

AGL1 电转化感受态使用说明

◇ 产品简介

本品为根癌农杆菌 AGL1（基因型：C58 RecA (rif^R/carb^R) Ti pTiBo542DT-DNA Succinamopine）制作的电击感受态细胞。AGL1 菌株为 C58 RecA 型背景，核基因中含有筛选标签—利福平抗性基因 rif 和羧苄青霉素抗性基因 carb，为了便于转化操作，此菌株携带一无自身转运功能的琥珀碱型 Ti 质粒 pTiBo542DT-DNA，此质粒含有 vir 基因（vir 基因是 T-DNA 插入植物基因组必需的元件，pTiBo542DT-DNA 质粒自身的 T-DNA 转移功能被破坏，但可以帮助转入的双元载体 T-DNA 顺利转移）。AGL1 菌株适用于水稻、拟南芥、杨树等植物的转基因操作，AGL1 电转感受态特别适用于大质粒的转化。经 pCAMBIA2301 质粒（12739bp, Kan^R）检测转化效率>10⁵ cfu/μg DNA；经 pCAMBIA2301-ZH 质粒（40kb, Kan^R）检测转化效率>5×10³ cfu/μg DNA。

◇ 产品规格

品名	货号	规格
AGL1 电转化感受态	EL025H-S	10×50 μL
	EL025H-M	50×50 μL

-80℃（12 个月）

◇ 转化方法

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℃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），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，根据仪器要求设置参数，将电击杯快速放入电转槽中，电击完成快速插入冰中，加入 900 μl 无抗生素的 LB 并转移到感受态空管中，28℃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℃培养箱培养 2-3 天（当平板只含有 50 μg/ml kan 时，28℃培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μg/ml kan, 20 μg/ml rif 时，需 28℃培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μg/ml rif 则需要 28℃培养 72-90 h）。

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. 混入质粒时应轻柔操作。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。
4. 利福平浓度不应高于 25 $\mu\text{g/ml}$ ，过高的利福平浓度不利于农杆菌生长，会降低其生长速度和转化效率。
5. 培养基中加入利福平的目的是防止杂菌生长、筛选农杆菌；根据所用菌株抗性加入链霉素或庆大霉素可防止 Ti 质粒丢失，但链霉素不利于农杆菌的转基因操作，所以一般培养农杆菌时不考虑链霉素或庆大霉素，Ti 质粒丢失的概率极低。