



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℃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REPE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。适用于菸草、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℃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℃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℃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。（实验表明当平板只含有50μg/ml的Kan时，28℃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℃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℃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配制成为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为浓度为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