

农杆菌感受态制备试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0303	农杆菌感受态制备试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天生产的农杆菌感受态制备试剂盒(Agrobacterium Competent Cells Preparation Kit), 是一种专门用于农杆菌感受态快速制备的试剂盒。农杆菌经过本试剂盒处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 成为能允许外源DNA分子进入的感受态细胞。
- 农杆菌常生活在植物根表面, 依靠由根组织渗透出来的营养物质生存, 是一类广泛存在于土壤中的革兰氏阴性细菌, 常用于基因过表达、敲除、敲减和编辑等转基因植物的构建。根瘤农杆菌Ti质粒上的T-DNA上有8个左右的基因在植物细胞内表达, 指导合成一种特殊化合物冠瘿碱, 引起转化细胞癌变;而发根农杆菌的Ri质粒同样含有T-DNA,可诱导产生发状根, 其特征是大量增生高度分支的根系。
- 本试剂盒适用于绝大多数常见的农杆菌, 如GV3101、EHA101、LBA4404和EHA105等根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或C58C1和Ar.1193等发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感受态细胞的制备。使用本试剂盒可以使感受态转化效率达到 10^3 - 10^4 cfu/ μ g质粒。但是不同种类农杆菌菌种制备出来的感受态细胞, 转化效率可能有较大差异。此外, 对于较小的质粒转化效率会略高, 而对于较大的质粒则转化效率会略低一些。
- 本试剂盒操作简单, 细菌培养后仅需1个小时左右即可完成感受态细胞的制备。
- 本试剂盒提供了专门用于制备农杆菌感受态的培养液, 使感受态的制备更加便捷。
- 使用碧云天生产的农杆菌感受态制备试剂盒制备的农杆菌感受态转化效果参考图1。

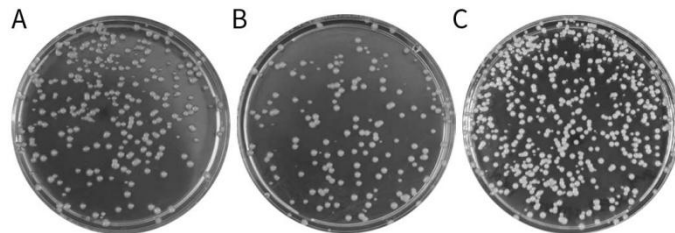


图 1. 使用碧云天农杆菌感受态制备试剂盒制备的农杆菌感受态转化效果图。使用本试剂盒制备的感受态在液氮中速冻后保存在-80°C。取-80°C 保存的农杆菌感受态放置于室温片刻, 待其部分融化, 处于冰水混合状态时插入冰浴中。每 100 μ l 感受态细胞加入 0.1 μ g 质粒 DNA, 用手拨打管底混匀, 依次于冰上静置 15min、液氮 1-3min、37°C 水浴 3-5min。然后在超净台中加入 500 μ l 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基, 28°C 振荡培养 2h。4000 \times g 离心 1min 收菌, 留取 100 μ l 左右上清轻轻吹打重悬农杆菌沉淀, 涂布于含相应抗生素的 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28-30°C 培养箱培养 2-3 天。GV3101 转化效果见图 1A(转化效率约为 3×10^3 CFU/ μ g 质粒), LBA4404 转化效果见图 1B(转化效率约为 1.5×10^3 CFU/ μ g 质粒), EHA101 转化效果见图 1C(1×10^4 CFU/ μ g 质粒)。本产品的实际使用效果会因具体实验条件、实验材料等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒可以分多次使用, 共可以制备足够进行100次转化的感受态细胞。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0303-1	农杆菌感受态细胞培养液	250ml
D0303-2	农杆菌感受态制备试剂A	50ml
D0303-3	农杆菌感受态制备试剂B	5ml
D0303-4	利福平(34mg/ml)	300 μ l
—	说明书	1 份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。利福平须避光保存。

注意事项:

- 本试剂盒中提供的利福平溶液如果出现沉淀, 属于正常现象, 可以在充分溶解后使用。

- 感受态制备的过程中须注意无菌操作，避免其它微生物的污染。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 平板划线：

为取得最佳的感受态效率，必须先把农杆菌甘油菌或其它形式保存的菌种划线到含有相应抗生素的LB或YEB平板，28-30°C培养2-3天。

2. 接种：

取一有新鲜培养的农杆菌菌种的LB或YEB平板。把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下，并在酒精灯上稍微烧一下，使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签，从平板上挑取一个单克隆，然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签放到装有5毫升含有相应抗生素的LB或YEB液体培养基的试管内。上述操作也可以使用接种环等进行操作。

3. 培养：

在摇床上 28-30°C约200rpm培养过夜，通常培养时间控制在16-18h之间。

4. 再接种培养：

对于根瘤农杆菌和具有利福平抗性的发根农杆菌(如C58C1和Ar.1193等)，使用试剂盒中提供的利福平(34mg/ml)，按照1:1000的比例加入到农杆菌感受态细胞培养液中。根据需要制备的农杆菌感受态细菌的量，按照1:50的比例用新鲜培养的过夜菌接种培养。例如取1ml的新鲜过夜菌到50ml本试剂盒提供的农杆菌感受态细菌培养液中，置于摇床上28-30°C，200rpm培养约5-6h后，OD600达到0.4-0.6。注：培养液中须含有34μg/ml的利福平，同时可根据不同类型农杆菌Ti或Ri质粒抗性再添加一种抗生素。对于不具有利福平抗性的发根农杆菌，则需根据各菌株对应的抗性，使用相应抗生素进行培养。

注1：常用根瘤农杆菌抗性请参见下表。R，抵抗；S，敏感。

农杆菌菌株	羧苄青霉素(carb)	链霉素(strep)	利福平(rif)	庆大霉素(gent)	硫酸卡那霉素(kan)
GV3101	S	S	R	R	S
LBA4404	S	R	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
AGL-1	R	S	R	S	S

注2：常用发根农杆菌抗性请参见下表。R，抵抗；S，敏感。

农杆菌菌株	羧苄青霉素(carb)	链霉素(strep)	利福平(rif)	氯霉素(cam)	硫酸卡那霉素(kan)
Ar.A4	S	S	S	S	R
MSU440	S	R	S	S	S
Ar.Qual	S	R	S	R	S
C58C1	S	R	R	S	S
ATCC15834	S	S	S	S	S
K599	S	R	S	S	S
Ar.1193	R	R	R	S	S

5. 制备农杆菌感受态细胞：

- 将培养好的菌液倒入50ml离心管中，冰浴放置15min。注意：后续所有操作均在4°C或冰浴中进行。
- 4°C，3000×g离心5min收集菌体，弃去上清。注意：离心机必须提前冷却至4°C。如果离心前的菌量为50ml，直接按后续操作进行，如果是其它体积则按比例换算后进行后续操作。
- 加入10ml冰上预冷的农杆菌感受态制备试剂A轻轻重悬离心后的菌体，冰浴放置30min。
- 4°C，3000×g离心5min，再次收集菌体。
- 使用预冷的1ml的农杆菌感受态制备试剂B轻轻重悬离心后的菌体，冰浴放置20min。
- 在冰浴条件下将重悬后的感受态快速分装在1.5ml离心管中，可以根据需要适当分装成50-200μl/管。
- 液氮速冻至少3min后取出，保存在-80°C，通常6个月内感受态效率不会有明显变化。

6. 感受态细胞的转化：

- 取-80°C保存的农杆菌感受态放置于室温片刻，待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰浴中。
- 每50μl感受态加入0.1-1μg质粒DNA(第一次使用前最好做预实验确定所加质粒的量)，用手拨打管底混匀。
- 冰上静置15-20min。
- 放于液氮中速冻1-3min，立即放入37°C中水浴5min。
- 加入500-700μl无抗生素的LB或YEB液体培养基，28-30°C振荡培养2-4h。
- 4000×g离心1min收菌，留取100μl左右上清轻轻吹打重悬农杆菌沉淀，涂布于含相应抗生素的LB或YEB平板上，倒置放于28°C培养箱培养2-3d。

g. 后续可以挑取菌落进行PCR鉴定等。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0332	2-T1甘油菌	200μl
D0337	BL21(DE3)甘油菌(蛋白诱导表达菌株)	200μl
D0339	BL21(DE3)pLysS甘油菌(低本底蛋白诱导表达用)	200μl
D0346	DH10Bac甘油菌(重组Bacmid制备用菌株)	200μl
D0351	DH5α甘油菌	200μl
D0360	JM109甘油菌	200μl
D0361	JM110甘油菌(Dam和Dcm甲基化缺陷菌株)	200μl
D0371	Rosetta(DE3)甘油菌(密码子兼容的蛋白诱导表达)	200μl
D0378	Stbl3甘油菌(慢病毒等逆转录病毒载体扩增用)	200μl
D0389	TG1甘油菌	200μl
D0390	TOP10甘油菌	200μl
D0391	细菌冻存液	50ml
D0301	一步法感受态细菌制备试剂盒	200次
D0302	超级感受态细菌制备试剂盒	100次
D0303	农杆菌感受态制备试剂盒	100次
D0392	GV3101根瘤农杆菌甘油菌(转基因植物构建用)	200μl
D0393	LBA4404根瘤农杆菌甘油菌(转基因植物构建用)	200μl
D0394	EHA101根瘤农杆菌甘油菌(转基因植物构建用)	200μl

Version 2021.01.21