



LBA4404 农杆菌电转感受态细胞

产品组成:

| 组成 | BC305-01 |
|--------------------------------|----------|
| LBA4404 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: *Ach5 (Rif^R) Ti pAL4404 (Str^R), Octopine type*

产品说明:

LBA4404菌株为农杆菌Ach5型背景(Hoekema et al., 1983)，核基因中含有利福平抗性基因(Rif)。此菌株还携带一种自身转运功能丧失的质粒(disarmed Ti plasmid)，LBA4404菌株含有章鱼碱型Ti质粒pAL4404，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，pAL4404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）。pAL4404质粒含有链霉素抗性(Str)，赋予LBA4404菌株链霉素抗性。LBA4404农杆菌适用于番茄、烟草等植物的转基因操作。LBA4404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. 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（当平板只含有50 μg/ml kan 时，28℃培养48小时即可；平板中同时加入50 μg/mlKan，20μg/mlRif时，需28℃培养60小时；如果使用的平板含有50μg/mlRif

则需要28°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. 利福平使用的工作浓度浓度不应高于25 µg/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）。

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) Binary vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180

BM230130