AGL1 农杆菌感受态细胞

产品信息：

组成	BC302-01
AGL1 Chemically Competent Cell	20×100μl
pCAMBIA2301（1ug/μl）	1 支

储存条件：-70℃保存，避免反复冻融。

基因型：

C58RecA (rif^R/carb^R) Ti pTiBo542DT-DNA (strep^R) Succinamopine

产品介绍：

AGL1 菌株为 C58, RecA 型背景，核基因中含有筛选标签——利福平抗性基因 Rif 和羧苄青霉素抗性基因 carb，为了便于转化操作，此菌株携带一无自身转运功能的琥珀碱型 Ti 质粒 pTiBo542DT-DNA，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， pTiBo542DT-DNA 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）。pTiBo542DT-DNA 型 Ti 质粒含有筛选标签：Strep，赋予 AGL1 菌株链霉素抗性，适用于水稻、拟南芥、杨树等植物的转基因操作，经植物双元 pCAMBIA2301 表达质粒检测，转化效率可达 10^3 cfu/μg，-70℃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 AGL1 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（第一次使用前最好做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 800μl 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. 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℃培养箱中倒置培养 48-72 小时。

（当平板只含有 50 μg/ml Kan 时，28℃培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μg/ml Kan，20 μg/ml Rif 时，需 28℃培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μg/ml Rif 则需要 28℃培养 72-90 h）。

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、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)。

20180305