

利用平板法获得高效价 λ 噬菌体悬液

詹谷宇 刘心明 张旭东

(陕西微生物研究所, 武功)

我们研究了在平板上获得高效价 λ 噬菌体的方法, 并将平板增殖的高效价 λ 噬菌体用于 λ DNA 的简易制备。

材料与 方法

1. 菌株: λ 噬菌体用 *E. Coli* w1485 (cI 85757) 经热诱导获得; 指示菌为 *E. Coli* 266 YMC Lac⁻。由中国科学院微生物研究所提供。

2. 培养基: (1) BPY 培养基^[1]: 用于斜面

培养。(2) LB 培养基^[2]: 液体培养基培养指示菌, 固体平板用作扩增及测定效价。双层平板底层加 1.5—2% 的琼脂, 上层加 0.6—1% 的琼脂。

3. λ 噬菌体的平板扩增和效价测定: 直径 9 厘米平皿底层加 10 毫升 LB 固体培养基, 凝固后加 0.2 毫升, 培养至对数期的指示菌和 0.1 毫升已知效价的 λ 噬菌体稀释液, 再加入 50℃ 左右的 LB 软琼脂 3 毫升, 摇匀铺层, 37℃ 保温至噬菌斑不再扩大, 取出加 1% 蛋白胨 2 毫升,

摇荡, 1 小时后加氯仿离心, 用这种方法获得的 λ 噬菌体溶液叫作浸出液; 另一种方法是将平板上层软琼脂刮出, 置白细布中拧挤, 挤出的 λ 噬菌体原液加氯仿离心叫挤出液。本文中所列数据除指明是挤出液外, 均为用浸出液测得的结果。两种方法获得的 λ 噬菌体原液均用 10 倍稀释法作平板效价测定。

4. λ DNA 的制备: 将扩增的 λ 平板挤出液加 0.5% 氯仿摇荡 5 分钟, 置冰箱半小时, 使被挤出的部分琼脂凝固沉淀, 4000 r. p. m 离心 20 分钟取上清液。原液效价要求在 5×10^{11} — 10^{12} /ml 以上, 用于 λ DNA 制备。向 λ 噬菌体原液加入 NaCl、MgCl₂、及 1 M pH8.0 Tris-HCl 缓冲液, 使浓度达到 0.1 M NaCl、0.01 M MgCl₂、0.02 M Tris-HCl pH = 7.8, 再加入少量 DNase、RNase 及链霉素蛋白酶 G, 于 37°C 水浴反应 20 分钟, 冷却, 上国产 60—120 目 2% 琼脂糖凝胶柱, 上柱液与凝胶比例按 1:20, 柱高与直径比为 10:1, 流速为 1.2—2 毫升/分, 用 0.2 M NaCl 洗脱, 收集呈强烈乳白荧光的第一紫外吸收峰供提取 λ DNA。用等体积 0.1 M Tris-HCl (pH 7.9) 饱和的重蒸酚抽提 4 至 5 次, 再用等体积氯仿异戊醇 (24:1) 抽提 2—3 次, 然后按 Mandell 和 Hershey^[3,4] 的方法上 MAK 柱精制。将上柱液配成 0.1 M NaCl pH 6.8 的磷酸钠缓冲液,

上柱毕, 先用 0.2 M NaCl 的上述缓冲液洗柱, 继用 0.4 M NaCl 的相同缓冲液洗柱至紫外吸收至基线, 改用 1.0 M NaCl 的相同缓冲液洗脱 λ DNA, 将洗脱液装入透析袋, 对 pH 7.9 10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA 透析, 再用上述透析液配制的 25% 聚乙二醇 12000 行透析浓缩。

5. λ DNA 含量测定: 用二苯胺法^[5]。

6. λ DNA 的 EcoRI 酶切: 按文献 [6]。

7. 琼脂糖凝胶电泳: 按文献 [7]。

结 果

一、高效价 λ 噬菌体平板的获得

表 1 为指示菌数量、 λ 噬菌体数和平板上层培养基量对 λ 噬菌体扩增的正交试验。表明指示菌量以 10^8 、 λ 噬菌体数以 10^5 、上层培养基以 3 毫升对 λ 噬菌体的增殖较为有利。在固定上层培养基为 3 毫升的条件下, 仔细试验了指示菌从 10^6 至 10^{10} , λ 噬菌体从 10^3 至 10^7 的各种组合, 结果指出, 指示菌量以 7×10^7 至 5×10^8 , λ 噬菌体数以 2.6×10^4 至 2.1×10^6 , 指示菌量应比噬菌体高出 2 至 4 个数量级, 其中以高出 3 个数量级为最好。这样的组合增殖时间常在 9.5 小时以上, 平板形态多出现为连斑网状。

表 1 指示菌数、 λ 噬菌体数和上层培养基量三因子正交组合试验及其结果

因子 \ 组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	\bar{K}_1	\bar{K}_2	\bar{K}_3
指示菌量 (pfu/ml)	2.5×10^9	2.5×10^8	2.5×10^7	5×10^7	5×10^7	5×10^7	5×10^6	5×10^6	5×10^6	878	302	123
上层培养基量 (ml/ml)	3	4	5	3	4	5	3	4	5	747	403	152
λ 噬菌体数 (pfu/ml)	3.6×10^6	3.6×10^5	3.6×10^4	3.6×10^3	3.6×10^4	3.6×10^6	3.6×10^4	3.6×10^6	3.6×10^5	545	733	26
效 价 (pfu/ml)	147×10^9	116×10^9	0.3×10^9	73×10^9	3.3×10^9	14×10^9	4.1×10^9	1.7×10^9	31×10^9	—		

表 2 为平板底层琼脂用量对 λ 噬菌体扩增的影响。表明加大底层培养基用量对 λ 噬菌体的扩增有良好作用。

比较了几种培养基对 λ 噬菌体平板扩增的影响, 结果差异不大。但用同一培养基扩增的 λ 噬菌体平板, 采用不同的提取方式, 效价相差

很大。表 3 为 1% 蛋白胨或 0.045 M CaCl₂ 2 毫升加入平板表面, 不时摇荡, 浸泡 1 小时后加氯仿离心获得的浸出液, 或者不加浸出液, 直接将上层软琼脂刮出的挤出液效价的比较, 表明挤出液较浸出液效价高出 3 至 5 倍以上。曾对浸出液用量、浸出时间和摇荡方式对效价的影响

表2 平板底层培养基用量对λ噬菌体扩增的影响

平板底层培养基用量 (ml)	效价 试验号	λ噬菌体效价 (pfu/ml)		
		I	II	III
5		1.9×10^{10}	8.2×10^{10}	6.4×10^{10}
10		4.6×10^{10}	2.3×10^{11}	1.8×10^{11}
15		9.6×10^{10}	3.2×10^{11}	2.7×10^{11}
20		2.2×10^{11}	4.1×10^{11}	4.4×10^{11}

进行了研究,这些处理间虽有些差异,但远不及挤出液获得的效价高,所以在制备λ DNA 时采用平板挤出液。

表3 不同浸挤方式对λ噬菌体平板效价的影响

平板浸挤方式	效价 试验号	λ噬菌体效价 (pfu/ml)			
		I	II	III	IV
1% 蛋白胨浸出液		2.1×10^{10}	1.4×10^{11}	3.4×10^{11}	3.5×10^{11}
0.045 M 氯化钙浸出液		—	—	—	3.7×10^{11}
细布挤出液		1.1×10^{11}	5.5×10^{11}	1.1×10^{12}	1.2×10^{12}

二、λ DNA 的得率与鉴定

按上述制备程序,一个典型试验常用平板15个获得挤出液30毫升左右,制备结果于表4。

表4 λ DNA 制备试验结果

批次	平板挤出液 (ml)	效价 (pfu/ml)	λDNA (μg)
I	35	9.8×10^{11}	263
II	38	1.0×10^{12}	402
III	27	1.02×10^{12}	270

制得的λ DNA 其紫外吸收图谱见图1,最大吸收值在260nm,最小吸收值在230nm,280:260为0.48左右。产品经琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色为一条带,经EcoRI限制内切酶切

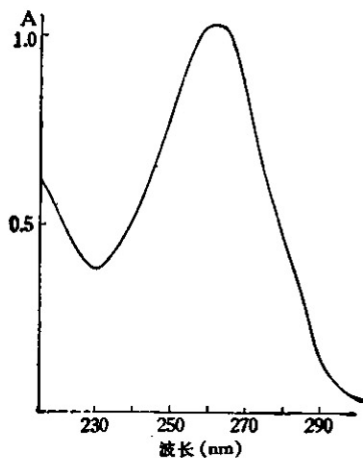


图1 λ DNA 的紫外吸收谱

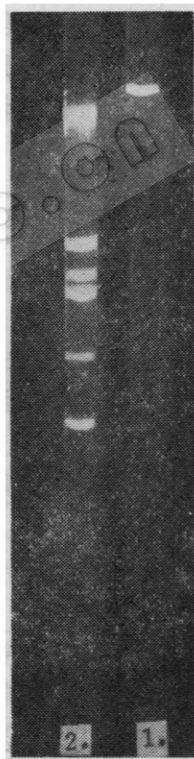


图2 λ DNA 的琼脂糖-溴化乙锭电泳图谱电泳条件: 0.9%琼脂糖,电泳缓冲液含0.04 M Tris 0.02 M NaAc, 2mM EDTA, pH8.1, 1.5V/cm 电泳24小时。(1)为λDNA (2)λDNA 经EcoRI 酶切

为六条带(图2)与文献一致^[6]。用该法制备λ DNA,简单易行,适于一般实验室应用。

参 考 文 献

- [1] 范云六等: 微生物学报 16 (4): 277-281, 1976.
- [2] Luria, S. et al., J. Bacteriol. 74: 461, 1957.

- [3] Mandell, J. D., and D. Hershey,: *Analytical Biochemistry*, 1: 66—67, 1960.
- [4] Noboru, S., and T. Y. Cheng: *J. Mol. Biol.*, 4: 161—172, 1962.
- [5] Chandra, P., and W. Appel: *Methods of Molecular Biology*, 李申德译: <分子生物学方法>科学出版社 p. 92 1977.
- [6] 中国科学院生物物理研究所三室三组: 生物化学与生物物理学报, 10(1): 71—76, 1978.
- [7] 范云六等: 遗传学报, 6 (3): 265, 1977.
- [8] Marjorie T., and R. W. Davis,: *J. Molecul. Biol.* 91 (1): 315—328, 1975.