

ET12567 (pUZ8002)二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Bec-3070)

ET12567 (pUZ8002)二代甘油菌	400 μ l / 1 支	保存: -80 $^{\circ}$ C/大于 10 年
LB+25 μ g/ml 氯霉素+25 μ g/ml 卡那霉素平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	—

● 基因型

F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44 (pUZ8002 Tet^r)

● 产品说明

ET12567 (pUZ8002)菌株来源于 GM2929 菌株, 是甲基转移酶 dam、dcm 缺陷菌株, 主要用于链霉菌的转基因操作。ET12567 (pUZ8002)利用接合转移的方法将链霉菌基因编辑相关质粒 pSET152、pKC1139 等导入链霉菌中, 可以对链霉菌基因进行敲除或过表达等各种转基因操作。大部分链霉菌拥有“甲基化敏感限制系统”, 是甲基化敏感受体菌, 能够通过甲基修饰系统区分出自身 DNA 和外来 DNA。普通大肠杆菌 (如 DH5 α), 其细胞中的质粒会被自身的 Dam 和 Dem 甲基化酶修饰, 打上“大肠杆菌印记”, 一旦链霉菌检测到带有这种“印记”的外来 DNA, 其限制系统就会启动, 将其切割并降解, 导致这类质粒转化或接合转移效率极低; 所以需要转入到链霉菌中的质粒不被甲基化, ET12567(pUZ8002)菌株的两个甲基转移酶被突变, 提取的质粒不会被甲基化标记, 同时 pUZ8002 质粒含有 tra 基因, 能够编码转移蛋白 Tra, 可以通过接合转移的方法将链霉菌编辑相关质粒高效导入链霉菌细胞内, 完成链霉菌的转基因操作。ET12567 (pUZ8002)菌株的 hsdM hsdR 突变废除自身限制系统, 确保不会降解外源质粒, 能接受来自其他菌株的 DNA; 转座子 Tn9 插入 dam 基因产生 dam 突变的同时赋予 ET12567 菌株氯霉素抗性; 接合转移辅助质粒 pUZ8002 携带四环素抗性基因和卡那霉素抗性基因。ET12567(pUZ8002)在培养过程中需加入 25 μ g/ml 氯霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素, 有助于维持细胞内的 dam 突变和 pUZ8002 质粒存在。本产品为二代甘油菌株(一代种扩增两个世代后保种), 未经过大量扩繁, 核 DNA 及表型稳定, 菌落表型及生长曲线与原种匹配度大于 99.5%。

● 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+25 μ g/ml 氯霉素+25 μ g/ml 卡那霉素平板表面轻轻划线(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。

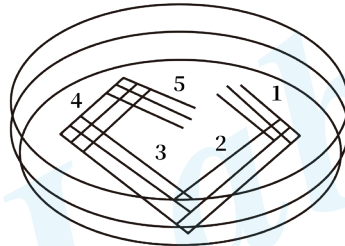


图1. 五段交叉划线法示意图

● 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。