

AGL1 农杆菌电转感受态细胞

AGL1 Electroporation-Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

AGL1	10×50μl
pCAMBIA2301 (control vector)	10ng/ul; 10ul

基 因 型

C58 RecA (rif^R/carb^R) Ti pTiBo542DT-DNA (strep^R) Succinamopine

简 要 说 明

AGL1 菌株为 C58, RecA 型背景, 核基因中含有筛选标签——利福平抗性基因 rif 和羧苄青霉素抗性基因 carb, 为了便于转化操作, 此菌株携带一无自身转运功能的琥珀碱型 Ti 质粒 pTiBo542DT-DNA, 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, pTiBo542DT-DNA 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)。pTiBo542DT-DNA 型 Ti 质粒含有筛选标签 strep, 赋予 AGL1 菌株链霉素抗性, 适用于水稻、拟南芥、杨树等植物的转基因操作, 开发的 AGL1 电转感受态特别适用于大质粒的转化: 经 pCAMBIA2301 质粒(size:11633bp)检测转化效率可达 5×10^4 cfu/μg; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (size:40kd) 检测转化效率可达 5×10^3 cfu/μg。

操 作 说 明

- 0.2cm 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 0.5cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
- 取-80℃ 保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入 1-5ug 质粒 DNA (质粒体积不大于 6ul, 最好用试剂盒抽提, 双蒸水溶解), 用手拨打管底混匀, 立即插入冰中, 用 200ul 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。
- 启动电转仪, 设置参数: C=25uF, PC=200ohm, V=2400V (此参数为 Biorad 推荐, 使用者也可按所用电转仪推荐的 protocol 操作), 将电击杯快速放入电转槽中, 电击完成快速插入冰中, 加入 700ul 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中, 28℃振荡培养 2~3 小时。
- 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；质粒不纯或存在盐，乙醇等污染，转化效率急剧下降；若转化大质粒或想获得较高转化效率，推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。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 ₂ O	0.49g	0.49g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15g