

### K599(pSoup) Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: AC1082)

K599(pSoup) Competent Cell	100μl/支
pGs2(control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

#### ● 基因型

*Agrobacterium rhizogenes* (str<sup>R</sup>) pRi2659 (agropine type)(pSoup-tet<sup>R</sup>)

#### ● 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 (NCPB2659) 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。在 K599 菌株中转入 *help* 质粒: pSoup 即为 K599(pSoup) 菌株,可帮助 pGreen, 62SK, pGs2 系列质粒在农杆菌中复制,同时赋予该菌株四环素 (tet) 抗性。本公司生产的 K599(pSoup)化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pGs2 质粒 (4445bp, Kan<sup>R</sup>) 检测转化效率>10<sup>4</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 常规操作方法

- 1.取-80°C保存的 K599(pSoup)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 μl 感受态加入 0.01-1 μg 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°C水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 冰浴中拿出放室温,加入 700 μl 无抗生素的 TY 液体培养基,于 28°C振荡培养 2 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 TY 平板上,倒置放于 28°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 100-150ug/ml,壮观霉素浓度低于 100ug/ml 时,会产生糊板现象,很难长出阳性菌落;壮观霉素浓度为 100-150ug/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(pSoup)具有链霉素、四环素抗性，不可用于具有链霉素、四环素抗性质粒的转化。

● 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(pSoup)具有链霉素、四环素抗性，不可用于具有链霉素、四环素抗性质粒的转化。