

EHA105(pSoup) 感受态细胞

EHA105(pSoup) Chemically Competent Cell

保存条件: -80°C

产品规格:

EHA105 (pSoup)	$10 \times 100 \mu\text{l}$
pGs2 (control vector)	$10\text{pg}/\mu\text{l}$ $10 \mu\text{l}$

基因型

C58 (rif^R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) Succinamopine (pSoup-tet^R)

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)。在 EHA105 菌株中转入 help 质粒: pSoup 即为 EHA105 (pSoup) 菌株, 可帮助 pGreen, 62SK, pGs2 系列质粒在农杆菌中复制, 同时赋予该菌株四环素 (tet) 抗性, 适用于水稻、烟草等植物的转基因操作。生产的 EHA105(pSoup) 化学转化感受态细胞经特殊工艺制作, pGs2(卡那霉素抗性) 质粒检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μg DNA。

操 作 说 明

1. 取-80℃保存的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 μ l 感受态加入 0.01-1 μ g 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. 6000 rpm 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 50 μ g/ml kan 时，28℃培养 48 h 即可；平板中同时加入 50 μ g/ml kan，20 μ g/ml rif 时，需 28℃培养 60 h；如果使用的平板含有 50 μ g/ml rif 则需要 28℃培养 72-90 h)。

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. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，本公司生产的 GV3101(pJIC SA_Rep)感受态细胞具有四环素抗性，但在转入目标质粒涂板筛选阳性克隆时，只需加入目标质粒抗性的抗生素，不加四环素。
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。
4. 利福平浓度不应高于 25 μ g/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。
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，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, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μ g/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 μ g/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 μ g/ml
利福平 (rif)	DMSO 溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	20 μ g/ml
庆大霉素 (gent)	双蒸水溶解, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌	20 mg/ml	40 μ g/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	S	R	S	S
EHA101	S	S	R	S	R
EHA105	S	S	R	S	S
LBA4404	S	R	R	S	S
GV3101	S	S	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 ₂ O	0.49 g	0.49 g

			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g