



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 30744—2014

---

## 深海微生物样品前处理技术规范

The technology specification for the pre-treatment of deep-sea microorganism  
samples

2014-06-09发布

2014-10-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前言 .....	I
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语、定义和缩略语 .....	1
4 试剂和材料 .....	2
5 仪器与设备 .....	5
6 一般规定 .....	6
7 样品现场处理 .....	6
8 深海微生物菌种分离 .....	8
9 深海微生物基因组 DNA 提取 .....	10
10 深海微生物宏基因组 DNA 提取 .....	12
11 深海生物样品及微生物资源保存 .....	13
附录 A (资料性附录) 深海微生物样品前处理记录表格式 .....	22
附录 B (资料性附录) 耐压菌株分离 .....	28
附录 C (资料性附录) 微生物菌种分子鉴定 .....	29
附录 D (资料性附录) 宏基因组 Cosmid 文库构建 .....	32
表 A.1 深海样品采样记录表 .....	22
表 A.2 深海微生物分离鉴定记录表 .....	22
表 A.3 深海微生物基因组 DNA 提取记录表 .....	23
表 A.4 深海样品宏基因组 DNA 提取记录表 .....	23
表 A.5 深海样品保藏记录表 .....	24
表 A.6 深海细菌保藏记录表 .....	24
表 A.7 深海放线菌保藏记录表 .....	25
表 A.8 深海真菌保藏记录表 .....	26
表 A.9 深海样品宏基因组 DNA 文库记录表 .....	27
表 C.116S rRNA 基因通用引物的适用范围 .....	29

## 前 言

本标准按照GB/T1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家海洋局提出。

本标准由全国海洋标准化技术委员会(SAC/TC 283)归口。

本标准起草单位：国家海洋局第三海洋研究所。

本标准主要起草人：曾润颖、邵宗泽、叶德赞、陈新华、林荣澄、孙凤芹、徐丽美、盖英宝。

# 深海微生物样品前处理技术规范

## 1 范围

本标准规定了深海微生物样品前处理中的技术要求、工作条件、深海样品现场处理、微生物及遗传物质提取、保存及资料处理。

本标准适用于水深大于或等于1000 m 的深海微生物样品的现场处理、提取与保存。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T12763.4 海洋调查规范 第4部分：海洋化学要素调查

GB/T12763.6 海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查

HY/T 058 海洋调查观测监测档案业务规范

## 3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

### 3.1 术语和定义

#### 3.1.1

**深海** deep sea

水深大于或等于1000 m 的海洋区域。

#### 3.1.2

**微生物样品** microorganism samples

已培养或已提取纯化的，具有一定科学意义，具有实际或潜在实用价值的，可直接应用于各种科学研究的各种菌株(包括细菌、真菌、放线菌等)、DNA/RNA 等遗传物质；以及包含上述菌株和遗传物质的深海样品，包括水样、沉积物样、岩石样等。

#### 3.1.3

**前处理** pre-treatment

在开展深海微生物研究工作之前对采集自深海的各种微生物样品(见3.1.2)所进行的各种处理，包括：深海生物样品现场处理、深海微生物菌种分离、深海微生物基因组 DNA 提取、深海微生物宏基因组 DNA 提取、深海生物样品及微生物资源保藏。

#### 3.1.4

**低温微生物** cold-adapted microorganism

在37 ℃以下的温度中生长良好的微生物(包括细菌、真菌、放线菌等)，最适生长温度等于或低于25 ℃。

#### 3.1.5

**嗜热微生物** thermophile

在等于或高于55℃的温度中生长良好的微生物(包括细菌、真菌、放线菌等)。

### 3.1.6

#### 宏基因组 metagenome

不经菌株分离筛选步骤，直接从环境样品中提取的遗传物质(DNA 或 RNA)，包含了样品中所有微生物的基因信息。

### 3.1.7

#### 寡营养培养基 oligotrophic medium

与正常培养基成分相同，但碳源、氮源营养物质浓度减为十分之一的培养基。

## 3.2 缩略语

16S rRNA:细菌染色体上编码核糖体 RNA16S 亚基的基因

18S rRNA:真核生物染色体上编码核糖体 RNA18S 亚基的基因

Amp: 氨苄青霉素(Ampicillin)

BOD: 生化需氧量(Biochemical oxygen demand)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltriethylammonium bromide)

dATP: 脱氧腺苷三磷酸(Deoxyadenosine triphosphate)

dGTP: 脱氧鸟苷三磷酸(Deoxyguanosine triphosphate)

DNA: 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

DMF: 二甲基酰胺(N,N-Dimethylformamide)

EDTA: 乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic Acid)

GYT: 甘油酵母膏蛋白胨培养基(Glycerol yeast extract tryptone medium)

IPTG: 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)

LB: 肉汤培养基(Luria-bertani)

OD: 光密度(Optical density)

PFGE: 脉冲场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis)

PDA: 马铃薯葡萄糖培养基(Potato dextrose agar)

RNase A: 核糖核酸酶A(RNAase A)

SDS: 十二烷基硫酸钠(Dodecyl sulfate, sodium salt)

SOC: 含分解代谢抑制物的超级肉汤培养基(Super optimal broth with catabolite repression)

Tris: 三羟甲基氨基甲烷(2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)

TE: Tris-HCl 和 EDTA-Na<sub>2</sub> 配成的缓冲液

TBE: Tris-HCl、硼酸和 EDTA-Na<sub>2</sub> 配成的缓冲液

X-gal: 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside)

YPD: 酵母膏蛋白胨葡萄糖培养基(Yeast extract peptone dextrose medium)

λDNA/EcoR I+Hind III: 经 EcoR I 酶(4.1)和 Hind III 酶(4.2)两种核酸内切酶消化后的 λ 噬菌体 DNA

## 4 试剂和材料\*

4.1 EcoR I 酶。

4.2 Hind III 酶。

4.3 BamH I 酶。

---

\* 除非另有说明，在操作中仅使用分析纯试剂和电阻率大于18 MΩ·cm 的超纯水。

- 4.4 Sal I 酶。
- 4.5 Sau3A I 酶。
- 4.6 Klenow 酶。
- 4.7 琼脂糖酶。
- 4.8 液体石蜡。
- 4.9 dATP (市售)。
- 4.10 dGTP (市售)。
- 4.11 琼脂糖凝胶: 10 g 琼脂糖, 缓慢加入1 L 水中, 混匀, 配制成10 g/L 的琼脂糖凝胶。
- 4.12 低熔点琼脂糖凝胶: 10 g 低熔点琼脂糖, 缓慢加入1 L 水中, 混匀, 配制成10 g/L 的低熔点琼脂糖凝胶。
- 4.13 人工海水, 按照GB/T12763.4 的规定配制。
- 4.14 乙醇溶液: 用水配制750 mL/L (体积百分数为75%) 的乙醇溶液。
- 4.15 稀酸溶液: 量取83 mL 分析纯浓 HCl, 缓慢加入917 mL 水中, 混匀, 制成浓度为1 mol/L 的稀酸溶液。
- 4.16 稀碱溶液: 称取40 g 分析纯 NaOH, 溶解于水中, 混匀, 加水稀释至1 L, 制成浓度为1 mol/L 的稀碱溶液。
- 4.17 NaI 溶液: 称取900 g 分析纯 NaI, 溶解于水中, 混匀, 加水稀释至1 L, 制成浓度为6 mol/L 的 NaI 溶液。
- 4.18 甘油溶液: 量取800 mL 分析纯甘油, 溶解于200 mL 水中配制成800 mL/L 的甘油溶液, 混匀后灭菌处理。
- 4.19 Tris-HCl 贮液: 称取121.14 g Tris, 溶解于800 mL 水中, 用稀酸溶液(4.15)调节 pH 值为8.0, 用水补足体积至1 L, 配成1 mol/L 的贮液, 使用时根据实验要求进行稀释。
- 4.20 TE 溶液: 称取0.373 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 量取10 mL Tris-HCl 贮液(4.19), 将二者溶解于800 mL 水中, 用稀碱溶液(4.16)调节 pH 值为8.0, 用水补足体积至1 L, 灭菌处理。
- 4.21 Amp 溶液: 将1g Amp 溶解于5 mL 水中, 配制成0.2 g/mL 的溶液。
- 4.22 DNA 抽提缓冲液: 称取37.3 g EDTA-Na<sub>2</sub>、17.8g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub> O、15.6g NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub> O、87.8 g NaCl 和10 g CTAB, 溶解于700 mL 水中, 加入100 mL Tris-HCl 贮液, 用稀酸溶液和稀碱溶液调节 pH 值为8.0, 加水补足体积至1 L 后灭菌处理。
- 4.23 凝胶回收洗涤液: 称取2.4 g Tris, 溶解于200 mL 水中, 用稀酸溶液调节 pH 值为7.4。加入292.5g NaCl, 0.37 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 用水补足体积至500 mL, 灭菌处理后, 冷却至室温, 在超净台中加入 500 mL 无水乙醇。
- 4.24 甘露醇缓冲液: 称取182.2g 甘露醇, 37.3 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 溶解于500 mL 水中, 用稀酸溶液和稀碱溶液调节 pH 值为7.5, 灭菌处理。
- 4.25 GYT 培养基: 称取1.25 g 酵母膏, 2.5 g 蛋白胨溶解于800 mL 水中, 加入100 mL 甘油, 用水补足体积至1 L, 灭菌处理。
- 4.26 SOC 培养基, 按以下步骤制备:
- 称取20 g 蛋白胨, 5 g 酵母膏, 0.5 g NaCl, 0.19 g KCl, 0.95g MgCl<sub>2</sub> 溶解于1 L 水中, 灭菌处理, 备用;
  - 称取10 g 葡萄糖, 溶解于80 mL 水中, 用水补足体积至100 mL, 用0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 备用;
  - 在灭菌后的4.26 a) 溶液中加入36 mL 4.26 b) 溶液, 混匀。

- 4.27 甲醛溶液：用水配制370 mL/L~400 mL/L的甲醛溶液，0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜(见5.1)过滤。
- 4.28 [甲基- $^3\text{H}$ ] 胸腺嘧啶核苷工作液：取放射性比活度高于1.85 TBq/mmol 的[甲基- $^3\text{H}$ ] 胸腺嘧啶核

昔,用水稀释成5 nmol/mL 的工作液。

**4.29** [4,5-<sup>3</sup>H] 亮氨酸工作液:取放射性比活度高于2.22 TBq/mmol 的[4,5-<sup>3</sup>H] 亮氨酸,用水稀释成20 nmol/mL的工作液。

**4.30** D-[ULC] 葡萄糖工作液:取放射性比活度高于7.4 GBq/mol 的 D-[UL<sup>14</sup>C] 葡萄糖,用35 g/L 的 NaCl 溶液稀释成0.185 MBq/mol 的工作液,并按10 μg/mL 的量加入非放射性葡萄糖,然后定量分装于安瓿瓶中,封熔后于0.07 MPa 高压灭菌15 min 备用。

**4.31** 酚/氯仿/异戊醇溶液:量取500 mL 经 Tris 饱和的苯酚,480 mL 氯仿,20 mL 异戊醇溶液,混合均匀,装于棕色玻璃瓶中,于4℃保存,保存时间为两周。

**4.32** 盐酸胍溶液:称取573.2 g 盐酸胍,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成浓度为6 mol/L 的盐酸胍溶液。

**4.33** SDS 溶液:称取100 g SDS,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成质量浓度为10%的 SDS 溶液。

**4.34** 蛋白酶 K 溶液:称取20 g 蛋白酶K,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成浓度为20 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液。

**4.35** NaCl 溶液:称取41 gNaCl,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成浓度为0.7 mol/L 的 NaCl 溶液。

**4.36** CTAB 溶液:称取10 gCTAB,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成质量浓度为10%的 CTAB 溶液。

**4.37** 蜗牛酶溶液:称取30 g 蜗牛酶,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成浓度为30 g/L 的蜗牛酶溶液。

**4.38** 醋酸钾溶液:称取490.7 g 醋酸钾,溶解于水中,混匀,加水稀释至1 L,制成浓度为5 mol/L 的醋酸钾溶液。

**4.39** RNase A 贮液,按以下步骤配制:

a) 用水将 Tris-HCl 贮液稀释100倍,用稀酸溶液调节至 pH 值7.5,备用;

b) 称取 1 gRNase A,0.09gNaCl,溶解于100 mL4.39 a)溶液中,配成浓度为10 mg/mL 的溶液,于100 °C加热15 min,按每管1 mL 分装于小离心管中,于一20 °C保存。

**4.40** Silica 浆液:每克硅土(Silica) 干粉加入3 mL 浓硝酸混匀,浸泡5 h,然后反复用水洗至中性,去除上清液和中间不能沉淀的部分悬浊液后,保留沉淀,加入等体积水,于一20 °C保存。

**4.41** 溶菌酶贮液:用水将 Tris-HCl 贮液稀释100倍后加入溶菌酶,配成溶菌酶浓度为10 mg/mL 的贮液,于一20 °C保存。

**4.42** X-gal 贮液:将 X-gal 溶解于DMF 中,配成20 mg/mL 的贮液,按每管100 μL 分装于小离心管中,避光于一20 °C保存。

**4.43** IPTG 贮液:将 IPTG 溶解于水中,配成200 g/L 的贮液,用0.22 μm 的滤膜过滤除菌,按每管500 μL分装于小离心管中,于一20 °C保存。

**4.44** TBE 电泳缓冲液:称取108 g Tris,7.5g EDTA-Na<sub>2</sub>,55g 硼酸,溶解于800 mL 水中,用稀酸溶液和稀碱溶液调节 pH 值为8.0,配制成贮液,使用时用水稀释20倍使用。

**4.45** MgCl<sub>2</sub> 溶液:称取0.95 g MgCl<sub>2</sub>,溶解于10 mL 水中配制成1 mol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 溶液,灭菌处理,按每管1 mL 分装于小离心管中,于一20 °C保存。

**4.46** 硫酸锰溶液:称取36.4 g 硫酸锰(MnSO<sub>4</sub> ·H<sub>2</sub>O) 溶于水,稀释至100 mL。

**4.47** 碱性碘化钾溶液:称取50 g 氢氧化钠,溶解于30 mL~40 mL 水中,另称取15 g 碘化钾溶于20 mL水中,将此两部分混合,加水稀释至100 mL。

**4.48** LB 培养基:称取10 g 蛋白胨,5 g 酵母膏,10 g NaCl,18g 琼脂粉溶解于1 L 水中,灭菌处理,制成 LB 固体培养基。配制 LB 液体培养基时无需加入琼脂粉。

4.49 含 Amp 的 LB 培养基: LB 培养基灭菌后冷却至50 °C~60 °C,按50 mL/L 的比例加入 Amp 溶液,再按18g/L 比例加入琼脂粉,灭菌处理,制成含 Amp 的 LB 固体培养基。配制含 Amp 的 LB 液体培养基时无需加入琼脂粉。

4.50 2216E 培养基:称取5 g 蛋白胨,1 g 酵母膏,0.01 g  $\text{FePO}_4$ ,溶解于1 L 人工海水(见4.13)中,用稀碱溶液调节至 pH 值7.4~7.8,再按18 g/L 比例加入琼脂粉,灭菌处理,制成2216E 固体培养基。配制2216E 液体培养基时无需加入琼脂粉。

4.51 高氏一号培养基,按以下步骤制备:

a) 称取20 g 可溶性淀粉,1 g  $\text{KNO}_3$ ,0.5g $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,1g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.01g  $\text{FeSO}_4$ ,溶解于

1 L海水(4.13)中,用稀碱溶液调节至 pH 值7.2~7.4,待用;

b) 称取5 g 重铬酸钾溶于1 L 水中配制成重铬酸钾溶液;

c) 按10 mL/L 的比例将重铬酸钾溶液加入4.51 a) 溶液中,再按18g/L 比例加入琼脂粉,灭菌处理,制成高氏一号固体培养基。配制高氏一号液体培养基时无需加入琼脂粉。

4.52 PDA 培养基:将200 g 去皮切块的马铃薯放入1 L 人工海水中煮沸30 min,用纱布过滤,补加人工海水至1 L,加入20 g 葡萄糖,再按18 g/L 比例加入琼脂粉,灭菌处理,待冷却至50 °C~60 °C时,加入50 mg 庆大霉素,制成 PDA 固体培养基。配制 PDA 液体培养基时无需加入琼脂粉。

4.53 YPD 培养基:称取20 g 蛋白胨,20 g 葡萄糖,10 g 酵母膏,溶解于1 L 人工海水中,用稀碱溶液调节至pH 值7.4~7.8,再按18 g/L 比例加入琼脂粉,灭菌处理,制成 YPD 固体培养基。配制 YPD 液体培养基时无需加入琼脂粉。

## 5 仪器与设备

5.1 滤膜:材料为醋酸纤维或硝化纤维的微孔滤膜,直径25 mm 和47 mm,孔径包括0.22  $\mu\text{m}$  和0.45  $\mu\text{m}$ 两种。

5.2 小离心管:材料为聚丙烯的离心管,容量为0.5 mL、1.5 mL、2 mL、5 mL 和50 mL。

5.3 枪头:材料为聚丙烯的微量加样器套头,规格为0.2 mL、1 mL。

5.4 超低温冰箱:最低保存温度为-80 °C的冰箱。

5.5 生化培养箱:培养室温度可在0°C~60 °C 范围内调节。

5.6 振荡培养箱:培养室温度可在0°C~60 °C 范围内调节,转速可在0 r/min~300 r/min 范围内调节。

5.7 电泳仪:最大输出电压为250 V 以上,最大输出电流为300 mA 以上。

5.8 高速冷冻离心机:离心可在4°C~20 °C 范围内调节,离心管规格50 mL,转速可在0 r/min~18000 r/min 范围内调节。

5.9 湿盒:材料为聚丙烯或其他能耐121°C 高温灭菌的塑料,长×宽尺寸大于或等于130 mm×130 mm,内部放置若干用水润湿的棉球。

5.10 小离心机:可使用规格为0.5 mL 和1.5 mL 的离心管,转速在0 r/min~13000 r/min 范围内调节。

5.11 分光光度计:波长范围190 nm~1100 nm 可调,测量所用比色杯的光径为10 mm。

5.12 紫外投射仪:波长为280 nm,观察面积为140 mm×110 mm。

5.13 玻璃试管:直径×长度为18 mm×180 mm 的平口玻璃试管。

5.14 金属网筛:孔径包括0.30 mm、0.20 mm、0.15 mm。

5.15 安瓿管:内径8 mm,长度不小于100 mm 的中性玻璃管。

5.16 塑料冻存管:材料为聚丙烯,或其他能耐121°C 高温和液氮的塑料管,容积大于或等于5 mL。

5.17 电转化仪：最大输出电压2500 V, 输出电压可在50 V~2 500 V 范围内调整，最大输出电流

125 A, 电弧时限定值1500 A。

5.18 脉冲场电泳仪系统：最高输出电压350 V, 电压连续可调，最大输出电流0.5 A, 转换范围50 ms到18 h, 转换角度为0°~360°，包括电泳仪、水浴循环仪、电泳槽。

5.19 其他生物实验常规仪器：热循环仪、超净工作台、漩涡振荡器、水浴锅、高压灭菌锅、酒精灯、普通家用冰箱、显微镜、硅胶塞、涂布棒、培养皿、剪刀、液氮罐、无菌采样瓶、脱脂棉花塞、纱布、接种针、微量注射器、筛子、镊子。

## 6 一般规定

6.1 深海微生物样品前处理工作程序包括：深海生物样品现场处理、深海微生物菌种分离和分类、深海微生物遗传物质提取、深海微生物宏基因组 DNA 提取、深海生物样品及微生物资源保藏。

6.2 深海微生物样品前处理程序中除了深海生物样品现场处理以外，其他操作均应在超净工作台中进行。

6.3 微生物样品应从原位海水或未与上层海水发生交换的深海沉积物中获取。水样应选用CTD 采水器采集的样品，沉积物样品应选用多管采样器、箱式采样器采集的样品。

6.4 在深海微生物样品前处理过程中，除特别说明，灭菌处理均指于高压灭菌锅中121℃灭菌20 min处理的过程。

## 7 样品现场处理

### 7.1 技术要求

7.1.1 采水器在入水前应用原位海水冲洗3次，采泥器在入水前应用原位海水将其上附着的泥样完全洗净，以防止不同站点之间样品的交叉污染。

7.1.2 用于分样的器具均应灭菌，如无法高压高温灭菌的，应用乙醇溶液处理后使用。

7.1.3 分样过程应于2 h 内完成，若无法立即处理，应暂时于4℃保存，但不应超过24 h。

7.1.4 分样后保存的沉积物样品每份不少于30 g。

### 7.2 样品适用范围

7.2.1 箱式采样器采集的样品不应用于需要分层次的微生物分析中。

7.2.2 多管采样器采集的沉积物样品及上覆水可应用于各种微生物分析。

7.2.3 CTD 采水器采集的水样主要用于生态学分析，采集时应设计好采水的层次。

### 7.3 沉积物样品的现场处理

#### 7.3.1 箱式采样器样品的现场处理

7.3.1.1 刮去表层3 cm 的沉积物样，插入无菌取样管(口径5 cm~15 cm)。

7.3.1.2 将取样管拔出，用经灭菌处理过的50 mL 小离心管(见5.2)插入柱状样中取样后密封，分两份分别于4℃和-20℃保存。

7.3.1.3 另取一份样品用于微生物的现场分离培养，分离步骤见8.3、8.4、8.5和8.6。

#### 7.3.2 多管采样器样品的现场处理

7.3.2.1 将采样管置于超净工作台前，用灭菌后的导管吸出上覆水置于采水瓶中。

7.3.2.2 将沉积物样品顶出，每隔3 cm 用无菌不锈钢板分层取样，转移到超净工作台中。

7.3.2.3 去除外圈1 cm 的沉积物样品,将中心的沉积物样品分成三份装入无菌采样瓶,分别于4℃、-20℃和液氮罐保存。

7.3.2.4 另取一份样品用于微生物的现场分离培养,分离步骤见8.3、8.4、8.5和8.6。

## 7.4 海水样品的现场处理

### 7.4.1 采样层次

根据水深设置采样层次,每个站位按500 m 间隔取样,例如:1000 m、1500 m、2000 m、2500 m、3000 m、离底200 m、离底50 m 和离底5 m。

### 7.4.2 样品分装

CTD 采水器上甲板后,按水深设置用采样瓶从 CTD 采水器的各对应管中分装水样。

### 7.4.3 水样滤膜过滤

每 5 L 水样经0.45 μm 和0.22 μm 滤膜两级过滤后,将0.22 μm 的滤膜放入冻存管中,分别于4℃、-20℃保存,待分离培养。

### 7.4.4 用于荧光直接计数的水样处理

按20 mL/L 的比例在50 mL 水样中加入甲醛溶液(见4.27)固定样品,于2℃~8℃低温保存。固定后的样品宜立即分析,或在4℃中避光保存,保存期限不宜超过一周。

### 7.4.5 用于培养基平板计数的水样处理

按10 mL/L 的比例在水样中加入灭菌处理过的吐温-80,于-20℃保存。

### 7.4.6 用于细菌生产力分析的水样处理

取3支50 mL 带盖培养管,各加入20 mL 水样,其中一管加1 mL 甲醛溶液混匀作为对照,再向各管加入[甲基-<sup>3</sup>H] 胸腺嘧啶核苷工作液(见4.28)作为示踪剂,使其在样品中的最终浓度为250 nmol/L,混匀,置于原位现场温度下培养1 h,再加入1 mL 甲醛溶液摇匀,保存于2℃~8℃中。上述步骤中示踪剂可用[4,5-<sup>3</sup>H] 亮氨酸工作液(见4.29)代替。

### 7.4.7 用于微生物异养活性测定的水样处理

取3个125 mL 培养瓶,各加入100 mL 水样,其中1瓶加入5 mL 甲醛溶液作对照,再向各瓶中加入1 mL D-[UL-4C] 葡萄糖工作液(见4.30),混匀后置于原位现场温度下培养1 h,加入5 mL 甲醛溶液,摇匀。

### 7.4.8 用于生态呼吸率测定的水样处理

7.4.8.1 将水样按溶解氧测定方法的要求注入4个250 mL BOD 培养瓶中。

7.4.8.2 其中两瓶立即进行溶解氧的固定,用吸管插入溶解氧瓶的液面下加入1 mL 硫酸锰溶液(4.46)、2 mL 碱性碘化钾溶液(4.47),盖好瓶塞。颠倒混合数次,静置。待棕色沉淀物降至瓶内一半时,再颠倒混合1次,静置至沉淀物下降到瓶底。

7.4.8.3 另两瓶置暗处于原位现场温度下培养1 d 后,取出溶解氧的固定的 BOD 培养瓶。

## 7.5 资料处理

将采样时间,采样站位的经纬度、水深、温度、盐度,采样方式,处理方式,样品体积,保存方式等相关

参数记录于深海样品采样记录表(参见表 A.1)。数据资料处理记录应按 HY/T 058 的要求归档。

## 8 深海微生物菌种分离

### 8.1 总则

本章规定了从所采集的沉积物、水等样品中分离微生物菌株,包括低温菌、常温菌和嗜热菌。

菌种分离的工作程序包括:样品稀释、涂布于培养基平板、挑菌、复筛、菌株生长温度确定、菌株培养。所有菌株操作均在常压下进行,如进行耐压微生物的分离可参见附录 B。

### 8.2 技术要求

8.2.1 进行微生物菌种分离应选用4℃保存的样品,或用刚采集的样品进行现场分离。

8.2.2 所有的小离心管(5.2)、枪头(5.3)、配制的溶液均应灭菌处理,冷却后使用。

8.2.3 培养基的配置应采用下列海水之一进行:

- a) 现场原位海水,经0.45 μm 滤膜过滤。
- b) 避光保存3个月以上的天然海水,经0.45 μm 滤膜过滤的滤液。
- c) 人工海水。

8.2.4 分离菌株时除选用相应的培养基外,还应用寡营养培养基进行分离培养。

### 8.3 基本操作

#### 8.3.1 沉积物样品中微生物的分离培养

沉积物样品中微生物的分离培养步骤如下:

- a) 取 1 mL 的沉积物样品,用灭菌处理的海水稀释到10 mL,制成10<sup>-1</sup>样品稀释液,振荡均匀,备用;
- b) 取 1 mL 8.3.1 a) 溶液,用灭菌处理的海水稀释到10 mL,制成10<sup>-2</sup>样品稀释液,振荡均匀,备用;
- c) 按8.3.1 a) 和8.3.1 b) 的步骤依次稀释成10<sup>-3</sup>~10<sup>-6</sup> 的样品梯度稀释液,振荡均匀,备用;
- d) 取各梯度样品梯度稀释液分别涂布于培养基平板上进行培养,选取菌落在50个~100个之间的培养基平板进行分离培养。低温菌培养温度为2℃~8℃,高温菌培养温度为55℃,培养时间宜为72 h 以上。

#### 8.3.2 含菌滤膜中微生物的分离培养

取按7.4.3处理的含菌滤膜,在超净工作台中剪碎装入50 mL 小离心管中,浸泡于经灭菌处理的海水中,充分振荡制成菌悬液,除去滤膜,菌悬液经8000 r/min 离心10 min 后除去上清液,另加入1 mL 经灭菌处理的海水,将沉淀充分混匀,按8.3.1 中的方法进行分离培养。

#### 8.3.3 菌株生长温度的确定

8.3.3.1 从培养基平板上分离得到的单菌落经镜检为纯种后,接种于LB 液体培养基(见4.48)或2216E 液体培养基(4.50)中培养。

8.3.3.2 在0℃~40℃的范围内进行培养,温度分别设置为4℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、37℃和40℃,每个温度设三个平行样。

8.3.3.3 在菌株生长的第2 h、4h、6h、8h、12 h、16h、20 h、24h、36h、48 h、72 h、84h 和96 h 于超净工作台中吸出1 mL 菌液,测定600 nm 处的 OD 值。

8.3.3.4 根据测定结果确定菌株的最适生长温度和生长温度范围。

## 8.4 低温菌分离

### 8.4.1 技术要求

8.4.1.1 所有操作均应在无菌条件下进行。

8.4.1.2 所有操作应在低于10℃的条件下进行。

8.4.1.3 用于分离筛选的沉积物样品、水样均应选用在4℃保存的样品。

8.4.1.4 细菌的分离筛选采用2216E培养基、LB培养基和相应的寡营养培养基。

8.4.1.5 放线菌的分离筛选采用高氏一号培养基(4.51)和相应的寡营养培养基。

8.4.1.6 真菌的分离筛选采用PDA培养基(4.52)、YPD培养基(4.53)和相应的寡营养培养基。

### 8.4.2 菌株分离步骤

8.4.2.1 按8.3.1和8.3.2的规定制备样品梯度稀释液，取200 μL各梯度样品梯度稀释液涂布于相应的培养基平板上。

8.4.2.2 在10℃中放置直到涂布的样品梯度稀释液完全渗透入培养基中后，将培养基平板倒置，于10℃培养直至长出菌落。

8.4.2.3 将长出的单菌落分别转接至新的相同培养基平板上，并做好相应的记号，于10℃中培养。

8.4.2.4 将培养基平板上长出的单菌落多次划线分离培养，根据平板上的菌落形态和颜色，以及镜检检测，直至获得纯的单菌落。

8.4.2.5 根据菌落形态差别进行菌株的区分，排除重复的菌株。

8.4.2.6 对形态近似的菌落，通过比较细菌和放线菌的16S rRNA基因序列，或真菌的18S rRNA基因序列，进行分子鉴定(步骤参见附录C)，排除重复的菌株。

## 8.5 常温菌分离

常温菌分离步骤按8.4的规定进行，其培养温度为37℃。

## 8.6 嗜热菌分离

### 8.6.1 技术要求

8.6.1.1 用固体培养基培养时，所用的湿盒(5.9)应每天加水或更换湿棉球。用液体培养基进行培养时，瓶口应采用通气的硅胶塞代替纱布进行密封。

8.6.1.2 选用的固体培养基应采用高熔点琼脂粉，其浓度为8 g/L。

8.6.1.3 细菌的分离筛选采用2216E培养基、LB培养基和相应的寡营养培养基。

8.6.1.4 放线菌的分离筛选采用高氏一号培养基和相应的寡营养培养基。

8.6.1.5 真菌的分离筛选采用PDA培养基、YPD培养基和相应的寡营养培养基。

### 8.6.2 菌株分离步骤

8.6.2.1 吸取500 μL 10<sup>-1</sup>样品稀释液[8.3.1 a)]于培养基平板上，用涂布棒涂抹均匀。

8.6.2.2 将培养基平板装入湿盒中，置于高温培养箱中进行培养，培养箱温度应根据采样现场的温度和研究需要进行选择，一般在55℃~90℃。

8.6.2.3 待形成菌落后，挑单菌落进行多次划线转接，根据平板上的菌落形态和颜色，以及镜检检测，直至获得纯的单菌落。

8.6.2.4 对形态近似的菌落，通过比较细菌和放线菌的16S rRNA基因序列，或真菌的18S rRNA基因

序列，进行分子鉴定后(步骤参见附录 C)，排除重复的菌株。

## 8.7 资料处理

将所分离的菌株来源、种类、培养条件等相关参数记录于深海微生物分离鉴定记录表(参见表 A.2)。数据资料处理记录应按 HY/T 058 的要求归档。

## 9 深海微生物基因组 DNA 提取

### 9.1 总则

本章规定了从深海微生物菌株中提取基因组 DNA 的方法，包括细菌、放线菌、真菌。提取的工作程序包括：培养、裂解、提取、纯化。

### 9.2 技术要求

9.2.1 基因组 DNA 应达到的指标为： $OD_{260}/OD_{280}$  的比值应在1.8~2.0之间，且  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值应

大于2.0。

9.2.2 经10 g/L 琼脂糖凝胶(4.11)电泳检测，以  $\lambda$  DNA/EcoRI+HindIII 为分子量标记，所提的 DNA 大小应与标记物中最大的一条带位置相近。

9.2.3 所提取的微生物基因组 DNA 以每管20  $\mu$ L~50  $\mu$ L的体积分装于小离心管中，于一80  $^{\circ}$ C保存，不应反复冻融。

9.2.4 所用的小离心管、枪头均应灭菌，冷却后使用。

### 9.3 基因组 DNA 提取

#### 9.3.1 细菌基因组 DNA 提取

9.3.1.1 按照8.3.3 确定菌株生长温度，挑取菌落接种入5 mL 相应的液体培养基中，培养至对数期，装入1.5 mL 小离心管中，用小离心机5000 r/min 离心 5 min, 弃上清液，重复分批进行离心，将5 mL 培养液的菌体完全收集下来。

9.3.1.2 在收集后的菌体沉淀物中加入1.5 mL 水，悬浮菌体，用小离心机5000 r/min 离心5 min, 弃上清液重复操作1次。

9.3.1.3 加入500  $\mu$ L~1 mL 盐酸胍溶液(4.32), 轻轻混匀后静置5 min, 直至菌液裂解清亮，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(4.31), 混匀，13000 r/min 离心5 min, 将上层水相移入新管，在新管内缓慢加入等体积异丙醇，混匀后放置5 min。

9.3.1.4 13000 r/min离心15 s, 吸去上清液，用乙醇溶液(4.14)洗沉淀物两次，放置超净工作台内吹干，加入200  $\mu$ L TE 溶液(4.20), 放置5 min 溶解沉淀。

9.3.1.5 加入 2  $\mu$ L RNase A 贮液(4.39), 37  $^{\circ}$ C水浴中酶解1 h。

9.3.1.6 等体积加入异丙醇，再按10 mL/L 的比例加入  $MgCl_2$  溶液(4.45), 轻轻混匀，于一20  $^{\circ}$ C中放置30 min。

9.3.1.7 13000 r/min离心 5 min, 去除上清液，加入200  $\mu$ L 无水乙醇，放置3 s~5 s 后弃去无水乙醇，并重复1次，然后将沉淀物放置超净工作台内吹干后加入50  $\mu$ L TE 溶液，于一20  $^{\circ}$ C保存。

9.3.1.8 用分光光度计测定纯度。如纯度达不到9.2.1 中所列要求，应按9.4的规定采用凝胶回收方法进行进一步纯化。

**9.3.1.9** 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的大小，如未达到9.2.2 中要求，应重新提取DNA。  
注：细菌基因组 DNA 可采用商用试剂盒提取。

### 9.3.2 放线菌基因组 DNA 提取

9.3.2.1 按照8.3.3确定菌株生长温度，挑取菌落接种入5 mL 相应的液体培养基中，培养至对数期，装入1.5 mL 小离心管中，用小离心机5000 r/min 离心 5 min, 弃上清液，重复分批进行离心，将5 mL 培养液的菌体完全收集下来。

9.3.2.2 在收集后的菌体沉淀物中加入1.5 mL 水，悬浮菌体，用小离心机5000 r/min 离心5 min, 弃上清液重复操作1次。

9.3.2.3 往沉淀物中加入567  $\mu$ L TE 溶液，悬浮菌体沉淀，加入30  $\mu$ L SDS溶液(4.33)和3  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液(4.34)，混匀，于37  $^{\circ}$ C水浴1 h。

9.3.2.4 加入100  $\mu$ L NaCl 溶液，充分混匀，再加入80  $\mu$ L CTAB 溶液(4.36)，混匀，于65  $^{\circ}$ C水浴10 min,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇，充分混匀，13000 r/min 离心5 min。

9.3.2.5 将上清液转入新管中，如果难以移出上清液，先用无菌接种针除去界面物质，加入等体积的酚/氯仿/异戊醇，充分混匀，13000 r/min 离心 5 min, 将上清液转入新管中。

9.3.2.6 按等体积加入异丙醇，按10 mL/L 的比例加入  $MgCl_2$  溶液，混匀，于一20  $^{\circ}$ C中放置30 min。

9.3.2.7 13000 r/min离心 5 min, 去除上清液，加入200  $\mu$ L 无水乙醇，放置3 s~5 s 后弃去无水乙醇，并重复1次，然后将沉淀物用放置超净台内吹干后加入50  $\mu$ L TE溶液，于一20  $^{\circ}$ C保存。

9.3.2.8 用分光光度计测定纯度，如纯度达不到9.2.1中要求，应按9.4的规定采用凝胶回收方法进行进一步纯化。

9.3.2.9 用10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的大小，如未达到9.2.2中要求，应重新提取 DNA。

注：放线菌基因组 DNA 可采用商用试剂盒提取。

### 9.3.3 真菌基因组 DNA 提取

9.3.3.1 按照8.3.3确定菌株生长温度，挑取菌落接种入5 mL 相应的液体培养基中，培养至对数期，装入1.5 mL 小离心管中，用小离心机5000 r/min 离心 5 min, 弃上清液，重复分批进行离心，将5mL 培养液的菌体完全收集下来。

9.3.3.2 在收集后的菌体沉淀物中加入1.5 mL 水，悬浮菌体，用小离心机5000 r/min 离心5 min, 弃上清液重复操作1次。

9.3.3.3 往沉淀物中加入0.5 mL 甘露醇缓冲液(4.24)，悬浮菌体沉淀，加入20  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液和20  $\mu$ L 蜗牛酶溶液，混匀，于37  $^{\circ}$ C水浴2 h。

9.3.3.4 10000 r/min离心 2 min, 弃上清液，往沉淀中加入0.5 mL TE 溶液，悬浮菌体沉淀，加入20  $\mu$ L SDS溶液，混匀，于65 $^{\circ}$ C水浴1 h。

9.3.3.5 加入0.2 mL 醋酸钾溶液(4.38)，于0 $^{\circ}$ C中水浴1 h,14000 r/min离心10 min, 移取上清液至新的小离心管中。

9.3.3.6 等体积加入异丙醇，按10 mL/L 的比例加入  $MgCl_2$  溶液，混匀，于一20 $^{\circ}$ C中放置30 min。

9.3.3.7 13000 r/min离心 5 min, 去除上清液，加入200  $\mu$ L 无水乙醇，放置3 s~5 s后弃去无水乙醇，并重复1次，然后将沉淀物放置超净工作台内吹干后加入50  $\mu$ L TE溶液，于一20  $^{\circ}$ C保存。

9.3.3.8 用分光光度计测定纯度，如纯度达不到9.2.1中要求，应按9.4的规定采用凝胶回收方法进行进一步纯化。

9.3.3.9 用10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的大小，如未达到9.2.2中要求，应重新提取 DNA。

注：真菌基因组 DNA 可采用商用试剂盒进行提取。

## 9.4 DNA 凝胶回收

9.4.1 将凝胶放在紫外透射仪(5.12)上将目的基因所对应的条带切下，称重。

- 9.4.2 每克条带加入3 mL NaI 溶液(4.17), 55 °C 水浴至胶完全溶解。
- 9.4.3 加入5 μL Silica 浆液(4.40), 在0°C 水浴30 min, 充分振荡数次。
- 9.4.4 14000 r/min 离心20 s, 弃上清液。
- 9.4.5 加入400 μL 凝胶回收洗涤液(4.23), 充分悬浮沉淀物, 14000 r/min 离心20 s, 弃上清液。
- 9.4.6 重复步骤9.4.5一次, 吸干液体, 并放置于超净工作台内, 进一步吹干残余液体。
- 9.4.7 加入10 μL 水, 55°C 水浴5 min 后14000 r/min 离心5 min。
- 9.4.8 吸取上清液至新的小离心管中, 用分光光度计(5.11)测定 DNA 含量, 于一20 °C 保存。
- 注: DNA 凝胶回收也可采用商用试剂盒进行。

## 9.5 资料处理

将所提取的微生物种类、DNA 浓度、纯度等相关参数记录于深海微生物基因组 DNA 提取记录表(见表 A.3)。数据资料处理记录应按 HY/T058 的要求归档。

## 10 深海微生物宏基因组 DNA 提取

### 10.1 总则

本章规定了从深海沉积物、含菌滤膜、大型生物中提取微生物宏基因组 DNA 的方法。工作程序包括: 裂解、提取、纯化。

### 10.2 技术要求

- 10.2.1 合格的宏基因组 DNA 应达到的指标为:  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值应在1.8~2.0之间, 且  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值应大于2.0。
- 10.2.2 用于构建 Cosmid 或者 Fosmid 文库的宏基因组 DNA 大小经脉冲电泳检测后应在35 kb~45 kb之间。
- 10.2.3 用于构建小片段(小于10 kb)基因文库的宏基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 以  $\lambda$  DNA/EcoRI+Hind III 为分子量标记, 所提的DNA 大小应与标记物中最大的一条带位置相近。
- 10.2.4 用于宏基因组 DNA 提取的深海样品, 宜采用-80 °C 或液氮罐保存, 不应采用常温保存。

### 10.3 样品前处理

- 10.3.1 沉积物样品可直接用于提取宏基因组 DNA, 每次提取所用的沉积物量宜为2 g~5g (湿重)。
- 10.3.2 将含菌滤膜(7.4.3)剪成约1 cm×1cm 的小片, 浸泡于装有水的50 mL 小离心管中, 充分振荡制成菌悬液, 除去滤膜, 菌悬液经8000 r/min 离心10 min 后除去上清液, 加入1 mL 水将沉淀充分混匀。
- 10.3.3 虾、鱼、蟹等样品应首先在水中充分洗净, 取其消化道组织, 用水洗净外表, 在解剖镜下剪开, 浸泡于水中, 用毛刷将消化道内部的附着物洗至水中, 除去组织, 将混合液经8000 r/min 离心10 min 后除去上清液, 加入1 mL 水, 将沉淀充分混匀。
- 10.3.4 管状蠕虫样品应先在超净工作台中去除外壳, 用水洗净虫体, 用灭菌后的剪刀剪开虫体, 将虫体浸泡于水中, 用毛刷将虫体内部的附着物洗至水中, 除去虫体, 将混合液经8000 r/min 离心10 min 后除去上清液, 加入1 mL 水, 将沉淀物充分混匀。

### 10.4 宏基因组 DNA 提取

- 10.4.1 在处理好的样品(10.3)中加入5 mL DNA 抽提缓冲液(4.41), 混匀, 于37°C, 225 r/min 条件下

振荡30 min。

10.4.2 加入1 mL TE 溶液和0.5 mL 溶菌酶贮液,继续振荡30 min,加入0.5 mL SDS 溶液,65 ℃水浴30 min。

10.4.3 6000 r/min 离心10 min,将上清液移入新的小离心管。

10.4.4 往沉淀中加入5 mL DNA 抽提缓冲液(4.22)和0.5 mL SDS溶液,65 ℃水浴10 min,6000 r/min 离心10 min,将上清液与10.4.2 中的上清液合并于同一离心管中。

10.4.5 重复10.4.3步骤,将上清液与10.4.3 中的上清液合并于同一离心管中。

10.4.6 测量合并后的上清液体积,加入RNase A贮液至RNase A的终浓度为200 μg/mL,37 ℃水浴15 min,等体积加入酚/氯仿/异戊醇,轻轻混匀,13000 r/min 离心15 min,将上层水相移入新的离心管。

10.4.7 等体积加入异丙醇,于一20℃中沉淀1 h,4℃13000 r/min 离心10 min,弃上清液。

10.4.8 加入200 μL 无水乙醇,放置3 s~5s 后弃去无水乙醇,并重复1次,然后将沉淀物放置超净工作台内吹干后溶解于50 μL TE溶液或水中,即为 DNA 粗提液,于一20 ℃保存。

10.4.9 DNA 粗提液的大片段 DNA(大于等于35 kb)应采用10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶(4.13)电泳检测,用琼脂糖酶(4.7)进行回收纯化。DNA 粗提液的小片段 DNA(小于35 kb)按9.4的要求采用凝胶回收纯化。

注1:小片段 DNA(小于35 kb)也可用商用试剂盒进行纯化。

注2:宏基因组 DNA 也可采用商用试剂盒进行提取。

注3:琼脂糖酶回收纯化的方法可参见琼脂糖酶商品的说明书。

## 10.5 资料处理

将所提取宏基因组 DNA 的来源、站位、大小、纯度、图谱等数据记录于深海样品宏基因组 DNA 提取记录表(参见表 A.4)。数据资料处理记录应按 HY/T058 的要求归档。

## 11 深海生物样品及微生物资源保存

### 11.1 技术要求

11.1.1 深海生物样品、微生物菌株、DNA 资源的保存应有详细的记录,资源的共享应有入库、出库记录。

11.1.2 同一菌株应选用两种或两种以上方式进行保藏。

11.1.3 只能采用一种保藏方法的菌株、DNA 资源应备份并存放于两个以上的保藏设备中。

11.1.4 菌株应定期检查保藏效果,有污染或退化迹象时,应及时纯化分离、复壮,每次检查均应有详细记录。

11.1.5 微生物菌株和 DNA 资源的分离、提取、保存和分装等所有操作均应在无菌条件下进行。

### 11.2 深海生物样品保藏

11.2.1 船上现场分样并按不同温度保存的沉积物样品、水样品、热液烟囱样品,在运输转移入样品库的过程中应保持温度不变, -80 ℃保存的样品应采用干冰运输。

11.2.2 深海小型虾、鱼、蟹等样品应首先在无茵水中充分洗净,取含有微生物的消化道组织进行保存,保存时应加入的甘油溶液(4.18),使甘油的终浓度为150 mL/L,于一80 ℃保存。

11.2.3 样品出库时如需进一步分样操作,应在各自保存温度下进行。

11.2.4 保存条件应包括4 ℃、-20 ℃、-80 ℃和液氮等四种。在样品量较少的情况下,应优先保证4 ℃保存和-80 ℃保存的样品。

### 11.3 微生物菌种资源保藏

#### 11.3.1 定期移植法保藏

##### 11.3.1.1 适用范围

本方法适用于大多数细菌和真菌的短期保存。

##### 11.3.1.2 保藏培养基的配制

###### 11.3.1.2.1 有效时间

空白斜面培养基应尽快使用，放置时间不应超过7 d。

###### 11.3.1.2.2 操作步骤

11.3.1.2.2.1 选择所保存菌株的最适生长培养基，先在烧杯中放适量海水，按培养基配方称取各种材料，依次将缓冲化合物、主要元素、微量元素、维生素等材料加入水中溶解，最后加足水量，搅拌均匀，可加热溶解。

11.3.1.2.2.2 配料溶解后将培养基冷却至室温，根据要求用稀酸溶液或稀碱溶液调节 pH 至所需要的规定值，加酸或碱液时应缓慢、少量、多次搅拌，防止局部过碱或过酸而导致测量不准确和营养成分被破坏。

11.3.1.2.2.3 将琼脂加入相应的液体培养基中，加热并不断搅拌至溶解，再补足所蒸发水分，在二层纱布中间夹入脱脂棉，将配好的培养基趁热过滤并分装。斜面培养基分装量应为玻璃试管高度的1/4 (4 mL~5 mL)，穿刺培养基分装量应为玻璃试管高度的1/2，玻璃试管加棉塞后，外面包扎一层牛皮纸或铝箔并注明培养基名称及配制日期，分装过程中培养基不应沾污到管口或棉塞上。

11.3.1.2.2.4 将制好的固体培养基经灭菌处理，及时摆放斜面，斜面长度不应超过玻璃试管管长的1/2，将灭菌的固体培养基放入培养箱中作无菌检验，通常为30 ℃培养1 d~3 d，无菌检查合格后将其保存于4℃下备用。

##### 11.3.1.3 接种方式

###### 11.3.1.3.1 斜面接种

斜面接种分为以下几种：

- a) 点接：把待保藏菌种点接在斜面培养基中部偏下方处。此方法适用于扩散型生长及绒毛状气生菌丝类霉菌(如毛霉、根霉等)。
- b) 中央划线：从斜面培养基中央自下而上划一直线。此方法适用于细菌和酵母菌等。
- c) 稀波状蜿蜒划线法：从斜面培养基底部自下而上划之字形线。此方法适用于易扩散的细菌，也适用于部分真菌。
- d) 密波状蜿蜒划线法：从斜面培养基底部自下而上划密之字形线。能充分利用斜面获得大量菌体细胞，此方法适用于细菌和酵母菌等。
- e) 挖块接种法：挖取菌丝体连同少量培养基，转接到斜面培养基上。此方法适用担子菌类真菌。

###### 11.3.1.3.2 穿刺接种

用接种针从待保藏菌种挑取少量菌体，从柱状培养基中心自上而下刺入，直到接近管底(勿穿到管底)，然后沿原穿刺途径慢慢抽出接种针。此方法适用于细菌和酵母菌等。

### 11.3.1.3.3 液体接种

挑取少量待保藏菌种或用无菌滴管吸取液体待保藏菌种(接种量与接种体积比不超过100 mL/L)接种于空白液体培养基中。

### 11.3.1.4 培养

接种后的培养基放入培养箱中,在各菌株的最适生长温度下培养至细胞稳定期或得到成熟孢子。

### 11.3.1.5 保藏

培养好的菌种于4℃保存,相对湿度应为50%~70%。视菌株在培养基上的生长状况每两个月移植1次,菌种应保藏相继三代的培养物以便对照,防止因意外和污染所造成的损失。

## 11.3.2 液体石蜡法保藏

### 11.3.2.1 适用范围

本方法适用于不能分解液体石蜡的酵母菌、某些细菌(如芽孢杆菌属、醋酸杆菌属等)和某些丝状真菌(如青霉属、曲霉属等)。但以下细菌和真菌不应用此方法保藏,包括:固氮菌、乳杆菌、明串珠菌、分枝杆菌、红螺菌、沙门氏菌、布拉霉、丝枝霉、卷霉、小克银汉霉、毛霉、根霉等属。

### 11.3.2.2 液体石蜡的准备

11.3.2.2.1 选用液体石蜡(4.8),将其分装到玻璃试管中,加塞,并用牛皮纸包好,采用以下两种方式进行灭菌:

- a) 灭菌处理,置40℃恒温箱中干燥2 h;
- b) 160℃干热灭菌2 h。

11.3.2.2.2 将灭菌的液体石蜡冷却至室温,随机选取三管液体石蜡,无菌条件下用无菌吸管吸取少量液体石蜡滴入空白麦芽汁平板上,涂布后于30℃条件下培养1 d~3 d,检查无菌落长出后方可使用,如有杂菌长出则需重新灭菌。

### 11.3.2.3 灌注石蜡

在无菌条件下将液体石蜡注入按11.3.1.3和11.3.1.4处理的斜面菌种上,液面高出斜面顶部1 cm左右,使菌体与空气隔绝。

### 11.3.2.4 保藏

注入液体石蜡的菌种斜面以直立状态置低温(4℃)干燥处保藏,保藏时间2年~10年。保藏期间应定期检查,如培养基露出液面,应及时补充灭菌的液体石蜡。如发现异常应选新的斜面菌种按11.3.1.4和11.3.2.3的规定处理后重新保藏。

### 11.3.2.5 恢复培养

恢复培养时,挑取少量菌体转接在适宜的空白培养基上,生长繁殖后,再重新转接1次。

## 11.3.3 沙土管法保藏

### 11.3.3.1 适用范围

本方法适用于产孢类放线菌、芽孢杆菌、梭菌、曲霉属、青霉属及少数酵母如隐球酵母和红酵母等。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/455111044304011204>