

巧释转化试验中各菌株的培养特征和代谢机理

刘相梅 胡宇鸿 孔 健 吴志红*

(山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘要:介绍了在分子生物学实验课的一个环节——重组质粒转化结果的观察和分析中,不仅指导学生分析和掌握常规的实验结果和培养特征,而且引导学生对转化试验中不同基因型菌株在麦康凯培养基平板上的不同培养特征进行认真细致的观察,对各种现象及其潜在的代谢机理进行全面的综合分析,并进一步利用常规生物学实验室中易于得到的 pH 试纸,酸碱溶液等,设计简便易行的实验,为分析推测提供快速直观的试验佐证。

关键词:麦康凯培养基,培养特征,pH 试纸,酸碱溶液,实验方法

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0173-04

生物科学是一门实验性科学,在高等院校生物类各专业的学习中,实验教学是十分重要的环节。在指导学生掌握基本原理与方法,按照规范化操作流程实施实验步骤,获得预期结果的基础上,引导学生发现问题、思考问题和解决问题,提高学生的兴趣和综合素质,应是实验教学中不断追求的质量目标。

在对我院本科生开设的《分子生物学实验》教学中,我们一直努力探索如何引导学生对实验结果和可能的实验现象作良好的分析,启迪学生广开思路,综合利用所学知识,提高分析问题和解决问题的能力。在题为“重组质粒的连接、转化和筛选鉴定”实验中,尤其是重组质粒转化结果的分析环节中,我们的尝试和努力产生了良好的效果。不仅获得了正常的实验结果,还发现了一些在讲义和其他参考资料上未提及和阐述的实验现象。以剖析这些现象为契机,进一步设计了简便易行的小实验,直观地阐明了这些现象及其产生原因。此举使学生深受启发,不但对该部分的学习起到了促进作用,而且提高了学生在整个实验中的学习兴趣和观察能力。在此总结相关的实验现象及简便易行的实验验证方法。

1 实验概略

“重组质粒的连接、转化和筛选鉴定”是分子生物学实验中的经典实验。在教学中,我们以质粒 pUC19 作为克隆载体,以 *Hind*III 酶切的 λ DNA 作为外源片段,与 pUC19/*Hind*III 连接构建重组质粒;采用 CaCl_2 法诱导 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行转化试验;以麦康凯琼脂 (MacConkey Agar, 北京奥博星生物技术公司) 作为筛选鉴别培养基。在转化环节中,设置了如表 1 所示的转化和对照体系,按照常规操作步骤完成转化和培养。在结果观察和分析环节上,我们尝试了层层深入观察和解析不同培养特征的探索。

2 常规的培养特征及分析

根据表 1 中的转化实验和对照体系,将产生 3 种不同基因型的菌株:受体菌本身

* 通讯作者 Tel: 0531-88366175, Fax: 0531-88564288, E-mail: wuzhihong@sdu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-21, 修回日期: 2005-11-25

(*E. coli* DH5 α , 即表 1 中的受体菌对照)、非重组转化子 (含有 pUC19 的 *E. coli* DH5 α , 即表 1 中的质粒对照和连接反应中的载体自连产物转化子) 和重组转化子 (含有重组 pUC19 的 *E. coli* DH5 α , 即连接反应中重组质粒转化子)。根据实验原理, 常规的预期结果简列于表 1 中。实验教学中, 各学生组均能取得所预期的结果。作为常规的教学要求, 本部分结果分析的重点放在利用得到的直观实验结果, 进一步阐明实验原理, 加深学生对原理和操作流程的理解, 达到前后呼应, 相互印证的效果, 完成基本教学任务。

表 1 转化实验及对照体系一览表

实验编组	质粒 (μL)	感受态细胞 (μL)	培养平板	预期结果
连接产物	5.0	100	Mac + Amp	红、白两种菌落
质粒对照 (pUC19)	1.0	100	Mac + Amp	红色菌落
受体菌对照-1	0	50	Mac + Amp	不生长
受体菌对照-2	0	50	Mac	白色菌苔

注: Mac 为麦康凯琼脂 (MacConkey Agar), Amp 为氨苄青霉素 (培养基中浓度 80 $\mu\text{g/mL}$)

3 特殊培养特征的深入观察

除了表 1 中预期的基本结果外, 在不同转化平板上还存在着一些特殊实验现象 (见表 2)。实验中, 有些学生能够注意到这些现象并提出问题, 但有些现象则被学生忽视了。因此, 在本环节的教学, 完成常规结果解析后, 进一步引导学生对不同菌株在平板上的培养特征作细致全面的观察。主要由学生观察总结各种现象, 指导教师引导补充。

表 2 不同转化平板上特殊培养特征总结

实验编组	培养平板	特殊培养特征	终了 pH
连接产物	Mac + Amp	红菌落密集处的培养基常由红色透明状变成浅紫色非透明状, 白菌落周围有透明圈 (见图 3)。	未检测*
质粒对照 (pUC19)	Mac + Amp	培养基常由红色透明状变成浅紫色非透明状。	5.0~5.5
受体菌对照-1	Mac + Amp	培养基为红色透明状 (可作为分析对照平板)。	6.5 左右
受体菌对照-2	Mac	培养基由红变黄, 透明状态无改变 (见图 2)。	8.0~8.5

* 连接产物转化平板上同时存在着重组与非重组转化子, 不适于 pH 试纸检测

4 特殊培养特征的分析推测和实验验证

经查阅, 上述特殊现象在文献中未见阐述。教师组成员根据实验原理和表 2 中的特征分析推测, 这些表观特征可能与不同基因型菌株的生理代谢有关。众所周知, 以麦康凯平板上菌落颜色差异区分重组与非重组转化子的基础是 α -互补作用。非重组转化子具有 α -互补作用, 可发酵乳糖产酸, 菌落为红色; 反之, 菌落为白色。重组转化子和受体菌的基因型不同, 但共同特征是缺乏 α -互补作用, 不能利用乳糖产酸。但是, 相关文献中并没有进一步阐述重组转化子等不利用乳糖时的代谢状况。根据麦康凯培养基标准配方 (蛋白胨 20 g, 胆盐 5 g, 氯化钠 5 g, 乳糖 10 g, 中性红 0.025 g, 琼脂 13 g, 定容至 1 L, pH7.2 $\pm$ 0.2) 和菌株特性, 这两类菌株不能利用乳糖时, 培养基中的蛋白胨是唯一的碳氮源。蛋白胨为胨、胨、肽和氨基酸的混合物^[1], 根据生化原理

其代谢后产生氨^[2], 将导致培养基的 pH 上升。据此推测, 表 2 中菌落及培养基变化特征应当是不同菌株代谢不同的营养基质, 产生酸性或碱性代谢物, 并与培养基中的中性红指示剂进行反应的结果。

为了验证上述推测, 首先设计了“pH 试纸条实验”检测各菌株的代谢结果。将 pH 试纸 (pH 5.5~9.0 精密试纸, 上海三爱思公司) 剪成 5 mm 宽的条状, 用镊子将试纸条铺于各平板上, 半分钟后观察其颜色变化。各类平板的表观颜色及试纸显色结果见图 1, 培养基的终了 pH 结果列于表 2 中。以受体菌对照-1 组 (表 1 和 2) 的无生长平板的 pH 值 (约为 6.5) 为参照, 受体菌对照-2 组 (表 1 和 2) 平板培养基的 pH 达到 8.0~8.5, 与受体菌代谢蛋白胨产氨的分析预测结果一致; 质粒对照组 (表 1 和 2) 平板 pH 下降到 5.0~5.5, 是非重组转化子利用乳糖产酸的结果。该实验证明具有 α -互补作用和不具有 α -互补作用的两类菌株分别进行着不同的代谢。中性红的变色范围为 pH 6.8~8.0 (红→黄), 表 2 中受体菌对照-2 组的平板由红变黄, 正是受体菌代谢产氨使其 pH 达到 8.0~8.5 所造成的。

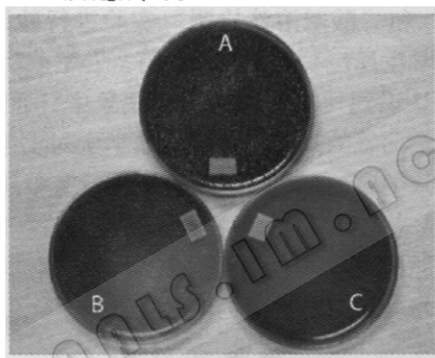


图 1 不同菌株在麦康凯平板上的生长及 pH 试纸显色结果

A pUC19 转化感受态细胞涂布于 Mac + Amp 平板, B 感受态细胞涂布于 Mac 平板,

C 感受态细胞涂布于 Mac + Amp 平板

为了进一步证明表 2 中特殊培养特征的本质就是代谢不同基质产生的酸性或碱性产物与中性红之间的简单反应, 设计了“酸碱溶液检测”实验。将直径 6 mm 的滤纸片蘸取 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液, 置于空白麦康凯平板上, 观察培养基与酸碱溶液的反应 (见图 2)。实验表明, 酸性溶液能使培养基由红色透明状变为浅紫红色的非透明状 (该现象还被 pH 4.8~5.2 的其它酸性盐溶液证实); 碱性溶液能使培养基由红变黄而不改变其透明状态。该结果与实验中观察到的现象吻合, 进一步证明上述推论的可靠性。

根据上述验证结果, 在连接产物转化平板上重组转化子周围产生透明圈 (见图 3) 的原因就易于解释了。该平板上存在两种转化子: 较多的非重组子 (红菌落) 和较少的重组子 (白菌落)。源于载体自连的非重组子, 能够利用培养基中的乳糖产酸, 使培养基由红色透明状变成浅紫红色非透明状。重组子则代谢培养基中的蛋白胨产氨, 中和了其周边非重组子产生的酸性物质, 阻止了培养基由红色透明状向浅紫色非透明状的转变而显示出透明圈。由于重组子菌落周围的微环境太小, 无法以试纸给出直观的检测结果。我们进一步将重组子划线转接至空白麦康凯平板上, 其生长的结果是麦康凯培养基由红色变为黄色, 试纸检测显示 pH 为 8.0~8.5。该结果也与上述的分析推测相吻合。

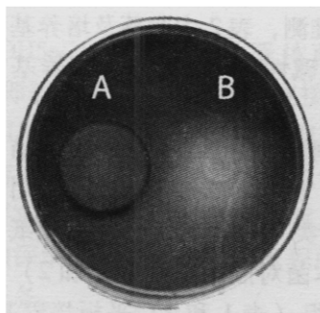


图2 麦康凯培养基与酸碱溶液的反应
A 1 mol/L HCl 溶液, B 1 mol/L NaOH 溶液

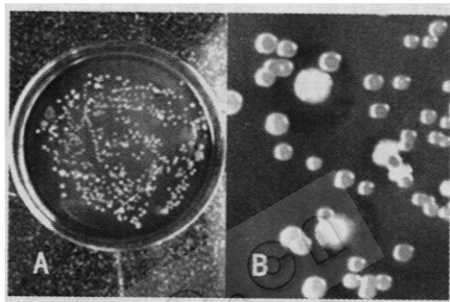


图3 重组转化子在麦康凯平板上产生的透明圈
A 完整平板, B 局部放大

经教师组分析、讨论和实验验证后,在教学中首先以“为什么出现这些现象,其本质是什么,与已知的实验原理有何关联”等问题的方式,引导学生进行分析和归纳,进而利用“pH 试纸条法”和“酸碱溶液检测”实验进行验证。该工作在连续两年 20 多个班次的教学尝试中,学生反应积极,效果良好。

综上所述,引导学生认识到司空见惯的实验现象中,通过认真的观察,仍可能发现自己认识不清、甚至无法回答的问题,从而启迪学生对实验原理的深入思考和理解,并有助于培养学生认真细致的实验工作习惯。利用实验室中易于得到的 pH 试纸、酸碱溶液等,通过简单的实验,快速、直观而巧妙地阐明实验现象及潜在的机理,使学生认识到分析问题和解决问题的思维和创意随时随地都可以产生,有助于提高学生的实验兴趣和综合分析能力,培养和提高学生的综合素质。

参考文献

- [1] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995. 54 ~ 90.
- [2] 沈 同, 王镜岩. 生物化学(下册). 北京: 高等教育出版社, 1999. 217 ~ 222.