

噬菌体的分离与纯化

实验原理

噬菌体感染宿主细胞后，其 DNA(或 RNA)在细胞体内进行复制、转录，相关基因表达，装配成完整的噬菌体颗粒，最后裂解宿主细胞或通过挤出方式从宿主细胞(宿主细胞不被杀死，如 M1 噬菌体)中释放出来。

因此，在液体培养基中可使浑浊的菌悬液变为清亮或较清亮。利用噬菌体的这种特性，在样品中加入敏感菌株与液体培养基混合后培养，噬菌体便能大量增殖，释放，从而可分离到特定的噬菌体。

在有宿主细菌生长的软琼脂平板上，噬菌体可裂解细菌或限制被染细菌的生长，形成透明的或浑浊的空斑，亦称噬菌斑。一个噬菌体产生一个噬菌斑，利用这种现象可将分离获得的噬菌体进行纯化。

实验用具及材料

1. 宿主菌

2. 培养基:

固体培养基:每 100mL 液体培养基加入 1.5g 琼脂粉，121℃ 20min 高压灭菌。

半固体培养基:每 100mL 液体培养基加入 0.7g 琼脂粉，121℃ 20min 高压灭菌。

3. 仪器及其他用品:无菌小试管、无菌吸管、涂棒、无菌细菌过滤器(孔径 0.22um)，恒温水浴锅等。

4. 污水

实验步骤

1. 噬菌体的分离

(1) 制备菌悬液:用移液枪吸取少许宿主菌至盛有 5mL 培养液的试管中，混合均匀后置 37℃ 培养过夜；

(2) 增殖培养:使用污水配置 100mL 液体培养基，添加宿主菌过夜培养物 1mL，混

合后置 37℃振荡培养 12~24h;

(3)制备裂解液:将上述混合培养物倒入一支 50mL 无菌离心管中,经 4000r/min 离心 15min;将上清液小心的转入另一无菌离心管中,所得裂解液经 37℃培养过夜,以作无菌检查,此为噬菌体裂解液;

(4)噬菌体检测:在固体培养基平板上加入 0.1mL 大肠杆菌菌液,用无菌玻璃涂棒将菌液均匀地涂布在培养基表面上。待平板菌液干后分别滴加数小滴裂解液于其上,置 37℃培养过夜。如果滴有裂解液处形成无菌生长的透明或浑浊噬菌斑,便证明裂解液中有宿主菌噬菌体。

2. 噬菌体的纯化

(1)取经证实的噬菌体裂解液 0.1mL 于一支无菌试管中,再加入 0.1mL 新鲜的宿主菌培养物,混合均匀;

(2)取上层琼脂培养基溶化并冷却至 55℃(可预先溶化后置 50~55℃水浴锅内保温备用),加入 0.2mL 上述噬菌体与细菌的混合物,混匀后快速倒入含下层固体培养基的平板上,铺匀,置 37℃培养 24h;

(3)取出培养的平板,仔细观察平板上噬菌斑的形态特征(如噬菌斑形状、大小、清亮程度等)。此过程制备的裂解液中往往有多种噬菌体,需进一步纯化;

(4)纯化时,通常采用接种针在单个噬菌斑中刺一下,蘸取少许噬菌体接入含有宿主菌的液体培养基中,置 37℃振荡培养,直至试管中菌悬液由浑浊变清;培养物经离心后取上清液,再重复步骤(2)、(3)直到出现的噬菌斑形态一致为止。

五、实验结果

仔细观察和比较平板上出现的不同噬菌斑的形态特性。

六、注意事项

1. 使用仪器要保证是无菌的;
2. 注意琼脂的浓度。