

● pRK2013 质粒来源及用途

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。

● 注意事项

- 1, 收到含有质粒的菌株应立即放-80 度,不可放-20 度保存;在 4 度或室温长时间存放会增加发生错误突变的概率。
- 2, 质粒在不同实验室保存的过程中有发生突变的概率,所以实际的测序结果与数据库下载序列可能会有部分序列存在 SNP 或突变,只要不在核心元件发生突变或不影响质粒核心功能,一般不影响使用。

● 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.

上海唯地生物技术有限公司,专注成就卓越。