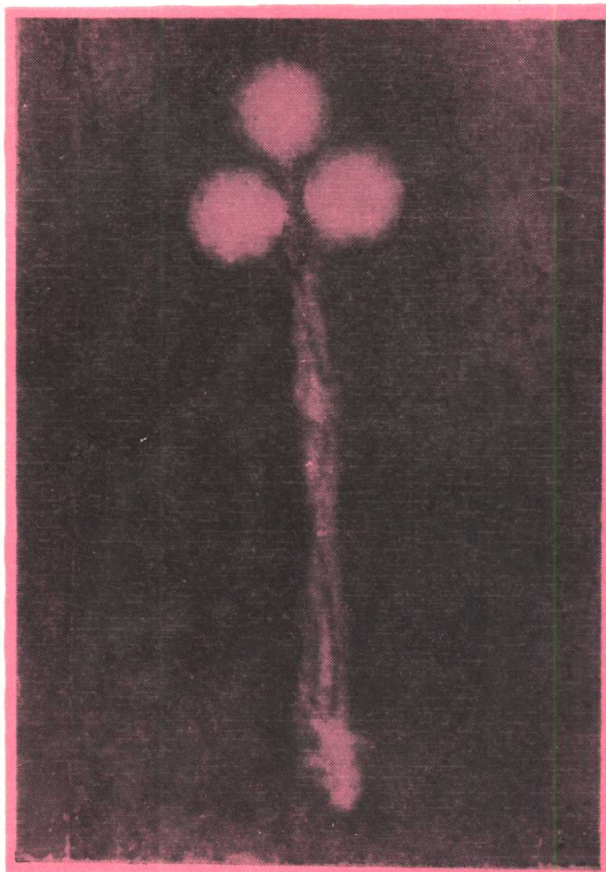


微生物学技术丛书

噬菌体实验技术

余司 编著
茂东 释



科学出版社

微生物学技术丛书

噬菌体实验技术

余茂勋 司穉东 编著

科学出版社

1991

内 容 简 介

《噬菌体实验技术》一书是微生物学技术丛书的一个分册。它由长期从事噬菌体研究的专家根据自己的经验编写而成。本书全面叙述了噬菌体的操作方法和实验技术,涉及的基础研究方法包括生物学、形态学、血清学和遗传学,同时也详细地介绍了在工业发酵中和医学分型方面的技术。全书共分十三章,包括宿主菌的培养,噬菌体的分离、纯化,溶原性菌株的检查、转导、转染等,内容丰富、适用,有助于分子克隆技术及遗传工程的操作。

本书可供微生物学研究人员、病毒学工作者、大专院校有关专业师生及工、农、医有关技术人员使用。

微生物学技术丛书

噬 菌 体 实 验 技 术

余茂勋 司榭东 编著

责任编辑 范淑琴

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100707

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1991年3月第一版 开本: 787×1092 1/32

1991年3月第一次印刷 印张: 3 3/8

印数: 0001—1500 字数: 70 000

ISBN 7-03-002228-9/Q·302

定价: 3.40 元

丛书编辑委员会名单

主 编 张树政

副主编 余茂効

编 委 王大耜 王祖农 王 岳
刘 肃 余茂効 李季伦
张树政 张启先 焦瑞身

前 言

中国微生物学会编辑出版工作委员会于1983年11月4—6日在苏州召开了第一次工作会议。会议决定组织编辑出版一套“微生物学技术丛书”，后经微生物学会常务理事会通过正式成立了编辑委员会。

本丛书主要目的是为了适应“四化”需要，为广大微生物学工作者提供适用的工具书，以便提高技术水平和实验手段。主要对象为具有大专程度的微生物学科技工作者以及大专院校师生及研究生等。丛书由编委会邀请有实践经验的微生物学专家编写。内容力求新颖，但也考虑到国内条件，要便于使用，易见实效。要求作者本人有亲身经验，简要叙述原理，着重介绍具体操作、实验结果及本人心得体会，便于读者应用。

会议并初步确定了一些分册的选题，如：普通微生物学操作技术、微生物分类学技术、微生物菌种保藏技术、微生物生理和代谢实验技术、酶学实验技术、微生物遗传学实验技术、微生物细胞学实验技术、免疫学实验技术、病毒及噬菌体实验技术、抗生素实验技术等。这是微生物学会组织编写的第一套技术丛书，由于缺乏经验，缺点错误在所难免，希望读者批评指正。

另外，由于要求作者具有亲身经验，故在选题及内容方面，就有一定的局限性，涉及的方面可能不够广，或者方法不够先进，也希望读者提出改进意见。随着学科的发展和技术的进步，新的分册和新的内容将不断增加，继续出版下去，使

这套丛书成为微生物学工作者的得力助手，更好地为“四化”建设服务。

张树政

1985年10月

目 录

前言

第一章 宿主菌和培养基	1
一、斜面和穿刺保藏	2
二、甘油保藏	2
三、冷冻干燥保藏	3
四、沙土管保藏	4
第二章 噬菌体的分离和纯化	5
一、从自然来源材料的分离	5
二、从溶原菌中分离	7
三、噬菌体的纯化	10
第三章 噬菌体原液的制备和保存	11
一、液体法	11
二、平板法	15
三、大量噬菌体的生产技术	16
四、噬菌体的保存	17
第四章 噬菌体的定量测定和裂解反应的检查	19
一、双层琼脂法	19
二、单层琼脂法	20
三、琼脂平板表面接种法	21
四、点滴法	21
五、比浊法	22
第五章 噬菌体液的浓缩和提纯	23
第六章 抗噬菌体血清的制备和中和试验	26

一、动物免疫和抗噬菌体血清的制备	26
二、抗噬菌体血清的检定——血清中和试验	30
三、抗噬菌体血清的应用	31
第七章 吸附	34
一、测定未吸附噬菌体	35
二、测定感染噬菌体的细菌	36
三、测定存活的细菌	37
第八章 一级生长实验和单细胞中噬菌体的增殖	39
一、一级生长实验	39
二、单细胞中噬菌体的增殖(单细胞裂解)	44
第九章 溶原性细菌的检查	48
一、自发释放噬菌体的菌株检查	49
二、经诱导产生噬菌体的菌株检查	49
三、交叉裂解法检查菌株溶原性	50
四、利用温和噬菌体构建溶原菌	52
第十章 转导	54
一、普遍性转导	54
二、局限性转导	58
第十一章 噬菌体核酸的提取和转染	62
一、从平板上噬菌体制备的裂解液中提取核酸	62
二、噬菌体的转染	64
第十二章 噬菌体的电镜技术	68
一、网和支持膜	68
二、噬菌体标本的制备	71
三、染色技术	72
四、电镜观察的分析和解释	74
五、测量大小	75
第十三章 噬菌体分型	77

一、对细菌的噬菌体分型要求·····	77
二、噬菌体常规试验稀释度 (RTD) ·····	78
三、细菌的噬菌体分型方法·····	78
四、型别的命名·····	82
附录 1 培养基 ·····	84
附录 2 缓冲液和溶液 ·····	91
参考文献 ·····	95

第一章 宿主菌和培养基

各种细菌和放线菌都有自己最适宜的生长条件,相应地,这也是适宜于它们噬菌体的生长条件。一般说来,当宿主菌处于快速生长和繁殖阶段时,细胞易于被噬菌体侵染。通气振荡的液体培养方法为好氧细菌的生长创造了良好的条件,但对于一些需吸附在细菌伞毛尖端而入侵细胞的丝状噬菌体,由于因剧烈振荡而不利于吸附,同时,脆弱易折断的伞毛也会因此而影响通过吸附伞毛而侵入的噬菌体的感染。大多数细菌在营养丰富的培养基(LB培养基,YT培养基和营养肉汤培养基等)中能良好地生长,多数放线菌能在CM和R2培养基中生长^[9]。处于对数生长期的宿主菌可用于双层或单层琼脂法以形成噬菌斑,或用于液体法增殖噬菌体。在双层琼脂平板中,对于形成较小噬菌斑的噬菌体,需适当增加底层厚度,为细胞生长提供足够的营养,以便出现较明显的噬菌斑。铺展上层琼脂或单层琼脂平板时,融化后的软琼脂应保持在45℃待用。过高温度会影响宿主菌和噬菌体的存活,同时也会产生较多的冷凝水,这样在培养过程中可能造成噬菌斑的汇合,影响计数。此外,有条件时可在超净台中铺平板,待干燥2—3h后铺展上层。

常用的细菌与放线菌培养基和稀释液可按宿主菌的需要和不同试验目的加以选择,各实验室可按自己的条件或偏好选用(详见附录1)。培养基基本上可分为两类,一类系丰富培养基,用天然的氮源和碳源等配制而成;另一类系合成培养基,由有机或无机化合物配制。

为了繁殖噬菌体,必须保藏宿主菌,常用的方法在许多实验室中大致包括四种。

一、斜面 and 穿刺保藏

一般采用能与空气隔绝带有螺旋帽盖的小瓶(细胞瓶),内装入所需培养基,摆成斜面或小柱,将单个生长良好的菌落或对数生长期的菌悬液接种在表面或穿刺接种,经过培养,待生长良好后旋紧帽盖,用石蜡膜封住,以防止水分蒸发和隔绝空气流通,放置在低温保存,保存时间随菌种而异,一般可保存1—2年。常用培养基为含 Difco 营养肉汤粉 10g,氯化钠 5g,琼脂 15g,用作穿刺小柱时改取琼脂 7g,按每升含量计算。

需要指出,通常实验室中在 L 培养基平板上划线保存单菌落用作试验,这种短期保存法至多不应超过 1 个月,因为往往超过 10 天就会明显降低活力。有时为了工作需要,可将新培养的过夜生长细菌培养物,经 3 500r/min 离心 15 min 沉降菌体,将其重悬在菌体沉降体积一半的 10mmol/L MgSO₄ 溶液中,放在冰箱中待用,可保存 1 个月。

二、甘油保藏

取过夜生长培养的细菌培养物或放线菌孢子悬液,加入灭菌甘油,使浓度达到 20%,保存在-70℃,可保持数年而不失其活力。在保藏期间需要随时取出转种,再放回低温保藏。此法对性状不稳定的菌株保藏具有优越性。

通常可配制成 40% 甘油,经高压灭菌后待用,也可先行分装在细胞瓶中,放在室温下备用。加入等量菌悬液后,混合均匀移至-70℃ 保藏。此法不适于保藏大肠杆菌 Hfr 或 F'

菌株和带有 Mu 和 Tn5 的菌株。

为了有效地保存细菌活力，应将分装后制备的菌悬液速冻，即投入液氮或乙醇干冰浴中冻结。取用时刮取表面冰屑，在平板上划线接种。如需融化后接种，应在 37℃ 速融后操作，每次冻融后的活力都将会减少 1%。

此外，也有一些改良技术很值得考虑。先配制一种冰冻液，内含 K_2HPO_4 6.3g，柠檬酸钠 0.45g， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.09g， $(NH_4)_2SO_4$ 0.9g， KH_2PO_4 1.8g，甘油 44g，加水至 500ml；用此液稀释过夜生长菌悬液，再行分装，也可在配制的甘油菌悬液中放入制作项链用的塑料珠子，进行冰冻保藏。使用时以灭菌镊子取出一颗珠子，放在琼脂平板上或培养基中培养，其优点是可避免融化整瓶冰冻菌液。

三、冷冻干燥保藏

此法需要用一台冷冻干燥机装置来制备冷冻干燥安瓿，利用脱脂牛乳作保护剂，也可将菌悬液和牛乳混合后吸收在滤纸条或纸片上，用来保藏细菌和放线菌。在 4℃ 或常温下可稳定地保存数年不致明显地丧失活力。这是一种较为理想和有效的手段，也便于邮寄和携带。

取细菌斜面培养物或放线菌孢子悬液。配制 10% 的 Difco 细菌用脱脂牛乳或经离心后去除脂肪的鲜牛乳，经 121℃ 灭菌 15min 待用。准备经酸清洗后冲洗的安瓿或带橡皮塞的安瓿，对于后者需放入 Whatman 3MM 滤纸芯条 3—4 条，灭菌后备用。以上三部分准备妥当，在严格无菌操作下，将斜面培养物用 1ml 牛乳洗下，或在孢子悬液中每 1ml 加入 0.05—0.5ml 脱脂牛乳，如孢子悬液浓度不高时，可经离心后将孢子悬浮在 0.5ml 牛乳中。取配成的牛乳菌悬液 0.2—0.4

ml 注入安瓿中，或使滤纸芯条吸饱牛乳菌悬液，加橡皮塞但留出排气口，移至冷冻干燥机中抽真空，性能良好的装置在数小时至过夜即可完成冻干，利用火焰在真空中封口或加橡皮塞后用金属套环封口，贴上标签。每批制品应抽样检查存活率。

四、沙土管保藏

此法常用于放线菌和芽孢菌。国内生产菌种多采用此法保藏。沙土管制成后可放在干燥器中于室温或低温保存。

操作程序

1. 取 500g 左右的河沙，过筛后选取中间颗粒均匀的细沙，用 10% 盐酸浸泡 2—4h，去掉盐酸，用清水泡洗，冲淋直至中性，烘干。

2. 将细沙分别装入安瓿管中，高约 1cm，加棉塞，121℃ 灭菌 30min，在室温下经过 3—5 天后，依法再灭菌一次，然后取少量细沙，放入肉汤培养基中培养，检查有无杂菌生长，以决定是否合格。

3. 取已生成孢子的细菌培养物或放线菌培养物，用无菌水洗下孢子，配成悬液，每支加入 0.5ml，与细沙混合。

4. 移置入干燥器中干燥，器中可用 P_2O_5 吸湿。

5. 干燥后，管口经烧熔封口，可较长期保存。

第二章 噬菌体的分离和纯化

一、从自然来源材料的分离

分离噬菌体的取材依不同目的而选择, 这些材料包括污水、土壤、河湖江海水、人畜和野生动物粪便、堆肥、尸体、腐烂里实和残株、痰液和脓液、异常发酵液和乳制品、发酵车间的排气和洗涤水以及其周围的空气。如拟分离指定宿主菌的噬菌体, 可将此菌培养物与取样混合培养过夜, 以增加其中存在的噬菌体, 便于分离。但为了定量目的, 应避免用此法, 而应设法增大被检样品(如水和空气)体积来达到此目的。为简便起见, 通常分离中, 可在一小区内分别取样混合, 作为一代表样品进行分离。

(一) 采样和分离程序

1. 凡采样工具和器皿均需灭菌。常规采土样时, 取表层或表层下 5cm 深度的土壤 5—10g, 水样为 50ml, 各种组织约 5—10g^[7]。在病房, 诊疗所, 车间地面、墙壁、桌椅和工作服, 以及发酵装置和摇床等不能取样时, 可用灭菌棉球蘸取无菌盐水或培养基, 擦拭表面作为样品。如欲富集, 可在 10ml 样液中加入 1ml 带菌培养物, 在适宜温度下培养过夜后进行分离^[7]。

2. 将样液以 4 000r/min 离心 15min, 取上清液。

3. 按 10 倍稀释至 10^{-2} — 10^{-4} 。

4. 取 0.2 ml 对数生长的菌悬液(常用过夜生长菌培养物)与 0.1ml 的上述稀释液混合在一起,与 3 ml 经融化后保持在 45℃ 水浴中温度平衡的上层琼脂混合,均匀地铺在平板上。这是通常使用的双层琼脂法。也可省却平板而只用上层琼脂,直接铺展在平皿上凝固,但其量需增至 7—10ml。

5. 移至适宜温度温箱中,反置培养过夜,翌日观察,并记录噬菌斑数。

如需了解车间周围空气中是否有噬菌体及其污染数量的变化,可按具体要求和现场,设计简易的采样方法。现介绍我们在一些工厂的检查方法^[1,8]。

(二) 空气检查程序

1. 利用双层或单层琼脂法,光铺展含有指示菌悬液的琼脂层,如用双层法则铺展在已凝固的底层上,凝固待用。

2. 将皿放在指定的被检查地点,标上记号,开启皿盖,暴露 30min,如有需要也可规定 60min。

3. 检查滤器或过滤材料及其有效使用期时,选定压缩空气流向正侧面 50cm 处,开启皿盖,手持平皿以斜侧接触平板,并不断旋转平皿,暴露 5min,注意勿使微小水滴冲入平皿,同时在取样处于操作过程中打开另一皿作对照。

4. 检查分过滤器时,取出滤纸片,将出气面贴在平板上,尽量缩短操作时间,减少污染机率。

5. 为了常规定期检查进入发酵罐的过滤空气质量,应在过滤空气管道中专门按置一分阀,定期按置盛有肉汤培养基的抽滤瓶,使空气充分通过肉汤。定期取样检查细菌和噬菌体污染变化情况。检查噬菌体仍按双层或单层琼脂法。

6. 将以上铺展的平板,放在适宜温度下培养过夜,观察结

果,计数记录。

在分离工作中,经常会遇到杂菌污染影响观察和判定,除延长离心时间和利用 Eppendorf 离心机加大离心速度外,有的实验室采用氯仿消除杂菌,即在样品上清液中加入 1/50—1/10 体积的氯仿,混合,涡动,在 37℃ 保温 1h 后,取上清液与指示菌混合按双层或单层法进行。这种方法仅对氯仿不敏感的噬菌体适用,如部分大肠杆菌噬菌体,但不适用于大肠杆菌的丝状噬菌体和其他许多芽孢杆菌的噬菌体。如需要,可将上清液通过微孔滤膜(孔径 $0.45\mu\text{m}$)或烧结玻璃滤器(G5, 国产 G6),以取得无菌上清液。

噬菌斑的形成是由于一个被感染的细菌通过噬菌体的生活周期,释放出新的子代颗粒,继续向附近正在生长的细菌侵染,通过几次连续侵染,在琼脂层中不断往外扩展,逐渐形成抑制和杀死细菌的区域,即可看到无细菌生长的斑,即噬菌斑。噬菌体的裂解量、潜伏期、吸附速度、细胞裂解酶的合成、宿主控制的修饰等能影响斑的大小、清晰度和斑的边缘。此外,培养基的成分由于受到批号不同的生物试剂的改变而引起的变动、琼脂的浓度、底层平板的厚度、培养温度和时间也会影响斑的变化。在观察和判定噬菌斑时,往往与经验有关,许多新手可能在开始时会遇到不易判断的困难。在难于得出结论时,建议将可疑的斑挑出,在生理盐水中经适当稀释后再按琼脂层法分析,可以得出可靠无误的结果。

二、从溶原菌中分离

从溶原菌中分离噬菌体,首先必须排除由菌体本身所携带的游离噬菌体(见第六章),其次要选择足够数量的相近菌株。因此,从不同地理环境中较广泛地收集有关菌株进行分

析测定,也是十分有意义的。

将生长过夜的菌悬液,离心去除细胞,取其上清液与不同菌株的过夜生长培养物混合,按双层或单层琼脂法分析有无噬菌斑的出现。这种不经诱导而自发释放噬菌体的细菌可按此法分离。通常在实验室常用紫外线或丝裂霉素 C 来诱导溶原菌,在 λ 溶原菌处理后使阻遏蛋白失活,从而 λ 噬菌体 DNA 进入裂解发育,最终合成 λ 噬菌体。溶原菌经诱导产生噬菌体的分离程序如下:

1. 取已纯化的生长在对数期或培养过夜的溶原性菌株培养物 10ml,经 4 000r/min 离心,弃上清液。

2. 以同体积的生理盐水或 TE 缓冲液洗涤细胞后,配制成 10^3 细胞/ml 悬液,取 5ml 放在直径为 6cm 的有搅拌子的皿中。

3. 移入已开启 30 min 的紫外光灯下,15W 灯管相距 50 cm,伴以磁力搅拌,使悬液均匀照射 30—60s,照射时间应根据不同菌株而异。

4. 离心,弃上清液,以新鲜肉汤培养基再悬浮沉淀菌体,收集于用锡箔或黑纸包被的小管中,遮光振荡培养,避免光复活现象。

5. 经 2—6h 培养后,离心去除菌体,再经过滤或加入氯仿(与悬液之比为 1:10)处理。

6. 对未知菌最好先在涂布有指示菌的平板上点滴上清液,经培养后观察到有抑菌区时,再按双层琼脂法分析。对已知菌可直接分析,省却点滴上清液。

如果利用丝裂霉素 C 诱导时,取对数生长或过夜生长的菌悬液,加入丝裂霉素 C,使终浓度达到 0.1—1 μ g/ml,振荡培养 6h 或静止培养过夜,继续上述程序 5—6 步骤。

溶原性菌可能有两种或两种以上的不同前噬菌体,所以