|  |
| --- |
| **拟南芥的种植，转化和筛选** |
|  |
| **1 拟南芥的种植**  **试剂配制**  **人工土**：3份蛭石，1份珍珠岩和1份黑土混合  **PNS营养液**：  每升含  5ml 1M KNO3，  2ml 1M Ca(NO3)2˙4H2O，  2ml 1M MgSO4˙7H2O，  2.5ml 20mM  Fe.EDTA，  2.5ml 1M磷酸缓冲液（pH5.5），  1ml MS 微量元素 。  **PNS营养液母液配方**  ①1M    KNO3  101.1g  ②1M    Ca(NO3)2˙4H2O    236.15 g  ③1M    MgSO4˙7H2O，246.48 g  ④20mM  Fe.EDTA：  FeSO4       5.57g  EDTA        7.45g  注意先各自配成溶液，在混合。  ⑤1M磷酸缓冲液（pH5.5）：  磷酸二氢钾    130.4g  磷酸氢二钾    9.12g  ⑥MS 微量元素  硼酸                     0.434g  硫酸锰（MnSO4 H2O）     1.7626g  CuSO4˙H2O                0.0798g  ZnSO4˙7H2O               0.172g  NaMoO4˙2H2O             0.0432g  NaCl                     0.585g  CoCl˙6H2O                0.00129g  以上母液均配至1L  **种植步骤**  将春化过的拟南芥种子种于浇过饱和PNS营养液的人工土中，并用保鲜膜罩上。两天后光照，三天后揭膜。  人工培养室条件：相对湿度80%，恒温20-240C，光照强度80-200umol/M2/S，光照周期为8 h黑暗﹑16 h光照培养。  **2 拟南芥的转化**  **试剂配制**  渗透培养基（一升中）：1/2xMurashige-Skoog；5% 蔗糖；0.5克 MES；用KOH调至pH5.7；再加：10微升1mg/ml的6-BA 母液；200微升Silwet L-77）  注意：6-BA 母液配制时用乙醇溶解。1/2xMurashige-Skoog是用MS的基本组分配制，但大量元素减半。  另：经转化的拟南芥，种子收获后需在相应的抗性平板上筛选转化子  **转化步骤**  (1) 制备好已转化了相应质粒的农杆菌菌液10ml，在转化前一天晚上，转入大瓶培养过夜，第二天取出使用时农杆菌液O.D600当在1.2到1.6之间。  (2) 室温5000rpm离心15分钟。  (3) 弃上清，将农杆菌沉淀悬浮于相应体积的渗透培养基里，使O.D600在0.8左右。  (4) 将农杆菌悬浮液直接喷洒至整个植株（或用抽真空的方法），盖上透明的塑料盖子或保鲜膜以保持湿度，移入恒温室避光培养，第二天可开盖，正常光照培养。  (5) 一周后再喷洒一次，方法同上。  3 转化子的筛选  (1) 种子消毒：先用70%乙醇浸泡10分钟，在上述处理时要不时地使种子悬浮；然后用无菌水洗四次，在这步处理时最好也不时地使种子悬浮。  注意：用乙醇浸泡的时间不宜过长！  (2) 处理后的种子用Top agar（0.1%琼脂水溶液）均匀涂布在固体筛选培养基表面。一块150mm直径的平皿最多种1500棵。  (3) 4℃春化2到3天，移入22℃恒温室培养。  (4) 观察种子在固体筛选培养基上生长情况,可确定为转化子时,将转化子移栽至浇过饱和PNS营养液的人工土壤培养。 |