

### LBA4404(pSoup-p19) Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: AC1033)

LBA4404(pSoup-p19) Competent Cell	100μl /支
pGs2 (control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

#### ● 基因型

Ach5 (rif<sup>R</sup>) Ti pAL4404 (strep<sup>R</sup>) Octopine(pSoup-p19-tet<sup>R</sup>)

#### ● 产品说明

P19 蛋白来源于番茄丛矮病毒,可抑制宿主对外源基因的 RNA 沉默效应,提高异源基因转录本的稳定性,进而促进异源蛋白的表达,广泛应用于转基因植物及烟草叶片,拟南芥叶片,番茄叶片或原生质体的瞬时表达系统中。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(pSoup-p19)菌株链霉素抗性。在 LBA4404 菌株中转入 help 质粒: pSoup-p19 即为 LBA4404(pSoup-p19)菌株,可帮助 pGreen, 62SK, pGs2 系列质粒在农杆菌中复制,同时赋予该菌株四环素 (tet) 抗性,适用于菸草、番茄、烟草等植物的转基因操作。本公司生产的 LBA4404(pSoup-p19)化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pGs2 质粒 (4445bp, Kan<sup>R</sup>) 检测转化效率 >10<sup>4</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 常规操作方法

1. 取 -80°C 保存的农杆菌感受态于室温或手心片刻待其部分融化,处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每 100 μl 感受态加入 0.01-1 μg 质粒 DNA (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,依次于冰上静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37°C 水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 加入 700 μl 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基,于 28°C 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 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 50 μg/ml kan 时,28°C 培养 48 h 即可;平板中同时加入 50 μg/ml kan, 20 μg/ml rif 时,需 28°C 培养 60 h;如果使用的平板含有 50 μg/ml rif 则需要 28°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 <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> 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. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，本公司生产的 LBA4404(pSoup-p19)化学转化感受态细胞具有四环素抗性，但在转入目标质粒涂板筛选阳性克隆时，只需加入目标质粒抗性的抗生素，不加四环素。
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。
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)。