



# 遗传学实验

## ——微生物实验

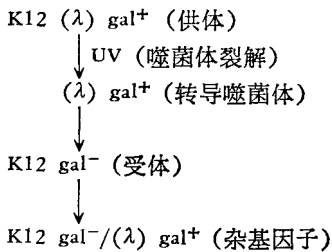
复旦大学生物系

### (十三) 细菌转导

#### 原理

所谓转导是指以噬菌体作为媒介将某一细胞(供体)的基因导入另一细胞(受体)的过程。转导可以分为两大类:(1)普遍性转导;(2)局限性转导。两者主要区别是:前者可转导供体细胞的任意一个基因,后者只能转导供体细胞的某些特定基因。

本实验以局限性转导为例,用噬菌体( $\lambda$ )专一性转导大肠杆菌的半乳糖发酵基因。选用溶源性菌株 *E. coli* K12 ( $\lambda$ ) gal<sup>+</sup> 为供体菌( $\lambda$ 与半乳糖发酵基因紧密连锁),当此菌株受紫外线照射后,噬菌体被诱发释放,并以一定比例形成转导噬菌体,即既具有转导能力,又带有供体细菌的半乳糖发酵基因的噬菌体。转导噬菌体和受体细菌 *E. coli* K12 gal<sup>-</sup> 混合接触,带有供体菌 DNA 片段(外基因子)的转导噬菌体以一定频率整合到宿主染色体上,使原来不能利用半乳糖的受体细菌变为能利用半乳糖的细菌。整个过程图示如下:



#### 菌株

1. *E. coli* K12 ( $\lambda$ ) gal<sup>+</sup>
2. *E. coli* K12 gal<sup>-</sup>

#### 实验准备

1. 用具: 培养皿(9厘米),三角烧瓶(150毫升),试管,离心管,吸管(5、1、0.1毫升),涂棒,离心机,水浴锅、紫外线照射箱,接种环。

#### 2. 培养基:

(1) 肉汤液体培养基: 牛肉膏5克,蛋白胨10克,NaCl 15克,蒸馏水1000毫升, pH7.2—7.0。高压灭菌15磅/吋<sup>2</sup> 15分钟。

(2) 肉汤固体培养基: 在上述肉汤液体培养基中加2%琼脂。高压灭菌15磅/吋<sup>2</sup> 15分钟。

(3) 2E 肉汤液体培养基: 加倍浓度的肉汤液体培养基。高压灭菌15磅/吋<sup>2</sup> 15分钟。

(4) 半固体琼脂培养基: 1%琼脂(视质量而定,可适当降低用量),蒸馏水100毫升。高压灭菌15磅/吋<sup>2</sup> 15分钟。

(5) 半乳糖 EMB 培养基: 伊红0.4克,美蓝0.06克,半乳糖10克,多胺10克, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2克,琼脂20克,蒸馏水1000毫升。pH7.0—7.2<sup>1)</sup>。高压灭菌8磅/吋<sup>2</sup> 20—30分钟。

(6) 磷酸缓冲液: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2克, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7克, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25克,蒸馏水1000毫升。高压灭菌15磅/吋<sup>2</sup> 15分钟。

#### 3. 药品 氯仿。

#### 步骤

##### 1. 噬菌体的诱导和裂解液的制备:

(1) 取一环供体菌,接种于盛有5毫升肉汤液体培养基的三角瓶中,37℃培养16小时后,吸0.5毫升菌液,接种于盛有4.5毫升肉汤液体培养基的三角瓶中,继续培养4—6小时。

(2) 将三角瓶的菌液倒入离心管,以3,500转/分,离心10分钟。

(3) 除去上清液,加4毫升磷酸缓冲液,制备悬浮液。

(4) 取悬浮液3毫升于培养皿中,经UV处理(15W,距离40厘米),诱导10秒钟。

(5) 处理后,加入3毫升加倍肉汤液体培养基,37℃避光培养2—3小时。

(6) 吸取培养物于离心管中,以3,500转/分,离心10分钟,再加入0.2毫升氯仿(4—5滴),剧烈振荡半分钟,静止5分钟,小心把上清液用无菌吸管转移到

Jin Jianzhong et al.: An Experiment in Genetics

1) 伊红、美蓝预先充分溶解,再倒入所配培养基中,pH值必须在伊红、美蓝未倒入所配培养基之前测定。

另一试管,这就是噬菌体 ( $\lambda$ ) gal<sup>+</sup> 的裂解液。

### 2. 噬菌体效价测定:

(1) 挑取受体菌一环,接种于盛有 5 毫升肉汤液体培养基的离心管中,37°C 培养 16 小时。

(2) 吸取上述 0.5 毫升培养液,放入盛有 4.5 毫升肉汤液体培养基的三角瓶中,继续培养 4—6 小时,作指示菌用;剩余的菌液用于点滴法转导试验,随即放入冰箱保存,供后面涂布转导试验用。

(3) 取已经融化并于 45°C 保温的半固体琼脂试管 4 支,每支加上上述的指示菌液 0.5 毫升。

(4) 取噬菌体裂解液 0.5 毫升,放入盛有 4.5 毫升肉汤液体培养基的试管中,依次稀释到 10<sup>-7</sup>。

(5) 从 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 的试管中分别吸取 0.5 毫升裂解液,加到有指示菌的半固体琼脂中(每个稀释度 2 支),搓匀,分别倒入事先准备好的肉汤固体培养基培养皿中,摇匀,凝固后,37°C 培养过夜,观察出现的噬菌斑数,并计算噬菌体裂解液的效价。

### 3. 转导方法:

(1) 点滴法: a. 取倒好的 EMB 培养基培养皿 2 只,在皿底用玻璃铅笔按实验图解中的样子画好。 b. 取一环受体菌,涂出一条菌带,共涂二条,37°C 培养 1.5 小时。 c. 取出培养皿,在二个圆圈和四个方格处,各加一环噬菌体裂解液,培养 2 天,观察结果。

(2) 涂布法: a. 取倒好的 EMB 培养基 6 只,其中 2 只加 0.1 毫升噬菌体裂解液,用于对照; 2 只加 0.1 毫升受体菌,也用于对照; 2 只加噬菌体裂解液和

受体菌液各 0.05 毫升。 b. 用玻璃涂棒将各皿上的菌液(或噬菌体裂解液)涂开,相同的 2 只培养皿用同一根玻璃涂棒,37°C 培养 2 天,观察结果,整个操作过程见图 13-1。

### 实验结果

表 13-1 噬菌体效价测定

噬菌体来源	裂解液稀释	取样	噬菌斑数/皿	噬菌体数/毫升
噬菌体 ( $\lambda$ ) 裂解液	10 <sup>-6</sup>	0.5 毫升		
	10 <sup>-7</sup>	0.5 毫升		

表 13-2 细菌转导

转导试验	点滴法			涂布法		
	受体菌	噬菌体裂解液	受体菌+噬菌体裂解液	受体菌	噬菌体裂解液	受体菌+噬菌体裂解液
菌落生长情况						
菌落色泽						

菌落生长者: + 表示

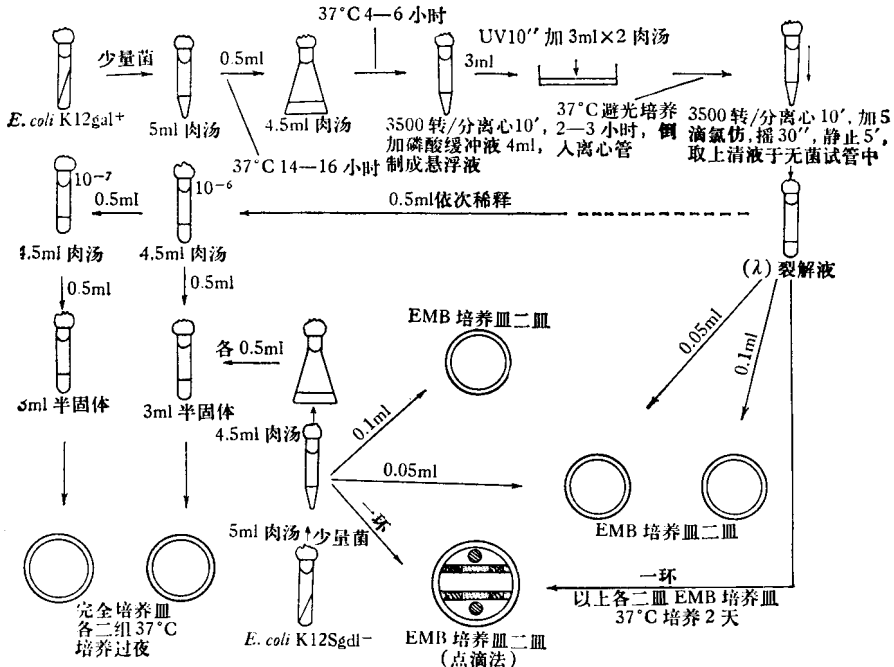


图 13-1 细菌转导实验图解

(金建中)