

## EHA105 农杆菌感受态细胞

### EHA105 Chemically Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G2040

保存条件: -80℃

产品规格: 10×100μl 50×100μl 100×100ul

产品介绍

基 因 型

**C58 (rif R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (strepR) Succinamopine**

简 要 说 明

MLBioEHA105 菌株由 EHA105 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，经 **pCAMBIA2301** 质粒检测转化效率可达 **104cfu/μg**。

## 操作说明

- 1.取-80℃保存的 **MLBio** 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 1ug（体积不大于 10ul）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、28℃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℃振荡培养 2~3 小时。
- 4.6000rpm 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（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。
- 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（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 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	50 mg/m	50 $\mu$ g/ml
硫酸卡那霉素 (kan)	双蒸水溶解，0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	50 mg/ml	50 $\mu$ g/ml
链霉素 (strep)	双蒸水溶解，0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌	10 mg/ml	50 $\mu$ g/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
GV3101S	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
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 <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.49 g	0.49 g
			NaOH	调 PH 到 7.0	调 PH 到 7.0
			Agar	—	15 g

