

三孢布拉霉结合实验

参考文献：

熊力，三孢布拉霉发酵产番茄红素的代谢调控研究，华中科技大学，硕士学位论文 2012.

实验材料：

三孢布拉霉（产 β -胡萝卜素，+ 菌）*Neurospora crassa* CCTCC AF 97006

三孢布拉霉（产 β -胡萝卜素，- 菌）*Neurospora crassa* CCTCC AF 96002

三孢布拉霉发酵产生 β -胡萝卜素：

三孢布拉霉正负菌混合培养会增加其 β -胡萝卜素的产量。正、负菌混合培养时属于有性生殖，正、负菌的菌丝体互相接触，可生成有性生殖促进剂三孢酸（在 β -胡萝卜素合成过程中存在的一种酶）。此酶主要在八氢番茄红素之后起作用。三孢酸在培养基中能促进上述酶的大量产生，使得八氢番茄红素大量转化为 β -胡萝卜素。

实验步骤：

✿ 孢子悬液的制备。在无菌条件下，分别挑取斜面培养的三孢布拉霉正、负菌接种到装有 60ml PDA 培养基的 250ml 三角瓶中，在 30℃ 恒温培养箱中培养，待菌丝长满后，将三角瓶置于 18℃ 低温下刺激 2 天，此时可以看到三孢布拉霉正、负菌的菌丝都生成大量孢子。加入 60ml 含有玻璃珠的灭菌生理盐水，180r/min 摇床振荡处理 10min。将孢子充分打散，得到孢子悬液。然后吸取 1ml 孢子悬液到灭菌的离心管中。血球计数板计数后，调整孢子浓度至 5×10^3 个/ml。

✿ 将正、负菌按 1:2 的比例接种到发酵培养基中。接种量为 10%。28℃ 培养。每天对发酵液的生物量及产生 β -胡萝卜素进行测定。

实验结果：

结果表明 7 天时生物量达到最大值，培养基中的糖几乎耗尽。发酵 8 天 β -胡萝卜素产量达到最大值。

教学建议：

- ✨ 最佳发酵条件为，初始 pH 为 6.5，装液量为 90/250ml。摇床转速为 180r/min，发酵温度 28℃。
- ✨ 发酵培养基，葡萄糖 100g/L、酵母浸粉 12g/、磷酸二氢钾 3g/L、磷酸氢二钠 3g/L、七水硫酸镁 0.5g/L。
- ✨ 最佳保存条件：室温保存，可用于一周教学实验。

Ames 致突变和致癌实验

实验教材：

沈萍，陈向东《微生物学实验》4版. 高等教育出版社.2007, 137-140.

实验材料：

菌株：鼠伤寒沙门氏菌突变型 TA97 (CCTCC AB 2014173)，TA98 (CCTCC AB 204062)，TA100 (CCTCC AB 204063)，TA102 (CCTCC AB 2014174)；

培养基：LB 培养基，底层葡萄糖基本培养基，表层琼脂培养基（含 10% 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液，2ml/管）；

溶液、试剂及待测物质：滤纸片，氨苄青霉素溶液(8mg/ml)，四环素溶液(8mg/ml)，结晶紫溶液(1mg/ml)，秋水仙碱，亚硝酸钠，丙烯酰胺，无菌水。

实验步骤：

1. 鉴定实验

(1) 组氨酸营养缺陷 (his^-) 实验

- 1.1 分别制备底层葡萄糖基本培养基平板和含有 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液 (0.2ml/皿) 的底层葡萄糖基本培养基平板；
- 1.2 用无菌棉签蘸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液，分别划线接种于含组氨酸和不含组氨酸的平板上；
- 1.3 将平板倒置放入 37℃ 培养箱培养 48h，观察菌株生长情况。若菌株只在添加微量组氨酸的平板上生长，而在不含组氨酸的平板上不能生长，则菌株为 his^- 型菌株。

(2) 紫外线敏感实验 (Δ uvrB 实验)

- 2.1 制备含有 0.5mmol 组氨酸/生物素溶液 (0.2ml/皿) 的底层葡萄糖基本培养基平板, 用无菌棉签分别蘸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液在平板上平行划线;
- 2.2 待菌液浸干后, 打开皿盖, 用锡箔纸遮盖平板的一半, 置于 15W 紫外灯下照射 15s;
- 2.3 盖上皿盖, 置 37°C 避光培养 27h, 观察菌株生长情况。只在未经照射一侧的平板上生长的菌株为 Δ uvrB 型菌株。

(3) 抗氨基青霉素实验 (R 因子-抗氨基青霉素实验);

- 3.1 吸取 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液 0.1ml 分别放入盛有 2ml 表层培养基的试管中 (预先加热融化后 45°C 保温), 摇匀后倾倒在底层葡萄糖基本培养基平板上, 并使其分布均匀;
- 3.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 8mg/ml 氨基青霉素溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

(4) 抗四环素实验 (质粒 pAQ1 菌株实验)

- 4.1 平板制备同 3.1
- 4.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 8mg/ml 四环素溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

(5) 结晶紫敏感实验 (深粗糙突变, rfa)

- 5.1 平板制备同 3.1
- 5.2 待琼脂凝固后, 将一直径约 1cm 的无菌滤纸片贴在平板上, 然后在滤纸片上滴加 1mg/ml 结晶紫溶液 20 μ l, 倒置于 37°C 培养 24h, 观察滤纸片周围是否出现抑菌环。

2.致癌物检测（平板渗入法）

- (1) 制备底层葡萄糖基本培养基平板，置于 37°C 培养箱中过夜；
- (2) 菌液准备：分别挑取适量四种缺陷菌株，接种于 LB 液体培养基中振荡培养 10~12h，使菌液浓度达到 $(1\sim 2) \times 10^9$ 个/ml；
- (3) 表层培养基试管置于 45°C 水浴备用，依次加入 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌悬液 0.1ml 和待检测致癌物质 0.1ml；
- (4) 表层培养基混匀后，迅速倾倒在底层葡萄糖基本培养基平板上，平放凝固后，倒置于 37°C 培养箱 48h 后观察结果，计数平板上的回变菌落数。

实验结果：

1.鉴定试验

各菌株的鉴定结果如下：

TA97：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA98：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA100：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线敏感，氨基青霉素不敏感，四环素敏感；

TA102：组氨酸缺陷，结晶紫敏感，紫外线不敏感，氨基青霉素不敏感，四环素不敏感。

综合以上结果，本实验选用的鼠伤寒沙门氏组氨酸缺陷型菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 均符合 Ames 实验要求。

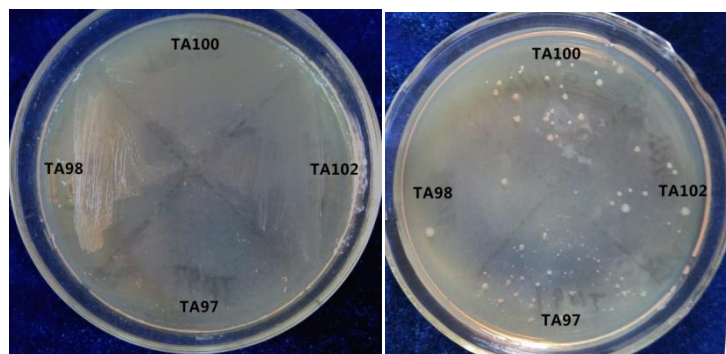


图 1.组氨酸营养缺陷实验：分别为含组氨酸和不含组氨酸的平板

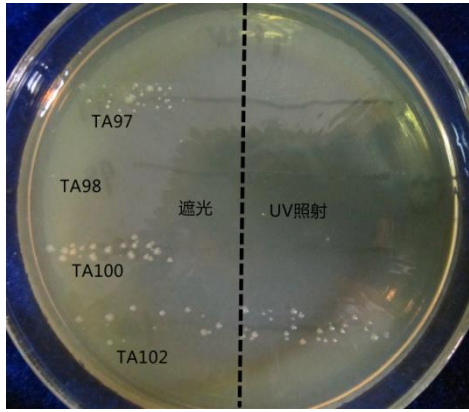
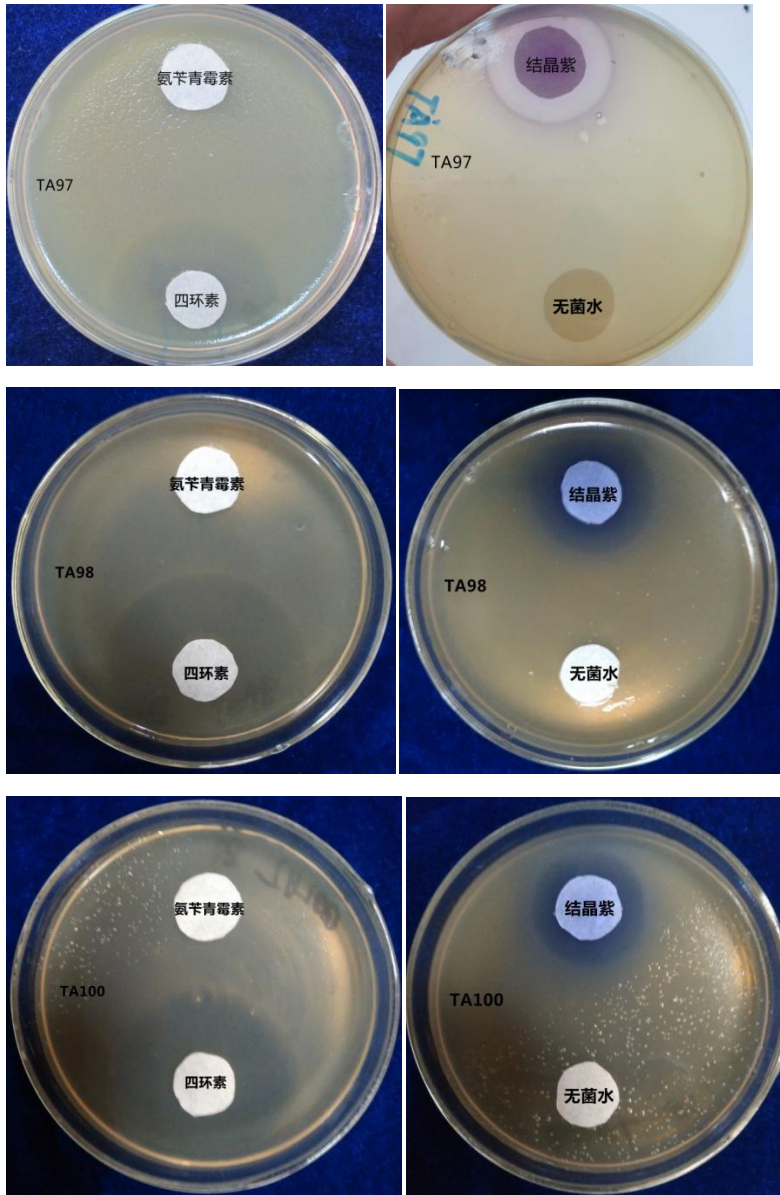


图 2. 紫外线敏感实验



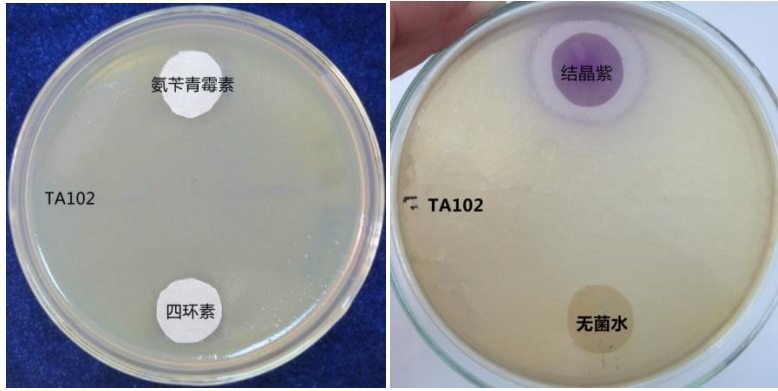


图 3：抗氨苄青霉素实验、抗四环素实验和结晶紫敏感实验

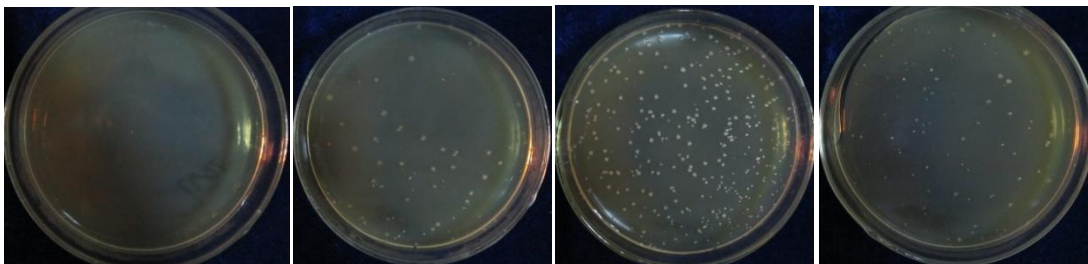
2. 致癌物检测（平板渗入法）

计数结果（CFU/皿）：

菌株 检测物	TA97	TA98	TA100	TA102
空白	1	73	350	85
秋水仙碱	32	102	444	119
亚硝酸钠	29	83	684	524
丙烯酰胺	19	113	524	125

三种待检测物导致的四种菌株菌落突变数均多于自发突变菌落数，可认为三种待测物为致癌物或致突变物质。

空白（自发突变）：



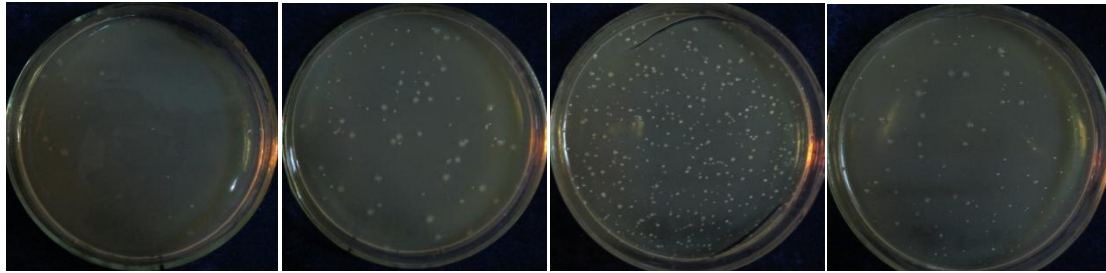
TA97

TA98

TA100

TA102

秋水仙碱：



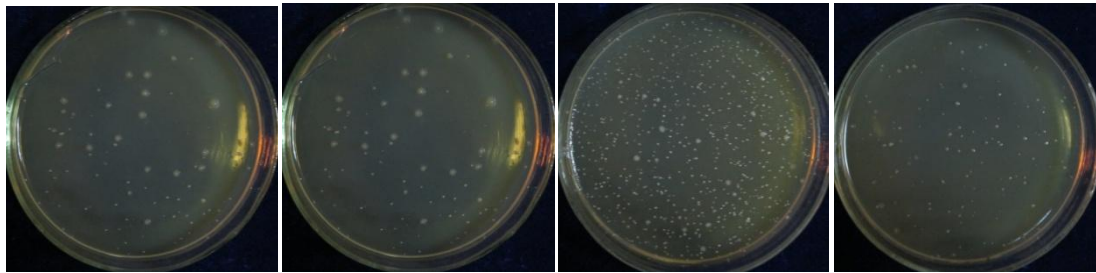
TA97

TA98

TA100

TA102

亚硝酸钠:



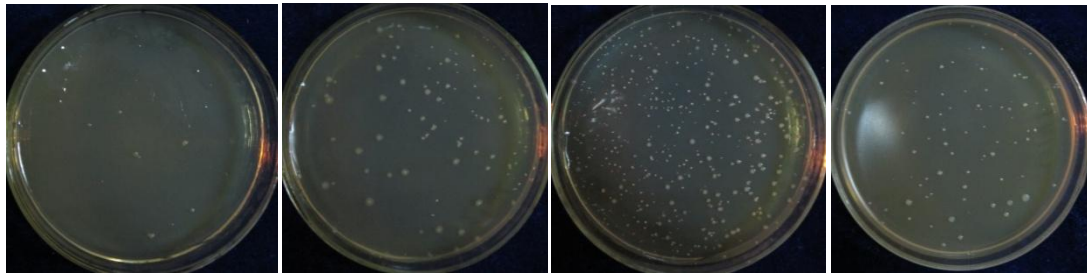
TA97

TA98

TA100

TA102

丙烯酰胺:



TA97

TA98

TA100

TA102

教学建议:

最佳保存条件: 不用于实验时, 该菌种可 4°C 存放 2 周左右。