

农杆菌转化拟南芥

1. 农杆菌感受态制备

- ① 从 YEB 平板培养基上挑取农杆菌单克隆，接种于 5 mL YEB（含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平）液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，过夜培养；
- ② 取 2 mL 过夜培养液接种于 50 mL 上述含有利福平的 YEB 液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，摇床培养至 OD 达到 0.5；
- ③ 菌液冰浴 30 min，转至预冷的 50 mL 离心管中，4 $^{\circ}\text{C}$ ，5000 rpm，离心 10 min，收集菌体；
- ④ 2 mL 预冷的 50 mM 无菌 CaCl_2 溶液（含 15% 甘油）悬浮菌体，即为感受态细胞；以 100 μl /管分装，液氮速冻后，保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱，备用。

2. 质粒转化农杆菌感受态

- ① 吸取构建好的表达载体质粒 5 μl ，加入到 100 μl 感受态细胞中，混匀；
- ② 冰浴 30 min，液氮冷冻 5 min，37 $^{\circ}\text{C}$ 热击 5 min；
- ③ 加入 800 μl YEB 液体培养基，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，摇床培养 5 h；
- ④ 离心，留 200 μl 上清重悬沉淀，将菌液涂于 YEB 固体培养基（含质粒对应的抗生素），28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d，挑取单克隆，检测筛选阳性克隆，摇菌后 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存，用于下一步植物转化。

3. 农杆菌侵染拟南芥花序

- ① 将筛选的阳性农杆菌在 YEB（抗生素）固体培养基划线培养，至长出单克隆后挑 3-5 个单克隆，于 5 mL YEB（抗生素）液体培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm 培养 16 h，（以培养基变得很浑浊为准），保菌之后全部接到 250-500 mL 的培养基中，培养 16 h 以上；
- ② 5000 rpm 离心 20 分钟，然后用转化液（1/2MS（只用大量和微量元素），添加 50 g/L 的蔗糖，调 pH 为 5.8 左右，然后加 200 $\mu\text{l}/\text{L}$ 的 Silwet L-77 混合），剧烈悬浮沉淀至完全悬起；
- ③ 在拟南芥盛花期，将悬浮液直接浸泡地上部分约 1 分钟，然后用保鲜膜完全包裹以保湿，放回培养室 12 小时以上打开保鲜膜；
- ④ 待种子成熟后（半个月左右），收取种子用于下一步筛选工作。

4. 拟南芥转基因苗筛选

- ① 种子消毒：用 75% 的酒精添加 0.1% 的 Triton X-100 在 1.5 mL 的离心管中摇晃 15 min，然后在超净台中用 95% 的酒精洗两次，最后一次直接把种子连同酒精倒在灭菌过的滤纸上，滤纸直接放在超净台上，吹干种子（30 min 以上），然后把滤纸对折，左手捏着一角，右手拿一把镊子轻轻敲击滤纸把种子均匀撒到筛选培养基上；

- ② 抗性苗筛选：MS 培养基中加 25 mg/L 的氨苄青霉素，抑制细菌的生长；根据质粒抗性，在培养基中还得加 20 mg/L Basta 或 25 mg/L 潮霉素。筛选培养 15 d 左右，把阳性苗转移到土中，用透明的薄膜盖 3 d 左右以保湿；
- ③ PCR 鉴定：提取抗性苗 DNA，外源基因特异引物检测基因整合情况；
- ④ 荧光定量 PCR 分析：提取抗性苗 RNA，外源基因特异引物检测基因表达情况。