EHA101 农杆菌感受态细胞

EHA101 Chemically Competent Cell

保存条件： −80℃

产品规格:

EHA101	10×100 μl
pK7WGF2 (control vector)	10 ng/μl；10 μl

基 因 型

C58 (rif ^{R}) Ti pEHA101 (pTiBo542 D T-DNA) (kan^{R}, strep^{R}) Nopaline

简 要 说 明

EHA101 菌株为 C58 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胭脂碱型 Ti 质粒 pEHA101 (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，pEHA101 (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)。pEHA101 (pTiBo542DT-DNA) 型 Ti 质粒含有筛选标签：strep、kan，赋予 EHA101 菌株链霉素抗性和卡那霉素抗性，适用于玉米、水稻、烟草等植物的转基因操作，经 pK7WGF2 质粒检测转化效率可达 10^4 cfu/μg DNA。

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 μl 感受态加 1 μg（体积不大于 10 μl）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 μl 无抗生素的 LB 或 YEB 液体培养基，于 28℃，200rpm 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 LB 或 YEB 平板上，倒置放于 28℃培养箱培养 2-3 天。

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. 利福平浓度不应高于 25 μg/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。本公司感受态计算转化效率时所用平板只含有 50 μg/ml kan，若所用平板同时含有 20 μg/ml rif 则转化效率降低到 1/2。
4. 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)。

备注：

1、农杆菌相关抗生素配方：

抗生素	配方	原液浓度	工作浓度
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

2、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)	庆大霉素(gent)	硫酸卡那霉素(kan)
AGL-1	R	R	R	S	S
EHA101	S	R	R	S	R
EHA105	S	R	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	R	R	R	S

3、**LB 及 YEB 配方：**

component	LB(液体)/L	LB(固体)/L	component	YEB(液体)/L	YEB(固体)/L
Tryptone	10 g	10 g	Tryptone	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g	Yeast extract	1 g	1 g
NaCl	10 g	10 g	牛肉浸膏	5 g	5 g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5 g	5 g
Agar	—	15 g	$MgSO_4*7H_2O$	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g