



LBA4404 电转感受态细胞

LBA4404 Electroporation Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC143D

目录编号	产品名称	包装单位
■ ZC143D	LBA4404 电转感受态细胞	20×50μl

备注: 以上包装均含有 Compcell Control Plasmid pCAMBIA2301M(10ng/μl)5μl (质量控制用)。

储存: -70°C 保存六个月。

产品介绍:

LBA4404 菌株为农杆菌 Ach5 型背景 (Hoekema et al., 1983), 核基因中含有利福平抗性基因 (Rif)。此菌株还携带一种自身转运功能丧失的质粒 (disarmed Ti plasmid), LBA4404 菌株含有章鱼碱型 Ti 质粒 pAL4404, 该质粒含有 vir 基因 (vir 基因是 TDNA 插入植物基因组所必需的元件, pAL4404 质粒自身的 T-DNA 转移功能被破坏, 但可辅助植物双元表达载体的 T-DNA 的转移)。pAL4404 质粒含有链霉素抗性 (Str), 赋予 LBA4404 菌株链霉素抗性。LBA4404 农杆菌适用于番茄、烟草等植物的转基因操作。LBA4404 电转感受态特别适用大质粒的转化, 经 pCAMBIA2301 质粒检测转化效率大于 10^5 cfu/μg DNA。

基因型为: Ach5 (Rif^R) Ti pAL4404 (Str^R), Octopine type

操作方法:

1. 电极间距为 0.1cm 的电转杯 (Gene Pulser[®]/MicroPulser[™] electroporation cuvettes) 插入碎冰中, 压实冰面, 冰中静置 5 分钟, 使电转杯充分降温。(电转杯重复使用方法: 每次用完后, 用大量的自来水冲洗干净去掉菌液和 DNA, 用蒸馏水洗 3 遍, 将其泡在 75% 乙醇中 30 分钟, 取出杯子, 沥干液体, 放在超净台中, 使乙醇充分挥发, 盖上盖子放干燥地方备用。)

2. 取 -70°C 保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入 10ng-1μg 质粒 DNA (洗脱或溶解质粒的溶液中离子不能太高, 可用双蒸水稀释。第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的最佳量), 用手拨搅管底混匀, 立即插入冰中, 在超净台中用无菌吸头将感受态 - 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, 设置电击参数: C=25μF, PC=200Ω, V=2.4KV (此参数为 BioRad 公司推荐, 依据不同电转仪设置针对农杆菌合适的电击参数)。用纸巾擦掉电转杯外部的水分, 将电转杯快速放入电转槽中进行电击步骤。电击完成后, 将电转杯快速插入冰中, 加入 700μl 无抗生素的 LB 并转移到原来保留的感受态空管中, 28°C, 150-200rpm, 振荡培养 2-3 小时。

4. 6000rpm 离心一分钟收菌, 留取 200μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块, 取 100μl 的菌液涂布于含相应抗生素的 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28°C 培养箱培养 2-3 天 (当平板只含有 50μg/ml Kan 时, 28°C 培养 48 小时即可; 平板中同时加入 50μg/ml Kan, 20μg/ml Rif 时, 需 28°C 培养 60 小时; 如果使用的平板含有 50μg/ml Rif 则需要 28°C 培养 72-90 小时)。



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. 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。
4. 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, 若所用平板含有 20 μ g/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 Ti 质粒筛选抗生素可防止 Ti 质粒丢失, 但 Ti 质粒筛选抗生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这些抗生素, Ti 质粒丢失的概率极低 (可以忽略)。

ZOMANBIO