

## K599 电击感受态细胞

### K599 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G27031

保存条件: -80℃

产品规格: 10×50μl 50×50μl

#### 产品介绍

基 因 型

**Agrobacterium rhizogenes (strR ) pRi2659 (agropine type)**

简 要 说 明

MLBio 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。K599 发根农杆菌（NCPB2659）含有 pRi2659 农杆菌型 Ri 质粒，具有广泛的宿主范围（葫芦科，豆科，茄科等），同时具有链霉素抗性。MLBio 生产的 K599 电转感受态细胞经特殊工艺制作，pCAMBIA2301 质粒（卡那霉素抗性）检测，转化效率 > 103 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 MLBio 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.混匀质粒时应用手指快速拨打管底或用枪吹吸混匀，务必使质粒快速、均匀分散开，与感受态细胞充分接触。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，应减少质粒用量或降低涂板的菌量。
- 4.K599 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 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解，0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml

链霉素 (strep)	双蒸水溶解, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 $\mu$ g/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 $\mu$ g/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。