



AGL1农杆菌电感受态细胞

产品组成:

组成	BC306-01
AGL1 Electrocompetent cells	20×50μl
pCAMBIA2301 (10ng/μl)	1 支

储存条件: -70℃保存，避免反复冻融。

基因型: *C58RecA (Rif^R/Carb^R) TipTiBo542DT-DNA(Str^R),Succinamopine type*

产品说明:

AGL1菌株为农杆菌C58, RecA型背景(Lazoet al.,1991),核基因中含有利福平抗性基因(Rif)和羧苄青霉素抗性基因(Carb)。此菌株还携带一种自身转运功能丧失的质粒(disarmed Ti plasmid), AGL1菌株含有琥珀碱型Ti质粒pAGL0(pTiBo542DT-DNA),该质粒含有vir基因(vir基因是T-DNA插入植物基因组所必需的元件,pAGL0(pTiBo542DT-DNA)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)。pAGL0(pTiBo542DT-DNA)质粒还含有Str抗性基因,赋予AGL1菌株链霉素抗性。AGL1农杆菌适用于水稻、拟南芥、杨树等植物的转基因操作。AGL1电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10⁵ cfu/μg DNA。

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℃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**),用手拨打管底混匀,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=200ohm,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℃,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℃培养箱培养2-3天(当平板只含有50μg/ml Kan时,28℃培养48小时)

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小时；如果使用的平板含有50 μ g/ml Rif则需要28 $^{\circ}$ C培养72-90小时）。

注意事项：

1. 混入质粒时应轻柔操作，加入质粒的体积不大于感受态体积的1/10，质粒不纯或超大质粒会导致转化效率急剧下降。
2. 平板上菌落过多时，菌落很小。为了获得大的菌落，应减少质粒用量或减少涂布量，或将菌落转移到新平板上生长。
3. 利福平使用的工作浓度浓度不应高于25 μ g/ml，过高的利福平浓度会降低生长速度和转化效率。
4. 利福平具有防止杂菌生长筛选农杆菌的作用；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可不考虑添加链霉素或庆大霉素，Ti质粒丢失的概率极低（可忽略）。

Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *A. tumefaciens* genomic library in *Agrobacterium*. *BioTechnology* 9:963-967

BM230130