10ml，加热溶解，然后加入10ml相对密度为1.21的乳酸和20ml甘油，最后加入0.02g棉蓝，使其溶解即成。
4. 器具 显微镜，载玻片，盖玻片，酒精灯，接种环，吸水纸，解剖针。

#### (二) 操作步骤

1. 将培养基溶化倒入培养皿，每皿约10~12ml，置保温箱(内温30℃)培养过夜，进行无菌试验。
2. 用接种环挑取菌丝少许，在培养皿的培养基表面上划线2~3条，在30℃下培养24~48h。
3. 肉眼观察培养皿的生长情况，并作好记录。
4. 取皿盖和皿缘于显微镜低倍镜下观察，可以观察到孢子囊、假根、菌丝等。
5. 取载玻片，当中滴加乳酸石炭酸棉蓝液一滴，用两根解剖针小心挑

取菌丝少许，并在棉蓝盖上摊开，小心加盖玻片，注意不要产生气泡。

6. 观察假根、菌丝、孢子囊、孢子囊柄、囊轴、孢子囊孢子，并作图。开始用低倍镜，然后用高倍镜观察，一般无须用油浸镜。

## 二、曲 霉

曲霉是发酵工业中常见常用的菌类之一，由于它富含各种酶系，所以与生产密切相关。曲霉以特殊的分生孢子头为特征。由于各种曲霉的菌落具有比较稳定特有的颜色，所以是分类的主要

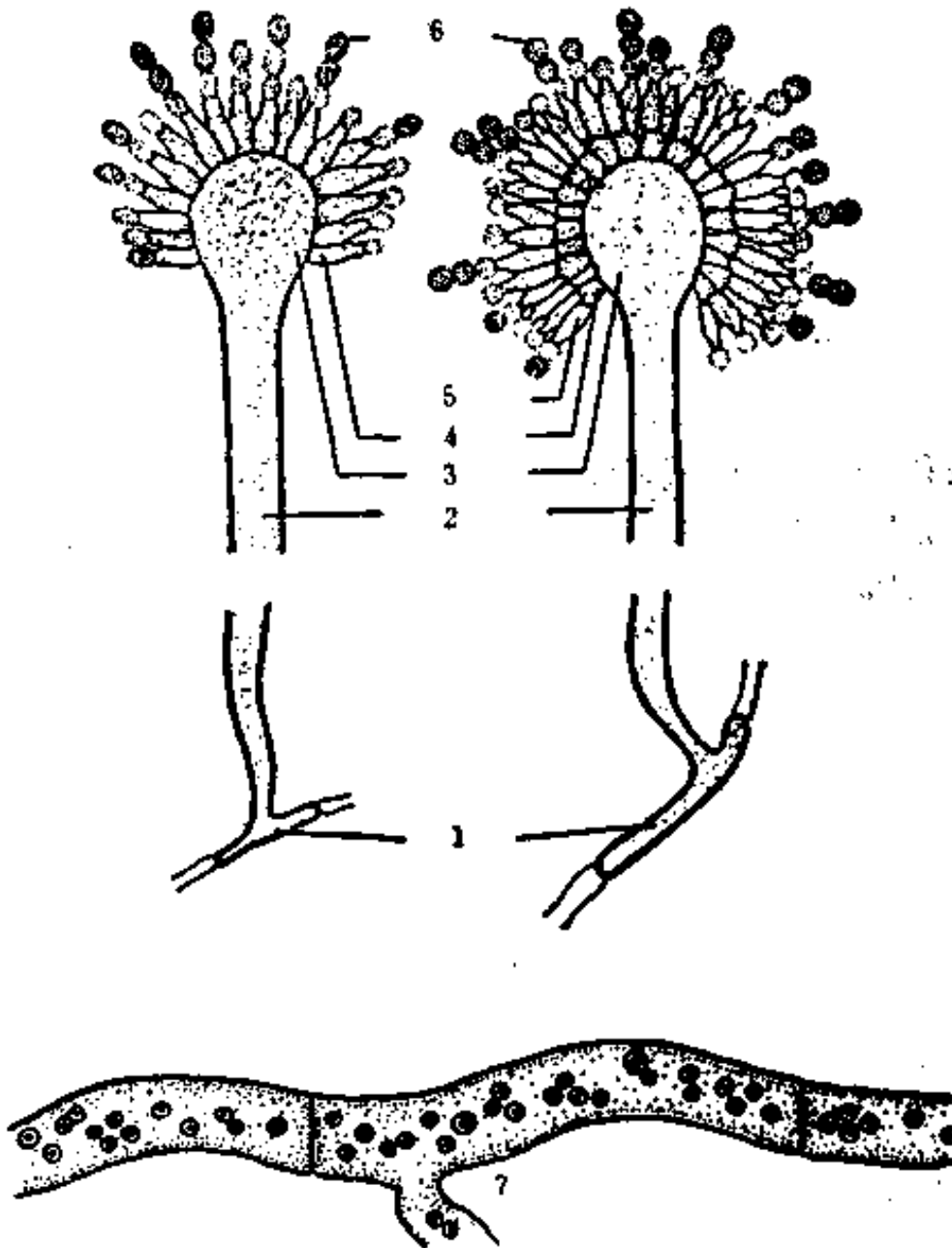


图 2-19 分生孢子头模式图

1—足细胞 2—分生孢子柄 3—顶囊 4—一列小梗  
5—二列小梗 6—分生孢子 7—有隔菌丝

特征之一。

图2-19是曲霉分生孢子头的模式图。图2-20是曲霉的分生孢子头。分生孢子是由小梗上顶生出去的,若将分生的孢子洗去,余下的是小梗顶囊。分生孢子柄着生在足细胞上。足细胞实际上是

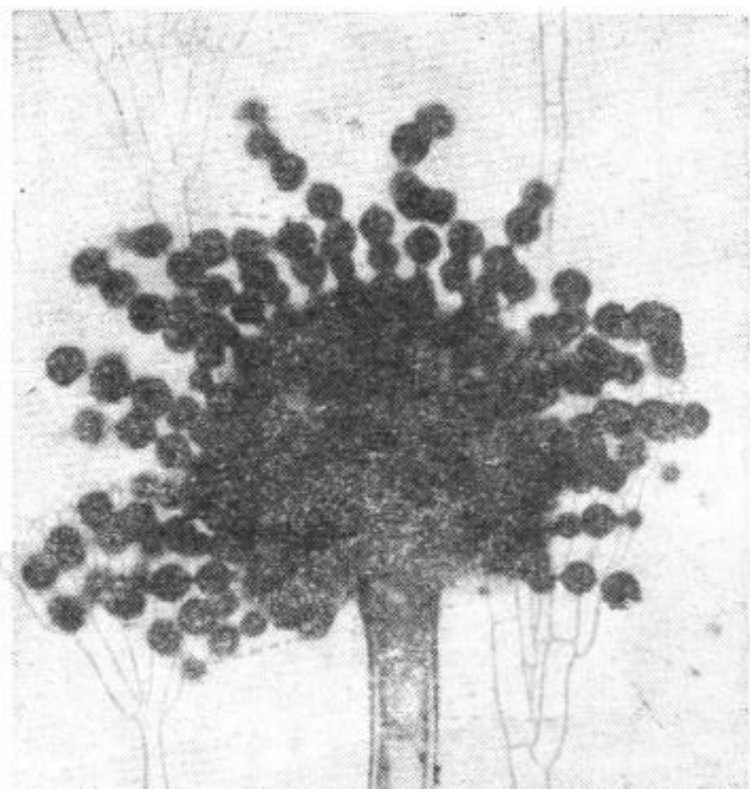


图 2-20 曲霉的分生孢子头部(600×)

营养菌丝的特殊部位,它与其他营养菌丝以隔分开。这种结构也是曲霉所特有的。

### 三、青 霉

青霉以产生青霉素著称。但有一些种也产有机酸和酶,不过青霉在食物霉变、生活用品发霉上也起重要的破坏作用。青霉以其具帚形分生孢子头为其特点。

青霉帚的形态也随种而异,有单轮生,有双轮生,有多轮生,也有对称对轮生和非对称轮生的(图2-21)。这些是分类上的依据之一。青霉的菌落形态比较类似,多数呈暗蓝色,菌落较曲霉小而紧密。

(实验2-9) 青霉、曲霉的形态观察

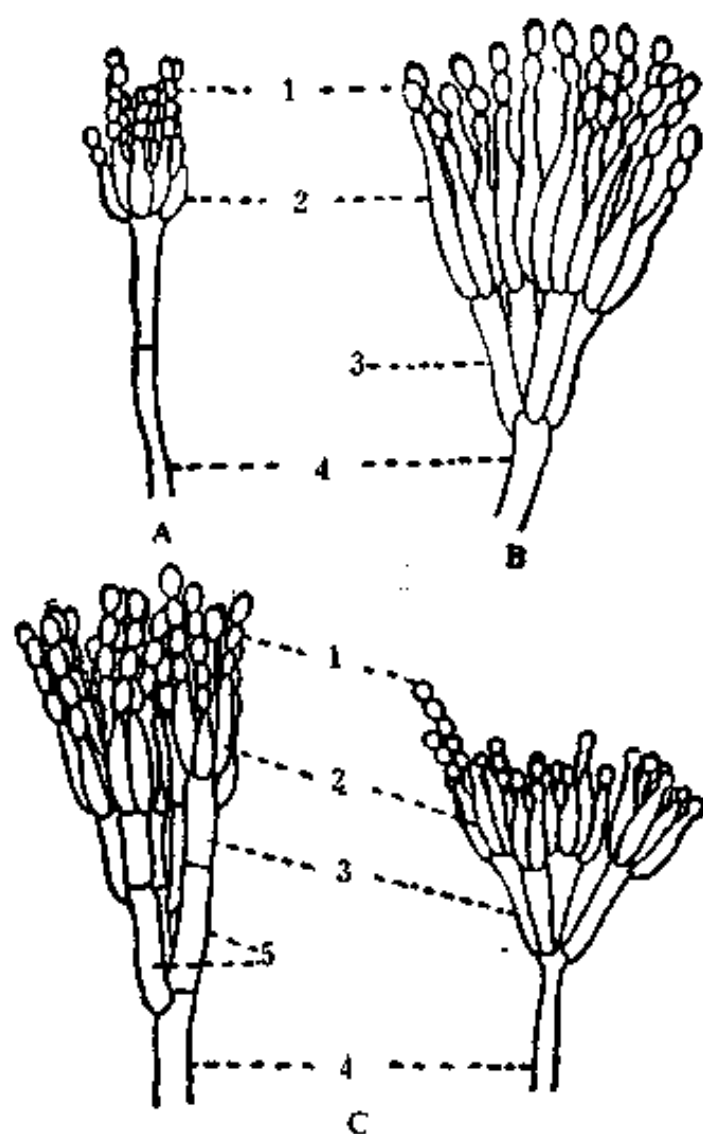


图 2-21 青霉菌的分类

A. 单轮生形 B. 对称轮生形 C. 非对称型  
1—分生孢子 2—小梗 3—梗基 4—分生孢子柄 5—副梗

### (一) 实验材料

1. 菌种 曲霉、青霉斜面各一支。
2. 培养基 蔡氏固体培养基。
3. 染色液 乳酸石炭酸棉蓝染色液。
4. 器具 显微镜，载玻片，盖玻片，酒精灯，解剖针，吸水纸，玻璃纸，培养皿，镊子，刮棒，生理盐水，玻棒，20%甘油。

### (二) 操作步骤

观察曲霉和青霉的形态，可以采用3种方法。

1. 点种培养法 将蔡氏固体培养基融化，每培养皿倒入12~15ml 摇匀，让其凝固，并培养过夜作无菌试验，将接种针（非环）沾取斜面少许孢

子在培养皿中央穿刺接种，在30℃下培养7~10天，形成巨大菌落，进行特征观察。

2. 载片培养法 对于小而易碎的孢子头，通过做载片标本很难保持其形态的完整。用载片培养法可克服这一难点。

取一培养皿，内放一层吸润20%甘油的滤纸，放两根短玻璃棒，取一干燥无菌的载玻片和盖玻片，于盖玻片上一边滴加一滴融化的蔡氏培养基，点种孢子，并立即盖于载、盖玻片之间，如图2-22，外涂蜡以封固。放入培养皿中的玻璃棒之上，盖好皿盖培养。可以在不同的培养时间直接置于显微镜下观察。

3. 玻璃纸透析培养法 为了得到清晰、完整、保持自然状的霉菌形态，可以采用此法。

在斜面中加入无菌水，制成稀释孢子液，用无菌镊子将无菌的9cm直径的玻璃纸覆盖于倒有蔡氏培养基的培养皿表面，吸取0.1ml孢子液于玻璃纸表面，用无菌玻璃刮棒涂布均匀。在28℃下培养48h，取出培养基，镊出玻璃纸，用小剪刀剪取小条置于载玻片上，用低倍或高倍镜观察。

观察分生孢头的细微结构和菌丝，可做染色玻片。于清洁的载玻片上，滴加乳酸石炭酸棉蓝液，用解剖针从菌落边缘挑取少量孢子的菌丝，横放在染液中，再小心将培养基刮去，然后小心盖上盖玻片，注意不要产生气泡。置于显微镜低倍镜和高倍镜下观察，并记录和绘图。

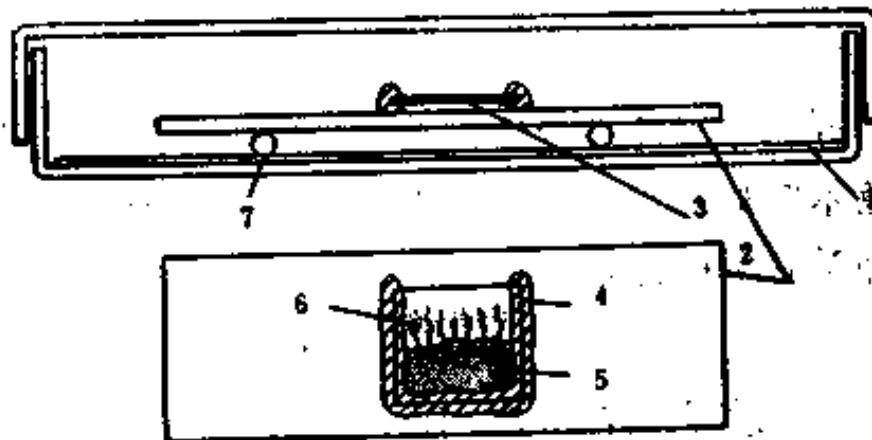


图 2-22 霉菌的载片培养

1—浸有甘油滤纸 2—载玻片 3—盖玻片 4—蜡 5—玻璃棒  
6—菌丝 7—玻璃棒

#### 四、其他霉菌

常见的霉菌还很多，这里列举几种：

### (一) 白地霉

白地霉的菌落是白绒毛状的，但它产生的却是菌丝裂子。也称菌丝孢子。所以至今还有微生物学家将其归于酵母一类。白地霉具有利用低等碳源的能力，所以在利用某些废水制取单细胞蛋白方面是很有前途的。

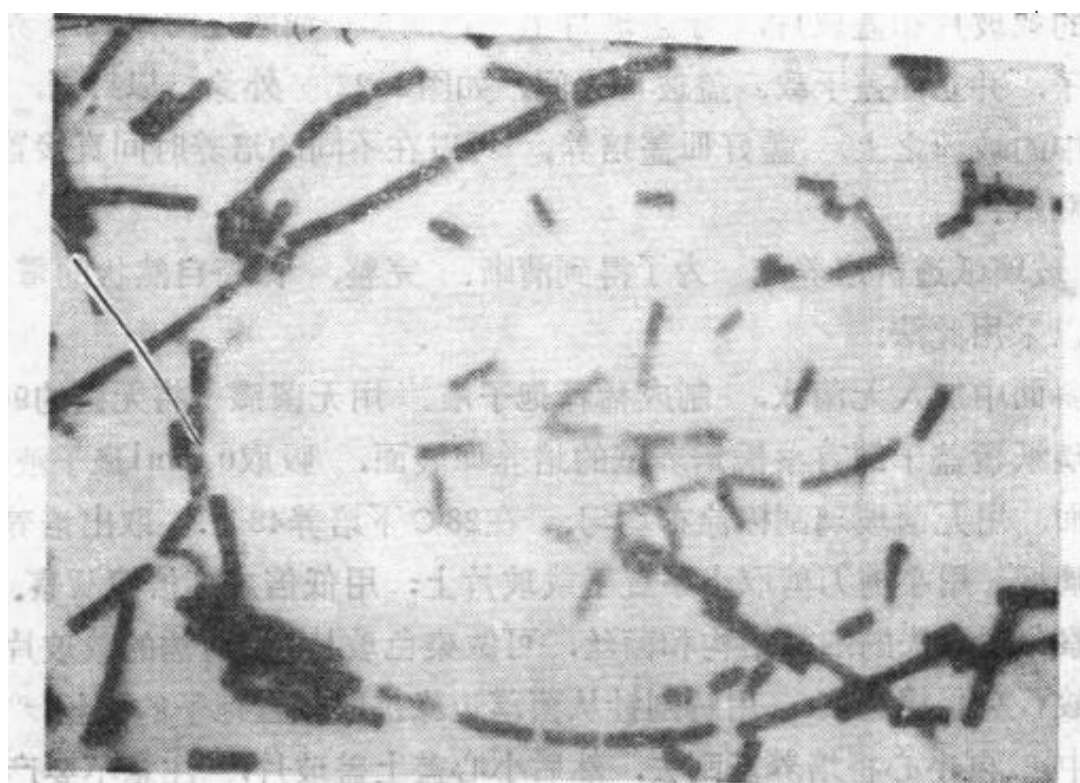


图 2-23 白地霉细胞形态

### (二) 木霉

木霉是一群能分泌纤维素酶，具有分解天然纤维素能力的霉菌。其中绿色木霉最常见，在利用天然纤维素作为能源方面，木霉深为国内外学者所重视。

## 第六节 食用真菌

食用真菌又称为大型丝状真菌，在微生物分类上属担子菌。我们熟悉的木耳、灵芝、猴头、蘑菇等，都是食用真菌。由于这种菌味美鲜口，含有人类所需的必需氨基酸，所以深为人们所喜爱。近来试验证实，不少食用真菌的代谢产物可能对肿瘤有一定

的防治作用。这类菌的特点是能利用纤维素，发酵工业中的不少废水如酒精蒸馏废液含有纤维素，还有丰富的维生素B，是适合这类菌生长的，因此这是化废为利的一项值得研究的课题。

食用真菌的菌丝都有分隔和分枝，最重要的特征是形成担孢子，通常是4个。它们的有性生殖系未经分化菌丝的接合或孢子的接合，而且接合时只行质配，不予核配，结果有一个双核细胞期，并以锁状联合方式形成新的双核细胞（图2-24）。只有形成担孢子前才进行核配，行减数分裂，产生单倍体的担孢子。

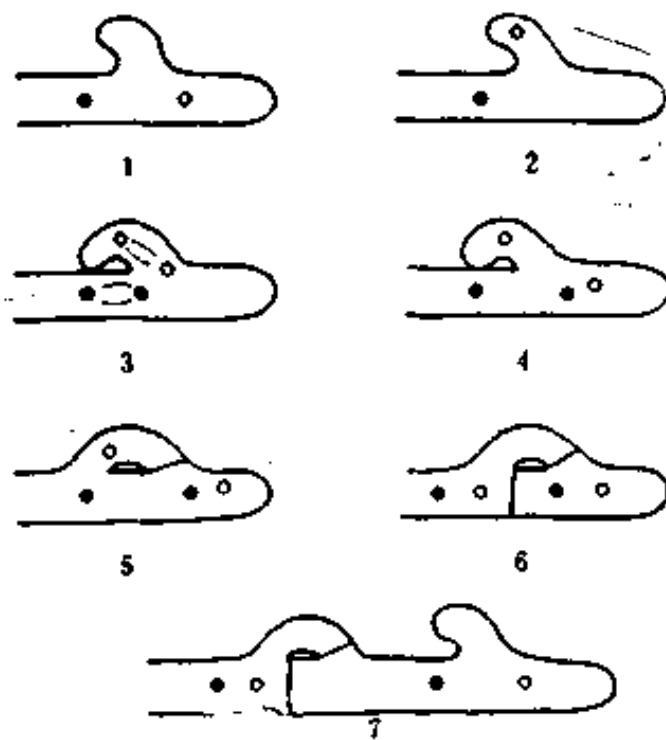


图 2-24 双核菌丝的锁状联合和双核菌丝的形成过程

这类菌的子实体是供食用的，它的形成过程见图2-25。首先是单核的二性菌丝吻合，形成双核菌丝。第一阶段形成菌丝球，第二阶段形成原基，是子实体的雏形，第三阶段就形成子实体。成熟后可采摘食用。将子实体作剖面观察，可见其由菌丝组成，仅在菌褶部分形成担孢子。

### (实验2-10)平菇的菌栽

#### (一) 实验材料

1. 菌种 平菇菌丝斜面。

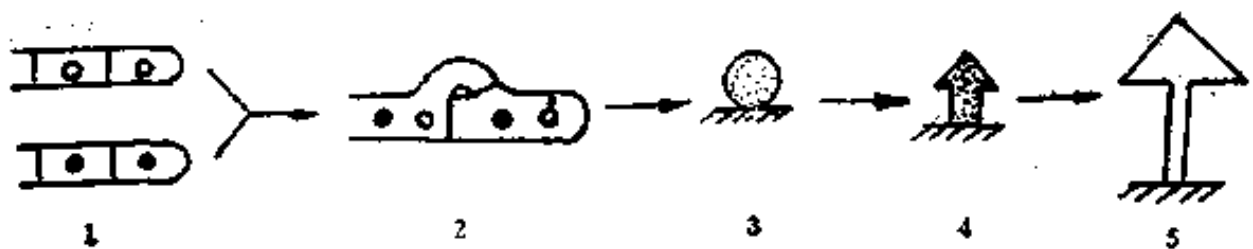


图 2-25 食用真菌的子实体的形成

- 1—单核菌丝 2—双核菌丝 3—菌丝球 4—原基  
5—子实体

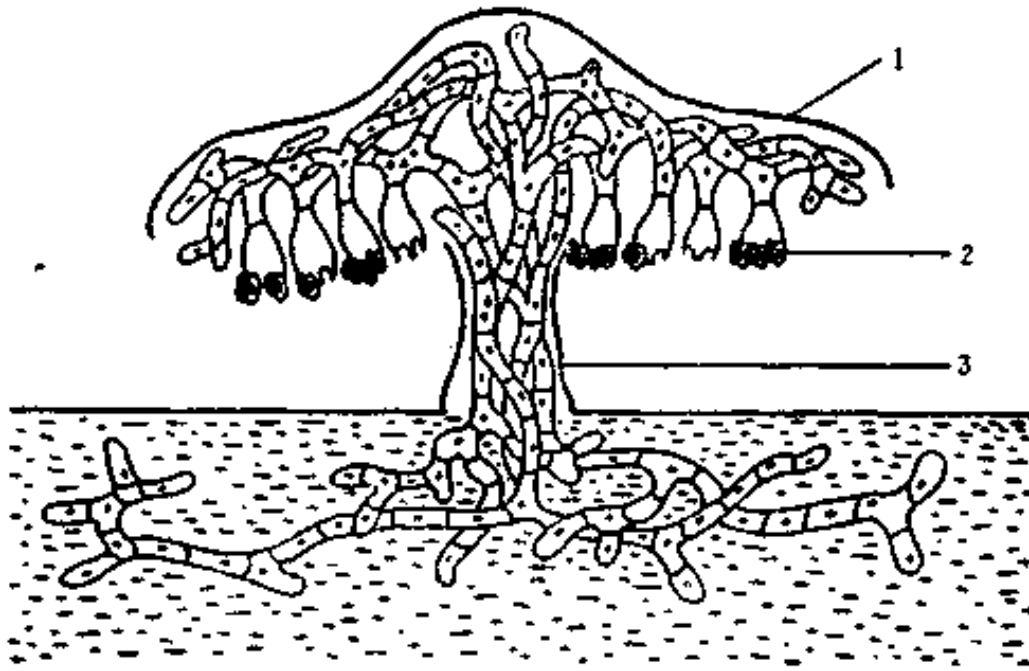


图 2-26 子实体的剖视图

1—菌盖 2—担孢子 3—菌柄

2. 种菌培养基 干木屑或棉子壳80g, 麸皮1g, 蔗糖1g, 碳酸钙1g, 水100~120ml, pH6~5.6, 配料应均匀而不过湿, 分装入无色的500ml容量的广口瓶中, 四周适度压紧, 塞棉塞, 包油纸, 147.10kPa灭菌1.5h; 栽培培养基: 新鲜棉壳加入100~110%的水拌匀。

3. 器具 培养箱, 保温房间, 接种室。

### (二) 操作步骤

1. 种菌培养基灭菌凉后, 在接种室接入斜面菌丝入瓶中央小孔内, 在25~28℃下培养, 几天后可见菌丝生长, 培养过程尽量避免杂菌污染, 经一个月, 菌丝即可长满全瓶, 选取菌丝洁白, 粗壮密集, 并有小原基产生的种瓶作种子。

2. 栽培培养基配好后, 加入菌种菌丝一起拌匀 (一瓶可接几十至上百), 装瓶压紧, 在3~15℃的自然气温下培养一个月。整个瓶内充满绒毛状菌丝后, 控制室温在10℃, 瓶内不能有干皮, 这时原基开始成长, 约7~10天便可采收, 这阶段应不时喷洒清水。



## 第三章 工业微生物细胞一般结构与特殊结构的观察

微生物细胞的一般结构在前一章已提及，其特殊结构本章只着重说明在工业生产中应用广泛的芽孢及酵母有性繁殖产生的子囊孢子及荚膜、鞭毛等。观察它们不能采用一般制片法，而必须涉及复杂的染色法，即利用细胞各成分对特殊染料的吸着能力的差异在显微镜下区别它们。为此必须对染色技术要有足够的了解。

### 第一节 染色技术

一般的微生物细胞含水量都在80~90%，因此细胞对光的吸收和反射与水溶液相差不大，特别在油浸镜下观察时细胞与背景几乎无反差，呈现一片透明状态。所以在观察微生物细胞的一般结构与特殊结构时都采用染色法，其目的是通过细胞对染料的吸着所产生的与背景较明显的明暗差。使观察容易。但值得注意的是染色后的是死细胞，其形态与结构会发生一些变化。

#### 一、染色的基本原理

微生物细胞染色的基本原理是根据物理因素和化学因素的作用。物理因素包括细胞及细胞物质对染料的毛细现象、渗透、吸附、吸收作用等。化学因素则是根据细胞物质和染料的不同性质而发生的化学反应。一般酸性成分对碱性染料较易吸附，而且较稳定。同样，碱性成分对酸性染料也较易吸附，而且也较稳定。例如细胞核含有大量核酸是酸性的，它对碱性染料有亲和力，所

以容易吸着。有时为了让酸性成分吸着酸性染料或碱性成分吸着碱性染料，就必须改变它们的某些形式。例如：可以改变染色反应的pH值，使它们的离解情况改变，促使它们吸着染料。实际上细胞内一些成分为两性物质，其性质与pH的改变密切相关。

细菌的等电点较低，大约在pH2~5之间。因为细菌正常带有负电荷，它们在中性、碱性或弱酸性溶液中，菌体蛋白质电离后带阴电荷。碱性染料离子带阳电荷，因此带阴电的细菌往往和带阳电的染料容易结合，所以细菌一般常用碱性染料进行染色。若细菌在此等电点低的pH溶液中，则变成带正电荷。在这样的条件下，它们就可以吸着带负性电荷的染料，例如酸性品红。

影响染色的其他因素，除与菌体细胞的结构和其外膜的通透性，如胞膜的通透性，膜孔的大小及细胞结构的完整等有关外，还与培养基的组成、菌龄、染色液中的电解质含量、pH值、温度、药物的作用等有关。

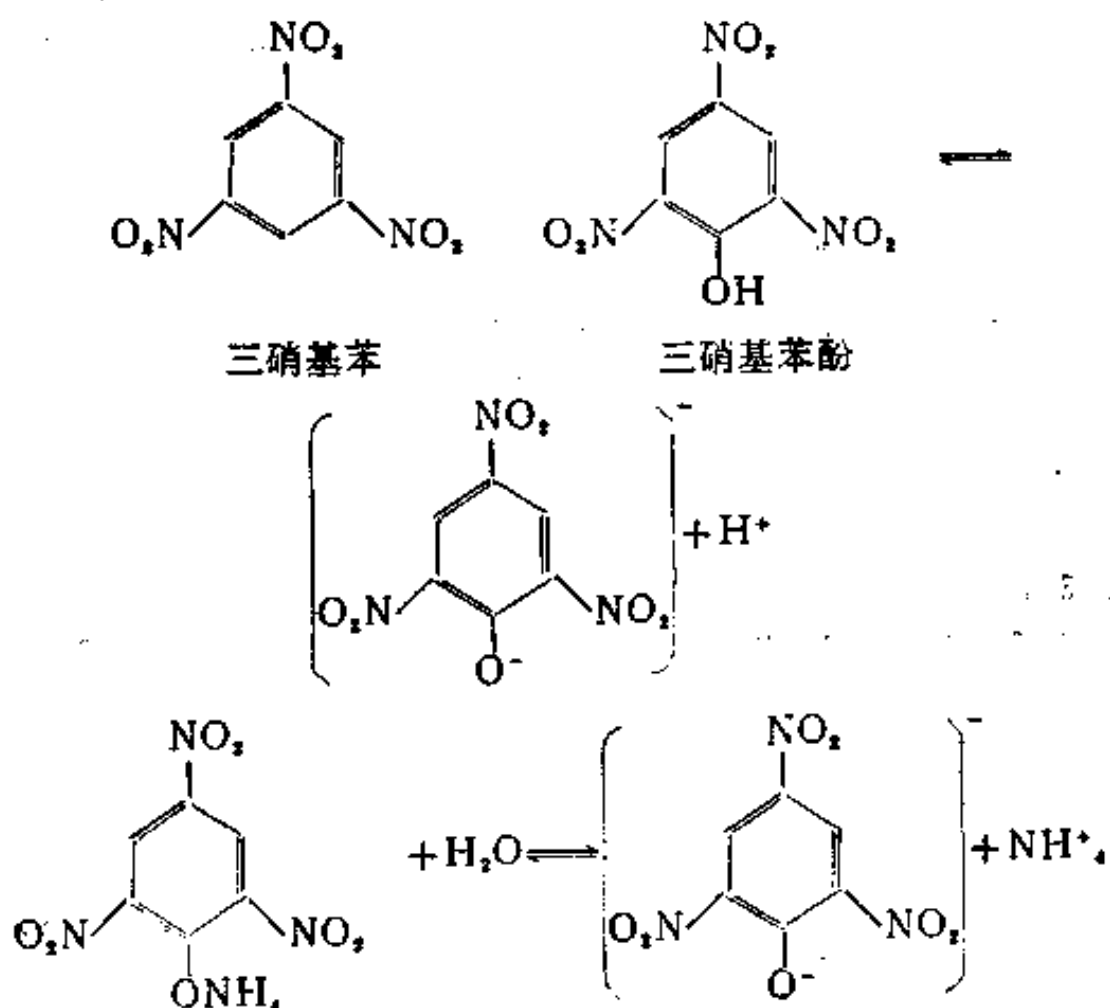
综上所述，染色过程是物理和化学两种作用的结果。

## 二、染料

### (一) 染料的一般性质

染料是一些有机化合物。微生物学上使用的染料都是含有苯环的有机化合物，由三部分组成。一是苯环，二是基团，三是助色基团。苯环上若只连结发色基团，它虽能呈色，但不能电离而成盐类，水溶性很小，与细胞的亲和力很差，因此不能牢固染色，很易除去。若苯环上再连接上助色基团，使具有电离性质，就能与有关物质结合而成盐类，带有正或负电荷的染料离子便能与细胞有较牢固的结合，使其呈现牢固的颜色。例如三硝基苯，是一种黄色化合物，但它不能电离也不能与酸或碱化合成盐类，不能溶于水。所以它虽呈黄色，但染不上黄色。如果在苯环上再连接上一个羟基(-OH)，生成三硝基苯酚，就是苦味酸，它也是黄色，但能电离，于是就能与其他物质结合生成盐类。有了一定

的水溶性，苦味酸就是一种染料。这时硝基就是发色基团，羟基就是助色基团，带苦味酸的负离子就可以和带正电荷的细胞物质相结合，使其染色。



## (二) 染料种类和选择

染料分为天然染料和人工染料两种。天然染料有胭脂红、地衣素、石蕊、苏木素等，它们多从动植物体中提取而得，其成分均较复杂。目前主要采用人工染料，它们多从煤焦油中提取，是苯的衍生物。为了使它们易溶于水，通常制成盐类。

染料按其电离后染料离子所带电荷的性质而分为酸性、碱性和中性染料。

1. 酸性染料 这类染料电离后，染料离子带负电，如伊红、刚果红、藻红、苯胺黑、苦味酸和酸性复红等。可与碱性物质结合成盐，当培养基中糖类分解产生酸，使pH下降时，细菌带正电荷增加，就可为酸性染料着色。

2. 碱性染料 这类染料电离后，染料离子带正电，可与酸性物质结合成盐。微生物实验一般常用的碱性染料有美蓝、结晶紫、碱性复红、中性红、孔雀绿、蕃红等。

3. 中性染料 酸性染料与碱性染料的结合物称中性染料，也称复合染料。如瑞氏染料与姬姆萨氏染料，后者常用于细胞核染色。

此外还有一些染料如苏丹类染料，它们的化学亲和力低，不能和被染物结合成盐类，它的染色能力视其能否溶于被染物而定。这些染料不溶于水，但溶于脂肪溶剂中。

表3-1列出了微生物实验中常用的染料。

表 3-1 微生物实验常用染料

名 称	性质	用 途	常 用 配 方
结晶紫 (龙胆紫) Gryetal Violet	碱性	革兰氏染色	结晶紫2g溶于20ml 95%乙醇中；草酸铵0.8g溶于80ml蒸馏水中，两液混合静置48h后使用
蕃红(藏花红沙黄) Safrania	碱性	革兰氏染色 核染色	0.25g溶于10ml 95%乙醇中，然后加水100ml
美蓝(次甲基蓝) methyleneblue	碱性	活体染色 氧化还原指示剂	1%的95%乙醇液30ml加0.01% KOH液100ml
孔雀绿 malachito greeu	碱性	芽孢染色	5%水溶液或95%乙醇液
中性红 neutral red	碱性	活体染色 指示鉴别肠道细菌	1%水溶液
苏丹Ⅲ Sudan III	酸性	脂肪染色	95%乙醇饱和液
苏丹黑 B Sudan black B	碱性	脂肪染色	0.5%的70%乙醇液
甲基蓝(棉蓝) Methyl blue	酸性	菌丝染色	10g 石炭酸，100ml水，10ml乳酸，20ml甘油，0.02g 甲基蓝
刚果红 Congo red	酸性	细菌负染色 酵母菌染色	95%乙醇饱和液

续表

名 称	性质	用 途	常 用 配 方
苦味酸 Picric acid	酸性	染真菌细胞壁 海藻细胞壁	95%乙醇饱和液65ml加95%乙醇35ml
伊红(曙红Y) Eosin Y	酸性	细胞质染色, 细胞的嗜酸性颗粒	1%的95%乙醇液
酸性品红 Acid fuchsin	酸性	单染色	1%水溶液
碱性品红 Basic fuchsin	碱性	核染色	0.3g碱性品红加5g石炭酸溶于95%乙醇10ml中, 加水至100ml
黑色素 Nigrosin	混合物	负染色	4%水溶液加10滴福尔马林
金胺 O Auramin O	碱性	结核杆菌 鞭毛	1:1000水溶液 1:500酒精溶液
吖啶橙 Acridine orange	碱性	细胞核 细菌 粘液 空泡	1:10000水溶液 1:30000水溶液 1:20000水溶液 1:5000酒精溶液
荧光素 Fluorescein		细胞核 细菌	1:1000水溶液

### 三、染色种类

微生物染色方法一般分为单染色法、复染色法、特殊染色法及负染色法。单染色法是用一种染料使微生物染色,但不能鉴别微生物;复染色法则采用两种或两种以上的染料,将不同微生物染成不同颜色以鉴别微生物,常用的有革兰氏染色法和抗酸染色法;负染色法则使微生物背景着色;特殊染色法可将细菌各部结构染成特定颜色。

#### 〔实验3-1〕革兰氏鉴别染色法

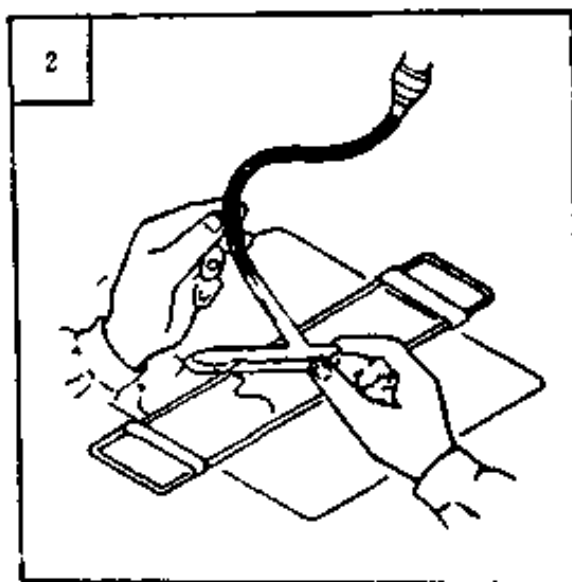
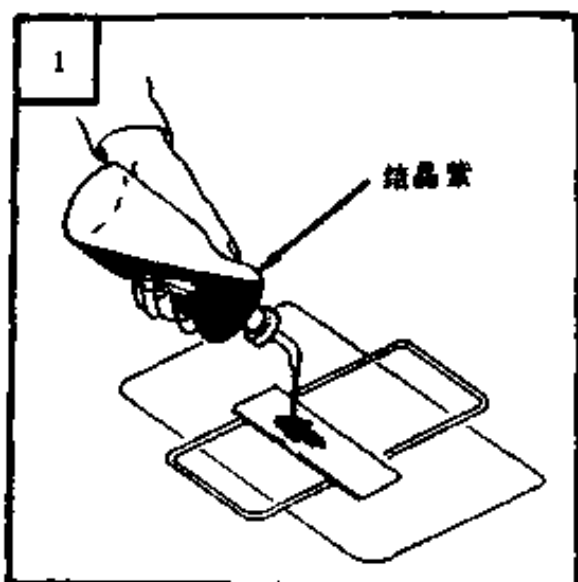
##### (一) 实验材料

1. 菌种 大肠杆菌, 枯草杆菌, 20h的肉汁斜面培养物。
2. 染色液 草酸铵结晶紫染液; 路哥尔氏碘液 (碘1g, 碘化钾2g,

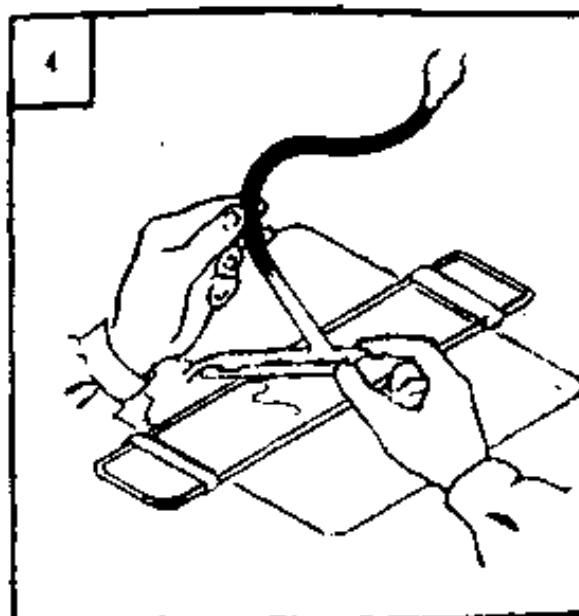
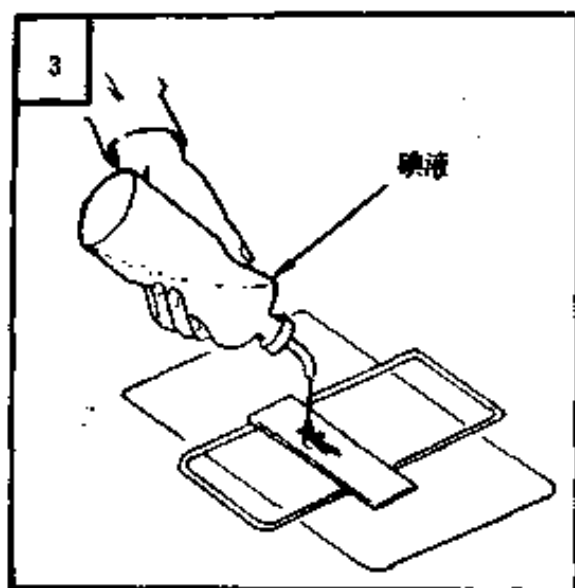
先将碘化钾溶解在少量水中，再将碘溶解在碘化钾溶液中，后加水至300ml，保存于棕色瓶中；95%酒精（950ml加50ml丙酮混合液）；蕃红液。

3. 器具 显微镜，香柏油，二甲苯，擦镜纸，载玻片。

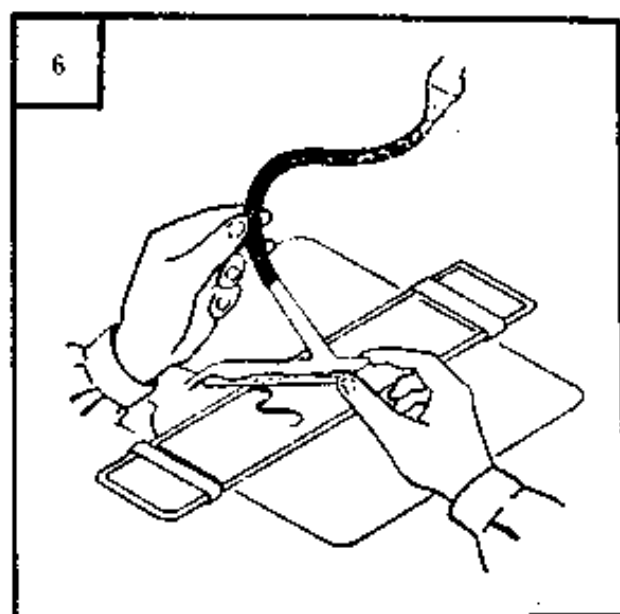
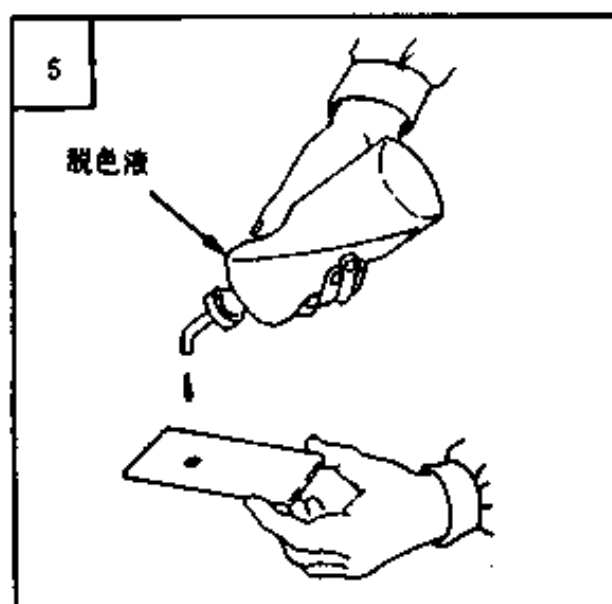
(二) 操作步骤



1. 将固定好的涂片加滴结晶紫1min，若干了，还要补加染料。
2. 用缓冲流水冲去染料。

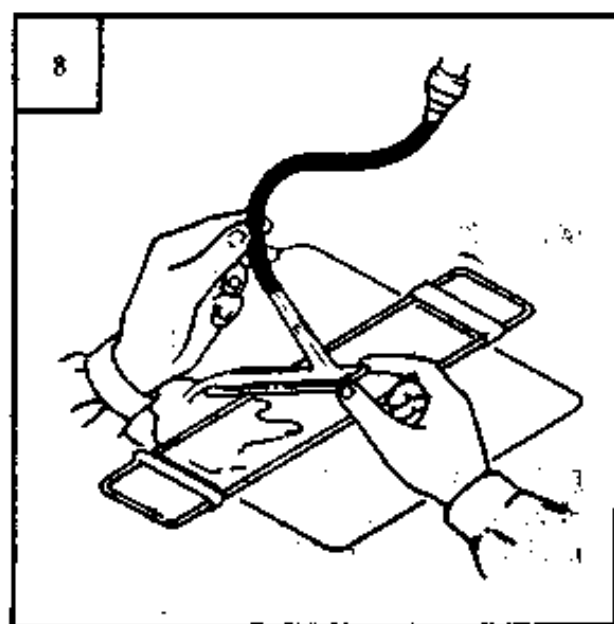
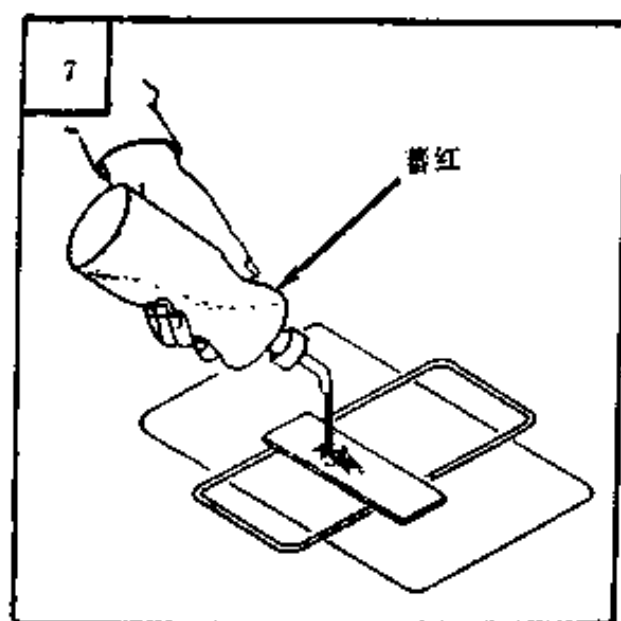


3. 加碘液浸没，起媒染作用1min。
4. 加缓冲流水冲去碘液并吸干。



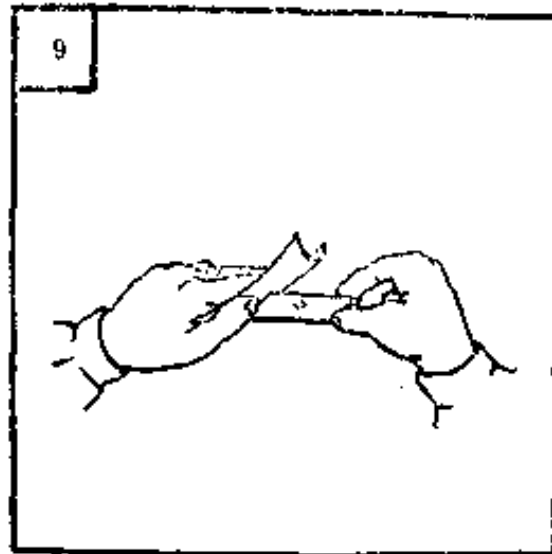
5. 慢慢滴加酒精-丙酮脱色液直到染料不再流去(注意:脱色速度与酒精浓度、涂片厚度、涂片的干湿程度有关),一般约为30~60 s。

6. 再一次用缓冲流水洗去并吸干。



7. 加番红液复染30 s。

8. 用缓冲流水洗去。



9. 用吸水纸轻轻吸干，直接用显微镜观察。先用低倍镜观察，然后用油浸镜观察，作图。

### (三) 革兰氏染色各步骤的作用及结果

操作步骤和使用的试剂	处理时间	与细胞所起的反应		镜检细胞观察到的现象
		革兰氏阳性细菌 (G <sup>+</sup> )	革兰氏阴性细菌 (G <sup>-</sup> )	
涂片与火焰固定		细胞蛋白质凝固	与革兰氏阳性菌相同	无色
结晶紫染色	45~60 s	1. 染料为细胞吸附，以结合和不结合两种形式吸附 2. 细胞成紫色	与革兰氏阳性菌相同	紫色
碘液染色	1min	1. 碘反应，即可能固定结合或不结合结晶紫 2. 形成一种碘结晶紫复合沉淀物 3. 细胞仍为紫色	与革兰氏阳性菌相同	紫色
脱色(乙醇或乙醇-丙酮混合物)	小心地一滴一滴地点到标本上，直到不出现紫色液溢出	1. 脱色液引起结晶紫-碘复合物离解 2. 复合物的成分成为可溶性 3. 厚的细胞壁呈现脱水 4. 染料的扩散慢慢进行	1, 2与革兰氏阳性菌相同  3. 薄的细胞壁呈现脱水 4. 染料的扩散很快进行	G <sup>+</sup> 紫色 G <sup>-</sup> 无色



续表

操作步骤和使用的试剂	处理时间	与细胞所起的反应		镜检细胞观察到的现象
		革兰氏阳性细菌 (G <sup>+</sup> )	革兰氏阴性细菌 (G <sup>-</sup> )	
复染(番红或稀的石炭酸复红)	0.5~1min	1. 稍有出现结晶紫被取代, 但总的细胞并不受影响 2. 细胞呈现紫色或红色	1. 原结晶紫染色部位被取代 2. 细胞被复染 3. 细胞呈红色	G <sup>+</sup> 紫色 G <sup>-</sup> 红色

在进行革兰氏染色中有时结果不稳定, 主要的原因是脱色时间掌握不当, 涂片太厚, 或菌龄太长, 一般采用20~24 h的培养物。

#### (四) 染色操作步骤及注意点

从革兰氏染色法可以看到染色操作包括制片、固定、染色、媒染、脱色、复染、水洗、干燥等步骤, 每一步都具有其操作要点和注意点, 若不当心, 可能就得不到满意的结果。

1. 制片 制片要采用干净的载玻片, 并注意接种环的无菌操作。做斜面菌体片时, 要防止菌体和水混合不均匀有结团现象, 注意菌体量适中。

2. 固定 涂片后最好先在室温下自然干燥, 然后固定。固定的目的是: (1) 杀死微生物, 固定其细胞结构; (2) 保证菌体能牢固地粘附在载玻片上, 因而可防止标本被冲洗掉; (3) 改变菌体对染料的通透性, 一般使死细胞原生质染色。

固定常用高温, 手执载玻片一侧, 标本面朝上, 在火焰外层快速来回通过3~4次, 共约3~4s, 要求玻面温度不超过60℃, 此时以手背皮肤接触不觉过烫为度。放置待冷后染色。由于热固定会改变细胞的内部结构及外形, 所以研究菌体细胞结构时常采用化学固定法。

常用的化学固定剂有: 95%酒精、酒精和醚1:1的混合液、丙酮、1~2%铬酸液。适用于固定丝状菌的固定液介绍两种: (1) 铬酸-醋酸-钨酸液: 铬酸1g, 冰醋酸1g, 1%钨酸1ml。(2) 铬酸-醋酸-福尔马林液: 1%铬酸80ml, 冰醋酸5ml, 福尔马林15ml。

钨酸能很快固定细菌细胞而不改变其结构, 因此用它来固定微生物细胞很方便。

3. 媒染与染色 标本固定以后, 滴加染色液, 使整个标本固定在染色液中。染色时间视标本与染料的性质而定, 有时还需加热。一般染色时间

为1~3min.

如作复合染色，要在染色前作媒染处理。媒染剂与染料能形成不溶性的化合物，它能增加染料和细胞的亲和力（表3-2）。媒染一般在固定后进行，但也可结合固定或染色同时进行。

表 3-2 各种媒染剂的作用

媒染液名称	作用
醋酸(少量)	增加猩红、胭脂红的染色
氯化钨(2~4%)	酸性染色剂的染色
硅钨酸(4%水溶液)	碱性染色剂的染色
碳化锂(少量)	增进碱性染料染色
碘和苦味酸	各种紫色媒染，染色后用

4. 脱色与复染 一般脱色都用醇类和酸类处理，通常可以检查染料与细胞结合的程度，用以鉴定菌类，常见的脱色剂是95%的酒精，3%的盐酸液。

脱色后需再用一种染色剂染色，它能与脱色的部分形成鲜明的对比，便于区别观察。革兰氏染色中可以采用蕃红液或石炭酸品红等作复染液。

5. 水洗与干燥 染色时间一到，就应用细小的缓流水将多余染料从标本上洗去，但不会将细胞所吸附的染料洗去。洗净后，将标本置桌上风干，也可用吸水纸轻轻吸去水分。有时也可微微加热，待干后再镜检。

6. 标本玻片的封藏 标本镜检后，有时需要长期保存，这时应将标本封存。常用的制片粘着剂是加拿大胶，其制法是：混合等量的干加拿大胶和碳酸氢钠在乳钵内磨碎，加入等量二甲苯，制成透明溶液，约一星期后过滤，并微热，使溶液具适当稠度，保存在暗处，并外涂黑色。将此液滴加到标本中，上盖清洁盖玻片，压平，待干，保存。用此种中和性的加拿大胶保藏标本，较不易褪色。

### 〔实验3-2〕活体染色法

美蓝进入活细胞后，可被还原脱色，而死细胞及代谢缓慢的老细胞，无还原能力而可着色，借此可区别活菌和死菌。

#### (一) 实验材料

1. 啤酒酵母 为24~48 h培养斜面。

2. 染料 0.1%美蓝水溶液。

### (二) 操作步骤

1. 在干净的载玻片上加一滴蒸馏水，取啤酒酵母少许，于蒸馏水中涂磨成菌悬液。

2. 加0.1%美蓝染色液1滴，封盖盖玻片，2~3min于高倍镜下观察。活的酵母细菌体为无色，而死的酵母菌则被染成蓝色。

### 〔实验3-3〕单染色法

在一般情况下，细菌的菌体多带负电荷，因此我们在选用染料时常用碱性染料如美蓝、孔雀绿、碱性复红、结晶紫和中性红等。

#### (一) 实验材料

1. 普通培养基斜面上生长24 h的枯草杆菌。
2. 染料 结晶紫染色液，或碳酸复红染色液或美蓝染色液。
3. 酒精灯，接种环，染色架，显微镜等。

#### (二) 操作步骤

1. 涂片干燥 取1小滴生理盐水于干净载玻片上，用接种环取少许枯草杆菌于水滴中，涂磨成菌浆，空气中自然干燥。

2. 固定 手持载玻片，将背面迅速通过酒精灯2~3次。

3. 染色 加结晶紫染色液1~3滴，染色1min。

4. 水洗，吸干。

5. 油镜观察细菌的形态。

碳酸复红染色液着色快、时间短，菌体呈红色；美蓝染色液着色慢，时间长，菌体呈蓝色；结晶紫染色液着色深而迅速，菌体呈紫色。

### 〔实验3-4〕假丝酵母负染色法

#### (一) 实验材料

1. 斜面生长24~48 h的假丝酵母。
2. 墨汁。
3. 接种环等。

#### (二) 操作步骤

1. 挑取少许假丝酵母于2ml无菌水中制成稀悬液。
2. 加墨汁1~2滴于载玻片上，加同体积菌悬液；混匀后涂成薄层。
3. 空温下风干，封盖盖玻片。

4. 高强度光源下高倍镜镜检，假丝酵母在黑色背景中象星星一样。

### 〔实验3-5〕枯草芽孢杆菌的抗酸性染色

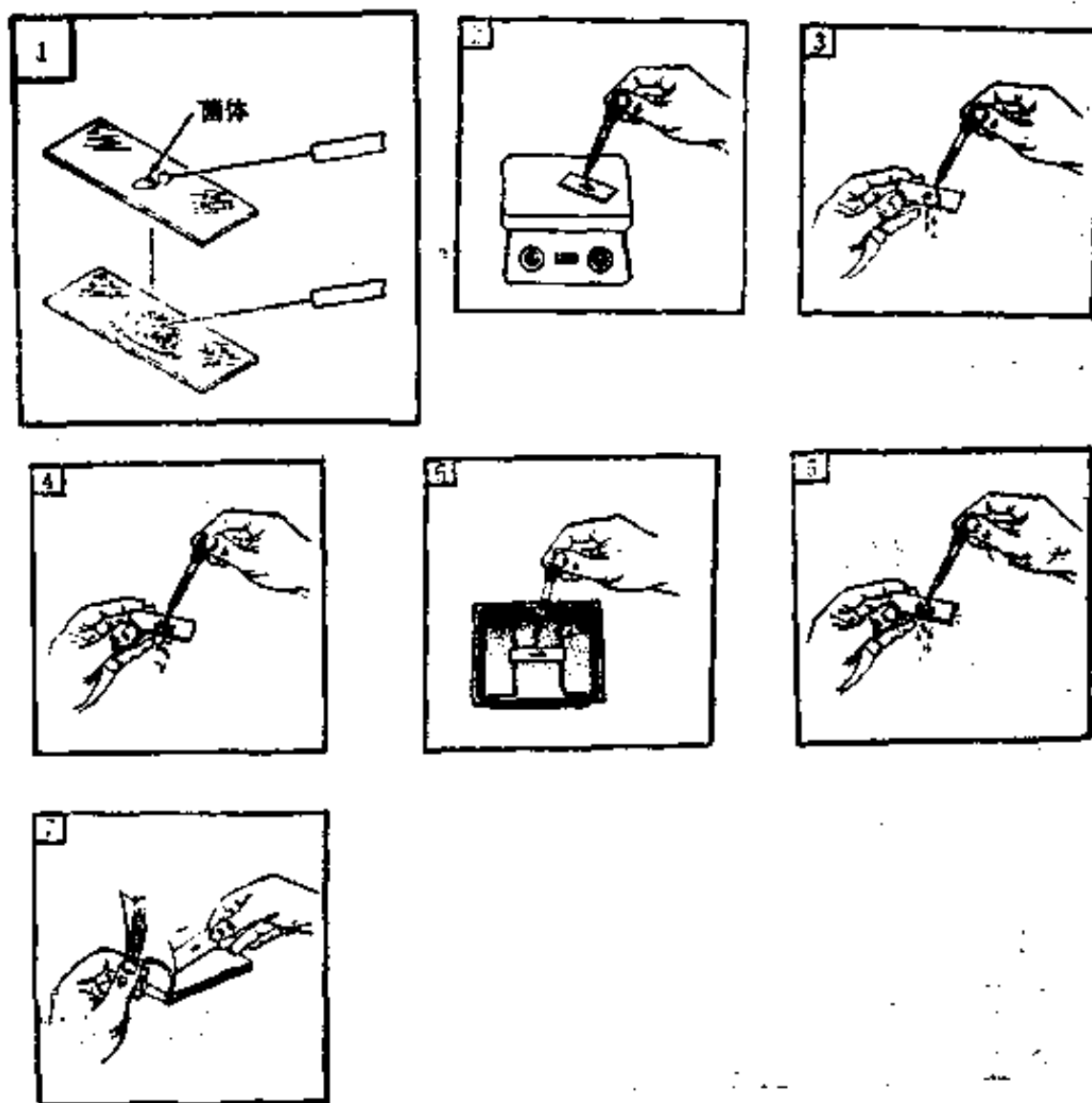
尽管绝大多数细菌可很容易被单染或用革兰氏染色法染色，但分枝杆菌属、放线菌、细菌芽孢、酵母菌子囊孢子则必须通过抗酸性方法才能被着色。

#### (一) 实验材料

1. 枯草芽孢杆菌18~24h培养斜面。
2. 石炭酸复红染色液，碱性美蓝染色液，3%盐酸酒精(70%酒精97ml加盐酸3ml)。
3. 器具 显微镜，载玻片，酒精灯，接种环等。

#### (二) 操作步骤

1. 涂片、干燥、固定。加一滴生理盐水于一张干净的载玻片上，取枯



草杆菌于生理盐水中涂磨后，自然干燥，以热固定。

2. 滴加3~4滴石炭酸复红染液，加热使染液冒出少许蒸汽，并及时添加染液至5min，切勿煮沸。

3. 标本自然冷却后，水洗。

4. 3%盐酸酒精脱色30~60s，不时摇动玻片；或将玻片倾斜，用3%盐酸酒精脱色至无颜色脱出为止。

5. 水洗后，加碱性美蓝复染2min。

6. 水洗。

7. 吸干后镜检。枯草杆菌芽孢被染成红色，而菌体则被染成蓝色。

### (实验3-6) 真菌的荧光染色与观察

荧光染色法较之普通染色法，其最特出的特点是敏感度极高，荧光染色液浓度极低而可在不表现明显毒性的情形下进行活体染色。荧光染色可以同时采用两种以上的色素，用同一光源和不同波谱的光能同时激发，而形成相互区别的荧光。

常用的荧光染色法有：

1. 金胺-酚染色法 用5%石炭酸制备0.1%金胺溶液，染已固定标本0~15min，3%盐酸酒精脱色3min，水洗后0.1%高锰酸钾处理5s。抗酸性细菌呈黄绿色。棒状杆菌菌体发淡黄色荧光，异染颗粒为金黄色。后者染色时用酒精脱色1min。

2. 金胺-罗丹明染色法 0.1%罗丹明水溶液与0.1%金胺石炭酸溶液等量混合，加温染色标本片30~90s，水洗干燥镜检。芽孢呈黄色荧光。

3. 金胺-单宁酸染色法 金胺-单宁酸染液配制方法如下：

(1) 媒染液A：

单宁酸	10ml
亚尼林水(亚尼林油0.15ml，无水乙醇 1.00ml，蒸馏水9.00ml)	2ml
蒸馏水	10ml

(2) 媒染液B：

硫酸镁	2g
3~5%石炭酸	10ml
蒸馏水	10ml

(3) 1%金胺酒精溶液。

媒染液A与B混合，补加1%金胺溶液7ml，用此染色标本5~10min，水洗吸干镜检。鞭毛呈黄绿色荧光。

4. 苏木精-吖啶橙染色法 需用铁苏木精和吖啶橙两种染液。铁苏木精染液配制如下：

母液A：苏木精	1g
95%酒精	100ml
母液B：29% FeCl <sub>3</sub> 溶液	4ml
浓盐酸	1ml
蒸馏水	95ml

工作液为母液A与B等体积混合物。

吖啶橙染液的使用浓度为0.1~0.01%。

标本经铁苏木精染色5~10min，再经吖啶橙染2min，水洗吸干镜检。真菌呈黄色或红色荧光。

以下以真菌的荧光染色法说明荧光染色法过程。

(一) 实验材料

1. 24~48 h 毛霉培养斜面。
2. 真菌解剖刀等。
3. 0.5%铁木精染液，0.1~0.01%吖啶黄染色液。
4. 10~20% KOH溶液。
5. 保存液：阿拉伯树胶10g，水10ml，纯甘油5ml，水合氯醛1g。
6. 荧光显微镜等。

(二) 操作步骤

1. 用真菌解剖刀取毛霉至1滴10%KOH溶液中，磨散。
2. 室温干燥、冷甲醇固定10min。
3. 玻片用水浸湿。
4. 铁苏木精染色5min。
5. 以缓流自来水洗。
6. 吖啶橙染色2min。
7. 再以水洗30min。
8. 95%酒精脱水1min，然后用95%酒精脱水两次，每次2~3min。

9. 以吸水纸吸干。
10. 加1~2滴保存液，覆以盖玻片。
11. 石蜡封固，荧光显微镜镜检。真菌菌丝发黄色荧光。

## 第二节 细胞各部结构成分的分离与观察

主要是细胞壁、荚膜、异染颗粒，肝糖及核的观察，以及部分物质的提取。

细胞壁指细胞质膜外的结构。它的功能主要是固定细胞外形和保护菌体，也是性活动的组成部分。所有的细菌均含有粘肽层。此外，革兰氏阳性菌中含胞壁酸和多糖，革兰氏阴性菌中含脂多糖-蛋白质-脂类化合物。酵母的细胞壁含有葡聚糖、甘露聚糖、几丁质、蛋白质、脂类。细胞壁的厚度因菌种而不同，一般多在10~25 $\mu$ m。细胞壁约占菌体干重的20%左右。

细胞壁和细胞膜多是多孔结构，但膜的孔径小得多。细菌细胞壁的制备过程见图3-1。

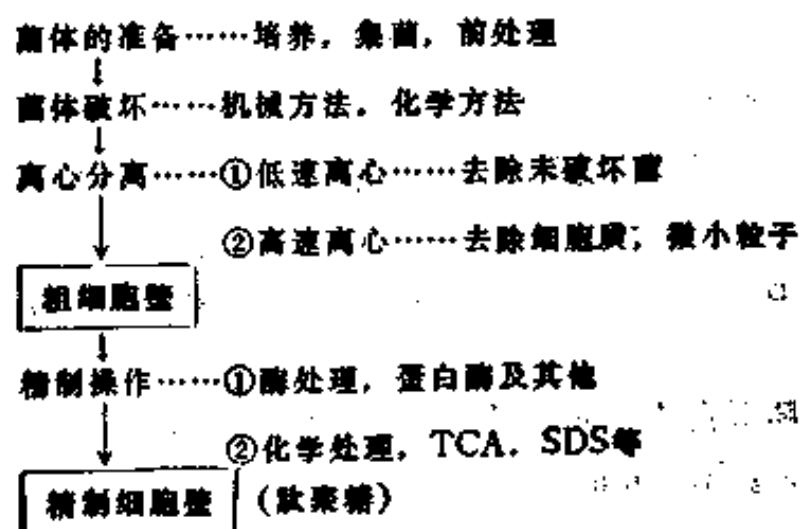


图 3-1 细菌细胞壁制备流程

### 〔实验3-7〕革兰氏阳性细菌细胞壁的制备

#### (一) 实验材料

1. 革兰氏阳性细菌(如枯草芽孢杆菌, 谷氨酸棒杆菌),
2. 0.05mol/L, pH7.2磷酸盐缓冲液(PB),
3. 三氯醋酸(TCA),
4. 生理盐水 0.85g溶于100ml蒸馏水中,
5. 10g/L胰蛋白酶(1:250 Fluka)溶液 1g胰蛋白酶溶于100ml 0.05mol/L, pH7.2磷酸盐缓冲液中, 4℃过夜, 次日经0.22μm过滤除菌, 分装-20℃存放,
6. 10mg/ml脱氧核糖核酸酶(DNase) 100mg脱氧核糖核酸酶溶于10ml去离子水中, 分装-20℃存放,

7. 超声波振荡器,
8. 低、高速离心机,

## (二) 操作步骤

1. 固体培养基或液体培养基中增菌, 收获,
2. 冷PB离心洗涤一次,
3. 按每克湿菌体加10ml pH7.2, 0.05mol/L PB的比例悬浮菌体, 将此菌悬液移入一不锈钢或玻璃容器内, 置冰水浴中,
4. 将超声振荡器探头浸入液面以下约2~3mm,
5. 打开超声振荡器, 调输出功率为100W, 处理15~30min,
6. 1000×g离心10min, 去除未破坏细胞,
7. 20000×g, 离心20min, 取细胞壁层,
8. 生理盐水离心洗涤两次(10000×g, 离心20min), 每次皆去除沉淀物和上清液交界部分及离心管底的未破坏菌体, 由此获得粗细胞壁(图3-2),
9. 将粗细胞壁100mg (相当于干物重25mg左右) 用5ml pH7.6, 0.05mol/L PB充分悬浮, 加入50μl脱氧核糖核酸酶溶液, 37℃, 作用1h,
10. 加入胰蛋白酶溶液50μl, 37℃缓慢搅拌2h,
11. 1000×g离心10min, 取上清液,
12. 20000×g离心20min, 取沉淀,
13. 用重蒸馏水离心洗涤3次,
14. 收获沉淀, 冻干保存, 此为“精制细胞壁”。如需进一步去除多糖、脂质等, 可继续进行以下步骤,
15. 取25mg细胞壁(干物重)悬浮于1.25ml 50g/L的三氯醋酸水溶液



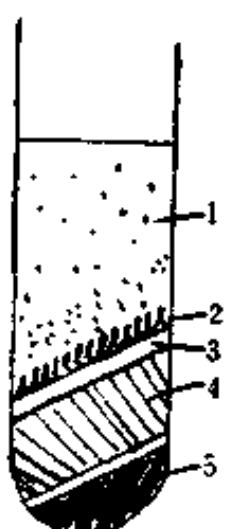


图 3-2 细菌破碎液经  
10000×g离心15min的  
分离状态

1—细胞质可溶成分、核糖体、小粒子 2—残渣样物质 3—细胞质膜碎片 4—细胞壁 5—全细胞、粗碎片

中，35℃下振荡萃取过夜，或90℃萃取15 min。

16. 20000×g 20min. 收获残渣。

17. 重复步骤15、16。

18. 重蒸水离心洗涤2~3次沉淀。

19. 乙醇、乙醚洗涤、脱水、干燥。

### (实验3-8) 酵母细胞壁甘露聚糖的制备

#### (一) 实验材料

1. 啤酒酵母。

2. 酵母细胞培养基 酵母膏10g，麦芽汁3ml，蛋白胨5g，葡萄糖20g，水1000ml。分装高压蒸汽灭菌。

3. 20g/L KOH。

4. 200ml/L乙酸。

5. 甲醇、丙酮、浓盐酸(A、R)。

6. 菲林溶液。

7. Amber lite IR-120 离子交换树脂。

8. 振荡器或摇床，布氏滤斗。

#### (二) 操作步骤

1. 在盛装有100ml酵母细胞培养基的500ml三角烧瓶中，接入5ml啤酒酵母菌液。

2. 20℃下振荡培养24h。

3. 600×g，10min离心收获菌体。

4. 无菌馏水洗涤3次。

5. 取20g湿酵母，用100ml，20g/L KOH悬浮，并移入300ml三角烧瓶中。

6. 100℃下加热萃取2h。

7. 冷却至室温，用200ml/L乙酸调整pH为中性。

8. 10000×g离心20min，取上清。

9. 在40~50℃下减压浓缩上清液至50ml。

10. 加入200ml甲醇并搅拌过夜。

11.  $6000 \times g$  离心 10min, 收获沉淀。
12. 甲醇洗涤 3 次, 丙酮洗涤 3 次, 风干, 至此获得粗多糖。
13. 取 1g 粗多糖用少许蒸馏水悬浮并搅拌至溶解, 补足水至 50ml。
14.  $100^{\circ}\text{C}$  下加热 2h, 使絮状不溶物析出。
15. 冷却至温室后,  $10000 \times g$ 、10min 离心去沉淀。
16. 上液加入等体积菲林溶液,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。
17. 倾去母液, 用刮勺在烧瓶壁上压碎沉淀至细粉末状。
18. 加入 20g/L KOH 溶液 20ml, 并搅拌。
19.  $4000 \times g$ 、10min 离心分离。
20. 重复步骤 19、20 两次, 再用甲醇洗涤 4 次。
21. 沉淀用 50ml 去离子水悬浮, 并加入 50ml Amberlite IR-120 离子交换树脂。
22. 磁力搅拌器上, 强烈搅拌 1h。
23. 过布氏漏斗去除离子交换树脂, 并用去离子水洗涤树脂 2~3 次。
24. 将滤液合并,  $40\sim 50^{\circ}\text{C}$  下减压浓缩至 20ml。
25. 加入至 180ml 甲醇中, 加浓盐酸 1 滴搅拌至生成白色沉淀。
26.  $4000 \times g$ 、10min 离心收获沉淀, 并用甲醇洗涤 4 次, 丙酮洗涤 3 次后风干, 至此获得白色粉末状的精制甘露聚糖。

由 1g 粗多糖大约可获得 300~350mg 左右的精制甘露聚糖。

### 〔实验 3-9〕 细胞壁的形态观察

#### (一) 实验材料

1. 菌种 巨大芽孢杆菌, 枯草杆菌。
2. 试剂 0.2% 结晶紫水溶液, 5% 单宁酸水溶液, 1% 磷钼酸水溶液, 3% 甲基绿水溶液。
3. 器具 显微镜, 香柏油, 二甲苯, 载玻片, 吸水纸, 擦镜纸。

#### (二) 操作步骤

##### 1. 单宁酸法

- (1) 将培养 16~18h 的菌体按常规方法制成涂片。
- (2) 用 5% 单宁酸媒染 3~5min, 水洗。
- (3) 用 0.2% 结晶紫染 3~5min, 水洗, 吹干, 用油镜观察, 细胞壁呈棕黑色, 细胞质呈淡紫色。

##### 2. 磷钼酸法

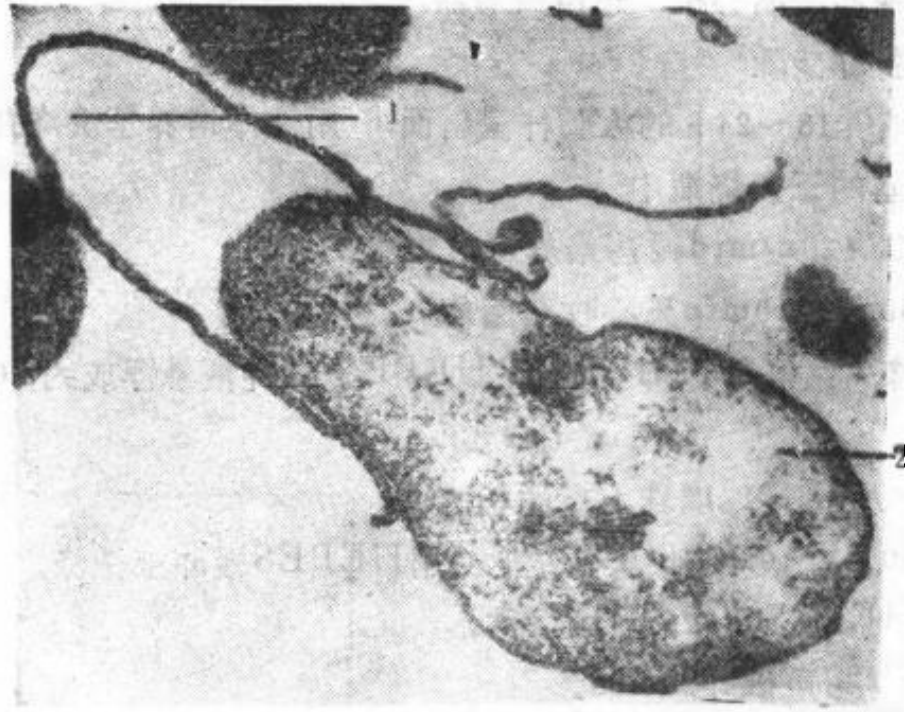


图 3-3 革兰氏阳性菌原生质体脱出，留下的细胞壁空壳  
1—细胞壁空壳 2—外移中的原生质体

(1) 制备浓厚的涂片，在未干时浸入1%磷钨酸水溶液3~5min。起媒介作用。

(2) 用1%甲基绿水溶液染3~5min。

(3) 水洗后吹干，用油镜观察，壁为绿色，细胞质无色。

图 3-3 为革兰氏阳性菌原生质体脱出，留下的细胞壁空壳照片。

#### (实验3-10) 革兰氏阴性菌细胞外膜蛋白的分离

革兰氏阴性菌细胞壁结构复杂，其中外膜是革兰氏阴性菌特有的结构，外膜蛋白(OMP)是其主要结构，在维持外膜结构，保证物质运输，作为大肠菌素噬菌体受体以及参与F因子接合等方面发挥极为重要的作用，OMP主要有OmpA、OmpC、OmpF、PhoE、Porus、Maltoporin、脂蛋白、tsx、TonA、FepA、Cir、Fec蛋白等。

##### (一) 实验材料

1. 大肠杆菌。
2. 培养基 蛋白胨10g，NaCl 5g，酵母膏1g，牛肉浸汁1000ml，pH7.0，高压灭菌30min。
3. 0.01mol/L HEPES 缓冲液。
4. 2% Triton X-100。

5. TE 0.05mol/L Tris-5mmol/L EDTA.

6. 高速冷冻离心机, 超声振荡器.

## (二) 操作步骤

1. 将培养18~24 h的大肠杆菌斜面, 用液体培养基洗涤并接入盛有100ml培养基的三角烧瓶中.

2. 37℃ 120r/min振荡培养至对数生长中期.

3. 1000×g 10min离心收获菌体.

4. 洗涤后菌体用0.01mol/L HEPES缓冲液悬浮成约 $10^{10}$ 个/ml菌悬液.

5. 加入一定量玻璃珠, 振荡10min.

6. 1000×g 10min收获菌体, 并用HEPES缓冲液洗涤.

7. 用HEPES缓冲液悬浮菌体.

8. 120 V超声破碎20min.

9. 7000×g离心10min, 去除细胞及碎片.

10. 上清液在4℃下200000×g离心45min, 取沉积, 此为细胞被膜.

11. 沉积悬于0.01mol/L HEPES-2% TritonX-100.

12. 4℃下200000×g离心45min, 去上清液.

13. 沉积用TE-2% TritonX-100悬液, 并置30℃水浴中10min.

14. 30℃下20000×g离心45min, 收获上清液, 即获得OMP.

## (实验3-11) 细菌荚膜的观察

细菌荚膜是整个包围在细胞外的粘稠的透明层, 部分地由细胞质内合成, 它大概继续合成到细胞壁区域为止(图3-4). 粘稠透明层荚膜的主要成分为多糖, 有少许菌种是多肽. 荚膜的主要功用是: (1) 对外界干扰具有增强抗性的作用, 使本身对外界其他生物的毒力抵抗有增强作用; (2) 是养料的贮藏库, 可以作碳源和能量的来源; (3) 是细胞代谢物的废物库; (4) 对干燥有抵抗作用. 产生荚膜的菌落常是光滑透明的, 称光滑型. 右旋糖酐就是明串珠菌的荚膜. 值得指出的是某些酵母也具有荚膜.

荚膜染色主要是采用负染色法. 因为荚膜和染料亲合力很低, 不易被染色, 所以若将菌体染色, 又使背景着色, 这样就可将荚膜衬托出来.

### (一) 实验材料

1. 菌种 金黄色葡萄球菌, 产气肠杆菌, 肉汁葡萄糖培养基经24 h培养.

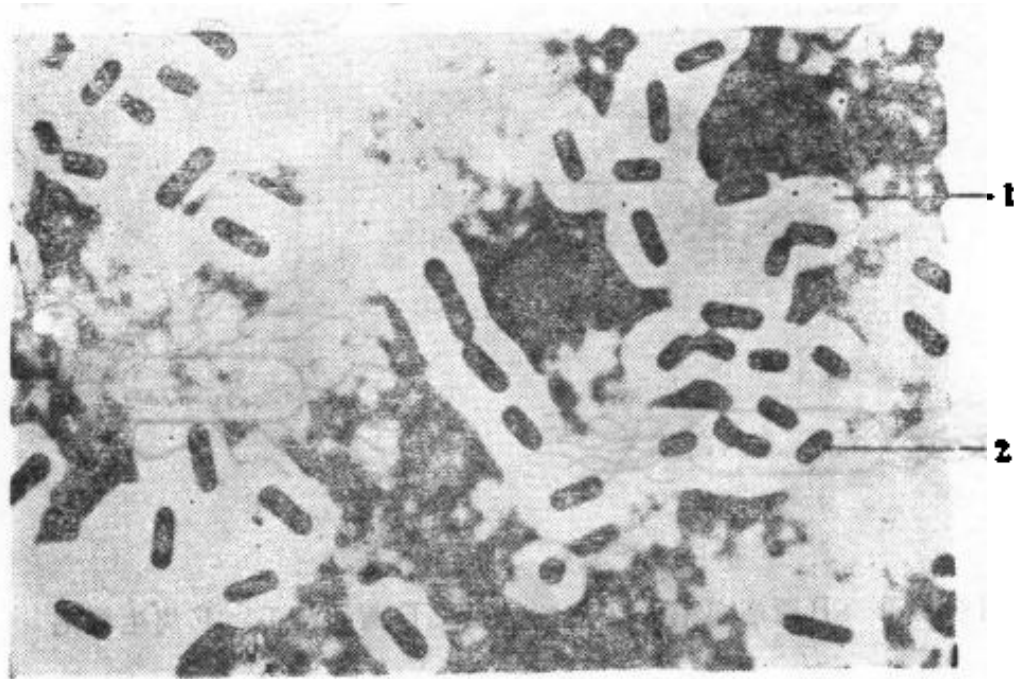


图 3-4 细菌的荚膜

1—荚膜 2—细胞

2. 试剂 印度墨水或黑素液, 蕃红液。

3. 器具 显微镜, 擦镜纸, 载玻片, 接种环

### (三) 操作步骤

1. 滴一滴印度墨水或黑素液于干净载片一侧。

2. 接种环取菌液一环, 与染色液混合均匀。

3. 取另一块干净的载玻片将混合物自载片一侧平刮至另一侧, 又平刮回来, 使成一薄层, 在空气中干燥。

4. 加蕃红液盖于载玻片上30s, 然后用水洗去。

5. 用吸水纸吸干载玻片底部水分, 风干, 镜检。此时背景为黑色, 细胞为红色, 荚膜为一些无色圈。也有在加蕃红前加纯甲醇固定1min的。

### (实验3-12)细菌鞭毛的观察

鞭毛是一种蛋白质, 为细的毛发状动性器官, 它位源于细胞壁区。并不是所有微生物都有此结构, 所以通常鞭毛是否存在和其数量是分类的依据之一。由于鞭毛直径仅有10~20nm, 在普通光学显微镜的分辨力限度之外。因此要想在普通光学显微镜下观察鞭毛, 就不仅要使它着色, 而且要使染料堆积在鞭毛上, 加粗鞭毛的直径, 然后再行观察。图3-5为一组细菌鞭毛的显微摄影照片及结构示意图。

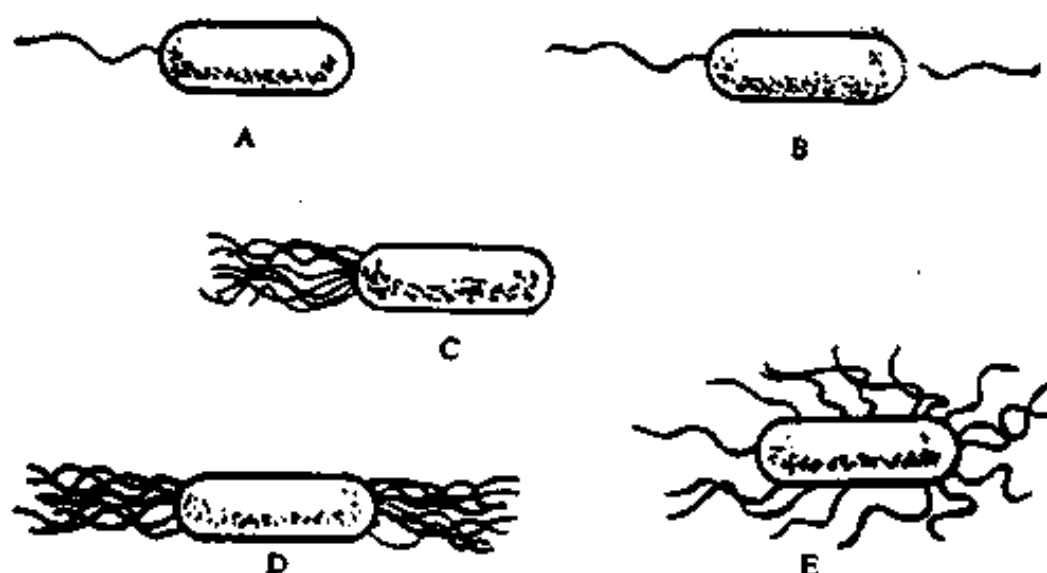


图 3-5A 细菌鞭毛

A 一端单毛 B 两端单毛 C 一端丛毛 D 两端丛毛 E 周生鞭毛

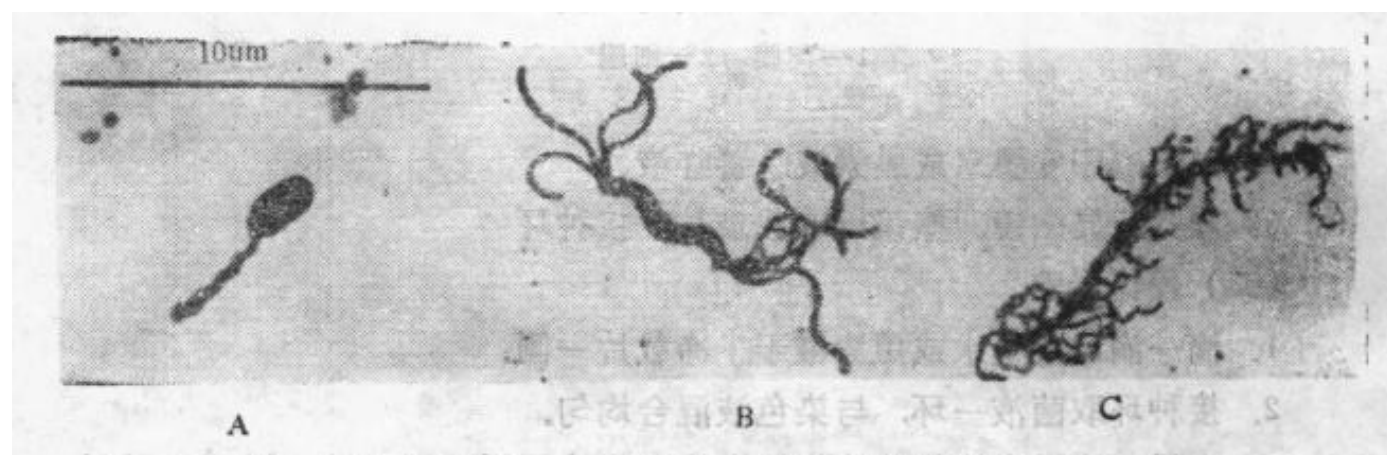


图 3-5B 细菌鞭毛

A 一端鞭毛 B 两端丛毛 C 周生鞭毛

### (一) 实验材料

1. 菌种 苏云金杆菌。
2. 鞭毛染色液 溶液A, 单宁酸5g,  $\text{FeCl}_3$  1.5g, 蒸馏水100ml, 福尔马林(15%) 2.0ml,  $\text{NaOH}$  (1%) 1.0ml, 配好后, 当日使用, 次日效果差, 第3日就不好使用。溶液B,  $\text{AgNO}_3$  2g, 蒸馏水100ml, 待  $\text{AgNO}_3$  溶解后, 取出10ml备用, 向其余的90ml中滴加浓  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 使之成为很浓的悬浮液, 再继续滴加  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 直到新形成的沉淀又重新刚刚溶解为止。再将备用的10ml  $\text{AgNO}_3$  慢慢滴入, 则出现薄雾, 但轻轻摇动后, 薄雾状沉淀又消失, 再滴入  $\text{AgNO}_3$ , 直到摇动后仍呈现轻微而稳定的薄雾。

状沉淀为止。如所呈雾不重，此染剂可使用一周，如雾重，则银盐沉淀出，不宜使用。

3. 器具 显微镜，擦镜纸，酒精灯，载玻片，接种环。

### (二) 操作步骤

1. 实验宜用新培养的菌体。一般用新制备的培养10 h的斜面。如斜面菌种已长期未移接，则最好用新制备的斜面连续移接2~3次后再使用。

2. 取清洁的载玻片，在一端滴一滴蒸馏水，用接种环挑取少量菌体在载玻片的水滴中轻沾几下，将载玻片倾斜，使菌液随水滴缓缓流到另一端，然后平放于空气中干燥。

3. 涂片干燥后，滴加A液染2~3min，用蒸馏水洗，或将废水沥干，或用B液冲去残水。一定要将A液充分洗净，再加B液，否则背景很脏。洗净A液后滴加B液，将载玻片于酒精灯上稍加热，使其微冒蒸气且不干，一般染30~60 s，然后用蒸馏水洗。

4. 镜检时，应多找几个视野，因为有时只有部分涂片上染上鞭毛。菌体为深褐色，鞭毛为褐色。

值得注意的是有鞭毛的细菌并不是在任何情况下都长鞭毛，而只是在一定的群体和个体发育阶段才长鞭毛。一般而论，在适宜的培养基上，具有适宜的温度和通气条件下，这样的菌体健壮，生长鞭毛情况就良好，尤其在短期内经过多次反复移植的菌体最佳。此外采用新鲜的染色液和高度清洁的载玻片才能获得满意的结果。

#### 附：鞭毛染色所用载玻片的清洗

选择光滑无伤痕的玻璃片，先用洗衣粉煮沸。洗衣粉最好在洗玻璃片前加蒸馏水煮沸，用滤纸过滤去渣。为了避免玻璃片彼此磨损，最好把载玻片放在特制的架上煮。煮后稍冷却后取出，用清水洗净，再放入浓洗液中浸泡24 h左右，取出用清水冲洗残酸，最后用蒸馏水洗净，沥干水并放于95%乙醇中脱水。取出玻片，用火焰烧去酒精，立即使用。如不立刻使用，可存放于干净盒中或50%乙醇中短期存放。清洁的玻璃片上滴上水滴后能均匀散开。

### 〔实验3-13〕微生物细胞核的观察

细胞核的主要成分为核酸(DNA)。细菌细胞中的DNA一般呈环状，以核质状(n)分布在细胞体内，核质无膜包围着，所以与典型的核有一定的区别(图3-6)。真菌细胞核一般呈球状或椭圆形，外面由核膜包住，核内的

中心是核仁，不管差别多少，但他们的功能是完全一致的。

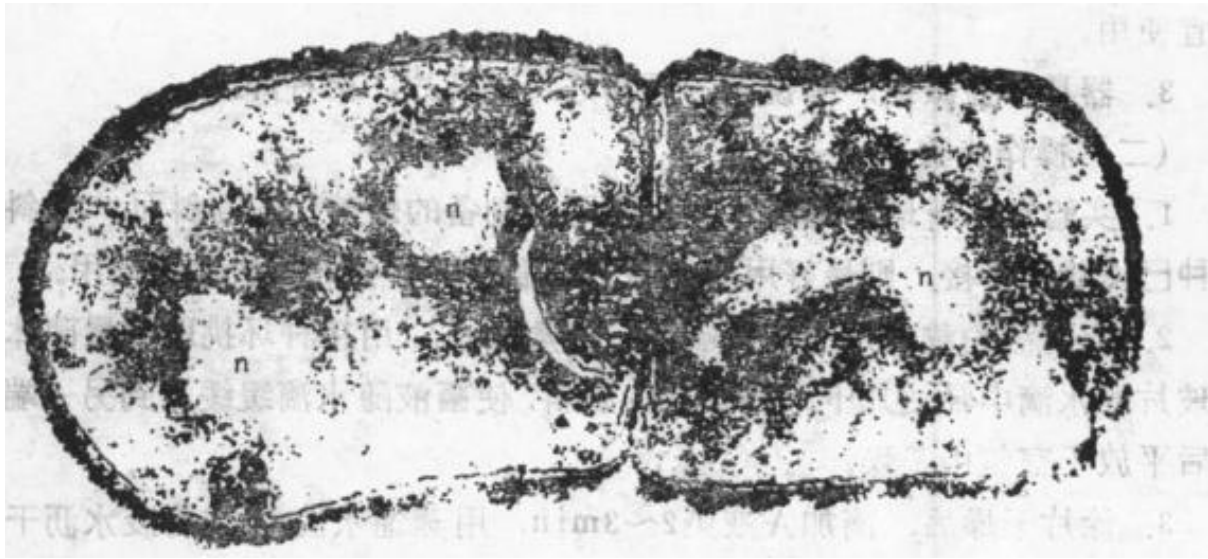


图 3-6 微生物细胞核

DNA为核酸，易为碱性染料着色，但细胞质中的核糖核酸(RNA)也易为碱性染料着色，特别是微生物细胞中RNA含量都较高，因而就会影响细胞核的染色和观察。进行核质染色时根据DNA较之RNA对稀酸水解有较大的抗性，因此可用稀酸在一定条件下对细胞进行水解，使RNA水解而保留DNA，然后再用碱性染料染色。若水解程度不足，RNA未水解掉，就区别不清DNA；若水解过度，DNA也会被水解。水解程度由使用酸的种类、浓度、处理时的温度和时间决定。常用 $1\text{mol/L}$  HCl，于 $60^\circ\text{C}$ 下处理5min，但具体应用要看所用菌种，培养时间而定。当然，若用RNA酶处理细胞以分解RNA，再用碱性染料，同样可使DNA着色。

Feulgen氏染色法是根据Schiff氏试剂进行反应而建立的。Schiff试剂含有碱性复红和亚硫酸，碱性复红和亚硫酸结合后，失去醌式结构而变为无色。当DNA经酸作用后生成的醛化合物与Schiff试剂结合后，使醌式结构恢复，合成一种带紫红色的碱性复红衍生物。这个染色法对DNA有特异性。细菌细胞用此法染色后，可在普通光学显微镜下观察到核。

Feulgen染色法主要分二步：(1) 将细菌用 $1\text{mol/L}$  HCl温和水解，使DNA中嘌呤碱与戊糖分开，放出戊糖基的醛基。(2) 放出的戊糖醛基与Schiff试剂作用后呈紫红色。

#### (一) 实验材料

1. 菌种酵母。
2. 试剂



(1) 1mol/L HCl.

(2) 2% 钨酸, 此渗透力弱, 固定时勿见光, 固定后用水洗净, 否则组织发黑.

(3) Schandium固定液: ① 饱和升汞水溶液(50ml升汞水溶液加95%酒精25ml), ② 冰醋酸; 取①液9ml加②液1ml混匀后加热60℃.

(4) 亚硫酸水溶液: 10%偏重亚硫酸钠水溶液5ml, 1mol/L HCl 15ml, 加蒸馏水100ml混合即得.

(5) Schiff试剂: 将1g的碱性复红加入100ml煮沸的蒸馏水中, 振荡5min, 冷至50℃左右过滤, 加入1mol/L HCl 20ml, 摇匀, 待冷至25℃时, 加 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ (偏重亚硫酸钠)3g, 摇匀后装在棕色瓶中, 用黑纸包好, 放置暗处过度. 此时试剂应为淡黄色(如为粉红色则不能用), 再加中性活性炭过滤, 其滤液振荡1min后再过滤, 滤液置冷处备用. 过滤操作也需避光进行. 在整个操作过程中所用的器皿都需十分清洁、干燥, 以消除还原性物质.

3. 器具 显微镜, 吸水纸, 擦镜纸, 载玻片, 酒精灯, 接种环, 水浴, 钨酸蒸汽瓶.

## (二) 操作步骤

1. 取培养8~10h的酵母涂片, 风干.

2. 将涂片置于有2%钨酸的蒸汽瓶口上, 用钨酸蒸汽固定5min, 然后放入加热至60℃的Schandium固定液中10min.

3. 用水冲洗固定后的标本, 然后放在60℃ 1mol/L HCl中水解8min, 水洗.

4. 用Schiff氏试剂作用30~40min.

5. 到时取出放在亚硫酸水溶液中洗5min.

6. 再取出水洗, 干燥后用油镜观察.

## 〔实验3-14〕细菌染色体DNA的分离与观察

细菌染色体DNA的分离包括细菌细胞壁的破碎、蛋白外膜的去除及核酸的沉淀等步骤.

### (一) 实验材料

1. 枯草芽孢杆菌.

2. 培养基 蛋白胨10g, 牛肉膏10g, 酵母膏3g, NaCl 5.0g, 水1000ml, 调pH至7.2, 高压蒸汽灭菌.

3. TES 10mmol/L, EDTA  
150mmol/L, pH8.0 Tris,  
150mmol/L, NaCl
4. ST 250g/L蔗糖  
50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)
5. 30mg/ml溶菌酶溶液 用ST配制, 现配现用.
6. 200g/L十二烷基硫酸钠 (SDS) 20g SDS (电泳级), 蒸馏水  
100ml.
7. 水饱和酚溶液 新鲜出厂苯酚 (分析纯, 最好用液体酚) 加等体积  
1.0mol/L Tris (pH8.0)饱和过夜, 吸去上层水相, 用50mmol/L Tris饱  
和至上层水相pH至7.6, 加入0.1% 8-羟基喹宁, 置棕色瓶内, 于4℃存放  
备用.
8. 氯仿-异戊醇溶液 氯仿:异戊醇为24:1.
9. 100%、70%乙醇若干毫升.
10. TE 10mmol/L Tris (pH8.0)  
1mmol/L EDTA
11. RNA酶溶液 RNase A 5mg, 0.5mmol/L NaCl 1ml, 沸水  
中保温10min, 缓慢冷却后小量分装-20℃存放.
12. 冷冻离心机、水浴器、煮沸锅等.
13. 链霉蛋白酶溶液 20mg链霉蛋白酶溶于1ml 10mmol/L Tris中,  
80℃孵育10min, 分装, -20℃存放.

## (二) 操作步骤

1. 枯草杆菌接入含200ml肉汤培养基的500ml锥形瓶中, 37℃振荡培  
养16h.
2. 离心收获细胞, TES洗涤3次.
3. 沉积用TE洗涤一次, 并用TE悬浮成每1ml菌悬液约含0.2g湿菌  
体.
4. 取此菌悬液0.5ml继续试验.
5. 加入0.05ml溶菌酶溶液, 37℃孵育15min.
6. 加入0.03ml 20% SDS, 搅拌数分钟.
7. 加入0.006ml RNaseA溶液, 37℃孵育60min.
8. 加入0.024ml链霉蛋白酶溶液, 50℃孵育过夜.

9. 加入0.25ml TES.
10. 加入0.8ml饱和酚；用吸管轻轻吹吸1min.
11. 冰浴中或低速离心使相分离.
12. 吸取上层水相，加等体积氯仿-异戊醇溶液，用吸管轻轻反复吹吸1min.
13. 吸取上层水相，加2体积无水乙醇（-20℃预冷），-20℃沉淀过夜.
14. 用灭菌玻璃棒挑出沉淀物，旋转玻璃棒，沉淀物绕在玻璃棒上，空干.
15. 将绕在玻璃棒上的DNA溶于0.1ml TE中，-20℃存放.

此为0.5ml菌液的提取步骤，如需大或小样本提取，可根据此步骤相应扩大或缩小。此提取步骤对其他微生物染色体DNA的提取是通用的。染色体DNA的电镜观察与质粒电镜的DNA观察完全相同，请参阅有关章节。图3-7为染色体DNA的透射电镜照片。

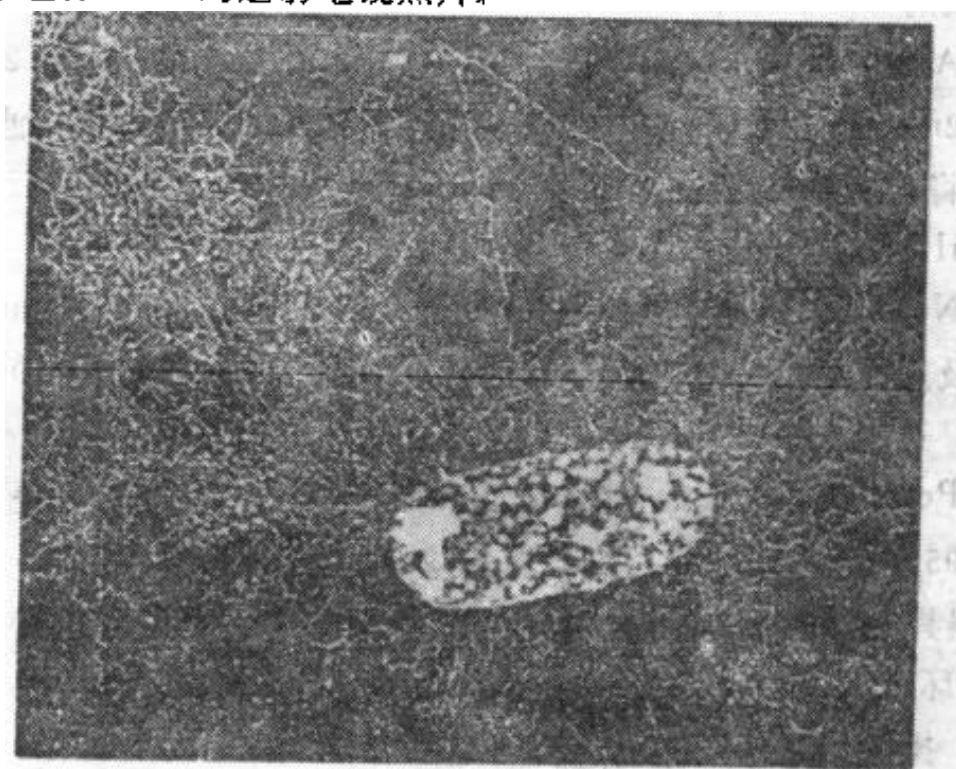


图 3-7 染色体DNA的透射电镜照片

#### 〔实验3-15〕异染颗粒的观察

异染颗粒广泛存在于微生物细胞内，而在酵母细胞中是最重要的组成部分之一。在酵母细胞中，这些颗粒几乎完全局限在液泡内，但也出现在包围着液泡的细胞质内。异染颗粒可能起源于细胞质内，而以后才定位于液泡内。在老龄细胞中，异染颗粒可以表现为相当大的团块。颗粒在未染

色的制片中呈现为折光体，并且对亚甲基蓝和其他碱性染料表现极大的亲和性，这种表现表明它们是酸性的。

异染颗粒已经确定含有RNA。颗粒被认为具有细胞贮藏营养物质的机能。现在认为它可能由多磷酸盐组成的一种高能库而积极参与新陈代谢。这种颗粒大量出现在老龄细胞内，在幼龄的培养物内，细胞非常活泼，很少能积累异染颗粒。当细胞变老和活动较少时，就出现颗粒。当含有大量异染颗粒的老龄细胞移植到新培养基时，颗粒消失，只有当细胞变老时，颗粒才重新出现。异染颗粒的染色主要是根据它易与亚甲基蓝染色，并且显示出与细胞质其他部分不同的颜色。异染颗粒可因所用染料不同呈现不同颜色。

### (一) 实验材料

1. 菌种 酵母，斜面培养48 h。

2. 试剂

(1) Albert氏染色液：a液：甲苯胺蓝0.15g，孔雀绿0.2g，溶于95%酒精2ml中，加入蒸馏水100ml及冰醋酸1ml，放24 h后，以滤纸过滤。b液：先将碘化钾3g溶于蒸馏水10ml中，再加碘2g，待溶解后，加蒸馏水至300ml。

(2) Neisser氏染色液：a液：亚甲基蓝1g溶于95%酒精2ml后，加冰醋酸5ml及蒸馏水95ml，混合过滤。b液：斯麦褐0.2g溶于100℃蒸馏水100ml中，过滤。

(3) Ponder氏染色液：甲苯胺蓝0.1g，1号天青0.1g及美蓝0.1g，分别溶于95%酒精5ml中，再加蒸馏水120ml和冰醋酸1ml。

3. 器具 显微镜，香柏油，二甲苯，吸水纸，擦镜纸，载玻片，酒精灯，接种环。

### (二) 操作步骤

1. Albert法 涂片，热固定，用Albert染液a液染3~5min，清水洗，吸干。加Albert染液b液染1min，水洗，吸干，风干，油镜观察，异染颗粒暗色或黑色，细胞质淡绿色。

2. Neisser法 涂片，热固定，用Neisser染液a液染30~60s，水洗，再后Neisser染液b液染30s，水洗，干后镜检。菌体呈黄褐色，异染颗粒呈深紫色。

3. Ponder法 涂片，热固定，滴加染液染5min，水洗，干后镜检。

菌体呈淡蓝色，异染颗粒呈深蓝色。

### 〔实验3-16〕酵母细胞内脂肪颗粒和肝糖颗粒的观察

肝糖粒和脂肪粒均系微生物细胞内的贮藏颗粒，酵母细胞内特别明显。肝糖是一种白色的无定形的碳水化合物，与糊精和淀粉性质接近。它与稀无机酸一起煮沸后水解为葡萄糖，也可为淀粉酶水解为葡萄糖。肝糖加一滴稀碘液即产生褐色而易于辨认，当溶液加热到60℃时颜色消失，再冷却后又重新出现。在营养良好的酵母菌细胞内可以看到大量的肝糖，而缺乏营养时又消失。肝糖随酵母的菌龄而增加，48 h后达到最大量。当发酵作用临向结束时，肝糖含量逐渐少，最后完全消失。所以观察肝糖量也可作为了解发酵情况的一种检测手段。肝糖一般局限在液泡内，可与含有异染颗粒的液泡区别开来。肝糖在孢子生成时积累在子囊内，并且在孢子成熟时被孢子吸收。

脂肪粒以大小不一的颗粒状态存在于酵母细胞质内，它们可被钨酸染成褐色。脂肪球在酵母菌细胞内是很明显的，特别是当孢子生成时，作为子囊孢子的营养。酵母内有几种脂肪含量特高，如内孢霉等，有时含量达菌体净重的40~60%，所以不少微生物学家曾研究以此作为人类的油脂来源。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母培养48h的斜面。
2. 试剂 碘液：碘化钾3g溶于100ml蒸馏水中，再加入1g碘，0.5%苏丹黑液。
3. 器具 显微镜，载玻片，盖玻片，酒精灯，接种环，吸水纸。

#### (二) 操作步骤

1. 肝糖观察 加一滴碘液于载玻片上，取菌体少许和匀，加盖片，观察。肝糖呈红褐色。
2. 脂肪观察 加一滴苏丹黑液于载玻片上，取菌体少许和匀，加盖片，镜检。细胞内脂肪为黑色。

### 〔实验3-17〕酵母液泡及线粒体的提取

在微生物细胞内都含有液泡。它是细胞质内空腔，内含细胞液的液体。这种液体通常是各种有机酸及盐类的水溶液，在细胞接近成熟时，细胞所制造的一些水溶性贮藏物质溶解在泡液中，就是一些不同阶段的中间代谢产物和一些分泌物也会暂时贮存于其中。液泡中的不溶成分则会沉淀成为

细胞内含颗粒。但是近来的研究表明不同微生物的液泡组成不同，功用不同，数量也有差异。酵母细胞的液泡有时非常明显，就是在活细胞制片时也可观察到。

线粒体是真核细胞的细胞器之一，它不但具有膜的完整外形(图3-8)，而且含有一些特殊的酶，它也贮存有遗传信息、复制和传送的一套基因。线粒体含有酶与呼吸作用有关，所以细胞依靠线粒体放出的能量来完成细胞的各项生理功能，故有细胞“动力房”之称。线粒体的形状是多种多样的，常因细胞的种类不同和生理状态而异，在一般情况下为粒状或杆状。

### 一、酵母液泡制备

#### (一) 实验材料

1. 菌种 麦芽汁液体摇瓶培养至对数后期或平衡期初期的酵母（约需净重300mg，即3g左右的湿酵母）。

2. 试剂 0.025mol/L EDTA-0.1mol/L 半胱氨酸液，0.5mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.25mol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (pH5.8)，0.7mol/L 甘露醇-25mmol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (pH6.5，简称 MTC)，1mmol/L

EDTA-0.025% TritonX-100-25mmol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (pH6.5)，16% (W/V) Ficoll 的 Tris-柠檬酸缓冲液 (16% FTC)；7.4% 和 7.2% 的 FTC；蜗牛酶。

3. 器具 超速离心机，大口吸管，离心管。

#### (二) 操作步骤

1. 酵母菌体3g放入8ml的0.025mol/L EDTA-0.1mol/L 半胱氨酸中，30℃下放置1h后，2000r/min离心收集。

2. 取30mg的蜗牛酶溶入15ml的0.5mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0.025mol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (pH5.8) 中，放入菌体，于

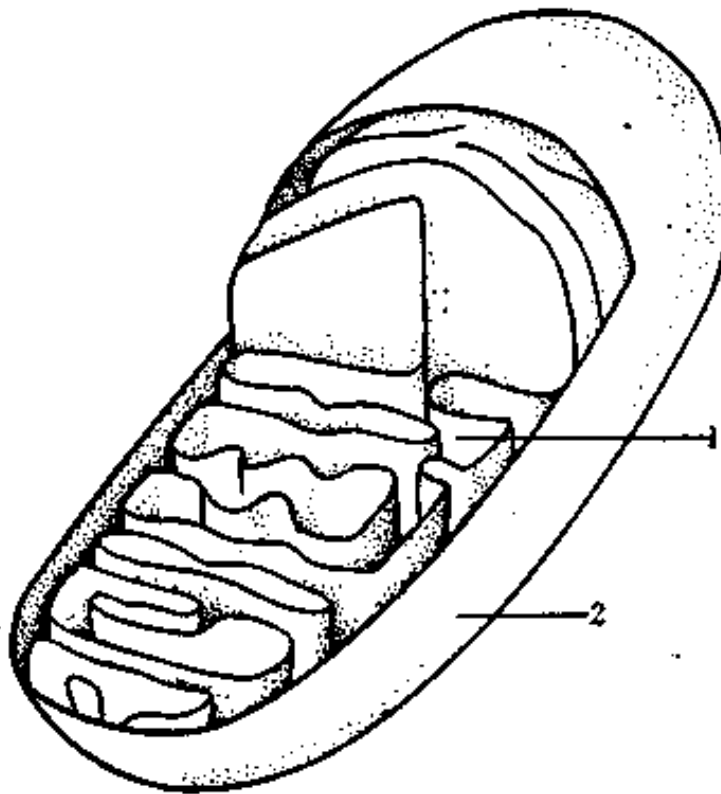


图 3-8 线粒体的形状  
1—内膜(脊) 2—外膜

30℃下保温30~60min, 消化细胞壁成原生质体。

3. 2000r/min离心收集原生质体, 用45ml pH6.5的 MTC洗净, 离心, 用MTC定容至10ml。

4. 取7ml原生质体悬液, 相应加入7ml 1mmol/L EDTA-0.025% TristonX-100-25mmol/L Tris-柠檬酸缓冲液 (pH6.5), 用大口吸管轻轻搅动使之破裂。

5. 在5min内加入3ml MTC和16% FTC。

6. 取日立RPS25型离心管, 加入1ml 16% FTC, 继第二层加入10ml样品, 第三层加8ml 7.4% FTC, 第四层加8ml FTC, 以2400r/min离心2h。

7. 收集最上层的白色区带, 加1/5体积的16% FTC, 重复上述离心操作, 收集最上层得液泡。

## 二、酵母线粒体的制备

### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母在培养基[酵母膏3.5g, 蛋白胨3.5g, 甘油10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g, 水1000ml]中摇瓶培养至对数期, 离心收集。

2. 试剂 0.1mol/L EDTA, 2-巯基乙醇, 1.3mol/L山梨醇-0.1mmol/L EDTA-10mmol/L Tris-顺丁烯二酸 (pH6.5), 0.65mol/L山梨醇-0.1mol/L EDTA-0.03%血清蛋白, 蜗牛酶。

3. 器具 超速离心机, 韦林氏捣切机。

### (二) 操作步骤

1. 取湿酵母细胞1g, 加1.4ml 0.1mol/L EDTA, 和0.24ml 2-巯基乙醇, 再加水至总量为3.5ml, 将此悬液30℃振荡30min后, 2000×g离心10min, 收集细胞, 用10%甘露醇洗净, 离心。

2. 把细胞悬于2ml的1.3mol/L山梨醇-0.1mmol/L EDTA-10mmol/L Tris-顺丁烯二酸中, 加蜗牛酶4mg, 30℃处理到90%细胞成为原生质体。

3. 以4000r/min小心离心, 0℃收集原生质体, 用1.3mol/L山梨醇液洗涤后, 离心。

4. 按0.1g/ml悬浮于0.65mol/L山梨醇-0.1mmol/L EDTA-0.05%血清蛋白中, 用韦林氏捣切机低速处理30s, 破坏细胞。

5. 以2100r/min离心5min得上清液，再以8100×g离心9min得到深褐色沉淀，再用同一溶液洗沉淀两次，即为线粒体制剂。

### 第三节 芽孢、子囊孢子和假菌丝的观察

#### 一、芽 孢

某些细菌在菌体细胞内会形成芽孢，是一种内生孢子。芽孢大多呈圆形或椭圆形，它的形状、位置以及它的形成是否使菌体膨胀等，都是细菌种的特征(图3-9)。

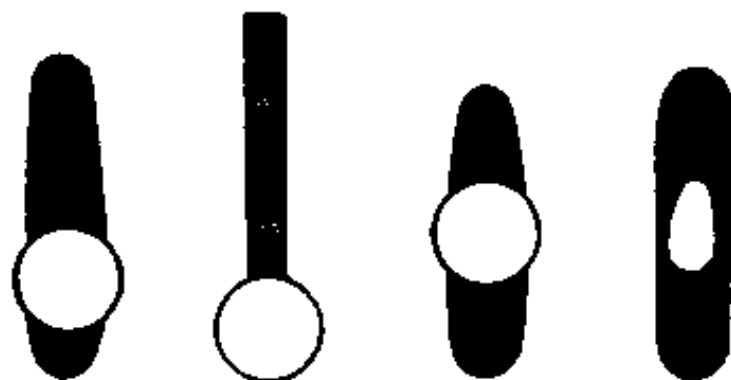


图 3-9 芽孢的位置

工业上常见的枯草芽孢杆菌的芽孢一般都位于细胞当中，且菌体不膨大。但嫌气的梭状芽孢杆菌，其芽孢长于细胞的一端使菌体膨大成一鼓槌状(图3-10)。酿酒工业中遇到的许多己酸菌及丁酸菌也是这种形态。

芽孢在光学显微镜下折光率很大，难于用普通染色法着色，但经用媒染剂或加热法一旦着色，则难于脱色。芽孢的内部是浓缩的细胞质和核，外部由一或两层厚孢子膜包围，它的许多性质与营养细胞是不同的(表3-3)。例如它的水分较营养细胞少，约为60%，而且水分大多呈结合水状态；芽孢内富含吡啶2,6-二羧酸钙，这可能与它对热具有极大抗性有关(图3-11)。

关于芽孢的形成一般认为是细菌生长的环境变得恶劣，如陈





图 3-10 梭菌的芽孢  
1—芽孢 2—梭菌

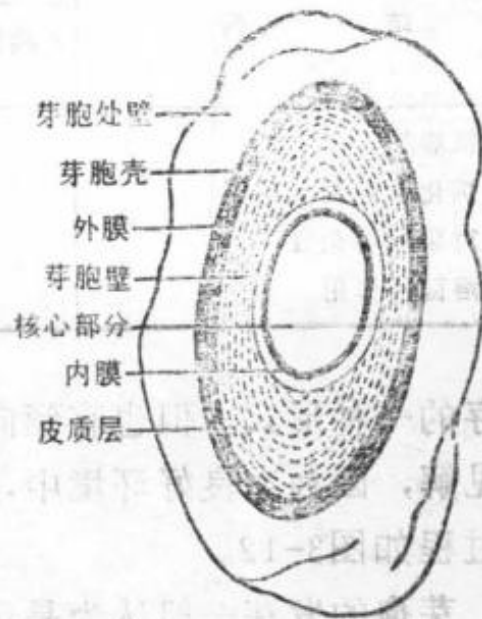


图 3-11 细菌芽孢的结构

旧培养基等使之容易形成。因此理解芽孢为抵抗不良环境，延续

表 3-3 细菌内生孢子和营养细胞的区别

结 构	营养细胞	芽 孢
	典型革兰氏阳性细胞	厚的孢皮层 孢衣、外孢子膜(某些区别)
显微镜观外形	无折光性	折光性
化学成分:		
钙	低	高
吡啶二羧酸	无	有
PHB	有	无
多糖	高	低
蛋白质	较低	较高
硫氨基酸	低	高
酶促活性	高	低
代谢(氧摄取)	高	低或缺
大分子合成	有	无
mRNA	有	低或无

续表

结 构	营养细胞	芽 孢
	典型革兰氏阳性细胞	厚的孢皮层 孢衣、外孢子膜(某些区别)
抗热性	低	高
抗化学药物和酸类	低	高
对染料可染性	可染	只有特殊方法可染
溶菌酶作用	敏感	抗性

生存的一种形式。但也有倾向为芽孢是细菌生活期中的一个阶段的见解，因为在良好环境中，细菌也会形成芽孢。细菌芽孢的形成过程如图3-12。

芽孢的发芽一般认为是环境条件适合后，它就从一种休眠体状态转变为营养生长状态。发芽的早期阶段，皮层已经转化，使得核心部分没有任何可看清的各种结构。然后是伸长和外长的阶

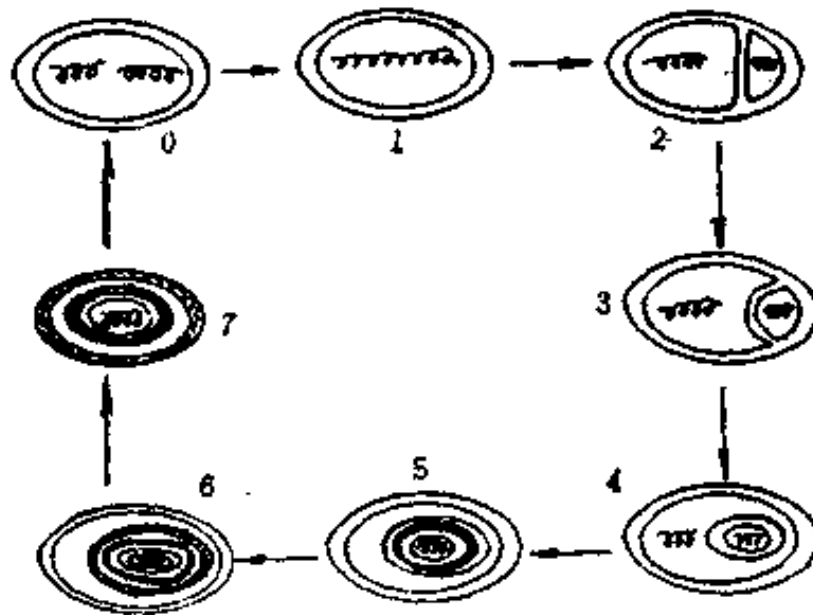


图 3-12 细菌芽孢的形成过程

0—细菌繁殖体，有两团核质 1—核质连接形成长轴丝 2—菌体一端的胞膜内陷，形成横膈，将部分染色体和原生质包住 3—横膈两端边缘向菌体顶端生长推进，逐渐融合 4—细胞中出现由两层膜（内膜和外膜）包住的前芽孢 5—芽孢膜合成肽聚糖，堆积在两层膜之间，形成皮质层 6—在外膜之外又形成芽孢壳 7—原菌体崩溃，释放出成熟的芽孢，以后在适宜条件下又可发芽形成繁殖体

段。在生长阶段表示细菌细胞被芽孢外壳收缩住；在外长阶段则表层物质为芽孢的残余物所夹住，而细胞则外出。

芽孢能多年保持休眠状态，但却能在几分钟之内变回成营养细胞。这过程总的只有两步，即终止休眠和生长。终止休眠可由某些环境变化触发引起，如热，60~70℃处理几分钟常引起休眠终止。芽孢明显膨大、它的外壳层破裂、新的营养细胞推开皮层的过程就叫生长。然后开始分裂。

有关芽孢的形成和萌发的因素是复杂的，了解这些因素在实践上是有其重要意义的。因为能形成芽孢的细菌，有的是人的重要病原菌，有的是发酵工业上的生产菌或污染菌。对芽孢形成和发芽的研究与消毒灭菌，加快生长的控制条件都有关。

#### 〔实验3-18〕细菌芽孢形成及发芽的观察(附伴孢晶体的观察)

##### (一) 实验材料

1. 菌种 芽孢杆菌培养24~48h斜面。

2. 培养基

形成芽孢培养基：酵母膏0.07g，蛋白胨0.1g，葡萄糖0.1g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.02g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g，pH7.2，琼脂2g，水100ml，58.84kPa灭菌30min。

肉汁营养培养基：牛肉膏0.5g，蛋白胨1g，NaCl 0.5g，水100ml，pH7.2，103.4kPa灭菌20min。

3. 试剂 5%孔雀绿染液，0.5%蕃红液。

4. 器具 培养箱，显微镜，吸水纸，擦镜纸，载玻片，酒精灯，接种环。

##### (二) 操作步骤

1. 将斜面接入产芽孢斜面，培养24h。

2. 涂片，固定。

3. 加孔雀绿染液3~5滴于涂片处，在火焰上加热使产生蒸汽，但不沸腾，并随时补加染液，使涂片不干，约维持6~10min。

4. 水洗，用0.5%蕃红液染1min，水洗，干燥，镜检，芽孢绿色，菌体红色。

5. 将产芽孢菌体菌悬液（产芽孢培养基培养48~72h）在接入肉汁营

养培养基前用80℃水浴处理10min, 然后在30℃下培养, 每隔1h镜检一次, 观察发芽情况。

附：伴孢晶体的观察

有些芽孢杆菌在芽孢囊的一端产生一种多肽性质的晶体, 通常称为伴孢晶体。这种晶体可以作为微生物农药, 它能杀死一些昆虫, 如青虫、毛虫之类。晶体的形成稍迟于芽孢, 因此应在形成芽孢之后检查有无晶体, 一般在肉汁蛋白胨斜面上培养48h。

菌种：苏云金杆菌。

染料：1/10稀释的石炭酸品红液。

步骤：按常规制片。滴染液染1min, 水洗, 风干, 镜检。晶体呈红色菱形状, 游离芽孢为红色圈状。

## 二、酵母子囊孢子

子囊孢子是子囊菌纲进行有性繁殖的一种产物。但产生的子囊孢子形状, 因各种菌每个子囊形成的孢子数及孢子产生的难易程度而不同, 这里主要是指酵母菌的情况 (图3-13A)。

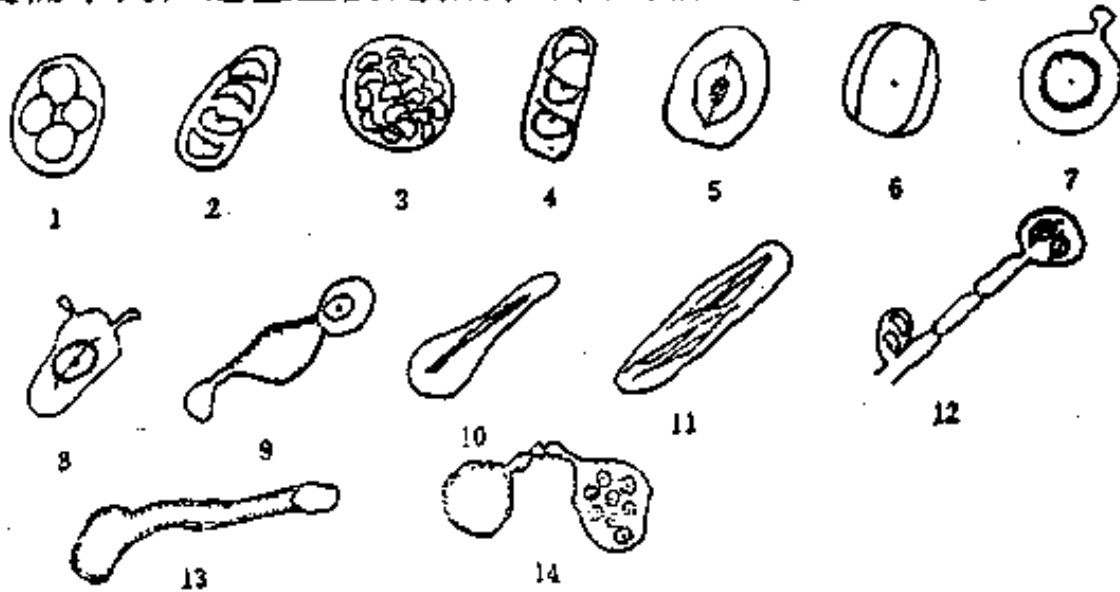


图 3-13A 酵母的子囊孢子形态

1—球形 (*Saccharomyces*属) 2—半球形 (*Pichia*属) 3—半月形, 肾形 (*Kluyveromyces polysporus*) 4—草帽形 (*Hansenula*属) 5—土星形 (*Hansenula Salurnus*) 6—长方形 (*Lodderomyces elongisporus*) 7—球形棘面, 油滴 (*Debaryomyces hansenii*) 8—球形棘面, 油滴, 中央绿轮 (*Schwanniomycetes*) 9—球形棘面 (*Nadsonia*) 10—针状 (*Melschnikowia*) 11—有鞭毛纺锤状 (*Nematospora*) 12—扣篮状内孢霉的孢子 13—管囊酵母的孢子 14—油脂酵母的孢子

作者曾对我国各种有代表性的酿酒酵母进行试验，它们的产子囊孢子能力相差极大。

表3-4中的数据表明，一般上面型啤酒酵母都不同程度地产孢子，但底面型的卡氏啤酒酵母是很少产或不产的。而且在实验室长期人工培养移接的酵母，产孢子能力都会有不同程度的衰减。因此啤酒酿造酵母常用能否快速形成孢子来测其纯度。

酵母在一般培养基上很难产生子囊孢子，也就是说从平时的无性繁殖转变到进行减数分裂，需要特殊的培养基。当然不同品种对此要求有差异。表3-5是推荐采用的产子囊孢子培养基。

在酿酒中，主要应用的酵母还是酿酒酵母种中的亚种，即酿酒酵母、酒精酵母和啤酒酿造酵母等，它们形成的孢子主要为球形，但每个子囊中形成的孢子数不相同，产孢子的细胞比例也不同。

表 3-4 各种酿酒酵母产子囊孢子能力

菌号	培养时间 (h)	48	88	120	156	两星期	用途	来源
2.604	几个	5	30	55	50	啤酒酿造	中科院微生物所 (北京原双合盛啤酒厂用)	
WL-2006	0	0	8	10	30	啤酒酿造	上海啤酒厂	
WL-2007	0	0	0	0		啤酒酿造	沈阳啤酒厂	
WL-2012	0	0	0	0	0	啤酒酿造	上海华光啤酒厂	
2.109	0	几个	2	5	30	白酒酿造	中科院微生物研究所	
2.558	几个	50	50	65	85	酒精发酵	中科院微生物研究所	
WL-2003	0	3	5	10	50	酒精发酵	山东酒精厂	
WL-2001	0	3	30	40	40	酒精发酵	常州酒精厂	
WL-2005	0	20	50	50	50	酒精发酵	南阳酒精厂	
WL-2011	0	30	40	40	40	酒精发酵	上海酒精二厂	
WL-2013	0	几个	10	10	10	酒精发酵	Rasse XI	
WL-2010	30	98	98	98	99	面包酵母	古巴	
WL-2014	0	0	0	0	0	啤酒酿造	青岛啤酒厂	

注：培养基及培养条件见实验部分。

表 3-5

产子囊孢子培养基的成分及重量百分比

成分 (g)	培养基名称	酵母青葡萄琼脂	Gorodkova 琼脂	酵母青麦芽琼脂	玉米粉琼脂	醋酸琼脂	马铃薯葡萄糖琼脂
酵母膏		0.5		0.3			
葡萄糖		5.0	0.25	1.0		0.062	2.0
琼脂		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
肉汁			1.0				
$\text{NaCl}$			0.5			0.062	
蛋白胨				0.5			
麦芽汁				0.3			
玉米粉浸出汁*					(100ml)		
磷酸钠(三结晶水)						0.25	(23ml)
马铃薯浸出汁**						0.5	(77ml)
蒸馏水		100ml	100ml	100ml		100(ml)	
适用菌属		<i>Schwannomyces</i> (许廷酵母属)	<i>Deberomyces</i> (德巴利酵母属)	<i>Hansenula</i> (汉逊酵母) <i>Pichia</i> (毕赤氏酵母属)	<i>Endomyces</i> (内孢霉属) <i>Saccharomyces</i> (类酵母属)	<i>Saccharomyces</i> (酵母属)	某些单倍体的 <i>Saccharomyces</i> (酵母属)

\* 12.5g 黄玉米粉边搅边倒入水中, 60°C 水浴保温 1h, 此悬液然后用滤纸过滤, 滤液恢复到 300ml, 灭菌。

\*\* 100g 马铃薯切片, 加 300ml 水, 冰箱放置一夜, 通过纱布过滤, 滤液灭菌。

培养适合温度为 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ ，培养时间对于从自然界分离的酵母仅 $1\sim 2$ 天就长孢子，但其他需要 $1\sim 2$ 周，甚至几周。

能产生子囊孢子的细胞必须是双倍体，但这种双倍体细胞产生的方式及孢子形成过程有许多不同。

### 〔实验3-19〕酵母子囊孢子的形成及观察

#### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母，上面型与下面型各一，面包酵母，麦汁斜面培养48h。
2. 产子囊孢子培养基 醋酸钠琼脂。
3. 染色液 石炭酸蕃红液（蕃红 $0.1\text{g}$ 溶于 $10\text{ml}$  95%酒精中，然后加入30%石炭酸 $90\text{ml}$ ），酸性酒精（盐酸 $3\text{ml}$ ，加95%酒精 $97\text{ml}$ ），1%次甲基蓝液。
4. 器具 显微镜，载玻片，酒精灯，吸水纸，接种环，摇瓶架，三角瓶。

#### (二) 操作步骤

1. 子囊孢子的获得 将斜面上菌种接入麦汁三角瓶，摇瓶培养24h，离心、洗涤得菌体，将菌体大量涂布醋酸钠斜面上， $25\sim 28^{\circ}\text{C}$ 下培养3天以上，即产生子囊孢子。

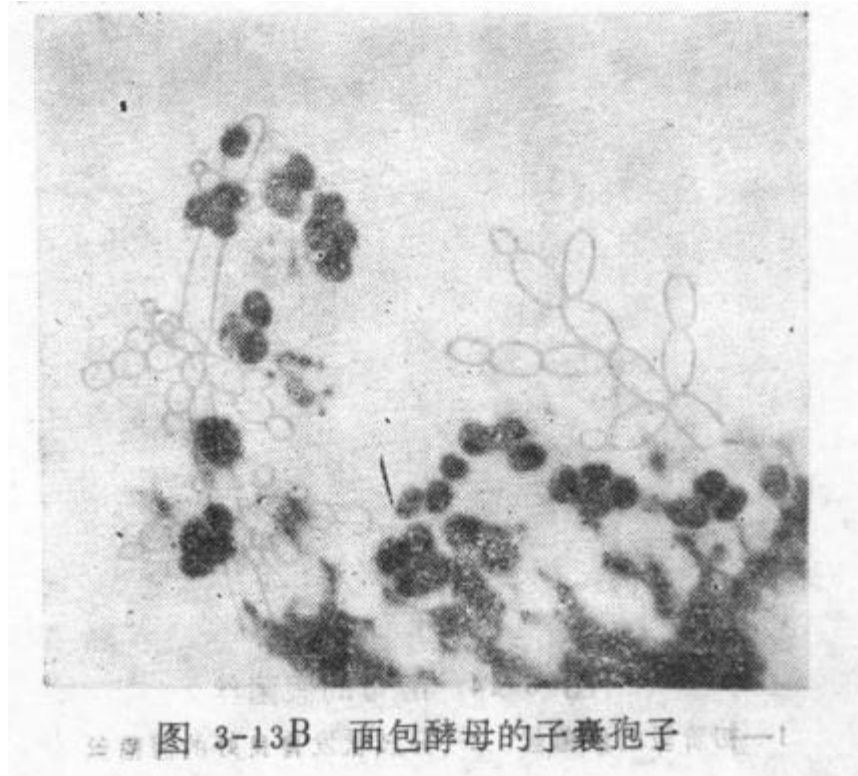


图 3-13B 面包酵母的子囊孢子

2. 子囊孢子的染色观察 滴一滴蒸馏水于载玻片上，接菌体涂片，火焰固定。将石炭酸蕃红液滴加一层，并在火焰上方加热，要求冒气但不沸腾。为了防止干枯，不时加滴染液。加热约5min，水洗，加酸性酒精脱色约30s，水洗，加酸性酒精脱色约30s，水洗，加亚甲基蓝液复染1min。镜检，孢子红色，菌体蓝色（图3-13B）。

注意：产子囊孢子的细胞应培养到平衡期为好；孢子形成后培养温度不要高于28℃；要采用特殊的培养基。

### 三、酵母假菌丝

酵母的营养细胞体的排列形式也是该种的一种特征。最简单的一种是酿酒酵母单个细胞或出芽后仍与母细胞连在一起，只有当母细胞出第二个芽才分开的形式。但另一类酵母则非如此，当它的姐妹细胞出芽后，它仍然留在母细胞上，如此周而复始地各自出芽，结果形成丛状或链状细胞（图3-14），链状的形成导致假菌丝的形成。当然这时细胞与细胞间的连接点是有真正的横隔壁的。假菌丝的主要差别之一是假菌丝是靠芽殖形成的，如果球形或卵圆形的芽出自假菌丝上，称芽生孢子。如果长自假菌丝的主杆上，有时称芽生分生孢子。在分类上，形不形成假菌丝是有参考

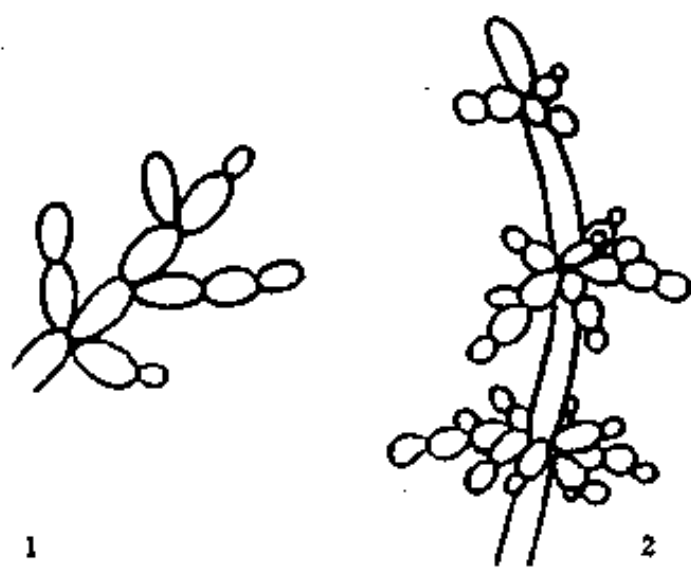


图 3-14 酵母的假菌丝

1—初分段的假菌丝 2—分枝状发育良好的假菌丝



价值的，而假菌丝的类型则价值较小。

在类酵母属(即拟内孢霉)和某些假丝酵母中具有隔壁，形成芽，但这两个属菌丝一般不断裂成节孢子。在类酵母中两相邻细胞间有孔存在。

强烈形成假菌丝的一些种中，有的很容易形成假菌丝，但另一些则需在产假菌丝培养基上才能形成。

### (实验3-20) 酵母假菌丝的观察

#### (一) 实验材料

1. 菌种 假菌丝酵母(如热带假菌丝酵母 *Candida tropicalis*) 斜面。
2. 培养基 玉米粉琼脂; 马铃薯琼脂。
3. 器具 显微镜, 凹载玻片, 18×18盖玻片, 接种环, 酒精灯, 固体蜡, 镊子。

#### (二) 操作步骤

1. 将凹载玻片和盖玻片浸入95%酒精液中15min, 用镊子取出, 灯上烧去残余酒精, 置接种箱内。
2. 将两种培养基溶化, 用接种环沾取数滴于盖玻片中央, 待凝固, 取斜面菌体点接在培养基表面。将接种面盖入凹玻片内, 盖玻片四周用熔化固体蜡封固, 25~28℃培养4~5天。
3. 放凹玻片凹面朝上, 置载物台上镜检, (先低倍, 后高倍。(图3-15)。

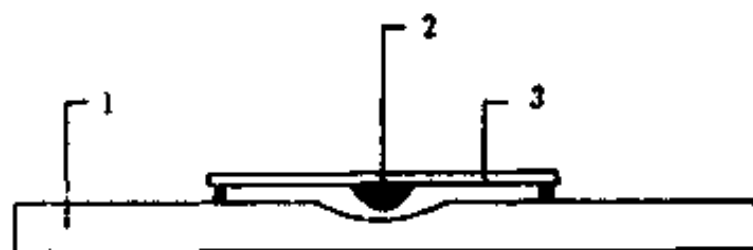


图3-15 凹玻片培养法

1—凹面载玻片 2—点种的培养基 3—盖玻片

## 第四章 工业微生物纯培养技术

混合培养包括两个或两个以上的种互相生长在一起。纯培养则仅让一种微生物的菌株生长在培养基内或培养基上。纯培养为生产和研究所必需。

要达到纯培养，首先是建立无菌状态，然后在适宜的培养基上以正确的分离和接种技术获得微生物培养物。

### 第一节 消毒与灭菌

消毒是指对致病细菌和其他有害微生物起致死作用，但芽孢不一定致死。而灭菌是指用热或其他物理和化学的方法将所有活的微生物完全破坏或除去。此外还可用过滤除菌法灭菌。在发酵工业上主要是指灭菌而言。

#### 一、热 杀 菌

主要指干热和湿热灭菌。干热灭菌常用烘/烤箱，一般温度范围为60~200℃，但用作灭菌常为160℃保持2h或170℃保持1.5h。它的适用范围主要为玻璃和金属制品。但要注意用纸包和器具灭菌不能超过180℃，否则纸会焦枯或燃烧。另外使用的器具在灭菌前必需洗净，特别不能剩留糖类培养基等，不然灭好菌的器皿也是焦枯的。

热杀菌中广泛使用的蒸汽灭菌，即湿热灭菌。湿热灭菌的好处是灭菌效果好，蛋白质在含水时易变性，另外蒸汽穿透力大，含能量高。使用蒸汽灭菌器要注意排气完全，否则达不到灭菌温度。表4-1表示排空气程度与实际温度的关系。

表 4-1 蒸汽灭菌器中空气排除程度与器内温度的关系

空气排除程度	表压力 (kPa)	灭菌器内实际温度(℃)
完全排除	98.07	121
排除十	98.07	115
排除十	98.07	112
排除十	98.07	109
完全未排除	98.07	100

蒸汽灭菌器的压力有的以lb/in<sup>2</sup> (磅/英寸<sup>2</sup>)、kg/cm<sup>2</sup>表示, 现统一以帕 (Pa) 或千帕 (kPa) 表示, 它们与温度的关系如表 4-2。

表 4-2 蒸汽压力与温度的关系

蒸汽压力			相应温度 (℃)
kPa	lb/in <sup>2</sup>	kg/cm <sup>2</sup>	
34.47	5	0.352	107.7
68.95	10	0.703	115.5
103.42	15	1.055	121.6
137.90	20	1.406	126.6
172.37	25	1.756	130.5
206.84	30	2.109	134.4

表 4-3 糖在不同温度下湿热灭菌的破坏情况

分析方法	糖名 (10%糖液)	灭菌方法							
		103.42kPa (121℃)		68.95~82.74kPa (115.6~118℃)		55.16~68.95 kPa (113~ 115.6℃)		100℃	
		15min		20min		20min		30min	
		含量 (%)	破坏 (%)	含量 (%)	含量 (%)	含量 (%)	破坏 (%)	含量 (%)	破坏 (%)
旋光法	葡萄糖	76.0	24.0	81.8	18.2	99.4	0.6	99.5	8.0
	乳糖	67.9	32.1	85.7	14.3	95.3	4.7	81.9	18.1
	麦芽糖	94.0	6.0	84.7	15.3	86.5	13.5	78.8	21.2
	蔗糖	87.7	12.3	97.7	2.3	98.7	1.3	96.3	3.7

表 4-4

一些微生物杀死的温度与时间

微生物	热死条件		微生物	热死条件	
	温度 (°C)	时间 (min)		温度 (°C)	时间 (min)
脆弱假单胞菌	50	35	保加利亚乳杆菌	71	30
氧杆假单胞菌	60	10	胚芽乳杆菌	65~75	15
荧光假单胞菌	53	25	嗜热乳杆菌	71	30
斐氏杆菌(低温性)	30	30	啤酒足细胞	60	8
海产弧菌(低温性)	25	80	芽孢杆菌芽孢	100	2~1200
鼠伤寒沙门氏菌	55	10*	梭状芽孢杆菌芽孢	100	5~300
伤寒沙门氏菌	60	5	酵母菌	50~60	10~15
桑夫顿柏格沙门氏菌	60	6*	产阮假丝酵母	55	10
金黄色葡萄球菌	63	7	异常汉逊氏酵母	50	30*
大肠杆菌	60	5~30	脆壁酵母	54	7
结核杆菌	61	30	鲁氏酵母	50	14*
产气肠细菌	47	60	膜膜华赤氏酵母	54	5
玫瑰色醋酸杆菌	50	5	啤酒酵母	50	9
纹膜醋酸杆菌	60	10	霉菌菌核	62~85	1000
	80	5		90~ 100	300
许氏醋酸杆菌	55	10	霉菌	60	5~10
胶醋酸杆菌	55	10	黑曲霉孢子	50	4*
嗜热链球菌	70~75	30	汤密青霉孢子	60	2.5*

\* 指活菌数减少一个对数级即90%被杀死所需的时间。

蒸汽灭菌适用范围很广，但主要是培养基的灭菌。在培养基灭菌中最需注意不要过多破坏营养，特别是糖类。糖类在湿热灭菌时破坏情况见表4-3。

当然培养基中尚有其他物质如蛋白质类等，会对糖类起保护作用的。一般含糖物质的培养基灭菌压力应不超过68.95kPa，时间15~20min。但对淀粉等固形物多的，灭菌压力可高至117.0g kPa，30~60min。当然首要指标是培养基已达无菌。

灭菌的目的要杀死各种微生物，表4-4是一些微生物的热死时间。

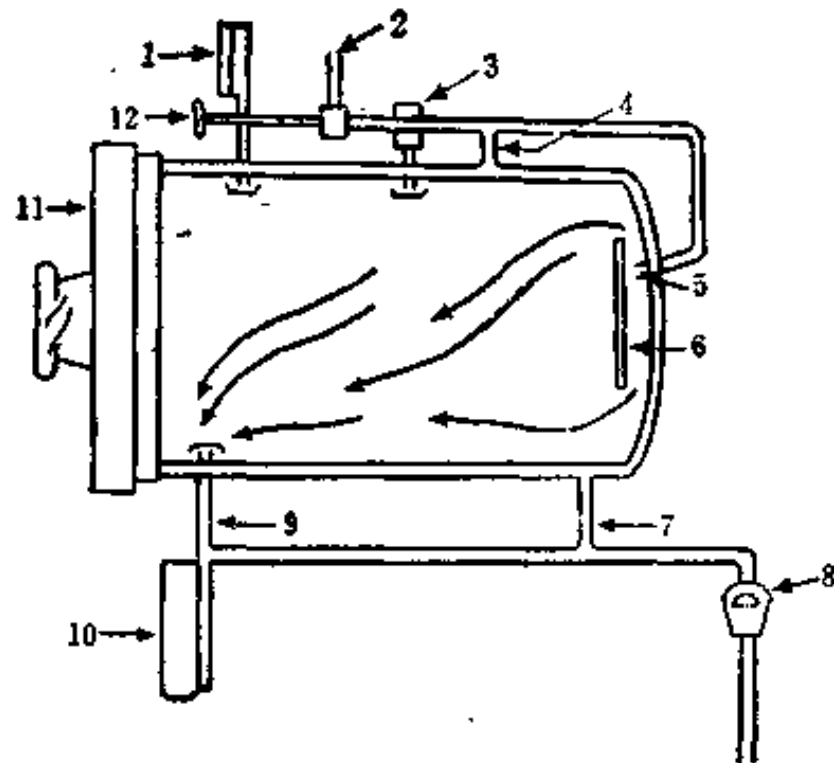


图 4-1 蒸汽灭菌器

1—压力表 2—蒸汽进口 3—安全阀 4—进夹层蒸汽 5—进器内蒸汽  
6—缓冲板 7—夹层废气 8—废水 9—排气口 10—温度传感器和记录器  
11—压力表 12—蒸汽控制阀

一般蒸汽灭菌器的结构及蒸汽流动路径见图4-1。

## 二、化学消毒剂

表4-5为常用于发酵工业中厂房及实验室中灭菌和器具与皮肤消毒的化学消毒剂。

表 4-5 常用化学消毒剂

类别	消毒剂	常用浓度	应用范围
醇 酸	乙醇	70%	皮肤消毒
	乳酸	0.33~1mol/L	用于空气喷雾消毒
	食醋	3~5ml/m <sup>3</sup>	熏蒸空气消毒
碱 酚	石灰水	1~3%	厕所、厂房周围消毒
	石炭酸	5%	空气喷雾消毒
	来苏尔	3~5%	皮肤消毒
醛	福尔马林	10%	接种箱、厂房熏蒸
重金属盐	升汞	0.1%	植物组织外表消毒

续表

类别	消毒剂	常用浓度	应用范围
氧化剂	KMnO <sub>4</sub>	0.1~3%	皮肤、水果、茶具的消毒
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3%	清洗伤口
	氯气	0.2~1ppm	自来水消毒
	漂白粉	1~5%	洗刷培养室、伙水消毒
去垢剂	新洁尔灭	1:50	皮肤消毒、不能遇热的器具消毒
染料	龙胆紫	2~4%	外用药水

### 三、紫外线和射线

#### (一) 紫外线

紫外线波长在2000~3000 Å之间都有杀菌作用，尤以2500~2700 Å的杀菌作用最强。但不同种微生物对不同种波长紫外线的敏感度不一样，致死剂量大小也有差异。紫外线的穿透能力很弱，所以只对空气消毒和表面消毒有效。

革兰氏阴性无芽孢杆菌对紫外线最敏感，用15W紫外线灯，距离50cm，照射1min，或10cm照射6s，几乎可把大肠杆菌等菌

表 4-6 一些微生物对放射线的敏感性

微生物	基 质	D值 (m rad)	微生物	基 质	D值 (m rad)
肉毒杆菌A型	食品	0.40	短小芽孢杆菌	缓冲液, 无氧	0.30
肉毒杆菌B型	缓冲液	0.33	短小芽孢杆菌	缓冲液, 有 氧	0.17
肉毒杆菌E型	肉汤	0.20	耐射线小球菌R <sub>1</sub>	牛肉	0.25
鼠伤寒沙门氏菌	冰冻蛋	0.07	生芽孢梭状芽孢杆 菌	缓冲液	0.21
鼠伤寒沙门氏菌	缓冲液, 有氧	0.02	嗜热脂肪芽孢杆菌	缓冲液, 有氧	0.10
大肠杆菌	肉汤	0.02	枯草杆菌	缓冲液	0.20~ 0.25
产气荚膜杆菌	肉	0.21~ 0.24	酿酒酵母	缓冲液	0.20~ 0.25
粪链球菌	肉汤	0.05	米曲霉	缓冲液	0.043
假单胞菌	缓冲液, 有氧	0.004	产黄青霉	缓冲液	0.04

全部杀死。而杀死革兰氏阳性球菌照射强度就得增大5~10倍。噬菌体对紫外线抵抗力更大。细菌的芽孢较之营养体抵抗力要大5~10倍。

## (二) 放射性同位素

表4-6是一些微生物对放射线的敏感性。这里的D值系指活菌数每减少一个数量级所需的射线剂量 (m rad)。

## 四、接种室的空气灭菌

一般实验室接种多用接种箱或直接在接种室内，要求空气及室内用品无菌。平时都用紫外线空气杀菌和化学消毒剂熏蒸灭菌，效果是好的。但就一般而言，30W紫外线开启1h，在一有限的小室内就够了。时间过长，紫外灯管易损坏，而且产生过多的臭

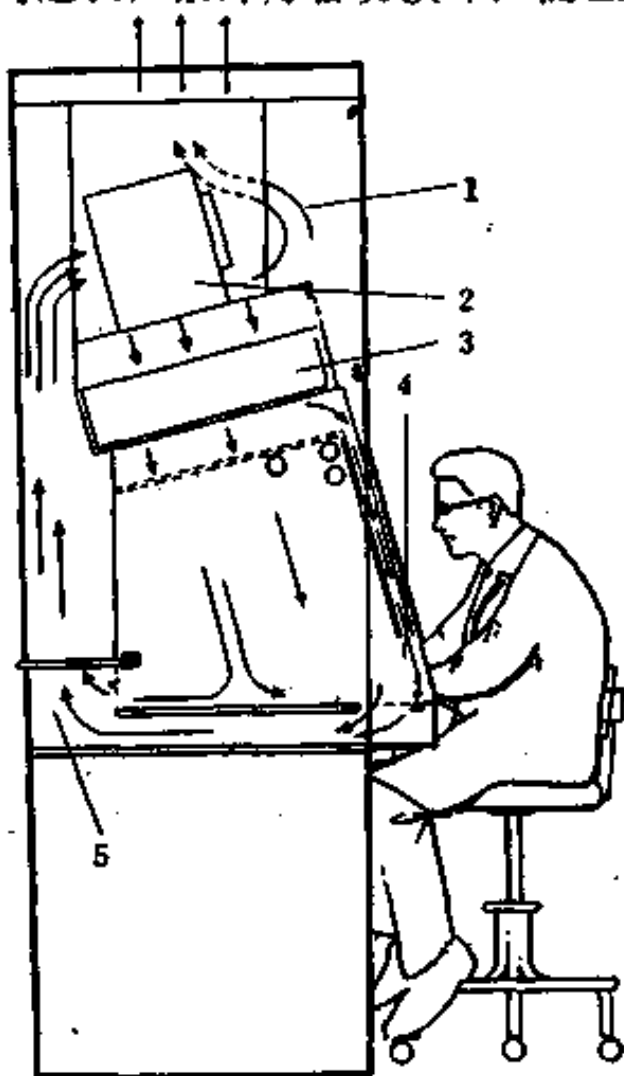


图 4-2 超净台工作原理

1—排气过滤系统 2—供气系统 3—空气过滤口 4—工作小室 5—排气系统

氧，对工作人员不利。熏蒸可用乳酸和甲醛，但多在前一天晚上熏，至第二天早晨使用，这样对人的刺激小。要求高一些的接种环境可以通入无菌空气，让小室保持正压，造成无菌状态。否则，小室内闷热往往造成霉雨季节长霉，夏天工作条件艰苦，所以近年来多采用一种“超净台”作为接种室。其原理主要是借助一鼓风机将有菌空气鼓入，通过粗滤、超滤纤维细滤，这样出来的空气就是除净微生物、尘埃的干净空气（图4-2）。作者曾进行无菌测定，效果是令人满意的。使用该种设备的房间要求清洁无尘，不然过滤部分易吸附饱和，而造成短路失效。或者是阻力太大，风压小而保持不了小室正压，让外部有菌空气入侵，造成有菌。

## 五、过滤除菌

要除掉培养液或悬浮液中的微生物，而又不能用加热的方式的话，可采用过滤除菌。过滤除菌有几种，可以根据过滤物大小选用。

### （一）细菌过滤器的种类、规格

1. 布氏（Berkefeld）滤器 为用硅藻土制成的空心圆柱体，底部连接在金属托上，伸出于筒柱体外的中央装有金属管。根据孔的大小分为W（密），N（标准）和V（粗）3级。分级决定于某种恒压下流过滤液的流速。V：8~12 $\mu\text{m}$ ，N：5~7 $\mu\text{m}$ ，W：3~4 $\mu\text{m}$ 。

2. 曼得尔氏（Mandler）滤器 由硅藻土（60~80%）、石棉（10~30%）和熟石膏（10~15%）制成。它们的孔径依成分配比而改变。一般为分P、R、F3级。P：8~12 $\mu\text{m}$ ，R：5~7 $\mu\text{m}$ ，F：3~4 $\mu\text{m}$ 。

3. 赛氏（Seitz）滤器 由金属制成漏斗状，中嵌以石棉制滤板，孔径编号有K、EK、EK-S等。K：最大孔径，作澄清用；EK：滤孔较小，常用来去除一般细菌；EK-S：滤孔极小，可阻止大病毒通过。



4. 玻璃滤器 用玻璃粉末烧结而成的膜滤器, 其规格见表4-7。

表 4-7 玻璃滤器的型号及用途

型 号	滤板平均孔径( $\mu\text{m}$ )	一般用途
G <sub>1</sub>	80~120	滤去大粒沉淀, 收集或分布大分子气体
G <sub>2</sub>	40~80	滤去较大颗粒的沉淀, 收集或分布较大分子气体
√ G <sub>3</sub>	15~40	滤去化学处理中的一般晶体和杂质, 过滤水银, 收集与分布一般气体, 阻挡真菌菌丝
G <sub>4</sub>	5~15	滤除细粒沉淀, 收集和分布小分子气体, 阻挡酵母细胞、霉菌孢子
G <sub>5</sub>	2~5	能阻挡较大细菌通过
√ G <sub>6</sub>	<2	能阻挡细菌通过

5. 微孔滤膜滤器 微孔滤膜滤器是利用一定孔径的混合纤维酯薄膜为过滤介质, 通过正压、负压及自然压力下过滤的一种滤器。滤器有不锈钢和塑料制品两种, 滤膜孔径依用途而选定。作为除菌目的, 一般选用0.22~0.45 $\mu\text{m}$ 孔径的滤膜。由于滤膜不重复使用, 滤器可大可小, 处理方便, 因此, 此已成为处理多种液体的最有效和最方便的滤过除菌设备而广泛用于实验室及工业生产中。

### (二) 玻璃滤器使用要点

1. 新的玻璃滤器在使用前应以热稀盐酸或硫酸先行抽滤, 并立即用蒸馏水冲洗干净。这一预处理可将滤器中的灰尘等外来杂质除去, 以便进一步处理。

2. 玻璃滤器不可用来过滤氢氟酸、热的浓磷酸、热或冷的浓碱液。这些试剂能溶解滤片的微粒, 使滤孔增大, 并造成滤片脱裂。

3. 滤片的厚度是兼顾到过滤的速度和必要的机械强度两方面的。因此在减压或加压的情况下使用时, 滤片两面的压力差不能超过98.07kPa。

4. 滤器的升温 and 减温必须十分缓慢。

### (三) 滤器的洗涤方法

玻璃滤器每次用毕或使用一定时间后。会因沉淀物堵塞滤孔而影响过滤的效能，因此必须及时进行有效的洗涤。

1. 机械冲洗法 将滤器倒置在沉淀物的相反方向，用蒸馏水反复冲洗，将沉淀带走，待洗净后烘干备用。如有必要，可以在冲洗时采用减压方法，以加速蒸馏水从滤器孔中通过。

2. 化学洗涤法 针对不同的沉淀物，采用各种有效的洗涤液进行处理，然后再用蒸馏水冲洗干净，烘干备用（表4-8）。

表 4-8 某些沉淀物的有效洗涤液

沉淀物	洗 涤 液
脂肪、脂膏	四氯化碳和适当有机溶液
蛋白、粘胶、葡萄糖	盐酸，热氨水，5~10%碱液，或热硫酸和硝酸的混和液
有机物质	含有重铬酸钾的温热浓碱、酸，或含有少量硝酸钾和高氯酸钾的浓硫酸，放置过夜
氧化亚铜斑点	混有氟酸钾的热盐酸
硫酸钡	100℃热硫酸
汞渣	热浓硝酸
氯化银	氨水或硫代硫酸钠溶液
铝质和硅质残渣	先用2%氢氟酸，继用浓硫酸洗涤，立即用蒸馏水洗涤，再用丙酮漂洗，重复漂洗至无酸痕为止

### (四) 6号除菌滤器的化学洗涤法

经细菌过滤后的滤器，应立即加入洗涤液抽滤一次，洗涤液用量可按容器大小来决定。在洗涤液未滤尽前，取下滤器浸泡于洗涤液中48h，滤片的两面均需完全接触溶液，然后取出用蒸馏水抽滤洗净，烘干待用。

#### 〔实验4-1〕 微孔滤膜滤器的使用

##### (一) 实验材料

1. 微孔滤膜滤器 (图4-3), 已灭菌。

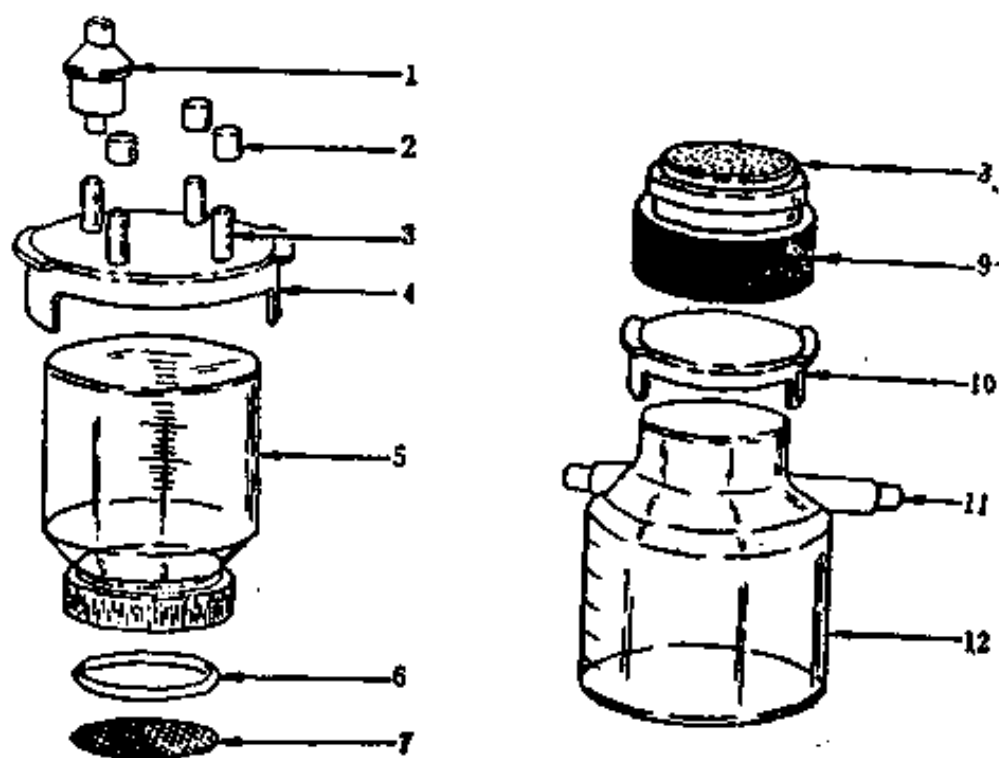


图 4-3 微孔滤膜滤器

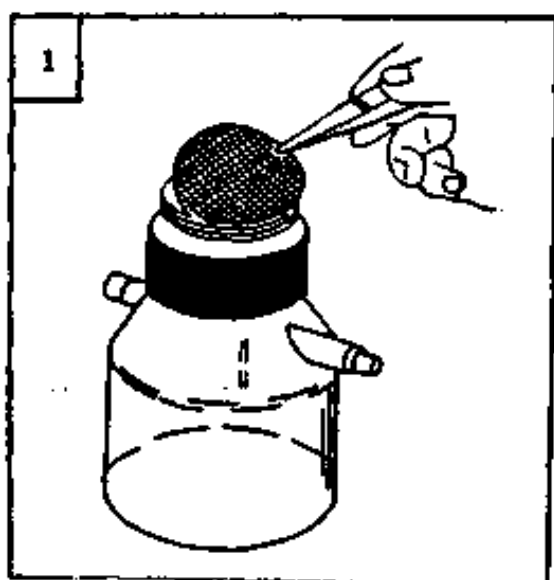
1—通气过滤器 2—橡皮帽 3—有孔柱 4—漏斗盖 5—200ml漏斗 6—硅树脂O号垫圈 7—0.22µm微孔滤膜 8—膜承受部分 9—滤器底座 10—盖 11—抽滤口 12—250ml接瓶

2. 菌种 24h的大肠杆菌 (*E. Coli*) 肉汁培养物。

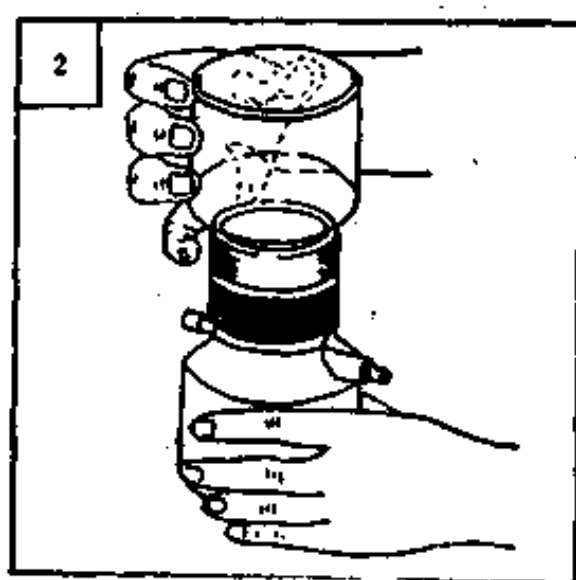
3. 培养基 1管肉汁, 100ml蒸馏水, 一只含有伊红-美蓝的琼脂平皿。

4. 2支无菌1ml吸管, 一对无菌的镊子, 真空系统。

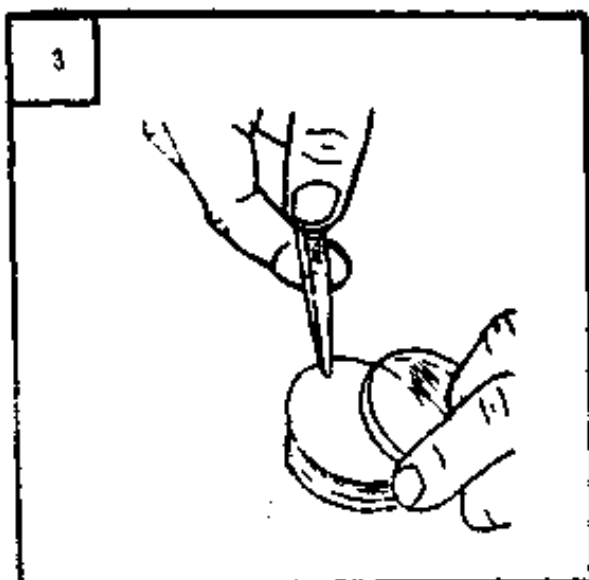
(二) 操作步骤



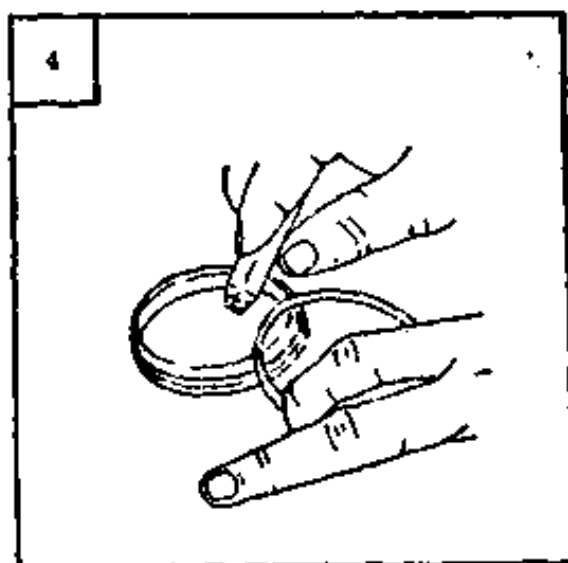
1. 用无菌镊子置一无菌滤膜于承受器当中。



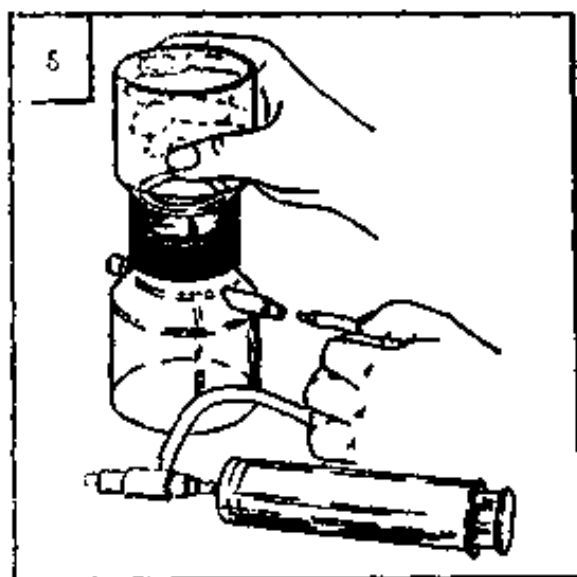
2. 将过滤斗放于滤膜承受器上面, 旋下, 使垫圈密封该部分



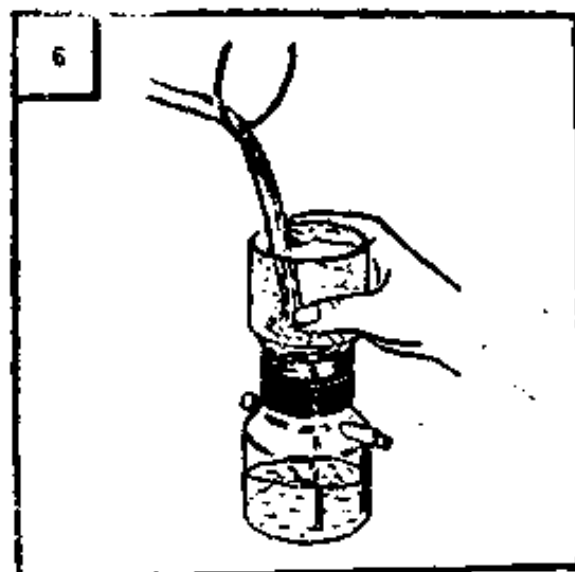
3. 另用酒精灯烧过的镊子将一吸附垫放入47mm的培养皿中。



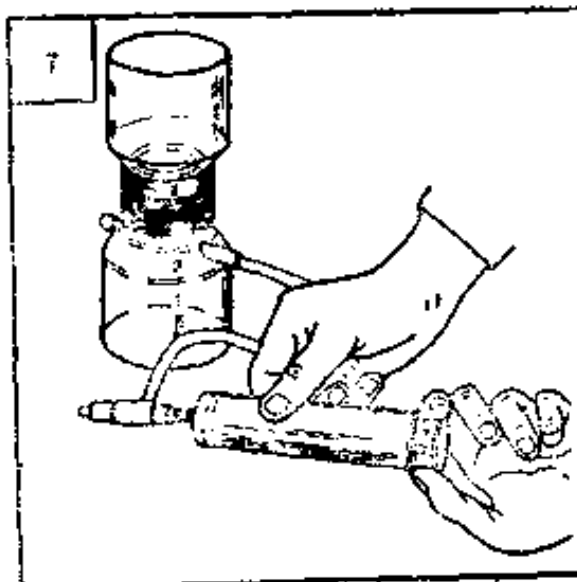
4. 然后倒入安瓿的培养基，盖上皿盖，留至步骤9使用。



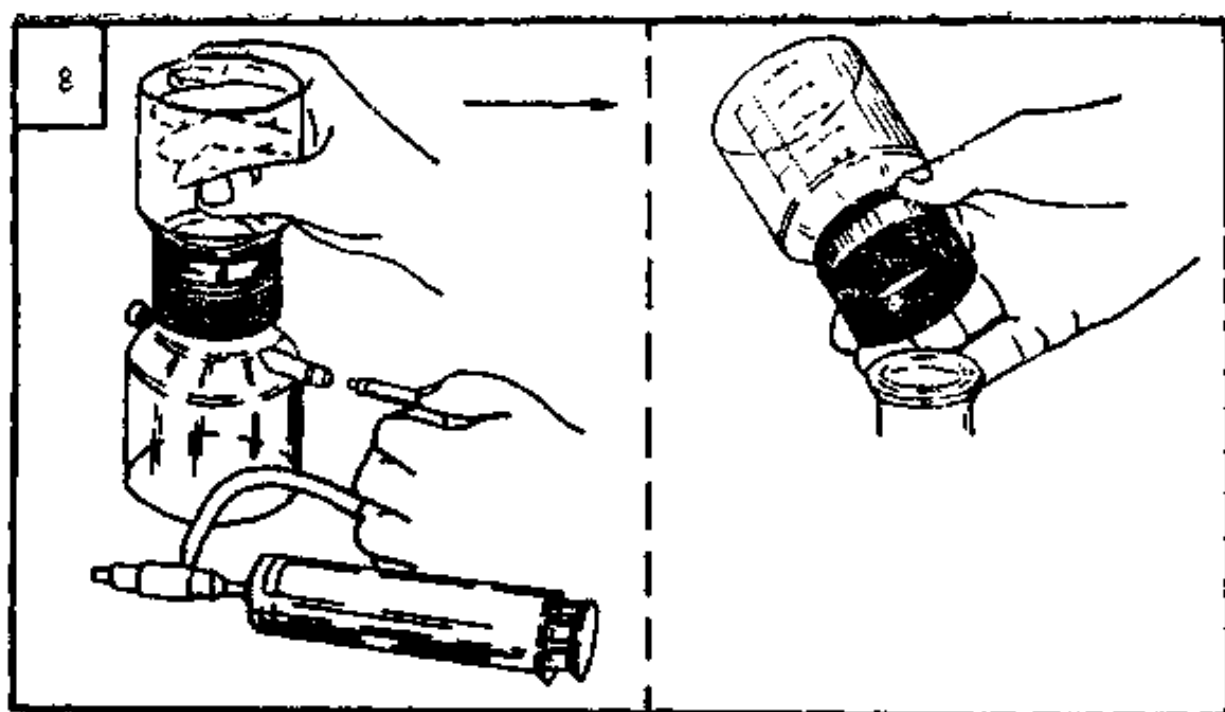
5. 接上真空泵或其他真空系统。



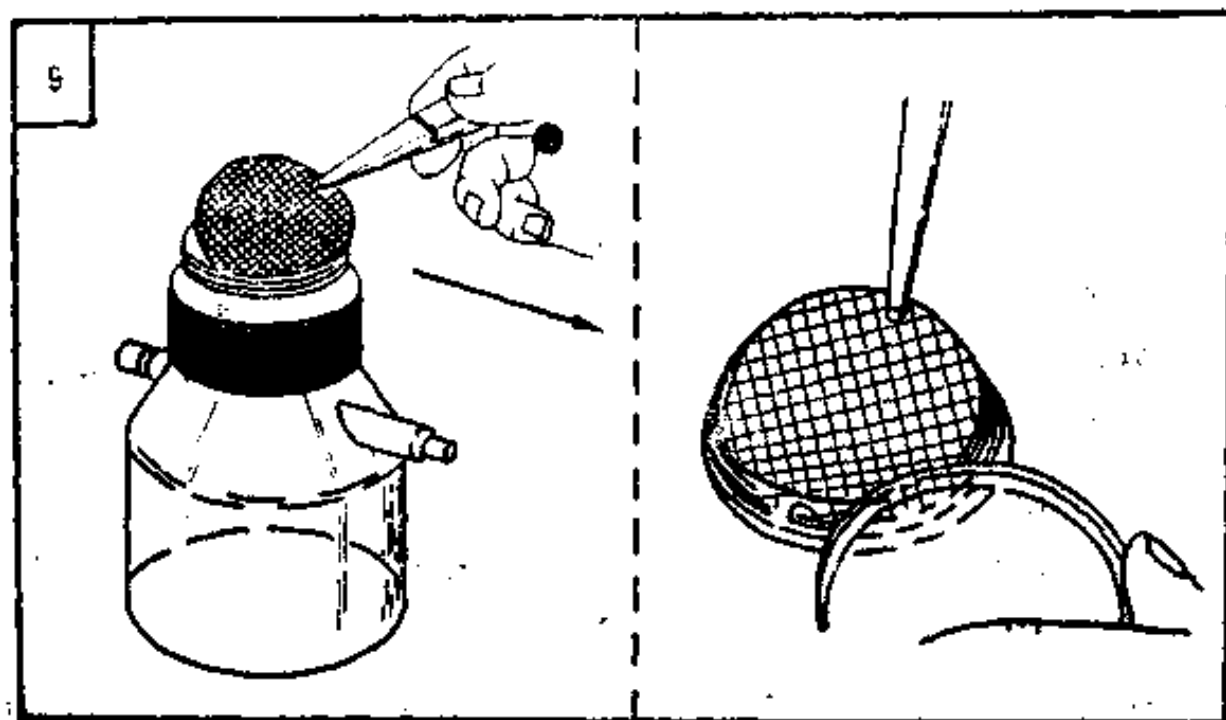
6. 加水100ml样品水后，再加10ml灭菌蒸馏水。



7. 启动真空系统，使水在滤去任何细胞后通过滤膜流到下部。



8. 过滤完毕，小心破坏真空系统，然后拆去该系统，但不要旋出漏斗。



9. 用酒精消过毒的镊子小心取出滤膜，放到吸饱了培养基的垫子上(步骤4)盖好皿盖，送去培养。

图4-4是滤膜在过滤后用扫描电镜观察的结果，可以看到留在滤膜上的细菌细胞，请注意细胞与孔径的大小比例。

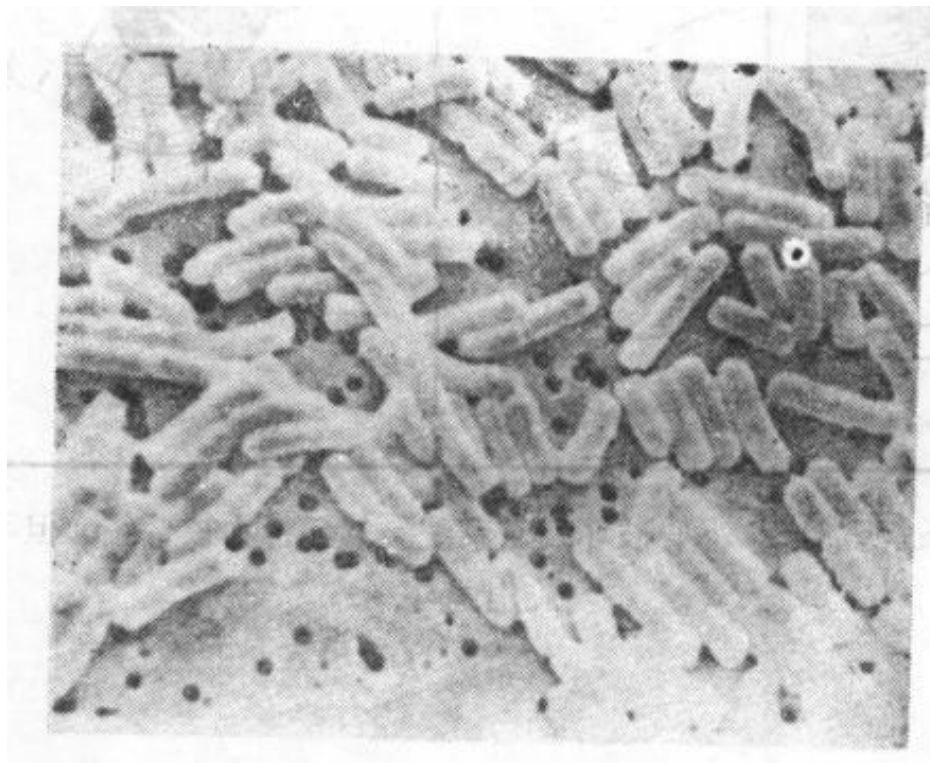


图 4-4 滤膜的孔径和阻挡住的细菌细胞

## 六、防 霉 剂

工业材料与制品的霉腐是由微生物引起的，引起工业材料霉腐的霉菌种类很多，据统计单是与各种工业材料与制品劣化有关的霉菌就有110多个属，230多个种，其中主要是曲霉、青霉、毛壳霉、木霉等。

它们在这些基质上生长与繁殖的基本条件是营养、温度、空气相对湿度及基质本身的水分。此外，pH值和一些金属离子等也有重要影响。

在各种工业材料与制品中一般都含有某些微生物所能利用的养料。例如：一些胶粘剂，特别是粮食胶粘剂中的淀粉、蛋白质，针织品中的上浆料，铜版纸中的干酪素，皮革中的蛋白质，纸张中的纤维素，以及木竹制品本身包含的单糖、多糖、氨基酸等。

此外，环境中的挥发性有机质或营养粉末也往往会在看来营养很差的一些制品表面覆盖起来，形成一种营养膜，从而作为培养基使微生物生长繁殖。因此很多的物质，包括金属、玻璃等都会在温度适宜、湿度较大的情况下因生长霉菌而被破坏。为了防止工业材料与制品发生霉变，应针对霉变因素采取相应措施，以减低或根除霉菌的生长。除加强管理，注意湿度调节外，常常采用消毒剂熏蒸、喷雾、干燥保藏、冷藏以及制品中添加防霉剂等。

防霉剂很多，例如汞类(醋酸苯汞、硫柳汞、高氯化汞、氯化苯汞等)，有机锡类(氯化二丁基锡、醋酸三丁基锡等)，酚类(苯酚、乙-萘酚)等化合物。由于这些化合物有毒，使用后不仅影响人们健康，而且会造成环境污染。因此选择与应用低毒高效的防腐剂很重要。

选取工业防腐剂，除注意其本身的稳定性、抗毒性外，防腐效果是最重要的衡量标准。

筛选防腐剂的方法很多，较为简易的是“带菌平板观察法”，即在培养皿中的培养基里均匀地混进混合菌(一般用7~8种不同的菌)的孢子悬液，然后用圆块滤纸浸取一定浓度的药液后，放在平皿中心，使药液在琼脂中逐渐向四周扩散，经数天恒温培养后，根据抑菌圈的大小来判断化合物的杀菌能力。要评价制品抗霉性能，除了将加有防腐剂样品在实际环境中考验外，需将实样混入或喷上菌液，在恒温(28~30℃)、恒温(相对湿度90%以上)箱中进行加速培养试验，以观察制品的抗霉能力。当然，人工加速试验的结果与自然环境中的实地存放的结果不一定完全吻合，这是由于自然条件的错综复杂和变化多端以致难以完全仿效的缘故。

表4-9是一些防腐剂的防腐能力。

#### 〔实验4-2〕防腐剂的选用

防腐剂是防止微生物生长的药物。根据其用量对微生物会出现4种不同的作用：① 浓度很低时，有促进微生物生长的作用；② 浓度稍大时，有

表 4-9

一些防腐剂的抑菌能力及其毒性

菌名	防霉剂 (ppm)	苯咪唑 氨基甲 酸甲酯	噻唑酮	灭菌丹	水杨苯胺	巯酸苯汞	苯酚	乙-萘酚
黑曲霉		1.0	80	110	60	0.8	700	70
黄曲霉		1.5	100	110	70	0.8	1100	100
杂色曲霉		0.4	80	100	60	1.0	700	70
桔青霉		0.2	80	100	60	1.0	700	80
拟青霉		1.5	50	100	60	1.5	1100	80
蠟叶枝孢霉		0.4	40	50	60	1.5	500	60
木霉		0.6	50	200	30	1.0	600	90
LD <sub>50</sub> (mg/kg)		>500	500~600	1100	1100	45	300~400	300~400

抑制微生物生长的作用；③ 浓度高时，会诱发微生物突变；④ 浓度很高时，有杀灭微生物作用。

微生物对防霉剂抵抗力也会随培养基及环境条件的改变而变化，还与菌种有密切关系。例如水杨酸对许多青霉毒性甚大，可黑曲霉能将它作为碳源利用。氯化锌是一种普通的防腐剂，但它对土曲霉无效。铊盐类对一般霉毒性都很强，但对诸如交链孢霉、枝孢霉却无效。对一般霉菌毒性弱的六氨铬物对抗铊盐强的霉类反大有效果。石炭酸的毒性对细菌大而对霉菌小。

### (一) 实验材料

1. 菌种 黑曲霉与供试菌种若干。
2. 培养基 察氏琼脂培养基（见表4-10）。
3. 试剂 水杨酸、氯化锌、氯化汞、苯甲酸、硝酸汞。
4. 器具 平皿、培养箱、接种针、酒精灯。

### (二) 操作步骤

1. 将察氏琼脂溶化后凉至45℃，接入菌种孢子，量要大，摇瓶，倾入平皿，液厚3cm，共倒5副。
2. 待凝固，将小米粒大的固体防霉剂点置于平皿中央，稍压埋，置培养箱培养。
3. 2天后观察：中央和最外有无生长圈，中间层生长情况如何，由此比较防霉剂的效果。



4. 若采用小圆滤纸片浸泡一定浓度的防霉剂代之固体防霉也可。

## 第二节 培养基及其制备

### 一、培养基

培养基按用途分有好几类，这里讲的是一般生长用的普通培养基(表4-10)。至于特殊用途的将在各有关章节加以说明。

此外，有关书刊还报道大量的各种培养基，虽名目繁多，但主要成分与这里列的相差不大。里面有许多是习惯用法，有的是根据菌体生长特点，需添加某种特殊成分，这些均应看具体情况决定，可以自由选用。

上述成分是指液体培养基而言，若需做成固体或半固体，就要分别添加琼脂1.5~2%或0.6~0.7%。

### 二、培养基成分的说明

1. 蛋白胨 蛋白胨是用胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等蛋白质水解酶水解酪素、兽肉、大豆蛋白等制成的。主要成分各种氨基酸、肽类、胨等可溶性氮化合物。因此依所用原料和酶的不同，其组成也有所不同，表4-11是蛋白胨的种类及特点。

由于蛋白胨的质量对微生物生长、代谢产物产生影响很大，所以采用时应注意。但即使同一牌号的产品也会因不同批次而质量有所差异，所以尽可能使用同批产品。由于蛋白胨易潮解，使用后必须将瓶子密封。

2. 牛肉膏 牛肉膏是牛肉浸出液的浓缩物，肉中的可溶性氮化合物、维生素等生长促进因子以及无机盐都很丰富，广泛用于细菌培养。但不同牌号的制法不同，所以应使用同一牌号为好。

表 4-10

四大类微生物的典型培养基

微生物	培养基	培养基成分(%)				培养基 pH
		碳 源	氮 源	无机盐类	生长素	
细菌	肉汁培养基	牛肉膏 0.5	蛋白胨 1.0	NaCl 0.5	牛肉膏中 已有	7.2
	疱肉培养基	葡萄糖2.0	胰蛋白胨 2.0	NaCl 0.5	牛心浸出 液 45.5	自然 7.0~ 7.2
放线菌	淀粉培养基	可溶性淀 粉2.0	KNO <sub>3</sub> 0.1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05 NaCl 0.05 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001		7.0~ 7.2
	蔗糖硝酸盐培养基	蔗糖 3.0	NaNO <sub>3</sub> 0.2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001		7.0~ 7.3
酵母菌	麦芽汁培养基	(麦芽汁内已含有)				自然
	My培养基	葡萄糖 1.0	蛋白胨 0.5		酵母膏0.3 麦芽汁0.3	自然
霉菌	察氏培养基	蔗糖或葡 萄糖3.0	NaNO <sub>3</sub> 0.3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05 KCl 0.05 FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.001	-	6.0

表 4-11

蛋白胨的种类及特点

原 料	水解法	特点及用途	商品名称
酪素	胰蛋白酶或胰酶水 解	富含氨基酸，尤以色氨酸含 量高，含硫氨基酸少。用于 一般微生物培养基及生化检 验，适用于产生吲哚的试 验，对产H <sub>2</sub> S的试验不适宜	BBL, Trypticase Difco, Tryptone Casitone Oxoid, Tryptone L43 Tryptone T42
兽肉	木瓜蛋白酶或胃蛋 白酶	含有大量含硫氨基酸，含有 维生素等生长因子，供一般 培养产生H <sub>2</sub> S。由于它成分 丰富，所以适合于大部分细 菌的生长	Difco, Proteose Peptone Oxoid, Proteose Peptone L48

续表

原 料	水解法	特点及用途	商品名称
大豆蛋白	木瓜蛋白酶	富含维生素B、碳水化合物，适于培养包括真菌的大多数微生物，但单独使用时，因其营养成分较少，最好和其他蛋白酶配合使用。由于含碳水化合物，所以不能用于糖分解试验	BBL; Phytone Difco; Soytone Oxoid; Soya Peptone L4
酪素	盐酸水解	蛋白质全部水解为氨基酸为止，含硫氨酸和色氨酸含量少，产品含较多的氯化钠，不含维生素的产品可供维生素要求试验用。广泛用于微生物生理学、营养学等方面的研究，也用以配制以乳酸菌进行维生素定量时的基础培养基	Difco; Casamino Acids Technical Casamino Acids (Vitaminfree) BBL; Acidicase Oxoid; Caseinhydrolytate L41
混合蛋白酶	酪素、蛋白酶和兽内蛋白酶的混合物	普通培养基	BBL; Polypeptone Difco; Bacto-peptone Oxoid; Peptone L37

3. 酵母膏 酵母膏系啤酒酵母或面包酵母在低温下的自溶浸出汁，经低温真空蒸发而成。富含氨基酸、维生素类、无机盐类，被广泛用于微生物的培养，近来有用来取代肉膏的趋向。

4. 麦芽汁 是酿造啤酒前，未加酒花，未经发酵的新鲜麦芽汁，可向啤酒厂购买，也可自制：取大麦芽粉1kg，加水3L，保温60℃使其自行糖化，直到液体无淀粉反应为止。过滤，在滤液中加入2~3个鸡蛋清(有助于麦汁的澄清)；搅均匀，煮沸，再过滤，则得麦芽汁。加水冲至10~15波林备用。麦芽汁适于培养霉菌和酵母等真菌。主要成分是麦芽糖等，但也有含氮源和生长素等。

5. 米曲汁 被广泛用来代替麦芽汁。其制法：将米曲霉接种在大米饭上，制成大米曲。取干大米曲1kg，加水3L，保温60℃，使之糖化，至无淀粉反应为止。然后与制麦芽汁一样，澄清、过滤。

6. 琼脂 琼脂本由石花菜制成，近来差不多以青丝菜为原料来制备。琼脂是一种硫酸化的聚半乳糖。琼脂含有两种主要成分：琼脂糖和琼脂胶。琼脂的特点是微生物无毒害，又不为大多数微生物利用。在加热到100℃时融化，凉至45℃时凝固，所以很适合于做培养基的固化剂。

商品琼脂规格因产地不同，常含一些不纯物质，对一些试验会产生影响。

#### 〔实验4-3〕麦芽汁培养基的配制

##### (一) 实验材料

1. 大麦芽(无霉变)。
2. 水浴锅、烧杯、比色盘、碘液、纱布、灭菌钻、漏斗等。

##### (二) 操作步骤

1. 取大麦芽若干，粉碎，装到1L烧杯中。
2. 加入4倍于麦芽重量的60℃水，在55~60℃水浴锅中保温糖化，间歇性地不断搅拌。经3~4h后，玻棒定时沾糖化液于白色比色盘内，与碘液一滴混和，颜色反应由紫逐步成碘色，即为糖化完毕。
3. 用纱布过滤，除去残渣。煮沸后再用脱脂棉过滤，即得澄清的麦芽汁。也可每500g麦芽粉的麦芽汁加入一个鸡蛋的蛋清，煮沸，过滤，就可得清澈透明的麦芽汁。
4. 大约每1000g麦芽粉能制得15~18℃麦芽汁3500~4000ml，再加水稀释成10°的麦芽汁配用。麦芽汁灭菌条件宜采用68.65kPa，20min。若加入1.5~2%琼脂即成固体培养基。

## 第三节 分离、接种和培养技术

### 一、分 离

分离的目的是将混杂的菌群的个体间各个分开，形成纯培养物。这里介绍3种常用的分离法。

#### 〔实验4-4〕试管倾侧培养皿分离法

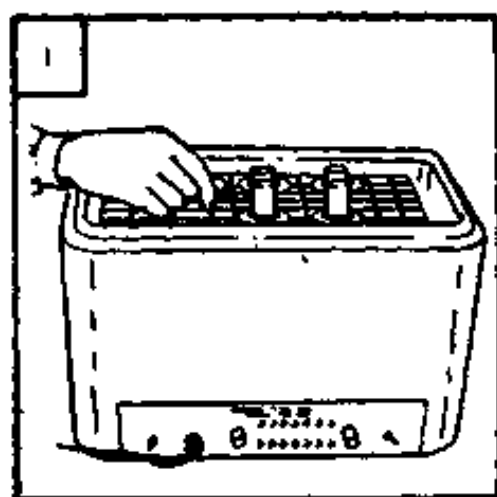
##### (一) 材料

1. 经24h培养的肉汁试管，内部是枯草杆菌和大肠杆菌的混合物。

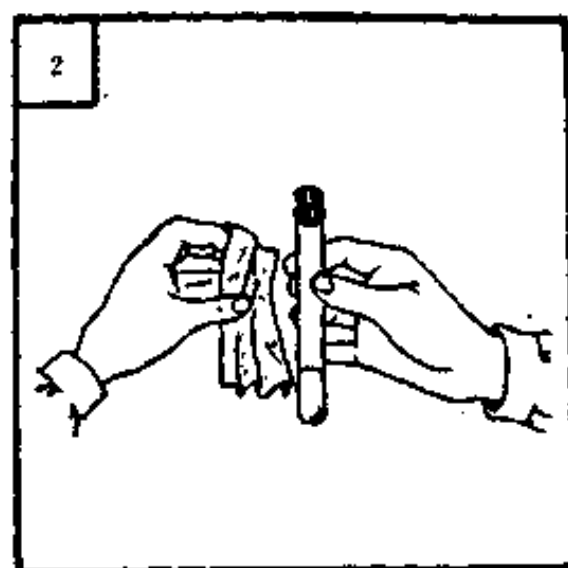
2. 培养基 试管肉汁琼脂。

3. 实验器具 一副无菌培养皿，水浴锅，酒精灯，接种环，培养箱。

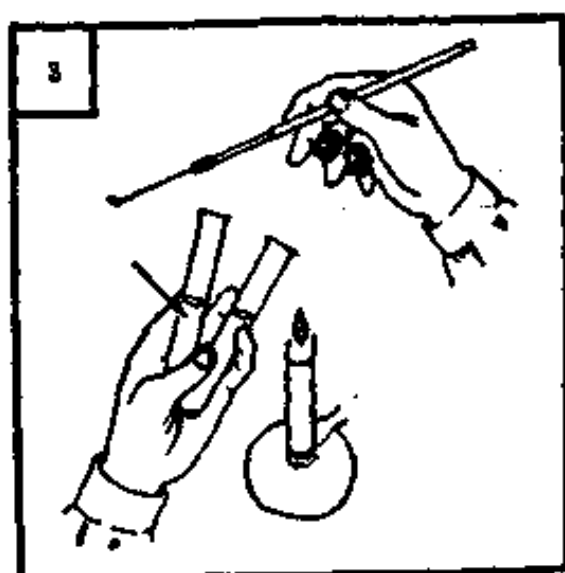
(二) 操作步骤



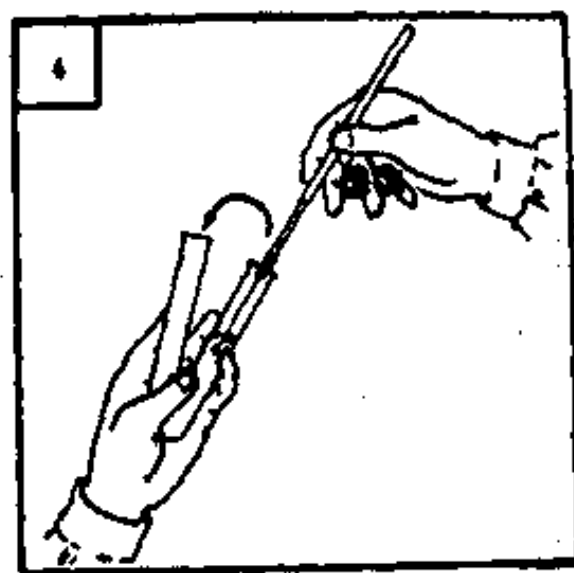
1. 放肉汁琼脂入水浴锅融化。



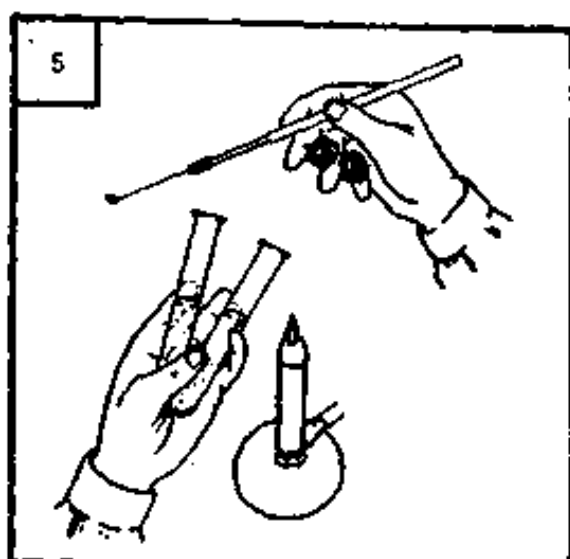
2. 将融化试管培养基擦干。



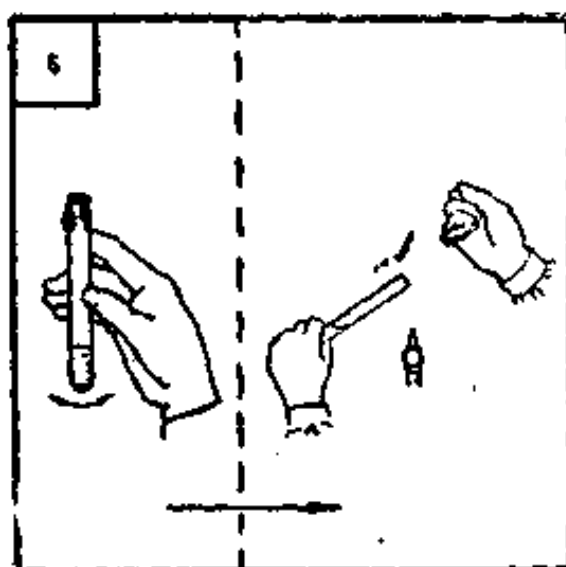
3. 左手持两管，左边一管系融化已凉的培养基，右边是一管混合物。



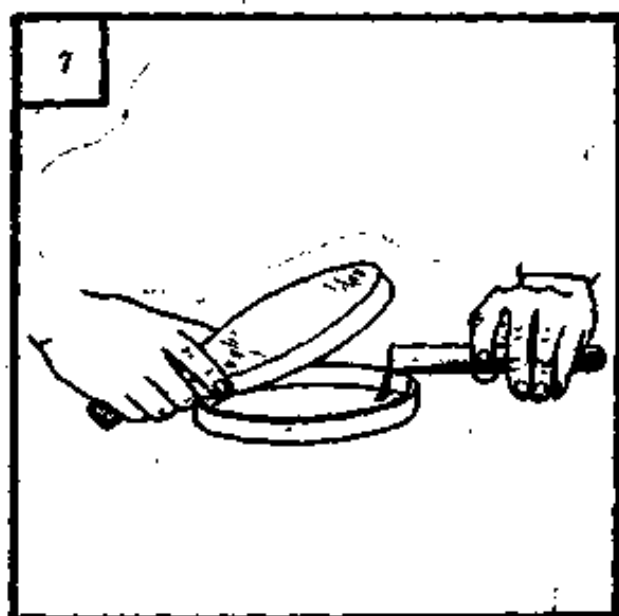
4. 用无菌接种环取一环培养物到培养基中。



5. 火焰烧管口，重新将管塞塞回，接种环火焰烧后，放回原处。



6. 微振荡培养基，使之和匀，然后在火焰边拔去管塞。

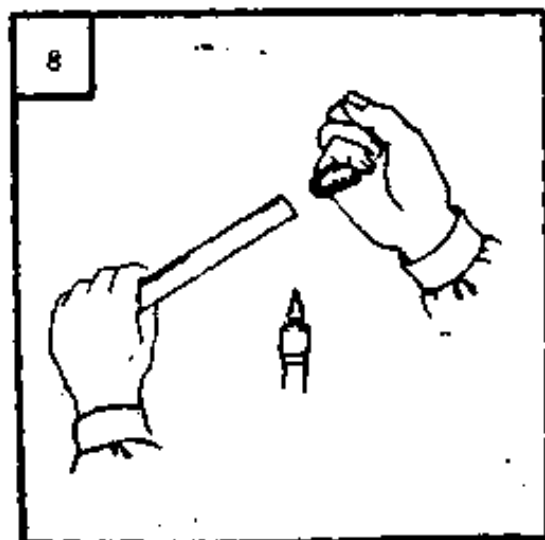


7. 将和匀待分离样品的培养基倾倒入培养皿中，摇匀。若菌液中细胞数过大，平皿中菌落过多，可将原菌培养液预先稀释。

#### (实验4-5) 平皿划线分离法

##### (一) 实验材料

1. 菌种 将酵母菌中的两个种（啤酒酵母和拟内孢霉）在麦汁中培养

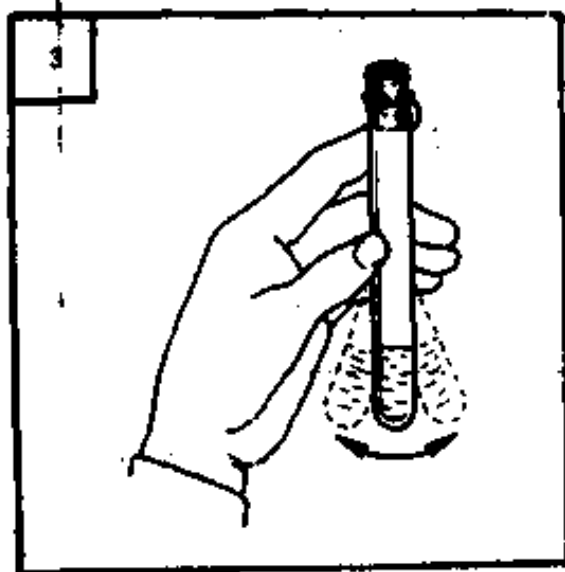


8. 将试管塞塞回试管于培养箱培养，待观察。

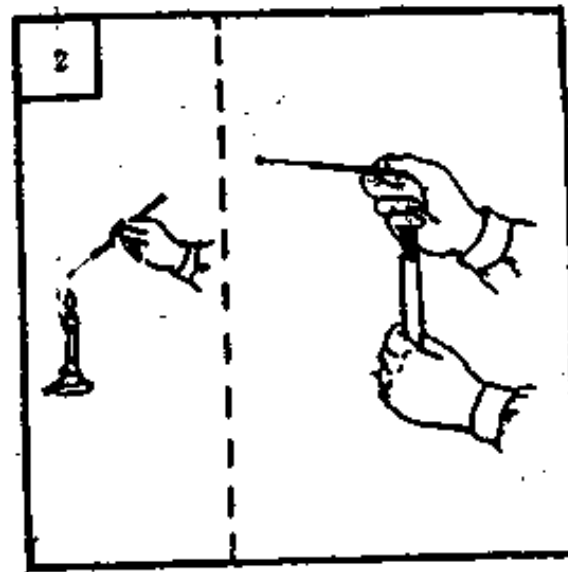
2. 培养基 麦芽汁固体培养基平皿。

3. 实验器具 接种环、试管、酒精灯、培养箱。

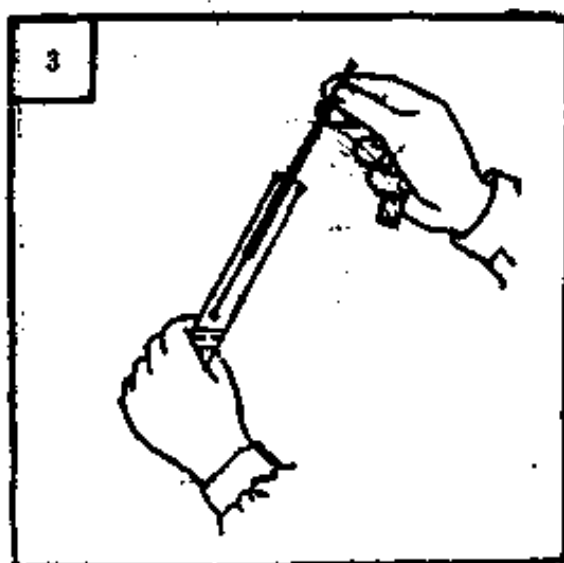
(二) 操作步骤



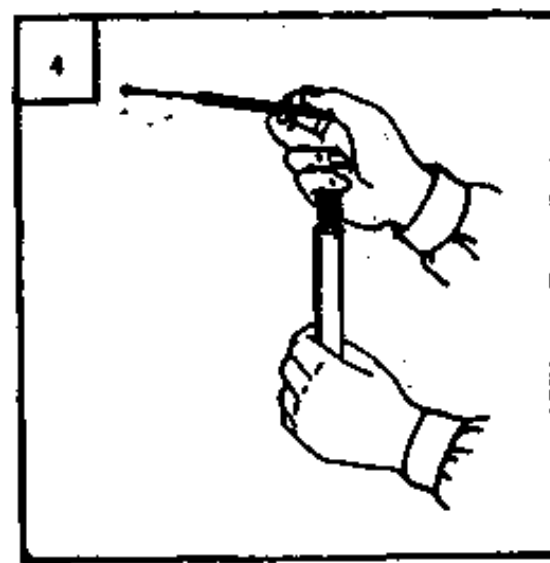
1. 将混合菌分离样品摇匀。



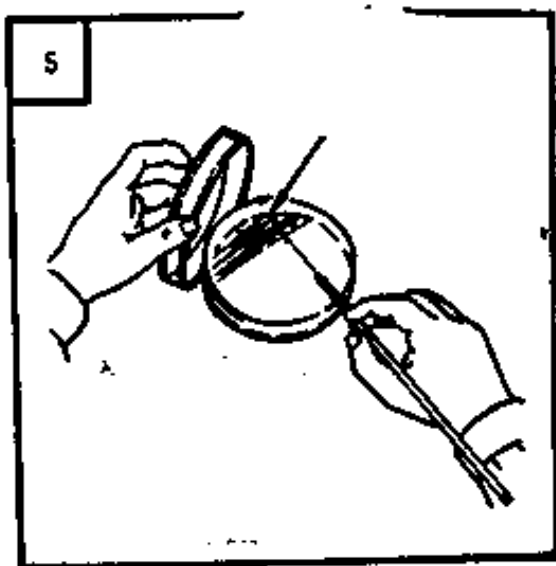
2. 接种环火焰灭菌后，在火焰边取出试管塞。



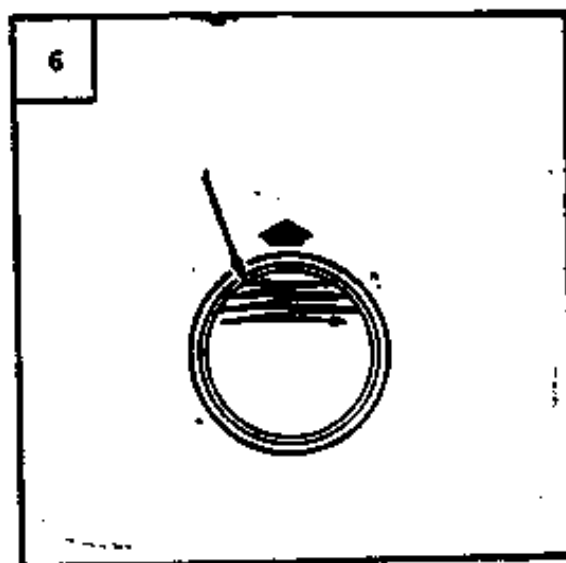
3. 火焰灭菌后至少凉4s，再将接种环插入样品试管。



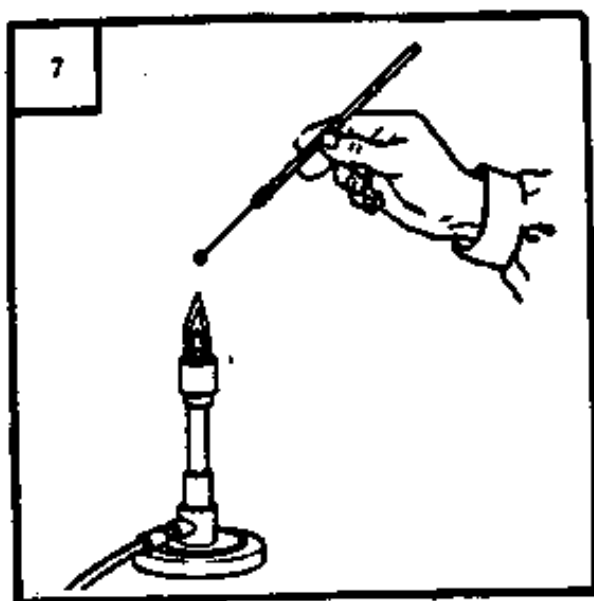
4. 取出样品，并将试管塞塞紧。



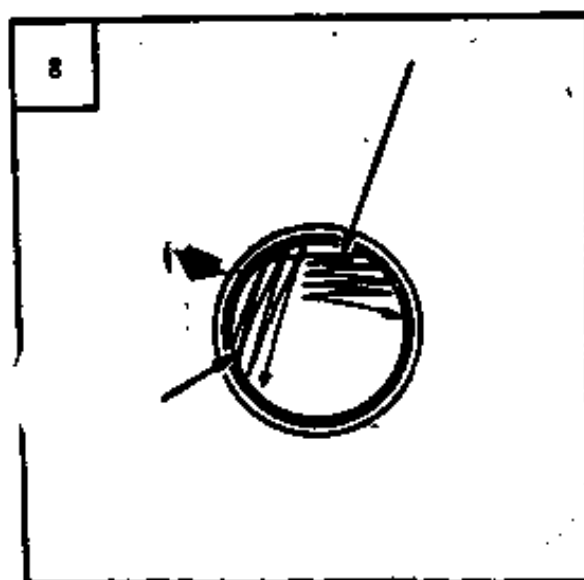
5. 左手掀开皿盖, 右手持接种环, 自皿的一边开始轻轻来回划线, 开始纹条间密些。



6. 划线时千万别将琼脂划破, 或划到琼脂内部。这是第一次划线区。

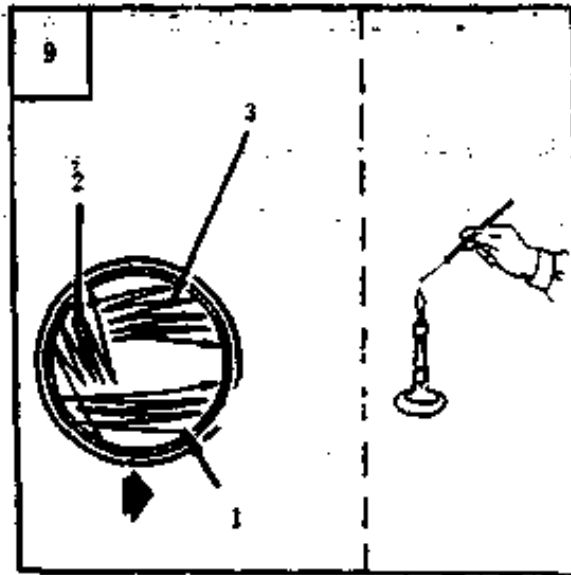


7. 将接种针火焰灭菌, 然后凉几秒钟。

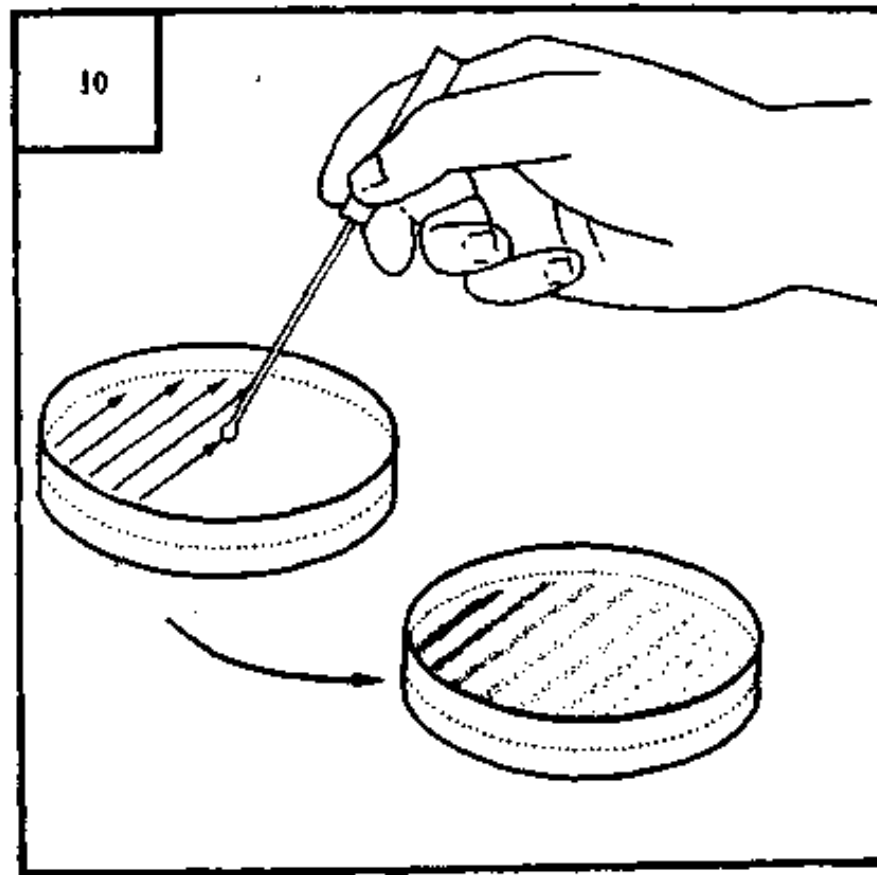


8. 将培养皿转一个向, 接种环从第一次划线区划一条, 继续如前在第二区划线。





9. 接种针再次火焰灭菌，再从第二区划出一线，在第三区前划线，放置培养箱内待观察。



10. 简单的划线分离法。

#### 〔实验4-6〕稀释分离平板菌落计数

如果样品内含有各种类型的微生物，要将它们分离开，采用的是稀释分离。此法与后面的选种实验是一样的，这里不予重复。但若是一个纯种

菌培养液，要知道每毫升含有多少个活细菌，就要采用稀释分离平板菌落计数。

计数时首先将待测样品制成均匀的、一系列不同稀释度，并尽量使样品中的微生物细胞分散开来，使成单个存在。这样一个细胞生长繁殖只形成一个菌落，如果不是单细胞态，即两个以上细胞聚集在一起，结果表面上仍形成一个菌落。这样一个菌落就不能代表一个细胞数。然后再取具一定稀释度、一定量的稀释液接种到培养皿中，使其均匀涂布于培养皿的培养基表面，经培养后，由单个细胞生长繁殖形成菌落。统计菌落数目，即可计算出样品中的含菌数。

在具体操作上有两种方式，一是先将稀释菌液加到无菌培养皿中，再将融化的并凉至50℃的培养基摇动倒入培养皿均匀凝固。一种是将融化稍凉的琼脂培养基先倒入培养皿均匀后凝固，再将一定稀释菌液加入，用玻璃涂棒(图4-5)均匀涂于培养基面上，可手动也可采用机械转动(图4-6)。它们的差别点是前一法是均匀分布在培养基内，在培养基表面和内部都长有菌落，由于培养基内空气不多，菌落形成会出现迟缓型。而后一方法则在菌落表面均匀形成。

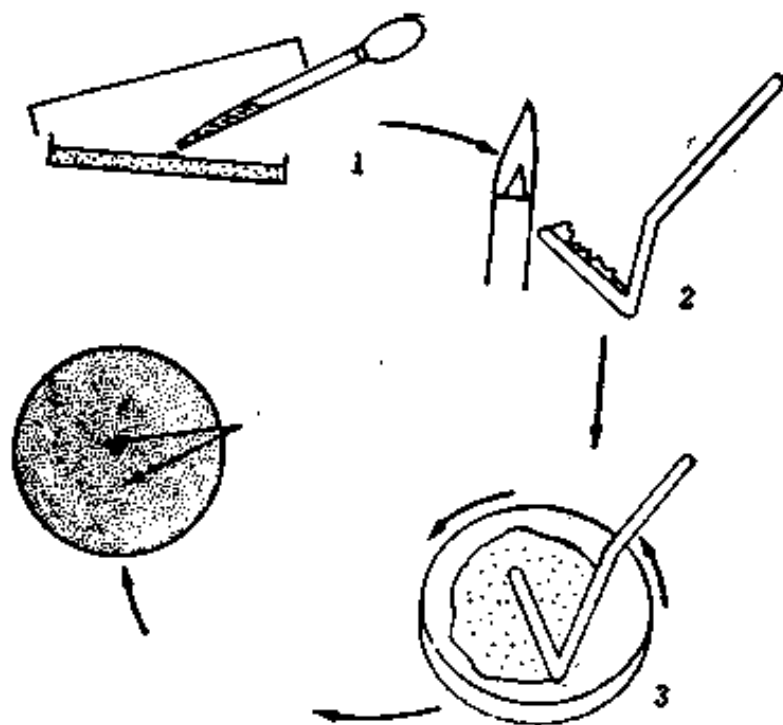


图 4-5 培养皿的涂布培养

1—滴入经适当稀释的菌液 2—将浸于酒精中的涂棒取出用火烧去多余酒精，成无菌涂棒 3—放置已凉的涂棒于已接种培养皿固体培养基上，快速转动培养皿 4—按的菌液在皿上长满菌落

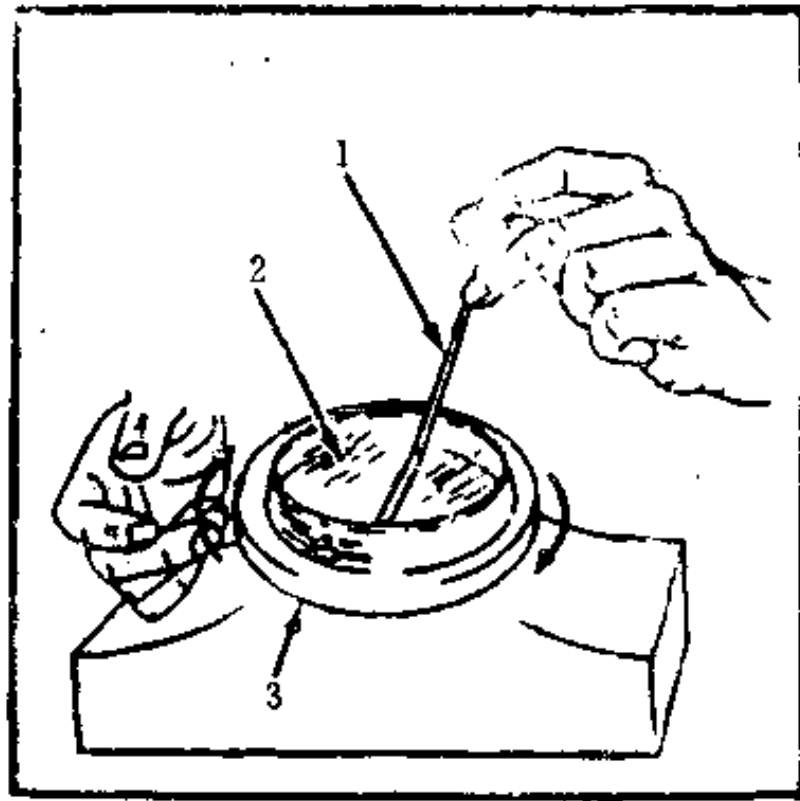


图 4-6 一种涂布转台

1—玻璃涂棒 2—加过菌液的琼脂培养基 3—转台

很明显，此法测定的不是总菌数，而仅是活的总菌数，因为死细胞是长不出菌落的。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母24h麦芽汁培养液。
2. 培养基 麦芽汁或曲汁固体培养基。
3. 实验器具 无菌培养皿9套，试管6只，1ml吸管6根，10ml吸管1根，生理盐水(0.9% NaCl)100ml，培养箱1只。

#### (二) 操作步骤

1. 将培养皿用玻璃铅笔标记，标明-4、-5、-6各3个，另外6个试管插入试管架，分别表明-1、-2、-3、-4、-5、-6。将无菌生理盐水往6个试管中各加入4.5ml。
2. 开始稀释。如图4-7，用吸管吸取已摇匀的酵母培养液0.5ml注入-1试管，摇匀，即从0.5ml加至5ml，稀释了10倍，这一试管的菌液浓度为原菌液浓度的1/10，即 $10^{-1}$ ，简称-1。另取一吸管从-1试管吸0.5ml至-2试管，摇匀。再取一吸管从-2试管吸取0.5ml至-3试管……依次进行。要求一支吸管只吸取一个稀释度菌液，随即换掉。并在吸取菌液入下一

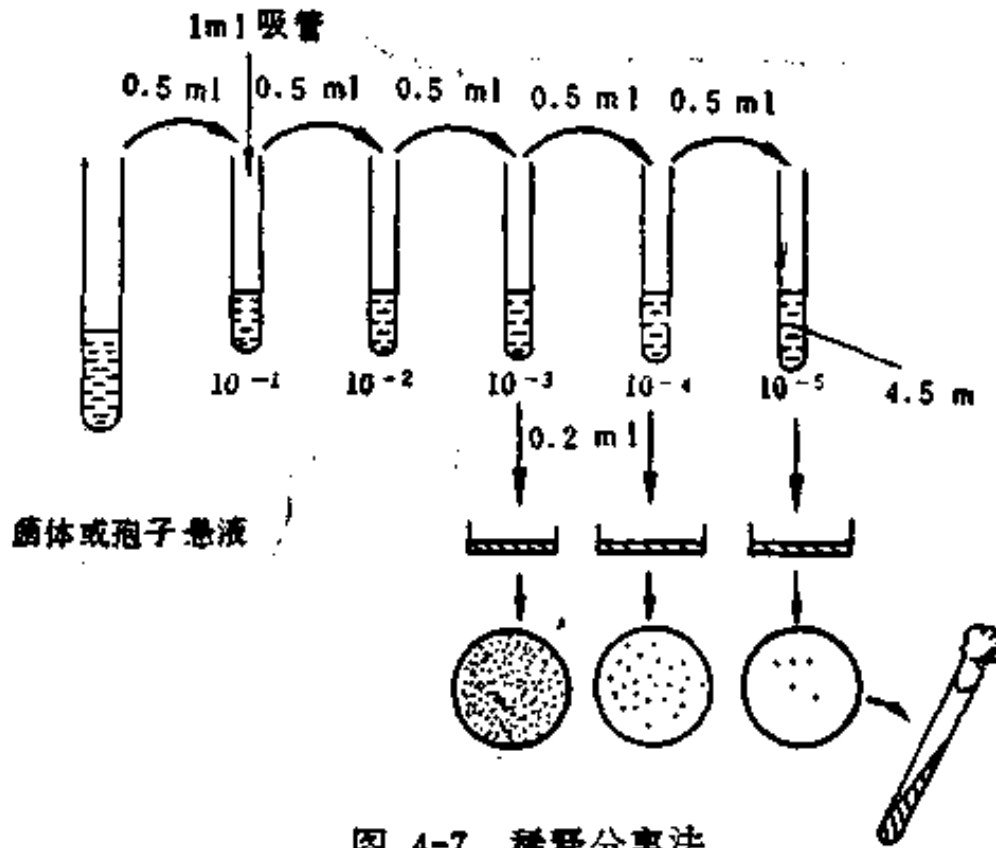


图 4-7 稀释分离法

号试管前，用吸管吸取和吹出此已摇匀后的菌液3~5次，以帮助菌液均化。

3. 从 $10^{-4}$ 号试管开始，在吸取0.5ml至下一试管后，同一吸管吸取菌液各0.2ml至3个同一稀释标号的培养皿中，直至 $10^{-6}$ 试管为止。采用什么方式和匀菌液于培养基内，可根据要求进行。然后将9个培养皿放在30℃的保温培养箱中培养。

4. 计数 取出培养皿，算出3个平皿上同一稀释度的菌落平均数。计数可用沾笔在培养皿背面每数一菌落点一标记，以免计算重复和漏点，也可采用菌落计数器。半自动菌落计数器采用一电子探针，每点一菌落，电子探针的信息即转动计数器积累记数。全自动的菌落计数器具有高度的灵敏度，易于操作，可用于测定各种微生物菌落、噬菌斑和颗粒的数目。就是对于低反差的菌落形态也可检出。它的操作是将培养皿放入待测位置，打开选择开关，调节扫描区至平皿大小，控制到屏幕上能看到，并调节灵敏度旋钮达最佳点，然后观察和记录数字显示数。

用于标记的方法计算菌落数，可按下列公式计算。

每毫升菌液中的总活菌数等于同一稀释度3副重复的培养皿的菌落平均数乘以稀释倍数再乘以5。其中5是指每皿0.2ml化成1ml的系数。

3个稀释度的平均差应是1:10:100的比例，实际操作中尽量达到这个要求，当然每一稀释度的3副皿的菌落数更应相近或一致。在这3个稀释

度中，要求按30~300个菌落/皿的稀释度来正式计数，如这3个稀释度均不能满足，则应将相应稀释度前后移动。

## 二、显微操作技术用于单细胞分离

显微操作术是一种借助于显微镜和显微操作器械进行的微细作业。完成这一操作的装置称为显微操纵器 (micromanipulator)。根据传动原理不同，显微操作器可分为气压传动、水压传动和机械传动三大类，以机械传动式较为常用，此又可分为三维旋螺式和杠杆式。

显微操纵器的基本结构：

1. 显微操纵器(以德国Leitz产品为例) 分布在载物台的两侧，由滑动板、转鼓、手柄、粗升降器、细升降器及微型工具固定支架等组成(图4-8)。

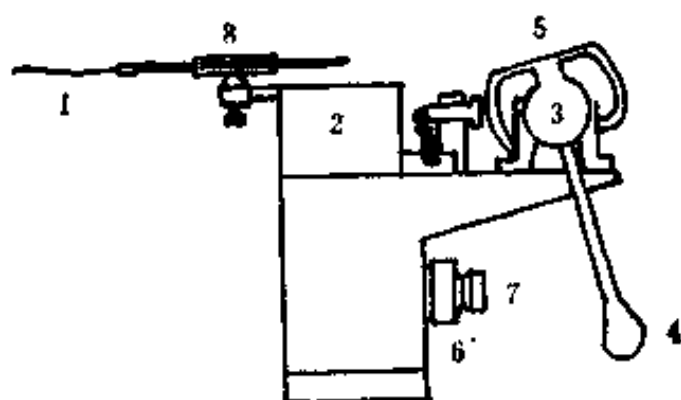


图 4-8 显微操纵器结构



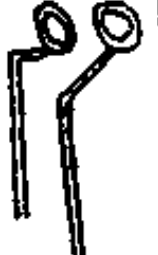


1—微针 2—滑动板 3—转鼓 4—手柄 5—转鼓螺丝 6—粗升降器 7—细升降器 8—固定支架

微型工具通过支架紧连于可以调整位置的滑动板上，转动转鼓及操纵手柄则可带动固定在微型工具固定支架上的微型工具在水平位置上作前后左右的活动。转动转鼓螺丝使其上、下移动，可以调节手柄活动和微型工具活动范围的比例为16:1~80:1，从而适应不同的操作精度和不同的放大倍数的物镜。粗、细升降器位于操纵器下外侧靠近手柄，可使微型工具上、下移动。

2. 微型工具 显微操纵器所使用的微型工具，一般由玻璃或特殊金属材料制成，以前者较为常用。常用的微型工具有微

针、微解剖刀等(表4-12)

表 4-12 常用微型工具的种类

类别	图示	用途
微针 { 空心 实心		直径约几微米。空心微针主要用于注射或用作吸管；实心微针用于拨离或挑取细胞
直角平头微针 { 长颈 短颈		主要用于细胞拨离
微环		直径5~10μm，相当于红血球的直径，用于细胞拨离等
微吸管刺		用于从细胞内吸出或白细胞内注入液体
微解剖刀		用于剥离或解剖细胞

3. 湿室 在长时间显微操作过程中，保持操作样本的湿度、防止其死亡、变性或被污染是极为重要的。因此显微操作时常在一侧或一侧开口、并盛有少量营养液的小室中进行，这种小室又

称为湿室 (图4-9), 可自制。自制方法是在一干净载玻片、用阿拉伯树胶在载玻片两侧粘连上高5mm、长约60mm的玻璃条; 再在玻璃条两端粘上高1mm的玻璃条, 由此粘合成一小池。

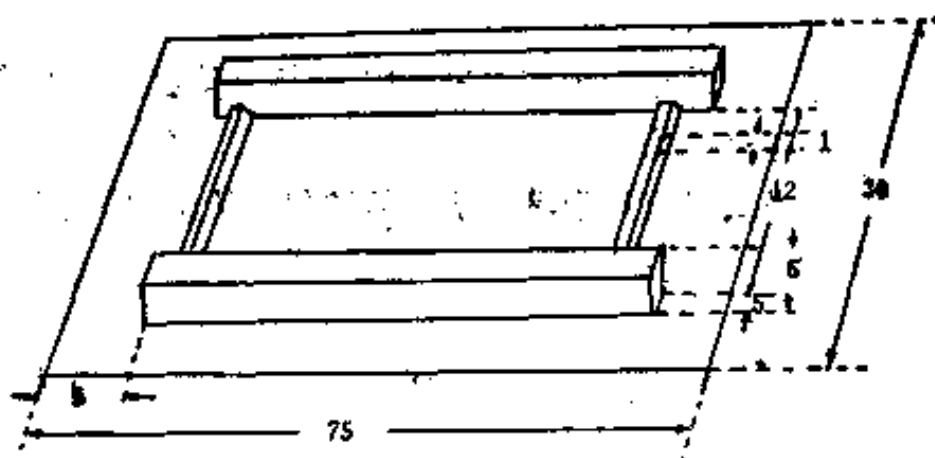


图 4-9 湿室示意图及规格 (单位: mm)

### (实验4-7) 显微操纵器用于单细胞分离

#### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母。
2. 培养基 酵母氮基6.7g, 葡萄糖10.0g, 琼脂粉(Difco)8.0g; 水1000ml, 78.46kPa, 10min灭菌。
3. 相差显微镜及显微操纵器 (Leitz)。

#### (二) 操作步骤

1. 取两块经酸、乙醇等处理的洁净无菌盖玻片, 向其中一块的中央滴加半滴已经稀释的酿酒酵母菌悬液, 向另一块中央滴加一滴已溶化的培养基, 待其凝固。
2. 将两块盖玻片翻转盖于湿室上 (图4-10)。
3. 将湿室置显微镜载物台上并固定。
4. 选用直角平头微针, 用70%酒精消毒5min, 固定至微型工具固定支架上。
5. 在显微镜下观察, 调节显微操纵器, 使微针的前端位于视野的中央, 然后将微针降下。
6. 移动载物台推进器, 选择待分离单个细胞, 并移至视野中央。
7. 将微针缓缓开起至针尖再现在视野中。
8. 操纵显微操纵器, 轻轻拨离细胞, 使单细胞附着在针尖上。

9. 降下微针。
10. 移动载物台推进器，使载有培养基的盖玻片移至针尖上方。
11. 慢慢地升起微针，使针尖轻轻地接触到培养基的表面，使针尖上的单细胞植入至培养基中。
12. 将微针降下。
13. 经显微观察确认单细胞在培养基中，将此盖玻片无菌取下，至一盛有少许无菌水的平皿中培养。

#### 〔实验4-8〕显微操纵器用于酵母子囊的解剖及子囊孢子单孢化

##### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母。
2. 培养基 酵母氮基6.7g，葡萄糖10.0g，琼脂粉(Difco) 8.0g，水1000ml，78.46kPa、10min灭菌。
3. 相差显微镜及显微操纵器 (Leitz)。

##### (二) 操作方法

1. 取两块无菌洁净盖玻片，其中一块滴加半滴已经稀释的酵母子囊悬液，另一块滴加一滴融化的培养基，待其凝固，倒置于湿室上。
2. 固定好直角平头微针。
3. 在显微镜下用微针从子囊群中拨离出一个待解剖的酵母子囊。
4. 用微针压迫子囊，使囊壁破裂，释放出子囊孢子。
5. 用微针轻轻拨离子囊孢子，使单孢子附着在针尖上。
6. 降下微针。
7. 移动载物台推进器，将培养基移入视野中。
8. 慢慢升起微针，将单孢子植入培养基中，保湿。
9. 培养。

##### 附：玻璃微型工具的制作

玻璃质微型工具因不易保存等因素，常需重新制作。先将直径5~6mm的硬质玻璃管在普通喷灯上拉制成直径1mm左右的毛细管，然后用焰口径在1mm以下的本生煤气喷灯或自制微灯(图4-11)细烧拉制成纤细的各种针形。实心及空心微针，其尖端应细而短，顶端平整，以拉断者为好。直角平头微针的垂直杆不宜太长，也不宜太短。太长使微针上、下活动范围缩小，太短则影响观察。微环的制作需在低倍物镜下进行。下面介绍一下平头微针及微环的制作过程。



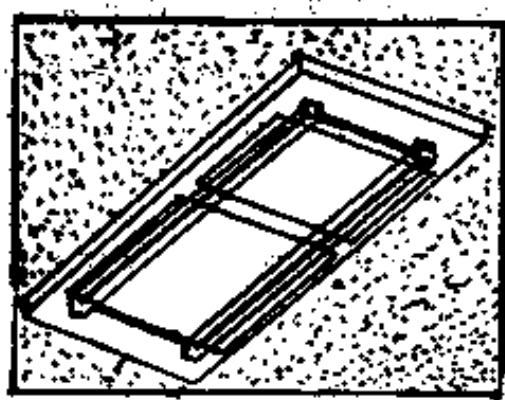


图 4-10 湿室及盖片

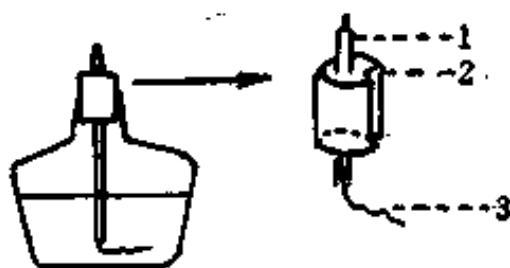


图 4-11 自制微灯

1—微量吸管断头 2—灯塞缺口 3—一根细棉线

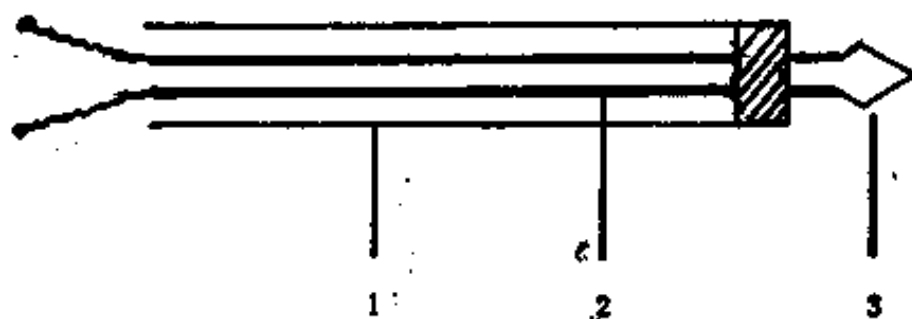


图 4-12 显微操纵电热丝

1—玻璃管 2—漆包铜线 3—铂丝(电热丝)

1. 取一直径1mm左右,长10cm左右的玻璃毛细管在微灯上拉出尖端。
2. 固定在右侧显微操纵器上。
3. 将显微操纵电热丝(图4-12)固定在左侧显微操纵器上。
4. 分别调节微针和电热丝的位置,使两者都出现在视野中。
5. 用左手调节变压器加热电热丝至玻璃熔化的温度(电热丝通常使用电压为10V)。
6. 用右手调节微针的尖端前沿部分与电热丝轻轻接触,微针的前沿部分即熔化在电热丝上。
7. 移动操纵器将微针的前沿部分拉细成所需要的尺寸,立即断开左侧电源,这时,因电热丝冷却收缩而将微针顶端拉断成一平面(图4-13)。有时因微针前沿部分未被拉得很细,靠电热丝冷却收缩的力量不足以将针端拉断,此时,可用右侧操纵器微微拉动针端,使其断开。由此获平头微针。须烧制微环时,可在此基础上继续完成下列步骤。
8. 重新调整电热丝和微针的位置,使两者都出现在视野中。
9. 调节左侧变压器电源,调节电热丝的温度,使其达到使玻璃软化而不

是熔化的温度。调节的方法是先将电热丝的温度调节装置打到最低点，然后缓慢调节电压，每调一点，稍等片刻，用微针顶端与电热丝轻轻接触，一直调节到微针顶端能弯曲而不与电热丝粘连，此即为电热丝烧制微环的最适温度。固定调节装置。

10. 用右手操纵器缓慢而间断地将微针端与电热丝接触，逐步将针端弯曲成环状（图4-14）。

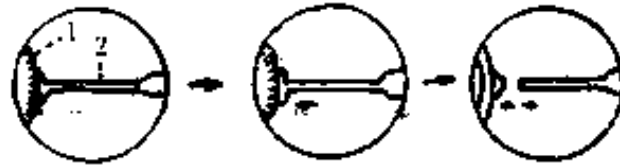


图 4-13 显微操纵电热丝烧制平头微针过程

1—铂丝(黑色表示灼热状态, 空白表示冷却状态) 2—微针(箭头表示微针移动的方向)

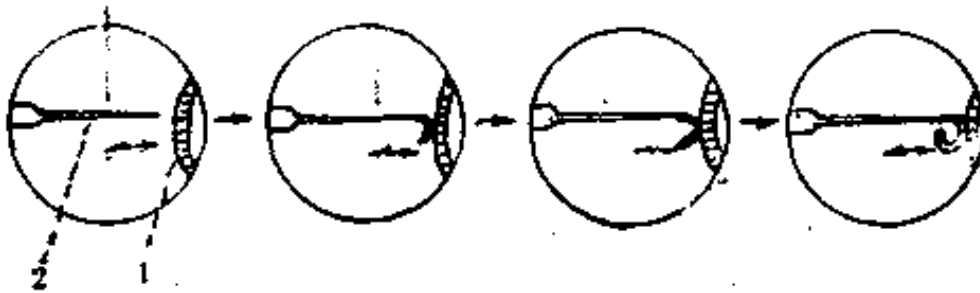


图 4-14 显微操纵电热丝烧制微环过程

1—铂丝(中度灼热) 2—微针(箭头表示微针移动方向)

### 三、接 种

接种操作也是微生物试验中的一项基本技术。它要求将用无菌状态分离的菌落或斜面或试管菌液中的菌体，接入斜面或液体试管或其他培养容器中。

接种的用具具有接种钩、接种针、接种耳、接种环等（图4-15）。其中接种钩较粗、较硬，用于挑取放线菌的菌落。接种针用于穿刺培养。接种耳与接种环一般通用，都称接种环。

#### 〔实验4-9〕接种技术

##### （一）实验材料

1. 菌种 啤酒酵母麦芽汁培养液。

2. 培养液 灭菌麦芽汁培养基试管。

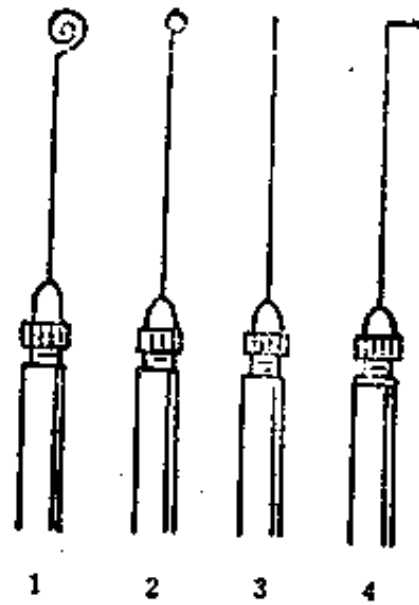
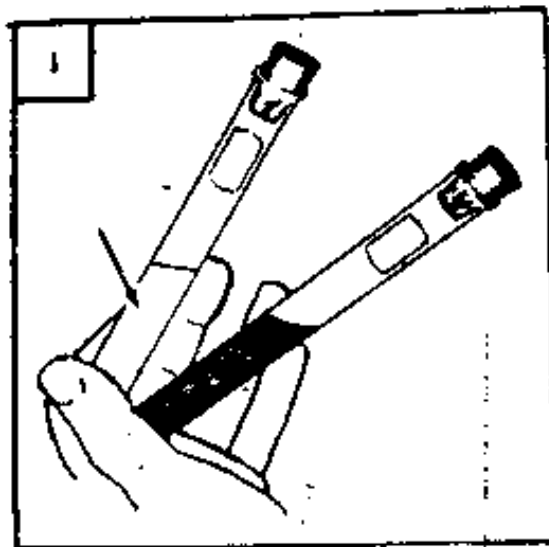


图 4-15 接种用具

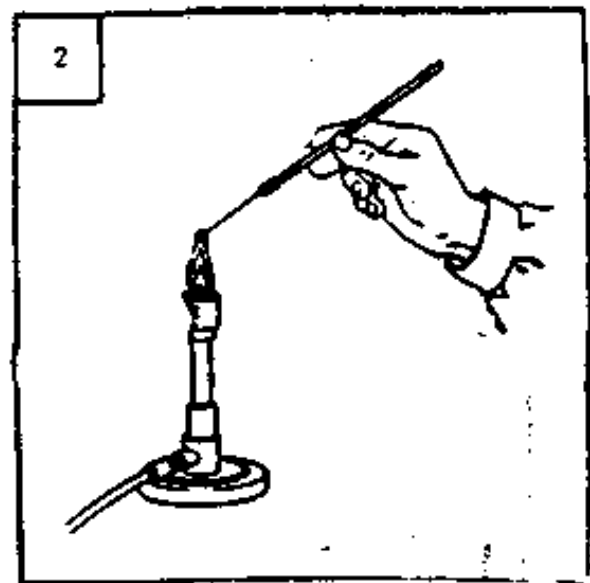
1—接种环 2—接种耳 3—接种针 4—接种钩

3. 器具 接种环、酒精灯、标签。

(二)操作步骤(以液体试管移接液体试管为例说明)

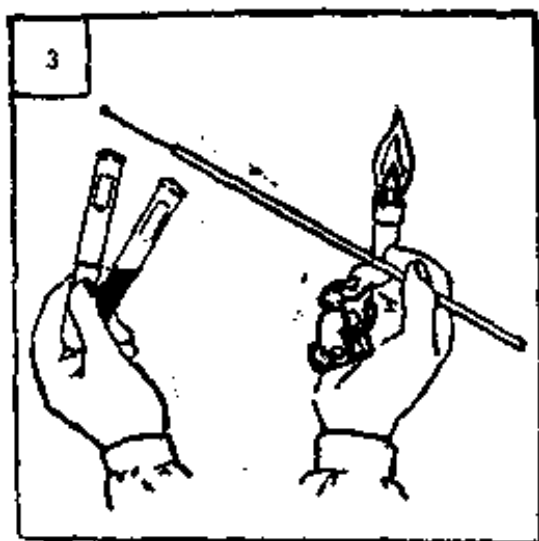


1. 左手手拿两支液体试管，  
外侧为菌液试管。

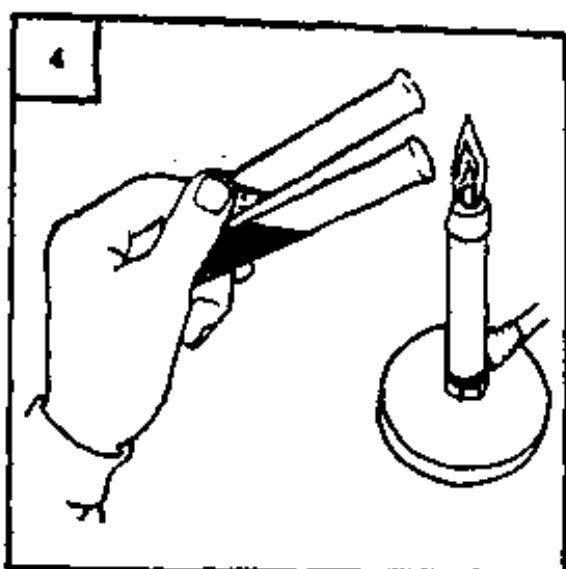


2. 将接种环在火焰上烧红灭菌。

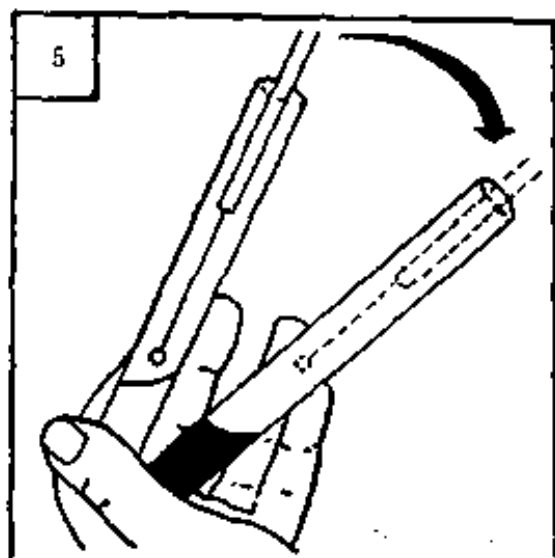
若移接到新鲜斜面上，一般在移接细菌和放线菌时，接种环由管底波浪式滑动移至管口斜面末端，而一般移接酵母和霉菌则只要直线式一拉就行了。图 4-16 展示了一些培养容器。



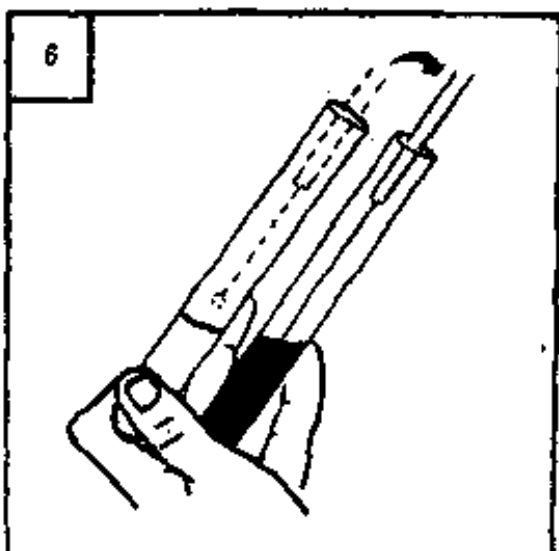
3. 右手取下试管塞，接种环凉后使用。



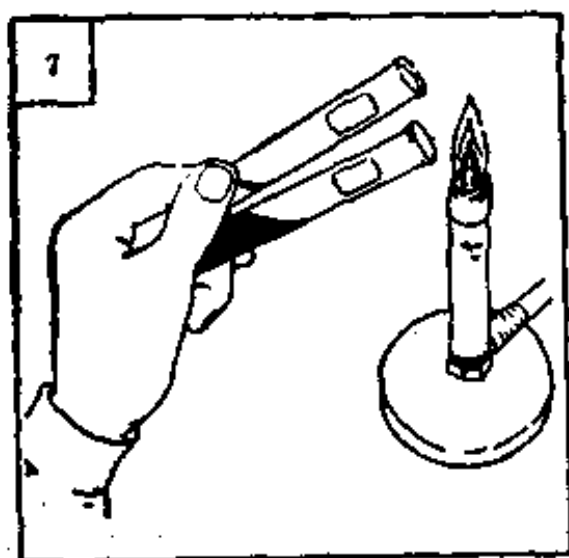
4. 试管口靠近火焰灭菌。



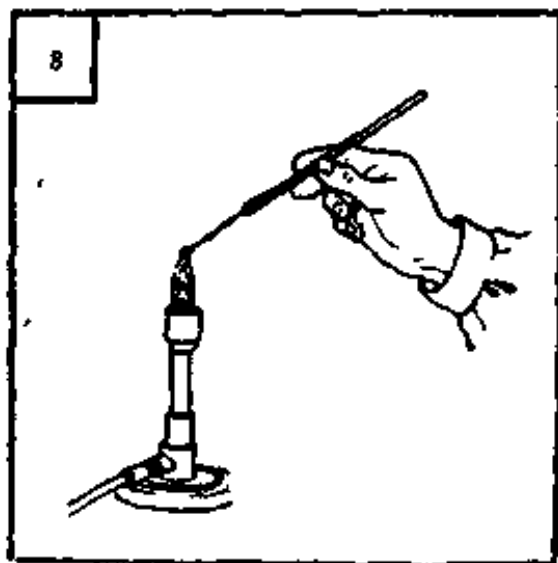
5. 将一环菌液移接至培养液管中。



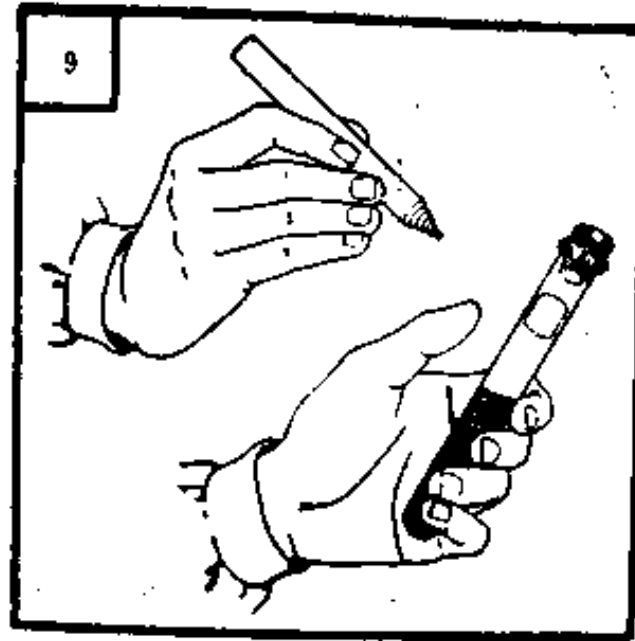
6. 将接种环在培养液管中摇动一下，取出。



7. 先将试管在火焰上消毒后，塞管塞。



8. 将接种环火焰灭菌放回原处。



9. 在试管标签上标上菌名、日期等送培养箱培养。

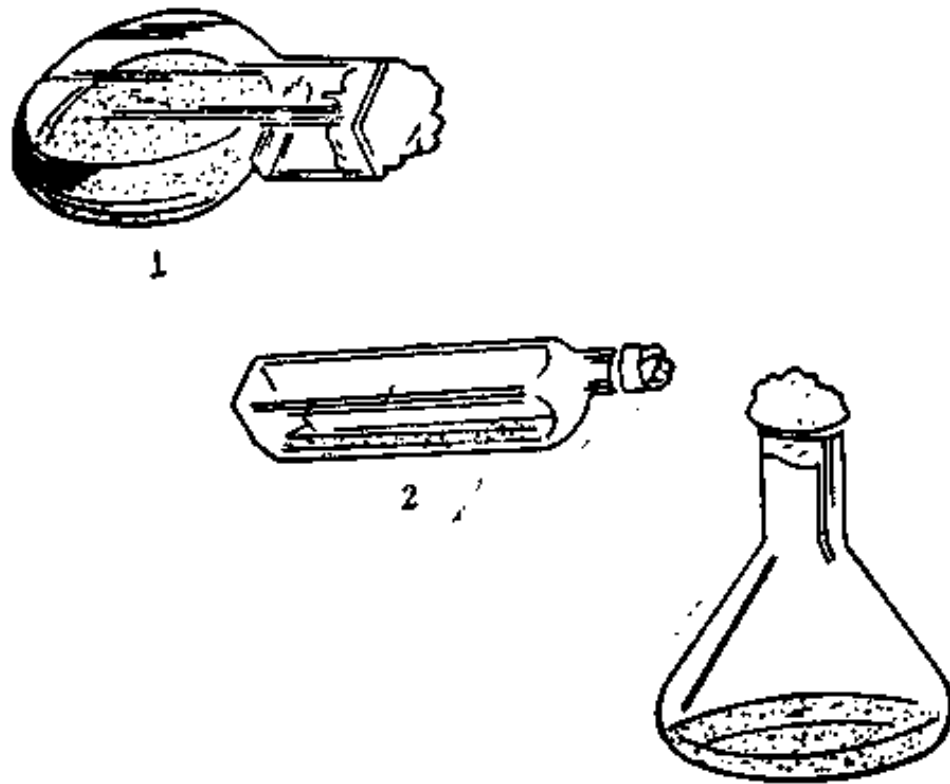


图 4-16 一些培养容器

1—克氏瓶 2—罗氏瓶 3—费氏烧瓶

#### 四、摇瓶与发酵

微生物培养类型主要有好氧培养和厌氧培养。绝大多数工业微生物的培养采用好氧培养，其实验室中最常见的方法便是振荡培养，以摇瓶培养为代表。

## (一) 摇瓶培养

摇瓶培养技术问世于本世纪30年代，由于其简便、实用，很快便被发展成为微生物培养中极重要的技术而普及，并广泛用于工业微生物菌种筛选、实验室大规模发酵试验、种子培养等。

摇瓶培养设备主要有旋转式摇床和往复式摇床两种类型，也有旋转式和往复式的混合类型，其中以旋转式最为常用。用旋转式摇床进行微生物振荡培养时，固定在摇床上的三角烧瓶随摇床以200~250r/min的速度运动，由此带动培养物围绕着三角烧瓶的内壁平稳地运动。在用往复式摇床进行振荡培养时，培养物被前后抛掷，引起较为剧烈的搅拌和撞击。振荡培养中所使用的发酵容器通常为三角烧瓶，也有使用特殊类型的烧瓶或试管。在振荡培养过程中所采用的烧瓶类型和振荡类型主要取决于所要研究的发酵类型及性质。振荡培养通常用于有氧过程中，主要是两种类型：(1) 供氧相对较大，以产生大量的细胞，常见于丝状微生物(如食用菌、放线菌)中；(2) 需供氧但所需供氧量较小，常见于细菌。要获得高氧供应，可在较大的烧瓶(250~500ml三角烧瓶)中盛装相对较小容积的培养基，由此可获得更高的氧传递速率，便于细胞的迅速生长，要获得较低的氧供，则采用较慢的振荡速度和相对大的培养体积。经连续振荡培养一段时间后，细菌等单细胞微生物可以呈均一的细胞悬液；而丝状真菌和放线菌，可得到纤维糊状培养物——纸浆状生长。如果振荡不足，则会形成许多球状菌团——颗粒状生长。

振荡培养技术通常用于微生物菌种的筛选或生产工艺的改良和工艺参数的优化。因此，通常使用复合培养基。用于振荡培养的复合培养基通常由碳水化合物及多种蛋白质性物质(玉米上清、大豆粉、豌豆粉等)及植物油组成。这些培养基组分以不同的速率被代谢掉，从而为微生物提供一较长的、最适生长和代谢的条件。在复合培养基中通常还加入一些固体物质如石膏( $\text{CaCO}_3$ )，以协助培养基pH的控制并有利于絮凝物的形成。此在啤酒工艺

中特别重要。此外，经过精心设计的化学限定性培养基（避免pH波动及防止重要培养基组分的突然耗尽）也可用于振荡培养，这类培养基的组成通常是蔗糖加酒石酸盐、铵盐、磷酸盐、金属盐类以及生长因子。

1. 摇瓶培养方法 在浸没培养过程中振荡的目的在于改善活细胞的氧气和营养物的供给。摇瓶培养通常以特定生长条件下的培养物接种，也可用孢子接种。在绝大多数情况下，摇瓶接种量有一最佳浓度，此在摇瓶开始之前，必须通过预试加以确定。而在整个摇瓶发酵过程中保持相对无菌是成功地实施这项技术的必要保证。

摇瓶培养的机械装置主要由用于放置和固定烧瓶的平台以及牵引其运转的马达和运转系统组成，摇瓶需安装于有维持恒温和恒湿自动调节能力的隔热室内。目前也有具备恒温装置的小型台式摇床。考察摇床的设计和使用性能主要从下列几项入手：(1) 所使用的设备，(2) 平衡要求，(3) 摇床的大小、型号，(4) 培养条件及恒温调控，(5) 试管或小型发酵器的振荡培养性能。

通常，摇床的工作温度为25~37℃。由于电机和机械传动部分的产热、振荡产热和微生物生长代谢释放的热能，使摇瓶中培养基的实际温度要比实际室温高2℃左右，且在强烈振荡时，此温差更为明显。因此，在实验过程中设计高温点时必须认真注意到这一问题。另外，由于夏季气温偏高，温控困难随之增大；培养放线菌和真菌时温控更为主要，因为大部分放线菌和真菌在30℃下培养时，其代谢已被严重干扰，而30℃的温度在摇瓶中是极易形成的。因此，在摇床室中必须装配一个可靠的致冷系统。一般台式摇床都有一通过空气循环或水浴来保持恒温的装置，可使所有的摇瓶内培养基温度处于同一水平。

振荡培养所用的发酵容器也可选用试管。所选用的试管大小可根据需要来定。将盛有一定体积的培养基的试管倾斜固定在支架上，倾斜角度一般为15~30°，倾斜方向与振荡方向一致。试管

随摇床平台作旋转式或往复式运动。用试管作发酵容器的优点在于在较小的空间范围内一次可处理较大的试样数。但其效率远不如三角烧瓶。因此,在通常情况下更多的是选择25~50ml小烧瓶。同样,在用试管进行振荡培养时,可在试管中盛装相对较少的培养基以旋转式振荡培养来提供丝状微生物良好的气体环境,也可以用相对多的培养基,以往复式振荡培养,使细菌迅速生长。振荡培养中,三角烧瓶用6~8层医用纱布封口,试管塞一般用普通棉塞,也有使用封口胶或其他的塑料或金属盖。

2. 振荡培养中遇见的实际问题 振荡培养是建立深层发酵的开始。就一特定微生物而言,振荡培养时存在一最佳培养基配方和最佳培养基容量。一般来说,振荡培养丝状微生物时培养基最佳容量为50~100ml/500ml三角烧瓶,或25~50ml/250ml三角烧瓶,即为所使用的发酵容器容积的10~20%。在这一范围内,所使用培养基量越小,所得试验结果越好。通过使用带有挡板的烧瓶、使用气体通透性更好的封口胶代替纱布或棉塞,以及增加摇床振荡速率也可获得相同的效应。但需特别注意的是提高振荡速率时必须注意烧瓶的放置位置与重力平衡,以减少由于角速度增加引起的磨损和不平衡甚至翻车。使用棉塞和纱布时应采用普通棉纱而非脱脂棉纱,以防吸水潮湿而妨碍氧的扩散。

将经接种的烧瓶固定到摇床上培养,在培养过程中应特别注意两个问题:一是上文已提及的温度控制,另一个十分重要的问题就是维持连续振荡。振荡不连续进行那怕只是数分钟的停顿,对结果的影响都是极显著的;而且由于数分钟的停顿对微生物细胞生长的影响不明显,使影响从表面上不易被发现。有报道在用黑曲霉生产柠檬酸的发酵试验中,提高通气率可以刺激柠檬酸的生产,中断通气时柠檬酸的产生直线下降,甚至不可逆转。在繁殖期中断通气20min不会使菌株的活力下降,但菌株生产和积累柠檬酸的能力受到不可逆的破坏或减慢。

经24~48h培养,可对烧瓶进行检查,以判断生长的程度和



类型。在好氧生长时，消耗1g葡萄糖通常可增加0.25~0.5g的细胞。单细胞性细菌经培养后会出现一稠密或轻度稠密的培养物；而丝状菌株如在含5%的糖的培养基中生长可形成密细胞培养物，4~5天后，细胞密度可达20~30g/L，如果培养物产生毒性物质或大量的副产物以及产生抑制细菌生长的产物，则其生长速度相应降低。

振荡培养过程中，必须定期定时分析培养过程中的各种参数。通过光密度、培养基中细胞沉积或通过过滤、干燥和称重可定量或半定量地估计细胞生长情况。迅速而粗略地估计细胞生长的方法是将一些培养物放置于一小的测量瓶中，室温静置一段时间后根据细胞沉积粗略估计微生物细胞生长情况。此外，培养液的pH、残糖、色质、外观和气味变化也应随时加以记录；用显微镜检测菌丝末端状态、分枝情况、絮凝体形成及污染情况，对于掌握培养物的培养状况也是重要的。

细胞或孢子接种浓度对试验的成功极为重要，不同的微生物细胞或孢子以及不同的振荡培养过程的接种浓度差异可以是十分显著的，且各自存在一最适浓度。此必须在预试验中确定。最适接种浓度的获得和使用可保证良好的生长和高质量的培养物的获得。使用不同的接种浓度还可获得不同的生产类型。例如，当使用 $2 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ /ml青霉孢子接种浓度时，经25℃培养120h后菌丝呈平滑、致密沉积体；而当接种浓度在 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ /ml时，相同条件下培养后则呈小、纤丝状、絮凝物，直径在0.4mm左右。

振荡培养中最常出现的另一问题是贫瘠生长。这通常是由于接种浓度太低或种子活力较差。经验而言，种子的培养时间为1~2天，接种后培养基中的孢子浓度在 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ /ml。

振荡培养时培养物被污染并不常见，但一旦被污染，会带来许多麻烦。出现污染时，培养物表面为外观改变，气味异常，菌丝体雾浊不清，产品丢失等。需及时发现并及时处理。

#### **〔实验4-10〕 需氧发酵生产柠檬酸**

### (一) 实验材料

1. 生产菌株 黑曲霉 (*Aspergillus niger*).
2. 生产培养基 去离子葡萄糖140g, 硝酸铵2.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5g,  $\text{Cu}^{2+}$  0.06mg,  $\text{Zn}^{2+}$  25mg,  $\text{Fe}^{2+}$  1.3mg,  $\text{Mn}^{2+}$  1.0mg, 去离子水加至1000ml, pH 3.8.
3. 500ml三角烧瓶.
4. 旋转式摇床等.

### (二) 操作步骤

1. 取干净500ml三角烧瓶, 分装50ml培养基, 高压灭菌.
2. 以 $8 \times 10^4$ /ml的接种浓度无菌接入黑曲霉孢子, 混匀.
3. 置旋转式摇床(振幅25mm, 转速270r/min)振荡培养9天.

此可获得72%的糖转化为柠檬酸, 菌体为小的沉积体, 直径在0.1~0.5mm.

## (二) 小型深层发酵系统

实验中各种发酵试验, 最终是为了获得理想的菌种并根据这些发酵试验获得的数据进行有效的放大。因此, 在一易于改变控制条件, 便于结果观察和分析的小型台发酵罐中进行发酵试验是十分理想的。多数发酵产品是微生物好氧培养得到的。氧在培养基的溶解浓度很高, 因此, 微生物细胞反应器(发酵罐)必须不断进行通气和搅拌, 使培养液中有一定的溶解氧浓度, 并可保持培养液的均匀悬浮状态, 促进发酵热的散失等。常见的发酵罐有机械搅拌式、自吸式、鼓泡式和气升式。图4-17是一种小型恒化器, 一种常见的机械搅拌式实验发酵罐。采用台式发酵罐获得的各种参数, 比起三角烧瓶摇瓶发酵获得的数据更接近于生产, 因而更便于使用到扩大生产规模, 但价格较贵。实验室中可自行配制成一种通气培养装置(图4-18)。这些由一些玻璃器皿装配而成的, 有箭头处拆开处, 依次是搅拌、发酵瓶(三颈烧瓶)、洗气瓶和棉花过滤器。空气可来自空气压缩机。各部分的开口处用锡纸或棉花包上, 进行高压灭菌。灭菌后按图连接。用于此装置的塞子和管子最好为硅氧橡胶。过滤器中的棉花尽可能压紧。取样口

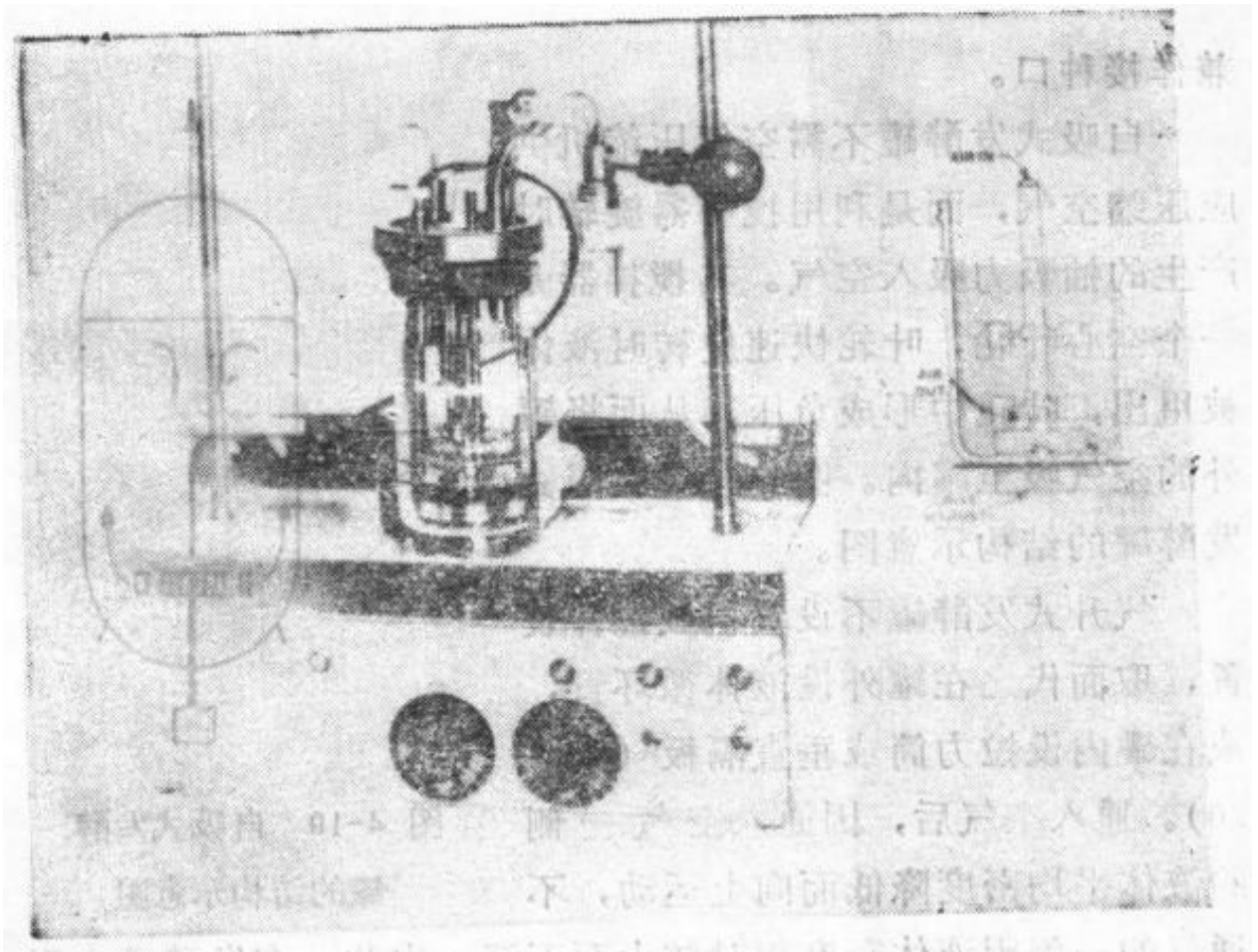


图 4-17 小型恒化器

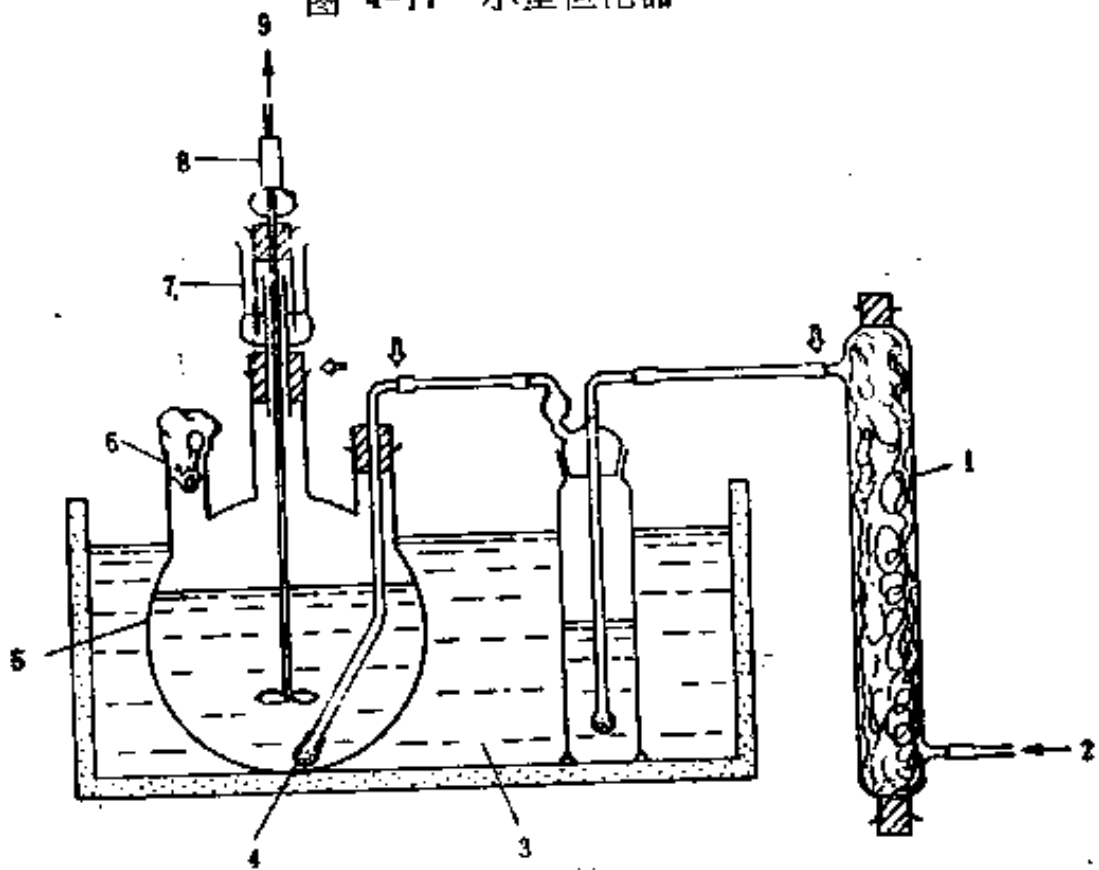


图 4-18 装配型小型通风培养器

1—棉花过滤嘴(冷凝管的外套管) 2—空气压缩机 3—恒温水浴 4—通气  
 喷嘴 5—三颈烧瓶 6—取样管 7—搅拌轴封 8—厚壁胶管 9—洗气瓶

兼作接种口。

自吸式发酵罐不需空气压缩机供应压缩空气，而是利用搅拌器旋转时产生的抽吸力吸入空气。其搅拌器是一个空心叶轮，叶轮快速旋转时液体被甩出，叶轮中形成负压，从而将罐外的空气吸至罐内。图4-19为自吸式发酵罐的结构示意图。

气升式发酵罐不设置机械搅拌装置，取而代之在罐外设液体循环管，或在罐内设拉力筒或垂直隔板（图4-20）。通入空气后，因通入空气一侧的液体平均密度降低而向上运动，不通气的一侧因液体密度相对较大而下沉，由此，在发酵罐内形成液体环流。气升式发酵罐由于省去了机械搅拌装置，使其能耗较低，易于密封和防止污染，且结构简单，液体剪刀作用较小。

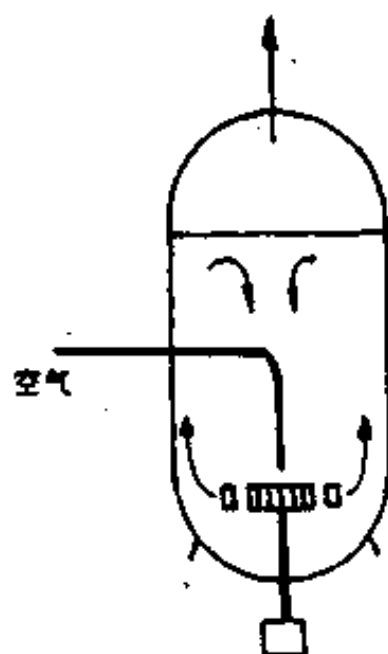


图 4-19 自吸式发酵罐的结构示意图

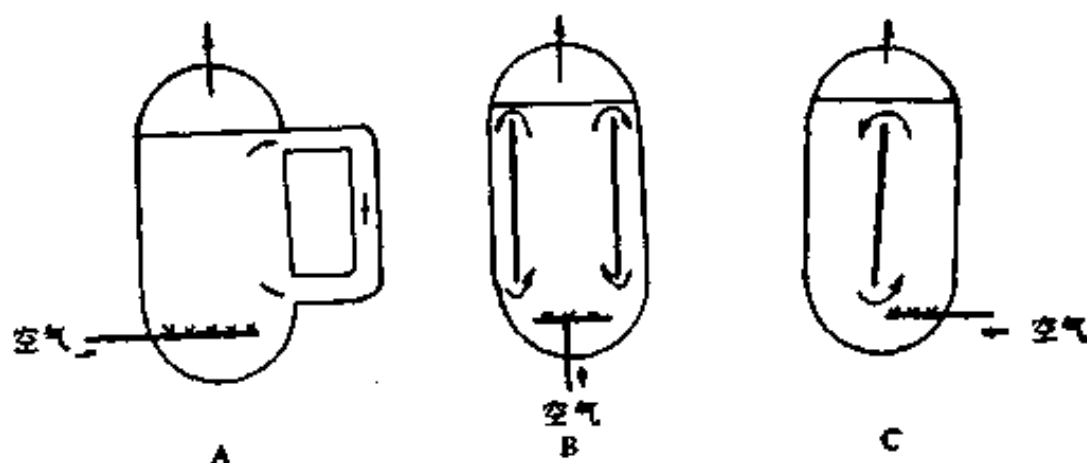


图 4-20 气升式发酵罐示意图

A. 罐外循环 B、C. 罐内循环

好氧发酵中连续发酵工艺的研究是很重要的。当连续培养达到稳定状态时，反应器中的细胞、基质和产物浓度保持恒定不变，细胞的比生长速率也保持恒定，从而有利于研究细胞的代谢活动与环境的关系。连续培养方式有单级连续培养、细胞回流单

级连续培养和多级连续培养。在单级连续培养时，当反应器内达到稳定状态，细胞的比生长率就和稀释率相同。此时只要改变加料的流量，就可改变细胞的比生长速率，从而可以研究特定细胞在不同比生长率下的生理特性。连续培养还用于菌种筛选过程中生长优势的优选与富集、基因工程菌质粒稳定性、细胞壁生长效应以及生物反应动力学等方面的研究。

除恒化器之外，连续培养控制技术尚有以细胞密度恒定不变的恒浊器 (Turbidostat)，以残余底物浓度为不变量的营养恒定反应器 (Nutristat)，以pH为不变量的pH自动恒定器 (pH-auxostat)，以CO<sub>2</sub>排出速率(CER)为控制量的CER-恒定器(CER-stat) 以及以氧为不变量的溶氧恒定器 (Do<sub>2</sub>-stat) 和摄氧恒定器 (OUR-stat)。图4-21为一CER-stat的结构示意图。

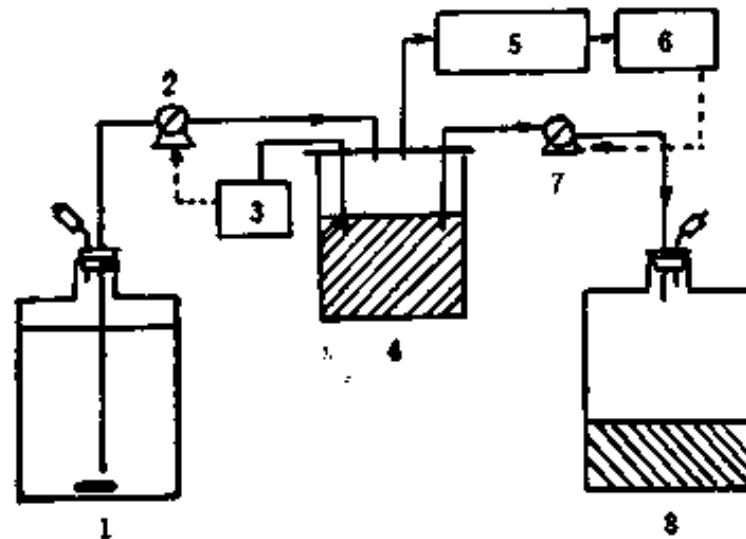


图 4-21 CER-恒定器结构示意图

1—培养基贮藏罐 2—泵 3—水平控制仪 4—发酵罐 5—流量计 6—计数器  
7—泵 8—发酵液收集容器

#### 〔实验4-11〕小型连续发酵实验

##### (一) 实验材料

酿酒酵母培养液，麦芽汁4L，简单连续发酵装置 (如图4-22)，容积为2L的三角瓶。

##### (二) 操作步骤

1. 将制备好的1L麦芽汁倒入2000ml的三角瓶中，用棉塞固定玻璃管，玻璃管上端接内径3mm、外径5mm的橡皮管，用弹簧夹住，然后经69.65 kPa压力灭菌20min。

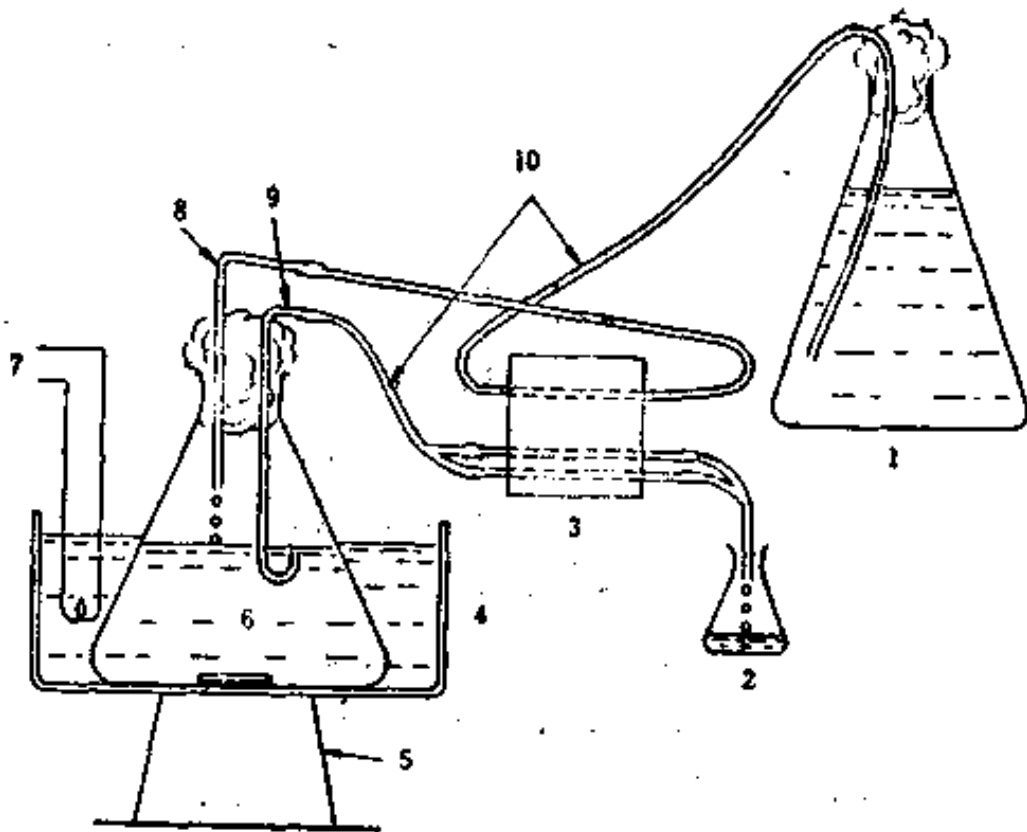


图 4-22 简单连续发酵装置

1—培养基贮槽 2—流出液接受器 3—蠕动泵 4—恒温水浴 5—磁力搅拌器  
6—培养槽中搅拌转子 7—温度调节器 8—培养基加入管 9—培养液流出管 10—输送管

2. 将灭菌后凉至 $30^{\circ}\text{C}$ 的三角瓶安装于恒温水浴锅中培养。
3. 将酿酒酵母培养液以1:10接入三角瓶中，先进行搅拌间歇培养。若有无菌通气导管，也可通气搅拌培养。
4. 将补料用的培养基3L装在3L的三角瓶中，将送料的橡皮管的一端插入，用棉塞固定。另一端用油纸包好，在 $68.65\text{kPa}$ 压力下灭菌20min。
5. 定时测定间歇培养的菌液浓度，以求出增殖速度。
6. 取下输液用的橡皮管，剥去油纸，接到蠕动泵进液口，将培养器的输液橡皮管接到蠕动泵出液口。
7. 根据增殖速度，以较小稀释率开始流加培养基，此时稀释率必须小于此增殖率。
8. 计算出流出液中的细胞产率。

### (三) 微生物细胞的同步培养

微生物细胞的同步培养是利用诱导或选择等方法，使一微生物群体的每个细胞的生长周期完全同步，即在同一时间内分裂的方法。诱导法有营养诱导法，此法是微生物细胞在生长一段时间

后，使其营养不足而造成生长终点或使生长终止；然后小量接入新鲜富营养培养基中，一般将处于对数生长后期的细胞重新悬浮于新鲜的培养基中，可造成1~2次细胞周期的同步生长。诱导法尚有抑制诱导法、温度变化诱导法、生长因子补加诱导法等。选择法则是利用非同步细胞处于不同生长周期时细胞大小及密度有差异进行选择。选择的主要方法有过滤和离心法，此法不常用。

#### (实验4-12) 酿酒酵母的同步培养

##### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母。
2. 培养基  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.0g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.5g, 酵母粉 5.0g, 水1000ml, pH 5.5.
3. 200g/L葡萄糖溶液。
4. 1L实验室发酵罐, 50ml三角烧瓶。
5. 摇床。

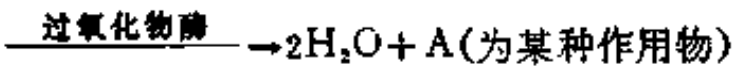
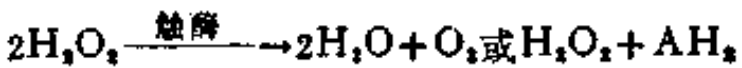
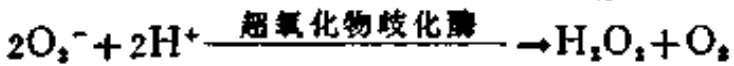
##### (二) 实验步骤

1. 将10ml基础培养基分装入50ml三角烧瓶内，接入酿酒酵母，补加200g/L葡萄糖溶液0.1ml。
2. 置摇床振荡培养8h。
3. 将基础培养基加入发酵罐内，强烈通风。
4. 取20ml上述培养物接入发酵罐内。
5. 调节温度为24℃。
6. 以递增流加葡萄糖液量流加葡萄糖液（葡萄糖液递增量控制可根据实验确定），一般经10h左右的培养可得到同步细胞。

##### (四) 厌氧培养

厌氧培养在发酵工业研究上是很重要的，发酵工业中的制酒等混合发酵过程有大量厌氧微生物的有益作用，特别是对己酸菌、丁酸菌、甲烷菌等的研究。厌氧微生物细胞具有脱氢酶系，但缺乏细胞色素及缺乏超氧化物转化酶、触酶和过氧化物酶。在氧化还原过程中，氧化还原电势(Eh)高的物质可以氧化Eh低的物质，而Eh低的物质不能氧化Eh高的物质。在有氧环境中，培养基中的营养物质转化为氧化型，Eh升高，细菌必须具有Eh很高的酶如细胞

色素氧化酶，才能氧化培养基中的物质，以获得能量。厌氧菌缺乏这一类Eh较高的酶，所以能量供应不足，不能生长。同样，细菌在有氧环境中进行代谢时，常产生超氧离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)与过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，有强烈的杀菌作用。需氧菌有超氧化物歧化酶能将超氧离子转化为过氧化氢；又有触酶(即过氧化氢酶)和过氧化物酶，能迅速分解所生成的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，从而消除其损害作用。



厌氧菌不含这些酶类，不能破坏超氧离子和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，易被杀伤，故在有氧时不能生长。

因此，在培养厌氧菌时，须消除环境的氧气并降低培养基的

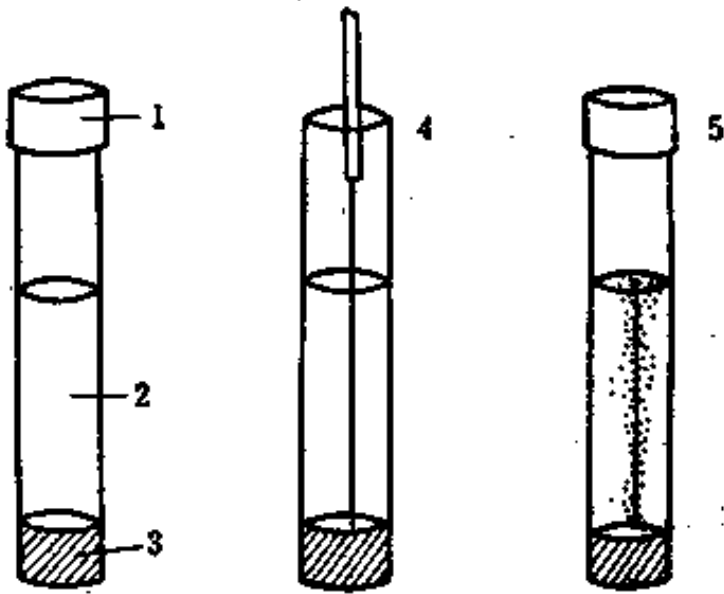


图 4-23 深层穿刺分离培养厌氧微生物

1-接种量 2-营养琼脂 3-无菌橡皮塞 4-穿刺至底部 5-培养后长的菌落

Eh。消除氧气的方法有物理、化学和生物方法。在培养基中添加还原物质可有效地降低培养基的Eh。

厌氧培养法有多种，下面介绍数种常用的方法。

(1) 深层穿刺分离培养(图4-23)：用一根18~20mm直径的



玻璃管，截成180~200mm长，洗净烘干。一头塞入橡皮塞，加入 $\frac{2}{3}$ 管长的营养琼脂，塞上胶塞或塑料帽，灭菌，凉至凝固。穿刺接菌种或待分离物。培养后可见到生长的厌氧微生物菌落。此时拔出橡皮塞，用无菌刀切割，分离再培养。此法对于一般厌氧微生物适用。

(2) 深层穿刺与化学吸氧相结合(图4-24A)：深层穿刺后，

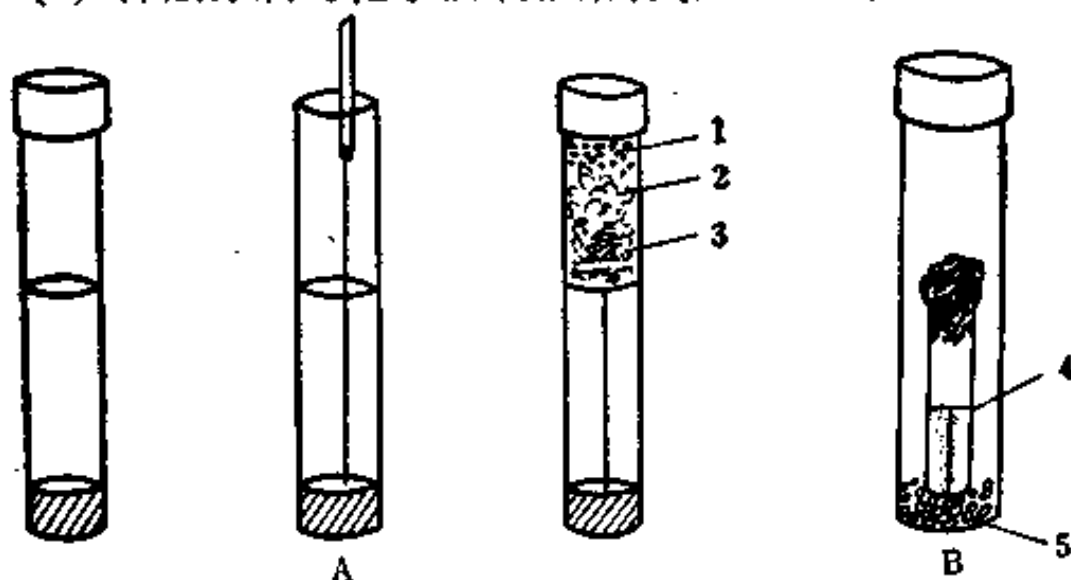


图 4-24 化学吸氧法分离培养厌氧微生物

1—焦性没食子酸和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ， 2—脱脂棉 3—非脱脂棉 4—穿刺培养厌氧菌小试管 5—焦性没食子酸和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$

在培养基上部加一层非脱脂棉，再加一层脱脂棉，上面加入焦性没食子酸和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 粉末的混合物，用胶塞或塑料帽盖紧。焦性没食子酸和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 在有湿气(即水分)存在的条件下缓慢作用吸氧和放出 $\text{CO}_2$ ，造成厌氧状态，强化了厌氧条件。

(3) 夹套试管法(图4-24B)：将大试管(20×180mm)灭好菌，底下放一点脱脂棉，在上面加入按1:1混和的焦性没食子酸和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 粉末2~3g。将一已穿刺培养的小试管松动棉塞或开口，以无菌手续放入，并即用胶塞或塑料帽盖紧。

(4) 液体培养基法：液体培养基法主要是在培养基中加入一定的还原物质并隔绝空气。常见的有庖肉培养基法、硫乙醇酸钠法、牛心脑浸液培养基法等。

① 庖肉培养法：将庖肉培养基在水溶液中煮沸10min，速冷后立即接入厌氧菌，于培养基上加入融蜡，37℃培养。

② 硫乙醇酸钠法：在肉汤培养基中加入0.1%硫乙醇酸钠，1%葡萄糖，0.05~0.1%琼脂，加热溶解，调pH7.6。按1:1000加入0.2%次甲基蓝水溶液，摇匀，10ml分装试管，高压蒸汽灭菌。接种后封口于37℃培养。本法中如备用的培养基上层的绿色扩展至培养基的1/5时，使用前须隔水煮至绿色消失，速冷后再使用。

#### (5) 厌氧罐培养法：

① 碱性焦性没食子酸法：按每1000ml容量的厌氧罐在37℃24h内全部吸收氧气需用焦性没食子酸10g和10%NaOH溶液100ml的比例，计算出所需焦性没食子酸和10%NaOH溶液量。将已接种好的平皿或试管装入罐内，向装入大试管或烧杯内的氢氧化钠溶液中加入焦性没食子酸，立即放入罐内，封罐，置孵箱中培养。本试验中可用50%过饱和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 代替10%NaOH溶液。因焦性没食子酸与NaOH起反应，在吸收氧的同时也吸收掉 $\text{CO}_2$ ，不利于部分厌氧菌的生长。而焦性没食子酸与 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 反应可释放出 $\text{CO}_2$ 并吸收环境中的氧。

② 抽气换气法：美蓝指示剂的配制方法：a. 6%葡萄糖水溶液6ml；b. 6ml 10mol/L氢氧化钠溶液加蒸馏水至1000ml；c. 0.5%美蓝水溶液3ml加蒸馏水至1000ml；等量a、b、c溶液混合呈蓝色的美蓝溶液，分装中号试管(10×1000)，每管1~2ml。使用前煮沸还原成无色。将已接种厌氧菌的平板试管等置于带有活塞的密封罐内。罐内同时放有冷触媒钯10~20粒及已煮沸去氧的美蓝指示剂1管。用真空泵通过活塞抽去罐内空气充以 $\text{N}_2$ ，反复2次，再灌入80% $\text{N}_2$ 、10% $\text{CO}_2$ 和10% $\text{H}_2$ 的混合气体。置密封罐于37℃培养24~48h，观察厌氧菌生长情况。

③ GasPak 罐或气袋法：此法特点是培养容器可以是GasPak工程塑料罐或塑料袋。其内放小包，内装有氢气和 $\text{CO}_2$ 的发生源。氢气发生源常用硼氢化物， $\text{CO}_2$ 发生源则常用碳酸钠或碳酸氢钠。当水一加入，氢气就释放，在一催化剂(常用钯粒)的催化下与容器中的氧气起作用而形成无氧状态。 $\text{CO}_2$ 也定量产生，使专性厌氧

微生物能满足生长条件。此时罐内的指示系统——次甲基蓝将会成无色，以此了解罐内的无氧程度。

④ 生物吸氧法：将接种有厌氧菌的培养基和接种有大肠杆菌、沙雷氏菌等需氧菌的培养基置同一密闭罐内培养或在同一平板上，一半接种厌氧菌，一半接种需氧菌，再以石蜡密封。37℃培养24~48h后，观察厌氧菌生长情况。也有将提纯的大肠杆菌细胞膜添加入溶液培养基中，通过细胞膜中含有的大量氧化酶使培养基中的Eh降低。

⑤ 厌氧箱培养法：厌氧培养箱由厌氧环境操作箱、恒温培养箱、高度真空传递箱、气路控制系统、箱架、瓶架等部分组成。培养箱的温度能自行调节控制，气路安排合理，能任意输入所需气体和准确调节流量。箱内备有紫外灯，可消毒操作室内空气。使用厌氧培养箱进行厌氧微生物分离培养时，整个操作过程可在正压CO<sub>2</sub>或氮气下进行，使整个接种过程在无氧状态。因此，厌氧培养箱在分离、研究极端专性厌氧菌时更有其优势。现以美国Forma公司生产的厌氧培养系统为例介绍如下基本操作过程。a. 关闭内门后开启外侧门，将培养基及标本等物品放入传递箱内，随即关上外门。b. 按下循环起始钮，真空泵即开始自动排气减压充入N<sub>2</sub>，重复2次。c. 通过手套箱打开内门，混合气体即流入传递箱，直至箱内压力和大气压相等。d. 当厌氧状态指示灯亮时，将培养物移入操作箱内，关闭内门。e. 在厌氧环境操作箱内，将标本接种于培养基上，送入恒温箱中培养。手套箱中的混合气体是由气瓶直接供给，通过该箱中的钯催化剂可以除去剩余的氧，以达到高度的厌氧状态。

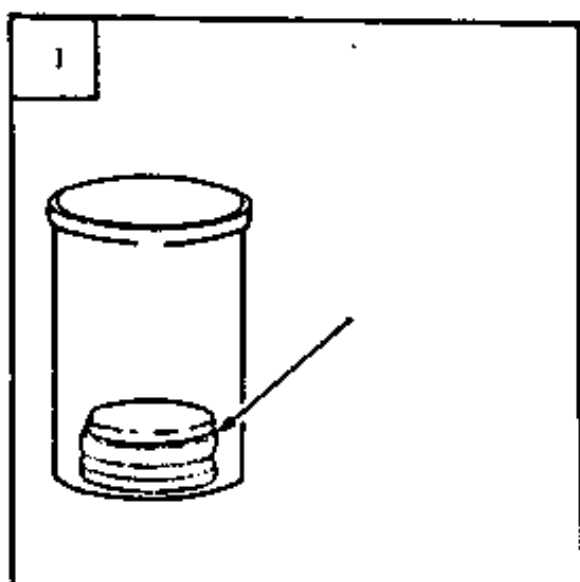
在厌氧培养时，使用的钯催化剂经160℃干烤2h后，又可恢复其活力，但不宜重复复苏。

#### 〔实验4-13〕厌氧罐分离培养厌氧微生物

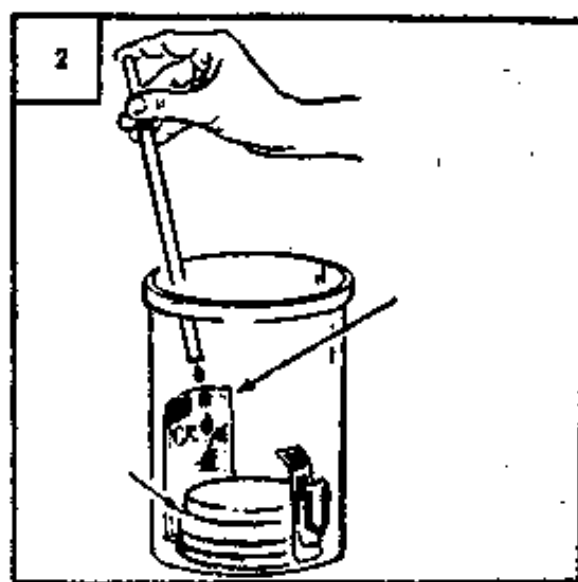
##### (一) 实验材料

1. 划线或稀释分离用的丁酸菌的培素基若干。
2. 厌氧罐系统、吸管、水。

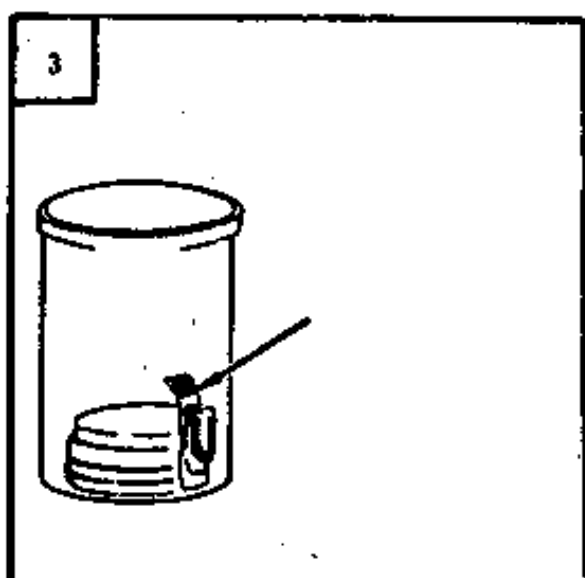
##### (二) 操作步骤



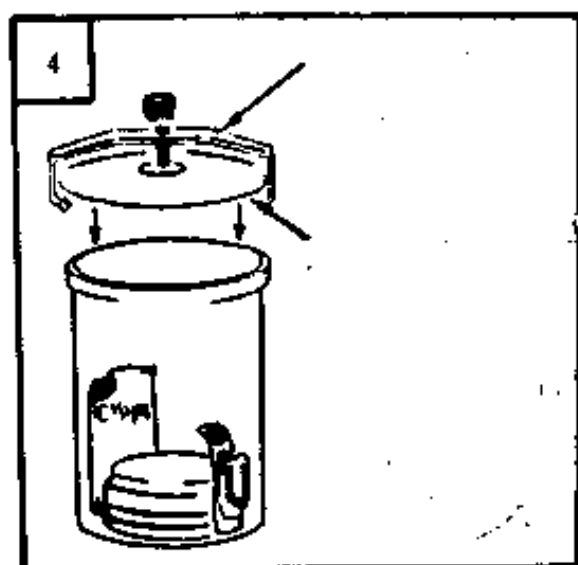
1. 将已划线或稀释分离的平皿倒置入罐内。



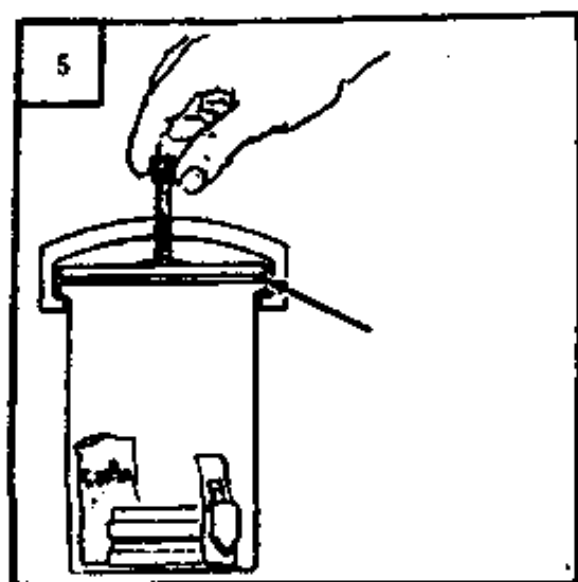
2. 把 $H_2-CO_2$ 发生源的封口打开, 加入10ml无菌蒸馏水, 加入指示纸。



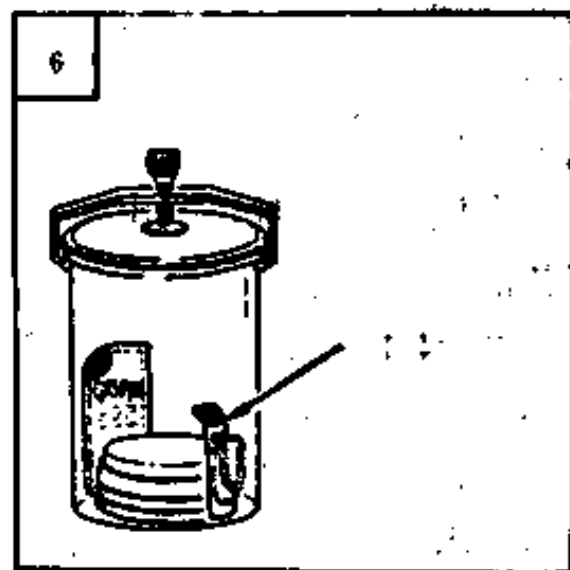
3. 打开指示纸条, 指示面对外。



4. 将罐盖压上。



5. 拧紧螺旋压紧。  
7. 置恒温箱中培养3~7天。



6. 1~2h内指示纸由蓝变红, 否则要调换产气源。

## 第五章 培养条件对工业微生物 生长与发酵的影响

这一章的一些实验项目实际上是大型生产工艺条件试验的缩影，所以有关这方面的小型试验必将对生产具有参考价值。有的试验对一些新菌株是应该做的，是这些菌种的特性档案，是制工艺条件的依据。

环境因素在生产上最常遇到的是温度、水分、氧气、pH、某些重金属离子等。

### 第一节 温 度

温度是影响微生物生长和存活的主要环境因素之一，对发酵效果影响也颇大。温度能从有利和有害两方面产生影响。例如温度升高，细胞内的化学和酶反应也加快，生长也较迅速。另一方面蛋白质、核酸和其他细胞成分对高温都是敏感的，并且有可能产生可逆的失活，因此，通常是当温度在一定范围之内增加时，生长和代谢功能也随之增加，直至失活反应未到之前的最高温度。超过这一最高温度，细胞功能很快就下降至零。每种微生物都有一个最低温度，低于此温度，微生物长期不能生长。温度对嗜冷、嗜温、嗜热微生物生长速率的关系有一个迅速生长的最适温度，以及高于此温度而不能生长的最高温度，图 5-1 是对温度有不同嗜好的3种微生物的生长率曲线。

同一温度对微生物生长和发酵的影响不同（表5-1），有的微生物是一致的，有的微生物不一致，而且同一微生物的最适生长

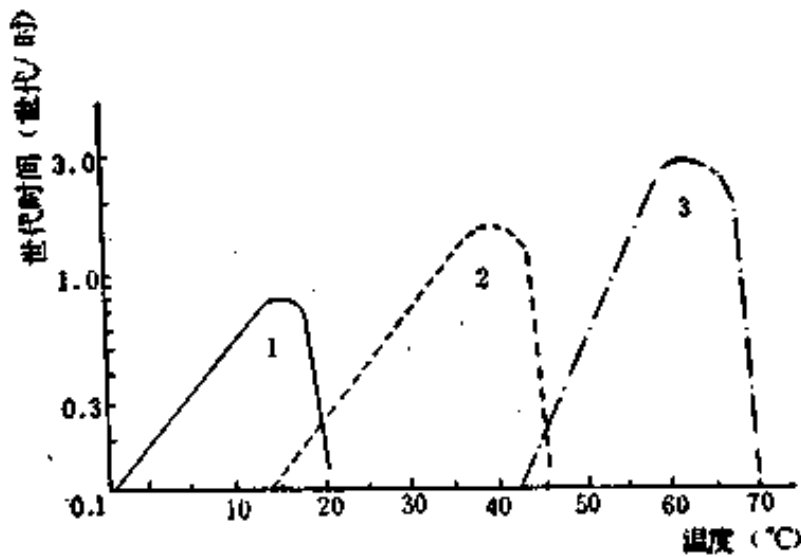


图 5-1 微生物在不同温度下的生长率曲线

1—嗜冷菌 2—嗜温菌 3—嗜热菌

温度与不同产物的最适温度都会不同。

表 5-1 某些微生物的最适生长温度和最适发酵温度

菌 种	最适生长温度(°C)	最适发酵温度(°C)	产 物
德氏乳酸杆菌	45	50	乳酸
乳酸链球菌	34	42	乳酸
灰色链霉菌	37	28	链霉素
底面啤酒酵母	25	4~7	啤酒
酒精酵母	28	32~33	酒精
面包酵母	26~33	30	酵母
枯草杆菌 (Bf7658)	37	37~38	$\alpha$ -淀粉酶
枯草杆菌 (As1.398)	37	30~30	中性蛋白酶
丙酮丁醇梭状芽孢杆菌	37	30~30	丙酮丁醇
曲霉 As3.4309	30	32	糖化酶

值得指出的是所谓最适发酵温度，有的与代谢活性有关，有的还与工艺控制、食品风味有关，所以上述数据仅作参考。但表中的两种最适温度显然是有差异的可能，虽然也有一致的。因此工艺条件中温度的试验是大有研究余地的。以高温刺激分生孢子发芽，然后降温，使之在正常情况下生长，这用在固体曲生产中。

温度对代谢产物的实验是较易做的，这里进行一个微生物对

热抗性的实验。因为高温较之低温对微生物的致死作用强烈得多。有时需测定微生物的致死温度，即某一微生物在一定时间内（通常10min），杀死细胞所需最低温度。致死时间指在一定温度下杀死某种微生物所需的最短时间。它们的测定对发酵食品的灭菌保存有参考价值。表5-2至表5-4分别列举了一些细菌及酵母的致死时间和温度处理的活化作用。

表 5-2 细菌芽孢的致死时间

菌 种	100℃时的致死时间 (min)	120℃时的致死时间 (min)
枯草芽孢杆菌	15~20	—
肉毒杆菌	360	5
凝结芽孢杆菌	1140	17

表 5-3 酵母的细胞和子囊孢子的致死时间

菌 种	悬浮介质	致死温度 (℃)	致死时间(min)	
			细 胞	孢 子
球形德巴利酵母	葡萄糖肉汤	55	25	
		60	5	
白色丛孢酵母	葡萄糖肉汤	55	25	
		60	5	
康酒酵母	水	54	5	5
		60		
鞘菌酵母	啤 酒	54	20	15
		56		
椭圆酵母	葡萄汁	54	120	
		57.5	10	
椭圆酵母	葡萄糖肉汤	60	15	
得萨酵母	啤 酒	62~64	20	15
牛油酵母	啤 酒	52	20	
		58		20
圆拟酵母的一种	葡萄糖肉汤	50	35	
		60	20	
异常威尔酵母	葡萄糖肉汤	55	10	
		60	5	

表 5-4 活化各种微生物休眠孢子的温度处理

菌种	休眠体种类	处理温度(°C)	处理时间(min)
一般芽孢杆菌	芽孢	60~70	数分至数10分钟
丙酮丁醇芽孢杆菌	芽孢	90~100	1~2
粗糙链胞菌	子囊孢子	50~60	20
布拉克须霉	孢子囊孢子	50	4
辐毛鬼伞菌	担孢子	44~46	4h
好食脉胞菌	分生孢子	35	1~3h
短光多胞饼菌	复孢子	27	8h
蜡鳞蘑菇	担孢子	-7	40~140 d
麦角菌	菌核	0~3	数月
利特拿透酵母	子囊孢子	0~5	—
葱霜菌	卵孢子	1~3	1月

〔实验5-1〕酵母营养细胞致死时间的测定

(一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母麦芽汁摇瓶菌液, 细胞数约 $10^8$ 个/ml。
2. 培养基 麦芽汁固体培养基, 无菌生理盐水。
3. 器具 无菌培养皿, 无菌吸管, 水浴锅。

(二) 操作步骤

1. 应用逐步稀释法测定培养菌液的活细胞数。
2. 与此同时, 取5ml上述菌液于无菌试管中, 置已恒温至60°C的水浴锅中, 保温(事先应做一置入多少分钟后菌液温度可达到60°C的预备试验)。以菌液达到60°C的时间为起点。
3. 取处理2, 4, 8, 10, 12min的菌液各0.5ml进行稀释, 平板分离, 稀释度可逐次减少, 直至处理菌液直接分离。
4. 以分离活菌数为0的时间作为60°C的热死时间。  
热死温度也可用类似方法测定。

## 第二节 水活度与渗透压

一切微生物生活都需要水。不同的环境中水的含量是有变化



的，然而水的可利用性不单纯决定于水的含量。吸附于表面的水是否可以利用，取决于它被吸附的紧密程度和微生物把它移入体内的效力大小。同时溶质溶于水中时，它们或多或少地变成了水合物，溶解变成水合物程度也影响水对微生物的可利用性。这种吸附和溶液因子对水的利用性的影响，称之为水的活度，以 $a_w$ 表示。 $a_w$ 与溶液或物质上面空气中的蒸汽压有关，可以用测量蒸汽中相对湿度的方法估计。例如 $a_w$ 为0.75，就等于75%相对湿度。

我们常用的盐、糖、甘油溶液的 $a_w$ 度见表5-5。

表 5-5 糖、盐、甘油溶液的水活度(25℃)

水的活度	NaClg/100ml水	蔗糖g/100ml水	甘油g/100ml水
1.000	0	0	0
0.995	0.87	0.92	0.28
0.980	3.5(海水)	3.42	1.10
0.960	7	6.5(枫树汁)	2.10
0.900	16.5	14	5.1
0.850	23(大盐湖)	20.5(饱和)	7.8
0.800	30(饱和)	—	10.5
0.700	—	—	16.8
0.650	—	—	20

从表5-5可以看出，不同溶质不同程度地影响水的活度，影响的大小取决于溶质溶解时离解和水合程度。

水活度与微生物的生长关系极大。微生物生长于因添加溶质使水活度变低的培养基中时，它必须作更多功从溶液中抽取水，这样就导致生长量减低或降低生长速度。有时有的溶质对细胞有一种特殊毒害作用，这样即使两种水活度相同的培养基也可以不同程度地影响生长。在培养微生物的过程中也可观察到，细胞质常比培养基中有较高的溶质浓度，使水流向细胞内。若胞外的溶质浓度高于胞内，水就将向外流。此时微生物细胞只有增加胞内溶质浓度才能获得水而生长，而微生物的种类不同，增加细胞内溶质浓度的能力也不同，这就使得不同类型微生物生长的 $a_w$ 不同。从

表5-6中可以看出某些酵母和霉菌是最能在低水活度中生长的。以前常把溶质浓度对生长的影响看作是对渗透压影响，但实质上是由于水活度影响。那些能够在溶质高的培养基中生长的微生物通常称为耐渗透压的微生物。水活度对各类微生物的生长影响见图5-2。

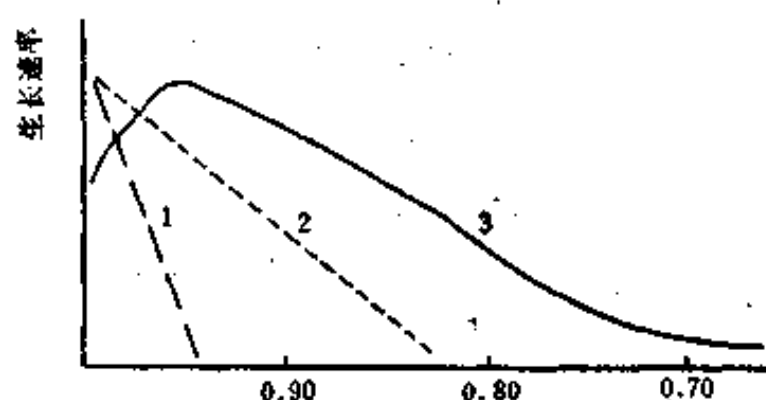


图 5-2 水活度对各类微生物生长的影响

- 1—正常微生物，水活度高生长良好，减低水活度，生长显著受到抑制。
- 2—耐渗透压微生物，水活度高，生长良好，但稍降低水的活度，微生物仍可适当生长。
- 3—嗜渗透压的微生物，在一定范围内水活度降低有利于生长，但继续降低则生长也会受抑制。

表 5-6 不同微生物生长的最低 $a_w$ 。

微生物群类	最低 $a_w$	微生物类群	最低 $a_w$
细菌：大肠杆菌	0.935~0.960	霉菌：刺状毛霉	0.93
沙门氏菌	0.945	黄曲霉	0.90
枯草杆菌	0.950	黑曲霉	0.90
粘质赛氏杆菌	0.940	青霉	0.8~0.9
八叠球菌	0.915~0.930	灰绿曲霉	0.78
玫瑰色微球菌	0.905	耐旱真菌	0.60
金黄色葡萄球菌	0.900	酵母：产灰假丝酵母	0.94
嗜盐杆菌	0.750	酿酒酵母	0.94
		裂殖酵母	0.93
		某些酵母群	0.85
		鲁氏酵母	0.65

在发酵工业上，工艺技术上发展的趋势之一是采用高浓度发酵，除了工艺操作上的合理外，选育耐高渗透压的菌种实为关键之一。

## 〔实验5-2〕培养基中糖和盐浓度对微生物生长的影响

### (一) 实验材料

1. 菌种 枯草杆菌、灰绿曲霉、大肠杆菌、接合酵母斜面。
2. 培养基 含有12.5%的豆芽汁。黄豆芽125g加水1L,煮沸0.5h,过滤,将滤液恢复至1L。以豆芽汁为基础,分别加入0.5%、15%、30%、60%的葡萄糖制成琼脂斜面;又分别加入0.5%、5%、15%、20%的食盐制成豆芽汁食盐琼脂斜面各4管。
3. 器具 接种环、酒精灯、培养箱。

### (二) 操作步骤

1. 分别将各菌划线于各培养基斜面上,计每菌8支斜面。
2. 将各菌置于27℃培养箱中培养,于1天、3天及7天时分别检查各菌生长情况,以“+”表示菌体生长量记录于下格式的表中。

菌名	培养时间(天)	葡萄糖含量(%)				NaCl含量(%)			
		0.5	15	30	60	0.5	5	15	20
枯草杆菌	1								
	3								
	7								
大肠杆菌	1								
	3								
	7								
灰绿杆菌	1								
	3								
	7								
接合酵母	1								
	3								
	7								

## 第三节 氧气和氧化还原电位

根据微生物生长对氧的要求,微生物可分为四类:需氧、微需氧、兼性厌氧与厌氧。将这些微生物分别培养在含0.7%琼脂

的试管中，就会出现像图5-3的生长情况。

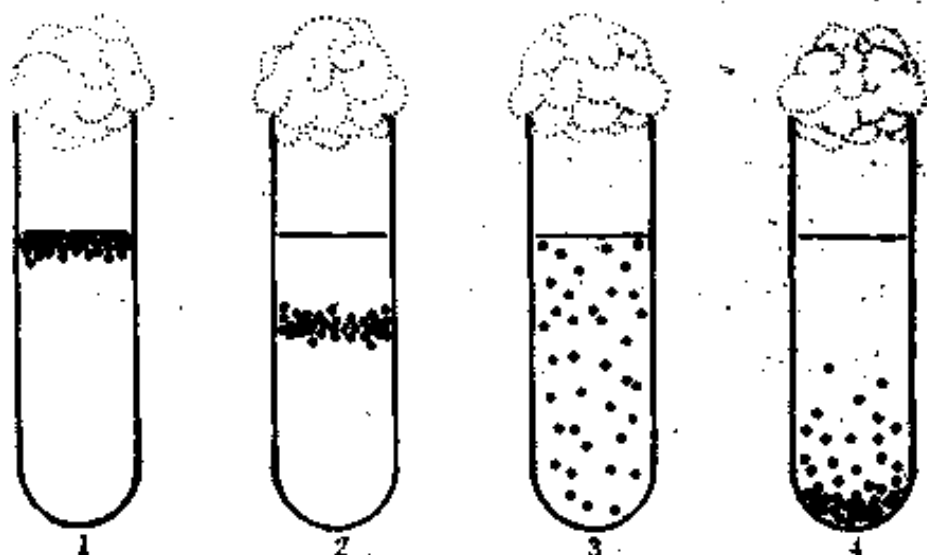


图 5-3 微生物生长对氧的要求

1—需氧的 2—微需氧的 3—兼性厌氧的 4—厌氧的

专性需氧的，通常是因为它们不能通过发酵作用产生能量，它们进行甾醇类和不饱和脂肪酸类合成也需要氧。兼性厌氧微生物能够通过氧化磷酸化作用或通过发酵获得能量，并且不需要氧来进行生物合成。厌氧微生物是一些在产生能量方面不能利用氧作为最终电子受体，因它通常缺乏把电子传送给氧的终端细胞色素。其中专性厌氧的微生物不但不会利用氧，而且氧对它也有害。微需氧微生物是需要氧，但氧压要低于20.27kPa，这很可能是由于氧的毒性关系。

实际上描述微生物对氧的关系还应与培养环境中氧化还原电位（rH）联系起来。因为有些微生物有氧存在时不能生长，但若在培养基中加入一些还原剂如抗坏血酸、 $H_2S$ 或含-SH的有机化合物（如半胱氨酸、二硫乙醇钠、二硫苏糖醇和谷胱甘肽等）来减低氧化还原电位，微生物仍能生长。所以微生物有需氧与厌氧之分，这不仅仅是分子氧存在与否。需要强调的是培养液中rH值还影响微生物的代谢途径。

微生物通过其代谢过程常使环境的氧化还原电位降低，其原因主要是由于氧化消耗，其次是一些代谢产物的产生，pH的变化等。改变多少，因菌种不同，菌龄不同、培养基成分不同及培养

方法不同而异。固定某些因素可根据 rH 值观察到菌龄的大小、代谢的强弱。在代谢过程中, rH 值的变化是明显的。例如: 丙酮丁醇梭状芽孢杆菌培养液的变化是 20→0, 德氏杆菌是 28→7, 根霉的乳酸发酵是 28→5, 酵母的酒精发酵是 25→10, 枯草杆菌的培养是 25→10, 膜醋酸菌是 27→6, 黑曲霉的柠檬酸发酵是 25→12 等。若发酵培养基中加入一种类似 pH 的缓冲剂, 使发酵液的 rH 固定, 则原代谢情况会改变。例如丙酮酸丁醇发酵液中加入多量的中性红, 使发酵液 rH 稳定于 3, 则发酵产物中丁醇量增加, 其他二物减少 (丙酮: 丁醇: 乙醇 = 11: 48: 4), 若用苯蕃红或 Janus 绿使发酵液稳定于 pH 6 上下, 则 3 种产物的比例正常 (30: 60: 10)。

测定 rH 的方法可用电位差计或用 rH 指示剂, 前者测出是电位差, 以伏特 (V) 或毫伏特 (mV) 表示 (Eh), 它与 rH 的关系,

$$\text{在 } 30^{\circ}\text{C} \text{ 时为: } rH = \frac{Eh(mV)}{30} + 2pH。$$

在微生物学内常用的方法是把指示剂加到培养基中, 接入微

表 5-7 用于测定 rH 值的指示剂

指示剂	rH	氧化型颜色
中性红	2~4.5	红
碱性蕃红	4~7.5	红
苯蕃红	6	红
Janus 绿	6	绿
靛双磺酸盐	8.5~10.5	蓝
Nile 蓝	9~11	蓝
靛三磺酸盐	9.5~12	蓝
靛四磺酸盐	11.5~13.5	蓝
英蓝 (亚甲基蓝)	13.5~15.5	蓝
硫蓝 (phionine)	15~17	紫
甲苯蓝	16~18	蓝紫
百里香吡酚	17.5~20	pH 9 以下浅红, 以上蓝
M-甲酚吡酚	19~21.5	pH 8.5 以下红, 以上蓝
2,6-双氯酚吡酚	20~22.5	pH 6.0 以下浅红, 以上蓝

生物加以培养,以指示剂的变化判定培养液中的rH。常用于测定rH值的指示剂见表5-7。

图5-4是微生物在生长过程中,培养基中氧化还原电位的变化,一般讲,专性厌氧菌开始生长的电位约 $-0.1V$  (pH7.0),需氧菌开始良好生长的电位为 $+0.3V$  (pH7.0)。一些厌氧性芽孢发芽的培养基电位不能高于 $-0.06V$ (pH7.0),否则就不能发芽。

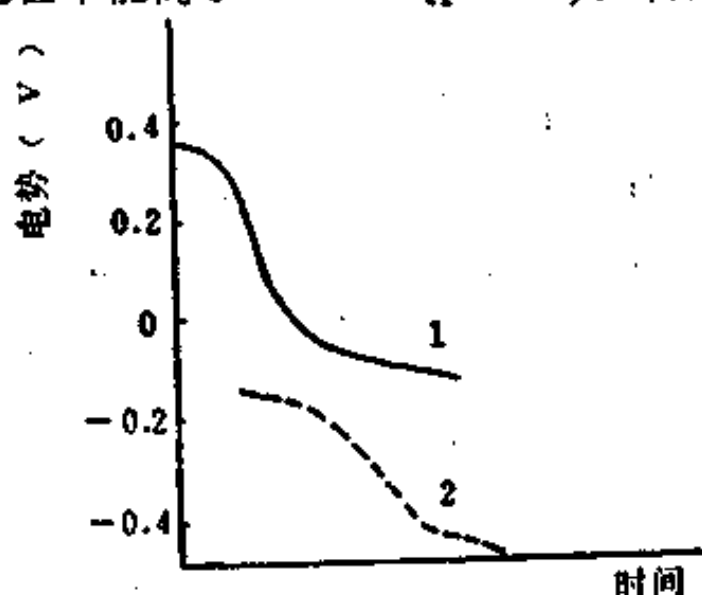


图 5-4 微生物在生长过程中培养基中氧化还原电位的变化  
1—好氧微生物 2—厌氧微生物

为此描述微生物对氧的要求还应与环境的氧化还原电位结合起来(表5-8)。

表 5-8 微生物生长对 $O_2$ 和环境氧化还原电位要求

微生物类型	环境氧化还原电位		$O_2$
	氧化态	还原态	
需氧微生物			
专性	生长	不生长	需氧
兼性	生长	生长	不需要,但有氧长得好些
厌氧微生物			
耐氧的	生长	生长	不要,有氧存在时生长较差
忌氧的	死亡	生长	有损害
微需氧的	氧水平不高时生长	氧水平不高时生长	需要,但氧水平在20kPa以下

### 〔实验5-3〕微生物生长对氧的要求

#### (一) 材料

1. 菌种 酵母菌、己酸菌的培养液，黑曲霉的孢子液。
2. 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基和麦芽汁培养基，各加0.7%琼脂，pH调到7.0，68.6kPa灭菌20min(装在18×180试管中，2/3高度)。
3. 器具 水浴锅、1ml无菌吸管、培养箱。

#### (二) 操作步骤

1. 将2管麦芽汁软琼脂和1管牛肉汁蛋白胨软琼脂在水浴锅中融化。
2. 待凉至50℃，各吸酵母液、黑曲孢子液和乙酸菌液1ml，手搓，搅匀，凝固。
3. 在30℃下培养24~48h，观察生长情况。

### 〔实验5-4〕培养液氧化还原值(rH)的测定

#### (一) 材料

1. 菌种 米根霉、黄曲霉、酿酒酵母、白地霉、枯草杆菌、大肠杆菌、乳链球菌、产气杆菌。
2. 培养基 普氏液、豆芽汁葡萄糖、豆芽汁。
3. 指示剂 中性红、碱性蕃红、亮茜草蓝、靛双磷酸盐、Nile蓝、靛三磷酸盐、靛四磷酸盐、美蓝、硫堇、甲苯蓝、百里香吲酚、M-甲酚吲酚、2,6-双氯酚吲酚、Janus 绿、苯蕃红等的0.5%溶液。

#### (二) 操作步骤

1. 各培养液加0.5%指示剂，到呈现明显的颜色。因指示剂不同，用量也异，大致是100ml的培养基内加指示剂0.5~5ml，分装各管，每管7~10ml的培养液(深层)，56kPa 15min杀菌。乘热摇动各管，使吸收氧气。将因杀菌变为无色还原型指示剂吸氧后，恢复为有色的氧化型。若仍有不上色的，可静置数天后用。
2. 将各菌接入各培养液中，在30℃下培养，每天轻轻地连管架取出，观察各培养液颜色的变化，每管培养液上下颜色的差异及与菌类生长的关系等。观察时，尽量不要摇动，以免空气进入培养液、菌膜下沉等。
3. 把结果列表，比较各菌间及各生长阶段的rH值之间的关系。

## 第四节 酸 碱 度

一个溶液的酸碱度用它的pH值来表示，pH代表氢离子浓度的负对数的倒数。纯水的氢离子浓度是 $10^{-7}$ mol，因此它的pH为7.0。pH值小于7.0呈酸性，大于7.0的呈碱性。自然界中一些物质的pH值见表5-9。

表 5-9

一些物质的pH等级

	氢离子浓度(g/L)	pH
	$10^{-9}$	0
	$10^{-1}$	1 - 胃液
	$10^{-2}$	2 - 柠檬汁 酸性矿水
↑	$10^{-3}$	3 - 酸、大黄、桃汁
酸度增加	$10^{-4}$	4 - 酸性土、番茄汁
	$10^{-5}$	5 - 干酪、甘蓝
	$10^{-6}$	6 - 豌豆、谷类、鲑、小虾
中性	$10^{-7}$	7 - 纯水
	$10^{-8}$	8 - 海水
碱度增加	$10^{-9}$	9 - 很碱的自然土、碱性湖水
	$10^{-10}$	10 - 肥皂水
	$10^{-11}$	11 - 粗氨水、混凝土
	$10^{-12}$	12 - 石灰(饱和液)
	$10^{-13}$	13
↓	$10^{-14}$	14

微生物生长的pH有一定范围，就整个微生物而言，生长的pH范围在pH2~9之间，小于2大于9能生长的微生物就很少了。表5-10是各种微生物生长的pH范围。最适生长和发酵pH见表5-11。



表 5-10

各种微生物生长的pH范围

微生物类别	最低值	最适值	最高值
细菌和放线菌	5.0	7.0~8.0	10.0
专性嗜酸菌	1.0	3.0~3.4	7.0
酵母	2.0	5.0~6.0	8.0
霉菌	1.5	5.0~6.0	10.0

表 5-11

一些微生物最适生长与最适发酵的pH

菌种	产物	最适生长pH	最适发酵pH
丙酮丁醇芽孢杆菌	丙酮丁醇	5.5~7.5	第一阶段较高第二阶段 4.3~4.5
灰色链霉菌	链霉素	7.0~8.0	7.0~8.0
黑曲霉	草酸	5.0~6.0	近中性
黑曲霉	柠檬酸	5.0~6.0	2~3
酵母菌	酒精	5.0~6.0	4~5
酵母菌	甘油(厌氧)	5.0~6.0	8.0
酵母菌	甘油(好氧)	5.0~6.0	3.4~4.5
北京棒杆菌	谷氨酸	7.8~8.0	6.8~7.2
北京棒杆菌	谷氨酰胺	7.0~8.0	小于 6.8

虽然在各种pH的环境中都可发现微生物,但它们细胞内的pH十分接近中性。在酸性环境里,微生物细胞可以通过阻止H<sup>+</sup>的进入,或者一旦当H<sup>+</sup>进入后立即进行排除,来保持pH值接近中性。因为细胞内有许多对酸和碱不稳定的成分,所以必须保持中性。pH除对细胞直接影响外,还由于培养基中有机化合物的离子化作用而对细胞有间接影响,因为多数非离子状态的化合物比起离子状态的化合物更易渗入细胞(图5-5)。碱性物质刚好与有机酸相反,在碱性pH值下它们不能离子化,于是较易进入细胞。

微生物自己的生命活动也会改变环境的pH值。如细菌发酵葡萄糖产生乳酸,常能降低环境pH两个单位。酵母菌通过活跃分泌的H<sup>+</sup>到培养基中,降低pH值。由于多数离子化了的发酵产物是酸

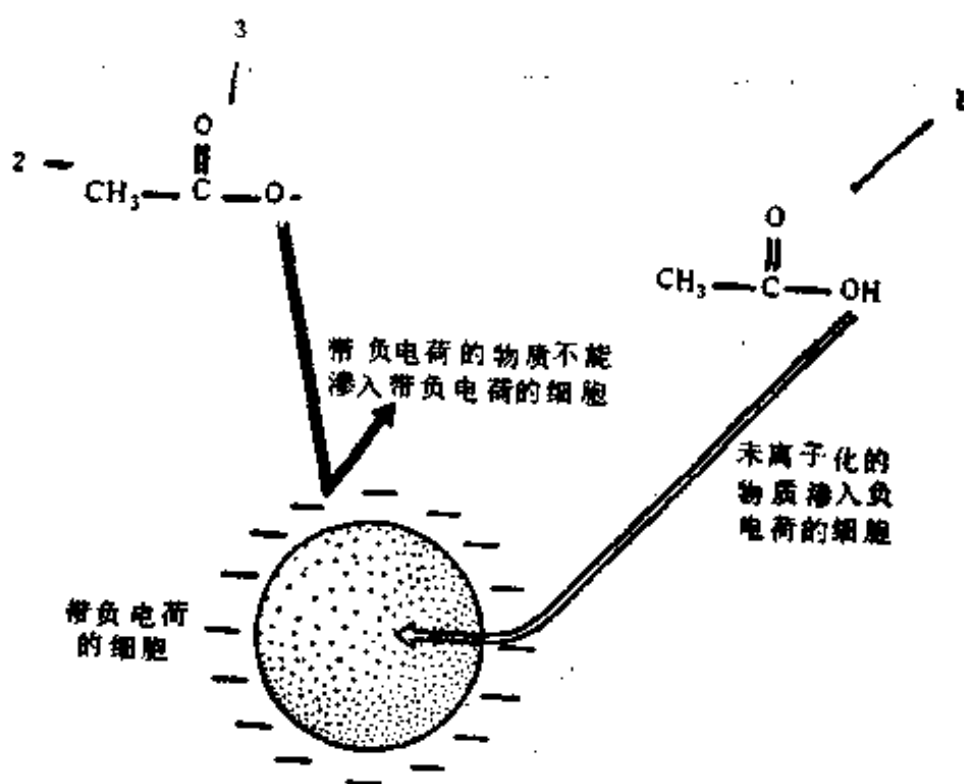


图 5-5 pH对有机酸渗入细胞的影响

1—在中性和碱性pH中未离子化的醋酸 2—醋酸 3—在中性和碱性pH中离子化的醋酸

性的,因此微生物常使它们环境的pH降低而不是升高。当经过微生物的活动,pH升高时,通常是由于氨基酸或其他的含氮有机物通过脱氨作用而释放出氨来。环境的pH也可以通过有选择地从环境中除去一些物质而改变。例如以 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 为氮源时,当除去 $\text{NH}_4^+$ 时就使培养基的pH降低了;以 $\text{NaNO}_3$ 为氮源时,可使pH升高。

为了避免环境pH的变化,不影响微生物的生长和发酵,可以采用缓冲液来配制培养基,也可流加酸、碱等营养物质来调节,也可添加像 $\text{CaCO}_3$ 这样的物质来中和酸类。

#### 〔实验5-5〕 pH对微生物的影响

##### (一) 材料

1. 菌株 48 h 培养的枯草杆菌、肉汤培养液、大肠杆菌、粘质赛氏杆菌、48 h 培养的酵母液,培养基为蔗糖肉汁。

2. 培养基 4套,每套为pH3、5、7、9的4支葡萄糖酚红肉汁,装5ml的试管,16只营养琼脂平皿。

3. 器具 4支无菌1ml吸管,接种环,酒精灯,培养箱。

## (二) 操作步骤

1. 注意葡萄糖酚红肉汁在不同pH的颜色：pH7.0为橙色；低于7.0为黄色；高于7.0为红色。并作记录。
2. 每套4支试管分别用吸管接入一种菌的培养液0.2ml，并作记录。
3. 37℃培养直至下次实验。
4. 检查每支试管的生长量，分别记录。用“0”表示不长，“+”表示稍浑浊；“++”比较浑浊；“3+”表示十分浑浊；“4+”表示最浑浊。还要注意培养基颜色的改变。
5. 将每个试管的培养物相应划线于一个培养皿，作记录。
6. 在37℃下培养至下次实验，检验结果，记录。

## 第五节 重金属和一些化合物对微生物的抑制作用

1893年就已经知道银在高度稀释时能杀死绿藻。其他的重金属，如铜和汞或它们的化合物都能对微生物有伤害作用。这种极少量金属具有对微生物的毒害能力称微动作用。

若放置一枚清洁的铜币或银币于一接种过的琼脂平皿表面，经培养，将会看到绕金币一圈圈清楚的微动作用圈，这主要是这些金属与微生物细胞内的含-SH基酶起作用，使酶失去活性，或与菌体酶相吸附发生变性的抑制作用。

重金属的微动作用可以用于控制微生物的活动，可以应用于包括一些酒精饮料，牛奶和水的处理，用来制备消毒剂等。

### 〔实验5-6〕滤纸片法测定重金属对微生物的影响

#### (一) 实验材料

1. 菌种 经48 h培养的营养肉汁培养物：枯草杆菌、大肠杆菌、藤黄微球菌、粘质赛氏杆菌。
2. 培养基 4支营养肉汁琼脂试管。
3. 化学试剂 70%酒精、10ml的1%浓度的下列药物：氯化汞、硝酸银、氯化亚锡。
4. 器具 镊子、滤纸片、水浴锅、无菌吸管、小尺。

#### (二) 操作步骤

1. 将琼脂试管水浴融化，凉至50~55℃。
2. 将4种培养液吸0.5ml加入上述培养基中，摇匀，倒入无菌平皿中和匀凝固。
3. 在培养皿底面划4个等分，分别标记。
4. 用70%酒精消毒镊子，夹一片滤纸片放到3种药物溶液中，让其吸饱，然后放入4个平皿的同一装置，作标记。如此每处3个位点皆有不同药物的滤纸片。另空一位点放空白滤纸片。
5. 在37℃下培养48h。
6. 观察抑菌圈，并用小尺量度。

上述纸片法可以用于多种试验，包括营养需求等。

### 〔实验5-7〕消毒剂杀菌力的测定

常用的化学消毒剂主要包括重金属、盐类及酚、醇、醛等有机化合物及碘和表面活性剂等。它们的杀（抑）菌作用主要是使菌体蛋白质变性，或者与酶的一SH基结合，使酶失活。不同的化学药剂、不同的浓度、不同的作用时间对杀菌力各不相同。同时，各种微生物抵抗消毒剂的能力，不仅仅属与属不同，而且种与种之间也不相同。因此应选定一种菌种和一种微生物作为比较标准。现今标准的菌种采用金黄色葡萄球菌为细菌的代表，而以甘兰黑斑交链孢霉作为霉菌的代表，在药剂方面通常以石炭酸作为杀灭细菌的代表，即将其他一种消毒剂作不同程度的稀释后，在一定的条件下，一定时间内杀死全部供试微生物的最高稀释浓度，与达到同样效果的石炭酸最高稀释浓度的比值，称作这种消毒剂对该微生物的石炭酸系数（酚系数）。石炭酸系数愈大，说明杀菌力愈强。

#### （一）实验材料

1. 菌种 营养肉汁琼脂培养18h的金黄色葡萄球菌，枯草杆菌。
2. 培养基 蛋白胨肉汁培养基60管，蛋白胨肉汁琼脂2管。
3. 化学药剂 2.5%碘酒、0.1%升汞（ $\text{HgCl}_2$ ）、5%石炭酸、75%酒精、1%来苏尔、1/500福尔马林、0.05%、0.005%龙胆紫。
4. 器具 无菌培养皿、滤纸片、无菌试管与吸管。

#### （二）操作步骤

##### 1. 抑菌圈法

（1）用无菌吸管各吸取培养18h的一种菌液0.2ml于两只直径12cm的无菌二重皿内，分别倒入已融化并冷至45℃左右的营养肉汁琼脂培养基，

摇匀待凝。

(2) 用蜡笔在二重皿底上均匀划成 8 等分。每份内标明一种药剂名称及浓度，然后将无菌镊子将同等大小的小滤纸片分别浸入各种药剂中，取出（取出时应在试管壁上除去多的药液），以无菌操作将纸片对号放在培养皿的小区中央。

(3) 置 37℃ 下培养 24 h 后，观察，比较抑菌圈的大小，抑菌圈大者表示杀菌力强。

## 2. 石炭酸系数测定。

(1) 将 5% (1:20) 的石炭酸液按下表配成不同浓度，每管 5 ml。

浓度	原液 (ml) 1:20	加水 (ml)	总量 (ml)	和匀后取出 (ml)	留下量 (ml)
1:50	2	3	5	0	5
1:60	2	4	6	1	5
1:70	2	5	7	2	5
1:80	2	6	8	3	5
1:90	2	7	9	4	5

(2) 将待试药物先配成 1:20 的原液后再按下表配成不同浓度，每管 5 ml。

浓度	原液 (1:20) (ml)	加水 (ml)	总量 (ml)	和匀后取出 (ml)	留下量 (ml)
1:150	1	6.5	7.5	2.5	5
1:200	0.5	4.5	5	0	5
1:250	0.5	5.725	6.225	1.225	5
1:300	0.5	7	7.5	2.5	5

(3) 取蛋白胨肉汁培养基 30 × 2 管 (2 套，每套一种菌种)，每管 1~15 管标明石炭酸的 5 种浓度，每种浓度 3 管，每管分 5、10、15 min 处理。16~30 管标明供试药物的 5 种浓度，同样每种 3 管，每 3 管分 5、10、15 min 处理。

(4) 在上述不同浓度的石炭酸和供试药物溶液中，各接 0.5 ml 供试菌种

菌液，摇匀以后，注意每管从接菌种时起，每5、10、15min用同一接种环(直径5mm)，从各管内取一环接入上述已标记的液体培养基试管中。

(6) 置37℃下培养48h，观察并记录好，生长者(浑浊)以“+”表示，不生长者(澄清)以“-”表示。

(6) 计算石炭酸系数：找出在处理5min生长、而10、15min均不生长的石炭酸与供试药剂的最大稀释度，计算两者的比值。

例如：石炭酸在10min内杀死金黄色葡萄球菌的最大稀释度是1:70，来苏尔液是1:250，则来苏尔的石炭酸系数是 $250/70=3.6$ 。

## 第六节 表面张力

液体表面的分子被它周围和下面的分子所吸引，因而具有使收缩到尽可能小的体积的倾向，这种力量叫做表面张力。表面张力的大小用N/m表示。每种液体都有其自己的表面张力，加入一物质可以增大或减少表面张力。许多有机酸、醇、肥皂、甘油、去污剂、蛋白质和多肽等都能降低溶液表面张力。一些无机盐则可增加溶液的表面张力，它们都称表面活性剂。表面张力与菌体的生长、繁殖、形态均有密切关系。

有一些微生物在培养液表面会形成一层皮膜，若皮膜沉下，可能再生成一层，但沉下的皮膜不再浮回液面，这是因为菌体被培养液湿润了，而浮于表面者未被湿润。已知湿润是表面张力的即函数。即液体表面张力大时，皮膜才能形成，若表面张力减小到不能支持皮膜时，就只能在液内生长。

有些人以为形成皮膜的微生物都是专性需氧菌，其实不然，若培养液表面张力小时，它们也能在液体内部繁殖，所以产皮膜的微生物可视为需氧菌或兼性厌氧菌。

### 〔实验5-8〕表面张力对微生物的影响

#### (一) 实验材料

1. 菌种 培养48h的枯草杆菌和膜醋酸性杆菌。
2. 培养液 葡萄糖豆芽汁6个试管，每管10ml。

3. 表面活性剂 1:100的蓖麻子酸钠或吐温-80的水溶液。

4. 无菌吸管(1ml), 接种针, 酒精灯。

(二) 操作步骤

1. 将葡萄糖豆芽汁分两组, 每组两管, 一组接入枯草杆菌, 另一组接入膜醯杆菌。

2. 每组再分1、2、3号。1号为空白管, 2号内加蓖麻子酸钠或吐温-80液0.5ml, 3号管内加1ml。

3. 和匀, 30℃下培养7天。按下表记录。

管 号	枯草杆菌	膜醯杆菌
1号管, 空白试管		
2号管, 0.5ml蓖麻子酸钠		
3号管, 1.0ml蓖麻子酸钠		

## 第七节 极端环境因素对微生物的影响

表 5-12 各种极端处理对微生物的影响和极端处理下引起的微生物抗性和对损伤的反应

处理方法	细胞损伤	抗性微生物	对极端条件的反应
热处理	酶变性	嗜热性微生物	合成更加热稳定蛋白质
冷处理	调节、破坏、降低细胞膜的通透性	嗜冷性微生物	合成较高比例的脂肪酸
低 $\alpha_w$	脱水和抑制酶活力	高渗性微生物, 嗜旱、嗜盐微生物	补偿溶质的积累或见有适应高离子强度的酶
低pH	蛋白质变性酶的抑制	嗜酸性微生物	核子活性排除表面附件适应
电离辐射	自由离子或者光量子诱导的DNA和蛋白质的破坏	抗电离辐射的微生物	DNA耐修复

各种极端处理对微生物的影响及极端处理下引起的微生物抗性和对损伤的反应如表5-12所示。除此之外, 少数微生物能够在极端化学环境中生长繁殖。

## 第六章 工业微生物的生理与发酵试验

要对微生物进行分类，并有效地利用它们为人类服务，对微生物的一些主要生理特征如营养利用及代谢产物等必须很好了解，并对其进行试验。

营养包括碳源、氮源和能源，从工业发酵的角度考虑，主要是试验多种糖类能否被利用作为碳源或能源。对于氮源则主要看其对蛋白质、蛋白胨、氨基酸、铵盐和硝酸盐的利用能力。由于不同的微生物，其生理特性不同而产生的代谢产物也不同。据此可用来鉴别菌种，例如能否形成有机酸、酒精、某些气体等。

### 第一节 微生物对碳源的利用

细菌和酵母对各种糖类、醇类、配糖体的作用，在分类上占重要地位。所谓糖类，包括很广，如组成复杂的纤维素、淀粉；三糖类的棉子糖；双糖类的麦芽糖、蜜二糖、蔗糖及乳糖；单糖类的葡萄糖、果糖、半乳糖、戊糖等。醇类如乙醇、甘油、甘露醇；糖苷如杨梅素等。在微生物鉴定上，生成物无需定量，只需定性。测定这些物质是否被利用，只看以这些物质为碳源的培养基中培养是否产气或生酸；凡产气或生酸，即说明基质已被利用。但作为发酵产物就要进行定量。

测试糖类是否发酵可用两种方法。第一种是在发酵管内培养，若发酵即生成 $\text{CO}_2$ 或其他气体（图6-1）。第二种用琼脂培养基，微生物在琼脂内生长产气后即将琼脂裂开破碎。

测定微生物利用基质产酸，因要求不同而采用不同方法。产



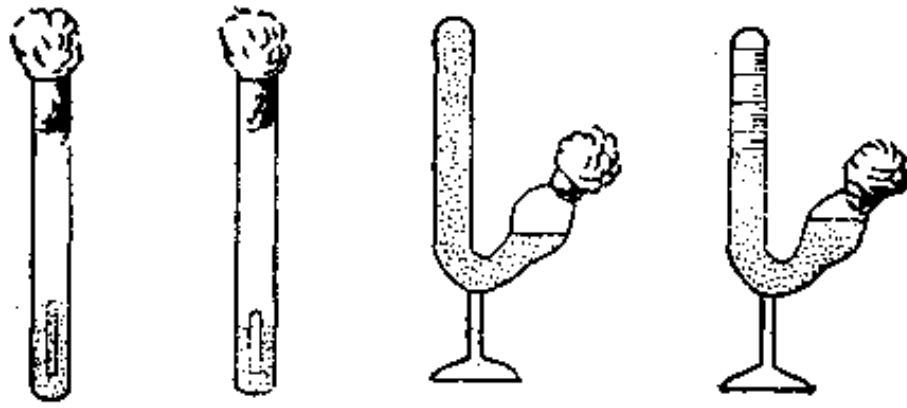


图 6-1 发酵管内培养

左边：杜氏发酵管 左：不发酵 右：发酵  
 右边：艾氏发酵管 左：不发酵 右：发酵

酸强的菌，如乳酸菌、醋酸菌等，可用碱滴定测酸。若只测定该基质能否被利用产酸，可用一种近中性的pH指示剂，显示发酵液是否较原培养液pH小即行。若鉴定种型，要准确的pH值，就需用pH计、pH试纸或同时用几种指示剂来决定。指示剂的用法可加于培养基内，培养后视其颜色的转变认定是否产酸。也可培养后测定。

测定生产发酵生酸的基础培养基必须保证微生物在培养基内不产生气体或酸才行（空白试验）。如豆芽汁，有的细菌能在培养基内生酸或产气体，故须先作空白试验。能利用无机氮又不需生长素的微生物可用合成培养基，否则还得用酵母汁、肉汁、豆芽汁等作基础培养基。但要注意培养基中氮碳比及培养时间，若培养基内胺多，糖少，培养时间长，培养基可能由中性先变酸后再变成中性或碱性。

有关酵母测定的糖类有13种：葡萄糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、棉子糖、蜜二糖、纤维二糖、海藻糖、松三糖、菊芋糖、可溶性淀粉、 $\alpha$ -甲基葡萄糖苷。糖类在培养基中（10%豆芽汁）的浓度一般为2%，棉子糖为4%。但国际上多用酵母含氮的培养基（Difco Yeast Nitrogen Base，酵母氮基，YNB）。培养温度一般采用25~28℃，每天观察，注意是否发酵产生CO<sub>2</sub>，一般2~3天即可，有的要延长至10天。

本章所列实验仅生理试验中的一部分并配之以一些发酵形成产物及其测试的试验。

### 〔实验6-1〕细菌对糖、醇及糖苷的利用

#### (一) 实验材料

1. 菌种 葡萄糖豆芽汁(10%豆芽汁含葡萄糖2%)培养的大肠杆菌、产气杆菌、德氏乳酸杆菌、枯草芽孢杆菌。

2. 培养基 下列培养基每种5管。

① 葡萄糖肉汤琼脂内加溴百里香酚蓝。

② 蔗糖肉汤琼脂内加溴百里香酚蓝。

③ 乳糖肉汤琼脂内加溴百里香酚蓝。

④ 葡萄糖肉汤内加酚红盛于杜氏管。

⑤ 蔗糖肉汤内加酚红盛于杜氏管。

⑥ 乳糖肉汤内加酚红盛于杜氏管。

⑦合成培养基:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{KCl}$  0.02%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%, 琼脂 0.3%, pH7, 0.04% 溴甲苯酚紫溶液1.2ml。

3. 接种针, 酒精灯, 培养箱。

#### (二) 操作步骤

1. 各培养管标记糖、菌名及接种月、日, 然后接种。对琼脂培养基以针刺接种, 第5管作空白对照。

2. 各管于37℃培养箱中培养48h。

3. 观察各菌是否形成气体。琼脂内若生气体, 则有气泡或甚至裂口节断。杜氏管中若生气体, 气体聚集于小管顶, 易辨认。

4. 溴百里香酚蓝酸性为黄色, 中性为草绿, 碱性为蓝色。酚红酸性为黄色, 中性为肉红; 碱性为深红色。以空白试验作标准, 比较各培养管内的颜色, 以决定该菌是否产酸或碱。以+表示酸, ⊕表示酸及气, ⊖表示无变化, ①表示碱性反应, 记录于表(表6-1)。

5. 不需或稍需生长素的细菌, 如芽孢杆菌等可用琼脂合成培养基, 含糖约0.5%。分装小试管中, 每管0.5ml, 用过滤灭菌法。针刺接种, 30℃培养, 于3、7、14及21天观察是否生长、生酸(变为黄色)及产气(琼脂破碎)。

### 〔实验6-2〕酵母对糖类的发酵

酵母对各种糖类的发酵能力差别甚大, 是酵母分类的重要依据。在酵母

应用方面，对糖的发酵能力也要熟悉，如上面酵母不能发酵蜜二糖，卡氏酵

表 6-1 各种细菌对糖的利用结果

培养基	糖名	大肠杆菌	产气杆菌	德氏乳杆菌	芽孢杆菌	空白试验
琼脂	葡萄糖					
	蔗糖					
	乳糖					
肉汤	葡萄糖					
	蔗糖					
	乳糖					

母却能，酵母发酵糖类都生成乙醇和 $CO_2$ ，所以若有气体生成，即为发酵该糖。

### (一) 实验材料

1. 菌种 酿酒酵母，卡氏酵母，红酵母，待测菌种。
2. 培养基 豆芽汁或酵母煮汁，或酵母含氮基础培养基，葡萄糖、蔗糖、乳糖、蜜二糖、半乳糖、麦芽糖、鼠李糖、木糖等。
3. 杜氏管或艾氏管，酒精灯，接种环。

### (二) 操作步骤

1. 将培养基加入发酵管内，并标清菌名及糖类，然后加糖10%左右。加棉塞，58.84kPa，20min灭菌。
2. 接种各管。若各管有气泡产生，应除去。置于25℃下培养2、3、4、5、6天。
3. 逐日观察、记录。

## 第二节 微生物对氮源的利用

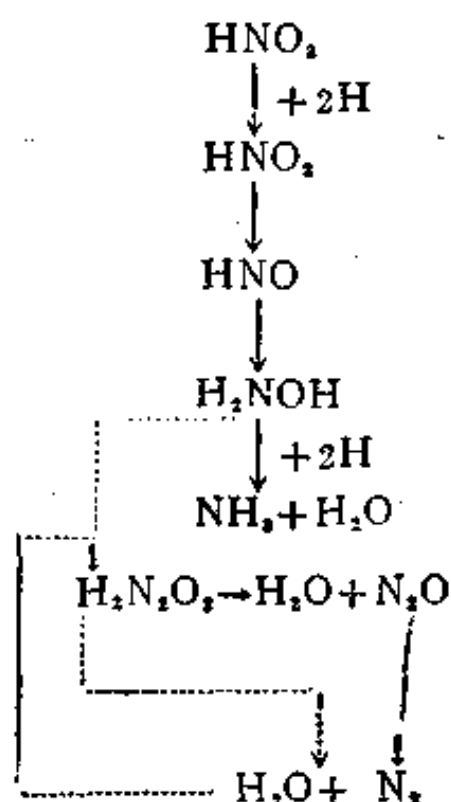
氮是构成微生物细胞蛋白质和核酸的主要元素。氮的来源可分为无机氮和有机氮。就微生物的总体而言，从分子态氮到复杂的含氮化合物，包括硝酸盐、铵盐、尿素、胺、酰胺、嘌呤碱、

嘧啶碱、氨基酸、蛋白质和氰化物等都可利用，但就某一类微生物来看，由于其合成能力的差异，对氮营养的需要仍有很大差别，这就成了分类上的依据之一，对发酵培养基的组成也是一种根据。

### 〔实验6-3〕细菌对硝酸盐的还原作用

某些细菌能把培养基中的硝酸盐还原为亚硝酸盐、氨和氮等。如果是这样，当培养液中加入格里斯氏试剂时，溶液呈现粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等。

硝酸盐还原作用的反应式如下：



从反应式可见，亚硝酸盐的形成可能是终产物，也可能是一系列反应的中间产物。

#### (一) 实验材料

1. 大肠杆菌、枯草杆菌和待测菌种。

2. 培养基

(1) 肉汁胨培养基100ml,  $\text{KNO}_3$  0.1g, pH7.0~7.6。

(2) 硝酸钠培养基：琥珀酸钠1%， $\text{NaNO}_3$  0.1%， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%， $\text{KCl}$  0.02%，pH7.2。

每管分装4~5ml, 103.4kPa, 灭菌20min。

### 3. 试剂

(1) 格里斯氏试剂, A液——对氨基苯磺酸0.5g, 稀醋酸(10%左右) 150ml; B液—— $\alpha$ -萘胺0.1g, 蒸馏水20ml, 稀醋酸(10%) 150ml.

(2) 二苯胺试剂, 二苯胺0.5g溶于100ml浓硫酸中, 用20ml蒸馏水稀释.

#### (二) 操作步骤

1. 将待测菌接种于硝酸盐液体培养基中, 置适温下培养1、3、5天. 每株菌作复本, 另留两管作对照.

2. 取两支干净的空试管或在白色瓷盘中倒入少许培养1、3、5天的培养液, 再滴一滴A液和B液. 在对照管中同样加入A、B液各一滴.

3. 滴入A、B液后, 溶液若变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等, 表示有亚硝酸盐存在, 为硝酸盐还原阳性. 如无红色出现, 则可加1、2滴二苯胺试剂, 此时呈蓝色, 表示培养液中仍有硝酸盐而无亚硝酸盐反应, 则还原作用为阴性. 若不呈蓝色, 表示硝酸盐和新形成的亚硝酸盐都已还原成其他物质, 故仍按阳性对待.

该反应是在较为厌氧条件下进行的, 所以分装培养液时液面宜高些. 由于亚硝酸盐可以是硝酸盐还原最终产物, 也可以是整个还原过程的中间产物, 而且各种菌种还原速度相差较大, 所以培养18~24h的第一次观察应及时.

#### 〔实验6-4〕酵母对氮来源的利用

蛋白质不能直接进入细胞, 活酵母的蛋白酶不分泌于体外, 所以一切酵母对蛋白质都不能消化利用. 对较简单的含氮化合物, 酵母利用程度也不一致, 因种属而异. 有无生长素存在, 酵母对氮源的利用能力不同. 生长素存在时, 酵母对铵盐、尿素及消化蛋白都能利用, 但对硝酸盐的利用仍有差别.

##### (一) 实验材料

1. 菌种 酿酒酵母, 产朊圆拟酵母, 克氏(*Kloeckera*)酵母.

2. 培养基 无氮合成培养基100ml ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.07%, 豆芽汁0.5ml, 葡萄糖2%, 琼脂2%), 硫酸铵, 硝酸钾, 尿素, 消化蛋白.

3. 器皿 无菌试管, 酒精灯, 接种针, 吸管.

##### (二) 操作步骤

1. 在试管上标明菌名、氮源及空白。
2. 分装培养液5ml于各管，顺序添加氮源，空白不加。103.4kPa, 20min灭菌。
3. 放置斜面，依次接种。25℃下培养。
4. 一周后观察并记录。生长情况与空白一样者，说明酵母不能利用那种氮源。

### 第三节 细菌鉴定中的某些特殊生理实验

由于各种微生物的新陈代谢类型不同。因此对各种物质利用后所产生的代谢产物也不同。而这些产物是可以利用化学方法来测定的。对碳源、氮源的利用是非常重要的生理特征，除此外还有一些特殊的生理试验。这些也是微生物分离鉴定的重要依据。

#### 〔实验6-5〕淀粉水解

细菌产生淀粉酶在分类上和应用上都有重要的意义。细菌能产生各种淀粉酶，例如枯草杆菌等产生 $\alpha$ -淀粉酶，凝结芽孢杆菌等产生好热细菌 $\alpha$ -淀粉酶。

测定细菌的水解淀粉能力有两种方法：一种是利用淀粉水解成糊精后遇碘不呈现蓝或红色的反应；另一种是细菌水解后即行发酵产生气体或酸。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 枯草杆菌及供试菌种。
2. 培养基 淀粉培养基：可溶性淀粉2%， $KNO_3$  0.1%， $NaCl$  0.05%， $K_2HPO_4$  0.05%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%，琼脂2%，pH7.2~7.4, 103.4kPa, 20min灭菌。配制时先用少量冷水将淀粉调成糊状，在火上加热，边搅拌边加水及其他成分，融化，补足水分至原体积。
3. 碘液：碘片1g， $KI$ 2g，蒸馏水300ml。先用3~5ml溶解 $KI$ ，再投入碘片，待碘全溶后，加水稀释至300ml。
4. 器皿 接种针，平皿，培养箱。

#### (二) 操作步骤

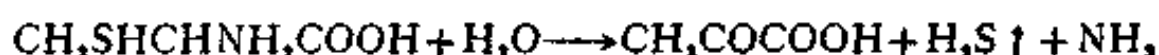
1. 将淀粉培养基融化，倒入平皿，凝固后将平皿倒置于30℃培养箱中



1. 接菌种于斜面培养基上，37℃下培养24h。
2. 培养24h后取出，加入等量的40%的NaOH相混，加少许肌酸（约0.5~1.0mg）。然后猛烈振荡，2~10min内若培养液出现红色即为V-P试验阳性。也可放置37℃下保持30min，若不呈红色为阴性。

#### 〔实验6-7〕硫化氢的生成

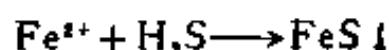
某些细菌能分解含硫化合物如胱氨酸、甲硫氨酸而产生硫化氢气体。若于培养基中加入柠檬酸铁铵或醋酸铅，则与硫化氢作用生成硫化亚铁或硫化铅（黑色）沉淀。



（半胱氨酸）



（醋酸铅）                      黑色（硫化铅）



#### （一）实验材料

1. 菌种 大肠杆菌和供试菌种。
2. 培养基 牛肉膏0.75%，蛋白胨2.5%，NaCl 0.5%，明胶10~12g，10%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5ml，蒸馏水100ml，pH 7.0，58.84kPa，20min灭菌。在明胶培养基尚未凝结时，加入新制备的过滤灭菌的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，用无菌试管分装，培养基高度为4~5cm，立即置冷水中冷却凝固。
3. 器皿 接种针，培养箱，酒精灯。

#### （二）操作步骤

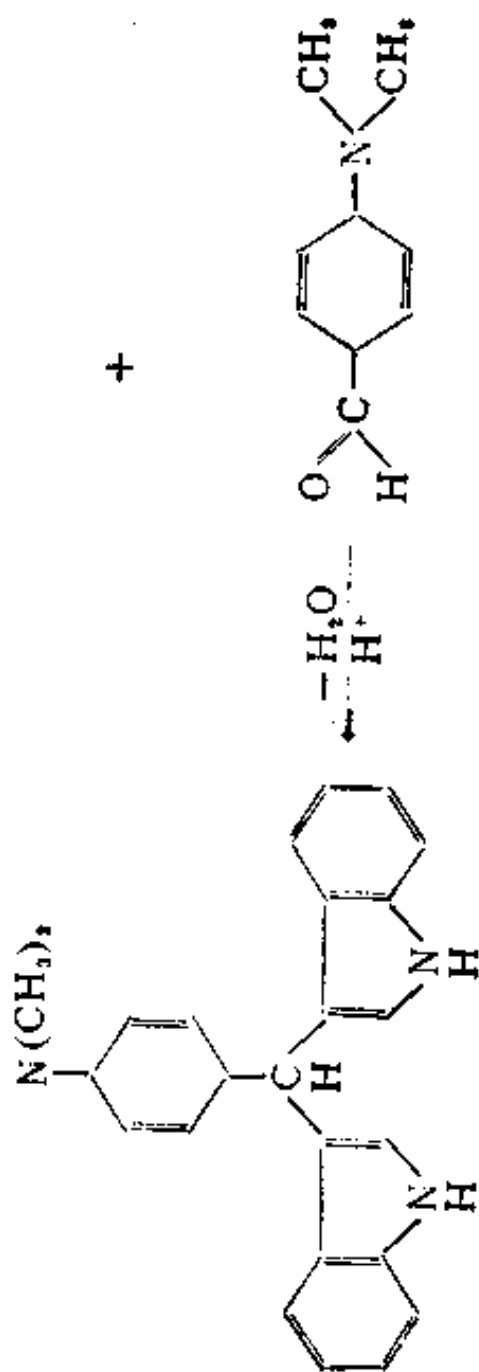
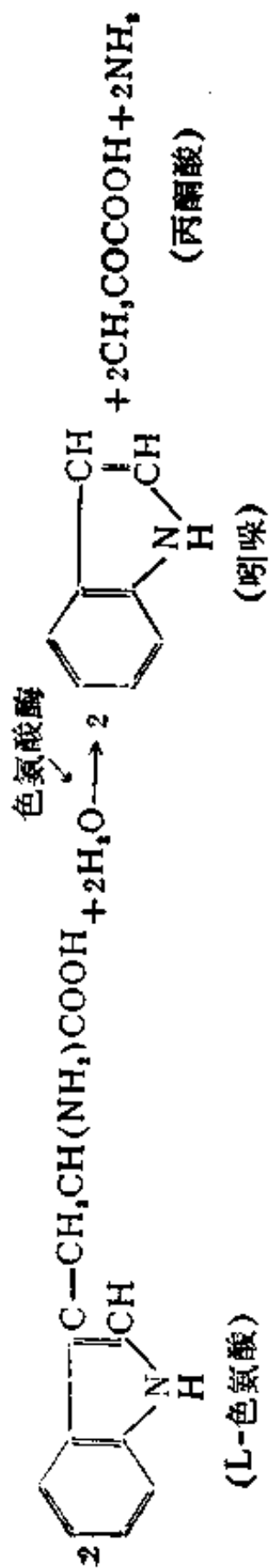
1. 用穿刺法接种，并以凡士林封管，20℃下培养。
2. 培养一周观察结果，变黑者为阳性，不变者为阴性。

此法可同时测定明胶液化。

#### 〔实验6-8〕吲哚试验

某些细菌能分解蛋白胨中色氨酸而产生吲哚。吲哚与对二甲氨基苯甲醛结合，形成玫瑰吲哚，为红色化合物，其化学反应式如下：





(对二甲氨基苯甲醛)

(玫瑰吲哚)

### (一) 实验材料

1. 菌种 大肠杆菌, 产气杆菌和供试菌种。
2. 培养基 1%蛋白胨水溶液, 调成pH 7.2~7.6装管, 高度占管长的 $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{4}$ , 58.84kPa, 灭菌20min。
3. 试剂 对二甲基氨基苯甲醛8g, 95%酒精760ml, 浓HCl 160ml。
4. 器皿 接种针, 培养箱, 酒精灯。

### (二) 操作步骤

1. 取蛋白胨水培养基试管分别接入大肠杆菌, 产气杆菌及其他供试菌, 37℃下培养48h或更长时间。

2. 取出培养管后, 缓缓滴加吲哚试剂5滴, 在液层界面发生红色, 即为阳性反应, 黄色即为阴性反应。

若颜色不明显, 可加4~5滴乙醚, 摇动, 使乙醚分散于液体中, 将培养液静片刻, 待乙醚浮至液面后再加吲哚试剂。如培养液中有吲哚时, 吲哚可被萃取到乙醚层中, 浓缩吲哚和试剂, 反应颜色就明显。加入试剂后不可再摇动, 否则被混合, 红色不明显。

### 〔实验6-9〕过氧化氢酶的产生

过氧化氢酶又叫触酶, 能催化过氧化氢分解成水和氧。某些微生物可生成这种酶, 是种属分类的根据之一。

测定过氧化氢酶是否存在, 可加3%  $H_2O_2$ 于斜面培养的试管中, 看它是否产生气泡。若该菌产生过氧化氢酶, 在2~3min内, 就有不少氧气产生。这项测定主要用于把乳酸菌和许多厌氧菌与其他细菌区分开来, 乳酸菌和许多厌氧菌都是过氧化氢酶阴性。

### (一) 实验材料

1. 菌种 培养24h的乳酸菌, 枯草杆菌和其他供试菌种。
2. 培养基 细菌采用营养琼脂, 其他菌类可采用适合的斜面培养基。
3. 试剂 3%  $H_2O_2$ 。
4. 器皿 接种针, 酒精灯, 培养箱。

### (二) 操作步骤

1. 接菌种于斜面培养基上, 30℃培养24h。
  2. 滴入3%  $H_2O_2$ 数滴于斜面菌体上, 若有气泡为阳性。
- 测定采用的培养基不可有血红素或红血球,

不然易产生假阳性反应。在测定乳酸菌时, 应使用至少含有1%的葡萄

糖培养基。若在无糖或少糖培养基上生长时，可能产生一种假阳性反应。

### 〔实验6-10〕明胶液化试验

明胶是一种具有在温水中溶解时形成凝胶性质的动物蛋白质。有些细菌能分泌蛋白酶（胞外酶），可分解这种蛋白，使其失去凝胶性质而没有凝固性。明胶培养基本身在低于20℃下会凝固为固体，高于24℃则自行液化。但明胶分解后，其分子变小，虽低于20℃也不会再凝固。所以观察温度高于24℃时需经低温处理。

明胶分解是一种酶反应，参与的酶称明胶酶，无此酶的微生物不能液化明胶。

#### （一）实验材料

1. 菌种 大肠杆菌及供试菌种。
2. 培养基 蛋白胨0.5%，明胶10~15%，pH 7.2~7.4，分装试管，培养基高度约为4~5cm，68.65kPa，20min灭菌。
3. 器皿 低温培养箱，接种针，酒精灯。

#### （二）操作步骤

1. 取明胶培养基试管，取培养18~24h的斜面培养基作穿刺接种，另有两支不接种作空白对照。于20℃培养箱中培养。

2. 培养2、7、10、14和30天的试管，在20℃以下观察菌的生长情况和明胶是否融化。如菌已生长，明胶表面无凹陷，且为稳定的凝块，则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部在20℃以下变为可流通的液体，则明胶水解阳性。如菌已生长，明胶未液化，但明胶表面菌落下出现凹陷小窝（需与未接种对照管比较，因培养过久的明胶也会水分失散出现凹陷）也是轻度水解，按阳性处理。若细胞未生长，可能是不能在明胶培养基上生长，或是基础培养基不适宜。

应注意培养基灭菌温度过高或过低都易影响结果，一般用68.65kPa，15min灭菌较适合。另外由于明胶质量不一，其用量也有差异，以在20℃时凝固成稳定的凝块为宜。用量一般采用10%为宜，但在夏天明胶不易凝固，可采用12%的浓度。

### 〔实验6-11〕石蕊牛乳试验

石蕊牛乳中主要含有乳糖、酪蛋白和石蕊等。在牛乳中加入石蕊是作为酸碱指示剂和氧化还原指示剂，石蕊在中性时呈淡紫色，酸性时呈粉红色，碱性时呈蓝色，还原时则自下而上褪色。细菌对牛乳的作用有以下几

种情况:

1. 产酸 细菌发酵乳糖产酸, 使石蕊变红。
2. 产碱 细菌分解酪蛋白产生碱性物质, 使石蕊变蓝。
3. 胨化 细菌产生蛋白酶, 使酪蛋白分解, 使牛乳变得较为澄清略透明。
4. 酸凝固 细菌发酵乳糖产酸, 使石蕊变红, 当酸度很高时, 可使牛乳凝固。
5. 凝乳酶凝固 有些细菌能产生凝乳酶, 使牛乳中的酪蛋白凝固。此时石蕊常呈蓝色或不变色。
6. 还原 细菌生长旺盛, 使培养基氧化还原, 电位降低, 因而石蕊褪色。上述 5 种情况石蕊均可还原。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 乳链球菌、大肠杆菌、枯草杆菌和供试菌种。
2. 培养基

(1) 脱脂牛乳制备: 新鲜牛乳用离心机分离, 除去上层奶油, 取下层脱脂牛乳。若无新鲜牛奶也可用脱脂奶粉代替, 每1000ml溶解100g脱脂奶粉。或将新乳煮沸, 置冰箱2h, 用虹吸法取出底层牛乳。

(2) 石蕊液的制备: 石蕊2.5g, 蒸馏水100ml。将石蕊浸泡在蒸馏水中过一夜或更长时间, 使石蕊变软而易于溶解。溶解后过滤, 即可用于配制石蕊牛乳。

(3) 石蕊牛奶的配制: 2.5%石蕊水溶液4ml, 脱脂牛乳100ml, 混合后的颜色以丁香花紫色为适度, 分装试管, 牛奶高度约4cm, 58.84kPa, 灭菌20min。

3. 器皿 接种针, 酒精灯, 培养箱。

#### (二) 操作步骤

1. 将新鲜菌种移接至上述石蕊牛乳试管中, 30℃下培养。
2. 培养1、3、5、7、14和30天后观察酸碱反应、酸凝、酶凝、胨化、还原等现象。

#### [实验6-12] 甲基红试验 (M-R)

该试验是测定细菌发酵葡萄糖的变化, 有些细菌发酵葡萄糖产酸, 并将培养基pH下降到4.2或更低, 呈甲基红阳性。有些细菌能将新产生的酸进一步转化为中性化合物, 如乙酰甲基甲醇或2,3-丁二醇, 则为V-P阳性。

所以M-R试验与V-P试验对鉴定肠杆菌科的细菌甚为重要。

### (一) 实验材料

1. 菌种 大肠杆菌和供试菌种。
2. 培养基 蛋白胨0.5%，葡萄糖0.5%， $K_2HPO_4$  (或NaCl) 0.5%，pH 7.0~7.2。每管分装4~5ml，58.84kPa，灭菌20min。
3. 试剂 甲基红0.1g，95%乙醇300ml，蒸馏水300ml。

### (二) 操作步骤

1. 接种试验菌于上述培养基中置适温下培养。
2. 培养2、4、9天后观察，若仍为阴性，可适当延长培养时间，但肠杆菌科的菌要求37℃下培养。
3. 在培养基中加入一滴甲基红试剂，红色 (pH 4.4) 为M-R阳性，黄色 (pH 6.0) 为阴性。

若测试芽孢杆菌时，培养液中 $K_2HPO_4$ 以NaCl取代。

### 〔实验6-13〕乙醇的氧化

氧化乙醇为乙酸是醋酸菌的特征之一。这项测定可用于鉴别醋酸菌和其他一些氧化性的革兰氏阴性杆菌。 $C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$

### (一) 实验材料

1. 菌种 醋酸菌和供试菌种。
2. 培养基  
醋酸菌采用：酵母膏1%，溴酚蓝 (0.04%水溶液)2%，pH 6.8~7.0，分装试管，每管装高度为4cm，103.4kPa，20min灭菌，使用前每管加乙醇，使最终浓度为10%。由于乙醇氧化为需氧过程，液层不宜过高。  
一般细菌用： $(NH_4)H_2PO_4$  0.05%， $K_2HPO_4$  0.05%，酵母膏0.05%，溴百里酚蓝1%水溶液3ml (先用95%乙醇溶解后，再加水配成1%水溶液)，pH 7.0~7.2，分装试管高度约4.5cm，103.4kPa灭菌20min，使用前，每管加乙醇，使最终浓度为1%。

3. 器皿 接种针，酒精灯，培养箱。

### (二) 操作步骤

1. 将供试菌种分别接入培养液试管，30℃下培养。
2. 培养1、3、7、14天观察，产酸变黄者为阳性，不变黄者阴性。  
本试验也可采用下列方法：在上述培养基中加入碳酸钙 (1%) 和琼脂 (2%)，灭菌后加入2%的乙醇，不加指示剂，在适温下培养3、7、14天后

观察，菌落四周有透明圈者为阳性，否则为阴性。但应注意，有的醋酸菌培养初期产酸溶解碳酸钙，形成透明圈，但所形成的醋酸钙进一步被氧化分解，转化成碳酸钙，使菌落四周呈不透明的乳白色并有彩色光泽，这表明乙酸又进一步氧化。

#### 〔实验6-14〕乙酸的氧化

醋酸细菌可以将乙酸进一步氧化分解，用于区别醋酸细菌属和葡萄糖细菌属。



##### (一) 实验材料

1. 菌种 醋酸细菌、葡萄糖细菌和供试菌种。
2. 培养基 酵母膏1%，乙酸钙1%，琼脂2%，pH 7.0~7.2，分装在三角瓶或大试管内，以备倒入平皿或分装斜面。
3. 器皿 接种针，培养箱，酒精灯。

##### (二) 操作步骤

1. 将幼龄菌接种平皿或斜面，30℃下培养。
2. 3~5天后，观察菌落周围是否出现乳白色晕圈，出现者为阳性，即将可溶性乙酸钙中的乙酸氧化分解，游离钙重新成为不溶性的碳酸钙，未出现乳白色晕圈的为阴性。

#### 〔实验6-15〕脲酶的测定

有不少微生物产生脲酶，水解尿素为氨。



在胨水中加尿素，接入芽孢杆菌，往往就会促使尿素水解，且分解速度极快。产生的氨气使培养基的pH升高，酚红指示剂就呈现红色。

##### (一) 实验材料

1. 菌种 芽孢杆菌、大肠杆菌和供试菌种。
2. 培养基 营养琼脂。
3. 试剂 酚红液(1:500的酚红水溶液)，尿素，无菌生理盐水。
4. 器皿 无菌试管，吸管。

##### (二) 操作步骤

1. 测定菌在营养琼脂斜面上培养3~7天。
2. 于斜面内加入无菌生理盐水4ml，做成菌悬液，将其倒入相应无菌试管内。于试管内加入一滴酚红指示剂，调pH到7，使酚红刚转黄。

3. 将此液分为两份装入无菌试管内，其中一管加入少许结晶尿素，约0.05~0.1g，另一管不加作对照。

4. 观察对照 若加尿素的试管几分钟内变碱，酚红指示剂变红，则称该菌脲酶阳性，反之为阴性。

该法较为方便，尤在测定菌数量少时。但对肠细菌等属的菌株有可能出现假阴性。

## 第四节 常用细菌的分离和检测

在发酵工业上常见常用的细菌是较多的，如何识别有价值的细菌并且分离出它们是甚为重要的。这里仅列举了部分细菌，据此稍加改变也适用于其他的细菌的分离和检测。

### 〔实验6-16〕枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)

在实验室内常遇见的生芽孢需氧杆菌，多为枯草杆菌，因为它的芽孢能抗高热（有的在100℃下3h才死），分布广泛。枯草杆菌能形成多量的淀粉酶、蛋白酶，还产生枯草杆菌素，所以是重要工业用菌之一。另外，它又是腐败菌之一，危害也大。

枯草杆菌的芽孢为椭圆或长桶形， $0.6\sim 0.9\times 1.0\sim 1.5\mu\text{m}$ ，于芽孢囊中央或近中央部形成，一般于腰间发芽。芽孢囊很少或不为芽孢所膨大。营养细胞杆状 $(0.7\sim 0.3)\times (2\sim 3)\mu\text{m}$ ，孤立或成短链，杆端半圆形。染色时均匀上色，能运动。革兰氏阳性。能液化明胶，水解干酪素，糖化淀粉。在一般培养基上生长旺盛，菌落为蔓延性，灰白，淡黄甚至黄色，也有黑色。细皱或折迭。液体表面形成皱皮膜。能于铵盐中发酵各种糖成酸，但不产气。V-P反应为阳性，利用柠檬酸，还原硝酸盐。在50~56℃时生长，适温为30~37℃。为需氧或兼性需氧。存在于土壤、枯草等中。在含糖的培养基上生红及黑色素的是糖黑枯草杆菌，只在含酪氨酸培养基内产生黑色素的是黑枯草杆菌。

常用的热处理法可纯化枯草杆菌，也可用于分离酪酸梭菌。该法原理是利用生芽孢细菌的芽孢能抗高热。加热处理会杀死不产芽孢的一切菌类，而产生芽孢的细菌，则因其芽孢生存而不死。

### （一）实验材料

4. 菌种 枯草杆菌、黑枯草杆菌、枯草分离源等。

2. 培养基 斜面蔗糖豆芽汁琼脂、斜面肉汤琼脂、马铃薯、牛奶、肉汤、蔗糖、豆芽汁等。

3. 试剂 齐氏石炭酸复红液、吕氏美蓝液。

4. 器具 显微镜、接种针、酒精灯、测微计、香柏油、二甲苯。

## (二) 操作步骤

1. 100ml三角瓶中加入水30ml, 枯草数根, 切碎加入瓶中, 浸于水内, 加棉塞。常压蒸20min取出置37℃保温箱中24~48h, 液面则产生黄白皮膜。

用二重皿及蔗糖豆芽汁琼脂, 分离液面皮膜细菌。将独立的菌落移接至斜面培养基上, 待菌落形成, 再移殖于其他各培养基内, 37℃下培养, 记录其生长情况。

2. 培养分离出及保存的菌种描述以下特性: 营养细胞形状、大小排列, 芽孢形状、大小、部位, 芽孢囊形状, 肉汁琼脂, 马铃薯片, 蛋白酶、淀粉酶, V-P反应, 硝酸盐还原, 柠檬酸盐的利用等等。

## 〔实验6-17〕醋酸细菌

醋酸细菌是重要的工业用菌之一, 不但可制醋, 还可用于制造葡萄糖、维生素C等。

醋酸菌的细胞为椭圆至杆状; 单个、成对或短或长链。端毛或周毛运动, 或不能运动。还能形成圆形、长形、线状、膨状、弯曲或甚至分枝的异常形态。幼细胞为革兰氏染色阴性, 老细胞则不定。专性需氧菌, 过氧化氢酶强阳性, 但有时也有微弱或不产生者。氧化各种有机物或有机酸及其它种氧化生成物, 且这些生成物可能再被氧化。普通的氧化生成物中包含着由乙醇生成乙酸, 由葡萄糖生成的葡萄糖酸或酮葡萄糖酸, 由甘油生成的磷酸二羟丙酮, 山梨醇生成山梨糖等。营养上需要由简单至复杂的化合物。一般说, 醋酸菌在加乙醇或其他种可氧化物的酵母煮液或酵母消化液培养基上生长茂盛。生长最适温度因菌种而异。自然界中分布很广。

醋酸菌的分类 有主张醋菌属下分为各群的; 有主张分为两个属的: 醋菌属及葡萄糖酸菌属。似乎不同意分为两个属的人多些。不管如何, 醋菌属中有几个明显独立的种, 易于认识。一个是生黑色素的黑醋菌; 一个是生红色素的醋菌; 一个是在液体表面生成一层很厚的皮膜的膜醋菌; 一个是无色素及厚皮膜而在葡萄糖培养基中生多量的葡萄糖酸 (0.5mol/L以



上)的弱氧化醋菌:一个是在含酒精的培养液中生成大量醋酸的醋酸菌;还有一个不产生过氧化氢酶的过氧化醋菌。

过氧化醋菌多存在于经常含厨房废水的土壤及污水中,在加0.5%醋酸,含有酒精3%,醋酸钠0.1%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.1%, $\text{MgHPO}_4$  0.1%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%的Hoyer培养液中增殖,用酵母汁加2%乳酸钙,2%琼脂或酵母汁加3%乙醇,2% $\text{CaCO}_3$ ,2%琼脂分离。

产生醋酸多的菌存在于未杀菌的醋、黄酒、啤酒、水果酒、酒糟、大曲等内,在加1%的醋酸,3%的乙醇的酵母汁或豆芽汁内,或用豆芽汁把醋冲淡一倍加乙醇3%, $30^\circ\text{C}$ 培养增殖醋菌,用加有 $\text{CaCO}_3$ 及乙醇的麦芽汁琼脂分离。

用柿子皮分离膜醋菌、柿饼分离葡萄糖酸菌都易成功。

醋酸为挥发性酸,有醋的气味,在其钠盐钙盐等溶液中,加氯化铁液,即成黄红色液,煮沸生红褐色沉淀,清液变成无色。发酵液中若无其他酸存在,可直接用0.1mol/L NaOH滴定,以定其量,若有它种挥发酸共存在,可加硫酸使发酵液成醋性后蒸馏,然后滴定,用0.06乘0.1mol/L NaOH毫升数,即得醋酸的克数,并可用纸上层析法确定。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 醋酸菌、膜醋菌、弱氧化醋菌,未杀菌的新鲜醋醪等少许,大曲一块。
2. 培养基 酒精、曲汁、啤酒或黄酒,碳酸钙曲汁琼脂。
3. 试剂 氯化铁液,0.1mol/L NaOH液,酚酞指示剂。
4. 器具 无菌吸管、试管、培养皿和三角瓶,显微镜,载片,酒精灯,接种针。

#### (二) 操作步骤

1. 称大曲20g,磨碎,盛于250ml三角瓶内,加水100ml, $25\sim 30^\circ\text{C}$ 发酵两周,会有醋菌长出,用显微镜检查该发酵液中是否有细菌(石炭酸复红液染色,油镜检查)。
2. 曲汁30ml,盛于100ml三角瓶中灭菌,冷却后,用无菌吸管吸入1ml酒精,然后接入新鲜醋醪少许, $25\sim 30^\circ\text{C}$ 培养1周。
3. 啤酒或黄酒50ml,盛于250ml三角瓶中,不加盖静置数天,液面生酸,后醪沿瓶壁上升,镜检可见较大的卵圆形至长形的芽殖酵母细胞及微细杆状的细菌细胞。

4. 用碳酸钙曲汁琼脂及平皿分离1~2及3发酵液中的醋菌。分离时皿中先加酒精3滴，25~30℃下培养3天至1周。先长出白色菌落较大，边缘微带毛状是粗醱酵母。后长小菌落是醋菌，醋菌因生酸将碳酸钙溶解，菌落周围的培养基变为透明。菌落周围透明圈的大小，因菌而异。但培养基若未摇匀，碳酸钙沉于底部，表面甚少，故生长在表面的菌落也可能无透明圈围着。

5. 豆芽汁数瓶，每瓶30ml，杀菌后各加入酒精1.5ml，将上述分离出的不同菌落移接于内，并将醋酸菌等分别移接于其他瓶中。在25~30℃的保温箱中培养。不时观察各菌生长情况，并镜检细胞形态。2周后滴定各瓶醋度。换算成100ml中醋酸的克数。

6. 取培养液5ml入试管内，加NaOH液中和，然后加氯化铁液2~3滴和匀，观察液色是否变为黄红，火焰上煮沸，有无红褐色沉淀生出。

#### 〔实验6-18〕乳酸菌

乳酸菌在自然界中普遍存在。由于它繁殖快，能利用各种糖类产生抑制其他菌生长的乳酸。所以，人们利用乳酸菌的作用，每年为人类及家禽家畜贮藏了许多营养价值高的食物及饲料，对于人们及禽畜的健康起着巨大的作用。现在用的乳酸菌全是发酵制成，乳酸菌制剂是一种重要的药品，代血浆（即右旋糖胶）也是用乳酸菌制成的。但乳酸菌也有破坏力，如酒精发酵酸败是乳酸菌的破坏作用之一。

乳酸菌分为许多类群，著名的有德氏乳杆菌、发酸乳杆菌、嗜酸乳杆菌、浸汁四联菌、肠膜状明串珠菌、乳链球菌、乳酪链球菌等。大肠杆菌及产气杆菌有时也列入乳酸菌类，因为它们也生乳酸。

德氏乳杆菌、植物乳杆菌及发酵乳杆菌都是微需氧的乳酸杆菌。前者存在于麦芽等上，在45~50℃时生长很好，是采用粮食原料制乳酸的菌种；发酵时只产生乳酸的所谓同型发酵菌。后两者都存在于植物浸汁中，生长最适温度较低，发酵时除产生乳酸之外，还产生其他代谢物，称异型发酵菌。有人把这类称为蔗糖杆菌。嗜酸乳杆菌存在于肠内，特别是吃奶的婴儿大便中，是产生右旋乳酸的名种菌，有人利用此菌作乳酸菌制剂，但因它易于死亡，已改用其他菌。

四联菌多少年来都认为是只存在于所谓八叠菌病坏啤酒中，实际上青草等植物浸汁中也普遍存在。也许就是因为这个，细菌分类学家后来才承认这个属。这类菌很好认识，球细胞的连结不少是三角及四方的。虽然单

个及成双的也不少，甚至有短链的，但习惯上很多人称之为八叠菌，而并没有八叠的细胞排列。

肠膜状明串珠菌存在于植物汁液及牛奶中，在糖厂蔗汁中造成大粘团，为害不小，但近来利用它制造代血浆，功效很好。这类菌，一般条件下细胞呈圆形，但在某些培养基内，如发酸的水果及植物汁液中，细胞延长，变成杆状，细胞成双或短链。在蔗糖液中，菌链外有厚粘膜，形如大肠，由右旋糖胶组成，发酵蔗糖产生乳酸、醋酸及 $\text{CO}_2$ 。生长适温 $21\sim 25^\circ\text{C}$ 。

链球菌细胞当然是球形，但不少情况下细胞是卵形或甚至延长为杆状，成双短链及长链。菌落一般为无色，少数在一定条件下有生黄或砖红色色素的，粪链球菌是一群别致的菌，存在于人及热血动物的肠道及大便中。主要特征是生长温度极宽（ $10\sim 45^\circ\text{C}$ ），在 $6.5\%$  NaCl pH9.6、 $0.1\%$ 的美蓝液中生长，能抗 $0.5\sim 1$ 单位/ml的青霉素。由此看来这是一个很泼辣的乳酸菌，利用这一特性，使此菌为人类服务。乳链杆菌是酸奶的重要菌，在 $20^\circ\text{C}$ 上下发酸的牛奶中乳链杆菌占总细菌的 $90\%$ 。时间加长及温度提高时，乳酸菌增加，乳酸量能达 $3\%$ 。一般的牛奶在自然条件下，先有抑制作用，后来链球菌繁殖牛奶发酵并凝固；再后乳酸菌生长，酸性增强，以后酵母（圆酵母，白地霉等）增殖，消耗乳酸，最后腐败菌生长，牛奶变臭。乳链球菌的突出特征是在 $10^\circ\text{C}$ 或其以下及 $40^\circ\text{C}$ 生长，但在 $45^\circ\text{C}$ 时不生长。牛奶凝固之前很快还原石蕊色素。 $4\%$  NaCl下生长，但 $6.5\%$  NaCl下不生长，pH 9.2生长，pH 9.6不生长。乳酪链球菌与乳链球菌最大不同之处是 $40^\circ\text{C}$ 、 $4\%$  NaCl、pH 9.2下不生长。

乳酸菌因为需要各种氨基酸生长素及微需氧，所以培养分离时比较困难。它在一般琼脂培养基表面生成的菌落较小，不注意时常被忽略掉，认为没有生出菌落。一般分离用的培养基有酵母汁、葡萄糖、碳酸钙琼脂，有水解牛奶（牛奶1L，加胰酶 $1.5\sim 3\text{g}$ ， $45^\circ\text{C}$ 下72h过滤，滤液内加 $1.5\%$  NaCl， $10\%$  陈， $2\%$  琼脂，pH7.0~7.2， $103.4\text{kPa}$ ，15min杀菌），有豆芽汁豆豉葡萄糖琼脂等等。也有用番茄酵母汁培养基的，成效不错。有人认为，油酸是乳酸菌的生长素，用吐温-80可以代替。醋酸盐可以抑制其他菌生长而对乳酸菌有害。

分离乳酸菌时最好先增殖。方法是將牛奶裝在帶玻塞的瓶中，滿后加塞，放于要求的溫度下， $1\sim 2$ 天發酵。同樣的瓶子裝酵母汁葡萄糖，接入少許青貯汁，使其中乳酸菌大量繁殖。將青草、青菜放入瓶中加水淹沒，放于

暖处，1~2天也生出许多乳酸菌。增殖出来的乳酸菌可移植于牛奶或番茄酵母培养液中，适温，培养10多小时进行分离。

分离的方法有两种：一种是用平板法，另一种是用玻璃管法。用普通的培养基玻璃管法较好，近来用番茄酵母培养基平板法也易成功。

### (一) 实验材料

1. 菌种 乳酸菌、供试样品（泡菜水、青草浸汁）。

2. 培养基

(1) 番茄酵母吐温-80醋酸盐培养：豚1%，牛肉膏1%，葡萄糖1%，酵母汁5ml，番茄汁20ml，吐温-80 0.05ml，琼脂1.5g，加自来水至50ml。另醋酸缓冲液pH 5.4, 0.4mol/L，分别用58.84kPa，15min灭菌，用时混合。

(2) 豆豉葡萄糖豆芽汁琼脂：豆豉10g，葡萄糖5g，豆芽汁100ml，琼脂2g。豆芽汁和豆豉103.4kPa，60min灭菌，用布过滤，于滤汁中加琼脂及葡萄糖，加热溶化，分装各管，78.46kPa，15min灭菌。

(3) 葡萄糖豆芽汁：葡萄糖5g，豆芽汁100ml，58.84kPa，灭菌15min。

3. 试剂 0.1mol/L NaOH酚酞指示剂，石炭酸复红液。

4. 器具 吸管、滴管、小玻杯、显微镜、接种环、酒精灯、载片及盖片、测微计。

### (二) 操作步骤

1. 半尺长细玻璃管，两端加棉栓纸包杀菌。硬石蜡放入蒸气皿中熔化，蜡若太硬易碎，可加入凡士林少许。

将豆豉培养基煮沸溶化，因其中还原能力强，美蓝应还原为无色。放入45℃水中0.5h。

接种针取半针泡菜水，放入豆豉培养基中，摇匀。将细玻璃管纸包打开，小心取下一端的棉塞（手勿触及管端），然后插入培养基中。用嘴吸细玻璃管另一端，使培养基装满，直立，加上棉塞。将两端棉塞溶于熔化的蜡中，取出待凝固后，将纸包放入25℃温箱中培养24h，管中出现小白菌落，第4天可移植。

再用酒精洗抹玻板及培养细玻璃管，并用酒精洗锉刀再烧去余酒，反复数次以杀菌。切断附近有菌落的玻管。用接种针挑取菌落，移接于葡萄糖豆芽汁瓶中。

2. 番茄酵母吐温-80琼脂融化冷却到45℃, 接入少许青草浸汁, 常法稀释分离, 注意菌落的大小。接不同菌落于各瓶培养液中。

3. 将各瓶置于25℃温箱中培养48h。取10ml, 用0.1mol/L NaOH滴定其酸度。用纸上层析法测定是否为乳酸。

4. 测定各菌必要的形态生理, 认定乳酸为哪个类群。

#### 〔实验6-19〕德氏乳酸杆菌

德氏乳酸杆菌是用淀粉糖化等制造乳酸的菌。在麦芽汁糖化液(尤其不加热杀菌者)内繁殖特别旺盛。菌体健壮, 产酸力特强。但因培养基中酸度大而易死亡, 故培养德氏乳杆菌, 也与培养其他产酸菌一样, 要用添加CaCO<sub>3</sub>的培养基。该菌的特性是能在45~50℃时繁殖, 且把90%以上的糖变成乳酸(副产物甚少), 故为一种耐高温的真正乳酸菌。在不加CaCO<sub>3</sub>的糖液中, 不生产气体, 形成1%以上的乳酸, 但不发酵乳糖, 故不能利用此菌发酵乳汁制造乳酸。

德氏乳酸杆菌的特点是: 细胞为杆状, 0.5~0.8×2~9μm, 单个或短链。不运动, 革兰氏阳性。固体培养基上菌落甚小, 肉汁内略浑, 牛奶内不起作用。能发酵麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、半乳糖及糊精生乳酸, 不发酵木糖、乳糖、棉子糖、菊芋糖、淀粉等。酸中生成酸能达1.6%, 不还原硝酸盐, 微需氧, 适温45℃。这是发酵醪中高温微生物, 刚分离出来的菌较保藏的纯种的适温为高, 存在于谷类醪及发酵植物汁液中。

##### (一) 实验材料

1. 分离源 如绿麦芽。

2. 培养基

(1) 碳酸钙麦芽汁琼脂: 麦芽汁于103.4kPa灭菌1h, 分装各管, 每管5ml, 再加沉淀碳酸钙0.2g, 常压蒸30min。该碳酸钙应先于热灭菌。作固体培养时, 加2%的琼脂, 蒸汽灭菌后再加入无菌的CaCO<sub>3</sub>。

(2) 乳酸发酵培养基: 葡萄糖10%, 消化蛋白0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, NaCl 0.1%, CaCO<sub>3</sub> 5%, CaCO<sub>3</sub>单独干热灭菌。其他物质溶于水中灭菌后接入乳酸菌, 24h培养后, 再加入CaCO<sub>3</sub>。

(3) 麦芽汁或米曲汁。

3. 试剂 0.1mol/L NaOH, 酚酞指示剂。

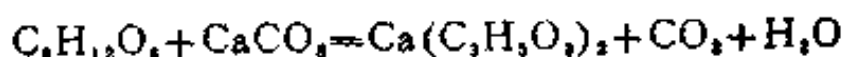
4. 器具 三角瓶、试管、吸管、滴管、玻杯、蒸发皿、干燥箱、吸滤器。

## (二) 操作步骤

1. 加绿麦芽数粒于麦芽汁或曲汁瓶中，温度48~50℃，培养24h，培养液浑浊而液面无膜，摇动培养瓶时，液内出现绢丝样波动物。镜检有肥大的长杆菌存在，移接于新麦芽汁中两代纯化。然后用含CaCO<sub>3</sub>的麦芽汁琼脂及培养皿分离培养。40~45℃，2~5天，德氏乳杆菌形成极小圆形，白色菌落，菌落周围的CaCO<sub>3</sub>被所生的酸溶解，故现一透明环。

2. 选择菌落及透明环不同的微生物，分别移接试管麦芽汁中，48~50℃，2天，用无菌吸管吸取5ml，用0.1mol/L NaOH液滴定其酸度。所以用0.1mol/L NaOH毫升数乘系数0.18，即得100ml发酵液中乳酸的克数。

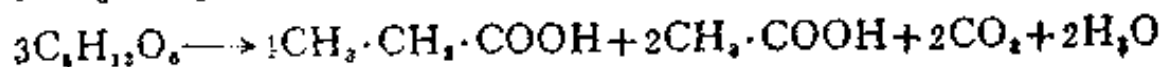
3. 选择生酸力较强的乳酸菌两个，用无菌吸管取5ml，移入乳酸发酵培养液中，45~50℃，24h后，将无菌CaCO<sub>3</sub>加入继续培养。每日摇动一、二次，使碳酸钙起中和产生酸。一周后发酵停止，加石灰使成碱性煮沸，吸滤器滤过。将滤液蒸发浓缩，冷凉（夏天最好放入冰箱中），乳酸钙结晶析出，滤出烤干，称量，即得粗乳酸钙。以下式计算所得粗乳酸钙为理论数的百分率。



### (实验6-20) 丙酸细菌

丙酸菌是发酵各种糖类及乳酸等生成丙酸的细菌，副产物是乙酸、CO<sub>2</sub>及琥珀酸等。短状或长杆状；有氧时，革兰氏染色阳性，过氧化氢酶阳性，无芽孢，不运动，兼性需氧，不生硫化氢及靛基质。虽然有人说它们能利用铵盐的氮，但是仍以酵母汁、消化蛋白、乳清等含氮物质为宜，最适pH值6.8~7.2（一般以pH 7为佳）。固体培养基上生长缓慢，菌落为淡黄或橙至淡红褐色。

丙酸菌存在于牛奶、干酪及其他乳制品、土壤、家畜粪便中。分离时，可用乳酸盐作碳源的培养液，先进行数次生理增殖，然后在微缺氧下培养皿分离。丙酸菌发酵乳酸等为丙酸及乙酸。丙酸及乙酸都是挥发酸，故培养液中挥发酸的有无及多少，为丙酸菌存在与否及发酵力强弱的表现。



#### (一) 实验材料

1. 菌种 丙酸分离源，如干酪，

## 2. 培养基

(1) 乳酸钠2g, 消化蛋白1g, 酵母煮汁100ml, 琼脂2g.

(2) 乳酸钠2g, 酵母煮汁100ml, 消化蛋白1g, pH 6.9.

(3) 葡萄糖2g, 消化蛋白1g, 酵母煮汁100ml,  $\text{CaCO}_3$  1g 于58.84 kPa, 灭菌20min.

3. 试剂 2.5mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.1mol/L NaOH液, 酚酞液.

4. 器具 三角瓶、试管、吸管、培养皿、接种针、显微镜、吕氏蓝液、载片、无菌培养器及真空泵1套, 无菌小刀.

### (二) 操作步骤

1. 用无菌小刀切干酪数小薄片, 加入一个盛(1)丙酸菌培养液的管中, 于无氧培养器内30~34℃下培养10天. 用无菌吸管取5ml, 入试管中, 加2.5mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  约二滴煮沸, 嗅闻有无挥发酸及乙酸发出. 若无挥发酸, 重新再用干酪培养. 若有挥发酸时, 可用接种环移接培养管中的培养液一环于另一盛(1)培养液管中. 如前法培养下去, 同样移接3、4次, 行生理纯化法(增殖法)后, 丙酸菌已多, 其他微生物已减少, 用(2)培养基及平皿, 进行分离, 且于缺氧培养器内30至34℃下培养12~20天, 选择不同的菌落接种于(1)培养基内. 并用显微镜检查菌体形态.

2. 移接分离出的丙酸菌于盛(3)培养液的瓶内, 30~34℃培养1天后, 加入 $\text{CaCO}_3$ , 再继续培养2周, 发酵完后, 可以测定发酵液中的挥发酸量.

取发酵液50ml, 加2.5mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2ml, 用水蒸馏. 但最初应将冷凝器直立, 煮沸10min, 然后蒸馏. 馏出液达400ml为止.

取馏出液20ml, 测其酸度, 改算为200ml馏出液中时需要0.1mol/L NaOH的毫升数, 此数称为总酸度, 以 $a$ 代表.

再用200ml馏出液, 入前述蒸器中, 徐徐蒸馏出一半(100ml)为止. 称半量馏出液, 用0.1mol/L NaOH中和, 所用毫升数以 $b$ 代表.

以 $P$ 代替水蒸馏出液200ml(即等于原发酵液25ml)中所含丙酸中和时所需0.1mol/L NaOH毫升数.

以 $E$ 代替水蒸汽馏出液200ml内乙酸中和时所需0.1mol/L NaOH毫升数.

$P$ 及 $E$ 算法如下,

$$P = \frac{b - 0.366 \times a}{0.219}$$

$$E = a - P$$

100ml 发酵液中丙酸及乙酸含量如下:

$$\text{丙酸} = 7.4 \times P \times 4\text{ml}$$

$$\text{乙酸} = 6 \times E \times 4\text{ml}$$

### (实验6-21)丁酸细菌

产生丁酸(酪酸)的细菌一般都生芽孢,为厌氧或兼性厌氧菌类。发酵生成物,除了酸外,尚有乙酸、丙酮、乙醇、异丙醇等。但因微生物种型不同,各产物的比例也不一样。丁酸菌为杆状,芽孢巨大,为生芽孢的细胞,或一端膨大成鼓锤状,或中部鼓胀成纺锤状或梭状,因此这类细菌可称梭菌(*Clostridium*),强健的细胞内多有淀粉类物,用碘液可染上色。虽然有些型类能利用铵盐,但培养时仍以氨基酸或消化蛋白为优。梭菌在自然界中散布很广,耕土、谷粒、马铃薯、甜菜、牛奶、干谷等上都存在。

丁酸为挥发酸之一,不溶于浓氯化钙液中。丁酸铜溶于氯仿、戊醇等;成蓝色液。但丁酸及其盐类遇浓硫酸加热,不起分解作用。丁酸钙在水内的溶解度较醋酸钙小,含有这两种钙盐的水溶液浓缩时,丁酸钙先结晶析出。

#### (一)实验材料

1. 菌种 分离源如腐植土壤。

2. 培养基

(1) 葡萄糖豆芽汁:葡萄糖5g,豆芽汁100ml,于58.84kPa, 15min 灭菌。

(2) 碳酸钙葡萄糖豆芽汁:葡萄糖10g加入100ml豆芽汁中,58.84kPa, 15min 灭菌,然后加入已干热灭菌的CaCO<sub>3</sub> 5g,常压蒸30min。

3. 试剂 CuCl<sub>2</sub>-HCl液,石炭酸复红液,氯仿。

4. 器具 天平、三角瓶、试管、吸滤器、滤纸、蒸发皿、显微镜、载片、香柏油、二甲苯、测微计。

#### (二)操作步骤

1. 将葡萄糖豆芽汁的三角瓶置于火上去塞煮沸片刻,投入耕土少许,或带皮马铃薯一小片,继续煮沸4~5min,去火,加塞冷凉至35℃培养2天。用厌氧分离法分离,镜检细菌形状及大小。

2. 将分离的丁酸菌接种于碳酸钙葡萄糖豆芽汁中,称瓶重。40℃下培养14天,再称瓶重,瓶的减轻量为氢气及CO<sub>2</sub>(但部分CO<sub>2</sub>是丁酸及其他副产酸类与CaCO<sub>3</sub>化合所产生),瓶的减轻量越大,说明该瓶内的细菌发酵



力越强。

3. 取发酵液5ml, 滤纸过滤, 用滤液2ml, 入小型试管, 再加  $\text{CaCl}_2\text{-HCl}$ 液0.5ml, 和匀, 加氯仿1ml, 用指压管口上下翻动10次, 然后静置于管架上, 管口液体应分两层, 下层为溶解丁酸铜的氯仿液, 氯仿若为无色, 说明丁酸很少或没有, 蓝或绿色越浓, 则说明丁酸含量越多。

4. 将含有丁酸盐的发酵液全部滤过, 洗净滤液及洗液蒸发浓缩, 丁酸钙结晶成磷片状先析出, 趁热滤过, 烤干, 得粗丁酸钙称量, 计算百克葡萄糖可得粗丁酸钙的克数。

## 第五节 酵母应用特性的测定

在工业生产中, 需利用酵母发酵某些碳水化合物的能力。人们将酵母利用碳源能力分成非氧性利用(发酵)和氧化性利用(呼吸)。长期以来, 人们就知道利用酵母来做酒和发面。酵母的本来意思就是发泡, 这是由于发酵时产生的 $\text{CO}_2$ 引起泡沫翻腾。当然酵母本身概念的发展还是显微镜发明之后的事。

尽管酵母还可以生产多元醇、高级醇、氨基酸、维生素、有机酸等一系列代谢物, 但历来只用于酒和酒精以及作为面包酵母的生产。

### 〔实验6-22〕酵母发酵力的测定

酵母在微酸性糖液中行发酵作用, 糖逐渐少, 乙醇及 $\text{CO}_2$ 比例增大。 $\text{CO}_2$ 是气体, 除溶解于醪中外, 都排至外面。所以测定酵母的发酵力可以通过测定糖液比重的减小, 或测糖的减少, 或乙醇的增加, 或称培养器的减轻量, 以确定 $\text{CO}_2$ 失去多少; 或用 $\text{NaOH}$ 等固定 $\text{CO}_2$ 然后称量; 或将培养器密闭, 根据增大的压力, 来确定发酵的强弱等。

测醪的糖度(Brix), 可以算出发酵度,  $D$ 表示未发酵前醪的糖度,  $d$ 表示发酵后摇动去除 $\text{CO}_2$ 后的糖度,

$$AP = \frac{D-d}{D} \times 100$$

可是发酵后的醪内有乙醇, 所以它的糖度不能代表糖的残留量, 前式算出的发酵度也因此加上“表观”两字, 真正发酵度的计算法, 是取发酵后

的醪100ml, 蒸发至50ml, 将乙醇完全驱逐, 用蒸馏水冲兑成100ml, 然后测量其糖度, 以  $d$  示之, 则真正发酵度  $RP$  如下式计算。

$$RP = \frac{D-d}{D} \times 100$$

称发酵瓶法, 多用发酵栓 (见图6-2) 内盛稀硫酸, 吸收随  $CO_2$  跑出的水泡。

### (一) 实验材料

1. 菌种 酒精酵母及供试菌种。
2. 培养基 15度麦芽汁300ml。
3. 试剂 2.5mol/L左右的硫酸。
4. 器具 糖度表1支、无菌1ml吸管、10ml吸管、带发酵栓的250ml发酵瓶、天平。

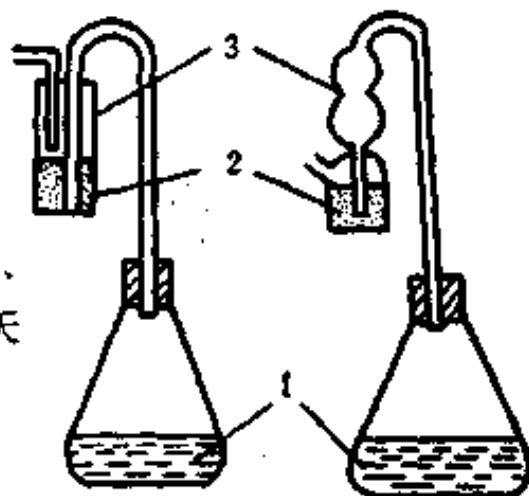


图 6-2 带发酵栓的发酵瓶  
1—发酵培养液 2—稀硫酸  
3—发酵栓

### (二) 操作步骤

1. 用糖度表测出麦芽汁的糖度, 记入附表, 然后分装入发酵瓶中, 每瓶10ml, 加棉塞, 另用油纸包发酵栓, 一齐以58.84 kPa, 20min灭菌。

2. 麦芽汁冷至20~30℃ (勿用表量, 手测), 贴上标签, 注明菌种及接种日期。将管中麦芽汁培养的酵母摇匀, 用无菌吸管移1ml于发酵瓶中, 再用另一吸管移接到另一发酵瓶。

3. 打开发酵栓的油纸, 装于发酵瓶, 用吸管装2.5mol/L硫酸入发酵栓, 以距离出气口管0.5cm为度。

4. 用干布将发酵瓶各部分抹干净, 置瓶于天平上称量, 记入附表。移瓶于25℃保温箱中, 以后每天称量一次, 均记入附表, 以减轻量小于0.2g为止。

5. 摇动两瓶, 使  $CO_2$  尽量逸去, 然后打开, 加水仍成150ml, 用糖度表测出糖度, 计算表观发酵度。

6. 取发酵醪100ml, 蒸发去约一半, 冷却, 加蒸馏水, 冲成100ml, 测其糖度, 计算真正发酵度。

(甲) 发酵瓶减轻量(CO<sub>2</sub>量)

菌种名称	重量(g)									总减轻量
	原重量	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第8天	
酒精酵母										
试验菌种 1										
试验菌种 2										

(乙) 发酵度

菌种名称	糖度(Brix)	原麦芽汁	发酵后糖	去乙醇后	表观发酵度	真正发酵度
酒精酵母						
试验菌种 1						
试验菌种 2						

(实验6-23) 压榨酵母发酵力的测定

压榨酵母是除去培养液的固体酵母，多用于面包、发酵、食用、饲料及药用。

压榨酵母的外观为黄白色，有光泽，成紧密块，无霉臭，不腐败，无异味。取弹子大小一团，掷于地上能弹回而不胶贴于地的为好。在22℃保温箱中，停留16天不软化为好。关于发酵力的测定，多用测CO<sub>2</sub>的重量法：蔗糖4g，磷酸二氢钾0.22g，磷酸镁0.25g，加水50ml，入带有发酵栓的瓶中，加压榨酵母1g，称瓶重。放至30℃培养箱内，6h后再称瓶重，减少数即为CO<sub>2</sub>量。以产生1.75g CO<sub>2</sub>为发酵度100，由下式得到酵母的发酵力：

$$\text{CO}_2\text{克数} \times \frac{100}{1.75} = \text{发酵力}$$

后经改进在发酵液中加入无机盐类，结果与实际制面包发酵成绩相近。在400ml的发酵液中加入压榨酵母10g，30℃温度下，2h产生CO<sub>2</sub> 1000ml以上的为好酵母，800~1000ml的为中等，800ml以下为劣品。

无压榨酵母时，可用澄清曲汁培养，酵母生成后，在过滤纸中压榨，即得固体酵母。

### (一) 实验材料

1. 菌种 压榨酵母10g。
2. 培养基 发酵液400ml，蔗糖40g，磷酸二氢钾2g，磷酸二氢铵1g，硫酸0.25g及硫酸钙0.2g。
3. 器具 测定设备一套(图6-3)，培养箱，天平，水浴。

### (二) 操作步骤

1. 发酵液置培养箱中1h，使其温度达30℃。发酵器置于30℃水浴中，维持不变。

2. 将10g酵母加入发酵液中和匀，入发酵器的1瓶中。记时间，连接管塞，酵母在1瓶发酵所生 $\text{CO}_2$ ，经导管到2瓶，排2瓶的水入量筒，量筒内水的毫升数即等于1瓶中所生 $\text{CO}_2$ 的毫升数。为免去2瓶中水吸收 $\text{CO}_2$ ，可于水面加石蜡一层，使 $\text{CO}_2$ 与水不相连触，或用食盐饱和水，减低 $\text{CO}_2$ 的溶解量。

3. 6h后，观察量筒中水的容量，将所生 $\text{CO}_2$ 的毫升数乘以0.03841，得百克酵母所发酵的蔗糖的克数；或乘0.4得百克酵母发酵葡萄糖的克数。

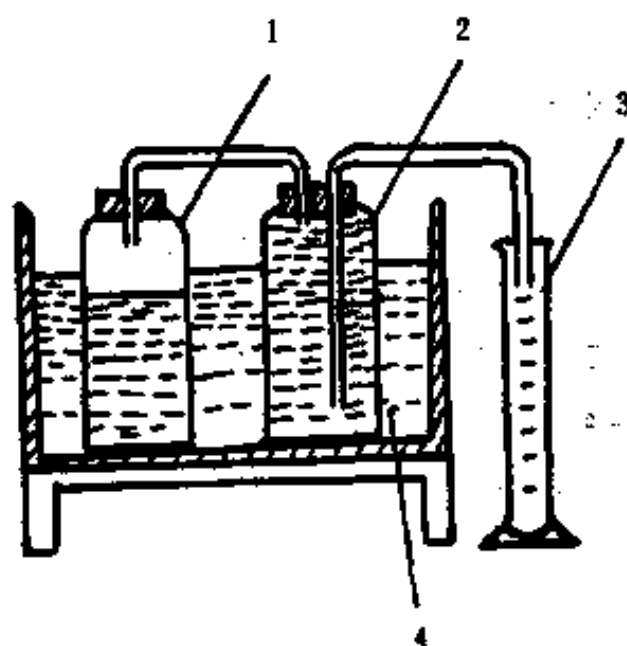


图 6-3 压榨酵母发酵力测定装置

1—发酵瓶 2—充水瓶 3—量筒 4—水浴

### (实验6-24) 面包酵母发面力的测定

所谓的面包酵母，即做面包用的压榨酵母。面包酵母的优劣，当以其发

面力的大小而定。德国规定，加2g蔗糖于160ml的2%食盐水中，热至30℃，加入5g酵母及35℃的面粉280g，电机搅拌5min，将面包团压入一上口15×10cm、下口14×9cm、高8.4cm的盒中，在盒高7cm处，盖一活板。保温33~35℃，记录由和面起至面团发达至活板（7cm高）时的时间。此时间若在92min以上，则表示酵母不良。

经改良后较为省事。在90min内，面团能增高原容积的60%为合格。

### (一) 实验材料

1. 菌种 500ml三角瓶盛100ml麦芽汁培养1周的酵母1瓶。
2. 培养基 面粉100g，蒸馏水55ml。
3. 器具 500ml量筒1只，大碗1只，长筒水浴，酒精灯。

### (二) 操作步骤

1. 面粉放入碗中，蒸馏水加入玻杯，均置于30℃培养箱内，水浴盛水，保温30℃。

2. 将培养的酵母上部清液倾去，加入蒸馏水和匀，即加入面粉内（记时间），和成团，压入量筒，记容积。加棉塞，置量筒于水浴中，保温30℃，每30min记容积一次，直到面团收缩为止，填入下表。

时间	和面开始 _h_min	和面终止 _h_min	保温发酵后					酵母 优劣
			0min	60min	90min	120min	150min	
面团 容积	入量筒后 _ml							
面团容积增加(%)								

### 〔实验6-25〕酵母忍耐酒精浓度的测定

酵母在糖液中发酵，到某一时期，就趋停止。其最大原因之一是由于酒精浓度增高所致。每一种酵母能忍耐的最高酒精浓度，是它在应用上的一个重要特性。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 曲汁琼脂培养的酿酒酵母菌。
2. 培养基 10度曲汁或麦芽汁50ml。
3. 器具 10mlV形发酵管5支，无菌2ml刻度吸管1支，10ml刻度吸管1支，酒精灯，接种环，95%（容量）酒精。

## (二) 操作步骤

1. 将标签贴于各酵管上, 标12、14、16、18、20等数字, 按下表每管加入曲汁量:

发酵管号	12	14	16	18	20
95%酒精(ml)	1.26	1.4	1.68	1.90	2.15
曲汁(ml)	8.74	8.60	8.32	8.10	7.85
培养液含酒精%(V/V)	12	14	16	18	20

2. 使曲汁聚集于封口的一端, 加棉塞, 58.84kPa, 20min消毒, 右手大拇指用酒精浸洗消毒待干后, 左手拔去12号管的棉塞且执好, 右拇指压管口, 倒和数次, 使酒精与曲汁和匀, 拇指移去, 再加棉塞。如上法混和其他管中液体。

3. 每发酵管接入酵母两接种环, 保温25℃, 一周后检查各管中气泡有无及多少, 填入下表。

管号	12	14	16	18	20
生成气泡					

注: 用“+”的个数表示气泡多少, “-”表示无气泡。

### 〔实验6-26〕酵母抵抗防腐剂能力的测定

有的酵母如一些粉状毕赤氏酵母、接合酵母、球拟酵母、醭酵母等需氧耐盐, 酵母能在酱油等发酵食品上生长, 形成一些白色斑点并扩大成皮膜。由于它们的生长使酿造食品的一些有效成分如糖分、氨基酸等减少, 使特有香味消失, 并产生霉味、酸臭、腐败味, 使之无法食用。为此可添加规定限度内的防腐剂以便预防。目前最常用的防腐剂是苯甲酸钠, 规定最高用量不超过0.1%(表6-2)。

防腐剂的抑制效能试验因菌种、培养基、环境条件而异, 所以测定酵母对防腐剂的耐忍能力时要把这些条件固定。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 粉状毕赤氏酵母、接合酵母、醭酵母及酱油白花等供试样品。

2. 培养基 生酱油。

3. 防腐剂 苯甲酸钠。

4. 器具 三角瓶、棉塞、量筒、天平。

(二) 操作步骤

1. 分装生酱油于三角瓶中，150ml的三角瓶装1000ml，可分装数个。

2. 每瓶装入苯甲酸钠若干，然后摇匀，加棉塞，一齐加热至70℃，20min冷却。

3. 每瓶接种25℃培养，每天观察是否生醭，以2周为限。

4. 结果

瓶号	苯甲酸钠加入量(%)	生醭日期(天): 毕赤氏酵母														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0															
2	0.05															
3	0.01															
4	0.5															

注：一个表只表示接入一种菌，还应作一对照，即不接任何菌种。

表 6-2 我国防腐剂使用卫生标准

名称	使用范围	最大使用量(g/kg)	备注
苯甲酸	酱油、醋、果汁类、果酱类、果子露、罐头	1	(1) 浓缩果汁不得超过2g/kg.
苯甲酸钠	葡萄酒、果子酒	0.8	(2) 苯甲酸和苯甲酸钠同时使用时，以苯甲酸计，不得超过最大使用量
	汽酒、汽水	0.2	
	果子汽水	0.4	
	低盐酱菜、面酱类、蜜饯类、山楂糕、果味露	0.5	

续表

名称	使用范围	最大使用量 (g/kg)	备注
山梨酸	酱泥、醋、果酱类	1	(1) 浓缩果汁不得超过 2g/kg
山梨酸钾	低盐酱菜、面酱类、蜜饯类、罐头、山楂糕、果味露	0.5	(2) 山梨酸及山梨酸钾同时使用时，以山梨酸计，不得超过最大使用量
	果汁类、果子露、葡萄酒、果酒	0.6	
	汽酒、汽水	0.2	
二氧化硫	葡萄酒	0.25	二氧化硫残留量不得超过 0.05 g/kg

### 〔实验6-27〕啤酒酵母凝絮力的测定

凝絮作用的遗传学和生物化学还未完全清楚，但“凝絮”一词在发酵过程中，显然包括酵母的两种不同的物理状态。

1. 酵母细胞聚集成为絮状物，而这种聚集体可能是由于：酵母出芽繁殖后，细胞不再分开而形成的；也可能是在发酵后期单个的酵母细胞结合成群体而成。

2. 发酵啤酒中的细胞沉淀，对于这些特性除了一种通用的测定方法外，其基本程序已用了许多年，并已公布了若干的派生方法。

#### 一、Gilliland法

通过在麦芽汁中发酵以后，观察酵母的悬浮和沉淀的状态来决定酵母细胞聚集体类型。

##### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母。

2. 培养基

(1) 加酒花的麦芽汁琼脂：在 100ml 10~12°加酒花的麦芽汁中加 2g 琼脂，加热融化，并在 121℃ 下灭菌 20min。

(2) 加酒花的麦芽汁：加过酒花的 10~12°麦芽汁，100℃ 灭菌 30min，连续 3 天，间歇灭菌。

3. 生理盐水，溶解 9g NaCl 于 1L 蒸馏水中，121℃ 灭菌 20min。

4. 器具：无菌培养皿、接种环、涂棒、培养箱。

##### (二) 操作步骤



### 酵母样的制备:

1. 用生理盐水稀释酵母样品后, 使浓度为每毫升  $10^6 \sim 10^7$  个酵母细胞。
2. 制备麦芽汁琼脂平板, 将10ml溶化的麦芽汁琼脂倒入培养皿, 使冷却并固定化。
3. 在琼脂平板上, 涂布一环酵母悬浮液后, 在25℃下培养3~7天。

### 发酵试验:

1. 准备50个瓶, 每瓶装有5ml无酒精的加酒花麦芽汁。
2. 从琼脂平板上取一个酵母菌落, 接种到每个瓶中, 并在25℃下培养3天。
3. 首先轻微地旋动培养液来观测每个瓶的现象, 如果出现固体沉淀的情况则倒出大部分, 只剩下0.5ml液体, 并振荡残留在液体中的沉淀。

### 结果的解释:

确定酵母是属于下列4类中的哪一种情况:

第一类: 在整个发酵过程中, 酵母完全呈分散状态。沉淀是紧密的, 并且将0.5ml发酵的麦芽汁中的沉淀振荡起来, 以后是完全均匀的, 没有任何颗粒。

第二类: 在发酵开始时候, 酵母完全呈分散状态, 但是接近后期则絮凝成为小而松散的一团。沉淀是紧实的, 当将0.5ml发酵麦芽汁中的沉淀振荡起来后, 明显呈颗粒状。这种颗粒的强度是可变的, 对某些酵母, 它几乎是看不见的, 而对另外一些酵母种就有很明显块状。

第三类: 这些酵母像第二类酵母, 在发酵开始的时候, 是完全分散的, 但是接近发酵的末期, 絮凝成块状。这些沉淀或者大片地沉到底部, 不再分散开, 或组成稠密的块状。这些圆块同样分开。

第四类: 发酵开始以后, 这些酵母絮凝很快, 这是因为重新生成的酵母不再分开的缘故, 其沉淀是由松散的小片或酵母团组成, 当使瓶中的液体旋动时, 沉淀也随之而动。

## 二、Helm法

在pH4.5的硫酸钙缓冲液中, 观察酵母样品的沉淀作用。

### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母,
2. 试剂

(1) 硫酸钙溶液：在1 L蒸馏水中溶解5.10 g 硫酸钙 ( $\text{CaSO}_4$ )。

(2) 硫酸钙缓冲液：在1 L蒸馏水中溶解5.10 g 硫酸钙，6.80 g 醋酸钠 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )，4.05 g 醋酸，溶液pH为4.5。

3. 器具 50ml离心管，15ml刻度离心管，离心机，天平，20℃水浴锅。

## (二) 操作步骤

酵母样品的制备：

1. 在30ml硫酸钙溶液中，悬浮5~6 g 酵母样品。
2. 离心，然后轻轻倒去上清液。
3. 用30ml硫酸钙再洗一次。
4. 离心。

沉淀体积的测定，进行下列程序，重复3次：

1. 量取10ml硫酸钙缓冲液注入15ml离心管中。
2. 加1 g 洗过的酵母，并使悬浮。
3. 在20℃水浴中放置20min。
4. 振荡使酵母悬浮。
5. 10min以后测量沉淀酵母的量（体积）。

结果的解释：

除了测定沉淀的体积外，还应观察沉淀的两种特殊类型。

类型一：接近液体的上部，悬浮物快速分成两层。这个界面迅速下降，在10min以后测量沉降的区界，这是典型的絮凝酵母。

类型二：在接近试管底部非常慢地形成界面，在10min以后测量上升的区界，这是典型的非絮凝酵母。

### 〔实验6-28〕啤酒酵母产生双乙酰的测定

啤酒中双乙酰含量的高低直接影响啤酒的质量，是啤酒酵母选育的重要指标。双乙酰与邻苯二胺反应形成2,3-二甲基噻嗪啉，经比色可测知双乙酰的含量。啤酒中双乙酰的含量应低于0.15mg/L。

#### (一) 实验材料

1. 蒸馏装置（图6-4）。
2. 紫外分光光度计。
3. 4mol/L HCl。
4. 10g/L邻苯二胺溶液 将250.0mg邻苯二胺溶于4mol/LHCl中，

定量至25.00ml, 贮于暗处。

5. 聚醚消泡剂。

6. 双乙酰标准溶液 称取500.0mg双乙酰溶于1000ml蒸馏水中, 4℃存放。临用前吸取5.00ml稀释成1000ml, 此液浓度为0.25mg/ml。

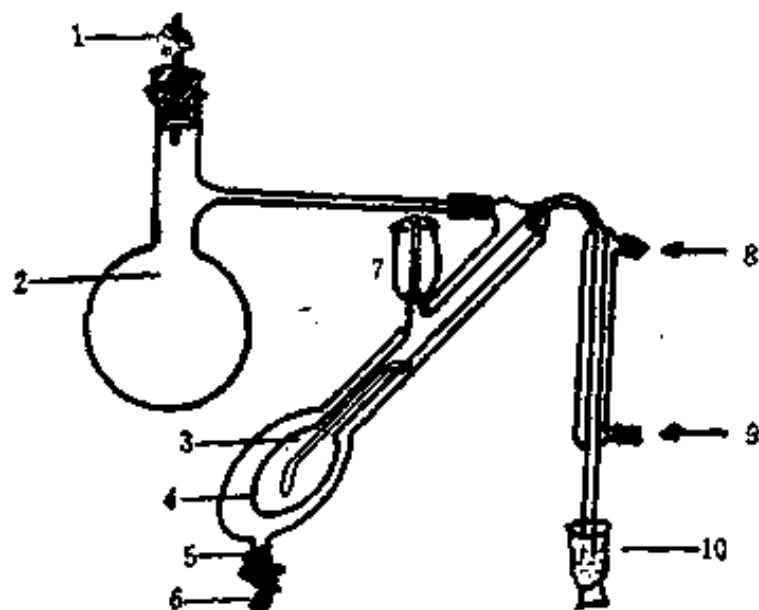


图 6-4 测定双乙酰的蒸馏装置

1—簧夹 2—蒸汽发生瓶(2L) 3—蒸馏管 4—蒸汽室  
5—簧夹 6—废液排放管 7—进样口 8—冷却水出口  
9—冷却水入口 10—量筒(25ml)

## (二) 操作步骤

### 1. 蒸馏出双乙酰

(1) 按图示装好蒸馏装置, 加热蒸汽发生瓶至沸腾。

(2) 量筒内装有2.5ml水的25ml量筒于冷凝器下端, 使馏出口尖端正好浸没在水面之下。

(3) 加2~4滴消泡剂于100ml量筒中, 再注入100ml未经除气的酒样, 迅速加入已先加热的蒸馏器内进行蒸馏, 直到馏出液接近25ml时取下量筒, 用水补足到25.0ml。

### 2. 反应及测定

(1) 取10.00ml馏出液于两个比色管内, 管1加0.50ml邻苯二胺溶液, 管2不加, 充分混匀。

(2) 暗处放置20~30min。

(3) 管1加2.00ml 4mol/L HCl, 管2加2.50ml 4mol/L HCl, 混匀。

(4) 于335nm处用2cm比色池，以空白作对照，测定样品的吸光度。

3. 计算：

$$\text{双乙酰}(\text{mg/L}) = \text{吸光度} \times 1.2 - 0.01$$

为精确起见，可以标准浓度的双乙酰按上述方法同时测定，以对测定结果进行校正。

## 第六节 发酵制品的试验

### 〔实验6-29〕细菌液化型淀粉酶的发酵及活力测定

液化型淀粉酶俗称 $\alpha$ -淀粉酶。这是一种单成分酶，即除单纯的酶蛋白外，没有辅酶的成分。 $\alpha$ -淀粉酶能任意切开淀粉分子 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键，将长链分裂成为短链的糊精，使淀粉粘度迅速降解，失去对碘的呈色反应。水解的终产物是麦芽糖和少量葡萄糖。它不能水解支链淀粉的分点 $\alpha$ -1,6-糖苷键，也不能切开靠近分枝处的 $\alpha$ -1,4-键，但可以越过 $\alpha$ -1,6-键而切开内部 $\alpha$ -1,4-键。除支链淀粉的水解终产物麦芽糖和少量葡萄糖外，还留下带有1,6-糖苷键的寡糖，由于生成的糖是 $\alpha$ -型的，所以叫 $\alpha$ -淀粉酶。

(一) 实验材料

1. 菌种 枯草芽孢杆菌(如Bf-7658)。

2. 培养基 豆饼粉4%，玉米粉8%，磷酸氢二钠0.8%，硫酸铵0.4%，无水氯化钙0.2%，500ml三角瓶装50ml，103.4kPa灭菌30min。

3. 器具 培养箱、摇瓶架、接种针、灭菌锅、酒精灯、天平等。

(二) 操作步骤

1. 接种入三角瓶培养基，37℃摇瓶发酵。

2. 发酵49h后进行酶活力测定。

附：液化型淀粉酶活力的测定方法(部级标准)

(一) 原理

液化型淀粉酶(即 $\alpha$ -1,4-糊精酶，俗称 $\alpha$ -淀粉酶)能将淀粉分子键的 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键任意切断成长短不一的短链糊精，以及少量麦芽糖和葡萄糖。而使淀粉对碘呈蓝紫色特异反应逐渐消失，以该颜色消失的速度计算酶的活力。

(二) 试剂

1. 原碘液 称取碘( $I_2$ ) 11g，碘化钾(KI) 22g，先用少量蒸馏水使

碘完全溶解后定容至500ml, 贮于棕色瓶内。

2. 稀碘液 取原碘液2ml, 加入KI 20g, 用蒸馏水溶解定容至550ml, 贮于棕色瓶内。

3. 2%可溶性淀粉 精确称取 2.000g 可溶性淀粉 (以绝干计), 然后用少量蒸馏水调匀, 徐徐倾于煮沸的蒸馏水中, 加热煮沸至透明为止, 冷却定容至100ml, 此溶液需当天配制。

4. 0.02mol/L pH 6.0磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 45.2g 和柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 8.07g, 用蒸馏水溶解定容至1000ml, 配好后应以酸度计或精密试纸校正pH。

5. 标准终点色溶液

A液: 精确称取氯化钴( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 40.2439g 和重铬酸钾( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 0.4878g, 以蒸馏水溶解定容至500ml。

B液: 精确称取铬黑T ( $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}$ ) 10mg, 以蒸馏水溶解定容至100ml。

使用时取A液40ml与B液50ml混合, 此混合液宜冰箱保存, 使用15天后需要重新配制。

### (三) 操作步骤

1. 待测酶液的制备 精确称取酶粉1.000~2.000g, 先用少量40℃的0.02mol/L pH6.0磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液溶解, 并用玻璃棒捣研, 将上层液小心倒入容量瓶中, 沉渣部分再加入少量上述缓冲液, 如此反复捣研3~4次, 最后全部移入容量瓶中, 用缓冲液定容至刻度, 摇匀, 通过4层纱布过滤, 供测定用。

2. 测定 取2ml标准终点色溶液滴于白磁板空穴内, 作为比较颜色的标准。

取20ml 2%可溶性淀粉和5ml pH6.0磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 放于20×200mm大试管中, 在60℃恒温水浴中预热4~5min, 然后加入预先稀释好的酶液0.5ml, 立即记录时间, 充分摇匀, 定时用滴管取出反应液约0.5ml, 滴于预先充满比色稀碘液 (约1.5ml) 的磁板空穴内, 当穴内颜色反应由紫色逐渐变为红棕色, 与标准终点色相同时, 即为反应终点, 并记录时间*t*(min)。

### (四) 计算

1g酶粉或1ml酶液于90℃, pH6.0的条件下, 用1h液化可溶性淀粉的

克数来表示(g可溶性淀粉/g(或ml)·h)。

$$\text{酶活力单位} = \left( \frac{60}{t} \times 20 \times 2\% \times n \right) \div 0.5$$

式中 60——60min

20——可溶性淀粉的毫升数

$n$ ——稀释倍数

$t$ ——测定记录时间(min)

2%——淀粉浓度

0.5——测定时的用酶量

#### (五) 说明

1. 酶反应全部时间控制在2~2.5min之间。
2. 为统一起见，可溶性淀粉使用浙江菱湖淀粉厂生产的化学纯试剂配制，如暂时不能购到，需要使用其他厂生产的可溶性淀粉时，必须做对照试验。
3. 测定时照明采用40W日光灯，灯与白磁板的间距以60cm为宜。

#### (实验6-30) 曲霉的葡萄糖淀粉酶生成和活力测定

葡萄糖淀粉酶又称 $\gamma$ -淀粉酶，作用于淀粉时，从非还原端开始逐次切下一个葡萄糖分子，它不仅能分解 $\alpha$ -1,4-糖苷键，而且能分解 $\alpha$ -1,3-糖苷键，但速度慢得多。据此，葡萄糖淀粉酶作用于直链淀粉和支链淀粉时，能将它们全部分解为葡萄糖。葡萄糖淀粉酶的最适pH值范围是4~5，在24h作用内最适宜温度范围是50~60℃。这类酶主要由根霉、黑曲霉等产生。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 黑曲霉(如AS. 3.4309等)。
2. 培养基 玉米粉10%，豆饼粉4%，麸皮1%。每个500ml三角瓶的装液量为25~50ml，103.4kPa 灭菌30min。
3. 器具 摇床，培养箱，三角瓶，灭菌锅，接种针，酒精等。

#### (二) 操作步骤

1. 接种入三角瓶中培养基内，30℃左右摇瓶培养。
2. 发酵4~5天，取出测定糖化酶活力。

附：糖化型淀粉酶活力的测定方法(部颁标准)

#### (一) 原理

糖化型淀粉酶（即淀粉 $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷酶）有催化淀粉水解的作用，从淀粉分子非还原性末端开始，分解 $\alpha$ -1,4-糖苷键生成葡萄糖，反应生成的葡萄糖用次碘酸钾法定量测定，以表示糖化性淀粉酶的活力。

## （二）试剂

1. 0.1mol/L pH4.6醋酸钠缓冲液 称取醋酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 6.7g 和冰醋酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2.6ml，用蒸馏水溶解，定容至1000ml。上述缓冲液应以酸度计或精密试纸校正pH。

### 2. 0.1mol/L硫代硫酸钠溶液

（1）配制：称取硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 24.82g 和硫酸钠0.2g 溶于煮沸后冷却的蒸馏水中，定容至1000ml，即得0.1mol/L硫代硫酸钠液。贮存于棕色瓶中密封保存，配制后应放置一星期标定使用。0.05mol/L溶液则用蒸馏水稀释制得。

（2）标定：取在120℃下干燥至恒重的标准重铬酸钾0.25g，精密称量。置碘量瓶中，加水50ml使溶解，加碘化钾2g，轻轻振摇使溶解，加1mol/L硫酸溶液40ml摇匀，密塞。在暗处放置10min后，用蒸馏水250ml稀释，用本液滴定至近终点时，加淀粉指示液3ml，继续滴定至蓝色消失而显亮绿色，并将滴定的结果用空白试验校正。每1ml的0.1mol/L硫代硫酸钠液相当于4.903mg的重铬酸钾。根据本液的消耗量与重铬酸钾的用量，计算硫代硫酸钠的当量浓度。本溶液需每月标定一次。

3. 0.1mol/L碘液 称取碘化钾(KI)36g，溶解在100ml蒸馏水中，再加入碘( $\text{I}_2$ )12.98g 溶解，定容至1000ml，贮存于棕色瓶中。

用标准的0.05mol/L硫代硫酸钠溶液标定碘液。

吸取10ml待标定的碘液放入250ml碘量瓶中，以0.05mol/L硫代硫酸钠滴定至淡黄色时，加入2%淀粉指示剂1~2滴，继续滴定至无色为终点。

$$\text{碘当量} = \frac{c_1 \times V_1}{V}$$

式中  $c_1$ ——硫代硫酸钠的浓度(mol/L)

$V_1$ ——消耗硫代硫酸钠的毫升数

$V$ ——碘液毫升数

4. 0.1mol/L氢氧化钠溶液 称取4g 氢氧化钠(NaOH) 加蒸馏水溶解，定容至1000ml。

5. 1mol/L硫酸溶液 量取浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ 相对密度1.84)5.6ml，慢慢

加入于80 ml蒸馏水中，冷却后定容至100 ml，摇匀。

6. 20%氢氧化钠溶液 称取20 g氢氧化钠，溶解定容至100 ml。

7. 2%可溶性淀粉 称取可溶性淀粉2 g，然后用少量蒸馏水调匀，徐徐倾入已沸的蒸馏水中，煮沸至透明，冷却定容至100 ml，此溶液需当天配制。

### (三) 操作方法

1. 待测酶液的制备 精确称取酶粉2.000 g，倒入50 ml烧杯中，用少量pH4.6的醋酸-醋酸钠缓冲液溶解，并用玻璃棒捣开，将上层液小心倾入适当容量的瓶中，残渣再加入少量缓冲液，如此反复捣研3~4次，最后全部移入容量瓶中。用缓冲液定容至刻度，摇匀，用四层纱布过滤供测定。

2. 测定 于甲、乙两支比色管中(50 ml)，分别加入20%可溶性淀粉液25 ml及0.1 mol/L pH4.6的醋酸-醋酸钠缓冲液5 ml，摇匀，40℃±0.2℃的恒温水浴中预热(5~10 min)。在甲管中加入制备液2 ml(酶活总量约100~170单位)，立即记时间，摇匀。在此温度下准确反应1 h后，立即各加20% NaOH溶液0.2 ml，摇匀，将两管取出迅速用水冷却，并于乙管中补加酶制备液2 ml。

取上述反应液5 ml放入碘量瓶中，准确加入0.1 mol/L碘液10 ml，再加入0.1 mol/L氢氧化钠15 ml(边摇晃)。暗处放置15 min，加入1 mol/L硫酸2 ml，用0.05 mol/L硫代硫酸钠滴定至无色为终点。

### (四) 计算

按1 g酶粉或1 ml酶液，于40℃、pH4.6的条件下，1 h分解可溶性淀粉产生1 mg葡萄糖的酶量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力单位} = (A - B) N \times 90.05 \times \frac{1}{2} \times \frac{32.2}{5} \times n$$

式中 A——空白所消耗硫代硫酸钠毫升数

B——样品所消耗硫代硫酸钠毫升数

N——硫代硫酸钠当量浓度

90.05——1 ml 1 mol/L硫代硫酸钠所相当的葡萄糖毫克数

1/2——折算1 ml酶液的量

32.2——反应液总体积毫升数

5——吸取反应液毫升数

n——稀释系数



### (五) 注意事项

1. 酶液制备时, 酶液浓度最好控制在消耗 $0.05\text{mol/L}$ 硫代硫酸钠(空白一样品)的差数为 $3\sim 6\text{ml}$ 左右(以每毫升约 $50\sim 90$ 单位为宜)。

2. 为统一起见, 可溶性淀粉使用浙江菱湖淀粉厂生产的化学纯试剂配制, 如暂不能购制, 而需使用其他厂生产的可溶性淀粉时, 必须做对照试验。

### (实验6-31)米曲霉的蛋白酶生成及活力测定

米曲霉产生的酶系有蛋白酶、淀粉酶、肽酶、谷氨酰胺酶、纤维分解酶和其他酶类。它们在酱油酿制中都有不同的作用。但蛋白酶又分碱性、中性和酸性。它们的最适 $\text{pH}$ 值分别为 $9.5$ 、 $7.2$ 和 $3.5$ , 这3种蛋白酶具有特殊的作用。

从酱油酿造的角度考虑, 若筛选菌种仅考虑蛋白酶单一活力的高低来决定取舍是不全面的, 特别对高质量的酱油酿造更应从多方面着眼。

蛋白酶的活力测定方法有两种, 但以福林法使用最广。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 米曲霉(AS 3.951或 AS 3.4382等)。
2. 培养基 麸皮、豆粕粉、脱脂米糠粉以 $2:3:7$ 的比例混合。混合料总浓度为 $3\%$ , 另加豆粕水解液 $5\%$ , 三角瓶装液量 $10\sim 15\%$ ,  $151.7\text{kPa}$ 灭菌 $40\text{min}$ 。豆粕水解液制法: 豆粕 $100\text{g}$ , 水 $600\text{ml}$ ,  $\text{CaCO}_3$   $6\text{g}$ , 灭菌:  $103.4\text{kPa}$  水解 $1\text{h}$ , 使用时用 $\text{HCl}$ 调至 $\text{pH}7.2$ 。
3. 器具 摇瓶架, 三角瓶, 天平, 接种针, 酒精灯, 培养箱, 灭菌锅。

#### (二) 操作步骤

1. 接种入混和物培养基,  $35\pm 1^\circ\text{C}$ 摇瓶发酵。
2. 发酵 $40\text{h}$ 左右, 进行蛋白酶活力的测定。

### 附: 蛋白酶活力的测定方法(每瓶标准)

#### (一) 原理

根据福林试剂(磷钼酸与磷钨酸混合物), 在碱性情况下极稳定, 可被酚类化合物还原而呈蓝色反应(钼蓝和钨蓝的混合物)。由于蛋白质分子中含有酚基的氨基酸(如酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸等), 它使蛋白质或其水解产物也呈这个反应, 于是就可利用这个原理来测定蛋白酶活力的强弱, 即以酪蛋白为作用底物, 在一定 $\text{pH}$ 与温度下, 同酶液反应, 经一定时间后, 加入三氯醋酸, 以终止酶反应, 并使残余的酪蛋白质沉淀, 同水解产物分开。

经过滤后取滤液（即含蛋白水解产物的三氯醋酸液），用碳酸钠碱化，再加入福林试剂使之发色，用分光光度计或光电比色计测定。蓝色反应的强弱，同三氯醋酸中蛋白水解产物的多少成正比，而水解产物的量又是同酶活力成正比例关系。因此，根据蓝色反应的强弱就可推测蛋白酶的活力。

## （二）试剂

（1）福林试剂：于2000ml磨口回流装置内，加入钨酸钠（ $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）100g，钼酸钠（ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）25g，水700ml，85%磷酸50ml，浓盐酸1000ml，文火回流10h，加入硫酸锂（ $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ）150g，蒸馏水50ml，混匀取去冷凝器，加入几滴液体溴，再煮沸15min，以驱逐残溴及除去颜色，溶液应呈黄色而非绿色。若溶液仍有绿色，需再加滴溴液，再煮沸除去之。冷却后，定容至1000ml。细菌漏斗4~5号过滤，置于棕色瓶中保存。此溶液使用时加2倍蒸馏水稀释，即成稀释的福林试剂。

（2）0.4mol/L三氯醋酸（TCA）溶液：称取三氯醋酸65.4g，定容至1000ml。

（3）0.4mol/L碳酸钠溶液：称取无水碳酸钠（ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ）42.4g，定容至1000ml。

（4）pH7.2磷酸缓冲液：称取磷酸二氢钠（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）31.2g，定容至1000ml，成0.2mol/L溶液（A液）。

称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）71.63g，定容至1000ml，成0.2mol/L溶液（B液）。取A液28ml和B液7.2ml，再用蒸馏水稀释1倍，即成0.1mol/L pH7.2的磷酸缓冲液。

（5）2%酪蛋白溶液：称取干酪素2g，加入0.1mol/L氢氧化钠20ml，在水浴中加热使溶解（必要时用小火加热煮沸），然后用pH7.2磷酸缓冲液定容至1000ml即成。配制后应及时使用或放入冰箱内保存。否则极易繁殖细菌，引起变质。

（6）100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 酪氨酸溶液：精确称取在105 $^\circ\text{C}$ 烘箱中烘至恒重的酪氨酸0.1g，逐步加入0.1mol/L盐酸（HCl）使溶解，加蒸馏水定容至100ml，其浓度为1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。再吸取此液10ml，以蒸馏水定容至100ml，即配成100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的酪氨酸溶液。此溶液配成后也应及时使用或放入冰箱内保存，以免繁殖细菌而变质。

## （三）操作步骤

### 1. 标准曲线的绘制

(1) 按表配制各种不同浓度的酪氨酸溶液。

试剂(ml)	管 号					
	1	2	3	4	5	6
蒸 馏 水	10	8	6	4	2	0
100 $\mu$ g/ml酪氨酸	0	2	4	6	8	10
酪氨酸最终浓度( $\mu$ g/ml)	0	20	40	60	80	100

(2) 测定步骤：另取6支试管按上表编号分别吸取不同浓度的酪氨酸1ml，各加入0.4mol/L碳酸钠5ml，再加入已稀释的福林试剂1ml（即福林试剂1ml，加蒸馏水2ml），摇匀置于水浴锅中，40℃保温发色20min。在531型光电比色计上分别测定消光度( $E$ )（滤色片用680nm），或用72型分光光度计进行测定（波长660nm）。一般测3次，取平均值。将2~6号管所测得的消光度( $E$ )减去1号管（蒸馏水空白试验）所测得的消光度即为实际 $E$ 数。

为了清楚起见，再列出表格，以实际 $E$ 值为纵座标，酪氨酸的浓度为横座标，绘制成标准曲线（或可求出每度 $E$ 所相当的酪氨酸量 $K$ ）。

## 2. 样品稀释液的制备

(1) 测定酶制剂：称取酶粉0.1g，加入pH7.2的磷酸缓冲液定容至100ml，再稀释至500ml，即成5000倍的酶粉稀释液。

试剂(ml)	管 号					
	1	2	3	4	5	6
按上表制备不同浓度酪氨酸	1	1	1	1	1	1
0.4mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3$	5	5	5	5	5	5
福林试剂	1	1	1	1	1	1
$E$ 值	1					
	2					
	3					
	平 均					
实际 $E$ 值						

(2) 测定成曲酶：称取成曲5g，充分研细后，加自来水100ml，在40℃水浴内间断搅拌1h，过滤，滤液用0.1mol/L pH7.2磷酸缓冲液稀释到一定倍数。

(3) 样品测定：取 $\phi 15 \times 100$ mm 试管3支，编号1、2、3（做2只也可），每管内加入样品稀释液1ml，置于40℃水浴中预热2min，再各加入经同样预热的酪蛋白1ml，精确保温10min，时间到后，各管立即加入0.4mol/L 三氯醋酸2ml，以终止反应。继续置于水浴中保温20min，使残余蛋白质沉淀后离心分离或过滤。然后另取 $\phi 15 \times 150$ mm 试管3支，编号为1、2、3，每管内加入滤液1ml，再加0.4mol/L 碳酸钠5ml，已稀释的福林试剂1ml，摇匀保温发色20min后进行消光度( $E$ )测定。

空白试验也取试管3支，编号①、②、③，测定方法同上，唯在加酪蛋白之前先加0.4mol/L 三氯醋酸2ml，使酶失活，再加入酪蛋白。为了清楚起见，参见下表：

试剂 (ml)	管 号					
	1	2	3	①	②	③
预热酶液	1	1	1	1	1	1
0.4mol/L TCA	0	0	0	2	2	2
预热2%酪蛋白	1	1	1	0	0	0
40℃下作用10min (必须精确)						
0.4mol/L TCA	2	2	2	0	0	0
预热2%酪蛋白	0	0	0	1	1	1
40℃下作用20min，离心或过滤，取滤液作下列试验						
滤 液	1	1	1	1	1	1
0.4mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3$	5	5	5	5	5	5
福 林 试 剂	1	1	1	1	1	1
$E$ 值						
平均 $E$ 值						
净 $E$ 值 *						

\* 净  $E$  值 = 样品的平均消光度( $E$ ) - 空白的平均消光度( $E$ )。

3. 计算 在40℃下每1min水解干酪素产生 1 $\mu\text{g}$  酪氨酸，定义为1个

蛋白酶活力单位。

$$\text{蛋白酶活力单位} = A/10 \times 4 \times N$$

式中  $A$ ——由样品测得 $E$ 值，查标准曲线得相当的酪氨酸微克数

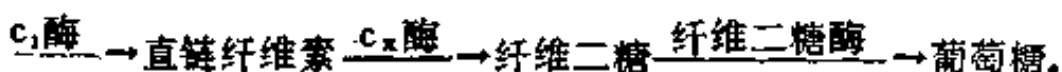
$4$ ——4ml反应液取出1ml测定(即4倍)

$N$ ——酶液稀释的倍数

10——反应10min。

### (实验6-32) 纤维素酶的发酵及其活力测定

纤维素酶是水解纤维素生成纤维二糖及葡萄糖的一类酶的总称。它包括 $c_1$ 酶、 $c_x$ 酶及纤维二糖酶( $\beta$ -葡萄糖苷酶)。作用方式：天然纤维素



其中 $c_1$ 酶是使天然纤维素晶体部分链，起一个分离作用和水合作用，从而使天然纤维素裂解成为直链纤维素。 $c_x$ 酶不能水解天然纤维素，而能水解直链纤维素的 $\beta$ -1, 4-葡萄糖苷酶键，生成纤维二糖，纤维二糖再经过纤维二糖酶水解成为葡萄糖。

本法以滤纸和羧甲基纤维素钠盐(CMC)作为底物(基物)，加入一定量的酶液，在一定的条件下起作用，然后观察滤纸的溃崩情况来判断 $c_1$ 酶活力的大小。同时，测定CMC水解液中还原糖的含量用来表示 $c_x$ 酶活力的大小。

用羧甲基纤维素钠盐作底物，经纤维素酶水解后生成还原糖，然后用DNS法测定还原糖的含量，从还原糖的数量来求得酶活力的大小。

纤维素分子是由 $\beta$ -葡萄糖从1, 4键相连的长链，由于纤维素的分子间氢键数目极其多，因此不溶于水。在纤维素分子中 $\beta$ -葡萄糖上第2、3及5个碳原子都有一个游离的羧基，如羧基上的氢被羧甲基取代，由于羧基有着很强的亲水性，因此，CMC就能溶于水而成为胶状溶液。

羧甲基纤维素无论在结构上或是在性质上都很大程度地不同于纤维素。因为它溶于水，所以，非常容易被纤维素酶水解，在相同的条件下，同一纤维素酶水解CMC所产生的还原糖远大于水解纤维素所产生的还原糖，因此CMC酶活力只能代表 $c_x$ 酶的活力，而且它的数值总是比较高的，所以CMC的酶活力只能供作参考。

测定还原糖的方法很多，只是采用DNS(3, 5-二硝基水杨酸)法，比较简便。3, 5-二硝基水杨酸是一种氧化剂，能与还原糖作用，使硝基还原成



硫酸钙和0.5%磷酸钙的混合溶液), 103.4kPa灭菌1h。

### 3. 试剂

(1) 二硝基水杨酸试剂: 称取酒石酸钾钠91g溶于500ml的水中,于溶液中依次加入3,5-二硝基水杨酸3.15g, NaOH20g, 加热搅拌,使之溶解,再加入重蒸酚2.5g, 无水亚硫酸钠2.5g, 搅拌使之溶解,冷却后定容至1L, 贮于棕色瓶中, 放置一周后使用。

(2) 柠檬酸缓冲液: pH4.6。

甲液: 0.1mol/L柠檬酸缓冲液1000ml中含19.21g柠檬酸。

乙液: 0.2mol/L磷酸氢二钠溶液1000ml中含53.63g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

取26.7ml甲液, 23.3ml乙液混合后加水稀释到1000ml。

(3) 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液: pH5.0。

甲液: 0.2mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液。配制见测定法(二)。

乙液: 0.1mol/L柠檬酸溶液。配制见测定法(二)。

取甲液25.7ml加乙液24.3ml, 并加水稀释至100ml。

(4) 羧甲基纤维素钠盐缓冲液: 称取CMC 1g, 加入100ml水, 在水浴上加热使溶解, 再加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液20ml, 水40ml混匀。

(5) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准葡萄糖溶液: 称取在105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥2h的分析葡萄糖0.5g, 加水溶解, 稀释定容至1L。

(6) 新华滤纸1\*。

4. 仪器 721型分光光度计。

5. 标准曲线的绘制 取大试管7支, 编号, 按表一用吸管准确吸取标准葡萄糖500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与蒸馏水混匀, 即得各种不同浓度的标准葡萄糖液。

另取试管7支, 编号, 用吸管分别吸取上述试管各种浓度的标准葡萄糖溶液, 对号加入各试管(0\*管内加2.5ml蒸馏水), 然后于各试管中加入DNS试剂2.5ml, 摇匀, 置于沸水中煮沸5min, 取出置于冷水浴中冷却, 在721型分光光度计(或58型光电比色计)上比色。选用520nm波长及0.5cm厚的比色杯, 以0\*管内的溶液作比较, 测各管内的光密度(OD)值, 填入表, 以2.5ml标准葡萄糖液中所含的葡萄糖的微克数为横坐标, 以OD值为纵坐标, 作出葡萄糖的标准曲线(见表)。

### 葡萄糖标准曲线的绘制

管号	2.5ml标准葡萄糖液中所含葡萄糖量( $\mu\text{g}$ )	OD值
1*	100	
2*	200	
3*	300	
4*	400	
5*	500	
6*	600	

### 标准葡萄糖液的制备

管号	制备标准葡萄糖溶液的浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	加500 $\mu\text{g/ml}$ 标准葡萄糖液(ml)	加入蒸馏水量(ml)
0*(对照)	0	0	10.0
1*	40	0.8	9.2
2*	80	1.6	8.4
3*	120	2.4	7.6
4*	160	3.2	6.8
5*	200	4.0	6.0
6*	240	4.8	5.2

### (二) 纤维素酶活力的测定方法

1. 酶液的制备 取纤维素酶曲(干重)加10倍水, 搅拌, 于40℃水浴中保温45min, 用脱脂棉过滤入离心管中, 以3000r/min离心5min, 取上层清液备用。

2. 滤纸崩溃的测定 取15×150mm试管1支, 加入缓冲液1.0ml, 酶液(即离心后的上清液) 4ml及1×3cm新华滤纸一张, 摇匀, 使滤纸全部浸入溶液中。然后将试管放入40℃恒温水中保温2h, 取出后观察滤纸崩溃情况(将手指按住管口, 把试管倒一次), 结果以一、±、+、++、+++表示。

3. CMC酶活力的测定 酶液的稀释, 取大试管1支, 用吸管吸取离心后的酶液1ml, 加水24ml, 摇匀(稀释倍数应根据酶活力大小来决定, 这里稀释25倍)。

还原糖的测定: 取试管1支, 加入稀释酶液0.5ml, CMC缓冲液2.0ml,



混匀，入40℃恒温水浴中糖化0.5h，取出后加入DNS试剂2.5ml。另外备一只空白管，于其中加入蒸馏水2.5ml，DNS试剂2.5ml，将两只试管同时放入沸水浴中煮沸5min，取出于冷水浴中冷却至室温。在721型分光光度计上比色，选520nm 0.5cm厚的比色杯，测出样品液中的OD值，查阅标准曲线后，求出溶液中葡萄糖的含量。

计算：

在pH5.0、40℃下，每1g纤维素酶曲在1min内能水解CMC，生成1μg的葡萄糖，称作一个纤维素酶活力（CMC酶活）单位。

$$\text{CMC酶活单位} = \frac{10 \times 25 \times G}{0.5 \times 30} \quad (\text{葡萄糖} \mu\text{g}/(\text{g曲} \cdot \text{min} \cdot 40^\circ\text{C}))$$

式中 G——样品溶液中葡萄糖的含量（μg）

10——固体曲稀释倍数

25——酶液稀释倍数

0.5——吸取酶的数量

30——糖化半小时，换算为min。

### （三）纤维素酶的获得

三角瓶培养基灭菌后接入斜面孢子，于29~30℃下培养72h，若制成的纤维酶曲不马上使用，为防止酶的失活，应尽快低温干燥，然后装入瓶中备用。

### 〔实验6-33〕乳酸发酵及测定

乳酸可用乳酸菌发酵产生，也可用根霉进行发酵，但以乳酸菌为主。

#### （一）实验材料

1. 菌种 德氏乳酸杆菌。
2. 培养基 葡萄糖5%，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%，蛋白胨0.5%，NaCl 0.01%，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%。将上述培养液装入300ml的三角瓶中，58.84kPa灭菌15min，另取CaCO<sub>3</sub> 160℃干热灭菌2h备用。
3. 器具 接种环，酒精灯，培养箱。

#### （二）操作步骤

1. 接种于三角瓶培养液中，43~45℃静止培养，为不使发酵液过酸使菌种死亡，发酵24h后即加入CaCO<sub>3</sub> 3g。
2. 接种24h后，每6~8h取样分析，测定残糖，发酵6~8天结束。

#### 附：乳酸的比色测定法

当乳酸稀释成稀溶液时，在浓硫酸存在的条件下，加热后可变成乙醛，乙醛与羟基联苯作用所呈之色可进行比色定量测定。

#### (一) 试剂

1. 40%硫酸铜液 将4g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于水中，并配成100ml。
2. 羟基联苯( $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}$ ) 将1g羟基联苯溶于100ml的0.08 mol/L NaOH中，贮存于褐色试剂瓶中。
3. 乳酸标准液 将280mg纯乳酸锂溶于水中，配成250ml，使每毫升溶液中含有相当于1mg的乳酸，置冰箱中。在作标准曲线时可将该溶液稀释10倍，使乳酸含量为100 $\mu\text{g}$ ，再各取1、3、5ml稀释至100ml，这样溶液中所含乳酸量分别为1、3、5 $\mu\text{g}$ 。每1000mg乳酸相当于106.6mg乳酸锂。
4. 浓硫酸溶液 浓硫酸 (C.P.)。

#### (二) 操作步骤

1. 于比色管中加入1ml样品液 (约含1~10 $\mu\text{g}$ 乳酸)，一滴硫酸铜液，然后加入6ml浓硫酸。由于浓硫酸遇水发热，放置5min，让其冷至20℃以下。
2. 于上液中滴加1滴(0.05ml)羟基联苯溶液于该管中，混合均匀后，在温室下放置6~8h或过夜。
3. 于570nm波长处比色，测定其消化率。同时以乳酸锂作标准曲线。由此查得样品中的乳酸含量。至于葡萄糖所引起的误差，大约每毫克葡萄糖所呈之色的相当于0.02mg乳酸的量。

#### (实验6-34) 乳酸菌饮料

乳酸菌饮料是一种以脱脂乳为原料，接种乳酸菌进行发酵，使其大量生酸，再加入多量糖制成浓饮料。饮用时可进一步稀释。该类饮料名称繁多，营养丰富，是一种值得开发的饮料。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 乳酸菌。
2. 原料 脱脂乳粉，砂糖，香料，空瓶，瓶盖。
3. 器具 发酵瓶 (5L三角瓶)，压盖机，匀质器，培养箱。

#### (二) 操作步骤

1. 流程 原料→溶解→灭菌→冷却→添加菌种→发酵→匀质处理→补充糖、酸→装瓶→压盖→灭菌→冷却→成品。
2. 原料乳的调制 水1L添加脱脂乳100~110g，充分混合，于80℃灭

菌10min, 冷却。

3. 添加乳酸菌 1L发酵原液, 添加50ml乳酸菌液, 添加时保持温度40℃。

4. 发酵 放在40~45℃的发酵室中发酵, 约24~48h, 生酸量达2.2~2.6%左右。

5. 砂糖添加及匀质处理 此时发酵液呈凝冻状, 匀质后加入1L发酵原液, 加入等量砂糖, 搅拌均匀。

6. 添加香料 加温至90℃后冷却, 添加总容量0.1%的香精, 后装瓶。

7. 灭菌, 冷却 压盖后于80℃灭菌10min后冷却, 得成品。

8. 成品稀释 5倍即可饮用, 也可稀释后再匀质, 然后饮用。

#### 〔实验6-35〕葡萄酒饮料

葡萄酒品种繁多, 一般按颜色, 糖分多少, 有没有添加白兰地或酒精, 含不含CO<sub>2</sub>或酒的产地来分类。

红葡萄酒是用带色果皮的葡萄制成, 含有果皮或果肉中的有色物质, 酒色深红、鲜红或红宝石色, 干红葡萄酒含酒精9~13%。

白葡萄酒是用白葡萄或红葡萄的果汁制成, 色泽淡黄或金黄色, 酒精一般为9~13%。

葡萄酒发酵可以采用天然发酵和纯种发酵两种方法。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 葡萄酒酵母。
2. 白葡萄酒用一般糖度的白葡萄, 红葡萄酒用红黑色葡萄, 砂糖。
3. 器具 棉塞三角瓶(1L), 大漏斗(直径16cm), 蒸锅, 调羹, 纱布, 牛皮纸, 杆秤, 温度计, 糖度计(0~30%), pH试纸, 培养箱。

#### (二) 操作步骤

1. 流程 原料葡萄→除梗→压榨→葡萄汁→砂糖→混合→发酵原液→注入三角瓶→湿热灭菌→放凉→加酵母→发酵→过滤→成品。

2. 原料的调制及发酵原液的调制 同一般果汁的制法相同, 但红葡萄酒不除种子及皮。对1L三角瓶, 需备红葡萄700g或白葡萄1000g。葡萄汁加砂糖调整糖度至发酵最适的24%的糖度, 此为发酵原汁。其计算方法如下:

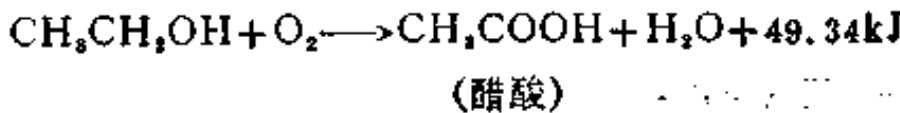
设果实原糖度为 $d\%$ , 总量为 $G$ kg, 现要配制24%( $d\%$ )的发酵原汁, 需加糖若干 $g(x)$ ?

$$\frac{G \times d\% + x}{G + x} = \frac{24}{100} \left( \text{或} \frac{d}{100} \right)$$

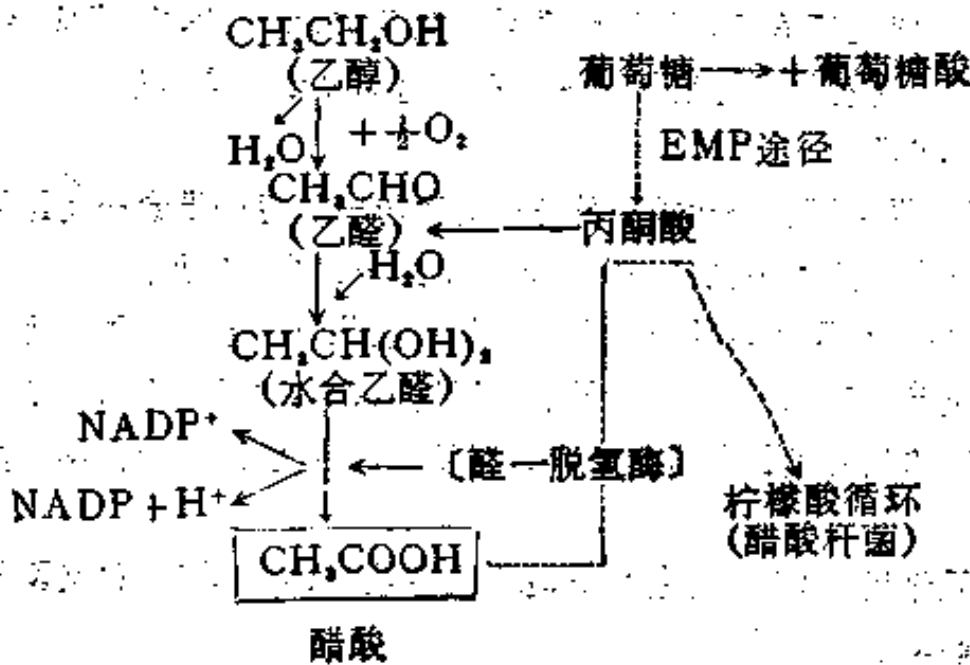
3. 将发酵原汁加入三角瓶达容器高度的 $\frac{1}{3}$ 为宜。
4. 灭菌 塞上棉塞，上包牛皮纸， $60^{\circ}\text{C}$ 灭菌20min，凉至 $30^{\circ}\text{C}$ ，加入纯培养菌100ml左右。  
若进行自然发酵，则无须灭菌。
5. 发酵与管理  $28\sim 30^{\circ}\text{C}$ 恒温培养发酵，每天振一次，不宜过多。主发酵约7~10天，发酵停止后过滤。再进入后发酵，后发酵期间过滤2~3次，即得澄清液。

### 〔实验6-36〕发酵法酿制食醋

醋酸是由醋酸细菌氧化乙醇而产生的；但有的醋酸菌能直接发酵生酸。所以可以说在整个酿酒业、酵母厂都存在醋酸细菌，例如葡萄汁及麦芽汁醋菌，啤酒醋菌，葡萄酒醋菌等。这些在各自的酿造品种中都属于污染杂菌。目前醋厂采用的多为人工培育型，它们具有良好的生产性能，如对营养物质要求简单，即能生长于很稀的含乙醇培养液中；仅形成很薄的膜，当振荡培养器皿时，能沉于瓶底；能迅速高产地生成醋酸；仅形成少量的粘质等。目前酿醋工业上常用的醋酸杆菌主要是恶臭醋酸杆菌、许氏醋酸杆菌等。在醋酸杆菌的代谢中，主要按下式由乙醇氧化产生醋酸。



具体途径是：



制造醋酸的最重要原料是乙醇，乙醇可以由化学合成法制备，也可由发酵法制得。为了取得某种特殊品质的醋，可以采用相应原料发酵成含酒精的产品，然后再氧化成该种醋。例如葡萄酒醋、麦芽汁醋、蜜醋、乳清醋等。当用酒精作为唯一碳源时，还必须加入其他的有机碳源，如糖、麦芽汁，以便使乙醇氧化。

食醋制造技术在我国已有了许多改进。如1956年使纯种人工培养的曲霉和酵母进行固态糖化和酒精发酵，提高了出醋率。1967年创造了酶法液化自然通风回流的固态发酵工艺，将酿醋过程分为液化、糖化、酒精发酵、醋酸发酵4个生化阶段，各使用了纯培养的枯草杆菌、曲霉菌、酵母菌和醋酸菌。1972年以后又采用了液态深层发酵新工艺，是制醋工业的重要技术革新。

食醋是一种酸性调味料，在烹调食品时会引起许多化学变化，能增进风味，去腥味；还具防腐作用。食醋还可以帮助消化，增进食欲。因食醋中含有挥发性物质，能刺激大脑中枢，促进消化液的分泌，使食物得到良好消化。此外，食醋还能防止某些疾病，因为食醋中含有各种氨基酸、有机酸、糖类等营养成分。在烹调食物时能溶解钙质，预防小儿软骨病，熏醋有防治感冒作用；醋还可作药用和清凉饮料等。

本实验是以残次果梨为原料酿制食醋的实验。

### (一) 实验材料

1. 原料 残次果梨、麦曲、酒母液、麦麸、大糠、盐。
2. 器皿 饲料粉碎机、烧杯、培养箱、水浴锅、温度计。

### (二) 操作步骤

1. 残次果梨处理 将残次果梨摘去果柄，去腐烂部分，清洗干净。用筛孔1.5cm的饲料粉碎机将果梨破碎至米粒大，然后将渣汁煮熟成糊状，倒入烧杯中(100ml)。

2. 酒精发酵 待熟果梨冷却至30℃时，接入麦曲(1.6%)和酒母液(6%)，盖好盖子，培养箱培养(温度30℃)5~6h。这时逐渐有大量气泡冒出，12~15h后气泡逐渐减少，此时梨果中的各种成分发酵分解，并有少量酒精产生。

3. 醋酸发酵 每烧杯加入麦麸(50%)，谷糠(5%)，使醋醅含水54~

58%，保温发酵。温度不得超过40℃，醋酸发酵4天，基本结束。

4. 后熟增色 将醋醅水浴加温，保温品温60~80℃，一般经10天，醋醅呈棕色，醋香浓郁；无焦糊味即成熟。

5. 醋淋：要求醋的总酸为5%左右。

## 第七章 发酵过程及发酵食品中 微生物的检测

发酵过程是整个发酵生产中的核心部分，包括了微生物的各个生化代谢环节，范围很广。这里在叙述有关微生物检测的基础和方法后，还将介绍一些现代微生物检测手段。

### 第一节 微生物生长、大小和数量的检测方法

微生物的培养发育，包括培养微生物细胞个体数量的增加(增殖)和细胞物质的增加(成长)。一般在培养微生物时，细胞数量增加，与细胞的物质质量的增加之间不一定存在比例关系。但在生长发育活跃地进行并稳定地保持下去时，细胞数量和质量通常成比例。

#### 一、细胞质量测定

1、干重 将洗净的菌体置于放有干燥剂的干燥器内减压干燥，或加热烘干后称重。一般可将洗净菌体摊于玻璃表面上成薄薄一层，然后放在红外线烘干机或110~120℃烘箱内烘干至恒重再称重。

2、菌体的含氮量 蛋白质是细胞成分的基本组分，每类微生物细胞的蛋白质含量几乎恒定，如细菌、酵母蛋白质含量都占干重的40~60%，霉菌少些。因此将洗涤过的菌体用克氏微量定氮法

测定，可以表示出细胞物质的量。

上述两法可用于单细胞细菌、酵母、菌丝、孢子等的质量测定。

## 二、细胞菌数测定法

有几种方法，如表7-1。

表 7-1 各种菌数计数法比较

方法	设备	适用菌类	最后稀释浓度 (个/ml)	误差(%)	操 作
计数器法	血球计数板	细菌、酵母、细胞和孢子	$10^6 \sim 10^8$		菌液吸入计数板与盖片的缝隙中的凹体积内，镜检计数
平皿数	直径9cm的平皿	细菌、酵母、细胞和孢子	150~1500	8	以0.2ml最后稀释液滴于琼脂平皿表面，涂布培养计数
稀释法	液体培养基试管	细菌、酵母	1~10	$\frac{1}{3.3} \sim 3.3$	以10、1、0.1ml的最后稀释液各入5只试管的培养基中接种
毛细管法	容积0.5ml有刻度毛细管	厌氧细菌兼性酵母	500~1000	11	以0.2ml的最后稀释液与4.5ml的1%氯化琼脂培养基相混合，吸入毛细管中凝固、培养、计数
比浊法	光电比色器	细菌	$10^6 \sim 10^9$		培养液应无色，或以对照进行比色

其中平皿法，毛细管法，稀释法得出的数据为活菌数，而计数器法和比浊法是总菌数的测定。但计数法中若用次甲基蓝液染色，则蓝色为死细胞，淡蓝色为活细胞，以资区别。

### 〔实验7-1〕酵母细胞数的测定

利用血球计数法在显微镜下直接计数，这是一种常用的微生物计数法。此法是将菌悬液放在血球计数板与盖玻片之间的计数室中，在显微镜下进行计数。由于载玻片上的计数室盖上盖玻片后容积是一定的，所以根据在显微镜下观察到的微生物数目来计算单位体积内的微生物总数目。

血球计数板也有几种，图7-1是其中的一种。



常见的有四条槽构成3个平台的计数板。中间的中心区台较宽，它的结构有多种，有的又被一短横槽隔成两半。每个半边上面各刻有一个计数区，有的只有一个计数区，每区分许多大格，其中中央的25个中格为计数区。每个中格又分为16个小方格，即中央大格有 $25 \times 16 = 400$ 个小方格组成。每个大方格边长1mm，即面积为 $1\text{mm}^2$ 。盖上盖玻片，载片与盖片间的距离为0.1mm，于是每大格的体积为 $0.1\text{mm}^3$ 。在计数时，通常数5个中格的总数，求得平均值，再乘以25得一大格，即 $0.1\text{mm}^3$ 的总数含量。

计算：A为每格中平均总数。B为总液稀释倍数。

$$\begin{aligned} \text{则1ml中总菌数} &= A \times 25 \times 10 \times 1000 \times B \\ &= 250000 \cdot A \cdot B \text{个} \\ &= 2.5 \times 10^8 A \cdot B \text{个} \end{aligned}$$

### (一) 实验材料

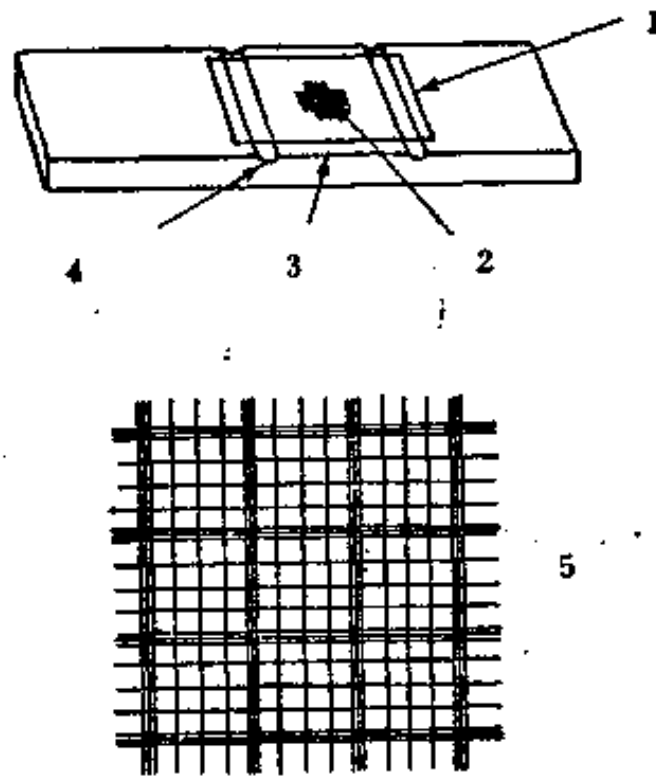


图 7-1 血球计数板

1—盖玻片 2—计数区 3—中心区台 4—凹槽 5—计数区的放大图

1. 菌液 啤酒酵母发酵液。
2. 器具 血球计数板(附盖玻片)，无菌水，无菌试管，玻棒，无菌吸管，显微镜。

### (二) 操作步骤

1. 将原菌液稀释50倍。取0.5ml稀释菌液入无菌试管内，吸取0.5ml 1%次亚基蓝液入内混均匀。

2. 取清洁干净的血球计数板，加盖玻片于中央，用无菌玻棒沾取染色菌液于盖片周围碰及，依靠毛细管作用吸入菌液，注意不能产生气泡，将余液用吸水纸吸去。

3. 静置5min，让菌细胞沉于计数器内，开始计数。注意在中格四周的酵母，处于线上的细胞，其计数原则是4条边框两边计数，两边不计。酵母的芽在未脱离母细胞前，芽已达母细胞 $\frac{1}{2}$ 以上可计数。深蓝色为死细胞或衰老细胞，非着色的为一般活细胞。

4. 随机计数5个中格，求得每中格平均数后代入公式，稀释度为100可求出细胞总数。

5. 清洗 完后用水冲去计数区菌液，让其自行凉干。

#### 〔实验7-2〕酵母细胞大小的测量

微生物细胞的大小，是微生物的形态特征之一，也是分类鉴定的依据之一。其大小的测定一般是在显微镜下用接目测微计来测量。接目测微计

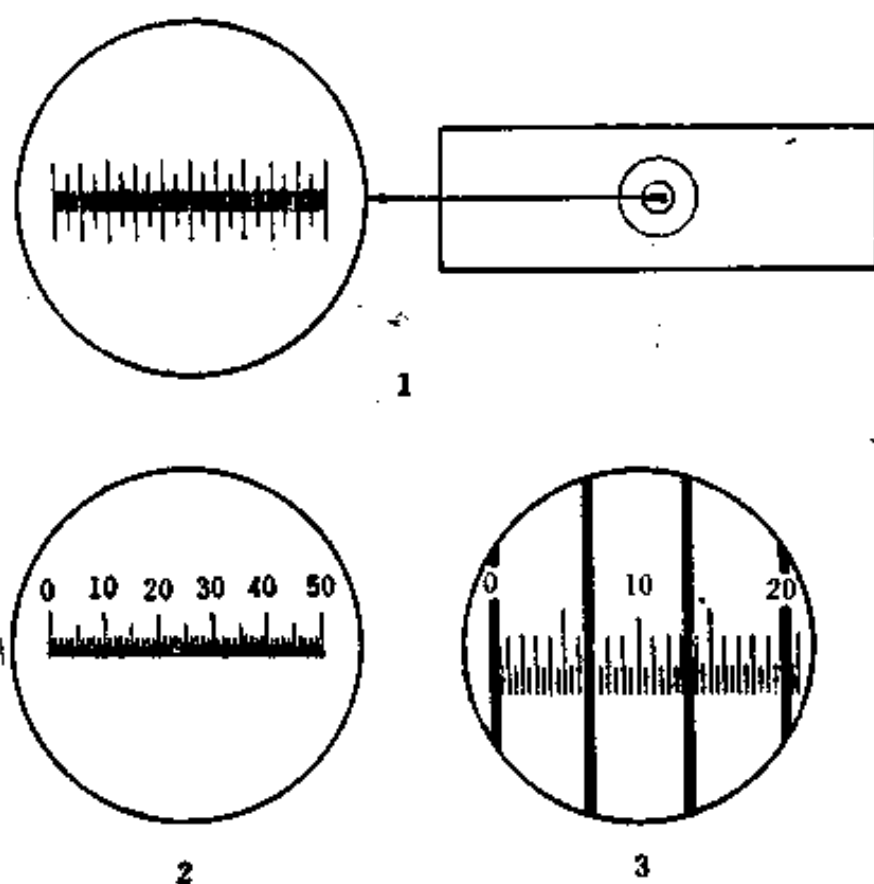


图 7-2 接目与接物测微计及其校正

1—接物测微计 2—接目测微计 3—接目测微计的校正

是一块圆形玻片，在中央刻有5mm长的等分数，共100分格（图7-2(2)）。测量时放在接目镜的隔板上。也有专用接目镜，里面已安放好接目测微计。接目测微计是测量放大后在目镜中观察到的大小，所以放大倍数不同，测得的大小也显然不同，为此必须在物镜观察处用接物测微计校正〔图7-2(3)〕。这样，在一定接物和接目镜的倍数下，可求得接目测微计每格的实际长度。接物测微计是中央部分刻有精确等分线的载玻片〔图7-2(1)〕，一般将1mm等分为100格，每格等于0.01mm (10 $\mu$ m)，是专用于校正目镜测微尺每格长度的。

### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母发酵液。
2. 器具 接目测微计，接物测微计，无菌水，试管，显微镜。

### (二) 操作步骤

1. 将接目镜的上透镜旋下，将接目测微计装入目镜。将接物测微计放于载物台上对光后，先用低倍镜对焦距，在视野中看到接目测微计的黑线图，然后转动目镜，使两测微计的刻度线平行。调节接物测微计，使接目测微计端线与接物测微计上的一条刻度线重合，然后旋到高倍物镜，细调焦点，使刻度清晰重合可见，找到接目测微计与接物测微计的另一重合线，由于已知接物测微计每格10 $\mu$ m，即可算出接目测微计每格的相当长度。图中所示接目测微计19格相当于接物测微计的3小格，即接目测微计每格长为 $\frac{3 \times 10}{19} = 1.58\mu\text{m}$ 。

2. 将接物测微计取下，立即将稀释100倍啤酒酵母汁滴在载玻片下，盖以盖玻片，小心别有气泡。将标本片放于载物台上观察，测定细胞大小约含接目测微计上的几格。测定10~20个细胞，求出平均值，得出细胞的大小尺寸。

若目镜和物镜不加更换，这台显微镜可在一次校正后，无须再校正，就可测定各种细胞大小。

### 〔实验7-3〕细菌增殖曲线的测定

微生物培养过程的增殖曲线，也称生长曲线，即从接种到培养结束，细胞数量的变化曲线。每种菌种的增殖曲线并不相同，但其规律是一致的。增殖曲线（图7-3）一般均分迟滞期、加速期、对数期、减速期、恒定期。在生产中，前4个期是最重要的，有许多代谢产物产生。分泌主要在

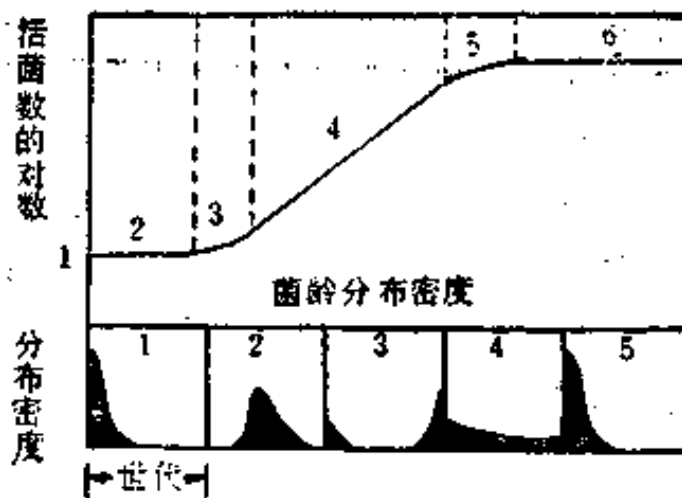


图 7-3 微生物的增殖曲线及其菌龄分布

1—接种时 2—迟滞期 3—加速期 4—对数期  
5—减速期 6—恒定期

恒定期。恒定期结束，一般发酵也就结束。表7-2总结了各个生长期产生的细胞群体的状态。

表 7-2 每个生长期细胞群体组成的变化与细胞生理状态

生长期	细胞的生理状态	细胞群体生理状态
迟滞期	从衰退变为恢复，并开始生长	同步
加速期	最初的分裂开始	大致同步
对数期	生长、分裂周而复始	非同步
减速期	分裂后状态不变而停止生长	非同步
恒定期	开始衰退	大致同步

一种微生物的增殖曲线随着培养条件的改变也会不同，因此一种标准状态的生长曲线作成后，还可以与异常情况下的作比较，可以从中发现问题。

由于细菌悬液的浓度与浊度成正比，因此可以用光电比色计测定菌悬液的光密度（OD值）来推知菌液的浓度。也可用血球计数板法或可用平板分离计数。但比浊法主要用于细菌。因为其他微生物如酵母细胞大，沉降速度快，此法就不易准确。另外比浊法的空白对照很重要，因为培养液往往有颜色，有一定消光度，必须用无菌的相同培养液予以校正。

#### （一）实验材料

1. 菌种 20 h 培养的枯草杆菌培养液。
2. 培养基 12瓶300ml 内装30ml 肉汁蛋白胨培养液的三角瓶, 68.65 kPa, 灭菌30min。无菌生理盐水。
3. 器具 光电比色计, 无菌试管12个, 冰箱, 摇床。

## (二) 操作步骤

1. 将培养20 h的培养液 3000r/min 离心 10min, 倾去上层液, 加入无菌生理盐水, 成均匀液, 细胞数系 $10^8$ 个/ml。
2. 取11个盛培养液的三角瓶, 各接 3ml<sub>0</sub>菌液作种子, 在摇床上相同位置30℃振荡培养, 并立即取下一瓶为 0 时的增殖状态。之后于培养 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 h 各取一瓶。约11个间隔的菌液分别吸取 5ml 菌于无菌试管中, 置4℃下保存。
3. 用没接种的培养液为空白对照, 将上述菌液于 400~440nm 波长比色, 但要求消光度在 0.3~0.6 之间, 若超过, 用未接种培养液适当稀释。
4. 以菌悬液 OD 值为纵坐标, 培养时间为横坐标, 绘出枯草杆菌在摇瓶状态培养的增殖曲线。

## 〔实验7-4〕丝状真菌生长速率的测定

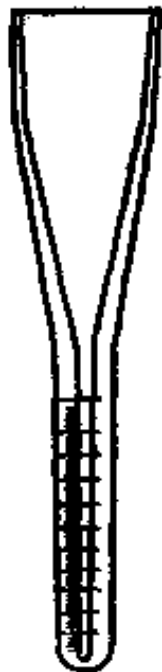


图 7-4 容积离心管

单细胞微生物的增殖曲线可以细胞数的增加来描绘, 但丝状真菌就无法如此。因为它的生长繁殖主要表现在菌丝的延长, 细胞内含物重量的增加, 或者是菌落直径的扩大。所以我们可以采用干重法, 离心测定它的菌丝量 (图7-4) 和用生长管 (图7-5) 测定它的菌丝增长速度来得到它的生长速率曲线。值得指出的是, 霉菌的菌丝量与一些水解酶的产量往往有相应关系。菌丝生长快, 量大, 对酶的产生是有利的。

### (一) 实验材料

1. 菌种 培养72 h 的黑曲霉斜面。
2. 培养基 5%葡萄糖, 1%酵母汁, 0.5%蛋白胨, pH5.5的培养液, 分装于12个300ml三角瓶中; 每瓶装30ml, 68.84kPa灭菌15min。



图 7-5 霉菌生长管

1—接种点 2—培养液

3. 器具 吸滤装置一套, 定量滤纸, 红外烘干器或烘箱, 分析天平, 无菌吸管。

### (二) 操作步骤

1. 将斜面加入10ml无菌生理盐水制成孢子悬液, 尽力摇匀。

2. 将孢子悬液 0.5ml 作种子接入12个三角瓶内, 全部30℃摇瓶培养。摇瓶培养时间分别为: 0、5、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 h, 于每一时间末将三角瓶取出, 入冰箱保存。全部培养完成, 即挨次将 30ml 培养液各抽滤于一张定量滤纸上, 然后一并用烘箱或红外烘干器于 100~105℃烘至恒重, 再用分析天平称重。

3. 若将各个时间的培养物镜检, 将会观察到孢子发芽的迟滞期较长, 约需8~10 h, 之后菌丝生长, 但随之菌丝伸长增多, 因菌丝缠绕和凝集而成球状, 其形状和数目等由培养基的性质和振荡条件所决定。菌丝球的增大和数量的增加, 显示了菌体量的增加, 由于霉菌菌丝的生长呈不均匀状态, 所以测定时要求菌液量多, 以免造成过多误差。

## 第二节 发酵和食品工业中常见的微生物

### 物种类及其概测

发酵和食品工业中常见的微生物从类群来讲当然还是以细菌、放线菌、酵母和霉菌为主, 但采用哪种较简单的方法将这些微生物进行初步鉴定分类, 以便使我们了解在每一发酵和食品腐败过程中哪一类或哪一种微生物在数量上占有什么地位以及它

们的消长趋势，这对进一步研究它们在每个过程中的生化反应，对发酵和食品产品的质量和产量的影响会有所帮助。

### 一、发酵和食品工业中常见微生物的种类

细菌和放线菌与酵母和霉菌的区别：

形态特征：细菌与放线菌都是很小的微生物，要看清它们的外形轮廓，只有在放大1000倍的油浸镜下才行。而酵母和霉菌都较大，在放大100倍时，它们大体概貌就能区分清楚。凭这一点，在显微镜下，就可将这4大类微生物分为两类：细菌和放线菌划分为原核细胞微生物；酵母和霉菌划为真核细胞微生物。后者常称为真菌，其中霉菌又称小型丝状真菌。放线菌在分类上常属细

表 7-3 常见的细菌和真菌的主要区别

特 征	细 菌	真 菌
细胞宽度和直径( $\mu\text{m}$ )	0.5~1.2	2~10
细胞体积( $\mu\text{m}^3$ )	小于1~5	酵母20~50, 霉菌较酵母大
细胞核	称核质, 无核膜	具完整的核
细胞器	无	线粒体, 内质网膜等
细胞壁组成	革兰氏阳性菌含40~90%的肽聚糖, 还含有磷壁酸, 革兰氏阴性菌仅含10%肽聚糖, 但含大量的蛋白质, 脂多糖等	由葡聚糖、甘露聚糖几丁质等组成
对氧的要求, 对药物和抗生素的敏感性	专性或兼性好氧与厌氧, 常对青霉素、链霉素、四环素、氯霉素、利福平和黄胺敏感	好氧与兼性厌氧, 未见专性厌氧, 对多烯类抗生素与灰黄霉素敏感
生长适合pH	中性偏碱	偏酸性
对溶菌酶敏感性	敏感	不敏感
繁殖方式	主要为无性繁殖	无性, 有的还有有性繁殖
对噬菌体	敏感	不敏感

菌。两大类微生物间的主要区别见表7-3。每大类在上表诸特征上是相同的或相似的，但仍有差别（表7-4）。

酵母和霉菌的区别：它们都属于真菌，所以都具有真菌的特

点，但除主要点上相同外，也存在差别（表7-5）。

表 7-4 细菌和放线菌的区别

特 征	细 菌	放 线 菌
细胞形态	单细胞的球状和杆状等	为菌丝体，有气生菌丝和营养菌丝之分，菌体远较细菌为大
菌落形态	长于培养基表面，有各种形状，但易挑起	菌落一般紧密，有皱折不易挑起
繁殖方法	主要裂殖	有菌丝断裂，孢子及孢囊孢子等方式
革兰氏染色	有阳性和阴性	阳性

表 7-5 酵母和霉菌的区别

特 征	酵 母	霉 菌
细胞形态	一般为单细胞的球形、卵形、椭圆形，也有腊肠形管，有的有假菌丝或真菌丝，但远没有霉菌典型	为菌丝，有气生和营养菌丝之分，体积远较酵母为大
菌落形态	一般为奶油状的单细胞集群，有光泽或光滑，粘稠状，易挑起	一般为线状、毡状或网状的菌丝，集群不光滑，不粘稠，孢子易沾取
繁殖方式	主要为芽殖，少量裂殖，有的具有性繁殖，产生子囊孢子	无性繁殖主要产生分生孢子与孢囊孢子，还有一些产生菌丝孢子，具有有性繁殖的产子囊孢子和接合孢子等
细胞壁的组成	主要由葡聚糖和甘露聚糖等组成，几丁质含量极少	一般为几丁质组成，有的含有纤维素
对氧的要求	好氧或兼性好氧	专性好氧

## 二、发酵和食品工业中常见微生物 类属检索表

### (一) 细菌

化能异养

细胞无滑行运动

细胞非丝状，无鞘



## 细胞有严整的形状

### A. 革兰氏阴性菌

#### I. 细胞杆状

1. 好氧性：假单胞菌属，醋酸菌属
2. 兼性厌氧菌：肠杆菌科、色杆菌属
3. 厌氧性：链杆菌属、梭杆菌属、纤杆菌属

#### II. 球状或类球状杆菌

1. 好氧性：奈瑟氏球菌属
2. 厌氧性：韦荣氏球菌属、氨基酸球菌属

### B. 革兰氏阳性菌

#### I. 细胞球状

1. 好氧性：
  - (1) 形成内生芽孢：芽孢八叠球菌属
  - (2) 不形成内生芽孢：葡萄球菌属、明串珠菌属
2. 厌氧性：不形成内生芽孢：八叠球菌属、链球菌属

#### II. 细胞杆状

1. 好氧性形成内生芽孢：芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属
2. 厌氧性形成的内生芽孢：梭菌属
3. 不形成内生芽孢：
  - a. 直杆状；厌氧性：乳杆菌属
  - b. 不规则杆状；好氧性：棒杆菌属、矩杆菌属  
厌氧性：丙酸杆菌属、真杆菌属

## (二) 放线菌

### A. 形成孢子，没有孢子囊

#### I. 营养菌丝断裂为杆状或球菌状，放线菌丝。

1. 厌氧或微需氧，非抗酸性，放线菌属
2. 好氧，部分抗酸性或非抗酸性，诺卡氏菌属

#### II. 营养菌丝无隔膜，不断裂为杆菌状，球菌状

##### 1. 形成气生菌丝

- (1) 孢子呈链状、链霉菌属
  - (2) 产生单个孢子，高温放线菌属
  - (3) 孢子成对或成链状
    - (a) 孢子成对、小双孢菌属
    - (b) 好热，孢子成对或成链，高温多孢菌属
2. 不形成气生菌丝，在短杆上产生单个孢子

- (1) 中温性：小单孢菌
- (2) 好热性：高温小单孢菌

B. 在孢子囊中形成孢子，游动放线菌科

1. 一般不形成气生菌丝，分生孢子链不呈螺旋状，孢囊孢子运动，为游动放线菌属

2. 形成丰茂的气生菌丝，分生孢子链和孢囊相同，呈螺旋状，孢囊不运动。孢囊链霉菌属

(三) 酵母菌(表7-6)

表 7-6 酵母菌分类检索表

繁殖方式	细胞形态	子囊孢子的形态和形成	发酵性	硝酸盐同化	其他特征	推断的属名
分裂繁殖	圆筒形	球形	+	-		裂殖酵母属
芽殖	球形至椭圆形	球形至椭圆形 表面光滑	+	-	不同化乳糖、液体石蜡	嗜糖酵母属
		球形至椭圆形， 表面有刺	+或-	-	异宗接合	德巴利氏酵母属
		尖帽形至土星形	+或-	+或-	从菌丝顶端或中间形成子囊，形成节孢子	拟内孢霉
		尖帽形至土星形	+或-	+或-	形成皮膜，产生脂类	汉逊氏酵母属
		尖帽形至土星形	+或-	+或-	形成皮膜	毕赤氏酵母属
	半球形	+或-	+		汉逊氏酵母属	

续表

繁殖方式	细胞形态	子囊孢子的形态和形成	发酵性	硝酸盐同化	其他特征	推断的属名
		半球形	+	+	自母细胞长出的长管状细胞的顶端形成子囊	管囊酵母属
		镰刀形	+或-	+或-		拟内孢霉属
		不形成子囊孢子	+或-	+或-	形成假菌丝	假丝酵母属
			+或-	+或-	不形成假菌丝, 不形成淀粉类似物, 脲酶多为阴性	球拟酵母属
			-	+或-	不形成假菌丝, 不同化肌醇, 有类似胡萝卜素, 赤红色菌落	红酵母属
	尖头椭圆形		+	+或-	产酸	酒香酵母属

#### (四) 霉菌

##### A. 营养体单细胞或菌丝状

孢子或配子能运动, 有性世代的孢子为典型的卵孢子, 游动孢子二根鞭毛, 细胞壁由纤维素组成: 腐霉属。

##### B. 无运动细胞

##### I. 存在有性世代

1. 有性世代的孢子为接合孢子, 腐生性: 梨头霉属、毛霉属、根霉属。

2. 有性世代的孢子为子囊孢子, 营养体菌丝状: 一般有横隔(简单隔膜); 稀有单细胞; 经有性增殖过程, 在子囊内形成子囊孢子; 有子囊果及产囊丝, 营养体菌丝状, 子囊一般为单囊壁结构。

(1) 子囊一般是无规则地分布在闭囊壳内, 可消失: 红曲霉属。

(2) 子囊规则地排列在子囊果的底部或器内，子囊果一般在有孔口的被子器内，往往隐藏在子座内，子囊无囊盖：脉孢菌属。

II. 缺乏完全世代，营养体菌丝状；有横隔或单细胞；无有性生殖，有的有准性生殖过程；菌丝发育良好，营养体无出芽细胞，直接从菌丝上或大小分枝乃至特别分枝(分生孢子梗)上形成分生孢子，分生孢子以种种方式集合在一起，但不在分生孢子器或分生孢子盘中形成。分生孢子梗不形成组织化的束丝或分生孢子座。这类菌包括曲霉属、头孢霉属、镰孢霉属、青霉属、木霉属、枝孢霉属、交链孢霉属、长蠕孢属、地霉属。

### 三、发酵和食品工业中常见微生物类别的概测

在分离获得微生物种类后，首先依靠目测菌落形态及显微镜观察细胞形态，决定它们属于哪一大类微生物。例如遇到的是单细胞微生物，如果在低倍放大能看得较清楚，一般是酵母类。如果需要用油浸物镜才清楚，则属于细菌的可能性较大。如果观察到的是菌丝体，那么霉菌在低倍放大甚至肉眼就能观察清楚。如果需要用油浸镜观察，很大可能是放线菌。

在这一粗略分类基础上，然后按照检索表再进行分类，这样至多可分类到属。至于种的鉴定，需更加细致。对细菌、酵母则要进行一些生理试验才能解决。而放线菌和霉菌则主要靠形态观察，并辅之以生理试验。

这里主要概测到属。在概测到属的试验过程中，除进行少量生理试验外，主要还是从形态上观察。在方法上则要抓住主要特征，然后根据检索表逐步“对号入座”。但对这样一些概测方法分类学家们并不一致。这里写的，也仅仅是从教学角度，并结合实用上的方便予以综括，是否恰当，还得经过大家实践才能肯定。此外也将正规分类的描述写上，供作参考。

#### (一) 细菌

1. 细菌分类的依据 细菌的分类需以形态特征和生化特征相结合，而又重于生理生化特征。

(1) 形态特征：包括个体形态、大小及排列情况，革兰氏染色反应，有无运动，鞭毛着生位置和数目，芽孢有无及芽孢着生的部位和形状，细胞内含物，个体发育过程中形态变化的规律性，荚膜、菌胶团是否存在等。

(2) 培养特征：

① 琼脂平板培养基上的特征：主要观察表面菌落的形态、大小、色素、粘稠度、透明度、边缘情况及隆起情况，光泽、质地、表面性质等。

② 斜面特征：生长好坏、形状和光泽等。

③ 马铃薯斜面上生长特征：生长发育情况，生成色素情况。

④ 明胶柱内生长特征：能否水解明胶及水解后的状况。

⑤ 液体培养基中生长情况，是否浑浊及浑浊程度，液面有无菌膜，管底有无沉淀及沉淀多少。

(3) 生理特性与生化反应：

① 营养源：碳源、氮源和能源。

试验几种简单或复杂碳水化合物能否被利用作为碳源或能源，以及对一定的有机化合物或 $\text{CO}_2$ 利用的能力；对氮源和蛋白质、蛋白胨、氨基酸、铵盐、硝酸盐或空气中氮的利用能力。

② 代谢特征：能否形成有机酸、酒精、碳氢化合物、气体等；能否分解色氨酸形成吲哚，能否使硝酸盐还原而生成亚硝酸盐和氨，能否产生色素或其他物质等。

③ 能否凝固牛乳，胨化牛乳蛋白质，产酸还是产碱。

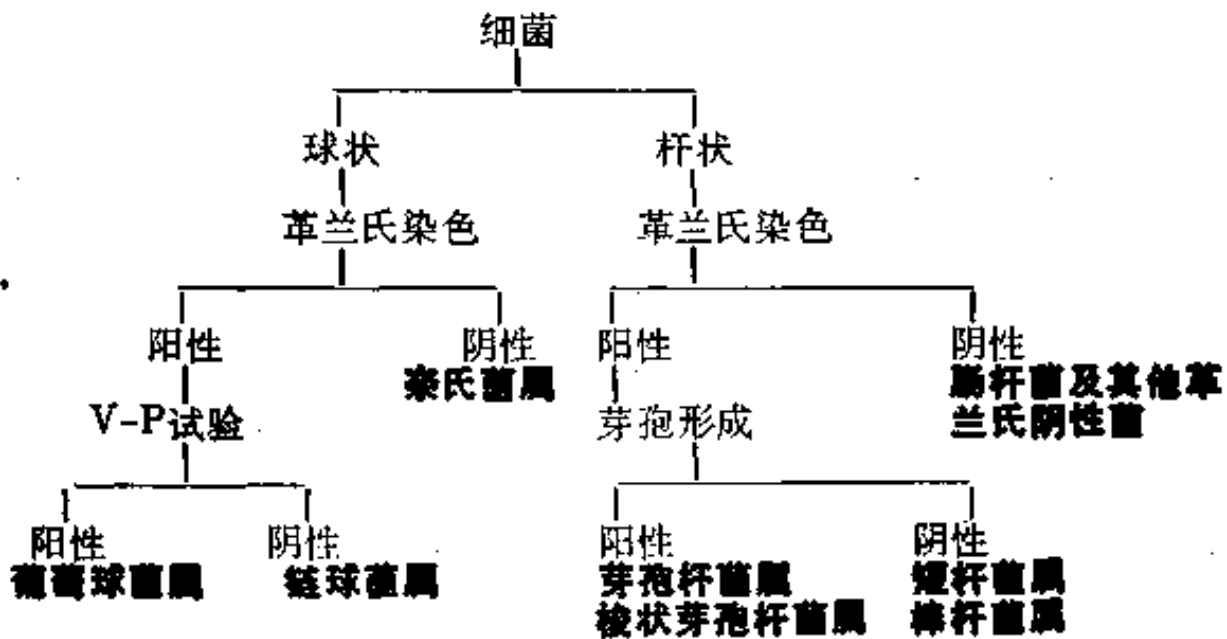
④ 生长发育的温度，需氧的程度等。

此外还参考细菌的适应pH，寄生性和共生性，致病性，血清学反应，对某抗生素和噬菌体的敏感性和抗性，在自然界的分布等。

2. 简捷的分类法

主要进行4次实验步骤：

- (1) 显微镜观态形态：是球菌还是杆菌。
  - (2) 进行革兰氏染色：是阴性还是阳性。
  - (3) 进行产芽孢试验：是否产芽孢。
  - (4) 进行V-P试验(乙酰甲基甲醇试验)：是阴性还是阳性。
- 结果参考如下：



## (二) 放线菌

1. 放线菌的分类依据 放线菌的分类依据一向以形态、营养特征为主，生理生化和生态特征为辅。

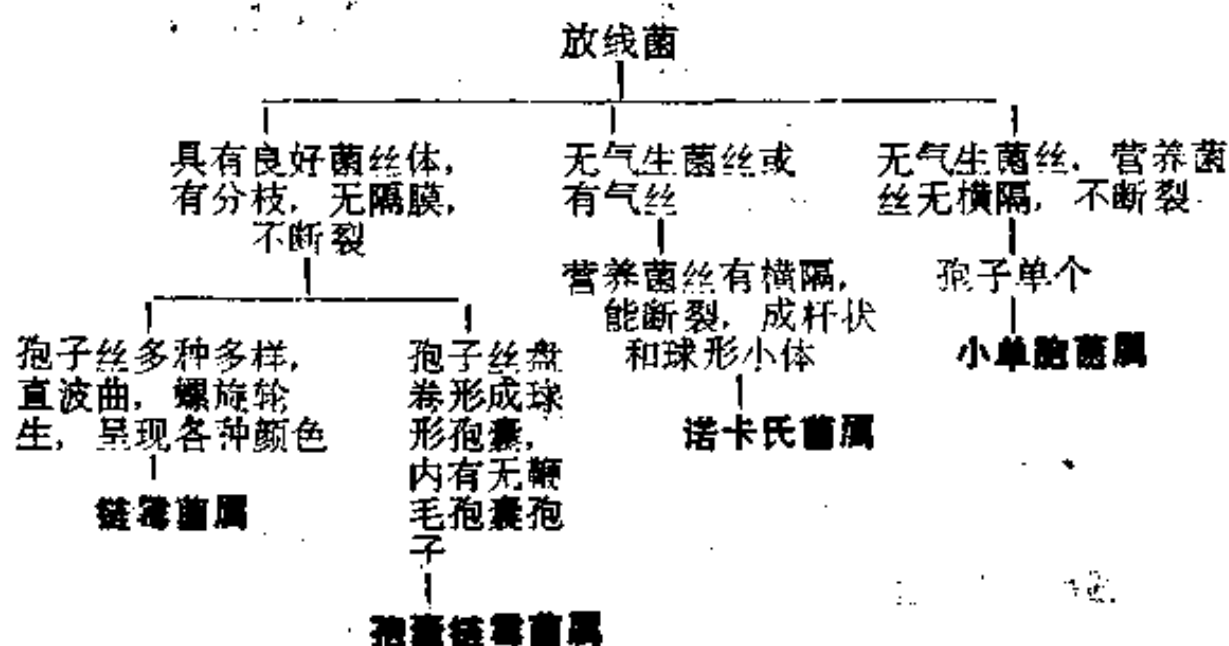
在划分种属时基本以形态为主要依据，有时还需参考生态条件。

(1) 形态特征：菌丝体完善程度和是否断裂，是否形成孢囊；有无气菌丝，有无孢子，孢子是单个、成对还是成链；在气菌丝上，在基丝上还是在两种菌丝体上都产生孢子，有孢囊的要考虑孢囊和孢囊孢子的形态等。

(2) 生态条件：好氧还是兼性厌氧，腐生还是寄生，生长温度，孢子和基体内菌丝的颜色和可溶性色素的有无。

(3) 生理生化特征：在复杂蛋白质培养基内是否产生黑色素以及对各种碳源的利用，某些酶活性，是否产生  $H_2S$ ，拮抗性等。

2. 简捷分类法 主要通过培养菌观察及油镜镜检。结果参考如下：



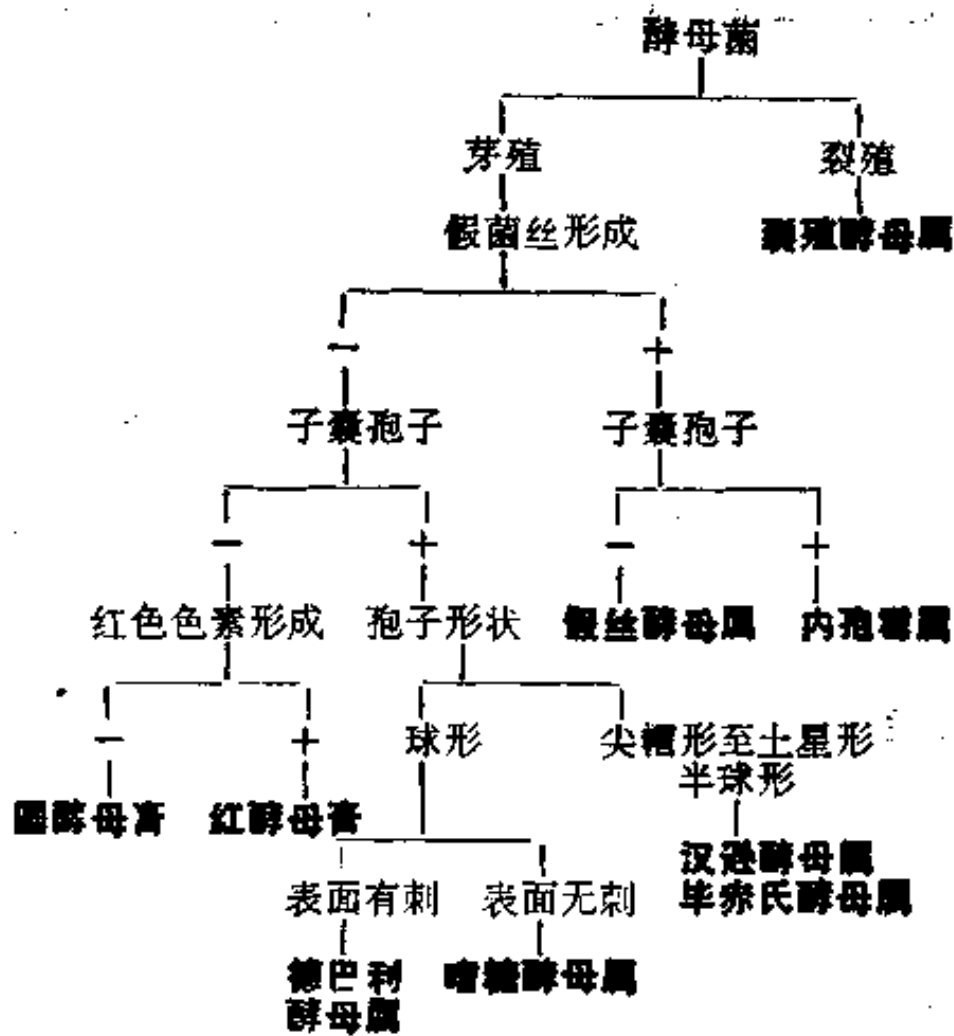
### (三) 酵母类

1. 酵母分类的依据 要鉴定一株酵母，首先依据形态特征，如是否有有性过程，能否形成子囊孢子和其他孢子，这样就把酵母分为有孢子酵母和无孢子酵母或其他。根据有孢子酵母所生孢子的形状、特点和数目及酵母的繁殖方式，是芽殖还是裂殖及出芽的方式，真菌丝和假菌丝形成情况等，可以决定此酵母应为哪一科、哪一属。所以在属以上鉴定时，以形态为主要依据。但在进行种的划分时，主要是靠生理特性。生理特性试验中，以各种糖的发酵和同化最主要。在氮源中以是否同化硝酸盐最重要。

2. 简捷分类法 主要进行下列几次实验。

- (1) 显微镜下观察细胞形态大小及出芽方式。
- (2) 产生子囊孢子培养基上培养，镜检能否形成子囊孢子、孢子形状。
- (3) 在玉米粉或马铃薯汁培养基上能否形成假菌丝。

结果参考如下：



#### (四) 霉菌

##### 1. 霉菌的鉴定依据

###### (1) 先用肉眼和低倍镜观察

① 生长和发育的速度：培养一定天数后，测量菌落直径，以生长极慢、慢、中等和快来说明。

② 菌落颜色：表面和底部菌丝的颜色及其变化，菌落背面的颜色及其变化等。

③ 菌落的表面：平滑或有皱纹，致密或疏松，有无同心环或辐射状沟纹。菌落的全部、中心部分、中间部分以及边缘部分的形态。

④ 菌落的质地：指菌落的外观似毡状、绒毛状、棉絮状、羊



毛状、束状、粉粒状、明胶状或皮革状等类型。

⑤ 菌落的边缘：全缘、锯齿状、树枝状、纤毛状等。

⑥ 菌落的高度：菌落扁平，血状隆起，陷没，菌落中心部分凸起或凹陷。

⑦ 渗出物：有些真菌如青霉，常在菌落表面出现带颜色的液滴及其数量和色调。

⑧ 培养基颜色的变化：颜色变化仅限于菌丝体所盖的部分或扩大到其他部分。

⑨ 气味：许多真菌在培养基中有霉味、土气味、芳香味等，也有无味者。

(2) 显微镜下观察孢子和子实体结构形态。

① 菌丝：气生菌丝和底部菌丝的宽度，有无横隔、色泽、特殊的菌丝器官(假根，足细胞，结节或隆起等)的特征。

② 子实体的形态：成熟后子实体如孢子囊、子囊、担子果等的颜色、形状、大小、结构等。

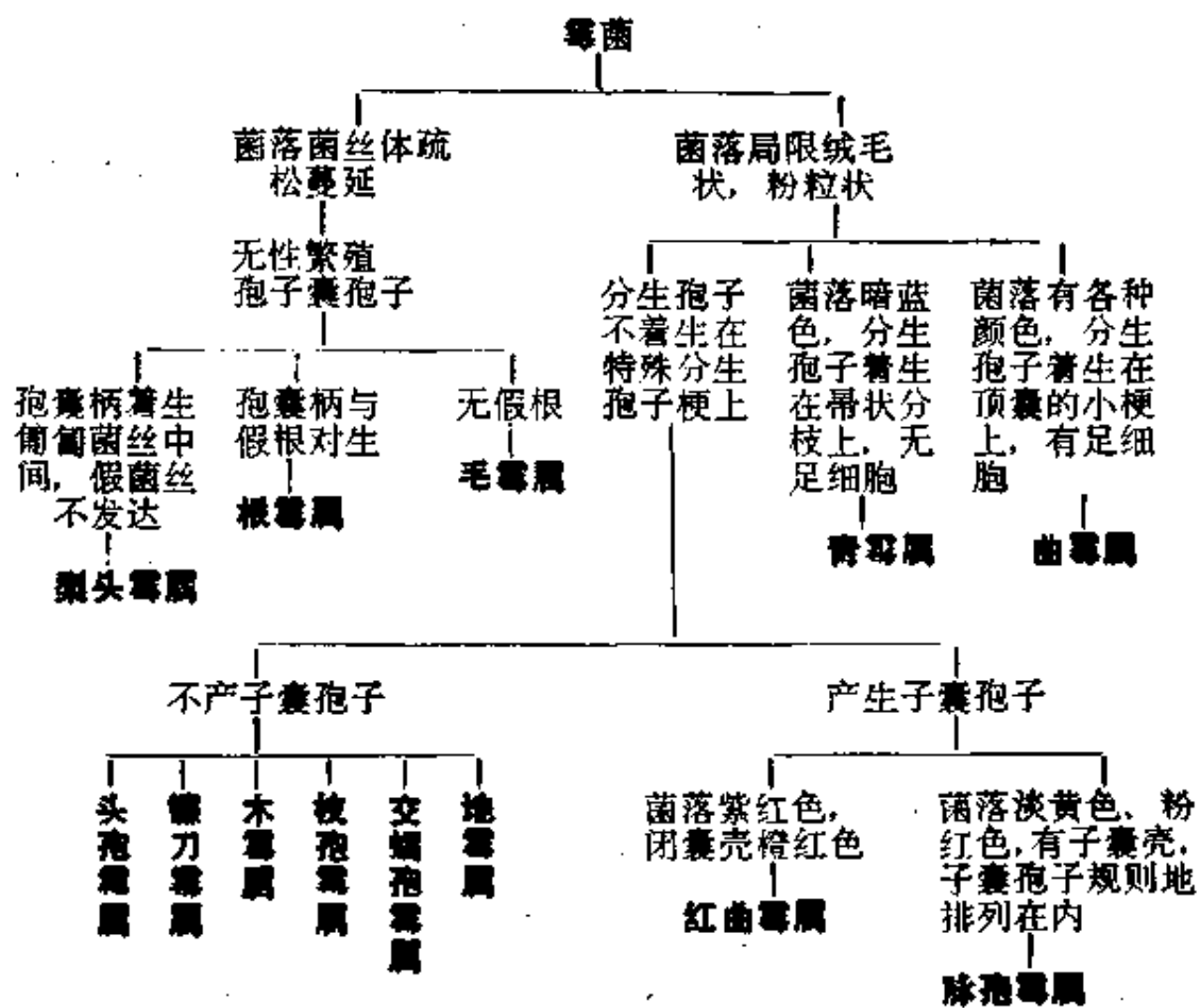
③ 孢子：无性孢子如孢囊孢子、分生孢子、芽孢子、节孢子、厚垣孢子等；有性孢子如卵孢子、接合孢子、子囊孢子和担孢子等。它们的形状、颜色、表面的特征(纹饰或突起等)，孢子有无分隔(由单细胞还是多细胞构成)，孢子萌芽的类型(单极出芽，两极出芽或多极出芽等)。

(3) 生理特征：

① 温度：不同类型的真菌，生长对温度的反应有的较灵敏。由于真菌生长时所需的温度多有差异，可分为低、中、高温菌群。

② 对氮源的利用：能否利用硝态氮、亚硝态氮、铵态氮或有机氮等。

2. 霉菌的简捷分类法 简捷分类法如下：



### 第三节 发酵和食品工业用水和发酵

#### 过程微生物数量的检测

从微生物学的角度来看, 这些检测主要是一些方法学问题, 它涉及到取样、培养、计数、培养基和培养条件, 以及数据处理等方面。为了相互比较, 在很大程度上还取决于各单位使用的方法与操作上的一致。

##### 一、发酵和食品工业用水微生物数量的测定

从卫生指标来看, 发酵和食品工业用水的微生物数量主要考虑的是细菌, 特别是病原菌的数量。从防疫的角度出发, 在正常情况下主要涉及用水中细菌总数的测定和大肠杆菌数量的测定。

有人研究成人粪便中的大肠杆菌群的数量，发现每克粪便含有 $10^8 \sim 10^9$ 个。若水中发现有大肠杆菌群的细菌，即可证明已为粪便污染。虽然大肠杆菌群在人及动物肠道内生存，一般无致病性，但有粪便污染也就有可能有肠道病原菌存在。根据这个理由，就可以认为这种含有大肠杆菌群的水供饮用或酿造是不安全的。当然，即使无病原菌存在，只要有粪便污染的水，总是被人们认为是不卫生，并为人们所厌恶的。

水的卫生学检验中最常用的指标是细菌总数和大肠菌群。细菌总数是指每克或每毫升食品或水样中，经过处理，在一定条件下培养后所得细菌菌落的总数，也可称菌落总数。细菌总数主要用于判断试样被污染的程度。在实际工作中，一般只用一种常用方法去作细菌总数的测定，测定结果仅反映一群能在营养琼脂上生长， $37^\circ\text{C}$ 普通培养箱中培养24 h后的细菌菌落的总数。大肠菌群是指一大群在 $37^\circ\text{C}$ 经24 h培养后能发酵乳糖产酸产气、需氧或兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌。包括肠杆菌科中的埃希氏菌属、枸橼酸菌属、克雷伯氏菌属和肠杆菌属。大肠菌群数也称大肠菌指数是指每100ml (g) 水 (食品) 中大肠菌群最近似值。检查大肠菌群数，一方面能表明样品有无污染，另一方面可判定试样的污染程度。大肠菌群数的测定是以不同稀释度的样品定量接种乳糖发酵管各数管，按照乳糖发酵产酸产气并确证为大肠菌群的阳性管数，查检索表求出大肠菌群的最近似值。

#### (实验7-5) 水中细菌数的测定

##### (一) 实验材料

1. 水样。
2. 培养基 肉汁营养琼脂培养基，无菌生理盐水。
3. 器具 无菌吸管，试管，培养皿，培养箱，100ml 磨砂瓶或玻璃瓶。

##### (二) 操作步骤

1. 取样 被检验的水样收集在一个清洁无菌的、容量为100ml磨砂口带塞的瓶中，瓶的颈部和上部用牛皮纸覆盖，并用粗线捆上，然后 $160 \sim 170^\circ\text{C}$ 干热灭菌2 h。

为了取得典型的水样，取自来水样时，至少应先放水5min，以冲去龙头口所带的微生物。另外，水管中的细菌数目易发生变化，先放5min，易获得主流管有代表性的水样。取样时，用右手握瓶，左手启开瓶塞，用覆盖瓶口的纸托住瓶塞。收集样品后，连覆盖用纸一起将瓶口塞仔细塞上；将纸盖上，并用线扎紧。手指绝不能接触瓶颈或塞内部。在静水中取样时，先以右手揭去盖子，瓶口朝下浸入水深30cm处，然后反转过来，待水注满后，取出塞好瓶口。如果水在流动，瓶口必须直接朝水流方向，以免手指传入细菌。

水样取好后若加以贮藏，内含细菌已经发生变化，数目往往会显著增加，而且类型比例会变动。所以要求水样贮存温度保持6~10℃，时间不超过6h即行检验。

2. 稀释培养 以无菌操作，取水样10ml放于含有90ml灭菌生理盐水的灭菌玻璃瓶内，充分摇匀成1:10的均匀稀释液。用1ml灭菌吸管，吸取上述稀释液1ml，注入含有9ml灭菌生理盐水的试管内，摇匀，作成1:100稀释液。另取1ml灭菌吸管，按上述操作即可获得1:1000的稀释度。如此每递增稀释1次，换用1支1ml灭菌吸管。根据对水样菌数估计，选择2~3个适宜稀释度，在分别作10倍递增稀释的同时，即以吸取该稀释度的吸管吸取1ml液至灭菌培养器中，每个稀释度作3个培养皿。然后凉至45℃左右，融化肉汁营养琼脂倾入培养皿中约15ml，转移培养皿使之均匀。待培养皿凝固后，翻转培养皿，置37℃下培养42h，取出，计算菌落，乘以稀释倍数，求出每毫升水样含总菌落数。

根据我国规定，饮用水的标准是每毫升水中的细菌总数不超过100个。

培养得到的菌落数受各方面影响，包括培养基组成、温度和时间，氧的供给及湿度等。因此，要控制好每个因素，否则所得数目不同。应该指出，上述所得细菌总菌落数仅为水样中总细菌数一部分，一般大部分细菌都因种种原因未能长出，所以菌落总数约为显微镜直接计数法得到的菌数的1/20~1/70。

#### 〔实验7-6〕水中大肠菌群数量的测定

发酵和食品的制造都需耗用大量的水，水质对酿造产品有着一定影响其中矿物质种类和含量、pH等都有其特定作用。但从卫生学角度看，水中致病菌是一个重要指标。

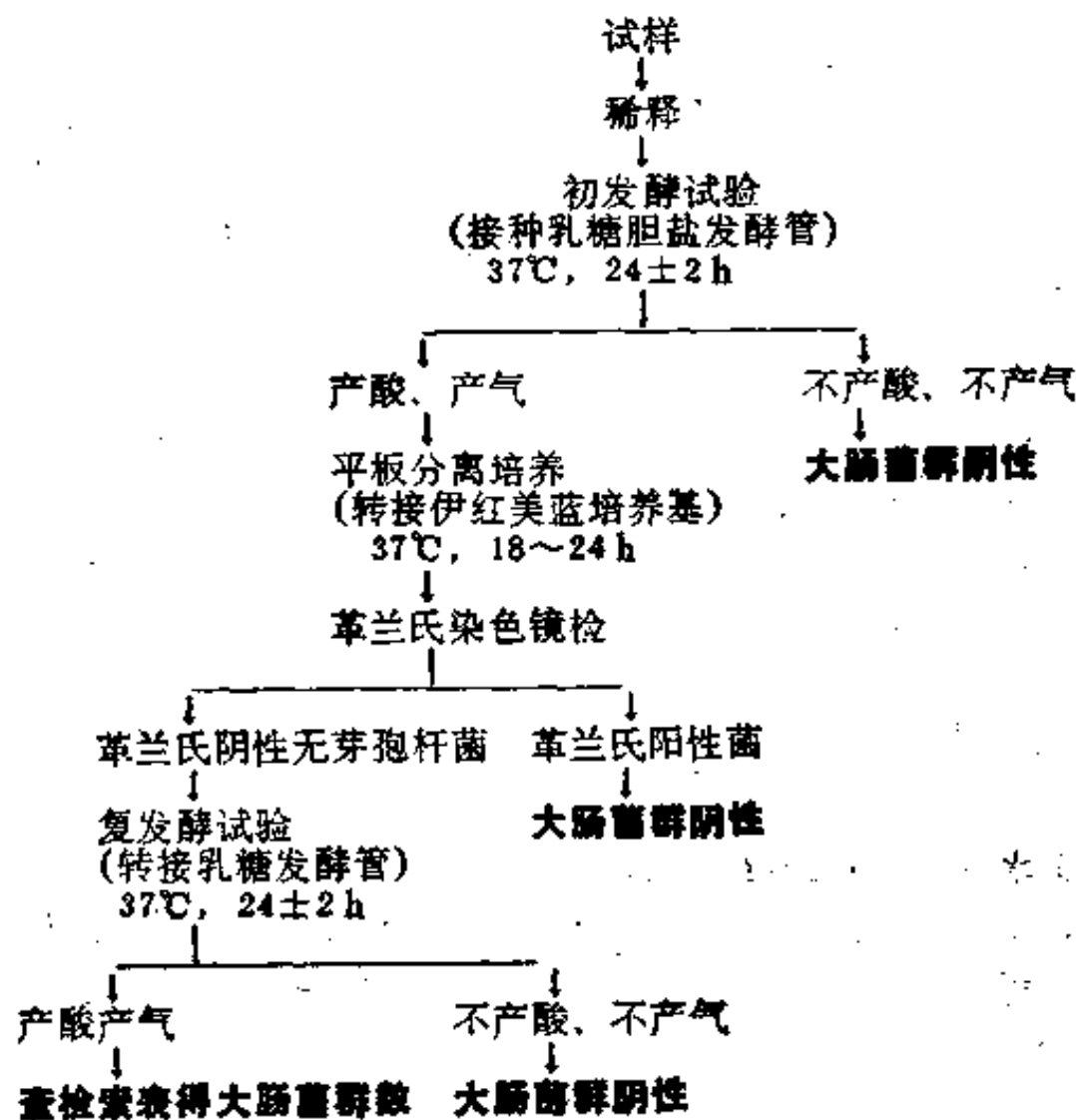
要直接测定水中的致病菌，是非常困难的工作，因此一般是通过测定诸

如大肠菌群和大肠杆菌这类指示菌的数量来间接表示致病菌数量的。

大肠菌群主要包括大肠杆菌及与其近似的产气杆菌和一些中间类型的杆菌。由于大肠杆菌和多数肠道病原细菌在水中存活期基本相近，而且在人工条件下，大肠杆菌又易于培养和观察，所以用它作为卫生检验的指标菌。

发酵与食品工业的用水被大肠菌群污染后，就有可能存在病原菌污染，但病原菌在整个污染水中的数量与大肠菌群的含量相比，在绝大多数场合下毕竟是很少的。因此若能使食品中大肠菌群的含量降至极少时，那么病原菌存在的可能性也随之降低，甚至不存在。

大肠菌群检验的程序：



### (一) 实验材料

1. 水样。
2. 乳糖胆盐发酵管 (Mac Conkey培养基) 蛋白胨20g, 猪胆盐(或

牛、羊胆盐) 5g, 乳糖 10g, 0.5% 中性红水溶液 5ml, 蒸馏水 1000ml, pH7.4. 每管 10ml 与 3ml, 并加入一倒管。双料发酵管除蒸馏水外, 其他成分加倍。

3. 乳糖发酵管 蛋白胨 20g, 乳糖 10g, 1.6% 溴甲酚紫酒精液 0.6ml, 蒸馏水 1000ml, pH7.4. 每管 10ml 或 3ml 并放入一小倒管。

4. 伊红美蓝琼脂 (EMB) 乳糖 1g, 2% 伊红液 2ml, 0.65% 美蓝 1ml, pH7.6 的无糖琼脂 100ml (蛋白胨 10g, 磷酸氢二钾 2g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml)。

5. 无菌玻璃皿。

6. 试管。

## (二) 操作步骤

1. 采水样 见实验 7-5。

2. 初步发酵试验 将水样 10ml、1ml 及 0.1ml, 接种于乳糖胆盐发酵管内, 除 10ml 接种量采用双料培养基外, 其余多为单料培养基。每一稀释度接种 3 管, 置 35~37℃ 下培养 24±2h。如所有乳糖胆盐发酵管都不产气, 则定论为大肠杆菌阴性; 若有产气, 则继续进行下列程序进行。

3. 于指示性培养基上分离培养 将产气的发酵管分别转接划线在伊红美蓝琼脂平板上, 经 35~37℃ 培养 18~24h, 然后取出作下列试验。

4. 于上述平皿挑上, 取大肠菌群可疑菌落 1~2 个进行革兰氏染色, 同时接种乳糖发酵管, 置 35~37℃ 下培养 24±2h, 观察产气情况。凡乳糖管产气, 革兰氏染色阴性, 无芽孢杆菌, 即为大肠菌群。若乳糖不产气, 或革兰氏染色阳性, 则为非大肠菌群。

5. 结果 根据大肠菌群具有的发酵管数, 查表 7-7 得含有大肠菌群的最近似数。

## 〔实验 7-7〕水中大肠杆菌数量的测定

有些食品, 以大肠杆菌作为污染指示菌, 比用大肠菌群更为恰当。实际上, 在大肠菌群中, 能显示肠道细菌污染标志作用最强的, 还是大肠杆菌。

检验大肠杆菌的培养基与大肠菌群类似, 操作也大多相仿, 都采用胨盐培养基。检验大肠杆菌采用的培养温度为 44±1℃, 时间为 18~24h。因为在较高温下, 大部分产气杆菌和一些中间型细菌以及冷血动物肠内的大肠杆菌就不能生长发育, 从而可把这些细菌排除掉, 这样可使所检验的大

表 7-7

100ml (g) 檢样中大肠菌群最近似数检索表

检 样 量				大肠菌群最近似数(个/100ml)
10ml(g)×3	1ml(g)×3	0.1ml(g)×3	0.01ml(g)×3	
0	0			<3
0	1			3
0	2			6
0	3			10
1	0			4
1	1			7
1	2			12
1	3			16
2	0			9
2	1			15
2	2			20
2	3			30
3	0			25
3	1			45
3	2			110
3	3			250
	0	0		<30
	0	1		30
	0	2		60
	0	3		100
	1	0		40
	1	1		70
	1	2		120
	1	3		160
	2	0		90
	2	1		150
	2	2		200
	2	3		300
	3	0		250
	3	1		450

续表

检 样 量				大肠菌群近似数(个/100ml)
10ml(g)×3	1ml(g)×3	0.1ml(g)×3	0.01ml(g)×3	
	3	2		1100
	3	3		2500
		0	0	<300
		0	1	300
		0	2	600
		0	3	1000
		1	0	400
		1	1	700
		1	2	1200
		1	3	1600
		2	0	900
		2	1	1500
		2	2	2000
		2	3	3000
		3	0	2500
		3	1	4500
		3	2	11000
		3	3	25000

使用法：该法采用样品的每一加量同时接入3个同样的试管，共采用2个加量即共6个发酵管。培养后根据发酵管产气或阳性反应的管数查表。如10ml加样量有两个产气，1ml加样量有2个产气，则大肠菌群最可能菌数100ml水样中为20个。若1ml加样量有3个产气，0.1ml加样量中有2个产气，则大肠菌群每100ml水样中有1100个。若两个稀释度都出现3个阳性，则进一步做再稀释的2个稀释度。

肠杆菌的指标作用更具针对性。我国规定每1L水中大肠杆菌不得超过3个为合格饮用水。

#### (一) 实验材料

1. 水样(见实验7-5)。
2. 乳糖胆盐发酵管(见实验7-6)。
3. 伊红美蓝琼脂(见实验7-6)。
4. 蛋白胨水 蛋白胨20g, 蒸馏水1000ml, pH7.4。



5. 柯凡克试剂 将对二甲氨基苯甲醛10g溶于150ml戊醇中，然后慢慢加入50ml浓盐酸，保存于冰箱中。

6. 革兰氏染色试剂（见实验3-1）。

7. 显微镜。

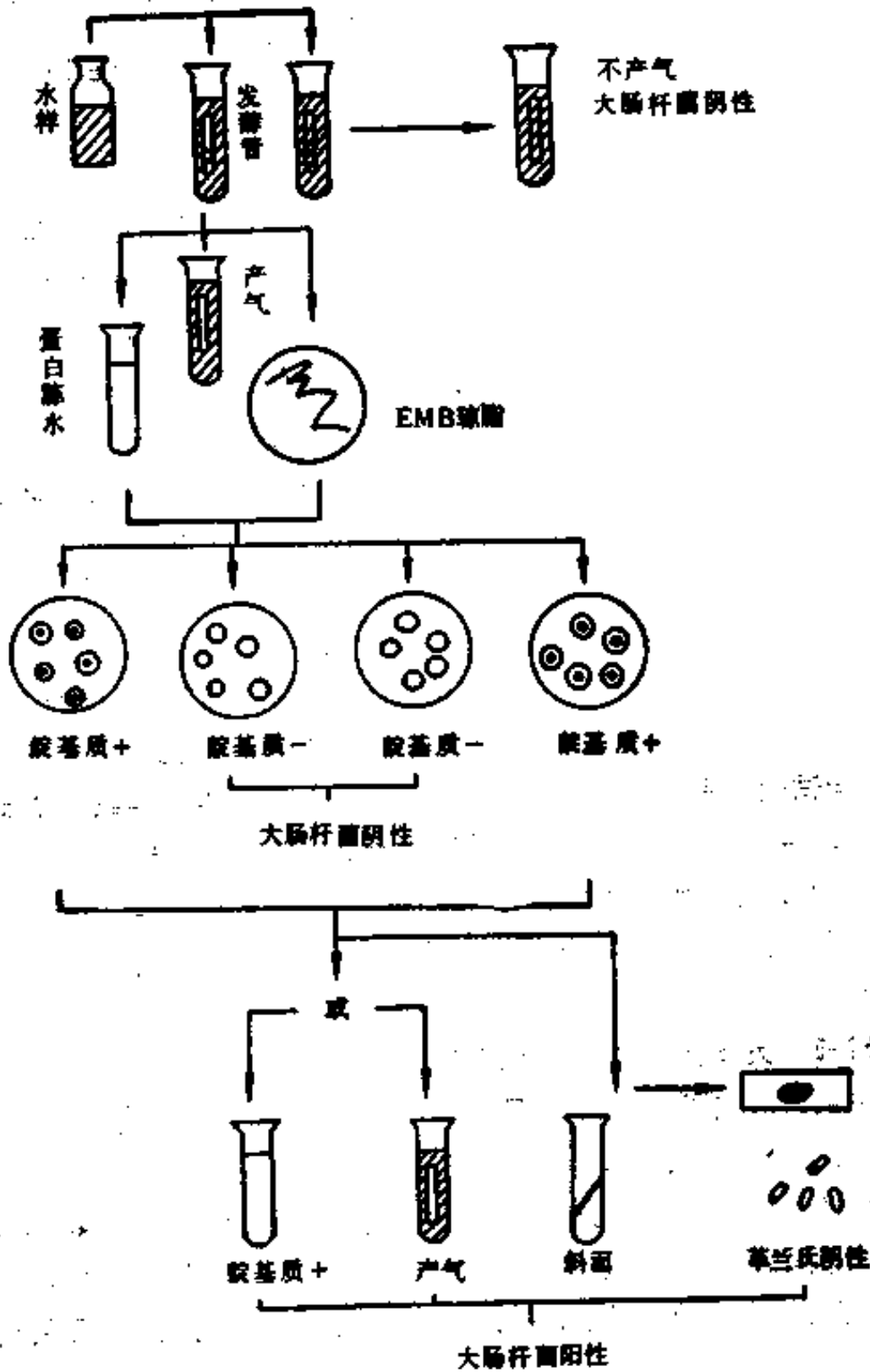


图 7-6 大肠杆菌检验程序图解

8. 培养箱。

9. 吸管、试菌、培养皿、载玻片。

## (二) 操作步骤 (图7-6)。

1. 假定试验 由于在乳糖营养肉汤中要产生可见的气体,需要在每1ml培养基中有4000万到39000万大肠杆菌。大多数情况下,需要每1ml含7500万或更多数目的大肠杆菌才能产生第一次可见气体,大肠杆菌接种乳糖营养肉汤的起始接种量对产生气体所必需菌密度的影响较小,但对产生气体所必需的时间影响较明显。

将水样接种于乳糖胆盐发酵管内,置 $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴或培养箱培养18~24h。经培养后,若所有乳糖胆盐发酵都不产气,则定为大肠杆菌阴性。

产生气体并不能完全确定有大肠杆菌存在,虽然多数情况下是正确的,但由于其他可能发酵乳糖产生酸和气体的细菌的存在,或细菌共生和互生作用也有可能产生气体,所以这时仅是设想有大肠杆菌存在。

2. 证实试验 将上面产气试管分别转接到伊红美蓝琼脂培养皿上,置 $37^{\circ}\text{C}$ 下培养24h,并同时接种蛋白胨水,置 $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养24h,若在培养基上长出典型的大肠杆菌菌落,而且在蛋白胨水中产生吲哚,加入柯凡克试剂轻摇呈深红色,具靛基质反应阳性,就可证实是大肠杆菌阳性。如果培养基中无典型大肠杆菌菌落,一般作大肠杆菌阴性。若靛基质反应为阴性,而培养皿又有大肠杆菌典型菌落,则应再作完全试验。

3. 完全试验 将菌落再接入乳糖营养肉汁培养基中, $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养,能产生气体,并将其接入斜面,培养后进行革兰氏染色,若为阴性,则认为大肠杆菌为阳性。另一做法是进行革兰氏染色的同时,再接入蛋白胨水培养,若为革兰氏阴性,且靛基质反应为阳性,则确认为大肠杆菌为阳性,否则为大肠杆菌阴性。

## 〔实验7-8〕大肠杆菌的简易检出法

由于去氧胆酸钠可以抑制革兰氏阳性细菌的发育,而当含乳糖的培养基中有革兰氏阴性菌生长时,TTC(三苯基四唑盐酸盐)能被该菌的琥珀酸脱氢酶所还原而成红色。据此,将含有去氧胆酸钠和乳糖的培养液加滤纸条浸泡和干燥后,即成大肠杆菌群的检出试纸。将其浸各种试样,然后喷雾TTC溶液,将这种试纸于 $37^{\circ}\text{C}$ 培养24h,若出现红色斑点,则可能有大肠杆菌存在。

### (一) 实验材料

1. 试样液体若干。

2. 大肠杆菌试纸的制备 配制下列培养液：蛋白胨1g，乳糖1g，去氧胆酸钠0.1g，NaCl 0.5g， $K_2HPO_4$  0.2g，柠檬酸铁铵0.2g，蒸馏水100ml，pH 7.2。剪取长5cm，宽2cm的滤纸条若干，浸泡于该培养液中，铺于干净纸上，在30~50℃下干燥，备用。

3. 0.4% TTC酒精液。

4. 器具 小型喷雾器，镊子，保温箱。

### (二) 操作步骤

1. 将大肠杆菌试纸浸入各试样。

2. 把浸样试纸铺于干净纸上，用0.4% TTC酒精溶液全面喷雾。每条试纸装入干净的塑料小袋中，37℃培养24h。

3. 观察滤纸条的颜色改变：若为红色，则初步认为样品中有大肠杆菌。

附：中华人民共和国发酵食品微生物卫生国家标准(表7-8)

表 7-8 中华人民共和国发酵食品微生物卫生国家标准

项 目	品 名	酱油	酱	食醋	生啤酒	熟啤酒	黄酒	葡萄酒
细菌总数(个/ml)		≤30000	—	≤5000	—	≤50	≤50	≤50
大肠菌群(个/100ml)		≤30	≤30个/ 1.00g	≤3	≤50	≤3	≤3	≤3
致病菌(多指肠道致病菌)		不得检出	不得检出	不得检出	—	—	—	—

## 二、酒醪中微生物总数测定

发酵过程可包括发酵前，发酵进行中和发酵成熟等几部分，就其试验讲，成品酒为液态，醪是固态。既有固、液之分，方法也有差异。

### 〔实验7-9〕酒醪中微生物数量的测定

#### (一) 实验材料

1. 酒醪 取发酵池各方，上下6个点的酒醪均匀混合样。

2. 培养基 鉴于酒醪处于无氧或微氧状态，主要存在的是细菌和酵母

菌，所以采用两类培养基，即牛肉膏蛋白胨培养基和麦芽汁或曲汁培养基。即使有放线菌和霉菌存在，也有可能分离出来。

3. 器具 无菌吸管，试管，培养皿，生理盐水，培养箱。

## (二) 操作步骤

1. 以尽可能完善的灭菌操作方法将样品10g置于含100ml无菌生理盐水的三角瓶中，经充分摇匀，作成1:10的均匀稀释液。

2. 以稀释分离法，稀释几个稀释度，如 $10^{-2}$ ， $10^{-3}$ ， $10^{-4}$ ，将它们分别吸取0.2ml培养皿中。每个稀释度，分别吸稀液于6个培养皿中，3个为肉膏(胨培养基)，3个为麦汁或曲汁培养基中，并作标记。

3. 将培养基融化，凉至 $50^{\circ}\text{C}$ 左右，倒入每个加样皿内摇匀，凝固。培养时间可在24至72h之间。

4. 观察计数，可按微生物概测法大体分类计数。该法主要测定好氧、兼性厌氧微生物的数量。

## (实验7-10) 固态发酵水浆厌氧微生物的分离

黄浆水发酵窖底孔穴内经发酵器长期滤沥下来的液体，酸度大，几乎集中了各种各样的发酵微生物。但鉴于酸度大，微生物的数量相差是很大的。这里仅从作为一项液体厌氧分离的方法来分离。

### (一) 实验材料

1. 窖底黄浆水。

2. 培养基 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基；丁酸菌培养基：蛋白胨1g，氯化钠0.05g，牛肉膏0.5g，葡萄糖3g，硫酸铵0.1g，硫酸亚铁0.01g，硫酸镁0.03g，碳酸钙3g，琼脂2g，水100ml， $58.84\text{kPa}$ 灭菌20min。

3. 器具 无菌生理盐水，双层试管厌氧培养装置，无菌吸管，试管，水浴。

### (二) 操作步骤

1. 将黄浆水稀释10倍。

2. 将装有两种培养基的 $15\times 150\text{mm}$ 试管或更小的水浴融化，待冷至 $50^{\circ}\text{C}$ 。

3. 将稀释和未稀释的黄浆水每管加0.5ml，每种培养基，每个稀释度3管，摇匀，凝固。

4.  $20\times 180\text{mm}$ 的大试管(已灭菌)底层放少许脱脂灭菌棉花，上放1g焦性没食子酸和碳酸钠的混合粉末，然后速将凝固试管无菌操作放入。

在大试管上塞以灭菌胶塞。每个小试管配以一大试管。

5. 于30℃培养, 48~72h后可看到小试管琼脂中长有分散菌落, 可能为厌氧性细菌。

#### 第四节 培养皿或试管中菌落总数的确定

表 7-9 稀释度选择与菌落总数的记录方式

平均 菌落 例次	稀释倍数	稀释度			两稀释倍 数之比	菌落总数 (个/g或个/ ml)	数据记录方式 (个/g或个/ ml)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>			
1		1356	164	20	—	16400	1.6 × 10 <sup>4</sup>
2		2760	275	46	1.6	37750	3.8 × 10 <sup>4</sup>
3		2890	271	60	2.2	27100	2.7 × 10 <sup>4</sup>
4		不可计	4650	513	—	513,000	5.1 × 10 <sup>5</sup>
5		27	11	5	—	270	2.7 × 10 <sup>2</sup>
6		不可计	305	12	—	30500	3.1 × 10 <sup>4</sup>

以表7-9为例说明。

1. 以选取菌落数30~300之间的培养皿作为菌落总数测定的依据。酵母、细菌可采用菌落数偏大者, 而霉菌则应选取菌落数偏小者。如: 根、毛霉菌偏多, 可于培养基内加入0.1%去氧胆酸钠, 以限制它们迅速扩展。总之, 菌落计数应以菌落间各个分开为度(例1)。

2. 若有两个稀释度, 其生长的菌落均在30~300之间, 则应视两者之比如何来决定。若其比值小于2, 则应取其平均值; 若大于2, 则取其较小数(例2及例3)。

3. 若所有的稀释的平均菌落数大于300, 或重行再次稀释分离培养, 或取稀释度最高的平均菌落数乘以稀释倍数 为菌落数(例4)。

4. 若所有的稀释度的平均菌落数均小于30, 或重行再次稀释分离培养或取稀释度倍数最低的平均菌落数乘以稀释倍数, 定为

菌落数(例5)。

5. 若所有稀释度的平均菌落数均不在30~300之间, 则以最接近30或300的平均数乘稀释倍数(例6)。

6. 菌落数在100以内, 按实有数记录, 若大于100时, 采用二位有效数, 二位有效数后的数值, 以四舍五入法计算。一般以10的指数表示(如表7-9记录方式)。

## 第五节 免疫学技术

抗原抗体相互间特异结合为我们提供了一系列十分敏感且专一的免疫学分析方法。随着免疫学技术的迅速发展和单克隆抗体(MAb)的普及应用以及免疫学技术与其他先进技术的有机结合。现在, 若干科学领域的科学工作者已逐渐将这一类方法作为一种极有价值的分析和研究工具, 用于各自的学科研究和生产实践中。

### 一、免疫学中的基本概念及原理

免疫学中首先出现的两个基本概念便是抗原(Ag)和抗体(Ab)。抗原是一能够刺激机体的免疫系统发生免疫应答, 产生抗体或致敏淋巴细胞, 并能在体内或体外与相应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的物质。由此得出抗原具有两重性质: 一是刺激机体的免疫系统, 使之发生免疫应答的免疫原性; 二是在体内或体外与相应的免疫应答产物发生特异性结合的反应性。作为抗原物质应具备的特点是异物性、高分子量和分子结构的复杂性。因此, 在食品中所研究的若干大分子(包括蛋白质、酶、多糖、核酸等)都是良好的抗原, 而一些小物质(如激素、真菌毒素)可以通过与大分子的载体(如牛血清蛋白, BSA)相结合成完全抗原。如此, 食品科学中遇到的几乎一切物质都可直接或间接地作为抗原。抗体则是抗原引起的免疫应答的产物之一, 可与引发的

抗原发生特异性结合。它是一类糖蛋白，人血清中的抗体有 IgG<sub>1-4</sub>，IgM，IgD，IgE 和 IgA，在应用于免疫分析方法中的 MAb 主要为 IgG 和 IgM。抗体单体由两条相同的重链和相同的轻链排列成对称的“Y”形分子。IgG 为单体结构，IgM 簇则是由 5 个单体组成的聚合体。

决定抗原分子与相应抗体发生反应之特异性为抗原分子表面具有特殊立体构象的有免疫活性的化学基团——抗原决定基（或决定簇）。因此在制备抗体时，如用常规方法制备免疫血清（抗体），则这种血清实际是针对多种抗原决定簇的不同的抗体混合物；而用杂交瘤技术获得的 MAb 是仅针对于抗原分子上的某一特定的抗原决定簇，因而具有较好的均一性和较高的专一性。

抗原抗体特异性结合后发生肉眼可见的凝集或沉淀反应是着干免疫学技术的基础。当抗体在一定的电解质、pH 和温度等条件下与相应的适量抗原（至少带有两个相同的抗原决定簇）结合时，可形成大而密的网络状复合物。一抗体分子上的一个抗原识别位点与抗原分子上一个抗原决定簇结合，余下的抗原决定簇可与另一抗体上的抗原识别位点起反应，后者又可以另一识别位点与另一抗原的决定簇结合。如果抗原为颗粒性的（如细胞），则以凝集表现出来；如果抗原为可溶性的（如蛋白质，多糖），则以沉淀表现出来。如果抗原分子上仅有一个与抗体相对应的抗原决定簇，则仅能发生由一个抗体单体与两个抗原分子结合形成可溶性复合物。遇到这种情况，我们可以对抗原或抗体进行加工，如将抗体结合到绵羊红细胞（SRBC）或胶乳颗粒上。

抗原抗体特异性结合的结果也可通过酶促反应、荧光反应等来显示，由此建立起来更为敏感且极实用的标记技术。

## 二、抗体的制备

各抗体所表现的对相应抗原的高度特异性，使得这些抗体成为大分子研究和纯化的理想工具。因此，获得满意的抗体是进行各

种免疫学分析的基础。目前，抗体主要从两方面获得，一是将抗原注射入动物体内经过一段时间诱导后，可在动物血液中出现高滴度的抗体，收集免疫血清，这种来自于免疫血清的抗体称为普通抗体，又习惯称为抗血清或常规血清。运用杂交瘤技术制备的MAb具有高度的均一性，是现代免疫学技术中最重要的工具。

### (一) 抗血清的制备

抗血清的制备过程包括将抗原注射入动物体内，采血检查抗体水平和最后放血收集免疫血清。影响优良抗血清获得的因素有免疫动物、抗原组成及性质、免疫程序等。

1. 抗原及佐剂 抗原一般分为天然抗原、人工抗原和合成抗原3类。根据其化学结构又可将天然抗原分为蛋白、多糖及核酸抗原3类。可根据组成和物理性状分为可溶性抗原如蛋白质和颗粒性抗原如细菌。在制备抗血清时，抗原最好充分纯化，越纯越好。

佐剂是指在抗原之前或同时注射入动物体内，能增加抗体对抗原的免疫应答或改变免疫反应类型的物质。佐剂在制备抗血清、特别是可溶性低免疫原性的抗原物质的抗血清中发挥极为主要的作用。可作为佐剂的物质很多，但常用的佐剂仅为弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

2. 免疫 常用于制备抗血清的实验动物主要有家兔、鼠、山羊、鸡、豚鼠等，以兔和小鼠最为常用。免疫用动物应适龄、健壮，如家兔体重在2.5~3kg，小白鼠在6~8周龄，最好雄性。由于动物个体差异较大，因此，每次制备抗血清时最好选用一组动物，一个抗原常用2~3只动物。

3. 抗血清的采集与处理 采血的操作取决于采血后是否需要动物恢复，试验性采血时，取血量少，动物可康复。收获抗血清时则一般将动物放血至死。各种动物的试验性采血和放血方法见表7-10。最初操作者最好在有经验的操作者指导下进行。

#### [实验7-11] 乳化抗原的制备



表 7-10

动物试验性采血和放血法

动物	试验性采血	抗血清收获
小鼠或大鼠	断尾或摘眼球	心脏穿刺
豚鼠	心脏穿刺	心脏穿刺
家兔	耳缘静脉放血	心脏穿刺
山羊或绵羊	耳静脉放血	颈静脉放血
鸡	翅静脉放血	臂静脉放血

## (一) 实验材料

1. 溶于或悬浮于生理盐水中的抗原。
2. 液体石蜡(或医用石蜡油)。
3. 羊毛脂。
4. 卡介苗冻干制剂。
5. 硫酸铝。
6. 氢氧化钠。
7. 生理盐水。
8. 双通接头(连接注射器用, 可用24°及16°注射针头各一只经焊接而成)。
9. 0.5~5ml玻璃注射器。
10. 1.5ml尖顶塑料离心管或10ml玻璃离心管。
11. 液体混合仪。
12. 吸管等。
13. 研磨器。

## (二) 操作步骤

## 1. 佐剂配制

(1) 氢氧化铝佐剂: 取50.0g/L硫酸铝250ml, 在强烈搅拌下加入50.0g/L氢氧化钠100ml, 沉淀用生理盐水洗2次, 再用生理盐水悬成250ml, 4℃存放。

(2) 弗氏佐剂: 取10ml液体石蜡至研磨器中, 向其中加入6ml羊毛脂, 研磨混匀, 2ml分装, 高压灭菌后-20℃存放。此即为弗氏不完全佐剂。在弗氏不完全佐剂中加入3mg/ml卡介苗即为弗氏完全佐剂。

## 2. 佐剂-抗原混合液的制备

(1) 氢氧化铝-佐剂抗原: 取适量氢氧化铝凝胶液加等体积抗原, 混

合即可。

(2) 弗氏佐剂-抗原(油包水乳剂)：

① 取所需体积的抗原(蛋白浓度为 $0.1\sim 10\text{mg/ml}$ ；细胞浓度为 $10^6$ 个/ml)，用相应大小的注射器吸水，勿留气泡。

② 取等体积的弗氏佐剂，用另一注射器吸入，勿留气泡。

③ 用双接头连接两注射器。

④ 将抗原液猛推入佐剂内。

⑤ 将混合物用两注射器来回推挤，直至无水珠残留，混合物应为均匀乳白色。

替代方法：

① 将所需体积的抗原和弗氏佐剂体积加入 $1.5\text{ml}$ 塑料离心管内(总体积少于 $0.6\text{ml}$ )或 $4\text{ml}$ 塑料液氮保存管内(总体积少于 $2\text{ml}$ )。

② 塞好，在液体混合仪上混合直至无水珠残留，混合物应为均匀乳白色。

抗原与佐剂之间是否充分乳化对免疫效果影响极大。一般经肉眼就可正确判断油包水乳剂良好与否。也可用下法进行质量检测：滴 $1\sim 2$ 滴已乳化的佐剂抗原于冷水表面，如聚而不散，浮于水面或沉于水底则为合格，即乳化充分；如很快分散成云雾状细小颗粒则为不合格。

### 〔实验7-12〕动物的免疫

#### (一) 实验材料

1. 实验动物 $2\sim 3$ 只。
2. 抗原(不含叠氮钠)。
3. 弗氏完全佐剂(初次注射)。
4. 弗氏不完全佐剂(加强注射)。
5.  $1\sim 5\text{ml}$ 注射器。
6. 70%酒精棉球。

#### (二) 操作步骤(注射量皆为每只动物的用量)

##### 1. 家兔(方法之一)(适用于各种抗原)

(1)  $50\sim 200\mu\text{g}$  纯抗原与等体积弗氏完全佐剂充分乳化(总体积在 $1\sim 2\text{ml}$ )。

(2) 助手两手固定家兔，70%酒精消毒后，在背部皮内注射 $6\sim 8$ 点，每点 $0.05\sim 0.1\text{ml}$ ，余下注射入后肢大腿内侧肌肉内。

(3) 做好标记，放入笼内饲养，每次注射5天内观察动物反应，如死

亡应及时补充。

(4) 20~40天后, 50~200 $\mu$ g纯抗原与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化(总体积为1~2ml), 在两后肢肌肉与颈部皮下多点注射, 每点0.2~0.3ml,

(5) 30天后, 再以50~200 $\mu$ g纯抗原(不加佐剂)同法多点注射。

(6) 4~5天后, 耳缘静脉采血试抗血清效价, 合格时再隔2天心脏放血, 不合格时, 继续饲养动物30天, 重复步骤3~4, 直至满意效价的抗血清的获得(抗血清效价测定: 可溶性抗原用双扩法, 双扩效价应大于1:8; 颗粒性抗原用试管凝集法, 凝集效价应大于1:800~1:1600, 具体方法见后)。

## 2. 家兔(方法之二)(适用于颗粒性抗原)

(1) 灭活菌液用生理盐水悬成10%。

(2) 助手两手固定家兔, 70%酒精消毒一侧耳缘。

(3) 抽取菌悬液, 选用5\*针头, 排净空气。

(4) 远耳根处行耳缘静脉穿刺, 注入1ml菌悬液。

(5) 每隔5天, 重复注射一次, 每次递增0.5ml, 共5次, 末次注射后4天试血, 各隔时7天放血。

## 3. 绵羊或山羊

(1) 0.5~10mg纯抗原溶于5ml生理盐水中, 加入等体积弗氏完全佐剂, 充分乳化。

(2) 将绵羊或山羊4条腿全十字形交叉, 绷带固定。

(3) 背部去毛, 70%酒精消毒。

(4) 背部皮内、皮下多点注射。

(5) 4周后, 0.5~10mg抗原溶于4ml生理盐水并与4ml弗氏完全佐剂充分乳化, 于肌肉或皮下数点注射。

(6) 在6~8月内, 用不含佐剂的抗原多数免疫, 每2个月一次, 注射后5天试血合格, 7天放血。

## 4. 小鼠

(1) 5~50 $\mu$ g抗原溶于0.15ml生理盐水中, 加等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 吸入注射器内。

(2) 左手固定小鼠, 消毒注射部位。

(3) 选一侧足垫注入50 $\mu$ l乳化抗原, 余下注入腹腔。

(4) 2~4周后取5~50 $\mu$ g抗原加等体积弗氏不完全佐剂, 充分乳化(总

体积0.2ml), 腹腔注射小鼠。

(5) 4~8周后, 小鼠尾静脉注入5~50 $\mu$ g抗原(不加佐剂)/0.2ml。

(6) 5天后摘眼球放血, 检测效价。

### 【实验7-13】兔抗血清的收集

#### (一) 实验材料

1.  $\phi$ 16cm大平皿(清洁无菌)。
2. 50ml注射器配20 $\times$ 针头。
3. 离心管。
4. 离心机。
5. 兔解剖固定台。
6. 中性甘油: 每10ml甘油(A.R)中, 加入固体 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2~3g, 沸水浴中溶解。

#### (二) 操作步骤

1. 已免疫好的家兔禁食24h。
2. 将兔子仰卧固定于解剖固定台上。
3. 剪去左前胸处毛。
4. 用食指及中指探测左前胸自下第三与第四肋骨间心脏跳动最强的部位。
5. 酒精消毒局部皮肤, 近胸骨肋间(心脏跳动最强部位)垂直进针, 出现明显突破感及感受到针尖的搏动时, 回抽针筒, 血流如涌, 证明已成功进行了心脏穿刺(进针一般在1.5~2cm)。如果抽不出血液, 需细心调节针头的深浅和方向再行穿刺。
6. 缓慢抽出血液, 斜放大平皿。
7. 将血液分放入大平皿中, 室温30min待凝。
8. 用无菌5 $\times$ 针头将血凝块作放射状划破。
9. 将平皿以一定角度置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中4h, 以利析出血清并流出血凝块。
10. 收集析出血清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放。
11. 血凝块置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。
12. 收集析出血清, 合并血清。
13. 3000r/min离心10min。
14. 上清加等体积中性甘油, 混匀, 分装-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 也可直接分装-20 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

## (二) 单克隆抗体的制备

单克隆抗体较之常规血清具有以下优点:

(1) MAb仅针对抗原分子表面的单个抗原决定簇,因此,其以全或无的方式与抗原决定簇反应,因此具有较高的特异性,可测定抗原分子上的微细差异。

(2) 可以无限量的获得理化特性和免疫生物学特性明确的匀质MAb,便于研究方法和结果的统一及标准化。

(3) 可更好地运用于以抗原抗体识别为基础的免疫学技术的其他分析技术,这些方法包括免疫荧光试验,酶联免疫吸附试验等。

(4) 相对投资等费用低,并可根据不同用途制备不同的MAb如用于一般分析检测,则可选择出亲和力强的MAb;如用于纯化抗原的亲和色谱中,则制成中等强度亲和力的MAb。

MAb的制备和方法类似工业微生物育种中原生质体融合技术。制备MAb的亲本之一是能够合成和分泌抗体的B细胞:具有次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶(HGPRTase),但不能在体外存活一周以上;另一种亲本是(HGPRTase缺陷型)肿瘤细胞具有在体外培养系统中无限生长繁殖的能力。在加有次黄嘌呤(氨甲喋呤和胸腺嘧啶核苷(HAT)的培养基中,两亲本的从头合成DNA的能力被氨甲喋呤(A)阻断,细胞存活则必须依靠HGPRTase由添加入培养基中的次黄嘌呤(H)、胸腺嘧啶(T)合成DNA的补救途径。因此,两亲体单独存在于HAT选择性培养基中皆不能存活,如两亲本在PEG介导下融合为一杂种细胞(杂交瘤),则此杂交瘤细胞的HGPRTase活力恢复,可以利用补救途径合成DNA,并且获得合成和分泌抗体的能力。因此,在HAT选择性培养基生长出的细胞克隆皆为已融合了的细胞。

### (实验7-14) 杂交瘤与单克隆抗体的制备

#### (一) 实验材料

1. 肿瘤细胞系 Sp 2/0, 来源于BALB/C小鼠,不分泌抗体, HGPRTase缺陷型。

2. 已被特定抗原免疫的BALB/C小鼠1只。

3. 空白BALB/C小鼠(8~12周龄)。

4. HT贮液 (100×)

次黄嘌呤 (H) 136.1mg

胸腺嘧啶核苷 (T) 38.8mg

四蒸水 100ml

加热至70℃使其溶解, 0.22 $\mu$ m过滤除菌, -20℃保存。

5. A贮液 (100×)

氢甲喋呤(A) 1.9mg

四蒸水 100ml

过滤除菌, 1ml分装, -20℃避光保存。

6. 青霉素-链霉素贮液 (PS, 1000×)

青霉素 200万单位

链霉素 2g

四蒸水(已灭菌) 10ml

分装, -20℃存放。

7. 6%碳酸氢钠溶液

NaHCO<sub>3</sub> 6.0g

四蒸水 100ml

高压灭菌, 无菌分装, -20℃保存。

8. 0.1%台盼蓝溶液

台盼蓝 0.5g

蒸馏水 500ml

氯化钠 4.5g

室温保存。

9. PEG PEG 1000 (Baker) 20~50g于三角瓶中, 60~80℃水浴中融化, 0.6ml分装, 高压灭菌, -20℃存放。

10. 基本培养液

改良依格尔培养粉(DMEM, 含葡萄糖1.0g/L)

四蒸水(或超纯水, 阻抗 $\geq$ 15.5M $\Omega$ ) 980ml

葡萄糖 (A.R) 3.5g

NaHCO<sub>3</sub> (A.R) 3.7g

PS (1000×) 1ml

过滤除菌，分装后4℃存放，一个月内用完。

11. L-谷氨酰胺贮液 (LG, 100×)

L-谷氨酰胺 2.92 g

基本培养液 100ml

0.22μm过滤除菌，分装-20℃保存。

12. HT培养基

四蒸水(或超纯水，阻抗≥15.5MΩ) 980ml

改良依格尔培养粉 (Sigma) 10 g

葡萄糖 (A. R) 3.7 g

HT (100×) 10ml

LG (100×) 10ml

NaHCO<sub>3</sub> (A. R) 3.7 g

PS (1000×) 1ml

新生牛血清 (FCS) 150ml

磁力搅拌至溶解，0.22μm孔径滤膜自然压力下过滤除菌，分装，4℃保存。一个月内用完，如暂不使用，可置-20℃冻存，用前在4℃冰箱中缓慢融化后，再行使用。

13. HAT培养基 在HT培养基中每100ml添加1ml A贮液。

14. 二甲亚砜 (A. R).

15. 37℃水浴。

16. 秒表。

17. 倒置显微镜。

18. 血球计数板。

19. 水平式离心机。

20. 50ml玻璃融合离心管。

21. 24、96孔带盖细胞培养板 (Costar, Corning, Nunc等)。

22. 二氧化碳培养箱 (6.5~7% CO<sub>2</sub>)。

23. 医用净化台(单人双面)。

24. 细胞玻璃培养瓶(方瓶)25ml, 50ml。

25. 巴氏滴管(弯头及直头)。

26. 吸管 (1ml, 10ml)。

27. 冰箱 (4℃, -25℃, -70℃)。

28. 液氮罐(两只)。

29. 解剖工具 眼科用小剪刀(5把), 镊子(5把), 1ml注射器4支, 10ml注射器1副(配18°针头), L型针头(可用8°针头自制), 5°针头。

30. 10ml离心管。

31. 安瓿。

32. 玻璃培养皿( $\phi 5\sim 7\text{cm}$ )。

## (二) 操作步骤

操作之前应准备好所有实验材料, 所有玻璃器具皆须按细胞级处理(见附录)。所有操作步骤都须在高度无菌条件下进行。

1. 从液氮罐中取出冻存的Sp 2/0细胞1支, 立即在37℃水浴中融化至最后一块刚好化完, 取出置冻水浴中。

2. Sp 2/0细胞冻存液移入10ml离心管中, 加入8ml已预热至37℃的HT培养基, 1000r/min离心10min。

3. 细胞沉积用小量HT培养基悬浮, 移入50ml方瓶中, 补加HT培养基8ml, 置CO<sub>2</sub>孵箱中培养, 每天换液1次, 增殖细胞至 $2\sim 5\times 10^7$ (50ml方瓶长满细胞, 约需3~4瓶)。融合前12~16h换液1次。

4. 融合前3天最后1次尾静脉免疫BALB/C小鼠(免疫程序及方法见抗血清制备章节)。

5. 解剖工具加四蒸水, 煮沸5min。

6. 摘眼球放血, 收获血液, 处死已免疫BALB/C小鼠, 70%酒精中浸泡5min。

7. 用4只图钉将小鼠固定于一已用70%酒精消毒的小木板上, 将小鼠置净化台内继续下列步骤。

8. 沿腹腔中线横向剪切皮肤(勿剪破腹膜), 用两把镊子将皮肤向头部充分解剖开, 直至充分暴露胸肋。

9. 更换剪刀, 沿腹中线打开腹腔。

10. 更换镊子, 在小鼠左上腹后部分离出脾脏, 钝性分离, 剪去结缔组织(脾脏很脆, 操作应轻)。

11. 助手吸取10ml基本培养液(37℃)置底及盖中。

12. 取出脾脏, 置10ml培养液中, 用剪刀及镊子小心解剖, 去掉脾脏表面的脂肪、结缔组织, 移入另一平皿中。

13. 助手摘眼球处死空白小鼠1只(收集血液作为阴性对照用), 浸入



70%酒精中。

14. 用1ml注射器取基本培养液，缓慢注入脾脏内。

15. 助手在倒置显微镜下观察Sp 2/0细胞，选生长良好的细胞4瓶，弯头巴氏滴管吹打下。

16. 用L型针头轻轻敲打脾脏，使脾脏细胞尽可能以单细胞释放出，用巴氏滴管吹打数次，尽可能将脾细胞打散。移入10ml离心管内静置1min；使组织块沉淀。

17. 将脾细胞与Sp 2/0细胞悬液混合移入融合管内(初次融合，可进行脾细胞及Sp 2/0细胞活细胞计数，两者以10:2~5混合)。

18. 1000r/min离心，8min。

19. 助手准备40℃水浴(用1000ml烧杯)。

20. 取一小瓶PEG (0.6ml)，加热熔化，加入0.5ml基本培养液，滴加6% NaHCO<sub>3</sub>至溶液刚好变红之前。补加基本培养液至总体积为1.2ml。

21. 取出融合管，用基本培养液再离心洗涤1次，去尽上清。

22. 将融合管在手掌敲击，打散细胞沉积。

23. 将融合管置40℃水浴中预热。PEG溶液同时预热(冬天须将1ml吸管同时预热)。

24. 用1ml吸管吸取1ml PEG液，加入细胞悬液中，开始记录时间。加时先慢后快，边加边搅拌，50s内加完。

25. 立即加入20ml基本培养液，先慢后快，90s内加完。

26. 室温静置10min。

27. 移去40℃水浴烧杯，助手取小鼠腹腔细胞，方法如下：

(1) 同上固定小鼠，剪刀腹部皮肤，充分暴露腹膜。

(2) 用10ml注射器(配20\*针头)吸10ml HT培养基。

(3) 沿腹中线水平进针，针头进入腹腔后，边注入培养基边将针头向前推进，注入全部培养基。

(4) 用消毒拇指和食指轻轻揉挤腹部数次。

(5) 针头前推置肝脏上方，下压吸入培养基。

(6) 推注出培养基再吸入，一般可回收8ml培养基，其中含有大量的巨噬细胞。

28. 1000r/min离心融合物8min。

29. 取90ml HT培养基无菌补加1ml A贮液(100×)。

30. 弃尽离心上清,加少许HAT培养基悬浮细胞沉积,再加5ml HAT培养基,混合移入HAT培养基中,轻轻混合,加入腹腔细胞液,混合。

31. 分装96孔板4块,每孔0.25ml。

32. 置7% CO<sub>2</sub>培养箱中,37℃培养。

33. 7天后用HAT培养基换液一半。

34. 12天后用HT培养基换液一半。

35. 14天对上清进行检测(一般克隆直径在3mm以上时作检测)。检测方法常用酶联免疫吸附试验(ELISA),间接免疫荧光试验(IFA)及间接血凝试验(PHA)等(操作步骤详见后)。

36. 阳性孔用有限稀释法进行克隆化,方法如下:

(1) 将需克隆化的阳性孔中的细胞悬浮吸出至已置有1ml HT培养基的24孔培养板孔中。

(2) 取0.1ml细胞悬液加0.9ml 0.1%台盼蓝用血球计数板进行活细胞计数。以4个大方格的活细胞总数除以4再乘以10<sup>6</sup>,即得每毫升细胞数。

(3) 以HT培养基稀释细胞至20个/ml,每个克隆细胞做3个稀释度。96孔板中每孔加0.2、0.1及0.05ml即4、2和1个细胞/孔,每个稀释度至少有16个培养孔。

(4) 按步骤27(1)~27(6)制备小鼠腔腹细胞,用HT作对倍稀释,每孔加1滴(0.05ml)腹腔细胞悬液。

37. 7% CO<sub>2</sub>, 37℃培养7~10天,中间换液一次,换液前倒置显微镜下观察记录单一克隆生长孔。单克隆直径大于3mm时对其上清进行检测。强阳性单克隆冻存并再按上法克隆化一次。

38. 将强阳性单克隆细胞放大入24孔板,7% CO<sub>2</sub>, 37℃培养3~7天。

39. 放大入50ml方瓶中培养扩大,一部分准备冻存,一部分继续培养,以用于制备单克隆抗体。

40. 细胞冻存,步骤如下:

(1) 将2瓶已长满的细胞吸下,移入离心管中。

(2) 1000r/min离心8min。

(3) 配制细胞冻存液: HT培养基9ml加二甲亚砜1ml,预冷至0℃,置冰水浴中。

(4) 弃上清,细胞沉积用3~4ml细胞冻存液悬浮,分装4支安瓿。

(5) 安瓿封口后,装入纱布袋中,做好标记,放入-70℃冰箱中3~

18h, 移入液氮罐中。

41. 制备单克隆抗体步骤如下:

(1) 选择8~10周雄鼠若干只, 每只腹腔内注射无菌石蜡油0.4ml。

(2) 7~10天后每只小鼠腹腔植入 $1 \times 10^6/0.2\text{ml}$ 阳性单克隆的杂交瘤细胞。

(3) 从植入细胞后第6天起, 每天观察小鼠腹部, 待腹部明显膨大时用18#针头穿刺腹腔放出腹水, 3000r/min离心10min, 收集上清, 分装 $-20^\circ\text{C}$ 或 $-70^\circ\text{C}$ 存放。一般1只小鼠可收到5~10ml腹水, 腹水中单克隆抗体的含量可达20mg/ml左右。

### 三、抗体的纯化及标记

抗体的纯化方法主要有盐析、离子交换色谱、凝胶色谱及亲和色谱等方法。就一般实验条件, 盐析法简便、高效, 所纯化的抗体已足够胜任一般实验目的。

#### 〔实验7-15〕抗血清中IgG抗体的纯化

IgG在50%饱和硫酸铵中形成沉淀, 不吸附DEAE-纤维素, 利用此可纯化IgG。

##### (一) 实验材料

1. 抗血清10ml。
2. 硫酸铵 (A. R)。
3. 2mol/L硫酸铵溶液。
4. PBS, 15mmol/L PB  
50mmol/L NaCl  
pH 7.2
5. DEAE纤维素 (Whatman DE52)。
6. 透析袋。
7. 离心机。
8. 磁力搅拌器。

##### (二) 操作步骤

1. 10ml抗血清移入小烧杯中, 置磁力搅拌器上慢速搅拌。
2. 室温下缓慢加入2.7g固体硫酸铵。
3. 室温下缓慢搅拌2h。

4. 10000r/min 离心30min去尽上清。
5. 沉淀用5ml 2mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 重新悬浮, 室温缓慢搅拌30min。
6. 10000r/min离心30min去尽上清。
7. 沉淀用2ml PBS 悬浮, 移入透析袋中(透析袋的预处理参见第十三章), 封口。
8. 对PBS透析15h (4℃), 中间更换PBS 4次。

作为一般实验用途的抗体, 经上述提纯其纯度已完全可满足各种常用的免疫学检测技术而不再纯化。如需更高纯度的抗体, 则继续下列实验。

9. 将已预溶胀的 DEAE-纤维素 10g, 用 PBS 平衡并洗涤, 去多余 PBS。

10. 将透析好的盐析纯抗体经离心去沉淀, 上清加入湿 DEAE-纤维素中, 室温搅拌2h。

11. 离心、收集上清液, 分装,  $-20^\circ\text{C}$  存放备用。

进一步纯化, 可采用抗原或 SPA 等亲和色谱技术。腹水单克隆抗体 IgG 的纯化可采用上述方法。但在用 DEAE-纤维素纯化时结果不稳定, 最好用 SPA 亲和色谱。

#### 〔实验7-16〕辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体 IgG 的制备

用于标记抗体的酶有 HRP、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、尿素酶等。国内最常用的酶为 HRP, 最广泛使用的交联剂是戊二醛和过碘酸钠, 我们更喜欢使用过碘酸钠。

HRP 上有多个糖基, 被过碘酸钠氧化后形成醛基, 再与 IgG 的游离氨基形成席夫氏碱。经硼氢化钠还原后而稳定。为防止 HRP 在氧化过程中自身形成聚合物, 将氧化时溶液 pH 维持在弱酸性。HRP 与 IgG 交联之前调 pH 至 9~9.5。

##### (一) 实验材料

1. 0.2mol/L  $\text{NaIO}_4$  (用前配制)
  - $\text{NaIO}_4$  21.4mg
  - 蒸馏水 0.5ml
2. 1mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 4.5)。
3. 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) (CBS)
  - $\text{NaHCO}_3$  0.294g
  - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.159g

- 蒸馏水 25ml
4. 10mmol/L CBS (pH 9.5)  
0.2mol/L CBS 1ml  
蒸馏水 19ml
  5. 4mg/ml NaBH<sub>4</sub> 溶液, 新鲜配制
  6. PBS: 0.05mol/L PB  
0.1mol/L NaCl  
pH 7.5
  7. 5mg/ml BSA甘油溶液  
BSA (牛血清蛋白) 50mg  
PBS 1ml  
甘油 9ml
  8. HRP (RZ $\geq$ 3.0, 250u/mg)
  9. 待标记纯化抗体IgG
  10. 台式振荡器
  11. 磁力搅拌器

## (二) 操作步骤

1. 将5mg HRP溶于1.25ml蒸馏水中。
2. 加0.25ml新配制的过碘酸钠液。
3. 室温振荡20min。
4. 装入透析袋, 4℃对1mmol/L、pH 4.5醋酸盐缓冲液, 在磁力搅拌器搅拌下透析10h, 换透析缓冲液5~6次。
5. 将氧化HRP溶液移入一小瓶内, 加入0.2mol/L、pH 9.5 CBS 50ml, 立即加入10mg IgG (溶于1.25ml 10mmol/L、pH 9.5 CBS中), 混匀。
6. 检查pH (pH应在9.0~9.5), 否则, 用0.2mmol/L、pH 9.5 CBS调节。
7. 室温振荡2h。
8. 加入0.12ml新配制硼氢化钠溶液, 4℃放置2~4h。
9. 用5000倍体积的PBS透析反应混合物过夜。
10. 加等体积的BSA-甘油溶液, 混匀, 分装-20℃存放。
11. HRP标记抗体工作浓度, 质量鉴定。

(1) 摩尔比值测定:

$$\text{酶量 (mg/ml)} = OD_{405} \times 0.4$$

$$\text{IgG量 (mg/ml)} = (OD_{280} - OD_{405} \times 0.3) \times 0.62$$

$$\text{酶结合物摩尔比值 (E/P)} = \text{酶量} \times 4 / \text{IgG量}$$

$$\text{标记率} = OD_{405} / OD_{280}$$

E/P值在1~2之间合格。

(2) 特异性及效价测定: 应用酶联免疫吸附试验, 同时确定酶结合物的特异性、酶活力, 抗体的活性及效价。

将酶结合物对倍稀释后, 平行加于阴性及阳性孔, 合适底物显色后, 记录各个稀释度的特异及非特异显色值, 以阴性孔OD小于0.2, 阳性孔在1.0时的最高稀释倍数作为酶标抗体的效价。实际使用浓度应适当提高2~4倍。

### (实验7-17) 荧光抗体的制备

#### (一) 实验材料

1. 待标记纯化抗体IgG。
2. 活化荧光素 5(6)-羧基荧光素-N-羟基琥珀酰胺酯 [5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimide ester, Fluos] (MW473.4), 可从Boehringer Mannheim公司订购。

3. 0.1mol/L、pH 8.5碳酸盐缓冲液。

4. 二甲亚砜 (DMSO)。

5. Sephadex G-50。

6. 台式振荡器。

#### (二) 操作步骤

1. 取5g Sephadex G-50充分溶胀后装入有玻璃毛的15ml注射器外筒内, 用0.1mol/L、pH 8.5碳酸盐缓冲液平衡2h。

2. 10mg IgG溶于1ml碳酸盐缓冲液中。

3. 0.5mg FLUOS溶于1ml DMSO, 取0.85ml加入到IgG溶液中。

4. 室温振荡1h。

5. 反应混合物加入Sephadex G-50柱中, 用0.1mol/L、pH 8.5碳酸盐缓冲液洗脱, 收集第一有色峰。

6. 对蒸馏水透析过夜, 换水3次。

7. 冻干或加等体积甘油-20℃存放。

FLUOS对光敏感，因此在与抗体相遇之前，应避光操作。FLUOS选择性地与蛋白质的氨基起反应，最大吸收波长为  $494\mu\text{m}$ ，最大发射波长为  $518\mu\text{m}$ 。国内常用荧光素为异硫氰酸荧光素 (FITC) 和四甲基异硫氰酸罗丹明 (TMRITC)，标记方法相似，但标记时间较长，标记效果不稳定。

#### 四、凝集反应

在适当浓度的电解质环境中，颗粒性抗原与相应抗体结合形成肉眼可见的凝集块，此反应称为凝集反应。

##### (实验7-18) 玻片凝集试验

###### (一) 实验材料

1. 抗沙门氏菌多价血清。
2. 沙门氏菌可疑菌落。
3. 生理盐水。
4. 接种环、玻片等。

###### (二) 操作步骤

1. 取干净玻片一块，用蜡笔分为两格。左侧加3~4环生理盐水，右侧加3~4环多价血清。
2. 灭菌接种环，从平板上挑取可疑菌落分别在生理盐水和多价血清中研磨。
3.  $20\sim 37^{\circ}\text{C}$  静置 3~5min后，肉眼观察凝集现象，如左侧仍呈乳白色而右侧内形成白色小块状凝集物，液体变清，则分离培养出沙门氏菌。如左右两侧皆仍呈乳白色，则为沙门氏菌阴性。如左右两侧皆凝集成块，则为非特异性凝集。

##### (实验7-19) 试管凝集试验

###### (一) 实验材料

1. 抗血清。
2. 菌悬液。
3. 生理盐水。
4.  $37^{\circ}\text{C}$  孵箱。

###### (二) 操作步骤

1. 取10支5ml无菌试管，编号。
2. 每试管加0.5ml生理盐水。

3. 取抗血清, 用生理盐水作1:50稀释, 取此稀释抗血清0.5ml加入第1支试管中, 吹吸数次以混匀, 从第1支试管中吸出0.5ml加入第2支试管中, 混匀, 吸出0.5ml加到第3支试管中, 由此作对倍稀释至第8支试管, 从第8支试管中吸出0.5ml, 弃去。第9~10支作空白对照。

4. 混匀菌悬液, 用生理盐水稀释成 $10^8$ 个/ml, 每试管加0.5ml菌悬液, 摇匀。

5.  $37^{\circ}\text{C}$ 静置18~24h观察结果。

#### 〔实验7-20〕反向间接血凝试验

将绵羊细胞 (SRBC) 经双醛化后, 用抗体致敏, 此血球在遇到相当的可溶性抗原时, 抗原抗体特异性结合后, 出现血球凝集。此法敏感、快速、方便, 适用于各种可溶性抗原的定性及定量检测。

##### (一) 实验材料

1. SRBC 颈静脉抽血, 玻璃球振荡去纤维蛋白原, 生理盐水洗涤3次。

2. 0.11mol/L、pH 7.2磷酸盐缓冲液 (PB)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  28.37 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.82 g

蒸馏水 加至 1000ml

3. 3%丙酮醛-3%甲醛液

丙酮醛 15ml

甲醛 8ml

PB 60ml

混合后用10% NaOH调pH至7.2, 再加PB至100ml。

4. 0.2mol/L、pH 4.0醋酸盐缓冲液

$\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4.9 g

冰醋酸 9.4ml

蒸馏水 加至 1000ml

5. 稀释液

PEG 6000 500mg

牛血清白蛋白 40mg

$\text{NaN}_3$  100mg

PB 加至100ml



6. 磁力搅拌器。
7. V型孔微量血凝反应板。
8. 微型振荡器。
9. 37℃水浴。
10. 微量稀释器。
11. 待测样本。

## (二) 操作步骤

1. 将沉积SRBC用0.11mol/L、pH 7.2 PB洗4~6次，用此PB配成10%悬液，移入小烧杯中。

2. 在磁力搅拌下，缓慢滴入等体积的3%丙酮醛-3%甲醛液。

3. 室温下继续缓慢搅拌17h。

4. 离心收集醛化SRBC，用10倍体积0.11mol/L、pH 7.2 PB洗3次后，用此PB配成20%悬液，加NaN<sub>2</sub>至1.0g/L，4℃保存。

至此SRBC醛化完成，醛化SRBC可在4℃存放。

5. 取20%醛化SRBC 0.1ml，离心弃去上清液，加入0.2mol/L、pH 4.0醋酸盐缓冲液0.9ml及用生理盐水稀释的最适浓度（预试确定）的抗体IgG 0.1ml，混匀。

6. 45℃下致敏（孵育）35min。

7. 离心去上清液。

8. 用PB洗一次。

9. 沉积用4ml稀释液悬起，即成0.5%致敏SRBC悬液，4℃存放。

至此，致敏SRBC制备完成，致敏血球可在4℃保存3~6个月，用前摇匀。

10. 取一块干净V型孔微量血凝反应板，按每个待测标本用2排孔，每孔加入稀释液25μl。取25μl待测量标本，从第1孔起作倍比稀释至12孔，稀释度分别为1:2, 1:4, 1:8……1:4096。

11. 第1排每孔补加稀释液25μl；第2排每孔补加最适浓度的抗体25μl作阻断试验（最适浓度预试确定）。

12. 每孔加入25μl致敏血球，于微型振荡器上振荡2min。

13. 37℃孵育2h，判读结果。

14. 结果判断

(1) 阴性：血球全部下沉于孔底，形成紧密圆点，周围整齐光滑。

(2) 4+ : 100%凝集。血球在孔内均匀分布。

(3) 3+ : 75%凝集。血球凝集较疏松,有时孔底部有少许红细胞沉积。

(4) 2+ : 50%凝集。孔底有明显的血球沉积,沉积的圆点大小约为阴性反应孔的 $\frac{1}{2}$ 。周围血球凝集。

(5) 1+ : 25%凝集。多数血球下沉于孔底,仅于沉积圆点周围有少量细胞凝集。

以上50%凝集(2+)为终点。试验排应较阻断试验排至少高2个滴度(2孔)才为阳性,以终点的抗原稀释度为其效价。

## 五、沉淀反应

可溶性抗原与相应的抗体结合,在有适量电解质存在的条件下两者比例适合时,形成肉眼可见的沉淀物,称为沉淀反应。免疫沉淀的主要类型有琼脂扩散试验。除此之外,沉淀反应尚用于各种大分子物质的分离纯化。

### (实验7-21) 单相免疫扩散法

单向扩散是目前最可靠的免疫定量方法。将一定量的抗体混合于琼脂内,在玻板上制成凝胶。在凝胶打孔中加入抗原液,孔中抗原即向四周扩散,在抗原与抗体的比例合适处出现白色沉淀环。沉淀环的直径大小与抗原的浓度成正比。

#### (一) 实验材料

1. 玻板。
2. 琼脂。
3. 湿盒。
4. 磷酸盐缓冲液(PBS),添加0.02%叠氮钠。
5. 特异抗体IgG(制备及纯化见前)。
6. 待检抗原液。
7. 琼脂打孔器(可用蘸水钢笔头代替)。
8. 微量加样器(10 $\mu$ l)。
9. 刻度尺。
10. 50℃水浴。

#### (二) 操作步骤

1. 用PBS配制1.2%的琼脂溶液。
2. 熔化后预冷至56℃。
3. 加入适宜稀释度的抗血清，混匀(如抗血清效价不高，可制备2.4%琼脂溶液及2倍浓度抗血清溶液，等体积混和)。
4. 浇注1.6mm厚的琼脂板，6×12cm玻板，浇注琼脂量为11.6ml，6×8cm为7.7ml，2.5×7.5cm为3.0ml。
5. 用打孔器打成3mm直径的孔，孔间距在1.2~1.5cm，用针头挑出孔内的琼脂。
6. 取已知浓度的抗原用PBS稀释成1000μg/μl，然后倍比稀释成800、600、400、200、100、50、25μg/ml。
7. 用微量加样器取10μl稀释抗原液加入琼脂孔内，做复孔。
8. 待检样本用PBS适当稀释，每孔加10μl。
9. 加样的琼脂板置湿盒内，37℃，24h。
10. 测定各孔沉淀环直径。
11. 以各种浓度标准抗原的沉淀环直径为横坐标，以相应孔中抗原含量的对数为纵坐标，画出标准曲线。
12. 根据待检样本沉淀环直径，查标准曲线，将查得的抗原含量乘以标本的稀释倍数，即为标本中相应抗原的含量。

#### (实验7-22) 双相免疫扩散法

双相免疫扩散是将可溶性抗原和抗体分别加入琼脂凝胶板上相对应的孔中，两者各自向四周扩散，如果抗原和抗体相对应，则在两者比例适当处形成白色沉淀线。此试验主要用于检测抗体的效价、抗原或抗体的纯度、已知和未知抗原或抗体的检测。

##### (一) 实验材料

1. PBS (添加0.02%叠氮钠)。
2. 琼脂。
3. 载玻片。
4. 湿盒
5. 琼脂打孔器。
6. 待检抗原、抗血清等。

##### (二) 操作步骤

1. 在水平台上放上所需数量的载玻片。

2. 制备1%琼脂溶液。
3. 琼脂溶液冷却到45℃，吸取3ml加到每块玻片上，待其凝固。
4. 小心地用打孔器打孔，以中心打1孔，其周围分布6孔，使每孔的直径为3mm，两孔之间的距离皆为6mm（先在白纸上制一打孔模式，打孔时衬于玻片后）。
5. 用针头挑去孔中琼脂。
6. 分别制备抗血清，和抗原系列稀释液。
7. 吸取10μl抗血清加入中央孔中，按浓度顺序吸取抗原液置于周围孔中。
8. 置湿盒中，37℃，24h。
9. 检查玻片上的免疫测定线。

**附：琼脂中沉淀线的染色**

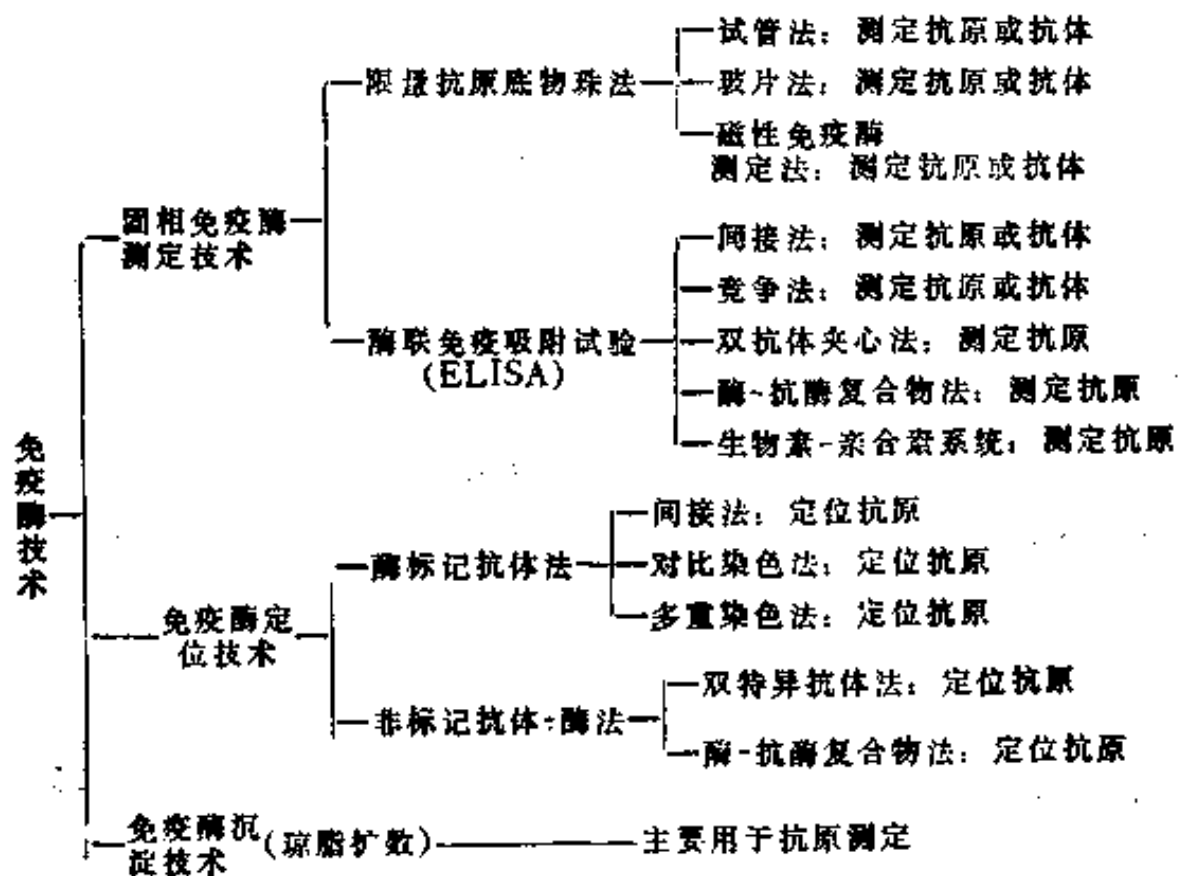
1. 用100ml PBS洗涤凝胶，换液5次，共48h。
2. 用滤纸复盖凝胶，40℃，2~6h，使其干燥。
3. 将琼脂板浸入0.5%考马斯亮蓝R250溶液中染色5~10min（考马斯亮蓝R250用50:45:5的酒精、水、冰醋酸溶液配制），直至出现染色带。
4. 用水、冰醋酸、甲醇（87:8:5）脱色液脱洗3~4次，直至背景变清晰。
5. 置室温空气干燥。

## 六、酶联免疫吸附技术 (ELISA)

免疫酶技术 (EIA) 是将抗原、抗体特异反应和酶的高效催化作用原理有机结合的一种新颖、实用的免疫学分析技术；该方法除可在细胞水平或亚细胞水平上进行抗原或抗体的定位研究外，还可定性或定量地检测体内的半抗原、抗原或抗体。免疫酶技术的基本原理是将酶与抗原或抗体用交联剂等结合起来，此种标记抗原或抗体可与组织内的或固相载体上的相应抗体或抗原发生特异性反应。加入相应酶的底物时，底物被酶催化生成可溶性或不溶性呈色产物。可用肉眼或分光光度计定性或定量，根据呈色深浅，确定待测抗原或抗体的浓度与活性。不溶性呈色产物，则可用光学显微镜或电镜进行检测。免疫酶技术方法见表7-11。

表 7-11

常用免疫酶技术的分类及主要用途



## 〔实验7-23〕夹心ELISA

## (一) 实验材料

## 1. 包被缓冲液 (pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.16 g	$\text{NaHCO}_3$	0.29 g
蒸馏水加至	100ml	4℃ 保存	

## 2. 稀释和封闭液

## (1) PBS (pH7.2)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g	$\text{NaCl}$	8.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g	$\text{KCl}$	0.2 g
蒸馏水加至	1000ml		

## (2) PBS/T20-BSA

PBS	1000ml	BSA	5.0 g
Tween-20	0.5ml		

## (3) Tris-HCl 缓冲液 (TB) -BSA

1mol/L Tris-HCl	(pH7.2)		10ml
-----------------	---------	--	------

NaCl	8.5 g	BSA	50 g
水加至	1000ml	(BSA可用5%脱脂奶粉代替)	

3. 洗涤液

(1) PBS/T20

PBS	1000ml	Tween-20 (或80)	0.5ml
-----	--------	----------------	-------

(2) Tris-HCl/T<sub>20</sub>

1mol/L Tris-HCl (pH 7.2)			20ml
--------------------------	--	--	------

水	1000ml	Tween 20	0.5ml
---	--------	----------	-------

4. 底物缓冲液

(1) 0.1mol/L 磷酸盐-柠檬酸缓冲液 (pH 5.0)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.8 g	柠檬酸	0.52 g
--	-------	-----	--------

蒸馏水	100ml		
-----	-------	--	--

4℃存放, 用前加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

(2) 0.05mol/L Tris-HCl缓冲液 (pH7.6)

1mol/L Tris (pH7.6)	5ml	蒸馏水	95ml
---------------------	-----	-----	------

4℃存放, 用前加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

5. 终止液 ( mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

浓硫酸	55.5ml	水	444.5ml
-----	--------	---	---------

6. 酶联免疫阅读仪.

7. 37℃水浴.

8. 40孔或55孔聚苯乙烯酶标板.

9. 酶标抗体.

10. 酶标底物 联苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB) 或二氨基联苯胺 (DAB).

11. 微量移液器 (50μl, 100μl).

(二) 操作步骤

1. 单一或混合单克隆抗体腹水或纯化的免疫血清 IgG, 用包被液稀释成25~100μg/ml.

2. 以50~100μl/孔量加入酶标板中.

3. 4℃吸附过夜.

4. PBS/T20洗涤3次, 每次3min.

5. PBS/T20-BSA封闭游离结合位点, 200μl/孔, 4℃过夜.

6. PBS/T20洗涤3次, 每次3min (暂不用时置-20℃存放)。

7. 每孔加50~100μl待查抗原, 同时设立阴性阳性对照。

8. 37℃孵育2h。

9. PBS/T20洗4次, 每次5min。

10. 每孔加50~100μl酶标单抗或酶标纯化抗体, 37℃孵育2h。

11. PBS/T20洗6次, 每次3min。

12. 配制底物溶液。

(1) OPD 4mg溶于10ml pH 5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液中, 溶解后加入3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150μl, 避光保存。

(2) TMB底物

TMB 200mg

DMSO 20ml

溶解后分装-20℃保存。用前取TMB贮液(37℃助溶) 0.1ml加入pH5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液7ml, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 90μl。

13. 选择上述底物溶液一种, 加100μl/孔, 保温, 10~15min。(OPD有致癌作用, 使用时应小心; TMB无致癌作用, 且灵敏度等较OPD高, 但应注意不与NaN<sub>3</sub>等混用)。

14. 打开酶联免疫阅读仪, 预热。

15. 每孔加2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50μl终止反应。

16. 以空白对照调零, 读取OD值(OPD底物用490nm滤光片, TMB底物选用450nm滤光片)。

17. 结果判定(可按下列方式的任何一种)

(1)  $P/N \geq 2.1$ 为阳性。

(2)  $P \geq N + 2.5SD$ 为阳性。

$P$ : 待检标本OD值,  $N$ : 阴性对照OD值,  $SD$ : 标准差。

## 七、免疫荧光试验

免疫荧光试验的基本原理同ELISA, 所不同的是以荧光素标记代替酶标记, 在荧光显微镜下观察荧光反应, 可用已知抗体定位抗原。

### 〔实验7-24〕间接免疫荧光试验

#### (一) 实验材料

1. 无色载玻片和盖玻片。
2. 抗体及荧光标记抗体。
3. 缓冲甘油 甘油 (A. R) 和 0.01mol/L pH7.4 PBS 以 1:1 混合。
4. 荧光显微镜。
5. 0.01mol/L pH7.4 PBS。
6. 待检菌液。

### (二) 操作步骤

1. 待检菌液配成  $10^8$  个/ml。
2. 0.8~1mm 厚的载玻片用清洁液处理并 95% 酒精脱脂等处理，凉干。
3. 涂片，风干。
4. 微火加热固定。
5. 用 0.01mol/L pH7.4 PBS 浸洗 3 次，每次 3min。
6. 空气中晾干，立即使用，或密封保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。
7. 加上适当稀释的已知抗血清或单克隆抗体， $37^{\circ}\text{C}$  温盒 30min。
8. 0.01mol/L pH7.4 PBS 浸洗 3 次，每次 5min。
9. 加上荧光素标记的抗抗体（第二抗体）， $37^{\circ}\text{C}$ ，30min，同上浸洗。
10. 吹干后，加上缓冲甘油 1 滴，封上盖玻片，荧光显微镜下观察（见第一章）。

## 八、免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是应用于电镜检查的一种免疫示踪技术，现也称为胶体金探针。它的原理是根据需要，将氯金酸用还原法形成不同大小颗粒的金溶胶（胶体金），用此金溶胶标记抗体或能与抗体 IgG 特异性结合的金黄色葡萄球菌 A 蛋白（SPA），再将此胶体金标记抗体或 SPA 用于免疫组织化学定位。

### (实验 7-25) 免疫胶体金试验

#### (一) 实验材料

1. 菌悬液 ( $10^8$  个/ml)。
2. 0.05mol/L pH7.4 TBS

Tris	6.05g	NaCl	8.5g
------	-------	------	------



水 500ml  
用0.2mol/L HCl调pH至7.4, 补水至1000ml。(约需0.2mol/L HCl 207ml)。

3. 0.02mol/L pH 8.2 TBS

Tris	2.42 g	NaCl	8.5 g
水	900ml		

用0.2mol/L HCl调pH至8.2 (约需43.8ml), 补水至1000ml。

4. 1% BSA溶液

BSA	1 g	硫柳汞	20mg
-----	-----	-----	------

0.05mol/L pH 7.4 TBS 100ml

5. SPA胶体金或羊抗兔抗体胶体金 (可从Sigma公司订购)。

6. 小鼠单克隆抗体或兔抗血清IgG。

7. 电镜专用铜网。

8. 透射电镜。

9. 微量移液器等。

## (二) 操作步骤

1. 用铜网沾取细菌悬液。

2. 空气中自然干燥。

3. 0.05mol/L pH7.4 TBS漂洗3次, 每次5min。

4. 将兔抗血清IgG (或单克隆抗体) 用1% BSA适当稀释。

5. 滴加兔抗血清IgG (或单克隆抗体), 37℃孵育30min。

6. 0.05mol/L pH7.4 TBS同前漂洗。

7. 0.02mol/L pH8.2 TBS洗3次, 每次5min。

8. 加入稀释羊抗兔胶体金 (或SPA胶体金) 溶液 (用0.1% BSA稀释)。

9. 0.02mol/L pH8.2 TBS洗3次, 每次5min。

10. 0.05mol/L pH7.4 TBS洗涤3次。

11. 晾干后电镜观察。

## 九、免疫转移电泳 (Western blot)

免疫转移电泳, 也称免疫印渍或免疫转印技术, 其基本过程是将凝胶电泳分离条带用电泳法转移至固相膜上, 再用免疫学方

法测定固相膜上相应的抗原的存在。此技术现已广泛用于多组成抗原的分析等工作中。

**〔实验7-26〕 免疫转移电泳法**

**(一) 实验材料**

**1. 氨基黑染液**

氨基黑A	0.2g	7%醋酸	100ml
------	------	------	-------

**2. 转移缓冲液**

Tris	12.0g	甘氨酸	57.65g
水	4000ml <sup>1</sup>		

Tris及甘氨酸溶解后, 加入1000ml甲醇, 用浓盐酸小心调 pH至9.3.

**3. 脱色缓冲液**

甲醇	300ml	醋酸	100ml
水加至	1000ml		

**4. 封闭缓冲液**

0.02mol/L pH7.2 PBS	100ml	脱脂奶粉	5g
---------------------	-------	------	----

**5. 0.02mol/L pH 7.2 PBS.**

**6. PBS/T20**

吐温-20	0.5ml	PBS	1000ml
-------	-------	-----	--------

**7. 第一抗体** 制备所需蛋白质抗血清或单克隆抗体 (制备方法参见抗体节).

**8. 第二抗体** 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗第一抗体 (参见标记章节).

**9. 二氨基联苯胺溶液**

二氨基联苯胺4HCl	80mg	PBS	100ml
------------	------	-----	-------

避光搅拌3h, 使其溶解, 临用前加3%双氧水0.2ml.

**10. 电泳转移槽及转移仪.**

**11. 脱色摇床.**

**12. 塑料封口机.**

**13. 硝酸纤维薄膜 (NC).**

**(二) 操作方法**

**1. 制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 加样后电泳分离蛋白质 (参见本章第**

6节)。

2. 将凝胶浸泡入转移缓冲液中0.5h, 将相当大小的硝酸纤维素薄膜(NC)及6张滤纸也浸入转移缓冲液中。

3. 将NC置于凝胶表面, 做好标记, 用玻璃吸管在NC上滚动, 排出气泡, 展平NC。

4. 将凝胶及NC用3层滤纸夹成三明治状, 避免气泡出现。

5. 再用多孔海绵及塑板将滤纸/胶/NC/滤纸夹好, 移入电泳转移槽中, 使NC侧为阳极, 凝胶侧为阴极(图7-7):

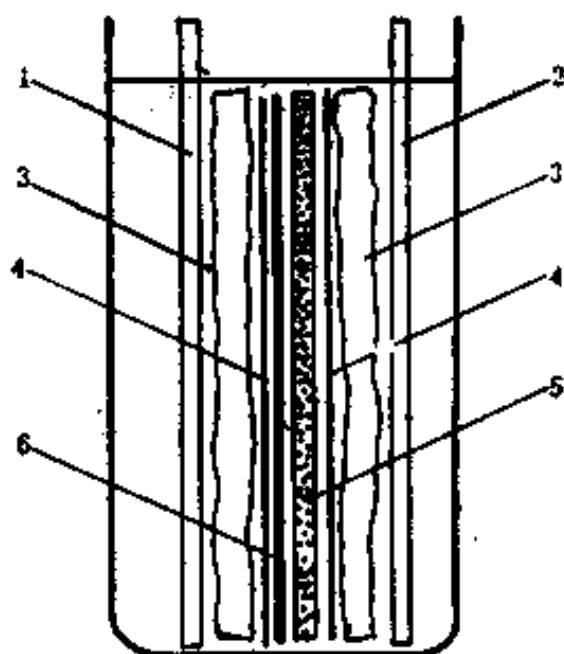


图 7-7 电泳转移装置

1—阳极 2—阴极 3—多孔海绵 4—3层滤纸  
5—凝胶 6—硝酸纤维素薄膜

6. 注入转移缓冲液使之刚过凝胶。

7. 接通电源, 进行电泳转移。典型的转移条件为0.5A, 2~3h, 此时产热较剧, 室温高于15℃时应加冷却装置。

8. 转移结束后, 取出NC。

9. 切下一条带在氨基黑染液中漂洗, 直至分子量标准及电泳样品条带可见为度。标好标准位置。

10. 将余下的NC用PBS/T20洗涤一次。

11. 加入100ml封闭液, 4℃过夜。

12. 将NC切成4mm宽的条带(暂不使用时在-20℃下存放)。

13. 将NC条带装入小塑料口袋内。
14. 加入10ml用封闭液作适当稀释的第一抗体。
15. 脱色摇床上室温摇荡2h。
16. 用PBS/T20充分洗涤4次，每次5min。
17. 将NC条带装入小塑料口袋内，加入10ml用封闭液稀释的第二抗体（酶标抗抗体），室温下摇荡2h。
18. 按步骤16充分洗涤NC条带。
19. 加入二氨基联苯胺溶液。
20. 室温显色10min。
21. 自来水冲洗，NC条带终止反应。
22. 空气干燥，于暗处保存并记录结果。

## 第六节 分子生物学技术

### 一、GC含量测定

鸟嘌呤胞嘧啶（GC）含量是DNA的特征值中最简单的一项，因为只根据它的差异即可确知DNA在碱性组成上的差异，所以GC含量现已成为细菌及酵母分类学上的不可缺少的参数。用GC含量作为分类参数具有以下特点：①测定容易；②方法简便且适用性广；③重现性较遗传表型高；④酵母及细菌的GC含量分布范围非常广泛。

细菌DNA有4个碱基组成（G、C、A、T），如果将这4种碱基的总分子含量看作100，则细菌DNA的碱基成分可用G、C对全部4个碱基的摩尔百分比（mol%）来表示。所谓GC含量即指G+C mol%。GC含量的测定方法大致可分为4种：①利用分解后的化学分析结果的直接法；②作为一种间接方法，测定DNA本身的紫外吸光度；③浮力密度法；④热变性温度（ $T_m$ ）法（表7-12）。热变性温度法操作简便，精确，重复性好，最为常用。

〔实验7-27〕热变性温度法测定GC含量

天然DNA在一定的离子强度和 pH 中不断加热使其发生变性时, 随着

表 7-12 测定GC含量的方法

方 法	被测定特征	使用情况
直接法	水解及色谱分析法	碱基mol/L
	气-液色谱法	碱基mol/L
	高效液相色谱法 (HPLC)	碱基mol/L
紫外吸收法	天然DNA光谱分析	紫外吸光度
	酸变性及光谱分析	紫外吸光度
	在稀酸中脱嘌呤及光谱分析	紫外吸光度
	双频率分析	紫外吸光度
	溴化反应	紫外吸光度
浮力密度法	氯化铯密度梯度离心法	浮力密度
热变性法	热变性温度法( $T_m$ )	$T_m$

碱基对间氢键的不断打开及双链解螺, 会导致DNA溶液的260nm紫外吸收明显增加, 当氢键全部断裂, 双链完全变成单链后, 这种在260nm紫外线处吸收值就停止增加。  $T_m$  被定义为在 DNA 热变性过程中, 紫外吸收增加的中点值所对应的温度。因为在DNA双链-碱基对组成中A-T碱基对之间形成两个氢键; 而G-C碱基对之间形成3个氢键。因此在DNA热变性过程中打开G-C碱基对所需温度也较高。若某种细菌DNA中G-C碱基对含量高, 全部打开G-C碱基对所需的温度就要高,  $T_m$  值也就高。所以样品的  $T_m$  值直接反映出该样品G-C碱基对的绝对含量 (图7-8)。表7-12列出了测定GC含量的方法。

(一) 实验材料

1. 20×SSC

NaCl	175.3 g	柠檬酸钠	88.2 g
水	800ml		

10mol/L NaOH几滴调pH至7.0, 定容至1L, 分装高压灭菌。

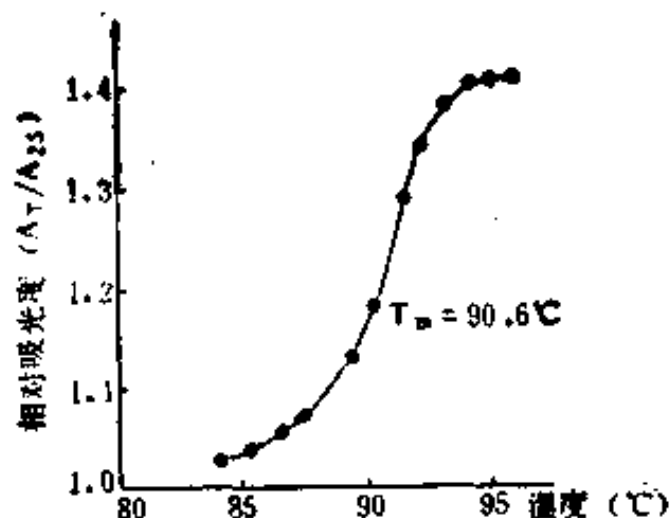


图 7-8 大肠杆菌K<sub>12</sub> DNA在1×SSC中的热变性曲线

## 2. 1×SSC

20×SSC

1份 水

19份

3. 待测DNA样品 按有关章节提纯，用1SSC溶解并稀释至 $A_{260nm}$ 在0.15~0.30之间（DNA提纯方法参见第三章及第八章）。

4. 带有加热装置的紫外线分光光度计。

5. 晶体管点温计、热电敏电阻探头及记录装置。

6. 抽真空装置。

### (二) 操作步骤

1. 将待测DNA样品及1×SSC在真空装置中脱气。

2. 将待测DNA样品装入一只石英比色杯中，塞好带有晶体管点温计热电敏电阻探头的塞子；另一带塞子的石英比色杯装入1×SSC作对照。

3. 将比色杯放入分光光度计的带有加热装置的比色架内，固定波长在260nm。

4. 记录25℃的吸光度，然后将温度迅速上升到50℃左右，取出比色杯检查有无气泡，如有气泡用手指轻弹可除去。

5. 继续加热比色杯，估计到开始变性前3~5℃，停止升温，稳定5~10min。

6. 以1℃的间距升温，每升高1℃，持续5min，以保证杯内温度充分平衡和在给定温度下变性彻底，记录每次升温前比色杯内温度（ $T$ ）和相应的吸光度（ $A_t$ ）。

7. 记录至升温后吸光度不再增加为止。

8. 将各吸光度乘以相应的相对膨胀体积（ $V_t/V_{25}$ ）（见表7-13）。

9. 校正吸光度分别除以25℃的吸光度, 得出各温度的相对吸光度 ( $A_t/A_{25}$ ).

10. 以温度为横坐标, 相对吸光度 ( $A_t/A_{25}$ ) 为纵坐标绘制 DNA 热变性曲线.

11. 以热变性曲线中点对应的温度为  $T_m$ .

12. 根据下式计算GC含量

$$GC (\%) = (T_m - 69.3) / 0.41$$

## 二、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术

蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (DAGE) 是一种十分有用的分析和制备技术。聚丙烯酰胺凝胶由丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺在引发剂四甲基乙二胺和催化剂的存在下室温聚合而成。通过调

表 7-13 25℃水对不同温度水的相对膨胀体积

温度 (°C)	相对体积 ( $V_T/V_{25}$ )	温度 (°C)	相对体积 ( $V_T/V_{25}$ )
25	1.0000	75	1.0228
		76	1.0234
60	1.0141	77	1.0240
61	1.0146	78	1.0247
62	1.0152	79	1.0253
63	1.0157	80	1.0260
64	1.0162	81	1.0266
65	1.0168	82	1.0273
66	1.0174	83	1.0280
67	1.0180	84	1.0287
68	1.0185	85	1.0293
69	1.0191	86	1.0300
70	1.0197	87	1.0308
71	1.0203	88	1.0314
72	1.0209	89	1.0321
73	1.0215	90	1.0329
74	1.0221	91	1.0336

续表

温度 (°C)	相对体积 ( $V_T/V_{25}$ )	温度 (°C)	相对体积 ( $V_T/V_{25}$ )
92	1.0343	99	1.0396
93	1.0351	100	1.0404
94	1.0358	101	1.0411
95	1.0365	102	1.0419
96	1.0373	103	1.0426
97	1.0380	104	1.0433
98	1.0388	105	1.0441

聚丙烯酰胺浓度和交联程度可有效地改变凝胶的孔径，从而对大多数大分子颗粒起到过筛效应。电泳时，根据样品组分的形状、大小及所带电荷多少而分开。在两性电解质存在下，还可根据分子的pI进行分离，此法称为等电点聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳，简称等电聚焦。将等电聚焦后的分离片段再行横向SDS-PAGE，则分离结果更佳，此称为双向PAGE。

#### 〔实验7-28〕 SDS-PAGE

SDS-PAGE是一种广泛用于蛋白质分析的方法，其原理基于这样一个事实，即在SDS（十二烷基硫酸钠）存在的情况下，所有蛋白质都带负电，并有相同的电荷数与分子量之比。十二烷基硫酸与蛋白质的结合力很强，大约一个SDS分子结合两个氨基酸残基，因此仅用1% SDS就足以饱和多肽链。每个SDS分子带有一个负电荷，所以一分子量为40kd的多肽就会得到180个负电荷，远远超过在中性环境下所能带的电荷。因此，对所有蛋白质来说，其所带电荷与其分子大小的比值实际上是完全相同或十分相似的。通过凝胶微孔的分子筛作用即可达到分离蛋白质的目的。因此，当把蛋白质置于某一个电场中，蛋白质的分离只依赖于蛋白质分子的大小和形状，而不依赖于它们所带的电荷。而且，用已知分子量的标准多肽混合物作对照，整个凝胶可根据多肽的近移率与其分子的大小比值进行标化。SDS-PAGE有柱状电泳即盘状电泳、水平板电泳、垂直板电泳；又有不连续梯度和连续梯度等。以垂直板不连续梯度法最为常用和有效。

聚丙烯酰胺优于其他凝胶物质，首先，它是化学合成制品，纯度高、化



学性质稳定，而其他凝胶物质如琼脂糖，都不同程度污染有自然界的不同物质，以致可以改变大分子在电泳时的迁移率；第二，丙烯酰胺浓度范围可自2%到30%，常用5~20%，其分离范围广是没有一个其他生物凝胶所能比拟的。

不同的丙烯酰胺制得的凝胶的有效分辨范围见表7-14。

表 7-14 丙烯酰胺浓度及其有效分辨范围

丙烯酰胺浓度(%)	蛋白有效分辨范围(道尔顿)
5.0	$7.0 \sim 20.0 \times 10^4$
7.5	$4.0 \sim 15.0 \times 10^4$
10.0	$2.0 \sim 10.0 \times 10^4$
12.5	$1.0 \sim 7.0 \times 10^4$
15.0	$0.8 \sim 5.0 \times 10^4$

(一) 实验材料

1. 30%丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺 (A·R) 30 g

甲叉双丙烯酰胺 (A·R) 0.82 g

去离子蒸馏水 102.7ml

溶解后滤纸过滤，4℃密封存放。

注意：丙烯酰胺是一种神经毒素，操作时需戴口罩和手套。

2. 分离胶(下层胶)缓冲液

Tris 18.2 g SDS 0.4 g

去离子蒸馏水 90ml

浓盐酸调pH至8.8

加去离子蒸馏水至100ml

4℃存放

3. 浓缩胶(上层胶)缓冲液

Tris 6.0 g SDS 0.4 g

去离子蒸馏水 80ml

浓盐酸调pH至6.8

加去离子蒸馏水至 100ml

4℃存放

4. SDS电泳缓冲液贮液 (10×)

Tris	30.3 g	甘氨酸	144 g
SDS	10 g	去离子蒸馏水加至	1 L

室温存放。用前用去离子蒸馏水作1:10稀释。

5. SDS加样缓冲液

Tris	1.5 g	水	84 ml
------	-------	---	-------

用浓盐酸小心调pH至6.8

蔗糖	40 g	SDS	6.0 g
2-巯基乙醇	6 ml	溴酚蓝	0.02 g

加水至 100 ml

4℃存放。

6. 四甲基乙二胺 (TEMED)。

7. 10%过硫酸铵 (APS)，新鲜配制。

8. 分子量标准。

9. 0.1%考马斯蓝溶液

考马斯蓝R-250	0.5 g	甲醇	250 ml
-----------	-------	----	--------

溶解后加入：

水	200 ml	醋酸	50 ml
---	--------	----	-------

10. 脱色液

甲醇	100 ml	醋酸	75 ml
----	--------	----	-------

水	825 ml		
---	--------	--	--

11. 10%醋酸溶液。

12. 10%甘油溶液。

13. 玻璃纸。

14. 液体石蜡。

15. 1%琼脂糖溶液。

16. 垂直板电泳槽。

17. ~~电泳仪~~。

18. 凝胶干燥器。

(二) 操作步骤

1. 将电泳槽组装好，加铁夹固定并放垂直。

2. 用45℃溶化的琼脂糖溶液封漏（两侧及底部）。
3. 根据电泳样品中待分离蛋白质分子的大小确定所采用的丙烯酰胺凝胶浓度（表7-15），查表确定分离胶的配方。
4. 按所需浓度的分离胶的配方将所需体积的蒸馏水、分离胶缓冲液及30%丙烯酰胺溶液混匀。
5. 加入过硫酸铵及TEMED，混匀。
6. 立即将凝胶液倒入电泳槽的凝胶槽中。
7. 室温聚合4h。
8. 配制5ml浓缩胶（见表7-16）。
9. 吸去分离胶上层水相，灌注浓缩胶溶液。

表 7-15 不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶分离胶的配制

凝胶溶液组分	配制下列体积的凝胶液各组分用量(ml)							
	5ml	10ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
<b>6%分离胶:</b>								
去离子蒸馏水	2.7	5.4	8.1	10.8	13.5	16.2	21.6	27.0
30%丙烯酰胺	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
分离胶缓冲液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
<b>8%分离胶:</b>								
去离子蒸馏水	2.4	4.7	7.1	9.5	11.8	14.2	18.9	23.7
30%丙烯酰胺	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
分离胶缓冲液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
<b>10%分离胶:</b>								
去离子蒸馏水	2.0	4.1	6.1	8.1	10.2	12.2	16.3	20.3
30%丙烯酰胺	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
分离胶缓冲液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10%APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.2	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.008	0.012	0.016	0.02

续表

凝胶溶液组分	配制下列体积的凝胶液各组分用量(ml)							
	5ml	10ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
12%分离胶:								
去离子蒸馏水	1.7	3.4	5.1	6.8	8.5	10.2	13.6	17.0
30%丙烯酰胺	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
分离胶缓冲液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%分离胶:								
去离子蒸馏水	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	9.6	12.0
30%丙烯酰胺	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
分离胶缓冲液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

表 7-16

5%浓缩胶的配制

溶液组分	配制下列体积的胶液各组分用量(ml)							
	1ml	2ml	3ml	4ml	5ml	6ml	7ml	8ml
去离子蒸馏水	0.69	1.4	2.1	2.7	3.5	4.2	5.0	5.8
30%丙烯酰胺	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.2	1.4
浓缩胶缓冲液	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	0.88	1.0
10%APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008

10. 将梳子用液体石蜡涂磨, 插入浓缩胶中。
11. 室温聚合1~2h。
12. 小心去梳, 吸取梳孔中的水相。
13. 将蛋白质样品及蛋白质分子量标准溶液与加样缓冲液以4:1混合, 沸水浴中加热处理5min。
14. 加样。每梳孔的加样量控制在5~50 $\mu$ l。

15. 小心加入电泳缓冲液。

16. 接好电源电极，上槽为负极；下槽为阳极，20mA恒流下电泳至溴酚蓝前沿刚走出凝胶处。

17. 关闭电源，小心取下凝胶连同玻璃。

18. 蒸馏水冲洗凝胶一次，将凝胶小心滑入已盛有250ml考马斯蓝溶液的染色缸内，染色4~6h。

19. 取出染色凝胶，蒸馏水冲洗一次。

20. 用脱色液在脱色摇床上脱色过夜，换脱色液1~2次。

21. 将凝胶在10%醋酸浸泡，使胶重新膨胀。

22. 浸泡于10%甘油中1h。

23. 取出，贴上玻璃纸，置凝胶干燥器中干燥（也可直接摄影记录结果，凝胶摄影术参见第一章）。

在非变性条件下的PAGE与SDS-PAGE相似，所不同的是所有溶液中的SDS必须省去，样品用电泳缓冲液透析，加样前加入蔗糖溴酚蓝指示剂，电泳缓冲液的浓度仅为SDS-PAGE的0.2倍。非变性条件下PAGE通常采用低浓度的丙烯酰胺，常用4~8%，电泳速度主要决定于样品蛋白质固有的荷电状态，分辨能力较差。但对于那些有生物学活性，但又不希望改变其空间构象的大分子而言（如某些酶的分离及制备）仍是有用的。

#### 〔实验7-29〕聚丙烯酰胺凝胶的等电聚焦电泳

等电聚焦对蛋白质混合物有极高的分辨力，混合物中的各成分根据它们的等电点（ $pI$ ）的不同而得到分离，等电点即蛋白质分子的净电荷为零时的pH值。等电聚焦的基本原理是运用两性电解质如Ampholine（LKB）使处于正负极之间的凝胶形成一个稳定的pH梯度，当蛋白质泳动至它们的等电点位置时，不再带电荷，故保持静止。

等电聚焦常采用的电泳槽为水平式，电泳槽须带有冷却装置。

##### （一）实验材料

1. 两性电解质（Ampholine 40%，LKB）。

2. 高压恒功率电泳仪（LKB）。

3. 凝胶模子。

4. 带有铂电极的适用于等电聚焦的电泳槽（LKB）。

5. 紫外灯。

6. 30%丙烯酰胺溶液

烯丙酰胺 28.5 g 甲叉双丙烯酰胺 1.5 g  
去离子蒸馏水 100ml

7. 核黄素溶液: 4mg/100ml水, 新鲜配制.

8. 四甲基乙二胺 (TEMED).

9. 电极溶液: 见表7-17. 电极液一般采用稀酸作阳极溶液, 稀碱作阴极溶液. 通常采用 1mol/L  $H_3PO_4$  和 NaOH, 也有采用 2% 硼酸和 0.5% 乙醇胺的.

10. 0.05% 甘氨酸溶液.

11. 凝胶固定液: 5% 三氯醋酸.

12. 染色液:

考马斯蓝R250 0.25 g 甲醇 136ml  
去离子水 200ml 冰醋酸 50ml  
硫酸铜 0.5 g 去离子水加至 500ml

表 7-17

等电聚焦的电极缓冲液

pH范围	电 极 溶 液	
	阳 极	阴 极
2.5~4	1mol/L $H_3PO_4$	2% ampholine, pH 6~8
3.5~5.2	1mol/L $H_3PO_4$	2% ampholine, pH 5~7
4.6~7	1mol/L $H_3PO_4$	1mol/L NaOH
5.5~7.7	2% ampholine	1mol/L NaOH
6~8.5	2% ampholine	1mol/L NaOH
7.8~10	2% ampholine	1mol/L NaOH
5.5~9.5	1mol/L $H_3PO_4$	1mol/L NaOH

13. 脱色液

乙醇 50ml 冰醋酸 50ml  
水加至 500ml

14. 滤纸.

15. 待分析样品.

(二) 操作步骤

1. 用100倍体积的甘氨酸溶液透析样品过夜, 中间换液 2 次.

2. 水平组装好凝胶模子, 内衬干净玻璃板.

3. 配制凝胶溶液, 配方为:

30%丙烯酰胺	1.8ml	2.7ml	去离子水	6.5ml	9.9ml
Ampholine(40%)			真空脱气	5min	
	0.5ml	0.75ml	核黄素溶液	0.1ml	0.15ml
87%甘油	1.2ml	1.7ml	总体积	10ml	15ml

4. 将凝胶溶液混匀后倾注到凝胶模子中, 距凝胶 50~70cm 处用紫外灯照射1.5~2.5h.

5. 室温放置过夜.

6. 取出凝胶至电泳槽的冷却板上.

7. 用滤纸做两个电极纸条 (0.5cm×凝胶宽度), 分别浸入正极和负极溶液中, 然后放在凝胶二端.

8. 分别把 10~15 $\mu$ l 样品加到长方形滤纸片 (3×5mm) 上, 吸去多余的液体, 放这些滤纸于负极端离电极纸条1cm处, 各滤纸片间隔5mm, 样品应含有5~20 $\mu$ g.

9. 将铂电极压到电极纸条上, 连接电源.

10. 25W恒功率聚焦. pH范围宽 (3.5~9.5)的聚焦用时1.5~2.0h  
pH范围窄的聚焦用时3~3.5h.

11. 关闭电源, 取出凝胶, 于固定液中固定1h.

12. 染色液室温染色4h以上.

13. 脱色液脱色至背景清晰, 条带清楚.

14. 凝胶、干燥、摄影等参见SDS-PAGE.

### 三、色谱技术

色谱技术用于各种物质的分离具有以下优点: ① 方法温和、不产生机械剪力和热量; ② 回收率高, 通常可达到100%的回收率; ③ 一步可获得高纯度分离物; ④ 一次可分出多个组分; ⑤ 方法相对简单、易于放大; ⑥ 色谱基质种类繁多, 易于选择; ⑦ 设备简单. 常用的色谱技术有凝胶过滤色谱、离子交换色谱、亲和色谱等.

#### 离子交换色谱

离子交换色谱技术是根据物质所带电荷的差异而进行分离纯

化的一种方法。蛋白质等可通过相反电荷基团之间的离子相互反应而可逆地与离子交换剂结合。当逐渐增加缓冲液离子强度或改变缓冲液的pH, 可将不同荷电组分依次洗脱下。

常用的离子交换剂是以纤维素或葡聚糖凝胶等不溶性物质为基质, 通过酯化、醚化或氧化等化学反应, 引入阳性或阴性离子基团的特殊制剂。带有阳离子基团的离子交换剂可置换阴离子样品, 称为阴离子交换剂, 如 DEAE-纤维素; 而带有阴离子基团的交换剂, 则可置换阳离子样品, 称为阳离子交换剂, 如 CM-纤维素。常用的离子交换剂如下表7-18。

表 7-18 常用的离子交换剂

类 型	离子基团	交换容量(毫克当量/g)	pH应用范围
<b>阴离子交换剂</b>			
DEAE-纤维素*	DEAE (二乙氨基)	0.1~1.1	2~9
DEAE- Sephadex A-25 Sephadex A-50	DEAE	3.0~4.0	2~9
QAE-纤维素	QAE(季胺乙基)	0.5~1.0	2~10
QAE- Sephadex A-25 Sephadex A-50	QAE	3.0~3.5	2~10
GE-纤维素	GE(胍乙基)	0.2~5.0	2~12
<b>阳离子交换剂</b>			
CM-纤维素*	CM(羧甲基)	0.5~1.0	3~10
CM- Sephadex C-25 Sephadex C-50	CM	4~5	6~10
SP-纤维素	SP(磺丙基)	0.7~7.4	2~12 ②
SP- Sephadex C-25 Sephadex C-50	SP	2~2.6	2~10 ②

\* 最为常用。

离子交换剂的选择无标准可言, 一般是① 溶液 pH值高于样



品的等电点时，选用阴离子交换剂；pH值低于样品等电点时，选用阳离子交换剂；② 弱离子交换剂用于分离对电荷具有高度亲和力的样品，强离子交换剂用于亲和力低的样品；③ 分离分子量低于 $3 \times 10^4$ 或高于 $4 \times 10^6$ 的样品，可采用离子交换剂 Sephadex A-25或C-25型，分离分子量在 $3 \sim 20 \times 10^4$ 之间的样品，最好用A-50或C-50型。④ 最常用的阴离子交换剂为DEAE-纤维素(如Whatman DE-52)，最常用的阳离子交换纤维素为CM-纤维素(如WhatmanCM-52)。

### 〔实验7-30〕离子交换色谱技术

#### (一) 实验材料

1. 离子交换剂。
2. 色谱柱 (1.0×30cm)。
3. 起始缓冲液 (如0.01mol/L pH7.0 PB)。
4. 终末缓冲液 (如0.01mol/L pH7.0PB, 添加2.0mol/L NaCl)。
5. 梯度混合仪 (图7-9)。
6. 核酸蛋白仪及记录仪。
7. 0.5mol/L NaOH。
8. 0.5mol/L HCl。
9. 待分离纯化样本。
10. Go玻璃漏斗。

#### (二) 操作步骤

##### 1. 离子交换剂的预处理

离子交换剂的预处理可遵循下列原则：① 新购进的已预溶胀的离子交换剂如DE-52、CM-52可直接使用而不进行预处理；② 以Sephadex和 Sepharose为基质的离子交换剂仅需浸入0.1 mol/L的酸或碱中充分溶胀。

③ 一般离子交换剂皆需预处理。

使用酸及碱的浓度为0.5mol/L，即使是DE-52，CM-52，每次使用后皆

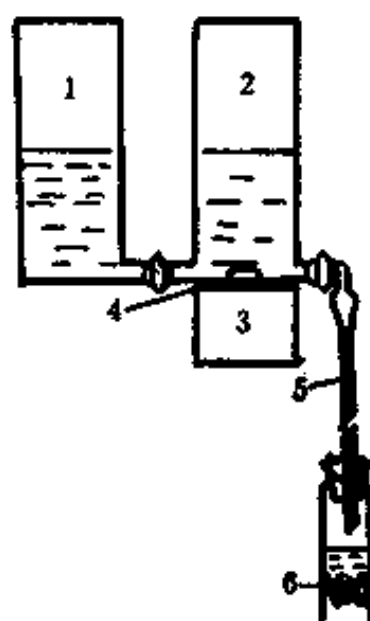


图 7-9 梯度混合仪

1—1.6mol/L缓冲液罐 2—0.1mol/L  
缓冲液罐 3—磁力搅拌器 4—转子  
5—胶管 6—色谱柱

须及时再生，再生方法同预处理。

(1) 用边加边轻轻搅匀的方法，将离子交换剂加入 5 倍溶胀体积的 0.5mol/L HCl (阳离子交换剂) 或 0.5mol/L NaOH (阳离子交换剂) 中，室温 30min 并间或搅匀。

(2) Go 玻璃漏斗抽滤，用蒸馏水洗至滤液 pH 大于 4 (酸浸后) 或小于 8 (碱浸后)。

(3) 将离子交换剂加 5 倍体积的 0.5mol/L NaOH (阴离子交换剂) 或 0.5mol/L HCl (阳离子交换剂) 中，轻轻混匀，室温 30min 并间或搅匀。

(4) 重复步骤 (2)，水洗至中性。

## 2. 离子交换色谱技术

(1) 用边加边轻轻搅匀的方法，将离子交换剂加入 5 倍溶胀体积的 0.5mol/L HCl (阴离子交换剂) 或 0.5mol/L NaOH (阳离子交换剂) 中，室温 30min 并间或搅匀。

(2) Go 玻璃漏斗抽滤，用蒸馏水洗至滤液 pH 大于 4 (酸浸后) 或大于 8 (碱浸后)。

(3) 将离子交换剂加 5 倍体积的 0.5mol/L NaOH (阴离子交换剂) 或 0.5mol/L HCl (阳离子交换剂) 中，轻轻混匀，室温 30min 并间或搅匀。

(4) 重复步骤 2，水洗至中性。

(5) 将离子交换剂用 10 倍体积的起始缓冲液悬浮，室温放置 30min，倾去大部分起始缓冲液。

(6) 将色谱柱垂直固定于支架上；徐徐装入离子交换剂，静置，让其自然沉降。

(7) 用 10 倍体积的起始缓冲液平衡。

(8) 样品对起始缓冲液充分透析过夜，换液两次。

(9) 打开核酸蛋白仪及记录仪预热。

(10) 加样。将样品徐徐加到色谱床上，让其慢慢进入色谱床。

(11) 用 2 倍体积的起始缓冲液洗柱，收集未结合峰。

(12) 用起始缓冲液和终末缓冲液进行梯度洗脱 (如无须进行多组分分离，则在洗脱时可直接用高离子强度的缓冲液或改变洗脱液的 pH)。

(13) 收集各峰的洗脱液。

(14) 离子交换剂再生 (按预处理方法进行)。

## 凝胶过滤色谱

凝胶过滤色谱技术是60年代初发展起来的一项简便有效的液相柱色谱技术。它利用化学惰性而多孔的凝胶物质为基质。使混合样品中的各种物质按其分子大小不同而得以分离。当样品加在色谱柱上，由于缓冲液的脱洗作用，样品中各组分皆存在两种运动，即垂直向下的移动和无定向扩散运动，以垂直向下运动为主。在凝胶排阻限以上的大分子组分不能进入凝胶小珠上的网孔内，从而在一个空白体积后从柱上洗下来。很小的组分可自由地进入胶粒网孔，在向下移动过程中，它们从凝胶内扩散至胶粒孔隙后再进入另一珠粒中，如此不断地进入和逸出，故必须通过一个总体积后才能被洗脱下来。中等大小的组分能部分进入珠粒中，因此在空白体积和总体积之间被洗脱出来，其洗脱体积与其分子量呈对数相关并与其分子形状有一定关系。

常用的凝胶过滤色谱基质有 Sephadex、Sephacryl、Sephacryl、Factogel、Trisacryl 等。它们的一些特征参数参见表7-19。

Sephadex 不溶于水、盐溶液、稀酸、稀碱以及一般有机溶剂，化学反应能力近似于葡萄糖，稳定性较高。Sephadex 结构上的羟基在过强的碱性条件下 ( $\text{pH} > 12$ ) 对氧敏感，易氧化成酸，在强酸中则可以水解断裂。对热稳定。氧化剂易使羟基氧化成羧基而增加离子电荷。芳香类和杂环类化合物或环形糊精可吸附在凝胶颗粒上。硼酸盐离子能与葡聚糖形成复合体。这些都会改变凝胶的色谱性质，须加以注意。此外，所有葡聚糖凝胶都含有约  $10 \sim 20 \mu\text{mol/g}$  的羧基，故洗脱的缓冲液的离子强度应不小于  $0.02 \text{ mol/L}$ 。Sephadex 是目前实验室中最常使用的凝胶基质。

琼脂糖凝胶（包括 Sepharose, Bio-gel A, Sagavac 等）的物理刚性超过同等聚合浓度的聚丙烯酰胺和葡聚糖凝胶，故洗脱流速可以较快，但分辨力不如 Sephadex。pH4~9 时稳定，浓尿素和盐酸胍溶液减少使用寿命，干燥、剧烈搅拌、冷冻、加热大于  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  均可使此种凝胶破坏。易被过碘酸盐、溴化氰、环氧乙烷等

氧化而偶合蛋白，是最常用的亲和色谱基质。由 Sepharose 衍生出的 Sepharose CL-2B、4B及6B 具有稳定性高、非特异吸附低的特点。可用浓尿素或盐酸胍以及有机溶剂进行色谱分析，耐热，pH 3~12 稳定，但不能用作亲和色谱基质。Ultragel 由聚丙烯酰胺凝胶构成的三维空间格子，格中充填琼脂糖凝胶，机械性能较纯琼脂糖凝胶好。颗粒较小，分辨力高。Bio-Gel 不溶于水和一般有机溶剂，也不与浓的盐、尿素或盐酸胍溶液反应。在 pH1~10 范围内均稳定，洗脱缓冲液离子强度应大于 0.02mol/L。Sepharyl S 的机械性能和化学性能都很好，可在 120℃ 下高压灭菌。流速较快。Bio-Glass 除氟化氢和强碱外，对所有化学物质在化学

表 7-19 常用凝胶过滤色谱基质的性质

类 型	颗粒大小 ( $\mu\text{m}$ )	组分范围 ( $K_d$ )	流 速 (cm/h)	溶胀体积 (ml/g干胶)	溶胀时间 (h)	
					20℃沸水浴	
Sephadex(交链葡聚糖)						
G-25(细)	20~80	1~5	>80	4~6	6	2
G-50(细)	20~80	1.5~30	45	9~11	6	2
G-75	40~120	3~80	25	12~15	24	3
G-100	40~120	4~150	20	15~20	48	5
G-150	40~120	5~300	15	20~30	72	5
G-200	40~120	5~600	10	30~40	72	5
Bio-Cel(聚丙烯酰胺)						
P-2F	40~100	0.1~1.8		3.5	4	2
P-4F	40~80	0.8~4		5.0	4	2
P-6F	40~80	1~6	22	8.0	4	2
P-10F	40~80	1.5~20	18	9.0	4	2
P-30F	80~150	2.5~40		11.0	12	3
P-60F	80~150	3~60	12	14.0	12	3
P-100F	80~150	5~100		15.0	24	5
P-150F	80~150	15~150	10	18.0	24	5
P-200F	80~150	30~200		25.0	48	5

续表

类 型	颗粒大小 ( $\mu\text{m}$ )	组分范围 ( $K_d$ )	流 速 ( $\text{cm/h}$ )	溶胀体积 ( $\text{mg/g}$ 干胶)	溶胀时间 (h)	
					20°C	沸水浴
P-300F	80~150	60~400	5	30.0	48	5
Ultragel (丙烯酸胺-琼脂糖)						
ACA 202	60~140	1~15	4~6			
ACA 54	60~140	5~70	3~6			
ACA 44	60~140	10~130	3~6			
ACA 34	60~140	20~350	3~5			
ACA 22	60~140	100~1200	2~3			
Sephacryl (交链丙烯酸胺-丙烯基葡聚糖)						
S-200	40~105	5~250	30			
S-300	40~105	10~1500	25			
S-400	40~105	20~8000				
Sephacrose (琼脂糖)						
2B/CL-2B	60~200	70~40000	15			
4B/CL-4B	60~140	60~20000	26			
6B/CL-6B	45~165	10~4000	30			
Bio-gel (琼脂糖)						
A-0.5M M	80~150	10~500	30			
A-1.5M M	80~150	10~1500	30			
A-5M M	80~150	10~5000	25			
A-15M M	80~150	40~15000	12			
A-50M F	80~150	100~50000	8			
A-150M F	80~150	1000~150000	5			
Fractogel (从乙烯基多聚体获得的亲水胶)						
TSK HW 40F	32~63	0.1~10				
TSK HW 50F	32~63	0.5~80				
TSK HW 55F	32~63	1~700	20			
TSK HW 65F	32~63	50~5000				
TSK HW 75S	25~40	500~50000	30			
BiO-Glass (多孔玻璃)						

续表

类 型	颗粒大小 ( $\mu\text{m}$ )	组分范围 ( $K_r$ )	流 速 ( $\text{cm/h}$ )	溶胀体积 ( $\text{mg/g}$ 干胶)	溶胀时间 (h)
					20°C 沸水浴
200F	100~120	3~30			
300F	100~120	10~100			
1000F	100~120	50~500			
1500F	100~120	40~2000			
2500F	100~120	80~8000			

上都是惰性的；分辨力及产率较高，不需溶胀，装柱容易且不被压缩，流速较快。

### 〔实验7-31〕凝胶过滤色谱技术

#### (一) 实验材料

1. 凝胶基质 根据不同的分离材料及分离目的进行选择，最常使用的是Sephadex (有关参数见表7-19)。

2. 色谱柱 通常为塑料或玻璃制成。选择色谱柱时最主要的问题是在柱底部的死腔应尽可能小，一般不得超过柱床体积的1/1000。用于组别分离，即将样品中分子量截然不同的两类物质分开，内径与长度比可在1/5~1/15；用于分段分离，则内径与长度之比需在1/20~1/100。柱横截面的选择决定于样本体积的大小和蛋白量的多寡，标本体积不能超过总柱体积的5%。标本体积小，则分辨力高。通常每方厘米截面面积荷载10~30mg蛋白为好。

3. 洗脱缓冲液 常用0.02mol/L, pH7.4, PBS。

4. 核酸蛋白仪及记录仪。

5. 蠕动泵。

6. 待分离蛋白质样品。

#### (二) 操作步骤

1. 根据床体积的大小确定凝胶的用量，需溶胀的进行溶胀。

2. 将色谱柱垂直固定，连接好底部流出导管，加入洗脱缓冲液排层柱底部可能的空泡，控制洗脱液流出速度。

3. 加入凝胶基质，让其自然沉降形成柱床。

4. 用 5 倍柱体积的洗脱液平衡色谱柱。
5. 预热检测仪及记录仪至基线平稳。
6. 吸去栓上层多余的液体。
7. 缓缓加入待分离样品，平铺于凝胶表面，待样品全部进入凝胶相中后开始洗脱（样品须经高速离心以去除不溶性大颗粒）。
8. 接通洗脱液进行洗脱并以核酸蛋白仪监测及记录。
9. 收集各部组分。
10. 洗脱完毕后，凝胶加防腐剂，如 0.01% 硫柳汞，室温保存。

### 亲和色谱

亲和色谱是一种广泛用于生物高分子分离；纯化和微量蛋白浓缩的十分有效而简便的技术，通过此法可以高度纯化生物活性分子。其基本原理是生物高分子与相应的特异配体通过特殊的化学结构相互结合，而这种结合又是可逆的。通过不溶性的配体 A 和可溶性分子 B 间的特异性相互作用，使分子 B 暂时不溶并与可溶性杂质相分离，然后将分子 A 与 B 之间的键断开即可获得纯化的可溶性分子 B。亲和色谱较之其他分离方法的优点是：① 简单；② 迅速，分离过程通常很快，可节省时间和纯化不稳定分子；③ 产量高，通常高于 90%；④ 高纯度，选择合适的配体，可从仅含 1~5% 所需分子的初始样品中一步获得纯度高于 90% 的纯化物；⑤ 可用于含量极低组分的纯化，纯化过程同时也浓缩了分子。亲和色谱包括两项基本技术要求：① 配体的适当不溶性衍生物；② 复合物的有效解离。常见的亲和色谱使用的特异性可逆反应如表 7-20。

用于制备不溶性配体衍生物的基质主要有 Sepharose、Sephadex 等，方法主要有溴化氰活化法和过碘酸盐氧化法，以溴化氰活化 Sepharose 最为有效和常用。

表 7-20

特异性可逆反应

酶	底物 竞争性抑制剂

续表

	辅酶
抗体	抗原 SPA(金黄色葡萄球菌A蛋白) 半抗原
凝集素	糖蛋白 糖类
mRNA	互补DNA
细胞表面受体	激素

**(实验7-32) Sepharose 4B 溴化氰偶联技术**

溴化氰在高pH时与Sepharose 4B上的羟基反应, 形成亚氨基碳酸盐基团。此活性基团可在中性pH时与氨基迅速偶联, 而形成氨基碳酸盐和异脲衍生物而使配体固相化。

**(一) 实验材料**

1. Sepharose 4B (Pharmacia, 国产4%珠状琼脂糖也可使用) 10ml.

2. 0.1mol/L pH6.5柠檬酸盐缓冲液 (4℃)

柠檬酸钠 $2H_2O$                       52.9 g              柠檬酸 $H_2O$                       4.2 g

水加至2000ml

3. 纯化的配体 100mg溶于10ml 0.1mol/L, pH6.5柠檬酸盐缓冲液中, 移入带螺帽的25ml玻璃瓶中, 置于4℃。

4. 溴化氰。

5. 0.5mol/L pH 10.5碳酸盐缓冲液

$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$                       64.4 g               $NaHCO_3$                       2.1 g

水加至500ml

6. 4mol/L NaOH溶液。

7. 2mol/L乙醇胺。

8. 0.02mol/L pH7.2 PBS。

9. 1~5ml带有不透气盖子的小瓶。

10. 乳胶手套。



11. 通风橱。
12. 真空泵。
13. 抽滤瓶 (2L), G<sub>3</sub>或G<sub>4</sub>玻璃漏斗 (200ml)。
14. pH计。
15. 磁力搅拌器。

## (二) 操作步骤

溴化氰有剧毒, 可经呼吸道及皮肤吸入, 本身易挥发, 所有接触, CNBr的设备应浸在NaOH中, 置通风橱中过夜。

1. 以1L水抽滤洗涤Sephacrose 4B, 悬于水中 (总体积约为18ml), 置于50ml烧杯中。
2. 加入2ml 0.5mol/L碳酸盐缓冲液和磁力搅拌子, 在通风橱中搅拌, 将pH电极置于悬液中, 随时测量悬液pH。
3. 将装有250ml 1mol/L NaOH的烧杯放入通风橱中。
4. 戴好手套, 在一小瓶中小心称量1.5g 溴化氰 (避免大颗粒), 此步必须在通风橱中进行。
5. 缓慢搅拌Sephacrose 4B悬液, 监测pH并加入固体溴化氰 (药勺及空小瓶浸入1mol/L NaOH中)。
6. 逐滴加入4mol/L NaOH, 以保持pH在10.5~11.0, 直至固体溴化氰全部溶解以及pH降低的速度减慢。在此过程中, 如果pH高于11.5, 则弃之重做。
7. 用抽滤法用2L 4℃柠檬酸盐缓冲液迅速洗涤Sephacrose 4B (勿完全抽干)。
8. 快速将活化的Sephacrose 4B加到配体溶液中, 盖好盖子, 轻轻振荡混匀1h, 然后4℃静置过夜。
9. 加入1ml乙醇胺溶液, 继续轻轻搅拌1h。
10. 自然沉降Sephacrose 4B, 上清液1000r/min, 离心5min, 紫外分光光度计确定游离配体的浓度。
11. 将配体Sephacrose装入底部填有玻璃毛的5ml注射器中, 用PBS洗涤, 柱中加入含0.1%叠氮钠的PBS, 4℃保存。

## 【实验7-33】Sephadex过碘酸钠偶联技术

过碘酸钠氧化Sephadex后使其羟基氧化成醛基, 可直接与蛋白质的氨基结合。常用的Sephadex类型是G-75, 也有使用G-50和G-100。

### (一) 实验材料

1. Sephadex G-75 (Pharmacia).
2. 0.015mol/L  $\text{NaIO}_4$  溶液(新鲜配制).
3. 2mol/L 乙二醇.
4. 0.01mol/L, pH9.5 碳酸盐缓冲液 (CBS)  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$             86mg       $\text{NaHCO}_3$             59mg  
水加至 100ml
5. 1mg/ml  $\text{NaBH}_4$  (新鲜配制)  
     $\text{NaBH}_4$  10mg  
    0.01mol/L, pH7.4 PBS 10ml
6. 0.01mol/L, pH6.0 PB.
7. 3mol/L 硫氰酸钠 (用0.01mol/L pH6.0 PB配制).
8. 偶联蛋白 (用0.01mol/L pH9.5 CBS配成10~20mg/ml).

### (二) 操作步骤

1. 取Sephadex G-75 0.75g, 加10ml蒸馏水充分溶胀, 换水3次.
2. 1000 r/min离心3min, 吸去上层水相.
3. 取1ml已溶胀的Sephadex G-75, 加2ml  $\text{NaIO}_4$ , 混匀, 120r/min振荡30min.
4. 加入1ml 2mol/L乙二醇溶液, 120r/min振荡30min.
5. 用10ml CBS洗3次.
6. 立即加入偶联蛋白溶液1ml, 120r/min振荡18~20h.
7. 离心去除上清, 加入2ml  $\text{NaBH}_4$ , 120r/min振荡1h.
8. 用10ml PB洗3次.
9. 加入2ml硫氰酸钠溶液, 120r/min振荡30min.
10. 离心去除上层.
11. 重复步骤9~10.
12. 用10ml PB洗3次.
13. 悬浮于1ml PB中, 加入0.1%  $\text{NaN}_3$ 防腐.

### 〔实验7-34〕亲和色谱技术

#### (一) 实验材料

1. 已偶联配体的凝胶基质.
2. 洗脱冲液(见表7-21, 选择一种).

表 7-21

常用于亲和色谱的洗脱缓冲液

洗脱缓冲液	应 用
2% $\alpha$ -甲基甘露糖苷-0.5% Nonidet P40-PBS	ConA-Sepharose, 分离糖蛋白
0.1mol/L甘氨酸-HCl (pH2.2~2.8)	一般亲和色谱, 还可进行梯度洗脱
3mol/L KSCN	免疫亲和色谱标准洗脱液
含有酶的底物或底物类似物的缓冲液	酶或酶抑制剂的亲和洗脱

## 3. 透析袋、

## 4. 0.1mol/L, pH8.5 TBS溶液

0.1mol/L, pH8.5 Tris缓冲液

0.5mol/L NaCl

## 5. 0.1mol/L, pH4.5醋酸盐缓冲液

0.1mol/L, pH4.5醋酸钠缓冲液

0.5mol/L NaCl

## 6. 核酸蛋白仪及记录仪。

## 7. 待分离样品

## 8. 5ml注射器。

## (二) 操作步骤

1. 取5ml注射器, 内衬玻璃毛, 出口用胶管连接检测仪, 垂直固定于支架上。

2. 装入偶联有配体的凝胶基质。

3. 洗脱缓冲液以5ml/10min, 平衡于至 $OD_{280} < 0.02$ , 再以TBS平衡至 $OD_{280} = 0.00$ 。

4. 加入待分离样品, 待其全部进入凝胶相后夹住出口。

5. 室温保留2h。

6. 用TBS洗脱至流出液 $OD_{280} < 0.02$ 。

7. 洗脱缓冲液以5ml/10min洗脱至 $OD_{280} < 0.02$ , 收集洗脱液。

8. 装入透析袋对PBS透析。

9. 亲和色谱柱再生。用10体积TBS和10体积的醋酸盐缓冲液洗涤后即获再生, 再用起始缓冲液平衡后即可使用。

#### 四、核酸分子杂交技术

核酸分子杂交技术是近十几年迅速发展起来的一个灵敏度高、应用面广的研究手段，广泛用于分子遗传、基因工程、微生物分类鉴定及检测等方面。核酸的杂交是指具有一定互补顺序的核酸单链在液相或固相体系中按碱基互补原则缔合成异质双链的过程。DNA与DNA链，DNA与RNA链之间，只要具有一定的互补顺序，均可在适当条件下发生杂交。以已知的带有放射性同位素标记及其他标记的DNA或RNA顺序片段(此称为探针)，与液相中或吸附在固相支持物如硝酸纤维膜上的DNA或RNA进行杂交，以放射性同位素或其他标记的存在与否来反映是否已杂交。探针可经限制性内切酶酶切及电泳纯化、机械破碎、人工合成、体外转录、基因克隆技术或聚合酶链反应(PCR，见下节)获得。典型的细菌DNA探针的制备如图7-10所示。核酸分子杂交的成功与否主要取决于两个方面的因素：一是核酸探针的质量；另一是杂交双链的热变性温度( $T_m$ )。影响杂交双链 $T_m$ 的因素主要有①杂交双链的碱基组成，GC含量愈高的杂交双链， $T_m$ 值愈高；②杂交双链的长度，杂交双链愈长， $T_m$ 值愈高；③杂交双链的碱基错配程度，错配程度愈高， $T_m$ 值愈低；④杂交溶液的离子强度，离子强度愈高， $T_m$ 值越高；⑤变性剂(如甲酰胺)的使用浓度，浓度提高， $T_m$ 值降低。综合这些因素，对不短于50个核苷酸的探针的 $T_m$ 可按下列公式估算：

$$T_m(^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.5 \lg M + 0.41 (G+C) \% - 500/n - 0.61 \times \text{甲酰胺} \%$$

式中  $M$ ——离子强度 (mol/L)

$n$ ——DNA中最短的双链片段的长度 (bp)

要使双链以最大速率形成，杂交温度一般要比 $T_m$ 低25℃。用寡聚核苷酸(14~20个碱基)作探针时，可按下列式计算：

$$T_m(^\circ\text{C}) = 4(G+C) + 2(A+T) \text{ [在约} 0.9 \text{ mol/L NaCl 条件下]}$$

式中  $T_m$ ——50%的短双螺旋区段解链时的温度

$G、C、A、T$ ——寡聚核苷酸探针中相应核苷酸的数量

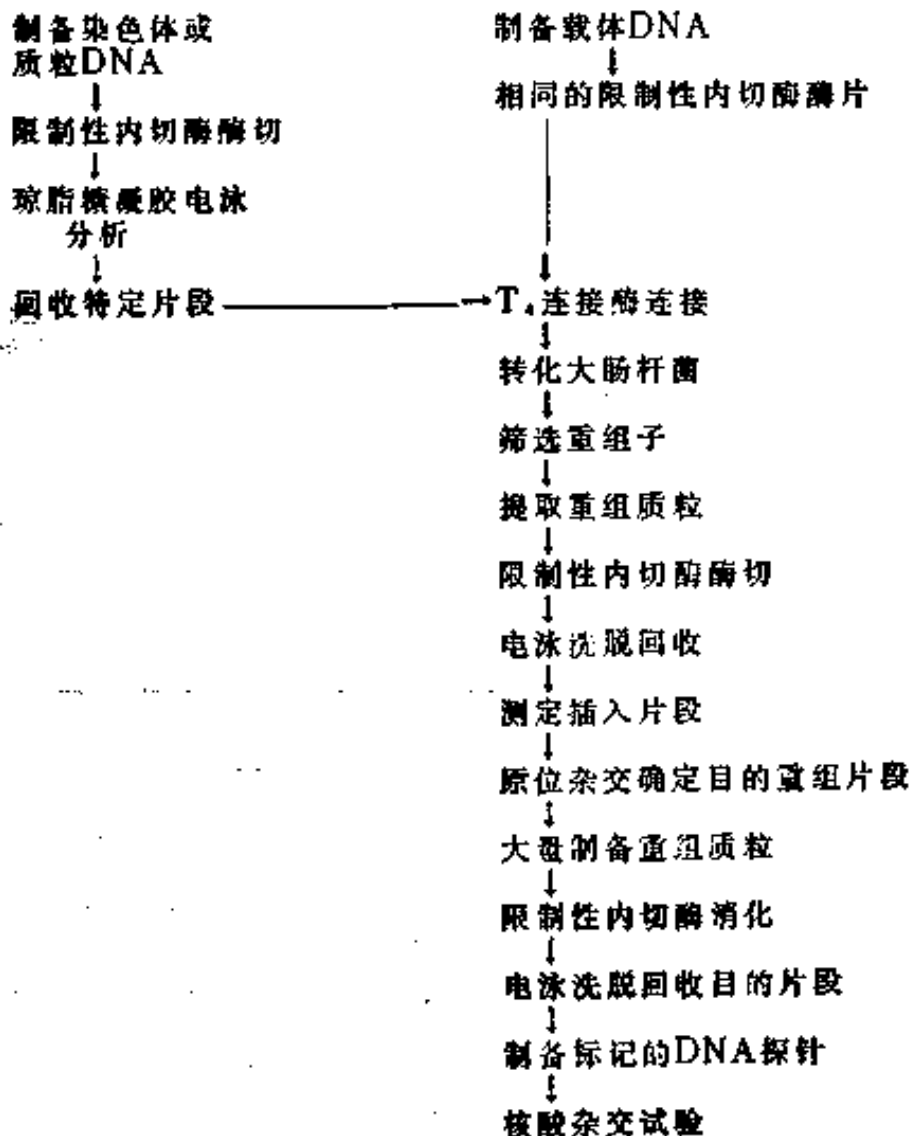


图 7-10 细菌DNA探针的制备基本过程

错配的碱基对双链稳定性有显著影响。长于 150bp 的杂合双链，每错配1%的碱基，其 $T_m$ 就降低1℃左右；短于20bp的杂合双链，每错配1bp， $T_m$ 约降低5℃。

核酸分子杂交技术大致分为液相分子杂交和固相分子杂交。前者有羟基磷灰石法，复性速率法和 $S_1$ 内切酶分析法等；后者有滤膜法及琼脂凝胶法等。

### (一) 同位素标记探针的制备

用于同位素标记探针制备的常用同位素有  $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$  等，以  $^{32}\text{P}$  应用最多（表7-22）。标记方法有活体内标记

特 征	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}$	$^{32}\text{P}$	$^{35}\text{S}$	$^{125}\text{I}$
射线性质	软 $\beta$	软 $\beta$	硬 $\beta$	软 $\beta$	$\gamma$
射线强度	0.156MeV	0.0186MeV	1.709MeV	0.167MeV	0.035MeV
半衰期	5730年	12.35年	14.3天	87.4天	59.7天
常用标记化合物	氨基酸	氨基酸 核苷酸	核苷酸	氨基酸 核苷酸	NaI
用途	mRNA 生 物活性测定	标记核酸 及 mRNA 生物活性测 定	标记核酸	标记核酸 及 mRNA 生物活性 测定	标记 RNA 等单 链核酸
一般使用剂量	$\mu\text{Ci}$	$\mu\text{Ci}$	$\mu\text{Ci}$ -1mCi	$\mu\text{Ci}$ -1mCi	mCi
简单防护要求	戴手套, 勿入口	戴手套, 勿 入口	戴手套, 勿入口, 操作前加 有机玻璃 屏	戴手套, 勿入口	戴手套, 勿入 口, 通风橱内 加铅玻璃屏

法和外标记法。活体内标记法需要大量的放射性同位素，目的 DNA 的提纯繁琐，且标记率低，现已基本不用。外标记法主要有① 缺口平移法，② 随机引物标记法，③ 体外合成法。用于标记的 DNA 一般用酚、氯仿抽提纯化，大分子核酸如染色体 DNA 等需经部分酶切或机械破碎；含有特定 DNA 片段的质粒可直接经酶切获得。这些方法请参阅第八章。

#### 〔实验7-35〕缺口平移法制备DNA探针

本法主要是利用适当浓度的 DNase I 在 DNA 双链上造成小的缺口，再以大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 在缺口 3' 端加入核苷酸残基。同时利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'→3' 的外切酶的活力，从缺口 5' 端切去核苷酸，由此被高比放射活性的核苷酸所替换。用此方法可获得高于  $10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$  的  $^{32}\text{P}$  标记 DNA (图7-11)。

##### (一) 实验材料

##### 1. 切口平移缓冲液(10×)

0.5mol/L Tris (pH7.5)

0.1mol/L  $\text{MgSO}_4$

0.1mol/L 2-巯基乙醇

500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  牛血清白蛋白

分装-20℃存放。

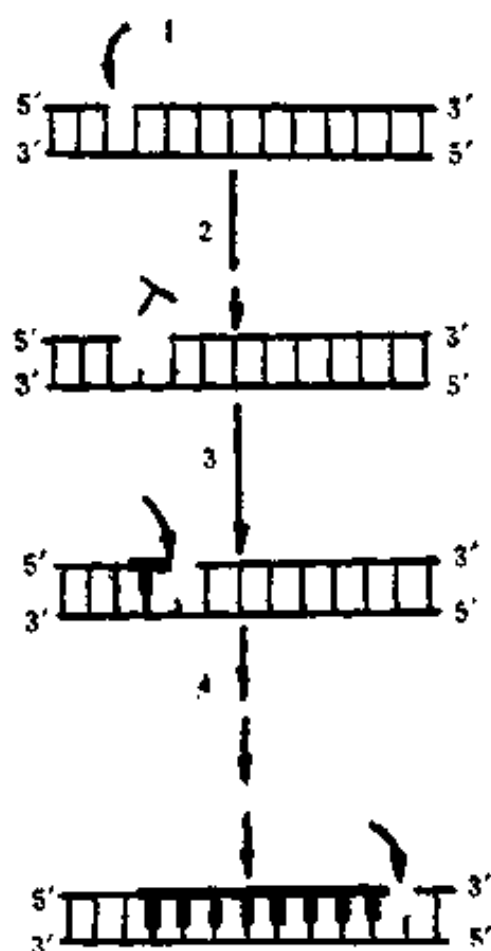


图 7-11 缺口平移法制备标记探针示意图

1—运用 DNase I 诱导出一个具有 3'-OH 末端的缺口  
 2—用 DNA 聚合酶 5'→3' 外切酶活力切去第一个核苷酸  
 3—DNA 聚合酶 5'→3' 聚合酶活力使  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dNTP 补加缺口  
 4—DNA 链上的核苷酸不断为  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dNTP 所取代

## 2. 胰液 DNase I 溶液

1mg/ml 胰 DNase I (电泳级纯)      50% 甘油  
 0.15mol/L NaCl                      5 $\mu$ l 分装, -20 $^{\circ}\text{C}$  存放

3. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 溶液      5 单位/ $\mu$ l

## 4. 未标记 dNTP 混合物

100mmol/L dGTP                      100mmol/L dTTP  
 100mmol/L dATP                      50mmol/L Tris (pH7.4)

分装 -20 $^{\circ}\text{C}$  存放.

5. ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ) dCTP (比活 > 3000 Ci/mmol, 1 $\mu$ Ci/ $\mu$ l).

6. 3mol/L 乙酸钠溶液 (pH4.7).

7. 0.5mol/L EDTA (pH8.0).
8. 氯仿.
9. 水饱和酚溶液.
10. 10%三氯乙酸-0.1mol/L磷酸钠溶液.
11. 无水乙醇.
12. 1.5ml塑料离心管及塑料吸嘴(已硅化).
13. 冰水浴.
14. 小型台式高速离心机.
15. 12~14℃水浴.
16. 待标记DNA(高纯度, 参见第八章).
17. 液体混合振荡器.

## (二) 操作步骤

1. 配制0.2μg/ml DNase溶液。取1mg/ml DNase原液2μl加入100μl 1×缺口平移缓冲液中, 用微量移液器和塑料尖嘴略微搅动一下, 使之混匀, 放在冰上10min让其扩散。从中取1μl加入另一100μl 1×缺口平移缓冲液中, 略微搅动一下, 冰上扩散10min。

2. 将0.2~1μg待标记DNA溶于43μl 1×缺口平移缓冲液中, 加入1.5μl DNase稀释液, 37℃ 10~15min。

3. 70℃热浴5min灭活DNase, 置冰上。

4. 加入1μl dNTP混合液。

5. 加入3μl (约30μCi)<sup>32</sup>P-dCTP。

6. 加入2.5单位的DNA聚合酶I, 轻轻混匀。

7. 12~14℃水浴中静置2h。

8. 加入1μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应, 置冰上。

9. 加入下列溶液:

3mol/L 乙酸钠	40μl	水饱和酚	300μl
水	200μl	氯仿	300μl

10. 盖上盖, 振荡器混合反应液。

11. 10000r/min离心1min分相。

12. 上清液移入另一小离心管中, 加入600μl乙醇, -20℃, 4h。

13. 10000r/min离心10min, 去上清液(有同位素)。

14. 沉淀用1ml水溶解, 振荡混匀, 用于杂交或放入有机玻璃防护盒内



-20℃存放, 1~2周使用。

### 〔实验7-36〕随机引物标记法

本法以随机寡核苷酸为引物, 通过仅具 5'→3' 聚合酶活力的大肠杆菌 DNA 聚合酶大片段 (Klenow 片段), 以单链 DNA 为模板或用 RNA 依赖性 DNA 聚合酶以 RNA 为模板, 合成具有高比放射活性的互补 DNA 片段。此法可获得更高比放射活性的探针 (10<sup>8</sup>cpm/μg), 同位素标记化合物的掺入率可高达 70~80%, 而且可直接利用在低熔点胶里的 DNA 进行标记。

随机引物是本法的关键, 可由下列 3 种方法获得: ① 以 DNase I 限量酶切牛胸腺或鲑精 DNA, 分离获得含 6~12 核苷酸残基的单链 DNA 片段; ② 牛胸腺 DNA 随机引物可从有关生物试剂商店购得及 ③ 根据计算机分析生物基因组 DNA 六核苷酸排列的多种可能性而设计, 人工合成含 6 个核苷酸残基的脱氧核苷酸顺序 [pd(N)<sub>6</sub>], 此可从 Pharmacia 等公司购得。

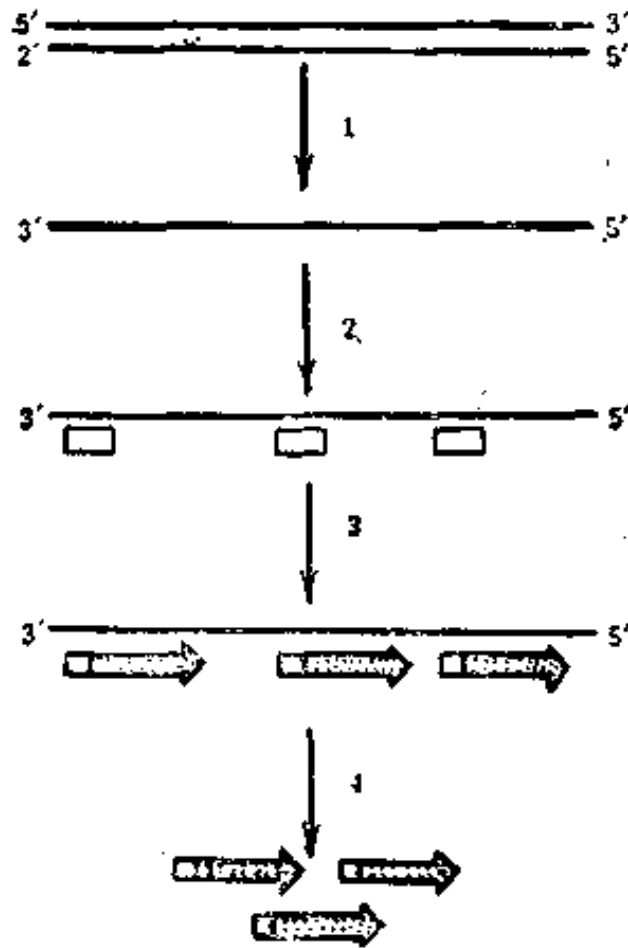


图 7-12 随机引物标记步骤

1—变性 2—随机引物配对 3—在 dNTPs、α<sup>32</sup>PdATP 存在下由 DNA 聚合酶大片段酶促 DNA 复制  
4—变性

由于此引物具有长度一致，相互间无互补作用等优点，现大有取代缺口平移法的可能（图7-12）。

### （一）实验材料

1. 待标记已纯化的双链DNA（详见第八章）。
2. 随机引物混合物 以10mmol/L Tris (pH8.0) 配制成75ng/ $\mu$ l。分装，-20℃存放（可从Pharmacia公司购得）。
3. 10×标记缓冲液 (RP)
  - 90mmol/L HEPES (以4mol/L NaOH调pH至8.6)
  - 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>
4. 终止缓冲液
 

50mmol/L Tris (pH7.5)	5mmol/L EDTA (pH8.0)
50mmol/L NaCl	0.5% SDS
5. dNTPs溶液
 

5mmol/L dGTP	5mmol/L dTTP
5mmol/L dCTP	
6. ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) dATP (比活大于3000Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)。
7. 20mmol/L DTT。
8. 大肠杆菌DNA聚合酶大片段 (5单位/ $\mu$ l)
9. 沸水浴。
10. 封口胶 (Parafilm)。
11. 冰浴。
12. 0.5ml塑料离心管。
13. 微量移液器及吸嘴。
14. 玻质微管。
15. 喷灯。

### （二）操作步骤

1. 在一小片封口胶上将 200ng/ml 双链DNA和 75ng/1 $\mu$ l 随机引物混合，移入一玻质微管中，封口。置沸水浴中10min。

2. 同时将1支0.5ml离心管置冰浴中，加入下列溶液：

20mmol/L DTT	1 $\mu$ l	( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) dATP	3 $\mu$ l
dNTPs (5mmol/L)	1 $\mu$ l	无菌重蒸水	1 $\mu$ l
10×RP	1 $\mu$ l		

3. 从沸水浴中取出玻质微管，立即插入冰水浴中，.min后取出并擦干外表。折断微管，取出内容物加到步骤2的小离心管内。

4. 加入5单位/1 $\mu$ l的大肠杆菌DNA聚合酶I大片段，敲击管壁混合内容物。

5. 10000r/min离心1~2 S。

6. 室温放置至少3 h (可放置12~16 h)。

7. 加入10 $\mu$ l终止缓冲液，-20 $^{\circ}$ C存放，数日内使用。

如标记凝胶中的DNA片段，则按下列步骤进行：

① DNA经电泳，溴化乙锭染色确定需要的片段(参见第八章)。切下凝胶置一支已称重的小离心管内，每克胶加入3ml水。

② 置沸水浴中7min，使凝胶溶化及DNA变性。

③ 置37 $^{\circ}$ C水浴。

④ 在另一支小离心管内，按下列顺序加入下列溶液：

5 $\times$ 寡核苷酸标记缓冲液 10 $\mu$ l

250mmol/L Tris (pH8.0)
25mmol/L MgCl <sub>2</sub>
5mmol/L 2-巯基乙醇
2mmol/L dCTP
2mmol/L dGTP
2mmol/L dTTP
1mol/L HEPES (pH6.6)
1mg/ml随机引物

10mg/ml牛血清白蛋白(第5部分) 2 $\mu$ l

DNA溶液(体积小于32 $\mu$ l) 20~50ng

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (比活>3000Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) 5 $\mu$ l

大肠杆菌DNA聚合酶I大片段 5单位/1 $\mu$ l

水 加至50 $\mu$ l

⑤ 室温反应3~12 h。

⑥ 加入200 $\mu$ l终止缓冲液(同上)，-20 $^{\circ}$ C存放，数日内使用。

#### (实验7-37) RNA探针的制备

以带有多克隆位点，其上游带有鼠伤寒沙门氏菌噬菌体SP<sub>1</sub>启动子或大肠杆菌噬菌体T<sub>7</sub>和T<sub>3</sub>启动子的质粒为模板，在特定的DNA依赖性RNA聚

合酶的作用下可引导DNA依赖的RNA的合成。利用这一性质可进行RNA探针的制备。将适当的基因片段(DNA)克隆到多克隆位点后,再选择适当的限制性核酸内切酶,在紧靠插入顺序的下游区将质粒切成线形,加入适当的DNA依赖性RNA聚合酶及RNA合成底物rNTPs,其中之一为<sup>32</sup>P标记,则RNA的合成从启动子开始,一直延伸到切点。合成的RNA中掺入了<sup>32</sup>P并只带有极少的非特异性核苷酸序列。RNA被认为是当今最优秀的探针,具备以下优点:①合成容易, RNA产量是模板量的数倍;②可合成相对价廉的高比放射活性的探针,而rNTPs用量很低(1~20μmol);③RNA探针中的DNA可十分方便地经不含RNase的DNase I酶切而去除,无需再行纯化;④RNA探针的灵敏度远较DNA探针高;⑤杂交双链不被RNase水解。

### (一) 实验材料

1. 模板重组质粒DNA(已克隆入目的基因片段,参见第八章);带有SP<sub>6</sub>、T<sub>7</sub>或T<sub>3</sub>启动子。

2. 胎盘RNase抑制剂, 20单位/μl。

3. 噬菌体T<sub>7</sub>、T<sub>3</sub>或SP<sub>6</sub> DNA依赖性RNA聚合酶溶液(10~20单位/μl)。

4. 无RNase活性的胰DNase I (1mg/ml)。

5. 转录缓冲液(10×)

400mmol/L Tris, pH7.5                      20mmol/L亚精胺·HCl

60mmol/L MgCl<sub>2</sub>                              50mmol/L NaCl

分装, 高压灭菌后-20℃存放。

6. 1mol/L DTT。

7. 2mg/ml牛血清白蛋白(BSA)(第5部分)。

8. rNTPs溶液 分别制备20mmol/L rATP, rCTP, rGTP和rUTP溶液,以0.05mol/L Tris调溶液pH至7.0。再配制一个每种浓度均为5mmol/L的rATP, rCTP, rGTP的混合液。

6、7、8三种溶液必须用无RNase的水配制。无RNase的水的制备方法是将去离子水用0.1% DEPC(diethyl pyrocarbonate)于97℃处理至少12h,然后高压灭菌15min。

9. TE

10mmol/L Tris (pH7.5)                      1mmol/L EDTA

10. 无水乙醇。
11. 水饱和酚-氯仿液 (1:1)。
12. 5mol/L 乙酸铵溶液。
13. 1.5ml 塑料离心机。
14. 台式高速离心机。
15. 40℃ 及 37℃ 水浴。

## (二) 操作步骤

1. 将模板DNA用适当的限制性核酸内切酶酶切完全。
2. 如果需要, 以大肠杆菌 DNA 聚合酶大片段或 T<sub>7</sub> DNA 聚合酶在 dNTPs 存在下补齐 3' 末端。

3. 用酚-氯仿抽提两次去除蛋白质, 再以 2 体积的乙醇于 -20℃ 沉淀 4h。
4. 10000r/min 离心 10min, 取沉淀, 风干。
5. 加入适量 TE 溶解沉淀并使 DNA 含量在 0.5μg/μl 左右。
6. 在 1 支小离心管中依次加入下列溶液:

无RNase水	0.4μl	
线性模板DNA溶液	1μl	
1mol/L DTT	0.1μl	
5mmol/L rATP, rCTP, rGTP, 混合液		1μl
10× 转录缓冲液		1μl
胎盘RNase抑制剂		0.5μl
2mg/ml BSA		0.5μl
(α- <sup>32</sup> P) rUTP (400~800Ci/mmol 10μCi/μl)		5μl
噬菌体DNA依赖性RNA聚合酶(与启动子相对应)		1.0μl

7. 混合后孵育 1~2 h (使用 T<sub>7</sub> 或 T<sub>3</sub> RNA 聚合酶时, 孵育温度为 37℃; 使用 SP<sub>6</sub> RNA 聚合酶, 孵育温度为 40℃)。

8. 加入 1μl 无 RNase 的 DNase I (1mg/ml)。
9. 混匀, 37℃ 孵育 15min。
10. 加入 100μl 无 RNase 的水。
11. 加入 150μl 酚-氯仿液抽提一次。
12. 10000r/min 离心 5min。
13. 冰水相移入另一支小离心管中, 加入 20μl 5mol/L 乙酸铵, 混合。
14. 加入 250μl 乙醇, -20℃ 4h。

15. 12000r/min离心10min, 去净乙醇, 风干。
16. 加入100 $\mu$ l无RNase水使沉淀溶解。
17. 加入200 $\mu$ l乙醇, 存放于-70 $^{\circ}$ C中。
18. 用前加入0.1体积的5mol/L乙酸铵, 混匀, -20 $^{\circ}$ C沉淀4h, 12000r/min离心10min, 沉淀以杂交缓冲液溶解。

## (二) 非同位素标记核酸探针的制备

同位素标记核酸探针的高灵敏度以及制备过程简便是其最大的优点。但因其使用放射性同位素, 使后处理较为麻烦, 且常用同位素 $^{32}$ P等半衰期十分短, 标记好的探针不易长时间保存。为此, 80年代以来, 人们努力寻找能替代放射性同位素标记核酸探针的各种途径, 其中较为成功的是地高辛半抗原(Dig-dUTP)掺入法和光敏生物素核酸探针标记法。两者皆以酶促显色反应显示杂交结果。不同的是前者在制备探针过程中, 按随机引物法进行, DNA合成底物中掺入一定比例的Dig-dUTP, 从而将Dig半抗原引入合成的核苷酸序列中; 而后者是利用生物素的一种在光照下可活化的衍生物——光敏生物素, 将光敏生物素与待标记核酸混合, 在强可见光照射下就可将生物素标记在单链或双链的DNA或RNA上, 形成稳定的共价结合。两种方法制备的探针可在-20 $^{\circ}$ C下贮存1年不变。非放射性核酸探针的主要缺陷是一般不适用基质成分复杂、特别是存有固形成分的样品的杂交。

### 〔实验7-38〕 Dig-核酸探针的制备

#### (一) 实验材料

(所有材料可从Mannheim公司购得)

1. 待标记已纯化的双链DNA(纯化过程详见第八章)。
2. 随机引物混合物(Pharmacia) 为6个脱氧核苷酸组成的不同顺序(pd(N)<sub>6</sub>), 以10mmol/L Tris-1mmol/L EDTA, pH8.0悬浮成75ng/ $\mu$ l, 分装-20 $^{\circ}$ C存放。
3. 10 $\times$ 标记缓冲液(RP)
  - 90mmol/L HEPES (4mol/L NaOH调pH至6.6)
  - 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>

4. 终止缓冲液
 

50mmol/L Tris (pH7.5)	5mmol/L EDTA (pH8.0)
50mmol/L NaCl	0.5% SDS
5. dNTPs 标记混合液
 

1mmol/L dGTP	1mmol/L dATP
1mmol/L dCTP	0.35mmol/L Dig-dUTP
0.65mmol/L dTTP	
6. 20mmol/L DTT.
7. 大肠杆菌DNA聚合酶大片段 (5单位/ $\mu$ l).
8. TE
 

10mmol/L Tris (pH8.0)	1mmol/L EDTA
-----------------------	--------------
9. 乙醇.
10. 酚-氯仿混合液.
11. 4mol/L LiCl.
12. 沸水浴.
13. 封口胶 (Parafilm).
14. 冰浴.
15. 0.5ml塑料离心管(已硅化).
16. 微量移液器及吸嘴.

## (二) 操作步骤

1. 在一小块封口胶上混合200ng/ $\mu$ l双链DNA和75ng/ $\mu$ l随机引物, 移入一微玻管中, 沸水浴中10min.
2. 同时将1支0.5ml离心管置冰浴中, 加入下列溶液:
 

20mmol/L DTT	1 $\mu$ l	10 $\times$ RP	1 $\mu$ l
dNTPs标记混合液	2 $\mu$ l	无菌重蒸水	12 $\mu$ l
3. 从沸水浴中取出微玻管, 立即插入冰浴中, 1min后取出, 用移液器移出内容物加入至上述小离心管内.
4. 加入5单位/ $\mu$ l的大肠杆菌DNA聚合酶I大片段, 敲击管壁混合内容物.
5. 10000r/min离心1~2s.
6. 室温放置20h.
7. 加入10 $\mu$ l终止缓冲液.

8. 加入3.5 $\mu$ l 4mol/L LiCl, 80 $\mu$ l乙醇, 混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  4h.
9. 12000r/min离心10min, 沉积用70%冷乙醇洗1次.
10. 去乙醇, 风干,  $-20^{\circ}\text{C}$ 存放.
11. 用前用TE溶解, 再以杂交缓冲液稀释.

### 〔实验7-39〕光敏生物素标记核酸探针的制备

#### (一) 实验材料

1. 待标记已纯化的DNA (纯化过程详见第八章).
2. 光敏生物素 (Photobiotin, Sigma), 避光存放.
3. 正丁醇.
4. 3mol/L, pH4.6, 醋酸钠溶液.
5. 乙醇.
6. 0.1mmol/L EDTA (pH8.0).
7. TE  
100 mmol/L Tris (pH9.0)      1mmol/L EDTA
8. 冰浴.
9. 强光源 可用LYQ12-100W碘钨灯配以介质膜反光镜组装而成.
10. 1.5ml离心管 (已硅化).
11. 小型台式高速离心机.
12. 微量移液器及吸嘴.
13. 暗室.

#### (二) 操作步骤

1. 在暗室中将光敏生物素醋酸盐用灭菌重蒸水配成1mg/ml, 2 $\mu$ l分装,  $-20^{\circ}\text{C}$ 冻存.
2. 待标记DNA用重蒸水或0.1mmol/L EDTA配成0.5~1.0 $\mu$ g/ml.
3. 在1支小离心管中加入:

光敏生物素	2 $\mu$ l	待标记DNA	2 $\mu$ l
-------	-----------	--------	-----------
4. 开启管口, 插入冰浴中.
5. 调节强光源距离离心管10cm, 光照20min.
6. 加入50 $\mu$ l TE.
7. 加入100 $\mu$ l 正丁醇.
8. 充分混合.
9. 12000r/min离心1min.



10. 小心吸去上层正丁醇相, 弃去。
11. 水相中加入 100 $\mu$ l 正丁醇重复抽提 1 次, 水相应无色并浓缩至 30~40 $\mu$ l。
12. 加入 5 $\mu$ l 3mol/L 醋酸钠溶液, 加入 100 $\mu$ l 无水乙醇, 混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  4h。
13. 12000r/min 离心 10min。
14. 弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇洗 1 次, 风干。
15. 用 20 $\mu$ l 0.1mmol/L EDTA 溶解,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放。

### (三) 待检样固相化

待检样固相化是核酸分子杂交的一个步骤。所采用的固相载体一般均为硝酸纤维素薄膜 (NC)。现介绍琼脂糖凝胶中的 DNA, 菌落的固相化过程。已纯化的核酸溶液可直接在 NC 上点样, 固相化过程与琼脂糖凝胶中的 DNA 和菌落的固相化相似。

#### 〔实验 7-40〕凝胶中 DNA 转移至硝酸纤维素膜 (Southern blot)

此项技术通常用来确定某段 DNA 序列在较大核酸片段或基因组中的位置。通常, 将 DNA 用限制性核酸内切酶酶切, 获得大小不等的 DNA 片段, 经琼脂糖凝胶和硝酸纤维素膜吸取上来, 将此 DNA 从凝胶转移到 NC 上, 热干燥固定后, 即可用核酸探针进行检测。DNA 序列从凝胶中转移到 NC 上的速率与其分子大小有关。一般小于 1Kb 的 DNA 片段可很容易被转移, 而大于 15Kb 的 DNA 片段的转移较困难且效率低。遇到这种情形可将含 DNA 的凝胶先用酸处理以脱去部分嘌呤, 再经碱处理后可重复获得大小均一的 DNA 片段 (一般为 1~2Kb)。

#### (一) 实验材料

1. 0.25mol/L HCl,
2. 0.5mol/L NaOH-1.5mol/L NaCl,
3. 1mol/L Tris (pH7.5)  
1.5mol/L NaCl
4. 20 $\times$ SSC

NaCl	175.32 g	蒸馏水加至	1000ml
柠檬酸三钠	88.23 g	pH7.0	
5. 2 $\times$ SSC			



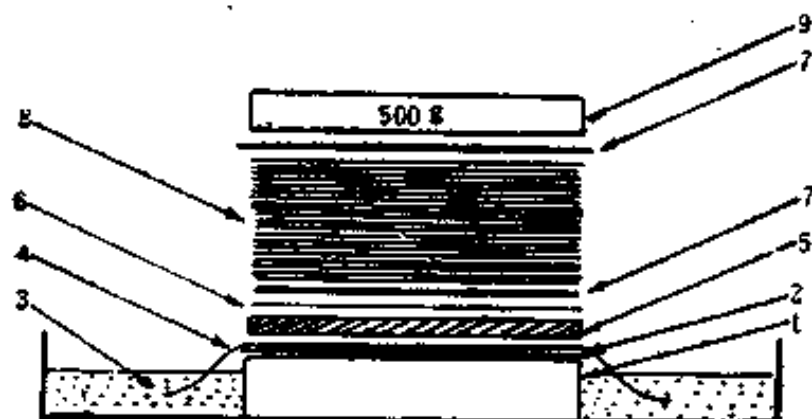


图 7-13 Southern blot 装置

- 1—粗圆木 2—玻璃板 3—转移缓冲液 4—滤纸  
5—凝胶 6—硝酸纤维滤膜 7—滤纸 8—吸水纸巾  
9—重物

14. 将5cm厚的吸水纸裁成比凝胶小2~3mm大小, 并将其铺于滤纸上, 再在其上放5cm厚的未精确剪裁的吸水纸巾。
15. 放上一块玻璃板。
16. 放上500~1000 g 的重物。
17. 室温放置8~24 h, 纸巾全部湿润后进行更换。
18. 去除纸巾和滤纸, 取下NC, 浸入6×SSC中5min。
19. 取出NC, 置于2张干滤纸之间, 两侧夹以纸巾, 室温干燥。
20. 将NC重新夹于2张干滤纸之间, 80℃真空固定0.5~2 h。
21. 装入塑料袋中室温保存或立即进行杂交。

#### 〔实验7-41〕菌落原位杂交

将硝酸纤维膜 (NC) 影印菌落, 然后在 NC 上将菌落进行原位溶菌, 再用碱处理使释放出的DNA变性, 固定后以核酸探针进行检测, 此法可一次对若干菌株及若干菌落进行检测。

##### (一) 实验材料

1. 待检菌株。
2. 培养基平板 ( $\phi 9\text{cm}$ )。
3. 硝酸纤维膜 (NC,  $0.45\mu\text{m}$ ,  $\phi 9\text{cm}$ )。
4. 1%碱性十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液

1% SDS

1mol/L NaOH

5. 中和溶液

1mol/L Tris (pH7.5)

1.5mol/L NaCl

6. 90%乙醇。

7. 10% SDS。

8. 真空烘箱。

9. 新华滤纸。

10. 高压灭菌锅。

## (二) 操作步骤

1. 将NC用铅笔轻轻划成若干个约6×6mm大小的方格。

2. 将划好格子的NC夹在两张普通滤纸中间，高压灭菌15min。

3. 用无菌镊子将NC平放于培养基平板表面，排除NC与琼脂间的气泡。

4. 在每个格子的中央点接入待检菌株，适宜温度下培养适当时间。如一般细菌，37℃ 5~8h即可。

5. 小心取出NC，在NC上用铅笔作标记。

6. 将NC菌落朝上放在3张已经10% SDS溶液饱和的滤纸上，勿使NC与滤纸之间存有气泡，室温放置3~5min。

7. 将NC以菌落面朝上放在3张已经1%碱性SDS溶液饱和的滤纸上，赶净气泡，室温放置20min。

8. 将NC以菌落面朝上放在3张已经中和溶液浸泡过的滤纸上，赶净气泡，静置5min。重复3次。

9. 将NC在90%乙醇上稍放一会儿后，夹在2张滤纸中置室温下干燥。

10. 放入80℃的真空烘箱中烘烤1.5~2h。

11. 如不马上进行杂交，可放入塑料袋中室温下存放。

菌落原位杂交的另一种方法是在步骤3用无菌镊子将已灭菌的NC平放于一软面上（如纸巾），用天鹅绒做成的影印章（已灭菌）将已在琼脂平板上生长出的菌落影印到NC。琼脂平板继续培养18h，封口，4℃存放；NC和琼脂平板上用铅笔在两个不对称位置上作标记。然后将NC按步骤6~11进行处理。

## (四) 硝酸纤维素膜上DNA原位杂交

将待检DNA固定到NL上后，用标记的DNA或RNA探针进行杂交便可确定待检DNA中对应DNA片段的有无。用于

DNA-DNA杂交的方法主要有使用甲酰胺系统和不使用甲酰胺系统。杂交全过程一般分为预杂交、杂交、洗膜和结果显示4个过程。预杂交是选用一些物质将DNA上那些非特异性的核酸结合位点结合掉，从而降低非特异性及本底。结果显示根据探针标记物的不同而不同。放射性同位素标记探针用放射性自显影显示结果，非放射性核酸探针一般皆用酶促呈色反应显示结果。

### 〔实验7-42〕放射性同位素标记核酸探针的杂交

#### (一) 实验材料

1. 放射性同位素标记核酸探针。
2. 已固定好DNA的硝酸纤维膜。
3. 20×SSC

0.3mol/L柠檬酸钠	3 mol/L NaCl
pH7.0	

4. 100×Denhardt's溶液
- 2%聚蔗糖(Ficoll, MW400000)
- 2%牛血清白蛋白(第5部分)
- 2%聚乙烯吡咯烷酮 (MW 360000)

5. 10mg/ml非同源DNA的水解液(常用小牛胸腺DNA或鲑精DNA, DNA要用物理方法打断或部分脱嘌呤, 加入预杂交及杂交溶液之前应将DNA置90~100℃水浴中加热10min, 然后迅速插入冰中)。

6. 甲酰胺 (A·P)。

7. 预杂交溶液 I (使用甲酰胺系统)

50%甲酰胺	5×Denhardt's溶液
6×SSC	0.5% SDS
100μg/ml切变性小牛胸腺DNA	

8. 预杂交溶液 II (不使用甲酰胺系统)

6×SSC	0.5% SDS
5×Denhardt's溶液	
100μg/ml切变性小牛胸腺DNA	

9. 洗涤液 I

2×SSC	0.5% SDS
-------	----------

10. 洗涤液Ⅱ  
2×SSC                      0.1% SDS

11. 洗涤液Ⅲ  
0.1×SSC                    0.5% SDS

12. 洗涤液Ⅳ  
0.1×SSC

13. 68℃或42℃水浴。

14. 沸水浴。

15. 冰浴。

16. 塑料封口机。

17. 乳胶手套。

18. 微量移液器及吸嘴等。

## (二) 操作步骤

(1) 将制备好的DNA硝酸纤维膜用铅笔或圆珠笔编号。

(2) 用预杂交溶液将NC浸湿并浸入其中，室温放置2min。

(3) 将NC装入一个合适大小的塑料袋内，以0.2ml/cm<sup>2</sup>膜的量加入已预热至42℃的预杂交溶液。

(4) 赶净所有气泡，将袋口热封，放入68℃水浴中（不使用甲酰胺系统）或42℃水浴中（使用甲酰胺系统）孵育1~2h，如有气泡出现，摇动去除之。

(5) 将核酸探针在沸水浴中处理5min后立即插入冰浴中速冷。

(6) 从水浴中取出塑料袋，剪去一角，倒去预杂交液，立即补入同体积的预杂交溶液，加入变性探针（最终浓度一般为1~10ng/ml）。

(7) 排净气泡，热封口。

(8) 在适宜温度下杂交适当时间（杂交温度一般根据 $T_m$ 初定，一般比 $T_m$ 低15~25℃，常用68℃；加入甲酰胺后，杂交温度再降低25℃左右，常用42℃，杂交时间5~48h），不时摇动。

(9) 戴好手套，从水浴中取出塑料袋，立即剪去一角。

(10) 倒出杂交液（放-20℃以备再用），充分打开塑料袋，取出NC，立即浸入100ml洗涤液Ⅰ中。

(11) 5min后取出NC，立即浸入100ml洗涤液Ⅱ中，室温放置15min，

间或摇动。

(12) 取出NC, 立即浸入100ml洗涤液Ⅲ中, 37℃下缓慢摇动30~60 min.

(13) 更换洗涤液Ⅲ, 68℃下缓慢摇动30~60min.

(14) 用洗涤液Ⅳ, 室温洗涤NC 1min.

(15) 取出, 用吸水纸吸去多余的液体.

(16) 将NC置于滤纸上, 晾干.

(17) 放射性自显影记录结果(见第一章).

#### (实验7-43) 地高辛标记核酸探针的杂交及显色

地高辛 (Dig) 标记核酸探针是目前使用效果最理想的非放射性核酸探针。虽然其敏感性不如放射性同位素标记探针, 但其无放射性同位素的污染, 杂交结果直接用肉眼观察。

##### (一) 实验材料

1. Dig标记核酸探针.

2. 碱性磷酸酶 (AKP) 标记抗地高辛抗体 (Mannheim), -20℃存放.

3. 已固定DNA的NC.

4. 四唑氮兰 (NBT) 溶液

NBT	75mg	70%二甲亚砜	1ml
-----	------	---------	-----

5. 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 (BCIP) 溶液

BCIP	60mg	二甲亚砜	1ml
------	------	------	-----

6. 杂交溶液

5×SSC	0.02% SDS
-------	-----------

0.1%月桂酰甲基甘氨酸钠 (N-Lauroylsarcosine, Na-Salt)	
---	--

5%脱脂奶粉	50%甲酰胺
--------	--------

100μg/ml切变性小牛胸腺DNA	
--------------------	--

7. 洗涤液 I

2×SSC	0.1% SDS
-------	----------

8. 洗涤液 II

0.1×SSC	0.1% SDS
---------	----------

9. 缓冲液 I

100mmol/L Tris (pH7.5)	150mmol/L NaCl
------------------------	----------------

### 10. 缓冲液 II

100 mmol/L Tris (pH7.5)      150mmol/L NaCl

0.5% 脱脂奶粉

### 11. 缓冲液 III

100mmol/L Tris (pH9.5)      50mmol/L MgCl<sub>2</sub>

100mmol/L NaCl

### 12. 缓冲液 IV

10mmol/L Tris (pH8)      1mmol/L EDTA

### 13. 底物溶液(用前新配)

NBT 溶液      45μl      缓冲液 III      10ml

BCIP 溶液      35μl

14. 42℃ 及 68℃ 水浴。

### (二) 操作步骤

1. 将 NC 装入适宜大小的塑料袋中, 以 20ml/100cm<sup>2</sup> 加入杂交溶液, 热封口。
2. 42℃ 孵育 2~4 h。
3. 取出塑料袋, 剪去一角, 倒去杂交液, 立即以 2.5ml/100cm<sup>2</sup> 的比例加入杂交溶液, 加入标记探针至最终浓度为 10~50ng/ml 杂交溶液 (如 NC 面积很小, 可适当提高杂交液使用量)。热封口。
4. 42℃ 水浴中杂交 6 h 以上, 间或摇动。
5. 用洗涤液 I, 室温洗涤 2 次, 每次 5min。
6. 用洗涤液 II, 在 68℃ 下洗涤 2 次, 每次 15min。
7. 用缓冲液 I 洗涤 1min。
8. 将 AKP-标记抗 Dig 抗体用缓冲液 I 稀释至 150mU/ml (用多少配多少, 此酶标抗体在 4℃ 存放时间不可超过 12h)。
9. 将 NC 与 20ml 稀释抗体一起室温孵育 30min。
10. 用 100ml 缓冲液 I 洗涤 2 次, 每次 15min。
11. 用 20ml 缓冲液 III 浸泡 2min。
12. 将 NC 装入塑料袋中, 加入 10ml 新鲜配制的底物溶液, 暗处静置反应 1 天。
13. 去底物溶液, NC 用 50ml 缓冲液 I 洗涤 5min。
14. 室温晾干, 记录结果 (阳性反应呈蓝色)。



## (实验7-44) 生物素标记核酸探针的杂交及显色

### (一) 实验材料

1. 生物素标记核酸探针。
2. 已固化DNA的NC。
3. 亲和素-碱性磷酸酶 (Sigma)。
4. 四唑氮兰 (NBT) 溶液

NBT                                75mg        70% 二甲亚砜                                1ml

5. 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸 (BCIP) 溶液

BCIP                                50mg        二甲亚砜                                1ml

6. 预杂交溶液

50% 甲酰胺    5×SSC  
5×Denhardt's 溶液    5mmol/L EDTA  
0.5mg/ml 切变性小牛胸腺DNA  
50mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH8.5)

7. 洗涤液 I

2×SSC    0.1% SDS

8. 洗涤液 II

0.1×SSC    0.1% SDS

9. 封闭液 3%牛血清白蛋白 (第5部分)。

10. 缓冲液 I

100mmol/L Tris (pH7.5)                                0.5% Tween 20  
150mmol/L NaCl

11. 缓冲液 II

100mmol/L Tris (pH7.5)                                150mmol/L NaCl  
0.5% 脱脂奶粉

12. 缓冲液 III

100mmol/L Tris (pH9.5)                                100mmol/L NaCl  
50mmol/L MgCl<sub>2</sub>

13. 缓冲液 IV

10mmol/L Tris (pH8)                                        1mmol/L EDTA

14. 缓冲液 V

100mmol/L Tris (pH7.5)                                1.0mol/L NaCl

2mmol/L MgCl<sub>2</sub>,

0.05% Triton X-100

15. 底物溶液(用前新配)

NBT溶液                      45μl      缓冲液Ⅲ                      10ml

BCIP溶液                      35μl

16. 42℃及68℃水浴。

(二) 操作步骤

1. 将已固化DNA的NC装入适当大小的塑料袋中, 加入预杂交液, 用量为80μl/cm<sup>2</sup>。

2. 42℃水浴中2~4 h。

3. 取出塑料袋, 剪去一角, 倒去预杂交液, 加入等体积的预杂交液, 加入生物素标记核酸探针(最终浓度至200ng/ml), 封口。

4. 42℃水浴中24 h, 间或摇动。

5. 倾去杂交液(杂交液于-20℃存放, 可用于下次杂交), 加洗涤液 I 250ml室温洗3次, 每次20min。

6. 加洗涤液Ⅱ 250ml 68℃洗3次, 每次30min。

7. 轻轻吸干NC, 放入新塑料袋内, 加入4ml封闭液, 热封口。

8. 42℃, 60min。

9. 倒去封闭液, 加入4ml缓冲液V, 加入2~8μl亲和素-碱性磷酸酶, 热封口。

10. 室温15min, 轻轻振荡。

11. 300ml缓冲液V洗涤3次, 每次20min。

12. 用100ml缓冲液I洗涤2次, 每次15min。

13. 余下步骤同(实验7-43)步骤11-14。

## 五、聚合酶链反应技术 (PCR)

聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是1985年美国Cetus公司Mullis等人开发的一项专利, 经Saiki, Scharf, Horn, Faloona, Chien等人的改进, 于1988年将产品推向市场。

PCR是一项特异性DNA序列的体外酶促合成方法。它是利用2个寡聚核苷酸作为引物与对应DNA链的目的区域的侧翼杂

交，经过模板变性作用，引物退火和耐热 DNA 聚合酶酶促引物延伸，周而复始地重复产生特定片段。该片段的末端由引物的 5' 末端决定。因一个周期所合成的引物延伸产物可作为下一个周期的模板，所以目的 DNA 拷贝数目在每个周期中近似呈倍数增加。这样，20个PCR周期可得约百万倍 ( $20^{20}$ ) 扩增。

PCR一个周期中所采用的最适温度和时间是①热变性：92~97℃，5min；②退火：50℃，1min；③延伸：72℃，1min。现已发展出PCR热循环仪，使PCR扩增全部实行自动化。

PCR反应原理如图7-14所示。此技术已广泛用于分子克隆和



图 7-14 PCR扩增原理 (图示1~4次循环)

▲、△分别代表寡聚引物 1、2、3、4分别代表第1、2、3、4次扩增

DNA分析，包括①已克隆的双链DNA特定序列的扩增，以用于核酸探针的制备；②运用特定的引物选择性扩增 cDNA 特定片段，用于未克隆基因检测的探针；③从极少量mRNA建立 cDNA 文库；④用于序列分析的大量DNA的制备；⑤突变分析；⑥染色体全序分析。

本文仅介绍PCR的一般过程。

#### 〔实验7-45〕PCR技术

### (一) 实验材料

1. Taq DNA聚合酶 为从嗜热菌 *Thermus aquaticus* YT1中分离可耐95℃温度，最适反应温度在72℃的耐热DNA聚合酶，1单位/μl，-20℃存放。

2. 引物 一般由两个不同序列，长度在20~30个碱基组成的核苷酸序列。两个引物的序列决定PCR扩增产物的特异性及其长度。一般皆由DNA合成仪合成，反应体系中的浓度在50pmol/100μl。

引物的设计一般遵循下列原则：① 碱基尽可能随机分布，GC含量与待扩增片段相似，避免含有一段多聚嘌呤或嘧啶等不常见序列作引物；② 避免在引物中存在明显的二级结构，尤其在引物的3'端；③ 避免引物间存在互补性；④ 长度在20~30碱基，两引物间距离在150~600bp最好。

#### 3. 4×dNTPs混合液

2.5mmol/L dATP	2.5mmol/L dCTP
2.5mmol/L dGTP	2.5mmol/L dTTP

用NaOH溶液调节pH至8.3。

#### 4. 反应缓冲液 (10×)

670mmol/L Tris (pH8.3)	100mmol/L	2-巯基乙醇
67mmol/L MgCl <sub>2</sub>	1.7mg/ml	牛血清白蛋白
166mmol/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	67μmol/L	EDTA

#### 5. 液体石蜡。

#### 6. 二甲亚砜。

7. 待扩增DNA (模板DNA) 可经热、反复冻融及Triton X-100等裂解菌体或经水饱和酚粗提。如扩增对象为细菌，则菌体浓度不应高于10<sup>8</sup>/10μl。

#### 8. PCR热循环仪 (Cetus, Pedna或国产1109型)。

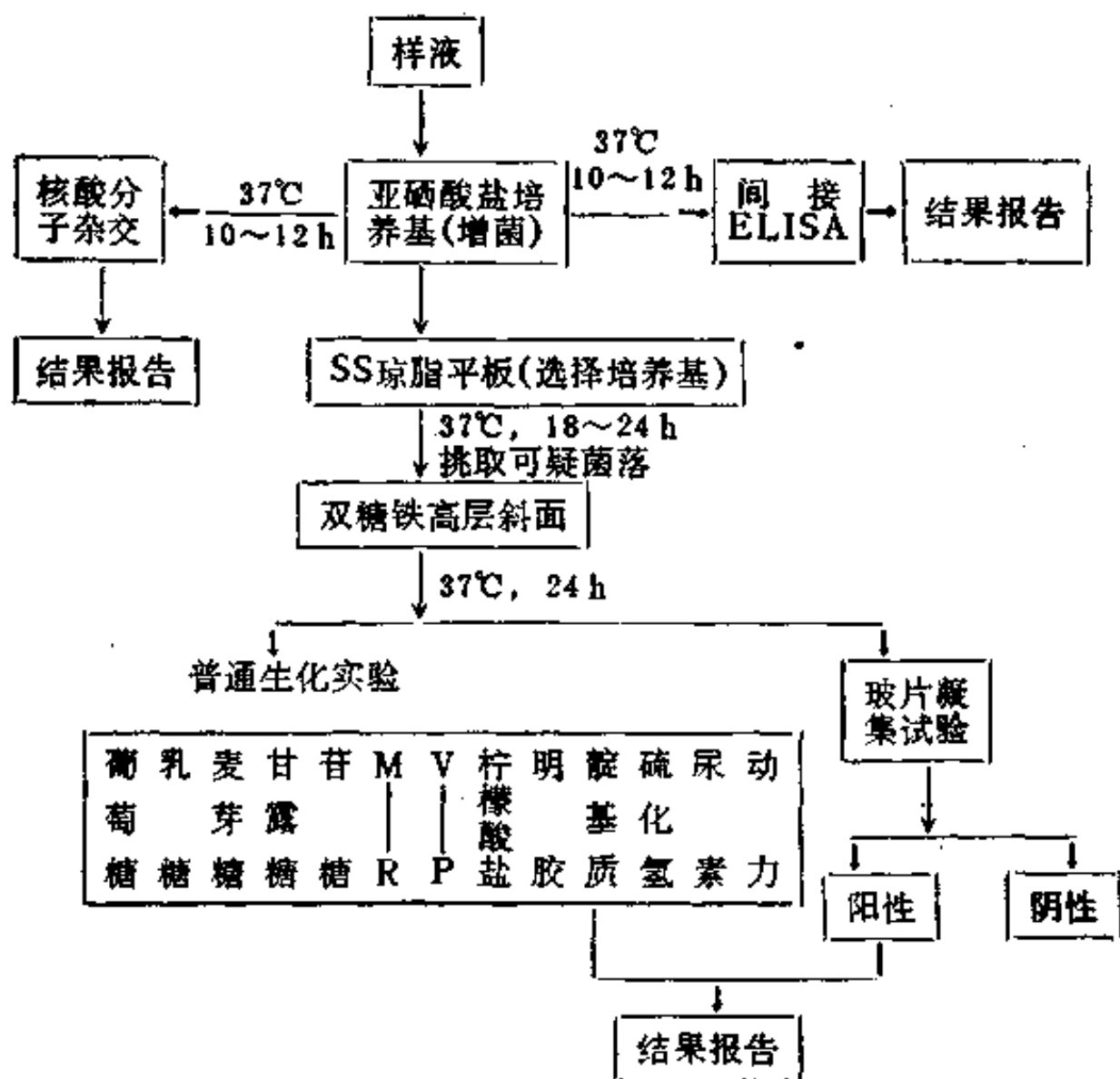
#### 9. 0.5ml小离心管，微量移液器等。

### (二) 操作步骤

1. 在1支0.5ml小离心管中按下列顺序加入下列溶液：

去离子蒸馏水	70μl
反应缓冲液 (10×)	10μl
4×dNTP	8μl
引物 I	1μl (100pmol)





### 【实验7-46】沙门氏菌和志贺氏菌的检验

通过本实验，要求能够了解沙门氏菌和志贺氏菌的特征和基本检验方法。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 含沙门氏菌和志贺氏菌的样液。
2. 培养基

##### (1) 亚硒酸盐增殖培养基

蛋白胨	0.5g	磷酸氢二钠	0.55g
乳糖	0.4g	亚硒酸氢钠	0.4g
磷酸二氢钾	0.45g	无菌蒸馏水	100ml

先将亚硒酸氢钠溶于200ml水中(不可加热)，再加入其他成分和水，加热溶解，调pH至7.1，分装于无菌试管中，经流动蒸汽(常压)灭菌

15min。用于沙门氏菌和志贺氏菌的增殖。

(2) S·S琼脂培养基

豚蛋白胨	1.5 g	牛肉浸膏	0.5 g
牛胆酸钠	1.0 g	硫代硫酸钠	0.85 g
乳糖	1.0 g	琼脂	1.8 g
柠檬酸钠	1.0 g	蒸馏水	100ml
柠檬酸铁	0.05 g		

将牛肉膏、琼脂和水加热溶解并过滤后再将其他成分加入溶解，调pH至7.1，加1%中性红2.3ml和0.1%煌绿 (Billiont green) 0.33ml，经煮沸2次即达灭菌的目的。供沙门氏菌、志贺氏菌培养分离用。

(3) 三糖铁琼脂培养基

牛肉浸膏	0.3 g	氯化钠	0.5 g
蛋白胨	2 g	硫酸亚铁	0.02 g
酵母浸膏	0.3 g	硫代硫酸钠	0.03 g
乳糖	1.0 g	琼脂	1.5 g
蔗糖	1.0 g	蒸馏水	100ml
葡萄糖	1.0 g		

调pH为7.4，加0.2%酚红12ml，分装试管每管约5ml，68.65kPa灭菌20min，摆成高底柱斜面，用于细菌三铁糖琼脂试验。

(4) 糖类发酵试验培养液 (葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖)

肉汤蛋白胨	100ml	糖(或醇)类	1.0 g
-------	-------	--------	-------

调pH为7.4，加0.2%溴甲酚紫2.5ml，68.65kPa，灭菌20min，用于糖(或醇)类发酵试验。

(5) 葡萄糖蛋白胨水培养基

蛋白胨	0.5 g	磷酸氢二钾	0.5 g
葡萄糖	0.5 g	蒸馏水	100ml

pH 7.0~7.2，68.65kPa灭菌20min，用于细菌的MR和V-P试验。

(6) 胰蛋白胨水培养液

胰蛋白胨	1.0 g	蒸馏水	100ml
氯化钠	0.5 g		

pH为7.4，103.4kPa灭菌20min，用于细菌吲哚试验。

(7) 柠檬酸铁铵培养基

蛋白胨	2.0 g	硫代硫酸钠	0.05 g
氯化钠	0.5 g	琼脂	1.8 g
柠檬酸铁胺	0.05 g	蒸馏水	100ml

pH为7.2, 103.4kPa 灭菌15min, 灭菌后试管直立, 凝固后备用, 用于细菌产生H<sub>2</sub>S试验用。

(8) 柠檬酸盐利用培养基

磷酸二氢铵	0.1 g	柠檬酸钠	0.2 g
磷酸氢二钾	0.1 g	琼脂	0.2 g
氯化钠	0.5 g	蒸馏水	100ml
硫酸镁	0.02 g		

调pH为6.8, 加1%溴麝香草酚蓝10ml, 103.4kPa 灭菌20min, 调制斜面。用于细菌柠檬酸盐利用试验。

(9) 明胶培养基

肉汤蛋白胨培养液	100ml	明胶	12 g
----------	-------	----	------

pH7.2~7.4, 68.65kPa 灭菌20min, 灭菌后试管直立, 凝固后备用, 用于细菌明胶液化试验。

(10) 尿素培养基

酵母浸膏	0.1 g	尿素	2.0 g
磷酸二氢钾	0.1 g	葡萄糖	0.1 g
磷酸氢二钠	0.1 g	蒸馏水	100ml

调pH为7.0, 加0.2%酚红5ml, 过滤灭菌, 分装无菌试管。用于细菌尿素分解试验。

(11) D·C琼脂培养基

蛋白胨	1 g	磷酸氢二钾	0.2 g
乳糖	1 g	去氧胆酸钠	0.1 g
氯化钠	0.5 g	琼脂	1.8 g
柠檬酸钠	0.1 g	蒸馏水	100ml
柠檬酸铁	0.1 g		

调pH至7.2, 加入1%中性红3ml, 经流动蒸汽(常压)灭菌15min, 用于沙门氏菌和志贺氏菌的培养、分离。

3. 诊断血清 沙门氏菌多价诊断血清, 志贺氏菌多价诊断血清。

4. 器具 培养箱、显微镜、革兰氏染色液、生理盐水、接种环, 接种



针、酒精灯、无菌培养皿、载玻片、凹玻片、盖玻片等。

## (二) 操作步骤

1. 沙门氏菌的检验 沙门氏菌为革兰氏阴性短杆菌，无芽孢和荚膜，有动力（鸡沙门氏菌和维沙门氏菌无动力），需氧或兼性厌氧，适应pH为6.8~7.6，在普通培养基上能良好生长，在基础琼脂平板上生长的菌落无色透明，中等或较小，稍扁平，边缘整齐，在S·S琼脂平板上可形成中心带黑色的菌落，能发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇产酸产气（除伤寒杆菌、沙门氏菌只产酸不产气，猪伤寒沙门氏菌不发酵甘露醇，雏沙门氏菌不发酵麦芽糖以外），不发酵乳糖、蔗糖，产生硫化氢。

(1) 增殖培养：用吸管（或滴管）吸取含菌液1~2滴注入亚硒酸盐增殖菌液试管内，经37℃ 24 h培养后，观察培养液的变化，并涂片镜检，判别其形状、大小和革兰氏染色反应。

(2) 分离培养：将样液或经24 h培养的增菌液用划线方法接种于S·S琼脂平板，或接种于铋琼脂平板，经37℃ 24 h培养后，观察其菌落形状、大小和颜色。

(3) 普通生化反应：取S·S平板上的可疑菌落，将穿刺和涂布的方法移到三糖铁高层斜面培养基上，经37℃ 24 h培养后，观察培养基的底层和斜面两部分的变化，并将斜面上的菌接入葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖等发酵管和蛋白胨水、柠檬酸盐琼脂、明胶、尿素等培养基中，经37℃ 24 h培养后观察结果和作MR、V-P、靛基质、硫化氢和尿素酶试验，记录结果。

(4) 多价“O”血清凝集试验：取三糖铁斜面上生长的菌作沙门氏多价“O”血清玻片凝集试验，如果凝集即可初步确定为沙门氏菌属。

2. 志贺氏菌的检验 志贺氏菌是革兰氏阴性短杆菌，无荚膜，无芽孢，需氧或兼性厌氧适应生长温度为10~40℃，适应生长pH6.4~7.8，在一般培养基上均能生长，在基础琼脂平板上生长的菌落呈圆形突出，无色透明，表面光滑，边缘整齐。可在水或冰内存活几个月。它们的生化反应特性是葡萄糖、麦芽糖、甘油、醇多数发酵。但只产酸不产气。乳糖多数不发酵，蔗糖也如此，柠檬酸盐不利用，尿素不分解，明胶不液化，不产生硫化氢，硝酸盐还原。靛基质产生情况因菌种和菌株不同而有所不同。

(1) 增殖培养：将样液接种于亚硒酸盐增菌液中（或革兰氏阴性杆菌增菌液），经37℃ 18~24 h培养后，观察培养液中细菌生长情况，涂片染色

镜检，并用悬滴法观察有无动力。

(2) 分离培养：将样液或培养后的增菌液用划线方法接种于S·S琼脂平板（或去氧胆酸琼脂平板）上，经37℃ 24 h培养后观察，如有玫瑰红色，半透明，边缘整齐的菌落，即为可疑菌落。将可疑菌再以穿刺和涂布方式移种至高层斜面培养基上，经37℃ 24 h培养后观察，如底层有颜色变化，但无黑色气泡产生，斜面无颜色变化的，即可进一步作生化试验。

(3) 普通生化试验：试验方法与项目与沙门氏菌相同。

(4) 血清凝集反应：采用培养基高层斜面上生长的菌，先作志贺氏菌多价血清玻片凝集试验。凡凝集者，即可初步确定为志贺氏菌。

3. 结果的确定：根据以上普通生化反应和多价血清凝集试验参照表7-23进行鉴定。

表 7-23 志贺氏菌的试验项目

试验项目	大肠杆菌	沙门氏菌	志贺氏菌
葡萄糖发酵	⊕	⊕	+
乳糖发酵	⊕	-	-
麦芽糖发酵	⊕	⊕/-	+/-
甘露醇发酵	⊕	⊕/-	+/-
蔗糖发酵	⊕/(-)(少数)	-	-
柠檬酸盐利用	-	+	-
靛基质	+	-/+ (个别)	-
V-P	-	-	-
硫化氢	-	+	-
明胶液化	-	-	-
尿素分解	不定	-	-
动力	+	+	-
多价沙门氏“O”血清	-	+	-
志贺氏多价血清	-	-	+

注：⊕表示产酸产气；+表示产酸或阳性；-表示阴性。

## 第八章 选种和育种

以微生物为基础的发酵工业,要使产品产量、质量和品种都有高速度的发展,首先必须具备良好的菌种。菌种的选与育是一个问题的两个方面,没有的菌种要向大自然索取;有了的菌种还要改造、提高,更符合人们的要求。

有了优良的菌种,还要有合适的工艺条件和合理先进的设备与之配合,这样优良的菌种性能才能充分发挥。

### 第一节 工业菌种筛选程序

自然界中微生物种类异常之多,估计不少于几十万种,但目前已为人类研究及应用的不过千余种,可见这项自然资源的潜力之大。微生物虽然到处都有,无孔不入,但随着地理条件的差异,水质的不同,甚至在不同的基质和不同的气候,微生物存在的区系是不同的。但有一点是共同的,在自然界它们是以混杂的形式群居在一起的。现代发酵工业是以纯种培养为基础的,要根据菌种的特性、嗜好、形态上的差异,运用灵活的手段,才能将所要的微生物分离出来,并通过筛选手段获得新种。

新种筛选的步骤主要是:采样、增殖培养、培养分离和筛选。如果产物与食品制造有关,还需对菌种进行毒性鉴定。

#### 一、采 样

以采集土壤为主。一般园田土和耕作过的沼泽土中,以细菌和放线菌为主。富含碳水化合物的土壤和沼泽地中,酵母和霉菌较多,如一些野果生长区和果园内。采样的对象也可以是植物,腐败物品,某些水域等。

采样季节以温度适中，雨量不多的秋初为好。采土方式都在选好适当地点后，用小铲子除去表土，取离地面5~15cm处的土约10g，盛入清洁的牛皮纸袋或塑料袋中，扎好，标记，记录采样时间、地点、环境条件等，以备查考。为了使土样中微生物的数量和类型尽量少变化，宜将样品逐步分批寄回，以便及时分离。

## 二、增殖培养

采来的样品往往是我们所要求的菌类含量并不很多，而另一些微生物却大量存在。为了容易分离到所需的菌种，让无关的微生物至少是在数量上不要增加，可以通过选择性的配制培养基，选择一定的培养条件来控制。例如碳源利用的控制，可选定糖、

表 8-1 控制某些增殖条件获得的细菌种类

培养基外添加物* (g/L)	控制的环境条件	分离的样品	增殖的微生物类别
无	pH7.0, 通空气	土	好气氨基酸氧化菌
无	pH7.0, 通空气	经巴斯德灭菌的土	芽孢杆菌
无	pH7.0, 无空气	经巴斯德灭菌的土	发酵氨基酸细菌
尿素50.0	pH8.5, 通空气	经巴斯德灭菌的土	耐碱尿素分解芽孢杆菌
葡萄糖20.0	pH2.0~3.0, 无空气	土	厌气的某种八叠球菌
葡萄糖20.0	pH6.5, 无空气	植物材料、牛奶	乳酸细菌
葡萄糖20.0 CaCO <sub>3</sub> 20.0	pH7.0, 有或无 空气	土或污水	肠道细菌
葡萄糖20.0 CaCO <sub>3</sub> 20.0	pH7.0, 无空气	经巴斯德灭菌的土	发酵糖细菌
乳酸钠 20.0	pH7.0, 无空气	瑞士干酪	丙酸细菌
乙醇40.0	pH6.0, 通空气	果汁, 未经巴斯德 灭菌的土	醋酸细菌

\* 培养基的基本成分:

酵母膏1.0g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02g; 水100ml, 培养温度30℃.

淀粉、纤维素, 或者石油等, 以其中的一种为唯一碳源, 那么只有利用这一碳源的微生物才能大量正常生长, 而其他微生物就可能死

亡或淘汰。这样对下阶段的纯种分离就会顺利得多。表8-1和表8-2是通过某些细菌增殖条件的控制而获得的增殖结果，很有参考价值。

表 8-2 一些化能异养型细菌的增殖条件

基础培养基*添加物		特殊的 供气条件	pH	增殖的微生物类别
有机质 (g)	无机质 (g)			
乙醇 4.0	无	空气	7.0	固氮细菌
乙醇 4.0	NH <sub>4</sub> Cl 1.0	空气	7.0	好气性菌如假单胞菌
乙醇 4.0	NaNO <sub>3</sub> 3.0	无 (有瓶塞)	7.0	仅硝化细菌，如某些假单胞菌
乙醇	NH <sub>4</sub> Cl 1.0 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5.0	无 (有瓶塞)	7.2	脱硫弧菌
乙醇 4.0	NH <sub>4</sub> Cl 1.0 NaHCO <sub>3</sub> 1.0 CaCO <sub>3</sub> 5.0	无 (有瓶塞)	7.4	甲烷产生菌
葡萄糖 10.0	CaCO <sub>3</sub> 5.0	纯N <sub>2</sub>	7.0	巴氏梭菌和有关菌
葡萄糖 10.0	NH <sub>4</sub> Cl 1.0	无 (有瓶塞)	7.0	发酵细菌，如气杆菌

注：无照明培养，温度25~30℃。

\* 基础培养基成分，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g；FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g；CaCl<sub>2</sub> 0.02g；MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01；NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.001g；水1000ml。

从表中的控制环境条件看，是很有针对性的，并不复杂，但收效显著。所以增殖培养是关键的一步。

### 三、培养分离

尽管通过增殖培养效果显著，但还是处于微生物的混杂生长状态。因此还必须分离，纯化。在这一步，增殖培养的选择性控制条件还应进一步应用，而且控制得细一点，好一点。纯种分离的方法与前面所述的划线分离法、稀释分离法相类似。

### 四、筛选

这一步是采用与生产相近的培养基和培养条件，通过三角瓶的容量进行小型发酵试验，以求得适合于工业生产用菌种。

## 五、毒性试验

自然界的一些微生物是在一定条件下产毒的，将其作为生产菌种应当十分当心，尤其与食品工业有关的菌种，更应慎重。据有的国家规定，微生物中除啤酒酵母、脆壁酵母、黑曲霉、米曲霉和枯草杆菌作为食用无须作毒性试验外，其他微生物作为食用，均需通过两年以上的毒性试验。

## 第二节 培养分离

从自然界中分离培养微生物是菌种选育的重要和基础的步骤。Hesse发明的琼脂培养基、Richard采用的培养皿、Winogradsky和Beijernek的富集培养法以及毛细管单细胞分离技术、显微操作法、微孔滤器法等也已成为我们分离培养微生物的技术基础。然而，到目前为止，还没有一种分离培养方法能揭示一个试样中所包含的所有微生物总数和种类。而且，在任一试样中所存在的微生物仅为极少数特定种类的菌株，同时，在工业微生物筛选过程中，应及时调整检测方法，以与各种不同类型的生长和代谢之微生物相适应。因此，建立一更为科学的和针对性不强的分离方法是必要的。

一般而言，一组成功的分离培养方法应（1）认真考虑所需产品的特征和生产过程，（2）制订初步的筛选标准，（3）将生态学方法运用到分离和筛选过程。

培养分离中第一个要解决的问题是“分离什么和从哪里分离出？”例如，我们为了改善夏季白酒生产中出酒率，需要酒母是耐高温、高产乙醇，就自然引发我们到高温的发酵醪采样分离。再如，我们希望找到一个能在碱性pH下和高盐分时表现最佳作用的酶，那么，这一微生物在沙漠土样中被发现的机率远远超过森林土样。第二，必须充分考虑所分离微生物的生产能力、生长

速度、生物群体培养和产品生产工艺及其提纯的难易和费用、工业生产发酵罐中稳定性及遗传操作的难易程度等。第三，选择适宜的培养分离方法和检测方法。

自然生态环境中微生物的存在与其周围环境有着密切的关系。因此，在我们分离和筛选微生物时，将其放到其本来所处的环境中来研究是最易接近其本来面目的。生态学技术与培养分离相结合可更好地筛选大量和多种能生产有益产品的微生物。尽管微生物适应周围环境的能力很强，但特定的微生物种类与不同生态系统的样本有着密切的关系。如果系统地抽查在一特定生态系统中的不同部位。则会筛选出更多的不同类型的微生物。培养基、稀释液、培养条件及样本预处理措施等的选择实际上也就已经决定了从植物、土壤和水等样中分离出的数量和类型。将生态学方法用于培养分离的一般思路要点如下：

1. 罗列出所要分离的微生物类群；
2. 根据所采集样本的各种生态参数，描述所要分离的微生物之生态系统或栖息地；
3. 将若干样本分成若干类型，如植物和植物各部，土壤(类型和土层)、岩石、水、昆虫和发酵食品等；
4. 罗列出所要考察和测量的环境参数，如pH、盐分、水分、氧化还原电势及温度等；
5. 列出生物系统中有用的自然底物，如森林土壤中的几丁质、葡萄表皮的果胶；
6. 根据上述1~5项中所获得的数据，设计分离方法，即选择适宜的稀释液、底物、试样、天然浸出汁和培养条件；
7. 用标准方法作对照来评价生态学分离方法；
8. 根据待检材料的生态参数需要，修改已知的方法；
9. 运用特定的富集方法，富集那些可能具有筛选意义的微生物类群。

## 一、自然界中细菌的分离

### (一) 采样和采集方法

为了从一特定生态系统中分离出具有代表性的细菌菌群，特别是分离那些在唯一微环境区域中出现的菌群时，必须十分重视样本的采集。样本采集时所需的工具通常有无菌刮铲、土样采集器、镊子、解剖刀、手套、无菌小塑料袋和塑料瓶等。采样时应尽可能保持相对无菌，所采集的样本必须具有某种代表性，如特定的土样类型和土层，叶子碎屑和腐质，根系及根系周围区域，海底水，泥及沉积物，植物表皮及各部，阴沟污水及污泥，反刍动物第一胃内含物，发酵食品等。采好的样必须完整地贴上样本的种类及采集日期、地点以及采集地点的地理、生态参数等。应充分考虑采样的季节性和时间因素，因为真正的原地菌群的出现可能是短暂的。如在夏季或冬季土壤中微生物存活数量较少，暴雨后土壤中微生物会显著减少。采好的样应及时处理，暂不能处理的也应贮存于4℃下，但贮存时间不宜过长。这是因为一旦采样结束，试样中的微生物群体就脱离了原来的生态环境，其内部生态环境就会发生变化，微生物群体之间就会出现消长。如果要分离嗜冷菌，则在室温下保存试样会使嗜冷菌数量明显降低。

#### 1. 土样采集方法

选择好适宜地点后，用小铲子取样。就森林、旱地、草地而言，可先掘洞，由土壤下层向上层顺序采集；就水田等浸水土壤而言，一般是在不损土层结构的情况下插入圆筒采集。如果层次要求不严格，可取离地面5~15cm处的土。将采集到的土样盛入聚乙烯袋或玻璃瓶中。在采集植物根际土样时，一般方法是自土壤中慢慢拔出植物根，在大量无菌水中浸渍约20min，洗去粘附在根上的土壤，然后再用无菌水漂洗下根部残留的土，这部分土即为根际土样。

#### 2. 植物体采集方法



在采集叶面时,一般是用灭菌的剪刀、打孔器、安全刀片等,由几片新鲜叶片的同一部位切取一小块,并注意不要损伤周围边缘。选择叶面时应考虑叶位、叶龄、叶片正反面和在一片叶上的取样部位。采集植物根及根系时,方法与根际土样采集方法相似。将洗净的根装入采样袋中,采集根系时,一般与根际土样一起保存。

### 3. 水样采集方法

用于细菌检测的水样应收集于100ml 干净、灭菌的广口塑料瓶中。在使用前,需将瓶子彻底洗净。由于表层水中含有泥沙,故在采样时应在较深的静水层中采集水样。方法是:握住采样瓶底浸入水中30~50cm处,然后瓶口朝下打开瓶盖,让水样进入。如果有急流存在的话,应直接将瓶口反向于急流。采集瓶从水中取出时应迅速并带有较大的弧度。水样不应装满采样瓶。所有水样都应在24 h 之内迅速进行检测,或者4℃下贮存。

#### (二) 生态学参数及培养基的组成原则

加入培养基中的天然提取物种类和用量、环境生物物理学参数以及用于平板涂布分离样本的溶剂都会影响实验中所要分离的细菌的数量和种类。

用于细菌分离培养的培养基是多种多样的,而用于分离同一生态系统中不同土样中的细菌的培养基也是多样化的。就分离培养基的组成而言,部分培养基中必须含有10~50%的天然提取物。加入培养基中的天然提取物,通常由在所检测的生态系统中采集到的材料,如土、泥、叶、根、岩石、灰泥、腐质、木质等经浸泡、过滤等处理后制得。部分培养基中则应含有多种碳、氮源,如几丁质、纤维素或果胶。对G<sup>-</sup>菌有选择的培养基(如结晶紫营养培养基、红-紫胆汁琼脂、煌绿胆汁琼脂等)通常也应含有5~15%的天然提取物。所有分离培养基中都应含有抗真菌剂(如放线菌酮和制霉菌素),掺加浓度一般为50μg/ml,以抑制真菌的生长。琼脂平板在使用前应置于37℃培养箱中孵育1~2天,这样

一方面可以检测培养基是否灭菌充分及是否真的未被污染，另一方面可以使平板干燥，减少培养过程中水气的产生。培养基的生物物理学参数，如 pH 及盐分也应调节到与试样的生态系统参数值相近。

### (三) 分离培养基及试液

所有细菌分离培养基都必需补加 50 $\mu$ g/ml 的制霉菌素或 75 $\mu$ g/ml 的放线菌酮，以抑制真菌的生长。

有机混合肥料浸出液琼脂

酵母浸出汁	5.0 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40.5 g
葡萄糖	8.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
有机混合肥料浸出液*	400ml		
水	600ml		

调节 pH 至试样的 pH 后，121 $^{\circ}$ C 下高压蒸汽灭菌 20min。在培养基冷到 50 $^{\circ}$ C 时加入经过滤灭菌的抗生素溶液。

\* 有机混合肥料浸出液的制备方法是：取 1000 g 有机混合肥料加入到 3000ml 自来水中煮沸浸泡 30min，轻轻倒出上清液，冷却后过 4 层纱布，然后将滤液在 3000 $\times$  g 下离心 10min。

纤维素琼脂

溶胀纤维素*	7.0ml	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
酵母浸出汁	1.0 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
琼脂	15.0 g	ZnSO <sub>4</sub>	0.001g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7 g	水(蒸馏水，海、湖、	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g	河水等)	1000ml

在烧杯 A 中，用 500ml 蒸馏水混合溶胀纤维素和盐；在烧杯 B 中，混合琼脂、酵母浸出汁及余下的水。于 121 $^{\circ}$ C 下分开高压灭菌 15min，灭菌后将两烧杯搅拌，慢慢地将烧杯 A 中内容物倒入烧杯 B 中，并边加边轻轻搅拌。抗真菌抗生素在琼脂冷至 50 $^{\circ}$ C 时立即加入。

\* 溶胀纤维素的制备方法：

1. 将30 g 干燥纤维素粉末加到少量的丙酮中，然后缓慢地加入800ml 85%磷酸，用一机械搅拌器强烈搅拌2 h。

2. 加入2L 蒸馏水并强烈搅拌。

3. 4000 × g 离心收集悬浮物。

4. 悬浮沉积于5 L 蒸馏水中，再次离心。

5. 用1 L 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  重新悬浮沉积。

6. 用捣碎机全速均浆5min，然后4℃ 静置12 h。

7. 减压过滤，并用5 L 蒸馏水洗涤过滤，然后悬浮于15 L 蒸馏水中。

8. 10000 × g 离心 5min 得沉积，再均浆5min。

#### 海底水琼脂

细菌蛋白胨	5.0 g	KBr	0.08 g
酵母浸出汁	1.0 g	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.034 g
$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.1 g	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.022 g
NaCl	19.45 g	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	8.8 g	NaF	0.0024 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	3.24 g	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0016 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.8 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.008 g
KCl	0.55 g	琼脂	15.0 g
$\text{NaHCO}_3$	0.16 g		

最终pH调至7.6。121℃ 高压蒸汽灭菌15min。

#### 地衣浸出汁琼脂

地衣浸出汁*	300ml	痕量矿物质溶液**	1.0ml
蛋白胨	5.0 g	蒸馏水	700ml
酵母浸出汁	5.0 g	琼脂	17.5 g
葡萄糖	3.5 g		

\* 地衣浸出汁：蒸馏水3000ml，鲜地衣1000 g。

\*\* 痕量矿物质溶液：

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
$\text{FeSO}_4$	0.01 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.001 g	蒸馏水	1000ml

将水烧开，加入新鲜采集的地衣，浸泡20min，然后慢慢倒出上清液，冷却后用4层纱布过滤。滤液于3000×g下离心10min，上清液即为地衣浸出汁。

#### 复合碳-氮源琼脂

天冬氨酸	0.1 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g
酵母浸出汁	4.0 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
葡萄糖	5.0 g	琼脂	18.0 g
琥珀酸	0.2 g	蒸馏水	1000ml
NH <sub>4</sub> Cl	0.1 g		

121℃，高压蒸汽灭菌20min。最终pH大约为6.5。

#### 复合浸出汁琼脂

土浸出汁*	100ml	蛋白胨	4.0 g
植物浸出汁**	100ml	葡萄糖	2.0 g
根浸出汁***	100ml	琼脂	15.0 g
合成海盐 (IOAS)	0.25 g	蒸馏水	700ml
维生素溶液****	1.0ml		

121℃下高压蒸汽灭菌蛋白胨、葡萄糖、琼脂及水15min，然后加入上述各种浸出汁。培养基最终 pH 将依赖各种浸出汁的 pH。

\* 土浸出汁：采集具有生态系统代表性的花园、农田、森林、沼泽等土或泥，然后平铺于通风橱中干燥6h以上，取干土400g加到960ml自来水中，搅拌后于121℃下高压蒸汽灭菌1h，小心倒出上清液并离心，由此制得一金色的上清液，此上清液可直接使用或经过滤灭菌后4℃贮藏。

\*\* 植物浸出汁：从生态系统中采集植物，并用剪子剪成碎片，取植物碎片500g加到1000ml水中，煮开后，小火继续煮沸30min，用4层纱布过滤，滤液经0.22μm滤膜过滤灭菌并在4℃贮藏。

\*\*\* 根浸出汁：将植物从土中拔起，轻轻震落根上的土，取下根部置于热水中小火煮沸15min，此液体经0.22μm滤膜过滤灭菌后，4℃下贮藏。

\*\*\*\* 维生素溶液(mg/L)：

盐酸硫胺素	0.5	核黄素	0.5
-------	-----	-----	-----

烟酸	0.5	遍多酸钙	0.5
盐酸吡哆醇	0.5	对氨基苯甲酸	0.5
肌醇	0.5	生物素	0.25

0.22 $\mu$ m滤膜过滤灭菌。

#### 结晶紫-营养琼脂

土或其他浸出汁	100ml	琼脂	15.0g
牛肉浸膏	5.0g	自来水	900ml
酵母浸膏	5.0g		

121 $^{\circ}$ C下高压蒸汽灭菌10min, 然后加入1.0ml过滤灭菌的0.1%结晶紫。

#### 植物浸出汁琼脂

植物浸出汁	400ml	粗琼脂丝	17.5g
葡萄糖	8.5g	蒸馏水	600ml
酵母浸膏	4.5g		

调整最终pH为6.6~6.8。混匀组成成分, 于121 $^{\circ}$ C下高压蒸汽灭菌15min。

#### 根浸出汁琼脂

根浸出汁	375ml	淀粉	2.0g
植物浸出汁	25ml	酵母膏	1.0g
天冬氨酸	0.5g	合成海盐	0.5g
精氨酸	0.5g	琼脂	16.0g
色氨酸	0.5g	蒸馏水	600ml

#### 土浸出汁琼脂

土浸出汁*	400ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
蒸馏水	600ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g
酵母浸出汁	3.0g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
葡萄糖	7.5g	琼脂	16.0g

培养基的最终pH将根据所检测的生态系统的pH来调整。

\* 土浸出汁制备方法: 新鲜上层土壤(任何起孔的土壤)500g与1000ml蒸馏水混合后, 轻轻加热15min(80~90 $^{\circ}$ C), 然后用4层纱布粗滤并经

0.22 $\mu$ m 滤膜过滤灭菌, 4 $^{\circ}$ C 贮存备用。

#### 浸出汁-紫红胆汁琼脂

紫-红胆汁琼脂 (Difco)	28.0 g	天然浸出汁	250ml
		蒸馏水	750ml
琼脂	700 g		

培养基的最终 pH 根据所检测的生态系统及所使用的浸出汁而定。培养基各组分混合后于121 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌15min。

#### 林格氏液

NaCl	8.6 g	明胶	0.1 g
KCl	0.3 g	蒸馏水	1000ml
CaCl <sub>2</sub>	0.33 g		

#### 蒸馏水-海水混合液

蒸馏水	980.0ml	合成或天然海水	20.0ml
-----	---------	---------	--------

#### 浸出汁溶液

自然浸出汁10~40%, 蒸馏水60~90%, 根据试样的 pH 调节浸出汁溶液 pH 值。

#### 生理盐水

NaCl	9 g	蒸馏水	1000ml
------	-----	-----	--------

### (四) 土壤中细菌的分离

#### (实验8-1) 土壤中细菌的直接分离

##### (一) 实验材料.

1. 土样.
2. 无菌土样浸出汁或提取液 (0.25 $\times$ ).
3. 琼脂平板(已添加天然提取物).
4. 恒温振荡器.
5. 样本稀释液(表8-3).
6. 无菌三角烧瓶 (250ml), 吸管等.
7. 恒温箱.

##### (二) 操作步骤

1. 称取5 g 土样(湿重), 加到含100ml 0.25 $\times$  无菌土样浸出汁或提取

液的三角烧瓶内。

表 8-3

细菌分离培养基及试液

试样类型	推荐使用的培养基	推荐使用的试液
土、泥	复合浸出汁琼脂, 结晶紫营养琼脂, 土浸出汁琼脂, 浸出汁紫-红胆汁琼脂	浸出汁溶液 磷酸缓冲液 林格氏液
腐质、灰泥、叶片	复合碳氮源琼脂, 纤维素琼脂, 植物浸出汁琼脂, 土浸出汁琼脂	浸出汁溶液 生理盐水 蒸馏水-海水
干燥而新鲜的 植物及根	地衣浸出汁琼脂, 结晶紫营养琼脂, 植物浸出汁琼脂, 根浸出汁琼脂	浸出汁溶液 生理盐水
新鲜海水	纤维素琼脂, 胶状几丁质琼脂, 浸出汁-紫红胆汁琼脂	浸出汁溶液 海水 蒸馏水-海水

2. 26℃, 150~200r/min振荡培养25min。

3. 以适宜的样本稀释液系列稀释培养液。

4. 取3个适宜稀释度的稀释液0.1ml, 涂布3组(每组3~4个)琼脂平板。

5. 22~26℃下皿底朝上培养4~10天, 每2天检测一次平板上菌落的形成情况。

培养温度需根据原土样温度进行调整, 样本的稀释程度, 一般凭经验和浊度来掌握, 需注意是大粘土的成分易使浊度明显增高。

#### 〔实验8-2〕土中细菌的富集培养与分离

分离土样中的大部分细菌的分离程序中无需进行富集, 但对某些少数细菌则要求特殊的富集或选择技术才能很好地被分离培养, 运用细菌的酶诱导性, 在分离培养基中添加若干抗生素、复杂底物及生长因子的前体物质来激活细菌某一特殊基因组, 可以建立起若干富集技术, 同样, 富集

可以促进抗性的产生并维持下来。因此，对具有利用同一底物而代谢途径不同的微生物来说，其中之一可能是占优势的，这就像等位基因有显、隐性之分一样。在培养分离过程中运用富集技术的目的在于，对处于生态系统中细菌的活力的富集，而不是对在某种人工选择方法中具有迅速生长能力的优势微生物的富集。将土样用含有底物的土样稀释液溶解，则底物即可出现在细菌所处的生态系统中，又有利于细菌专一性或必需的酶系（如利用几丁质、纤维素、果胶、氨基酸、抗生素前体物质、抑制物、氨基酸、乙醇、塑料、石油等的酶系）的形成和完善。将pH调节到同于土样pH，可利于土样原生态系统中细菌的分离；通过调节pH，也可以获得一定的富集，如，一般的细菌在碱性环境中生长较好，如调pH至碱性，则不但提供细菌良好生长的pH环境，同时因霉菌、酵母一般是嗜酸性环境而被碱性pH所抑制，由此可获得有效而方便的富集效应。

#### (一) 实验材料

1. 土样。
2. 无菌土样浸出汁(0.25×)。
3. 无菌林格氏液(0.5×)。
4. 50ml无菌烧杯。
5. 特定的底物(如几丁质、纤维素等)。
6. 取采样环境中的干燥草绒(经环氧乙烷灭菌)。
7. 土浸出汁平板(添加及未添加富集底物)。

#### (二) 操作步骤

1. 取1g土样(湿重)，加到一只50ml无菌烧杯中。
2. 加入已补加特定底物的0.25×无菌土样浸出汁，0.5×无菌林格氏液或无菌蒸馏水2~10ml，将土样混匀。
3. 用无菌干草绒盖复土样悬浮液表面。
4. 用无菌纸帽盖好烧杯。
5. 在一密封罐中加200ml无菌水，将烧杯移入其中。
6. 适宜温度下培养2~12天。
7. 定期取样，适度稀释后，取0.1ml涂布已添加及未添加富集底物的土浸出汁平板。
8. 适宜温度下培养。

与植物根系相关联的微生物群体在数目及种类上与存在于其周围土壤



中的微生物群体并不相同，根系微生物群体受植物品系的影响，因此，在从根际土样中分离细菌的过程中，认识所包括的植物的品种具有重要的意义。分离培养基中通常加入一定量的植物根际土壤浸出液。大多数G<sup>-</sup>菌可通过直接分离方法或通过使用各种碳水化合物、纤维素及各种氮源富集的方法而分离。

### (五) 植物体上细菌的分离

#### [实验8-3]植物体上细菌的直接分离

##### (一) 实验材料

1. 植物样。
2. 样本稀释液(表8-3)。
3. 无菌三角烧瓶(250ml, 盛有玻璃珠)。
4. 恒温振荡器。
5. 琼脂平板(用于植物上细菌的分离, 表8-3)。
6. 无菌解剖刀或剪子。
7. 恒温箱。

##### (二) 操作步骤

1. 在超净工作台中用无菌解剖刀或剪子将植物切成小片。
2. 取1g切碎的植物组织加到盛有100ml样本稀释液及玻璃珠的三角烧瓶中。
3. 25℃, 150r/min振荡培养15~20min。
4. 取此1ml经适度稀释。
5. 取3~4个稀释度的稀释液涂布琼脂平板。
6. 20~27℃下倒置培养2~7天。

#### [实验8-4]植物体上细菌的富集培养及分离

##### (一) 实验材料

1. 50ml无菌烧杯。
2. 富集培养基  
植物浸出液(0.25×) 100ml  
植物多糖/蛋白质/蔗糖5g
3. 样本稀释液: 植物浸出液(0.25×)或磷酸盐缓冲液(0.5×)。
4. 琼脂平板(植物体上细菌的分离, 表8-3)。
5. 密封罐。

6. 恒温箱。

## (二) 操作步骤

1. 将1g切碎的植物组织加到一只50ml的无菌烧杯中。
2. 加入7.5ml富集培养基。
3. 用无菌纸杯盖好烧杯。
4. 在密封罐中加入200ml无菌水。
5. 将烧杯放入其中，封好。
6. 适宜温度下培养2~12天。
7. 定期取样，用样本稀释液适度稀释。
8. 取3~4个稀释度的稀释液0.1ml涂布琼脂平板，倒置培养。

## (六) 水中细菌的分离

### 1. 细菌的直接分离

用0.22 $\mu$ m的普通定性滤纸过滤50ml水样。如果滤纸上出现沉积，则再补加1ml无菌稀释液(通常是从水体周围的泥或土制得的1:2泥或土浸出液)，然后用一2ml扁平大口径无菌移液管轻轻地将滤纸上的沉积移至9ml相应的稀释液中并搅拌5min。接着逐步稀释样品，用3个适宜稀释度的稀释液0.1ml涂布3~7个已加入天然浸出汁的不同类型的琼脂板，然后将平板于22~26℃下培养4~10天。每两天检测一次平皿，注意观察有无新的菌落形成。

### 2. 滤纸压印分离法。

详见〔实验8-6〕。

### 3. 水中细菌分离的简易富集技术

水中细菌分离的最简便的富集技术是在一无菌的、用棉团塞好的500ml广口三角烧瓶中盛装50ml水样，于22~27℃下连续培养，定期取样涂布到含有50~100%水样(过滤灭菌)的适宜分离琼脂平板上。在不同水体的水样中加入一定的底物如蔗糖、多糖及蛋白质等，同样可以促进水中微生物的增殖。培养过程中可加入低浓度的抗真菌剂(15~35 $\mu$ g/ml)以抑制真菌的生长。另一富集方法是在培养烧瓶中添加细菌“附着材料”，如无菌的植物

组织或土壤浸出液。通过改变培养温度和培养周期可选择性富集嗜冷性细菌、中温菌和嗜高温菌。

#### (实验8-5)水中细菌的直接分离

##### (一) 实验材料

1. 混合纤维素滤膜(0.22 $\mu$ m,  $\phi$ 25mm)。
2. 注射式滤器( $\phi$ 25mm)。
3. 样本稀释液(通常是从水体周围的泥或土制得的0.5 $\times$ 泥或土浸出液)。
4. 50ml三角烧瓶(已灭菌)。
5. 琼脂平板(已添加天然浸出汁)。
6. 恒温箱。
7. 巴氏滴管。
8. 50ml注射器。
9. 恒温振荡器。

##### (二) 操作步骤

1. 将50ml水样通过0.22 $\mu$ m无菌滤膜。
2. 取出滤膜用1ml无菌稀释液将滤膜上的沉积洗下。
3. 用滴管将此洗出液移入含9ml样本稀释液的三角烧瓶中。
4. 120r/min振荡5min。
5. 用样本稀释液适度稀释。
6. 取3个稀释度的稀释液0.1ml涂布3组(每组3~7块)平板。
7. 22~26 $^{\circ}$ C倒置培养4~10天, 每两天检测1次, 注意有无新的菌落形成。

#### (实验8-6)水中细菌的滤膜压印分离法

##### (一) 实验材料

1. 混合纤维素滤膜(0.22 $\mu$ m,  $\phi$ 25mm)。
2. 注射式滤器( $\phi$ 25mm)。
3. 琼脂平板(已添加天然浸出汁, 表8-3)。
4. 恒温箱。
5. 50ml注射器。
6. 无菌镊子。

##### (二) 操作步骤

1. 将50ml水样通过0.22μm无菌滤膜。

2. 用无菌镊子轻轻将滤纸剥下。
3. 将有沉积物的一面朝下逐一在1组平板上压印,如此获得稀释效应。
4. 倒置培养2~8天,每两天检测1次,注意有无新的菌落形成。

### (七) 次代培养及纯化

涂布的平板经培养后,如生长出菌落,则按涂布不同稀释度的稀释液所得的单菌菌落和多菌菌落对琼脂平板进行分类。然后用无菌牙签将菌落转接到筛选平板上及转接至添加有少量天然浸出液的适宜保藏琼脂斜面上。筛选平板经培养后,按生长出菌落的形态学特征如色素、菌落形态等进行最初分组。然后将认为有希望的菌落用牙签转接到另一模拟分离琼脂平板上进行筛选。

## 二、放线菌的分离

### (一) 采样及采集方法

放线菌群试样的采集方法与上述用于分离细菌的方法基本一样。这里需强调指出的是:采样前应选择好季节,做好采样的各项准备,采样时应尽可能实行无菌操作。所采集的样本应具有一定的代表性。样本采集完后,应及时处理或在4℃下贮存,贮存试样处应与划线、筛选平板分开,贮存时间不宜过长。

### (二) 生态学参数和培养基的组成原则

放线菌分离培养过程中所需考虑的生态参数有温度(高温、中温或低温)、pH、离子强度、氧化还原电势和底物浓度。这些参数大部分可在采样的同时或在实验室中通过检测试样生态系统参数来确定。在了解采集试样所处的生态环境参数后,我们就可以有目的地进一步修改放线菌分离培养基,以更好地适应所要检测的生态系统。例如,将海水以不同浓度加到分离琼脂平板中,可获得与海湾盐浓度梯度相似的结果;将pH调低到不同水平,可适合森林中不同土层样的生态系统;将培养温度降低可有利于嗜冷(4~15℃)微生物的分离;将培养温度提高可有利于嗜温

微生物 (55~70℃) 的富集和分离。在分离培养基中, 通常要加入1~5ml 天然浸出汁 (植物、岩石、有机混合腐质等的浸出汁) 作为最初分离的生长促进因子, 由此可以分离出更多不同类型的放线菌类型。

放线菌可十分有效地利用低浓度的底物和复杂底物 (如几丁质)。因此, 大多数放线菌的分离培养是在贫脊或复杂底物的琼脂平板上进行的, 而不是在含丰富营养的生长培养基上分离的。除嗜温性放线菌外, 其他放线菌一般在培养4~20天内在分离平板上缓慢形成菌落。大多数放线菌的分离可采用下列培养基: 精氨酸-甘油-盐, AV、Benedict、胶状几丁质、M<sub>3</sub>、GAc、淀粉-干酪素和WA琼脂培养基。在放线菌分离琼脂中通常都加入抗真菌剂制霉菌素或放线菌酮, 以抑制真菌的繁殖 (表8-4)。此外, 为了对某些特殊种类的放线菌的富集和分离, 可选择性地添加一些抗生素 (表8-4)。分离琼脂平板制备好后, 一般皆应在37℃培养箱中存放3天, 以检测有关微生物的污染及灭菌是否彻底, 同时也可使平板干燥些。就我们的经验而论, 目前尚无法用某一种培养基能够将出现在一个试样的所有放线菌皆分离出来的。

### (三) 放线菌分离培养基及试液

#### 精氨酸-甘油培养基

精氨酸·HCl	1.0 g	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.010 g
甘油 (25℃时相对密度不 低于1.249)	12.50 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001 g
NaCl	1.0 g	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.001 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	琼脂	15.0 g
		蒸馏水	1000ml

调pH至6.9~7.1。121℃高压蒸汽灭菌15min, 然后添加50~75μg/ml的无菌放线菌酮及制霉菌素溶液。配制放线菌酮及制霉菌素溶液时应注意放线菌酮在45℃的温水中溶解较好; 制霉菌素

在pH7.0时溶解不完全，需用1mol/L NaOH调pH至11，过滤灭菌后立即用HCl中和滴定，使pH尽快回复至7.0。

#### AV琼脂

L-精氨酸	0.3 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
葡萄糖	1.0 g	NaCl	0.3 g
甘油	1.0 g	琼脂	15.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g	蒸馏水	1000ml

121℃下高压蒸汽灭菌 15min。然后加入经过滤灭菌的维生素溶液\*

#### \*维生素溶液 (mg/L)

盐酸硫胺素	0.5mg	肌醇	0.5mg
核黄素	0.5mg	遍多酸钙	0.5mg
烟酸	0.5mg	对氨基苯甲酸	0.5mg
盐酸吡哆醇	0.5mg	生物素	0.25mg

#### 抗真菌抗生素无机盐溶液

Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	10.0mg	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1.0mg	制霉菌素	50.0mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0mg	放线菌酮	50.0mg

#### Benedict琼脂

甘油	20.0 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
L-精氨酸	2.5 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
NaCl	1.0 g	琼脂	20.0 g
CaCO <sub>3</sub>	0.1 g	蒸馏水	1000ml

调pH至7.0，121℃高压蒸汽灭菌15min。

#### 胶状几丁琼脂

胶状几丁质*	2.0 g (干重)	MnCl <sub>2</sub>	0.001 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3 g
MgSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.5 g	琼脂	20.0 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g	蒸馏水	1000ml
ZnSO <sub>4</sub>	0.001 g		

在三角烧瓶 A 中，将胶状几丁质与 500ml 蒸馏水混合。在三角烧瓶 B 中，将余下的盐及琼脂混合，在 121℃ 下分开灭菌 15 min，灭菌后将两三角烧瓶搅拌，慢慢地将烧瓶 A 中内容物倒入烧瓶 B 中，并轻轻搅拌。抗真菌因子可在琼脂冷至 50℃ 时立即加入混匀。培养基的最终 pH 应在 6.8~7.0。

• 胶状几丁质的制备：

1. 在 25℃ 下，洗涤 100 g 未漂白的几丁，用 1mol/L HCl 和 1mol/L NaOH 交替振荡过夜 (24 h)，如此进行 4 个循环，用普通定性滤纸滤干几丁。

2. 在 4℃ 下，将几丁在冷乙醇中洗涤 4 次，每次 6 h 以上。

3. 在一大容量烧杯中用 4℃ 丙酮将棕色颗粒状几丁充分浸湿。

4. 操作者戴好口罩，小心而缓慢地将 4℃ 浓盐酸加入烧杯中，边加边搅拌；并继续搅拌过夜。在加入浓盐酸后 2 h，原棕色颗粒状几丁变成粘稠的棕黑色溶液。如在 2 h 后未出现此变化则需再补加浓盐酸。

5. 将烧杯转置于 4℃ 蒸馏水中。

6. 用 3 层玻璃毛盖好烧杯口，然后小心地过滤几丁。这一过程极为缓慢，而且需经常更换玻璃毛。

7. 将经玻璃毛过滤的几丁直接流入等体积的 4℃ 蒸馏水中。一旦几丁进入水中，便会絮凝成一绒毛状白块。

8. 过滤后，粘附在玻璃毛上的几丁块可用更浓的盐酸溶解，然后再过滤至冷水中。

9. 9000×g 或更高离心力下离心 15min，去除絮状几丁。小心地将上清液倒入贮存瓶中。

10. 用水离心洗涤几丁两次。

11. 将仍很酸的几丁置于大容量的透析袋中透析。透析用流动的自来水并不时搅拌。

12. 透析至透析液的 pH 达 7.0 为止。这一过程可能需用数天时间。

13. 切开透析袋，检测几丁的 pH 值。如果几丁的 pH 值已大于 3.0，则可很容易地用少量 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0。

14. 测定几丁干重。

15. 用环氧乙烷或高压蒸汽灭菌。

### CYC

硝酸钠	2.0 g	酵母膏	2.0 g
氯化钾	0.5 g	无维生素酪蛋白氮	
磷酸甘油镁	0.5 g	基酸	6.0 g
硫酸亚铁	0.01 g	琼脂	16.0 g
硫酸钾	0.35 g	蒸馏水	1000ml
蔗糖	30.0 g		

最终pH为7.2。121℃下高压蒸汽压菌20min。过滤灭菌新生霉素及放线菌酮，并在琼脂冷至50℃时加入，直到最终浓度分别为25和50μg/ml。

### Czapek酵母膏琼脂 (CYA)

NaNO <sub>3</sub>	2.0 g	蔗糖	15.0 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g	酵母膏	4.0 g
KCl	0.5 g	琼脂	15.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	蒸馏水	1000ml
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g		

将各组分混合，121℃下高压蒸汽灭菌20min。琼脂冷至50℃时加入过滤灭菌的放线菌酮和制霉菌素。

### 药敏试验琼脂

豚豚	10.0 g	盐酸鸟嘌呤	0.01 g
牛肉膏	10.0 g	尿嘧啶	0.01 g
葡萄糖	2.0 g	黄嘌呤	0.01 g
NaCl	3.0 g	硫胺素	0.00002 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g	琼脂	12.0 g
【乙酸钠	1.0 g	蒸馏水	1000ml
硫酸腺嘌呤	0.01 g		

121℃下高压蒸汽灭菌15min，冷至50℃时添加下列抗生素至最终浓度为放线菌酮50mg/L、制霉菌素50mg/L，氯四环素45mg/L，甲烯土霉素10mg/L。



### GAC琼脂

下层:

葡萄糖	1.0 g	痕量盐溶液*	1.0 ml
L-天冬氨酸	1.0 g	抗生素溶液**	2.0 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3 g	琼脂	20.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 g	蒸馏水	1000 ml
NaCl	0.3 g		

将痕量盐溶液和抗生素溶液之外的其他组分混合于121℃下高压蒸汽灭菌,冷至50℃时加入过滤灭菌的痕量盐溶液和抗生素溶液。最终pH为7.4。

上层:

酪蛋白氨基酸	0.5 g	琼脂	20.0 g
抗生素溶液**	4.0 ml	蒸馏水	1000 ml

混合抗生素溶液以外的组分进行高压蒸汽灭菌。在50℃时补加抗生素溶液。在制备平板时先倾注15ml下层,待其凝固后再倾注4ml上层。

\* 痕量盐溶液(mg/ml):

FeSO <sub>4</sub>	10.0	CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0

\*\* 抗生素溶液(mg/ml):

制霉菌素	50.0	多粘菌素	4.0
放线菌酮	50.0	青霉素	0.8

M<sub>3</sub>琼脂

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.466 g	丙酸钠	0.02 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.732 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 μg
KNO <sub>3</sub>	0.10 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180 μg
NaCl	0.29 g	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	20 μg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.10 g	琼脂	18.0 g
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g	蒸馏水	1000 ml

121℃下高压蒸汽灭菌15min, 灭菌后的最终pH为7.0。在琼脂冷至50℃时, 加入4.0mg过滤灭菌的硫胺素和5.0mg过滤灭菌的放线菌酮。

MGA-SE琼脂

葡萄糖	2.0 g	土浸出汁*	200ml
L-天冬氨酸	1.0 g	琼脂	15.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	蒸馏水	加至 1000ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g		

混合各组分并于121℃下高压灭菌20min。冷至50℃时加过滤灭菌的青霉素1mg, 多粘菌素B 5mg, 放线菌酮50mg, 制霉菌素50mg。

\* 土浸出汁的制备方法: 取1000g土样加入1000ml自来水中, 于121℃下高压蒸汽灭菌30min。然后缓慢倒出上清液并过滤。

淀粉-酪蛋白-硝酸盐琼脂

淀粉	10.0 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g
酪蛋白(无维生素)	0.3 g	CaCO <sub>3</sub>	0.02 g
KNO <sub>3</sub>	2.0 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 g
NaCl	2.0 g	琼脂	18.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g	蒸馏水	1000ml

调pH至7.0~7.2。121℃下高压蒸汽灭菌15min。在琼脂冷至50℃时加入经过滤灭菌的制霉菌素75mg和放线菌酮75mg。

WA

自来水	1000ml	粗琼脂丝	17.5 g
-----	--------	------	--------

121℃下高压蒸汽灭菌15min, 添加抗真菌抗生素。

谷氨酸酵母膏无机盐琼脂

葡萄糖	2.0g/L	NaCl	0.5g/L
谷氨酸单钠	0.1g/L	ZnCl <sub>2</sub>	0.5μg/L
酵母膏	0.1g/L	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.4μg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5g/L

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g/L	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250μg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50μg/L	CaCl <sub>2</sub>	5μg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	50μg/L	琼脂	15g/L

121℃高压灭菌后加入溶菌酶、土霉素、环乙酰亚胺及制霉菌素到最终浓度分别为1000, 25, 50和50μg/ml。

#### (四) 土样中放线菌的分离

土样中放线菌的分离有非选择性分离和选择性分离两种方法。非选择性分离是对土样所有的放线菌群体的分离，一般从土样干燥开始；而选择性分离则在分离培养之前对土样进行特殊的预处理，只留下具有特定特性的放线菌。一些有用的预处理方法见表8-4。

表 8-4 增加土样中特定放线菌群分离时的  
土样预处理方法

预处理方法	推荐使用的培养基	掺入抗生素及浓度(μg/ml)	培养温度及时间	分离菌群
1. 风干土样，磨碎，100~1.0℃下加热处理1h，用蒸馏水配成水土悬液	AV, GAC, MGASE	放线菌素(50) 制霉菌素(50) 多粘菌素(5) 青霉素(1~8)	30, 32或40℃; 20~40d	小四孢菌属 链孢子囊菌属 <i>actinomadura</i> 小双孢菌属
2. 蒸馏水混匀土样，然后在60~65℃下加热处理1h	CYC	放线菌素(50) 新生霉素(25)	50~55℃; 1d	嗜温放线菌
3. 风干土样，磨碎，60~65℃加热处理1h，压碎	精氨酸甘油培养基，淀粉酪蛋白硝酸盐琼脂	放线菌素(75) 制霉菌素(75)	26~28℃; 10~13d	小单孢菌属 诺卡氏菌属
4. 风干土样，磨碎，用水1:4稀释后于55℃加热6min	谷氨酸酵母青无机盐琼脂	溶菌酶(1000) 土霉素(25~30) 环乙酰亚胺(50) 制霉菌素(50)	28℃; 10~14d	轮枝链霉菌属
5. 将研碎几丁质与土样以1:1混合，然后在26℃下静置2~3周，磨碎	精氨酸甘油培养基，淀粉酪蛋白硝酸盐琼脂	放线菌素(75) 制霉菌素(75)	28℃; 10~14d	小单孢菌属

续表

预处理方法	推荐使用的培养基	掺入抗生素及浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	培养温度及时间	分离菌群
6. 将 $\text{CaCO}_3$ 与土样等量混合, 移接入一皿盖内附有一张润湿的平皿内, 静置 10 d	精氨酸甘油培养基, WA		28°C; 10 d	所有放线菌
7. 将死酵母细胞与土样以 1:3 混合, 调 pH 到 5.0, 后于 28°C, 高湿度下培养 10 d	CYA	放线菌酮(75) 制霉菌素(50)	26~28°C; 10 d	Derskovia
8. 土样在 4°C 下贮存, 然后用 0.01% 明胶-林格氏液 (pH 7.0) 稀释并涂布琼脂平板	药物敏感试验琼脂	氯四环素(50) 放线菌酮(45) 制霉菌素(50) 甲烯土霉素(10)	25°C 7, 14, 21 d	诺卡氏菌属

### 〔实验8-7〕土样中放线菌的非选择性分离

#### (一) 实验材料

1. 土样。
2. 无菌玻璃平盘。
3. 无菌玻璃棒。
4. 无菌海绵印章( $\phi 16\text{mm}$ , 用海绵制成)。
5. 放线菌分离平板。
6. 恒温箱。

#### (二) 操作步骤

1. 将采集的土样, 在一无菌玻璃平盘中平铺, 依土样中的温度在室温下空气干燥 3~10 天。此可大幅度减少细菌菌群。
2. 用无菌玻璃棒将干土样轻轻磨碎。
3. 用一无菌海绵印章直接压印到干土粉上。
4. 移开印章, 轻震去掉印章上多余的土粉。
5. 以 9~12 个不同的放线菌分离平板为一组, 用已带有土粉的海绵印章在每块琼脂平板表面连续压贴 13 次(周边压贴 10 次, 中央压贴 3 次), 以达到稀释目的。
6. 平板接种后于适宜温度下培养(4~15°C, 嗜冷菌; 22~35°C, 嗜中温菌; 55°C 以上, 嗜热菌)。

7. 每3天检查平板上菌落生成情况。

在培养分离嗜热放线菌时，由于使用较高的培养温度，使得水分蒸发增多，此时应在平板中放置一些无菌干滤片，以保持琼脂平板的干燥。

### (五) 植物及植物材料上放线菌的分离

在某些生态系统中，不同的季节对从植物体分离的放线菌数目及与植物某个部位相关联的特殊放线菌群体数量有不同的影响。例如，在早春季节，植物幼小，植物体上所具有的放线菌数量很少，而在夏末植物开始衰老和枯萎时，放线菌数目很高。植物体上的不同部位所包含的放线菌数目和种类也不同，如从花中分离的放线菌通常与茎或根中分离出的放线菌不同。

#### [实验8-8]植物体上放线菌的分离

##### (一) 实验材料

1. 植物及植物材料。
2. 植物浸出汁 (0.25×)。
3. 0.2mmol/L pH7.2磷酸盐缓冲液 (PBS)。
4. 恒温振荡器。
5. 剪刀。
6. 恒温箱。
7. 50ml三角烧瓶。

##### (二) 操作步骤

###### 方法 I:

1. 将植物组织 (花、叶、茎、根) 用剪刀在超净工作台中无菌地剪切开。
2. 平铺于一无菌玻璃平皿中置超净工作台内干燥2~7天，以减少细菌的数量。
3. 将剪碎的植物材料植入琼脂平板表层或轻轻贴于琼脂平板表面。
4. 恒温箱内培养4~12天。

###### 方法 II:

1. 将植物组织剪成薄片，超净台内干燥2~7天。
2. 将植物薄片无菌加入含10ml无菌植物浸出汁 (0.25×) 或PBS的三角烧瓶中。

3. 150r/min适宜温度下振荡培养20min.
4. 系列稀释后涂布琼脂平板, 适宜温度下培养4~12天.

### (六) 植物体上放线菌分离的诱捕法

在通过平板涂布法或微操作法分离放线菌之前, 用一组无菌固体底物来诱捕试样中的放线菌是目前最为常用的富集放线菌的方法之一。通过简便的诱捕法可分离出处于不同生态系统的植物体上的放线菌 (图8-1)。

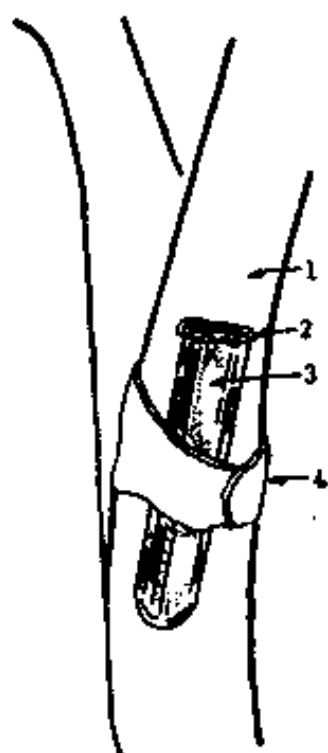


图 8-1 诱捕法分离放线菌  
1—植物叶 2—尼龙网 3—琼脂培养基 4—胶带

### (实验8-9) 诱捕法分离植物体上的放线菌

#### (一) 实验材料

1. 放线菌琼脂培养基及琼脂平板 (表8-4).
2. 放线菌酮和制霉菌素.
3. 植物浸出汁 (1×).
4. 尼龙布网 (孔径100 $\mu$ m).
5. 硅胶.
6. 胶带.
7. 镊子.
8. 0.02mmol/L, pH7.2磷酸盐缓冲液(PBS).
9. 50 $^{\circ}$ C水浴.
10. 恒温振荡器.

11. 玻璃管 (12 $\times$ 75mm).

#### (二) 操作步骤

1. 将玻璃管 (12 $\times$ 75mm)沿其轴向切成二半, 灭菌.
2. 将琼脂培养基溶化后冷却至50 $^{\circ}$ C.
3. 加入1/10体积的植物浸出汁.
4. 加入放线菌酮及制霉菌素至终浓度为75 $\mu$ g/ml, 混匀.
5. 用上述琼脂培养基将半片玻璃管填满.
6. 凝固后将一尼龙网用硅胶贴到玻璃槽缘上, 以防止昆虫和较大的原

生动物的浸出。

7. 将琼脂面与植物的某个特定部位吻合，用胶带固定好。
8. 自然条件下培养2~5天。
9. 用无菌镊子取下琼脂条，按下述任一种方法操作。
  - 10a. 将琼脂条置于10ml PBS中。
    - 11a. 22~28℃ 150r/min, 振荡洗涤15min.
    - 12a. 系列稀释后，取3个稀释度的稀释液0.1ml 涂布到适宜的分离琼脂平板上。
      - 13a. 22~28℃ 培养10~15天。
      - 10b. 将含有孢子和菌丝的琼脂条面贴于琼脂平板表面。
        - 11b. 28℃ 培养过夜。
        - 12b. 移去琼脂条。
        - 13b. 22~28℃ 下再培养10~15天。

### (七) 水中放线菌的分离

为使所要分离的放线菌的数量种类增多，一般都需对水样进行预处理。常用的方法是：将水样于6000×g 下离心或0.45μm 滤纸过滤，取离心沉积或滤纸表面沉积进行系列稀释和涂布。在选择性分离小单胞菌和红球菌属时，可采用下述方法。将先前贮藏于4℃的2ml水样加到100×12mm 玻璃管中，玻璃管用硅橡胶塞塞好，然后将此玻璃管于55℃水浴箱中浴6min。将此处理过的水样稀释于含0.01%明胶的1:4 Ringer氏溶液(pH7.0)中，取此稀释液涂布于M<sub>3</sub>琼脂平板上，于30℃、皿底朝上培养。一般小单胞菌在10~21天后生长出菌落，而红球菌菌落在5~7天出现。

分离幅动菌属之简易方法是将水样直接涂布到WA平板上。

### (八) 次代培养及纯化

菌落形成后可根据肉眼可见的菌落形态上的差异，如菌落形状、气生孢子的颜色、纤涉性生长等情况作初步的鉴定和区分。通过高倍放大进行镜检，可了解气生和营养孢子形成情况。这里需要强调的是，成功地分离出各种不同的放线菌属及种的关键是

所采集样本的本身及其分离用的琼脂培养基；而肉眼识别不同的生长形态、从而初步地加以鉴定，在分离放线菌时显得尤为重要。

将分离平板上所形成的菌落用经火焰灼烧灭菌的钩形针或无菌牙签挑取，转接到适宜的保藏琼脂斜面上，或者点接到琼脂平板上进行影印培养，以进一步筛选和分离。

### 三、真菌分离

#### (一) 采样及采集方法

真菌系自然界中分布极广的异养真核微生物，占据了几乎所有可到之处。因此，在我们着手从自然界中分离真菌之前，应该确定某一目标(如产品的效益)，做到有的放矢，并认真了解所要采集的试样的微生物生态系统的结构和特征，从而确定所需采集的试样的环境类型。

与上述方法一样，试样采集时应使用无菌手套、镊子、解剖刀等工具，所采集的试样应装入无菌塑料袋或瓶中，封好并做好必要的记录。试样处理应尽快、尽早进行。否则需在4℃贮存，但时间不宜过长。采集土样时，试样应包括所有土层的特征土壤、植物叶片、腐殖、根、沙、石等。水样一般可从潮区、阴沟、湖、海底、小溪等处采集。采集时用无菌瓶至少采集50ml水样。植物体的任何部位都可用来分离真菌，但也应该注意到植物不同部位的形态、大小及生理状态(活的、死的、健康的、有病的)、体表条件(无毛的、颗粒状的)，以及植物所处的生态系统的位置及方位已经或多或少地决定了所分离的真菌的品种。

#### (二) 生态学参数及培养基组成原则

各种真菌的营养要求不完全相同，因此可通过改变一种培养基组分进行某种真菌的富集，但要用一种培养基分离出所有的真菌显然是不可能的。所采集样本的生态系统的物理学参数以及所要分离的真菌的种类(如可在木质素上生长或嗜盐)应在组建分离培养基时加以考虑。



利用低碳/氮比的培养基可使真菌生长菌落分散,利于计数、分离和鉴定。这里主要是利用营养成分的减少而使生长减慢,并由此限制真菌的迁涉生长。改变培养温度将有利于不同嗜温区真菌的分离。低温(最好在5~15℃)对嗜冷真菌的分离是必要的,中温菌分离时使用的培养温度是20~35℃,嗜热真菌分离培养的最适温度一般选择在45~50℃以上。有时,真菌子实体形成必须有光线,这在分离培养时应加以考虑。选择性富集和选择性抑制培养在真菌分离培养中也是十分重要的。从土样、植物体和水样中分离真菌的常用分离培养基见表 8-5。

表 8-5 用于真菌分离的常用分离培养基

试样类型	推荐代用的培养基	备 注
土: 沙、沃土、腐殖土、石、粘土	土浸出汁琼脂, 玫瑰红培养基, 草浸出汁琼脂, PCNB琼脂, WA	必要时可添加盐类、四环素、链霉素、抗真菌因子等
植物: 新鲜或陈腐植物材料、腐质	草浸出汁琼脂, 叶屑浸出汁琼脂, PCNB琼脂, WA	必要时可添加无机盐类、几丁、果胶、纤维素或无菌胡萝卜块、抑菌剂
水: 海底水及阴沟污水	玫瑰红培养基, PCNB琼脂, WA, 水(加诱饵)	必要时可添加无机盐类, 抗生素(如氟脲环素), 诱饵(如种子、毛发)
担子菌: 子实体	担子菌选择性培养基, 马铃薯-葡萄糖琼脂, 酵母麦芽汁琼脂	

1. 选择性富集 选择性富集是通过一定的方式使样本中一种或一群微生物数量上的增加而利于分离的一种技术。富集可以是种水平的, 如通过营养要求的改变来富集分离镰刀菌; 也可以是组成群水平的, 如以纤维素为唯一碳源的选择性培养基可选择性富集所有能降解纤维素的纤维素裂解微生物。

简便而有效的富集真菌的方法是将 从采样环境中获得的无菌底物(土浸出汁、蔬菜浸出汁等)掺到普通培养基进行培养分离。如从葡萄叶上分离酵母, 如果用同样的葡萄树汁(如葡萄汁/酵母浸出汁或葡萄汁/肝脏浸出汁)的糖类培养基来分离, 比起用标准

酵母培养基分离出的酵母，无论在数量、种类和质量上都高得多。分离渗透压敏感性酵母时，可将无菌植物片断掺到琼脂块中进行分离。分离嗜碱性真菌时，可利用高盐分的耐受性来分离，即在培养基中加入各种不同的海水盐分，并调节pH至碱性。如要分离耐高渗酵母，可用蔗糖将培养基渗透压调高，并调节pH至酸性。

2. 选择性抑菌 选择性抑制培养基可使非目标微生物消除或减少到一定程度。在分离培养基中加入一定的抗生素如氯霉素、四环素、卡那霉素、青霉素、链霉素等即可有效地抑制细菌生长及菌落形成。抑制细菌的另外一些方法有：在使用平皿之前，将平皿先干燥3~4天；降低培养基的pH值或在无法达到低pH时，加入1:30000玫瑰红。与抑制细菌生长相似，我们可以使用多种抗真菌抗生素，如制霉菌素、配马霉素、放线菌酮作为极有效的真菌选择性因子。其他已有应用的非抗生素抑制因子包括高CO<sub>2</sub>浓度、丙酸钙、结晶紫及胆汁。其他一些被利用的杀真菌剂有2,6-二氯-4-硝基苯胺、五氯硝基苯、benlate、captan。应该注意的是并非所有真菌都受这些因素的影响；同时，并非所有影响都是有益的。这就要求我们在设计分离程序时应周全考虑。

### (三) 真菌培养分离常用培养基及试液

#### 担子菌选择培养基

麦芽汁	3.0 g	邻苯酚	0.006 g
蛋白胨	0.5 g	蒸馏水	1000ml
琼脂	2.5 g		

121℃高压蒸汽灭菌15min。最终pH为3.5。

#### 草浸出汁琼脂

草浸出汁滤液*	1000ml	琼脂	15.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g		

调pH至6.2。121℃高压蒸汽灭菌15min。

\*草浸出汁滤液：蒸馏水1000ml，分解干草 60.0g，121℃高压蒸气灭菌30min，过滤。

### 碎叶片浸出汁琼脂

碎叶片浸出汁	400ml	酵母膏	2.5g
自来水	600ml	琼脂	17.5g

121℃下高压蒸汽灭菌15min, 然后添加0.5g/L青霉素及0.025g/L的链霉素。

### PCNB琼脂

琼脂	20.0g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50g
蛋白胨	5.0g	蒸馏水	1000ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25g		

121℃下高压蒸汽灭菌15min, 冷至50℃时加入下列经过滤灭菌的物质: 200μg/ml五氯氮苯、50μg/ml青霉素G、85%乳酸溶液1.3ml、130μg/ml去氧胆酸钠。

### 马铃薯胡萝卜琼脂

马铃薯(洗涤、去皮、研磨)			20.0g
胡萝卜(洗涤、去皮、研磨)			20.0g
琼脂	20.0g	蒸馏水	1000ml

将胡萝卜及马铃薯在水中煮沸1h, 单层纱布压滤后加琼脂及蒸馏水到1000ml。121℃下高压蒸汽灭菌15min。

### 马铃薯葡萄糖琼脂(一)

脱水马铃薯	22g	蒸馏水	178ml
-------	-----	-----	-------

轻轻加热使马铃薯复水, 然后加葡萄糖20.0g, 琼脂17.0g, 蒸馏水加至1000ml。121℃下高压蒸汽灭菌15min。

### 马铃薯葡萄糖琼脂(二)

马铃薯(洗涤、去皮、切碎)	200g	琼脂	20.0g
		葡萄糖	15.0g
蒸馏水	1000ml		

先将马铃薯和蒸馏水混合后煮开, 然后缓缓煮1h, 单层纱布过滤后滤液与其他组分混合并加水至1000ml。121℃下高压蒸汽灭菌15min。

### 玫瑰红培养基

KH <sub>2</sub> PQ	1.0 g	葡萄糖	10.0 g
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g	玫瑰红	0.035 g
大豆蛋白胨或植物 蛋白胨	5.0 g	琼脂	20.0 g
		蒸馏水	1000ml

121℃下高压蒸汽灭菌15min, 然后添加35μg/ml过滤灭菌的氯四环素。

### 土浸出汁琼脂

用蒸馏水与等量的上层土或沙壤土混合, 去掉重的颗粒, 然后过四层纱布得清液。

溶液1: 土浸出汁1.25L 葡萄糖 12.5 g

溶液2: 蒸馏水 1.25L 琼脂 37.5 g

将溶液1与溶液2按一定比例混合, 121℃高压蒸汽灭菌15 min。

### WA

琼脂	15.0 g	自来水	1000ml
----	--------	-----	--------

高压蒸汽灭菌后加入数片无菌植物物质、盐等。

### 酵母麦芽汁琼脂

酵母膏	3.0 g	葡萄糖	10.0 g
麦芽汁	3.0 g	蒸馏水	1000ml
蛋白胨	5.0 g	琼脂	20.0 g

121℃高压蒸汽灭菌15min。

### (四) 土中真菌的分离

土中真菌的分离培养方法有稀释法、混入法、压贴法、粘附浮选法、注射器采集法、土过筛法、蔗糖密度梯度离心法等。以前4种最为常用。

1. 植入法 用一把无菌刮铲或镊子将一小块土移置琼脂表面, 然后将其稍稍压入琼脂中进行培养。

2. 稀释涂布法 排好一组盛有9ml无菌蒸馏水或其他稀释液

的试管（一般6~9支）。取1g土样加到第1支试管中，搅拌15min；从中取出1ml加到第3支试管中；如此稀释。然后取最后3个稀释度的稀释液0.1ml涂布于琼脂平板。稀释度应掌握在每皿出现40~60个菌落为佳。相似的方法是用一湿的天鹅绒进行影印/稀释平板，方法与细菌分离培养中介绍的方法一样。

3. 混入法 取少量土样置于一无菌平皿中，用少量无菌蒸馏水将土样分散开制成悬浊液。取50℃融化琼脂倾注此平皿，混匀，室温下让其凝固10min，然后进行培养。这一方法可用来分离生长缓慢的真菌。

4. 压贴法 将土样通过一塑料印章压贴入分离琼脂平板中，可有效地稀释土样并可明显提高所分离的真菌数目和类型。如在培养基中加入4~10% NaCl，则真菌的分离培养效果进一步被提高。

#### **〔实验8-10〕土样中真菌的压贴分离**

##### **（一）实验材料**

1. 用聚脲烷泡沫塑料制得的15×40mm圆柱形印章。
2. 琼脂平板（表8-5）补加4~10% NaCl。
3. 无菌蒸馏水。
4. 恒温箱。

##### **（二）操作步骤**

1. 将塑料印章高压灭菌。
2. 将干燥的土样磨碎。
3. 将印章与琼脂表面接触的一端用少许无菌蒸馏水润湿。
4. 将印章压入碎土中。
5. 在一块平板上沿平板边压贴10次，中央压贴3次。如此继续压贴6~8个平板。
6. 适宜温度下培养2~10天。

本法的关键是印章用蒸馏水湿润时切勿过度。

##### **（五）植物材料中真菌的分离**

1. 植入法 用一把无菌解剖针取一小片植物材料置于琼脂平板表面，然后将其轻轻压入琼脂中培养。经培养后，真菌以植入点处为中心向四周扩散生长而分离。

2. 压贴法 带好无菌手套，轻轻地将一片叶子表面压贴到琼脂表面。移去叶片，按上述过程将此叶片在第2、第3……个琼脂表面上压贴。用此叶片的另一面重复上述过程。一般而言，所分离得到的不产孢子的真菌的数目随压贴次数的增加而增加。此方法也可用于若干不同类型的植物材料上真菌的分离。

3. 洗涤法 真菌菌丝一端与植物材料粘附较好，而孢子很容易被洗落。根据这一特征，将一植物体浸入含0.05%吐温-80的无菌水中旋转振荡2~5min，然后立即过滤，将洗涤液接种液适度稀释并在琼脂平板上涂布。经洗涤的植物体部分可按上述方法进行培养分离。

4. 浸泡法 首先将植物材料浸泡，然后按植入法或稀释涂布法进行操作。需注意的是一些植物可在浸泡过程中释放出一些对真菌生长起抑制作用的化合物。浸泡也会对一些真菌形态产生有害的影响，另外由于浸泡过程中微生物的生长，使得计数不可靠。

#### (六) 水中真菌的分离

为了获得最佳的分离效果，首先应对水样进行一定的稀释，一般使每一皿生长出50个左右的菌落的稀释度最佳。一般而言，水样稀释10倍，淤泥稀释100倍，含30~60%干物质的淤泥稀释10000倍。水样真菌的分离方法一般皆用稀释涂布法。

饵诱技术常用于水中真菌的富集。方法是将某种“饵诱剂”（如用头发或羊毛富集嗜角蛋白真菌、用植物纤维富集藻菌纲真菌，以及植物材料、种子、纸、玻璃纸、死昆虫等也常用作饵诱剂，装入浸出水体内的网篮中，定期采样数周，分离方法同上。

#### (七) 从子实体直接分离培养担子菌

担子菌纲真菌可从其子实体组织直接分离。最常用的适宜培养基有马铃薯-葡萄糖-琼脂、酵母麦芽琼脂和担子菌选择性培养基。

在从子实体中分离担子菌时，要选择最新采集的子实体，子实体成熟度也应根据分离目的和对象不同来确定，陈旧的或过渡潮湿的子实体易于隐藏更多的杂菌。采集时应注意无菌操作。

#### **(实验8-11)担子菌组织分离法**

##### **(一) 实验材料**

1. 待分离担子菌实体。
2. 75%乙醇。
3. 眼科镊子(带钩)。
4. 琼脂平板或液体培养基(表8-5)。
5. 滤纸。
6. 恒温箱。

##### **(二) 操作步骤**

1. 在超净台中将新采集的子实体表面的碎屑刷去。
2. 外层用75%乙醇消毒。
3. 无菌地扒开子实体并暴露内里。
4. 立即用无菌镊子取出一小块菌髓。注意不要将取下的菌髓接触到可能暴露于环境的子实体外表层。
5. 将取出的小块菌髓植入琼脂平板内或在液体培养基表面放一小块无菌滤纸，将小块菌髓置于其上。
6. 适宜温度培养。

#### **(实验8-12)担子菌孢子分离**

##### **(一) 实验材料**

1. 待分离担子菌实体。
2. 白凡士林。
3. 无菌玻璃皿。
4. 琼脂平板或液体培养基(表8-5)。

##### **(二) 操作步骤**

1. 将菌伞从菌柄上切下。

2. 小心地将菌伞用凡士林粘附到皿盖内侧。
3. 翻转皿盖使菌褶朝下，将皿盖置于一平板上（平板以深玻璃平皿制得）。
4. 1~2 h后，去皿盖，更换新的无菌皿盖。
5. 适宜温度下培养。

改良的方法是将菌伞以菌褶朝下悬于培养基上方，孢子弹落入培养基表面。培养基也可使用液体培养基，在液体培养基收集孢子后，适度稀释涂布琼脂平板或混入50℃融化的琼脂培养基后再制备平板。

#### (八) 植物组织中担子菌的分离

无菌采集根状菌索、菌核或菌根，将其表面用稀漂白液、双氧水或氯化汞灭菌。然后用无菌蒸馏水充分漂洗数次。无菌地切碎或研碎试样并平铺于培养基上。经培养后菌丝将缓慢地生长出组织并可进一步分离。生长于木质上的担子菌的分离方法与上述相似，只是采样时应注意选择生长旺盛的区域。

#### (九) 次代培养及纯化

次代培养及纯化通常是筛选真菌分离株的必要步骤。真菌的生长速度相差很大，如有些担子菌在4~6周后才从木质中生长出，酵母则可在24 h内生长出菌落。利用显微操纵器可进行单孢子分离或菌丝切割(参见第四章)，从而可有效地获得纯化。

### 四、目标菌株的分离、筛选及毒性试验

根据上述方法可对某试样进行综合性微生物分离培养及进一步筛选，用于生产目的。

#### (实验8-13)利用碱法纸浆废液的微生物的分离

碱法造纸废液污染环境极为严重。废液内含有大量有机物质，但非为一般酵母菌所能利用。它含有碳源，主要是五碳物质，有些微生物能较好利用。若能分离获得这类微生物，利用这些污染碳源产生蛋白质菌体，变害为利，是极有其价值的。与此相仿，发酵工业上的一些废水和废渣应该更好地为某些微生物所利用。

##### (一) 实验材料

1. 采样 碱法造纸厂污水排出口，厂内沟道，废液淤积区等的各种



土样。

2. 培养基 碱法纸浆液预处理：稻草黑液→加入0.5~0.6%粗硫酸，pH3~4，60℃保温10min→过滤→取滤液加入1~1.1%风化石灰，pH9~10，煮沸→8℃自然澄清10min→过滤液。

将过滤液加0.4%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  或发酵液。

3. 器具 三角瓶、试管、吸管、摇床。

### (二) 操作步骤

1. 将土样等1g，加入上述过滤液10ml，摇匀、澄清，成菌悬液。

2. 将培养液装入300ml三角瓶，每瓶30ml，灭菌，凉后接入5ml澄清的菌悬液。

3. 于32~35℃摇瓶增殖培养，至培养液浑浊，镜检有酵母类、细菌类和霉菌类细胞。

4. 于固体融化培养基内加入200单位/ml链霉素，将上述增殖液进行平皿划线培养，32~35℃培养48h。

5. 将长出的霉菌状酵母和曲霉接入固体斜面，培养48h。

6. 每株菌接入发酵培养液摇瓶振荡培养，32~35℃下培养24h，用刻度离心管2500r/min离心5min，定容10ml培养液含有的菌体量。

7. 选菌体产量得多、生长快的菌株再进行分离纯化，并再筛选培养。

8. 将筛得的菌株作进一步试验，如测氮含量、毒性试验和菌种初步鉴定等。

### [实验8-14]葡萄酒酵母的筛选

葡萄酒型野生酵母在葡萄皮上附着得甚多，所以分离这类酵母并非难事，特别对于采用当地特产葡萄酿制具有风味的葡萄酒，分离本地的葡萄酒型酵母非常必要。但是单是分离还不够，分离后还必须做酿酒试验，在取得品尝合格的结果后，该分离酵母就可继续作生产试验，并逐步用于生产。

#### (一) 实验材料

1. 分离源 自葡萄园采集数公斤葡萄。

2. 培养基 取自新鲜葡萄的榨汁，加2%琼脂，若pH小于4，宜调节至4~4.5后，然后58.84kPa，灭菌20min，可用于斜面，也可用于平皿分离。

3. 器具 试管、平皿、接种环、培养箱、漏斗。

## (二) 操作步骤

1. 自葡萄园采集新鲜葡萄数公斤。
2. 将4层洁净纱布铺平，放上葡萄包起来，然后用手将葡萄汁挤出，通过漏斗进入试管中。于30℃增殖培养48 h，此即为分离源。
3. 倒培养基入平皿，待其凝固，取一接种环，沾取葡萄汁，分别划线分离，在30℃培养箱中培养。
4. 培养48 h，将长出的菌落接入斜面，可随机挑取数10个菌落，但应挑分离成单个的，以免不纯。
5. 进行小型酿酒试验。

### (实验8-15)生产选种

由于菌种的自然变异，菌种群体中的个别或少数菌体有可能变好或变坏。虽然这种变异频率很低，但总有发生。变坏是菌种退化，变好就可以进行生产选种。所谓生产选种是在长年累月的生产实践中，在培养工艺条件没有任何可见变更情况下，突然发现某批次生产水平提高较大，这就有可能是个别自然变异朝好的方向变的细胞，在这种条件下很适应于培养条件，并逐渐显示出它的生长优势，这种优势的发展，促使它优良的生产性能表露。我们就抓紧时机加以利用，进行类似新种筛选的分离筛选，达到获得新的优良生产菌株的目的。

#### (一) 实验材料

1. 分离源 某一次高单位发酵液。
2. 培养基 发酵培养基，无菌生理盐水。
3. 器具 无菌吸管、试管、培养皿和摇床等。

#### (二) 操作步骤

1. 分离源的逐步稀释分离，30~33℃分离培养。
2. 将分离得的纯菌落各接斜面。
3. 每支斜面接三角瓶培养，测定发酵水平。另一支接原生产菌种作对照。
4. 将发酵单位高的菌株再次自然分离，挑取10个菌落作摇瓶试验，测定其产量稳定性。
5. 选取产量高，稳定性好的菌株作生产扩大试验，准备供生产正式使用。

### (实验8-16)发酵蔗糖COD测定

COD 系化学需氧量， 是表示废水污染程度的标志。 它是以强氧化剂  $\text{KMnO}_4$  氧化污水中有机物所消耗的氧量来表示的。 但无论有机物或无机物， 只要能被试剂氧化的物质均出现COD， 所以数据偏高。

我国规定废水排出COD标准不高于80ppm。

#### (一) 实验材料

1. 待测废水样。

2. 试剂

(1) 硫酸液：于2倍体积蒸馏水的烧杯中边搅拌边徐徐加入1容积的浓硫酸，0.5%  $\text{KMnO}_4$  至淡红色。

(2) 硫酸银：将硫酸银于玛瑙研钵中研细。

(3) 1/80mol/L草酸钠标定用：精确称取特级草酸钠1.675g，加水溶解至1L，此时每毫升相当于含氧0.2mg。

(4) 1/40N  $\text{KMnO}_4$ ：0.8g  $\text{KMnO}_4$  溶于100ml水中，缓缓沸腾1~2h，置于阴暗处放一夜。

3. 器具 三角瓶、容量瓶、水浴、滴定管、量筒、天平、酒精灯。

#### (二) 操作步骤

1. 标定 于300ml三角瓶中加蒸馏水100ml，加入硫酸液10ml，加入1/80mol/L标准草酸钠液10ml，保存于60~80℃下。以1/40N  $\text{KMnO}_4$  溶液滴定，另一空白试验为水100ml，硫酸液10ml，也滴定。得出校正系数  $t$ ， $t=10/x$ ， $x$  为扣除空白试验后的确定数。

2. 取100ml检验废水于300ml三角瓶内，加入硫酸银1g，硫酸液10ml，剧烈振荡后放置数分钟。准确加入1/40N  $\text{KMnO}_4$ ，于沸水浴中加热30min，同时作一空白试验。

(三) 加1/80mol/L草酸钠10ml保持60~80℃，用1/40N  $\text{KMnO}_4$  滴定，直至淡红色终止。

#### (四) 计算

从下式可由 $\text{KMnO}_4$ 推算出需氧量 (ppm)：

$$O = (b - a) \times x \times 1000 / V \times 0.02$$

O——由 $\text{KMnO}_4$ 推算出的需氧量 (ppm)

b——滴定所消耗的1/40N  $\text{KMnO}_4$  溶液 (ml)

a——空白试验所耗的1/40N  $\text{KMnO}_4$  溶液 (ml)

t——1/40N  $\text{KMnO}_4$  的校正系数

### 第三节 工业菌种的育种方针

工业菌种的育种是运用遗传学原理和技术对某个用于特定生物技术目的的菌株进行的多方位的改造。通过改造,可使现存的优良性状强化,或去除不良性质或增加新的性状。用于工业菌种育种的方法主要有诱变,基因转移和基因重组,其中诱变是菌株改良的一项基本而有效的手段,基因重组则包括若干有效手段,如原生质体技术,基因克隆技术等是当今菌种改良中具有最大生命力的方法。一般而言,育种过程包括下列3个步骤:

- (1) 在不影响菌种活力的前提下,有益基因型的引入。
- (2) 希望基因型的选出。
- (3) 改良菌种的评价(包括实验规模和工业生产规模)。

就一个特定的菌种而言,在选择其育种方法时应该综合考虑如下因素:(1)待改良性状的本质及与发酵工艺的关系(如批式或连续发酵试验);(2)对这一特定菌种的遗传和生物化学方面认识的明了程度;(3)经济费用等。如果对特定菌种的基本性状及其工艺知晓甚少;则多半采用随机诱变、筛选及选育等技术;如果对其遗传及生物化学方面的性状已有较深的认识,则可选择基因重组等手段进行定向育种。

工业菌种改良的主要目标是提高有益产品的产率,而这些产品往往有单一基因或少数几个基因控制。对于这种目的育种,工作者必须熟悉有关代谢途径的限速步骤和热动力学的限速因素。提高有益产品的产率的育种方法有很多种。如:

(1) 解除或绕过代谢途径中的限速步骤:通过增加特定基因的拷贝数或增加相应基因的表达能力来提高限速酶的含量;在代谢途径中引伸出新的代谢步骤,由此提供一个旁路代谢途径。

(2) 增加前体物的浓度。

(3) 改变代谢途径,减少无用副产品的生成以及提高菌种对高浓度的有潜在毒性的底物、前体或产品的耐受力。

(4) 抑制或消除产品分解酶。

(5) 改进菌种外泌产品的能力。

(6) 消除代谢产品的反馈抑制。如诱导代谢产品的结构类似物抗性。

提高特定基因的表达水平,可以从下列方法入手:

(1) 引入强转录及翻译信号,可通过①在一高效表达载体上克隆靶基因;②在靶基因的上游引入强启动子;③修改现有表达信号,提高基因效力等。

(2) 诱导解除基因表达抑制的突变。

(3) 增加基因拷贝数,可通过①在多拷贝或松弛型质粒上或噬菌体载体上克隆和放大特定基因;②组建多倍体菌种。

改进菌种的生长效率也可有效地提高菌株对特定产品的产率。方法之一是提高菌株对底物的利用率,此可通过确定并改变代谢中的耗能部分,或由另一菌株的高效低能代谢途径代谢来实现。方法之二是赋予菌种对多种底物,特别是价廉而丰富的底物的利用能力,由此可降低操作费用。

#### 第四节 富集培养技术在育种中的应用

微生物学者通常使用特定的、对大部分细胞类型有毒性、而对那些期望的一小部分细胞无毒性或仅有很小毒性的环境条件,富集期望的突变菌群,这种选择称为富集法。

单一的工业筛选每年可为一个经济上称心的,通常是增加了产品形成的表型而检测千百个单一微生物分离株。此法并不需要对所涉及的微生物分子生物学和生理学的高深了解。与此相反,富集法则是通过对细胞代谢和有益产物的生物合成的认识而发展出来的,并且通常是从包括更为精深地研究的微生物,如*E.*

*coli*和*Sacch. cerevisiae*所采用的方法中选出的。

### 一、去调节突变株的富集

许多富集法都充分利用了彻底改变了的微生物中控制初级代谢的自然调节机理。通过添加调节自身合成的氨基酸和维生素的结构类似物，突变型因缺乏反馈调节而被选出，且此突变株具有超产氨基酸和维生素的能力，而在野生型亲代细胞中，结构类似物阻止了足量的初级代谢产物的合成，由于这一代谢产物为生长和保存所必需，因此，大部分正常细胞死亡。

#### (一) 初级代谢产物的发酵生产中的去调节突变型

去调节突变型的选择已被广泛用于氨基酸、维生素和核苷酸前体的发酵生产中。如脯氨酸(Pro)结构类似物抗性突变株超产脯氨酸，*Bacillus* sp. 的5-(2-噻吩)-戊酸和放线噻唑酸抗性突变株增产生物素，*Bacillus* 的色氨酸结构类似物和重氮丝氨酸及6-偶氮-5-氧代L-正亮氨酸(谷氨酰胺结构类似物)抗性突变株超产L-色氨酸，*Corynebacterium* sp. 的2-脱氧核糖和谷氨酰胺结构类似物抗性突变株增产5-肌苷酸，*Bacillus subtilis*的8-氮鸟嘌呤抗性突变株增产肌苷，*Bacillus* sp. 的嘌呤结构类似物抗性突变株超产鸟苷-1-磷酸。随着重组DNA技术的深入应用，可将编码反馈阻遏酶的突变标记移入期望的菌株中加以放大。将从*B. subtilis* 的组氨酸结构类似物1, 2, 4-三唑丙氨酸抗性突变株中得到的DNA片段插入进PVB110中，然后用来转化一组氨酸营养缺陷株，结果转化体能产生组氨酸23g/L。当然并非所有的富集法都与阐明了的特殊代谢步骤的去调节相关联，*Corynebacterium* sp. 的蒽素环酸(anthracycline)抗性突变株超产L-谷氨酸便是一例。

#### (二) 酶发酵生产中的去调节突变

许多降解复杂多聚物的酶可通过去调节突变株的使用来进行商业化生产或由此而得以改良。这些酶的生物合成常受糖降解产

物的抑制而受到控制。葡萄糖结构类似物抗性突变株的筛选已被用来分离缺乏糖降解产物对这些酶的抑制的突变株。例如，2-脱氧葡萄糖抗性最近被用来分离超产纤维素酶的*Trichoderma sp.* 去调节突变株，*B. subtilis* 糖降解产物抑制抗性突变株超产淀粉酶。

从*B. subtilis* 选出衣霉素抗性突变株可生产出比敏感亲本高4倍的淀粉酶，而核酸酶和蛋白酶的含量在正常范围。衣霉素能抑制G<sup>+</sup>菌细胞壁碳水化合物的生物合成，通过衣霉素抗性影响淀粉酶生产的机理很可能是多效性的而不是直接的。

### (三) 次级代谢产物发酵生产中的去调节突变株

富集法也已用于分离那些生产不为细胞生长和生命维持所必需的次级代谢产物的改良菌株。如*Streptomyces aureofaciens* 的氯四环素抗性突变株、*S. goldiniensis*的aurodox (一种抗生素)抗性株以及*S. kanamyceticus*的卡那霉素抗性株。

用于富集超产抗生素的前体物质——初级代谢产物的突变株的选择法已被用于改良抗生素发酵。如*Pseudomonas fluorescens* 的色氨酸结构类似物抗性突变株超产硝吡咯菌素，在一小部分*Penicillium stoloniferum*的多烯类抗生素抗性突变株中分离出一超产麦角固醇株，此菌株也超产广谱抗生素霉酚酸，焦磷酸法呢酯是麦角固醇和霉酚酸生物合成的通用中间体。

此外，氨离子可抑制一些次级代谢产物的合成，铯离子可模拟氨的抑制作用，因此对氨抑制性抗生素来说，为获得抗生素高产，筛选大量的甲氨抗性和铯抗性菌株是有用的。用含有二乙醚的培养基培养孢子形成贫脊的酵母已报道为在营养细胞群体中富集稀少孢子的一有效方法。放线菌噬菌体用于分离超产万古霉素的*streptomyces orientalis* 菌株。自然出现的非期望富集的现象也可被利用，如一出现在酿酒酵母*Sacch. biastaticus*中的脱羧酶可分解自然出现的毒性肉桂酸，此酶受POF<sub>1</sub>核基因控制，并负责将麦芽汁中阿魏酸转化为4-乙烯基愈创木酚。POF<sub>1</sub>阴性菌株用

原生质体融合法与葡萄糖糖化酶菌株 (POF<sub>1</sub><sup>+</sup>) 进行遗传杂交, 产生能利用麦芽汁中糊精和产生可口的啤酒的杂合体。

## 二、营养缺陷型的富集

### (一) 发酵过程中营养缺陷型的例子

*Streptomyces coelicolor* 的鸟嘌呤营养缺陷型超产黄嘌呤、*Acinetobacter luoffi* 的精氨酸营养缺陷型在以烃的唯一碳源时超产L-鸟氨酸、*Brevibacterium lactofermentum* 的高丝氨酸营养缺陷型超产L-赖氨酸、*Corynebacterium* 的腺嘌呤营养缺陷型超产5'-肌苷酸, *Brevibacterium ammoniens* 的腺/黄嘌呤营养缺陷型生产鸟苷-5'-二磷酸达13g/L和鸟苷酸-3'-磷酸14g/L。*B. lactofermentum* 的酪氨酸营养缺陷型能生产苯丙氨酸。此外, *Cephalosporium acremonium* 的硝酸盐转化到半胱氨酸阻断突变型在加蛋氨酸的基础培养基上具有优产头孢菌素的能力。

### (二) 营养缺陷型富集法在原核细胞中的应用

1. 青霉素富集法 应用最为广泛的、了解最深的并且一般说来是最为有效的分离原核微生物的营养缺陷型的方法是青霉素富集技术。青霉素抑制大多数原核细胞壁肽聚糖组分中的交链所必需的转肽反应, 青霉素共价地与少数不同的位于这些微生物细胞膜上的蛋白质起反应形成青霉素蛋白质复合物, 其中一些蛋白质抑制转肽酶活力, 青霉素与这些蛋白质相互反应的结果是处于生长期细胞的死亡和裂解。如果活细胞能阻止环境条件抑制其生长和细胞壁合成, 则这些微生物就具有抗青霉素毒性的能力而存活。在青霉素富集营养缺陷型的方法中, 细胞生长于含有青霉素的MM中, 故原养型首先活跃地生长, 结果为青霉素所杀死, 而营养缺陷型起始不能生长, 因为缺乏必需的营养物质, 继续培养可得较高百分比的营养缺陷型。要获得有较多的营养缺陷型的菌群, 在营养缺陷型成为菌群的优势部分之前进行几个选择循环是必需的。



青霉素富集技术在 *Streptomyces* 菌种用于新抗生素的产生中的典型应用也许是伴随诱变处理的菌丝的裂殖开始的。经洗涤后，裂殖菌丝接种于适当的MM中，于30~37℃下饥饿培养4~8 h，将新溶解的青霉素加到饥饿菌丝上(限度达1000到2000单位/ml)，继续培养4~24 h (如果出发菌已经多次突变和选择的循环，可能会出现生长缓慢，因此要求更长时间地暴置于青霉素中)。经青霉素处理后，加入足量的青霉素酶，使青霉素在1 h内丧失活性，再经1 h培养，处理过的菌丝在水中洗涤以破坏任何未裂解的原生质球和破损细胞，同样地可去除任何残余的青霉素。将洗涤后的菌丝接入CM过夜生长和裂殖，裂殖的菌丝可用作新的青霉素富集循环的起始菌或分等分子于-80℃冷冻，直到设法筛选出其中缺陷型的数目和种类之前。

2. 应用于原核细胞的其他营养缺陷型的富集法 萘啶酮酸、D-环丝氨酸、5-Fu等也在原核细胞营养缺陷型的富集中得到应用。

### (三) 营养缺陷型富集法在真核细胞中的应用

最早的一些获得低等真核细胞的营养缺陷型的富集法包括遗传杂交，这种方法因不方便而未得到广泛的采用。在另一早期使用的方法中，先将 *Neurospora crassa* 孢子在MM中培养，然后用过滤法将营养缺陷型与能够在MM中发芽和形成菌丝因而不能通过过滤器的原养型分开，这一方法简单且直接，有报道可获得29倍的营养缺陷型的富集。

许多用于霉菌和酵母的技术是以许多年前 Fries 观察到的现象为基础的，那就是 *Ophiostoma* 双缺能在MM中比其具有单缺的亲本存活更长的时间。这一现象在 *Aspergillus*、*Allomyces* 和 *Ustilago* 菌种的营养缺陷型富集法的发展中得到应用。当肌醇营养缺陷型可获得时，无肌醇死亡提供了有意义的对双缺的富集。这一方法已得到广泛的应用，如：在 *N. crassa*、*C. acremonivem* 和 *Sacch. cerevisiae* 中，脂肪酸营养缺陷型和胸腺嘧啶营养缺陷

型已被相似地用在引出无脂肪酸死亡和无胸腺嘧啶死亡的富集法中。

许多用于真核细胞营养缺陷型的富集法是基于在一定条件下，相对迅速生长的细胞比不生长和静止期细胞具有更大的生理上的敏感性。如：多烯抗生素更善于作用于迅速生长的真核细胞，制霉菌素可用于富集酵母和*Penicillium*的营养缺陷型。另一水溶性多烯抗生素，N-糖基-多真菌素已被成功地用于富集 *Aspergillus* 的营养缺陷型。有意义的是，多真菌素方法的应用获得所有类型的营养缺陷型，50%的菌落在富集后试验表现为营养突变型。可溶性二性霉素 B 在特定的生理条件下使用时，在 *S. cerevisiae* 营养缺陷型中产生不伴随有呼吸缺陷型突变型发生的有意义的富集。

棘假丝菌素 B 是一组含有脂肪酸的寡肽抗生素之一，此化合物已被用于 *S. cerevisiae* 营养缺陷型富集法，其作用是抑制真菌细胞壁形成所必需的葡聚糖的合成；戊氯石炭酸钠能够更优先地杀死原养型细胞而保留营养缺陷型细胞，这一观察已被证实并用于 *Penicillium chrysogenum*；一些作用于酵母和其他真菌的细胞壁的裂解酶同样优先作用于迅速生长的细胞而在 MM 中被用于富集营养缺陷型；高温也表现出影响生长着的细胞而对静止期细胞无影响，并且已有报道将这一现象用于酵母的营养缺陷型的富集；用灰黄霉素可得到5倍的 *Rhodoforula* 营养缺陷型富集。

选择特殊类别的真核营养缺陷型的方法也有报道。细胞死亡可由掺入其大分子中的氮的裂变而引起，*S. cerevisiae*、*Aspergillus* 和 *Neurospora* 的营养缺陷型可通过饲加不能掺入营养缺陷型的大分子中的同位素标记的前体物质来富集。

富集技术已被发展用来获得某些控制一些菌株中嘧啶生物合成的酶的位点的损坏突变株。脘基琥珀酸是嘌呤生物合成的一中间产物，在 *Coprinus* 的二氮乳清酸缺乏的突变型中积累，此对真菌有毒。这一现象已被用于氨甲酰磷酸合成酶或天冬氨酸转氨甲

酰酶缺陷型突变株的富集，使两个酶无活性地缺失可防止脲基琥珀酸的形成，但运用此方法时，菌株必须具有一特征性的二氢乳酸酶缺失突变型，而且菌体中具有很强的尿嘧啶反馈调节系统，故此法并未普及。

### 三、富集法在研究次级代谢的重组DNA技术中的应用

应用于发酵过程的重组 DNA 技术现已集中在允许的哺乳动物激素、细胞分裂素、酶的发酵生产的系统发展中。重组 DNA 技术应用于要求一系列生产初级代谢产物的基因的发酵途径正开始受到认真的重视。在某些以氨基酸前体为次级代谢产物的限制步骤的情况下，重组 DNA 技术已被用于增加次级代谢产物的产量。

重组 DNA 技术应用于改良初级代谢产物向抗生素、色素和其他次级代谢生物的转化是十分困难的。然而，称为级联杂交 (cascade hybridization) 的一系列方法可减少控制初级代谢产物向次级代谢产物转化的大量基因的克隆化所必需的时间。基本方法是，从营养体和变异体分离得 mRNA，用营养体 mRNA 去除变异体非变异体态特异的 mRNA，然后将变异体特异的 mRNA (如链霉菌的抗生素生产相) 用来产生用于克隆的互补 DNA。在产生抗生素菌株中，有关抗生素生产的互补 DNA 可被转化入一低滴度的、基因的效应可以被更容易地认识的菌体中而得到鉴定和分离。如此，基因可因对抗生素的影响而筛选出。这一方法可促进但不能替代更古典的通过逐步的途径的阐明和由基因库得来的 DNA，对具有较好特征的代谢阻断突变株的补充所出现的方法。

## 第五节 诱变育种

以微生物的自然变异作为基础的生产选种的机率并不很高，

因为这种变异率太小，一个基因的自然突变频率仅 $10^{-6} \sim 10^{-10}$ 左右。为了加大其变异频率，可采用物理和化学因素促进诱发突变。这种以诱发突变为基础的育种就是诱变育种，是迄今为止国内外提高菌种产量、性能的主要手段。

### 一、诱变剂和诱变处理

诱变剂有物理因素如紫外线、X-射线、 $\gamma$ -射线、快中子；化学因子如碱基类似物、5-氟尿嘧啶、烷化剂等。

物理因素都是些射线，它们的波长分布见图8-2。

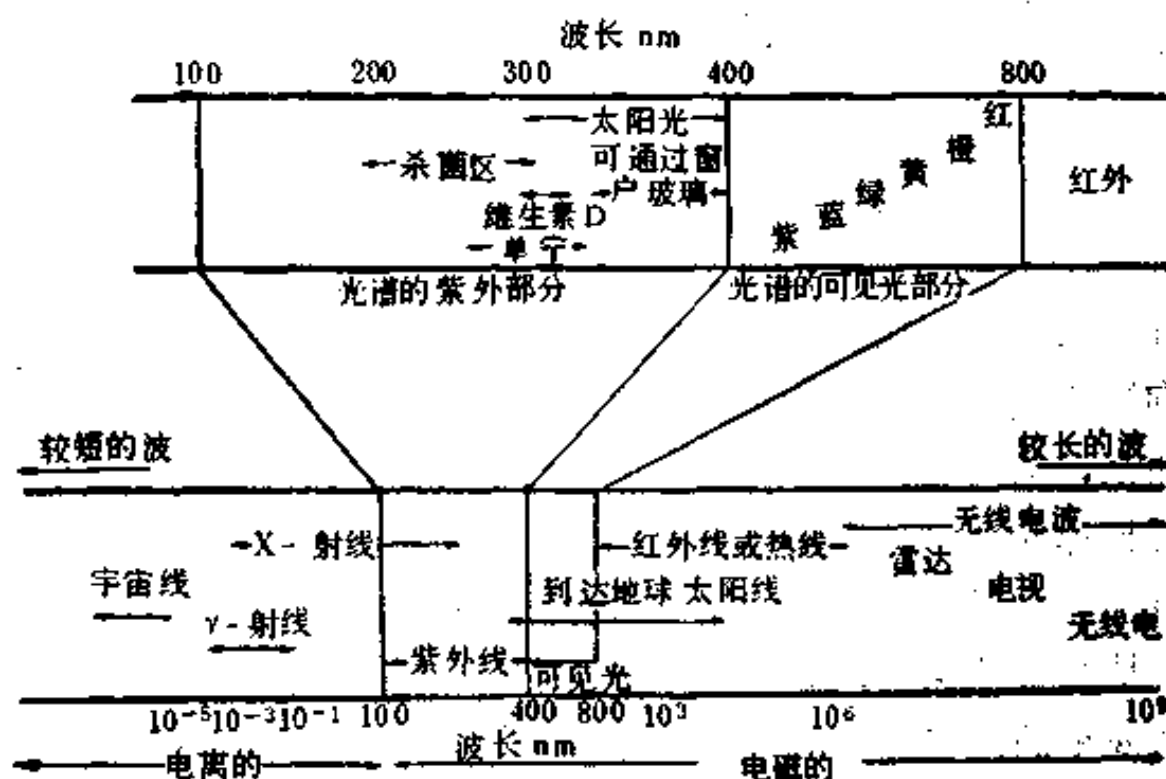


图 8-2 电磁波谱

物理因素中目前使用得最方便而且十分有效的是紫外线。许多高产菌株的选育都用过紫外线，对于一般实验室、中小型工厂都适用，也很安全。其他的几种射线都是电离性质的，有一定的穿透力，一般都由专业人员在专门的设备中使用，否则有一定危险性。

化学诱变剂中使用最多、最有效的是烷化剂。使用化学诱变剂的优缺点如下：

1. 大多数情况下, 就突变数量而言, 要比电离辐射更有效。

2. 化学诱变剂是很经济的, 因为只需要少量的合适的诱变剂, 设备是实验室的一般玻璃器皿, 一个蒸气罩。而用电离辐射进行工作时, 设备费用大, 并要注意安全性。

3. 大部分诱变剂是致癌剂, 所以在使用中必须非常谨慎, 要避免化学诱变剂与皮肤接触, 且切勿吸入其蒸气, 有人对某些诱变剂极其敏感, 甚至未直接接触就会过敏, 这就更要当心。

表 8-6 常用烷化剂的一些理化特性

理化特性	烷 化 剂					
	甲基磺酸乙酯 (EMS)	乙烯亚胺 (EI)	亚硝基乙基 尿 烷 (NEU)	亚硝基甲基 脒(NMU)	硫酸二乙酯 (DES)	亚硝基胍 (MNNG, NTG)
状态	无色液体	无色液体	粉红色液体	黄色固体	无色油状物	黄色固体
水溶性	约 8%	易溶	约 5%		不易溶	
沸点	85~86°C (1.333kPa)	56°C (101.3 kPa)	53°C (665Pa)			118°C (熔点)
pH7水中半衰 期	93h(20°C) 26h(30°C) 10.4h(37°C)		84h(30°C)	35h(30°C)	1h(30°C) 0.5h(37°C)	
分子量	124	43	117	103		

一些烷化剂的某些理化性质列于表8-6中。一些诱变剂的使用方法和诱变效应如表8-7及表8-8。不同的诱变因素的处理效果

表 8-7 一些化学诱变剂常用处理浓度、时间、中止方法

诱 变 剂	处理浓度	处理时间	处理介质	中止反应方法
亚硝酸	0.01~0.1 mol/L	5~10min	1mol/L, pH4.5 醋酸缓冲液	0.07mol/L, pH 8.6 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
甲基磺酸乙酯	0.05~0.5 mol/L	细胞: 10~ 60min, 孢 子3~6h	0.1mol/L, pH 7.0磷酸缓冲液	硫代硫酸钠或大 量稀释

续表

诱变剂	处理浓度	处理时间	处理介质	中止反应方法
硫酸二乙酯	细胞: 0.5~1%, 孢子: 0.1% (V/V)	15~30min 18~24h	0.1mol/L, pH 7.0 磷酸缓冲液	硫代硫酸钠或大量稀释
N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍	细胞: 0.1~1.0mg/ml 孢子: 3mg/ml	15~60min 90~120min	0.1mol/L, pH 6.0 磷酸缓冲液 或 Tris-苹果酸缓冲液	大量稀释
亚硝基甲基脒	0.1~1.0 mg/ml	15~90min	0.1mol/L, pH 6.0~7.0 磷酸缓冲液 或 Tris-苹果酸缓冲液	大量稀释
氮芥	0.1~1.0 mg/ml	5~10min	碳酸氢钠	甘氨酸或大量稀释
乙烯亚胺	1:1000~1:10000	30~60min	蒸馏水	硫代硫酸钠或大量稀释
羟胺	0.1~5%	数小时或生长过程中诱变	蒸馏水	大量稀释
氯化锂	0.3~0.5%	加入培养基生长过程中诱变	蒸馏水	大量稀释
秋水仙碱	0.01~0.2%	数小时或在生长过程中诱变	蒸馏水	大量稀释

表 8-8

几种诱变剂的诱变效应

诱变剂	在DNA上的初级效应	遗传反应
碱性类似物 羟胺	渗入作用 与胞嘧啶起反应	AT $\rightleftharpoons$ GC转换 易错DNA修复GC $\rightarrow$ AT转换
亚硝胺 烷化剂	A, G, C脱氨基, 交联 烷化碱基 (主要是G) 烷化磷酸基团 丢失烷化的嘌呤 糖-磷酸骨架的断裂	AT $\rightleftharpoons$ GC转换, 缺失 易错DNA修复 AT $\rightarrow$ GC转换 AT $\rightarrow$ TA颠换 GC $\rightarrow$ CG颠换
嘧啶类 紫外线	碱基之间相互作用 形成嘧啶的水合物 形成嘧啶的二聚体	移码突变 GC $\rightarrow$ AT转换 移码突变

续表

诱变剂	在DNA上的初级效应	遗传反应
电离辐射	碱基的羟基化和降解, 脱氧核糖核酸的降解 糖-磷酸骨架的断裂, 丧失嘌呤	AT $\rightleftharpoons$ GC转换 移码突变 巨大损伤(缺失、重复、倒位、易位)

表 8-9 诱变剂的复合处理及其协同效应

诱变对象	单一处理		复合处理	
	诱变剂	突变率(%)	诱变剂	突变率(%)
土曲霉 1	紫外线	21.3	X-射线、紫外线	42.8
	X-射线	19.7		
土曲霉 2	0.1% 氟芥	不明显	氟芥、紫外线	11.0
	紫外线	4.7		
链霉菌	紫外线	31.0	紫外线、 $\gamma$ -射线	43.6
	$\gamma$ -射线	35.0		
金色链霉菌	二乙烯三胺	6.06	二乙烯三胺、紫外线	26.6
	硫酸二乙酯	1.78		
灰色链霉菌	紫外线	12.5	紫外线、光复活1次	9.7
	紫外线	9.8		
			紫外线、光复活6次	16.6

及组合使用时有差异, 这些差异见表 8-9。

关于诱变剂的选择, 有几点可供参考:

1. 碱基类似物和羟胺具有很高的特异性, 但很少使用, 回复突变率高, 效果不大。

2. 亚硝酸和烷化剂应用的范围较广, 造成的遗传损伤较多。其中亚硝基胍和甲基磺酸乙酯常被称为“超诱变剂”, 甲基磺酸乙酯是毒性最小的诱变剂之一。

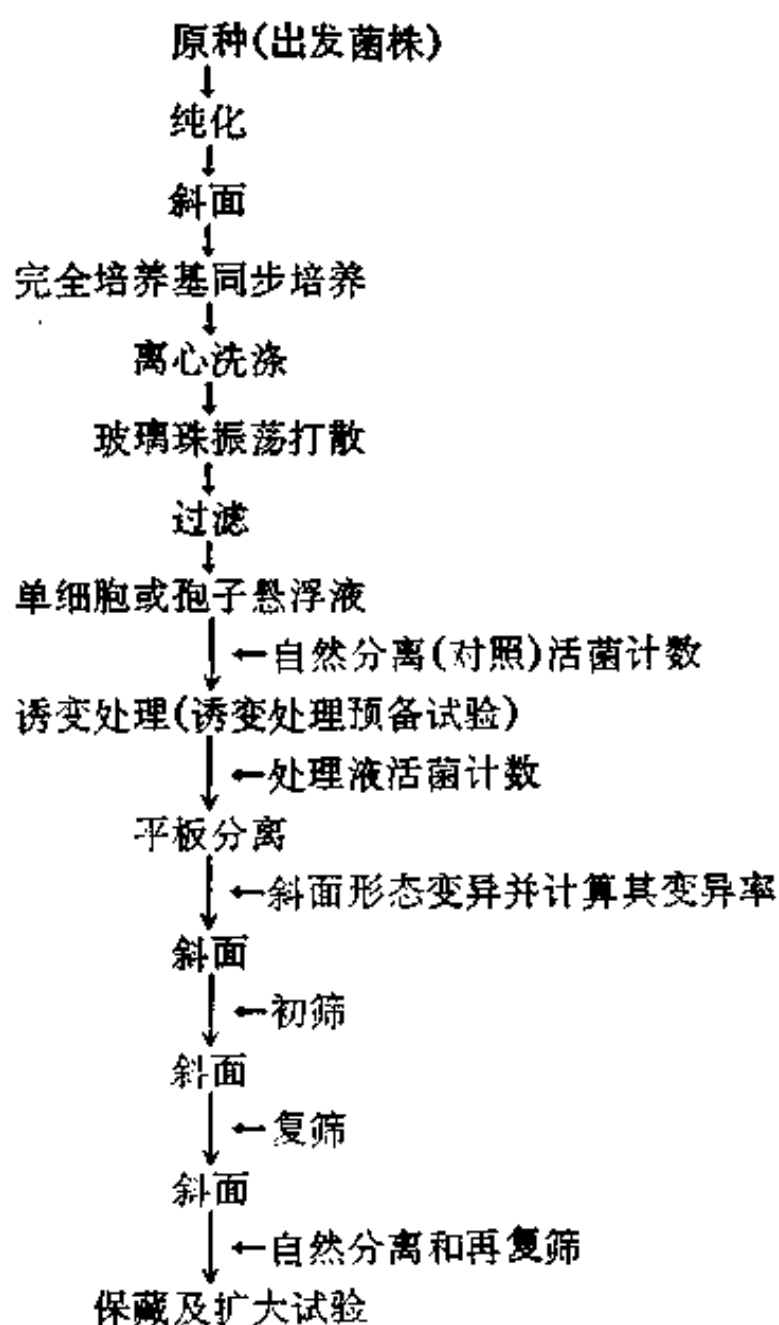
3. 吡啶类诱变剂可以造成生化代谢途径的完全中断。

4. 紫外线仍十分有效。电离辐射是造成染色体巨大损伤的

最好诱变剂，它能造成不可回复的缺突变。但它可能影响邻近基因的性能。

## 二、诱变育种步骤

诱变育种步骤如下：



### (一) 出发菌株的选择

出发菌株选择的好坏，常直接影响最后的诱变效果，通常选取的原则是：

1. 自然界新分离的野生型菌株，对诱变处理较敏感，容易达到好的效果。



2. 在生产中经生产选种得到的菌株与野生型较相像，也是良好的出发菌株。

3. 每次诱变处理都有一定提高的菌株，往往多次诱变能积累较多的提高。

4. 出发菌株开始时可以同时选2~3株，在处理比较后，将更适合的出发菌株留作继续诱变。

5. 要尽量选择单倍体细胞、单核或核少的多细胞体来作出发诱变细胞，这是由于变异性状大部分是隐性的，特别是高产基因。如果是双倍体细胞或多核细胞往往只有一条染色体或一个核起了变异，这时起了突变的性状有可能因处于隐性而显现不出来，造成筛选上的误差。

6. 根据采用的诱变剂或根据细胞生理状态或诱变谱选择诱变剂，因为同一诱变剂的重复处理会使细胞产生抗性，使诱变效果下降。有的诱变剂是作用于营养细胞，就要选对数期的细胞；有的作用于休止期，就可选用孢子。

### **(二) 处理菌悬液的制备**

这一步骤的关键是制备单细胞和单孢子状态的、活力类似的菌悬液，为此要进行合适培养基的培养，并要离心，洗涤，过滤。

### **(三) 诱变处理**

根据前面有关诱变剂及诱变处理的介绍，结合诱变对象的实际，设计诱变处理方案。

### **(四) 中间培养**

由于在发生了突变尚未表现出来之前，有一个表现延迟的过程，即细胞内原有酶量的稀释过程(生理延迟)，需3代以上的繁殖才能将突变性状表现出来。这个过程对今后的筛选和获得稳定菌株都是极为重要的。方法是让变异处理后细胞在液体培养基中培养几小时，以让细胞的遗传物质复制，让细胞繁殖几代，以得到纯的变异细胞。这样，隐性的变异就会显现出来，若不经液体

培养基的中间培养，直接在平皿上分离就会出现变异和不变异细胞同时存在于一个菌落内的可能，形成混杂菌落，以致造成筛选结果的不稳定和将来的菌株退化(见图8-3)。

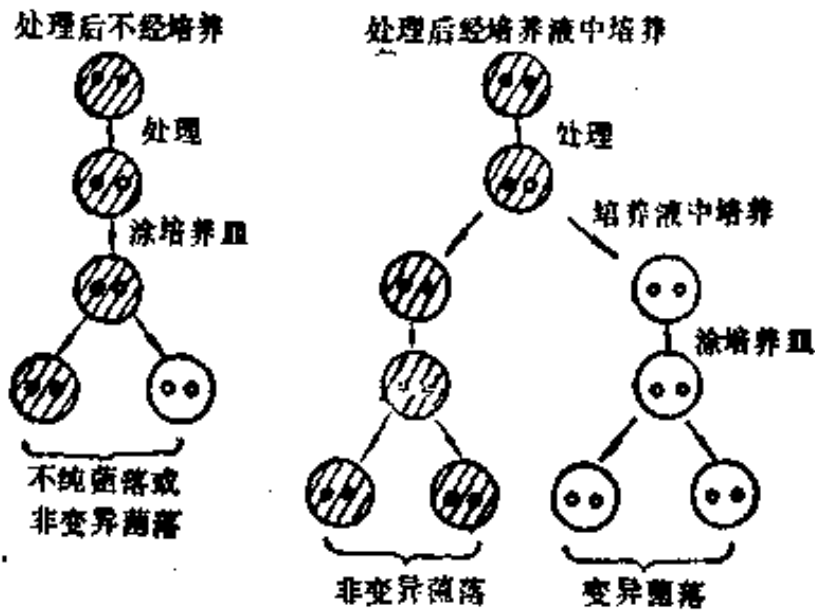


图 8-3 是否经过中间培养造成的平板分离菌落的差异

### (五) 分离和筛选

在整个诱变育种工作中，工作量最大的要数筛选。分离后得到的菌落，真正能发生性能变好的所谓正突变为数极少，要从几千万个菌落中选出几个好的，需花费大量的人力和物力。怎样花费较小的工作量达到最大的效果，是筛选工作中的一条原则。可采用上节叙述的各种富集技术。

筛选分初筛和复筛。初筛以迅速筛出大量的达到初步要求的分离菌落为目的，以量为主。复筛则是精选，以质为主，也就是以精确度为主。因此在具体方法上就有差异，例如初筛1株菌1个三角瓶，而复筛就要1株菌3~5个三角瓶。初筛甚至可以在平皿上直接以菌落的代谢产物与某些染料或基质的作用形成的变色圈或透明圈的大小来挑取参加复筛者，而将90%的菌落淘汰。在数量减少后就要仔细比较参加复筛和再复筛的菌株，最后才能选得优秀菌株。当然在以后的复筛阶段，还应不断结合自然分离，

纯化菌株。

### 〔实验8-17〕紫外线的诱变育种

紫外线诱变一般采用15W紫外线杀菌灯，波长为2537Å。灯与处理物的距离为15~30cm，照射时间依菌种而异，一般为几秒至几十分钟。紫外线的剂量若灯的功率为30W，距离为30cm时，每平方米每秒为 $53 \times 10^{-3} \text{J}$ 。一般我们常以细胞的死亡率表示。例如，我们希望照射的剂量死亡率控制在70~80%为宜。

被照射的菌悬液细胞数，细菌为 $10^8$ 个/ml左右，霉菌孢子和酵母细胞为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml。由于紫外线穿透力不强，要求照射液不要太深，约0.5~1.0cm厚，同时要用电磁搅拌器或手工进行搅拌，使照射均匀。由于紫外线照射后有光复活效应，所以照射时和照射后的处理应在红灯下进行。

#### (一) 实验材料

1. 菌种 枯草杆菌AS 1.398。在肉汁蛋白胨培养液中摇瓶培养18~20h。
2. 培养基 牛肉汁蛋白胨固体和液体培养基。
3. 无菌生理盐水。
4. 15W紫外灯。
5. 磁力搅拌器。
6. 摇床(或恒温振荡器)。
7. 漏斗、三角瓶、玻璃珠等。

#### (二) 操作步骤

1. 将细菌培养液以3000r/min离心5min，倾去上清液，将菌体打散加入无菌生理盐水再离心洗涤。

2. 将菌悬液放入一已灭菌的、装有玻璃珠的三角瓶内用手摇动，以打散菌体。将菌液倒入有定性滤纸的漏斗内过滤，单细胞滤液装入试管内，一般处于浑浊态的细胞液含细胞数可达 $10^8$ 个/ml左右，作为待处理菌悬液。

3. 取2~4ml制备的菌液加到直径9cm培养皿内，放入一无菌磁力搅拌器，然后置磁力搅拌器上、15W紫外线下30cm处。在正式照射前，应先开启紫外线10min，让紫外灯预热，然后开启皿盖正式在搅拌下照射10~50s。操作均应在红灯下进行，或外用黑纸包住，避免白炽光。

4. 取未照射的制备菌液和照射菌液各0.5ml进行稀释分离，计数活菌

细胞数。

5. 取照射菌液2ml于液体培养基中(300ml三角瓶内装30ml培养液), 120r/min振荡培养4~6h。

6. 取中间培养液稀释分离、培养。

7. 挑取菌落进行筛选。

$$\text{死亡率(\%)} = \frac{\text{未照射菌液菌数/ml} - \text{照射菌液菌数/ml}}{\text{未照射菌液菌数/ml}} \times 100$$

#### (实验8-18)亚硝基胍诱变曲霉菌(黑曲霉、米曲霉)

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NGN, MNNG或TG)对真核或原核微生物都有强烈的诱变作用。其精确的作用机制尚不很清楚,据认为是伴随着重氮甲烷的生成及在酸性条件下生成亚硝酸,直接作用于细胞内的DNA复制系统,从而诱发了变异。MNNG的诱变作用随pH的升高而增强。

##### (一) 实验材料

1. 菌种 黑曲霉(产糖化酶)或赤曲霉(产蛋白酶),于察氏培养基斜面30℃培养7天。

2. 培养基 察氏琼脂。

3. MNNG。

4. 0.1mol/L, pH 6.0磷酸缓冲液。

5. 带滤纸漏斗试管。

6. 培养皿等。

##### (二) 操作步骤

1. 单孢子悬液制备 取斜面,加入6ml, 0.1mol/L, pH6.0的磷酸缓冲液,用接种环刮下孢子,振荡试管,立即通过带滤纸漏斗过滤,由此制得单孢子悬液,若孢子液浑浊状,其孢子浓度可达 $10^6$ 个/ml,此为待处理孢子悬液。

2. MNNG溶液的制备 用分析天平称取2mg,加入2ml 0.1mol/L, pH 6.0磷酸缓冲液,于暗处振荡溶解。

3. 诱变处理 吸取MNNG溶液1ml,加入到1ml孢子悬液中,30℃振荡30min,立即稀释1000倍停止作用,然后以 $10^{-2}$ 、 $10^{-4}$ 两个稀释度分离培养,30℃3天后计数。

4. 死亡率计算 将未处理的孢子液1ml加入1ml磷酸缓冲液中,同上

逐级稀释分离，30℃下培养3天。根据处理前后的活孢子数可计算出死亡率。

5. 挑取菌落进行糖化酶及蛋白酶产量筛选。

### 〔实验8-19〕链霉菌菌丝体的诱变育种

链霉菌为纤丝状微生物，在一定的环境条件下可形成具有单基因组的孢子。因此，在通常情况下，一般选择其孢子制备孢子悬液进行诱变。常用的诱变方法有UV诱变法和亚硝基胍诱变法。方法与前述方法相似。但许多链霉菌变种形成孢子后很难诱导，只能对其菌丝体片段进行诱变处理。用于链霉菌的诱变剂主要有UV、羟胺(HA)、4-硝基喹啉-1-氯化物(NQO)、EMS、甲基磺酸乙酯(MMS)和MNNG，它们的诱变效率和诱变方法的差异见表8-10。

表 8-10 用于链霉菌菌丝体诱变的各种诱变剂的比较

诱变剂	UV	HA	NQO	EMS	MMS	MNNG
诱变细胞	对数生长后期或稳定期	对数生长后期	对数生长后期	对数生长后期	对数生长后期	对数生长3h
缓冲液及pH	TES, 7.2	0.1mol/L磷酸缓冲液, 7.0	0.05mol/L磷酸缓冲液, 7.0	0.2mol/L磷酸钾缓冲液, 7.0	0.2mol/L磷酸钾缓冲液, 7.0	pH 8.5
诱变剂剂量	20~160 (J/m <sup>2</sup> )	100~200 (mmol/L)	100~400 (μg)	0.5~3.0 % (V/V)	0.05~0.4 % (V/V)	最终浓度 100~400 μg/ml
诱变时间和培养条件	1~5min, 37℃	2h, 37℃	2h, 37℃	10min, 37℃	30min, 37℃	20min, 37℃, 250~300 r/min振荡
诱变终止方法	移去照射源	含10%丙酮的营养肉汤10倍稀释	0.16mol/L硫酸钠10倍稀释	同NQO	同NQO	离心洗涤
诱变机制	胸腺嘧啶二聚体的形成及易错DNA修复	易错DNA修复及错配	易错DNA修复	诱导性易错DNA修复	易错DNA修复	易错DNA修复
突变率与剂量的关系		正比于起始剂量效能	正比于剂量的平方	正比于剂量的平方	正比于剂量效能的 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$	低浓度时正比于剂量平方, 高浓度时不变
诱变能力	$2 \times 10^{-7}$					$1 \times 10^{-4}$

### (一) 实验材料

1. 链霉菌斜面。
2. TS豆汤

胰蛋白胨豆汤粉 (BBL)	30 g	蒸馏水	1000ml
3. AS-1琼脂平板			
酵母膏	1 g	NaCl	25 g
L-丙氨酸	0.2 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
L-精氨酸	0.2 g	琼脂	20 g
L-天冬酰胺	0.5 g	蒸馏水	1000ml
可溶性淀粉	5 g	pH	7.5

4. 2% NaOH。
5. MNNG。
6. 组织研磨器。
7. 超声破碎仪。
8. 恒温振荡器。
9. 离心机。
10. 通风橱。
11. 恒温箱。
12. 无菌50ml、250ml三角瓶及10ml离心管等。

### (二) 操作步骤

1. 将从斜面培养物上制取的孢子或菌丝接入TS豆汤中，培养24h或培养到对数生长后期或稳定期 ( $A_{600}=2.0\sim 9.0$ )。
2. 离心收获菌丝体，加入等体积 TS 豆汤，用无菌组织研磨器制成均浆。
3. 加入等体积 TS 豆汤稀释菌丝悬液 (一次诱变约需此菌丝悬液20ml)。
4. 移入50ml无菌三角瓶中。
5. 将超声探头的尖端浸入液面下大约1~2cm，75W超声破碎菌丝3~10s。
6. 按1~10%的接种量将菌丝片段悬液接入新鲜的TS豆汤中。
7. 34℃，270r/min振荡培养3h。

8. 用2% NaOH调培养基pH至8.5。

9. 移入通风橱内，称取少量 MNNG 晶体（如1~4mg）置于预重的无菌离心管内，加入菌丝体悬液，到MNNG的最终浓度为100~400 $\mu$ g/ml。

10. 立即将离心管盖好，振荡，使MNNG晶体完全溶解。

11. 37 $^{\circ}$ C，250~300r/min振荡培养20min。

12. 取1ml培养物至19ml TS豆汤中，涂布 AS-1 平板，以测定存活比。

13. 余下的培养物以3000r/min离心5min收获菌丝片段，上清倒入2% NaOH中。

14. 用TS豆汤洗涤1次，上清倒入2% NaOH中。

15. 将菌丝片段重新悬浮于10ml TS豆汤中，32 $^{\circ}$ C培养过夜。

16. 离心收获菌丝体，均浆，超声破碎。

17. TS豆汤适度稀释后涂布 AS-1 平板。

18. 单菌落生产性能筛选。

## 第六节 营养缺陷型的选育

营养缺陷型是指通过诱变而产生的缺乏合成某些营养物质如氨基酸、维生素和碱基等的的能力，必须在其基本培养基中加入相应的营养成分才能正常生长的变异株。与营养缺陷型对应的是野生型。能满足野生型菌株正常生长的培养基称基本培养基（MM）；在基本培养基中加入相应的营养成分的称补充培养基（SM）；能满足各种营养缺陷型生长的称完全培养基（CM），如牛肉膏蛋白胨培养基、麦芽汁培养基等。

营养缺陷型在生产上和科学研究上用途很大。目前生产氨基酸、核苷酸的菌种都是各种类型的缺陷型。要研究代谢途径，育种技术都必须有营养缺陷型的菌株为材料。

筛选营养缺陷型一般有4个步骤：诱变、淘汰野生型、检出缺陷型和确定生长谱。全过程如图8-4。

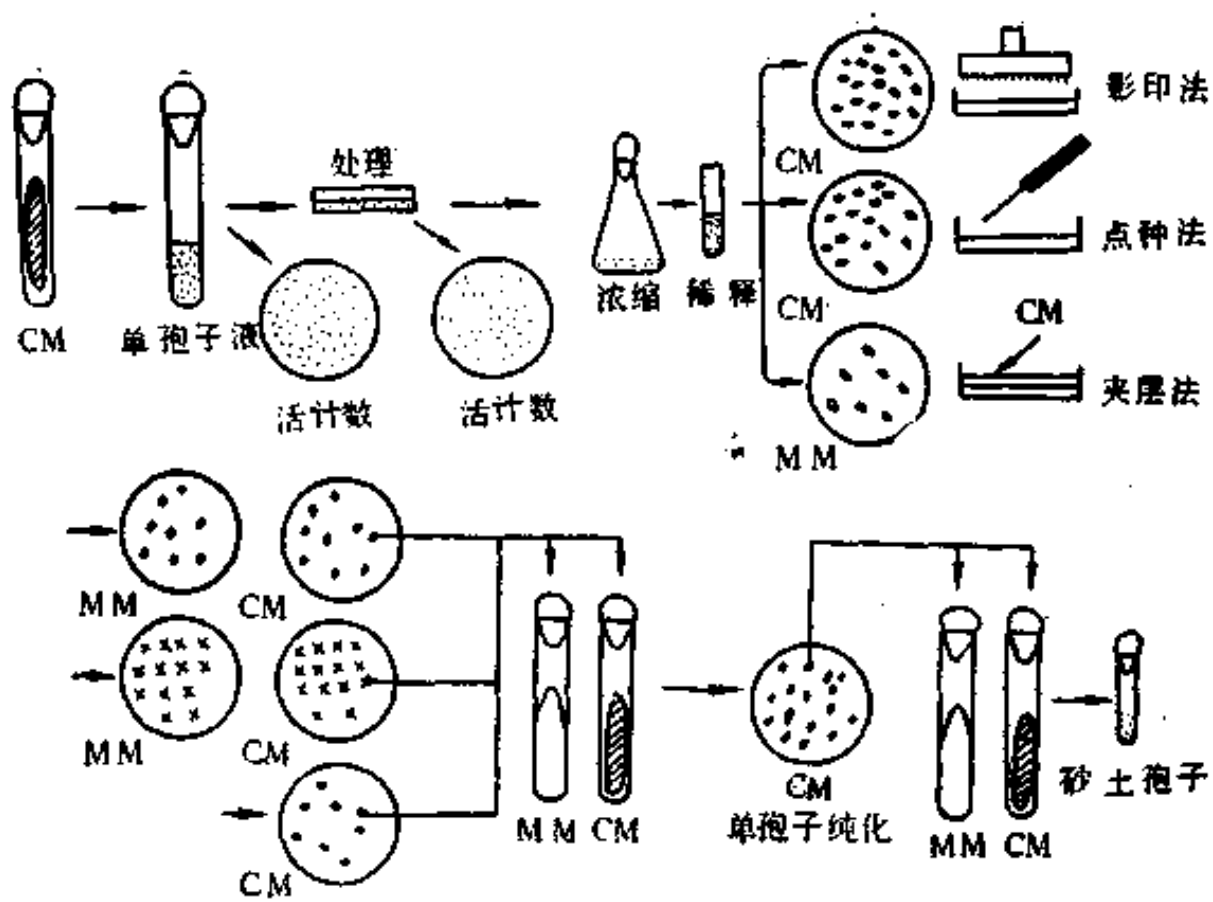


图 8-4 营养缺陷型筛选的步骤

### 一、诱变方法

同前。

### 二、淘汰野生型

由于在诱变之后，具有合成营养物质能力突变的菌株比例很小，通常只是百分之几至万分之几，所以要淘汰野生型细胞以达到“浓缩”缺陷型的目的。淘汰的方法可采用抗生素法或菌丝过滤法。由于野生型能在MM中生长，而缺陷型不能，于是将诱变处理液在MM中培养短时让野生型生长，处于活化阶段，而缺陷型无法生长，仍处于“休眠状态”。由于细菌或酵母对一些抗生素敏感，于是就相应加入一定量的抗生素，结果活化状态的野生型就被杀死，保存了缺陷型。对于霉菌，因孢子生长后会长出菌丝体，就可用滤纸过滤法将菌丝滤去，而缺陷型孢子却因未发芽而



不能滤过。一般细菌可以采用青霉素，酵母可采用制霉菌素。

### 三、检出缺陷型

应用的方法很多，但其原理一致。即在固体基本培养基和完全培养基上，生长情况完全不同，缺陷型在CM上生长良好，而在MM上则不生长，野生型都能生长。

具体方法有影印法(图8-5)、点种法和夹层法。

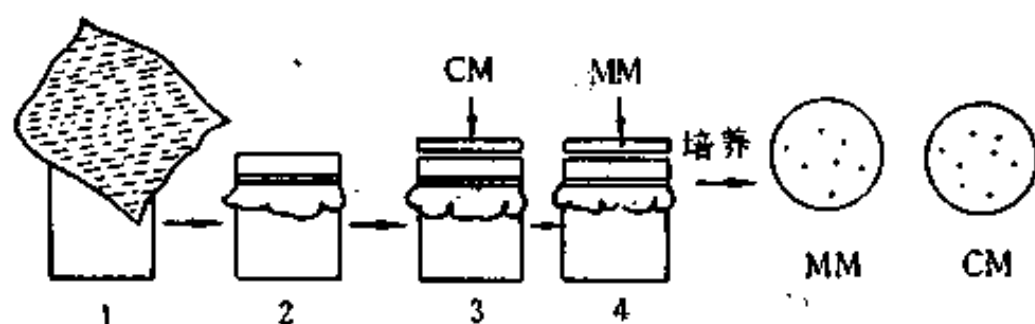


图 8-5 影印法

#### (一) 影印法

1. 将一较平皿直径小1cm的金属圆筒蒙上一层灭菌的丝绒，用金属夹夹住，灭菌。
2. 将完全培养基上长出的全部菌落在丝绒上轻轻一压，使之成为印模，标记方位。
3. 将基本培养基平皿和完全培养基平皿在标记的同一方位上先后轻轻一压，此菌印模即复印于上。
4. 将CM和MM在恒温箱中培养。
5. 二平皿相同方位进行比较，即可发现在MM平皿上长出的菌落少于CM平板上的。MM上未长而相应于CM上长出的那几个菌落就可能是缺陷型。当然此法要求平皿上菌落不能太多，菌落之间应有一定间隔。

#### (二) 点种法

也就是任意法。用接种针或牙签将CM上长出的菌落在MM和CM两副平板上接种，依次在相应位置点种，然后一起培养，

观察其生长情况。此法结果明确，但工作量大，如果机率是几千或几万分之几，那就得点种几千或几万个菌落才会出现缺陷型的菌落。

### (三) 夹层法

先在培养皿上倒一层基本琼脂培养基，凝固后涂上一层含菌的MM，凝固后再倒一薄层MM琼脂培养基，培养24h，将出现菌落标记，然后倒上一层CM琼脂培养基，再培养。这时第二批长出的菌落就可能是缺陷型。此法缺点是，结果有时不明确，而且将缺陷型菌落从夹层中挑出并不很容易。

## 四、营养缺陷型生长谱的确定

采用上法选出的缺陷型经几次验证确定是缺陷型后，就需确定其缺陷的因子，即生长谱测定。生长谱测定可以用两种方法：一种是将缺陷型菌株培养后，收集菌体，洗净所附的培养基，在制备成细胞悬液后，与MM培养基(融化并凉至50℃)混合并倾注平皿。待凝固后，分别在平皿的5~6个区间放上不同的营养组合的混合物或吸饱此组合营养物的滤纸圆片。培养后会在某组合区长出，就可测得所需营养。另一种方法是以不同组合的营养混合物与融化凉至50℃的MM培养基混合铺成平皿，然后在这些平皿上划线接种各个缺陷型菌株于各相应位置，培养后根据在什么组合长出可推知其营养因子。前法一个平皿测一个菌，后者在5~6个平皿上可测20株菌以上。

配制营养组合的原则是最后的结果必须清晰肯定。例如，手头有15种营养因子，可配制为5组，其组合如下：

组合编号	组合营养因子				
一	1	2	3	4	5
二	2	6	7	8	9
三	3	7	10	11	12

续表

组合编号	组合营养因子				
四	4	8	11	13	14
五	5	9	12	14	15

如果有21种因子，可配制如下：

组合编号	组合营养因子					
一	1	2	3	4	5	6
二	2	7	8	9	10	11
三	3	8	12	13	14	15
四	4	9	13	16	17	18
五	5	10	14	17	19	20
六	6	11	15	18	20	21

根据生长情况(图8-6)确定营养要求(以5组营养为例)。营养要求与生长关系如表8-11。

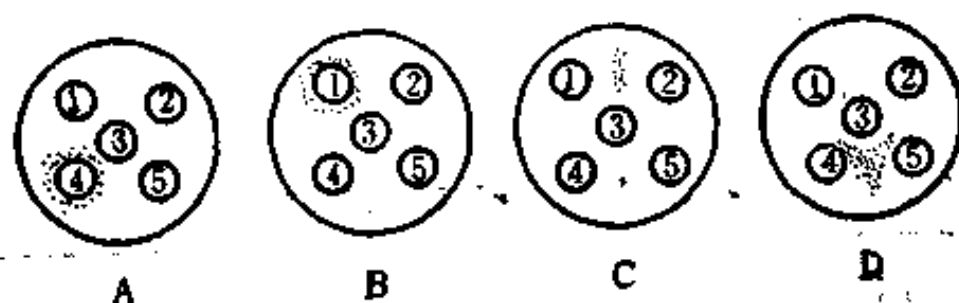


图 8-6 缺陷型菌株生长谱测定

A: 缺4 B: 缺1 C: 缺组一、组二中的2种营养物质  
D: 缺组三、四、五中的3种营养物质

表 8-11 缺陷型缺陷因子的确定(以5组营养为例)

生长组合区	营养要求
一	1
二	6
三	10
四	13

续表

生长组合区	营养要求
五	15
一、二	3
一、三	3
一、四	4
一、五	5
二、三	7
二、四	8
二、五	9
三、四	11
三、五	12
四、五	14

最后还应以确定的营养因子加入到MM中（即SM）进行确证试验，表8-12是配制SM培养基时营养因子的浓度表。值得指出的是浓度过大会引起抑制生长的作用，浓度小，生长不明显，都得不到满意的结果。

表 8-12 配制SM时氨基酸和碱基浓度表

氨基酸·或碱基 (mg/L)	细菌	放线菌	真菌
赖氨酸	10	50	72
精氨酸	10	50	20
蛋氨酸	10	50	70
胱氨酸	50	50	120
亮氨酸	10	50	70
异亮氨酸	10	50	70
缬氨酸	10	50	66
苯丙氨酸	10	50	80
酪氨酸	10	50	90
色氨酸	10	50	100
组氨酸	10	70	80

续表

氨基酸*或碱基 (mg/L)	细菌	放线菌	真菌
苏氨酸	20	50	60
谷氨酸	10	50	90
脯氨酸	10	50	60
天冬氨酸	10	50	70
丙氨酸	10	50	40
甘氨酸	10	50	40
丝氨酸	10	50	50
羟脯氨酸	10	50	70
腺嘌呤	10	15	70
次黄嘌呤	10	15	80
黄嘌呤	10	15	70
鸟嘌呤	10	15	80
胸腺嘧啶	10	10	60
尿嘧啶	10	10	60
胞嘧啶	10	10	60

\* 如用水解干酪素作为混合氨基酸，则须添加胱氨酸50mg/L和色氨酸10mg/L。

### (实验8-20)大肠杆菌营养缺陷型的筛选

#### (一) 实验材料

##### 1. 大肠杆菌斜面。

##### 2. 肉汤培养基

牛肉膏	5 g	水	1000ml
蛋白胨	10 g	pH	7.2
NaCl	5 g		

加入2%琼脂，即为固体完全培养基 (CM)。

##### 3. MM

葡萄糖	20 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaNH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.5 g	琼脂	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	11.9 g	水	1000ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g	pH	7.2
柠檬酸·1H <sub>2</sub> O	2 g		

##### 4. 无氮基本液体培养基

$K_2HPO_4$	7g	葡萄糖	20g
$KH_2PO_4$	3g	水	1000ml
柠檬酸钠· $3H_2O$	5g	pH	7.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g		

5. 双倍含氮基本液体培养基

$K_2HPO_4$	7g	$(NH_4)_2SO_4$	2g
$KH_2PO_4$	3g	葡萄糖	20g
柠檬酸钠· $3H_2O$	5g	水	1000ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1g	pH	7.2

6. 混合氨基酸、碱基溶液 按生长谱的确定方法对氨基酸进行编号，并分组。使用21种营养物质时分组如下：

- 一组：组氨酸 赖氨酸 苯丙氨酸 胱氨酸 苏氨酸 嘌呤
- 二组：赖氨酸 谷氨酸 天冬氨酸 亮氨酸 甘氨酸 嘧啶
- 三组：苯丙氨酸 天冬氨酸 蛋氨酸 异亮氨酸 缬氨酸 丙氨酸
- 四组：胱氨酸 亮氨酸 异亮氨酸 酪氨酸 色氨酸 丝氨酸
- 五组：苏氨酸 甘氨酸 缬氨酸 色氨酸 精氨酸 羟脯氨酸
- 六组：嘌呤 嘧啶 丙氨酸 丝氨酸 羟脯氨酸 脯氨酸

按表8-12的各种营养物质的添加量配制6组营养物质混合液(10×)，过滤除菌。

- 7. 青霉素(100×) 用蒸馏水配成20000单位/ml,分装-20℃存放。
- 8. 无菌生理盐水。
- 9. 2% NaOH。
- 10. 恒温箱。
- 11. 无菌牙签。
- 12. 50℃水浴。
- 13. 无菌培养皿。
- 14. 无菌干滤纸圆片(φ6mm)。
- 15. 离心机。

(二) 操作步骤

- 1. 将大肠杆菌接入肉汤培养基中，37℃培养过夜。
- 2. 取对数期生长细胞10ml，3000r/min离心10min收获。
- 3. 生理盐水洗涤2次，并用生理盐水重新悬浮，用2% NaOH调pH

至8.0。

4. 按(实验8-19)用MNNG进行诱变(步骤8~14, TS豆汤用生理盐水代替)。

5. 经诱变的细胞用等体积的生理盐水悬浮。

6. 吸取0.1ml菌悬液, 加到5ml无氮基本培养液中, 37℃培养12h。

7. 加入5ml双倍含氮基本培养液, 加入0.2ml青霉素液(100×)。

8. 37℃下培养, 每隔12, 16, 24h从菌液中分别吸取0.1ml菌液, 涂布MM及CM平板。

9. 涂布平板于37℃培养48h。

10. 选用CM上菌落数大大超过MM这一组, 用无菌牙签从CM上挑取100~150个菌落对应接种MM及CM。

11. 37℃培养24h。

12. 选择在MM不生长而在CM对应位置上生长的菌落, 继续在MM上划线。如在37℃ 24h后不长, 则初步确定为营养缺陷型。

13. 将初定营养缺陷型菌落编号并接入5ml肉汤培养液中, 37℃培养14~16h。

14. 离心收获细胞, 用无菌生理盐水洗涤3次, 用同体积生理盐水悬浮。

15. 将MM融化, 冷却至50℃。

16. 取1ml洗涤菌液, 加至无菌平皿中, 倒入50℃融化MM, 立即摇匀平放, 待凝。

17. 用无菌滤纸片蘸取各组营养物混合液, 贴于琼脂表面(注意编号及在琼脂平板上作记号)。

18. 37℃培养48h, 观察生长情况。

19. 根据生长谱确定营养缺陷类型。如为双缺或多缺则可进一步试验加以验证。

20. 斜面接种保藏。

### (实验8-21)酵母营养缺陷型的筛选

#### (一) 实验材料

1. 菌种 啤酒酵母。

2. CM

蛋白胨

20g

酵母膏

10g

葡萄糖	20 g	水	1000ml
琼脂	20 g	pH	6.0

不加琼脂即为液体CM。

### 3. MM

葡萄糖	2 g	琼脂粉	1.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g	蒸馏水	100ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05 g	pH	6.0

58.84kPa灭菌15min。若不加琼脂和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>即为无氮液体MM。

4. 0.1mol/L, pH 7.0磷酸缓冲液。

5. 无菌生理盐水。

6. 100μg/ml制霉菌素溶液(用95%酒精配制)。

7. 10mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液(用无氮液体MM配制)。

8. 甲基磺酸乙酯 (EM S)。

9. 恒温振荡器。

10. 离心机。

11. 无菌培养皿等。

### (二) 操作步骤

1. 将啤酒酵母接入20ml液体CM中, 20℃, 120r/min振荡过夜。

2. 取0.1ml接入另一20ml液体CM中, 20℃, 120r/min振荡培养至A<sub>600</sub>约为0.7。

3. 离心收获菌体, 并用无菌生理盐水洗涤两次。

4. 细胞悬于2ml 0.1mol/L, pH 7.0磷酸缓冲液中。

5. 加入6μl EMS, 30℃, 150r/min振荡培养1h。

6. 离心收获细胞, 沉积用5ml液体MM悬浮。

7. 30℃, 120r/min振荡培养6h。

8. 用无菌生理盐水离心洗涤2次。

9. 重新悬浮于无氮MM中, 细胞浓度约在10<sup>7</sup>个/ml。

10. 取1ml细胞悬液加到8ml无氮MM中, 30℃振荡培养3.5h。

11. 加入1ml 10mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液。

12. 加入0.5ml 100μg/ml制霉菌素溶液。

13. 30℃, 静置培养2h。

14. 稀释后涂布CM平板, 37℃培养48h。



15. 生长菌落点种MM及CM平板，将在MM平板上不生长而在CM上生长的菌落选出。

16. 在CM平板上划线分离，挑取生长单菌落，再在MM和CM上点种，以确认缺陷型。由于酵母为多倍体细胞，划线分离步骤应重复2~3次。

17. 按前述方法确定缺陷型菌株的生长谱（〔实验8-20〕步骤13~19），并传代验证。

18. 接入斜面保藏。

### 〔实验8-22〕青霉菌营养缺陷型菌株的筛选

#### （一）实验材料

1. 菌种 产黄青霉斜面。

2. MM

蔗糖	30 g	微量元素溶液*	10 ml
NaNO <sub>3</sub>	3 g	琼脂粉	20 g
KCl	0.05 g	水加至	1000 ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	pH	6.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g		

不加琼脂粉即为液体MM；水加至500ml则为双倍MM。

3. CM

葡萄糖	30 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
蛋白胨	4 g	水解酪素	2 g
酵母膏	2 g	微量元素溶液	20 ml
NaNO <sub>3</sub>	2 g	琼脂	20 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g	水	1000 ml
KCl	0.5 g	pH	6.8

不加琼脂即为液体CM。

4. 生理盐水。

5. 紫外灯（15W）。

6. 盛有玻璃珠的三角烧瓶。

\*微量元素溶液（100×）：

FeSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.02 g
MnSO <sub>4</sub>	0.02 g	水	100 ml

7. 无菌玻璃皿 ( $\phi 9\text{cm}$ ).
8. 天鹅绒印章 ( $\phi 8.5\text{cm}$ ).
9. 氨基酸混合液(同实验8-20).
10. 恒温培养箱.
11. 离心机.
12. G<sub>6</sub>烧结玻璃滤器.

## (二) 操作步骤

1. 将产黄青霉接入CM大斜面上, 25℃培养7天.
2. 加入10ml无菌生理盐水, 用接种环轻轻地把孢子刮下.
3. 倒入盛有玻璃珠的无菌三角瓶中, 手持振荡10min.
4. 过无菌G<sub>6</sub>烧结玻璃滤器, 制得孢子悬液.
5. 取3ml孢子悬液加至玻璃皿内, 盖好皿盖.
6. 打开紫外灯稳定10min.
7. 将盛有孢子悬液的玻璃皿放于紫外灯下30cm处. 打开紫外灯稳定10min. 打开皿盖照射5min, 关去紫外线.
8. 暗处加入3ml双倍液体MM.
9. 25℃下培养48h, 过G<sub>6</sub>烧结玻璃滤器去除野生型菌丝.
10. 用液体MM将滤液作10、100倍稀释.
11. 取0.1ml涂布CM.
12. 25℃下培养7天.
13. 选择长满50个左右的分散的菌落的平板进行下列步骤试验.
14. 将平板上的菌落用天鹅绒印章将菌落影印到MM及CM平板上, 每组编上号及做好定位标记(影印时将平板反扣在印章上, 用手指轻轻敲击数次, 取下平板, 然后用同样方法将MM及CM平板依次反扣印章上, 轻敲数次).
15. 25℃培养7~10天.
16. 将在MM上不生长而在CM上生长的菌落挑选出, 分别接种于MM及CM上. 25℃培养7~10天.
17. 按前述方法确定生长谱.
18. 斜面接种保藏.

## 第七节 呼吸缺陷型及代谢调节突变株的筛选

### 〔实验8-23〕酵母呼吸缺陷型的筛选

在酵母中，呼吸缺陷型突变是经常遇到的。在平皿分离中，会长出约1%的小菌落，这些小菌落丧失呼吸能力。产生这种变异大部分是细胞质基因发生，但有时核基因也会突变成小菌落。小菌落突变后，对非发酵型底物如甘油、乙醇、醋酸等不能氧化，但  $\text{CO}_2$  放出高于对照株，酒精脱氢酶活力也较对照高出1倍左右，对提高酒精产率有好处。同样，呼吸缺陷型也是育种工作可利用的一个有效的遗传标记。

#### (一) 实验材料

1. 菌株 酒精酵母。

2. CM

葡萄糖	40 g	$\text{MgSO}_4$	2 g
蛋白胨	10 g	琼脂	15 g
酵母膏	5 g	水	1000 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5 g		

不加琼脂即为液体CM，分装30 ml于300 ml三角瓶中。

3. TTC上层培养基

葡萄糖	5 g	TTC	0.5 g
琼脂	10 g	水	1000 ml

分装，58.84 kPa灭菌15 min。

4. TTC下层培养基

葡萄糖	10 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 g
蛋白胨	2 g	琼脂	20 g
酵母膏	1.5	水	1000 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g	pH	5.5~5.7

5. MM甘

酵母氨基	6.7 g	甘油	20 ml
------	-------	----	-------

水	980ml	pH	5.5
琼脂粉	20g		

分装, 58.84kPa灭菌10min.

6. 吡啶黄。
7. TTC(三苯基四唑盐酸盐)。
8. 恒温振荡器。
9. 培养箱等。

### (二) 操作步骤

1. 第1天接入酒精酵母到液体CM三角瓶中振荡培养过夜, 另倒TTC下层平皿和含0.1%吡啶黄的CM平板, 也培养过夜。
2. 分离: 将稀释菌液涂布于吡啶黄的CM平板上, 30℃培养24h。
3. 第3天将长出菌落点种到TTC下层培养基平板上, 30℃培养24h。
4. 第4天小心倾入TTC上层培养基, 凝固后30℃保温2~3h。此时会出现红色、粉红色和白色菌落, 呼吸缺陷型为白色。
5. 白色菌落在CM上划线分离, 30℃培养48h, 重复步骤3~4。
6. 白色菌落分别在MM甘及CM上点种确证。

### [实验8-24] 氨基酸抗反馈调节突变株的选育

在细菌代谢过程中, 代谢终产物被积累到一定程度后, 细菌就终止这一代谢终产物的积累。这一调节机理是因代谢终产物与变构酶或阻遏蛋白的结合。通过基因突变, 使变构酶和阻遏蛋白的结构发生改变, 使其不能与代谢终产物相结合, 从而去除了代谢终产物的负反馈调节作用或失去阻遏作用, 就可使特定代谢终产物的过量的积累。这类突变株称抗反馈调节突变株。

结构类似物抗性突变的利用, 使氨基酸生产菌株的改良变得相对容易。结构类似物在其结构上与代谢终产物相似, 可竞争性地与变构酶或阻遏蛋白结合, 抑制菌株的生长繁殖, 此竞争性结合作用可被高浓度的相应代谢终产物所解除。选出抗结构类似物抗性突变, 也即获得相应代谢终产物合成的负反馈调节的消除的突变株。

常用于抗反馈调节突变株选育的结构类似物见表8-13。

下以赖氨酸生产抗性突变株的筛选为例说明这一过程。

#### (一) 实验材料

1. 出发菌株 黄色短杆菌2247。

表 8-13

常用结构类似物

产 品	结构类似物	使用的微生物
赖 氨 酸	s-(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸(AEC)	黄色短杆菌
	$\gamma$ -甲基赖氨酸(ML)	乳糖发酵短杆菌
	苯酯基赖氨酸(CBL)	乳糖发酵短杆菌
	$\alpha$ -氯己内酰胺(CCL)	谷氨酸棒杆菌
苏 氨 酸	$\alpha$ -氨基- $\beta$ -羟基戊酸( $\alpha$ -AHV)	黄色短杆菌
	邻甲基-L-苏氨酸(MT)	谷氨酸棒杆菌 大肠杆菌 黄色短杆菌
蛋 氨 酸	乙硫氨酸(ET)	谷氨酸棒状菌 大肠杆菌
	N-乙酰正亮氨酸	鼠伤寒沙门氏菌
	ET+蛋氨酸氧肟酸 (Met-Hx)+硝代蛋氨酸	谷氨酸棒杆菌
精 氨 酸	L-精氨酸氧肟酸(Arg-Hx)	枯草杆菌
	$\alpha$ -噻唑丙氨酸( $\alpha$ -TA)	黄色短杆菌
	D-精氨酸(D Arg)	谷氨酸棒杆菌
苯丙氨酸	苯丙氨酸氧肟酸(Phe-Hx)	谷氨酸棒杆菌
	对氟苯丙氨酸(PFP)	
	对氨基苯丙氨酸(PAP)	
色 氨 酸	6-氟代色氨酸( $\beta$ -FT)	谷氨酸棒杆菌
	5-甲氨基色氨酸( $\beta$ -MT)	黄色短杆菌
	对氟苯丙氨酸(PFP)	大肠杆菌
酪 氨 酸	D-酪氨酸(D-Tyr)	枯草杆菌
	酪氨酸氧肟酸(Tyr-Hx)	谷氨酸棒杆菌
	3-氨基酪氨酸( $\beta$ -AT)	枯草杆菌
	三氟亮氨酸	链孢霉
亮 氨 酸	2-噻唑丙氨酸( $\beta$ -TA)	乳糖发酵短杆菌
	亮氨酸氧肟酸(Leu-Hx)	
	$\alpha$ -氨基丁酸( $\sigma$ -AB)	枯质赛氏杆菌
缬 氨 酸	2-噻唑丙氨酸( $\beta$ -TA)	乳糖发酵短杆菌
	3,4-二羟脯氨酸	大肠杆菌
脯 氨 酸	硫酸胍(SG)	黄色短杆菌
	SG	黄色短杆菌
谷氨酰胺	SG	
瓜 氨 酸		
肌 苷	8-氮杂鸟嘌呤( $\beta$ -AG)	短小芽孢杆菌
吡 哆 醇	异烟肼	啤酒酵母

## 2. CM

胰蛋白胨	10 g	自来水	1000ml
酵母膏	10 g	pH 7.2	
NaCl	5 g		

## 3. MM

葡萄糖	5 g	CaCl <sub>2</sub>	0.001 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5 g	生物素	30μg
尿素	1.5 g	硫胺素	100μg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g	微量元素溶液*	1ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g	蒸馏水	1000ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g	pH	7.0

加入2%琼脂粉即为固体MM。

4. 巨大芽孢杆菌培养上清液 巨大芽孢杆菌接入MM中培养48h, 离心取上清液, 过0.22μm滤膜即得。

5. MNNG。

6. 0.1mol/L, pH 8.0磷酸缓冲液 (PB)。

7. 20mg/ml苏氨酸溶液 用液体MM配制, 过滤除菌。

8. 20mg/ml s-氨基乙基-L-半胱氨酸 (AEC) 溶液 用液体MM配制, 过滤除菌。

9. 恒温箱。

10. 50℃水浴。

11. 离心机。

12. 恒温振荡器。

13. 通风橱。

## (二) 操作步骤

1. 将黄色短杆菌接入CM中, 30℃, 120r/min振荡过夜。

2. 取此菌液1ml加到40ml CM中, 30℃ 120r/min振荡5h。

3. 取此菌液10ml, 离心收获。

4. 菌体用0.1mol/L, pH 8.0 PB洗2次。

\* 微量元素溶液: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.8mg, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 970mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 393mg, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 88mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 72mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·H<sub>2</sub>O 37mg, 蒸馏水 1000ml。

5. 以5ml PB悬浮菌体。
6. 在通风橱中称取少量MNNG晶体 (2~5mg)。置预重的无菌离心管内，加入菌悬液至MNNG最终浓度为1mg/ml。
7. 立即将离心管盖好，振荡使MNNG晶体完全溶解。
8. 0℃处理30min。
9. 将MM琼脂融化并冷至50℃，补加入1%的无菌巨大芽孢杆菌培养上清液。取此9ml，补加入1ml 20mg/ml苏氨酸溶液，混匀倾注无菌平皿，制成不含AEC平板底层 (图8-7)。
10. 取8ml上述融化MM (50℃)，补加入1ml 20mg/ml苏氨酸溶液及1ml 20mg/ml AEC溶液，混匀，倾注于底层上，放平平皿，制成含AEC梯度平板。
11. 液体MM离心洗涤诱变菌悬液2次。
12. 用5ml液体MM将菌体悬浮。
13. 取0.1ml涂布上述制备的平板。
14. 30℃培养2~7天后，挑取AEC抗性菌落，进一步在AEC平板上鉴定。
15. 确定的AEC抗性菌落进行发酵赖氨酸试验并保存。

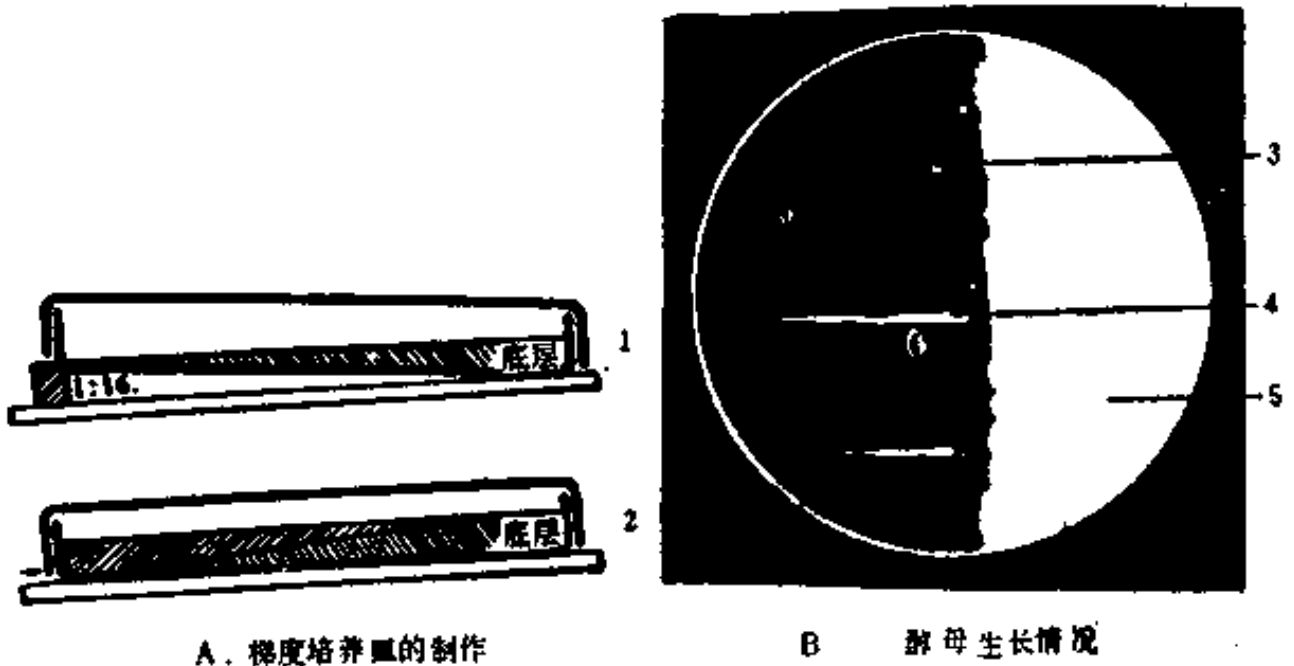


图 8-7 梯度法选育抗性菌株

1—不含AEC底层培养基 2—含有AEC上层培养基  
3—抗性菌落 4—抗性菌落划线培养物 5—非抗性菌

## 第八节 抗噬菌体菌株的选育

用于抗噬菌体菌株的选育方法主要有自然选育法和诱变法，有时两者联合使用。自然选育法是将常见的污染噬菌体与生产菌株混合培养，淘汰掉绝大多数敏感菌株。将不被裂解的菌株增殖后再加入噬菌体，由此反复淘汰后可获得不受噬菌体感染的菌株，继续淘汰其中的溶源株。诱变法按常规诱变方法进行并由此获得抗性菌株，此法可有效地避免溶源株的产生。

### (实验8-25)抗噬菌体产 $\alpha$ -淀粉酶菌株的选育

#### (一) 实验材料

1.  $\alpha$ -淀粉酶生产菌株 枯草芽孢杆菌BF 7658.
2. 枯草芽孢杆菌敏感噬菌体BS5、BS10、BS12.
3. 培养基

牛肉膏	5 g	葡萄糖	10 g
蛋白胨	10 g	NaCl	5 g
酵母膏	1 g	水	1000 ml
可溶性淀粉	20 g	pH	7.0

加入1.8%琼脂则为固体培养基。

4. 生理盐水.
5. 0.1 mol/L, pH 6.5磷酸缓冲液.
6. MNNG.
7. 恒温振荡器.
8. 37℃ 水浴.
9. 15W紫外灯.
10. 装有0.22 $\mu$ m孔径的微孔滤膜的注射式滤器.
11. 50 ml无菌三角瓶.

#### (二) 操作步骤

1. 取10 ml培养液加入50 ml三角瓶内，接入菌种，37℃，120 r/min振荡培养过夜.
2. 取0.5 ml菌液转接入含10 ml培养液的50 ml三角瓶中，接入一定量的



噬菌体悬液(感染系数0.01)。

3. 37℃, 120r/min振荡培养24~72h。
4. 适度稀释后涂布琼脂平板, 37℃培养24h。
5. 挑取单菌落划痕接入另一块平板, 在划线的两端点上微量的噬菌体BS5和BS10液 ( $10^8$ pfu/ml), 37℃培养24h。
6. 挑出形态与亲株一致和呈现抗性的菌株接入斜面保藏及进一步试验。
7. 将经自然选择法获得的抗性菌株接入10ml培养液中, 37℃培养过夜。
8. 取菌液5ml, 无菌生理盐水离心洗涤2次。
9. 用生理盐水悬浮菌体成 $10^8$ 个/ml。
10. 取3ml菌悬液置于无菌平皿内。
11. 置15W紫外灯下30cm处紫外诱变4~5min。
12. 暗处放3h。
13. 暗处移入10ml离心管中, 添加3ml 0.1mol/L, pH 6.6 PB。
14. 加入MNNG, 使终浓度为180 $\mu$ g/ml, 37℃, 30min离心。
15. 离心后去除上清液, 用培养液洗涤1次。
16. 菌体用10ml培养液悬浮, 加入0.1ml噬菌体BS 10悬液 ( $10^8$ pfu/ml), 120r/min振荡培养22h。
17. 0.1ml菌悬液涂布平板, 37℃培养24h。
18. 挑取单菌落在琼脂平板上划痕接种, 于划线两端点种微量的噬菌体BS5和BS10。
19. 划线分离抗性菌株。
20. 生产水平发酵试验及抗性稳定性试验。

## 第九节 基因育种

基因重组育种是运用体外DNA各种操作或修改手法获得目的基因,再借助于病毒、细菌质粒或其他载体,将目的基因转移至新的宿主细胞并使其在新的宿主细胞系统内进行复制和表达,或者通过细胞间的相互作用,使一个细胞的优秀性状经其间遗传物

质的交换而转移给另一个细胞的方法。

## 一、质粒的提取与纯化

质粒是微生物染色体外的遗传物质，多为双链、共价、闭环状 DNA，常有一定的遗传信息，控制微生物某些特定的遗传性状，并能在胞浆中自主复制，维持许多世代，细胞分裂时质粒也转移到子代细胞中。质粒的存在并非微生物生命活动必需。每个细胞中存在的质粒数称为该质粒的拷贝数。不同类型的质粒其拷贝数各异，同一质粒在不同条件下，拷贝数也可能差异很大。有的质粒处于产紧型控制下，即这些质粒的复制与染色体复制是偶联的，在细胞中拷贝数很低，每个细胞仅含一个或几个；而另有一些质粒的复制处于松弛型控制下，其拷贝数可达 10~200 之多。如果使宿主细胞蛋白合成停止，则松弛型质粒拷贝数可增加至每个细胞几千个之多。质粒 DNA 分子常呈现三种形态，常见的一种是共价、闭环状 DNA (ccc DNA)；其次是由于一条链有缺口而产生的开环 DNA (ocDNA)；第三种是由双环分子两段均断裂而产生的线性 DNA。

各类质粒所赋予宿主细胞的不同表现型有：① 抗生素抗性，② 抗生素产生，③ 大肠杆菌素的产生，④ 肠毒素的产生，⑤ 复杂有机化合物的降解，⑥ 限制性核酸内切酶和修饰酶的产生，⑦ 杀伤性能等。在自然条件下，许多质粒可经细菌接合或相似方式在宿主间相互转移。在实验室条件下，质粒也可经人工手段将其转化入宿主细胞内。

质粒 DNA 的提取方法有多种，但所有方法都包括 3 个基本步骤：① 细菌培养和质粒扩增，② 细菌的收获和裂解；③ 质粒 DNA 的提取。

### 〔实验 8-26〕大肠杆菌质粒 DNA 的提取

#### 一、细菌生长和质粒扩增

##### (一) 实验材料

1. 带有质粒的大肠杆菌。

2. LB培养基

胰蛋白胨	10g	NaCl	10g
酵母膏	5g	加水1000ml, 调pH至7.5	

10ml分装试管, 25ml分装100ml三角瓶, 250ml分装1L三角瓶。高压灭菌。

3. 34mg/ml 氯霉素溶液 氯霉素340mg溶于10ml无水酒精中, -20℃贮存。

4. 台式振荡器等。

(二)操作步骤

1. 以无菌方法, 用接种环从平皿上挑选菌落, 接种于10ml含适量抗生素的LB培养基中。

2. 120r/min 37℃振荡培养过夜。

3. 取0.1ml培养物接入25ml含有适量抗生素的LB培养基中。

4. 120r/min, 37℃振荡过夜, 直至培养液达到对数生长后期, 其OD<sub>600</sub>约为0.6。

5. 将上述对数生长后期培养液, 接入已预热至37℃的、置250ml LB培养液的三角瓶中, 每瓶12.5ml。

6. 120r/min, 37℃振荡培养2.5h左右, 使其OD<sub>600</sub>接近0.4。

7. 每瓶中加入氯霉素溶液1.25ml。

8. 120r/min, 37℃振荡培养12~16h。

二、细菌收获

(一)实验材料

1. TES

10mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)

1mmol/L EDTA

0.1mol/L NaCl

预冷至4℃

2. 水平式离心机

(二)操作步骤

1. 上述培养物以3000r/min离心10min。

2. 弃上清液, 用冰冷的TES洗涤菌体两次。

三、菌体裂解和质粒DNA的提取

菌体裂解方法主要有煮沸法、强碱法和表面活性剂裂解法。前两者对小质粒的提取效率很高，每升培养物可制得 2~3mg，第三种方法较温和，更适用于大于 10Kb 的大质粒的提取。现在以此 3 种方法为基础又派生出若干方法。菌体裂解后，各种各样的大分子物质释放出来。质粒 DNA 的提取时既要去除质粒 DNA 以外大分子物质，特别是核酸，又要保证质粒 DNA 完整无缺。细菌染色体 DNA 与质粒 DNA 间较大的区别在于：① 分子量，大肠杆菌染色体 DNA 为  $4.6 \times 10^3$  Kb 左右，而通常用于基因工程中的载体一般均小于 10Kb；② 大肠杆菌染色体 DNA 的分子构象为线性；而所要提纯的质粒 DNA 是 cccDNA。两者的分子构象不同决定了其理化性质的不同。在加热线或碱性 (pH 12.5) 条件下，绝大多数染色体 DNA 双链分子间的氢键被破坏，而解离成单链。可 cccDNA 链间氢键需被破坏，但互补链不分离。因此，当冷却或调节 pH 至弱碱性 (pH 10.0 左右) 时，染色体 DNA 在复性过程中无法恢复其原有的结构而相互交织成巨型 DNA，而 cccDNA 可恢复其原有的构型。通过离心就可以有效地将两者分开。常用的方法中还使用苯酚变性沉淀蛋白质，用乙醇、异丙醇、正丁醇等沉淀出 DNA。

### (一) 碱变性法

在 pH 12.0~12.5 的碱性条件下，开环 DNA 和线性 DNA 变性，两条链之间的氢键断开。而 cccDNA 质粒在此碱性条件下其结构不变。当溶液的 pH 由碱性变成中性后，变性的开环 DNA 和线性 DNA 的单链又会在不同分子间互补而复性和凝聚形成一个不溶性团块，同时，菌体裂解物中的大量蛋白质在弱碱性条件下变性，经离心而易于去除。

上液中 cccDNA 质粒经 70% 乙醇沉淀而提纯。

#### 1. 实验材料

##### (1) STE

15% 蔗糖

10mmol/L EDTA

25mmol/L Tris pH8.0

高压灭菌。用前检查溶液的 pH，如 pH 低于 8.0，应加以调整。因 pH 低于 8.0 会影响溶菌酶活性。

(2) 10mol/L NaOH。

(3) 20% 十二烷基硫酸钠 (SDS)。

(4) 3mol/L 醋酸钠溶液 (pH 4.8) 取 40.8g  $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶于 60ml 水中，加 11.5ml 冰醋酸，28.5ml 水。

- (5) 异丙醇。
- (6) TE  
10mmol/L Tris     1mmol/L EDTA

- (7) 溶菌酶。
- (8) 超速离心机等。
- (9) 冰水浴。

## 2. 操作步骤

- (1) 将200mg溶菌酶溶于10ml STE中。
- (2) 用已溶有溶菌酶的STE将上述收获的菌体悬液，移至50ml离心管中。
- (3) 室温静置5min。
- (4) 加入18.6ml无菌蒸馏水，1ml 20% SDS，加入0.4ml 10mol/L NaOH。用蜡纸或盖子封盖后轻轻颠倒管子数次混匀。
- (5) 置冰浴中10min，将3mol/L NaAc 预冷。
- (6) 加入15ml冰冷的3mol/L NaAc，迅速颠倒管子数次。
- (7) 置冰水浴中60min。
- (8) 4℃下15000r/min离心20min。
- (9) 取上清液分装两个50ml离心管，每管约18ml。
- (10) 每管加0.6倍体积（约12ml）的异丙醇，充分混合，室温静置15min。
- (11) 20℃下15000r/min离心30min。
- (12) 取沉积用70%乙醇洗一次。
- (13) 去上清液，真空抽干
- (14) 用5ml TE或蒸馏水溶解，4℃存放。

由此获得的质粒DNA中还有少量的染色体DNA和RNA，需进一步纯化。

## (二) 热变性法

此法的基本原理和方法与碱变性法相似。运用适度的热处理可破坏线性DNA和开环DNA的双链结构，使其成为单链。退火后，拆开的单链DNA复性而形成大的分子结团。

### 1. 实验材料

- (1) TES

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

0.1mmol/L EDTA                      0.1mol/L NaCl

(2) 20mg/ml溶菌酶溶液 200mg溶菌酶溶于10ml 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放。

(3) 水饱和苯酚 将新出厂的分析纯苯酚在 $60^{\circ}\text{C}$  水浴中融化, 加入等积1.0mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 过夜, 吸去水层, 再用 0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 抽提至水层pH大于7.6, 加入 0.1% 8-羟基喹啉,  $4^{\circ}\text{C}$  棕色瓶中保存。

(4) 异丙醇。

(5) 70%乙醇。

(6) TE

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

(7) STET

8%蔗糖

50mmol/L EDTA

1% Triton X-100

50mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

(8) TS

500mmol/L NaCl

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

(9) 超速离心机、普通离心机等。

## 2. 操作步骤

(1) 将 500ml 培养液中获得的细菌沉积物, 用 10ml TES 悬浮, 移入 50ml 三角瓶中。

(2) 加入 1ml 溶菌酶液, 混匀, 置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中 20min。

(3) 用 2L 烧杯准备一沸水浴。准备一冰水浴。

(4) 加入 10ml STET, 室温 5min。

(5) 夹子夹住三角瓶, 置酒精灯上加热并振摇至液体沸腾。

(6) 立即将三角瓶移入沸水浴中, 放置 40s。

(7) 立即移入冰水中, 静置 5min, 让其速冷。

(8) 加入等体积的 TS, 混匀。

(9)  $-4^{\circ}\text{C}$  25000r/min 离心 30min。

(10) 取上清液, 加入等体积的水饱和苯酚, 充分混摇。

(11) 2000r/min离心5min, 使相分离。

(12) 吸出水相, 加入0.6体积的异丙醇, 充分混合,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中 30 min。

(13) 20000r/min离心15min, 收获沉淀, 并用 70% 乙醇洗涤沉淀两次。

(14) 真空抽干, 沉积溶于8ml TE 中  $4^{\circ}\text{C}$  存放备用。

由此获得的质粒DNA已相对较纯, 此法也可按比例缩小成总提取容积在1.5ml以下。

### (三) 微量快速提取法

#### 1. 实验材料

##### (1) 碱性SDS溶液

0.3mol/L NaOH                      2% SDS

##### (2) 酸性苯酚/氯仿

苯酚 (A·R)	5g	水	1ml
氯仿 (A·R)	5ml	8-羟基喹啉	5mg

(3) 3mol/L醋酸纳 40.8g  $\text{NaAc}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶于60ml开水中, 加 11.6ml冰醋酸, 28.5ml水。

(4) 异丙醇。

(5) TE

10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

(6) 70%乙醇。

(7)  $70^{\circ}\text{C}$ 水浴。

(8) 液体混合振荡器。

(9) 1.5ml塑料离心管, 微量移液器等。

(10) 1.5ml台式高速离心机。

#### 2. 操作步骤

(1) 取10ml培养物, 离心收获菌体并洗涤。

(2) 菌体用500 $\mu\text{l}$ TE悬浮, 移至1.5ml离心管内。

(3) 加入250 $\mu\text{l}$ 碱性SDS溶液。

(4) 立即用液体混合振荡器充分混合。

(5) 打开离心管盖, 70℃放置15min, 在水浴中冷却至室温(大于20Kb的质粒最好放在55℃水浴中30min)。

(6) 加入80μl酸性苯酚/氯仿, 用混合器振荡至液体彻底混合均匀。

(7) 台式离心机10000r/min离心2min, 取上清液(约700μl)。

(8) 加入70μl 3mol/L醋酸钠溶液, 加入700μl异丙醇, 混匀, 室温静置5min。

(9) 10000r/min离心2min, 倾净上清液。

(10) 70%冷乙醇洗涤沉淀两次。

(11) 真空抽干, TE溶解于4℃存放备用。

#### 四、质粒 DNA 的纯化

经上述方法制得的质粒 DNA 已可用于一般用途, 如电泳鉴定、转化等。但由此获得的质粒DNA溶液中仍含大量宿主细菌的RNA, 特别是 m-RNA及一些蛋白质, 同时仍含有少量开环线性质粒DNA。纯化质粒DNA的方法主要有3类。一类是凝胶过滤色谱法, 此法利用不同核酸分子间分子大小, 空间构象差异及特异吸附等将质粒DNA与RNA和Pr 分开。另一类方法是经过RNA 酶处理除去 RNA, 并用苯酚氯仿等除去蛋白质, 从而达到纯化的目的。再一种方法就是可一次获得大量高纯度质粒DNA的氯化铯密度梯度离心法。3类方法各有特点, 国内学者多采用前两种方法, 国外最新有一步纯化专利产品, 结果十分理想。

##### (一) 沉淀法

表 8-14

典型的DNA沉淀方式

沉淀剂	盐浓度	作用条件	备注
乙醇(2~2.5倍体积) 异丙醇(0.6~1倍体积)	必须在高盐条件下, 常规用0.3mol/L NaAc	-70℃, 30min, 或-20℃, 4h	用70%酒精洗去沉淀中的盐分
PEG 6000 (最终浓度为10%)	必须在高盐条件下, 常规用1mol/L NaCl	0℃, 4h	只适用于高浓度DNA
葡聚-盐酸 (最终浓度5mmol/L)	沉淀只在低盐条件下发生, 如TE缓冲液	在冰浴中或室温下15min	处理十分稀薄的样品时, 延长沉淀时间和离心时间



沉淀法是纯化质粒DNA的最常用的方法。常用的沉淀剂有乙醇、异丙醇、聚乙二醇(PEG) 6000和精胺(表8-14)。依照样品中DNA的浓度和纯度, DNA的沉淀可在瞬时完成, 或需要较少时间。

#### 精胺沉淀法:

##### 1. 实验材料

(1) 100mmol/L精胺溶液。

(2) TE:

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

(3) 0.3mol/L NaAc-10mmol/L MgCl<sub>2</sub>。

(4) 无水乙醇。

(5) 台式高速离心机。

(6) 微量移液器, 1.5ml塑料离心管等。

##### 2. 操作步骤

(1) 将待纯化的DNA用500μl TE溶解成1~50μg/ml, 移入1.5ml塑料离心管中。

(2) 加入25μl 100mmol/L精胺, 混合后置室温5min。

(3) 15000r/min, 离心2min, 倾净上清液, 再离心2s, 用微量移液器吸去残留液体。

(4) 加入300μl 0.3mol/L NaAc-10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 振荡分散沉积。

(5) 加入700μl乙醇, 混合后置室温放置1h。

(6) 15000r/min离心2min, 倾净上清液, 再离心2s, 用微量移液器吸去残留液体。

(7) 用50μl TE溶解沉积, 4℃存放。

#### PEG沉淀法:

##### 1. 实验材料

(1) TE:

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

(2) 10mg/ml RNase A溶液 RNaseA 10mg用1ml 10mmol/L Tris (pH 7.5) 15mmol/L NaCl溶解, 100℃水浴中15min, 缓慢冷却至室

温, -20℃存放。

(3) 水饱和酚(同前)。

(4) 氯仿。

(5) 20% PEG

PEG 6000                      20 g              加双蒸水溶解至100ml

NaCl                              5.84 g

(6) 预冷70%乙醇。

(7) 台式高速离心机等。

(8) 37℃水浴。

## 2. 操作步骤

(1) 用500μl TE溶解待纯化DNA沉积(浓度大于100μg/ml)。

(2) 加入2μl RNaseA, 37℃水浴中孵育1h。

(3) 加入500μl水饱和酚, 混匀器上混匀。

(4) 离心吸出水相, 再用水饱和酚抽提一次。

(5) 氯仿抽提一次。

(6) 上清液加等体积20% PEG, 混匀。

(7) 0℃, 1h。

(8) 15000r/min离心15min, 质粒DNA沉积于管底而RNA碎片留于液相中。

(9) 沉积用70%乙醇洗一次。

(10) 真空抽干。

(11) 沉积用50μl TE溶解, 4℃存放。

## (二) 色谱法

常用的基质有Sepharose 4B, Bro-Gel A150, Sephacryl S-1000, 羟基磷灰石等。目前已有快速纯化的色谱法商品, 如Neusorb和Elutip产品使用结果都十分满意, 但费用较高, 多为一次性柱。

### 羟基磷灰石柱色谱法:

#### 1. 实验材料

(1) 待纯化质粒DNA。

(2) 羟基磷灰石。

(3) B液 0.27mol/L磷酸缓冲液 (pH 6.8) -9mol/L尿素, 用前现

配。

- (4) B<sub>1</sub>液 0.01mol/L磷酸缓冲液 (pH 6.8).
- (5) B<sub>2</sub>液 0.24mol/L磷酸缓冲液 (pH 6.8) -8mol/L尿素.
- (6) B<sub>3</sub>液 0.5mol/L磷酸缓冲液 (pH 6.8).
- (7) TE<sub>1</sub>

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

(8) 玻璃色谱柱1.5×10cm.

(9) 核酸-蛋白检测仪及记录仪.

(10) 透析袋 新透析袋用前先作下列处理: 将透析袋剪切成合适长度, 加入500ml 2%碳酸氢钠和1mmol/L EDTA, 煮10min, 蒸馏水彻底冲洗, 再在蒸馏水中煮10min, 冷却后置4℃存放, 透析袋全部浸入水中, 用时用镊子或戴手套操作.

(11) 真空抽气装置, 蠕动泵等.

## 2. 操作步骤

(1) 将羟基磷灰石悬浮于B<sub>1</sub>液, 充分搅拌, 放置过夜.

(2) 用B<sub>1</sub>液洗涤两次并重新悬浮.

(3) 将色谱柱垂直固定于支架上.

(4) 将羟基磷灰石悬液真空脱气, 再装入色谱柱内, 柱床为1.5×2.0cm.

(5) 用B<sub>1</sub>液平衡2h以上. 流速为2ml/min.

(6) 调节核酸蛋白仪检测波长至260nm处, 打开核酸蛋白仪及记录仪预热0.5~2h(根据仪器要求确定).

(7) 待纯化质粒DNA用2ml双蒸水溶解, 加入18ml B<sub>1</sub>液. 色谱柱连接检测仪.

(8) 加样, 以B液为洗脱液, 流速0.5ml/min. RNA不被羟基磷灰石吸附, 记录仪可记录出一很大的吸收峰, B<sub>1</sub>液继续洗脱至峰基线平 (0)

(9) B<sub>2</sub>液继续洗脱至基线平稳.

(10) B<sub>3</sub>液洗脱, 收获吸收峰, 此为吸附上的DNA被洗脱下(图8-8).

(11) 将峰收集液移入透析袋中, 对TE透析过夜, 换液3次.

(12) 收获, 4℃存放.

凝胶色谱法:

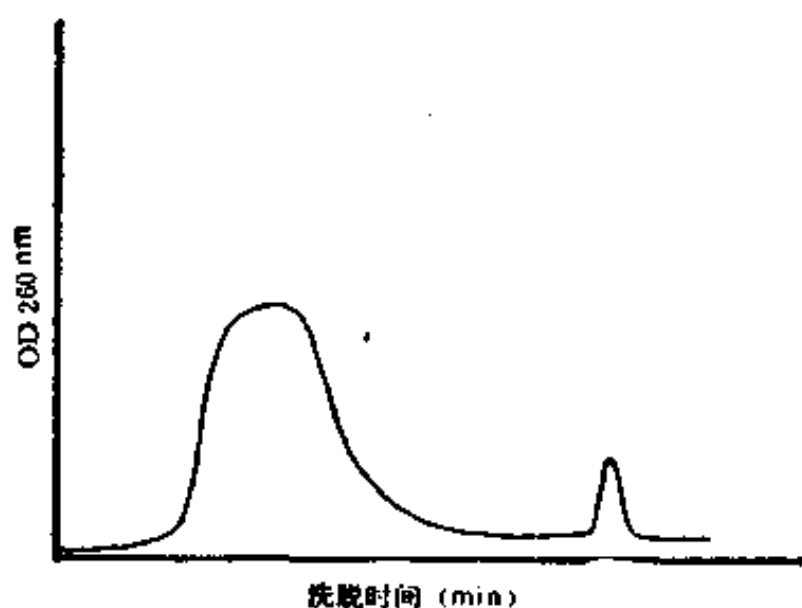


图 8-8 典型的洗脱曲线

### 1. 实验材料

- (1) 待纯化质粒DNA。
- (2) Sephacryl S-1000 (pharmacia)。
- (3) 甘油。
- (4) 洗脱液

80mmol/L Tris-HCl                      1mol/L NaCl

85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0)

- (5) 无水乙醇。

- (6) TE<sub>2</sub>

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

- (7) 玻璃色谱柱 2×45cm。

- (8) 核酸蛋白检测仪及记录仪。

- (9) 高速离心机。

- (10) 蠕动泵。

### 2. 操作步骤

- (1) 将Sephacryl S-1000悬液装入色谱柱中，凝胶床为 2.0×30cm。

- (2) 用洗脱液平衡过夜，流速1ml/min。

- (3) 调核酸蛋白检测仪至260nm部分，打开检测仪及记录仪预热0.5~2h。

- (4) 待纯化质粒DNA用洗脱液溶解成50~100μg/ml的浓度。

- (5) 取2ml质粒DNA溶液, 加0.5ml甘油, 混匀。色谱柱连接检测仪。
- (6) 加样。
- (7) 用洗脱液洗脱, 流速0.2ml/min, 收获第二峰的中段(图8-9)。
- (8) 加两倍体积的乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  过夜。
- (9) 15000r/min离心15min, 收获沉积。
- (10) 真空抽干, 溶于TE,  $4^{\circ}\text{C}$  存放。

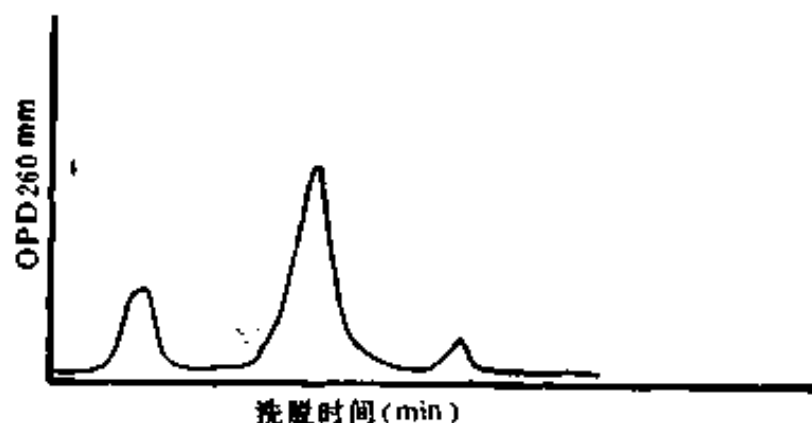


图 8-9 典型的洗脱曲线

### (三) 核糖核酸酶-酚氯仿法

#### 1. 实验材料

- (1) 待纯化质粒DNA。
- (2) RNaseA溶液 RNaseA 10mg用1ml 10mmol/L Tris(pH7.5)-15mmol/L NaCl溶解,  $100^{\circ}\text{C}$  水浴中加热15min, 缓慢冷却至室温,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放。

(3) 水饱和酚(同前)。

(4) 酚-氯仿溶液 水饱和酚与氯仿等体积混合。

(5) 氯仿-异戊醇溶液 氯仿与异戊醇以24:1混合。

(6) 5mol/L NaCl。

(7) 无水乙醇及70%乙醇。

(8) TE,

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

(9) 高速离心机等。

#### 2. 操作步骤

- (1) 将从500ml培养物中提取的质粒DNA悬于10ml TE中。

- (2) 加入50 $\mu$ l RNase溶液, 混匀。
- (3) 37 $^{\circ}$ C 1h。
- (4) 加等体积水饱和酚, 充分混匀。
- (5) 15000r/min离心10min, 收集上层水相。
- (6) 重复步骤(4)、(5)。
- (7) 取上层水相, 分别用等体积酚-氯仿及氯仿异戊醇抽提一次。
- (8) 离心取上清, 加200 $\mu$ l NaCl溶液。
- (9) 加2倍体积的无水乙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C沉淀过夜。
- (10) 15000r/min, 离心30min收获沉积。
- (11) 70%洗一次, 真空抽干。
- (12) TE溶解, 4 $^{\circ}$ C存放。

### [实验8-27] 链霉菌质粒DNA的分离与纯化

链霉菌质粒DNA的提取方法与从大肠杆菌提取质粒DNA方法相似, 可以相互借鉴, 现以小量提取法介绍提取过程。

#### (一) 实验材料

##### 1. 培养基

酵母膏	3g	葡萄糖	10g
蛋白胨	3g	蔗糖	340g
麦芽膏	3g	蒸馏水	1000ml

高压灭菌后加入无菌2.5mol/L MgCl<sub>2</sub>溶液2ml/L。

2. 所需菌株的浓孢子悬液。

3. 10%甘油。

4. 溶菌酶溶液 溶菌酶2mg溶于1ml 0.3mol/L 蔗糖-25mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) -25mmol/L EDTA (pH 8.0)-0.02% 溴酚绿。

5. 碱性SDS

0.3mol/L NaOH                      2% SDS

6. 酸性苯酚-氯仿

苯酚 (A·R)	5g	蒸馏水	1ml
氯仿 (A·R)	5ml	8-羟基喹啉 (A·R)	5mg

7. 中性苯酚-氯仿 酸性苯酚-氯仿用等体积的1mol/L Tris (pH 8.8) 平衡过夜, 再用0.5倍体积0.1mol/L Tris (pH 8.0) 平衡两次。

8. 3mol/L醋酸钠溶液 (同前)。

9. 100mmol/L精胺溶液。
10. 0.3mol/L醋酸钠-10mmol/L  $MgCl_2$ 。
11. TE
- 10mmol/L Tris (pH8.0)      1mmol/L      EDTA
12. 异丙醇。
13. 无水乙醇。
14. 1.5ml塑料离心管, 微量移液器。
15. 37℃、70℃水浴。
16. 液体混合器。
17. 台式高速离心机。
18. 旋转式摇床。
19. 布氏漏斗及抽气装置。

## (二) 操作步骤

1. 于一装有10ml培养基的100ml三角瓶内接入5 $\mu$ l浓孢子悬液。
2. 30℃振荡培养48h。
3. 在铺有两张新华1号滤纸的抽气漏斗上收集菌丝体。
4. 用5ml 10%甘油洗涤菌丝体。
5. 收获菌丝体用500 $\mu$ l溶菌酶溶液悬浮移入1.5ml塑料离心管中。
6. 37℃放置30min。
7. 加入250 $\mu$ l碱性SDS, 立即用液体混合器将液体完全混合。
8. 打开离心管盖, 70℃水浴中放置15min, 如质粒大于20Kb, 放55℃水浴, 30min。
9. 加入80 $\mu$ l酸性苯酚-氯仿。
10. 混合器振荡至液体彻底混合均匀。
11. 10000r/min离心2min。
12. 移上层液相(约700 $\mu$ l)至一新1.5ml离心管中, 加入70 $\mu$ l 3mol/L NaAc, 加入700 $\mu$ l异丙醇, 混匀。
13. 室温放置5min。
14. 15000r/min离心2min, 倾净上清液, 再离心2s, 用微量移液器吸除所有液体。
15. 用50 $\mu$ l TE重新溶解沉淀。
16. 加入5 $\mu$ l 3mol/L NaAc, 25 $\mu$ l中性苯酚/氯仿, 振荡混合两相。

17. 15000r/min离心 2min, 将上层液相转移到一新的 1.5ml 离心管中。

18. 加入50 $\mu$ l 异丙醇, 混合后离心2min, 用微量移液器除去所有的上清液。

19. 用500 $\mu$ l TE重新溶解沉淀; 加入25 $\mu$ l 100mmol/L精胺, 混合后置室温5min。

20. 15000 r/min离心2min, 倾净上清液, 再离心 2s, 用微量移液器吸除所有液体。

21. 加入 300 $\mu$ l 0.3mol/L NaAc-10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 振荡分散沉淀块, 加入700 $\mu$ l乙醇, 混匀后室温下放置1h。

22. 重复步骤20。

23. 70%乙醇洗涤一次, 真空抽干。

24. 用50 $\mu$ l TE溶解沉积, 4 $^{\circ}$ C存放。

## 二、染色体DNA的提纯

染色体 DNA 的提取也分为三步: ① 菌体的培养与收获; ② 菌体胞壁的破碎; ③ 染色体 DNA 的提取。菌体的培养与收获及质粒提取章节中描述的共同或相似, 一般都采用振荡培养方法增殖菌体。菌体胞壁的破碎则根据不同的微生物对象而有所不同。常用的方法包括化学法和物理法。一般革兰氏阴性液和某些革兰氏阳性菌用SDS溶液, 一般每克的湿菌体加10%SDS 2.5ml 于60 $^{\circ}$ C不断摇动处理10min。菌体溶解后, 则菌悬液变清且粘稠度增加。革兰氏阳性菌的破壁的最有效方法是在加入亚适量的青霉素或 D-甘氨酸的培养基中诱生菌体, 再加入一定量的溶菌酶于37 $^{\circ}$ C处理1h。金黄色葡萄球菌可用葡萄球菌自溶酶 (Lyso-staphin) 破壁; 酵母可用蜗牛酶、Zymolyase等处理; 丝状真菌多采用纤维素酶加蜗牛酶等处理。另外一种更激烈且不常使用的破碎胞壁的方法有反复冻融, 超声粉碎等。这些方法, 可切断染色体DNA分子, 使分子量变小, 在提取中不易获得DNA的丝状沉淀, 需离心收集DNA。DNA提取的方法较多, 有氯仿提取法、



苯酚提取法、氯仿-苯酚混合提取法、羟基磷灰石柱色谱法、Sephrose AB柱色谱法及氯化铯密度梯度离心法等。一般情况下多采用前3种方法。细菌的染色体DNA的提取已在第三章描述，本节着重描述链霉菌和真菌染色体DNA的提取。

### (实验8-28) 链霉菌染色体DNA的分离与纯化

#### (一) 实验材料

1. 链霉菌菌丝1g(湿重) 见(实验8-27)。

2. TE

10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)

1mmol/L EDTA

3. TES

10mmol/L Tris (pH 8.0)      100mmol/L NaCl

1mmol/L EDTA

4. SM

20mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)

100mmol/L NaCl      0.1%      明胶

1mmol/L      MgSO<sub>4</sub>

5. 5mol/L NaCl 292.2g NaCl溶于800ml水中,定容至1L,分装灭菌。

6. 30% PEG 6000.

7. 3mol/L NaAc (pH 4.8) 取40.8g NaAc·3H<sub>2</sub>O溶于60ml水中,加11.5ml冰醋酸,28.5ml水。

8. 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 186.1g EDTA二钠·2H<sub>2</sub>O,溶于800ml水中,用磁力搅拌器剧烈搅拌,加固体NaOH 20g左右,定容至1L,分装灭菌。

9. 10% SDS 10g电泳级纯SDS,加90ml水,加热至68℃助溶,加浓盐酸,调pH至7.2,定容至100ml。

10. 蛋白酶溶液 20mg蛋白酶溶于2ml水中,30℃放置10min,1ml分装,-20℃存放。

11. 水饱和苯酚溶液 参见质粒提取章节。

12. 核糖核酸酶(RNase)溶液 用SM配成1mg/ml,沸水浴处理15min,缓慢冷却至室温,分装-20℃存放。

13. 氯仿 (A·R)。
14. 无水乙醇, 70% 乙醇(A·R)。
15. 溶菌酶。
16. 旋转式摇床。
17. 30℃ 和37℃ 水浴。
18. 吸管, 玻棒等。

## (二) 操作步骤

1. 在20ml离心管中用5ml TE悬浮1g 湿菌体。
2. 加入10mg固体溶菌酶, 旋转溶解。
3. 置30℃ 孵育 15~60min (不同菌株预试确定最适处理时间, 一般方法是取一滴菌悬液至载玻片上, 加入一滴10% SDS时, 变成完全澄清时所需时间为溶菌酶最适处理时间)。
4. 加入1.2ml 0.5mol/L EDTA, 轻轻混合。
5. 加入0.13ml蛋白酶溶液, 小心混合。
6. 30℃ 孵育5min。
7. 加入0.7ml 10% SDS, 立即斜摇混匀。
8. 37℃ 孵育2h。
9. 加入6ml水饱和酚, 室温下用手摇匀10min。
10. 加入6ml氯仿, 室温下摇匀5min。
11. 3000r/min离心10min。
12. 用玻璃滴管小心地吸取上层水相至一新离心管中。
13. 下层苯酚相中加入5ml TES, 轻摇5min。
14. 重复步骤11-12。
15. 合并二次上层水相, 重复步骤9~12两次。
16. 加入6ml氯仿, 室温下摇动5min。
17. 3000r/min离心5min。
18. 用滴管小心移出上层水相。
19. 加入6ml氯仿, 室温下摇动5min, 3000 r/min离心5min, 小心移出上层水相。
20. 加入RNA酶至终浓度100μg/ml。
21. 37℃ 孵育2h。
22. 加入0.25倍体积的5mol/L NaCl, 轻轻混匀。



## 12. TE

10mmol/L Tris (pH8.0)                      1mmol/L                      EDTA

13. 3.0mol/L NaAc溶液 (pH4.6).

14. 离心机。

15. 台式振荡器。

16. 玻棒滴管等。

### (二) 操作步骤

1. 酿酒酵母接入PYG培养液中, 24℃振荡培养20h。

2. 离心收集菌体。

3. SE离心洗涤菌体两次。

4. 每克湿菌体用4ml 50mmol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 9.5) -2.5% 2-巯基乙醇液悬浮, 25℃, 静置30min。

5. 3000r/min离心10min收获菌体。

6. 沉积用ST洗涤1次。

7. 加入5ml Zymolyase溶液, 悬浮菌体。

8. 37℃水浴中孵育, 不时轻轻搅动, 以悬浮菌体。

9. 待原生质体形成充分后, 5000r/min离心15min收获原生质体。检查原生质体形成是否充分的方法可采用相差显微镜下计算法, 原生质体形成率大于95%即可。也可按下列步骤进行: 取菌液1~2滴, 加入4ml蒸馏水中, 混匀, 再滴加数滴20% SDS, 如浊度很快消失, 则原生质体形成良好。一般酶处理时间在1~3h)。

10. 加入4ml SE悬浮原生质体, 加入20% SDS 0.2ml, 混匀, 室温放置10min。

11. 加入4ml水饱和酚, 2ml氯仿-异戊醇, 用滴管立即轻轻反复吹吸5min。

12. 3000r/min离心10min, 用滴管小心吸出上层水相移至另一离心管中。

13. 加入4ml氯仿-戊醇, 用滴管轻轻反复吹吸1min, 3000r/min离心10min, 用滴管小心吸出上层水相, 重复两次。

14. 吸出上层水相, 加RNase至终浓度为100μg/ml, 37℃孵育1h。

15. 重复步骤13。

16. 吸出上层水相, 加入0.5ml/L醋酸钠和10ml无水乙醇, 混合。

17. 用玻棒缠绕出丝状沉淀的DNA。
18. 加入2ml 70%乙醇洗涤DNA沉淀。
19. 风干，用5ml TE溶解DNA沉淀，4℃存放。

### 三、DNA和RNA的定量测定

测定样品中DNA和RNA含量的方法主要有两种。如果样品纯度好(如无明显的蛋白质、苯酚、琼脂糖或其他核酸的污染)，利用碱基在特定波长的紫外线上的吸收与核酸浓度呈正比，可对DNA及RNA进行紫外吸收法定量测定。此方法简便易行且准确可靠。作RNA或DNA定量测定时，一般需读出溶液在260nm和280nm的吸光度。以260nm读数估算样品中核酸浓度。当在1×SSC中260nm处的吸收 $OD=1.0$ 时，双链DNA浓度被定义为50 $\mu\text{g/ml}$ ；单链DNA和RNA为40 $\mu\text{g/ml}$ ；寡聚核苷酸20 $\mu\text{g/ml}$ 。也有以320nm的OD值校正260nm OD值的： $OD_{260}$ 校值=1.043 $OD_{320}$ 。以 $OD_{260}$ 与 $OD_{280}$ 的比值估计核酸的纯度。纯DNA或RNA的 $OD_{260}/OD_{280}$ 应分别为1.8和2.0。习惯上，有将DNA或RNA含量直接以OD单位表明，如50 $\mu\text{g}$ 双链DNA被称为1.0OD。

当DNA的量不够进行分光光度测定(少于250 $\mu\text{g/ml}$ )，或样品中存在吸收紫外光的物质时，可利用溴化乙锭嵌入DNA分子中并能发出紫外诱导的荧光来定量测定DNA。荧光量与DNA总量成正比，通过一系列标准样品的荧光相比较，就可达到定量测定。该法可检测出1~5 $\mu\text{g/ml}$ 的DNA(总量在1~5 $\mu\text{g}$ )。(方法有塑料薄膜法和微型胶法，主要用于双链DNA含量测定。

#### (实验8-30) DNA的定量测定

##### 一、紫外分光光度法

##### (一) 实验材料

1. 待测DNA样本(见质粒DNA及染色体DNA提取章节)
2. 测定剂

钼酸铵	0.25 g	过氯酸	2.5ml
-----	--------	-----	-------

去离子水至100ml

3. 紫外分光光度计。

### (二) 操作步骤

1. 接通电源，打开汞灯，调波长为260nm，预热紫外分光光度计1h。

2. 取2支离心管，各加入0.2ml待测DNA样本，加0.2ml去离子水于甲管，加0.2ml沉淀剂于乙管，摇匀。

3. 置4℃冰箱中放置30min，离心去乙管沉淀。

4. 用光程为1cm的石英比色杯，以乙管为空白，调零和100%。

5. 适当稀释甲管，使OD<sub>260</sub>在0.1~1.0之间。

6. 按下式计算DNA含量：

$$\text{DNA含量} (\mu\text{g/ml}) = \text{甲管的OD}_{260} \times m \times n$$

式中  $m$ ——100中DNA含量。双链DNA为50 $\mu\text{g}$ ，单链为40 $\mu\text{g}$ ，寡聚核苷酸为20 $\mu\text{g}$

$n$ ——稀释倍数

## 二. 溴化乙锭-塑料薄膜法

### (一) 实验材料

1. 食品保鲜膜。

2. 待检DNA样品。

3. 标准浓度DNA样品。

4. 2 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭溶液 用蒸馏水配制10 $\mu\text{g/ml}$ 贮存液贮存棕色瓶中，用前用TE配成2 $\mu\text{g/ml}$ 应用液。注意：溴化乙锭为强诱变剂，操作时务必戴手套及口罩。

5. 紫外透射仪。

6. 2~20 $\mu\text{l}$ 微量移液器。

### (二) 操作步骤

1. 在紫外透射仪上覆盖一块食品保鲜膜。

2. 用微量移液器点加2 $\mu\text{l}$ 未知浓度的DNA样品。

3. 将标准浓度DNA用TE作系列稀释 (0.5~20 $\mu\text{g/ml}$ )。

4. 按浓度次序点加系列样品的DNA标准浓度DNA样品2 $\mu\text{l}$ 。

5. 于每一只中，加入2 $\mu\text{l}$ 溴化乙锭，混匀。

6. 在短波紫外光下观察(戴带玻璃眼镜)，并比较荧光强度，计算样品DNA的浓度。

## 四、遗传转化

转化是指受体细胞直接摄取供体细胞游离的 DNA 片段，将其同源部分进行碱基配对，组合到自己的基因中，从而获得供体细胞的某些遗传性状。在转化过程中，转移的 DNA 片段称为转化因子。转化因子分子量一般在 $10^7$ 道尔顿，多半为双链 DNA，最多不超过60个基因。转化的形式主要有染色体 DNA 转化感受态细胞；质粒 DNA 转化感受态细胞；原生质体转化等。除原生质体转化外，受体上有处于感受态时，才能摄取转化因子。处于感受态的细胞是因为其表面有一种吸附 DNA 的受体。感受态一般出现在对数生长期的后期，维持几分钟至 3~4h，如需氧芽孢杆菌和嗜盐杆菌等，而大肠杆菌的感受态发生在对数生长期的早期与中期。

染色体DNA转化过程大致如下：① 转化因子吸附在细胞壁上，② 双链DNA被降解为单链，③ 单链DNA被摄入细胞内，④ 单链DNA与受体细胞染色体的相应部分形成供体-受体复合物，置换下染色体上相应部分的DNA并被消化，⑤ 经 DNA 多聚酶与连接酶的作用，供体DNA整合到受体染色体上。

在重组以后，染色体上就有一段其两股 DNA 序列不一样，其中一股属受体原有的，另一股为外来的。这二股不完全互补。所以，在复制时，二股各自复制成二条不同的双链。经分裂分

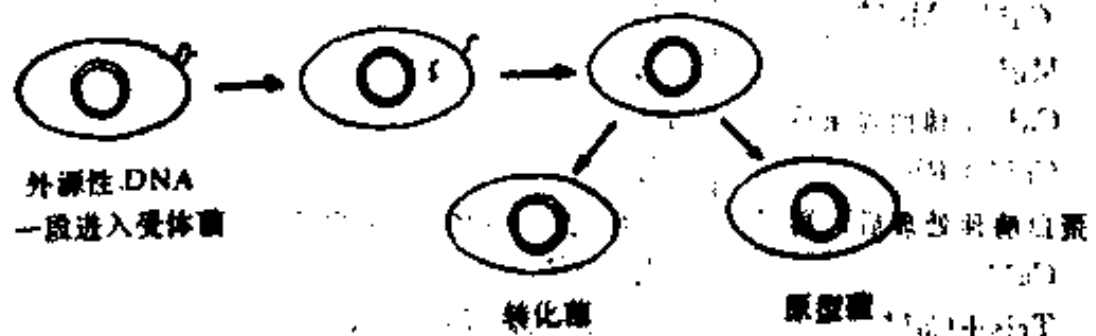


图 8-10 基因转化模式图

离，二个细胞中，一个带有供菌的DNA片段，获得新的性状；

另一个仍维持原来的性状 (图8-10)。

一般细菌只能摄入同种或种属近缘的转化因子, 但需氧芽孢杆菌还可摄入RNA, 链球菌可摄入哺乳动物的DNA。常见的转化系统参见表8-15。

表 8-15 常用的遗传转化系统

感受态诱导	微生物	备注
自然条件	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptococcus sanguis</i> <i>Anacystis nidulans</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Methylobacterium organophilum</i> <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Thiobacillus thioparus</i>	需寡聚质粒DNA或重组体  存在摄取顺序  需辅助噬菌体
人工诱导(完整细胞) 1. 二价阳离子系统: $Ca^{2+}$  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ $Mg^{2+}$ $Ca^{2+} +$ 辅助噬菌体 $Ca^{2+} + Rb^+$ 蛋白酶预处理后, 再用 $Ca^{2+}$ $Tris + Ca^{2+}$  2. 单价阳离子系统: PEG+ $Li^+$ / $Ca^+$ / $Rb^+$	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Rhizobium meliloti</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Alcaligenes eutrophus</i> <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> <i>S. cerevisiae</i>	



续表

感受态诱导	微生物	备注
3. 冻融系统:	<p><i>Agrobacterium tumefaciens</i>  <i>E. coli</i>  <i>Rhizobium leguminosarum</i>  <i>Rhizobium meliloti</i></p>	
4. Triton处理: 人工诱导 (PEG/原生质体)	<p><i>S. cerevisiae</i>  <i>Bacillus cereus</i>  <i>B. subtilis</i>  <i>B. stearothermophilus</i>  <i>B. thuringiensis</i>  <i>Brevibacterium lactofermentum</i>  <i>Clostridium acetobutylicum</i>  <i>Staphylococcus carnosus</i>  <i>Streptococcus faecalis</i>  <i>Streptococcus lactis</i>  <i>Streptomyces antibioticus</i>  <i>Streptomyces coelicolor</i>  <i>Streptomyces griseus</i>  <i>Streptomyces lividans</i>  <i>Streptomyces parvulus</i>  <i>Alcaligenes eutrophus</i>  <i>Aspergillus nidulans</i>  <i>Cephalosporium acremonium</i>  <i>Neurospora crassa</i>  <i>S. cerevisiae</i>  <i>Schizosaccharomyces pombe</i></p>	<p>需二步培养</p>
人工诱导(原生质体系统)	<p>1. 完整细胞</p> <p><i>E. coli</i>  <i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i></p> <p>2. 原生质体</p> <p><i>Streptomyces lividans</i>  <i>Neurospora crassa</i>  <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	

## 〔实验8-31〕质粒DNA转化感受态大肠杆菌

### (一) 实验材料

1. PBR322 DNA、待转化质粒DNA (按质粒提取章节提纯或从有关部门购置)。

2. 大肠杆菌HB101。

3. 0.1mol/L  $\text{CaCl}_2$ 。

4. 2.5mol/L  $\text{MgCl}_2$ 。

5. L-肉汤

胰蛋白胨	10g	葡萄糖	1g
酵母膏	5g	蒸馏水	1000ml
NaCl	5g		

6. 加有抗生素的L-琼脂培养基平板。

7. 37℃摇床及孵箱。

8. 分光光度计。

9. 离心机。

10. 冰浴。

11. 微量移液器等。

### (二) 操作步骤

1. 从L-琼脂平板上挑取新鲜菌落接入10ml L-肉汤中, 37℃培养过夜。

2. 取0.5ml培养物接入50ml L-肉汤中, 无菌添加0.4ml 2.5mol/L  $\text{MgCl}_2$ , 于37℃振荡培养。

3. 将0.1mol/L  $\text{CaCl}_2$ 溶液、试管及吸管在冰浴中冷却。

4. 当培养物  $\text{OD}_{600}$  在 0.5~0.8左右时, 开始收获细胞 (大约需2~2.5 h)。

5. 将培养物置冰浴中冷却10min。

6. 取10ml培养物置2个冷离心管中, 4℃, 3000r/min 离心10min, 弃去上清液。

7. 加入1ml 0.1mol/L  $\text{CaCl}_2$ , 用手指轻弹管壁悬浮细胞, 再加入9ml 0.1mol/L  $\text{CaCl}_2$ 。

8. 置冰浴中放置20min。

9. 3000r/min离心10min(4℃), 弃去上清液。

10. 加入1ml 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub>,重新悬浮细胞,置冰浴中保存。
11. 在每个插在冰上的试管中加入0.1ml上清细胞悬液(每管一个转化试验)。设立无DNA对照和已知量PBR322转化的对照。
12. 加入1~20μl DNA溶液。
13. 在冰上放置20min。
14. 在37℃处理2min。
15. 再插入冰中,加入0.9ml L-肉汤。
16. 37℃静置培养90min。
17. 以不同的量涂布选择培养基平板。
18. 于37℃培养过夜,鉴定转化菌落。

### (实验8-32) 质粒DNA转化啤酒酵母

#### (一) 实验材料

1. 啤酒酵母。
2. 质粒DNA 为酵母质粒 YRP7 的衍出质粒,含有一卡那霉素抗性基因Tn903, PBR322, 2μm质粒启动子,和外源酵母染色体 DNA片段。
3. YEPD

酵母膏	10 g	葡萄糖	20 g
蛋白胨	10 g	水1000ml, pH 5.3	

琼脂平板加20%琼脂。高压灭菌。

4. 卡那霉素 用蒸馏水配成25mg/ml,过滤除菌,分装,于-20℃保存。

#### 5. TE

10mmol/L Tris-HCl (pH7.5)

1mmol/L EDTA

高压灭菌。

6. 无菌蒸馏水。

7. 0.2mol/L LiAc, 高压灭菌。

8. 70% PEG4000, 高压灭菌。

9. 30℃及42℃水浴。

10. 30℃孵箱。

11. 台式振荡器。

12. 液体混合仪。

13. 微量移液器等。

## (二) 操作步骤

1. 接种啤酒酵母于含100ml YEPD液体培养基的500ml三角烧瓶中。
2. 30℃振荡培养至对数生长期后期 ( $OD_{610nm}$  在4~8), 大约需18~24 h。
3. 2000r/min离心5min, 收获细胞并用TE洗涤两次。
4. 用TE悬浮细胞成 $2 \times 10^8$ 个/ml。
5. 取0.5ml细胞悬液与0.5ml 0.2mol/L LiAc混合。
6. 30℃振荡培养1 h。
7. 取0.1ml细胞悬液加入10 $\mu$ g质粒DNA (1030 $\mu$ l), 混匀。
8. 30℃静置30min。
9. 加入等体积70% PEG 4000。
10. 立即在液体混合仪上充分混匀。
11. 30℃孵育1 h。
12. 42℃孵育5min。
13. 立即用无菌水离心洗涤2次。
14. 用1.0ml无菌水悬浮。
15. 取适量在添加100 $\mu$ g/ml卡那霉素的YEPD平板上涂布。
16. 30℃培养24~48 h。

此法的最大优点是不需对受体菌株预先进行遗传改良。转化子经卡那霉素的选择作用可直接被选出。

## 五、DNA的琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳可用来分离、纯化、鉴定不同分子量大小和不同形状的DNA分子, 且操作快速, 直接显示DNA在凝胶中的位置, 并可在紫外线下检测出凝胶中少至1 $\mu$ g的DNA。

琼脂糖凝胶电泳结果取决于琼脂糖浓度、凝胶电泳缓冲液、电泳所用电流强度、DNA分子的大小和构象、碱基组成和电泳温度、掺入性色素的存在以及电场方向等诸因素。凝胶状况是很难准确重复的, 因而很关键的是每一个DNA样品电泳时要有合适妥当的标准对照。

### (一) 影响DNA在琼脂糖凝胶的电泳迁移率的因素

1. DNA分子大小与构象 电泳时线性双螺旋 DNA 分子是以头尾位向前迁移的, 迁移率与其分子量的对数成反比。分子量相同的共价、闭合、环状DNA (cccDNA)、有缺刻的(即开环DNA) 和线性 DNA, 在琼脂糖凝胶中的迁移率不同。其相对迁移率主要取决于琼脂糖浓度, 此外也受电流强度、缓冲液离子强度、溴化乙锭的存在及含量、cccDNA超螺旋扭曲度的影响(表8-16)。在通常情况下, 琼脂糖为1%时, cccDNA 分子泳动最快, 线性DNA次之, ocDNA最快。

2. 琼脂糖凝胶浓度 一定大小的DNA片段, 通过不同浓度的琼脂糖凝胶时, 其迁移率不同, 胶越浓, 迁移率越低, 分辨率也相应发生改变。DNA 电泳迁移率 ( $\mu$ ) 的对数值与凝胶浓度 (C) 间存在着线性关系。

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \cdot C$$

式中 $\mu_0$ 为无介质支持时的自由电泳迁移率, 对特定 DNA 分子是一个常数;  $K_r$ , 阻滞系数, 为与凝胶性质、电泳分子大小及

表 8-16 常用的凝胶条件分离DNA分子的有效范围

缓冲液	琼脂糖浓度 (%)	电压/cm (V)	电泳时间 (h)	适用的DNA分子大小(Kb)	相同DNA cccDNA与线性结构的相对位置
TAE	1	4	4	0.5~20	cccDNA较线性DNA快
TAE	1	1	16	1~30	cccDNA较线性DNA快
TBE	0.7	10	1.5	0.5~5	10Kb ccc DNA泳动速度相当于20Kb线性DNA
TBE	1.4	10	1.5	0.08~2	cccDNA难以进入凝胶

空间构象有关的常数。常用的凝胶条件分离 DNA 及不同浓度的琼脂糖凝胶分离DNA分子的有效程度分别见表 8-16 和表 8-17。一般而言, 使用低浓度琼脂糖时, 大片段 DNA 分辨清楚, 小片段形成扩散带; 反之, 使用高浓度琼脂糖时, 大片段 DNA 分辨

不清楚，小片段形成狭窄带。

表 8-17 不同浓度的琼脂糖凝胶分离线性DNA分子的有效范围

琼脂糖浓度(%)	有效分离范围(Kb)
0.3	60~5
0.6	20~1
0.7	10~0.8
0.9	7~0.5
1.2	6~0.4
1.5	4~0.2
2.0	3~0.1

3. 溴化乙锭 在pH 7.9以上时，溴化乙锭分子带正电荷，向负极泳动。它与DNA分子结合后，改变DNA电荷性质和空间构象等，平均可使DNA电泳迁移率降低至少15%，特别是cccDNA因溴化乙锭使用浓度不同会改变cccDNA、ocDNA、展线性DNA在凝胶中的相互位置。因此，如果需精确确定DNA的分子量或需快速鉴定DNA的性质，一般在电泳过程中不加溴化乙锭，而在电泳结束后再置0.5 $\mu$ g/ml溴化乙锭水溶液中染色。

4. 电泳缓冲液 在琼脂糖凝胶电泳中常用的电泳缓冲液主要为TAE (Tris-醋酸) 和TBE (Tris-硼酸)。TAE缓冲液很容易发生缓冲能力下降，当电泳时间长时，需循环缓冲液；TBE比TAE电导率低，可在高压下电泳，但加样量较TAE少。

## (二) 琼脂糖凝胶电泳中常用试剂及配制

1. 电泳缓冲液 常用于琼脂糖凝胶电泳的缓冲液见表8-18，以TBE最为常用。

2. 加样缓冲液 (5 $\times$ )

60%蔗糖液(高压灭菌)      100mmol/L EDTA (pH8.0)

表 8-18

常用电泳缓冲液及配方

缓冲液	工作浓度	贮液配方
TAE	0.04mol/L Tris-HAc 0.002mol/L EDTA	50×: Tris 242g 冰醋酸57.3ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 200ml 加水至1000ml
TBE	0.089mol/L Tris 0.089mol/L 硼酸 0.002mol/L EDTA	5×: Tris 54g 硼酸 27.5g 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 20ml 加水至1000ml

## 0.25% 溴酚蓝

适宜浓度的DNA样与加样缓冲液以4:1混合。

3. 琼脂糖 包括普通琼脂糖和低熔点琼脂糖，一般DNA时皆用前者。

4. 10mg/ml 溴化乙锭染色液 戴好乳胶手套及口罩，称取100mg溴化乙锭，加入10ml水，磁力搅拌数小时，使其充分溶解，转移至棕色瓶内，4℃保存。使用浓度一般为0.5~1.0μg/ml。

5. 1mol/L MgSO<sub>4</sub>溶液。

## (三) 琼脂糖凝胶的制备(以1%凝胶为例)

1. 在150ml 1×TAE中加入7.5μl 10mg/ml 溴化乙锭，配成TAE-EB(注意戴手套)。

2. 称取1.5g 琼脂糖，加入其中。

3. 文火煮沸，不断搅拌至琼脂糖全部熔化。

4. 将琼脂糖溶液冷却至45~50℃。

5. 在平铺的食品保鲜膜上，将凝胶填板放水平，然后安放两端的胶框和梳子，梳齿底部与底板之间留有约1mm的间隙。

6. 将少许琼脂糖液加入两端胶框底部及侧面，室温放置5 min，使琼脂糖凝固而封漏。

7. 将余下的琼脂糖液根据所需凝胶的厚度一次性倒入胶框内，放置30 min。

8. 小心取出梳子。

### 〔实验8-33〕质粒DNA的琼脂糖凝胶电泳

#### (一) 实验材料

1. 琼脂糖(电泳级)。
2. 电泳缓冲液 1×TBE，以5×TBE与蒸馏水以1:4混合。
3. 质粒DNA提取物(参见质粒提取章节)。
4. 加样缓冲液。
5. 10mg/ml 溴化乙锭溶液。
6. 1mol/L  $MgSO_4$ 溶液。
7. 稳压电源。
8. 电泳仪。
9. 水平电泳槽。
10. 紫外透射仪。
11. 乳胶手套，眼镜。
12. 50℃水浴，电炉。
13. 微量移液器。
14. 照相机及近摄影装置。
15. 暗房。

#### (二) 操作步骤

1. 以1×TBE配制1%琼脂糖溶液(质粒DNA电泳时常用1%琼脂糖浓度，可根据质粒DNA大小确定琼脂糖浓度)。
2. 置50℃水浴中冷却。
3. 将胶槽组装好、放平，一次性倒入琼脂糖溶液，室温放置30 min。
4. 将胶槽移入电泳槽中，去两端胶框。
5. 加入1×TBE至液面超过胶平面约1 mm。
6. 小心去掉梳子。
7. 打开稳压电源。



8. 在质粒DNA样品中混合0.25倍体积的加样缓冲液。
9. 用微量移液器加样，加样量根据梳孔大小及凝胶厚度等确定，一般为5 $\mu$ l，DNA含量在20~200ng。
10. 连接电极与电泳仪，近加样孔侧电极为负极（黑板标志）；远加样孔侧为正极（红色标志）。
11. 接通电源并选择正确电压。一般为 $\leq 5$ V/cm，常用80V电压。电泳过程中温度会升高，一般不会对电泳结果产生影响。如室温偏高，可连接冷却装置。
12. 电泳至溴酚蓝泳动靠近凝胶底线（一般15cm长的凝胶，80V下电泳，常需时间1.5~2h）。
13. 切断电源，关掉稳压电源。
14. 戴好手套，以1 $\times$ TBE配成100ml 0.5 $\mu$ g/ml溴化乙锭溶液。
15. 将泳毕凝胶连同胶框一起浸入0.5 $\mu$ g/ml溴化乙锭溶液中30~45min。
16. 取一块保鲜薄膜，将凝胶及胶框移至其上，放至紫外透射仪上面。

17. 打开长波紫外灯（300~360nm）进行观察。溴化乙锭具有可插入DNA或RNA碱基群中的基团。这一基团的结合部分与碱基很接近，使其与核酸结合后较游离于液体中的染料表现出更强的荧光，DNA所吸收及传给溴化乙锭的260nm紫外光线结合的溴化乙锭吸收的300nm与360nm射线，均在可见光的橙红光区以590nm波长发射出来。

18. 摄影，记录结果（参见第一章）。

溴化乙锭可预先掺入凝胶及电泳液中，使用浓度为0.5 $\mu$ g/ml，电泳结果后可直接观察。但电泳时间较长。另外，如背景着色较深，可将凝胶浸入1mmol/L MgSO<sub>4</sub>中1h，粗提质粒DNA典型的凝胶电泳图谱如图8-11所

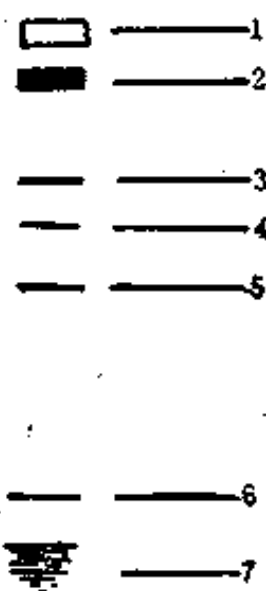


图8-11 质粒DNA粗提物凝胶电泳图谱  
1—原点 2—染色体DNA 3—ccDNA 4—线性DNA 5—cccDNA 6—溴酚蓝 7—RNA

示。电泳时可在凝胶一侧或两侧加上分子量标准。常用的DNA分子量标准有 $\lambda$ DNA Hind III, pBR322 EcoRI 酶切分子量标准, 可从有关部门购得。

## 六、DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 在分子分离与鉴定上占有极为重要的地位。对DNA而言, PAGE对于长度小于1Kb的DNA片段分离效果很好, 同时用于制备目的荷载能力也高。但使用率显然比琼脂糖凝胶电泳低得多。

### (一) PAGE中常用试剂及配制

#### 1. 30%丙烯酰胺贮液

丙烯酰胺 (A.R)	29 g	甲叉双丙烯酰胺	1 g
------------	------	---------	-----

蒸馏水加至100ml

丙烯酰胺有神经剧毒作用, 操作时应戴好手套和口罩。切勿吸入或接触皮肤。

#### 2. Tris-硼酸盐缓冲液 (TBE)

10×: Tris	54 g	硼酸	27.5 g
-----------	------	----	--------

0.5mol/L EDTA (pH8.0) 20ml

水加至500ml。

3. 10%过硫酸铵 (APS) APS 0.1 g 溶于1ml蒸馏水中。新配现用。

#### 4. 四甲基乙二胺 (TEMED)。

#### 5. 加样缓冲液 (5×)

60%蔗糖液(高压灭菌)	0.25%	溴酚蓝
--------------	-------	-----

100mmol/L EDTA (pH8.0)

#### 6. 10mg/ml溴化乙锭染色液。

### (二) 聚丙烯酰胺凝胶的配方

以配制100ml为例, 不同浓度的配方及其分辨见表8-19。

### (实验8-34)DNA的聚丙烯酰胺凝胶电泳

表 8-19 不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶的有效分辨范围与配方

	聚丙烯酰胺凝胶浓度(%)						
	3.5	4	5	6	8	12	20
有效分辨范围 (bp)	100~1000	90~800	80~500	70~400	60~400	40~200	10~100
配方 10×TBE(ml)	10	10	10	10	10	10	10
30% 丙烯酰胺 (ml)	11.6	13.3	16.6	20	26.6	40.0	68.6
蒸馏水	77.7	76	72.7	69.30	62.7	49.3	22.7
10% APS (ml)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
TEMED (μl)	30	30	30	30	30	30	30
总量 (ml)	100	100	100	100	100	100	100
溴酚蓝移动位置 (bp)	100	90	65	50	45	20	12

(一) 实验材料

1. 30% 丙烯酰胺。
2. 10×TBE。
3. 10% 过硫酸铵。
4. TEMED。
5. 加样缓冲液 (5×)。
6. 10mg/ml 溴化乙锭。
7. 1% 琼脂糖。
8. 蒸馏水。
9. 10% SDS 待检 DNA 样品。
10. 垂直板电泳槽。
11. 电泳仪、稳压电源。
12. 真空装置。
13. 紫外透射仪。
14. 近摄相机等。
15. 微量加样器及移液器。

(二) 操作步骤

1. 将垂直板电泳槽用 0.1% SDS 清洗, 再用蒸馏水彻底冲洗, 凉干。
2. 熔化 1% 琼脂糖, 熔化后冷至 60℃ 左右。

3. 组装好电泳槽，放平并垂直。
  4. 用滴管吸加1%琼脂糖溶液，对电泳槽底部及两侧封漏。室温放置10min。
  5. 计算所需30%丙烯酰胺，10× TBE和水的量，按表8-19配成所需体积，如100ml，置一抽气瓶中。
  6. 抽气5min左右。
  7. 加入10% APS，旋摇均匀。
  8. 加入TEMED，旋摇均后立即倒胶（如果电泳槽封漏不好，可将凝胶液置4℃存放，用1%琼脂糖封漏后，重新倒胶）；多余的胶液在4℃存放。
  9. 立即插入梳子，小心不要使梳齿下形成气泡。
  10. 室温下缩合1~4h。如果凝胶收缩厉害，可补加剩下的胶液。
  11. 小心取出梳子，用1×TBE冲洗加样孔。
  12. 将上、下电泳槽装满1×TBE
  13. 用微量加样器吸取已添加0.25体积加样缓冲液的DNA样品，加至加样孔中。加样量通常为10~25 $\mu$ l，DNA在0.5×0.2cm加样孔中可加达1 $\mu$ g。
  14. 打开稳压电源，连接好电极线路。上槽电极为负极，下槽电极为正极。
  15. 打开电泳仪，按需要调节电泳电压，一般用1~8V/cm进行电泳。
  16. 泳毕，从电泳槽中取下玻板，浸入0.5 $\mu$ g/ml溴化乙锭+1×TBE液中浸泡45min（戴好乳胶手套）。
  17. 小心取出凝胶（凝胶脆而滑），放置于食品保鲜薄膜上，去掉玻板。
  18. 打开紫外透射器，观察并照相记录结果。
- 聚丙烯酰胺可使溴化乙锭荧光减弱，一般难以测出少于10 $\mu$ g DNA的区带。

#### 〔实验8-35〕从凝胶中回收纯化DNA片段

从琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶中分离特定大小的DNA片段的方法主要是电泳洗脱法。因绝大多数市售的琼脂糖中皆含有硫酸化的多糖，它对限制性核酸内切酶、连接酶、聚合酶及激酶等是一潜在的抑制剂，而且可与DNA同时从凝胶中提取出来，因此如果回收的DNA片段用于克隆、体外

扩增等目的，最好从聚丙烯酰胺凝胶中分离DNA，其次可从低熔点琼脂糖中回收。尽量不直接用琼脂糖凝胶回收。

### 一、透析袋中电泳洗脱法

#### (一) 实验材料

1.  $1\times$ TBE。
2. 苯酚/氯仿。
3. 乙醇或异丙醇。
4. TE。
5. 紫外透射仪。
6. 平端不锈钢药勺。
7. 手术刀片。
8. 透析袋。
9. 水平电泳槽及电泳仪。

10. 硅化玻璃棉。

11. 1ml塑料吸嘴。

12. 平塑料夹。

#### (二) 操作步骤

1. 按常规进行琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳。如电泳在没有溴化乙锭条件下进行，则将凝胶在含  $1\sim 5\mu\text{g}/\text{ml}$  溴化乙锭的电泳缓冲液中浸染  $10\sim 15\text{min}$ 。

2. 在长波紫外线 ( $300\sim 360\text{nm}$ ) 下确定要回收的DNA条带。

3. 用锋利的手术刀片小心切下所需DNA片段的胶条，胶条的体积应尽可能缩小。

4. 将透析袋一端夹好，装入4ml的 $1\times$ TBE。

5. 用平端不锈钢药勺把切下的胶条放入透析袋内。

6. 轻轻挤压透析袋，除去大部分缓冲液和气泡，在靠近胶条的另一端将透析袋夹好。

7. 将透析袋浸没在水平电泳槽中的浅层 $1\times$ TBE中，以  $10\text{V}/\text{cm}$  电泳洗脱  $2\sim 3\text{h}$ 。

8. 长波紫外线下鉴视，如胶条上看不到荧光，则在沿透析袋内壁上观察到紫外荧光，洗脱完毕。

9. 轻轻挤压透析袋，以使DNA从管内壁脱下。

10. 打开透析袋的一端，吸出其内的缓冲液，用小体积  $1\times$ TBE 洗涤透析袋。

11. 如果电泳洗脱液中有残留的凝胶颗粒，则取1ml的塑料吸嘴，去掉少许尖头部分，在其尖端填入些硅化玻璃棉，使电泳洗脱下来的DNA溶液通过，以去除残留的凝胶颗粒。

12. 收集液用苯酚/氯仿抽提两次。

13. 加2倍体积的无水乙醇沉淀回收DNA。

14. 沉淀加入200 $\mu$ l蒸馏水重悬，加入25 $\mu$ l 3mol/L醋酸钠，再加450 $\mu$ l乙醇沉淀DNA。

15. 用70%乙醇漂洗沉淀。

16. 真空抽干，加少许TE溶解，4 $^{\circ}$ C存放。

## 二、低熔点琼脂糖凝胶中DNA的分离

### (一) 实验材料

1. 低熔点琼脂糖。

2.  $1\times$ TBE。

3. TE

20mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

1mmol/L EDTA

4. 水饱和苯酚、酚/氯仿。

5. 乙醇。

6. 10mg/ml溴化乙锭溶液。

7. DNA样品。

8. 65 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C水浴。

9. 电泳仪、生化培养箱等。

### (二) 操作步骤

1. 将低熔点琼脂糖加入 $1\times$ TBE中，加热至熔化并冷却至37 $^{\circ}$ C，加入溴化乙锭，使终浓度为0.5 $\mu$ g/ml。

2. 制胶后放于4 $^{\circ}$ C，以促进凝胶形成。

3. 加入DNA样品，4 $^{\circ}$ C下电泳。低熔点琼脂糖凝胶的电泳特性与一般琼脂糖凝胶相似。

4. 长波紫外线下切下所需的凝胶条。

5. 65 $^{\circ}$ C熔化胶条，如果凝胶的琼脂糖大于1%，则用TBE稀释至1%。

6. 加NaCl至终浓度为100mmol/L。
7. 把熔化了的凝胶在37℃中冷却，加入 $\frac{3}{4}$ 体积的室温水饱和苯酚（水饱和苯酚最好为新近配制）。
8. 立即用混合振荡器混匀30s。
9. 离心后收集水相，再用酚/氯仿及氯仿各抽提一次。
10. 用乙醇沉淀法回收DNA。

## 七、杂交育种

### （一）细菌杂交

细菌杂交与高等动、植物不同，它们没有明显的性别和性器官，所以不是典型的杂交。在细菌中实现杂交的种类尚不多，主要是大肠杆菌，其他还有鼠伤寒沙门氏菌、铜绿假单胞菌、淋病奈氏球菌等。大肠杆菌中存在着致育因子F，有F因子为F<sup>+</sup>，没有F因子称F<sup>-</sup>。F因子可两种因子存在于细胞中：游离状态(F<sup>+</sup>细胞)；整合状态，即F因子插入胞核质的一定位置上(Hfr细胞)。它们的重组频率不同，Hfr较F<sup>+</sup>高1000倍，高频重组。F因子有明显的感染性，大肠杆菌的接合，实质上是F因子的转移，所以F<sup>+</sup>和Hfr称供体菌，而F<sup>-</sup>称受体菌。

进行基因重组试验，需有标记菌种，如缺陷型，抗性，糖发酵特性等。所以进行这部分实验必须要有前面的实验基础。例如营养缺陷型菌株Arg<sup>-</sup>（精氨酸缺陷型）与Leu<sup>-</sup>（亮氨酸缺陷型）两株菌，各自在MM上都无法生长，将它们两者杂交后，实现杂交的，就可能在MM上长出，因为它们的特性基因进行了交换而达到互补的表现。

#### 〔实验8-36〕细菌的接合

本试验运用一对链霉素敏感的原养型Hfr大肠杆菌，作为基因供体，以苏氨酸(Thr)、亮氨酸(Leu)、硫胺素(Thi)营养缺陷型、链霉素抗性(Str-r)为受体进行杂交试验。

#### （一）实验材料

1. 菌株 受体：F<sup>-</sup>大肠杆菌thr<sup>-</sup>、Leu<sup>-</sup>、thi<sup>-</sup>、str-r；供体：Hfr

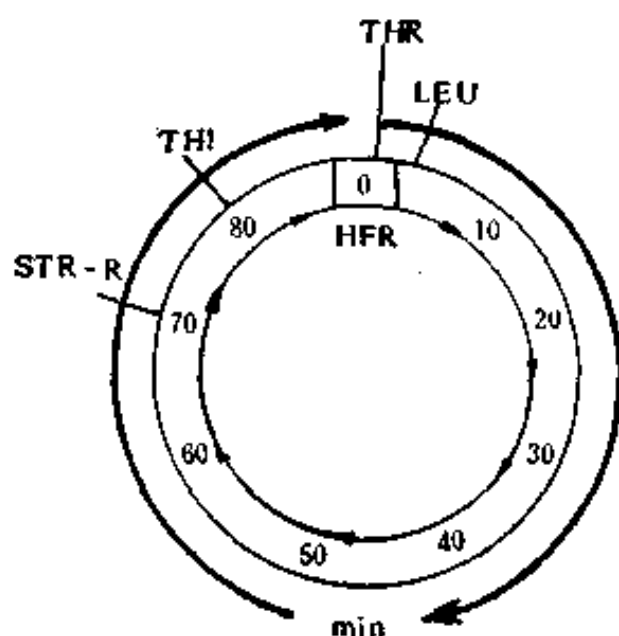


图 8-12 大肠杆菌基因图谱

大肠杆菌str-s (基因图谱见图8-12)。

## 2. 培养基

### (1) 肉汤培养基

牛肉膏	0.5 g	NaCl	0.5 g
蛋白胨	1 g	水100ml	pH7.2

10ml分装。高压灭菌。

### (2) 基本培养基(外加硫胺素及链霉素)

溶液A (pH7.0),

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g	NaCl	5.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g	蒸馏水	800ml
NH <sub>4</sub> Cl	2.0 g		

溶液B (pH7.0),

葡萄糖	8.0 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
琼脂粉	15.0 g	蒸馏水	20ml

溶液A与溶液B分开高压灭菌, 然后混合, 补加0.1mg无硫硫胺素, 倾注琼脂平板前补加50mg链霉素。

### (3) 无菌生理盐水。

## 3. 70%乙醇。

## 4. 吸管、玻璃涂棒、无菌试管等。



## (二) 操作步骤

1. 将供体及受体大肠杆菌接入肉汤培养基试管中，37℃培养12h。
2. 取1ml F<sup>-</sup>大肠杆菌培养液和0.3ml Hfr 大肠杆菌培养物于一无菌试管中，轻轻混合均匀。
3. 37℃培养30min。
4. 剧烈振荡，终止细菌结合。
5. 离心收获菌体并用生理盐水洗涤一次，用生理盐水恢复原体积。
6. 取0.1ml 菌悬液加至补加链霉素及硫胺素的基本培养基平板上，用在70%乙酸中浸泡并经火焰灼烧灭菌的涂棒涂布平板。以相同方式作亲本对照。
7. 37℃倒置培养48h，按下表记录细菌培养情况及菌落数目。

生 长	Hfr大肠杆菌平板	F <sup>-</sup> 大肠杆菌平板	混合培养平板
+/-			

## (二) 酵母杂交育种技术

酵母为单细胞型真菌，一般以出芽方式生殖，在通常情况下，繁殖体为双倍体，但经过特定条件的诱导，可使其产生单倍体孢子并可出芽产生单倍体繁殖体（图8-13）。单倍体细胞具a及α两种交配型。两种交配型细胞经其细胞壁上特定的凝聚因子诱导而进行交配，恢复为双倍体；用一交配型细胞之间，则因细胞壁上凝集因子的存在而不能进行交配。在生活过程中，酵母细胞还可以形成三倍体、四倍体、多倍体或非整倍体细胞（图8-14）。啤酒酵母生产菌体，产孢能力十分弱，几乎不形成小子囊孢子，且即使形成孢子，其通常也不具备活力。

一般而言，杂交育种运用了酵母的单双倍生活周期，将不同基因型和相对的交配型的单倍体细胞经诱导杂交而形成二倍体细胞，经筛选便可获得新的遗传性状。酵母的杂交方法有孢子杂交法，群体交配法，单倍体细胞杂交法和罕见交配法。就啤酒酵母而言，运用罕见交配法更易获得结果。

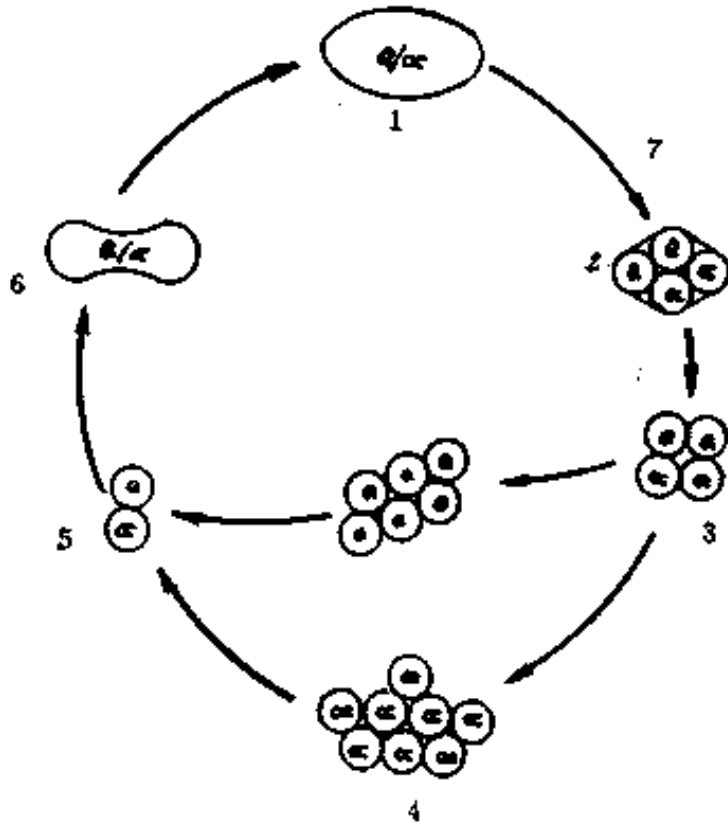


图 8-13 嗜糖酵母属的单双倍生活周期

1—双倍期 2—子囊 3—四分孢子 4—单倍期  
5—异宗配对 6—合子 7—减数分裂

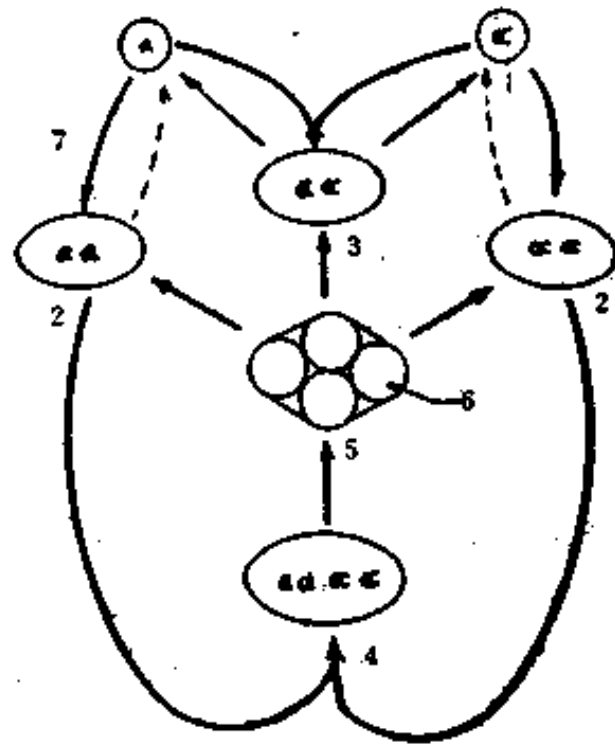


图 8-14 多倍体酵母的形成

1—单倍体 2—同宗二倍体 3—异宗二倍体  
4—四倍体 5—子囊 6—二倍体孢子 7—核  
内有丝分裂

## (实验8-37)酵母单倍体的分离与鉴定

### (一) 实验材料

1. 啤酒酵母。
2. 标准交配型菌株  $\alpha, a$  交配型单倍体、酵母H1004-3Ca及H1014-Aa。
3. MYPG

麦芽浸膏	3 g	葡萄糖	20 g
酵母浸膏	3 g	琼脂	20 g
蛋白胨	5 g	水	1000ml

分装灭菌制成斜面和平板。

### 4. 预生孢子培养基 (PSM)

酵母膏	3 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0 g
蛋白胨	3.5 g	醋酸钾	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g	去离子蒸馏水	1000ml

50ml分装300ml三角瓶，高压灭菌。

### 5. 生孢子培养基 (SPM)

葡萄糖	0.062 g	胰蛋白胨	0.25 g
NaCl	0.062 g	NaAc	1.0 g

去离子蒸馏水100ml，pH6~7，10ml分装300ml三角瓶。

6. 无菌生理盐水。
7. 蜗牛酶。
8. 无菌石蜡(液体)。
9. 装有小玻璃珠的100ml三角瓶，高压灭菌。
10. 33℃、58℃水浴。
11. 台式振荡器。
12. 离心机。
13. 相差显微镜。

### (二) 操作步骤

1. 将啤酒酵母在MYPG斜面上转接一次。
2. 用生理盐水洗下，接种PSM，接种浓度为 $5 \times 10^7$ 细胞/三角瓶。
3. 21℃，150r/min振荡培养3天。
4. 取此培养液10ml，离心收获菌体。

5. 用生理盐水洗涤两次, 再悬成 $10^8$ 细胞/ml。
6. 取0.1ml细胞悬液接入SPM中,  $81^{\circ}\text{C}$ , 150r/min振荡培养3天。
7. 用子囊孢子染色法检查子囊孢子形成情况(参见第三章)。
8. 取SPM培养物, 离心收获并用生理盐水洗涤两次, 再用生理盐水悬浮。
9. 加入蜗牛酶至终浓度为2%。
10.  $33^{\circ}\text{C}$ 孵育2h左右, 中间不时摇动数次, 相差显微镜下定时观察子囊壁裂解及子囊孢子的释放。
11. 经90%以上的子囊壁破除后, 置 $58^{\circ}\text{C}$ 水浴10min杀死营养细胞。
12. 迅速冷却, 移入装有玻璃珠的三角瓶中, 加入8ml生理盐水, 2ml液体石蜡。
13.  $33^{\circ}\text{C}$ 振荡1h以打散子囊孢子, 镜检。
14. 2000r/min离心10min, 取上层, 以1:9生理盐水稀释, 获得单个子囊孢子悬液。
15. 将上述获得的子囊孢子悬液适当稀释, 取0.1ml涂布MYPG平板。 $28^{\circ}\text{C}$ 培养3~5天。
16. 挑取小菌落转移至MYPG斜面,  $30^{\circ}\text{C}$ , 培养3天。
17. 根据表8-20确认为单倍体细胞。

表 8-20

单倍体与双倍体的区别

观察项目	双 倍 体	单 倍 体
细胞形态及大小	大且呈椭圆形	小, 球形
菌落	大小一致	小, 形态多变
MYPG液体培养	快, 细胞分散	快, 常聚成团
基中生长情况		
生孢子斜面	形成子囊	不形成子囊

18. 将获得的单倍体细胞编号, 并与标准交配型单倍体酵母细胞一起在MYPG斜面上转接一次。

19. 在MYPG平板的同一处分别接种试验获得的单倍体细胞和标准交配型单倍体细胞培养物各一环。

20.  $21^{\circ}\text{C}$ , 培养3~5天; 镜检产孢子情况。

21. 取混合物 1 环于 10ml 无菌水中，充分混匀，并稀释，取 0.1ml 菌液涂布 MYPG 平板，28℃ 下培养 3 天。

22. 挑取大菌落转移到产孢子培养基中，进行产孢子试验。

23. 确定试验获得的单倍体细胞的交配型。如与标准 a 型杂交得双倍体杂交细胞，而和 α 型杂交不形成二倍体杂交细胞，则此菌株为 α 型，反之为 a 型。

单倍体细胞的获得还可借助显微操纵器，具体过程可参见第四章。

### (实验 8-38) 罕见交配法转移酵母杀伤质粒

罕见交配法主要用于常规杂交法失败的实验中。因啤酒酵母的多倍体性和产孢能力及孢子活力低下，通过常规杂交法很难获得成功。罕见交配法可在  $10^8$  个细胞中筛选出那怕只有 1 个杂交株，并已成功地用于抗野生酵母污染之能力的转移。罕见交配法的亲本之一是工业生产菌株的呼吸缺陷型，可以是二倍体，三倍体或多倍体。另一亲株为带有遗传标记的营养缺陷等、呼吸原养型单倍体或双倍体 α 或 a 型酵母细胞。呼吸缺陷型细胞在

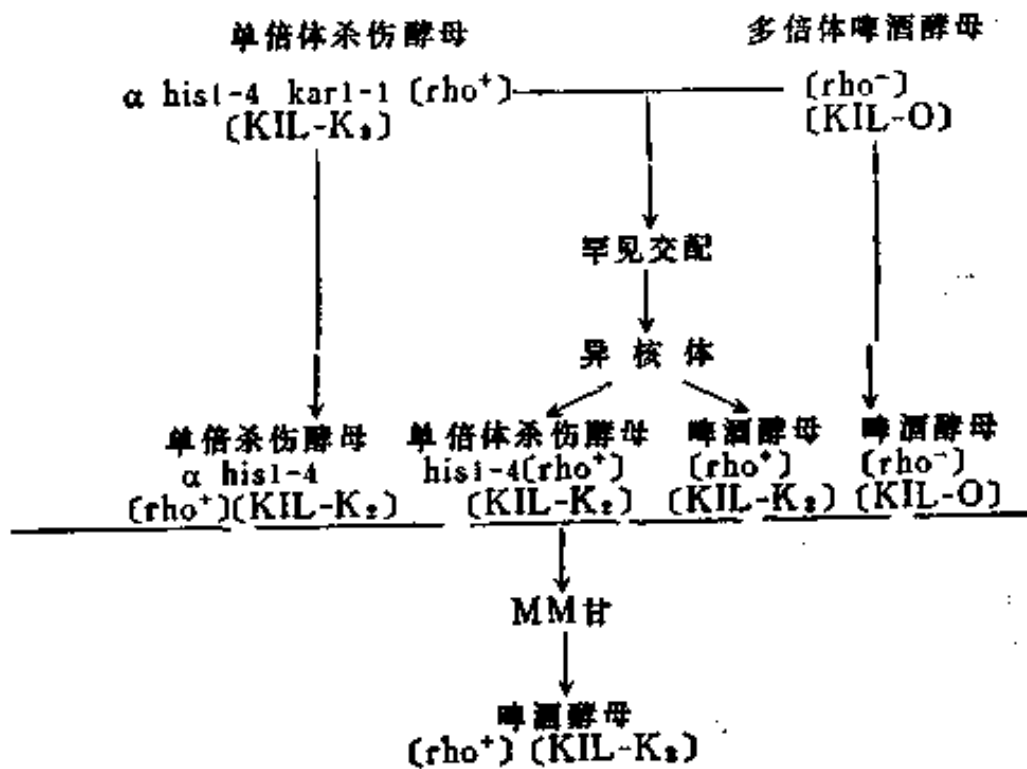


图 8-15 罕见交配试验原理

以葡萄糖为碳源的培养基上形成小菌落，在以甘油及乙醇为唯一碳源的培养基上生长极慢，甚至不能生长，一般半个月仅能生长成针尖大的小菌落，易于与呼吸原养型细胞相区别。本试验以一带有核遗传标记，且为核

融合缺陷型 (kar) 并带有K<sub>2</sub>型杀伤质粒的单倍体酵母细胞为供体, 通过罕见交配转移K<sub>2</sub>型杀伤质粒 (图8-15)。

(一) 实验材料

1. 菌株

(1) 供体: 酿酒酵母 ATCC 44075 ( $\alpha$  his1-4 kar 1-1 (KIL-K<sub>2</sub>) (NEX-O))。

(2) 受体: 啤酒酵母工业生产菌株。

(3) 杀伤酵母敏感株: 糖化酵母7-25。

2. 培养基

(1) MM甘:

酵母氮基 (YNBw/o, Difco)	6.7 g	
甘油 20.0ml	琼脂15.0 g	水加至1000ml, pH5.5

(2) MM:

YNBw/o (Difco)	6.7 g	琼脂	15.0 g
葡萄糖	10.0 g	水加至1000ml, pH5.5	

(3) MYPG<sub>1</sub>:

麦芽浸膏	3 g	蛋白胨	5 g
酵母膏	3 g	葡萄糖	20 g

水加至1000ml, 固体培养基加琼脂20.0 g。

(4) PYG底层:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g	胰蛋白胨	3.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g	酵母膏	3.0 g
(MH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g	琼脂	15.0 g
葡萄糖	10.0 g		

水1000ml, pH4.5~4.7。灭菌后, 倾注平板。

(5) PYG上层:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g	酵母膏	3.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g	美兰	0.03 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g	琼脂	12 g
葡萄糖	10.0 g	胰蛋白胨	3.5 g

pH4.3~4.5, 10ml分装。

3. 溴化乙锭 (10mg/ml)。



9. 取 $10^8$ 标准敏感株混入10ml已熔化的 $50^{\circ}\text{C}$  PYG上层, 混匀后倒至PYG底层上, 室温放置10min待凝。

10. 用接种环将待检菌株接入PYG上层表面, 同时以供体和受体分别作对照。

11.  $21^{\circ}\text{C}$ 培养24~48h。具有杀伤性能的菌株其周围形成一明显的抑菌圈。

如需进一步鉴定杀伤质粒的转移, 可继续进行下列试验。

12. 将酵母菌株接入10ml MYPG中,  $23^{\circ}\text{C}$ 培养48~72h。

13. 离心收获细胞并用灭菌水洗涤2次。

14. 加50mmol/L EDTA (pH7.0)洗涤1次。

15. 沉积用1ml 50mmol/L Tris- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH9.3) 2.5% 2-巯基乙醇悬浮, 室温孵育10min。

16. 离心收获细胞, 以7ml TES悬浮, 加入SDS至终浓度1%  $50^{\circ}\text{C}$ 下孵育10min。

17. 离心收获上清液。

18. 加入等体积水饱和酚抽提核酸10min。

19. 15000r/min离心10s, 取上层水相。

20. 加2倍体积的无水乙醇 $-20^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜。

21. 15000r/min离心5min, 沉淀以70%乙醇洗涤一次。

22. 加0.2 TE溶解沉淀。

23. 以1%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 核酸透射仪下观察并照相(参见本节琼脂糖凝胶电泳)。

## 第十节 原生质体育种

原生质体育种技术主要有原生质体融合、原生质体转化技术, 此外尚有原生质体诱变育种等。原生质体融合育种是基因重组的一种重要方法。原生质体融合作为一种新的基因重组手段是1978年第三届国际工业微生物遗传学讨论会上提出来的, 在1982年举行的第四届讨论会上仍然是最使人感兴趣的议题之一。由于它具有一系列的特点, 所以目前已为国内外微生物育种学者所广



泛研究和应用。

## 一、原生质体融合育种的特点

### (一) 杂交频率较高

由于细胞壁是微生物细胞之间进行物质交换的主要障碍之一，用一些方法将细胞壁去除后在高渗条件下形成类似于球形的原生质体，在原生质体融合时又加入融合促进剂聚乙二醇(PEG)，所以微生物原生质体间的杂交频率都明显高于常规杂交法。霉菌与放线菌已达 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ ，细菌与酵母已达 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ 。表8-21是链霉菌达到的种内杂交频率。

表 8-21 某些链霉菌采用不同方法处理的杂交频率

菌 株	不同处理方法的杂交频率		
	常 规	原生质体	原生质体+PEG
天蓝色链霉菌A <sub>1</sub>	$1.7 \times 10^{-6}$	$3.8 \times 10^{-6}$	$4.7 \times 10^{-2}$
天蓝色链霉菌A <sub>2</sub>	$1.7 \times 10^{-7}$	$1.0 \times 10^{-6}$	$4.7 \times 10^{-2}$
小小链霉菌ACTT <sub>1234</sub>	$6.3 \times 10^{-6}$	$1.3 \times 10^{-6}$	$0.6 \times 10^{-2}$
变铅青链霉菌66	$1.1 \times 10^{-6}$	$4.0 \times 10^{-7}$	$6.0 \times 10^{-2}$
灰色链霉菌WB94	$2.3 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-2}$
吡啶毒素链霉菌IPA 1610	$3.2 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$2.6 \times 10^{-4}$
<i>St. qingfengmyceticus</i> A201 × A54	$1.1 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^{-5}$	$2.2 \times 10^{-2}$
<i>St. qingfengmyceticus</i> A544 × A54	$4.6 \times 10^{-6}$		$3.0 \times 10^{-2}$

### (二) 受接合型或致育型的限制较小

二亲株中任何一株都可能起受体或供体的作用，因此有利于不同种属间微生物的杂交。有的学者认为原生质体融合是和“性”没有关系的细胞杂交，但目前有关工业微生物中原生质体远缘融合的报道仍然不多见，因此尚不能断言任何种属间的原生质体都

可实现融合。尽管如此，较常规的接合、转化、转导方法的应用范围及其杂交频率都大得很多。

已有报道的丝状真菌种间的原生质体融合主要是曲霉属和青霉属。如构巢曲霉×皱孢曲霉，构巢曲霉×烟曲霉，产黄青霉×萎地青霉，产黄青霉×蓝棕色青霉等。

链霉菌种间融合的有龟裂链霉菌×卡那霉素链霉菌，吸水链霉菌×紫色链霉菌等。酵母中种间原生质体融合的有乳酸克鲁维酵母×脆壁克鲁维酵母，彭贝裂殖酵母×八孢裂殖酵母等。细菌中芽孢杆菌已报道了枯草芽孢杆菌×地衣芽孢杆菌的种间融合。

已报道的属间原生质体融合主要在酵母中实现：热带假丝酵母×饰针复膜孢酵母，解脂复膜孢酵母×季也蒙毕赤酵母，酿酒酵母×彭贝裂殖酵母等。

### (三) 遗传物质传递更为完整

原生质体融合是二亲株的细胞质和细胞核进行类似的合二为一的过程。因此可以想象遗传物质的交换更为完整。原核微生物可以将两个或更多个完整基因组携带一起，在放线菌中甚至还能形成短暂的拟双倍体的融合产物，而在真菌中能形成暂时的或稳定的杂合双倍体。据报道在天蓝色链霉菌原生质体融合得到的重组体中，多发交换的重组体占20%，较之常规杂交多10倍以上。事实上，通过融合还可得到三倍体或四倍体那样的多倍体。

在工业微生物中，代谢物的产生量往往随产物结构基因的拷贝数的增加而增加，而通过融合增加拷贝数也是一条可行的途径。

遗传物质不仅存在于细胞核内，也存在于细胞质内。一般的常规杂交往往主要局限于核DNA重组，但原生质体融合还包括二亲株的细胞质的交换。这里有一组实验可以证明：采用枯草杆菌的溶源性菌株和该对噬菌体 Q105 敏感的菌株作为二亲株进行原生质体融合。结果融合子的存活率正常，而用常规的杂交方

法，却发现许多次代细胞因Q105裂解而死亡，其原因是溶源性细菌细胞质中含有某种免疫因子。它能使原噬菌体不致成为营养噬菌体，但在无原噬菌体的敏感菌株中则不存在这种免疫因子。当二亲株细胞一般接合时，原噬菌体仅仅随溶源菌染色体进入敏

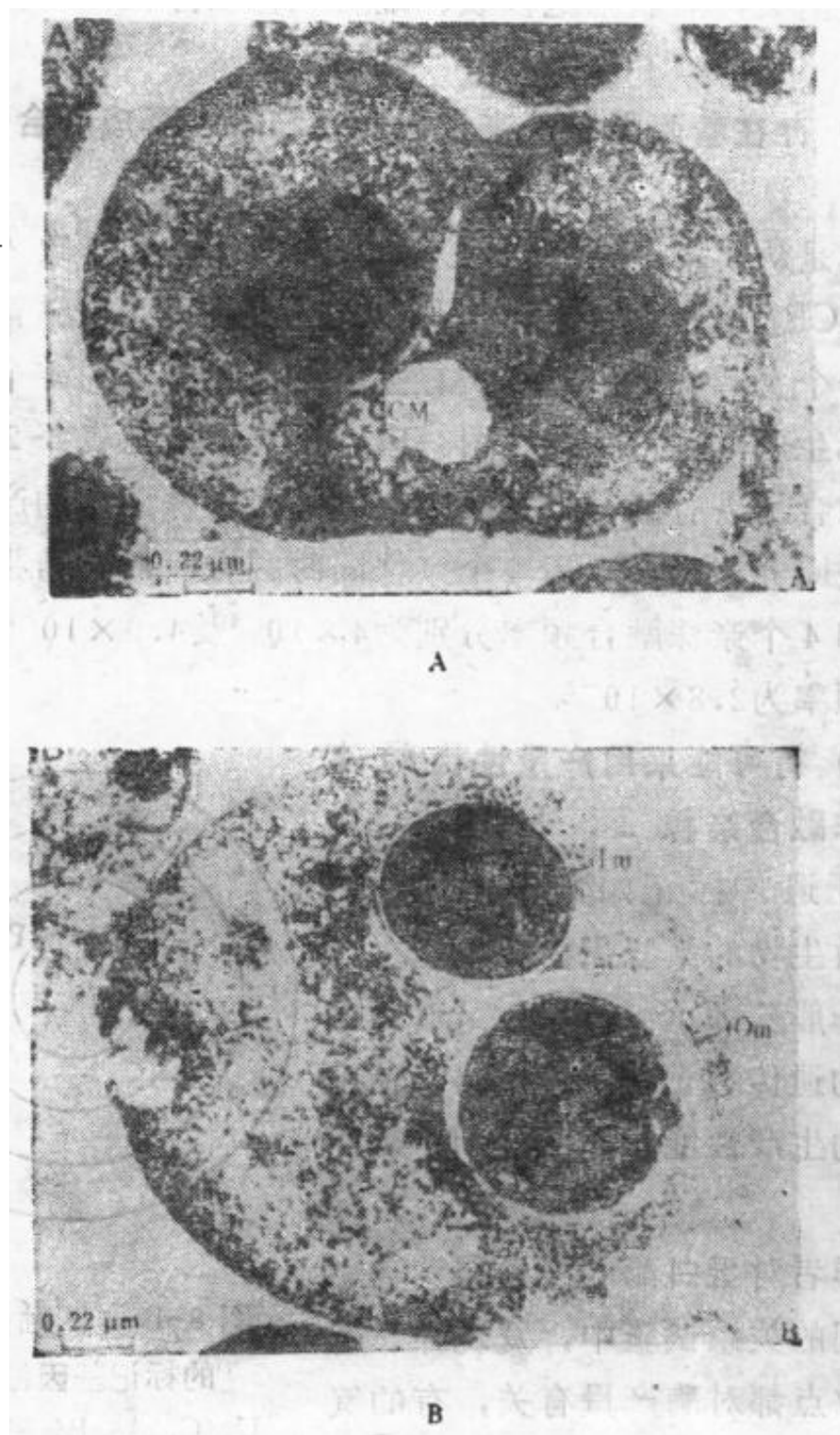


图 8-16 枯草芽孢杆菌原生质体的完全融合  
A—吻合融合 B—细胞融合二为一

感细胞，结果因不存在免疫因子而转变为营养期噬菌体进行复制，致使敏感性细胞裂解。

还有一组实验也是以枯草芽孢杆菌进行的。从图8-16可以看出，两个枯草杆菌的原生质体各有一个芽孢，在吻合融合时细胞膜接触处消失，然后细胞核质、细胞质包括芽孢，全部进入一个细胞内。

#### (四) 存在着两株以上亲株同时参与融合形成融合子的可能性

这也是从实验结果推导出来的。实验采用的是缺少性因子SCP<sub>1</sub>和SCP<sub>2</sub>，以排除可能体细胞杂交的一种天蓝色链霉菌菌株，选取的4个基因位点中分别仅有一位点是原养型的4个亲株，以它们的原生质体进行融合（图8-17），其结果见表8-22。可以推断，融合子若有两个位点缺陷应为两个亲株融合的产物，如果融合子是原养型的，则为4个亲株同时融合而成。结果表明，来自3个和4个亲株融合频率分别为 $4 \times 10^{-4}$ 及 $4.9 \times 10^{-7}$ ，两亲株的融合频率为 $2.8 \times 10^{-2}$ 。

#### (五) 有可能采用产量性状较高的菌株作融合亲株

由于遗传标记如缺陷型往往影响工业微生物的某些生物合成能力，而进行一般基因重组方法时又必须采取较多的遗传标记，这样就势必使出发菌株的生产性能下降而影响杂交子

但作者对蛋白酶的产量与营养缺陷标记间的关系试验中，发现并非所有缺陷位点都对酶产量有关，有的氨基酸缺陷型其产量反较野生型更高。

但在次级代谢产物的生产中，缺陷型对产量的影响是较大的。

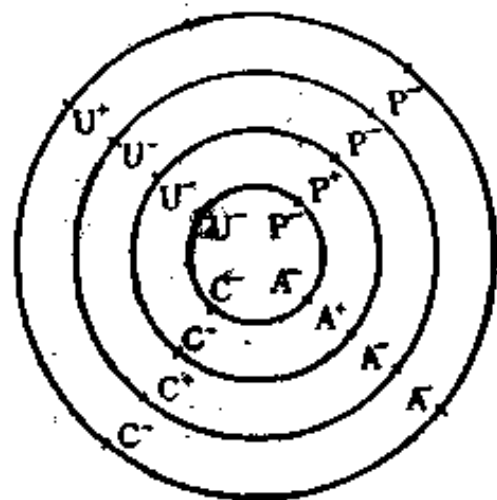


图 8-17 四融合亲株的标记基因位点图

U、C、A、P分别代表尿嘧啶、胱氨酸、精氨酸、脯氨酸

表 8-22

各亲株融合情况

添加的生 长因子 *	菌落数	添加的生 长因子	菌落数	添加的生 长因子	菌落数	添加的生 长因子	菌落数
P, A, C	$51 \times 10^5$	P, A	$118 \times 10^3$	P	$67 \times 10^2$	/	$6 \times 10$
P, A, U	$72 \times 10^5$	P, C	$548 \times 10^3$	A	$27 \times 10^2$		
P, C, U	$26 \times 10^5$	A, C	$41 \times 10^3$	C	$53 \times 10^2$		
A, C, U	$126 \times 10^5$	A, U	$176 \times 10^3$	U	$4 \times 10^2$		
		C, U	$57 \times 10^3$				
总 计	$275 \times 10^5$		$961 \times 10^3$		$151 \times 10^2$		6
			(融合株亲本数)		(二株亲株融合数)		(三株亲株融合数)
							(四株亲株融合数)

\* P, A, C, U 分别代表脯氨酸、精氨酸、胱氨酸、尿嘧啶代的生产水平。但因原生质体融合频率较高，故可以采用较少标记或不带标记进行菌株融合，这对改良生产菌株性能更为有效。

### (六) 提高菌株产量的潜力较大

由于影响菌株产量的因素是多方面的，涉及的基因位点显然较多。它不仅涉及到有关代谢途径上的有关结构基因、调节基因，还涉及影响提供初级代谢产物或辅助因子的基因，控制竞争性代谢途径的基因、渗透障壁的控制的基因等。但一次或数次突变是不可能同时对这些基因都起正突变的，这就限制了突变育种产量提高的速度。若能如图8-18所示，将各经5次诱变的两亲株进行种内原生质体融合，就可能将各次所积累的提高产量的潜力有效地发挥出来。如图所示，可获得1024种基因型融合子，通过对多样化基因型筛选而获得高产菌株，这较之单用诱变方法当然机率大得多。

### (七) 有助于建立工业微生物转化体系

由于原生质体已经去除了细胞壁，因此较细胞易于进行遗传标记。1979年Chang和Cohen首次报道了枯草杆菌种内的原生质体的质粒DNA高频转化。我们对蛋白酶产生菌种间原生质体转化也告成功并获得高频转化。目前，一些重要的工业微生物如放

线菌、酵母和丝状真菌等转化体系多未建立，但采用原生质体转化，就有可能将这些菌株作为转化的受体，对工业微生物育种工作就可前进一大步。

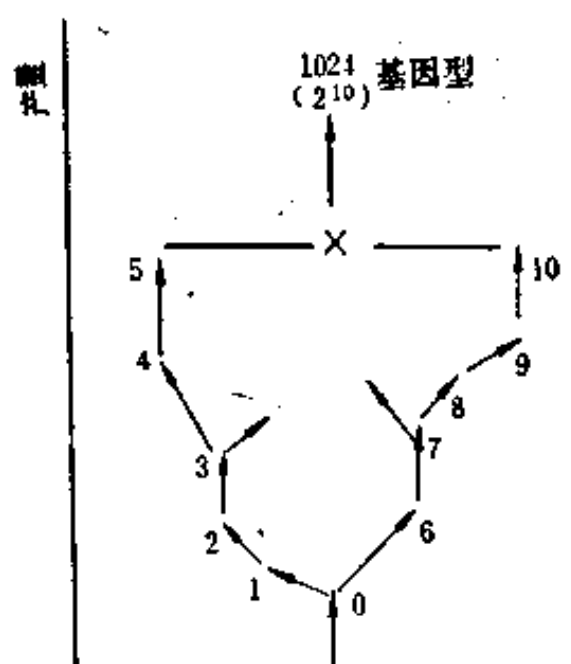


图 8-18 出发菌株经10次诱变后进行种内原生质体融合得到的基因型融合子

## 二、原生质体融合育种步骤

1. 标记菌株的筛选和稳定性验证。
2. 原生质体制备。
3. 等量原生质体加聚乙二醇促进融合。
4. 涂布于再生培养基，再生出菌落。
5. 选择性培养基上划线生长，分离验证，挑取融合子进一步试验、保藏。
6. 生产性能筛选。

## 三、原生质体融合育种的要点

### (一) 标记菌种的选择

获得标记菌种的方法是采用常规诱变育种，筛选出营养缺陷

型或/和抗药性菌株。这里最重要的是标记必须稳定。采用抗药性菌株除可作标记外，在实验室中还可排除杂菌污染的干扰。至于遗传标记的数量，若是初步探索性试验，为的是确证融合的成功，可以采用多标记菌种。Schaeffer指出，每个亲本都各带两种稳定的营养缺陷型标记就可以排除以后实验结果中获得的原养型融合子中出现的回复突变原养型。所以选择标记无须过多。若已知融合频率较高，为了减少标记对菌株正常代谢的干扰，也可以采用没有标记或一个标记的菌株作为融合的亲本。当然选择对生产性能无影响的标记作标准是更为合适的。

## (二) 原生质体的制备

在细菌原生质体制备中，有两个术语需有所区别，原生质体(Protoplast)系用于描述完全去壁后的革兰氏阳性细菌；原生质球(Spheroplast)系用于描述残留或为部分细胞壁束缚住的革兰氏阴性细菌。在酵母菌中则有时混用。现一般皆称为原生质体而少用原生质球。原生质体的制备主要是在高渗透压溶液中加入细胞壁分解酶，将细胞壁分离剥离，结果剩下由原生质膜包住的类似球状的细胞，它保持原细胞的一切活性。嗜热芽孢杆菌原生质体的释放如图8-19所示。



图 8-19 嗜热芽孢杆菌原生质体的释放

在放线菌和细菌中，制备原生质体主要采用溶菌酶；酵母和霉菌一般可用蜗牛酶、Zymolyase或纤维素酶等。据报道，在制备彭贝裂殖酵母原生质体时，若在蜗牛酶液中加入 $\alpha$ 和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶，原生质体获得率会大大提高，在制备啤酒酵母原生质体时还采用一些称为Gluculase或Helicase的商品酶(即蜗牛酶)。在

制备青酶的原生质体时，我国学者采用纤维素酶和褐云玛瑙螺酶的混合酶效果良好。在制备须霉的原生质体时，采用的是几丁质和壳聚糖水解酶，所以对某一种菌以哪种酶为佳，需进行一些预试验。

影响原生质体制备的因素是多方面的，归纳如下：

1. 菌体的前处理 为了使酶作用的效果好一些，可将菌作一些前处理。如细菌加入亚抑制剂量的青霉素，粟酒裂殖酵母用

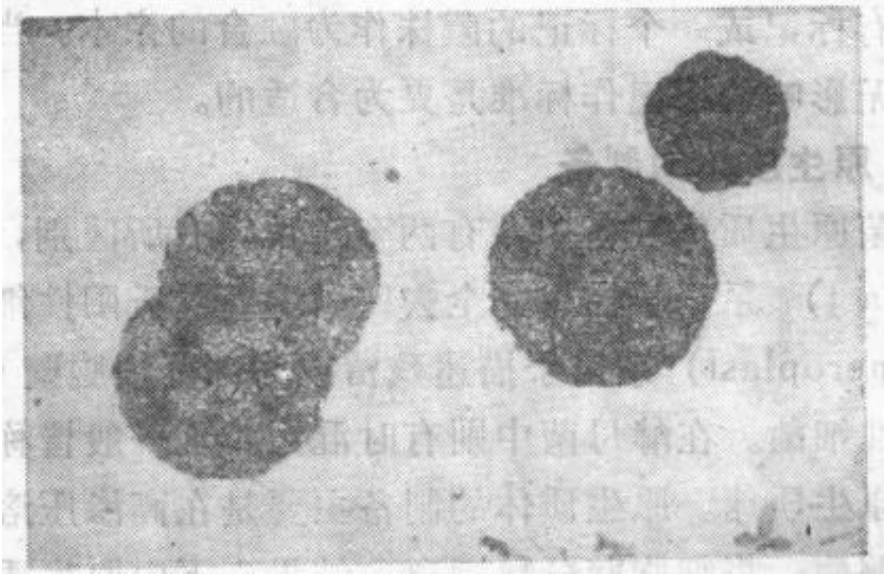


图 8-20 啤酒酵母的原生质体

2-脱氧葡萄糖处理，以抑制葡聚糖的重新合成。在细菌及放线菌的培养液中加入1~4%的D-环丝氨酸或甘氨酸等，酵母属酵母通常将对数增殖期的细胞用EDTA或EDTA和巯基乙醇作前处理。

2. 菌体的培养时间 为了使细胞易于原生质体化，一般选择增殖期的菌体。芽孢杆菌采用对数后期更好。对于放线菌，有建议采用对数增殖期到稳定期之间的转换期的菌体最为适当。

3. 酶浓度 对于不同种属的微生物，不仅对酶的种类要求不同，就是对酶的浓度也有差异。在制备大肠杆菌原生质体时，溶菌酶浓度要避免低于 $20\mu\text{g/ml}$ 和高于 $500\mu\text{g/ml}$ 。因为这都会减少原生质体的形成率。制备枯草芽孢杆菌原生质体时，多数学者采用 $100\mu\text{g/ml}$ 的溶菌酶浓度，我们采用 $250\mu\text{g/ml}$ ，原生质体化



率相差不太大。另外，最佳酶浓度还随不同的生长期的菌体而变化，例如对数期的大肠杆菌以 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 为好，而处于饥饿条件下的就需要 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在我们的试验条件下，处于对数前期的枯草杆菌较对数后期的更难去壁，所需酶浓度更高。

4. 酶处理温度 以枯草杆菌为对象时，温度在 $25\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内，完全去壁的时间随温度上升而缩短。但从易于控制破壁程度及避免原生质体因温度的损伤，我们采用 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的温度。大肠杆菌也与此类似。酵母则多数采用 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右。在青霉菌中，我国学者认为 $0.8\text{mol}/\text{L}$  KCl配制的混合酶以 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为佳，在 $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时几乎不形成原生质体。在须霉中采用的是 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，效果也很好。可见，细菌类的酶作用温度比较高些，酵母、霉菌类则偏低些。当遇到很难形成原生质体时，用改变温度的方法是起不了多大作用的。自然，这里的温度也不是孤立的因素，与其他条件是相互影响的。

5. 破壁时的pH值 我国学者在制备青霉菌的原生质体时发现酶液的自然pH ( $6.2\sim 6.4$ ) 和pH 4.5对原生质体产量无明显区别。我们制备枯草杆菌原生质体时也观察到pH  $5.8\sim 7.7$ 范围内对原生质体的释放无明显影响。但配制缓冲液的离子强度是有一定影响的，一般原则是酶浓度增加时，浓度应予减少。

6. 渗透压稳定剂 等渗透压在原生质体制备中，不仅起到保护原生质体免于膨裂，而且还有助于酶和底物的结合，渗透压稳定剂多采用甘露醇，山梨醇，蔗糖等有机物和KCl和NaCl等无机物。菌种不同，其最佳稳定剂也有差异。产黄青霉以KCl和NaCl为好，酵母多用山梨醇，我们则用甘露醇，KCl效果也好。在细菌中多采用蔗糖，但我们采用NaCl也有优点，主要是粘度较低，易于离心收获原生质体。稳定剂的使用浓度一般均在 $0.3\sim 0.8\text{mol}/\text{L}$ 之间。

如何断定原生质体化的程度（即原生质体化了的细胞与尚未破壁的比例）？由于原生质体对渗透压较细胞敏感得多，所以在蒸

馏水这样的低渗溶液中可立即被破裂，在一般固体培养基中也无法形成菌落。根据上述原理，就可以分别用血球计数比较低渗处理前后的被处理细胞加原生质体总数量，或在平板上的菌落数以求得原生质体得率。但对于丝状菌就困难了，因它们形成凝集块和菌丝状，无法直接观察计数。这时可将进行酶解的菌体混合液分别等量悬浮于低渗和高渗的溶液中，然后将它们分别于高渗的再生培养基上涂布分离计数。还可将高渗液中的菌体涂布于普通固体培养基和再生培养基上分别计数，这样也可大体求得原生质体得率。

### (三) 原生质体融合

从表8-21可以看到，仅仅将原生质体等量的混合在一起，融合频率仍然很低，只有加入表面活性剂聚乙二醇 (PEG)，融合率方出现突破性的提高，因为它具有强制性的促进原生质体结合的作用。

Fodor等曾报道了初生态的磷酸钙可用于诱导原生质体融合。但后来由于PEG的发现，该法才被替代了。在将PEG最早用于植物原生质体融合的促进剂时得到如下一些重要结果：①分子量在1000~6000之间一系列聚合度的PEG都是有效的；②较高浓度的PEG (50%) 较之较稀浓度 (25%) 的溶液更为有效；③不同分子量 (1500和4000) 的PEG溶液在相同重量百分比时是同效的；④适当浓度的钙离子的存在是必要的；⑤PEG溶液一加入，原生质体间的粘着即强烈地发生，融合就能较长时间地有效进行，所以PEG的处理时间很短就足够了。

除了PEG本身的因素外，原生质体融合时钙离子的浓度以0.01mol/L为最佳。而钾、钠离子的存在会显著降低融合频率。融合剂的pH也很重要，有Ca<sup>2+</sup>存在时，碱性条件(最高为pH 9)可得最佳的融合频率；缺乏Ca<sup>2+</sup>、低pH，融合频率也较高。这可能涉及膜中氢键的键合，K<sup>+</sup>和Na<sup>+</sup>降低融合效果的可能因素是K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>优先结合到质膜上，从而降低了Ca<sup>2+</sup>的刺激作用。

PEG促进原生质体融合的机理尚不完全清楚。一般认为，带负电的PEG与带正电的Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>同细胞膜表面的分子相互作用，原生质体表面形成极性，以致相互作用易于吸着融合。融合的程序开始是由于强烈脱水而引起原生质体的粘合，不同程度地形成聚集性物，原生质体收缩并高度变形，大量粘着的原生质体紧密接触，接着可能是接触处的膜间蛋白颗粒的转位和聚集，然后似乎是邻近的裸露蛋白膜之间的脂-脂相互反应。Ca<sup>2+</sup>由于强烈地促进脂分子的扰动和重新组合，结果接触处的膜产生小区域的融合，形成小的原生质桥，逐渐增大，直至两个原生质体融合。

Hopwood指出先采用紫外线照射原生质体时可大大增加融合率。若试验中重组频率较低，如1%左右；那么在融合前直接照射两亲株的原生质体悬液，融合频率可增加10倍。就是在重组频率已经很高的情况下，如20%，那么UV照射后仍可提高重组率达1倍(表8-23)。

表 8-23 UV照射原生质体对融合频率的影响

菌 株	融合频率(%)	
	未 照 射	照 射
天蓝色链霉菌	1.5	12.6
弗氏链霉菌	12.6	25.7
灰褐链霉菌	19.9	38.0
委内瑞拉链霉菌	24.0	35.0

原生质体融合，并非要求两亲株原生质体都具活性，其中一株原生质体可以是死的。这样，只需对活的一株作标记就可以了。灭活的方式可以是热灭活，也可以是紫外灭活等。以巨大芽孢杆菌为例(表8-24)可以清楚地看到亲株一方的原生质体虽被加热灭活，但仍能与另一活的原生质体融合，但融合频率明显低于两亲株原生质体皆活的情况。

表 8-24 巨大芽孢杆菌原生质体热处理的融合结果

再生菌落类型	菌落数(个/ml)			
	融合A*	融合B*	融合C*	融合D*
巨大芽孢杆菌THT	$2.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^3$	$3.0 \times 10^1$	$3.0 \times 10^1$
巨大芽孢杆菌ALTi	$1.1 \times 10^3$	$9.0 \times 10^1$	$1.1 \times 10^3$	$9.0 \times 10^1$
原养型	$2.64 \times 10^5$	$7.60 \times 10^3$	$8.1 \times 10^3$	0
融合率	0.1148%	0.0033%	0.0035%	0.000%

\* 融合A: THT原生质体×ALTi原生质体

融合B: THT原生质体×加过热的ALTi原生质体

融合C: 加过热的THT原生质体×ALTi原生质体

融合D: 加过热的THT原生质体×加过热的ALTi原生质体

#### (四) 再生

由于原生质体已经被剥去了坚韧的外层细胞壁，仅有一层薄的100Å厚的细胞膜，是失去了原有细胞形态的球形体。虽然它们具有生理活性，但它不是一种正常的细胞，在普通培养基上也不能生长繁殖。进行融合的原生质体在这种情况下是无法表现杂交性状的，所以必须想办法使其细胞壁再生长出来，恢复细胞原来状态。

由于仅有细胞膜的原生质体对渗透压很敏感，很易破碎，致使原生质外流使之死亡，所以再生培养基必须与原生质体内的渗透压相等，这就要在再生培养基中加入具有一定渗透压的基质，即渗透压稳定剂，这与制备原生质体时是一样的。

细胞壁的再生培养基是一种含有Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等离子的完全培养基，但采用高渗的基本培养基也可以使融合的营养互补的原生质体再生，差别是菌落形成速度慢，再生率低。在再生培养基上培养后，原生质体就恢复成正常的细胞状态。一些研究认为，若原生质体的细胞壁消化不太彻底，则有助于细胞壁的再生；残留的细胞壁就如同结晶时的“晶种”。实际上，壁消化太彻底往往会引起再生率大幅度下降。

原生质体的再生率通常在 $10^{-3} \sim 10^{-1}$ ，甚至达100%。再生率相差如此之大，足见影响再生率的因素很多，其中菌种本身特性、原生质体制备条件、再生培养基成分、再生培养条件等都是些重要的影响因素。

#### **(五) 融合子的选择**

原生质体融合获得的融合子，其重组率较之常规的要高很多，但这里面高低仍然相差甚大，特别是对于融合率较低的，选择融合子仍然是麻烦的。这时，我们依赖的是那些选择性遗传标记，它可以在各种选择培养基上显示出来。

由于原生质体融合会产生两种情况，一种是真正的融合，即产生杂合双倍体，或单倍重组体；另一种是暂时的融合，形成异核体。它们都能在基本培养基上生长出来，但前者一般是比较稳定的，而后一种则是不稳定的，会分离成亲本类型，有的甚至可以异核状态移接几代。所以要获得真正的融合子，在融合原生质体再生后，应进行数代的自然分离、选择。否则以后会出现各种性状不断变化的状态。

#### **(六) 实用性菌株的筛选**

微生物原生质体融合是一种新的基因重组技术，它具有某种定向育种的含义。但是融合后产生的融合子类型仍然是各式各样的，性能不同、产量不同的情况依然存在，只是性状变化的范围有所限制。在试验中，发现产量基因是可以转移的，芽孢产生、色素产生等性能也能转移。这些融合子中有产量提高的，也有降低的；有产色素的，有少产或不产的；芽孢有产得多的，也有产得少的。所以最后人为地定向筛选仍然是重要的一步。

已成功地进行种内、种间及属间原生质体融合的例子很多，参见表8-25。

## 种内融合

## 原核微生物:

芽孢杆菌属 (如: *B. megaterium*, *B. subtilis*)

短杆菌属 (如: *B. flavum*, *B. Lactofermentum*)

棒杆菌属 (如: *C. glutamicum*)

大肠杆菌

微小单胞菌属 (如: *M. echinospora*, *M. rosaria*)

*Prodidencia alcalifaciens*

链霉菌属 (如: *S. antibioticus*, *S. coelicolor*, *S. fradiae*, *S. griseus*, *S. Lividans*, *S. parvulus*, *S. viridosporus*)

## 真核微生物:

曲霉 (如: *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*)

青霉 (如: *P. chrysogenum*, *P. cyaneo-fulvum*, *P. frequentans*, *P. roquefortii*)

假丝酵母 (*Candida tropicalis*)

头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*)

*Kluyveromyces lactis*

*Saccharomyces cerevisiae*

*Schizosaccharomyces pombe*

*Yarrowia lipolytica*

## 种间融合

## 原核微生物:

*Bacillus cereus* × *B. thuringiensis*

*Bacillus subtilis* × *B. licheniformis*

*Brevibacterium flavum* × *B. lactofermentum*

*Streptomyces fradiae* × *S. narbonensis*

*S. viridosporous* × *S. setonii*

## 真核微生物:

*Aspergillus nidulans* × *A. rugulosus*

*Penicillium chrysogenum* × *P. cyaneo-fulvum*

*P. chrysogenum* × *P. notatum*

*P. cyaneo-fulvum* × *P. citrinum*

续表

属间融合

*Bacillus subtilis* × *E. coli*

*Brevibacterium flavum* × *Corynebacterium glutamicum*

*Candida tropicalis* × *Saccharomyces fibuligero*

*Hansenula wingei* × *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* × *E. coli*

#### 四、原生质体转化

如前所述，转化在工业微生物遗传改良及基因工程中占有十分重要的地位。但除少数细菌外，多数微生物的自然转化能力很低，特别是真核微生物几乎很少能发现自然转化。这主要是因为转化的必备条件之一是感受态的存在。经过人工诱导法可使一些微生物获得感受态，已成功的例子如枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等并得到广泛应用。但在链霉菌及真菌中，人工诱导法实现完整细胞的转化的成功例子就不多了。原生质体技术出现后不久，Bibb等发现，当有PEG存在时，质粒DNA可以很高频率转化链霉菌原生质体，从而彻底摆脱了转化依赖感受态出现的限制。在真菌中已成功地进行原生质体转化的菌株如表8-26。

表 8-26 已成功地进行原生质体转化的真菌

真菌类型	说 明
芽生酵母：酿酒酵母	转化带有Leuz的酵母嵌合质粒Col(E)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	
<i>K. fragilis</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Hansenula polymorpha</i>	
裂殖酵母： <i>Schizosaccharomyces</i>	
<i>pombe</i>	
霉菌类：粗糙链孢霉	

续表

	真菌类型	说明
	<i>Podospora anserina</i>	
盘菌类:	<i>Ascobolus immersus</i>	
不整子囊 菌及其相 近真菌	构巢曲霉	
	黑曲霉	同源5'-磷酸乳清酸核苷脱羧酶基因的转化
	米曲霉	转化黑曲霉pyrG基因
	产黄青霉	
	顶头孢霉	
黑粉菌类	黑粉菌	2 $\mu$ 质粒, 卡那霉素抗性基因
Agarica- les	<i>Coprinus lagopus</i>	
	<i>Schizophyllum commune</i>	
毛霉	布拉克须霉	
	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	
	<i>Mucor circinelloides</i>	

## 五、原生质体再生率和融合率计算

原生质体再生率(%)

$$\frac{\text{再生平板上的总菌数} - \text{未形成原生质体菌数/ml}}{\text{菌检原生质体数/ml}} \times 100$$

$$\text{融合率(}\%) = \frac{\text{融合子数}}{\text{CM平板上再生原生质体数}} \times 100$$

原生质体形成、融合和再生能力在不同的微生物种类中差异很大。原生质体化好并不能保证原生质体的良好再生。在原生质体形成之前和细胞再生过程中, 实验条件及技术的微小变化可显著地影响原生质体的再生和遗传重组。本节将介绍的用于各种微生物的原生质体形成、融合及再生技术是经若干次重复, 认为是最好的方法, 并对工业菌株的改良有普遍意义。为了选择原生质体融合子, 确定遗传重组率, 亲株最好带有易于获得的遗传标记



(如营养、抗生素抗性、形态等)的突变株。当然,对绝大多数革兰氏阳性原核细菌而言,由于种内原生质体融合时重组率极高,可以不引入任何选择性遗传标记。为了简化讨论,本节介绍的方法中假定亲株为带有不同标记的营养缺陷型,以原养型重组子数来确定原生质体融合和遗传重组率。

### 〔实验8-39〕芽孢杆菌的原生质体融合

#### (一) 实验材料

1. 菌种 芽孢杆菌。

2. 培养基及试液(补加25 $\mu$ g/ml的营养物质以满足缺陷型的营养要求,将一定浓度的DNase加到培养基中可排除DNA介导的转化或转染)

#### (1) 改良营养琼脂 (NA),

营养肉汤(Difco)	8.0 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.002 g
KCl	1.0 g	琼脂	17.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g	pH 7.0	

高压灭菌。将分开灭菌的CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O和FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O溶液加到最终浓度为5 $\times$ 10<sup>-4</sup>和5 $\times$ 10<sup>-4</sup>mol/L。

(2) 高渗营养琼脂 (HNA): 在NA中添加0.5mol/L的蔗糖。

(3) 高渗营养培养液 (HNB): 为不添加琼脂的HNA。

(4) 蔗糖-顺丁烯二酸-镁-DNase溶液 (SMMD):

0.5mol/L 蔗糖	0.02mol/L MgCl <sub>2</sub>
0.02mol/L 顺丁烯二酸缓冲液 (pH6.5)	
5 $\mu$ g/L DNase I	

(5) SMMAD: 含1%牛血清白蛋白的SMMD。

(6) PEG6000: PEG6000溶于SMMAD中配成40% (W/V), 过滤除菌。

(7) 再生培养基(RD):

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0 g	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.07
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.5 g	葡萄糖	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g	琼脂	20.0
琥珀酸钠	1.0 g	水	1000ml
明胶	5.0 g	pH 7.3	

高压灭菌后，无菌加入无菌小牛血清至0.5%和DNase I至5 $\mu$ g/ml。

(8) 改良S培养基：

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.0 g	L-Val	0.0025 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.0 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.005 g
柠檬酸钠	1.0 g	MgCl <sub>2</sub>	0.024 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	CaCl <sub>2</sub>	0.017 g
L-葡萄糖	0.0025 g	FeSO <sub>4</sub>	0.004 g
L-Lys	0.0050 g	琼脂	15.0 g
L-Asp	0.0125 g	水 加至	1000ml

使用前无菌地加入最终浓度为5 $\mu$ g/ml的DNase I及0.5%的葡萄糖。

(9) 10mg/ml溶菌酶溶液：用SMMD配成，过滤除菌。

3. 台式振荡器。

4. 分光光度计。

5. 高速离心机。

6. 相差显微镜。

7. 无菌天鹅绒。

8. 42 $^{\circ}$ C水浴。

(二) 操作步骤

1. 将芽孢杆菌接入HNB中，30 $^{\circ}$ C，120r/min振荡培养过夜。

2. 在稳定期前收获培养物并转接入20ml新鲜HNB中。

3. 30 $^{\circ}$ C，120r/min振荡培养至培养液的A<sub>600</sub>达到0.3~0.4。取少许稀释后在HNA上涂布测定活细胞数。

4. 18 $^{\circ}$ C，2000r/min离心10min收集菌体。

5. 用SMMD悬浮菌体至A<sub>600</sub>为2.0左右。

6. 加入溶菌酶液至最终浓度为100 $\mu$ g/ml，混匀。

7. 42 $^{\circ}$ C水浴中孵育30min。

8. 用相差显微镜证实原生质体形成大于99%。

9. 4000r/min离心10min，收集原生质体并用原体积的1/5~1/10的SMMD轻轻悬浮。

10. 在添加了亲株生长必需的营养因子的RD平板上涂布原生质体稀释液，以确定有活力的原生质体数。

11. 未原生质体化的细胞通过在改良的 NA 上涂布原生质体稀释液来确定。

12. 将两种准备进行融合的原生质体悬浮液，等量混合。

13. 取 0.1ml 混合原生质体液加到 0.9ml 40% PEG 6000 中。

14. 用力振荡混匀，然后在室温下静置 2min。

15. 用 SMMAD 稀释融合物，并在非选择性 RD 平板上涂布，以允许所有原生质体再生。

16. 37℃ 培养 2 天。

17. 用无菌天鹅绒将平板上的菌落影印至改良的 S 平板上。此平板为已添加一些适量的营养或抗生素等物质，以允许单一亲株或重组子生长的非高渗性选择性培养基，可获得 1~10% 的双亲本型菌落。双亲本型为能表达一亲本的完整表型又能分离出另一亲本的表型，并能产生真正的重组子的半稳定菌株。

18. 37℃ 培养 1~2 天，检测亲本和重组子菌落。

19. 进行划线分离纯化及其他生理发酵性能试验。

在细菌原生质体再生时，有用完全培养基，也有用基本培养基的。需要注意的是在确定重组子之前，将融合物直接涂布到一完全或富营养培养基中，一般会引起亲本型的互补；再生过程中会使大量已融合的细胞以极高的速度分离成亲本细胞。在有利于早期有效再生的条件下，如在完全或富营养培养基上再生，则二倍体原生质体被诱生出一个细胞壁，在两条染色体复制之前分裂，从而降低了发生遗传重组的机会。因此，细菌的原生质体融合的再生最好在基本培养基上进行。影响芽孢杆菌原生质体再生率的主要因素有温度和 PEG。细菌生长温度及溶菌酶处理时的温度都可能影响原生质体的再生。已发现原生质体形成之前的细胞生长温度与溶菌酶处理时的温度之间的差异会增加再生率和重组率。PEG 作用时间超过 5min 可显著降低再生率。

### (三) 典型范例

生产中性蛋白酶的枯草杆菌 AS 1.398 经诱变获得带有  $arg^+$ 、 $Leu^+$ 、 $Rif^+$ 、 $Str^+$  遗传标记的 AS 1.398-28-6；生产碱性蛋白酶的地衣芽孢杆菌 AS 1.807 经诱变获得带有  $thr^+$ 、 $ade^+$ 、 $Str^+$ 、 $Rif^+$  遗传标记的 AS 1.807-9-9。以两者的出发菌株进行原生质体融合，结果如表 8-27 所示。

表 8-27

芽孢杆菌种间原生质体融合结果

菌株	标记*	原生质体形成率 (%)	再生率 (%)	融合频率	稳定的融合子率 (%)	产量提高最高幅度 (%)
AS1.398-28-6	arg <sup>-</sup> , leu <sup>-</sup> , Rif <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	99.9	3.30	$2.28 \times 10^{-5}$	18.99	130
AS1.807-9-9	thr <sup>-</sup> , adr <sup>-</sup> , Str <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	99.9				

\* Str, 链霉素, Rif, 利福平, 最终使用浓度分别为200U/ml和5U/ml.

### 〔实验8-40〕 链霉菌属原生质体融合

#### (一) 实验材料

1. 链霉菌属链霉菌孢子, 已带有遗传标记.

2. 培养基及试液

(1) TS液体培养基(用于链霉菌增殖的完全培养基):

胰蛋白胍大豆汁                      30 g                      蒸馏水                      1000ml

121℃灭菌30min.

(2) TS琼脂: TS液体培养基中加15g/L琼脂, 121℃灭菌30min.

(3) 甘氨酸溶液: 用蒸馏水配成10%, 过滤除菌.

(4) P液:

基础液:

蔗糖                                      103 g                      MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O                      2.03 g  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                                      0.25 g                      蒸馏水                      加到700ml

70ml 分装, 121℃灭菌30min.

分开灭菌下列原液:

① 0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

② 36.8g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

③ 0.25mol/L N-三羟甲基-2-氨基乙烷磺酸(Tris)溶液 (pH 7.2)

④ 微量元素溶液:

ZnCl<sub>2</sub>                                      40mg                      Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O                      10mg  
FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O                              200mg                      (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O                      10mg  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O                              10mg                      蒸馏水                      1000ml  
MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O                              10mg

使用前各取10ml  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、TES、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和2ml微量元素溶液加到70ml基础液中。

(5) 溶菌酶溶液：用P液配成10mg/ml，过滤除菌。

(6)  $R_2$ 琼脂

基础液：

蔗糖	103 g	酪蛋白氨基酸	0.1 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.25 g	微量元素溶液	2ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.12 g	琼脂	22.0 g
葡萄糖	10.0 g	蒸馏水	加至 700ml
L-天冬酰胺· $1\text{H}_2\text{O}$	2.0 g		

121℃灭菌25min。

分开灭菌下列原液：

① 22.2g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

② 0.5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

③ 0.25mol/L, pH 7.2 TES

在倒平板前，无菌地将 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 和TES原液各100ml加到700ml基础液中。

(7)  $R_2$ 软琼脂覆盖层：

蔗糖	103 g	0.5g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$	100ml
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.12 g	琼脂	4.10 g
22.2g/L $\text{CaCl}_2$	100ml	蒸馏水	加到1000ml
0.25mol/L TES(pH7.2)	100ml		

以3ml分装带盖试管，121℃灭菌25min。

(8) PEG溶液：PEG 1000用P液溶解成50% (W/V)，过滤除菌。

(9) 基本培养基 (MM)：

琼脂	10 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
L-天冬酰胺	0.5 g	蒸馏水	1000ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5 g	pH	7.0~7.2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g		

20ml分装，121℃灭菌30min。使用时，每瓶中加入4ml 50%的无菌葡萄糖液。

(10) AS-1.

酵母膏	1.0 g	NaCl	2.5 g
L-Ala	0.2 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0 g
L-Arg	0.2 g	琼脂	20.0 g
L-Asn	0.5 g	水	1000ml
可溶性淀粉	5.0 g	pH	7.6

121℃灭菌30min.

3. 组织研磨器.

4. 超声粉碎仪.

5. 旋转式振荡器.

6. 分光光度计.

7. 高速离心机.

8. 无菌天鹅绒.

9. 相差显微镜.

10. 血球计数板.

11. 30℃, 46℃水浴.

(二) 操作步骤

1. 将0.1ml链霉菌孢子等作种子接种25ml TS培养液.

2. 30℃, 200r/min振荡培养直至A<sub>600</sub>至2~9(约需24~48h).

3. 用一无菌组织研磨器均聚培养液, 加等体积的TS培养液稀释.

4. 取20ml稀释培养液加到60ml无菌瓶中.

5. 将超声探头浸没于液面以上1~2cm, 76W超声处理5~10s.

6. 以此培养液1.2ml接种25ml TS, 补加亚抑制量甘氨酸(预试确定).

30℃, 200r/min振荡培养16~24h.

7. 超声处理1~3s.

8. 以此溶液1.2ml接种25ml已补加亚抑制量甘氨酸的TS, 继续振荡培养至A<sub>600</sub>达到2.0~7.0.

9. 重复步骤3~5, 超声处理时间改为1~3s.

10. 取一些菌液稀释液涂布TS琼脂, 计算CFU.

11. 3000r/min离心10min收获菌体, 用P液洗涤3次.

12. 在含有1mg/ml溶菌酶的等体积P液中重新悬浮菌体, 30℃ 15~

60min, 用相差显微镜观察原生质体形成情况, 以仅观察到几无或极少的菌丝断片存在时为原生质体化完成。

13. 离心收获原生质体并用P液轻轻悬浮洗涤2次, 并以等体积P液轻轻悬浮。

14. 取0.1ml在P液中系列稀释的原生质体液加到46℃的融化R<sub>2</sub>软琼脂覆盖层并搅拌, 将覆盖层倒入R<sub>2</sub>琼脂平板表面。R<sub>2</sub>平板中加入适量的氨基酸以利亲本原生质体的再生。根据存活原生质体数确定再生率。

15. 通过在未补加氨基酸的R<sub>2</sub>平板上涂布原生质体的稀释液来确定亲株回复突变率。

16. 通过非高渗培养基TS琼脂平板上涂布原生质体稀释液确定非原生质体化存活细胞率。

17. 在一圆底的无菌离心管中将待融合的两亲株原生质体液各取0.5ml混合。

18. 3000r/min离心10min。

19. 弃尽上清液, 加0.1ml P液, 轻轻悬浮原生质体沉积。

20. 加入0.9ml 50% (W/V) PEG 1000。

21. 立即轻轻吸吹混匀。

22. 置室温30~60s。

23. 用P液适当稀释融合物, 取0.1ml加至已融化的46℃的R<sub>2</sub>软琼脂覆盖层中, 混合, 倾到R<sub>2</sub>琼脂表面 (R<sub>2</sub>培养基中添加和不添加亲株生长必需的重组子非必需的氨基酸或其他营养物质各1份)。

24. 29~30℃培养1~14天。

25. 重组子菌落进一步纯化鉴定。

在原生质体化之前第一次匀浆及超声处理是为了获得几乎为单细胞的菌丝体, 以利于后续培养时较易达到对数生长并减少妨碍原生质体化的大菌丝团块的形成。最后一次匀浆及超声处理则利于原生质体化。如用带有弹簧的三角烧瓶培养链霉菌并增加振荡频率 (~240r/min), 可代替匀浆及超声处理。但需在原生质体形成后用非脱脂棉花柱过滤原生质体悬液。

在原生质体化之前的培养过程中, 必需添加一定浓度的甘氨酸, 以部分干扰细胞壁的合成, 利于原生质体化。甘氨酸的添加浓度一般在0.1~2.0%。最适浓度的确定可录用下列步骤。①在盛有25ml TS培养液的250ml三角烧瓶中添加从0到2.0%不同浓度的甘氨酸; ②接种超声破碎菌液0.1

ml; ③30℃, 200r/min 振荡培养 16~24h; ④均浆培养物, 测定 $A_{600}$ , 以能减小吸光度到大约为无甘氨酸的对照培养物的吸光度的一半时的甘氨酸浓度为甘氨酸最适使用浓度。

如果特定链霉菌不能在TS液体培养基中生长或生长不良, 则首先检查培养液的pH, 可适当调碱培养基。另外, 对许多营养缺陷型菌株, 最好以100 $\mu$ g/ml添加必需的营养成分。另外, 有些菌株易于形成菌丝团块, 此严重影响原生质体形成率。如强烈的均浆和超声处理仍达不到效果, 可在TS培养液中添加10%的蔗糖。

在原生质体化过程有时会出现原生质体难以形成或原生质体絮凝成团, 有时也出现原生质体“空泡”。出现原生质体化困难时首先要考虑细胞培养时间是否恰当。处于高速生长的对数期( $A_{600} < 2.0$ )或稳定期后( $A_{600} > 7.0$ )的细胞的原生质体形成, 有时比处于对数和稳定期( $A_{600} = 2.0 \sim 7.0$ )过渡期的细胞难以原生质体化。其次得考虑溶菌酶的使用浓度。用1mg/ml溶菌酶30℃作用1h后仍没有任何原生质体形成的迹象则应离心回收细胞, 然后再用更高浓度的溶菌酶液悬浮细胞。溶菌酶的浓度有时可用到20mg/ml, 然而仍有一些菌株即使在高浓度的溶菌酶中也难以诱导原生质体的形成。此原因现认为是这些菌株细胞壁组成上存在拮抗溶菌酶的物质或结构。诱导这些菌株的原生质体形成需注意研究其不同生长条件; 另一途径是寻找新的酶。自溶酶的开发和利用是一个途径。有报道将无色肽酶(achromopeptidase)与溶菌酶联合使用可更好地诱导链霉菌原生质体形成并可改善原生质体的再生。在原生质体化过程中常遇见的另一问题是原生质体絮凝。通常在细胞生长过程中易絮凝的菌株的原生质体在原生质体形成过程中也易于絮凝成团。解决这一问题时, 可通过旋转来散开絮凝团块, 如仍不能散开, 则需轻轻搅拌或吹吸均浆。如在生长过程中不易絮凝的菌株在原生质体化时原生质体发生絮凝, 通常原因是在离心过程中原生质体的过度堆积, 使用圆底离心管而非锥形离心管可有效地解决这一问题。在少数情况下, 有些链霉菌原生质体化时会形成大量的原生质体“空泡”和不规则的原生质体, 而这些原生质体一般都是无活力的, 大量存在时应考虑原生质体化过程中存在不利因素。特别是培养温度和溶菌酶处理时温度是否过高; 另一方面可小心调整P液的pH或其中的二价阳离子的浓度可能会达到意想不到的效果。

原生质体融合后再生的方法, 除上面的稀释后直接在选择性培养基上再



生外，不少学者建议先在非选择性培养基上再生，然后再涂布或影印到MM和AS-1平板上，以检测重组子和亲本菌落，并认为这样可以得到在总的群体中不同基因型频率的真实情形，在原则上应该可以回收所有的基因型。但如果菌株生孢子很差，则此法不实用。

链霉菌原生质体融合物的再生和重组受环境条件的影响较大。在原生质体形成之前的细胞生长及原生质体再生的培养温度可巨大地影响再生和遗传重组率。高温下（37~42℃）培养可大幅度降低一些菌株的再生率和重组率。用于诱导原生质体融合的PEG浓度对重组率有较大的影响。实际操作中用到的PEG分子量总在1000~6000，最适浓度为50%。低于40%时，融合率大幅度降低。不同批号的PEG也会存在较大差异。链霉菌原生质体再生过程中常遇到的另一问题是再生最快的原生质体抑制周围的原生质体再生的所谓“自动抑制效应”。解决这一问题的方法是将R<sub>1</sub>琼脂平板打开，在超净台中吹2h左右，使其丧失15~22%的重量，以此为再生培养基。此还可以缩短再生时间和可提高重组率。因此，在链霉菌原生质体再生过程，丧失15~22%水分的再生培养板已作为常规使用。

#### 〔实验8-41〕小单胞菌的原生质体融合

##### （一）实验材料

1. 待融合亲株(带有稳定的遗传标记)。
2. 培养基及试液

##### （1）发芽培养基（GER）

牛肉膏	3g	可溶性淀粉	24g
酵母膏	5g	CaCO <sub>3</sub>	2g
胰蛋白胨	5g	水	1000ml
葡萄糖	1g	pH 7.6	

##### （2）P液（MP）

基础液：

蔗糖	103g	微量元素溶液	2ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25g	蒸馏水	加到700ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5.09g	pH 7.6	

121℃灭菌15min。

分开灭菌下列原液：

- ① 0.5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ② 73.7g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ③ 0.25mol/L TES (pH 7.6)

使用时，加上面3种原液各100ml到700ml基础液中。

### (3) 再生培养基 (RM)

蔗糖	125 g	L-Asn	4 g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.25 g	酪蛋白氨基酸	0.1 g
微量元素溶液	1ml	琼脂	20 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5.09 g	蒸馏水	加至700ml
葡萄糖	10 g		

121℃灭菌15min。

分开灭菌下列原液：

- ① 73.7g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- ② 0.5g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ③ 0.25mol/L TES (pH 7.6)

倒平板前，无菌地混入上述3种原液各100ml到700ml RM中。

(4) 55.6% (W/V) PEG溶液：PEG 1000用P液配成55.6%，过滤除菌。

(5) 甘氨酸溶液：用蒸馏水配成10%，过滤除菌。

(6) 溶菌酶溶液：用P液配成10mg/ml，过滤除菌。

(7) 无菌蒸馏水。

3. 台式振荡器。

4. 超声粉碎仪。

5. 高速离心机。

6. 32℃水浴及培养箱等。

7. 相差显微镜，血球计数板。

### (二) 操作步骤

1. 亲株接种GER，32℃下振荡培养。

2. 将细胞生长至对数生长后期(细胞浓度达到菌体干重5.0~5.5g/L)时，取10ml培养物加入一无菌试管中。

3. 100W超声粉碎1min。

4. 取1ml超声粉碎菌丝片断接种20ml补加了0.075%甘氨酸的新鲜GER, 32℃振荡培养。

5. 对数生长后期收获细胞。

6. 系列稀释, 涂布GER琼脂平板, 以测定每毫升中CFU数。

7. 用P液离心洗涤细胞(5000r/min, 10min)。

8. 将细胞沉积用含2mg/ml溶菌酶的P液悬浮并恢复原体积。

9. 32℃水浴中孵育1h, 定时用相差显微镜检查原生质体形成情况, 以原生质体形成率大于99%所耗时间为原生质体化时间。

10. 5000r/min离心10min收获原生质体并用P液洗涤一次, 以P液悬浮原生质体并恢复原体积。

11. 用血球计数板计数原生质体总数, 在补充亲株生长必需因子(以30μg/ml补加, 下同)的RM上涂布系列稀释液, 以确定存活原生质体数, 平板在32℃培养。

12. 原生质体悬浮液在无菌蒸馏水中稀释并在RM上涂布, 以确定非原生质体细胞数。

13. 各取0.5ml待融合的原生质体悬液, 混合。

14. 5000r/min离心10min沉淀原生质体。

15. 去尽上清液, 沉积用0.1ml P液悬浮。

16. 加入0.9ml 55.6% PEG 1000, 轻轻吹吸2~3次, 以混匀混合液。

17. 32℃水浴中静置3min。

18. 用P液适当稀释融合混合物, 涂布于补加和未补加营养因子(如氨基酸)的RM平板上。

19. 32℃培养7~12天。

20. 重组子分离纯化、保藏及进一步鉴定。

#### **〔实验8-42〕酵母的原生质体融合**

从酵母细胞制备原生质体, 通过原生质体融合获得重组子及其再生比起前述的细菌、链霉及小单胞菌要困难得多, 如要获得稳定的遗传重组子, 融合时需有两个或两个以上的原生质体发生融合, 且需进一步发生核融合和重组后分离。

##### **(一) 实验材料**

1. 菌株 带有稳定的遗传标记, 最好为单倍体(参见本章杂交育种部分), 如啤酒酵母WL-2010单倍体his<sup>-</sup>和ade<sup>-</sup>。

## 2. 培养基和试液

### (1) PYG液体培养基:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g	胰蛋白胨	3.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g	酵母膏	3.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g	水	1000ml
葡萄糖	10.0 g	pH 5.5	

121℃灭菌20min.

(2) PYG琼脂: 在PYG液体培养基中补加20.0g/L琼脂.

### (3) MM

酵母氮基(YNB0/0, Difco)	6.7 g	pH 5.5
葡萄糖	10 g	
水	100ml	

过滤除菌后加到900ml 2.1%无菌琼脂中, 并补加1ml微量元素溶液\*, 1ml维生素溶液\*\*, 10ml氨基酸混合液\*\*\* (用于再生重组子时, 省去亲株生长必需的营养因子).

\* 微量元素溶液:

H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10ml	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	70mg	水	加至1000ml
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10mg		

0.22μm过滤除菌.

\*\* 维生素溶液:

烟酸	400mg	吡哆醇	400mg
肌醇	2000mg	生物素	2mg
泛酸	200mg	水	1000ml
硫胺素	400mg		

0.22μm过滤除菌, 分装-20℃存放.

\*\*\* 氨基酸混合液:

Try	2.5 g	Tyr	3.6 g
Arg	2.5 g	Leu	3.6 g
Met	2.5 g	Iso	3.6 g

Phe	6.0 g	Thr	20.0 g
Asp	10.0 g	双蒸水	1000ml
Val	15.0 g		

过滤除菌，分装-20℃存放。

(4) RPYG琼脂：在PYG中添加0.7mol/L KCl或10%蔗糖。

(5) RMM：在MM中添加0.7mol/L KCl或10%蔗糖。

(6) 10mmol/L Tris-HCl (pH7.4) (TB)。

(7) 高渗缓冲液 (ST)：

10mmol/L, pH7.4 Tris-HCl

0.5mol/L 蔗糖

10mmol/L MgCl<sub>2</sub>

(8) PEG<sub>4</sub>

PEG4000	30 g	CaCl <sub>2</sub> (无水)	0.47 g
蔗糖	5 g	10mmol/L TB	加至100ml

0.22μm过滤除菌。

(9) 0.5mol/L EDTA<sub>4</sub>

EDTA·Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 186.1 g 蒸馏水 加至 1000ml

NaOH 20.0 g 高压灭菌。

(10) Zymolyase 20T。

(11) 2-巯基乙醇。

3. 台式振荡器。

4. 离心机。

5. 28℃水浴。

6. 相差显微镜。

7. 已灭菌注射式滤器。

(二) 操作步骤

1. 将两亲株分别接入含30ml PYG的500ml三角瓶中。

2. 28℃, 100r/min振荡培养18h。

3. 取此培养液各5ml, 3000r/min离心收获, 并用10mmol/L TB及100mmol/L EDTA各洗涤一次。

4. 用ST洗涤一次。

5. 用含10mmol/L 2-巯基乙醇的ST配制 Zymolyase 20T至所需浓

度, 过滤除菌, 用前配制。

6. 用酶液悬浮细胞至 $10^7/\text{ml}$  (约需酶液共20ml)。

7.  $28^\circ\text{C}$ 振荡酶解60~120min (镜检确定)。

8. 1000r/min离心 3min去沉积。

9. 上清液3000r/min 离心10min收获原生质体。

10. 用ST洗涤两次, 用1ml ST悬浮。

11. 血球计数板计数原生质体数。

12. 适当稀释原生质体悬液, 分别在RPYG和 PYG平板上涂布,  $28^\circ\text{C}$ 培养来确定再生率。

13. 取两亲株原生质体液各0.5ml, 混合。

14. 3000r/min离心10min, 去尽上清液。

15. 加0.1ml ST悬浮原生质体。

16. 加3.9ml PEG溶液, 轻轻吹吸2~3次。

17.  $28^\circ\text{C}$ 放置20~30min。

18. 1500r/min去上清液。

19. 用ST适当稀释, 涂布埋入RMM及RPYG。

20.  $28^\circ\text{C}$ 培养 3~7天。

21. 融合子进一步分离纯化及鉴定。

酵母的原生质体化过程采用的酶主要有Zymolyase、蜗牛酶及纤维素酶等。以Zymolyase使用效果最好。由于酶来源困难, 国内多采用蜗牛酶或蜗牛酶加纤维素酶。原生质体化时酶浓度及其活性对原生质体化有极大的影响。以Zymolyase 20T为例, 此酶存在一最适使用浓度, 过高及过低皆不能较好地原生质体化, 且酶活在室温保存时半衰期短于3个月。我们使用在 $+4^\circ\text{C}$ 下保存已两年的Zymolyase 20T时, 发现其最适使用浓度为 $0.8\sim 1.5\text{mg}/\text{ml}$ , 达90%原生质体化时间在60min左右。另外, 不同菌株间对Zymolyase的敏感性也存在差异。因此, 使用新酶及新的菌株时应先通过预试验确定酶的最适使用浓度和作用时间。

酵母原生质体融合时常采用低浓度的PEG, 常用浓度在20~35%, 我们习惯使用30%PEG, 融合时间也较长。酵母原生质体不像细菌原生质体那样坚固, 因此在进入原生质体化后续操作步骤中应十分温柔。融合剂中二价阳离子的存在为原生质体融合所必需。 $\text{Ca}^{2+}$ 常用浓度在 $5\sim 50\text{mmol}/\text{L}$ , 最适浓度 $10\text{mmol}/\text{L}$ , 有时在再生培养基中也添加适量的 $\text{Ca}^{2+}$ , 而单价阳

离子如 $K^+$ 、 $Na^+$ 等则不应在原生质体融合时出现。配制融合剂时，最好不要使用磷酸盐缓冲液。

酵母原生质体再生十分困难，一般不超过10%。在不补加营养物质的基本培养基上几乎不能再生。目前，用于提高酵母原生质体再生率的方法不多，主要有用明胶代替琼脂作再生培养基固形剂；在再生培养基中加入牛血清白蛋白、小牛血清、明胶等物质；以及最近报道的将原生质体先用藻酸钙凝胶包埋，然后于液体再生培养基中再生。

### 〔实验8-43〕丝状真菌的原生质体融合

与酵母细胞相似，丝状真菌的原生质体再生比细菌困难，遗传重组率也很低。要获得遗传重组子，不仅需获得两个或多个原生质体间的融合，出现多核异核体细胞，更重要的是需发生核融合和进一步的单倍体化。就丝状真菌种内和种间的原生质体融合而言，在MM再生出现的营养互补的菌落（即原养型）通常皆为异核体。在种内原生质体融合中，可获得40~60%的营养互补率，而种间原生质体融合时互补率很低，在 $10^{-4}$ 个。融合产物的鉴定也较细菌复杂，常需进行细胞学、生物化学和遗传学的分析，以确定其遗传稳定性和倍性。

本实验主要描述青霉、曲霉及头孢霉的原生质体融合育种技术。营养缺陷型的营养要求为添加 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

#### （一）实验材料

1. 菌株 带有不同营养缺陷型标记的突变株。

2. 培养基及试液

（1）头孢霉完全培养基(CM)：

麦芽糖	40 g	琼脂粉	20 g
蛋白陈	10 g	水	1000ml
麦芽汁	24 g	pH	7.5

121℃高压灭菌20min。

（2）HCM（用于头孢霉）：CM中添加 $0.8\text{mol}/\text{L}$  NaCl, 2%蔗糖。

（3）麦芽汁琼脂（曲霉、青霉）：

麦芽汁	20 g	琼脂	20 g
-----	------	----	------

（4）MM（曲霉、青霉、头孢霉）：

$\text{NaNO}_3$	3 g	KCl	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g	水	1000ml
葡萄糖	40 g	pH	6.0

(5) HMM, MM中补加0.6mol/L NaCl.

(6) MMA (青霉): MM中补加0.7mol/L NaCl, 1.8%琼脂.

(7) MMD (头孢霉):

蔗糖	36 g	$\text{CaCl}_2$	0.06 g
L-Asp	7.5 g	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.15 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	21 g	$\text{MnSO}_4$	0.03 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.03 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	0.75 g	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.008 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.18 g	水	1000ml

(8) HMMD (头孢霉): MMD中添加0.8mol/L NaCl, 2%蔗糖.

(9) MMP (曲霉):

$\text{NaNO}_3$	6.0 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	微量*
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.52 g	水	700ml
KCl	0.52 g	pH	6.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	微量*		

70ml分装高压灭菌。70ml中无菌加入无菌10%葡萄糖、5%酵母膏、2%酪蛋白氨基酸各10ml.

\*原始文献未列出用量, 一般用0.00015%.

(10) PMA (青霉): MMA中补加0.2%酵母膏.

(11) PCMPA (曲霉):

$\text{NaNO}_3$	6.0 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.52 g
酵母膏	1.0 g	KCl	0.52 g
蛋白胨	1.0 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	微量*
酪蛋白氨基酸	1.0 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	微量*
腺嘌呤	0.15 g	水	加至 700ml
维生素溶液**	10ml	pH	6.0
琼脂	15 g		

70ml分装高压灭菌。用前每70ml培养基无菌补加10ml 10%葡萄糖, 20ml 3mol/L KCl.

\* 原始文献未注明用量, 一般用0.00015%.



**\*\*维生素溶液:**

生物素	10mg	对氨基苯甲酸	10mg
吡哆醇·HCl	10mg	尼克酸	10mg
硫胺素·HCl	10mg	蒸馏水	10ml
核黄素	10mg		

过滤除菌, 分装保藏于暗处。

(12) RMMPA (曲霉): 在MMP中补加0.6mol/L KCl和2%琼脂。

(13) Vogel培养基 (青霉):

柠檬酸三钠	3.0 g	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.0 g	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.0 g	葡萄糖	10.0 g

(14) 0.2mol/L, pH5.8 柠檬酸-磷酸盐缓冲液。用于配制头孢霉和曲霉用渗透压稳定剂。

(15) 渗透压稳定剂,

① 0.7mol/L NaCl

② 0.6mol/L NaCl

(16) 酶液,

① Novozyme 234: 用0.7mol/L NaCl配成5mg/ml, 过滤除菌。

② Novozyme 234-纤维素酶CP: 用0.6mol/L NaCl配成含两种酶各5mg/ml, 过滤除菌。

(17) 二硫苏糖醇液(DTT): 用0.2mol/L, pH7.3柠檬酸-磷酸盐缓冲液配成0.01mol/L, 过滤除菌。

(18) PEG溶液: 用0.01mol/L CaCl<sub>2</sub>-0.05mol/L 甘氨酸 (用0.01mol/L NaOH调节 pH至7.5)溶液配制30% (W/V)的PEG6000, 过滤除菌。

3. 离心机。

4. 摇床 (往复式和旋转式)。

5. 真空泵、灭菌烧结玻璃漏斗(G<sub>1</sub>)。

6. 灭菌注射式微孔膜滤器。

7. 30℃水浴。

8. 相差显微镜。

9. 血球计数板。

## (二) 操作步骤

### 菌丝体培养与收获

#### 1. 青霉

- (1) 将青霉在麦芽汁琼脂平板上接种，28℃培养48 h。
- (2) 收获孢子，制成悬液，接入含25ml Vogel培养基的250ml三角瓶中。
- (3) 28℃，180r/min振荡培养18 h。
- (4) 真空抽滤，无菌收获滤纸上的菌丝。

#### 2. 曲霉

- (1) 曲霉孢子悬液接入含25ml MMP的250ml三角瓶中。
- (2) 28℃，180r/min振荡培养19 h。
- (3) 真空抽滤，无菌收获滤纸上的菌丝。

#### 3. 顶头孢霉

- (1) 将顶头孢霉在CM上生长，制成孢子悬液。
- (2) 接种MMD，28℃，180r/min振荡培养48 h。
- (3) 真空抽滤，无菌收获滤纸上的菌丝。

### 原生质体制备：

#### 1. 青霉

- (1) 菌丝用0.7mol/L NaCl洗涤两次。
- (2) 用5mg/ml Novozyme 234酶液悬浮菌丝成50mg(湿重)/ml。
- (3) 在往复式摇床上120振/min轻轻振荡(28℃)3 h。
- (4) 过G<sub>1</sub>玻璃滤器，分离出原生质体。
- (5) 500×g离心10min，回收滤液中原生质体。
- (6) 用0.7mol/L NaCl洗涤两次。
- (7) 用少许0.7mol/L NaCl悬浮原生质体。
- (8) 用血球计数板计数原生质体数。
- (9) 用0.7mol/L NaCl稀释成每毫升 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 原生质体。

#### 2. 曲霉

- (1) 菌丝用0.6mol/L NaCl洗涤两次。
- (2) 用Novozyme 234-纤维素酶CP组合酶液悬浮菌丝至50mg/m<sup>3</sup>(湿重)。
- (3) 28℃，120振/min轻轻振荡3 h。

- (4) 过G<sub>1</sub>玻璃滤器分离出原生质体。
- (5) 500×g 离心10min回收滤液中的原生质体。
- (6) 用0.6mol/L NaCl洗涤两次。
- (7) 用0.6mol/L NaCl悬浮原生质体。
- (8) 用血球计数板计数原生质体数。
- (9) 用 0.6mol/L NaCl稀释原生质体成 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml。

### 3. 顶头孢霉

- (1) 菌丝用0.7mol/L NaCl洗涤两次。
- (2) 将菌丝用0.01mol/L DTT悬浮成0.2g (湿重)/ml, 28℃, 1h。
- (3) 离心回收菌丝并用0.7mol/L NaCl 洗涤3次。
- (4) 用Novozyme 234悬浮菌丝 (50mg/ml, 湿重)。
- (5) 28℃, 往复式摇床轻轻振荡3h。
- (6) G<sub>1</sub>玻璃滤器过滤分离出原生质体。
- (7) 500×g 离心10min, 回收滤液中的原生质体。
- (8) 用0.7mol/L NaCl溶液洗涤两次。
- (9) 用少许0.7mol/L NaCl悬浮原生质体。
- (10) 用血球计数板计数原生质体数。
- (11) 用0.7mol/L NaCl稀释原生质体成 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml。

### 原生质体融合:

1. 将待融合的亲株原生质体各1ml混合。
2. 700×g 离心10min去尽上清液。
3. 用1ml预热至30℃的PEG溶液悬浮原生质体沉积。
4. 30℃静置10min。
5. 用6ml HMM稀释悬浮液。
6. 700×g 离心5min, 去尽上清液。
7. 用8ml渗透压稳定剂 (青霉、头孢霉用0.7mol/L NaCl, 曲霉用0.6mol/L NaCl) 温柔洗涤两次。
8. 用5ml渗透压稳定剂轻轻悬浮原生质体。

### 原生质体再生:

#### 1. 青霉

- (1) 用0.7mol/L NaCl适当稀释原生质体融合物。
- (2) 涂布MMA和PMA,

(3) 28℃培养5天以上。

(4) 重组菌落进一步纯化鉴定。

## 2. 曲霉

(1) 用0.6mol/L NaCl适当稀释原生质体融合物。

(2) 涂布 RMMPA和RCMPA。

(3) 28℃培养, 3~5天后通常可见到菌落。

## 3. 头孢霉

(1) 用0.7mol/L NaCl适当稀释原生质体融合物。

(2) 涂布HMMD和HCM。

(3) 28℃培养。

(4) 重组菌落进一步纯化、鉴定。

上述介绍的方法对大多数丝状真菌都是实用的。在原生质体制备过程中, 有时会遇到不少丝状真菌的液体培养物不利于原生质体的形成。此时, 可改用下列步骤制备原生质体:

1. 制备浓孢子悬液( $>4 \times 10^8/ml$ )。
2. 在完全培养基平板表面覆盖一张无菌玻璃纸。
3. 接入浓孢子悬液于玻璃纸表面。
4. 28℃培养适当时间。
5. 将玻璃纸移入一无菌干净平皿内, 加入2~5ml酶液。
6. 28℃孵育3h。
7. 用相应渗透压稳定液洗涤玻璃纸回收原生质体。
8. 过G<sub>1</sub>玻璃滤器。
9. 500×g离心10min回收原生质体。余下步骤同前。

影响丝状真菌原生质体化的因素主要有培养基的组成, 菌龄、渗透压稳定液和酶解细胞壁的酶。一般而言, 处于对数生长期的细胞最合适。用于丝状真菌的原生质体制备的各种商品酶活力可能存在较大差异。除上面已介绍的酶, 还有许多酶可单一或组合起来用于原生质体化。这些酶有纤维素酶CT、Cereflo 200L、Oxyporus cellulase、Helicase、β-D-葡萄糖苷酸酶、几丁酶、Cytophaga酶L、β-D-葡聚糖酶和Zymolyase。国内因蜗牛酶来源容易, 常应用蜗牛酶。此外, 对一些丝状真菌而言, 用硫醇化物预处理细胞为原生质体形成的必需步骤。硫醇试剂(如DTT)预处理菌丝可有效地降低二硫化物的形成。

在丝状真菌原生质体融合过程中以CaCl<sub>2</sub>出现的Ca<sup>2+</sup>对所有丝状真菌的原生质体融合都绝对需要。对于青霉和曲霉，CaCl<sub>2</sub>的最适浓度是pH 7.2~7.5时10mmol/L。对青霉来说，如果融合混合物pH值上升，融合剂中CaCl<sub>2</sub>浓度随之上升。可从最适浓度的10mmol/L增加到pH9.0时的600mmol/L。在融合混合物中加入Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>会降低融合率。用于青霉和曲霉的PEG分子量通常为4000和6000，最佳使用浓度为25~30%。如PEG浓度小于20%，则PEG的稳定效应丧失，原生质体裂解。PEG浓度高于30%，则原生质体褶缩，活力降低。

丝状真菌原生质体融合物的再生几乎无一例外地使用选择性基本再生培养基。这是因为异核体在完全培养基或无正相选择的基本培养基上生长时很快会导致亲本型的分离。

#### (实验8-44) 芽孢杆菌属间原生质体转化

有关原生质体质粒转化的报道，革兰氏阴性菌和阳性菌都有。在枯草杆菌的转化系统中，用30%PEG6000短时间处理可以得到很高的转化频率，但在巨大芽孢杆菌中使用同样的方法转化频率比较低。近来报道在20%PEG存在下，外来染色体DNA可使原生质体转化并产生重组体，每个标记最高转化频率大约为再生原生质体的 $5 \times 10^{-6}$ ，最适DNA浓度为1~2μg/ml。

在以枯草芽孢杆菌为供体转化地衣芽孢杆菌的原生质体时，转化频率为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ 。这个频率大大高于它们的原生质体融合频率，而且除营养和抗性标记能互补外，产芽孢性能和分泌红色色素的性能也能转移。

##### (一) 实验材料

##### 1. 菌种

- (1) 枯草杆菌AS1.398-28-6 (Arg<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Rif<sup>r</sup>, Str<sup>r</sup>).
- (2) 地衣芽孢杆菌AS1.807-9-9 (thr<sup>-</sup>, ade<sup>-</sup>, Str<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>).

##### 2. 培养基及试液

##### (1) CM:

蛋白胨	10 g	NaCl	5 g
牛肉膏	10 g	水	1000ml
葡萄糖	5 g	pH7.0~7.2	

固体培养基加1.5%琼脂。

##### (2) MM:

葡萄糖	5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14 g
-----	-----	---------------------------------	------

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g	琼脂粉	15 g
柠檬酸三钠	1 g	水	加至1000ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	pH7.0~7.2	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g		

(3) RCM 和 RMM: 分别在 CM 和 MM 中添加0.5mol/L 蔗糖或0.3mol/L NaCl和20mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

(4) SMM:

0.5mol/L 顺丁烯二酸(NaOH调pH至6.7)

20mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

(5) NSM:

0.55mol/L NaCl

20mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

0.2mol/L 琥珀酸钠

pH6.7

(6) PEG溶液: 用SMM或NSM配成60% (W/V), 过滤除菌.

(7) 溶菌酶溶液: 用 SMM配成3mg/ml, 过滤除菌.

3. 供体DNA (参见实验 3-14).

4. 受体原生质体 (参见实验8-39).

5. 30℃及40℃水浴.

6. 离心机.

(二) 操作步骤

1. 取新鲜制备的受体原生质体用SMM洗涤并悬浮成10<sup>6</sup>/ml.

2. 取1ml原生质体悬浮液, 加入1μg~100μg DNA/10μl, 加入1ml SMM, 2ml 60% PEG, 混匀.

3. 30℃水浴保温, 定时取样涂布 RMM及 RCM.

4. 取不加DNA的受体原生质体涂布RMM及RCM.

5. 将获得的种间转化子在加有链霉素(200U/ml)和利福平(10U/ml)的平板上连续传代, 在MM上检出具有两种抗性的原养型融合重组子.

**[实验8-45] 质粒DNA转化链霉菌原生质体**

(一) 实验材料

1. 原生质体按[实验8-40]制备.

2. 质粒和克隆载体按[实验8-50]制备.

3. 培养基及试液

(1) R<sub>1</sub>YE平板 (营养缺陷型补加营养物质)

基础液:

蔗糖	103 g	微量元素溶液*	2ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g	酪蛋白氨基酸	0.1 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.12 g	琼脂	22.0 g
葡萄糖	10.0 g	蒸馏水	加至 700ml
L-天冬酰胺·H <sub>2</sub> O	2.0 g		

70ml分装, 121℃灭菌25min.

分开灭菌下列原液:

- ① 22.2g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.
- ② 0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- ③ 0.25g/L TES (pH7.2).
- ④ 100g/L酵母膏溶液.

使用前, 70ml培养基添加 10ml 22.2g/L CaCl<sub>2</sub>, 10ml 0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10ml TES溶液, 5ml 100g/L酵母膏溶液.

(2) 营养软琼脂(SNA):

营养豆汤粉	8 g	水	1000ml
琼脂	5 g		

(3) P液:

基础液:

蔗糖	103 g	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.03 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g	蒸馏水	加至700ml

70ml分装, 121℃灭菌30min.

分开灭菌下列原液:

- ① 0.5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- ② 36.8g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.
- ③ 0.25mol/L TES (pH7.2).
- ④ 微量元素溶液:

ZnCl <sub>2</sub>	40mg	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	10mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200mg	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10mg	蒸馏水	1000ml
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10mg		

使用前各取10ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, TES和2ml 微量元素溶液加到

70ml基础液中。

(4) T液:

混合以下无菌溶液:

10.3%蔗糖	25ml	微量元素溶液*	0.2ml
蒸馏水	75ml	2.5% $K_2SO_4$	1ml

在9.3ml上述溶液中加入:

5mol/L  $CaCl_2$  0.2ml

1mol/L Tris-马来酸缓冲液\*\* 0.5ml

使用时取3份体积的上述溶液加到1份重量的PEG1000中, PEG1000预先要经高压灭菌。

\* 见P液。

\*\*配制 1mol/L Tris, 然后用马来酸调节至pH8.0。

4. 台式离心机。

5. 相差显微镜。

6. 血球计数板。

7. 30℃培养箱, 等。

(二) 操作步骤

1. 按〔实验8-40〕步骤1-13制备链霉菌原生质体。

2. 从悬浮中取少量用血球计数板计数原生质体数。

3. 将原生质体悬液等分成小体积, 每份约含 $4 \times 10^8$ 个原生质体。

4. 取一个小体积样品, 3000r/min离心7min, 去上清液。

5. 用手指轻弹试管, 用残留的缓冲液分散原生质体。

6. 加入DNA (溶于TE缓冲液中, 总体积不超过20 $\mu$ l) 混匀, 吸好5mlP液。

7. 立即加入0.5mlT液, 用同一微量移液器上下吹吸一次, 从加入T液时开始计时。

8. 1~2min后加入5mlP液, 2min内加完, 先慢后快。

9. 2000r/min离心5min。

10. 弃尽上清液, 沉积用1mlP液重新悬浮。

11. 0.1ml涂布R<sub>2</sub>YE平板。

12. 30℃培养20h。

13. 用含有抗生素的SNA覆盖R<sub>2</sub>YE平板或让其形成孢子, 3天后选



行抗性菌落的计数。

**(实验8-46)真菌原生质体转化**

真菌原生质体摄取外源DNA有如下特征：① 必须有Ca<sup>2+</sup>的出现。对于酿酒酵母和绝大多数曲霉以及其他若干丝状真菌而言，氯化钙的最适浓度为10mmol/L，仅链孢霉使用50mmol/L CaCl<sub>2</sub>。② 转化原生质体的细胞浓度通常为10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>/ml。③ 待转化的外源DNA通常为线性或环状双链DNA，单链DNA对酿酒酵母和*Ascobolus immersus* 同样有效。DNA使用量通常在1~20μg。④ 转化缓冲液通常为10mmol/L Tris-HCl (pH 7.5或8.0) 或10mmol/L 3-(N-吗啡啉) 丙磺酸 (MOPS) (pH6.0)。⑤ 转化时间通常在15~30min。⑥ 必须使用PEG。使用浓度在30~40%。

经转化成功的原生质体再生后必须进行有效的选择，常用的选择标记

**表 8-28 真菌原生质体转化用DNA常带有的标记**

标 记	来 源	表 型	已使用的菌属
Hyg B <sup>r</sup>	大肠杆菌	潮霉素抗性	嗜糖酵母属、头孢霉属、孢囊菌属、草刺盘属、针孢霉属、黑粉菌属、 <i>Fulvia</i>
Neo <sup>r</sup>	大肠杆菌	卡那霉素(G418)抗性	黑粉菌属、须霉属 <i>Sclerotium</i>
Pen <sup>r</sup>	粗糙链孢霉	多菌灵抗性	草刺盘属、全浊菌属
oli C <sup>r</sup>	黑曲霉	寡霉素抗性	构巢曲霉
amd S <sup>r</sup>	构巢曲霉	乙酰胺的利用	青霉 孢腔菌属 草刺盘属
pyr-4 <sup>r</sup>	粗糙链孢霉	嘧啶合成	曲霉属 青霉属
arg B <sup>r</sup>	构巢曲霉	精氨酸合成	曲霉属 <i>Magnaporthe</i>
bla	大肠杆菌	β-内酰胺酶(分开青霉素并与溴发生呈色反应)	嗜糖酵母属
lac Z	大肠杆菌	β-葡萄糖苷酶(分解X-gal使菌落呈色)	曲霉属

表 8-29

常用于真菌原生质体转化的成熟方法

菌 株	原生质体制备方法	转化方法	转化率 (个/ $\mu\text{g}$ .DNA)
粗糙链孢菌	① 发芽分生孢子 ② 50mmol/L Tris(pH 8.0), 1.4mg/ml Novozyme 234, 1mol/L 山梨醇, 30°C 培养 1h	① 1~2 $\mu\text{g}$ DNA (溶于 5 $\mu\text{l}$ 5mg/ml 的肝素溶液中) 及 5 $\mu\text{l}$ 原生质体 (约 $10^7$ 个) 加到 100 $\mu\text{l}$ 50mmol/L Tris-1mol/L 山梨醇-50mmol/L $\text{CaCl}_2$ (TSC)-10% PEG4000-1.2% 二甲亚砜中, 冰浴 30min ② 用 TSC 配制 40% PEG 4000, 加 1ml 于上述反应液中, 室温下 20min	$(1\sim 2) \times 10^4$
构巢曲霉	① 发芽分生孢子 ② 10mmol/L 磷酸钠 (pH 5.8), 4mg/ml Novozyme 234 4mg/ml $\beta$ -葡萄糖苷酶, 1mg/ml 血清白蛋白, 30°C 90min	① 1~10 $\mu\text{g}$ DNA, $10^7$ 个原生质体加入 100 $\mu\text{l}$ TSC 中, 室温 25min. ② 连续加入 200, 200, 850 $\mu\text{l}$ 60% PEG4000 (溶于 TSC 中), 室温 20min	70
构巢曲霉	① 玻璃纸上生长菌丝 ② 5mg/ml Novozyme 234, 0.6mol/L KCl, 30°C 90min	① 1 $\mu\text{g}$ DNA, $10^7\sim 10^8$ 个原生质体加到 50 $\mu\text{l}$ 50mmol/L $\text{CaCl}_2$ -9.6mol/L KCl, 添加 12.5 $\mu\text{l}$ 25% PEG6000 (溶于 50mmol/L KCl-10mmol/L Tris (pH 7.5)), 冰上 20min. ② 加入 8 体积 25% PEG, 室温 5min.	50~100
鹅柄孢菌	① 菌丝 ② 25mmol/L 磷酸钾 (pH 6.0), 10mg/ml Novozyme 234, 0.6mol/L 蔗糖, 37°C 1h	① 10 $\mu\text{g}$ DNA, $10^8$ 个原生质体加入 200 $\mu\text{l}$ 10mmol/L Tris (pH 7.6)-10mmol/L $\text{CaCl}_2$ , 室温 15min. ② 加入 2ml 60% PEG 4000, 室温 10min	100
酿酒酵母	① 对数期细胞 ( $2 \times 10^8$ /ml) ② 1% glucosylase, 1mol/L 山梨醇, 30°C 1h	① 5-10 $\mu\text{g}$ DNA 加入 $10^8$ 个原生质体/500 $\mu\text{l}$ (悬浮于 TSC 中), 室温 5min. ② 加入 5ml 40% PEG (溶于 TSC 中), 室温 10min	1~2 (自主复制质粒约为 $1\sim 2 \times 10^6$ )
粟酒裂殖酵母	① 对数生长后期细胞。 ② 20mmol/L 柠檬酸-磷酸 (pH 5.8), 1.2mol/L 山梨醇, 5mg/ml Novozyme 234, 32°C 1h	① $5 \times 10^8$ 个原生质体, 10 $\mu\text{g}$ DNA 加入 1ml TSC, 25°C 15min. ② 10 体积 20% PEG4000-TSC, 25°C 15min	$10^4$

有① 重组子的可见改变 (如菌落形态); ② 重组子的抗生素抗性或营养缺陷型标记; 以及运用共转化技术, 即在转化过程中使用两种DNA, 一种带有选择标记, 而另一种无, 由于共同转化的存在而被选择出。常用的选择性标记如表8-28所示。值得一提的是粗糙链孢霉的 $\beta$ -微管蛋白突变基因, 此赋予对多菌灵抗性特征。将此突变等位基因插入cosmid质粒载体已成功地建立起了粗糙链孢霉的完整基因库。

常用于真菌原生质体转化的成熟方法如表8-29。

## 六、原生质体技术中的一些特殊技术

### (一) 供体原生质体的热灭活

在原生质体融合时, 有时会遇到供体能够产生对受体原生质体有致死作用的酶或抗生素或者供体或受体菌株不能找到合适的遗传标记, 此时, 可热灭活作为遗传信息供体的原生质体。经热灭活的原生质体失去再生为细胞的能力, 但在融合过程中可将其遗传物质传递给有活力的受体原生质体。在芽孢杆菌、小单胞菌及链霉菌中已成功地使用了此法。

热灭活时所用的温度至关重要。温度应高到足够引起原生质体活力的显著降低, 但又不能破坏细胞膜和基因组的完整性。温度太高对原生质体有害, 并降低重组子的再生。一般而言, 芽孢杆菌原生质体热灭活用 $50^{\circ}\text{C}$ , 2 h, 链霉菌原生质体热灭活用 $50^{\circ}\text{C}$ , 2.5 h。

### (二) 供体原生质体的紫外灭活

在原生质体融合实验中, 可用紫外辐射来使所用的亲本原生质体之一或两者失活。紫外辐射即可使重组率提高, 又可降低连锁基因的长度。在原生质体融合时, 如果两亲本原生质体皆经辐射, 则消除两基因组间潜在致死紫外线打击位点选择性交换方可获得重组子。通过调节紫外辐射剂量可调节每基因组致死紫外线打击的数目, 因此当将一亲本基因组的特定区域引入另一菌株的染色体上时, 使用紫外辐射是有益的。此技术已成功地用于链霉

菌、酿酒酵母的原生质体融合中。

### (三) 遗传转移

遗传转移 (genetic transfusion) 通常是指原生质体间非核遗传物质如线粒体、质粒、病毒的转移。原生质体融合可有效地介导这一过程。与真正的原生质体融合不同, 原生质体融合时, 两个完整的基因组可相互作用而无任何直接的物质转移, 遗传转移则总是直接的。

线粒体转移有选择性和非选择性之分。在转移过程中核遗传物质发现交换时为非选择性转移; 在转移过程中不伴有核基因组的转移则为选择性转移。在遗传转移过程中核外遗传物质的转移也非同时进行。

在原生质体融合技术出现之前, 细胞交配仅出现于相对交配型的细胞间。现在, 运用原生质体融合可实现线粒体的非选择性转移且不依靠融合菌株的核交配型。选择性线粒体转移有两种途径, 一是利用亲本的核融合缺陷型, 可以在介导遗传转移时不发生核融合; 二是运用分离纯化的线粒体。运用差速离心将携带有一线粒体标记的无核供体菌原生质体与更大的、有核原生质体分开, 然后用PEG介导无核原生质体与呼吸缺陷型受体原生质体融合; 也可将提纯线粒体用脂质体包裹, 再介导其与受体原生质体融合。

#### (实验8-47) 原生质体融合法转移酵母线粒体及杀伤质粒

本试验中供体菌株为核融合缺陷型, 运用原生质体融合技术诱导亲本原生质体融合形成异核体后, 胞质物质交换而核分离, 由此可使呼吸缺陷型受体菌株获得供体的线粒体及杀伤质粒。

#### (一) 实验材料

##### 1. 菌株

(1) 供体: 酿酒酵母 ATCC 44075 (a his4 kar 1-1[KIL-k<sub>1</sub>]  
[NEX-0],  $\rho^+$ 。

(2) 受体: 啤酒酵母 $\rho^-$ 。

(3) 杀伤酵母敏感株: 糖化酵母7-25。

## 2. 培养基及试液

### (1) MM甘:

酵母氮基(YNBw/o, Difco)	6.7 g		
甘油	20.0 ml	水	1000 ml
琼脂	15.0 g	pH 5.5	

### (2) RMM甘:

酵母氮基(YNBw/o, Difco)	6.7 g		
维生素溶液*	1 ml	氨基酸混合液(不含His)*	10 ml
甘油	20 ml	KCl	46.6 g
琼脂	20 g	水	加至 1000 ml
微量元素溶液*	1 ml	pH 5.5	

\* 参见实验。

### (3) PYG液体培养基:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g	胰蛋白胨	3.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g	酵母膏	3.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g	水	1000 ml
葡萄糖	10.0 g	pH 5.5	

(4) PYG琼脂: PYG液体培养基中添加20.0g/L琼脂, pH4.7.

(5) PYG琼脂上层: PYG液体培养基中添加12.0g/L琼脂, 0.03g/L亚甲基蓝, pH4.7.

(6) TB: 10mmol/L Tris-HCl (pH7.4).

(7) ST:

10mmol/L Tris-HCl (pH7.4)	
0.5mol/L 蔗糖	10mmol/L MgCl <sub>2</sub>

(8) 30% (W/V) PEG:

PEG 4000	30 g	TB	加至	100 ml
蔗糖	5 g	过滤除菌.		
CaCl <sub>2</sub> (无水)	0.47 g			

(9) 0.5mol/L EDTA.

(10) Zymolyase 20T.

(11) 2-巯基乙醇.

## 3. 台式振荡器.

4. 离心机。
5. 28℃水浴。
6. 相差显微镜。
7. 已灭菌注射式微孔滤膜滤器。

## (二) 操作步骤

1. 用Zymolyase酶解, 制备二亲株原生质体((实验8-42)步骤1-12)。
2. 取两亲株原生质体各 $10^8$ , 混合。
3. 3000r/min离心10min, 去上清液。
4. 用残留液体打散原生质体。
5. 加入4ml PEG 溶液, 轻轻吹吸2次。
6. 28℃放置 20min。
7. 1500r/min离心 10min去上清液。
8. ST适当稀释后涂布RMM甘。
9. 28℃培养3~7天。
10. 再生菌落接入MM甘平板。
11. 划线分离纯化。
12. 单菌落点种PYG琼脂平板, 21℃, 48 h。
13. 取 $10^8$ 个糖化酵母7-26细胞混入5ml PYG上层(已融化, 45℃)中, 混匀, 倾注到PYG琼脂平板上的菌落上。
14. 21℃ 24~48 h。
15. 菌落周围有明显抑制圈为已转入, 杀伤质粒和线粒体的胞质重组子。

## (四) 原生质体诱变育种

去除了细胞壁的原生质体由于经紫外辐射后更易获得突变, 因此, 原生质体诱变育种已成为原生质体育种的一种方法。

### (实验8-48) 紫外线诱变原生质体选育苏氨酸高产菌

L-苏氨酸是人体的必需氨基酸, 运用紫外线诱变原生质体法使L-苏氨酸的产量由原先的15mg/ml提高到21.5mg/ml。

#### (一) 实验材料

1. 苏氨酸产生菌(由黄色短杆菌经多次诱变获得)。
2. 溶菌酶、青霉素、甘氨酸。
3. 紫外灯。

4. 其他同〔实验8-39〕。

### (二) 操作步骤

1. 苏氨酸产生菌在含0.8U/ml青霉素、1mg/ml甘氨酸的完全培养基中培养2.5 h。

2. 离心收获菌体，用5mg/ml溶菌酶溶液悬成 $10^7$ 个/ml，32℃下酶解适宜时间(13 h左右)，获94.7%以上的原生质体形成率。

3. 3000r/min离心10min收获原生质体。

4. 高渗缓冲液洗涤一次并稀释成 $10^7$ 个/ml。

5. 按紫外线诱变处理常规〔实验8-17〕诱变处理原生质体1~4min。

6. 涂双层再生平板，32℃培养3天。

7. 挑取再生菌落。

8. 摇瓶发酵筛选高产苏氨酸菌株。

9. 将新筛出菌株作为出发菌株再作2~3次原生质体诱变，筛选高产菌株并分离纯化。

### (五) 原生质体电融合技术

电诱导原生质体融合技术首先由 Zimmermann等提出，先后用于植物原生质体、动物细胞、微生物原生质体的融合及质粒或基因的转移。电诱导原生质体等融合的基本原理是将两个靠近的细胞在高压方波电脉冲作用下，两者发生质膜的融合。此法直观，定向，高效。主要用于替代难以进行化学物质诱导融合的情形中。

#### (实验8-49)电诱导酵母原生质体融合

##### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母( $\rho^-$ )。

2. 糖化酵母( $\rho^+$ 、his $^-$ )。

3. YEPD

酵母膏	20 g	水	1000ml
蛋白膏	10 g	琼脂	20 g
葡萄糖	20 g		

不加琼脂则为液体YEPD。

4. YNBS

酵母氮基(YNBw/o)	6.7 g	水	加至	1000ml
可溶性淀粉	20 g	pH 5.5		
甘油	20ml			

5. RM在YNBS中加入1mol/L山梨醇。

#### 6. 淀粉发酵培养基

可溶性淀粉	50 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
蛋白胨	5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
酵母膏	0.25 g	水	1000ml
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 g	pH 5.5	

7. 0.2mol/L, pH5.8磷酸缓冲液 (PB)。

8. 0.2mol/L, pH5.8 PB-1mol/L山梨醇 (SPB)。

9. 脉冲缓冲液(PM)。

聚乙二醇4000	100g/L	山梨醇	1mol/L
CaCl <sub>2</sub>	10mmol/L		

(去离子水配制)

10. 电诱导细胞融合/基因转移仪GH-401型。

#### (二) 操作步骤

1. 按〔实验8-42〕制备两亲株原生质体。
2. 将两亲株原生质体以1:1比例混合。
3. 用PM洗涤原生质体混合物并重悬成10<sup>8</sup>个/ml。
4. 将原生质体悬浮液注入融合小罐中。
5. 接通电极和电融合仪, 调定电脉冲强度为11kV/cm, 脉冲时间为10μs, 脉冲个数为3, 脉冲间隔时间为1s。
6. 打开电源进行电诱导融合。
7. 室温放置5~10min。
8. 倒出融合混合物, 适当稀释后涂布RM。
9. 28℃培养7~10天。
10. 取出融合子在YNBS平板上传代15次。
11. 淀粉发酵能力测定



## 第十一节 基因工程技术用于工业菌种改良

基因工程是通过核酸分子在体外的插入、拼接和重组而实现遗传物质的重新组合，再借助基因运载系统将目的基因转移至另一宿主细胞系统，并使其在另一宿主细胞系统内进行复制和表达的技术。又称基因操作，基因克隆，DNA重组等。其全部过程大体可分为以下6个步骤：①目的基因的获得；②运载体的选择；③目的基因克隆入运载体中构成重组载体；④将重组载体引入宿主细胞内进行无性繁殖；⑤鉴定带有目的基因的克隆株；⑥目的基因的次克隆及表达。

1. 目的基因的获得 目的基因的获得一般有4条途径；①从生物细胞中提取、纯化染色体DNA并经适当的限制性内切酶部分酶切。在工业菌种基因工程中，目的基因的获得多半采用提取法；②经反转录酶的作用由mRNA在体外合成互补DNA (cDNA)，此主要用于真核微生物及动、植物细胞中特定基因的克隆化；③化学合成，主要用于那些结构简单、核苷酸顺序清楚的基因的克隆；④从基因库中筛选、扩增获得，目前认为是取得任何目的基因的最好和最有效的方法。

2. 运载体的选择 基因工程中所用的载体系统主要有细菌质粒、粘性质粒、酵母菌质粒、 $\lambda$ 噬菌体、动物病毒等。载体一般为环状DNA，能在体外经限制酶及DNA连接酶的作用同目的基因结合成环状(即重组DNA)，然后经转化进入受体细胞；大量复制和表达。

运载体需具备以下特点：①在宿主细胞内具有自我复制的能力；即具有复制起始点。②质粒载体应是松弛型；③分子尽可能小。在保证自我复制能力的同时便于结合较大的目的基因，也不易被机械剪切；④载体上具有两个以上容易检测的遗传标记。一个用来检查是否接上了目的基因，另一个用来检查是否转移至受

体细胞内；⑤在主要区段外具有若干单限制酶切点。

3. 常用载体的种类及用途 常用载体主要有质粒、病毒及噬菌体等。其中细菌质粒主要用于质粒生物分子克隆；噬菌体主要用于原核生物和真核生物特别是cDNA分子克隆；植物DNA病毒和致瘤质粒用于植物分子克隆；猿猴病毒(SV<sub>40</sub>)则主要用于动物分子克隆；酵母质粒用于酵母分子克隆。

4. 酶系的选用 用于分子克隆的酶类主要有限制性内切酶、末端转移酶和连接酶。限制性内切酶有非特异性及特异性两类。作为基因克隆的工具酶，主要是指特异性限制性内切酶，其需要高度特异性的DNA裂解点，用于特定DNA片段的克隆和纯化。经过限制性内切酶酶切后，DNA会形成具有互补的粘性末端或平齐末端，由此允许外源DNA与载体DNA的相同粘性末端的互补(表8-30)。末端转移酶在无模板存在下，可以将任何一种或多种脱氧核苷酸连接在一个DNA片段的3'-OH端上，如另用一种

表 8-30 常用限制性内切酶的切点

限制性内切酶	缓冲液*	特异性切点**
<i>Ava</i> I	L	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \text{C} \underline{\text{YCGR}} \text{G} 3' \\ 3' \text{GRGCY} \text{C} 5' \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Ava</i> II	L	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \quad \blacktriangle \\ \text{G} \underline{\text{G} \text{C} \text{C}} \\ \text{C} \underline{\text{C} \text{G}} \text{G} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Bal</i> I	O	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ \text{TGG} \text{C} \text{C} \text{A} \\ \text{ACC} \text{G} \text{G} \text{T} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Bam</i> HI	H	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ \text{G} \underline{\text{GATCC}} \\ \text{CCTAG} \text{G} \\ \blacktriangle \end{array}$

续表

限制性内切酶	缓冲液 <sup>*</sup>	特异性切点 <sup>**</sup>
<i>Bgl</i> III	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{A} \underline{\text{GATCT}} \\ \text{TCTAG} \text{A} \\ \triangle \end{array}$
<i>Cla</i> I	L	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{AT} \underline{\text{CGAT}} \\ \text{TAGC} \text{TA} \\ \triangle \end{array}$
<i>Eco</i> RI	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{G} \underline{\text{AATTC}} \\ \text{CTTAA} \text{G} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hae</i> III	L	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{GG} \text{CC} \\ \text{CC} \text{GG} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hinc</i> II	L	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{GTY} \text{RAC} \\ \text{CAR} \text{YTG} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hind</i> III	L	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{A} \underline{\text{AGCTT}} \\ \text{TTCGA} \text{A} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hinf</i> I	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{G} \underline{\text{ANTC}} \\ \text{CTNA} \text{G} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hpa</i> I	L or K	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{GTT} \text{AAC} \\ \text{CAAT} \text{TTG} \\ \triangle \end{array}$
<i>Hpa</i> II	O	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{C} \underline{\text{CGG}} \\ \text{GGC} \text{C} \\ \triangle \end{array}$
<i>Kpn</i> I	O	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{GGTAC} \text{C} \\ \text{C} \text{CATGG} \\ \triangle \end{array}$

续表

限制性内切酶	缓冲液*	特异性切点**
<i>MboI</i>	H or L	$\begin{array}{c} \nabla \text{GATC} \\ \text{CTAG} \end{array}$
<i>MspI</i>	L	$\begin{array}{c} \nabla \text{CCGG} \\ \text{GGC} \end{array}$
<i>PstI</i>	H or L	$\begin{array}{c} \text{CTGCAG} \\ \nabla \text{GACGTC} \end{array}$
<i>PvuI</i>	H	$\begin{array}{c} \text{CGATCG} \\ \nabla \text{GCTAGG} \end{array}$
<i>PvuII</i>	L	$\begin{array}{c} \nabla \text{CAGCTG} \\ \text{GTCGAC} \end{array}$
<i>SacI(SstI)</i>	O	$\begin{array}{c} \text{GAGCTC} \\ \nabla \text{CTCGAG} \end{array}$
<i>SacII</i>	L	$\begin{array}{c} \text{CCGGGG} \\ \nabla \text{GGCGCC} \end{array}$
<i>SalI</i>	H	$\begin{array}{c} \nabla \text{GTCGAC} \\ \text{CAGCTG} \end{array}$
<i>Sau3A</i>	L	$\begin{array}{c} \nabla \text{GATC} \\ \text{CTAG} \end{array}$
<i>SmaI</i>	K	$\begin{array}{c} \text{CCCGGG} \\ \nabla \text{GGGCC} \end{array}$

续表

限制性内切酶	缓冲液*	特异性切点**
<i>Stu</i> I	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{AGGCCT} \\ \text{TCCGGA} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Taq</i> I	L	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{T CGA} \\ \text{AGC T} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Xba</i> I	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{TCTAGA} \\ \text{AGATC T} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Xho</i> I	H	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{CTCGAG} \\ \text{GAGCT C} \\ \blacktriangle \end{array}$
<i>Xma</i> I	O	$\begin{array}{c} \nabla \\ \text{C CCGG G} \\ \text{GGGCC C} \\ \blacktriangle \end{array}$

\* 缓冲液 O: 无盐, L: 低盐, H: 高盐 K: 钾盐

\*\* A: 腺嘌呤, C: 胞嘧啶, G: 鸟嘌呤, T: 胸腺嘧啶, N: 任一碱基, R: 任一嘌呤, Y: 任一嘧啶

底物如dATP并可形成同聚末端, 如A-A-A-A...; 将另一种DNA片段的3'端则可用dTTP为底物形成T-T-T-T...; 将另一种DNA片段的3'端则可用dTDD为底物形成T-T-T-T...同聚末端。此法的优点是: ①任一种DNA片段的两端都连上一个同聚末端, 可以避免本身粘合环化, ②同聚末端比限制酶切所得粘合更紧密, 所以不需要在体外连接, 就可以直接用于转化, 然后利用受体细胞内的连接酶进行连接。缺点是回收目的基因比较困难。DNA连接酶是在一定条件下把一个DNA片段的5'-P同另一个DNA片段的3'-OH, 通过脱水作用, 形成磷酸二酯键, 由此将两个DNA片段连接成一个分子。

5. 重组载体的构建 DNA 体外重组是将目的基因用DNA

连接酶连接到合适的载体DNA上，可采用粘端连接法和末端连接法。粘端连接法的一般过程是：用适当的限制性内切酶分别酶切含有目的基因的DNA及载体DNA，使它们的两端各具有相同的粘性末端；用磷酸单酯酶去除载体5'-P，使之不能自身环化；在适当温度下，两者的互补粘性末端通过氢键配对，再在DNA连接酶的作用下连接载体DNA与外源DNA间的单链缺口。平端连接法又分平接法和接夹法。前者是运用高剂量的T<sub>4</sub>连接酶将载体和目的基因的平端连接起来；后者是运用DNA连接酶将带有一种或多种常用限制性内切酶识别顺序的双链DNA多切点接头连接到目的DNA的两端，再用限制性内切酶将接头切成具有粘性末端的单链，然后按粘性末端连接法进行。此外，还有运用末端转移酶合成同聚末端进行粘合的。

6. 重组DNA的转化与鉴定 重组DNA的转化方法见本章第八节。鉴定方法可运用分子生物学及免疫学方法，也可运用酶方法(见第四章及下述实验)。

**〔实验8-50〕耐热 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆和表达**

将提取的嗜热脂肪芽孢杆菌全染色体DNA，经限制性内切酶切割成小片段并与pBR322质粒DNA重复，转化大肠杆菌获得芽孢杆菌基因文库，从中选出目的基因克隆入芽孢杆菌表达载体并转化入芽孢杆菌中(图8-21)。

**(一) 实验材料**

1. 耐热 $\alpha$ -淀粉酶生产菌 嗜热脂肪芽孢杆菌。
2. 枯草芽孢杆菌。
3. 大肠杆菌HB101。

4. 质粒

① pBR322

② pBD8

5. LB

蛋白胨	10g	水	1000ml
酵母膏	5g	pH 7.5	
NaCl	10g		

半固体含0.6%琼脂粉，固体LB含1.5%琼脂粉。

6. 25mg/ml 氨苄青霉素溶液 水配制, 过滤除菌,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放。
7. 12.5mg/ml 四环素溶液 用乙醇 (50%V/V) 配制,  $-20^{\circ}\text{C}$ , 避光存放。
8. Hind III

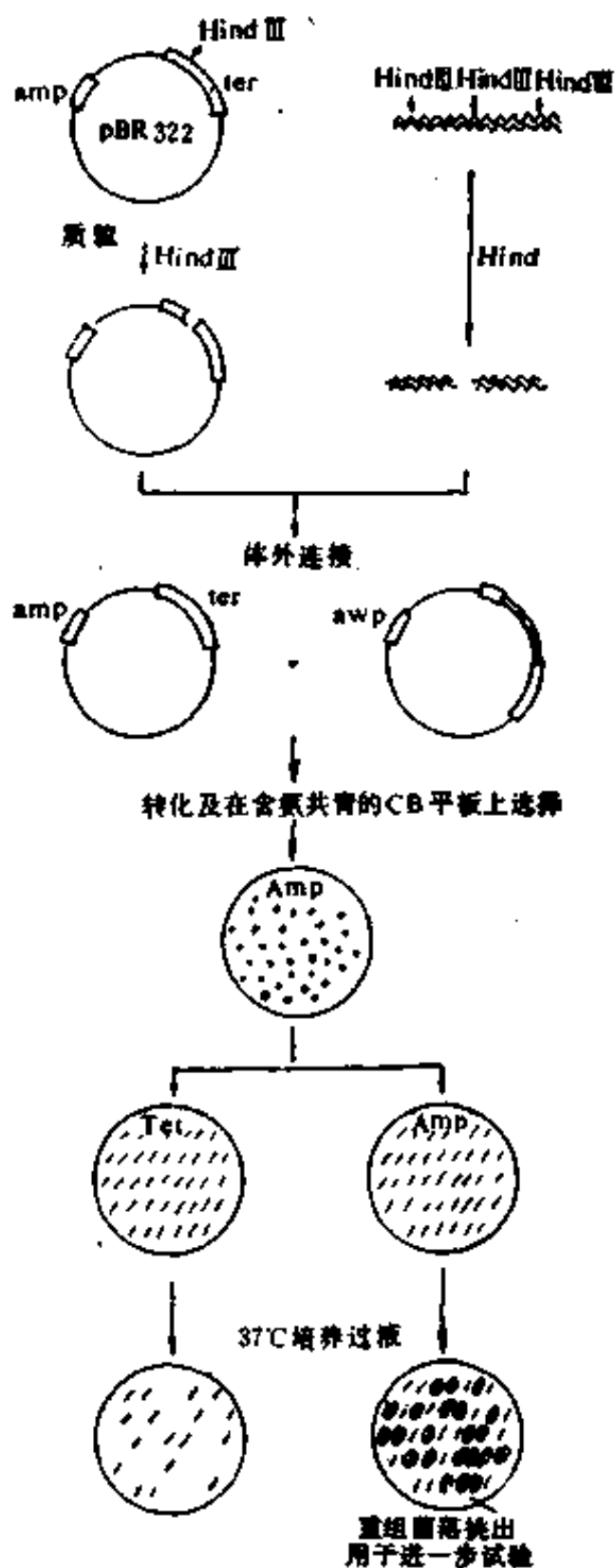


图 8-21 外源DNA插入失活及重组子的选择

9. 无水乙醇.
10. TE  
10mmol/L Tris (pH8.0)                      1mmol/L EDTA
11. STE (10×)  
100mmol/L Tris (pH8.0)                      10mmol/L EDTA  
1mmol/L NaCl
12. 氯仿.
13. 小肠碱性磷酸酯酶 (CIP).
14. 65℃水浴.
15. T<sub>4</sub> DNA连接酶.
16. 37℃水浴.
17. 16℃水浴.

## (二) 操作步骤

1. 嗜热脂肪芽孢杆菌染色体DNA提取及纯化按〔实验3-8〕进行.
2. 质粒pBR322及pBD6的提取及纯化按〔实验8-26〕进行.
3. 染色体DNA及质粒DNA的含量用紫外分光光度测定, 按〔实验8-30〕进行.
4. 染色体DNA的酶切
  - (1) 在一小离心管中按下列顺序加入:
    - ① 10×浓缩酶解缓冲液 20μl; ② 100mmol/L Tris, pH7.6;
    - ③ 100mmol/L MgCl<sub>2</sub>; ④ 500mmol/L NaCl; ⑤ 10mmol/L DTT;
    - ⑥ H<sub>2</sub>O(180-x-y)μl; ⑦ DNA溶液10μg/xμl; ⑧ Hind III 20U/yμl
  - (2) 37℃ 1h.
  - (3) 65℃ 10min.
  - (4) 取5μl作琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切结果〔实验8-33〕.
  - (5) 加入200μl水饱和酚/氯仿抽提, 并用2倍体积的冷乙醇沉淀纯化酶切DNA〔实验3-8〕.
  - (6) 风干后用10μl TE溶解, 4℃存放备用.
5. 载体pBR322 DNA的制备
  - (1) 在一小离心管中按下列顺序加入:
    - ① 10×浓缩酶解缓冲液 2μl; ② H<sub>2</sub>O (18-x-y)μl; ③ pBR322 DNA溶液2μg/xμl; ④ Hind III 4U/yμl



- (2) 37°C 1 h.
- (3) 65°C 10min.
- (4) 取1 $\mu$ l作琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切是否完全.
- (5) 用20 $\mu$ l水饱和酚/氯仿抽提, 并以2倍体积的冷乙醇测定纯化酶切DNA.

(6) 风干后用5 $\mu$ l TE溶解, 并加入,  
 10 $\times$  CIP缓冲液                      5 $\mu$ l

}	0.5mmol/L Tris (pH9.0) 10mmol/L MgCl <sub>2</sub> 1mmol/L ZnCl <sub>2</sub> 10mmol/L精胺酰
---	--

H<sub>2</sub>O (40-x) $\mu$ l; CIP 0.5U/x $\mu$ l

- (7) 37°C, 60min.
- (8) 加入: H<sub>2</sub>O 40 $\mu$ l; 10 $\times$ STE 10 $\mu$ l; 10% SDS 5 $\mu$ l.
- (9) 65°C, 45min.
- (10) 用苯酚/氯仿抽提2次, 再用氯仿抽提2次.
- (11) 2体积冷乙醇沉淀DNA, 70%乙醇洗涤沉积3次.
- (12) 风干, 用10 $\mu$ l TE溶解, 4°C存放备用.

## 6. DNA重组

(1) 在一小离心管中加入:

酶切去磷酸载体DNA 1 $\mu$ g/5 $\mu$ l; 酶切染色体DNA 5 $\mu$ g/5 $\mu$ l;  
 T<sub>4</sub> DNA连接酶缓冲液 (10 $\times$ ) 5 $\mu$ l

}	0.5mmol/L Tris(pH7.6) 100mmol/L MgCl <sub>2</sub> 100mmol/L DTT 500 $\mu$ g/ml牛血清白蛋白(第五部分)
---	---

10mmol/L ATP 5 $\mu$ l; H<sub>2</sub>O (30-x) $\mu$ l; T<sub>4</sub> DNA连接酶5 $\mu$ l/  
 x $\mu$ l

- (2) 16°C 8~16 h.
- (3) 65°C 15min.
- (4) 取2 $\mu$ l连接混合物进行琼脂糖凝胶电泳, 确定连接情况.

## 7. 质粒DNA转化及克隆株的筛选

(1) 将大肠杆菌HB101接入40ml LB培养液中, 120r/min振荡培养过夜(37℃)。

(2) 取1ml HB101培养液加到100ml LB培养液中, 37℃, 120r/min振荡培养至 $OD_{600nm}$ 达到0.3~0.5(约需2~3h)。

(3) 取10ml HB101培养液离心收获细胞。

(4) 将细胞沉积用5ml 50mmol/L  $CaCl_2$ 溶液轻轻悬浮。

(5) 将细胞悬液置冰浴中30min。

(6) 10000r/min离心2min, 收获沉积并用4℃的50mmol/L  $CaCl_2$ 溶液1ml悬浮。

(7) 取此细胞悬液200 $\mu$ l与0.1 $\mu$ g重组质粒DNA混匀。

(8) 置冰浴中30min。

(9) 转置42℃水浴中2min。

(10) 加入1ml LB培养液。

(11) 37℃, 120r/min振荡培养45min。

(12) 转化株在含氨苄青霉素50 $\mu$ g/ml的LB平板上选择转化子。复印一定数目的转化子至含四环素(10 $\mu$ g/ml)的平板上, 根据对四环素敏感的菌落比例数, 得到转化子中的重组频率。

(13) 以氨苄青抗性而四环素敏感的菌株为重组子, 用于进一步试验。

## 8. 产生 $\alpha$ -淀粉酶活力的重组菌株的鉴定。

(1) 制备含0.5%可溶性淀粉的LB平板。

(2) 将重组菌株点种其上。

(3) 37℃ 24h。

(4) 将浸有0.5% Triton的滤纸一次性盖于平板表面。

(5) 37℃ 10min。

(6) 每皿加入2~3ml碘液[实验6-29]。

(7) 菌落及周围被染色为阳性克隆。

(8)  $\alpha$ -淀粉酶活力的定量测定[实验6-29]。

(9) 重组 $\alpha$ -淀粉酶的耐热性测定。同上, 反应温度在65℃

(10) 重组株斜面保藏。

## 9. 耐热 $\alpha$ -淀粉酶基因的次克隆及表达

(1) 将重组株增殖, 提纯重组质粒, 按[实验8-26进行]。

(2) 按载体pBR322 DNA制备方法〔步骤5(1)~5(3)〕, 用HindⅢ酶切20 $\mu$ g重组质粒。

(3) 0.8%琼脂糖凝胶电泳, 电泳洗脱法回收 $\alpha$ -淀粉酶基因〔实验6-35〕。

(4) 回收 $\alpha$ -淀粉酶基因纯化产物, 以10 $\mu$ iTE溶解。

(5) 枯草芽孢杆菌质粒载体pBD, 按上述方法制备去磷酸HindⅢ酶切载体〔步骤5(1)~5(12)〕。

(6) 按步骤6(1)~6(4)将 $\alpha$ -淀粉酶基因与酶切去磷酸载体DNA重组, 载体DNA和 $\alpha$ -淀粉酶基因DNA以1:1混合。

(7) 将重组质粒DNA 转化入枯草芽孢杆菌, 转化按〔实验6-44〕步骤1~3进行。

(8) 筛选转化株, 确定其产 $\alpha$ -淀粉酶的产量及性质。

(9) 转化株保藏及稳定性等试验。

## 第九章 工业微生物菌种保藏技术

在生产发酵中，具有高产有重要经济价值的某一期待代谢产物之能力的微生物菌种的保存和长期保藏，对于一成功的工业发酵过程极为重要。理想的菌种保藏方法应具备下列条件：(1) 经长期保藏后菌种存活健在；(2) 保证高产突变株不改变表型和基因型，特别是不改变初级代谢产物和次级代谢产物生产的高产能力。菌种保藏的基本措施是低温、干燥、真空。近年来，大量有特殊意义和特征的高等动、植物细胞能够在液氮中长期保藏，并发现在液氮中保藏的菌种的存活率远比其他保藏方法高且回复突变的发生率极低。液氮保藏已成为工业微生物菌种保藏的最好方法。

工业微生物菌种保藏技术很多。本章主要介绍有实际应用价值的、极为有效的四类菌种保藏技术：(1) 冷冻干燥或真空干燥保藏；(2) 超低温或在液氮中冷冻保藏；(3) 转接培养或斜面传代保藏；(4) 土壤或陶瓷珠等载体干燥保藏。

### 第一节 冷冻保藏

冷冻保藏为保藏微生物菌种的最简单而有效的方法。通过冷冻，使微生物代谢活动停止。一般而言，冷冻温度愈低，效果愈好。为了获得满意的冷冻结果，通常应在培养物中加入一定的冷冻保护剂。冷冻保藏时温度要求在 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下，同时应认真掌握好冷冻速度和解冻速度。冷冻保藏的缺点之一是培养物运输较困难。

### 一、普通冷冻保藏技术 (-20℃)

将液体培养物或从琼脂斜面培养物收获的细胞分接到试管或指管内，然后贮藏于一冰箱的冷藏室中，或于温度范围在 -5 ~ -20℃ 的普通冰箱 (-20℃) 中。或者，将菌种培养在小的试管或培养瓶斜面上，待生长适度后，将试管或瓶口用橡胶塞严格封好，同上置于冰箱中保存。用此方法可以维持若干微生物的活力 1~2 年。应注意的是经过一次解冻的菌株培养物不宜再用来保藏。保藏过程中应注意控制保藏温度，培养瓶或试管应严格密封。这一方法虽简便易行，但不适宜多数微生物的长期保藏。

### 二、超低温冷冻保藏技术 (-60~-80℃)

要求长期保藏的微生物菌种，一般都要求在一60℃以下进行保藏。在超低温冷藏柜中保藏菌种的一般方法是：

1. 离心收获对数生长中期至后期的微生物细胞；
2. 用新鲜培养基重新悬浮所收获的细胞；
3. 加入等体积的20%甘油或10%二甲亚砜；
4. 混匀后分装入冷冻指管或安瓿中，于一70℃超低温冰箱中保藏。

如果待保藏菌种生长在斜面上，则可用含10%甘油的新配制液体培养基洗涤收获。超低温冰箱的冷冻速度一般控制在1~2℃/min。若干细菌和真菌菌种可通过此保藏方法保藏5年而活力不受影响。

### 三、液氮冷冻保藏技术

把细胞悬浮于一定的分散剂中或是把在琼脂培养基上培养好的菌种直接进行液体冷冻，然后移至液氮 (-196℃) 或其蒸汽相中 (-156℃) 保藏。进行液氮冷冻保藏时应严格控制致冷速度。

### (一) 冷冻保护剂

在液氮冷冻保藏中，最常用的冷冻保护剂是二甲亚砜和甘油，最终使用浓度一般为甘油10%、二甲亚砜5%。所使用的甘油一般用高压蒸汽灭菌，而二甲亚砜最好为过滤灭菌。

### (二) 液氮冷冻保藏微生物菌种的步骤

#### 1. 待冷冻保藏菌种悬液的制备

##### (1) 从生长斜面制备菌悬液

- ①每一斜面加入5ml含10%甘油的营养液体培养基；
- ②用巴氏吸管吹吸斜面制成孢子及菌体细胞悬液；
- ③0.5~1ml分装玻璃安瓿或液氮冷藏专用塑料瓶，玻璃安瓿用酒精喷灯封口；
- ④将所有封好的安瓿置于5℃冰箱中30min，以使细胞和悬浮培养基间达到平衡。

##### (2) 从浸没培养物制备菌悬液

- ①在浸没培养液中加入等体积20%无菌甘油；
- ②轻轻振荡混匀培养液，如果菌体絮凝较紧，则需先用玻璃珠打散；
- ③0.5~1ml分装玻璃安瓿或液氮冷藏专用塑料瓶，玻璃安瓿用酒精喷灯封口；
- ④将所有封好的安瓿置于5℃冰箱中30min，以使细胞和悬浮培养基之间达到平衡。

#### 2. 控速冷冻

- (1)将安瓿或液氮瓶置于铝盒或布袋中，然后置于一较大的金属容器中；
- (2)将此金属容器置于控速冷冻机的冷冻室中；
- (3)以1~2℃/min的致冷速度降温，直到温度达到相对温度之上几度的细胞冻结点(通常为-30℃)；
- (4)补加一定量的液氮至系统中，使细胞在冻结点时尽可能快地发生相变；

(5)细胞冻结后,将致冷速度降为 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,直到温度达 $-50^{\circ}\text{C}$ ;

(6)将安瓿迅速移入液氮罐中于液相( $-196^{\circ}\text{C}$ )或气相( $-156^{\circ}\text{C}$ )中保存。

如果无控速冷冻机,则一般可用如下方法代替:将安瓿或液氮瓶置于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻4h,然后迅速移入液氮罐中保存。

### (三)复苏

复苏液氮冷冻菌种的一般方法是:

1. 从液氮罐中取出所需的安瓿,立即置于冰浴中;
2. 迅速将安瓿置于 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 水浴中,并轻轻摇动以加速解冰;

3. 用巴氏吸管将安瓿中贮存培养物移接入含有2ml无菌液体培养基的试管中,用同一支吸管反复抽吸数次,然后取 $0.1\sim 0.2\text{ml}$ (约4~8滴)转接入琼脂斜面上。

#### (实验9-1) 快速沙土管保藏法

典型的沙土管保藏菌种真空抽干需一天,很费时间,作者采用安瓿管,分支快速抽干仅需1h左右,待干后采用真空融封,对菌种保藏更为有利(图9-1)。

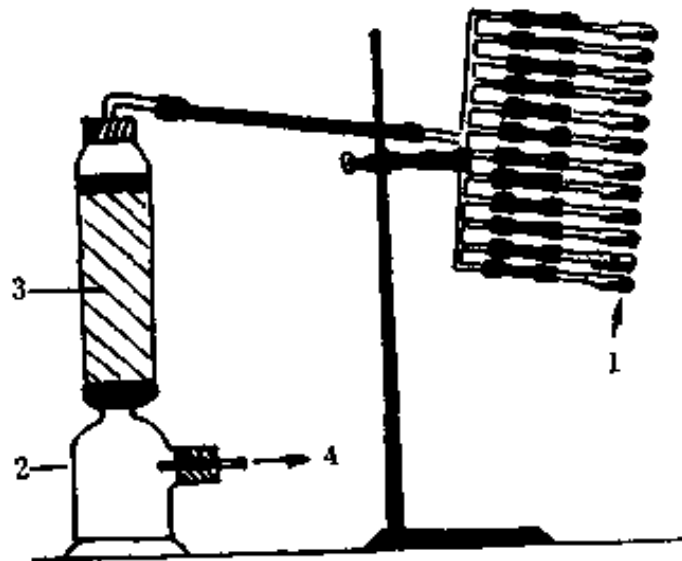


图 9-1 快速沙土管菌种保藏装置

1—安瓿管 2—真空干燥吸收塔 3—CaO 4—连接真空泵

#### (一)实验材料

1. 菌种 曲霉和芽孢杆菌, 培养至长满孢子和芽孢。

2. 沙 取河沙若干, 60目过筛, 弃去大颗粒及杂质, 再用80目过筛, 去掉细砂。用吸铁石吸去铁质, 放在烧杯中加入10%盐酸浸泡2~4h。倒去盐酸, 用水洗至中性, 烘干备用。

3. 器具 7.5×105mm(样品部分直径11mm)的安瓿管, 分支管, 吸收塔, 旋片式真空泵, 无菌水, 6.5×50mm滤纸条, 喷灯, 长镊, 棉花, 烘箱, 高压蒸汽灭菌器, 真空测定器, 接种环, 无菌吸管, 10cm长针头与1ml针筒, 固体蜡。

## (二) 操作步骤

1. 将每个安瓿管中装沙少许, 约为半球量, 塞棉塞, 装入铝质饭盒中高压灭菌1h, 然后120℃烘干。

2. 将无菌水5ml倒入斜面, 用接种环将菌体或孢子刮下, 注意不要刮破培养基。

3. 每安瓿管用长针头吸取上述菌液0.1~0.2ml, 与沙和匀, 将写好菌号、日期的无菌滤纸条放入, 塞好棉塞。

4. 将各安瓿管装在分支管的橡皮管内, 用蜡封好。

5. 开动真空泵抽真空。约5~10min, 安瓿管样品出现露滴, 温度降低, 说明没有漏气现象, 否则要检查密封情况。

6. 继续抽气30~40min, 砂粒干后再抽20~30min, 使砂粒完全干燥。

7. 在喷灯上真空封固安瓿管并用高频火花真空测定器测定, 若为天蓝色, 则真空合格, 若为红色, 则不合格, 不予保藏。

8. 将安瓿管置室温或冰箱内保藏。

## 第二节 冻干保藏

冷冻干燥的基本方法是通过在减压条件下使冻结的细胞悬液中的水分升华, 使培养物干燥。此法是微生物菌种长期保藏的最为有效的方法之一。冷冻干燥过程中必须使用冷冻保护剂, 目前国内常用脱脂乳和蔗糖, 国外尚有运用动物血清等的(表9-1)。

大部分微生物菌种可以在冻干状态下保藏10年之久而不丧失



表 9-1

菌种冷冻真空干燥用的保护剂

保护剂的组成	使用者
脱脂牛奶 脱脂牛奶(或奶粉)20%, 110℃灭菌20min	ATCC 国内
脱脂牛奶-谷氨酸钠 脱脂牛奶 10%, 谷氨酸钠1%	
脱脂牛奶-蔗糖-谷氨酸钠 脱脂牛奶 3%, 蔗糖5%, 谷氨酸钠1%	
血清 马血清, 过滤除菌	NRRL
血清-葡萄糖 马血清400ml, 葡萄糖30g, 0.2μm过滤除菌	NCTC
干燥合剂 马血清300ml, 牛肉膏0.5g, 蛋白胨0.8g, 葡萄糖30g, 蒸馏水100ml, 0.2μm过滤除菌	NCTC NCIB

注: ATCC 美国标准菌种收藏所 NCTC 英国国立标准菌种收藏所 NCIB 英国国立工业细菌收藏所

活力。而且经冻干后的菌株无需进行冷冻保藏, 便于运输。常见的冻干装置见图9-2及图9-3。

### (实验9-2) 菌种冷冻干燥保藏

#### (一) 实验材料

1. 冷冻干燥器。
2. 可调控温装置 (-40~-10℃)。
3. 带有泡沫塑料内衬冷冻槽(2只)。
4. -50~50℃温度计(2支)。
5. 用脱脂棉轻轻塞好, 并经高压灭菌的硼硅酸盐安瓿。
6. 20%脱脂乳, 高压灭菌。
7. 1ml吸管。
8. 待保藏菌株培养物。

#### (二) 操作步骤

1. 启动冷冻干燥器的致冷单元。当冷凝器的温度达到-40℃时, 启动真空泵, 使真空度达到2.67~4.00Pa。

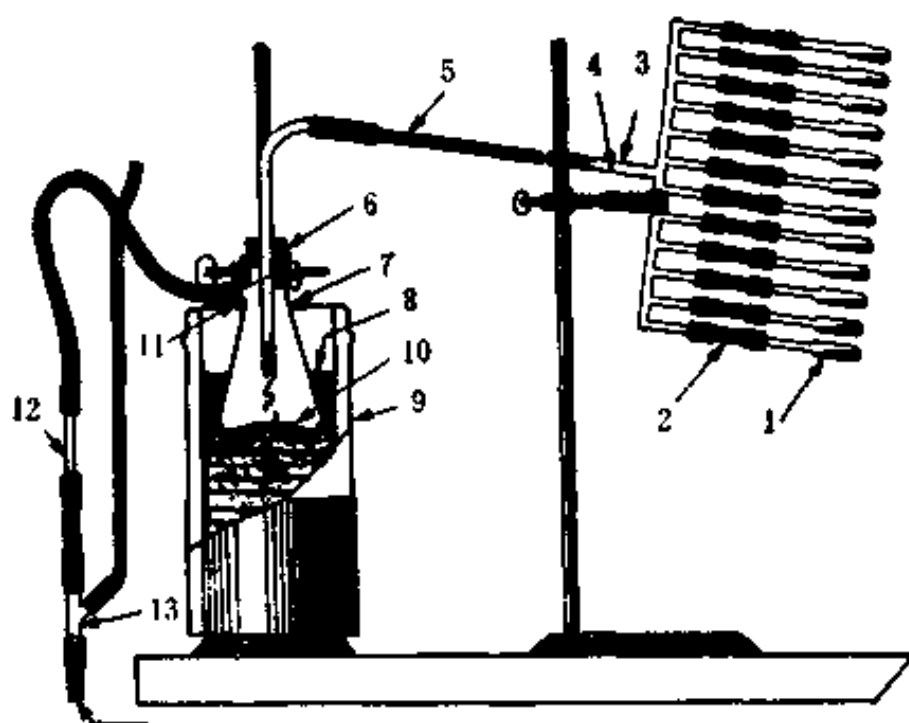


图 9-2 冰冻悬液真空快速干燥简易装置

1—含有冰冻悬液的玻璃安瓿管 2—连接玻璃管和安瓿管的橡皮管  
 3—有12个插口的并联金属或玻璃分支管 4—抽气口 5—连接抽气口与玻璃弯管的真空橡皮塞 6—橡皮塞 7—冷凝抽滤瓶 8—冷冻剂(干冰和酒精) -78°C 9—广口保温瓶 10—冷冻抽吸过来的水分  
 11—抽滤瓶出口 12—棉花过滤器 13—三通: 一头接真空泵, 一头接真空计

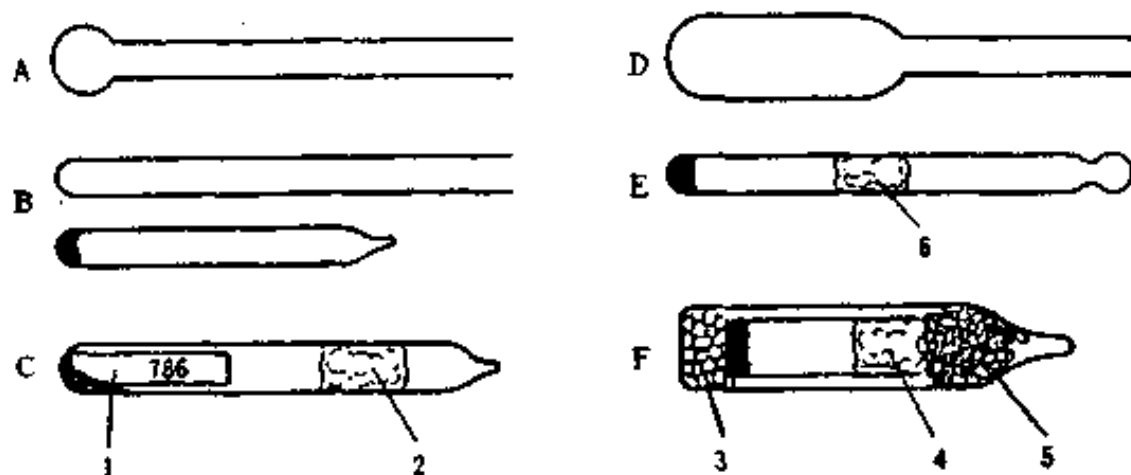


图 9-3 各种安瓿管的实例

A—泪滴型 (7.5×105mm, 样品部分直径为11mm) B—NRRL使用的型式 (6×100mm) C—NCIB、NCTC使用, 放进印有菌号的滤纸片 (5×20mm) D—制备疫苗用 (7.5×110mm, 样品部分15×58mm) E—IAM使用 (8×105mm, 上端用电热封口) F—双管型, ATCC使用 (内管11.5×35mm, 外管14.5×85mm)  
 1—滤纸片(菌种号) 2—棉塞 3—硅胶 4—棉塞 5—石棉线 6—棉塞

2. 将冷冻槽置于歧管之下方。槽中装入2/3 体积的异丙醇，然后插入温度计及可调温控仪降温探头。打开降温探头控制醇浴温度在 $-40^{\circ}\text{C}$ ，这一过程约需30min。

3. 每支斜面加入2ml 20%的脱脂乳，然后用巴氏吸管将斜面上的菌苔吹打下制成孢子或菌体均悬液，最终菌体浓度一般要求在 $10^6\text{CFU/ml}$ 。用细菌浸没培养物来保藏时，加入40%的脱脂乳，混合制成含 $10^6\text{CFU/ml}$ 的均悬液。

4. 取下安瓿上的棉塞，然后用1ml移液管分装安瓿（0.2ml/瓿），重新塞好棉塞。

5. 轻轻振荡安瓿，以使细胞重新悬浮。将安瓿与歧管相联后迅速置于醇浴中，使细胞悬液迅速冻结。

6. 15min后，将歧管与真空泵相通。

7. 维持 $-40^{\circ}\text{C}$ 的醇浴温度90~120min，然后调节温控装置，使醇浴温度上升至 $-10^{\circ}\text{C}$ ，维持2h。

8. 关掉可调温控装置的降温探头，让醇浴温度上升至室温（ $25^{\circ}\text{C}$ ）。

9. 在冷冻干燥的最初4h内应定期测真空度。在安瓿置于真空下后1h内，真空度必须达到13.33Pa，并于菌悬液接近干燥时逐渐降到2.67~4.00Pa。

10. 在真空状态下，让安瓿保存在冷冻干燥机中至少16h，以获得完全干燥。

11. 干燥后，在2.67~4.00Pa的真空度下封瓶。

12. 在所有安瓿都封盖好后，撤去真空。

13. 关闭真空泵。

14. 关闭冷凝器。

如无冷冻干燥器，则应在 $-40^{\circ}\text{C}$ 冰柜中或化学致冷单元中进行。

### (三)冻干菌种的保藏与再生

1. 保藏 冷冻干燥后的培养物在低于 $5^{\circ}\text{C}$ 下保藏。一般认为较低的保藏温度（ $-20\sim-70^{\circ}\text{C}$ ）对于培养物的长期稳定更好。

#### 2. 复苏

(1) 在超净工作台中用70%酒精棉球擦洗安瓿，然后用砂轮在安瓿中锉一道沟。

(2) 用无菌纱布垫或无菌毛巾包好安瓿，然后用手掰开安瓿。

(3) 在安瓿中加入0.5~1ml营养液体培养基, 慢慢旋转安瓿, 使冻干菌种复水。然后将此转接到一含有再生培养基的无菌试管中, 或直接接种琼脂斜面或涂布平板。

(4) 在指管中冻干的菌种通常为絮粉状, 可以将此直接振落入盛有1~2ml液体培养基的试管中, 轻轻振荡5~10min, 然后用此悬液接种适宜的再生培养基。

### 第三节 其他保藏方法

除上述介绍的冷冻保藏和冻干保藏外, 常用的保藏方法还有传代保藏、矿物油中浸没保藏、干燥载体保藏等。

#### 一、传代保藏

将菌种定期在新鲜琼脂培养基上传代, 然后在一定的生长温度下生长和保存的传代保藏方法可用于实验室中若干菌种的保藏。此法最为简单和经济, 且不要求任何特殊的设备。但此方法易发生培养基干枯、菌体自溶、基因突变。因此要求在基本培养基上传代为好, 目的是能淘汰突变株; 同时转接菌量应保持较低水平。斜面培养物应在密闭容器中于5℃保藏, 以防止培养基脱水并能降低代谢活性。此方法一般不适宜作工业生产菌种的长期保藏方法。

#### 二、矿物油中浸没保藏

将琼脂斜面或液体培养物浸入矿物油中于室温下保藏。此方法简便有效。可用于丝状真菌、酵母、细菌和放线菌的保藏。特别对难于冷冻干燥的丝状真菌和难以在固体培养基上形成孢子的担子菌等的保藏更为有效。浸没保藏的操作要点是首先让待保藏菌种在适宜的培养基上生长, 然后注入经170℃下灭菌1~2h的矿

物油，矿物油的用量以高出培养物1cm为宜。

以液体石蜡作为保藏方法时，应对需保藏的菌株预先作试验。因为某些菌株在液体石蜡下生长还十分明显，有些菌株如某些假丝酵母还会同化液体石蜡，也有的对液体石蜡保藏敏感。所有这些菌株都不能用液体石蜡保藏。为了预防不测，一般保藏株2~3年也应做一次存活试验。

我国轻工业部食品发酵研究所对此法进行了研究，获得的主要结果如表9-2。

表 9-2 液体石蜡保藏各类微生物的效果

菌种类型	保 藏 时 间								
	1 年			2 年			3 年		
	供试株数	存活数	存活率	供试株数	存活数	存活率	供试株数	存活数	存活率
酵母	102	99	97.0%	94	85	90.4%	79	71	89.4%
霉菌	74	66	89.2%	70	53	75.7%	54	43	79.6%
毛、根霉	21	19	90.5%	19	16	84.2%	15	13	89.6%
红曲霉	12	12	100%	12	12	100%			

该所指出，矿物油保藏除某些细菌之外，对绝大多数酵母、霉菌、红曲、毛霉、根霉是适合的，尤其对红曲霉效果更好，有的试管能存活达13年之久，发酵性能一般变化不大。

对担子菌的保藏，有报道用液体石蜡保藏担子菌36属43种87株达8年之久，只有一属中的菌株失去活力，以株数计其成活率为94.4%。保藏7年的39属52种的124株则全部存活。以液体石蜡法与菌丝体法及橡皮塞法保藏担子菌进行比较，从存活情况看液体石蜡法更为可取。作者采用液体石蜡保藏了部分细菌、酵母、霉菌，5年后发现米曲霉、黑曲霉和枯草杆菌、八叠球菌生活力仍很强。

### (实验9-3) 液体石蜡保藏菌种

#### (一) 实验材料

1. 供试菌种 保藏培养基斜面培养至菌体或孢子长丰满，对能利用烷烃为碳源的菌株不能采用此法保藏。

2. 液体石蜡 相对密度0.845，馏出温度 340℃，分析纯，装 250~500ml三角瓶，高压灭菌1 h，后置120℃烘箱中干燥2 h，凉冷备用。

3. 器具 10ml吸管，酒精灯，试管塑料帽。

### (二) 操作步骤

1. 将培养好的保藏斜面直接加入无菌液体石蜡至超出斜面顶端 1cm左右，加盖试管塑料帽。

2. 将加液体石蜡的试管置于20℃或室温竖直放置保藏，严防液体石蜡冻结。

## 三、干燥-载体保藏

若干孢子形成真菌和链霉菌可通过吸附于干燥惰性固相载体如土、硅胶或陶瓷表面获得较长时间的保藏。土或硅胶洗涤后分装入带螺盖的试管中，用前高压蒸汽灭菌并风干。

### (一) 土壤保藏法

1. 将经10~15目过筛的园田土晒干，然后与等分的石英砂混匀，5g分装。

2. 121℃ 高压蒸汽灭菌1 h，25℃下风干。

3. 取1ml待保藏菌株的高密度分生孢子或菌丝体悬液滴加到5g干土上，移入无菌试管中并用棉塞塞好。

4. 25℃下让其干透，然后于室温或低温下保藏。

此保藏方法易于进行，并能在普通条件下长期保藏若干菌种。用时，只需无菌地取出少许的土壤洒在新鲜琼脂斜面上。土壤保藏法可适用于放线菌、真菌孢子和细菌芽孢的保藏。

### (二) 硅胶干燥保藏法

1. 在带有螺旋帽的试管(13×100mm)中装半管6~12目G40白色硅胶(含有氯化钙)；

2. 180℃下干热灭菌1.5 h，放入干燥器中严格密封保藏；

3. 用1~2ml 10%脱脂乳从一适度生长的斜面制备一浓的分生孢子或菌丝体悬液；

4. 将上述装有硅胶的试管置于冰浴中，然后滴加入孢子及菌丝体悬

液 (0.5ml/管);

5. 轻轻振荡试管, 使硅胶颗粒松动;
6. 25℃下真空干燥此保藏试管, 然后在干燥剂存在下保藏于一密封容器中。

此保藏法主要适用于链孢霉、曲霉的保藏。

### (三) 陶瓷珠干燥保藏

1. 将10~12粒陶瓷珠置于10ml玻璃管中;
2. 121℃, 高压蒸汽灭菌15min;
3. 用1~2ml 20%蔗糖液洗脱下 24~48 h 的斜面培养物, 制备成细胞悬液;
4. 将灭菌后的陶瓷珠无菌地平铺于一无菌平皿中, 然后每珠接种1滴(约0.2~0.3ml)细胞悬液;
5. 将接种好的陶瓷珠重新装入试管中, 每管以10~12粒为宜;
6. 轻轻塞上塞子, 置于真空干燥箱中干燥 72~96h;
7. 取出试管并击碎陶瓷珠;
8. 25℃下干燥、密封保存。

## 第四节 基因工程菌的保藏

随着基因工程的不断发展, 越来越多的携带含有外源 DNA 片段的杂合质粒的基因工程菌需要得到合理的保藏。由载体质粒等携带的外源DNA片段通常是遗传不稳定的、且很易丢失其外源质粒复制子。质粒基因通常为宿主细胞生长非必需。一般情况下当细胞丢失这些质粒时, 生长速度会加快。

由质粒编码的抗生素抗性在富集含此类质粒的细胞群体时极为有用。当培养基中加入抗生素时, 抗生素提供了一有利于携带质粒的细胞群体的极有用的生长选择压。例如, 在将外源 DNA 输入 *E. coli* 时, 最为常用的质粒是 pBR322。pBR322除能将外源DNA输入 *E. coli* 细胞外, 还赋予 *E. coli* 细胞 Amp<sup>r</sup> 和 Tet<sup>r</sup>。如果在培养基中加入 Amp 和 Tet, 则培养时可选择出含 pBR322 质粒的细

胞。而且在运用基因工程菌进行发酵时，抗生素的加入可帮助维持质粒复制与染色体复制的协调。

我们建议基因工程菌应保藏在含低浓度选择剂的培养基中。

## 第五节 微生物活力和稳定性测定

尽管保藏菌种的方法很多，但所有方法都必须是长期可靠地保持菌种的优良性状不变。这就要求我们在保藏时定期检测菌种活力，以确定保藏培养物的保藏期限和保藏方法的可靠性，以及确定在实际保藏过程中出现的细胞死亡程度和遗传稳定性。对工业微生物生产菌种来说，我们建议保藏菌种的形态学和生化特征（如代谢产物的产生、酶活力、遗传特征及生化指标）应在保藏后加以检测和确定。

加速保藏试验可用于预测保藏过程中保藏培养物的稳定性。在一给定温度下通过对高温下短期活力丧失程度检测，可以用来预测嗜酸乳杆菌的稳定性。

成功的菌种长期保藏方法之有价值的指标包括在保藏6个月、1年或更长时间内存活百分率（或存活单位）。细胞群体的形态学特征或一些特别的生化特征应在菌种保藏前后保持同一性，以及实验室中、中试车间中和生产发酵中产品滴度的稳定性，后者极为重要。

## 第六节 常用菌种保藏培养基

### 一、细菌保藏用培养基

#### (一) PY琼脂 (g/L)

蛋白胨	5	酵母膏	5
-----	---	-----	---



葡萄糖	1	琼脂	20
$K_2HPO_4$	1		

用于需氧菌的保藏。

### (二) 营养琼脂 (g/L)

牛肉膏	1	NaCl	5
酵母膏	2	琼脂	15
蛋白胨	5	pH7.4	

用于需氧菌的保藏。

### (三) 土浸出液琼脂

蛋白胨	5g	琼脂	15g
牛肉膏	3g	水	750ml
土浸出液*	250ml	pH7.0	
$MnSO_4$	5mg		

此培养基最宜用于芽孢杆菌的保藏。其中土浸出液的制备参见第八章。

### (四) MRS

牛肉膏	10 g	吐温-80	1ml
酵母膏	5 g	醋酸钠	5 g
蛋白胨	10 g	$CaCO_3$	15 g
$K_2HPO_4$	2 g	琼脂	11 g
柠檬酸铵	2 g	水	1000ml
葡萄糖	20 g	pH	6.2~6.6

无机盐溶液( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 11.5%;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ , 2.4%) 5ml

用于乳酸杆菌的保藏。

### (五) 番茄汁培养基

酵母膏	10 g	$CaCO_3$	15 g
蛋白胨	10 g	琼脂	11 g
番茄汁滤液(pH7.0)	200ml		
水	800ml	pH7.2	

用于乳酸杆菌的保藏。

#### (六) 醋酸杆菌保藏培养基

蛋白胨	5 g	葡萄糖	20 g
肝浸汁	100ml	琼脂	20 g
CaCO <sub>3</sub>	10 g	水	900ml

肝浸汁的制备方法是：称取450 g 牛肝，切碎，加水2 L，加热煮沸3 h，过滤。

#### (七) 糖蜜培养基 (g/L)

黑色糖蜜	100	CaCO <sub>3</sub>	5
黄豆饼	100	琼脂	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	pH7.2	
蛋白胨	5		

用于厌氧芽孢菌的保藏。

## 二、放线菌用保藏培养基

#### (一) PSA

酵母膏	2 g	蒸馏水	1000ml
可溶性淀粉	10 g	pH7.2	
琼脂	15 g		

#### (二) 天冬酰胺-葡萄糖琼脂 (g/L)

天冬酰胺	0.5	葡萄糖	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	琼脂	17
牛肉膏	2.0	pH6.8~7.0	

#### (三) Emerson氏培养基 (g/L)

蛋白胨	4.0	葡萄糖	10
酵母膏	1.0	琼脂	20
牛肉膏	4.0	pH7.0	
NaCl	2.5		

#### (四) 高氏合成培养基 (g/L)

可溶性淀粉	20	NaCl	0.5
KNO <sub>3</sub>	1	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	琼脂	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	pH7.2	

### 三、酵母菌株用保藏培养基

#### (一)MY培养基 (g/L)

麦芽汁	3	葡萄糖	10
酵母膏	3	琼脂	15
蛋白胨	5		

#### (二)PYG (g/L)

蛋白胨	3.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0
酵母膏	3.0	葡萄糖	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0	琼脂	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0		

#### (三)麦芽汁琼脂

麦芽汁 (12%)	1000ml	琼脂	15g
-----------	--------	----	-----

### 四、丝状真菌用保藏培养基

#### (一)CMA (g/L)

玉米粉	60	琼脂	15
-----	----	----	----

#### (二)马铃薯琼脂

25%马铃薯浸汁	1000ml	琼脂	20g
葡萄糖	10g	pH	6.0

#### (三)干草琼脂

干草	50g	蒸馏水	1000ml
----	-----	-----	--------

121℃, 30min, 过滤得浸汁。每1000ml浸汁中补加:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g	琼脂	20g
pH	6.2		

#### (四) 察氏琼脂 (g/L)

NaNO <sub>3</sub>	2~3	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	蔗糖(或葡萄糖)	30
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	琼脂	15~20
KCl	0.5	pH	6.0

此培养基主要用于青霉及曲霉的保藏。

#### (五) 菠菜-胡萝卜琼脂

菠菜	20 g	蒸馏水	1000ml
胡萝卜	20 g		

煮沸1 h 过滤, 滤液中加琼脂20 g, 补加水至1000ml。

此培养基主要用于毛霉的保藏。

## 第七节 菌种保藏机构

1979年7月, 在国家科委和中国科学院主持下, 成立了中国微生物菌种保藏管理委员会。(CCCCM), 并确定由有关单位首先组成了与普通、农业、工业、医学、抗生素和兽医等微生物学有关的菌种保藏中心。它的任务是促使我国微生物菌种保藏的合作、协调与发展, 以便更好地利用微生物资源为我国的经济建设、科学研究和教育事业服务。各保藏管理中心从事应用微生物各学科的微生物菌种的收集、保藏、管理、供应和交流。

### (一) 中国微生物菌种保藏管理委员会组织系统

中国微生物菌种保藏管理委员会办事处:

中国科学院微生物研究所内, 北京

#### 1. 普通微生物菌种保藏管理中心 (CCGMC):

中国科学院微生物研究所, 北京 (AS): 真菌、细菌

中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 (AS-IV): 病毒

2. 农业微生物菌种保藏管理中心 (ACCC);  
中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 (ISF)
3. 工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC);  
轻工业部食品发酵工业科学研究所, 北京 (IFFI)
4. 医学微生物菌种保藏管理中心 (CMCC);  
中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 (ID); 真菌  
卫生部药品生物制品检定所, 北京 (NICPBP); 细菌  
中国医学科学院病毒研究所, 北京 (IV); 病毒
5. 抗生素菌种保藏管理中心 (CACC);  
中国医学科学院抗菌素研究所, 北京 (IA) 和四川抗  
菌素工业研究所, 成都 (SIA); 新抗菌素菌种  
华北制药厂抗菌素研究所, 石家庄 (IANP); 生产用抗  
菌素菌种
6. 兽医微生物菌种保藏管理中心 (CVCC);  
农业部兽医药品监察所, 北京 (CIVBP)

## (二) 国外著名菌种保藏中心

1. 美国标准菌种收藏所 (ATCC), 美国马里兰州, 罗克维尔市
2. 荷兰真菌中心收藏所 (CBS), 荷兰, 巴尔恩市
3. 英联邦真菌研究所 (CMI), 英国, 丘(园)
4. 冷泉港研究室 (CSH), 美国
5. 日本东京大学应用微生物研究所 (IAM), 日本, 东京
6. 发酵研究所 (IFO), 日本, 大阪
7. 科研化学有限公司 (KCC), 日本, 东京
8. 国立标准菌种收藏所 (NCTC), 英国, 伦敦
9. 国立卫生研究院 (NIH), 美国, 马里兰州, 贝塞斯达
10. 美国农业部, 北方开发利用研究部 (NRRL), 美国皮奥里亚市
11. 国立血清研究所 (SSI), 丹麦

12. 威斯康星大学, 细菌学系(WB), 美国, 威斯康星州马迪孙

13. 世界卫生组织 (WHO)

14. 日本北海道大学农业部 (AHU), 日本, 北海道札幌市

## 第十章 微生物细胞固定化方法

微生物酶具有生产成本低、生产条件不受地点和季节的限制、生产周期短以及可进行工业化生产的特点，因此最适合用于工业目的。微生物酶有胞外酶和胞内酶之分，前者由微生物细胞合成后分泌至培养基中；后者在整个培养过程中始终保留在胞内或细胞表面，只有当细胞裂解后才能释放至培养环境中。因此，在使用胞内酶时，应将其从细胞中提取出，由此增加了固定化酶的复杂性，并且有些胞内酶在提纯、固定化过程中会丧失活性。此

表 10-1 微生物细胞固定化载体的分类

### 有机载体

多糖类:	K-角叉胶
	纤维素
	琼脂
	藻酸钙
	葡聚糖凝胶
蛋白质:	骨胶原
合成多聚体:	聚丙烯酰胺
	聚苯乙烯
	酚醛树脂

### 无机载体

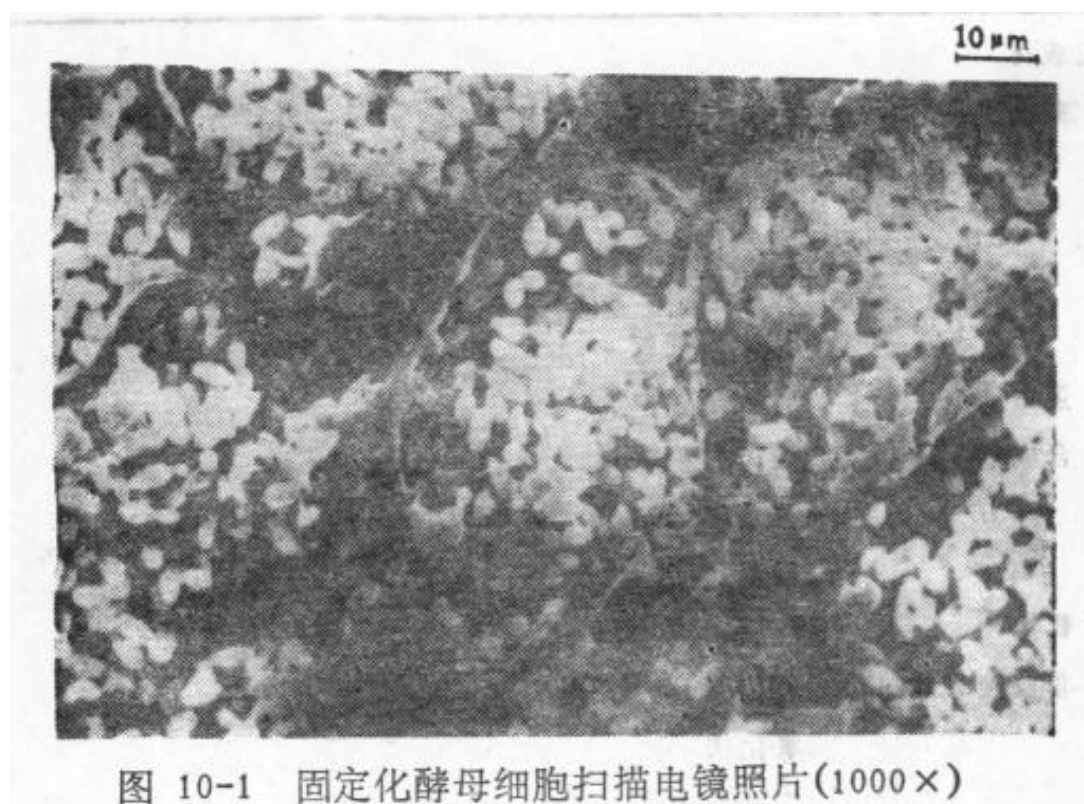
非枝接载体:	氧化铝
	氧化锆
	二氧化硅
	玻璃
	陶瓷
	磁铁

·枝接载体: (用各种偶联剂枝接)

外，有些酶促反应需多步方能完成，单用固定酶并不能满足。因此将整个细胞固定化，以此作为固态催化剂可避免复杂的酶提取和纯化过程，并解决了酶的不稳定性问题。整个细胞固定化时，酶活较高，操作稳定性较好。可在多步酶促反应中应用并可进行连续操作。

在①酶是胞内酶；②提纯酶在固定化及固定化后不稳定；③微生物不含干扰性酶或易去除干扰性酶；或者④代谢底物及产物为低分子物质时，使用固定化微生物细胞最为合适。

微生物细胞固定化方法主要有3种基本类型：载体结合、交联和包埋(表10-1,图10-1)。然而到目前为止尚无一可用于所有种类的微生物的细胞固定化的通用方法，因此对某一特定的细胞来说，选择适宜的固定化方法和条件是必要的。本章重点介绍最常用的细胞固定化方法。



## 第一节 载体结合法

载体结合法是以水不溶性多糖(纤维素、糊精和琼脂糖衍生



物)、蛋白质(明胶、清蛋白)、合成多聚体(离子交换树脂、聚氯乙烯)及无机材料(沙、陶土、多孔玻璃)为载体,经物理吸附、离子键、共价键将微生物细胞直接结合到载体上的方法。

通过微生物细胞与载体之间的静电相互作用,离子键及氢键将细胞吸附到载体上的固定化方法易受周围环境的影响,但此法简便易行。

共价结合法是微生物细胞与载体之间经共价键交联而固定,一般是将细胞直接连接到已活化的载体上。最常用的载体有硅胶、陶瓷、琼脂糖珠。共价结合法是酶固定化中最为常用的方法之一,但在细胞固定化中由于交联剂具有毒性,有时还会引起酶及细胞活力丧失。因此,此法在细胞固定化中未被广泛使用。表10-2为载体结合法固定微生物细胞的例子。

表 10-2 载体结合法固定微生物细胞的例子

微生物	固定化方法及载体
大肠杆菌和活泼固氮菌 卡氏酵母	Dowex-1载体, 吸附法 多孔硅胶, 多孔硅胶先用氨基-丙基-三乙氧基甲硅烷处理, 再以戊二醛活化
灵芝菌 啤酒酵母 泡沫酵母	硼硅玻璃、氧化锆陶瓷、异氰酸酯交联法
藤黄色微球菌 啤酒酵母	琼脂糖珠 琼脂糖珠、蛋白载体, 先将酵母细胞用0.01~0.015mol/L, pH6.5过碘酸钠氧化, 然后用pH7.2 PBS洗涤, 洗涤后的活化细胞与载体以1:0.6(w/w)比例混合, 以pH7.2 PBS稀释后, 在4℃振荡16h, 再用pH6.0的PBS洗涤

## 第二节 交 联 法

运用双官能团交联剂(如戊二醛、甲苯二异氰酸等)可使细胞互相交联而被固定。但此法研究较少,应用价值尚难确认,新

的低毒或无毒交联剂的开发是本法的关键。Tadashi 等用戊二醛成功地固定了具有高天冬氨酸酶活性的大肠杆菌，固定后的细胞仍保留34%的天冬氨酸酶活力。

### 第三节 包埋法

微生物细胞最为常用、也最为有效的固定化方法是将细胞直接包埋于多聚体载体中的包埋法。目前已被广泛使用的载体有藻酸盐、 $\kappa$ -角叉胶、胶原、琼脂糖、果胶、聚苯乙烯、二乙酸纤维素、环氧树脂、聚丙烯酰胺、聚亚胺脂、聚酯等，其中以藻酸盐、角叉胶和聚丙烯酰胺最为常用。

#### 一、藻酸钙凝胶包埋法

从海藻提取获得的藻酸盐(常为钠盐)为D-甘露糖醛酸和古洛糖醛酸的线性共聚物，多价阳离子(如 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ )可诱导凝胶形成。藻酸钙凝胶包埋法已被广泛用于微生物细胞及其原生质体的固定化(表10-3)。本法的优点有①不同分子量及不同化学组成的藻酸盐，其凝胶形成性质一致，都可用于固定化；②藻酸盐使用浓度较宽，可在0.5~10%之间任意选择；③ $\text{Ca}^{2+}$ 浓度在0.05~2%之间改变，对凝胶形成影响不大；④不同大小的凝胶珠粒的制备比较方便(0.1~5mm)；⑤细胞固定量较高(可高达30g细胞/ml固定化催化剂)；⑥工作温度可在0~80℃；⑦适当改进包埋方法后，可使被包埋的细胞在凝胶珠内形成克隆。

在使用藻酸钙包埋细胞进行酶促反应时，应尽可能使培养基中不含有钙螯合剂(如磷酸根)，因为此可导致钙的溶解释放并由此引起凝胶的破坏。另外，包埋细胞在凝胶珠中分裂或使用不当的搅拌发酵也可导致包埋细胞的流失。

微生物细胞包埋于藻酸钙凝胶中的方法主要有两种类型，即外胶凝法和内胶凝法。其中以前者应用广泛。外胶凝法的基本方

表 10-3

藻酸钙固定化细胞的典型例子

微 生 物	产 品
节杆菌 ( <i>Arthrobacter simplex</i> )	氢化泼尼松
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	柠檬酸、葡萄糖酸
黄色短杆菌原生质体 ( <i>Brevibacterium flavum</i> )	L-谷氨酸
酪酸梭菌 ( <i>Clostridium butyricum</i> )	异丙醇、丁醇
酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	乙醇
台湾酵母 ( <i>Saccharomyces formosensis</i> )	乙醇
运动单胞菌 ( <i>Zymomonas mobilis</i> )	乙醇
乳酸乳杆菌 ( <i>Lacto bacillus loctis</i> )	乳酸
德氏乳杆菌 ( <i>Lactobacillus delbruckii</i> )	乳酸
产黄青霉 ( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	青霉素G
链霉菌 ( <i>Streptomyces sp</i> )	泰乐霉素
变性三角酵母 ( <i>Trigonopsis variabilis</i> )	$\alpha$ -酮酸

法是将微生物细胞与藻酸钠溶液混匀后，通过一注射器针头或相似的滴注器将上述混合液滴入 $\text{CaCl}_2$ 溶液中， $\text{Ca}^{2+}$ 从外部扩散进入藻酸钠-细胞混合液珠内，使藻酸钠转变为不溶的藻酸钙凝胶，由此将细胞包埋其中。用于外胶凝法制备珠状藻酸钙凝胶装置有简单滴落法固定化装置（图10-2），此装置能满足一般实验室制备珠状藻酸钙凝胶，可用一般医用注射器进行改装。另一种装置由Hulst等发明，此装置中，利用共振将固定化混合物射

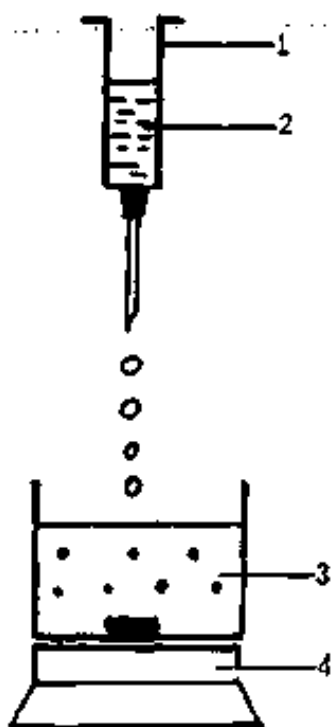


图 10-2 藻酸钙固定化细胞装置示意图

1—注射器外套 2—藻酸钠-细胞混合液 3—CaCl<sub>2</sub>溶液 4—磁力搅拌器

流断裂成均匀的微滴后，注入持续搅拌的CaCl<sub>2</sub>溶液中形成胶珠，此装置可满足工业化生产需要。

内胶凝法是利用柠檬酸钙在酸性条件下释放钙离子，可使藻酸钙凝胶形成的性质将藻酸钠溶液与待固定细胞混匀，然后加入柠檬酸钙，再立即加入D-葡萄糖酸-1,5-内酯，充分混匀，D-葡萄糖酸酯在水溶液极易分解并使溶液pH下降，柠檬酸钙释放Ca<sup>2+</sup>，凝胶很快就被诱导形成。数分钟后，将形成的凝胶移至湿盒中过夜，次日将凝胶块按需要切成一定大小，然后浸泡于10mmol/L CaCl<sub>2</sub>溶液中，使钙离子饱和。

此外，有报道将藻酸钠-细胞混合液中加入一定量的明胶，然后按外胶凝法制备藻酸钙微珠，再将此珠在37℃下孵育一段时间。这样微珠中的明胶液化，使微珠中留下孔穴，固定的细胞可在这些孔穴中形成菌落。

### 〔实验10-1〕酿酒酵母的藻酸钙固定化

#### (一)实验材料

1. 酿酒酵母(酒精酵母)保藏菌种。
2. YEPD,

酵母膏	10 g	水	1000ml
蛋白胨	20 g	pH 5.5	
葡萄糖	20 g		

分装100ml于500ml三角瓶中，高压灭菌。

#### 3. 4%藻酸钠溶液

藻酸钠	2 g	水	50ml
-----	-----	---	------

高压灭菌, 4℃存放。

4. 0.05mol/L  $\text{CaCl}_2$

无水 $\text{CaCl}_2$  : 4.75 g 去离子水 1000ml

pH6~8, 高压灭菌。

5. 10ml注射器外套及5\*头皮静脉针。

6. 100ml三角烧瓶(无菌)。

7. 20~22℃及37℃水浴。

8. 水平式离心机。

9. 50ml带盖离心管(无菌)。

10. 恒温振荡器。

11. 磁力搅拌器。

## (二) 操作步骤

1. 将酿酒酵母接入YEPD液体培养基中, 恒温振荡器中22℃振荡培养。离心收获菌体并用无菌水洗涤2次。

2. 将2.5g湿菌体悬于5ml无菌去离子水中。

3. 加入5ml 4%藻酸钠溶液, 充分混匀。

4. 将50ml 0.05mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液移入1只三角瓶中, 将头皮静脉针通过三角烧瓶口的棉塞伸入三角瓶内, 并与10ml注射器连接。将此浸入37℃水浴中10min。

5. 将藻酸钠菌体混悬液移入注射器中, 适度加力, 将藻酸钠菌体悬液滴入0.05mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液中。

6. 滴完, 将三角瓶移入20~22℃水浴中, 放置1h。

7. 倾去溶液, 加入100ml无菌去离子水冲洗1次。

8. 重新加入50ml 0.05mol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液, 4℃平衡过夜。

9. 乙醇发酵试验。

## 二、κ-角叉胶包埋法

κ-角叉胶是一种从海藻中分离出来的多糖, 其化学组成为β-D-半乳糖硫酸盐和3,6-脱水-α-D-半乳糖交联而成。热κ-角叉胶可经冷却或经胶诱生剂如 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、氨水及水溶性有机溶剂诱导形成凝胶。

κ-角叉胶固定微生物细胞的有以下几个优点：①胶凝条件粗旷；②胶凝诱生剂对酶活很少有影响。一般而言，将K<sup>+</sup>作为胶诱生剂制得的固定化细胞无论是酶活还是细胞产率都相当高；③可十分方便地制得各种尺寸的固定化细胞珠粒；④细胞回收极为方便。只需将固定化细胞悬浮于生理盐水中，κ-角叉胶就会迅速溶解并释放出细胞。因此，用κ-角叉胶包埋微生物细胞获得固定化细胞现已成为最为常用的细胞固定化方法之一（表10-4）。需指出的是反应混合物中如无胶诱生剂，则凝胶会溶解而使细胞流失。

表 10-4 κ-角叉胶固定化微生物细胞的典型例子

微 生 物	产 品
黄色短杆菌 ( <i>Brevibacterium flavum</i> )	L-苹果酸, L-谷氨酸
酿酒酵母 ( <i>Sacchromyces cerevisiae</i> )	酒精、甘油
运动单胞菌 ( <i>Zymomonas mobilis</i> )	酒精
木霉 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	纤维素酶
热带假丝酵母 ( <i>Candida tropicalis</i> )	十二烷双酸、十三烷双酸
大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> )	L-天冬氨酸
产气肠杆菌 ( <i>Enterobacter aerogenes</i> )	2,3-丁二醇
大肠杆菌及假单胞菌 ( <i>E. coli</i> 和 <i>Pseudomonas dacunhae</i> )	L-丙氨酸

用κ-角叉胶进行细胞固定化的方法有两种基本类型，即一步法和二步法。一步法是直接将大量细胞包埋于凝胶中；二步法则是先将小量细胞包于凝胶中，然后经一段时间培养增殖凝胶中细胞。

### 〔实验10-2〕 一步法 $\kappa$ 角叉胶细胞固定化

$\kappa$ -角叉胶一步包埋法是将大量细胞同时固定化到角叉胶中，被固定化的细胞则一般处于生长休止或自溶状态，而所需的酶仍保持活性和稳定。因此，在制备凝胶时，应较好地控制凝胶孔径，保证小分子底物和产物的通过而保留大分子物质(如酶)于凝胶晶格中。运用典型的凝胶制备方法(图10-3)，可将固定化细胞制成各种形状，如立方体形、珠状及膜状。

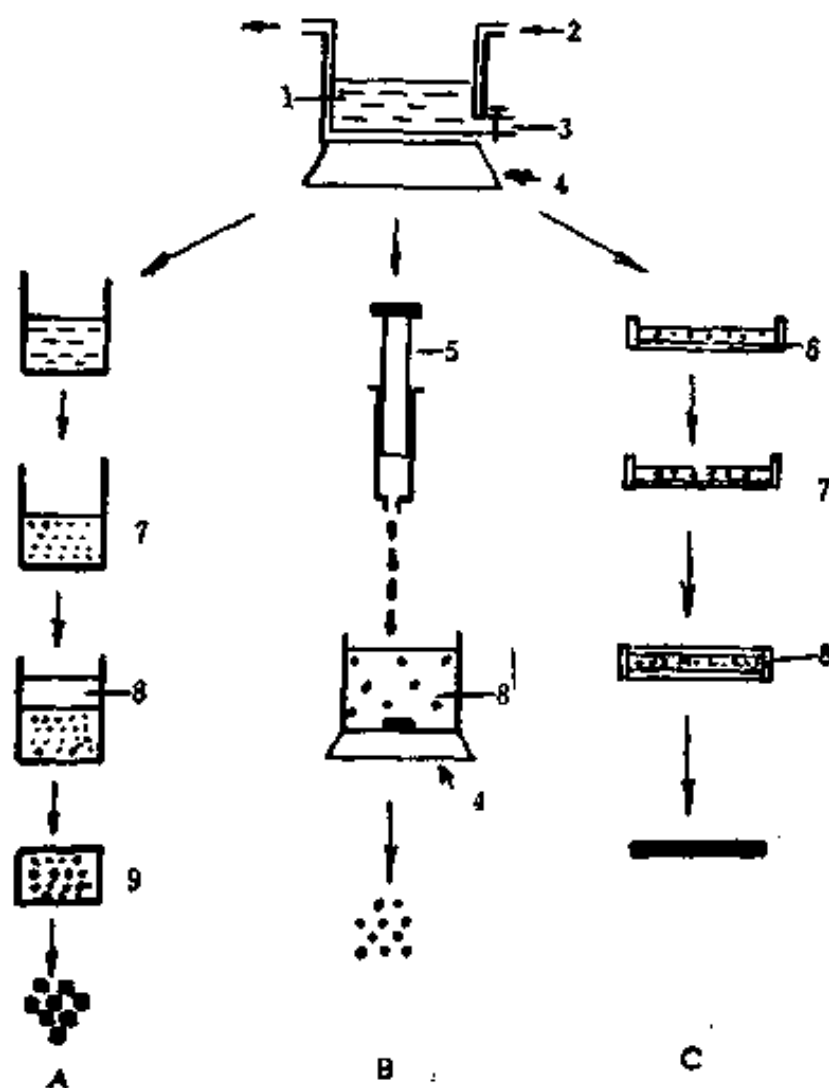


图 10-3  $\kappa$ -角叉胶固定化步骤

A. 立方形固定化细胞 B. 珠状固定化细胞 C. 膜状固定化细胞  
 1—细胞角叉胶混合物 2—控温水套 3—取样孔 4—磁力搅拌器  
 5—注射器 6—尼龙网 7—冷却 8—KCl溶液 9—切割

#### (一) 实验材料

1. 大肠杆菌斜面(具有高天冬氨酸酶活力)。
2. 生理盐水(0.9%氯化钠)
3.  $\kappa$ -角叉胶。

4. 0.3mol/L KCl.
5. 10ml注射器及5\*头皮静脉针.
6. 40℃及45℃水浴.
7. 尼龙网 (3×250×200mm).
8. LB培养基

蛋白胨	10 g	水	1000ml
酵母膏	5 g	pH 7.5	
NaCl	10 g		

10ml分装500ml三角瓶, 高压灭菌.

9. 恒温振荡器.
10. 10℃水浴.
11. 离心机.
12. 手术刀片、离心管等.

## (二) 操作步骤

立方体形固定化细胞的制备:

1. 大肠杆菌接入LB培养基中, 37℃振荡培养24h.
2. 离心收获细胞, 无菌生理盐水洗涤2次.
3. 将16g菌体悬浮于16ml的生理盐水中, 置40℃水浴中.
4. 将3.4g  $\kappa$ -角叉胶溶于60ml 45℃生理盐水中.
5. 将菌悬液与角叉胶液充分混匀.
6. 冷却至10℃, 维持此温度30min.
7. 转浸入0.3mol/L KCl溶液中, 4℃过夜.
8. 切成3mm<sup>3</sup>大小的立方块, 浸入0.3mol/L KCl中待用.

珠状固定化细胞的制备:

1. 按上述方法(步骤1~5)制备 $\kappa$ -角叉胶-大肠杆菌混合液.
2. 经5\*头皮静脉针以恒定速度滴入20℃、轻轻搅拌的0.3mol/L KCl溶液中.
3. 4℃放置过夜.

膜状固定化细胞的制备:

1. 按上述方法(步骤1~5)制备50ml  $\kappa$ -角叉胶-大肠杆菌混合液.
2. 将此混合液喷洒到3×250×200mm尼龙网上. 随着温度的下降, 凝胶在尼龙网表面形成.



3. 将胶膜浸入0.3mol/L KCl中, 4℃过夜。

### 〔实验10-3〕 二步法κ-角叉胶细胞固定化

在此方法中, 首先将待固定的微生物进行培养, 然后用全培养液在无茵操作条件下与κ-角叉胶溶液混合。将此混合物边轻轻搅拌边滴加到含有胶诱生剂的水溶液中。收获胶珠再悬于营养培养基中继续培养一段时间。

下面以酿酒酵母固定化用于乙醇发酵为例说明κ-角叉胶二步包埋法。

#### (一) 实验材料

1. 酿酒酵母(酒精酵母)。

2. YEPD

酵母膏	1.25 g	NaCl	0.5 g
蛋白胨	1.0 g	水	100ml
葡萄糖	0.5 g	pH 5.5	

10ml分装 100ml 三角瓶, 高压灭菌。

3. YG培养基

酵母膏	1.5 g	NaCl	1 g
葡萄糖	100 g	CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
NH <sub>4</sub> Cl	2.5 g	柠檬酸	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.5 g	蒸馏水	1000ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g	pH 5.0	

100ml分装, 高压灭菌

4. 4%κ-角叉胶溶液

κ-角叉胶	4 g	蒸馏水	100ml
NaCl	0.85 g		

45℃溶解后, 移至 37℃水浴中。

5. 2% KCl溶液(装入一只三角瓶中, 内装一磁力搅拌器, 高压灭菌)

6. 10ml注射器及5\*头皮静脉针。

7. 恒温振荡器。

8. 离心机。

9. 37℃水浴。

10. 磁力搅拌器。

#### (二) 操作步骤

1. 将酿酒酵母接入10ml YEPD中, 30℃, 150r/min 振荡培养18h。

2. 取此培养液1ml, 加入50ml 37℃的κ-角叉胶溶液中, 立即置37℃水浴中无菌条件下充分混匀。

3. 以一恒定的流速将细胞-角叉胶混合物经5\*头皮静脉针滴入已预热至20℃ 2% KCl溶液中, 用磁力搅拌器缓慢搅拌。

4. 低速离心, 收获胶珠 (直径约3~4mm, 每毫升胶中大约含  $3.5 \times 10^6$  细胞)。

5. 取胶珠10ml无菌加到 100ml YG 培养基中。

6. 30℃, 150r/min培养 60h。

7. 离心收获胶珠。经培养后胶珠中的细胞数增至  $5.4 \times 10^8$ /ml 胶。

经此法固定化的细胞浓度是一般悬浮培养中所能达到的细胞浓度的10倍以上。

#### (实验10-4)固定化细胞的回收与活细胞计数

##### (一)实验材料

1. 已固定化细胞胶珠(2粒, κ-角叉胶包埋法)。

2. 无菌生理盐水, 5ml分装25ml三角瓶中。

3. 恒温振荡器。

4. 琼脂平板。

##### (二)操作步骤

1. 取2粒胶珠放入5ml无菌生理盐水中。

2. 37℃轻振15min, 使胶珠溶解。

3. 适当稀释后涂布琼脂平板进行活菌计算(见第七章第四节)。

### 三、聚丙烯酰胺凝胶包埋法

聚丙烯酰胺凝胶包埋微生物细胞应用较为广泛(表10-5)。下以固定具有高天冬氨酸酶活性的大肠杆菌为例说明此法。

#### (实验10-5)大肠杆菌的聚丙烯酰胺凝胶固定化

##### (一)实验材料

1. 大肠杆菌(高天冬氨酸酶活, 增殖至100g湿菌体)

2. 丙烯酰胺溶液

丙烯酰胺	75g	去离子水	240ml
甲叉双丙烯酰胺	4g		

表 10-5

聚丙烯酰胺凝胶固定化微生物细胞的一些典型例子

微生物	产 品
大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> )	L-天冬氨酸、L-色氨酸、5-羟色胺
胶朊酸杆菌 ( <i>Acetobacter xylinum</i> )	二羟基丙酮、6-APA
无色杆菌 ( <i>Achromobacter</i> )	6-磷酸葡萄糖、酒石酸
游动无色杆菌 ( <i>A. liquidum</i> )	尿刊酸
球形节状菌 ( <i>Arthrobacter globiformis</i> )	氯化泼尼松
土曲霉 ( <i>Aspergillus terreus</i> )	衣康酸
芽孢杆菌 ( <i>Bacillus</i> )	杆菌肽素、D- $\alpha$ -苯基甘氨酸、D- $\alpha$ -羟苯基甘氨酸
枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	$\alpha$ -淀粉酶
产氨短杆菌 ( <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> )	L-苹果酸、辅酶A、NADP
谷氨酸棒杆菌 ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> )	L-谷氨酸
嗜氨微杆菌 ( <i>Microbacterium ammoniophilum</i> )	L-赖氨酸
产黄青霉 ( <i>Penicillium chrysogenum</i> )	青霉素G
啤酒酵母 ( <i>Sacchromyces cerevisiae</i> )	酒精
啤酒酵母及大肠杆菌 ( <i>Sacchromyces cerevisiae</i> 和 <i>E. coli</i> )	谷胱甘肽
链霉菌 ( <i>Streptomyces</i> )	头孢霉素C、蛋白酶

溶解后4℃存放。

- 25%  $\beta$ -二甲氨基丙腈溶液 ( $\beta$ -dimethylaminopropionitrile)。
- 1% 过硫酸酸钾溶液。
- 30℃ 水浴。
- 无菌生理盐水。
- 冰水浴。

8. 手术刀等。

### (二) 操作步骤

1. 取100g湿菌体悬浮于200ml生理盐水中，将此悬液冷至8℃。
2. 将丙烯酰胺溶液温至8℃。
3. 将200ml菌悬液与240ml丙烯酰胺溶液在8℃下混合。
4. 加入10ml 25%  $\beta$ -二甲氨基丙酰胺和50ml 1%过硫酸钾，混匀。
5. 移至20~25℃环境中。
6. 当聚合反应开始、混合液温度升至30℃时，立即移至冰水浴中并维持15~20min。
7. 将胶切成3~4mm<sup>3</sup>大小的方块，备用。

## 四、光交联树脂前聚体包埋法

聚乙二醇寡聚体可与带有可聚合的乙烯末端基团发生官能团作用。加入光敏剂后用UV线照射数分钟可获得扁平网状膜。控制寡聚体链长可获得所需的网孔性能；使用不同化学组成的聚乙二醇前体可获得亲水性能不同的载体。现以产葡萄糖氧化酶的黑曲霉原生质体固定化为例描述这一方法。

### (实验10-6) 光交联树脂固定化原生质体

#### (一) 实验材料

1. 黑曲霉(葡萄糖氧化酶生产菌)。
2. 聚乙烯乙二醇。
3. 羟乙基丙烯酸。
4. 异佛尔酮二异氰酸。
5. 70℃水浴。
6. 苯偶姻乙醚。
7. 紫外灯(370nm)。
8. 手术刀等。

#### (二) 操作步骤

1. 将等摩尔的羟乙基丙烯酸和异佛尔酮二异氰酸混合(70℃)，并加入适宜的催化剂。
2. 70℃，2h后加入1/2摩尔的聚乙烯乙二醇。

3. 70°C, 5h.

产品即为光交联树脂前聚体(可从有关单位购得, 国内华南理工大学有此产品)。由Fukui等合成的光交联树脂前聚体结构式见图10-4。

4. 制备黑曲霉原生质体(按〔实验8-43〕步骤2(1)~2(9)进行), 制得的原生质体以高渗溶液配成1g细胞/5ml。

5. 取6g光交联树脂预聚体, 用15ml蒸馏水溶解(可加热至60°C助溶)。

6. 加入60mg苯偶姻乙醚, 混匀并使其溶解。

7. 加入5ml原生质体悬液, 混匀。将此混合液摊成0.8mm厚的薄片。

8. 紫外线照射2min。

9. 切树脂胶呈5×5mm立方体小块或其他形状。

## 五、其他包埋方法

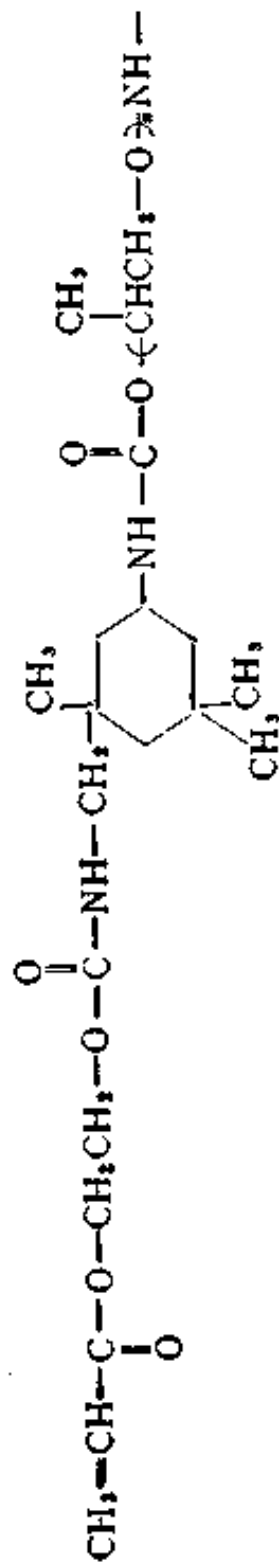
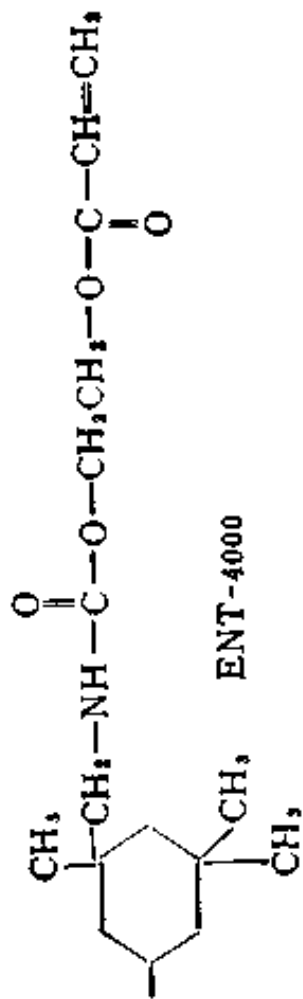
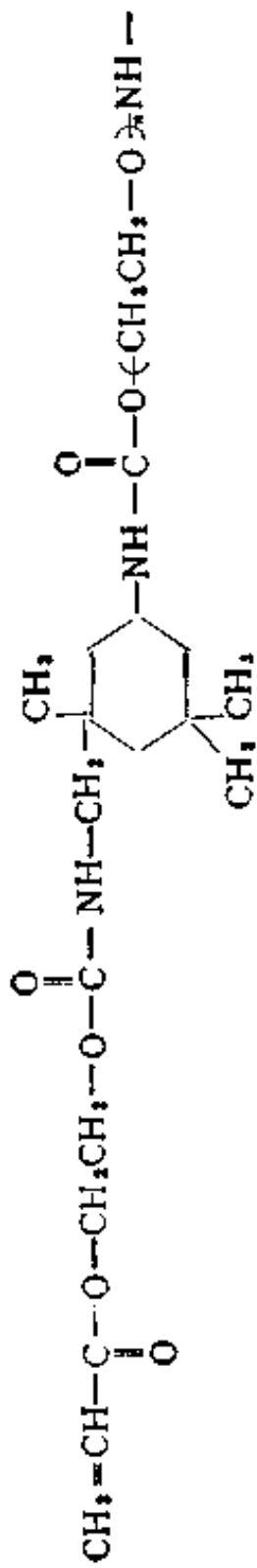
### (一) 胶原包埋法

将20g干燥棒杆菌 (*Corynebacterium simplex*) 悬于100ml水中, 然后将此细胞悬浮轻轻加到2%胶原溶液中, 用0.1mol/L NaOH调节混合液pH至8.5。加入3ml 5%戊二醛溶液, 孵育5~10min。涂布于聚酯薄膜上让其室温干燥。将此膜浸于碱性戊二醛溶液中增硬, 切成所需形状。

用此法对多种微生物细胞进行了固定化。由于胶原膜机械强度很差, 并且酶很容易从基质中丢失。因此, 在固定化后需进行增硬处理, 其中甲醛、戊二醛、乙醛、淀粉等是最常用的增硬剂。

### (二) 纤维素包埋法

将三醋酸纤维素溶于二氯甲烷, 然后逐滴加入10%甘油, 微生物细胞悬液并轻轻搅拌。将混合物乳化后喷入一含有甲苯的凝集浴中。收获纤维膜, 置真空中干燥。由此法获得的固定化细胞的酶活力十分稳定, 并在高离子强度的弱酸或弱碱溶液及一些有机溶剂中具有较好的稳定性, 已用于多种微生物细胞的固定化。但此法会限制高分子量底物及产物的扩散; 有时可引起细胞的破损。



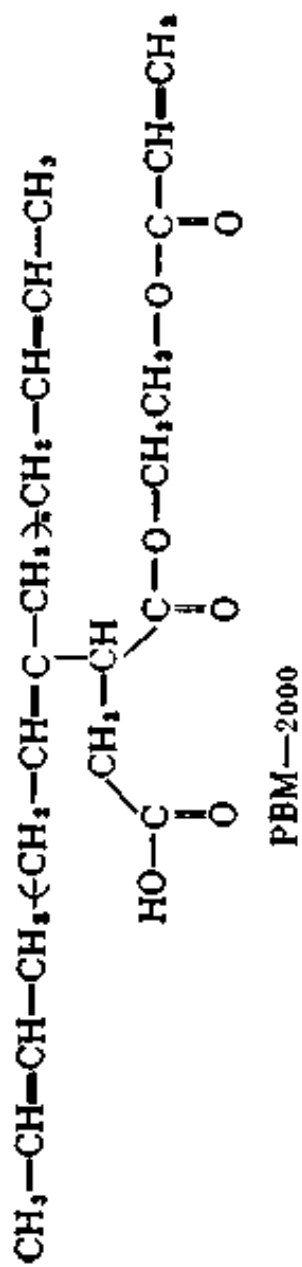
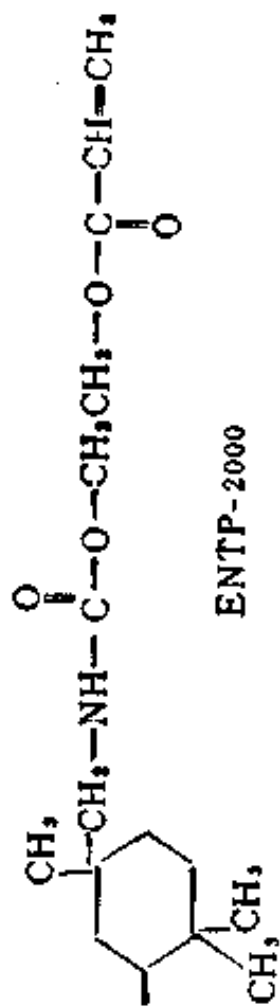


图 10-4 光交联树脂前聚体的结构

ENT-4000: 水溶性, ENT-2000: 水不溶性, PBM-2000: 水不溶性

## 第四节 其他固定化方法

随着固定化细胞研究与应用,新方法不断涌现。利用不至于破坏酶活力的温度对微生物细胞进行热处理可将胞内酶固定于细胞中。将具有葡萄糖异构酶活力的链霉菌在60~85℃下加热处理10min,由此可将酶固定于细胞内且在应用时无酶流失。此法固定化链霉菌已被用于从D-葡萄糖工业化生产高葡糖浆。经辐射可将产褐色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)葡萄糖异构酶固定于细胞内。将具有葡萄糖异构酶活力的产褐色链霉菌或具有色氨酸合成酶活力的大肠杆菌细胞加到脱乙酰几丁质醋酸溶液中,用0.1mol/L NaOH调pH至6.0,此时细胞和脱乙酰几丁质形成复合物,由此可对细胞固定化。游动放线菌(*Actinoplanes*)细胞经超声破碎后制得细胞碎片,脱水后再固定到蒙脱石-活性炭上,可制成具有较高葡萄糖异构酶活性的固定化细胞碎片。

## 第五节 固定化微生物细胞的应用

### 一、L-氨基酸生产

氨基酸广泛用于食品、医药、饲料及化妆品工业;也是生物体合成大分子物质的原料之一。就人体利用而言,只有L-氨基酸才具生物学活性。有许多化学合成途径可以用于氨基酸的生产,但产品为L型和D型氨基酸的混合体。为了获得L-氨基酸,需经化学或酶促方法进行旋光拆开。然而这一步骤很复杂。因此,我们可以筛选一定的微生物菌种直接用于L-氨基酸的生产,也可以用固定化酶及固定化细胞进行旋光拆开,从混合型氨基酸生产L-氨基酸。

#### (一)旋光拆开D,L-氨基酸



用固定化酰氨酶旋光拆开D, L- 氨基酸现已成功地用于工业生产。Tetsuya将具有酰氨酶活力的固定化赭曲霉 (*Aspergillus ochraceus*) 细胞用戊二醛交联固定于卵白蛋白上, 可连续拆开外消旋氨基酸混合物。

## (二) 旋光活性氨基酸的生物合成

由固定化微生物细胞生成 L- 氨基酸已有若干成功的报道 (表10-6), 其中用固定化细胞生产L-谷氨酸及L-丙氨酸已实现

表 10-6 固定化细胞用于L-氨基酸生产的一些典型例子

氨基酸	原材料	微生物	固定化载体
L-丙氨酸	L-天冬氨酸	<i>Pseudomonas dacunhae</i>	κ-角叉胶
	延胡索酸铵	大肠杆菌和 <i>P. dacunhae</i>	κ-角叉胶
	葡萄糖	<i>Corynebacterium dismutans</i>	聚丙烯酰胺 κ-角叉胶
L-精氨酸	葡萄糖	<i>Serratia marcescens</i>	κ-角叉胶
L-天冬氨酸	延胡索酸铵	<i>E. coli</i>	聚丙烯酰胺
ε-氨基己酸	ε-氨基己酸环状二聚体	<i>Achromobacter guttatus</i>	聚丙烯酰胺
L-赖氨酸	二氨基庚二酸	<i>Microbacterium ammoniophilum</i>	聚丙烯酰胺
L-谷氨酸	葡萄糖	黄色短杆菌	胶原
		谷氨酸棒杆菌	聚丙烯酰胺
L-色氨酸	吲哚及L-丝氨酸	<i>E. coli</i>	聚丙烯酰胺 几丁质
L-异亮氨酸	葡萄糖	<i>Serratia marcescens</i>	κ-角叉胶
D-α-苯丙氨酸	苯基乙内酰脲	芽孢杆菌	聚丙烯酰胺

工业化。

1. L-丙氨酸 (L-Ala) L-Ala最初是用假单胞菌 (*Pseudomonas dacunhae*) L-天冬氨酸-4-脱羧酶由L-天冬氨酸 (L-Asp) 生产获得。为了建立更为有效的及更为经济的方法, 先后发展了利用固定化*P. dacunhae* 细胞以及固定化大肠杆菌配合固定化*P. dacunhae*连续生产L-丙氨酸 (图10-5)。将具有天冬氨

酸酶活力的大肠杆菌在45℃, pH5.0下处理1h, 可去除引导逆反应的延胡索酸酶; 将具有L-天冬氨酸β-脱羧酶活力的 *P. dacunhae* 细胞在 30℃、pH4.75下处理 1h, 可去除丙氨酸消旋酶 (图10-6)。然后将这两种细胞用κ-角叉胶固定化, 可用于由延胡索酸铵连续生产L-丙氨酸。此工艺已于1982年实现工业化。

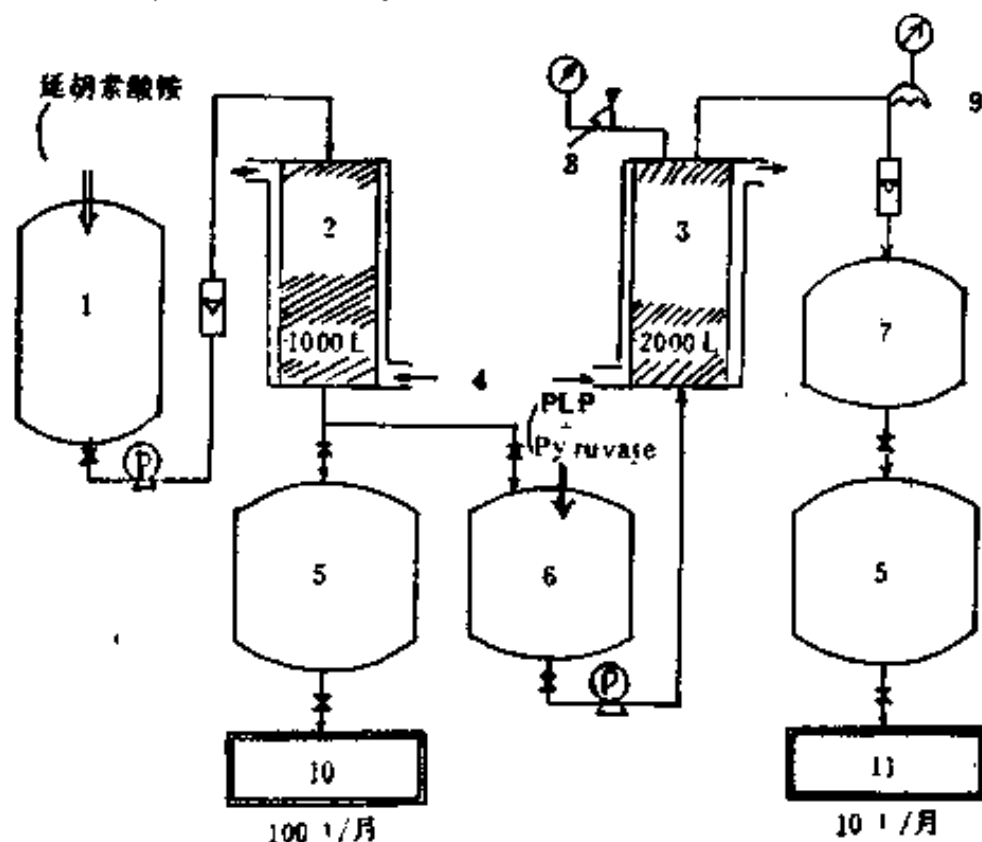


图 10-5 混合固定化细胞连续发酵生产L-Ala工艺

1—底物罐 2—固定化 *E. coli* 柱 3—固定化 *P. dacunhae*  
4—恒温水 5—结晶罐 6—pH控制罐 7—蒸发 8—安全阀  
9—压力控制阀 10—L-谷氨酸 11—L-丙氨酸

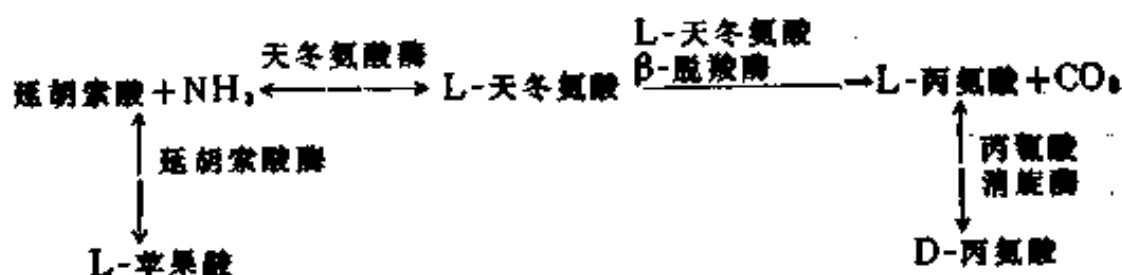


图 10-6 L-丙氨酸的合成过程

2. L-天冬氨酸(L-Asp) 通过发酵法或天冬氨酸酶酶促法可从延胡索酸铵工业化生产L-Asp。为了改善这一系统的生产性能, Tosa等建立了用固定化天冬氨酸酶连续生产天冬氨酸工艺。

但由于天冬氨酸酶是一胞内酶，经抽提后的天冬氨酸酶不甚稳定，固定化后则活力表达不高；而用多种方法获得的固定化细胞则能表达较高的天冬氨酸酶活力，其中以聚丙烯酰胺及κ-角叉胶包埋最好。用聚丙烯酰胺包埋的具有高天冬氨酸酶活力的大肠杆菌细胞具有良好的操作稳定性，37℃半衰期达120天；用κ-角叉胶包埋后再用戊二醛及六亚甲基二胺处理后的固定化大肠杆菌细胞表现出最高的生产性能，37℃半衰期达680天，使用1000L填充柱，则每天的理论产率为3.4t。此法已取代聚丙烯酰胺包埋法，并于1978年实现工业化生产。

3. L-谷氨酸 (L-Glu) 一般而言，工业化L-Glu生产主要采用化学合成法及发酵法。将谷氨酸棒杆菌细胞固定于聚丙烯酰胺凝胶中用于由葡萄糖生产L-Glu。实验室研究发现，此法产率高于发酵法。由于L-Glu产生后得由胞内分泌至胞外，因而，此步受细胞壁的限制。酶法去除黄色短杆菌细胞壁，然后用包埋法制备固定化原生质体用于L-Glu生产，发现其产率较固定化黄色短杆菌细胞高。此外，将活黄色短杆菌细胞包埋于胶原中，实现L-Glu的连续生产。

## 二、抗生素生产

固定化细胞在抗生素生产中是极为有用的，其中，固定化细胞已成功地用于青霉素及头孢霉素的工业化生产（表10-7）。

表 10-7 固定化细胞用于抗生素生产的典型例子

抗 生 素	原 材 料	微 生 物	固 定 化 载 体
氨基比林	6-APA及D-苯基甘氨酸乙酯	<i>Bacillus megaterium</i>	DEAE-纤维素
		<i>Achromobacter aceris</i>	DEAE-纤维素
		<i>Achromobacter liquidum</i>	DEAE-纤维素
		<i>Kluyvera citrophila</i>	聚丙烯酰胺

### 三、有机酸生产

有机酸已被广泛用于食品及医药工业，其中一些已由发酵法替代化学法进行生产。采用固定化微生物细胞则有可能改善生产性能（表10-8）。

L-苹果酸是细胞内部代谢循环的基本物质，已被广泛用于医药工业。Takata等将具有耐热延胡索酸酶的黄色短杆菌细胞固定于含聚乙烯亚胺的κ-角叉胶中，用于从延胡索酸连续生产L-苹果酸，并于1980年取代了使用多年的单纯κ-角叉胶固定化黄色短杆菌和产氨短杆菌细胞及聚丙烯酰胺凝胶固定化产氨短杆菌细胞，用于工业化L-苹果酸的生产。

表 10-8 固定化细胞用于有机酸生产的典型例子

有机酸	原材料	微生物	载体
醋酸	葡萄糖	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Acetobacter</i> sp.	多孔陶瓷 水合硅
柠檬酸	葡萄糖	<i>Aspergillus niger</i>	藻酸钙
α-酮酸	D-氨基酸 L-氨基酸	<i>Trigonopsis variabilis</i> <i>Chlorella vulgaris</i> 和 <i>Anacystis nidulans</i>	藻酸钙 琼脂糖
葡萄糖酸 乳酸	葡萄糖 葡萄糖	<i>A. niger</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>Lactobacillus</i> sp.	藻酸钙 藻酸钙 藻酸钙中空纤维 藻酸钙
L-苹果酸	蔗糖 延胡索酸	<i>Lactobacilli</i> 和酵母 <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> <i>B. flavum</i> <i>Thermus rubens</i>	明胶 聚丙烯酰胺 κ-角叉胶 Dialite A-7 树脂
酒石酸 尿酸	环氧琥珀酸 L-组氨酸	<i>Achromobacter</i> sp. <i>A. liquidum</i> <i>Micrococcus luteus</i>	聚丙烯酰胺 聚丙烯酰胺 碳化二亚胺、活化的CM-纤维素

续表

有机酸	原材料	微生物	载体
2-葡萄糖酮酸	葡萄糖	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	中空纤维
2-古洛酮酸	L-山梨醇	<i>Serratia marcescens</i>	胶原
		<i>Gluconobacter melanogenus</i>	聚丙烯酰胺

尿刊酸作为一种防晒剂已用于医药及化妆品工业。尿刊酸在L-组氨酸解氨酶作用下由L-组氨酸生产。将具有高L-组氨酸解氨酶活性的无色杆菌 (*Achromobacter liquidum*) 细胞先经70℃热处理30min, 以去除其中的尿刊酸酶, 然后用聚丙烯酰胺凝胶包埋, 用于尿刊酸的连续生产。此固定化细胞37℃活力半衰期达180天。

$\alpha$ -酮酸对慢性尿毒症可能有治疗作用, 因此对  $\alpha$ -酮酸的生产及应用正引起越来越广泛的注意。 $\alpha$ -酮酸通过氨基酸氧化酶氧化相应氨基酸产生。将具有高D-氨基酸氧化酶活性的三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*) 用藻酸钙凝胶包埋并已用于从D-氨基酸生产 $\alpha$ -酮酸, 此固定化细胞可用于从Val、Leu、Ile、Met、Phe、Tyr、Try和His生产相应的 $\alpha$ -酮酸。

2-酮古罗糖酸可通过微生物氧化由山梨糖生产, 此酸为维生素C合成中极为重要的中间产物。Martin等将葡糖杆菌 (*Gluconobacter melanogenus*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas syringus*) 细胞共固定于聚丙烯酰胺凝胶中, 用于直接氧化L-山梨糖为2-酮古罗糖酸。

#### 四、醇类生产

运用固定化活细胞连续生产醇类(主要为乙醇)有着极为重要的工业应用前景(表10-9)。

近年来, 一方面乙醇的需求量增加很快; 另一方面, 由于生产乙醇的微生物菌种得到了极大的改良, 现已不仅仅以葡萄糖作

表 10-9

固定化细胞用于酶类生产

醇 类	微 生 物	载 体
乙醇	<i>Saccharomyces buyanus</i>	$\kappa$ -角叉胶
	<i>S. carlsbergensis</i>	$\kappa$ -角叉胶
	<i>S. cerevisiae</i>	藻酸钙、明胶
		纤维素膜、中空纤维
		果胶
	<i>S. formosensis</i>	聚丙烯酰胺
	<i>Zymomonas mobilis</i>	$\kappa$ -角叉胶
		藻酸钙
		多孔硅玻璃
		藻酸钙、 $\kappa$ -角叉胶
异丙醇	<i>Clostridium butyricum</i>	藻酸钙
正丁醇	<i>C. butyricum</i>	藻酸钙
2, 3-丁二醇	<i>Enterobacter aerogenes</i>	$\kappa$ -角叉胶
甘油	<i>S. cerevisiae</i>	$\kappa$ -角叉胶

为底物，而且可以以纤维素水解液中的戊糖等作为底物；加之固定化活细胞在乙醇发酵工业的应用，发酵法生产乙醇已成为近年来发酵工业的主攻目标。

用于细胞固定化的方法中最常用的是包埋法。不同载体及固定化方法对乙醇的产率影响较大（表10-10），其中以藻酸钙、 $\kappa$ -角叉胶及加固琼脂凝胶最为理想。聚丙烯酰胺也是极为理想的载体，但用于连续发酵则比较困难。目前主选 $\kappa$ -角叉胶、藻酸钙作为包埋载体。用于生产的反应器主要有填充床式反应器、膜反应器、流动搅拌式发酵罐和流化膨胀床式反应器。

表 10-10

不同载体对固定化细胞酒精生产的影响

包埋载体	产量(mg/(g酶·h))
多孔环氧树脂	26
尼龙微胶囊	2
不饱和聚酯	4

续表

包埋载体	产量(mg/(g胶·h))
乙酰丁基纤维素	14
多孔聚苯乙烯	14
聚丙烯酰胺凝胶	36
藻酸钙凝胶	40
$\kappa$ -角叉胶	40
琼脂凝胶	40

### 五、固定化细胞酿造啤酒

应用固定化酵母生产啤酒比传统酿制法具有若干优点。运用固定化生长静止期酵母可使主发酵在24~30h内完成，而且啤酒质量稳定，双乙酰含量也较低。用于酵母细胞固定化的方法主要为包埋法，如将酵母细胞先吸附于膨胀珍珠岩空孔内，再用藻酸钙凝胶包埋。主发酵温度控制在18℃以内，主发酵后用露天发酵罐在高温高压下还原2~3天，以利双乙酰等物质的还原。

运用固定化酵母可提高单位体积生产率1倍以上，而费用可节约30%，酿造全过程缩短为6~13天，且可获得优质二氧化碳。

### 六、食醋酿制

运用固定化醋酸菌酿制食醋可缩短发育迟缓期；较有效地提供培养液和气体可以提高生产率。Ohsuga等人首先用 $\kappa$ -角叉胶包埋醋酸菌进行醋酸发酵；Kennedy等则用含水氧化钛或纤维素螯合的含水氧化钛在塔式发酵罐中固定化醋酸菌进行发酵，将乙醇转化为醋酸。Akira用吸附法将醋酸菌固定到聚丙烯纤维载体上用于食醋生产，醋化能力要比深层发酵提高9~25倍。

#### (实验10-7)固定化酵母连续生产酒精

##### (一)实验材料

1. 固定化酵母：用 $\kappa$ -角叉胶二步法固定化的酒精酵母或卡氏酵母。

2. 反应柱 (12.5×2.8cm)。

3. 自动流加装置。

4. 其余同实验。

### (二) 操作步骤

1. 将50ml固定化酵母细胞凝胶装入已灭菌反应柱中。

2. 以50ml/h的速率加入30℃ YE 培养基。

3. 收获流出液。

流出液中含有5%左右的酒精，发酵效率接近100%。

### (实验10-8) 固定化枯草杆菌连续生产耐热 $\alpha$ -淀粉酶

#### (一) 实验材料

1. 菌体 耐热 $\alpha$ -淀粉酶生产菌株枯草杆菌斜面。

2. 培养基

葡萄糖	10 g	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 g	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.1 g
酵母膏	1 g	水	1000ml
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	pH 7.2	
柠檬酸钠	0.5 g		

3. 发酵培养基

葡萄糖	10 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
酵母膏	1 g	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	水	1000ml
柠檬酸钠	0.5 g	pH 7.2	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 g		

4. 无菌生理盐水。

5. 4%藻酸钠溶液。

6. 0.05mol/L CaCl<sub>2</sub>。

7. 玻璃柱 (25×3.0cm)。

8. 37℃水浴。

9. 恒温振荡器。

10. 500ml灭菌三角烧瓶。

11. 离心机。



12. 10L发酵罐。

13. 蠕动泵。

14. 磁力搅拌器。

### (二)操作步骤

1. 将斜面保藏菌株接入含100ml培养基的500ml三角瓶中。

2. 37℃, 120r/min 振荡培养16h。

3. 以此500ml培养液为种子接入含4.5L培养基的10L发酵罐中。

4. 37℃搅拌培养至对数生长后期。

5. 在预重离心机管中离心收获细胞。

6. 无菌生理盐水洗涤2次。

7. 菌体用生理盐水悬成10g(湿菌体)/100ml。

8. 将菌体悬液与4%藻酸钠等体积混合(37℃)。

9. 通过蠕动泵, 将菌体-藻酸钠悬液, 经 $\phi 2\sim 3\text{mm}$ 的玻璃滴管, 滴入轻轻而连续磁力搅拌的0.05mol/L  $\text{CaCl}_2$ 溶液中。

10. 4℃过夜或室温2h。

11. 无菌生理盐水充分洗涤。

12. 取2粒胶珠溶于pH5.0的柠檬酸缓冲液中进行活细胞计数。

13. 在一无菌25×3.0cm的玻璃管外套上水套循环, 以保证反应温度

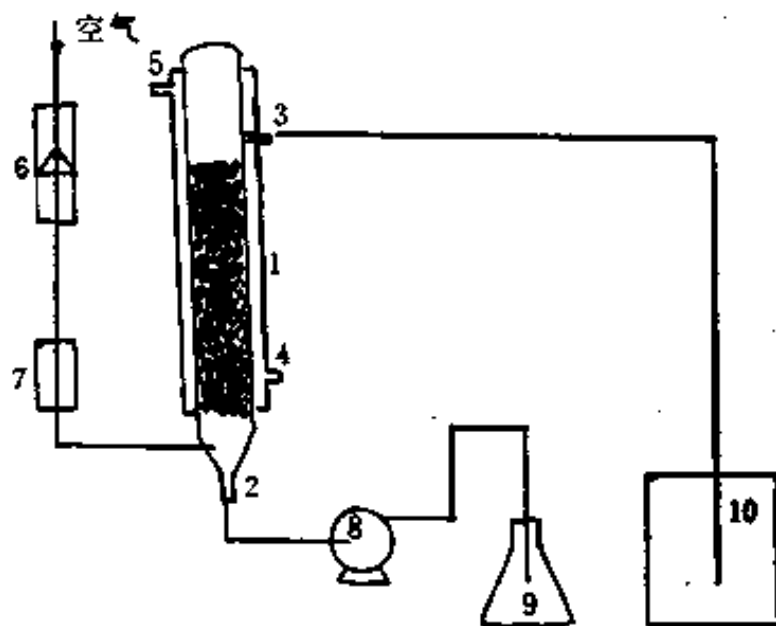


图 10-7 固定化细胞连续生产 $\alpha$ -淀粉酶装置示意图

1—装填固定化细胞的玻璃柱 2—入口 3—出口 4—水循环外套的入口 5—水循环外套的出口 6—流量计 7—空气滤器 8—蠕动泵 9—流加培养基 10—产品收集容器

在恒温37℃。

14. 在柱内装入 70g 固定化细胞胶珠 (反应床高 20cm, 总体积 40.5ml)。

15. 经过蠕动泵, 将发酵培养基流加入, 多余的培养液自柱顶流出, 收集。同时, 反应系统供给经空气过滤器装置过滤的无菌空气 (图10-7)。

16. 定期取样, 分析。

17. 合并发酵液, 纯化耐热 $\alpha$ -淀粉酶。

# 第十一章 酶固定化技术

在过去20多年中，酶固定化已成为酶工程中一大主要研究课题，并且已从实验室的研究探索阶段进入了实际应用阶段。运用若干可靠的方法可将各种酶方便且稳定地连接到不溶性或可溶性载体上，用于工业、环境、分析和医药等领域。在食品工业中，由于食品加工过程中最为重要的是食品的营养、风味、芳香和质地，因此，运用酶进行定向改良，改善食品的风味、质地等，保证或增加其营养价值，以及消除由于其他加工手段伴随的副反应是极有意义的。

## 第一节 概 述

固定化生物催化剂是指运用一定方式、以单一或组合形式固定到一定载体上的、可以重复使用的酶、细胞或细胞器。酶固定

表 11-1 常用载体类型

类 型	举 例
有机载体	聚苯乙烯、尼龙、酚醛树脂、丙烯酸胺共聚物(如聚丙烯酰胺)
生物多聚物载体	纤维素、葡聚糖(如Sephadex)、琼脂糖(如Sepharose) 胶原、几丁及脱乙酰几丁
无机载体	玻璃珠 不锈钢、金属氧化物(孔性陶瓷、砂)

化方式不外乎吸附、包埋和共价交联3种基本类型，由此可将固定化酶分成3大基本类型，即①吸附酶，②包埋酶，③共价交联酶。酶固定化中常用的载体包括有机载体、生物多聚物载体和无

机载体 (表11-1)。在选择载体时应认真考虑下列关键因素: ①载体基质的稳定性, ②可结合酶的最大能力, 以及③载体基质与底物的竞争力。在加工过程中, 载体基质必须保持稳定, 以防止酶的丢失和产品的老熟。多孔载体较之无孔载体具有更大的单位表面积, 因而单位体积的酶结合量较大, 多孔载体因此被广泛使用。为了更有效地使用载体, 重要的一点是酶能够占据所有孔穴。在选择载体时还应认真考虑的是底物分子大小和所带净电荷的性质和数量。

## 第二节 吸 附 法

在酶固定化技术中, 传统的吸附法是指通过弱引力将酶连接到一不再能共价键合的惰性载体上。吸附法是将酶连接到一固体载体上的最简单和经济的方法。此法的一般过程为: 先将载体进行最低限度的前处理, 如在缓冲液中洗涤或浸泡, 然后将载体材料与一定量的酶溶液混合并在某一特定的湿度、pH和离子强度下孵育。

许多无机材料如白土、矾土、沙、玻璃和硅石等已被用于酶的吸附载体, 这些惰性载体结合酶的机理可能包括范德华力和氢键。有些载体如矾土, 吸附过程中尚可有部分共价性质。但这些载体的共同缺陷是酶吸附容量低, 结合酶的能力大约为1mg/g载体; 吸附力弱, 使得酶在操作过程中会持续丢失。因此, 更好的载体应具备高连接强度和稳定性, 离子交换树脂作为载体可获得更强的静电相互作用; 蛋白质作为载体则能提供更多的复合官能团连接; 有些材料中非极性基团的数量和类型可进行人为控制, 以此作为载体可产生稳定的疏水反应; 有些材料含有特定的向心配位体或具备对固定酶的特殊亲和性质。需要指出的是, 在绝大多数情形中, 酶的丢失是不可避免的。通过改变pH、温度和离子强度可有效地降低酶的丢失。

酶吸附固定法具有若干优点 (表11-2), 其中最为重要是能

表 11-2 各种固定化方法的优缺点

类 型	优 点	缺 点
吸附法	1. 简便, 2. 经济, 3. 可就地再生, 4. 通用	1. 流失, 2. 非特异性连接, 3. 需受控的使用玻璃(pH、温度、离心强度)
包埋法	1. 对酶、细胞、多酶系统、辅酶系统通用, 2. 较少抑制酶活性, 3. 可渗入特定粒子, 以增加密度或赋予磁性	1. 流失, 2. 部分胶的机械性能较差, 3. 单体或交联剂可引起酶失活, 4. 大分子底物扩散受阻 (对于超滤系统而言, 此为一特别重要的优点)
共价交联法	1. 特异性连接, 2. 几乎无流失, 3. 载体材料及其固定化方法丰富	1. 相对昂贵, 2. 固定程序复杂, 3. 再生困难或不可能, 4. 环境要求苛刻

够十分方便地对固定酶活力进行就地再生。如果操作过程中酶的丢失率得以控制, 则吸附酶在连续工业化生产过程中的应用是极具魅力的。事实上, 第一例成功地用于工业生产的固定化酶便是用吸附法制得的。为了减少吸附酶的流失和改善操作稳定性, 有时可将载体和吸附酶暴露于双官能团交联剂中(如戊二醛)。在用双官能团交联剂处理时, 如果载体是惰性的, 则交联剂可使酶分子相互连接在一起, 从而延缓吸附于载体上的酶的松散流失; 如果载体具有一些游离氨基酸(如胶原或几丁), 则交联剂可使酶分子与载体之间出现共价连接, 从而明显改善酶活和操作半衰期。

### 一、几丁载体上酶的吸附固定

几丁为一复杂的氨基聚多糖, 是蟹、虾等加工工业的主要副产品, 纯化几丁具有一粗糙的多孔结构, 能够通过简单的吸附结合大量的酶分子。

#### 〔实验11-1〕吸附法几丁固定化酶的制备

##### (一) 实验材料

1. 蟹、虾等外壳。
2. 待固定酶液。

3. 6mol/L HCl.
4. 5mol/L NaOH.
5. 1% NaCl.
6. 1%醋酸.
7. 陶瓷研磨器.
8. 戊二醛.
9. 50℃水浴.
10. 95℃水浴.

## (二) 操作步骤

### 吸附法

1. 将蟹、虾等外壳磨碎.
2. 以1:10 (g/ml) 的比率加入6mol/L HCl溶液, 混匀, 室温下去无机盐2h.
3. 去HCl, 加入10倍体积的去离子水洗涤两次.
4. 加入10倍体积95℃的5mol/L NaOH溶液, 95℃下处理2h去除蛋白质.
5. 加入5倍体积的1% NaCl洗涤5min.
6. 加入5体积的1%醋酸于50℃下洗涤5min, 去除色素.
7. 加入去离子水充分洗涤.
8. 干燥, 磨成20~50目大小的几丁颗粒.
9. 用蒸馏水或缓冲液制备50%湿几丁.
10. 将适量的酶用蒸馏水或缓冲液溶解.
11. 将湿几丁与酶溶液以1:2 (g/ml) 混合于室温下放置2h, 间以搅拌, 然后于4℃放置12h.
12. 用蒸馏水充分洗涤至洗脱液不表现酶活.
13. 悬于适当缓冲液中, 于4℃保存.

Flor等用上述方法将葡糖淀粉酶固定到几丁上(方法中用0.02mol/L, pH 3.8醋酸缓冲液), 此固定酶在4℃湿贮存时稳定性持续80天, 在0.02mol/L, pH 3.8醋酸缓冲液中和50℃下, 以液化马铃薯淀粉(45%固本)作为底物, 于一柱反应器中连续操作20天未出现酶活的明显降低. 连续操作30天后, 酶活下降大约30%, 此时可将固定酶进行就地再生, 获得与原固定化酶相当的酶活. 再生方法如下:

14. 用缓冲液洗去糖分。

15. 用100ml含200mg酶的缓冲液以5ml/h的流速过柱。

在吸附法中，稳定酶结合量依赖pH和离子强度。最佳pH通常在酶的等电点附近，最佳离子强度在0.01~0.05mol/L之间。如蔗糖酶吸附于几丁的最佳pH和离子强度分别为5.0和0.01mol/L。当离子强度从0.01mol/L增加到0.25mol/L时，酶固定量下降84%。

戊二醛交联吸附法

1. 按上述方法(步骤1-9)制备湿几丁。

2. 在酶液中加入0.1~1%的戊二醛(预试确定使用浓度)。

3. 按上述加入湿几丁。

4. 如果酶不能直接与戊二醛接触，则用戊二醛(1~10%)溶液先活化载体。

Stanley等用此法固定葡萄糖淀粉酶于几丁上时发现，交联的最适条件是在加入10g湿几丁的20ml酶-蒸馏水溶液中使用1%戊二醛。用1%戊二醛预先活化几丁进行固定，结果相似。此固定酶在45℃，0.1mol/L，pH 4.5醋酸缓冲液中连续操作17天后仍保持90%的活力。

## 二、疏水吸附法

含有非极性基团，特别是含芳香基团的载体，能够通过和酶蛋白的色氨酸、酪氨酸和异亮氨酸残基发生疏水反应使酶分子固定到载体上。多糖的脂肪和芳香酯衍生物最常作为疏水载体，其中，三苯基甲基琼脂糖用得最广、也最有前途。疏水吸附法特别适用于固定那些在自然环境中结合于质膜上的酶类。

疏水吸附法为一极为简便的酶固定化方法，由此法制得的固定酶具有以下优点：①酶分子与载体之间的结合十分稳定、牢固；②耦联率和酶活优于其他吸附法；③在pH 4~11和离子强度在5mmol/L~2mol/L内不会引起酶的流失；④用0.1% SDS或Triton X-100加25%甘油可将吸附上的酶完全洗下，载体及酶的性能不变，从而保证载体和可溶性酶的重复使用。此法的不足之处是载体昂贵；制得的固定液受 $\text{SCN}^-$ 、 $\text{I}^-$ 等阴离子及洗涤剂

的影响极大。

### (实验11-2) 疏水吸附法固定化酶的制备

#### (一) 实验材料

1. Sepharose CL-4B (Pharmacia).
2. G<sub>1</sub>玻璃滤器。
3. 95%乙醇。
4. 二甲基甲酰胺。
5. 三苯甲基氯。
6. 待固定酶。
7. 沸水浴, 30℃水浴。
8. 玻璃色谱柱 (50×2cm)。

#### (二) 操作步骤

1. 制备100ml Sepharose CL-4B凝胶。
2. G<sub>1</sub> 烧结玻璃滤器中用5倍体积的95%的乙醇抽滤脱水。
3. 再用5倍体积的无水二甲基甲酰胺抽滤。
4. 将凝胶转至一盛有3倍床体积的二甲基甲酰胺的500ml三角瓶中。
5. 置沸水浴中蒸发掉部分二甲基甲酰胺至总体积为200ml。
6. 立即冷却至30℃。
7. 将8g三苯甲基氯加到200ml Sepharose CL-4B二甲基甲酰胺混合物中于30℃轻轻搅拌 (注意, 凝胶应始终保持潮湿状态)。
8. 反应4h后将反应混合物用乙醇洗涤, 终止反应。
9. 经乙醇充分洗涤后的凝胶可置乙醇中于5~10℃保存, 或在pH 5~10的含水条件下保存。
10. 将三苯甲基琼脂糖凝胶装柱, 用适宜缓冲液平衡。
11. 将酶用缓冲液溶解并稀释, 然后慢慢通过柱, 流速1~2ml/min。
12. 用2个床体积的缓冲液洗柱, 洗出液继续用作洗涤液, 反复洗涤直至所有的酶都被固定。

通过改变三苯甲基氯的使用浓度和反应时间, 可控制凝胶载体上结合上三苯甲基基团的数目。在每毫升凝胶用100mmol三苯甲基氯完全反应时, 凝胶结合三苯甲基基团达到饱和。饱和状态下每一个二糖重复单元平均连接上一个三苯甲基基团。Cashion等运用此法已固定了20多种酶, 包括RNA连接酶、多核苷酸激酶和限制性核酸内切酶。研究结果表



明，一些酶以高达30mg/ml载体被固定，且有50~100%的酶蛋白被固定；但也有些酶无法用此法固定，如胰核糖核酸酶，可能是由于其缺少色氨酸并且含有为数不多的酪氨酸和亮氨酸。另有些酶(如糜蛋白酶和羧肽酶A)，由于受载体上苯基的抑制，固定化后酶活很低。

### 三、亲和吸附法

亲和吸附法是基于酶分子与一定的分子物质如抗体及其酶抑制剂间存在一特异性相互作用。但由于抗体或酶抑制剂在与酶结合后往往会使酶的活力下降乃至消失，因此在应用上受到限制。外源凝集素具有与糖类亲和结合的特点而大多数皆含有糖基，一些外源凝集素通过与酶蛋白分子中的糖基反应使酶得以固定并能显著提高固定化酶的活力与稳定性。此外还可利用抗原抗体特异性结合反应对酶进行固定化。

#### (实验11-3) 亲和吸附法固定L-维生素C氧化酶

##### (一) 实验材料

1. ConA-Sepharose 4B (制备方法见第七章亲和色谱法，可用溴化氰活化法)。
2. L-维生素C氧化酶。
3. 0.1mol/L, pH 5.5醋酸钠缓冲液。
4. 1mol/L NaCl。
5. 5ml注射器外套。

##### (二) 操作步骤

1. 将0.5ml ConA-Sepharose 4B凝胶装入底衬玻璃毛的注射器外套内。
2. 用数个床体积的0.1mol/L, pH 5.5醋酸钠缓冲液洗涤 ConA-Sepharose 4B柱。
3. 用相同的缓冲液将4.5单位的L-维生素C氧化酶溶解并适当稀释，以0.05ml/min的流速过柱。
4. 用1mol/L NaCl洗涤去除非特异性结合酶，接着用醋酸钠缓冲液洗涤。

运用此法已固定了L-维生素C氧化酶、D-葡萄糖氧化酶(固定缓冲液

为pH 5.0, 0.1mol/L醋酸钠缓冲液)和蔗糖酶(pH 5.5, 0.1mol/L醋酸钠-磷酸钠缓冲液)。一般认为此法对那些使用热不稳定性或昂贵酶的分析以及对不可逆抑制剂的分析特别有用。

#### 〔实验11-4〕亲和吸附交联法固定蔗糖酶

##### (一) 实验材料

1. ConA-Sepharose 4B(制备方法同前)。
2. 0.1mol/L, pH 5.6醋酸钠缓冲液。
3. 蔗糖酶。
4. 0.2%戊二醛溶液 用0.2mol/L磷酸钠缓冲液配制(pH 6.1)。
5. 0.01%乙醇胺。
6. 30℃水浴。
7. 5ml注射器外套。

##### (二) 操作步骤

1. 将5ml ConA-Sepharose 4B凝胶装入已衬玻璃毛的注射器外套中。
2. 用0.1mol/L, pH 5.6醋酸钠缓冲液洗涤。
3. 加入0.45mg/0.5ml蔗糖酶(1160单位), 孵育12h。
4. 用醋酸钠缓冲液循环洗涤。
5. 取出凝胶, 用醋酸钠缓冲液配制成10%悬液, 然后加入等体积0.2%戊二醛溶液。
6. 30℃, 交联反应2~3h。
7. 去大部分上清, 添加等体积0.01%乙醇胺, 放置1h终止反应。
8. 相同的醋酸钠缓冲液洗涤。

经此法获得的固定化酶在柱反应器中用于转化1mol/L蔗糖时(30℃), 以100ml/h流速连续操作60天, 酶活仅丧失18%。

#### 〔实验11-5〕葡萄糖氧化酶的免疫固定化

##### (一) 实验材料

1. 葡萄糖氧化酶。
2. 抗葡萄糖氧化酶抗体(制备及纯化参见第七章)。
3. Sepharose 4B。
4. 溴化氰。
5. 0.02mol/L, pH 7.4 PBS。

6. 5ml注射器外套。

### (二) 操作步骤

1. 按实验7-32步骤1-10制备抗葡萄糖氧化酶抗体-Sepharose。
2. 将抗体-Sepharose装入底部衬有玻璃毛的5ml注射器中，用PBS洗涤。
3. 加入适当浓度的葡萄糖氧化酶，循环过柱。
4. 用5倍床体积的PBS洗涤。

此外，利用相似的方法，以尼龙网膜为载体，将葡萄糖氧化酶固定于其上，已成功制成酶电极用于葡萄糖浓度的自动化检测。

## 四、过渡金属介导法

过渡金属介导法是通过过渡金属介导使酶蛋白和载体间形成螯合物而使酶固定。当与多种载体材料（包括纤维素、玻璃、陶瓷、尼龙、几丁、沙及一些有机多聚体）同时使用时，固定酶活力和稳定性较单一的吸附法显著改善，且再生十分容易。

### 〔实验11-6〕过渡金属介导葡萄糖淀粉酶固定于控孔玻璃

#### (一) 实验材料

1. 控孔玻璃微珠 ( $\phi 177 \sim 250 \mu\text{m}$ )。
2. 15%  $\text{TiCl}_4$ 溶液：

$\text{TiCl}_4$                       15g      15% (V/V) HCl加至100ml

3. 0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液。
4. 葡萄糖淀粉酶。
5. 45℃烘箱。

#### (二) 操作步骤

1. 将控孔玻璃珠与15%  $\text{TiCl}_4$ 溶液以1g:10ml混合。
2. 45℃下烘烤30h。
3. 用0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液充分洗涤活化的控孔玻璃珠。
4. 活化载体与酶液以1g:200ml的比例混匀(酶用0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液溶解并稀释成340单位/ml)。
5. 4℃，孵育16h。
6. 用0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液充分洗涤。

此法可制得72单位/g载体的固定化酶，但此法制得的固定化酶流失问题较突出。运用相似的方法已将葡糖淀粉酶固定到经TiCl<sub>4</sub>活化的矾土、Spheron等载体上。

### (实验11-7) 过渡金属介导葡糖淀粉酶固定化改良法

#### (一) 实验材料

1. 控孔玻璃珠 (177~250 $\mu$ m)。
2. 15% TiCl<sub>4</sub>溶液  
TiCl<sub>4</sub> 15g      15% HCl加至 100ml
3. 葡糖淀粉酶(60单位/mg)。
4. 0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液。
5. 0.05mol/L, pH 7.0磷酸钠缓冲液(PB)。
6. 氯仿
7. 1%二氨基己烷溶液  
1,6-二氨基己烷 1g      氯仿 100ml
8. 5%戊二醛溶液(0.05mol/L PB配制, pH 7.0)。
9. 甲醇。
10. 45℃水浴及烘箱。
11. G<sub>1</sub>玻璃漏器。

#### (二) 操作步骤

1. 将控孔玻璃珠与15% TiCl<sub>4</sub>溶液以1g:2.5ml的比例混合。
2. 45℃烘烤30h, 使其干燥。
3. 氯仿充分洗涤。
4. 以5ml/g载体加入1%二氨基己烷溶液于45℃胺化30min。
5. 在玻璃滤器中用5体积甲醇洗涤胺化控孔玻璃珠。
6. 用去离子水充分洗涤胺化载体。
7. 将胺化控孔玻璃珠移入一小烧杯中, 以5ml/g载体加入5%戊二醛溶液 (pH 7.0), 室温作用1h。
8. 将葡萄糖淀粉糖用0.02mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液溶解并稀释成495单位/ml(约8.25mg/ml)。
9. 将酶液与活化控孔玻璃珠以200ml/1g混合, 4℃孵育2h, 相同缓冲液洗涤去掉未结合酶。

经此法制得的固定化葡糖淀粉酶的操作半衰期达60天。如载体用ZrCl<sub>4</sub>

活化，则操作半衰期可达71天。

### 第三节 包埋法

包埋法是通过物理方法将酶固定于载体基质的网眼中。用于包埋酶的常用的载体材料是聚丙烯酰胺，此外尚有用淀粉、胶原蛋白、硅胶等作载体的。常用的包埋方法见表 11-3。

表 11-3 常用包埋法

- |                              |
|------------------------------|
| 1. 凝胶(共)聚合: (1) 可溶性, (2) 悬浮性 |
| 2. 酶蛋白共聚合                    |
| 3. 交联多聚物网凝胶形成                |
| 4. 贯通网络法(在一孔性载体上形成凝胶)        |

#### 一、凝胶聚合包埋法

用于制备凝胶的常用单体有丙烯酰胺、2-羟乙基甲基丙烯酸酯 (HEMA) 及一些疏水胶。另外，一些聚合分子如明胶、脱乙酰几丁质、聚乙烯醇等也已逐渐被广泛使用。

用聚丙烯酰胺凝胶包埋酶首先由Bernfeld等于1963年创建。不久，聚丙烯酰胺包埋固定的葡萄糖氧化酶使用于酶电极的研究和应用中。聚丙烯酰胺包埋法的一般步骤是：①将酶与丙烯酰胺单体、交联剂(如甲叉双丙烯酰胺)在缓冲液中混合；②通过氧化还原系统(如过硫酸钾和四甲基乙二胺)或光化学系统(如核黄素加光照)启动聚合。聚合反应如在水溶液中进行，则聚合产生的凝胶机械性能十分差，搅拌产生的剪切力便可使凝胶折断；如果在聚合反应刚被启动时，将聚合混合液迅速混入含有少量非离子表面活性剂作为悬浮稳定剂的有机溶剂(如3:1甲苯-氯仿)中，则可制得致密球状凝胶颗粒。丙烯酰胺的聚合反应是一放热过程，为防止酶的热变性，一般要求此反应在0~25℃范围内进行。另

外，在聚合前，最好用氮气流洗脱去聚合混合液中的氧气。

在凝胶聚合包埋酶的方法中，单体浓度和交联剂/单体比率对酶的固定率及固定酶的活力表达有着极大的影响。现已证实丙烯酰胺单体对酶蛋白变性的作用与尿素相似，浓度越高，变性作用越强。凝胶基质中如加入一定量的酶底物，则可部分降低丙烯酰胺的变性作用。因此，在对某一种酶进行包埋固定之前，应通过预试验来确定单体的最佳浓度及最佳交联剂/单体比率。通常，总单体浓度在20~50%不等，而交联剂/单体比率一般在1~10%之间。此外，聚合启动剂过硫酸钾可通过氧化聚合反应过程中酶分子出现的游离巯基使酶活降低。解决这一问题的方法是还原剂的使用。通常用0.125%戊二醛、半胱氨酸或二硫苏糖醇 (DTT) 可有效地防止使用浓度为0.625%过硫酸钾的巯基氧化作用。

## 二、辐射聚合包埋法

$\gamma$ -射线可诱导丙烯酰胺在超低温 ( $< -70^{\circ}\text{C}$ ) 下进行聚合反应，聚合反应可在溶液或悬浊液中进行，无需通入氮气。一般方法是将丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和酶混合后迅速冷冻 (使用浓度与上节一致)。根据用途，可将此冻成块状、膜状或珠状，然后用剂量为800000rad/h的 $^{60}\text{C}$ 的 $\gamma$ -射线辐射5~30min，置冰水中融溶。由于冰晶的作用，凝胶为高度多孔，且酶活及其稳定性皆十分理想。需要注意的是凝胶的这一多孔性质易被高浓度缓冲液破坏。因此，酶固定化用缓冲液浓度应限制在10~30mmol/L内。通过与丙烯酸钙、钠、镁共聚合可改善凝胶的机械和溶胀性能。

几种不同类型的亲水或疏水单体一起经辐射共聚合可改善固定酶的性能。在这一方法中，运用在真空状态及超低温 ( $-24\sim -78^{\circ}\text{C}$ ) 下不大于 $10^6$ rad的辐射剂量对酶活几无损害的特征，用较高的辐射剂量启动聚合，同时消除了上述方法中缓冲液浓度的使用限制。在辐射共聚合方法中，亲水单体 (如HEMA) 及疏水单体 (如二甲醇双丙烯酸酯) 浓度对酶活的影响极大，单体浓度在

30~50%时,一般可获得30~70%的固定酶活。但为了防止酶的流失,单体浓度最好高于50%。亲水和疏水单体间共聚合可改善固定酶的活力表达。

疏水单体的辐射聚合与亲水单体辐射聚合相似。在水溶液中疏水单体聚合成无孔珠粒,其直径随单体浓度的改变而改变,由于形成的是无孔珠粒( $\phi 100\sim 300\mu\text{m}$ ),酶分子仅能包埋于或共价连接于载体外表层,这就更适合于那些具有大分子底物的酶的固定化。与亲水单体辐射聚合不同的是在使用疏水单体进行辐射聚合的一般方法中,常常使用醋酸钠。将1~4mol/L醋酸钠加入到单体及酶的水溶液中,使醋酸钠与疏水单体起反应产生微细的单体盐析颗粒,然后再在 $-78^{\circ}\text{C}$ 真空条件下用 $10^6\text{rad}$ 剂量的 $^{60}\text{Co}$ Y-射线辐射。控制醋酸钠和单体浓度,可获得希望大小的固定酶珠粒(平均直径在50~900 $\mu\text{m}$ 范围)。

#### **(实验11-8) 辐射共聚合包埋法固定葡糖淀粉酶**

##### **(一) 实验材料**

1. 葡糖淀粉酶。
2. 亲水单体 (HEMA)。
3. 疏水单体(二甲醇双丙烯酸酯)。
4. 0.1mol/L, pH 4.5醋酸缓冲液。
5. 干冰-甲醇浴。
6.  $^{60}\text{Co}$ 放射源。
7. 真空泵及真空装置。
8. 试管等。

##### **(二) 操作步骤**

1. 将500单位葡糖淀粉酶溶于5ml醋酸缓冲液中。
2. 加入1.25g HEMA和1.25g 二甲醇双丙烯酸酯,迅速振荡混匀。
3. 随即浸入盛有干冰-甲醇冷却剂的真空瓶中。
4. 建立真空状态。
5. 以 $1.0\times 10^6\text{rad/h}$ 的剂量,用 $^{60}\text{Co}$ 辐射1h,整个辐射过程应在超低温( $-78^{\circ}\text{C}$ )下进行。

6. 根据用途, 将包埋酶切成一定大小的珠粒。

### 三、酶蛋白共聚合包埋法

在酶蛋白共聚合方法中, 首先将酶分子烯化, 然后再与其他单体共聚合。因此, 这一方法实质上是物理包埋和化学交联法的结合。

#### 〔实验11-9〕 酰化共聚合包埋法固定 $\alpha$ -糜蛋白酶

##### (一) 实验材料

1.  $\alpha$ -糜蛋白酶。
2. 0.2mol/L, pH 8.0磷酸钾缓冲液。
3. 烯丙酰氯 (acryloyl chloride)。
4. 5mol/L KOH。
5. 30%丙烯酰胺溶液

丙烯酰胺	30 g	甲叉双丙烯酰胺	1.5 g
去离子水	100ml		

6. 30mg/L核黄素溶液。
7. 钨灯(300W)。
8. 冰水浴。

##### (二) 操作步骤

1. 在0.2mol/L, pH 8.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中制备300mmol/L的 $\alpha$ -糜蛋白酶溶液, 冷至0℃。
2. 以每个酶分子17个氨基为基准, 加入1000倍过量烯丙酰氯, 立即置冰水浴中剧烈搅拌5min, 用KOH控制pH在8.0。
3. 在pH 8和25℃下继续孵育1h, 以去除酰化糜蛋白酶活性部位的氨基官能团, 并维持酶的最佳活力。
4. 将30%丙烯酰胺溶液、修饰过的糜蛋白酶溶液、30mg/L核黄素溶液按比例混合(预试确定最适比例)。
5. 置冰水浴中用30W钨灯放射出的紫外线诱导聚合1h。
6. 将聚合物研磨成0.1mm直径的珠粒, 然后用水充分洗涤。

由此法制备的固定酶具有极好的保藏和操作稳定性能, 且可耐受较高的操作温度。此外, 固定酶的再生十分容易, 能够从一明显的变性状态下



再生并可作数次再生。这一方法也可用于辅酶的固定化。

#### 四、交联多聚物凝胶包埋法

交联多聚物凝胶包埋法的一般过程是在一水溶液中将酶与可溶性多聚体聚合，然后将此混合液喷洒到一无粘附性的固相表面，干燥后形成薄膜。有时预先将交联剂加入到多聚物-酶混合溶液中，可将固定酶做成各种形状。

##### 〔实验11-10〕明胶交联包埋法

明胶的蛋白质性质，使其能够与酶蛋白分子间形成较强的共价连接，并提供一防止交联过程中酶变性和失活的稳定内环境。明胶包埋获得的固定化酶的酶活还可借助在交联后仍然存在数小时的明胶珠粒表面自由醛基加以改善。此外，将明胶-酶溶液喷制成薄膜，干燥并用戊二醛等进行交联，可制成各种用途的生物催化剂膜。

##### (一) 实验材料

1. 明胶。
2. 0.1mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液。
3. 葡萄糖淀粉酶。
4. 正丁酸乙酯。
5. 10%戊二醛溶液 (pH 5.0)。
6. 冰浴。
7. 50℃水浴。
8. 磁力搅拌器。
9. 50ml注射器。

##### (二) 操作步骤

1. 用0.1mol/L, pH 4.5醋酸钠缓冲液配制6%明胶溶液30ml，加热助熔后，50℃水浴中存放。
2. 加入葡萄糖淀粉酶，最终浓度为40mg/ml。
3. 将盛有400ml正丁酸乙酯(正丁酸乙酯需新鲜蒸馏制得)的三角瓶置冰浴中。
4. 用注射器以2ml/min的恒速将明胶-酶液注入丁酸乙酯中，在凝胶颗粒形成达30ml体积后磁力搅拌5min。

5. 去除丁酸乙酯。
6. 在 30ml 葡萄糖淀粉酶-明胶颗粒中加入 50ml 10% 戊二醛溶液, 室温下搅拌 30min。
7. 用 0.1mol/L, pH 4.5 醋酸缓冲液洗涤。
8. 将固定酶与 5mg/ml 游离酶液以 1:5 体积混合, 4℃ 搅拌 18h。
9. 同上缓冲液洗涤。

### (实验 11-11) 明胶交联法制备固定化双酶膜

#### (一) 实验材料

1. 乳酸氧化酶(1300 单位/g)。
2. 过氧化氢酶(3650 单位/g)。
3. 明胶(Ⅳ型)。
4.  $K_2HPO_4$ 。
5. FSN 氟表面活性剂。
6. 戊二醛。
7. 尼龙网膜(孔隙  $2 \times 2\text{mm}$ )。
8. 丙烯酸乙酯。
9. 40℃ 水浴。

#### (二) 操作步骤

1. 将明胶溶于双蒸水中, 制成 20% 悬液于室温下溶胀 60min。
2. 移入 40℃ 水浴中, 搅拌溶解 60min。
3. 将 0.2g 乳酸氧化酶溶于 0.5ml 蒸馏水中。
4. 将酶液加入 10g 明胶液中, 40℃ 充分混匀。
5. 加入 20mg 过氧化氢酶, 混匀。
6. 加入 0.1g  $K_2HPO_4$  和 40mg 氟表面活性剂, 调 pH 至 6.0, 用蒸馏水将总量调节到 40g, 混匀。
7. 用丙烯酸乙酯处理尼龙网。
8. 在双酶-明胶液中加入戊二醛溶液 (pH 6.0) 至终浓度为 0.125%。
9. 挤压涂层于尼龙网表面。
10. 室温放置 6h。
11. 4℃ 存放。

由此法制备的固定化双酶可用于丙酮酸的生产。在 pH 6 时, 用戊二醛作为交联剂, 制备的固定化酶氧化 L-乳酸为丙酮酸的活性最高, 丙酮酸产

率为47%。Buridick等用相似的方法共固定化了葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶。通过摇瓶，D-葡萄糖向葡萄糖酸的转化率为100%。

#### 〔实验11-12〕聚乙烯醇交联包埋法

##### (一) 实验材料

1. 5%聚乙烯醇水溶液(PVA, 聚合度2400)。
2. 苯甲酸。
3. 苯甲酸钠。
4. 蔗糖酶。
5. 0.1mol/L, pH 4.6醋酸钠缓冲液。
6. 紫外灯。
7. 聚氯乙烯板。
8. 干燥器(以五氧化二磷为干燥剂)。

##### (二) 操作步骤

1. 用0.1mol/L, pH 4.6醋酸钠缓冲液配制蔗糖酶溶液。
2. 在100g 5% PVA溶液中加入1.5g苯甲酸钠, 0.5g苯甲酸, 混合溶解。再加入1g酶液, 混匀。
3. 将混合物喷涂到聚乙烯板上, 置干燥器内, 在其上3cm处用253.7nm波长的紫外线辐射2~3h。
4. 4℃放置过夜。

#### 〔实验11-13〕脱乙酰几丁质交联包埋法

##### (一) 实验材料

1. 几丁。
2. 0.01% NaBH<sub>4</sub>溶液。
3. 氢氧化钠。
4. 2%醋酸。
5. 待固定化酶。
6. 25%戊二醛。
7. 离心机。

##### (二) 操作步骤

1. 按〔实验11-1〕步骤1~8制备几丁。
2. 将几丁用0.01% NaBH<sub>4</sub>悬浮成10%。
3. 加入固体NaOH至40%。

4. 室温反应2h.
5. 3000r/min离心10min, 收获沉淀, 蒸馏水洗涤3次.
6. 取100mg脱乙酰几丁质, 加入2ml 2%醋酸, 室温过夜, 以溶解脱乙酰几丁质.
7. 加入100mg酶, 混匀.
8. 滴加0.8ml戊二醛, 边加边搅拌.
9. 室温放置10min.
10. 4℃过夜.
11. 蒸馏水洗涤3次.

### 五、移植共聚合包埋法

酶移植共聚合包埋法 (Graft Copolymerization) 与酶共聚合法相似, 基本方法是将酶与聚合单体混合于另一类型的聚合物 (载体, 如Sephacrose) 表面进行聚合, 使前者形成的聚合物构成后者的长链分枝, 同时使酶固定。此方法的优点是可通过第二聚合物改善固定酶的机械操作性能, 并能降低底物分子的载体内部扩散效应。

移植共聚合包埋法也有氧化还原系统和光化学系统之分。在氧化还原启动剂存在下, 乙烯化酶作用于乙烯基单体完成聚合。光化学启动聚合系统则是运用Sephacrose等多糖载体, 用 $\text{FeCl}_3$ 作为光化学启动剂, 耦联率及酶活水平显著提高。这一方法的基本步骤是先将Sephacrose浸入 $\text{FeCl}_3$ 溶液中, 将铁催化剂牢固地吸附到载体上, 接着加入酶和单体, 用UV辐射活化, 聚合一特定时间后, 用1mol/L NaCl洗涤去除未结合的酶。经此法制备的固定化酶的酶活及耦联率受 $\text{FeCl}_3$ 浓度、聚合时间, 以及单体/载体和酶/载体重量比的影响。一般而言, 这些参数分别为0.15mmol/L  $\text{FeCl}_3$ /g Sephacrose, 30min聚合时间, 40mg酶/g Sephacrose, 50~200mg单体/g Sephacrose。在此法中, 常用的单体为甲基丙烯酸缩水甘油酯、二丙烯酸酰哌嗪和1,3,5-六氧三丙烯酸酰-s-三嗪。

#### (实验11-14) 移植共聚合包埋法

### (一) 实验材料

1. 0.15mmol/L  $\text{FeCl}_3$ 。
2. Sepharose 4B。
3. 待固定化酶。
4. 甲基丙烯酸缩水甘油酯。
5. 1mol/L  $\text{NaCl}$ 。
6. 低压汞灯。
7.  $G_1$ 玻璃滤器。

### (二) 操作步骤

1. 将Sepharose 4B 2ml移入 $G_1$ 玻璃滤器中, 用蒸馏水洗涤, 加入5ml 0.15mol/L  $\text{FeCl}_3$ , 抽干。
2. 称取1g Sepharose 4B, 加入1ml 0.15mmol/L  $\text{FeCl}_3$ , 室温放置30min。
3. 蒸馏水洗涤。
4. 加入40mg酶, 100mg甲基丙烯酸缩水甘油酯, 混匀。
5. 紫外照射2h。
6. 1mol/L  $\text{NaCl}$ 洗涤去除未结合酶。

运用此法对辣根过氧化物酶进行固定化, 可获得125单位/g载体酶活, 交联率大约为15%, 连续操作20h无酶活丧失。

## 六、物理定位法

物理定位法有纤维包埋法, 微囊、脂质体及红细胞包埋法、超滤法等。这里仅介绍纤维包埋法。

纤维包埋法是酶固定化技术中较早使用且较为成熟的方法, 青霉素酰胺酶及乳酸酶等已用此法固定并已商品化。此法的基本原理是在水溶性酶相与含纤维形成多聚物的不溶混有机溶剂相之间形成一乳胶, 然后挤压此乳胶, 使其从一狭口进入液体沉淀剂中, 在另一端连续收集所得的纤维, 真空干燥去除纤维中的有机溶剂, 从而将酶包埋于纤维微腔中。此法中最常用的多聚体是溶于二氯甲烷中的三醋酸纤维素, 最常用的沉淀剂是甲苯和石油

髓。

运用此法制备的固定化酶的最大优点是酶活十分高，操作性能十分稳定。以三醋酸纤维固定化的蔗糖酶为例，此固定化酶表达65%的原始酶活，且能在25℃下连续水解20%的蔗糖溶液(0.1 mol/L, pH 4.5磷酸钠) 5年，而酶活仅降低10%。

## 第四节 共价交联法

共价交联法是通过酶分子与载体之间共价键的形成而使酶固定。此法已成为现今及今后固定化酶，特别是工业应用的固定化酶制备的主要手段。

共价交联法的最为突出的优点是固定化酶操作稳定性极好，共价交联剂、载体及交联方法也十分丰富(表11-4)。

表 11-4 常见的共价交联

方 法	反应基团	
	载 体	酶
溴化氰	-OH	-NH <sub>2</sub> (Lys)
碳化二胺	-COOH/-NH <sub>2</sub>	-NH <sub>2</sub> /-COOH
蔗糖合物	-CHO	-NH <sub>2</sub>
重氮化	芳香胺	Lys, Tyr, His
酰基叠氮	-CH <sub>2</sub> COOH→CH <sub>2</sub> CON <sub>3</sub>	Lys, Tyr, Cys, Ser
酸酐	N-酰酐	-NH <sub>2</sub>
芳基化	-OH	-NH <sub>2</sub>
乙磺基-羟乙基-二羟苯酮	-COOH	-NH <sub>2</sub>
硫磺胺	-NH <sub>2</sub> →-NCS	-NH <sub>2</sub>

共价交联固定方法中最常用的载体有①多糖，如Sephacrose, Sephadex, 纤维素，以及它们的衍生物(如p-氨基苯基、羧甲基、氨基乙基等衍生物)；②丙烯多聚体和共聚体，如聚丙烯酰胺(Bio-Gel, Enzacryl)、Spherons(羧烷基甲基丙烯酸)、顺丁烯二酸及苯乙烯衍生物；③聚酰胺，如尼龙；④蛋白质，如胶原；⑤活性

碳；以及⑥控孔玻璃珠等。

### 一、溴化氰交联法

溴化氰法首先由Axen等于1967年提出，从此，此法在固定化技术中被广泛使用。通过溴化氰活化，使多糖载体产生大量活性基团而与酶蛋白分子上的游离基团键合，使酶固定。溴化氰法主要有两类：一是滴定法，此法中通过连续加碱来维持恒定的pH；另一是缓冲法，在此法中用一强的缓冲系统。后者易于操作，但产生的载体耦联容量不高。需要指出的是溴化氰为剧毒易挥发物质，操作时应在通风橱中进行并需十分小心。

#### (实验11-15) 溴化氰交联滴定法

##### (一) 实验材料

1. Sepharose 4B.
2. 溴化氰.
3. 二甲基甲酰胺.
4. 2~4mol/L  $\text{Na}_2\text{O}$ .
5. 待固定化酶.
6.  $\text{G}_1$ 烧结玻璃漏斗.
7. 磁力搅拌器.
8. 通风橱.
9. pH酸度计.

##### (二) 操作步骤

1. 用蒸馏水在 $\text{G}_1$ 烧结玻璃过滤器中洗涤Sepharose 4B，然后借助一低真空将Sepharose中的水分抽干。

2. 取10g上述处理过的Sepharose 4B置反应容器中，加入蒸馏水到1.2倍原体积，搅拌成泥状。

3. 冷至 $10^\circ\text{C}$ 。

4. 将pH计置反应容器中。以下在通风橱内操作。

5. 将1g溴化氰溶解于2ml二甲基甲酰胺或乙腈中，然后加到反应容器中并用磁力搅拌器强烈搅拌。

6. 用2~4mol/L NaOH维持反应溶液pH在11.0。

7. 15min后, 或者当碱消耗明显减慢时, 将Sephacrose转至玻璃滤器中, 并用500ml 4℃蒸馏水洗涤。

8. 在缓冲酶溶液中悬浮上述制得的活化载体, 4℃孵育12~24h (碱性pH下)。

经甘氨酸检验, 此法可获得20 $\mu$ mol/g载体的结合量。经活化的载体可在密闭条件下长期-20℃保存于水-丙酮液中, 其结合量降低不明显。但一旦被激活应立即用于耦联。

缓冲剂法与滴定法相似, 所不同的是抽吸干燥后的载体用2mol/L碳酸钠缓冲液(pH 11)悬浮; 1g 溴化氰溶于1ml二甲基甲酰胺中, 活化反应在0℃进行2min。

活化载体上结合酶的主要活化基因明显依赖于所用载体的类型, 由此也决定了活性载体的处理方法。多糖载体(如Sephadex, 纤维素或葡聚糖)一旦被溴化氰活化, 则首先形成不稳定的氰酸酯, 然后在溶液中迅速转化为氨基甲酸和亚氨基氨基甲酸(线状或环状)。酶结合最先通过与环状亚氨基氨基甲酸反应形成N-取代亚氨碳酸键或异脲衍生物。由于亚氨碳酸在碱性环境中十分稳定, 因此建议用冷的0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8.5)洗涤活化后的多糖载体。琼脂糖载体(如Sephacrose)则与上述多糖载体不同, 它明显地使氰酸酯稳定, 酶结合直接发生于酶蛋白与氰酸酯形成异脲衍生物。由于氰酸酯在酸性环境中十分稳定, 因此推荐使用1mmol/L HCl洗涤活化后的载体。

#### **〔实验11-16〕三乙烯胺-溴化氰活化法**

三乙烯胺(TEA)可增加溴化氰亲电性氰酸基, 且使活化pH降低(pH 8.0), 由此可减少活化氰酸酯的水解并减少溴化氰的用量。运用此法可使每克载体获得75 $\mu$ mol氰酸酯。

##### **(一) 实验材料**

1. 丙酮(A·R)。
2. 溴化氰。
3. 三乙烯胺(A·R)。
4. Sepharose 4B。
5. G<sub>1</sub>玻璃滤器。

##### **(二) 操作步骤**



1. 在40ml丙酮中溶解4g 溴化氰。
2. 在40ml丙酮中溶解6.1g 分析纯TEA。
3. 将Sepharose 4B置于G<sub>1</sub>玻璃滤器中，顺次用水、水-丙酮(7:3)、水-丙酮(4:6)洗涤。
4. 抽干Sepharose 4B。
5. 将2L去离子水冷却至4℃。
6. 取10g 抽干的Sepharose 4B置一反应容器中，加入10ml水-丙酮(4:6)，搅拌成泥状。
7. 置冰箱冷冻室中，将Sepharose悬液冷却至-15℃。
8. 加入40ml溴化氰丙酮液，在剧烈搅拌的同时滴加40ml TEA 丙酮液，2min内加完。
9. 迅速加入4℃的水500ml，并在G<sub>1</sub>玻璃滤器中用4℃水充分洗涤。
10. 在pH 8.0左右下，缓冲酶液加入到活化的 Sepharose 中，4℃孵育12~24h。

经此法获得的活化 Sepharose 可在0.05~0.1mol/L HCl (5ml/g载体)于4℃保存数小时而其耦联量几乎不下降。用前再用4℃水充分洗涤后，再用固定化用缓冲液(4℃)洗涤。

由于丙酮溶液可引起琼脂糖凝胶轻轻改变，使凝胶在活化和耦联过程中形成凝集块，因此可使用交联衍生物如Sepharose CL-4B。同样，由于丙酮具有高度的挥发性且在280nm处也有一吸收峰，因此可用其他有机溶剂如二甲基甲酰胺代替。

### 〔实验11-17〕溴化氰活化法制备可溶性载体固定化酶

#### (一) 实验材料

1. 葡聚糖T-70 (MW=70000)。
2. 0.2mol/L NaOH。
3. 溴化氰。
4. 0.2mol/L HCl。
5. 2~4mol/L NaOH。
6. α-D-半乳糖酶。
7. α-D-半乳糖。
8. 0.1mol/L, pH 6.5醋酸钠缓冲液。
9. 1mol/L乙醇胺(pH 8.0)。

10. Sephadex G-200.

11. pH计.

12. 磁力搅拌器.

## (二) 操作步骤

1. 将185mg葡聚糖T-70溶于3.5ml水中, 用0.2mol/L NaOH调pH至10.7.

2. 在通风橱中配制1ml 6mg/ml溴化氰水溶液.

3. 在葡聚糖溶液中5min内滴加入1ml溴化氰水溶液, 强烈搅拌. 用2~4mol/L NaOH维持pH在10.7.

4. 将5.5mg $\alpha$ -D-半乳糖酶和16mg  $\alpha$ -D-半乳糖溶于2.5ml醋酸钠缓冲液中.

5. 葡聚糖经溴化氰活化20min后用0.2mol/L HCl调pH至8.4.

6. 将2.5ml酶液加入其中, 调pH至8.4.

7. 4℃孵育16h, 不时充分混匀.

8. 加入0.5ml 1mol/L乙醇胺 (pH 8.0), 再混合2h, 以封闭载体上残存的活性基因.

9. 过Sephadex G-200柱(4℃)分离出固定酶 (Sephadex凝胶色谱技术参见第七章).

运用此法可使每克葡聚糖结合24.3mg酶, 交联率达80%, 固定酶表达55%的酶活且酶的热稳定性明显改善. 此法中运用较低浓度的溴化氰目的是为了减少葡聚糖分子间的交联.

## 二、碳化二亚胺法

共价交联进行酶固定化的另一类常用的方法是运用水溶性碳化二亚胺在pH4.75~5时与载体上的羧基起反应, 使载体上产生大量高活性O-酰基异脲衍生物. 常用的碳化二亚胺有1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和1-环己烷基-3-(2-吗啉代-乙基)-碳化二亚胺-N-甲基-P-苯-硫酸(CMC). 酶与活化载体的耦联最佳条件是在4℃、pH 7下反应4~16h. 用于酶固定化的碳化二亚胺法有两种基本类型, 即二步法和一步法. 前者是先将载体用碳化二亚胺活化, 洗涤后再加入酶, 此法最为常用;

后者是将载体和酶混合在一起后加入碳化二亚胺进行酶的固定化。此外，尚有将酶先用碳化二亚胺处理，此作用发生在酶蛋白的羧基，然后被固定到载体氨基上。

水溶性碳化二亚胺常可用于多种酶和载体间的耦联。通过一步法，用CMC和EDC已将酸性磷酸酶固定到聚丙烯酸-聚乙烯共聚体上；用EDC已将葡糖淀粉酶和葡糖氧化酶固定到活性炭上；用EDC (pH 4.8, 0℃, 18h) 已将索青霉纤维酶耦联到可溶性PVA上。此外，碳化二亚胺还常常用于分隔臂固定法中。分隔臂固定法中常用的分隔分子为盐酸-1,6-二氨基己烷和ε-氨基己酸。Mazid和Laidler在固定化N<sup>6</sup>-羧甲基NAD时用CMC先将分隔分子耦联到N<sup>6</sup>-羧甲基NAD上，然后用一步法由CMC介导 (pH 5, 500mg CMC/100mg NAD, 21℃, 24h) 将分隔分子修饰后的N<sup>6</sup>-羧甲基NAD固定到部分水解的尼龙网膜上。Kitano等以ε-氨基己酸为分隔分子用EDC将碱性磷酸酶固定到聚苯乙烯胶乳颗粒上。

### (实验11-18) 碳化二亚胺二步法固定巯基氧化酶

#### (一) 实验材料

1. 0.2mol/L, pH4.7磷酸钠缓冲液。
2. 控孔玻璃珠(120~200目, 孔径200nm)。
3. 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)。
4. 氮气。
5. 0.047mol/L, pH7.0磷酸钠缓冲液 (预冷至 0℃)。
6. 巯基氧化酶。
7. G<sub>1</sub>玻璃滤器。
8. 冰水浴。
9. 磁力搅拌器。

#### (二) 操作步骤

1. 在500mg控孔玻璃珠中加入0.2mol/L, pH 4.7磷酸钠缓冲液至总体积为17ml。
2. 加入380mg固体EDC。

3. 室温下通入氮气, 搅拌反应混合液20min.
4. 立即用0℃的0.047mol/L, pH7.0磷酸钠缓冲液250ml洗涤玻璃珠2min.
5. 将巯基氧化酶用0.047mol/L, pH7.0磷酸钠缓冲液配成6mg/ml.
6. 在G<sub>1</sub>玻璃滤器中将活化玻璃珠用15ml酶溶液以70ml/h的速度于4℃下循环洗涤16~24h.

在两步法中, 酶和载体结合的关键因素是碳化二亚胺浓度和活化时间, 洗涤时间和体积, 以及耦联时间, 其中以洗涤步骤最为关键, 因为此直接决定了O-酰基异脲基团的数量和载体活性.

碳化二亚胺一步固定法与二步法相似. 以固定巯基氧化酶为例, 操作步骤如下: ①在500mg琥珀酰控孔玻璃珠中加入0.047mol/L, pH7.0磷酸钠缓冲液至17ml; ②加入0.38mg固体EDC和酶溶液; ③4℃搅拌60min. 一步法中使用的EDC浓度远较两步法低, 但两种方法获得的固定酶比活和耦联率相似. 但有些酶因羧基破坏而失活, 则仅能用两步法固定.

### 三、戊二醛交联法

戊二醛是有两个醛基的五碳直链化合物, 其分子式为: O—CH—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—CH—O, 这两个对称的醛基可与碱性氨基酸的氨基形成Schiff碱或Michael型加合物. 戊二醛还能与胱氨酸的巯基、酪氨酸和组氨酸的苯环和咪唑环发生交联. 因此, 戊二醛法固定酶的机理是十分复杂的.

戊二醛通常为25%的酸性水溶液, 有芳香味, 无色或淡黄色, 易挥发、聚合及氧化. 戊二醛纯品在280nm处有一单一的最大吸收峰, 在有缩合体存在时, 在235nm出现第二个最大吸收峰. 温度升高及在碱性条件下会加速戊二醛单体的聚合反应, 但此并不影响其交联蛋白的能力. 戊二醛现已成为酶固定化中使用最为广泛的双官能团交联剂, 其中应用最多的是将吸附酶化学交联到载体上, 制备可溶性多聚体的交联凝胶, 将酶交联到可溶性低聚体中或不溶性膜中等方面.

戊二醛法中较难掌握的是戊二醛浓度、温度、pH值和反应

时间,对任何一个具体的酶和载体,上述变量可能完全不同,需经预试验加以确定。交联一般是在中性或弱酸性 pH 下进行;载体预活化通常在室温下进行,此时戊二醛浓度相对较高(有时高达 10%),然后充分洗涤。在有酶存在时,则使用低浓度的戊二醛(0.01~1.0%),作用时间依戊二醛浓度而定,通常在 1~60min。交联完成后,通常加入赖氨酸、谷氨酸、Tris、乙醇胺或联氨溶液,以消除酶-载体复合物上残存的醛基。最后,再用硼氢化钠稳定酶与载体间形成的 Schiff 碱。

与戊二醛作用方式相似,近年来开发出的异基双官能团交联剂在酶固定中日趋广泛使用,这些交联剂的最大优点是避免酶蛋白分子间的互相交联。

#### (实验 11-19) 戊二醛交联固定化葡萄糖氧化酶

##### (一) 实验材料

- 20% 牛血清白蛋白溶液:  
牛血清白蛋白(BSA, 第 V 部分) 20mg  
0.2mol/L, pH6.5 磷酸钠缓冲液 0.1ml
- 葡萄糖氧化酶(GOD)。
- 聚四氟乙烯膜。
- 2.5% 戊二醛溶液(pH6.5)。
- 0.2mol/L, pH 6.5 磷酸钠缓冲液。

##### (二) 操作步骤

- 将 GOD 用 0.2mol/L, pH6.5 磷酸钠缓冲液配成 1.25 单位/ $\mu$ l。
- 在一聚四氟乙烯膜上混匀下列溶液:

20% BSA	3 $\mu$ l	GOD 溶液	4 $\mu$ l
2.5% 戊二醛溶液	2 $\mu$ l		
- 涂布 10mm<sup>2</sup> 面积。
- 室温静置 1 h, 成膜。

#### 四、交链聚乙烯亚胺法

聚乙烯亚胺(PEI, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>n</sub>)为一高分枝的合成聚胺,可用

作裨料改善原载体的性能，也可经交联后形成大孔载体或与其他载体联合使用。

### 〔实验11-20〕PEI修饰载体的制备及用于酶固定化

#### (一) 实验材料

1. 待固定酶。
2. 无孔玻璃珠( $\phi 13\sim 44\mu\text{m}$ )。
3. 超声破碎仪。
4. 铝酸钠溶液 将过量铝酸钠加入20ml蒸馏水中，室温放置1h，离心取上清液10ml溶于1000ml蒸馏水中。
5. 100mg/ml PEI水溶液 (pH10.0, 用6mol/L HCl调节)。
6. 50mg/ml PEI水溶液 (pH7.0, 用6mol/L HCl调节)。
7. 10mmol/L, pH7.4磷酸钠缓冲液(PB)。
8. 1mol/L戊二醛溶液(pH7.4)。
9.  $\text{NaBH}_4\text{CN}$  (A. R)。
10. 50mmol/L, pH7.5柠檬酸-磷酸盐缓冲液。
11. 70℃及90℃水浴。
12. 离心机。
13. 磁力搅拌器。

#### (二) 操作步骤

1. 将100g无孔玻璃珠用蒸馏水离心洗涤3次。
2. 在100g无孔玻璃珠中加入100ml蒸馏水90℃处理5min。
3. 50~55kHz超声处理5min。
4. 蒸馏水离心洗涤1次，倾去蒸馏水。
5. 加入1000ml铝酸钠溶液，70℃孵育1h。
6. 离心去上清液，加蒸馏水洗涤1次。
7. 离心取玻璃珠，加入150ml 100mg/ml PEI溶液 (pH10.0)。
8. 室温下缓慢搅拌5min。
9. 离心收获后用少许PEI溶液重新悬浮。
10. 速冻冻干或用PB洗涤(前者产生粗糙表面，后者可得光滑表面)。
11. PB洗涤1次。
12. 加入1mol/L戊二醛溶液2.5ml，搅拌1.5h。

13. 在通风橱中加入1.2g  $\text{NaBH}_4\text{CN}$ .
14. 用PB离心洗涤后加入125ml 50mg/ml pH7.0 PEI 溶液、0.2g  $\text{NaBH}_4\text{CN}$ , 搅拌过夜.
15. 用PB离心洗涤3次.
16. 用蒸馏水洗涤2次.
17. 冻干后 $-20^\circ\text{C}$ 存放备用或直接进行酶固定化.
18. 将此微珠浸入待固定化的酶溶液中30~60min (酶用50mmol/L, pH7.5柠檬酸-磷酸盐缓冲液配制).
19. 加入25%戊二醛至最终浓度为0.91%.
20. 室温孵育30~60min.

用PEI涂裱玻璃珠用于固定化葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶, 发现此法极大地改善了固定酶活力和稳定性.

### 五、活性载体法

活性载体法是利用已有活性耦联基团的载体材料直接对酶等进行固定化。此法中省去了载体的活化过程。含有乙醛基和环氧乙烷的载体表现出高的反应活性而被广泛使用。活性载体已用于酶的固定、免疫吸附剂的制备、亲和色谱等领域。

将活性载体与酶一起孵育一段时间后就可使酶固定化, 其最佳孵育时间依赖于酶/载体比率。通过将 $\beta$ -半乳糖苷酶与环氧活化的聚丙烯载体混合, pH7.6、室温下放置12~72 h便可获得糖苷酶的固定化。

缩水甘油基甲基丙烯酸(70%)-乙烯基二甲基丙烯酸共聚体由Drobrik等用悬浮自由基反应合成, 此聚合物具有高度活泼的环氧乙烷环, 使其在作为酶固定化载体时具有万能性。此载体可直接用于酶耦联, 也十分易于修饰成带有分隔分子臂或其他活性基团的载体, 如在其上加上自由氨基十分方便, 可通过直接与25%氢氧化铵接触; 用1,6-二氨基己烷蒸汽环流5 h可加上六碳分子臂。Drobnik等在研究青霉素酰胺酶的基础上建议, 对于那些稳定性好, 价格低的酶可采取直接法固定, 此法中每克载体至

少需100mg的酶，孵育至少需72 h，孵育温度尽可能地提高，固定化过程中可选择一定的防腐剂抑制微生物的生长；对于不稳定或较为昂贵的酶，应选择氨基修饰及戊二醛活化法，如需考虑戊二醛对酶的失活作用，则应采用更为昂贵的方法。

含有大量活性醛基的聚丙烯醛微球由丙烯醛和聚环氧乙烯经钴辐射聚合而成。其基本方法是：将含有12%丙烯醛和0.5%聚环氧乙烯的水溶液用氩气脱气；然后用1 Mrad辐射剂量辐射聚合；水中充分洗涤；用琼脂糖包埋。所制得的琼脂糖-聚丙烯醛微球状小珠直径可在200 $\mu\text{m}$ ~1cm范围内任意选择确定。此外，在包埋过程中，将铁剂液（一种十分微小的磁性颗粒悬浊液）掺入琼脂糖凝胶溶液中可制成磁性微球载体。

酶及各种亲和配体与载体孵育后可被直接结合到载体上的活性醛基上。方法是将400mg待固定配体或其他材料与20ml琼脂糖-聚丙烯醛微球状小珠在200ml缓冲液中混合后于4 $^{\circ}\text{C}$ 反应24h；洗涤后在含乙醇胺的缓冲液中孵育12 h，以去除残存的醛基。此外，也有将聚溶素等先接到载体上作为一与待固定酶交联的分子臂，然后用戊二醛法进行固定化。



## 第十二章 工业微生物实验室的 设计和实验数据处理

微生物实验室的工作性质可以分成三种类型：

1. 有关院校内微生物实验室，担负教学和科研任务。
2. 研究所实验室，主要担任研究任务。
3. 工厂实验室，担负生产和研究任务。

这里当然指的是工业微生物方面的工作，所以与普通、医学、农业微生物方面的要求不同。实验室的设计主要依本单位的条件和要求而定，这里仅叙述一般原则。

### 第一节 工业微生物实验室范围与基本要求

实验室一般分为以下几个部分：

1. 预备室 一般的准备工作，洗涤、实验都可在此室进行；冰箱、培养箱可放此室。
2. 培养基室 主要进行培养基的配调。化学药剂可放置此室内，具备水、电、煤气。
3. 灭菌室 主要是进行蒸汽和干热灭菌的场所。内有干燥箱，蒸汽灭菌器，具备水、电、煤气或蒸汽。通风要好。有安全装置。
4. 接种室 是无菌室，进行分离、接种的场所。具备电和煤气。建筑要求光滑，干燥，密闭性好，最好有无菌空气导入。否则应有调温、通风装置，室内安放接种箱和超净工作台。
5. 摇瓶室 是进行好气培养的场所。要有制冷或加热即保持一定温度的设备。具备电和蒸汽，要求隔热性能好。

6. 菌种保藏室 是菌种保藏的场所，最好能保持10℃左右恒温。

7. 仪器室 是一些精密仪器陈放和使用的场所。此室仅供电，建筑要求高，需防霉、防潮、恒温。

8. 暗室 显微摄影和冲洗照片用。有水、电，要求无光线投入，有通风恒温设备。

## 第二节 实验室的仪器设备

### 一、常见玻璃仪器与设备

品 名	规 格
烧(低型)杯	50, 100, 250, 500, 1000ml
三角烧瓶	500, 1000, 100, 250, 50ml
圆底烧瓶	500, 1000ml
碘量瓶	100, 250ml
蒸馏烧瓶(具支管)	500, 1000ml
分馏烧瓶(克氏)	500, 1000ml
培养皿	60, 90, 150ml
试剂瓶(白色)	100, 500, 1000ml(细口, 广口)
试剂瓶(棕色)	100, 500, 1000ml(细口, 广口)
表面皿	50, 70mm
蒸馏水瓶	2000ml
龙头瓶	2500ml
滤液瓶	125, 250, 500ml
过滤瓶	250, 500ml
酒精灯	25ml
洗瓶(平底)	250, 500ml
干燥器	内径100, 180, 300mm
滴瓶(白色)	30, 60ml
滴瓶(棕色)	30, 60ml
树脂滴瓶	50ml

续表

品 名	规 格
称量瓶(扁形)	40×25mm
称量瓶(高形)	25×40mm
染色缸(8片装)	
量筒	10, 50, 100, 250, 500ml
容量瓶	10, 25, 100, 500, 1000ml
离心管	10, 50ml(磨底, 有刻度或无刻度)
钟罩(具塞)	内径250mm
蓝线磨砂自动滴定管	25, 50ml
红背具三路活塞滴定管	25, 50ml
红背皮头滴定管(碱式)	25, 50ml
红背皮头滴定管(酸式)	25, 50ml
刻度吸管	0.1, 1, 2, 5, 10ml
脐肚吸管	5, 10, 20, 25, 50, 100ml
微量移液器	5, 10, 20, 25, 10, 100, 1000 $\mu$ l
可调定量加液器	200, 1000 $\mu$ l
比色管	6支组、12支组
漏斗	50, 90ml
试管	100×12, 180×18, 150×15, 130×13
旋桨式搅拌器	d40mm
球形吸气管	
冷凝管	250mm
玻棒	$\phi$ 2~10mm
玻管	$\phi$ 2~10mm
过滤漏斗	60mm
玻璃珠	$\phi$ 3.6mm
发酵管(杜氏)	
发酵管(艾氏)	
血球计数板	
计数板盖片	
载玻片	(72片装)厚1.2mm
盖玻片	(100片装)18×18mm
单凹片	
双凹片	
接物测微计	

## 续表

品 名	规 格
接目测微计	
网形接目测微计	
试管架	24孔
漏斗架	双孔
比色管架	12支×50ml
标本盒	25片装
气体干燥塔	250ml
标本瓶	瓶径150~400mm
真空干燥器	内径100、150mm
球形分液漏斗	250、500ml
橡皮管	
吸气球	
打孔器	
煤气灯	
电炉	300W, 1000W, 2000W
玻璃滴定台	
铁板架	
铁圈	3×1
冷凝管夹	
铁三角架	蝶式
自由夹	
铁十字	
弹簧夹	
石棉网	100×100mm
镊子	120mm
水银减压计	
牛角匙	3×1
洗瓶刷	
特种铅笔(或记号笔)	
盖片镊	
茄形瓶	250ml
铜丝或铁丝笼	圆形或方形
擦镜纸	
染色片架(铜)	

续表

品 名	规 格
接种棒	
镍铬丝	10×1
紫外线杀菌灯管	
生物显微镜	
显微摄影仪	
显微镜照明灯	
放大镜	4倍
电冰箱	130~200L
恒温培养箱	0~50℃, 450×400×400mm
鼓风干燥箱	300℃ 450×400×400mm
手提式高压蒸汽灭菌锅	
电热恒温水浴锅 (二、六孔)	
手撒计数器	
砂轮	10片
温度计	0~100℃, 0~200℃
比重计	重表、轻表
挂式酒精喷灯	
离心机	~4000r/min
真空泵(旋片式)	
阻尼天平	TG 328A
扭力天平	100g TN型
台式天平	100, 500g
定时钟	
pH酸度计	
分光光度计	
磁力加热搅拌器	
阿贝氏折光仪	
改良式微量定氮仪	
蒸馏器	
砂芯漏斗(或具盖)	1~6号, 35ml
直管式砂芯漏斗	10ml
微量定氮烧瓶	100ml
磁研钵	内径60mm

续表

品 名	规 格
细孔漏斗	80mm
白反应板	6、12孔
接种箱或超净台	单人、双人
棉花	
牛皮纸	
棉纱线	
旋转蒸发器	
双重蒸馏器	
三角锥形瓶	30ml
色度分析柱(具活塞)	30、35、40mm(内径)
砂芯过滤活动装置	滤片直径25mm
微孔滤膜	孔径: 0.22、0.3、0.45、0.8、1.2 $\mu$ m 直径: 25、50、100、150、200、250mm

1. 较高级的仪器 自动高级分析天平、相差显微镜和显微摄影装置、高速冷冻离心机、紫外分光光度计、小型台式发酵罐、箱式摇床、真空冷冻干燥器、细胞破碎器、显微操纵器、瓦勃式呼吸计、气相色谱仪、电子显微镜及电子计算机等。

2. 贵重仪器 冷冻超速离心机、高分辨力电子显微镜(透射型和扫描型)、超薄切片机、GC含量自动连续分析仪、原子分光光度计、液相色谱仪、红外分光光度计、核磁共振仪等。

## 二、容 器

玻璃容器包括试管、烧杯、锥形烧瓶、平底烧瓶等等。短而粗的试管特别运用于半微量操作。对于低沸点可燃性的有机溶剂，不宜用烧杯贮放，可使用具有标准磨口套管的锥形烧瓶。

平底容器不能抽真空(有内向爆破的危险)。

圆底烧瓶、梨形瓶以及锥形底烧瓶，主要用在蒸馏中作为煮沸容器和接受器。锥底烧瓶尤其适用于作半微量蒸馏时的煮沸容器，

因为用这样的容器运行蒸馏时残渣很少。

### 第三节 实验室大小及布局

这里以设计实例说明。尺寸比例按1:1000制图。

#### (一) 学生微生物实验室

1. 32人实验实，分8张实验台，1台1水槽（图12-1）。

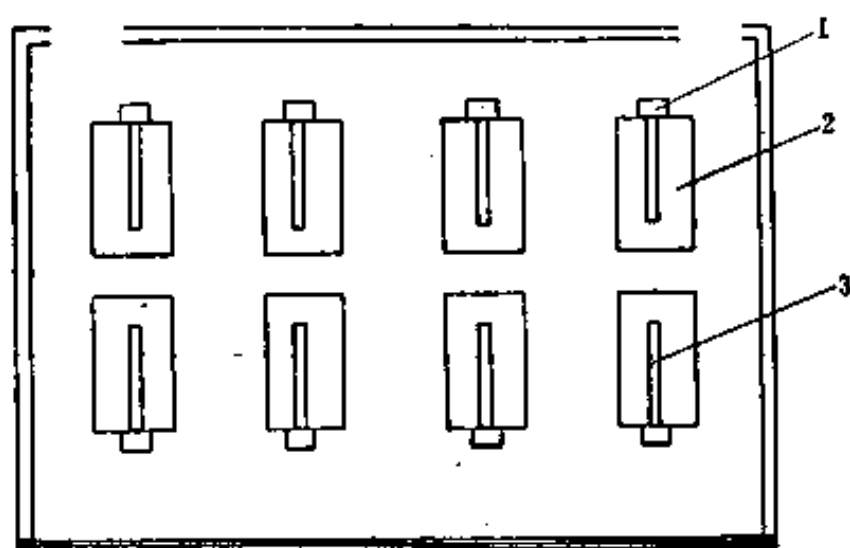


图 12-1 32人学生微生物实验室(一)

1—水槽 2—实验台 3—排水槽

2. 32人实验室，分4张实验台，1台2水槽（图12-2）。

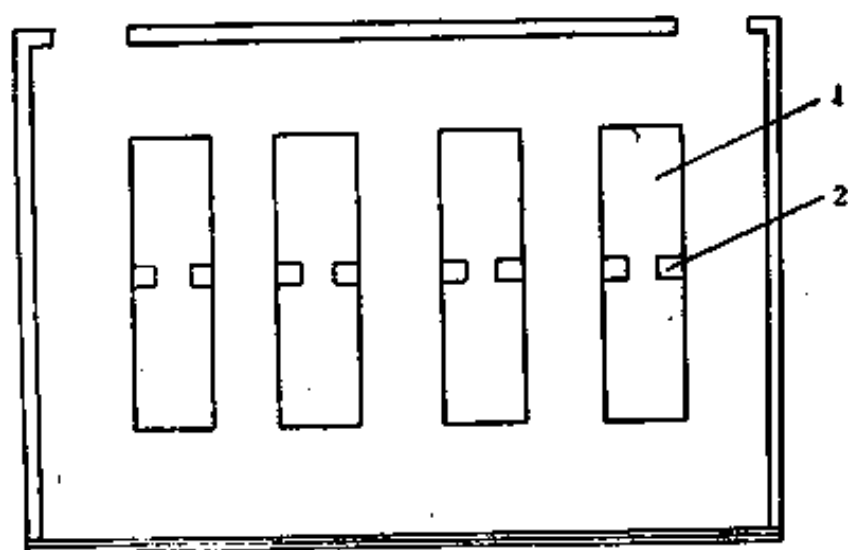


图 12-2 32人微生物实验室(二)

1—实验台 2—水槽

3. 9人提高课实验，1人1桌，共6个水槽（图12-3）。

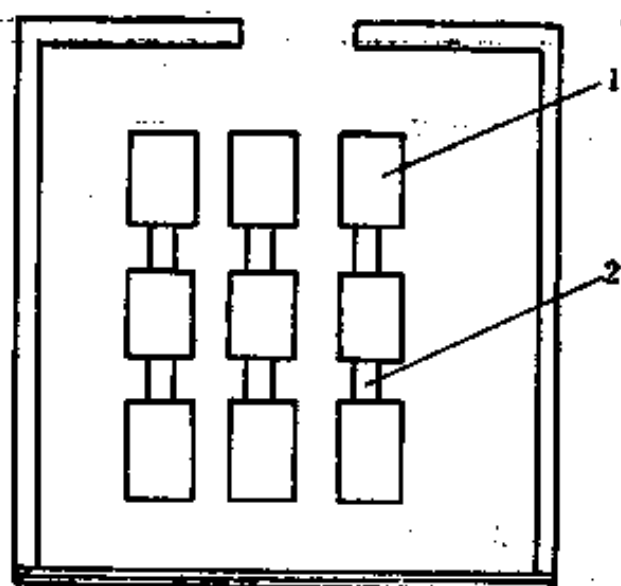


图 12-3 9人微生物实验室（提高课）

1—实验台 2—水槽

## (二) 接种室

1. 缓冲走廊在房间外层。结构示意图如图12-4所示。

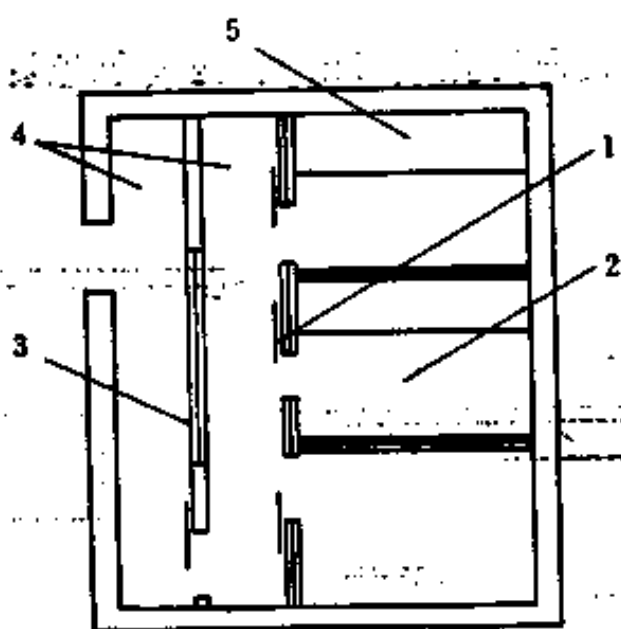


图 12-4 接种室(一)

1—移门 2—接种室 3—玻璃视窗 4—缓冲走廊  
5—水湿台(磨石子)

2. 缓冲走廊在房间内层。结构示意图如图12-5所示。



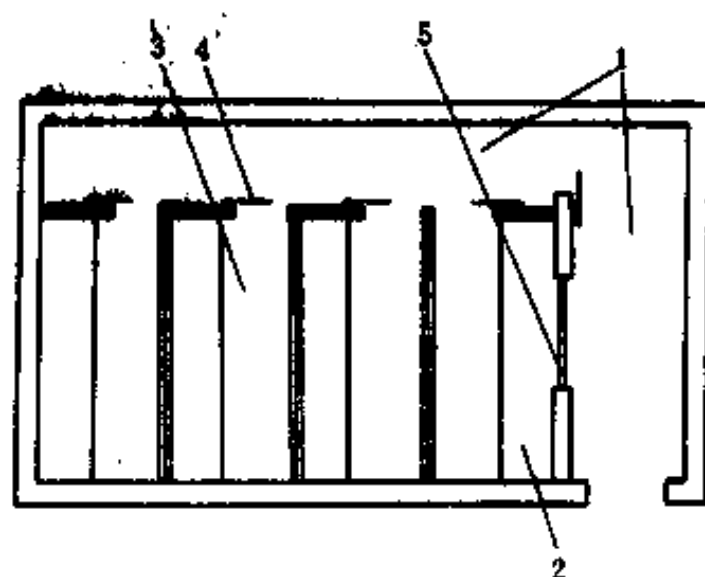


图 12-5 接种室(二)

1—缓冲走廊 2—水泥台(磨石子) 3—接种室  
4—移门 5—玻璃视窗

### (三) 工作室或研究室

1. 1~2人, 备有超净工作台的工作或研究室 (20m<sup>2</sup>)。结构示意图见图12-6。

2. 3人工作或研究室 (35m<sup>2</sup>)。结构示意图见图12-7。

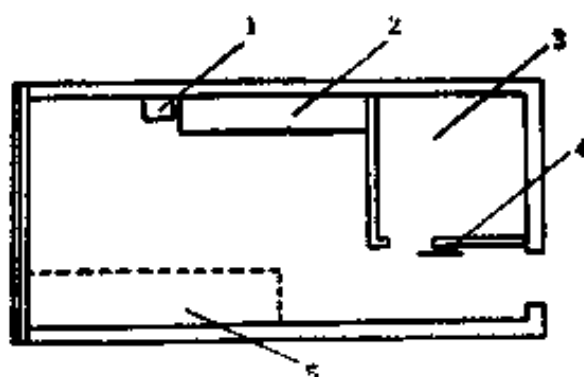


图 12-6 工作室(一)

1—水槽 2—水泥台 3—超净台  
4—移门 5—实验桌

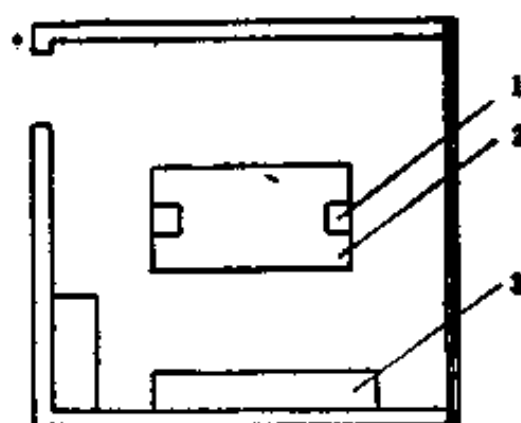


图 12-7 工作室(二)

1—水槽 2—工作台 3—水泥台

## 第四节 实验数据处理

### 一、显著性检验法

在实际工作中常遇到两个或多个平均值的比较问题，如测定平均值和已知值的比较；实验组平均值与正常对照组的比较或对比性试验研究；发酵参数优化等，通过实验数据的处理，运用统计方法说明如上述差别是否存在显著性。显著性检验常用方法有  $t$  检验法和  $F$  检验法，前者常用于两均数间的比较，后者则可用于超过两个均数时的相互比较。在显著性检验中习惯采用  $P \leq 0.05$  及  $P \leq 0.01$  作为下结论的界限。即：

$P \leq 0.05$             差别有显著意义，习惯记作 \*

$P \leq 0.01$             差别有非常显著意义，习惯记作 \*\*

$P > 0.05$             差别无显著意义

#### (一) $t$ 检验法

进行  $t$  检验的程序如下：

1. 建立检验假设 如  $H_0: \mu = 0$  或  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ ，式中  $H_0$  代表检验假设， $\mu$  代表在抽样所得各样本差别的均数。

2. 计算样本  $t$  值

(1) 选定所用的检验统计量。当检验样本均值  $\bar{X}$  与总体均值  $\mu$  是否有显著性差异时，使用统计量

$$t = \frac{\bar{X} - \mu}{s / \sqrt{n}} \quad (12-1)$$

式中  $s$  代表标准差， $n$  代表样本数。 $s$  可用下式进行计算。即：

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (12-2)$$

式中 $X_i$ 代表各单次测定值， $\bar{X}$ 代表 $n$ 次测定值的平均值。

当检验两个均值之间是否有显著性差异时，使用统计量

$$t = \frac{X_1 - X_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad (12-3)$$

式中 $s$ 代表合并标准差，按下式计算

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (12-4)$$

式中 $s_1$ 、 $s_2$ 分别代表第一、第二个样本的方差， $n_1$ 、 $n_2$ 分别代表第一、第二个样本的样本量或测定次数。

(2) 计算统计量值并与 $t$ 值表中按一定的自由度 $f$ 和显著性水平 $\alpha$ 查得的 $t_{(f),0.05}$ 或 $t_{(f),0.01}$ 的数值进行比较。这里 $f = n - 1$ 或 $f = n_1 + n_2 - 2$ 。

当样本 $t$ 值大于 $t_{(f),0.05}$ ，两者差别有显著意义；当样本 $t$ 值大于 $t_{(f),0.01}$ ，两者差别有非常显著意义；当样本 $t$ 值小于 $t_{(f),0.05}$ ，两者差别无显著意义。

## (二) $F$ 检验法

$F$ 检验法是通过计算两组数据方差之比来检验两组数据是否存在显著性差异。进行 $F$ 检验的程序如下：

1. 建立检验假设 设各处理组间的变异属于抽样误差，它与组内的变异是一致的，所增加的处理因素并不增加变异。

2. 计算统计量方差比。

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (12-5)$$

式中 $s_1^2$ 、 $s_2^2$ 分别代表两组测定值的方差。测定各组的方差 $s_1^2$ 及 $s_2^2$ 可从统计量12-2计算出，方差等于标准差的平方。计算 $F$ 值时，习惯上以方差较大者作分子。

3. 按一定自由度查 $F$ 分布表求得 $F_{(f_1, f_2),0.05}$ 或 $F_{(f_1, f_2),0.01}$

4. 判断结果 根据计算的 $F$ 值与查 $F$ 分布表求得的 $F$ 值进

行比较，得出如下结论：

当  $F > F_{(f_1, f_2), 0.05}$  时，该处理所引起的差别有显著意义；

当  $F > F_{(f_1, f_2), 0.01}$  时，该处理所引起的差别有非常显著的意义；

当  $F < F_{(f_1, f_2), 0.05}$  时，该处理所引起的差别无显著意义。

## 二、回归分析法

在科学研究中，经常遇到要同时研究两个变量之间的关系，解决这一问题的统计学方法通常采用回归分析法。回归分析主要用于：① 寻找两个变量  $x$  和  $y$  的关系，用一定的函数形式表示出来，也即回归方程的求得。回归方程主要有直线回归方程、指数回归方程等。② 应用回归方程，从一个变量所取的值去估计另一变量。③ 评价和量度变量间的关系的密切程度及标准曲线的精密度与置信区间。④ 检验变量间的因果假设。

### (一) 直线回归方程的求法

直线回归最为简单，其变量间的函数关系为一个二元一次方程： $\hat{y} = a + bx$ ，式中  $a$ ， $b$  为两个常数。

$$\text{回归方程为 } \hat{y} = a + bx \quad (12-6)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2} \quad (12-7)$$

$$a = \bar{Y} - b\bar{X} \quad (12-8)$$

式中  $\hat{y}$  代表回归估计值； $b$  代表回归系数，是回归直线的斜率； $a$  代表回归直线的截距。

在绘制回归直线时，在实测值  $X$  变化范围内，任意取相差较大的两个值  $X_1$  和  $X_2$ ，代入已建立的直线回归方程，计算出两个相应的  $\hat{Y}_1$  和  $\hat{Y}_2$ ，用直线连接直角坐标系中的  $(x_1, \hat{Y}_1)$  和  $(x_2, \hat{Y}_2)$  两点即得回归直线。

## (二) 直线回归方程线性相关的显著性检验

经上述方法求得的直线回归方程可适用于任何两个变量。因此，必须确定两个变量之间确实存在线性统计关系，所求出的直线回归方程才有意义。表示两个变量之间线性关系的密切程度可用相关系数  $r$  表示。

### 1. 计算 $r$ 用统计量

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (12-9)$$

$$= \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n\bar{X}\bar{Y}}{\sqrt{(\sum_{i=1}^n y_i^2 - n\bar{Y}^2)(\sum_{i=1}^n x_i^2 - n\bar{X}^2)}} \quad (12-10)$$

2. 查相关系数检验表，求得  $r_{(f), \alpha, n}$  或  $r_{(f), \alpha, n}$ ，这里  $f = n - 2$ 。

3.  $r$  与  $r_{(f), \alpha}$  比较，获得如下结果：

当  $|r| \geq r_{\alpha}$ ，那末  $x$  与  $y$  之间线性相关显著，且  $|r|$  越接近 1， $x$  与  $y$  线性相关越显著；

当  $|r| < r_{\alpha}$ ，那末  $x$  与  $y$  之间线性相关不显著，此时求得的回归直线方程无意义。

## (三) 非线性回归方程的求法

在生物科学研究中，经常会遇到两个变量之间的统计关系并非线性关系，如幂函数关系、双曲线关系、指数关系、对数关系等，经过适当转变后可按直线回归方程的求法进行回归处理。

1. 在普通图纸上标出处理量，观察变量间存在的可能关系；有时靠专业知识就可判断。

2. 根据可能的函数关系，按下列方法进行变换。

(1) 幂函数关系：

$$y = ax^b$$

$$\text{令 } x' = \lg x, y' = \lg y, a' = \lg a$$

$$\text{则 } y' = a' + bx'$$

(2) 双曲线关系:

$$\frac{1}{y} = a + \frac{b}{x}$$

$$\text{令 } x' = \frac{1}{x}, y' = \frac{1}{y}$$

$$\text{则 } y' = a + bx'$$

(3) 指数关系:

$$y = ae^{bx}$$

$$\text{令 } y' = \ln y, a' = \ln a$$

$$\text{则 } y' = a' + bx$$

(4) 对数关系:

$$y = a + b \lg x$$

$$\text{令 } x' = \lg x$$

$$\text{则 } y = a + bx'$$

(5) S型曲线关系:

$$y = \frac{1}{a + be^{-x}}$$

$$\text{令 } x' = e^{-x}, y' = \frac{1}{y}$$

$$\text{则 } y' = a + bx'$$

3. 按统计量12-7, 12-8计算出  $a$ 、 $b$  值。

### 三、方差分析

方差分析在进行方法学条件试验、多种参数优化分析等方面

有着重要的指导意义。在进行方差分析时，把要考察的指标称为试验指标，影响试验指标的条件称为因素，因素所处的状态称为水平。方差分析需借助F检验法。

### 单因素的方差分析

让一个因素变化，其他因素保持不变，这样的试验叫做单因素试验。单因素多水平试验安排如表12-1所示。

表 12-1 单因素多水平试验安排表

试验次数	因 素 水 平					
	$A_1$	$A_2$	...	$A_i$	...	$A_m$
1	$X_{11}$	$X_{21}$	...	$X_{i1}$	...	$X_{m1}$
2	$X_{12}$	$X_{22}$	...	$X_{i2}$	...	$X_{m2}$
⋮	⋮	⋮		⋮	⋮	⋮
$j$	$X_{1j}$	$X_{2j}$	...	$X_{ij}$	...	$X_{mj}$
⋮	⋮	⋮		⋮	⋮	⋮
$n$	$X_{1n}$	$X_{2n}$	...	$X_{in}$	...	$X_{mn}$

单因素多水平方差分析的一般提法是：设因素  $A$  有  $m$  个水平，在第  $i$  个水平下的总体  $X^{(i)}$  服从正态分布  $N(\mu_i, \delta^2)$  ( $i=1, 2, \dots, m$ )， $x^{(1)}, x^{(2)}, \dots, x^{(m)}$  相互独立，每个水平各做  $n$  次试验，以  $X_{ij}$  表示第  $i$  个水平第  $j$  次试验的样本观察值，检验原假设  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_m$ 。记

$$\bar{X}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_{ij}$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij}$$

观察值各项变差平方和的计算用下列统计量：

(1) 组间变差平方和，用  $Q_A$  表示，即

$$Q_A = n \sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

$$= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^m \left( \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 - \frac{1}{mn} \left( \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 \quad (12-11)$$

(2) 组内变差平方和或误差平方和，用 $Q_0$ 表示，即

$$Q_0 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{X}_i)^2$$

$$= \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n x_{ij}^2 - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^m \left( \sum_{j=1}^n x_{ij} \right)^2 \quad (12-12)$$

(3) 总变差平方和，用 $Q$ 表示，即

$$Q = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{X})^2$$

$$= Q_A + Q_0 \quad (12-13)$$

(4) 自由度，分别为：

$$\text{总自由度 } f = mn - 1$$

$$\text{组间自由度 } f_A = m - 1$$

$$\text{组内自由度 } f_0 = m(n - 1)$$

(5) 方差：

$$\text{组间方差 } S_A^2 = \frac{Q_A}{m-1} \quad (12-14)$$

$$\text{组内方差 } S_0^2 = \frac{Q_0}{m(n-1)} \quad (12-15)$$

$$\text{方差比 } F = \frac{S_A^2}{S_0^2} \quad (12-16)$$

对显著水平 $\alpha$ ，自由度 $(m-1, m(n-1))$ ，由 $F$ 分布临界值表定出单侧临界值 $F(f_A, f_0)$ 。如果 $F \geq F(f_A, f_0)$ ，那末拒绝原



假设  $H_0$ ，即可以认为  $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m$  之间有显著差异，说明此因素对观察值有显著影响；如果  $F < F(f_A, f_e)$ ，那末就接受  $H_0$ ，即可认为  $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m$  之间无显著差异。

实际计算时可按表12-2、12-3进行。

表 12-2 单因素多水平试验方差分析计算表

水平	$\Sigma$	$(\Sigma)^2$	$\Sigma^2$
$A_1$	$\sum_j x_{1j}$	$(\sum_j x_{1j})^2$	$\sum_j x_{1j}^2$
$A_2$	$\sum_j x_{2j}$	$(\sum_j x_{2j})^2$	$\sum_j x_{2j}^2$
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
$A_m$	$\sum_j x_{mj}$	$(\sum_j x_{mj})^2$	$\sum_j x_{mj}^2$
$\Sigma$	$\sum_i \sum_j x_{ij}$	$\sum_i (\sum_j x_{ij})^2$	$\sum_i \sum_j x_{ij}^2$

表 12-3 单因素多水平试验方差分析表

方差来源	平方和	自由度	方差	$F$	显著性
$A$	$Q_A$	$m-1$	$S_A^2 = \frac{Q_A}{m-1}$	$F = \frac{S_A^2}{S_e^2}$	
误差	$Q_e$	$m(n-1)$	$S_e^2 = \frac{Q_e}{m(n-1)}$		
总和	$Q$	$mn-1$			

当因素  $A$  的各水平的试验次数不相等时，设水平  $A_1, A_2, \dots, A_m$  的试验次数分别为  $n_1, n_2, \dots, n_m$ ，则：

$$Q_1 = \sum_{i=1}^m \frac{1}{n_i} \left( \sum_{j=1}^{s_i} x_{ij} \right)^2 - \frac{1}{\sum_{i=1}^m n_i} \left( \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{s_i} x_{ij} \right)^2 \quad (12-17)$$

$$Q_2 = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{s_i} x_{ij}^2 - \sum_{i=1}^m \frac{1}{n_i} \left( \sum_{j=1}^{s_i} x_{ij} \right)^2 \quad (12-18)$$

$$\text{总自由度 } f = \sum_{i=1}^m n_i$$

$$f_1 = m - 1$$

$$f_2 = \sum_{i=1}^m n_i - m$$

方差分析结果表示：

- (1)  $F > F_{\alpha, m-1}$ , 因素影响特别显著, 记作“\*\*\*”;
- (2)  $F_{\alpha, m-1} \geq F > F_{\beta, m-1}$ , 因素影响显著, 记作“\*\*”;
- (3)  $F_{\beta, m-1} \geq F > F_{\gamma, m-1}$ , 因素有一定的影响, 记为“(\*)”;
- (4)  $F_{\gamma, m-1} > F$ , 看不出因素对观察值有较大影响, 不记任何符号。

#### 四、正交试验法

用正交表安排多因素试验与分析试验结果的方法, 简称正交试验法。利用正交试验可解决① 诸因素中哪些因素对指标的影响较大, 哪些较小。也即哪些是主要因素, 哪些是次要因素; ② 所考察的因素各取什么水平能使试验指标较好; ③ 指标在各因素不同水平时的变化规律等。

##### (一) 正交表的选择与使用

在分析测试中, 常用的几种正交表是  $L_4(2^3)$ ,  $L_8(2^7)$ ,  $L_9(3^4)$ ,  $L_{16}(4^5)$ ,  $L_{25}(5^5)$ ,  $L_{27}(3^{13})$  等。以  $L_n(t^q)$  代表正交表格式, 则  $L$  代表正交表,  $n$  代表实验次数,  $t$  代表因素水平数,  $q$  代表因素数。如  $L_4(2^3)$  表示用此正交表可设计 3 个观察因素, 每个因素有

2个水平，须进行4次实验。

正交表的选择依据是：在能容纳所研究的因素数和因素水平数的前提下选用试验次数最少的正交表来安排试验。

在用正交表安排试验时还须注意下列事项：要尽可能使各因素的水平数相等、试验的重复次数相同。

## (二) 试验结果的直观分析

先计算每一因素每一水平下试验指标值的总和，记作 $K_1, K_2, \dots$ ；均值 $k_1, k_2, \dots$ ；以及试验指标值随因素水平变化而改变的最大范围即极差，记作 $R$ 。现作如下分析：

1. 比较各因素的极差 $R$ ，按极差的大小决定因素的主次顺序。如有4个考察因素 $A, B, C, D$ ，按极差大小的排列顺序是 $B > C > A > D$ ，则认为因素的主次顺序也为 $B \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow D$ ，以 $B$ 为主要因素， $C$ 次之， $A$ 再次之， $D$ 是次要因素。

2. 以各因素不同水平下的均值 $k_1, k_2, \dots$ 对各水平作图，观察每个因素的变化对观察值的影响的关系。

3. 比较每个因素的不同水平下的均值 $k_1, k_2, \dots$ ，确定最优工艺条件。例如，有4个因素 $A, B, C, D$ 影响某有机酸的产率，根据 $R$ 值已确定因素的主次顺序是 $B, C, A, D$ 。经比较4个因素不同水平下各自的均值，发现 $B_2, C_3, A_4, D_1$ 在每一因素的4个水平下对产酸率提高最大。由此确定此有机酸生产的最优条件为 $B_2C_3A_4D_1$ 。

4. 在试验中出现因素交互作用且为主要因素，如4因素 $A, B, C, D$ 并考察 $A$ 与 $B, C$ 以及 $B$ 与 $C$ 的交互作用 ( $A \times B, A \times C, B \times C$ )，采用 $L_8(2^7)$ 安排试验。经 $R$ 的大小比较， $C$ 和 $A \times B$ 是主要的，为选取 $A$ 及 $B$ 的最优水平，可将 $A, B$ 不同水平组合的结果进行其均值的比较，如得到 $\bar{X}_{A_2B_1} > \bar{X}_{A_2B_2} > \bar{X}_{A_1B_1} > \bar{X}_{A_1B_2}$ ，则取 $A_2B_1$ 好。

正交试验结果的直观分析的优点是简便、计算工作量小，但判断因素效应的精度不够，也不能给出误差的大小。

### (三) 试验结果的方差分析

下面以实例说明正交试验设计及方差分析的具体方法。

例 在甘油发酵生产中，探索发酵最佳工艺，准备对影响甘油产率的pH、振荡频率、发酵温度、糖浓度进行优化。选择的因素和水平如表12-4所示。

表 12-4 正交试验表头设计

水平	因 素				考察指标
	A pH	B 振荡频率(r/min)	C 温度(°C)	D 磷(ppm)	产率 (g/L)
1	3.5	100	28	200	
2	4.0	140	30	400	
3	4.5	180	32		
4	5.0	220	34		

这是一个 $2^1 \times 4^3$ 的试验，选用正交表 $L_{16}(4^3 \times 2^0)$ ，A、B、C、D分别放在1, 2, 3, 9四列，试验安排与结果见表12-5。

表 12-5 甘油生产正交试验结果

试验号	因 素				甘油产率 $x_i$ $x'_i = x_i - 80$	$x_i^2$
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	4	16
2	1	2	2	2	-10	100
3	1	3	3	2	-6	36
4	1	4	4	1	22	484
5	2	1	2	2	-8	64
6	2	2	1	1	24	576
7	2	3	4	1	31	961
8	2	4	3	2	0	0
9	3	1	3	1	-7	49
10	3	2	4	2	-4	16
11	3	3	1	2	0	0
12	3	4	2	1	44	1936

续表

试验号	因 素				甘油产率 $x_i$ $x'_i = x_i - 80$	$x'_i{}^2$
	A	B	C	D		
13	4	1	4	2	-16	256
14	4	2	3	1	16	324
15	4	3	2	1	28	784
16	4	4	1	2	14	196
$K_1$	10	-27	42	164	$\Sigma x'_i = 134$	$\Sigma x'_i{}^2 = 5798$
$K_2$	47	28	54	-30		
$K_3$	33	53	5			
$K_4$	44	80	33			
$K_1^2$	100	729	1764	26896		
$K_2^2$	2209	784	2916	900		
$K_3^2$	1089	2809	25			
$K_4^2$	1936	6400	1089			
$\Sigma K_i^2$	5334	10722	5794	27796		

以  $n$  表示试验的总次数,  $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $d$  分别表示  $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$  四因素每个水平的重复试验次数, 则:

$$n = 16$$

$$a = b = c = 4$$

$$d = 8$$

$$Q_A = \frac{1}{a} \Sigma K_i^2 - \frac{1}{n} (\Sigma x'_i)^2 = \frac{5334}{4} - \frac{134^2}{16} = 211.25$$

同理得:

$$Q_B = \frac{10722}{4} - \frac{134^2}{16} = 1558.25$$

$$Q_C = \frac{5794}{4} - \frac{134^2}{16} = 326.25$$

$$Q_D = \frac{27796}{8} - \frac{134^2}{16} = 2352.25$$

$$\text{而 } Q = \sum x_i'^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i')^2 = 5798 - \frac{134^2}{16} = 4675.75$$

$$\begin{aligned} \text{则 } Q_e &= Q - (Q_A + Q_B + Q_C + Q_D) \\ &= 4675.75 - (211.25 + 1558.25 + 326.25 + 2352.25) \\ &= 227.75 \end{aligned}$$

列方差分析表如下并查单侧  $F$  分布表

方差来源	平方和	自由度	方差	$F$	显著性
$A$	211.25	$3(f_1)$	70.42	1.55	
$B$	1558.25	$3(f_1)$	519.420	11.40	*
$C$	326.25	$3(f_1)$	108.75	2.39	
$D$	2352.25	$1(f_1)$	2352.25	51.64	**
误差	227.75	$5(f_2)$	45.55		
总和	4675.75	15			

根据  $F$  检验可以看出因素  $D$  非常显著，因素  $B$  显著地影响甘油产量。方差分析的观点认为，只需对显著的因素进行选择，不显著的因素原则上可选试验范围内的任一点。对因素  $D$ ，最大的数是  $K_1$ ；因素  $B$ ，最大的数是  $K_4$ ，因此选择  $D_1B_4$ 。而因素  $A$  和  $C$  可在试验范围内任取一点或由其他指标确定。

## 五、实验数据处理常用表格

### (一) $t$ 分布临界值表

表 12-6

t分布临界值表

自由度	水 平 $\alpha$						
	双侧 单侧	0.5	0.1	0.05	0.02	0.01	0.001
		0.25	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0005
1		1.00	6.31	12.71	31.82	63.66	636.62
2		0.82	2.92	4.30	6.97	9.93	31.60
3		0.77	2.35	3.18	4.54	5.84	12.92
4		0.74	2.13	2.78	3.75	4.60	8.61
5		0.73	2.02	2.57	3.37	4.03	6.86
6		0.72	1.94	2.45	3.14	3.71	5.96
7		0.71	1.90	2.37	3.00	3.50	5.41
8		0.71	1.86	2.31	2.90	3.36	5.04
9		0.70	1.83	2.26	2.82	3.25	4.76
10		0.70	1.81	2.23	2.76	3.17	4.59
11		0.70	1.80	2.20	2.72	3.11	4.44
12		0.70	1.78	2.18	2.68	3.06	4.32
13		0.69	1.77	2.16	2.65	3.01	4.22
14		0.69	1.76	2.15	2.62	2.98	4.14
15		0.69	1.75	2.13	2.60	2.96	4.07
16		0.69	1.74	2.12	2.58	2.92	4.02
17		0.69	1.73	2.11	2.57	2.90	3.97
18		0.69	1.73	2.10	2.55	2.88	3.92
19		0.69	1.73	2.09	2.54	2.86	3.88
20		0.69	1.73	2.09	2.53	2.85	3.85
21		0.69	1.72	2.08	2.52	2.83	3.82
23		0.69	1.72	2.07	2.51	2.82	3.80
23		0.69	1.71	2.07	2.50	2.81	3.75
24		0.69	1.71	2.06	2.49	2.80	3.76
25		0.68	1.71	2.06	2.49	2.79	3.73
26		0.68	1.71	2.06	2.48	2.78	3.72
27		0.68	1.70	2.05	2.47	2.77	3.71
28		0.68	1.70	2.05	2.47	2.76	3.68
29		0.68	1.70	2.05	2.46	2.76	3.67
30		0.68	1.70	2.04	2.46	2.75	3.66
40		0.68	1.68	2.02	2.42	2.70	3.55
60		0.68	1.67	2.00	2.39	2.66	3.46
120		0.68	1.66	1.98	2.36	2.62	3.37
$\infty$		0.67	1.65	1.96	2.33	2.58	3.29

## (二) F分布临界值表

### F分布临界值表

表 12-7

单侧:  $\alpha=0.10$ , 临界值  $F_{\alpha}$ ; 双侧  $\alpha=0.20$ , 临界值  $F_{\frac{\alpha}{2}}$

$f_2$	$f_1$															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	60	$\infty$
1	39.9	43.5	53.6	55.6	57.2	58.2	58.9	59.4	59.9	60.2	60.7	61.2	61.7	62.8	63.3	
2	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.41	9.42	9.44	9.47	9.49	
3	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.20	5.18	5.15	5.18	
4	4.64	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.90	3.87	3.84	3.79	3.76	
5	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.24	3.21	3.14	3.10	
6	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.90	2.87	2.84	2.76	2.72	
7	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.67	2.63	2.59	2.51	2.47	
8	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.50	2.46	2.42	2.34	2.29	
9	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.38	2.34	2.30	2.21	2.16	
10	3.28	2.92	2.73	2.61	2.52	2.46	2.41	2.38	2.35	2.32	2.28	2.24	2.20	2.11	2.06	
11	3.23	2.86	2.66	2.54	2.45	2.39	2.34	2.30	2.27	2.25	2.21	2.17	2.12	2.03	1.97	
12	3.18	2.81	2.61	2.48	2.39	2.33	2.28	2.24	2.21	2.19	2.15	2.10	2.06	1.96	1.90	
13	3.14	2.76	2.56	2.43	2.35	2.28	2.23	2.20	2.16	2.14	2.10	2.05	2.01	1.90	1.85	
14	3.10	2.73	2.52	2.39	2.31	2.24	2.19	2.16	2.12	2.10	2.05	2.01	1.96	1.86	1.80	
15	3.07	2.70	2.49	2.36	2.27	2.21	2.16	2.12	2.08	2.06	2.02	1.97	1.92	1.82	1.76	
16	3.05	2.67	2.46	2.33	2.24	2.18	2.13	2.09	2.05	2.03	1.99	1.94	1.89	1.78	1.72	



续表

$f_2$	$f_1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$
17	3.03	2.64	2.44	2.31	2.22	2.15	2.10	2.06	2.03	2.00	1.96	1.91	1.89	1.75	1.69
18	3.01	2.62	2.42	2.29	2.20	2.13	2.08	2.04	2.00	1.98	1.93	1.89	1.84	1.72	1.66
19	2.99	2.61	2.40	2.27	2.18	2.11	2.06	2.02	1.98	1.96	1.91	1.86	1.81	1.69	1.63
20	2.97	2.59	2.38	2.25	2.16	2.09	2.04	2.00	1.96	1.94	1.89	1.84	1.79	1.67	1.61
21	2.96	2.57	2.36	2.22	2.14	2.08	2.02	1.98	1.95	1.92	1.87	1.83	1.78	1.66	1.59
22	2.95	2.56	2.35	2.22	2.13	2.06	2.01	1.97	1.93	1.90	1.86	1.81	1.76	1.64	1.57
23	2.94	2.55	2.34	2.21	2.11	2.05	1.99	1.95	1.92	1.89	1.85	1.80	1.74	1.62	1.55
24	2.93	2.54	2.33	2.19	2.10	2.04	1.98	1.94	1.91	1.88	1.83	1.78	1.73	1.61	1.53
25	2.92	2.53	2.32	2.18	2.09	2.02	1.97	1.93	1.89	1.87	1.82	1.77	1.72	1.59	1.52
30	2.88	2.49	2.28	2.14	2.05	1.98	1.93	1.88	1.85	1.82	1.77	1.72	1.67	1.54	1.46
40	2.84	2.44	2.23	2.09	2.00	1.93	1.87	1.83	1.79	1.76	1.71	1.66	1.61	1.47	1.38
60	2.79	2.39	2.18	2.04	1.95	1.87	1.82	1.77	1.74	1.71	1.66	1.60	1.54	1.40	1.29
120	2.75	2.35	2.13	1.99	1.90	1.82	1.77	1.72	1.68	1.65	1.60	1.54	1.48	1.32	1.19
$\infty$	2.71	2.30	2.08	1.94	1.85	1.77	1.72	1.68	1.65	1.60	1.55	1.49	1.42	1.24	1.00

单侧:  $\alpha=0.05$ , 临界值  $F_{\alpha}$ ; 双侧:  $\alpha=0.10$ , 临界值  $F_{\frac{\alpha}{2}}$

$f_2$	$f_1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$
17	15.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	252.2	254.3		

续表

$f_2$	$f_1$																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$				
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.48	19.50				
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.75	8.74	8.70	8.66	8.57	8.53				
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.03	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.69	5.63				
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.43	4.36				
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.74	3.67				
7	5.59	4.74	4.35	4.17	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.30	3.23				
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.01	2.93				
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.79	2.71				
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.62	2.54				
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.49	2.40				
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.38	2.30				
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.30	2.21				
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.22	2.13				
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.17	2.07				
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.11	2.01				
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.06	1.96				
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.02	1.92				
19	4.36	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	1.98	1.88				
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.43	2.39	2.33	2.28	2.20	2.12	1.95	1.84				

续表

$f_2$	$f_1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	1.92	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	1.89	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	1.86	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.84	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.82	1.71
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.74	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.64	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.53	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.07	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.43	1.25
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.32	1.00

单侧:  $\alpha=0.01$ , 临界值  $F_{\alpha}$ ; 双侧:  $\alpha=0.02$ , 临界值  $F_{\alpha/2}$

$f_2$	$f_1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$
1	4052	4992.5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056	6106	6157	6209	6313	6366
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45	99.48	99.50

续表

$f_1$	$f_2$																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	40	50	60	70	80	90	∞		
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69	26.32	26.13								
4	21.20	18.00	16.68	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02	13.69	13.46								
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55	9.20	9.02								
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40	7.06	6.88								
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.77	6.62	6.47	6.31	6.16	5.82	5.65								
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36	5.03	4.86								
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.42	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81	4.48	4.31								
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.29	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41	4.08	3.91								
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.71	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10	3.78	3.60								
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.87	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86	3.54	3.36								
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66	3.34	3.17								
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51	3.18	3.00								
15	8.69	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37	3.05	2.87								
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26	2.93	2.75								
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16	2.83	2.65								
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.73	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08	2.75	2.57								
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00	2.67	2.49								
20	8.10	5.85	4.74	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94	2.61	2.42								

续表

$f_1$	$f_2$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	60	$\infty$
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.83	3.64	3.51	3.40	3.31	3.17	3.03	2.88	2.55	2.36
22	7.95	5.72	4.81	4.31	3.99	3.76	3.57	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83	2.50	2.31
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.07	2.93	2.78	2.45	2.26
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.96	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.03	2.89	2.74	2.40	2.21
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70	2.36	2.17
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55	2.21	2.01
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.11	2.99	2.89	2.80	2.66	2.52	2.37	2.02	1.80
60	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.50	2.35	2.20	1.84	1.60
120	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56	2.47	2.34	2.19	2.03	1.66	1.38
$\infty$	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.61	2.51	2.41	2.32	2.18	2.04	1.88	1.47	1.00

### (三) 相关系数检验表

表 12-8 相关系数检验表

$n-2$	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
1	0.997	1.000
2	0.950	0.990
3	0.878	0.959
4	0.811	0.917
5	0.754	0.874
6	0.707	0.834
7	0.666	0.798
8	0.632	0.765
9	0.602	0.735
10	0.576	0.708
11	0.553	0.684
12	0.532	0.661
13	0.514	0.641
14	0.497	0.623
15	0.482	0.606
16	0.468	0.590
17	0.456	0.575
18	0.444	0.561
19	0.433	0.548
20	0.423	0.537
21	0.413	0.526
22	0.404	0.515
23	0.396	0.505
24	0.388	0.496
25	0.381	0.487
26	0.374	0.478
27	0.367	0.470
28	0.361	0.463
29	0.355	0.456

续表

$n-2$	$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
30	0.349	0.449
35	0.325	0.418
40	0.304	0.393
45	0.288	0.372
50	0.273	0.354
60	0.250	0.325
70	0.232	0.302
80	0.217	0.283
90	0.205	0.267
100	0.195	0.254

(四) 正交表

表 12-9

正交表

$L_4(2^3)$

试验号	列 号		
	1	2	3
1	1	1	1
2	1	2	2
3	2	1	2
4	2	2	1

$L_9(3^4)$

试验号	列 号			
	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

$L_8 (2^7)$ 

试验号	列 号						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

 $L_{18} (3^7)$ 

试验号	列 号						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3	3	3
4	2	1	1	2	2	3	3
5	2	2	2	3	3	1	1
6	2	3	3	1	1	2	2
7	3	1	2	1	3	2	3
8	3	2	3	2	1	3	1
9	3	3	1	3	2	1	2
10	1	1	3	3	2	2	1
11	1	2	1	1	3	3	2
12	1	3	2	2	1	1	3
13	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	3	1	2	1	3
15	2	3	1	2	3	2	1
16	3	1	3	2	3	1	2
17	3	2	1	3	1	2	3
18	3	3	2	1	2	3	1



$L_{27}(3^{13})$ 

试验号	列 号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	3	3
5	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1
6	1	2	2	2	3	3	3	1	1	1	2	2	2
7	1	3	3	3	1	1	1	3	3	3	2	2	2
8	1	3	3	3	2	2	2	1	1	1	3	3	3
9	1	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1
10	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
11	2	1	2	3	2	3	1	2	3	1	2	3	1
12	2	1	2	3	3	1	2	3	1	2	3	1	2
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	1	3	1	2
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	2	1	2	3
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	3	2	3	1
16	2	3	1	2	1	2	3	3	1	2	2	3	1
17	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3	3	1	2
18	2	3	1	2	3	1	2	2	3	1	1	2	3
19	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2
20	3	1	3	2	2	1	3	2	1	3	2	1	3
21	3	1	3	2	3	2	1	3	2	1	3	2	1
22	3	2	1	3	1	3	2	2	1	3	3	2	1
23	3	2	1	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2
24	3	2	1	3	3	2	1	1	3	2	2	1	3
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	1	2	1	3
26	3	3	2	1	2	1	3	1	3	2	3	2	1
27	3	3	2	1	3	2	1	2	1	3	1	3	2

$L_{16} (4^6)$ 

试验号	列 号				
	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	1	2	4
12	3	4	2	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

 $L_{32} (5^6)$ 

试验号	列 号					
	1	2	3	4	5	6
1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4	4
5	1	5	5	5	5	5
6	2	1	2	3	4	5
7	2	2	3	4	5	1
8	2	3	4	5	1	2
9	2	4	5	1	2	3
10	2	5	1	2	3	4
11	3	1	3	5	2	4
12	3	2	4	1	3	5
13	3	3	5	2	4	1
14	3	4	1	3	5	2
15	3	5	2	4	1	3
16	4	1	4	2	5	3
17	4	2	5	3	1	4
18	4	3	1	4	2	5
19	4	4	2	5	3	1
20	4	5	3	1	4	2
21	5	1	5	4	3	2
22	5	2	1	5	4	3
23	5	3	2	1	5	4
24	5	4	3	2	1	5
25	5	5	4	3	2	1

$L_8(4 \times 2^4)$

试验号	列 号				
	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	2	1	1	2	2
4	2	2	2	1	1
5	3	1	2	1	2
6	3	2	1	2	1
7	4	1	2	2	1
8	4	2	1	1	2

$L_8(4 \times 2^4)$ 表头设计

因素数	列 号				
	1	2	3	4	5
2	A	B	(A×B) <sub>1</sub>	(A×B) <sub>2</sub>	(A×B) <sub>3</sub>
3	A	B	C		
4	A	B	C	D	
5	A	B	C	D	E

$L_{16}(4^2 \times 2^9)$

试验号	列 号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	3	2	2	2	1	1	1	2	2	2
4	1	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1
5	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
6	2	2	1	2	2	2	1	1	2	1	1
7	2	3	2	1	1	1	2	2	2	1	1
8	2	4	2	1	1	2	1	1	1	2	2
9	3	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2
10	3	2	2	1	2	1	2	1	1	2	1
11	3	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1
12	3	4	1	2	1	1	2	1	2	1	2
13	4	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1
14	4	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2
15	4	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2
16	4	4	1	1	2	1	1	2	2	2	1

$$L_{16}(4^3 \times 2^6)$$

试验号	列 号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	1	1	2	2	2	2
3	1	3	3	2	2	1	1	2	2
4	1	4	4	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	2	2	1	2	1	2
6	2	2	1	2	2	2	1	2	1
7	2	3	4	1	1	1	2	2	1
8	2	4	3	1	1	2	1	1	2
9	3	1	3	1	2	2	2	3	1
10	3	2	4	1	2	1	1	1	2
11	3	3	1	2	1	2	2	1	2
12	3	4	2	2	1	1	1	2	1
13	4	1	4	2	1	2	1	2	2
14	4	2	3	2	1	1	2	1	1
15	4	3	2	1	2	2	1	1	1
16	4	4	1	1	2	1	2	2	2

$$I_{16}(4^4 \times 2^3)$$

试验号	列 号						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	1	2	2
3	1	3	3	3	2	1	2
4	1	4	4	4	2	2	1
5	2	1	2	3	2	2	1
6	2	2	1	4	2	1	2
7	2	3	4	1	1	2	2
8	2	4	3	2	1	1	1
9	3	1	3	4	1	2	2
10	3	2	4	3	1	1	1
11	3	3	1	2	2	2	1
12	3	4	2	1	2	1	2
13	4	1	4	2	2	1	2
14	4	2	3	1	2	2	1
15	4	3	2	4	1	1	1
16	4	4	1	3	1	2	2

$L_8 (2^7)$ 二列间的交互作用表

		列 号						
		1	2	3	4	5	6	7
列 号	(1)	3	2	5	4	7	6	
	(2)	1	6	7	4	5		
	(3)	7	6	5	4			
	(4)	1	2	3				
	(5)	3	2					
	(6)	1						

$L_8 (2^7)$ 二列间交互作用表头设计

因素数	列 号						
	1	2	3	4	5	6	7
3	A	B	A×B	C	A×C	B×C	
4	A	B	A×B C×D	C	A×C B×D	B×C A×D	D
4	A	B C×D	A×B	C B×D	A×C	D B×C	A×D
5	A D×E	B C×D	A×B C×E	C B×D	A×C B×E	D A×E B×C	E A×D

$L_{12} (3^{11})$ 二列间的交互作用表

		列 号												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
列 号	(1)	{	3	2	2	6	5	5	9	8	8	12	11 <sup>n</sup>	11
			4	4	3	7	7	6	10	10	9	13	13	12
	(2)	{	1	1	8	9	10	5	6	7	5	6	6	7
			4	3	11	12	13	11	12	13	8	9	10	10
	(3)	{	1	9	10	8	7	5	6	6	7	5	5	
			2	13	11	12	12	13	11	10	6	9	9	
	(4)	{	10	8	9	6	4	2	7	6	6	6	6	
			12	13	11	13	11	12	9	10	8	8	8	

续表

		列 号												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
列 号	(5)					1	1	2	8	4	2	4	3	
						7	6	11	13	12	8	10	9	
	(6)					1	4	2	2	3	2	4		
						5	13	12	11	10	9	8		
	(7)					3	4	2	4	3	2			
						12	11	12	9	8	10			
	(8)					1	1	2	3	4				
						10	9	5	7	6				
	(9)					1	4	2	3					
						8	7	6	6					
	(10)					3	4	2						
						6	5	7						
(11)					1	1								
					13	12								
(12)					1									
					11									

$L_{13}(3^{13})$ 二列间交互作用表头设计

列 号	因 素	
	3	4
1	A	A
2	B	B
3	$(A \times B)_1$	$(A \times B)_1, (C \times D)_1$
4	$(A \times B)_2$	$(A \times B)_2$
5	C	C
6	$(A \times C)_1$	$(A \times C)_1, (B \times D)_1$
7	$(A \times C)_2$	$(A \times C)_2$
8	$(B \times C)_1$	$(B \times C)_1, (A \times D)_1$
9		D
10		$(A \times D)_1$
11	$(B \times C)_2$	$(B \times C)_2$
12		$(B \times D)_1$
13		$(C \times D)_1$

# 第十三章 工业微生物实验室常见的一些单元操作技术

## 第一节 搅拌和振荡

为了保证反应组分能充分混合，对于非均相体系，必须加以搅拌或振荡。如果是分层的液体，还必须充分混合，搅拌器的叶片则必须处于两液层的界面。对于均相系统，为了使分作小份投入的物质快速和全部分布于整个溶液中，也必须搅拌，以避免局部浓度过高或局部过热等。

### 一、搅 拌 器

利用玻璃棒很容易制成简单的搅拌器(图13-1的1~5)。对于

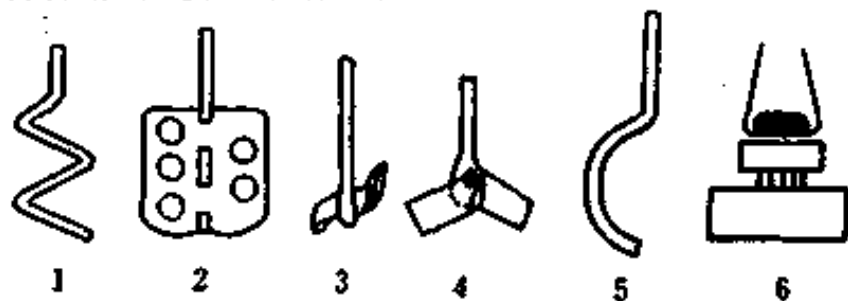


图 13-1 搅拌器的类型

广口容器，叶轮搅拌器(2)较为合适；对于细颈容器，可用小型旋桨搅拌器(3)；或在离心力作用下能自动展开的叶片搅拌器(4)；对于容易沉积在烧瓶壁上的物质，长弓型搅拌器(5)比较理想，而且也能通过细颈进入瓶内。只是在使用这种搅拌器时，烧瓶中不能同时装温度计。

搅拌器也可由不锈钢或其他不与被搅拌物质起反应的金属制成的。

磁力搅拌器(6)能在完全封闭的装置中进行搅拌。其操作原理是由电动机转动磁体，磁体又带一根浸在反应瓶中、包有玻璃或聚四氟乙烯外壳的铁棒。它可用于诱变反应、高真空下的操作，以及其他类似情况。当反应规模较小的时候，能代替大多数其他形式的搅拌器。但搅拌棒必须与反应容积的底部相适应。所以只能用于平底的容器。

通入反应装置中的空气或 $\text{CO}_2$ 、 $\text{N}_2$ 往往有一定压力，具有足够的搅拌作用，若再加搅拌，效果更好。

## 二、导管和密封

玻璃管用橡皮塞或软木固定之后，就形成一个简单的搅拌器导管〔图13-2 (1)〕。在必要的情况下，经过仔细装配的这种搅拌器也能用于回流装置。只要其中物质的沸点并不太低，特别是在轴和导管上套有一小段橡皮管、密封有所改进后，这种密封可用甘油润滑，若用蓖麻油则更好。

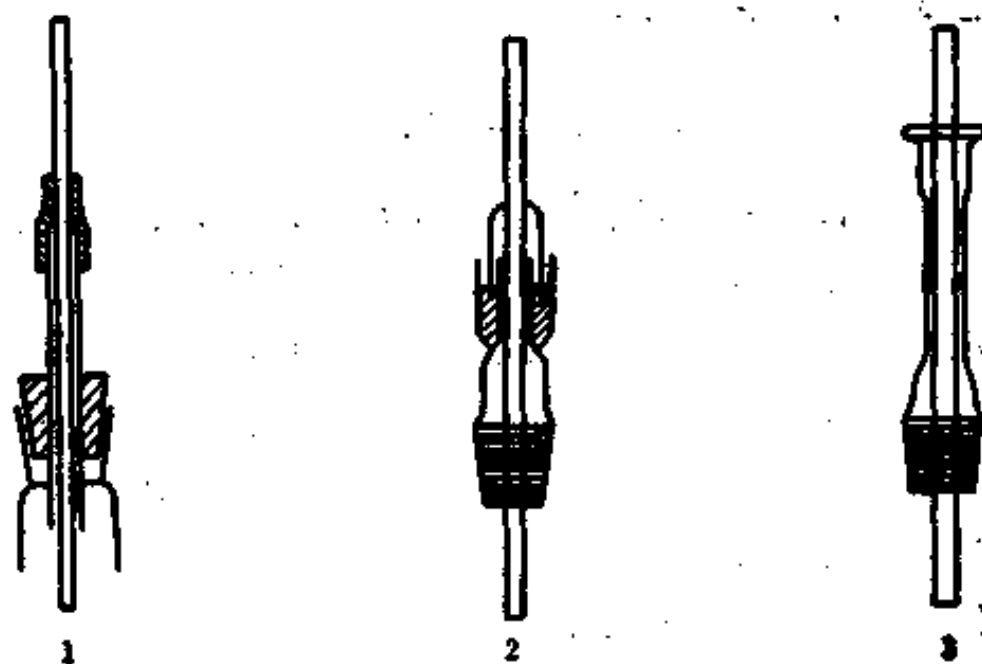


图 13-2 搅拌器的密封



虽然液体密封(2)(汞、甘油)具有良好的气密性,但只能在大气压下使用。

对于回流装置,宜于用汞作密封液,因为它既不会被冷凝液稀释,也不会从密封装置中被挤出。搅拌器的汞封能承受轻度的正压力。

最完善和简便的密封搅拌器是精度磨口搅拌器(3),由套管与精密装配的搅拌器轴组成(允许误差为 $\pm 0.01\text{mm}$ ),价格很贵。用蓖麻油(或石蜡油)润滑,当存在能溶解脂类的溶剂时,则用卡普森作润滑剂。

由于在高速旋转下精密磨口搅拌器发热量相当大,故转速不得超过 $600\text{r}/\text{min}$ 。

利用注射器也能制成类似的搅拌器装置,此时将截断的针筒套以橡皮塞固定在烧瓶上,利用橡皮管将搅拌杆与截断的针筒芯相连,作为转动部件。

甘油不宜单独使用作精密磨口搅拌器的润滑剂,因为其粘度太低,玻璃的磨损程度高,会缩短搅拌器的寿命。

具有滚珠轴承和标准锥(金属或聚四氟乙烯)的填料压盖型搅拌器密封也很有效,但价格昂贵。

### 三、电动机

搅拌器一般都是用电动机传动,电动机的转速都用电阻或变压器调节。在开始搅拌之前,应用手将搅拌器转动一下,检查旋转是否正常,以及是否触及器壁或温度计。用以固定装置的所有夹子都必须适当地旋紧,使装置没有任何扭曲。对于精密磨口搅拌器,其套管必须用专门的夹子另外加以固定,因为搅拌轴的磨擦很容易使之与烧瓶脱离。

电动机的轴与搅拌器的轴由两段真空橡皮管制成的联合器连接在一起,应成一直线,以防止搅拌器的导管被磨损(图13-3)。

#### 四、振 荡

就实验室而论,振荡培养很重要,采用三角瓶和大试管进行发酵试验时,旋转式和往复式的振荡培养都是振荡的重要形式。

如必须进行较长时间的振荡,则可使用机械装置,但在使用这类装置的同时,往往无法进行直接加热或冷却,因此可在恒温室内进行振荡。振荡时必须注意很仔细地将容器固定在振荡装置上。振荡的程度往往以振幅和振荡次数/min或旋转次数/min( $r/min$ )表示。



图 13-3 拌搅棒与马达的连接

### 第二节 气体的计量和导入

气体的数量可通过体积来测量。要测定气体的体积,可以将其直接收集于标准容器(计量筒、气体计量器)中,或用计量泵或气量计直接测定,通常是用注满水的所谓“湿球气流计”,气体通过时,与指示装置相连的转筒就旋转起来。

气体的流量也可用流速计或转子流量计(套管-浮子流量计)来间接测量。在流速计量中,用同种气体的已知流量进行校准,并根据单位时间内所通过的气体量与 $\Delta p$ 之间的函数关系标绘曲线。但必须注意的是,该曲线图只能运用于同一种气体。

工业用转子流量计(图13-4)用于不同的测量范围,因为其刻度管愈往下愈细,转动浮子的上升程度取决于流量,流量愈大,上升愈高。

此外,通过测定反应器重量的增加,或者当所用气体的流量

较大时，通过测定气体钢瓶的减量，也能对气体进行计量。容易冷凝的气体可首先以液态重量或体积计量，然后再控制一定的速度使其蒸发。

将空气通入液体时，进气管的出口一般都处于液面之下。对于一些可被液体吸收的气体，液体有被反吸而进入装置其他部分的危险，当气体被猛烈吸收时危险更大。因此，在反应装置的前面必须连接一只空的容器（如洗瓶），该容器的容量要足以容纳全部反应液。在供气装置（钢瓶）的后面也必须连接一只类似的安全瓶。



图 13-4 转子流量计

### 第三节 加热和冷却

#### 一、加 热

耐热玻璃空气浴是一种较好的加热浴。它既很整洁，加热速度又不慢；但不宜传导大量的热。在蒸馏过程中，可从任何一个方向观察沸腾情况。空气浴的顶部应盖一块石棉板（图13-5）。

砂浴加热速度很慢，温度也难于控制。通常用其他的加热浴来代替。用液体作热介质的加热浴最适用于温和均匀的加热。

100℃以下的水浴用得相当广泛。由于其热惯性较大，所以对温度进行很精确的自动调节。

为了控制浴中的水平面，可以使用如图13-6所示的自动控制器。水平面控制器与水管相连接。

油浴和石蜡浴可达到约250℃温度，但因加温时产生烟，所以只能在通风橱内使用。

温度的测量是将温度计放在浴中示出度数，倘若是油浴和石

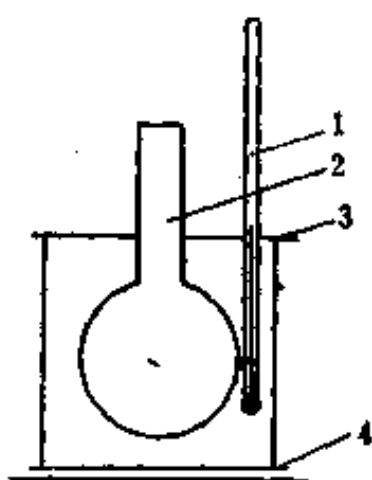


图 13-5 空气浴  
1—温度计 2—圆底烧瓶 3—石棉板 4—石棉网

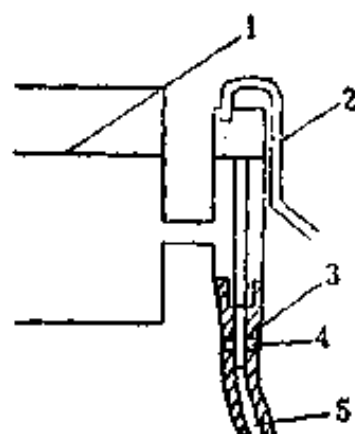


图 13-6 水浴的水平面调节  
1—水平面 2—进口 3—橡皮管 4—可调的玻璃管 5—出口

蜡浴，则必须在熔化的加热介质冷却固化之前将温度计取出。通过调节煤气火焰、或者调节变压器或可变电阻来控制电热装置，即可使浴温得到某种程度的调节。然而单凭这些方法还很难在长时间内保持温度恒定，利用自动调节装置来控制，可使温度达到所要求时，即自动切断电源。在实验室中，常用接触式温度计的两点调节器和断电器。在接触式温度计中，金属丝能借助于可转动的磁铁上下移动并调节到所需的温度，接触金属丝本身能进行最精确的温度调节。一旦加热到预定的温度，继电器本身即形成通路而将电流切断。温度一旦降到预定数值以下，继电器又将加热系统重新接通。恒温槽内的温度也以同样的原理来保持恒定，温度的变化能被控制在几分之一度以内。

## 二、冷 凝 器

为了使挥发性物质不至于从反应器中逸出，反应器上必须装配回流冷凝器。加热时所形成的蒸汽在冷凝管(回流冷凝管)内冷凝而且回流。而蒸馏时则将冷凝液导出冷凝管(产物冷凝器)外。

图13-7(1)所示的空气冷凝管最为简单，但由于空气的冷却效果差，只能用于沸点超过150℃的高沸点物质。有时它也以垂

直管形式，当作回流冷凝管使用，但由于此时层流占主导地位，所以不很有效，而且物料容易从冷凝管中冲出。其改良型〔图13-7(2)〕用作回流冷凝管就比较适宜。它特别适用于半微量制备，因为有待除去的热量少，即使对于低沸点物质，在空气冷却下也已是足够有效了（必要时在冷却管外还可以包上浸湿的滤纸或湿布）。只要蒸馏速度慢一些，对于150℃以上的高沸点物质〔图13-7(1)〕型也可以用作产物冷凝管。

冷凝管〔图13-7(3)〕主要用作产物冷凝（约可高达160℃）。120℃以下流动的水作冷却介质；从120~160℃，可以用静止的水冷却。由于冷却面小以及层流的关系，该冷凝管使用时不很有效，只能用于沸点较高、超过150℃的物质。当用作冷凝器时，在冷却的外层表面上冷凝下来的大气中，潮气有可能通过接头处的毛细空隙流入反应烧瓶，因而接头必须涂以润滑脂，或用干燥的滤纸作成套筒，装在接头的上面。由钠玻璃制成的这种冷凝管不能用于高沸点的物质。

球形冷凝管〔图13-7(4)〕只能作回流冷凝器使用，因为内部呈球形，蒸汽流变成了湍流，冷却效果就好多了。由于大气中的潮气冷凝在其壁上，其熔接部位是危险点。

蛇形冷凝管〔图13-7(5)〕绝对不能作回流冷凝器，因为冷凝液在狭窄的旋管中不能顺利地回流，常常从管顶冲出，而引起意外事故，但以垂直向下的位置装配时，它是一种极好的产物冷凝器，特别适用于低沸点物质。然而它不能在倾斜向下的位置使用。

图13-7(6)的冷凝管是图13-7(5)的改良式。在该冷凝管的夹套中可以装入冰-盐或冰-丙酮等混合物，从而使得即使是沸点很低的物质也能冷凝下来。蛇形冷凝管的另一种型式是低温接受器，其中冷凝管与蒸馏接受器已合二为一。

图13-7(7)所示的冷凝管是一种高效的回流冷凝管。粘附在冷却旋管上的、数量较大的蒸馏出物损失是允许的，也可将其作

产物冷凝管，可用于沸点高达160℃的物质，但不能用作低沸点物质的回流冷凝管。另一方面，空气中的水蒸气却容易在其开口端冷凝，只要加接一支干燥管即可防止。

夹套蛇形冷凝管〔图13-7(8)〕因其冷却效率很高，故低沸点物质（如乙醚）不能从中逸出。大气中的水蒸气会在其外壁上冷凝。由于这种冷凝器很贵，所以非必要时不要使用。同时还应该记住，这种冷凝器通冷水时水分较重，故必须注意夹紧。

悬挂式冷凝器〔图13-7(9)〕是一种特殊形式的回流冷凝器，可以悬挂在回流装置中，在半微量装置中特别有用。如果用塞子或橡皮管将其固定在反应器上，则系统必须留有空隙。

必须经常注意，冷却水决不能中断，否则将有危险。由于自来水旋塞的垫圈膨胀，原来供应情况正常的冷却水可能中断，故

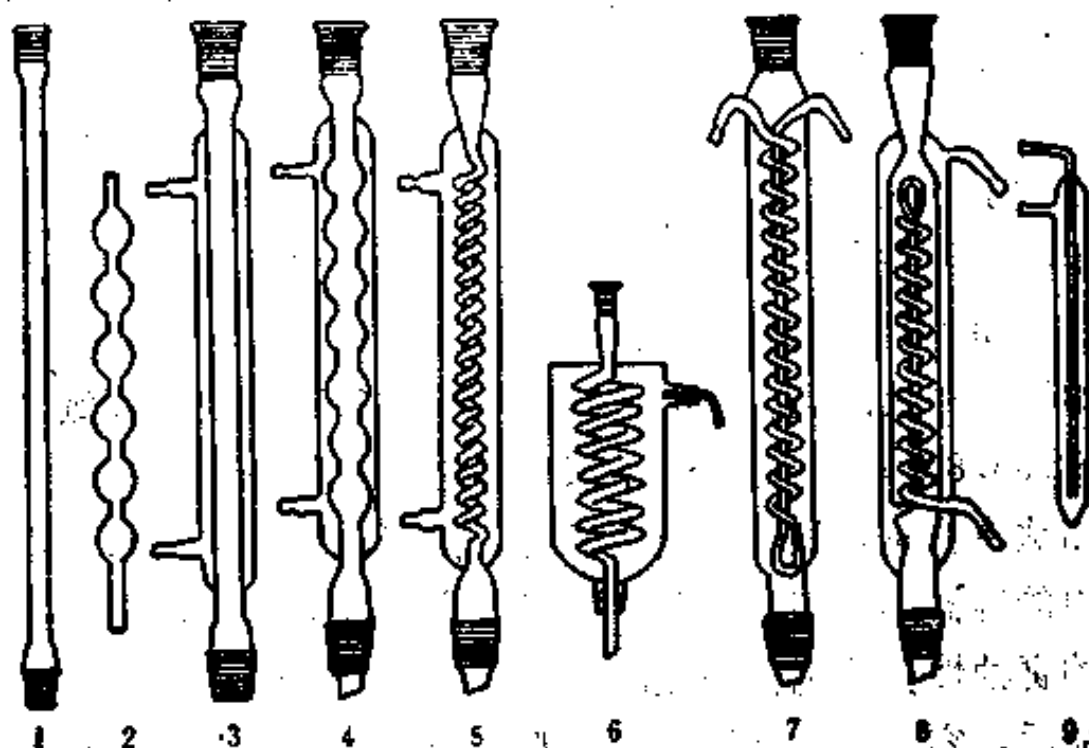


图 13-7 冷凝管的类型

对于贵重的装置(譬如汞扩散泵和油扩散泵)，应该加装冷却水的安全装置。该装置通过自动元件将加热和冷却系统组合在一起。

### 三、冷 却 剂

冷却剂的选择条件是以能维持所需的温度和去除多余的热量

而定。由于水的价格便宜以及热容量大，故为常用的冷却剂。连接在装置中的烧瓶可以用水冷却，只要将其放在具有排水管的大漏斗内流水浇淋就行。

冰在使用前应用碎冰机粉碎。为了使传热效果更好，可加入少量的水，使之呈浆状。

冰和食盐的混合物可冷却到约 $-20^{\circ}\text{C}$ ，通常是将粉碎的冰和相当于其重量的三分之一粗盐混合(最低可达 $-21.3^{\circ}\text{C}$ )。

碎冰片：氯化钙也是很适用的致冷剂。与冰盐混合物相仿，随两者的比例不同，可达不同的低温。当以143 g 结晶氯化钙与100 g 碎冰混匀时，可达到最低的温度为 $-54.9^{\circ}\text{C}$ 。

将固体二氧化碳(“干冰”或“雪状二氧化碳”，升华温度 $-78.5^{\circ}\text{C}$ )加入甲醇、丙酮或其他适当的溶剂内(加入时必须当心，因为会产生大量的泡沫)，可使温度降至 $-78^{\circ}\text{C}$ 。由于这种致冷混合物的冷却容量并不很大，为了使其贮有足够的致冷量，最好向冷却剂中加入过量的干冰。

干冰必须在铁研钵(不能用瓷研钵)中很好地粉碎。操作时应戴护目镜和手套。真空冷冻保藏菌种预冷需采用 $-78^{\circ}\text{C}$ 的温度。

如果这种致冷混合物的效果还不够强，则可使用液氮(可冷却到 $-195.8^{\circ}\text{C}$ )。液氮常用于深度冷冻保藏菌种。

如欲将物质较长时间地在低温下保藏，则可利用冰箱。放入冰箱中的容器必须塞紧，防止水浸入内藏物而冷凝，有时将有机物放出的腐蚀性气体也会侵蚀冰箱，有机物溶剂甚至有可能引起爆炸。最后，容器上应有标签和说明，最好在标签上涂以石蜡，以免沾上冰箱中的冷凝水而模糊甚至脱落。在实验室中冰箱常用于保藏菌种。

#### 第四节 减压操作

为了种种目的，实验室内必须利用真空。主要的是减压蒸馏

和减压升华、减压干燥、过滤(吸滤)。

### 一、真空的产生

为了使用上的便利，将真空分为以下几种：

水泵真空 (约 $1.333\sim 101.3\text{kPa}$ )。

油泵真空 (约 $0.133\sim 133.3\text{Pa}$ )。

汞扩散泵真空( $0.133\text{Pa}$ )。

在实验室中，喷水泵和旋转滑动阀油泵是最常用的减压装置。

喷水泵(如图13-8)的耗水量较多(每排出 $0.6\text{L}$ 气体大约消耗 $1\text{L}$ 水)。所能达到的真空度以水的蒸气压为极限。当水的压力足够时，随水温的不同，能够获得 $1.067\sim 2.0\text{kPa}$ 压力的真空。

旋转滑动阀油泵外面是圆柱形的金属壳体，里面是一只旋转的偏心转子。由于转子和滑动阀的运动，一定量的气体通过进气口吸入泵的吸气空间，并随着滑动阀的旋转而不断地受到压缩，终于到达比大气压高的压力，最后通过喷嘴和出口阀而被压入大气中。

单级的旋动滑动阀泵的极限真空度可达 $6.67\sim 13.33\text{Pa}$ 。但它需与类似的泵组合联用，办法是将后者的真空端与第一只泵的出口喷嘴相连接(两级油泵)。这样能达到约 $0.133\text{Pa}$ 的最后真空度。油泵在使用 $100\text{h}$ 后必须更换。如最终真空度较差，更换则需提前。绝对不允许腐蚀性气体和蒸气进入油泵内。

为了获得高真空 ( $<0.133\text{Pa}$ )，可以用扩散泵。这是一种次级泵，它以性能良好的机械泵作为前级。其原理是：将液体(蒸馏过的汞或硅油)加热，使其沸腾，液体的蒸气从喷嘴中高速喷



图 13-8 喷水泵



出，将已经处于相当真空（此真空由机械造成，并已达到了前级机械泵的作用极限）下的空气向前驱赶。此后，液体蒸气被冷凝回流，空气则被驱赶和压缩，从而达到前级机械泵的作用范围以内，被前级泵抽走。

按照所用液体的不同，扩散泵大致可分为汞扩散泵和油扩散泵两种。汞的主要缺点在其毒性，但汞扩散泵的性能较佳。油扩散泵使用硅油，极限真空度约为 $1.333 \times 10^{-6} \text{Pa}$ ，其缺点是硅油不如汞稳定。倘若前级泵不能将压力系统地降低至 $133.32 \text{Pa}$ 以下，则因空气太多，硅油在加热下很容易分解。但由于油的分子比汞大很多（约15倍），所以它能携带的气体比较多，抽气速率就大。

油扩散泵和汞扩散泵不能互换使用。就是说，油扩散泵不能用汞；反之也然。因为油分子大，汞泵的喷口对油泵说就嫌小了，蒸气挤不出去。而汞蒸气如从油扩散泵的喷口中喷出，则由于相对说来孔太大，因而达不到使它急速冲出的目的。

## 二、真空的测量

班那特短型真空计（如图13-9）用于测量 $133.32 \sim 26664 \text{Pa}$ 的压力。虽然其精确度可达 $\pm 66.67 \text{Pa}$ ，但如在使用中有空气泡或蒸气渗入真空计的密封端时，常造成更大的误差。所以应该规定：只在读数时才允许打开真空计的旋塞。可用简单的方法检验其是否已为空气或挥发性物质所污染，这就是用油泵将其抽至 $26.66 \text{Pa}$ 以下，此时真空计两臂中的汞面应处于同一水平，倘若呈现“负压”，即表示有杂质存在。

压缩真空表用于测量 $0.133 \sim 133.32 \text{Pa}$ 范围的压力，现以盖德式短型真空表来说明其原理。盖德式真空表（如图13-10）运用范围较大。

当盖德式真空表处于水平位置时，测量室M中的压力与装置的压力相同，而当真空表旋转 $90^\circ$ ，变为图示位置时，经过准确

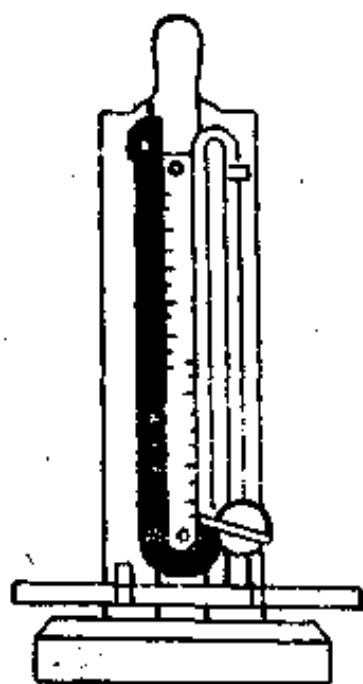


图 13-9 班那特短型真空计

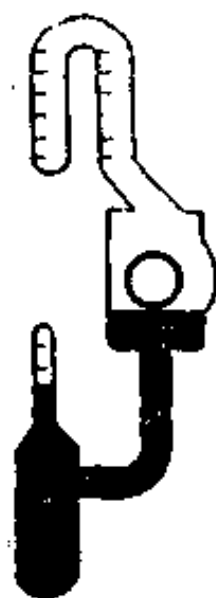


图 13-10 盖德式真空计

称量的汞便将小室M中气体压缩到较小的体积，该体积在标尺上的读数(预先校正为压力单位)即相当于装置的原始压力。当盖德式真空表处于测试位置时，决不能释放装置中的真空。只有在室温下没有可以冷凝的蒸气存在时，压缩式真空表才表示装置中的真正压力。

所用的泵应不时地加以净化。处理汞时必须严格遵守有关的操作规程。

### 三、真空操作

良好的真空装置应该装配得使系统内的压力梯度很低，并使真空泵的能量能够获得充分的利用。要作到这一点，应该在装置中尽可能地避免使用直径小的部件，如长的真空管路，细孔旋塞、狭窄的接头，以及填充得很紧密的柱等。再则，由于平底烧瓶在真空下口能向内爆炸，故必须注意，在真空蒸馏和真空升华中只能用圆底烧瓶。

为了防止水被反吸而进入真空计装置中(例如在水压突然降低的情况下)，在喷水泵与装置相连时必须通过安全瓶，这种安

全瓶也可以用单向阀代替，两者同时使用则更为妥当。这类单向阀可从市场购得，也可请玻璃工吹制。

真空计与安全瓶的连接如图 13-11 所示。在任何情况下，都必须首先通过安全瓶或真空计管道上的旋塞，使空气充满装置，然后才能关闭喷水泵。

图 13-12 是获得良好真空的简单系统的示意图。在必须将瓶

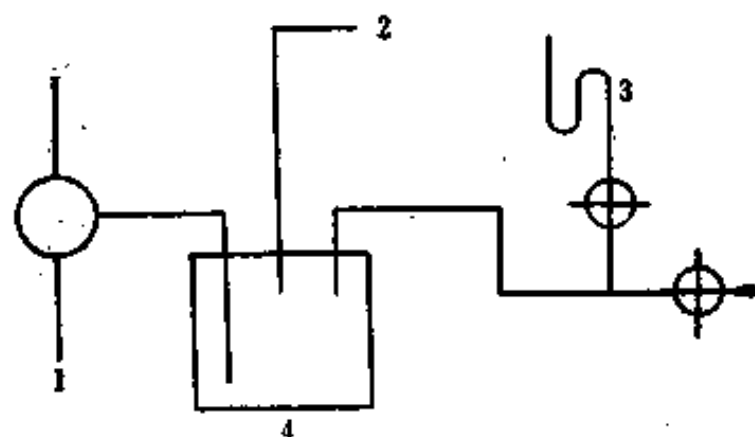


图 13-11 真空系统示意图

1—水冲泵 2—接装置口 3—压力计 4—安全瓶

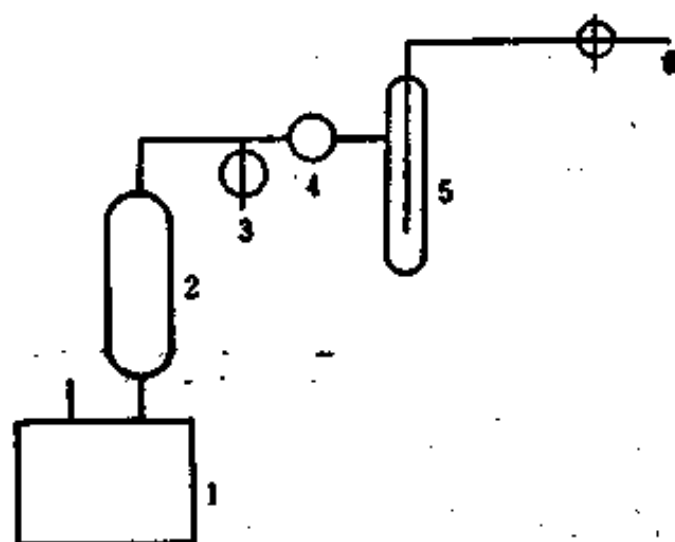


图 13-12 获得精密真空的操作

1—油泵 2—缓冲瓶 3—放气阀 4—真空计 5—冷凝器 6—接装置口

强烈加热的情况下（譬如真空蒸馏中的蒸馏瓶），也只有在该瓶冷却之后，才能让空气进入真空装置。

## 第五节 干 燥

作为一种有效的干燥剂，不仅要具有良好的干燥强度，而且还应具有大的干燥容量。

干燥剂所能达到的最大干燥强度取决于它的水蒸汽压（如表13-1）。人们所熟知的那些干燥剂，一旦由于吸水量增加而生成水化合物之后，干燥能力就比较低了（参见表中的过氯酸镁）。在

表 13-1 常见干燥剂于20℃时的水蒸汽压

干燥剂	水蒸汽压 (mmHg*)	干燥剂	水蒸汽压 (mmHg*)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.00002	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (浓)	0.006
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.0005	硅胶	0.008
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.002	NaOH(经过熔融)	0.15
KOH(经过熔融)	0.002	CaO	0.2
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (未经熔融)	0.003	CaCl <sub>2</sub>	0.2
CaSO <sub>4</sub> (硬石膏)	0.004	CuSO <sub>4</sub>	1.3

\* 1mmHg=133.322Pa

保持足够干燥强度的前提下，干燥剂所能吸收的水量越大，其干燥容量即越大，诸如五氧化二磷、硫酸、氯化钙、硫酸镁及硫酸钠等物质在某种程度上能同时符合这两种要求，故成为常见的干燥剂。实际上硫酸钙的干燥强度很高，但其干燥容量却小。

### 一、气体的干燥

气体的干燥是用固体干燥剂在干燥塔中进行的(如图13-13)，为了防止干燥剂在干燥过程中结块，那些不能保持其固有形态的干燥剂(如五氧化二磷)应与载体(如石棉绒、玻璃纤维、浮石)混合使用。

化学惰性气体通常在洗气瓶中用浓硫酸干燥，在洗气瓶之前必须装置安全瓶，还必须使用洗瓶安全管。多孔板式洗气瓶比筒

单的洗气瓶优越。

为了防止大气中的湿气浸入，凡开口装置都应加接干燥管，管中装氯化钙、钠石炭或其他适当的干燥剂。

## 二、液体的干燥

液体是通过将其与粉碎的干燥剂放在一起并不时的激烈振荡而干燥的。对于含有大量水的液体，干燥剂可分步进行。这就是每隔一定时间倾出液体，用新干燥剂调换已失效的干燥剂，直到再也没有显著数量的水被吸出为止（即氯化钙保持粒状，硫酸铜无色，五氧化二磷不再结块）。如果更细致一些，初步的干燥可选用吸水容量大而强度低的廉价干燥剂，然后再使用高强度的干燥剂。适用于第一步的干燥剂有饱和氯化钠水溶液、无水硫酸钠（它形成水化合物，吸水量达其本身重量的127%），无水硫酸钙可用于第二步干燥（它能吸收相当于其重量6%的水分，形成 $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ，但强度很大）。

## 三、固体的干燥

为了进行物理鉴定或作定量分析，必须从固体中除尽水分和有机溶剂。

为了从非吸湿性的物质中除去易挥发组分，可将该物质铺在陶瓷板或滤纸上凉干；热稳定的物质可置于烘箱中或红外灯上烘干。一般固体可达 $105^\circ\text{C}$ 干燥温度至恒定。

## 四、干燥剂

如表13-2、13-3所示。

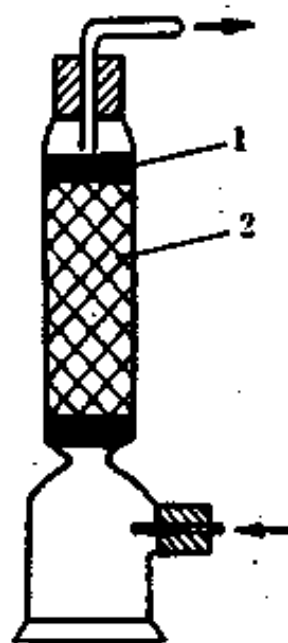


图 13-13 气体干燥塔

1—玻璃绒 2—干燥剂

表 13-2

气体干燥剂

干燥剂名称	适用于干燥的气体
石灰	NH <sub>3</sub> , 胺类
无水氯化钙	H <sub>2</sub> , HCl, CO, CO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , 醚等
五氧化二磷	H <sub>2</sub> , CO, CO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 等
浓硫酸	H <sub>2</sub> , CO, CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , Cl <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> 等
氢氧化钾	NH <sub>3</sub> , 胺类

表 13-3

液体干燥剂

干燥剂名称	适用于干燥的液体	不适用
五氧化二磷	二硫化碳、碳氢化合物、卤烷	碱类、醇等
浓硫酸	饱和碳氢化合物、卤烷	碱类、酮、醇、羧等
无水氯化钙	醚、酯、卤烷	醇、胺、酚、脂肪酸
氢氧化钾	碱类	醚、酮、酯、酸等
无水碳酸钾	碱类、酮、某些卤化物	脂肪酸、酯等
无水硫酸钠	很多液体均可	脂肪酸、酯等
无水硫酸镁	很多液体均可	脂肪酸、酯等
无水硫酸钙	很多液体均可	脂肪酸、酯等
金属钠	醚、饱和碳氢化合物	醇、胺、酯等

干燥剂中常用的吸水剂有五氧化二磷、浓硫酸、无水氯化钙、硅胶(常放于光学仪器中, 定期烘烤可反复使用)。

常用的除有机溶剂蒸气干燥剂有石蜡片。

常用的除酸性气体干燥剂有石灰、氢氧化钾、氢氧化钠等。

常用的除碱性气体干燥剂有浓硫酸, 五氧化二磷等。

## 第六节 过滤和离心

欲将固体颗粒从液体中分离, 最简单的方法是将液体倾出(倾析法)。但这样的分离是不彻底的, 为获得纯净状态的固体必须用过滤法或离心法。

最简单的过滤是在铺有软滤纸(折成槽纹形状的滤纸)的三角漏斗中进行的。不同级别的滤纸适用于不同性质的沉淀。粗孔滤纸过滤最快,但不适用分散得很细的沉淀(浑浊的悬浮液)。当用某种滤纸滤某沉淀时,如果只是开始的滤液呈现浑浊,则只需将滤液回入同一漏斗中重滤一次即可。但如所有的滤液都是浑浊的,则需将所谓助滤剂(纸浆、石棉、硅藻土、活性炭)与待滤液预先搅拌混合,然后再进行过滤,助滤剂也使那些会堵塞滤纸孔的沉淀变得较易分离。此外,也可以首先将助滤剂铺于漏斗中,然后再倾出待滤液。当然,在只需要滤液而沉淀可以弃去的情况下,才能使用助滤剂。

当要求回收晶状沉淀或要求过滤迅速时,普通的过滤就不再适用了,可用抽滤法。对于数量较大的物质,可使用与吸滤瓶相配合的布氏漏斗(如图13-14),两者再通过吸瓶与真空泵相连。

抽滤漏斗的大小应与待滤物质的数量相适应,晶体必须能全部覆盖滤纸的表面,但晶体层也不宜太厚,否则将影响抽干和洗涤。

抽滤前,先将大小适宜的、软圆形滤纸放在漏斗的漏板上,以溶剂润湿,压紧或抽吸一下使之与漏板紧贴,然后将待滤混合物倾入漏斗。抽吸的力量应加以控制,使过滤速度适中。用平底的玻璃塞将沉淀往下挤压,直到再也没有母液流出为止。必须注意,滤瓶不能有裂缝,因为裂缝会使母液的滤除不够均匀彻底,并在此后由于溶剂的蒸发而使晶体含有较多的杂质。为了进一步除去粘附于晶体上的母液,可用小份的同种溶剂、甚至另一种适当的溶剂洗涤潮湿的晶体。所用溶剂应很少溶解晶体。洗液在过滤之前就应准备好,如有必要,可加以预冷,以减少产品的溶解损

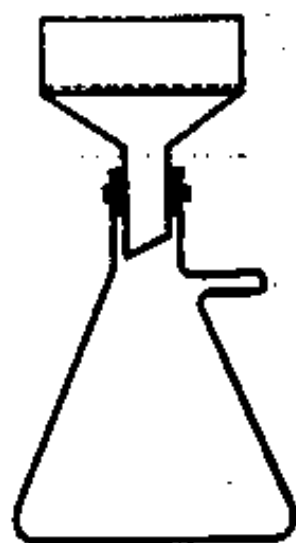


图 13-14 配有布氏漏斗的吸滤瓶

失。洗涤时，先用溶剂将沉淀物彻底浸透，然后再用真空抽滤，洗涤完成后，即将固体干燥。干燥也可采用抽吸法。

如果待滤混合物中存在碱、酸、酸酐、氧化剂等对普通滤纸有腐蚀性的物质，则吸滤可用适当孔径的烧结玻璃板漏斗（砂芯漏斗）进行。这种漏斗在一般情况下也能代替铺滤纸的滤器。但由于它的价格较贵，而且在很多情况下难以清洗，故其使用的普遍性受到限制。此外，还需注意强碱、氢氟酸、热的磷酸对这种漏斗的腐蚀作用。

如果待滤的物质较少，则可使用与吸管相连的侯许漏斗（图13-15），玻璃钉漏斗（图13-16）尤其适用于很少量的物质。玻璃钉系用细玻璃制成，只要将其一端在火焰上烧软压扁就行。抽滤时，钉上的滤纸必须形成完善的密封，而且滤纸的边缘不能显著

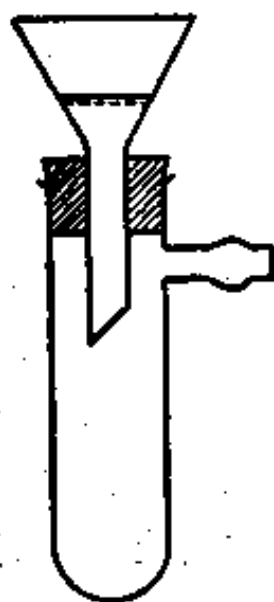


图 13-15 侯许漏斗



图 13-16 玻璃钉漏斗

地向上弯曲。为了避免因转移而引起损失，可将小试管放在吸管中收集滤液。

如果晶体的熔点很低，则要求进行低温过滤。当沉淀量少时，只要将漏斗和滤液放在冰箱中预冷即可。在其他情况下，最简单的方法是将漏斗与截底的滤瓶相结合，截底的边缘应磨平或熔平，在瓶中装冰或混合致冷剂（图13-17）。



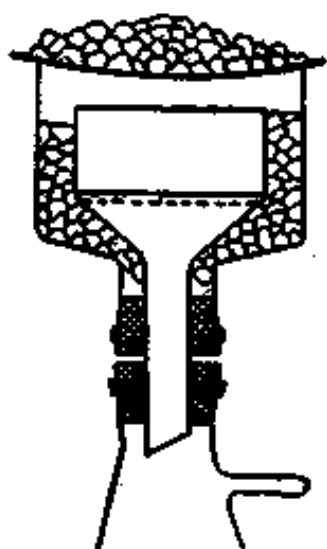


图 13-17 低温漏斗

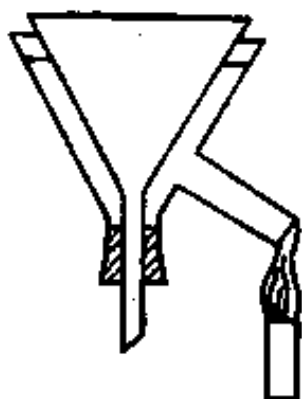


图 13-18 保温漏斗

如须趁热过滤或天冷时分装试管固体培养基可用图13-18的保温漏斗，也可以用由蒸气加热旋管围绕的漏斗进行。漏斗颈必须尽可能地粗而短，否则易被结晶堵塞。当使用通常的三角漏斗进行热过滤时，可将漏斗的颈部整个截去，以减少堵塞的危险。

在实际工作中，离心也是个好方法。当分离少量物质，要求尽量减少损失，或待过滤的物质容易堵塞漏斗孔时，离心法有其优点。实验室中常用的离心机是沉降式离心机，转速为2000~4000r/min。将悬浮液转移入离心试管(不能用普通式试管)，调节管中液体的量，使装有液体的各支离心管重量相同。离心沉降后，当沉淀足够坚实地附于管底时，即将上层清液倾去。向管中加入少许洗涤液，与沉淀搅拌成浆状，再次离心。对于小型离心机，重量的平衡并不要求十分精确。在这种情况下，离心沉降后可用一条滤纸将整个上层溶剂吸去(图13-19)。

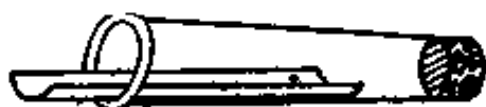


图 13-19 少量固体的干燥

为了除去残余的溶剂，可以慢慢地、小心地将离心管抽成真空(图13-20)。

在实际工作中还会经常遇到一些需灭菌处理、但又不耐热且体积较小的溶液，如氨基酸混合液、维生素混合液、酶液等，此

时采用注射式滤膜滤器是十分方便的。将滤器洗净、烘干；将 $0.22\mu\text{m}$ 孔径的混合纤维酯滤膜浸于蒸馏水中24h，取同等大小的定性滤纸片浸入蒸馏水中；将滤膜用两张滤纸夹好，安放于滤器中；包扎好，高压灭菌；用无菌注射器（1.0~25ml）吸以待除菌溶液，与滤器连接；让溶液通过滤膜并收集滤液于一无菌容器中，分装存放。

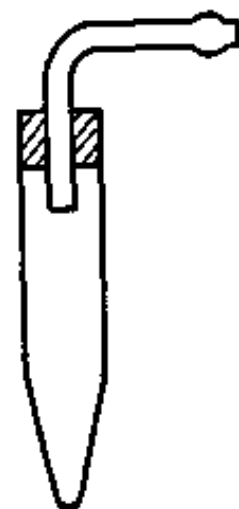


图 13-20 少量溶剂的真  
空去除

## 第七节 简单蒸馏

由于很多物质在 $150\text{℃}$ 以上已显著分解，而沸点低于 $4\text{℃}$ 的液体用普通装置进行蒸馏又难免招致损失，故常压蒸馏主要用于沸点为 $40\sim 150\text{℃}$ 之间的液体。如果一种物质在常压下的沸点高于 $150\text{℃}$ ，蒸馏即需在减压进行。在大多数情况下，喷水泵（ $\approx 1066.58\sim 1999.83\text{Pa}$ ）或旋转滑动阀油泵（ $\approx 1.33\sim 133.32\text{Pa}$ ）所形成的真空度已能满足减压蒸馏的需要。

有很多物质只能耐受很小的热应力，所以尽管其常压沸点处于 $150\text{℃}$ 以下，蒸馏也必须在低真空下进行。

图13-21示的是简单的真空蒸馏装置，由常规的元素组成。该装置也能用于常压蒸馏（不用沸腾毛细管，加入沸石）。

在实验室中，通常将圆底烧瓶用作蒸馏器。在常压蒸馏时，应选择适当大小的烧瓶，使待馏液不超过其容量的 $1/3$ 至 $1/2$ ，过大的烧瓶将会增加瓶中残留物的损失。

烧瓶用热浴加热。为了减少局部过热的现象，不宜在金属网上加热或直接用火焰加热。冷凝管根据被蒸馏物的沸点、蒸发热及蒸馏速度来选择。

蒸馏瓶通过蒸馏头与冷凝管相连。真空蒸馏使用克氏蒸馏头，

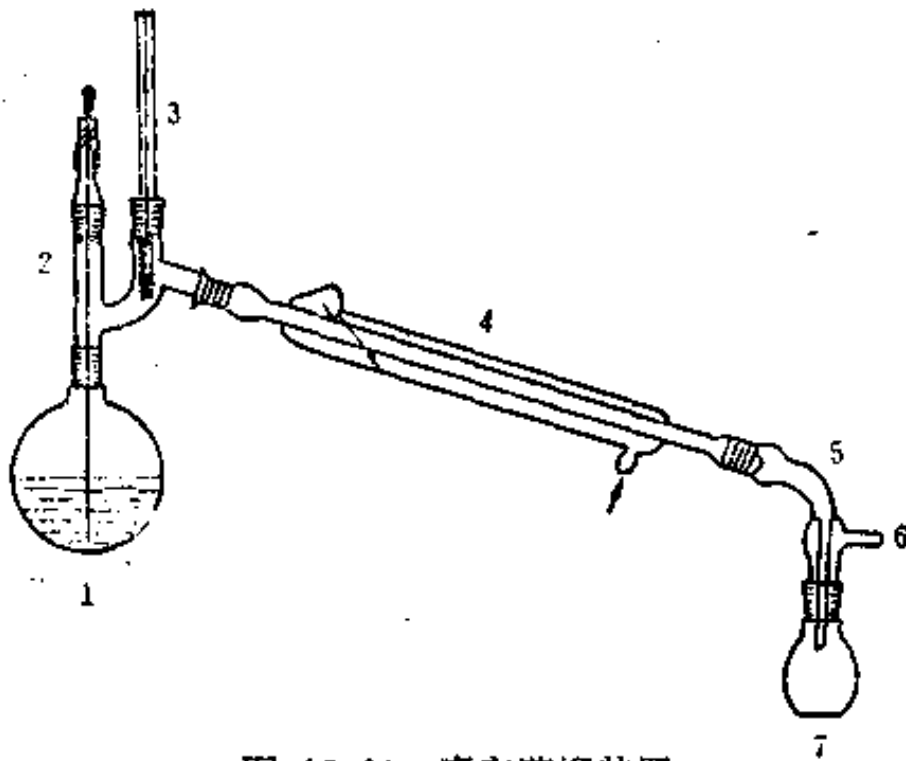


图 13-21 真空蒸馏装置

1—蒸馏瓶 2—克氏蒸馏头 3—温度计 4—冷凝器 5—接管 6—接  
真空泵口 7—受器

这种蒸馏头也可以用于常压蒸馏。

必须注意，温度计的汞球应完全被蒸气所包围，也就是说，汞球应略处于支管以下(选购仪器时应考虑到这一点)。如果用没有磨口接头的温度计，其读数必须加以校正。

蒸馏接头上滴管的尖端不应太细(内径应为5~6mm)。如果使用昂雪兹-梯莱应接器，就能在真空下更换接受瓶。该真空接器只在全部旋塞的磨口情况良好时，才能使用。用这种接受器，可在真空下同时装接几个接受瓶。但如不使蒸馏中断，它所能收集的馏分管数目是有限的，而且前面蒸馏的低沸部分在此后的蒸馏过程中还有向高沸点接受器扩散的危险。

接受器最好用圆底烧瓶，即使常压蒸馏也是如此。应预备好足够的、事前经过称重的圆底烧瓶，瓶重可用玻璃墨水或玻璃铅笔写在烧瓶的蚀刻圈上。

## 第八节 纸层析

纸层析是一种微量的方法，固定相的载体是制成特种滤纸的

纯纤维素。这种滤纸必须纯度很高而且质地均匀。各种型号的区别根据其厚度和吸附性不同。在大多数情况下，固定相是原先就存在于纤维素上的水分，但也可用不同的溶剂(硅酮油、石蜡油、汽油)浸渍滤纸作为固定相，将待分离物点于滤纸的某一处(起始点)，流动相移动(展开)时，就进行分离。纸层析系在密闭容器中进行，容器内的空间必须为所用溶剂体系中的各种组分所饱和。最重要的几种展开方法见表13-4和表13-5。展开完成之后，物质斑点的位置以 $R_f$ (比移值)鉴别：

$$R_f = \frac{\text{从起始点到物质斑点到(中心)距离}}{\text{从起始点到溶剂前缘的距离}}$$

$R_f$  值是每个化合物特征数值，很多化合物的  $R_f$  值已经计算

表 13-4 溶剂洗脱力顺序(按箭头方向递增)

石油醚(己烷, 戊烷) ↓ 环己烷 ↓ 二硫化碳 ↓ 四氯化碳 ↓ 二氯乙烯 ↓ 苯 ↓ 二氯甲烷	氯仿 ↓ 乙醚(无水) ↓ 二氢呋喃 ↓ 醋酸乙酯(无水) ↓ 丙酮(无水) ↓ 甲基乙基甲酮 ↓ 正丁醇	乙醇 ↓ 甲醇 ↓ 水 ↓ 冰醋酸 ↓ 吡啶 ↓ 有机酸
---	---	--

表 13-5 纸上层析

方 法	优 点	缺 点
上升法：滤纸悬挂于层析槽中，其下缘浸在流动相内，流动相因毛细力而上升	装置简单，可定量	重力与毛细力相成，故当上升高度约达20cm时，上升速度即显著下降，只能用于 $R_f$ 值差别较大的物质
下降法：滤纸上缘浸在流动相内，因流动相内重力向下移动	流动相移动速度快，展开距离没有限制；可分离 $R_f$ 值差别较小的物质并可以定量	装置比上升法复杂
水平经向法：流动相连续供应到圆形层析纸的中心	操作迅速，展开层狭窄，界线清楚，分离效果比两种方法好	只能定性，用所谓“扇形法”时(滤纸分成扇形)，才可能同时展开对照物质

出来，可用于鉴定。但是 $R_f$ 在很大程度上受溶剂和温度以及滤纸质量的影响，故重现性常常很差。因此在制备未知物质的层析谱时，总是同时展开一个已知物作对照。如果已知物的 $R_f$ 实验值与报道值不同，则所有其他 $R_f$ 值必须按同样的比例校正。

纸层析也适用于检查物质的纯度。为此，建议至少要用两种不同的溶剂体系对试样进行层析，以使结果可靠。

现将固定相的上升法纸层析的程序介绍如下：

### 一、流动相的制备

将所选定的溶剂体系内的各组分按预定的比例在分液漏斗中混合。如果呈现两相，通过振荡则可使其互相饱和。

### 二、点 样

将选用的滤纸裁成小条（宽度根据所用的层析槽决定，但长度不应超过30~35cm），在距底边3cm处用铅笔划一条线，起始点即标在线上。点与点之间的距离以及边缘点距纸边的距离均为2~2.5cm。将试样溶于水或易挥发有机溶剂中。溶液的浓度，对每一组分而言均应为1%左右。用特制的移液管在起点线上点入大约2mm<sup>3</sup>溶液（约相当于每一组分20μg），使其形成一个直径约0.5cm的斑点。作为一种权宜措施，毛细管、接种环也可用来点样。点样之后让溶剂蒸发。

在通过比较点的大小来进行半定量或定量的实验中，所在点的溶液数量必须精确，故需使用标有精确刻度的点样管，或用微型注射器。如果溶液较稀而又不便浓缩，则必须细致地多次点样，以保证能够获得足够明显的层析谱。此时必须耐心，一次点样之后，务必等待溶剂挥发后再点第二次。否则将使样品点过大，在开展时即会发生组分重迭、拖尾或扩散的现象。

### 三、展 开

将流动相倒入层析槽约2cm高，将点有试样的滤纸条悬挂于

槽中，使其既不接触器壁、也不接触液体，密闭放置过夜。然后（如有可能，最好不要开启层析槽）使滤纸条的下缘浸入流动相中约0.5cm深。当溶剂升到20~25cm左右时，取出滤纸，用铅笔标出溶剂的前缘，让其干燥。

#### 四、显 色

如果展开后的斑点不能直接看出，或不能在紫外线下看出荧光，则可喷一种适当的、能与有关组分产生颜色的试剂，使斑点显色。将其置于碘蒸气中显色也是常用的方法，但形成的色斑可能很快会消褪。

### 第九节 薄 层 层 析

薄层层析也是一种吸附层析，它是“一支剖开的层析柱”，实际上就是在一块涂有吸附剂的薄玻璃板上进行操作。作为一种微量的方法，它只需要很少的试样，所费的时间也很少。其操作程序与纸层析相似。

吸附剂层的载体是玻璃板（50×200mm，200×200mm），吸附剂主要是硅胶或氧化铝与石膏的混合物（石膏作粘合剂），加水调成糊状以备铺板。为了获得厚度均匀的涂层（250~500 $\mu$ m），可以使用市售的涂布器。涂好的潮湿薄板于空气中干燥，然后在高温（105~150 $^{\circ}$ C）下活化。吸附层的活性随着含水量的降低而增加。经过活化的层析板在使用前应保存于干燥器内。

将待分离物溶于极性尽可能低的溶剂，配成大约1%浓度的溶液。待分离物质点样量最好经过预试验确定。浓度太高将使分离效果下降并导致拖尾现象。不产生拖尾而能清楚地分离出来的物的质量随吸附剂的活性和厚度而增加。

溶剂的选择可参照表13-4，分离未知的混和物时，可以先用苯或氯仿，根据分离的情况，再考虑改用极性较大或较小的溶

剂。正如纸层析一样，展开可用上升法、下降法或水平径向法等。

层析谱的识别也是利用 $R_f$ 值。当溶剂不变时，其重现性取决于吸附剂活性的稳定性、层析槽内的饱和度、薄层的厚度及温度。

薄层层析可用来鉴定物质、检验反应产物的纯度(均一性)以及定性地掌握反应的进程，故其应用范围与纸层析相当。但和纸层析相比，薄层层析具备一些基本的优点，这主要是：所需的时间较少；能在较小的展开距离下获得清晰的分离效果；可用腐蚀性的试剂，甚至用烘烤使其碳化的方法来显示物质的斑点，以及由于检测的最低极限量约比纸层析低10倍，故试样消耗量也更少。

进行柱层析分离之前，先用薄层层析，以帮助确定条件。但必须记住“完整的”柱的分离效果不如“剖开的柱”，也就是不如层析板。此外，在适当条件下，薄层层析也可用于混合物的制备性分离。

上升法薄层层析的实验程序：

### 一、五块层析板的一次涂布

取20 g 吸附剂，与50 ml 蒸馏水一同置于密闭的三角瓶中，猛烈振荡40 s，将所得的悬浮液立即倾入涂布器，在玻璃板上涂成均匀的薄层(玻璃板已预先顺次排列在工作垫板上)。当薄层由于在空气中干燥而变得不透时(约经15 min)，即可将层析板垂直于干燥箱中活化。

倘若没有适宜的涂布器，则可按下述程序进行：将含有粘合剂的吸附剂悬浮于氯仿中，把悬浮液倒在玻璃板上，尽可能涂匀。溶剂蒸发后(必要时可置于干燥箱中)即可使用。另一种方法是用玻璃棒将不含粘合剂的吸附剂均匀地铺制在玻璃板上，玻璃棒的两端裹有布条或套以塑料管，其厚度与所欲铺制的薄层的厚

度相等，吸附剂层应该是铺在板上，而不是滚压在板上。

上述权宜办法的优点是比较简单，缺点是 $R_f$ 值的重现性较差。

## 二、点 样

用毛细管将样品溶液点在距层析板底边1.5~2cm的水平线上，各点彼此相隔1~2cm，边缘点与层析板侧缘的距离也不小于1.5~2cm。起始的样品点必须尽可能地小(直径2~3mm)，使用不含粘合剂的层析板时，应将样品溶液小心地滴压板上。

标出溶液前缘上升的预定高度(大约10cm)。为了核对分离条件，可将有三种染料(甲基黄、苏丹红G、靛酚)组成的斯他尔试验混合物点于层析板的边缘，并于展开后记录各染料的 $R_f$ 值(或移动距离)。

## 三、展 开

展开在密闭的层析槽内进行，槽内的空间必须为溶剂蒸气所饱和。可将几片滤纸条衬于槽内的内壁并浸及槽内的溶剂，静置约30min。层开时，层析板浸入液体中的深度必须达到5~7mm。

对于不含粘合剂的薄层，应该使用扁平的层析槽，因为吸附层的机械稳定性较差，层析板在扁平的槽内倾斜角较小，可以避免薄层脱落。

## 四、斑点的显色和鉴定

展开之后的层析板置于空气中干燥。对于无色物质，可在紫外线下观察荧光，用碘或溴的蒸气处理，或对它喷以适当的试剂(浓硫酸、酪酸、高锰酸钾/硫酸等)，也可以干烤使其碳化(将层析板加热至300~400℃)。

对于不含粘合剂的薄层，最好趁它仍然潮湿的时候就喷涂显色剂，因为这种薄层不牢，若待干燥之后再行显色，就有可能使



其遭到破坏。

## 第十节 溶液的脱色

溶液脱色的目的，是除去对主要产物的结晶有干扰的有色副产物(一般为分子量较高的化合物)。倘若这些杂质的物理和化学性质与主要产物有显著的差别，便可以加入适当的吸附剂而将其从溶液中选择性地去除，被吸附的杂质连同吸附剂一同弃去。

为了避免主要产物损失，吸附剂的用量必须尽可能减少。极性的溶液可用活性炭脱色，非极性溶液用氧化铝等。只用于水溶液。

搅拌法主要用于活性炭脱色。先以活性炭处理待脱色的溶液，然后再搅拌或沸腾一段时间。将活性炭加入热溶液时必须十分小心，由于过热溶液的暴沸，以及原被活性炭所吸附的空气猛然放出，会产生大量泡沫。

吸附了杂质的吸附剂用过滤法(必要时可以加入助滤剂，如硅藻土)或离心法分离。如有必要，还可重复脱色。以活性炭脱色时应该记住，敏感物质很容易被炭上吸附的氧所氧化，在热溶液中尤其如此。

过滤脱色法主要用于氧化铝等脱色剂，是将吸附剂装在短而粗的柱内，或铺在布氏漏斗或烧结波板漏斗中，再使待脱色的冷溶液通过吸附剂层进行过滤。当整个吸附剂层由无色变为深色时，即表明它已失去吸附作用。

## 第十一节 密度的测定

使用比重瓶的测定法是基于测量已知体积液体的质量。为此，首先将清洁、干燥的比重瓶精密称重至 $\pm 0.001\text{ g}$ ，并注满待测液体，然后塞紧毛细管，直到瓶达到标记位置。必须注意的

是,瓶内不能留有空气气泡,而且待测液体充满比重瓶时的温度须近似地等于此后的测量温度(决不能超过后者)。由于液体的体积与温度的关系很密切,故比重瓶的温度必须利用恒温槽来保持恒定(至 $\pm 0.03^\circ\text{C}$ )。当比重瓶处于恒温槽中时,可用一片干净的吸水纸和纤维织物吸去因膨胀从瓶中排出的液体。此后将比重瓶揩干并加以称重。重复测定一次以减少误差。按下式计算在测定温度下的密度 $D_t'$  (g/ml):

$$D_t' = \frac{G - G_0}{V_t} + 0.0012$$

式中的 $G$ 是充满待测液体的比重瓶在空气中的重量, $G_0$ 为空气比重瓶在空气中的重量, $V_t$ 为比重瓶在测量温度 $t$ 下的容积。按照同样的程序测定重蒸水在 $4^\circ\text{C}$ (或 $t^\circ\text{C}$ )下的密度之后,便能精确地获知比重瓶在 $4^\circ\text{C}$ (或 $t^\circ\text{C}$ )时的容积,因为纯水在 $4^\circ\text{C}$ 时的密度为1,在 $t^\circ\text{C}$ 下的密度可经过校正而求出。

如果使用校正过的比重瓶和温度计,按上述方法测定密度时,精确度可达 $\pm 0.001\text{g/ml}$ 左右。

液体的密度还可以用比重计(液体比重计)加以简单的近似测量。这种方法在实践中用得颇多。例如硫酸和硝酸密度的测定就用这一方法。但这需要较大数量的液体。

## 第十二节 折 光 率

折光率 $n$ 也可以用来鉴定液态物质,并检验其纯度。单色光在两种介质的界面上发生的折射服从于斯内尔定律:

$$\frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = \frac{C_1}{C_2} = n$$

式中的 $C_1$ 和 $C_2$ 分别为光线在介质1和2中的速度。一般是以空气为参比介质的。

折光率在很大程度上与温度有关，对于有机液体，温度每升高 $1^{\circ}\text{C}$ ，折光率大约降低 $4\sim 5\times 10^{-4}$ 。此外，它还随着光的波长而变化（色散）。所以折光率通常是对黄色钠光的谱线（D线， $589\text{nm}$ ）来测定的。温度和谱线的波长标记在 $n$ 的旁边，如 $n^{25}_{\text{D}}$ 。

折光率用折射仪测定，实验室中所用的标准仪器是阿贝折光仪。其测量的原理是测出全反射的极限角。而且仪器的特殊构造使即使采用多色的入射光（例如日光），仍然测得对于D谱线的折光率。测定只需要一小滴液体，精确度可达到 $\pm 0.0001$ 。为了达到这样高的精确度，测定期间必须用恒温槽来使温度保持恒定，温度的变化幅度不应超过 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。最好在 $20^{\circ}\text{C}$ 或 $25^{\circ}\text{C}$ 进行测定，对于低熔点固体，可将温度控制得恰好比它的熔点略低一些。

因为折光率与浓度有关，故折射法也被用来测定溶液的浓度，用作纯度试验和用以检查分离过程，例如分析蒸馏水。如果两种液体混合时体积不发生变化。则该二元混合物的折光率与组分的浓度（单位体积的百分率）呈线性关系，若体积有所增减，折光率与浓度的关系就会偏离直线，此时则须以精确测定的浓度作出校正曲线才行。

### 第十三节 比旋光度

某些化合物在受到线性偏振光的透射时，呈现“光学活性”，它们能将光线的振动平面转一定的角度 $\alpha$ 。当化合物的分子具有不对称结构，它便表现出光学活性来。

偏振面的旋转可能向右（+）（顺时针方向），也可向左（-）。旋转的角度 $\alpha$ 取决于样品溶液的浓度 $C$ （g/ml），光线所穿过的液层长 $l$ （d<sub>m</sub>），温度 $t$ ，以及波长 $\lambda$ 。一定的波长和温度下，可写出下面的关系式：

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100^{\circ}}{Cl}$$

$[\alpha]_D^{25}$ 被称之为比旋光度。一般是用钠光的D线于20℃或25℃进行测定。测定结果写成 $[\alpha]_D^{25}$ 的形式，例如 $[\alpha]_D^{25}$ 。

旋转角 $\alpha$ 用旋光仪测量。目测旋光仪通过单色光源，使单色光偏振化的尼科尔棱镜(起偏镜)以及盛放待测溶液的样品池中的溶液，利用固定在刻度盘上可旋的第二个棱镜(检偏镜)测量光线偏振面的旋转角度。在此期间，通过目镜所观察到视场常为2个或3个亮度不同的扇形区域，必须旋转检偏镜而将其调节到亮度均匀。检偏镜必要的旋转度数即从标尺上读出。为了调整仪器的零点，可以在不装样品管或内装样品管内充满溶剂的情况下按同样的方法测定一次。

这样测出的角度 $+\alpha$ 可以相当于右旋转了 $\alpha$ 度(或 $\alpha+180^\circ$ )，也可以相当于向左旋转了 $180-\alpha$ (或 $360^\circ-\alpha$ )。所以旋转的方向必须经过第二次测量才能确定。这第二次测量是将液层的厚度减半，或溶液的浓度减半之后再进行的。如果此时测得的数值为 $\alpha/2$ 或 $(\alpha/2+90^\circ)$ ，则证明旋转是向右的；而如果测定值变为 $90^\circ-\alpha/2$ (或 $180^\circ-\alpha/2$ )，则证明旋转是向左的。由于比旋光度对温度的依赖关系并不是很大，通常不必使旋光管处于恒温器中，但在精确测定时必须这样。

由于溶质与溶剂的相互作用，溶剂对于诸如缔合或离子化等现象的影响，以及其他一些尚未明了的因素，比旋光度与溶剂的关系很密切，在某些情况下显著地受到浓度的影响。因此对所测出的数值必须标出溶剂和浓度，例如 $[\alpha]_D^{25} = 27.3^\circ$ ，在水中( $c = 0.130\text{g/ml}$ )。

旋光测定法不仅用来鉴定纯的化学性物质，也用来测量溶剂的浓度。例如糖溶液的浓度就是用旋光法测量的(糖量测定法)。

## 第十四节 硅 化

在某些精细的实验中，如处理极少量的DNA，盛装某些贵

重且含量较低的酶等，所使用的玻璃及塑料器皿须进行硅化，以降低可能的吸附。在进行分子克隆操作时常规进行硅化。硅化的方法主要有蒸发法和浸没法。

### 一、蒸发硅化

1. 将待硅化的已洗净的干燥器皿放在一只玻璃真空干燥中；
2. 在干燥器中放一只小烧杯，内盛1ml二氯二甲基硅烷；
3. 抽真空5min；
4. 关闭真空泵，迅速使空气进入干燥器，使气态的二氯二甲基硅烷均匀地弥散；
5. 启动真空泵将干燥器内抽成真空；
6. 关闭阀门，保持干燥器内部真空2h；
7. 打开干燥器，取出玻璃器皿于使用前在160~180℃烘烤2~3h。塑料器皿在使用前用无菌水充分洗涤。

### 二、浸没硅化

1. 将1ml二氯二甲基硅烷溶于49ml氯仿中；
2. 将每个待硅化的试管等物盛满二氯二甲基硅烷氯仿液，放置5min；
3. 重蒸水冲洗；
4. 玻璃器皿在使用前于160~180℃烘烤2~3h；塑料器皿应在60℃烘烤过夜。

## 第十五节 透析袋的准备

1. 将透析袋剪成合适长度。
2. 在一只250ml玻璃烧杯中加入大量的2%碳酸氢钠和1mmol/L EDTA。

3. 将透析袋装入其中，煮沸10min。
4. 用蒸馏水彻底洗涤。
5. 蒸馏水中煮10min或高压灭菌4min。
6. 冷却后4℃存放；在贮存过程中透析管应完全浸于水中。
7. 使用前用蒸馏水清洗透析管内外，操作时用镊子或戴手套。

## 第十六节 天平的使用与维护

常用的分析天平的最大载荷在100g，最低可称量质量为0.1mg。新天平安装调试完毕稳定24h后应保持示值不变，两臂误差不大于3个分度值以及准确反应出标准质量。正确使用分析天平应遵循下列原则：

1. 天平应安放在干燥、配有窗帘的房间内，远离震源、不受气流的影响，放置天平的台最好用水泥台。
2. 定期更换干燥剂，更换后应等待1~2h再使用。
3. 拉动边门要轻缓，以免发生位移。
4. 挥发性及腐蚀性物质的称量应放于称量瓶内进行。
5. 称物总量不应超出天平的最大载荷。
6. 天平不用时，横梁必须与刀口脱离，砝码恢复原状，关严边门，切断电源。
7. 定期检查和校正，方法如下：

(1) 零点的检查及校正 接通电源后，启开天平，在不载重的情况下，检查投影屏上标尺的位置。若零点与投影屏上的标线不能重合，应予调整。若相差3格以内，可挪动开关旋钮附近的微调扳手进行调整；若相差5格以上，则应调节平衡螺丝的位置。

(2) 灵敏度的检查和校正 零点校正后，于天平上加上10mg砝码，开启天平，从投影屏上观察移动情况。新安装的天平应移

动 99~101 格；使用中的天平应移动 98~102 格。如低于上述范围，应将重心球的下半球上旋；如高于上述范围则应将重心球的上半球下旋。

(3) 示值变动性误差的检查 在空盘时连续测定零点两次，记录读数，两个盘中各加 20 g 砝码，反复开、关数次，取出砝码，再连续测定零点两次。求出两次测定的最大差异；分析天平的示值变动性误差不得大于 2 个分度（1 格）。

## 第十七节 分光光度计波长的校正

1. 配制 0.1 mol/L 高锰酸钾溶液。

2. 取 2 ml 0.1 mol/L 高锰酸钾溶液放入 100 ml 容量瓶中，加蒸馏水定容。

3. 以蒸馏水为空白，用 1 cm 比色皿在 460~570 nm 波长测定 2 mmol/L 高锰酸钾溶液光密度并绘制吸收曲线，其最大吸收峰应在 525 nm 处。

4. 若波长误差大于 10 nm，应进行校正。

5. 若需调整波长，可按下列步骤进行：

(1) 将波长盘的外盖取下，旋松波长盘上的固定螺丝；

(2) 移动波长盘，使其波长与特征吸收峰相吻合。

## 附 录

### 一、实验室安全及防护知识

#### (一) 实验室安全知识

在微生物学实验室中，经常使用有毒性、腐蚀性、易燃烧的化学物品，常使用易碎的玻璃和瓷质器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行工作。因此，必须十分重视安全工作。

1. 进入实验室开始工作前应了解煤气总阀门、水阀门及电闸所在处。离开实验室时，一定要将室内检查一遍，应将水、电、煤气开关关好，门窗锁好。

2. 使用煤气灯时，应先将火柴点燃，一手执火柴紧靠灯口，一手慢开煤气门。不能先开煤气门，后燃火柴。灯焰大小和火力强弱应根据实验的需要来调节。用火时，应做到火着人在，人走火灭。用酒精灯和喷灯时，也应按操作规程进行。

3. 使用电器设备(如烘箱、恒温水浴、离心机、电炉等)时，严防触电；绝不可用湿手或在眼睛旁视时开关电闸和电器开关。检查电器设备是否漏电时，应将手背轻轻触及电器表面，有麻感时即为漏电。凡是漏电的设备，一律不能使用。实验室应备有诸如测电笔等常用检测工具。

4. 使用浓酸、浓碱，操作时谨防溅失。用吸管量取这些试剂时，必须使用橡皮球，绝对不能用口吸取。若不慎溅在实验台或地面上，必须及时用湿布擦洗干净。如果触及皮肤应及时治疗。进工作室应穿着工作服。

5. 使用可燃物，特别是易燃物应特别小心。不要大量放在



桌上，更不应放在靠近火焰处，只有远离火源时，或将火焰熄灭后，方可大量倾倒这类液体。低沸点的有机溶剂不允许在火焰上直接加热，只能在水浴上利用回流冷凝管加热或蒸馏。

6. 如果不慎倾出大量的易燃液体，则应按下列法处理：

(1) 立即关闭室内所有的火焰和电加热器。

(2) 关门、开启小窗及窗户。

(3) 用毛巾或抹布擦拭撒出的液体，并将液体拧到大的容器中，然后再倒入带塞的玻璃瓶中。

7. 用油浴时，应小心加热，不断用温度计测量，不使用超过油的燃烧点的温度。

8. 易燃易爆和有毒物质的残渣不得倒入污物桶或水槽中，应收集在指定的容器内，妥善处理。

9. 使用过的培养基、培养物应及时灭菌后再弃去。一些诱变剂在诱变作用完后应用化学药物使其失效（如加入硫代硫酸钠溶液等），然后弃去。

10. 废液，特别是强碱和强酸不能直接倒在水槽中，应先稀释，然后倒入水槽中，再用大量自来水冲洗水槽及下水道。

11. 毒物应按实验室的规定，办理审批手续后领取，使用时严格操作，用后妥善处理。

## (二) 灭火法

实验室一旦发生火灾切不可惊慌失措，应保持镇静。首先立即切断室内一切火源和电源，然后根据具体情况积极正确地进行抢救和灭火。常用的方法有：

1. 在可燃液体燃着时，应立刻拿开着火区域内的一切可燃物质，关闭通风器，防止扩大燃区。若着火面积较小，可用湿棉布，湿布、金属片或沙土覆盖，隔绝空气使之熄灭。但覆盖时要轻，避免破坏或打翻盛有易燃溶剂的玻璃皿，导致更多的溶剂流出而再着火。

2. 酒精及其他可溶于水的液体着火时，可用水灭火。

3. 汽油、乙醚、甲苯等有机溶剂着火时，应使用湿棉布或沙土扑灭。绝不能用水，否则反而会扩大燃烧面积。

4. 导线着火时不能用水及二氧化碳灭火器，应切断电源或用四氯化碳灭火器。

附表 1 某些物质燃烧时应用的灭火剂

燃 烧 物 质	应 用 灭 火 剂
苯胺	泡沫 二氧化碳
乙炔	水蒸汽 二氧化碳
丙酮	泡沫 二氧化碳 四氯化碳
松节油	喷射水 泡沫
火漆	水
磷	砂 二氧化碳 泡沫 水
硝基化合物	泡沫
氯乙烷	泡沫 二氧化碳
钾、钠、钙、镁	砂
松香	水 泡沫
苯	泡沫 二氧化碳 四氯化碳
重油、润滑油、植物油、石油	喷射水 泡沫
蜡、石蜡、二硫化碳	喷射水 二氧化碳
漆	泡沫
煤油	泡沫 二氧化碳 四氯化碳
橡胶	水
纤维素	水
赛璐珞	水
醚类(高沸点, 175℃以上)	水
醚类(低沸点, 175℃以下)	泡沫 二氧化碳
醇类(沸点>175℃)	水
醇类(沸点<175℃)	泡沫 二氧化碳

5. 衣服被烧着时切忌奔走，可用衣服、大衣等包裹身体或躺在地上滚动以灭火。

6. 发生火灾时应注意保护现场，较大的着火事故应立即报

警。

附表 1 列出了某些物质燃烧时应用的灭火剂。

### (三) 急救

在实验过程中不慎发生受伤事故，应立即采取适当的急救措施。

1. 被玻璃割伤及其他机械损伤：首先必须检查伤口内有无玻璃或金属碎片，然后用硼酸水洗净，再涂擦碘酒或红汞，必要时用纱布包扎。若伤口较大或过深而大量出血，应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血并立即到医院诊治。

2. 烫伤 一般用浓的 (90~95%) 酒精消毒后，涂上苦味酸软膏。如果伤处红、痛或红肿 (I°灼伤)，可擦医用橄榄油或用棉花沾酒精敷盖伤处；若皮肤起泡 (II°灼伤)，不要弄破水泡，防止感染；若伤处皮肤呈棕色或黑色 (III°灼伤)，应用干燥无菌的纱布轻轻包扎好，急送医院治疗。I°及II°灼伤，若面积较大或部位重要 (如面部) 也应及时去医院治疗。

3. 强碱 (如氢氧化钠、氢氧化钾) 等触及皮肤而引起灼伤时，要先用大量自来水冲洗，再以5%硼酸氢钠或2%醋酸溶液涂洗。

4. 强酸、溴等触及皮肤灼伤时，应立即用大量自来水冲洗，再以5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。

5. 如酚触及皮肤引起灼伤，可用酒精洗涤。

6. 若煤气中毒时，应到室外呼吸新鲜空气，若严重时应立即到医院诊治。

7. 水银容易由呼吸道进入人体，也可经皮肤直接吸收而引起积累性中毒。严重中毒的征象是口中有金属味，呼出气体也有气味；流唾液，牙床及嘴唇上有硫化汞的黑色；淋巴腺及唾腺肿大。若不慎中毒时，应送医院急救。急性中毒时，通常用碳粉或呕吐剂彻底洗胃，或者食入蛋白 (如1L牛奶加3个鸡蛋清) 或蓖麻油解毒并使之呕吐。

8. 触电时可按下述方法之一切断电源，然后实措抢救。

(1) 关闭电源，(2) 用干木棍使导线与受害者分开，(3) 使受害者和土地分离。急救时急救者必须做好防止触电的安全措施，手或脚必须绝缘。

## 二、实验室常识

(一) 挪动干净玻璃仪器时，勿使手指接触仪器内部。

(二) 量筒、量杯、量瓶等量器不要用来做盛器。带玻璃塞的仪器和玻璃瓶等，如暂时不使用，要用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

(三) 洗净的仪器要放在架上或干净纱布上晾干，不能用抹布擦拭，更不能用抹布擦拭仪器内壁。

(四) 不要用棉花代替橡皮塞或木塞堵瓶口或试管口。盛装碱性溶液或物质的玻璃器要用橡皮塞。

(五) 不要用纸片覆盖烧杯和锥形瓶等。

(六) 不要用滤纸称量样品，更不能用滤纸作记录。

(七) 不要用石蜡封闭精细药品的瓶口，以免掺混。

(八) 标签纸的大小应与容器相称，或用大小相当的白纸，绝对不能用滤纸。标签上要写明物质名称、规格和浓度、配制日期及配制人。标签应贴在试剂瓶或烧杯的2/3处，试管等细长形的容器则贴在上部。用记号笔立即标记时也应在相应位置书写。

(九) 使用铅笔写标记时，要在玻璃仪器的磨砂玻璃处。如用玻璃蜡笔，则写在玻璃容器的光滑面上，若写不上，说明表面不干净，需重洗。

(十) 取用试剂和标准溶液后，需立即将瓶塞严，放回原处。取出的试剂和标准溶液，如未用尽，切勿倒回瓶内，以免掺混。

(十一) 凡是发生烟雾、有毒气体和有臭味的气体的实验，如使用诱变剂、消化等，均应在通风橱内进行。橱门应紧闭，非必要时不能打开。

(十二) 用实验动物进行实验时，不许戏弄动物。进行杀死或

附表 2

在标准温度20℃时标准

容 量 (ml)	标准容量的						
	一等容量瓶		二等容量瓶		量筒		量杯
	量入式	量出式	量入式	量出式	量入式	量出式	量出式
2000±	0.50	1.00	1.00	2.00	6.0	12.0	
1000±	0.30	0.60	0.60	1.00	4.0	8.0	10.0
500±	0.15	0.30	0.30	0.60	2.0	4.0	6.0
250±	0.10	0.20	0.20	0.40	1.0	2.0	3.0
200±	0.10	0.20	0.20	0.40			
100±	0.10	0.20	0.20	0.40	0.4	0.8	1.5
50±	0.05	0.10	0.10	0.20	0.3	0.6	1.0
40±							
25±	0.03	0.06	0.06	0.12	0.2	0.4	0.6
20±							
15±							
11±							
10±	0.02	0.04			0.2	0.4	0.6
5±					0.2	0.4	
4±							
2±							
1±							
0.5±							
0.2±							
0.1±							

### 容量的允许误差

允许误差 (ml)

直通活门 滴管及微 量滴管		侧边活门 滴管及无 活门滴管		吸 管				
一等	二等	一等	二等	无分度只有 一标线者		有分度者和无分 度有二标线者		有分度完全流 出式微量吸管
				一等	二等	一等	二等	
0.10	0.20	0.12	0.24	0.08	0.16	0.10	0.20	
0.05	0.10	0.06	0.12	0.05	0.12	0.08	0.16	
				0.05	0.12	0.08	0.16	
0.03	0.06	0.05	0.10	0.04	0.10	0.06	0.10	
				0.03	0.06	0.04	0.06	
				0.03	0.06	0.04	0.06	
				0.02	0.04	0.03	0.06	
0.020	0.040			0.02	0.04	0.03	0.06	
0.010	0.030			0.01	0.03	0.02	0.04	
				0.01	0.03	0.02	0.04	
0.006	0.015			0.006	0.015	0.01	0.02	
0.006	0.015			0.006	0.015	0.01	0.02	
				0.006	0.015	0.01	0.02	
								0.002
								0.001

解剖操作，必须按照规定方法进行。绝对不能用动物、手术器械或药物开玩笑。

(十三)使用贵重和精密仪器，如分析天平、分光光度计、酸度计、冷冻离心机等应十分注意加倍爱护。使用前，应熟知使用方法，严格按操作步骤进行。若有问题，随时请教。发生故障时，应立即关闭仪器，告知管理人员，不得擅自拆修。

(十四)一般容量仪器的容积都是在 $20^{\circ}\text{C}$ 下校准的。使用时如温度差异在 $5^{\circ}\text{C}$ 以内，容积改变不大，可以忽略不计。现将我国国家科学技术委员会计量局制定的容量仪器标准容量的允许误差列于附表 2。

### 三、玻璃器皿的洗涤及各种洗液的配制

实验中所使用的玻璃器皿清洁与否，直接影响实验结果，往往由于器皿的不清洁或被污染而造成较大的实验误差，甚至会出现相反的实验结果。因此，玻璃器皿的洗涤清洁工作是非常重要的。

#### (一)初用玻璃器皿的清洗

新购买的玻璃器皿表面常附着有游离的碱性物质，可先用肥皂水(或去污粉)洗刷，再用自来水洗净，然后浸泡在 $1\sim 2\%$ 盐酸溶液中过夜(不少于4h)，再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 $2\sim 3$ 次，在 $100\sim 130^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干备用。

#### (二)使用过的玻璃器皿的清洗

1. 一般玻璃器皿 如试管、烧杯、锥形瓶等(包括量筒)。先用自来水洗刷至无污物，再选用大小合适的毛刷沾取去污粉(掺入肥皂粉)刷洗或浸入肥皂水内。将器皿内外，特别是内壁，细心刷洗，用自来水冲洗干净后再用蒸馏水洗 $2\sim 3$ 次，烘干或倒置在清洁处，干后备用。凡洗净的玻璃器皿，不应在器壁上带有水珠，否则表示尚未洗干净，应再按上述方法重新洗涤。若发现内壁有难以去掉的污迹，应分别使用下述的各种洗涤剂予以清除，

再重新冲洗。

2. 量器 如吸量管、滴定管、量瓶等。使用后应立即浸泡于凉水中，勿使物质干涸。工作完毕后用流水冲洗，以除去附着的试剂、蛋白质等物质，晾干后浸泡在铬酸洗液中4~6h（或过夜），再用自来水充分冲洗，最后用蒸馏水冲洗2~4次，风干备用。

3. 其他 具有传染性样品的容器，如分子克隆、病毒沾污过的容器，常规先进行高压灭菌或其他形式的消毒，再进行清洗。盛过各种毒品，特别是剧毒药品和放射性同位素物质的容器，必须经过专门处理，确知没有残余毒物存在时方可进行清洗。否则使用一次性容器。

### (三) 洗涤液的种类和配制方法

1. 铬酸洗液(重铬酸钾-硫酸洗液，简称洗液或清洁液) 广泛用于玻璃器皿的洗涤，常用的配制方法有以下4种：

(1) 取100ml工业浓硫酸置于烧杯内，小心加热，然后慢慢地加入5g重铬酸钾粉末，边加边搅拌，待全部溶解后冷却，贮于带玻璃塞的细口瓶内。

(2) 称取5g重铬酸钾粉末置于250ml烧杯中，加水5ml，尽量使其溶解。慢慢加入100ml浓硫酸，边加边搅拌，冷却后贮存备用。

(3) 称取80g重铬酸钾，溶于1000ml自来水中，慢慢加入工业浓硫酸1000ml，边加边搅拌。

(4) 称取200g重铬酸钾，溶于500ml自来水中，慢慢加入工业浓硫酸500ml，边加边搅拌。

2. 浓盐酸(工业用) 可洗去水垢或某些无机盐沉淀。

3. 5%草酸溶液 可洗去高锰酸钾的痕迹。

4. 5~10%磷酸三钠( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )溶液 可洗涤油污物。

5. 30%硝酸溶液 洗涤 $\text{CO}_2$ 测定仪器及微量滴管。



6. 5~10% 乙二铵四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 加热煮沸可洗去玻璃器皿内壁的白色沉淀物。

7. 尿素洗涤液 为蛋白质的良好溶剂, 适用于洗涤盛蛋白质制剂及血样的容器。

8. 酒精与浓硝酸混合液 最适合于洗净滴定管, 在滴定管中加入3ml酒精, 然后沿管壁慢慢加入4ml浓硝酸(相对密度 1.4), 盖住滴定管管口。利用所产生的氧化氮洗净滴定管。

9. 有机溶液 如丙酮、乙醇、乙醚等可用于洗脱油脂、脂溶性染料等污痕。二甲苯可洗去油漆污垢。

10. 氢氧化钾-乙醇溶液和含有高锰酸钾的氢氧化钠溶液 是两种强碱性的洗涤液, 对玻璃器皿的侵蚀性很强, 清除容器内壁污垢, 洗涤时间不宜过长。使用时应小心谨慎。

上述洗涤液可多次使用, 但使用前必须将待洗涤的玻璃器皿先用水冲洗多次, 除去肥皂液、去污粉或各种废液。若仪器上有凡士林或羊毛脂时, 应先用软纸擦去, 然后再用乙醇或乙醚擦净。否则会使洗涤液迅速失效。例如肥皂水、有机溶剂(乙醇、甲醛等)及少量油污物均会使重铬酸钾-硫酸液变绿, 降低洗涤能力。

#### (四) 细胞培养级玻璃器皿的洗涤处理

1. 按上述方法对玻璃器皿进行初洗, 凉干。
2. 将玻璃器皿浸泡入洗液中, 24~48h。注意玻璃器皿内应全部充满洗液, 操作时小心勿将洗液溅到衣服及身体各部。
3. 取出, 沥去多余的洗液。
4. 自来水充分冲洗。
5. 排列6桶水, 前3桶为去离子水, 后3桶为去离子双蒸水。
6. 将玻璃器皿依次过6桶水, 玻璃器皿在每桶中过6~8次。
7. 倒置, 60℃烘干。
8. 用硫酸纸包扎, 160℃干烤3h。

#### 四、缓冲液

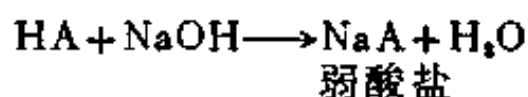
由具有酸或碱相同的离子的物质所组成的溶液。在加入一定量的酸或碱时，其氢离子浓度改变甚微或几乎不变。此种溶液称为缓冲溶液，这种作用称为缓冲作用，其溶液内所含物质称为缓冲剂。

缓冲剂组成多为弱酸及这种弱酸与强碱所组成的盐，或弱碱及这种弱碱与强酸所组成的盐，调节两者比例可配成各种 pH 的缓冲液。

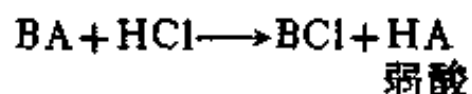
例如，某一缓冲液由弱酸 (HA) 及其弱酸盐 (BA) 所组成，它的解离方程式如下：



若向缓冲溶液中加入碱 (NaOH)，则：



若向缓冲溶液中加入酸 (HCl)，则：



由此可见，向缓冲液中加碱或酸，主要的变化就是溶液内弱酸 (HA) 的增加或减少。由于弱酸 (HA) 的解离度很小，所以它的增加或减少对溶液内氢离子浓度改变不大，因而起到缓冲作用。

例一：醋酸钠 (NaAc) 与醋酸 (HAc) 缓冲液  
加入盐酸溶液，其缓冲作用：

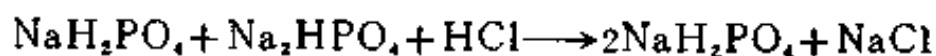


加入氢氧化钠溶液，其缓冲作用：

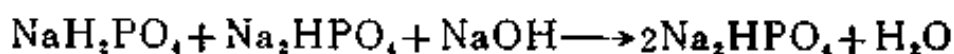


例二：磷酸钠缓冲液

加入盐酸溶液，其缓冲作用：



加入氢氧化钠溶液，其缓冲作用：



(一) 一些常用缓冲剂的解离常数 ( $pK_a$ )

缓 冲 液	$pK_a^*$
二甲胺	0.85
草酸, $K_1$	1.30
顺丁烯二酸, $K_1$	1.92
磷酸, $K_1$	1.96
EDTA, $K_1$	2.00
甘氨酸, $K_1$	2.45
EDTA, $K_2$	2.67
吡啶, $K_1$	2.80
丙二酸, $K_1$	2.85
苯二甲酸, $K_1$	2.90
酒石酸, $K_1$	2.93
延胡索酸, $K_1$	3.02
柠檬酸, $K_1$	3.10
甘氨酸甘氨酸, $K_1$	3.15
$\alpha, \beta$ -二甲基戊二酸, $K_1$	3.66
甲酸	3.75
巴比妥酸	3.79
乳酸	3.89
琥珀酸, $K_1$	4.18
苯甲酸	4.20
草酸, $K_2$	4.26
酒石酸, $K_2$	4.37
延胡索酸, $K_2$	4.39
乙酸	4.73
柠檬酸, $K_2$	4.75
苹果酸, $K_2$	5.05
吡啶, $K_1$	5.19
苯二甲酸, $K_2$	5.40
琥珀酸, $K_2$	5.60

续表

缓 冲 液	$pK_a^*$
丙二酸, $K_1$	5.66
羟胺	6.09
组氨酸, $K_1$	6.10
二甲胂酸	6.15
EDTA, $K_1$	6.16
$\alpha, \beta$ -二甲基戊二酸, $K_1$	6.20
顺丁烯二酸, $K_1$	6.22
碳酸, $K_1$	6.35
柠檬酸, $K_1$	6.40
4-或5-羟甲基咪唑	6.40
焦磷酸, $K_1$	6.54
砷酸, $K_1$	6.60
磷酸, $K_1$	6.70
咪唑	6.95
2-氨基嘌呤	7.14
乙二胺, $K_1$	7.30
2,4,6-三甲吡啶	7.32
4-或5-甲基咪唑	7.52
三乙醇胺	7.77
二乙基巴比妥酸	7.98
Tris	8.08
甘氨酸甘氨酸, $K_1$	8.13
2,4-或2,5-二甲基咪唑	8.36
焦磷酸, $K_2$	8.44
2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇	8.67
吡啶, $K_1$	8.85
二乙醇胺	8.88
精氨酸, $K_1$	9.04
硼酸	9.23
氢氧化铵	9.30
乙醇胺	9.44
甘氨酸, $K_2$	9.60
三甲胺	9.87
乙二胺, $K_2$	10.11

续表

缓 冲 液	$pK_a^*$
EDTA, $K_4$	10.26
碳酸, $K_2$	10.32
乙胺	10.67
甲胺	10.70
二甲胺	10.70
二乙胺	11.00
哌啶, $K_2$	11.12
磷酸, $K_2$	12.32
精氨酸, $K_3$	12.50

\*  $pK_a = -\lg K_a$ ,  $K_a$ : 电离常数

## (二) 常用缓冲溶液配制方法

### 1. 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液

pH	0.2mol/L $Na_2HPO_4$ (ml)	0.1mol/L 柠檬酸 (ml)
2.2	0.40	19.60
2.4	1.24	18.76
2.6	2.18	17.82
2.8	3.17	16.83
3.0	4.11	15.89
3.2	4.94	15.06
3.4	5.70	14.30
3.6	6.44	13.56
3.8	7.10	12.90
4.0	7.71	12.29
4.2	8.28	11.72
4.4	8.82	11.18
4.6	9.35	10.65
4.8	9.86	10.14
5.0	10.30	9.70
5.2	10.72	9.28
5.4	11.15	8.85
5.6	11.60	8.40

续表

pH	0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (ml)	0.1 mol/L 柠檬酸 (ml)
5.8	12.03	7.91
6.0	12.63	7.37
6.2	13.33	6.78
6.4	13.85	6.15
6.6	14.55	5.45
6.8	15.45	4.55
7.0	16.47	3.53
7.2	17.39	2.61
7.4	18.17	1.83
7.6	18.73	1.27
7.8	19.15	0.85
8.0	19.45	0.55

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  MW=178.05; 0.2mol/L 溶液为 35.61g/L

柠檬酸  $\cdot \text{H}_2\text{O}$  MW=210.14; 0.1mol/L 溶液为 21.01g/L

## 2. 柠檬酸缓冲液(0.1mol/L)

pH	0.1mol/L 柠檬酸 (ml)	0.1mol/L 柠檬酸钠 (ml)
3.0	18.6	1.4
3.2	17.2	2.8
3.4	16.0	4.0
3.6	14.9	5.1
3.8	14.0	6.0
4.0	13.1	6.9
4.2	12.3	7.7
4.4	11.4	8.6
4.6	10.3	9.7
4.8	9.2	10.8
5.0	8.2	11.8
5.2	7.3	12.7
5.4	6.4	13.6
5.6	5.5	14.5
5.8	4.7	15.3
6.0	3.8	16.2

续表

pH	0.1mol/L 柠檬酸 (ml)	0.1mol/L 柠檬酸钠 (ml)
6.2	2.8	17.2
6.4	2.0	18.0
6.6	1.4	18.6

柠檬酸( $C_6H_8O_7$ )· $H_2O$  MW=210.14; 0.1mol/L 溶液为 21.01g/L

柠檬酸钠 ( $Na_3C_6H_5O_7$ )· $H_2O$  MW=294.12; 0.1mol/L 溶液为 29.41g/L

### 3. 醋酸缓冲液(0.2mol/L)

pH	0.2mol/L NaAc (ml)	0.2mol/L HAc (ml)
3.6	0.75	9.25
3.8	1.20	8.80
4.0	1.80	8.20
4.2	2.65	7.35
4.4	3.70	6.30
4.6	4.90	5.10
4.8	5.90	4.10
5.0	7.00	3.00
5.2	7.90	2.10
5.4	8.60	1.40
5.6	9.10	0.90
5.8	9.40	0.60

NaAc· $3H_2O$  MW=136.09; 0.2mol/L 溶液为 27.22g/L

冰醋酸 (相对密度 1.049) MW=60.05; 0.2mol/L 溶液为 11.46ml/L

### 4. 磷酸缓冲液

#### (1) 磷酸钠缓冲液(0.2mol/L)

pH	0.2mol/L $Na_2HPO_4$ (ml)	0.2mol/L $NaH_2PO_4$ (ml)
5.8	8.0	92.0
5.9	10.0	90.0
6.0	12.3	87.7
6.1	15.0	85.0
6.2	18.5	81.5

续表

pH	0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (ml)	0.2mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (ml)
6.3	23.5	77.5
6.4	26.5	73.5
6.5	31.5	68.5
6.6	37.5	62.5
6.7	43.5	56.5
6.8	49.0	51.0
6.9	55.0	45.0
7.0	61.0	39.0
7.1	67.0	33.0
7.2	72.0	28.0
7.3	77.0	23.0
7.4	81.0	19.0
7.5	84.0	16.0
7.6	87.0	13.0
7.7	89.5	10.5
7.8	91.5	8.5
7.9	93.0	7.0
8.0	94.7	5.3

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  MW=178.05; 0.2mol/L 溶液为 35.61g/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  MW=358.22; 0.2mol/L 溶液为71.64g/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  MW=138.01; 0.2mol/L 溶液为27.6g/L

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  MW=156.03; 0.2mol/L 溶液为 31.21g/L

(2) 磷酸钾缓冲液(0.1mol/L)

pH	0.1mol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ml)	0.1mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3



续表

pH	0.1mol/L $K_2HPO_4$ (ml)	0.1mol/L $KH_2PO_4$ (ml)
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

$K_2HPO_4$  MW=174.18; 0.1mol/L 溶液含 17.4g/L

$KH_2PO_4$  MW=136.09; 0.1mol/L 溶液含 13.6g/L

(3) 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4)

NaCl	8.0 g	KCl	0.2 g
$KH_2PO_4$	0.2 g	蒸馏水	1000ml
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.9 g		

(4) 磷酸氢二钠-磷酸二氢钾缓冲液 (1/15mol/L)

pH	1/15mol/L $Na_2HPO_4$ (ml)	1/15mol/L $KH_2PO_4$ (ml)
4.92	0.10	9.90
5.29	0.50	9.50
5.91	1.00	9.00
6.24	2.00	8.00
6.47	3.00	7.00
6.64	4.00	6.00
6.81	5.00	5.00
6.98	6.00	4.00
7.17	7.00	3.00
7.38	8.00	2.00
7.73	9.00	1.00
8.04	9.50	0.50
8.34	9.75	0.25
8.67	9.90	0.10
9.18	10.00	0

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  MW=178.05; 1/15mol/L 溶液为 11.87g/L

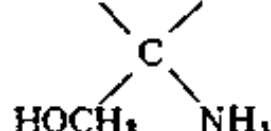
$KH_2PO_4$  MW=136.09; 1/15mol/L 溶液为 9.078g/L

5. Tris缓冲液 (0.05mol/L, 25℃)

50ml 0.1mol/L Tris (三羟甲基氨基甲烷) 溶液与 Xml 0.1mol/L 盐酸混匀后, 加水稀释至100ml。

pH	X(ml)	pH	X(ml)
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

Tris:  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  MW=121.14; 0.1mol/L 溶液为12.114g/L。



Tris溶液可从空气中吸收二氧化碳, 使用时注意将瓶盖严。

浓盐酸(相对密度1.18, 36%) MW=36.5, 0.1mol/L溶液为 8.4ml/L

### 6. 甘氨酸-HCl缓冲液 (0.05mol/L)

50ml 0.2mol/L甘氨酸溶液中加入 Xml 0.2mol/L HCl, 加水稀释至200ml。

pH	X (ml)	pH	X(ml)
2.2	44.0	3.0	11.4
2.4	32.4	3.2	8.2
2.6	24.2	3.4	6.4
2.8	16.8	3.6	5.0

甘氨酸, MW=75.07; 0.2mol/L溶液为15.01g/L

浓盐酸, 0.2mol/L溶液为 16.8ml/L

7. 碳酸盐缓冲液 (0.1mol/L) ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  存在时不得使用)

pH		0.1mol/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	0.1mol/L NaHCO <sub>3</sub> (ml)
20°C	37°C		
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O MW=286.2; 0.1mol/L溶液为 28.62g/L

NaHCO<sub>3</sub> MW=84.0; 0.1mol/L溶液为 8.40g/L

### 8. 巴比妥缓冲液 (0.04mol/L, 18°C)

pH	0.04mol/L巴比妥钠盐 (ml)	0.2mol/L HCl (ml)
6.8	100	18.4
7.0	100	17.8
7.2	100	16.7
7.4	100	15.3
7.6	100	13.4
7.8	100	11.47
8.0	100	9.39
8.2	100	7.21
8.4	100	5.21
8.6	100	3.82
8.8	100	2.52
9.0	100	1.65
9.2	100	1.13
9.4	100	0.70
9.6	100	0.35

巴比妥钠盐 MW=206.18; 0.04mol/L 溶液为 8.25g/L

## 五、一些有机物质的性质

### (一) 氨基酸

中文名称	缩写	分子量	熔点* (°C)	溶解度 (25°C)	等电点	pKa(25°C)
DL-丙氨酸	Ala	89.09	295d	16.6	6.00	(1) 2.35 (2) 9.69
L-丙氨酸	Ala	89.09	297d	16.65	6.00	
DL-精氨酸	Arg	174.20	238d		10.76	(1) 2.17(-COOH) (2) 9.04(-NH <sub>2</sub> ) (3) 12.48(胍基)
L-精氨酸		174.20	244d	15.0 (21°C)	10.76	
DL-天冬酰胺	Asn	132.12	213~ 215d	2.16		(1) 2.02 (2) 8.8
L-天冬酰胺		132.12	236d	2.989		
L-天冬氨酸	Asp	133.10	269~ 277	0.5	2.77	(1) 2.09(α-COOH) (2) 3.86(β-COOH) (3) 9.82(-NH <sub>2</sub> )
L-瓜氨酸	Cit	175.19	234~ 237d	易溶		
L-半胱氨酸	Cys	121.15		易溶	5.07	(1) 1.17 (2) 8.33(-NH <sub>2</sub> ) (3) 10.78(-SH)
DL-胱氨酸	Cyss	240.29	269	0.0049	5.05	(1) 1.65(2) 2.26 (3) 7.85 (4) 9.85
L-胱氨酸		240.29	258~ 261d	0.011	5.05	
DL-谷氨酸	Glu	147.13	225~ 227d	0.054	3.22	(1) 2.19 (2) 4.25 (3) 9.67
L-谷氨酸		147.13	247~ 249d	0.864	3.22	
L-谷氨酰胺	Gln	146.15	184~ 185	4.25		(1) 2.17 (2) 9.13
甘氨酸	Gly	75.07	292d	24.99	5.97	(1) 2.34 (2) 9.6
DL-组氨酸	His	155.15	285~ 286d	易溶		(1) 1.82(-COOH) (2) 6.0(咪唑基) (3) 9.17(-NH <sub>2</sub> )
L-组氨酸		155.15	277d	4.16		

续表

中文名称	缩写	分子量	熔点* (°C)	溶解度 (25°C)	等电点	pKa(25°C)
L-羟脯氨酸	Hyp	131.13	270d	36.11	5.83	(1) 1.92 (2) 9.73
DL-异亮氨酸	Ile	131.17	292d	2.229	6.02	(1) 2.36 (2) 9.73
L-异亮氨酸		131.17	285~ 286d	4.12	6.02	
DL-亮氨酸	Leu	131.17	332d	0.991	5.98	(1) 2.36 (2) 9.80
L-亮氨酸		131.17	237d	2.19	5.93	
DL-赖氨酸	Lys	146.19			9.74	(1) 2.18 (2) 8.95( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ) (3) 10.50( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> )
L-赖氨酸		146.19	224d	易溶	9.74	
DL-蛋氨酸	Met	149.21	281	3.38	5.74	(1) 2.28 (2) 9.21
L-蛋氨酸		149.21	283d	易溶	5.74	
DL-苯丙氨酸	Phe	165.19	318~ 320d	1.42	5.48	(1) 1.83 (2) 6.13
L-苯丙氨酸		165.19	283~ 284d	2.96	5.48	
DL-脯氨酸	Pro	115.13	213	易溶	6.30	(1) 1.99 (2) 10.6
L-脯氨酸		115.13	220~ 222d	162.3	6.30	
DL-丝氨酸	Ser	105.09	246d	5.02	5.68	(1) 2.21 (2) 9.15
L-丝氨酸		105.09	223~ 228d	25.00 (20°C)	5.68	
DL-苏氨酸	Thr	119.12	235d	20.1	6.16	(1) 2.63 (2) 10.43
L-苏氨酸		119.12	253d	易溶	6.16	
DL-色氨酸	Trp	204.22	283~ 285	0.25 (30°C)	5.89	(1) 2.38 (2) 9.39
L-色氨酸		204.22	281~ 282	1.14	5.89	
DL-酪氨酸	Tyr	181.19	316	0.0351	5.66	(1) 2.20(-COOH) (2) 9.11(-NH <sub>2</sub> ) (3) 10.07(-OH)
L-酪氨酸		181.19	342.4d	0.045	5.66	
DL-缬氨酸	Val	117.15	263d	7.04	5.96	(1) 2.32 (2) 9.62
L-缬氨酸		117.15	315d	8.85 (20°C)	5.96	

\* d 代表达到熔点后分解。

## (二) 一些糖类的物理常数

名称	分子量	物理状态	相对密度 (20°C)	熔点*(°C)	溶解度 (20°C)
L-木糖	150.13	白色晶体有甜味	1.535	153~154	117
D-核糖	150.13	白色晶体有甜味		87	溶
糊精	(162.14) <sub>n</sub>	黄色或白色无定形粉末	1.038		稍溶
纤维素	(162.14) <sub>n</sub>	白色无臭无味细纤维状	1.3~1.4		易溶于热水, 不溶于醇
淀粉	(162.14) <sub>n</sub>	白色无臭无味粉末	1.499~1.513		不溶
D-果糖	180.16	白色晶体或粉末, 很甜	1.60	103~105d	易溶
D-半乳糖	180.16	白色晶体		165~168	易溶于热水
L-葡萄糖	180.16	无色或白色粉末, 有甜味带苦	1.544	146d	82(17.5°C)
甘露醇	180.16	白色晶体粉末, 味甜而带苦	1.539	132d	348(17°C)
山梨糖	180.16	白色晶体或结晶粉末, 甜味	1.654	165	55(17°C)
麦芽糖	342.30	白色晶体, 甜度为蔗糖的40%	1.540	102~103	溶
纤维二糖	342.30	无色晶体或粉末		225d	溶
乳糖	342.30	白色晶体或粉末, 甜度为葡萄糖的76%	1.525	120	17(冷水) 40(热水)
蔗糖	342.30	无色或白色晶体	1.588	170~186d	易溶

\* d 代表达到熔点分解。

## (三) 一些有机酸的物理常数

名称	分子量	物理状态	相对密度 (20°C)	熔点* (°C)	沸点 (°C)	折光率 (n <sub>D</sub> <sup>20</sup> )	溶解度 (25°C)
丙酸	74.08	无色有刺激性液体	0.992	-20.8	140.7	1.3874	∞
L-乳酸	90.08	无色液体或固体	1.249	26			∞
延胡索酸	116.07	白色结晶粉末	1.635	286~287	200 升华		稍溶于冷水 易溶于热水

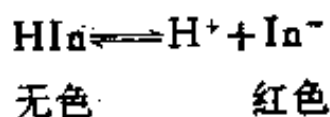
续表

名称	分子量	物理状态	相对密度 (20°C)	熔点* (°C)	沸点 (°C)	折光率 (n <sub>D</sub> <sup>20</sup> )	溶解度 (25°C)
琥珀酸	118.09	无色晶体	1.572	185	235		6.8, 20°C 121, 100°C
D-苹果酸	134.09	无色晶体, 有不愉快的 酸味	1.595	99~ 100	140d		易溶
酒石酸	150.09	大块透明菱 形晶体	1.765	168~ 170	d		139, 20°C 243, 100°C
丁酸	88.10	无色油状液 体	0.9587	-8.5	163.5	1.3979	∞
柠檬酸	192.12	无色晶体或 粉末, 有强 酸味	1.542	153	d		易溶
己酸	116.16	无色无恶臭 气味油状液 体	0.939	-50	187	1.4145	溶
葡萄糖酸	196.16	白色结晶		110 (软化)			溶
乙酸	60.05	无色刺激性 液体	1.049	16.7	118	1.3715	∞
草酸	90.04	无色透明结 晶有毒	1.653	101~ 102	157 升华		10, 20°C 120, 100°C
甲酸	46.03	无色有刺激 气味液体	1.220	8.6	100.8	1.3714	∞

\* d 代表达到熔点分解。

## 六、指示剂

指示剂种类繁多, 应用广泛。常用的为酸碱指示剂。这类指示剂都是有机弱酸(或弱碱)化合物, 在溶液中或多或少的解离, 解离所生成的离子和未解离的分子往往具有不同的颜色。例如, 酚酞是一种非常弱的有机化合物, 若以HIn代表它的分子, In<sup>-</sup>代表其离子, 则在水溶液中的电离平衡如下:



在酸性溶液中，由于过多的  $H^+$  存在，使平衡向左移动，酚酞以无色的分子存在，则溶液不显色；在碱性溶液中，平衡向右移动，红色酚酞离子占优势，溶液显红色。

附表 3 一些常用酸碱指示剂

指示剂名称	配制方法 (0.1g 溶于250ml下列溶剂)	颜色		变色范围 (pH)
		酸	碱	
甲酚红(酸范围)	水, 含2.62ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	0.2~1.8
间苯甲酚紫(酸范围)	水, 含2.72ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	1.0~2.6
麝香草酚蓝(酸范围)	水, 含2.15ml 0.1mol/L NaOH	红	黄	1.2~2.8
金莲橙OO	水	红	黄	1.5~3.0
甲基黄	90%乙醇	红	黄	2.9~4.0
溴酚蓝	水, 含1.49ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫	3.0~4.6
四溴酚蓝	水, 含1.0ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	3.0~4.6
刚果红	水或80%乙醇	紫	红橙	3.0~5.0
甲基橙	水(游离酸): 水, 含3ml 0.1mol/L HCl (钠盐)	红	橙黄	3.1~4.4
溴甲酚绿(蓝)	水, 含 1.43ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	3.6~5.2
甲基红	水(钠盐); 60%乙醇(游离酸)	红	黄	4.2~6.3
氯酚红	水, 含2.36ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫红	4.8~6.4
溴甲酚紫	水, 含1.85ml 0.1mol/L NaOH	黄	紫	5.2~6.8
石蕊精(石蕊)	水	红	蓝	5.0~8.0
溴麝香草酚蓝	水, 含1.6ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	6.0~7.6
酚红	水, 含2.82ml 0.1mol/L NaOH	黄	红	6.8~8.4
中性红	70%乙醇	红	橙棕	6.8~8.0
甲酚红(碱范围)	水, 含2.62ml 0.1mol/L NaOH	黄	红	7.2~8.8



续表

指示剂名称	配制方法 (0.1g溶于250ml下列溶剂)	颜色		变色范围 (pH)
		酸	碱	
间苯甲酚紫(碱范围)	水, 含2.62ml 0.1mol/L NaOH	黄	红紫	7.6~9.2
麝香草酚盐(碱范围)	水, 含2.15ml 0.1mol/L NaOH	黄	蓝	8.0~9.6
酚酞	70~90%乙醇	无色	桃红	8.3~10.0
麝香草酚酞	90%乙醇	无色	蓝	9.3~10.5
茜黄	乙醇	黄	红	10.1~12.0
金莲橙O	水	黄	橙	11.1~12.7

指示剂通常用 0.1mol/L NaOH或 0.1mol/L HCl 调节至中间色调。

## 七、冷却剂和吸水剂

### (一) 冷却剂

组成的物质成分(按重量比)	可达低温(°C)
NH <sub>4</sub> Cl:水 (30:100)	-5.1
NH <sub>4</sub> Cl:雪或碎冰 (25:100)	-15.4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :水 (108:100)	-4.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :水 (83:100)	-14.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :水 (76:100)	-17.5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :雪或碎冰 (59:100)	-18.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :雪或碎冰 (62:100)	-19.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·10H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (9.6:100)	-1.2
(NH <sub>4</sub> )CNS:水 (133:100)	-18.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (143:100)	-50.0
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:水 (250:100)	-12.4
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (204:100)	-19.7
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (164:100)	-39.0
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (143:100)	-54.0
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (124:100)	-40.3
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O:雪或碎冰 (81:100)	-21.5

续表

组成的物质成分(按重量比)	可达低温(℃)
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :雪或碎冰 (40:100)	-9.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :雪或碎冰 (20:100)	-4.0
$\text{KCl}$ :水 (30:100)	0.6
$\text{KCl}$ :雪或碎冰 (30:100)	-11.5
$\text{KI}$ :水(140:100)	-11.7
$\text{KNO}_3$ :雪或碎冰(13:100)	-2.9
$\text{KCNS}$ :水 (150:100)	-23.7
$\text{NaAc}$ :水(85:100)	-47
$\text{NaCl}$ :雪或碎冰(33:100)	-21.3
$\text{NaNO}_2$ :水 (75:100)	-5.3
$\text{NaNO}_2$ :雪或碎冰(50:100)	-17.8
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :水(110:100)	-8.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :雪或碎冰 (67.5:100)	-11.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :雪或碎冰 (51.3:100)	-3.9
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (66.1%):雪或碎冰 (91:100)	-37.0
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (66.1%):雪或碎冰 (40:100)	-30.0
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (66.1%):雪或碎冰 (23:100)	-25.0
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (66.1%):雪或碎冰(13:100)	-20.0
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (66.1%):雪或碎冰 (8:100)	-16.0
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ :雪或碎冰 (105:100)	-30.0
4℃乙醇:固体 $\text{CO}_2$	-72.0

## (二) 吸水剂

干燥器中常用的吸水剂有：五氧化二磷、浓硫酸、变色硅胶、无水氯化钙。

## 八、硫酸按饱和度的常用表

### (一) 调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)

		硫酸铵终浓度(每饱和度)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
		57	86	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
		29	29	59	59	78	91	123	155	183	225	262	300	340	382	424	520	619
		30	30	30	49	49	61	93	125	158	193	230	267	307	343	390	485	583
		19	19	30	30	30	62	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
		12	12	43	43	43	12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
		31	31	31	63	63	94	123	164	200	238	278	319	361	411	469	566	667
		31	31	31	63	63	97	132	168	205	245	285	325	365	405	485	583	684
		32	32	32	63	63	99	132	168	205	245	285	325	365	405	485	583	684
		33	33	33	66	66	101	137	174	211	248	285	322	359	396	474	572	673
		33	33	33	66	66	101	137	174	211	248	285	322	359	396	474	572	673
		34	34	34	67	67	103	141	179	217	255	293	331	369	407	485	583	684
		34	34	34	67	67	103	141	179	217	255	293	331	369	407	485	583	684
		35	35	35	70	70	107	146	184	222	260	298	336	374	412	490	588	689
		35	35	35	70	70	107	146	184	222	260	298	336	374	412	490	588	689
		36	36	36	72	72	115	154	192	230	268	306	344	382	420	498	596	697
		36	36	36	72	72	115	154	192	230	268	306	344	382	420	498	596	697
		36	36	36	72	72	115	154	192	230	268	306	344	382	420	498	596	697

硫酸铵初浓度(每饱和度)

续表

		硫酸铵终浓度(％饱和度)																	
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
		每 1L 溶液 加 固 体 硫 酸 铵 的 克 数 *																	
硫酸铵 初浓度 (％饱 和度)	80																	77	157
	90																	79	
	100																	0	

\* 在25℃, 硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每1L溶液所加固体硫酸铵的克数。

### (二)调整硫酸铵溶液饱和度和计算表 (25℃)

		在 0℃ 下 硫 酸 铵 终 浓 度 (％ 饱 和 度)																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
		每 100ml 溶 液 加 固 体 硫 酸 铵 的 克 数																
硫酸铵初浓度(饱和度)	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.2
	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
	20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
	25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
	30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
	35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3

续表

		在 0°C 下 硫酸铵 终 浓度 (% 饱和度)																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
40	硫酸铵 初 浓度 (饱和度)					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45					0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3		
50						0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8		
55						0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3			
60						0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.1	27.9				
65							0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4				
70								0	3.3	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9				
75									0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4				
80										0	3.3	6.7	10.3	13.9				
85											0	3.4	6.8	10.5				
90												0	3.4	7.0				
95													0	3.5				

### (三)不同温度下的饱和硫酸铵溶液

组成特征	0℃	10℃	20℃	25℃	30℃
每100g水中含硫酸铵摩尔数	5.35	5.53	5.73	5.82	5.91
重量百分数	41.42	42.22	43.09	43.47	43.85
1000ml水用硫酸铵饱和所需克数	706.8	730.5	755.8	766.8	777.5
每升饱和溶液含硫酸铵克数	514.8	525.2	536.5	541.2	545.9
饱和溶液摩尔浓度	3.90	3.97	4.06	4.10	4.13

## 九、试剂的配制及一些常用数据表

### (一)一般注意事项

1. 称重要精确，特别是在配制标准溶液、缓冲液时，更应注意严格称量。有特殊要求的，要按规定进行干燥、恒重、提纯等。

2. 一般溶液都应用蒸馏水或去离子水配制，有特殊要求的除外。用于分子生物学方面的溶液一般用重蒸馏水配制，用于细胞培养的溶液最好用四蒸去离子水或超净水配制。

3. 化学试剂根据其质量分为各种规格（品级），一般化学试剂的分级见附表4。另外还有一些规格，如纯度很高的光谱纯、色谱纯，纯度较低的工业用、药典纯（相当于四级）等。

配制溶液时，应根据实验要求选择不同规格的试剂。

4. 试剂应根据需要量配制，一般不宜过多，以免积压浪费或过期失效。

5. 试剂（特别是液体）一经取出，不得放回原瓶，以免因量器或药勺不清洁而污染整瓶试剂。取固体试剂时，必须使用洁净干燥的药勺。

6. 配制试剂所用的玻璃器皿都要清洗干净。存放试剂的试剂瓶应清洁干燥。

7. 试剂瓶上应做标记，写明试剂名称、浓度、配制日期及

附表4

一般化学试剂的分级

标准及用途	一级品	二级品	三级品	四级品	生物试剂
代号	G·R	A·R	C·P	L·R	B·R/C·R
称谓	保证试剂, 优级纯	分析试剂, 分析纯	化学纯	实验试剂	
标签颜色	绿色	红色	蓝色		
纯度	纯度最高, 杂质含量最少	纯度较高, 杂质含量较低	质量低于二级品	纯度很低, 但高于工业用的试剂	
用途	精密分析和科研工作	定量分析, 为分析实验室广泛使用	一般分析工作, 少用于定量分析	定性分析	依据说明书使用

配制人。

8. 试剂用后要用原瓶塞塞紧, 瓶塞不得沾染其他污染物或沾染桌面。

9. 有些化学试剂极易变质, 变质后不能继续使用。易变质和需用特殊方法保存的常用试剂见附表5。

10. 需要密封的化学试剂, 可先加塞塞紧, 然后再用蜡封口。有的平时还需要保存在干燥器内, 干燥剂可以用生石灰、无水氯化钙和硅胶, 一般不宜用硫酸。需要避光保存的试剂, 可置于棕色的瓶内或用黑纸包装。

附表5

易变质及需特殊方法保存的试剂

注意事项	试剂名称 (举例)
需要密封:	
易潮解吸湿	氯化钙、氢氧化钠、氢氧化钾、三氯醋酸
易失水风化	结晶硫酸钠、硫代硫酸钠、硫酸亚铁、含水磷酸氢二钠
易挥发	氨水、氯仿、醚、碘、麝香草酚、甲醛、乙醇、丙酮
易吸收CO <sub>2</sub>	氢氧化钾、氢氧化钠、Tris
易氧化	硫酸亚铁、醚、醛、酚、抗坏血酸和一切还原剂
易变质	丙酮酸钠、乙醚和许多生物制品 (常需冷藏)
需要避光:	

续表

注意事项	试剂名称(举例)
见光分解	硝酸银、过氧化氢、氯仿、氢氟酸、溴化乙烷
见光氧化	乙醚、醛类、亚铁盐和一切还原剂
见光变色	硝酸银(变黑)、酚(变淡红)、氯仿(产生光气)
需特殊方法保管:	
易爆炸	苦味酸、硝酸盐类、过氯酸、叠氮化钠
剧毒	氰化物、汞、溴、砷化物、诱变剂
易燃	乙醚、甲醇、乙醇、丙醇、苯、甲苯、二甲苯
腐蚀	强酸、强碱

## (二) 常用数据表

### 1. 实验室中常用酸碱的相对密度和浓度的关系

试剂	分子式	分子量	相对密度	百分浓度 (W/V)	摩尔浓度 (mol/L)	配1L 1mol/L 溶液所需毫升数
盐酸	HCl	36.47	1.19	37.2	12.0	84
			1.18	25.4	11.8	
			1.10	20.0	6.0	
硫酸	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98.09	1.84	95.6	18.0	56
			1.18	24.8	3.0	
硝酸	HNO <sub>3</sub>	63.02	1.42	71.0	16.0	63
			1.40	65.3	14.5	
			1.20	32.4	6.1	
冰醋酸	CH <sub>3</sub> COOH	60.05	1.05	99.5	17.4	59
醋酸	CH <sub>3</sub> COOH		1.025	80.0	14.3	
磷酸	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98.06	1.71	85.0	15	67
氨水	NH <sub>4</sub> OH	30.05	0.90	—	15	67
			0.904	27.0	14.3	70
			0.91	25.0	13.4	
			0.96	10.0	5.6	
氢氧化钠溶液	NaOH	40.0	1.50	50.0	19.0	53



## 2. 常用固态化合物的摩尔浓度配制参考表

试剂	分子式	分子量	mol/L(每升溶液需试剂克数)
草酸	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	126.08	1mol/L (63.04)
柠檬酸	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	210.14	0.1mol/L (21.01)
氢氧化钾	KOH	56.10	5mol/L (280.50)
氢氧化钠	NaOH	40.00	1mol/L (40.00)
碳酸钠	$Na_2CO_3$	106.00	1mol/L (106.00)
磷酸氢二钠	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	358.20	1mol/L (358.20)
磷酸二氢钾	$KH_2PO_4$	136.10	1/15mol/L (9.08)
重铬酸钾	$K_2Cr_2O_7$	294.20	0.1mol/L (29.42)
碘化钾	KI	166.00	0.5mol/L (83.00)
高锰酸钾	$KMnO_4$	158.00	0.1mol/L (15.80)
硼酸钠	$C_2H_3O_2 \cdot Na$	82.04	1mol/L (82.04)
硫代硫酸钠	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	248.20	0.1mol/L (24.82)

## 3. 一些常用化合物的溶解度 (20℃)

名称	分子式	溶解度
硝酸银	$AgNO_3$	218.0
硫酸铝	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	36.4
氯化钡	$BaCl_2$	35.7
氢氧化钡	$Ba(OH)_2$	3.84
氯化钙	$CaCl_2$	74.5
醋酸钙	$Ca(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$	34.7
氢氧化钙	$Ca(OH)_2$	$1.65 \times 10^{-1}$
硫酸铜	$CuSO_4$	20.7
三氯化铁	$FeCl_3$	91.9
硫酸亚铁	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	26.5
氯化汞	$HgCl_2$	6.6
碘	$I_2$	$2.9 \times 10^{-2}$
溴化钾	KBr	65.8
氯化钾	KCl	34.0

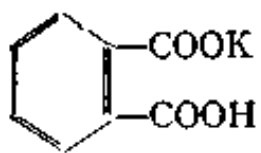
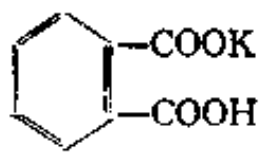
续表

名 称	分 解 式	溶 解 度
碘化钾	KI	144
重铬酸钾	$K_2Cr_2O_7$	13.1
碘酸钾	$KIO_3$	8.13
高锰酸钾	$KMnO_4$	6.4
硝酸钾	$KNO_3$	31.6
氢氧化钾	$KOH \cdot 2H_2O$	112
硫酸锂	$Li_2SO_4$	34.2
硫酸镁	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	26.2
草酸铵	$(NH_4)_2C_2O_4$	4.4
氯化铵	$NH_4Cl$	37.2
硫酸铵	$(NH_4)_2SO_4$	75.4
硼砂	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	2.7
碳酸钠	$Na_2C_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$	46.5
醋酸钠	$NaC_2H_3O_2$	123.5
氯化钠	$NaCl$	36.0
氢氧化钠	$NaOH$	109.0
碳酸钠	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	21.5
	$Na_2CO_3 \cdot H_2O$	50.5(30°C)
碳酸氢钠	$NaHCO_3$	9.6
磷酸氢二钠	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	7.7
硫代硫酸钠	$Na_2S_2O_3$	70.0

#### 4. 常用标准物质的干燥温度和应用范围

标准物质		干燥后组成	干燥温度 (°C)	应用范围
名称	分子式			
碳酸氢钠	$NaHCO_3$	$Na_2CO_3$	270~300	标定酸
十水合碳酸钠	$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$	$Na_2CO_3$	270~300	标定酸
四硼酸钠	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	在装有NaCl和蔗糖饱和溶液的干燥器中	标定酸
碳酸氢钾	$KHCO_3$	$K_2CO_3$	270~300	标定酸

续表

标准物质		干燥后组成	干燥温度 (°C)	应用范围
名称	分子式			
二水合草 酸	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$	室温空气 干燥	标定碱
邻苯二甲 酸·氢钾			110~120	标定碱
重铬酸钾	$K_2Cr_2O_7$	$K_2Cr_2O_7$	140~150	标定还原剂
溴酸钾	$KBrO_3$	$KBrO_3$	150	标定还原剂
碘酸钾	$KIO_3$	$KIO_3$	180	标定还原剂
草酸钠	$Na_2C_2O_4$	$Na_2C_2O_4$	130	标定还原剂
锌	Zn	Zn	室温, 干燥 器中保存	标定EDTA
氧化锌	$ZnO$	$ZnO$	900~1000	标定EDTA
碳酸钙	$CaCO_3$	$CaCO_3$	110	标定EDTA

## 5. 某些有机溶剂的主要物理常数

名称	化学式	相对密度 (20°C)	沸点或沸 程(°C)	水中溶解度 (20°C)	闪光点 (°C)	爆炸极限 %(体积)
苯	$C_6H_6$	0.897	80.1	0.03	-16	—
甲苯	$C_6H_5CH_3$	0.866	110.8	0.05	~5	1.2~7.0
二甲苯 (邻、对间 混合物)	$C_6H_4(CH_3)_2$	0.86~ 0.87	136~ 145	不溶	~20	—
汽油	—	0.69~ 0.73	40~ 200	不溶	<-25	—
甲醇	$CH_3OH$	0.7915	64.65	∞	~0	6.0~36.5
乙醇	$C_2H_5OH$	0.7893	78.4	∞	12	3.5~18.0
正丙醇	$C_3H_7OH$	0.8036	97.19	∞	15	2.5~8.7
异丙醇	$C_3H_7OH$	0.7851	82.5	∞	12	3.8~10.2
正丁醇	$C_4H_9OH$	0.8098	117.7	9	28	3.7~10.2
异丁醇	$C_4H_9OH$	0.806	107	9.5	22	2.40
异戊醇	$C_5H_{11}OH$	0.811	137.8	2.6	4.0	—
甘油	$C_3H_5(OH)_3$	1.2613	290(分解)	∞	—	—

续表

名称	化学式	相对密度 (20℃)	沸点或沸 程(℃)	水中溶解度 (20℃)	闪光点 (℃)	爆炸极限 % (体积)
乙醚	$C_2H_5OC_2H_5$	0.7135	34.5	7.5	-40	1.85~36.5
醋酸乙酯	$CH_3COOC_2H_5$	0.901	77.15	8.6(35℃)	-5	—
丙酮	$CH_3COCH_3$	0.7898	56.5	∞	-20	2.55~12.80
环己酮	$CO(CH_2)_4CH_3$	0.9478	155.7	2.4(31℃)	-44	—
硝基苯	$C_6H_5NO_2$	1.2036	201.9	0.19	-20	—
吡啶	$C_5H_5N$	0.978	115.56	∞	20	1.8~12.4

### 6. 常用试剂的配制

(1) 1mol/L Tris: 称取121.14g Tris, 溶于80ml水中, 加浓HCl (cHCl), 调pH至所需值。

pH	cHCl
7.4	70ml
7.6	60ml
8.0	42ml

待溶液冷却至室温, 对pH作最后的调节, 定容至1L, 分装高压灭菌。

如1mol/L溶液呈黄色, 则应更换更好的Tris。另外, Tris缓冲液的pH随温度而改变, 大约为每升高1℃降低0.03pH。

(2) 0.5mol/L EDTA (pH 8.0): 称取186.1g EDTA·Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O溶于800ml水中, 磁力搅拌, 加入固体NaOH(约20g)调pH 8.0, 定容至1L, 分装高压灭菌。

(3) 3mol/L醋酸钠溶液: 称取40.8g NaAc·3H<sub>2</sub>O溶于60ml水中, 用冰醋酸调节至pH 4.8, 5.2或5.6, 定量至100ml, 高压灭菌。

(4) 10% SDS: 称取100g电泳级纯SDS溶于900ml水中,

加热至68℃助溶，加入几滴cHCl调节pH至7.2，冷却定容至1L，分装。

称量及配制时请戴好口罩，切勿入口。

(5) PBS: 称取8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 及0.24g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 溶于800ml水中，用HCl调pH至7.4，加水至1L，高压灭菌。

(6) 10%三氯醋酸 (TCA): 在500ml TCA中加入227ml水，配成100% TCA，稀释至10%作为贮液。

(7) 1mol/L DTT: 称取3.09g DTT溶于20ml 0.01mol/L, pH 5.2的醋酸缓冲液中，过滤除菌，1ml分装，-20℃保存。

(8) 1mol/L  $\text{CaCl}_2$ : 称取54g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于100ml超纯水中，过滤除菌，1ml分装，-20℃存放。

(9) 0.1mol/L ATP: 60mg ATP溶于0.8ml水中，用0.1mol/L NaOH调pH至7.0，定量至1ml，分装，-70℃存放。

(10) dNTPs: 将每一dNTP溶于水中配成100mmol/L，用0.05mol/L Tris (pH 7.6) 小心调节pH至7.0。适度稀释后按下列波长读取溶液的吸光度。计算dNTP的实际浓度，用水稀释至50mmol/L，分装-70℃存放。

碱基	波长(nm)	校正系数 (1/(mol·cm))
A	259	$1.54 \times 10^4$
G	253	$1.37 \times 10^4$
C	271	$9.10 \times 10^3$
T	260	$7.40 \times 10^3$

吸光度 $\text{OD}^{1.0\text{cm}} = \text{校正系数} \times \text{浓度}$

(11) 1mol/L  $\text{MgCl}_2$ : 称取203.3g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于800ml水中，定量至1L，分装高压灭菌。

(12) 2-巯基乙醇 (2-ME): 原液为14.4mol/L，4℃存于棕

色瓶中，不可高压灭菌。

(13) 水饱和苯酚溶液：取新近出厂的A·R级苯酚<sub>1</sub>（最好为液体酚）于68℃水浴中融化，分装-20℃存放。取一定体积的融化苯酚，加入8-羟基喹啉至终浓度为0.1%。加入等体积的0.5mol/L, pH 8.0 Tris，搅拌15min，静置分相后吸尽上层水相。加入等体积0.1mol/L, pH 8.0 Tris，搅拌15min，吸去上层水相，重复这一过程，直至上层水相的pH>7.8。加入0.1体积的0.1mol/L, pH8.0 Tris及0.2% 2-ME，移入棕色磨口瓶中，4℃存放。使用时如人体接触了苯酚，则立即用自来水冲洗，再用肥皂洗涤。

(14) 酚:氯仿液：等量苯酚与氯仿混合，用0.1mol/L, pH 7.6 Tris 平衡数次，加入等体积0.01mol/L, pH 7.6 Tris，4℃避光保存。

(15) 5mol/L NaCl：称取292.2g NaCl溶于800ml水中，定置至1L，分装，高压灭菌。

(16) 10mol/L NaOH：称取80g NaOH，溶于160ml水中，定容至200ml。

(17) 200mmol/L葡萄糖液：称取葡萄糖3.96g，溶于80ml水中，定容至100ml，110℃灭菌30min，4℃存放。

(18) 10mg/ml溴化乙锭溶液：戴手套称取200mg溴化乙锭于棕色瓶中，加入20ml重蒸水，溶解后4℃存放。有液体溅出，可加少量漂白粉使其分解。

(19) 50mg/ml溶菌酶溶液：用水配制50mg/ml溶菌酶液，分装-20℃存放。

(20) 10mg/ml RNase溶液(无DNase)：[在10mmol/L, pH 7.5 Tris-15mmol/L NaCl中配制10mg/ml RNase A溶液，沸水浴中热处理15min，缓慢冷却至室温，分装-20℃存放。

(21) 1mg/ml DNase溶液(无RNase)：市售DNase一般皆含有RNase，做RNA工作时必须去除。去除方法主要有亲和色谱法和吸附法。这里介绍一有效的简易方法。将10mg胰DNase I

溶于10ml 0.1mol/L吡啶乙酸-0.15mol/L, pH 5.2 醋酸钠中, 55℃中孵育 45min, 冷至0℃, 加入 1mol/L CaCl<sub>2</sub> 至终浓度为 5mmol/L。分装-20℃存放。

(22) 20mg/ml链霉蛋白酶: 20mg链霉蛋白酶溶于1ml水中, 37℃过夜, 分装, -20℃存放。

(23) 20mg/ml蛋白酶K: 20mg蛋白酶K溶于1ml水中, 分装, -20℃存放。

(24) 20×SSC: 称取175.32g NaCl, 88.23g 柠檬酸三钠·2H<sub>2</sub>O溶于800ml水中, 定容至 1L。

### 本书使用的英文缩写

A	腺嘌呤	dCTP	脱氧三磷酸胞苷
Ab	抗体	dGTP	脱氧三磷酸鸟苷
Ag	抗原	dUTP	脱氧三磷酸尿苷
A·R	分析试剂, 分析纯	dTTP	脱氧三磷酸胸苷
ATP	三磷酸腺苷	dNTP	脱氧三磷酸核苷
a <sub>w</sub>	水活度	α- <sup>32</sup> P-	
BSA	牛血清白蛋白	dNTP	<sup>32</sup> P 标记脱氧核苷
C	胞嘧啶	EB	溴化乙锭
cDNA	互补脱氧核糖核酶	EDTA	乙二氨基四乙酸
CM	完全培养基	ELISA	酶联免疫吸附试验
C·P	化学纯	EMS	甲基磺酸乙酯
CTP	三磷酸胞苷	FCS	胎牛血清
DES	硫酸二乙酯	G <sup>+</sup>	革兰氏阳性
Dig	地高辛	G <sup>-</sup>	革兰氏阴性
DNA	脱氧核糖核酸	G	鸟嘌呤
DNase	脱氧核糖核酸酶	GTP	三磷酸鸟苷
DTT	二巯基糖醇	HEPES	
dATP	脱氧三磷酸腺苷	HRP	辣根过氧化物酶

Ig	免疫球蛋白	YNB	酵母氮基
MAb	单克隆抗体	Ala	丙氨酸
2-ME	2-巯基乙醇	Arg	精氨酸
MM	基本培养基	Asn	天冬酰胺
MNNG	亚硝基胍	Asp	天冬氨酸
(NTG)		Cys	半胱氨酸
NC	硝酸纤维素薄(滤)膜	Cyss	胱氨酸
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	Glu	谷氨酸
PCR	聚合酶链反应	Gln	谷氨酰胺
PEG	聚乙二醇	Gly	甘氨酸
RNA	核糖核酸	His	组氨酸
RNase	核糖核酸酶	Hyp	羟脯氨酸
SDS	十二烷基磺酸钠	Ile	异亮氨酸
SM	补充培养基	Leu	亮氨酸
SRBC	绵羊红细胞	Lys	赖氨酸
T	胸腺嘧啶	Met	蛋氨酸
Tm	热变性温度	Phe	苯丙氨酸
Tris	三羟甲基氨基甲烷	Pro	脯氨酸
TTP	三磷酸胸苷	Ser	丝氨酸
U	尿嘧啶	Thr	苏氨酸
UV	紫外线	Trp	色氨酸
		Tyr	酪氨酸
		Val	缬氨酸



# 限 表

## 主要参考资料

1. Wistreich Lechtman, Microbiology, Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 1980
2. Eugene W. Nester et al., Microbiology, Holt, Rinehart and Winston, New York, 1973
3. H.-J. Rehm and G. Reed, Biotechnology, Vol. 1., Verlag Chemie, Weinheim, 1981
4. 无锡轻工业学院等编:《微生物学》(适用于工业发酵专业), 轻工业出版社, 北京, 1980
5. 白毓谦, 等:《微生物实验技术》, 山东大学出版社, 济南, 1986
6. 王伯扬编:《生物科学摄影基础》, 人民教育出版社, 北京, 1980
7. 焦瑞身等 (诸葛健参与撰稿):《微生物生理代谢实验技术》, 科学出版社, 北京, 1990
8. 诸葛健:《发酵微生物实验与研究技术基础》《酿酒》, 哈尔滨, 1983
9. 诸葛健:《发酵微生物实验技术》, 江苏调味品情报站, 镇江, 1985



\*C0163983\*

[ G e n e r a l I n f o r m a t i o n ]

书名 = 工业微生物实验技术手册

作者 =

页数 = 7 1 0

SS号 = 1 0 3 1 1 7 4 0

出版日期 =

封面  
书名  
版权  
前言  
目录  
正文