

LBA4404 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: AE1030)

LBA4404 Electroporation- Competent Cell	50 μ l /支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (12个月)

● 基因型

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

● 产品说明

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动能的章鱼碱型 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。唯地生物开发的 LBA4404 电感受态特别适用于大质粒的转化: 经 pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, Kan^R) 检测转化效率 >10⁵ cfu/ μ g DNA; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40kb, Kan^R) 检测转化效率 >5 \times 10³ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

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 $^{\circ}$ C 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 μ g 质粒 DNA (体积不大于 6 μ l, 感受态转化效率较高, 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 μ l 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 μ F, PC=200 ohm, V=2400 V (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 700 μ l 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 2~3 小时。
4. 6000 rpm 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 $^{\circ}$ C 培养箱培养 2-3 天
(当平板只含有 50 μ g/ml kan 时, 28 $^{\circ}$ C 培养 48 h 即可; 平板中同时加入 50 μ g/ml kan, 20 μ g/ml rif 时, 需 28 $^{\circ}$ C 培养 60 h; 如果使用的平板含有 50 μ g/ml rif 则需要 28 $^{\circ}$ C 培养 72-90 h)。

● 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)(唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素(kan)(唯地 CAT#YC9020)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
壮观霉素(spec)(唯地 CAT#: YC9070)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	75 μg/ml
链霉素(strep)(唯地 CAT#: YC9060)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
利福平(rif)(唯地 CAT#: YC9080)	DMSO 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	60 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素(gent)(唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	40 μg/ml
氯霉素 (cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	68 ug/ml

● 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

● LB (唯地 CAT#: CM1010) 及 YEB (唯地 CAT#: CM2010) 配方：

Component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10 g	10 g	Tryptone	5 g	5 g
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

● 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 μg/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 LBA4404 感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 μg/ml kan，若所用平板含有 20 μg/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。