

农杆菌感受态细胞的制备

[实验原理]

在利用根癌农杆菌介导的基因转化中，首先要获得含有目的基因的农杆菌工程菌株。

在基因工程操作中，感受态细胞的制备和质粒的转化是一项基本技术。感受态是细菌细胞具有的能够接受外源 DNA 的一种特殊生理状态。农杆菌的感受态可用 CaCl_2 处理而诱导产生。将正在生长的农杆菌细胞加入到低渗的 CaCl_2 溶液中， 0°C 下处理便会使细菌细胞膜的透性发生改变，此时的细胞呈现出感受态。制备好的农杆菌感受态细胞迅速冷冻于 -70°C 可保存相当一段时间而不会对其转化效率有太大的影响。

[实验仪器、材料和试剂]

一、仪器：超净工作台，恒温摇床，冷冻高速离心机，高压灭菌锅，冰箱， -70°C 超低温冰柜，分光光度计，接种针，10ml 试管，50ml 离心管，1.5ml 离心管，冰浴，微量进样器及吸头。

以上玻璃仪器和离心管需在用前灭菌，灭菌条件： 120°C ，15 分钟。

二、材料：土壤农杆菌 LBA4404 菌株或其它农杆菌菌株

三、试剂：YEB 液体培养基 (1L)：酵母提取物 1g，牛肉膏 5g，蛋白胨 5g，蔗糖 5g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g，pH7.0，高压灭菌。

利福平 (Rif) 储液：50mg/ml

20mM CaCl_2 ，高压灭菌。

[实验步骤]

1、挑取根癌农杆菌 LBA4404 单菌落于 3ml 的 YEB 液体培养基 (含 Rif 50mg/l) 中， 28°C 振荡培养过夜；

2、取过夜培养菌液 1ml 接种于 50ml YEB (Rif 50mg/l) 液体培养基中, 28°C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5;

3、取 2ml 菌液, 13000rpm, 离心 30sec, 弃上清;

4、加入 1000μl 20mM CaCl₂, 使农杆菌细胞充分悬浮, 冰浴 30min;

5、13000rpm, 离心 30sec, 弃上清, 置于冰上, 加入 500μl 预冷的 20mM CaCl₂, 充分悬浮细胞, 冰浴中保存, 24hr 内使用, 或液氮中速冻 1min, 置 -70°C 保存备用。

质粒 DNA 直接导入农杆菌

[实验原理]

在低温下, 外源 DNA (质粒) 可吸附到感受态细胞表面, 诱导细胞吸收 DNA。(加入热激原理) 转化了质粒 DNA 的农杆菌随后 28°C 恢复培养, 可使质粒上携带的编码抗生素的抗性基因得到表达, 因此, 转化了质粒的农杆菌细胞可在含有相应抗生素的培养基上生长, 而没有转化的细胞则无法生长。

[实验仪器、材料和试剂]

一、仪器: 超净工作台, 恒温摇床, 培养箱, 台式离心机, 水浴锅, 高压灭菌锅, -70°C 超低温冰箱, 培养皿, 微量进样器及吸头。

材料: 根癌农杆菌 LBA4404 (或 EHA105) 感受态细胞, 质粒 pCAMBA11300+SPR 植物表达载体

二、试剂: 液氮

YEB 液体培养基 (1L): 酵母提取物 1g, 牛肉膏 5g, 蛋白胨 5g, 蔗糖 5g, MgSO₄ • 7H₂O 0.5g, pH7.0, 高压灭菌。

YEB 固体培养基: 每升 YEB 液体培养基加 15g 琼脂粉, 高压灭菌。

卡那霉素 (Kan) 储液: 50mg/ml

利福平 (Rif) 储液: 50mg/ml

YEB 固体培养基平板 (Kan 抗性): 灭菌后的 YEB 固体培养基待其温度降至 50°C 时加入卡那霉素 (Kan) 和利福平 (Rif), 至终浓度分别为 100µg/ml 和 50µg/ml, 混匀后立即倒入培养皿, 凝固后 4°C 倒置保存。

[实验步骤]

- 1、在 200µl 感受态细胞中加入 2 - 6µl 质粒 (pBI121) DNA, 冰浴 5min, 液氮中速冻 5min;
- 2、迅速转入 37°C 水浴中, 热激 5min;
- 3、加入 1ml YEB 液体培养基, 28°C 慢速振荡培养 2 - 4 小时;
- 4、3000rpm 离心 4min, 去一部分上清, 留取 200µl 菌液涂布于含有 50µg/ml Kan 和 50µg/ml Rif 的 YEB 平板;
- 5、放置约 0.5h, 待水份干后, 28°C 培养约 24 小时至长出菌落。

农杆菌转化子的鉴定

[实验原理]

经改造的 Ti 质粒 (只含有帮助 T-DNA 跳到植物染色体上的 Vir 区) 存在于农杆菌工程菌株中, 含有 T-DNA 的双元载体 (Binory Vectors) 完成重组后可以在大肠杆菌中扩增, 再转入农杆菌中。从抗性培养基上筛选得到的农杆菌转化子中应携带转入的重组质粒, 而对照菌株则没有。

碱裂解法是一种应用最为广泛的质粒 DNA 提取方法, 该法用于从小量培养物中抽提质粒 DNA, 比较方便、省时, 提取的 DNA 质量较高, 可用于 DNA 的酶切、PCR 甚至测序。提取质粒 DNA 是基于染色体 DNA 与质粒 DNA 的变性与复性的差异而使其分离。当细胞

在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，在 pH 高达 12.6 的碱性条件下，蛋白质和染色体 DNA 发生变性，染色体 DNA 的氢键断裂、双螺旋结构解开，而质粒 DNA 虽大部分氢键也断裂，但超螺旋共价闭合环状结构的两条互补链不会完全分离，当加入中和液醋酸钾或醋酸钠高盐缓冲液时，质粒 DNA 恢复原来的构型，而染色体 DNA 不能复性，形成缠绕的网状结构，通过离心，染色体 DNA、蛋白质-SDS 复合物随细胞碎片等沉淀下来，质粒 DNA 则留在上清中。

[实验仪器、材料和试剂]

一、仪器：台式高速离心机，高压灭菌锅，恒温摇床，恒温水浴，电泳仪及电泳槽，紫外灯，加样器 (pipettor)，小离心管 (eppendorf tube)，吸头 (tip)，三角瓶，牙签。

二、材料：含质粒的农杆菌 LBA4404 (或 EHA105)，农杆菌 LBA4404 或 EHA105)

三、试剂：YEB 液体培养基 (1L)：酵母提取物 1g，牛肉膏 5g，蛋白胨 5g，蔗糖 5g，
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g，pH7.0，高压灭菌。

溶液 I：50mmol/L 葡萄糖

25mmol/L Tris-HCl (pH8.0)

10mmol/L EDTA (pH8.0)，高压灭菌 ($6.895 \times 10^4 \text{Pa}$)，4°C 保存

溶液 II：0.2mol/L NaOH，1% SDS

先分别配成浓度 0.4M NaOH (灭菌) 及 2% SDS，用前等体积混合。

溶液 III：3mol/L NaAc/KAc (pH4.8) 10

5mol/L NaAc/KAc 60ml (灭菌)

HAc 11.5ml

H_2O 28.5ml (灭菌)，三者混合

EB: 贮液浓度为 10mg/mL, 工作浓度为 0.5 μ g/ml

TAE: 40mmol/L Tris-HAc, 2mmol/L EDTA, pH8.0, Tris 饱和酚、氯仿、无水乙醇、RNase A

[实验步骤]

1、质粒 DNA 的提取

- (1) 挑取一个单菌落接种于 3ml 含相应抗生素的 YEB (50mg/L Km) 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 剧烈振荡过夜;
- (2) 收集 1.5ml 过夜培养物于 1.5ml 离心管中, 10000rpm 离心 30sec 收集菌体, 尽可能除尽培养基;
- (3) 向细胞沉淀中加入 100 μ l 预冷的溶液 I, 剧烈振荡, 使菌体充分悬浮;
- (4) 加入 200 μ l 溶液 II, 立即温和颠倒离心管 4-10 次, 避免剧烈振荡;
- (5) 加入 150 μ l 溶液 III, 温和颠倒离心管 4-10 次, 将离心管置冰浴 5min;
- (6) 于室温 12000g 离心 15min, 将上清液转入新的离心管中 (尽量避免吸取沉淀);
- (7) 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 颠倒混匀;
- (8) 12000g 离心 10min, 弃上清液, 加入 400 μ l 70%乙醇, 12000g 离心 8min, 弃上清, 在真空抽干或在超净工作台中吹干;
- (9) 加入 10 μ l 含 20 μ g/ml RNase A 的 TE 或重蒸水溶解 DNA, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min;
- (10) -20 $^{\circ}$ C 保存。

2、用琼脂糖电泳检测质粒 DNA (或用 PCR 进行检测)

用 1 \times TAE 配制 0.8% 的琼脂糖凝胶, 取所提取的质粒 DNA 溶液 2-5 μ l 进行电泳, 50-100v 约 0.5-1hr, 紫外灯下观察结果。

烟草遗传转化实验

[实验器材]

摇床、超净工作台、冰箱、移液枪、镊子、手术刀、打孔器、酒精灯、棉球、培养皿、三角瓶、滤纸、牛皮纸、牙签。

[实验药品]

MS 培养基母液、NaCl、酵母、水解酪蛋白、琼脂、蔗糖、卡那霉素、羧苄青霉素、无菌水、6-BA、NAA、0.1%升汞、70%乙醇。

烟草愈伤诱导或分化培养基：MS + 6-BA(1.0 mg/L) + NAA(1.0mg/L)

烟草生根培养基：MS + NAA(0.1mg/L)

烟草选择培养基：MS + 6-BA(1.0 mg/L) + NAA(1.0mg/L) + 75mg/L Km + 500mg/L 羧苄青霉素 (Cb)

[实验步骤]

1.受体材料的准备与预培养

(1) 取自田间栽培烟草植株，用蒸馏水冲洗 1 遍后，以 70%乙醇清洗 45s，再以 0.1% 的升汞消毒 6-8min，无菌水冲洗 5 遍，无菌滤纸吸干水分。

(2) 用灭过菌的打孔器将无菌烟草叶片凿成 6mm 的叶盘 (或用手手术刀切成 5 - 10mm 方形叶片)。

(3) 将叶盘或叶片接种在烟草愈伤组织诱导或分化培养基上进行预培养，预培养 2 - 3 天，材料切口处刚刚开始膨大时备用。

2.根癌农杆菌培养

(1) 从平板上挑取单菌落，接种到 20mL 附加相应抗生素 (卡那霉素) 的 YEB 液体培养基中，在恒温摇床上，于 28℃下以 180r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 (约需 17h)。

(2) OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 的菌液，按 1%~2%的比例，转入新配制的无抗生素的 YEB 液体培养基中，可同时加入 100~500μmol/L 的乙酰丁香酮。在上述相同的条件下再培养 6h 左右，待 OD₆₀₀ 为 0.2~0.5 时即可用于转化。

3.浸染

在超净工作台上，将菌液倒入无菌三角瓶中，从培养瓶中取出预培养过的外植体，放入菌液中，浸泡适当时间（5~30min）。取出外植体置于无菌滤纸上吸去附着的菌液。

4.共培养

将浸染过的外植体接种在烟草愈伤组织诱导或分化培养基上，在 28℃暗培养条件下共培养 2~4 天。

5.选择培养

将经过共培养的外植体移到加有选择压的烟草愈伤组织诱导或分化培养基（附加 500mg/L 的羧苄青霉素，抑制根癌农杆菌生长）上，在光照为 2000~10000lx、25℃条件下进行选择培养。

6.继代选择培养

选择培养 2 - 3 周后，外植体的转化细胞将分化出抗性不定芽或产生抗性愈伤组织，将这些抗性材料转入相相应的选择培养基中进行继代扩繁培养，或转入附加选择压的生长或分化培养基中使其生长或诱导生化。

7.生根培养

待不定芽长到 1cm 以上时，切下并插入含有选择压的烟草生根培养基上进行生根培养，两周左右长出不定根。

附 YEP 可用 LB 培养基替代，配方如下：

LB 固体培养基和 LB 液体培养基

酵母提取物(yeast Ext)	5g/L
蛋白冻(peptone)	10g/L
NaCl	10g/L

液体 LB 培养基不含琼脂, 供摇床培养农杆菌, 含 0.5%琼脂的固体供短期保存菌种用。

(pH7.0-7.2)