



K599 农杆菌化学感受态细胞

产品信息:

组成	BC321-01
K599 化学感受态细胞	10×100μl
pCAMBIA2301 (100ng/μl)	10μl

储存条件: -70℃保存, 避免反复冻融。

基因型: *Agrobacterium rhizogenes* (*str^R*) pRi2659 (agropine type)

产品介绍:

发根农杆菌属于根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(*agrobacterium*), 是一种土壤传播的革兰氏阴性细菌, 可以感染大多数双子叶植物、少数单子叶植物和一些裸子植物。K599 农杆菌最初是从表现出毛状根病症症状的黄瓜中分离出来的, 已被广泛用于毛状根转化[1]。K599 发根农杆菌 (NCPPB2659) 含有 pRi2659 农杆菌碱型 (agropine-type) Ri 质粒 (Root inducing plasmid, Genbank 登录号 EU186381), 具有广泛的宿主范围 (葫芦科, 豆科, 茄科等), 同时具有链霉素抗性。K599 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, 经植物二元 pCAMBIA2301 质粒 (卡那霉素抗性) 检测, 转化效率可达 $10^3 \text{cfu}/\mu\text{g}$, 正确保存 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℃保存的 K599 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 100 ng-1 μg 质粒 DNA (第一次使用, 可以进行预实验, 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: 也可以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℃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 800 μl 无抗生素的 2xYT 或 LB 液体培养基, 于 28℃振荡培养 2~3 小时, 菌体复苏;
7. 6000 rpm 离心 1 分钟收菌, 留 100 μl 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℃培养箱中倒置培养 48-72 小时。

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. 根据所用菌株抗性加入 Ri 型质粒筛选抗生素可防止 Ri 型质粒丢失, 但 Ri 型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, Ri 型质粒丢失的概率极低(可以忽略)。
3. K599 菌株最好使用 TY 培养基, 若使用 LB 培养基, 在抗生素筛选时平板底部容易产生一层菌膜。
4. K599 菌株对壮观霉素不敏感, 若转化壮观霉素抗性的质粒, 必须使用 TY 培养基, 同时壮观霉素使用浓度为 100-150μg/ml, 壮观霉素浓度低于 100μg/ml 时, 会产生糊板现象, 很难长出阳性菌落; 壮观霉素浓度为 100-150μg/ml 时, 会长出正常的阳性菌落, 此时平板底部可能会有一薄层菌膜, 这是正常现象, 不影响试验, 挑菌时挑阳性菌落即可。

参考文献:

1. Combard, A.; Brevet, J.; Borowski, D.; Cam, K.; Tempé, J. Physical map of the T-DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* strain NCPPB2659. Plasmid 1987, 18, 70 - 75.