Ar A4D　电击感受态细胞

Ar A4　Electroporation-Competent Cell

保存条件：　-80℃

产品规格:

Ar A4 电击	10×50μl
pK7WGF2（control vector）	10pg/μl　10μl

基　因　型

Agrobacterium rhizogenes(kan^R) Ar A4 Ri(agropine type)

简 要 说 明

发根农杆菌是根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(agrobacterium)的一种革兰氏阴性土壤细菌，它能够感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物以及个别裸子植物。Ar.A4 发根农杆菌菌株含有农杆碱型 Ri 质粒，具有广泛的宿主范围（玉米，烟草，胡萝卜，甘草等），同时具有卡那霉素抗性。开发的 Ar.A4 发根农杆菌电转感受态特别适用于大质粒的转化：经 pK7WGF2 质粒 (size:11876 bp)检测转化效率>105 cfu/μg DNA；经 pK7WGF2-ZH 质粒（size:40 kd）检测转化效率可达 5×10^3 cfu/μg DNA。

操　作　说　明

1. 0.1 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟，待其沥干水分，正置 5 分钟，使乙醇充分挥发，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电极杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。

2. 取-80℃保存的农杆菌感受态插入冰中5分钟，待其融化，加入0.01-1 μg质粒DNA（体积不大于6ul，最好用试剂盒抽提，双蒸水溶解；转化效率较高，第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量），用手拨打管底混匀，立即插入冰中，用200 μl枪头将感受态-质粒混合物快速移到电击杯中，盖上杯盖，空管保留待用。

3. 启动电转仪，设置参数：C=25 μF，PC=200 ohm，V=2400 V（此参数为Biorad 推荐，使用者也可按所用电转仪推荐的protocol操作），将电击杯从冰中拿出，吸水纸吸干外表面水份，快速放入电转槽中，启动电击，电击完成快速插入冰中，加入1 ml无抗生素的TY，并转移到感受态空管中，28℃振荡培养2~3小时。

4. 6000 rpm离心一分钟收菌，留取100 μl左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的TY平板上，倒置放于28℃培养箱培养2-3天

注 意 事 项

1. 加入质粒时体积不应大于感受态体积的1/10；质粒不纯或存在乙醇等有机物污染，转化效率急剧下降；质粒增大一倍，转化效率下降一个数量级。

2. 电转感受态细胞中不可混入气泡，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。

3. 平板上阳性克隆密度过大时，由于营养不足，阳性克隆生长变慢，菌落变小，为了获得大的菌落，应减少质粒用量或最终用于涂板的菌量。

4. Ar.A4具有卡那霉素抗性，不可用于具有卡那霉素抗性质粒的转化。

备　　注

1、农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素（carb）	双蒸水溶解，0.22 μm滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素（kan）	双蒸水溶解，0.22 μm滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml

链霉素（strep）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μg/ml
利福平（rif）	DMSO 溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素（gent）	双蒸水溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μg/ml

2、常用农杆菌抗性：（R：抗；S：敏感。）

农杆菌菌株	羧苄青霉素(carb)	链霉素(strep)	利福平(rif)	庆大霉素(gent)	硫酸卡那霉素(kan)
AGL-1	R	S	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	S	R	R	S

3、TY 配方（1L）：

Tryptone 5g

Yeast extract 3g

补水到 1L 体积，完全溶解后，121 度、20 分钟高温灭菌

配制 1M 的氯化钙水溶液，121 度、20 分钟高温灭菌

每 1L 灭菌的 TY 液体营养液中加入 10ml 无菌的 1M 氯化钙水溶液即可。

若配制 TY 固体培养基，则加入 15g 琼脂粉。