



根瘤农杆菌高效化学感受态细胞制备试剂盒

High Efficient Agrobacterium tumefaciens Chemically Competent Cell Prep Kit

Cat.NO. ZC134

版本号:2018-07-17

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	100 μ l \times 50 支	100 μ l \times 100 支
溶液 A	4 $^{\circ}$ C	20ml	40ml
溶液 B	4 $^{\circ}$ C	5ml	10ml

备注: 产品附带转化效率检测专用的 500ng/ μ l pCAMBIA2301M 质粒一支。

储存: 产品短期 4 $^{\circ}$ C 保存, 长期 -20 $^{\circ}$ C 保存, 一年有效。避免污染。

附带的 pCAMBIA2301M 质粒 4 $^{\circ}$ C 运输, -20 $^{\circ}$ C 保存。

产品介绍:

- 1、根瘤农杆菌高效感受态细胞制备试剂盒是在传统根瘤农杆菌感受态细胞制备方法的基础上进行适当改良而成, 操作便捷, 转化效率高。
- 2、使用本试剂盒可以使农杆菌感受态效率达到 10^3 cfu/ μ g 质粒。对于小的质粒效率略高, 而对于大的质粒则效率略低一些。
- 3、使用本试剂盒操作简单, 细菌培养好后仅需 60 分钟左右即可完成高效根瘤农杆菌感受态细胞的制备。
- 4、本试剂盒适用于绝大部分常见的根瘤农杆菌杆菌, 包括 GV3101、EHA105、LBA4404、AGL1 以及一些发根农杆菌等。但是不同的菌种, 转化效率可能有很大差别。
- 5、本试剂盒可以分多次使用, 共可以制备 50/100 支 100 μ l 的根瘤农杆菌感受态细胞。

注意事项:

- 1、所有试剂、耗材、仪器、设备务必经过灭菌处理。
- 2、在制备根瘤农杆菌感受态细胞的过程中均使用不含抗生素的 LB 培养基。在使用根瘤农杆菌感受态菌的过程中热休克后的 28 $^{\circ}$ C 培养时也必须使用无抗生素的 LB 培养基, 即便转入的质粒是有抗性的。
- 3、细胞培养好后, 后续所有操作均须在 4 $^{\circ}$ C 或冰浴进行。
- 4、感受态细胞制备完毕请快速转入 -70 $^{\circ}$ C。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

准备工作

- 配培养基: 建议使用 LB 培养基, 按标准进行灭菌操作。
- 倒板: 如含 50 μ g/ml Rif 平板 (活化菌种), 含 50 μ g/ml Rif+50 μ g/ml Kan 平板 (转化质粒)。
- 涂板复苏菌株: 为取得最佳的根瘤农杆菌感受态效率, 必须先把甘油菌或其他形式保存的菌种涂含 50 μ g/ml Rif 平板, 28 $^{\circ}$ C 培养 36-48h。

接种:

取复苏菌种的 LB 平板, 把镊子的顶端在 70% 酒精中蘸一下, 并在酒精灯上略略烧一下, 使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签, 从平板上挑取一个长势优良的单克隆, 然后把蘸有菌种的塑料枪头或牙签放到装有 3ml LB (客户应该根据菌种不同选择适合的培养基) 的细菌培养试管内, 上述操作也可以使用接种环等进行操作。28 $^{\circ}$ C 220rpm/min 培养 24h。



吸取适量培养菌液，按 1:100 的比例接入培养基中，置于 28℃ 摇床 230-250rpm/min 培养约 12h。不同菌株，培养时间不同；培养基装量推荐为瓶总体积的五分之一，也就是 500ml 三角瓶装入 100ml 培养基。

1) 在培养的细菌 OD₆₀₀ 达到 0.6-1.2 间时，把培养的菌液置于冰浴中，冷却 30min。

4℃（离心机必须预先冷却）3000-4500×g 离心 10min 收集细菌，弃上清（尽量去除干净上清，残留越少越好）。

注意：离心机转速和离心时间对于感受态细胞制作非常重要，不同种类的细菌最佳的转速和离心时间不同，应该根据具体情况优化。最佳状况是适当的转速和离心时间让细菌刚好离心沉淀下来，又不能太紧密，否则重悬困难，只能用力吹打才能重悬，会对细胞造成损害，影响转化效率。

2) 如果离心沉淀前的菌量为 200ml，按后续操作进行，如果是其他体积则按比例换算后进行后续操作。

3) 用 20ml 预冷的根瘤农杆菌高效感受态制备溶液 A，置于小摇床 200rpm/min 2-3min（在冰浴条件下）重悬细菌沉淀（也可用移液枪吹打重悬，操作一定要很轻柔，否则会影响效果）。

4) 冰浴条件下静置 30min。

5) 4℃（离心机必须预先冷却）3000-4500×g 离心 10min 收集细菌，弃上清。

6) 用 5ml 预冷的根瘤农杆菌高效感受态制备溶液 B 轻轻重悬细菌沉淀。吹打重悬时一定要很轻柔，否则会影响效果。

7) 冰浴上进行分装，可以根据需要适当分装成 50-200μl/ 管。

8) 立即使用或用液氮或乙醇干冰浴速冻后 -70℃ 保存。

质量检测：

● 无杂菌检测：

针对您的实验要求，在相应的抗性板中涂布感受态细胞。

● 转化效率检测：

转化方法（采用冻融方法）：

1. 取 -70℃ 保存的农杆菌感受态细胞于冰水浴中融化；
2. 无菌条件下，向感受态细胞中加入 1μg 质粒 DNA，轻轻混匀，冰水浴中静置 5min；
3. 将离心管置于液氮中速冻 5min（注：也可以用干冰和无水乙醇混合物代替液氮）；
4. 然后快速将离心管置于 37℃ 水浴中保持 5min，不要晃动水面；
5. 将离心管放回冰水浴中，冰浴 5min；
6. 无菌条件下加入 800μl 无抗生素 LB 液体培养基，于 28℃ 180rpm/min 振荡培养 2~3h，菌体复苏；
7. 5000rpm 离心 1min 收菌，留 100μl 左右上清，轻轻吹打重悬菌体，取适量菌液，涂布于相应抗生素的 LB 平板上，于 28℃ 培养箱中倒置培养 48-72h。

效率计算：转化效率 = 长斑数 * 稀释倍数 / DNA 用量

如按以上操作 1μg DNA 转化 100μl 感受态全部涂板：长斑数量为 2000 个，及转化效率为 2×10^3 cfu/μg DNA