

LBA4404 电转化感受态使用说明

✧ 产品简介

本品为根癌农杆菌 LBA4404（基因型：Ach5 (rif^R) Ti pAL4404 (strep^R) Octopine）制作的电击感受态细胞。LBA4404 菌株为 Ach5 型背景，核基因中含有筛选标签—利福平抗性基因 rif，为了便于转化操作，此菌株携带一无自身转运功能的章鱼碱型 Ti 质粒 pAL4404，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，pAL4404 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）。pAL4404 型 Ti 质粒含有筛选标签：strep，赋予 LBA4404 菌株链霉素抗性，适用于菸草、番茄、烟草等植物的转基因操作。

LBA4404 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 $>10^5$ cfu/ μ g DNA；经 pCambia2301-ZH 质粒（40kb, Kan^R）检测转化效率 $>5 \times 10^3$ cfu/ μ g DNA。

✧ 产品规格

品名	货号	规格
LBA4404 电转化感受态	EL026H-S	10 $\times$ 50 μ L
	EL026H-M	50 $\times$ 50 μ L

-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 μ g 质粒 DNA（体积不大于 6 μ l），用手拨打管底混匀，立即插入冰中，用 200 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ g/ml kan 时，28℃培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μ g/ml kan, 20 μ g/ml rif 时，需 28℃培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μ g/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。