

噬菌体 Charon4A 增殖条件的研究

李育阳 袁汉英 严维耀 汪训明

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

王 文 华

(复旦大学遗传学教研组, 上海)

噬菌体 Charon 4A 是噬菌体 λ 经过改建而成的, 可用作基因工程的载体。由于这种噬菌体载体与相应的宿主菌 *Escherichia coli* DP50 supF 一起成为 EK₂ 级安全宿主载体系统, 同时它还具有允许插入的 DNA 容量大, 重组 DNA 选择方便等优点。因此, 它特别适合于在建立基因文库 (gene library) 时作为载体。为了有效的增殖它, 我们对其增殖条件进行了研究。

材料与方法

1. 宿主菌: *E. Coli* DP50, 美国加州大学 J. Bonner 教授提供。

2. 噬菌体: Charon4A 美国加州大学 J. Bonner 教授提供。

3. 宿主菌培养条件和噬菌体增殖步骤: 我们基本上采用 NZYDT 培养基^[1]和 PDS 法的操作条件^[2], 并进一步作了较大的改动, 以期在简便易行的情况下得到尽量高效价的噬菌体裂解物。

结果与讨论

一、宿主菌龄对 Charon4A 裂解物效价的影响

在噬菌体吸附阶段, 我们采用了两种不同条件的细菌 DP50supF 培养物: (1) 挑单菌落接种到 NZYDT 培养液中, 于 37℃ 静止培养 27 小时后, 置冰箱存放, 在两天内使用。(2) 挑单菌落接种到培养液中, 37℃ 静止培养 24 小时后, 再以 10% 接种量接入新鲜培养液中, 37℃ 摇床培养 12 小时即可。

结果是: 采用(1)培养条件下的宿主菌时, Charon 4A 裂解物的效价为 3.2×10^9 /ml, 而采用(2)培养条件下的宿主菌时, 裂解物的效价为 2.95×10^9 /ml, (1)略高于(2), 在以下试验中, 均采用条件(1)。

二、感染系数对 Charon 4A 裂解物效价的影响

为了研究感染系数对 Charon4A 裂解物效价的影响, 我们分别选用 1:1000, 1:100, 1:50, 1:10 四种感染系数进行试验, 结果见表 1。

表 1 感染系数对 Charon4A 裂解物效价的影响

感染系数	1:1000	1:100	1:50	1:10
噬菌体效价(PFU/ml)	1.1×10^9	2.1×10^9	2.5×10^9	6.5×10^9
效价相对值(%)	44	84	100	260

结果表明噬菌体效价随感染系数增大而增加, 感染系数在 1:10 时为最好。

三、宿主菌浓度对 Charon4A 裂解物效价的影响

在一定感染系数情况下, 感染三种不同浓度细菌后, 噬菌体效价见表 2。

表 2 宿主菌浓度对 Charon4A 裂解物效价的影响

宿主菌浓度(细胞/毫升)	1×10^6	2×10^7	1×10^8
噬菌体效价(PFU/ml)	4.75×10^9	3.3×10^9	1.45×10^9
效价相对值(%)	144	100	44

由表 2 可知, 宿主菌浓度对 Charon4A 裂解物效价有较明显的影响。在以下试验中, 宿主

菌的浓度均为 1×10^6 细胞/ml。

四、振荡培养时间对 Charon4A 效价的影响

为选择最适振荡培养时间,分别对振荡培养 8.5、10.5、12.5 小时的裂解物进行了比较,结果表明,在 Charon 4A 增殖试验中,振荡培养时间在 8.5—10.5 小时之间,对效价无甚影响,但时间过长反而有效价下降的趋势。

五、二氨基庚二酸及酶水解酪朊 (NZamin₂)

减量对噬菌体 Charon 4A 效价的影响

为了尽可能减少 NZYDT 培养基中两个主要成份二氨基庚二酸及酶水解酪朊的用量,将氨基庚二酸的量从 100mg/l 减为 50 或 25 mg/l; 将酶水解酪朊的量从 10g/l 减为 5、2.5、1.25g/l,其它成份用量不变。试验结果表明,如果把二氨基庚二酸量减为 50mg/l,酶水解酪朊减为 2.5g/l,Charon 4A 裂解物的效价比减量前提高 21%。

六、代用培养基对噬菌体 Charon4A 裂解物效价的影响

为了使培养基成份来源方便,我们设计了代用培养基,并与 NZYDT 培养基作了比较。在代用培养基中,我们以多肽(日本产)代替酶水解酪朊(Difco 公司产),以国产酵母膏代替酵母抽提物(Difco),以自制二氨基庚二酸水溶液*代替二氨基庚二酸(Sigma),试验结果见

表 3。

表 3 代用培养基对 Charon 4A 裂解物效价的影响

培养基	原培养基	代用培养基
噬菌体效价 (PFU/ml)	5.1×10^9	8.8×10^9
效价相对值 (%)	100	172

试验结果表明,代用培养基完全能代替原培养基,而且有利于噬菌体裂解物效价的提高。

我们采用以上测得的最适条件,即用静止培养 27 小时的宿主细菌,使其菌浓度为 1×10^6 细胞/ml,噬菌体感染系数为 1:10,振荡培养 8.5—10 小时,得到了高效价的噬菌体裂解物,并以乙二醇 6000 及氯化铯分级梯度沉淀,由 1 升 Charon4A 裂解物得到约 200 μ g 的 Charon4A DNA。

参 考 文 献

- [1] Blattner, F. R., Williams, B. G., Blechl, A. E. et al.: *Science*, **196**(4286): 159—169, 1977.
- [2] Blattner, F. R., M. Fianidt, K. K. Haas et al.: *Virology*, **62**(2): 458—471, 1974.
- [3] Iederberg, J., J. St. Clair.: *J. Bacteriol.*, **75**: 143—160.

* 二氨基庚二酸水溶液是用大肠杆菌 *E. Coli* K₁₂ SF⁺ 菌制备的,参照文献^[3]方法,每克噬菌体得水溶液 10ml。在代用培养基中,每升培养液加水溶液 50ml。