

K599 Electroporation-Competent Cell 产品说明书

- 产品规格 (CAT#: AE1080)

K599 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 (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。唯地生物开发的 K599 电转感受态经特殊工艺制作,特别适用于大质粒的转化:经 pCAMBIA2301 质粒(12739bp, KanR)检测转化效率 $>10^5$ cfu/μg DNA;经 pCAMBIA2301-ZH 质粒(40kb, KanR)检测转化效率 $>5 \times 10^3$ 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 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 相关抗生素配方及使用浓度

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. 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。
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, 应减少质粒用量或最终用于涂板的菌量。
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。