EHA105 农杆菌电转感受态细胞

EHA105 Electroporation-Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

EHA105	**10×50μl**
pCAMBIA2301（control vector）	**10ng/ul；10ul**

基 因 型

C58 (rif ^{R}) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (strep^{R}) Succinamopine

简 要 说 明

EHA105 菌株由 EHA101 菌株改造而来，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琥珀碱型 Ti 质粒 pEHA105 (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，pEHA105 (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）。pEHA105 (pTiBo542DT-DNA)型 Ti 质粒含有筛选标签：strep，赋予 EHA105 菌株链霉素抗性，适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。开发的 EHA105 电转感受态特别适用于大质粒的转化：经 pCAMBIA2301 质粒(size:11633bp)检测转化效率可达 5×10^{5}cfu/μg；经 pCAMBIA2301-ZH 质粒（size:40kd）检测转化效率可达 5×10^{3}cfu/μg。

操 作 说 明

1. 0.2cm 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 0.5cm 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 1-5ug 质粒 DNA（质粒体积不大于 6ul，最好用试剂盒抽提，双蒸水溶解），用手拨打管底混匀，立即插入冰中，用 200ul 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，设置参数：C=25uF，PC=200ohm，V=2400V（此参数为 Biorad 推荐，使用者也可按所用电转仪推荐的 protocol 操作），将电击杯快速放入电转槽中，电击完成快速插入冰中，加入 700ul 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. 4.6000rpm 离心一分钟收菌，留取 100μl 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；质粒不纯或存在盐，乙醇等污染，转化效率急剧下降；若转化大质粒或想获得较高转化效率，推荐使用高纯质粒提取试剂盒提取质粒。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/ul，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。

备注：

1. 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，0.22um 滤膜过滤除菌	50mg/ml	50ug/ml
硫酸卡那霉素（kan）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	50mg/ml	50ug/ml
链霉素（strep）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	10mg/ml	50ug/ml
利福平（rif）	DMSO 溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	10mg/ml	20ug/ml
庆大霉素（gent）	双蒸水溶解，0.22um 滤膜过滤除菌	20mg/ml	40ug/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
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	10g	10g	Tryptone	5g	5g
Yeast extract	5g	5g	Yeast extract	1g	1g
NaCl	10g	10g	牛肉浸膏	5g	5g
NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0	蔗糖	5g	5g
Agar	—	15g	$MgSO_4*7H_2O$	0.49g	0.49g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15g