

HB101(含 pRK2013)二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Beh1011)

HB101(含 pRK2013)二代甘油菌	400μl /1 支	保存: -80℃/大于 10 年
LB+Kan50ug/ml 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	——

● 产品说明

pRK2013 是通过重组 DNA 技术构建的合成质粒,来源于 pRK2 质粒,pRK2 提供全套高效接合转移所需的基因(tra 和 trb 等)。为了使该质粒能在常规大肠杆菌中方便操作,研究人员将来源于 ColE1 质粒的复制起始位点 (ColE1 ori) 和一段包含卡那霉素抗性基因 (kanR) 的 Tn903 转座子插入到 pRK2 骨架中,保留了完整的 RK2 质粒接合转移基因,能有效驱动其他质粒的转移。自 1980 年构建以来,在超过 2000 篇文献中使用。其宿主范围广泛,能将质粒转移至不动杆菌属、农杆菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、根瘤菌属等多种革兰氏阴性菌,甚至部分革兰氏阳性菌中。

● pRK2013 工作原理: 三亲本接合法 (Triparental Mating)

这是 pRK2013 最核心的应用场景。其工作原理涉及三种不同的细菌:

供体菌 (Donor): 含有待转移的目标质粒 (该质粒需带有 oriT 转移起始点) 的大肠杆菌。

辅助菌 (Helper): 含有 pRK2013 质粒的大肠杆菌。

受体菌 (Recipient): 最终接收目标质粒的目的菌,如根癌农杆菌、根瘤菌、枯草芽孢杆菌、假单胞菌等。

作用机制: 将三种细菌混合培养时, pRK2013 利用其编码的接合蛋白 (Mob/Tra 蛋白), 游动进入供体菌。在供体菌内, pRK2013 识别目标质粒上的 oriT 序列, 并动员目标质粒进入受体菌。pRK2013 本身通常不会进入最终受体菌, 从而避免了外源遗传元件的持续干扰 (部分实验中, pRK2013 可以进入受体菌, 但不能在许多非肠道革兰氏阴性菌中复制)。

核心用途: 非自转移质粒的动员 (Mobilization of Non-self-transmissible Plasmids), 作为最经典的帮助质粒 (Helper Plasmid), pRK2013 的核心作用是辅助那些自身缺乏移动能力的质粒进行接合转移。在植物遗传转化、难转化芽孢杆菌或假单胞菌的质粒转化等实验中, 它可通过三亲接合的方式, 将目标质粒从大肠杆菌转移到根癌农杆菌、根瘤菌、枯草芽孢杆菌、假单胞菌等受体菌中。

附言: 待转移的目标质粒必须带有一个特定的转移起始点 (oriT), pRK2013 的游动和转移基因才能对其起作用, 并驱动其转移进入受体菌; 若质粒同时含有活化位点 (bom), 可促进质粒移动, 部分受体菌不需要质粒含有 bom 序列。

● 操作方法

1, 客户收到菌株后, 不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮, 待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁; 复壮方法如下: 在超净台打开盖子, 用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法 (图 1) 在 LB+Kan50ug/ml 平板表面轻轻划线 (注意: 不要刺破培养基), 将平板封口后放 37 度培养 15-20h, 即可长出单菌落。

2, 交叉划线法: 划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果, 保证能长出单菌落。具体步骤如下:

A, -80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子, 立即在表面挑取菌液/菌块划线, 不用等融化后划线, 固体状态时即可用接种环挑取划线, 操作要点是“快速操作, 立即划线”, 目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤; 如果收到的是液体甘油菌, 可直接划线, 在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B, 取出无菌接种环, 注意不要污染, 图 1 所示为标准的五段交叉划线法, 分五个区, 每个区划三条直线, 第 1、2 区可共用一个接种环, 划好 1、2 区后换一个新接种环划第 3 区, 再换一个新接种环划第 4 区, 再换一个新接种环划第 5 区, 每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹, 这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线也可只划 3 个区或 4 个区。

C, 客户也可用金属接种环灼烧后划线; 本公司提供的接种环为 ABS 材质, 不可灼烧。

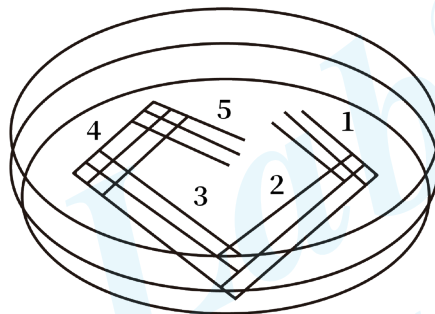


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 注意事项

- 1, 客户收到二代甘油菌株后, 应立即放-80 度保存, 不可放-20 度保存。
- 2, 应减少甘油菌冻融的次数, 冻融的次数越多, 菌种的活力越低;
- 3, 若扩繁菌种, 注意一次扩繁不要超过四个世代, 以保证菌种基因组的稳定; 扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证, 所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。

● 相关文献

Hall, A., Donohue, T. J., & Peters, J. M. (2023). Complete sequences of conjugal helper plasmids pRK2013 and pEVS104. *microPublication Biology*, 2023. Available at: <https://www.osti.gov/biblio/2202406>.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., & Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7347-7351.

Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1648-1652.