

文章编号:1674-7054(2012)01-0022-05

影响根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞 转化效率因素的研究

高世武, 郭晋隆, 阙友雄, 许莉萍, 杨颖颖, 陈如凯

(福建农林大学 农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点开放实验室, 福建 福州 350002)

摘要:通过对 EHA105 菌株 48 h 不间断培养观察, 绘制出其生长曲线图;同时用不同浓度的 CaCl_2 溶液分别制备根癌农杆菌 EHA105 的感受态细胞, 在转化过程中用不同的温度进行热激处理, 统计分析阳性转化子个数, 明确了采用冻融法将外源 DNA 导入农杆菌 EHA105 时的几个影响因素的参数。结果表明, 当 OD_{600} 值在 1.0 ~ 1.5 之间时, 根癌农杆菌 EHA105 正处在对数生长期, 活力最强;制备感受态细胞时, CaCl_2 溶液的浓度在 6 ~ 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 无显著差异, 但以 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果最佳, 转化率达 $5.322 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$, 热激处理温度在 20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 之间均无显著差异, 但 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理时转化率最高, 达 $5.550 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。

关键词: 根癌农杆菌 EHA105; 生长曲线; 冻融法; 转化率

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

自从 1985 年 HORSCH 等^[1]发明了农杆菌介导的烟草叶盘转化法以来, 农杆菌介导的基因转化技术得到了快速发展。通过农杆菌介导获得转基因植物的报道也越来越多, 如水稻、玉米、小麦、棉花、西红柿等^[2-6]。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是 1 种革兰氏阴性土壤杆菌, 含有 1 种环形的 Ti 质粒 (> 200 kb), 该质粒含有 1 段 T-DNA 和 *vir* 基因, 当其侵染植物细胞后, 能将其 T-DNA 插入到被侵染细胞的基因组中, 并能稳定遗传给后代, 可作为外源 DNA 进入植物细胞的载体^[7]。但在农杆菌介导的基因转化过程中, 将携带外源基因载体质粒导入农杆菌是第 1 个限速步骤。目前将重组质粒导入农杆菌的方法有多种, 但都存在着一些弊端。例如, 三亲杂交法, 其操作繁琐, 转化过程长达 2 d, 并且需要辅助质粒^[8]; 电激转化法需要昂贵的仪器和耗材, 转化条件严格^[9]; 相比之下, 冻融法虽然转化效率低^[10], 但由于其操作简单, 不需昂贵的仪器和耗材, 因此, 在普通实验室中得到了广泛的应用。

影响冻融法转化效率的主要因素有农杆菌的生长状态、感受态细胞的质量、转化时的热激温度等^[11-14], 由于培养基及农杆菌菌株不同等原因, 各文献报道的优化条件有所不同。为此, 本试验以根癌农杆菌 EHA105 为受体细胞, 并用多梯度不同浓度的 CaCl_2 处理, 使其处于感受态, 然后使用本实验室自己构建的 p2AST2301 植物表达载体质粒 DNA 进行转化, 分析根癌农杆菌 EHA105 的生长状态、不同浓度 CaCl_2 所制备感受态细胞的质量以及转化时的热激温度对根癌农杆菌 EHA105 转化效率的影响, 筛选出具有较高转化效率的优化条件, 旨在为根癌农杆菌 EHA105 介导的基因转化试验提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由农业部甘蔗遗传改良重点开

收稿日期: 2011-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871581); 国家高技术研究发展“863”计划 863 项目 (2007AA100701); 福建省科技厅国家科技项目 (F2007AA100701); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (nycytx-024-01-06)

作者简介: 高世武 (1982-), 男, 河南南阳人, 福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点开放实验室助理研究员, 硕士。

通信作者: 陈如凯. E-mail: fafu948@126.com

放实验室提供,p2AST2301 植物表达载体由本实验室自己构建,含有 *cry2A*,*NPT II*,*gus* 等基因,具有卡那霉素抗性。

1.1.2 培养基 YEB 培养基成分:Yeast extract $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;Beef extract $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;Tryptone $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;Sucrose $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;pH 7.4(固体培养基中含 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂粉)。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌菌株 EHA105 生长曲线的建立 根据细菌生长曲线测定的方法^[15],使用 YEB 培养基,对农杆菌菌株 EHA105 进行整个生长过程的观测,测定其吸光值(OD_{600}),绘制其生长曲线,以确定其活力最强的时期。

从 YEB(含 Rif^+ $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 平板上挑取新鲜培养的农杆菌菌株 EHA105 的单菌落,接种到 20 mL YEB 液体培养基中, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜,使其 OD_{600} 值达到 1.50 左右,作为母液。试验共设 25 个处理,每个处理重复 3 次。利用含有 Rif^+ ($35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 YEB 液体培养基作参照。取 75 个 50 mL 三角瓶,每瓶加入 20 mL YEB 液体培养基(含 Rif^+ $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 EHA105 母液($OD_{600} = 1.40$) $20 \mu\text{L}$ 。控温 $28 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养。从培养起始,持续观测 48 h,每 2 h 取出 3 瓶菌液,用 752 型分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光值,记录结果,绘制生长曲线。

1.2.2 农杆菌感受态细胞制备时 CaCl_2 浓度的确定 农杆菌感受态细胞制备及转化过程采用冻融法。为确定 CaCl_2 溶液浓度,在制备感受态细胞时,采用不同浓度的 CaCl_2 溶液去重悬沉淀。 CaCl_2 共设置 12 个浓度梯度:0,2,4,6,8,10,20,40,60,80,100,200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个梯度设置 3 次重复。用不同处理制备的感受态细胞(每管 200 μL) 分别加入等量(20 ng)的质粒 DNA (p2AST2301) 混匀,转化后加 1 mL 不含任何抗生素的 YEB 培养基,最后取 100 μL 转化液涂平板(Rif^+ $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Kan^+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),30 h 后观察拍照,记录转化子个数,计算其转化频率。同时从各抗性平板上随机挑取 10~12 个单菌落,用 YEB 液体培养基培养,以菌液为模板,根据 *cry2A* 基因序列设计合成特异性引物(Sense:GGAAGAGGGAGTAGAGGAACG;Anti-sense:CAACCAGCAGGTGGACAA),进行 PCR 扩增,扩增条件如下: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s,30 个循环,最后延伸 7 min。PCR 运行结束后将其产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测其阳性率,以确定最佳的 CaCl_2 浓度。

转化频率按下面公式计算:

转化子总数 = 菌落数 \times 稀释倍数 \times 转化反应原液总体积/涂板菌液体积

转化频率 = 转化子总数/质粒 DNA 加入量(μg) $\times 100\%$

1.2.3 植物表达载体导入农杆菌 EHA105 时热激温度的确定 取 EHA105 菌液 400 mL($OD_{600} = 1.36$),采用冻融法使用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液制备感受态细胞,取感受态细胞(每管 200 μL) 分别加入等量(20 ng)的质粒 DNA (p2AST2301),用液氮速冻,然后分别用不同的温度去热激。热激共设置 10 个温度梯度:0,10,20,27,32,37,42,47,55,65 $^\circ\text{C}$,每个处理重复 3 次。最后取 100 μL 转化液涂平板(Rif^+ $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Kan^+ $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),静止培养 30 h 后观察转化子个数,计算其转化频率。同时从各抗性平板上随机挑取 10~12 个单菌落,用 YEB 液体培养基培养,以菌液为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件同 1.2.2。PCR 运行结束后将其产物进行琼脂糖凝胶电泳,检测其阳性率,确定出合适的热激处理温度。

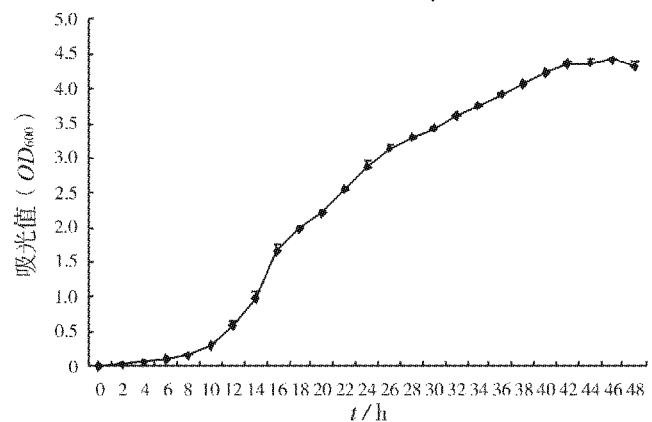


图1 农杆菌菌株 EHA105 生长曲线图

2 结果与分析

2.1 农杆菌菌株 EHA105 生长曲线的建立 通过对农杆菌菌株 EHA105 整个生长过程的观测,以时间为横坐标,以 OD_{600} 吸光值为纵坐标绘制出 EHA105 的生长曲线(见图 1)。从图 1 可以看出,农杆菌菌株

EHA105 在培养过程中,在所试验的 48 h 内,随着时间的增加 OD_{600} 值逐渐增大,即菌液浓度越来越高。在 EHA105 菌株的整个生长过程中,大致可分为 4 个时期,即适应期(Lag phase)、对数期(Log phase)、稳定期(Stationary phase)、衰败期(Death phase)。其中 0~8 h 为适应期,在这个时期内,细菌细胞虽然也在快速繁殖,但总量有限;8~42 h 为对数期,细菌经过适应期的调整,便开始高速分裂繁殖, OD_{600} 值快速升高,细胞数目以几何级数增加,其中以 12~18 h 最明显,之后增长速度有所下降;当培养到 42 h 时,生长曲线进入稳定期,直到 46 h 还维持该现象,这是由于细菌经过对数期高速生长繁殖,大量消耗营养液并使其发生一系列的变化,从而限制了细菌继续高速生长繁殖,使新细菌增加和老细菌死亡的数量趋向平衡,因此,42~46 h 为稳定期;46 h 起开始进入衰败期,这是由于细菌的生长环境变化而不利于其生长,因此死亡细胞急剧增加,表现出“负增长”现象。

在试验过程中还发现,当培养 14 h 时, OD_{600} 值达到 0.974;当培养 16 h 时, OD_{600} 值达到 1.644,在 2 h 内增长了近 1 倍, OD_{600} 值适中,这一时段正处在细菌的对数生长期,活力最强,制备的感受态细胞接受外源 DNA 的能力最好。因此,从 14~16 h 这一时段,是收获菌体的最佳时期,也就是 OD_{600} 值在 1.0~1.5 之间时收获的菌体最好。

2.2 $CaCl_2$ 浓度对农杆菌 EHA105 感受态细胞质量的影响 采用不同浓度的 $CaCl_2$ 溶液制备感受态细胞,转化后获得了不同数量的抗性转化子(见表 1),并对试验结果进行单向分组随机区组试验分析(见表 2)。

表 1 不同 $CaCl_2$ 浓度对感受态细胞的影响

$CaCl_2/(mmol \cdot L^{-1})$	0	2	4	6	8	10	20	40	60	80	100	200
转化子均值	2.7	63.3	77.7	84.7	84.7	88.7	40.0	31.7	9.7	5.0	3.0	1.0
标准差	0.092	0.250	0.386	0.242	0.250	0.193	0.262	0.211	0.092	0.060	0.060	0.060
转化频率($\times 10^6$)	0.162	3.798	4.662	5.082	5.082	5.322	2.400	1.902	0.582	0.300	0.180	0.060

注:转化子均值为 3 次重复的平均值

表 2 $CaCl_2$ 处理方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重复间	12.500	2	6.250	0.508	3.44	5.72
$CaCl_2$ 浓度处理间	44 424.670	11	4 038.606	328.059**	2.26	3.18
误差	270.833	22	12.311			
总变异	44 708.000	35				

注:表中“**”表示差异极显著

从表 2 可以看出,处理间达到了极显著水平,说明不同浓度的 $CaCl_2$ 溶液制备的感受态细胞接受外源 DNA 分子的能力不同,对转化频率有着显著的影响。而重复间无显著差异,说明试验重复性较好。通过新复极差法对 $CaCl_2$ 浓度处理间进行进一步的多重比较(见表 3)可以看出, $CaCl_2$ 溶液浓度分别为 6,8,10 $mmol \cdot L^{-1}$ 时,制备的感受态细胞感受外源 DNA 的能力无显著差异,但与其他处理之间的差异均达到了显著或极显著水平。

表 3 不同 $CaCl_2$ 浓度处理间多重比较结果

$CaCl_2/(mmol \cdot L^{-1})$	均值	差异显著水平		$CaCl_2/(mmol \cdot L^{-1})$	均值	差异显著水平	
		5%	1%			5%	1%
10	88.67	a	A	40	31.67	e	E
8	84.67	a	AB	60	9.67	f	F
6	84.67	a	AB	80	5.00	fg	F
4	77.67	b	B	100	3.00	g	F
2	63.33	c	C	0	2.67	g	F
20	40.00	d	D	200	1.00	g	F

注:不同字母表示差异显著,相同表示不显著

从图 2 中可以看出, CaCl_2 浓度从 $0 \sim 200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 所制备的感受态细胞均能感受外源 DNA, 在不使用 CaCl_2 溶液的情况下, 制备的感受态细胞也有一定的感受能力, 但远比不上使用 CaCl_2 溶液所制备的感受态细胞的感受能力。不过 CaCl_2 溶液浓度并不是越高越好, 而是在小于 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时感受能力较强, 高于 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 转化频率骤然下降。从图 2 和表 1 中还可以看出, 在 CaCl_2 浓度为 $0 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内, 随着浓度的增加, 感受态细胞的感受能力逐渐增强, 在 6, 8, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个处理中, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理制备的感受态细胞感受能力最强, 转化率达到 $5.322 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。 CaCl_2 浓度高于 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 感受态细胞的感受能力随着 CaCl_2 溶液浓度的升高而迅速下降, CaCl_2 溶液浓度为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 感受态细胞的感受能力还不如用纯水制备的感受态细胞效果好。

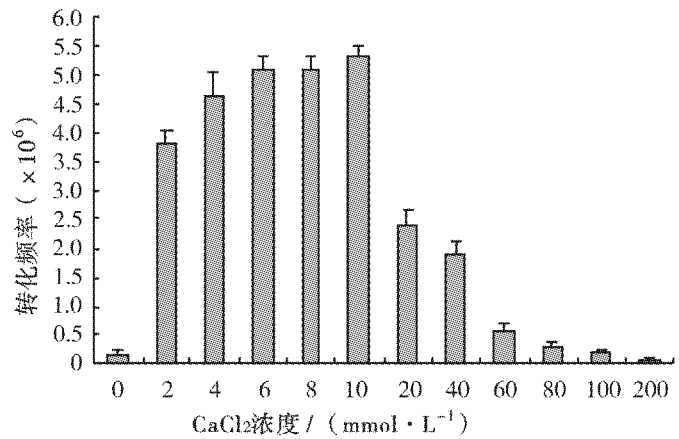


图 2 CaCl_2 浓度对转化效率的影响

用设计合成的特异引物, 对各平板上随机挑取的单菌落进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 所有单菌落都能扩增出约 500 bp 的目标条带 (见图 3), 与预期的 519 bp 一致, 该结果进一步证明抗性平板上的克隆为阳性克隆。使用不同浓度的 CaCl_2 溶液制备感受态细胞转化 p2AST2301 质粒后的菌落生长情况见图 4。

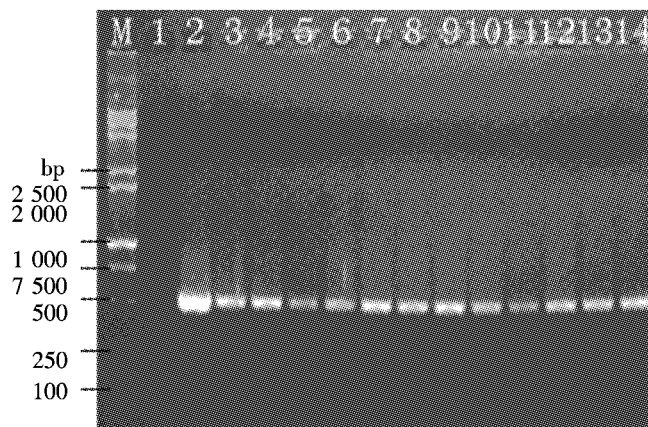


图 3 拟转化子 PCR 检测结果

M. DNA Marker; 1. H_2O 空白对照;

2. p2AST2301 质粒阳性对照; 3~14. 随机挑取的单菌落

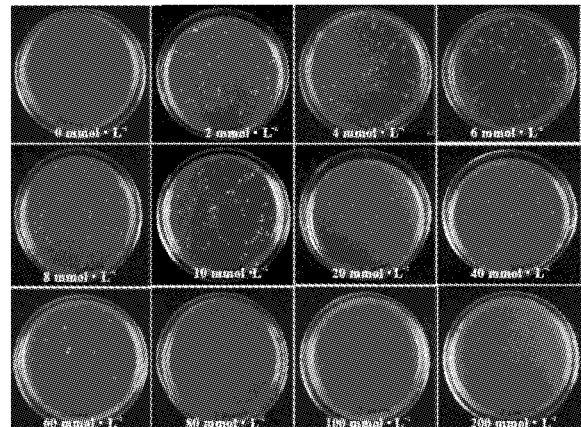


图 4 不同 CaCl_2 浓度制备感受态细胞

转化后的菌落生长情况

2.3 热激温度对植物表达载体导入农杆菌 EHA105 的影响 为了确定一个比较合适的热激温度, 本研究设置 $0 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ 共 10 个温度梯度进行处理, 转化后获得了不同数量的抗性转化子, 统计结果见表 4。同时对不同热激温度处理的试验结果进行单向分组随机区组试验分析, 结果见表 5。

表 4 热激温度对转化的影响

热激温度/ $^\circ\text{C}$	0	10	20	27	32	37	42	47	55	65
转化子均值	87.7	173	173.7	177.7	179	185	103.3	23.3	14	2.3
标准差	0.183	0.151	0.288	0.062	0.383	0.423	0.176	0.075	0.114	0.017
转化频率 ($\times 10^6$)	2.631	5.190	5.211	5.331	5.370	5.550	3.099	0.699	0.420	0.069

注: 转化子均值为 3 次重复的平均值

从表 5 可以看出, 温度处理间达到了极显著差异水平, 说明使用农杆菌菌株 EHA105 制备的感受态细胞进行转化时, 热激温度对其影响很大。而重复间并无显著差异, 说明试验重复性较好。为了找到一个合适的热激处理温度, 笔者进一步对各个温度处理用新复极差法进行多重比较, 结果见表 6。由表 6 可以

看出,热激温度分别为 20, 27, 32, 37 °C 时,转化效果均无显著差异,而 10 °C 和 37 °C 处理间的差异达到了显著水平,但未达到极显著水平。除此之外,这几个温度处理和其他温度处理之间的差异均达到了极显著水平。

表 5 热激处理方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
重复间	235.267	2	117.633	2.359	3.55	6.01
热激温度处理间	154 248.700	9	17 138.740	343.768 **	2.46	3.60
误差	897.400	18	49.856			
总变异	155 381.400	29				

注:表中“**”表示差异极显著

表 6 不同热激温度处理间多重比较结果

热激温度/°C	均值	差异显著水平		热激温度/°C	均值	差异显著水平	
		5%	1%			5%	1%
37	185.00	a	A	42	103.33	c	B
32	179.00	ab	A	0	87.67	d	B
27	177.67	ab	A	47	23.33	e	C
20	173.67	ab	A	55	14.00	ef	CD
10	169.67	b	A	65	2.33	f	D

注:不同字母表示差异显著,相同表示不显著

从图 5 可以看出,在 10~37 °C 的范围内,转化频率均达到了 $5.0 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 以上,在 37 °C 时达到最高 $5.550 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ (见表 4),而高于 37 °C 或低于 10 °C 的热激温度均显著影响转化频率。当热激温度高于 37 °C 时,随着温度的提高转化频率明显降低,达到 65 °C 时,转化频率几乎为零,这是因为过高的温度导致细胞死亡,失去了接受外界 DNA 分子的能力。当热激温度低于 10 °C 时,随着温度的降低转化频率也随之下降,但没有高温端明显,在 0 °C 时(冰水混合物中慢慢溶解)亦可以转化,但转化频率相对较低。因此,在使用农杆菌菌株 EHA105 制备的感受态细胞进行转化时,虽然热激温度在 10~37 °C 之间,转化频率均达到了 $5.0 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 以上,但 10 °C 和 37 °C 2 个处理间存在显著差异,因此,热激温度选择在 20~37 °C 之间更好,且以 37 °C 时转化频率最高。同时,用设计合成的特异性引物,对各平板上随机挑取的单菌落进行 PCR 扩增,电泳结果显示,所有单菌落都能扩增出约 500 bp 的目标条带(见图 6),与预期的 519 bp 一致,该结果进一步证明抗性平板上的克隆为阳性克隆。不同热激温度处理转化后的菌落生长情况见图 7。

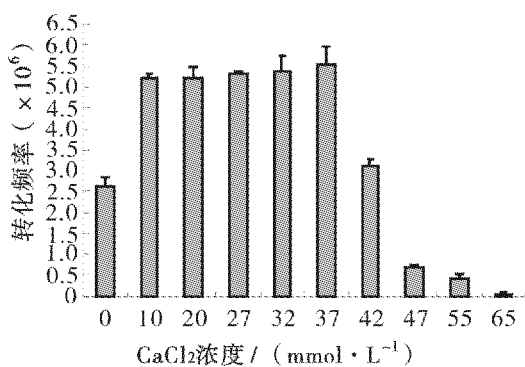


图 5 热激温度对转化效率的影响

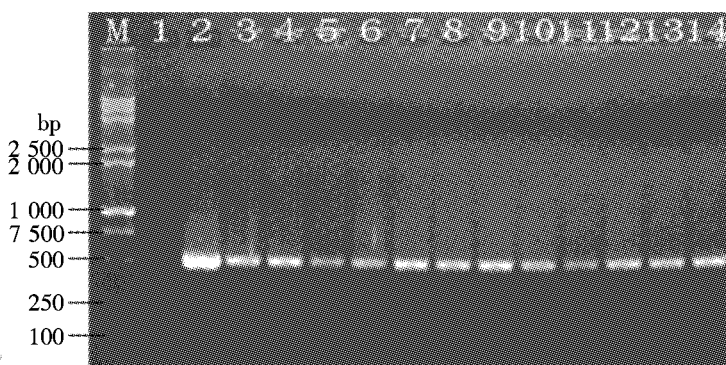


图 6 拟转化子 PCR 检测结果

M. DNA Marker; 1. H₂O 空白对照; 2. p2AST2301 质粒阳性对照; 3~14. 随机挑取的单菌落

3 讨论

根癌农杆菌 EHA105 在农杆菌介导的遗传转化中越来越受到科研人员的青睐,为了提高根癌农杆菌

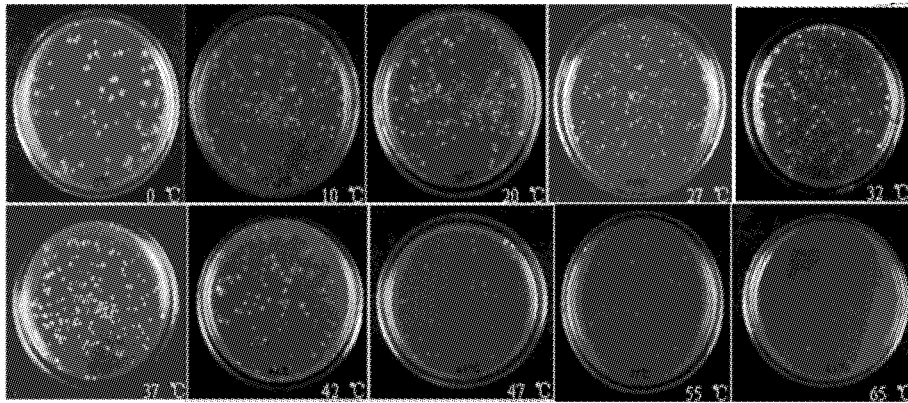


图 7 不同热激温度转化后的菌落生长情况

EHA105 感受态细胞的转化效率,本研究在前人的研究基础上对影响 EHA105 感受态细胞转化效率的因素进行了系统的研究。结果表明,根癌农杆菌 EHA105 菌液 OD_{600} 值在 1.0 ~ 1.5 时,使用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液制备的感受态细胞转化率最高,达到了 $5.322 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$,这与罗雯^[11]等以 pCAMBIA1305.1 质粒作为外源 DNA 转化农杆菌 GV3101 时结果不同,可能是所用的农杆菌菌株不同或制备感受态的菌液浓度不同造成的,这有待进一步的试验研究。试验结果还表明,转化过程以 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 热激处理时转化率达到最高值 $5.550 \times 10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$,这与朱锦辉^[13]等使用质粒 Prok II 转化 LBA440 时的研究结果相同,但与罗雯^[11]等研究结果不同,可能是不同的农杆菌菌株对热激温度的敏感性不同造成的。同时,本研究的转化效率达到了 $10^6 \cdot \mu\text{g}^{-1}$,比前人的研究结果 $10^5 \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 提高了 1 个数量级,为提高根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞转化效率提供了参考。下一步的实验,可以针对不同的农杆菌菌株,通过分析比较不同农杆菌的细胞生长状态、重悬液成分、冻融时间、热处理温度等条件对转化效率的影响,筛选出方法简单、步骤简便、易操作,并具有较高转化率的实验方案,为农杆菌遗传转化提供相应的试验依据。

参考文献:

- [1] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMANN N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227: 1229 - 1231.
- [2] 谢学文, 于晶, 徐建龙, 等. 玉米细菌性条斑病非寄主抗性基因 *Rxo1* 转化水稻的研究[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 607 - 611.
- [3] 魏开发. 农杆菌介导的高效玉米遗传转化体系的建立[J]. *遗传*, 2009, 31(11): 1158 - 1170.
- [4] 朱晋云, 许玉娟, 杨丽萍, 等. 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(1): 84 - 89.
- [5] 张海平, 王学德, 邵明彦, 等. 棉花农杆菌基因转化体系的优化和转苜蓿抗菌肽基因(*alfAFP*)植株的获得[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(6): 1020 - 1026.
- [6] 朱莹, 周琦, 崔继哲. 根癌农杆菌介导 *AtNHX1* 基因转化番茄的研究[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 119 - 123.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] BEVAN M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation[J]. *Nucl Acids Res*, 1984, 12(22): 8711 - 8721.
- [9] TAKETO A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 949(3): 318 - 324.
- [10] RHODES C A, PIERCE D A, METTLER I J, et al. Genetically transformed Maize plants from protoplasts[J]. *Science*, 1988, 240: 204 - 207.
- [11] 罗雯, 刘阳. 根癌农杆菌转化条件优化的研究[J]. *生物技术*, 2006, 16(1): 41 - 43.
- [12] 余云舟, 杜娟, 王罡, 等. 重组质粒导入根癌农杆菌冻融法的研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2003, 25(3): 257 - 259.
- [13] 朱锦辉, 权军利, 何玉科, 等. 根癌农杆菌感受态细胞的制备以及质粒 Prok II 对其转化的研究[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(7): 91 - 95.
- [14] 张边江, 陈全战. 质粒导入不同种农杆菌冻融法的探讨[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46(3): 329 - 331.
- [15] 牛天贵, 张宝芹. 食品微生物检验[M]. 北京: 中国计量出版社, 2003.

(下转第 31 页)

Isolation and 16S rRNA gene analysis of lipase strains in Haikou in Hot Summer

PAN Xiao-lei¹, LIAO Cheng-hong^{1,4}, CONG Qian¹, LI Xiao-tuo¹, GUO Gui-ying³,
ZHANG Xu¹, CHI Ting-ting^{1,4}, ZHENG Ji-ping^{1,2,4}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bio-resources-State Key Laboratory Incubation Base Haikou 570228, China;

2. Ministry of Education Key Laboratory for Tropical Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou 570228, China; 4. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Nine high producing lipase strains were isolated from rich oil soil at canteens, sea sludge and garages from Haikou in hot summer. All these strains were Gram-negative and rod-shaped single cells and investigated in terms of morphology, growth and 16S rRNA gene sequences. All colonies of these strains were blue green on the plate under light microscope, indicating that the strains might secrete pigments of such color. The optimal growth conditions for these strains were pH7.0 at the temperature of above 42 °C. All the strains had completely the same 16S rRNA gene sequences as *Pseudomonas aeruginosa*, and hence are identified as *P. aeruginosa*.

Key words: lipase; 16S rRNA; *Pseudomonas aeruginosa*; Haikou

(上接第 27 页)

Factors affecting transformation efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 competent cells

GAO Shi-wu, GUO Jing-long, QUE You-xiong, XU Li-ping, YANG Ying-ying, CHEN Ru-kai

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fuzhou, China)

Abstract: Growth of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, the quality of the competent cells and the heat-shock temperature during transformation are the three main factors affecting the transformation efficiency of *A. tumefaciens* EHA105. The growth of the strain EHA105 with 48 h continuous culture was observed based on which the growth curve was plotted. At the same time, different concentrations of CaCl₂ and different temperatures in heat-shocking during the transformation were tested in preparing the competent cells of EHA105. The number of positive transformants was determined and the factors affecting introduction of exogenous DNA into the strain EHA105 by using the freeze-thaw method were identified. When the OD₆₀₀ value ranged from 1.0 to 1.5, the strain EHA105 was found at the logarithmic growth phase and had the highest vitality. No significant difference was observed in the transformation rates of competent cells prepared with the CaCl₂ at the concentration of between 6 mmol · L⁻¹ and 10 mmol · L⁻¹, but the best transformation rate was 5.322 × 10⁶ · μg⁻¹ at 10 mmol · L⁻¹ CaCl₂. No significant difference was found in transformation rates at the heat-shock temperatures from 20 °C to 37 °C during transformation, but the best transformation rate (5.550 × 10⁶ · μg⁻¹) was achieved at 37 °C. The results provide a reference for improving the transformation efficiency of *A. tumefaciens* EHA105 competent cells.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens* EHA105; growth curve; freeze-thaw method; transformation rate