噬菌体的检查及效价测定

1、目的：

1.1 了解噬菌体效价的含义及其测定原理。

1.2 学会检查噬菌体的方法。

1.3 掌握用双层琼脂平板法测定噬菌体效价的操作技能。

2、原理：

噬菌体是一类专性寄生于细菌和放线菌等微生物的病毒，其个体形态极其微小，用常规微生物计数法无法测得其数量。当烈性噬菌体侵染细菌后会迅速引起敏感细菌 裂解，释放出大量子代噬菌体，然后它们再扩散和侵染周围细胞，最终使含有敏感菌的悬液由混浊逐渐变清，或在含有敏感细菌的平板上出现肉眼可见的空斑——噬 菌斑。了解噬菌体的特性，快速检查、分离，并进行效价测定，对在生产和科研工作中防止噬菌体的污染具有重要作用。

检样可以是发酵液、空气、污水、土壤等（至于无法采样而需检查的对象，可以用无菌水浸湿的棉花涂拭表面作为检查样品）。为了易于分离可先经增殖培养，使样品中的噬菌体数量增加。

采用生物测定法进行噬菌体检查，约需 12h 左右，因而不能及时判断是否有噬菌体污染。通过快速检查可大致确定是否有噬菌体污染，以采取必要的防治措施。根 据正常发酵（培养）液离心后菌体沉淀，上清液蛋白含量很少，加热后仍然清亮；而侵染有噬菌体的发酵（培养）液经离心后其上清液中因含有自裂解菌中逸出的活 性蛋白，加热后发生蛋白质变性，因而在光线照射下出现丁达尔效应而不清亮。此法简单、快速，对发酵液污染噬菌体的判断亦较准确。但不适于溶源性细菌及温合 噬菌体的诊断，对侵染噬菌体较少的一级种子培养液也往往不适用。

噬菌体的效价即 1 mL 样品中所含侵染性噬菌体的粒子数。效价的测定一般采用双层琼脂平板法。由于在含有特异宿主细菌的琼脂平板上，一般一个噬菌体产生一个 噬菌斑，故可根据一定体积的噬菌体培养液所出现的噬菌斑数，计算出噬菌体的效价。此法所形成的噬菌斑的形态、大小较一致，且清晰度高，故计数比较准确，因 而被广泛应用。

3、材料：

3.1 菌种：

敏感指示菌（大肠杆菌）、大肠杆菌噬菌体(从阴沟或粪池污水中分离)。

3.2 培养基：

二倍肉膏蛋白胨培养液，上层肉膏蛋白胨半固体琼脂培养基（含琼脂 0.7%，试管分装，每管 5 mL），下层肉膏蛋白胨固体琼脂培养基（含琼脂 2%），1%蛋白胨水培养基。

3.3 仪器和器具：

无菌的试管、培养皿、三角瓶、移液管（1、5mL），恒温水浴锅，离心机、721 分光光度计等。

4、流程：

4.1 噬菌体的检查

4.2 噬菌体效价的测定

5、方法：

5.1 噬菌体的检查：

5.1.1 样品采集

将 2～3g 土样或 5mL 水样（如阴沟污水）放入灭菌三角瓶中，加入对数生长期的敏感指示菌（大肠杆菌）菌液 3～5mL，再加 20mL 二倍肉汤蛋白胨培养液。

5.1.2 增殖培养

30℃振荡培养 12～18h, 使噬菌体增殖。

5.1.3 离心分离

将上述培养液以 3000rpm 离心 15～20min, 取上清液，用 pH7.0，1%蛋白胨水稀释至 10-2～10-3，用于噬菌体检查及效价测定。

5.1.4 生物测定法

5.1.4.1 双层琼脂平板法

5.1.4.1.1 倒下层琼脂

融化下层培养基，倒平板（约 10mL/皿）待用。

5.1.4.1.2 倒上层琼脂

融化上层培养基，待融化的上层培养基冷却至 50℃左右时，每管中加入敏感指示菌 (大肠杆菌) 菌液 0.2mL，待检样品液或上述噬菌体增殖液 0.2～0.5mL，混

合后立即倒入上层平板铺平。

5.1.4.1.3 恒温培养

30℃恒温培养 6～12h 观察结果。

5.1.4.1.4 观察结果

如有噬菌体，则在双层培养基的上层出现透亮无菌圆形空斑——%26not;%26not;%26not;%26not;噬菌斑。

5.1.4.2 单层琼脂平板法

省略下层培养基，将上层培养基的琼脂量增加至 2%，融化后冷却至 45℃左右，如同上法加入指示菌和检样，混合后迅速倒平板。30℃恒温培养 6～16h 后观察结果。

5.1.5 离心分离加热法（快速检查）

取大肠杆菌正常培养液和侵染有噬菌体的异常大肠杆菌培养液，4000rpm 离心 20min，分别取两组发酵液的上清液(A1)，一部分于 721 分光光度计上测定 OD650 光密度值，另外各取 5mL 上清液于试管中，置水浴中煮沸 2min（A2），检测 A2 溶液 OD650 光密度值，记录结果。

5.2 噬菌体效价的测定：

5.2.1 倒平板

将融化后冷却到 45℃左右的下层肉膏蛋白胨固体培养基倾倒于 11 个无菌培养皿中，每皿约倾注 10mL 培养基，平放，待冷凝后在培养皿底部注明噬菌体稀释度。

5.2.2 稀释噬菌体

按 10 倍稀释法，吸取 0.5mL 大肠杆菌噬菌体，注入一支装有 4.5mL1%蛋白胨水的试管中，即稀释到 10-1，依次稀释到 10-6 稀释度。

5.3 噬菌体与菌液混合：

将 11 支灭菌空试管分别标记 10-4、10-5、10-6 和对照。分别从 10-4、10-5 和 10-6 噬菌体稀释液中吸取 0.1mL 于上述编号的无菌试管 中，每个稀释度平行做三个管，在另外两支对照管中加 0.1mL 无菌水，并分别于各管中加入 0.2mL 大肠杆菌菌悬液，振荡试管使菌液与噬菌体液混合均匀， 置 37℃水浴中保温 5min，让噬菌体粒子充分吸附并侵入菌体细胞。

5.4 接种上层平板：

将11支融化并保温于45℃的上层肉膏蛋白胨半固体琼脂培养基5mL分别加入到含有噬菌体和敏感菌液的混合管中，迅速搓匀，立即倒入相应编号的底层培养基平板表面，边倒入边摇动平板使其迅速地铺展表面。水平静置，凝固后置 37℃培养。

5.5 观察并计数：

观察平板中的噬菌斑，并将结果记录于 计算公式：N=Y/V%26#8226;X

（N：效价值，Y：平均噬菌斑数／皿，V：取样量，X：稀释度）

例如：当稀释度为 10-6 时，取样量为 0.1 mL/皿，同一稀释度中 3 个平板上的噬菌斑的平均值为 186 个，则该样品的效价为：N＝186／0.1%26#215;10-6＝1.86%26#215;109。

6、结果：

6.1、噬菌体检查

6.1.1 离心分离加热法

处理方法 OD650 光密度值

正常发酵液（对照） 异常发酵液（试验）

离心上清液(A1)

离心上清液加热煮沸后(A2)

A2/A1

6.1.2 绘出平板上的噬菌斑检测结果，指出噬菌斑和宿主细菌。

6.2、噬菌体效价测定

6.2.1 平板上噬菌斑数目

噬菌体稀释度 10-4、10-5、10-6 对照

噬菌斑数（个）/皿

平均每皿噬菌斑数目

6.2.2 计算噬菌体效价(即噬菌斑形成单位 pfu, plague-forming unit).