



# AGL1 农杆菌电转感受态细胞

## 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<sup>R</sup>/Carb<sup>R</sup>) TipTiBo542DT-DNA(Str<sup>R</sup>), 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TDNA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,但可辅助植物二元表达载体的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<sup>5</sup> 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,可用双蒸水溶解或稀释),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=2KV/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. 6000 rpm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。



建议: (1) 利福平不利于农杆菌生长, 会降低其生长速度和转化效率, 仅使用质粒抗性即可。

例如对于 Kan 抗性质粒, 使用 Kan(50  $\mu\text{g/ml}$ ) 平板, 28°C培养48 h 即可;

(2) 摇菌时可加入Rif, 工作浓度建议不超过25  $\mu\text{g/ml}$ 。

#### 注意事项:

1. 混入质粒时应轻柔操作, 加入质粒的体积不应大于感受态体积的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. 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)。

20241011