

一微生物学创始人及其重要成就他们的工作及意义进行评论
相差显微镜改变了样品不同部位间光的（），使人眼可以察觉
古菌的概念及其与细菌、真核生物的主要区别
4. 微生物的特点：个体小、结构简、胃口大、食谱广、繁殖快、易培养、数量大、分布广、
种类多、级界宽、变异易、抗性强、休眠长、起源早、发现晚
二 5. 无菌技术，常用灭菌方法，固体培养基分离纯培养稀释方法，选择培养，富集培养，二元培养物，
6. 显微镜（放大倍数，反差，分辨率）各类显微镜在原理、样品制备和观察方面的异、同进行概括、比较，冰冻蚀刻
7. 细胞的结构与功能，各种细菌的基本特性；哪些特点可以作为分类依据？
球菌 弧菌 螺旋体菌 螺旋菌，柄细菌，纳米比亚硫磺珍珠菌
支原体，衣原体，立克次氏体
三 细胞壁结构功能，革兰氏染色，细菌染色法，细胞壁缺陷细菌，原生质体，原生质球，类何帕烷
细胞膜，颗粒状贮藏物（类囊体、羧酶体、气泡、伴胞晶体或磁小体）
芽孢，伴胞晶体，苏云金芽孢杆菌
糖被（3种）
观察和判断细菌鞭毛的方法旋转论”
放线菌，蛭弧菌，黏细菌，蓝细菌，酵 jiao 母菌
四 微生物的营养要求，微生物营养类型 4 种&代表菌，营养缺陷型
设计培养基的原则和方法，各种培养基，扩散 促进扩散 主动运输 膜泡运输
五 微生物的各种产能途径（方式）的基本特点 ATP 和还原力产生微生物在代谢上的多样性
生物氧化的形式包括某物质与氧结合、脱氢或脱电子三种，底物水平磷酸化（substrate level phosphorylation）氧化磷酸化（oxidative phosphorylation）
生物氧化的功能为：产能（ATP）、产还原力[H]和产小分子中间代谢物；发酵（fermentation）；不同微生物发酵产物的不同，也是细菌分类鉴定的重要依据。有氧呼吸，无氧呼吸；巴斯德效应；硫细菌（sulfur bacteria）能，氧化亚铁硫杆菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）硝化细菌亚硝化细菌；硫的氧化氨的氧化铁的氧化，氢的氧化，氢细菌。
光合磷酸化，嗜盐菌紫膜的光合作用
初级代谢VS次级代谢
次级代谢产物
六 微生物生长：单位时间里微生物数量或生物量（Biomass）的变化

第一节 微生物生长的测定

在微生物学中提到的“生长”，一般均指群体生长。

➤ 以数量变化对微生物生长情况进行测定



1、培养平板计数法

2、膜过滤培养法



3、显微镜直接计数法

1) 常规方法:

2) 其它方法:

➤ 以生物量为指标测定微生物的生长



1、比浊法

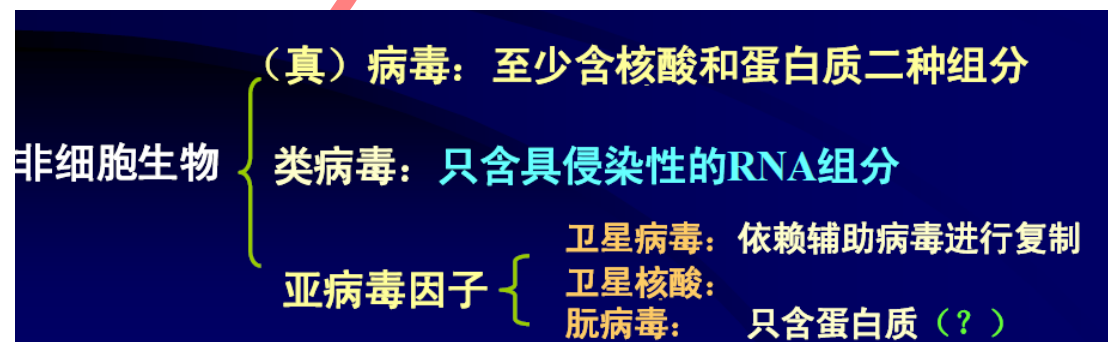
2、重量法

3、生理指标法

细菌生长曲线4个时期；群体感应（Quorum-Sensing）现象；连续培养，恒浊培养，恒化培养；抗微生物剂；石碳酸系数，抗代谢物，磺胺药物作用原理；抗生素（青霉素机制）；如何避免细菌耐药性？

灭菌过滤

七 病毒是一类既具有化学大分子属性，又具有生物体基本特征；既具有细胞外的感染性颗粒形式，又具有细胞内的繁殖性基因形式的独特生物类群；病毒特点定义，



细菌计数一样CFU, 形成的噬菌斑也可用于对噬菌体的数目进行估算。计量单位: PFU; 病毒分离纯化方法; 毒粒的化学组成; 病毒壳体结构 (20面体, 螺旋对称, 双对称); 结构蛋白, 非结构蛋白, 一步生长曲线, 吸附期, 潜伏期, 裂解量。病毒复制周期5个阶段: 非增殖性感染包括流产感染 (abortive infection); 限制性感染 (restrictive infection); 潜伏感染 (latent infection); 溶源性噬菌体 (lysogenic phage); 整合于细菌染色体或以质粒形式存在的温和噬菌体基因组称做原噬菌体 (prophage)

溶源性感染的影响: 免疫性+溶源转变; 原噬菌体引起的溶源性细菌除免疫性外的其他的表型改变, 包括溶源菌细胞表面性质的改变和致病性转变被称为溶源转变 (lysogenic conversion)。白喉杆菌只有在含有特定类型的原噬菌体时才能产

生白喉毒素，引起被感染机体发病。

溶原性细菌与野生型菌株相比有何异同？如何确定某菌确系溶原性菌株？

MMC或者UV处理，诱导：

观察宿主细胞是否裂解；

- ✓ 作用于敏感菌，形成噬菌斑；
- ✓ 将细胞裂解物进行离心纯化后电镜观察；
- ✓ 以细胞裂解物为材料抽提核酸，电泳检测；



八肺炎球菌的转化实验

生命的最基本特征：新陈代谢

Prion朊病毒其致病作用是由于动物体内正常的蛋白质PrP^c改变折叠状态为PrP^{sc}所致，而这二种蛋白质的一级结构并没有改变。

基因组（genome）宏基因组（metagenome）

原核生物（细菌、古生菌）的基因组特点；真核生物（酵母）的基因组特点，质粒（plasmid）&结构，质粒与宿主的关系，质粒的6种主要类型；细菌素：能抑制或杀死近缘、甚至同种不同株的细菌的因子（细菌蛋白）；细菌素vs抗生素；编码 δ 内毒素（伴胞晶体中）的质粒（苏云金芽胞杆菌）；松弛型质粒（relaxed plasmid）严谨型质粒；质粒的不亲和性；基因突变特点6个；常见的微生物突变类型1营养缺陷型（auxotroph）一种缺乏合成其生存所必须的营养物（包括氨基酸、维生素、碱基等）的突变型，只有从周围环境或培养基中获得这些营养或其前体物（precursor）才能生长。负选择标记；2抗药性突变型（resistant mutant）

3条件致死突变4形态突变；

诱变剂与致癌物质——Ames试验

诱变剂的共性原则：

化学药剂对细菌的诱变率
与其对动物的致癌性成正比

超过95%的致癌物质对微生物有诱变作用

90%以上的非致癌物质对微生物没有诱变作用

回复突变reverse mutation

三种基因水平转移方式及其应用

水平基因转移（Horizontal gene transfer, HGT）接合转导转化；普遍性转导，

整合到细菌染色体的特定位点上
宿主细胞发生溶源化

局限性转导；局限性转导与普遍性转导的主要区别；溶源转变（lysogenic conversion）；感受态细胞：具有摄取外源DNA能力的细胞（competent cell）；群体感应（Quorum-Sensing）现象：许多细菌都能合成并向胞外释放一种被称为自诱导物质（autoinducer, AI）的信号分子。胞外的AI浓度能随细菌密度的增加而增加，达到一个临界浓度时，AI能启动菌体中相关基因的表达，调控细菌的生物行为。如产生毒素、形成生物膜、产生抗生素、生成孢（胞）子、形成感受态、产生荧光等，以适应环境的变化。这一现象被称为群体感应（quorum sensing, QS）调节。

假噬菌体：噬菌体的DNA包装酶也能识别染色体DNA上类似pac的位点并进行切割以“headful”的包装机制包装进P22噬菌体外壳，形成只含宿主DNA的转导噬菌体颗粒；转染，

“接合”“转导”及“自然转化”这**三种**在自然界中存在的**细菌遗传重组过程各自的特点**：

- a) 外源DNA的来源及进入途径有差异；
- b) 决定因素也各有不同；

如何设计实验对三种途径进行区分？

3、如果二个不同营养缺陷标记 ($a^-b^-c^+d^+$ 和 $a^+b^+c^-d^-$) 的菌株经混合后能产生在基本培养基平板上生长的原养型重组菌株，请设计实验来决定该遗传转移过程是转化、转导还是接合？

用 CaCl_2 处理细胞，~~电穿孔~~等是常用的人工转化手段

普遍性转导中外源DNA的三种后果：

1) 与细胞染色体重组交换

稳定的重组子（转导子）
在选择平板上出现正常菌落

2) 不能进行重组和复制，但基因可转录、表达。

流产转导（abortive transduction）
在选择平板上形成微小正常菌落

3) 被降解

转导失败
在选择平板上无菌落形成

第六节 菌种保藏 (参见P20)

基本要求:

在一定时间内使菌种不死、不变、不乱

基本方法:

生活态

培养基传代培养 斜面、平板

寄主传代培养

休眠态

冷冻 液氮、低温冰箱

干燥 沙土管、冷冻真空干燥

专业保藏机构最常用的保藏手段: 液氮、冷冻真空干燥

九PCR技术的原理（变性退火延伸）；一个质粒载体需要哪些基本的遗传学元件；

以扩增外源DNA为目的载体---克隆载体（cloning vector）

作为克隆载体的基本要求（p256 倒数第2大段）：

- ✓(1) 独立的复制子—能够进行独立自主的复制
- ✓(2) 具有若干限制酶的单一切割位点，便于外源DNA的插入
- ✓(3) 具有可供选择的遗传标记—便于对阳性克隆的筛选和鉴定
- (4) 具有一定的安全性—胞内不重组和转移；胞外不扩散
- (5) 载体DNA须易于分离和实验操作

质粒载体特点，穿梭载体（Shuttle vector） λ 噬菌体克隆载体特点

分子进化树的意义

建立16 S r RNA系统发育树的意义

abcde

细菌分类、鉴定的常用方法（特别是分子技术）的原理

利用16S rRNA建立分子进化树的美国科学家 Carl Woese

生物大分子作为进化标尺的基本原则

（参见p312第4大段）

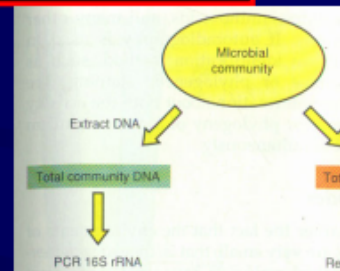
- 1) 在所需研究的种群范围内，它必须是**普遍存在**的。
- 2) 在所有物种中该分子的**功能是相同**的。
- 3) 为了鉴定大分子序列的同源位置或同源区，要求所选择的分子序列必须能**严格线性排列**，以便进行进一步的分析比较。
- 4) 分子上序列的**改变（突变）频率**应与**进化的测量尺度**相适应。



大量的资料表明：功能重要的大分子、或者大分子中功能重要的区域，比功能不重要的大分子或分子区域进化变化速度低。

未培养微生物（uncultured microorganisms）

从环境中直接分离并克隆rRNA并分析其序列和在分子进化树上的位置等方法而发现的目前尚不能在人工条件下获得培养的微生物。



利用特异性rRNA探针进行
荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH），
或进行**原位PCR**（In Situ PCR）后再进行荧光原位杂交的技术
对环境中的这些未培养微生物进行定位、计数和进行形态观察。

六、未培养的微生物

研究意义：

- ★ 生物多样性和系统发生的多样性
(Biodiversity and Phylogenetic diversity)
- ★ 微生物生态学的研究提出新的要求
- ★ 寻找新的致病微生物
- ★ 从未培养微生物中寻找新的基因、新的蛋白

分类学涉及三个相互依存又有区别的组成部分：

分类、命名、鉴定

三域domain

双名法，由二个拉丁字或希腊字或拉丁化了的其它文字组成，
一般**用斜体**表示

(参见 p322 ~ 323)

属名在前，一般用拉丁字名词表示，**字首字母大写**

种名在后，常用拉丁文形容词表示，**全部小写**

二、rRNA作为生物进化的计时器（参见p312）

16S rRNA被普遍公认为是一把好的谱系分析的“分子尺”。

1) rRNA具有**重要且恒定的生理功能**；

2) 在16SrRNA分子中，既含有高度保守的序列区域，又有中度保守和高度变化的序列区域，因而它**适用于进化距离不同的各类生物亲缘关系的研究**；

3) 16SrRNA**分子量大小适中**，便于序列分析；

4) rRNA在细胞中**含量大**(约占细胞中RNA的90%)，易于提取；

5) 16 S rRNA**基因**可方便地进行**测序和分析**（例如，利用PCR技术）；

6) 16SrRNA普遍存在于真核生物和原核生物中(真核生物中其同源分子是18SrRNA)。因此它可以作为**测量各类生物进化的工具**。

用“**模式概念**”。对于原核生物而言，种的**模式菌株(type strain)**是**长期保藏在永久性的、为公众开放的菌种保藏机构中特定的培养物**。

否定： G+C含量差异达到一定范围的细菌肯定不属于某同一分类单位

生物分类的传统指标： 形态学特征、
生理学特征、
生态学特征

从不同层次(细胞的、分子的)，用不同学科(化学、物理学、遗传学、免疫学、分子生物学等)的技术方法来研究和比较不同微生物的细胞、细胞组分或代谢产物，从中发现的反映**微生物类群特征**的资料。

四、DNA / RNA 分子 (参见p338-34)

1. 16S rRNA(18S rRNA) 基因序列分析
2. DNA的碱基组成(G+Cmol%)
3. 核酸分子杂交
4. 看家基因及多位点序列分析
5. DNA指纹图谱
6. 全基因组序列分析

自学

十一

生态系统: (参见p279; p290)

在一定的空间内生物的成分和非生物的成分通过物质循环和能量流动互相作用、互相依存而构成的一个生态学功能单位。

微生物之间，与原生生物，动物，植物互生（例子）共生（例子）。
寄生，竞争捕食

一、微生物在生态系统中的地位

(参)

- 1、微生物是有机物的主要分解者；
- 2、微生物是物质循环中的重要成员；
- 3、微生物是生态系统中的初级生产者；
- 4、微生物是物质和能量的贮存者；
- 5、微生物在地球生物演化中扮演着重要的作用；

活的非可培养状态

(viable but nonculturable state , VBNC state)

细菌处于不良环境条件下时产生的一种特殊的生存方式或“休眠”状态。

在常规培养条件下培养时不能生长繁殖，但仍然是具有代谢活性的活菌。

一般表现为细胞保持完整，胞内酶维持活性，染色体及质粒DNA均保持稳定，而用显微镜观察，其细胞会表现为缩小成球状，细胞表面产生皱折等。

在一定条件下（例如经过宿主，或通过其它菌株的帮助）可恢复活性。

传统的免疫概念： 机体抵抗病原微生物的能力，即抗传染免疫。

免疫(immunity)： 生物体能够辨认自我与非自我，对非我做出反应以保持自身稳定的功能。

病原菌致病力的强弱 → **毒力** { 侵袭力
毒素

条件致病菌(opportunistic pathogen)或机会致病菌：

在一般情况下不致病，但在某些特定条件下可致病的微生物

2) 毒素(toxin) (参见p388-389)

细菌毒素按其来源、性质和作用的不同： { 外毒素
内毒素

(1) 外毒素(exotoxin)：

病原细菌，主要是一些革兰氏阳性菌，在生长过程中合成并分泌到胞外的毒素，如**破伤风痉挛毒素**、**白喉毒素**等；也有存于胞内当细菌溶解后才释放的如痢疾志贺菌的**肠毒素**。

特点：

通常为**蛋白质**，**抗原性强**，可选择作用于各自特定的组织器官，不同病原菌产生的外毒素不同，所引起的症状也不同。其毒性作用强，但毒性不稳定，对热和某些化学物质敏感。

破伤风梭菌的**破伤风痉挛毒素(tetanospamin)**和
破伤风溶血毒素(tetanolysin)。



(2) 内毒素 (endotoxin)

革兰氏阴性菌的细胞壁物质，主要成分是脂多糖(LPS)，于菌体裂解时释放，作用于白细胞、血小板、补体系统、凝血系统等多种细胞和体液系统，引起发热、白细胞增多、血压下降及微循环障碍，有多方面复杂作用，但相对毒性较弱。各种革兰氏阴性菌的内毒素作用相似，且没有器官特异性。

外毒素与内毒素的比较：

项目	外毒素	内毒素
产生菌	革兰氏阳性菌为主	革兰氏阴性菌
化学成分	蛋白质	脂多糖 (LPS)
释放时间	一般随时分泌	菌体死亡裂解后释放
致病特异性	不同外毒素各不相同	不同病原菌的内毒素作用基本相同
毒性	强*	弱
抗原性	完全抗原，抗原性强	不完全抗原，抗原性弱
制成类毒素	能	不能
热稳定性	差	耐热性强

特异性免疫，非特异性免疫

二、抗原和抗体

(参见p398 ~ 402)

1. 抗原 (Antigen, Ag)

能诱导机体产生体液抗体和细胞免疫应答，并能与抗体和致敏淋巴细胞在体内外发生特异结合反应的物质。

免疫原性 (immunogenicity)：

在体内激活免疫系统，使其产生抗体和特异效应细胞的特性。

免疫反应性 (immunoreactivity) 或反应原性 (reactinogenicity)：

能与相对应的免疫应答产物(抗体及致敏淋巴细胞)发生特异结合和反应的能力。

完全抗原 (complete antigen) 或免疫原 (immunogen)：

具有免疫原性和反应原性的抗原

不完全抗原 (incomplete antigen) 或半抗原 (hapten)：

只有反应原性而没有免疫原性的抗原

4. 什么是天然免疫和特异性免疫？试举例说明二者之间并无截然界限。

抗原决定簇（antigen determinant），或表位（epitope）：

抗原物质上能够刺激淋巴细胞产生应答并与其产物特异反应的化学基团。它是抗原特异性的物质基础。

抗原所携抗原决定簇的数目称为抗原价，一般抗原是多价的。

多次題