

LBA4404(pSoup)农杆菌感受态细胞

产品信息:

组成	BC311-01
LBA4404(pSoup) Chemically Competent Cell	20×100μl
pGs2 (100ng/μl)	1 支

储存条件: -70°C保存, 避免反复冻融。不适合在液氮中保存。

基因型: *Ach5 (rif^R) Ti pAL4404 (strep^R) Octopine pSoup(tet^R)*

产品介绍:

农杆菌LBA4404菌株为Ach5型背景, 核基因中含有利福平抗性筛选基因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质粒含有筛选标签基因strep, 赋予LBA4404菌株链霉素抗性。一些缺失农杆菌复制相关元件(如pVS1的复制起点REP区或pVS1质粒的STA区)的表达质粒如pGreen、pGreenII-62SK和pGs2等不能在LBA4404菌株中繁殖。辅助质粒pSoup可以帮助这些不完整双元表达质粒在农杆菌中的复制并使LBA4404(pSoup)菌株具有四环素(Tet)抗性。适用于番茄和烟草等植物的转基因操作。LBA4404 (pSoup)农杆菌感受态细胞经特殊工艺制备, 经pGs2质粒检测, 转化效率可达10³cfu/μg, -70°C保存12个月转化效率不发生改变。

转化方法: (采用冻融方法)

1. 取-70°C保存的LBA4404 (pSoup)农杆菌感受态细胞于冰水浴中融化;
2. 无菌条件下, 向感受态细胞中加入100ng-1μg质粒DNA (第一次使用, 最好做一下预实验, 确定所加质粒的最佳量), 轻轻混匀, 冰水浴中静置5 分钟;
3. 将离心管置于液氮中速冻5分钟; (注: 可用干冰和无水乙醇混合物代替液氮)
4. 然后快速将离心管置于37°C水浴中保持5分钟, 不要晃动水面;
5. 将离心管放回冰水浴中, 冰浴5分钟;
6. 无菌条件下加入800μl无抗生素的2xYT、SOB、SOC或LB液体培养基, 于28°C振荡培养2-3小时, 菌体复苏;
7. 6000rpm离心1分钟收菌, 留100μl左右上清, 轻轻吹打重悬菌体, 取适量菌液, 涂布于相应抗生素的LB平板上, 于28°C培养箱中倒置培养48-72小时。(实验表明当平板只含有50μg/ml的Kan时, 28°C培养48 h即可看到菌落; 平板中含有50 μg/ml Kan和20 μg/ml Rif 时, 需28°C培养60 h可看到菌落; 如果平板中含有50 μg/ml Kan和50 μg/ml Rif时则需要28°C培养72-90 h可看到菌落)。

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。
5. 培养基中加入利福平的目的是防止杂菌生长和筛选农杆菌; 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)。
6. 相关抗生素配制及工作浓度:
利福平(Rif)用DMSO配制成20mg/ml的储存液, 工作浓度为20μg/ml。盐酸四环素(Tet)用甲醇溶解成10mg/ml的储存液, 工作浓度为10μg/ml。硫酸卡那霉素(Kan)、硫酸链霉素(Strep)、硫酸庆大霉素(Gent)和羧苄青霉素钠盐(Carb)分别用双蒸水配制成浓度为50mg/ml, 50mg/ml、40mg/ml和50mg/ml的储存液, 并用0.22μg滤器过滤除菌。工作浓度分别为Kan:50μg/ml, Strep:50μg/ml, Gent:40μg/ml和Carb:50μg/ml。

BM190911