
专业实验指导书

(生物工程)

厦门大学化学工程与生物工程系

2011 年 7 月

目 录

实验一	重组大肠杆菌产 L-色氨酸的补料-分批发酵	- 1 -
实验二	发酵液中 L-色氨酸的提取纯化	- 4 -
实验三	L-色氨酸含量和纯度的测定	- 7 -
实验四	质粒 DNA 的提取实验.....	- 11 -
实验五	聚合酶链式反应体外扩增 DNA.....	- 14 -
实验六	琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定质粒 DNA.....	- 19 -
实验七	大肠杆菌的 DNA 转化实验.....	- 22 -
实验八	厌氧细菌丁酸梭菌的培养	- 24 -
实验九	碱性磷酸酶的酶促反应动力学实验	- 28 -
实验十	荧光显微镜检测大肠杆菌基因工程菌死活细胞	- 32 -

实验一 重组大肠杆菌产 L-色氨酸的补料-分批发酵

一、 实验目的

1. 通过对 L-色氨酸的发酵，了解 L-色氨酸的补料-分批发酵的基本过程；
2. 初步掌握微生物发酵的基本操作。

二、 概述和原理

L-色氨酸（L-Trp）是含有吲哚的中性芳香族氨基酸，是人和动物生命活动中不可缺少的必需氨基酸之一。L-色氨酸不仅在营养代谢中起重要作用，而且还广泛应用于医药、食品、饲料等方面^[1-2]，随着市场需求量的日益增加，L-色氨酸具有广阔的应用前景。

早期的 L-色氨酸的生产方法主要依靠化学合成法和蛋白质水解法，但是由于这些方法存在着材料来源有限、周期长、工艺复杂、产品成分复杂等缺点，因而在上世纪 90 年代逐渐被淘汰，随着对微生物法生产 L-色氨酸研究的不断深入，微生物法已经走向实用并且处于主导地位，微生物发酵法具有产酸高、成本低、质量好等优势，将是未来大规模生产 L-色氨酸的首选技术。该法主要是以葡萄糖、甘蔗糖蜜等廉价原料为碳源，利用优良的 L-色氨酸生产菌种来生产 L-色氨酸。

补料-分批发酵，是指在分批培养过程中，间歇或连续地补加新鲜培养成分的一种发酵方法，现已广泛应用于发酵工业。流加操作的主要特点就是能够调节微生物生长反应环境中营养物质的浓度，可以避免营养成分的初始浓度过高而出现的底物抑制现象，同时也能阻止某些限制性营养成分由于在反应过程中被耗尽而影响微生物的生长和产物的形成。在发酵生产 L-色氨酸过程中，菌体主要以葡萄糖为碳源，由于在高浓度的葡萄糖条件下，大肠杆菌容易产生乙酸，而当发酵液中乙酸浓度积累到 2 g/L 时，菌体将停止生长并且抑制外源基因的表达^[3]。因此本实验需采用补料-分批发酵的方式。

补料培养基加入形式可以分为非反馈补料和反馈补料，非反馈补料主要包括恒速补料、指数补料、逐级提速流加等几种流加形式，而反馈补料根据所选反馈指标的不同可分为恒 pH 值法、恒溶解氧法、菌体浓度反馈、CER 法、DO-stat 法等几种补料方法。反馈补料由于能够根据反馈的信息及时调整补料的速率和策略，从而能够很好地控制系统

的营养浓度，防止营养浓度过高，故在大肠杆菌培养中常被广泛采用^[4]。本实验主要采用溶氧反馈流加葡萄糖的方式，即当发酵液中葡萄糖耗尽时，溶氧值表现为上升，开始流加葡萄糖；当溶氧值降低时，停止流加葡萄糖。通过溶氧反馈补料能够很好的控制发酵液中葡萄糖的浓度，从而实现 L-色氨酸的高效表达。

本实验以重组大肠杆菌为菌种，进行 L-色氨酸补料-分批发酵，并测定发酵液中 L-色氨酸的含量。

三、 实验材料、试剂与仪器

1. 菌种

重组大肠杆菌 K12 W3110。

2. 培养基

(1) 摇瓶种子培养基：K₂HPO₄ 2.0%，酵母粉 2.0%，KH₂PO₄ 1.0%，葡萄糖 3.0%，MgSO₄·7H₂O 0.1%，pH7.4；

(2) 发酵罐培养基：K₂HPO₄ 0.5%，酵母粉 0.2%，MgSO₄·7H₂O 0.1%，(NH₄)₂SO₄ 0.1%，柠檬酸 0.3%，FeSO₄·7H₂O 0.005%，葡萄糖 0.8%；

(3) 摇瓶种子培养基为 300 mL 三角瓶装培养基 50 mL；流加葡萄糖浓度为 600 g/L；以上培养基均于 0.1 MPa 下灭菌 20 min，其中葡萄糖单消后加入。

3. 仪器

紫外-可见分光光度计，往复式恒温摇床，离心机，pH 计，灭菌锅，显微镜。

四、 实验操作步骤

1. 摇瓶种子培养

打开冷冻甘油管，取 500 μL 的菌液加入种子摇瓶中，摇瓶于 37 ℃、200 rpm 摇床中培养 10~12 h，取样测定菌体浓度，使得最终 OD₆₆₀ 值为 6~7。

2. 发酵罐培养

以 10%的接种量将培养好的种子培养液接入发酵罐中，发酵罐装液量 50%，pH 用 25%氨水控制在 6.5，温度 35 ℃，搅拌速度 900 rpm，溶氧自动显示，空气流量 2 VVM，培养时间 36 h。当初糖耗尽溶氧表现为突然上升时，设定合适的流加泵补料周期（如设

定流加周期 10 s: 工作 2 s, 停 8 s), 使得溶氧值处于上下波动状态。每隔 4 h 从发酵罐中取样, 在紫外-可见分光光度计上测定发酵液 660 nm 处的光密度值 $A(OD_{660})$, 在 pH 计上测定 pH 值, 记录溶氧值。

3. 无菌体发酵液的制备(实验三备用)

取 1 mL 发酵液加入离心管, 10000 rpm 离心 5 min, 取上清, 将上清液稀释 100 倍后, 4 °C 冰箱保存。

五、 实验结果及其处理

根据不同发酵时间发酵液的 OD_{660} 、DO、pH 和 L-色氨酸产量(此值实验三测得), 绘制菌体的生长曲线。

六、 思考题

1. 微生物发酵罐发酵有哪几种方法? 发酵罐发酵主要检测哪几种指标?
2. 工业发酵罐常用何种灭菌方式?

七、 参考文献

- [1] 陈涛, 陈宁. L-色氨酸的生产及其代谢控制育种[J]. 生物科技通讯, 2000, 2: 141-145.
- [2] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69(1): 1-8.
- [3] Shiloach J, Fass R. Growing E. coli to high cell density—A historical perspective on method development[J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(5): 345-357.
- [4] Yuan H, Yang X, Hua Z C. Optimization of expression of an annexin V-hirudin chimeric protein in Escherichia coli[J]. Microbiological Research, 2004, 159(2): 147-156.

实验二 发酵液中 L-色氨酸的提取纯化

一、实验目的

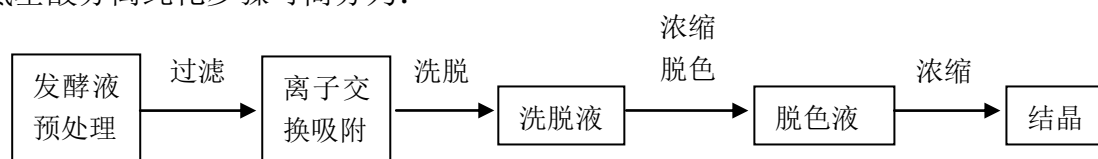
1. 了解氨基酸的一般提取纯化工艺;
2. 掌握离子交换过程的反应机理。

二、概述和原理

分离纯化是氨基酸工业生产中的一个重要组成部分，它在投资及产品中的费用都占有很大比例。因此，研究分离纯化技术，降低其成本，对氨基酸工业的发展是非常重要的。

发酵液是极其复杂的多相体系，含有微生物细胞、代谢产物、未耗用的培养基等。氨基酸的提取纯化，主要是应用它的物理化学性质，如两性电解质的特性，溶解度，分子大小，分配系数及与吸附剂吸附特性等，达到把发酵液氨基酸提取出来的目的。

一般的氨基酸分离纯化步骤可简分为：



其中离子交换法具有设备投资少、纯化效果好、工艺简单、污染小、节能的优点，常用于工业生产中氨基酸的提取。其原理主要是应用氨基酸的两性电解质特性：在酸性溶液中，氨基酸以阳离子状态存在，因而能被阳离子交换树脂交换吸附；在碱性溶液中，氨基酸以阴离子状态存在，因而能被阴离子交换树脂交换吸附。根据氨基酸是两性电解质这一特性，以及目的氨基酸与杂质氨基酸 pK 、 pI 值的差异，通过调节氨基酸发酵液的 pH 值，使不同氨基酸的带电性质及解离状态不同，再通过选择合适的离子交换树脂就能分离纯化各种氨基酸。

三、实验试剂及仪器

1. 试剂

L-色氨酸发酵液(由实验一提供); 浓硫酸(AR 95.5%); 盐酸; 氢氧化钠; 氨水; 冰醋酸; 001×7 型阳离子交换树脂。

2. 仪器

离子交换柱, 离心机, 控温磁力搅拌器, 旋转蒸发仪, 蠕动泵、真空干燥箱。

四、 实验操作步骤

1. 树脂预处理及装柱

先用蒸馏水冲洗 001×7 型阳离子交换树脂除去杂质, 然后用 2 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液反复浸泡 3 次后, 再用 2 mol/L 的 HCl 转成 H⁺型, 最后用去离子水洗至中性备用; 离子交换柱用去离子水冲洗干净后, 在柱中先装入半柱水, 然后将树脂和水一起倒入柱中, 让树脂自然沉降。装柱时应注意柱中的水不能低于树脂界面, 否则, 树脂间形成气泡, 影响交换效率。

2. 发酵液预处理

用浓硫酸将发酵液 pH 值调至 4.0, 然后用高速冷冻离心机 10000 rpm 离心 30 min, 除去发酵液中含有的菌体和蛋白质等杂质。

3. 离子交换树脂吸附及洗脱

(1) 使用蠕动泵将预处理后的发酵液打入交换柱中, 调节交换柱顶部的进料速度和底部的出料速度均为 1 倍柱体积/h, 每 5~10 min 收集并测定流出液 pH 值和 L-色氨酸浓度, 当流出液浓度与上柱液浓度相同时停止上柱 (流出液颜色与进料液颜色相近时)。

(2) 树脂吸附结束后, 使用 1~2 倍柱体积的去离子水进行水洗, 流速为 1.5 倍柱体积/h;

(3) 水洗结束后, 使用浓度为 2 mol/L 氨水进行洗脱实验, 洗脱流速为 1 倍柱体积/h, 收集洗脱液, 每 5~10 min 测定流出液 pH 值和 L-色氨酸浓度, 当流出液颜色变淡时停止洗脱。

4. 洗脱液浓缩脱色

(1) 使用旋转蒸发仪对洗脱液进行浓缩, 控制料液温度在 50~60 °C, 浓缩液中 L-色氨酸含量控制在 25 g/L 左右;

(2) 浓缩液使用 80%的醋酸调节 pH 值至 6.0~7.0, 然后加入 1%的活性炭, 升温至 55~65 °C 搅拌 1 h, 然后使用抽滤瓶进行过滤, 可得到脱色液。

5. 脱色液浓缩

使用旋转蒸发仪对脱色液进行浓缩, 控制料液温度在 50~60 °C, 浓缩液中 L-色氨酸含量控制在 40 g/L 左右, 浓缩过程中应避免结晶析出。

6. 结晶

将浓缩的脱色液搅拌降温至 25 °C 左右时, L-色氨酸析出, 保温 1 h 后进行离心分离, 得到 L-色氨酸的结晶湿粉。

7. 干燥

将结晶湿粉置于真空干燥箱内 80 °C 过夜干燥 (实验三测定纯度)。

五、 实验结果及其处理

绘制 L-色氨酸的吸附和洗脱曲线;

六、 思考题

1. 洗脱液脱色的目的?
2. 树脂在吸附和洗脱过程中流出液的 pH 和 L-色氨酸含量的变化趋势?

七、 参考文献

- [1] 甘林火, 翁连进, 王士斌. 国产 732 型阳离子交换树脂吸附 L-精氨酸的特性[J]. 离子交换与吸附, 2002, 18(6): 559-563.
- [2] 徐虹, 藤农, 应汉杰, 等. 离子交换法提取 L-苯丙氨酸的研究[J]. 离子交换与吸附, 1999, 15(1): 81-85.
- [3] 梅丛笑. L-色氨酸提取工艺的研究[D]. 天津: 天津轻工业学院, 2000.
- [4] 武彩莲, 郭长江, 杨继军, 等. 发酵液中 L-色氨酸分离纯化工艺研究[J]. 氨基酸与生物资源, 2007, 29(3): 42-46.

实验三 L-色氨酸含量和纯度的测定

一、实验目的

1. 了解对二甲氨基苯甲醛与 L-色氨酸的反应机理；
2. 了解高效液相色谱分析的基本原理；
3. 掌握 L-色氨酸的测定方法。

二、概述和原理

L-色氨酸的分析方法主要有氨基酸自动分析仪分析法、高效液相色谱分析法、毛细管电泳法、薄层色谱法和分光光度法等。

本实验主要采用分光光度法进行 L-色氨酸含量测定。分光光度法测定 L-色氨酸的基本原理为：在硫酸溶液中，L-色氨酸与对二甲氨基苯甲醛发生缩合反应，生成的希夫碱对二甲氨基苯甲醛缩色氨酸为蓝色，颜色深度在一定范围内与 L-色氨酸含量成线性关系，可在分光光度计下定量测定。

高效液相色谱是色谱法的一个重要分支，其系统主要由储液器、泵、进样器、色谱柱、检测器、记录仪等几部分组成，由于该法具有高效、快速和灵敏等特点，不仅可用于 L-色氨酸含量的测定，还可用于纯度的测定。其工作原理为：储液器中的流动相被高压泵打入系统，样品溶液经进样器进入流动相，被流动相载入色谱柱（固定相）内，由于样品溶液中的各组分在两相中具有不同的分配系数，在两相中作相对运动时，经过反复多次的吸附-解吸的分配过程，各组分在移动速度上产生较大的差别，被分离成单个组分依次从柱内流出，通过检测器时，样品浓度被转换成电信号传送到记录仪，数据以图谱形式打印出来。

三、实验试剂及仪器

1. 试剂

浓硫酸；对二甲氨基苯甲醛；亚硝酸钠；L-色氨酸标准品；磷酸二氢钾；冰醋酸；甲醇（液相纯）；纯净水；乙腈（液相纯）。

2. 仪器

紫外可见分光光度计, Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪。

四、 发酵液中 L-色氨酸含量的测定

1. 对二甲氨基苯甲醛溶液 (3 g/L) 制备

准确称取 0.3 g 对二甲氨基苯甲醛, 溶于 100 mL 1:1 浓硫酸中。

2. 亚硝酸钠溶液 (2%) 制备

准确称取亚硝酸钠 0.2 g 于 10 mL 容量瓶中, 以蒸馏水定容, 新鲜配制。

3. L-色氨酸标准储备液 (100 mg/L) 制备

准确称取 25 mg L-色氨酸标准品, 用纯水定容于 250 mL 棕色容量瓶中, 制得浓度为 100 mg/L 的 L-色氨酸标准储备液, 于 4 °C 冰箱保存备用。

4. L-色氨酸标准曲线的测定

将 L-色氨酸标准储备液稀释至 20、40、60、80、100 mg/L, 分别量取 1 mL 稀释后的标准液与 9 mL 对二甲氨基苯甲醛溶液混合于试管中, 沸水加热 2 min, 再加入亚硝酸钠 1 滴, 混匀后, 继续加热 3 min, 冷水冷却, 最后以试剂作空白, 在 600 nm 处测定吸光值。以浓度为纵坐标, 相对应的吸光值为横坐标, 制作 L-色氨酸标准曲线。

5. 发酵样品的处理

取 1 mL 发酵液加入离心管中, 10000 rpm 离心 5 min, 取上清, 将上清液稀释 100 倍后用于 L-色氨酸含量的测定。

6. 发酵样品的测定

在与 L-色氨酸标准品相同的检测方法下进行样品测定, 所得的吸光值与 L-色氨酸标准曲线比对, 确定发酵液中 L-色氨酸的含量。

五、 L-色氨酸结晶纯度的测定

1. 流动相的制备

称取 1.3265 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 850 mL 水, 加 0.5 mL 乙酸, 混匀, 再加 150 mL 甲醇。过滤, 超声。

2. 色谱条件

色谱柱：Sunfire-C18（4.6×250 mm, Agilent 1200 Series LN MP055203）；

流速：1 mL/min；

检测波长：278 nm；

温度：36 ℃。

3. 标准样品的制备

精密称取 25 mg L-色氨酸标准品，用纯水定容于 25 mL 棕色容量瓶中，制得浓度为 1 g/L 的 L-色氨酸标准储备液，于 4 ℃ 冰箱保存备用。精密移取适量上述标准储备液，用纯水配制成浓度为 10、20、40、60、80、100 mg/L 的 L-色氨酸标准品溶液。使用前须用 0.22 μm 一次性针头过滤器过滤。

4. L-色氨酸标准曲线的测定

根据上文所述的色谱条件，将上述不同浓度的 L-色氨酸标准液进行 HPLC 测定，并以浓度为横坐标，相对应的峰面积为纵坐标，制作 L-色氨酸标准曲线。

5. L-色氨酸结晶样品的处理

准确称取 25 mg L-色氨酸结晶样品，用纯水定容于 250 mL 棕色容量瓶中，制得浓度为 100 mg/L，用 0.22 μm 一次性针头过滤器过滤，滤液用于 HPLC 测定。

6. 结晶样品纯度的测定

在与标准品相同的色谱条件下进行样品测定，根据保留时间确定样品中的 L-色氨酸，再将结晶样品峰的峰面积对照标准曲线可得到结晶样品中的 L-色氨酸含量，从而计算 L-色氨酸结晶纯度。

六、 实验结果及其处理

1. 绘制 L-色氨酸标准曲线。
2. 计算发酵液样品中 L-色氨酸含量。
3. L-色氨酸含量 = 标准曲线查得 L-色氨酸浓度 × 稀释倍数
4. 计算 L-色氨酸结晶的纯度。

$$\text{L-色氨酸结晶纯度} = \frac{\text{结晶中 L-色氨酸含量 (mg/L)}}{100 \text{ (mg/L)}} \times 100\%$$

七、 思考题

测定 L-色氨酸时，分光光度法相对于其他测定方法有何优缺点？

实验四 质粒 DNA 的提取实验

一、 目的要求

1. 了解并掌握质粒 DNA 的提取方法。

二、 概述和原理

质粒 (pLasnid) 是一种染色体外的稳定遗传因子, 大小在 1~200 kb 之间, 具有双链闭合环状结构的 DNA 分子, 主要发现于细菌、放线菌和真菌细胞中。质粒具有自主复制和转录能力, 能使子代细胞保持它们恒定的拷贝数, 可表达它携带的遗传信息。它可独立游离在细胞质内, 也可以整合到细菌染色体中, 它离开宿主细胞就不能存活, 而它控制的许多生物学功能也是对宿主细胞的补偿。

所有分离质粒 DNA 的方法都包括三个基本步骤: 培养细菌使质粒扩增; 收集和裂解细菌; 分离和纯化质粒 DNA。采用溶菌酶可破坏菌体细胞壁, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 可使细胞壁裂解, 经溶菌酶和阴离子去污剂 (SDS) 处理后, 细菌染色 DNA 缠绕附着在细胞壁碎片上, 离心时易被沉淀出来, 而质粒 DNA 则留在上清液中, 用乙醇沉淀、洗涤, 可得到质粒 DNA。

三、 实验材料、试剂与仪器

1. 仪器和材料

1 mL 移液枪, 200 μ L 移液枪, 20 μ L 移液枪, 台式高速离心机 (15000 r/min) 二台, 基因工程菌。

2. 试剂

碱裂解溶液 I: 50 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L EDTA- Na_2 (pH 8.0), 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 灭菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

碱裂解溶液 II: 0.2 mol/L NaOH, SDS 浓度为 1 %, 现用现配置, 室温下使用。

碱裂解溶液 III: pH 4.8 乙酸钾溶液 (60 mL 的 5 mol/L KAc, 11.5 mL 冰醋酸, 28.5 mL H_2O), 灭菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。该溶液钾离子浓度为 3 mol/L, 醋酸根离子浓度为 5 mol/L。用

时置于冰浴中。

四、 实验步骤

1. 培养细菌

将带有质粒 pGEX-2T-KGF 的基因工程菌接种在 LB 培养基中，37 °C 培养 12~18 h。

LB 培养基成分如下：每升含有大豆蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，用 NaOH 调 pH 至 7.5。加入抗生素氨苄青霉素 Amp，使用浓度均为 25 µg/mL。

2. 从菌落中快速提取制备质粒 DNA

- ① 取液体培养菌液 2 mL，在 10000 rpm 下离心 2 min，去掉上清液；
- ② 将细菌沉淀重悬于 100 µL 冰预冷的碱裂解溶液 I，剧烈振荡；（使用 EDTA 是为了去除细胞壁上的 Ca^{2+} 。）
- ③ 加入 200 µL 新配置的碱裂解溶液 II。加盖，快速颠倒离心管 5 次，使之混匀，切勿振荡！将离心管放置冰上；（SDS 能使蛋白质变性，NaOH 能使细胞裂解。）
- ④ 加入 150 µL 冰预冷的碱裂解溶液 III，加盖后颠倒数次使混匀，冰上放置 3~5 min；
- ⑤ 台式高速离心机，在 12000 rpm 下离心 10 min，上清液移入另一干净的离心管中。如果离心后上清液仍混浊，应将上清液冷却至 0°C 并重新离心；（乙酸钾能沉淀 SDS 和 SDS 与蛋白质的复合物，在冰上放置 15 min 是为了使沉淀完全。）
- ⑥ 向上清液中加入两倍体积的无水乙醇，混匀，静置 2 min；
- ⑦ 在 12000 rpm 下离心 5 min，收集沉淀的核酸；
- ⑧ 离心管中加入 1 mL 70%乙醇，混匀；
- ⑨ 12000 rpm 离心 5 min，倒尽上清液后，加入 50 µL 无菌水溶解沉淀；
- ⑩ 小离心管中加入 RNA 酶(10 mg/mL) 1µL，去除可能存在的 RNA，而后-20°C 下保存。

五、 思考题

如何提高质粒 DNA 的纯度？

六、 实验前期准备工作

碱裂解溶液 I~III;

灭菌: 100 mL LB 培养基, 100 mL 无菌水, 碱裂解溶液 I, 枪头;

提前一天接种培养基, 摇床培养过夜。

实验五 聚合酶链式反应体外扩增 DNA

一、实验目的与要求

1. 掌握 PCR 实验的原理及其操作过程；
2. 了解影响 PCR 反应的影响因素；
3. 了解 PCR 的用途。

二、实验原理

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法，为最常用的分子生物学技术之一。典型的 PCR 由（1）高温变性模板；（2）引物与模板退火；（3）引物沿模板延伸三步反应组成一个循环，通过多次循环反应，使目的 DNA 得以迅速扩增。

其主要步骤是：将待扩增的模板 DNA 置高温下（通常为 93 °C~94 °C）使其变性解成单链；人工合成的两个寡核苷酸引物在其合适的复性温度下分别与目的基因两侧的两条单链互补结合，两个引物在模板上结合的位置决定了扩增片段的长短；耐热的 DNA 聚合酶（Taq 酶）在 72 °C 将单核苷酸从引物的 3' 端开始掺入，以目的基因为模板从 5'→3' 方向延伸，合成 DNA 的新互补链。

PCR 能快速特异扩增任何已知目的基因或 DNA 片段，并能轻易在皮克（pg）水平上使起始 DNA 混合物中的目的基因扩增达到纳克、微克、毫克级的特异性 DNA 片段。因此，PCR 技术一经问世就被迅速而广泛地用于分子生物学的各个领域。它不仅可用于基因的分离、克隆和核苷酸序列分析，还可以用于突变体和重组体的构建，基因表达调控的研究，基因多态性的分析，遗传病和传染病的诊断，肿瘤机制的探索，法医鉴定等诸多方面。PCR 反应对模板 DNA 的纯度要求不高，所需样品量也极低，这就为抽提过程简单化创造了条件。

三、实验材料、试剂与仪器

1. 仪器

Bio-Rad iCyle PCR 仪、1 μL 、5 μL 、100 μL 移液枪、DNA 模版、对应目的基因的特异引物、DNA 聚合酶（Taq 酶）

2. 试剂

10×Buffer、2.5 mM dNTPmix（含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mM）

四、 实验方法与步骤

在冰浴中,按以下次序将各成分加入一无菌 0.5 mLPCR 管中(或者灭菌滴定板的孔);

10×PCR buffer	5 μL
20 mmol/L dNTP mix	0.5 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	2.5 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	2.5 μL
1-5 U/5 μL DNA 聚合酶	1~2 单位
模版 DNA	1~5 μL
ddH ₂ O	补充至 50 μL

下表提供标准 PCR 反应条件

Mg ²⁺	KCl	dNTPs	引物	DNA 聚合酶	模版 DNA
1.5 mmol/L	50 mmol/L	200 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	1-5 单位	1 pg~1 μg

（注：模板 DNA 的量要求根据 DNA 序列的复杂度适当改变，对于哺乳动物 DNA，每个反应 DNA 的量为 1.0 μg ，酵母、细菌及质粒 DNA 分别为 10 ng、1 ng 和 10 pg。）

调整好反应程序。将上述混合液稍加离心，立即置 PCR 仪上，执行扩增。一般：在 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3~5 min，进入循环扩增阶段：94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s → 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s → 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s，循环 30~35 次，72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 7 min，最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存；

结束反应，PCR 产物放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 待电泳检测或-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存；

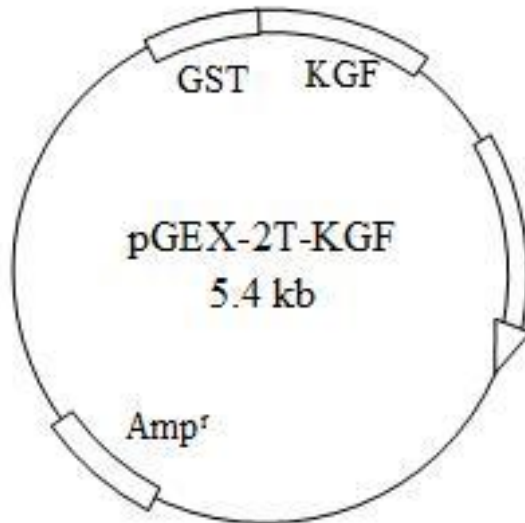
PCR 的电泳检测：如在反应管中加有石蜡油，需用 100 μL 氯仿进行抽提反应混合液，以除去石蜡油；否则，直接取 5~10 μL 电泳检测。

五、 数据处理及分析讨论

-
1. 如何提高 PCR 的忠实性？
 2. 如何降低 PCR 实验中的污染？
 3. 引物的设计需要注意什么事项？

六、 实验前期准备工作及注意事项

1. 反应缓冲液：一般随 Taq DNA 聚合酶供应。标准缓冲液含：50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3 室温), 1.5 mM MgCl₂;
2. PCR 反应应该在一个没有 DNA 污染的干净环境中进行。最好设立一个专用的 PCR 实验室;
3. 纯化模板所选用的方法对污染的风险有极大影响。一般而言, 只要能够得到可靠的结果, 纯化的方法越简单越好;
4. 所有试剂都应该无核酸和核酸酶的污染, 操作过程中均应戴手套;
5. PCR 试剂配制应使用最高质量的新鲜双蒸水, 采用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌或高压灭菌;
6. 试剂都应该以大体积配制, 试验一下是否满意, 然后分装成仅够一次使用的量储存, 从而确保实验与实验之间的连续性;
7. 试剂或样品准备过程中都要使用一次性灭菌的塑料瓶和管子, 玻璃器皿应洗涤干净并高压灭菌;
8. PCR 的样品应在冰浴上化开, 并且要充分混匀;
9. 所使用的质粒: pGEX-2T-KGF



10. KGF 基因大小为 585 bp。

具体序列（单链）如下：

```

1 atgcacaaat ggatactgac atggatcctg ccaactttgc tctacagatc atgctttcac
61 attatctgtc tagtggccac tatatcttta gcttgcaatg acatgactcc agagcaaatg
121 gctgcaaatg tgaactgttc cagccctgag cgacatacaa gaagttatga ttacatggaa
181 ggaggggata taagagttag aagacttttc tgcgaacac agtggtatct gaggattgat
241 aaacgaggca aagtaaaagg gactcaagag atgaagaaca attacaatat catggaaatc
301 aggactgtgg cagttggaat tgtggcaatc aaaggggtgg aaagtgaata ttatcttgca
361 atgaacaaag aaggaaaact gtatgcaaag aaagaatgca atgaagattg caacttcaag
421 gaattaattc tggaaaacca ttacaacaca tacgcatcag cttaatggac acacagtgga
481 ggagaaatgt ttgtgcctt aaatcaaaag ggggttcctg taagagggaa aaaaacgaag
541 aaagaacaaa aaacggccca ctttcttct atggcaataa cctaa
  
```

11. 所使用的引物：

上游（87 bp）：

5'-GTCGA,AGATCT,AAAAAA,ATG,GAG,ATG,TTC,CAG,GGG,CTG,CTG,CTG,TTG,C
TG,CTG,CTG,AGC,ATG,GGC,GGG,GCT,TGC,AAT,GAC,ATG,AGT,C-3'

下游 (56 bp):

5'-CACCG+AAGCTT+ACGCGT+ATG,ATG,GTG,ATG,GTG,ATG+TTA,AGT,TAT,TGC,
CAT,AGG,AAG-3'

实验六 琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定质粒 DNA

一、 目的要求

1. 了解质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳的原理；
2. 初步掌握质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分离技术。

二、 概述和原理

DNA 电泳一般使用的都是琼脂糖凝胶电泳，电泳的驱动力靠 DNA 骨架本身的负电荷。但是，区分这些条带直接可以用分子量而无需使用电荷数，是因为这些样品的电荷/分子量比都是恒定的了。以 DNA 分子为例，它在电泳中的移动是靠其骨架中磷酸所携带的负电荷来实现的，而这个磷酸分子又是每一个核苷酸中都有的，所以 DNA 分子所携带的负电荷数是由其核苷酸总数决定的。而且，DNA 分子中核苷酸的组成动辄成百上千，在如此大的分子量面前，讨论单个核苷酸之间分子量的差别就显得毫无意义。这样，DNA 分子中负电荷的量就可以用 DNA 的分子量来代替，反过来，DNA 的分子量也可以用 DNA 分子所携带的电荷来代替。

在低电压条件下，线性 DNA 片段的迁移速度与电压成比例关系，但是，在电场强度增加时，不同相对分子量的 DNA 片段泳动度的增加是有差别的。因而，随着电压的增加，琼脂糖凝胶的有效分离范围随着减小。为了获得电泳分离 DNA 的最大分辨率，电场强度不应高于 5 V/cm。

三、 实验材料、试剂与仪器

1. 仪器

电泳仪，电泳槽，样品槽模板（梳子），有机玻璃内槽，胶带，锥形瓶（100 mL），紫外灯，照相机，一次性手套，凝胶自动成像仪，微波炉，20 μ L 移液枪。

2. 试剂

琼脂糖

5×TBE 缓冲液（每升含 Tris 54 g，硼酸 27.5 g，EDTA- Na_2 3.72 g，pH 8.0）；

菲啶溴红染色液：将菲啶溴红（溴乙啶）溶于琼脂糖凝胶中，使最终浓度达 $1\ \mu\text{g/mL}$ ；
（注意：溴乙啶是中度毒物，能使 DNA 变性，切勿用手接触，应戴手套操作。）

上一个实验提取的质粒 DNA 和 PCR 产物；

标准质粒 DNA。

四、 实验步骤

1. 琼脂糖凝胶板的制备

琼脂糖凝胶的制备：称取 $0.4\ \text{g}$ 琼脂糖，置于锥形瓶中，加入 $40\ \text{mL}$ $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液，瓶口倒扣一个小烧杯，将锥形瓶用微波炉加热至琼脂糖溶解；

胶板的制备：用少量胶把有机玻璃内槽边缘封好，形成一个模子。将有机玻璃内槽模子放置在一个水平位置，放好样品槽模板梳子；

琼脂糖待温度冷却至 $50\ ^\circ\text{C}$ ，加入 $10\ \mu\text{L}$ 的溴乙啶，搅拌均匀后，将琼脂糖凝胶液小心地倒入有机玻璃内槽，控制灌胶速度，使胶液缓慢地展开，直到整个有机玻璃板表面形成均匀的胶层。室温下，静置 $30\ \text{min}\sim 1\ \text{h}$ 左右，待凝胶完全凝固后，轻轻拔出样品槽模板梳子，在胶板上即形成互相隔开的样品槽；

在样品槽内注满 $0.5\times\text{TBE}$ 缓冲液，取下有机玻璃内槽内的隔板，将制好的胶连同有机玻璃内槽一起放入电泳槽中使用。

2. 加样

用 $20\ \mu\text{L}$ 的移液枪将样品加入样品槽。加样时，应防止破坏样品槽周围的凝胶面，每个样品槽容量约为 $15\sim 20\ \mu\text{L}$ （根据槽的大小适当调整）；

3. 电泳

加完样后的凝胶板立即通电，进行电泳。但要注意控制一定的条件，先用 $70\ \text{mV}$ 的电压，将样品压出样品槽，而后，将电压下调至 $50\ \text{mV}$ ，进行电泳。当溴酚兰染料移动到距离胶板下 $1\sim 2\ \text{cm}$ 处，停止电泳。

4. 观察与拍照

在波长 $254\ \text{nm}$ 的紫外灯下，观察染色后的电泳凝胶。DNA 存在处显示红色的荧光条带，用凝胶自动成像仪拍摄电泳图片。

观察时要注意避免眼睛遭受强紫外光损伤，应戴上防护眼镜或有机玻璃防护面罩。

五、 思考题

1. 琼脂糖凝胶电泳能否跑蛋白质？
2. 蛋白质电泳和核酸电泳的区别是什么？

六、 附录实验前期准备工作

TBE 缓冲液配制；无菌水、枪头灭菌；

琼脂糖凝胶板的制备（若实验时间充裕有 5~6 h，则琼脂糖凝胶板的制备由学生完成。制胶板约 15 min，胶板凝固约 1 h）。

实验七 大肠杆菌的 DNA 转化实验

一、实验目的

1. 以目的基因转化大肠杆菌为例，学习转化的基本原理及方法；
2. 验证 DNA 是遗传物质，加深对中心法则的理解。

二、实验原理

转化（Transformation）是指一段同源或异源的 DNA 转入受体细胞并得到表达的水平基因的转移过程，是现代分子生物学研究和基因工程不可缺少的重要技术。目前常用的转化方法有 CaCl_2 法（化学转化法）和电转化法。本实验采用 CaCl_2 转化法。

该方法的主要原理：用低渗 CaCl_2 溶液在低温（0℃）时处理快速生长的细菌，从而获得感受态细菌。此时细菌膨胀成球形，外源 DNA 分子在此条件下易形成抗 DNA 酶的羟基—钙磷酸复合物粘附在细菌表面，通过热激作用促进细胞对 DNA 的吸收。转化效率可达 $10^6 \sim 10^7$ 转化子/微克 DNA。本方法的关键是选用的细菌必须处于对数生长期，实验操作必须在低温下进行。

三、实验材料

1. 实验设备

三孔恒温水浴锅，电热恒温培养箱，无菌工作台，200 μL 移液枪，20 μL 移液枪。

2. 试剂

含 Amp 的 LB 筛选平板，感受态细胞 DH5 α

四、实验步骤

1. 菌液分装入 ep 管（1.5 mL），于 6000 rpm 离心 5 min，沉淀菌体，弃上清液；
2. 加 800 μL 预冷的 CaCl_2 （0.1 mol/L）重新悬浮沉淀，6000 rpm 离心 5 min，弃上清液；
3. 每管中加 100 μL CaCl_2 （0.1 mol/L 含 20% 甘油）重新悬浮，置于冰上备用或于 -70℃ 冰箱保存；

-
4. 取 30 μL 感受态细胞悬液，加入重组质粒 10 μL 轻轻摇匀，冰上放置 30 min;
 5. 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热击 60 s，热击后迅速置于冰上冷却 3~5 min;
 6. 向管中加入 100 μL LB 液体培养基(不含 Amp)，混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴培养 1 h;
 7. 将上述菌液摇匀后涂布于含 Amp 的筛选平板上，正面向上放置半小时，待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~24 h。(使细菌恢复正常生长状态，并表达质粒编码的抗生素抗性基因(Amp))。

同时做两个对照：

- (1). 对照组 1：以同体积的无菌双蒸水代替质粒溶液，其它操作与上面相同。此组正常情况下在含抗生素的 LB 平板上应没有菌落出现。
 - (2). 对照组 2：以同体积的无菌双蒸水代替 DNA 溶液，但涂板时只取 5 μL 菌液涂布于不含抗生素的 LB 平板上，此组正常情况下应产生大量菌落。
8. 统计每个培养皿中的菌落数。

转化后在含抗生素的平板上长出的菌落即为转化子，根据此皿中的菌落数可计算出转化子总数和转化频率，公式如下：

- (1). 转化子总数 = 菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 转化反应原液总体积 / 涂板菌液体积
- (2). 转化频率 (转化子数 / 每 mg 质粒 DNA) = 转化子总数 / 质粒 DNA 加入量
- (3). 感受态细胞总数 = 对照组 2 菌落数 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 菌液总体积 / 涂板菌液体积
- (4). 感受态细胞转化效率 = 转化子总数 / 感受态细胞总数

五、 思考题

1. 电转化法的基本原理？
2. 感受态细胞制备与转化过程中的影响因素有哪些？
3. “蓝白筛”的基本原理？

六、 参考文献

萨姆布鲁克，鲁塞尔，黄培堂，分子克隆实验指南，科学出版社，北京，2002.

实验八 厌氧细菌丁酸梭菌的培养

一、实验目的

1. 了解氧对厌氧微生物生长的影响及其原理；
2. 学习厌氧微生物的培养方法，使学生对工业微生物的培养方法有较全面的认识，提高学生动手能力及综合素质。

二、基本原理

分子氧对好氧微生物和厌氧微生物都有毒害作用，因为在有分子氧存在的条件下，会在微生物胞内生成超氧阴离子，对细胞有毒害作用。对于好氧微生物，由于能合成超氧化物歧化酶和过氧化氢酶，剧毒的超氧阴离子先被超氧化物歧化酶转化成毒性较低的过氧化氢，过氧化氢再被过氧化氢酶迅速分解，从而消除其对微生物细胞的毒害作用。而厌氧微生物不能合成这些酶，不能将超氧阴离子和过氧化氢迅速转化掉，细胞易被杀伤，故厌氧微生物在有氧时不能生长。

因此，在培养厌氧微生物时，需要消除环境中的氧气并降低培养基的氧化还原势。消除氧气的方法有物理、化学和生物方法，或它们的综合使用。简单地介绍如下：

(1). 通无氧气体。向厌氧微生物培养的小环境和培养基中通入无氧气体，如高纯氮气和二氧化碳，即可基本驱除其中的氧气。

(2). 添加还原剂。向培养厌氧微生物的培养基中添加还原剂，如半胱氨酸和硫化钠，可消除其中的氧，降低培养基的氧化还原势。

(3). 碱性焦性没食子酸法。焦性没食子酸与碱溶液作用后形成易被氧化的碱性没食子盐，能通过氧化作用而形成黑、褐色的焦性没食子橙，从而除掉密封容器中的氧。该法操作简单，无需特殊和昂贵的设备，但其除氧速度较慢。

对于一些厌氧要求较高的微生物，如产甲烷菌，单一的除氧方法无法达到其生长所需的厌氧程度，常需结合两种除氧方法。如对培养基进行除氧，制作预还原培养基时，常先向培养基中通高纯氮气，先去除培养基中的绝大部分的氧后，再往培养基中添加适量的还原剂，即可制成高度无氧的预还原培养基。

厌氧微生物的培养方法有多种，主要是在培养过程中避免使菌与氧气接触，下面介绍几种常用的方法：

(1). 深层穿刺培养法。在试管中倒入适当高度的预还原固体培养基，凝固后穿刺接菌种，用胶塞封口。培养后可见到生长的厌氧微生物菌落。此方法对于一般的厌氧微生物使用。

(2). 深层穿刺与化学吸氧相结合。将大试管灭菌，在底部放一点脱脂棉，在脱脂棉上放上适量的焦性没食子酸，加入碱液后迅速将一已穿刺培养的小试管以开口状态放入此大试管，并将大试管管口密封，强化厌氧条件。

(3). 厌氧手套箱法。厌氧手套箱是一密封装置，先通过用高纯氮气对箱内进行换气，使箱内的氧气浓度降至很低的水平，再用含有氢气的混合气体置换箱内的气体，通过箱内的钯催化剂将箱内剩余氧与氢反应生成水，进一步除氧，使箱内达到高度的厌氧状态，即可通过手套在箱内进行菌种的分离培养操作。使用厌氧手套箱进行厌氧微生物培养时，整个过程都在厌氧状态下进行，在研究极端严格厌氧菌时更具有优势。但其设备和日常操作费用比较昂贵。

本实验以厌氧菌丁酸梭菌为菌种，用高层半固体琼脂柱进行培养，观测菌种在琼脂柱中的生长情况，以了解氧对厌氧微生物生长的影响。

三、 实验材料、试剂与仪器

1. 菌种

丁酸梭菌 (*Clostridium butyricum* VPI 1718)

2. 培养基

生长培养基 (/L): 甘油, 20 g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 4.45 g; KH_2PO_4 , 1.3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g; 酵母粉, 1 g; Fe 溶液, 1 mL; 微量元素溶液, 2 mL; pH 调至 7.5。

半固体培养基: 在生长培养基中添加 5 g/L 的琼脂。

Fe 溶液 (/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g; HCl (37%), 4 mL。

微量元素溶液 (/L): $ZnCl_2$, 0.07 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.1 g; H_3BO_3 , 0.06 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,

0.2 g; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.035 g; HCl (37%), 0.9 mL。

3. 仪器设备

恒温培养箱，往复式恒温摇床，pH 计，试管及棉塞，血清瓶及配套设备，市售医用一次性无菌注射器。

4. 其他试剂

半胱氨酸盐酸盐一水；液体石蜡，121 °C 灭菌备用。

四、 实验操作步骤

1. 预还原培养基的制备

量取 50 mL 和 100 mL 配置好的培养基装入血清瓶(或在瓶中预先加入对应量的琼脂以制备半固体培养基)，通入高纯氮气 10 min (50 mL) 或 15 min (100 mL)，通气过程中适当搅动通气针，在接近通气结束时，在氮气保护下加入半胱氨酸 (0.5 g/L)，通气结束后迅速塞上胶塞并用铝盖密封，121 °C 灭菌备用。

2. 菌种活化及扩培

用无菌注射器抽取保存于 4 °C 的菌液 2 mL，接种于装有 50 mL 培养基的血清瓶中，37 °C 摇床过夜培养 16 至 18 h，转速 150 rpm。将活化后的菌种用无菌注射器抽取 5 mL 接种于装有 100 mL 培养基的血清瓶中进行扩培，37 °C 摇床培养 4 h，转速 150 rpm。

3. 高层半固体琼脂柱培养

将玻璃试管塞上棉塞，121 °C 灭菌备用。

将血清瓶中的半固体培养基加热溶化后保温于 50 °C 水浴中。用无菌注射器按 5% 的接种量抽取扩培后的菌种接种于半固体培养基中，摇匀。在无菌状态下迅速打开瓶口并倒入已灭菌的玻璃试管中，倒入量为试管的 2/3，制备两支，其中一支倒入高度约 2 cm 的已灭菌的液体石蜡，塞上棉塞，并在试管上写上标记，放于 37 °C 恒温培养箱中培养。

五、 实验结果

对比两支试管中菌体的生长情况（条件允许可拍照）并予以分析。

六、 参考文献

-
- [1] 微生物学教程（第二版）. 周德庆, 高等教育出版社, 2002
 - [2] 现代微生物学与实验技术. 林雅兰等, 科学出版社, 2002

实验九 碱性磷酸酶的酶促反应动力学实验

一、实验目的

1. 通过实验加深关于底物浓度的变化对酶促反应速度的影响的认识；
2. 通过实验了解酶标仪的相关操作。

二、实验原理

酶促反应动力学（Kinetics Enzyme-Catalyzed Reactions）主要研究各种理化因素对酶促反应速度的影响。在酶的结构与功能关系以及酶作用机理的研究中，需要动力学提供证据。为了最大限度地实现酶促反应的高效率、寻找最有利的反应条件以及了解酶在代谢中的作用和某些药物的作用机理等，都需要掌握酶促反应速度的规律。因此，酶促反应动力学是酶学研究中的一个既具有重要理论意义又具有实践意义的课题。影响酶促反应速度的因素主要有底物的浓度、酶的浓度、温度、pH 值、酶的激活剂及抑制剂等。本实验中主要考虑底物浓度对其影响。

在酶浓度、温度、pH 值恒定的条件下，对大多数酶来说，在低底物浓度时，反应速度与底物浓度成正比，表现为一级反应特征，当底物浓度达到一定值，几乎所有的酶都与底物结合，反应速度达到最大值（ $V_{\max}$ ），此时再增加底物浓度，反应速度不再增加，表现为零级反应。

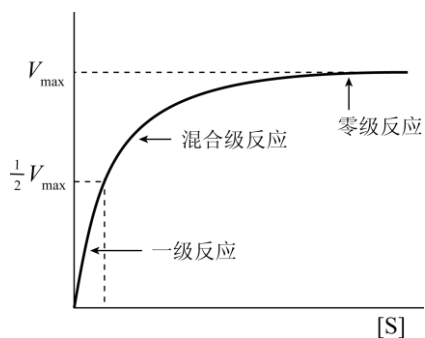
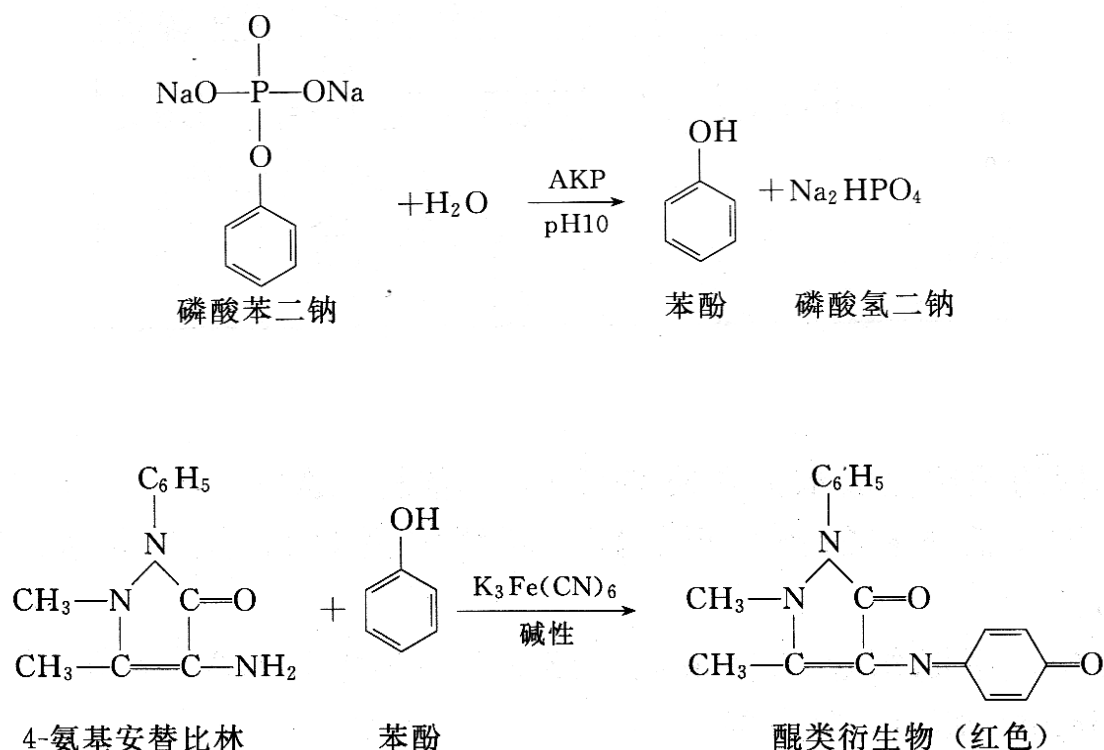


图 9-1 底物浓度对反应初速度的影响

碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, ALP/AKP）正式化学名为磷酸单酯水解酶（EC 3.1.3.1），是一种非特异性的水解酶，最适 pH 为 7.6~10.4。不同来源的 ALP，其分子量

和亚基结构各不相同。小牛肠碱性磷酸酶分子量为 145 kDa，等电点为 5.7，最适 pH 值为 10.0。本实验以不同浓度的磷酸苯二钠作为 ALP 的底物，在最适条件下（pH=10.0，37 °C）准确反应 15 min，使之水解释放出苯酚和磷酸氢二钠，在碱性溶液中与 4-氨基安替比林作用，经铁氰化钾氧化而成红色的醌类衍生物，其色泽深浅与光密度成正比，反应式如下：



三、实验试剂及仪器

1. 试剂

0.1 mol/L、pH 10.0 的碳酸盐缓冲液：称取无水碳酸钠 3.18 g、碳酸氢钠 1.68 g，置于 500 mL 容量瓶中，加少量蒸馏水使之溶解并稀释至刻度；

0.02 mol/L 磷酸苯二钠底物溶液：称取磷酸苯二钠（ $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, A.R.）0.05 g，置于 10 mL 容量瓶中，加蒸馏水溶解并稀释至刻度；

0.3 %4-氨基安替比林溶液：称取 4-氨基安替比林 0.03 g，溶解于 10 mL 容量瓶中；

0.5 %铁氰化钾溶液：称取铁氰化钾 0.05 g，溶于 4 mL 蒸馏水中，另称 0.15 g 硼酸，溶于 4 mL 蒸馏水中，将两液混合，定容至 10 mL，置棕色瓶内；

酶液：0.1 U/ μ L 碱性磷酸酶

2. 仪器

SPECTRA MAX-190 型酶标仪，酶标板，容量瓶等。

四、 实验操作步骤

取酶标板一块，按下表依次加入试剂，每一样品同时做 3~6 个平行样

试 剂	酶标板孔编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
底物溶液/ μ L	0	2	4	8	16	24	32	40
缓冲液/ μ L	36	36	36	36	36	36	36	36
蒸馏水/ μ L	40	38	36	32	24	16	8	0
4-氨基安替比林/ μ L	40	40	40	40	40	40	40	40
铁氰化钾/ μ L	80	80	80	80	80	80	80	80
混合后，37 $^{\circ}$ C 预温 5 min								
酶液/ μ L	4	4	4	4	4	4	4	4

五、 实验结果及其处理

以 1 号孔为空白，于 510 nm 下比色，记录每个孔板每隔 20 s 的吸光度变化情况，和同一时间下所有孔板的吸光度变化情况，作出相应的变化曲线。

以时间为横坐标，绘制不同底物浓度下 OD 值随时间的变化曲线图，计算不同浓度下的初速度 $V_{\max}$ ，做初速度与浓度的双倒数坐标图，得到 K_m 与 $V_{\max}$ 值。

六、 思考题

1. 实验操作过程的注意事项及误差产生的原因，如何减小误差？

-
2. 高浓度底物对酶是否产生抑制？
 3. 酶催化反应动力学的研究意义？

七、 参考文献

- [1] 栾雨时等, 生物工程实验技术手册, 化学工业出版社, 2005.
- [2] 苏拔贤, 生物化学制备技术, 科学出版社, 1998.

实验十 荧光显微镜检测大肠杆菌基因工程菌死活细胞

一、 目的要求

1. 熟悉荧光显微镜的使用方法，掌握荧光显微镜滤镜的选择标准；
2. 了解 AO/EB 的染色原理及其实验步骤；
3. 通过 AO/EB 染色观察，区分正常细胞及死亡细胞荧光染色的不同，从而区分死活细胞，达到观察和区分微生物的不同生理状态的目的，最终用于考察含 RBS0.07 细胞程序性死亡群体感应通路工程菌(*E. coli* BL21(DE3))的活菌曲线动态变化过程。

二、 背景知识

荧光法较一般光学方法具有灵敏度高、特异性强、方法简便等优点，利用荧光技术可研究细胞内化学成分的分布与定位，研究细胞与组织中物质的吸收与转运，进行病理鉴别以及细胞免疫等方面的研究。

当用一种波长的光（如紫外光）照射某种物质时，这种物质会在极短的时间内发射出较照射波长为长的光（可见的光），这种光就称为荧光。有些生物材料受到紫外线照射后能直接发出荧光称自发荧光（或直接荧光）；有的生物材料受紫外线照射后并不发光，但当它吸收荧光染料后，也同样产生荧光，称间接荧光（或次生荧光）。除少数生活物质含有自发荧光外，大多数研究需外加荧光染料，进行特异性结合而得以显示。

荧光显微镜（FLuorescence Microscope）是用来观察标本中的自发荧光物质或以荧光素染色或标记的细胞和结构。常用的染色方法有丫啶橙（AO）染色、碘化丙啶（PI）染色、DAPI 染色、Hoechst33342 染色、Hoechst 33342-PI 双重染色和丫啶橙/溴化乙锭（AO/EB）双重染色等。AO/EB 双重染色法的染色原理是基于正常细胞和死亡细胞生化性质的差异，AO 是最经典的灵敏的荧光染料，能进入细胞膜正常的细胞，与 DNA 结合发绿色，EB 不能进入正常细胞，但能穿透死亡细胞的细胞膜，与 DNA 结合发橙红色荧光。AO/EB 双重染色结果为：正常活细胞只被 AO 染色，胞核呈绿色，但密度不均，表现所谓“结构样”特征。死亡细胞被 EB 染色，发红色荧光。

三、 仪器与方法

1. 仪器

荧光显微镜

荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本工具。它是由光源、滤板系统和光学系统等主要部件组成。是利用一定波长的光激发标本发射荧光，通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像（图 10-1， 10-2）。



图 10-1. 倒置荧光显微镜



图 10-2. 荧光显微镜部件图

光源多采用 200 W 的超高压汞灯，它是用石英玻璃制作，中间呈球形，内充一定数量的汞，工作时由两个电极间放电，引起水银蒸发，球内气压迅速升高，当水银完全蒸发时，可达 50~70 个标准大气压力，这一过程一般约需 5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光，足以激发各类荧光物质，因此，为荧光显微镜普遍采用。

滤色系统是荧光显微镜的重要部位，常有以下几种激发滤光片：B（干涉激发滤片 490 nm 蓝色光激发）；BV（404~435 nm 蓝色光激发）；G（干涉激发滤片 520~550 nm 绿色光激发）；V（干涉激发滤片 410~420 nm 紫色光激发）；UV（356 nm 紫外光激发）。基本要求是以获得最明亮的荧光和最好的背景为准。

载玻片

载玻片厚度应在 0.8~1.2 mm 之间，太厚的载玻片，一方面光吸收多，另一方面不能使激发光在标本上聚集。载玻片必须光洁，厚度均匀，无明显自发荧光。有时需用石英玻璃载玻片。

盖玻片

盖玻片厚度在 0.17 mm 左右，光洁。为了加强激发光，也可用干涉盖玻片，这是一种特制的表面镀有若干层对不同波长的光起不同干涉作用的物质（如氟化镁）的盖玻片，它可以使荧光顺利通过，而反射激发光，这种反射的激发光源可激发标本。

2. 标本

组织切片或其他标本不能太厚，如太厚激发光大部分消耗在标本下部，而物镜直接观察到的上部不充分激发。另外，细胞重叠或杂质掩盖，影响判断。

3. 图像记录方法

荧光显微镜所看到的荧光图像，一是具有形态学特征，二是具有荧光的颜色和亮度（荧光亮度的判断标准：一般分为四级，即“-”无或可见微弱荧光。“+”仅能见明确可见的荧光。“++”可见有明亮的荧光。“+++”可见耀眼的荧光），在判断结果时，必须将二者结合起来综合判断。结果记录根据主观指标，即凭工作者目力观察。作为一般定性观察，基本上可靠的。

荧光显微镜摄影技术对于记录荧光图像十分必要，由于荧光易褪色减弱，要即时摄影记录结果。方法与普通显微摄影技术基本相同。只是需要采用高速感光胶片如 ASA200 以上或 240 以上。因紫外光对荧光猝灭作用大，如 FITC 的标记物，在紫外光下照射 30 s，荧光亮度降低 50%。所以，曝光速度太慢，就不能将荧光图像拍摄下来。一般研究型荧光显微镜都有半自动或全自动显微摄影系统装置。

四、 实验步骤

1. 试剂

缓冲体系：用 pH 6.6 的 PBS 缓冲液（1 mol/L Na_2HPO_4 , 35.2 mL, 1 mol/L NaH_2PO_4 , 64.8 mL）；

AO 保存液：用缓冲液将 AO 溶解至终浓度为 10 g/L，4 °C 保存。已检测过将浓缩液放置数月后，并无观察到染色活性的丢失；

EB 保存液：用缓冲液将 EB 配成 1 g/L，4 °C 保存；

AO/EB 溶液：1 份 PBS 中 100 µg/mL AO 溶液，1 份 PBS 中 100 µg/mL EB 溶液。

2. 细胞收集

活细胞收集：采用装有 LB 液体培养基的试管，过夜培养细胞。将悬浮细胞直接收集到 10 mL 的离心管中，用缓冲液稀释至样本细胞数量级为 10^6 /L，4 °C 保存；

死细胞制备：乙醇固定法，细胞经乙醇固定后通透性增强，DNA 可被 EB 着染。取 2.1 中的一管细胞悬液于 1000 rpm 离心 10 min 沉淀细胞，弃上清，用 PBS 洗涤三次。加入 70% 冰冷乙醇，4 °C 固定 1~2 h。1000 rpm 离心 10 min，弃乙醇，用 PBS 清洗 2 次。乙醇固定的细胞不易沉淀，可在洗涤截止中加入 BSA 克服。用 PBS 重悬细胞至浓度为 2.1 中活细胞的浓度，4 °C 保存；

活/死细胞各半的样品制备：取 2.1 的活细胞与 2.2 的死细胞等量混合，4 °C 保存。

含 RBS0.07 细胞程序性死亡群体感应通路工程菌(*E. coli* BL21(DE3))的活菌曲线观察：采用装有 LB 液体培养基的试管，过夜培养含有程序性死亡群体感应通路的细胞。将不同时间点取样的悬浮细胞分别收集到 10 mL 的离心管中，用缓冲液稀释至样本细胞数量级为 10^6 /L，各离心管做好标记，4 °C 保存。

3. 加入染色剂（AO/EB 溶液）

1 µL AO/EB 溶液孵育 25 µL 悬浮细胞 (10^6 /mL)。轻微混合。每个样品显微定量前应混合。样品必须马上测。

4. 荧光显微镜分析

将载玻片（必须十分清洁）平放在桌上，置 10 µL 悬浮细胞于显微载玻片上，加盖玻片（注意防止气泡），在荧光显微镜下观察。

5. 结果判断

在蓝光激发下，活细胞呈明亮的绿色荧光，死细胞呈明亮橙色荧光；在绿光激发下，活细胞呈弱红色荧光，死细胞呈亮红色荧光；在紫外激发下，活细胞呈亮蓝色荧光，死细胞呈橙色荧光。

五、 结果讨论

1. 正常/死亡细胞荧光染色观察

激发光	蓝光	绿光	紫外
活细胞颜色/强度			
死细胞颜色/强度			

2. 荧光显微镜定量分析不同比例的正常/死亡细胞

配制比例	100%活细胞	100%死细胞	活/死细胞各半	基因工程菌的 活菌曲线观察
荧光显微镜分析结果				

注意事项:

- (1). 荧光显微镜光源寿命有限，标本应集中检查，以节省时间，保护光源。天热时，应加电扇散热降温，新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再用时，须待灯泡充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源；
- (2). 检查时间每次以 1~2 h 为宜，若超过 90 min，超高压汞灯发光强度逐渐下降，荧光减弱；标本受紫外线照射 3~5 min 后，荧光也明显减弱；所以，最多不得超过 2~3 h；
- (3). 显微放大倍数依照细胞形态而定，核形应该分辨清楚；
- (4). 每种荧光染料，均有自己的最适 pH 值，此时荧光最强。当 pH 改变时，不仅荧光强度减弱，而且波长将有所改变，因此荧光检测时要在一定的 pH 值的缓冲液中进行；
- (5). 荧光染色在 20 ℃ 以下时荧光比较稳定，温度升高常出现温度猝灭；
- (6). 一般荧光染液的浓度在万分之一以下，甚至亿万分之一，也能使标本着色。在一定的限度内，荧光强度可随荧光素的浓度增加而增强，但超过限度，荧光强度反而下降，这是由于荧光分子间的缔合而使自身荧光猝灭所致；
- (7). 在荧光观察中，常因激发光的增强而使样品荧光很快衰竭，造成观察和照相困难。

为此最好用能量小的长波长光进行观察，需照相时再适当增强激发光。

六、 思考题

1. 为什么标本染色后应立即观察？
2. 滤色系统选择的依据是什么？
3. 该方法有什么优缺点？一般只用该法做定性观察，如需做定量测定需用什么方法？

七、 参考文献

- [1] 细胞生物学实验. 蒋亚林, 复旦大学出版社, 1996.
- [2] 荧光与荧光显微镜. 杨广烈, 光学仪器, 2001, 23(2): 18~29.
- [3] 显微术中的分析与定量方法. 米克, 埃尔德编, 管汀鹭译, 科学出版社, 1983.