LBA4404 农杆菌感受态细胞

LBA4404 Chemically Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

LBA4404	10×100μl
pCAMBIA2301（control vector）	10ng/ul；10ul

基 因 型

Ach5 (rif ^{R}) Ti pAL4404 (strep^{R}) Octopine

简 要 说 明

LBA4404 菌株为 Ach5 型背景，核基因中含有筛选标签——利福平抗性基因 rif，为了便于转化操作，此菌株携带一无自身转运功能的章鱼碱型 Ti 质粒 pAL4404，此质粒含有 vir 基因（vir 基因是 T-DNA 插入植物基因组必需的元件，pAL4404 质粒自身的 T-DNA 转移功能被破坏，但可以帮助转入的双元载体 T-DNA 顺利转移）。pAL4404 型 Ti 质粒含有筛选标签：strep，赋予 LBA4404 菌株链霉素抗性，适用于菸草、番茄、烟草等植物的转基因操作，经 pCAMBIA2301 质粒检测转化效率可达 10^4cfu/μg。

操 作 说 明

1. 取-80℃保存的农杆菌感受态于冰上待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每 100μl 感受态加 1ug（体积不大于 10ul）质粒 DNA，用手拨打管底混匀，依次于冰上静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37℃水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 加入 700μl 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基，于 28℃振荡培养 2~3 小时。
4. 6000rpm 离心一分钟收菌，留取 100μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的 LB 或 YEB 平板上，倒置放于 28℃培养箱培养 2-3 天（当平板只含有 50ug/ml kan 时，28℃培养 48h 即可；平板中同时加入 50ug/ml kan，20ug/ml rif 时，需 28℃培养 60h；如果使用的平板含有 50ug/ml rif 则需要 28℃培养 72-90h）。

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.混入质粒时应轻柔操作。

3.转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。

4.利福平浓度不应高于 25ug/ul，过高的利福平浓度不利于农杆菌生长，会降低其生长速度和转化效率。本公司感受态计算转化效率时所用平板只含有 50ug/ml kan，若所用平板含有 20ug/ml rif 则转化效率降低到 1/2。

5.培养基中加入利福平的目的是防止杂菌生长、筛选农杆菌；根据所用菌株抗性加入链霉素或庆大霉素可防止 Ti 质粒丢失，但链霉素不利于农杆菌的转基因操作，所以一般培养农杆菌时不考虑链霉素或庆大霉素，Ti 质粒丢失的概率极低（可以忽略）。

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，0.22um 滤膜过滤除菌	50mg/ml	50ug/ml
硫酸卡那霉素（kan）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	50mg/ml	50ug/ml
链霉素（strep）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	10mg/ml	50ug/ml
利福平（rif）	DMSO 溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	10mg/ml	20ug/ml
庆大霉素（gent）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	20mg/ml	40ug/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	R	R	S	S
EHA105	S	R	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	R	R	R	S

3.LB 及 YEB 配方：

component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10g	10g	Tryptone	5g	5g
Yeast extract	5g	5g	Yeast extract	1g	1g
NaCl	10g	10g	牛肉浸膏	5g	5g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5g	5g
Agar	—	15g	$MgSO_4*7H_2O$	0.49g	0.49g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15g