



微生物综合实验

本科生专业选修课程，共48学时

任课教师：潘皎 牛淑敏 李明春
杨建华

教材《微生物学实验》

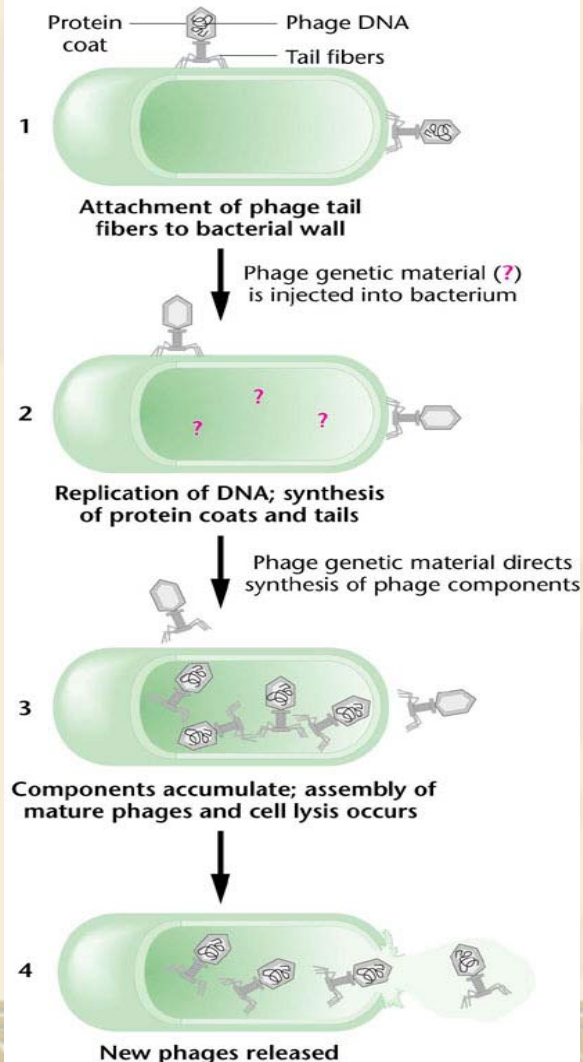
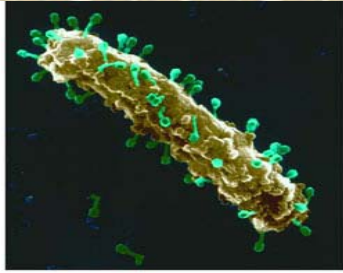
杨文博主编



微生物综合实验

T4噬菌体基因组rII

区域不同基因突变的互补



❖ T4噬菌体

1. 大肠杆菌的烈性噬菌体,专性寄生的原核生物。

2. 基因组是双链线性DNA分子,高度螺旋、紧密折叠地装配在头部中。

3. 繁殖速度比细菌快

30min内, 1个T4噬菌体 形成100个左右的子代噬菌体。 2h 后, ?个

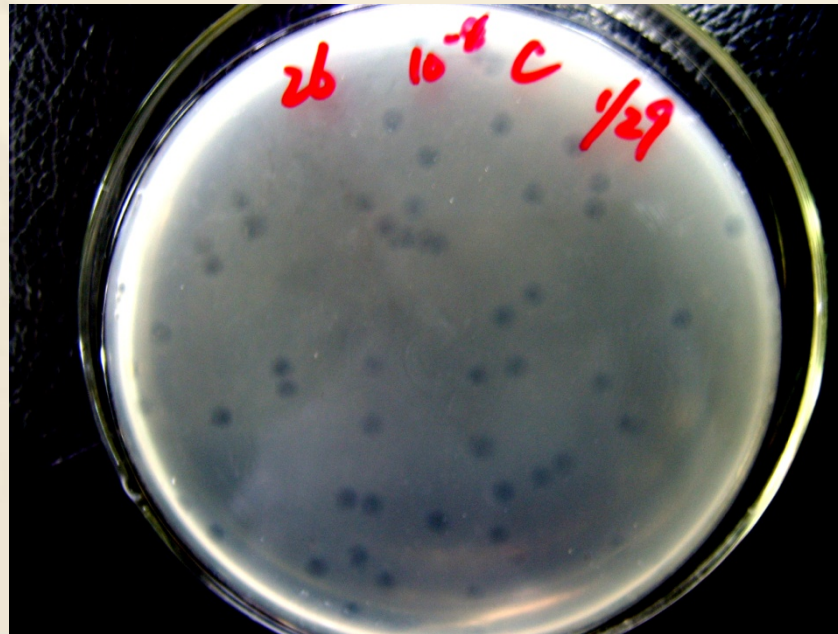
一. 实验目的

1. 学习噬菌体裂解液效价的测定方法
2. 通过实验了解基因互补的原理，并确定几个T4快速溶菌突变型是否属同一基因突变。

二、实验原理

- ❖ 1个噬菌体形成 1个噬菌斑（**plaque**），故噬菌体的浓度单位（效价）—噬斑形成单位，表示：**PFU/mL**。

噬菌斑，双层平板法，菌苔（**lawn**），**Top agar**（**Soft agar**）



- ❖ T4基因组rII区域有2个基因rIIA和 rIIB， A和B的基因突变均表现为快速溶菌。
- ❖ *E.coli* C菌株为受纳性寄主， *E.coli* K菌株为限制性寄主

	<i>E.coli</i> C	<i>E.coli</i> K
Wild type T4	+	+
T4 rII	+	-

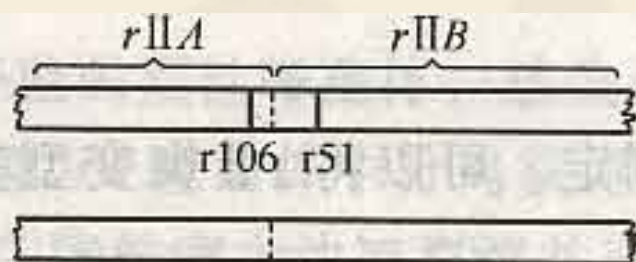
+ 产生噬菌斑

- 无噬菌斑

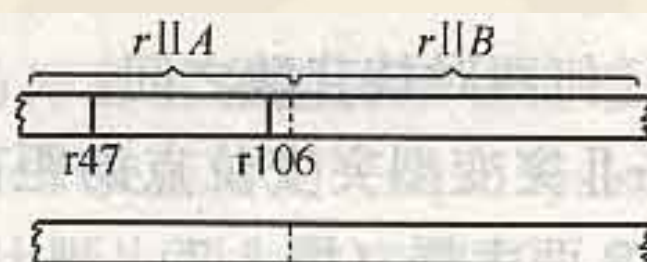
互补实验

- ❖ S.Benzer 巧妙地利用T4与*E.coli* 不同菌株的这一特点设计了经典的互补实验。
- ❖ 首次证明顺反子（Cistron 即基因）是一个必须保持完整, 才具有正常生理功能的遗传物质最小的功能单位。

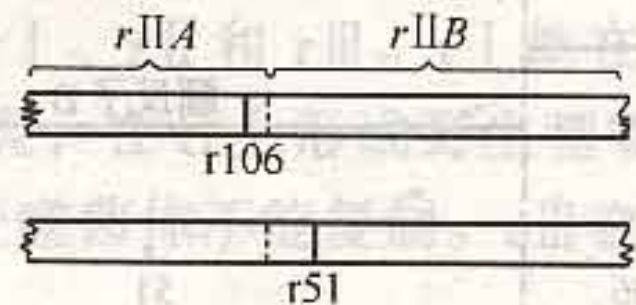
- ❖ 2个不同的T4 rII突变型共同感染*E.coli* K菌株.
- ❖ 若2个突变型不在同一个基因内部，则可表现互补，使其各自的DNA在*E.coli* K菌株中得以复制。
- ❖ 在复制过程中相互重组，进而形成了野生型的噬菌体。
- ❖ 野生型的噬菌体经反复感染和裂解限制性寄主，便可形成清晰的噬菌斑。



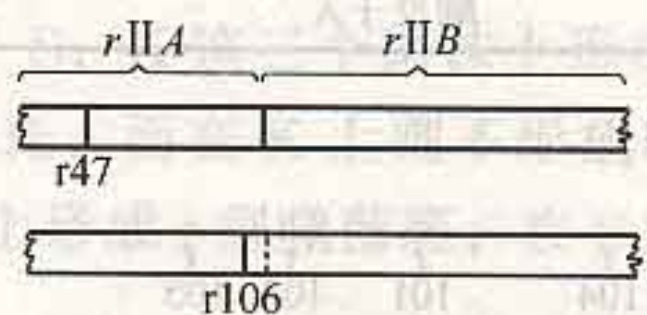
(a) 突变位点在不同顺反子内



(c) 突变位点在同一顺反子内



(b) 突变位点在不同顺反子内



(d) 突变位点在同一顺反子内

图 3-9 T4 噬菌体 $rII A$ 和 $rII B$ 的顺反结构效应

?

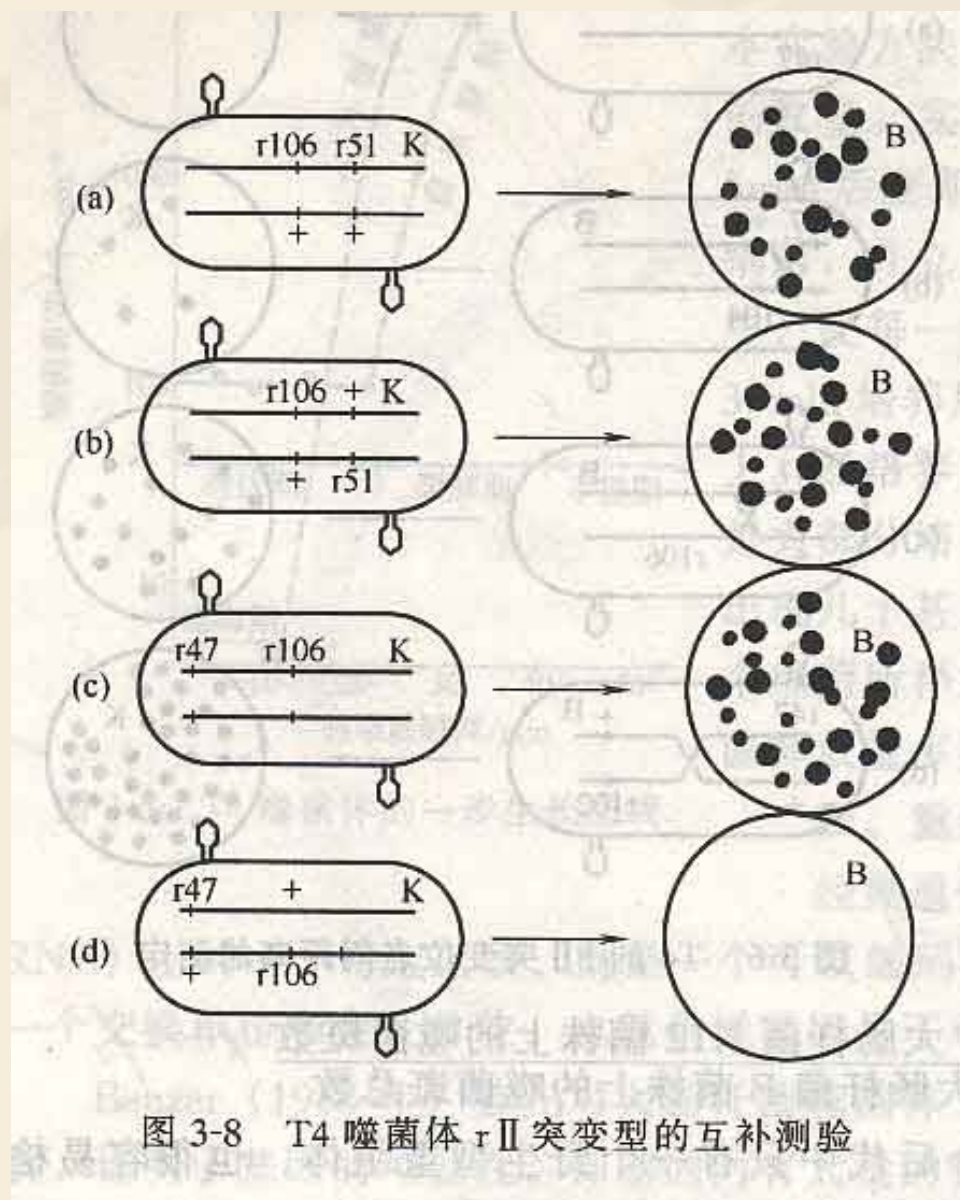


图 3-8 T4 噬菌体 rII 突变型的互补测验

互补测验和顺反子

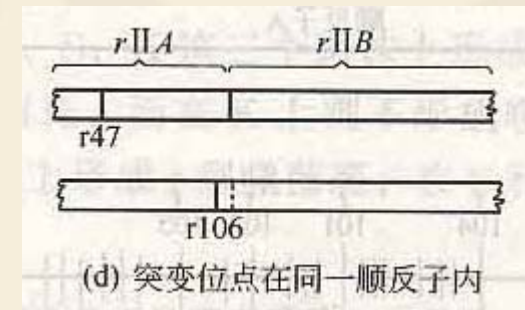
❖ 互补测验（Complementary Test）：

是一种对基因进行功能等位性测定的实验。

❖ 功能等位性：

对于基因等位性的判断不来自基因位置的测定，

而来自基因功能的测定，这种等位性称为功能等位性。



❖ 互补测验的基本要求：

1. 能使2个突变型的基因同处1个细胞，形成二倍体或局部合子。
2. 同处1个细胞的2个突变型的基因不可以重组。
3. **rII** 突变型均为点突变，点突变具有较高的回复突变率，故实验中必须要有检测回复突变的对照。

三、实验材料和用具

- 1、 菌种： *E.coli* C(容纳性寄主)和 *E.coli* K（限制性菌株）
- 2、 T4 rII突变型 26， 28， 29：
- 3、 HA平板
- 4、 HSA试管
- 5、 20 μ l、 200 μ l移液器各一支， Tip
- 6、 50 $^{\circ}$ C水浴

四. 实验方法和内容

(一) 噬菌体T4裂解液的制备 (*E.coli* C)

1. 双层平板法制备裂解液
2. 液体法制备裂解液

(二) 效价测定

- (1) 将*E.coli* C 接种 3mL HB中，37℃震荡培养5小时。
- (2) 制备HA平板，待凝固后置50℃ 烘30分钟备用。
- (3) 将T4裂解液依次稀释至 10^{-8} 。(100μL → 1mL)
- (4) 取一只小试管，加入0.2mL *E.coli* C，加入T4裂解液0.1mL (10^{-7} , 10^{-8})，每个稀释度两只试管，再加入3.0mL HAS (50℃左右)，混合均匀后迅速倒在HA平板上层，凝固后，37℃倒置培养。

(5) 培养6小时后，便可以计数噬菌斑，计算裂解液效价。

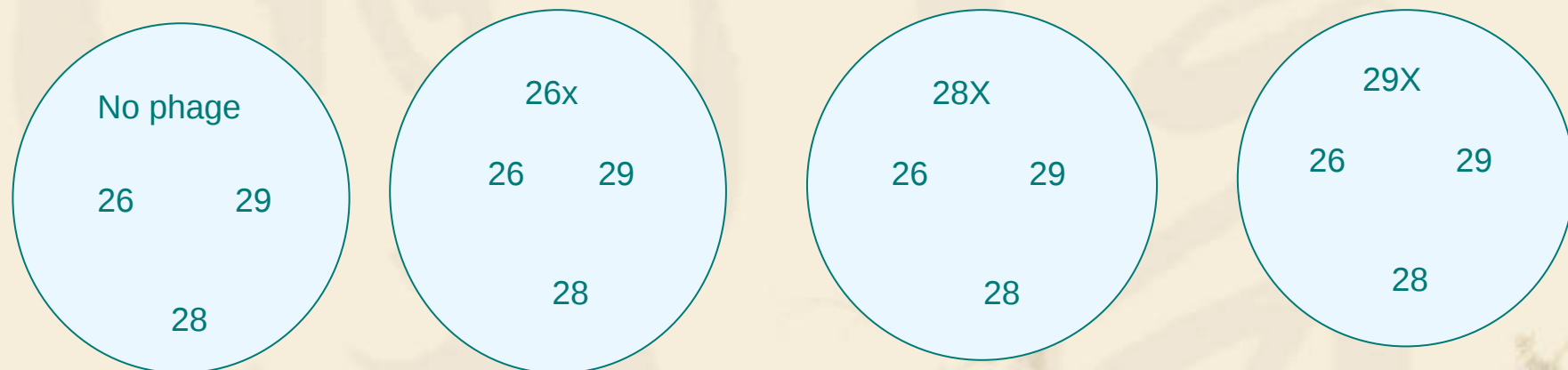
(6) 检测回复突变 (*E.coli* K)

取一只小试管，加入0.2mL *E.coli* K，加入T4裂解液0.1mL (10^{-6})，再加入3.0mL HAS (50℃左右)，混合均匀后迅速倒在HA平板上层，凝固后，37℃倒置培养。

(三) 互补实验

- 1) 取*E.coli K*，接种于HB培养基，37 °C ， 180 rpm振荡培养过夜。
- 2) 首先制备好4 块HA平板，将装有HSA（软琼脂）的试管置于48 °C 水浴保温。
- 3) 在每一HA平板的底部预先标记好以下内容：
No phage, 26 X, 28 X, 29 X

倒平板浓度为 $1 \times 10^9/\text{ml}$,点样浓度为 $1 \times 10^8/\text{ml}$



“x”-杂交

- 4) 在每支HSA试管中加0.3ml *E.coli K*过夜培养物。
- 5) 将第一支HSA试管倒到“无噬菌体”的平板上，用做回复突变的对照。
- 6) 往第二支HSA试管中加0.1mL rII 26 (1×10^9 /mL), 混合好后倒“26x”平板，其它的噬菌体均以相同的方式倒好平板。

7) 将噬菌体26, 28, 29分别进行10倍稀释。

8) 用接种环或用移液器吸取3-5 μ l各种稀释后的噬菌体悬液 (1×10^8 /ml), 小心点到每一平板相应的位置上。



实验注意事项：

- ❖ 点样时应小心勿将琼脂划破！
- ❖ 各种噬菌体的点样位点必须有一定间隔，防止连成片不易分析结果！
- ❖ 点完样后不要立即翻动平板，待所点样品完全干后，再倒置平板培养！

五. 实验报告:

- (一) 效价测定要求列出全部原始数据和计算方法。
- (二) 实验结果用+或-表示。如点样位置上有较多的噬菌斑则为+，无噬菌斑则为-，但要与对照平板比较，检查每一 rII 突变型单独感染K菌株是否形成噬菌斑，记录下观察的实验结果。
- (三) 分析各T4噬菌体基因组rII突变型的基因互补关系，已知29位于基因B，依据实验结果确定噬菌体26、28分别为哪一基因突变。

六. 思考题（讨论部分）

- 1) 互补实验的意义。
- 2) 两个不同基因突变的T4噬菌体所发生的互补是基因产物的互补，为什么发生互补后会形成野生型的T4噬菌体？