



半乳糖基因的高频转导实验

杜润洋 李育阳

(复旦大学生物系,上海)

1975年我们从低频转导子中分离到双重溶原菌 *Escherichia coli* K 12 F₂—建立了半乳糖基因的高频转导实验。经过七年的教学实践,证明本实验方法简便,重复性好,成功率高。现介绍如下,以便交流。

一、实验目的和原理

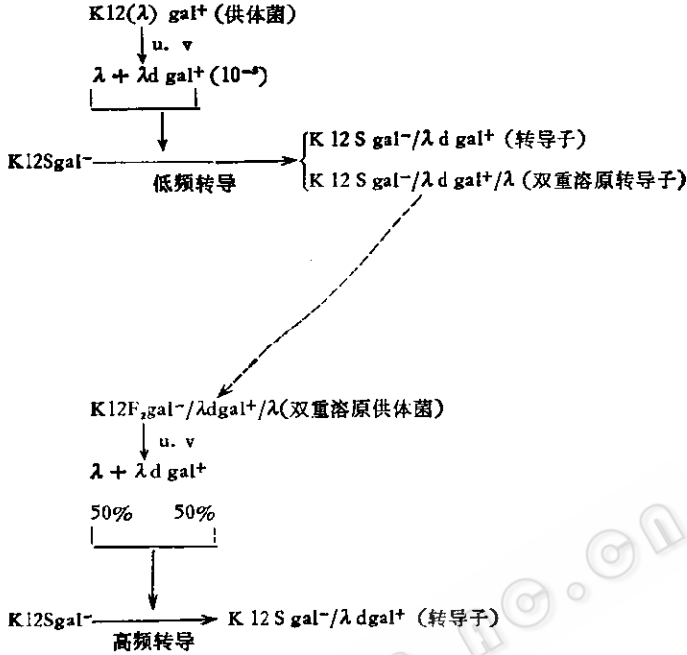
转导是以噬菌体为媒介,将供体细胞的部分或个别基因转移给受体细胞的细菌基因重组现象,它在理论与实践上都有重要意义。本实验试图用噬菌体(λ)局限性转导半乳糖基因的现象来了解转导的基本过程,并掌握高频转导实验技术。

E. coli K12(λ) gal⁺带有原噬菌体(λ),(λ)与细菌染色体上的半乳糖基因 gal 紧密连锁,当

此溶原菌受紫外光诱导后,原噬菌体被切离下来。在切离过程中由于偶然的机误(约 10^{-5}),个别噬菌体携带了细菌的半乳糖基因,同时丢失了部分噬菌体基因,而成为缺陷噬菌体 λ dgal⁺,用 λ dgal⁺ 和 λ 的子代噬菌体去侵染受体菌 *E. coli* K 12 Sgal⁻,就能产生 10^{-5} — 10^{-6} gal⁺ 的转导子,这种现象称为低频转导(LFT)。由于 λ 的数量大大超过 λ d gal⁺,在可以多重侵染的条件下,一个被 λ dgal⁺ 侵染的受体菌也会同时受到正常的 λ 侵染,产生带有 λ dgal⁺ 和 λ 的双重溶原菌,其基因组为 gal⁻/ λ d gal⁺/ λ 。如果诱导这种双重溶原菌,裂解液中的噬菌体颗粒有 50% 是 λ ,50% 是 λ dgal⁺,因此裂解液侵染受体菌 *E. coli* K12 Sgal⁻ 能产生很高的转导频率(10^{-2} — 10^{-3}),这种现象称为高频转导

(HFT)。高频转导的转导子大多数只受到一个 $\lambda d gal^+$ 颗粒的侵染，很少有双重侵染。本实验就是用从低频转导中分离到的双重溶原菌

K12F₂ gal⁻/λ gal⁺/λ 作为高频转导的供体菌。实验原理图解如下：



二、实验材料

(一) 菌种

E. coli K12F₂ gal⁻/λdgal⁺/λ 是带原噬菌体 (λ) 和缺陷噬菌体 λ dgal⁺ 的双重溶原菌的局部二倍体，能发酵半乳糖，作为高频转导的供体菌。

E. coli K12 Sgal⁻ 的不带噬菌体、不能发酵半乳糖、对噬菌体 (λ) 敏感的大肠杆菌，作为受体菌及测定噬菌体 (λ) 效价的指示菌。是我们用亚硝基胍诱变 *E. coli* K12 S 后选得的。

(二) 培养基

1. 肉汤培养液 100ml (装 250ml 三角瓶，另取 2 支试管，每管装 3ml)：牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，蒸馏水 1000 ml，pH 7.0—7.2。

2. 肉汤培养液 100 ml (装入 250ml 三角瓶，另取 2 支试管，每管装 3ml)：牛肉膏 5g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g，蒸馏水 1000ml，pH7—7.2。

3. 肉汤培养基 150 ml：在肉汤培养液中加入 2% 琼脂。

4. 加倍肉汤培养液 3 ml：成分与肉汤培养液相同，但浓度加倍。

5. 加镁磷酸缓冲液 4ml：KH₂PO₄ 2g，K₂HPO₄ 7g，MgSO₄·7H₂O 0.25 g，蒸馏水 1000ml。

6. 半乳糖 EMB 培养基 250 ml：伊红 (Y) 0.4 g，美兰 0.05 g，半乳糖 10 g，蛋白胨 10 g，K₂HPO₄ 2g，琼脂 20 g，蒸馏水 1000 ml，pH7—7.2 (配制时先调好 pH，最后加染料)。

7. 半固体琼脂 30ml (分装试管，每管 4ml)：1% 琼脂，用蒸馏水配制。

(三) 试剂 0.4 ml

(四) 器皿

1. 培养皿：6cm 1 套，9 cm 10 套。试管 20 支。离心管 3 支 (1 支配软木塞)。涂布棒 5 支。移液管 5ml 5 支，1 ml 20 支。三角瓶 250 ml 3 只，100 ml 2 只。滴管 1 支。平头玻璃匙 (自制) 1 支。恒温水浴 2 只。

三、方法和步骤

(一) 噬菌体的诱导和裂解液的制备

从供体菌 K12 F₂ 斜面挑取一环接种于 3ml

肉汤培养液中, 37℃ 培养约 18 小时, 取 1ml 接种于装有 9 ml 肉汤培养液的 100 ml 三角瓶中, 37℃ 继续培养 4—6 小时后, 以 2500 rpm 离心 15 分钟, 弃上清液, 加 4ml 镁磷酸缓冲液重新制成悬浮液, 取 3ml 入小培养皿中。在暗室红光下用距离 40cm、15 瓦紫外灯照射 10 秒钟(照射前紫外灯需预热 5 分钟左右, 待光线稳定后打开皿盖照射菌液)。用紫外光诱导供体菌释放噬菌体的最佳条件是 15 瓦, 距离 40cm, 照射 10 秒钟。然后加入加倍浓度的肉汤 3 ml, 在 37℃ 避光培养 2—3 小时。

用移液管 (5ml) 把培养物转移入带软木塞的离心管中, 加入约 0.4 ml (10 滴左右) 氯仿, 剧烈振荡半分钟左右, 静置 5 分钟, 以 3000 rpm 离心 10 分钟。将上清液用无菌管转移到另一离心管中, 此即噬菌体裂解液。

(二) 噬菌体效价的测定

从指示菌 K 12 Sgal⁻ 斜面挑取 1 环接种于 3ml 肉汤培养液中, 37℃ 培养 18 小时, 取 1 ml 移入装有 9 ml 肉汤培养液的 100 ml 三角瓶中 (剩下的菌液留作点滴法试验用), 继续培养 6 小时。取 6 支已溶化的半固体琼脂 (48℃), 每支内加入上述菌液 0.3ml。

用肉汤培养液将噬菌体裂解液稀释为 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 浓度, 分别吸取 0.5 ml 稀释液加到上述带指示菌的琼脂中(每稀释度 2 支)搓匀, 分别倒入已装好肉汤培养基为底层的培养皿中, 摇匀, 凝固后, 37℃ 培养过夜, 记录出现的噬菌斑数, 计算噬菌体裂解液的效价。

(三) 高频转导现象的观察

取装有 EMB 的培养皿 3 只, 在皿底事先用白色蜡笔按图样画好区域。取 (二) 中保存的 K 12 Sgal⁻ 菌液, 涂 1 cm 宽的菌带, 在 37℃ 培养 6 小时左右, 分别取一环噬菌体裂解液点种在 3 个培养皿的圆圈处作对照, 然后各取 1 环分别点种在 2 个已涂有受体菌的圆圈内 (取裂解液之前接种针要经火焰灭菌, 以免带入指示菌污染裂解液)。37℃ 培养 2—3 天后观察转导现象 (见图 1)。

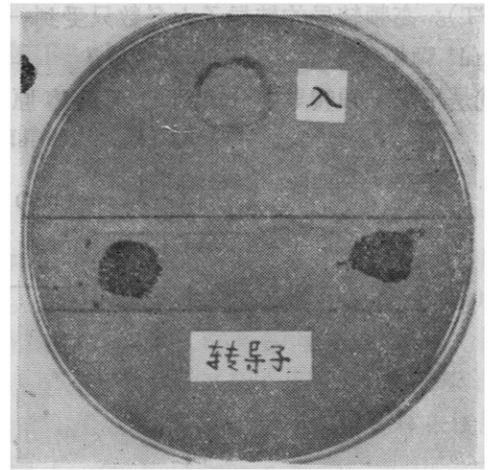


图 1 半乳糖基因 gal⁺ 的转导现象

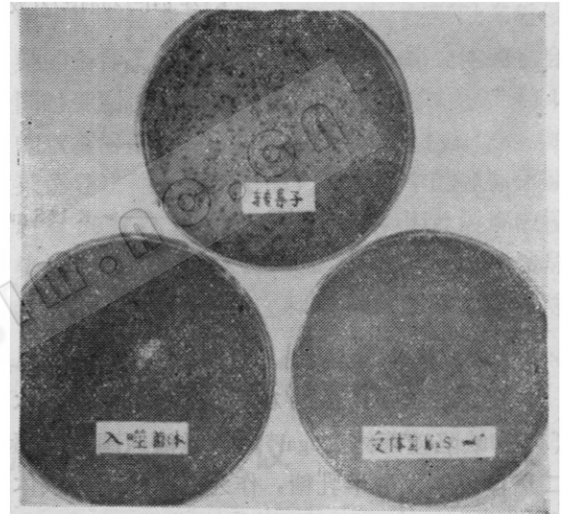


图 2 半乳糖基因 gal⁺ 的转导结果

表 1 半乳糖基因高频转导实验结果

| 实验批号 | 噬菌体效价 (个/ml) | 转导子数 (个/ml) | 转导频率 (%) |
|------|------------------------|------------------------|----------|
| 1 | 3.59 × 10 ⁷ | 1.8 × 10 ⁶ | 5.01 |
| 2 | 7.8 × 10 ⁷ | 3.46 × 10 ⁶ | 4.44 |
| 3 | 1.12 × 10 ⁸ | 5.59 × 10 ⁶ | 4.99 |
| 4 | 5.7 × 10 ⁷ | 1.54 × 10 ⁶ | 2.70 |
| 5 | 2.1 × 10 ⁸ | 6.06 × 10 ⁶ | 2.89 |
| 6 | 2.8 × 10 ⁸ | 5.6 × 10 ⁶ | 2.0 |
| 7 | 5.3 × 10 ⁸ | 8.26 × 10 ⁶ | 1.56 |
| 8 | 3.4 × 10 ⁸ | 4.52 × 10 ⁶ | 1.33 |
| 9 | 1.32 × 10 ⁹ | 1.41 × 10 ⁶ | 0.11 |
| 10 | 2.5 × 10 ¹⁰ | 2.7 × 10 ⁶ | 0.01 |

(四) 高频转导频率的测定

取受体菌 K12Sgal⁻ (三角瓶中的) 0.5 ml 到

试管中,置 37℃ 预热数分钟后,加 0.5 ml 噬菌体裂解液摇匀,置 37℃ 水浴中保温 10 分钟后稀释到 10^{-3} ,取 10^{-2} 和 10^{-3} 的稀释液各 0.1 ml 在预先倒好的 EMB 平板上涂布(重复 3 皿)。另外各取 0.1ml 噬菌体裂解液和 K12Sgal⁻ 受体菌分别涂布在 EMB 平板上(各重复 2 皿)作为对照,37℃ 培养 48 小时左右,观察实验结果(见图 2,表 1) 计算转导频率。

四、实验结果计算

转导子总数 = 每皿转导子平均数 (个/
0.1 ml) × 10 × 2 × 稀释倍数

转导频率

$$= \frac{\text{转导子总数 (个/ml 噬菌体裂解液)}}{\text{噬菌斑总数 (个/ml 噬菌体裂解液)}} \times 100\%$$

五、注意事项

1. 裂解液加氯仿去除供体菌时要充分振荡,离心后把上清液小心转移到干净的离心管

中备用。

2. 测定效价时宜提前 1 天倒好底层培养基,置 37℃ 烘干后用,或用 48℃ 左右的已熔化的培养基当天倒皿,总之要尽可能减少底层培养基表面的水膜,以免倒入上层培养基后引起滑坡现象。

3. 测定转导频率时动作要迅速,加入裂解液后保温时间不宜过长。

观察实验结果在第 2—3 天为宜,在 EMB 培养基上 1 噬菌体裂解液无色,受体菌 K 12 Sgal⁻ 是白色或淡红色,转导子是带有金属光泽的深紫色菌落。时间过长颜色会变淡,影响鉴别。

参 考 文 献

- [1] 范云六等: 微生物育种学术讨论会文集, 61—77 页, 1974, 科学出版社。
- [2] P. F. 史密斯-凯利: 遗传的结构与功能, 褚启人译, 174—184, 1980, 上海科学技术出版社。
- [3] M. L. Morse et al.: *Genetics*, **41**: 758—779, 1956.
- [4] A. Campbell: *Advan. Genet.*, **11**:101—145, 1962.