

农杆菌感受态制备及转化

Preparation and Transformation of *Agrobacterium* Competent Cells

徐远涛, 徐强*

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: xuqiang@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 徐远涛, 徐强. (2018). 农杆菌感受态制备及转化. *Bio-101* e1010204. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010204.

How to cite: Xu, Y. T. and Xu, Q. (2018). Preparation and transformation of *Agrobacterium* competent cells. *Bio-101* e1010204. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010204. (in Chinese)

实验原理: 在利用根癌农杆菌介导的基因遗传转化过程中, 首先要得到携带目的基因载体的农杆菌菌株。细胞经过 CaCl_2 处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 成为能允许外源 DNA 分子进入的细胞, 即感受态细胞。农杆菌感受态细胞的制备常用冰预冷的 CaCl_2 处理细菌的方法制备, 即用低渗 CaCl_2 溶液在低温 ($0\text{ }^\circ\text{C}$) 时处理快速生长的细菌, 从而获得感受态。此时细菌膨胀成球形, 外源 DNA 分子在此条件下易形成抗 DNA 酶的羟基—钙磷酸复合物粘附在细菌表面, 通过热激作用促进细胞对 DNA 的吸收进而实现载体质粒的农杆菌转化。

实验目的: 制备农杆菌感受态细胞, 将表达载体质粒转 (以 pK7WG2D_Cs7g29500-ox 为例) 入农杆菌感受态细胞中, 获得携带表达载体的农杆菌菌株用于基因遗传转化。

关键词: 农杆菌, 感受态, 制备, 热激转化

材料与试剂

1. 各种型号枪头
2. 各种型号离心管
3. 吸水纸
4. GV3101 农杆菌菌株
5. NaCl
6. 胰蛋白胨
7. 酵母提取物

8. 琼脂粉
9. 利福平 (50 mg/ml)
10. CaCl₂
11. 壮观霉素
12. 甘油
13. 0.02 mol/L CaCl₂ (见溶液配方)
14. CaCl₂/15%甘油混合液 (见溶液配方)
15. LB 培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 恒温培养箱
2. 超净工作台
3. 恒温摇床
4. 冷冻高速离心机
5. -80 °C 超低温冰箱
6. 4 °C 冰箱
7. 分光光度计

实验步骤

1. 农杆菌感受态制备
 - 1.1 超低温冰箱中取出保存的 GV3101 农杆菌菌株于含 50 mg/L 的固体 LB 培养皿上划线，28 °C 恒温培养箱培养 48 h 复苏。
 - 1.2 挑取单菌落接种于含 50 mg/L 的液体 LB 培养基，28 °C、200 rpm 摇床培养 24 h (取出后可 4 °C 暂存)。
 - 1.3 取 2 ml 菌液转入 300 ml 液体 LB 培养基培养至 OD₆₀₀ = 0.3~0.4(大约 15~20 h, 期间不时用分光光度计检测)。
 - 1.4 将菌液全部转入 50 ml 离心管，冰浴 30 min，同时冰浴 0.02 mol/L CaCl₂ 及 CaCl₂ 混合液。
 - 1.5 将装有菌液的所有 50 ml 离心管放入 4 °C 离心机，5,000 x g 离心 5 min，倒去

上清，灭菌吸水纸吸干残留液体。

- 1.6 每个离心管加入 2 ml 预冷的 0.02 mol/L CaCl₂ 重悬农杆菌 (先加 1 ml 吸打, 再加 1 ml), 冰上放置 20 min。
 - 1.7 在 4 °C、5,000 x g 离心 5 min。
 - 1.8 去上清, 加入 2 ml CaCl₂ + 15%甘油混合液, 用 1 ml 移液器吸打混匀后, 将多个 50 ml 离心管中的菌液集中到一个离心管, 冰上冷冻, 然后放到 4 °C 冰箱冷冻 24 h。
 - 1.9 冰上将菌液分装到无菌的 1.5 ml 离心管中, 每管装 100 μl, -80 °C 超低温冰箱保存。
2. 农杆菌热激转化
- 2.1 取 5 μl pK7WG2D_Cs7g29500-ox 终载体质粒 (约 1-2 μg) 加入到 100 μl 农杆菌感受态细胞中混匀。
 - 2.2 冰浴 30 min, 液氮速冻 5 min, 再 37 °C 水浴 5 min, 冰浴 2 min。
 - 2.3 加入 800 μl 液体 LB 培养基, 28 °C、200 rpm 摇床培养 4-5 h。
 - 2.4 吸取 200 μl 菌液涂在含 50 mg/L 壮观霉素的固体 LB 培养皿上, 28 °C 恒温培养箱培养 48 h。
 - 2.5 培养至有菌斑长出后, 挑单克隆, 阳性检测确认转化成功后扩繁菌液即可用于后续基因遗传转化。

注意事项

1. 操作过程均为无菌操作, 在超净工作台上完成。
2. 常用农杆菌菌株主要有两种: GV3101 (多用于转化拟南芥和烟草)、EHA105 (多用于转化柑橘和愈伤组织)。

溶液配方

1. 0.02 mol/L CaCl₂
0.22198 g CaCl₂ 溶解于 100 ml 双蒸水中, 121 °C、15 min 灭菌
2. CaCl₂/15%甘油混合液
0.1099 g CaCl₂, 7.5 ml 甘油, 加双蒸水定容至 50 ml, 121 °C、15 min 灭菌

3. LB 培养基

1 L 固体 LB 培养基成分为 10 g NaCl、10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、15 g 琼脂粉，加水定容至 1 L，121 °C、15 min 灭菌。液体 LB 不加琼脂粉