

LBA4404 化学感受态细胞

产品编码：KW-96302

保存条件：-80℃

产品组成：

组分	KW-96302
LBA4404 化学感受态	10 ×100 μ L

基 因 型

Ach5 (rif R) Ti pAL4404 (strepR) Octopine

简 要 说 明

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，经pCAMBIA2301质粒检测转化效率可达10⁴cfu/ μg。

操 作 说 明

1. 取-80℃保存的农杆菌感受态于冰上待其部分融化，处于冰水混合状态时插入冰中。
2. 每100 μ l感受态加1ug（体积不大于10 μ l）质粒DNA，用手拨打管底混匀，依次于冰上静置5分钟、液氮5分钟、37℃水浴5分钟、冰浴5分钟。
3. 加入700 μ l无抗生素的LB或YEB液体培养基，于28℃振荡培养2~3小时。
4. 6000rpm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℃培养箱培养2-3天（当平板只含有50ug/ml kan 时，28℃培养48h即可；平板中同时加入50ug/ml kan，20ug/ml rif 时，需28℃培养60h；如果使用的平板含有50ug/ml rif 则需要28℃培养72-90h）。

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。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 利福平浓度不应高于25ug/ μ l，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。本公司感受态计算转化效率时所用平板只含有50ug/ml kan，若所用平板含有20ug/ml rif则转化效率降低到1/2。
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（可以忽略）。