

K599 Chemically Competent Cell 产品说明书

- 产品规格 (CAT#: AC1080)

K599 Competent Cell	100 μ l/支
pCAMBIA2301(control vector, 10ng/ μ l)	10 μ l
保存条件 (保质期):	-80 $^{\circ}$ C (12 个月)

- 基因型

Agrobacterium rhizogenes (str^R) pRi2659 (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。K599 发根农杆菌 (NCPPB2659) 含有 pRi2659 农杆菌型 Ri 质粒, 具有广泛的宿主范围 (葫芦科, 豆科, 茄科等), 同时具有链霉素抗性。本公司生产的 K599 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pCAMBIA2301 质粒 (12739bp, Kan^R) 检测转化效率 $>10^3$ cfu/ μ g DNA。

- 常规操作方法

1. 取-80 $^{\circ}$ C保存的 K599 发根农杆菌感受态于室温或手心片刻待其部分融化, 处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每 100 μ l 感受态加入 0.01-1 μ g 质粒 DNA (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), 用手快速、剧烈拨打管底混匀或用枪吹吸混匀, 依次放于冰中静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37 $^{\circ}$ C水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 冰浴中拿出放室温, 加入 700 μ l 无抗生素的 TY 液体培养基, 于 28 $^{\circ}$ C振荡培养 2 小时。
4. 6000 rpm 离心一分钟收菌, 留取 100 μ l 左右上清轻轻吹打重悬菌块涂布于含相应抗生素的 TY 平板上, 倒置放于 28 $^{\circ}$ C培养箱培养 2-3 天

- 注意

1. K599 菌株最好使用 TY 培养基, 若使用 LB 培养基, 在抗生素筛选时平板底部容易产生一层菌膜。
2. K599 菌株对壮观霉素不敏感, 若转化壮观霉素抗性的质粒, 必须使用 TY 培养基, 同时壮观霉素使用浓度为 100-150 μ g/ml, 壮观霉素浓度低于 100 μ g/ml 时, 会产生糊板现象, 很难长出阳性菌落; 壮观霉素浓度为 100-150 μ g/ml 时, 会长出正常的阳性菌落, 此时平板底部可能会有一薄层菌膜, 这是正常现象, 不影响试验, 挑菌时挑阳性菌落即可。

● K599 相关抗生素配方及工作浓度

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素(carb)(唯地 CAT#: YC9040)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素(kan)(唯地 CAT#YC9020)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
壮观霉素(spec)(唯地 CAT#: YC9070)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	100 μg/ml
链霉素(strep)(唯地 CAT#: YC9060)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	50 μg/ml
利福平(rif)(唯地 CAT#: YC9080)	DMSO 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	60 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素(gent)(唯地 CAT#: YC9090)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	40 μg/ml
氯霉素 (cam) (唯地 CAT#: YC9030)	无水乙醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	100 mg/ml	68 ug/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
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

● 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. 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. 混匀质粒时应用手指快速拨打管底或用枪吹吸混匀, 务必使质粒快速、均匀分散开, 与感受态细胞充分接触。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, 应减少质粒用量或降低涂板的菌量。
4. K599 具有链霉素抗性, 不可用于具有链霉素抗性质粒的转化。