

农杆菌感受态制作试剂盒说明书

- 产品规格 (CAT#: ACK1010S, 100T; ACK1010M, 500T; ACK1010L, 1000T)

- 产品组分:

包装名称	ACK1010S	ACK1010M	ACK1010L	包装数量	保存条件/时间
W1 Buffer	20ml	100ml	200ml	1 瓶	4°C/24 个月
ST Buffer	12ml	60ml	120ml	1 瓶	4°C/24 个月

- 产品说明

农杆菌感受态制作试剂盒提供了制作农杆菌感受态的两种试剂: W1 Buffer (已过滤除菌)、ST Buffer (已过滤除菌); 客户需要准备 YEB/TY 营养液和农杆菌菌种平板。本试剂盒适用于 GV3101、EHA105、LBA4404、K599、Ar A4 等几乎所有根癌农杆菌和发根农杆菌感受态的制作。使用唯地生物的农杆菌感受态制作试剂盒制作的农杆菌感受态细胞, 可在 -80 度保存 1-2 年; 用 pCambia2301 质粒检测转化效率可达 10^4 - 10^6 cfu/ μ g DNA。

- 操作方法

一, 感受态制作方法

每 4ml 农杆菌菌液制作 1 支感受态, 对应 0.2ml W1 Buffer, 0.1ml ST Buffer。

制作感受态前将 W1 Buffer, ST Buffer 埋入冰中预冷至少 15 分钟, 离心机提前调到 4°C 预冷; 准备好液氮。

1. 农杆菌菌种在 YEB/TY 平板上划线, 挑新鲜的单菌落接种到 3ml YEB/TY (用 50ml 离心管) 中 30 度, 250rpm 摇菌 24h 左右, 直到菌液变浓(OD600 值>2.0), 取 2ml 菌液接种到 200ml YEB/TY (用 1000ml 三角瓶) 中, 250rpm 摇菌到 OD600 约 0.6-0.8, 菌液放冰水中冰浴 10-15 分钟。

2. 4°C、3000g、5min 离心收集菌体, 弃上清, 加入 10 ml 预冷的 W1 Buffer, 吸打, 重悬农杆菌细胞, 冰浴 10 分钟。

3. 4°C、3000g、5min 离心收集菌体, 弃上清, 加入 5 ml 预冷的 ST Buffer, 吸打, 重悬农杆菌细胞, 冰浴 10 分钟, 按每支感受态 0.1ml 分装, 立即丢入液氮中速冻, 液氮中放置 1-10 分钟后取出放 -80 度冰箱, 可长期保存。

二, 感受态转化方法

1. 取 -80°C 保存的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), 用手拨打管底混匀, 依次于冰上静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37°C 水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。

3. 加入 700 μ l 无抗生素的 LB 或 YEB/TY 液体培养基, 于 28°C 振荡培养 2~3 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 LB 或 YEB 平板上, 倒置放于 28°C 培养箱培养 2-3 天

- 注意事项

1. 制作不同数量的感受态, 按比例使用各种试剂。
2. 不开封的试剂盒各组分可保存两年, 开封后若发现染菌, 停止使用。