

微生物学实验模块“蛋白酶产生菌的筛选、培养和选育”的教改研究与实践

张茵 徐旭士 何伟 袁生*

(南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210046)

摘要: 围绕“蛋白酶产生菌的筛选、培养和选育”主线,设计了一个由5个相互关联、前后衔接、形成一体的实验组成的综合性研究型实验模块,并进行教学实践。它们是:培养基的配制、分装与灭菌;产蛋白酶细菌的分离与纯化;产蛋白酶细菌的培养发酵与条件优化;产蛋白酶细菌的鉴定;产蛋白酶细菌的紫外诱变育种。

关键词: 微生物学实验, 实验模块, 蛋白酶产生菌

A Experiment Module of Isolation, Cultivation and Breeding of Protease-producing Bacteria for Microbiological Experiment Teaching

ZHANG Yin XU Xu-Shi HE Wei YUAN Sheng*

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046, China)

Abstract: We integrated a group of related experiments focusing on isolation, cultivation and mutation breeding of protease-producing bacteria into an experiment module and applied it in microbiological experiment teaching. The experiment module included preparation and sterilization of media, isolation of protease-producing bacteria, optimization of cultivation conditions, characterization of the strain, mutation breeding of the strain by UV exposure.

Keywords: Microbiological experiment, Experiment module, Protease-producing bacteria

现行高校普通微生物学实验课程通常由若干个独立的实验构成,每个实验之间缺乏关联性,导致学生对微生物学实验没有系统的认识。学生掌握的是一些零星分散的实验技术,如何将有关知识技术整合并应用于解决实际生产和科研应用问题则显得比较欠缺。为了弥补这一问题,我们在高年级学生中开设微生物学大实验选修课,但它是在学生掌握

了微生物学基本实验技能的基础上开设的,增加了新课时,并且不能面向全体学生,显然不可能通过增设所有生物学主干课的大实验课程来解决学生综合利用各种实验技术解决实际问题能力。近年来,我们尝试进行综合性、研究型微生物学实验教学体系构建的研究。本文主要介绍以“蛋白酶产生菌的筛选、培养和选育”为主线的实验模块的教改研

究。该实验模块按照实际研究课题执行过程设计, 由 5 次实验课组成, 相互关联, 前后衔接, 共同组成一个研究性的实验, 代替了原先微生物学实验课程几个分散的、独立的实验, 而将相关的形态学观察、培养基制备及灭菌、菌种的分离纯化、菌种的鉴定、营养元素及环境对微生物生长的影响、发酵以及诱变育种等微生物学的基础实验与技术实验有机地组合起来, 以一个综合性研究型实验的方式开设给学生, 提高了学生综合利用这些实验技术解决实际问题的能力, 具体介绍如下。

1 第 1 次实验: 培养基的配制、分装与灭菌(3 学时)

安排学生配制本实验所需的全部培养基, 包括固体培养基、液体培养基, 并进行分装(表 1), 准备培养皿、移液管等, 分别进行高压蒸汽灭菌和烘箱干热灭菌。由于配制培养基种类较多, 可 2 个同学为一组, 分工配制不同的培养基, 然后进行交流。这次实验课的安排与以往不同的是, 将单纯的培养基配制和灭菌技术安排为一系列实验的准备工作, 这样就大大提高了实验的针对性和目的性, 丰富了培

养基的配制种类, 使同学们更加认识到培养基在微生物实验中的重要性, 实验的积极性和主动性大大增强。

2 第 2 次实验: 产蛋白酶细菌的分离与纯化(3 学时)

学生于课前到校园附近采集土壤样本, 不同组学生可选择不同采集地点。然后回到实验室进行样品处理和稀释, 选用稀释浇注法或涂布法分离纯化产酶菌株, 含菌样品置培养箱中 30°C 培养 48 h 后, 观察、比较平板上所形成的菌落, 并将出现水解圈的菌落形态记录下来。各组同学挑取菌落形态不一致并有水解圈的菌体, 采用平板划线法进一步纯化, 纯化的目的菌株保存于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上, 留待下次实验使用。该实验将以往的单纯土壤微生物的分离纯化实验变为产蛋白酶细菌的分离纯化, 稀释浇注平板、稀释涂布平板和平板划线分离、斜面菌种转接等实验技术全部安排在这个实验中, 使同学们不但掌握了具体的实验技术, 还了解到如何应用这些技术从自然界分离获得所需要的目的菌株。

表 1 培养基的配方、分装和灭菌要求
Table 1 Formula, packing and sterilization requirement of medium

培养基 Medium	配方 Formula (g/L)	分装 Packing	灭菌 Sterilization
菌种筛选培养基 Strain-isolated medium	酵母粉 5, NaCl 5, 琼脂 18, 每升含新鲜脱脂牛奶 100 mL (单独灭菌, 待铺制平板前再和其他培养基成分混合), 自然 pH	平板	0.9×10^5 Pa, 30 min
牛肉膏蛋白胨固体培养基 Beef-protein solid medium	牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.2	平板/斜面	1×10^5 Pa, 20 min
牛肉膏蛋白胨液体培养基 Beef-protein liquid medium	牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, pH 7.2	试管	1×10^5 Pa, 20 min
产蛋白酶培养基 Protease-producing fermentation medium	碳源* 5, 氮源# 10, KH_2PO_4 0.5, MgSO_4 0.3, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, CaCl_2 1.0, NaCl 1.0, pH 7.0	试管/摇瓶	0.9×10^5 Pa, 30 min
蛋白酶活力检测培养基 Enzyme activity assay medium	干酪素 10, 酵母膏 2, 琼脂 20, pH 7.2	平板	1×10^5 Pa, 20 min

注: *: 葡萄糖或者 NaHCO_3 ; #: 酵母粉, NH_4Cl 或者尿素。用于不同碳源或氮源实验。

Note: *: Glucose or NaHCO_3 ; #: Yeast powder, NH_4Cl or urea. Which are used as different carbon or nitrogen sources in media.

3 第 3 次实验: 产蛋白酶细菌的培养发酵与条件优化(3 学时)

安排学生摇瓶培养发酵前次实验课所筛选到的蛋白酶产生菌, 试验碳源、氮源和 pH 值 3 个因素对产酶的影响(温度条件因为需要较多的培养箱我们省略未安排, 如条件允许, 可设置实验)。产蛋白酶

种子培养液为 5 mL 装液量/ Φ 15 mm \times 150 mm 试管, 发酵培养液为 15 mL 装液量/50 mL 锥形瓶。当碳源为葡萄糖、pH 值为 7.0 时, 试验酵母粉、 NH_4Cl 和尿素这 3 种氮源, 当氮源为酵母粉、pH 值为 7.0 时, 试验葡萄糖和 NaHCO_3 这 2 种碳源, 当以葡萄糖为碳源、酵母粉为氮源时, 试验酸性、中性和碱性环境对产酶的影响。采用 Folin-酚的方法^[1]

测定发酵液中蛋白酶的活力。这样的安排就将原先一次环境因素对平板培养微生物生长影响的验证性实验,变为实际的发酵培养条件优化的实验,同时还让同学们掌握了摇瓶液体培养微生物的方法。

4 第4次实验:产蛋白酶细菌的鉴定(3学时)

安排学生于实验前一天将自己分离到的蛋白酶产生菌接种于牛肉膏蛋白胨平板上。在课堂上学生观察培养特征,挑起少量菌体进行革兰氏、芽孢和荚膜染色,菌体细胞形态观察和大小测定,同时进行菌体 PCR 扩增 16S rDNA 序列^[2]并进行电泳检测,PCR 阳性样品送测序公司进行 DNA 测序。为节约时间,先进行 PCR 扩增和电泳实验,其间穿插进行细菌形态学和细胞学鉴定。16S rDNA 序列测序和同源性比对鉴定结果放在第 5 次实验课开始前讲授。这样的实验设计不仅安排了学习细菌 16S rDNA 序列分子鉴定技术^[2],而且还注意让学生应用前期实验单元中已学过的微生物形态观察和大小测定技术对所筛选到的产酶野生菌株进行形态学鉴定,以提高其实际应用能力。虽然要将菌株鉴定到种,还应与标准菌株杂交,但考虑到时间等因素我们没有进一步安排。

5 第5次实验:产蛋白酶细菌的紫外诱变选育(3学时)

安排学生于实验前一天接种牛肉膏蛋白胨液体培养基,30℃ 培养至对数生长期。实验课时学生离心收集菌体,遮蔽日光,红外灯照明,利用超净台内紫外灯照射诱变,稀释涂布法于蛋白酶活力检测培养基上,于暗处 30℃ 培养。48 h 后观察实验结果,测量水解圈的直径与菌落直径并计算其比值,菌落计数并计算各个照射剂量组的存活率^[3-4](经紫外照射后存活的菌落数与对照组存活的菌落数的比值)。这样安排实验的目的,是将单纯的紫外诱变验证性实验,设计成为学生实际应用紫外诱变进行菌种选育,提高菌种蛋白酶活性或产量的实验,使同学们不但了解了紫外线可以引起基因突变,而且知道如何利用紫外诱变原理对所分离纯化获得的野生产酶菌株进行选育,以提高生产性状。

在这一模块的微生物实验中,我们并不要求学生按每次实验分别单独写出一个个实验报告,而是要求把 5 个实验作为一个整体做一个实验报告,写成小论文。我们向学生展示教师科研所发表的相近的学术论文^[5-6],要求学生模仿学术论文写实验报告,将培养基的配制写入材料与方法,在介绍和叙述实验结果之后,要有讨论一节,分析实验中出现的各种问题,并对结果进行必要的归纳总结和理论探讨。

这样的综合性、研究型的实验教学主要存在的问题是:(1) 教师的工作量增大;(2) 学生需要花费较多的课外时间;(3) 实验会有正负结果,对于没有筛选到所需目标菌的同学,可共享全班阳性结果,我们顺势提醒学生科学研究不是一个一帆风顺的过程,团结互助和资源共享尤为必要。同学们反映,实验结果的不同使他们“了解到科研工作的不易,更好地培养了对实验的细致和耐心。”

同学们在无记名的问卷调查表中对我们这样的实验改革评价道:“最大的特点就是整体的实验从头到尾分次做完,而不是单独的一个个实验。”“最大的收获就是有了做研究的感觉,增加了动手能力,增加了发散性思维,学会了写论文,学会了实际操作并应用于解决问题,而不仅仅停留在理论上。”

参考文献

- [1] 魏群,李森,井健,等.基础生物化学实验.第3版.北京:高等教育出版社,2009:154-156.
- [2] Hurek T, Wagner B, Reinhold-Hurek B. Identification of N₂-fixing plant- and fungus- associated *Azoarcus* species by PCR genomic fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(11): 4331-4339.
- [3] 张敏,赵丛,路福平,等. N⁺注入中性蛋白酶高产菌株诱变选育的研究. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2008, **34**(3): 245-248.
- [4] 方海红,黄红英,张林普,等.一株地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶的研究 II. 微生物学通报, 2001, **28**(6): 52-55.
- [5] 陆伟宏,徐莉,戴亦军,等.一株烟酸羟基化菌株的筛选和鉴定. 微生物学报, 2005, **45**(1): 6-9.
- [6] 陆伟宏,王鑫,徐莉,等.恶臭假单胞菌 NA-1 菌株烟酸羟基化酶活性的诱导和转化条件的研究. 微生物学报, 2005, **45**(4): 551-555.