

温和噬菌体 $\rho 11$ 的分离纯化及其 DNA 的提取

郭兴华 贾士芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 温和噬菌体已广泛用于转导、转染、分子生物学和基因克隆等研究^[1,2], 但是它的分离和纯化尚有一定的困难。原因在于: 1. 和烈性噬菌体不同^[3], 高效价的温和噬菌体难以制备; 2. 枯草芽孢杆菌往往带有多种噬菌体^[4], 不易纯化。本文简述温和噬菌体 $\rho 11$ 的纯化和 DNA 的提取方法。

(一) 试验材料

1. 菌株: 枯草芽孢杆菌 168 (trpC2 $\rho 11$) 用于诱导噬菌体。枯草芽孢杆菌 AS1. 1098 (trp lys met) 为 $\rho 11$ 噬菌体的指示菌。

2. 培养基: LB 培养基: 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, 蒸馏水 1L, 用氢氧化钠调到 pH7.5, 若为固体, 加洋菜 15g。LG 培养基^[5]: 水解酪素 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 5g, 葡萄糖 2g, 蒸馏水 1L, 用氢氧化钠调到 pH7.5。加富 LG 培养基: 除酵母粉和水解酪素为 2 倍外, 其它同 LG。SM 缓冲液^[6] (用于保存和稀释噬菌体): NaCl 5.8g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g, 1M Tris HCl (pH7.5) 50ml, 2% 明胶, 加水到 1L。上述培养基缓冲液均为 $1kg/cm^2$ 高压蒸汽灭菌 30 分钟。

3. 化学试剂: 丝裂霉素 C (Mitomycin C), Kyown 产品。CsCl, Sigma 产品。聚乙二醇-6000 (PEG-6000), 上海化学试剂采购供应站分装日本产品。SDS, Baker 公司产品。

(二) 实验步骤

1. 活化菌株: 将枯草杆菌 168 ($\rho 11$) 在 LB 料面转 1—2 次。

2. 细菌培养: 接一环于 LG 液体 (100ml/500ml 三角瓶), 28℃ 振荡培养 (120r/min) 过夜, 次日转到 37℃ 振荡 (200r/min) 培养 1—2 小时, 当菌长到 $2-3 \times 10^7$ 细胞/ml 时, 以

4500r/min 离心 8—10 分钟 (K70, 离心机) 用 10ml LG 培养液悬浮。

3. 诱导释放噬菌体: 接 1ml 悬液于 LG 液体培养基 100ml 中 (500ml 三角瓶装), 共三瓶, 37℃ 下摇床培养 2 小时 (200r/min), 加丝裂霉素 C, 终浓度为 $1\mu g/ml$ 继续振荡 15 分钟, 诱导噬菌体。立刻在 k70D 离心机以 4500r/min 离心 8—10 分钟, 弃去上清液, 用加富 LG 悬浮到原体积的一半 (150ml) 分装于两个 500ml 三角瓶中, 37℃ 摇床 (200 r/min) 培养 3 小时左右, 直到清亮度不再变化为止。在 Hitachi 离心机上以 15000r/min 离心 10 分钟, 取上清液测效价, 可得 5×10^7 噬菌体颗粒/ml。共得粗噬菌体裂解液约 150ml。

4. 噬菌体浓缩: 向上述裂解液加固体氯化钠 (终浓度为 1M) 和 PEG-6000 (终浓度为 10%)。放 4℃ 过夜。在 Hitachi 离心机以 15000r/min 离心 20 分钟, 弃去上清液, 沉淀用 1.5ml SM 缓冲液溶解, 测效价约为 $4-5 \times 10^9$ 噬菌体颗粒/ml。为进一步提高噬菌体的效价, 可按下述两种方法之一进行。

a. 以感染系数 5 感染敏感菌: 按 1—4 的步骤培养细菌获得噬菌体, 用 5 倍量的噬菌体颗粒感染指示菌细胞, 至裂解液变清亮, 然后离心, 取上清液测效价。

b. 诱导加感染: 按 1—3 的步骤培养细菌, 诱导离心后, 用加富 LG 悬浮菌沉淀, 加 1M 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 终浓度为 1% (体积比), 并以 2—3 倍的 $\rho 11$ 噬菌体颗粒感染细菌, 直到细菌悬液变清, 然后离心, 取上清液测效价, 接着按步骤 4 进行。

实验过程中, 贾盛兴同志提出宝贵意见, 特此致谢。

5. 去除 DNA 和 RNA: 向噬菌体裂解液加 DNase 和 RNase, 终浓度均为 $4\mu\text{g/ml}$, 3.7°C 保温 20 分钟。

6. 去除细菌: 加等体积的氯仿, 慢慢混匀, 以 4000r/min 在 Hitachi 离心机上离心 5 分钟。离心管内液体分三层, 上层为噬菌体, 中层为氯仿, 底层是沉淀。取上层测效价。沉淀适当稀释后, 再离心, 仍可得到液体 $1 \times 10^9/\text{ml}$ 效价的噬菌体, 这样制的噬菌体为混合噬菌体, 效价在 $6 \times 10^{10}/\text{ml}$ 以上。

7. 分离纯化 $\rho 11$ 噬菌体: 配不连续的 CsCl 梯度溶液, 密度分别为 1.5g , 1.3g 和 1.1g , 向离心管 (约 14ml) 中加 CsCl 溶液的体积比为: $1.9:1.3:1.1 = 3:2:1$, 顶层铺样品 2ml , 用贝克曼 SV40 Ti 转头在 10°C 以 21K 离心 3.5 小时, 结果如图 1 所示, 最下面一条带呈鱼肚白色为 $\rho 11$ 噬菌体, 噬菌斑比较小。

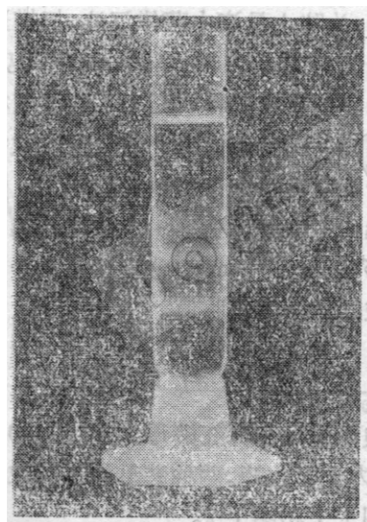


图 1 几种噬菌体经超速离心形成的条带, 底层是 $\rho 11$ 噬菌体

8. 沉淀噬菌体, 透析去除 CsCl: 小心吸取第四条带, 并用 SM 缓冲液适当稀释 (如稀释到 5ml), 在东德 VAC 离心机上以 8×11 的转头, 10°C , 30000r/min 离心 30 分钟, 弃去上清

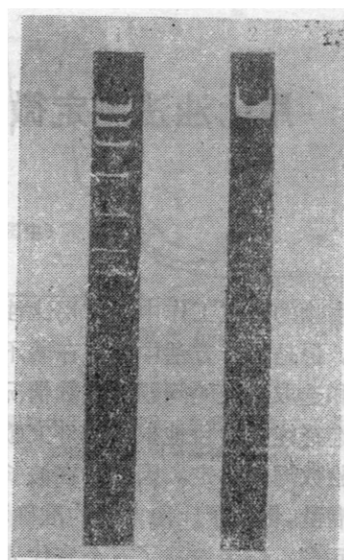


图 2 $\rho 11$ 噬菌体的 DNA

1. $\rho 11$ DNA 被 Bam HI 消化后的片段
2. 完整的 $\rho 11$ DNA

液, 以下述缓冲液悬浮沉淀: 0.02M Tris ($\text{pH } 7.6$), 0.01M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1M NaCl。装入预先用蒸馏水 (不加 EDTA) 煮过的透析袋, 用上述缓冲液透析过夜, 去掉氯化铯。

9. 提取噬菌体 DNA: 透析过的噬菌体倒入 Eppendorf 离心管, 加 EDTA 和 SDS, 终浓度分别为 0.04M 和 1% , 50°C 保温 10 分钟, 用 Tris-Cl 饱和酚提取两次, 对 TE 缓冲液 (0.02M Tris-Cl), $\text{pH } 7.5$, 0.1M EDTA 透析。

10. 电泳行为和 BamHI 酶切片段: 所提取的 DNA 走琼脂糖凝胶电泳, $\rho 11$ 噬菌体的 DNA 比染色体大一些。用 BamH I 酶解后的带见图 2。

参 考 文 献

- [1] Kawamura, F. et al.: *Gene*, **5**: 87—91, 1979.
- [2] Yoneda, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**: 1556—1564, 1979.
- [3] 郑文尧: 微生物学通报, **11**(5): 229, 1984.
- [4] Okamoto, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, **34**: 413—428, 1968.
- [5] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, C. S.H., 1982.