

教育部高中生物科學資優生培育計畫
高雄區

微生物學實驗

學生：_____

學校：_____

授課教師：楊文仁 老師

國立高雄大學 生命科學系

實驗一、噬菌體效價測定

一、概述

1917 年法國科學家狄艾勒(d' Herelle)發現病毒除非在消耗活細菌的情況之下，否則不能複製；因此稱之為噬菌體(bacteriophage, phage)，並提供了檢測此等「不可見」之病原的方法，其中被廣泛使用且效果最佳者為「斑點測定法(plaque assay)」。使用固態培養基培養細菌菌地(lawn of bacteria)與噬菌體，能藉由噬菌斑計數(plaque counts)的方法較準確的計算樣品中噬菌體的數量。此方法的理論基礎是：每一個噬菌體在宿主細菌的菌地上都能形成一個清晰容易區別的噬菌斑，噬菌斑的數目與加入的噬菌體稀釋度成反比，因此噬菌體的效價可以根據斑點形成單位(plaque forming units, pfu)來推算。此方法所測到的病毒為具有感染細菌能力的活病毒。

微生物的接種培養過程必需在無菌環境下操作以避免雜菌的污染，通常在無菌操作台(laminar flow)或無菌室內接種細菌，與任何定性、定量分析實驗一樣，操作時的精確性及方法設計的準確度都會影響實驗結果的真實性。本實驗將以雙層瓊膠重疊噬菌斑分析法(double agar overlay plaque assay)進行樣本中噬菌體效價的測定。

二、藥品與器材

藥品

1. 70%酒精
2. Tris-buffer saline (TBS)：每一升水含 87.66 g NaCl, 60.5 g Tris (pH 8.0)
3. M13 絲狀噬菌體
4. 含有 ER2738 *E. coli* 之液態培養菌液
5. LB agar plates：每一升水含 1 % (w/v) tryptone，0.5 % yeast extract，1 % NaCl (pH 7.0)，1.5 % (w/v) agar powder，以高壓釜滅菌。
6. Top agar：每一升 LB medium 加入 1 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 與 7 g agar powder，以高壓釜滅菌，冷卻凝固後於使用前以微波爐加熱溶解成液態。

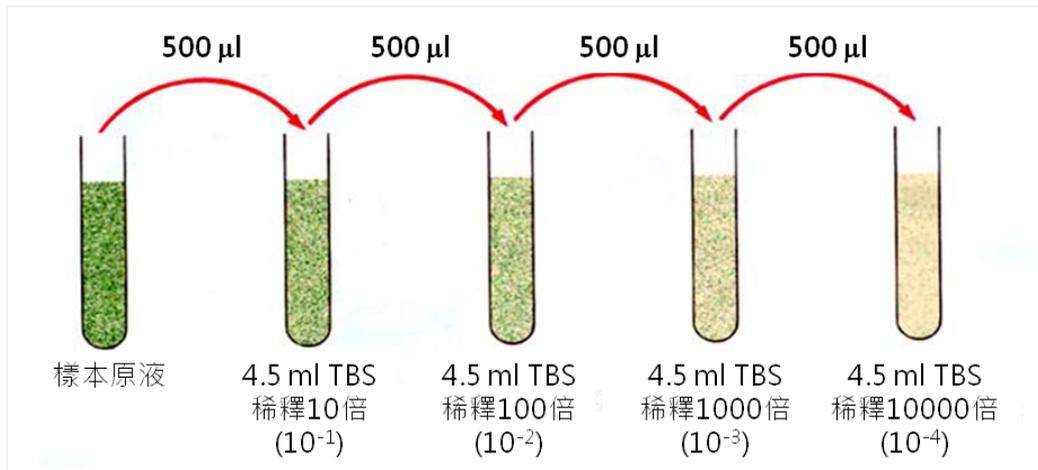
器材

1. 微量吸管：20-200 μ l、100-1000 μ l
2. 試管、試管架
3. 酒精燈
4. 培養皿
5. 蠟紙

三、實驗步驟

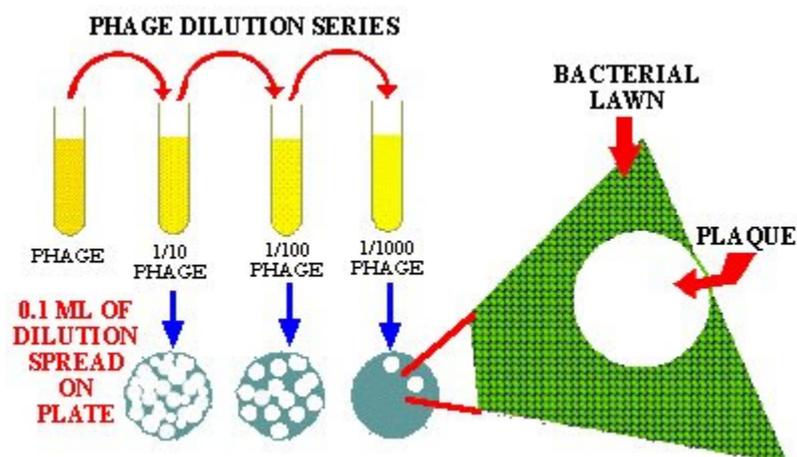
I. 序列稀釋

1. 將試管標上欲稀釋倍數，如 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ；每管加入 4.5 ml TBS。
2. 取 500 μ l 噬菌體樣本原液加入第一稀釋管混勻，再由此管吸出 500 μ l 加至下一稀釋管混勻，以此類推。



II. 倒盤

1. 取 1.5 ml tube 與 LB plate 標明座號、日期、稀釋倍數。
2. 於 1.5 ml tube 中加入 200 μ l 的 ER2738 *E. coli* 菌液。
3. 從不同的噬菌體稀釋管中各取出 50 μ l 加入相對的 1.5 ml tube 混勻。
4. 將 1.5 ml tube 中溶液全部吸出，加至分裝預熱好的 top agar 試管中。
5. 將 top agar 倒入培養皿後搖勻且去除氣泡，靜置待 top agar 冷卻凝固。
6. 使用蠟紙將培養皿封好並倒置，於 37°C 培養箱中培養過夜，隔日觀察及計算噬菌斑，一般範圍以 30~300 個為主。



<http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/images/virus28.gif>

III. 觀察與計算

1. 觀察並計算所有培養皿上之噬菌斑，若培養皿上噬菌斑過多以至於無法計算時，記錄為 too numerous to count (TNTC)，若噬菌斑少於 30 視為過少，記錄為 too few to count (TFTC)，僅計算 30 至 300 之間的噬菌斑。
2. 噬菌斑 × 稀釋倍數 = 原培養液中每毫升之噬菌體數
(Number of plaques × Dilution factor = Plaque-forming unit per ml)

例如：

a. 稀釋倍數=1 : $1 \times 10^6 = 10^{-6}$

加入培養皿之噬菌體稀釋液體積=1 ml

培養皿上噬菌斑數=54

回推原樣本中之噬菌體數：

$$(54 \times 10^6) \text{ phages} / 1 \text{ ml} = \underline{5.4 \times 10^7 \text{ PFU/ml}} \text{ (PFU : plaque-forming unit)}$$

b. 稀釋倍數=1 : $1 \times 10^6 = 10^{-6}$

加入培養皿之噬菌體稀釋液體積=100 μ l

培養皿上噬菌斑數=54

回推原樣本中之噬菌體數：

$$(54 \times 10^6) \text{ phages} / 100 \mu\text{l} = \underline{5.4 \times 10^8 \text{ PFU/ml}} \text{ (PFU : plaque-forming unit)}$$

實驗二、革蘭氏染色法

目的

革蘭氏染色為鑑別染色法中最常見者，藉染色結果可區別革蘭氏陽性菌(G+)及陰性菌(G-)，是重要的分類依據之一。

一、概述

1884年丹麥醫生 Gram 發明 Gram-staining，至今仍為鑑別細菌之最重要方法。依據 Gram-staining 我們可將細菌分為兩類，一為 Gram-positive，一為 Gram-negative。其染色原理至今未明，推測其與此二類細菌之細胞壁結構有重大關係。說法有二，其一為：Gram-negative 細菌之細胞壁含脂量高，以酒精處理時會將部份脂質(lipid)萃取出來，而使細胞壁結構鬆動，通透性(permeability)增加，故 crystal violet-I 複合體被帶出細菌體外而無色。Gram-positive 細菌之細胞壁幾乎不含脂質，酒精甚至會使細胞壁脫水，故結構更形緻密，Crystal violet-I 複合體就被留在細菌體內。其二為：酒精處理時，會使 peptidoglycan 空隙縮小，Gram-positive 細菌之 peptidoglycan wall 較厚而 Gram-negative 者較薄，所以 Crystal violet-I 複合體離開 Gram-negative 細菌的機會較大。

在本實驗中，我們在酒精處理後用紅色的 Safranin O 複染，此時無色的 Gram-negative 細菌就會變成粉紅色，而本來已染上藍色的 Gram-positive 細菌就會變成紫色。

二、藥品與器材

藥品

1. 液態培養菌液
 - * 大腸桿菌 *Escherichia coli*
 - * 糞腸球菌 *Enterococcus faecalis*
2. 染劑
 - * 初染劑：2% Crystal Violet
 - * 媒染劑：Gram Iodine
 - * 脫色劑：95%酒精
 - * 複染劑：3.6%之 Safranin
3. 蒸餾水洗滌瓶
4. 95%酒精
5. 鏡油

器材

1. 光學顯微鏡
2. 玻片 x2
3. 拭鏡紙
4. 酒精燈
5. 接種環

三、實驗步驟

(一)玻片塗抹

1. 玻片先以清潔劑洗淨，再以蒸餾水與 95%酒精潤濕後擦乾備用。
2. 以接種環取出一環菌液，塗抹於乾淨玻片中央，再均勻分散之。
3. 塗抹之玻片為半透明、白色的一層膜狀物，風乾後，快速在酒精燈上加熱 2~3 次，以便將菌體固定在玻片上，並於旁邊以簽字筆註明菌名與座號。

(二)革蘭氏染色

1. 將此玻片平放，先以 2% Crystal Violet 染液作用 1 分鐘，再以蒸餾水將剩餘染料沖洗去除。
2. 加入 Gram Iodine 媒染液(Mordant)，作用 1 分鐘，用水沖洗。
3. 再以 95%酒精進行脫色作用。將玻片斜置，由上往下滴入酒精溶液，直到流出的酒精變成無色後，再用水沖洗。
4. 加入第二種染液 3.6%之 Safranin (Counterstain)，繼續作用 1 分鐘後，用水沖掉多餘之染料，以濾紙吸去玻片上之水份，於顯微鏡以 100 倍油鏡下仔細觀察，並記錄細胞之外形與顏色。

四、實驗結果

學校：_____ 姓名：_____ 座號：_____

1. 噬菌體效價測試

稀釋倍數	加入之體積	噬菌斑數
10—		
10—		

計算：

回推樣本原液之噬菌體數=_____

2. 細菌染色之觀察

Escherichia coli :

中文學名：_____

形狀：_____

顏色：_____

為革蘭氏_____菌，簡寫為(G__)

Enterococcus faecalis :

中文學名：_____

形狀：_____

顏色：_____

為革蘭氏_____菌，簡寫為(G__)

圖檔裁切後貼此

圖檔裁切後貼此

盲測樣本編號：_____

形狀：_____

顏色：_____

為革蘭氏_____菌，簡寫為(G__)

此樣本應為_____ (*E. coli* or *E. faecalis*)

五、問題與討論

1. 無菌操作技術之重點如下，其原理為何？
 - (1) 70%EtOH 而非 95%EtOH 消毒
 - (2) 試管管口在接種前後先以酒精燈過火
 - (3) 接種時管口不可離火
 - (4) 培養細菌時倒置培養皿
2. 無菌操作台使用前需以 UV 光殺菌，請問其殺菌原理為何？
3. 簡述 M13 噬菌體如何將其 DNA 送入 *E. coli* 進行複製？
4. 試簡述革蘭氏染色法之原理，且為何宜採用未超過 24 小時培養之菌液進行實驗？
5. 何以在革蘭氏染色時要用 Mordant 和 Counterstain？
6. 請問本次染色實驗結果與別組結果比較之優劣？為何？