

LBA4404 农杆菌电转感受态细胞

LBA4404 Electroporation-Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G2033

保存条件: -80℃

产品规格: 10×50μl 50×50μl

产品介绍

基 因 型

Ach5 (rif R) Ti pAL4404 (strepR) Octopine

简 要 说 明

MLBioLBA4404 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。
MLBio 开发的 **LBA4404** 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 104cfu/ μ g；经 **pCAMBIA2301-ZH** 质粒（size:40kd）检测转化效率可达 103cfu/ μ g。

操 作 说 明

1.0.2cm 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。

2.取-80℃保存的 **MLBio** 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。

3.启动电转仪，设置参数：**C=25uF**，**PC=200ohm**，**V=2400V**（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。

4.6000rpm 离心一分钟收菌，留取 100 μ l 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，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
- 3.利福平浓度不应高于 25 μ g/ml，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 50 μ g/ml kan，若所用平板同时含有 20 μ g/ml rif 则转化效率降低到 1/2。
- 4.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	原液浓度	工作浓度
羧苄青霉素 (carb)	双蒸水溶解，0.22 μ m 滤膜过滤除菌	50 mg/m	50 μ g/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解，0.22 μ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μ g/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解，0.22 μ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μ g/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解，0.22 μ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μ g/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解，0.22 μ m 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μ 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	R	R	S	S
EHA101	S	R	R	S	R
EHA105	S	R	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101S	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
-----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------

Yeast extract	5 g	5 g	Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	10 g	10 g	牛肉浸膏	5 g	5 g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5 g	5 g
Agar	—	15 g	MgSO ₄ *7H ₂ O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g