

Ar.A4 Chemically Competent Cell 产品说明书

- 产品规格 (CAT#: AC1050)

Ar.A4 Competent Cell	100μl/支
pK7WGF2 (control vector, 10ng/μl)	10μl
保存条件 (保质期):	-80°C (12个月)

- 基因型

Agrobacterium rhizogenes(kan^R) Ar A4 Ri(agropine type)

- 产品说明

发根农杆菌是根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(agrobacterium)的一种革兰氏阴性土壤细菌,它能够感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物以及个别裸子植物。Ar.A4 发根农杆菌菌株含有农杆菌型 Ri 质粒,具有广泛的宿主范围(玉米,烟草,胡萝卜,甘草等),同时具有卡那霉素抗性。本公司生产的 Ar.A4 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pK7WGF2 质粒(壮观霉素抗性)检测,转化效率>10⁴ cfu/μg DNA。

- 常规操作方法

- 1.取-80°C保存的 Ar.A4 发根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 μl 感受态加入 0.01-1 μg 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),用手快速、剧烈拨打管底混匀或用枪吹吸混匀,依次放于冰中静置 5 分钟、液氮 5 分钟、37°C 水浴 5 分钟、冰浴 5 分钟。
3. 冰浴中拿出放室温,加入 700 μl 无抗生素的 TY 液体培养基,于 28°C 振荡培养 2 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 TY 平板上,倒置放于 28°C 培养箱培养 2-3 天

● 农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液	工作液
羧苄青霉素 (carb)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μg/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μg/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μg/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μg/ml
氯霉素 (cam)	无水乙醇溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌	34 mg/ml	34 ug/ml

● 常用农杆菌抗性：(R：抗；S：敏感。)

农杆菌菌株	羧苄青霉素(carb)	链霉素(strep)	利福平(rif)	氯霉素(cam)	硫酸卡那霉素(kan)
Ar.A4	S	S	S	S	R
MSU440	S	R	S	S	S
Ar.Qual	S	R	S	R	S
C58C1	S	R	R	S	S
ATCC15834	S	S	S	S	S
K599	S	R	S	S	S
Ar.1193	R	R	R	S	S

● TY 配方 (1L)：

Tryptone 5g

Yeast extract 3g

补水到 1L 体积, 完全溶解后, 121 度、20 分钟高温灭菌

配制 1M 的氯化钙水溶液, 121 度、20 分钟高温灭菌

每 1L 灭菌的 TY 液体营养液中加入 10ml 无菌的 1M 氯化钙水溶液即可。

若配制 TY 固体培养基, 则加入 15g 琼脂粉。

● 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. 混匀质粒时应用手指快速拨打管底或用枪吹吸混匀, 务必使质粒快速、均匀分散开, 与感受态细胞充分接触。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, 应减少质粒用量或降低涂板的菌量。
4. Ar.A4 具有卡那霉素抗性, 不可用于具有卡那霉素抗性质粒的转化。