

产品使用说明书 Product Manual

农杆菌侵染液（烟草专用）

品牌	Chinook 钦诺克	
货号	CN250079	
中文名称	农杆菌侵染液（烟草专用）	
英文名称	Agrobacterium Infection Solution (For Tobacco)	
产品别名	农杆菌侵染液	
用途	用于农杆菌介导的遗传转化等相关实验	
产品组成：		
货号	产品名称	包装
CN250079-01	农杆菌侵染缓冲液（烟草专用）	500 mL（2-8℃保存）
CN250079-02	乙酰丁香酮溶液（100mM）	500 μL（-20℃保存）
用法：		
本产品中农杆菌侵染缓冲液浓度为工作液浓度，乙酰丁香酮溶液浓度为 100mM。临用前量取适量的农杆菌侵染缓冲液，按照比例，加入适量的乙酰丁香酮溶液，使乙酰丁香酮最终工作浓度为 100μM，即稀释 1000 倍。注意无菌操作，现配现用。		
实验方法与步骤（供参考）：		
1.将检测成功的农杆菌菌液过夜扩摇，28℃，200rpm。		
2. 取 1-1.5mL 菌液，加到灭菌的 1.5mL 离心管中。		
3. 1000g，10min，沉淀菌体（室温），弃上清，加 1mL 农杆菌侵染液，悬浮菌体。		
4. 重复步骤 3，进一步去除少量的抗生素。		
5. 去少量悬浮液稀释 10 倍，测定 OD600,并乘以 10，作为悬浮菌液的 OD600 值。		
注：如果悬浮液的 OD600 值在 1.5-2.0 之间，说明有大量的死菌细胞，将降低转化效率。		
6. 确定悬浮菌液对农杆菌侵染液的滴定度，计算稀释系数，使得最终悬浮菌液（用于侵染）为 0.5-5mL，OD600 为 0.01-0.1，通常 0.5-1mL 的最终悬浮菌液就能满足侵染了。		
例如：需要 OD600=0.1 的 500μL 最终悬浮菌液，而测定的悬浮菌液的 OD600=0.4，则最终悬浮菌液中，悬浮菌液的用量为 $(0.1*500)/0.4=125\text{mL}$ ，则需要渗透液为 375μL。		
7. 在 1.5mL 离心管中，配好最终悬浮菌液，准备侵染。		
8. 侵染前，将烟草放于白色荧光灯下 1h，使气孔张开。		

9. 选择倒三叶和倒四叶，用于侵染（于两叶脉之间侵染），一株选两叶，侵染一种菌液。
10. 用去掉针头的注射器，轻柔地摩擦待转叶片的背部（0.5cm²），活用小枕头刺穿，以去除其蜡质层。
11. 侵染前，用记号笔标记待转区域。
12. 将第 7 步中的最终悬浮菌液吸入 1mL 去针头的注射器中。
13. 将注射器对着叶片背部的待转区域，一手按着叶片上面，另一只手轻轻推动活塞。直到看到液体扩散，再侵染其他部位，侵染后，用记号笔圈定侵染区域。
14. 将侵染后的烟草放回到培养室。
15. 2-3 天后：
 - (1) 亚细胞定位试验：切掉侵染区域，制片，荧光显微镜观察。
 - (2) 启动子 GUS 活性：GUS 染色，75%酒精脱色，观察结果。

储存方式：

农杆菌侵染缓冲液（烟草专用）500mL，2-8℃保存，乙酰丁香酮溶液（100mM）500 μL，-20℃保存，贮存期一年。

注意事项：

1. 注意无菌操作，避免污染。
2. 各溶液保存于适当的温度，现配现用。

废物处理：

检测之后带菌物品置于 121℃下高压灭菌 30 分钟后处理。

附录：

微生物培养基正确配置方法及注意事项

步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

步骤二：溶解

1. 搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水并用玻璃棒小幅度搅拌。

注意：一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

2.加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热**；相反**含有琼脂**，需要用**本生灯/电磁炉加热煮沸**。

注意：

(1) 琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

(2) 不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

(3) 琼脂溶解不充分导致非常严重的后果，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。

3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，**防止焦化**。

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。

注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

④其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

步骤三：调培养基 pH

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

(1) 如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸**。

(2) 然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠**或 **1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4 ~ 7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需将 pH 调至比要求值高 0.1 ~ 0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~ 0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

步骤四：培养基过滤

1.如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。

2.培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121℃高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

步骤五：培养基分装

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。

用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37℃培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

(1) 高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121℃ 十五分钟

②对于大份：121℃ 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115℃/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化**。

(2) 煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

(3) 过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

- (1) 倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。
- (2) 在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。
- (3) 试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。
- (4) 不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开灭菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高，否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水；温度太低，培养基容易凝固成块状，不能做成平板。

2.倒平板时，要靠近酒精的火焰（以此防止外来细菌落入盘中）。左手托住培养皿，右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞，烧灼烧瓶口，用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝，直到烧瓶口刚好伸进去，倒入培养基，直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一，迅速盖上盖子，放在桌上后轻轻旋转培养皿，使培养基分布均匀，凝结后即可。24 小时后检查，如培养基未长杂菌，即可用来培养微生物。

步骤八：培养基摆斜面

灭菌完成后，将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上，并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。（斜面长度不超过试管的二分之一）

步骤九：微生物培养基质检

1. 检验培养基灭菌后，若发现有破损，浸水，颜色异常，棉塞被培养基污染。所有这些问题，都必须丢弃，不能重复使用，并确定其最终 pH 值。

2. 无菌检查和效果检查也是必需的。

(1) 无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基，37℃ 孵育一两天，确认无细菌生长。

(2) 效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格，准备好的培养基就可以使用了。