

ATCC15834 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

- 产品规格 (CAT#: AE1100)

ATCC15834 Electroporation- Competent Cell	50μl/支
pCAMBIA2301 (control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

- 基因型

Agrobacterium rhizogenes pRi15834 (agropine type)

- 产品说明

发根农杆菌是根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(agrobacterium)的一种革兰氏阴性土壤细菌,它能够感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物以及个别裸子植物。ATCC15834 发根农杆菌菌株来源于 ATCC (美国模式培养物集存库/American type culture collection), 为发根农杆菌原始菌株 (wild strain), 含有 pRi15834 农杆菌型 Ri 质粒, 具有广泛的宿主范围 (禾本科, 豆科, 烟草等), 特别适合对紫杉醇, 青蒿等药用植物毛状根的诱导。唯地生物开发的 ATCC15834 电转感受态细胞经特殊工艺制作, 特别适用于大质粒的转化: 经 pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, KanR) 检测转化效率 >10⁵ cfu/μg DNA; 经 pCAMBIA2301-ZH 质粒 (40kb, KanR) 检测转化效率 >5 × 10³ cfu/μg DNA。

- 常规操作方法

1. 0.1 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟, 待其沥干水分, 正置 5 分钟, 使乙醇充分挥发, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电极杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
2. 取 -80°C 保存的农杆菌感受态插入冰中 5 分钟, 待其融化, 加入 0.01-1 μg 质粒 DNA (体积不大于 6ul, 最好用试剂盒抽提, 双蒸水溶解; 转化效率较高, 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, 立即插入冰中, 用 200 μl 枪头将感受态-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, 设置参数: C=25 μF, PC=200 ohm, V=2400 V (此参数为 Biorad 推荐, 使用者也可按所用电转仪推荐的 protocol 操作), 将电击杯从冰中拿出, 吸水纸吸干外表面水份, 快速放入电转槽中, 启动电击, 电击完成快速插入冰中, 加入 1 ml 无抗生素的 TY, 并转移到感受态空管中, 28°C 振荡培养 2~3 小时。
4. 6000 rpm 离心一分钟收菌, 留取 100 μl 左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的平板上, 倒置放于 28°C 培养箱培养 72 小时

● ATCC15834 菌株质粒转化相关抗生素使用浓度：

抗生素	配方	筛选培养基	原液	工作液
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	YMB 或 TY	100 mg/ml	130 μg/ml
壮观霉素 (spec)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	TY	50 mg/ml	70 μg/ml

● 常用发根农杆菌抗性：(R：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
ATCC15834	S	S	S	S	S
MSU440	S	R	S	S	S
Ar.Qual	S	R	S	R	S

● YMB 配方 (1L)：

Yeast extract	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.5g
NaCl	0.1g
甘露醇	10g

补水到 1L 体积，完全溶解后，调 PH 值到 7.0，121 度、20 分钟高温灭菌

若配制 YMB 固体培养基，则加入 15g 琼脂粉。

● TY 配方 (1L) (唯地 CAT#: CM2210)：

Tryptone	5g
Yeast extract	3g

补水到 1L 体积，完全溶解后，121 度、20 分钟高温灭菌

配制 1M 的氯化钙水溶液，121 度、20 分钟高温灭菌

每 1L 灭菌的 TY 液体营养液中加入 10ml 无菌的 1M 氯化钙水溶液即可。

若配制 TY 固体培养基，则加入 15g 琼脂粉。

● 注意事项

1. ATCC15834 生长缓慢，转化质粒的 ATCC15834 菌涂布在含抗生素的平板上应生长 72 小时。
2. 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。
3. 电转感受态细胞中不可混入气泡，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 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，应减少质粒用量或最终用于涂板的菌量。